

Verifikacija referentnih intervala S-adenozilmetionina (SAM) i S-adenozilhomocisteina (SAH) u plazmi na tandemskom spektrometru masa

Bogić, Anamarija

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:163:643544>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-25**



Repository / Repozitorij:

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



Anamarija Bogić

**Verifikacija referentnih intervala S-adenozilmetionina
(SAM) i S-adenozilhomocisteina (SAH) u plazmi na
tandemskom spektrometru masa**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2018.

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

Veliku zahvalnost dugujem svojoj mentorici izv. prof.dr.sc Kseniji Fumić na prenesenom znanju, brojnim savjetima, velikom trudu i ugodnom druženju prilikom izrade ovog rada.

Zahvaljujem specijalizantici Ivi Bilandžiji na utrošenom vremenu i pomoći oko ekperimentalnog dijela rada.

Zahvaljujem svojim roditeljima Višnji i Zlatku, te bratu Filipu na bezuvjetnoj ljubavi, podršci i vjeri u mene.

Zahvaljujem svom Marku što je uvijek uz mene i na potpori koju mi pruža.

Zahvaljujem mojim prijateljima i prijateljicama koji su mi uljepšali cjelokupno studiranje, na njihovom poticanju, zajedničkim učenjima, razgovorima i smijanjima, te svim nezaboravnim trenucima.

KRATICE

5,10-MTHF - 5,10-metilentetrahidrofolat

5-MTHF - 5-metiltetrahidrofolat

ADK - adenzin kinaza

AHCY - gen koji kodira enzim SAHH

AMP - adenzin monofosfat

ATP - adenzin trifosfat

BHMT - betain-homocistein metiltransferaza

CBS - cistationin β -sintaza

CE - kolizijska energija, *engl. collision energy*

CK - keratin kinaza

DNA - deoksiribonukleinska kiselina (od *engl. deoxyribonucleic acid*)

EDTA - etilendiamintetraoctena kiselina

ESI - elektrosprej ionizacija, *engl. Electrospey ionization*

GNMT - glicin N-metiltransferaza GSH – glutation

HPLC - tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti, *eng. High Performance Liquid Chromatography*

IS – interni standard

LC-MS/MS - vezani sustav tekućinske kromatografije i tandemskog spektrometra masa

MALDI - Matriksom pomognuta ionizacija uz desorpciju laserskim zračenjem, *engl. Matrix assisted laser desorpton ionizaton*

MS - Spektrometrija masa, *engl. Mass spectrometry*

MAT - metionin adenziltransferaza

Met - metionin

MS - metionin sintaza

MT - metiltransferaze

MTHFR - metilentetrahidrofolat reduktaza

MTs – SAM ovisne metiltransferaze

PBA - fenilboronska kiselina, *engl. phenylboronic acid*

QQQ - Trostruki kvadrupol, *engl. Triple quadrupole*

RSD - relativna standardna devijacija

RV - retencijsko vrijeme

SAH, AdoHcy - S-adenozilhomocistein

SAHH - S-adenozilhomocistein hidrolaza

SAM, AdoMet - S-adenozilmetionin
SD - standardna devijacija
SPE - kolona za ekstrakciju čvrsto-tekuće, *engl. SPE extraction*
ST - standard
tHcy - ukupni homocistein
THF - tetrahidrofolat
TOF - Analizator koji mjeri vrijeme leta, *engl. Time-of-flight*
TRC - Toronto Research Chemicals
UPLC-MS/MS - vezani sustav tekućinske kromatografije ultra visoke djelotvornosti i tandemskog spektrometra masa

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1 Metioninski ciklus	1
1.2 Metionin	4
1.3 S-adenozilmetionin (SAM)	5
1.3.1 SAM - ovisne metiltransferaze (MT)	7
1.4 S-adenozilhomocistein (SAH).....	8
1.5 Metilacijski indeks	10
1.6 Uloga i važnost metilacije	11
1.6.1 Posttranslacijske modifikacije proteina	11
1.7 Poremećaji metioninskog ciklusa.....	12
1.7.1 Nedostatak aktivnosti S-adenozilhomocistein hidrolaze (SAHH)	13
1.7.2 Nedostatak aktivnosti metionin adenoziltransferaze (MAT)	14
1.7.3 Nedostatak aktivnosti Glicin N-metiltransferaze	15
1.7.4 Nedostatak aktivnosti adenzin kinaze.....	16
1.8 Referentni intervali.....	17
1.8.1 Odabir referentne osobe.....	18
1.8.2 Verifikacija referentnih intervala	19
2. OBRAZLOŽENJE TEME	20
3. MATERIJALI I METODE	21
3.1 Oprema	22
3.2. Reagensi	22
3.3 Priprema uzoraka.....	24

3.3.1 Priprema kalibracijske krivulje.....	24
3.3.2 Priprema internih standarda.....	25
3.3.3 Ekstrakcija čvrsto-tekuće (engl. SPE extraction).....	26
3.3.4 Obrada uzoraka.....	28
3.4 Tekućinska kromatografije i masena spektrometrija	30
3.4.1 Tekućinska kromatografija (engl. liquid chromatography, LC)	30
3.4.2 Masena spektrometrija (MS)	31
3.5 UPLC-MS/MS vezani sustav	32
3.5.1 Tekućinska kromatografija ultra visoke djelotvornosti (engl. Ultra performance liquid chromatography, UPLC)	32
3.5.2 Elektrosprej ionizacija (engl. Electrospray Ionization, ESI)	33
3.5.3 Kvadrupol filter masa.....	35
3.5.4 Tandemska spektrometrija masa (LC-MS/MS)	36
4. REZULTATI I RASPRAVA	39
4.1 REZULTATI.....	39
4.2 RASPRAVA.....	50
5. ZAKLJUČCI	54
6. LITERATURA.....	55
7. SAŽETAK.....	59
8. SUMMARY	60
TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/ BASIC DOCUMENTATION CARD	

1. UVOD

1.1 Metioninski ciklus

Metioninski ciklus ima tri vrlo bitne funkcije u staničnom metabolizmu. Regulira ravnotežu između metionina i cisteina u svrhu sinteze proteina, supstrat je za sintezu poliamina, te osigurava mehanizam kojim se metilne skupine prenose na brojne supstrate i predstavljaju primarni mehanizam reakcija transmetilacije. Funkcioniranje metioninskog ciklusa neophodno je za normalan rast i razvoj, a nedostaci metabolizma metionina povezani su s brojnim patološkim stanjima. Zbog svoje važne uloge u metabolizmu stanica, metioninski ciklus predmet je brojnih eksperimentalnih studija (Brosnan i sur., 2007; www.creative-proteomics.com).

Aminokiselina metionin (Met) i njezini ATP-om obogaćeni spojevi S-adenozilmetionin (SAM) i S-adenozilhomocistein (SAH) te aminotiol homocistein (Hcy), dio su tri važna stanična procesa, metilacije, remetilacije i transsulfuracije (slika 1), a u tim procesima sudjeluju i mnogi enzimi i kofaktori (vitamin B6, vitamin B12, folna kiselina). Procesima metilacije i remetilacije daje se i obnavlja ugljik kao dio metilnih skupina (CH₃) (Guiraud i sur., 2017; Hao i sur., 2016; Ćuk, 2013).

Transmetilacijske reakcije se odvijaju u svim stanicama organizma, a jetra je najvažniji organ za metabolizam metionina (Finkelstein, 1990). U metioninskom ciklusu, transmetilacija uključuje energetski skup aktivaciju metionina u SAM (S-adenozilmetionin), uz pomoć enzima metionin adenziltranseraze (MAT). Zatim slijedi daljnji prijenos metilne skupine SAM-a pomoću brojnih metiltransferaza na različite akceptorske molekule. Odnosno metilna skupina metionina se aktivira ATP-om (adenozin trifosfatom), te vezanjem adenozina na metioninski sumpor formira S-adenozilmetionin (SAM), koji je donor metilne skupine za brojne reakcije metilacije. Nakon metilacije SAM gubi svoju metilnu skupinu, što rezultira stvaranjem SAH-a (S-adenozilhomocisteina), koji se zatim odmah hidrolizira u aminokiselinu homocistein, uklanjanjem adenozinske molekule. Time završava proces transmetilacije (Brosnan i sur., 2007; www.creative-proteomics.com).

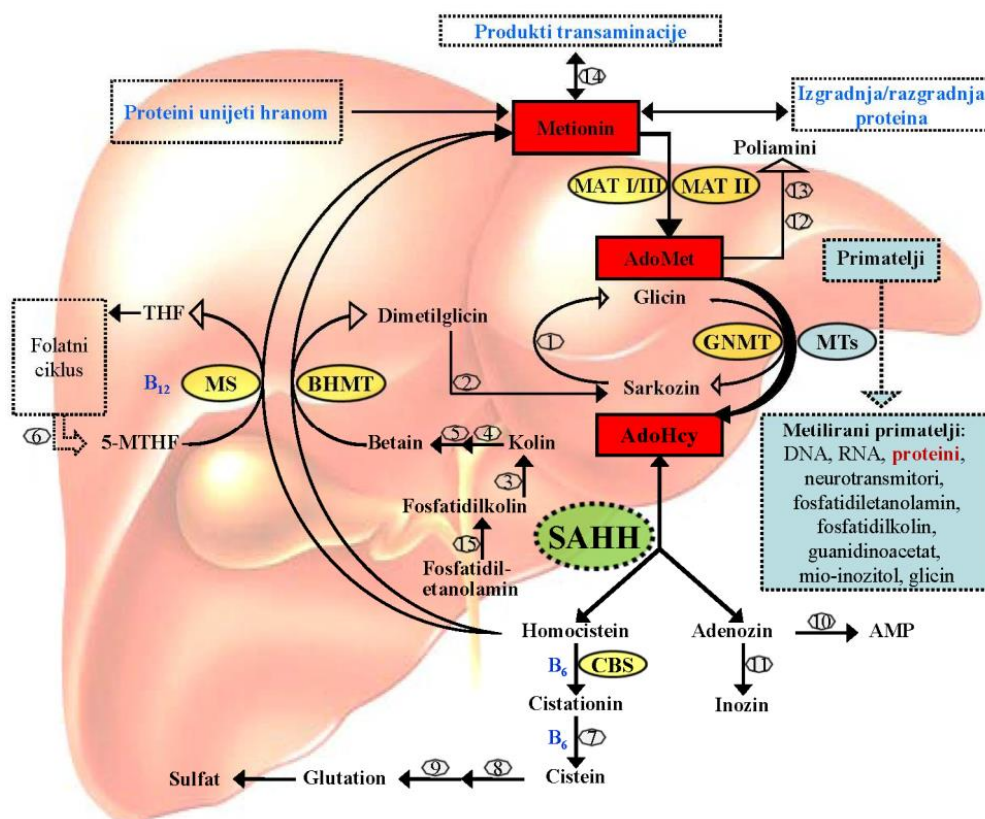
Homocistein ovisno o potrebama organizma ili prelazi (reciklira se metilacijom) ponovno u metionin ili ulazi u put transsulfuracije kako bi se sintetizirale druge aminokiseline koje sadrže sumpor. Transsulfuracijom se odstranjuje višak sumpora i stvaraju važni spojevi poput

glutaciona i taurina. Put transsulfuracije je ireverzibilan i kataliziran enzimom cistation- β -sintazom, čiji je kofaktor vitamin B6, a rezultira nastajanjem cistationa (kondenzacijom homocisteina i serina). Cistation se pomoću enzima cistation- γ -liaze prevodi u cistein. Procjenjuje se da se 60% homocisteina metabolizira transsulfuracijom u jetri. Cistein se može ugraditi u proteine, koristiti za sintezu antioksidativne molekule glutaciona (GSH), ili se može oksidirati i formirati aminokiselinu taurin. Transsulfuracijski proces ima ograničenu distribuciju u tkivima, najviše se odvija u jetri, te u bubrezima, tankom crijevu i gušterači (Brosnan i sur., 2007; James i sur., 2004).

Ako homocistein ne ulazi u put transsulfuracije, uslijed niskih koncentracija metionina u organizmu, homocistein se može pregraditi natrag u metionin reakcijom remetilacije (dodavanjem metilnih skupina), koristeći jedan od dva različita metabolička puta. U prvom metaboličkom putu donor metilne skupine je 5-metilentetrahidrofolat (5-MTHF), koji nastaje reakcijom katalizacije uz enzim 5,10 - metilentetrahidrofolat reduktazu (MTHFR), čiji je kofaktor vitamin B12. Prijenos metilne skupine sa 5-MTHF na homocistein katalizira enzim metionin sintetaza, uz pomoć vitamina B12. U drugom putu (samo u jetri), betain (TMG) je izvor metilne skupine, za njezin prijenos na homocistein uz pomoć enzima betain-homocistein metiltransferaze. Unosom hrane bogate metioninom, homocistein se više remetilira nego katabolizira, odnosno kada su metilne skupine prisutne u suvišku smanjuje se brzina remetilacije. Također u situaciji povišenog metionina jetrena MAT koja se aktivira svojim produktom (SAM) pokazivati će povišenu aktivnost. SAM djeluje kao alosterički aktivator cistationin beta-sintaze i alosterični inhibitor metilentetrahidrofolat reduktaze. Ove aktivnosti, stoga, ukazuju na činjenicu da povećana opskrba metioninom potiče transsulfuraciju i inhibira remetilaciju (Brosnan i sur., 2007; James i sur., 2004).

Jedan od ključnih enzima metioninskog ciklusa je enzim S-adenozilhomocistein hidrolaza (SAHH, E.C. 3.3.1.1). SAHH je jedini enzim u eukariotskim stanicama koji sudjeluje u metabolizmu (hidrolizi) SAH-a u homocistein (Hcy) i adenzin (Ado), zbog čega ima ključnu ulogu u metilacijskim procesima. Regulira koncentracijski omjer SAM-a i SAH-a, a taj omjer nazivamo metilacijski potencijal ili metilacijski indeks (MI) stanice. Enzim se nalazi u citoplazmi i jezgri stanice, te je bliski kontakt s metiltransferazama u jezgri i citoplazmi stanice nužan za neometane procese transmetilacije, čime je omogućena brza razgradnja SAH-a, glavnog inhibitora SAM-ovisnih metiltransferaza (Petković Ramadža, 2018). SAHH može reverzibilno katalizirati reakciju u oba smjera, odnosno SAH se može sintetizirati iz

Ado i Hcy ili razgraditi do njih. U fiziološkim uvjetima se reakcija odvija isključivo u smjeru hidrolize SAH-a uklanjanjem produkata reakcije, iako bi zbog povoljnijih termodinamičkih uvjeta reakcija mogla teći i u smjeru sinteze SAH-a. Produkti razgradnje SAH-a se metaboliziraju, adenozin adenozin kinazom i deaminazom, a homocistein enzimima ciklusa transsulfuracije ili remetilacije. Budući da je reakcija povoljnija u smjeru sinteze SAH-a, sva stanja koja dovode do hiperhomocisteinemije mogu uzrokovati povećanje koncentracije SAH-a i poremećaje metilacije (James i sur., 2004; Yi i sur., 2000).



Slika 1 : Metabolizam metionina, S-adenozilmetionina i S-adenozilhomocisteina (preuzeto iz literaturnog navoda Ćuk, 2013)

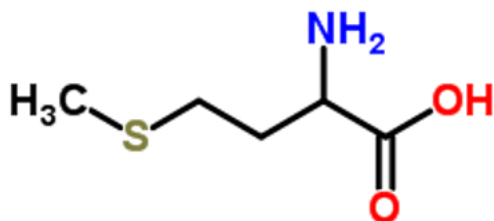
AdoMet, S adenoilmetionin; AdoHcy, S adenoilhomocistein; THF, tetrahidrofolat; 5 MTHF, 5-metiltetrahidrofolat; AMP, adenoil monofosfat; MAT, metionin adenoiltransferaza; GNMT, glicin N metiltransferaza; MTs, različite metiltransferaze ovisne o AdoMet; SAHH, AdoHcy hidrolaza; CBS, cistationin β -sintetaza; MS, metionin sintetaza (5-MTHF-homocistein metiltransferaza); BHMT, betain-homocistein metiltransferaza.

Brojevi označavaju slijedeće: 1, sarkozin dehidrogenaza; 2, N,N dimetilglicin dehidrogenaza; 3, fosfolipaza D; 4, kolin dehidrogenaza; 5, betain aldehyd dehidrogenaza; 6, metilentetrahidrofolat reduktaza (MTHFR); 7, γ -cistationaza; 8, glutamat-cistein ligaza; 9, glutation sintetaza; 10, adenoil kinaza; 11, adenoil deaminaza; 12, AdoMet dekarboksilaza; 13, spermidin (spermin) sintetaza; 14, put transaminacije metionina; 15, fosfatidiletanolamin metiltransferaza (PEMT).

1.2 Metionin

Metionin je esencijalna aminokiselina, odnosno aminokiselina koja ulazi u tijelo putem proteina iz hrane. Također je i aminokiselina koja sadrži sumpor (slika 2), te je preko metioninskog ciklusa prekursor ostalih aminokiselina koje sadrže sumpor (homocistein, cistein i taurin). Na atomu sumpora metionin sadrži labilno vezanu metilnu (-CH₃) skupinu, što je vidljivo i iz samog imena aminokiseline (slika 2). Metilna skupina se koristi za prijenos na druge vrste molekula (proces metilacije), ali samo nakon aktivacije metionina (Brosnan i sur., 2007).

Metionin je uključen u mnoge stanične procese, te je dio dvaju staničnih ciklusa, ciklusa metionina i ciklusa transsulfuracije. Prvi je konzervirajući, a drugi katabolički put za metionin. Bitan je za sintezu proteina, sintezu cisteina (metioninskim ciklusom) i mnogih drugih biomolekula potrebnih za preživljavanje. Izvor je metilnih skupina za transmetilacijske procese u obliku ATP-om aktiviranog metionina, odnosno u obliku SAM-a, glavnog donora metilne skupine. Također je i metilakceptor za betain-metiltransferazu te 5-metiltetrahidrofolat-homocistein metiltransferazu (metionin sintazu), te na taj način uključen u jedinu reakciju koja omogućava recikliranje ovog oblika folata (www.mudest.com).



Slika 2: Struktura metionina (preuzeto s www.chemspider.com)

Metionin je neophodan za DNA metilaciju, a smanjena DNA metilacija rezultira genskom nestabilnošću, promijenjenom ekspresijom gena i povećanim rizikom za razvoj karcinoma. Iako je metionin potreban za sintezu proteina, gotovo polovica metionina unesenog hranom pretvara se u SAM u jetri (Ćuk, 2013; Brosnan i sur., 2007).

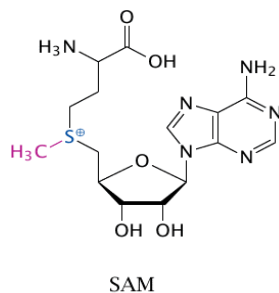
Metionin je potreban za rast i popravak tkiva. Kao aminokiselina koja sadrži sumpor, metionin utječe na čvrstoću i savitljivost kože, kose i noktiju. Uključen je u mnoge detoksikacijske procese, usporava starenje stanica i bitan je za apsorpciju i biološku

raspoloživost selen i cinka. Kelira teške metale poput olova i žive, te na taj način omogućuje njihovu eliminaciju iz organizma (pubchem.ncbi.nlm.nih.gov).

Kada je metionin prisutan u previsokim koncentracijama može uzrokovati aterosklerozu i kardiovaskularnu bolest. Osim u tim stanjima kronično povišene koncentracije metionina povezane su s najmanje deset metaboličkih poremećaja, poput homocistinurije, tirozinemije, galaktozemije, homocistinurije sa megaloblastičnom anemijom uslijed nedostataka kobalamina, uključujući nedostatak cistationin β -sintaze, glicin N-metiltransferaze, metionin adenoziltransferaze, metilentetrahidrofolat reduktaze i S-adenozilhomocistein (SAH) hidrolaze. Kongenitalno povišene koncentracije metionina mogu dovesti do neuroloških problema, zaostajanja u motoričkim sposobnostima, općeg umora, slabosti mišića i poremećaja jetre, te povišene tendencije za razvoj kardiovaskularnih bolesti kasnije u životu (Barić i sur., 2017; pubchem.ncbi.nlm.nih.gov).

1.3 S-adenozilmetionin (SAM)

S-adenozilmetionin (SAM) je jedan od metabolita u metioninskom ciklusu. Sintetizira se iz adenzin trifosfata (ATP) i metionina, koji se nije ugradio u tjelesne proteine u reakciji posredovanoj metionin adenoziltransferazom (MAT I/III i MAT II). Metionin svoju ključnu metaboličku funkciju ispoljava upravo putem SAM-a, koji je izvor labilnih metilnih skupina za metilacijske reakcije. Pozitivno nabijeni sulfonijev ion (elektofil) zbog svoje nestabilnosti omogućava prijenos metilne skupine na nukleofilni akceptor pri čemu nastaju S-adenozilhomocistein i metilirani akceptor (slika 3). Te reakcije katalizirane su metiltransferazama. Važno svojstvo svih poznatih metiltransferaza je da ih inhibira njihov produkt, S-adenozilhomocistein. Poznato je oko 300 različitih metiltransferaza, ali stvarni broj je vjerojatno veći (Barić i sur., 2017; Brosnan i sur., 2007; Clarke i Banfield, 2001). DNA metiltransferaze i metiltransferaze histona, kojima je SAM donor metilne skupine, reguliraju utišavanje gena i epigenetsko nasljeđivanje. SAM nastaje u svim stanicama, a njegova koncentracija ovisi o unosu metionina i statusu folata. Ključna je molekula u regulaciji samog metionskog ciklusa jer u suvišku blokira enzim metiltetrahidrofolat reduktazu i smanjuje stvaranje 5-metiltetrahidrofolata koji je supstrat za remetilacijski enzim metionin sintazu, a s druge strane aktivira enzim cistationin β -sintazu i transulfuraciju homocisteina (Brosnan i sur., 2007).



Slika 3: Struktura S-adenozilmetionina (preuzeto s <http://watcut.uwaterloo.ca/webnotes/Metabolism/FolateB12.html>)

Dakle, SAM se nalazi u gotovo svim živim organizmima i izrazito se koristi kao univerzalni donor metilnih skupina (kofaktor) i supstrat različitih metiltransferaza, za više od stotinu trenutno poznatih transmetilacijskih reakcija u stanicama. Reakcije obuhvaćaju biosintezu malih molekula (npr. epinefrina, fosfatidilkolina i kreatina), modifikacije makromolekula (npr. DNA, RNA, proteina), detoksifikacije ksenobiotika (npr. tioli, arsenit) i metaboličke inaktivacije neurotransmitera (npr. adrenalina, noradrenalina, dopamina) (Guiraud i sur., 2017; Brosnan i sur., 2007). Odnosno, SAM služi kao metildonor u mnogim reakcijama transmetilacije i uključen je u sintezu važnih spojeva poput endogenih kateholamina, hormona i neurotransmitera (adrenalin, noradrenalin, dopamin, serotonin), melatonina, (cirkadijski ritmički modulator), karnitina i acetil-l-karnitina (uloga u membranskom transportu dugolančanih masnih kiselina), fosfatidilkolina (najvažniji membranski fosfolipid), fosfokreatina (glavno spremište ATP-a), CoQ, te vitamina K (Hao i sur., 2016; Kerins i sur., 2001; Spillmann i Fava, 1996). Osim uloge metilog donora, SAM služi kao izvor metilenskih skupina (za sintezu ciklopropilnih masnih kiselina), amino skupina (za sintezu biotina) i aminopropilnih skupina (za sintezu poliamina) (Brosnan i sur., 2007).

SAM osim uloge u transmetilaciji i transsulfuraciji ima ulogu i u aminopropilaciji. Kao rezultat SAM aminopropilacije u upalnim procesima se stvaraju snažni protuupalni faktori poput spermina, spermidina i MTA (metiltioadenozina). Aminopropilacija je proces koji SAM započinje pomoću dekarboksilacije. Dekarboksilirani SAM povezan je s putrescinom i ima ulogu u stvaranju spermidina i spermina, koji su potrebni za rast stanica te stabilnost DNA i RNA. MTA, produkt poliaminske sinteze, snažan je analgetički i protuupalni medijator koji može biti odgovoran za kliničku korist opaženu prilikom liječenja osteoartritisa, reumatoidnog artritisa i fibromijalgije sa S-adenozilmetioninom. Pod određenim patološkim uvjetima, SAM - aminopropilacija može biti blokirana ili smanjena

zbog smanjene koncentracije SAM-a, što rezultira neodgovarajućim protuupalnim funkcijama SAM-a i nekontroliranim upalnim reakcijama (Hao i sur., 2016; Cheng i sur., 1997).

Poremećaji metabolizma SAM-a imaju teške posljedice za život, diferencijaciju i funkciju stanica, najviše jetre i središnjeg živčanog sustava. SAM trenutno ima ulogu kao biomarker za cerebrovaskularne bolesti, Parkinsonovu bolest i depresiju (Xiujuan Hao i sur., 2016). Također, koristi se kao terapijski pripravak u određenim neuropsihijatrijskim (zajedno sa antidepressivima) i jetrenim bolestima, a potrebne su daljnje studije kako bi se jasno utvrdila njegova primjena i u drugim bolesnim stanjima, poput demencije (Hao i sur., 2016; Spillmann i Fava, 1996).

Budući da se razine SAM-a smanjuju u patološkim situacijama, vrlo je važno upotrebljavati osjetljive metode za određivanje njegovih niskih koncentracija u uzorcima. Nestabilna priroda SAM-a dodatno otežava njegovo određivanje. Odnosno SAM je analitički zahtjevan spoj zbog njegove enzimatske interkonverzije i razgradnje u SAH u uzorcima. Kiseline poput octene kiseline obično se koriste za stabiliziranje SAM-a u uzorcima plazme. Gellekink i suradnici istražili su utjecaj octene kiseline na stabilnost SAM-a u plazmi te pronašli sniženje SAM-a i paralelno povećanje SAH vrijednosti u nezakiseljenim uzorcima, čak i nakon pohrane na -20°C (Kopp i sur., 2016).

1.3.1 SAM - ovisne metiltransferaze (MT)

SAM - ovisne metiltransferaze (MT) su velika skupina enzima koji prenose metilnu skupinu SAM-a na različite molekule akceptora. Akceptori su većinom male molekule (aminokiseline, guanidinoacetat, neurotransmitori, fosfatidiletanolamin, intermedijere sinteze CoQ, vitamina K i E), te velike molekule (DNA, RNA i različiti proteini poput histona u jezgri, topivih citoplazmatskih proteina, strukturnih proteina stanične membrane). Svaka SAM - ovisna metiltransferaza kao izvor metilne skupine koju će prenijeti na molekulu akceptora koristi SAM, nakon čega, kao univerzalni produkt reakcije i snažan inhibitor tih istih reakcija, ostaje SAH. SAH je jedini unutarstanični izvor homocisteina i kompetitivni inhibitor brojnih metiltransferaza. Međutim, nisu sve metiltransferaze jednako ovisne o koncentraciji SAH-a te su neke podložnije inhibiciji (Woodeerchak i sur., 2008).

Postoji više od 300 SAM - ovisnih MT. Razne MT su na različite načine osjetljive na inhibiciju s SAH. Među najosjetljivijima MT na SAH je protein-arginin metiltransferaza 1 (PRMT1), a najotpornija je glicin-N-metiltransferaza (GNMT). Što je viša koncentracija

SAH-a, niži je metilacijski indeks stanice što dovodi do jače inhibicije transmetilacijskih reakcija posredovanih SAM ovisnim metiltransferazama. Ovisno o tipu metiltransferaze, nastaju različiti specifični metilirani produkti (Ćuk, 2013).

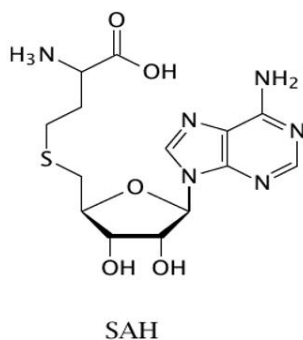
Unatoč broju i različitosti metiltransferaza, tri enzima najviše koriste SAM kao metilni donor. Ti enzimi su fosfatidiletanolamin metiltransferaza koja sintetizira fosfatidilkolin, gvanidinoacetat metiltransferaza koja sintetizira kreatin i glicin N-metiltransferaza koja sintetizira sarkozin i čija je aktivnost povišena tijekom povišene koncentracije i razgradnje metionina. Ti enzimi su prvenstveno ili isključivo ekspresirani u jetri, što pokazuje da jetra ima ključnu ulogu u ravnoteži reakcija metilacije.

Neke od najvažnijih SAM ovisnih reakcija metilacije su metilacija fosfatidiletanolamina do fosfatidilkolina, gvanidinoacetata do kreatina, noradrenalina do adrenalina, acetilserotonina do melatonina, DNA metilacija te metilacija različitih lijekova poput merkaptopurina (watcut.uwaterloo.ca).

1.4 S-adenozilhomocistein (SAH)

S-adenozilhomocistein (SAH) je metabolit koji nastaje transmetilacijskim reakcijama posredovanim brojnim metiltransferazama (MT), pri čemu se CH₃ skupina prenosi sa SAM-a na različite akceptorske molekule. SAH je zapravo demetilirani SAM i razlikuje se od njega samo po jednoj metilnoj skupini, međutim to je dovoljno za potpuno suprotne biološke učinke tih dvaju spojeva (slika 4). SAH je snažan inhibitor svih reakcija u kojima nastaje. Također je i neposredni prekursor homocisteina sintetiziranog u organizmu (Gellekink i sur., 2005).

Prilikom svoje sinteze SAH se odmah hidrolizira i razgrađuje djelovanjem SAHH enzima na homocistein (Hcy) i adenzin (Ado). Kako bi se reverzibilna reakcija SAHH enzima odvijala u željenom smjeru hidrolize SAH-a, produkti se moraju neprestano uklanjati. Ado se uklanja fosforilacijom u adenzin monofosfat ili deaminacijom u inozin djelovanjem enzima adenzin deaminaze, a Hcy remetilacijom u metionin ili transsulfuracijom do cisteina, čime se zatvara krug metioninskog ciklusa (Finkelstein, 1998). Zanimljivo je da je dinamika ravnoteže pomaknuta u smjeru reverzne reakcije (sinteze SAH-a). Stoga, povišene koncentracije ukupnog homocisteina prati nakupljanje SAH-a u plazmi i niži metilacijski indeks SAM/SAH. Kronično povišene koncentracije SAH-a imaju štetne učinke na zdravlje, a povezane su s nedostatnom aktivnosti SAHH i adenzin deaminaze (Kirsch i sur., 2009).



Slika 4: Struktura S-adenozilhomocisteina (preuzeto s watcut.uwaterloo.ca)

Kada je prisutan u dovoljno visokim koncentracijama, S-adenozilhomocistein je faktor rizika za mnoge bolesti i može dovesti do imunosupresije djelujući na limfocitnu DNA hipometilacijom, te do neurodegenerativnih bolesti poput demencije, depresije i Parkinsonove bolesti (Yi i sur., 2000; Cheng i sur., 1997; Spillmann i Fava, 1996). Povišena koncentracija SAH, osim što je povezana i dobro korelira s DNA hipometilacijom u limfocitima, jetri i mozgu, nalazi se i kod bolesnika s kardiovaskularnim bolestima gdje uzrokuje disfunkciju endotela (hipometilacijom endotelne DNA) (Kerins i sur., 2001). Štoviše, nekoliko je studija pokazalo da je SAH osjetljiviji pokazatelj rizika za kardiovaskularne bolesti od homocisteina (Gellekink i sur., 2005; Castro i sur., 2003; Kerins i sur., 2001), te je od nedavno predložen kao osjetljiviji pokazatelj rizika vaskularnih bolesti nego plazma HCys (Hao i sur., 2016; Wagner i Koury, 2007).

Osim prilikom remetilacije u reakciji sinteze metionina, SAH je produkt svih metilacijskih reakcija koje uključuju S-adenozilmetionin (SAM) kao metilni donor. Najčešće se radi o SAM - ovisnim metilacijama DNA, RNA, histona i ostalih proteina. SAH zbog visokog afiniteta vezanja za aktivno mjesto SAM - ovisnih metiltransferaza dovodi do inhibicije (kompetitivni je inhibitor) enzima (Struys i sur., 2000). Vezanjem na aktivno mjesto enzima inhibira vezanje SAM-a i dovodi do poremećaja metilacije raznih biomolekula (hipo/hiper metilacija DNA, modifikacija histona, RNA interferencija), te posljedično dolazi do promijenjene ekspresije gena, diferencijacije i apoptoze stanica, te strukture i funkcije proteina (Hobbs i sur., 2005).

Nedovoljno je podataka o tome nalazi li se SAH u slobodnom obliku u plazmi ili vezan za proteine. Obzirom da SAH nema slobodnu sulfhidrilnu skupinu, ne može oblikovati adukte na isti način kao homocistein. Koncentracije homocisteina u plazmi su u mikromolima po litri,

dok su koncentracije SAM-a i SAH-a u nanomolima po litri (znatno niže). To može biti razlog zašto je organizam osjetljiv na promjene koncentracija SAH-a u odnosu na koncentracije homocisteina (Kerins i sur., 2001). Nanomolarne koncentracije analita zahtjevaju upotrebu osjetljivijih metoda detekcije, a obzirom da SAH, kao i SAM, nema specifične apsorpcijske karakteristike onemogućena je njegova direktna detekcija spektrofotometrijom u serumu ili plazmi (Hao i sur., 2016).

1.5 Metilacijski indeks

Metilacijski indeks (MI) ili metilacijski potencijal stanice je definiran kao omjer koncentracije SAM-a i koncentracije SAH-a (Hao i sur., 2016). Metilacijski indeks određuje tijek brojnih transmetilacijskih reakcija važnih u staničnim procesima. Važan je za metaboličku kontrolu različitih staničnih procesa, od ekspresije gena do sinteze raznih proteina i za život važnih spojeva. Ovisno o tipu stanice, stupnju rasta i razvoja tkiva, vrijednosti MI se mijenjaju.

Budući da je SAH proizvod svih metilacijskih reakcija koje uključuju SAM kao metilni donor, promjenu procesa metilacije unutar stanice uz povišenu koncentraciju SAH-a često prati smanjena koncentracija SAM. Omjer SAM/SAH smatra se osjetljivijim i prikladnijim biomarkerom za brojna patološka stanja, od zasebne koncentracije SAM-a ili SAH-a (osobito kada su njihove promjene neznatne tijekom ranih faza disfunkcije) (Kopp i sur., 2016).

MI je znatno snižen u mnogim bolestima i može poslužiti u budućnosti kao novi biomarker za procjenu zdravstvenog statusa pojedinca i otkrivanje potencijalno nepovoljnih zdravstvenih stanja. Hao i sur., navode da će MI vjerojatno biti koristan u otkrivanju bolesti u zdravim populacijama te biti uključeni u panel godišnjih zdravstvenih pregleda.

Uslijed poremećaja metilacije i remetilacije poremećeni MI nalazimo u brojnim patološkim procesima poput demijenilizacije središnjeg živčanog sustava i smanjene sinteze neurotransmitera te neurodegenerativnim bolestima kao što su demencija, depresija i Parkinsonova bolest. Promjene metilacijskog indeksa prisutne su kod promijenjene kemotaksije i fagocitoze makrofaga, poremećene propusnosti stanične membrane, promijena u ekspresiji gena i staničnoj diferencijaciji, te otežanom sazrijevanju limfocita koje može voditi k imunosupresiji. Zabilježene su promjene MI i kod osoba s artritismom i

fibromijalgijom, karcinomom, jetrenim bolestima te kod kardiovaskularnih bolesnika (uključujući pojavu kongenitalnih malformacija poput prirođenih srčanih grešaka).

Zbog promjena u brojnim patološkim stanjima, određivanje SAM-a i SAH-a u biološkim uzorcima i računanje MI postaje od velikog interesa, te zahtijeva upotrebu osjetljivih metoda kvantifikacije (Kirsch i sur., 2009).

1.6 Uloga i važnost metilacije

Stanice u organizmu čovjeka sadrže iste gene, a izgrađuju različita tkiva i organe s različitim funkcijama. Razlike su vidljive u aktivaciji i ekspresiji određenog gena u određeno vrijeme na određenom mjestu, što rezultira sintezom određenog proteina koji se na specifičan način može posttranslacijski modificirati. Fenotip osim o genotipu, ovisi i o epigenomu pri čemu transmetilacijske reakcije posredovane SAM- ovisnim MT imaju značajnu ulogu. Genom je ukupna DNA organizma sastavljena od slijeda nukleotida deoksiribonukleinske kiseline koji translacijom glasničke RNA određuju slijed aminokiselina u novosintetiziranom proteinu. Epigenom obuhvaća promjene u ispoljavanju gena koje ne proizlaze iz slijeda nukleotida DNA, nego vezanja kemijskih spojeva i proteina na DNA i čini osnovu raznolikosti svih živih bića. Uključen je u regulaciju genske ekspresije i translaciju proteina u pojedinim stanicama te diferencijaciju tkiva, a može se mijenjati pod utjecajem okoliša. Promjene epigenoma mogu rezultirati promjenama strukture kromatina i promjenama funkcije genoma. Jedan od važnih mehanizama pomoću kojih se promjene epigenoma ostvaruju jest metilacija. Odnosno metilacija je značajna u epigenetskom reguliranju proteinske ekspresije putem metilacije DNA i histona. Metilacija je neophodna kao što je već navedeno i u sintezi nekih važnih spojeva (Ćuk, 2013; Mudd 2011; www.genome.gov).

1.6.1 Posttranslacijske modifikacije proteina

Većina proteina (ujedno i metiltransferaze) se nakon translacije na ribosomima dodatno kovalentno modificira i na taj način osposobljava za svoju tkivno-specifičnu ulogu. Te modifikacije nazivamo posttranslacijskim modifikacijama (PTM). Od PTM razlikujemo metilaciju, acetilaciju, fosforilaciju, glikozilaciju, ubikvitinizaciju, prenilaciju i druge. PTM pružaju dodatne mogućnosti regulacije strukture i funkcije proteina te doprinose raznolikosti stanica i tkiva, nastalih iz istih gena (Ćuk, 2013).

Metilacija mijenja veličinu, strukturu i naboj, a time i funkciju proteina. Razlikujemo N, O, S i C-metilaciju. Posttranslacijskoj transmetilaciji ne podliježu svi proteini. Preko 200 proteina kodiranih humanim genom su metiltransferaze, a njihova funkcija je poremećena u stanjima povišenih koncentracija SAM-a i SAH-a. Postraslacijska transmetilacija ima ulogu u kontroli transkripcije, inicijaciji, elongaciji i terminaciji transkripcije gena, alternativnom prekrajanju mRNA i njenom transportu u citoplazmu, translaciji proteina, te aktivaciji i regulaciji funkcije brojnih proteina (enzimi, receptori, signalne molekule, proteini međustanične komunikacije, proteini staničnog ciklusa i popravka DNA) (Ćuk, 2013).

1.7 Poremećaji metioninskog ciklusa

Nasljedni poremećaji metilacije odnosno poremećaji transmetilacije skupina su metaboličkih bolesti vezanih uz metioninski ciklus. Transmetilacija je jedna od reakcija u metabolizmu aminokiselina (uz deaminaciju, transaminaciju i desulfuraciju). To je proces prijenosa metilne skupine s aktivnog metionina (u obliku S-adenozilmetionina) na druge molekule, a sama reakcija je važna za organizam jer njome dolazi do aktivacije i sinteze biološki aktivnih spojeva. Prijenos metilne skupine posreduju brojne različite metiltransferaze. Do danas je poznato oko 300 metiltransferaze ovisnih o SAM-u kod ljudi. Veliku skupinu akceptora metilnih skupina čine važne molekule poput DNA, RNA, lipida, proteina, aminokiselina i neurotransmitera (Brosnan i sur., 2007).

Trenutno su opisana četiri poremećaja metilacije (četiri nasljedne enzimopatije). To su nedostatak aktivnosti metionin adenziltransferaze (MAT), nedostatak aktivnosti glicin-N-metiltransferaze (GNMT), nedostatak aktivnosti S-adenozilhomocistein hidrolaze (SAHH) te nedostatak aktivnosti adenzin kinaze (AK) (Barić i sur., 2017).

Ti poremećaji spadaju u skupinu rijetkih metaboličkih bolesti koje karakterizira slaba aktivnosti ili potpuni nedostatak aktivnosti specifičnog enzima, a zbog svoje rijetkosti takvi poremećaji su većim dijelom kasno i nedovoljno dijagnosticirani. Temelj dijagnoze je svijest o takvim poremećajima te povećana klinička sumnja. Nastaju mutacijama gena koji kodiraju specifične enzime (www.rijetke-bolesti.hr).

Na mjestu nedostatne aktivnosti enzima dolazi do prekida reakcije, samim time i do nedostatka konačnog produkta reakcije. Nedostatak konačnog produkta i nakupljanje njegovog prekursorskog metabolita u količini u kojoj nije normalno prisutan u organizmu,

najčešće izaziva simptomatsku metaboličku bolest. Metaboliti koji se nakupljaju su korisni u dijagnostičkim postupcima. U ovom radu osvrnuto se na metilacijske reakcije na koje utječu promjene u koncentracijama metabolita metioninskog ciklusa, SAM i SAH, što se može odraziti njihovim omjerom (metilacijskim indeksom). Odnosno iako je izolirana hipermetioninemija biokemijski pokazatelj ove skupine poremećaja, ona nije uvijek prisutna, stoga su plazma S-adenozilmetionin i S-adenozilhomocistein ključni metaboliti za biokemijsko pojašnjenje izolirane hipermetioninemije (Barić i sur., 2017).

Poremećaji pretežno djeluju na tri ciljna organa, jetru, središnji živčani sustav i mišiće, međutim klinička prezentacija može značajno varirati između i unutar poremećaja. Stoga, takvi pacijenti zahtijevaju multidisciplinarni pristup i doživotno praćenje kako bi se bolest što bolje kontrolirala i odgodile njene komplikacije.

Liječenje takvih rijetkih poremećaja zbog progresivnog tijeka bolesti jedino je uspješno ukoliko se započne dovoljno rano. Suplementacija S-adenozilmetioninom uz nisku metioninsku dijetu može biti korisna kod bolesnika s nedostatnom aktivnosti metionin adenoziltransferaza I/III, obzirom da do pojave neuroloških simptoma dolazi kada koncentracije metionina u plazmi prelaze 800 $\mu\text{mol/L}$. Također, postoje dokazi da takva prehrana može biti korisna i kod bolesnika s nedostatnom aktivnosti enzima S-adenozilhomocistein hidrolaze i adenzin kinaze (Barić i sur., 2017).

1.7.1 Nedostatak aktivnosti S-adenozilhomocistein hidrolaze (SAHH)

Nedostatak aktivnosti S-adenozilhomocistein hidrolaze (SAHH) je prvi puta opisan 2004. godine od strane istraživača KBC Zagreb. Do sada je zabilježeno tek 10 slučajeva bolesti. Također, na Odjelu za laboratorijsku dijagnostiku nasljednih metaboličkih bolesti i novorođenački probir KBC Zagreb kontinuirano se prati i liječi četvero braće i sestara sa dijagnosticiranom nedostatnom aktivnosti S-adenozilhomocistein hidrolaze, što je između ostalog potaknulo početak ovog istraživanja.

Povišene vrijednosti kreatin kinaze (CK) i miopatija praćene hipotonijom, poteškoćama u razvoju, problemima u ponašanju, hipomijelinizacijom, bolesti jetre (uključujući hepatocelularni karcinom), koagulacijskim poremećajima, te strabizmom, trebale bi pobuditi sumnju na ovu bolest. Terapija je uglavnom simptomatska te se bolest većinom može održavati pod kontrolom primjerenom restriksijskom (niskoproteinskom) dijetom. Moguća je

terapija i nadoknada cisteina, prekursora glutationa, čije se sniženje javlja uslijed njegove nedostatne sinteze iz metionina. Na taj način se sprječava mogući nedostatak glutationa i podložnost organizma utjecaju oksidativnog stresa koji mogu dodatno oštetiti jetru. U novije vrijeme spominje se učinkovitost transplantacije jetre kod osobe koja nije reagirala na niskoproteinsku dijetu (Barić i sur., 2005).

S terapijom je važno započeti rano kako bi se izbjegle ireverzibilne neurološke posljedice toksičnog djelovanja S-adenozilhomocisteina, te neuromotoričko zaostajanje. Stoga je za odgodu pojave komplikacija bolesti važna rana dijagnoza, a komplikacije su najčešće vezane uz tromboemolijske incidente i promjene na jetri (Barić i sur., 2017).

SAHH ima ulogu u prijenosu metilne skupine, te spada u skupinu enzima koji se nazivaju metiltransferazama. Njegova je uloga pretvorba SAH-a (odmah pri njegoj sintezi), u adenzin i homocistein. Do nedostatne aktivnosti SAHH dolazi mutacijom na AHCY genu. Uslijed smanjene aktivnosti SAHH dolazi do nakupljanja SAH-a te smanjene sinteze adenozina i homocisteina kao konačnih produkata reakcije. SAH je snažni inhibitor svih SAM - ovisnih metiltransferaza, te je stoga SAHH enzim važan regulator reakcija transmetilacije (Barić i sur., 2017).

Biokemijske promjene uključuju povišene aminotransferaze (AST,ALT) i aktivnosti CK, te koagulacijske promjene (najčešće je produženo protrombinsko vrijeme, nizak fibrinogen, antitrombin III, protein S, faktor II, faktor VII te povećani faktor V). Specifične biokemijske promjene (tipične za nedostatak aktivnosti SAHH) koje omogućuju postavljanje dijagnoze su povišena koncentracija SAM-a i izrazito povišena koncentracija SAH-a u plazmi i likvoru, s normalnom ili približno normalnom koncentracijom plazma tHcy. Hipermetioninemija je stanje koje je često povezano s brojnim patološkim stanjima (kao i nedostatkom SAHH) te stoga njegovo određivanje nije dovoljno selektivno i specifično za postavljanje dijagnoze. Iz tog razloga je važno određivanje plazmatske koncentracije S-adenozilmetionina i S-adenozilhomocisteina, kao i njihovog omjera. Konačna dijagnoza se potvrđuje molekularnom dijagnostikom na prisutnost genskih mutacija (Barić i sur., 2017).

1.7.2 Nedostatak aktivnosti metionin adenziltransferaze (MAT)

Enzim metionin adenziltransferazom (MAT, E.C.2.5.1.6) katalizira aktivaciju metionina u SAM. MAT ima tri izoforme. MAT I i MAT III specifični su za jetru, dok je MAT II prisutan

uglavnom u fetalnoj jetri i ekstrahepatičkom tkivu. Bolest je većinom uzrokovana mutacijama u MAT1A genu koje dovode do nedostatne aktivnosti enzima MAT I/III (Barić i sur., 2017).

Nedostatak aktivnosti metionin adenoziltransferaze najblaža je bolest od četiri poremećaja ciklusa metionina. U većini slučajeva se radi o bezopasnom poremećaju. Veći rizik za razvoj simptomatske bolesti nastaje uslijed visoke koncentracije metionina u plazmi ($> 800 \mu\text{mol/L}$), zbog vrlo niske aktivnosti MAT enzima. Simptomi su uglavnom vezani uz mozak i poteškoće u razvoju. Neurološki simptomi uključuju glavobolje, odgođen razvoj govora te nekontrolirane pokrete očiju. Međutim, zabilježeni su slučajevi kada osobe s potpunim nedostatkom enzimske aktivnosti nisu imale simptome. Liječenje se provodi prehranom siromašnom metioninom uz suplemenciju ostalih aminokiselina čija je uloga sinteza proteina, a zabilježeni su pozitivni slučajevi prilikom davanja S-adenozilmetionina bolesnicima (Barić i sur., 2017).

Biokemijske promjene su perzistentna izolirana hipermetioninemija (koja se može povezati s neuobičajenim mirisom daha). Određivanje koncentracije SAM-a i SAH-a u plazmi može poslužiti za isključivanje ostalih poremećaja metilacije (nedostatak aktivnosti SAHH, GNMT, ADK, ali i nedostatak CBS), koji se vežu uz njihove povišene koncentracije (Barić i sur., 2017).

1.7.3 Nedostatak aktivnosti Glicin N-metiltransferaze

Glicin N-metiltransferaza (GNMT; E.C. 2.1.1.20) je enzim koji katalizira prijenos metilne skupine na glicin pri čemu se sintetizira sarkozin. Nedostatak aktivnosti Glicin N-metiltransferaze iznimno je rijetka bolest koja je do sada zabilježena kod samo pet osoba. Simptomi bolesti vezani su prvenstveno uz jetru, dok su ostali organi većinom intaktni. Bolest je uglavnom asimptomatska. Međutim, postoje slučajevi sa zabilježenim blagim porastom jetrenih enzima i hepatomegalijom (Barić i sur., 2017).

Terapija najčešće nije potrebna, ali uzimajući u obzir zabilježena opažanja visoko povišenih koncentracija metionina u plazmi (koji je faktor rizika za razvoj neuroloških simptoma), kod takvih slučajeva može biti od koristi niskoproteinska dijeta. Temelj dijagnoze je svijest o nedostatnoj aktivnosti GNMT i povećana klinička sumnja na asimptomatske osobe s neobjašnjivim povećanjem aminotransferaza. Također, nedostatak aktivnosti Glicin N-

metiltransferaze je poremećaj za koji je poznato da smanjena aktivnost enzima uzrokuje porast koncentracija SAM-a (Barić i sur., 2017).

Početni laboratorijski pristup uključuje određivanje aminokiselina i tHcy u plazmi, a u prisutnosti perzistentne izolirane hipermetioninemije potrebno je određivanje koncentracija SAM-a i SAH-a, te ako je moguće koncentracije sarkozina u plazmi. Kako pacijenti s nedostatnom aktivnosti GNMT-a mogu imati vrlo visoke razine metionina i povećan rizik za razvoj komplikacija središnjeg živčanog sustava, preporučuje se praćenje razine metionina u plazmi. Osim određivanja metionina, preporuča se i redovito praćenje pacijenata određivanjem aminotransferaza (pokazatelj oštećenja jetrenog tkiva), te albumina i protrombinskog vremena (za procjenu sintetske funkcije jetre) (Barić i sur., 2017).

1.7.4 Nedostatak aktivnosti adenozin kinaze

Enzim Adenozin kinaza (ADK, E.C.2.7.1.20) nije izravno uključen u proces transmetilacije. ADK katalizira fosforilaciju adenzina u adenzin monofosfat, a nedostatak njezine aktivnosti uzrokuje nakupljanje adenzina. Nakupljanje adenzina potom dovodi do povišenih koncentracija SAM-a i SAH-a, čime se remeti metioninski ciklus i metilacijski procesi (Barić i sur., 2017).

Nedostatak aktivnosti adenzin kinaze drugi je poremećaj po ozbiljnosti nakon nedostatka SAHH, a zabilježen je kod 20 osoba. Za razliku od bolesnika s nedostatnom aktivnosti SAHH, bolesnici s nedostatnom aktivnosti ADK imaju puno blaži porast SAM-a i SAH-a. Bolest se javlja rano nakon poroda i uglavnom pogađa jetru (pojava teške hiperbilirubinemije) i središnji žičani sustav. Kod pacijenata su vidljive dismorfne crte lica, izduženo čelo, rijetka kosa, iskrivljeni zubi, poteškoće u razvoju i problemi s učenjem, te mišićna hipotonija. Zabilježeni su slučajevi kod kojih je došlo do razvoja epilepsije, hipoglikemije i gluhoća (Barić i sur., 2017).

Biokemijske pretrage uključuju određivanje ukupnih proteina, određivanje aminokiselina u plazmi (tHcy, SAM, SAH) i adenzina u mokraći, određivanje aminotransferaza, ukupnog i direktnog bilirubina, amonijaka i glukoze. Terapija je uglavnom simptomatska, a uključuje dijetu s niskim udjelom metionina (Barić i sur., 2017).

1.8 Referentni intervali

Laboratorijski nalazi imaju široku primjenu u donošenju medicinske odluke poput postavljanja dijagnoze, praćenja uspješnosti liječenja i tijeka bolesti pa sve do probira zdrave populacije u svrhu prevencije određenih bolesti. Za interpretaciju laboratorijskih nalaza potrebno je poznavanje referentnih intervala. Referentni interval obuhvaća vrijednost između gornje i donje referentne granice, uključujući i vrijednosti granica. Najčešće je upotrebljavani i preporučeni oblik referentnog intervala 95-postotni interval koji obuhvaća 95 % središnjih vrijednosti omeđenih 2,5. i 97,5. percentilom. Percentili označavaju granične vrijednosti prema kojima su ostale izmjerene vrijednosti 2,5 % odnosno 97,5 % manje od graničnih vrijednosti ili su im jednake (Šimundić AM, ured., 2013).

Za izradu referentnih vrijednosti potrebno je odabrati referentne osobe odnosno referentni uzorak, u kojem se određuju referentne vrijednosti koje pokazuju referentnu distribuciju iz koje se zatim izračunavaju donje i gornje referentne granice koje omeđuju referentne intervale. Referentni uzorak se sastoji od odgovarajućeg broja referentnih osoba koje predstavljaju referentnu populaciju. Referentna vrijednost jest vrijednost dobivena mjerenjem koncentracije nekog analita u biološkom materijalu (npr. serum, plazma, likvor) referentne osobe. Referentna osoba jest osoba definiranog statusa zdravlja izabrana prema određenim kriterijima, u čijem se biološkom materijalu određuju referentne vrijednosti (Kolić i sur., 2017; CLSI, 2008).

Određivanje referentnih vrijednosti i intervala potrebno je provesti na velikom broju zdravih ispitanika, što predstavlja dugotrajan i skup proces. Zato se u laboratorijskoj praksi upotrebljavaju uglavnom referentne vrijednosti i intervali koje navodi proizvođač korištenih testova. Prema preporukama struke, svaki laboratorij mora verificirati referentne intervale proizvođača kako bi provjerio jesu li prikladni za populaciju bolesnika koju pokriva određeni laboratorij. Referentne intervale moguće je provjeriti na nekoliko načina i važno je da se provjera ponavlja periodično odnosno jednom godišnje ili pri promjeni bilo kojih uvjeta koji mogu znatno utjecati na primjenjivani referentni interval. Od nekoliko preporučenih postupaka najčešće se primjenjuje provjera na 20 uzoraka zdravih ispitanika (Kolić i sur., 2017; CLSI, 2008).

EP28-A3C dokument koji je izradila ekspertna skupina Međunarodne federacije za kliničku kemiju (engl. *The International Federation of Clinical Chemistry – IFCC*) sadrži smjernice za

određivanje referentnih vrijednosti i referentnih intervala za kvantitativne kliničke laboratorijske testove. Preporuke su objavljene u šest dokumenata objedinjenih u dokumentu Instituta za kliničko laboratorijske standarde (*engl. The Clinical & Laboratory Standards Institute – CLSI*) C28-P. Dokument pruža protokol za određivanje referentnih intervala koji udovoljavaju minimalnim zahtjevima pouzdanosti i korisnosti. Obuhvaćeni su i različiti zahtjevi za studije prilikom određivanja referentnih vrijednosti za novi analit ili novu analitičku metodu prethodno izmjerenog analita. Za određene pretrage koje nisu obuhvaćene navedenim dokumentom laboratorij obično preuzima referentne intervale koje navodi proizvođač reagensa, uz verifikaciju na osobama koje vjerno predstavljaju populaciju koju obuhvaća laboratorij (Kolić i sur., 2017).

1.8.1 Odabir referentne osobe

Referentnom se osobom može smatrati ona osoba određene životne dobi kod koje se anamnezom i fizikalnim pregledom te uvidom u postojeću medicinsku dokumentaciju ne može utvrditi bolesno stanje koje bi utjecalo na promjenu rezultata laboratorijskih pretraga za koje se određuju referentne vrijednosti. Kriteriji za odabir referentne osobe su osobna i obiteljska anamneza, liječnički pregled, uvid u razne biološke čimbenike (npr. farmakološki aktivne tvari), promijenjena fiziološka stanja (npr. trudnoća), prisutnost rizičnih čimbenika (npr. hipertenzija, pušenje, prekomjerna tjelesna težina), ocjena zdravstvenog statusa te pisani pristanak (Kolić i sur., 2017; CLSI, 2008).

Odabir referentne osobe iz referentne populacije može se provesti na dva načina, izravno i neizravno. Izravnim pristupom se unaprijed određuju *kriteriji isključivanja* (npr. uzimanje lijekova, hipertenzija, genetski čimbenici) i *kriteriji podjele* referentnih osoba u podskupine (npr. spol, dob). Neizravno se odabir referentne osobe može provesti koristeći se postojećom laboratorijskom bazom podataka (npr. darivatelja krvi, sistematskih pregleda). Ta metoda nije preporučena te se smije primijeniti isključivo u situacijama u kojima je uzorkovanje otežano i kada je teško doći do referentnog uzorka izravnim pristupom (npr. kod pedijatrijskih uzoraka) (Kolić i sur., 2017; CLSI, 2008).

1.8.2 Verifikacija referentnih intervala

Interpretacija laboratorijskih rezultata pretraga provodi se analizom individualnog rezultata u odnosu na referentne intervale određene na referentnoj populaciji. Njihovu izradu za sve laboratorijske pretrage moraju osigurati svi klinički laboratoriji ali i proizvođači komercijalnih reagensa. Prema preporukama se za svaku validiranu laboratorijsku pretragu treba provesti ocjena bioloških referentnih intervala, neovisno o tome primjenjuju li se harmonizirani referentni intervali ili preporučeni referentni intervali iz literaturnih izvora. 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 (Kolić i sur., 2017; CLSI, 2008).

Ocjenom je potrebno definirati analit za koji se primjenjuju referentni intervali, analitičku metodu, moguće predanalitičke varijacije, udio referentne populacije, literaturne izvore podataka, subpopulaciju (npr. spol), način izražavanja, kliničko značenje i primjenu, moguću primjenu jedinstvenih referentnih intervala, te odluku o primjeni odgovarajućih referentnih intervala (Kolić i sur., 2017).

Iako bi svaki laboratorij trebao napraviti referentne intervale za svoju ispitivanu populaciju, iz ekonomskih razloga najčešće se koristimo referentnim intervalima iz drugih izvora. Uporaba tih referentnih intervala dozvoljena je ako smo osigurali usporedivost analitičkog sustava i referentnog uzorka na kojem je referentni interval napravljen. Provjera takvog intervala može se provesti na tri načina: subjektivnom procjenom, verifikacijom s manjim brojem referentnih osoba (na 20 referentnih osoba koje zadovoljavaju sve postavljene kriterije za referentnu populaciju) i verifikacijom na većem broju referentnih osoba (primjerice na 60 referentnih osoba) (Kolić i sur., 2017; Šimundić AM, ured., 2013; CLSI, 2008).

Verifikacija se najčešće provodi na 20 referentnih osoba iz populacije kojoj je referentni interval namijenjen. Ukoliko manje od 10% ispitanika ima vrijednost izvan očekivanog referentnog intervala on se prihvaća, dok se u suprotnom ispitivanje ponavlja. Ako je ponovljeni rezultat ponovno iznad 10% potrebno je izraditi specifične referentne intervale.

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Aminokiselina metionin (Met) te njezini spojevi obogaćeni ATP-om S-adenozilmetionin (SAM) i S-adenozilhomocistein (SAH) zajedno s homocisteinom (Hcy) sudjeluju u procesima metilacije, remetilacije i transsulfuracije u stanici. Poremećaji procesa metilacije i remetilacije koji se očituju poremećenim koncentracijama SAM-a i SAH-a te poremećenim metilacijskim indeksom (omjer SAM-a i SAH-a) mogu rezultirati brojnim patološkim procesima poput demijetilacije središnjeg živčanog sustava, smanjene sinteze neurotransmitera, smanjene kemotaksije i fagocitoze makrofaga, promijenjenog sustava membranskih fosfolipida i poremećene propusnosti stanične membrane, promijenjene ekspresije gena i stanične diferencijacije, te otežanog sazrijevanja limfocita koje može voditi k imunosupresiji. Promjene u koncentracijama SAM-a, SAH-a i metilacijskog indeksa prisutne su u mnogim bolestima poput neurodegenerativnih (demencija, depresija i Parkinsonova bolest), jetrenih i kardiovaskularnih bolesti, karcinoma, te kod osoba s artritisom i fibromijalgijom. Također se povezuje s povećanom pojavnosti kongenitalnih malformacija poput prirođenih srčanih grešaka i meningomijelokele. Povišena koncentracija SAH-a smatra se važnim čimbenikom patogeneze bolesti koje nastaju zbog nedostatne aktivnosti S-adenozilhomocistein hidrolaze i adenozin kinaze.

Na Odjelu za laboratorijsku dijagnostiku nasljednih metaboličkih bolesti i novorođenački probir KBC Zagreb kontinuirano se prati i liječi troje braće i sestra s dijagnosticiranom nedostatnom aktivnosti S-adenozilhomocistein hidrolaze. Obzirom na uključenost SAM-a i SAH-a u brojne patološke procese, te zastupljenosti bolesti u navedenoj obitelji, cilj istraživanja bila je verifikacija referentnih intervala naše populacije, u kojoj je sudjelovalo 50 odraslih volontera bez navedenih patoloških stanja (32 žene i 18 muškarca).

3. MATERIJALI I METODE

Koncentracije SAM-a i SAH-a određivane su na UPLC-MS/MS (Shimadzu Nexera 8050) analizatoru na Odjelu za laboratorijsku dijagnostiku nasljednih metaboličkih bolesti i novorođenački probir Kliničkog bolničkog centra Zagreb, korištenjem modificirane metode Gellekink i sur. (Stable-Isotope Dilution Liquid Chromatography - Electrospray Injection Tandem Mass Spectrometry Method for Fast, Selective Measurement of S-Adenosylmethionine and S-Adenosylhomocysteine in Plasma).

Zbog nedostupnosti komercijalnih kontrola kao i vanjske procjene kvalitete, kao kontrolni uzorak koristio se uzorak poola plazme zdravih osoba.

Uzorci koji su se koristili prilikom izrade diplomskog rada su uzorci venske plazme uzete na antikoagulans EDTA (Greiner Bio-One), te potom centrifugirane na 3500g tijekom 5 minuta. Unutar jednog sata od uzorkovanja izdvajalo se 500 µL plazme u eppendorfice i izravno zakiseljavalo s 50 µL octene kiseline, kako bi se održala stabilnost analita (SAM-a). Odvojena plazma u ependorficama se potom pohranjivala na -80 °C do analize. Analizirano je ukupno 50 ostalih uzoraka plazme volontera (32 žene i 18 muškarca), naizgled zdravih osoba, tj. bez navedenih patoloških stanja.

Obzirom da je cilj studije bila verifikacija referentnih intervala naše populacije, prvotno je bilo potrebno izvršiti pretraživanje literature u svrhu otkrivanja interferencija i izvora biološke varijabilnosti, definiranje kriterija prema kojima će ispitanici biti uključeni u skupinu referentnih osoba odnosno kriterija podjele i kriterija isključivanja ispitanika, te definiranje mogućih predanalitičkih varijacija (uzorkovanja i postupanja s uzorcima).

Odabir referentne osobe iz referentne populacije kao što je navedeno u točki 1.8.1 *Odabir referentne osobe* može se provesti na izravan i neizravan način. U ovom radu izravnim pristupom unaprijed su se odredili *kriteriji isključivanja* i *kriteriji podjele* referentnih osoba u podskupine.

Kriteriji isključivanja osoba iz skupine referentnih osoba su osobe za koje se na osnovu pregleda podataka i uvida u postojeću medicinsku dokumentaciju nije moglo utvrditi bolesno

stanje koje bi utjecalo na promjenu rezultata laboratorijskih pretraga za koje se određuju referentne vrijednosti, osobe koje redovito konzumiraju farmakološki aktivne tvari, osobe sa promijenjenim fiziološkim stanjima poput trudnoće, fizioloških i mentalnih stanja koje mogu izazvati stresne situacije, te konzumiranje hrane ili pića u vremenu kraćem od 10 sati prije uzimanja krvi. Također osobe koje su uključene u studiju morale su zadovoljiti referentne intervale osnovnih biokemijskih pretraga kao što su AST i ALT (za procjenu oštećenje jetrenog tkiva), ureja i kreatinin (za procjenu funkcionalne sposobnosti bubrega i glomerularne filtracije), CK te glukoze u plazmi. *Kriteriji podjele* referentnih osoba u podskupine sačinjavali su podjelu referentnih osoba prema spolu.

Da bi se izbjegle predanalitičke varijacije uzorkovanje se provodilo na standardiziran način venepunkcijom ujutro (12 sati nakon zadnjeg obroka), pri čemu je ispitanik mirovao 15 do 30 minuta prije uzorkovanja, položaj tijela za vrijeme uzorovanja krvi je bio sjedeći, krv se uzimala iz antekubitalne vene nakon minimalne kompresije u trajanju manjem od 1 minute, a uzorkovanje se izvodilo u standardizirane epruvete, uz zakiseljavanja uzorka octenom kiselinom u svrhu održavanja stabilnosti analita i odgovarajuću pohranu na -80 °C do analize.

3.1 Oprema

- UPLC-MS/MS (Shimadzu Nexera 8050)
- kolona za ekstrakciju čvrsto-tekuće (Bond Elut kolone, Agilent Technologies)
- vorteks
- automatske pipete (*Eppendorf*; volumeni 5 µl, 20 µl, 100 µl, 1000 µl)
- centrifuga (*Eppendorf 5810R*)
- centrifuga (*Eppendorf 5415R*)

3.2. Reagensi

1. Octena kiselina 1M; CH_3COOH , MW 60.052 g/mol; pripremljena je sa 2895 uL 96% octene kiseline Merck EMSURE® (Ontario, Canada), kataloški broj :1000621000, na 50 ml H_2O (reagens 12.)

2. Mravlja kiseline 0,1 M; HCOOH , MW 46.025 g/mol; pripremljena je sa 3773 uL 98% octene kiseline Merck Suprapur® (Ontario, Canada), kataloški broj : 1116700250, na 1L H_2O (reagens 12.)

3. Amonijev acetat 0.02M; $\text{CH}_3\text{COONH}_4$, MW 77.083 g/mol; pripremljen otapanjem 1,5416 g amonijevog acetata Merck EMSURE® (Ontario, Canada), kataloški broj: 1011161000, na 1L H_2O uz namještanje odgovarajućeg pH(8,8) pomoću reagensa 14.

4. S-(5'-Adenosyl)-L-methionine Disulphate Salt; $\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{N}_6\text{O}_{13}\text{S}_3$; MW 594.59; Toronto Research Chemicals; lot (serijski broj): 12-JWA-106-1; kataloški broj: A291530
Svijetložuta sol sa 95 % čistoće čija je detekcija moguća putem NMR-a i MS-a.

5. Matična otopina SAM od 168 $\mu\text{mol/L}$ pripremljena je otapanjem 10 mg reagensa 4. u 100 ml mravlje kiseline (reagens 2). Alikvotirana otopina pohranjena je na -80°C , i stabilna do godine dana.

6. S-(5'-Adenosyl)-L-homocistein; $\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{N}_6\text{O}_5\text{S}$; MW 384.41; Toronto Research Chemicals; lot (serijski broj): 13-YKZ-3-2; kataloški broj: A291500
Svijetložuta do svijetlosmeđa sol sa 95 % čistoće čija je detekcija moguća putem NMR-a i MS-a.

7. Matična otopina SAH od 650 $\mu\text{mol/L}$ pripremljena je otapanjem 10 mg reagensa 6. u 40 mL mravlje kiseline (reagens 2). Alikvotirana otopina pohranjena je na -80°C i stabilna do godine dana.

8. S-(5'-Adenosyl)-L-methionine- d_3 Disulfate Salt ; $\text{C}_{15}\text{H}_{23}\text{D}_3\text{N}_6\text{O}_{13}\text{S}_3$; MW 597.61; Toronto Research Chemicals; lot (serijski broj): 16-JWA-53; kataloški broj: A291532
Bijela sol sa 96% kemijske i 99.6% izotopske čistoće čija je detekcija moguća putem NMR-a i MS-a.

9. Matična otopina 2H3-SAM od 16 $\mu\text{mol/L}$ pripremljena je otapanjem 1 mg reagensa 8. u 104 mL mravlje kiseline (reagens 2).

10. S-(5'-Adenosyl)-L-homocistein-d₄; ; C₁₄H₁₆D₄N₆O₅S; MW 388.4; Medical Isotopes; lot (serijski broj): 13-YKZ-3-2; kataloški broj: A291500

Bijela sol sa 99.1 % kemijske i > 99 % izotopske čistoće čija je detekcija moguća putem HPLC-a i MS-a.

11. Matična otopina 13C₅-SAH od 12 μmol/L pripremljena je otapanjem 1 mg reagensa 10. u 214 mL mravlje kiseline (reagens 2).

12. HPLC-MS ultra čista voda; H₂O; 18.02 g/mol; Merck LiChrosolv®; kataloški broj: 1153331000

13. Radna otopina internih standarda pripremljena je sa 40 μL matične otopine 2H₃-SAM (reagens 9.) i 200 μL matične otopine 13C₅-SAH (reagens 11.). Konačni volumen smjese otopine iznosio je 2 mL nakon dodavanja 1760 μL HPLC-MS ultra čiste vode (reagens 12.). Smjesa se priprema neposredno prije rada i dovoljna je za sekvencu od 18 uzoraka.

14. Otopina amonijaka 1M; NH₄OH; 35.04 g/mol; pripremljena je sa 3,77 mL 25% amonijeve otopine Merck Suprapur® (Ontario, Canada), kataloški broj: 1054280250, na 50 ml H₂O (reagens 12.)

3.3 Priprema uzoraka

Pohranjene uzorke plazme je potrebno izvaditi iz hladnjaka i odmrznuti. Potom se uzorci 500 μL plazme i 50 μL octene kiseline (reagens 1.) vorteksiraju. Ako nema dovoljno plazme potrebno je razrijediti plazmu u omjeru 1:1 (250 μL plazme + 250 μL destilirane vode). Uzorci se potom centrifugiraju 3 minute na 14rpm u *Eppendorf 5415R* centrifugi.

3.3.1 Priprema kalibracijske krivulje

Prije same analize potrebno je odrediti ispravnu kalibracijsku krivulju korištenjem kalibratora, odnosno standarda poznatih koncentracija. Izradi kalibracijske krivulje prethodi priprema radne otopine.

Protokol za pripremu standarda :

Radna otopina se priprema na način da se prvotno ispipetira 95,2 μmol/L SAM standarda (reagens 5.), te 6,16 μL SAH standarda (reagens 7.) i vorteksira. Pipetiranje se izvodi u

odmjernu tikvicu od 10 mL, koju je prethodno potrebno isprati redestiliranom vodom, te se tikvica potom dopuni do oznake HPLC-MS ultra čista vodom (reagens 12.). Odgovarajuće alikvote matičnih standarda SAM-a i SAH-a i redestilirane vode je potrebno ispipetirati kako bi se priredilo 5 točaka standardne krivulje, čije su koncentracije definirane u tablici 1. Neiskorišteni alikvoti SAM i SAH standarda pohranjivani su na -80 °C do sljedeće analize.

Tablica 1: Priprema pet točaka kalibracijske krivulje SAM-a i SAH-a

	Matične otopine SAM i SAH standarda μL	HPLC-MS ultra čista voda μL	konc. SAM nmol/L	konc. SAH nmol/L
ST1	100	900	160	40
ST2	50	950	80	20
ST3	25	975	40	10
ST4	12.5	988	20	5
ST5	0	1000	0	0

Priprema standarda se izvodila u eppendorficama. Nakon dilucije, kako je prikazano u tablici 1, standardi su se vorteksirali, te su se potom obilježavale nove eppendorfice. U nove eppendorfice se prenosilo 500 μL standarda i 50 μL octene kiseline (reagens 1). Zakiseljeni standardi su nakon dodatka octene kiseline stabilni na sobnoj temperaturi.

3.3.2 Priprema internih standarda

Osim pripreme standarda potrebna je i priprema internih standarda, koji omogućavaju kvantifikaciju analita od interesa putem tandemске spektrometrije masa. Zbog osjetljivosti masenog spektrometra na kontaminacije uspješnost analize uvelike ovisi o prethodnoj obradi uzorka i kontroliranim uvjetima u okolini. Komplikacije u analizi složenih uzoraka mogu nastati zbog tvorbi adukata i nakupina, kromatografskih interferencija, te potiskivanja iona zbog konkurentnih metabolita ili drugih sastojaka matriksa. Stoga je upotreba internih standarda s visokom fizikalno-kemijskom sličnošću ciljanim metabolitima potrebna u razvoju analiza HPLC-MS/MS. Kako bi se postigla što veća kemijska sličnost (struktura) s analitima,

interne standarde čine strukturni homolozi analita ili izotopno označeni stabilni derivati. Označavanje izotopa provodi se namjernim umetanjem izotopa ^2H ili ^{13}C u molekularnu strukturu kvantitativnom zamjenom određenih ^1H ili ^{12}C atoma. Na taj se način uvodi pomak molekularne mase i razlučuje interni standard od analita u masenom spektrometru (Seger i Griesmacher, 2007).

Interni standard osim kemijske sličnosti sa analitom od interesa, treba imati i slično retencijsko vrijeme izlaska sa kromatografske kolone. Interni standardi se dodaju u fazi pripreme uzorka kako bi prošli kroz jednaki proces pretpripreme i analize kao i analiti. Stabilnost internih standarda je važna, ali i da ne interferiraju s komponentama uzorka. Uglavnom nadoknađuju eventualne gubitke analita koji su tijekom postupka pripreme uzorka prouzročeni isparavanjem organskog otapala ili pogreškama u rukovanju tijekom pripreme. Vršni omjeri analita/internog standarda moraju se dobro uravnotežiti kako bi se izbjegle bilo kakve razlike u analizama zbog učinaka potiskivanja iona uzrokovanih internim standardom (Ho i sur., 2003).

Prilikom izrade rada u sve točke krivulje (standarde) i zakiseljene uzorke plazme dodano je 100 μL radne otopine internih standarda (reagens 13.) i uzorci su vorteksirani.

3.3.3 Ekstrakcija čvrsto-tekuće (engl. SPE extraction)

Obzirom da se radi o uzorcima plazme koji su nepročišćeni nemoguće ih je izravno umetnuti u vakuum masenog spektrometra, stoga je potrebno prethodno pročišćavanje uzorka kolonama za čvrsto-tekuću ekstrakciju. Uzorke čine sastojci kako male, tako i velike molekularne težine, a obuhvaćaju široki raspon polariteta, odnosno u otopini su prisutni hidrofilni (aminokiseline, organske kiseline, peptidi), amfolitički (fosfolipidi) i hidrofobni (kolesterol, trigliceridi, lipidi) metaboliti. Stoga se i za lipofilne (lijekove, endogene steroidne hormone) i hidrofilnije analite (aminokiseline, organske kiseline, kateholamine) najčešće primjenjuje dvodijelni protokol pročišćavanja uzorka u kojem se kombinira ekstrakcija na krutoj fazi (SPE) i HPLC (Seger i Griesmacher, 2007).

Primjena SPE pogodna je metoda za pročišćavanje uzorka ili ukoncentriravanje analita. Danas su dostupni različiti materijali za kolone, poput klasičnih materijala reverzne faze (RP-18),

lipofilnih polimera, te smola anionskih i kationskih ionskih izmjenjivača. SPE metoda je prisutna u mnogim analitičkim laboratorijima, a koristi se za gotovo sve vrste matriksa.

3.2.3.1 Kondicioniranje kolone

Nakon pripreme uzoraka i standarda slijedi kondicioniranje kolone, odnosno solvatacija sorbena kolone, pri čemu se kolona ispiri odgovarajućim otapalom i priprema za interakciju s analitom.

Protokol:

Prvo je kolone potrebno obilježiti i postaviti u odgovarajuće plastične epruvete za otpad. Zatim se 1 mL mravlje kiseline (reagens 2.) pipetira u kolonicu i centrifugira 1 minutu na 1000 rpm, te se postupak pipetiranja i centrifugiranja ponovi. Nakon 2 ciklusa centrifugiranja potrebno je izliti otpad iz epruveta za otpad.

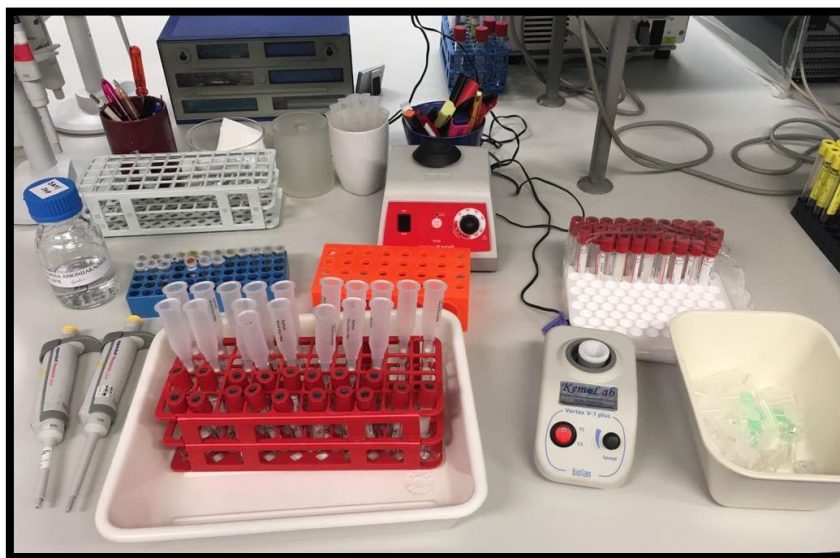
Potom slijedi pipetiranje 1 mL amonijevog acetata (reagens 3.) kako bi se s amonijakom namjestio pH od 8.8 i omogućilo vezanje cis diolnih analita. Slijedi centrifugiranje tijekom 1 min na 1000 rpm. Postupak se zatim ponavlja te se sadržaj epruveta za otpad odbacuje. Takve kolonice su tada priređene i spremne za interakciju sa analitom.



Slika 5: Korištene kolone za ekstrakciju čvrsto-tekuće, Bond Elut PBA (Anamarija Bogić)

Pročišćavanje uzoraka je provedeno uz Bond Elut PBA kolone za ekstrakciju, Agilent Technologies proizvođača (slika 5). Elut PBA je jedinstveni SPE silika sorbens koji kao funkcionalnu skupinu sadrži fenilboronsku kiselinu. Fenilboronska kiselina može zadržati analite reverzibilnom kovalentnom vezom te omogućuje visoku specifičnost i čistoću. Boronatna skupina ima snažan afinitet za spojeve koji sadrže cis-diol skupinu, poput katehola,

nukleinskih kiselina, nekih proteina, ugljikohidrata, amino alkohola, te alfa-hidroksi amida. Boronatna skupina pri pH 7-8 selektivno veže cis-diol skupine SAM-a i SAH-a.



Slika 6: Korištena oprema neposredno prije postavljanja kolona za ekstrakciju čvrsto-tekuće na centrifugu (Anamarija Bogić)

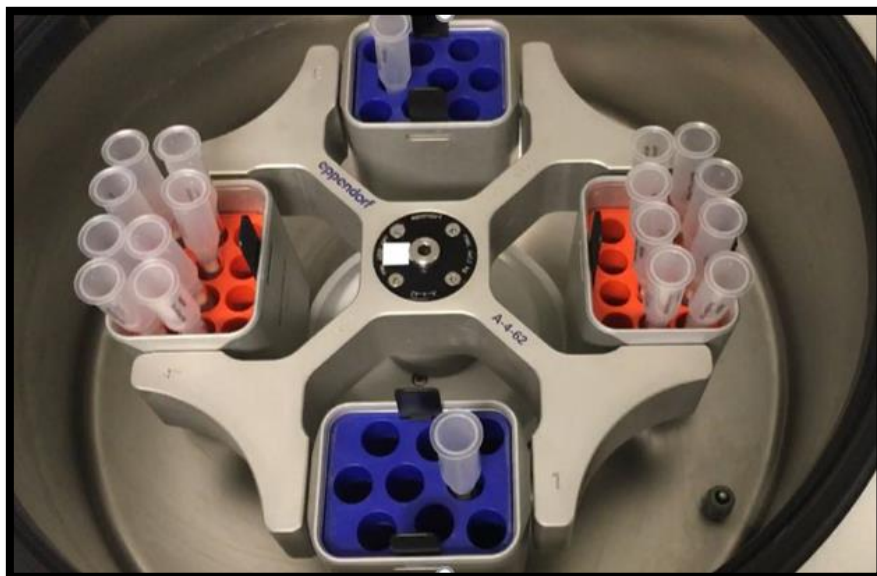
3.3.4 Obrada uzoraka

Nakon kondicioniranja SPE materijala na kolone se nasloje uzorci. Daljnjim se fazama ispiranja uklanjaju neželjeni sastojci matriksa. Na kraju se analit od interesa eluira sa kolone čija je upotreba jednokratna. Protok otapala kroz stacionarnu fazu SPE obično je potpomognut primjenom blagog vakuuma ili centrifugalnim silama. Prilikom izrade rada izvodilo se centrifugiranje na *Eppendorf 5810R centrifugi*. Nedostatak SPE metode je da je to ručna metoda (Seger i Griesmacher, 2007).

Protokol:

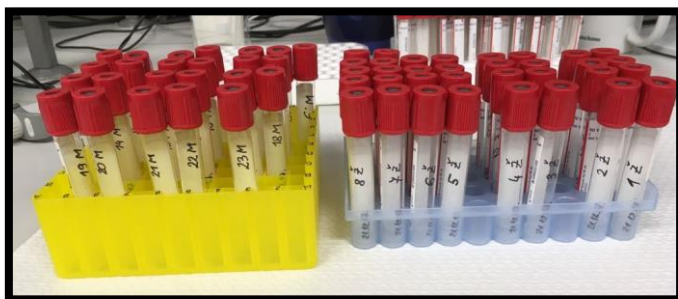
Potrebno vratiti pH zakiseljenih uzoraka plazme s otopinom amonijaka (reagens 14) : 125 μL u standarde, a 100 μL u uzorke, te vorteksira. Potom se uzorci plazme iz eppendorfica nasloje na kolone. Zatim slijedi daljnje centrifugiranje kolona 2 do 3 minute na 1000 rpm. Ako uzorak ne prolazi kroz stacionarnu fazu kolone potrebno je ponoviti centrifugiranje. Ukoliko se situacija ne promijeni, uzorak se centrifugira na više okretaja (2000 rpm, 3min). Obzirom da uzorak prolazi kroz priređenu kolonu natopljenu otapalima, SAM i SAH kao cis diolni analiti, te interni standardi, pri pH 7-8 vežu se za stacionarnu fazu kolone.

Kako bi se uklonili neželjeni sastojci matriksa odnosno nečistoće topljive u vodi, slijedi ispiranje sa 1 mL amonijevog acetata (reagens 3.) te centrifugiranje tijekom 1 minute na 1000 rpm. Zatim se postupak ispiranja ponovi, te odbaci otpad iz epruveta za otpad (slika 7).



Slika 7: Eppendorf 5810R centrifuga, ispiranje kolona i sakupljanje otpada u epruvete za otpad (Anamarija Bogić)

Nakon ispiranja i pročišćavanja uzoraka slijedi eluiranje SAM-a i SAH-a, te internih standarda s kolone u nove epruvete (BD Vacutainer Systems, Plymouth, UK). Eluranje se provodi dodatkom 500 μ L mravlje kiseline (reagens 2.), te centrifugiranjem na 1000 rpm tijekom 1 minute (slika 8). Uzorci su na -20 $^{\circ}$ C stabilni najmanje 6 mjeseci, jer elucija mravljom kiselinom (pH 2-3) stabilizira SAM i SAH (Kirsch i sur., 2009; Gellekink i sur., 2005). Ako se nastavlja s analizom, uzorci se prenesu u staklene HPLC vialice te potom injektiraju u UPLC-MS/MS (slika 9).



Slika 8: Prikupljeni uzorci nakon SPE, neposredno prije pohranjivanja na -20 $^{\circ}$ C / injektiranja u UPLC-MS/MS (Anamarija Bogić)



Slika 9: HPLC staklene vialice (preuzeto s <https://www.indiamart.com/proddetail/hplc-vials-7616795988.html>)

3.4 Tekućinska kromatografija i masena spektrometrija

3.4.1 Tekućinska kromatografija (engl. liquid chromatography, LC)

Tekućinska kromatografija je višenamjenska metoda razdvajanja molekula, koja je za razliku od ostalih metoda razdvajanja pogodna za razdvajanje termički nestabilnih molekula, poput analita od interesa u ovom radu. U većini kliničkih laboratorija pretežno nalazimo tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti (engl. High Performance Liquid Chromatography, HPLC). Razvoj ove kromatografske tehnike potaknut je brojnim istraživanjima u područjima proteomike, metabolomike, toksikologije, biofarmaceutskih lijekova, te u neonatalnoj dijagnostici (posebno ukoliko je vezana na spektrometar masa), a služi za razdvajanje više različitih molekula kao što su proteini, peptidi, polimeri, te manje farmaceutske molekule (Cindrić i sur., 2009).

Analiti se razdvajaju mijenjanjem udjela vode ili pufera pomiješanih s organskim otapalom. Kao organsko otapalo najčešće se koriste metanol ili acetonitril. Uzorak se nanosi na kolonu punjenu stacionarnom fazom te uz pomoć mobilne faze putuje kroz kolonu pod visokim tlakom. Samo razdvajanje nastupa na način da tvari iz otopina različito stupaju u interakciju s nepokretnom i pokretnom tekućom fazom. Različita interakcija sa fazama proizlazi iz razlika u veličini tvari, ionskoj izmjeni, adsorpciji ili razdiobi između faza. Posljedično analiti imaju različita vremena zadržavanja na kromatografskoj koloni. Odnosno analiti se eluiraju sa kromatografske kolone različitom brzinom i izlaze kao jedan po jedan vršak, te se potom detektiraju pogodnom tehnikom detekcije (Cindrić i sur., 2009).

Odabir HPLC metode, koja koristi polarna organska otapala i hlapljive pufere neometano omogućuje jednostavno povezivanje sa spektrometrom masa kao detektorom. Moguće je i povezivanje HPLC-a sa dvojnou spektrometrijom masa (engl. *tandem mass spectrometry*, MS/MS) (skraćeno HPLC-MS/MS) (Cindrić i sur., 2009).

Spajanje HPLC i MS osim analize termički nestabilnih analita omogućuje i analizu analita uz bolju specifičnost, na način da se analit od interesa prije MS analize ukoncentrira i razdvoji od ostalih komponenti u originalnom uzorku. Kako bi se izbjeglo taloženje soli u masenom spektrometru često korišteni hlapljivi puferi (natrijevi i kalijeve fosfatni puferi) zamijenjeni su amonijevim formijatom ili acetatima (Seger i Griesmacher, 2007; Chace i Kalas, 2005).

3.4.2 Masena spektrometrija (MS)

Masena spektrometrija odjeljuje komponente smjese i detektira nabijene čestice na temelju omjera mase i naboja (m/z). Osnova svakog spektrometra mase je utjecaj elektromagneta (magnetskog polja) na kretanje nabijene čestice kroz medij, te različito skretanje molekule u magnetskom polju ovisno o omjeru mase i naboja.

Spektrometrija masa se sastoji od 3 dijela. Prvi je izvor gdje uzorke ioniziramo, odnosno prevodimo u plinovito i nabijeno stanje, zatim analizator gdje se molekule razdvajaju prema omjeru mase i naboja, te posljednji detektor gdje se određuje količina analita (molekularnih iona) za svaki omjer mase i naboja (Chace i Kalas, 2005).

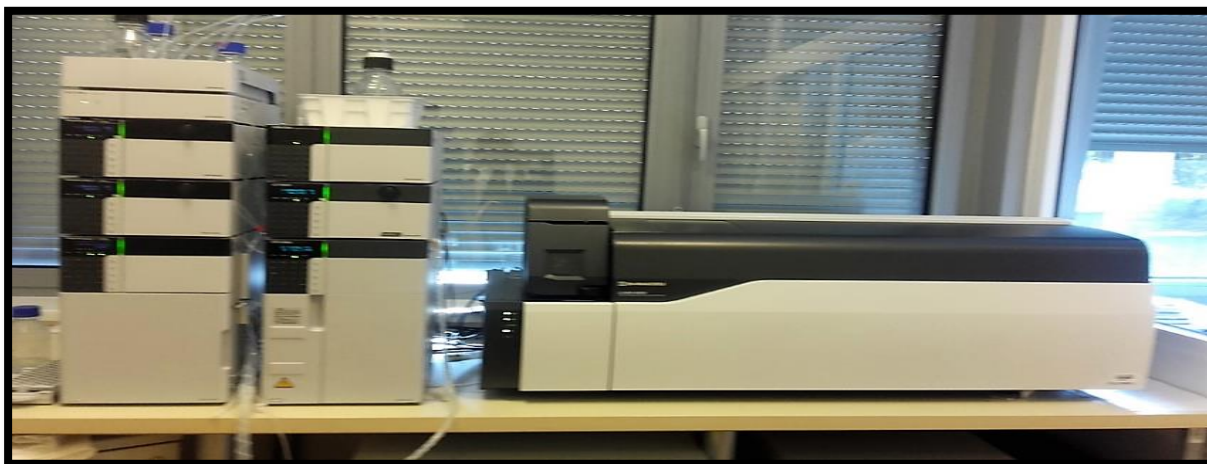
Ovisno o vrstama analiza, bilo da se radi o kvalitativnoj, kvantitativnoj ili strukturnoj analizi kompleksnih smjesa odabiru se izvor iona, analizator ili kombinacija više analizatora (tandemska spektrometrija masa), te detektor iona. Da bi se pojednostavila kvantitativna analiza i određivanje strukture analita razvili su se različiti pretraživači baza podataka i programske aplikacije (Cindrić i sur., 2009).

Danas se najčešće koriste dva oblika ionizacije MALDI (matriksom pomognuta ionizacija uz desorpciju laserskim zračenjem) i ESI (elektrosprej ionizacija). Metoda ionizacije mora istovremeno naš uzorak prevesti iz tekućeg ili krutog stanja u plinovito, te ga učiniti nabijenim. Odnosno u izvoru se stvara molekularni (prekursorski) ioni zbog mogućnosti analize samo molekula koje se nalaze u ionskom obliku (Chace i Kalas, 2005).

U analizatoru se ioni pod vanjskim utjecajem (električnog ili magnetskog polja) različito ubrzavaju i skreću (osim kod TOF analizatora koji razdvaja molekule prema brzini kretanja), te razdvajaju ovisno o specifičnom omjeru mase i naboja. Na detektoru se mjeri količina molekularnih iona za svaki omjer mase i naboja. Detektor pojačava ionske impulse iona dospjelih iz analizatora i pretvara ih u električni signal. Rezultat je graf (maseni spektar), koji predstavlja funkciju zbroja svih iona dobivenih u jedinici vremena, što je grafički vidljivo kao ovisnost m/z vrijednosti o intenzitetu signala (Chace i Kalas, 2005; Ho i sur., 2003; Hoffmann, 1996).

3.5 UPLC-MS/MS vezani sustav

Prilikom izrade diplomskog rada za kvantifikaciju SAM-a i SAH-a koristio se UPLC-MS/MS vezani sustav (slika 10).



Slika 10: UPLC-MS/MS, Shimadzu Nexera 8050 (Iva Bilandžija)

Nakon pročišćavanja uzoraka pomoću kolona za ekstrakciju čvrsto-tekuće uzorci su injektirani u UPLC-MS/MS. Koncentracije SAM-a i SAH-a određivane su modificiranom metodom Gellekink i sur. (Stable-Isotope Dilution Liquid Chromatography - Electrospray Injection Tandem Mass Spectrometry Method for Fast, Selective Measurement of S-Adenosylmethionine and S-Adenosylhomocysteine in Plasma). Kao metoda ionizacije koristila se elektrosprej ionizacija, a kao analizator trostruki kvadrupol spektrometar masa (2 kvadrupola filtera masa povezana kolizijskom ćelijom).

3.5.1 Tekućinska kromatografija ultra visoke djelotvornosti (engl. Ultra performance liquid chromatography, UPLC)

UPLC je tekućinska kromatografija ultra visoke djelotvornosti, što se odnosi na poboljšanu brzinu, rezoluciju i osjetljivost. Odnosno dizajnirane su kolone s manjim unutarnjim promjerima napunjene materijalima sa česticama manje veličine ($1,8\ \mu\text{m}$), na koje se djeluje većim brzinama protoka i višim temperaturama. Međutim, razdvajanje i kvantifikacija pod vrlo visokim tlakom zahtjeva bolji dizajn pumpe (strojne opreme) kako bi se smanjio pozadinski tlak na kolonu. U usporedbi s HPLC-om, pod višim tlakom nisu opaženi negativni utjecaji na kromatografsku kolonu, smanjena je potrošnja otapala i skraćeno vrijeme analize (Taleuzzaman i sur., 2015; Seger i Griesmacher, 2007).

3.5.2 Elektrosprej ionizacija (engl. *Electrospray Ionization, ESI*)

Tekućinski kromatograf i spektrometar masa povezani su međuspojemkoji ima višestruku ulogu: otparavanje tekućine, ionizaciju neutralnih molekula i uvođenje analita u analizator. Ionizacija neutralnih molekula moguća je elektrosprej ionizacijom koja je jedan od najzastupljenijih načina ionizacije u vezanom sustavu LC-MS, a korištena je i prilikom izrade ovog rada. Razdvajanjem molekula na LC koloni povećava se razlučivanje, a obzirom da eluirani vršak izlazi u tekućem stanju s kolone, ESI je vrlo prikladna metoda ionizacije upravo zbog mogućnosti ionizacije analita (stvaranja iona) iz tekućine (Ho i sur., 2003).

Ionizacija može biti pozitivna i negativna ovisno o naponu na kapilari i kolektorskoj elektrodi, a događa se pri atmosferskom tlaku. Optimalna temperatura ionizacije je iznad 100 °C i događa se u struji dušika. Ionizacija se odvija na način da se analit i tekuća pokretna faza uvode u ionizator kroz kapilaru (špricu ili iglu), koja je ujedno i elektroda pod visokim naponom (slika 11) (Ho i sur., 2003).

Na vrhu kapilare se formira maglica sastavljena od niza kapljica otapala i molekula od interesa koje su nabijene zbog napona na kapilari. Istovremeno s protokom otopine kroz kapilaru dovodi se i toplina (suhi zrak) te dolazi do isparavanja otapala. S obzirom da su molekule nabijene dolazi do njihovog elektrostatskog odbijanja, a istovremeno se kapljice uslijed isparavanja otapala smanjuju.

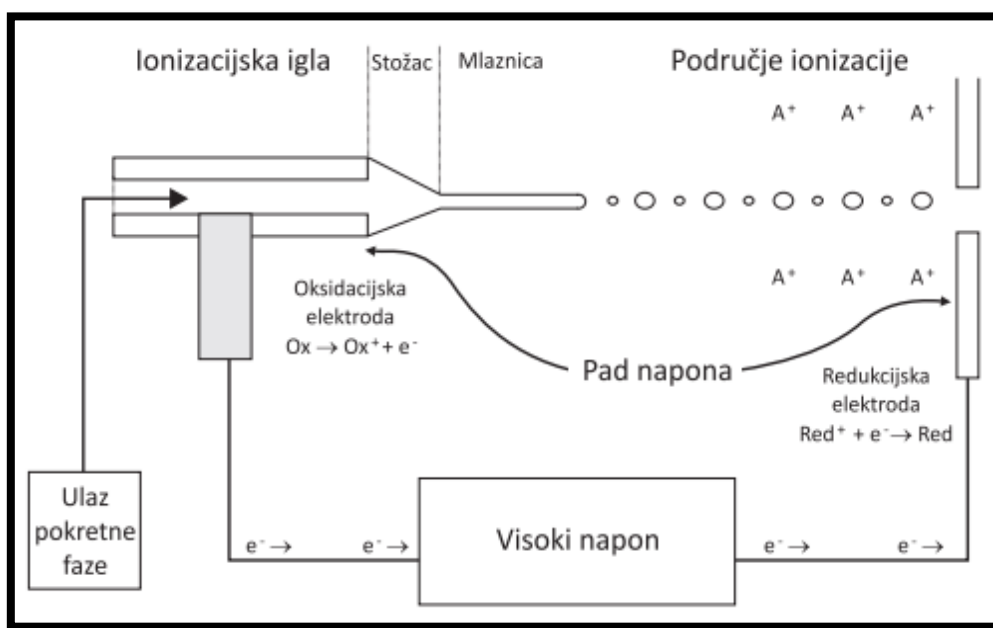
Kako otapalo otparava pod utjecajem temperature, električnog potencijala i struje dušika, ioni unutar otapala dolaze na površinu, a kapljice se smanjuju i postaju nestabilnije. Nakon što se dovoljno smanje i više se iona pojavi na površini kapljica, sile kulonskog odbijanja postaju veće, molekule se sve više međusobno odbijaju te se kapljice otpare ili razbiju na manje kapljice. Posljedično nastaje sprej (raspršenje) nabijenih tekućih kapljica.

Kolektorska elektroda privlači nabijene kapljice i daje im dodatno ubrzanje. U konačnici se kapljice rasprše toliko da je moguće dobiti izbačene čiste ione. Dodatci mobilnoj fazi, kao što su hlapljive organske kiseline i soli (trikloroctena kiselina, mravlja kiselina, octena kiselina i njihove amonijeve soli) olakšavaju proces ionizacije prinosom iona.

Nakon što su molekule ionizirane i prevedene u plinovito stanje, ioni se prenose u vakuum uređaja za MS, te ih analizator masa privlači. Moglo bi se reći da odabir analita započinje već u ionskom izvoru, jer su parametri strojne podrške (temperatura izvora, potencijal za

razdvajanje) usklađeni tako da je maksimalno povećana relativna količina iona željenog analita (Seger i Griesmacher, 2007). Modificirani uvjeti ESI za UPLC-MS/MS (Shimadzu Nexera 8050) analizator u odnosu na preuzetu metodu Gellekink i sur. su: radni protok plina od 3 L/min, protok plina zagrijavanja od 10 L/min, protok plina isušivanja od 10 L/min, te optimalna temperatura ionizacije od 400 °C, temperatura međuspoja od 300 °C i temperatura isparavanja od 250 °C.

Za ESI možemo koristiti različite vrste detektora, te za razliku od MALDI ima veću točnost. Rezultat ionizacije je stvaranje višestruko nabijenih iona što proširuje raspon masenog spektrometra i omogućuje analizu makromolekula, ali i zahtijeva složeniju interpretaciju. Općenito, ionizacijske tehnike s atmosferskim tlakom poput ESI pripadaju u blage ionizacijske tehnike koje stvaraju spektre sa slabom fragmentacijom, te se zato moraju koristiti višefazni ionski analizatori, tandemski spektrometri masa (QQQ, QQ-TOF ili ionske stupice) (Seger i Griesmacher, 2007). ESI je također zbog svoje blage ionizacije prikladna za proučavanje nekovalentnih protein-ligand, protein-protein ili protein-ligand-inhibitor interakcija.



Slika 11: Ionizacija analita metodom ESI (preuzeto iz literaturnog navoda Cindrić i sur., 2009)

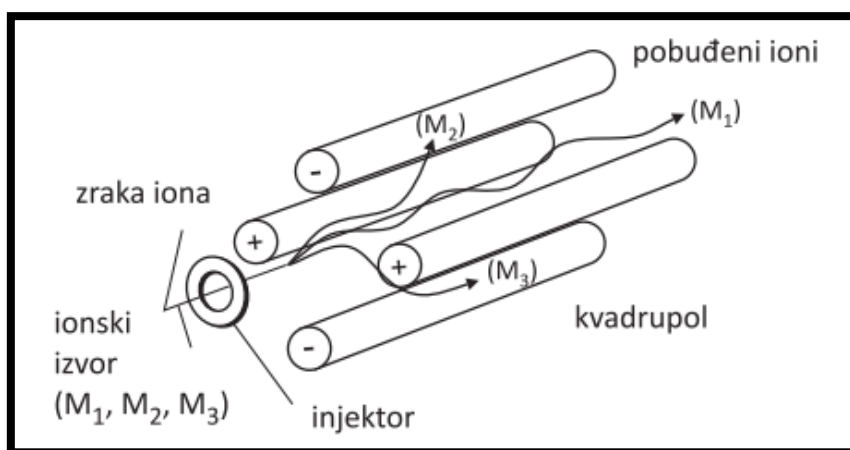
3.5.3 Kvadrupol filter masa

Nakon ionizacije, slijedi kretanje iona u masenom analizatoru pod visokim vakuumom pri čemu se razdvajaju ioni na osnovu omjera mase i naboja (m/z). Od analizatora razlikujemo TOF (Time of Flight) analizator, kvadrupol filter masa, magnetni filter masa, ionsku klopku (ion trap), te orbitalnu klopku (orbitrap). Prilikom izrade ovog rada koristio se trostruki kvadrupol filter masa kao analizator, koji se sastoji od dva kvadrupola i kolizijske ćelije.

Kvadrupol filter masa je uz TOF jedan od najzastupljenijih analizatora, a sastoji se od 4 elektrode koje su električki povezane (slika 12). Dvije elektrode su pozitivno nabijene, a druge dvije negativno. Dodatno su parovi elektroda povezani s radiofrekvencijskim potencijalom izmjenične struje. Ioni koji ulaze u analizator imaju različite omjere m/z , a u ovisnosti o struji i električnom polju mogu zadržati stabilnu putanju i proći analizator ili dotaknuti elektrode i postati neutralne molekule (Ho i sur., 2003).

Manipulacijama u analizatoru (električnim poljem) te mijenjanjem frekvencije između dvije suprotne elektrode moguće je skretati i filtrirati određene mase, tj. odučiti koji će se omjeri mase i naboja propustiti kroz analizator i dolaziti na detektor. Odnosno svi ioni koji nisu rezonantni odabranoj frekvenciji skreću u jednu od elektroda, a ioni koji su rezonantni i kojima odgovara frekvencija prolaze dalje do detektora. Kvadrupol detektor selektira i određuje jednu po jednu masu. Selektirani molekularni ioni mogu se podvrgnuti fragmentaciji u drugom spektrometru masa i proizvesti fragmentirane ione, a na taj način se poboljšava osjetljivost i specifičnost analize (Dasgupta i sur., 2014; Cindrić i sur., 2009).

Ovisno o formatu analizatora mogu se analizirati kationi ili anioni, tada govorimo o pozitivom ili negativnom modu. Zraka iona se pretvara fotomultiplikatorom u električni signal koji je pojačan 10^6 puta i omogućava izrazito osjetljivu detekciju. Dolaskom iona na detektor dobiva se signal koji se uz odgovarajući omjer mase i naboja prikazuje u obliku spektra masa. 100%-tni signal predstavlja omjer mase i naboja kojeg poprima najveći broj čestica, u odnosu na udio preostalih iona (Chace i sur., 2003; Ho i sur., 2003). Spektar masa je zapravo grafički prikaz relativnog broja nabijenih čestica s određenim omjerom mase i naboja. Spektar se snima nekoliko puta kako bi se dobio prosjek i što točnije snimke (Ho i sur., 2003).

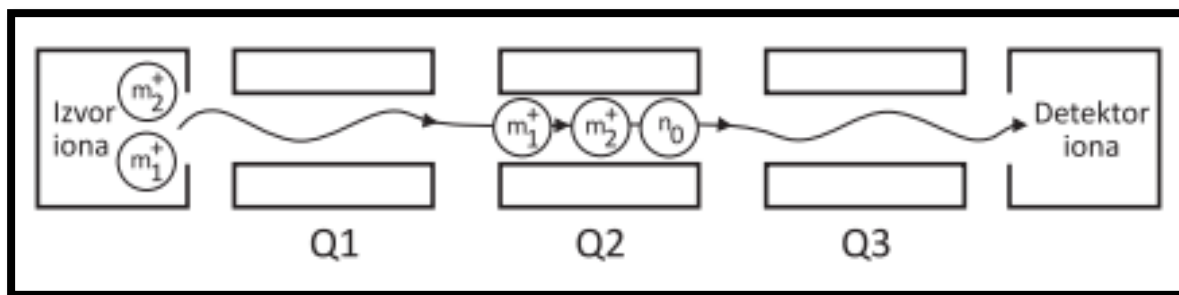


Slika 12: Kvadrupol filter masa (preuzeto iz literaturnog navoda Cindrić i sur., 2009)

3.5.4 Tandemska spektrometrija masa (LC-MS/MS)

Određivanje analita pomoću tandem spektrometrije masa visoko je selektivno i osjetljivo. Omogućava istodobno brzu analizu i detekciju većeg broja molekula od interesa ukompleksnom biološkom uzorku. Rutinski je LC-MS/MS metodom moguće odrediti femtomolarne koncentracije analita. Takva osjetljivost, uz izostanak križnih reakcija (s bilo kojim drugim strukturno srodnim ili nesrodnim analitima) čini glavne prednosti LC-MS/MS metode u odnosu na imunokemijske metode s kojima konkuriraju. Međutim maseni spektrometar jedna je od najskuplje analitičke opreme za rutinsku analizu u kliničkim laboratorijima. Uz visoku cijenu, iziskuju i visoku educiranost i vještine laboratorijskih djelatnika (Seger i Griesmacher, 2007).

Tandemska spektrometrija masa omogućuje dodatnu analizu iona, na način da se izazove namjerna dodatna fragmentacija iona i unaprijedi razdvajanje ili se pak može kvalitetnije odrediti struktura analiziranog iona spajanjem fragmenata. Tada su u analizatoru prisutni prekursorski ioni (intaktne molekule), fragmentni ioni, izotopni ioni, te pozadinski ioni. Ova metoda koristi dvojne masene spektrometre (od kuda dolazi naziv tandem masena spektrometrija) kao vrlo snažan detekcijski sustav. Trostruki kvadrupol spektrometar masa (engl. *triple quadrupol*, QQQ) sadrži dva serijski povezana masena analizatora razdvojena kolizijskom ćelijom čiji razmještaj omogućuje kontroliranu fragmentaciju iona (slika 13) (Cindrić i sur., 2009; Seger i Griesmacher, 2007).



Slika 13: Trostruki kvadrupol (preuzeto iz literaturnog navoda Cindrić i sur., 2009)

Prilikom izrade diplomskog rada analiza na trostrukim kvadrupol masenim analizatorima izvodila se uz upotrebu MRM način rada (engl. *Multiple Reaction Monitoring*). Optimalni uvjeti MRM dobiveni su u pozitivnom načinu elektrosprej ionizacije.

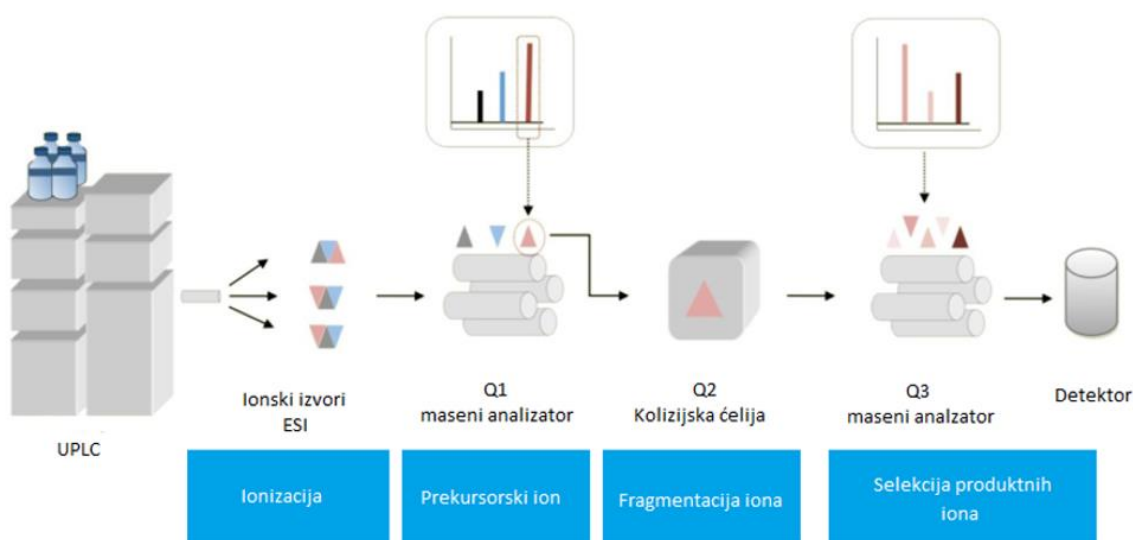
Unutar prvog kvadrupola filtera masa (Q1) ciljano se odabiru primarni molekularni / prekursorski ioni definiranih omjera mase i naboja (m/z) karakterističnih za SAM i SAH, te potom odlaze prema drugom kvadrupolu (Q2) koji je kolizijska ćelija. Unutar kolizijske ćelije izabrani ioni kolidiraju tj. sudaraju se s molekulama inertnog plina i fragmentiraju u produktne ione. Potom dolaze do trećeg kvadrupola (Q3) gdje će biti ponovno selektirani na temelju m/z . U konačnici produktni ioni dolaze na detektor gdje se detektiraju i kvantificiraju te se snima maseni spektar. Potom softver analizira spektar, tj. uspoređuje sve mase s onima koje se nalaze u bazi (Seger i Griesmacher, 2007; Ho i sur., 2003).

Na temelju očekivanih vrijednosti m/z prekursorskih i produktnih iona SAM-a, SAH-a te njihovih internih standarda, odnosno njihovih karakterističnih masenih prijelaza (prikazanih u tablici 2) omogućena je njihova identifikacija. Maseni prijelazi su prilagođeni za UPLC - MS/MS (Shimadzu Nexera 8050) u odnosu na preuzetu metodu Gellekink i sur. (Stable-Isotope Dilution Liquid Chromatography - Electrospray Injection Tandem Mass Spectrometry Method for Fast, Selective Measurement of S-Adenosylmethionine and S-Adenosylhomocysteine in Plasma).

Tablica 2: Karakteristični maseni prijelazi, kolizijske energije te Q1 i Q3 naponi za SAM, SAH i njihove interne standarde

Imena komponenti	Prekursor (m/z)	Produkt (m/z)	Q1 napon (V)	Kolizijska energija (eV)	Q3 napon (V)
SAM (+)	399.00	250.15	-20	-17	-19
SAM (+)	399.00	136.10	-20	-27	-29
SAH (+)	384.80	134.00	-28	-21	-29
SAH (+)	385.10	136.05	-19	-20	-15
SAM-d3 (+)	402.00	136.10	-20	-29	-15
SAM-d3 (+)	402.00	250.10	-16	-18	-20
SAH-d3 (+)	390.05	136.05	-15	-19	-27

Zaključno, LC-ESI-QQQ-MS (slika 14) označava razdvajanje komponenti uzorka na vrške pomoću tekućinske kromatografije nakon koje komponente odlaze na elektrosprej ionizaciju, pri čemu se pod visokim naponom i uz isparavanje tekućine prevode u ionizirano i plinovito stanje. Zatim se ioni analita određenog m/z selektiraju u prvom kvadrupolu filtera masa, te svaka selektirana masa odlazi na fragmentaciju u produktne ione pod utjecajem inertnog plina kolizijske ćelije. Potom se karakteristični fragmentirani produktni ioni ponovno selektiraju kvadrupol filterom masa i odlaze prema detektoru.



Slika 14: Shematski prikaz LC-ESI-MS/MS tandemskog spektrometra masa povezanog sa sustavom tekućinske kromatografije (preuzeto i prilagođeno s www.creativeproteomics.com)

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1 REZULTATI

Dobivene vrijednosti ispitivanih referentnih osoba za svaki od pojedinih analita SAM, SAH, kao i njihov omjer dobiven izračunom, prikazani su tablično. Kvantitativne vrijednosti prikazane su kroz aritmetičke sredine (srednje vrijednosti) i standardne devijacije, medijane i percentile. U ovom radu je sudjelovalo 50 naizgled zdravih osoba Kliničke bolnice Zagreb, u svrhu verifikacije referentnih intervala. Žene dobi 21-59 godina, te prosječne dobi od 45 godina (N = 32, tj. 64 %) i muškarci dobi 42-73 godina, te prosječne dobi od 57 godina (N = 18, tj. 36 %). Kako bi se provjerile referentne vrijednosti SAM-a, SAH-a i SAM/SAH omjera, odredile su se koncentracije SAM-a i SAH-a u odgovarajuće pripremljenim uzorcima plazme, koristeći se UPLC tandemskim spektrometrom masa, UPLC Nexera-MS8050 (*Shimadzu*).

Upotrebom internih standarda obilježenih stabilnim izotopima u tandemskoj spektrometriji masa omogućena je kvantifikacija analita od interesa. Interni standardi kemijskom strukturom približno odgovaraju analitima, odnosno od analita se razlikuju u masi za nekoliko jedinica (daltona). Budući da ostvaruju gotovo jednaka fizikalno-kemijska svojstva očekuje se da su njihova retencijska vremena i intenziteti masenih spektara usporedivi sa analitima (Guiraud i sur., 2017).

Prilikom kvantifikacije analita dobiveni rezultat je vidljiv kao ovisnost signala svakog pojedinog analita u odnosu na retencijsko vrijeme. Retencijsko vrijeme označava vrijeme koje je potrebno svakom specifično selektiranom ionu za dolazak do detektora. Odnosno, obzirom da su ioni analita sa karakterističnim masenim prijelazima selektirani u Q3 kvadrupol analizatoru putem pozitivnog MRM moda, svaki omjer mase i naboja napuštanjem analizatora dolazi do potpunog vakuuma, pri čemu ioni s različitim m/z različito padaju na detektor. Potom detektor bilježi signal u ovisnosti o retencijskom vremenu koji je vidljiv u obliku vrška. Kvantifikacija (određivanje koncentracije) analita od interesa se ostvaruje na temelju omjera površina signala analita i internog standarda korištenjem kalibracijske krivulje (Kirsch i sur., 2009; Gellekink i sur., 2005; Stabler i Allen, 2004; Struys i sur, 2000).

Pomoću LabSolution softvera tvrtke Shimadzu linearnom regresijom su napravljene kalibracijske krivulje na način da su se zadavale točke krivulje definiranih poznatih koncentracija. LabSolution softver prilikom izrade kalibracijske krivulje definira određenu

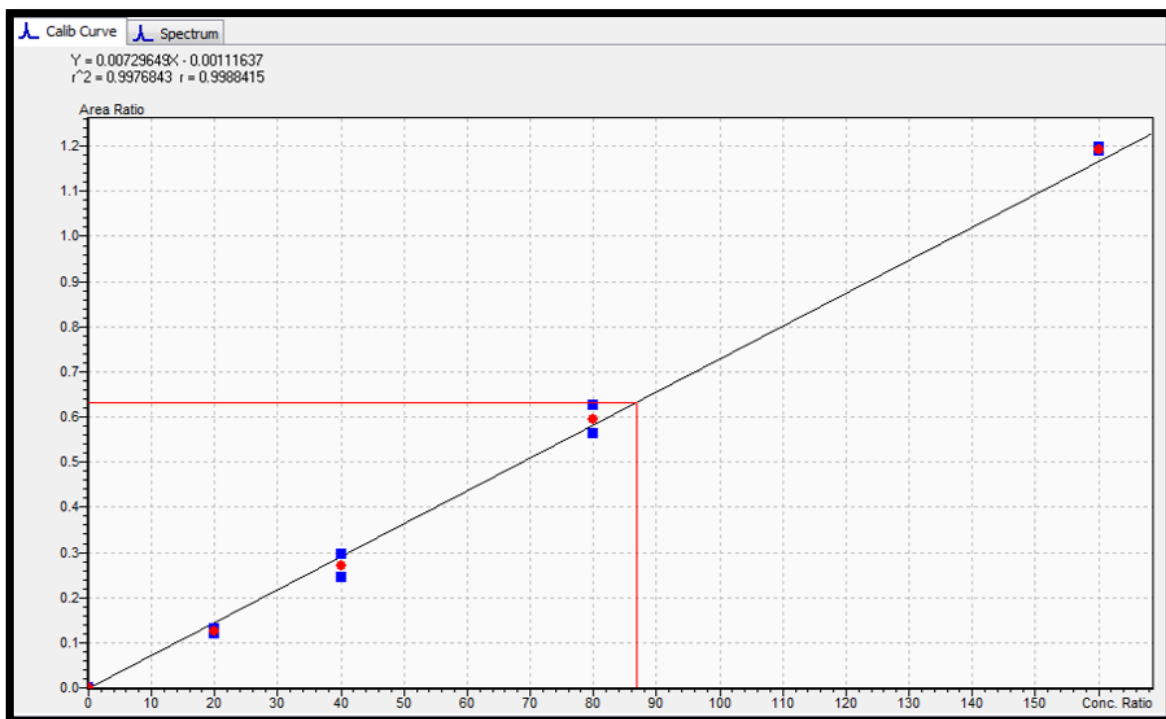
točnost, a u našem radu točnost se kretala između 92,9% i 114,7%. Potom softver automatski, korištenjem kalibracijske krivulje, omogućuje direktnu kvantifikaciju komponentni od interesa. Svaka površina signala analita uspoređuje se s odgovarajućim internim standardom, a osnovu kvantifikacije čini uspoređivanje omjera površina ispod vrška endogenih SAM-a i SAH-a s površinama internih standarda. Automatska obrada podataka je olakšana ukoliko nisu zabilježene smetnje drugih vrškova (Seger i Griesmacher, 2007).

Tablica 3: Prikaz retencijskog vremena standarda, površina vrška standarda i internih standarda (uz zadovoljavajuću relativnu standardnu devijaciju od 11%), te koncentracija standarda (nmol/L)

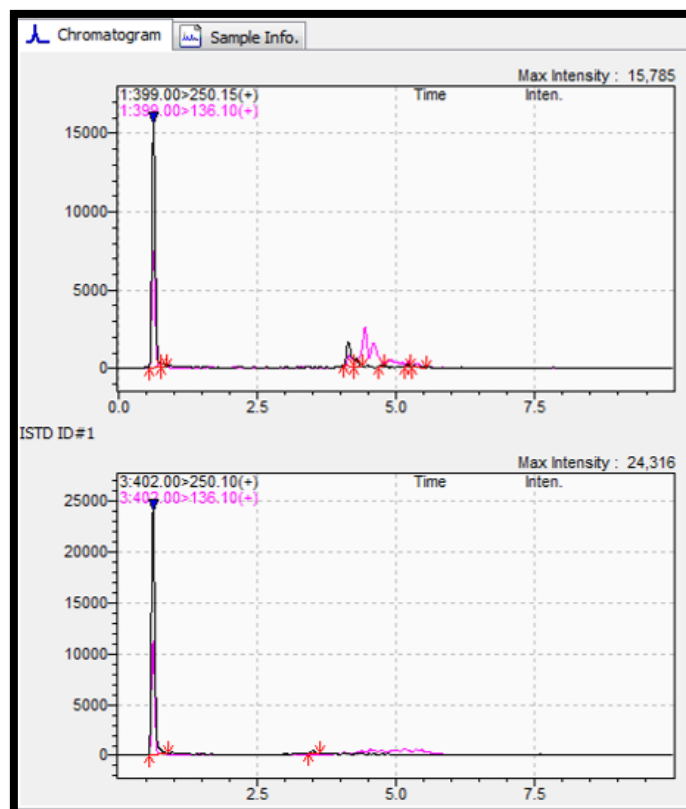
Standard/ kalibrator	Level	RV (min)	Površina vrška standarda	Površina vrška IS	Koncentracija (nmol/L)
ST5	1	1,562	23,445	23,445	1,000
ST5	1	1,533	22,025	22,025	1,000
ST4	2	1,510	28,740	28,740	1,000
ST4	2	1,542	21,155	21,155	1,000
ST3	3	1,532	27,466	27,466	1,000
ST3	3	1,533	22,213	22,213	1,000
ST2	4	1,537	23,672	23,672	1,000
ST2	4	1,532	24,564	24,564	1,000
ST1	5	1,530	20,873	20,873	1,000
ST1	5	1,534	21,767	21,767	1,000
Srednja vrijednost		1,534	23,592	23,592	1,000
% RSD		0,834912	11,260296	11,260296	0,00000

Name	Type	ISTD Group	m/z	Ret. Time	Conc.(1)	Conc.(2)	Conc.(3)	Conc.(4)	Conc.(5)	Event
SAM d3	ISTD	1	402.00>250.10	0.608	1	1	1	1	1	1:MRM(+)
SAM	Target	1	399.00>250.15	0.613	0	20	40	80	160	1:MRM(+)
SAH d3	ISTD	2	390.05>136.05	1.512	1	1	1	1	1	4:MRM(+)
SAH	Target	2	385.10>136.05	1.518	0	5	10	20	40	2:MRM(+)

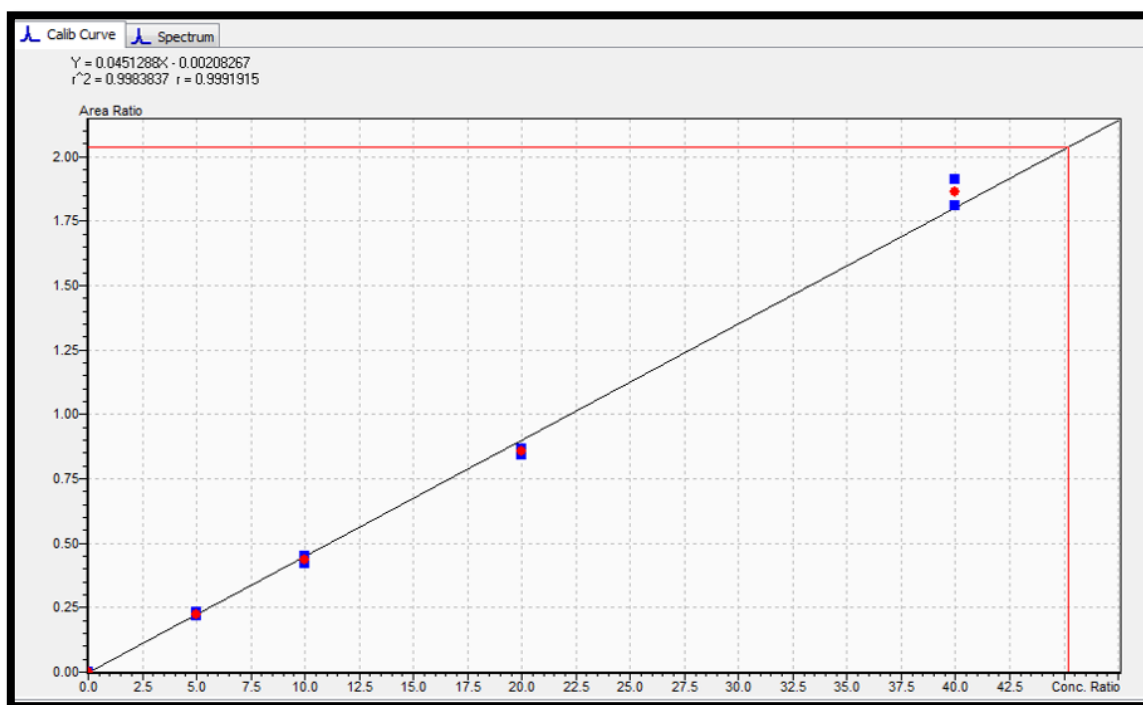
Slika 15: Prikaz masenih prijelaza, retencijskih vremena i koncentracija (nmol/L) SAM i SAH standarda (kalibratora)



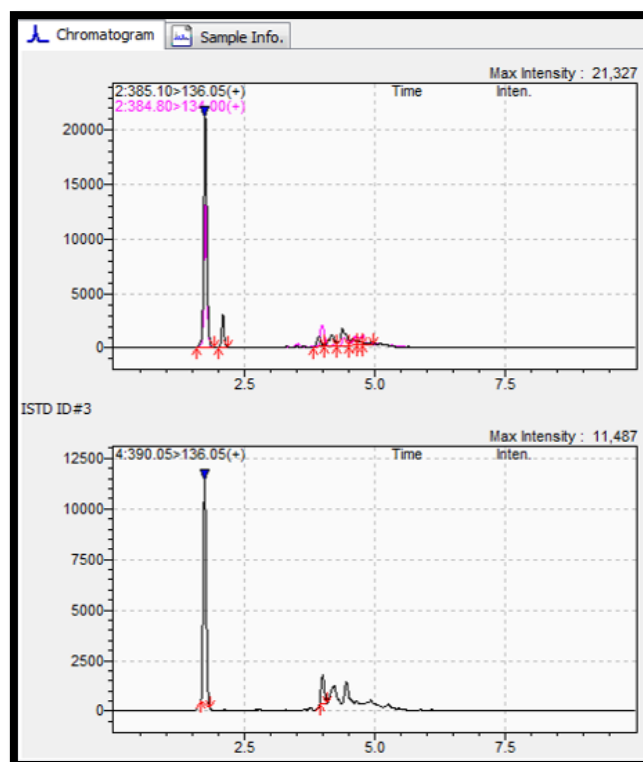
Slika 16: Prikaz kalibracijske krivulje za SAM.
 Kalibracijska krivulja za SAM: $Y = (0.00727016)X - 0.00120389$
 $R^2 = 0.997$, R označava koeficijent korelacije



Slika 17: Prikaz vrškova kalibratora (standarda) i internog standarda za SAM

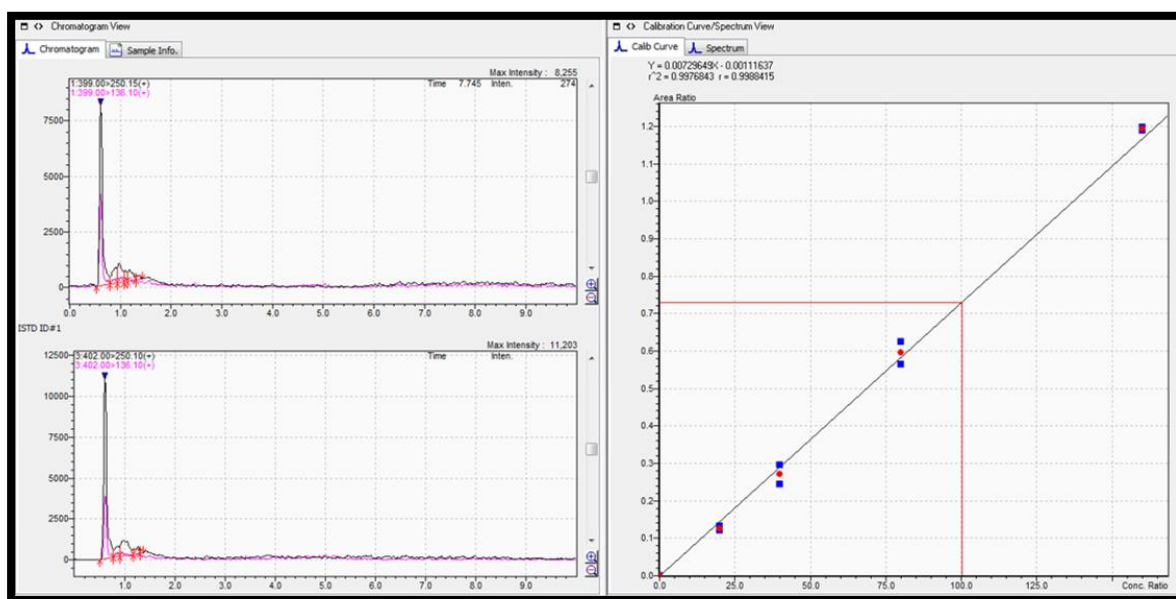


Slika 18: Prikaz kalibracijske krivulje za SAH.
 Kalibracijska krivulja za SAH: $Y = (0.0453300)X - 0.0009780$
 $R^2=0.997$, R označava koeficijent korelacije

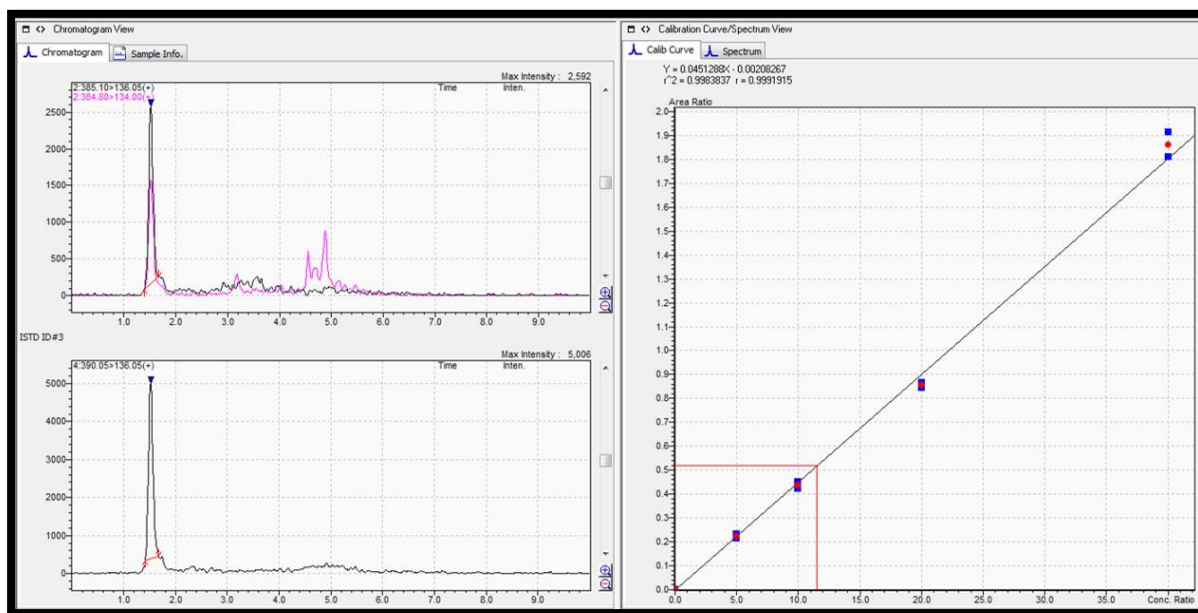


Slika 19: Prikaz vrškova kalibratora (standarda) i internog standarda za SAH

Zbog nedostupnosti komercijalnih kontrola, kao kontrolni uzorak u sklopu svake obrade uzoraka koristio se in-house uzorak poola plazme zdravih osoba.



Slika 20: Prikaz kvantifikacije SAM u nmol/L u uzorku kontrolne plazme nakon LC-ESI-MS/MS analize (Shimadzu HPLC Nexera povezan sa LCMS-8050)



Slika 21: Prikaz kvantifikacije SAH u nmol/L u uzorku kontrolne plazme nakon LC-ESI-MS/MS analize (Shimadzu HPLC Nexera povezan sa LCMS-8050)

U uzorku kontrolne plazme za SAM i SAH retencijska vremena iznosila su 1,514 i 0,614 min. Površine vrškova kontrolnog uzorka iznosile su 14,230 (SAM) i 33,827 (SAH), a površine internih standarda 27,517 i 46,314. Dobivene koncentracije SAM-a i SAH-a iznosile su 11,505 i 100,254 nmol/L.

Tablica 4: Prikaz retencijskih vremena (RV), površina vrška (SAM i odgovarajućeg internog standarda 2H3- SAM), te izračunatih koncentracija SAM-a u uzorcima plazme ispitivanih referentnih osoba ženskog spola.

UZORAK	RV	POVRŠINA	POVRŠINA IS	KONC (nmol/L)
UZORAK 1	0,758	77.707	284.514	40,29
UZORAK 2	0,661	194.815	431.371	65,69
UZORAK 3	0,785	295.928	614.519	69,95
UZORAK 4	0,783	203.922	544.342	54,74
UZORAK 5	0,732	214.239	436.759	71,23
UZORAK 6	0,688	222.729	567.584	57,27
UZORAK 7	0,76	361.963	661.276	79,32
UZORAK 8	0,623	168.336	542.316	45,6
UZORAK 9	0,857	187.563	551.249	49,85
UZORAK 10	0,711	248.106	422.221	85,05
UZORAK 11	0,664	197.122	491.263	58,53
UZORAK 12	0,688	172.628	464.741	54,29
UZORAK 13	0,601	269.947	692.219	56,92
UZORAK 14	0,748	192.005	481.961	58,12
UZORAK 15	0,82	210.184	495.761	61,72
UZORAK 16	0,582	145.839	414.415	51,46
UZORAK 17	0,726	182.989	499.013	53,57
UZORAK 18	0,588	184.889	515.071	52,47
UZORAK 19	0,732	182.437	430.452	61,7
UZORAK 20	0,786	166.498	388.645	62,36
UZORAK 21	0,742	184.015	470.928	56,99
UZORAK 22	0,704	155.356	346.581	65,18
UZORAK 23	0,915	177.245	318.992	80,47
UZORAK 24	0,814	165.533	330.479	72,68
UZORAK 25	0,593	224.162	459.319	70,85
UZORAK 26	0,716	130.123	415.076	45,99
UZORAK 27	0,831	241.833	720.785	49,13
UZORAK 28	0,692	198.724	433.386	66,65
UZORAK 29	0,773	209.074	831.895	37,14
UZORAK 30	0,893	203.194	603.931	49,26
UZORAK 31	0,934	244.452	538.477	66
UZORAK 32	0,714	427.977	779.248	79,56

Tablica 5: Kvantitativne vrijednosti (koncentracije) SAM u uzorcima plazme ispitivanih referentnih osoba ženskog spola prikazane su kroz aritmetičku sredinu (srednju vrijednost) i standardnu devijaciju, medijan i percentile.

SREDNJA VRIJEDNOST	SD	MEDIJAN	2.5 percentila	97.5 percentila
60,3	11,9	58,3	39,6	81,5

Tablica 6: Prikaz retencijskih vremena (RV), površina vrška (SAH i odgovarajućeg internog standarda 13C5-SAH), te izračunatih koncentracija SAH u uzorcima plazme ispitivanih referentnih osoba ženskog spola.

UZORAK	RV	POVRŠINA	POVRŠINA IS	KONC (nmol/L)
UZORAK 1	1,183	98.616	90.754	30,18
UZORAK 2	1,081	125.276	100.878	34,44
UZORAK 3	1,26	131.718	108.784	33,59
UZORAK 4	1,261	107.369	107.915	27,66
UZORAK 5	1,138	159.206	101.148	43,57
UZORAK 6	1,099	132.258	120.114	30,58
UZORAK 7	1,222	80.154	72.801	30,57
UZORAK 8	0,994	56.554	100.100	15,85
UZORAK 9	1,266	97.556	103.196	26,3
UZORAK 10	1,129	106.336	90.551	32,59
UZORAK 11	1,12	143.470	108.189	36,76
UZORAK 12	1,151	102.501	83.320	34,12
UZORAK 13	1,05	101.455	111.985	25,22
UZORAK 14	1,196	85.149	91.698	25,84
UZORAK 15	1,289	100.543	91.952	30,37
UZORAK 16	1,015	97.126	92.219	29,26
UZORAK 17	1,152	87.737	82.218	29,64
UZORAK 18	0,993	70.851	82.790	23,84
UZORAK 19	1,091	95.106	87.002	30,36
UZORAK 20	1,132	74.168	103.096	20,09
UZORAK 21	1,162	83.385	88.367	26,25
UZORAK 22	1,109	68.257	81.185	23,43
UZORAK 23	1,326	80.975	58.354	38,45
UZORAK 24	1,158	102.096	76.403	37,04
UZORAK 25	1,098	63.894	75.499	23,58
UZORAK 26	1,184	69.266	111.787	17,35
UZORAK 27	1,299	106.895	84.303	35,16
UZORAK 28	1,176	95.831	73.451	36,17
UZORAK 29	1,283	96.737	104.011	25,88
UZORAK 30	1,226	162.293	134.593	33,45

UZORAK 31	1,324	143.375	126.694	31,42
UZORAK 32	1,152	108.080	128.918	23,36

Tablica 7: Kvantitativne vrijednosti (koncentracije) SAH u uzorcima plazme ispitivanih referentnih osoba ženskog spola prikazane su kroz aritmetičku sredinu (srednju vrijednost) i standardnu devijaciju, medijan i percentile.

SREDNJA VRIJEDNOST	SD	MEDIJAN	2.5 percentila	97.5 percentila
29,4	6,2	30,3	17,0	39,6

Tablica 8: Prikaz retencijskih vremena (RV), površina vrška (SAMi odgovarajućeg internog standarda 2H3- SAM), te izračunatih koncentracija SAM u uzorcima plazme ispitivanih referentnih osoba muškog spola.

UZORAK	RV	POVRŠINA	POVRŠINA IS	KONC (nmol/L)
UZORAK 1	0,784	338.626	723.960	67,96
UZORAK 2	0,724	382.565	733.713	75,6
UZORAK 3	0,699	284.796	384.005	106,96
UZORAK 4	0,819	384.092	581.190	95,46
UZORAK 5	0,772	322.322	874.946	53,81
UZORAK 6	0,679	193.486	339.799	82,43
UZORAK 7	0,753	255.696	638.235	58,4
UZORAK 8	0,75	275.654	637.238	62,95
UZORAK 9	0,565	104.155	189.621	79,57
UZORAK 10	0,568	106.799	278.080	56,04
UZORAK 11	0,581	233.559	498.845	68,02
UZORAK 12	0,576	227.330	422.746	77,92
UZORAK 13	0,573	259.321	210.657	176,64
UZORAK 14	0,797	253.051	445.757	82,19
UZORAK 15	0,722	244.748	526.440	67,55
UZORAK 16	0,679	199.035	587.939	49,56
UZORAK 17	0,872	221.405	592.353	54,58
UZORAK 18	0,817	105.621	262.243	58,7

Tablica 9: Kvantitativne vrijednosti (koncentracije) SAMu uzorcima plazme ispitivanih referentnih osoba muškog spola prikazane su kroz aritmetičku sredinu (srednju vrijednost) i standardnu devijaciju, medijan i percentile.

SREDNJA VRIJEDNOST	SD	MEDIJAN	2.5 percentila	97.5 percentila
76,4	29,3	68,0	51,4	147,0

Tablica 10: Prikaz retencijskih vremena (RV), površina vrška (SAH i odgovarajućeg internog standarda 13C5-SAH), te izračunatih koncentracija SAH u uzorcima plazme ispitivanih referentnih osoba muškog spola.

UZORAK	RV	POVRŠINA	POVRŠINA IS	KONC (nmol/L)
UZORAK 1	1,219	101.669	107.943	26,2
UZORAK 2	1,171	109.962	132.266	23,17
UZORAK 3	1,114	207.674	107.915	53,19
UZORAK 4	1,3	162.182	112.371	39,98
UZORAK 5	1,338	128.128	98.333	36,12
UZORAK 6	1,095	115.426	65.262	48,92
UZORAK 7	1,179	88.380	74.657	32,85
UZORAK 8	1,191	115.661	110.522	29,08
UZORAK 9	1,589	36.808	29.190	34,97
UZORAK 10	1,584	114.901	85.283	37,34
UZORAK 11	1,587	137.382	107.050	35,58
UZORAK 12	1,588	136.934	80.859	46,85
UZORAK 13	1,583	163.776	50.166	90,01
UZORAK 14	1,132	94.889	110.944	23,82
UZORAK 15	1,21	101.299	61.121	45,86
UZORAK 16	1,129	121.924	91.071	37,11
UZORAK 17	1,259	81.803	75.328	30,16
UZORAK 18	1,284	73.922	51.630	39,66

Tablica 11: Kvantitativne vrijednosti (koncentracije) SAH u uzorcima plazme ispitivanih referentnih osoba muškog spola prikazane su kroz aritmetičku sredinu (srednju vrijednost) i standardnu devijaciju, medijan i percentile.

SREDNJA VRIJEDNOST	SD	MEDIJAN	2.5 percentila	97.5 percentila
39,5	15,2	36,6	23,4	74,4

Tablica 12: Prikaz kvantitativnih vrijednosti odnosno omjera SAM/SAH u uzorcima plazme ispitivanih referentnih osoba ženskog i muškog spola.

SAM/SAH	
žene	muškarci
N = 32	N = 18
1,3	2,6
1,9	3,3
2,1	2,0
2,0	2,4
1,6	1,5
1,9	1,7
2,6	1,8
2,9	2,2
1,9	2,3
2,6	1,5
1,6	1,9
1,6	1,7
2,3	2,0
2,2	3,5
2,0	1,5
1,8	1,3
1,8	1,8
2,2	1,5
2,0	
3,1	
2,2	
2,8	
2,1	
2,0	
3,0	
2,7	
1,4	
1,8	
1,4	
1,5	
2,1	
3,4	

Tablica 13: Kvantitativne vrijednosti odnosno omjeri SAM/SAH u uzorcima plazme ispitivanih referentnih osoba ženskog i muškog spola prikazane su kroz aritmetičku sredinu (srednju vrijednost) i standardnu devijaciju, medijan i percentile.

SPOL	SREDNJA VRIJEDNOST	SD	MEDIJAN	2.5 percentila	97.5 percentila
ŽENSKI	2,1	0,5	2,0	1,4	3,2
MUŠKI	2,0	0,6	1,9	1,4	3,4

U 50 odraslih volontera (žene N = 32, muškaraci N = 18) određene su koncentracije SAM-a i SAH-a te su prikazane kao srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija (SD). Srednja vrijednost $\pm$ SD za žene iznosila je: za SAM $60,3 \pm 11,9$ nmol/L, za SAH $29,4 \pm 6,2$ nmol/L, a za SAM/SAH omjer $2,1 \pm 0,5$. Srednja vrijednost $\pm$ SD za muškarce iznosila je: za SAM $76,4 \pm 29,3$ nmol/L, za SAH $39,5 \pm 15,2$ nmol/L, a za SAM/SAH omjer $2,0 \pm 0,6$.

Obzirom da je cilj istraživanja bila verifikacija referentnih intervala naše populacije, te da je najčešće upotrebljavani i preporučeni oblik referentnog intervala 95-postotni interval koji obuhvaća 95 % središnjih vrijednosti omeđenih 2,5. i 97,5. percentilom, u tablicama 5,7,9,11 i 13 prikazane su vrijednosti 2,5. i 97,5. percentila.

95-postotni referentni interval za žene iznosio je: za SAM 39,6 - 81,5 nmol/L, za SAH 17,0 - 39,6 nmol/L, a za SAM/SAH omjer 1,4 - 3,2. 95-postotni referentni interval za muškarce iznosio je: za SAM 51,4 - 147,0 nmol/L, za SAH 23,4 - 74,4 nmol/L, a za SAM/SAH omjer 1,4 - 3,4.

Prema preporukama struke, svaki je laboratorij dužan verificirati referentne intervale proizvođača korištenih testova kako bi provjerio jesu li prikladni za populaciju bolesnika koju pokriva određeni laboratorij. U laboratorijskoj praksi uglavnom se preuzimaju referentne vrijednosti i intervali od proizvođača korištenih reagensa ili iz literaturnih navoda. Obzirom da su u većini literaturnih navoda rezultati izraženi kao srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija, u točki 4.2 *Rasprava* će se takav način izražavanja rezultata koristiti za usporebu s ostalim studijama.

4.2 RASPRAVA

Kako bi se provjerile referentne vrijednosti SAM-a, SAH-a i SAM/SAH omjera, odredile su se koncentracije SAM-a i SAH-a korištenjem UPLC tandemskog spektrometra masa, UPLC Nexera-MS8050 (*Shimadzu*) na Odjelu za laboratorijsku dijagnostiku nasljednih metaboličkih bolesti i novorođenački probir KBC Zagreb. Metoda obuhvaća postupak ekstrakcije čvrsto-tekuće pomoću kolona sa fenilboronskom kiselinom koja omogućava reverzibilno kovalentno vezanje SAM-a, SAH-a i njihovih internih standarda, te pročišćavanje uzorka. Kromatografija ultra visoke djelotvornosti (UPLC) koristila se kako bi se postiglo učinkovito razdvajanje sličnih molekulskih masa SAM-a i SAH-a te ostvarila bolja specifičnost. Vezani sustav UPLC tandemski spektrometar masa osjetljiva je i specifična tehnologija detekcije s brzim vremenom analize, koja omogućava razdvajanje i istovremenu detekciju nanomolarnih koncentracija SAM-a i SAH-a u plazmi uz upotrebu internih standarda obilježenih stabilnim izotopima. Dakle, propuštanjem određenih omjera mase i naboja uz odgovarajuće retencijsko vrijeme UPLC tandemski spektrometar masa služi kao snažan analitički sustav za identifikaciju i kvantifikaciju metabolita metioninskog ciklusa (SAM-a i SAH-a).

Određivanje referentnog intervala za svaki analit u bilo kojem uzorku biološkog materijala važna je faza svakog laboratorijskog rada, iz razloga što utječu na pouzdanost tumačenja laboratorijskih rezultata pa tako i na njihovu korisnost i upotrebljivost u dijagnostici. Stoga je potrebno ili osigurati njihovu izradu za sve laboratorijske analite ili omogućiti provjeru prihvaćenih referentnih intervala. Određivanje referentnih vrijednosti i referentnih intervala opsežan je postupak koji se provodi na velikom broju zdravih ispitanika, što predstavlja vrlo dugotrajan i skup proces. Stoga se u laboratorijskoj praksi uglavnom preuzimaju referentne vrijednosti i intervali od proizvođača korištenih reagensa ili iz literaturnih navoda. Prema preporukama struke, svaki je laboratorij dužan verificirati referentne intervale proizvođača korištenih testova kako bi provjerio jesu li prikladni za populaciju bolesnika koju pokriva određeni laboratorij, što se u ovoj studiji i ispitalo, a dovoljno ih je provjeriti na 20 uzoraka zdravih ispitanika.

Tablice u poglavlju 4.1 *Rezultati* prikazuju kvantitativne vrijednosti prikazane kroz aritmetičke sredine (srednje vrijednosti) i standardne devijacije, medijane i percentile. Obzirom da su u većini literaturnih navoda rezultati izraženi kao srednja vrijednost $\pm$

standardna devijacija, takav način izražavanja rezultata koristio za usporebu s ostalim dostupnim literaturnim podacima.

Ispitivana referentna skupina odnosila se na 50 zdravih ispitanika, odrasle dobi. Istovremeno, uz ovo pilot istraživanje provodilo se određivanje koncentracija SAM-a i SAH-a te njihovog metilacijskog indeksa u populaciji novorođenčadi. Nađene su povišene vrijednosti sa trostruko povišenim koncentracijama SAM-a i SAH-a u odnosu na ispitivanu odraslu populaciju. Stoga se u budućnosti planira proširenje pilot istraživanja na veću djecu, pri čemu bi podjela referentnih intervala tada uključivala podjelu na novorođenčad, djecu i odrasle prema dobi, te odraslih osoba prema spolu.

Tijekom proteklih godina opisano je nekoliko HPLC metoda povezanih sa različitim detektorima, koje omogućavaju kvantifikaciju SAM-a i SAH-a. Metode uključuju detekciju putem fluorescencije (Hobbs i sur., 2005; Kerins i sur., 2001; Loehrer i sur., 1998), kulometrijsko elektrokemijsku detekciju (Melnik i sur., 2000), te detekciju tandemskim spektrometrom masa (Guiraud i sur., 2017; Alsayed i sur., 2013; Gardner i sur., 2013; Kirsch i sur., 2009; Gellekink i sur., 2005; Stabler i Allen, 2004; Struys i sur., 2000).

Tehnike fluorescencijske i elektrokemijske detekcije dizajnirane su za određivanje mikromolarnih koncentracija SAM-a i SAH-a u tjelesnim tekućinama, tkivima, eritrocitima i limfocitima. Zbog nedostne osjetljivosti i slabe reproducibilnosti ove metode nisu prikladne za pouzdanu kvantifikaciju nanomolarnih koncentracija SAM-a i SAH-a u plazmi. Također, nedostak spomenutih metoda uključuje duže vrijeme pripreme uzoraka (zbog potrebe za derivatizacijom metabolita i upotrebe anorganskih kemikalija kao što su fosfatni puferi i perklorna kiselina za deproteinizaciju uzorka, koji se u sljedećim koracima pripreme uzoraka moraju dodatnim postupcima ukloniti). Za razliku od navedenih metoda, prednosti LC-ESI-MS/MS metode su brže vrijeme analize, viša osjetljivost, koja se može pripisati visokoj selektivnosti, te korištenje internih standarda i MS-kompatibilnih pufera čime se smanjuje potencijalno suzbijanje ionskog djelovanja. SPE kolone omogućuju jednostavno pročišćavanje uzoraka uz eliminaciju potrebe za derivatizacijom metabolita. Iako interni standardi olakšavaju kvantifikaciju analita od interesa, nedostatak metode je upravo njihova visoka cijena i otežana dostupnost, te potreba za visokom educiranosti i vještinama laboratorijskih djelatnika prilikom upotrebe tandemskog spektrometra masa.

Razlike u koncentracijama između metoda mogu se objasniti varijacijama u predanalitičkim uvjetima (uzorkovanju, zakiseljavanju uzoraka), uvjetima skladištenja uzoraka i korištenim reagensima.

Nestabilan SAM se u netretiranim uzorcima djelomično degradira u SAH. Kako bi se spriječio proces razgradnje, Gellekink i sur. (od kojih je preuzeta i modificirana metoda prilikom izrade diplomskog rada) dokazali su učinkovitost pohrane uzoraka na -70 °C do analize uz prethodno zakiseljavanje uzoraka plazme s octenom kiselinom do pH 5,0 neposredno nakon uzorkovanja krvi i centrifugiranja, što ujedno objašnjava niske koncentracije SAM-a i visoke koncentracije SAH-a dobivene u prethodnim studijama.

Tablica 14 : Usporedba plazma koncentracija S-adenozilmetionina, S-adenozilhomocisteina i njihovog omjera (metilacijskog indeksa) sa ostalim metodama prikazanim u različitim literaturnim navodima

Broj ispitanika (n)	Dob (godine) i spol (%) ispitanika	Konc. SAM (nmol/L)	Konc. SAH (nmol/L)	MI (SAM/SAH)	Octena kiselina (da/ne)	Metoda detekcije	Literaturni navod
50	64% ženski, 21-59 god.	60,3 ± 11,9	29,4 ± 6,2	2,1 ± 0,5	da	LC-MS/MS	Diplomski rad
	36 % muški, 42-73 god.	76,4 ± 29,3	39,5 ± 15,2	2,0 ± 0,6			
26	69% ženski, srednja dob je 28.3 god.	94,5 ± 15,2	12,3 ± 3,7	8,5 ± 3,0	da	LC-MS/MS	(Gellekink i sur., 2005)
31	80% ženski, 20-55 god.	85,5 ± 11,1	13,3 ± 5,0	7,0 ± 1,8	da	LC-MS/MS	(Kirsch i sur., 2009)
10	40% ženski, 40-61 god.	53,1 ± 21,6	15,2 ± 0,66	2,1	da	LC-MS/MS	(Gardner i sur., 2013)
50	100% ženski, srednja dob je 30 god.	87 ± 22	28,8 ± 8,1	4,8 ± 2,2	da	LC-MS/MS	(Alsayed i sur., 2013)
6	/	88,5 ± 18,1	25,7 ± 9,9	/	ne (metanol + mravlja kiselina)	LC-MS/MS	(Guiraud i sur., 2017)
15	100% ženski, dob /	74,7 ± 14,5	26,2 ± 6,1	2,9	ne (perklorna kiselina za deproteinizaciju)	LC-MS/MS	(Struys i sur., 2000)
48	44% ženski, 22-59 god.	109	15,0	7,4	ne (perklorna kiselina za deproteinizaciju)	LC-MS/MS	(Stabler i Allen, 2004)
90	100% ženski, 59% ima dob > 30 god.	83,02 ± 13,27	24,60 ± 89,8	3,91 ± 1,62	ne (metafosforna kiselina)	elektrokemijska detekcija	(Hobbs i sur., 2005)
30	7% ženski, 49-75 god.	103,9 ± 21,8	27,0 ± 6,7	/	ne	fluorescencijska detekcija	(Kerins i sur., 2001)
40	48% ženski, 34-82 god.	60 ± 3	24,4 ± 1,1	2,7 ± 0,2	ne	fluorescencijska detekcija	(Loehrer i sur., 1998)

U tablici 14 prikazane su nanomolarne koncentracije SAM-a, SAH-a te izračunati metilacijski indeks, izraženi kao srednje vrijednosti i pripadajuće standardne devijacije (SD). Također, prikazane su metode detekcije, literaturni navodi, dob (izražena u postocima za ženski spol) i spol ispitanika koje su različito izražene u različitim literaturnim navodima (kao najniža i najviša dob ili srednja vrijednost dobi). U prvom redu su prikazani podaci iz ovog rada u svrhu usporedbe sa ostalim metodama iz različitih dostupnih literaturnih navoda. Budući da je prilikom izrade ovog rada tandemski spektrometar masa (MS/MS) korištena metoda detekcije, najviše je prikazanih metoda detekcije za usporedbu upravo MS/MS detekcija. Obzirom da je zakiseljavanje uzoraka važan predanalitički uvjet za održavanje stabilnosti SAM-a i kvantifikaciju analita od interesa, prikazana je upotreba (da/ne) octene kiseline prilikom analize.

Srednja vrijednost koncentracije SAM-a provjerene na našoj populaciji analizom na UPLC-MS/MS, Shimadzu Nexera 8050 analizatoru pokazala je niže vrijednosti u usporebi s ostalim LC – MS/MS metodama literaturnih navoda. Prosječna koncentracija SAM-a u plazmi (60,3 i 76,4 nmol/L) usporediva je s vrijednostima dobivenim od Struys i sur. (74,7 nmol/L) i nalazi se između onih koje su objavili Gardner i sur. (53,1 nmol/L), te Kirsch i sur. (85,5 nmol/L), Alsayed i sur. (87 nmol/L), Guiraud i sur. (88,5 nmol/L), Gellekink i sur. (94,5 nmol/L) i Stabler i Allen (109 nmol/L).

Srednja vrijednost koncentracije SAH-a provjerene na našoj populaciji analizom na UPLC-MS/MS, Shimadzu Nexera 8050 analizatoru pokazala je povišene vrijednosti u usporebi s ostalim LC – MS/MS metodama literaturnih navoda. Prosječna koncentracija SAH-a u plazmi (29,4 i 39,5 nmol/L) usporediva je s vrijednostima dobivenim od Alsayed i sur. (28,8 nmol/L), Struys i sur. (26,2 nmol/L) i Guiraud i sur. (25,7 nmol/L), a povišena je u odnosu na vrijednosti koje su objavili Gellekink i sur. (12,3 nmol/L), Kirsch i sur. (13,3 nmol/L), Stabler i Allen (15,0 nmol/L) te Gardner i sur. (15,2 nmol/L).

Srednja vrijednost izračunatog metilacijskog indeksa (SAM/SAH) pokazala je snižene vrijednosti u usporebi s ostalim LC – MS/MS metodama literaturnih navoda. Izračunati metilacijski indeks (2,0 i 2,1) usporediv je s vrijednostima dobivenim od Struys i sur. (2,1) i Gardner i sur. (2,9), a snižen je u odnosu na vrijednosti koje su objavili Alsayed i sur. (4,8), Kirsch i sur. (7,0), Stabler i Allen (7,4) te Gellekink i sur. (8,5).

Naše pilot istraživanje pokazalo je usporedive vrijednosti metilacijskih indeksa te više koncentracije SAM-a i SAH-a za muškarce u odnosu na žene, te su stoga njihove vrijednosti razdijeljene prema spolu za razliku od ostalih istraživanja (tablica 14).

5. ZAKLJUČCI

- 1) Uspješno su verificirani referentni intervali na zdravim odraslim ispitanicima naše populacije korištenjem vlastite metode (UPLC-MS-MS), pri čemu se postigla odgovarajuća kvantifikacija analita od interesa (SAM-a, SAH-a i SAM/SAH omjera).
- 2) Zbog slične metode i pripreme uzoraka, naši rezultati su uglavnom usporedivi s onima koje je izvijestio Gellekink i sur., te ostalim studijama koje su također modificirale metodu prema Gellekink i sur.
- 3) UPLC-MS/MS, Shimadzu Nexera 8050 analizator pogodan je za brzu, osjetljivu i istovremenu identifikaciju i kvantifikaciju niskih nanomolarnih koncentracija S-adenosilhomocisteina i S-adenozimionina iz plazme.
- 4) Istovremeno, uz ovo pilot istraživanje provodilo se određivanje koncentracija SAM-a i SAH-a te njihovog metilacijskog indeksa u populaciji novorođenčadi u prvim danima života. Nađene su trostruko povišene koncentracije SAM-a i SAH-a u odnosu na ispitivanu odraslu populaciju. Stoga se u budućnosti planira proširenje pilot istraživanja na veću djecu, pri čemu bi podjela referentnih intervala tada uključivala podjelu na novorođenčad, djecu i odrasle prema dobi, te odraslih osoba prema spolu.
- 5) Opisana metoda može doprinijeti istraživanju bioloških odnosa između metilacije i brojnih patoloških stanja ispitivanjem referentnih vrijednosti na bolesnim ispitanicima.
- 6) Zbog malog broja laboratorija koji se bave navedenim područjem i nedostupnosti literaturnih podataka, oni nisu primjenjivi u kliničkoj praksi.
- 7) Analiti od interesa kvantificirani su na manjem broju ispitanika te je potrebno provesti određivanje referentnih intervala na većem broju uzoraka prema dokumentu Instituta za kliničko laboratorijske standarde (*engl. The Clinical & Laboratory Standards Institute – CLSI*) C28-P.

6. LITERATURA

Alsayed R, Al Quobaili F, Srour S, Geisel J, Obeid R. Elevated dimethylglycine in blood of children with congenital heart defects and their mothers. *Metabolism*, 2012, 62(8), 1074-1080.

Barić I, Ćuk M, Fumić K, Vugrek O, Allen RH, Glenn B, i ostali. S-Adenosylhomocysteine hydrolase deficiency: A second patient, the younger brother of the index patient, and outcomes during therapy. *J Inherit Metab Dis*, 2005, 28(6), 885-902.

Barić I, Staufner C, Augoustides-Savvopoulou P, Chien Y-H, Dobbelaere D, Grünert SC, i ostali. Consensus recommendations for the diagnosis, treatment and follow-up of inherited methylation disorders. *J Inherit Metab Dis*, 2017, 40, 5-20.

Brosnan JT, Brosnan ME, Bertolo RFP, Brunton JA. Methionine: A metabolically unique amino acid. *Sv. 112, Livestock Science*, 2007, 112, 2–7.

Castro R, Rivera I, Struys EA, Jansen EEW, Ravasco P, Camilo ME, i ostali. Increased homocysteine and S-adenosylhomocysteine concentrations and DNA hypomethylation in vascular disease. *Clin Chem*, 2003, 49(8), 1292-1296.

Chace DH, Kalas TA. A biochemical perspective on the use of tandem mass spectrometry for newborn screening and clinical testing. *Clin Biochem*, 2005, 38(4), 296-309.

Chemical Structure DL-Methionine, 2018., <http://www.chemspider.com>, pristupljeno dana 17.06.2018.

Cheng H, Gomes-Trolin C, Aquilonius SM, Steinberg A, Löfberg C, Ekblom J, i ostali. Levels of L-methionine S-adenosyltransferase activity in erythrocytes and concentrations of S-adenosylmethionine and S-adenosylhomocysteine in whole blood of patients with Parkinson's disease. *Exp Neurol*, 1997, 145, 580-585.

Cindrić M, Marković A, Horvatić A. Spregnute tehnike tekućinski kromatograf-spektrometar masa : osnove metodologije i primjene. *Medicina (B Aires)*, 2009, 45(3), 218-232.

CLSI. Defining , Establishing , and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory; Approved Guideline. U: *Clsi*, 2008, 28(30), 56-59.

Ćuk M. Utjecaj nedostatne aktivnosti S-adenozilhomocistein hidrolaze na metilaciju proteina. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu, 2013.

Dasgupta A, Wahed A, Instrumentation and Analytical Methods. U: Clinical Chemistry, Immunology and Laboratory Quality Control. Dasgupta A, Wahed A, London, Elsevier, 2014, str 7-14.

Epigenomics, 2018., <https://www.genome.gov>, pristupljeno dana 19.06.2018.

Finkelstein JD. Methionine metabolism in mammals. The Journal of Nutritional Biochemistry, 1990, 1(5), 228-37.

Finkelstein JD. The metabolism of homocysteine: pathways and regulation. Eur J Pediatr. 1998, 157(2), S40-S44.

Gardner LA, Desiderio DM, Groover CJ, Hartzes A, Yates CR, Zucker-Levin AR, i ostali. LC-MS/MS identification of the one-carbon cycle metabolites in human plasma. Electrophoresis, 2013, 34, 1710-1716.

Gellekink H, Van Oppenraaij-Emmerzaal D, Van Rooij A, Struys EA, Heijer M Den, Blom HJ. Stable-isotope dilution liquid chromatography-electrospray injection tandem mass spectrometry method for fast, selective measurement of S-adenosylmethionine and S-adenosylhomocysteine in plasma. Clin Chem. 2005, 51(8), 1487-1492.

Guiraud SP, Montoliu I, Da Silva L, Dayon L, Galindo AN, Corthésy J, i ostali. High-throughput and simultaneous quantitative analysis of homocysteine–methionine cycle metabolites and co-factors in blood plasma and cerebrospinal fluid by isotope dilution LC–MS/MS. Anal Bioanal Chem, 2017, 409, 295-305.

Hao X, Huang Y, Qiu M, Yin C, Ren H, Gan H, i ostali. Immunoassay of S-adenosylmethionine and S-adenosylhomocysteine: the methylation index as a biomarker for disease and health status. BMC Res Notes, 2016, 9(498), 1-14.

Ho CS, Lam CWK, Chan MHM, Cheung RCK, Law LK, Lit LCW, et al. Electrospray ionisation mass spectrometry: principles and clinical applications. Clin Biochem, 2003, 24(1), 3–12.

Hobbs CA, Cleves MA, Melnyk S, Zhao W, James SJ. Congenital heart defects and abnormal maternal biomarkers of methionine and homocysteine metabolism. Am J Clin Nutr, 2005, 81, 147-152.

Hoffmann E de. Tandem mass spectrometry: a primer. J mass Spectrom, 1996, 31, 129-137.

James SJ, Cutler P, Melnyk S, Jernigan S, Janak L, Gaylor DW, i ostali. Metabolic biomarkers of increased oxidative stress and impaired methylation capacity in children with autism. *Am J Clin Nutr*, 2004, 80, 1611-1615.

Kerins DM, Koury MJ, Capdevila A, Rana S, Wagner C. Plasma, S-adenosylhomocysteine is a more sensitive indicator of cardiovascular disease than plasma homocysteine. *Am J Clin Nutr*, 2001, 74, 723–729.

Kirsch SH, Knapp JP, Geisel J, Herrmann W, Obeid R. Simultaneous quantification of S-adenosyl methionine and S-adenosyl homocysteine in human plasma by stable-isotope dilution ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci*, 2009, 877(30), 3865-3870.

Kolić V, Turković LF, Šegulja D, Matišić D. Referentni intervali u laboratorijskoj medicini, 2017, 3(1), 107-114.

Kopp M, Morisset R, Koehler P, Rychlik M. Stable isotope dilution assays for clinical analyses of folates and other one-carbon metabolites: Application to folate-deficiency studies. *PLoS One*, 2016, 1-19.

Loehrer FM, Angst CP, Brunner FP, Haefeli WE, Fowler B. Evidence for disturbed S-adenosylmethionine : S-adenosylhomocysteine ratio in patients with end-stage renal failure: a cause for disturbed methylation reactions? *Nephrol Dial Transpl*, 1998, 13, 656-661.

Melnyk S, Pogribna M, Pogribny IP, Yi P, James SJ. Measurement of Plasma and Intracellular Utilizing Coulometric Electrochemical Detection : Alterations with Plasma Homocysteine and Pyridoxal 5J-Phosphate Concentrations. *Clin Chem*, 2000, 46(2), 265-272.

Methionine Cycle Analysis Service, 2018., <https://www.creative-proteomics.com>, pristupljeno dana 17.06.2018.

Methionine, 2018., <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>, pristupljeno dana 17.06.2018.

Methionine, SAME, Homocysteine, and the Methionine Cycle, 2018., <https://www.benbest.com/> pristupljeno dana 18.07.2018.

Mudd SH. Hypermethioninemias of genetic and non-genetic origin: A review. *Am J Med Genet Part C Semin Med Genet*, 2011, 157, 3–32.

O bolestima, 2018., <http://www.rijetke-bolesti.hr>, pristupljeno 18.06.2018.

Petković Ramadža D. Nedostatna aktivnost S-adenozilhomocistein hidrolaze i omjer S-adenozilmetionina i S-adenozilhomocisteina u osoba s trajno povišenom aktivnošću kreatin kinaze. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu, 2018.

Seger C, Griesmacher A. Some important aspects of implementing tandem mass spectrometry in a routine clinical laboratory environment | Važni aspekti uspostave dvojne spektrometrije masa u uvjetima rutinskoga kliničkog laboratorija. *Biochem Medica*, 2007, 17, 29-51.

Spillmann M, Fava M. S-Adenosylmethionine (Adenmetionine) in psychiatric disorders: Historical perspective and current status. *CNS Drugs*, 1996, 6(6), 416-425.

Stabler SP, Allen RH. Quantification of Serum and Urinary S-Adenosylmethionine and S-Adenosylhomocysteine by Stable-Isotope-Dilution Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. *Clin Chem*, 2004, 50(2), 365-372.

Structures of S-adenosylmethionine and S-adenosylhomocysteine, 2018., <http://watcut.uwaterloo.ca>, pristupljeno dana 15.06.2018.

Struys EA, Jansen EEW, De Meer K, Jakobs C. Determination of S-adenosylmethionine and S-adenosylhomocysteine in plasma and cerebrospinal fluid by stable-isotope dilution tandem mass spectrometry. *Clin Chem*, 2000, 46(10) 1650-1656.

Taleuzzaman M, Ali S, Gilani S, Imam, Hafeez A. Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) - A Review. *Austin J Anal Pharm Chem*, 2015, 16(15), 114.

Wagner C, Koury MJ. S-Adenosylhomocysteine - A better indicator of vascular disease than homocysteine? *American Journal of Clinical Nutrition*, 2007, 86(6), 1581-5.

Wooderchak WL, Zhou ZS, Hevel J. Assays for S-adenosylmethionine (AdoMet/SAM)-dependent methyltransferases. *Current Protocols in Toxicology*, 2008, 22(11), 1480-1490.

Yi P, Melnyk S, Pogribna M, Pogribny IP, Hine RJ, James SJ. Increase in plasma homocysteine associated with parallel increases in plasma S-adenosylhomocysteine and lymphocyte DNA hypomethylation. *J Biol Chem*, 2000, 275(38) 29318-29323.

Zec I. Referentni intervali – izrada i verifikacija. U: Upravljanje kvalitetom laboratorijskog rada. Šimundić AM, Zagreb, Medicinska naklada, 2013, str. 65–78.

7. SAŽETAK

Aminokiselina metionin i metaboliti metioninskog ciklusa S-adenozilmetionin (SAM), S-adenozilhomocistein (SAH) te aminotiol homocistein (Hcy), dio su tri važna stanična procesa, metilacije, remetilacije i transsulfuracije, a u tim procesima sudjeluju i mnogi enzimi i kofaktori (vitamin B6, vitamin B12, folna kiselina). SAM je donor metilne skupine za brojne reakcije metilacije raznih makromolekula. Poremećaji procesa metilacije i remetilacije koji se očituju poremećenim koncentracijama SAM-a i SAH-a te poremećenim metilacijskim indeksom (MI, omjer SAM/SAH) mogu rezultirati brojnim patološkim procesima poput neurodegenerativnih bolesti, jetrenih i kardiovaskularnih bolesti, karcinoma i kongenitalnih abnormalnosti. Obzirom na uključenost SAM-a i SAH-a u brojne patološke procese, izvršena je verifikacija referentnih intervala naše populacije određivanjem koncentracija SAM-a i SAH-a te izračunavanjem metilacijskog indeksa u 50 odraslih volontera bez navedenih patoloških stanja. Prema preporukama struke, svaki je laboratorij dužan verificirati referentne intervale kako bi provjerio jesu li prikladni za populaciju bolesnika koju pokriva određeni laboratorij. Koncentracije SAM-a i SAH-a određivane su na UPLC-MS/MS (Shimadzu Nexera 8050) modificiranom metodom Gellekink i sur. Odgovarajuće pripremljeni uzorci i obilježeni interni standardi pročišćeni su pomoću kolona za ekstrakciju čvrsto-tekuće i injektirani u UPLC-MS/MS. Koncentracije SAM-a, SAH-a i izračunatog MI izražene su kao srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija kako bi se omogućila njihova usporedba s ostalim dostupnih literaturnim podacima. Srednja vrijednost $\pm$ SD za žene iznosila je: za SAM $60,3 \pm 11,9$ nmol/L, za SAH $29,4 \pm 6,2$ nmol/L, a za MI $2,1 \pm 0,5$. Srednja vrijednost $\pm$ SD za muškarce iznosila je: za SAM $76,4 \pm 29,3$ nmol/L, za SAH $39,5 \pm 15,2$ nmol/L, a za MI $2,0 \pm 0,6$. Zbog slične metode i pripreme uzoraka, naši rezultati su uglavnom usporedivi s onima koje je izvijestio Gellekink i sur., te ostalim studijama koje su također modificirale metodu prema Gellekink i sur. Opisana metoda može doprinijeti istraživanju bioloških odnosa između metilacije i brojnih patoloških stanja ispitivanjem referentnih vrijednosti na bolesnim ispitanicima. Zbog malog broja laboratorija koji se bave navedenim područjem i nedostupnosti literaturnih podataka, oni nisu primijenjivi u kliničkoj praksi.

8. SUMMARY

Amino acid methionine and methionine cycle metabolites S-adenosylmethionine (SAM), S-adenosylhomocysteine (SAH) and aminothiol homocysteine (Hcy) are part of three important cellular processes, methylation, remethylation and transsulfuration, in which are many enzymes and cofactors (vitamin B6, vitamin B12, folic acid) involved. SAM is a donor of methyl-groups for numerous methylation reactions of various macromolecules. Methylation and remethylation disorders that are manifested in disturbed SAM and SAH concentrations and disturbed methylation index (MI, SAM/SAH ratio) can result in numerous pathological processes such as neurodegenerative diseases, liver and cardiovascular diseases, cancer and congenital abnormalities. Given the involvement of SAM and SAH in numerous pathological processes, verification of reference intervals was done in our population by measuring SAM and SAH concentrations and calculation of methylation index in 50 adult volunteers without these pathological conditions. According to experts' recommendations, each laboratory is required to verify the reference intervals to test if it is suitable for the population of patients covered by a particular laboratory. Concentrations of SAM and SAH were determined on UPLC-MS/MS (Shimadzu Nexera 8050) using the modified method by Gellekink et al. Appropriately prepared samples and labeled internal standards were purified by using the columns for solid phase extraction and then injected in UPLC-MS/MS. Concentrations of SAM, SAH and calculated methylation indexes are represented as the mean $\pm$ standard deviation to allow comparison with other available literature data. For women mean $\pm$ SD for SAM is 60.3 ± 11.9 nmol/L, for SAH 29.4 ± 6.2 nmol/L and SAM/SAH ratio is 2.1 ± 0.5 . For men mean $\pm$ SD for SAM is $76, 4 \pm 29, 3$ nmol/L, for SAH $39, 5 \pm 15, 2$ nmol/L and SAM/SAH ratio is 2.0 ± 0.6 . Due to similar methods and sample preparation, our results are mostly comparable to those reported by Gellekink et al., and other studies which also modified the method according to Gellekink et al. The described method can contribute to the study of biological relationships between methylation and numerous pathological conditions by establishing the reference values in sick patients. Due to the small number of laboratories involved in this area and limited number of data publications, those publications are not applicable in clinical practice.

Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

Verifikacija referentnih intervala S-adenozilmetionina (SAM) i S-adenozilhomocisteina (SAH) u plazmi na tandemskom spektrometru masa

Anamarija Bogić

SAŽETAK

Aminokiselina metionin i metaboliti metioninskog ciklusa S-adenozilmetionin (SAM), S-adenozilhomocistein (SAH) te aminotiol homocistein (Hcy), dio su tri važna stanična procesa, metilacije, remetilacije i transsulfuracije, a u tim procesima sudjeluju i mnogi enzimi i kofaktori (vitamin B6, vitamin B12, folna kiselina). SAM je donor metilne skupine za brojne reakcije metilacije raznih makromolekula. Poremećaji procesa metilacije i remetilacije koji se očituju poremećenim koncentracijama SAM-a i SAH-a te poremećenim metilacijskim indeksom (MI, omjer SAM/SAH) mogu rezultirati brojnim patološkim procesima poput neurodegenerativnih bolesti, jetrenih i kardiovaskularnih bolesti, karcinoma i kongenitalnih abnormalnosti. Obzirom na uključenost SAM-a i SAH-a u brojne patološke procese, izvršena je verifikacija referentnih intervala naše populacije određivanjem koncentracija SAM-a i SAH-a te izračunavanjem metilacijskog indeksa u 50 odraslih volontera bez navedenih patoloških stanja. Prema preporukama struke, svaki je laboratorij dužan verificirati referentne intervale kako bi provjerio jesu li prikladni za populaciju bolesnika koju pokriva određeni laboratorij. Koncentracije SAM-a i SAH-a određivane su na UPLC-MS/MS (Shimadzu Nexera 8050) modificiranom metodom Gellekink i sur. Odgovarajuće pripremljeni uzorci i obilježeni interni standardi pročišćeni su pomoću kolona za ekstrakciju čvrsto-tekuće i injektirani u UPLC-MS/MS. Koncentracije SAM-a, SAH-a i izračunatog MI izražene su kao srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija kako bi se omogućila njihova usporedba s ostalim dostupnim literaturnim podacima. Srednja vrijednost $\pm$ SD za žene iznosila je: za SAM $60,3 \pm 11,9$ nmol/L, za SAH $29,4 \pm 6,2$ nmol/L, a za MI $2,1 \pm 0,5$. Srednja vrijednost $\pm$ SD za muškarce iznosila je: za SAM $76,4 \pm 29,3$ nmol/L, za SAH $39,5 \pm 15,2$ nmol/L, a za MI $2,0 \pm 0,6$. Zbog slične metode i pripreme uzoraka, naši rezultati su uglavnom usporedivi s onima koje je izvijestio Gellekink i sur., te ostalim studijama koje su također modificirale metodu prema Gellekink i sur. Opisana metoda može doprinijeti istraživanju bioloških odnosa između metilacije i brojnih patoloških stanja ispitivanjem referentnih vrijednosti na bolesnim ispitanicima. Zbog malog broja laboratorija koji se bave navedenim područjem i nedostupnosti literaturnih podataka, oni nisu primijenjivi u kliničkoj praksi.

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

Rad sadrži: 60 stranica, 21 grafičkih prikaza, 14 tablica i 44 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: S-adenozilmetionin, S-adenozilhomocistein, metilacijski indeks, metilacija, referentni intervali, verifikacija referentnih intervala, tandemski spektrometar masa

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

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

Dr. sc. Ana- Maria Šimundić, naslovni izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta

Dr. sc. Marija Grdić Rajković, docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta

Rad prihvaćen: srpanj 2018.

Basic documentation card

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

Diploma thesis

Verification of reference intervals of S-adenosylmethionine (SAM) and S-adenosylhomocysteine (SAH) in plasma on tandem mass spectrometry

Anamrija Bogić

SUMMARY

Amino acid methionine and methionine cycle metabolites S-adenosylmethionine (SAM), S-adenosylhomocysteine (SAH) and aminothiols homocysteine (Hcy) are part of three important cellular processes, methylation, remethylation and transsulfuration, in which are many enzymes and cofactors (vitamin B6, vitamin B12, folic acid) involved. SAM is a donor of methyl-groups for numerous methylation reactions of various macromolecules. Methylation and remethylation disorders that are manifested in disturbed SAM and SAH concentrations and disturbed methylation index (MI, SAM/SAH ratio) can result in numerous pathological processes such as neurodegenerative diseases, liver and cardiovascular diseases, cancer and congenital abnormalities. Given the involvement of SAM and SAH in numerous pathological processes, verification of reference intervals was done in our population by measuring SAM and SAH concentrations and calculation of methylation index in 50 adult volunteers without these pathological conditions. According to experts' recommendations, each laboratory is required to verify the reference intervals to test if it is suitable for the population of patients covered by a particular laboratory. Concentrations of SAM and SAH were determined on UPLC-MS/MS (Shimadzu Nexera 8050) using the modified method by Gellekink et al. Appropriately prepared samples and labeled internal standards were purified by using the columns for solid phase extraction and then injected in UPLC-MS/MS. Concentrations of SAM, SAH and calculated methylation indexes are represented as the mean $\pm$ standard deviation to allow comparison with other available literature data. For women mean $\pm$ SD for SAM is 60.3 ± 11.9 nmol/L, for SAH 29.4 ± 6.2 nmol/L and SAM/SAH ratio is 2.1 ± 0.5 . For men mean $\pm$ SD for SAM is 76.4 ± 29.3 nmol/L, for SAH 39.5 ± 15.2 nmol/L and SAM/SAH ratio is 2.0 ± 0.6 . Due to similar methods and sample preparation, our results are mostly comparable to those reported by Gellekink et al., and other studies which also modified the method according to Gellekink et al. The described method can contribute to the study of biological relationships between methylation and numerous pathological conditions by establishing the reference values in sick patients. Due to the small number of laboratories involved in this area and limited number of data publications, those publications are not applicable in clinical practice.

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

Thesis includes: 60 pages, 21 figures, 14 tables and 44 references. Original is in Croatian language.

Keywords: S-adenosylmethionine, S-adenosylhomocysteine, methylation index, methylation, reference intervals, verification of reference intervals, tandem mass spectrometry

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

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

Ana-Maria Šimundić, Ph.D. Associate 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: July 2018.

