

# 2. PRACOVNÍ DNY KLINICKÉ HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE



13. – 14. 5. 2024

Pevnost poznání, Přírodovědecká fakulta UP Olomouc

## **ODBORNÝ GARANT**

prof. RNDr. David Friedecký, Ph.D.

## **POŘADATEL**

Oddělení klinické biochemie, Fakultní nemocnice Olomouc  
Laboratoř růstových regulátorů, Univerzita Palackého v Olomouci

Další informace najdete na:

<https://www.fnol.cz/kalendar-akci/pracovni-dny-klinicke-hmotnostni-spektrometrie>

# PROGRAM

## PONDĚLÍ 13. 5. 2024

13:00 – 14:30

### Hmotnostní spektrometrie v klinické biochemii

Předsedající: E. Klapková

**M. Mellová Význam stanovení metabolitů katecholaminů v moči pomocí LC-MS u pacientů s neuroblastomem** (2. LF UK v Praze, FN Motol) 15min

**M. Kanášová Lipidomický test pro včasnou diagnostiku karcinomu slinivky břišní** (Lipidica, Univerzita Pardubice) 15min

**H. Janečková LC-MS/MS v rutinním provozu OKB, FNOL** (FN Olomouc, SCIEX) 15min

**A. Vernerová 24,25(OH)2 D3 vitamin: výzvy a úskalí analytického chemika pro LC-MS/MS stanovení v klinické praxi** (Altium) 15min

**J. Vlasák Symbióza core shell a plně porézních částic: Implementace obou přístupů s cílem dosažení lepších HPLC/UHPLC výsledků** (Phenomenex) 10min

14:30 – 15:00 přestávka na kávu

15:00 – 16:30

### Terapeutické monitorování léků pomocí MS

Předsedající: R. Uřinová

**J. Hrudíková Význam monitorování dávkování antipsychotik** (Krajská nemocnice T. Bati) 15min

**K. Burešová Vývoj metody pro analýzu remdesiviru v biologickém vzorku pomocí kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí** (2. LF UK v Praze, FN Motol) 15min

**E. Klapková Stanovení gancikloviru v séru u pacientů po transplantaci plic** (2. LF UK v Praze, FN Motol) 15min

**V. Pešáková Metoda kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní detekcí pro stanovení celkové a volné koncentrace teriflunomidu v séru pacientů s roztroušenou sklerózou** (FN Ostrava) 15min

**M. Švidrnoch Novinky v oblasti TDM antibiotik** (Agellab) 15min

16:30 – 17:00 přestávka na kávu

17:00 – 18:30

### Diagnostika dědičných metabolických poruch pomocí MS

Předsedající: J. Bártl

**O. Součková LC-MS jako účinný nástroj pro studium vzácných onemocnění** (BIOCEV, PŘF UK, 1.LF UK v Praze) 15min

**L. Kuchař Lipidomická analýza u lysosomálních stádivých onemocnění (a nejen u nich)** (VFN, 1.LF UK v Praze) 15min

**J. Bártl Novorozenecký screening dědičných metabolických vad očima tandemové hmotnostní spektrometrie** (VFN, 1.LF UK v Praze) 15min

**D. Friedecký Multikomponentní analýza pomocí LC/MS pro diagnostiku DMP - kam až MS dosáhne** (FN Olomouc) 15min

**V. Škopová Stanovení věkově závislého fyziologického rozmezí intermediátů de novo syntézy purinů v moči** (VFN, 1.LF UK v Praze) 10min

19:00 – 22:00 Večeře

## ÚTERÝ 14. 5. 2024

9:00 – 10:30

### Hmotnostní spektrometrie v toxikologii

Předsedající: P. Ondra

**P. Ondra Analýza hexahydrokanabinolu v biologickém materiálu** (FN Olomouc) 15min

**M. Bursová Náhodná či úmyslná intoxikace?** (ÚVN, VFN, 1.LF UK v Praze) 15min

**R. Papoušek Využití hmotnostní spektrometrie v toxikologické praxi** (FN Ostrava) 15min

**M. Žídková Nové syntetické drogy aneb „Co se v prosinci naučíš, v lednu jako když najdeš“** (VFN Praha) 15min

**Z. Birkáš Hmotnostní spektrometrie v AGELLAB** (Agellab, Shimadzu) 15min

10:30 – 11:00 přestávka na kávu

11:00 – 12:30

### Kam směřuje klinická MS „nejen“ v Česku

Předsedající: D. Friedecký

**P. Matlak Nové přístupy ve vývoji analytických metod používaných ke stanovení koncentrací biologických léčiv** (LF, Ostravská Univerzita a FN Ostrava) 15min

**R. Kupčík Možnosti proteomických metod v analýze klinických vzorků** (FN Hradec Králové, Pragolab) 15min

**A. Hučíková Automatizace hmotnostní spektrometrie v rutinní klinické laboratoři** (Roche) 15min

**D. Friedecký IVD-R - kam jsme se posunuli a co nás letos čeká** (FN Olomouc) 15min

**Panelová díkuze IVD-R - jak to vidí výrobci a distributoři MS** (Altium, AMEDIS, Pragolab, Shimadzu, Waters) 20min

12:30 – 14:00 Oběd

## Význam stanovení metabolitů katecholaminů v moči pomocí LC-MS pacientů s neuroblastomem

Mellová Mária<sup>1</sup>, Vícha Aleš<sup>2</sup>, Čepová Jana<sup>1</sup>, Průša Richard<sup>1</sup>, Klapková Eva<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Ústav lékařské chemie a klinické biochemie 2. LF UK a FN Motol, Praha

<sup>2</sup> Klinika dětské hematologie a onkologie 2. LF UK a FN Motol, Praha

Neuroblastom je maligní nádorové onemocnění raného dětského věku, které vzniká z nediferencovaných nervových buněk neurální lišty, tzv. neuroblastů<sup>[1]</sup>. Vyznačuje se značnou klinickou a biologickou variabilitou. Incidence neuroblastomu v České Republice je přibližně 1:7 000 živě narozených dětí, tedy asi 15 nově diagnostikovaných případů ročně<sup>[2]</sup>. Společnou biologickou vlastností neuroblastomů je nadprodukce katecholaminů a jejich metabolitů. Uvádí se, že téměř 90 % všech diagnostikovaných neuroblastomů nadprodukuje katecholaminy<sup>[3]</sup>. Stanovení konečných metabolitů katecholaminů – kyseliny vanilmandlové (HVA) a homovanilové (HVA) v moči se v současnosti využívá v diferenciální diagnostice tohoto onemocnění. Doplnkovou prognostickou hodnotu má také index HVA/VMA<sup>[4]</sup>. Nevýhodou současných prognostických markerů je potřeba invazivního odběru tkáně otevřenou biopsií. V současnosti probíhají snahy o nalezení spolehlivého biologického prognostického markeru, který by bylo možné stanovit relativně neinvazivně a opakovaně, pro sledování účinnosti terapie. Poslední studie naznačují možnost využití 3-metoxytyraminu (3-MT) jako doplňkového prognostického markeru<sup>[4, 5]</sup>.

Stanovení metabolitů katecholaminů se v klinických laboratořích provádí pomocí chromatografických metod. Dnes široce využívána vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) s elektrochemickou detekcí se postupně nahrazuje spojením HPLC s tandemovou hmotností detekcí (LC MS/MS), čímž je minimalizováno riziko interferencí. Také je výrazně zkrácen čas potřebný pro přípravu vzorky a rovněž je zkrácena i délka vlastní analýzy.

Pro stanovení HVA, VMA a volného 3-MT byla vyvinutá LC-MS/MS metoda za použití elektrospreje v negativním (HVA, VMA) i pozitivním (3-MT) módu. Jako vnitřní standardy byly použity izotopově značené metabolity katecholaminů (HVA-d5, VMA-d3 a 3-MT-d4). Vzorky byly separovány na koloně Acquinity UPLC HSS T3 (2,1x100 mm, 1,8 μm, Waters) při 35 °C s gradientovou elucí v systému voda/metanol. Tandemová hmotnostní detekce byla prováděna pomocí trojitého kvadrupólu (Agilent 1290, Triple Quad 6495, Agilent Technologies) v módu dynamického monitorování vybraných reakcí. V porovnání s původní HPLC metodou poskytuje nová LC-MS/MS metoda přesnější kvantifikaci dosud využívaných konečných metabolitů katecholaminů a současnou detekci nového markeru volného 3-MT. Vyvinutá multikomponentní analýza poskytuje jak diagnostickou (HVA, VMA), tak prognostickou (3-MT) výpovědní hodnotu, a to vše jen za použití 50 μl patientského vzorku moče. Metoda byla úspěšně validována, ověřena na 50 patientských vzorcích a zavedena do klinické praxe.

*Poděkování: Tato práce vznikla za podpory MZ ČR – RVO, FN v Motole 0064203.*

1. Matthay, K.K., et al., Neuroblastoma. Nat Rev Dis Primer 2, 16078 (2016).
2. Krejčí, D. et al. Czech Childhood Cancer Information System [online]. (2018) [cit. 2024-3-26]. Dostupné z: <https://ccc-izis.cz>.
3. Hwang, N., et al. Application of an LC-MS/MS Method for the Simultaneous Quantification of Homovanillic Acid and Vanillylmandelic Acid for the Diagnosis and Follow-Up of Neuroblastoma in 357 Patients. Molecules. 26, 3470 (2021).
4. Peitzsch, M., et al., Biochemical testing for neuroblastoma using plasma free 3-O-methylidopa, 3-methoxytyramine, and normetanephrine. Pediatric Blood & Cancer. 67, 28081 (2020).
5. Verly, I.R.N., et al. 3-Methoxytyramine: An independent prognostic biomarker that associates with high-risk disease and poor clinical outcome in neuroblastoma patients. European Journal of Cancer. 90, 102-110 (2018).

## Lipidomický test pro včasnou diagnostiku karcinomu slinivky břišní

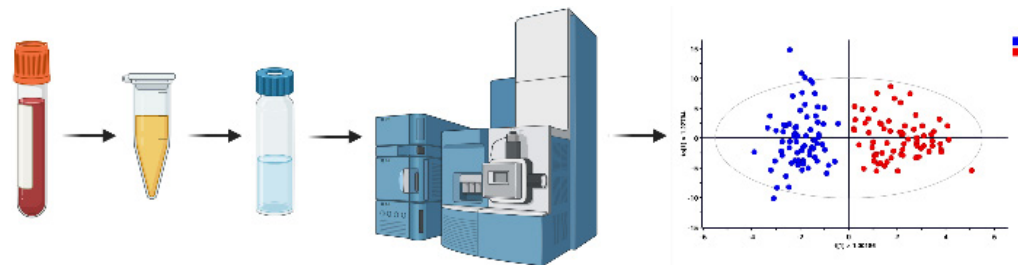
Kanásová M.<sup>1</sup>, Dolečková Z.<sup>1</sup>, Peterka O.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Lipidica, a.s., Pernštýnské náměstí 51, Pardubice

<sup>2</sup> Katedra analytické chemie, Fakulta chemicko-technologická, Univerzita Pardubice

Rakovina slinivky břišní je nádorové onemocnění s nejnižší mírou přežití (průměrně 8 měsíců od stanovení diagnózy) vzhledem k absenci typických příznaků v časném stádiu. To je důvodem pro současné diagnostické metody, jako jsou endoskopická ultrasonografie (EUS), magnetická rezonance (MRI) a výpočetní tomografie (CT) obvykle detekují pokročilé stadium onemocnění s velmi omezenými možnostmi léčby vzhledem k rychlé tvorbě metastáz. Včasná diagnostika by vedla k většímu podílu kurativních resekcí, a tak i delšímu přežití pacientů s rakovinou slinivky. Za využití lipidomické analýzy bylo potvrzeno rozlišení vzorků jedinců bez rakoviny slinivky břišní od vzorků pacientů trpících tímto onemocněním již v raných stádiích<sup>[1]</sup>. Lipidomický test se zakládá na analýze lipidomického extraktu krevní plazmy pomocí superkritické fluidní chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií. Vícerozměrnou statistickou analýzou jsou porovnány profily cca 150 lipidů ze 7 lipidových tříd v každém vzorku, přičemž nejvíce dysregulované jsou sfingomyeliny, ceramidy a (lyso)fosfatidylcholin. Převod této metody do praxe je spojen s ověřením klinické funkce na vzorcích od dobrovolníků spadajících do skupiny se zvýšeným rizikem rozvoje tohoto onemocnění. Riziko je zvýšené u jedinců s výskytem tohoto onemocnění u příbuzných, s přítomností určitých genetických mutací podmiňujících vznik rakoviny slinivky nebo u lidí trpících hereditární pankreatitidou.

1. Wolrab, D. et al. Lipidomic profiling of human serum enables detection of pancreatic cancer. Nat. Commun. 13, 124 (2022).



## LC-MS/MS v rutinním provozu OKB, FNOL

Janečková H, Ivanovová E, Hlídková E, Bekárek V, Kittlová L, Kowalczuková L, Petrželová S, Peřinová J, Semeniuk T, Svačinková Z, Friedecký D

Laboratoř dědičných metabolických poruch, Oddělení klinické biochemie, Fakultní nemocnice Olomouc

Použití kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií (LC-MS/MS) se stává v klinické laboratoři nepostradatelnou součástí rutinního provozu. Nahrazuje tak metody imunochemické či separační metody založené na UV detekci. V přednášce budou prezentovány praktické zkušenosti s použitím LC-MS/MS při rutinním vyšetřování léčiv a diagnostice dědičných metabolických poruch (DMP). Pro analýzy jsou používány hmotnostní spektrometry firmy SCIEX (API 4000, Triple Quad 6500, QTRAP 6500+).

V naší laboratoři je vyšetřována široká škála léčiv (imunosupresiva, antihypertenziva, tyrosinkinasy inhibitory, antimitotika, nízkodávkový methotrexát, beta-laktamová antibiotika). Používána je vždy stejná kombinace mobilních fází (A - mravenčar amonny, 28 mmol/l, pH 2,8; B - methanol) a kolony (ACQUITY UPLC BEH C18, 130Å, 1,7 μm, 2,1 mm x 50 mm), tím odpadá problémy způsobené nutným promýváním systému. Pro každou skupinu léků byla vždy optimalizována příprava vzorku, objem nástřiku vzorku a separační podmínky tak, aby vše probíhalo v provozu jednoduše a rychle.

LC-MS/MS je používáno v diagnostice DMP jednak v rámci druhostupňového vyšetřování vzorků krevních skvrn z novorozeneckého screeningu (stanovení homocysteinu a rozlišení izomerů C5-karnitinů) a dále komplexního vyšetřování vzorků moči od dětí s podezřením na DMP. Rutinně jsou analyzovány organické kyseliny, acylkarnitiny a acylglyciny (doi: 10.1515/cclm-2023-0084), puriny, pyrimidiny a další diagnosticky významné látky (doi: 10.1016/j.talanta.2024.125699).

Pro kvantifikaci je vždy využíváno izotopicky značených standardů a komerčně dostupných kalibrátorů. K vyhodnocování jsou používány programy Analyst Software nebo Sciex OS. Kontrola kvality je zajištěna pomocí komerčních kontrolních materiálů a účastí v relevantních programech externího hodnocení kvality.

## 24,25(OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub> vitamin: výzvy a úskalí analytického chemika pro LC-MS/MS stanovení v klinické praxi

Vernerová Andrea

Altium International, s.r.o., Na Jetelce 69/2, 190 00 Praha 9

Vitamin D má zásadní roli pro udržení homeostázy vápníku a fosforu v lidském těle, a s tím spojený správný růst a mineralizaci kostí. Dále má také protektivní roli u řady systémových onemocnění jako jsou nádorová, kardiovaskulární, renální nebo nemoci spojené s imunitním systémem<sup>[1]</sup>. I když za klíčový aktivní metabolit vitaminu D je považován 1,25-dihydroxy vitamin D<sub>3</sub>, vzrůstá zájem stanovit také hladiny neaktivního metabolitu 24,25-dihydroxy vitaminu D<sub>3</sub>, které mohou poskytnout další informace o stavu pacienta s deficiencí vitaminu D. Nicméně, hlavním benefitem stanovení je screening nedostatku enzymu 24-hydroxylázy pro případy hyperkalcémie nezávislé na parathormonu, která může vést až k chronickému onemocnění ledvin<sup>[2]</sup>.

Na rozdíl od kvantifikací 25(OH)D vitaminů, kterých lze dosáhnout i pomocí imunotestů, metabolit 24,25-dihydroxy vitamin D<sub>3</sub> lze kvantifikovat pouze pomocí LC-MS/MS. I přes vyšší specifitu detekce pomocí hmotnostní spektrometrie (MS) je stanovení komplikované, zejména z důvodu obtížné ionizace, matričních efektů a velmi nízkých hladin v lidském séru (desetiny až jednotky ng/ml).

V prezentaci budou rozebírána úskalí stanovení 24,25-dihydroxy vitaminu D<sub>3</sub> v séru. Pro implementaci v rutinní laboratoři je vhodný výběr úpravy vzorku před analýzou klíčový. Jako obvykle je nutné volit mezi robustností metody, spolehlivými výsledky stanovení a minimalizací manipulace se vzorky.

Poděkování za spolupráci patří Klatovské nemocnici, a.s., pro kterou byla aplikace vyvíjena a má potenciál být využita v jejich portfoliu nabízených metod.

1. WAGNER, D. et al. The ratio of serum 24,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> to 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> is predictive of 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> response to vitamin D<sub>3</sub> supplementation. The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology. 126, 72-77 (2011).
2. FABREGAT-CABELLO, N. et al. A fast and simple method for simultaneous measurements of 25(OH)D, 24,25(OH)<sub>2</sub> D and the Vitamin D Metabolite Ratio (VMR) in serum samples by LC-MS/MS. Clinica Chimica Acta. 473, 116-123 (2017).

## Symbióza částic s jádrem a plně porézních částic: Zavedení obojího pro lepší výsledky HPLC a UHPLC

Jan Vlasák

PHENOMENEX LTD

Prezentace popisuje základní charakteristiky plně porézních částic a částic s pevným jádrem, tzv. core shell. Oba segmenty jsou zastoupeny a demonstrovány značkou Phenomenex a oba mohou přinést další výhody, ale nemusíte vidět plný potenciál. Cílem je poskytnout posluchačům ucelené informace o obou typech částic s ohledem na přístrojové vybavení a povahu testovaných látek.

Experimentální údaje pro maximalizaci účinnosti separace, nalezení ideální délky analýzy, retence a zatížení vzorku s ohledem na rozlišení a faktor asymetrie pro polární kyseliny, polární zásady. Jak zlepšit zatížení pro zásadité látky a jak pracovat s ortogonální selektivitou.

### Obecná chromatografická účinnost

Criteria/Need	Ranking	Caveat/Exceptions/Recommendation
Need maximum efficiency (Rs, H)	Kinetex > Omega	Benefits of core-shell diminish with particle size decrease
Fastest Analysis Time	Kinetex > Omega	
Need more sample loading	Kinetex < Omega	Usually not a factor with neutrals or acids
Need more retention (C18)	Kinetex < Omega	Can be offset with stationary phase selection
Injecting strong solvent	Kinetex < Omega	

### Zohlednění systému

Criteria/Need	Ranking	Caveat/Exceptions/Recommendation
Standard HPLC-UV	Kinetex >> Omega	Benefits of core-shell diminish with high dwell volume
UHPLC/UPLC®-UV	Kinetex <= Omega	Core-shell will be faster usually
LC/MS	Kinetex = Omega	Very case-specific

### Vývoj metody

Criteria/Need	Ranking	Caveat/Exceptions/Recommendation
Polar bases	Kinetex = Omega	Kinetex Biphenyl or Kinetex/Omega Polar C18
Polar acids	Kinetex < Omega	Omega PS C18 (Polar C18 phases are alternatives)
Best peak shape/loading for Bases	Kinetex < Omega	Omega PS C18 (Kinetex EVO C18 is alternative)
Stability at high pH	Kinetex > Omega	Kinetex EVO C18
"Orthogonal Selectivity" to C18	Kinetex > Omega	Kinetex Biphenyl & F5

### Závěr

Značka Kinetex obecně nabízí vyšší účinnost a kratší RT. Pro HPLC je téměř vždy výhodné vidět více než dvojnásobně vyšší účinnost. Pokud jde o UHPLC - je třeba více zohlednit retenci, asymetrii piků a nosnost, protože zvýšení účinnosti není tak výrazné. Proto obvykle dominuje značka Luna omega

## Význam monitorování dávkování antipsychotik

Jana Hrudíková

Krajská nemocnice T. Bati, a.s. Zlín, OKBF

Antipsychotika (AP) neboli neuroleptika jsou látky určené k léčbě psychotických poruch. Působí jako antagonisté dopaminových D<sub>2</sub> receptorů. Společnou vlastností celé skupiny AP je schopnost při dlouhodobém užívání potlačovat psychotické symptomy, především halucinace a bludy u schizofrenie, psychózy, agresivity a neklidu. Některá antipsychotika druhé generace se využívají v udržovací i akutní léčbě manické a depresivní fáze bipolární afektivní poruchy nebo například v monoterapii unipolární deprese. Jednotlivá AP se od sebe liší nejen intenzitou účinku, ale i farmakodynamickými vlastnostmi.

Zklidňující účinky AP nastupují velmi rychle, podle typu aplikace od minut až po hodiny. Antipsychotické účinky se však mohou projevit až po týdnu užívání, většinou to ovšem trvá v řádu několika týdnů, než dojde ke zlepšení stavu pacienta.

Užívání antipsychotik může provázet celá řada vedlejších, nežádoucích účinků. Mezi časté patří akatizie, třes, zvýšení hmotnosti, úbytek mozkového objemu, úbytek počtu bílých krvinek, cukrovka, různé sexuální poruchy, únava, deprese a snížená střední délka života. K omezení či snížení těchto nežádoucích účinků je nutná správná volba nejen léku, ale také jednotlivé dávky.

K dosažení terapeutického rozmezí a tím správného účinku terapie je důležité monitorovat hladiny léčiv (TDM) u pacientů a podle toho efektivně upravovat dávkování monoterapie i polyterapie. U některých typů léčiv hraje významnou roli také kouření, které zrychluje odbourávání léčiva, a proto potřebují kuřáci vyšší dávky.

Ke stanovení léčiv využíváme biologický materiál sérum a plazmu, jako metodu kapalinovou chromatografii s hmotnostní detekcí a jako způsob ionizace elektrosprej (ESI) v pozitivním módu. Výhodou této metody je stanovení několika látek současně, včetně jejich metabolitů za relativně krátkou dobu.

1. Mohr, P. a kolektiv. Klinická psychofarmakologie. Maxdorf s.r.o., 111-121 (2017)
2. Kopeček, M. Aktualizované klinické a teoretické aspekty podávání antipsychotik. Klin. Farmakol. Farm, 26(1), 18-28 (2012)

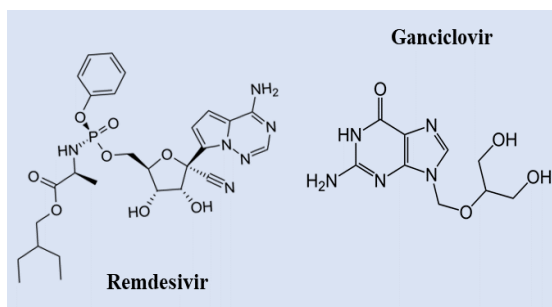
## Vývoj metody pro analýzu remdesiviru v biologickém vzorku pomocí kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí

Kristýna Burešová, Kateřina Dunovská, Julia Werle, Jana Čepová, Richard Průša, Karel Kotaška, René Kizek, Eva Klápková

Ústav lékařské chemie a klinické biochemie, 2. lékařská fakulta Univerzity Karlovy a Fakultní nemocnice Motol, V Úvalu 84, 150 06, Praha, Česko

Jednovláknový RNA virus SARS-CoV-2 se přenáší kapénkovou cestou. Po vstupu se přes vazbu na ACE2 receptory dostává do buněk, kde se replikuje. U terapie remdesivirem byla pozorována hepatotoxicita i nefrotoxicita, proto je nutné funkce těchto orgánů při terapii monitorovat<sup>[1]</sup>. Analytickému stanovení remdesiviru není věnována dostatečná pozornost. Kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní detekcí vykazuje maximální selektivitu stanovení<sup>[2]</sup>. Metody však nebyly použity pro dlouhodobé monitorování hladin remdesiviru u pacientů. Cílem práce bylo studium přípravy vzorku pro maximální snížení efektu interferujících složek. Pro kvantifikaci remdesiviru byl vybrán jeden kvantifikační přechod a jeden konfirmační přechod m/z při 603,2 → 261,0 (kvantifikační) a 603,2 → 200,0 (konfirmační).

Pro přípravu mobilních fází byl použit acetonitril a kyselina mravenčí. Jako vnitřní standard byl použit ganciklovir- d5 o koncentraci 5 µg/ml. Vzorek krevního séra se připravil jako směsný vzorek sér. Kalibrační roztoky byly naředěny do séra. Vzorek byl poté zpracován následovně: do zkumavek bylo přidáno 50 µl vzorku, 750 µl precipitačního činidla (AC-N:methanol:TCA) s ganciklovirem-d5 (vnitřní standard, koncentrace 5 ng/ml). Pro metodu standardního přídávku bylo 90 µl vzorku (po extrakci) smíšeno s 30 µl remdesiviru (100 ng/ml). Vzniklá směs se extrahovala a odebraný supernatant se naředil v poměru 1:2 a takto připravený vzorek byl analyzován. U všech analyzovaných vzorků byla prokázána linearita QC parametr pod 5 % a r nad 0.99. Variabilita vyjádřená pomocí variačního koeficientu (%CV) se pohybovala kolem 5 %. Podařilo se dosáhnout velmi dobrého limitu detekce 0,3 ng/l a kvantifikace 5 ng/l remdesiviru.



*Poděkování: Práce byla řešena za podpory výzkumného záměru MZ ČR – RVO, FN v Motole č. 00064203.*

- Petrus J, Dunovska K, Klappkova E, Hosnedlova B, Jakubek M, Cepova J, Prusa R, Kizek R: Infekce virem SARS-CoV-2 u dětí se zhoubnými nádory: léčba remdesivirem. *Prakt Lek* 2022, 102(1):6-12.
- Petrus J, Grondzak T, Cepova J, Dunovska K, Hosnedlova B, Berousek J, Prusa R, Kizek R, Klappkova E: Detection of Remdesivir by Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry in a Patient with SARS-CoV-2 Infection. *Chemické Listy* 2022, 116(11):687-692.

## Stanovení gancikloviru v séru u pacientů po transplantaci plic

Klappková E.<sup>1</sup>, Dunovská K.<sup>1</sup>, Petrus J.<sup>1</sup>, Dvořáčková E.<sup>2,3</sup>, Lischke R.<sup>3</sup>, Průša R.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Ústav lékařské chemie a klinické biochemie 2. LF UK a FN Motol, Praha

<sup>2</sup> Farmakologický ústav 1. LF UK a VFN, Praha

<sup>3</sup> III. chirurgická klinika 1. LF UK a FN Motol, Praha

Ganciklovir (GCV) je antivirotikum využívané k systémové léčbě a prevenci nákazy organismu DNA viry patřícími do čeledi herpesviridae. K závažným projevům onemocnění způsobených těmito viry dochází u pacientů s oslabením imunity zapříčiněným například chemoterapií při léčbě onkologických onemocnění, získanou imunodeficiencí při nazeze virem HIV či díky imunosupresivní terapii po transplantaci orgánů. U toho léku je popisována vysoká inter a intra-individuální variabilita.

Ke stanovení GCV byla vyvinuta LC-MS/MS metoda za použití ionizace elektrosprejem v pozitivním modu na systému Agilent 1290 Triple Quad 6470. Jako vnitřní standard byl použit isotopově značený ganciklovir-d5. Analýza byla prováděna na koloně Eclipse Plus C18 (1,8 µm, 3,0 x 50 mm, Agilent Technologies) za použití gradientu mobilních fází (A – voda s pufrém (5 %), B – acetonitril s pufrém (5 %)). V mobilních fázích byl použit pufr obsahující kyselinu octovou (25 ml/l), octan amonný (5 g/l) a kyselinu trifluoroctovou (2 ml/l). Metoda byla úspěšně validována. K předúpravě vzorku byla použita pouze precipitace proteinů acetonitrem, po centrifugaci byl vzorek dále naředěn 5% roztokem kyseliny trichloroctové.

Pacientům po transplantaci plic je vždy profylakticky podáván valganciklovir, u prokázané infekce ganciklovir. Hladiny byly stanovovány u 60 pacientů po transplantaci plic. U více jak 80 % nebylo při počátečním nastavení dávkování dosaženo optimálních hladin gancikloviru v séru. Výsledky prokázaly, že TDM je nezbytné u všech pacientů po transplantaci plic pro nastavení individualizované optimální farmakoterapie.

- Sunada M., Kinoshita D., Furukawa N., Kihara M., Nishimura A., Moriuchi M., Moriuchi H.: Therapeutic drug monitoring of ganciclovir for postnatal cytomegalovirus infection in an extremely low birth weight infant: a case report. *BMC Pediatrics* (2016) 74: 141
- Märtson A. G., Edwina A. E., Burgerhof J. G. M., Berger S. P., de Joode A., Damman K., Verschuuren E. A. M., Blokzijl H., Bakker M., Span L. F., van der Werf T. S., Touw D. J., Sturkenboom M. G. G., Knoester M., Alffenaar J. W. C.: Ganciclovir therapeutic drug monitoring in transplant recipients, *J Antimicrob Chemother* 2021; 76: 2356-2363

## Metoda kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní detekcí pro stanovení celkové a volné koncentrace teriflunomidu v séru pacientů s roztroušenou sklerózou

Veronika Pešáková<sup>1,2</sup>, Hana Brozmanová<sup>1,2</sup>, Pavel Šišťák<sup>1,2</sup>, Zuzana Krška Kušnířiková<sup>1,3</sup>, Milan Grundmann<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Ústav klinické farmakologie, Lékařská fakulta, Ostravská univerzita, Ostrava

<sup>2</sup> Oddělení klinické farmakologie, Ústav laboratorní medicíny, Fakultní nemocnice Ostrava, Ostrava

<sup>3</sup> Oddělení dětské neurologie, Neurologická klinika, Fakultní nemocnice Ostrava, Ostrava

Teriflunomid patří k lékům, které se využívají při léčbě roztroušené sklerózy. Podle studií se více než 99,4 % teriflunomidu váže na plazmatické proteiny a pouze méně než 1 % koncentrace teriflunomidu se v krvi vyskytuje volně a vykazuje klinickou aktivitu.<sup>1</sup> V této práci byla vyvinuta a validována UPLC-MS/MS metoda pro stanovení celkového a volného teriflunomidu v séru pacientů s roztroušenou sklerózou. Pro stanovení celkové koncentrace teriflunomidu byla jako příprava vzorků použita precipitace proteinů z krevního séra a pro stanovení volné frakce pak ultracentrifugace. Analýza byla provedena na systému Acquity UPLC Xevo TQ-XS (Waters, USA). Separace probíhala na koloně Acquity UPLC BEH C18 1,7 µm (100 x 2,1 mm) při 30 °C a jako vnitřní standard byl použit teriflunomid-D4. Ionizace bylo docíleno elektrosprejem v negativním módu. Vyvinutá metoda byla validována podle pravidel Evropské lékové agentury (EMA) pro validaci bioanalytických metod. Variační koeficienty byly v rozmezí 0,53-14,84 % a výtěžnost 97,92-108,33 %. Podíl volné frakce teriflunomidu z celkové koncentrace teriflunomidu byl v rozmezí 0,15-0,40 %. Mezi koncentracemi volného a celkového teriflunomidu byla nalezena signifikantní korelace R<sup>2</sup> = 0,9083 (p<0,0001). Tato nově vyvinutá metoda umožňuje rychlé a snadné stanovení koncentrace teriflunomidu a lze ji aplikovat na klinické vzorky pacientů s roztroušenou sklerózou.

*Chtěla bych velmi poděkovat své vedoucí práce RNDr. Haně Brozmanové, CSc. a kolegovi Mgr. Pavlu Šišťákovému Ph.D. za cenné rady, předané zkušenosti a čas, mi věnovaný, při vypracování této práce.*

- Rakhila, H. Et al. Quantitation of total and free teriflunomide ( A77 1726) in human plasma by LC-MS/MS. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 55, 325-331 (2011).

## Novinky v oblasti TDM antibiotik

Martin Švidrnoch

Laboratoř AGEL a.s., Laboratoř farmakologie a toxikologie, Revoluční 2214/35. 741 01 Nový Jičín

Terapeutické monitorování lékových hladin (TDM) a jejich interpretace dnes patří bezpochyby mezi rutinní laboratorní vyšetření v rámci komplementu. Mezi dnes již standardně prováděná vyšetření tzv. rizikových antibiotik (ATB) s úzkým terapeutickým indexem (např. glykopeptidy, aminoglykosidy) jsou neustále přidávány další skupiny ATB, kde potenciál TDM souvisí jak s eradikační účinností (a tedy i prevencí antibiotecké rezistence), tak i s optimalizací dávkování s ohledem na konkrétního pacienta a jeho onemocnění. Mezi relativně nová a stále více či méně "rezervní" antibiotikům patří linezolid. Jedná se o tzv. oxazolidonové antibiotikum jehož bakteriostatický mechanismus účinku je založen na vazbě s ribozomální podjednotku 50S. Zjednodušeným výsledkem je blokáce proteosyntézy v buňce bakterie. Z hlediska působení je linezolid aktivní pouze vůči grampozitivním bakteriím a mykobakteriím. V současné době je míra rezistence k linezolidu zanedbatelná, nicméně se stále častěji používáním tohoto ATB je důvod předpokládat, že rezistentní kmeny bakterií časem nebudou nijak výjimečné. Z výše popsaných důvodů je zavedení TDM linezolidu bezesporu přínosné. Doposud získaná data zcela jasně ukazují, že nemalé procento pacientů léčených standardními dávkami linezolidu (tedy v souladu s SPC) mají hladiny nízké (často zcela neúčinné), nebo naopak toxické. Je na místě rovněž zmínit, že nežádací účinky linezolidu nejsou marginální a mohou představovat závažný problém u pacientů, kteří běžně trpí řadou jiných komorbidit. Zásadním nežádoucím účinkem, který je závislý na dávce (resp. přesněji na plazmatické koncentraci) a délce léčby, je útlum hematopoézy. Laboratorně lze při vysokých hladinách linezolidu pozorovat postupný vznik leukopenie a trombocytopenie, v závažných a ojedinělých případech i pancytopenie. Pozitivním faktem je, že po ukončení léčby linezolidem se hematopoéza obvykle postupně normalizuje. Shora uvedené jen potvrzuje vhodnost provádění TDM linezolidu podobně jako u jiných tzv. rizikových ATB.

## LC-MS jako účinný nástroj pro studium vzácných onemocnění

Olga Součková

VFN, 1.LF UK v Praze

Celosvětově je popsáno více než 6000 různých druhů vzácných onemocnění, z nichž 80 % je genetického původu. Studium této skupiny onemocnění lze přispět k pochopení buněčných a molekulárních procesů a napomoci vývoji léčby nejen pro vzácná onemocnění. Úskalím při studiu jednotlivých poruch je jejich nízká incidence v populaci (méně než 1:2000). V současné době lze využít techniky celogenomového (WGS) nebo celoexomového (WES) sekvenování a v případě metabolických poruch i technik LC-MS (kapalinové chromatografie spojené s hmotnostním spektrometrem). Zmíněné techniky se navzájem mohou velmi dobře doplňovat. Výhodou LC-MS je možnost screeningu velkého množství vzorků získaných od pacientů ve formě moči, krve či odebraných kožních fibroblastů. Tuto techniku je možné aplikovat u metabolických onemocnění vedoucích k hromadění některého z metabolitů v buňkách nebo tělních tekutinách. Při správné optimalizaci metody můžeme cíleně detekovat desítky metabolitů v každém vzorku. Zavedení specifické metody v nemocnicích může napomoci včasnému odhalení vzácného metabolického onemocnění, které by jinak zůstalo nediodagnostikované.

## Lipidomická analýza u lysosomálních strádavých onemocnění (a nejen u nich)

Ladislav Kuchař

Laboratoř pro studium vzácných onemocnění, Klinika pediatrie a dědičných poruch metabolismu 1. LF UK

Lysosomální strádavá onemocnění (LSO) představují skupinu vzácných dědičných onemocnění charakterizovaných patologickými mechanismy postihujícími lysosomální systém buňky. Primární postižení lysosomálního systému je dáno strádáním nezprocesovaných molekul, mezi které patří i lipidy. Příčinou těchto patologických procesů jsou mutace v genech lysosomálních proteinů negativně ovlivňujících jejich funkce. Mezi postižené proteiny patří enzymy, kofaktory enzymů, transportní proteiny a další.

Hmotnostní spektrometrie je v současnosti hlavní analytickou metodou využívanou v lipidomice a to jak ve výzkumu tak i klinické praxi. Základem je kvantitativní hmotnostní spektrometrie, která umožňuje analýzu jak celých tříd lipidů, tak i jednotlivých molekulárních typů. Aplikaci hmotnostní spektrometrie u LSO z kategorie lipidů respektive sfingolipidů lze rozdělit do několika oblastí.

První aplikační oblast spočívá v kvantitativní a semi-quantitativní analýze nezprocesovaných molekul, které představují biomarkery, např. sulfatidy u Metachromatické leukodystrofie nebo globotriaosylceramid u Fabryho choroby. Metodicky se lze zaměřit na sledování koncentrace lipidů v rámci celé třídy nebo vyhodnocení tzv. profilu molekulárních typů. V současnosti se v této oblasti prosazují biomarkery druhé generace, které nepředstavují primární strádaný substrát, ale ke změnám jejich koncentrace dochází v důsledku primárního deficitu jako lysoglobotriaosylceramid u Fabryho choroby. V některých případech je lze využít i jako biomarkery v diferenciální diagnostice jako např. lysosfingomyelin a lysosfingomyelin 509 u Niemann-Pickovy choroby typu A/B a C.

Druhá oblast spočívá v in vitro měření enzymových aktivit příslušných lysosomálních hydroláz v suché krevní kapce, což lze využít při novorozeneckém screeningu. Jako substrát lze použít arteficiální molekuly (Fabryho choroba) nebo přirozené lipidní substráty (Gaucherova choroba).

Třetí oblast se zaměřuje na ex vivo měření funkce proteinu jak enzymů, tak i transportních molekul v buněčných kulturách. Tento přístup se uplatňuje např. u funkčního testu u Niemann-Pickovy choroby typu C. Dále lze tímto způsobem měřit aktivitu celé příslušné lysosomální degradační kaskády např. u GM1 gangliosidosy, Gaucherovy nebo Fabryho choroby.

Z analytického hlediska se v těchto aplikacích uplatňují lipidy s atypickou molekulovou hmotností, které plní funkci vnitřních standardů, značených substrátů nebo „biochemických sond“ v případě sledování celých metabolických drah. K extrakci lipidů se v jednotlivých metodách využívají specifické extrakční postupy specificky volené podle typu analyzovaných lipidů.

Jako potenciálně významnou aplikaci hmotnostní spektrometrie lze považovat i analýzu dolicholů v moči pacientů s deficitem Nogo-B receptoru a s možným přesahem do oblasti poruch glykosylace.

*Podpořeno z programového projektu Ministerstva zdravotnictví ČR s reg. č. NU21-08-00324*

## Novorozenecký screening dědičných metabolických vad očima tandemové hmotnostní spektrometrie

Josef Bártl

VFN, 1.LF UK v Praze

Novorozenecký laboratorní screening je nezbytným prvkem ve zdravotní péči o novorozence, umožňujícím detekci potenciálně vážných dědičných metabolických onemocnění v presymptomatickém, raném stádiu života. Jedním z klíčových nástrojů v této oblasti je tandemová hmotnostní spektrometrie (MS/MS), která umožňuje rozsáhlou analýzu metabolitů v krevních vzorcích s vysokou citlivostí a specifičtostí. Během jedné analýzy v rámci shotgun aplikace je možné analyzovat několik desítek aminokyselin a acylkarnitinů asociovaných s nejrůznějšími formami aminoacidopatií, organických acidurií či poruch oxidace mastných kyselin vybraných do panelu sledovaných nemocí. Daní za rychlou analýzu přímého nástřiku vzorku jsou ovšem občasná interference některých metabolitů s jinými endogenními nebo exogenními látkami. V rámci konfirmace těchto nálezů je nezbytné aplikovat metody tzv. druhostupňového testování (2nd-tier test), kde jsou identické vzorky krevní skvrny analyzovány separací na chromatografické koloně. Tím je ověřena jejich identita, případně je kvantifikován další sekundární marker charakteristický pro dané onemocnění. Dobře nastavený algoritmus referenčních rozmezí primárního screeningu i následných konfirmačních testů podmiňuje úspěšnost celého screeningového programu a přispívá k včasné diagnostice a léčbě metabolických onemocnění.

## Multikomponentní analýza pomocí LC/MS pro diagnostiku DMP - kam až MS dosáhne

David Friedecký<sup>1</sup>, Barbora Pisklákova<sup>1</sup>, Jaroslava Friedecká<sup>2</sup>, Eliška Ivanovová<sup>1</sup>, Dana Dobešová<sup>1</sup>, Radana Brumarová<sup>1,3</sup>, Aleš Kvasnička<sup>1</sup>, Jakub Rozhon<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratoř dědičných metabolických poruch, Oddělení klinické biochemie, Fakultní nemocnice Olomouc a Lékařská fakulta Univerzity Palackého v Olomouci

<sup>2</sup> Laboratoř růstových regulátorů, Přírodovědecká Fakulta Univerzity Palackého v Olomouci

<sup>3</sup> Ústav lékařské genetiky, Fakultní nemocnice Olomouc a Lékařská fakulta Univerzity Palackého v Olomouci

Hmotnostní spektrometrie (MS) se mimo další oblasti laboratorní diagnostiky vyprofilovala v nepostradatelnou analytickou techniku pro diagnostiku dědičných metabolických poruch (DMP). V posledních desetiletích je výzkum soustředěn na vývoj nových, rychlejších a robustnějších metod diagnostiky těchto vzácných onemocnění. Již více než 50 let se pro diagnostiku organických acidurií rutinně využívá kombinace technik plynové chromatografie a hmotnostní spektrometrie (GC-MS). Rutinní GC-MS metoda umožňuje analýzu širokého spektra organických kyselin, avšak vykazuje řadu omezení, jako jsou zdlouhavá příprava vzorku a náročné vyhodnocení analýz. Tento zdlouhavý proces činí tento přístup problematickým v případě urgentních požadavků u pacientů s akutní klinickou prezentací. Na našem oddělení byla vyvinuta inovativní LC-MS metoda vyšetření moči, která umožňuje současně analyzovat 99 organických kyselin, 32 acylkarnitinů a 15 acylglycinů, díky čemuž je touto metodou možné diagnostikovat více než 80 DMP. Byla provedena rozsáhlá analytická validace 140 biomarkerů a v rámci rutinního provozu byla také klinicky zvalidována na více než 1000 vzorcích moči.

Další důležitou skupinou biomarkerů jsou polární látky z řad purinů, pyrimidinů, cukrů, cukerných alkoholů a dalších. Řadu let bylo nutné tyto nutné tyto biomarkery analyzovat odděleně různými technikami, např. kapilární elektroforézou, chromatografií na tenké vrstvě nebo GC-MS. Metoda na principu HILIC-MS/MS zahrnující 65 biomarkerů byla vyvinuta v naší laboratoři a prošla taktéž komplexní analytickou i klinickou validací. Tato metoda nabízí výhodu širokého pokrytí meziproduktů, které jsou předmětem zájmu, a proto může být potenciální alternativou a zjednodušením pro klinické laboratoře, které použijí více metod pro screening těchto analytů.

Vyhodnocení obou typů analýz je založeno na jednoduchém, částečně automatickém robustním škálování vůči zdravé kontrolní populaci. Tyto hodnoty jsou vyneseny ve formě multikomponentních krabicových grafů a ve formě metabolických map biomarkerů, ve kterých lze vizualizovat narušený metabolismus pacienta. Ve srovnání běžně používanými technikami nabízí metoda LC-MS/MS rychlou a snadnou přípravu vzorku, nízkou spotřebu vzorku, vyšší pokrytí metabolitů, které výrazně zlepšuje diagnostický proces, pohodlné zpracování dat s jasnou identitou analytů a pokročilou vizualizací výsledků a statistické vyhodnocení.

## Stanovení věkově závislého fyziologického rozmezí intermediátů de novo syntézy purinů v moči

Václava Škopová<sup>1</sup>, Olga Součková<sup>1,2</sup>, Jakub Krijt<sup>1</sup>, Stanislav Kmoch<sup>1</sup> a Marie Zikánová<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Klinika pediatrie a dědičných poruch metabolismu 1.LF UK a VFN Praha

<sup>2</sup> Laboratoř hmotnostní spektrometrie, Přírodovědecká fakulta UK, BIOCEV, Vestec

Puriny jsou nezbytnými sloučeninami pro všechny živé organismy jako součásti DNA a RNA, kofaktory enzymů, ATP aj. Dostatek purinů v organismu je zajišťován především recyklačními drahami, při zvýšené potřebě je aktivována de novo syntéza purinů (DNPS). Tuto dráhu tvoří 10 enzymatických reakcí, katalyzovaných 6 enzymy. Mezi známé metabolické poruchy spojené s mutacemi v genech DNPS patří deficit enzymů PAICS, ADSL a ATIC. Spektrum jejich klinických projevů je velmi široké od autismu až po těžkou psychomotorickou retardaci či úmrtí v neonatálním období, biochemicky se projevují hromaděním defosforylovaných forem substrátů nefunkčního enzymu v tělních tekutinách.

Naše skupina provádí LC-MS/MS screening intermediátů DNPS v močích pacientů s nespecifickými neurologickými a psychomotorickými poruchami. Koncentrace těchto substrátů se v dětském věku mění dynamičtěji než se předpokládalo, a proto bylo potřeba v rámci této studie upřesnit jejich fyziologické rozmezí. Dosud bylo známé věkově stratifikované rozmezí jen některých z nich<sup>1</sup>. Zároveň nedávné případové studie mírných forem DNPS onemocnění ukázaly mnohem nižší koncentrace metabolitů v moči, než bylo dříve zaznamenáno.

Separace jednotlivých metabolitů je zajištěna kapalinovou chromatografií na koloně plněné reverzní fází (Bischoff ProntoSIL C18 AQ) a detekce na spektrometru s trojitým kvadrupólem v módu pozitivní ionizace elektrosprejem v režimu monitoringu selektivních reakcí (SRM).

Rozšířili jsme soubor kontrolních vzorků moči na cca 250 a stanovili jsme fyziologické rozmezí pro jednotlivé metabolity DNPS i některé metabolity recyklačních drah ve skupinách do 1 roku, od 1 do 3 let, od 3 do 5 let, od 6 do 9 let, od 10 do 14 let, od 15 do 20 let a nad 20 let. Nejvýraznější změny byly zaznamenány během prvních měsíců života. Například koncentrace GAR a SAICAR klesá během prvního roku až 3-5x, u sukcinyladenosinu a SAICAR je pokles mírnější, u hypoxantinu je pokles až po třetím roce života. U všech sledovaných metabolitů je v prvním roce života velmi široké rozmezí. Je potřeba shromáždit větší počet kontrolních vzorků do 1 roku věku, což by umožnilo rozdělení této kategorie do více věkových intervalů a zpřesnilo výsledné rozmezí.

Za poslední 1,5 roku jsme screeningově vyšetřili téměř 5000 vzorků moči a z nich bylo identifikováno přibližně 5% vzorků s více než 10x zvýšenými hodnotami některého z purinových metabolitů oproti mediánu. Tyto vzorky následně přeměříme kvantifikační metodou, získané hodnoty porovnááme s nově tvořeným fyziologickým rozmezím a zvažujeme patofyziologickou podstatu abnormalit purinového profilu.

*Grantová podpora: Tato práce je financována grantem Ministerstva zdravotnictví AZV NU23-01-00500 a AZV NU22-07-00126.*

1. Cremonesi, A. et al. Improved diagnostics of purine and pyrimidine metabolism disorders using LC-MS/MS and its clinical application. Clin Chem Lab Med 61, 1792-1801 (2023).

## Analýza hexahydrokanabinolu v biologickém materiálu

Peter Ondra, Vítězslav Maier

Ústav soudního lékařství a medínského práva, LF UP a FN Olomouc

Hexahydrokanabinol (HHC) je semisyntetický kanabinoid, přičemž malé množství této látky se vyskytuje přirozeně v rostlinách konopí. HHC se obvykle vyrábí synteticky z kanabidiolu, méně často z delta-9- tetrahydrokanabinolu (THC). Produkty obsahující HHC se bez omezení ještě do začátku března 2024 prodávaly v ČR jako náhrada konopí a produktů obsahujících THC, v řadě velmi atraktivních značkových i neznačkových výrobků. V řadě případů tyto produkty způsobily u uživatelů vážné intoxikace. Z klinického, ale i z forenzního hlediska bylo nutné vypracovat metody průkazu a stanovení HHC v biologickém materiálu (BM).

Analýza HHC a jeho metabolitů v BM se obvykle provádí metodami kapalinové nebo plynové chromatografie, využívající jako detektor hmotnostní spektrometr<sup>1</sup>. Pokud jde o LC-MS metodu použitou na našem pracovišti, HHC a jeho metabolity byly analyzovány v BM na systému firmy Bruker (Elute UHPLC + HRMS impact II), vybavený kolonou C18 (Intensity Solo HPLC Column, C18-2, 1.8 µm, 100 x 2.1 mm, Pore Size 90 Å) s gradientovou elucí, využívající toxikologickou screeningovou metodu s pomocí BbCID (broadband collision-induced dissociation). Výchozí objem zpracovávaného BM byl 50 µl séra nebo moče.

Délka analýzy cca 15 minut. V případě GC-MS metody použité pro analýzu HHC šlo o systém firmy Bruker (SCION 436-GC + EVOQ TQ) vybavený kapilární kolonou Rtx 5 MS (15m x 0.25 µm x 0.25 mm) s použitím teplotního gradientu. Výchozí objem zpracovávaného BM byl 1 ml séra. Délka analýzy cca 18 minut. U obou metod byl pro kvantifikaci HHC v krevních vzorcích použit THC-D3.

Analytickou zajímavostí je, že při použití LC-MS metody za výše uvedených podmínek, poskytuje HHC v chromatogramu jeden pík, zatímco při použití GC-MS metody, jsou v chromatogramu dva píky odpovídající 9(R)-hexahydrokanabinolu (R-HHC) a 9(S) hexahydrokanabinolu (S-HHC). Pro interpretace zjištěných koncentrací HHC jde o poměrně významnou skutečnost, a to nejen z klinického, ale především z forenzního hlediska. Důvodem je skutečnost, že R-HHC je významně biologicky aktivnější než S-HHC.

*Práce byla podpořena MZ ČR – RVO(FNOI, 00098892).*

1. Schirmer, W. et al. Identification of human hexahydrocannabinol metabolites in urine. Eur J Mass Spectrom. (5-6), 326 – 337 (2023).

## Náhodná či úmyslná intoxikace?

Miroslava Bursová<sup>1,2</sup>, Miloš Sokol<sup>1</sup>, Tomáš Hložek<sup>1,2</sup>, Ivana Černá<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Vojenský ústav soudního lékařství, Ústřední vojenská nemocnice Praha

<sup>2</sup> Ústav soudního lékařství a toxikologie, Všeobecná fakultní nemocnice v Praze a 1. lékařská fakulta Univerzity Karlovy

Tento příspěvek se věnuje identifikaci a stanovení léčiv ze skupiny antihypertenziv a antidiabetik, které byly prokázány v biologickém materiálu, který byl odebrán v rámci pitvy u zemřelého, který byl nalezen v kanceláři bez známek života.

Systematická toxikologická analýza (STA) biologického materiálu (krev, žaludeční obsah) byla provedena pomocí několika separačních metod - primárně byl proveden screening pomocí kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí. Ve vzorku krve a žaludečním obsahu tak byla prokázána přítomnost několika léčiv ze skupiny antihypertenziv: telmisartan, verapamil, indapamid a perorálních antidiabetik: metformin, gliclazid; a další léčiva (propylphenazon, paracetamol, pantoprazol, kofein).

Pomocí metody kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí (LC-MS/MS) byla stanovena koncentrace telmisartanu na 4 355 ng/ml, což odpovídá letální koncentraci; koncentrace verapamilu byla stanovena na 864 ng/ml, což je nad terapeutickou koncentrací; koncentrace metforminu byla stanovena na 8 778 ng/ml (toxická koncentrace). Kombinace těchto léků může způsobit výrazné snížení krevního tlaku, kolaps, motáním hlavy, selhávání srdce.

Za příčinu smrti bylo určeno selhání dechu a oběhu (kardiorespirační selhání) z důvodů intoxikace kombinací léčiv.

## Využití hmotnostní spektrometrie v toxikologické praxi

Roman Papoušek, Marie Staňková, Vladimíra Gebauerová

Ústav soudního lékařství, Fakultní nemocnice Ostrava

Hmotnostní spektrometrie je vysoce výkonnou a všestrannou analytickou technikou, která se díky své vysoké citlivosti, specifitě a schopnosti identifikovat stovky analytů v rámci jedné analýzy stala neodmyslitelnou součástí klinických a forenzních toxikologických laboratoří. Schopnosti a výhody této analytické techniky jsou každodenně využívány v systematické toxikologické analýze při identifikaci léčiv, omamných a psychotropních látek (včetně nově syntetizovaných psychoaktivních látek), jedů a dalších z toxikologického hlediska důležitých látek a jejich metabolitů, a to jak ve standardních, tak také méně obvyklých biologických vzorcích.

Autoři prezentují na konkrétních případech možnosti aplikace různých typů hmotnostních spektrometrů ve spojení s plynovou a kapalinovou chromatografií (GC-MS, GC-MS/MS, LC-MS/MS, LC-QTOF) v toxikologické praxi a pojednávají o možnostech a limitech zmíněných hmotnostně spektrometrických technik při identifikaci a kvantifikaci toxikologicky významných látek v biologickém materiálu. Diskutován je rovněž význam hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením, která v případě toxikologické aplikace je nenahraditelným nástrojem umožňujícím identifikovat stále rozšířenější nové syntetické deriváty psychoaktivních látek, ale také například metabolity léčiv, případně méně obvyklé přírodní toxiny, které nemusejí být vždy součástí běžných toxikologických databází a knihoven.

## Nové syntetické drogy aneb Co se v prosinci naučíš, v lednu jako když najdeš

Monika Židková<sup>1</sup>, J. Hampl<sup>1</sup>, T. Hložek<sup>1</sup>, K.M. Kroftová<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Ústav soudního lékařství a toxikologie 1. LF UK a VFN

<sup>2</sup> Kardiologická klinika 2. LF UK a FN Motol

Nové syntetické drogy (NSD) se staly neodmyslitelnou součástí drogové scény, přičemž syntetické katinony zaujímají významné místo mezi stimulačními látkami s rostoucí oblibou mezi uživateli. Na rozdíl od metamfetaminu nejsou k dispozici ověřená data k posouzení zdravotních rizik spojených s jejich užíváním.

Tento příspěvek prezentuje dva případy záchytu drogy ze skupiny katinonů, konkrétně N-ethylpentedronu. V prvním případě byl do naší laboratoře dodán bílý prášek, který měla pacientka užít na párty. Pomocí LC-HRMS a databázi mzCloud a HighResNPS se podařilo prokázat obsah N-ethylpentedronu v daném vzorku. V dodatečně zasláný vzorku moči pacientky byl však negativní. Ve druhém případě se jednalo o podezření na intoxikaci neznámou látkou u muže, který byl přijat na oddělení urgentního příjmu FN Motol kvůli psychotickému stavu a následně vyžadoval resuscitaci z důvodu zástavy oběhového systému. Analýza moči a krve odhalila přítomnost N-ethylpentedronu kromě látek podaných v nemocnici. Muž byl ve velmi vážném stavu hospitalizován více než týden na koronární jednotce FN Motol, což nám umožnilo zjistit, jak přibližně dlouho po užití je možné látku v moči a krvi detekovat.

## Hmotnostní spektrometrie v AGELLAB

Zuzana Birkáš<sup>1</sup>, Ondřej Hillmich<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Laboratoře AGEL a.s., Laboratoř farmakologie a toxikologie, Revoluční 2214/35. 741 01 Nový Jičín

<sup>2</sup> SHIMADZU Handels GmbH Česká republika

Laboratoře AGEL a.s. se sídlem v Novém Jičíně poskytuje zdravotnické služby pro nemocniční a ambulantní zařízení v rámci celé České republiky v oboru klinické toxikologie a klinické farmakologie pod záštitou odbornosti klinické biochemie. Laboratoř farmakologie a toxikologie disponuje týmem kvalifikovaných odborníků a velmi kvalitním přístrojovým vybavením, které umožňuje provádět vysoce citlivé a specifické analýzy. Samozřejmostí je pravidelné testování v cyklech externí kontroly kvality a akreditace naší laboratoře podle normy ISO 15 189. Naším cílem je neustálé zvyšování kvality poskytovaných služeb s ohledem na současný stav poznání v našem oboru.

Aktuálně pracoviště disponuje dvěma high-end kapalinovými chromatografy ve spojení s trojitým kvadrupólem SHIMADZU LCMS-8060 a LCMS-8060NX a také plynovým chromatografem s jednoduchým kvadrupólem a plamenově ionizační detekcí SHIMADZU GCMS-2020NX / FID 2030. GCMS/FID laboratoř využívá výhradně pro toxikologické analýzy a stanovení těkavých látek. LCMS přístroje jsou v laboratoři velmi vytižované pro svou citlivost, robustnost a nízkou nákladovost. Spektrum vyšetřovaných analytů na LCMS je dominantně analýza stanovení hladin léků a také toxikologické analýzy, dále vyšetření biogenních parametrů a pracovního lékařství. Oba LCMS systémy jsou kompatibilní a musí zvládnout přes 13 000 analýz ročně.

Software nového LCMS-8060NX je vybaven toxikologickou knihovnou, což dovoluje provádět rychlý LCMS toxikologický screening a eliminují se falešně pozitivní a falešně negativní výsledky v případech použití imunochemických metod.

Laboratoř se na konci roku 2023 rozhodla jít cestou automatizace a pořídila společně s novým LCMS-8060NX také CLAM-2040 (celý systém IVD-R). CLAM-2040 je preanalytický modul, který automatizovaně zpracovává biologický materiál (moč, plná krev, plazma nebo sliny) z primární zkumavky a připravený vzorek převádí do autosampleru kapalinového chromatografu bez nutnosti zásahu analytika/laboranta. Tato automatizace kromě ušetření celkového času na přípravu vzorků přináší také eliminaci lidské chyby.

## Nové přístupy ve vývoji analytických metod používaných ke stanovení koncentrací biologických léčiv

Patrik Matlak<sup>1,2</sup>, Hana Brozmanová<sup>2,3</sup>, Pavel Šišťák<sup>2,3</sup>, Milan Grundmann<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup> Katedra klinických neurověd, Lékařská fakulta, Ostravská univerzita

<sup>2</sup> Oddělení klinické farmakologie, Ústav laboratorní medicíny, Fakultní nemocnice Ostrava

<sup>3</sup> Ústav klinické farmakologie, Lékařská fakulta, Ostravská univerzita

Během posledních tří desetiletí prodělaly monoklonální protilátky (mAbs) výrazný posun z vědeckých nástrojů na terapeutika využívána pro léčbu různých onemocnění. Pokrok v terapii přinesla i výroba těchto protilátek, a to z původně chimérických na plně humanizované léčiva. Posun nastal i v oblasti stanovení jejich koncentrací v biologickém materiálu, a to z imunoanalytických metod (ELISA, RIA) na modernější metody využívající kapalinovou chromatografii s hmotnostní detekcí.

Pro analýzu mAbs natalizumabu a ocrelizumabu z lidského séra byl využit „bottom up“ přístup na kapalinovém chromatografu s hmotnostní detekcí. Pro úspěšnou kvantifikaci bylo nutné najít a identifikovat specifické sekvence peptidů na lehkém a těžkém řetězci, které se odlišují od běžných proteinů lidského séra. Úprava vzorků zahrnovala redukční činidlo dithiothreitol, alkylační činidlo iodacetamid a štěpení trypsinem na krátké specifické peptidy, které byly následně separovány kapalinovou chromatografií a detekovány hmotnostním spektrometrem. Kvantifikace monoklonálních protilátek a validace metod probíhala na systému UPLC-MS/MS s gradientovou elucí na koloně Acquity UPLC BEH C18 (100x2,1 mm, 1,7 um) při 55 °C.

Opakovatelnost, mezilehlá přesnost a výtěžnost byly testovány na 4 koncentračních hladinách. Variační koeficienty se nacházely v rozmezí 0,8–10,2 % a výtěžnost v rozmezí 89,8–106,4 %. Koncentrace v patientských vzorcích se pohybovaly od 1,8 do 193,3 µg/ml pro natalizumabu a od 0,5 do 21,8 µg/ml pro ocrelizumab.

Metody pro stanovení mAbs byly validovány podle směrnice European medicines agency (EMA) pro validaci bioanalytických metod a splnily všechna akceptační kritéria. Umožňují rychlé a snadné stanovení koncentrací natalizumabu a ocrelizumabu v patientských vzorcích a jsou vhodné pro použití v rutinní praxi.

## Možnosti proteomických metod v analýze klinických vzorků

Rudolf Kupčik

Centrum biomedicínského výzkumu, Fakultní nemocnice Hradec Králové

Význam laboratorních vyšetření pro zjištění aktuálního stavu pacientů v klinické praxi roste a analýza proteinů patří mezi ně. Hledání nových proteinových molekul, které mají diagnostický potenciál nebo nové přístupy k detekci těch známých, jsou jedněmi z mnoha aplikací proteomiky.

Standardní postup zahrnuje separaci pomocí kapalinové chromatografie (LC), identifikaci molekul pomocí hmotnostní spektrometrie (MS) a bioinformatické zpracování dat. Tímto způsobem se studují jak kvalitativní, tak kvantitativní změny na proteinové úrovni, ke kterým dochází na základě různých patologických jevů. Tyto změny jsou využívány při hledání nových diagnostických markerů, které umožní časnou detekci probíhající nemoci, ideálně ve snadno dostupném biologickém materiálu. Další možností využití je hodnocení působení léčiv na proteinové úrovni s cílem lépe porozumět mechanismu účinku nebo mechanismu jejich toxicity. Proteomické přístupy založené na MS jsou také nezastupitelné v rozklíčování mechanismu vzniku nejrůznějších onemocnění. LC separace v kombinaci s MS založenou na technologii Orbitrap umí změny na proteinové úrovni odhalit a ty jsou tak posléze cíleně ověřovány dalšími metodami na větším počtu vzorků, resp. pacientů.

V poslední době dochází k zavádění hmotnostní spektrometrie proteinů i pro klinické vyšetření, a to především u monoklonálních gamapatií, konkrétně mnohočetného myelomu (MM). Protože u mnoha pacientů s MM, kteří dosáhnou kompletní remise, nakonec dojde k relapsu, jsou třeba citlivé analytické metody odhalující hloubku léčebné odpovědi. Běžné diagnostické testy na M-protein u MM (proteinová elektroforéza a imunofixace) jsou spolehlivé a rychlé, ale nejsou dostatečně citlivé, aby odhalily velmi nízké koncentrace M-proteinu po léčbě, natož pak minimální reziduální chorobu. Ta je pak diagnostikována přímo z kostní dřeně, jejíž odběr je invazivní, na rozdíl od minimálně invazivního odběru periferní krve. V současné době se jedná o MALDI-ToF-MS technologii pro middle-up analýzu velkých fragmentů protilátek v krevním séru.<sup>1</sup> Tuto metodu, stejně jako např. imunofixaci, komplikuje přítomnost polyklonálního pozadí protilátek. Další technologie využívá LC separaci v kombinaci s MS (Orbitrap), kdy se identifikují a následně detekují specifické peptidy M-proteinu v průběhu onemocnění.<sup>2</sup> Zde je vysoké citlivosti dosaženo cílenou analýzou peptidů odvozených z variabilní oblasti M-proteinu (klonotypické peptidy), která je unikátní pro pacienta/klon protilátky, díky specifickému přeskupení V(D)J oblasti genu a somatické hypermutaci.

Proteomika založená na MS má velký potenciál pro hledání biomarkerů souvisejících s různými onemocněními, včasnou detekci/diagnostiku, hodnocení rizika relapsu, farmakodynamiku nebo sledování léčby.

1. Li, K. et al. Blood (2022) 140, 12446–12447.; 2. Noori, S. et al. Blood Cancer J. (2023) 13, 30.



## GENERÁLNÍ PARTNEŘI



## HLAVNÍ PARTNEŘI



## PARTNEŘI

