

3. PRACOVNÍ DNY KLINICKÉ HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE

15. – 16. 4. 2025

Pevnost poznání Olomouc

ODBORNÝ GARANT

prof. RNDr. David Friedecký, Ph.D.

POŘADATEL

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

PROGRAM A SBORNÍK ABSTRAKT

Další informace najdete na:

<https://biochemie.fnol.cz/pracovni-dny-klinicke-hmotnostni-spektrometrie>

PROGRAM

ÚTERÝ 15. 4. 2025

13:00–14:30 **SEKCE I**

Alan Kádek **Strukturní proteomika zítřka: Odshora a nativně**

(1.LF UK v Praze, BIOCEV – Mikrobiologický ústav AVČR) 20min

Aleš Hnízda **Strukturní hmotnostní spektrometrie a analýza pathogenicity genetických variant** (1.LF UK v Praze) 20min

Tomáš Čajka **Expanding from routine LC-MS analysis of metformin to metabolomics and lipidomics in type 2 diabetes patients**

(Fyziologický ústav AVČR) 25min

Lukáš Hekerle **Praktický přínos implementace cobas i 601 do rutinní klinické laboratoře** (Roche) 15min

14:30–15:00 přestávka na kávu

15:00–16:30 **SEKCE II**

Ladislav Kuchař **„Monitorování potenciálních terapií Farberovy choroby na myším modelu s využitím lipidomické analýzy pomocí LC-MS“**

(VFN, 1.LF UK v Praze) 20min

Daniel Heblík **Analýza lipidového profilu pro včasnou diagnostiku karcinomu slinivky břišní** (Lipidica) 20min

Rudolf Kupčák **Využití hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením pro cílenou proteomickou analýzu**

(FN Hradec Králové, Pragolab) 20min

David Maxa **HRMS v toxikologické praxi: Jak na identifikaci nelegálních látek** (Shimadzu) 15min

Jan Bohuslávek **Využití LC-MS/MS v klinické praxi** (Waters) 10min

16:30–17:00 přestávka na kávu

17:00–18:30 **SEKCE III**

Pavel Šišťák **Hmotnostně-spektrometrické stanovení inzulínu a jeho analogů v klinické praxi: Stabilita, citlivost a preanalytické výzvy** (FN Ostrava) 20min

Romana Uřínová **Vývoj metody na stanovení sérové koncentrace donepezilu a jeho dvou metabolitů metodou vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií s hmotnostní detekcí** (FN Ostrava) 20min

Martina Horejšová **Studium vztahů mezi metabolismem cytidinu a jeho nukleosidovými analogy s ohledem na léčbu hematologických malignit**
(FN Olomouc) 10min

Václava Škopová **Screening intermediátů de novo syntézy purinů v moči pomocí LC-MS/MS** (1.LF UK a VFN Praha) 10min

Jiří Petrů **Hmotnostní spektrometrie v diagnostice mnohočetného myelomu a sledování MRD** (Sebia) 10min

Jan Vlasák **Comparing Selectivity of Core-Shell and Modified Fully Porous HPLC Columns to Optimize Separation of 3 Classes of 47 TDM Analytes** (Phenomenex) 10min

19:00–22:00 večere

STŘEDA 16. 4. 2025

9:00–10:30 **SEKCE IV**

Vítězslav Maier **Netradiční biologické materiály v toxikologické analýze**
(FN Olomouc) 15min

Romana Uřinová **Validace in-house metod v klinické farmakologii**
(FN Ostrava) 20min

Hana Janečková **Troubleshooting v LC/MS** (FN Olomouc) 20min

Eva Klappková **Vitamin K a jeho využití v klinické praxi** (FN Motol) 20min

Ondřej Lacina **Analýza drog a farmak na LC/MS trojitým kvadupólu Agilent**
(Altium) 15min

10:30–11:00 přestávka na kávu

11:00–12:30 **SEKCE V**

David Friedecký **Implementace IVDR v MS laboratoři, management rizik**
(FN Olomouc) 20min

Lucie Václavková **Výrobní praxe a IVDR** (FN Olomouc) 20min

Karolína Kašparová **Zkušenosti se zpracováním dokumentace k IH-IVD dle IVDR: přístup společnosti Lipidica** (Lipidica) 15min

Panelová diskuze (Diskuze k IVDR) 20min

12:30–14:00 oběd

GENERÁLNÍ PARTNEŘI



HLAVNÍ PARTNEŘI



PARTNEŘI



SBORNÍK ABSTRAKT

SEKCE I

Structural Proteomics of Tomorrow: Native and from the Top, Down

Alan Kádek¹

¹ Laboratory of Structural Biology and Cell Signaling, Institute of Microbiology CAS – BIOCEV, Průmyslová 595, 252 50 Vestec, Czech Republic

Abstract

Efficient and informative fragmentation as well as high resolution and mass precision are key to the success of many MS-based experiments studying both small molecules as well as large multi-protein assemblies. Especially so, in the case of proteins, since the realization of both structural biologists, clinicians and mass spectrometrists of the complexity of proteoforms.

Therefore, both proteomics as well as structural MS have been dependent on various means of fragmentation for which diverse MS dissociation techniques and their combinations are often needed. This contribution will report on the successful implementation of both 10.6 μm CO₂ and 193 nm ArF lasers for infrared multi-photon dissociation (IRMPD) and ultraviolet photodissociation (UVPD), respectively, for in-cell dissociation inside a 15T SolariX Fourier-transform ion cyclotron resonance (FT-ICR) mass spectrometer at BIOCEV in Prague. It will also highlight native MS approaches as the direction of structural proteomics for studying non-covalent protein complexes in the gas phase.

The work was supported by EU (2D-TOPMASS).

Structural mass spectrometry utilized for the assessment of genetic variants in genetic diseases

Aleš Hnízda¹, Vítězslav Brinsa¹, Alan Kádek²

¹ Research Unit for Rare Diseases, Department of Pediatrics and Inherited Metabolic Disorders, 1st Faculty of Medicine and General University Hospital, Charles University in Prague, Czech Republic

² Institute of Microbiology, Czech Academy of Sciences, Videnska 1083, 14220, Prague 4, Czech Republic

Abstract

Rapid progress in DNA sequencing techniques dramatically increased our capability to explore genomes of undiagnosed patients with rare genetic diseases. Currently, major limitation is the relatively low capacity and high cost of the techniques needed for the assessment of potentially causative variants associated with diseases, marked as “variants with unknown significance” in genetic databases. Therefore, we implemented structural analysis using available experimental and theoretical models to assess the clinical significance of candidate causative genetic variants. Combining all publicly available data, we successfully assessed potential pathogenicity of variants in several candidate genes. In relevant cases, we investigated underlying pathogenetic mechanism further using experimental approaches.

In this talk, we will demonstrate the efficacy of structural mass spectrometry in assessing the pathogenicity of genetic variants and elucidating the molecular mechanisms in genetic diseases. Specifically, we will describe the methodology utilized to establish differential biochemical criteria for the evaluation of variants in EHMT1/2, which have been implicated in neurodevelopmental disease, clinically manifesting as Kleefstra syndrome. In this case, native ESI-MS was used for studying protein dimerization and enzyme-substrate binding affinities which was complemented with hydrogen-deuterium exchange – mass spectrometry to reveal local conformational perturbations induced by mutations or ligand binding. These data expand knowledge about biological function of EHMT1/2 in normal state and Kleefstra syndrome. In conclusion, we highlight versatility of structural mass spectrometric tools for studying diverse clinically relevant protein altering variants.

Supported by the project National Institute for Neurological Research (Programme EXCELES, ID Project No. LX22NPO5107) – Funded by the European Union – Next Generation EU.

Expanding from routine LC-MS analysis of metformin to metabolomics and lipidomics in type 2 diabetes patients

Tomáš Čajka¹, Jiří Hricko¹, Lucie Rudl Kulhavá¹, Michaela Paučová¹, Stanislava Rakušanová¹, Michaela Nováková¹, Veronika Holá¹, Vojtěch Škop², Ivana Laňková², Terezie Pelikánová², Martin Haluzík²

¹ Institute of Physiology of the Czech Academy of Sciences, Vídeňská 1083, 142 00 Prague 4

² Institute for Clinical and Experimental Medicine, Vídeňská 1958, 140 21 Prague 4

Liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS)-based analysis of antidiabetic drugs and their metabolites in biofluids is challenging, particularly in multi-targeted methods, due to variations in polarity, a wide range of concentrations, and potential co-isolation of polar metabolites or even polar lipids during sample preparation, which may interfere with separation and/or detection. In multi-drug analysis, a single-phase extraction with organic solvents is commonly used, followed by separating polar and medium-polar drugs using a reversed-phase LC (RPLC) column. However, RPLC provides suboptimal separation for highly polar metformin (XlogP -0.54), as it elutes near the void volume. Therefore, hydrophilic interaction chromatography (HILIC) represents a viable alternative for analyzing highly polar drugs.

Here, we present an LC-MS-based workflow for multi-drug analysis, including metformin, which was subsequently applied to assess drug adherence in type 2 diabetes (T2D) patients. This method enables the quantification of more than 40 drugs and selected metabolites at concentrations as low as 1–10 ng/mL, offering sufficient sensitivity for monitoring adherence.

Additionally, we optimized an LC-MS workflow for the combined “all-in-one” extraction of polar metabolites and complex lipids in plasma, followed by a multi-platform analysis of each fraction. The extraction process utilized a biphasic approach with a methanol/methyl *tert*-butyl ether mixture and water, allowing separate analyses of the organic phase (for complex lipids) and the aqueous phase (for polar metabolites) in untargeted metabolomics and lipidomics. Using MS-DIAL software and comprehensive MS/MS spectral libraries, we annotated over 600 complex lipids and polar metabolites from plasma samples of metformin adherent and non-adherent T2D patients and non-T2D controls, revealing metabolome and lipidome alterations in these groups.

This research was supported by the project National Institute for Research of Metabolic and Cardiovascular Diseases (Programme EXCELES, ID Project No. LX22NPO5104)—Funded by the European Union—Next Generation EU and the Czech Health Research Council (NU20-01-00186).

[1] Rakušanová S., Čajka T. *Trend Anal Chem* (2024) 180:117940.

[2] Rakušanová S., Čajka T. *Trend Anal Chem* (2023) 158:116831.

[3] Čajka T., et al. *Int J Mol Sci* (2023) 24(3) 1987.

Praktický přínos implementace cobas® i 601 do rutinní klinické laboratoře

Mgr. Lukáš Hekerle¹

¹Roche, Diagnostická divize

Prezentovaný příspěvek obsahuje přehledové informace o automatickém analyzátoru **cobas® i 601** včetně prvních výsledků globální multicentrické studie (MCE).

cobas® pro i 601 analyzer je integrovaný, počítačem řízený, automatický zdravotnický prostředek pracující v random-access módu zahrnující přípravu vzorku na bázi částic a kapalinové chromatografie a kvantitativní detekce analytů *in-vitro* na principu hmotnostní spektrometrie. **cobas® i 601** analyzer je určen pro identifikaci přírodních a syntetických sloučenin (např: steroidní hormony, vitamíny, opiáty, benzodiazepiny a další) v lidských vzorcích na základě ionizace analytů a separace vzniklých iontů v elektro-magnetickém poli dle poměru hmotnost/náboj. Po svém uvedení na lokální trh bude systém určen k použití vyškolenou obsluhou v klinických laboratořích.

cobas® pro i 601 analyzer je v současné době globálně uveden v zemích akceptujících CE značku. Uvedení analyzátoru na lokální trh je v gesci jednotlivých poboček. Pro bližší informace ohledně uvedení **cobas® pro i 601** analyzer kontaktujte Roche obchodního zástupce.

SEKCE II

Monitorování efektu transplantace hematopoetických kmenových buněk u myšího modelu Farberovy choroby a spinální svalové atrofie s progresivní myoklonickou epilepsií: využití lipidomické analýzy pomocí LC-MS/MS

Ladislav Kuchař

Laboratoř pro studium vzácných nemocí, Klinika pediatrie a dědičných poruch metabolismu 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze a Všeobecné fakultní nemocnice v Praze

Mutace v genu *ASAH1* vedou ke dvě onemocněním a to Farberově chorobě (FD) a spinální svalové atrofii s progresivní myoklonickou epilepsií (SMA-PME) a to v důsledku deficitní aktivity kyselých ceramidasy (ACDasa). Obě onemocnění patří mezi velmi vzácné lysozomální střádavé poruchy, ale s rozdílnými klinickými projevy. Těžší formou je FD, kdy pacienti obvykle umírají v dětství, zatímco pacienti s SMA-PME mohou žít až do dospělosti. Pro FD nebo SMA-PME neexistuje žádná kauzální léčba. Transplantace hematopoetických kmenových buněk (HSCT) a strategie genové terapie pro léčbu deficitu ACDasy jsou jedny ze zkoumaných terapií. Na dříve vytvořeném myším modelu FD i SMA-PME, které mají symptomy popsané u lidských pacientů lze testovat potenciální terapii.

V případech HSCT byly zkoumány různé parametry jako délka přežití, chování, anomálie hematopoetického systému, hladiny plazmatických cytokinů a histiocytická infiltrace a akumulace ceramidu ve zkoumaných tkáních včetně CNS. Spolu s těmito ukazateli byly stanoveny koncentrace významných sfingolipidů včetně signálních molekul reostatu pomocí tandemové hmotnostní spektrometrie. Tento kombinovaný přístup umožnil komplexní pohled na efekt HSCT v modelu FD a SMA-PME.

Kromě zlepšení ve výše uvedených parametrech došlo po HSCT též k prevenci rozvoje lézí a významné demyelinizace míchy pozorované u SMA-PME myši. Důležité bylo i zjištění, že pouze časná a obecně pre-symptomatická léčba byla účinná. Bohužel jsme zaznamenali poškození ledvin, které se nezlepšilo ani v jednom modelu.

Podpořeno z programového projektu Ministerstva zdravotnictví ČR s reg. č. NU21-08-00324. Tato práce vznikla též za podpory projektu MULTIOMICS_CZ, (Operační program Jan Amos Komenský, Ministerstvo školství, mládeže a tělovýchovy České republiky, reg. č. CZ.02.01.01/00/23_020/0008540) – Spolufinancováno Evropskou unií a též projektem Národní institut pro výzkum metabolických a kardiovaskulárních onemocnění (Program EXCELES, číslo projektu: LX22NPO5104) – Financováno Evropskou unií – Next Generation EU.

Analýza lipidového profilu pro včasnou diagnostiku karcinomu slinivky břišní

Heblík D.¹, Peterka O.^{1,2}, Holčapek M.²

¹ Lipidica, a.s., Pernštýnské náměstí 51, Pardubice

² Katedra analytické chemie, Fakulta chemicko-technologická, Univerzita Pardubice

Abstrakt

Rakovina slinivky břišní (PaC) je nádorové onemocnění s nejméně příznivou prognózou ze všech typů rakovin. Průměrná délka života je 8 měsíců od stanovení diagnózy a důvodem je agresivní vývoj bez varovných příznaků vedoucí k pozdní detekci převážně již v neresekabilním stádiu. Současné diagnostické metody jsou endoskopická ultrasonografie (EUS) a magnetická rezonance (MRI) se specificitou a citlivostí mezi 81–93 %. Představují však pro pacienta invazivní zákrok s možnými nežádoucími následky. Screening pomocí biomarkerů z biologických tekutin by mohl významně přispět k rozvoji včasné diagnostiky a vést k příznivější prognóze pacientů s tímto onemocněním.

Řada studií poukazuje na změny v metabolismu lipidů, jež by mohly souviset s výskytem některých typů tumorů. Tyto změny byly prokázány u rakoviny slinivky břišní, kde byl popsán rozdílný lipidomický profil zdravých jedinců a pacientů s PaC. Nejvíce dysregulovanými lipidy byly sphingomyeliny a ceramidy s dlouhým nasyceným řetězcem a (lyso)fosfatidylcholinu, které byly jako potenciální biomarkery potvrzeny analýzou více než 800 vzorků séra, přičemž senzitivita i selektivita přesahovala v obou případech 90 % [1].

Pro klinickou praxi je nezbytná metodika umožňující analýzu velkého počtu vzorků v krátkém čase, a pro-

to byly porovnány přístupy využívající hmotnostní spektrometrii spojenou s přímou infúzí (metodika využívaná v klinické praxi) a superkritickou fluidní chromatografií (UHPSFC/MS, výzkumná platforma) [2]. Lipidomický test je založen na analýze extraktů krevní plazmy, stanovení koncentrace daných lipidů a následném zpracování koncentrací pomocí vícerozměrné statistické analýzy. Obě metodiky vykazovaly výsledky s vysokou sensitivitou a specificitou, avšak UHPSFC/MS metoda umožňuje analýzu více lipidových tříd s větší prostupností vzorků, lepší robustností metodiky, která vede k mírně lepším výsledkům. Z tohoto důvodu byla UHPSFC/MS metoda zvolena pro klinické ověření lipidomické diagnostiky nádoru slinivky břišní (LDPC test). Převod této metody do praxe je spojen s ověřením klinické funkce na vzorcích dobrovolníků spadajících do skupiny se zvýšeným rizikem rozvoje rakoviny slinivky břišní, jako je prokázána alespoň jedna z mutací genu (např. STK11, DKN2A, BRCA1, BRCA2, TP53), rodinná anamnéza PaC, přítomnost hereditární pankreatitidy nebo kombinace těchto rizik.

Reference

- [1] Wolrab, D. *et al.* Lipidomic profiling of human serum enables detection of pancreatic cancer. *Nat. Commun.* **13**, 124 (2022).
- [2] Idkowiak, J. *et al.* Robust and highthroughput lipidomic quantitation of human blood samples using flow injection analysis with tandem mass spectrometry for clinical use. *Analytical and Bioanalytical Chemistry.* **415**(5), 935-951 (2023).

Využití hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením v cílené proteomice

Rudolf Kupčík

Centrum biomedicínského výzkumu, Fakultní nemocnice Hradec Králové

Cílená proteomika využívající hmotnostní spektrometrii s vysokým rozlišením (HRMS) se stala jedním z klíčových přístupů pro kvantifikaci specifických proteinů v komplexních biologických vzorcích s vysokou citlivostí a přesností. Hmotnostní spektrometrie, se tak díky těmto vlastnostem stala jednou z ústředních technologií v této oblasti, která umožňuje cílené měření proteinů v nízkých koncentracích, které jsou klíčové pro diagnostiku a monitorování nemocí. Klasická forma cílené proteomiky, která je stále často využívána v klinických podmínkách využívá monitorování vybraných reakcí (SRM), které se provádí pomocí hmotnostních spektrometrů se třemi kvadrupóly a tudíž nízké rozlišení. Tento přístup, je v poslední době nahrazován přístupem, kdy je namísto posledního kvadrupólu umístěn analyzátor, který zaznamenává kompletní spektra fragmentačních iontů (např. Orbitrap). Tato technika je pak nazývána Parallel reaction monitoring (PRM) a zajišťuje vyšší specificitu a vynechává požadavek na předvýběr přechodů (1), navíc je zde možné využít vysokého rozlišení.

Cílená proteomika pak má zásadní roli i v klinických studiích při validaci kandidátských biomarkerů identifikovaných globálními proteomickými přístupy. Citlivost a specificita cílených testů založených na HRMS pak umožňuje přesnou kvantifikaci proteinů i v nízkých koncentracích, což je velmi výhodné pro detekci onemocnění v raných fázích nebo pro monitoring hloubky léčebné odpovědi.

Stále je nutné dodržovat zdoluhavé procesy přípravy vzorků pro analýzu, stejně jako využívat syntetické peptidy značené stabilními izotopy za účelem kvantifikace peptidů/proteinů. I tak se cílené proteomické přístupy stále rozšiřují a to např. do podoby multiplexních cílených proteomických testů, umožňující simultánní kvantifikaci několika biomarkerů v jedné analýze. Toho se pak využívá např. v personalizované diagnostice, kdy se metody založené na technologii Orbitrap využívají v reálných klinických aplikacích monitoringu monoklonálních gamapatií. Tam nejen, že se v čase monitoruje klon monoklonální protilátky na základě detekce a kvantifikace několika pro klon/pacienta specifických peptidů, ale je možné také zároveň sledovat hladiny různých protilátkových léčiv podávaných pacientovi v několika liniích terapie (2). Je tak zřejmé, že vývoj cílené proteomiky založené především na přístrojích s vysokým rozlišením se rozšiřuje do klinických aplikací. V budoucnu pak bude pravděpodobně možné očekávat využití a rozšíření potenciálu těchto technologií především v precizní/personalizované medicíně.

1. A. Bourmaud *et al.*, *Proteomics* 16 (2016), 2146-2159.
2. Ch. Wijnands *et al.*, *Pharmaceutics* 17 (2025), 135.

HRMS v toxikologické praxi: Jak na identifikaci nelegálních látek

David Maxa

SHIMADZU Handels GmbH branch office Praha

Forenzní toxikologie čelí neustálým výzvám spojeným s detekcí a identifikací nelegálních látek, včetně nových psychoaktivních substancí. Vysokorozlišovací hmotnostní spektrometrie (HRMS) přináší pokročilé možnosti pro rychlou a přesnou analýzu klinických i forenzních vzorků. V této prezentaci představíme jak je možné využít systém Shimadzu LC-MS-9050 pro toxikologický screening a identifikaci neznámého vzorku zabavených drog.

Využití LC-MS/MS v klinické praxi

Jan Bohuslávek

Waters

Prezentace poskytne krátký průřez klinickými a toxikologickými aplikacemi s využitím hmotnostní spektrometrie, které nabízí a podporuje firma Waters. Tato firma má dlouholetou praxi v oblasti kliniky a toxikologie a pro mnoho z těchto aplikací vyvinula kompletní řešení od přípravy vzorků až po zpracování výsledků. Pro vybrané analýzy dokonce poskytuje IVD certifikované kity. Přednáška ukáže nejen seznam podporovaných metod, ale u některých i více detailní popis a doporučení pracovního postupu. Pozornost bude věnována hlavně aplikacím, pro které má firma vlastní kity, jako například analýza vitamínu D, panel steroidních hormonů či panel imunosupresiv. Krátce budou zmíněny i metody toxikologického screeningu pro klinické a forenzní laboratoře.

SEKCE III

2D-LC-MS/MS determination of insulin and its analogs in clinical practice: Improved Sensitivity, Stability and Preanalytical Challenges.

Pavel Šišťák^{1,2,3}, Romana Uřinová^{1,2}, Klára Handlosová^{4,5}, Petr Handlos^{4,5}, David Stejskal^{2,6}

¹Department of Clinical Pharmacology, Institute of Laboratory Medicine, University Hospital Ostrava, Ostrava, Czech Republic

²Institute of Laboratory Medicine, Faculty of Medicine, University of Ostrava, Ostrava, Czech Republic

³Department of Clinical Pharmacology, Faculty of Medicine, University of Ostrava, Ostrava, Czech Republic

⁴Department of Forensic Medicine, University Hospital Ostrava, Ostrava, Czech Republic

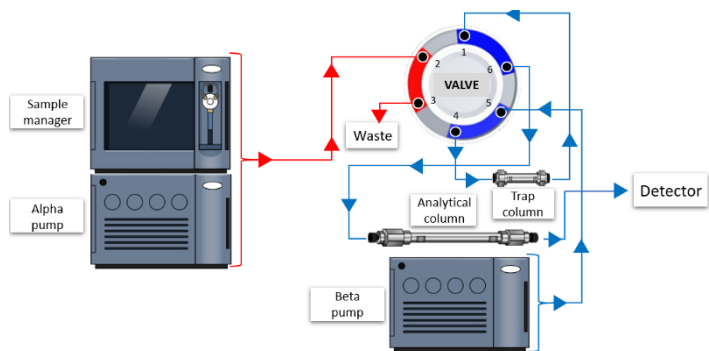
⁵Department of Forensic Medicine, Faculty of Medicine, University of Ostrava, Ostrava, Czech Republic

⁶Institute of Laboratory Medicine, University Hospital Ostrava, Ostrava, Czech Republic

Abstract:

The reliable quantification of insulin and its analogs in human plasma is essential for clinical diagnostics, forensic investigations and anti-doping measures. Traditional analytical approaches often face challenges related to insufficient sensitivity, poor chromatographic resolution and pre-analytical instability of analytes. In this study, we present a robust, sensitive and efficient two-dimensional liquid chromatography-tandem mass spectrometry (2D-LC-MS/MS) method developed and validated for the simultaneous determination of human insulin and six insulin analogues (lispro, glulisine, glargine, degludec, detemir and aspart) in human plasma.

A first dimension trap-and-elute approach using an XBridge C18 trap column combined with second dimension separation on a Cortecs UPLC C18+ analytical column significantly improved chromatographic



resolution. The method used a simplified sample preparation protocol involving protein precipitation, anion conversion and micro solid phase extraction in a 96-well format. Positive electrospray ionisation detection in multiple reaction monitoring mode provided accurate quantification with limits of quantification (50 pg/mL) well below therapeutic reference ranges.

Validation showed excellent analytical performance with intra-day precision (CV) ranging from 1.0% to 5.7%, inter-day precision from 0.7% to 5.9% and recoveries between 96.9% and 114.3%. Stability studies highlighted significant pre-analytical challenges, particularly enzymatic degradation, and emphasised the need for optimised sample handling and storage conditions. The addition of a protease inhibitor cocktail did not consistently improve analyte stability and in some cases negatively affected the sensitivity of the method.

The presented 2D-LC-MS/MS method offers significant advances in sensitivity, resolution and reliability for clinical and forensic insulin analysis, addressing key analytical and pre-analytical challenges in routine practice.

Stanovení donepezilu a jeho dvou metabolitů kapalinovou chromatografií ve spojení s hmotnostní detekcí.

Uřinováská Romana¹, Šišťák Pavel^{1,2}, Brozmannová Hana^{1,2}, Kacířová Ivana^{1,2}

¹Oddělení klinické farmakologie, Ústav laboratorní medicíny, Fakultní nemocnice Ostrava
²Ústav klinické farmakologie, Lékařská fakulta, Ostravská univerzita

Abstrakt

Alzheimerova choroba je progresivní neurodegenerativní onemocnění, její výskyt se zvyšuje se stárnutím populace a v současnosti se řadí mezi nejčastější se vyskytující demence. K léčbě je indikován donepezil, což je kognitivum zařazené do skupiny centrálně působících inhibitorů cholinesteráz. Jeho metabolismus probíhá v játrech pomocí cytochromu P450 na různé metabolity. Hlavní metabolit 6-O-demethyldonepezil má podobnou farmakologickou aktivitu jako mateřská látka.^{1,2}

Cílem byl vývoj metody na stanovení sérové koncentrace donepezilu a jeho dvou metabolitů metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní detekcí.

Analýza byla provedena na Waters H-class UPLC system (Waters, Milford Ma, USA) ve spojení s XEVO TQD triple quadrupole (Micromass, Manchester, UK). Separace látek probíhala při gradientové eluci na koloně BEH C18 s dobou analýzy 7 minut. Metoda byla validována dle EMA pravidel a je používána v rutinní praxi k monitorování hladin donepezilu a jeho dvou metabolitů.

Reference

1. SLÍVA, Jiří a Roman JIRÁK. Donepezilum. *Remedia: Internetové stránky českého farmakoterapeutického dvouměsíčníku* [online]. 2004, 2004(6) [cit. 2015-09-06]. Dostupné z: <http://www.remédia.cz/Archiv-rocniku/Rocnik-2004/6-2004/Donepezilum/e-9m-9l-cv.magarticle.aspx>
2. Donepezil. *Pubchem: Open Chemistry Database* [online]. [cit. 2016-09-06]. Dostupné z: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3152#section=Top>

Studium vztahů mezi metabolismem cytidinu a jeho nukleosidovými analogy s ohledem na léčbu hematologických malignit

Martina Horejšová¹, Barbora Piskláková¹, Aleš Kvasnička¹, Anna Ligasová³, Karel Koberna³, David Friedecký^{1,2}

¹ Laboratoř dědičných metabolických poruch, Lékařská fakulta Univerzity Palackého, Olomouc, Česká republika

² Oddělení klinické biochemie, Fakultní nemocnice Olomouc, Česká republika

³ Ústav molekulární a translační medicíny, Lékařská fakulta Univerzity Palackého, Olomouc, Česká republika

Úvod: Hematologické malignity jsou nádorová onemocnění krve, která zahrnují formy akutních a chronických myeloproliferativních a lymfoproliferativních onemocnění¹. Jednou z možností léčby hematologických malignit se nabízí léčba nukleosidovými analogy². Cytarabin (ara-C) je nukleosidový analog deoxy-cytidinu, jehož mechanismus účinku spočívá v tříkrokové fosforylaci na jeho trifosfátovou cytotoxickou formu (ara-CTP), která se inkorporuje do DNA a působí jako inhibitor DNA polymeras³. Fosforylace ara-C však může být ovlivněna dalšími enzymy, které tento analog přeměňují na jeho neaktivní uridinový protějšek. Naopak deaminace 5-ethynyl-2'-deoxycytidinu (EdC) na uridinový produkt je díky jeho vysoké toxicitě pro buněčný růst v protinádorové léčbě žádoucí⁴. Tato práce je zaměřena na charakterizaci metabolické dráhy vedoucí k přeměně ara-C na neaktivní produkt uracilarabinosid (ara-U) cytidindeaminasou (CDA).

Metody: Pro stanovení aktivity CDA byly využity nádorové buněčné linie, linie tvořené diploidními buňkami, linie imortalizovaných diploidních buněk a PDX (Patient-derived murine xenografts) modely vzorků myšího tumoru a plasmy. Buněčné lysáty i plasma byly inkubovány s ara-C, EdC, cytidinem (Cr), 5-brom-2'-deoxycytidinem (BrdC), 5-chlor-2'-deoxycytidinem (ClcC), 5-iod-2'-deoxycytidinu (IdcC) a 5-fluorocytidinem (FC) a to za různých podmínek pro sledování přeměny na jejich uridinové produkty. Analýza byla provedena cílenou metabolickou metodou využívající HILIC-MS/MS, tedy Exion LC (Sciex) s kolonou Luna NH₂ (3 μm, 100 mm x 2 mm, Phenomenex) ve spojení s hmotnostním spektrometrem QTRAP 6500⁺ (Sciex) pracující v MRM módu⁵. Aktivita CDA byla vypočtena z úbytku substrátu či z přírůdku produktu.

Výsledky: Vysoká aktivita CDA byla pozorovatelná v rámci nádorových buněčných linií po ošetření ara-C, ve zbylých případech byla zaznamenána nízká až nulová aktivita enzymu. Také byla pozorována rozdílná substrátová specifita CDA v rámci všech zkoumaných substrátů.

Závěr: Deaminace ara-C využívaného pro jeho antineoplastickou aktivitu v chemoterapeutické léčbě může vést ke snížení jeho terapeutických účinků⁶. Studium deaminace nukleosidových analog enzymem CDA má tedy potenciál v souvislosti s jejich využitím při léčbě hematologických malignit i v personalizované medicíně².

Grantová podpora: MZ ČR – AZV NU22-08-00148, MZ ČR – RVO (FNOI, 00098892).

Reference:

- Giordano M., Croci D. O., Rabinovich G. A.: Curr. Opin. Hematol. 20, 327 (2013). doi:10.1097/MOH.0b013e328362370f
- Yoshio E., Obata T., Murata D., Ito M., Sakamoto K., Fukushima M., Yamasaki Y., Yamada Y., Natsume N., Sasaki T.: Cancer Sci. 98, 1633 (2007). doi:10.1111/j.1349-7006.2007.00581.x

Hmotnostní spektrometrie v diagnostice mnohočetného myelomu a sledování MRD

Jiří Petruš, Vincent Bonifay

Sebía

Mnohočetný myelom (MM) je hematologické nádorové onemocnění způsobené maligní proliferací plazmatických buněk, které produkují monoklonální imunoglobulin (M-Ig). Zatímco skríníng, diagnostika a monitoring jsou mimo jiné postavené na detekci a kvantifikaci M-Ig v periferní krvi, sledování minimální reziduální choroby (MRD) využívá postupy založené na analýze kostní dřeně. S ohledem na invazivnost a zátěž, kterou opakovaný odběr kostní dřeně pro pacienta představuje, se v posledních letech intenzivně rozvíjejí metody založené na principu hmotnostní spektrometrie umožňující neinvazivní sledování MRD.

Společnost Sebia nedávno vyvinula vysoce senzitivní metodu **M-InSight®** založenou na detekci a kvantifikaci klonotypických peptidů z variabilní oblasti monoklonálního imunoglobulinu. Senzitivita **M-InSight®** z periferní krve je srovnatelná s hodnocením MRD prováděným z kostní dřene a u pacientů s MM a vykazuje obdobnou prognostickou hodnotu.

Příspěvek shrnuje nedávné studie zaměřené na využití metody **M-InSight®**, které hodnotí její shodu s konvenční elektroforézou sérových proteinů při vyšších koncentracích M-Ig, její konkordanci s NGS analýzou aspirátu kostní dřene, možnosti současného sledování hladin terapeutických protilátek a další oblasti jejího uplatnění v klinické diagnostice.

Comparing Selectivity of Core-Shell and Modified Fully Porous HPLC Columns to Optimize Separation of 3 Classes of 47 TDM Analytes

Jan Vlasák

Phenomenex LTD, Zeppelinstr.5, 63741 Aschaffenburg, Germany

Abstract

Therapeutic drug monitoring (TDM) research requires quantitation within narrow concentration ranges to distinguish between acceptable and toxic drug concentrations that could trigger potential adverse effects. For proper identification and measurement, a panel comprised of 47 analytes, subdivided into three categories: 22 Antidepressants, 14 Antipsychotics, and 11 Anticonvulsants were targeted. Here, a parallel comparison of two LC phases, a Kinetex™ 2.6 µm Biphenyl and a Luna™ Omega 3 µm Polar C18 both in 50 x 3.0 mm column dimensions packed with modified fully porous and core-shell and fully porous particles respectively, was conducted. The best selectivity and conditions for fast LC separation while achieving baseline resolution of critical isobaric compounds in each drug class was determined.

SEKCE IV

Netradiční biologické materiály v toxikologické analýze

Vítězslav Maier¹, Vladimír Halouzka¹, Jana Spurná¹

¹Ústav soudního lékařství a medicínského práva FN Olomouc

Abstrakt

V případech, kdy není k dispozici běžný biologický materiál pro toxikologickou analýzu (krev, moč, žaludeční obsah, vlasy, případně tkáň jater či ledviny) je možné provést analýzu z méně běžných biologických materiálů, které jsou za daných okolností k dispozici. Za méně běžné biologické materiály lze považovat u živých osob mateřské mléko a u zemřelých nehty nebo kostní dřeň, které mají význam zejména u těl s pokročilými hnilobnými změnami, případně v případech kosterních nálezů s absencí měkkých tkání.

Příspěvek popisuje případ, kdy matka před i po porodu užívala kratom. Alkaloidy kratomu (mitragynin a 7-hydroxymitragynin) byly následně prokázány s využitím LC-HRMS metody po jednoduché úpravě vzorku v moči novorozence a také v mateřském mléce matky. V aktuální odborné literatuře dosud není popsán případ, kdy byly alkaloidy kratomu prokázány v mateřském mléce, tedy dochází k prostupu alkaloidů kratomu z krve matky do mateřského mléka.

Úprava vzorků kostní dřene a nehtů odebraných post-mortem vyžaduje náročnější způsob úpravy před vlastní LC-HRMS analýzou. Kostní dřeň i nehty jsou v průběhu života součástí organismu a probíhá i zde ukládání, případně metabolismus toxikologicky významných látek (medikamenty, drogy, přírodní toxiny a další). Prezentovány budou případy, kdy na základě výsledků toxikologické analýzy s využitím LC-HRMS toxikologického screeningu byla prokázána přítomnost toxinu tisu červeného v kostní dřeni či přítomnost medikamentů a drog v kostní dřeni a nehtech odebraných post-mortem po homogenizaci a následné extrakci.

Kostní dřeň i nehty mohou být vhodnými biologickými materiály pro toxikologické vyšetření, které lze využít i v případech retrospektivní analýzy a v případech řešení otázky chronického (zne)užívání drog,

medikamentů, či k průkazu přírodních toxinů. Výsledky toxikologické analýzy mohou významně přispět k objasnění případných intoxikací, ke kterým mohlo dojít před smrtí a v některých případech i objasnit příčinu úmrtí. Kostní dřevě i nehty také mohou sloužit jako komplementární biologický materiál k běžně odebíranému biologickému materiálu.

Podpořeno MZ ČR – RVO (FNOI, 00098892).

Validace in-house metod v klinické farmakologii

Romana Uřinová¹

¹ Oddělení klinické farmakologie, Ústav laboratorní medicíny, Fakultní nemocnice Ostrava

Abstrakt

Při zavedení in-house metod do rutinní praxe je nutné provést ověření dané analytické metody. Validace je klíčovým krokem, kterým se prokazuje, že analytická metoda je vhodná pro zamýšlené použití. Jedná se o časově a finančně náročný proces. Mezi základní hodnocené parametry patří preciznost, pravdivost, selektivita, lineární rozsah, analytická citlivost, stabilita analytu. Validace metod pro analýzu biologických vzorků by měla vycházet ze směrnic pro validace bioanalytických metod jako jsou FDA Guidance for Industry nebo EMA Guideline on Bioanalytical Method Validation.

Troubleshooting v LC/MS

Hana Janečková

Oddělení klinické biochemie, Fakultní nemocnice Olomouc, Zdravotníků 248/7, 779 00 Olomouc

Kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií (LC-MS) je dnes nepostradatelnou analytickou technikou v oblasti klinické diagnostiky i biomedicínského výzkumu. Přestože se jedná o vysoce citlivou a selektivní metodu, její provoz bývá často provázen řadou technických komplikací. V každodenní praxi se lze setkat s poklesem citlivosti, kolísáním retence, kontaminací systému, poruchami ionizace či nestabilitou signálu, stejně jako s chybami ve fázi zpracování dat.

V příspěvku bude představen systematický přístup k troubleshootingu v LC-MS, který zahrnuje jak rutinní prevenci a údržbu přístroje, tak pokročilou diagnostiku běžných i méně obvyklých poruch. Na základě konkrétních případů z klinického i výzkumného prostředí budou ilustrovány typické projevy problémů, jejich identifikace a následná řešení.

Vitamin K a jeho využití v klinické praxi

Klapková Eva¹, Dunovská Kateřina¹, Barna Miloš^{1,2}, Melicherčík Pavel², Čepová Jana¹, Saveljev Michal³

¹ Ústav lékařské chemie a klinické biochemie 2. LF UK a FN Motol, Praha

² 1. Ortopedická klinika 1. LF UK a FN Motol, Praha

³ Rehabilitační oddělení Nemocnice Milosrdných sester sv. Karla Boromejského v Praze

Vitamin K působí jako kofaktor γ -glutamylkarboxylázy, která je důležitá pro post-translační karboxylaci vitamin K dependentních proteinů. Tato karboxylace je důležitá pro vazbu vápenatých iontů koagulačními faktory, pro protein C a protein S. Podílí se také na karboxylaci dalších bílkovin např. osteokalcinu a matrix Gla proteinu. Vitamin K1 se účastní především krevní koagulace, zatímco vitamin K2 se podílí na kostní remodelaci a kalciové homeostázi. Vitamin K1 přijatý běžnou pestrou stravou dostatečně pokryje požadavky koagulačních faktorů. Zatímco zhruba u 9 z 10 lidí nepostačuje příjem vitaminu K2 ze stravy na pokrytí dostatečné karboxylace ostatních vitamin K dependentních proteinů. Nedostatečná karboxylace vitamin K dependentních proteinů je spojována s vyšším rizikem výskytu osteoporotických zlomenin a nadměrnou kalcifikací měkkých tkání v důsledku kalciového paradoxu.

Cílem této práce bylo ověřit účinky suplementace vitaminu K2 u pacientů s kalcifikující tendinitidou ramene, osteopénií a zlomeninou radia. U pacientů s kalcifikující tendinitidou ramene byla suplementace K2 testována jako potenciální terapie zaměřená na zpomalení nebo zastavení patologické kalcifikace

v oblasti šlach a zlepšení jejich funkce. U pacientů s osteopénií byl vitamin K2 podáván s cílem zpomalit úbytek kostní hmoty a podpořit remineralizaci kostí. A u pacientů po zlomenině radia byla tato suplementace zkoumána jako podpůrná léčba při zajištění optimálního hojení kostí a snížení rizika sekundárních fraktur. V rámci této studie byla rovněž stanovována hladina vitamínu K2 v séru pacientů před začátkem suplementace, během ní a po jejím dokončení, aby se vyhodnotil vztah mezi hladinou vitamínu K2 a klinickými výsledky. Výsledky ukázaly, že zlepšení zdravotního stavu pacientů pozitivně korelovalo se zvýšením hladiny vitamínu K2 v séru.

Byla vyvinuta LC-MS/MS metoda pro stanovení hladin vitamínu K1 a vitamínu K2 (MK-4, MK-7) v séru za použití ionizace elektrosprejem v pozitivním modu. Hmotnostní detekce byla prováděna pomocí trojitěho kvadrupólu v módu MRM (Agilent 1290, Triple Quad 6470, Agilent Technologies). Jako vnitřní standardy byly použity izotopově značené formy vitamínu K (MK-7-d7, MK-4-d7, K₁-d7). Před samotnou analýzou bylo nezbytné provést předúpravu vzorku pomocí SPE extrakce. Vzorky byly separovány na koloně SB-C8 (2,1x100 mm, 1,8 μm, Agilent Technologies) při 40 °C za použití gradientu mobilních fází (A – 0,1% fluorid amonný v 50% metanolu, B – 0,1% fluorid amonný v metanolu). Doba analýzy byla přibližně 9 minut. LC-MS/MS metoda byla úspěšně validována. Limit detekce byl 0,0019 ng/ml pro K₁ a pro MK-7 a 0,003 ng/ml pro MK-4. Opakovatelnost nepřesáhla hodnotu 14,3 % pro žádnou z forem vitamínu K. Reprodukovatelnost nepřesáhla hodnotu 15,2 % pro žádnou z forem vitamínu K. Správnost stanovení se pohybovala v rozmezí 0,5 – 10,7 % pro všechny tři formy vitamínu K. Výsledky této studie naznačují, že vitamin K2 může hrát významnou roli v léčbě výše zmíněných stavů.

Podpořeno MZ ČR – RVO, FN v Motole 00064203.

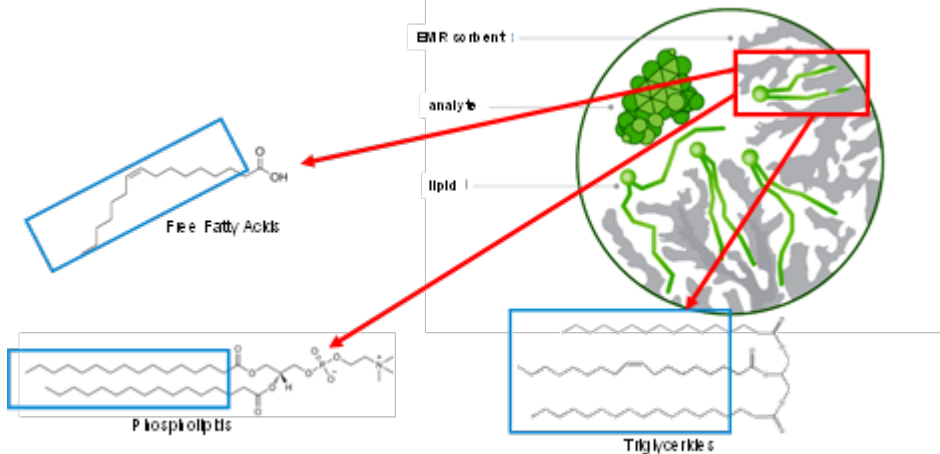
Analýza drog a farmak na LC/MS trojitým kvadrupólu Agilent

Ondřej Lacina, Jitka Zrostlíková

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

Moderní hmotnostní spektrometry umožňují díky vysoké akviziční rychlosti a selektivě stanovit desítky i stovky analytů v jedné analýze. Nicméně existují izomerní analyty, které nelze identifikovat pouze pomocí MS a je nutné je pro jednoznačnou identifikaci rozseparovat pomocí delší chromatografie. V přednášce si na příkladu analýzy drog a léčiv v plazmě ukážeme možnosti tzv. „Intelligent reflex“ implementovaného v software MassHunter 12, který (kromě jiného) umožňuje automatickou re-analýzu vzorku pomocí jiné chromatografie pouze v případě, kdy jsou detekovány výše zmíněné izomerní analyty. Tím lze ušetřit nejen čas přístroje, protože pro většinu vzorků není potřeba zdlouhavá separace, ale i práci analytika při opakovaném zadávání měření vzorků delší metodou.

Aby automatizované re-analýzy vzorků fungovaly spolehlivě, kromě samotné softwarové funkce je nutná i kvalitní příprava vzorků. Klíčové je především odstranění fosfolipidů, protože výrazně ovlivňují ionizaci analytů a snižují životnost kolony. SPE kolonky Captiva EMR Lipid selektivně odstraňují lipidy a jiné analyty díky úzkým pórům v sorbentu, kdy do póru může vstoupit pouze delší alifatický řetěz (přibližně



od 8 uhlíků) a běžné analyty projdou okolo bez interakce (viz obrázek). Proto Captiva EMR Lipid téměř ireverzibilně zadržuje lipidy a zároveň zachovává dobrou výtěžnost lipofilních analytů, jako je THC a jeho metabolity, 25-OH vitamin D3, nebo steroidní hormony.

SEKCE V

Implementace IVDR v MS laboratoři, management rizik

David Friedecký

Oddělení klinické biochemie, Fakultní nemocnice Olomouc, Zdravotníků 248/7, 779 00 Olomouc

Zavádění LC/MS metod do rutinní klinické diagnostiky přináší řadu výhod v oblasti specifity a flexibility, ale zároveň zvyšuje nároky na řízení kvality, validaci a dokumentaci. S příchodem nařízení IVDR (EU 2017/746) se důraz na systematické řízení rizik stal nedílnou součástí celého životního cyklu in-house vyvíjených metod.

Prezentace se zaměřuje na praktické aspekty analýzy a managementu rizik spojených s LC/MS metodami, a to jak z obecného pohledu, tak na konkrétním příkladu z klinické laboratoře. Představen bude rámec hodnocení rizik podle FMEA, přizpůsobený specifickým hmotnostní spektrometrie – včetně identifikace možných zdrojů selhání napříč jednotlivými fázemi metody (pre-analytická, analytická, post-analytická). Součástí bude i procesní mapa znázorňující klíčové body pro monitorování a řízení rizik.

Dále bude diskutováno, jak výsledky analýzy rizik ovlivňují rozhodování během vývoje metody, návrhu kontrolních mechanismů, validace a dlouhodobého sledování výkonnosti. Případová studie bude ilustrovat implementaci těchto principů při zavádění kvantitativní LC-MS/MS metody pro stanovení steroidních hormonů, včetně praktických výzev při sladění laboratorních postupů s požadavky IVDR.

Cílem je nabídnout ucelený a praktický návod, jak přistupovat k řízení rizik u LC/MS metod v klinickém prostředí, s důrazem na použitelnost v rámci interní dokumentace a připravenost na externí audity či inspekce.

Výrobní praxe a IVDR

Lucie Václavková

Odbor kvality, Fakultní nemocnice Olomouc, Zdravotníků 248/7, 779 00 Olomouc

Zavedení nařízení IVDR (EU 2017/746) výrazně změnilo požadavky kladené na klinické laboratoře, které si samostatně připravují kalibrační materiály, kontrolní vzorky nebo jiné reagenty pro vlastní diagnostické účely. Tyto in-house prostředky jsou nyní regulovány jako IVD výrobky, a laboratoř je v tomto kontextu považována za jejich výrobce.

Prezentace se zaměří na praktické zkušenosti s implementací požadavků IVDR v rutinním provozu klinické laboratoře využívající LC/MS metody. Ukázán bude celý výrobní proces – od návrhu a přípravy receptury, přes validaci výrobního postupu až po šaržovou dokumentaci, kontrolu jakosti a archivaci.

Součástí prezentace budou jednotlivé kroky výroby a uvolňování reagentů, včetně potřebných záznamů, sledovatelnosti a mechanismů pro řízení změn. Diskutována budou i praktická omezení spojená s adaptací existujících laboratorních postupů na nové regulační rámce, zejména v podmínkách omezených personálních a technických kapacit.

Cílem je sdílet zkušenosti s budováním „malé výroby“ uvnitř klinické laboratoře a nabídnout ostatním pracovištím inspiraci, jak naplnit požadavky IVDR bez výrazného narušení efektivity provozu a flexibility vývoje metod.

Zkušenosti se zpracováním dokumentace k IH-IVD dle IVDR: přístup společnosti Lipidica

Karolína Kašparová

Lipidica, a.s., Pernštýnské náměstí 51, 530 02 Pardubice

V souladu s požadavky nařízení (EU) 2017/746 (IVDR) jsme ve společnosti Lipidica zpracovali kompletní technickou dokumentaci k systému Lipidica jakožto in-house IVD (IH-IVD) zařízení používanému v rámci multicentrické klinické studie zaměřené na časnou detekci nádorů slinivky břišní. V příspěvku stručně představím strukturu a obsah jednotlivých částí dokumentace.