

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Diagnostika organických acidurií
Andrea Granátová

Bakalářská práce
2018

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Andrea Granátová**
Osobní číslo: **C14266**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**
Název tématu: **Diagnostika organických acidurií**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Definujte metabolická onemocnění a zaměřte se na problematiku organických acidurií
2. Uveďte možnosti diagnostiky organických acidurií
3. Popište možnosti léčby organických acidurií

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Původní práce v recenzovaných časopisech.

Vedoucí bakalářské práce: **doc. Mgr. Roman Kandár, Ph.D.**

Katedra biologických a biochemických věd


Datum zadání bakalářské práce: **28. listopadu 2016**

Termín odevzdání bakalářské práce: **7. července 2017**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Ing. Alexander Čegan, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2017

Prohlašuji: Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury. Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše. Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne

Andrea Granátová

Poděkování

Ráda bych tímto poděkovala vedoucímu této bakalářské práce prof. Mgr. Romanovi Kand'árovi, Ph.D. za odborné rady, věcné připomínky a vstřícný přístup během zpracovávání této práce. Dále Ing. Petrovi Chrastinovi za cenné rady a možnost vidět diagnostiku organických acidurií v praxi. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat svým rodičům, kteří mi umožnili studovat, přítelovi a kolegům za velkou podporu.

Anotace

Práce se zabývá diagnostikou organických acidurií. V úvodu je vysvětlen pojem organická acidurie. V další kapitole jsou popsány jednotlivé organické acidurie a jejich charakteristika. Následují jednoduché screeningové testy a pokročilejší diagnostika jednotlivých acidurií. V poslední kapitole je pojednáno o možnostech léčby organických aciurií.

Klíčová slova

kapalinová chromatografie, plynová chromatografie, kapilární elektroforéza, metabolická onemocnění, novorozenecký screening, organické acidurie, tandemová hmotnostní spektrometrie

Title

Diagnosis of organic aciduria

Annotation

The thesis deals with the diagnosis of organic aciduria. At the beginning this work is an introduction to organic aciduria. In the next chapter are listed the specific organic aciduria and their characteristics. Following are simple screening tests and more complex diagnostics. The last chapter deals with the possibilities of treatment of organic acids.

Keywords

liquid chromatography, gas chromatography, capillary electrophoresis, metabolic diseases, new-born screening, organic aciduria, tandem mass spectrometry

Úvod.....	13
Metabolická onemocnění	14
Patogeneze	15
Klasifikace dědičných metabolických onemocnění	15
Novorozenecký screening	16
Organické acidurie	19
Fenylketonurie	19
Galaktosémie	20
Nemoc javorového sirupu	21
Tyrosinémie typu I.....	22
Homocystinurie	23
Alkaptonurie.....	24
Isovalerová acidurie	25
Nemoc Canavenové	26
Glutarová acidurie I. typu (GA)	27
Laboratorní metody používané při diagnostice organických acidurií.....	29
Screeningové testy	29
Plynová chromatografie	32
Přehled derivatizačních činidel používaných při derivatizaci organických kyselin	33
Kapalinová chromatografie.....	36
Chromatografie na obrácených fázích	36
Derivatizace.....	37
Derivatizační činidla	38
Kolony v kapalinové chromatografii	39
Hydrofilní interakční chromatografie – HILIC.....	39
Tandemová hmotnostní spektrometrie.....	40
Kapilární elektroforéza	42
Léčba organických acidurií.....	44
Léčba fenylketonurie.....	44
Léčba galaktosémie	44
Léčba nemoci javorového sirupu	44
Léčba tyrosinémie I	45
Léčba alkaptonurie.....	45
Léčba homocysteinurie	45

Léčba glutarové acidurie	46
Léčba cystinurie.....	46
Závěr	47
Seznam literatury	48

Seznam obrázků

Obrázek 1 - Odběrová karta pro novorozenecký screening [11]	17
Obrázek 2 – chlapec s neléčenou fenylketonurií [22].....	20
Obrázek 3 – Katarakta oční čočky [25]	21
Obrázek 4 porovnání normální moči s močí nemocného pacienta s chorobou javorového sirupu [30].....	22
Obrázek 5 – Dítě s tyrosinemií I. typu [31]	22
Obrázek 6 – Jedenáctiletá dívka s homocystinurií [35].....	24
Obrázek 7 – Ukládání homogentisátu [37]	25
Obrázek 8 – Snímek mozku pacienta s nemocí Canavenové z magnetické rezonance [42]	27
Obrázek 9 – Snímek z magnetické rezonance u pacienta s Glutarovou acidurií typu I [44]....	28
Tabulka 1 - Souhrn screeningových metod [47].....	31
Obrázek 10 – Chromatogram pacienta s methylamolonovou acidurií (nahore) a člověka, který netrpí methylmalonovou acidurií (dole) [61]	35

Seznam tabulek

Tabulka 1 – Souhrn screeningových metod	31
-----------------------------------------------	----

Seznam zkratek

APCI	chemická ionizace za atmosférického tlaku
AQC	6-aminochinolyl-N-hydroxysukcinimidylkarbamát
ATP	adenosintrifofát
BCKA	aminokyseliny s rozvětveným řetězcem
CBS	cystathionin- β -syntethasa
DMB	1,2-diamino-4,5-methylendioxybenzen
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DNFB	2,4-dinitro-1-fluorbenzen
DPE	1,2-difenylethylendiamin
ESI	ionizace elektrospřejem
FAA	4-fumarylacetoacetasa
FIA	průtoková injekční analýza
FID	plamenově-ionizační detektor
FMOC – C1	9-fluorenylmethylchloroformát
GA	glutarová acidurie
GALK	galaktokinasa
GC	plynová chromatografie
GC – MS	plynová chromatografie s hmotnostní detekcí
HILIC	hydrofilní interakční chromatografie
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
LC – MS	kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí
MAA	methylacetoacetát
ME	2-merkptoethanol
MPA	3-merkptopropionová kyselina
MR	magnetická rezonance
MS	hmotnostní spektrometrie
MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie
NDA	naftalen-2,3-dikarboxaldehyd
NMR	protonová nukleární magnetická rezonance
NTBC	2-(2-nitro-4-trifluoromethylbenzoyl)-1,3-cyklohexandion
OPA	o-ftaldialdehyd
PAH	fenylalaninhydroxylasa
PEEK	polyetheretherketon

PITC	fenylisothiokyanát
PKU	fenylketonurie
PTC	derivát fenylthiokarbamylu
PTH	fenylthiohydantoin
RIA	radioimunoanalýza
RPC	chromatografie na obrácené fázi
SPE	extrakce tuhou fází
SPME	mikroextrakce tuhou fází
TSI	termosprej
UPLC	extrémně účinná kapalinová chromatografie
UV	ultrafialový
UV-Vis	ultrafialový-viditelný

Úvod

Organické acidurie jsou onemocnění, která jsou geneticky podmíněna. Tato onemocnění se dědí nejčastěji autosomálně recesivně. Organické acidurie se projevují většinou u dětí, a pokud nejsou včas diagnostikovány, tak končí smrtí jedince. K včasné diagnostice slouží novorozenecký screening, který je v ČR zaveden od roku 1975. Mezi organické acidurie patří nemoc javorového sirupu, isovalerová acidurie, fenylketonurie, glutarová acidurie typ I, galaktosémie a další. Nejčastějšími projevy jsou neurologické obtíže s akutní nebo progresivní encefalopatií a na první pohled patrné dýchací obtíže, špatný růst a různý stupeň mentálního postižení.

Cílem této práce je popsat jednotlivé metody k určení organických acidurií. Jedná se především o plynovou chromatografii s hmotnostní detekcí a tandemovou hmotnostní spektrometrii používanou při novorozeneckém screeningu. Dále je možno využít kapalinovou chromatografii s hmotnostní detekcí nebo spektrofotometrickou či fluorescenční detekcí a v neposlední řadě kapilární elektroforézu. V poslední kapitole jsou zmíněny možnosti léčby organických acidurií, které spočívají převážně v dietních opatřeních.

Metabolická onemocnění

V roce 1908 prvně použil výraz „metabolická onemocnění“ britský lékař sir Archibald Garrod, na základě čtyř dědičných onemocnění, alkaptonurie, pentosourie, albinismu a cysteinurie. V dnešní době je známo kolem 900 těchto onemocnění, která představují asi 15 % tzv. vzácných metabolických chorob [1].

Metabolická onemocnění se neobjevují jen po narození, ale i v dospělosti. Výskyt onemocnění v dětství je typický pro fenylketonurii a pro deficit acyl-CoA-dehydrogenasy mastných kyselin se středně dlouhým řetězcem. Statisticky se onemocnění vyskytuje v počtu 1 nemocný na 10 000 zdravých jedinců. Souhrnně lze říci, že incidence v dětství je 1 nemocný na 750 zdravě narozených dětí. U dospělých lidí se jedná především o familiární hypercholesterolemii a hemochromatózu. Tato onemocnění se vyskytují v incidenci nejméně 1 ze 100 jedinců trpících daným onemocněním. Ve skutečnosti ovšem nelze přesně určit, kolik nemocných je, protože mnoho z nich není diagnostikováno [2].

V určitých etnických skupinách, jako jsou například Židé s předky ze střední a východní Evropy, jsou metabolická onemocnění početnější [3]. Mnohem častěji jsou těmito onemocněními postiženi děti v odlehlých vesnicích, v úzce svázaných komunitách (např. Amishové v Pensylvánii) a zemích s malou imigrací během řady století (např. Finsko) [4].

Podstata onemocnění je genetická, způsobena patogenními mutacemi. Mutace jsou přítomny v DNA somatických a zárodečných buněk pacienta. Pro klinický projev onemocnění u pacienta s autosomálně recesivním typem dědičnosti je obvykle nutná přítomnost patogenních mutací na obou rodičovských alelách příslušného genu. Heterozygoti v tomto případě zůstávají nepostiženi, ale jejich nosičství můžeme spolehlivě prokázat vyšetřením DNA nebo výjimečně enzymologicky. U gonosomálně recesivního typu dědičnosti jsou nemocní hemizygotní chlapci a muži. Heterozygotní dívky a ženy jsou postiženy, pokud se do vyšší míry inaktivuje zdravý chromosom X. V případě mitochondriálních poruch energetického metabolismu jsou dědičná onemocnění často autosomálně nebo gonosomálně recesivní, jindy se může vyskytnout maternální dědičnost. U maternální dědičnosti jsou přenašečem vždy matky, které přenáší mutaci v mitochondriální DNA. Mitochondriální DNA nemá tolik kontrolních mechanismů jako jaderná DNA, proto je riziko vzniku mutací relativně vysoké [5].

Patogeneze

Příčinou onemocnění je hromadění substrátů enzymové reakce nad blokem, chybění produktů reakce nebo kombinace obou těchto mechanismů. Obdobné změny můžeme najít u poruch transportu látky mezi dvěma kompartmenty oddělenými membránou. U některých onemocnění převažuje ukládání látek. U dalších onemocnění vznikají příznaky v důsledku chybějícího produktu, to je například u encefalomyopatie s poruchami respiračního řetězce a sníženou tvorbou ATP. Charakter látek, které se vyskytují abnormálně, určuje klinický průběh i rychlost nástupu příznaků, závislost příznaků na vyvolávajících momentech, přítomnost či nepřítomnost morfologických změn v orgánech a pak také samozřejmě způsoby a možnosti léčby. Laboratorními metodami můžeme identifikovat dané metabolity a stanovit aktivitu enzymů, které ji mají nízkou nebo tyto enzymy nejsou vůbec přítomny [6].

Klasifikace dědičných metabolických onemocnění

Dědičné metabolické poruchy aminokyselin – hyperfenylalaninémie, tyrosinémie, alkaptonurie, homocystinurie, cystinurie, cystinóza, choroba javorového sirupu

Dědičné metabolické poruchy sacharidů – galaktosémie, deficit galaktokinasy, deficit uridindifosfát-4-epimerasy, intolerance fruktosy, deficit fruktosa-1,6-bisfosfatasy, glykogenózy

Dědičné metabolické poruchy purinů a pyrimidinů – Lesch-Nyhanův syndrom, Kelley–Seegmillerův syndrom

Dědičné metabolické poruchy lysozomů – Tay-Sachsova porucha

Dědičné metabolické poruchy komplexních molekul – lysosomální nemoci peroxisomální nemoci, poruchy mitochondriálního energetického metabolismu [4].

Novorozenecký screening

Zakladatelem novorozeneckého screeningu je pravděpodobně profesor Robert Guthrie z Univerzity v Buffalu [7]. Zavedl celkem jednoduchou, levnou a zároveň spolehlivou metodu pro screeningové vyšetření fenylylketonurie metodou suché kapky krve na filtračním papíře. Krev se odebírá z paty novorozence vpichem [8]. Počátkem 70. let se se toto screeningové vyšetření rozvíjí také u nás a později je uvedeno na seznam celostátního screeningového programu. V roce 1985 je zařazen novorozenecký screening kongenitální hypotyreózy. Postupně se přidaly kongenitální adrenální hyperplazie, cystická fibróza a 9 dalších dědičných metabolických poruch [9]. Od roku 2016 jsou v seznamu screeningových vyšetření novorozenců tato onemocnění:

- kongenitální hypotyreóza
- kongenitální adrenální hyperplazie
- cystická fibróza
- fenylylketonurie, hyperfenylalaninémie
- argininémie
- citrulinémie I. typu
- leucinóza, nemoc javorového sirupu
- homocystinurie z deficitu cystathionin- β -synthasy, na pyridoxin nereagující léčba
- homocystinurie z deficitu methyilentetrahydrofolátreduktasy
- glutarová acidurie typ I
- isovalerová acidurie
- deficit acyl-CoA-dehydrogenasy mastných kyselin se středně dlouhým řetězcem
- deficit 3-hydroxyacyl-CoA-dehydrogenasy mastných kyselin s dlouhým řetězcem
- deficit acyl-CoA-dehydrogenasy mastných kyselin s velmi dlouhým řetězcem
- deficit karnitinpalmitoyltransferasy I
- deficit karnitinpalmitoyltransferasy II
- deficit karnitinacylkarnitinslokasy
- deficit biotinidasy [8]

Pro screening tolika onemocnění bylo nutno zavést pravidla, a to již od roku 1968 Světovou zdravotnickou organizací.

Obecná pravidla pro provedení celoplošného novorozeneckého screeningu jsou:

- Chorobu, kterou vyšetřujeme, musíme jasně definovat neboli diagnostikovat.

- Onemocnění musí představovat zdravotně sociální problém.
- Choroba se vyskytuje často s incidencí 1:50 000–1:100 000 ve vyspělých zemích.
- Pokud se zachytí daná choroba, musí být její léčba zásadní. Opatření musí být jednoduché, dostupné pro všechny. Pro lepší efektivitu jsou využívána specializovaná centra.
- K diagnostice se používá obecně uznaný screeningový test.
- Musí být umožněno podstoupit daný test všem novorozencům, a to jak z hlediska ekonomického, tak i po stránce organizační.
- Stále se musí aktualizovat věrohodnost a přesnost screeningu [10].

Provedení novorozeneckého screeningu

Kapilární krev, odebraná mezi 48-72 hodinami po narození, se nakape na odběrové karty vyrobené ze speciálního filtračního papíru (Obrázek 1)



Obrázek 1 - Odběrová karta pro novorozenecký screening [11]

Stejným způsobem se postupuje i v případě úmrtí novorozence, což napomůže k zjištění příčiny smrti. Někdy je nutný tzv. „rescreening“, který se provádí stejným způsobem jako klasický screening, ale ve věku 8.-14. dne po narození. Učiní se tak pouze za určitých okolností, například při hmotnosti novorozence nižší než 1500 g. Následně se karty zasílají na daná pracoviště k analýzám. Karty ze speciálního filtračního papíru mohou být analyzovány mnohými technikami, včetně bakteriálního inhibičního testu, chromatografických technik,

ELISA, FIA, RIA a nejnověji tandemovou hmotnostní spektrometrií s ionizací elektrosprejem (MS/MS) [12]. Podrobněji budou metody popsány v následujících kapitolách.

Negativní nález není oznamován. V případě nejasného výsledku je nutno provést rescreening. Naopak u jasně zvýšených hodnot je nutné informovat co nejdříve lékaře. Všechny laboratoře podávají jednou za rok zprávu Ministerstvu zdravotnictví o počtu provedených screeningů, rescreeningů a také o falešně pozitivních či negativních výsledcích [13].

Organické acidurie

Organické acidurie jsou dědičná onemocnění, která způsobují poruchu intermediální dráhy sacharidů, aminokyselin a oxidace mastných kyselin [14]. Nejčastěji se organické acidurie dědí autosomálně recesivně [1]. Mezi významné zástupce těchto onemocnění patří fenyلكetonurie, isovalerová acidurie a nemoc javorového sirupu. Příčinou organických acidurií je snížená aktivita nebo úplná ztráta enzymu či kofaktoru. Metabolická dráha je zablokována a netvoří se dostatečné množství konečného produktu. Hromadí se organické kyseliny se ukládají do tkání, část se vylučuje močí [14]. Organické acidurie se projevují neurologickými obtížemi s akutní nebo progresivní encefalopatií [15]. Laboratorními nálezy jsou ketóza, metabolická acidóza, nerovnováha minerálů a hypoglykémie [16]. Při hematologickém vyšetření nalézáme neutropenii, trombocytopenii, anémii, či dokonce pancytopenii [17]. Nejčastějšími symptomy, patrnými již na první pohled, jsou dýchací obtíže, špatný růst a různý stupeň mentálního postižení [1]. Můžeme také pozorovat letargii, nechutenství, opakující se zvracení, celkové „neprospívání“ [18] a záchvaty, popřípadě kóma [16]. Pokud nejsou pacienti léčeni nebo správně diagnostikováni, může dojít během několika dní k úmrtí, nebo se vyvíjí těžká encefalopatie. U starších lidí jsou příznaky různorodé, od akutních záchvatů až po chronicky progresivní příznaky [16]. Většina přeživších má trvalé fyzické následky nebo mentální postižení různého stupně [15].

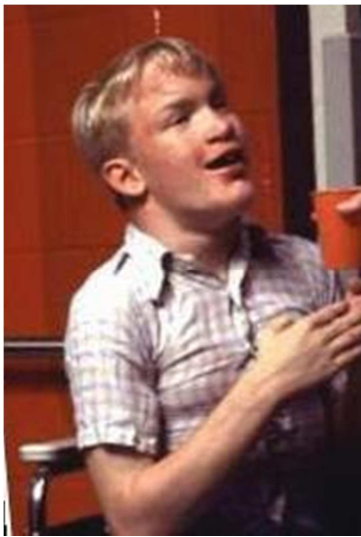
Fenyلكetonurie

Fenyلكetonurie je dědičné autosomálně recesivní onemocnění, které patří k organickým aciduriím. Chybný gen, který způsobuje fenyلكetonurii, je lokalizován na 12. chromosomu dlouhého raménka. V České republice onemocní touto chorobou kolem 10-12 dětí za rok. Fenyلكetonurie je při včasné diagnóze léčitelná dietou, díky čemuž se choroba neprojeví naplno [19].

Vysoké hladiny fenylalaninu poškozují mozkovou tkáň, zejména v dětství. Dítě neprospívá a kolem 6. – 12. měsíce věku trpí epileptickými křečemi typu grand mal. Křeče se objevují i několikrát denně. Pokud se začnou křeče léčit antiepileptiky, tak nemocný na léčbu nereaguje. Neléčená choroba postihuje funkce mozku, a tím způsobí mentální retardaci jedince, kterého můžeme vidět na obrázku 2. Dalšími typickými znaky jsou kožní ekzémy a albinismus [20].

Při fenyلكetonurii je defektní enzym fenylalaninhydroxylasa, který katalyzuje hydroxylaci fenylalaninu za vzniku tyrosinu. Ke správné funkci fenylalaninhydroxylasy je potřebný

kofaktor tetrahydrobiopterin (BH₄). Pokud není fenylalanin hydroxylován na tyrosin, tak se spouští tzv. alternativní cesta odbourávání fenylalaninu, která u zdravých jedinců není aktivní. Alternativní cestou odbourávání fenylalaninu vzniká fenylpyruvát a další metabolity. Vyšetření pro fenylketonurii je součástí novorozeneckého screeningu. Dříve se provádělo Guthrieho testem. Principem je semikvantitativní mikrobiologická zkouška, při které jsou spory bakterie *Bacillus subtilis* naočkovány do agarového média spolu s kompetitivním růstovým inhibítorem (β -2-thienylalanin). Terčík filtračního papíru se zaschlou kapkou krve pacienta se vkládá do média. Bakterie *B. subtilis* jsou inkubovány a je hodnocen jejich růst [21]. V současnosti se provádí diagnostika tandemovou hmotnostní spektrometrií.



Obrázek 2 – chlapec s neléčenou fenylketonurií [22]

Galaktosémie

Onemocnění, které se nazývá galaktosémie se projevuje deficitem galaktosa-1-fosfáturydyltransferasy, galaktokinasy a galaktosaepimerasy. Uvedené deficity je možné detekovat při novorozeneckém screeningu. Onemocnění se vyskytuje s incidencí 1:40000-60000. Chybný gen je umístěn na krátkém raménku 9. chromosomu. Galaktosémie se projeví hned po narození, hromadí se galaktosa, která se vylučuje močí a hlavně galaktosa-1-fosfát. Nemocné děti umírají někdy rychle a někdy je průběh onemocnění pozvolný, zatímco u dospělých není průběh nemoci tak závažný. Nemoc se projevuje nesnášenlivostí mléka, zvracením, zvětšením jater, žloutenkou a někdy mentálním poškozením. Viditelným znakem je zakalení oční čočky, které je způsobeno hromaděním galaktitolu, což můžeme vidět na obrázku 3. Galaktitol vzniká redukcí galaktosy. K detekci galaktosémie se využívá Beutlerův test, kdy se měří aktivita galaktosa-1-fosfáturydyltransferasy [23]. Stanovují se také hladiny galaktosy a galaktosa-1-fosfátu.

Jedinou možnou účinnou léčbou je dietologické opatření s vyloučením laktosy (disacharid tvořený z glukosy a galaktosy) z jídelníčku [24].



Obrázek 3 – Katarakta oční čočky [25]

Nemoc javorového sirupu

Nemoc javorového sirupu neboli leucinóza je autosomálně recesivní onemocnění podmíněné defektem společného komplexu dehydrogenasy α -oxokyselin odvozených od aminokyselin s rozvětveným řetězcem (BCKA, z angl. Branched-Chain Keto Acids), leucinu, isoleucinu a valinu. Celosvětový výskyt je s frekvencí 1:185 000 narozených dětí.

Onemocnění se obvykle projeví kolem prvního týdne po porodu. U nemocných novorozenců se hromadí v krvi a tkáních leucin a BCKA, rozvíjí se tzv. leucinóza. Pokud se novorozenci neléčí, tak se do 48 hodin rozvíjí ketonurie. Kolem 4.–5. dne se objevují neurologické příznaky, jako je letargie, apnoe a dystonie [26]. Nejvýznamnějším projevem je zapáchající zabarvená moč (obrázek 4) a ušní maz po javorovém sirupu. Tento projev se objevuje v časovém rozmezí kolem 5.–7. dne po porod. Při onemocnění leucinózou je zřejmá úplná nebo částečná dysfunkce enzymového komplexu. Aminokyseliny s rozvětveným řetězcem tvoří kolem 35 % nepostradatelných aminokyselin ve svazech. Aminokyseliny s rozvětveným řetězcem jsou do buněk transportovány specifickými membránovými transportéry. V buňce dochází k reverzibilní transaminaci za vzniku odpovídajících BCKA (α -oxoisokapronová, α -oxo- β -methylvalerová a α -oxoisovalerová). Vzniklé oxokyseliny jsou specifickým transportérem přeneseny do mitochondrií [27]. V mitochondriích jsou dekarboxylovány a oxidovány za katalýzy α -oxodehydrogenasového komplexu [28]. Koenzymem komplexu

α -oxodehydrogenasy je thiaminpyrofosfát. Podle biochemické reakce a aktivity enzymového komplexu, dělíme leucinózu do pěti fenotypových forem: klasická, intermediární, intermitentní, reagující na thiamin, a s deficitem dihydrolipoyldehydrogenasy [29]. Vyšetření na leucinózu je také součástí novorozeneckého screeningu.



Obrázek 4 porovnání normální moči s močí nemocného pacienta s chorobou javorového sirupu [30]

Tyrosinémie typu I

Tyrosinémie typu I se může objevit kdykoliv od novorozeneckého věku až po dospělost a má různé projevy. Různorodost je možné dokonce sledovat i mezi členy téže rodiny. Incidence tyrosinémie je 1 na 100000-200000 živě narozených dětí. Tyrosinémie se dělí obvykle na základě věku začátku symptomů, které významně souvisí se závažností choroby:

akutní forma, akutní selhání jater před šestým měsícem věku;

subakutní forma, jaterní onemocnění, neprospívání, koagulopatie, křivice a hypotonie mezi šestým měsícem a jedním rokem věku;

chronická forma, chronické onemocnění jater, onemocnění ledvin, křivice, kardiomyopatie po prvním roce věku [19]. Dítě s chronickou formou tyrosinémie můžeme vidět na obrázku 5.



Obrázek 5 – Dítě s tyrosinémií I. typu [31]

Jaterní onemocnění jsou hlavní příčinou morbidity a mortality u tyrosinémie typu I. Onemocnění jater se může projevit jako akutní selhání, cirhóza nebo hepatocelulární karcinom. Druhým, nejvíce postiženým orgánem, jsou ledviny. V kojeneckém věku se tyrosinémie typu I projevuje zejména zvracením, průjmem, hemoragickou diatézou, žloutenkou, edémem a ascitem. Mezi další příznaky patří křeče, respirační zástava a kardiomyopatie.[32].

K léčbě tyrosinémie I. typu se používá 2-(2-nitro-4-trifluoromethylbenzoyl)-1,3-cyklohexandion (NTBC), což je silný inhibitor 4-hydroxyfenylpyruvát-dioxygenasy. NTBC blokuje degradaci tyrosinu a díky tomu zabraňuje vzniku toxických metabolitů. Dalším možným řešením je transplantace jater u pacientů s akutním selháním jater, kteří neodpovídají na léčbu NTBC. K léčbě samozřejmě přispívá dietologické opatření s omezením příjmu bílkovin [33].

Homocystinurie

Homocystinurie se projevuje postižením očí, kostry, centrálního nervového systému a vaskulárního systému. Onemocnění se projevuje až v pozdějším batolecím věku, pokud není pacient léčen. Mezi nejčastější postižení očí patří dislokace očních čoček, myopie a glaukom. Typickými projevy postižení kostry jsou osteoporóza, skolióza, náchyllost k patologickým frakturám a zhroucení obratlů. Poškození centrálního nervového systému se projevuje mentální retardací s různým stupněm závažnosti. Ve vaskulárního systému se vyskytují tromboembolické komplikace. Ke komplikacím dochází v žilách i tepnách po celém těle.

Příčinou onemocnění je porucha aktivity cystathionin- β -syntetasy (CBS). CBS je enzym, který se podílí v organismu na přeměně methioninu na cystein. Homocystinurie je dědičná autosomálně recesivně [34].

Diagnostika homocystinurie spočívá v screeningovém vyšetření moče kyanid-nitroprussidovým testem nebo se stanovují hladiny aminokyselin v plazmě. Typické nálezy jsou zvýšené hladiny methioninu, homocysteinu a disulfidu cysteinylhomocystein. Diagnózu je nutné potvrdit molekulárně biologickým a genetickým vyšetřením, které nám prokáže, že zvýšená hladina homocysteinu není způsobena jiným dědičným nebo metabolickým onemocněním, kam například patří porucha metabolismu kyseliny methylmalonové.

Léčebným cílem je snížit hladinu celkového homocysteinu v plazmě. Snížení hladiny můžeme provést několika způsoby, podáváním velkých dávek pyridoxinu, dietou s omezením

methioninu, podáváním betainu, nebo kombinacemi výše zmíněných možností. Na obrázku 6 můžeme vidět jedenáctiletou dívku s homocystinurií [19].



Obrázek 6 – Jedenáctiletá dívka s homocystinurií [35]

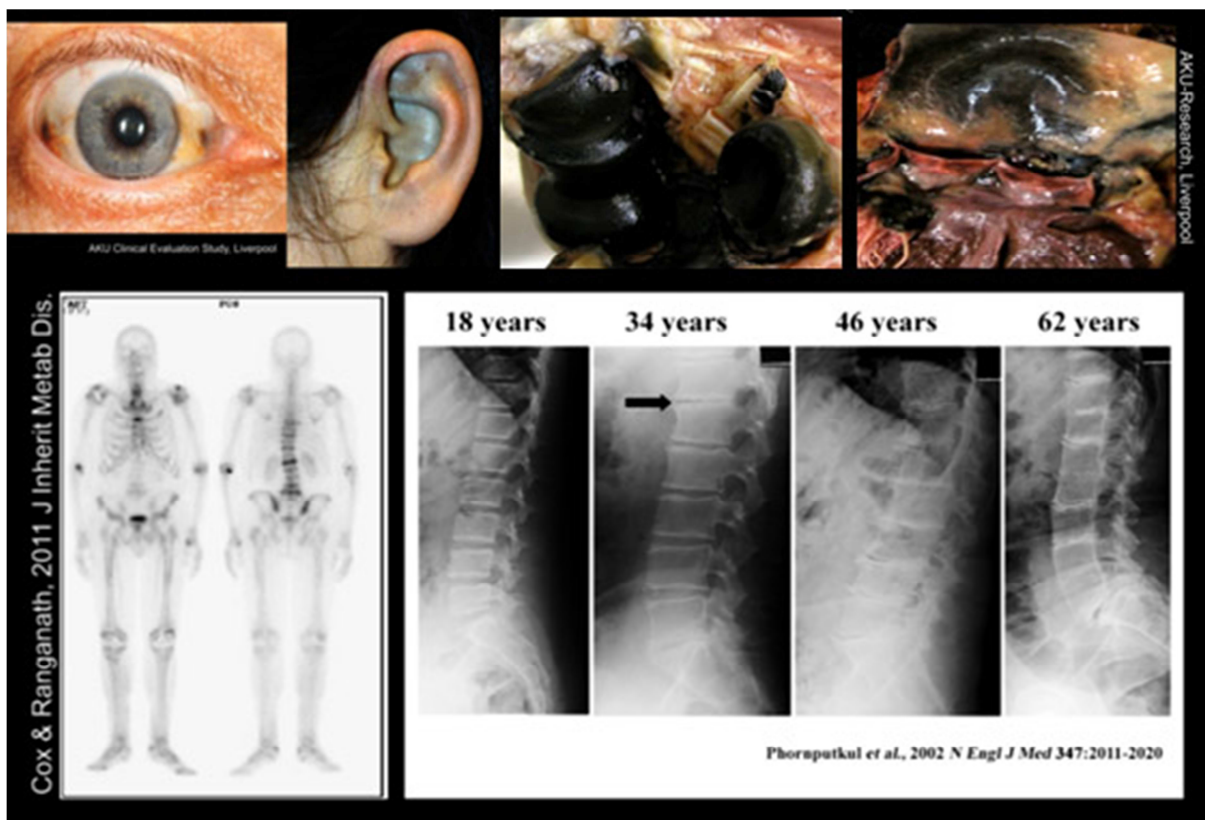
Alkaptonurie

Alkaptonurie bylo první onemocnění definované v roce 1902 Garrodem jako dědičná metabolická porucha. Je zapříčiněna deficitem enzymu homogentisátdioxygenasy, který je exprimován hlavně v játrech a ledvinách. V různých tkáních se hromadí homogentisát (obrázek 7) a jeho oxidovaný derivát benzochinonacetát, který údajně způsobuje tmavý pigment.

Alkaptonurie se projevuje již v kojeneckém věku tmavnutím moči za přístupu vzduchu. Symptomy se však objevují až v dospělosti. Nejvíce nápadným symptomem je postižení kloubů a pojivových tkání, v pozdějších letech může být zjištěno významné postižení srdce a urolitiáza.

Alkaptonurie se diagnostikuje testem na redukující látky, který vyjde pozitivní díky nadměrnému vylučování homogentisátu. Další metodou je stanovení organických kyselin plynovou chromatografií s hmotnostní spektrometrií, kdy se identifikuje a kvantifikuje kyselina homogentisová. Ke kvantifikaci lze použít taktéž HPLC [36].

Léčba spočívá v omezení příjmu fenylalaninu a tyrosinu v dietě, podáváním kyseliny askorbové a NTBC. Bohužel, žádný z těchto typů léčby nebyl účinný v prevenci pozdních účinků alkaptonurie.



Obrázek 7 – Ukládání homogentisátu [37]

Isovalerová acidurie

Isovalerová acidurie je autosomálně recesivní onemocnění s incidencí 1:230 000 a je také součástí novorozeneckého screeningu. Isovalerová acidurie je způsobená nedostatečnou aktivitou mitochondriálního enzymu isovaleryl-CoA-dehydrogenasy.

Isovaleryl-CoA-dehydrogenasa se nachází na vnitřní mitochondriální membráně, kofaktorem je flavinadeninukleotid. Gen pro tento enzym je lokalizován na 15. chromosomu dlouhého raménka. Mutace daného genu má za následek nesprávné fungování enzymu, což se projeví zvýšením hladiny kyseliny isovalerové a od ní odvozených látek [38].

Rozlišujeme akutní novorozeneckou, chronickou intermitentní a potenciálně asymptomatickou formu. U akutní formy se projevy nemoci dostaví během dvou týdnů života novorozence. Po narození je onemocnění bezpříznakové, ale později dítě začíná zvracet, odmítá stravu, může být dehydratované a později přejít až do kómatu. Charakteristický zápach moče, který je připodobňován zápachu „špinavých ponožek“ je způsobený nekonjugovanou isovalerovou kyselinou. Pacienti, kteří nejsou léčeni, přejdou do kómatu, který vede ke smrti. Kóma je způsobené často mozkovým edémem či krvácením do mozku. Jestliže pacienti s akutní formou překonají tento stav, tak je neodlišíme od pacientů s chronickou intermitentní formou. Chronická intermitentní forma vykazuje mentální nebo psychomotorickou retardaci a cholestázu [39].

Nemoc Canavenové

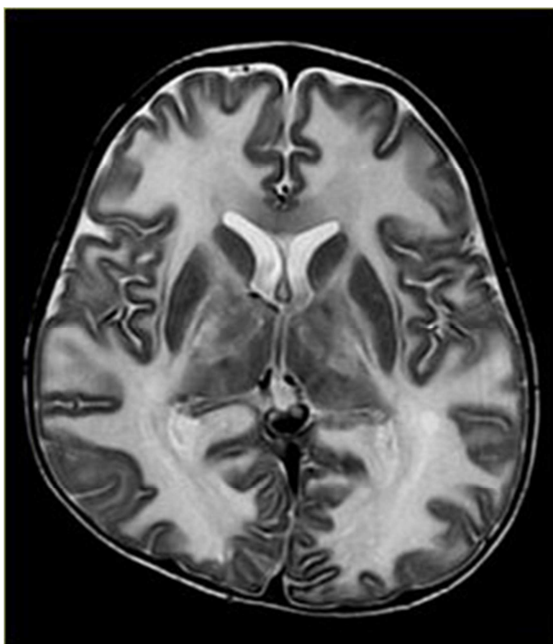
Nemoc Canavenové je autosomálně recesivní onemocnění. Onemocnění je neurodegenerativní a má fatální průběh. Nemoc Canavenové se často vyskytuje mezi Saúdskými Araby a židovskými Aškenazi.

Příčinou nemoci je deficit enzymu N-acetylaspartátamidohydrolasy, která katalyzuje hydrolýzu N-acetylaspartátu na L-aspartát a acetát. Hromadění N-acetylaspartátu je možné prokázat ve všech tělesných tekutinách, a to i v moči a likvoru. V podstatě jde o spongiózní degeneraci s maximem změn v subkortikální bílé hmotě a hlubokých vrstvách kůry [40].

V literatuře jsou popsány kongenitální, infantilní a juvenilní formy nemoci. Infantilní forma je nejčastější a začíná mezi 2.-4. měsícem života neklidem, problémy se sáním při kojení a je patrný i nedokonalý zrakový kontakt. Kolem 6. měsíce lze zpozorovat hypotonii s nedokonalou kontrolou polohy hlavy, makrocefalii, někdy s výraznější fontanelou, jsou přítomny nystagmoidní pohyby bulbů a poruchy spánku. Děti ztrácejí dříve dosažené dovednosti (úsměv). Přibližně u 50 % pacientů se mohou objevit generalizované tonické a klonické epileptické záchvaty. Po roce věku jsou děti pravděpodobně bez kontaktu s okolím. K úmrtí v důsledku interkurentních infekcí dochází během první dekády života. Kongenitální forma je mnohem agresivnější a její nástup je již v prvních týdnech života. Nejvzácnější je juvenilní forma se začátkem mezi 4-5 lety věku. Projevuje se dysartrií a tremorem mozečku a postupně přechází do spasticity a prohlubující se demence.

Nemoc Canavenové se diagnostikuje magnetickou resonancí (MR) mozku, která ukáže leukodystrofické změny, ty můžeme vidět na obrázku 8, MR může prokázat zvýšenou koncentraci N-acetylaspartátu v mozkových buňkách, pak zejména poměr N-acetylaspartátu k cholinu a kreatininu. Diagnostika je založena na stanovení N-acetylaspartátu v moči metodou GC-MS. Zvýšenou koncentraci můžeme taktéž prokázat v likvoru či krvi [41].

Terapie není zatím běžně dostupná. Touto problematikou se zabývá vědecký tým Dr. Paoly Leone z univerzity v New Jersey. Testují léčbu na principu genové terapie.



Obrázek 8 – Snímek mozku pacienta s nemocí Canavenové z magnetické rezonance [42]

Glutarová acidurie I. typu (GA)

Makrocefalie, patologicky se zvětšující obvod hlavy kojence, neurologické příznaky, jako je hypotonie s dominující poruchou vzpřimování hlavy, dráždivost, neklid, projevující se kolem devíti měsíců věku, to jsou typické příznaky glutarové acidurie. Celkem 75 % z postižených jedinců prodělá akutní atak poškození mozku obvykle při infekci horních cest dýchacích nebo gastrointestinální infekci. Dalšími znaky jsou ztuhlé končetiny, krouživé pohyby rukou a nohou. Zůstane-li porucha nedagnostikována, tak jsou postiženy i další mozkové funkce (Obrázek 9). Objevuje se generalizovaná atrofie mozku, která vede k mentální retardaci.

Glutarová acidurie (GA) I. typu je způsobena deficitem glutaryl-CoA-dehydrogenasy, což je mitochondriální enzym vyžadující flavinadenindinukleotid, který katalyzuje dehydrogenaci glutaryl-CoA a následnou dekarboxylaci glutakonyl-CoA na krotonyl-CoA. U GA I. typu se část hromadícího se glutaryl-CoA esterifikuje s karnitinem za katalýzy karnitinacyltransferasou, což vede ke zvýšení poměru acylkarnitiny/volný karnitin v plazmě a moči. Při GA se vylučuje glutarylkarnitin, což přispívá k sekundárnímu karnitinovému deficitu [43].

Diagnosticky nejlepší možností je stanovení kyseliny 3-hydroxyglutarové v moči.



Obrázek 9 – Snímek z magnetické rezonance u pacienta s Glutarovou acidurií typu I [44]

Laboratorní metody používané při diagnostice organických acidurií

Organické acidurie jsou známy teprve několik desítek let. Významnou úlohu v diagnostice organických acidurií hrají chromatografické metody. Dříve byly nejpoužívanějšími technikami tenkovrstvá chromatografie, plynová chromatografie a vysokoúčinná kapalinová chromatografie. Některé z těchto metod se používají dodnes.

Organické kyseliny obsahují kromě karboxylové skupiny další funkční skupiny, jako hydroxylovou, či oxoskupinu, případně nenasycené vazby. Žádná z nich neobsahuje primární aminoskupinu. Pro nedostatek vhodných analytických metod, jsou organické acidurie diagnostikovány teprve několik desítek let. Cílem výzkumných pracovníků je extrahovat organické kyseliny do vhodného organického rozpouštědla a následně je separovat a identifikovat. Pro stanovení organických kyselin jsou zapotřebí takové metody, které je dostatečně separují a identifikují, jsou citlivé a mají široký lineární rozsah.

Pro diagnostiku organických acidurií se jako vzorek používá většinou moč. Důvod je ten, že organické kyseliny jsou prakticky bezprahové látky, tedy hladiny v moči jsou více jak stonásobně vyšší než v krevní plazmě. Další metody pro diagnostiku acidurií, které připadají v úvahu, jsou protonová nukleární magnetická rezonance (NMR), tenkovrstvá chromatografie, či screeningové testy [45].

Screeningové testy

Na první pohled můžeme vidět, že vzorek moče je jinak zbarvený nebo „jinak“ zapáchá.

Pro diagnostiku fenylyketonurie se používá test s chloridem železitým. Principem testu je přidání chloridu železitého k moči pacienta. Pokud se v moči vyskytuje fenylypyruvát, tak se moč zbarví zeleně, když není přítomen, je moč červenohnědá. U novorozenců se může stát, že tato metoda nebude fungovat. Důvodem nefunkčnosti testu je vylučování velmi malého množství fenylypyruvátu [46].

Difenylyhydrazinový test se používá k detekci α -oxokyselin, což je důležité při diagnostice fenylyketonurie a onemocnění javorového sirupu. Pro nízkou specifitu se dává přednost chromatografickým technikám, která jsou dostupnější. Komerčně jsou dostupné speciální testovací proužky, kterými lze semikvantitativně stanovit ketolátky. Tento test je nejcitlivější pro stanovení kyseliny acetoctové, ale lze detegovat také aceton a butanon. Principem je Legalova reakce, kdy nitroprussid sodný reaguje s ketolátkami v alkalickém prostředí za vzniku fialového komplexu.

Kyanidnitroprussidový test zjišťuje přítomnost sloučenin obsahujících thiolovou skupinu (homocystein, cystein). Tento test je vhodný pro screeningové vyšetření homocystinurie a cystinurie. Falešně pozitivní výsledky dávají D-penicilamin a N-acetylcystein.

Redukci látek v moči je možné zjistit Benediktovým testem. Benediktův test je používán jako jednoduchý test na zjištění přítomnosti redukujících látek v moči. Test se provádí s CuSO_4 a citrátem sodným v alkalickém prostředí. Pokud je Benediktův test pozitivní, tak by mělo následovat přesnější určení redukující látky. Můžeme použít test Uristix nebo Phan papírky, které při negativním výsledku prokáží, že redukující látkou není glukosa. Falešná pozitivita je obvykle způsobena vysokými koncentracemi kyseliny močové, kyseliny askorbové, cefalosporiny, ampiciliny a dalšími léky. V tabulce 1 jsou shrnuty screeningové metody [47].

Tabulka 1 - Souhrn screeningových metod [47]

Test	Následek	Detekce	Onemocnění
Zápach	Zatuchlý	Fenylacetát	fenylketonurie
	vonící po javorovém sirupu	2-oxoisokaproát 2-oxo-3-methylvalerát	nemoc javorového sirupu
	špinavé nohy	Isovalerát	isovalerová acidémie
	kočičí moč	3-hydroxyisovalerát	3-methylkrotonylglycinurie
test s chloridem železitým	modrozelená barva	Fenylpyruvát	fenylketonurie
		Imidazolpyruvát	histidinémie
		xanturetická kyselina	xanthuretická acidurie
	přechodná modrozelená barva	homogentisát	alkaptonurie
	zelenošedá barva	postranní řetězec oxokyselin	nemoc javorového sirupu
	zelená barva	p-hydrofenylpyruvát	tyrosinémie, typ 1 a 2
test s difenylhydrazinem	zlatá žlutá sraženina	Fenylpyruvát	fenylketonurie
		2-oxoisovalerát 2-oxoisokaproát 2-oxo-3-methylvalerát	nemoc javorového sirupu
		4-hydroxyfenylpyruvát	tyrosinémie, typ 1 a 2
		Pyruvát	laktační acidóza
test s nitroprussidem	purpurová barva	Cystin	cystinurie, hyperargininémie
		Homocystein	homocysteinurie
Benediktův test	cihlově červená	glukosa	diabetes, Fankoniho syndrom
	hnědá sraženina	Galaktosa	galaktosémie
		Fruktosa	intolerance fruktosy, esenciální fruktosurie
		Xylosa	pentosurie
		4-hydrofenylpyruvát	tyrosémie, typ 1a2
		kyselina šťavelová	hyperoxalurie
		Homogentisát	alkaptonurie

Plynová chromatografie

Při stanovení organických kyselin v tělních tekutinách metodami plynové chromatografie je nutné nejprve organické kyseliny extrahovat z okyseleného vzorku vhodným organickým rozpouštědlem, nejčastěji ethylacetátem, diethyletherem nebo tetrahydrofuranem. Nevýhodou použití tetrahydrofuranu je extrakce dalších interferujících látek [47]. Přímá extrakce je jednoduchou a rychlou metodou, která umožňuje účinně extrahovat organické kyseliny a je spojována s nízkou kontaminací anorganických sulfátů a fosfátů [48]. Má však tu nevýhodu, že se extrahuje i močovina či glycerol a extrakce polyhydroxykarboxylových kyselin je méně účinná [49].

Dalším druhem extrakce je extrakce tuhou fází (SPE, z angl. solid phase extraction). Po zavedení moči do kolony se neutrální a bazické sloučeniny promyjí vodou a následně se provede eluce organických kyselin vodným pyridinovým acetalovým pufrem. Před aniontově výměnnou extrakcí se přidá hydroxid barnatý, kterým se vysráží velké množství anorganického fosfátu a sulfátu. Použití slabě aniontově výměnné pryskyřice diethylaminoethyl-Sephadex, poskytuje vyšší výtěžnost polárnějších kyselin a vyšší reprodukovatelnost [50], dále také vysoce účinnou extrakci polyhydroxykarboxylových kyselin. Další výhodou je minimální extrakce močoviny a glycerolu. Nevýhodou je potřebná lyofilizace, která je ale časově náročná. Kromě toho je anorganický fosfát extrahován i po srážení hydroxidu barnatého, extrakce kyseliny citronové a kyseliny akoniové je méně účinná úplná dehydratace extrahovaných vzorků moči je obtížná. Extrakce močových organických kyselin na jednorázových sloupcích naplněných trimethylaminopropylou fází (silný anioneměnný materiál) byla navržena společností Kumps a spolupracovníky [51].

Organické kyseliny mohou být také eluovány chloroformem nebo směsí chloroformu, 2-methyl-2-butanolu a ethylacetátu, popřípadě acetonem. Výhodou SPE oproti extrakci kapalina-kapalina je možná automatizace, zpracování většího počtu vzorků najednou a nízká spotřeba organických rozpouštědel [51].

Mikroextrakce tuhou fází (SPME) byla poprvé aplikována v roce 1998 Liebichem a jeho spolupracovníky [52]. Vyvinuli metodu pro diagnostiku organických acidurií, kdy organické kyseliny derivatizovali trimethyloxoniumtetrafluoroborátem. Při SPME se používá polyakrylové vlákno o tloušťce 85 μm , z něhož jsou vzniklé methylestery organických kyselin uvolněny v automatickém dávkovači vzorků plynového chromatografu na kolonu. Organické kyseliny jsou tak přímo derivatizovány ve vzorku moče a není zapotřebí žádné organické rozpouštědlo [52,53,54,55].

Přehled derivatizačních činidel používaných při derivatizaci organických kyselin

V případě plynové chromatografie se používají alkylační, acylační a silylační činidla. Principem alkylace je přeměna organických kyselin na estery, především methylestery. Výsledný produkt je méně polární než výchozí organická kyselina, protože aktivní vodík je nahrazen alkylovou skupinou. Mezi alkylační činidla patří dialkylacetyly, diazoalkany, pentafluorobenzylbromidy, benzylbromidy, fluorid boritý v methanolu nebo butanolu, tetrabutylammoniumhydroxid a další. Výhodou alkylesterů je jejich stabilita. Alkylační činidla mohou být použita samostatně nebo ve spojení s acylačními či silylačními činidly, jako je tomu při derivatizaci diazometanem. Diazometan patří mezi diazoalkany, je vysoce toxický a explozivní. Při reakci diazometanu s karboxylovými kyselinami vznikají odpovídající methylestery, které jsou dále silylovány.

Silylace je v plynové chromatografii nejvíce používanou derivatizační metodou. Silylace je substituční reakce, kdy se nahradí aktivní vodík v původní sloučenině za trimethylsilylovou skupinu (TMS). TMS deriváty jsou citlivé na vlhkost a změnu teplot. Další nevýhodou TMS derivátů je ztížená detekce plamenovou ionizací, díky jejich těkavosti [54].

Přehled běžně používaných silylačních činidel

N,O- bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid (BSTFA) rychle reaguje s organickými kyselinami, vznikají stabilní deriváty.

N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid v trimethylchlorosilanu (BSTFA/TMCS)

Přidáním trimethylchlorosilanu dojde ke zvýšení reaktivity samotného BSTFA a je umožněna derivatizace látek se sekundární hydroxy- a aminoskupinou, které nebylo možné do této doby realizovat. Deriváty by neměly přijít do styku s vodou, jinak dochází k hydrolyze BSTFA.

N-methyl-N-trimethylsilyltrifluoroacetamid (MSTFA) je nejvíce těkavý z trimethylsilylacetamidů, nelze ho použít pro derivatizaci amidů a sekundárních aminů.

N-trimethylsilylimidazol (TMSI) selektivně reaguje s alkoholy a fenoly, ale bohužel ne s aminy nebo amidy.

N-tert-butyldimethylsilyl-N-methyltrifluoroacetamid (MTBSTFA) Při derivatizaci MTBSTFA se nahradí aktivní vodík *tert*-butyldimethylsilylovou skupinou. Tato skupina je odolnější vůči hydrolyze a je více než 10 000krát stabilnější než TMS deriváty. Pro zabránění reakce s alkoholy a aminy je vhodné přidat 1% *tert*-butyldimethylchlorosilan (t-BDMCS) [53].

Acylace

Acylace je typ derivatizace, ve které se aktivní vodík nahradí acylovou skupinou. Sloučeniny, které obsahují aktivní vodík (-OH, -SH a -NH) mohou být převedeny na odpovídající estery, thioestery a amidy. Acylace zvyšuje stabilitu analytu tím, že zablokuje reaktivní skupinu. Vzniklé deriváty jsou méně polární a více těkavé než výchozí látka, což se využívá u látek, jako jsou sacharidy a aminokyseliny. Nevýhodou acylace je vznik interferujících derivátů s látkami, které je vhodné před vlastní derivatizací ze vzorku odstranit. Acylační činidla jsou citlivá na vlhkost, nebezpečná a zapáchající. Mezi acylační činidla patří anhydrid kyseliny octové, anhydrid pentafluoropropionové kyseliny a anhydrid kyseliny heptafluoromáselné, vzniklé deriváty jsou separovány GC a detegovány MS detektorem nebo detektorem elektronového záchytu [57].

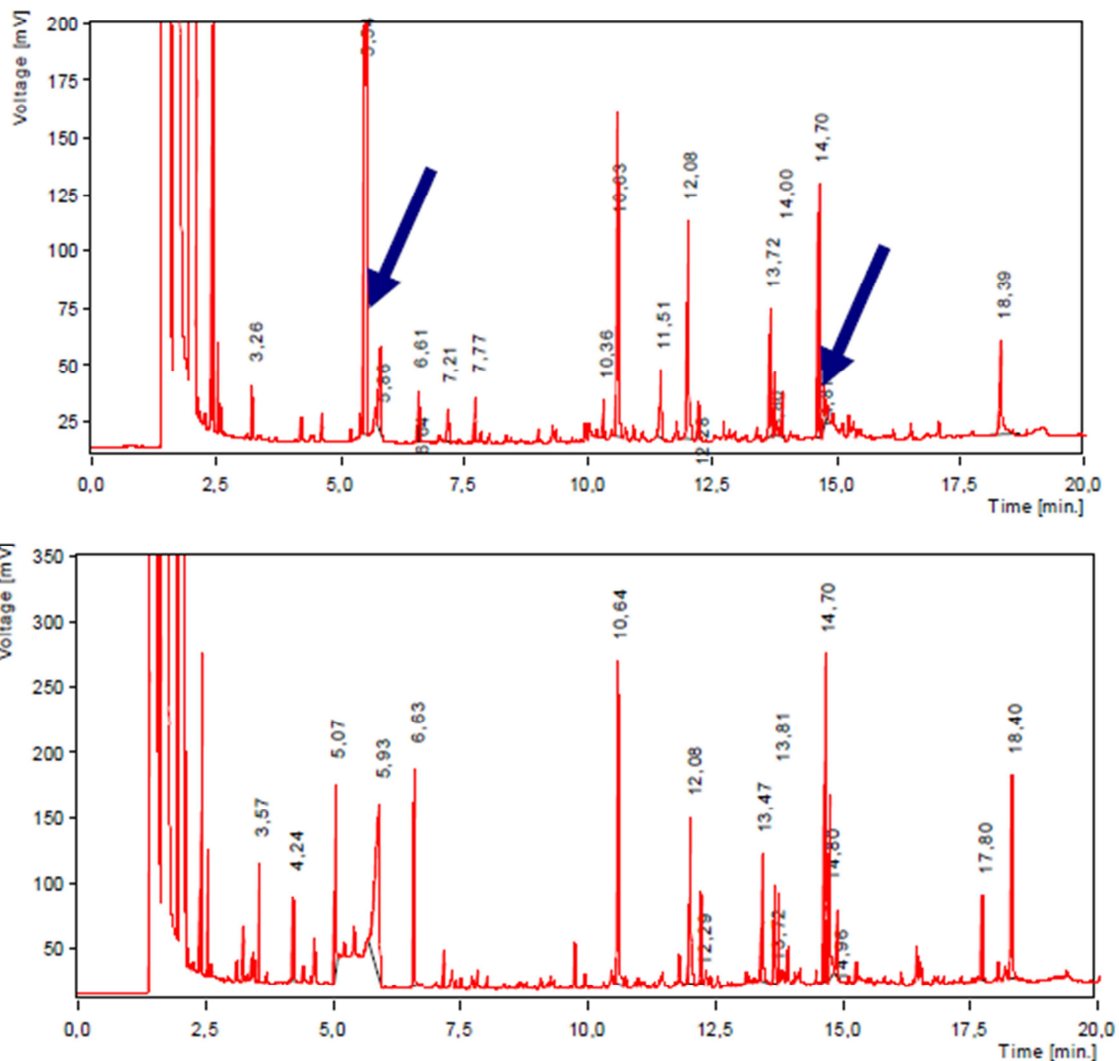
Volba vnitřního standardu při stanovení organických kyselin metodami plynové chromatografie

Obecně je vnitřním standardem látka, která má podobné fyzikálně-chemické vlastnosti jako stanovované analyty, ale není v biologickém vzorku za normálních okolností přítomna. Nejpoužívanějšími vnitřními standardy, používanými při stanovení organických kyselin, jsou propan-1,2,3-trikarboxylová kyselina, 3-hydroxy-2-fenylpropanová kyselina [48].

Organické kyseliny jsou běžně separovány na kapilárních křemenných kolonách, o délce 10-100 m, které jsou pokryté vrstvou polyimidu zajišťující pružnost kolon, o různém vnitřním průměru, nejčastěji 0,10 – 0,32 mm a tloušťce filmu stacionární fáze, zpravidla 0,20-0,50 μm . Při výběru kolony je důležité vzít v potaz délku a průměr kolony a tloušťku filmu stacionární fáze. Jako mobilní fáze (nosný plyn) se nejčastěji používá helium a stacionární fáze obsahující 5 % bifenyl- a 95 % dimethylpolysiloxan [58]. Pozornost by měla být věnována i možnému výskytu enantiomerů, pro tento účel je vhodná kolona s chirální stacionární fází, například modifikovaný cyklodextrin [59].

V případě, že použijeme kapilární kolonu, tak se doporučuje dávkování v módu split, například v poměru 1:10 až 1:50, při dávkování 1-2 μl vzorku [60]. Příklady chromatogramů můžeme vidět na obrázku 10, kde šipkami jsou označeny píky kyselina methylmalonová a methylcitrát, jejichž hladiny jsou u pacienta s methylmalonovou acidurií zvýšené. Pro porovnání je uveden chromatogram člověka, který není methylmalonovou acidurií

postižen.



Obrázek 10 – Chromatogram pacienta s methylamolonovou acidurií (nahore) a člověka, který netrpí methylmalonovou acidurií (dole) [61]

Vhodnými detektory pro detekci organických kyselin jsou plamenově ionizační detektor (FID) a hmotnostní detektor. FID se skládá z ocelové trysky, do které vstupuje směs nosného plynu, vodíku a vzduchu. Na špičce mikrohořáku se tato směs spálí a stanovované látky se ionizují, čímž je generován elektrický proud. Elektrický proud je dále zesilován [58].

Detekce hmotnostním spektrometrem

Při stanovení organických kyselin metodou GC se k detekci využívají hmotnostní detektory s tzv. „tvrdou“ ionizační technikou, jakou je elektronová ionizace, analyzátor je nejčastěji jednoduchý nebo trojitý kvadrupól [58].

Kapalinová chromatografie

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie je analytická separační metoda, kde se směs složek rozděluje na jednotlivé látky na koloně. Acylkarnitiny se separují iontově výměnnou chromatografií nebo chromatografií s obrácenými fázemi [62]. Samotnou separaci lze rozdělit do čtyřech kroků. Prvním krokem je izolace acylkarnitinů ze vzorku pomocí precipitace proteinů s acetonitrilem nebo metanolem a oddělení od supernatanu pomocí silikagelové kolony. Druhým krokem je derivatizace karnitinů a acylkarnitinů pentafluorfenacyl trifluoromethansulfonátem. Třetím krokem je postupná iontově-výměnná chromatografie nebo chromatografie na obrácených fázích s použitím nepokryté kolony C8. Poslední krokem je detekce pomocí iontové pasti hmotnostního spektrometru [63]. Další možností pro diagnostiku organických acidurií je isokratická kationtově-výměnná chromatografie s UV detekcí. Ze vzorku se separují organické kyseliny a aminokyseliny pomocí kationtové výměnné chromatografie. Kationtovou výměnnou chromatografií lze detekovat močový kreatinin a aromatické aminokyseliny s předchozí přípravou pomocí iontově-výměnné chromatografie. Obě frakce jsou analyzovány chromatografií na obrácených fázích

Oproti plynové chromatografii je jednodušší příprava vzorků k analýze. Většinou je vzorek přímo nadávkován do přístroje pouze po deproteinizaci a filtraci. Nevýhody jsou identifikačních systémů jako je u plynové chromatografie hmotnostní spektrometr, přítomnost mastných kyselin, které neabsorbují UV a relativně dlouhý retenční čas [64].

Chromatografie na obrácených fázích

Chromatografie na obrácených fázích (RPC, z angl. reversed phase chromatography) je účinná separační metoda, která se používá pro široký okruh analytů, mezi nimiž jsou i organické kyseliny. Mechanismus dělení v chromatografii na obrácených fázích kombinuje tři interakce, a to interakci analytu s mobilní fází, interakci mobilní a stacionární fáze a distribuci analytu mezi mobilní a stacionární fází. Nejpoužívanější stacionární fáze v RPC jsou chemicky vázané fáze, neboť mají řadu výhod, mezi které patří dostupnost fází s velkým rozsahem polarit a v dostatečné čistotě, velké aplikační pole, rychlé ustavování rozdělovací rovnováhy a možnost jejich kombinace s vodnými mobilními fázemi, což usnadňuje aplikaci na biologické vzorky se složitou maticí (krev, plasma, moč). Vlastnosti chemicky vázané fáze závisí na druhu a množství funkčních skupin, kterými jsou nejčastěji oktadecylové (C18), oktylové (C8), butylové (C4) či fenylové skupiny. Klasickým a nejdéle používaným nosičem chemicky zakotvené stacionární fáze je silikagel. Za vyšších teplot dochází i ke zkrácení

doby analýzy, což je velkým přínosem hlavně ve farmaceutických a klinických laboratořích, kde se analyzují velká množství vzorků [46].

RPC se využívá především pro detekci acylkarnitinů za použití kolony C8 k oddělení karnitinů v lidské plazmě. K separaci je nutné použít předkolonovou derivatizaci pomocí PPTS, což umožní UV detekci při 240-260 nm. Přibližně 500násobného zlepšení citlivosti by bylo možné při použití 2-(2,3-naftalimino)ethyl trifluoromethansulfonát (NETS) jako fluorescenčního derivatizačního činidla [65].

Derivatizace

Organické kyseliny mohou být stanoveny HPLC s předkolonovou nebo postkolonovou derivatizací. Předkolonová derivatizace by měla splňovat tyto podmínky: musí probíhat kvantitativně, ale nemusí probíhat rychle, reakce by měla být, pokud možno selektivní a bez vedlejších produktů, měla by probíhat za mírných reakčních podmínek (pH, teplota) tak, aby nebyla nutná předseparace vzniklého individua, při použití nadbytku derivatizačního činidla musí být dobře separovatelné od vzniklých derivátů a pokud možno by mělo mít jiné fyzikálně-chemické vlastnosti [66]. Předkolonová derivatizace vyžaduje poměrně velkou experimentální náročnost a zkušenost analytického chemika (reprodukovatelnost výsledků). U postkolonové derivatizační reakce nemusí derivát poskytovat jednoznačné chemické individuum, také nemusí probíhat kvantitativně, ale rozhodující je dobrá reprodukovatelnost chemické reakce. Postkolonová derivatizační reakce musí probíhat rychle a reakce může probíhat za extrémních podmínek (pH, teplota), používá se nadbytek reakčního činidla a dochází tak ke zředování mobilní fáze činidlem a dochází ke snížení účinnosti separace vlivem rozmytí chromatografické zóny. Samotná reakce může být neselektivní, vedlejší produkty reakce nejsou na závadu. Postkolonová derivatizace není náročná na podmínky separace, neboť se vzorek separuje v nezměněné podobě. Při této derivatizaci jsou vysoké náklady na techniku, protože se používají speciální zařízení a reaktory, v nichž je nutno provádět řadu operací, ovšem výhodou je automatizace procesu derivatizace [66, 67].

Derivatizační činidla

1,2-Difenylethyldiamin

1,2-Difenylethyldiamin (DPE) je podobné derivatizační činidlo jako *o*-fenylendiamin a používá se k derivatizaci oxokyselin, ale také katecholaminů, kyseliny glyoxalové, a dopaminu v séru a moči. Vzniklý derivát fluoreskuje s excitačním maxima má kolem 345 nm a emisním maximem kolem 485 nm.

1,2-Diamino-4,5-methylendioxybenzen a 1,2-diamino-4,5-dimethoxybenzen

1,2-Diamino-4,5-methylendioxybenzen (DMB) a 1,2-diamino-4,5-dimethoxybenzen (DDB) se používají pro derivatizaci oxokyselin, vzniklé deriváty velmi silně fluoreskují.

o-Fenylendiamin

Reakce *o*-fenylendiaminu (OPD) s oxokyselinami poskytuje vysoce fluoreskující 2-chinoxalinové deriváty. Deriváty se detekují při emisní vlnové délce 410 nm, excitační vlnová délka je 350 nm. OPD je citlivý na světlo a může snadno oxidovat, přičemž vedlejší produkty oxidovaného OPD mohou negativně ovlivnit analýzu, protože jeho deriváty eluují v podobných retenčních časech jako deriváty neoxidovaného OPD [68, 69].

Dansylhydrazin

Dansylhydrazin je syntetizován z dansylchloridu jako derivatizační činidlo pro ketony, aldehydy. Je vhodným činidlem pro fluorescenční detekci [70]. Deriváty intenzivně fluoreskují při excitační vlnové délce 360 nm a emisní délce 510 nm [71].

2,4- dinitrofenylhydrazin

2,4- dinitrofenylhydrazin se obvykle používá pro detekci pomocí UV-vis nebo fluorescenční. Pro identifikaci aldehydů a ketonů. Detekce kolem 360 nm a absorpční maximum okolo 430 nm [71].

3-nitofenylhydrazin

3-nitofenylhydrazin slouží jako derivatizační činidlo aldehydů a karnitinů, které se pak detekují chromatografií na obrácených fázích. Absorpční maximum má při 225 nm [72, 73].

Kolony v kapalinové chromatografii

Kolony v kapalinové chromatografii se používají většinou náplňové a vyrábějí se z nerezové oceli nebo skla, či polyetheretherketonu (PEEK), čímž je zajištěna velká mechanická odolnost. Délka kolony závisí na sorbentu. Čím menší zrna sorbentu, tím kratší kolona. Pro HPLC je typická náplň s velikostí částic 3, 5 nebo 10 μm , u UPLC do 2 μm . Při rozdělovací chromatografii se používá chemicky modifikovaný silikagel kondenzací silanových skupin s dimethylalkylchlorsilanem za vzniku vazby Si-O-Si-C. Stacionární fáze je nepolární, pokud je navázaná „R“ skupina alkylem nebo fenylem. Kolony se poté označují písmenem C, jako například C18 nebo C8, kde číslice za písmenem značí počet uhlíků v alkylovém řetězci. Další možností jsou kolony s polární stacionární fází, kam patří například oxid hlinitý. Oxid hlinitý se primárně používá při separaci nasycených, nenasyčených alifatických uhlovodíků a separaci polyaromatických uhlovodíků. Popřípadě se používá křemičitan hořečnatý (fluorosil), Al_2O_3 a hydroxyapatit [53].

Hydrofilní interakční chromatografie – HILIC

HILIC je vhodná pro polární a hydrofilní látky. Jde o speciální typ kapalinové chromatografie, která je jako alternativa pro chromatografii s reverzní fází pro separaci malých silně bazických a hydrofilních látek, které se zadržují na kolonách s obrácenou fází jen velmi málo. Typická mobilní fáze pro HILIC je organické rozpouštědlo (nejčastěji methanol, acetonitril, atd.) s malým přídavkem vody [65]. Aplikace HILIC slouží především k separaci acylkarnitinů, která byla popsána Liu a kol. za použití HILIC k detekci acetyl- a palmitoylkarnitin v myší plazmě [74]. Příprava vzorku moči spočívá v extrakci kapalina-kapalina. K samotné analýze používáme kolony C18 a CN [75].

Tandemová hmotnostní spektrometrie

Tandemovou hmotnostní spektrometrii při novorozeneckém screeningu poprvé použil v roce 1990 Millington [76]. Tato metoda se stala velice ceněnou při diagnostice a léčbě vrozených vad metabolismu. Vzorek se získá odebráním krevní kapky z patičky novorozence. Z filtračního papíru obsahující vzorek krve se vyrazí terčík o průměru asi 3 mm. Celý terčík je vložen do 96 jamkové polypropylenové mikrotitrační destičky [77]. Amino kyseliny, acylkarnitiny a další látky se extrahují methanolem s přidáním deuteriovanými vnitřními standardy. Stabilní, deuteriované vnitřní standardy slouží ke kalibraci měření vzorků. Standardy lze také koupit jako hotové kity například od firmy MassChrom nebo Chromsystem a od dalších firem. Vzorky se derivatizují butylestery nebo nederivatizují vůbec, ale musí se použít ionizace elektrosprejem.

Derivatizované vzorky jsou citlivější a mají lepší schopnost rozlišovat isobarové karnitiny. Destičky se vzorky, které obsahují metanolové eluáty jsou sušeny pod proudem dusíku při 50 °C po dobu 15 minut. Potom se přidá butylchlorid a směs se inkubuje při 60 °C po dobu 30 minut. Nakonec vzorek rozpustíme acetonitrem a destičku vložíme do přístroje [78].

V případě, že nepoužijeme derivatizaci, tak metanolové eluáty jednoduše převedeme do 96 jamkové polypropylenové destičky, usušíme proudem dusíku a rozpustíme mobilní fází (acetonitrem). Jako ionizační techniku použijeme ionizaci elektrosprejem. Dříve se používali ionizace FAB a FIB. Tyto metody ionizace se primárně používaly při ruční přípravě vzorků, u kterých byl rozpuštěn ve směsi metanol–glycerol s povrchově aktivní látkou [79]. Vizkózní směs se umístila na sondu a zasunula se do zdroje FAB/FIB, pak byla odplyněna a ionizována ionty cesia. Celý proces trval 3–4 minuty. V tomto systému málo vizkózní směs glycerol-metanol byla naplněna a protékala do ocelové špičky, kde byla konstantně bombardována zrychlenými neutrálními atomy nebo urychlenými ionty. Problémem je přenos, uchovávání vzorků a tekutost. Skutečný pokrok v analýze vzorků přišel až s elektrosprejovou ionizací, ve které může být udržován kontinuální proudící systém a vzorky vstříkovány do tohoto systému. Ionizace elektrosprejem vyřešil přenos i uchování vzorků, a navíc zlepšil ionizační účinnost mnoha acylkarnitinů a aminokyselin. Dnes se elektrosprejová ionizace využívá především v tandemové hmotnostní spektrometrii. FAB/FIB ionizace byla překonána. Vzorky se připravují třikrát pro tři samostatné analýzy.

Pro potřeby screeningu lze využít tandemovou hmotnostní spektrometrii bez jiné separační metody, jako je například kapalinová chromatografie. Jedná se o rychlou metodu

(cca 1 minuta pro analýzu jednoho vzorku) s vysokou citlivostí. [80]. Pro aminokyseliny je použit sken neutrální ztráty m/z 102 s rozsahem snímání m/z 140-280. Pro acylkarnitiny je to prekurzorový sken m/z 85 s rozsahem snímání m/z 210-502 v případě derivatizace butylestery. Hodnota skenu pro nederivatizované aminokyseliny je nižší o 46 Da, zatímco acylkarnitiny jsou stejné jako při derivatizaci. Kvantifikace acylkarnitinů a aminokyselin je dosaženo výpočtem poměrů iontové hustoty čistých neoznačených sloučenin vzhledem k jejich označeným standardům [81].

Kapilární elektroforéza

Kapilární elektroforéza je relativně novou metodou, vhodnou pro diagnostiku vrozených metabolických chorob. Kapilární elektroforézou je možné separovat acylkarnitiny s krátkým řetězcem a organické kyseliny s krátkým řetězcem. Kapilární elektroforéza se vyznačuje schopností oddělovat malé molekuly komplexní matrice bez úpravy vzorku před analýzou, použitím malého množství vzorku, což je výhodné u tekutin jako cerebrospinalní tekutina nebo krev novorozenců. Dalšími výhodami jsou malá spotřeba vzorku, možnost detekce v UV oblasti kolem 200 nm, kde karboxylová skupina absorbuje ve svém maximu, dále pak malá spotřeba reakčních činidel, vysoká rozlišovací schopnost. Kapilární elektroforéza je nejvhodnější pro stanovení hladin kyseliny propionové nebo šťavelové, které se metodou plynové chromatografie stanovují s obtížemi [82]. Hlavním nedostatkem je samotný detektor, kdy vzhledem k velmi malým objemům (nanolitry) není UV detekce nejvhodnější. Mnohem lepší detekci by představovala detekce laserem indukovaná fluorescence, ovšem v tomto případě je nutná derivatizace vzorku.

Pro dělení malých iontů se používá kapilární zónová elektroforéza. Kapilární zónová elektroforéza má dvě hlavní složky, které ovlivňují separaci. První složkou je elektroosmotický tok a druhou je elektroforetická pohyblivost. V kapilárách bez neutrální vnitřní vrstvy (kvůli eliminaci vlivu záporného náboje v kapiláře) jsou elektroforetický i elektroosmotický tok simultánní ve vzorku, obvykle je elektroosmotická pohyblivost vyšší než elektroforetická pohyblivost analytů v závislosti na kapilární stěně. Rychlost, kterou látky přijmou uvnitř kapiláry bude navýšena nebo snížena podle toho, zda jsou kladně nebo záporně nabitý, v závislosti na elektrickém poli. Všeobecně se vstříkuje vzorek na anodě a detekuje se na katodě, protože elektroosmotický tok jde z anody na katodu.

Příprava vzorku k analýze zahrnuje pouze pokud je nutné ředění, filtrace nebo centrifugace, aby se eliminovaly pevné částice. Pokud vzorky obsahují bílkoviny je nutné je odstranit, protože by mohly interferovat v kapiláře. Odstranění bílkovin se provádí nejčastěji extrakcí SPE na kazetě C18, ikdyž mnohdy se na kolonce zadrží některé organické kyseliny jako je například laktát. V séru je vyšší obsah bílkovin než v moči [83]. V tomto případě se bílkoviny odstraní ultrafiltrací. Polarita je zásadním parametrem při výběru analytické metody pro organické kyseliny s krátkým řetězcem. Vzhledem k tomu, že elektroforetická mobilita těchto kyselin směřuje přímo k anodě a je obvykle vyšší než elektroosmotický tok směřující přímo ke katodě. Nejběžněji používaný režim je s převrácenými polaritami, což znamená, že vzorek je dávkován ke katodě a detektor

je umístěn na anodě. Při režimu převrácených polarit se používají kryté kapiláry nebo surfaktantem přidaném v základním elektrolytu jako povrch k potlačení nebo zvrácení osmotického toku. Nejpoužívanější polyakrylamidem pokrytá kapilára a kyselina orotová se stanovuje kapilárou, která je pokryta polyvinylalkoholem [84]. Pro detekci lze využít levnější nepokryté kapiláry, ale ty oproti pokrytým mají malou reprodukovatelnost.

Nejpoužívanější je UV detekce a měří se přímo 200nm nebo níže. Kyselina orotová se měří při 280 nm. Další možností detekce je nepřímá, kdy přidáme do základního elektrolytu absorpční látku. Touto detekcí se detekují méně absorbující karboxylové skupiny jako negativní vrchol (peak). Obecně je nepřímá detekce vhodnější než přímá kvůli kontaminovaným nebo složitým vzorkům jako jsou biologické tekutiny. Volba nepřímého chromoforu se řídí pohyblivostí stanovovaných iontů, protože nejlepší rozlišení nastává v momentě, kdy pohyblivost iontů v pufru se blíží k hodnotě iontů vzorku. Po derivatizaci můžeme také použít fluorescenční detekci, ale derivatizace organických kyselin s krátkým řetězcem je velmi náročná, kvůli nízké reaktivitě karboxylových kyselin ve vodě. Vhodnými derivatizačními činidly jsou: 5-bromfluorescein pro C8 a C11 za použití argonového laseru při 489 nm a 1-pirenyldiazomethan pro dikarboxylové kyseliny, které mají být detekovány pomocí He-Cd laseru. Poslední možností je elektrochemická detekce. Problémem této detekce jsou velmi malé proudy na koncích kapilárách s vysokým napětím. Při elektrochemické detekci se používá grafitová elektroda [85].

Léčba organických acidurií

Některé z organických acidurií se léčí vhodnou dietou, při jiných je nutná transplantace orgánů, některé jsou prakticky neléčitelné, pacienti se tak dožívají velice nízkého věku.

Léčba fenylketonurie

Cílem léčby fenylketonurie je snížit hladinu fenylalaninu v krvi. Snížení fenylalaninu se docílí dodržováním diety. V případě fenylketonurie jde o velmi přísnou dietu, musí se omezit příjem bílkovin. Tohle je prozatím jediná možnost, jak zamezit nezvratnému poškození mozku a rozvoji mentální retardace. Při dobré kompenzaci dietou lze docílit toho, že dítě doroste do dospělosti bez vážných zdravotních komplikací. U některých pacientů s PKU se využívá k léčbě sapropterin, další možné způsoby léčby jsou ve stádiu výzkumu nebo mají nepřesvědčivý účinek [20].

Léčba galaktosémie

V současnosti je nejdůležitější součástí léčby galaktosémie dodržování diety bez laktosy a s omezením příjmu galaktosy. Omezení příjmu galaktosy ve stravě zabraňuje projevům akutní toxicity a vede k uzdravení život ohrožující novorozenecké krize. Nicméně dlouhodobým komplikacím galaktosémie nezabrání ani velmi přísná dieta. Protože galaktosu přijímáme nejčastěji vázanou v laktose, je základem dietní léčby vyloučení laktosy ze stravy, což obnáší vyřazení mléka a mléčných výrobků. Pacienti musí sledovat složení potravin a vyhýbat se potravinám, které obsahují mléko v jakékoli formě.

Přestože novorozenecký screening rapidně snížil úmrtnost kojenců s galaktosémií, dlouhodobé výsledky léčby jsou stále neuspokojivé, protože se některým dlouhodobým komplikacím nedá zabránit ani přísnou dietou. Proto se neustále hledají nové způsoby léčby galaktosémie. Jednou z možností by mohla být farmakologická inhibice galaktokinasy (GALK), která zabrání kumulaci galaktosa-1-fosfátu vzniklého jak z exogenních zdrojů galaktosy, tak i vzniklého endogenní produkcí. K tomuto účelu by měly být použity nízkomolekulární inhibitory GALK v kombinaci s dietou bez laktosy s omezením galaktosy [86].

Léčba nemoci javorového sirupu

Leucinóza je primárně léčena dietou s omezením bílkovin a speciální výživou. Speciální výživa zahrnuje konzumaci lékařem určeného množství potravin pro zvláštní léčebné účely,

kteří obsahují aminokyseliny nezbytné pro růst a zdravý vývoj pacienta. Potraviny pro zvláštní léčebné účely jsou plně nebo částečně hrazeny z veřejného zdravotního pojištění a jsou většinou objednávány prostřednictvím metabolické kliniky. Dieta s omezením bílkovin spočívá v konzumaci povoleného množství speciálních nízkobílkovinných potravin [87].

Léčba tyrosinémie I

Dříve se tyrosinémie I. typu léčila dietou s omezením fenylalaninu a tyrosinu, buď s transplantací nebo bez transplantace jater. V roce 1992 byl na trh uveden nový lék 2-(2-nitro-4-trifluoromethylbenzoyl)-1,3-cyklohexandion (NTBC), který inhibuje 4-hydroxyfenylpyruvátdehydrogenasu. NTBC blokuje odbourávání tyrosinu, a tak brání vzniku toxických metabolitů. Pacienti, kteří neodpovídají na léčbu NTBC a mají podezření na hepatocelulární karcinom, podstupují transplantaci jater [88].

Léčba alkaptonurie

Léčba alkaptonurie spočívá v omezení příjmu fenylalaninu a tyrosinu. Toto omezení snižuje vylučování kyseliny homogentisové, ale jelikož onemocnění je obvykle diagnostikováno u dospělého jedince, tak dochází ke komplikaci. Aktuálně se zkouší účinky kyseliny askorbové i NTBC, ovšem zatím se nejedná o dlouhodobé studie [89].

Léčba homocysteinurie

Základem léčby je snaha snížit celkové hladiny homocysteinu v plazmě na hodnoty co nejbližší referenčním hodnotám při zajištění normálního růstu. Hladiny homocysteinu můžeme snížit mnoha způsoby. Nejlepší přístup závisí na podstatě poruchy a sociálních faktorech u konkrétního pacienta. Kolem 50 % pacientů odpovídá na léčbu perorálně velkou dávkou pyridoxinu. Dále je vhodné dodržovat dietu s omezením methioninu a také podávat perorálně betain v maximální dávce. Betain remethyluje homocystein, čímž vzrůstá hladina methioninu, ale naštěstí není ovlivněna patofyziologie choroby. Pokud je dieta zahájena v novorozeneckém věku, tak se zabrání mentální retardaci, je oddálen začátek i progres dislokace čočky a klesá incidence křečí [90].

Léčba glutarové acidurie

Díky včasné diagnostice dokážeme předejít postižení mozku. Léčbu můžeme rozdělit do pěti opatření. Prvním z nich je akutní léčba, která musí být zahájena dříve, než dojde k závažným neurologickým příznakům. Podáváme pacientovi stravu bohatou na sacharidy a suplementujeme karnitinem. Druhé opatření je perorální suplementace karnitinu a riboflavinu. Karnitin by měl být podáván po celý život. Třetí opatření je dietní, kdy pacient nepřijímá lysin, což minimalizuje vznik malnutrice. Čtvrtá je neurologická léčba, kdy lze použít klomethiazol u těžkých případů hyperpyrexie, pak anticholinergika na zlepšení choreoartetózy. Posledním opatřením je nescifická multidisciplinární péče, kdy se snažíme zapojit pacienta do normálního života například s využitím speciálních počítačových programů [91].

Léčba cystinurie

Základem léčby cystinurie je dodržování vysokého přívodu tekutin ke zředění moči a alkalizace ke zlepšení rozpustnosti cystinu. Dospělí by měli vypít více než 3000 ml tekutin za den. Alkalizace se zajišťuje podáváním uhličitanů [92].

Závěr

Tato práce se zabývá diagnostikou organických acidurií, jednoduchými laboratorními testy, jako je test s chloridem železitým, difenylhydrazinový test nebo kyanidnitroprussidový test, popřípadě Benediktův test, ale také více sofistikovanými metodami, jako jsou chromatografické a elektroforetické metody s různými typy detekcí. Všeobecně lze tvrdit, že nejpoužívanější technikou k diagnostice organických acidurií je plynová chromatografie s hmotnostní detekcí. Výhodou plynové chromatografie je dostupnost knihoven při detekci hmotnostním spektrometrem, což u kapalinové chromatografii s hmotnostní detekcí není možné.. Další významnou metodou pro diagnostiku organických acidurií je tandemová hmotnostní spektrometrie. Tandemová hmotnostní spektrometrie se především využívá při novorozeneckém screeningu vrozených metabolických chorob. V poslední části bakalářské je pojednáno o možnostech léčby organických acidurií.

Seznam literatury

1. ENNS, Gregory. *Metabolic disease* [online]. listopad 22, 2017, 1-3 [cit. 2017-04-29]. Dostupné z: <https://www.britannica.com/science/metabolic-disease>
2. MARSHALL, William J., Marta LAPSLEY, Andrew P. DAY a Ruth M. AYLING. *Clinical biochemistry: metabolic and clinical aspects*. Third edition. New York: Churchill Livingstone/Elsevier, 2014. ISBN 978-070-2054-785.
3. DANSINGER, Michael. *Inherited Metabolic Disorders*. WebMD [online]. 2016, 1-4 [cit. 2017-06-18]. Dostupné z: <https://www.webmd.com/a-to-z-guides/inherited-metabolic-disorder-types-and-treatments#1-3>
4. RAMACHANDRAN, Tarakad S. *Inherited Metabolic Disorders* [online]. In: 2014 [cit. 2017-04-29]. Dostupné z: <https://emedicine.medscape.com/article/1183253-overview>
5. LEBL, Jan a Kamil PROVAZNÍK. *Preklinická pediatrie*. Praha: Galén, 2003. ISBN 80-726-2207-2
6. BRANDT, N. J. *Symptoms and Signs in Organic Acidurias*. 1984. DOI: 10.1007/978-94-009-5612-4_6. ISBN 978-94-010-8975-3. Dostupné také z: http://www.springerlink.com/index/10.1007/978-94-009-5612-4_6
7. Felix Votava, C.F.K.V., a kol. *Co je novorozenecký screening*. 2013; Dostupné také z: <http://www.novorozeneckyscreening.cz/ov-co-je-novorozenecky-screening>.
8. Votava, F., a kol., *Výsledky rozšířeného novorozeneckého screeningu v České republice*. Czecho-Slovak Pediatrics/Cesko-Slovenska Pediatrie, 2014. **69**(2)
9. *Metodický návod k zajištění celoplošného novorozeneckého laboratorního screeningu a následné péče*. Věstník Ministerstva zdravotnictví České republiky, 2009(6): p. 7-14.
10. GREEN, A. a R. J. POLLITT. *Population newborn screening for inherited metabolic disease: Current UK perspectives*, 572-577. DOI: 10.1023/A:1005572710844. ISBN 0141-8955. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1023/A:1005572710844>
11. *About Dried Blood Spot Technology*. In: Spot on sciences [online]. [cit. 2018-06-13]. Dostupné z: <https://www.spotonsciences.com/knowledge-center/dbs-technology/>
12. MAK, Chloe Miu, Han-Chih Hencher LEE, Albert Yan-Wo CHAN a Ching-Wan LAM. *Inborn errors of metabolism and expanded newborn screening: review and update*. DOI: 10.3109/10408363.2013.847896. ISBN 1040-8363. Dostupné také z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/10408363.2013.847896>

13. JURÁSKOVÁ, Dana. *Věstník Ministerstva zdravotnictví České republiky*. SEVT, a. s. Praha, 2009.
14. VAIDYANATHAN, Kannan, M. P. NARAYANAN a D. M. VASUDEVAN. *Organic Acidurias: An Updated Review*. DOI: 10.1007/s12291-011-0134-2. ISBN 0970-1915. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s12291-011-0134-2>
15. OZAND, Pinar T. a Generoso G. GASCON. *Topical Review Article: Organic Acidurias*. DOI: 10.1177/088307389100600302. ISBN 0883-0738. Dostupné také z: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/088307389100600302>
16. WAJNER, Moaçir, Kimiyo RAYMOND, Alethéa BARSCHAK, et al. *Detection of Organic Acidemias in Brazil*. DOI: 10.1016/S0188-4409(02)00402-2. ISBN 0188 4409. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0188440902004022>
17. Wichajarn, K., Liammongkolkul, S., Vatanavicharn, N., & Wattanasirichaigoon, D. (2017). *Clinical and laboratory findings and outcomes of classic organic acidurias in children from north-eastern Thailand: a 5-year retrospective study*, *Asian Biomedicine*, 11(1), 41-47. doi: <https://doi.org/10.5372/1905-7415.1101.537>
18. PATIL, Vidya S., et al. *Screening for aminoacidurias and organic acidurias in patients with metabolic or neurological manifestations*. *Biomedical Research*, 2012, 23(2)
19. FERNANDES, J., SAUDUBRAY, J.M., van den BERGHE, G., WALTER, J.H. et al.: *Diagnostika a léčba dědičných metabolických poruch*, Praha: Triton, 2008. s.257-363 ISBN 978-80-7387-096-6
20. BLAU, Nenad, Francjan J VAN SPRONSEN a Harvey L LEVY. *Phenylketonuria*. DOI: 10.1016/S0140-6736(10)60961-0. ISBN 0140-6736. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673610609610>
21. BIXBY, Emily M., Luz G. PALLATAO a Charles V. PRYLES. *Evaluation of the Bacillus subtilis Inhibition-Assay Technic as a Screening Procedure for the Detection of Phenylketonuria*. DOI: 10.1056/NEJM196303212681204. ISBN 0028-4793. Dostupné také z: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJM196303212681204>
22. *Fenylketonurie-co je a jak s ní žít*. In: Acikgunluk [online]. [cit. 2018-06-13]. Dostupné z: <http://acikgunluk.net/cs/fenilketonuriya-cto-eto-i-kak-s-etim-zhit/>
23. FUJIMOTO, Akie, Yoshiyuki OKANO, Tomiko MIYAGI, Gen ISSHIKI a Toshiaki OURA. *Quantitative Beutler Test for Newborn Mass Screening of Galactosemia Using a Fluorometric Microplate Reader*. *Clinical Chemistry*. 2000, 46(6), 806-810.

24. COELHO, Ana I., M. Estela RUBIO-GOZALBO, João B. VICENTE a Isabel RIVERA. *Sweet and sour: an update on classic galactosemia*. DOI: 10.1007/s10545-017-0029-3. ISBN 0141-8955. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s10545-017-0029-3>
25. MALEC, Jiří. *Katarakta oční čočky* [online]. In: FN Motol [cit. 2018-06-13]. Dostupné z: <https://www.sancedetem.cz/cs/hledam-pomoc/deti-se-zdravotnim-postizenim/deti-s-jinym-zavaznym-zdravotnim-znevyhodnenim/ocni-vady-a-onemocneni-u-deti/vrozene-ocni-vady.shtml>
26. BAULNY, Hélène Ogier de, Carlo DIONISI-VICI a Udo WENDEL. *Branched-chain Organic Acidurias/Acidaemias*. 2012. DOI: 10.1007/978-3-642-15720-2_19. ISBN 978-3-642-15719-6. Dostupné také z: http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-15720-2_19
27. LEE, J. Y., M. A. CHIONG, S. C. ESTRADA, E. M. CUTIONGCO-DE LA PAZ, C. L. T. SILAO a C. D. PADILLA. *Maple syrup urine disease (MSUD)—Clinical profile of 47 Filipino patients*. DOI: 10.1007/s10545-008-0859-0. ISBN 0141-8955. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s10545-008-0859-0>
28. YUNUS, Z Md., DP Abg KAMALUDIN, M MAMAT, Y S CHOY a LH NGU. *Clinical and Biochemical Profiles of Maple Syrup Urine Disease in Malaysian Children*. 2011-12-11. DOI: 10.1007/8904_2011_105. ISBN 978-3-642-28095-5. Dostupné také z: http://link.springer.com/10.1007/8904_2011_105
29. BARSHOP, Bruce A. *Organic Acid Metabolism: Genetic Disorders*. 2005-05-03. DOI: 10.1038/npg.els.0002288. ISBN 04-700-1617-5. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1038/npg.els.0002288>
30. *Maple Syrup Urine Disease (MSUD): Causes, Forms, Symptoms, Diagnosis, Treatment, Nutritional Therapy, Complications, Prevention*. In: Epainassist [online]. [cit. 2018-06-13]. Dostupné z: <https://www.epainassist.com/metabolic-disorders/maple-syrup-urine-disease-or-msud>
31. HONZÍK, PH.D., doc. MUDr. Tomáš. *Klinické příznaky dědičných metabolických poruch u dětí*. *Pediatric pro praxi* [online]. 2011, 12(5), 313-319 [cit. 2018-06-19]. Dostupné z: <https://www.pediatricpropraxi.cz/pdfs/ped/2011/05/06.pdf>
32. CHINSKY, Jeffrey M, Rani SINGH, Can FICICIOGLU, et al. *Diagnosis and treatment of tyrosinemia type I: a US and Canadian consensus group review and recommendations*. DOI: 10.1038/gim.2017.101. ISBN 1098-3600. Dostupné také z: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/gim.2017.101>

33. GROMPE, Markus. *The Pathophysiology and Treatment of Hereditary Tyrosinemia Type 1*. DOI: 10.1055/s-2001-19035. ISBN 0272-8087. Dostupné také z: <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-2001-19035>
34. YAP, S. *Classical homocystinuria: vascular risk and its prevention*. *Journal of inherited metabolic disease*, 2003, 26.2-3: 259-265.
35. MLČÁKOVÁ, Kateřina. *Pohyb je její život: remethylační forma homocystinurie*. In: *Česká asociace pro vzácná onemocnění* [online]. [cit. 2018-06-19]. Dostupné z: <http://vzacni.cz/remethylacni-forma-homocystinurie/>
36. PHORNPHTKUL, Chanika, Wendy J. INTRONE, Monique B. PERRY, et al. *Natural History of Alkaptonuria*. DOI: 10.1056/NEJMoa021736. ISBN 0028-4793. Dostupné také z: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa021736>
37. Alkaptonurie einfach erklärt. In: DSAKU [online]. 2012 [cit. 2018-06-19]. Dostupné z: <http://www.dsaku.de/was-ist-alkaptonurie/patienteninfo/einfuehrung-alkaptonurie/>
38. BUDD, Matthew A., Kay TANAKA, Lewis B. HOLMES, Mary L. EFRON, John D. CRAWFORD a Kurt J. ISSELBACHER. *Isovaleric Acidemia*. DOI: 10.1056/NEJM196708172770701. ISBN 0028-4793. Dostupné také z: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJM196708172770701>
39. VOCKLEY, Jerry a Regina ENSENAUER. *Isovaleric acidemia: New aspects of genetic and phenotypic heterogeneity*. DOI: 10.1002/ajmg.c.30089. ISBN 1552-4868. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/ajmg.c.30089>
40. LEONE, P., et al. *Aspartoacylase gene transfer to the mammalian central nervous system with therapeutic implications for Canavan disease*. *Annals of neurology*, 2000, 48.1: 27-38.
41. TRAEGER, Eveline C. a Isabelle RAPIN. *The Clinical Course of Canavan Disease*. DOI: 10.1016/S0887-8994(97)00185-9. ISBN 0887-8994. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0887899497001859>
42. GAO, PHD, Guangping. *Gene Therapy Strategies for Canavan Disease* [online]. In: . [cit. 2018-06-19]. Dostupné z: <https://www.umassmed.edu/gtc/our-research/canavan-disease/>
43. FUNK, C. B. R. *Neuropathological, biochemical and molecular findings in a glutaric acidemia type 1 cohort*. DOI: 10.1093/brain/awh401. ISBN 0006-8950. Dostupné také z: <https://academic.oup.com/brain/article-lookup/doi/10.1093/brain/awh401>
44. ELBEIALY, Dr Mohammad A. *Glutaric aciduria type I*. In: *Radiopaedia* [online]. [cit. 2018-06-19]. Dostupné z: <https://radiopaedia.org/cases/glutaric-aciduria-type-i>

45. VAIDYANATHAN, Kannan, M. P. NARAYANAN a D. M. VASUDEVAN. *Organic Acidurias: An Updated Review* [online]. [cit. 2018-06-18]. DOI: 10.1007/s12291-011-0134-2. ISBN 0970-1915. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s12291-011-0134-2>
46. Mudr. Ludmila Hejzmanová, *Vox paediatricae* [online]. 2001, 1(1) [cit. 2018-06-19]. ISSN 1213 - 2241. Dostupné z: http://www.detskylekar.cz/cps/rde/xbcr/dlekar/vox1_2001.pdf
47. ELSHAARI, F. A., D. S. SHERIFF, A. E. AGELA, A. A. ALSHAARI a S. S MUFTAH. *Screening for Inborn Errors of Metabolism. International Journal of BioMedicine* [online]. 2013, 3(3), 211-214 [cit. 2018-06-19]. Dostupné z: http://ijbm.org/articles/Article3_3_R1.pdf
48. Niessen, W. M. A., Ed. *Current Practise of Gas Chromatography-Mass Spectrometry*. Dekker: New York, 2001; pp. 341–354.
49. Niwa, T. *Procedures for MS Analysis of Clinically Relevant Compounds*. Clin. Chim. Acta 1995, 241–242, 75– 152.
50. Peters, V.; Garbade, S. F.; Langhans, C. D.; Hoffmann, G. F.; Pollitt, R. J.; Downing, M.; Bonham, J. R. *Qualitative Urinary Organic Acid Analysis: Methodological Approaches and Performance*. J. Inherit. Metab. Dis. 2008, 31, 690–696.
51. Vamos, E.; Mardens, Y.; Abramowicz, M.; Genin, J.; Duez, P. *Assessment of an Electron-Impact GC-MS Method for Organic Acids and Glycine Conjugates in Amniotic Fluid*. J. Inherit. Metab. Dis. 2004, 27, 567–579.
52. Liebich, H. M.; Gesele, E.; Woll, J. *Urinary Organic Acid Screening by Solid-Phase Microextraction of the Methyl Esters*. J. Chromatogr. B 1998, 713, 427–432
53. KAUNA-CZAPLIŃSKA, Joanna. *Current Applications of Gas Chromatography/Mass Spectrometry in the Study of Organic Acids in Urine* [online]. [cit. 2018-06-20]. DOI: 10.1080/10408347.2011.555242. ISBN 1040-8347. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10408347.2011.555242>
54. Jones, M. G.; Chalmers, R. A. *Artefacts in Organic Acid Analysis: Occurrence and Origin of Partially Trimethylsilylated 3-Hydroxy-3- Methyl Carboxylic Acids*. Clin. Chim. Acta 2000, 300, 203–212.
55. Paik, M.-J.; Kim, K.-R. *Sequential Ethoxycarbonylation, Methoximation and Tert-Butyldimethylsilylation for Simultaneous Determination of Amino Acids and*

- Carboxylic Acids by Dual-Column Gas Chromatography*, J. Chromatogr. A 2004, 1034, 13–23.
56. Purevsuren, J.; Hasegawa, Y.; Kobayashi, H.; Endo, M.; Yamaguchi, S. *Urinary Organic Metabolite Screening of Children with Influenza-Associated Encephalopathy for Inborn Errors of Metabolism Using GC/MS*. Brain Dev. 2008, 30, 520–526.
57. ORATA, Francis. *Derivatization Reactions and Reagents for Gas Chromatography Analysis* [online]. 2012-03-21 [cit. 2018-06-19]. DOI: 10.5772/33098. ISBN 978-953-51-0298-4. Dostupné z: <http://www.intechopen.com/books/advanced-gas-chromatography-progress-in-agricultural-biomedical-and-industrial-applications/derivatization-reactions-and-reagents-for-gas-chromatography-analysis>
58. Interní materiály Všeobecné fakultní nemocnice v Praze, *Plynová chromatografie*, Praha
59. EDITED BY A. BJØRSETH a G. ANGELETTI. *Analysis of Organic Micropollutants in Water Proceedings of the Second European Symposium held in Killarney (Ireland), November 17-19, 1981* [online]. Dordrecht: Springer Netherlands, 1982 [cit. 2018-04-19]. ISBN 978-940-0978-041
60. KUHARA, Tomiko. *Diagnosis and monitoring of inborn errors of metabolism using urease-pretreatment of urine, isotope dilution, and gas chromatography–mass spectrometry*. Journal of Chromatography B, 2002, 781.1-2: 497-517.
61. Interní materiály Všeobecné fakultní nemocnice v Praze, *Methylmalonová acidurie*, Praha
62. MINKLER, P. E., M. S. K. STOLL, S. T. INGALLS, S. YANG, J. KERNER a C. L. HOPPEL. *Quantification of Carnitine and Acylcarnitines in Biological Matrices by HPLC Electrospray Ionization- Mass Spectrometry*. DOI: 10.1373/clinchem.2007.099226. ISBN 0009-9147. Dostupné také z: <http://www.clinchem.org/cgi/doi/10.1373/clinchem.2007.099226>
63. MINKLER, Paul E., Stephen T. INGALLS a Charles L. HOPPEL. *Strategy for the Isolation, Derivatization, Chromatographic Separation, and Detection of Carnitine and Acylcarnitines*. DOI: 10.1021/ac0487810. ISBN 0003-2700. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac0487810>
64. BENNETT, M. J.; BRADEY, C. E. *Simpler liquid-chromatographic screening for organic acid disorders*. Clinical chemistry, 1984, 30.4: 542-546.

65. MANSOUR, Fotouh R., Wenjun WEI a Neil D. DANIELSON. *Separation of carnitine and acylcarnitines in biological samples: a review*. DOI: 10.1002/bmc.2995. ISBN 0269-3879. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/bmc.2995>
66. POOLE, C.F. *Derivatization in Liquid Chromatography*. 2013. DOI: 10.1016/B978-0-12-415806-1.00002-4. ISBN 978-012-4158-061. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780124158061000024>
67. STEWART, James T. *Post column derivatization methodology in high performance liquid chromatography (HPLC)*. DOI: 10.1016/0165-9936(82)80053-8. ISBN 0165-9936. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0165993682800538>
68. OLSON C. K., CHEN G., LYNCH J. CH. *Quantification of branched-chain keto acids in tissue by ultra fast liquid chromatography-mass spectrometry*. Analytical Biochemistry, 2013, 439, s. 116–122.
69. FUCHS M., ENGEL J., CAMPOS M., MATEJEC R., HENRICH M., HARBACH H., WOLFF M., WEISMÜLLER K., MENGES T., HEIDT C. M., WELTERS D. I., KRÜLL M., HEMPELMANN G., MÜHLING J. *Intracellular alpha-keto acid quantification by fluorescence-HPLC*. Amino Acids. 2009, 36, s. 1–11.
70. VOGEL, M., A. BÜLDT a U. KARST. *Hydrazine reagents as derivatizing agents in environmental analysis - a critical review*. DOI: 10.1007/s002160051572. ISBN 0937-0633. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s002160051572>
71. LAWRENCE, James F. *Fluorimetric Derivatization in High Performance Liquid Chromatography*. Journal of Chromatographic Science, 1979, 17.3: 147-151.
72. QI, Bao-Ling, et al. *Derivatization for liquid chromatography-mass spectrometry*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2014, 59: 121-132.
73. NARANG, R., B. NARASIMHAN a S. SHARMA. *A Review on Biological Activities and Chemical Synthesis of Hydrazide Derivatives*. DOI: 10.2174/092986712798918789. ISBN 0929-8673.
74. LIU, Zhi, Abdul E. MUTLIB, Jianyao WANG a Rasmy E. TALAAT. *Liquid chromatography/mass spectrometry determination of endogenous plasma acetyl and palmitoyl carnitines as potential biomarkers of β -oxidation in mice*. DOI: 10.1002/rcm.3755. ISBN 0951-4198. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/rcm.3755>
75. HUANG, Yin, Yuan TIAN, Zunjian ZHANG a Can PENG. *A HILIC–MS/MS method for the simultaneous determination of seven organic acids in rat urine as biomarkers*

- of exposure to realgar*. DOI: 10.1016/j.jchromb.2012.07.038. ISBN 1570-0232.
Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1570023212004485>
76. Millington DS, Kodo N, Norwood DL, Roe CR. *Tandem mass spectrometry: a new method for acylcarnitine profiling with potential for neonatal screening for inborn errors of metabolism*. J Inherit Metab Dis. 1990;13(3):321-4.
77. TU, Wen-Jun, Hui CHEN a Jian HE. *Methylmalonic aciduria: newborn screening in mainland China* [online]. [cit. 2018-06-20]. DOI: 10.1515/jpem-2012-0276. ISBN 2191-0251. Dostupné z: <https://www.degruyter.com/view/j/jpem.2013.26.issue-3-4/jpem-2012-0276/jpem-2012-0276.xml>
78. YUNUS, Zabedah Md., Salina Abdul RAHMAN, Yew Sing CHOY, Wee Teik KENG a Lock Hock NGU. *Pilot study of newborn screening of inborn error of metabolism using tandem mass spectrometry in Malaysia: outcome and challenges* [online]. [cit. 2018-06-20]. DOI: 10.1515/jpem-2016-0028. ISBN 2191-0251. Dostupné z: <https://www.degruyter.com/view/j/jpem.2016.29.issue-9/jpem-2016-0028/jpem-2016-0028.xml>
79. CHACE, D. H. *Use of Tandem Mass Spectrometry for Multianalyte Screening of Dried Blood Specimens from Newborns*. DOI: 10.1373/clinchem.2003.022178. ISBN 0009-9147. Dostupné také z: <http://www.clinchem.org/cgi/doi/10.1373/clinchem.2003.022178>
80. OMBRONE, Daniela, Elisa GIOCALIERE, Giulia FORNI, Sabrina MALVAGIA a Giancarlo LA MARCA. *Expanded newborn screening by mass spectrometry: New tests, future perspectives* [online]. [cit. 2018-06-20]. DOI: 10.1002/mas.21463. ISBN 0277-7037. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/mas.21463>
81. DE JESÚS, Víctor R., Donald H. CHACE, Timothy H. LIM, Joanne V. MEI a W. Harry HANNON. *Comparison of amino acids and acylcarnitines assay methods used in newborn screening assays by tandem mass spectrometry*. DOI: 10.1016/j.cca.2010.01.034. ISBN 0009-8981. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0009898110000689>
82. GARCÍA, Antonia; BARBAS, Coral. *Capillary electrophoresis for the determination of organic acidurias in body fluids: a review*. Clinical chemistry and laboratory medicine, 2003, 41.6: 755-761.

83. JELLUM, Egil, Herman DOLLEKAMP a Cynthia BLESSUM. *Capillary electrophoresis for clinical problem solving: analysis of urinary diagnostic metabolites and serum proteins*. DOI: 10.1016/0378-4347(96)00132-6. ISBN 0378-4347. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0378434796001326>
84. FRANKE, D. R.; NUTTALL, K. L. *Orotic acid in clinical urine specimens by capillary zone electrophoresis using polyvinyl alcohol coated capillaries*. *Journal of capillary electrophoresis*, 1996, 3.6: 309-312.
85. GARCÍA, Antonia a Coral BARBAS. *Capillary Electrophoresis for the Determination of Organic Acidurias in Body Fluids: A Review*. DOI: 10.1515/CCLM.2003.115. ISBN 1434-6621. Dostupné také z: <https://www.degruyter.com/view/j/cclm.2003.41.issue-6/cclm.2003.115/cclm.2003.115.xml>
86. 59. TANG, M., S.I. ODEJINMI, H. VANKAYALAPATI, K.J. WIERENGA a K. LAI. *Innovative therapy for Classic Galactosemia — Tale of two HTS* [online]. [cit. 2018-06-20]. DOI: 10.1016/j.ymgme.2011.09.028. ISBN 1096-7192. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1096719211003398>
87. SNYDERMAN, Selma E. *Treatment Outcome of Maple Syrup Urine Disease*. DOI: 10.1111/j.1442-200X.1988.tb02531.x. ISBN 1328-8067. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1442-200X.1988.tb02531.x>
88. GROMPE, Markus. *The pathophysiology and treatment of hereditary tyrosinemia type 1*. In: *Seminars in liver disease*. Thieme Medical Publishers, Inc., 333 Seventh Avenue, New York, 2001. p. 563-572.
89. GERTSMAN, Ilya, Bruce A. BARSHOP, Jan PANYARD-DAVIS, Jon A. GANGOITI a William L. NYHAN. *Metabolic Effects of Increasing Doses of Nitisinone in the Treatment of Alkaptonuria*. *JIMD Reports*, Volume 24. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2015, 2015-2-10, , 13-20. *JIMD Reports*. DOI: 10.1007/8904_2014_403. ISBN 978-3-662-48226-1. Dostupné také z: http://link.springer.com/10.1007/8904_2014_403
90. WILCKEN, David EL, et al. *Homocystinuria—the effects of betaine in the treatment of patients not responsive to pyridoxine*. *New England journal of medicine*, 1983, 309.8: 448-453.

91. KÖLKER, Stefan, et al. *Diagnosis and management of glutaric aciduria type I– revised recommendations*. Journal of inherited metabolic disease, 2011, 34.3: 677.
92. JOLY, Dominique, Philippe RIEU, Arnaud MÉJEAN, Marie-France GAGNADOUX, Michel DAUDON a P. JUNGERS. *Treatment of cystinuria*.
DOI: 10.1007/s004670050736. ISBN 0931-041X. Dostupné také z:
<http://link.springer.com/10.1007/s004670050736>