



ZBORNÍK PRÍSPEVKOV

3. KONFERENCIE

CENTRA EXCELENTNOSTI

Aplikácia OMICS nástrojov v štúdiu vzniku chorôb a ich prevencie



Chemický ústav SAV, v. v. i., Dúbravská cesta 9, Bratislava

30. november 2022

Recenzent

RNDr. Jana Bellová, PhD.

chemjbel@savba.sk

Editor

Mgr. Mária Šedivá, PhD.

chemsedm@savba.sk

Ing. Mária Kopáčová

chemmari@savba.sk

ISBN 978 – 80 – 971665 – 4 - 0

Monitorovanie hladiny Glc4 u Pompe pacientov pomocou ^1H NMR

Mária Matulová¹, Iveta Uhliariková¹, Anna Šalingová², Anna Hlavatá³

¹Chemický ústav SAV, v. v. i., Dúbravská cesta 9, 845 38 Bratislava, Slovensko; chemmatu@savba.sk

²NÚDCh, Oddelenie laboratórnej medicíny, Limbová 1, 833 40 Bratislava, Slovensko

³Detská klinika, Fakultná nemocnica LF UK a NÚDCh, Limbová 1, 83340 Bratislava, Slovensko

Úvod

Nukleárna magnetická rezonančná spektroskopia (NMRS) je v súčasnosti jednou z dôležitých kvantitatívnych, kvalitatívnych a zobrazovacích metód, ktorá otvára nové perspektívy v diagnostike známych ale i neznámych dedičných metabolických ochorení. V ^1H NMR spektre telových tekutín sú prítomné signály všetkých metabolitov obsahujúcich protón. Spektrum poskytuje obraz (fingerprint) o ich zastúpení v zmesi a je odrazom ich koncentrácie v čase odberu vzorky. Najčastejšie analyzovaným je moč, pretože jeho odber je najmenej invazívny.

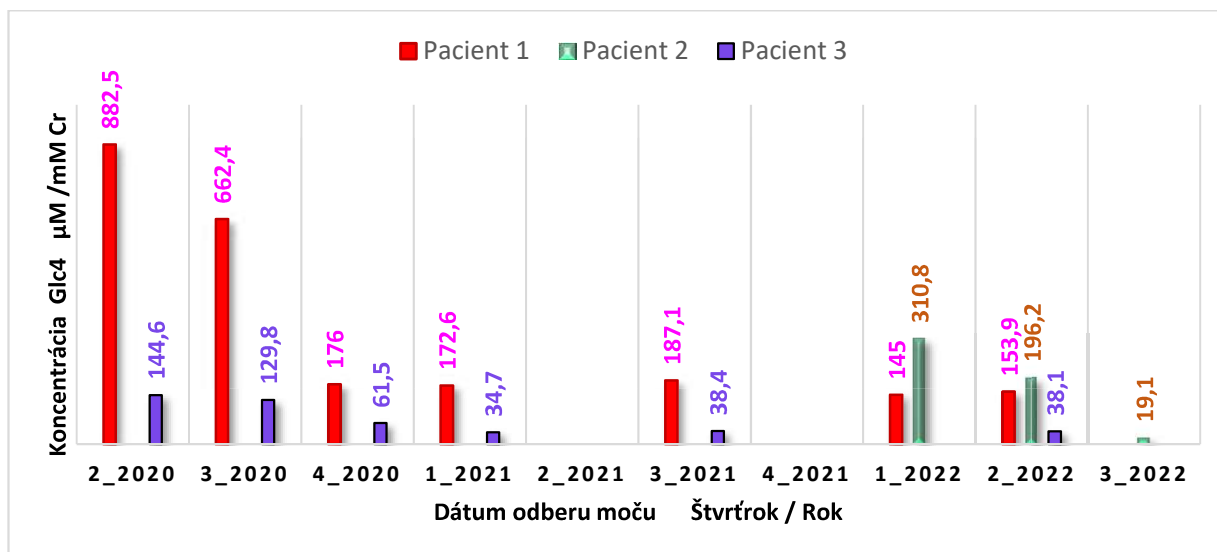
Spolupráca Chemického ústavu SAV s Centrom dedičných metabolických porúch Oddelenia laboratórnej medicíny, NÚDCh v Bratislave prispela k verifikácii a kvantifikácii biomarkerov v moči u pacientov s rôznymi zriedkavými ochoreniami. NMR spektroskopia zohráva dôležitú úlohu v diagnostike niektorých dedičných metabolických ochorení. Metóda je nedeštruktívna, rýchla, nevyžaduje špeciálnu úpravu vzorky a možno ju považovať za alternatívny analytický postup. Okrem identifikácie prítomnosti biomarkera umožňuje aj stanovenie jeho množstva. Z tohto dôvodu je v súčasnosti prakticky používaná na stanovenie koncentrácií špecifického biomarkera Glc4 (glukózového tetrasacharidu) v moči pacientov s Pompe ochorením (Pakanová 2016, 2017 a 2019). Analýzy vzoriek moču sa robia priebežne podľa potrieb lekárov u pacientov s podozrením na toto ochorenie, alebo u pacientov podstupujúcich enzymatickú substitučnú liečbu (ERT). Do komplexného zhodnotenia úspešnosti ERT vstupuje okrem klinického stavu pacienta mnoho ďalších faktorov, ku ktorým patrí aj stanovenie hladiny Glc4.

Materiál a metódy

Vzorky moču anonymných pacientov boli po odbere skladované pri $-20\text{ }^\circ\text{C}$ a rozmrazené tesne pred NMR analýzou; centrifugované pri 13000 g po dobu 5 minút. Zlyofilizovaný supernatant moču (150 μl) bol rozpustený vo fosfátovom pufrí pH 7.4 (230 μl) obsahujúceho 0.9 mM DSS- d_6 (3-(trimethylsilyl)-1-propanesulfonic acid- d_6 sodium salt) ako interný štandard. ^1H NMR spektrá boli merané pri teplote $60\text{ }^\circ\text{C}$ v 3-mm kyvete na 600MHz spektrometri Bruker AVANCE III HDX 600 MHz vybavenom inverznou kryo sondou CryoProbe TCI H-C/N-D-05-Z. Signál vody bol potlačený presaturáciou sekvenciou *presat*. Koncentrácia Glc4 bola vypočítaná relatívne vzhľadom na intenzitu signálu štandardu.

Výsledky a diskusia

Pre Pompe ochorenie sa na vyhodnotenie koncentrácie špecifického tetrasacharidu Glc4 využíva relatívne dobre rozlíšený H1 anomérny signál terminálnej 1,6-viazanej glukózovej jednotky s chemickým posunom δ 4.957 ppm. Koncentrácia Glc4 je závislá od veku pacienta; najvyššia je pri infantilnej forme, nižšia je pri juvenilnej forme Pompeho ochorenia a najnižšia je u dospelých jedincov (adultná forma). K vyhodnoteniu odozvy pacienta na ERT liečbu prispieva aj informácia o exkrécii Glc4. Tú je možné stanoviť zatiaľ len ^1H NMR spektroskopiou. Obr. 1 ukazuje vývoj stanovených Glc4 koncentrácií u vybraných pacientov.



Obr.1: Vývoj koncentrácií Glc4 v moči pacientov s ochorením Pompe.

Pod'akovanie

Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci Operačného programu Integrovaná infraštruktúra pre projekt: Štúdium štruktúrnych zmien komplexných glykokonjugátov v procese dedičných metabolických a civilizačných ochorení, ITMS: 313021Y920, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Literatúra

Pakanová Z., Matulová M., Behúlová D., Šalingová A., Hlavatá A., Pätoprstý V., Mucha J. (2016) Molecular diagnosis of Pompe disease using MALDI TOF/TOF and ^1H NMR. *Chemical Papers* 70 (3), 265–271. DOI: 10.1515/chempap-2015-0218.

Pakanová Z., Matulová M., Pätoprstý V., Šalingová A., Behúlová D., Hlavatá A., Juríčková K., Mucha J. (2017) Diagnostika a monitorovanie účinnosti terapie Pompeho ochorenia s využitím hmotnostnej spektrometrie a ^1H NMR. 6. Slovenská konferencia o zriedkavých chorobách, 9. novembra 2017, Bratislava. *Via Practica* 14(S2): 35-36. Abstrakt v Supplemente 2 časopisu *Via Practica* (ISSN 1336-930x).

Pakanová Z., Matulová M., Uhliariková I., Behúlová D., Šalingová A., Hlavatá A., Juríčková K., Nemčovič M., Pätoprstý V., Mucha J. (2019) Case study: Monitoring of Glc4 tetrasaccharide in urine of Pompe patients, use of MALDI-TOF-MS, and ^1H NMR. In *Chemical Papers*, 73, no.3, p.701-711. DOI: 10.1007/s11696-018-0623-3