

ANALÝZA NUKLEOTIDŮ V KREVNÍCH SKVRNÁCH POMOCÍ KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZY

ANNA BAREŠOVÁ*, DAVID FRIEDECKÝ
a TOMÁŠ ADAM

Laboratoř dědičných metabolických poruch, Oddělení klinické biochemie, Fakultní nemocnice Olomouc, I. P. Pavlova 6, 775 20 Olomouc
anba@post.cz

Došlo 22.4.10, přijato 1.7.10.

Klíčová slova: nukleotidy, krevní skvrna, kapilární elektroforéza, dědičné metabolické poruchy

Úvod

Nukleotidy patří mezi biologicky významné nízkomolekulární látky. Představují základní stavební složky nukleových kyselin i pohotový zdroj energie, účastní se enzymatických reakcí a hrají roli v buněčné signalizaci. Poruchy metabolismu nukleotidů vedou často k vážnému zdravotnímu postižení pacienta. Individuální rozdíly v enzymatické aktivitě mohou způsobit nežádoucí reakci při léčbě analogy nukleotidů¹. Analýzu nukleotidů je proto možné využít nejen při diagnostice dědičných metabolických poruch, ale i pro správné nastavení lékové terapie.

Byla publikována řada metod analýzy nukleotidů kapalinovou chromatografií, a to na reverzní fázi², na principu iontově párové³ i iontoměničové chromatografie⁴. Velmi dobrých výsledků bylo dosaženo také kapilární elektroforézou v kyselém^{5,6} i zásaditém pufru^{7,8}. V některých případech bylo vyššího rozlišení dosaženo micelární elektrokinetickou chromatografií⁹. Pro svou jednoduchost a nenáročnost na přístrojové vybavení je nejvíce rozšířená UV detekce, která poskytuje meze detekce v řádu $\mu\text{mol l}^{-1}$ (cit.¹⁰). Vyšší citlivosti bylo dosaženo hmotnostní spektrometrií², fluorimetrickou detekcí s před- i postkolonovou derivatizací, příp. nepřímou fluorimetrií¹⁰.

Krevní skvrny představují šetrný způsob odběru krve, při kterém je z drobného vpichu, nejčastěji do prstu, odebráno malé množství krve (desítky μl) nasátím do filtračního papíru. V suché krevní skvrně řada analytů vykazuje vyšší stabilitu než v krvi, v některých případech není nutné ani skladování při snížené teplotě¹¹. Malý objem odebrané krve je z analytického hlediska nevýhodou, která spolu

s odchylkami ve struktuře filtračního papíru vede k větším odchylkám měření. Rozptýl analytů v krevních skvrnách se pohybuje kolem 10 % a více. Přesto jsou krevní skvrny rutinně využívány k novorozeneckému screeningu, byly použity pro analýzu proteinů (včetně měření enzymové aktivity), steroidů, léčiv, DNA atd.^{11–14}.

V předkládané práci je popsána metoda analýzy nukleotidů v krevních skvrnách pomocí kapilární elektroforézy. Jde o novou aplikaci metody analýzy nukleotidů v erythrocytech⁶. Popisovaná metoda stanovení nukleotidů v krevních skvrnách byla aplikována na vzorky simulující některé dědičné metabolické poruchy, pro jejichž screening je vhodná.

Experimentální část

Použité chemikálie byly analytické čistoty a byly zakoupeny od firmy Sigma (St. Louis, USA), mimo diethylether, který pocházel od firmy Lach-Ner (Neratovice, ČR). Vzorky byly analyzovány na kapilární elektroforéze skládající se z křemenné kapiláry (75 μm , 90/97 cm), UV detektoru (Jasco, Tokio, Japonsko) a zdroje vysokého napětí (Spellman, New York, USA). Ke zpracování dat byl použit program Clarity (DataApex). Separační pufr se skládal z 50 mmol l^{-1} kyseliny citronové a 0,8 mmol l^{-1} cetyltrimethylammonium bromidu (CTAB), pH bylo upraveno na 4,3 kyselinou γ -aminomáselnou (GABA).

Vzorky byly připraveny z nesrážlivé krve. Čtyřicet μl plné krve bylo nanášeno na kroužek vyznačený na krevním papírku, po zaschnutí byl kroužek vystřižen a extrahován 400 μl vody (15 s vortex, 45 s sonikováno). Extrakty (příp. vzorky čerstvé krve) byly deproteinovány 1 mol l^{-1} kyselinou trichloroctovou, centrifugovány (1 min, 7800 g) a zbylá trichloroctová kyselina byla zpětně extrahována diethyletherem. Takto připravené vzorky byly analyzovány nebo uloženy při $-20\text{ }^\circ\text{C}$.

Pro určení stability nukleotidů v krevní skvrně byly krevní papírky po nanášení krve ponechány 1–5 dní při laboratorní teplotě a uloženy při $-20\text{ }^\circ\text{C}$ do zpracování vzorku. Linearita kalibrační závislosti byla ověřena ze skvrn, které byly připraveny smísením 10 μl roztoku uridin-5'-trifosfátu (UTP) a inosin-5'-monofosfátu (IMP) o určitém látkovém množství a 40 μl krve tak, aby koncentrace UTP a IMP ve skvrně byly 25, 50, 100, 150, 200, 400, 600, 800 a 1000 $\mu\text{mol l}^{-1}$. Limit detekce byl stanoven na základě trojnásobku šumu. Návratnost byla určena srovnáním sumy adeninových nukleotidů v krevní skvrně a ve vzorcích z čerstvé krve ($n=6$).

Nepřesnost analytického postupu v jednom dni a reprodukovatelnost migračních časů mezi vzorky byla stanovena srovnáním ploch píků vzorků krevních skvrn připra-

* Anna Barešová tuto práci úspěšně prezentovala na soutěži O cenu firmy Merck 2010 za nejlepší studentskou vědeckou práci v oboru analytické chemie.

vených z téže krve a měřených v sérii ($n=10$). Nepřesnost měření a reprodukovatelnost mezi dny byla stanovena opakovaným měřením téhož vzorku v různých dnech ($n=10$). Reprodukovatelnost migračních časů mezi vzorky byla určena měřením krevních skvrn připravených z různých kreví, zpracovaných a měřených v jednom dni ($n=10$).

Při simulaci metabolických poruch byly erythrocyty inkubovány 4 h při 37 °C v Eaglově médiu modifikovaném podle Dulbecca (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, DMEM) s 10 mmol l⁻¹ nukleosidy (5-aminoimidazol-4-karboxamidribosid AICAR, 2'-deoxyadenosin dAR, inosin HR, 2'-deoxyinosin dHR, 2'-deoxyguanosin dGR). Následně byly erythrocyty promyty 0,9% NaCl a zpracovány jako vzorky krve.

Vzorky byly dávkovány manuálně hydrostaticky. Separace probíhala při napětí 24,4 kV a proudu 44 μA, při laboratorní teplotě za temperování proudícím vzduchem. Analyty byly detegovány spektrofotometricky při 255 nm, při frekvenci sběru dat 10 Hz. Na začátku dne byla kapilára po 1 min promyta 0,1 mol l⁻¹ NaOH, 0,1 mol l⁻¹ HCl, 0,1 mol l⁻¹ dodecylsulfátem sodným (SDS) a separačním pufrům, mezi měřeními pouze pufrům.

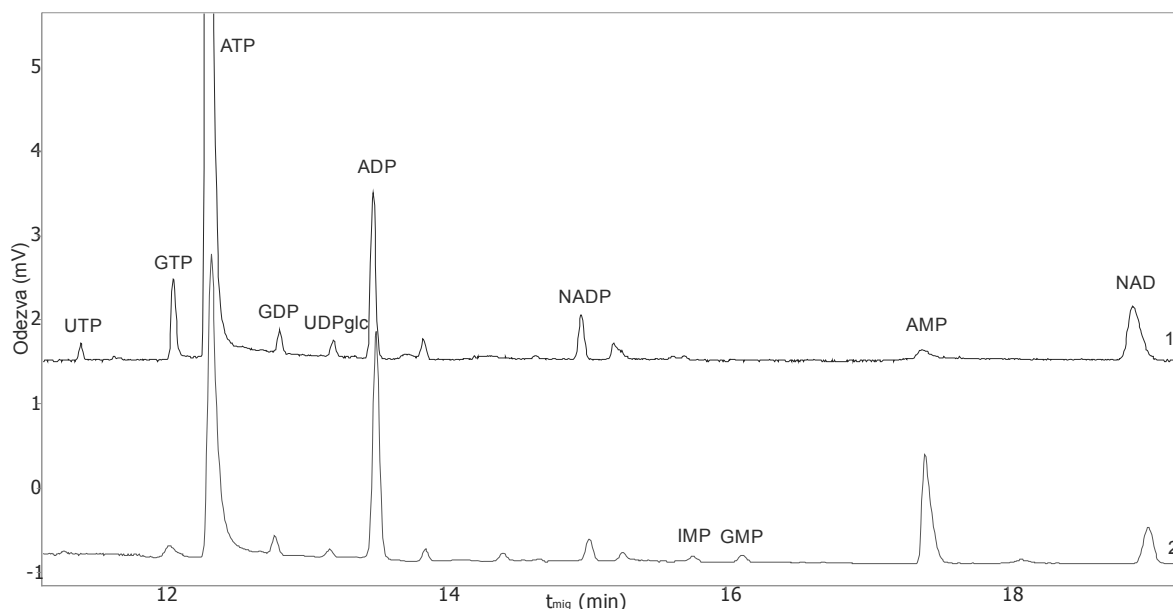
Výsledky a diskuse

V krevních skvrnách dochází ve srovnání s čerstvou krví ke snížení obsahu nukleosidtrifosfátů, které během

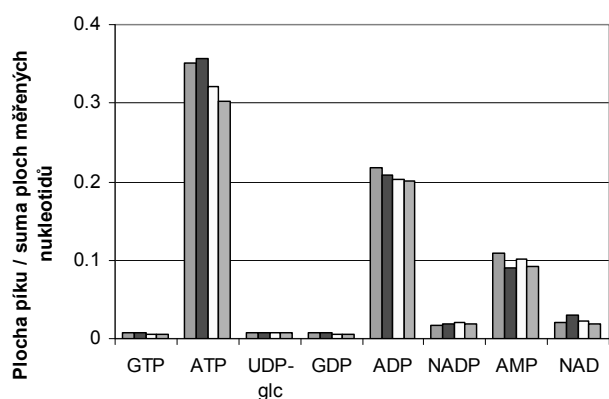
zasychání vzorku přecházejí na nukleosidmonofosfáty. Celkově jsou však profily měřených nukleotidů srovnatelné (obr. 1). Nukleotidy v krevní skvrně jsou relativně stálé. Nedochází k významné změně během 5 dnů při laboratorní teplotě (obr. 2).

Linearita a limit detekce byly stanoveny pro UTP a IMP. Kalibrační závislost je lineární v rozsahu 25 až 1000 μmol l⁻¹ ($R^2 = 0,997$ pro UTP a 0,992 pro IMP), limit detekce stanovený pomocí trojnásobku šumu je pro oba nukleotidy 1,2 μmol l⁻¹. Nepřesnost měření nukleotidů byla 4,8–13,2 % v sérii a 3,1–12,6 % mezi dny; uridindifosfoglukosa (UDPglc) měla odchylky 43,2 a 39,7 % (tab. I). Návratnost sumy adeninových nukleotidů byla 89,8 ± 10,5 %. Variabilita migračních časů je menší než 3 % mezi vzorky, 2 % v sérii a 5 % mezi dny ($n=10$).

Při inkubaci erythrocytů byly nukleosidy transportovány do červených krvinek a konvertovány na příslušné nukleotidy. Získané elektroferogramy simulovaly obsah nukleotidů při deficitu vybraných enzymů. Deficit adenosin deaminasy (EC 3.5.4.4, OMIM 102700) je autosomálně recesivní onemocnění způsobující některé případy těžké kombinované imunodeficiency (SCID). V organismu dochází k hromadění dAR a následnému zvýšení dATP v erythrocytech. Podobně i inkubace s dAR vedla k tvorbě deoxyATP, typického pro deficit adenosin deaminasy (obr. 3). Snížená aktivita ITPasy (inosintrifosfát difosfhydrolasa, EC 3.6.1.19, OMIM 147520) je relativně častý enzymový defekt bez klinických příznaků, který může způsobit vážné nežádoucí účinky při léčbě některými ana-



Obr. 1. Elektroferogramy vzorku čerstvé krve (1) a krevní skvrny (2). Separace v křemenné kapiláře (75 μm, 90/97 cm), separační pufr: 50 mmol l⁻¹ kyseliny citronové, 0,8 mmol l⁻¹ CTAB, titrováno GABA na pH 4,3; UV detekce při 255 nm. ADP – adenosindifosfát, AMP – adenosinmonofosfát, ATP – adenosintrifosfát, GDP – guanosindifosfát, GMP – guanosinmonofosfát, GTP – guanosintrifosfát, IMP – inosinmonofosfát, NADH – nikotinamidadenindinukleotid, NADPH – nikotinamidadenindinukleotidfosfát, UDPglc – uridindifosfát-glukosa, UTP – uridintrifosfát



Obr. 2. Stabilita nukleotidů v krevní skvrně při laboratorní teplotě během pěti dní: srovnání ploch píků korigovaných na sumu ploch nukleotidů; ■ 1 den, ■ 2 dny, □ 4 dny, ■ 5 dní

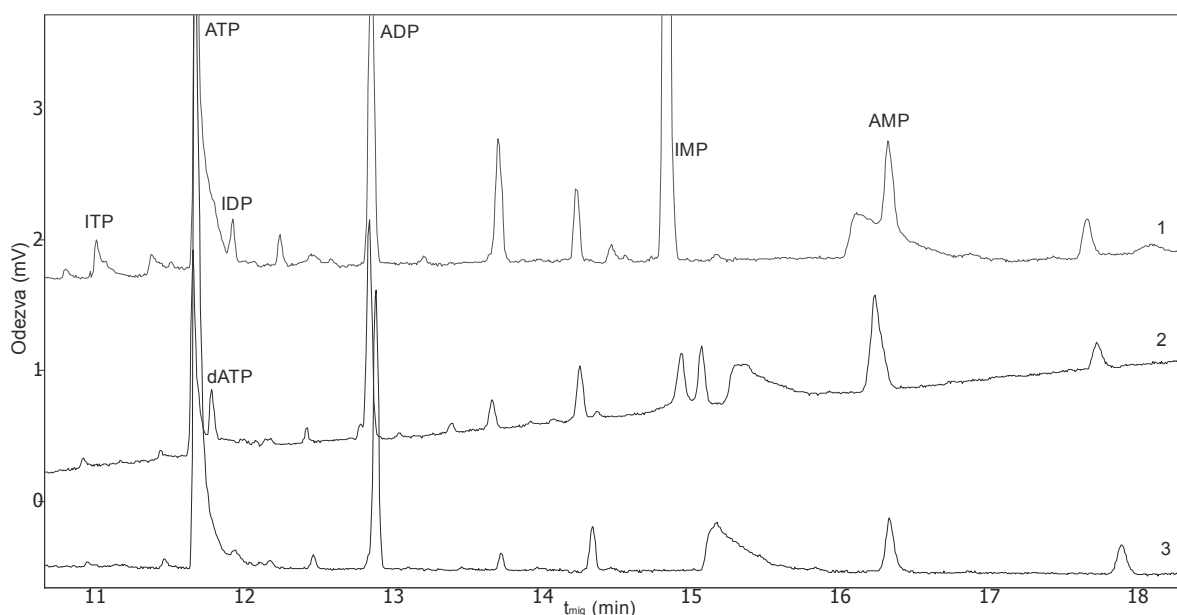
logy purinových nukleotidů¹. Je možné ho identifikovat zvýšením ITP v erythrocytech. Inkubace erythrocytů s HR vedla k nárůstu IMP a ITP (obr. 3). Při deficitu purin nukleosid fosforylasy (EC 2.4.2.1, OMIM 613179) nejsou dostatečně odbourávány purinové nukleosidy, dochází k hromadění zejména inosinu (HR), guanosinu (GR), deoxyinosinu (dHR) a deoxyguanosinu (dGR) a jejich zvýšenému vylučování močí. dGTP je hlavním toxickým metabolitem, způsobujícím sníženou imunitu, příp. anemii a neurologické poruchy. Deficit purin-nukleosid fosforyla-

Tabulka I

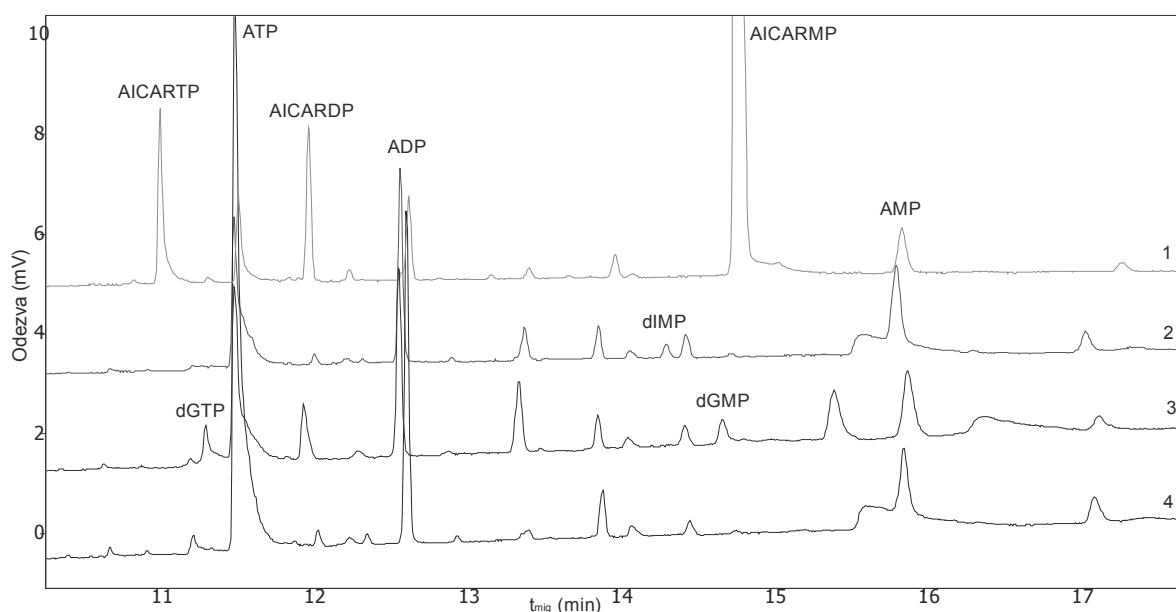
Relativní směrodatné odchylky (%; n = 10) přesnosti analytického postupu v sérii a měření mezi dny. Separace v křemenné kapiláře (75 μ m, 90/97 cm) při laboratorní teplotě, separační pufr: 50 mmol l⁻¹ kyseliny citronové, 0,8 mmol l⁻¹ CTAB, titrováno GABA na pH 4,3; UV detekce při 255 nm

Analyt	Relativní směrodatné odchylky [%]	
	v sérii	mezi dny
GTP	13,2	12,6
ATP	4,8	3,1
GDP	6,3	5,3
UDP-glc	43,2	39,7
ADP	5,7	4,2
NADP	9,2	7,5
AMP	7,6	4,9
NAD	7,2	7,3

sy byl simulován inkubací erythrocytů s dHR a dGR, došlo k akumulaci dIMP, dGTP a dGMP (obr. 4). První případ deficitu bifunkčního enzymu AICAR transformylasy – IMP cyklohydrolasy (ATIC, EC 2.1.2.3 a 3.5.4.10, OMIM 608688), který je součástí purinové *de novo* syntézy, byl popsán roku 2004 u těžce neurologicky postiženého paci-



Obr. 3. Elektroferogramy krevních skvrn – simulace deficitu enzymů purinového metabolismu: (1) deficit ITPasy – zvýšení IMP a ITP, patrný je i IDP; (2) deficit ADA – přítomen je dATP; (3) kontrolní vzorek krevní skvrny zdravého jedince. Inkubace erythrocytů byla provedena s 10 mmol l⁻¹ roztoky jednotlivých nukleotidů v DMEM (4 h, 37 °C)



Obr. 4. Elektroferogramy krevních skvrn – simulace deficitu enzymů purinového metabolismu: (1) deficit ATIC – přítomny AICARTP, AICARDP a AICARMP; (2) deficit PNP – inkubace s dHR, přítomen dIMP; (3) deficit PNP – inkubace s dGR, přítomen dGTP a dGMP; (4) kontrolní vzorek krevní skvrny zdravého jedince. Inkubace erytrocytů byla provedena s 10 mmol l⁻¹ roztoky jednotlivých nukleosidů v DMEM (4 h, 37 °C)

enta¹⁵. Podobně jako v tomto případě byly i po inkubaci s AICAR pozorovány zvýšený AICARmono-, di- a trifosfát. Tyto nukleotidy mohou být v erytrocytech přítomné i u deficitu hypoxanthin-guanin fosforibosyltransferasy a dalších poruch stimujících purinovou *de novo* syntézu.

Závěr

Popsaná metoda je vhodná pro analýzu nukleotidů v krevních skvrnách. Separace sledovaných nukleotidů je dostatečně přesná a citlivá, doba měření nepřesahuje 20 min. Pro malý objem odebrané krve, snadný transport a uchování a relativní stabilitu analytů představují krevní skvrny výhodný způsob odběru vzorku a alternativu pro možný screening dědičných metabolických poruch.

Tato práce byla podpořena grantem Islandu, Lichtenštejska a Norska v rámci finančních mechanismů EHP a Norským finančním mechanismem (A/CZ0046/2/0011), vnitřním grantem grantové agentury Univerzity Palackého (LF_2010_013) a grantem MSM6198959205. Infrastrukturaální část projektu (Ústav molekulární a translační medicíny) byla podpořena Operačním programem Výzkum a vývoj pro inovace (projekt CZ.1.05/2.1.00/01.0030).

LITERATURA

- Bierau J., Lindhout M., Bakker J. A.: *Pharmacogenomics* 8, 1221 (2007).
- Yamada K., Hara N., Shibata T., Osago H., Tsuchiya M.: *Anal. Biochem.* 352, 282 (2006).
- Yeung P., Ding L., Casley W. L.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 47, 377 (2008).
- Hull S. R., Montgomery R.: *Anal Biochem* 222, 49 (1994)
- Tomková, J., Friedecký, D., Vyskočilová, P., Adam, T.: *Nucleosides Nucleotides Nucl. Acids* 27, 656 (2008).
- Zinellu A., Sotgia S., Pasciu V., Madeddu M., Leoni G. G., Naitana S., Deiana L., Carru C.: *Electrophoresis* 29, 3069 (2008).
- Feng H. T., Wong N., Wee S., Lee M. M.: *J. Chromatogr., B* 870, 131 (2008).
- Qurishi R., Kaulich M., Müller C. E.: *J. Chromatogr., A* 952, 275 (2002).
- Mallampati S., Van Aerschot A., Hoogmartens J., Van Schepdael A.: *Electrophoresis* 28, 3948 (2007).
- Geldart S. E., Brown P. R.: *J. Chromatogr., A* 828, 317 (1998)
- Alfazil A. A., Anderson R. A.: *J. Anal. Toxicol.* 32, 511 (2008).
- Janzen N., Sander S., Terhardt M., Peter M., Sander J.: *J. Chromatogr., B* 861, 117 (2008).
- Wijnen P. A., Op den Buijsch R. A., Cheung S. C., van der Heijden J., Hoogtanders K., Stolk L. M., van Dieijen-Visser M. P.: *Clin. Chim. Acta* 388, 189 (2008).
- Friedecký D., Tomková J., Maier V., Janosťáková A., Procházka M., Adam T.: *Electrophoresis* 28, 373

(2007).

15. Marie S., Heron B., Bitoun P., Timmerman T., Van den Berghe G., Vincent M. F.: *Am. J. Hum. Genet.* 74, 1276 (2004).

A. Barešová, D. Friedecký, and T. Adam
(Laboratory of Inherited Metabolic Disorders, Department of Clinical Biochemistry, University Hospital, Olomouc):
Analysis of Nucleotides in Dry Blood Spots

Nucleotides play an important role in human metabolism and their disorders often result in severe health impairment. Separation of major cellular nucleotides from dry blood spots was achieved by capillary electrophoresis. On the basis of incubations of erythrocytes with nucleotides, possible applications of the method in screening tests are proposed. Deproteinated dry blood spot extracts were

analysed in a silica capillary using UV detection. The separation buffer was a solution of citric acid and cetyltrimethylammonium bromide, its pH was adjusted to 4.3 with 4-aminobutanoic acid (GABA). The overall nucleotide profile of blood spot extracts is comparable with that of fresh blood, although their contents may slightly change during drying and long-term storage of the spots. The method offers reproducibility within 5 %, accuracy below 14 %, recovery of total adenine nucleotides 89.8 ± 10.5 % and the limit of detection $1.2 \mu\text{mol L}^{-1}$ ($R^2 > 0.99$) for uridine triphosphate and inosine monophosphate. Nucleotide profiles simulating disorders of purine metabolism were obtained by incubation of erythrocytes with nucleosides. The use of dry blood spots instead of fresh blood facilitates collection, transport and storage of blood samples and is patient-friendly. This method may be applicable to screening of inherited metabolic disorders.