

VILNIAUS UNIVERSITETO MEDICINOS FAKULTETO
FIZIOLOGIJOS, BIOCHEMIJOS IR
LABORATORINĖS MEDICINOS KATEDRA

MAGISTRO DARBAS

KREATINO APYKAITOS METABOLITŲ ANALIZĖ DUJŲ CHROMATOGRAFU – MASIŲ
SPEKTROMETRU

Magistrantė MILDA BANYTĖ

_____ (parašas)

Darbo vadovas
Prof. Habil. Dr. Vaidutis Kučinskas

_____ (parašas)

VU MF Fiziologijos, biochemijos ir
laboratorinės medicinos katedros vedėja
hab. dr., prof. Z. Kučinskienė leidžiama ginti

_____ (parašas)

Darbo įteikimo data _____
Registracijos Nr. _____

Turinys

1.	ĮVADAS	5
1.1	Darbo tikslas ir uždaviniai	6
2.	LITERATŪROS APŽVALGA.....	7
2.1	Kreatinas ir jo vaidmuo ląstelėje	7
2.2	Kreatino vaidmuo energijos apykaitoje	10
2.3	Kreatino apykaita žinduolių smegenyse.....	11
2.4	Kreatino apykaitos sutrikimai.....	12
2.4.1	Kreatino apykaitos sutrikimams būdinga klinika	12
2.4.2	Arginino:glicino amidinotransferazės trūkumas	13
2.4.3	Guanidinoacetato metiltransferazės trūkumas	14
2.4.4	Kreatino nešiklio defektai.....	14
2.4.5	Kreatino apykaitos sutrikimų diagnostikos algoritmas	15
2.5	Diagnostikoje naudojami metodai	16
3.	TYRIMO MEDŽIAGA IR METODAI.....	19
3.1	Tyrimo medžiaga.....	19
3.2	Tyrimo metodai.....	19
3.2.1.	Mėginių paruošimas.....	20
3.2.2.	GC/MS veikimo principas	21
3.2.3.	Mėginio įvedimas	22
3.2.4.	Jonų generavimas	23
3.2.5.	Masių atskyrimas.....	24
3.2.6.	Jonų detekcija	24
3.2.7.	Specifinių jonų atrankos (SIM) metodas	25
3.2.8.	Kiekybinė analizė	28
4.	TYRIMO REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS	30
4.1.	Pacientas su įtariama kreatino nešiklio CrT stoka.....	35
4.2.	Pacientas, su įtariama AGAT stoka.....	36

4.3.	Galimos klaidos, atliekant kreatino ir guanidinoacetato kiekybinę analizę	37
4.4.	Rekomendacijos	37
5.	IŠVADOS	39
6.	SUMMARY	40
7.	LITERATŪROS SĄRAŠAS	41

TEKSTE NAUDOJAMI SUTRUMPINIMAI

ADP	adenozindifosfatas
AGAT	arginino-glicino amidinotransferazė
ATP	adenozintrifosfatas
CrT	kreatino nešiklis
ERNDIM	išorinės kokybės kontrolės programa (<i>European research network for evaluation and improvement of screening diagnosis and treatment of inherited disorders of metabolism</i>)
GABA	gama-aminobutirinė rūgštis
GAMT	guanidinoacetato metiltransferazė
GC/MS	dujų chromatografija – masių spektrometrija (<i>gas chromatography – mass spectrometry</i>)
GUAA	guanidinoacetatas
HPLC	didelio pajėgumo skysčių chromatografija (<i>high performance liquid chromatography</i>)
iRNR	informacinė ribonukleorūgštis
KR	kreatinas
MIM	(<i>mendelian inheritance in man</i>)
MRT	magnetinio branduolių rezonanso tyrimas
MS/MS	masių spektrometrija-masių spektrometrija
MTBSTFA	N-Metil-N-(Tert-Butildimetilsilil)trifluoroacetamidas
NIST	nacionalinis standartų ir technologijų institutas (<i>national institute of standards and technology</i>)
PCr	fosfokreatininas
PMAL	paveldimos medžiagų apykaitos ligos
PTFE	politetrafluoroetilenas
SIM	specifinių jonų atranka (<i>selective ion monitoring</i>)
TIC	visų jonų srautas (<i>total ion current</i>)

1. ĮVADAS

Intelektu negalios dažnis populiacijoje yra 1-3% (PSO, 2002). Šiuo metu tai viena iš intensyviausiai tiriamų patologijų, turinčių neigiamą socialinę, fizinę bei ekonominę reikšmę tiek visuomenei, tiek atskiroms šeimoms. Intelektu negalia išsiskiria savo priežasčių heterogeniškumu; genetinės priežastys sudaro 30-50% visų intelektu negalios priežasčių. Viena iš protinio atsilikimo priežasčių yra paveldimosios medžiagų apykaitos ligos (PMAL). Pavienės PMAL yra labai retos, o tai nulemia vėlyvą šių ligų diagnozavimą, nes net ir patyrę specialistai ne visada atpažįsta subtiliai besiskiriančius šių ligų klinikinius simptomus. Daugeliu atveju ankstyva diagnostika ir laiku suteikta pagalba gali padėti išvengti klinikinių PMAL komplikacijų, kurių svarbiausia yra intelektu negalia.

Paveldimi kreatino biosintezės bei pernašos į ląstelę sutrikimai sukelia psichomotorinį atsilikimą, kalbos sutrikimus bei epilepsiją, nes nerviniame audinyje trūksta kreatino. Kreatinas yra azoto turintis organinis junginys, kuris natūraliai susidaro organizme ir yra naudojamas energijai išgauti audiniuose, ypač raumeniniame, nes skatina adenozintrifosfato (ATP) susidarymą. Organizme kreatinas visuomet yra pusiausvyroje su kreatininu.

Yra išskiriami trys genetiškai paveldimi kreatino biosintezės ir pernašos sutrikimai:

1. Guanidinoacetato metiltransferazės stoka: kreatino ir kreatinino koncentracijų santykis šlapime sumažėjęs, guanidinoacetato koncentracija šlapime, kraujo plazmoje ir smegenų skystyje padidėjusi.
2. Arginino:glicino amidinotransferazės stoka: kraujo plazmoje ir šlapime guanidinoacetato koncentracija sumažėjusi, kreatino ir kreatinino koncentracijų santykis šlapime sumažėjęs.
3. Kreatino pernašos baltymo stoka: kreatino ir kreatinino koncentracijų santykis šlapime padidėjęs, guanidinoacetato koncentracija šlapime normali.

Neįprastos kreatino ir kreatinino bei jų pirmtako guanidinoacetato koncentracijos nustatomos kraujo plazmoje bei šlapime. Dujų chromatografijos – masių spektrometrijos metodas leidžia atlikti kokybinę bei kiekybinę kreatino ir guanidinoacetato analizę šlapime greitai, patikimai ir be didelių finansinių išteklių.

Diagnozavus pirmas dvi ligas, gali būti skirtas eksperimentinis gydymas kreatinu. Kreatino transportinio baltymo stokos atveju oraliai vartojamas kreatinas neturi įtakos ligos eigai bei klinikinei jos išraiškai.

Šios ligos gali būti diagnozuojamos atrenkant pacientų, kuriems pasireiškia protinis atsilikimas, epilepsija, šlapimo mėginius ir atlikus kokybinę bei kiekybinę kreatino ir guanidinoacetato analizę dujų chromatografu – masių spektrometru.

1.1 Darbo tikslas ir uždaviniai

Tikslas: Nustatyti intelekto negalios priežastis atliekant kreatino apykaitos metabolitų analizę dujų chromatografijos – masių spektrometrijos metodu.

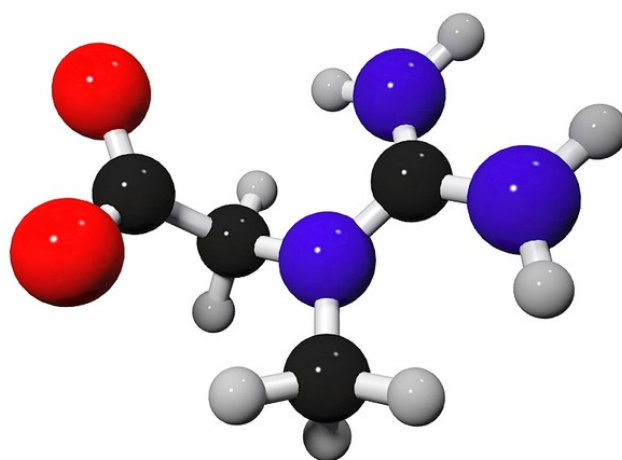
Uždaviniai:

1. Įdiegti ir pritaikyti dujų chromatografijos – masių spektrometrijos metodą kreatino apykaitos metabolitų kokybinei ir kiekybinei analizei.
2. Atlikti pacientų, turinčių intelekto negaliją, šlapimo mėginių kreatino apykaitos metabolitų kokybinę ir kiekybinę analizę dujų chromatografijos – masių spektrometrijos metodu.
3. Nustatyti kreatino apykaitos sutrikimų dažnį tirtoje pacientų su intelekto negalia grupėje ir palyginti su literatūros duomenimis.
4. Įvertinti kiekybinės kreatino ir guanidinoacetato analizės reikšmę, nustatant kreatino apykaitos kelio sutrikimo vietą protinio atsilikimo etiopatogenezėje.

2. LITERATŪROS APŽVALGA

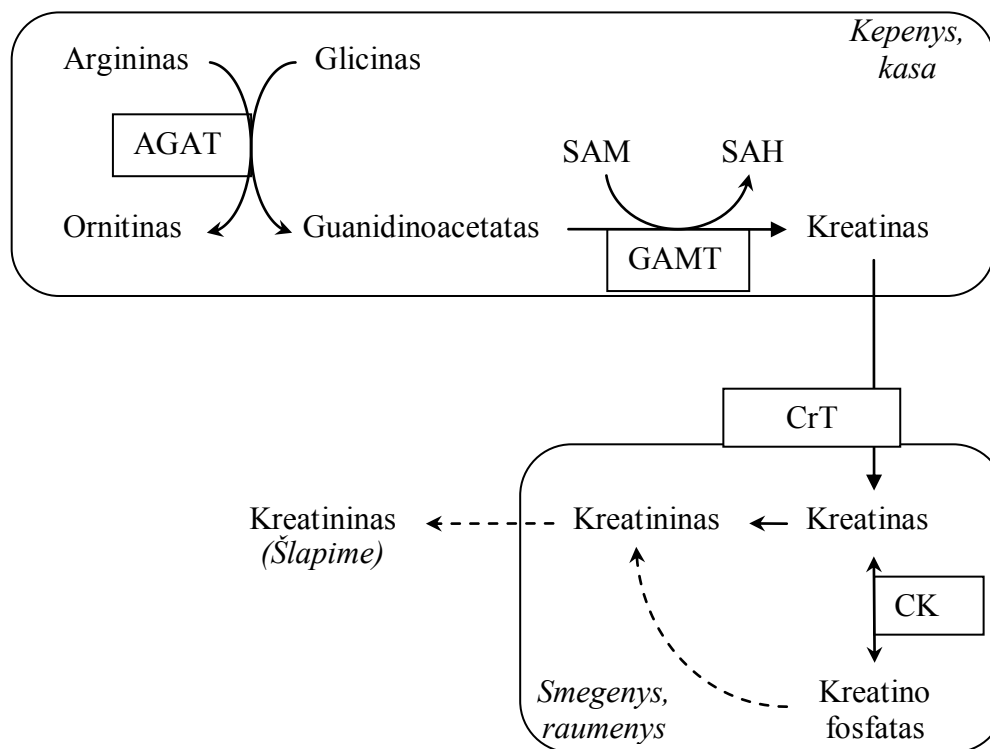
2.1 Kreatinas ir jo vaidmuo ląstelėje

Kreatinas (1 pav.) yra organizmui reikalinga medžiaga, kuri gali būti gaunama su maistu iš aplinkos (egzogeninės kilmės) arba sintetinama organizme (endogeninės kilmės) iš arginino, S-adenozilmetionino ir glicino (2 pav.). Kreatinas su maistu gaunamas valgant žuvį, mėsą ir kitus gyvulinės kilmės produktus. [27].



1 pav. Kreatino molekulos struktūra.

Kreatino biosintezė (2 pav.) vyksta dviem etapais: pirmajame etape, katalizuojant arginino:glicino amidinotransferazei (AGAT), amidino grupė perkeliama nuo L-arginino ant glicino molekulos, susidaro guanidinoacetatas bei ornitinas. Antrajame etape, katalizuojant guanidinoacetato metiltransferazei (GAMT) metilo grupė perkeliama nuo S-adenozilmetionino ant guanidinoacetato, susidaro kreatinas ir S-adenozilhomocisteinas [25]. Fiziologinėmis sąlygomis kreatino biosintezės greitį lemia AGAT fermento aktyvumas. Šio fermento aktyvumą slopina didelės kreatino koncentracijos. Kitas alosterinis AGAT inhibitorius – ornitinas. GAMT aktyvumą *in vitro* slopina didelės S-adenozilhomocisteino koncentracijos, tačiau šio fermento reguliavimo mechanizmai *in vivo* dar neištirti. Argininas, pagrindinis kreatino sintezės substratas, per ląstelių membranas pernešamas aktyvios pernašos būdu, tai atlieka katijoninių aminorūgščių nešikliai – CAT1, CAT2 ir CAT. Šių nešiklių defektai, būdingi žmogui, dar neaprašyti.



2 pav. Kreatino apykaitos schema. AGAT – arginino:glicino amidinotransferazė; GAMT – guanidinoacetato metiltransferazė; SAM – S-adenozilmetioninas; SAH – S-adenozilhomocisteinas; CrT – kreatino nešiklis.

Daugeliu atveju kreatinas iš organų, kuriuose yra sintetinamas (didžioji kreatino biosintezės dalis vyksta kepenyse ir kasoje [11]), krauju pernešamas į organus, kuriems jis reikalingas ir kuriuose yra panaudojamas. Daugiausia jo pasisavina tokie audiniai, kurie yra reiklūs energijai ir kuriuose energijos apykaitos svyravimo ribos plačios (griaučių raumenys, tinklainė, centrinė nervų sistema). Griaučių raumenyse sukaupiama apie 95 % visų organizmo kreatino atsargų. Daugiau nei 90 % ląstelėse esančio kreatino patenka į jas per nuo Na^+ ir Cl^- priklausomą kreatino pernašos baltymą CrT, kreatinas yra pernešamas į ląsteles prieš jo koncentracijos gradientą.

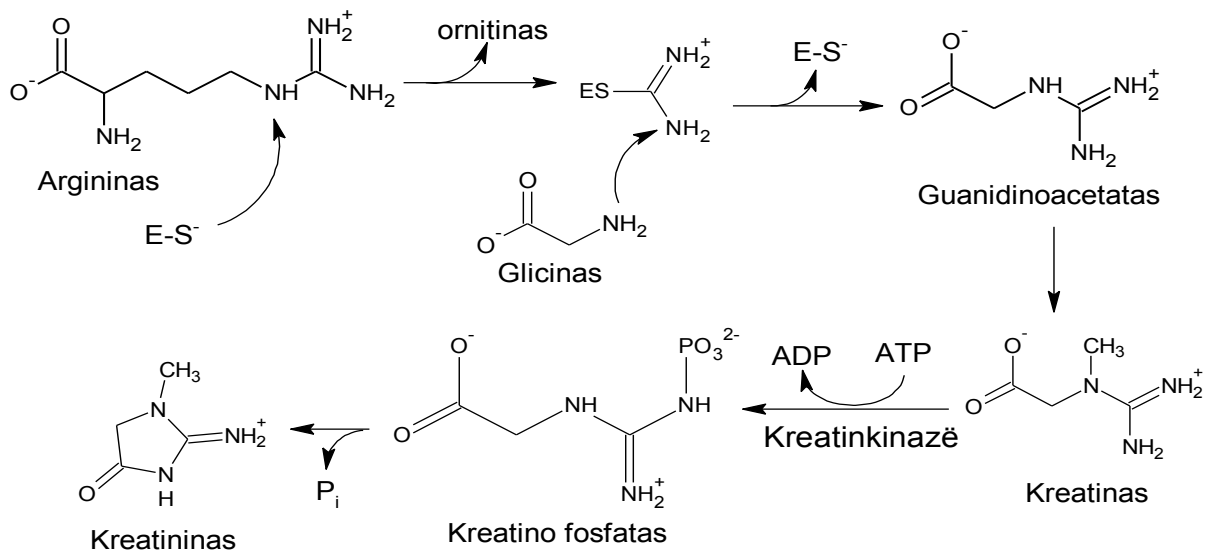
CrT1 kreatino nešiklis priskiriamas nuo Na^+ priklausomų neurosiuntiklių šeimai, todėl yra giminingiausias GABA (γ -amino sviesto rūgštis)/taurino/betaino nešikliams. Geną sudaro trylika egzonų, pirmieji aštuoni egzonai koduoja transmembranines nešiklio struktūras. Nustatyta, kad CrT1 nuo kitų šios šeimos nešiklių labiausiai skiriasi transmembraniniais 9-11 domenais. [27]. Išmatavus CrT1 K_M vertes ir palyginus su kraujo plazmoje randamomis kreatino koncentracijomis išaiškėjo, kad fiziologinėmis sąlygomis CrT1 yra beveik išotintas. Tai rodo,

kad kreatino pernašos per ląstelių membranas reguliavimui gali būti svarbus CrT1 tankis ląstelių membranoje [8].

Antras nešiklis CrT2 yra koduojamas geno *SLC6A8/CT2*, esančio 16p11.2 srityje, ir ekspresuojamas tik sėklidėse. Sėklidėse ekspresuojamas ir Xq28 srityje esantis genas. Tarp šių dviejų transkriptų yra 96% homologija ir CrT1 transkripto stop kodono nėra CrT2 transkripte. Todėl CrT2 baltymas yra 50 aminorūgščių ilgesnis už CrT1 baltymą [27].

Be abejoj gali būti ir kiti, specifiniai ir nespecifiniai, nešikliai, kurie perneša kreatiną į raumenis ir į kitus organus. Kita vertus, nepriklausomai nuo nešiklių, kreatinas gali patekti į raumenis ir paprastosios difuzijos būdu. Tačiau tiksliam šio pernašos mechanizmo supratimui reikalingi tyrimai [10].

Dalis kreatino, pernešamo į ląstelę, fosforilinama, susidarant kreatino fosfatui. [27] Kreatinkinazė grįžtamos reakcijos metu perkelia fosfogrupę nuo ATP ant kreatino molekulės, reakcijos metu susidaro kreatino fosfatas (3 pav.). Kadangi reakcija yra grįžtama, kreatinkinazė gali greitai prijungti fosfogrupę prie ADP molekulės, o pastarųjų ypač daug susidaro ATP hidrolizės metu susitraukiant raumenims. Iš kreatino fosfato ir kreatino spontaninės reakcijos metu susidaro ciklinis junginys – kreatininas (3 pav.). Tai galutinis kreatino apykaitos produktas, kuris pašalinamas iš organizmo su šlapimu.



3 pav. Kreatinino biosintezės schema.

2.2 Kreatino vaidmuo energijos apykaitoje

Gyvūninėje ląstelėje pagrindinė energijos apykaitos vieta – mitochondrijos, jose riebalų rūgščių ir angliavandenių oksidacijos metu pasigaminusi energija kaupiama ATP pavidalu. Kreatino ir kreatino fosfato randama jau bestuburiuose. Pintys – seniausias išlikęs daugialąsčių organizmų atstovas, kuriame esama kreatino ir kreatinkinazės [11]. Tai rodo, kad kreatino ir kreatino fosfato sistema yra svarbi energijos apykaitos dalis visoje gyvūnijos (*Animalia*) karalystėje.

Kreatinkinazė yra fermentas, katalizuojantis fosforilinimo reakciją. Kreatinkinazė aptinkama įvairuose audiniuose, tačiau daugiausia jos yra skeleto ir širdies raumeninio audinio ląstelių citozolyje bei mitochondrijose. Mitochondrijose kreatinkinazė yra išsidėsčiusi vidinės membranos išorinėje dalyje ir kreatino fosfato sintezei panaudoja ATP, kuris susidaro oksidacinio fosforilinimo metu. Susidaręs kreatino fosfatas difunduoja į ląstelės citozolį ir ten kaupiamas, kol jo prireikia raumenų energijai. Citozolyje esanti kreatinkinazė yra glaudžiai susijusi su miofibrilėmis ir katalizuoja ATP (reikalingą raumenų susitraukimams) susidarymą iš kreatino fosfato ir ADP molekulių.

Stuburiniai turi keturis CK genus, koduojančius penkias skirtingas šio izofermento formas. Du citozolinės kreatinkinazės (ciCK) genai koduoja raumenų ir (M-CK) ir smegenų (B-CK) izoformas. Šios formos ląstelių citozolyje sudaro aktyvius homodimerus (MM-CK ir BB-CK) ir heterodimerus (MB-CK). Du mitochondrinės kreatinkinazės (mtCK) genai koduoja labai paplitusią ir sarkomerinę kreatinkinazės formas. Labai paplitusios izoformos fermento formos gausu smegenyse, o sarkomerinė mtCK ekspresuojama tik raumenyse. Taip pat mtCK sudaro ne tik dimerus, bet ir oktamerus, kurie išsidėsto mitochondrijų membranų kristose ir tarpmembraniniame plyšyje [21]. Mitochondrijose kreatinkinazės reakcijos dinamika kreipiama kreatino fosfato susidarymo linkme, o citozolyje kreatinkinazinė reakcija vyksta abiem kryptimis.

Raumenyse 50-80% kreatino yra fosforilinta forma – kreatino fosfatas, kuris yra pusiausvyroje su ATP. Reakcijos greitį stipriai lemia kreatinkinazė. Kreatino fosfatas tarnauja kaip energijos rezervas (jo laisvoji hidrolizės energija $\Delta G^0 = -42,7$ kJ/mol; ATP laisvoji hidrolizės energija $\Delta G^0 = -29,7$ kJ/mol) [21]. Kreatino fosfatas turi didesnę fosforilo grupės pernešimo potencialą negu ATP. Dėl šios priežasties, kai raumenys yra stimuliuojami ilgesnį laiko periodą esant glikolizės arba kvėpavimo trūkumui, kreatino fosfato atsargos yra išsekvojamos per kelias valandas siekiant palaikyti pastovią ATP koncentraciją. Sumažėjus ATP poreikiui arba padidėjus jo sintezei, kreatinas yra fosforilinamas ir atkuriamos jo atsargos [15].

Kreatinas ir kreatino fosfatas yra verčiami į kreatiną neveikiant jokiems fermentams. Kreatininas yra išskiriamas kartu su šlapimu ir jo koncentracija atspindi bendrą organizme esančio kreatino kiekį [15]. Kasdien tokiu būdu prarandama apie 1,5% viso organizmo kreatino. Kiekvieno individo kasdien su šlapimu išskiriamo kreatinino koncentracija nekinta ir yra pastovi, nes yra tiesiogiai susijusi su individo raumenų mase.

Raumeninio audinio funkcijoms, o ypač esant metaboliniam stresui, svarbus bendras kreatino kiekis, kurį sudaro kreatinas ir kreatino fosfatas. [27] Bendrą kreatino kiekį lemia kreatino įsisavinimo su maistu greitis, kreatino sulaikymas ląstelėse bei kreatinino susidarymo greitis iš kreatino. Vienas iš svarbiausių reguliatorių yra su maistu gaunamas kreatinas. Jis slopiną pirmąją kreatino biosintezės reakciją, tuo pačiu mažindamas sintetinamo kreatino kiekį. Taip pat svarbų vaidmenį kreatino kiekio reguliavime atlieka kreatino transportinis baltymas CrT. [27]

2.3 Kreatino apykaita žinduolių smegenyse

Pagrindinės kreatino sintezės vietos organizme yra inkstai, kasa ir kepenys, tačiau AGAT, GAMT bei kreatino nešiklis CrT ekspresuojami ir žinduolių centrinėje nervų sistemoje [6, 19]. Centrinė nervų sistema gali panaudoti endogeninį kreatiną, susidaranti biosintezės metu inkstuose ir kepenyse arba sintetinti kreatiną, nes smegenų ląstelės ekspresuoja AGAT ir GAMT fermentus [6]. AGAT yra ekspresuojamas neuronuose, astrocituose, oligodendrocituose, mikropilarių endotelio ląstelėse, astrocituose, esančiuose prie smegenų-kraujo barjero, ir ependiminiame epitelyje. GAMT irgi ekspresuojamas neuronuose, astrocituose ir oligodendrocituose. GAMT nėra ekspresuojamas mikropilarių endotelio ląstelėse, tačiau yra ekspresuojamas astrocituose, kurie yra išsidėstę šalia mikropilarių. CNS ląstelės sugeba įsisavinti kreatiną iš kraujo, kuris patenka į CNS prieš koncentracijos gradientą, tačiau toks įsisavinimas nėra efektyvus. CrT yra ekspresuojamas neuronuose ir oligodendrocituose, tačiau jo nėra astrocituose. Tuo tarpu mikropilarių endotelio ląstelės, formuojančios smegenų-kraujo barjerą, ekspresuoja CrT, todėl gali įsisavinti kreatiną iš kraujo. Tačiau ne visas kreatinas, kuris reikalingas CNS, yra pasisavinamas iš kraujo, dalis jo yra sintetinama CNS ląstelėse. Atlikti tyrimai rodo, kad pilkojoje žievės medžiagoje AGAT ir GAMT fermentai yra ekspresuojami nepriklausomai vienas nuo kito ir tik kai kurios ląstelės ekspresuoja abu fermentus. Kreatino sintezei vykti smegenyse, guanidinoacetatas turi būti pernešamas iš ląstelių ekspresuojančių AGAT, į ląstelės, ekspresuojančias GAMT. Pernašai reikalingas kreatino nešiklis CrT. [6, 19]

Centrinei nervų sistemai kreatinas yra būtinas aksonų ir dendritų augimui, Na^+/K^+ ATP-azės aktyvumui, neuromediatorių atpalaidavimui, membranos potencialo palaikymui, Ca^{2+}

homeostazės palaikymui, joninių gradientui atkūrimui. Pastaruoju metu manoma, kad kreatinas gali veikti kaip centrinis neuromodulatorius [1], o ypač kaip kotransmitorius postsinapsiniuose GABA receptoriuose. Taip pat pasiūlyta, kad kreatinas gali reguliuoti apetitą bei kūno svorį veikdamas specifinį pagumburio branduolį [13].

Ankstyvose embriono stadijose CNS dominuoja kreatino pasisavinimas iš periferinių audinių, nes kreatino biosintezės genų raiška atsiranda gana vėlai: besivystančiose žiurkių smegenyse AGAT randama nuo dvyliktos embriono dienos, o GAMT – nuo aštuonioliktos, o CrT raiška pastebima jau anksčiausiose nervinio vamzdelio vystymosi stadijose [6].

2.4 Kreatino apykaitos sutrikimai

Kreatino apykaitos ir pernašos sutrikimų (kreatino trūkumo smegenyse sindromų) klinikiniai požymiai – psichomotorinis atsilikimas, ypač atsiliekanči kalbos raida, autistinis elgesys, epilepsija [28]. Neįprastos kreatino, kreatinino ir guanidinoacetato koncentracijos gali būti nustatomos organizmo skysčiuose (kraujyje, šlapime, smegenų skystyje) [7].

Galima išskirti dvi pagrindines kreatino apykaitos sutrikimų grupes: kreatino sintezės sutrikimai, apimantys AGAT ir GAMT trūkumą, bei sutrikimai, susiję su kreatino pernašos baltymo defektais [29].

Pacientams, kurie turi kreatino biosintezės defektą, paskyrus gydymą kreatino papildais ikisimptominiu laikotarpiu, ligos simptomų neatsiranda [5, 23, 24]. Tai rodo, kad smegenų pažeidimas vystosi jau po gimimo, o iki gimimo vaisiaus smegenis nuo pažeidimų apsaugo iš motinos gaunamas kreatinas [32].

2.4.1 Kreatino apykaitos sutrikimams būdinga klinika

Visiems sutrikimams būdingas protinis bei kalbos vystymosi atsilikimas. Pacientams su AGAT ir CRTR trūkumu gali papildomai pasireikšti ir epilepsijos priepuoliai, kurie sėkmingai nuslopunami bendraisiais antiepileptiniais vaistais [25].

Pacientai su GAMT trūkumu pasižymi sudėtingesniu fenotipu, jiems gali pasireikšti distonija, hiperkinetiniai judesiai bei epilepsijos priepuoliai, kurie nėra nuslopunami įprastais antiepileptiniais preparatais. GAMT trūkumas fenotipiškai gali pasireikšti labai sunkia, vidutine ir lengva forma. Pacientams su sunkia ligos forma pasireiškia sunkiai gydoma epilepsija, bendras vystymosi atsilikimas, ekstrapiramidinių judesių sutrikimas [25]. Pacientams su vidutine ligos forma būdingas nuo vidutinio iki sunkaus laipsnio protinis atsilikimas, kalbos vystymosi

atsilikimas, elgesio sutrikimai bei epilepsija. Lengva ligos forma buvo nustatyta dviem pacientams iš olandų ir turkų šeimų, jiems būdingas protinis atsilikimas, į autistinis elgesys ir kalbos vystymosi atsilikimas [25, 29].

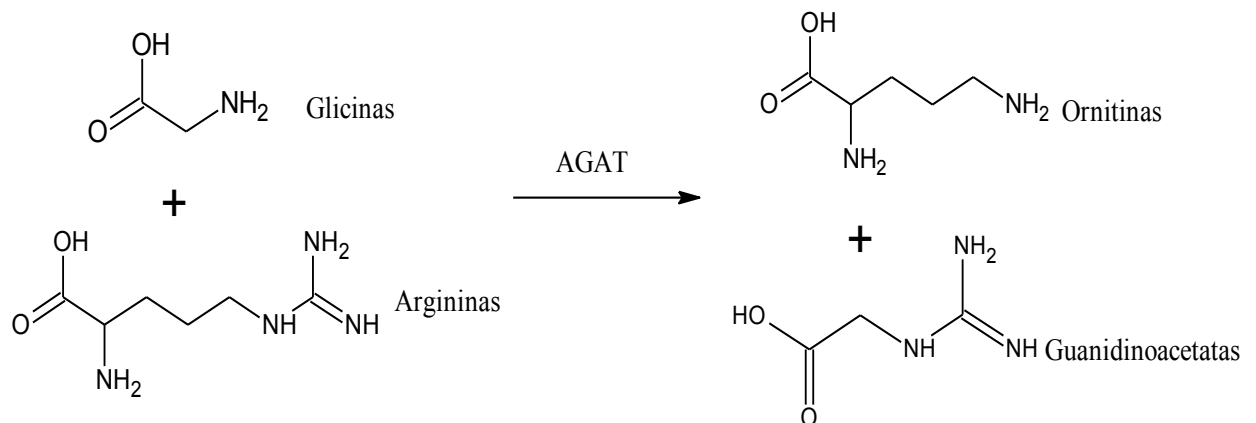
Pacientams su kreatino sintezės ir kreatino pernašos sutrikimais nepasireiškia kardiomiopatija, nes širdies raumens naudojamos energijos 60 % sudaro iš riebalų rūgščių oksidacijos gaunama energija [25, 29].

2.4.2 Arginino:glicino amidinotransferazės trūkumas

Arginino:glicino amidinotransferazės trūkumas (MIM 612718) iki 2005 metų buvo nustatytas tik 3 pacientams. Fermentas yra koduojama 15q15.3 srityje.

Arginino:glicino amidinotransferazė katalizuoja guanidino grupės pernašą nuo arginino molekulės ant glicino susidarant guanidinoacetato molekulei – tiesioginiam kreatino pirmtakui (4 pav.). Ląstelės citozolyje ir mitochondrijose esančios fermento formos yra koduojamos to pačio geno tačiau susidarė vykstant skirtingiems iRNR sukirpimams. Fermento aktyvusis centras turi cisteino liekaną (cys407).

AGAT genomine DNR yra 16.858 bp ilgio ir sudaryta iš 9 egzonų. Žmogaus organizme *AGAT* genas yra 15q15.3 srityje.



4 pav. Arginino:glicino amidinotransferazės (AGAT) katalizuojama reakcija.

AGAT fermento trūkumą lemia mutacija 15q15.3 srityje. Organizme trūkstant šio fermento, kraujo plazmoje ir šlapime sumažėja guanidinoacetato koncentracija, kreatino/kreatinino koncentracija šlapime yra normali arba irgi sumažėjusi. Šio fermento trūkumas gydomas oraliai vartojant kreatiną 300-400 mg/kg per parą.

2.4.3 Guanidinoacetato metiltransferazės trūkumas

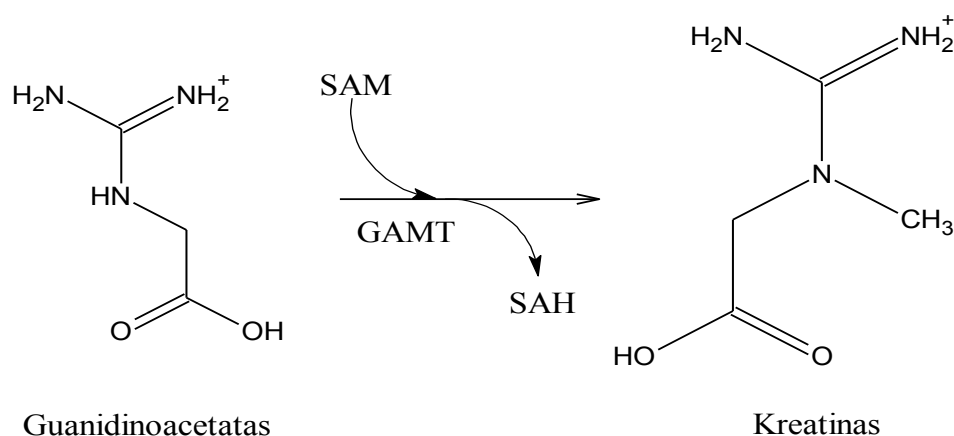
Guanidinoacetato metiltransferazės trūkumas (MIM 612736) iki 2005 metų nustatytas 14 pacientų. Fermentas koduojamas 19p13.3 srityje.

Guanidinoacetato metiltransferazė katalizuoja reakciją, kurios metu iš guanidinoacetato susidaro kreatinas, S-adenozilmetioninas dalyvauja reakcijoje kaip metilo grupės donoras (5 pav.).

Guanidinoacetato metiltransferazės trūkumas yra autosominiu recesyviniu būdu paveldimas kreatino biosintezės sutrikimas. Fermento trūkumą lemia mutacija 19p13.3 srityje. Dirbant su gyvūnų modeliais, nustatyta, kad GAMT $-/-$ pelėms būdinga aukšta guanidinoacetato ir žemos kreatino bei kreatinino koncentracijos smegenyse, kraujo serume ir šlapime. In vivo ^{31}P magnetinis branduolių rezonansas parodė aukštą P-guanidinoacetato ir žemą kreatinfosfato koncentraciją smegenyse, skeleto ir širdies raumenyse [12, 20].

Padidėjęs guanidinoacetato kiekis slopina $\text{Na}^+ \text{-K}^+$ ATPazę bei kreatinkinazę, o šie fermentai būtini užtikrinti smegenų audinio metabolizmą bei homeostazės palaikymą. Būtent šių fermentų slopinimas gali lemti GAMT trūkumui būdingą kliniką [33].

GAMT trūkumas sąlygoja padidėjusį naujagimių mirtingumą, raumenų hipotoniją, sumažėjusį vaisingumą ir sumažėjusią kūno masę dėl sumažėjusio riebalų kiekio.



5 pav. Guanidinoacetato metiltransferazės (GAMT) katalizuojama reakcija.

2.4.4 Kreatino nešiklio defektai

Kreatino nešiklio trūkumas (MIM 300036) yra nulemtas mutacijų Xq28 srityje, kuri yra atsakinga už kreatino nešiklio sintezę. Nustatyta, kad 1 % vyrų intelekto negalią lemia kreatino nešiklio stoka [9].

Kitaip nei pacientams su AGAT ir GAMT trūkumu, esant kreatino nešiklio (CrT) defektui ir vartojant kreatiną oraliai, jo koncentracija smegenyse nepadidėja.

Žmogaus organizme kreatino nešikli koduoja du genai. Vienas iš jų, *SLC6A8/CT1*, koduojamas Xq28 srityje ir ekspresuojamas beveik visuose audiniuose, tačiau didžiausias kiekis iRNR kiekis rastas energijai reikliuose audiniuose, tokiuose kaip griaučių raumenys, širdis, smegenys, tinklainė, bei audiniuose, kuriems būdinga absorbcinė funkcija, pavyzdžiui inkstuose ir žarnyne.

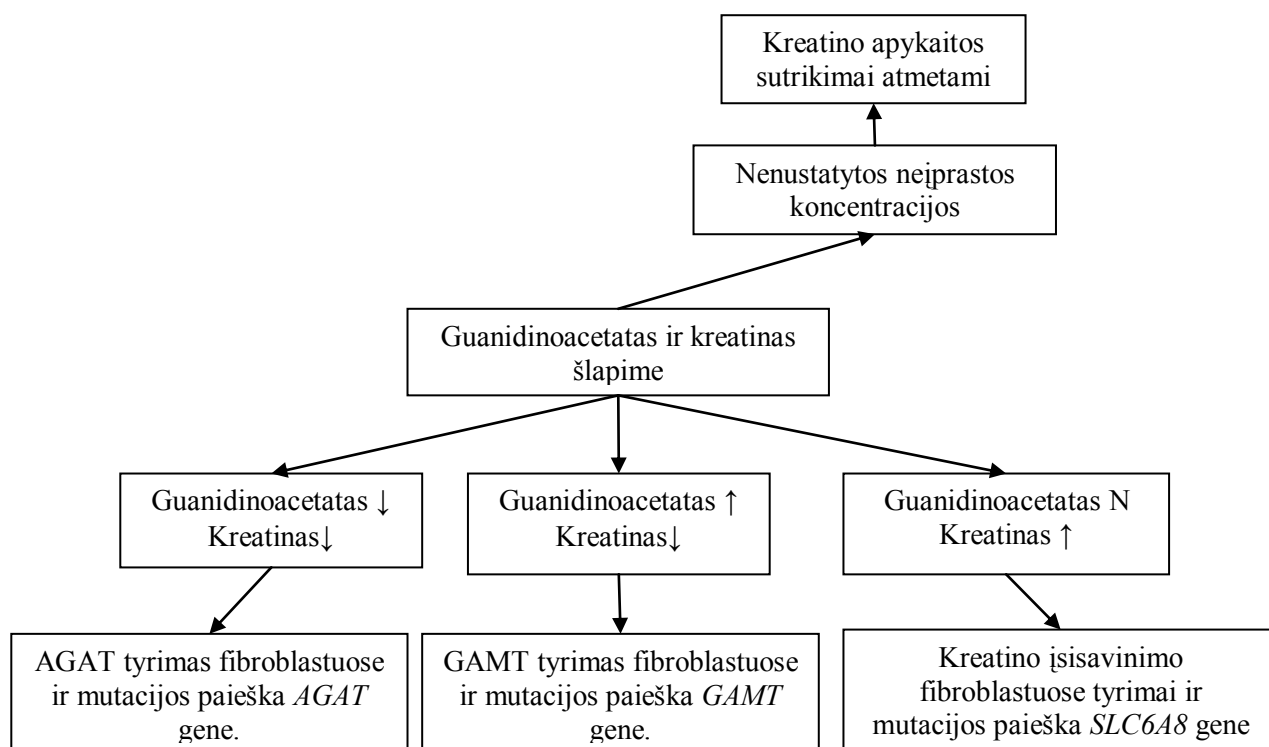
Vyriškos lyties pacientams, turintiems kreatino nešikli koduojančio geno iškritą, arba 1361C>T mutaciją dešimtame egzone [17], šlapime padidėja kreatino ir kreatinino koncentracijų santykis, tuo tarpu atliekant smegenų magnetinio rezonanso spektroskopiją, nenustatoma kreatino smailė. Šių pacientų fibroblastų kultūros įsisavina kreatiną tik esant didelėms jo koncentracijoms (>500nM) [26].

Esant kreatino nešiklio genetiniams defektams, pacientams pasireiškia hipotonija, epilepsija, vystymosi bei kalbos vystymosi atsilikimas, kraujyje ir šlapime būna padidėjusi kreatino koncentracija [10].

2.4.5 Kreatino apykaitos sutrikimų diagnostikos algoritmas

Atlikus kiekybinę kreatino ir guanidinoacetato analizę ir aptikus neįprastas šių metabolitų reikšmes, tolimesni tyrimai planuojami pagal kreatino apykaitos sutrikimų diagnostikos algoritmą (6 pav.)

Tiriant pacientų, kuriems įtariami kreatino apykaitos sutrikimai, mėginius, būtina žinoti, kad hiperornitinemija gali imituoti paveldimus kreatino apykaitos sutrikimus. Hiperornitinemija – sutrikimas, kurio metu organizme kaupiasi aminorūgštis ornitinas. Ornitino perteklius grįžtamuoju ryšiu slopina fermentą AGAT (arginino-glicino amidinotransferazę) (3 pav.), todėl sumažėja guanidinoacetato bei kreatino sintezė, šių medžiagų koncentracija sumažėja. Šiuo atveju atlikus guanidinoacetato bei kreatino analizę dujų chromatografu – masių spektrometru galima būtų įtarti AGAT trūkumą, tačiau diagnozė būtų klaidinga. Dėl šios priežasties diagnozuojant kreatino apykaitos sutrikimus būtina atlikti ir aminorūgščių analizę naudojant HPLC.



6 pav. Kreatino apykaitos sutrikimų laboratorinės diagnostikos algoritmas.

2.5 Diagnostikoje naudojami metodai

Kreatino apykaitos sutrikimai gali būti diagnozuojami naudojant įvairius metodus, arba deriant juos tarpusavyje. Diagnostikoje naudojami metodai:

- 1) biocheminis bendrasis tyrimas;
- 2) didelio pajėgumo skysčių chromatografija (HPLC);
- 3) didelio pajėgumo skysčių chromatografija suporuota su tandemine masių spektrometrija (HPLC MS/MS);
- 4) tandeminė masių spektrometrija (MS/MS);
- 5) dujų chromatografija – masių spektrometrija (GC/MS);
- 6) magnetinio rezonanso tyrimas (MRT).

Kiekvienas iš šių metodų toliau aptariamas detaliau.

1. Biocheminis bendrasis tyrimas. Kreatinino kiekis kraujyje yra pastovus, jo kiekio sumažėjimas diagnostinės reikšmės neturi. Kreatinino eritrocituose yra tiek pat, kiek ir plazmoje, tačiau galimas neteisingas tyrimo rezultatas, jei tirpale yra hemoglobino. Taigi būtina tirti nehemolizuotą kraujo plazmą ar serumą. Kraujo serume kreatinino koncentracija yra pastovi ir nedidelė: vyrų (75 – 115 $\mu\text{mol/l}$) ji yra didesnė negu moterų (58 – 88 $\mu\text{mol/l}$). Jo labai padaugėja

sutrikus didžiosios dalies nefronų veiklai – tai informatyvus inkstų funkcijos nepakankamumo rodiklis.

Konkreto asmens endogeninio kreatinino paros ekskrecija yra pastovi – per parą jo šalinama 1 – 2 g. Sveikuose inkstuose jis nei sekretuojamas, nei absorbuojamas – išsiskiria tik filtracijos būdu. Todėl iš endogeninio kreatinino kiekio šlapime įvertinama paros šlapimo rinkimo kokybė. Daugelio medžiagų kiekis šlapime išreiškiamas santykiu su 1 g kreatinino. Todėl galima tirti ne visą paros šlapimą, o jo porciją. Kreatinino klirenso normali reikšmė yra 80 – 160 ml/min. Kreatinino ekskrecija su amžiumi mažėja apie 6,5 ml/min per dešimtmetį [16].

2. HPLC – didelio pajėgumo skysčių chromatografija, yra patobulinta plonasluoksnės chromatografijos forma. Skystis kolonėle juda ne veikiamas traukos, o veikiant dideliems slėgiams (iki 400 atmosferų), todėl tyrimas vyksta greičiau. Taip pat kolonėlės užpildui naudojamos ypač mažos dalelės, kurios sukuria didelį nejudrios fazės paviršiaus plotą, todėl daug geriau yra atskiriami tiriamo mišinio komponentai. Atskirtų komponentų aptikimo sistema taip pat yra jautresnė bei tikslesnė, nei įprastos chromatografijos.

3. HPLC gali būti sujungiamas su masių spektrometrija (HPLC MS/MS): kuomet chromatografo detektorius rodo smailę (tam tikra išskirtą junginį), šis junginys yra nukreipiamas į masių spektrometrą. Pagal šio išskaidyto junginio fragmentus yra tiksliai identifikuojamas junginys. Medžiagų identifikavimui nebūtina žinoti tikslaus jų išėjimo laiko (*retention time*) chromatografijos spektre.

HPLC MS/MS yra labai jautrus ir greitesnis metodas nei GC/MS ar HPLC, tačiau jam būtini dideli finansiniai ištekliai, todėl ne visos laboratorijos naudoja šį metodą [4].

4. Tandeminė masių spektrometrija (MS/MS). Paprasčiausias tandeminis masių spektrometras susideda iš dviejų masių spektrometrų. Pirmasis masių spektrometras parenka charakteringą analitės, kuri yra tiriamame mišinyje, masę (*precursor*). Specifinės (nurodytos) masės jonai tuomet praeina sritį, kurioje yra aktyvuojami ir suskyla į specifinius fragmentus (*product*). Antrasis masių spektrometras atskiria susidariusius jonų fragmentus pagal jų masę. Matomą MS/MS spektrą sudaro tik parinktos masės junginio (*precursor*) jonų fragmentai. Spektre nėra cheminio fono bei kitų junginių.

5. Magnetinio rezonanso tyrimas (MRT). Nuolat vykstantis kreatino katabolizmas iki kreatinino reikalauja nuolatinio kreatino tiekimo į ląsteles. Į neuronai bei raumenų ląstelės kreatiną perneša kreatino nešiklis CrT, todėl ląstelėje esančio kreatino koncentraciją tiesiogiai lemia CrT baltymo ekspresija. Branduolių magnetinio rezonanso spektroskopijos (MRT) metu matoma kreatino smailė (bendras kreatinas) yra sudaryta iš dviejų metabolitų: kreatino ir kreatinofosfato [22].

Magnetinio rezonanso spektroskopija (arba branduolių magnetinio rezonanso spektroskopija) yra neinvazyvus analizinis metodas, leidžiantis ištirti metabolinius pokyčius smegenyse sergant Alzheimerio liga, esant augliams, įvykus insultui ar įvairiems priepuoliams. Kreatinas irgi gali būti išširtas MRT spektroskopijos metu.

6. Dujų chromatografija – masių spektrometrija. Tai metodas, kurio metu mišinyje esantys komponentai yra išskirstomi dujų chromatografijos metu, suskaidomi į fragmentus masių spektrometrijos metu ir pagal fragmentų masės ir krūvio santykį yra identifikuojama tiriamą analitę [14, 32].

Kreatino ir jo pirmtako guanidinoacetato kiekio nustatymas įvairiuose kūno skysčiuose (šlapime, kraujo plazmoje bei smegenų skystyje) yra labai informatyvus tyrimas. Masių spektrometrijos panaudojimas šių junginių analizei užtikrina didesnę tikslumą bei specifiškumą palyginus su kitais metodais [31].

Tandeminis MS/MS yra žymiai greitesnis ir tikslesnis metodas už GC/MS, tačiau jis reikalauja didelių finansinių išteklių. Palyginus HPLC MS/MS, GC/MS ir HPLC, paaiškėjo, kad HPLC metodu atliekant tyrimus nuolat pasitaiko klaidų bei netikslumų [4].

3. TYRIMO MEDŽIAGA IR METODAI

3.1 Tyrimo medžiaga

Siekiant patobulinti vaikų protinio atsilikimo diagnostiką rytų Europoje ir centrinėje Azijoje atliekant genetinę analizę ir remiantis bioinformatikos bei statistikos metodais, vykdomas „Cherish“ projektas. Projekto pradžia 2009-02-01, pabaiga 2012-01-31.

Magistrinio darbo metu ištirti 30 pacientų, atrinktų pagal žemiau nurodytus kriterijus, ir kuriems nebuvo aptikta organinių rūgščių, aminorūgščių, glikozaminglikanų apykaitos sutrikimų, šlapimo mėginiai. Pacientų amžius varijuoja nuo 1 iki 15 metų. Programoje buvo parenkamos tos šeimos, kuriose yra ligoniai, konsultuoti VšĮ VUL SK Medicininės genetikos centro Genetinio konsultavimo ir registro skyriuje nuo 2008 m. iki 2010 m. ir kuriems atlikus įprastus genetinius tyrimus, nebuvo nustatyta intelekto negalios priežastis. Šie ligoniai atitinka visus klinikinius kriterijus: 1) intelekto koeficientas <70 (vertinimui naudoti intelektiniu gebėjimu vertinimų testai) 2) patvirtintas psichomotorinės raidos atsilikimas 3) atmeta gimdymo trauma ar kitos žinomos prenatalinės ir perinatalinės priežastys, lemiančios protinę negalią bei atitinka vieną ar kelis šiuos klinikinius kriterijus: 1) sporadinis nespecifinis intelekto negalios/psichomotorinės raidos atsilikimo atvejis šeimoje, 2) sporadinis neurologinių psichikos - elgesio sutrikimų, įskaitant autizmo sutrikimų spektrą, atvejis šeimoje, 3) sporadinis sunkios idiopatinės epilepsijos atvejis šeimoje, 4) sporadinis nežinomos genetinės etiologijos struktūrinių įgimtų galvos smegenų vystymosi anomalijų atvejis šeimoje, 5) sporadinis nežinomos genetinės etiologijos sindromas (dismorfiniai pakitimai nebūdingi jokiai žinomam genetiniam sindromui) šeimoje.

Tyrimui buvo renkami šlapimo mėginiai pagal šiuos reikalavimus: vienkartinis šlapimas surenkamas į sterilų indelį ir transportuojamas į laboratoriją 0,5 val bėgyje. Jei transportavimas užtrunka ilgiau, šlapimą vežti leduose ar užšaldytą -20 C. Šlapimo mėginys stabilus 48 val +4°C temperatūroje ar 4 metus -20°C. Minimalus šlapimo kiekis tyrimui – 1 ml.

3.2 Tyrimo metodai

Surinktuose šlapimo mėginiuose kreatino ir guanidinoacetato koncentracijos nustatytos dujų chromatografijos – masių spektrometrijos metodu.

3.2.1. Mėginių paruošimas

Mėginių paruošimui bei analizei naudota įranga:

1. Dujų chromatografas su masių spektrometru (GC/MS)
2. Kapiliarinė kolonėlė 30m x 0,32mm x 0,25µm
3. Mikrošvirkštas
4. Centrifuga
5. Purtyklė
6. Kaitinamoji maišyklė
7. Didelio tikslumo (analitinės) svarstyklės
8. Mėgintuvėliai: 2 ml stikliniai; kamšteliai su PTFE įdėklų
9. Automatinės pipetės
10. Stikliniai piltuvėliai
11. 2 ml mėgintuvėlių stovas
12. Matavimo cilindrai
13. Šaldytuvas/šaldiklis
14. Kompiuteris, Excel programa
15. Maišymo magnetukai

Tirpalų paruošimas:

1. Prisotintas natriohidrokarbonato tirpalas:
15 g natriohidrokarbonato
100 ml dejonizuoto vandens. Laikoma šaldytuve 4°C, tirpalas stabilus iki 1 metų.
2. Guanidinoacetato standartinis tirpalas:
13 mg guanidinoacetato
10 ml dejonizuoto vandens. Laikoma šaldiklyje. Tirpalas stabilus iki 5 metų.
3. Kreatino standartinis tirpalas:
25 mg kreatino
10 ml dejonizuoto vandens. Laikomas šaldiklyje. Tirpalas stabilus iki 5 metų.

Tiriamąjį mėginį paruošimas:

Dirbama tik traukos spintoje, nenaudojami plastikiniai mėgintuvėliai ir kamšteliai. Kamšteliai privalo būti su PTFE įdėklais, nes organiniai tirpikliai gali reaguoti su įprastais plastmasiniais kamšteliais susidarant pašaliniais junginiais, kurie tyrimo metu trukdytų

identifikuoti kreatiną ir guanidinoacetatą. Taip pat, organiniams tirpikliams reaguojant su plastmasiniais kamšteliais gali būti pažeidžiamas mėgintuvėlių sandarumas.

1. Į stiklinius 2ml talpos mėgintuvėlius supilami tirpalai:
 - 50 µl natriohidrokarbonato tirpalo,
 - 100 µl šlapimo,
 - 600 µl tolueno,
 - 50 µl heksafluoracetilacetono.
2. Į kiekvieną mėgintuvėlį įdedama po maišymo magnetuką. Mėgintuvėliai sandariai užsukami su kamšteliais.
3. Mėgintuvėliai sudedami ant maišyklės-kaitinimo plytelės. Įjungiamas maišymas. Mėginiai kaitinami 16 valandų $80^{\circ}\text{C} \pm 10^{\circ}\text{C}$ temperatūroje.
4. Mėginiai atvėsunami kambario temperatūroje.
5. Mėginiai centrifuguojami 10 min 3000 rpm.
6. Į kitus stiklinius mėgintuvėlius su insertais įpilama 15 µl MTBSTFA tirpalo.
7. Nucentrifuguotuose mėgintuvėliuose susidaro dvi tirpalo fazės. Viršutinioji (tolueno) nusiurbiamą į mėgintuvėlius su insertais.
8. Gauti mišiniai gerai sumaišomi, buteliukai sandariai uždaromi.
9. Mėginio analizei dujų chromatografu – masių spektrometru naudojamas 1 µl paruošto tirpalo, analizės metu naudoti aparato parametrai nurodyti pirmoje lentelėje.

3.2.2. GC/MS veikimo principas

GC/MS – tai metodas sujungiantis chromatografijos ir spektrometrijos savybes, naudojamas įvairių mišinių sudedamosioms dalims nustatyti.

Dujų chromatografijos metu tiriamos medžiagos yra išgarinamos jų nesuskaidant į inertiškų dujų srauto, helio (inertiška judri fazė), pernešamos per chromatografijos kolonėlę. Naudojamos inertiškos dujos, kurios nereaguoja nei su tiriamąja medžiaga, nei su kolonėlės paviršių dengiančiu polimeru, taip nėra paveikiami tyrimo rezultatai. Nejudrią fazę sudaro polimeras, dengiantis vidinį kolonėlės paviršių. Skirtingi junginiai tiriamame mišinyje skirtingai sąveikauja su polimeru, todėl iš kolonėlės išeina skirtingu laiku, tai vadinama medžiagos išėjimo laiku (*retention time*).

Masių spektrometre teigiamai įkrautos dujinėje fazėje esančios dalelės išskirstomos vienalyčiame magnetiniame lauke pagal masės ir krūvio santykį. Masių spektrometro veikimą galima padalinti į keturias stadijas:

1. Mėginio įvedimas.
2. Jonų generavimas.
3. Masių atskyrimas.
4. Jonų detekcija.

3.2.3. Mėginio įvedimas

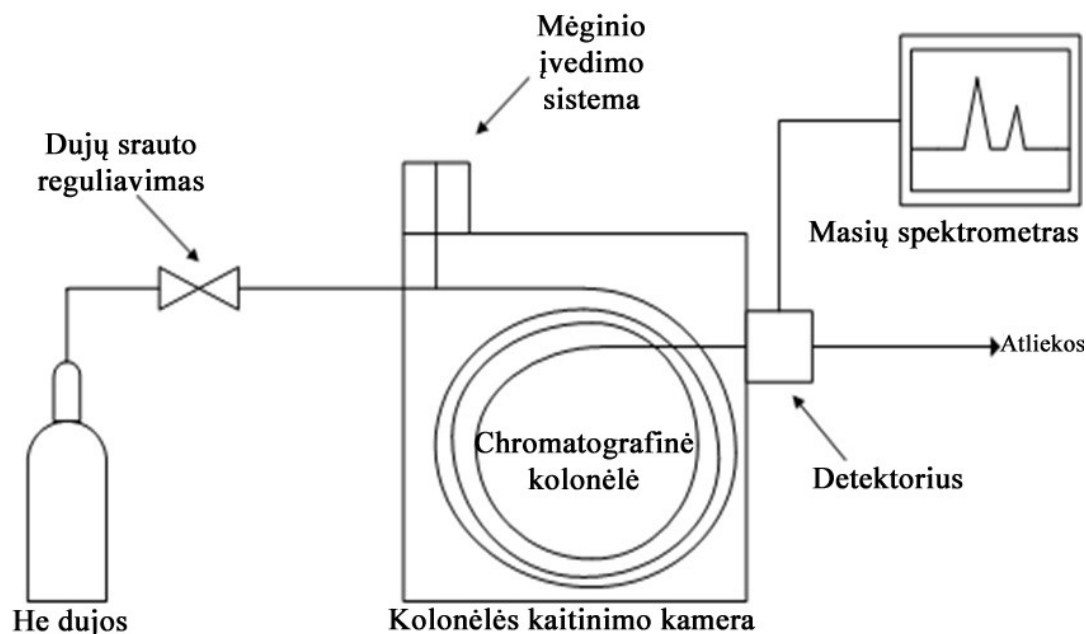
Į GC/MS sistemą įvedamas 1 μ l paruošto mėginio. Mėginys įvedamas naudojant mikrošvirkštą (10 μ l tūrio). Mėginio įvedimo sistemoje (7 pav.) yra palaikoma pastovi aukšta temperatūra (250°C), kad į ją patekęs mėginys iškart išgaruotų. Pagal nustatytus parametrus (2 lentelė) į chromatografinę kolonėlę patenka tik penkiasdešimtoji į sistemą įleisto 1 μ l mėginio dalis. Chromatografinė kolonėlė tiriamoji medžiaga juda dėl pastovaus inertiškų dujų srauto (darbo metu buvo naudojamos helio dujos).

Chromatografinė kolonėlė yra užpildyta į smėlį panašia medžiaga – polimeru, kuris lemia mėginyje esančių medžiagų atsiskyrimą. Mėginiui judant kolonėlėje, skirtingos molekulinės struktūros medžiagos skirtingai sąveikauja su kolonėlėje esančiu polimeru. Medžiagos, kurios stipriau sąveikauja su polimeru, lėčiau juda kolonėlėje, todėl iš jos išeina vėliausiai. Tuo tarpu medžiagos, kurios silpnai arba visai nesąveikauja su polimeru, kolonėlėje juda greitai ir išeina pirmosios.

Iš chromatografijos kolonėlės išeinančias medžiagas aptinka detektorius. Jų gali būti įvairių, priklausomai nuo tiriamųjų medžiagų ir darbo specifikos: liepsnos jonizacijos, liepsnos emisijos, elektronų sugavimo ir kt.

Detektorius užfiksuoja išeinančią medžiagą, kompiuteris apdoroja duomenis ir pateikia chromatografijos spektrą. Jame galima stebėti kiek medžiagų buvo mėginyje ir kokie yra jų išėjimo iš chromatografinės kolonėlės laikai.

Kiekviena medžiaga atskirai iš dujų chromatografo patenka tiesiai į masių spektrometrą.



7 pav. Dujų chromatografo – masių spektrometro schema.

3.2.4. Jonų generavimas

Į masių spektrometrą privalo patekti visiškai gryna dujinės būsenos medžiaga. Mėginio įvedimo dalyje yra palaikoma pastovi aukšta temperatūra (gali būti iki 400°C), kuri užtikrina, kad medžiaga bus dujinės būsenos. Medžiaga patenka į dalį, kurioje vyksta jonizacija, jos metu medžiagos dalelės yra įkraunamos, jos įgauna tam tikrą krūvį.

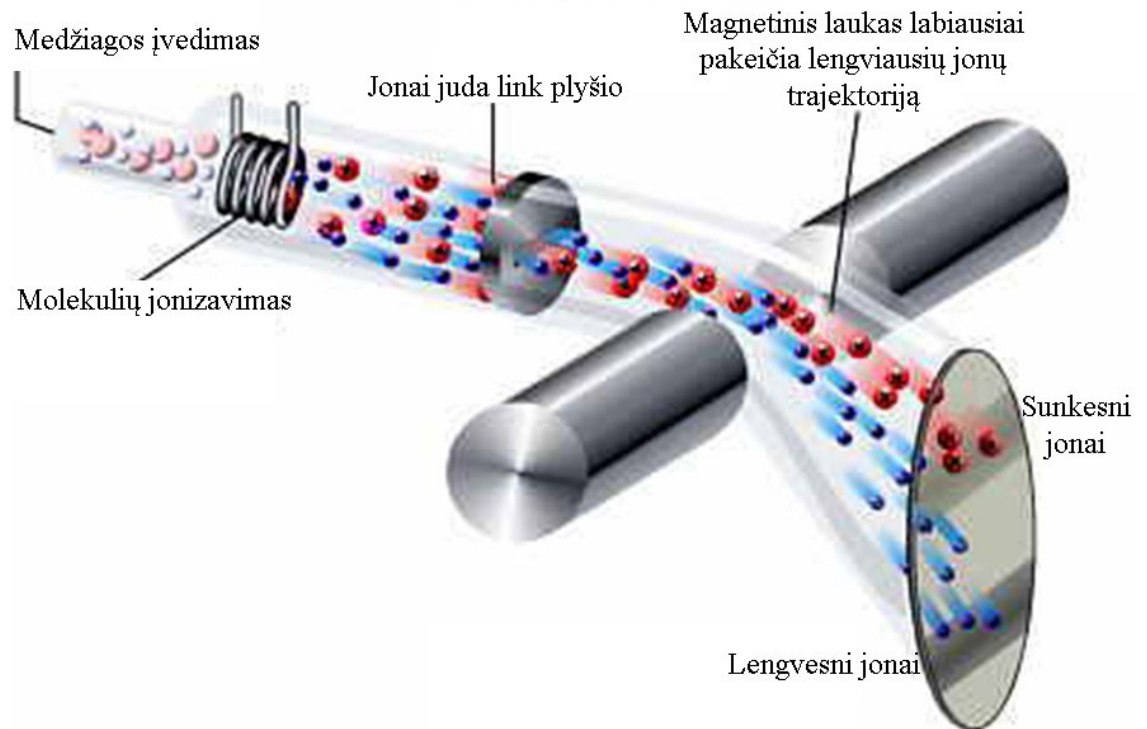
Iš medžiagos įvedimo sistemos eina kuo pastovesnis tiriamų molekulių srautas, o jį statmenai atakuoja elektronų spindulys. Elektronų spindulys susidaro tarp katodo ir anodo. Tarp jų gali susidaryti iki 300V potencialų skirtumas (tai reiškia, kad elektronai neša 300 eV srovę). Sąveika tarp elektronų ir neutralių molekulių sukuria teigiamai įkrautus molekulinis jonus:



Nejonizuotos dalelės yra pašalinamos iš jonizacijos šaltinio veikiant vakuomo pompoms. Jonizuotos molekulės yra orientuotos tiksliai. Jos juda dėl šaltiniui suteikto potencialo, kuris varijuoja nuo 2 iki 10 kV ir didžiausias greitis pasiekiamas išėjimo plyšyje (0V). Jonų fokusavimas sukuriamas dėl papildomo elektrinio lauko. Išėjimo plyšys leidžia į magnetinį analizatorių patekti tik siaurai, centrinės dalies ir todėl homogeniškiausiai jonų srauto daliai.

3.2.5. Masių atskyrimas

Jonų atskyrimas vyksta magnetiniame analizatoriuje, šis procesas priklauso nuo jonų masės. Atskyrimas vyksta magnetiniame lauke, kuriame jonų, turinčių vienodą krūvį, bet skirtingą masę, trajektorija bus pakeista skirtingai.



8 pav. Masių spektrometro veikimo schema.

Mažesnės masės jonų trajektorija bus labiau paveikta, negu jonų, pasižyminčių didesne mase. Kitais žodžiais tariant – įvairūs jonai juda apvalia trajektorija, kurios spindulys priklauso nuo jų masės (8 pav.). Jonų masės ir krūvio santykis priklauso nuo magnetinio lauko indukcijos, kreivės spindulio ir įtampos:

$$\frac{m}{z} = \frac{r_m^2 \cdot B^2}{2U}, \text{ kur } B - \text{magnetinio lauko indukcija, } z - \text{jono krūvis, } m - \text{jono}$$

masė, U – įtampa, r_m – trajektorijos spindulys.

3.2.6. Jonų detekcija

Jei akceleracijos potencialas ir magnetinio lauko stiprumas yra nekintantys (const) turime lygtį:

$$\frac{m}{z} = k \cdot r_m^2, \text{ kur } k - \text{konstanta.}$$

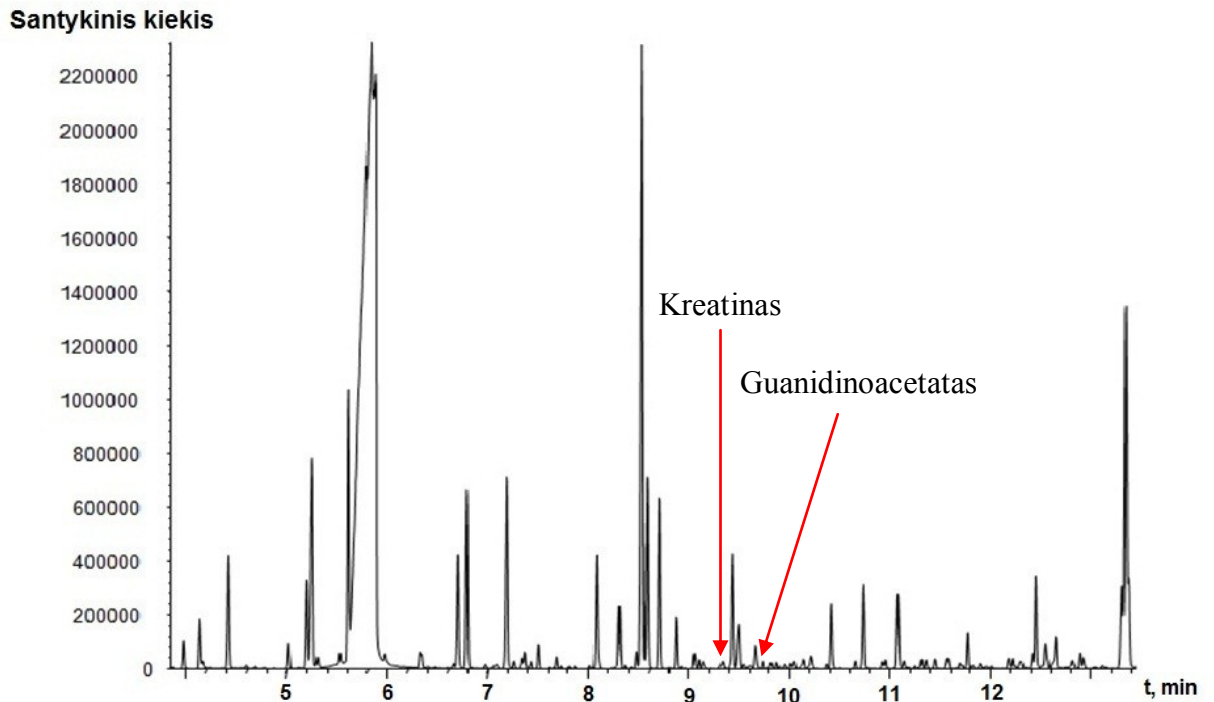
O tai reiškia, kad m/z santykis yra tiesiogiai proporcingas trajektorijos spindulio kvadratui. Remiantis šia savybe, galima naudoti daug kolektorių jonų detekcijai arba fotografinę plokštelę, ant kurios tamsesnės sritys atitiktų tam tikrus jonus, o atstumai tarp patamsėjusių sričių būtų siejami su dalelių masėmis.

Todėl m/z nustatymui naudojant pastovų kreivės spindulį, galima nekeisti ir magnetinio lauko stiprumo. Šiuo atveju reikia tik vieno jonų detektoriaus. Masių spektrometruose taip pat naudojamas elektromagnetinis elektronų daugiklis, kuris sustiprina silpną jonų srovę.

Gauti elektriniai signalai yra užrašomi matavimo metu į kompiuterį, kuris yra tiesiogiai sujungtas su prietaisu. Visi duomenys yra iškart apskaičiuojami ir gali būti atspausdinti. Kompiuteris taip pat pateikia spektrus grafiškai. Gauti spektrai vadinami masių spektrais, juose susidariusių fragmentų masę atspindi spektre stebimos smailės, smailės aukštis priklauso nuo fragmentų kiekio, gausos (*abundance*): kuo daugiau medžiagos fragmentų susidaro, tuo aukštesnė smailė matoma spektre.

3.2.7. Specifinių jonų atrankos (SIM) metodas

Atliekant tiriamosios medžiagos analizę dujų chromatografu – masių spektrometru paprastai yra pasirenkamas TIC (visų jonų srauto) metodas, kurio metu masių spektrometras fiksuoja visus jonus (susidariusius jonizuojant tiriamąją medžiagą), kurių m/z santykis varijuoja nuo 35 iki 500. Kompiuteryje, kuriame yra pateikiami bei išsaugomi visi analizės duomenys, yra įvairių junginių masių spektrų bibliotekos (NIST, Amsterdamo, Utrechto paveldimų medžiagų apykaitos ligų masių spektrų bibliotekos). Išmatavus tiriamosios medžiagos masių spektrą, jis palyginamas su spektrais, esančiais bibliotekoje, ir taip identifikuojamas junginys. TIC metodas yra ypač parankus, kai tiriami nežinomos sudėties mėginiai. 9 pav. pavaizduotas darbo metu gautas chromatografijos spektras naudojant TIC metodą, ieškomos analitės, kreatinas bei guanidinoacetatas, yra tik nežymios smailės visame spektre.

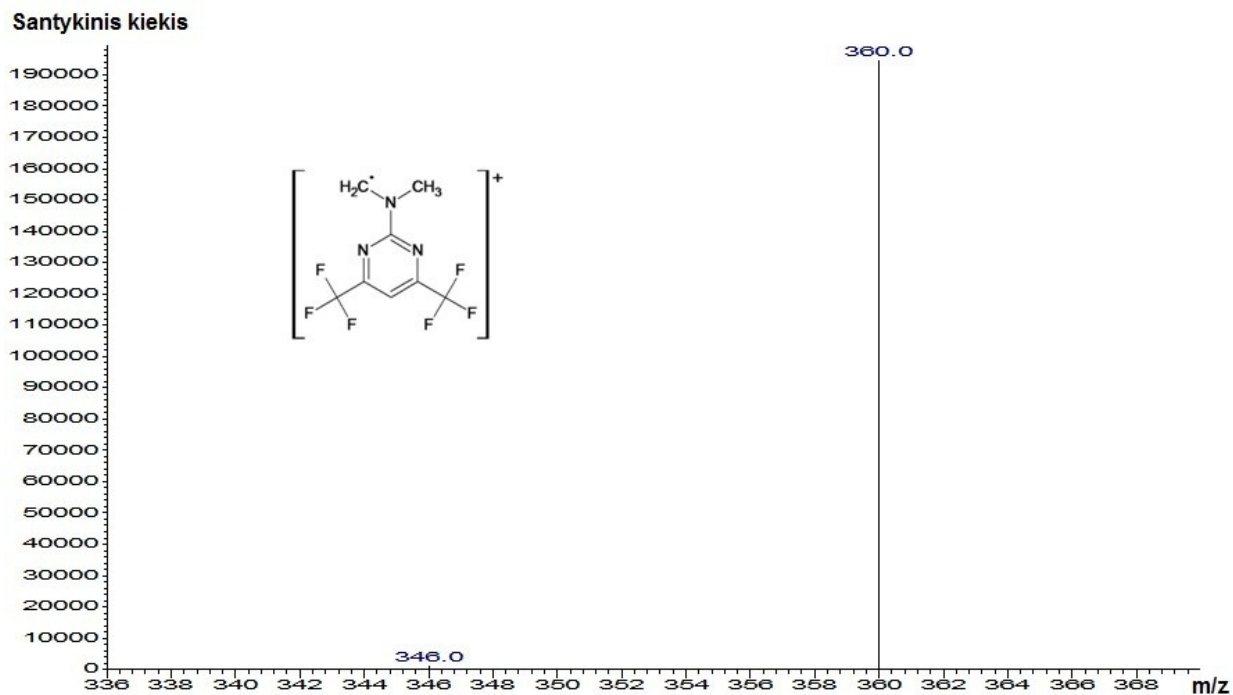


9 pav. Mėginio chromatografijos spektras naudojant TIC metodą.

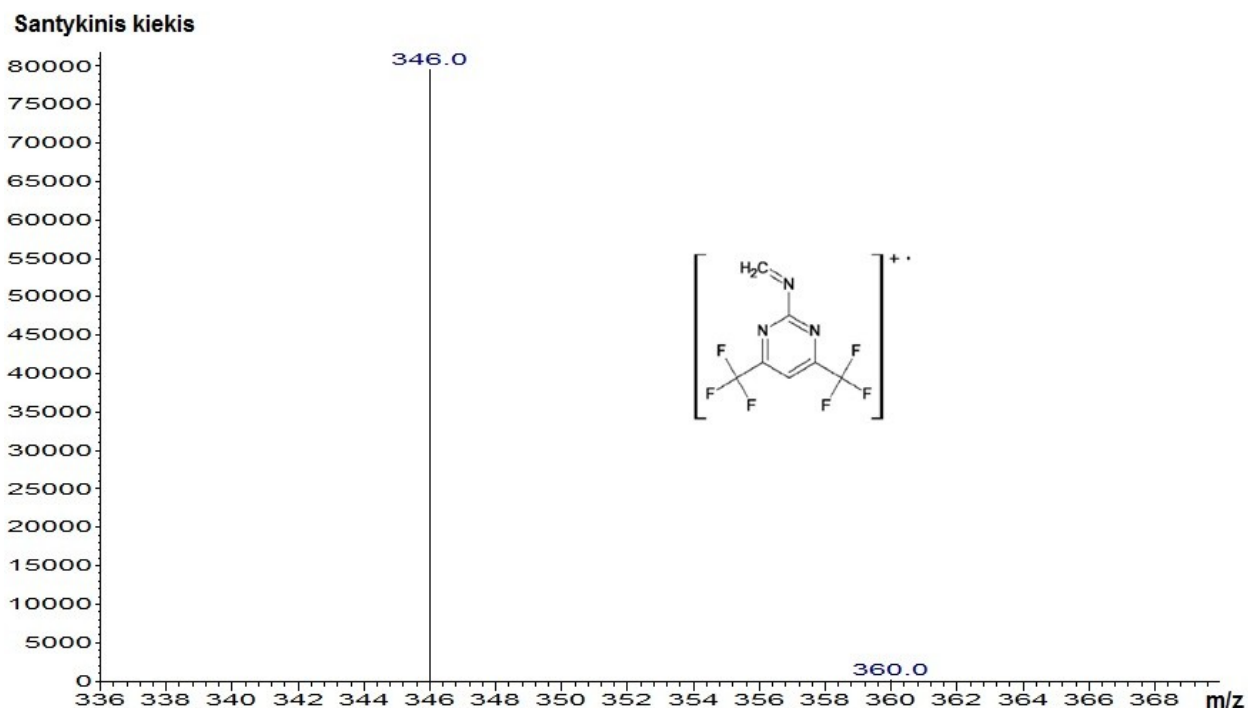
SIM metodas dujų chromatografijos – masių spektrometrijos metu leidžia aptikti specifines analites tiriamajame mišinyje su ypač dideliu jautrumu lyginant su TIC metodu. Naudojant SIM metodą masių spektrometras fiksuoja ne visus susidariusius jonus, o tik specifinių (nurodytų, tyrėją dominančių) masių jonų fragmentus. Pasirenkant specifinius jonų fragmentus galima susiaurinti ieškomų analičių aibę (net iki vieno junginio visame tiriamame mišinyje). Dažniausiai nurodomi nuo dviejų iki keturių skirtingų masių jonai, kurie susidaro tik iš tam tikros analitės (yra jai charakteringi). Darbo metu tiriamuosiuose mėginiuose buvo siekiama aptikti kreatiną bei guanidinoacetatą, todėl masių spektrometro parametruose nurodytos dvi skirtingos masės: 360 (kreatino fragmentas) ir 346 (guanidinoacetato fragmentas) (10 ir 11 pav.). SIM metodu gautas chromatografijos spektras pateiktas 12 pav. Ieškomos analitės, kreatinas bei guanidinoacetatas, sudaro dvi vieninteles smailes visame mėginio spektre.

Gerai pasirinkus masių spektrometro SIM metodo parametrus, junginių identifikavimo jautrumas gali padidėti 10-100 kartų lyginant su TIC metodu.

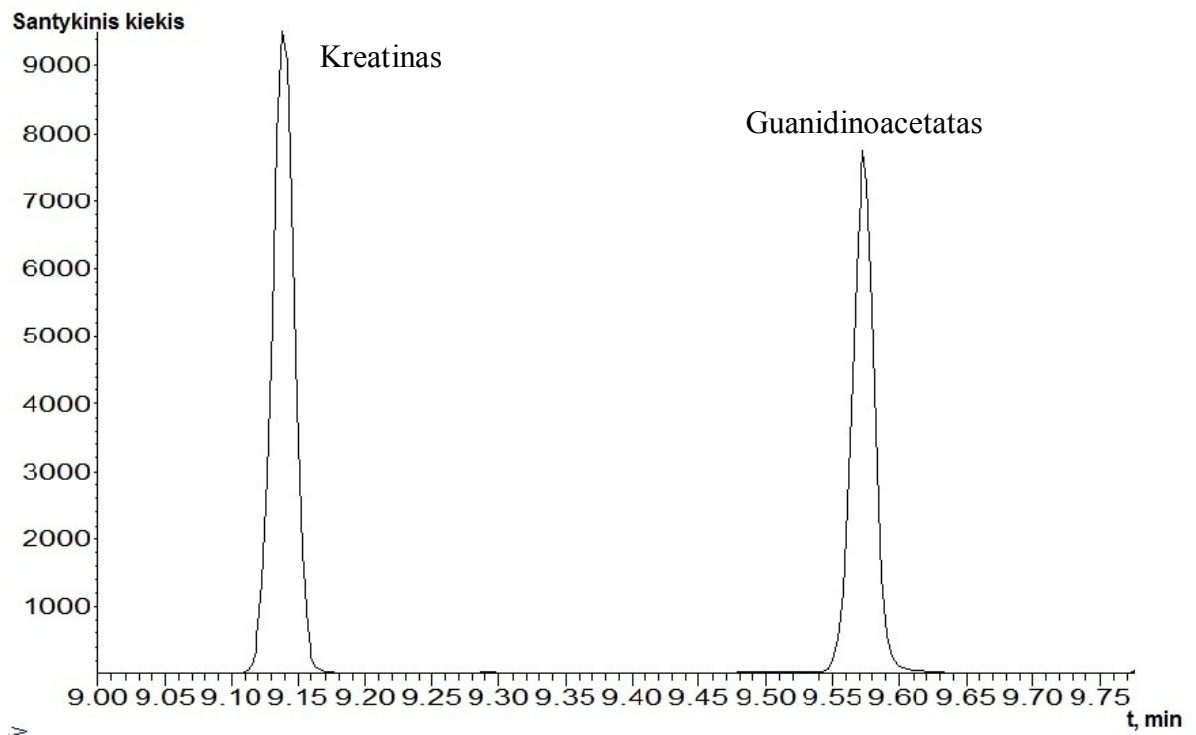
Masių spektrometro gebėjimas identifikuoti nežinomus junginius TIC metodu bei atlikti jų kiekybinę analizę naudojant SIM metodą padaro dujų chromatografiją – masių spektrometriją vieną iš efektyviausių laboratorijose naudojamų metodų medžiagų kiekybinei analizei atlikti.



10 pav. Kreatino masių spektras naudojant SIM metodą. Pavaizduota kreatinui charakteringo molekulinio fragmento struktūrinė formulė.



11 pav. Guanidinoacetato masių spektras naudojant SIM metodą. Pavaizduota guanidinoacetatui charakteringo molekulinio fragmento struktūrinė formulė.



12 pav. Mėginio chromatografijos spektras naudojant SIM metodą.

3.2.8. Kiekybinė analizė

Literatūros šaltiniuose aprašoma kreatino ir guanidinoacetato kiekybinė analizė atliekama į tiriamus mėginius įdėjus žinomą kiekį stabilių kreatino ir guanidinoacetato izotopų [2, 14, 32]. Toks tyrimo metodas reikalauja didelių finansinių išteklių, todėl darbo metu kiekybinė kreatino ir guanidinoacetato analizė atlikta naudojant SIM metodą bei sudarytas kreatino ir guanidinoacetato kalibracines kreives.

Kiekybinei guanidinoacetato ir kreatino analizei atlikti visų pirma buvo atlikta dujų chromatografo – masių spektrometro kalibracija. Kalibracijos metu naudoti tirpalai bei jų koncentracijos pateiktos pirmoje lentelėje.

Pirmojo (didžiausios koncentracijos) kalibracinio tirpalo kreatino ir guanidinoacetato koncentracijos buvo parinktos didesnės, negu literatūroje nurodomos didžiausios kreatino ir guanidinoacetato koncentracijos [14], kurioms esant dar nepasireiškia kreatino apykaitos sutrikimai.

Buvo pagaminti tirpalai, kuriuos naudojant atlikta kalibracija. 20 ml distiliuoto vandens ištirpinta 5 mg guanidinoacetato ir 12 mg kreatino. Taip pagamintas pirmasis (1) tirpalas. Antrajam (2) tirpalui paruošti paimta 1 ml pirmojo tirpalo ir 1 ml distiliuoto vandens (atskiesta dvigubai). Trečiajam tirpalui paruošti paimta 500 μl antrojo tirpalo ir 1500 μl

distiliuoto vandens (atskiesta keturis kartus). Pastaruoju būdu pagaminti ir ketvirtasis, penktasis, šeštasis ir septintasis tirpalai. Analizių koncentracijos paruoštuose tirpaluose pateiktos pirmoje lentelėje.

Lentelė 1. Kiekybinei analizei įdiegti paruošti kalibraciniai tirpalai ir jų koncentracijos.

Medžiaga	Tirpalo Nr.	Koncentracija mmol/l
Guanidinoacetatas	1.	2,135
	2.	1,067
	3.	0,267
	4.	0,0667
	5.	0,0167
	6.	0,00416
	7.	0,001
Kreatinas	1.	4,575
	2.	2,288
	3.	0,572
	4.	0,143
	5.	0,0357
	6.	0,00894
	7.	0,00223

Paruošti mėginiai buvo išanalizuoti dujų chromatografu – masių spektrometru SIM metodu, nustačius parametrus, nurodytus pirmoje lentelėje. Dujų chromatografas – masių spektrometras identifikuodavo junginius esant mažiausiai jų koncentracijai (tirpalai Nr.7), tačiau atliekant kokybinę analizę, minimali tirpalų koncentraciją, kuriai esant dujų chromatografas – masių spektrometras integravo spektre esančias smailes, buvo tirpalai Nr.5. Matuojant paskutinius du tirpalus (Nr.6 ir Nr.7) spektre esančios smailės yra per mažos, kad integravus jų plotą būtų gauti patikimi duomenys. Kreatino ir guanidinoacetato kalibracinių kreivių sudarymui buvo panaudoti penki skirtingų koncentracijų tirpalai. Sudarytų kalibracinių kreivių tiesės lygtys:

$$\text{Guanidinoacetato: } y = (8,20 \cdot 10^5) \cdot x + 1,8 \cdot 10^5; r^2 = 0,973.$$

$$\text{Kreatino: } y = (1,98 \cdot 10^6) \cdot x + 1,85 \cdot 10^5; r^2 = 0,986.$$

Metodo patikimumui patikrinti buvo ištirti 6 išorinės kokybės kontrolės (ERNDIM) mėginiai. Gauti rezultatai parodė, kad metodas patikimas ir galima atlikti pacientų mėginių kokybinę bei kiekybinę kreatino ir guanidinoacetato analizę remiantis sudarytomis kalibracinėmis kreivėmis.

4. TYRIMO REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

Darbo metu dujų chromatografijos – masių spektrometrijos metodas buvo pritaikytas kokybinei ir kiekybinei kreatino ir guanidinoacetato analizei atlikti, buvo parinkti optimaliausi dujų chromatografo – masių spektrometro parametrai, kuriems esant galima atlikti kokybinę ir kiekybinę analizę. Buvo parinktas optimalus temperatūros kitimo gradientas (nuo 70°C iki 275°C, temperatūros kitimo greitis 20°C/min). Parinktas temperatūros kitimas sutrumpino tyrimo trukmę iki 11 min. Parinkti dujų chromatografo – masių spektrometro parametrai pateikti antroje lentelėje.

Lentelė 2. Dujų chromatografo – masių spektrometro parametrai naudoti tyrimo metu.

Parametras	Reikšmės
Kolonėlė:	HP-5MS 30m x 0,25 mm x 0,25 µm
Nešančios dujos:	helis
Slėgis:	85 kPa
Įvedimo metodas:	split
Mėginio įvedimo dalis:	1:50
Įvedimo temperatūra:	250°C
Įvedimo tūris:	1 µl
Matavimo temperatūra:	275°C

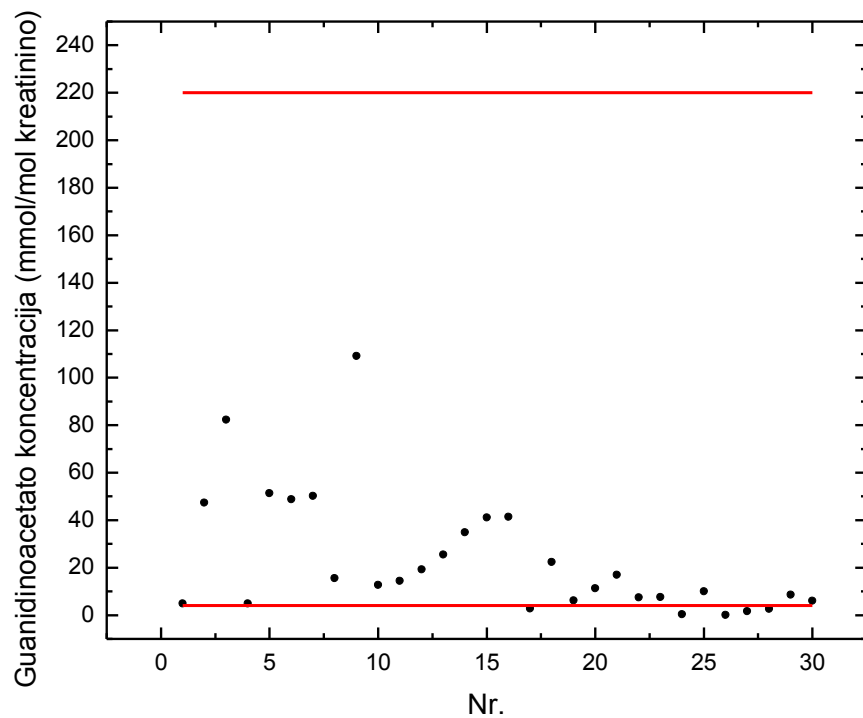
Buvo atlikta pacientų šlapimo mėginių kiekybinė kreatino ir guanidinoacetato analizė dujų chromatografu – masių spektrometru, tiriamųjų grupę sudarė 30 pacientų, kuriems būdinga intelekto negalia ir kurių šlapimo mėginiuose nebuvo rasta organinių rūgščių, aminorūgščių pokyčių. Trečioje lentelėje pateikti atliktos kiekybinės analizės rezultatai, apskaičiuotas kiekvienos analitės amžiaus grupėse vidurkis ir palygintas su literatūroje nurodytomis normos ribomis. Toliau aptariama kiekviena amžiaus grupė atskirai.

Lentelė 3. Pacientų mėginių kreatino ir guanidinoacetato vidurkiai kiekvienoje amžiaus grupėje ir normos ribos.

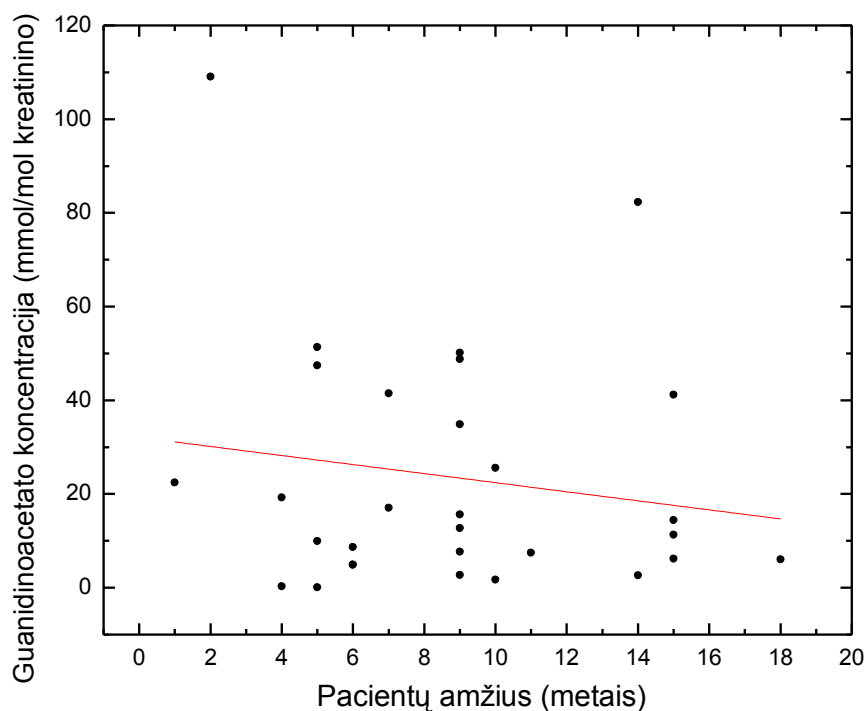
Analitė	Amžius (metais)	Vidurkis koncentracijos (mmol/mol kreatinino)	Normos ribos (mmol/mol kreatinino)
Kreatinas	0-4	440,69	6 – 1500
	4-12	95,1	17 – 720
	>12	115,19	11 – 560
Guanidinoacetatas	0-15	23,6	4 – 220

Surinktų šlapimo mėginių guanidinoacetato kiekybinės analizės rezultatai pateikti 13 pav. Išmatuotos koncentracijos varijuoja nuo 4,93 iki 109,1 mmol/mol kreatinino ir atitinka įprastas guanidinoacetato koncentracijas šlapime lyginant su nurodytomis reikšmėmis literatūroje (4-220 mmol/mol kreatinino). Analizės metu keliems pacientams buvo nustatytos ir mažesnės nei apatinė normos riba guanidinoacetato koncentracijos, tačiau kreatino koncentracijos šiems pacientams buvo normos ribose. Manoma, kad tokius tyrimo rezultatus galėjo nulemti tiriamųjų klinikinė būklė (ryški raumenų hipotonija, mažas fizinis aktyvumas). Kita vertus normos ribos buvo pasirinktos remiantis Olandijos mokslininkų literatūros duomenimis, nes dar nėra nustatytos Lietuvos populiacijos kreatino ir guanidinoacetato normos ribos.

Nenustatyta koreliacija tarp pacientų amžiaus ir jų šlapimo mėginiuose nustatyto guanidinoacetato koncentracijos, tačiau patebima tendencija, kad esant vyresniam amžiui, guanidinoacetato koncentracija mažėja. (14 pav.)



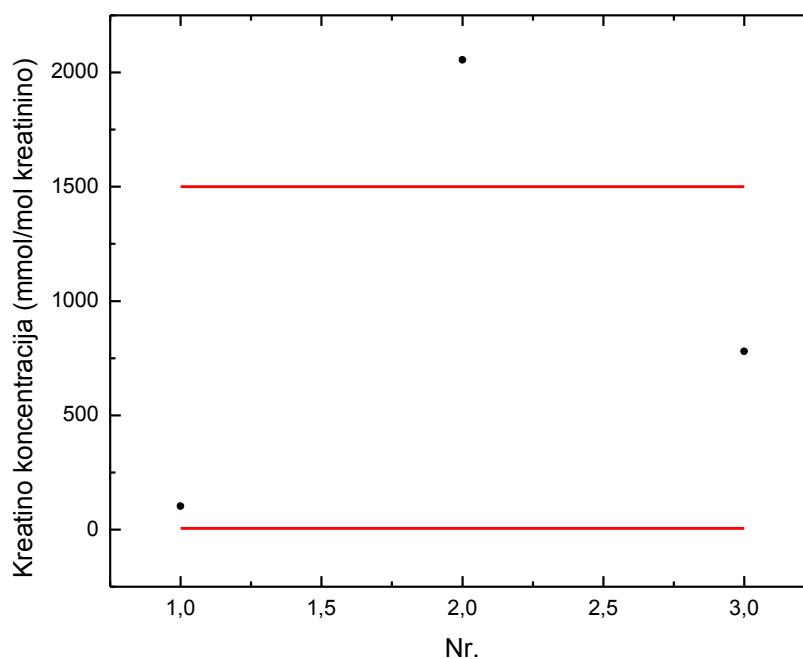
13 pav. Guanidinoacetato kiekybinės analizės rezultatai pacientų, kurių amžius iki 15 metų, grupėje. Raudonai pažymėtos koncentracijų normos ribos.



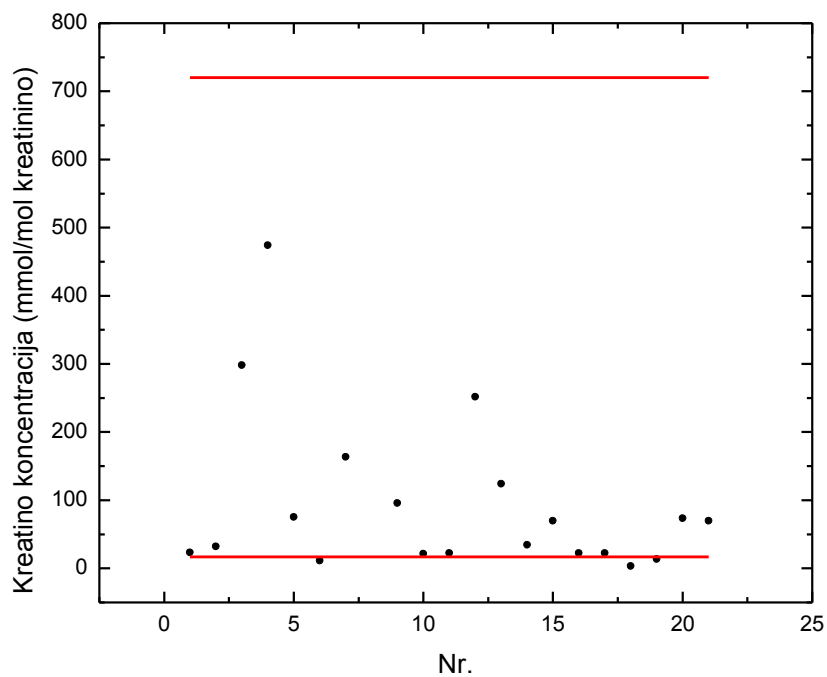
14 pav. Koreliacija tarp pacientų amžiaus (metais) ir jų šlapimo mėginiuose nustatytos guanidinoacetato koncentracijos, $r^2=0,026$.

Surinktų šlapimo mėginių kreatino kiekybinės analizės pirmoje amžiaus grupėje (iki 4 metų) rezultatai pateikti 15 pav. Vieno paciento kreatino koncentracija viršija didžiausią galimą kreatino koncentraciją. Šio paciento guanidinoacetato koncentracija buvo normos ribose, todėl šiam pacientui galima įtarti kreatino nešiklio CrT trūkumą.

Surinktų šlapimo mėginių kreatino kiekybinės analizės rezultatai antroje amžiaus grupėje (nuo 4 iki 12 metų) pateikti 16 pav. Kreatino koncentracijos šioje amžiaus grupėje kinta nuo 21,42 iki 474,3 mmol/mol kreatinino ir puikiai atitinka literatūroje nurodytas normas ribas (17 – 720 mmol/mol kreatinino). Analizės metu keliems pacientams buvo nustatytos ir mažesnės nei apatinė normos riba kreatino koncentracijos, tačiau guanidinoacetato koncentracijos šiems pacientams buvo normos ribose. Manoma, kad tokius tyrimo rezultatus galėjo nulemti tiriamųjų klinikinė būklė (ryški raumenų hipotonija, mažas fizinis aktyvumas). Kita vertus normos ribos buvo pasirinktos remiantis Olandijos mokslininkų literatūros duomenimis, nes dar nėra nustatytos Lietuvos populiacijos kreatino ir guanidinoacetato normos ribos.



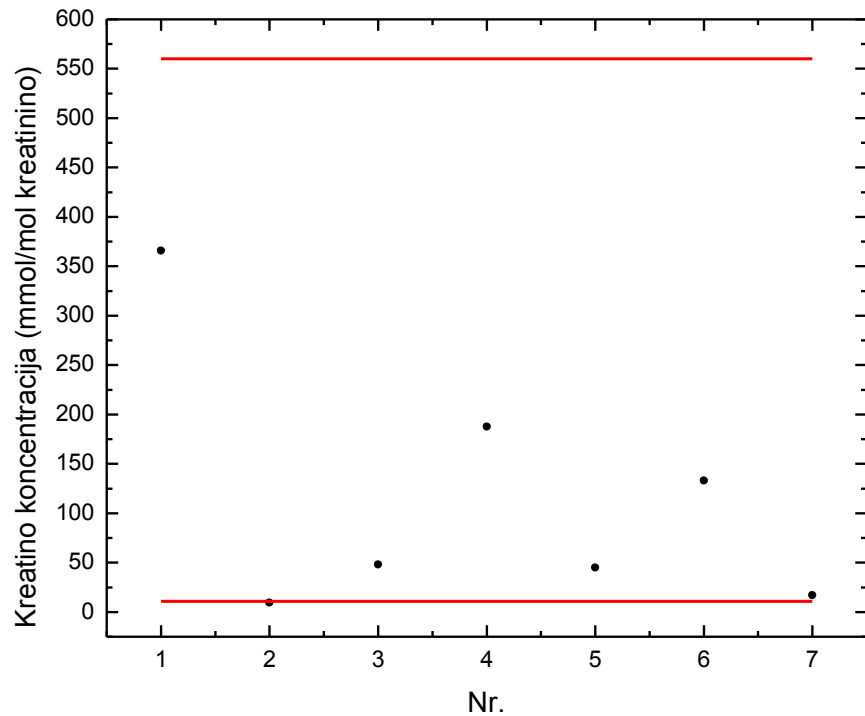
15 pav. Kreatino kiekybinės analizės pirmoje amžiaus grupėje (iki 4 metų) rezultatai. Raudonai pažymėtos kreatino koncentracijų šioje amžiaus grupėje normos ribos. Viena iš koncentracijų viršija didžiausią galimą kreatino koncentraciją.



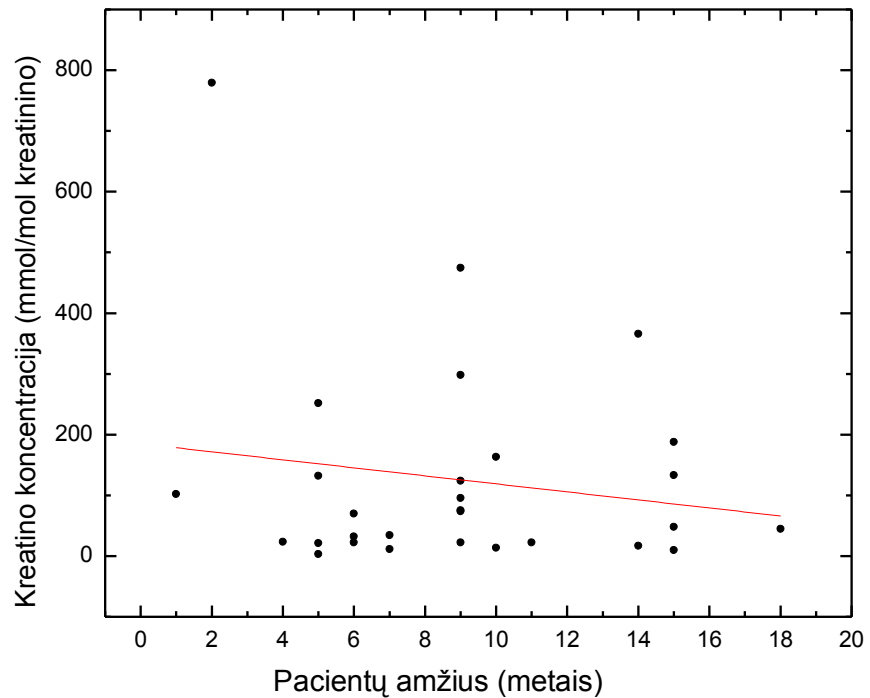
16 pav. Kreatino kiekybinės analizės antroje amžiaus grupėje (nuo 4 iki 12 metų) rezultatai. Raudonai pažymėtos kreatino koncentracijų šioje amžiaus grupėje normos ribos.

Surinktų šlapimo mėginių kreatino kiekybinės analizės trečioje amžiaus grupėje (>12 metų) rezultatai pateikti 17 pav. Šioje amžiaus grupėje kreatino koncentracijos kito nuo 9,53 iki 366 mmol/mol kreatinino, o tai atitinka literatūroje nurodytus duomenis.

Koreliacija tarp kreatino koncentracijos šlapimo mėginiuose ir pacientų amžiaus nenustatyta, tačiau pastebima tendencija, kad esant vyresniam amžiui, guanidinoacetato koncentracija mažėja (18 pav.). Į koreliacijos skaičiavimus neįtrauktas pacientas, kurio kreatino koncentracija (2055,14 mmol/mol kreatinino) smarkiai viršija didžiausią galimą koncentraciją (1500 mmol/mol kreatinino).



17 pav. Kreatino kiekybinės analizės trečioje amžiaus grupėje (> 12 metų) rezultatai. Raudonai pažymėtos kreatino koncentracijų šioje amžiaus grupėje normos ribos.



18 pav. Koreliacija tarp pacientų amžiaus (metais) ir jų šlapimo mėginiuose nustatytos kreatino koncentracijos, $r^2=0,027$.

Detalesnei analizei atlikti panaudoti šių pacientų amino rūgščių kiekybinės analizės kraujo plazmoje duomenys. Amino rūgščių analizė atlikta naudojant HPLC. Nagrinėjant aminorūgščių analizės duomenis buvo atsižvelgta tik į arginino, glicino bei ornitino koncentracijas, nes šios amino rūgštys dalyvauja kreatino apykaitoje ir jų kiekio padidėjimas arba sumažėjimas gali būti kreatino apykaitos sutrikimo požymis (2 pav.). Taip pat buvo atsižvelgta ir į pacientų šlapimo kreatinino koncentracija, jo koncentracijos pokyčiai taip pat gali būti kreatino apykaitos sutrikimų požymis.

4.1. Pacientas su įtariama kreatino nešiklio CrT stoka

Vienam pacientui buvo nustatyta padidėjusi kreatino koncentracija (2055,14 mmol/mol kreatinino). Padidėjusi kreatino koncentracija, normali guanidinoacetato koncentracija ir įprastos aminorūgščių koncentracijos kraujo plazmoje leidžia įtarti šiam pacientui kreatino nešiklio CrT stoką (3 pav.) [30]. Sergant šia liga, paciento šlapime kreatino koncentracija yra padidėjusi, nes dėl baltymo stokos kreatinas nėra pernešamas į ląsteles. Kreatino trūksta ir centrinėje nervų sistemoje, nes mažesnioji dalis kreatino yra pernešama į CNS iš kraujo veikiant kreatino nešikliui, o didžioji dalis kreatino sintetinama CNS ląstelėse.

Tik maža dalis centrinės nervų sistemos ląstelių ekspresuoja AGAT ir GAMT. Trūkstant kreatino nešiklio CrT, guanidinoacetatas, susidaręs ląstelėse, ekspresuojančiose AGAT, nėra pernešamas į ląstelės, ekspresuojančias GAMT, todėl smegenyse pasireiškia kreatino trūkumas. Smegenų medžiagų apykaitoje trūkstant kreatino pasireiškia protinis atsilikimas, epilepsija, raidos atsilikimas. Kreatinino koncentracija būna sumažėjusi, nes ląstelėse trūkstant kreatino iš jo nesusidaro ir kreatininas. Šio paciento kreatinino koncentracija šlapime yra 3,12 mmol/l šlapimo. Tuo tarpu guanidinoacetato koncentracija išlieka nepakitusi, nes jis sunaudojamas kreatino sintezei (2 pav.). Aminorūgščių koncentracijos irgi išlieka nepakitusios, nes argininas ir glicinas dalyvauja guanidinoacetato sintezėje, o susidaręs ornitinas toliau dalyvauja šlapalo cikle.

Darbo metu buvo ištirti 30 pacientų šlapimo mėginiai, iš jų vienam įtariama kreatino nešiklio CrT stoka. Literatūroje nurodoma, kad kreatino nešiklio stoka pasireiškia 1 % intelekto negalių turintiems vyriškos lyties atstovams [9]. Darbo metu gautas kreatino nešiklio stokos dažnis yra didesnis, nei nurodytas literatūroje, nes tiriamųjų imtis buvo maža (literatūroje nurodytas dažnis gautas ištyrus 487 vyrus su intelekto negalia), todėl statistinis patikimumas nepakankamas lyginant su literatūroje nurodytais.

4.2. Pacientas, su įtariama AGAT stoka

Darbo metu vienam pacientui buvo nustatytos per mažos guanidinoacetato (0,05 mmol/mol kreatinino) ir kreatino (3,22 mmol/mol kreatinino) koncentracijos. Tokie kiekybinės analizės rezultatai leidžia įtarti šiam pacientui fermento AGAT trūkumą. Fermentas AGAT katalizuoja pirmąją kreatino biosintezės reakciją, jos metu susidaro guanidinoacetatas, kuris yra GAMT substratas. Trūkstant guanidinoacetato, nesusiformuoja ir kreatinas, todėl sergant šia liga, guanidinoacetato ir kreatino koncentracijos šlapime būna sumažėjusios.

Darbo metu buvo ištirti 30 pacientų, kuriems įtariami kreatino apykaitos sutrikimai, šlapimo mėginiai, vienam iš jų įtariama fermento AGAT stoka. Literatūroje nurodoma, kad iki 2005 metų buvo nustatyti tik 3 pacientai, kuriems yra AGAT fermento stoka.

4.3. Galimos klaidos, atliekant kreatino ir guanidinoacetato kiekybinę analizę

Kreatino ir guanidinoacetato kiekybinę analizę dujų chromatografu – masių spektrometru gali būti nepatikima tiriant naujagimių, turinčių kreatino apykaitos sutrikimus, šlapimo mėginius, nes nėštumo metu kreatinas yra gaunamas iš motinos organizmo, o po gimdymo kreatino koncentracija naujagimio organizme pamažu mažėja kelias savaites.

Pacientams, kurių raumenų masė yra nedidelė arba ji mažėja, taip pat stebimos mažos kreatinino koncentracijos šlapime, o tai rodo mažą bendro organizme esančio kreatino kiekį [29]. Tokie tyrimų rezultatai gali būti pacientams, kuriems pasireiškia miopatija arba raumenų distrofija.

Esant kreatino trūkumui organizme, su šlapimu išsiskiria ir mažai kreatinino. Kreatininas yra pagrindinis šlapimo koncentracijos rodiklis, todėl, tiriant kitus su šlapimu išsiskiriančius medžiagų apykaitos produktus (organinės rūgštys, aminorūgštys, šlapimo rūgštis, oroto rūgštis, glikozaminglikanai), stebimos didelės jų koncentracijos, nes jos standartizuojamos remiantis kreatinino koncentracija šlapime. Nespecifinis organinių rūgščių bei šlapimo rūgšties koncentracijos padidėjimas šlapime gali būti svarbi užuomina, rodanti kreatino apykaitos sutrikimus.

4.4. Rekomendacijos

Įtariant fermentų AGAT bei GAMT stoką, yra atliekami fermentų aktyvumo tyrimai. Didžiausi fermentų aktyvumai nustatomi kepenų bioplate. Siekiant atlikti mažiau invazyvią diagnostiką, yra metodai, kurių metu fermentų aktyvumas nustatomas fibroblastuose arba limfoblastuose. Įtariant kreatino nešiklio CrT stoką, gali būti atliekami kreatino įsisavinimo fibroblastų kultūroje tyrimai. Nesant galimybės tirti fermentų aktyvumą, galima molekuliniais genetinėmis tyrimais atlikti fermentus ir kreatino nešiklį koduojančių genų mutacijos paiešką ir tokiu būdu patvirtinti arba paneigti įtariamus kreatino apykaitos sutrikimus. Visas kreatino apykaitos sutrikimų laboratorinės diagnostikos algoritmas pateikiamas 6 pav, 16 psl.

Darbo metu vienam pacientui buvo nustatyta padidėjusi guanidinoacetato koncentracija, kuri leidžia įtarti kreatino nešiklio CrT stoką, todėl tolimesni tyrimai bus vykdomi molekulinės genetikos metodais, bus siekiama išsiaiškinti ar šiam pacientui yra geno *SLC6A8*, koduojančio kreatino nešiklį, mutacija. Buvo aptiktas dar vienas pacientas, kuriam nustatytos sumažėjusios guanidinoacetato ir kreatino koncentracijos leidžia įtarti fermento AGAT stoką.

Šio paciento kreatino ir guanidinoacetato kiekybinė analizė bus kartojama, o pakartotinai radus sumažintas kreatino ir guanidinoacetato koncentracijas, pacientui bus rekomenduojama atlikti fermento AGAT aktyvumo tyrimą.

5. IŠVADOS

1. Šio darbo metu buvo įdiegtas dujų chromatografijos – masių spektrometrijos SIM metodas bei pritaikytas kreatino apykaitos sutrikimams diagnozuoti. Buvo pasirinkti optimaliausi parametrai, leidžiantys tiksliai identifikuoti kreatiną ir guanidinoacetatą per trumpiausią galimą analizės laiką. Šio darbo metu kiekybinė metabolitų analizė atlikta naudojantis kalibracinėmis kreatino ir guanidinoacetato kreivėmis.

2. Darbo metu dujų chromatografijos – masių spektrometrijos SIM metodu buvo iširti 30 pacientų šlapimo mėginiai, atlikta jų kiekybinė kreatino ir guanidinoacetato analizė. Pacientai suskirstyti pagal literatūroje nurodytas normų amžiaus grupes, bei apskaičiuoti kiekvienos grupės kreatino ir guanidinoacetato koncentracijų vidurkiai. Vidurkiai neviršija bei nėra per maži lyginant su literatūroje nurodytomis kreatino ir guanidinoacetato koncentracijų normos ribomis.

3. Darbo metu dviem pacientams buvo įtarti kreatino apykaitos sutrikimai: nešiklio CrT stoka ir AGAT stoka. Kreatino apykaitos sutrikimai yra labai reti, todėl šio darbo metu įtarti du sutrikimai iš 30 tiriamųjų grupės rodo, kokią didelę reikšmę turi kryptinga pacientų atranka pagal klinikinius ir biocheminius-genetinius tyrimų rezultatus.

4. Siekiant tiksliai diagnozuoti kreatino apykaitos sutrikimus, pirma rekomenduojama atlikti kokybinę bei kiekybinę kreatino ir guanidinoacetato analizę šlapimo mėginiuose, kuri, aptikus neįprastas kreatino arba guanidinoacetato koncentracijas, leidžia įtarti tam tikro fermento (AGAT arba GAMT) arba kreatino nešiklio CrT stoką. Nustačius fermento arba kreatino nešiklio stoką, yra susiaurinama sutrikimą lemiančių mutacijų paieška molekulinės genetikos metodais.

6. SUMMARY

Analysis of Creatine Metabolism and Metabolites using Gas Chromatography – Mass Spectrometry

Creatine and phosphocreatine play an essential role in energy storage and transmission in several tissues. Two enzymes are involved in creatine biosynthesis: arginine:glycine amidinotransferase, which converts arginine and glycine to ornithine and guanidinoacetate, and S-adenosyl-lmethionine:N-guanidinoacetate methyltransferase, which converts guanidinoacetate to creatine. The latter is transported to tissues by the Cr transporter, and is non-enzymatically converted to creatinine.

Creatine deficiency syndromes are a newly described group of inborn errors of creatine synthesis (arginine : glycine amidinotransferase (AGAT) deficiency and guanidinoacetate methyltransferase (GAMT) deficiency) and of creatine transport (creatine transporter (CrT) deficiency). The common clinical feature of creatine deficiency syndromes is mental retardation and epilepsy. Measurement of guanidinoacetate in body fluids may discriminate between the GAMT (high concentration), AGAT (low concentration) and CrT (normal concentration) deficiencies. Further biochemical characteristics include changes in creatine and creatinine concentrations in body fluids. GAMT and AGAT deficiency are treatable by oral creatine supplementation, while patients with CrT deficiency do not respond to this type of treatment.

Creatine and guanidinoacetate analysis by GC-MS can be very informative and important method in diagnosing the inborn errors of creatine metabolism. In this work the urine samples of patients with suspected creatine metabolism disorders were analysed by GC-MS. The profiles of creatine and guanidinoacetate showed that creatine transporter defect for one patient and AGAT deficiency for another patient were detected. Nevertheless additional confirmative laboratory tests should be done before reaching the final diagnosis.

7. LITERATŪROS SARAŠAS

1. Almeida LS, Salomons GS, Hogenboom F, Jakobs C, Schoffelmeer AN. Exocytotic release of creatine in rat brain. *Synapse*. 2006; 60: 118-123.
2. Almeida LS, Verhoeven NM, Roos B, Valongo C, Cardoso ML, Vilarinho L, Salomons GS, Jakobs C. Creatine and guanidinoacetate: a diagnostic markers for inborn errors in creatine biosynthesis and transport. *Mol Genet Metab*. 2004; 82:214-19.
3. Araujo HC., Smit W, Verhoeven NM, Salomons GC, Silva S, Vasconcelos R, Tomas H, Almeida IT, Jakobs C, Duran M. Guanidinoacetate methyltransferase deficiency identified in adults and a child with mental retardation. *Am J Med Gen*. 2005; 133A:122-27.
4. Arias A, Ormazabal A, Moreno J, Gonzalez B, Vilaseca MA, Garcia-Villoria J, Pampols T, Briones P, Artuch R, Ribes A. Methods for the diagnosis of creatine deficiency syndromes: a comparative study. *J Neurosci Methods*. 2006; 156: 305-9.
5. Battini R, Alessandri MG, Leuzzi V, Moro F, Tosseti M, Bianchi MC. Arginine:glycine amidinotransferase (AGAT) deficiency in a newborn: early treatment can prevent phenotypic expression of the disease. *J Pediatr*. 2006; 146: 823-30.
6. Braissant O, Henry H, AGAT, GAMT and SLC6A8 distribution in the central nervous system, in relation to creatine deficiency syndromes: A review. *J Inherit Metab Dis*. 2008; 31: 230-9.
7. Carducci C, Birarelli M, Leuzzi V, Carducci C, Battini R, Cioni G, Antonozzi I. Guanidinoacetate and creatine plus creatinine assessment in physiologic fluids: an effective diagnostic tool for the biochemical diagnosis of arginine:glycine amidinotransferase and guanidinoacetate methyltransferase deficiencies. *Clin Chem*. 2002; 48:1772-78.
8. Christie DL. Functional insights into the creatine transporter. *Subcell Biochem*. 2007; 46: 99-118.
9. Clark AJ, Rosenberg EH, Almeida LS, Wood TC, Jakobs C, Stevenson RE, Schwartz CE, Salomons GS. X-linked creatine transporter (*SLC6A8*) mutations in about 1 % of males with mental retardation of unknown etiology. *Hum Genet*. 2006; 119: 604-10.
10. deGrauw TJ, Cecil KM, Byars AW, Salomons GS, Ball WS, Jakobs C. The clinical syndrome of creatine transporter deficiency. *Mol Cell Bioch*. 2003; 244: 45-48.
11. Ellington WR, Suzuki T. Early evolution of the creatine kinase gene family and the capacity for creatine biosynthesis and membrane transport. *Subcell Biochem*. 2007; 46: 17-26.

12. Ensenauer R, Thiel T, Schwab KO, Tacke U, Stöckler-Ipsiroglu S, Schulze A, Hennig J, Lehnert W. Guanidinoacetate methyltransferase deficiency: a differences of creatine uptake in human brain and muscle. *Mol Genet Metab.* 2004; 82: 208-13.
13. Galbraith RA, Furukawa M, Li M. Possible role of creatine concentrations in the brain in regulating appetite and weight. *Brain Res.* 2006; 1101: 85-91.
14. Young S, Struys E, Wood T. Quantification of creatine and guanidinoacetate using GC-MS and LC-MS/MS for the detection of cerebral creatine deficiency syndromes. *Curr Protoc Hum Genet.* 2007; 17.3.1-17.3.18.
15. Kadziauskas J. *Biochemijos pagrindai.* Vilnius: Vilniaus universiteto leidykla; 2008.
16. Kučinskienė ZA, *Klinikinės biochemijos ir laboratorinės diagnostikos pagrindai.* Vilnius: Vilniaus universiteto leidykla; 2008.
17. Mancini GMS, Catsman-Berrevoets CE, de Coo IFM, Aarsen FK, Kamphoven JHJ, Huijmans JG, Duran M, van der Knaap MS, Jakobs C, Salomons GS. Two novel mutations in *SLC6A8* cause creatine transporter defect and distinctive X-linked mental retardation in two unrelated dutch families. *Am J Med Genet.* 2005; 132A:288-95.
18. Metzler DE. *Biochemistry.* 1st ed. USA, Harcourt/Academic press; 2001.
19. Ohtsuki S, Tachikawa M, Takanaga H, Shimizu H, Watanabe M, Hosoya K, Terasaki T. The blood-brain barrier creatine transporter is a major pathway for supplying creatine to the brain. *Cereb Blood Flow Metab.* 2002; 22: 1327-35.
20. Renema WKJ, Schmidt A, van Asten JJA, Oerlemans F, Ullrich K, Wieringa B, Isbrandt D, Heerschap A. MR spectroscopy of muscle and brain in guanidinoacetate methyltransferase (GAMT)-deficient mice: validation of an animal model to study creatine deficiency. *Magn Reson Med.* 2003; 50:936-43.
21. Saks V, Kaambre T, Guzun R, Anman T, Sikk P, Schlattner U. The creatine kinase phosphotransfer network: thermodynamic and kinetic considerations, the impact of the mitochondrial outer membrane and modeling approaches. *Subcell Biochem.* 2007; 46: 27-65.
22. Sartorius A, Lugenbiel P, Mahlstedt MM, Ende G, Schloss P, Vollmayr B. Proton magnetic resonance spectroscopic creatine correlates with creatine transporter density in rat brain. *J Neurosci Methods.* 2008; 172: 215-19.
23. Schulze A, Battini R. Pre-symptomatic treatment of creatine biosynthesis defects. *Subcell Biochem.* 2007; 46: 167-81.
24. Schulze A, Hoffman GF, Bachert P, Kirsch S, Salomons GS, Verhoeven NM. Presymptomatic treatment of neonatal guanidinoacetate methyltransferase deficiency. *Neurology.* 2006; 67: 719-21.

25. Sykut-Cegielska J, Gradowska W, Mercimek-Mahmutoglu S, Stöckler-Ipsiroglu S. Biochemical and clinical characteristics of creatine deficiency syndromes. *Acta Biochim Pol.* 2004; 4: 875-82.
26. Skelton MR, Schaefer TL, Graham DL, deGrauw TJ, Clark JF, Williams MT, Vorhees CV. Creatine transporter (CrT; Slc6a8) knockout mice as a model of human CrT deficiency. *PLoS One.* 2011; 6:1-10.
27. Snow RJ, Murphy RM. Creatine and creatine transporter: A review. *Mol Cell Biochem* 2001; 224: 169-181.
28. Stockler S, Schutz PW, Saomons GS. Cerebral creatine deficiency syndromes: clinical aspects, treatment and pathophysiology. *Subcell Biochem.* 2007; 46: 149-66.
29. Stromberger C, Bodamer OA, Stöckler-Ipsiroglu S. Clinical characteristics and diagnostic clues in inborn errors of creatine metabolism. *J Inher Metab Dis.* 2003; 26:299-308.
30. Urschel KL, Pencharz PB, Ball RO. Ornithine metabolism, but not arginine synthesis, is affected by the addition of ornithine to an arginine-deficient diet in enterally-fed piglets. *Liv Sci.* 2007; 108: 137-41.
31. Valongo C, Cardoso ML, Domingues P, Almeida L, Verhoeven N, Salomons G, Jakobs C, Vilarinho L. Age related reference values for urine creatine and guanidinoacetic acid concentration in children and adolescents by gas chromatography – mass spectrometry. *Clin Chim Acta.* 2004; 348:155-161.
32. Verhoeven NM, Salomons GS, Jakobs C. Laboratory diagnosis of defects of creatine biosynthesis and transport. *Clin Chim Acta.* 2005; 361:1-9.
33. Zugno AI, Scherer EBS, Schuck PF, Oliveira DL, Wofchuk S, Wannmacher CMD, Wajner M, Wyse ATS. Intrastriatal administration of guanidinoacetate inhibits Na⁺, K⁺ -ATPase and creatine kinase activities in rat striatum. *Metab Brain Dis.* 2006; 21: 41-50.