

## ANALÝZA NUKLEOTIDŮ V KREVNÍCH SKVRNÁCH

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

## Úvod

Nukleotidy patří mezi biologicky významné nízkomolekulární látky, poruchy jejich metabolismu mohou způsobit vážné zdravotní postižení pacienta. Některé dědičné poruchy metabolismu nukleotidů je možné rozpoznat jejich analýzou v krevních skvrnách.

V předkládané práci je popsána metoda stanovení nukleotidů v krevních skvrnách kapilární elektroforézou. Jde o novou aplikaci metody analýzy nukleotidů v erythrocytech<sup>1</sup>. Popisovaná metoda stanovení nukleotidů v krevních skvrnách byla aplikována na vzorky simulující některé dědičné metabolické poruchy, pro jejichž screening by ji bylo možné využít.

## Experimentální část

Použité chemikálie byly analytické čistoty. Chemikálie byly zakoupeny od Sigma (St. Louis, USA), mimo diethylether, který pocházel od Lach-Ner (Neratovice, ČR).

Vzorky byly analyzovány na kapilární elektroforéze skládající se z křemenné kapiláry (75  $\mu$ m, 90 / 97 cm), UV

detektoru (Jasco, Tokio, Japonsko) a zdroje vysokého napětí (Spellman, New York, USA). Ke zpracování dat byl použit software Clarity (DataApex).

Separční pufr se skládal z 50mM kyseliny citronové a 0,8mM CTAB (cetyltrimethylammonium bromid), pH bylo upraveno na 4,3 kyselinou  $\gamma$ -aminomáselnou.

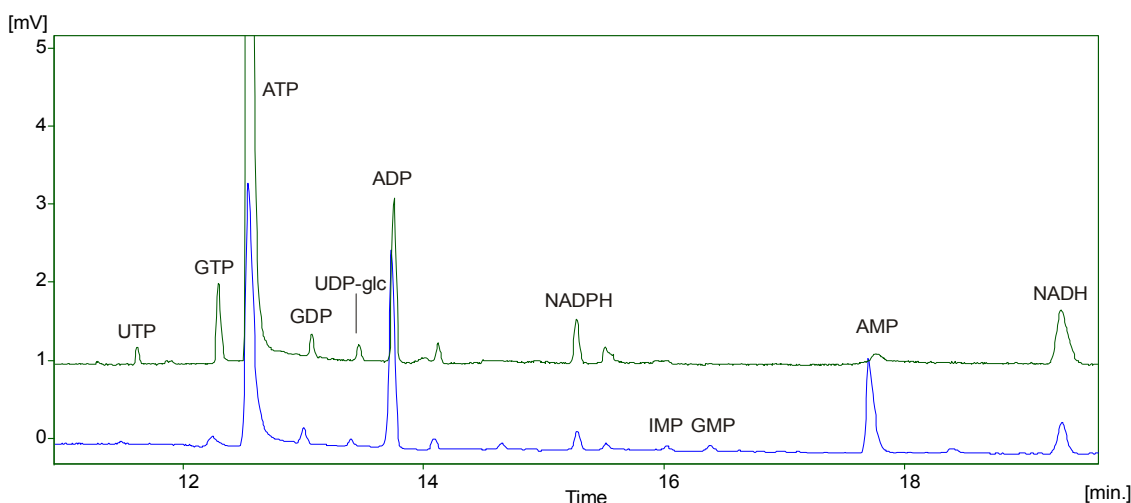
Vzorky byly připraveny z nesrážlivé krve. 40  $\mu$ l krve bylo nanášeno na kroužek vyznačený na krevním papírku, po zaschnutí byl kroužek vystřížen a extrahován 200  $\mu$ l vody (2 min, sonikováno). Extrakty (příp. vzorky čerstvé krve) byly deproteinovány 1M kyselinou trichloroctovou (TCA), centrifugovány (1 min, 7800 g) a nadbytečná TCA byla extrahována diethyletherem. Takto připravené vzorky byly skladovány při  $-20$  °C.

Při simulaci metabolických poruch byly erythrocyty inkubovány 4 h při 37 °C v DMEM (Eaglovo médium

Tabulka I

Relativní směrodatné odchylky ploch

RSD v sérii [%]		RSD mezi dny [%]	
GTP	13,19	GTP	12,63
ATP	4,83	ATP	3,09
GDP	6,25	GDP	5,28
UDP-glc	43,18	UDP-glc	39,74
ADP	5,67	ADP	4,20
NADP	9,22	NADP	7,52
AMP	7,58	AMP	4,87
NAD	7,21	NAD	7,28



Obr. 1. Elektroferogramy vzorku čerstvé krve (zelená) a krevní skvrny (modrá)

modifikované podle Dulbecca) s nukleosidy (5-aminoimidazol-4-karboxamidribosid AICAR, 2'-deoxyadenosin dAR, inosin HR, 2'-deoxyinosin dHR, 2'-deoxyguanosin dGR).

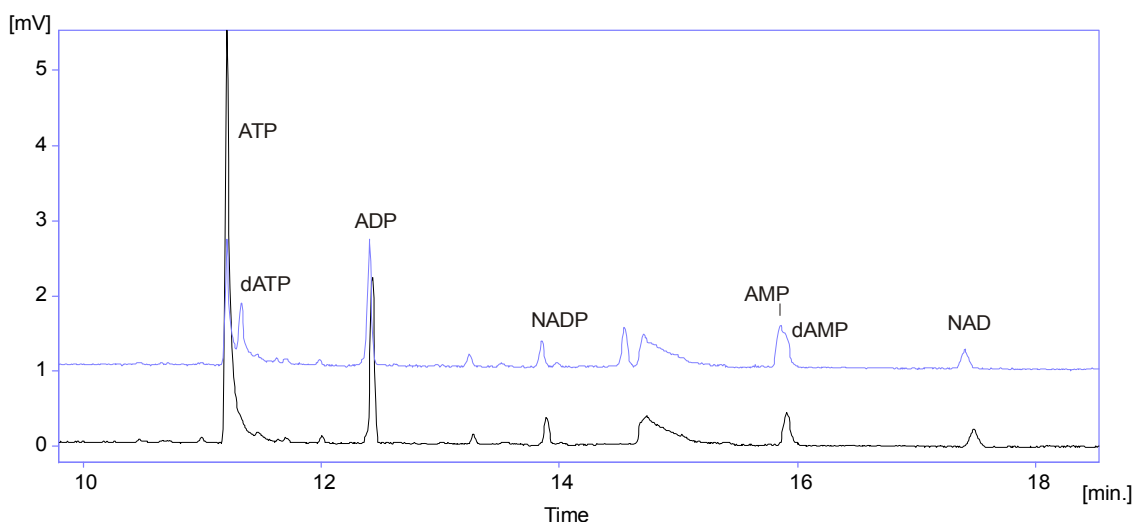
Hydrostatické dávkování vzorku bylo prováděno manuálně. Separace probíhala při napětí 24 kV, při laboratorní teplotě. Analyty byly detegovány fotometricky při 255 nm. Na začátku dne byla kapilára proplachována 0,1M-NaOH, 0,1M-HCl, 0,1M-SDS (dodecylsulfát sodný) a separačním pufrem, mezi měřeními pouze pufrem.

## Výsledky a diskuse

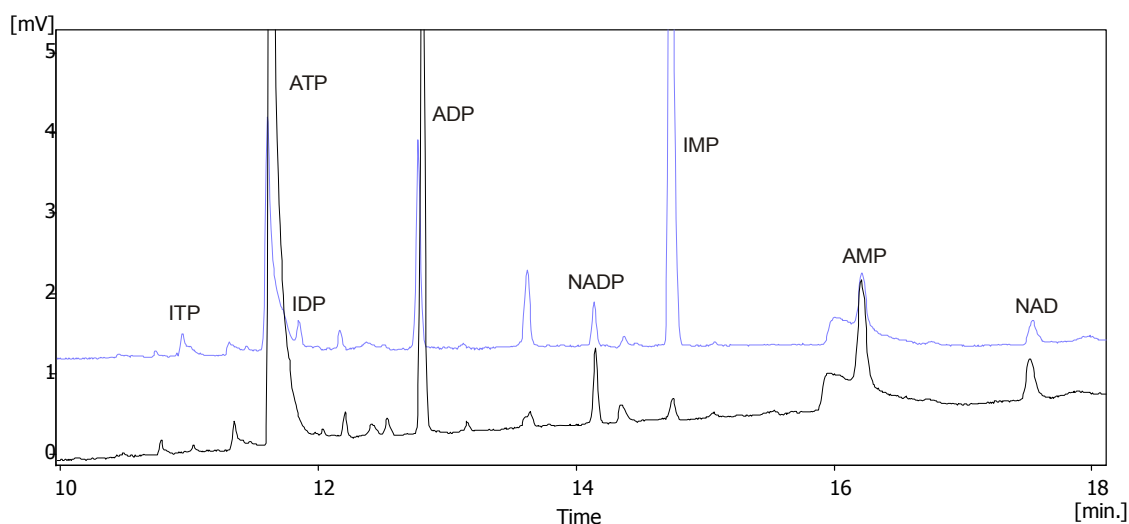
V krevních skvrnách dochází oproti čerstvé krvi ke snížení obsahu nukleosidtrifosfátů a zvýšení nukleosidmonofosfátů. Celkově jsou profily měřených nukleotidů srovnatelné (obr. 1).

Nukleotidy v krevní skvrně jsou relativně stálé. Nedochozí k významné změně během 5 dnů při laboratorní teplotě, srovnatelný profil bylo možno získat po 27 měsících při  $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Linearita, limit detekce a návratnost byly stanoveny pro UTP a IMP. Metoda je lineární v rozsahu 25 až



Obr. 2. Inkubace s dAR (modrá). Po inkubaci je patrná přítomnost deoxyATP a pravděpodobně deoxyAMP; černá linie – kontrola



Obr. 3. Inkubace s HR (modrá). Oproti kontrole (černá) došlo k výraznému zvýšení obsahu IMP a ITP, patrný je i IDP

1000  $\mu\text{mol l}^{-1}$  ( $R^2 = 0,997$  pro UTP a 0,992 pro IMP). Limit detekce je 1,2  $\mu\text{mol l}^{-1}$ . Návratnost byla  $43,8 \pm 4,5 \%$  pro UTP a  $34,1 \pm 3,9 \%$  pro IMP. Vyšší návratnosti ( $89,8 \pm 10,5 \%$  celkových adeninových nukleotidů) bylo dosaženo při extrakci 400  $\mu\text{l}$  vody (15 s vortex, 45 s sonikováno).

Relativní směrodatné odchylky migračních časů jsou pod 3 % mezi vzorky, do 2 % v sérii a pod 5 % mezi různými dny. Relativní odchylky ploch píků jsou uvedeny v tab. I.

Při inkubaci byly nukleosidy transportovány do červených krvinek a konvertovány na příslušné nukleotidy. Získané elektroferogramy simulovaly obsah nukleotidů při deficitu adenosin deaminasy (inkubace s dAR, obr. 2), purin-nukleosid fosforylasy (dHR, dGR), AICAR transformylasy – IMP cyklohydrolasy (AICAR) nebo ITPasy (HR, obr. 3).

## 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, metodu by proto bylo možné využít při screeningu dědičných metabolických poruch.

## LITERATURA

1. Friedecký D., Tomková J., Maier V., Janost'áková A., Procházka M., Adam T.: *Electrophoresis* 28, 373 (2007).