



Tartu Ülikooli Kliinikum
Geneetika ja personaalmeditsiini kliinik

Kreatiini ja guanidinoatsetaadi määramine uriinis vedelikkromatograafia-tandemmassispektromeetria meetodil

Magistritöö

Üliõpilane: Erki Sala

Juhendaja: Jekaterina Mazina-Šinkar, Tallinna Tehnikaülikool, Keemia ja biotehnoloogia instituut,
Nooremprofessor

Kaasjuhendaja: Mihkel Ilisson, Tartu Ülikooli Geneetika ja personaalmeditsiini kliinikum,
laborispetsialist

Õppekava: YASM 23/24 - Rakenduskeemia ja Geenitehnoloogia



Tartu Ülikooli Kliinikum
Geneetika ja personaalmeditsiini kliinik

Determination of creatine and guanidinoacetate in urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry

Master's thesis

Student: Erki Sala

Supervisor: Jekaterina Mazina-Šinkar, Tallinna Tehnikaülikool, Keemia ja biotehnoloogia instituut,
assistant professor

Co-supervisor: Mihkel Ilisson, Tartu Ülikooli Geneetika ja personaalmeditsiini kliinikum,
laboratory specialist

Curriculum: YASM 23/24 – Applied Chemistry and Gene Technology

Tallinn 2024

Autorideklaratsioon

Kinnitan, et olen koostanud antud lõputöö iseseisvalt ning seda ei ole kellegi teise poolt varem kaitsmisele esitatud. Kõik töö koostamisel kasutatud teiste autorite tööd, olulised seisukohad, kirjandusallikatest ja mujalt pärinevad andmed on töös viidatud.

Autor: Erki Sala
[allkiri ja kuupäev]

Töö vastab magistritööle esitatavatele nõuetele.
Juhendaja: Jekaterina Mazina-Šinkar
[allkiri ja kuupäev]

Töö on lubatud kaitsmisele.
Kaitsmiskomisjoni esimees:
[allkiri ja kuupäev]

ANNOTATSIOON

Kreatiini defitsiitsus sündroomid on küllaltki uus rühm pärilikke ainevahetushaigusi, mis kuuluvad harvikaiguste rühma. Grupi esinemissagedus on kuni 1:1292 vastsündinu kohta. Haiguste kliiniline pilt avaldub väga varieeruvalt ja haigused võivad avalduda juba vastsündinu aga ka palju hilisemas eas. Haigused võivad tekitada neuroloogilisele arengule pöördumatut kahju. Haiged omakorda vajavad mitmekülgset abi ja hoold, koormates seetõttu pikka aega perekonda kui ka riiki. Kuna mitmeid kaasasündinud ainevahetushaiguseid on võimalik kontrolli all hoida või selle haige sümptomaatikat leevendada asendusraviga on sõeluuringute teostamise vajadus selle rühma haigustele kasvanud.

Tänaseks päevaks on üha enam hakatud teostama sõeluuringuid ainevahetushaigustele. Ühelt poolt mängib selles osas diagnostiliste testide kättesaadavuse paranemine ja teiselt poolt on tõusnud raviarstide teadlikus pakutavatest võimalustest. Kiire areng massispektromeetria meetodikate valdkonnas ja selle meetodika kättesaadavuse tõus on oluliselt parandanud ainevahetushaiguste testimise võimalusi. Vedelikkromatograafia-tandemmassispektromeetria meetod võimaldab keerulistest maatriksitest väga täpselt määrata ka väga madalates kontsentratsioonides analüüte. Uriinis kreatiini ja guanidinoatsetaadi määramist vedelikkromatograafia-tandemmassispektromeetria meetodiga kasutatakse kreatiini defitsiitsus sündroomide (AGAT, GAMT, CRTR) tuvastamiseks.

Käesoleva magistri lõputöö eesmärk oli modifitseerida kirjanduses kirjeldatud kreatiini ja guanodinoatsetaadi määramise meetodika Tartu geneetika ja personaalmeditsiini kliiniku ainevahetuslaboris kasutusel olevale vedelikkromatograafia-tandemmassispektromeetria seadmele, viia läbi valideerimine ja veenduda, et laboris loodud meetod on Euroopa raviameti 2022 aasta kehtestatud nõuete kohane.

Töö käigus hinnati vedelikkromatograafia-tandemmassispektromeetria meetodi usaldusväärsust ja tulemuslikkust hinnates rahvusvaheliste ERNDIM kontrollproovidega saadud mõõtetulemusi. Laboris teostatud mõõtetulemustest võib järeldada, et kasutusele võetud meetod on efektiivne ja usaldusväärne. Kuid meetod vajab kliinilise valideerimise läbiviimist, mida tuleks tulevikus täiendavalt uurida.

Eestis haiguste täpsete esinemissageduste kohta andmed puuduvad kuna uuring ei ole osa riiklikus sõeluuringute programmis. Leiame, et esimene samm selle uuringu sõeluuringute programmi lisamiseks on tehtud. Kokkuvõttes töö käigus loodi uus meetod ja verifitseeriti, et rakendatav meetodika on uriini kreatiini ja guanodinoatsetaadi määramiseks rakendatav.

ABSTRACT

Creatine deficiency syndromes are a fairly new group of inherited metabolic diseases that belong to the group of rare diseases. The frequency of the group is up to 1:292 per newborn. The clinical picture of the diseases is very variable, and the diseases can appear in the newborn or at a much later age. Diseases can cause irreversible damage to neurological development. The sick, in turn, need multifaceted help and care, therefore burdening the family and the state for a long time. Since many inborn metabolic diseases can be controlled or the symptoms of this disease can be alleviated with replacement therapy, the need to perform screening tests for this group of diseases has increased.

Screening for metabolic diseases has increased in time. The improvement in the availability of diagnostic tests and the awareness of treating doctors has increased plays a role in this regard. The rapid development in the field of mass spectrometry methodologies and the increased availability of this methodology have greatly improved the possibilities of testing metabolic diseases. The LC-MS/MS method enables very precise determination of analytes even in very low concentrations from complex matrices. Determination of creatine and guanidinoacetate in urine by liquid chromatography tandem mass spectrometry method is used to help diagnose creatine deficiency syndromes (AGAT, GAMT, CRTR).

The aim of this master's thesis was to modify the methodology for determining creatine and guanidinoacetate described in the literature to the liquid chromatography-tandem mass spectrometry device used in the metabolic laboratory of the Tartu Genetics and Personal Medicine Clinic. To carry out validation and to make sure that the method created in the laboratory complies with the 2022 requirements established by the European Medicines Agency.

During the work, the reliability and performance of liquid chromatography tandem mass spectrometry method was evaluated by evaluating the measurement results obtained with international ERNDIM control samples. From the results of measurements performed in the laboratory, it can be concluded that the introduced method is effective and reliable. However, the method needs clinical validation, which should be further investigated in the future.

There are no data on the exact frequency of diseases in Estonia, as the study is not part of the national screening program. We consider that the first step to include this study in the screening program has been taken. In summary, during the work, a new method was created and it was verified that the applied methodology is applicable for the determination of urinary creatine and guanidinoacetate.

SISUKORD

Autorideklaratsioon.....	3
ANNOTATSIOON	4
ABSTRACT	5
SISUKORD	6
LÜHENDID.....	8
SISSEJUHATUS.....	9
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	11
a. Kreatiini biosüntees ja transport kudedesse	12
b. Kreatiini defitsiitsus sündroomid.....	13
c. Ravi	19
d. Tsentraalsed markerid	20
e. Kliinilise diagnostikas kasutatavad meetodid	22
f. Analüütilised meetodid kreatiini ja guanidinoatsetaadi määramiseks	24
g. Valideerimine	26
2. EESMÄRK	30
3. MATERJALID JA MEETODID.....	31
a. Kasutatud aparatuur	31
b. Kasutatud reagentid	31
c. Kasutatud tarvikud	31
d. Sisestandardi lahuste valmistamine	32
e. Kalibraatorite valmistamine	32
f. Kontrolliproovide valmistamine	32
g. Uriini lahenduslahuste valmistamine	33
h. Töölahuste valmistamine.....	33
i. Proovimaterjalide ettevalmistamine	33
j. Vedelikkromatograafia ja massispektromeetria parameetrid.....	34
4. TULEMUSED JA ARUTELU	36
5. KOKKUVÕTE	41
6. SUMMARY	42
7. KASUTATUD KIRJANDUS	43

8. TÄNUAVALDUSED	49
9. LISAD	50

LÜHENDID

ADP - adenosiindifosfaat

AGAT - L-arginiin:glütsiini amidinotransferaas

ASL - argininosuktsinaadi lüaas

ASS - argininosuktsinaadi süntetaas

CDS – kreatiini defitsiitsus sündroom (ingl *Creatine Deficiency Syndrome*)

CK – kreatiini kinaas

Crea - kreatiniin

CRTR - kreatiini transportvalk

DD – arengupeetus (ingl *developmental delay*)

ERNDIM - Pärilike ainevahetushaiguste Euroopa välise kvaliteedi kontrolli organisatsioon (ingl *European Research Network for Evaluation and Improvement of Screening, Diagnosis and Treatment of Inherited Disorders of Metabolism*)

ESI - elektropihustusionisatsioon (ingl *electrospray ionization*)

GA – guanidinoatsetaat

GAMT - guanidinoatsetaadi metüültransferaas

GCMS – gaaskromatograaf-massispektromeetria

¹H-MRS – prooton magnetresonants-spektroskoopia

HHH - hüperornitineemia-hüperammoneemia-homotsitrullinuuria (ingl *hyperornithinemia-hyperammonemia-homocitrullinuria*)

HPLS-FL - Kõrgsurvevedelikkromatograaf fluoretsents detektoriga

ID - intellektipuu (ingl *intellectual disability*)

IDD – Intellektuaalseid arenguhäireid (ingl *intellectual developmental disorders*)

Kr – kreatiin

LC/APCI-MS - vedelikkromatograaf-atmosfäärirõhuline keemiline ionisatsioon massispektromeetria

LC-MS/MS – vedelikkromatograafia-tandemmassispektromeetria

LDT – labori loodud testid (ingl *laboratory developed test*)

MR – vaimne alaareng (ingl *mental retardation*)

LPI - lüsinuuriline valgu talumatus (ingl *lysinuric protein intolerance*)

PC - pürovaadi karboksülaas

P5CS - pürroliin-5-karbokülaasi süntetaas (ingl *Δ-1-pyrroline-5-carboxylate synthetase*)

OAT - ornitiini aminotransferaas

OTC - ornitiini transkarbamülaas

XLID – X kromosoomi liitelise (pärandumise) vormiga intellektipuu (ingl *X-linked intellectual disability*)

SISSEJUHATUS

Kõigile Eestis sündinud vastsündinuile pakutakse sõeluuringut 21 erineva kaasündinud haiguse suhtes. Sõeluuringute eesmärk on võimalikult varakult avastada teatud pärilikud või kaasündinud haigused, mis tähelepanuta jätmisel võivad lapse tervist või arengut kahjustada. Tõenäosus, et sündival lapsel on mõni pärilik või kaasündinud haigus, on 3–4%. Ühe osa nendest haigustest moodustavad pärilikud ainevahetushaigused, mille korral häirub geenidefekti tõttu mõne valgu, suhkru, rasvhappe või keemilise aine tootmine, lammutamine või funktsioon organismis, põhjustades seeläbi lapsel erinevaid tervise- või arenguprobleeme (A).

Kreatiini defitsiitsuse sündroomid (CDS) on küllaltki uus grupp pärilikke ainevahetushaigusi, mida kirjeldati emakordselt viimasel sajandivahetusel (1994-2001). Haigestumise korral on häirunud kreatiini (Kr) ja guanidinoatsetaadi (kreatiini eelasmolekul; GA) biosüntees või kreatiini transport kudedesse. Kreatiin on kehas üldlevinud mitte-valk aminohape, mida sünteesitakse peamiselt maksas, neerudes ja pankreases ning vähesel määral ajus ja testistes (Bonilla 2001). Inimese keha toodab endogeenselt umbes 1 g kreatiini päevas ja umbes sama palju omandab seda toidu kaudu. Toidus (liha, õline kala) leiduv kreatiin pidurdab endogeenset sünteesi (Carling 2008). Kreatiin ja tema fosforüleeritud vorm (PKr) omavad organismis kriitilist ja kesket rolli adenosiintrifosfaadi (ATP) kontsentratsioonide säilitamisel suure energiavajadusega kudedes nagu skeletilihastes, südames ja ajus (Wallimann 2011). Kõrvalekalded põhjustavad funktsionaalseid häireid kudedes, mis väljenduvad erinevate haigustena – peamiselt intellektipuude näol. Haiguseid on seetõttu hakatud nimetatud tserebraalseteks kreatiini defitsiitsus sündroomideks (Salazar 2020).

Sõeluurimiseta ei ole võimalik haigusi õigeaegselt diagnoosida, kuna varased haigustunnused sageli puuduvad või on vähemärgatavad. Selleks ajaks, kui ilmneb lapse arengu mahajäämus või muu terviseprobleem, mille alusel arst saab antud haigust kahtlustada, on kahjuks juba tekkinud ka tervisekahjustus, mida sageli ei ole võimalik hilisema raviga enam muuta (A). Haigustest tulenevaid terviseprobleeme on võimalik ära hoida, leevendada vaid juhul, kui leiame üles ravi vajavad lapsed enne haigussümptomite teket usaldusväärsete uuringutega.

Uue *in vitro* diagnostika meditsiiniseadmete määrusega (2017/746/EL) (ingl *In-vitro Diagnostic Medical Devices Regulation – IVDR*) viidi ELi õigusaktid kooskõlla tehnika arenguga, arstiteaduse muutustega ja õigusloome edusammudega. Uues määruses on seatud nõue, et laboris kohapeal loodud nn. *in-house* meetodite (*Laboratory developed tests*, LDT) kasutamiseks peab meetod olema valideeritud (B). Kuna kreatiini defitsiitsus sündroomide puhul on tegu harvikaigustega ja kommertsiaalset lahendust haiguste diagnoosimiseks turul ei ole, on LDTi kasutamine laboritel põhjendatud. Käesoleva uurimistöö eesmärkideks oli kohandada kirjanduses kirjeldatud meetod kreatiini ja guanidinoatsetaadi sisalduse määramiseks uriinis TÜK kasutataval seadmel - vedelikkromatograafia-tandemmassispektromeetril (LC-MS/MS) ning teostada valideerimiseks nõuetekohased mõõtekatsed.

Käesolev töö koosneb kirjanduslikust ülevaatest ning eksperimentaalsest osast. Kirjanduslikus osas antakse ülevaade kreatiini sünteesirajast, kreatiini defitsiitsus sündroomidest, haiguste raviks kasutatavaid raviskeeme, diferentsiaaldiagnostika võimalustest, vedelikkromatograafia-

tandemmassispektromeetriast, meetodika valideerimisest, kirjanduse ülevaate kreatiini ja guanidinoatsetaadi määramise meetodikatest. Eksperimentaalses osas kirjeldatakse kasutatud materjale, standardaineid, kasutatud vahendeid, standardite ja kontrollmaterjalide valmistamise protokolle, kalibreerimisgraafiku moodustamise põhimõtet, uuringumaterjali proovi ettevalmistamise ja ekstraheerimise protokolle. Lõpus kirjeldatakse saadud kreatiini ja guanidinoatsetaadi määramisel kasutatud meetodi valideerimistulemusi. Töö lõpetab arutelu, järeldused ning kokkuvõte.

1.KIRJANDUSE ÜLEVAADE

Tänaseks on teadaolevalt 91 ravitavat metabolismihäiret põhjustavat geneetilist haigust, mis võivad avalduda intellektuaalsete arenguhäiretena (Stockler-Ipsiroglu 2014). Alates 1994 aastast on kirjeldatud kahte kreatiini sünteesiahela võtmeensüümi ja üht kreatiini transportvalgu kaasasündinud viga: guanidinoatsetaat metüültransferaasne häire ehk GAMT defitsiitsus (Stöckler 1994), L-arginiin:glütsiin amidinotransferaasi põhjustatud häire ehk AGAT defitsiitsus (Item 2001) ja X-liitelise päritavusega kreatiini transportvalgu häire ehk CRTR defitsiitsus sündroom (Salomons 2001).

Intellektuaalseid arenguhäireid (IDD) iseloomustab kognitiivsete funktsioonide märkimisväärne kahjustus, limiteeritud õppimisvõime, kahanenud kohanemis võime ja piirangutega oskused. IDD-d on sagedased – moodustade 2,5% haigestunud elanikkonnast ja nendega kaasneb märkimisväärne kaashaigestumine (Stockler-Ipsiroglu 2014). Seetõttu on seda gruppi haigusi hakatud nimetama tserebraalseteks kreatiini defitsiitsus sündroomideks (Salazar jt 2020). Märkimisväärne on ka intellektipuude (ing. *intellectual disability*, ID) poolt põhjustatud koormus emotsionaalsele kannatusele ja haigustega seotud tervishoiukuludele. Seetõttu on ennetamine ja ravi olulised (Stockler-Ipsiroglu 2014). Traditsiooniliselt on IDD-d peetud muutumatuks saatuseks, kuna põhjuslikud ravimeetodid, mis võiksid IDD-d ära hoida või ümber pöörata, ei ole enamiku etioloogiate jaoks saadaval (Stockler-Ipsiroglu 2014). Kaasasündinud metabolismi haigused esindavad praegu suurimat geneetilist IDD-te rühma, mida on võimalik allutada patofüsioloogiale suunatud raviga (Stockler-Ipsiroglu 2014).

CDS-id kuuluvad harvikaiguste hulka. Euroopa Liidu tasandil defineeritakse harvikaigust kui haigust, mis esineb kuni 5 inimesel 10000st. Harvikaigusi iseloomustab väga väike esinemissagedus. Teisalt on erinevaid harvikaigusi koos vaadatuna äärmiselt palju, hinnanguliselt enam kui 7000–8000 ja seetõttu on harvikaigust põdevate inimeste arv suur (C). Harvikaigused on ühtepidi haruldased, kuid teisalt puudutavad need märkimisväärset osa rahvastikust, hinnanguliselt 6-8% populatsioonist, Eestis seega ca 100 000 inimest. Loetute hulka kuuluvad lisaks patsiendi endile ka tema pereliikmed, kelle elu on lähedase haigusest mõjutatud (C).

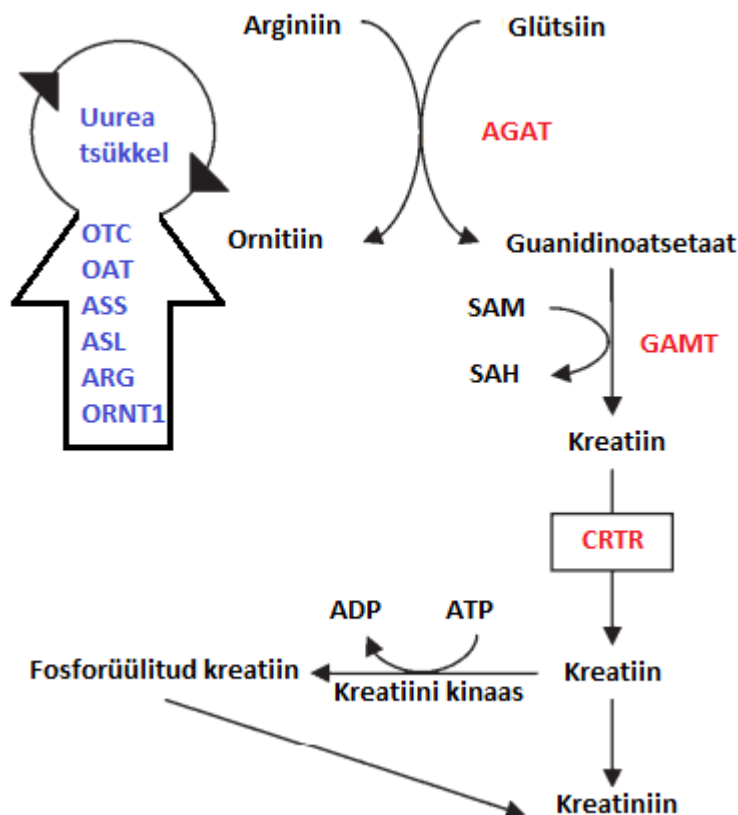
Intellektuaalpuue mõjutab arenenud riikides ligikaudu 1–3% elanikkonnast (Leonard 2002; Roeleveld 1997) ja hinnanguliselt 10–16% häiretest on X-liitelist vormi (*X-linked intellectual disability* (XLID)) (Ropers 2005). Enamiku XLID juhtude põhjusteks on mutatsioonid FMR1 geenis, mis on seotud fragiilse X sündroomiga. Sellegipoolest võib XLID tuleneda X-kromosoomi enam kui 100 erinevas geenis esinevast patogeensest mutatsioonist (Hu 2016). Teine kõige levinum XLID mutatsioonide klass FMR1 järel on SLC6A8 - kreatiini transporteris (Rosenberg 2004, Clark 2006, Salazar 2020).

Kõik CDS-id põhjustavad küllaltki ebaspetsiilist fenotüüpi, arvestades kõiki muid intellektipuuet ja globaalset arenguhäireid põhjustavaid haigusi, madal esinemissagedus, diagnostika puudumine sõeluuringu programmides ja ka haiguste uudsus on tõenäoliselt põhjusteks, miks haigused on alamääratud (Mercimek-Andrews 2022).

a. Kreatiini biosüntees ja transport kudedesse

Keha sünteesib kreatiini kolmest aminohappest: arginiin, glütsiin ja metioniin. Kreatiini süntees toimub peamiselt maksas, neerudes ja kõhunäärmes ning sellega on seotud kaks ensümaatilist etappi: (1) *L*-arginiin:glütsiinamidinotransferaas katalüüsib guanidinoatsetaadi moodustumist arginiinist ja glütsiinist; ja (2) guanidinoatsetaadi metüültransferaas katalüüsib kreatiini (Kr) moodustumist GA-st ja *S*-adenosüülmetioniinist (Stockler-Ipsiroglu 2014). Esimene Kr biosünteesi raja (Joonis 1) pidurdav etapp toimub ornitiini ja guanidinoatsetaadi (GA) moodustamisel, mida viib läbi AGAT neerudes (Walker 1979). GA moodustumine on kiirust piirav reaktsioon. Seda reaktsiooni pärssib negatiivse tagasiside kaudu akumulereeruv kreatiin ja ornitiin konkureeriva inhibeerimise kaudu (Stockler-Ipsiroglu 2014). Tekkiv GA transporditakse vereringe kaudu maksa. Maksas lisatakse GA-le *S*-adenosüülmetioniinilt metüülrühm. Seda etappi katalüüsib GAMT ning selle protsessi tulemusena tekib Kr. Kasvav Kr kontsentratsioon hakkab AGATi ensüümi inhibeerima, mis toimub arvatavasti mRNA translatsiooni tasemel (Guthmiller 1994). Kuigi aju on võimeline tootma väikeses koguses kreatiini, moodustab enamuse CRTR poolt üles korjatud kreatiinist (Stockler-Ipsiroglu 2014). Intratsellulaarne kreatiin muudetakse kreatiini kinaasi (CK) toimel pöörduvaks kreatiinfosfaadiks (PKr) (Stockler-Ipsiroglu 2014). Kreatiin/kreatiinfosfaat ja adenosüüldifosfaat/adenosüültrifosfaat koos CK-ga moodustavad suure energiaga fosfaadisüstiku peamiselt ajus ja lihastes (Stockler-Ipsiroglu 2014). Ööpäevas 1,5% kogu keha kreatiinist muudetakse pidevalt mitteensümaatilistelt kreatiiniiniks, mis eritub uriiniga (Guimbal 1993, Stockler-Ipsiroglu 2014). Kreatiini päevane eritumine on otseselt võrdeline kogu keha kreatiini sisaldusega ja eriti lihasmassiga (st lastel ja täiskasvanutel 20–25 mg/kg iga 24 tunni jooksul) (Stockler-Ipsiroglu 2014).

Erinevate kudede transportervalgu ekspressioon ühtib kenasti CK omadega – kreatiini viiakse kudedesse, mis vajavad rohkelt ATP-d. Kuigi kreatiin mängib olulist rolli lihaste funktsioonis, ei ole skeleti- ega ka südamelihaste müopaatia prominentne fenotüübi vorm CDS-iga patsientide seas. Ensenauei ja ta kolleegide 2004 aasta uurimistöös, uuriti ¹H-MRS-iga GAMT defitsiitsus sündroomiga patsiendi skeletilihaseid ja leiti, et neis sisaldus suures koguses Kr, Crea ja fosforüleeritud guanidinoatsetaati. Uurimisrühm püstitas hüpoteesi, et kreatiini sünteesi ja selle omandamise mehhanismid on ajus ja skeletilihastes erinevad (Ensenauei 2004).



Joonis 1. Kreatiini ja guanidinoatsetaadi biosünteesi rada (Autor: Carling 2008). Autori adaptatsioon

Hiljutistes töodes on kirjeldatud CRTR kodeerivas geenis *SLC6A8* üle 80 loss-of-function mutatsiooni. Mutatsioonid põhjustavad patoloogiliste ja neutraalsete isovormide esinemist (Salazar 2020). Salazar 2020 aasta uurimistöös kirjeldati 8 geenivarianti. Töörühm uuris mutatsioonide mõju CRTR valgu ekspressioonile, lokalisatsioonile rakus ning funktsioonile. Leiti, et geenivariantide põhjustatud mõju võib avalduda väga erineval kujul ning mistõttu tõenäoliselt avalduvad patsientide patoloogilised fenotüübid ka nii mitmekesiselt (Salazar 2020). On uuritud ka *SLC6A8* geeni patogeenseid Kr transportervalgude variante, kus näidati, et haigusel esineb molekulaarsete defektide spekter (Salazar 2020).

b. Kreatiini defitsiitsus sündroomid

CDS-e võib jagada 2-te gruppi: primaarseteks ja sekundaarseteks. Primaarseid kreatiini defitsiitsus seisundeid põhjustavad kreatiini primaarses sünteesiahelas ja transpordi eest vastutavates geenides päritud geenidefektid. Primaarsete CDS hulka kuuluvad *L*-arginiin:glütsiini amidinotransferaasi (EC:2.1.4.1) puudulikkus, guanidinoatsetaadi metüültransferaasi (EC:2.1.1.2) puudulikkus ja kreatiini transportvalgu (*SLC6A8*) geeni defekt. AGAT ja GAMT puudulikkus on autosoom-retsessiivse pärilikkusega. *SLC6A8* geeni defekt on X-liitelise pärilikkusega, mistõttu haiged on peamiselt meessoost invidiidid perekonnas (Mercimek-Andrews 2022). Edaspidi kirjeldatud primaarsed kreatiini defitsiitsus sündroomid.

AGAT defitsiitsuse kandjaid hinnatakse üldpopulatsioonis olevat sagedusega 1:1292 (DesRoches 2016). AGAT defitsiitsus on autosomaalne retsessiivne haigus, mida on kirjeldatud väga vähestel juhtudel (16. isikul) (Stockler-Ipsiroglu 2015). Järgnevad fenotüübilised tunnused põhinevad nendel aruannetel. Arengupeatetus ja kognitiivne düsfunktsioon või intellektuaalne puue on kõige järjepidevamad kliinilised ilmingu, mis esinevad kõigil mõjutatud isikutel. Vaimse puude raskusaste varieerub kergest kuni raskekujuliseni, kuigi enam kui 80% haigetest esineb kerge kuni mõõdukas intellektipuue. Ligikaudu 10%-l on täheldatud ükikut epilepsiahoogu, mis esines koos või ilma palavikuta. Liikumishäiretest ei teatatud ühelgi mõjutatud isikul. Käitumishäire esines 25% mõjutatud isikutest. Lihasnõrkust, müopaatiaid täheldati 50%-l mõjutatud isikutest (Mercimek-Andrews 2022, Mulik 2023) (kokkuvõtliku ülevaate saamiseks vaata tabel 1). Biokeemiliste markerite muustrites iseloomulikuks jooneks on patsientide uriinis ja plasmas vähenenud Kr ja GA kontsentratsioonid (Stockler-Ipsiroglu 2014). AGAT defitsiitsuse korral on GA kontsentratsioon plasmas ja uriinis eriti madal 0,01–0,04 µmol/L ja 2,4–5,8 µmol/L vastavalt. Terve inimese referentsväärtus on 311 ± 191 µmol/L (Carducci 2002). Maailmas on tuvastatud vähem kui 20 AGAT-i puudulikkusega patsienti (Stockler-Ipsiroglu 2015) ja siit võib järeldada, et seda haigust pole veel põhjalikult ära kirjeldatud (Ostojic 2020).

Tabel 1. Kreatiini defitsiitsus sündroomide sümptomid ja nende esinemissagedus. CDS kliinilise muistri kirjeldus on koostatud avalikult publitseeritud kirjelduste alusel. Tabel põhineb Mulik 2023 publitseeritud töötl.

Kliiniline sümptom	AGAT	GAMT	CRTR mehed	CRTR naised
Globaalne arengupeatetus, kognitiivne düsfunktsioon, intellektipuue	100%	100%	100%	Asümptomaatiline kuni meestel esineva fenotüübini
Krambihood		70%	70%	
Käitumishäire	25%	75%	85%	
Liikumishäire		30%	11%	
Hüpotoonia			40%	
Spastilisus			26%	
Sihvakas kehaehitus			45%	
Seedetrakti tunnused			35%	
Südamefunktsiooni häired			39%	
Lihasnõrkus, müopaatia	50%			
Üksikud krambihood	10%			
Kõnekeelehäire				

Madalate normaalsete ja madalate ebanormaalsete metaboliitide tasemete eristamine on tuntud diagnostiline väljakutse seisundites, mida iseloomustab pigem vaegus kui substraatide kuhjumine (Stockler-Ipsiroglu 2014). Täiendavate spetsiifiliste biomarkerite puudumine võib olla üheks põhjuseks, miks seni on AGAT-I puudulikkust diagnoositud nii vähestel patsientidel (Stockler-Ipsiroglu 2014). Samas kliinilised tähelepanekutes ilmneb, et AGAT-I puudulikkuse varajane äratundmine ja ravi võib

potentsiaalselt ennetada sümptomite tekkimist (Stockler-Ipsiroglu 2014). AGAT puudulikkus on ideaalne kandidaat vastsündinu sõeluuringuks (Stockler-Ipsiroglu 2014).

GAMT defitsiitsust on kirjeldatud 130. indiviidil ülemaailmselt. Hinnanguline esinemissagedus üldpopulatsioonis jääb vahemikku 1:2,640,000 ja 1:250,000 (Desroches et al 2015, Mercimek-Mahmutoglu et al 2016). Väiksemates uuringutes, kus uuriti neuroloogiliste haigustega või tõsise vaimupuuega populatsiooni, leiti et nendes esinemis sagedusega on 1,1% (Mercimek-Andrews 2009). GAMT defitsiitsus on autosomaalne retsessiivne haigus, millel on mitmekülgsem fenotüüp. GAMT puudulikkuse kirjeldatud kliinilised ilmingud põhinevad ~130 patsiendi andmetel (Stockler-Ipsiroglu 2014, Khaikin 2018). Esimesed kliinilised ilmingud algavad alates varasest imikueast (vanus 3–6 kuud) kuni 2 aasta vanuseni (Khaikin 2018). Diagnoosimise vanus ulatub vastsündinust kuni 34 aastani (Stockler-Ipsiroglu 2014, Khaikin 2018).

Arengupeatetus (DD) ja kognitiivne düsfunktsioon/häired või intellektuaalne puue (50-75% haigetest) on kõige järjepidevamad kliinilised ilmingud, esinevad kõigil mõjutatud isikutel. Sümptomite raskusaste ulatub kergest kuni raskeni (Mercimek-Mahmutoglu 2014, Stockler-Ipsiroglu 2014, Khaikin 2018). Kõne-keele häire esineb varieeruva ulatusega. Ühe pere kahel GAMT-i puudulikkusega lapsel avaldusid muutuvast ulatuses väljendumisvõimed: uuritav patsient rääkis vähem kui kümme sõna, samas kui tema noorem õde rääkis 13-aastaselt lühikeste lausetega (Rourke 2009). Käitumishäired (nt hüperaktiivsus, autism või ennastkahjustav käitumine) esinevad teadete kohaselt enam kui 75%-l mõjutatud isikutest (Mercimek-Mahmutoglu 2014, Khaikin 2018). Krambid, mis on GAMT puudulikkuse kolmas kõige järjekindlam ilming, on täheldatud enam kui 70%-l mõjutatud isikutest. Kirjeldatud on järgnevaid krambitüüpe: müokloonilised, generaliseerunud toonilis-kloonilised, osalised kompleksed, peanoogutused ja atoonilised krambid. Krambihoogude raskusaste ulatub juhuslikest krambihoogudest kuni krambihoogudeni, mis ei allu mitmetele krambivastastele ravimitele (Mercimek-Mahmutoglu 2014, Stockler-Ipsiroglu 2014, Khaikin 2018). Ligikaudu 30% haigetel on täheldatud liikumishäired: korea, atetoos, düstoonia või ataksia (Mercimek-Mahmutoglu 2014, Stockler-Ipsiroglu 2014, Khaikin 2018). Patoloogiliste signaalide intensiivsus basaalganglionides aju magnet resonantstomograafias täheldatakse nii liikumishäirega kui ka ilma häireteta isikutel (Mercimek-Mahmutoglu 2014, Stockler-Ipsiroglu 2014, Khaikin 2018). Liikumishäired algavad tavaliselt enne 12. eluaastat. Samas leidub ka erandeid. Näiteks Rourke jt kollegide 2009 teates kirjeldatakse, et GAMT puudulikkusega noorel naisel tekkis liikumishäire alles 17-aastaselt (Mercimek-Andrews 2022). GAMT-i patoloogiline protsess on põhjustatud kahes osast: akumulatsioonist GA toksilisest efektist ja Kr defitsiitsusest. GAMT defitsiitsusel on kõrge kontsentratsioon uriinis, plasmas, liikvoris, samas kui Kr on vähenenud uriinis ja plasmas (Mercimek-Andrews 2022).

Kõige sagedamini esineb CDS-i vormidest kreatiini transportvalgu defekt, mis põhjustab kreatiini defitsiitsust kudedes. Tegemist on X-kromosoomi liitelise haigusega, mida põhjustab mutatsioon *SLC6A8* geenis (van de Kamp 2013, Bruun 2018, Bahl 2020). CRTR defektist tingitud defitsiitsuse esinemissagedust on uuritud mitmetes kohortides erinevate autorite poolt. Rosenbergi uurimisrühm uuris 2004 aasta töös 290 X-liitelise vaimse alaarenguga (MR) patsiendi *SLC6A8* geenis leiduvate mutatsioonide suhtes ja leidsid, et vaadeldud rühmas seas oli CRTR defektiga patsiente 2,1%, mis on

võrreldav fragiilse-X sündroomi esinemissagedusega (Rosenberg 2004). Samas vaimupuudega meestel esines 0,4% kuni 1,4% juhtudel (van de Kamp 2014). Ja hiljutises 2020 aasta uuringus leiti, et närvisüsteemi arenguhäiretega indiviididel esines CRTR defektist tingitud defitsiitsus 2,6%-l (Bahl 2020). Sarnases uuringus, kus uuriti 114 MR-ga poissi, leiti, et esinemissagedus on veelgi suurem – 3,5% (Lion-Fraçois 2006). Samas kahes teises uuringus leiti, et CRTR defektist tingitud defitsiitsus sündroomi esinemissagedus meeste seas oli 1% ja 0,25% kellele oli diagnoositud MR ja MR koos autismiga vastavalt. Mainitud uuringutest võib järeldada, et vaimse arenguhäirega ja intellektipuudega patsiente tasub uurida CRTR defektist tingitud defitsiitsuse osas (Carling 2008). Biokeemiliselt on nendel patsientidel uriinis kõrgeenenud Kr/Crea suhe ja plasmas leiduv Kr on tavaliselt referentsväärtuste sees (Mercimek-Andrews 2022).

Praeguseks on tuvastatud 130 patogeense *SLC6A8* geenivariandiga patsienti (van de Kamp 2013a, Bruun 2018, Bahl 2020). Järgnevad fenotüübilised tunnused põhinevad nendel aruannetel. Esimeste kliinilised tunnused ilmuvad 4-54 kuul (Bruun 2018). Diagnoosi saavad patsiendid vanusevahemikus 1-66 aastat, mis viitab sellele, et haigusekandjad saavad elada kõrge eani. DD ja kognitiivne düsfunktsioon või ID esines kõigil mõjutatud meessoost isikutel, ulatudes kergest kuni raskeni vormini. 85%-l meestel oli kuni 4-aastaseks saamiseni kerge kuni mõõdukas ID. 75% haigestunud üle 18-aastastest meestest omas rasket ID-t (van de Kamp 2013). Ühel täiskasvanul oli progresseeruv kognitiivne düsfunktsioon (Kleefstra 2005).

Kõne areng hilines kõigil mõjutatud meestel. Esimesed sõnad ilmusid keskmiselt 3,1-aastaselt (vanusevahemik: 9 kuud kuni 10 aastat). 10-ndaks eluaastaks polnud kõne arenenud välja 14% mõjutatud meestel, üksikuid sõnu valdas selles eas 55% ja 31% haigetest omandasid oskuse rääkida kasutades lauseid (van de Kamp 2013).

Krambid esinesid 59%-l mõjutatud meessoost isikutel. Kõige levinumad krambitüübid olid generaliseerunud toonilis-kloonilised ja lihtsad või keerulised osalised krambid sekundaarse generalisatsiooniga/-ta. Krampide puudumine ja müoklooniliste krampide esinemine oli haruldane. Krambid algasid vanuses 1-21 aastat (van de Kamp 2013). Ravimatust epilepsias on teatatud vähem kui kümnel isikul (Mercimek-Mahmutoglu 2010, van de Kamp 2013).

Liikumishäiretest laiapõhjaline kõnnak või ataksia ja düstoonia või atetoosi esines vastavalt 29% ja 11% haigestunud meestel (van de Kamp 2013a). Käitumishäiretest teatati 85% haigestunud meestest. Kõige levinumad käitumishäireteks olid tähelepanupuudulikkus ja/või hüperaktiivsus (55%) ning autistlikud tunnused (41%). Muude mõjutatud käitumishäirete hulka kuuluvad sotsiaalne ärevus või häbelikkus (20%), stereotüüpne käitumine (20%), impulsiivne käitumine (27%), agressiivne käitumine (19%), ennast kahjustav käitumine (10%) ja obsessiiv-kompulsiivne käitumine (8%) (van de Kamp 2013a).

Esines ka mitmeid muid neuroloogilisi tunnuseid meestel. Hüpotoonia esines 40% haigestunudel. Spastilisust täheldati 26% haigestunud meestest. Neljal isikul oli kerge (sensorineuraalne) kuulmislangus. 9 haigel mehel teatati kõõrdsilmsusest või kahepoolsest VI kraniaalnärvi halvatuses. Samuti teatati müopaatilisest näost, ptoosist, liigeste lõtvusest ja lihasmassi vähenemisest (van de Kamp 2013a).

Võivad esineda ka mitmed mitteneurooloogilised kliinilised tunnused. 45%-l mõjutatud meestest omasid düsmorfsed tunnuseid sealhulgas mikrotsefaaliat, laia otsmikku, näo keskosa tagasitõmbumist, kõrget suulage, lühikest nina, silmapaistvat ninasilda, kõrvade erinevuseid (alavolditud spiraalid, suured kõrvad ja/või kumerad kõrvad), sügavalt asetsevaid silmi, viienda sõrme klinodaktiliat ja sihvakat kehaehitust (van de Kamp 2013a, van de Kamp 2013b). 35%-l mõjutatud meestel kirjeldati seedetrakti puudutavaid erinevaid leide: kehva kaalutõusu, oksendamist, kõhukinnisust, iileust, hepatiiti, mao- ja kaksteistsõrmiksoole haavandit ning hiatali songi (mis võib, aga ei pruugi olla seotud CRTR-i defektist tingitud kreatiini defitsiidist) (van de Kamp 2013a).

Kardioloogiliste iseärasustena on ühel haigel mehel kirjeldatud pikka QT sündroomi (van de Kamp 2013a). Seitsmel mehel (39%) oli EKG-s pikenenud QTc. Nendel isikutel ilmnes ehokardiograafias ka vasaku vatsakese laienemine (diastool) ja vasaku vatsakese tagumise seina mõõdu (diastool) vähenemine (Levin 2021).

Pere spetsiifilise *SLC6A8* geeni patogeense variandi suhtes heterosügootsed naised on tavaliselt kas asümptomaatilised või kerge ID-ga (van de Kamp 2011). Puudub kliiniline korrelatsioon kallutatud X-kromosoomi inaktiveerimise ja patoloogilise alleeli variandi ning kliinilise fenotüübi raskusastme vahel. Intellektuaalsete võimete ja aju ¹H-MRS-iga leitud kreatiini taseme vahel olulist statistilist korrelatsiooni ei ole leitud (van de Kamp 2011).

Edaspidi kirjeldatud sekundaarsed kreatiini defitsiitsus sündroomid. Sekundaarsete CDS-e põhjustavad mitmed pärilikud häired geenides, mis reguleerivad ensüüme ja transportvalke (vt tabelit) peamiselt uurea tsükliks, mis põhjustavad kas arginiini või ornitiini puudust või üleproduktiooni, mõjutades seeläbi kreatiini sünteesi esimest etappi (Joonis 1). Samuti võib osaliselt kattuda primaarsete CDS-ide patsientide kliiniline pilt ja sekundaarsete CDS-idega. Eelmainitud põhjused muudavad haiguste diagnostika ja diferentseerimise keerulisemaks (Mercimek-Andrews 2022). Indiviididel, kellel aju prooton magnetresonants-spektroskoopia (¹H-MRS) uuringul tuvastatakse osalist kreatiini defitsiitsust ja uriinis, plasmas või liikvoris on normaalsed GA kontsentratsioonid ning normaalsed kreatiini ja kreatiini (Kr/Crea) suhted uriinis, tuleks kaaluda ka järgnevate haiguste esinemise võimalust: pürroliin-5-karboksülaasi defitsiitsus (P5CS), argininosuktsinaadi lüaasi defitsiitsus (ASL), argininosuktsinaadi süntetaasi defitsiitsus e. (tsitrullineemia tüüp I (ASS1), ornitiini aminotransferaasi defitsiitsus (OAT), ornitiini transkarbamülaasi defitsiitsus (OTC), pürovaadi karboksülaasi defitsiitsus (PC), hüperornitineemia-hüperammoneemia-homotsitrullinuuria sündroom (HHH), lüsinuuriline valgu talumatus (LPI) (Mercimek-Andrews 2022).

Ornitiini aminotransferaasi puudulikkus

GA puudujääki võib põhjustada ka pärilik ornitiini aminotransferaasi (OAT) puudulikkus. OAT puudulikkus, teise nimega soonkesta ja võrkkesta progresseeruv atroofia on autosoom-retsessiivne nägemislangust põhjustav haigus (D). See haruldane kaasasündinud viga ornitiini metabolismis on põhjustatud ornitiini aminotransferaasi vähenenud aktiivsusest. Kuna kreatiini süntees nõuab arginiini ja glütsiini muundamist GA-ks ja ornitiiniks, võib patoloogiline ornitiini akumulatsioon (650 µmol/L kuni 1,3 mmol/L) pärssida AGAT-i ja seejärel blokeerida GA tootmist (ja omakorda kreatiini biosünteesi)

ning mille tõttu tekivad AGATi puudulikkusele iseloomulikud haiguse tunnused (Linsky 2010). Valayannopoulos ja kaastöötajad kinnitasid GA taseme langust plasmas ja uriinis seitsmel OAT puudulikkusega patsiendil vanuses 11–27 aastat (Valayannopoulos 2009). Kõigil OAT-ga patsientidel leiti mitmesuguseid neurokognitiivseid häireid, sealhulgas kerge kuni raskekujuline vaimne alaareng, õppimise raskused, agressiivne käitumine ja epilepsia (Valayannopoulos 2009). Patsientidel oli plasmas ja uriinis GA tase $\leq 0,61 \mu\text{mol/L}$ ja $4 \mu\text{mol/mmol Crea}$ kohta vastavalt (Valayannopoulos 2009).

Lisas pärilikele sekundaarsetele kreatiini defitsiitsus sündroomidele võivad mitmed kroonilised ja akuutsed seisundid põhjustada biomarkerite tugevaid kõrvalekaldeid uuringumaterjalides.

Kuna neer on üks peamistest organitest, mis sünteesib GA-i, võib igasugune püsiv ja raske neeruhaigus põhjustada GA puudulikkust (Ostojic jt 2020). Sawynok ja Dawborn olid ühed esimestest autoritest, kes teatasid madalast plasma GA tasemest ($< 2 \mu\text{mol/L}$) nii ambulatoorsetel kui ka hospitaliseeritud ureemilistel (uurea veres $62\text{--}325 \text{ mg/100 mL}$) ja hemodialüüsi saavatel patsientidel (Sawynok 1975). Tofuku tööühm 1985 a. avastas, et ureemia korral on GA metabolism halvenenud ja neerude GAMT aktiivsus vähenes $\sim 71\%$. Kuna seerumi uurea lämmastiku tase tõuseb neerukahjustuse kestusel, siis vähenes ka seerumi GA kontsentratsioon kroonilise neeruhaigusega patsientidel võrreldes tervete isikute näitudega märgatavalt (Tofuku 1985). Sarnaseid tulemusi saadi ka kroonilise neerupuudulikkusega mittedialüüsitud meestel ja naistel, kusjuures seerumi GA langus korreleerus positiivselt neeruhaiguse progresseerumisega (Marescau 1997). Raskema neerukahjustusega meespatsientidel vähenes tsirkuleeriv GA kõige enam ($\sim 49,8\%$) võrreldes kontrollrühmaga (Tofuku 1985). Teine jaapani rühm kinnitas ülaltoodud leide ja teatas, et seerumi GA vähenes koos neerufunktsiooni kaotusega kroonilise glomerulonefriidiga patsientidel ja eriti neil, kelle kreatiniini kliirens oli alla 30 ml/min (Tsubakihara 2012).

Dr Bart Marescau juhitud rühm analüüsis tsirkuleerivaid guanidinoühendeid suurel hulgal tavaliste kilpnäärme häiretega patsientidel. Autorid täheldasid seerumi GA väga olulist vähenemist subkliinilise hüpertüreoidismiga (keskmiselt $16,7\%$) ja kliinilise hüpertüreoidismiga ($36,8\%$) patsientidel, mis viitab kilpnäärme talitlushäiretest tingitud GA defitsiidile (Verhelst 1997). Autorid ei suutnud täpselt seletada avastatu põhjuslikke mehhanisme, kuid guanidinoühendite tasemed näivad olevat mõjutatud kilpnäärmehormoonide toimest skeletilihastele, neerudele, maksale ja perifeersetel valkude metabolismile (Ford 1989, Iglesias 2017).

Esimest GA puudulikkuse juhtumit tavaliste neuroloogiliste häirete korral kirjeldati peaaegu 30 aastat tagasi (Ostojic 2020). Shiraga ja kaastöötajad (Shiraga 1991) uurisid guanidinoühendite taset seerumis 58 neuroloogilisel mees- ja naispatsiendil, kellel oli tserebraalparalüüs, entsefalomeeningiit, intrakraniaalne hemorraagia ja muud seisundid. Autorid leidsid, et keskmine GA tase seerumis nii mitteepilepsia- kui ka epilepsiahaigetel oli oluliselt madalamad kui tervetel uuritavatel (Shiraga 1991). Lisaks näib, et tsirkuleeriv GA kontsentratsioonid on sobivate ravimitega ravitud epilepsiahaigete alampopulatsioonis vähem alanenud, võrreldes kontrollimatu epilepsiaga patsientide seerumis (Shiraga 1991). Need leiud viitavad sellele, et neuroloogilistele patsientidele manustatavad tavalised ravimid võivad parandada GA käivet ja kipuvad taastama normaalset GA tasakaalu (Ostojic 2020). Kuid mitte kõikides uuringutes ei leitud neuroloogilistel patsientidel GA puudulikkust (Ostojic 2020). Hiljutises uuringus teatati, et plasma GA kontsentratsioonid üheksal ägeda insuldi või mööduva isheemilise ataki

all kannatanul olid võrreldavad tervete inimeste näitajatega (Hanff 2016). Võimalik lahknevus uuringute vahel võib olla tingitud neuroloogiliste häirete olemusest (ägedad vs kroonilised patoloogiad), mis omakorda avaldab erinevat mõju GA homöostaasile (Ostojic 2020).

Manchesteri Ülikooli meditsiinikooli uuringus (Threlfall 1984) hinnati plasma guanidinoühendite muutusi 31 patsiendil, kes said juhuslikult mõõdukaid või raskeid vigastusi (nt luumurd, peatrauma, kõhuvigastus, kompartmendi sündroom). Lisaks muudele leidudele teatasid autorid, et enamikul patsientidest oli pärast õnnetust madal plasma GA kontsentratsioon. Ja ühe neerutraumaga patsiendi (naine, 17 aastat; vigastuse raskusaste 34 punkti 75-st) plasma GA langes väga madalale tasemele (0,3 µmol/l) (Threlfall 1984). Normaalne tase taastus koos neerufunktsiooni taastamisega - pärast 15 hemodialüüsi 17 päeva jooksul (Threlfall 1984). Sellest traumast tingitud GA puudujäägi mehhanismid ei ole teada (Threlfall 1984). Kuid jääb tõsiasjaks, et traumaatiline vigastus võib negatiivselt mõjutada neerufunktsiooni (Perkins 2019), kaotada elundi normaalset verevoolu ja/või kutsuda esile põletikueelset fenotüüpi ja raku düsfunktsiooni või apoptootilist surma (Civiletti 2019) ning seeläbi põhjustada GA defitsiitsust, kuna neerud on GA sünteesi peamised organid (Ostojic 2020).

c. Ravi

Kreatiini biosünteesi raja häiretest põhjustatud sündroomidega patsiente on võimalik ravida pikaajalise suukaudse toidulisandi võtmisega ja sobiliku dieedi jälgimisega (Stockler-Ipsiroglu 2014, Schulze 2007, Ndika 2012). Stöckler-Ipsiroglu ja ta kolleegide 2015 aasta uurimistöös selgub, et ravi võib omada väga efektiivseid tulemusi vähendades oluliselt müopaatiat ja võimaldades lausa normaalset arengut kui sellega alustatakse varajases eluetapis – imikueas.

Ravil on kaks peamist eesmärki: taastada aju kreatiini tase ja vähendada akumulieruva GA toksilist efekti. Aju kreatiini taseme taastamiseks AGATi ja GAMTi defitsiitsuse korral kasutatakse suukaudset täiendavat kreatiini (manustatakse kreatiinmonohüdraadina) manustamist annustes 400–800 mg/kg/päevas jagatuna 3-6 doosi vahel (Stockler-Ipsiroglu 2014).

GAMTi puudulikkus vajab lisaks täiendavaid strateegiaid, sealhulgas AGAT aktiivsuse konkureeriv pärssimine suures annuses *L*-ornitiini suukaudse tarbimise kaudu ja substraadi vähendamise arginiiniga piiratud dieedi kaudu (Stockler-Ipsiroglu 2014). Naatriumbensoaati lisandina on pakutud täiendava lähenemisviisina, et vähendada GA produktsiooni glütsiini konjugeerimise teel (mille tulemusena moodustub hippurhape, mis eritub kiiresti neerude kaudu) (Stöckler-Ipsiroglu 2005). Kreatiini manustatakse kreatiinmonohüdraadina soovitatavates annustes 400–800 mg/kg/päevas suukaudselt/enteraalselt (Stockler-Ipsiroglu 2014). *L*-ornitiini lisandit soovitatakse tarvitada 400–800 mg/kg/päevas suukaudselt/enteraalselt. Piiratud arginiinisaldusega dieedi soovitus on, et päevas tarvitataks 0,3–0,4 g/kg looduslikku valku (mis peaks sisaldama 15-25 mg/kg *L*-arginiini päeva kohta) koos arginiinivaba asendamatute aminohapete lisanditega, et vältida alatoitumist. Taoline dieet vähendab tõhusalt GA taset (Stockler-Ipsiroglu 2014 b, Stöckler-Ipsiroglu 2005). Raviga on assotsieeritud aju kreatiini taseme oluline tõus ja uriini, plasma ja tserebrospinaalvedeliku (CSF) GA taseme langus, samuti kliiniliste sümptomite paranemist või stabiliseerumist kõigil sümptomaatilistel juhtudel (Stockler-Ipsiroglu 2014 b, Mercimek-Mahmutoglu 2006).

Kui GAMTi- või AGAT-I defitsiitsusega patsiente saab tõhusalt ravida suukaudsete kreatiinilisanditega (Longo 2011, Nasrallah 2010). Siis funktsionaalse kreatiini transportervalgu puudumine muudab toidulisandid *SLC6A8* mutatsiooniga patsientidel ebaefektiivseks (Nasrallah jt 2010). Kuigi enamik defitsiitsusega patsientidest on mehed, ilmnevad õppimis- ja käitumishäired ~ 50% naissoost kandjatest, kellel on üks patogeenne *SLC6A8* variant (deGrauw 2003, Wyss 2007). Praegu puuduvad tõhusad ravimeetodid *SLC6A8* geenis funktsioonikaoga mutatsiooniga patsientidele.

Varasemates töödes on näidatud, et paljud mutatsioonid, mis on jaotatud kogu primaarse järjestuse ulatuses, häirivad CRTR valgu ekspressiooni ja posttranslatsiooni (Betsalel 2012). Ekspressiooni vähenemine ja ebanormaalne glükosüülimine viitab sellele, et teatud mutatsioonid soodustavad CRTR valgu valet pakkumist (Marinko 2019). Hiljuti demonstreeriti, et mitmel patogeensel *SLC6A8* variandil on toodetud valgule endoplasmaatilises retiikulumis suurenenud retentsioon (El-Kasaby 2019). Hetkel arvatakse, et patogeensed mutatsioonid tekitavad molekulaardefektide spektri, kus valgu funktsioon on erinevas astmes häiritud (Marinko 2019, Veit 2016) ja terapeutilised lähenemisviisid nende variantide parandamiseks on tõhusamad, siis kui need on kohandatud spetsiifilistele molekulaarsete defektide klassidele (Veit 2016, Rowe 2013). Mistõttu on ilmunud ka esimesed soovitusel hakata klassifitseerima CRTR defektidest tingitud defitsiitsuseid erinevatesse klassidesse. (Salazar 2020)

Hiljutised läbimurded tsüstilise fibroosi ravis on visandanud ka uudse lähenemisviisi konkreetsete väikeste molekulide skriinimiseks ja arendamiseks, mis taastavad teatud klassi defektsete membraanivalgu variantide ekspressiooni ja/või funktsiooni (Salazar jt 2020). Üheks selliseks ravimikandidaatmolekuliks on 4-PBA. On leitud, et see parandab oluliselt kreatiini transportvalgu funktsiooni (parandab pakkumist) ning sellest võidakse tulevikus arendada ravimi naissoost patsientide raviks (deGrauw 2003, Wyss 2007).

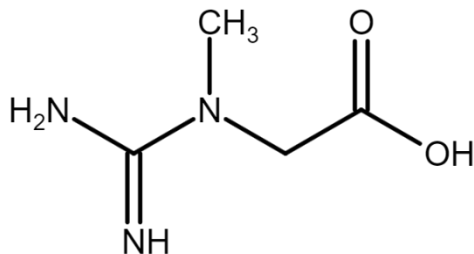
Aastate jooksul kuhjunud kahju ravimata CDS puhul on hetkel olevate vahenditega võimalik kas ainult pidurdada, parimal juhul leevendada. Seega varajane CDS-i tuvastamine on efektiivseks raviks väga oluline.

d. Tsentraalsed markerid

Kreatiin (2-metüülguanidinoetaanhape, Joonis 2) on kehas üldlevinud mitte-valk aminohape, mida sünteesitakse peamiselt maksas, neerudes ja pankreases (Bonilla 2001). Inimese keha toodab endogeenselt umbes 1 g kreatiini päevas ja umbes sama palju omandab seda toidu kaudu. Kreatiini toodetakse ka endogeenselt mitmetes kudedes. Toidus (liha, õline kala) leiduv liigne Kr pidurdab endogeenset sünteesi (Carling 2008). Vereringes leiduv kreatiin imendub kudedesse ja reabsorbeerub neerutuubulitesse kreatiini transporteri (CRTR) kaudu. Kreatiinivarusid tuleb endogeensetest ja eksogeensetest allikatest pidevalt täiendada, kuna kreatiin muundub konstantsel kiirusel kreatiiniiniks - ligikaudu 2% päevas (Sharer 2017). Füsioloogilistes tingimustes on Crea keemiliselt stabiilne ja eritub uriiniga konstantsel kiirusel.

Kreatiini esmane füsioloogiline roll on toimida ATP ajalise ja ruumilise puhvrina (Wallimann 2011, Kuiper 2009). Kreatiin varustab rakulist ATP tootmist, eriti skeletilihastes ja ajus. Suurem osa (~95%) kreatiini varudest asub skeletilihastes, kuigi see ei ole oluline biosünteesiline kude (Sharer 2017). Kreatiinkinaasi isovormid katalüüsivad tagasipöörduvat reaktsiooni, mille käigus kreatiin ja ATP muunduvad PKr-ks ja

ADP-ks (joonis 1). PKR ladestub lihastesse, mis kujutab endast suure energiaga fosfaadi allikat, mida on võimalik kiiresti kättesaadavaks muuta ATP regenereerimiseks (Sharer 2017). See protsess säilitab optimaalsed ATP ja ADP suhted, võimaldades seeläbi müosiini ja Ca^{2+} sõltuvat ATPaasi funktsioone, mis on vajalikud kontraktiilse pürskeenergia jaoks (Sharer 2017).

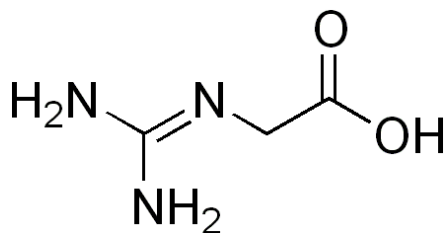


Joonis 2. Kreatiini molekuli keemilise struktuuri joonis. Molekulaarvalem $\text{C}_4\text{H}_9\text{N}_3\text{O}_2$

Kesknärvisüsteemis on kreatiini täpne roll kaudsemalt määratletud, kuid tõenäoliselt hõlmab see mitmeid ATP-st sõltuvaid protsesse, mis on ajufunktsiooni ja arengu aluseks (Almeida 2006). Kreatiinil võib olla ka mitmeid olulisi sekundaarseid füsioloogilisi funktsioone. Eelkõige võib kreatiin toimida neuromodulaatori või isegi neurotransmitterina (van de Kamp 2013). Seda väidet toetab teadmine, et neuraalne kreatiin vabaneb aktsioonipotentsiaalil sõltuval eksotsütootilisel viisil (Almeida 2006) ja kreatiini transporteri (CRTR) olemasolu sünaptosoomi membraanis võib vahendada kreatiini tagasihaaret (Peral 2010). Lisaks on kreatiinil antioksidantne toime, kaitseb rakumembraane, soodustab luude ja lihaste kasvu ning omab neuroprotektiivseid omadusi (Wallimann 2011).

Kreatiini referentsväärtused seerumis <10 a $17\text{--}109 \mu\text{mol/L}$ ja ≥ 10 a $6\text{--}50 \mu\text{mol/L}$. Uriinis < 4 a $5\text{--}6725 \mu\text{mol/L}$, 4 a kuni < 13 a $36\text{--}4964 \mu\text{mol/L}$ ja ≥ 13 a $31\text{--}2588 \mu\text{mol/L}$ (TÜK infoleht). Tihti esitatakse Kr väärtusi normaliseeritud kujul Kr/Crea suhtena. Sellisel juhul on referentsväärtused uriinis järgnevad < 4 a $6\text{--}1200 \text{ mmol/mol}$, 4 a kuni < 13 a $17\text{--}720 \text{ mmol/mol}$ ja ≥ 13 a $11\text{--}240 \text{ mmol/mol}$.

Guanidinoatsetaat (glükotsüamiin, guanidinoatset hape, joonis 3) on aminohappelaadne ühend ja suhteliselt uurimata, kuigi kaua tuntud inimese kehas leiduv metaboliit (Ostojic 2020). Umbes 85 aastat tagasi eraldas GA-di dr Clarence J. Weber esimesena kahest pseudohüpertroofilise lihasdüstroofiaga patsiendi ja terve paastunud inimese uriinist (Weber 1935). Põhjaliku töö tulemusena selgus, et GA on normaalse uriini ja seerumi tavaline koostisosa ning samas publikatsioonis arvati, et uuringumaterjalides leidumine ei ole põhjustatud toidust omandades, vaid GA on pigem kreatiini endogeense sünteesi vaheprodukt, mida tulevastes uuringutes ka kinnitati [Hoberman 1946, Walker 1959, da Silva 2009]. GA toodetakse asendamatuatest aminohapetest: glütsiinist ja arginiinist. Reaktsiooni katalüüsib *L*-arginiin:glütsiinamidinotransferaas. AGAT-i katalüüsitud reaktsioon toimub peamiselt neerudes ja kõhunäärmes (aga ka maksas, ajus, endokriinsetes kudedes ja soolestikus), kusjuures renaalne süntees võib moodustada $\geq 20\%$ GA kogutoodangust (Edison 2007). Äsja sünteesitud GA vabaneb vereringesse, mille kaudu liigub maksa (ka aju, müokardi, suguelunditesse) kreatiini biosünteesi teiseks etapiks. Teist etappi katalüüsib guanidinoatsetaat-N-metüültransferaas. GAMT kannab metüülrühma *S*-adenosüülmetioniinilt GA-le, moodustades kreatiini ja *S*-adenosüülhomotsüsteiini. Tekkinud kreatiin eritub lõpuks vereringesse, kust see imendub erinevatesse energiat nõudvatesse kudedesse, samas GA ülejääk aga väljutatakse tõenäoliselt neerude kaudu (Ostojic 2016).



Joonis 3. Guanidinoatsetaadi molekuli keemilise struktuuri joonis. Molekulaarvalem $C_3H_7N_3O_2$

Peale selle, et GA on otsene eelmolekul kreatiinile, ei näi sellel olevat muid olulisi füsioloogilisi rolle (Wyss 2000), kuigi eksogeenne GA võib stimuleerida hormonaalset vabanemist ja neuromodulatsiooni, muuta aminohapete (nt arginiin, kreatiin) metabolismet kasutamist ja toimida oksüdant-antioksidant regulaatorina (Ostojic 2015). Kui arvestada et GA-il on üsna lihtne metaboolne saatus ja selle esinemine toiduallikates on tühine (~ 10 mg/kg lihas) võiks GA homöostaas (mida näitab GA tase vereringes) illustreerida tasakaalu endogeense tootmise/kasutamise ja neerude kaudse eritumise vahel (EFSA 2009). Võimaliku defitsiidi põhjuseks võib olla kas sünteesi halvenemine (mis võib olla tingitud glütsiini ja arginiini puudusest, AGAT-i talitlushäiretest ja algorganite (nt neerude) puudulikkusest ja/või GA suurenenud tarbimisest/kõrvaldamisest. Kuigi seda guanidiiniperekonna liiget on juba 1930. aastatel identifitseeritud inimese biovedelikes looduslikult esineva ühendina, on GA puudulikkus siiani eksperimentaalses ja kliinilises meditsiinis vähe käsitletud (Ostojic 2020).

GA puudulikkus põhjustab madala energiatasemega seotud kliinilisi tunnuseid tänu oma rollile energia metabolismis (Wyss 2000). Kõige suurema rakuenergia nõudega elundid on aju, müokard ja skeletilihased. Seetõttu võivad GA puudulikkusega patsientidel leiduda lihaste nõrkust, väsimust ja vähenenud töövõimet, samas kui neuroloogiliste nähude ja sümptomiteks hõlmata ajuväsimust, intellekti puudeid, käitumis- ja liikumishäireid. Kõik eelnimetatud tunnused võivad areneda GA defitsiidi suurenemisel (Verhelst 1997) või on raskemakujulised kui puudus algas varasemas eas (Mercimek-Mahmutoglu 2015). GA on inimkehas loomulikult esinev kreatiini prekursorimolekul. Hiljutistes töös kirjeldati, et toidulisandina tõstab aju ja lihaskoe võimekust nii naistel kui ka meestel (Sepper jt 2021).

Guanidinoatsetaadi referentsväärtused seerumis $1,3\text{--}3,3$ $\mu\text{mol/L}$ ja GA/Crea ($2,8\text{--}118$ mmol/mol) (E). Tervetel inimestel ringleva GA normaalset taset hinnatakse käputäies uuringutes (Ostojic jt 2020). Viimane autorile teadaolev uuring näitas, et tervete isikute plasma GA kontsentratsioon on $2,6 \pm 0,8$ $\mu\text{mol/L}$ (Hanff 2016). Selles uuringus saadud väärtused on lähedased või samaväärsed teiste uurimisrühmade tervete meeste ja naiste plasmas ja seerumis saadut tulemustega (Marescau 1997, Shiraga 1991, Derave 1985, Marescau 1995, Olah 2019). Almeida ja kaastöötajad näitasid, et kuigi lastel oli vanematega võrreldes madalam plasma GA tase, ei esinenud sugude vahel olulisi erinevusi (Almeida 2004). Praegu viitab seerumi GA madal kontsentratsioon ($< 0,04$ $\mu\text{mol/L}$) tugevalt tõsisele GA puudulikkusele ja marginaalne GA defitsiit võib tuvastada siis, kui seerumi GA väärtused langevad alla $2,0$ $\mu\text{mol/L}$ (Verhelst 1997).

e. Kliinilise diagnostikas kasutatavad meetodid

CDS-de diagnoosimiseks kasutatakse mitmeid erinevaid meetodeid. Raviarstile annab palju informatsiooni patsientidelt tuvastatud kliinilised leiud, mida saadakse patsientide ülevaatamisel ja haige lähedase anamneesi kogumisel. Vihjeid võivad anda mitmed kliinilised leiud: arengu mahajäämus,

kognitiivne düsfunktsioon või ID, hüpotoonia, krambid või ravile allumatu epilepsia, mitmed liikumishäired ja (koreaatiline atetoos, düstoonia), käitumisprobleemid (tähelepanupuudulikkus, hüperaktiivsus, autismispekter, agressiivne käitumine) (Mercimek-Andrews 2022). Ka perekondlik ajalugu annab palju täiendavat informatsiooni võimalikust GAMT ja AGAT puudulikkusest või CRTR valgu defektist. Samas teadaoleva perekonna sugupuus haiguse esinemise puudumine ei välista diagnoosi (Mercimek-Andrews 2022).

Tänapäeval on raviarstidele kergesti kättesaadavad mitmed piltdiagnostika lahendused. Aju prootoni magnetresonants-spektroskoopia (¹H-MRS) näitab kõigil GAMT-i ja AGAT-i puudulikkusega inimeste ning CRTRi defektist tingitud kreatiini defitsiidiga meeste aju Kr piigi puudumist või olulist vähenemist (van de Kamp 2014). Samas CRTRi defektiga heterosügootsete naiste aju ¹H-MRS leid väljendub kreatiini piigi osalises ammendumises või normaalses tasemes (van de Kamp et al 2011). Lisaks ei ole mainitud uuringuga kahjuks võimalik määrata täpselt, mis tüüpi CDS-iga tegu on.

Lisaks kasutatakse diferentsiaaldiagnostikas mitmeid biokeemilisi leide [van de Kamp 2014, Mørkrid 2015]. Kõigi CDS-de ühiseks biokeemiliseks nimetajaks on kreatiini puudumine aju (Stockler-Ipsiroglu 2014). Kuigi kreatiini signaali märkimisväärset vähenemist on võimalik aju ¹H-MRS-ga määrata, siis kreatiini biosünteesi ja transpordi häirete diferentsiaaldiagnoosimisel kasutatakse põhiliselt uriini guanidinoatsetaadi ning uriini kreatiini/kreatiini suhte määramist (Stockler-Ipsiroglu 2014). Uriini guanidinoatsetaadil on kõrgenenud kontsentratsioonid GAMT ja vähenenud AGAT puudulikkusel. *SLC6A8* defektist tingitud kreatiini defitsiidile on iseloomulik uriini kreatiini eritumise suurenemine ja kreatiini eritumise vähenemine (Stockler-Ipsiroglu 2014). Kõrgenenud kreatiini/kreatiini suhe uriinis toimib hemisügootsete meeste puhul diagnostilise markerina, samas kui heterosügootsetel naistel ei ole see marker tundlik (Stockler-Ipsiroglu 2014).

AGAT (*GATM*), GAMT (*GAMT*) ja CRTR (*SLC6A8*) geenide molekulaaranalüüsi kasutatakse praegu diagnostiliseks kinnitamiseks mutatsioonide, insertioonide, deletsioonide või muude keerukate ümberkorralduste tuvastamiseks (Stockler-Ipsiroglu 2014). Olemasolevad biomarkeri sõeluuringud võivad anda valenegatiivseid tulemusi, eriti AGAT defitsiidi ja patoloogilise *SLC6A8* geeni defekti korral. Seetõttu soovivad osad autorid esmase diagnostilise meetodina kasutada molekulaaranalüüsi mõlema seisundi diagnostiliseks kindlakstegemiseks (Stockler-Ipsiroglu 2014). See kehtib eriti heterosügootsete *SLC6A8* naiste tuvastamise kohta, kelle jaoks puudub usaldusväärne diagnostiline marker (Stockler-Ipsiroglu 2014). Samas on molekulaarsed meetodid väga kulukad ja rutiinseks sõeluurimiseks neid seetõttu ka ei kasutata.

Täiendavalt võidakse kasutada funktsionaalseid teste (sealhulgas ensümaatilised testid fibroblastides, lümfoblastides ja/või ekspressioonisüsteemides) mis annavad diagnostilise kinnituse funktsionaalsel tasemel, mis võivad olla eriti informatiivsed uute tundmatu patogeensusega mutatsioonide puhul (Stockler-Ipsiroglu 2014).

Konsensuslik diagnostiline testimisalgoritm hetkel puudub. On küll välja pakutud mitmeid lahendusi aga tõenäoliselt kasutab iga raviarst oma piirkonnale sobivama lähenemisviisi. Algoritmid on kasulikud molekulaargeneetilise testimise juhtimiseks individile, kellel on viitavaid kliinilisi leide, biokeemilisi ja/või kreatiini taseme langus aju ¹H-MRS-is. Molekulaargeneetilise testimise lähenemisviisideks võivad olla geenipõhised testimised (ühe geeni testimine, epilepsia, intellektipuude või autismispektri häiretele) eraldi või kombineeritud põhjalike genoomsete testidega (eksoomi, genoomi

sekveneerimine). Üksikutele geenidele suunatud molekulaarsed uuringud nõuavad, et arst määraks biokeemiliste ja piltdiagnostika põhjal kindlaks, millised geenid on tõenäoliselt haigusega kaasatud, et mitte tellida ülearuseid uuringuid, see nõuab aga palju teadmisi ja kogemust. Üle genoomne testimine seda küll ei nõua aga on see-eest väga kallid. Isikutel, kellel on kirjeldatud iseloomulikud biokeemilised või piltdiagnostika leiud, kinnitatakse diagnoos üksiku geenipõhise testimise abil. Samas kui patsientidel, kelle fenotüüp ei eristu paljudest teistest pärilikest haigustest ja biokeemiline muster ei ole ka väga selge siis on tõenäoliselt mõistlik kasutada üle genoomseid teste (Mercimek-Andrews 2022).

Pidevalt täiendatakse sõeluuringute testpaneelide nimekirja uute uuringutega. Hetkel Eestis ei ole kreatiini ja guanidinoatsetaadi määramine osa riiklikus sõeluuringute seireprogrammist. Esimene samm sõeluuringute läbiviimise võimaldamiseks on diagnostiliste testsüsteemide väljaarendamine.

f. Analüütilised meetodid kreatiini ja guanidinoatsetaadi määramiseks

Sõeluuringutes kasutatavad protseduurid on kiired ja lihtsad. Vereproovi puhul võtab ämmaemand või õde uuritavalt lapselt vereproovi spetsiaalsesse vaakumkatsutisse ja uriini proov proovitopsi (imikutel ja väikelastel kasutatakse spetsiaalset nahale kleebitavat steriilset uriinikogumiskotte) (F). Seejärel saadetakse uuringumaterjalid SA Tartu Ülikooli Geneetika ja personalimediitsiini kliiniku laborisse, kus materjalid säilitatakse nõuetekohaselt kuni uuringute teostamiseni. Liiga hilise uuringuproovi kogumise korral haiguse diagnoos võib hilineda. Reeglina sünnivadki uuritavate haigustega lapsed perre, kus varem ei ole haigust esinenud. See risk püsib ka siis, kui vanematel on varem sündinud ühised terved lapsed. Seega on sageli haige lapse sünd perre ootamatu. Eestis kinnitub igal aastal keskmiselt 13–15 lapsel sõeluuritava haigus (A).

CDS-de tuvastamiseks ja diferentseerimiseks on vajalik kasutada mitmeid markereid: kreatiin, guanidinoatsetaat ja kreatiniin. Madalad GA kontsentratsioonid uriinis, plasmas ja tserebrospinaalvedelikus viitavad AGAT-i puudulikkusele, samas kui kõrged GA kontsentratsioonid on GAMT puudulikkusele iseloomulik. Uriini kreatiini/kreatiniini eritumise kõrge suhe toimib diagnostilise markerina *SLC6A8* geeni defektiga meestel (Stockler-Ipsiroglu 2014).

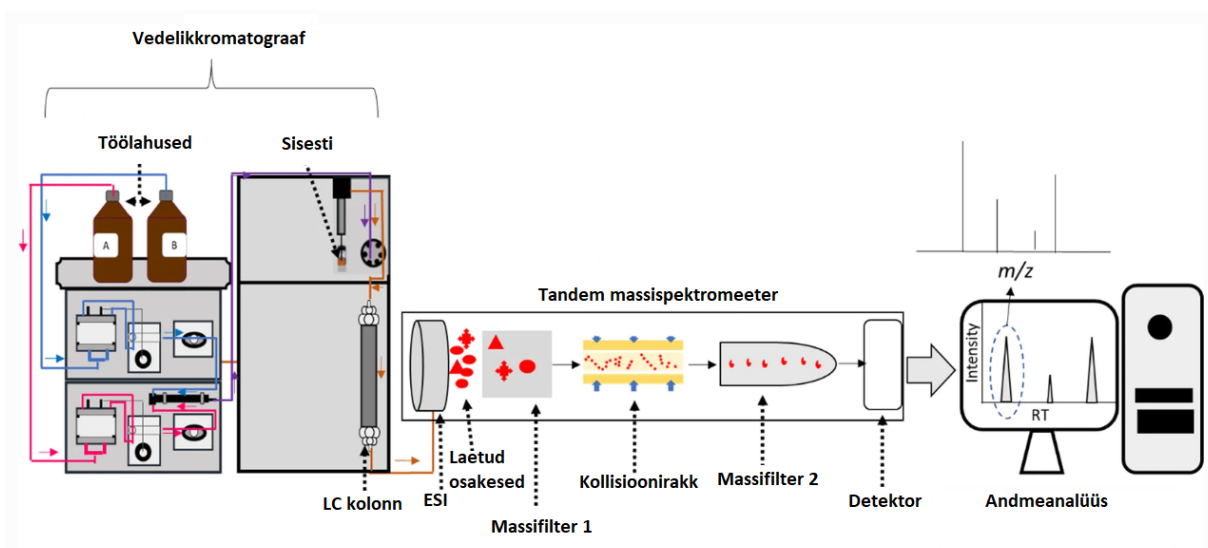
Kirjanduses on kirjeldatud mitmeid valideeritud meetodeid GA ja Kr määramiseks bioloogilistest materjalidest:

1. Gaaskromatograaf massispektromeetria meetodil (GCMS) (Hunneman 1997; Struys 1998);
2. Vedelikkromatograaf-atmosfäärirõhuline keemiline ionisatsioon massispektromeetria meetodil (LC/APCI-MS) (Yasuda 1997)
3. Vedelikkromatograaf tandem massispektromeetria meetodil (LC-MS/MS) (Bodamer 2001; Cognat 2004; Carducci 2006);
4. Kõrgsurvevedelikkromatograaf fluoretsents detektoriga meetodil (HPLS-FL) (Carducci 2001; Arias 2006)

Kõik eelnimetatud meetodid vajavad mõnda sorti proovimaterjali eeltöötlemist nagu tahke faasi ekstraksiooni või derivatiseerimist, mis muudavad proovimaterjali ettevalmistamise etapid aja- ja

töõjõu mahukamaks ning on seetõttu ka kulukamad (Carling 2008). Leidub ka teisigi kitsaskohti meetodites. Näiteks Hunnemani 1997 ning Struysi 1998 töödes kirjeldatud GCMS meetodid ei võimalda samaaegselt Crea määrata. Ka Carducci 2001 aasta töös kirjeldatud HPLC meetodi suurimaks puuduseks oli võimetus lahutada omavahel Kr ja Crea-st (Arias 2006).

Vedelikkromatograafia-tandemmassispektromeetria (edaspidi LC-MS/MS) koosneb kahest ainete lahutamise/eraldamise meetodikast: vedelikkromatograafiast (LC) ja massispektromeetrist (MS). Vedelikkromatograafia võimaldab segu komponentide eraldamist, kasutades nende afiinsuse erinevust statsionaarse faasi suhtes. Massispektromeeter on universaalne detektor LC jaoks. Massispektromeetriliseks analüüsiks peavad analüüsivad ühendid olema gaasifaasis laetud olekus. Selle saavutamiseks kasutatakse elektropihusutsionisatsiooni (ingl *electrospray ionization*, ESI) meetodit, kus proov pihustatakse lämmastikuvoos ning pihusti ja MS-i sisendi vahel rakendatakse suur potentsiaalide erinevus. ESI tulemusena tekivad laetud tilgad. Need tilgad suunatakse nüüd massispektromeetrisse. Tilgad kuivatatakse ning järgi jäänud laetud analüüdi molekulid suunatakse esimesse kvadrupool tüüpi massifiltrisse. Filter sorteerib huvipakkuva massi ja laengusuhtega (m/z) ioonid nn. prekursorioonid. Prekursorioonid fragmenteeritakse kollisioonirakus, kus neid põrgatatakse vastu inertgaasi (N_2 , Ar, He) molekulide, mille tulemusel molekulid lagunevad väiksemateks tütarioonideks. Laetud iseloomulikud fragmendid juhitakse edasi teise massifiltrisse, mida läbivate ioonide hulk detekteeritakse. Detektorilt saadav signaali intensiivsus on aluseks ühendi sisalduse määramisel (Ursula 2015). LC-MS/MS analüüsi põhimõtet illustreerib joonis 4.



Joonis 4. Vedelikkromatograafia-tandem massispektromeeter. Joonis valmistati Dewi 2023 järgi. Autori adaptatsioon

LC-MS/MS-iga saab analüüsida termolabiilseid analüüte, mis ei sobi GCMS-i jaoks. See võimaldab analüüsida mitteaurustuvaid analüüte ning analüüdid ei vaja derivatiseerimist. LC-MS/MS-i võime tuvastada paljusid komponente suure tundlikkuse ja spetsiifilisusega on muutnud selle populaarseks paljudel aladel. Näiteks võimaldab see tuvastada molekulmasse ning annab infot struktuuri kohta. MS on hea kõikjal, kus struktuuriline selgus ja tuvastamine on vajalik (Willoughby 2002). Analüüsid hõlmavad nii kvalitatiivseid kui ka kvantitatiivseid määramisi. Analüütideks võivad olla nii suure kui ka väikese molekulmassiga ained, sealhulgas sünteetilised polümeerid, biopolümeerid, keskkonna

saasteained, farmatseutilised ühendid (ravimid ja nende metaboliidid) ning looduslikud ühendid. Üldiselt on see kasutusel kõikide analüütide jaoks, mis võivad esineda keerulistes maatriksites (Niessen 1999).

Paljudes analüüsides on meid huvitav(ad) koostisosa(d) keerulistes maatriksites (nt plasma, uriin, liikvor ja muud kehavedelikud). Kromatograafia roll on need koostisad ainete segust eraldada, et oleks võimalik neid tuvastada ja kvantitatiivselt määrata. Kvalitatiivsest vaatenurgast põhiliseks kromatograafia miinuseks on see, et komponente pole võimalik üheselt kindlaks määrata isegi siis, kui nad on täielikult eraldatud. Identifitseerimine põhineb komponentide retentsiooniaegade võrdlemisel referentsainete retentsiooniaegadega. Kuid sellisel juhul ei ole kindlalt võimalik öelda, kas tegu on just sama ainega. Samuti pole alati võimalik saavutada ainete kromatograafilist lahutust. MS-i võimsus seisneb selles, et massispektril on info komponentide kohta piisavalt iseloomulik. See info võimaldab komponente väga suure kindlusega identifitseerida (Ardrey 2004).

g. Valideerimine

Valideerimine on protsess, mille käigus meetodile esitatavate erinõuete konkreetses tingimustes täitmist kontrollitakse ja kinnitatakse ning esitatakse selle kohta tõendid. Uue *in vitro* diagnostika meditsiiniseadmete määrusega (2017/746/EL) (ingl *In-vitro Diagnostic Medical Devices Regulation – IVDR*) viidi ELi õigusaktid kooskõlla tehnika arenguga, arstiteaduse muutustega ja õigusloome edusammudega. Kuna CDS-ide puhul on tegu harvikaigustega, millele kommertsiaalset lahendust turul ei ole siis on laboris loodud meetodite (ingl *Laboratory developed tests*, LDT) kasutamine põhjendatud. Uues määruses on LDT kasutamiseks seatud nõue, et meetod peab olema valideeritud.

Valideerimine põhines EMA 2022 aasta standardil „ICH guideline M10 on bioanalytical method validation and study sample analysis“. Valideerimine viidi läbi täies ulatuses. Valideerimise protsessis hinnati meetodi selektiivsust (ingl *selectivity*), spetsiifilisust (ingl *specificity*), analüüdi ülekannet (ingl *carry-over*), mõõteala (ingl *range*), kalibratsiooni kõverat (ingl *calibration curve*), täpsust (ingl *accuracy*), kordustäpsust (ingl *precision*), lahjendamise avaldatud mõju (ingl *dilution integrity*), maatriksi efekti (ingl *matrix effect*), stabiilsust (ingl *stability*) ja meetodi reprodutseeritavust (ingl *rejection reproducibility*) (EMA 2022).

Selektiivsus on meetodi võime eristada ja mõõta määratavat analüüti teiste potentsiaalselt interfereerivate ainete juuresolekul bioloogilise maatriksi tühiproovis. Selektiivsuse hindamine peaks näitama, et analüüdi või sisestandardi tühiproovi retentsiooniaegadel ei täheldata segavatest komponentidest tingitud olulist signaali. Segavatele komponentidele omistatav signaal ei tohi moodustada rohkem kui 20% analüüdi vastusest alumise määramispiiril (LLOQ) ja mitte rohkem kui 5% sisestandardi vastusest LLOQ proovis iga maatriksi puhul (EMA 2022).

Spetsiifilisus on meetodi võime tuvastada ja eristada uuritavat analüüti teistes ainetest, sealhulgas ka analüüdiga seotud ainetest (nt ained, mis on struktuurilt sarnased analüüdiga, metaboliidid, isomeerid, lisandid, proovi ettevalmistamisel tekkinud lagunemissaadused või samaaegsed ravimid) (EMA 2022). Kui meetodika on 100% spetsiifiline, siis ta identifitseerib kindlat analüüti ja kinnitab, et analüüdi piik ei ole mõjutatud segajatest.

Analüüdi piiki mõjutatavaid segajaid hinnatakse nii, et segajad nn. spaigitakse teadaoleva kontsentratsiooniga analüüti sisaldavale uuringumaterjalile ja kui spaigitud tulemus ei erine spaikimata proovi tulemusest, siis on meetodika selektiivne ja spetsiifiline. Käesoleva valideerimise käigus uuriti võimalikku interferentsi uriinis leiduvate põhiliste komponentidega: urea, kusihape, kreatiiniin, anorgaanilised soolad. Ühtlasi koostati nimekirja võimalikest interferentsi põhjustavatest ühenditest, kasutades HMDB (Human Metabolome Database) andmebaasi, mis sisaldab suurt hulka endo- ja eksogeenseid metaboliite. Nimekirja kaasati ühendid, millel on sama molekulmass ($\pm 0,5$ Da) nagu kreatiini ja guanidinoatsetaadil, ning mille struktuur võimaldab vastavalt eksperimentaalselt mõõdetud andmetele fragmentatsiooni käigus 42 massiühiku suuruse fragmendi eraldumist (mis vastavad mõõdetavatele üleminekutele $132 > 90$ ja $118 > 76$ vastavalt kreatiini ja guanidinoatsetaadi jaoks). Kreatiini puhul oleksid teoreetilised segajad N-atsetüülalaniin, N-atsetüül- β -alaniin ja β -guanidinopropioonhape ning guanidinoatsetaadi puhul N-atsetüülglütsiin.

Loetletud ühendeid testiti võimaliku interferentsi suhtes, lisades madalaima (Cal1) ja kõrgeima kontsentratsiooniga (Cal6) kalibreerimislahusele ühendeid kontsentratsioonil $400 \mu\text{mol/L}$. Tuvastatud ja segavatele komponentidele omistatavad vastused ei tohi moodustada rohkem kui 20% analüüdi vastusest LLOQ-s ja mitte rohkem kui 5% sisestandardi vastusest LLOQ-proovis (EMA 2022).

Maatriksi efekt on määratletud kui analüüdi vastuse muutuseks, mis on tingitud segavatest ja sageli identifitseerimata komponentidest proovimaatriksis. Maatriksi efekti hinnati analüüsides 2 ERNDIM kvaliteedikontrolli ja 4 patsiendiproovi, mida spaigit, et saada 2 madala 2 keskmise ja 2 kõrge kvaliteedikontrolli taset ($100 \mu\text{mol/L}$, $400 \mu\text{mol/L}$ ja $1600 \mu\text{mol/L}$ vastavalt kreatiini ja $25 \mu\text{mol/L}$, $100 \mu\text{mol/L}$, $400 \mu\text{mol/L}$ guanidinoatsetaadi korral). Uuringuproovide teostatud mõõtmiste täpsus pidi jääma (hinnates tõesust (ingl *trueness*)) $\pm 15\%$ nimikontsentratsioonist ja kordustäpsus (variatsioonikoefitsient (%CV)) ei tohinud olla suurem kui 15%.

Kalibreerimiskõver näitab seost analüüdi nimikontsentratsiooni ja analüütilise meetodiga mõõdetud reaktsiooni vahel. Kalibreerimisvahemiku määravad madalaim ja kõrgeim kalibreerimisstandard (LLOQ ja ULOQ) (EMA 2022). Iga analüüsitsükli jaoks loodi uus kalibreerimiskõver. Kalibreerimiskõvera loomiseks analüüsiti nullproov (sisestandardiga varustatud pimeproovi) ja 6 kalibreerimisstandardit kontsentratsioonitasemega (iga kalibreerimisstandardi kontsentratsioon erines järgnevast $4\times$). Kalibreerimiskõvera loomisel nullproovist saadud signaali ei kasutatud. Iga kalibreerimisstandardi järelarvutatud kontsentratsioonide täpsus pidi jääma $\pm 20\%$ piiresse nominaalkontsentratsioonist LLOQ puhul ja $\pm 15\%$ piires kõigil muudel tasemetel. Vähemalt 75% 6-st kalibreerimisstandardist pidid vastama ülaltoodud kriteeriumidele. Kalibreerimiskõvera puhul hinnati ka selle lineaarsust.

Lineaarsus on meetodika võime näidata analüüsitulemusi, mis on proportsionaalsed reaalse kontsentratsiooniga proovis. Andut uurimistöös väljendati seda seost matemaatiliselt lineaarse funktsioonina: $y=ax+b$. Lineaarne kalibreerimisgraafik koosneb lineaarsest alast ja tööalast. Tööala on piirkond, mis näitab absoluutselt kõiki kontsentratsioonide analüüsitulemusi. Lineaarne ala on tööala piirkond (piiritletud alumise ja ülemise määramispiiriga LLOQ ja ULOQ), kus kehtib seos: analüüsitulemus ja proovi reaalse kontsentratsiooni sõltuvus on lineaarne. Antud sõltuvust kontrolliti analüüsides kalibreerimisgraafiku residuaale – kui need on jaotunud juhuslikult, siis võib sõltuvuse lugeda lineaarseks. Hinnati korrelatsioonikoefitsienti (r ; tegu on korrelatsiooniga teoreetilise ja mõõdetud tulemuse vahel) ja kalibreerimiskõvera determinatsioonikordajat (R^2). **Täpsus** (ingl *accuracy*) on mõõteprotseduuri omadus anda tulemusi, mis on lähedased tõelisele väärtusele

(nominaalväärtusele) või väärtusele, mis on saadud kasutades mingit kindlat meetodit (EMA 2022). EMA 2022 dokumentatsioonis hinnatakse täpsust valemiga (1):

$$\text{Täpsus (\%)} = (\text{Mõõdetud väärtus/Nominaalne väärtus}) \times 100 \quad (1)$$

Kordustäpsus (ingl *precision*) iseloomustab korduvmõõtmiste tulemuste omavahelist kokkulangevust ning on seotud juhusliku veaga (Mihkel 2020). Kordustäpsust väljendatakse variatsiooni koefitsendiga (%CV) (EMA 2022). Leitakse valemiga (2):

$$\%CV = (\text{standardhälve/keskmine}) \times 100 \quad (2)$$

Täpsuse ja kordustäpsuse määrati, analüüsides kvaliteedikontrolle (QC) iga analüüsitsükli sees (ingl *within-run*; wr) ja tsüklite vahel (ingl *between-run*; br), mõõtes korduvust ja korratavust vastavalt (EMA 2022). Päevasisese täpsuse ja kordustäpsuse hindamiseks analüüsiti igas analüüsitsüklis igal QC kontsentratsiooni tasemel vähemalt 5 kordust. Päevadevahelise täpsust ja kordustäpsuse hindamiseks analüüsiti igat QC kontsentratsiooni taset 3. analüütilise tsükli jooksul 3-l päeval. Esimene ja viimase katse vahel möödus 29 päeva.

Kalibreerimisköverad koostati 1 kord värskelt tehtud kalibreerimisstandardeid kasutades ja järgnevatel juba külmutatud kalibreerimisstandarditega. Täpsus igal kontsentratsiooni taseme peab olema $\pm 15\%$ nimikontsentratsioonist, välja arvatud LLOQ-l, kus see peab jääma $\pm 20\%$ piiridesse. Iga määratud kontsentratsioonitaseme kordustäpsus (%CV) peab jääma 15% piiridesse, välja arvatud LLOQ, kus see ei tohi ületada 20%. Ebatäpsuse ja täpsuse kontrollimise korral vähemalt 2/3 kõigist kvaliteedikontrollidest ja vähemalt 50% iga kord kontsentratsiooni tase peaks jääma $\pm 15\%$ piiresse nimiväärtustest.

Analüüdi ülekanne (ingl *carry-over*) on mõõdetud kontsentratsiooni muutus, mida põhjustavad analüüsi jäägid eelmisest proovist, mis on mõõteprotseduuri järgselt instrumenti alles jäänud. Valideerimise ajal hinnati analüüdi ülekannet, analüüsides tühiproovides leiduvat signaali pärast kõrgeima kontsentratsiooni tasemega kalibreerimisstandardi analüüsimist. Kõrgeimast kalibreerimisstandardi tasemele järgnevatel tühiproovidesse ülekandumine ei tohi olla suurem kui 20% analüüdi vastusest LLOQ juures ja 5% sisestandardi vastusest (EMA 2022).

Lahjendamise mõju puhul hinnatakse proovimaterjalidele rakendatud lahjendusprotseduuri mõju mõõdetud analüüdi kontsentratsiooni täpsusele ja kordustäpsusele (EMA 2022). Proovid valmistati ette 3-l viisil:

- a. Proovimaterjalina kasutati 50 μL lahjendamata uriini.
- b. Proovimaterjalina kasutati 50 μL uriini lahust, mis oli eelnevalt lahjendatud MQ veega kreatiini kontsentratsioonini 1,000 mmol/L. Näiteks: kui uriiniproovi eelnevalt määratud kreatiini sisaldus oli 5,000 mmol/L, siis segati 100 μL uriini ning 400 μL MQ vett ning edasisiseks analüüsiks kasutati 50 μL saadud lahust.
- c. Proovimaterjalina kasutati sellist ruumala lahjendamata uriini, mis selle lahjendamise korral MQ veega 50 μL -ni andnuks saadud lahuse kreatiini kontsentratsiooniks 1,000 mol/L. Näiteks: kui

uriiniproovi eelnevalt määratud kreatiini sisaldus oli 5,000 mmol/L, siis analüüsiks võeti 10 µL proovi ja 40 µL mQ vett.

Kirjeldatud kolmel viisil valmistati ette 2 ERNDIM kvaliteedikontrolli proovi ning 3 patsiendi proovi. Ettevalmistatud proovimaterjalid mõõdeti ühe analüütilise protsessi käigus ning tulemuste võrdlemiseks normaliseeriti esimesel viisil ettevalmistatud proovide mõõtetulemused seal leiduva kreatiini kontsentratsiooniga. Kahel järgneval viisil toimus normaliseerimine juba proovi ettevalmistuse käigus. Arvutati suurim ettevalmistatud proovimaterjalide (a, b, c) kontsentratsioonide erinevus mõlema analüüdi jaoks. Ühes katses teostati 5 kordust lahjendusteguri kohta. Hinnati lahjendatud QC-de ja patsiendi proovide keskmist täpsust, mis peab olema $\pm 15\%$ nimikontsentratsioonist ja kordustäpsus (%CV) ei tohi ületada 15% (EMA 2022).

Stabiilsuse uuring näitab meetodika usaldusväärsust erinevate analüütiliste parameetrite kõikumiste piirides. Meetodika on seda robustsem, mida vähem mõjutavad teda väikesed variatsioonid meetodika parameetrites. Analüütide stabiilsust bioloogilistes proovides on varasemalt kirjanduses põhjalikult uuritud. Guanidinoatsetaat on uriinis stabiilne toatemperatuuril vähemalt 15 päeva, -20 kraadi juures vähemalt 29 päeva. Kreatiini kontsentratsioon suureneb 15 päeva jooksul +4 kraadi juures keskmiselt 75% ja toatemperatuuri juures 15 päeva jooksul keskmiselt 326%. -20 kraadi juures on kontsentratsioon stabiilne vähemalt 29 päeva. Külmutatud proovide sulatamise järgselt on oluline proovimaterjali sonikeerimine vähemalt 10 minuti vältel – vastasel juhul on täheldatud mõlema analüüdi kontsentratsiooni vähenemist tõenäoliselt väljasadenemise tõttu. Ainevahetushaiguste laboris hoiustatakse proovimaterjali analüüsieelselt -20 kraadi juures kuni 29 päeva ning pärast sulatamist sonikeeritakse ultrahelivannil 10 minuti jooksul. Kirjanduses kirjeldatu verifitseerimiseks teostati stabiilsuse katsed, kus hinnati:

1. Analüütide stabiilsust maatriksis;
2. Analüütide stabiilsust töödeldud uuringuproovis;
3. Analüütide, kvaliteedi kontrollide, kalibraatorite ja töölahuste stabiilsust.

Ainevahetushaiguste laboris säilitatakse kõiki kvaliteedikontrolle, kalibraatoreid, sisestandardeid, surrogaatoriini ja patsiendiproove sügavkülmutatud olekus. Säilitusperioodide kinnitamiseks analüüsiti QC-le 2-I tasemel (madal ja kõrge), mis kattis pikemat perioodi kui uuringumaterjalidele etteantud säilitamise periood (29 päeva). Kalibraatorid, madalad ja kõrged kvaliteedikontrollid sulatati samal viisil kui uuritavad proovid ja hoiti tööpingil samal temperatuuril ja vähemalt sama kaua kui uuritavad proovid. Madalad ja kõrged QC tasemed analüüsiti nullhetkel ja pärast säilitamistingimusi. Keskmise kontsentratsioon igal QC tasemel peab olema $\pm 15\%$ nimikontsentratsioonist. Analüüdi stabiilsus töödeldud proovides hinnati korrates analüüsi 24 tunni möödudes samadest autosämpleri katsutitest.

Meetodi reprodutseeritavust hinnati QC-de korduvate mõõtmistega ja määrati QC-de täpsust ja kordustäpsust (vastavalt EMA 2022 nõuetele). Taassüstimise reprodutseeritavuse hindamiseks korrati analüüs, mis sisaldas kalibreerimisstandardeid ja 3. QC tasandit (madal, keskmine, kõrge). Mõõtmisi samadest materjalidest korrati 5x.

Kliinilise valideerimise käigus analüüsiti ainult ühte patsiendi proovi, kellel oli varasemalt diagnoositud kreatiini transporteri defitsiit (*SLC6A8*). Kuna tegu on harvikaigusega, siis kahjuks antud töö käigus rohkem positiivse leiuga uuringumaterjale võimalik analüüsida.

2. EESMÄRK

LC-MS/MS meetodikaga analüüsitakse tihti väga keerulisi maatrikseid, mis vastab tõele ka antud uurimistöö osas. LTD-de puhul on oluline tõendada, et meetodid töötavad ootuspäraselt ja et kasutatud meetodiga saadud tulemused on usaldusväärsed. Teadmine, et uuringu teostamiseks kasutatav meetod on läbinud valideerimise protsessi on ainevahetushaiguste laborile väga oluline. Seadusandluses on nõue, et rakendada ja kasutusele võtta võib ainult valideeritud meetodikad.

Uurimistöö eesmärk oli kohandada kirjanduses publitseeritud protokoll, mis põhines Carling jt 2008 aastal publitseeritud uurimistöö: "Simultaneous determination of guanidinoacetate, creatine and creatinine in urine and plasma by underivatized liquid chromatography-tandem mass spectrometry". Kohandada TÜK Geneetika ja personaalmeditsiini kliiniku ainevahetuslaboris kasutusel olevatele seadmetele ja valideerida vastavalt uue Euroopa Raviameti (EMA) juhiste (ICH guideline M10 on bioanalytical method validation and study sample analysis) kohaselt, mis on kehtivad alates 21. jaanuarist 2023. Valideerimisega selgitada välja kas antud meetodit on võimalik laboris kasutusele võtta.

Eesmärk on läbi viia valideerimise protseduur täies ulatuses. Valideerimise protsessis saadud mõõtetulemustega hinnata meetodi selektiivsust, spetsiifilisust, analüüdi ülekannet, mõõteala, kalibratsiooni kõverat, täpsust, kordustäpsust, lahjendamisel avalduvat mõju, maatriksi efekti, stabiilsust ja meetodi reprodutseeritavust.

3. MATERJALID JA MEETODID

a. Kasutatud aparatuur

Tömbekapp Q-Dynamic-1200 (Pol-Eko Aparatura), UPLC-MS/MS MassLynx (Waters Corp.) koos tarkvaraga TargetLynx (versioon 4.1, (Waters)), analüütiline kaal (XA.210.4Y.A, maksimaalne kaalutis 210 g, d= 0,01 mg; Radwag), Segisti Vortex_Genie 2 (Scientific Industries Inc), tsentrifuug 5424R (rootor FA-45-24-11; Eppendorf), kombikülmik (+4 °C/-20 °C) ja sügavkülmkapp (-20 °C).

b. Kasutatud reagensid

Sipelghape (HCOOH; CAS nr. 64-18-6; kat. nr 33015), guanidinoastetaat (CAS 352-97-6; kat. nr G11608) ja kusihape (CAS 69-93-2; 99%; kat. nr. U2626) on tarnitud Sigma-Aldrich'ist. Kreatiin monohüdraat (CAS nr. 6020-87-7; kat. nr 226790250; 99%), naatriumdivesinikfosfaat (CAS nr. 7558-80-7; kat. nr 389872500; 99%), naatriummonovesinikfosfaat (CAS nr. 7558-79-4; kat. nr 204851000; 99%), kaaliumoksalaat monohüdraat (CAS nr. 6487-48-5; kat. nr 13452.22; 98,5 – 101,0%) ja naatriumasiid (CAS 26628-22-8; kat. nr 190380050; 99%) on tarnitud Thermo Scientific Chemicals'ist. Ammooniumkloriid (CAS nr. 12125-02-9; kat. nr A /3920/53; 99,5%), naatriumsulfaat (CAS nr. 7757-82-6; kat. nr S/6640/53; 99,5%), naatriumsitraat dihüdraat (CAS 6132-04-3; kat. nr S/3320/53; 99,5 – 100,5%) ja urea (CAS nr. 57-13-6; kat. nr U/P610/60; 99,5%) on tarnitud Fisher Chemical'ist. Metanool (CAS nr. 67-56-1; kat. nr 34885), atsetonitriil IN; CAS nr. 75-05-8; kat. nr 34851) ja kaaliumkloriid (CAS nr. 7447-40-7; kat. nr 60130-1KG; 99,5%) on tarnitud Honeywell'ist. Isotoobid kreatiin monohüdraat-D3 (99,9%-D3; CAS nr. 284664-86-4; kat. nr D-1972) ja guanidinoatsetaat-D2 (98,2%-D2; CAS nr. 1173020-63-7; kat. nr D-6320) on tarnitud CDN isotopes'ist. Naatriumkloriid (CAS nr. 7647-14-5; kat. nr 1.06404 99%) on tarnitud Merck'ist. Kaltsiumkloriid (CAS nr. 10043-52-4; kat. nr 1023780500; 98%) on tarnitud Supelco'st. Magneesiumsulfaat heptahüdraat (CAS nr. 10034-99-8; kat. nr BP213-1; 99%) on tarnitud Fisher BioReagents'ist. Kontrollproovid Level 1 (ERNDIM IQCS Special Assays in Urine; kat. nr SAU-01.1) ja Level 2 (ERNDIM IQCS Special Assays in Urine; kat. nr SAU-01.2) on tarnitud ERNDIM'ist. Lahjendamisel kasutati labori tüüp-A vett (MiliQ). Reagensid säilitati tootejuhistes kirjeldatud tingimustel.

c. Kasutatud tarvikud

Automaatpipetid (10 – 100 µL; 20 – 200 µL; 100 – 1000 µL; 1 – 10 mL); pipetiotsikud (200 µL; 1000 µL; 10 mL); polüpropüleenist mikrotsentrifuugituubid, 1,5 mL ja 2,0 mL (Nerbe plus, kataloogi nr. 04-232-1200); polüpropüleenist tsentrifuugituubid 15 mL (Nerbe, kataloogi nr. 02-502-8001) ja 50 mL (Corning, kataloogi nr. S_352070_CORN); analüütiline kolonn (Waters ACQUITY UPLC HSS T3 1,8 µm 2,1x 100 mm, tootekood 186003539); kromatograafi proovi viaalid koos korkidega (1,5 mL) (Waters, kataloogi nr. 186000327c); 500 mL, 1000 mL mõõtsilindrid (klass A); 1 L klaasist keeratava korgiga pudelid eluendi jaoks; mõõtkolvid 50 mL, 25 mL, 10 mL (A klass).

d. Sisestandardi lahuste valmistamine

Sisestandardite alglahuste valmistamiseks kaaluti eraldi 10 mL mõõtekolbidesse ligikaudu 7,5 mg kreatiin-D3 (molekulmass 152,17 g/mol) ja 6,0 mg guanidinoatsetaat-D2 (molekulmass 119,12 g/mol). Lisati MQ vett peaaegu 10 mL märgini. Guanidinoatsetaat-D2 lahuse puhul lisati lahustumise parandamiseks 10 µL sipelghapet ja seejärel täideti kolvid 10 mL märgini. Mõõtekolvid suleti korkiga ning asetati 30 minutiks ultrahelivanni. Arvutati saadud alglahuste lõppkontsentratsioonid. Valmistatud alglahustest valmistati nende ühendamisel 50 mL kombineeritud sisestandardit (100 µM kreatiin-D3 + 100 µM guanidinoatsetaat-D2). Mõõtekolvid täideti MQ veega 50 ml märgini ja segati hoolikalt. Seejärel valminud kombineeritud sisestandard alikvooditi 1,5 mL kaupa 3 mL mikrotsentrifuugituubidesse ja säilitati -20 °C külmkapis (kuni 12 kuud). Alikvooditud sisestandardit kasutati valideerimise protseduuris.

e. Kalibraatorite valmistamine

Kalibraatorite alglahuste valmistamiseks kaaluti eraldi 10 mL mõõtekolbidesse ligikaudu 24 mg kreatiini ja 6 mg guanidinoatsetaati. Seejärel listi MQ vett peaaegu 10 mL märgini. Guanidinoatsetaadi lahusele lisati täiendavalt lahustumise parandamiseks 10 µL sipelghapet. Seejärel täideti kolvid 10 mL märgini. Kolvid suleti korkidega ning asetati 30 minutiks ultrahelivanni lahustuma. Arvutati saadud alglahuste lõppkontsentratsioonid. Valmistatud alglahustest valmistati nende ühendamisel 10 mL kombineeritud kalibratsioonilahust (3072 µM kreatiini + 768 µM guanidinoatsetaati, Cal6). Seejärel võeti kuus 15 mL tsentrifuugituubi, mida markeeriti vastavalt Cal 1 ... Cal 6. Valmistatud kombineeritud kalibratsioonilahus valati ümber Cal 6 tsentrifuugituubi. Cal 6 kalibratsioonilahusest valmistati järjestikused 4-kordsed seerialahjendused (1 osa Cal 6 lahust ja 3 osa MQ vett) kasutades ühte ja sama pipette. Lõpliku kalibratsioonilahuste kontsentratsioonid olid järgnevad:

- Cal 1 (3 µM kreatiin + 0,75 µM guanidinoatsetaat)
- Cal 2 (12 µM kreatiin + 3 µM guanidinoatsetaat)
- Cal 3 (48 µM kreatiin + 12 µM guanidinoatsetaat)
- Cal 4 (192 µM kreatiin + 48 µM guanidinoatsetaat)
- Cal 5 (768 µM kreatiin + 192 µM guanidinoatsetaat)
- Cal 6 (3072 µM kreatiin + 768 µM guanidinoatsetaat)

Seejärel alikvooditi kalibratsioonilahused 250 µL kaupa 1,5 mL mikrotsentrifuugituubidesse. Lahused säilitati -20 °C külmkapis (kuni 12 kuud).

f. Kontrolliproovide valmistamine

Kontrollproovid (Level 1, Level 2) võeti külmkapist ja lasti soojeneda umbes 10 minutit toatemperatuuril. Pudelik avati eemaldades esmalt vaakum süstlanõela abil. Seejärel lahustati sisu 5 mL MQ vees. Kontrollproovi lahusel lasti seista 15 min, seejärel loksutati homogeniseerumiseks kiigutil 20 min. Valminud kontrollproovid alikvooditi 250 µL kaupa 1,5 mL mikrotsentrifuugituubidesse. Kontrolliproovide alikvoote säilitati -20 °C külmikus. Alikvoodid on sellistes tingimustes stabiilsed kuni 3 kuud.

g. Uriini lahjenduslahuste valmistamine

500-mL magnetsegajapulga varustatud klaaspudelisse valati 500 mL MQ vett. Vett soojendati magnetsegajal segades temperatuurile 35-40° C). Seejärel lisati ükshaaval järgnevad ained:

- Naatriumsulfaat (0,85 g)
- Kusihape (0,125 g)
- Naatriumtsitraat dihidraat (0,36 g)
- Urea (7,50 g)
- Kaaliumkloriid (1,154 g)
- Naatriumkloriid (0,878 g)
- Kaltsiumkloriid (0,093 g)
- Ammooniumkloriid (0,633 g)
- Kaaliumoksalaat monohüdraat (0,018 g)
- Magneesiumsulfaat heptahüdraat (0,541 g)
- Naatriumdivesinikfosfaat dihidraat (1,456 g)
- Naatriummonovesinikfosfaat dihidraat (0,416 g)
- Naatriumasiid (0,100 g)

Ainete lahustumise järel eemaldati magnetsegajapulga ning lahust säilitati +4° C juures (kuni 12 kuud).

h. Töölahuste valmistamine

50 % v/v ACN-MQ vesi lahuse valmistamine:

1 L klaaspudelisse mõõdeti mõõtsilindriga 500 mL AcN ja 500 mL MQ vett. Pudeli suleti korkiga ja loksutati läbi. Lahust valmistati vahetult enne analüüsi.

~ 0,2% v/v HCOOH lahuse valmistamine

1 L klaaspudelisse mõõdeti mõõtsilindriga 998 mL MQ vett. Juurde pipeteeriti 2 mL sipelghapet. Pudeli suleti korkiga ja loksutati läbi. Lahust valmistati vahetult enne analüüsi.

25 mL 2% v/v HCOOH lahuse valmistamine

25 mL mõõtekolbi pipeteeriti 500 µL sipelghapet ja seejärel täideti märgini MQ veega. Mõõtekolb suleti korkiga ja loksutati läbi. Lahust säilitati 6 kuud +4° C kuni +8° C juures.

i. Proovimaterjalide ettevalmistamine

Sügavkülmikust võetud sisestandard, kalibraatorid, kontrollid ja uriinid lasti sulada toatemperatuuril 30 minutit. Uriini lahjenduslahusest valmistati 10-kordse lahjendusega töölahus pipeteerides 4 mL lahjenduslahust 50 mL tsentrifuugituubi ning lisades MQ vett 40 mL märgini.

Juhul kui patsiendi uriiniproovi kreatiniini sisaldus oli üle 1,000 mmol/L, lahjendati patsiendi uriin MQ veega kreatiniini kontsentratsioonini 1,000 mmol/L lõppruumalani 500 µL. Seejärel segati lahust vorteks-segajal 10 sekundit. Juhul, kui patsiendi uriiniproovi sisaldus oli 1,000 mmol/L või alla selle, proovile lahjendust ei teostatud.

Seejärel võeti vajalik kogus 1,5 mL tsentrifuugituube, mida markeeriti sobivate identifikaatoritega (nt Blank, Cal 1...Cal 6, QC1, QC2, Pt 1). Igasse tuubi pipeteeri 20 µL sisestandardit. Tühiproovile (Blank) lisati 520 µL uriini lahjenduslahuse töolahust. Kalibratsiooniproovidele lisati 50 µL vastavat kalibratsioonilahust ning 470 µL uriini lahjenduslahuse töolahust. Kontrollproovidele lisati 50 µL vastavat kontroll-lahust ning 470 µL uriini lahjenduslahuse töolahust. Kui patsiendi proovile teostati eelnev lahjendamine siis tuubi lisati 50 µL lahjendatud uriini ning 470 µL uriini lahjenduslahuse töolahust. Lõpuks lisati igasse tsentifuugituubi 60 µL 2% v/v HCOOH lahust. Igat proovi segati vorteksil 15 s ja seejärel tsentrifuugiti 10 min 14 000 rpm juures 4° C temperatuuril. Igast ettevalmistatud proovist kanti 500 µL supernatanti LCMSMS automaatsisestusvialidesse. Pärast kõikide proovide valmistamist sisestati need koheselt LCMSMS seadme termostateeritud proovihoidjasse.

j. Vedelikkromatograafia ja massispektrometria parameetrid

Kromatograafia viidi läbi LC-MS/MS Acquity™ Ultra Performance LC (Waters Corp.) seadmega, mis on varustatud automaatse proovivõtturiga. Kreatiin ja guanidinoatsetaat eraldati gradientelueerimise käigus, süstides prooviekstrakti (5 µl) Waters ACQUITY UPLC HSS T3 1,8 µm 2,1x 100 mm kolonni. Proovivõtt ja kolonnis voolutamine toimus ümbritseva keskkonna temperatuuril. Mobiilfaas A koosnes MQ veest, millele oli lisatud 0,2% sipelghapet. Mobiilfaas B oli metanool (rakendatud gradient tabelis 2) ning seda manustati voolukiirusel 0,500 mL/min. Kogu jooksu aeg oli 14 minutit.

Tabel 2. Analüüsil rakendatud lahuste gradient

Nr	Aeg (min)	Voolukiirus (mL/min)	%A	%B
1	Proovi süstimise algusest alates	0,10	100,0	0,0
2	3,0	0,10	100,0	0,0
3	5,0	0,10	98,0	2,0
4	7,0	0,15	20,0	80,0
5	9,0	0,15	20,0	80,0
6	9,5	0,15	100,0	0,0
7	14,0	0,15	100,0	0,0

Analüüsiks kasutati kolmekordset kvadruupoolset massispektromeetrit Xevo™ TQD (Waters Corp.). Seadet kasutati positiivse ionisatsiooni režiimis ja proovi sisestamine toimus ülalkirjeldatud vedelikkromatograafia süsteemi kaudu. Massispektrometri häälestamiseks infuseeriti kreatiini, kreatiini ja guanidinoatsetaadi 10 µmol/L lahuseid mobiilfaasis A otse ioonilikkasse. Iga analüüdi jaoks optimeeriti lähtetingimused, et maksimeerida analüütide ja sisestandardite M+H⁺ prekursorioonide intensiivsust (m/z 114, 117, 118, 120, 132 ja 135). Optimeeritud seaded on kokku võetud tabelis 1. Seejärel reguleeriti kollisioonienergiat, et optimeerida signaali kõige levinumate fragmentioonide jaoks (m/z 44, 47, 76, 78, 90 ja 93). Instrumendi seadistused olid järgmised: kapillaarpinge 2,80 kV; koonuspinge 25 V; desolvatatsioonigaasi temperatuur 500° C; desolvatatsioonigaasi vooluhulk 650 (L/h); koonusgaasi vooluhulk 20 (L/h); ionisatsioonilika temperatuur 150° C; kollisioonienergia 11 V.

Kõik andmed saadi mitme reaktsiooni jälgimise režiimis (MRM) ooteajaga 100 ms kanali kohta. Jälgiti üleminekuid 118>76, 120>78, 132>90, 135>92, vastavalt guanidinoatsetaadi, [13C2]-guanidinoatsetaadi, kreatiini ja [2H3]-kreatiini puhul. Andmete kogumine ja töötlemine viidi läbi tarkvaraga TargetLynx (MassLynx ver. 4.1, Waters Corp.). Analüüdi ja sellele vastava sisestandardi

signaalide retentsiooniaeg ei tohtinud väljuda $\pm 0,1$ min piire. Kõik piigid integreeritud baasjoone pealt. Valideerimise andmete töötlemine viidi läbi Exceli™ (Microsoft). Kalibreerimiskõverad koostati kaalutud ($1/x$) lineaarse regressiooniga. Kalibreerimiskõverad koostati igal analüüsi protseduuril.

4. TULEMUSED JA ARUTELU

Üldiselt on LC-MS/MS meetodid väga kõrge spetsiifilisusega, sest proovi komponendid lahutatakse kromatograafiliselt ning massispektromeetriliselt tuvastatakse kindel massiüleminek. Kirjanduses leiduvatel andmetel ei ole kreatiini ja guanidinoatsetaadi määramise LC-MS/MS meetoditel täheldatud interferentsi ühegi endogeense ega eksogeense metaboliidiga.

Käesoleva valideerimise käigus uuriti võimalikku interferentsi uriinis leiduvate põhiliste komponentidega (uurea, kusihape, kreatiiniin, anorgaanilised soolad). Loetletud komponendid ei põhjustanud uuritavate üleminekute signaali kasvu tühiproovis kreatiini ja guanidinoatsetaadi elueerumisaegadel. Ja seega võib järeldada, et surrogaatmaatriksi ei avalda mõju meetodile.

Spetsiifilisuse hindamiseks koostati koostati nimekiri võimalikest interferentsi põhjustavatest ühenditest, kasutades HMDB (Human Metabolome Database) andmebaasi, mis sisaldab suurt hulka endo- ja eksogeenseid metaboliite. Nimekirja kaasati ühendid, millel on sama molekulmass ($\pm 0,5$ Da) kreatiini ja guanidinoatsetaadiga, ning mille struktuur võimaldab vastavalt eksperimentaalselt mõõdetud andmetele fragmentatsiooni käigus 42 massiühiku suuruse fragmendi eraldumist (mis vastavad mõõdetavatele üleminekutele $132 > 90$ ja $118 > 76$ vastvalt kreatiini ja guanidinoatsetaadi jaoks). Andmebaasi otsing andis tulemuseks, et kreatiini puhul on teoreetilised segajad N-atsetüülalaniin, N-atsetüül- β -alaniin, β -guanidinopropioonhape ja guanidinoatsetaadi puhul N-atsetüülglütsiin.

Loetletud ühendeid testiti võimaliku interferentsi suhtes, lisades madalaima (Cal1) ja kõrgeima kontsentratsiooniga (Cal6) kalibreerimislahusele ühendeid kontsentratsioonil $400 \mu\text{mol/L}$. Lisatud ühendid ei põhjustanud uuritavate üleminekute olulist signaali muutust kalibratsiooniproovides kreatiini ja guanidinoatsetaadi elueerumisaegadel (Tabel 3 ja kromatogramm lisa 1). Testitud ühendid ei andnud signaale sisestandardi massiüleminekul ja retentsiooniajal.

Tabel 3. Interferentskatsete tulemused

Interferent	Interfereeriva aine poolt avaldatud keskmine mõju analüüdile lineaarses alas	
	Kr	GAA
<i>N-atsetüülglütsiin</i>	1,7%	1,1%
<i>N-atsetüülalaniin</i>	3,9%	-2,6%
<i>N-atsetüül-β-alaniin</i>	4,2%	6,1%
<i>β-guanidinopropioonhape</i>	3,1%	2,0%

Maatriksi efekt juhuslikku viga hinnati nii päevasisese kui päevadevahelise juhusliku vea määramisega (Tabel 4). Kõik mõõtmistulemused vastasid EMA 2022 esitatud nõuetele. Päevasiseselt mõõdetud QC ja patsiendiproovide kontsentratsioonide hälved jäid nominaalkontsentratsioonide $\pm 15\%$ piiridesse: kreatiinil keskmiseks häveks oli 3,9% ja guanidinoatsetaadil 2,9%. Mõõdetud kordustäpsus (%CV) oli 1,4% ja 2,2% vastavalt ja jäi samuti nõutud 15% piiridesse.

Tabel 4. Päeviseste ja päevadevaheliste mõõtmiste keskmised tulemused

päeviseste mõõtmiste keskmised tulemused				
Analüüt	Hälve (%)	Saagis (%)	%CV	Tõesus (accuracy)
Kreatiin	3,9%	103,9%	1,4%	102,8%
Guanidinoatsetaat	2,9%	102,9%	2,2%	101,4%
päevadevaheliste mõõtmiste keskmised tulemused				
Analüüt	Hälve (%)	Saagis (%)	%CV	Tõesus (accuracy)
Kreatiin	3,4%	103,4%	1,3%	102,5%
Guanidinoatsetaat	0,7%	100,7%	4,0%	100,7%

Täiendavalt hinnati maatriksi efekti saagise määramisega. Kõiki proove rikastati määratavate analüütidega kolmel erineval kontsentratsioonil (kreatiini puhul 100 µmol/L, 400 µmol/L, 1600 µmol/L ja guanidinoatsetaadi puhul 25 µmol/L, 100 µmol/L, 400 µmol/L). Lubatud saagiste vahemik on 85 - 115%. Arvutatud mõõtmiste saagised jäid kreatiini puhul vahemikku 99,1 - 108,3% ning guanidinoatsetaadi puhul 90,4 - 112,3%. Järelduseks võib öelda, et maatriksi efekt esineb aga lubatud piirides.

Lineaarsus määrati mõõtes analüütidega rikastatud tühiproove kontsentratsioonide vahemikus 0,012 – 207840 µmol/L kreatiini ja 0,019 – 19980 µmol/L guanidinoatsetaadi korral. Signaal oli lineaarne kuni kontsentratsioonideni 12990 µmol/L ja 4995 µmol/L vastavalt kreatiini ja guanidinoatsetaadi puhul, mille puhul mõõdetud väärtuse erinevus kalibraatorite nimiväärtusest oli madalam kui EMA poolt lubatud 15%. Lineaarne tööala katab täies ulatuses analüütide bioloogilised kontsentratsioonide vahemikud uriinis. Tabelis 5 on summeeritud 5 kalibratsioonigraafiku karakteristikud (graafikud on LISA 3).

Table 5. Analüütide kalibreerimisgraafiku punktid, sirge valem ja determinatsioonikordaja (R²)

Aine	Korduste arv	Kalibreerimisgraafiku punktid	Regressioonisirge valem	R²
Kreatiin	5	3; 12; 48; 192; 768; 3072	$y=2,1914x + 0,141$	1
Guanidinoatsetaat	5	0,75; 3; 12; 48; 768	$y=2,2698x + 2E-13$	1

Alumise kvantifitseerimispiiri määramiseks teostati täiendavad mõõtmised (tabel 6). Madalaimad kontsentratsioonid, mille puhul EMA kriteeriumid oli täidetud, olid 0,4 µmol/L kreatiini puhul ja 0,75 µmol/L guanidinoatsetaadi korral.

Tabel 6. Alumise määramispiiri mõõtetulemused

Kreatiin			Guanidinoatsetaat		
c (µmol/L)	Tõesus	Korduvus (CV%)	c (µmol/L)	Tõesus	Korduvus (CV%)
3,0	4,4	0,8%	0,75	0,3	7,4%
1,0	8,7	3,0%	0,25	7,4	33,1%
0,4	14,8	5,8%	0,10	-13,2	30,4%
0,2	35,1	7,5%	0,05	58,9	63,9%

Analüütide ülekannet hinnati mõõtes pärast kontsentreerituima kalibratsiooniproovi süsti tehtud tühiproovi süsti analüüdi signaali pindala. 10 mõõtmise korral oli keskmine analüüdi ülekanne kreatiini puhul korral 0,111 µmol/L (0,0039%) ja guanidinoatsetaadi puhul 0,04 µmol/L (0,0052%) (Tabel 7). Tulemused vastasid esitatud nõuetele. Kuna analüüdi ülekanne kreatiini puhul on 0,111 µmol, mis on suurem kui EMA pool lubatud 20% LLOQ-st, siis meetodi kvantifitseerimispiiridena sätestatakse 0,6 µmol/L kreatiini jaoks ja 0,75 µmol/L guanidinoatsetaadi jaoks.

Tabel 7. analüüdi ülekande mõõtetulemused

Kreatiin			Guanidinoatsetaat		
Signaal		Analüüdi ülekanne (%)	Signaal		Analüüdi ülekanne (%)
Kalibraator 6	Tühiproov		Kalibraator 6	Tühiproov	
6491,5	0,179	0,0028%	1665,3	0,097	0,0058%
6459,2	0,273	0,0042%	1767,5	0,043	0,0024%
6438,9	0,189	0,0029%	1716,0	0,060	0,0035%
6659,0	0,274	0,0041%	1784,0	0,08	0,0045%
6528,6	0,248	0,0038%	1672,0	0,088	0,0053%
6110,1	0,232	0,0038%	1806,4	0,137	0,0076%
6228,7	0,251	0,0040%	1770,9	0,045	0,0025%
6281,0	0,277	0,0044%	1794,7	0,097	0,0054%
6169,2	0,304	0,0049%	1743,6	0,084	0,0048%
6311,5	0,227	0,0036%	1781,3	0,173	0,0097%
	keskmine:	0,0039%		keskmine:	0,0052%

Tõesuste määrati rahvusvaheliste kontrollmaterjaliga. Meetodika tõesuse hindamiseks kasutati ERNDIM kvaliteedikontrolliproove. Kuna kvaliteedikontrolliproove oli võimalik saada vaid kahel erineval kontsentratsioonil, siis kasutati täiendavaks tõesuse hinnangu saamiseks ka 4 patsiendi proovi, mida mõõdeti analüütidega rikastatult ja rikastamata ning mille mõõtetulemuste vahe ja lisatud analüüdi suhte (ehk saagise) järgi arvutati tõesus suhtelise hälvena. Päevadevaheline tõesus oli kreatiini puhul vahemiku -0,9% kuni 8,4%, guanidinoatsetaadi puhul -9,6% kuni 10,9%, jäädes lubatud 15% vahemikku. Päevasisene tõesus varieerus kreatiini puhul vahemikus -0,6% kuni 8,3%, guanidinoatsetaadi puhul -1,8% kuni 12,7%, jäädes lubatud 15% vahemikku.

Päevadevahelise ja päevasise kordustäpsuse määramiseks kasutati kahte ERNDIM kvaliteedikontrolliproovi ning 4 patsiendi proovi, mis katsid võimalikult suure vahemiku mõõtepiirkonnast. Täiendavalt kasutati samu proove, mis olid rikastatud analüütidega, et saada kordustäpsuse hinnang ka kõrgemate analüütide kontsentratsioonide piirkonnas. Variatsioonikoeffitsiendid jäid kreatiini puhul vahemikku 0,3-2,3% ja guanidinoatsetaadi puhul vahemikku 1,2-7,8%, olles kõikidel juhtudel madalam EMA nõutud 15% kriteeriumist. Päevasisesed kordustäpsuse variatsioonikoeffitsiendid olid EMA nõutud 15%-st kriteeriumist väiksemad, olles kreatiini puhul vahemikus 0,8-2,7% ja guanidinoatsetaadi puhul 1,0-4,2%.

Valideerimise käigus uuriti, kas uriiniproovide lahjendamine proovide ettevalmistamise käigus mõjutab analüüsi tulemusi. Uuriti 3 proovi ettevalmistamise viisi ning hinnati mõõdetud tulemuste maksimaalset üksteisest erinevust (tulemused tabel 8). Kreatiini jaoks oli see vahemikus 2,4–18,5% (keskmine 9,6%) ja guanidinoatsetaadi jaoks 6,4–17,3% (keskmine 9,0%). Erinevuste keskmised tulemused jäävad alla

EMA poolt sätestatud kvaliteedikriteeriumit (max 15%) ning siit saab järeldada, et testitud proovilahjenduse meetodikad ei põhjusta analüüsitulemustes olulisi hälbeid.

Tabel 8. Lahjendusefekti mõju uuringute koondtulemused.

Proov	Kreatiin			Guanidinoatsetaat		
	Keskmine c (µmol/L Crea)	Maksimaalne erinevus	Keskmine %CV	Keskmine c (µmol/L Crea)	Maksimaalne erinevus	Keskmine %CV
QC1	104,5	2,4%	0,6%	37,8	6,4%	2,5%
QC2	237,5	4,0%	0,5%	87,5	6,4%	1,1%
Pt1	53,1	5,0%	0,6%	59,8	6,7%	1,8%
Pt2	11,9	18,0%	0,4%	2,8	8,1%	1,2%
Pt3	2,8	18,5%	1,6%	8,0	17,3%	0,6%
Keskmine		9,6%	0,7%		9,0%	1,5%

Analüütide stabiilsust bioloogilistes proovides on varasemalt kirjanduses põhjalikult uuritud. Guanidinoatsetaat on uriinis stabiilne toatemperatuuril vähemalt 15 päeva, -20 kraadi juures vähemalt 29 päeva. Kreatiini kontsentratsioon suureneb 15 päeva jooksul +4 kraadi juures keskmiselt 75% ja toatemperatuuri juures 15 päeva jooksul keskmiselt 326%. -20 kraadi juures on kontsentratsioon stabiilne vähemalt 29 päeva. Külmutatud proovide sulatamise järgselt on oluline proovimaterjali sonikeerimine vähemalt 10 minuti vältel – vastasel juhul on täheldatud mõlema analüüdi kontsentratsiooni vähenemist tõenäoliselt väljasadenemise tõttu.

Reprodutseeritavuse kriteeriumi vastavad EMA esitatud nõuetele. Tulemused on välja toodud tabelis 9 ja 10.

Tabel 9. Reprodutseeritavuse andmed kreatiini meetodil

Kreatiin	Reprodutseeritavus				
	keskmine	Nominaalne	Hälve	Std.hälve	(%CV)
QC1	129,0	119,2	8,3%	3,1	2,4%
QC2	287,1	275,1	4,3%	4,7	1,6%
QC1 low	232,7	229,0	1,6%	4,4	1,9%
QC2 low	395,4	387,1	2,1%	6,1	1,5%
QC1 med	544,2	529,0	2,9%	6,3	1,1%
QC2 med	695,0	687,1	1,1%	7,2	1,0%
QC1 high	1719,7	1729,0	-0,5%	9,5	0,6%
QC2 high	1892,8	1887,1	0,3%	24,0	1,3%
		Keskmine	2,5%		1,4%

Tabel 10. Reprodutseeritavuse andmed guanodinoatsetaadi meetodil

Guanodinoatsetaat	Reprodutseeritavus				
	keskmine	Nominaalne	Hälve	Std.hälve	(%CV)
QC1	43,2	38,4	12,7%	1,1	2,5%
QC2	101,4	101,5	-0,1%	2,6	2,6%
QC1 low	68,2	68,2	0,0%	1,4	2,1%
QC2 low	128,5	126,4	1,7%	2,2	1,7%
QC1 med	145,5	143,2	1,6%	4,0	2,7%
QC2 med	202,4	201,4	0,5%	3,8	1,9%
QC1 high	435,9	443,2	-1,6%	12,3	2,8%
QC2 high	498,7	501,4	-0,5%	4,3	0,9%
		keskmine	1,8%		2,1%

Kliinilise valideerimise käigus analüüsiti patsiendi proovi, kellel oli varasemalt diagnoositud kreatiini transporteri defitsiit (*SLC6A8*). Proovi kreatiini sisalduseks määrati > 3072 mmol/mol crea (~ 12700 mmol/mol cr) ja guanidinoatsetaadi sisalduseks 166,1 mmol/mol crea. Oluliselt kõrgeks kreatiini sisaldus uriinis viitab kreatiini transporteri defitsiidile. Mõõdetud analüütide väärtused on kooskõlas ka Tallinna Terviseametis läbiviidud analüüsidega samast proovimaterjalist (kreatiin 11314,5 mmol/mol crea; guanidinoatsetaat 155,84 mmol/mol crea). Kuna meetodika vastab kõikidele EMA esitatud nõuetele võib meetodika kasutusele võtta. Kliinilisele valideerimise nõuetes on erisus harvikaigustele ja täiendavaid võrdlusmõõtmisi võib teostada veel pikemat aega pärast analüütilist valideerimist.

5. KOKKUVÕTE

Uurimistöõ käigus kohandadi kirjanduses publitseeritud protokoll, mis põhines Carling jt 2008 aastal publitseeritud uurimistöõl: "Simultaneous determination of guanidinoacetate, creatine and creatinine in urine and plasma by underivatized liquid chromatography-tandem mass spectrometry". Kohandati TÜK Geneetika ja personaalmeditsiini kliiniku ainevahetuslaboris kasutusel olevatele seadmetele. Meetodika eesmärk oli määrata kreatiini ja guanodinoatsetaati uriinis vedelikkromatograafia-tandemmassispektromeetria meetodil.

Viisime läbi valideerimise protseduur täies ulatuses vastavalt 2022 Euroopa Raviameti „ICH guideline M10 on bioanalytical method validation and study sample analysis“ juhiste, mis hakkasid kehtima 1 jaanuarist 2023. Valideerimise protsessis saadud mõõtetulemustega hinnata meetodi selektiivsust, spetsiifilisust, analüüdi ülekannet, mõõteala, kalibratsiooni kõverat, täpsust, kordustäpsust, lahjendamisel avalduvat mõju, maatriksi efekti, stabiilsust ja meetodi reprodutseeritavust. Tulemuseks leidsime, et meetodit saab rakendada ettenähtud eesmärgil. Kõik mõõdetud näitajad vastasid EMA kehtivatele nõuele.

Tulevikus tuleks teostada täiendavaid uuringuid kliinilis valideerimise läbiviimiseks. Kuna kreatiini tulemusi tihti normaliseeritakse kreatiniini tulemustega siis tuleks tulevikus proovida meetodit täiustada, et sellega oleks võimalik ka kreatiniini uriinist kvantitatiivselt määrata sama analüüsi protseduuriga.

6. SUMMARY

During the research, the protocol published in the literature was adapted, which was based on the research work published by Carling et al. in 2008: "Simultaneous determination of guanidinoacetate, creatine and creatinine in urine and plasma by underivatized liquid chromatography-tandem mass spectrometry". It was adapted to the equipment used in the metabolic laboratory of the Genetics and Personal Medicine Clinic of TÜK. The aim of the methodology was to determine creatine and guanidinoacetate in urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry.

We carried out the validation procedure in full accordance with the 2022 European Medicines Agency "ICH guideline M10 on bioanalytical method validation and study sample analysis" instructions, which came into force on January 1, 2023. With the measurement results obtained during the validation process, we evaluated the method's selectivity, specificity, carry over, measurement area, calibration curve, precision, repeatability, dilution effect, matrix effect, stability and method reproducibility. As a result, we found that the method can be applied for the intended purpose. All measured indicators were in accordance of the EMA requirements.

In the future, further studies should be performed to perform clinical validation. Since the results of creatine are often normalized with the results of creatinine, the method should be improved in the future so that it is also possible to quantitatively determine creatinine from urine in the same analytical run.

7. KASUTATUD KIRJANDUS

Ah Mew N, Simpson KL, et al. Urea cycle disorders overview. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJH, Stephens K, Amemiya A, eds. GeneReviews. Seattle: University of Washington. 1993-2020. [updated 2017 Jun 22].

Almeida LS, Salomons GS, et al. Exocytotic release of creatine in rat brain. *Synapse* 2006; 60: 118–123.

Almeida LS, Verhoeven NM, et al. Creatine and guanidinoacetate: diagnostic markers for inborn errors in creatine biosynthesis and transport. *Mol Genet Metab.* 2004; 82: 214–9.

Ardrey B. *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry: an introduction.* 2004.

Arias A, Garcia-Villoria J, et al. Guanidinoacetate and creatine/creatinine levels in controls and patients with urea cycle defects. *Mol Genet Metab.* 2004; 82(3): 220-3.

Betsalel OT, Pop A. et al. Detection of variants in SLC6A8 and functional analysis of unclassified missense variants. 2012; 105: 596-601.

Carducci C, Birarelli M. et al. Automated high-performance liquid chromatographic method for the determination of guanidinoacetate in dried blood spots: a tool for early diagnosis of guanidinoacetate methyltransferase deficiency. 2001; 755(1-2): 343-8.

Carducci C, Birarelli M, et al. 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(10): 1772-8.

Cheillan D, Salomons GS. et al. Renal diagnosis of guanidinoacetate methyltransferase deficiency: increased guanidinoacetate concentrations in amniotic fluid. 2006; 54(4): 775-7.

Civiletti F, Assenzio B, et al. Acute tubular injury is associated with severe traumatic brain injury: in vitro study on human tubular epithelial cells. *Sci Rep.* 2019; 9(1): 6090.

Clark AJ, Rosenberg EH, et al. X-linked creatine transporter (SLC6A8) mutations in about 1% of males with mental retardation of unknown etiology. 2006; 119(6): 604-10.

da Silva RP, Nissim I, et al. Creatine synthesis: hepatic metabolism of guanidinoacetate and creatine in the rat in vitro and in vivo. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2009; 296(2): E256-61.

deGrauw TJ, Cecil KM, et al. The clinical syndrome of creatine transporter deficiency. *Mol Cell Biochem.* 2003; 244(1-2): 45-8.

Derave W, Marescau B, et al. Plasma guanidino compounds are altered by oral creatine supplementation in healthy humans. *J Appl Physiol (1985).* 2004; 97(3): 852-7.

Dewi K. R. Advances and key considerations of liquid chromatography–mass spectrometry for porcine authentication in halal analysis. *Jour. of Anal Science and Tech.* 2023; 14(13).

Edison EE, Brosnan ME, et al. Creatine synthesis: production of guanidinoacetate by the rat and human kidney in vivo. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2007; 293(6): F1799-804.

El-Kasaby A, Kasture A, et al. Rescue by 4-phenylbutyrate of several misfolded creatine transporter-1 variants linked to the creatine transporter deficiency syndrome. *Neuropharmacology*. 2019; 161: 107572.

EMA. ICH guideline M10 on bioanalytical method validation and study sample analysis. 2022

Ensenauer R, Thiel T, et al. Guanidinoacetate methyltransferase deficiency: differences of creatine uptake in human brain and muscle. *Mol Genet Metab*. 2004; 82(3): 208-1.

European Food Safety Authority. Safety and efficacy of guanidinoacetic acid as feed additive for chickens for fattening. *EFSA Journal*. 2009; 988: 1-30.

Fan RJ, Guan Q, et al. Benzyllic rearrangement stable isotope labeling for quantitation of guanidino and ureido compounds in thyroid tissues by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *Anal Chim Acta*. 2016; 908: 132-40.

Fan RJ, Zhang F, et al. High-throughput screening and quantitation of guanidino and ureido compounds using liquid chromatography-drift tube ion mobility spectrometry-mass spectrometry. *Anal Chim Acta*. 2017; 961: 82-90.

Flood RG, Pinelli RW. Urinary glycoamine, creatine and creatinine; their excretion in children with the nephrotic syndrome. *Am J Dis Child*. 1949; 78(1): 67-71.

Ford HC, Lim WC, et al. Renal function and electrolyte levels in hyperthyroidism: urinary protein excretion and the plasma concentrations of urea, creatinine, uric acid, hydrogen ion and electrolytes. *Clin Endocrinol*. 1989; 30(3): 293-301.

Gordon GG, Southren AL. Thyroid - hormone effects on steroid – hormone metabolism. *Bull N Y Acad Med*. 1977; 53(3): 241-59.

Guthmiller P, Pilsum JFV, et al. Cloning and sequencing of rat kidney L-arginine:glucine amidinotransferase. Studies on the mechanism of regulation by growth hormone and creatine. *J Biol Chem*. 1994; 269(26): 17556-60.

Guimbal C, Kilimann MW. Na⁺-dependent creatine transporter in rabbit brain, muscle, heart and kidney. cDNA cloning and functional expression. *J Biol Chem*. 1993; 268(12): 8418-21.

Hanff E, Kayacelebi AA, et al. Simultaneous stable-isotope dilution GC-MS measurement of homoarginine, guanidinoacetate and their common precursor arginine in plasma and their interrelationships in healthy and diseased humans. *Amino Acids*. 2016; 48(3): 721-32.

Hjelmervik H, Hausmann M, et al. Sex-and sex hormone-related variations in energy-metabolic frontal brain asymmetries: a magnetic resonance spectroscopy study. *Neuroimage*. 2018; 172: 817-25.

Hoberman HD, Lloyd CW, et al. The role of the liver in guanidoacetic acid metabolism in man. *Science*. 1946; 104(2713): 619-20.

Hu H, Haas SA, et al. X-exome sequencing of 405 unresolved families identifies seven novel intellectual disability genes. *Mol Psychiatry*. 2016; 21(1): 133-48.

ICH Q2(R1) – Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. 2005.

Iglesias P, Bajo MA, et al. Thyroid dysfunction and kidney disease: An update. *Rev Endocr Metab Disord*. 2017; 18(1): 131-44.

Ilas J, Mühl A, et al. Guanidinoacetate methyltransferase (GAMT) deficiency: non-invasive enzymatic diagnosis of a newly recognized inborn error metabolism. *Clin Chim Acta*. 2000; 290(2): 179-88.

Item CB, Stöckler-Ipsiroglu S, et al. Arginine:Glycine amidinotransferase deficiency: the third inborn error of creatine metabolism in humans. *Am J Hum Genet*. 2001; 69(5): 1127-33.

Joncquel-Chevalier Curt M, Cheillan D, et al. Creatine and guanidinoacetate reference values in a French population. *Mol Genet Metab*. 2013; 110(3): 263-7.

Kuiper JW, van Horssen R, et al. Local ATP generation by brain-type creatine kinase (CK-B) facilitates cell motility. *PLoS One* 2009; 4: e5030.

Leonard H, Wen X. The epidemiology of mental retardation: Challenges and opportunities in the new millennium. *Res. Reviv*. 2002; 8: 117-134.

Linsky TW, Fast W. Guanidine-modifying enzymes in the penten superfamily. IN; Liu HW, Mander L, eds. *Comprehensive Natural Products II*. New York: Elsevier. 2010; 125-59.

Lion-Fraçois L, Cheillan D, et al. High frequency of creatine deficiency syndromes in patients with unexplained mental retardation. *Neurology*. 2006; 67(9): 1713-4.

Longo N, Ardon O, et al. Disorders of creatine transport and metabolism. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. 2011; 157C(1): 72-8.

Lopansri BK, Anstey NM, et al. Low plasma arginine concentrations in children with cerebral malaria and decreased nitric oxide production. *Lancet* 2003; 361: 676–8.

Marescau B, De Deyn PP, et al. Guanidino compounds in serum and urine of cirrhotic patients. *Metabolism*. 1995; 44(5): 584-8.

Marescau B, Nagels G, et al. Guanidino compounds in serum and urine of nondialyzed patients with chronic renal insufficiency. *Metabolism*. 1997; 46(9): 1024-31.

Marinko JT, Huang H, et al. Folding and Misfolding of Human Membrane Proteins in Health and Disease: From Single Molecules to Cellular Proteostasis. *Chem Rev*. 2019; 119(9): 5537-5606.

Mercimek-Andrews ja Salomons GS. Creatine Deficiency Disorders. 2009 Jan 15 (uendatud 2022 Feb 10) GeneReview (Internet).

Mercimek-Mahmutoglu S, Stoeckler-Ipsiroglu S, et al. GAMT deficiency: features, treatment and outcome in an inborn error of creatine synthesis. *Neurology* 2006; 67(3): 480-4.

Mercimek-Mahmutoglu S, Salomons GS. Creatine deficiency syndromes. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJH, Stephens K, Amemiya A, eds. *GeneReviews*. Seattle: University of Washington. 1993-2020. [updated 2015 Dec 10].

Mihkel Koel, Mihkel Kaljurand. 2020. Usaldusväärsed mõõtmised keemias.

Morris SM Jr. Arginases and arginine deficiency syndromes. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2012; 15(1): 64-70.

Mulik C, Mercimek-Andrews S. Creatine deficiency disorders: phenotypes, genotypes, diagnosis, and treatment outcomes. *Turk Arch Pediatr*. 2023;58(2):129-135.

Nasrallah F, Feki M, et al. Creatine and creatine deficiency syndromes: biochemical and clinical aspects. *Pediatr Neurol*. 2010; 42(3): 163-71.

Niessen W. M. A . *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*. Second Edition, Revised and Expanded. 1999.

Olah A, Stajer V, et al. Age-related changes in serum guanidinoacetic acid in women. *Physiol Res*. 2019; 68(6): 1033-6.

Ostojic SM. Advanced physiological roles of guanidinoacetic acid. *Eur J Nutr*. 2015; 54(8): 1211-5.

Ostojic SM. Guanidinoacetic acid as a performance-enhancing agent. *Amino Acids*. 2016; 48(8): 1867-75.

Peral MJ, Vázquez-Carretero MD, et al. Na(+)/Cl(-)/creatine transporter activity and expression in rat brain synaptosomes. *Neuroscience* 2010; 165: 53–60.

Perkins ZB, Captur G, et al. Trauma induced acute kidney injury. *PLoS One*. 2019; 14(1): e0211001.

Quackenbush EJ, Kraemer KH, et al. Hypoglycinaemia and psychomotor delay in a child with xeroderma pigmentosum. *J Inherit Metab Dis*. 1999; 22(8): 915-24.

Roeleveld N, Zielhuis GA. The prevalence of mental retardation: a critical review of recent literature. *Dev.Med. and Child Neur*. 1997; 30: 125-132.

Ropers HH, Hamel BC. X-linked mental retardation. *Nat Rev Genet*. 2005; 6(1): 46-57.

Rosenberg EH, Almeida LS, et al. High prevalence of SCL6A8 deficiency in X-linked mental retardation. *Am J Hum Genet*. 2004; 75(1): 97-105.

Rowe SM, Verkman AS. *Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator Correctors and Potentiators*. Cold Spring Harb Perspect Med 2013; 3:a009761.

Salazar MD, Zelt NB, et al. Classification of the Molecular Defects Associated with Pathogenic Variants of the SLC6A8 Creatine Transporter. *Biochemistry*. 2020; 59(13): 1367-1377.

Salomons 2001. X-linked creatine-transporter gene (SLC6A8) defect: a new creatine deficiency syndrome.

Sawynok J, Dawborn JK. Plasma concentration and urinary excretion of guanidine derivatives in normal subjects and patients with renal failure. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 1975; 2(1): 1-15.

Schulze. Creatine deficiency syndrome caused by guanidinoacetate methyl transferase deficiency: Diagnostic tools for a new inborn error of metabolism. 1997

Schulze. Presymptomatic treatment of neonatal guanidinoacetate methyltransferase deficiency. 2006

Sharer 2017

Shiraga H, Watanabe Y, Mori A. Guanidino compound levels in the serum of healthy adults and epileptic patients. *Epilepsy Res.* 1991; 8(2): 142-8.

Stockler. Guanidinoacetate methyltransferase deficiency. The first in born error of creatine metabolism in man. 1996

Stockler. Guanidino compounds in guanidinoacetate methyl transferase deficiency, a new inborn error of creatine synthesis. 1997

Stockler-Ipsiroglu. Cerebral Creatine Deficiencies: A Group of Treatable Intellectual Developmental Disorders. 2014

Stockler-Ipsiroglu S, Apatean D, Battini R, et al. Arginine:glycine amidinotransferase (AGAT) deficiency: Clinical features and long term outcomes in 16 patients diagnosed worldwide. *Mol Genet Metab.* 2015; 116 (4):252-9.

Stromberger 2003. Clinical characteristics and diagnostic clues in inborn errors of creatine metabolism.

Sykut Cegielska 2004. Biochemical and clinical characteristics of creatine deficiency syndromes.

Threlfall CJ, Maxwell AR, Stoner HB. Post-traumatic creatinuria. *J Trauma.* 1984; 24(6): 516-23.

Tofuku Y, Muramoto H, Kuroda M, et al. Impaired metabolism of guanidinoacetic acid in uremia. *Nephron.* 1985 ;41(2): 174-8.

Tsang SH, Aycinena ARP, Sharma T. Inborn errors of metabolism: gyrate atrophy. *Adv Exp Med Biol.* 2018; 1085: 183-5.

Tsubakihara Y, Hayashi T, Shoji T. Guanidinoacetic acid (GAA) in patients with chronic kidney disease (CKD) and diabetes mellitus (DM). *Kidney Res Clin Pract.* 2012; 31(2): A81.

Ursula I. Vastsündinute laiendatud skriining kaasasündinud ainevahetushaiguste suhtes tandem mass-spektromeetria meetodil. 2015

Valayannopoulos V, Boddaert N, Mention K, et al. Secondary creatine deficiency in ornithine delta-aminotransferase deficiency. *Mol Genet Metab.* 2009; 97(2): 109-13.

van de Kamp JM, Jakobs C, Gibson KM, Salomons GS. New insights into creatine transporter deficiency: the importance of recycling creatine in the brain. *J Inher Metab Dis* 2013; 36: 155–156.

Veit 2016. <https://doi.org/10.1091/mbc.e14-04-0935>,

Verhelst J, Berwaerts J, Marescau B, et al. Serum creatine, creatinine, and other guanidino compounds in patients with thyroid dysfunction. *Metabolism*. 1997; 46(9): 1063-7.

Walker JB. Creatine: biosynthesis, regulation, and function. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*. 1979; 50: 177-242.

Walker JB, Walker MS. Formation of creatine from guanidinoacetate in pancreas. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1959; 101: 807-9.

Wallimann T, Tokarska-Schlattner M, Schlattner U. The creatine kinase system and pleiotropic effects of creatine. *Amino Acids* 2011; 40:1271–1296.

Willoughby R., E. Sheehan, S. Mitrovich. *A Global View of LC/MS: How to Solve Your Most Challenging Analytical Problems*. Second Edition. 2002

Weber CJ. The presence of glycoamine in urine. *J Biol Chem*. 1935; 109: xcvi-xcvii.

Wyss. *Creatine and Creatine Kinase in Health and Disease – A Bright Future Ahead?* 2007

Wyss M, Kaddurah-Daouk R. Creatine and creatinine metabolism. *Physiol Rev*. 2000; 80(3): 1107-213.

Kasutatud veebiaadressid:

- A. [Tartu Ülikooli Kliinikumi patsiendi info](#) (külastatud 07.01.2024)
- B. [Euroopa komisjoni teabeleht](#) (külastatud 07.01.2024)
- C. [Tartu Ülikooli Kliinikum. Harvikaiguste tutvustus](#) (külastatud 07.01.2024)
- D. [Ultraheli.ee](#) (külastatud 07.01.2024)
- E. [TÜK infoleht](#) (külastatud 07.01.2024)
- F. [Imikute ja väikelastel uriini kogumise lühijuhend v03](#) (külastatud 07.01.2024)

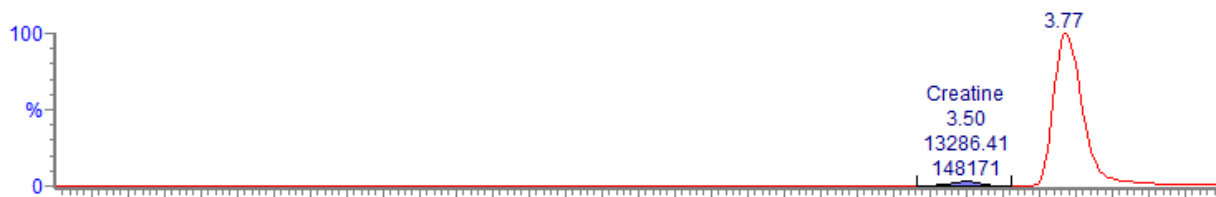
8. TÄNUAVALDUSED

Töö autor soovib tänada Tartu geneetika ja personaalmeditsiini ainevahetushaiguste laborit, et võimaldasite antud magistritööd Teie asutuses teha. Lisaks soovib autor tänada oma kaasjuhendajat Mihkel Ilissoni. Aitähh mitmekülgse toetuse ja abi eest. Lisaks soovib töö autor tänada Tartu geneetika ja personaalmeditsiini töötajaid, kellega ta kokku puutus. Ainevahetushaiguste laboris oli väga toetav keskkond. Töö autor soovib tänada ka oma Tallinna Tehnikaülikooli juhendajat Jekaterina Mazina-Šinkar, et olite kannatlik ning mõistev töö valmimisel. Töö autor soovib tänada ka oma perekonda ja sõpru, et nad alati toeks olid kui olin vajadus.

9. LISAD

LISA 1. Interferentsi uuringu kromatogrammid.

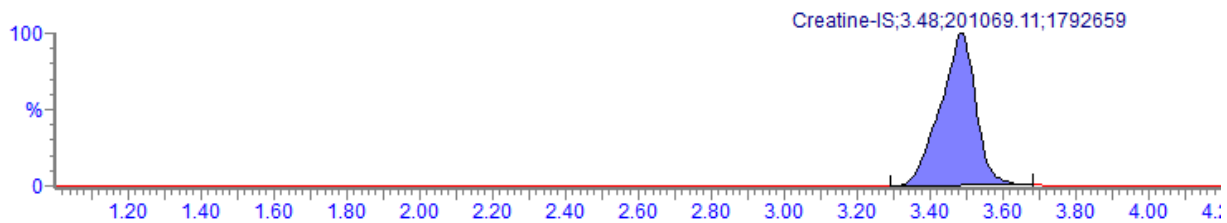
GUA_20230901_022 Smooth(Mn,1x2)
Pt 7 Cal 1 + 3-GPA Pt 7 Cal 1 + 3-GPA



GUA_20230901_022 Smooth(Mn,1x2)
Pt 7 Cal 1 + 3-GPA Pt 7 Cal 1 + 3-GPA

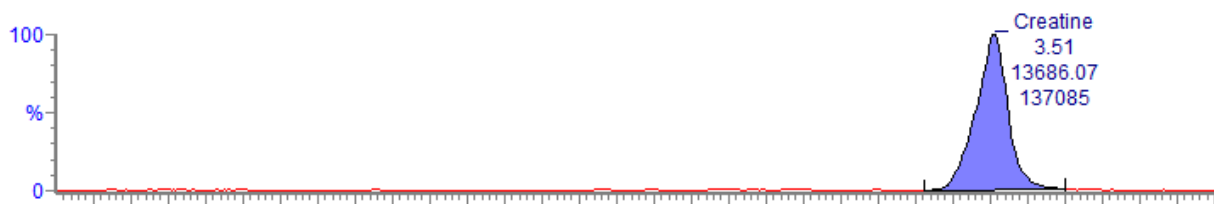


GUA_20230901_022 Smooth(Mn,1x2)
Pt 7 Cal 1 + 3-GPA Pt 7 Cal 1 + 3-GPA

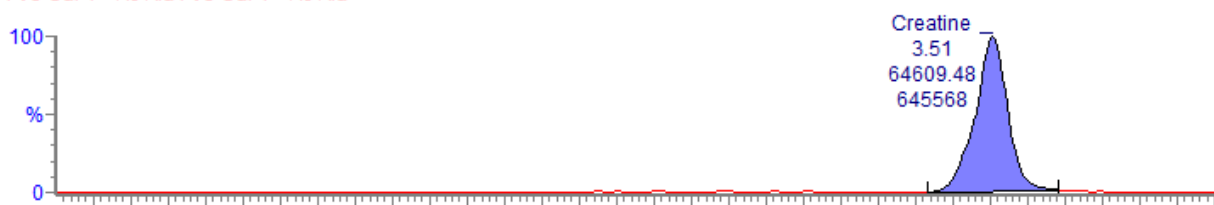


Joonis 6. *β*-guanidinopropioonhappe interferentsi uuringu kromatogrammid.

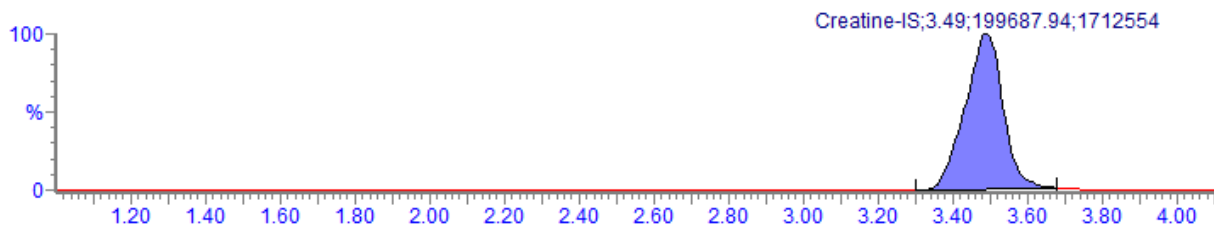
GUA_20230901_018 Smooth(Mn,1x2)
Pt 3 Cal 1 + Ac-Ala Pt 3 Cal 1 + Ac-Ala



GUA_20230901_018 Smooth(Mn,1x2)
Pt 3 Cal 1 + Ac-Ala Pt 3 Cal 1 + Ac-Ala

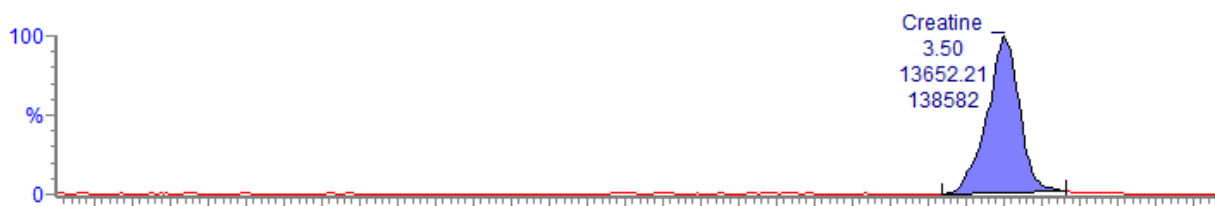


GUA_20230901_018 Smooth(Mn,1x2)
Pt 3 Cal 1 + Ac-Ala Pt 3 Cal 1 + Ac-Ala

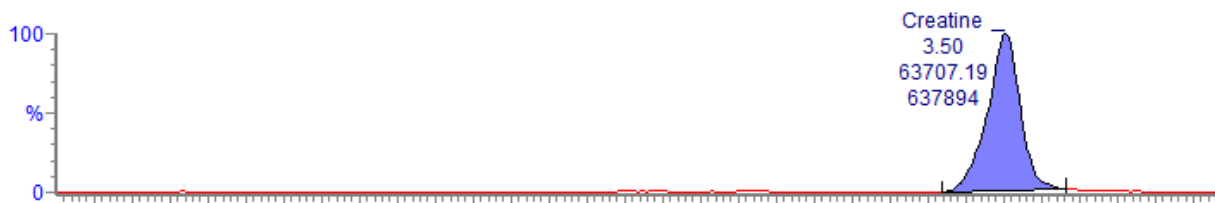


Joonis 7. *N*-atsetüül- β -alaniini interferentsi uuringu kromatogramm. *id.*

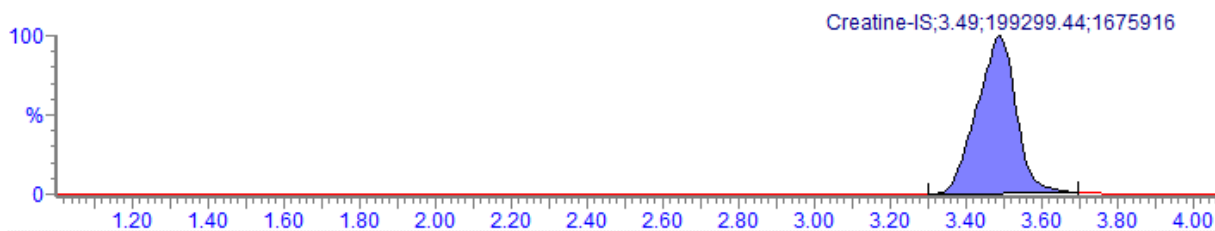
GUA_20230901_020 Smooth(Mn,1x2)
Pt 5 Cal 1 + Ac-b-Ala Pt 5 Cal 1 + Ac-b-Ala



GUA_20230901_020 Smooth(Mn,1x2)
Pt 5 Cal 1 + Ac-b-Ala Pt 5 Cal 1 + Ac-b-Ala

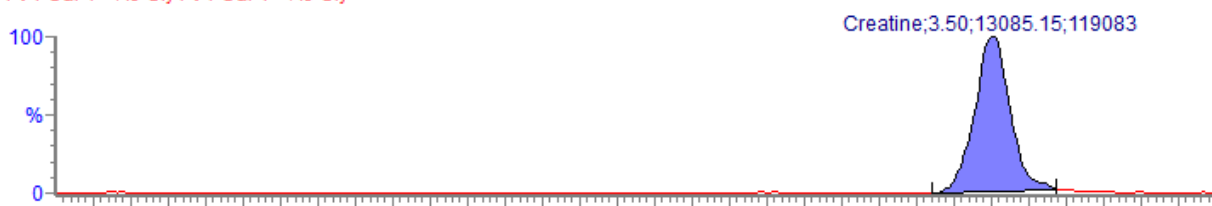


GUA_20230901_020 Smooth(Mn,1x2)
Pt 5 Cal 1 + Ac-b-Ala Pt 5 Cal 1 + Ac-b-Ala

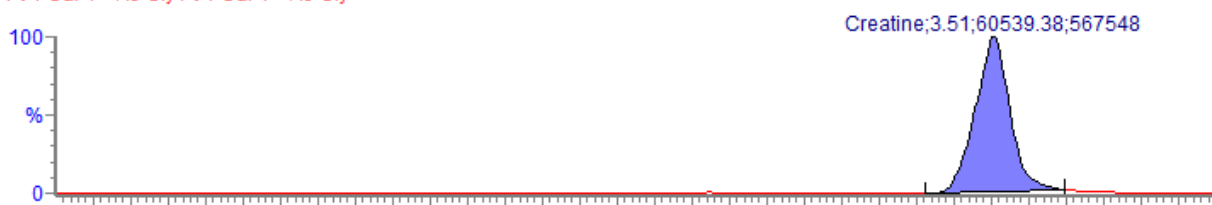


Joonis 8 *N*-atsetüül- β -alaniini interferentsi uuringu kromatogramm. *id.*

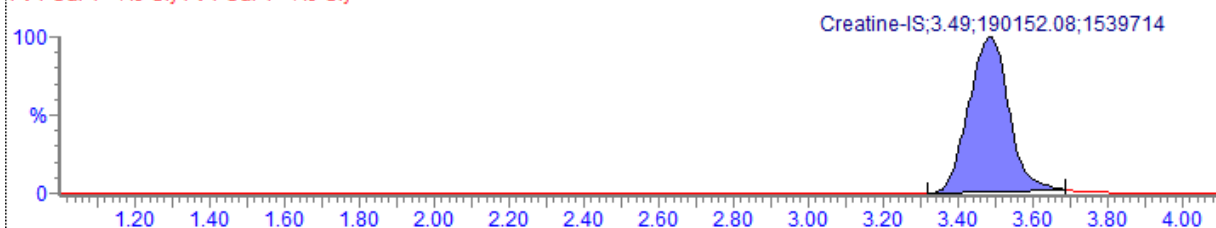
GUA_20230901_016 Smooth(Mn,1x2)
Pt 1 Cal 1 + Ac-Gly Pt 1 Cal 1 + Ac-Gly



GUA_20230901_016 Smooth(Mn,1x2)
Pt 1 Cal 1 + Ac-Gly Pt 1 Cal 1 + Ac-Gly

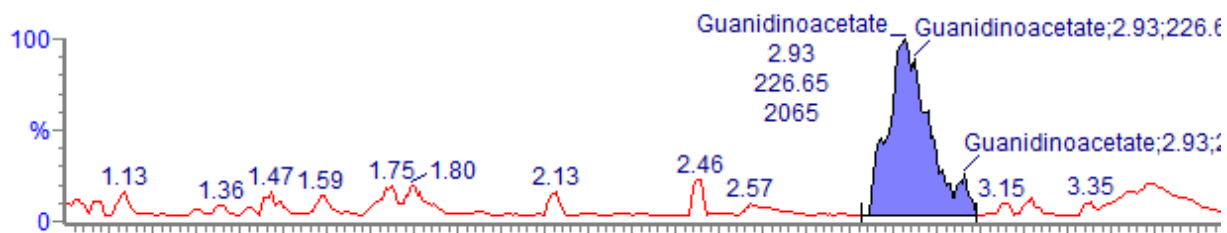


GUA_20230901_016 Smooth(Mn,1x2)
Pt 1 Cal 1 + Ac-Gly Pt 1 Cal 1 + Ac-Gly

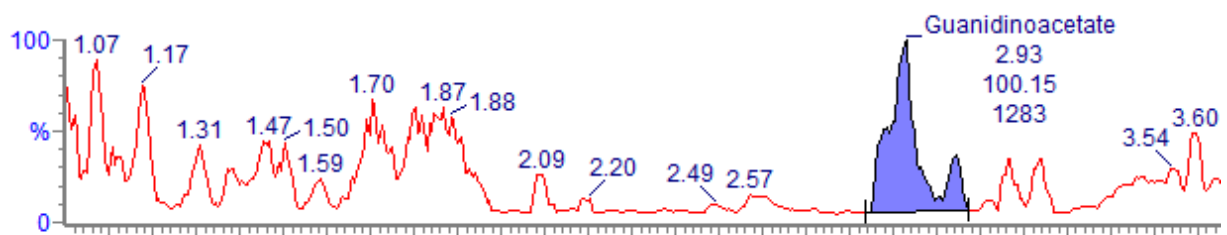


Joonis 9 N-atsetüülglütsiini interferentsi uuringu kromatogrammide.

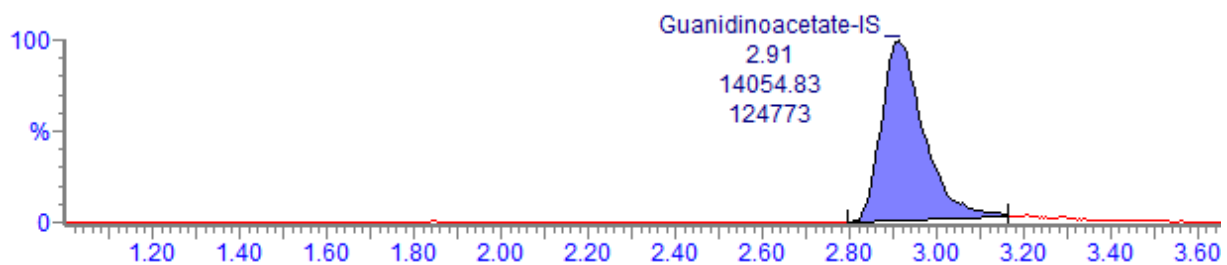
GUA_20230901_022 Smooth(Mn,1x2)
Pt 7 Cal 1 + 3-GPAPt 7 Cal 1 + 3-GPA



GUA_20230901_022 Smooth(Mn,1x2)
Pt 7 Cal 1 + 3-GPAPt 7 Cal 1 + 3-GPA

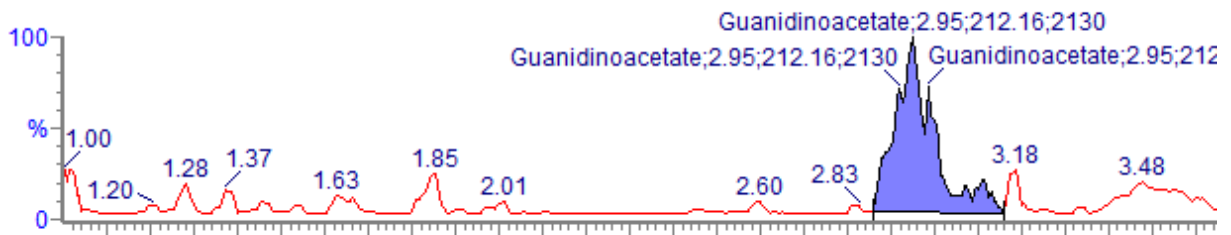


GUA_20230901_022 Smooth(Mn,1x2)
Pt 7 Cal 1 + 3-GPAPt 7 Cal 1 + 3-GPA



Joonis 10 β -guanidinopropioonhappe interferentsi uuringu kromatogramm.

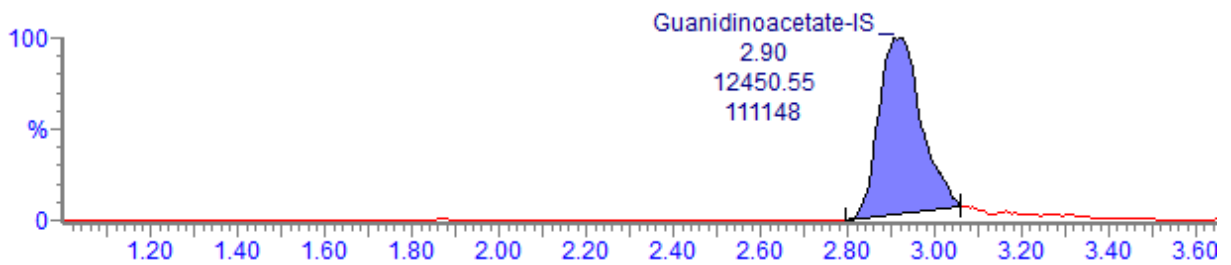
GUA_20230901_018 Smooth(Mn,1x2)
Pt 3 Cal 1 + Ac-Ala Pt 3 Cal 1 + Ac-Ala



GUA_20230901_018 Smooth(Mn,1x2)
Pt 3 Cal 1 + Ac-Ala Pt 3 Cal 1 + Ac-Ala

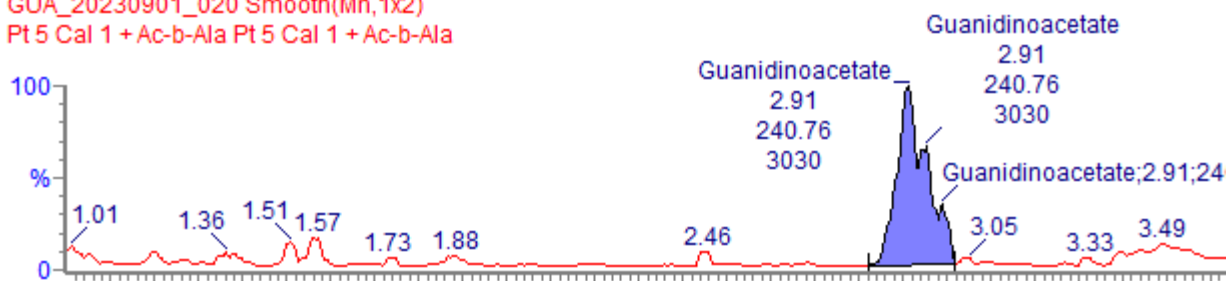


GUA_20230901_018 Smooth(Mn,1x2)
Pt 3 Cal 1 + Ac-Ala Pt 3 Cal 1 + Ac-Ala

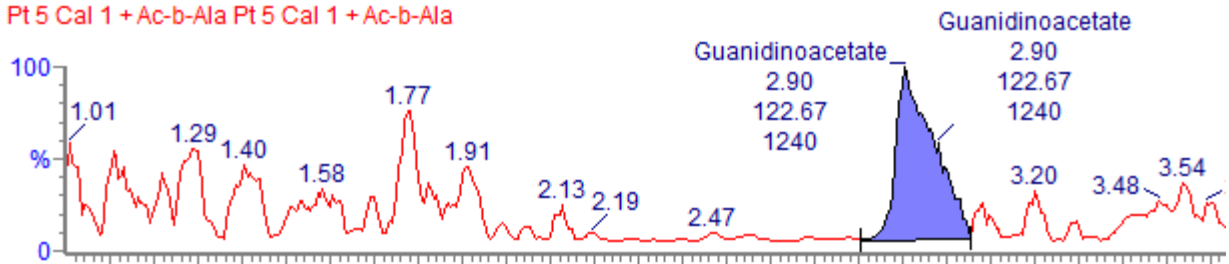


Joonis 11 N-atsetüülalaniini interferentsi uuringu kromatogramm. *(Note: The caption text is in Estonian and appears to be a mix of characters, possibly a typo for 'N-acetylalanine interference study chromatogram').*

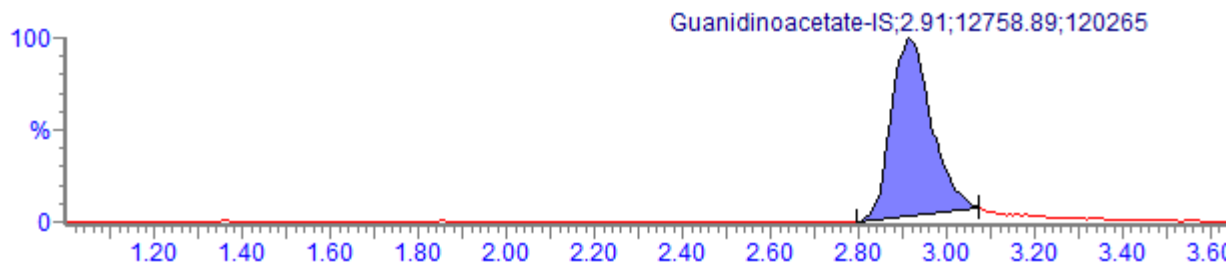
GUA_20230901_020 Smooth(Mn,1x2)
Pt 5 Cal 1 + Ac-b-Ala Pt 5 Cal 1 + Ac-b-Ala



GUA_20230901_020 Smooth(Mn,1x2)
Pt 5 Cal 1 + Ac-b-Ala Pt 5 Cal 1 + Ac-b-Ala

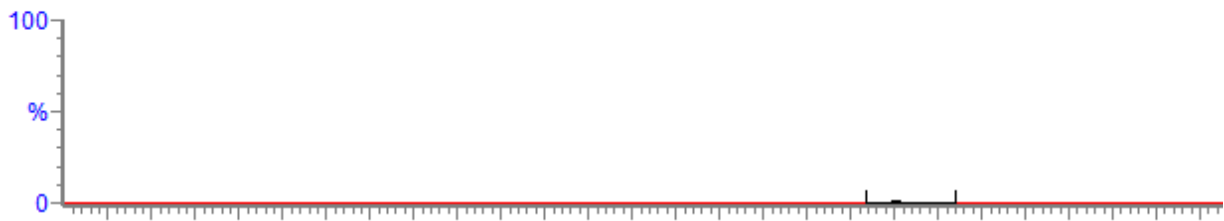


GUA_20230901_020 Smooth(Mn,1x2)
Pt 5 Cal 1 + Ac-b-Ala Pt 5 Cal 1 + Ac-b-Ala

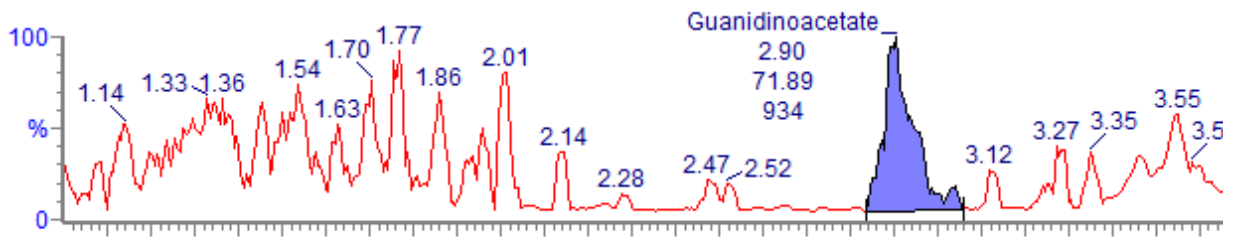


Joonis 12 N-atsetül- β -alaniini interferentsi uuringu kromatogramm. *(Note: The caption text is partially cut off in the image.)*

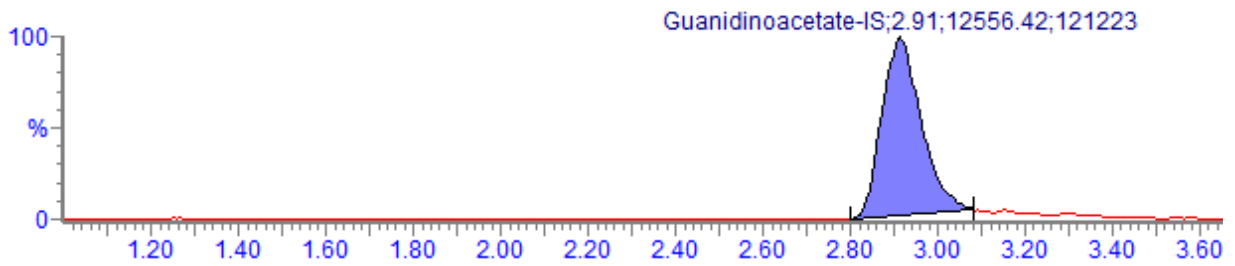
GUA_20230901_016 Smooth(Mn,1x2)
Pt 1 Cal 1 + Ac-Gly Pt 1 Cal 1 + Ac-Gly



GUA_20230901_016 Smooth(Mn,1x2)
Pt 1 Cal 1 + Ac-Gly Pt 1 Cal 1 + Ac-Gly



GUA_20230901_016 Smooth(Mn,1x2)
Pt 1 Cal 1 + Ac-Gly Pt 1 Cal 1 + Ac-Gly



Joonis 13 N-atsetüülglytsiini interferentsi uuringu kromatogrammid.

LISA 2. Maatriksi efekti päevasised mõõtetulemused

Kreatiini päevisisene							
	c (µmol/L)	Lisatud c (µmol/L)	Hälve (%)	Saagis (%)	SD	%CV	Tõesus (accuracy)
QC1	119,2		8,3%		3,5	2,7%	108,3%
QC2	275,1		4,3%		5,2	1,8%	104,3%
Pt1	66,1						
Pt2	14,8						
Pt3	3,6						
Pt4	164,8						
QC1 low	229,0	100,0	3,7%	103,7%	4,9	2,1%	101,6%
QC2 low	387,1	100,0	8,3%	108,3%	6,8	1,7%	102,1%
Pt1 low	166,1	100,0	5,2%	105,2%	4,4	2,6%	103,1%
Pt2 low	114,8	100,0	4,6%	104,6%	2,0	1,7%	104,0%
Pt3 low	103,6	100,0	6,6%	106,6%	1,8	1,6%	106,3%
Pt4 low	264,8	100,0	7,4%	107,4%	2,5	0,9%	102,8%
QC1 med	529,0	400,0	3,8%	103,8%	7,0	1,3%	102,9%
QC2 med	687,1	400,0	2,0%	102,0%	8,1	1,2%	101,1%
Pt1 med	466,1	400,0	7,1%	107,1%	4,9	1,0%	106,1%
Pt2 med	414,8	400,0	5,5%	105,5%	7,7	1,8%	105,3%
Pt3 med	403,6	400,0	6,3%	106,3%	3,5	0,8%	106,3%
Pt4 med	564,8	400,0	3,9%	103,9%	9,1	1,6%	102,7%
QC1 high	1729,0	1600,0	-0,6%	99,4%	10,6	0,6%	99,5%
QC2 high	1887,1	1600,0	0,4%	100,4%	26,8	1,4%	100,3%
Pt1 high	1666,1	1600,0	1,4%	101,4%	24,0	1,4%	101,3%
Pt2 high	1614,8	1600,0	1,6%	101,6%	16,5	1,0%	101,6%
Pt3 high	1603,6	1600,0	1,1%	101,1%	19,4	1,2%	101,1%
Pt4 high	1764,8	1600,0	1,6%	101,6%	14,6	0,8%	101,4%
Keskmine			3,9%	103,9%		1,4%	102,8%

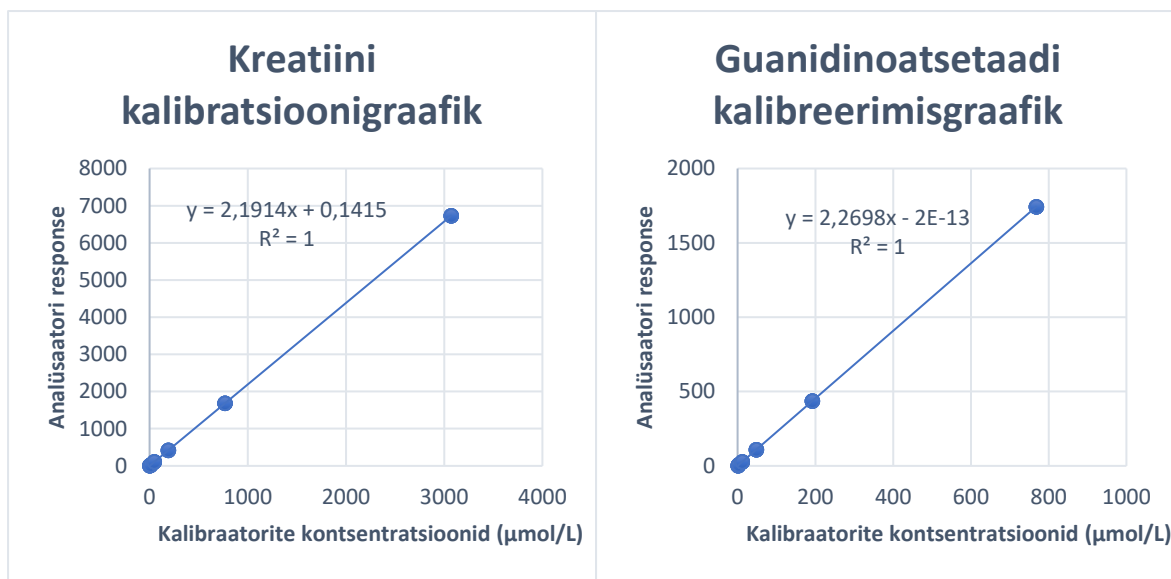
Guanidinoatsetaadi päevisisene							
	c (µmol/L)	Lisatud c (µmol/L)	Hälve (%)	Saagis (%)	SD	%CV	Tõesus (accuracy)
QC1	38,4		12,7%		1,2	0,3%	112,7%
QC2	101,5		-0,1%		2,9	0,0%	99,9%
Pt1	70,0						
Pt2	3,2						
Pt3	9,1						
Pt4	64,3						
QC1 low	68,2	25,0	0,0%	100,0%	1,6	2,3%	100,0%
QC2 low	126,4	25,0	8,6%	108,6%	2,4	1,9%	101,7%
Pt1 low	95,0	25,0	5,0%	105,0%	3,0	3,1%	101,3%
Pt2 low	28,2	25,0	3,8%	103,8%	0,8	2,6%	103,4%
Pt3 low	34,1	25,0	4,9%	104,9%	0,9	2,4%	103,6%
Pt4 low	89,3	25,0	12,3%	112,3%	3,9	4,2%	103,4%
QC1 med	143,2	100,0	2,2%	102,2%	4,4	3,1%	101,6%
QC2 med	201,4	100,0	1,0%	101,0%	4,2	2,1%	100,5%
Pt1 med	170,0	100,0	5,6%	105,6%	2,3	1,3%	103,3%
Pt2 med	103,2	100,0	4,8%	104,8%	2,8	2,6%	104,7%
Pt3 med	109,1	100,0	3,5%	103,5%	2,4	2,1%	103,2%
Pt4 med	164,3	100,0	4,6%	104,6%	1,8	1,1%	102,8%
QC1 high	443,2	400,0	-1,8%	98,2%	13,8	3,2%	98,4%
QC2 high	501,4	400,0	-0,7%	99,3%	4,8	1,0%	99,5%
Pt1 high	470,0	400,0	-0,8%	99,2%	6,1	1,3%	99,4%
Pt2 high	403,2	400,0	0,4%	100,4%	8,1	2,0%	100,4%
Pt3 high	409,1	400,0	0,3%	100,3%	6,7	1,6%	100,3%
Pt4 high	464,3	400,0	-1,4%	98,6%	8,5	1,8%	98,8%
Keskmine			2,9%	102,9%		2,2%	101,4%

LISA 3. Maatriksi efekti päevadevahelised mõõtetulemused

Kreatiini päevadevaheline tõesus							
Proov	c (µmol/L)	Lisatud c (µmol/L)	Hälve (%)	Saagis (%)	SD	%CV	Tõesus (accuracy)
QC1	119,2		8,4%		1,9	0,1%	108,4%
QC2	275,1		5,3%		3,6	0,0%	105,3%
Pt1	66,7						
Pt2	14,5						
Pt3	3,5						
Pt4	167,1						
QC1 low	229,2	100,0	4,9%	104,9%	1,4	0,6%	102,2%
QC2 low	389,6	100,0	7,8%	107,8%	7,9	2,0%	102,0%
Pt1 low	166,7	100,0	5,6%	105,6%	1,9	1,1%	103,4%
Pt2 low	114,5	100,0	4,5%	104,5%	2,0	1,7%	104,0%
Pt3 low	103,5	100,0	5,8%	105,8%	2,0	1,8%	105,6%
Pt4 low	267,1	100,0	3,5%	103,5%	1,5	0,5%	101,3%
QC1 med	529,2	400,0	3,9%	103,9%	7,6	1,4%	102,9%
QC2 med	689,6	400,0	1,3%	101,3%	10,7	1,5%	100,8%
Pt1 med	466,7	400,0	5,0%	105,0%	8,3	1,7%	104,3%
Pt2 med	414,5	400,0	5,7%	105,8%	7,3	1,7%	105,5%
Pt3 med	403,5	400,0	5,1%	105,1%	10,0	2,3%	105,1%
Pt4 med	567,1	400,0	2,0%	102,0%	4,7	0,8%	101,4%
QC1 high	1729,2	1600,0	-0,9%	99,1%	4,8	0,3%	99,2%
QC2 high	1889,6	1600,0	2,2%	102,2%	38,5	2,0%	101,9%
Pt1 high	1666,7	1600,0	2,4%	102,4%	18,6	1,1%	102,3%
Pt2 high	1614,5	1600,0	1,8%	101,8%	12,8	0,8%	101,8%
Pt3 high	1603,5	1600,0	-0,4%	99,7%	5,5	0,3%	99,7%
Pt4 high	1767,1	1600,0	1,1%	101,1%	26,8	1,5%	101,0%
Keskmine			3,4%	103,4%		1,3%	102,5%

Guanidinoatsetaadi päevadevaheline tõesus							
Proov	c (µmol/L)	Lisatud c (µmol/L)	Hälve (%)	Saagis (%)	SD	%CV	Tõesus (accuracy)
QC1	38,4		4,9%		3,1	0,1%	104,9%
QC2	101,5		0,2%		4,3	0,0%	100,2%
Pt1	69,8						
Pt2	3,2						
Pt3	9,0						
Pt4	65,3						
QC1 low	65,3	25,0	10,9%	110,9%	2,8	4,1%	104,2%
QC2 low	126,7	25,0	-5,1%	94,9%	6,6	5,2%	99,0%
Pt1 low	94,8	25,0	-9,6%	90,4%	4,3	4,7%	97,5%
Pt2 low	28,2	25,0	4,3%	104,3%	0,8	2,8%	103,8%
Pt3 low	34,0	25,0	3,9%	103,9%	1,5	4,2%	102,8%
Pt4 low	90,3	25,0	4,0%	104,0%	5,0	5,4%	101,1%
QC1 med	140,3	100,0	3,4%	103,4%	3,2	2,3%	102,4%
QC2 med	201,7	100,0	-2,2%	97,8%	10,6	5,3%	98,9%
Pt1 med	169,8	100,0	2,6%	102,6%	12,1	7,0%	101,5%
Pt2 med	103,2	100,0	5,9%	105,9%	6,1	5,6%	105,7%
Pt3 med	109,0	100,0	-0,2%	99,8%	4,1	3,7%	99,8%
Pt4 med	165,3	100,0	0,6%	100,6%	7,3	4,4%	100,3%
QC1 high	440,3	400,0	1,6%	101,6%	14,9	3,3%	101,4%
QC2 high	501,7	400,0	0,0%	100,0%	9,1	1,8%	100,0%
Pt1 high	469,8	400,0	-0,2%	99,8%	5,8	1,2%	99,8%
Pt2 high	403,2	400,0	-4,7%	95,4%	15,4	4,0%	95,4%
Pt3 high	409,0	400,0	-0,6%	99,4%	9,9	2,4%	99,4%
Pt4 high	465,3	400,0	-1,6%	98,5%	18,4	4,0%	98,7%
Keskmine			0,7%	100,7%		4,0%	100,7%

LISA 4. Keskmised kalibreerimiskõverad kreatiini ja guanidinoatsetaadi analüüsil



Joonis 5. Kalibreerimisgraafikud kreatiini ja guanidinoatsetaadile. Graafikud on koostatud summeerides 5 kalibratsiooni andmestikust.