

Význam vyšetření hladiny metabolitů biogenních aminů v mozkomíšním moku vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií v diagnostice dětských neurotransmitterových onemocnění

Szentiványi K.¹, Hansíková H.¹, Krijt J.², Zeman J.^{1,2}, Honzík T.^{1,2}

¹Klinika dětského a dorostového lékařství, 1. lékařská fakulta Univerzita Karlova v Praze a Všeobecná fakultní nemocnice v Praze

²Ústav dědičných metabolických poruch, 1. lékařská fakulta Univerzita Karlova v Praze a Všeobecná fakultní nemocnice v Praze

SOUHRN

Cíl studie: Zavedení metody stanovení hladin neurotransmitterových metabolitů v mozkomíšním moku do rutinní klinické praxe je podmínkou včasné diagnostiky a léčby neurotransmitterových onemocnění v dětském věku.

Materiál a metoda: Metodou vysoce účinné kapalinové chromatografie ve spojení s elektrochemickou detekcí bylo analyzováno 82 vzorků mozkomíšního moku dětských pacientů s podezřením na neurometabolické onemocnění.

Výsledky: Byla stanovena věkově vázaná referenční rozmezí. Ve třech vzorcích byla prokázána patologicky snížená koncentrace kyseliny homovanilové. U dvou pacientů s významnou mikrocefalií a závažným organickým poškozením mozku se pravděpodobně jedná o sekundární deficit. Neurologický náález u třetího pacienta svědčil pro primární poruchu metabolismu neurotransmitterů na úrovni tyrosinhydroxylázy (TH). Deficit TH byl následně potvrzen na molekulárně-genetické úrovni.

Závěr: Diagnostika poruch metabolismu biogenních aminů je obtížná a vyžaduje provedení lumbální punkce se speciálním odběrem mozkomíšního moku. Na našem pracovišti jsme vyšetření hladin neurotransmitterových metabolitů zařadili do rutinní diagnostiky všech dětí s podezřením na neurometabolické onemocnění. Diagnostikovali jsme prvního pacienta v České republice s primární poruchou metabolismu neurotransmitterů a zahájili léčbu.

Klíčová slova: mozkomíšní mok, kapalinová chromatografie, neurotransmitterová onemocnění, biogenní aminy.

SUMMARY

Szentiványi K., Hansíková H., Krijt J., Zeman J., Honzík T.: The importance of biogenic amines metabolites determination in cerebrospinal fluid by high performance liquid chromatography in the diagnostics of pediatric neurotransmitter disorders

Objective: The implementation of cerebrospinal fluid neurotransmitter metabolites analysis in clinical routine is necessary for early diagnosis and treatment of pediatric neurotransmitter disorders.

Material and methods: We analysed 82 cerebrospinal fluid samples from children suspected of neurometabolic disorder using high performance liquid chromatography coupled with electrochemical detection.

Results: We established age-related reference values. In three samples the level of homovanillic acid was found to be markedly decreased. In two patients with severe microcephaly and extensive organic brain damage secondary deficit is concerned. Neurological findings in third patient led us to the suspicion of primary neurotransmitter metabolism disorder at the level of tyrosine hydroxylase (TH). Subsequently, TH deficiency was confirmed by molecular genetic analysis.

Conclusion: Diagnosis of biogenic amines metabolism disorders is difficult and needs lumbar puncture to be performed. In our hospital we implemented cerebrospinal fluid neurotransmitter metabolites analysis into routine diagnostic workup for every patient suspected with neurometabolic disorder. We diagnosed first Czech patient with primary neurotransmitter metabolism disorder and commenced the treatment.

Key words: cerebrospinal fluid, liquid chromatography, neurotransmitter disorder, biogenic amines.

Úvod

Monoaminy, katecholaminy a serotonin – rovněž nazývané biogenní aminy – jsou neurotransmitery, které ovlivňují množství neuronálních funkcí. Jejich biosyntéza probíhá v centrálním a vegetativním nervovém systému (CNS, VNS). V rámci centrální nervové soustavy se, kromě jiného, zúčastňují regulace psychomotorických funkcí díky důležité roli v řízení pohybové koordinace a vlivu na proces učení, úroveň vědomí, zpracování vnějších podnětů, paměť, apetit, emoční stabilitu, spánek, náladu, sexuální chování a sekreci hormonů. Periferně jsou důležité

pro termoregulaci a modulaci vnímání bolesti, prokrvení, střevní motilitu, hemostázu a imunitní odpověď [1].

Neurotransmitterová onemocnění představují vzácnou skupinu neurometabolických poruch s manifestací, zejména v raném dětství. V novorozeneckém věku se projevují nespecifickými příznaky – potížemi s příjmem potravy, sníženým svalovým napětím, opožděným psychomotorickým vývojem. I když se jedná o onemocnění s velice variabilním klinickým obrazem, jako hlavní syndrom lze označit dětský parkinsonismus. Nicméně klinická diagnostika je obtížná a vyžaduje vhodný soubor specializovaných laboratorních vyšetření [2].

Diagnostika poruch metabolismu neurotransmiterů je založena především na vyšetření neurotransmiterových metabolitů v mozkomíšním moku, jehož úzký anatomický vztah s nervovou tkání poskytuje důležité informace o obratu biogenních aminů v CNS [3]. Analy-

za periferních biologických vzorků (plazma, krev, moč) není dostačující.

V metabolické dráze biogenních aminů je známo deset enzymových poruch (obr. 1). Enzymový defekt může být přítomen jak v dráze bio-

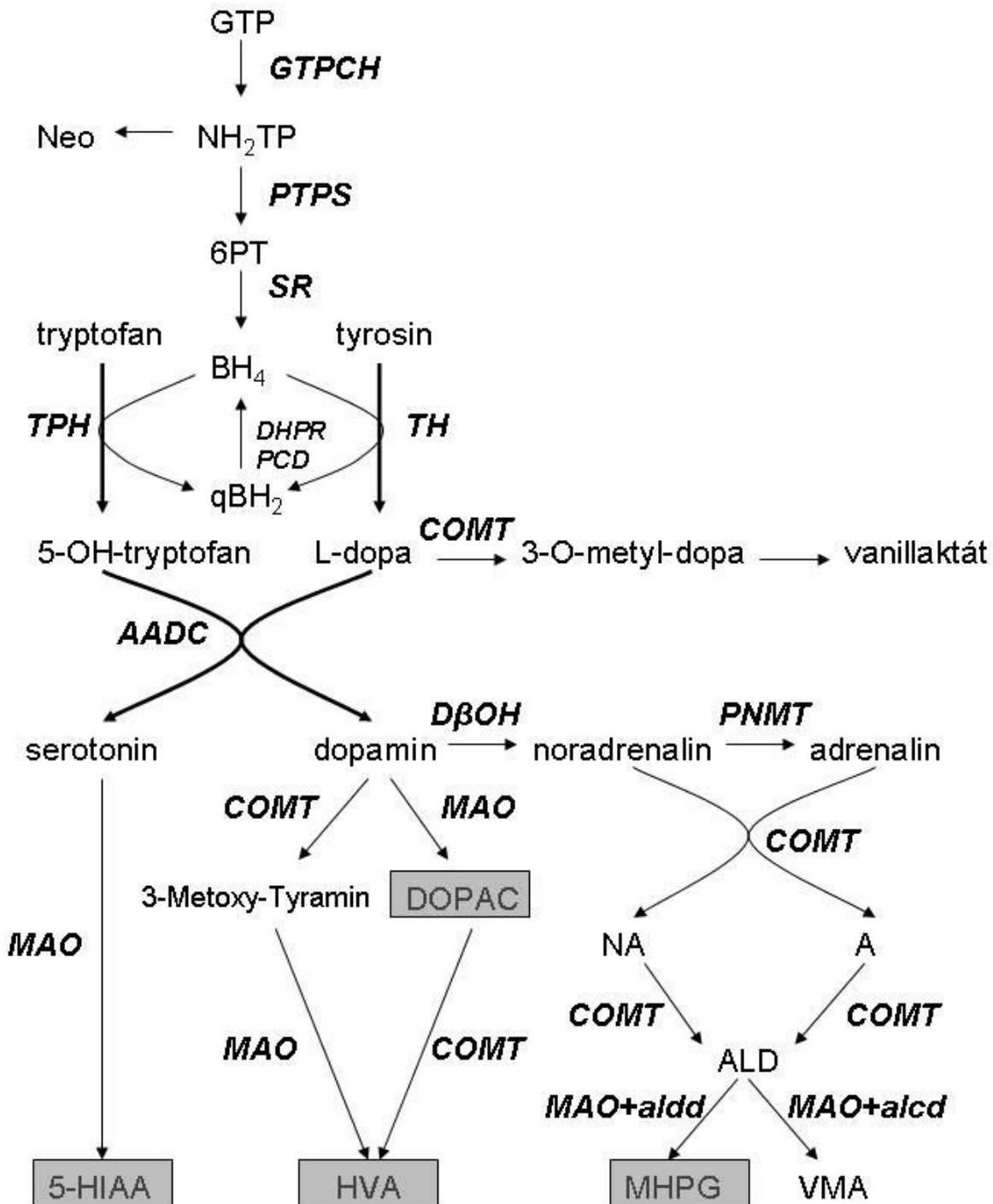


Fig. 1. Metabolism of serotonin and catecholamines [19]. Enzymatic defects indicated in bold and italic type. The highlighted metabolites can be measured in our laboratory

Neo: neopterin; GTP: guanosine triphosphate; NH₂TP: dihydroneopterin triphosphate; BH₄: tetrahydrobiopterin; qBH₂: quinoid dihydrobiopterin; GTPCH: GTP cyclohydrolase I; PTPS: 6-pyruvoyltetrahydropterinsynthase; 6-PT: 6-pyruvoyltetrahydropterin; SR: sepiapterin reductase; DHPR: dihydropteridine reductase; PCD: pterin-4 α -karbinolamine dehydratase; TH: tyrosine hydroxylase; TPH: tryptophan hydroxylase; L-dopa: L-3,4-dihydroxyphenylalanine; AADC: aromatic L-amino acid decarboxylase; D β H: dopamine- β -hydroxylase; COMT: catechol-ortho-methyltransferase; MAO: monoamine oxidase; PNMT: Phenylethanolamine N-methyltransferase; DOPAC: 3,4-dihydroxyphenylacetic acid; 3MT: 3-methoxytyramine; HVA: homovanillic acid; 5-HIAA: 5-hydroxyindolacetic acid; NM: normetanephrine; M: metanephrine; ALD: intermediate aldehyde (3-methoxy-4-hydroxyphenyl-hydroxyacetat-aldehyde); MHPG: 3-methoxy-4-hydroxy-phenylglycol; VMA: vanillylmandelic acid; aldd.: aldehyd dehydrogenase (CNS); alcd: alcohol dehydrogenase (periphery)

syntézy, tak i katabolismu. Závislost některých enzymů na přítomnosti funkčního kofaktoru (např. tetrahydrobiopterin; BH4) přispívá ke složitosti interpretace laboratorních vyšetření. Analýza mozkomíšního moku poskytuje aktuální profil neurotransmitterových metabolitů, které umožňují s různou přesností lokalizovat úroveň defektu. Mezi nejdůležitější patří degradační produkty dopaminu a serotoninu: kyselina homovanilová (HVA) a 5-hydroxyindolacetát (5-HIAA), dále 3,4-dihydroxyfenylacetát (DOPAC) a 3-methoxy-4-hydroxyfenylglykol (MHPG) [4].

Biogenní aminy jsou elektroaktivní látky, které je možné efektivně detekovat v biologických tekutinách využitím vysoce účinné kapalinové chromatografie (HPLC) s elektrochemickým detektorem (ECD) [5]. Fluorimetrické detekce po derivatizaci nebo chemiluminiscenční detekce byly rovněž popsány [6–8].

Cílem práce je detailně popsat metodu analýzy metabolitů biogenních aminů v mozkomíšním moku na našem pracovišti a shrnout naše zkušenosti s analýzou vzorků včetně stanovení referenčních rozmezí naší laboratoře.

Materiál a metody

Soubor

Soubor tvořilo 82 dětí (dívky/chlapci: 43/39) ve věku od jednoho měsíce do sedmnácti let (medián: 1,3 let), u nichž bylo indikováno vyšetření pro klinické podezření na neurometabolické onemocnění. Osm kontrolních vzorků pocházelo od dětí s podezřením na neuroinfekci, která nebyla potvrzena. Nebylo u nich vysloveno ani podezření na metabolické onemocnění, proto tento soubor představuje referenční skupinu. Mezi vylučovací kritéria dále patřily: motorické dysfunkce, abnormální nález na zobrazení centrální nervové soustavy.

Příprava vzorků

Odběr mozkomíšního moku byl standardizovaný [4]. Vzorky byly odebrány mezi 9. a 11. hodinou dopolední. Analýza biogenních aminů byla u dětí do dvou let věku provedena z druhého mililitru, u starších dětí ze čtvrtého mililitru mozkomíšního moku. Vzorky byly ihned po odběru zamrazeny v lázni suchý led/etanol nebo přímo v tekutém dusíku a uskladněny při teplotě $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ do doby analýzy. Sanguinolentní vzorky byly ihned centrifugovány (3 min., 10000 x g, pokojová teplota – RT) a čistý supernatant byl uskladněn při stejných podmínkách. Před analýzou bylo 200 μl rozmrazeného mozkomíšního moku deproteinováno 10 μl kyseliny chloristé (4 mmol/l). Vzorek byl poté centrifugován (3 min., 10000 x g, RT) a supernatant byl neutralizován fosforečnanovým pufrům (H_3PO_4 2,5 mmol/l, KOH 1,5 mmol/l) na pH 5–7. Následně byl vzorek po deseti minutovém stání na ledové tříšti centrifugován (1 min., 10000 x g, RT) a 20 μl supernatantu bylo aplikováno na HPLC kolonu.

Standard

Substance standardu (Sigma-Aldrich: DOPAC,

MHPG, 5-HIAA, HVA) byly naředěné v kyselině chloristé (0,1 mmol/l) a směs byla neutralizována použitím fosforečnanového pufru (H_3PO_4 2,5 mmol/l, KOH 1,5 mmol/l).

Podmínky analýzy

DOPAC, MHPG, 5-HIAA, HVA byly analyzovány pomocí izokratické HPLC (Gilson 712) s amperometrickým elektrochemickým detektorem. Mobilní fáze byla tvořena roztokem citrát-acetátového pufru o pH 5,1 (kyselina citrónová 28 mmol/l, acetát sodný 83 mmol/l; EDTA 100 $\mu\text{mol/l}$) a metanolu (85/15 v/v). Elektrochemické podmínky byly následující: napětí na analytické cele 850 mV, rozsah 5 nA/V. Metabolity neurotransmitterů byly separovány na koloně s reverzní fází (C18, 250mm x 2mm; 4 μm , Phenomenex). Rychlost průtoku byla 0,3 ml/min a dávkovací objem 20 μl . Vzorky i standard byly analyzovány v dubletu. Identifikace píků byla provedena na základě korelace retenčních časů analytů ve vzorku mozkomíšního moku a ve standardním vzorku a rovněž vnitřním přidavkem standardů do vzorku mozkomíšního moku (obr. 2A). Chromatografická data byla zpracována programem Gilson Appl. 712.

Výsledky

Bylo vyšetřeno 82 vzorků mozkomíšního moku od dětských pacientů se suspekci na neurometabolické onemocnění. Na obrázku 2B uvádíme příklad analýzy mozkomíšního moku u dítěte s fyziologickým nálezem hladin HVA a 5-HIAA. Ve třech vzorcích byla nalezena patologicky snížená koncentrace kyseliny homovanilové (obr. 2C). U dvou pacientek v klinickém obrazu dominuje závažné organické postižení mozku s redukcí jeho parenchymu. Vzhledem k tomuto nálezu byly výsledky vyhodnoceny jako sekundární změny. U třetího pacienta byl nápadný dystonický syndrom, porucha okohybné funkce a neurovegetativní dysfunkce. Hladina HVA dosahovala 55% dolní hranice referenčního rozmezí pro daný věk.

Podle dříve publikovaných věkově vázaných referenčních rozmezí [4] jsme sestavili vlastní referenční skupinu ($n = 8$), kterou průběžně doplňujeme. Tato normální rozmezí se nacházejí v intervalech uvedených v literatuře (tab. 1).

Přehled klinických a biochemických nálezů u pacientů se sníženou koncentrací HVA je v tabulce 2, kde rovněž uvádíme referenční meze souboru 123 dětí z práce Zeman et al. [9]. V této práci byla použita metoda HPLC s ECD, kterou jsme však pro naši studii modifikovali. U vyšetřovaných dětí byla přítomná závažná neurologická symptomatologie, ale u žádného dítěte nebylo prokázáno neurotransmitterové onemocnění.

Pro screeningové vyšetření metabolismu neurotransmitterů má hlavní význam koncentrace produktů degradace dopaminu a serotoninu – metabolitů HVA a 5-HIAA. Při jejich patologické koncentraci je možné k upřesnění poruchy stanovit také hladinu dalších metabolitů (DOPAC, MHPG), jejichž fyziologická koncentrace je velice nízká. Popsanou metodou lze jejich detekci v mozkomíšním moku provést po malé úpravě technických parametrů HPLC systému.

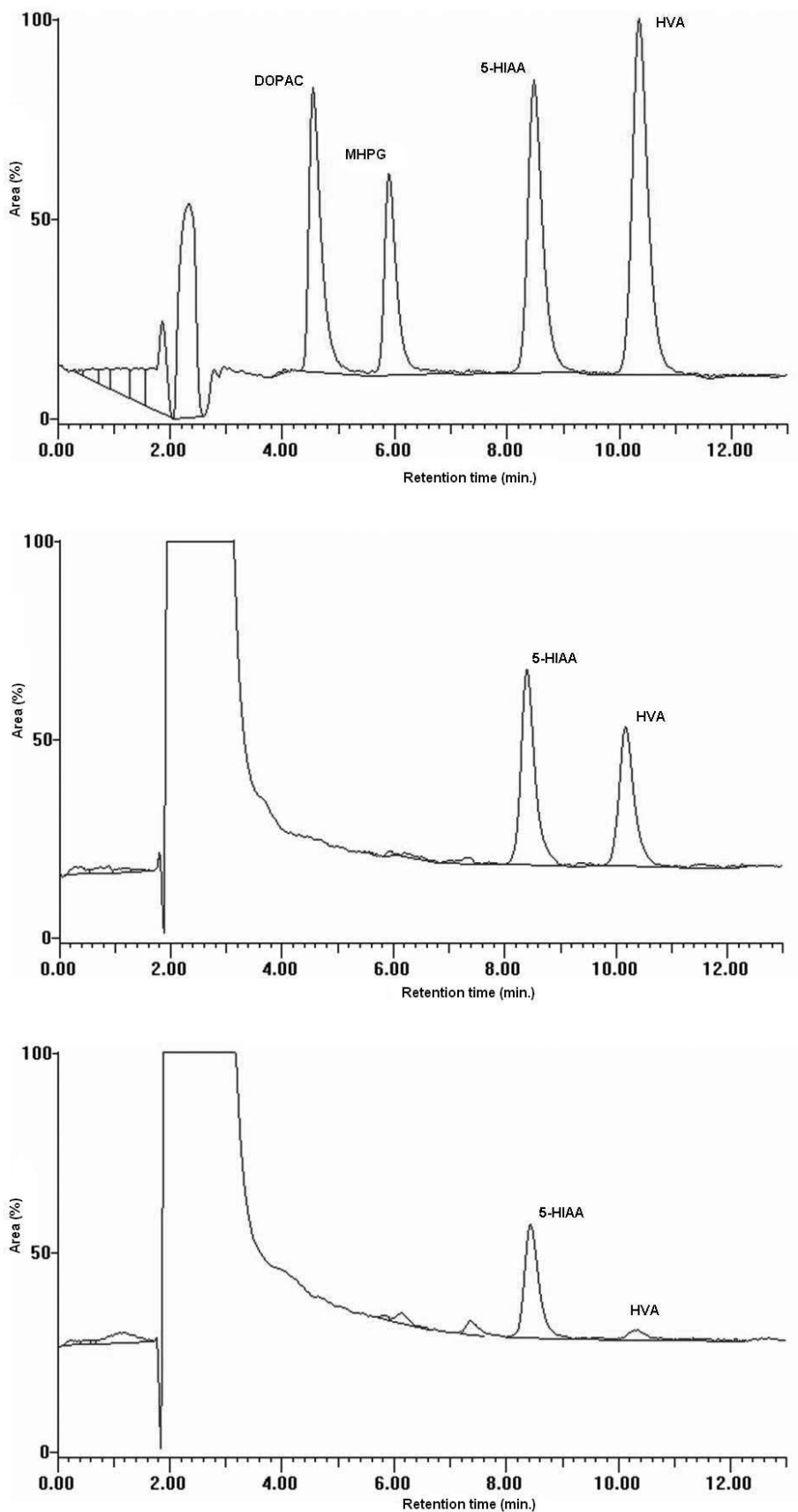


Fig. 2. HPLC chromatogram of neurotransmitter metabolites

A. HPLC chromatogram of standard mixture. DOPAC: 3,4-dihydroxyphenylacetic acid; MHPG: 3-methoxy-4-hydroxy-phenylglycol; HVA: homovanillic acid; 5-HIAA: 5-hydroxyindolacetic acid

B. HPLC chromatogram of cerebrospinal fluid – healthy control.

C. HPLC chromatogram of cerebrospinal fluid from patient 1 suspected of dopamine metabolism disorder. DOPAC: 3,4-dihydroxyphenylacetic acid; MHPG: 3-methoxy-4-hydroxy-phenylglycol; HVA: homovanillic acid; 5-HIAA: 5-hydroxyindolacetic acid

Table 1. Age-related reference intervals for monoamine metabolites in cerebrospinal fluid [4]

Age [years]	HIAA [nmol/l]	HVA [nmol/l]
0–0.2	208–1159	337–1299
0.2–0.5	179–711	450–1132
0.5–2	129–520	294–1115
2–5	74–345	233–928
5–10	66–338	218–852
10–15	67–189	167–563

5-HIAA – 5-hydroxyindolacetic acid, HVA – homovanillic acid

Table 2. Clinical and biochemical findings in patients with severe decrease of cerebrospinal fluid homovanillic acid concentration

Patient sex/age (years)	Clinical findings	HVA (nmol/l)		
		Deficit	Normal range	
			Hyland, K. [4]	Zeman, J. [9]
1. g/0.4	microcephaly, severe hypoxic-ischemic encephalopathy, brain atrophy	79	450–1132	214–422
2. g/1.7	severe microcephaly, brain atrophy	94	294–1115	143–351
3. b/5	dystonic syndrome, quadriparesis, oculomotor dysfunction	64	218–852	131–329

b – boy, g – girl, HVA – homovanillic acid

Diskuse

Identifikace tří patologických profilů neurotransmiterových metabolitů v relativně malém souboru pacientů by mohla svědčit pro jinak velice vzácnou primární poruchu metabolismu neurotransmiterů. Výsledky vysoce speciální analýzy je proto třeba interpretovat obezřetně, s vědomím výskytu možných sekundárních vlivů na jednotlivé fáze vyšetření i samotného pacienta.

Preanalytická fáze, standardizace odběru

V případě interpretace výsledků vyšetření koncentrace neurotransmiterových metabolitů je nutné zohlednit faktory zasahující do preanalytické fáze. Spolehlivost výsledků specializovaných vyšetření je možné dosáhnout jen při striktním dodržování doporučených protokolů: Samotný odběr mozkomíšního moku je potřebné provést v dopoledních hodinách pro známou diurnální fluktuaci hladin neurotransmiterů. Vzhledem k existenci rostrokaudálního koncentračního gradientu neurotransmiterových metabolitů doporučujeme k vyšetření použít u dětí do dvou let věku mozkomíšní mok z druhého mililitru, u starších dětí ze čtvrtého mililitru. Arteficiální oxidaci metabolitů neurotransmiterů hemolyzovanými erytrocyty lze zabránit bezprostřední centrifugací mozkomíšního moku. Po odběru je nezbytné okamžité zmrazení vzorku na suchém ledu nebo přímo v tekutém dusíku a skladovat při teplotě $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Stabilita sledovaných metabolitů v takto uskladněném vzorku se prodlužuje na několik měsíců až let. Při transportu do laboratoře musíme zabránit rozmrazení vzorku [10, 11].

Volba metodiky

K analýze neurotransmiterů a jejich metabolitů se využívají metody radiochemické a metody plynové a vysokoúčinné kapalinové chromatografie (GC a HPLC).

V případě radiochemických metod představují základní přístupy oxidační metody, radioenzymatické a radioimunologické eseje. Každá radiochemická metoda má své přednosti i nedostatky. Nepatří k technikám první volby, protože neumožňují determinovat skupinu neurotransmiterů a jejich metabolitů v rámci jedné analýzy. Navíc pro rutinní práci s velkým množstvím vzorků není vhodné používat radioizotopy.

Plynová chromatografie je vysoce senzitivní metoda, jejíž detekční limity se pohybují v rozmezí jednotek pikomolů. Příprava vzorků pro GC analýzu však vyžaduje derivatizaci neurotransmiterových metabolitů za účelem dosažení dostatečné těkavosti analytů. Variabilita ve výtěžku derivatizace analytů pro GC analýzu pak může způsobit nepřesnosti v kvantifikaci analytů, což je jistou nevýhodou GC metody.

Vysoce účinná kapalinová chromatografie je v současnosti rutinně aplikována při analýze biogenních aminů a jejich metabolitů. Vynikající separace je možné dosáhnout i na krátkých kolonách se stacionární reverzní fází. Snadná oxidabilita katecholaminů a neurotransmiterových metabolitů je předurčuje k detekci elektrochemickým detektorem (ECD) [12]. Kombinace HPLC s ECD v tomto případě patří k nejčastěji používaným metodám díky vysoké senzitivitě a selektivitě. Při detekci je možné využít amperometrický nebo coulometrický detektor. Proud vznikající při amperometrickém měření je přímo úměrný koncentraci elektrochemicky aktivních molekul. Naproti tomu využití coulometrie umožňuje kvantitativně efektivnější (téměř stoprocentní) detekci a zvyšuje tak senzitivitu analýzy.

Mezi další možnosti detekce patří využití fluorescenčního detektoru. Metabolity neurotransmiterů můžeme detekovat v nativní formě nebo po derivatizaci fluorescenčním činidlem s obdobně vysokou senzitivitou a specificitou, jako je tomu u ECD.

Metodiky HPLC s ECD nebo fluorescenčním detektorem jsou senzitivní a specifické, umožňují rychlou a reprodučibilní analýzu s minimální preanalytickou úpravou vzorku [13]. Spolehlivost výsledků je vzhledem k mnoha proměnným faktorům při odběru vzorku (diurnální fluktuační, rostrakaudální gradient, arteficiální oxidace metabolitů) možné dosáhnout jen při dodržení doporučených protokolů [14].

V poslední době se v rámci detektorů do popředí dostává hmotnostní spektrometrie (MS). MS detektor v kombinaci se separační technikou jako plynová nebo kapalinová chromatografie je vysoce specifický. Senzitivita však v současnosti není postačující pro kvantifikaci neurotransmitterových metabolitů v plazmě pro jejich velice nízkou koncentraci. Při analýze biologických vzorků je navíc někdy nutná jejich předběžná úprava, např. využitím extrakce na pevné fázi (solid-phase extraction) [15].

Sekundární změny profilu neurotransmitterových metabolitů

I když má vyšetření mozkomíšního mozku v diagnostice neurotransmitterových poruch své nezastupitelné místo, patologický profil neurotransmitterových metabolitů může být podmíněn také jiným chorobným stavem než primární poruchou dané metabolické dráhy, tedy sekundárně.

Mladý vyvíjející se mozek novorozenců může velice citlivě reagovat na různé inzulty poklesem koncentrace neurotransmitterových metabolitů. Čím mladší dítě, tím vyšší je fyziologická koncentrace neurotransmitterů v mozku, ale také zřetelnější porucha biosyntézy biogenních aminů.

Závažné dlouhotrvající farmakorezistentní epileptické projevy mohou vést ke ztrátě funkčních neuronů a synapsí, a tedy k sekundárně snížené produkci neurotransmitterů.

Příčinou disturbance koncentrace neurotransmitterových metabolitů může být rovněž těžké organické poškození mozku v důsledku perinatální asfyxie, pontocerebelární hypoplazie a různých typů leukodystrofie. Různé typy strukturálních abnormalit mají na metabolismus biogenních aminů odlišný vliv. Atrofie mozkové kůry se může projevit snížením koncentrace 5-HIAA, pontocerebelární atrofie má za následek snížení koncentrace 5-HIAA i HVA. Zajímavé je, že postižení bazálních ganglií se neprojevilo sníženou hladinou metabolitů neurotransmitterů [16].

Proces neurotransmise je energeticky náročný a je přímo závislý na funkci mitochondrií. Mitochondriální onemocnění proto mohou způsobit dysfunkci neurotransmitterových systémů, což se projeví právě sekundárními změnami v mozkomíšním moku [17].

Suspektní vzorky – interpretace

Mezi 82 vzorky byl u tří pacientů nalezen profil, který odpovídá deficitu aktivity tyrosinhydroxylázy (TH) s výrazně sníženou hladinou HVA (tab. 2). U všech tří pacientů představovala HVA méně než 60% dolní hra-

nice fyziologického rozmezí. V případě prvních dvou pacientů je možné usuzovat na sekundární poruchu metabolismu neurotransmitterů způsobenou těžkým organickým postižením mozku, jak již bylo dříve popsáno [18]. U třetího pacienta, jehož klinická symptomatologie svědčila pro primární poruchu neurotransmitterového metabolismu na úrovni TH, jsme indikovali molekulárně-genetické vyšetření TH genu s pozitivním nálezem. Diagnostikovali jsme tak prvního pacienta v ČR s deficitem aktivity tyrosinhydroxylázy a zahájili léčbu.

Závěr

Vyšetření koncentrace metabolitů neurotransmitterů v mozkomíšním moku patří mezi vysoce specializovaná vyšetření a má stěžejní úlohu v diagnostice poruch metabolismu biogenních aminů. Jedná se o vzácná, ale léčbou ovlivnitelná onemocnění. Metodika měření neurotransmitterových metabolitů pomocí vysoce účinné kapalinové chromatografie s elektrochemickým detektorem byla na našem pracovišti zavedena v rámci výzkumné a pilotní práce v roce 1991 [9], kdy bylo vyšetřeno 123 dětí s projevy neurometabolického onemocnění. Nebyl diagnostikován žádný pacient s tímto onemocněním. Avšak až v současné době jsme na našem pracovišti zavedli optimalizovanou metodu HPLC s ECD pro měření neurotransmitterových metabolitů v mozkomíšním moku do rutinní diagnostiky všech dětí s podezřením na neurometabolické onemocnění a našli prvního pacienta. Interpretace výsledků je náročná jak pro nutnost protokolární manipulace se vzorkem, tak pro sekundární abnormality v metabolismu neurotransmitterů. Analýza může sloužit jako screeningová metoda s možností následného potvrzení diagnózy na enzymatické a/nebo molekulárně-genetické úrovni.

Literatura

1. **Hyland, K.** Biochemistry and physiology of biogenic amines. In Hoffmann, G. F. *Diseases of Neurotransmission from Bench to Bed*. 1st ed. Heilbronn: SPS Publications, 2006 s. 11–28.
2. **Pons, R.** The phenotypic spectrum of paediatric neurotransmitter diseases and infantile parkinsonism. *J. Inherit. Metab. Dis.*, 2009, 32, 3, p. 321–332.
3. **Blau, N., Thöny, B., Cotton, R. G. H., Hyland, K.** Disorders of tetrahydrobiopterin and related biogenic amines. In Scriver, C. R., Beaudet, A. L., Sly, W. S. et al. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. 8th ed. New York: McGraw-Hill, 2001 s. 1725–1776.
4. **Hyland, K.** Clinical utility of monoamine neurotransmitter metabolite analysis in cerebrospinal fluid. *Clin. Chem.*, 2008, 54, 4, p. 633–641.
5. **Sabbioni, C., Saracino, M. A., Mandrioli, R.** Simultaneous liquid chromatographic analysis of catecholamines and 4-hydroxy-3-methoxyphenylethylene glycol in human plasma. Comparison of amperometric and coulometric detection. *J. Chromatogr. A.*, 2004, 1032, 1–2, p. 65–71.

6. **Iizuka, H., Ishige, T., Ohta, Y., Yajima, T.** Simultaneous determination of 5-hydroxyindoles and catecholamines by HPLC with fluorometric precolumn derivatization. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 1999, 467, p. 821–826.
 7. **Takezawa, K., Tsunoda, M., Murayama, K., Santa, T., Imai, K.** Automatic semi-microcolumn liquid chromatographic determination of catecholamines in rat plasma utilizing peroxyoxalate chemiluminescence reaction. *Analyst.*, 2000, 125, 2, p. 293–296.
 8. **Ragab, G. H., Nohta, H., Kai, M., Ohkura, Y., Zaitso, K.** 1,2-Diarylethylenediamines as sensitive pre-column derivatizing reagents for chemiluminescence detection of catecholamines in HPLC. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 1995, 13, 4–5, p. 645–650.
 9. **Zeman, J., Böswart, J.** Metabolity neurotransmitterů v mozkomíšním moku u dětí. *Česk. Pediatr.*, 1991, 46, 5, p. 262–265.
 10. **Szentiványi, K., Hansíková, H., Honzík, T. et al.** Poruchy metabolismu biogenních aminů v dětském věku a možnosti jejich diagnostiky. *Cesk. Slov. Neurol. N.*, 2010, 73/ 106, 1, p. 68–72.
 11. **Assmann, B., Surtees, R., Hoffmann, G. F.** Approach to the diagnosis of neurotransmitter diseases exemplified by the differential diagnosis of childhood-onset dystonia. *Ann. Neurol.*, 2003, 54, 16, p. 18–24.
 12. **Yi, Z., Brown, P. R.** Chromatographic methods for the analysis of basic neurotransmitters and their acidic metabolites. *Biomed. Chromatogr.*, 1991, 5, 3, p. 101 to 107.
 13. **Schmidt, D., Roznoski M., Ebert M. H.** Qualitative and quantitative high performance liquid chromatographic analysis of monoamine neurotransmitters and metabolites in cerebrospinal fluid and brain tissue using reductive electrochemical detection. *Biomed. Chromatogr.*, 1990, 4, p. 215–220.
 14. **Assmann, B., Surtees, R., Hoffmann, G. F.** Approach to the diagnosis of neurotransmitter diseases exemplified by the differential diagnosis of childhood-onset dystonia. *Ann. Neurol.*, 2003, 54, 6, p. 18–24.
 15. **Tsunoda, M.** Recent advances in methods for the analysis of catecholamines and their metabolites. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2006, 386, 3, p. 506–514.
 16. **García-Cazorla, A., Serrano, M., Pérez-Dueñas, B. et al.** Secondary abnormalities of neurotransmitters in infants with neurological disorders. *Dev. Med. Child. Neurol.*, 2007, 49, 10, p. 740–744.
 17. **García-Cazorla, A., Duarte, S., Serrano, M. et al.** Mitochondrial diseases mimicking neurotransmitter defects. *Mitochondrion.*, 2008, 8, 3, p. 273–278.
 18. **Van Der Heyden, J. C., Rotteveel, J. J., Wevers, R. A.** Decreased homovanillic acid concentrations in cerebrospinal fluid in children without a known defect in dopamine metabolism. *Eur. J. Paediatr. Neurol.*, 2003, 7, 1, p. 31–37.
 19. **Hoffmann, G. F., Assmann, B., Bräutigam, C. et al.** Tyrosine hydroxylase deficiency causes progressive encephalopathy and dopa-nonresponsive dystonia. *Ann. Neurol.*, 2003, 54, 6, s. 56–65.
- Poděkování: Práce byla podpořena grantovým projektem: IGA MZ NS 10561-3/2009 a MZOVFN2005, GAČR 305-08/H037, SWV č. 260501.
- Do redakce došlo 28. 3. 2011.
- Adresa pro korespondenci:
Doc. MUDr. Tomáš Honzík, Ph.D.
Klinika dětského a dorostového lékařství
Ke Karlovu 2
128 08 Praha 2
e-mail: tomas.honzik@vfn.cz*