

LIPIDOMICKÁ ANALÝZA BIOLOGICKÝCH VZORKŮ PŘÍMOU INFUZÍ SPOJENOU S HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIÍ

Ivana Brabcová, Eva Cífková, Robert Jirásko, Michaela Chocholoušková a Michal Holčapek

*Katedra analytické chemie, Fakulta chemicko-technologická, Univerzita Pardubice,
Studentská 573, 532 10 Pardubice*

Abstract

Lipidomic analysis of biological samples in clinical research represents a challenging task due to the extreme complexity of samples and their large number. One of the ways to get complex information on the composition of the sample is to use direct infusion mass spectrometry (DI-MS). The DI-MS technique was used to measure plasma samples of patients with renal cancer and healthy volunteers.

Souhrn

Lipidomická analýza biologických vzorků v klinickém výzkumu představuje náročný úkol, který je dán vysokou komplexností a velkým počtem zpracovávaných vzorků. Jednou z možností, jak získat komplexní informace o složení vzorku, je použití přímé infuze spojené s hmotnostní spektrometrií (DI-MS). Technika DI-MS byla použita pro měření vzorků plazmy pacientů s rakovinou ledvin a zdravých dobrovolníků.

1. Úvod

Lipidomika [1] je jednou z oblastí metabolomiky, která se zaměřuje na analýzu lipidů izolovaných z buněk, tkání nebo tělních tekutin. Tyto poznatky slouží k objasnění funkcí lipidů v biologických systémech. Lipidy se účastní buněčné signalizace, slouží k porozumění mechanismů některých závažných onemocnění a jsou potenciálními biomarkery těchto onemocnění. Lipidy představují [2,3] různé skupiny sloučenin s velkými rozdíly ve struktuře a fyzikálně-chemických vlastnostech, což klade nároky na používané analytické techniky při lipidomické analýze.

Pro lipidomickou analýzu biologických vzorků se klíčovou technikou stala hmotnostní spektrometrie, a to zejména díky jejímu významnému rozvoji v posledních letech. V lipidomické analýze pomocí MS se používají především dva přístupy, jde o přímou infuzi vzorku (DI-MS), označovanou také jako shotgun lipidomics [4]. Druhým přístupem je spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií.

DI-MS představuje analytickou techniku, ve které je lipidový extrakt zaveden přímou infuzí do iontového zdroje hmotnostního spektrometru, kde jsou všechny lipidy ionizovány společně. Lipidy jsou stanoveny pomocí MS/MS skenů, jako jsou skeny prekurzorových iontů (PI), skeny neutrálních ztrát (NL) a skeny iontových reakcí (SRM), které jsou založeny na charakteristickém fragmentačním chování jednotlivých tříd měřených lipidů. K měření se využívají hmotnostní spektrometry trojitého kvadrupólu nebo kvadrupól-lineární iontové pasti [5]. V klinickém výzkumu bývá technika DI-MS používána pro analýzu velkých souborů vzorků, neboť celý tento proces je možné snadno automatizovat. Navíc poskytuje přesné a reprodukovatelné výsledky. Stanovení izomerů může být na druhé straně obtížné, pozornost je třeba věnovat také iontové supresi.

Vzhledem ke komplikovanému složení vzorků je kvantifikace lipidomické analýzy obtížná, protože použití odpovídajících standardů pro všechny analyty je nereálné. Pro kvantifikaci se pro každou třídu jako interní standardy (IS) používají exogenní lipidy, které nejsou přítomny v reálných vzorcích. Jedná se o lipidy s netypickou kombinací sudých a lichých acylů.

2. Experimentální část

2.1 Chemikálie a standardy

Acetonitril, 2-propanol, metanol (odpovídající čistoty HPLC/MS grade), chloroform (HPLC grade), octan amonný a kyselina octová byly zakoupeny od SigmaAldrich (St. Louis, MO, USA). Redestilovaná voda byla připravena na přístroji Milli-Q Reference Water Purification System (Molsheim, France). Pro kvantifikaci byly použity následující IS: diacylglycerol (DG 12:1/0:0/12:1), monoacylglycerol (MG 19:1/0:0/0:0) a triacylglycerol (TG 19:1/19:1/19:1), zakoupené od Nu-ChekPrep (Elysian, MN, USA). Další - cholesteryl ester (CE-D7 16:0), ceramid (Cer d18:1/12:0), hexosylovaný ceramid (HexCer d18:1/12:0), deuterovaný cholesterol (Chol d7), dihexosylovaný ceramid (Hex2Cer d18:1/12:0), lysofosfatidylcholin (LPC 17:0/0:0), lysofosfatidylethanolamin (LPE 14:0/0:0), lysofosfatidylglycerol (LPG 14:0/0:0), fosfatidová kyselina (PA 14:0/14:0), fosfatidylcholin (PC 14:0/14:0), fosfatidylethanolamin (PE 14:0/14:0), fosfatidylglyceroly (PG 14:0/14:0), fosfatidylseriny (PS 14:0/14:0), sfingomyelin (SM d18:1/12:0) a sulfatid (d18:1/12:0) - byly zakoupeny od Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA).

Zásobní roztok jednotlivých IS byl připraven o koncentraci 2 mg/ml ve směsi obsahující chloroform – 2-propanol (1:4, v/v).

Vzorky plazmy pacientů s rakovinou ledvin a zdravých dobrovolníků byly získány z Fakultní nemocnice Olomouc na základě souhlasu etické komise.

2.1 Příprava vzorků

Lipidový extrakt byl připraven z 25 μ l plazmy, do které byla pro kvantitativní analýzu přidána směs IS. Vzorky byly připraveny podle upravené Folchovy metody [6]. Poté byly vzorky odpařeny pod dusíkem a odparky byly rozpuštěny 0,5 ml směsí, která obsahovala chloroform a 2-propanol (1:1, v/v). Výsledný lipidový extrakt byl osmkrát naředěn ve směsi, která se skládala z chloroformu, metanolu a 2-propanolu (1:2:4, v/v/v); směs dále obsahovala 7,5 mM octan amonný a 1%ní kyselinu octovou.

2.1 DI-MS podmínky

DI-MS byla provedena pomocí hmotnostního spektrometru ABSciex 6500 QTRAP s trojitým kvadrupólem a Turbo V iontovým zdrojem s elektrosprejovou ionizací (ESI). Nastavení iontového zdroje bylo následující: napětí kapiláry 5200V, „curtain“ plyn 20 psi, teplota zdroje 50 °C, zmlžující plyn (GS1) 15 psi, a turbo plynu (GS2) 10 psi. MS/MS sken byl měřen se skenovací rychlostí 1000 Da/s. Dalšími parametry byly deklasterizační potenciál 80 V, vstupní potenciál 10 V a kolizní energie 12 eV (cholesterol, CE), 20 eV (DG, MG), 25 eV (PA, SulfoHexCer), 30 eV (PE, LPE, PS, LPS, PG, LPG, TG) a 35 eV (PC, LPC, SM, Cer, HexCer, Hex2Cer). Vzorky byly zavedeny do iontového zdroje pomocí přímé infuze, která byla realizována pomocí kapalinového chromatografu Agilent 1290 Series (Agilent Technologies), který tvoří Agilent 1290 binary pumpy a Agilent 1260 autosampler. Rozpouštědlem pro přímou infuzi vzorku byla směs chloroform – metanol – 2-propanol (1:2:4, v/v/v) obsahující 7,5 mM octanu amonného a 1%ní kyseliny octové s průtokem 3 μ l/min. Systém byl následně promyt směsí metanol – 2-propanol – voda (2:2:1, v/v/v) obsahující 7,5 mM octan amonný a 1%ní kyselinu octovou. Dávkováno bylo 50 μ l vzorku.

3. Výsledky a diskuze

Tato práce navazuje na nedávno uveřejněné údaje [7]. Byla převzata validovaná metoda pro techniku DI-MS, která byla vyvinuta pro stanovení lipidů v biologických vzorcích. Cílem uvedené práce bylo hledání rozdílů v lipidovém složení ve vzorcích plazmy pacientů s rakovinou ledvin a zdravých dobrovolníků.

Ke vzorku plazmy byla přidána směs vnitřních standardů a následně byla provedena extrakce z kapaliny do kapaliny. Výsledný extrakt byl odpařen pod dusíkem. Následně byl odparek rozpuštěn ve směsi chloroformu a 2-propanolu, osmkrát naředěn a analyzován pomocí DI-MS. Extrakt vzorku byl přímou infuzí zaveden do ESI iontového zdroje, který vyžival záznam kladných iontů v rozsahu m/z 200 - 1000. Jednotlivé lipidy byly identifikovány pomocí skenu iontu prekursoru a skenu neutrálních ztrát, jak je uvedeno v Tabulce 1.

Jako vnitřní standardy byly vybrány exogenní lipidy, které nejsou přítomny v reálných vzorcích (Obrázek 1 a 2).

Pro kontrolu kvality a spolehlivosti měření velké série vzorků byl použit vzorek kontroly kvality (QC). Jedná se o směsný vzorek, který byl připraven smícháním extraktů vzorků pacientů a zdravých dobrovolníků. Vzorek byl měřen v pravidelných intervalech v průběhu celé série měření.

Technika DI-MS poskytuje komplexní informace o širokém spektru lipidů, s její pomocí bylo identifikováno 23 nepolárních a polárních tříd lipidů. Celkový čas rozboru je 23 minut, tato doba zahrnuje 12 minut vlastní analýzy, zbývající čas je využit k dosažení stabilních podmínek po nadávkování vzorku a k nutnému promytí systému.

Získaná data byla vyhodnocena prostřednictvím vyvinutého softwaru LipidQuant.

4. Závěr

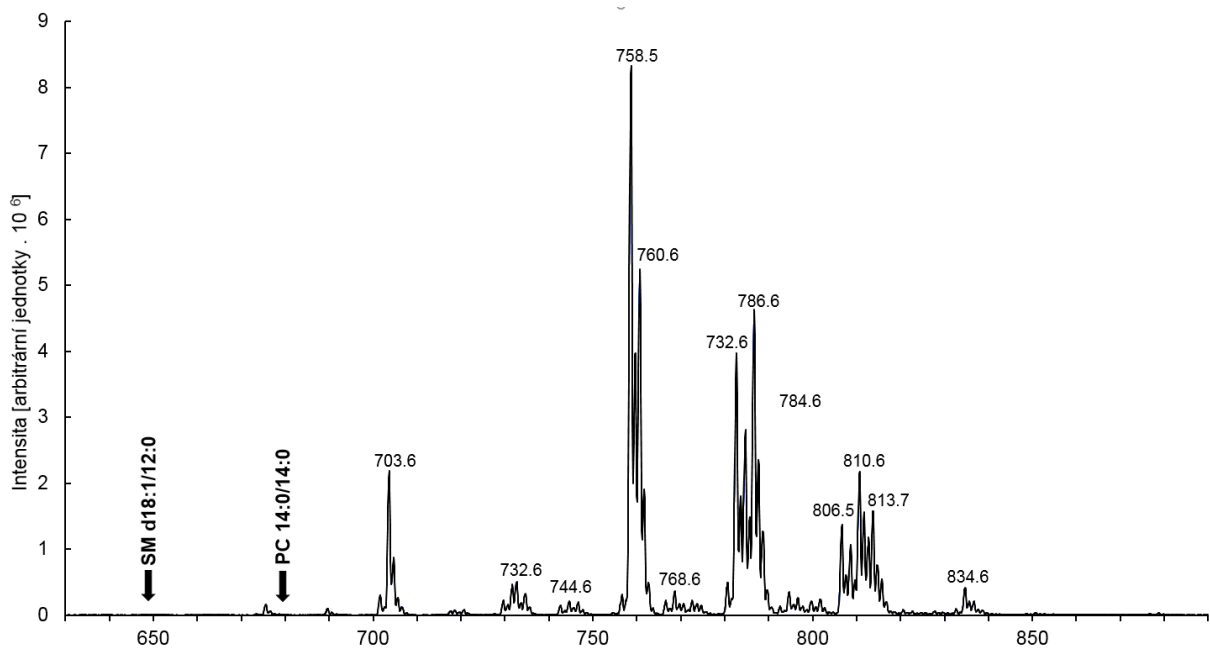
V rámci studie byly změřeny vzorky plazmy pacientů s rakovinou ledvin a zdravých dobrovolníků pomocí techniky DI-MS, která umožňuje získat komplexní informace o složení vzorku.

Poděkování

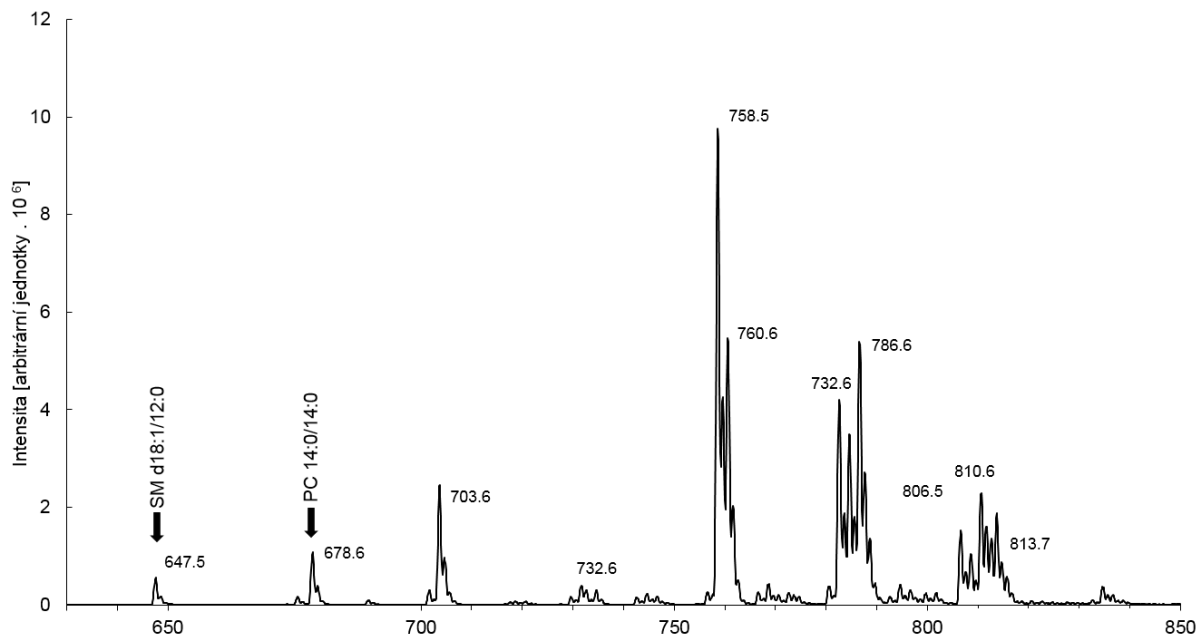
Tato práce byla podporována grantovým projektem ERC CZ číslo LL1302 Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy.

Tabulka 1: Skeny charakteristické pro jednotlivé třídy lipidů

Třída lipidů	Typ skenu
TG	NL17
MG	NL35
DG	NL 35
Sulfatidy	NL 98
PA	NL 115,2
LPE	NL 141,2
PE	NL 141,2
LPC	PI 184,1
PC	PI 184,1
SM	PI 184,1
LPS	NL 185,2
PS	NL 185,2
LPG	NL 189,2
PG	NL 189,2
Cer	PI 264,3
HexCer	PI 264,3
Hex2Cer	PI 264,3
Chol D7	PI 376,1
CE D7	PI 376,1



Obrázek 1. Záznam skenu PI 184,1 pro vzorek plazmy, který neobsahoval přídavek IS.



Obrázek 2. Záznam skenu PI 184,1 pro vzorek plazmy po přídavku IS.

Literatura

- [1] A.D. Watson: *J. Lipid Research* **47** (2006) 2101–2111.
- [2] E. Fahy, S. Subramaniam, H.A. Brown, C.K. Glass, A.H. Merrill, R.C. Murphy, C.R.H. Raetz, D.W. Russell, Y. Seyama, W. Shaw, T. Shimizu, F. Spener, G. van Meer, M.S. VanNieuwenhze, S.H. White, J.L. Witztum, E.A. Dennis: *J. Lipid Research* **46** (2005) 839–861.
- [3] E. Fahy, S. Subramaniam, R.C. Murphy, M. Nishijima, C.R.H. Raetz, T. Shimizu, F. Spener, G. van Meer, M.J.O. Wakelam, E.A. Dennis: *J. Lipid Research* **50** (2009) S9-S14.
- [4] M. Li, L. Yang, Y. Bai, H. Liu: *Analytical Chemistry* **86** (2014) 161–175.
- [5] M. Lída, M. Holčapek: *Analytical Chemistry* **87** (2015) 7187–7195.
- [6] E. Cífková, M. Holčapek, M. Lída, M. Ovčačíková, A. Lyčka, F. Lynen, P. Sandra: *Analytical Chemistry* **84** (2012) 10064–10070.
- [7] M. Lída, E. Cífková, M. Khalikova, M. Ovčačíková, M. Holčapek: *J. Chromatography A* **1525** (2017) 96–108.

