

## **ANALÝZA SULFATIDŮ V BIOLOGICKÝCH VZORCÍCH S VYUŽITÍM MALDI HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE**

Robert Jirásko<sup>1</sup>, Michal Holčápek<sup>1</sup>, David Vrána<sup>2</sup> a Bohuslav Melichar<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Katedra analytické chemie, Fakulta chemicko-technologická, Univerzita Pardubice, Studentská 573, 532 10 Pardubice*

<sup>2</sup>*Onkologická klinika, Lékařská fakulta Univerzity Palackého v Olomouci, I. P. Pavlova 6, 775 20 Olomouc*

### **Abstract**

The aim of this work was the optimization and validation of matrix-assisted laser desorption/ionization coupled with Orbitrap mass spectrometry (MALDI-Orbitrap-MS) of sulfatides in selected biological samples (human kidney tissue and plasma). First, sulfatide species were identified using high mass accuracy full scan and tandem mass spectra. More than hundred sulfatides containing one to five hexosyl units were found in studied human samples based on the systematic study of their fragmentation behavior. Subsequently, the optimization and method validation for semiquantitative measurement was performed. The optimized methodology was finally used for the clinical study of patients with renal cell carcinoma (RCC), as the most common type of kidney cancer.

### **Souhrn**

Cílem této práce byla optimalizace a validace hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí a ionizací za účasti matrice v kombinaci s Orbitrap analyzátozem (MALDI-Orbitrap-MS) pro analýzu sulfatidů v biologických vzorcích (tkáň lidských ledvin a plasmy). Za pomoci vysoké správnosti určení  $m/z$  a měření tandemových hmotnostních spekter (MS/MS) bylo ve studovaných vzorcích identifikováno více než sto sulfatidů obsahujících jednu až pět hexosylových jednotek. Následně byla provedena optimalizace a validace metody pro semikvantitativní měření. Optimalizovaná metoda byla finálně použita pro klinickou studii pacientů s renálním buněčným karcinomem (RCC), nejčastějším typem rakoviny ledvin.

### **1. Úvod**

Sulfatidy (sulfoglykosfingolipidy) jsou kyselé sfingolipidy s charakteristickým hydrofobním ceramidovým skeletem připojeným k polárnímu sacharidovému řetězci, který obsahuje alespoň jednu anionickou sulfátovou skupinu [1]. Tyto sloučeniny jsou přítomny v různých živočišných a lidských tkáních (mozek, ledviny, zažívací trakt) a hrají významnou roli v signální transdukcii, účastní se modulace buněčné adheze a růstu, rozpoznání antigenu, renálního vyloučení amonia a dalších biologických funkcí [2,3]. Odlišný metabolismus sulfatidů je často asociován s různými onemocněními. Zvýšená exprese

sulfoglykosfingolipidů byla zaznamenána v souvislosti s chronickou metabolickou acidózou [3], metachromatickou leukodystrofií [4], Alzheimerovou chorobou [5] a v řadě zhoubných chorob jako např. renální buněčný karcinom nebo rakovina tlustého střeva, plic a vaječníku [2,6,7]. Většina studií je zaměřena na analýzu galactosylceramid-I3-sulfátů, které jsou nejčastějším typem sulfatidů. Nicméně sulfoglykosfingolipidy představují širokou strukturní různorodost v závislosti na rozdílné délce, počtu dvojných vazeb a hydroxylace N-vázané mastné kyseliny a sfingoidní báze v ceramidové části či počtu hexosylových a sulfátových jednotek v části sacharidové. Tyto strukturní prvky nemohou být rozlišeny imunochemickými ani chromatografickými metodami a pro jejich identifikaci je nezbytné použití hmotnostní spektrometrie (MS). V rámci intervalu jedné nominální hodnoty  $m/z$  se však může vyskytovat více iontů z důvodů matričních efektů a isobarických překryvů lipidů s velmi blízkou hmotností, a proto je důležité použití hmotnostního analyzátoru s vysokou rozlišovací schopností, vysokým určením správné hodnoty  $m/z$  a zároveň možností MS/MS pro získání více strukturních informací a rozlišení nežádoucích interferencí [8]. Dalším důležitým krokem je výběr vhodné ionizační techniky. Nejvíce používaná technika pro analýzu lipidů je ionizace elektrosprejem (ESI), která byla pro analýzu sulfatidů aplikována v mnoha případech, ať už pro chromatografické analýzy ve spojení s MS, tak pro „shotgun“ MS analýzy [4,5,9]. Alternativou ESI je využití laserové desorpce/ionizace za účasti matrice (MALDI) pomocí silně bazického 9-aminoacridinu (9-AA) jako matrice, který umožňuje selektivní tvorbu iontů  $[M-H]^+$  pro sloučeniny s kyselým charakterem [10,11].

## **2. Experimentální část**

### **2.1 Chemikálie a standardy**

Použitá rozpouštědla (methanol, chloroform, 2-propanol) odpovídala čistotě pro gradientovou HPLC eluci (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Redestilovaná voda byla připravována na přístroji Milli-Q Reference Water Purification System (Molsheim, France). Interní standard (IS) SulfoHexCer d18:1/12:0 použitý pro validaci a vlastní semikvantitativní analýzy byl zakoupen od Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA). Matrice 9-AA byla zakoupena od Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

### **2.2 Získání a zpracování vzorků**

Všechny studované vzorky lidských tkání, plasmy a moči byly získány z Urologické kliniky Fakultní nemocnice Olomouc. Studie byla schválena etickou komisí a všichni zúčastnění pacienti podepsali informovaný souhlas. Plasma a moč byly ihned po získání

zmrazeny na  $-80^{\circ}\text{C}$ . Na stejnou teplotu byly zmrazeny i tkáně získané během jednotlivých chirurgických zákroků. Studované sloučeniny byly z ledvinových tkání a plasmy extrahovány pomocí modifikované Folchovy metody směsí chloroform-metanol-voda: 25 mg ledvinové tkáně (25  $\mu\text{L}$  plasmy) bylo společně s přísávkem IS homogenizováno ultrazvukem v 6 ml směsi chloroform – metanol (2:1, v/v). Homogenát byl následně smíchán se 120  $\mu\text{L}$  vody a 5 minut centrifugován (3000 rpm) při pokojové teplotě. Spodní chloroformová vrstva obsahující lipidy byla odpařena dusíkem a znovu rozpuštěna v 0.5 ml směsi chloroform – 2-propanol (1:1, v/v). Vzorky byly finálně zředěny metanolem 1:3 (tkáně) či 1:1 (plasma).

### 2.3 Validace metody

Validační parametry byly stanoveny v souladu s protokoly „European Medicines Agency“ (Guideline on bioanalytical method validation) [12] a zahrnovaly následující body: selektivitu, měření kalibrační křivky, stanovení přesnosti a opakovatelnosti, paměťového efektu, stability analytu po zamražení/rozmražení a matričního efektu. Lineární rozsah (0.37 - 1700 pmol/ml), limit detekce (0.37 pmol/ml) a limit kvantifikace (0.11 pmol/ml) byly stanoveny z kalibrační křivky (závislost koncentrace na absolutním signálu IS,  $R^2 > 0.99$ ), která byla sestavena na základě proměření 13 kalibračních roztoků, které obsahovaly vždy 50% směsného vzorku extraktů tkání (plasmy), roztok IS v rozmezí koncentrací IS 0.85 - 8500 pmol/ml a metanol.

Směsný vzorek pro validaci byl připraven homogenizací nádorové a okolní nenapadené tkáně 20 náhodně zvolených pacientů. V případě validace plasmy byl připraven homogenizací plasmy od 20 pacientů a 20 zdravých dobrovolníků. Selektivita byla ověřena proměřeními 6 různých vzorků extraktů tkání (plasmy) bez přísávku IS. Přesnost měření v rámci jednoho dne byla získána na základě výsledků měření 6 následných extrakcí směsného vzorku tkání (plasmy) s přísávkem IS provedených v jeden den pro dvě koncentrační hladiny IS. Přesnost měření mezi dny byla vypočítána z naměřených výsledků pro 9 extraktů směsných vzorků (6 připravených jeden den, 3 připravených druhý den) opět pro dvě koncentrační hladiny IS. Relativní směrodatná odchylka (RSD) v naměřených datech nepřesahovala 30%. Paměťový efekt nebyl pozorován a byl stanoven proměřeními směsi blanku a matrice napipetované po umytí MALDI destičky na pozici, kde byly před umytím přítomny kalibrační roztoky o nejvyšší koncentraci IS. Stabilita analytu po zamražení/rozmražení byla stanovena pro směsné vzorky s IS pouze pro vysokou koncentrační hladinu po dvou cyklech zmražení/rozmražení zahrnujících uskladnění vzorku při teplotě  $-20^{\circ}\text{C}$  přes noc a 1 h rozmražení při pokojové teplotě (RSD nepřesahovala 20%).

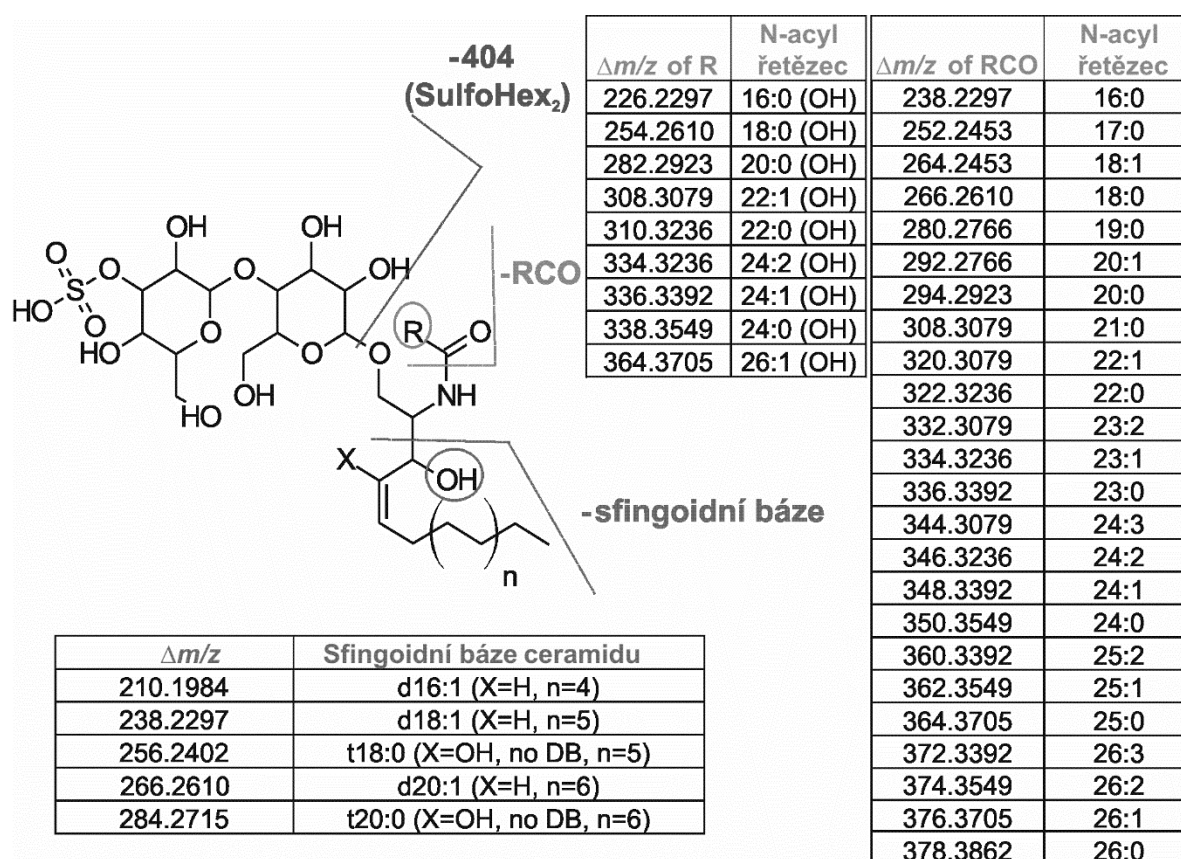
Opakovatelnost byla stanovena na základě porovnání absolutního signálu IS pěti spotů pipetované směsi vzorků a matrice (RSD se pohybovala v rozmezí 5 - 15%). Podrobné informace o validaci jsou k dispozici v již publikované práci [13].

#### **2.4 MALDI-Orbitrap-MS a MSI měření**

Hmotnostní spektra byla měřena pomocí MALDI hmotnostního spektrometru LTQ Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) s dusíkovým UV laserem (337 nm, 60 Hz) o velikosti paprsku 80  $\mu\text{m}$  x 100  $\mu\text{m}$ . Spektra byla snímána v módu pro snímání záporně nabitých iontů v hmotnostním rozsahu  $m/z$  400 – 2000 a hmotnostní rozlišení bylo nastaveno na hodnotu 100 000. 9-AA byl rozpuštěn ve směsi metanol – voda (4:1, v/v) na finální koncentraci 5 mg/ml. Matrice byla následně před každým pipetováním na MALDI destičku smíchána s naředěným vzorkem extraktu tkáně (plasmy) v poměru 1:1. Pipetované množství směsi extrakt/matrice bylo 1.5  $\mu\text{l}$  a každý vzorek byl pipetován 5x. Vzorky byly proměřeny při následujícím nastavení hmotnostního spektrometru: zig-zag pohyb vzorku s velikostí kroku 250  $\mu\text{m}$ , energie laseru 15% maxima, 2 laserové střely/mikrosken, 2 mikroskeny/sken. Měření každého vzorku zahrnovalo akumulaci spekter získaných z 36 různých pozic pro dosažení reprodukovatelného signálu. V případě tandemové hmotnostní spektrometrie bylo použito následující nastavení: 1) pro kolizně indukovanou disociaci (CID) byla izolační šířka  $\Delta m/z$  1, normalizovaná kolizní energie 25 – 80 %, aktivační hodnota Q byla 0.250, aktivační čas 30 ms a jako kolizní plyn bylo použito He; 2) pro Q kolizně indukovanou disociaci (PQD) byla normalizovaná energie 35%, aktivační Q hodnota byla 0.7 a aktivační čas 0.1 ms; 3) v případě kolizní disociace s vyšší energií byla použita normalizovaná energie v intervalu 25 - 50% v závislosti na stabilitě prekurzorového iontu.

### **3. Výsledky a diskuze**

Na základě porovnání několika matric byl pro analýzu sulfatidů v souladu s literaturou vybrán 9-AA, jehož použití přineslo s ohledem na reprodukovatelnost a citlivost signálu nejlepší výsledky. Dalším krokem byla optimalizace složení rozpouštědel, aby nedocházelo k rozmytí vzorku na destičce a krystalizace byla co nejvíce homogenní. Nejlepší výsledky byly získány pro směs metanol – voda (4:1, v/v). Před aplikací směsi extrakt/matrice bylo do jednotlivých jamek na destičce pipetováno malé množství chloroformu a následně odpařeno, což kompletně odstranilo rozmývání pipetovaného vzorku.



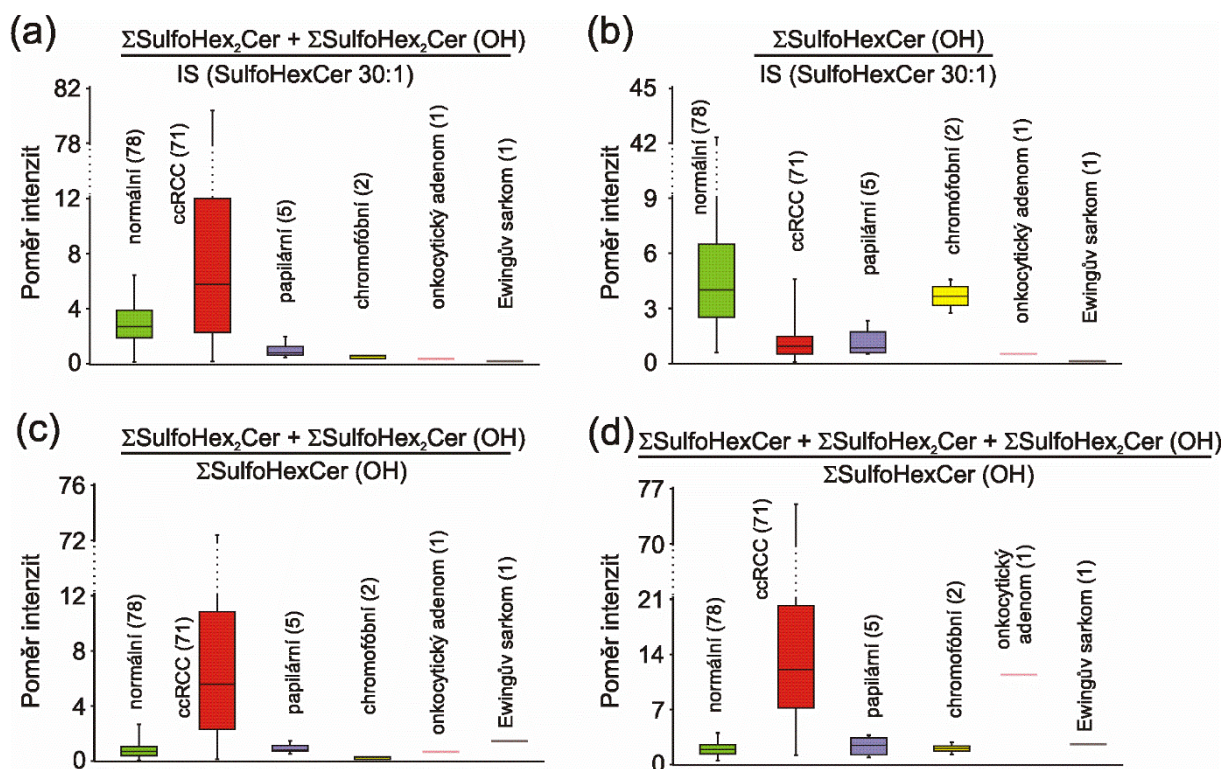
**Obrázek 1:** Schéma CID fragmentačního procesu sulfatidů a přehled pozorovaných neutrálních ztrát pro jednotlivé přítomné N-acyly bez nebo s hydroxylací a sfingoidní báze ceramidu.

Důležitým krokem při vývoji a optimalizaci metody byla identifikace přítomných sulfatidů ve studovaných vzorcích. S využitím vysokého rozlišení, vysoké správnosti určení hmoty a měření tandemových hmotnostních spekter bylo ve vzorcích tkání identifikováno celkem 119 sulfatidů obsahujících jednu (52), dvě (40), tři (12), čtyři (5) až pět (10) hexosylových jednotek a ve všech případech pouze jednu sulfátovou skupinu. V plasmě bylo identifikováno 30 sulfatidů s jednou (SulfoHexCer) a pět sulfatidů se dvěma hexosylovými jednotkami (SulfoHex<sub>2</sub>Cer). Jednotlivé sulfoglygospfingolipidy se lišily jednak v sacharidové části, ale hlavně také ve složení mastných kyselin, z kterých se skládá ceramidová část. Stručné schéma MS/MS štěpení studovaných látek je naznačeno v **obrázku 1**, který shrnuje pozorované neutrální ztráty, které sloužily pro identifikaci jednotlivých sfingoidních bází a N-acylů v ceramidu.

Mezi hlavní problémy při kvantitativních studiích pomocí MALDI-MS patří heterogenita společné krystalizace (kokrystalizace) analytu s matricí a potlačení iontového

výtěžku při ionizaci. Sloučeniny, které jsou společně se studovanými látkami přítomny ve vzorku, během těchto procesů soutěží s analytem. Proto může mít analyt o stejné koncentraci různý absolutní signál v případě studie extraktů plasmy a tkání odlišných pacientů s ohledem na jejich chemickou a biologickou variabilitu (např. obézní pacienti mají obvykle vyšší koncentraci acylglycerolů). Pokud sloučeniny, které nás zajímají, patří do stejné lipidické podtřídy (např. sulfatidy, sfingomyeliny, apod.) a tím pádem se projevují podobnými fyzikálními i chemickými vlastnostmi (např. podobné chování při extrakci, podobná kokrytalizace s matricí, rozpustnost, ionizace apod.), tak mohou být jejich intenzity v rámci studovaných vzorků relativně porovnávány nebo vztahovány na stejný IS.

Validovaná MALDI-Orbitrap-MS metoda byla použita pro měření série vzorků nádorových a okolních nenapadených ledvinových tkání získaných od 80 pacientů. Soubor získaných dat, který zahrnoval intenzity všech studovaných sulfatidů pro každý proměřený vzorek tkáně, byl následně statisticky zpracován. V první řadě byla použita nesupervizovaná metoda - analýza hlavních komponent (principal component analysis, PCA) a následně supervizovaná metoda - ortogonální diskriminační analýza nejmenších čtverců (orthogonal partial least squares-discriminant analysis, OPLS-DA). Z rozptylového grafu komponentních skóre pro PCA byly patrné dvě skupiny s malým překryvem shluků nádorových a okolních nenapadených tkání na jejich hranici [13]. Aplikace OPLS-DA se dvěma předdefinovanými skupinami (normální versus tumorové) vyústila v jasnou separaci obou shluků a s využitím S-plotu byly stanoveny jednotlivé sulfatidy, jejichž zastoupení je v nádorech zvýšeno (SulfoHex<sub>2</sub>Cer 44:2, SulfoHex<sub>2</sub>Cer 43:2, SulfoHex<sub>2</sub>Cer 43:1, SulfoHex<sub>2</sub>Cer 42:0 (OH), SulfoHex<sub>2</sub>Cer 44:1, SulfoHex<sub>2</sub>Cer 41:2, SulfoHex<sub>2</sub>Cer 40:0 (OH), SulfoHex<sub>2</sub>Cer 34:2 (OH), and SulfoHex<sub>2</sub>Cer 42:3 (OH)) nebo naopak sníženo SulfoHexCer 41:1 (OH), SulfoHexCer 42:0 (2\*OH), SulfoHexCer, 41:0 (OH), SulfoHexCer 42:1 (2\*OH), SulfoHexCer 40:0 (OH), SulfoHexCer 40:1 (OH), SulfoHexCer 41:0 (2\*OH), and SulfoHexCer 43:1 (OH)). Obecně lze konstatovat, že v nádorových tkáních roste koncentrace sulfoglykosfingolipidů se dvěma hexosylovými jednotkami (SulfoHex<sub>2</sub>Cer a SulfoHex<sub>2</sub>Cer (OH)) a oproti tomu klesá zastoupení hydroxylovaných sulfatidů obsahujících pouze jednu hexosylovou jednotku (SulfoHexCer (OH)). Tyto trendy jsou znázorněny pomocí krabicových grafů na **obrázku 2**.



**Obrázek 2:** Krabicové grafy reprezentující sumu intenzit jednotlivých sulfatidů vztažených na intenzitu IS nebo jejich relativní poměry pro studované tumorové a okolní nenapadené tkáně 80 pacientů. Číslo v závorce představuje počet vzorku příslušných RCC subtypů a normální tkáně.

#### 4. Závěr

V této práci byla optimalizována a validována MALDI-Orbitrap-MS metoda pro analýzu sulfoglykosfingolipidů ve vzorcích plasmy a ledvinových tkání. V porovnávací studii 80 nádorových a 78 nenapadených vzorků tkáně získaných od 80 pacientů byly nalezeny výrazné rozdíly v zastoupení jednotlivých sulfatidů. Tyto sloučeniny s záporným extracelulárním nábojem jsou zodpovědné za regulaci močového pH, vylučování amonia a hrají významnou roli při regulaci acidobazické homeostáze [3]. Na druhou stranu metabolismus RCC je úzce spojován s využíváním glutamínu pro zdroj energie, což má za následek zvýšenou expresi amonných iontů. Na základě těchto skutečností je možné, že dysregulace sulfatidů ve studovaných vzorcích může být zapříčena právě RCC metabolismem.

#### Poděkování

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

## Literatura

- [1] Ishizuka, I.: Prog. Lipid Res. **36** (1997) 245-319.
- [2] Takahashi, T., Suzuki, T.: J. Lipid Res. **53** (2012) 1437-1450.
- [3] Stettner, P., Bourgeois, S., Marsching, C., Traykova-Brauch, M., Porubsky, S., Nordstrom, V., Hopf C., Koesters R., Sandhoff R., Wiegandt H., Wagner C.A., Gröne H.J., Jennemann R.:  
P. Natl. Acad. Sci. USA **110** (2013) 9998-10003..
- [4] Spáčil, Z., Kumar, A.B., Liao, H.C., Auray-Blais, C., Stark, S., Suhr, T.R., Scott C.R., Turecek F., Gelb M.H.: Clin. Chem. **62** (2016) 279-286.
- [5] Han, X.L.: Bba-Mol. Cell Biol. L. **1801** (2010) 774-783.
- [6] Liu, Y.: Mol. Cancer. **9** (2010) 186.
- [7] Honke, K., Tsuda, M., Hirahara, Y., Miyao, N., Tsukamoto, T., Satoh, M., Wada Y.:  
Cancer Res. **58** (1998) 3800-3805.
- [8] Jirásko, R., Holčapek, M., Kuneš, M., Svatoš, A.: Anal. Bioanal. Chem. **406** (2014) 4601-4610.
- [9] Han, M., Jun, S.H., Song, S.H., Park, H.D., Park, K.U., Song, J.: Rapid Commun. Mass Sp. **28** (2014) 587-594.
- [10] Cheng, H., Sun, G., Yang, K., Gross, R.W., Han, X.L.: J. Lipid Res. **51** (2010) 1599-1609.
- [11] Vermillion-Salsbury, R.L., Hercules, D.M.: Rapid Commun. Mass Sp. **16** (2002) 1575-1581.
- [12] Guideline on bioanalytical method validation. European Medicines Agency,  
[http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Scientific\\_guideline/2011/08/WC500109686.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/08/WC500109686.pdf).
- [13] Jirásko, R., Holčapek, M., Khalikova, M., Vrána, D., Študent, V., Prouzová, Z., Melichar, B.: J. Am. Soc. Mass Spectr. **28** (2017) 1562-1574.