



Magyarország-Szerbia  
IPA Határon Átnyúló Együttműködési Program

A projekt az Európai Unió  
társfinanszírozásával valósul meg



# Hidrofil kölcsönhatási folyadékkromatográfia (HILIC) lipidomikai alkalmazása

Dr. Berkecz Róbert<sup>1</sup>, Kovács Nóra<sup>1</sup>, Prof. Thurzó László<sup>2</sup>, Dr. Aljoša Mandić<sup>3</sup>, Dr. Szegedi Viktor<sup>4</sup> és Prof. Janáky Tamás<sup>1</sup>

<sup>1)</sup> Orvosi Vegytani Intézet, SZTE, 6720, Szeged, Dóm tér 8

<sup>2)</sup> Onkoterápiás Klinika, SZTE, 6720, Szeged, Korányi Fásor 12

<sup>3)</sup> Vajdasági Onkológiai Intézet, UNS, 21000, Újvidék, Szerbia, Hejduk Veljkova 3

<sup>4)</sup> Szegedi Biológiai Kutatóközpont, 6726, Szeged, Temesvári körút 62

## Bevezetés

A HILIC elválasztási módszer elterjedése a proteomika és a metabolomika mellett a lipidomika területénél is megfigyelhető. A glicerofoszfolipidek (FL) fő sejtmembrán alkotók és jelvivő molekulák, az összetételükben bekövetkező változások kapcsolatba hozhatók számos idegrendszeri illetve rosszindulatú daganatos megbetegedésekkel, úgy mint Alzheimer-, Parkinson-kór, tüdőrák és méhnyak rák. A következőkben a HILIC kromatográfia két módszerét szeretnénk bemutatni agyi illetve plazma FL-ek minőségi és mennyiségi meghatározására, eltérő állófázisok és kromatográfiai körülmények alkalmazásával.

## Idegrendszeri kutatás célja

Szorongós reakciókban számos agyi régió rész vesz, úgy mint az amygdala, a hippocampus, a cinguláris kéreg, a hypothalamus és különböző agytörzs területek. Molekuláris szinten megváltozott géneexpressziót mutattak ki az agy különböző részein szorongós állatmodelleknél. Korábbi kutatások skizofréniában az agyi foszfatidil-szerin (PS) és a foszfatidil-kolin (PC) FL osztályoknál bekövetkező mennyiségi megváltozásra hívták fel a figyelmet.

A munkánk célja volt 5 szorongó (AX) és 5 bátor (MX) egér prefrontális kérgének (PFC), dorzális (DHC) és ventrális hippocampusának (VHC) FL összetételének összehasonlítása.

## Eredmények

### Egér agy minták gyűjtése

Teljes egér agy kivétel után a PFC, DHC és VHC agyterületek kimetszése történt.

### Agy homogenizálás

30 szoros mennyiségű 10 mM ammónium-acetátban történt (pH: 5,6) ultrahangos homogenizátorral (18A; 30 s-ként 10 s kezelés; 15 ciklus).

### Módosított Folch extrakció

300 µL agy-homogenizátum + 10 µL belső standard (2,95 pmol/µL PC(14:0/14:0), 4,41 pmol/µL LPC(13:0), 3,15 pmol/µL PE(14:0, 14:0), 4,7 pmol/µL LPE(14:0), 2,90 pmol/µL PG(14:0/14:0), 4,18 pmol/µL PG(14:0), 2,85 pmol/µL PS(14:0/14:0), 3,25 pmol/µL PA(14:0, 14:0), ) extrakciója két lépésben történt butil-hidroxi-toluol antioxidáns jelenlétében (0,02 mg/mL). Az extrakciót követően a bepárlást N<sub>2</sub> gázzal végeztük, majd a visszaoldást 500 µL 50/49/1 v/v/v % CHCl<sub>3</sub>/IPA/H<sub>2</sub>O-ban.

### HILIC

FL osztályok HILIC elválasztása Agilent 1100 készülékkel történt **MERCK ZIC-HILIC 3×150 mm ikerionos** oszlopon; 5 µm részecskeméret; 200 Å pórusméret. A eluens: 97/3 H<sub>2</sub>O/Aceton 5 mM ammónium-acetát (pH: 5,6); B eluens: 3/97 H<sub>2</sub>O/Aceton 5 mM ammónium-acetát. Gradiens elúció: 98% B 0-5 perc; 98-88% B 5-75 perc; 98% B 76-90 perc. Oszlop hőmérséklet 40 °C; áramlási sebesség 200 µL/perc; 5 µL injektált térfogat

## Petefészek rák biomarker kutatás célja

R rosszindulatú molekuláris változások, mint például metasztázis-szuppresszor géneexpresszió, onkogén expresszió és malignus transzformáció kapcsolatba hozható a foszfatidil-kolin (PC) anyagcseréjében bekövetkező változásával.

A kutatás célja volt a petefészek rosszindulatú elváltozását jelző plazma foszfolipid biomarker azonosítása, amelynek során összesen 130 egészséges, jóindulatú és I, II, III és IV FIGO stádiumú beteg plazma mintájának FL profiljának összehasonlítása történt.

## Eredmények

### Vérvétel és a plazma gyűjtése

Vénás vér gyűjtése Vacutainer 6 mL EDTA K2 plazma csöbe. Centrifugálás 10 °C-on 900 g-vel 10 percig.

### Módosított Folch extrakció

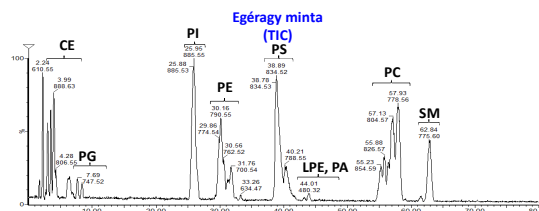
100 µL plazma + 20 µL belső standard (125 pmol/µL PC(14:0/14:0), 125 pmol/µL LPC(17:0), 50 pmol/µL PE(17:0, 17:0), 10 pmol/µL LPE(14:0), 5 pmol/µL PG(17:0/17:0), 5 pmol/µL PG(14:0), 50 pmol/µL PS(17:0/17:0), 50 pmol/µL PA(17:0/17:0), 50 pmol/µL LPA(17:0), 125 pmol/µL SM(18:1/12:0), 2 pmol/µL CE(18:1/12:0) extrakciója két lépésben történt butil-hidroxi-toluol antioxidáns jelenlétében (0,02 mg/mL). Az extrakciót követően a bepárlást N<sub>2</sub> gázzal végeztük, majd a visszaoldást 500 µL 80/20 v/v % CHCl<sub>3</sub>/MeOH-ban.

### HILIC

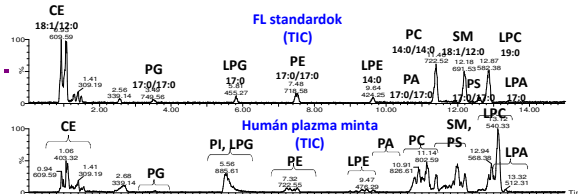
FL osztályok HILIC elválasztása Agilent 1100 HPLC készülékkel történt **Phenomenex Kinetex HILIC 2.1×150 mm** oszlopon; 2,6 µm részecskeméret; 100 Å pórusméret. A eluens: 50 mM ammónium-formiát (pH: 4,8); B eluens: acetone. Gradiens elúció: 94 – 70% B 0-15 perc; 70-94% B 15-16 perc; 94% B 16-30 perc. Oszlop hőmérséklet 50 °C; áramlási sebesség 400 µL/perc; 20 µL injektált térfogat.

### ESI-MS<sup>E</sup>

Waters Q-TOF Premier tömegspektrométer beállítása negatív módban: bemeneti kapilláris feszültség 3,0 kV; kúp feszültség: 26 V; tömegtartomány: 50–990 m/z; pásztázási sebesség: 1 s; porlasztó N<sub>2</sub> gáz hőmérséklete és áramlási sebessége: 250 °C, 500 liter/óra; forrás hőmérséklete: 95 °C, Ar ütközési gáz; ütközési energia MS és MS/MS esetében: 5 eV és 45 eV; tömegspektrometriai szoftver: MasslynxTM V4.1 SCN707.

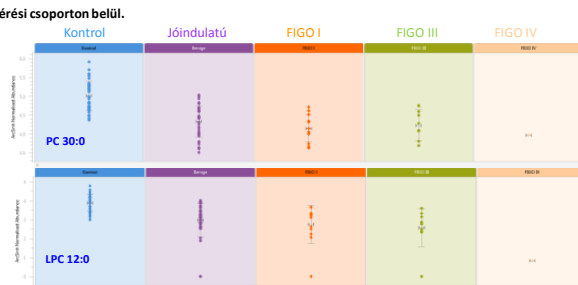
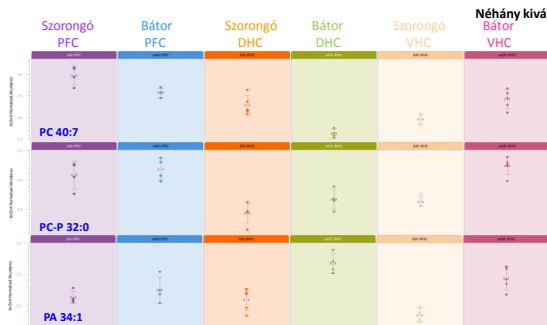


Egér agy és humán plazma minták kromatogramjai



### Adatkiértékelés

Mennyiségi és minőségi kiértékelés egységesen a Waters TransOmics (Progenesis QI, Nonlinear Dynamics) lipidomikai és metabolomikai szoftverével történt.



## Összefoglalás

HILIC kromatográfia alkalmazásával a foszfolipid osztályok igen jó elválasztását érték el egér agy illetve humán plazma minták vizsgálatok eltérő állófázisok használatával.

A szorongó és a bátor egerek agyi foszfolipid összetételében szignifikáns különbség volt megfigyelhető a különböző agyterületek összehasonlításakor. Jelentős eltéréseket a hippocampusban tapasztaltunk.

A humán plazma minták FL analízise során a foszfatidil-kolin, foszfatidil-etanolamin és szingomilein osztályokhoz tartozó speciek esetén találtunk különbséget a kontrol és a beteg csoportok összehasonlításakor.

## Köszönetnyilvánítás és támogatók

A Magyar Elválasztástudományi Társaságnak az Elválasztástudományi Vándorgyűlés 2014 konferencián való ingyenes részvételért.

A biomarker kutatás (Cross-border biomarker research of ovarian cancer, HUSRB/1203/214/091) az Európai Unió pénzügyi támogatásával valósult meg. A poszter tartalmáért teljes mértékben a Szegedi Tudomány, Orvosi Vegytani Intézet vállalja a felelősséget, és az semmilyen körülmények között nem tekinthető az Európai Unió és / vagy az Irányító Hatóság állásfoglalását tükröző tartalomnak.

Az idegrendszeri kutatás illetve a poszter a Bolyai János Kutatási Ösztöndíj támogatásával készült.