

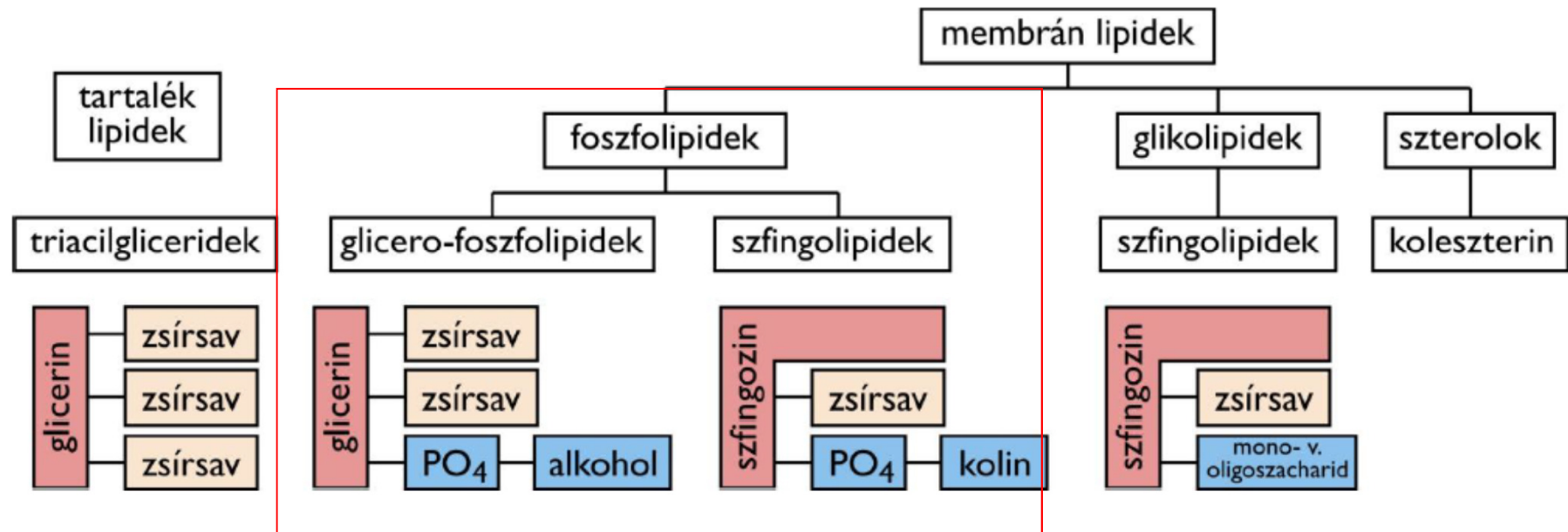


Foszfolipidek mint biomarkerek

Berkecz Róbert, Kovács Nóra és Janáky Tamás

Szegedi Tudományegyetem, Orvosi Vegytani Intézet,

Lipidek csoportosítása



Nyitrai László, Pál
Gábor, 2013

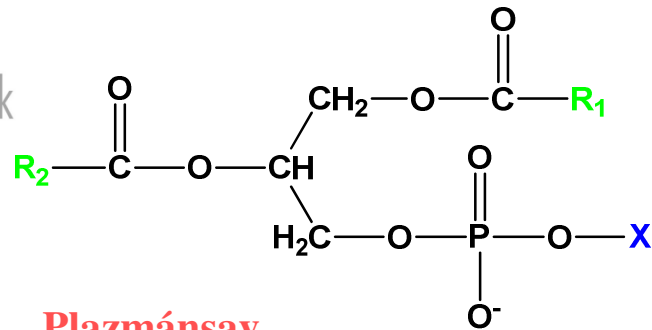
Lipidek csoportosítása

LIPID MAPS Structure Database (<http://www.lipidmaps.org/>)

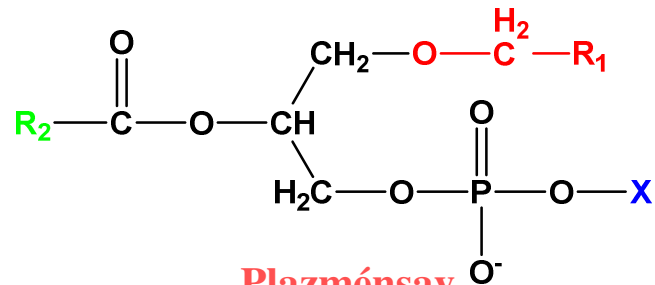
Zsírsavak	6954
Glicerolipidek	7542
Glicero-foszfolipidek	9387
Szifingolipidek	4352
Szterolok	2833
Prenolok	1257
Glikoipidek	1293
Poliketidek	6742
Összesen	40,360

Foszfolipidek (PL)

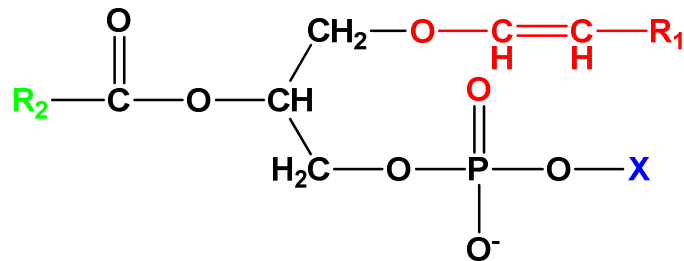
X



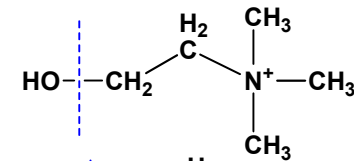
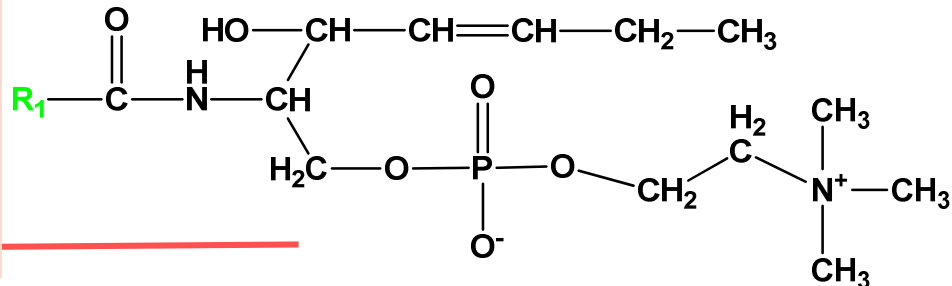
Plazmánsav



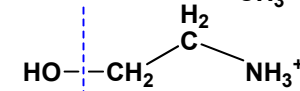
Plazménsav



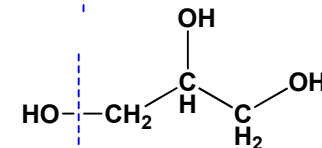
Szfingomielin
(SM)



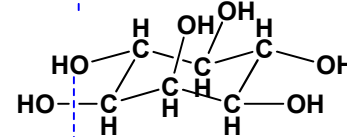
foszfatidil-kolin
(PC)



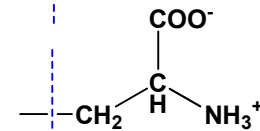
foszfatidil-etanolamin
(PE)



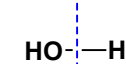
foszfatidil-glicerol
(PG)



foszfatidil-inozitol
(PI)



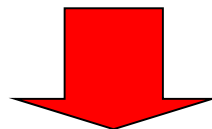
foszfatidil-szerin
(PS)



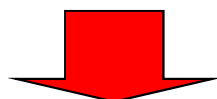
foszfatidsav
(PA)

Foszfolipidek (FL) analízise

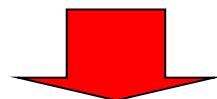
Biológiai minták



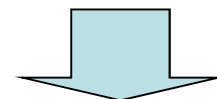
Extrakció
(Folch, Bligh and Dyer, MTBE)



**2D-LC-ESI-
MS/MS analízis**

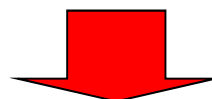


**1D-LC-ESI-
MS/MS analízis**



**ESI-MS/MS
analízis**

(NP-LC, RP-LC és HILIC-LC)



Adatfeldolgozás

Előnyök:

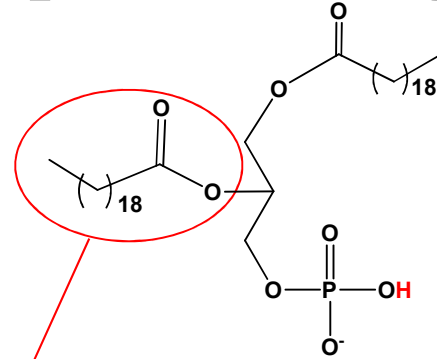
- gyors analízis
- nagy szabadság az oldószer választásban

Hátrányok:

- jelentős ionelnyomó hatás
- kevés szerkezeti információ (inter-intra-class izobárok)

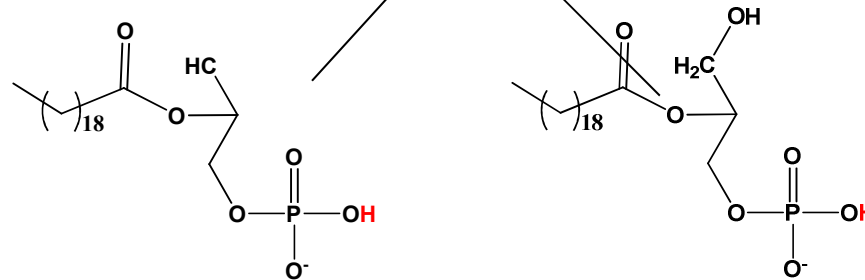
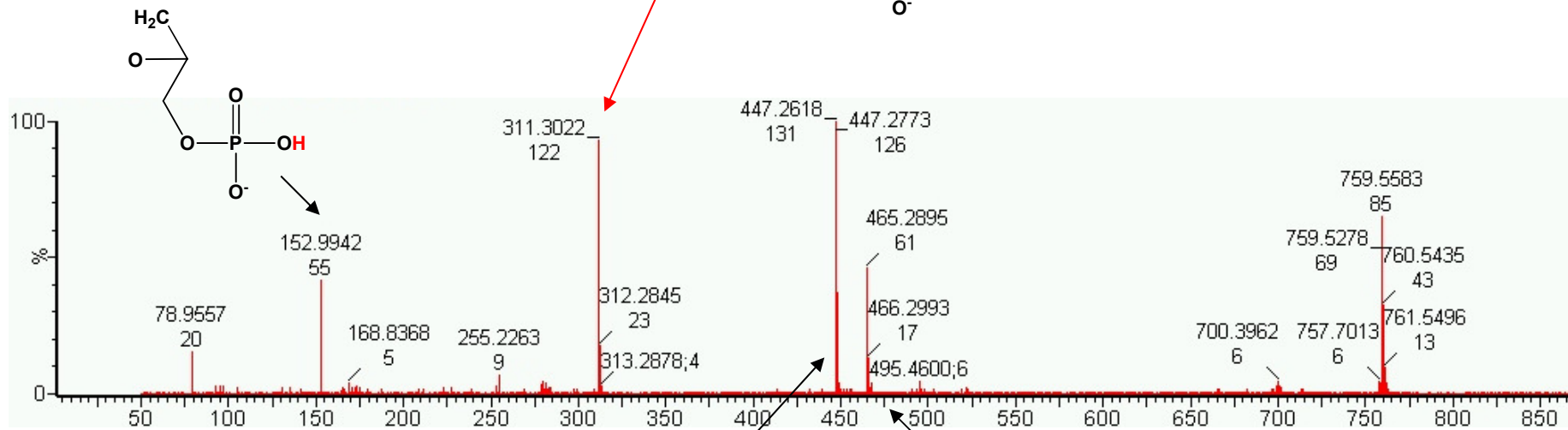
Foszfolipidek MS azonosítása

MS/MS spektrum, negatív mód



L-FOSZFATIDSÁV

PA 40:0

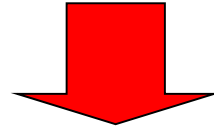


Direkt infúziós analízis

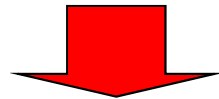
FOSZFOLIPID OSZTÁLYOK	VIZSGÁLT ION	MS/MS szken	FRAGMENS TÖMEGE m/z
PA	$[M-H]^-$	Anyaiion	153
	$[M+NH_4]^+$	Semleges vesztes	115
PG	$[M-H]^-$	Anyaiion	153
	$[M-H]^-$	Anyaiion	227
PI	$[M-H]^-$	Anyaiion	241
	$[M+NH_4]^+$	Semleges vesztes	277
PS	$[M-H]^-$	Anyaiion	153
	$[M+H]^+$	Semleges vesztes	87/185
PE	$[M+H]^+$	Semleges vesztes	141
	$[M-H]^-$	Anyaiion	196
PC	$[M+H]^+$	Anyaiion	184
	$[M+H]^+$	Semleges vesztes	189/59
	$[M+AcO]^-$	Semleges vesztes	60
SM	$[M+H]^+$	Anyaiion	184
	$[M-H]^-$	Anyaiion	168

Foszfolipidek (FL) analízise

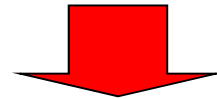
Biológiai minták



Extrakció
(Folch, Bligh and Dyer, MTBE)

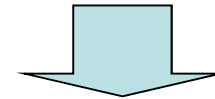


**2D-LC-ESI-
MS/MS analízis**

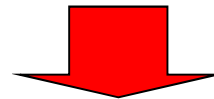


**1D-LC-ESI-
MS/MS analízis**

(NP-LC, RP-LC és HILIC-LC)



**ESI-MS/MS
analízis**



Adatfeldolgozás

Előnyök:

- alacsonyabb LOD és LOQ
- minor komponensek mennyiségi analízise
- pontosabb azonosítás

Hátrányok:

- időigényes
- oldószer választás korlátozott



Biomarker

A biomarkerek biológiai paraméterek, amelyek normális és kóros folyamatokat, beavatkozásokra adott válaszokat jeleznek, objektív értékkel kifejezhetőek.



Szorongásos megbetegedés biomarker kutatása

LC-ESI-MS/MS analízis

Szorongásos reakciókban számos agyi régió rész vesz, úgy mint az amygdala, a hippocampus, a cinguláris kéreg, a hipotalamusz és különböző agytörzs területek. Molekuláris szinten megváltozott génexpressziót mutattak ki az agy különböző részein szorongásos állatmodelleknél. *Korábbi kutatások skizofrénia esetében az agyi foszfatidil-szerin (PS) és a foszfatidil-kolin (PC) FL osztályoknál bekövetkező mennyiségi megváltozásra hívták fel a figyelmet.*

Cél

Szorongó (AX) és bátor (nAX) egér prefrontális kérgének (PFC), dorzális (DHC) és ventrális hippocampusának (VHC) FL összetételének összehasonlítása. FL biomarker azonosítás plazmából.

Kivitelezés

Agyterületek összehasonlítása majd plazma vizsgálat.

Analitika

1D- (HILIC) és 2D-LC-ESI-MS/MS mérés

Előzetes mérések

5 db AX és 5 db nAX egér vizsgálata



Szorongásos megbetegedés biomarker kutatása

LC-ESI-MS/MS analízis

Egér agy minták gyűjtése

Teljes egéragy kivétele után a PFC, DHC és VHC agyterületek kimetszése történt.

Agy homogenizálás

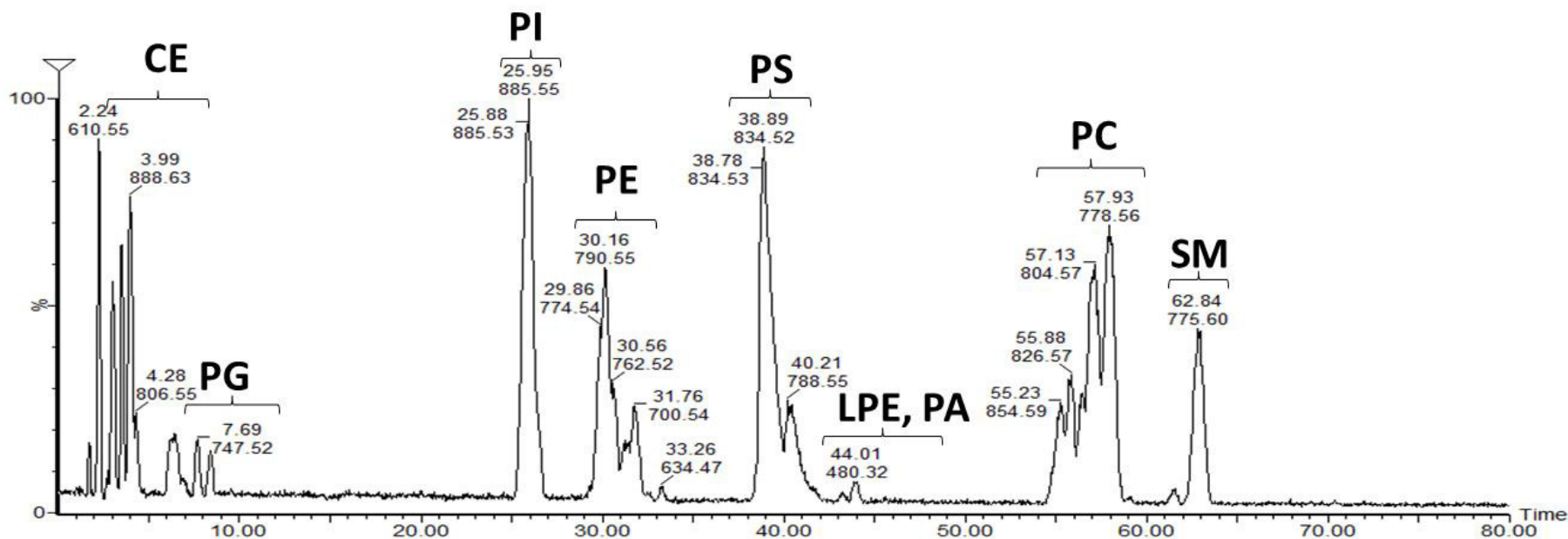
30 szoros mennyiségű 10 mM ammónium-acetátban történt (pH: 5,6) ultrahangos homogenizátorral (18A; 30 s-ként 10 s kezelés; 15 ciklus).

Módosított Folch extrakció

300 mL agy-homogenizátum + 10 mL 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-tolul antioxidáns jelenlétében (0,02 mg/mL). Az extrakciót követően a bepárlást N₂ gázzal végeztük, majd a visszaoldást 500 mL 50/49//1 v/v/v % CHCl₃/IPA/H₂O-ban.

Szorongásos megbetegedés biomarker kutatása

LC-ESI-MS/MS analízis



MERCK ZIC-HILIC 3×150 mm ikerionos oszlopon;
5 µm részecskeméret; 200 Å pórusméret.



Szorongásos megbetegedés biomarker kutatása

LC-ESI-MS/MS analízis

Adatkiértékelés

Szoftver

Progenesis Q1 lipidomics and metabolomics v2.0
(2015) (Nonlinear Dynamics, A Waters Company)

Lipid adatbázisok

Basic Lipid a kisenergiájú mérésekhez ($\pm 0,1$ Da)
Lipid Blast a nagy energiájú mérésekhez ($\pm 0,5$ Da)

Eredmények

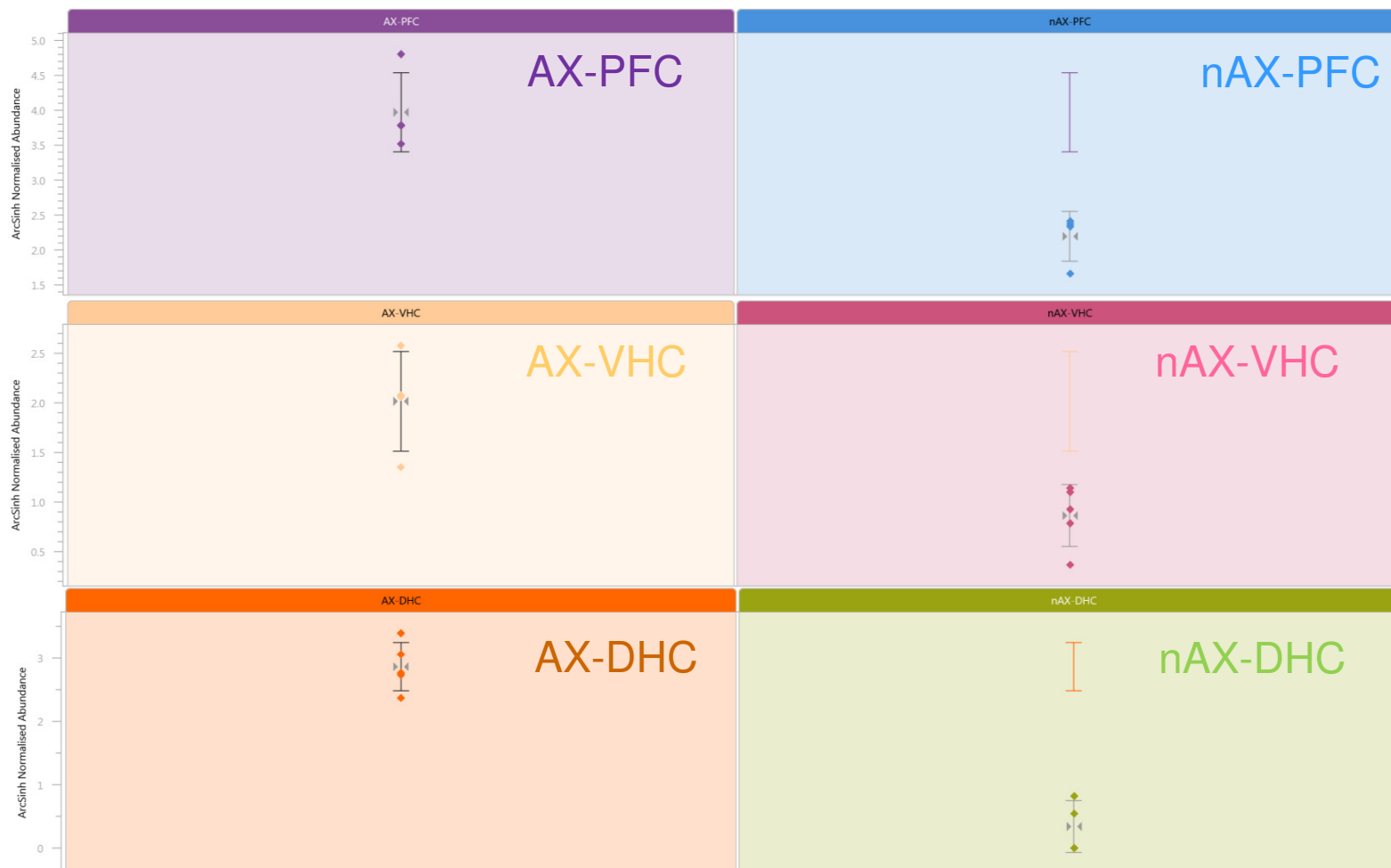
654 lipid

51 lipid esetben szignifikáns változás

- Mérési file-ból azonosítás és komplett statisztika.
- Retenciós idő korrigálás.
- Többféle normalizálási lehetőség.
- DDA mérésekhez kizárási lista készítése.
- Azonosítás pontostömeg és fragmentáció alapján.

Szorongásos megbetegedés biomarker kutatása

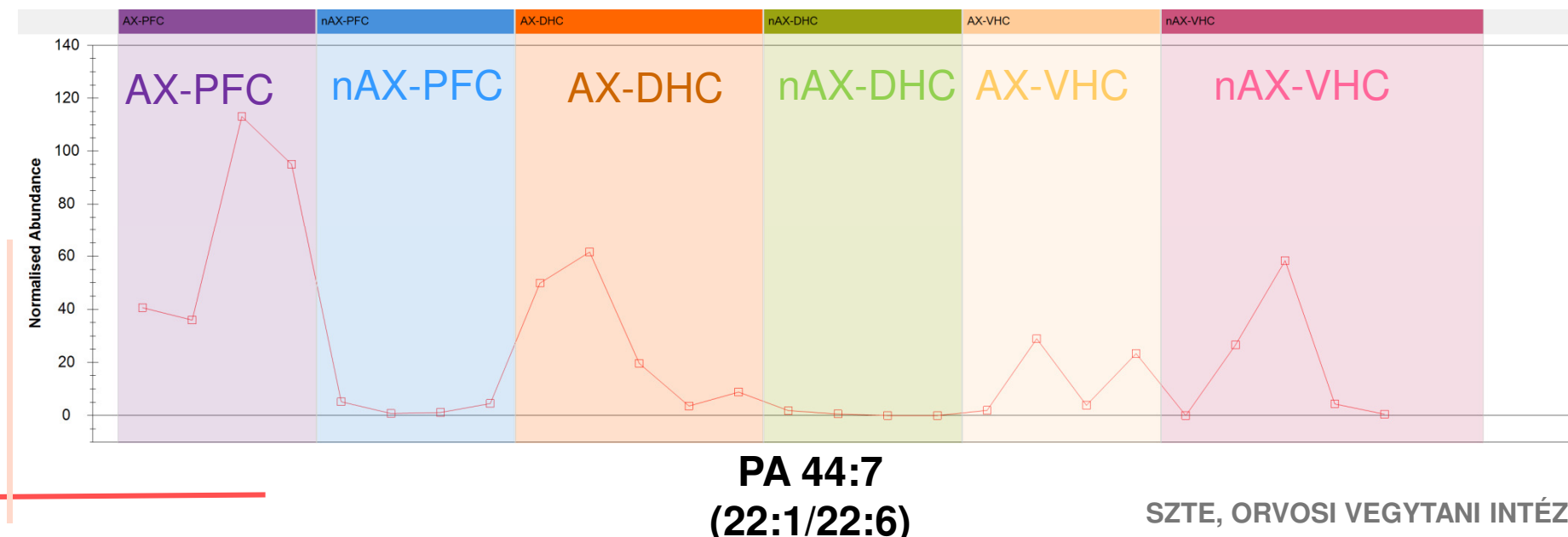
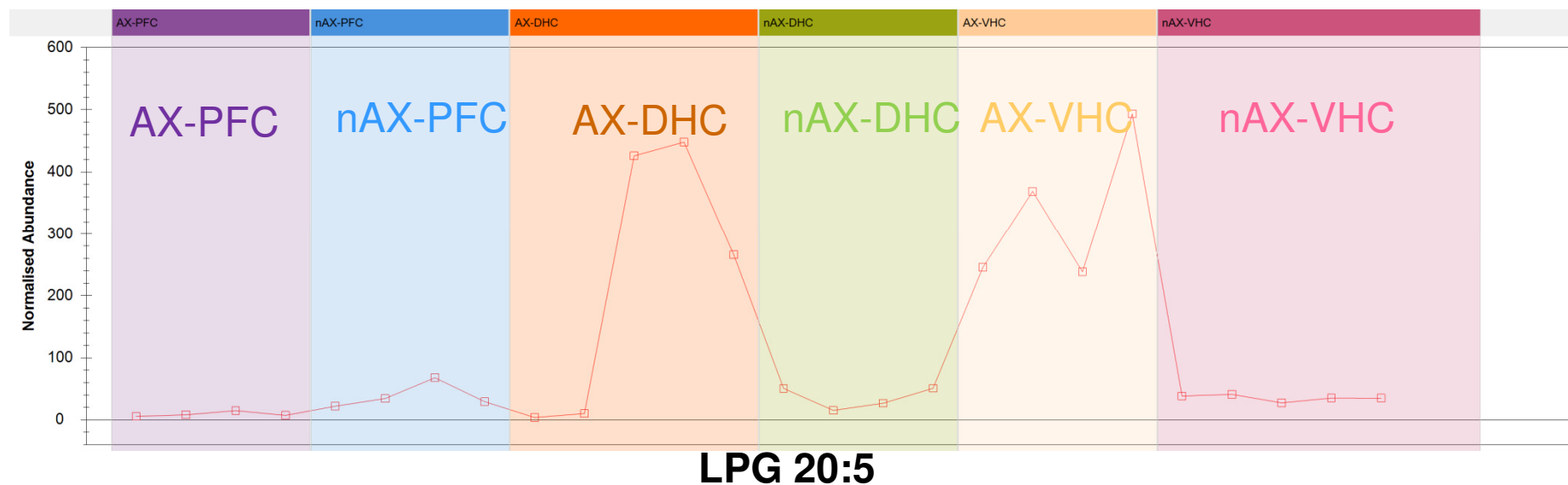
LC-ESI-MS/MS analízis



PC 42:7
(22:6, 20:1)

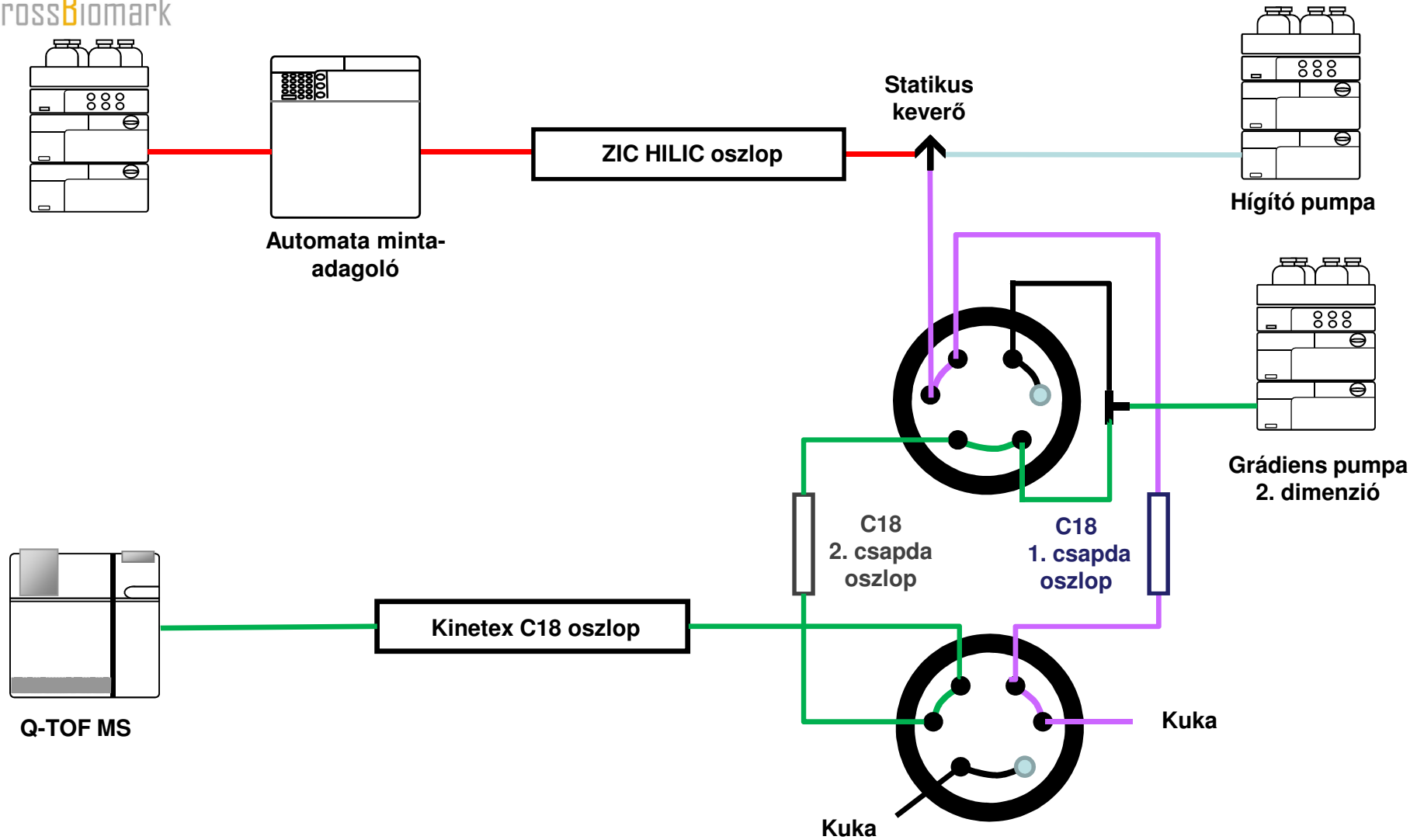
Szorongásos megbetegedés biomarker kutatása

LC-ESI-MS/MS analízis



Szorongásos megbetegedés biomarker kutatása

2D-LC-ESI-MS/MS analízis

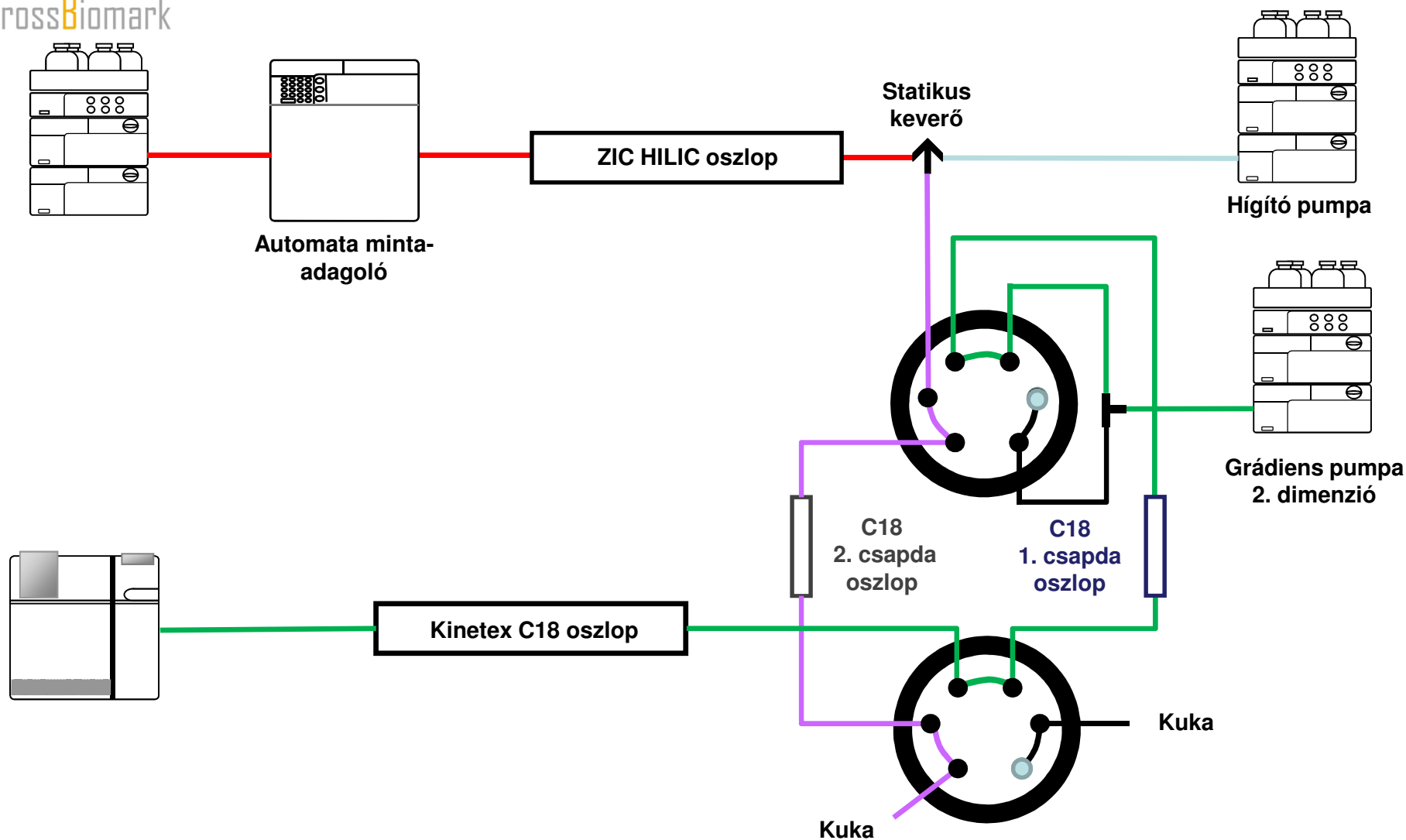


1. dimenzió: HILIC oszlop eluátumának hígítása, majd csapdázása a 1. csapda oszlopon.

2. dimenzió: 2. csapda és a C18 oszlop mosása.

Szorongásos megbetegedés biomarker kutatása

2D-LC-ESI-MS/MS analízis



1. dimenzió: HILIC oszlop **eluátumának hígítása**, majd **csapdázása** a 2. csapda oszlopon.

2. dimenzió: **1. csapda** és a C18 oszlopról **eluálás** majd MS detektálás.

Szorongásos megbetegedés biomarker kutatása

2D-LC-ESI-MS/MS analízis

tömegspektrométer



hígító pumpa

váltószelepek

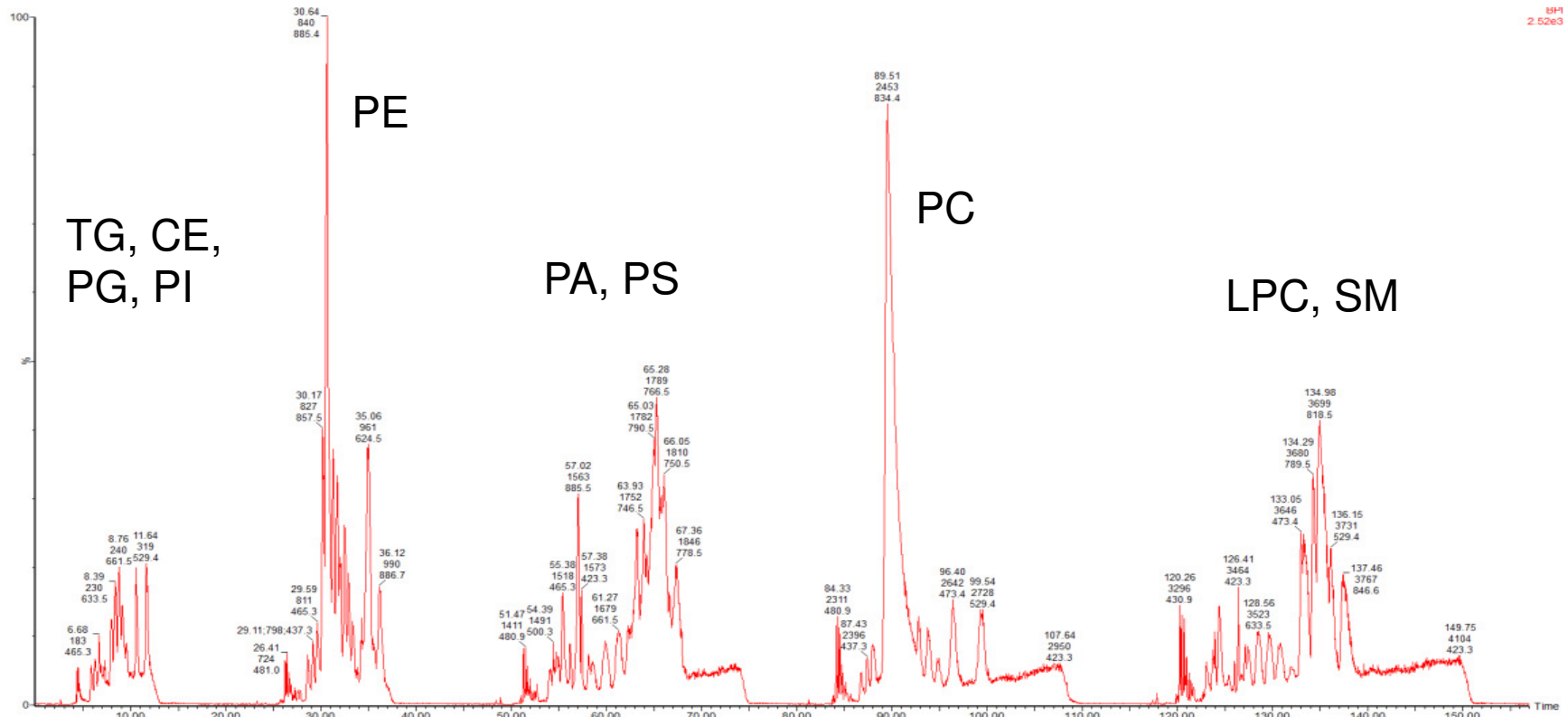
automata
mintaadagoló

2. pumpa

1. pumpa

2D-LC-ESI-MS/MS analízis

Szorongásos megbetegedés biomarker kutatása

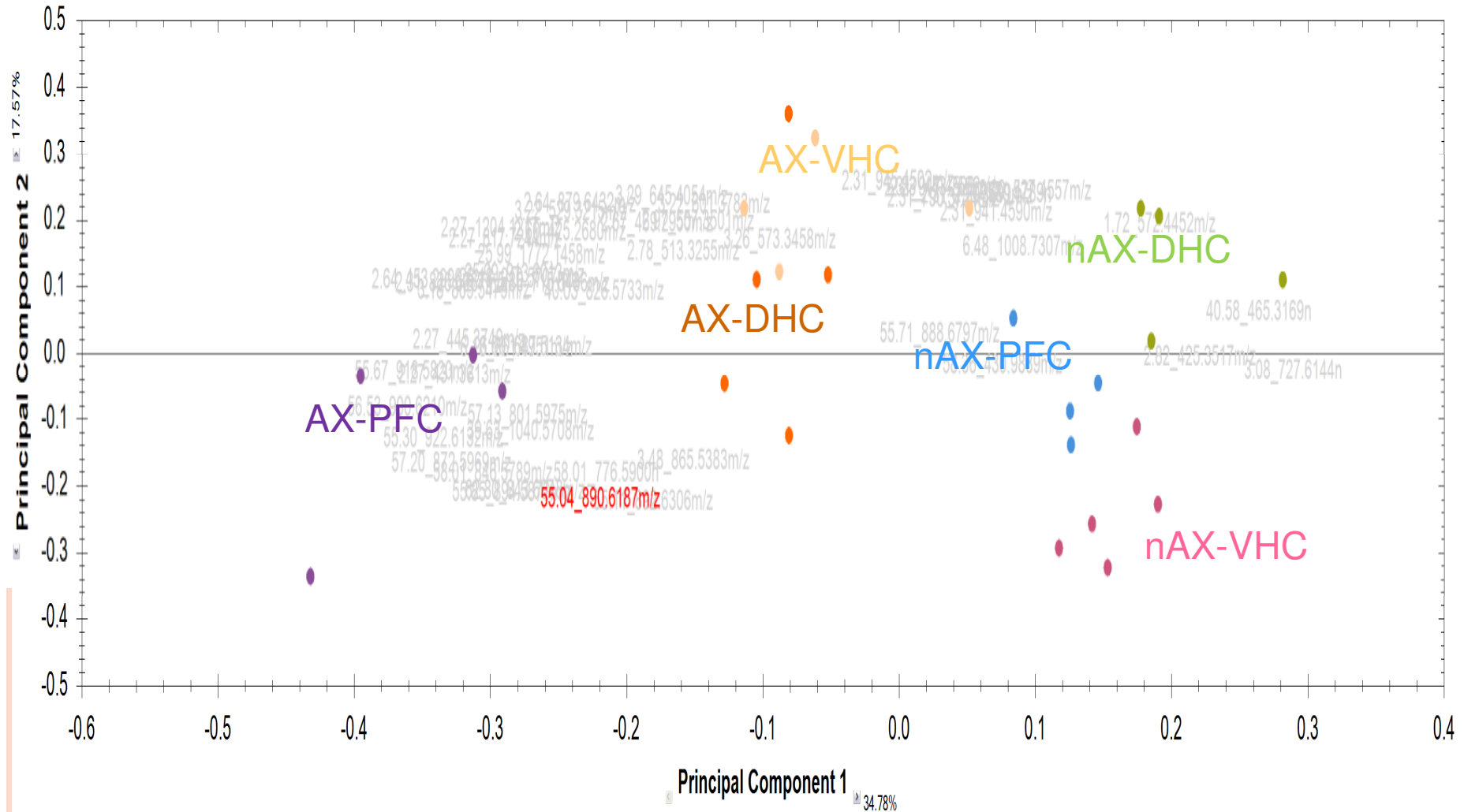


2D-LC-ESI-MS/MS analízis

Szorongásos megbetegedés biomarker kutatása

Főkomponens analízis

Principal Components Analysis





Köszönet nyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani a Magyar Tudományos Akadémiának a *Bolyai János Kutatási Ösztöndíj* támogatásáért.

További köszönettel tartozom Szegedi Viktornak a kísérleti állatokért és a biológiai kísérleti munkájáért.

A lipidomikai szoftver beszerzése a *Cross-border biomarker research of ovarian cancer, HUSRB/1203/214/091 projekt keretében az Európai Unió* pénzügyi támogatásával valósult meg.

.

KÖSZÖNÖM A FIGYELMÜKET!