

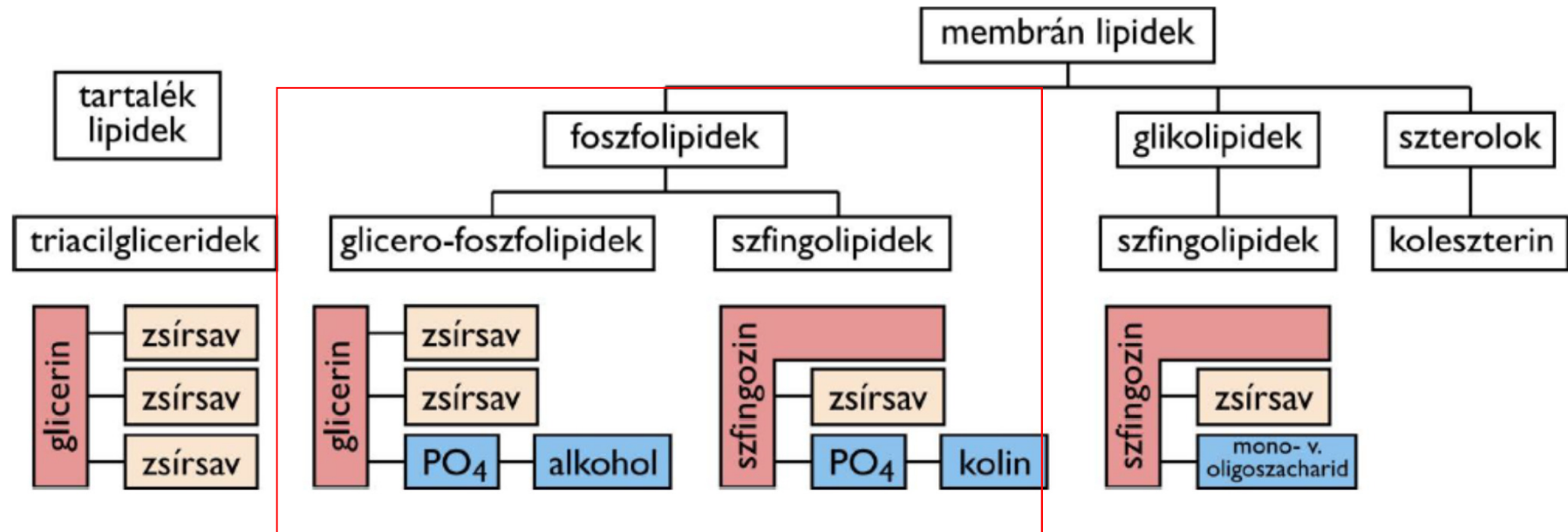


# Foszfolipidek mint biomarkerek

**Berkecz Róbert, Kovács Nóra és Janáky Tamás**

Szegedi Tudományegyetem, Orvosi Vegytani Intézet,

# Lipidek csoportosítása



Nyitrai László, Pál  
Gábor, 2013

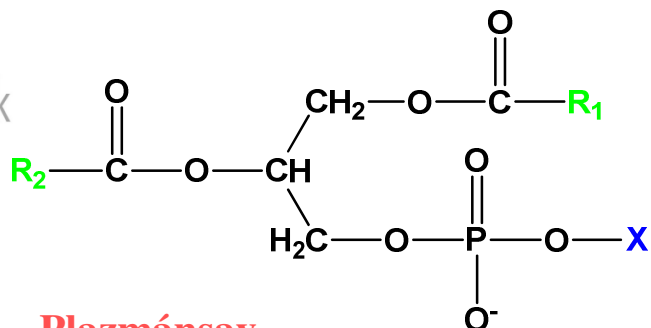
# Lipidek csoportosítása

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

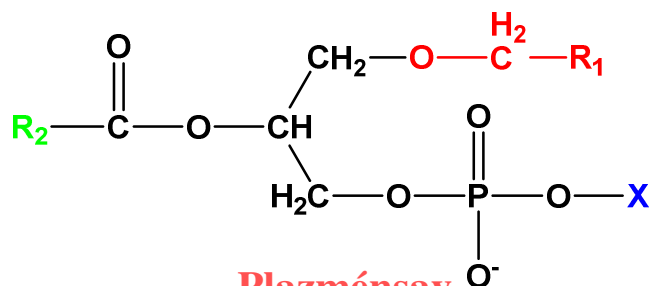
Zsírsavak	6954
Glicerolipidek	7542
Glicero-foszfolipidek	9387
Szifingolipidek	4352
Szterolok	2833
Prenolok	1257
Glikoipidek	1293
Poliketidek	6742
<b>Összesen</b>	<b>40,360</b>

# Foszfolipidek (PL)

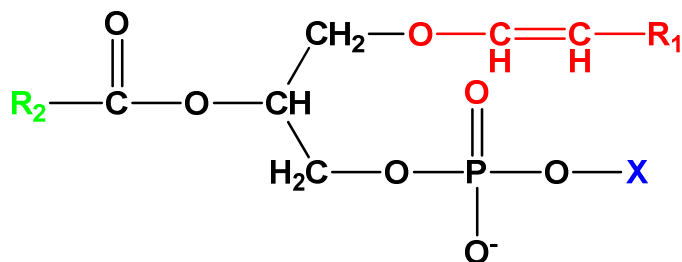
X



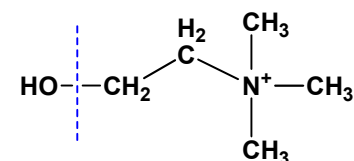
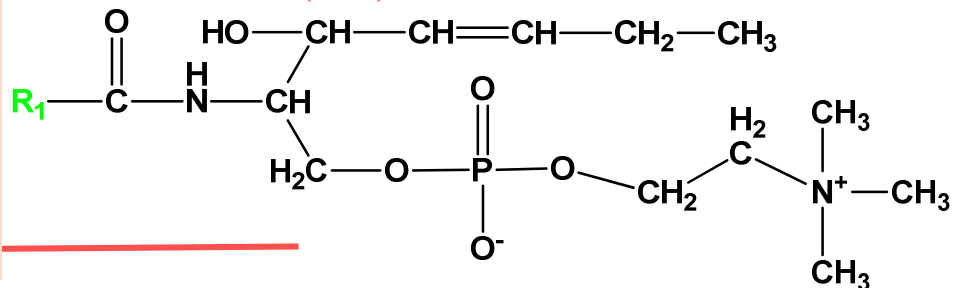
Plazmánsav



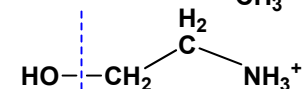
Plazménsav



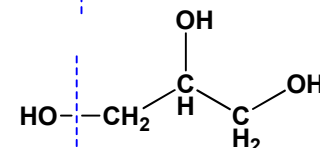
Szfingomielin (SM)



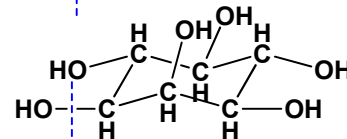
foszfatidil-kolin (PC)



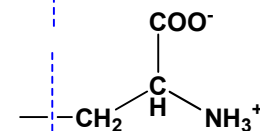
foszfatidil-etanolamin (PE)



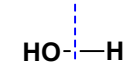
foszfatidil-glicerol (PG)



foszfatidil-inozitol (PI)



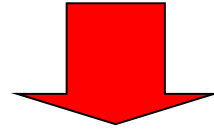
foszfatidil-szerin (PS)



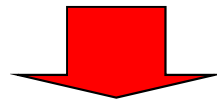
foszfatidsav (PA)

# Foszfolipidek (FL) analízise

**Biológiai minták**

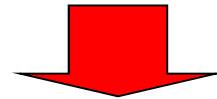


**Extrakció**  
(Folch, Bligh and Dyer, MTBE)

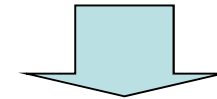


**2D-LC-ESI-MS/MS analízis**

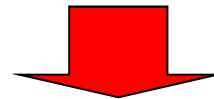
*(NP-LC, RP-LC és HILIC-LC)*



**1D-LC-ESI-MS/MS analízis**



**ESI-MS/MS analízis**



**Adatfeldolgozás**

**Előnyök:**

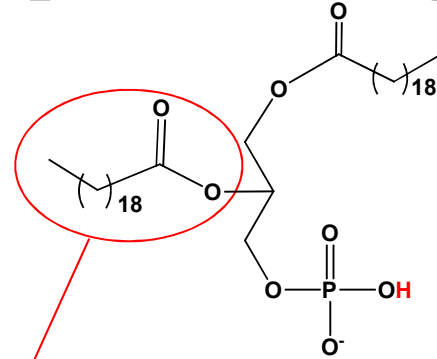
- gyors analízis
- nagy szabadság az oldószer választásban

**Hátrányok:**

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

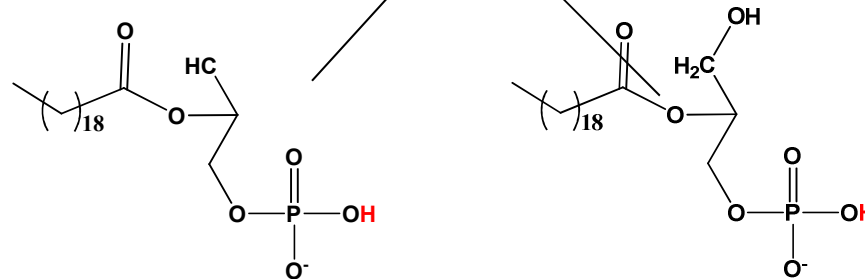
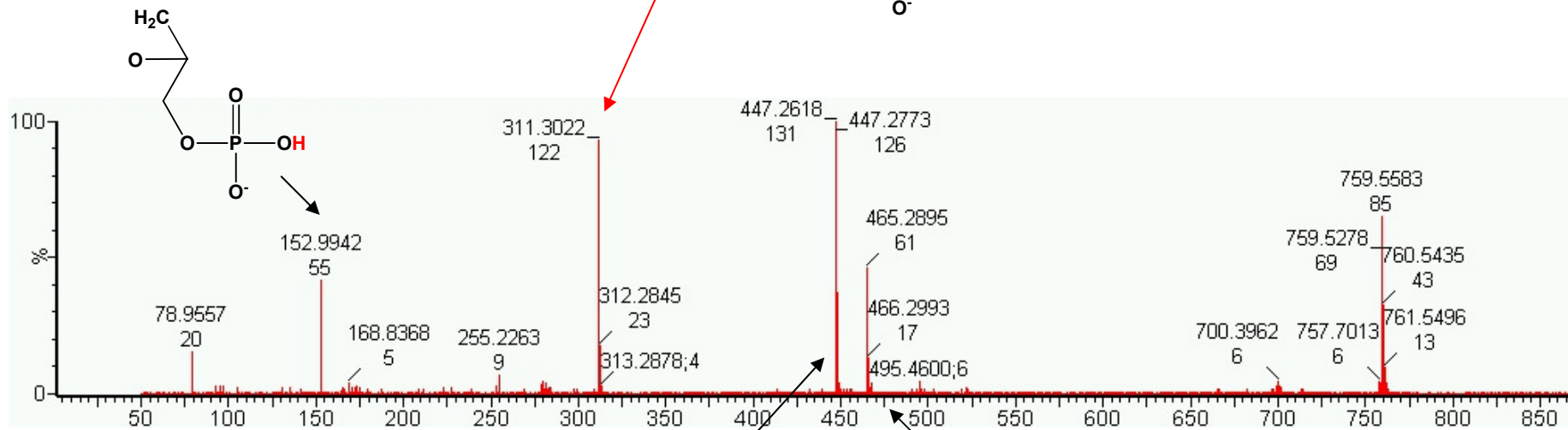
# Foszfolipidek MS azonosítása

## MS/MS spektrum, negatív mód



L-FOSZFATIDSÁV

PA 40:0

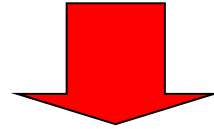


# Direkt infúziós analízis

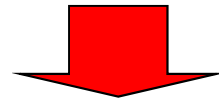
FOSZFOLIPID OSZTÁLYOK	VIZSGÁLT ION	MS/MS szken	FRAGMENS TÖMEGE m/z
PA	$[M-H]^-$	Anyaiion	153
	$[M+NH_4]^+$	Semleges vesztes	115
PG	$[M-H]^-$	Anyaiion	153
	$[M-H]^-$	Anyaiion	227
PI	$[M-H]^-$	Anyaiion	241
	$[M+NH_4]^+$	Semleges vesztes	277
PS	$[M-H]^-$	Anyaiion	153
	$[M+H]^+$	Semleges vesztes	87/185
PE	$[M+H]^+$	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

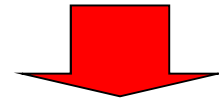
**Biológiai minták**



**Extrakció**  
(Folch, Bligh and Dyer, MTBE)

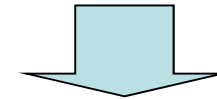


**2D-LC-ESI-  
MS/MS analízis**

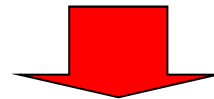


**1D-LC-ESI-  
MS/MS analízis**

*(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**

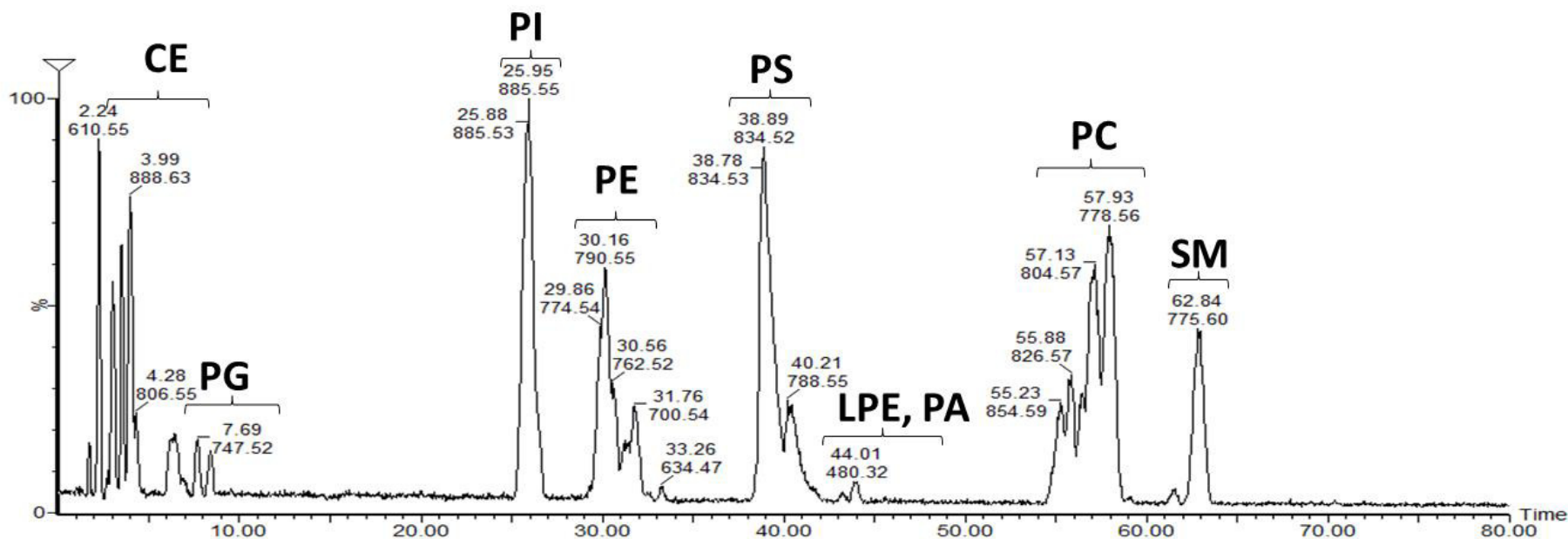
30 szoros mennyiségű 10 mM ammónium-acetátban történt (pH: 5,6) ultrahangos homogenizátorral (18A; 30 s-ként 10 s kezelés; 15 ciklus).

### **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 N<sub>2</sub> gázzal végeztük, majd a visszaoldást 500 mL 50/49//1 v/v/v % CHCl<sub>3</sub>/IPA/H<sub>2</sub>O-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

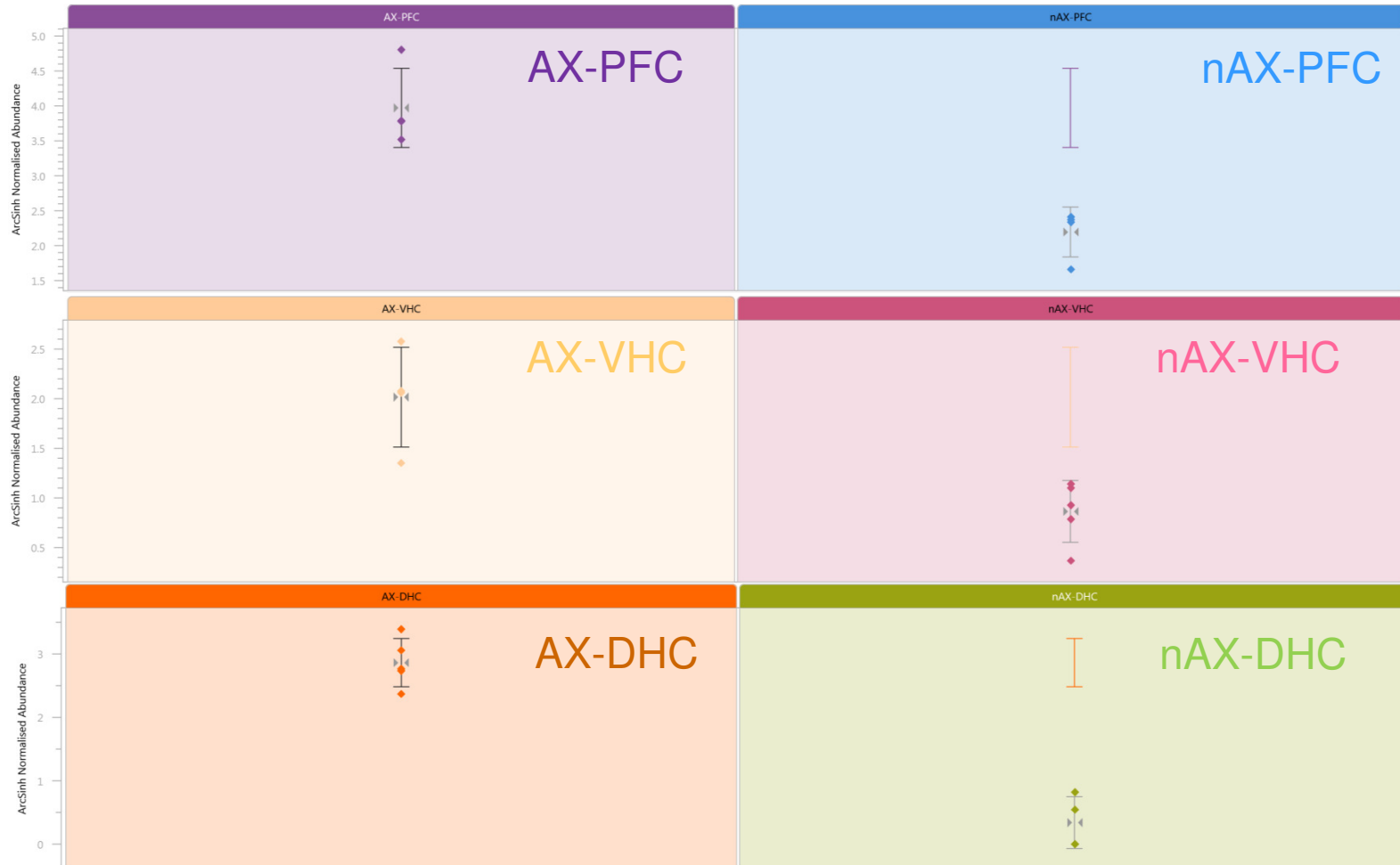
654 lipid

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

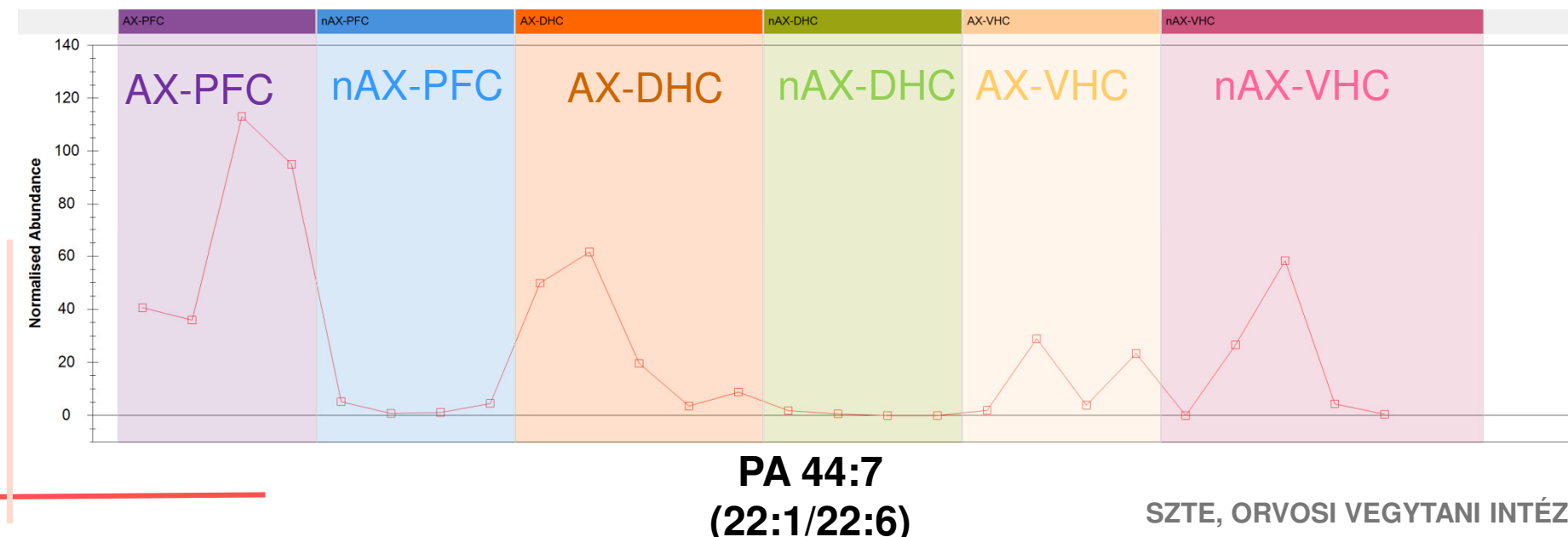
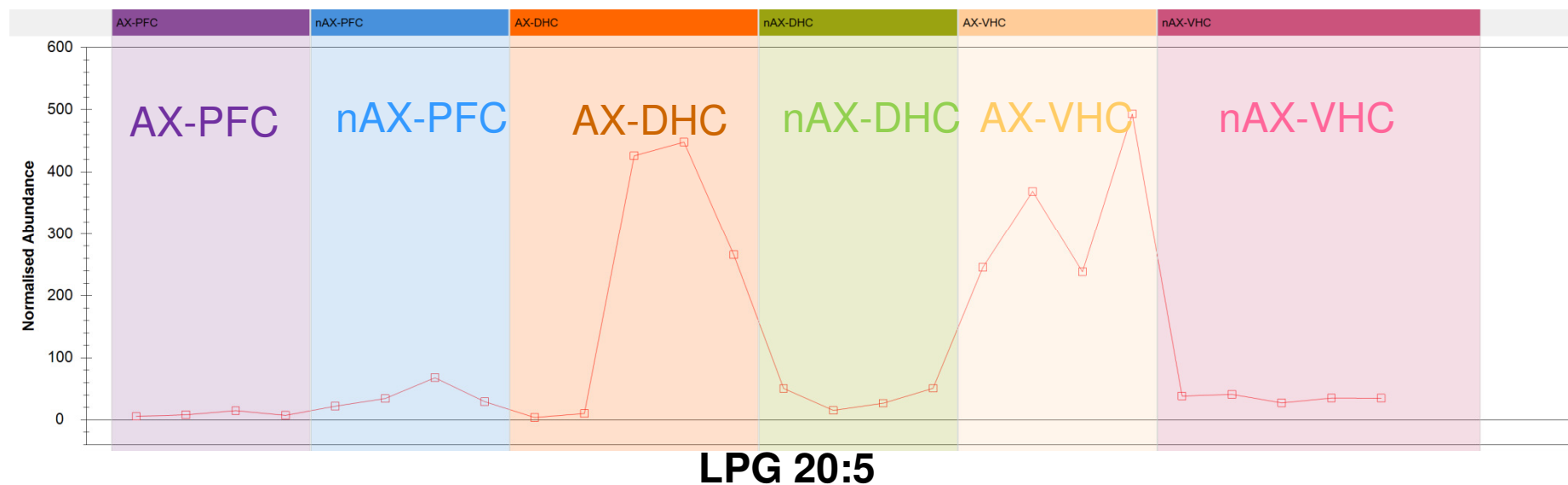
## LC-ESI-MS/MS analízis



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

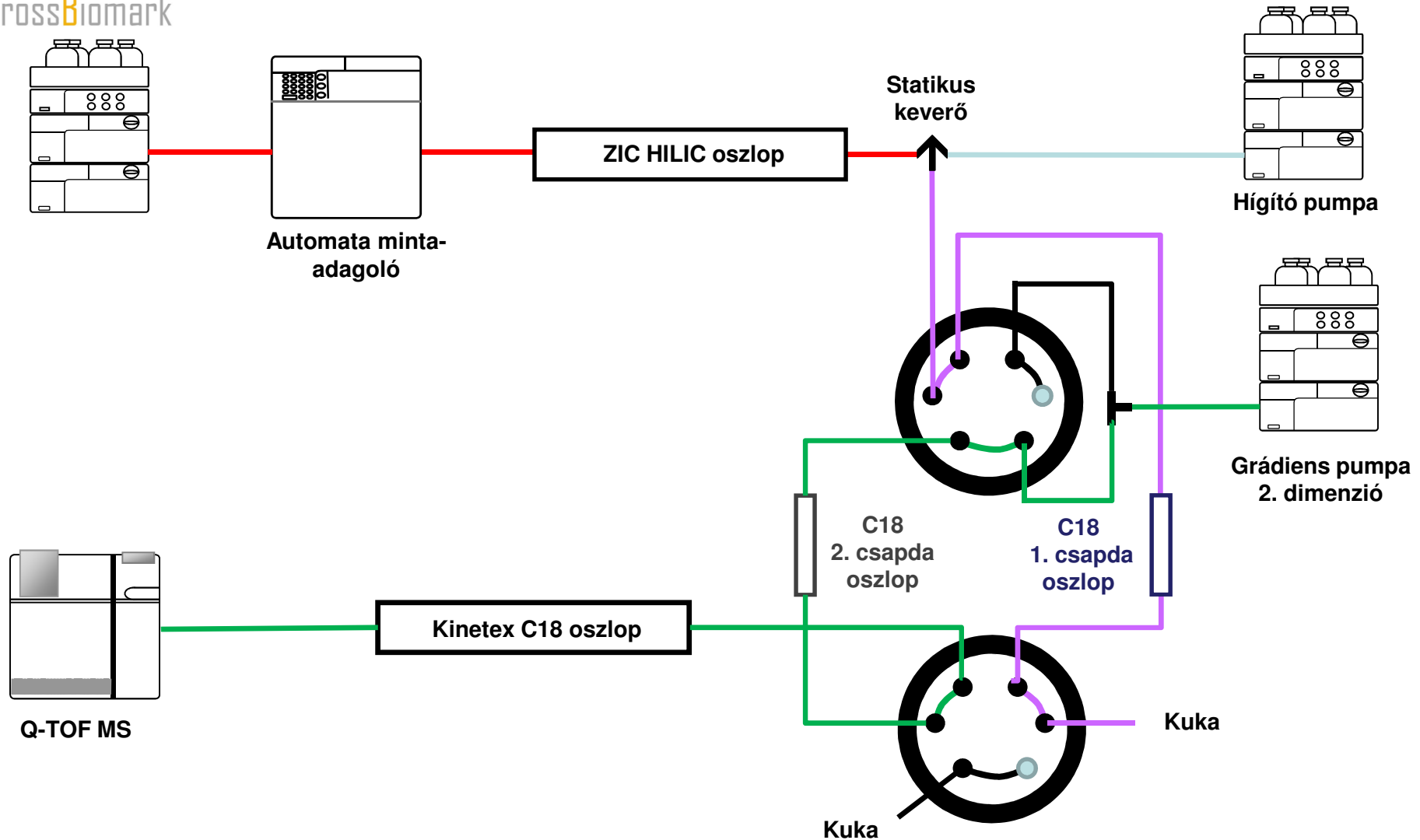
# Szorongásos megbetegedés biomarker kutatása

## LC-ESI-MS/MS analízis



# Szorongásos megbetegedés biomarker kutatása

## 2D-LC-ESI-MS/MS analízis



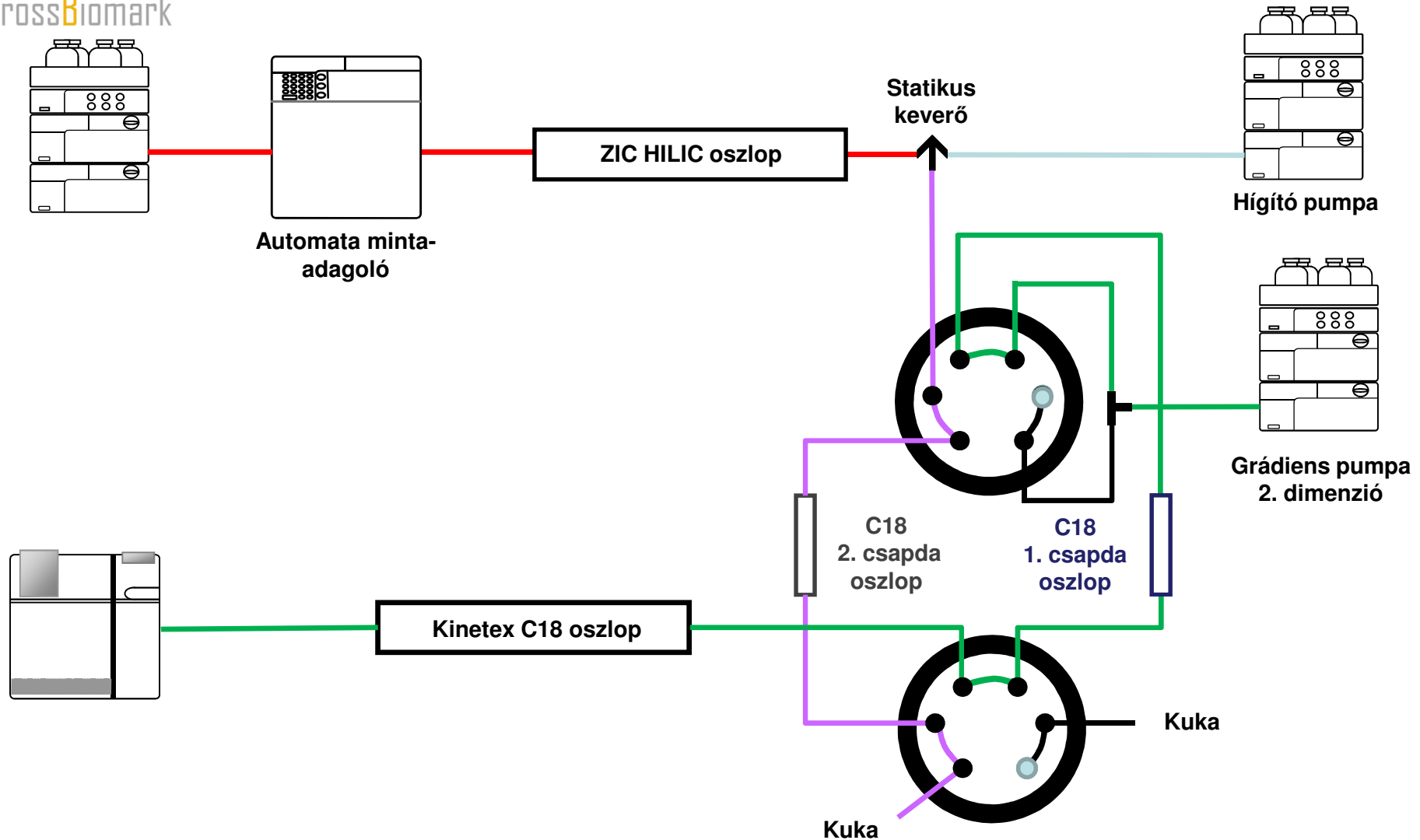
1. dimenzió: HILIC oszlop eluátumának hígítása, majd csapdázása a 1. csapda oszlopon.

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

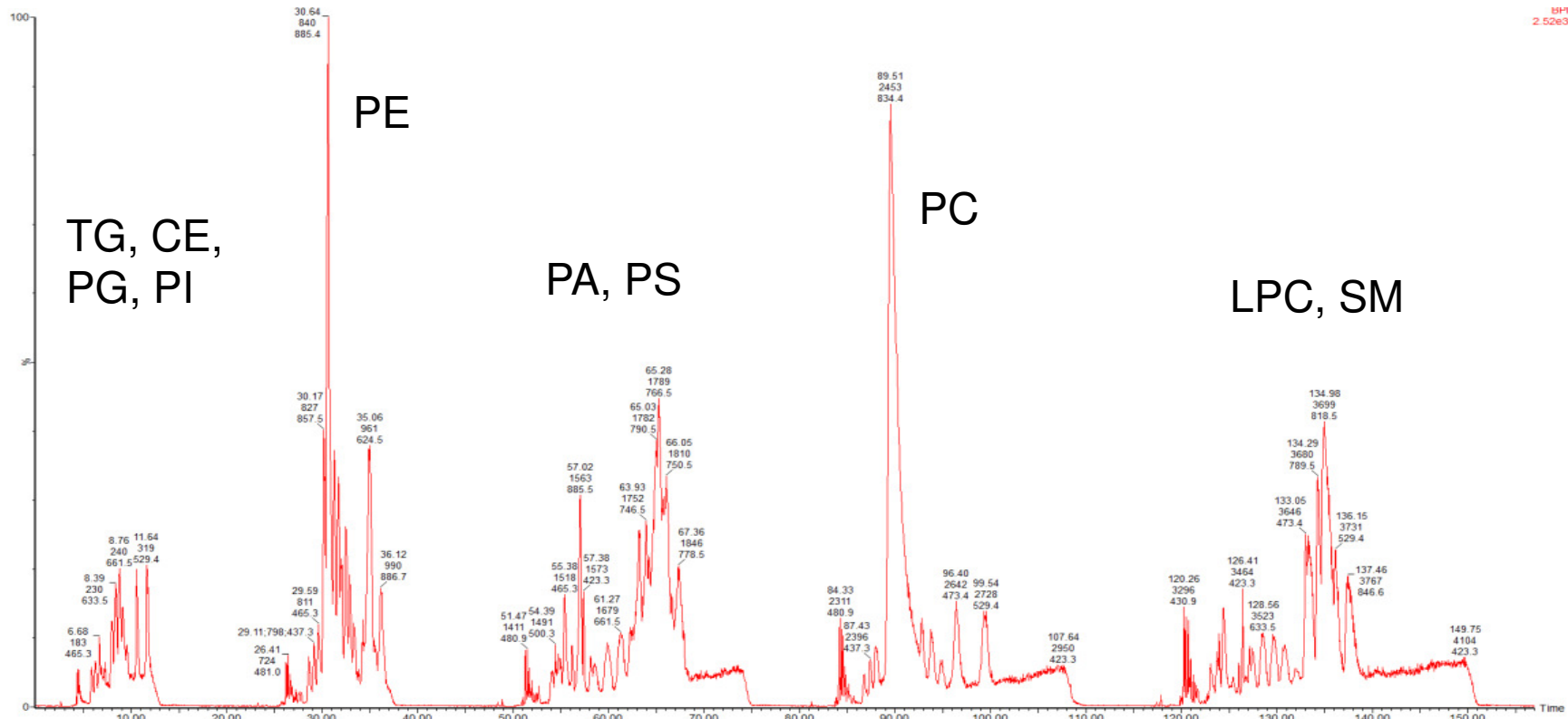
automata  
mintaadagoló

2. pumpa

1. pumpa

# 2D-LC-ESI-MS/MS analízis

## Szorongásos megbetegedés biomarker kutatása



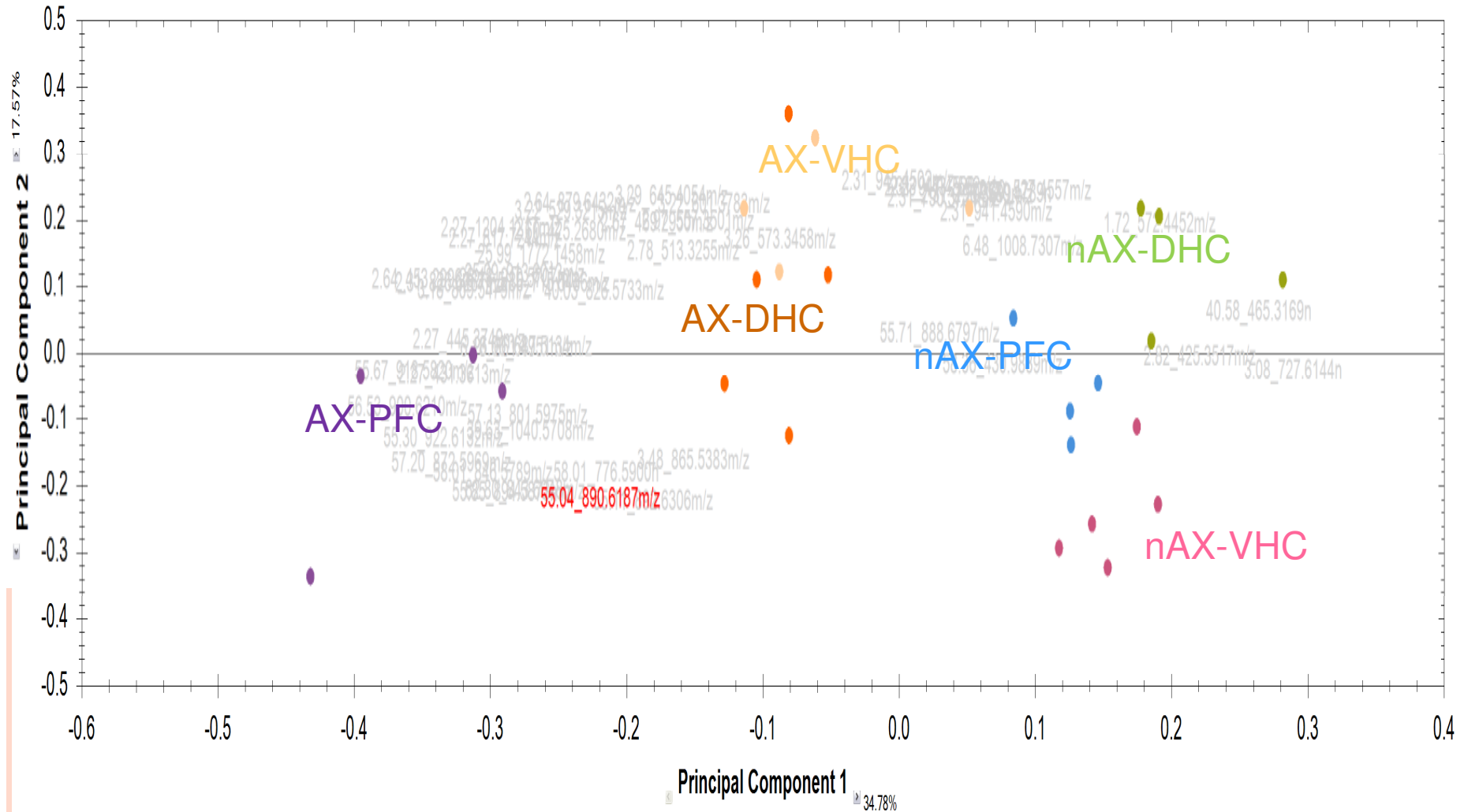
2. dimenzó MS spektruma

# 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!**