

Necílená metabolická analýza suchých krevních skvrn pro diagnostiku dědičných metabolických poruch

Janečková H.¹, Wojtowicz P.¹, Hron K.², Friedecký D.¹, Adam T.¹

¹Laboratoř dědičných metabolických poruch, Ústav molekulární a translační medicíny, Lékařská fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci a Fakultní nemocnice Olomouc

²Katedra matematické analýzy a aplikací matematiky, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci

SOUHRN

Cíl studie: Metabolomika se stává důležitým nástrojem v klinickém výzkumu a diagnostice lidských onemocnění. V této studii byla použita necílená metabolická analýza suchých krevních skvrn (DBS) pro diagnostiku dědičných metabolických poruch (DMP).

Typ studie: Klinická aplikace

Materiál a metody: Vzorky DBS byly analyzovány technikou vysoce účinné kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostním spektrometrem s vysokým rozlišením. Data byla zpracována a statisticky vyhodnocena s použitím softwaru R.

Výsledky: Bylo porovnáváno 20 kontrolních vzorků vůči třem vzorkům od pacientů s fenylketonurií a třem vzorkům od pacientů s leucinózou. Všechny patientské vzorky se podařilo rozlišit od kontrolních na základě příslušných markerů jednotlivých onemocnění.

Závěry: Tato studie ukazuje, že necílená metabolomika může být uplatněna při diagnostice DMP.

Klíčová slova: kapalinová chromatografie, průletový hmotnostní analyzátor, necílená metabolomika, diagnostika, dědičné metabolické poruchy

SUMMARY

Janečková H., Wojtowicz P., Hron K., Friedecký D., Adam T.: Untargeted metabolomic analysis of dry blood spots for diagnosing inherited metabolic disorders

Objective: Metabolomics has become an important tool in clinical research and diagnosis of human diseases. In this work we applied untargeted metabolomic analysis of dry blood spots (DBS) for diagnosing inherited metabolic disorders (IMDs).

Design: Clinical application

Material and methods: DBS samples were analyzed by high performance liquid chromatography coupled with high-resolution mass spectrometer. Data were processed and statistically evaluated using R software.

Results: We compared 20 control samples with three samples from patients with phenylketonuria and three samples from patients with maple syrup urine disease. All patient samples were distinguished from controls based on appropriate markers of the disorders.

Conclusion: This study shows that untargeted metabolomics can be applied for diagnosing various IMDs.

Keywords: liquid chromatography, time-of-flight mass analyzer, untargeted metabolomics, diagnostics, inherited metabolic disorders

Úvod

Metabolomika je nově se rozvíjející vědní disciplína, která se snaží analyzovat všechny nízkomolekulární metabolity přítomné v biologickém vzorku v definovaném čase. Našla své uplatnění v mnoha oborech, stává se důležitým nástrojem i v klinickém výzkumu a diagnostice lidských onemocnění. Metabolomika používá dva přístupy, a sice tzv. cílený a necílený postup. Cílený přístup využívá předem předdefinovaných metabolitů, které jsou analyzovány charakteristickými přechody v tandemovém hmotnostním spektrometru. Necílený přístup používá data z analyzátorů založených na měření přesné hmoty, přičemž analyzované látky jsou a priori neznámé a softwarové zpracování využívá pouze informací o přesné hmotě a retenci látek na koloně. Po statistickém zpracování jsou metabolity, které

nejlépe odlišují studované skupiny (např. pacient vs. zdravý), charakterizovány následně. První pokusy použít metabolické nástroje v diagnostice dědičných metabolických poruch (DMP) byly představeny skupinou prof. Siuzdaka [1], která uplatnila necílenou metabolomiku prostřednictvím technik kapilární kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením. Příkladem uplatnění cílené metabolomiky v DMP, může být studie zabývající se spojením dvoudimenzionální plynové chromatografie a průletového hmotnostního analyzátoru [2] či studie využívající metody přímého nástříku ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií [3].

Cílem této práce bylo uplatnit pro diagnostiku DMP necílenou metabolomiku prostřednictvím technik vysoce účinné kapalinové chromatografie (HPLC) ve spojení s hmotnostním spektrometrem s průletovým analyzátozem (TOF).

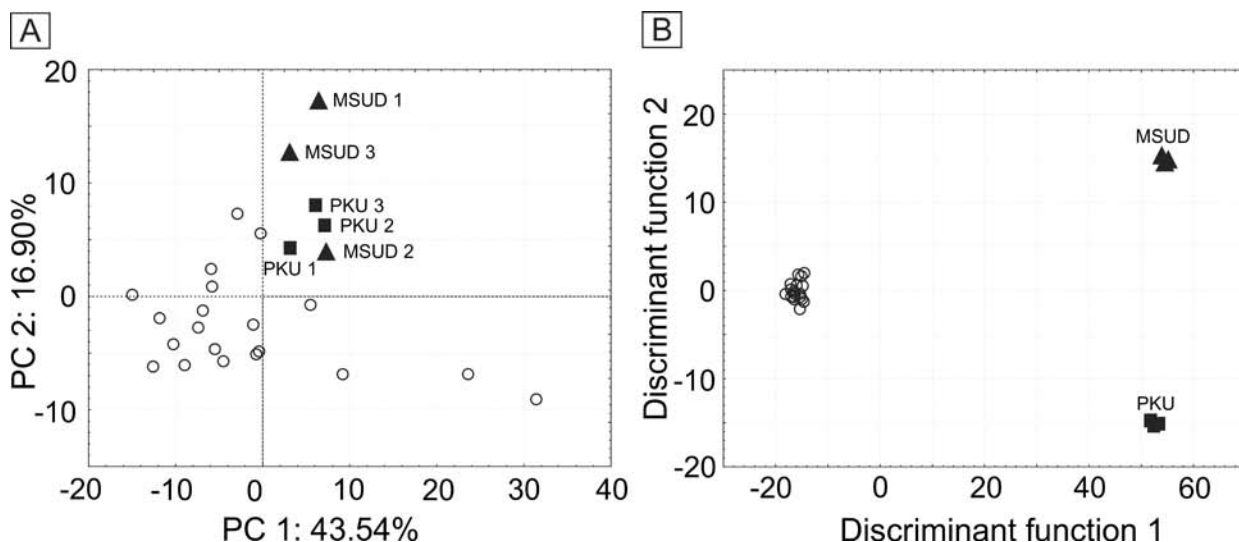


Fig. 1. Results of statistical data processing - (A) PCA and (B) PCA-DFA on the first 20 PCs (controls are marked by wheels, patients with PKU by squares and patients with MSUD by triangles).

Materiál a metody

Suché kapky krve byly extrahovány metanolem a analyzovány modifikovanou dříve publikovanou metodou [4]. Separace byly provedeny pomocí UHPLC Agilent 1200 Series na aminopropylkové koloně (Luna 3 μ m NH₂, 2 x 150mm, Phenomenex, Torrance, CA). Mobilní fáze A se skládala z octanu amonného (20 mmol/l, pH 9,45) a mobilní fáze B z acetonitrilu. Byla použita lineární gradientová eluce při průtoku 0,25 ml/min. Analýza začala s 85 % B, podíl B byl snižován po dobu 15 min na 15 %. Tento stav byl udržován po dobu 10 min, poté byl zvýšen během 1 min na 85 % B. Před dalším nástřikem byla kolona ekvilibrována po dobu 9 min. Celková doba analýzy činila 35 min. Detekce s přesností 5 ppm a rozlišením až 20 000 byla provedena pomocí Q-TOF Agilent G6520A s ionizací elektrosprejem v pozitivním módu.

Naměřená data byla zpracována a statisticky vyhodnocena pomocí softwaru R. Data byla extrahována z původních souborů (mzdata) pomocí XCMS knihovny R (<http://metlin.scripps.edu/xcms/>). Po extrakci byla data korigována na základní linii, normalizována na celkový iontový proud (total ion count, TIC) a statisticky normována. Byly použity následující statistické metody: analýza hlavních komponent (PCA) a diskriminační funkční analýza založená na PCA (PCA-DFA). Identifikace metabolitů na základě přesné hmoty byla provedena pomocí automatických pracovních postupů PUT-MEDID_LCMS [5], retence identifikovaných metabolitů pak byla srovnávána se standardy.

Výsledky a diskuse

Cílem práce bylo uplatnit necílený metabolomický přístup pro diagnostiku DMP. K tomuto účelu bylo využito spojení technik HPLC a Q-TOF. Bylo analyzováno dvacet kontrolních a šest defektních vzorků DBS - tři od pacientů s fenylketonurií (PKU) a tři od pacientů s leucinózou (MSUD).

Z celkového souboru dat bylo zpracováváno 256 znaků (angl. features, jde o ne předem charakterizované metabolity, které jsou identifikovány zpětně až po provedení statistické analýzy), které byly charakterizovány přesnou hmotou a retenčním časem. V rámci statistického vyhodnocení byla nejdříve provedena PCA. Již v této metodě došlo k patrnému oddělení patientských vzorků vůči kontrolám (obr. 1A), i když je zřejmé, že je potřeba naznačenou klasifikaci dále analyzovat. Jednoznačné výsledky byly následně získány pomocí PCA-DFA, kdy došlo k jasnému rozlišení všech 3 skupin – kontrol a pacientů s PKU a MSUD (obr. 1B). Po následné identifikaci metabolitů bylo zjištěno, že tomu bylo díky příslušným markerům jednotlivých onemocnění. V případě PKU to byly především vysoké hladiny fenylalaninu, v případě MSUD zvýšené koncentrace leucinu a valinu.

Závěr

V této studii bylo prokázáno, že necílená metabolomika může být uplatněna při diagnostice DMP. Statistickým zpracováním naměřených dat se podařilo rozlišit všech 6 patientských vzorků s DMP vůči 20 kontrolním vzorkům.

Literatura

1. **Wikoff, W. R., Gangoiti, J. A., Barshop B. A., Siuzdak G.** Metabolomics identifies perturbations in human disorders of propionate metabolism. *Clin. Chem.*, 2007, 53, p. 2169–2176.
2. **Wojtowicz, P., Zrostlíková, J., Kovalczuk, T., Schůrek, J., Adam, T.** Evaluation of comprehensive two-dimensional gas chromatography coupled to time-of-flight mass spectrometry for the diagnosis of inherited metabolic disorders using an automated data processing strategy. *J. Chromatogr. A*, 2010, 1217, p. 8054–8061.
3. **Janečková, H., Hron, K., Wojtowicz, P., Hlídková, E., Barešová, A., Friedecký, D., Zídková, L., Hornik, P., Behúlová, D., Procházková, D., Vinohradská,**

- H., Pešková, K., Bruheim, P., Smolka, V., Štátná, S., Adam, T.** Targeted metabolomic analysis of plasma samples for the diagnosis of inherited metabolic disorders. *J. Chromatogr. A*, 2012, 1226, p. 11–17.
4. **Bajad, S. U., Lu, W., Kimball, E. H., Yuan, J., Peterson, C., Rabinowitz, J. D.** Separation and quantitation of water soluble cellular metabolites by hydrophilic interaction chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 2006, 1125, p. 76–88.
5. **Brown, M., Wedge, D. C., Goodacre, R., Kell, D. B., Baker, P. N., Kenny, L. C., Mamas, M. A., Neyses, L., Dunn, W. B.** Automated workflows for accurate mass-based putative metabolite identification in LC/MS-derived metabolomic datasets. *Bioinformatics.*, 2011, 27, p. 1108–1112.

Tato práce vznikla za podpory Studentské grantové soutěže Univerzity Palackého v Olomouci, č. projektu LF_2012_016 a grantu IGA MZČR NT12218. Infrastrukturální část projek-

tu (Ústav molekulární a translační medicíny) byla podpořena Operačním programem Výzkum a vývoj pro inovace (projekt CZ.1.05/2.1.00/01.0030).

Toto krátké sdělení vzniklo na základě abstraktu posteru prezentovaného na konferenci „27th International Symposium on MicroScale Bioseparation and Analyses 2012“, 12.–15. 2. 2012, Ženeva, Švýcarsko.

Do redakce došlo 13. 2. 2012

*Adresa pro korespondenci:
Doc. RNDr. Tomáš Adam, Ph.D.
OKB, FN Olomouc a Univerzita Palackého v Olomouci
I. P. Pavlova 6
775 20 Olomouc
e-mail: tomasadam@gmail.com*