

Magyar Tudományos Akadémia, Kémiai Kutatóközpont
Szerkezeti Kémiai Intézet, Tömegspektrometria Osztály
&
Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem
Fizikai Kémia Tanszék

PH.D. ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

ÚJ TÖMEGSPEKTROMETRIÁS MÓDSZEREK FEJLESZTÉSE ÉS ALKALMAZÁSA A KLINIKAI KÉMIÁBAN

Nagy Kornél

Témavezető:
Dr. Vékey Károly

2004

I. ELŐZMÉNYEK, CÉLKITŰZÉSEK

A betegségek modern analitikai eszközökkel történő korai kimutatása és gyors kezelése kulcsfontosságú az emberi egészség megóvásában és az életminőség javításában. A közérdeklődés élénk figyelemmel követi új diagnosztikai eljárások gyors és hatékony bevezetését mindennapjaink gyógyászati eszköztárába. Ebben a modern analitikai kémiai módszerek egyre nagyobb jelentőségre tesznek szert. Az elmúlt évtizedben a tömegspektrometria széleskörű alkalmazása forradalmasította a biokémiai és klinikai kémiai kutatásokat és új lehetőséget nyitott hőérzékeny, nagy molekulatömegű anyagok, mint pl. metabolitok, proteinek, glikoproteinek vizsgálatára. Mindez komplex biológiai mátrixban is megvalósítható, így testfolyadékok (pl. vér, vizelet) minimális mintaelőkészítéssel is vizsgálhatóvá váltak. A robosztus, szelektív és gyors HPLC-MS és MS/MS technikák alkalmazásával a legtöbb vegyület származékképzés nélküli analízise is elvégezhető, így ezek a módszerek sok kutatási területen a korábban bevált gázkromatográfiával kapcsolt tömegspektrometria (GC-MS) alkalmazását is kiszorítják.

Nagy áteresztőképességű, érzékeny tömegspektrometriás szűrőmódszerek (mint pl. ESI-MS/MS) alkalmazásával számos betegség igen gyorsan kimutatható, ehhez igen csekély mennyiségű minta szükséges (pl. néhány mikroliter vér) és akár egy ország teljes lakossága is hatékonyan szűrhető. Ezek a módszerek több országban (Amerikai Egyesült Államok, Németország, Anglia) elterjedtek; újabb szűrőmódszerek kifejlesztése és a meglévők alkalmazása rendkívül gyors ütemben bővül. Bár a szakirodalomban számos közlemény hangsúlyozza a tömegspektrometria fontosságát a klinikai kémiában, egyre inkább felismert tény, hogy a tömegspektrometria által nyújtott lehetőségek még koránt sincsenek kihasználva.

Doktori munkámban célul tűztem ki

a) olyan tömegspektrometriás módszerek fejlesztését és alkalmazását, melyeket sikerrel lehet felhasználni klinikai kémiai tárgyú kérdések megválaszolására, és amelyek további diagnosztikai fejlesztések alapjául szolgálhatnak;

b) a hazai gyakorlatba bevezessünk és elterjesszünk külföldön már bevált, tömegspektrometrián alapuló diagnosztikai módszereket.

II. VIZSGÁLATI MÓDSZEREK ÉS BERENDEZÉSEK

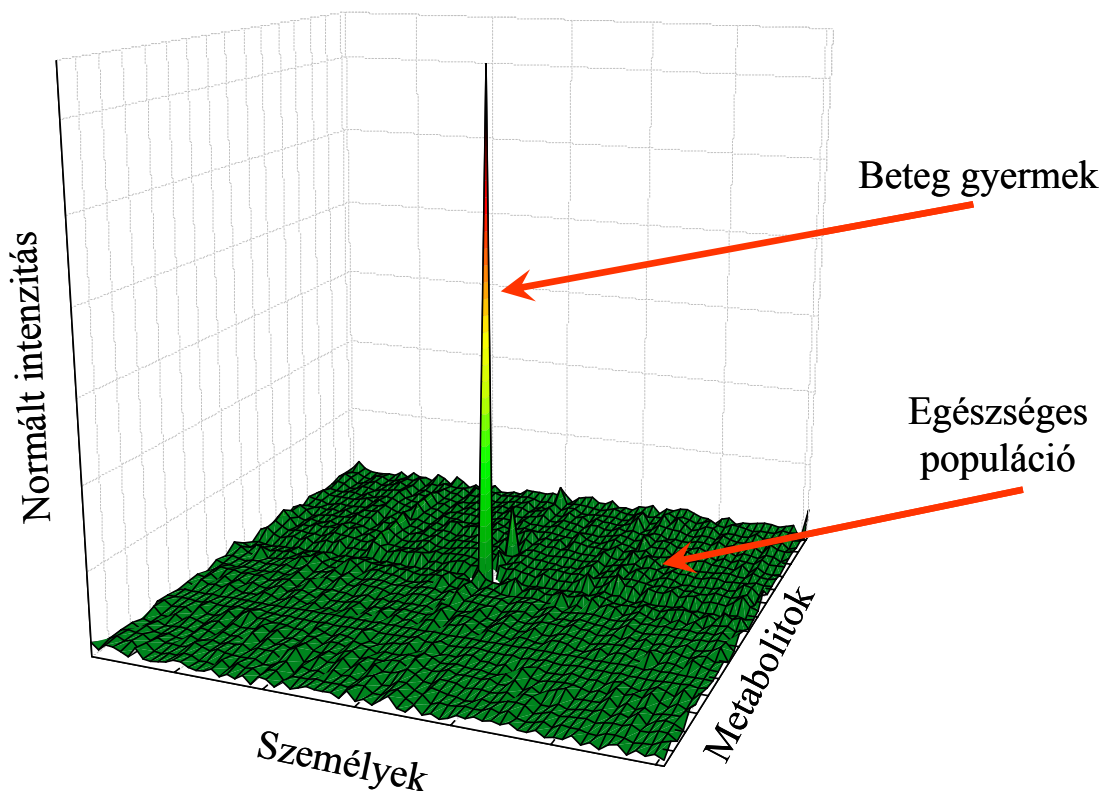
Az aminosavak és acilkarnitinek beszárított vércseppből történő vizsgálatát pozitív electrospray ionizációval és tandem tömegspektrometriás detektálással (ESI-MS/MS) végeztük egy Perkin Elmer API 2000 Triple Quadrupole tömegspektrométeren.

A zsírsavak, trigliceridek és egyéb apoláros komponensek vizsgálatát nagy hatékonyságú folyadékkromatográfiához kapcsolt atmoszférikus nyomású kémiai ionizációs tömegspektrometriával (HPLC-APCI-MS), a fent említett Perkin Elmer API 2000 Triple Quadrupole tömegspektrométerrel végeztük. A kromatográfiához egy C18 ec Purospher Star (3 µm particle size, 55 mm x 2 mm i.d.) kolonnát használtunk, az oldószerek szállítását két darab Perkin Elmer Series 200 mikropumpával biztosítottuk.

A humán alfa-1-acid glikoprotein vizsgálatokat egy electrospray ionforrással felszerelt, 9.4 Tesla-s Bruker APEX Fourier transzformációs ion ciklotron rezonancia tömegspektrométerrel (ESI-FT-ICR) végeztük. A részletes alkalmazott kísérleti körülményeket a dolgozatomban, illetve publikációimban ismertetem.

III. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

III.1. Magyarországon elsőként alkalmaztuk és sikeresen bevezettük fejlett egészségügyi ellátással rendelkező országokban már elterjedten használt electrospray tandem tömegspektrometriát veleszületett anyagcserezavarok kimutatására. Ennek során az ország számos kórházával együttműködést alakítottunk ki, több mint ezer beteg mintáját vizsgáltuk meg és számos anyagcsere betegséget (amino acidúriát, béta oxidációs zavart) mutattunk ki. Munkánk eredményeként a technika már Magyarországon is kezd a rutin klinikai vizsgálatok részévé válni, OEP elfogadás előtt áll. Kidolgoztunk egy számítógépes kiértékelési algoritmust, mely alkalmas nagymennyiségű személy-metabolit adatpár egyidejű áttekintésére (1. ábra).



1. ábra. Egy beteg gyermek a tömegspektrometriás adatok alapján éles csúcsként különül el az egészséges populációtól.

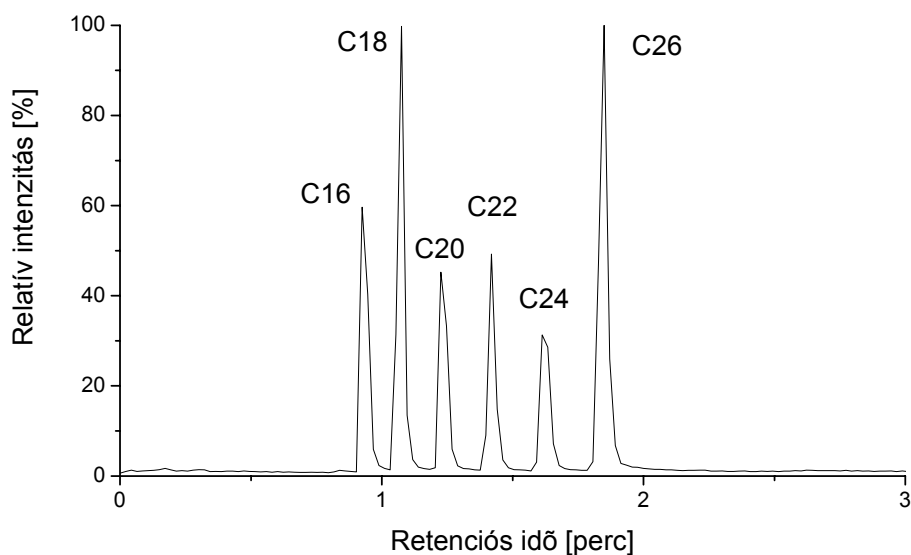
III.2. Kifejlesztettünk egy olyan új módszert aminosavak beszárított vércseppből történő meghatározására, amely sem a minta kémiai származékképzését, sem pedig előzetes kromatográfiás elválasztását nem igényli. A módszer szilárd fázisú extrakciót követő pozitív electrospray ionizáción alapszik, a detektálást tandem tömegspektrometriával, úgynevezett multiple reaction monitoring (MRM) módban végeztük. A szilárd fázisú extrakcióhoz acetát ellenionnal kondicionált tölteteket alkalmaztunk, amik lehetővé tették az aminosavak hatékony, szűk zónában történő megkötését. Mivel kémiai származékképzést nem végzünk számos, a klasszikus butilezéses módszerre jellemző probléma nem jelentkezik, mint például a glutamin-glutaminsav vagy aszparagin-aszparaginsav egymásba alakulása, acilkarnitinek hidrolízise stb. A kalibrációs görbék, kimutatási határok, napon belüli illetve napok közötti szórásértékek azt mutatják, hogy ez a módszer a klasszikus butilezéses módszer alternatívájaként szolgálhat, emellett lehetőséget nyújt új, aminosavaktól eltérő szerkezetű vegyületek analízisére is. A kifejlesztett módszerrel egy Magyarországon eddig nem szűrt betegséget, Citrullinémiát mutattunk ki egy páciens esetében.

III.3. Kutatásai eredményeink alapján kimutattuk, hogy a vér természetes nátriumszintje electrospray körülmények között az aminosavakkal szemben nagymértékű (90 % jel intenzitás csökkenés) szupresszióhoz vezet.

III.4. A kifejlesztett módszert sikeresen alkalmaztuk az izobár leucin, izoleucin és hidroxiprolin vegyületek kromatográfiás elválasztást nem igénylő megkülönböztetésére. A módszer során az electrospray ionizációval előállított molekulaionok fragmentálására 40-50 eV-os tartományban ütközéssel aktivált disszociációt alkalmaztunk. Ennél az ütközési

energiánál a fenti vegyületekből az aminosav oldalláncre jellemző fragmensek képződnek, amely lehetővé teszi egyértelmű azonosításukat.

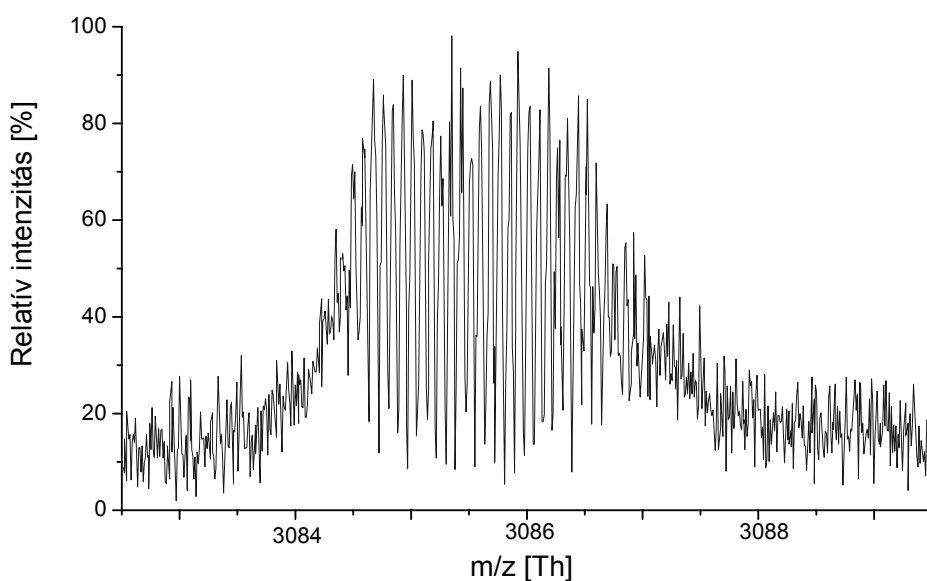
III.5. HPLC-MS módszert fejlesztettünk ki zsírsavak és más apoláros vegyületek vizsgálatára. A módszer korlátoltan elegyedő víz-metanol-n-hexán oldószerekkel végzett fordított fázisú elválasztáson alapul és rendkívül gyors gradiens elúciót tesz lehetővé (2. ábra). Valószínűsítettük, hogy az elválasztás mechanizmusa egy korábban nem ismert elven alapul. A kis áramlási sebesség és rövid analízisidők (2 perces kromatogramok, lásd 2. ábra) a módszert nagy áteresztőképességű vizsgálatok elvégzésére alkalmassá teszik. A detektálás atmoszférikus nyomású kémiai ionizációval történik, a módszer kimutatási határa zsírsavakra az alsó pikogram tartományban van.



2. ábra. Zsírsav keverék tipikus HPLC-MS felvétele.

A képen totálionáram látható.

- III.6. A kifejlesztett módszer alkalmas zsírsavak előzetes kémiai származékképzés nélküli vizsgálatára és ezt sikeresen alkalmaztuk vér nagyon hosszú szénláncú zsírsav összetételének (C18-C26) meghatározására. A validálási adatok és az igen rövid analízisidők azt mutatják, hogy a módszer a peroxiszómális zavarok szűrésére jelenleg használt időigényes származékképzést igénylő GC-MS technikának versenytársa lehet. A módszer minimális módosításokkal más vegyületcsoportok vizsgálatára is alkalmas, ezt trigliceridek és szterolok esetében igazoltuk.
- III.7. Új Fourier transzformációs ion ciklotron rezonancia tömegspektrometriás (FT-ICR) módszert fejlesztettünk ki a rendkívül heterogén (több száz komponensű) protein-, glikoprotein-keverékek vizsgálatára. A rendkívül komplex, tumor marker humán alfa-1-acid glikoprotein (AGP) esetében igazoltuk, hogy nagymennyiségű trifluoro-ethanol (50 %) oldószer adalék használatával intakt (nem emésztett) glikoprotein előzetes kromatográfias elválasztás nélkül is vizsgálható electrospray körülmények között.
- III.8. Izolálással kombinált axializációs kísérletekkel sikerült elérni a humán AGP egyes glikoformjainak monoizotópos felbontását (3. ábra). Az adatok kalibrálását követően lehetőség nyílt egyes AGP glikoformok atomi összetételének meghatározására. Az irodalmi eredmények összegzésével összeállítottunk egy adatbázist, mely segítségével a mért atomi összetételekhez lehetséges izomer szerkezeteket tudtunk rendelni. Az eredmények azt igazolják, hogy az ultranagy felbontású tömegspektrometria proteinek poszt-transzlációs módosításainak vizsgálatában is fontos szerepet játszhat.



3. ábra. A humán AGP egyik glikoformjának electrospray ionizációt követő, monoizotópos felbontású tömegspektruma.

IV. AZ EREDMÉNYEK JELENTŐSÉGE

Munkánk során egy új kutatási irányt alakítottunk ki és bevezettük a hazai egészségügybe az electrospray tandem tömegspektrometrián alapuló diagnosztikai módszert. Ennek keretében sikeresen bekapcsolódtunk abba a nemzetközi szinten igen gyorsan fejlődő kutatási irányzatba, mely biológiai rendszerek kis- és nagymolekulatömegű frakciójának vizsgálatát végzi (metabolomika, proteomika). Módszerfejlesztéseink során olyan eredményeket publikáltunk az irodalomban, melyek a korábbi módszerek javítása mellett jövőbeni kutatások alapjául is szolgálhatnak.

V. KÖZLEMÉNYEK

A tézisekhez kapcsolódó cikkek:

1 Kornél Nagy, Zoltán Takáts, Ferenc Pollreisz, Teréz Szabó and Károly Vékey; Direct tandem mass spectrometric analysis of amino acids in dried blood spots without chemical derivatization for neonatal screening; *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2003**; 17:983-990.

2 Kornél Nagy, Annamária Jakab, Jenő Feket, Károly Vékey; An HPLC-MS approach for analysis of very long chain fatty acids and other apolar compounds on octadecyl-silica phase using partly miscible solvents.; *Analytical Chemistry* **2004**; 76:1935-1941.

3 Kornél Nagy, Károly Vékey, Tímea Imre, Krisztina Ludányi, Mark P. Barrow, Peter J. Derrick; Electrospray Ionization Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry of Human Alpha-1-acid Glycoprotein; *Analytical Chemistry* **2004**; 76:4998-5005.

4 Kornél Nagy, Ferenc Pollreisz, Zoltán Takáts and Károly Vékey; Determination of aldehydes by atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry; accepted in *Rapid Communications in Mass Spectrometry*

5 Szabó Teréz dr., Takáts Zoltán , Nagy Kornél , Papp Zsuzsanna , Czinner Antal dr., Oroszlán György dr., Vékey Károly dr.; Új korszak az öröklődő anyagcsere-betegségek felismerésében: a tandem tömegspektrometria orvosi alkalmazásai, *Gyermekgyógyászat* **2001**; 52,6: 594-603.

Egyéb cikkek:

6 Kornél Nagy, Edina Epacher, Peter Staniek, Béla Pukánszky; Hydrolytic stability of phenolic antioxidants and its effect on their performance in high-density polyethylene; *Polymer degradation and stability* **2003**; 82:211-219.

7 Annamária Jakab, Kornél Nagy, Károly Héberger, Károly Vékey and Eszter Forgács; Differentiation of vegetable oils by mass spectrometry combined with statistical analysis; *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2002**;16:2291-2297.

8 Péter Bakó, Tibor Bakó, Katalin Bisztray, Áron Szöllősy, Kornél Nagy, László Tőke, Synthesis, Extraction Ability and Application in an Asymmetric Synthesis of Azacrown Ethers Derived from D-Mannitol; *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry* **2001**; 39:247-251.

Meghívott, a tézisekhez kapcsolódó előadások:

1 Kornél Nagy, Károly Vékey; Tandem Mass Spectrometry in Clinical Chemistry: the Metabolic Profiling Challenge; *Applied Biosystems Seminar*; 20-21 May, **2003**; Prague, Czech Republic

A tézisekhez kapcsolódó további előadások:

2 Kornél Nagy, Zoltán Takáts, Károly Vékey, Novel Aspects of Inherited Metabolic Disorder Screening by Tandem Mass Spectrometry, *19th Informal Meeting on Mass Spectrometry*; 29. Apr-3. May **2001**; Noszvaj, Hungary

3 Kornél Nagy, Zoltán Takáts, Károly Vékey, Tandem Mass Spectrometry in Clinical Diagnostics, *NATO Advanced Studies Institute, New Frontiers in Mass Spectrometry. Recent Developments in Instrumentation and Applications.*; 09.01-11.2001; Tetouan, Marocco

4 Nagy Kornél, Takáts Zoltán, Vékey Károly, Új Módszerek az Újszülöttek Anyagcsere-rendellenességének Tandem Tömegspektrometriás Szűrésében; IV. *Doktori Kémiai Iskola*; Május 20-22. 2001; Mátraháza

5 Kornél Nagy, Károly Vékey, Peter Derrick, ES-FT-ICR investigation of intact highly sialylated glycoproteins using human alpha-1-acid glycoprotein as model compound.; *21st Informal Meeting on Mass Spectrometry*; 11-15 May, 2003; Antwerp

6 Nagy Kornél, Vékey Károly; Tandem tömegspektrometria az orvosi kémiában, *Kutatóközponti Tudományos Napok*; május 28-29. 2003. MTA KKKI, Budapest

7 Kornél Nagy, Mária Bihari, Károly Vékey; New approach in Clinical Chemistry: application of mass spectrometry, *Advisory Board Meeting*; June 17-19. 2003; HAS CRC, Budapest

8 Kornél Nagy; Application of mass spectrometry in clinical chemistry; *RIGI Meeting 2003*; 30-31. Oct. 2003; Dorint Hotel Blüemlisalp, Beatenberg, Switzerland

A tézisekhez kapcsolódó poszterek:

1 Kornél Nagy, Zoltán Takáts, Ferenc Pollreisz, Károly Vékey, Analysis of long and very long chain fatty acids from human plasma by atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry; **20th Informal Meeting on Mass Spectrometry**; 12-16 May, **2002**; Fiera di Primiero, Italy - **ISBN 88 86281 69 3**

2 Kornél Nagy, Zoltán Takáts, Károly Vékey; Electrospray tandem mass spectrometric analysis of 24 amino acids from human blood spot without chemical derivatization used for neonatal screening; **50th Annual Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, American Society for Mass Spectrometry**; 2-6 jun. **2002**; Orlando, FL

3 Kornél Nagy, Jenő Fekete, Károly Vékey; A novel HPLC-MS method for the analysis of fatty acids and other apolar compounds on octadecyl-silica phase; **Advances in Chromatography and Electrophoresis - Conferentia Chemometrica 2003 (ACE&CC 2003)**; 27-29. Oct. **2003**; Budapest, Agro Hotel - **ISBN 963-508-391-2**

4 Kornél Nagy, David Bongiorno, Pasquale Agozzino, Giuseppe Avellone, Ceraulo Leopoldo, Károly Héberger, Károly Vékey; A simple High Performance Liquid Chromatography - Mass Spectrometry approach combined with Linear Discriminant Analysis for the characterization of top quality olive oils.; **22nd Informal Meeting on Mass Spectrometry**; May 2-6, **2004**; Tokaj, Hungary

5 Annamária Jakab, Kornél Nagy, Károly Vékey, Esther Forgács; Analysis of plant oil triacylglycerols by HPLC-APCI-MS and MALDI-

TOF-MS; *20th Informal Meeting on Mass Spectrometry*; 12-16 May, **2002**; Fiera di Primiero, Italy - *ISBN 88 86281 693*

6 Jakab Annamária, Nagy Kornél, Héberger Károly, Vékey Károly, Forgács Eszter; Növényi olajok csoportosítása lineáris diszkriminancia analízissel tömegspektrometriás adatok alapján; *Kemometria ' 02*; szept.29-okt.01. **2002**; Tata

7 Martin Zeller, Mark Barrow, Kornel Nagy, Simone Koenig and Peter J. Derrick; Electron capture dissociation (ECD): A tool for analysis of phosphorylated proteins with Fourier transform ion cyclotron resonance (FTICR) mass spectrometry; *Intermolecular Associations in 2D and 3D - Biochemical Society Focused Meeting Joint Meeting with The British Biophysical Society*; 19 - 20 June **2003**; University of Nottingham, UK

8 Martin Zeller, Mark Barrow, Kornel Nagy, Simone Koenig and Peter J. Derrick; Analysis of phosphorylated proteins with Fourier transform ion cyclotron resonance (FTICR) mass spectrometry. Electron capture dissociation (ECD) and sustained off-resonance irradiation (SORI) collision-induced dissociation (CAD); *16th IMSC*; Aug 31- Sep 5, **2003**; Edinburgh, Scotland, UK

9 Jenő Fekete, Kornél Nagy, Károly Vékey; Optimization of fast gradient elution for HPCL-MS/MS; *5th Balaton Symposium on High-Performance Separation Methods*; September 3-5, **2003**; Siófok, Hungary - *ISBN 963-508-391-2*

10 Annamária Jakab, Károly Héberger, Kornél Nagy, Károly Vékey, Eszter Forgács; Characterization of plant oils based on their triacylglycerol

content by HPLC/APCI-MS and MALDI-TOFMS combined with linear discriminant analysis; *Advances in Chromatography and Electrophoresis - Conferentia Chemometrica 2003 (ACE&CC 2003)*; 27-29. Oct. 2003; Budapest, Agro Hotel - *ISBN 963-7067-108*

Egyéb poszterek:

11 Kornél Nagy, Edina Epacher, Jan Malik, Peter Staniek, Béla Pukánszky; Hydrolytic stability of phenolic antioxidants; effect on their performance under extractive conditions; *Second International Conference on Polymer Modification, Degradation and Stabilization*; June 30 - July 04, 2002; Budapest, Hungary - *ISBN 963 420 723 5*

