

Universitatea de Medicină, Farmacie, Științe și Tehnologie din Târgu Mureș, România
Universitatea din Liège, Belgia

Dezvoltarea de metode inovative LC-MS/MS pentru cuantificarea biomarkerilor patologici în lichide biologice

Rezumat Teză de Doctorat

*Teză de doctorat derulată în cotutelă și colaborare cu Laboratorul de Analiza Medicamentului din
cadrul CIRM, Universitatea din Liège, Belgia*

Conducători Științifici: Prof. Dr. Daniela-Lucia Muntean; Prof. Dr. Marianne Fillet
Student Doctorand: Valentin Ion

Târgu Mureș, Liège 2019

Conform primelor definiții asupra “biomarkerilor”, formulate de către asociația asupra securității chimice prin “Programul Internațional asupra securității chimice” condus de către Organizația Mondială a Sănătății (coordonat de către Organizația Națiunilor Unite) și a Organizației Mondiale a Muncii, biomarkerii au fost definiți drept “orice substanță, structură sau proces care poate fi măsurat(ă) la nivelul organismului uman sau drept un produs al organismului care influențează sau prezice incidența sau urmările unei stări patologice”. Definițiile mai noi, formulate de către asociația FDA-National Institute of Health (NIH) în cadrul “Grupului de lucru pentru Biomarkeri”, enunță faptul că un biomarker reprezintă “o caracteristică bine definită care este măsurată a fi drept un indicator a proceselor biologice normale (fiziologice) sau patologice sau ca drept răspuns în urma expunerii unei intervenții de orice tip asupra sistemului biologic, inclusiv intervenții terapeutice”. Grupul de lucru pentru biomarkeri ai FDA-NIH, împarte biomarkerii în mai multe categorii cum ar fi: biomarkeri de diagnostic; biomarkeri de monitorizare; biomarkeri ai răspunsului farmacodinamic; biomarkeri predictivi; biomarkeri de prognostic etc.

Una dintre cele mai importante surse de biomarkeri în context clinic este reprezentată de molecule circulante sau non circulante, endogene sau xenobiotice. Din punct de vedere chimic, aceste molecule aparțin diferitelor clase chimice sau biochimice. Astfel, pentru o identificare corespunzătoare și o eventuală cuantificare a acestor biomolecule, diferite abordări analitice sunt folosite în laboratorul clinic de rutină sau în cercetarea medicală și biomedicală. În vederea analizei de rutină în cadrul laboratorului clinic, majoritatea platformelor analitice se bazează pe metode de tip Ligand Binding Assays, Teste Imunologice, Imuno-enzimatice (ELISA), Citometrie în flux sau Imunohistochimie acestea fiind printre cele mai des întâlnite abordări analitice. Chiar dacă multe dintre metodele analitice menționate anterior pot fi folosite și pentru descoperirea de noi biomarkeri, putând fi folosite pentru analiză în panel sau de tip multiplex, noi alternative analitice sau cel puțin complementare încep să-și găsească locul în laboratorul clinic. În această categorie, merită a fi menționate cromatografia de lichide cuplată cu spectrometria de masă în tandem (LC-MS/MS) sau electroforeza capilară cuplată cu spectrometria de masă în tandem CE-MS/MS).

Cromatografia de lichide cuplată cu spectrometria este o metodă analitică performantă fiind caracterizată de înaltă specificitate și sensibilitate. Specificitatea metodei este asigurată pe de-o parte de capacitatea de separare a analiților la nivelul coloanei cromatografice iar pe de altă parte, specificitatea este asigurată de către capacitatea spectrometrului de masă de a putea măsura rapoartele masă per sarcină a moleculelor care eluează de la nivelul coloanei și care sunt trimise către spectrometru de masă. La acestea se adaugă înalta specificitate a proceselor de fragmentare a moleculelor la nivelul celulei de coliziune cu urmărirea tranzițiilor specifice de tip ion molecular precursor-ion fiică obținut în urma fragmentării în cadrul experimentelor în tandem.

Partea de contribuții personale a tezei de doctorat este structurată în patru studii diferite, corespunzătoare diferitelor tipuri de biomarkeri/molecule implicați(te) în anumite patologii. Astfel, partea experimentală poate fi privită din două perspective diferite. Prima perspectivă este conturată bazându-se pe diferitele patologii în care sunt implicați anumiți biomarkeri în timp ce de-a doua perspectivă, mult mai pronunțată, se bazează pe inovarea în ceea ce privește abordările analitice, managementul probelor, protocoale de procesare a probelor pentru analiți care aparțin diferitelor clase biochimice și anume: iohexol-moleculă hidrofilă, de masă moleculară mică, xenobiotic; hormonii tiroidieni (TH)-molecule hidrofobe de masă moleculară mică, molecule

endogene; bradykinina umană alături de două fragmente moleculare alese drept molecule peptidice cu masă moleculară intermediară și NGAL drept moleculă endogenă proteică cu masă moleculară mare. Noi sisteme de microprelevare de ultimă generație de tip VAMS (Sisteme de microprelevare volumetrică bazate pe absorbție) capabile de a preleva cu acuratețe volume de sânge capilar de 10 sau 20 μL sau sisteme HemaPEN capabile de a preleva cu acuratețe patru replicări a câte 2.74 μL de sânge capilar au fost folosite pentru analiza iohexolului și a Hormonilor tiroidinei în contextul unor diferite patologii. Comportamentul cromatografic și de fragmentare a peptidelor a fost studiat prin utilizarea bradykininei umane și a două dintre fragmentele sale. Acest studiu a reprezentat o punte între analiza compușilor cu masă moleculară mică și analiza compușilor cu masă moleculară mare-proteine. În final, o nouă metodă asistată de LC-MS/MS folosind principiile proteomicii la țintă și o abordare de tip “bottom-up” (de jos în sus) a fost dezvoltată pentru analiza NGAL (Neutrophil Gelatinase Associated Lipocalin) în plasma umană.

Primul studiu a fost centrat pe analiza LC-MS/MS a iohexolului din sânge întreg în contextul măsurării ratei de filtrare glomerulară pentru evaluarea bolii cronice renale. Iohexolul a fost analizat din probe de sânge prelevate cu ajutorul sistemelor de prelevare VAMS și HemaPEN. Pentru aceasta, diferite tipuri de sub-studii au fost realizate. O nouă metodă LC-MS/MS pentru iohexol și un nou protocol de preparare a probelor și de extracție a iohexolului din VAMS și HemaPEN au fost dezvoltate. După această etapă, studii cu privire la stabilitatea iohexolului pe termen scurt și mediu în probe prelevate de tip VAMS, stabilitatea iohexolului în probe prelucrate și stocate sub formă de extracte în congelator la $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ cât și stabilitatea iohexolului în solventul final de analiză în autosampler au fost derulate. Pentru o evaluare critică a impactului procesului de prelucrare a probei asupra proceselor de ionizare-detectie cât și asupra proceselor de regăsire totală și a variabilității pe diferite domenii de concentrații, au fost derulate studii de efect de matrice, eficiența procesului și de determinare a procentelor de extracție. Studiile asupra sistemelor HemaPEN au fost conduse în vederea evaluării posibilității de analiză a iohexolului dintr-un volum redus de sânge capilar de 2.74 μL (HemaPEN). Iohexolul a putut fi analizat cu acuratețe și încredere din probe prelevate cu ajutorul HemaPEN, evaluând și comparând în același timp procentele de extracție față de cele obținute cu ajutorul sistemelor de tip VAMS. Studiile au fost continuate cu validarea întregului proces analitic pentru sistemele de tip VAMS și testarea întregului proces analitic în vederea evaluării unui profil farmacocinetic a iohexolului administrat in-bolus, folosind probe reale prelevate cu ajutorul VAMS. Per total, întregul studiu subliniază posibilitatea analizării iohexolului dintr-un volum de sânge capilar de 10 μL sau chiar mai puțin (2.74 μL) obținut printr-o puncție a degetului și posibilitatea stabilirii ratei de filtrare glomerulară în vederea evaluării statusului din boala cronică renală.

Al doilea studiu a fost focalizat asupra analizei LC-MS/MS a hormonilor tiroidieni (totalul de T3, rT3 și T4 sau „fracția totală”) în contextul evaluării funcției tiroidiene. Hormonii tiroidieni au fost analizați în premieră folosind sisteme de microprelevare de tip VAMS (20 μL) și HemaPEN (2.74 μL). Studiile au demarat cu dezvoltarea unei metode LC-MS/MS de analiză a TH urmată de conceperea și dezvoltarea unui protocol de procesare și extracție a TH din probe prelevate cu ajutorul VAMS și HemaPEN. Consecutiv acestei etape, studii cu privire la stabilitatea hormonilor tiroidieni au fost derulate: studii de stabilitate pe termen scurt și mediu a TH în probele de tip VAMS; studii de stabilitate a hormonilor tiroidieni în probe procesate sub formă de extracte stocate la congelator la $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ cât și studii de stabilitate a TH stocate în autosampler, în solventul final de injectare. Pentru toți cei trei hormoni tiroidieni, studii cu privire la efectul de

matrice, evaluarea ratelor de extracție cât și a eficienței procesului au fost derulate. Studiile cu privire la posibilitatea analizării TH din probe de sânge prelevate cu ajutorul HemaPEN au arătat faptul că 2.74 μ L sunt suficienți pentru analiza și cuantificarea totalul hormonilor tiroidieni. Astfel, studiile de efect de matrice și calculul ratelor de extracție din probele de tip HemaPEN au arătat faptul că efectele de matrice sunt mai mari-implicit supresia de ionizare mai redusă-pentru TH analizați din probe prelevate cu ajutorul HemaPEN comparativ cu probele de tip VAMS. După evaluarea performanțelor analitice conform criteriilor FDA, folosind întregul protocol, s-au evaluat nivelurile endogene de TH (T3 și T4) din probe reale caracterizate de status eutiroidic. Într-adevăr, nivelele măsurate de TT3 și respectiv TT4 s-au dovedit a se încadra în limitele plasmatică fiziologice pentru cei doi hormoni tiroidieni. Astfel, cel de-al doilea studiu, confirmă abilitatea utilizării sistemelor de microprelevare de tip VAMS și HemaPEN pentru cuantificarea “fracției” totale de TH din sânge capilar.

Cel de-al treilea studiu a avut drept scop sublinierea impactului unor parametri cromatografici asupra procesului de separare a peptidelor. Știind faptul că peptidele sunt molecule cu masă moleculară intermediară, între compuși cu masă moleculară mică și cei cu masă moleculară mare (proteine) se consideră faptul că atunci când separarea se bazează pe mecanisme de separare în fază inversă, peptidele tind mai degrabă să se adsoarbă la nivelul fazei staționare comparativ cu partiția între faza staționară și faza mobilă pe care moleculele mici o comportă. Impactul temperaturii de separare cât și a pantei gradientului de eluție a fazei mobile asupra selectivității a fost studiat și s-a dovedit faptul că influența acestor doi parametri se află în strânsă corelare cu anumiți descriptori, la rândul lor corelați cu proprietăți fizico-chimice ale peptidelor cum ar fi indexul de hidrofobicitate, indicele Gravy s.a. În ceea ce privește comportamentul bradikinenlor la nivelul spectrometrului de masă, s-a observat faptul că bradykinina umană generează după fragmentare ioni moleculari de abundență redusă, cel mai intens fragment corespunzând unui ion b_1 de tip “immonium” provenit de la prolină sau a unui ion provenit de la arginină cu sarcină electrică dublă. Și celelalte două fragmente peptidice generează fragmente-ioni moleculari de tip b la nivelul celulei de coliziune. Într-adevăr, toate cele trei peptide analizate au fost separate la nivelul liniei de bază dovedind și faptul că precipitarea sărurilor și a proteinelor din probe urinare nu au un impact substanțial asupra regisirii totale a fiecăreia dintre cele trei peptide.

Al patrulea studiu s-a axat pe demonstrarea aplicabilității analizei proteinei NGAL având la bază principiile proteomicii la țintă folosind abordarea de tip bottom-up, utilizând o proteină surogat marcată izotopic drept standard intern, totul asistat de o platformă analitică de tip LC-MS/MS. Acest studiu a fost derulat în contextul utilizării NGAL drept biomarker pentru decelarea instalării insuficienței renale acute. În primul rând, simulări ale digestiei enzimatice *in silico* au fost realizate pentru forma naturală a NGAL, forma sintetizată-recombinată genetic a NGAL cât și a proteinei surogat marcată izotopic folosită drept standard intern. Acest studiu a ajutat la stabilirea peptidelor ce pot fi obținute teoretic în urma digestiei enzimatice cu tripsină și la alegerea unor peptide unice-trasor pentru proteina țintită. Astfel două peptide trasor SYP și respectiv SYN au fost alese. În urma sintezei celor două peptide, o nouă metodă LC-MS/MS a fost dezvoltată folosind o coloană cromatografică dedicată separării peptidelor. Consecutiv, un protocol de extracție în fază solidă (SPE) bazat pe o fază staționară de tip schimbător slab de anioni a fost dezvoltat pentru izolarea peptidelor din digest de plasmă bovină și pentru prelucrarea digestelor de plasmă. Într-o etapă ulterioară a fost dezvoltat un protocol de digestie

enzimatică pentru NGAL și proteina surogat marcată izotopic în vederea evaluării ratei totale de digestie, a variabilității procesului cât și cu scopul de a genera o cantitate cât mai mare a peptidelor trasor. Acestei etape i-a succedat validarea analitică a întregului proces *digestie enzimatică-SPE-analiză LC-MS/MS* ce fost validat conform normelor FDA, urmând ca mai apoi să fie testat pe probe de plasmă reale folosind un grup control și un grup de studiu. În grupul de studiu au fost incluse probe provenite de la subiecții cu diferite comorbidități pentru care erau așteptate nivele ridicate ale NGAL. Într-adevăr metoda nou dezvoltată a putut discrimina din punct de vedere statistic ($p < 0,05$) grupul control de grupul studiu pe baza valorilor determinate ale NGAL. Astfel noua abordare bazată pe proteomica la țintă asistată de LC-MS/MS folosind un standard intern de tip proteină surogat marcată izotopic a fost capabilă a fi utilizată pentru analiza NGAL în plasma umană.

În concluzie, LC-MS/MS este o metodă analitică versatilă, ce poate fi utilizată pentru diferite tipuri de analiți în diferite contexte clinice. Într-adevăr, automatizarea analizoarelor folosite în analiza de rutină în cadrul laboratorului clinic oferă avantajul obținerii rezultatelor într-un timp relativ scurt, randament și debit a unui număr mare de probe reducând astfel și costul total per analiză. Totuși, LC-MS/MS începe să-și găsească tot mai mult locul în laboratorul clinic reprezentând o alternativă viabilă și oferind în același timp și complementaritate.