

# Význam analýzy lipidů pro klinickou praxi

M. Vecka

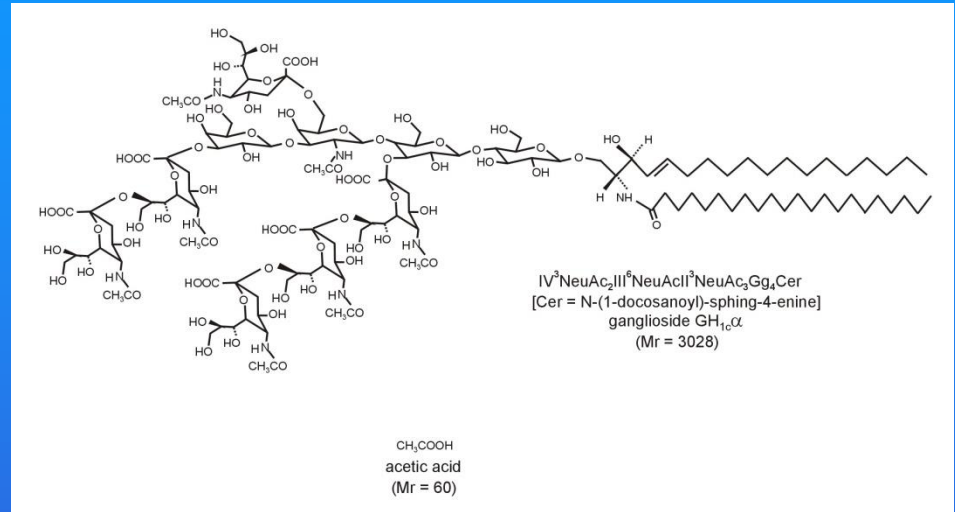
*IV.interní klinika a CVL ÚLBLD*

*1. LF UK a VFN v Praze*

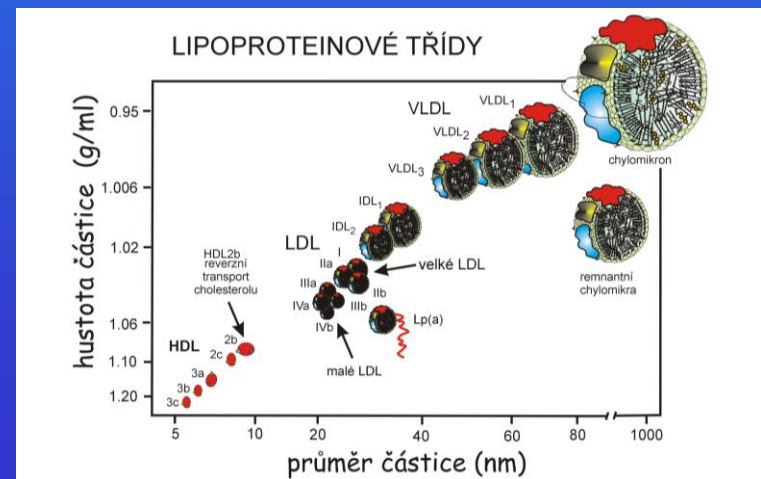
# LIPIDY

## Definování „lipidů“

- lipidové molekuly  
(malé vs. veliké)

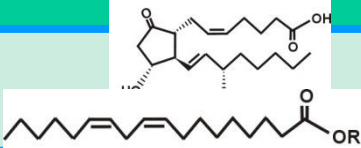
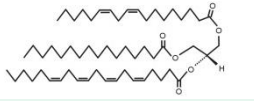
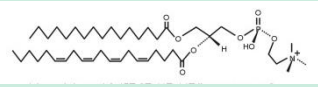
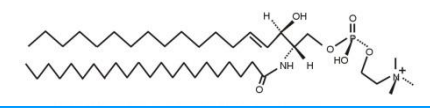
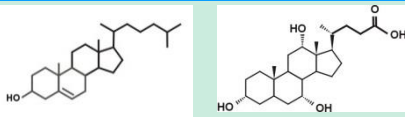
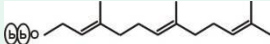


- lipidy jako součást supramolekulárních struktur  
(lipoproteinové částice)



# KLASIFIKACE LIPIDŮ

- podle molekulární struktury

Lipidová třída	Zkratka	N známých struktur
Acyly mastných kyselin 	FA	8231+1792
Glycerolipidy 	GL	288+7379
Glycerofosfolipidy 	GP	1676+8312
Sfingolipidy 	SP	1707+3176
Sterolové lipidy 	ST	3130
Prenolové lipidy 	PL	1553
Jiné- sacharolipidy, polyketidy	SL, PK	32+1294/69 98

# ANALÝZY LIPIDŮ

– historická perspektiva

jednoduchý

I Dělení lipidových tříd

1890

chemické  
reakce

NEFA

TC

PL

TAG

sfingolipidy

1965

enzymová  
katalýza

1973

analytický přístup

složitý

# LIPIDY & KLINICKÁ PRAXE

## Základní parametry

### Pouze lipidové třídy

nejsou konkrétní molekuly

TC TAG NEFA

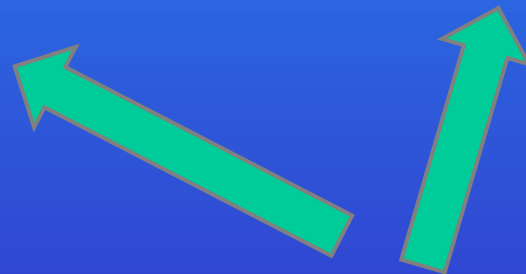


pouze sumace metabolických efektů

- rizikové faktory kardiometabolických onemocnění
- hodnocení dyslipidémie  
primární x sekundární

### Lipoproteiny

transportní děje pro lipidy v cirkulaci



LDL-C HDL-C Lp(a)

# ANALÝZY LIPIDŮ

– historická perspektiva

jednoduchý

analytický přístup

1890

chemické reakce

**I Dělení lipidových tříd**

NEFA

TC

PL

TAG

sfingolipidy

1965

enzymová katalýza

1973

1932

elektroforéza

**II Dělení lipidových podtříd**

**I Dělení lipoproteinů**

FC x  
CE

TAG x  
DAG/MAG

PC x  
PS

Cer x SPH  
x Gg

LDL  
VLDL  
HDL

1990

imunochemie

1910

UC

1950

chromatografie

2000

NMR

složité

# LIPIDY & KLINICKÁ PRAXE

## Pokročilé parametry I

### Lipidové podtřídy FA, ST

někdy i konkrétní molekuly

analýzy pokročilejšími technikami (GC, ELISA, elfo)

podrobnější pohled na metabolické děje



- *patogeneze některých onemocnění*

*ICHS, MetSy, DM, NAFLD*

*endokrinnologické poruchy*

*identifikace původců onemocnění*

**FA BA celkové/profil**

**steroidní hormony**

**FA profily - bakteriální kmeny**

### Subfrakce lipoproteinů

oxidační děje pro lipidy v cirkulaci **LDLox sdLDL**

metabolismus HDL částic (RCT, fce) **sdLDL HDL<sub>2b,2c,3a,3b,3c</sub>**

# LIPIDY & KLINICKÁ PRAXE

## Pokročilé parametry I

### Lipidové podtřídy PL

konkrétní molekuly (cílené analýzy)

*Lamari 2012*

aktivace destiček

PAFAH

*Lu 2015*

vlastnosti plicního surfaktantu

diPA-PC (majoritní)

mitochondriální poruchy

- Barthův sy

tetraLA-DPG

*Houtkooper 2009*

nutrice, farmakologie

- kontrola formulace lipozómů

PL nanočástice

*Maritim 2021*

### Lipidové podtřídy SL

střádavé choroby - lyzosomální poruchy

glykosfingolipidy

*Platt 2014*



# ANALÝZY LIPIDŮ

– historická perspektiva

jednoduchý

analytický přístup

1890

chemické reakce

## I Dělení lipidových tříd



1965

enzymová katalýza

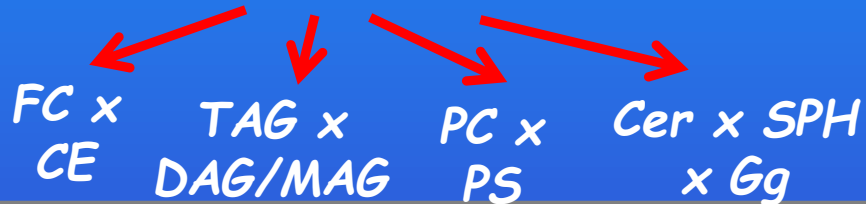
1973

## II Dělení lipidových podtříd

## I Dělení lipoproteinů

1932

elektroforéza



1990

imunochemie

1910

TLC UC

1950

GC HPLC chromatografie

## III Jednotlivé lipidové molekuly

## II Subfrakce lipoproteinů

2000

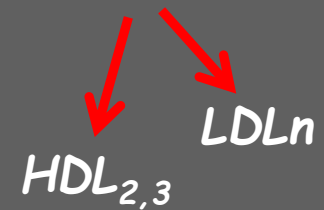
NMR

FA 18:1n-9c/t

PC 18:1\_20:0

PC 18:1/20:0

TAG 18:1/18:1/20:0



složitý

# LIPIDOMIKA

genotyp

„omika“

analytický prostor

genomika



30-60 tis.  
genů



transkriptomika



150-300 tis.  
transkriptů



proteomika



300-1000 tis.  
proteinů



metabolomika

- glykomika
- lipidomika



tisíce  
lipidů

fenotyp

# LIPIDOMIKA

## Výzvy lipidomiky

### Izomery lipidových molekul - hlavně díky FA

- poziční izomerie (n-3 vs. n-6)
- geometrická izomerie (*cis-* vs. *trans-*)
- regioizomery (1,3-DAG vs. 2,3-DAG, OOP vs. OPO)
- konstituční izomerie řetězců (16:0+20:0 vs. 18:0+18:0)
- „Izobary“ (PC 36:1 vs. PS 36:2)

### Analýza signálu

- „příliš“ mnoho informací

### Space analysis

- zobrazovací techniky
- buněčná/subcelulární lokalizace lipidů

### Klinické využití lipidomiky

- zvýšení množství analyzovaných vzorků

# LIPIDY & KLINICKÁ PRAXE

## Pokročilé parametry II

### Lipidy na molekulární úrovni

vždy konkrétní molekuly

analýzy pokročilými „high-end“ technikami (GC/LC-MS, NMR)  
podrobnější pohled na metabolické děje

1. metabolické dráhy lipidů (hledání změn)



2. patogeneze onemocnění (hledání regulátorů) steroidní hormony  
peroxisomální poruchy  
vrozené metabolické poruchy

molekulární „druh(y)“ lipidů  
= biomarker onemocnění?

biosyntéza cholesterolu  
EFA deficiencie

### Subfrakce lipoproteinů

oxidační děje pro lipidy v cirkulaci  
redistribuce lipidů mezi subfrakcemi  
(odpověď na patofyziologický děj)

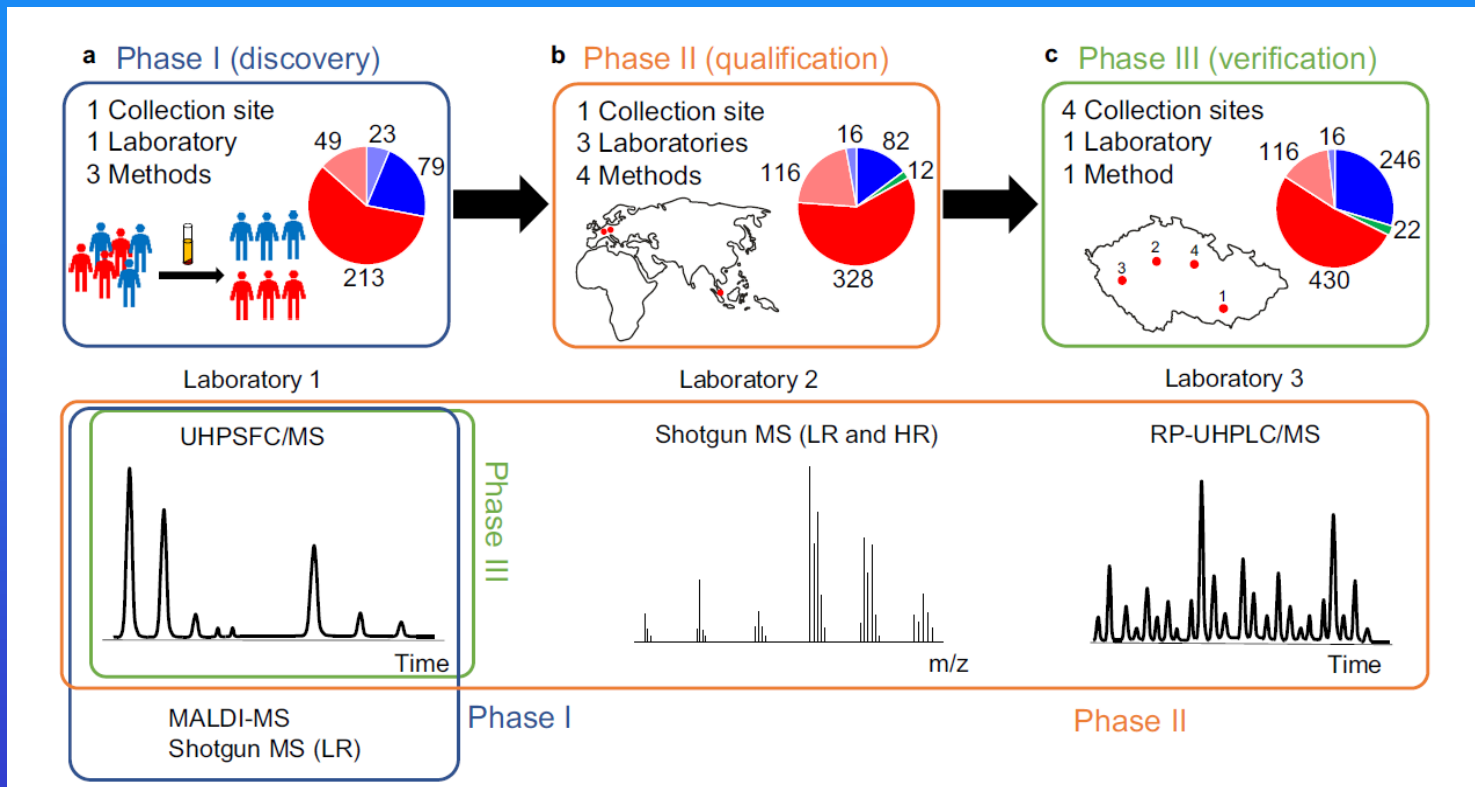
LDL<sub>1-7</sub>, IDL, VLDL

HDL<sub>1-10</sub>

# LIPIDY & KLINICKÁ PRAXE

## Pokročilé parametry II

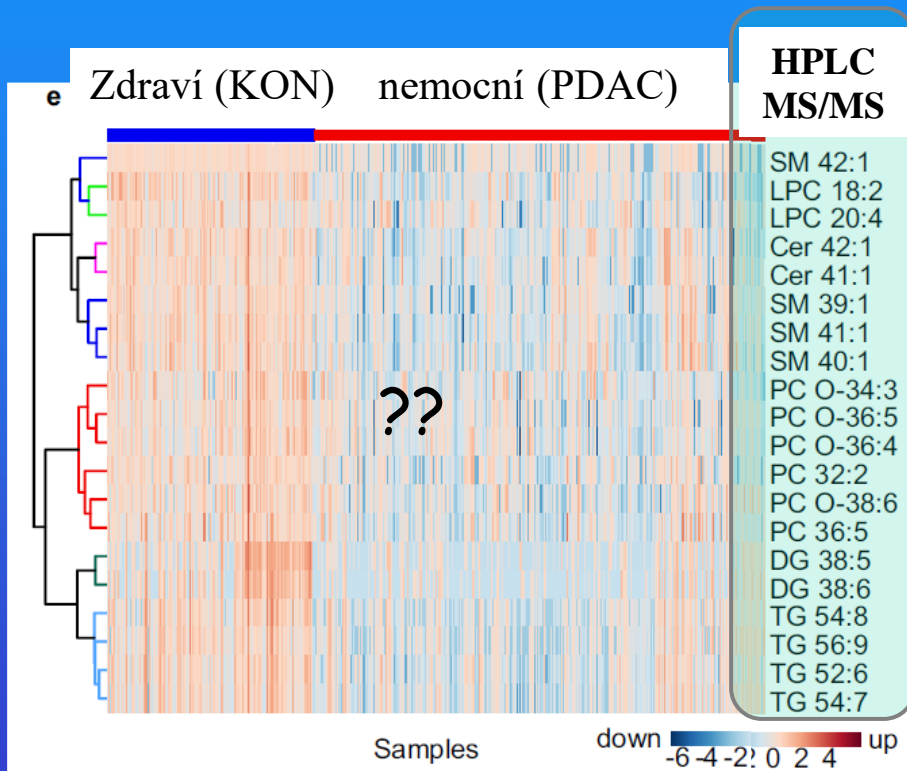
### Lipidy na molekulární úrovni - hledání biomarkerů



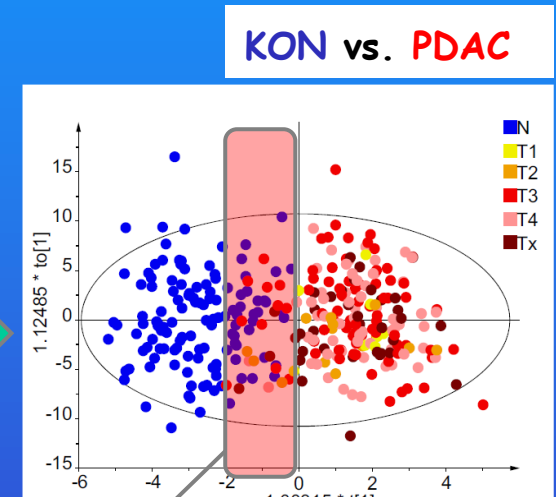
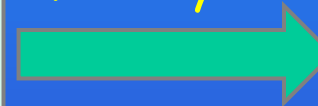
# LIPIDY & KLINICKÁ PRAXE

## Pokročilé parametry II

### Lipidy na molekulární úrovni - onkologické biomarkery



pokročilé statistické metody



riziko?

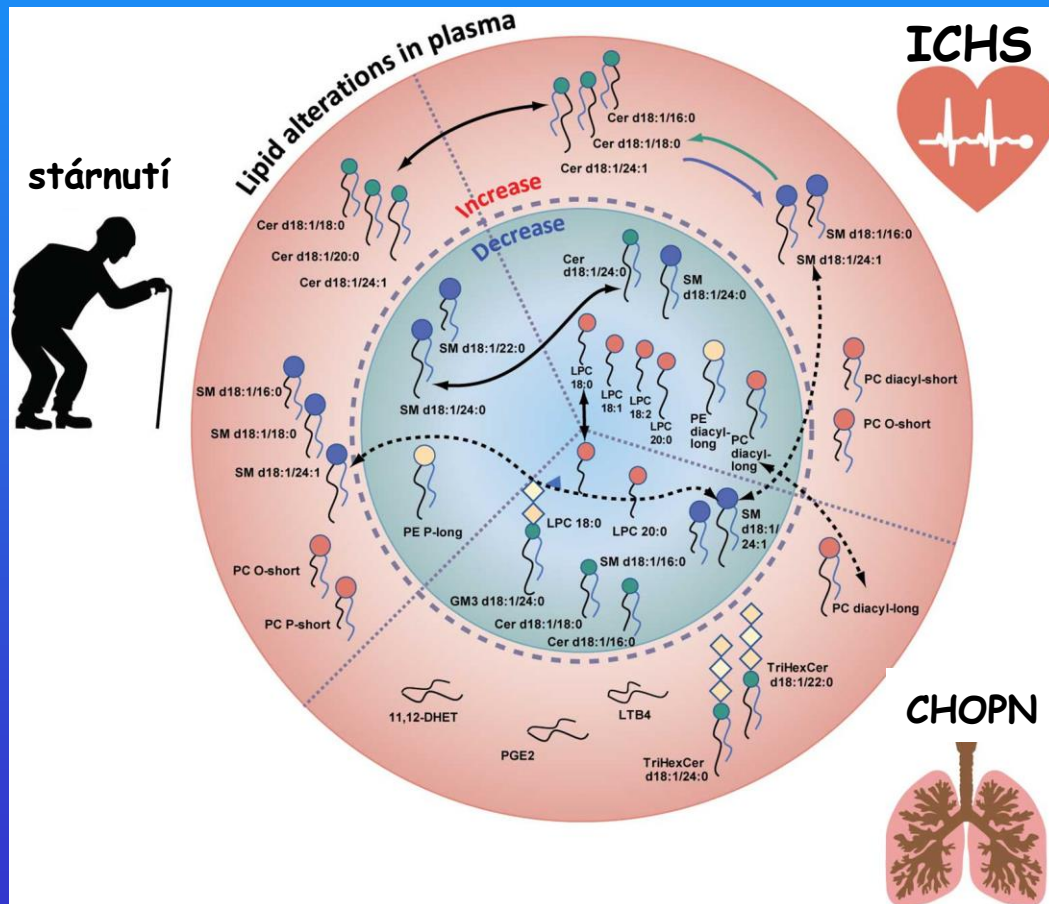


verifikace na dalších souborech

# LIPIDY & KLINICKÁ PRAXE

## Pokročilé parametry II

### Lipidy na molekulární úrovni - identifikace rizika



monitorování  
stavu

# Klinické využití lipidomiky

## Lipidy na molekulární úrovni

Relativní dostupnost LC/MSMS platformem  
+ snížená operační náročnost



## Komerční kity pro stanovení vybraného spektra analytů

- acylkarnitiny (kity pro neonatální screening) **Sciex 2015**
- fosfolipidy, ceramidy (metabolomické kity) **Biocrates 2014**
- steroidní hormony (+ metabolomické kity) **ChromSystems 2018**  
**Biocrates 2011**
- sekosteroly (skupina vit D<sub>3</sub>) **PerkinElmer 2015** **Sciex 2017** **Zivak 2018**
- profil žlučových kyselin **Biocrates 2017**
- vitamíny rozpustné v tucích (A+D<sub>2</sub>/D<sub>3</sub>+E+K<sub>1</sub>) **Zivak 2022**



# NMR

## Lipidomické analýzy

stanovování lipidových tříd (FC, TAG, PL)  
pro PL výhodou  $^{31}\text{P}$  NMR  
meze detekce vysoké (mM-100 $\mu\text{M}$ )

## Klinický systém NMR

### 1. systém Vantera

profil lipoproteinů (! FDA)

400 MHz  $^1\text{H}$

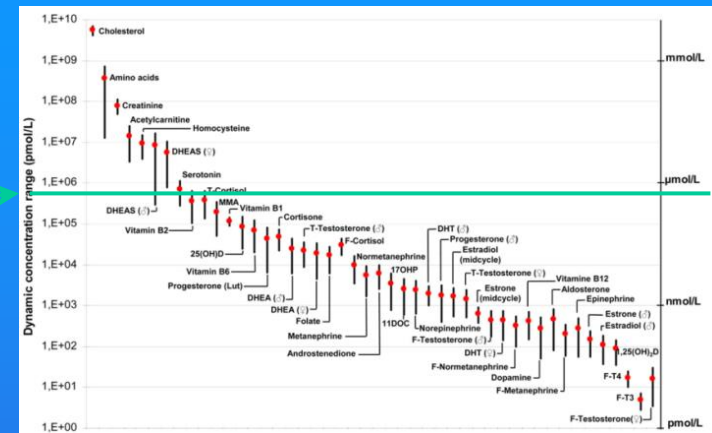
obsah TAG, PL, FC, apoB v jednotlivých subfrakcích VLDL, IDL, LDL, HDL

### 2. klinické analyzátory

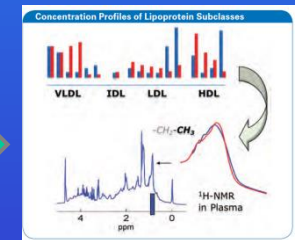
600 MHz  $^1\text{H}$

patentován pro USA

hlavně TMAO (trimethylamin-N oxid) pro CVD risk



*Fernando 2012, Pikula 2015*

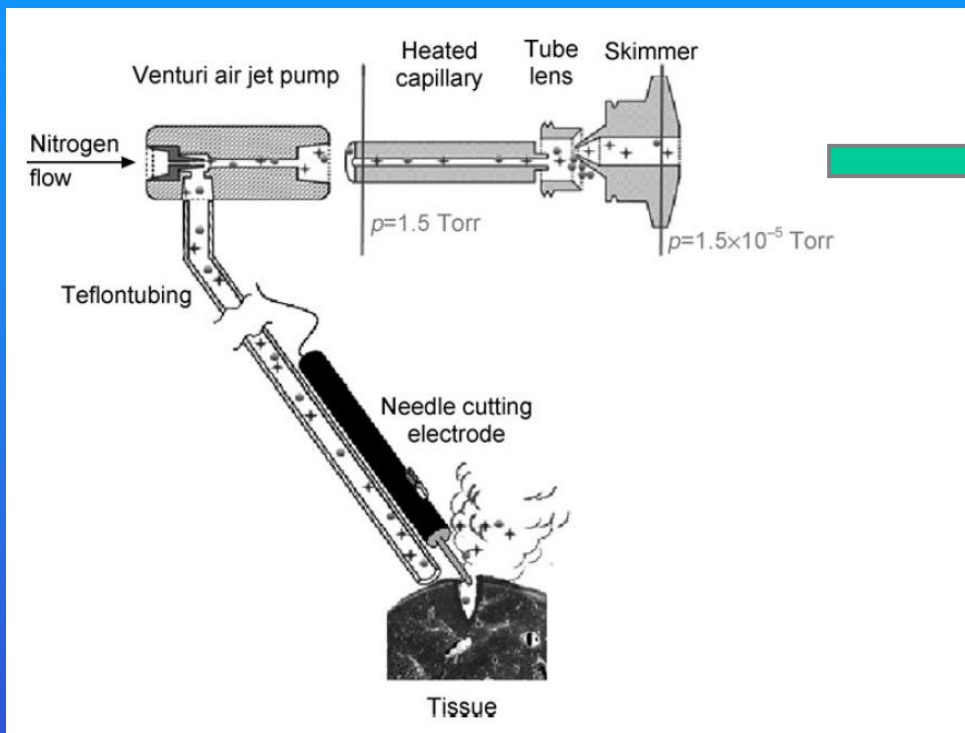


Parameters obtained by  $^1\text{H}$ -NMR Analysis

	Triglyceride	Cholesterol	Free Cholesterol	Phospho-lipids	Apo-A1	Apo-A2	Apo-B
PLASMA	✓	✓	✓	-	✓	✓	✓
VLDL, VLDL-1 ... -6	✓	✓	✓	✓	-	-	✓
IDL	✓	✓	✓	✓	-	-	✓
LDL, LDL-1 ... -6	✓	✓	✓	✓	-	-	✓
HDL, HDL-1 ... -4	✓	✓	✓	✓	✓	✓	-

*Otvos 2012, Otvos 2014*

# MS imaging

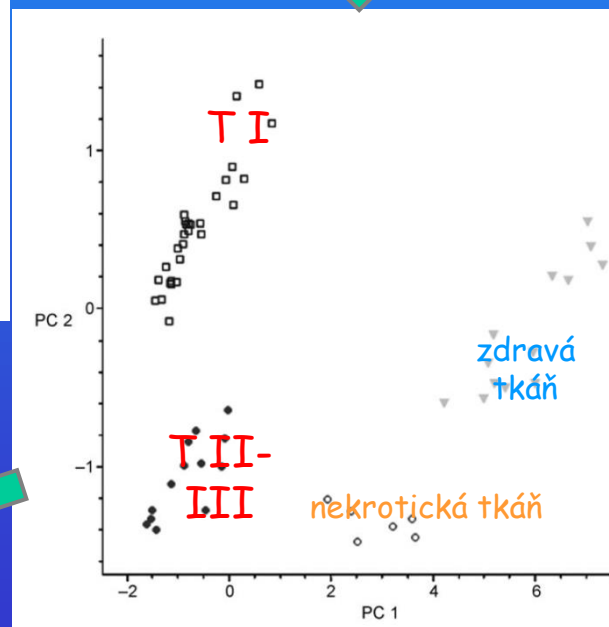


nádor  
prsu

chirurgické metody

system  
identifikace tkáně

Compound	Fatty acids
<i>Positive ion mode</i>	
phosphatidyl cholines (PC)	16:0,16:1,18:1, 18:2, 20:4,20:2, 20:3 22:6
phosphatidyl ethanolamines (PE)	14:0, 16:0, 16:1, 18:1, 18:2, 20:4, 20:2, 20:3 22:6
sphingomyelins (SM)	18:0, 18:1, 20:4, 22:6
triglycerides (NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> adducts)	16:0, 16:1, 18:1, 18:2, 20:4, 20:2, 20:3 22:6
<i>Negative ion mode</i>	
fatty acids	2:0, 3:0, 4:0, 8:0, 8:1, 10:0, 10:1, 12:0, 12:1, 14:0, 14:1, 16:0, 16:1, 18:0, 18:1, 18:2, 20:2, 20:3, 20:4, 22:6
phosphatidyl ethanolamines (PE)	14:0, 16:0, 16:1, 18:1, 18:2, 20:4, 20:2, 20:3 22:6
phosphatidyl ethanolamines (NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> adducts)	identical to PE
phosphatidyl cholines (PC)	16:0, 16:1, 18:1, 18:2, 20:4, 20:2, 20:3 22:6
phosphatidyl inositols (PI)	16:0, 18:0, 20:4
sulfatides	16:0, 18:1, 20:4
plasmalogens	16:0, 18:1
phosphatidic acids	16:0, 18:1, 18:0



Schafer 2009

# ZÁVĚREM

## Analýzy lipidů v klinické praxi

A. Množství/počet analyzovaných vzorků

B. Rozvoj nových technik

- NMR-MS

- (ionizace)-HPLC-MS/MS/MS

C. Rychlost/převoditelnost „translational research“

- „cost-effective“ přístup

- interpretace dat

- standardizace výsledků

- personalizovaná medicína

# Poděkování

*Práce podpořena výzkumnými projekty*

*RVO-VFN 64165*

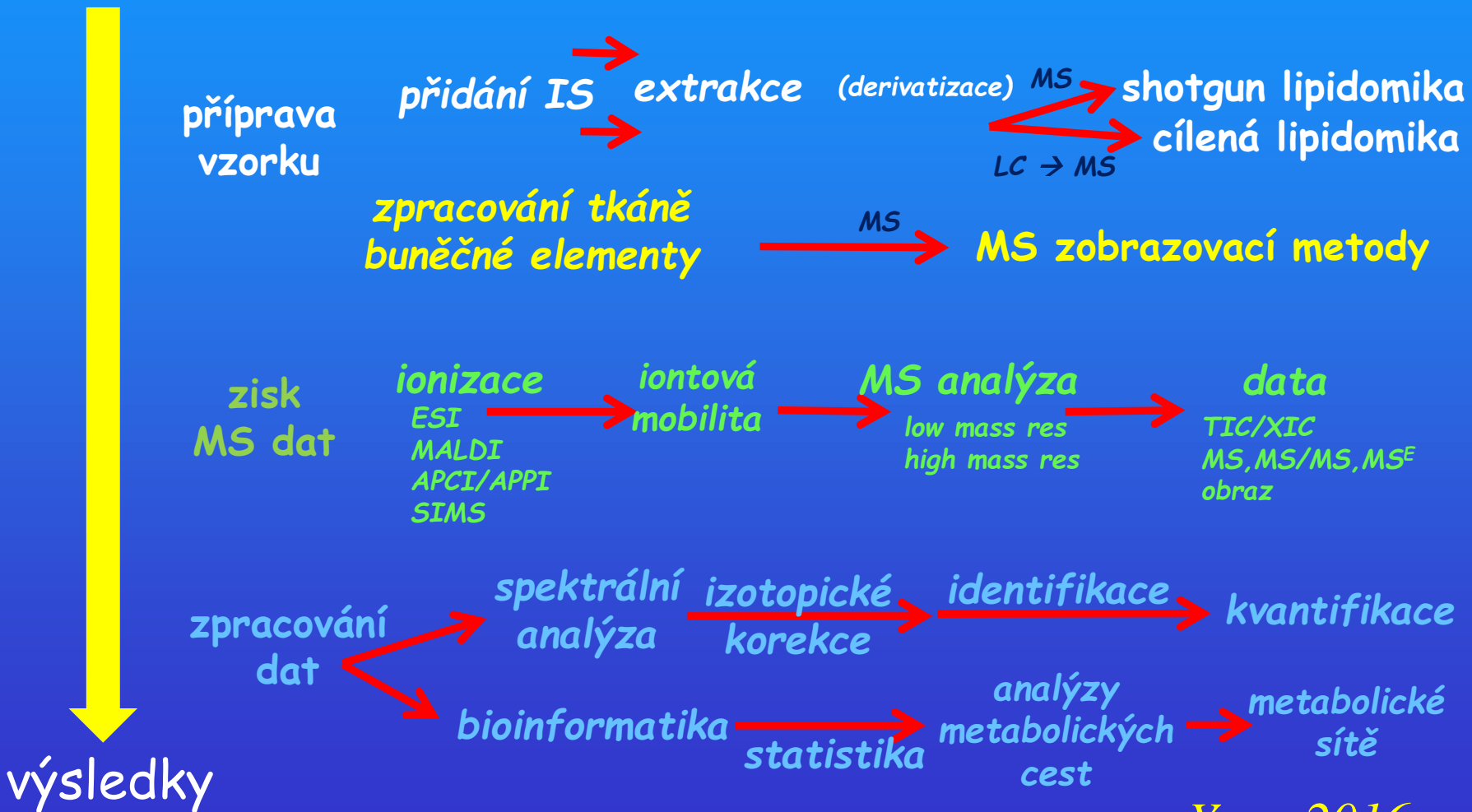
*COOPERATIO*



# LIPIDOMIKA

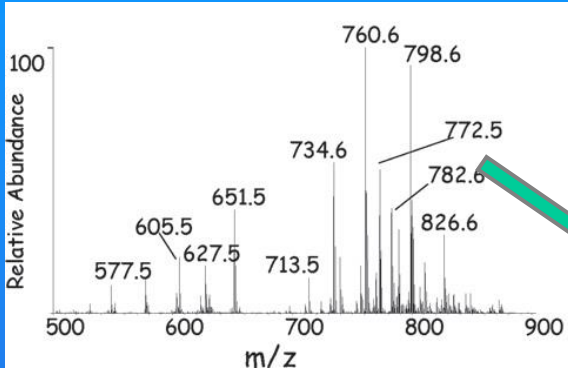
## Metody a postupy lipidomiky

matrice

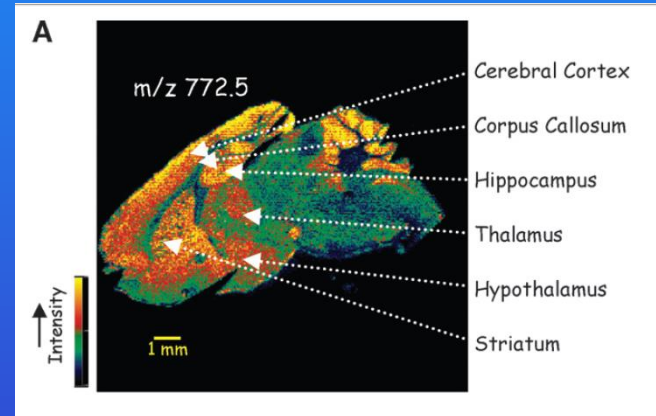
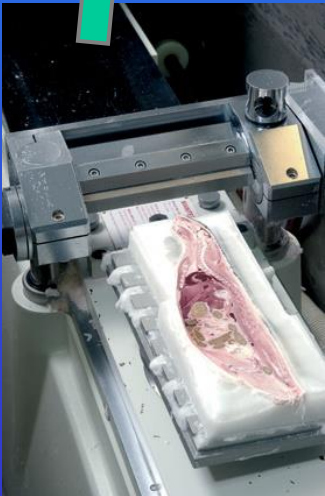


# MS imaging

MALDI-MS



PC 16:a/16:0 + K<sup>+</sup>



# HPLC – NMR - MS

## (HP)LC-NMR

### Hmotnostní detekce spojená s NMR

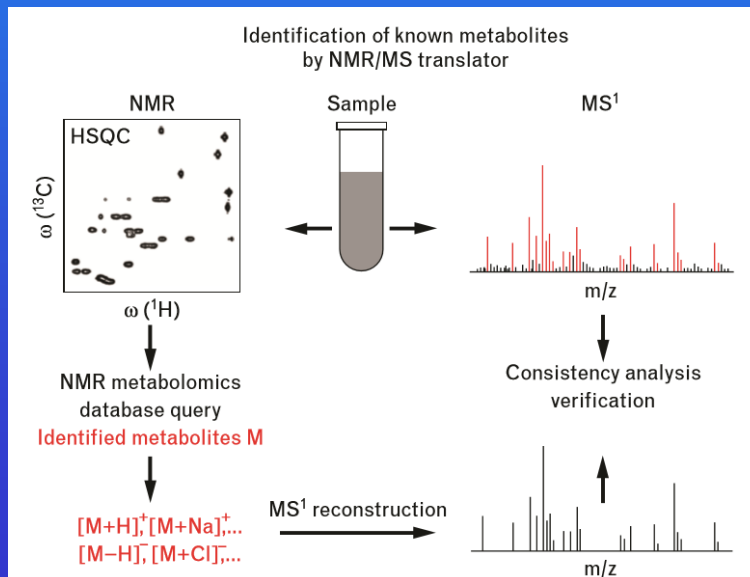
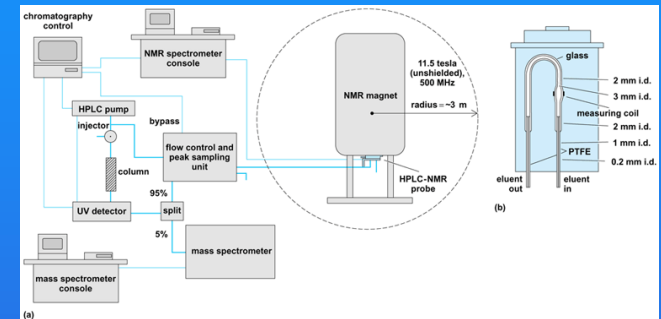
až na přelomu tisíciletí použitelný systém

Výhody

- omezení preanalytické fáze

Nevýhody

- nízká citlivost systému ( $\sim \mu\text{mol/l}$ )
- NMR systém: cena, provoz systému



*Duarte 2008, Cvačka 2012,  
Bingol 2015*



# ANALÝZY LIPIDŮ

– historická perspektiva

jednoduchý

analytický přístup

1890

chemické reakce

1965

enzymová katalýza

1973

1932

elektroforéza

1990

imunochemie

1910

TLC UC

1950

GC HPLC chromatografie

2000

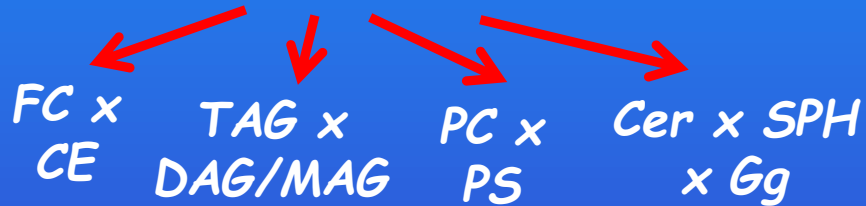
NMR

složité

## I Dělení lipidových tříd



## II Dělení lipidových podtříd



## I Dělení lipoproteinů



## III Jednotlivé lipidové molekuly

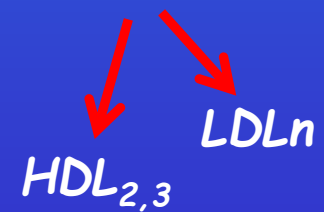
FA 18:1n-9c/t

PC 18:1\_20:0

PC 18:1/20:0

TAG 18:1/18:1/20:0

## II Subfrakce lipoproteinů



# HPLC

## Retenční charakteristiky

- Retenční faktor  $k'$
- Selektivita  $\alpha$
- Účinnost  $N$

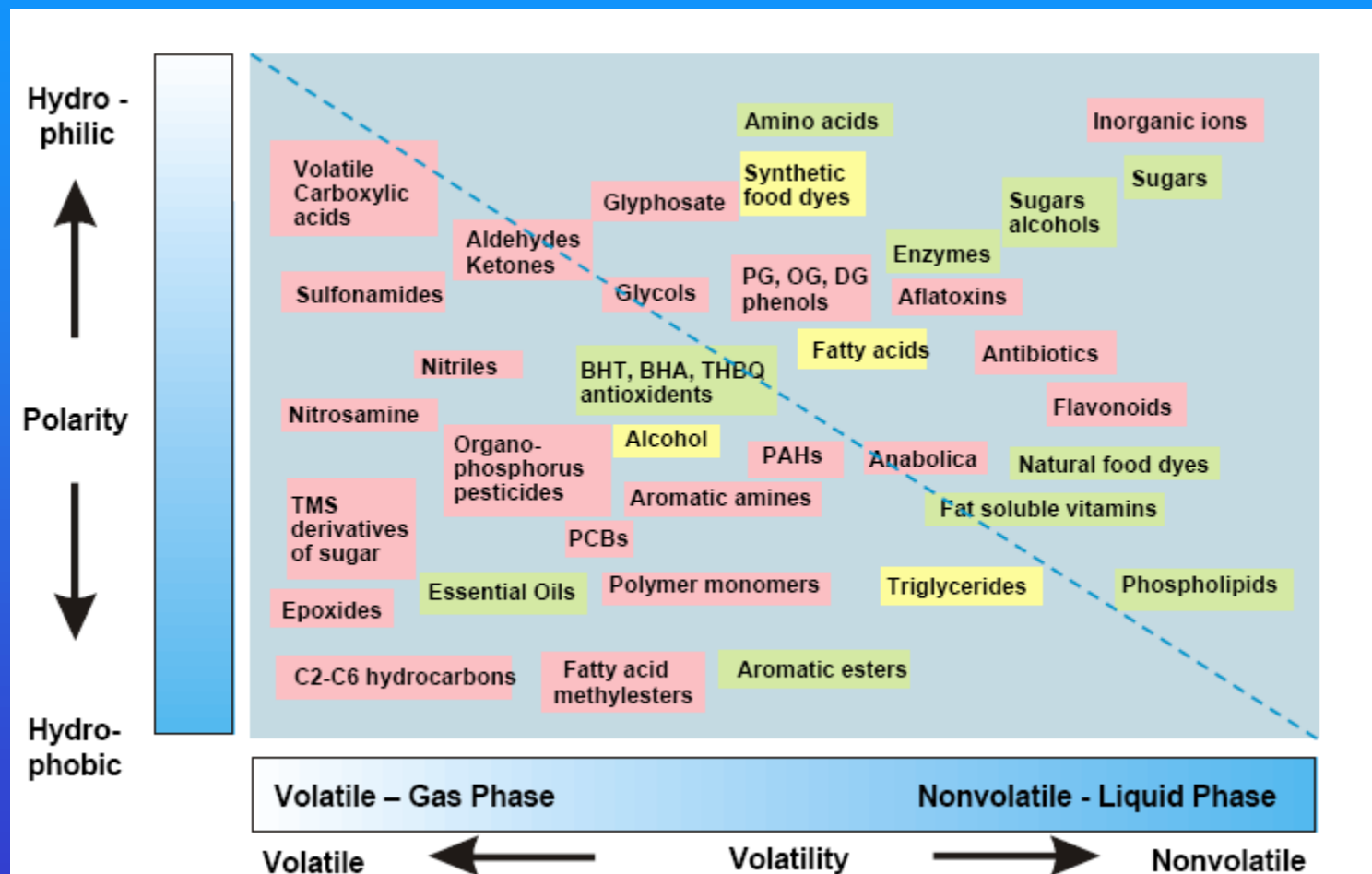
Měřítka separace dvou analytů

$$k' = \frac{V_R - V_0}{V_0}; \quad \alpha = \frac{k'_2}{k'_1}; \quad N = 16 \left( \frac{V_R}{w_b} \right)^2$$

Čas strávený analytem  
ve stacionární/mobilní fázi

Vliv difúze, proměnného toku  
mobilní fáze a neuniformity  
částic stacionární fáze

# HPLC a klinická laboratoř



# HPLC – nové trendy

## Parametry ovlivňující účinnost:

- rychlost toku mobilní fáze **fast HPLC, nano HPLC**
- délka kolony **fast HPLC, 2D HPLC, nano HPLC**
- průměr a distribuce částic stacionární fáze **nové kolony**

## Parametry ovlivňující retenční faktor:

- typ a složení eluentu **high T HPLC**
- typ stacionární fáze **nové kolony**
- vlastnosti analytu **nové způsoby derivatizace**

## Parametry ovlivňující selektivitu:

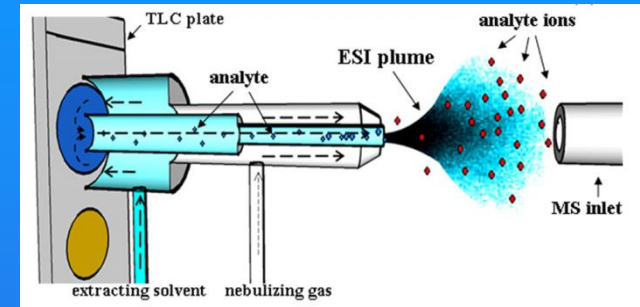
- typ stacionární fáze **nové kolony**
- vlastnosti analytu **nové způsoby derivatizace**
- aditiva v eluentu **nová aditiva**
- teplota **high T HPLC**
- složení eluentu (u ionizovatelných analytů)

# TLC - MS

## Tenkovrstevná chromatografie spojená s MS detekcí

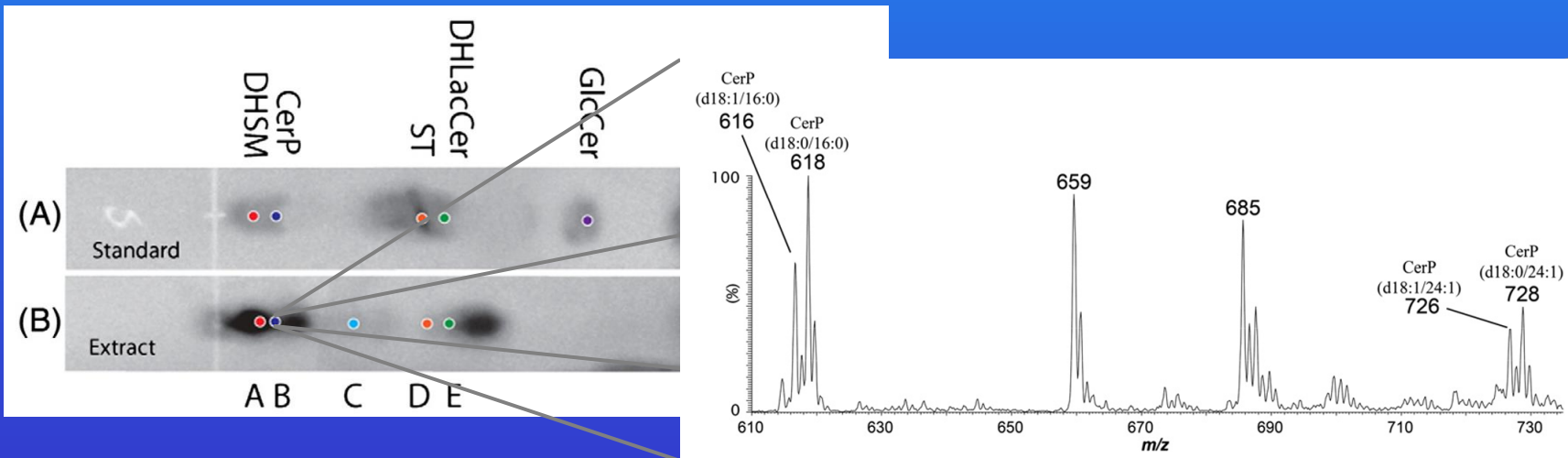
zapojení off-line (zpracování vzorku)

on-line (přímo s MS detektorem)



různé ionizační techniky (MALDI, ESI, DESI)

detekční limit (ESI) cca 20 pg při eluční oblasti 2-4 mm



# LIPIDOMIKA MASTNÝCH KYSELIN

## Plynová chromatografie (GC)

GC(MS) - derivatizace, nelze intaktní lipidové třídy

GC vs GCMS:

GC/FID - variabilita stacionární fáze

- separační účinnost kolon - nejsou problémy s izomery

GC/MS - stabilita stacionární fáze

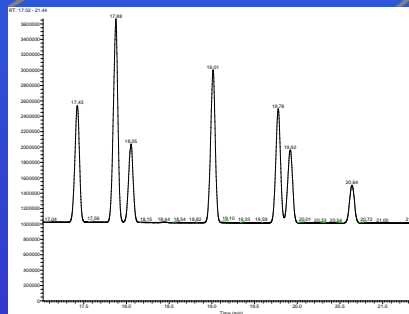
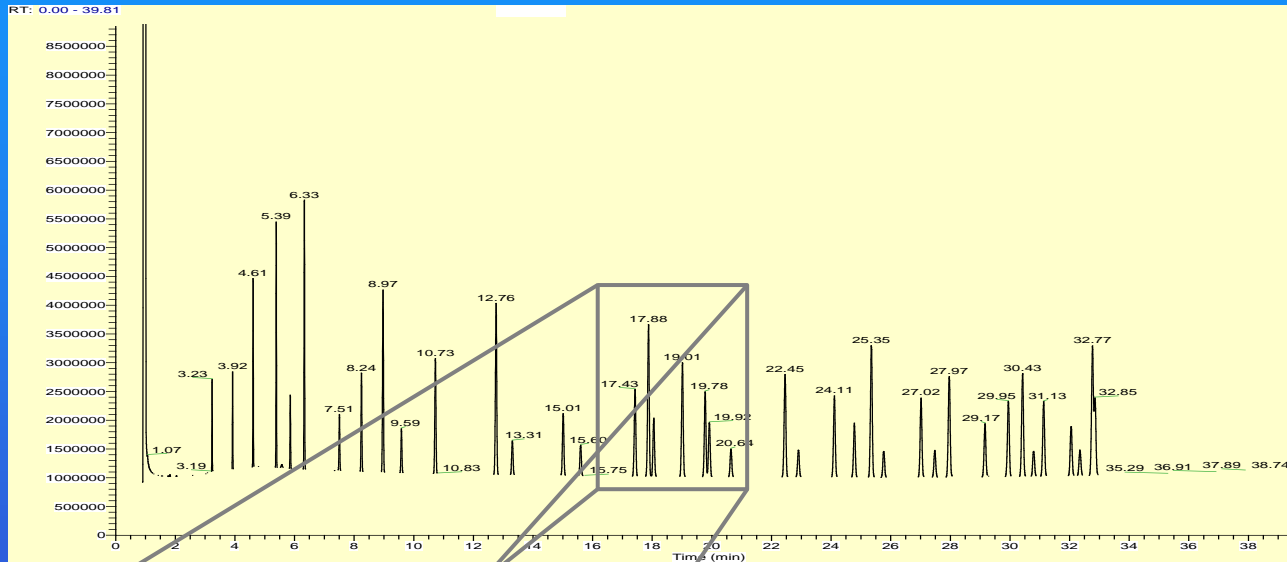
- selektivita detektoru

(FID vs MS vs MS/MS)

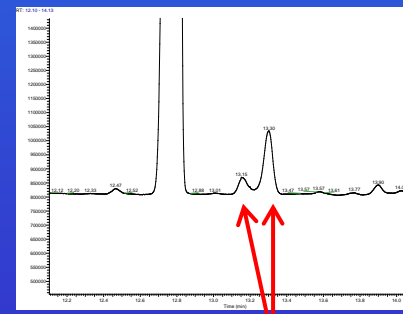
# LIPIDOMIKA MASTNÝCH KYSELIN

## Plynová chromatografie (GC)

GC: - separace lipidových tříd + separace acylů + derivatizace



izomery 18:1, 18:2

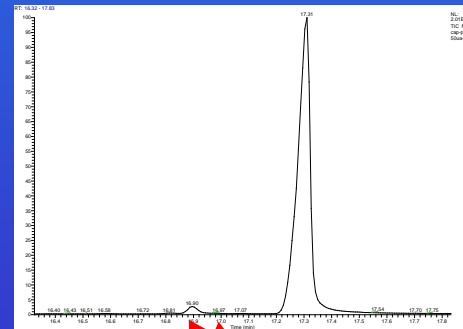
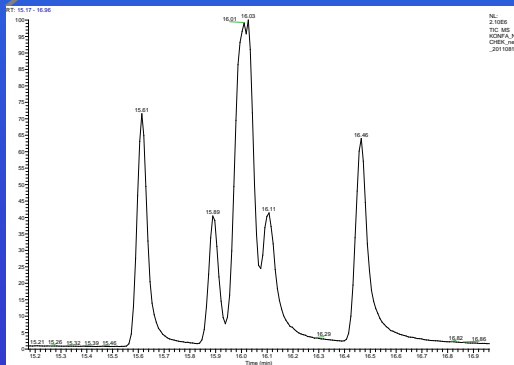
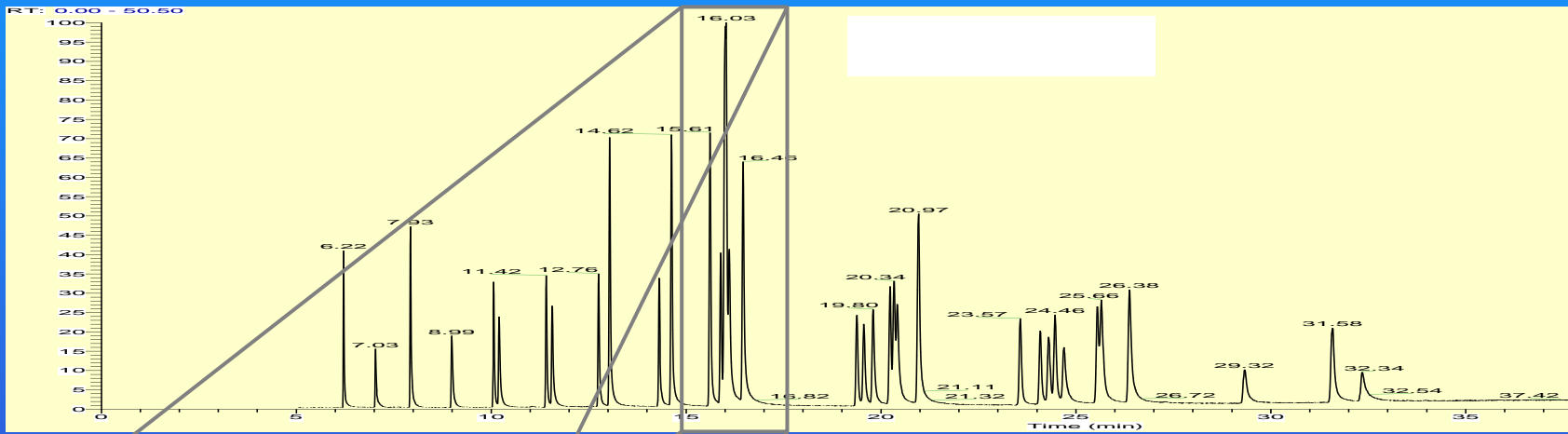


izomery 16:1

# LIPIDOMIKA MASTNÝCH KYSELIN

## Plynová chromatografie a MS

GCMS: - separace lipidových tříd + separace acylů + (derivatizace)



izomery 18:1, 18:2

izomery 16:1

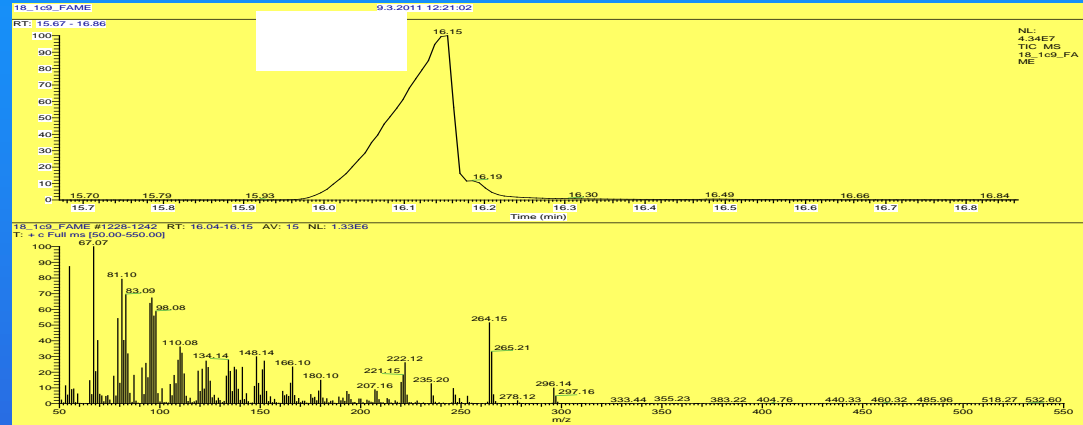


# LIPIDOMIKA MASTNÝCH KYSELIN

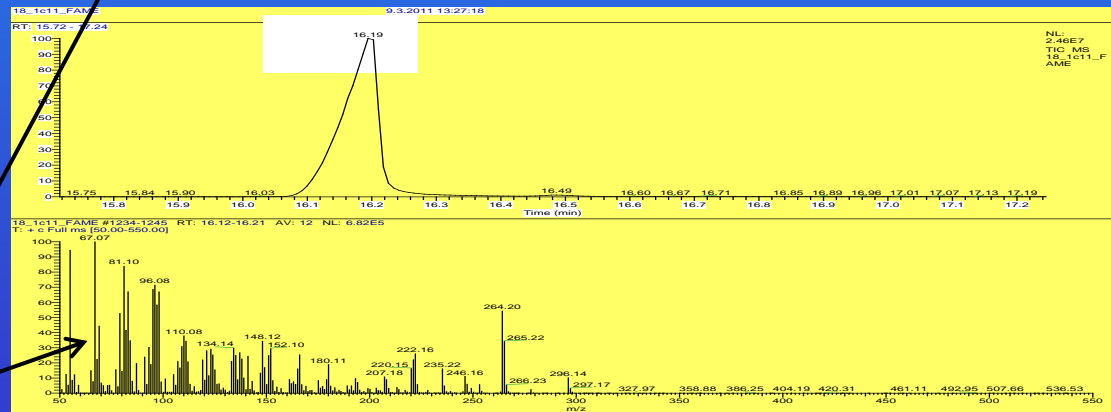
## Plynová chromatografie a MS

GCMS: - detekce různých MS (MS/MS fragmentů)

izomer 18:1n-9



izomer 18:1n-7



malé rozdíly ve fragmentaci → kalibrace na poměry fragmentů velmi zřídka

# LIPIDOMIKA MASTNÝCH KYSELIN

## Chromatografie a derivatizace

jak pro GCMS, tak pro LCMS platformy

### 1. Derivatizace na karboxylu

- pikolinace (jednodušší fragmentační charakteristiky)

### 2. Reakce na dvojně vazbě

- adukty s ACN
- ozonizace
- fotoindukované reakce

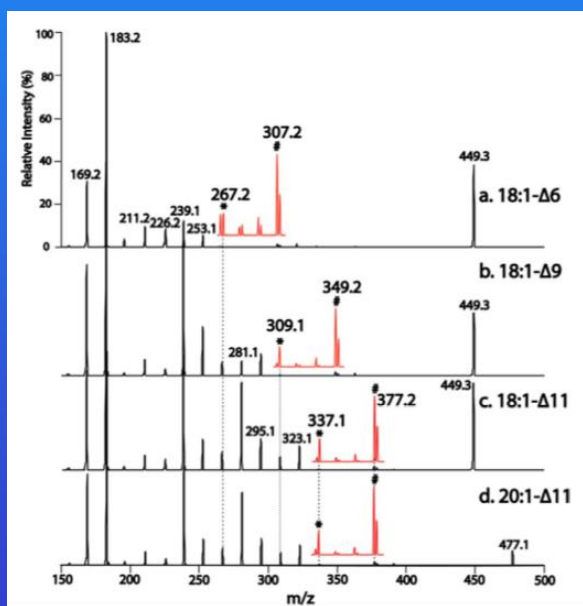
# LIPIDOMIKA MASTNÝCH KYSELIN

Kapalinová chromatografie (LC) spojená s MS detekcí

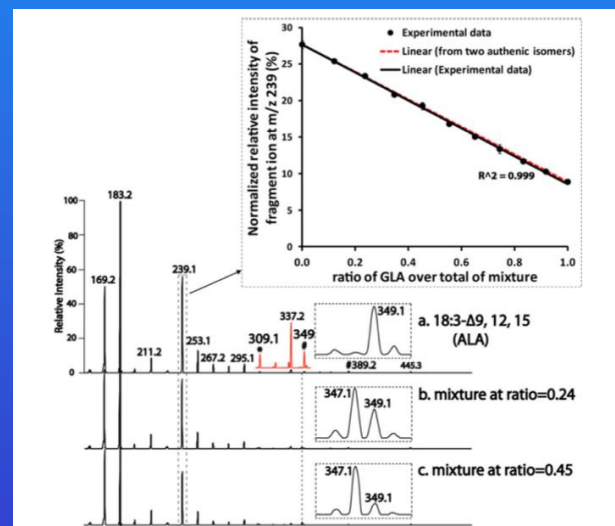
LC - lze intaktní lipidové třídy

(kratší preanalytická fáze)

- problémy s izomery - možná derivatizace



různé fragmentace  
izomerů



nutná kalibrace

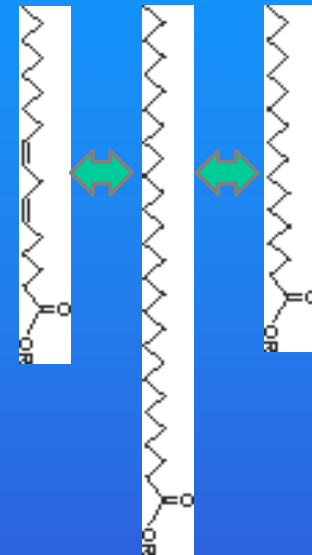
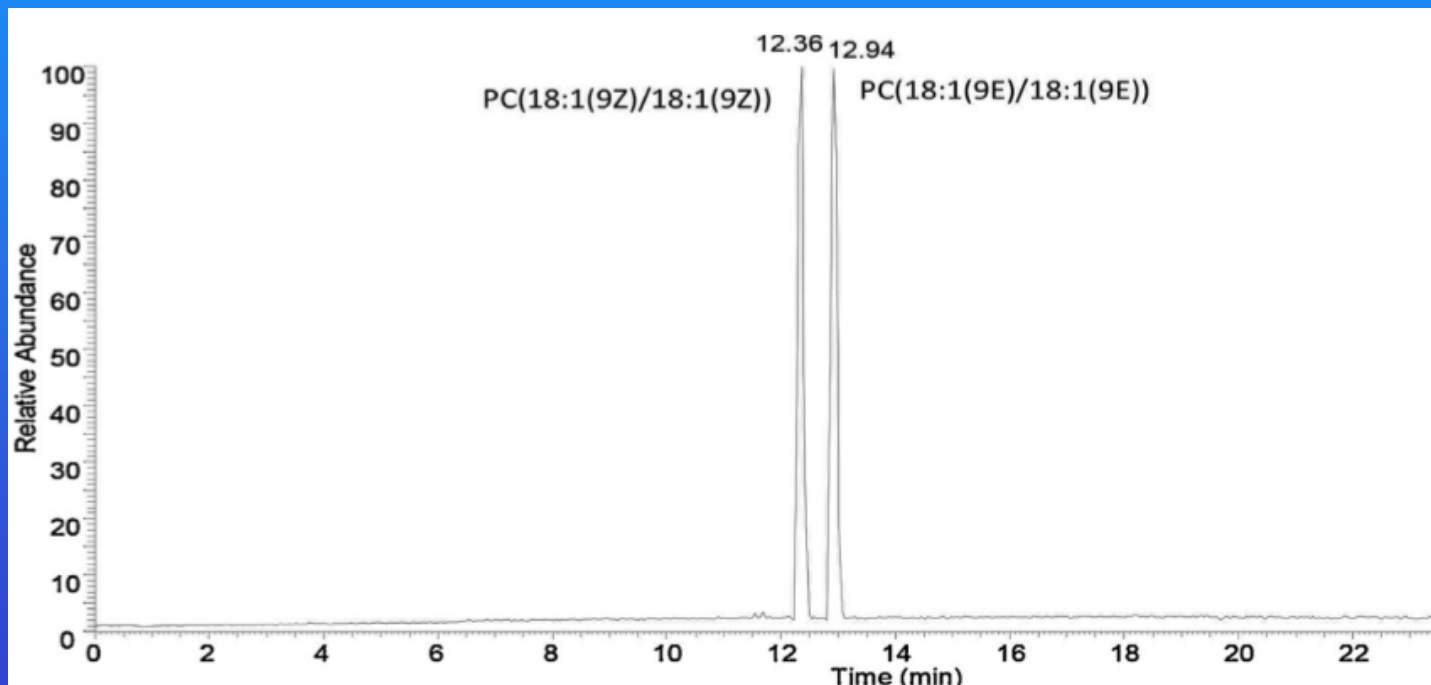
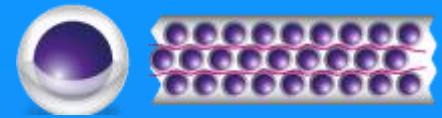
Yang 2013

# LIPIDOMIKA MASTNÝCH KYSELIN

## Kapalinová chromatografie (LC)

- nové separační možnosti

HPLC kolony na bázi C30 core shell

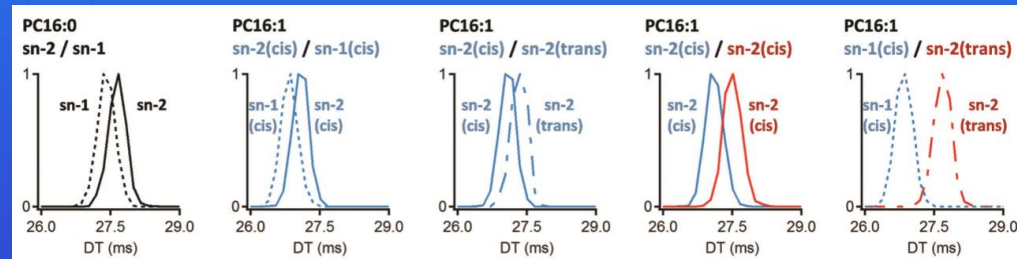
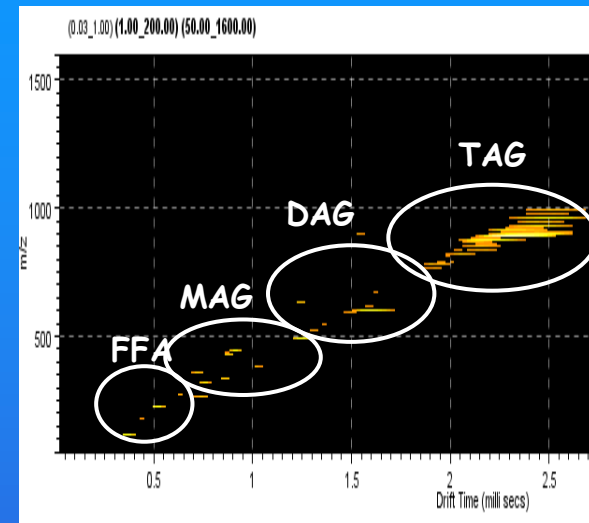
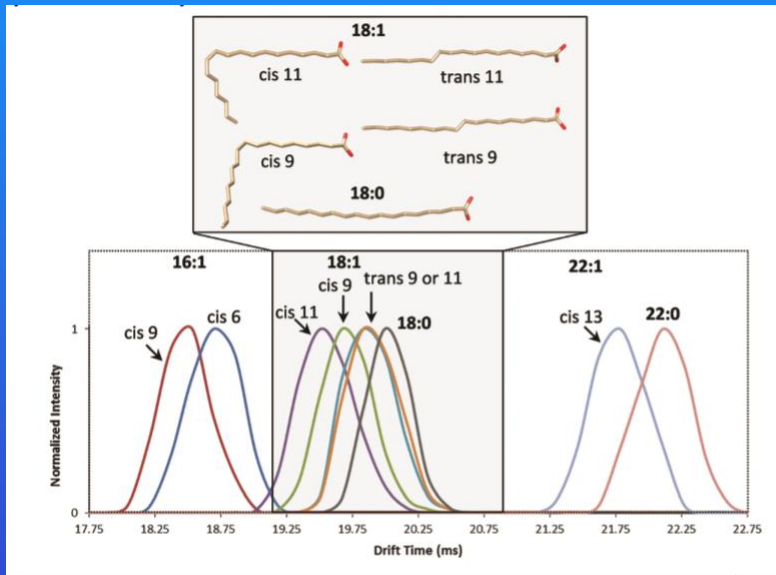


# LIPIDOMIKA MASTNÝCH KYSELIN

## Kapalinová chromatografie (LC)

- nové ionizační možnosti

ionizace ve zdroji - iontová mobilita



*Paglia 2015, Kyle 2016*

# LIPIDOMIKA STEROLŮ

## Plynová chromatografie (GC)

GC - není nutná derivatizace,

používá se pro lepší separaci, snížení bodu varu

GC vs GCMS:

GC/FID - variabilita stacionární fáze (vyšší teplotní limit)

- separační účinnost kolon - nejsou problémy s izomery

GC/MS - stabilita stacionární fáze

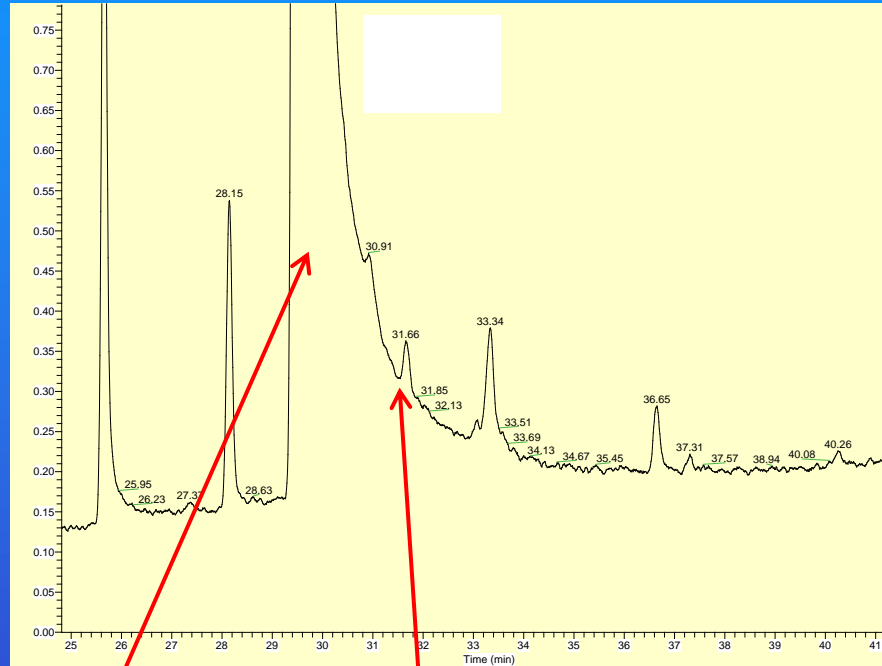
- selektivita detektoru

(FID vs MS vs MS/MS)

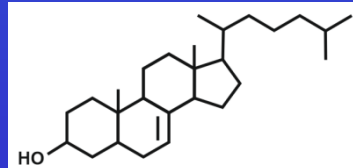
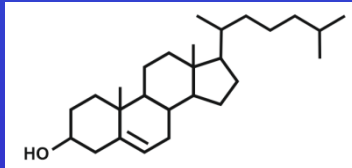
# LIPIDOMIKA STEROLŮ

## Plynová chromatografie (GC, GCMS)

GC: saponifikace + derivatizace



izomery cholesterol - lathosterol  
(mM) (µM)

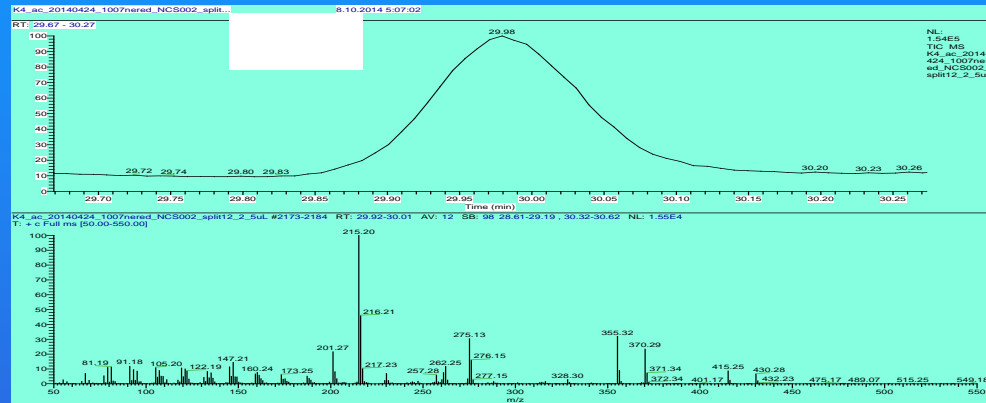


# LIPIDOMIKA STEROLŮ

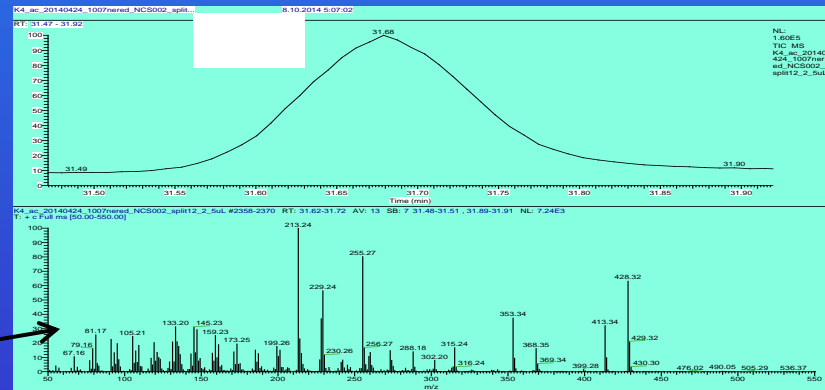
## Plynová chromatografie a MS

GCMS: - detekce různých MS (MS/MS fragmentů)

cholesterol



lathosterol



rozdíly ve fragmentaci → nepoužitelné díky poměru koncentrací 1000:1 → nutná separace



# LIPIDOMIKA STEROLŮ

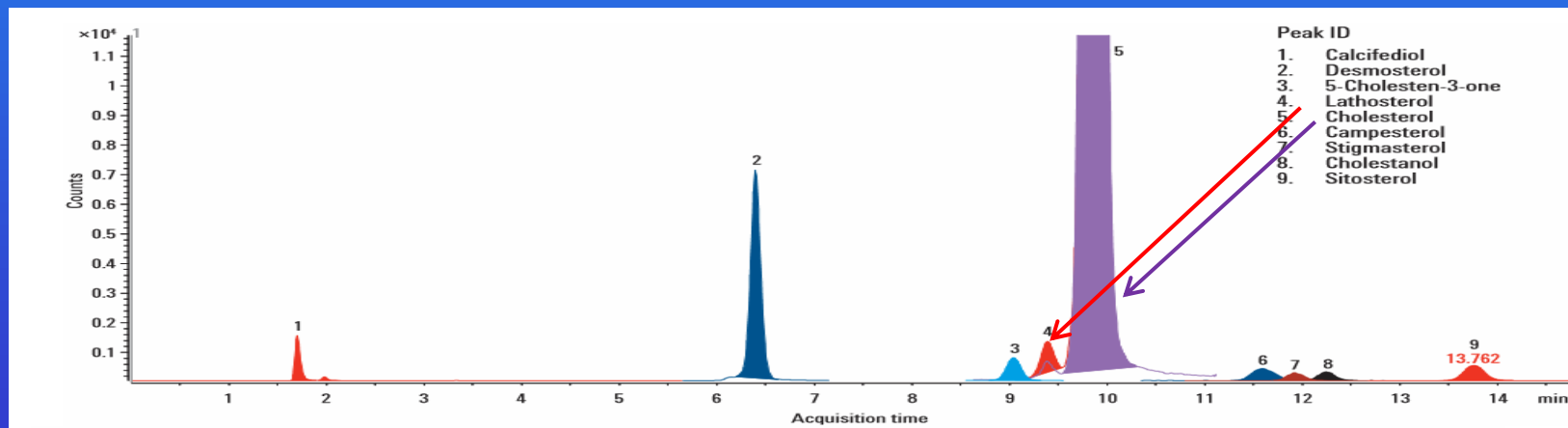
## Kapalinová chromatografie (LC)

LC MS - lze intaktní sterolové molekuly

1. horší ionizační vlastnosti → APCI/APPI sondy
2. cholesterol v nadbytku → zahlcení kolony



citlivá LC-MS platforma + vhodná HPLC kolona



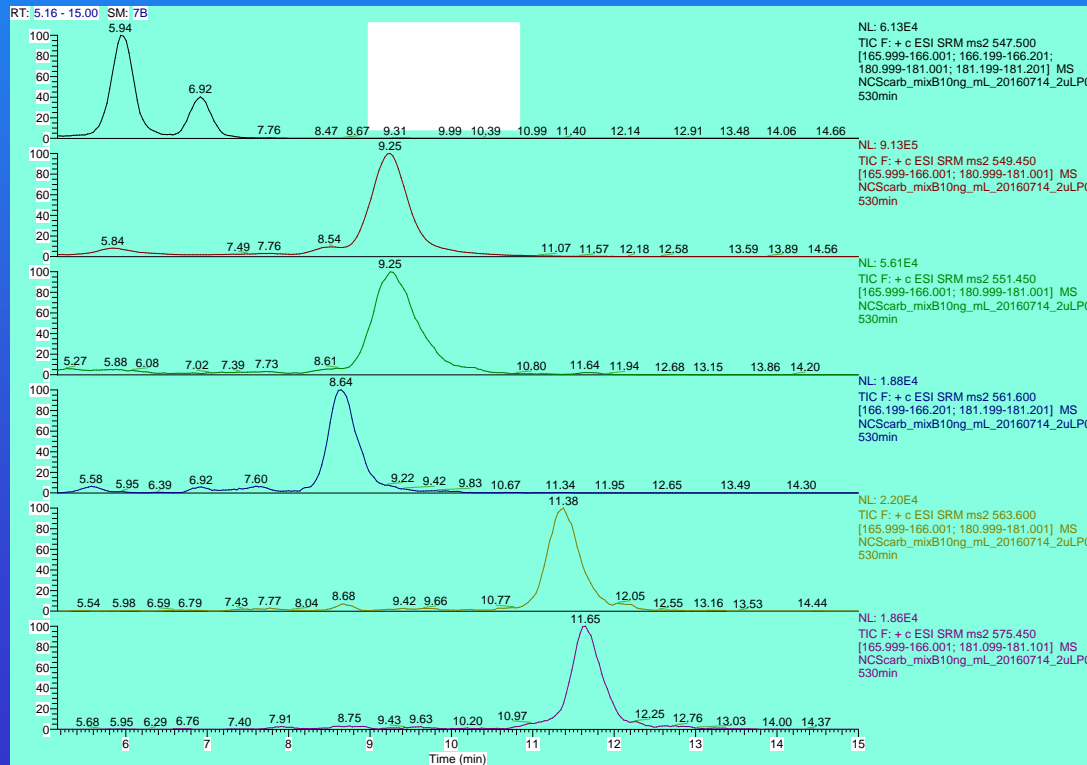
# LIPIDOMIKA STEROLŮ

## Kapalinová chromatografie (LC)

### LC MS - problémy s ionizací - derivatizace

→ ESI sonda

→ lepší ionizovatelnost (méně vzorku na kolonu)



desmosterol  
7-DHC

lathosterol  
cholesterol

IS

cholestanol

kampesterol

$\beta$ -sitosterol