

A tömegspektrometria új labordiagnosztikai alkalmazása az endokrin betegségek diagnosztikájában

Karvaly Gellért Balázs

Semmelweis Egyetem Laboratóriumi Medicina Intézet

Tömegspektrometriai Laboratórium

A tömegspektrometria legfontosabb alkalmazási területei az endokrin betegségek diagnosztikájában

- endogén szteroid hormonok, prekursorok és metabolitjaik vizsgálata
- biogén aminok és metabolitjaik vizsgálata (katekolaminok, triptaminok)
- D-vitamin metabolitok vizsgálata
- IGF-1 vizsgálata
- plazma renin aktivitás mérése



Érdeklődő kollégáknak:

Role of Mass Spectrometry in Clinical Endocrinology



Siva S. Ketha, MBBS, MPH^a, Ravinder J. Singh, PhD^b, Hemamalini Ketha, PhD^{c,*}

KEYWORDS

- Liquid chromatography mass spectrometry in clinical endocrinology
- Liquid chromatography tandem mass spectrometry
- Steroid Liquid chromatography tandem mass spectrometry
- IGF1 by mass spectrometry

KEY POINTS

- Mass spectrometry has found numerous applications, such as quantitation of steroid hormones and vitamin D metabolites, pheochromocytoma diagnosis, and protein biomarker quantitation.
- Mass spectrometry has improved the diagnosis and management of several endocrine diseases.
- Mass spectrometry assays will become a mainstay in clinical laboratories, small and large, in the future.

Ketha SS, Sing RJ, Ketha H. Endocrinol Metab Clin N Am 2017;46:593-613.

Mikor jó ötlet MS alapú vizsgálati módszereket használni?

- ha olyan diagnosztikai információhoz jutunk, amely más technológiával nem elérhető,
- ha nagy érzékenységű vizsgálatokat kell megfelelő teljesítmény jellemzőkkel végezni (elsősorban nagy pontossággal, precizitással és reprodukálhatósággal),
- ha több olyan vegyület egymás melletti meghatározására van szükség, amelyek egyidejű jelenléte analitikai szempontból zavaró,
- rugalmas módszerre van szükség, amely a későbbiekben módosítható, szűkíthető, vagy bővíthető,
- nagyszámú minta esetén költséghatékonysági céllal.

tömegspektrográfia → ez az „ős”.

tömegspektroszkópia → elavult kifejezés

320. mass spectrometry

Obsolete: mass spectroscopy

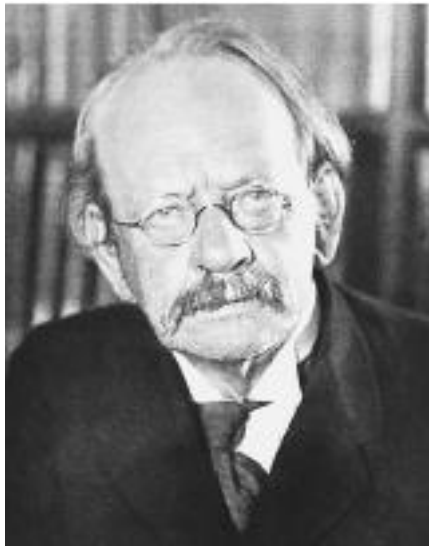
Study of matter through the formation of gas-phase *ions* that are characterized using *mass spectrometers* by their mass, charge, structure, and/or physico-chemical properties.

Note 1: The term is a misnomer because it is m/z rather than mass that is the independent variable in a *mass spectrum*.

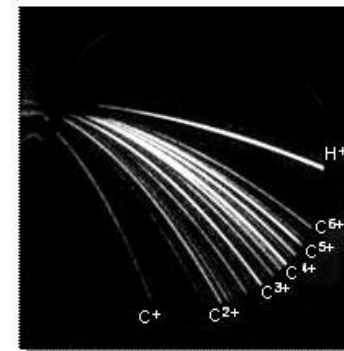
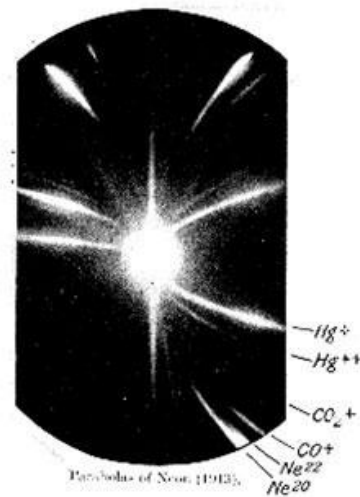
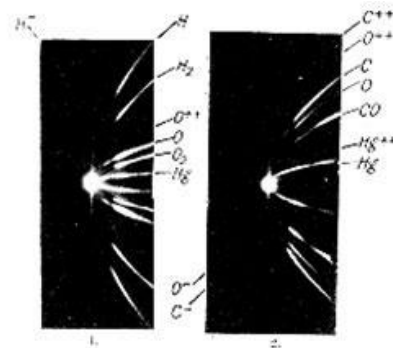
Note 2: *Mass spectroscopy* is an obsolete synonym for *mass spectrometry* that should not be used to avoid confusion with spectroscopies in which the measured quantity is the absorption or emission of electromagnetic radiation.

From [5,6].

Sir J. J. Thomson: a töltéssel rendelkező izotópok elektromágneses térben egyedi módon mozognak



Sir Joseph John Thomson
(1856-1940)



F. W. Aston: az első tömegspektrográf



The Nobel Prize in Chemistry 1922 was awarded to Francis W. Aston *"for his discovery, by means of his mass spectrograph, of isotopes, in a large number of non-radioactive elements, and for his enunciation of the whole-number rule"*.

A.O.C. Nier: tömegspektrométerek építése, stabil izotópok vizsgálata

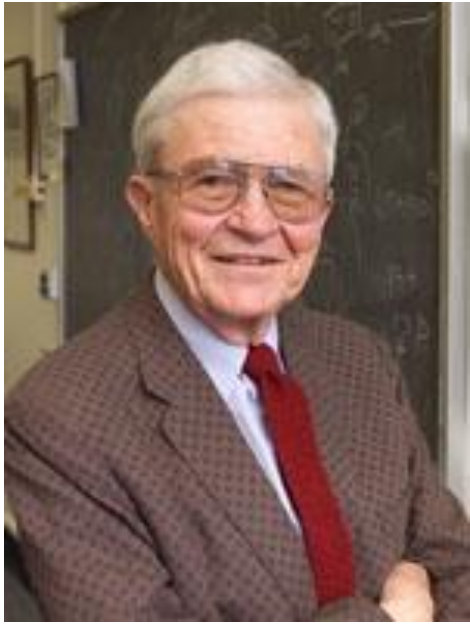


Alfred O.C. Nier

Alfred Otto Carl Nier
(1911-1994)







Fred McLafferty
(1923)

elektron ionizációval kapott
tömegspektrumok
értelmezése, adatbázisba
foglalása



Franz Hillenkamp (1936-2014) és Michael Karas (1952)

mátrix-asszisztált
lézer deszorpciós ionizáció (MALDI)
feltalálása

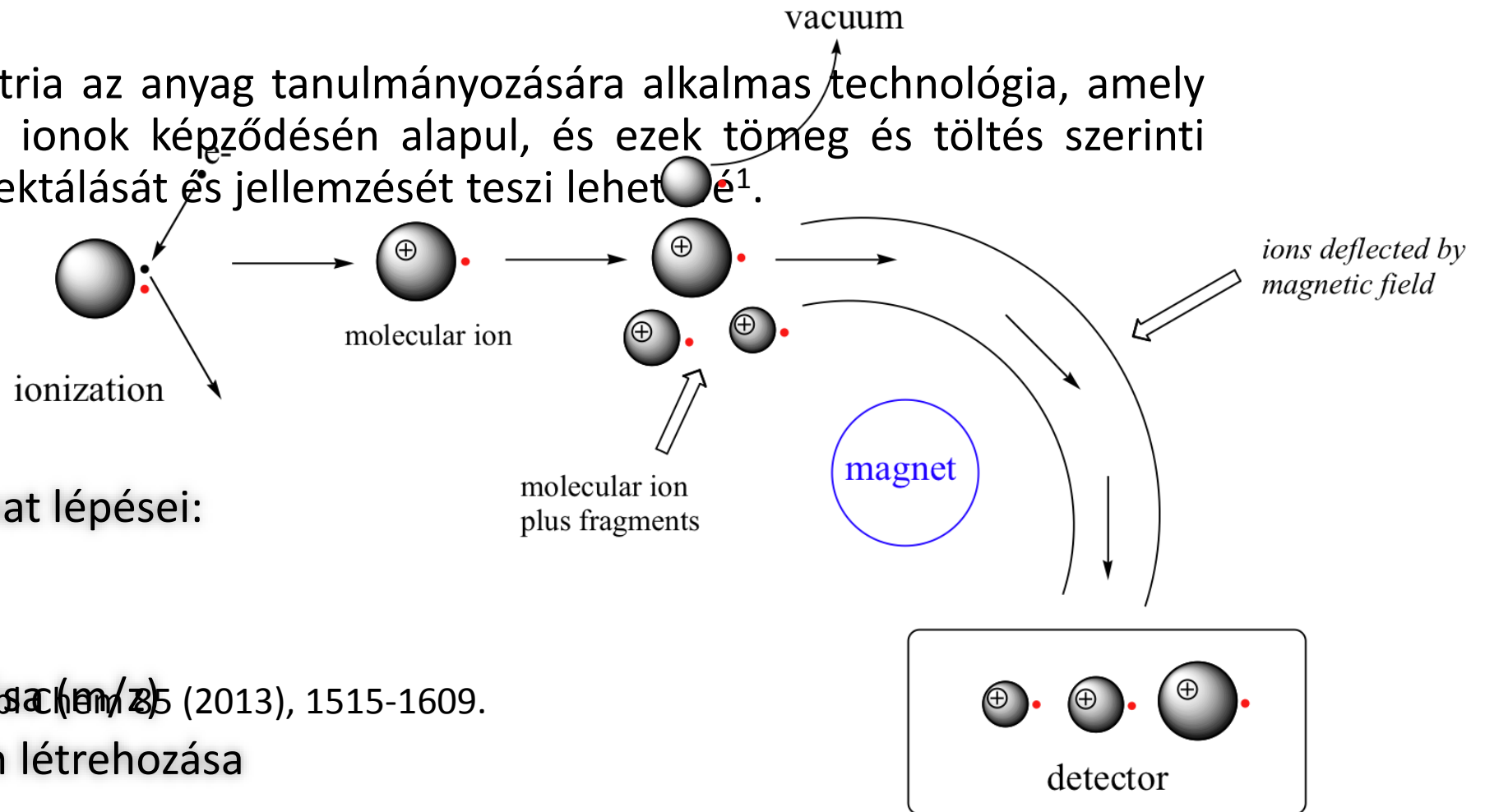


John Fenn (1917-2010)

elektrospray ionizáció (ESI)
feltalálása

A tömegspektrometria alapjelenségei

- A tömegspektrometria az anyag tanulmányozására alkalmas technológia, amely gáz halmazállapotú ionok képződésén alapul, és ezek tömeg és töltés szerinti szétválasztását, detektálását és jellemzését teszi lehetővé¹.



- A kimutatási folyamat lépései:

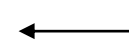
- ionizáció
- fragmentáció

¹ Murray, K. et al. *Mass Spectrometry* (2013), 1515-1609.

- ionok kiválasztása (m/z)
- tömegspektrum létrehozása

A tömegspektrométer felépítése

mintabeviteli egység
(inlet)



a.) közvetlen

b.) csatolt:

- folyadékkromatográf
- gázkromatográf
- kapilláris elektroforézis

nagyvákuum tér



ionforrás



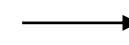
tömeganalizátor



elektronsokszorozó

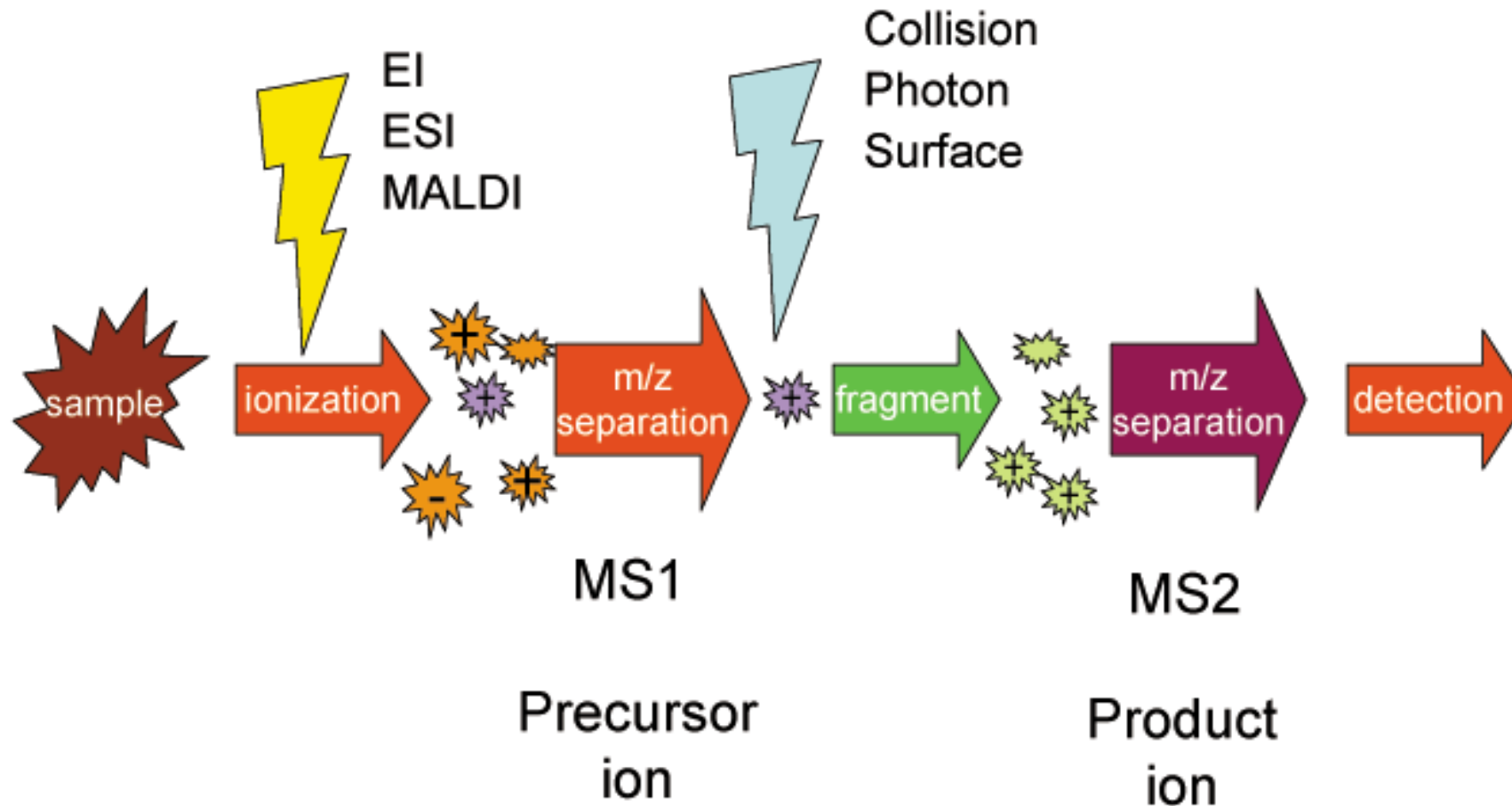


detektor



megjelenítés/adatfeldolgozás

Tandem tömegspektrometria



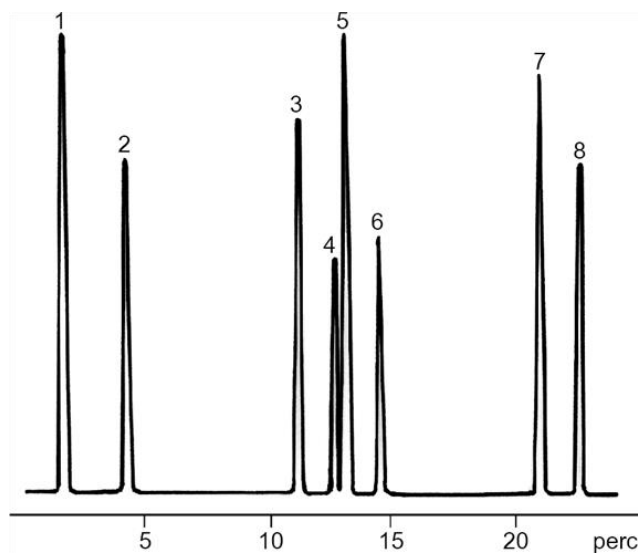
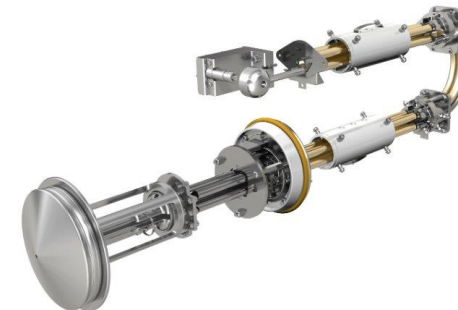
eluenstartály



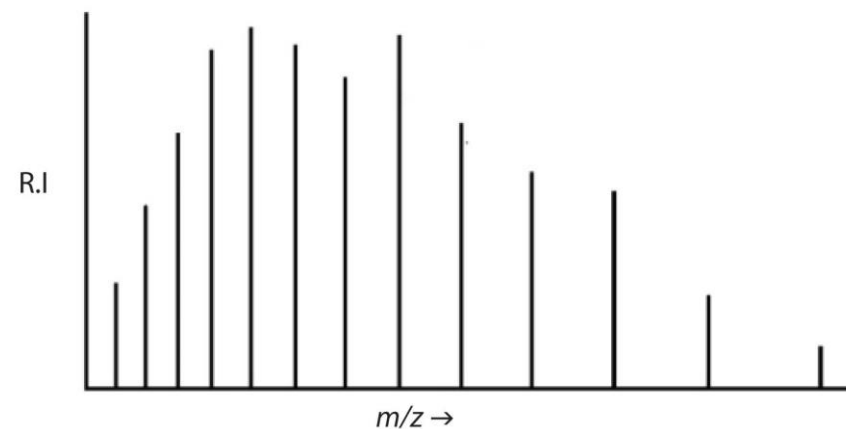
HPLC pumpa



mintabeviteli
egység



állófázis:
komponensek elválasztása



tömegspektrométer:
komponensek detektálása

Az LC-MS/MS vizsgálat folyamata

a minta komponenseit folyadékkromatográfiával elválasztjuk



a komponenseket ionizáljuk: a molekulaion jellemző a szerkezetre



a molekulaiont fragmentáljuk: kiválaszthatóak a szerkezetre
nagymértékben vagy egészében specifikus ionok



elvégezzük a mennyiségi analízist

Tömegspektrometria vs immunoassay

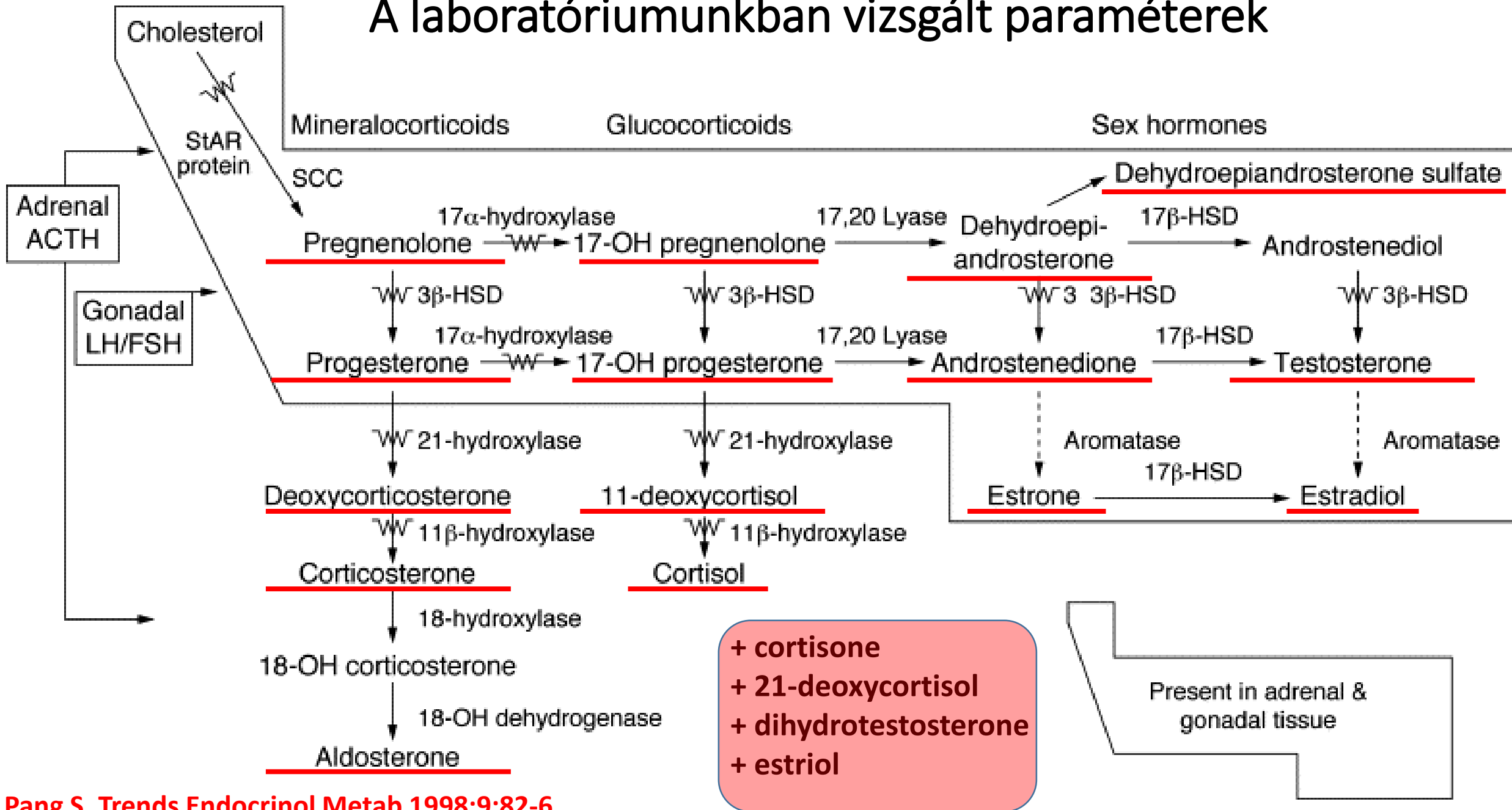
szempont	tömegspektrometria	immunoassay
érzékenység	<1 nmol/l	<1 nmol/l
specifikusság	kontrollálható	nem kontrollálható
módszer testreszabása	lehetséges	nem lehetséges
gyári reagenskészlet	nem jellemző	jellemző
mátrix	változatos	nem kontrollálható
megbízhatóság	megfelelő, kontrollálható	nem kontrollálható
üzemben tartási költség	magas	közepes
egy paraméterre eső költség	0,5 – 50 USD	széles tartományban változó
a vizsgálatok elvégzése szakembert igényel	igen	nem
bekerülési költség	magas	alacsony vagy nincs

Endogén szteroidok vizsgálata vérben

A szteroid profil felvételének jelentősége

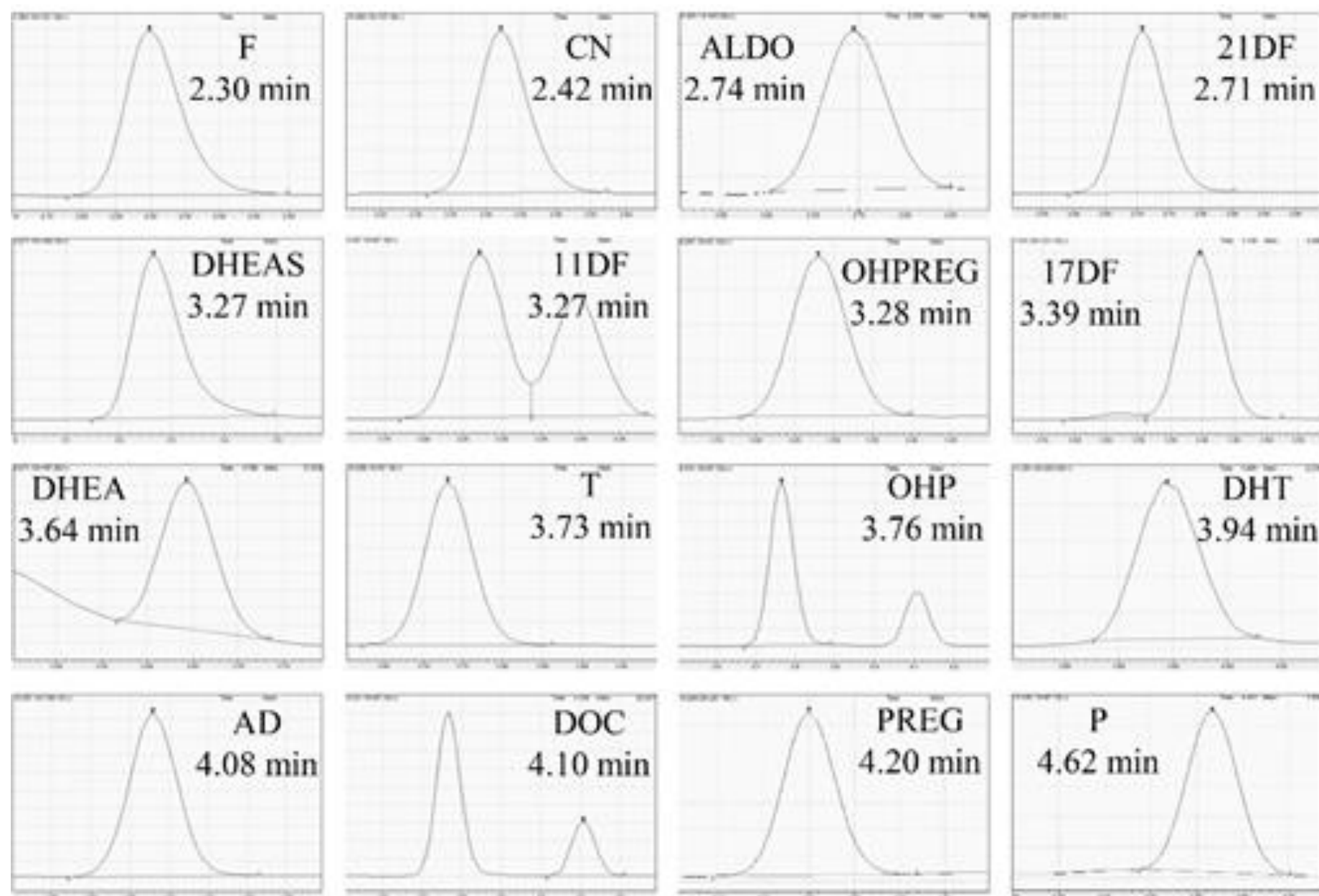
- Szűrés, diagnózis és az állapot, illetve a terápia nyomon követése:
- kongenitális adrenális hiperplázia
- policisztás ovárium szindróma
- Cushing-kór
- Addison-kór
- az HPA tengely és a gonádok egyéb funkciózavarai
- gyógyszeres kezelések mellékhatásai

A laboratóriumunkban vizsgált paraméterek



Vizsgálati stratégia

- vizsgálati minta: natív szérum, legalább 0,25 ml
- független kalibrátorokat és kontrollokat használunk (kivéve: pregnenolon, 17 α -hidroxipregnenolon)
- minta-előkészítés: fehérje mentesítés, szilárd fázisú extrakció
- mérés (5.5 min):
 - elválasztás: ultrahatékonyágú folyadékkromatográf; fordított fázisú, két dimenziós kromatográfia
 - detektálás: elektropray ionizáció, hármás kvadrupol tandem tömegspektrométer



D-vitamin metabolitok vizsgálata vérben

D-vitaminok (elsősorban D3)

25-hidroxi-D-vitaminok

24,25-hidroxi-D-vitaminok
(biológiailag inaktívak)

1,25-hidroxi-D-vitaminok
(biológiailag aktívak)

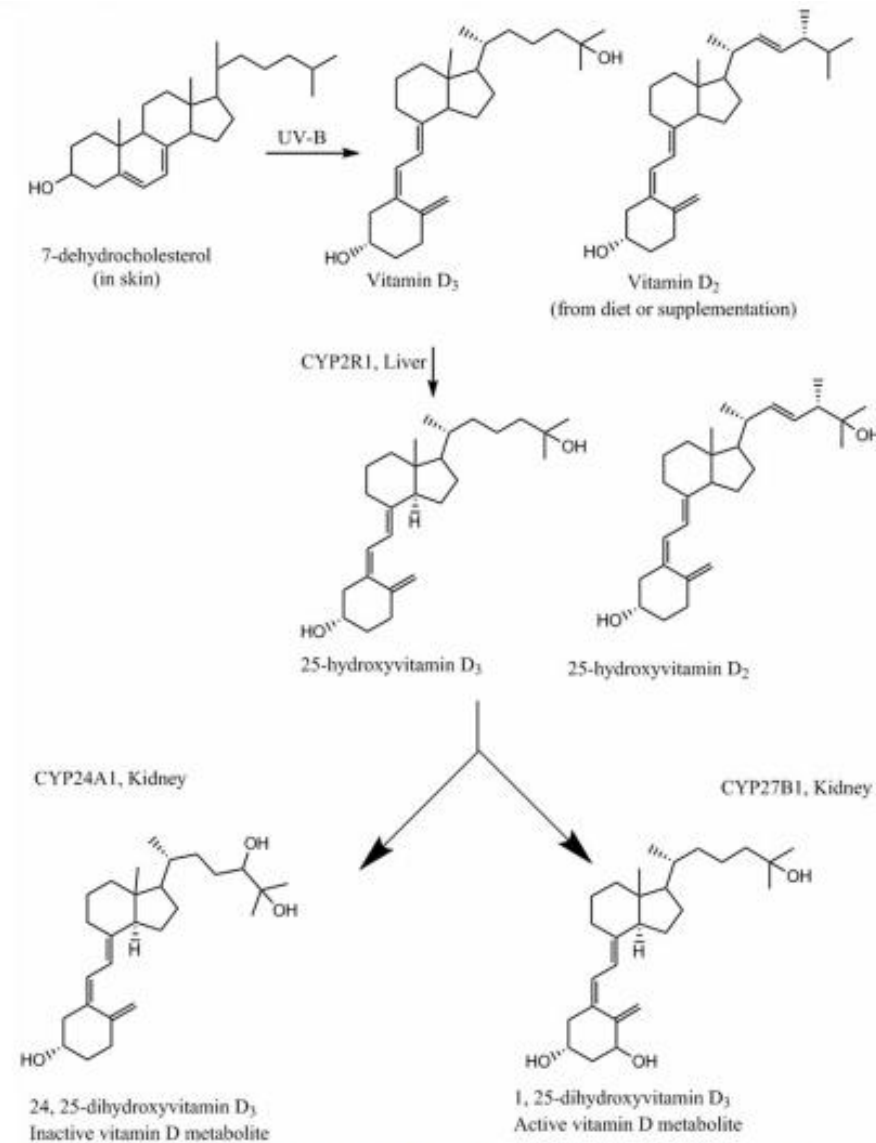
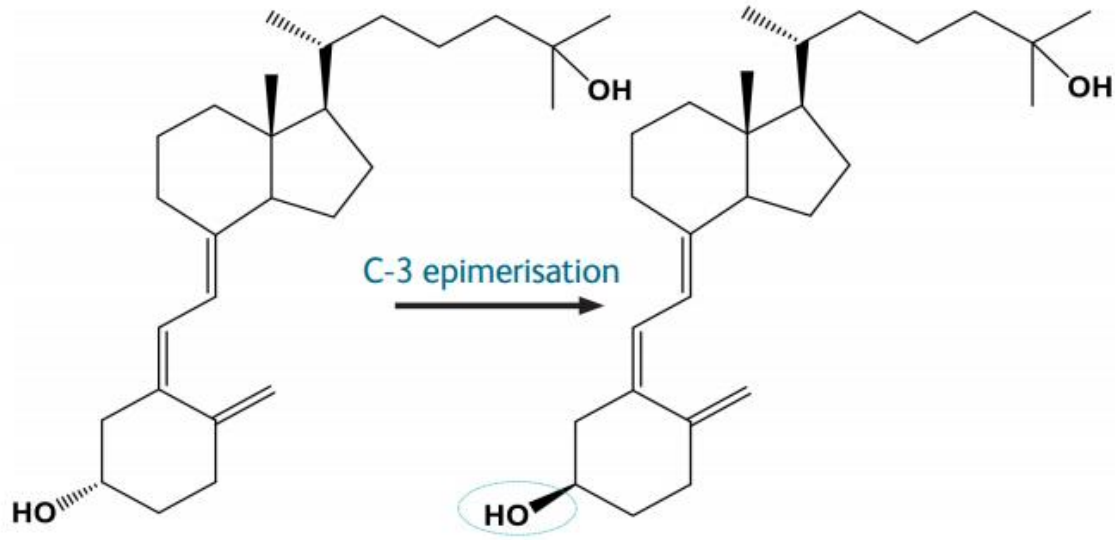


Fig. 2. Vitamin D metabolic pathway. (Adapted from Ketha H, Singh RJ. Chapter 9 - Vitamin D metabolite quantitation by LC-MS/MS. In: Nair H, Clarke W, editors. Mass spectrometry for the clinical laboratory. San Diego: Academic Press; 2017. p. 181–204; with permission.)



25-hydroxyvitamin D3

3-epi-25-hydroxyvitamin D3

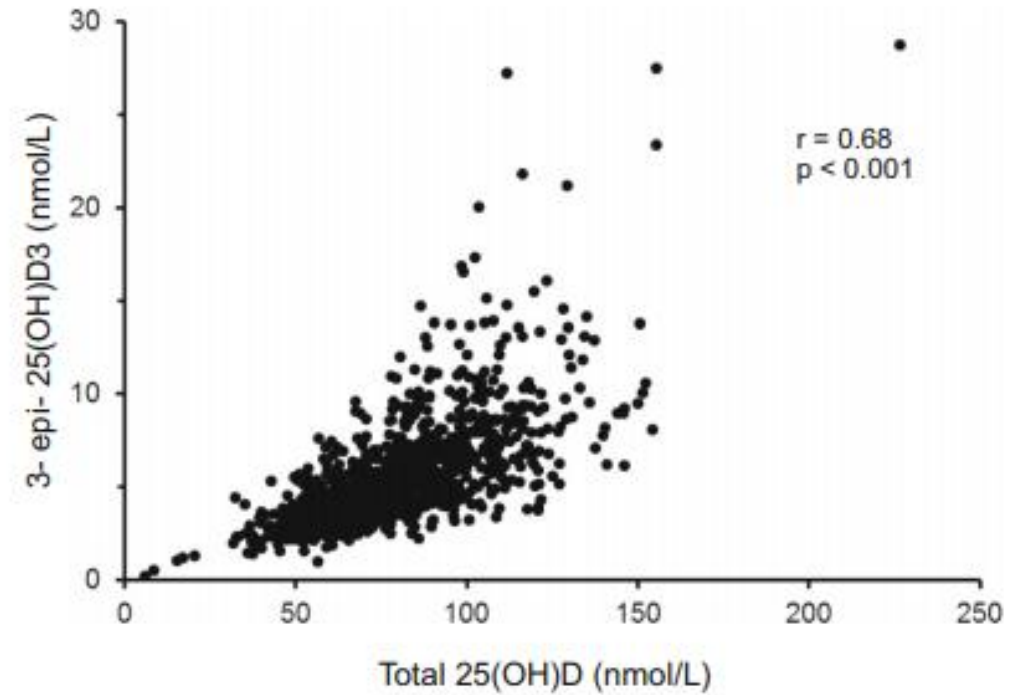


Fig. 2 Relationship between total 25-hydroxyvitamin D and the 3 epimer of 25-hydroxyvitamin D3 levels

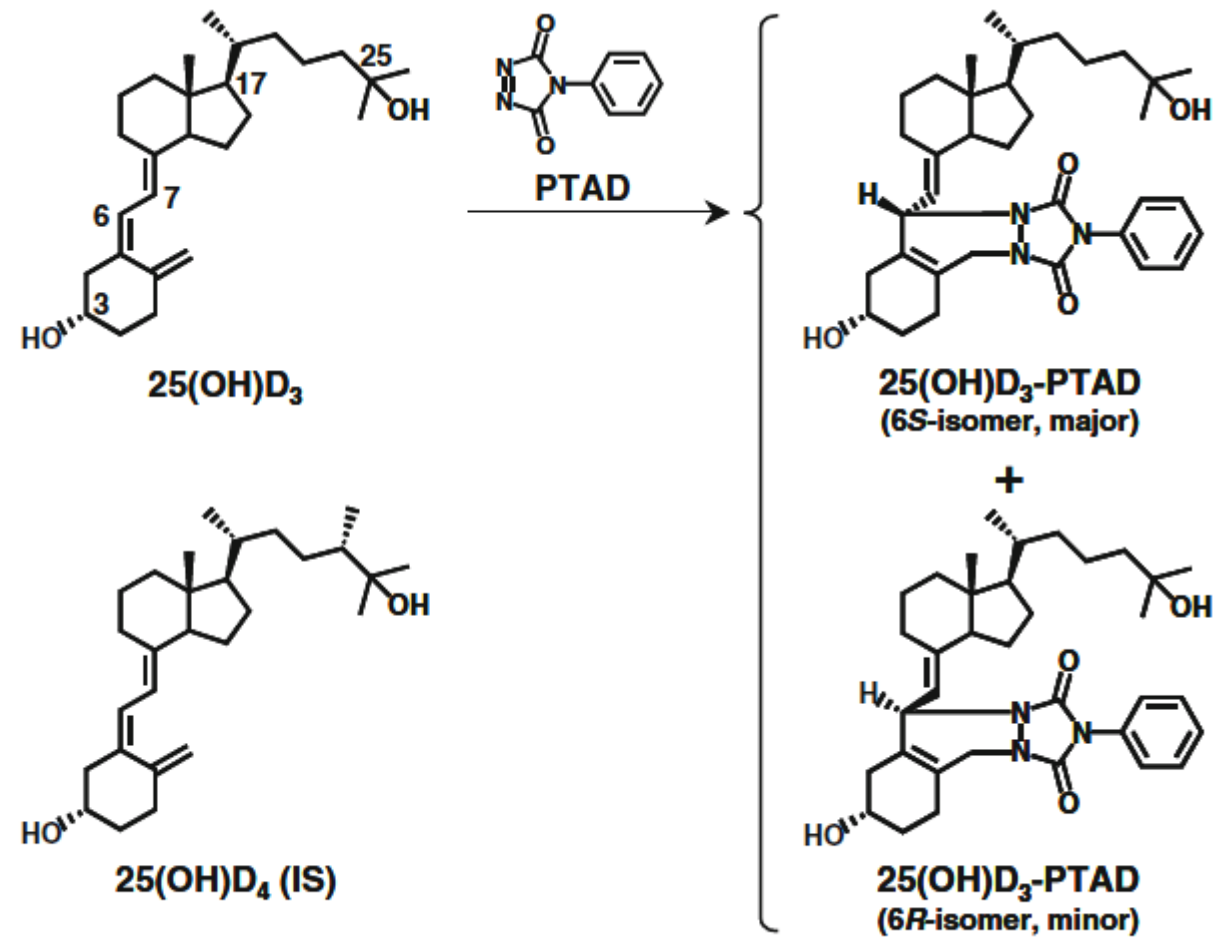
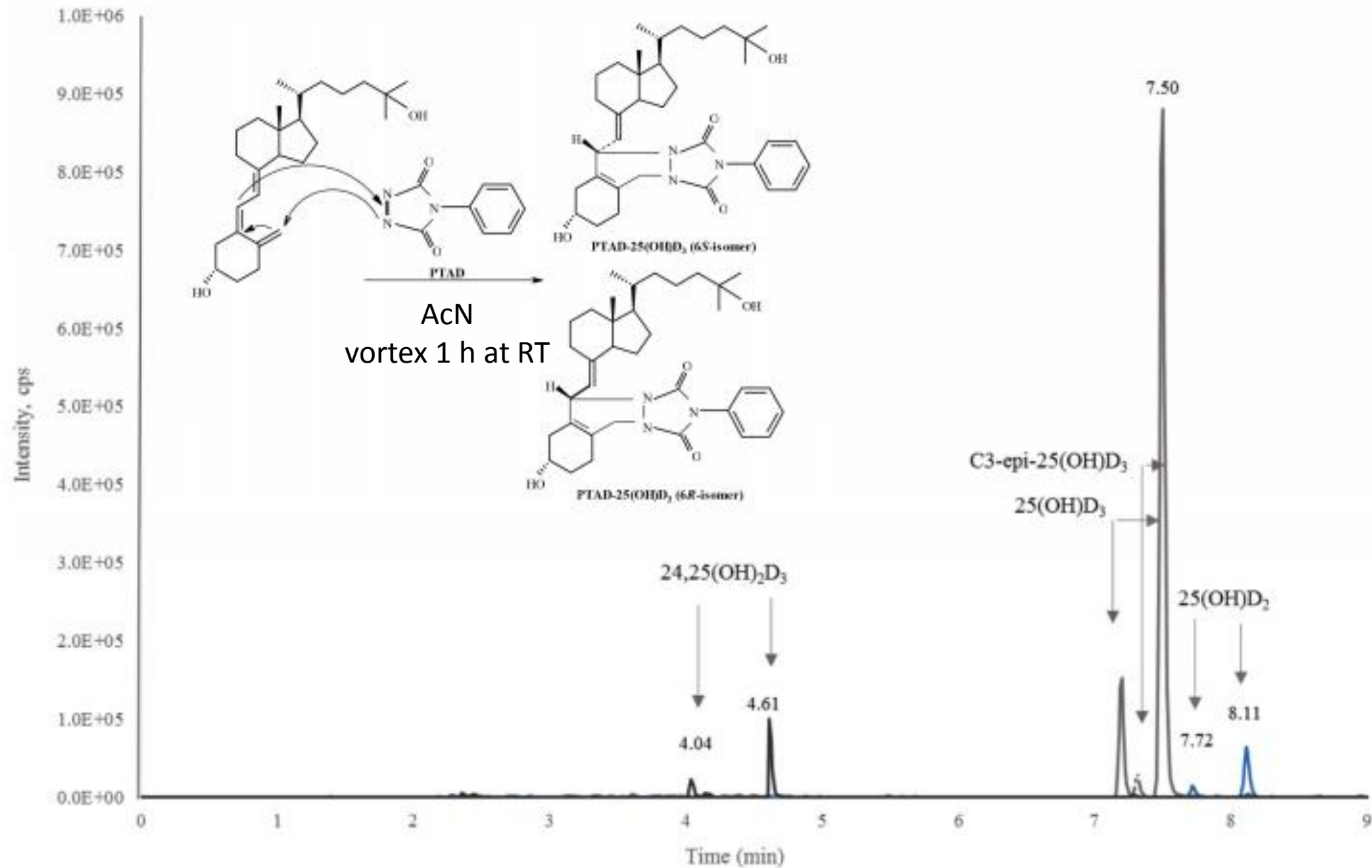


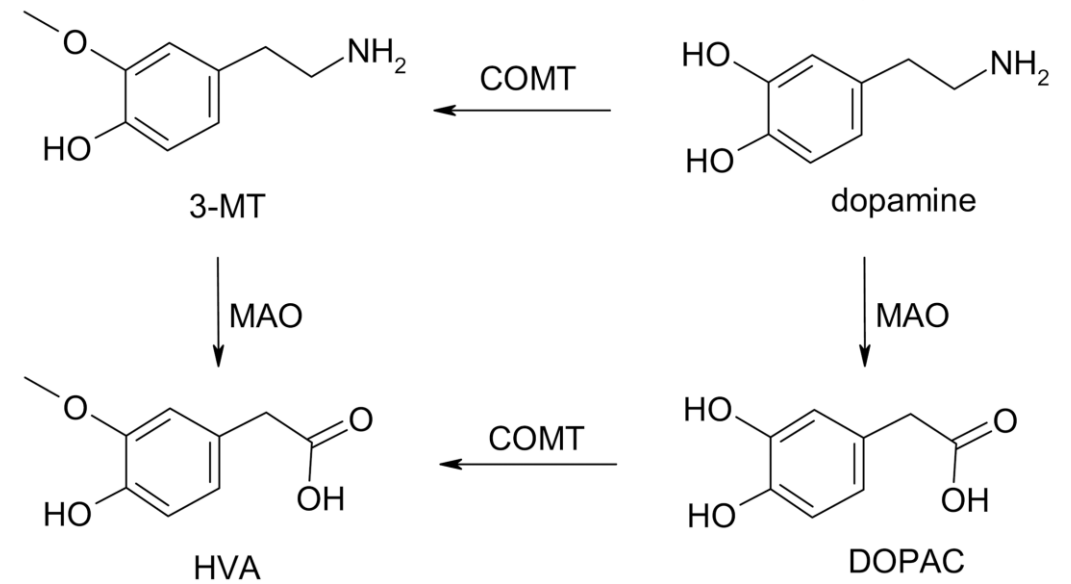
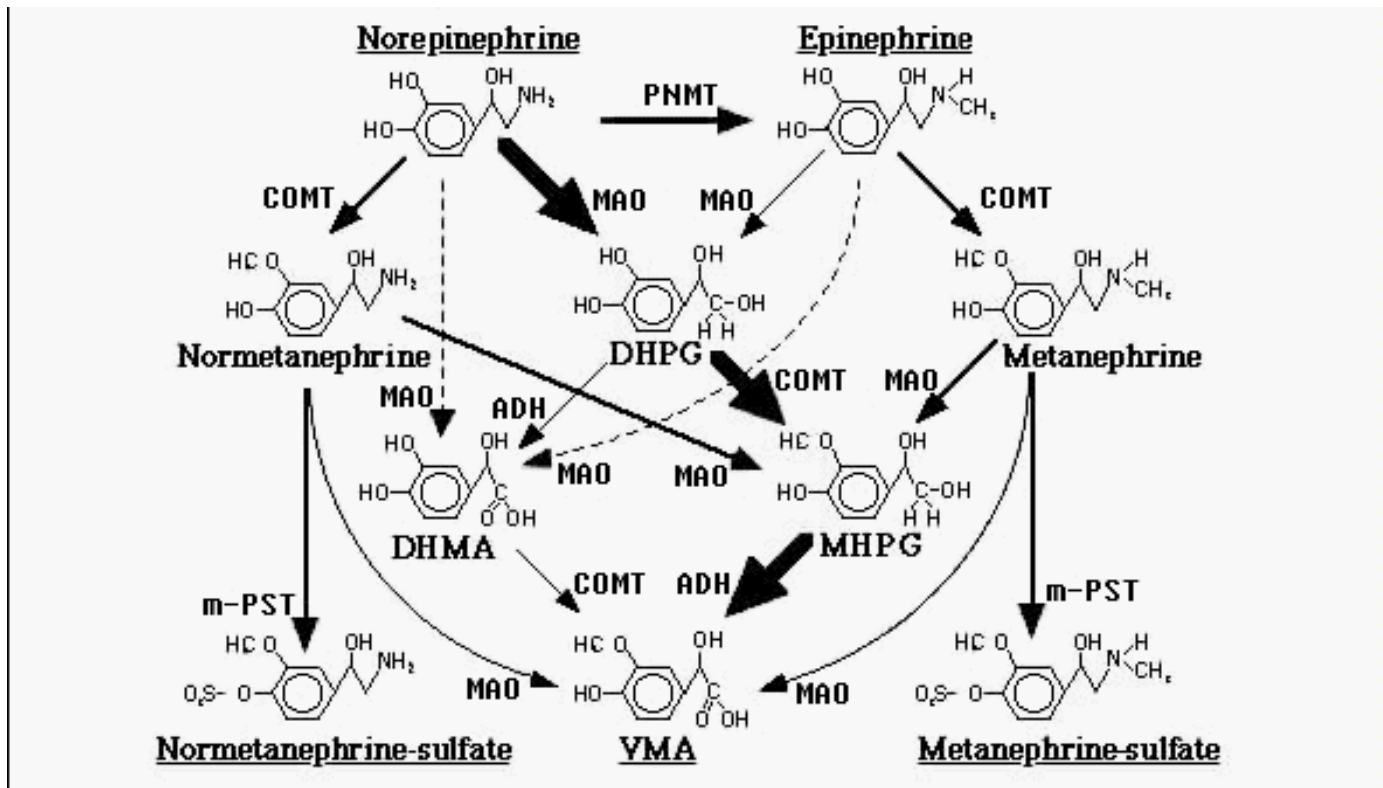
Fig. 1 Derivatization of 25(OH)D₃ with PTAD and the chemical structure of 25(OH)D₄ (IS)

PTAD: 4-phenyl-1,2,4-triazoline-3,5-dione



PTAD: 4-phenyl-1,2,4-triazoline-3,5-dione

Katekolaminok vizsgálata vérben és vizeletben



DOPAC: 3,4-dihydroxifenilecetsav, 3-MT: 3-metoxitiramin, HVA: homovanillinsav, VMA: vanilmandulasav

mátrix	vizsgált paraméter	beteg és referencia populációkban mért átlagos értékek aránya	várhatóan referencia tartomány feletti értékkel járó kórképek
plazma	szabad normetanefrin	12,2	VHL, MEN2, NF1, SDHB, SDHD, NAT, AT, DAT
	konjugált normetanefrin	7,4	VHL, MEN2, NF1, SDHB, SDHD, NAT, AT, DAT
	norepinefrin	4,2	VHL, NF1, SDHB, SDHD, NAT, AT, DAT
	konjugált metanefrin	3,8	MEN2, NF1, AT
	szabad 3-MT	3,3	SDHB, SDHD, DAT
	szabad metanefrin	3,0	MEN2, NF1, AT
	konjugált 3-MT	2,4	SDHB, NA, DAT
	dopamin	2,1	SDHB, SDHD, DAT
	epinefrin	1,8	MEN2, NF1, AT
	DHPG	1,6	NF1, SDHB, NA, AT
	DOPA	1,2	NF1, DAT
	DOPAC	1,0	---
vizelet	konjugált normetanefrin	6,7	VHL, MEN2, NF1, SDHB, SDHD, NAT, AT, DAT
	norepinefrin	4,4	VHL, MEN2, NF1, SDHB, SDHD, NAT, AT, DAT
	konjugált metanefrin	3,8	MEN2, NF1, AT
	VMA	2,8	MEN2, NF1, SDHB, NAT, AT, DAT
	epinefrin	2,2	MEN2, NF1, AT
	dopamin	1,4	DAT

AT: elsősorban epinefrint termelő tumorok

DAT: elsősorban dopamint termelő tumorok

MEN2: 2. típusú többszörös endokrin neoplasia

NAT: elsősorban norepinefrint termelő tumor

NF1: 1. típusú neurofibromatózis

SDHB: B alegységet érintő szukcinát-dehidrogenáz defektus

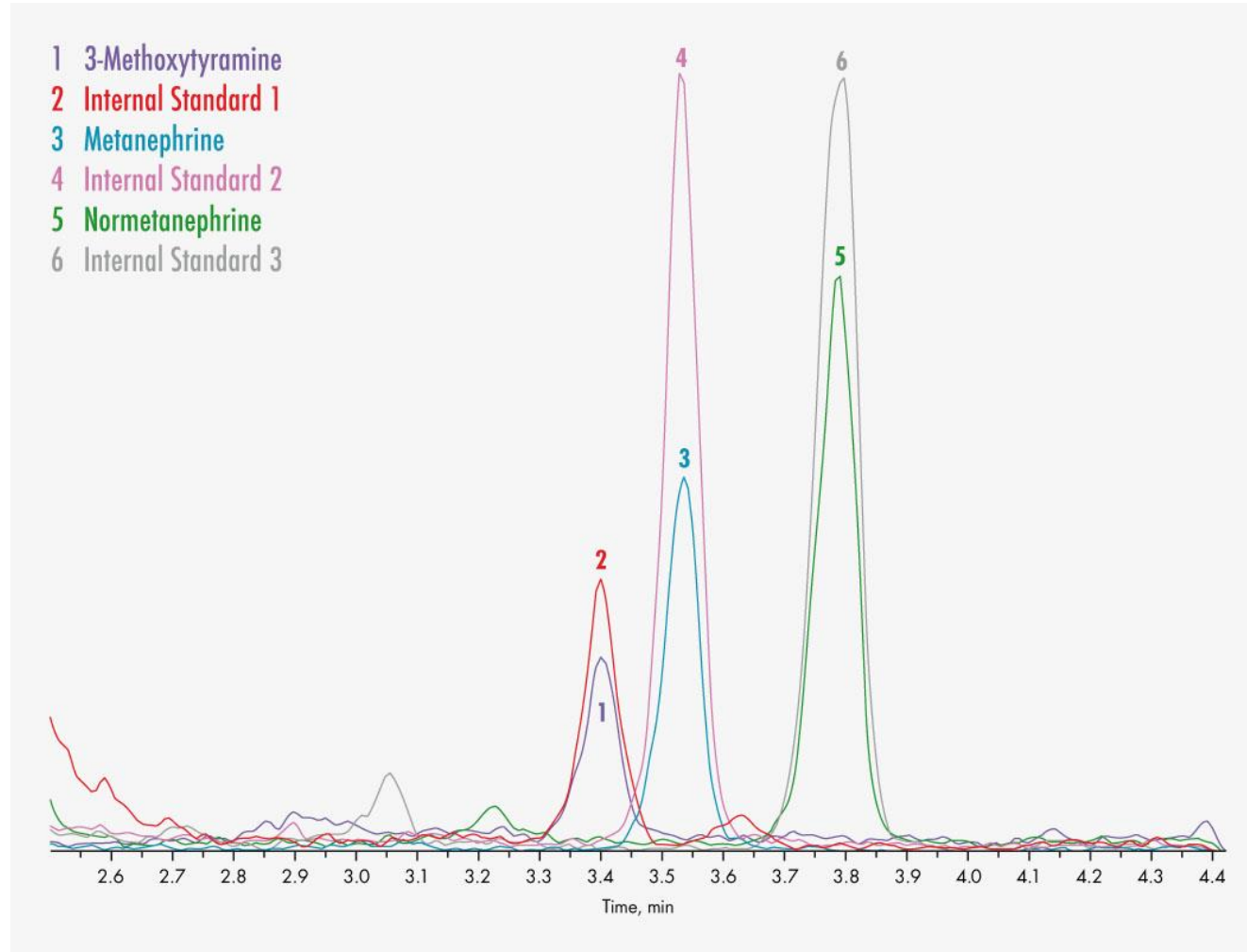
SDHD: D alegységet érintő szukcinát-dehidrogenáz defektus

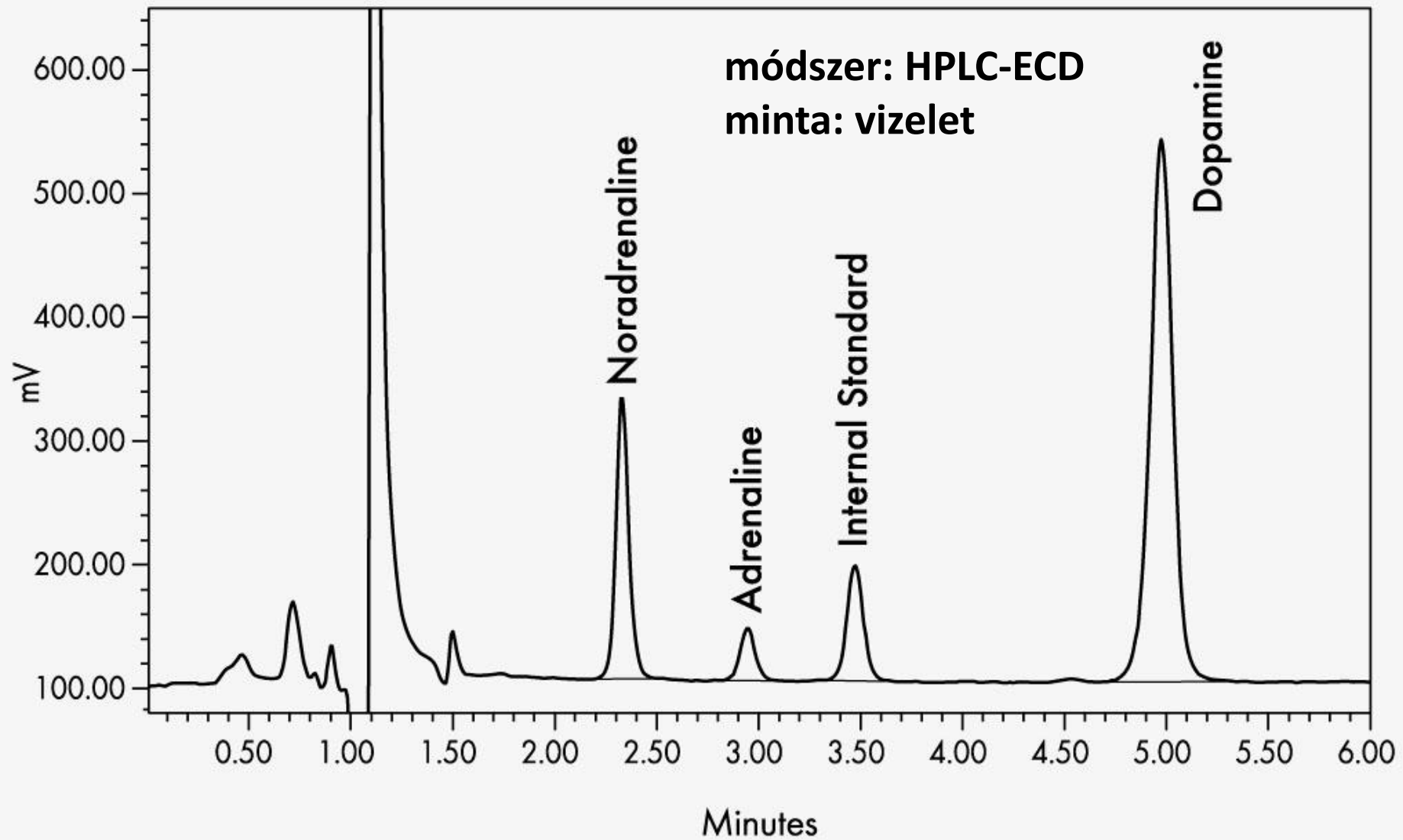
VHL: von Hippel-Lindau szindróma

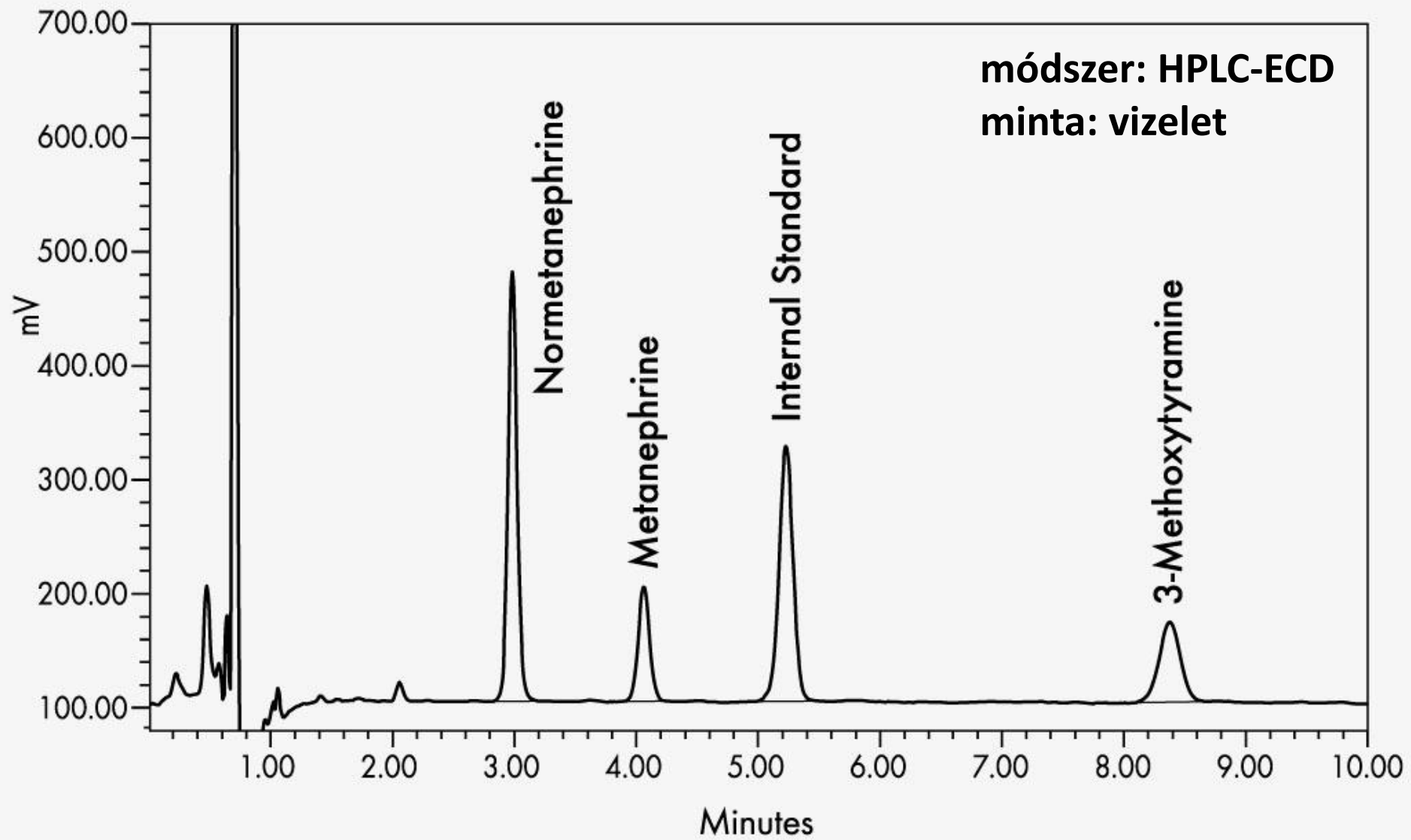
megnevezés	szabad / konjugált	mátrix	referencia tartomány	megjegyzés
dopamin	szabad	plazma	0-30 pg/ml	
dopamin	szabad	vizelet	0-400 µg/24 h	24 órás gyűjtött vizelet
epinefrin	szabad	plazma	0-111 pg/ml	fekvő állapotban vett vérben
epinefrin	szabad	vizelet	0-21 µg	24 órás gyűjtött vizelet
homovanillinsav	szabad	vizelet	életkortól függ	24 órás gyűjtött vizelet. Kreatininre normalizált értékek.
homovanillinsav	szabad	vizelet	életkortól függ	Középsugar vizelet. Kreatininre normalizált értékek.
metanefrin	szabad	plazma	0-0,5 nmol/l	
metanefrin	szabad	vizelet	<i>Normotenzív: fñ - 44-261 µg/24 h. nõ – 30-180 µg/24 h. Hipertoniás: 0-400 µg/24 h.</i>	24 órás gyűjtött vizelet
metanefrin + normetanefrin	szabad + konj.	vizelet	<i>Normotenzív: életkortól függ. Hipertoniás: 0-1300 µg/24 h.</i>	24 órás gyűjtött vizelet
norepinefrin	szabad	vizelet	0-80 µg/24 h	24 órás gyűjtött vizelet
norepinefrin	szabad	plazma	70-750 pg/ml	fekvő állapotban vett vérben
normetanefrin	szabad	plazma	0-0,9 nmol/l	
normetanefrin	szabad	vizelet	<i>Normotenzív: életkortól függ. Hipertoniás: 0-900 µg/24 h.</i>	24 órás gyűjtött vizelet
vanilmandulasav	szabad	vizelet	0-8 µg/ml	24 órás gyűjtött vizelet
vanilmandulasav	szabad	vizelet	0-6 µg/g kreatinin	középsugar vizelet

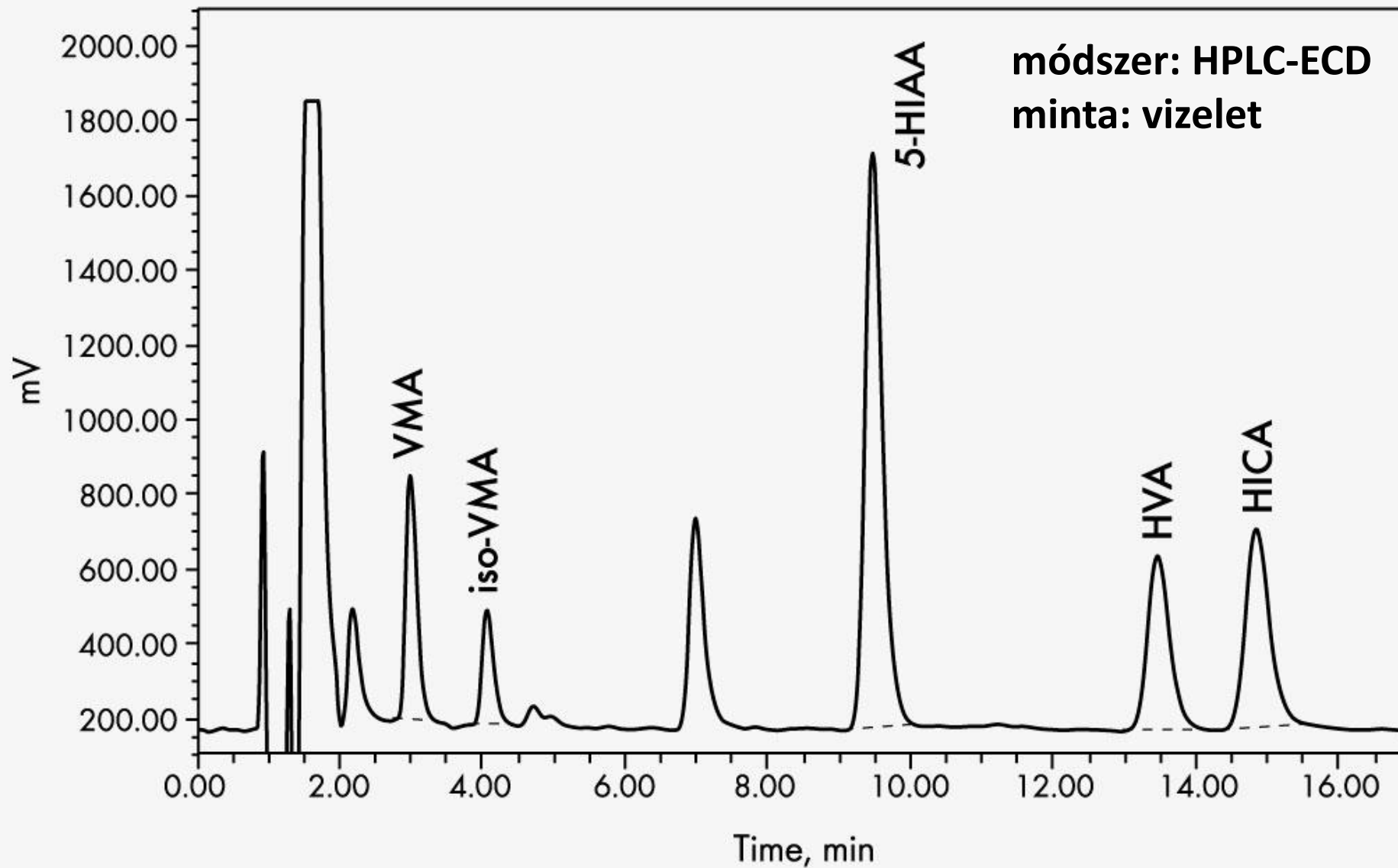
analit	forma	mátrix	specifikusság (%)	érzékenység (%)
dopamin	szabad	24 órás vizelet	99-100	7-8
epinefrin	szabad	24 órás vizelet	100	29-72
epinefrin és norepinefrin	szabad	plazma	81-100	76-84
epinefrin és norepinefrin	szabad	24 órás vizelet	88-100	71-93
metanefrin	szabad	plazma	96	46
metanefrin és normetanefrin	szabad	24 órás vizelet	100	94
metanefrin és normetanefrin	szabad	plazma	85-100	96-100
metanefrin és normetanefrin	szabad + konjugált	24 órás vizelet	98-100	71-94
norepinefrin	szabad	24 órás vizelet	100	50-61
normetanefrin	szabad	plazma	87	92
vanilmandulasav	szabad	24 órás vizelet	95-96	60-72

Metanefrinek és 3-metoxitiramin vizsgálata plazmában HPLC-ESI-QqQ-MS/MS módszerrel





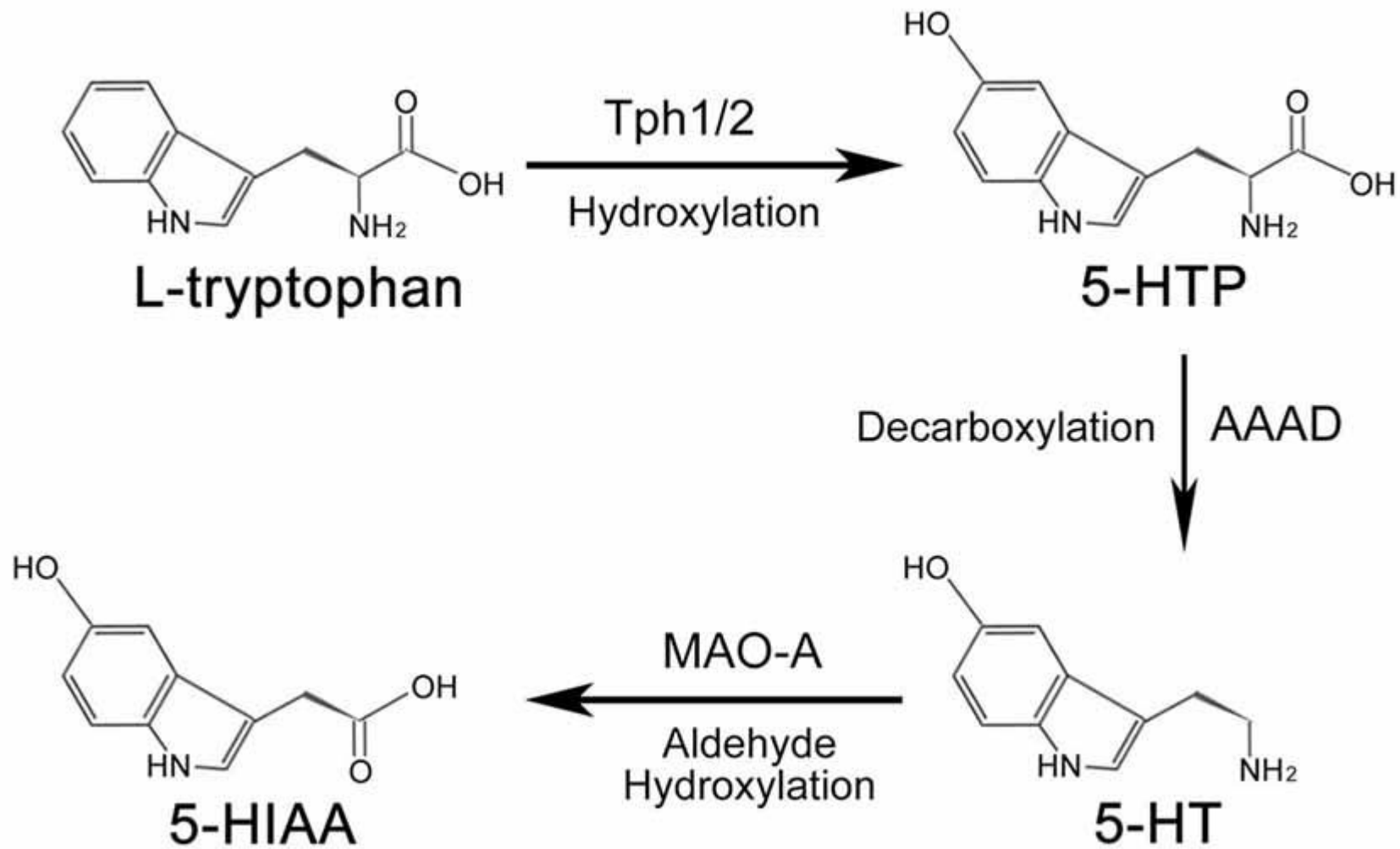




Fontos szempontok a katekolaminok és metabolitjaik vizeletben történő vizsgálata során

- középsugár (random) vizelet vagy 24 órás gyűjtés
- kreatinin mennyiségre történő normalizálás
- tároláshoz ill. gyűjtéshez $\text{pH} < 2$ javasolt

Triptaminok vizsgálata neourendokrin daganatok diagnózisa során



5-HTP: 5-hidroxitriptofán, 5-HT: szerotonin, 5-HIAA: 5-hidroxindolecetsav

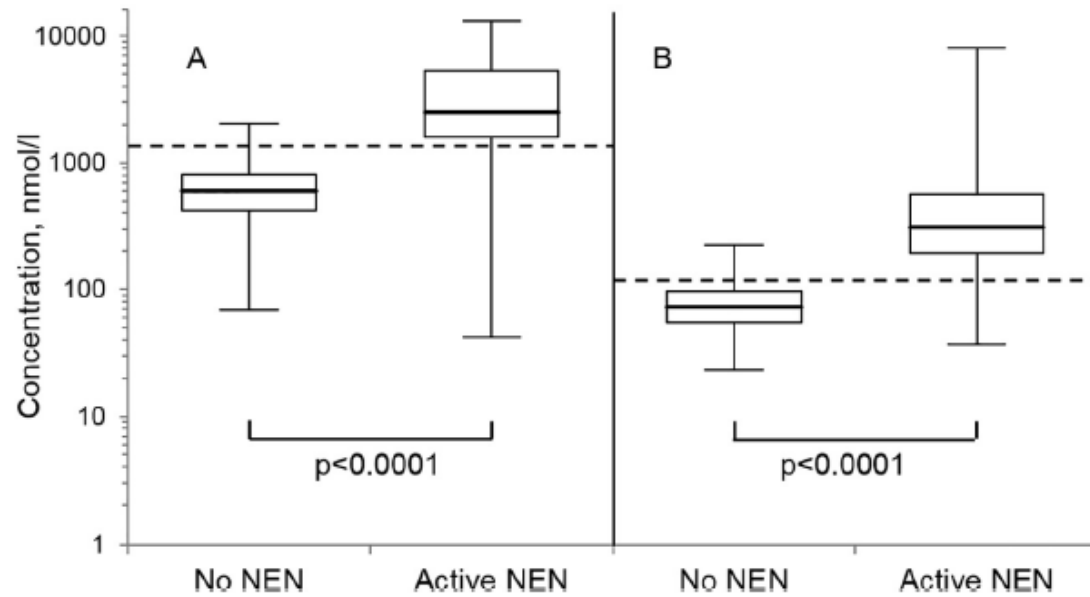


Fig. 5. Serotonin (A) and 5-HIAA (B) concentrations in serum from healthy individuals (No NEN, n = 89) and from active NEN patients (n = 39). The dotted line shows the respective upper reference limits of 1490 nmol/l and 123 nmol/l.

Szerotonin mérésére a plazma alkalmatlan!

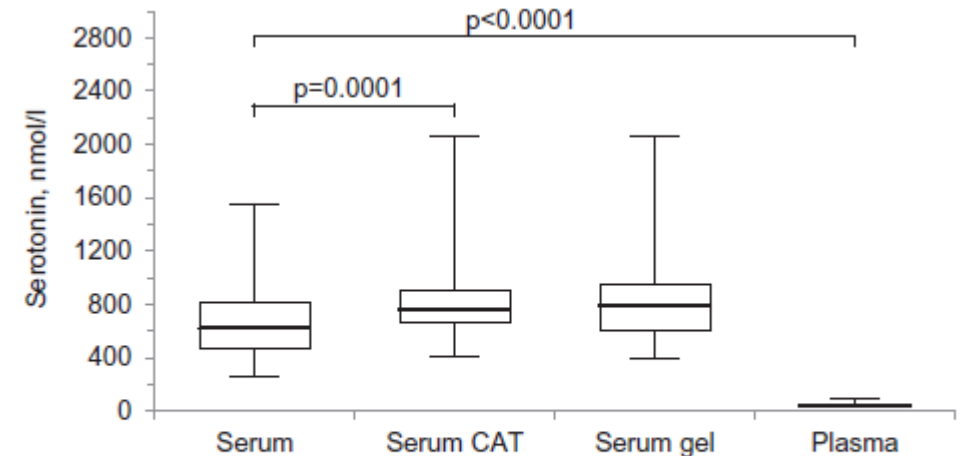


Fig. 2. Distribution of serotonin concentrations in samples drawn into plain serum (serum), serum activator (CAT), serum gel and plasma (Li-heparin) tubes from 31 healthy donors.

Köszönöm a figyelmet!

