

LIPIDOMICKÁ ANALÝZA MAKROFÁGŮ METODOU LC-MS

KATEŘINA PRAŽÁKOVÁ^{a,b}, VLADIMÍR VRKOSLAV^b, ŠTĚPÁN STRNAD^b, BARBORA MUFFOVÁ^c, SOŇA KAUEROVÁ^c, JIŘÍ FRONĚK^c, IVANA KRÁLOVÁ LESNÁ^c, RUDOLF POLEDNE^c a DAVID SÝKORA^a

^a Ústav analytické chemie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6, ^b Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v. v. i., Flemingovo náměstí 542/2, 160 00 Praha 6, ^c Institut klinické a experimentální medicíny, Vídeňská 1958/9 140 21 Praha 4, Česká republika
prazakoa@vscht.cz

Klíčová slova: makrofágy, lipidomika, kapalinová chromatografie, hmotnostní spektrometrie

• <https://doi.org/10.54779/ccsss20240066>

Úvod

V současnosti je v populaci pozorována zvyšující se incidence kardiovaskulárních chorob. Významným faktorem přispívajícím k jejich rozvoji je obezita a s ní spojené prozánětlivé procesy probíhající v tukové tkáni. Těch se významně účastní makrofágy, buňky nespecifického imunitního systému, které se dále dělí na prozánětlivé a protizánětlivé¹. Pro lepší pochopení probíhajících dějů je potřebné zabývat se analýzou lipidomu makrofágů z těchto dvou zmíněných skupin. Předkládaná práce byla zaměřena na optimalizaci vybraných parametrů LC-MS metody pro analýzu 71 lipidů z 16 lipidových tříd. Dalším cílem práce byla detailní charakterizace retenčních závislostí pro jednotlivé třídy lipidů za optimalizovaných chromatografických podmínek. LC-MS metoda byla následně aplikována pro analýzu lipidomu reálných vzorků makrofágů izolovaných z tukové tkáně ledvin dárců při transplantaci.

Experimentální část

Pro optimalizaci LC-MS metody byl využit směsný roztok standardů lipidů připravený ze směsi lipidů UltimateSPLASH™ ONE, cholesterolu a 16:0 kardiolipinu (vše Avanti Polar Lipids, USA). Seznam tříd lipidů obsažených ve směsi včetně počtu zástupců z jednotlivých tříd uvádí tab. I. Analýza probíhala na hmotnostním spektrometru Orbitrap IQ-X Tribrid (Thermo Scientific, USA) spojeném s chromatografickým systémem tvořeným autosamplermem

TriPlus RSH Smart 850, kvartérním čerpadlem a kompartmentem na kolony z řady Vanquish (vše Thermo Scientific, USA). Optimalizace vycházela z již publikované LC-MS metody². Mobilní fáze se skládala ze dvou složek. Složkou A byla směs acetonitrilu a ultračisté vody (60:40 (V/V)). Složkou B byla směs propan-2-olu a acetonitrilu (90:10 (V/V)). Obě složky obsahovaly přídavek mravenčanu amonného (koncentrace 10 mmol l⁻¹) a mravenčí kyseliny (0,1 obj.%). Výchozí nastavení průběhu gradientové eluce bylo následující: 0 min (30 % B), 2 min (43 % B), 2,1 min (55 % B), 12 min (65 % B), 18 min (85 % B), 20 min (100 % B), 20–25 min (100 % B), 25,1 min (30 % B) a 25,1–30 min (30 % B). Nastříkáváno bylo 5 µl vzorku pro měření v pozitivním módu a 10 µl vzorku pro měření v negativním módu elektrosprejové ionizace. Parametry elektrospreje uvádí tab. II. Skenování probíhalo v rozsahu m/z 250 až 1600. Hmotnostní spektra byla měřena s rozlišením 120 000.

Optimalizace se postupně soustředila na výběr vhodné stacionární fáze (testování čtyř kolon), nastavení průtoku mobilní fáze (varianty 180 µl min⁻¹ a 300 µl min⁻¹), desolvační teploty elektrospreje (varianty 300 °C, 350 °C,

Tabulka I
Seznam lipidových tříd obsažených ve směsném vzorku

Třída lipidů	Zkratka	Počet lipidů
Triacylglyceroly	TG	9
Cholesterol a cholesterylestery	Chol	6
Ceramidy	Cer	5
Diacylglyceroly	DG	5
Fosfatidylethanolaminy	PE	5
Fosfatidylglyceroly	PG	5
Fosfatidylcholin	PC	5
Fosfatidylinositoly	PI	5
Fosfatidylseriny	PS	5
Sfingomyeliny	SM	5
Lysofosfatidylethanolaminy	LPE	3
Lysofosfatidylglyceroly	LPG	3
Lysofosfatidylcholin	LPC	3
Lysofosfatidylinositoly	LPI	3
Lysofosfatidylseriny	LPS	3
Kardiolipiny	CL	1

Tabulka II
Vybrané výchozí parametry iontového zdroje

Parametr	Hodnota
Napětí (pozitivní mód)	3500 V
Napětí (negativní mód)	2800 V
Sušicí plyn	40 Arb
Pomocný plyn 1	3 Arb
Pomocný plyn 2	2 Arb
Teplota kapiláry	320 °C
Desolvační teplota	300 °C

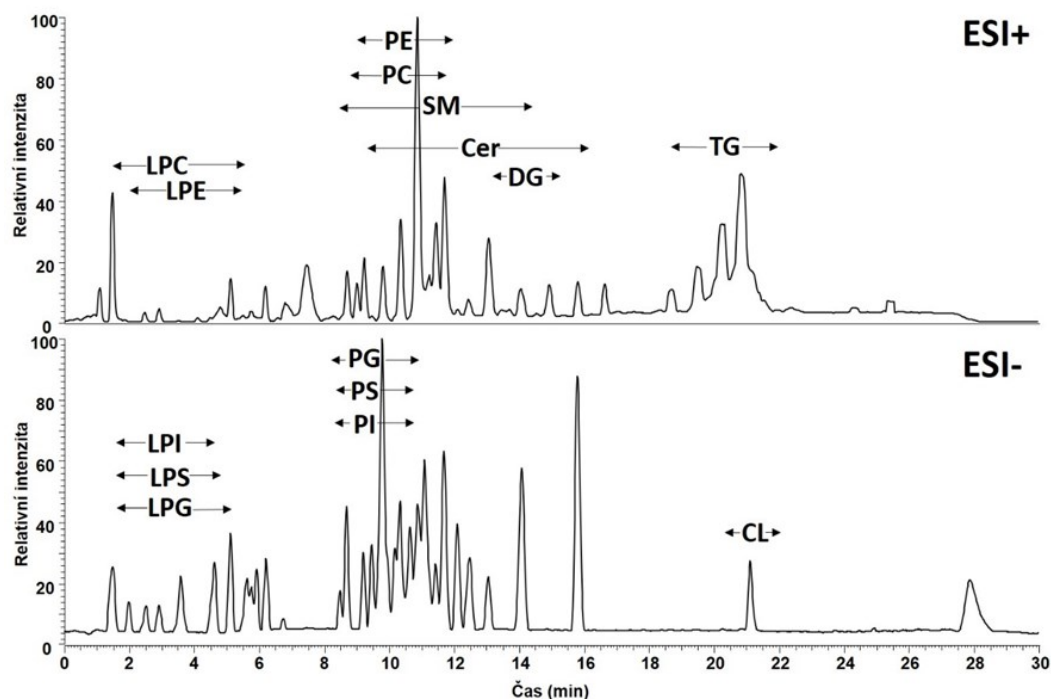
400 °C), počátečního bodu gradientové eluce (počátek na 30 % B a 0 % B) a teploty kolony (45 °C, 55 °C). K vyhodnocení byly využity programy Xcalibur™ (Thermo Scientific, USA) a MZmine 3 (cit.³). Volba optimálního nastavení parametrů metody proběhla na základě výpočtu a maximalizace píkových kapacit pro jednotlivé třídy, resp. zhodnocení intenzity signálu v případě výběru desolvační teploty. Důraz byl kladen rovněž na tvar píků, který byl zásadní pro správný odečet parametrů, jako je retenční čas a šířka píku v polovině jeho výšky.

Za výsledných optimalizovaných podmínek byla změněna směs standardů lipidů a pro každou třídu byly detailně zmapovány retenční závislosti. Následně byly provedeny pilotní experimenty se vzorky makrofágů od pěti dárců. Makrofágy od každého jedince byly rozděleny na prozá-

nětlivé (přítomnost charakteristických znaků CD14+, CD16+) a protizánětlivé (přítomnost znaků CD14+, CD16-) pomocí průtokové cytometrie. Izolované a rozříděné vzorky makrofágů dodal kolektiv pracoviště Centra experimentální medicíny na Institutu klinické a experimentální medicíny (IKEM). Tyto vzorky byly podrobeny extrakci (postup adaptován dle cit.⁴) a analyzovány za optimalizovaných podmínek LC-MS metody. Pro vyhodnocení dat byl použit program Lipid-Search™ (Thermo Scientific, USA). Statistická analýza byla provedena pomocí MetaboAnalyst⁵.

Výsledky a diskuse

Prvním krokem optimalizace byl výběr vhodné kolony. Testovány byly čtyři kolony určené pro chromatografii na reverzních fázích: Acquity UPLC BEH C18 1,7 μm, 2,1 mm × 50 mm (Waters, USA), Acquity UPLC BEH C18 1,7 μm, 2,1 mm × 100 mm (Waters, USA), Accura Triart C18, 1,9 μm, 2,1 mm × 50 mm (YMC, Japonsko) a Accura Triart C18 ExRS, 1,9 μm, 2,1 mm × 50 mm (YMC, Japonsko). Jako nejvhodnější byla experimentálně identifikována kolona Acquity UPLC BEH C18 o délce 100 mm. Ze všech testovaných kolon umožnila dosažení nejvyšší píkové kapacity pro 9 z 16 lipidových tříd a zároveň poskytla u všech lipidových tříd píky přijatelného tvaru. Zvýšení průtoku mobilní fáze na 300 μl min⁻¹ ukázalo výrazný vliv na navýšení píkové kapacity u 15 tříd

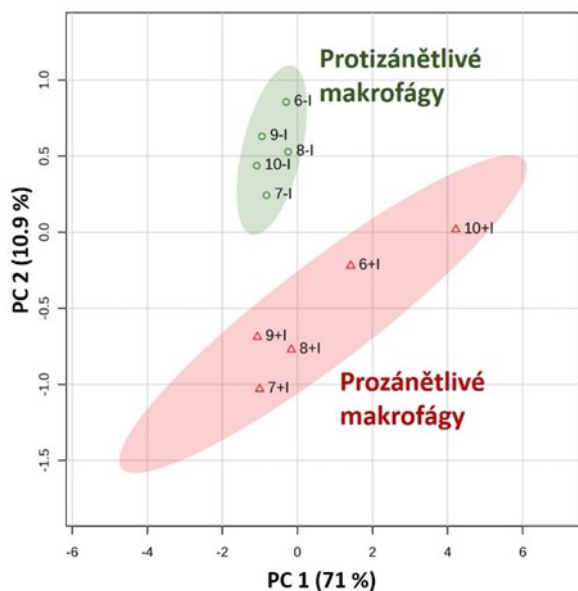


Obr. 1. LC-MS chromatogram pro měření v pozitivním (ESI+) a v negativním (ESI-) módu ionizace včetně vyznačení retenčních okén lipidových tříd; zkratky viz tab. I

z 16 (průměrně o 51 % oproti výchozímu nastavení $180 \mu\text{l min}^{-1}$). Optimální nastavení desolvační teploty bylo vyhodnoceno na základě porovnání intenzit signálů. Pro osm lipidových tříd bylo nejvyšších intenzit dosaženo při teplotě $350 \text{ }^\circ\text{C}$. Ukázalo se, že snížení počátečního zastoupení složky B v mobilní fázi na 0 % zvýšilo píkove kapacity pro 11 lipidových tříd. Nejvýraznější nárůst byl pozorován u tříd LPC (zvýšení o 42,8 %) a LPE (zvýšení o 47,9 %). Posledním optimalizovaným parametrem byla teplota kolony. U 13 lipidových tříd bylo s teplotou kolony $55 \text{ }^\circ\text{C}$ dosaženo vyšších píkovek kapacit. Průměrně narostla píkova kapacita o 24,5 %. Obr. 1 ukazuje LC-MS chromatogram základního píku za optimalizovaných podmínek v pozitivním a v negativním módu ionizace. Vyznačena jsou retenční okna jednotlivých tříd lipidů.

Za optimalizovaných podmínek byly zjištěny retenční závislosti jednotlivých tříd lipidů, tj. závislosti retenčního času na parametru ECN (equivalent carbon number), který lze vypočítat jako $\text{ECN} = \text{HCN} - 2n$, kde HCN odpovídá počtu atomů uhlíku ve všech acylových řetězcích daného lipidu a n odpovídá počtu dvojných vazeb v těchto řetězcích⁶. Závislosti bylo možné vhodně proložit lineárním modelem (dosaženo $R^2 > 0,99$).

Rovněž byly provedeny první analýzy reálných vzorků makrofágů. Po zpracování naměřených dat v programu LipidSearchTM bylo pro další vyhodnocení využito 39 lipidů z osmi různých tříd (Cer, DG, PC, PE, SM, TG, PI, PS). Obr. 2 zobrazuje graf komponentního skóre získaný metodou hlavních komponent. Pomocí prvních dvou hlavních komponent bylo možno vysvětlit celkem 81,9 % rozptylu vstupních dat. Z grafu je patrné, že došlo k rozdělení vzorků prozánětlivých a protizánětlivých makrofágů.



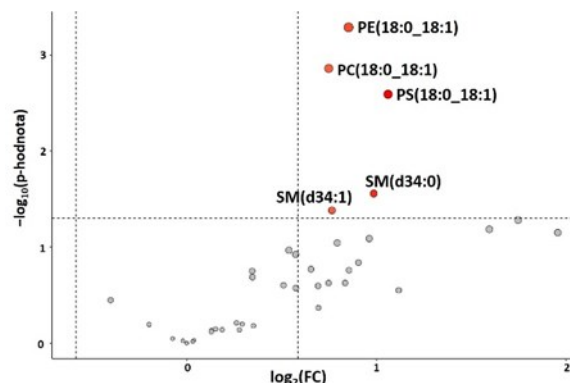
Obr. 2. Diagram komponentního skóre; analýza hlavních komponent pro sadu vzorků makrofágů

do dvou oddělených oblastí. Obr. 3 znázorňuje vulkánový graf. Prahová hodnota změny (fold change, FC) byla 1,5 a prahová p -hodnota byla nastavena na 0,05. Červeně je v grafu zvýrazněno pět lipidů, jejichž koncentrace byla u prozánětlivých makrofágů významně zvýšena (alespoň 1,5krát). Jednalo se o dva zástupce z třídy SM a fosfolipidy z tříd PE, PS, PC obsahující ve své struktuře acylové zbytky stearové kyseliny (18:0) a olejové kyseliny (18:1).

Závěr

V předkládané práci byla provedena optimalizace LC-MS metody pro analýzu 71 lipidů z 16 tříd. Nejlepších výsledků bylo dosaženo při separaci na koloně Acquity UPLC BEH C18 o délce 100 mm při průtoku mobilní fáze $300 \mu\text{l min}^{-1}$, zastoupení 100 % složky A v mobilní fázi na počátku analýzy a teplotě kolony $55 \text{ }^\circ\text{C}$. Desolvační teplota elektrospreje byla nastavena na $350 \text{ }^\circ\text{C}$. Za optimalizovaných podmínek byly změřeny retenční závislosti pro jednotlivé třídy lipidů, které byly v následujících analýzách použity pro ověření správné identifikace lipidů. Proběhla pilotní měření vzorků makrofágů izolovaných z tukové tkáně. Analýza hlavních komponent poskytla pohled na shlukování vzorků prozánětlivých a protizánětlivých makrofágů. Bylo zjištěno, že lipidomická analýza má potenciál rozlišit prozánětlivé a protizánětlivé makrofágy. Vulkánový graf dále ukázal, že v případě prozánětlivých makrofágů byla významně zvýšena koncentrace u pěti lipidů. Pro potvrzení dosažených závěrů a další rozvoj metody bude ovšem třeba proměřit větší skupinu vzorků makrofágů.

Podpořeno projektem Národního institutu pro výzkum metabolických a kardiovaskulárních onemocnění (Program EXCELES, ID: LX22NPO5104) – financováno Evropskou unií – Next Generation EU.



Obr. 3. Vulkánový graf; červeně zvýrazněny lipidy s významně zvýšenou koncentrací u prozánětlivých makrofágů, prahová změna 1,5, prahová p -hodnota 0,05

LITERATURA

1. Liang W., Qi Y., Yi H., Mao C., Meng Q., Wang H., Zheng C.: *Front. Immunol.* **13**, 908749 (2022).
2. Mrázíková L., Hojná S., Vaculová P., Strnad Š., Vrkoslav V., Pelantová H., Kuzma M., Železná B., Kuneš J., Maletínská L.: *Nutrients* **15**, 280 (2023).
3. Schmid R. a 41 spoluautorů: *Nat. Biotechnol.* **41**, 447 (2023).
4. Matyash V., Liebisch G., Kurzchalia T. V., Shevchenko A., Schwudke D.: *J. Lipid Res.* **49**, 1137 (2008).
5. <https://www.metaboanalyst.ca>, staženo 17. 1. 2024.
6. Lange M., Ni Z., Criscuolo A., Fedorova M.: *Chromatographia* **82**, 77 (2019).

K. Pražáková^{a,b}, V. Vrkoslav^b, Š. Strnad^b, B. Muffová^c, S. Kauerová^c, J. Froněk^c, I. K. Lesná^c, R. Poledne^c, and D. Sýkora^a (^a*Department of Analytical Chemistry, University of Chemistry and Technology Prague, Prague*, ^b*Institute of Organic Chemistry and Biochemistry of the Czech Academy of Sciences, Prague*, ^c*Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague, Czech Republic*):
LC-MS Lipidomic Analysis of Macrophages

Currently, an increasing incidence of cardiovascular diseases is observed in the population. Factors contributing to their development are obesity and pro-inflammatory processes occurring in the adipose tissue. Macrophages, cells of the non-specific immune system, which can be divided into pro-inflammatory and anti-inflammatory, play a significant role in these processes. For a better understanding of these phenomena, it is necessary to analyze the lipidome of macrophages of the two mentioned groups.

The presented work was focused on the optimization of selected parameters of the LC-MS method for the analysis of 71 lipids from 16 lipid classes. Best results were achieved with column Acquity UPLC BEH C18 (1.7 μm , 2.1 mm \times 100 mm) operating at the flow rate of 300 $\mu\text{L min}^{-1}$ and temperature of 55 $^{\circ}\text{C}$. The optimal desolvation temperature was 350 $^{\circ}\text{C}$ and the gradient elution started at 0 % of solvent B in the mobile phase. Retention dependencies were characterized for individual lipid classes. They were successfully fitted with a linear model ($R^2 > 0.99$) and subsequently used to confirm the accuracy of lipid identification. The optimized LC-MS method was also used to analyze the real samples of macrophages isolated from the adipose tissue of kidney donors. Samples were provided by Institute for Clinical and Experimental Medicine. The principal component analysis gave insight into the division of macrophages according to their type. The volcano plot showed a significant increase in the concentration of five lipids in the case of pro-inflammatory macrophages.

Keywords: macrophages, lipidomics, liquid chromatography, mass spectrometry

Acknowledgements

Supported by the project National Institute for Metabolic and Cardiovascular Disease Research (EXCELES Program, ID: LX22NPO5104) – Funded by the European Union – Next Generation EU.



Užití tohoto díla se řídí mezinárodní licencí Creative Commons Attribution License 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/legalcode.cs>), která umožňuje neomezené využití, distribuci a kopírování díla pomocí jakéhokoliv média, za podmínky řádného uvedení názvu díla, autorů, zdroje a licence.