

VÝVOJ NEINVAZIVNÍ DIAGNOSTIKY *ASTHMA BRONCHIALE*

Kamila Syslová¹, Petr Kačer¹, Marek Kuzma², D. Pelcová³, J. Lebedová³

¹ Ústav organické technologie, Vysoká Škola Chemicko-Technologická,
Technická 5, 166 28 Praha 6

² Mikrobiologický Ústav, Česká Akademie Věd, Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4

³ Ústav Pracovního Lékařství, 1. Lékařská Fakulta, Universita Karlova
Na Bojišti 1, 120 00 Praha 2

E-mail: syslovak@vscht.cz

Úvod

Bronchiální astma je onemocnění, jehož incidence v moderní populaci neustále roste jako důsledek zvyšujícího se počtu alergenů v životním prostředí. Včasná diagnostika uvedeného onemocnění je důležitá z hlediska zahájení účinné terapie a minimalizace poškození pacienta. V současné době v praxi používané diagnostické metody spočívají v kombinaci invazivních a *semi*-invazivních metod, které jsou pro pacienta zatěžující a v případě dětí až stresující záležitosti. Analýza dechového kondenzátu je poměrně novou metodou, která představuje alternativní cestu, kterou je možné charakterizovat jako zcela neinvazivní a i pro dětského pacienta nezatěžující. Princip metody spočívá v kvantifikaci specifických látek - biomarkerů, které se vyskytují v uvedené tělní tekutině a jejichž koncentrační hladina je v důsledku probíhající zánětlivé reakce v dýchacích cestách a plicích významně zvýšena. V případě *Astma Bronchiale* představují skupinu specifických látek – biomarkerů - cysteinylované leukotrieny (cys LTs). Jedná se o metabolity kyseliny arachidonové, která je obsažena v buněčných membránách jako součást membránových fosfolipidů [1]. Činností enzymu 5-lipoxygenázy se kyselina arachidonová přeměňuje na nestabilní epoxidový leukotrien A₄ (LTA₄), který může být dále přeměňován jednou ze dvou možných enzymatických drah. Působením LTA₄ hydrolázy dochází ke vzniku leukotrienu B₄ (LTB₄), případně enzymu LTC₄ syntetázy vzniká první člen z cys LTs a to leukotrien C₄ (LTC₄). K cysteinylovaným leukotrienům dále řadíme leukotrien D₄ (LTD₄) a leukotrien E₄ (LTE₄). V řadě cys LTs dochází k postupné přeměně v řadě LTC₄ → LTD₄ → LTE₄ následným působením enzymů glutamyltransferázy a dipeptidázy.

Předkládaná práce si kládla za cíl vypracování protokolu zpracování dechového kondenzátu a stanovení specifických biomarkerů – cys LTs. Výsledkem experimentální činnosti v této oblasti je vypracování zcela originální metody kombinující vysoce specifickou separaci cys LTs – immunoafinitní extrakci, jejíž principem je reakce monoklonální protilátky s příslušným biomarkerem, s dostatečně citlivou a selektivní detekční metodou – hmotnostně-spektrometrickou analýzou (MS), která umožňuje kvantifikaci těchto specifických látek.

Experimentální část

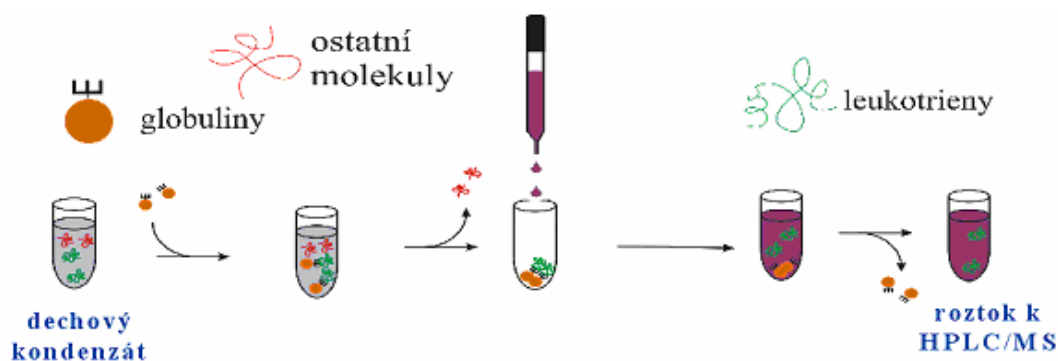
Odběr dechového kondenzátu

Odběr kondenzátu vydechaného vzduchu (KVV) byl prováděn na pracovišti 1.LF UK pomocí kondenzátoru vydechaného vzduchu EcoScreen (Jaeger, Německo) do plastových nádobek o objemu 5ml. Kondenzátor vydechaného vzduchu se skládá z náustku, jednosměrného dechového ventilu, který umožňuje separovat vzduch z výdechu a nádechu, a chladiče, který využívá chladicí protiproudý okruh umožňující provádět odběr při -20°C . Tato nízká teplota je významná pro kvantitativní uchování některých biomarkerů, kterými jsou i cys LTs. Dýchání nosem je zabráněno použitím nosní svorky. Objem 1,5-3,0 ml KVV je získán za dobu 5-15 minut. Ihned po odběru vzorku je k 1 ml KVV přidáno 100 pg vnitřního standardu a takto připravený vzorek byl zamrazen (-80°C). Jako vnitřní standard byl zvolen $[20,20,20,^2\text{H}]$ leukotrien E_4 . Deuterované látky mají stejné chemické a fyzikální vlastnosti, ale liší se pouze molekulovou hmotností, čehož se s výhodou využívá při MS analýzách.

Imunoafinitní separace

Vzhledem k velmi nízké koncentraci cys LTs v kondenzátu vydechaného vzduchu (1 – 200 pg/ml) a komplexnosti uvedené matrice bylo nutno látky před samotnou analýzou (vysokouúčinná kapalinová chromatografie v kombinaci s hmotnostní spektrometrií - LC/MS) separovat a zakoncentrovat. Jako vhodná metoda byla použita imunoafinitní extrakce. Základem této metody je imunochemická reakce založená na vzniku komplexu antigen-protilátka. Základní charakteristikou reakce mezi antigenem a protilátkou je její vysoká specifita. Tedy pokud je k dispozici specifická protilátka – monoklonální protilátka, může být při použití vhodné laboratorní techniky provedena extrakce sledovaného antigenu z biologického vzorku kvantitativně a téměř exklusivně (minimální podíl nespecifických reakcí).

V předkládané práci byla vlastní imunoafinitní extrakce prováděna následujícím postupem: k 1ml dechového kondenzátu (obsahující 100 pg vnitřního standardu $[20,20,20,^2\text{H}]$ leukotrienu E_4 (Biomol, USA)) bylo přidáno 50 μl komerčního cys LTs afinitního sorbentu (Cayman Chemicals, USA). Vzorky byly míchány 60 minut na laboratorní třepačce a poté byly odstředovány 10 minut (500 ot./min). Dechový kondenzát nad sorbentem byl opatrně odstraněn a znehodnocen. Sorbent byl promyt 1ml vody (5 minut třepán a při 500 otáčkách 10 minut odstředován). K promytému sorbentu bylo přidáno 2 x 0,5 ml metanolu pro uvolnění vazeb antigen-protilátka. Vzorek po přidání studeného methanolu byl 5 minut promícháván a následně 5 minut odstředován při 6000 ot./min. Po odstranění sorbentů byly methanolové extrakty slity. Rozpouštědlo bylo odpařeno jemným proudem dusíku. Zbytek po odpařování rozpouštědla byl rozpuštěn v 50 μl mobilní fáze (acetonitril/voda/triethylamin 70/30/pH=11) a následně podroben LC/MS analýze.



Obrázek 1 Schéma imunoafinitní extrakce

LC/MS analýza

Pro vlastní analýzu bylo použito spojení vysokoúčinné kapalinová chromatografie s hmotnostním spektrometrem (Varian 1200 L, USA). Chromatografické dělení látek bylo uskutečněno pomocí kolony Hypercarb Thermo (100 x 2,1 mm x 5 μm) a mobilní fáze o složení acetonitril : voda : triethylamin (TEA) = 70 : 30 : pH = 11, při isokratickém uspořádání a průtoku 200 μl/min. Byla použita elektrosprejová ionizace v negativním modu (ESI). Trojitý kvadrupól, kterým byl vybaven hmotnostní spektrometr umožnil použití vysoce citlivého a selektivního „multiple reaction monitoring“ modu (MRM). Jeho principem je izolace specifického iontu analytu na prvním kvadrupólu, který je následně podroben kolizně-indukované disociaci (CID) na druhém kvadrupólu a charakteristický produktový ion je pak detekován na kvadrupólu třetím. Optimalizací podmínek na hmotnostním spektrometru byly získány parametry používané pro analýzu jednotlivých biomarkerů – cys LTs (LTC₄, LTD₄, LTE₄). Podmínky na hmotnostním spektrometru byly zoptimalizovány z hlediska dosažení maximální citlivosti stanovení na následující hodnoty: napětí na kapiláře -70 V, tlak kolizního plynu (argon) využívaného pro kolizně-indukovanou disociaci (CID) 0,2 Pa. Kolizní energie jako výsledek série optimalizačních experimentů jsou uvedeny v následující tabulce pro každý jednotlivý analyt.

Tabulka 1 Kolizní energie pro jednotlivé biomarkery

Analyt	SRM	Kolizní energie (eV)
LTB ₄	335,1 → 194,1	18
LTB ₄ -d ₄	339,1 → 198,1	18
LTC ₄	624,8 → 271,1	27
LTD ₄	495,2 → 176,1	21
LTE ₄	438,2 → 333,1	19
LTE ₄ -d ₃	441,2 → 336,1	19

Výsledky a diskuse

Biomarkery *Asthma Bronchiale* – cys LTs jsou známy jako málo stabilní látky, proto bylo nezbytné zjistit jejich chování při teplotě skladování (-80°C), v matrici kondenzátu vydechaného vzduchu (KVV), při laboratorní teplotě (25°C) v KVV a v použité mobilní fázi tj. za podmínek jejich zpracování, stejně jako ověřit parametr vlivu opakovaného hlubokého rozmrazování a zamrazování. Bylo zjištěno, že po dobu 2 měsíců při skladování při -80°C nedocházelo k výrazné změně v koncentraci sledovaných látek. Průběh odbourávání za laboratorní teploty byl odlišný u látek vyskytujících se v KVV a v mobilní fázi nicméně rychlost degradace sledovaných biomarkerů byla výrazná a pohybovala se v jednotkách hodin za laboratorní teploty. V matrici KVV byla vedle rozpadu jednotlivých látek (velmi dobře patrný v mobilní fázi) sledována i jejich vzájemná přeměna v řadě $\text{LTC}_4 \rightarrow \text{LTD}_4 \rightarrow \text{LTE}_4$, která je katalyzována v KVV přítomnými enzymovými systémy. Rovněž počet cyklů rozmrazení-zamrazení má negativní vliv na množství cys-LTs detekovaných v KVV. Velmi nízká stabilita leukotrienů v KVV je jeden z nejpravděpodobnějších důvodů pro rozdílné hodnoty uváděné v literatuře [2]. V tomto ohledu je nutné zmínit i skutečnost, že je v průběhu odběru KVV nutné vyloučit kontaminaci slinami, které rovněž v důsledku různých zánětlivých procesů v ústní dutině mohou obsahovat uvedené látky. Absence kontaminace slinami byla proto kontrolována u každého vzorku KVV prostřednictvím testu na přítomnost α -amylázy, čímž byla vyloučena možnost kontaminace vzorků leukotrieny z jiné matrice. Pro extrakční metodu je nutné, aby kvantitativně byla schopná separovat sledované látky v co nejkratším časovém intervalu, s ohledem na jejich nízkou stabilitu. Imunoafinitní separace cys LTs s použitím komerčně vyráběných afinitních sorbentů tuto podmínku splňovala. Pro použití imunoafinitních sorbentů byl řadou pokusů optimalizován poměr přidávaného množství sorbentu/1 ml KVV na $50\mu\text{l}$ sorbentu k maximálnímu množství 500pg/ml markerů. Dalším parametrem, který bylo potřeba optimalizovat byla doba rovnovážné reakce antigen – protilátka, kde byla jako optimální nalezena hodnota 60 minut. Při delší době extrakce již převažovala degradace LTs. Při extrakci z kondenzátu vydechaného vzduchu, se projevila následná reakce cys LTs, tato skutečnost musela být uvažována při sledování korelace cys LTs na asthmatickém onemocnění. Z tohoto důvodu byla pro klinické vzorky vyhodnocována nejen koncentrační úroveň jednotlivých leukotrienů, ale rovněž suma cys LTs.

Získaná data byla statisticky vyhodnocena s pomocí softwaru - Statistica version 7.0. Statistická analýza byla realizovaná s využitím Studentova t-testu s přesností $p < 0,05$. Vyvinutou metodu kombinující imunoextrakci s LC/MS detekcí bylo na základě statistického vyhodnocení možné charakterizovat následujícími hodnotami:

Limit kvantifikace [pg/ml]:

biomarker	LTB_4	LTC_4	LTD_4	LTE_4
hodnota	4pg	10pg	6pg	5pg

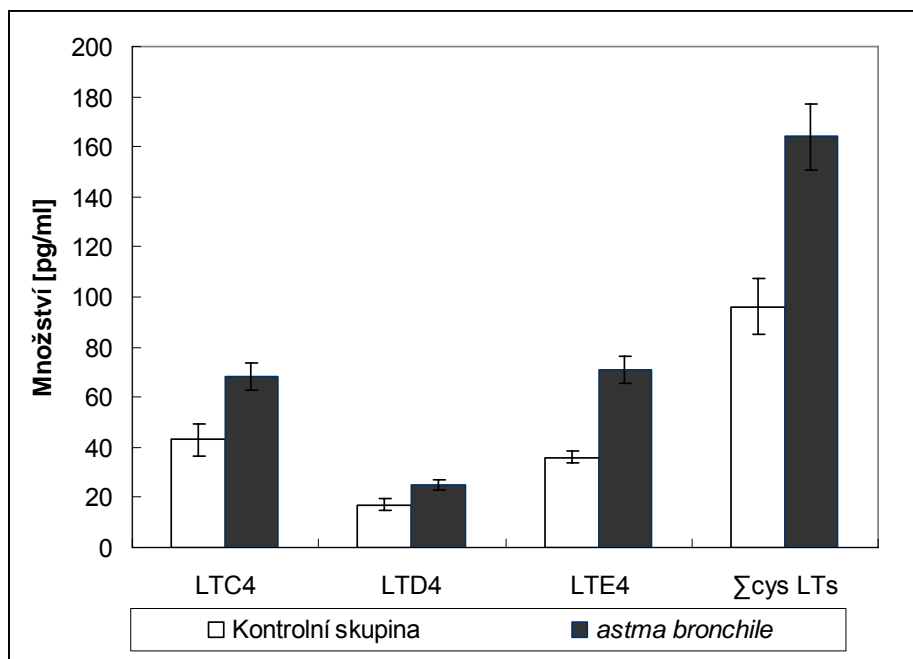
Limit detekce [pg/ml]:

biomarker	LTB ₄	LTC ₄	LTD ₄	LTE ₄
hodnota	1pg	2pg	1pg	1pg

Chyba stanovení: $11 \pm 2 \%$

Na 1. LF UK na katedře pracovního lékařství byla v průběhu dvou let shromážděna série 554 klinických vzorků KVV, přičemž 120 vzorků tvořila kontrolní skupina pacientů bez diagnózy *Asthma bronchiale*, zbylé vzorky pocházely od subjektů s různými formami a stádii uvedeného onemocnění (434 pacientů). Tento rozsáhlý soubor byl v uvedeném období zpracován a vyhodnocen, přičemž do vyhodnocení byla zahrnuta i celá řada parametrů a výsledků dalších medicínálních diagnostických metod, které budou v blízké budoucnosti vyhodnoceny s ohledem na možnost zavedení popsané metodiky do klinické praxe.

Výsledky byly statisticky zpracovány a jsou uvedeny na obrázku 5, z kterého je zřejmé, že existuje výrazný rozdíl mezi hodnotami koncentrací jednotlivých cys LTs, případně jejich sumární hodnoty mezi kontrolní skupinou na straně jedné a pacienty s diagnostikovaným onemocněním *Asthma bronchiale* na straně druhé.



Obrázek 2 Výsledky klinické studie

Závěr

Předkládaná práce se zabývá vývojem neinvazivní diagnostické metody bronchiálního astmatu. Navržená metoda kombinuje imunoafinitní separaci s hmotnostně spektrometrickým stanovením biomarkerů uvedeného onemocnění ze skupiny leukotrienů, které se vyskytují v kondenzátu vydechaného vzduchu. Stanovení leukotrienů v kondenzátu vydechaného vzduchu odráží skutečně zánětlivý proces odehrávající se výlučně v plicích případně dýchacích cestách a nikoliv v celém těle, jak je tomu v případě stanovení uvedených biomarkerů v moči, případně krevní plazmě. Navržená metoda byla optimalizována ve snaze postihnout co největší množství parametrů jak na straně odběru vzorku a zacházení s ním, tak na straně jeho zpracování a následného analytického stanovení. Vyvinutá metoda byla následně testována na poměrně velkém souboru klinických vzorků a byla nalezena velmi dobrá korelace mezi pacienty s diagnostikovaným onemocněním *Astma bronchiale*, u nichž se vyskytují významně zvýšené hladiny biomarkerů na bázi leukotrienů uvedeného onemocnění v porovnání s kontrolní skupinou. Metoda je vhodná jako základ pro navržení bio-chipu fungujícím na shodném principu kombinujícím imunoseparaci s vysoce citlivou detekční metodou na bázi LC/MS. Oba závěry by v sobě mohli skrývat možnost odstartování větší klinické studie, která by měla ověřit možnost zavedení uvedené metodiky do klinické praxe, stejně jako vyvinutí bio-chipu, který by zrychlil a zefektivnil navrženou metodiku.

Poděkování

Ministerstvu Zdravotnictví České Republiky (Grant 8108-3/2004) a Ministerstvu školství a tělovýchovy České Republiky (Grant CEZ: MSM 223 100001).

Literatura

- [1] E.S. Musiek, J. K. Cha, H. Yin, W. E. Zacker, E. S. Terry, N. A. Porter, T. J. Montine, J. D. Morrow J. Chromatogr. B 799 (2004) 95.
- [2] P. Montuschi, New perspectives in monitoring lung inflammation. Analysis of exhaled breath condensate. Boca Raton, CRC Press (2005), 53-64.