

Streszczenie

Celem niniejszej pracy było opracowanie metod oznaczenia stężenia hepcydyny oraz panelu metabolitów przemian NO, składającego się z argininy, asymetrycznej dimetyloargininy (ADMA), symetrycznej dimetyloargininy (SDMA), cytruliny oraz dimetyloaminy (DMA) w surowicy, przy użyciu techniki ultra wysokosprawnej chromatografii cieczowej (UHPLC) sprzęgniętej z wysokorozdzielczym spektrometrem mas, typu pojedynczy kwadrupol – analizator czasu przelotu (QTOF). Dotychczasowe metody oznaczania hepcydyny oparte są głównie na testach immunoenzymatycznych lub spektrometrii mas. Testy immunoenzymatyczne cechują się niską wiarygodnością ze względu na słabą immunogenność hepcydyny i istnienie kilku strukturalnie podobnych izoform. Natomiast opisane w literaturze metody oparte na ekstrakcji ciecz-ciecz i analizie z wykorzystaniem spektrometrii mas, cechują się niskim współczynnikiem odzysku lub wymagają dodatkowego oczyszczania na złożach SPE, co znacząco podnosi koszty analiz. Z kolei żadna z istniejących metod wykorzystywanych do oceny ilościowej intermediatów NO nie pozwala na jednoczesną analizę wszystkich wymienionych metabolitów.

W pracy zaproponowano metodę analizy hepcydyny techniką UHPLC-ESI-QTOF w odwróconym układzie faz na kolumnie HSS T3 z wykorzystaniem ekstrakcji typu ciecz-ciecz, przy użyciu acetonitrylu jako odczynnika ekstrakcyjnego. W analizie ilościowej monitorowano jony $m/z = 558,8113$ ($[M+5H]^{5+}$) dla hepcydyny oraz $m/z = 562,8209$ ($[M+5H]^{5+}$) dla jej znakowanej pochodnej. Dla analizy panelu metabolitów NO zaproponowano metodę również opartą na technice UHPLC-ESI-QTOF w odwróconym układzie faz na kolumnie HSS T3, lecz z wykorzystaniem chlorku benzoilu (BCI) do ekstrakcji i upochadniania metabolitów w jednym kroku. Do analizy ilościowej wykorzystano następujące jony (m/z): 279,1457 dla argininy; 286,1749 dla D7-argininy; 307,1717 dla ADMA i SDMA; 314,2076 dla D7-ADMA; 280,1297 dla cytruliny; 150,0919 dla DMA i 156,1113 dla D6-DMA. Obie metody zostały zwalidowane pod kątem liniowości, dokładności, precyzji, odzysku oraz granicy wykrywalności (LOD) i oznaczalności (LOQ). Uzyskano następujące wartości LOD: 1,7 μM dla argininy; 0,03 μM dla ADMA; 0,02 μM dla SDMA; 0,36 μM dla cytruliny; 0,06 μM dla DMA i 0,5 ng/ml dla hepcydyny. Wartości LOQ wynosiły: 3,2 μM dla argininy; 0,08 μM dla ADMA; 0,05 μM dla SDMA; 1,08 μM dla cytruliny; 0,19 μM dla DMA i 2,0 ng/ml dla hepcydyny. Zaproponowane metody są czułe, powtarzalne i cechuje je wysoki stopień odzysku.

Opracowane metody zostały wykorzystane do oceny stężeń hepcydyny i metabolitów przemian NO w otępieniu alzheimerowskim i naczyniopochodnym w odniesieniu do stopnia zaburzeń funkcji poznawczych i zmian strukturalnych w mózgu oraz do oceny mocy diagnostycznej badanych metabolitów jako potencjalnych biomarkerów w demencji. Choroby otępienne stają się poważnym problemem klinicznym i społecznym starzejących się społeczeństw. Ich poprawna i wczesna diagnoza warunkuje wdrożenie odpowiedniego leczenia, poprawiając komfort życia tak pacjentów dotkniętych tego typu schorzeniami, jak i ich rodzin. Jej warunkiem jest poznanie patomechanizmów choroby na poziomie molekularnym. Pogłębiona wiedza może pozwolić na identyfikację potencjalnych biomarkerów, a także umożliwić wskazanie nowych celów terapeutycznych.

Istniejący stan wiedzy pozwala na powiązanie zarówno hepcydyny, jak i metabolitów przemian tlenu azotu, z demencją. Jednak dane literaturowe nie są kompletne, istnieje też w nich wiele sprzeczności, które mogą wynikać z niewłaściwie dobranych metod analitycznych oraz niewielkich i niehomogennych grup pacjentów. Brak jest w literaturze prac analizujących związek z typem demencji i takich, które odnosiłyby obserwowane nieprawidłowości w stężeniu analitów nie tylko do zaburzeń funkcji poznawczych, ale i zmian strukturalnych w mózgu, będących bezpośrednią przyczyną chorób otępiennych.

Badaniem objęto 268 osób, wśród których było 127 pacjentów z demencją (49 z chorobą Alzheimera - AD, 42 z demencją naczyniopochodną - VaD i 36 z demencją mieszaną - MD), 13 pacjentów bez demencji lecz skarżących się na przewlekłe bóle lub zawroty głowy lub na ubytki pamięci oraz 128 honorowych krwiodawców stanowiących grupę kontrolną. W pracy wykazano po raz pierwszy wzrost stężenia hepcydyny a spadek stężenia argininy w demencji naczyniopochodnej, znamienne wyższy niż w demencji o patologii alzheimerowskiej, oraz spadek stężeń ADMA i cytruliny na poziomie zbliżonym do AD. Zaobserwowano, że stężenia hepcydyny oraz ADMA i SDMA rosną wraz z deterioracją funkcji poznawczych, przy czym na zależności te zasadniczy wpływ ma typ demencji: w patologii alzheimerowskiej występuje zależność dla hepcydyny, a w patologii naczyniopochodnej - dla ADMA i SDMA. Również po raz pierwszy wykazano, że wraz ze wzrostem zaawansowania globalnych zmian zanikowych kory mózgu, rośnie stężenie SDMA i DMA, a hepcydyna wykazuje taką tendencję. Także nasilanie się zaniku hipokampa wiązało się ze wzrostem stężeń SDMA i DMA. Natomiast wyższe stężenia hepcydyny, DMA i cytruliny oraz niższe argininy towarzyszyły zmianom naczyniopochodnym. W przypadku hepcydyny i argininy, obserwowano zależność ze stopniem zaawansowania zmian hiperintensywnych istoty białej mózgu, a w przypadku DMA i cytruliny

- z występowaniem zawałów strategicznych. W pracy wykazano również zależność między stężeniami DMA, argininy i hepcydyny a stopniem niedokrwienia mózgu wyrażonego wskaźnikiem HIS - liniową w przypadku DMA i nieliniową w przypadku argininy i hepcydyny. Udokumentowano także dobrą skuteczność diagnostyczną argininy jako indywidualnego markera dyskryminującego pacjentów z demencją od osób zdrowych oraz doskonałą skuteczność panelu markerów składającego się z metabolitów NO i hepcydyny.

Abstract

The study was designed to develop methods for quantification of serum hepcidin as well as of a panel of NO intermediates consisting of arginine, asymmetric dimethylarginine (ADMA), symmetric dimethylarginine (SDMA), citrulline and dimethylamine (DMA) using ultra-high performance liquid chromatography (UHPLC) coupled with a high-resolution hybrid mass spectrometer, single quadrupole - time-of-flight (QTOF) analyzer. Currently, hepcidin is quantified using either immunoenzymatic assays or mass spectrometry. Due to low immunogenicity of hepcidin and its being present in several structurally similar isoforms, the credibility of immunoassays has been questioned. In turn, the available methods using liquid-liquid extraction followed by mass spectrometry have low recovery rates or are expensive and time-consuming as they require analyte separation using SPE. Also, none of the published methods for simultaneous quantification of NO metabolites such as arginine, ADMA, SDMA and citrulline includes DMA.

Here, a reverse phase UHPLC-ESI-QTOF method on HSS T3 column using liquid-liquid extraction with acetonitrile as an extraction reagent was proposed. For hepcidin quantification, the following ions (m/z) were monitored: 558,8113 ($[M+5H]^{5+}$) for hepcidin and 562,8209 ($[M+5H]^{5+}$) for its isotope. For the quantification of NO intermediates panel, also a reverse phase UHPLC-ESI-QTOF method on HSS T3 column was used but a single-step of extraction and derivatization using benzoyl chloride was applied instead of acetonitrile extraction. The following ions (m/z) were used: 279,1457 for arginine; 286,1749 for D7-arginine; 307,1717 for ADMA and SDMA; 314,2076 for D7-ADMA; 280,1297 for citrulline; 150,0919 for DMA and 156,1113 for D6-DMA. Both methods were validated for linearity, accuracy, precision, recovery and limits of detection (LOD) and quantification (LOQ). The following LODs were obtained: 1,7 μM for arginine; 0,03 μM for ADMA; 0,02 μM for SDMA; 0,36 μM for citrulline; 0,06 μM for DMA and 0,5 ng/ml for hepcidin. Obtained LOQs were as follows: 3,2 μM for arginine; 0,08 μM for ADMA; 0,05 μM for SDMA; 1,08 μM for citrulline; 0,19 μM for DMA and 2,0 ng/ml for hepcidin. The methods proposed here are characterized by satisfactory sensitivity, reproductivity, and high recovery rates.

They were subsequently used for the evaluation of hepcidin and NO intermediates in neurodegenerative and vascular dementia with reference to the degree of cognitive loss and

structural changes in the brain as well as for the evaluation of the diagnostic potential of the metabolites as prospective markers in dementia.

Dementia becomes a growing clinical and socioeconomical problem of aging societies. Their correct and early diagnosis determines the implementation of appropriate treatment, improving the quality of life of patients affected by this type of diseases as well as their families. However, discerning the pathomechanisms of disease at the molecular level is prerequisite as the in-depth knowledge may allow for the identification of new potential biomarkers and/or therapeutic targets.

Both hepcidin and NO intermediates are linked with dementia. However, the available data is not complete and often contradictory, what may result from improperly selected analytical methods as well as small and inhomogeneous groups of patients. There are no reports on the relationship between these metabolites and the type of dementia or structural changes in the brain, a direct cause of the disease.

Study population consisted of 268 individuals, of whom 127 had dementia (49 with Alzheimer disease - AD, 42 with vascular dementia - VaD and 36 with mixed dementia - MD), 13 patients without dementia but suffering from chronic headaches, dizziness or memory loss and 128 apparently healthy blood donors used as a control group. To the best of author's knowledge, this is the first report on increased hepcidin and decreased arginine in vascular dementia, significantly higher than in neurodegenerative dementia, as well as decreased concentrations of ADMA and SDMA in a degree observed in AD patients. Increased hepcidin, ADMA and SDMA correlated with a degree of loss of cognitive function. However, the association was observed exclusively in patients with vascular dementia in case of ADMA and SDMA and in patients with dementia of neurodegenerative origin in case of hepcidin. SDMA and DMA concentrations significantly increased along with the deepening of the global cortical atrophy and the medial temporal lobe atrophy. Hepcidin tended to be more elevated in patients with advanced global cortical atrophy as well. In turn, hepcidin, DMA, and citrulline increased and arginine were related to the presence of vascular abnormalities: hepcidin and arginine with white matter lesions and DMA and citrulline with the presence of strategic infarcts. Moreover, there was a correlation between concentrations of DMA, hepcidin and arginine and Hachinski ischemic score - linear in case of DMA but biphasic in case of arginine and hepcidin. Arginine occurred to be the individual marker of the highest accuracy in discriminating patients with

dementia from healthy controls. However, it was surpassed by the panel consisting of all NO metabolites and hepcidin, which was characterized by near perfect accuracy.