

Streszczenie

Celem rozprawy doktorskiej było stworzenie kompleksowych metod analitycznych, opartych na technice chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas, służących do badania poziomu stężenia metabolitów witaminy D w materiale klinicznym. Badania w sposób szczególny posłużyły miarodajnej analizie metabolitów witaminy D w materiałach takich jak: surowica krwi obwodowej, sucha kropla krwi oraz mleko kobiet karmiących. Opracowane metody analityczne pozwoliły na oznaczenie wielu metabolitów w czasie jednej analizy, czego obecnie dostępne testy nie są w stanie zaoferować. Mimo, iż metody chromatograficzne w porównaniu z komercyjnymi testami są relatywnie drogie to znacząco większa selektywność kompensuje ich cenę.

Wykorzystanie chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas w analizie metabolitów witaminy D wiąże się z wieloma wyzwaniami. Złożony metabolizm skutkuje dużą liczbą podobnych strukturalnie związków. Utrudnia to proces rozdzielenia chromatograficznego. Co więcej, lipofilowa natura witaminy D powoduje, że skuteczność jonizacji tego związku w MS jest niska. Zastosowana w badaniach reakcja derywatywacji zwiększyła specyficzność, a także pozwoliła na oznaczanie metabolitów o mniejszym rozpowszechnieniu. Procedura przygotowania próbek DBS wykorzystywała ekstrakcję rozpuszczalnikiem organicznym, a w przypadku próbek surowicy – strącanie białek. Jedynie analiza aktywnego metabolitu witaminy D – kalcytriolu, obejmowała dodatkowo ekstrakcję ciecz-ciecz. Wykorzystanie stabilnych wzorców wewnętrznych znakowanych izotopowo zapewniło kompensację supresji jonowej w spektrometrze mas oraz potencjalnych strat analitów na wszystkich etapach przygotowania próbki. Opracowane metody analityczne zostały zweryfikowane w badaniach populacyjnych, a wykorzystane materiały biologiczne oceniono pod kątem ich stosowalności do oceny statusu witaminy D. Co więcej, metody przygotowania próbek surowicy i DBS zostały wdrożone w laboratorium Masdiag do rutynowej analizy witaminy D. Wyniki z przeprowadzonych badań zostały wykorzystane do opracowania oryginalnego zestawu do badania witaminy D, który znajduje się obecnie w ofercie komercyjnej laboratorium Masdiag.

Analiza materiałów biologicznych pochodzących jednocześnie od matek i noworodków pozwoliła na ocenę przepływu metabolitów witaminy D. Analizowanie wielu metabolitów witaminy D jednocześnie umożliwiło ich szczegółowe profilowanie i badanie wzajemnych stosunków stężeń. Warto podkreślić, że opracowane metody pozwoliły na wykrycie mutacji wpływających na aktywność enzymu CYP24A1, które grożą hiperkalcemią, hiperkalciurią i podwyższonym stężeniem kalcytriolu. Do tej pory, było to możliwe jedynie z wykorzystaniem drogich testów genetycznych.

Abstract

The aim of the doctoral dissertation was to create comprehensive analytical methods, using liquid chromatography coupled with mass spectrometry, to determine the concentration of vitamin D metabolites in the clinical material. The research was used for the reliable analysis of vitamin D metabolites in materials such as: peripheral blood-derived serum, umbilical cord blood-derived serum, dried blood spot and breastmilk. The developed analytical methods allowed for the determination of multiple metabolites during one analysis, which currently available tests are not able to offer. Although the chromatographic methods are relatively expensive compared to commercial tests, the significantly greater selectivity compensates for their price.

The use of liquid chromatography coupled with mass spectrometry in the analysis of vitamin D metabolites is associated with many challenges. Complex metabolism results in a large number of structurally similar compounds. This hinders the chromatographic separation process. Moreover, the lipophilic nature of vitamin D results in a low ionization efficiency of this compound in MS. The derivatization reaction used in the research increased the specificity and also allowed the determination of metabolites with a lower prevalence. The DBS and serum sample preparation procedure used organic solvent extraction and protein precipitation, respectively. Only the analysis of the active metabolite of vitamin D - calcitriol, additionally included liquid-liquid extraction. The use of stable isotopically labelled internal standards compensated for ion suppression in mass spectrometer and potential loss of analytes at all stages of sample preparation. The developed analytical methods were verified in population studies, and the used biological materials were assessed for their applicability for the assessment of vitamin D status. Moreover, the serum and DBS sample preparation methods were implemented in the Masdiag laboratory for routine vitamin D analysis. The results of the research were used to develop the original vitamin D test kit, which is currently in the commercial offer of the Masdiag laboratory.

The analysis of biological materials obtained from mothers and newborns allowed for the assessment of the flow of vitamin D metabolites. Analyzing multiple vitamin D metabolites simultaneously allowed for their detailed profiling and determining mutual relations of their concentrations. It is worth emphasizing that the developed methods allowed for the detection of mutation affecting the activity of the CYP24A1 enzyme, which may lead to hypercalcemia, hypercalciuria and increased calcitriol concentration. Until now, this was only possible with the use of expensive genetic tests.

Warszawa, 23.08.2021

