

# **Totale metaboliet profilering van serum van nierdialyse patiënten met behulp van gaschromatografie gekoppeld met massaspectroscopie**

Proefschrift voorgelegd tot het behalen van  
de graad van Master in de Chemie door

Dries Persyn

Academiejaar 2010-2011

Promotor: Prof. Dr. P. Sandra

Copromotor: Dr. F. Lynen

Begeleider: J. Boelaert

# Dankwoord

---

Ik zou graag de personen bedanken die mij direct of indirect geholpen hebben bij het tot stand komen van deze thesis.

Op de eerste plaats is er natuurlijk Prof.Dr.P.Sandra die ik wil bedanken omdat hij me de kans gaf om mijn thesis uit te voeren in zijn onderzoeksgroep. Dr.F. Lynen wil ik bedanken voor de begeleiding bij het experimentele werk en zijn geniale invallen die deze thesis terug op de sporen kregen wanneer het even vast zat. Mijn begeleider Jente Boelaert bedank ik voor haar continue hulp, bijstand met haar inhoudelijke kennis en ondersteuning bij het praktische werk. Vivienne Malanchin verdient ook een plaatsje in dit dankwoord voor het mij wegwijs maken in de instrumentatie van GC-MS. Daarnaast wil ik Kai Chen bedanken voor zijn hulp bij het verwerken van de resultaten met zijn uitgebreide ervaring in het werken met chemometrische programma's.

Ik wil ook het personeel van de dienst Nefrologie van het Universitair Ziekenhuis te Gent bedanken om mij op tijd en stond te voorzien van de bloedserummonsters die in dit onderzoek geanalyseerd werden.

Tim en Mathias, mijn thesiscollega's in de onderzoeksgroep, verdienen ook een bedankje voor de leuke gesprekken tussen het werken door. In die context wil ik ook alle andere medewerkers van PARC bedanken voor de luchtige, gezellige sfeer die het er werken een plezier maakt.

Vanzelfsprekend bedank ik ook mijn ouders omdat ze mij de kans geven om te studeren en mezelf te ontplooien. Daarbovenop zijn ze ook een continue bron van steun en is hun onvoorwaardelijk geloof in mijn slagen een heuse opkikker in slechte dagen.

Als allerlaatste is er natuurlijk mijn liefste Sarah. Ze kan mij altijd doen lachen. Ze doet net als ik haar thesis en weet dus als geen ander hoe druk het dit jaar geweest is en ze luistert toch met eindeloos geduld naar al mijn geklaag en slaagt er iedere dag opnieuw in om mijn dag goed te maken.

# Inhoudsopgave

---

Dankwoord .....	- 2 -
Inhoudsopgave .....	- 3 -
1. Inleiding en doelstelling .....	- 5 -
2. Belang van uremische toxines in chronisch nierfalen .....	- 7 -
2.1 De nieren in het menselijk lichaam .....	- 7 -
2.2 Chronic Kidney Disease .....	- 7 -
2.2.1 Algemeen.....	- 7 -
2.2.2 Oorzaken van Chronic Kidney Disease .....	- 9 -
2.2.3 Behandeling van Chronic Kidney Disease.....	- 9 -
2.3 Uremische toxines.....	- 10 -
3. Metabolomics in het biomarker ontdekkingsproces .....	- 13 -
3.1 Biomerkers .....	- 13 -
3.1.1 Algemeen.....	- 13 -
3.1.2 De fasen van het biomarker ontwikkelingsproces .....	- 14 -
3.2 Metabolomics.....	- 15 -
3.2.1 Algemeen.....	- 15 -
3.2.2 Metabolomics met behulp van GC-MS .....	- 17 -
3.2.2.1 Algemeen.....	- 17 -
3.2.2.2 Gaschromatografie-massaspectrometrie.....	- 18 -
3.2.2.3 Derivatisatiestrategieën .....	- 20 -
4. Verwerking van de data.....	- 24 -
4.1 Variantie .....	- 24 -
4.2 Voorafgaande databewerking.....	- 24 -
4.3 T-toets .....	- 25 -
4.4 Principale componenten analyse .....	- 26 -
4.5 Kleinste kwadraten regressie (PLS) .....	- 27 -
5. Experimenteel gedeelte .....	- 29 -
5.1 Op punt stellen van de derivatisatieprocedure .....	- 29 -
5.1.2 Gebruikte chemicaliën en instrumentatie.....	- 29 -
5.1.3 Instrumentele condities .....	- 29 -

5.1.4	Monstervoorbereiding .....	- 30 -
5.1.5	Resultaten.....	- 30 -
5.1.6	Aandachtspunten .....	- 32 -
5.2	Optimalisatie van de analysemethode.....	- 33 -
5.2.1	Gebruikte chemicaliën en instrumentatie.....	- 33 -
5.2.2	Optimalisatie van de extractie .....	- 33 -
5.2.3	Optimalisatie van de instrumentele condities .....	- 36 -
5.2.3.1	Splitless versus pulsed splitless .....	- 36 -
5.2.3.2	Temperatuursprogramma.....	- 36 -
5.2.3.3	Draaggassnelheid .....	- 37 -
5.2.3.4	Wachttijd tussen monstervoorbereiding en injectie .....	- 38 -
5.2.4	Finale procedure.....	- 39 -
6.	Resultaten.....	- 41 -
6.1	Samenstelling van de monsters van de meetcampagne.....	- 41 -
6.2	Identificatie met behulp van de database met massaspectra .....	- 41 -
6.3	Studie van de herhaalbaarheid van de analyses .....	- 43 -
6.4	Kwalitatieve visuele evaluatie van de data .....	- 47 -
6.5	Statistische verwerking van de data.....	- 51 -
6.5.1	Evaluatie van de classificatie .....	- 51 -
6.5.2	Identificatie van relevante metaboliëten.....	- 57 -
7	Besluit .....	- 62 -
Appendix A:	Uremische toxines .....	- 64 -
Appendix B:	“Features” gebruikt in PLS-classificatie tussen gezonde personen en personen met stadium 1 CKD .....	- 74 -
Lijst met afkortingen	.....	- 80 -
Referenties	.....	- 81 -

# 1. Inleiding en doelstelling

---

De nieren vervullen in het lichaam enkele levensnoodzakelijke functies zoals bijvoorbeeld afvalstoffen uit het bloed verwijderen en uitscheiden via de urine. Wanneer de nieren hun functies onvoldoende uitvoeren wordt er gesproken van nierfalen. Wanneer de nieren hun functionaliteit gradueel en permanent verliezen over een lange periode dan spreekt men van “Chronic Kidney Disease” (chronische nierziekte, CKD). Er wordt geschat dat ongeveer één op negen van alle volwassenen boven de 20 jaar in de Verenigde Staten aan CKD lijdt. [1]

Chronic Kidney Disease wordt ingedeeld in vijf arbitraire stadia gebaseerd op de mate waarin de nieren het bloed nog kunnen zuiveren. In het vijfde stadium is de nierschade zodanig groot dat er moet overgegaan worden op niertransplantatie of routinematige nierdialyse om een patiënt in leven te houden. Helaas zijn de wachtlijsten voor een transplantatie enorm en vermindert routinematige dialyse de levenskwaliteit van een patiënt in grote mate.[1][2]

Door het verlies aan nierfunctionaliteit gaan overtollig water, afvalstoffen, enz. zich opstapelen in het lichaam. Dit leidt tot hogere bloeddruk, misselijkheid, hoofdpijnen,... Door de hogere bloeddruk en zich opstapelende afvalstoffen ontwikkelen er zich doorgaans bij de patiënten ook cardiovasculaire aandoeningen. Hartfalen is dan ook de grootste doodsoorzaak bij patiënten met CKD.

De afvalstoffen die zich accumuleren in het lichaam worden uremische retentiestoffen geheten. In het geval deze stoffen biologische activiteit vertonen, worden ze uremische toxines genoemd. Ureum en creatinine zijn daar enkele heel bekende voorbeelden van. Deze uremische toxines worden ingedeeld in drie klassen: de kleine wateroplosbare moleculen met een moleculair gewicht onder de 500 Dalton, de middelgrote moleculen met een moleculair gewicht boven de 500 Dalton en de proteïnegebonden moleculen. Er worden nog steeds nieuwe uremische toxines ontdekt. Zo waren er in 2003 een 90-tal uremische toxines geïdentificeerd en zijn dat er tegenwoordig al iets meer dan 100.[3][4][5]

Desondanks het grote aantal personen dat aan CKD lijdt en het vele onderzoek dat al gebeurd is, valt er nog steeds veel te leren over de ziekte en over welke effecten de zich opstapelende afvalstoffen elk hebben op het menselijk lichaam. Ook wordt CKD meestal pas in een laat stadium opgespoord. Dit is enerzijds omdat de nieren over een enorme overcapaciteit beschikken. Zo gaan symptomen zoals hoge bloeddruk pas opkomen wanneer al een groot deel van de nierfunctionaliteit verdwenen

is. Anderzijds is ureum, de in klinische praktijk meest gebruikte marker, niet zeer representatief voor de grote verscheidenheid aan uremische toxines.

Daarom is het belangrijk om te blijven zoeken naar biomerkers voor CKD zodat de ziekte in een vroeger stadium opgespoord, en dus behandeld, kan worden. Daarnaast kan het ook interessante informatie over de ziekte opleveren waarmee nieuwe medicijnen of therapieën kunnen ontwikkeld worden door de farmaceutische industrie. In deze masterthesis wordt er gezocht naar nieuwe potentiële biomerkers, die al dan niet uremische toxines kunnen zijn, die dan in verder onderzoek kunnen gevalideerd worden als een nieuwe biomarker om CKD op te sporen. Meestal is het ook zo dat er gebruik gemaakt wordt van een combinatie van biomerkers in plaats van zich te richten op een enkele biomarker.

Bij deze zoektocht werd er gefocust op metabolomics. Concreet betekent dit dat er serum onderzocht werd en hierin zoveel mogelijk metabolieten, producten van de stofwisseling, werden gedetecteerd. Er werd ervoor gekozen om het metaboloom, de verzameling van alle metabolieten in een organisme, en niet het proteoom of transcriptoom te onderzoeken omdat het metaboloom het meest divers is bij verschillende fenotypes. Zo leidt een verhoogde hoeveelheid mRNA niet noodzakelijk tot een hoger aantal geproduceerde proteïnen. Ook zal een kleine verandering ter hoogte van het transcriptoom of proteoom meestal aanleiding geven tot een veel grotere verandering ter hoogte van het metaboloom wat dus gemakkelijker te analyseren en karakteriseren valt.

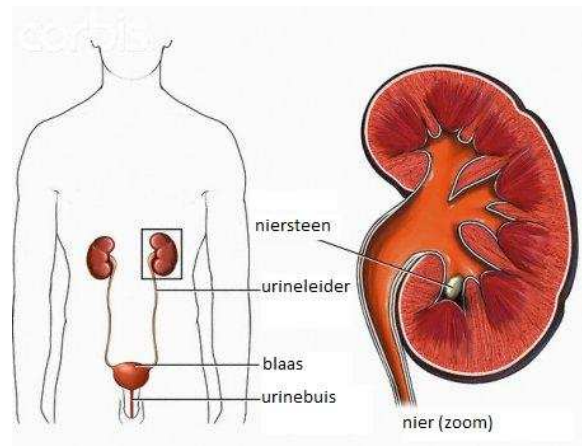
In deze masterthesis werden er serummonsters van patiënten van de verschillende stadia van CKD en van personen van een gezonde controlegroep onderzocht via gaschromatografie-massaspectrometrie(GC-MS). De condities van de GC-MS werden geoptimaliseerd om een zo groot mogelijke waaier aan metabolieten te detecteren. Met GC-MS kunnen echter enkel vluchtige moleculen geanalyseerd worden. Aldus werd het aantal metabolieten dat kon gedetecteerd worden, herleid tot de fractie van het metaboloom met een moleculair gewicht lager dan ongeveer 600 Dalton.

Via chemometrische statistische methodes werden de verschillende groepen serummonsters met elkaar vergeleken en de metabolieten met de grootste variabiliteit tussen zieke en gezonde personen geïdentificeerd. Deze aanpak zou een reeks reeds gekende uremische toxines van de klasse van de kleine wateroplosbare moleculen moeten opleveren. Daarnaast is het ook mogelijk dat er ook nieuwe uremische toxines ontdekt worden. Deze kunnen dan mogelijk meer informatie geven over de ziekte en verder onderzocht worden op hun potentieel als biomarker om CKD vroeger en/of efficiënter op te sporen.

## 2. Belang van uremische toxines in chronisch nierfalen

### 2.1 De nieren in het menselijk lichaam

De nieren (Figuur 1) bij de mens zijn twee ongeveer vuistgrote organen die zich links en rechts van de ruggengraat in de buikholte bevinden. De hoofdtaak van de nieren is de samenstelling van het bloed ongeveer constant te houden. Dit doen ze door de afvalstoffen van het metabolisme, verschillende vergiften, geneesmiddelen,... te verwijderen uit de bloedsomloop. Daarnaast verzorgen ze ook het zuur-base evenwicht in het bloed, scheiden ze overtollig lichaamsvocht af en produceren ze enkele belangrijke hormonen. Het “product” dat de nieren aanmaken, met alle verwijderde afvalstoffen en dergelijke in, heet urine.[1]



Figuur 1: De nieren in het menselijk lichaam

### 2.2 Chronic Kidney Disease

#### 2.2.1 Algemeen

Er wordt gesproken van chronisch nierfalen (Chronic Kidney Disease, CKD) als de nieren deze functies over een lange periode onvoldoende uitvoeren. Chronisch nierfalen komt voor bij tienduizenden volwassen Belgen. In de Verenigde Staten zijn dat er 26 miljoen en nog miljoenen anderen lopen verhoogd risico op de ziekte. Dat is in totaal ongeveer één op negen volwassen personen. Er worden 5 stadia van CKD gehanteerd (Tabel 1). Deze worden onderscheiden volgens het “glomerular filtration rate” (GFR), dat is de hoeveelheid bloed die de nieren kunnen zuiveren van afvalstoffen in een bepaalde tijd. Deze wordt gecorrigeerd voor de lichaamsoppervlakte (gemiddeld 1,73m<sup>2</sup> voor volwassenen) omdat dit in vele gevallen een betere indicator is voor de metabolische massa van een persoon dan het lichaamsgewicht. Vanaf CKD stadium 5 is de nierfunctionaliteit zodanig laag dat de persoon in kwestie een niertransplantatie of meermaals per week dialyse moet ondergaan om de nierfunctie te vervangen. Het GFR kan op een aantal verschillende manieren berekend worden. Afhankelijk van de gehanteerde formules worden parameters zoals leeftijd, gewicht, ras, geslacht,... opgenomen in de berekening. Ter illustratie worden hier de formules weergegeven waarmee het

estimated GFR (eGFR) berekend wordt voor mannen en vrouwen van Kaukasische afkomst volgens de “Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration”[2]

Voor vrouwen waarbij de creatinine concentratie in bloed([SCr]) kleiner dan of gelijk is aan 0,7mg/dL.

$$eGFR = 144 \times ([SCr]/0,7)^{-0,329} \times 0,993^{leeftijd}$$

Voor vrouwen waarbij [SCr] groter is dan 0,7mg/dL.

$$eGFR = 144 \times ([SCr]/0,7)^{-1,209} \times 0,993^{leeftijd}$$

Voor mannen waarbij [SCr] kleiner dan of gelijk is aan dan 0,9mg/dL.

$$eGFR = 141 \times ([SCr]/0,9)^{-0,411} \times 0,993^{leeftijd}$$

Voor mannen waarbij [SCr] groter is dan 0,9mg/dL.

$$eGFR = 141 \times ([SCr]/0,9)^{-1,209} \times 0,993^{leeftijd}$$

Tabel 1: de 5 stadia van Chronic Kidney Disease

<u>stadium</u>	<u>glomerular filtration rate</u> <u>(ml/min/1,73m<sup>2</sup>)</u>	<u>omschrijving</u>
1	>90	nierbeschadiging met normale of verhoogde GFR
2	60-89	nierbeschadiging met mild verlaagde GFR
3	30-59	matig verlaagde GFR
4	15-29	sterk verlaagde GFR
5	<15	nierfalen

GFR = glomerular filtration rate

Chronisch nierfalen wordt helaas meestal pas in een vergevorderd stadium vastgesteld omdat eigenlijke klachten en ongemakken pas voorkomen nadat de nierfunctionaliteit drastisch gedaald is. De nieren hebben namelijk een enorme reservecapaciteit. Zo kan een mens perfect een normaal leven leiden met slechts één functionerende nier. De meest voorkomende klachten die gepaard gaan met CKD zijn hoge bloeddruk, moeheid, hartkloppingen, een droge en geïrriteerde huid, enz. Dit zijn duidelijk niet zeer specifieke symptomen die op een brede waaier van ziektebeelden van toepassing



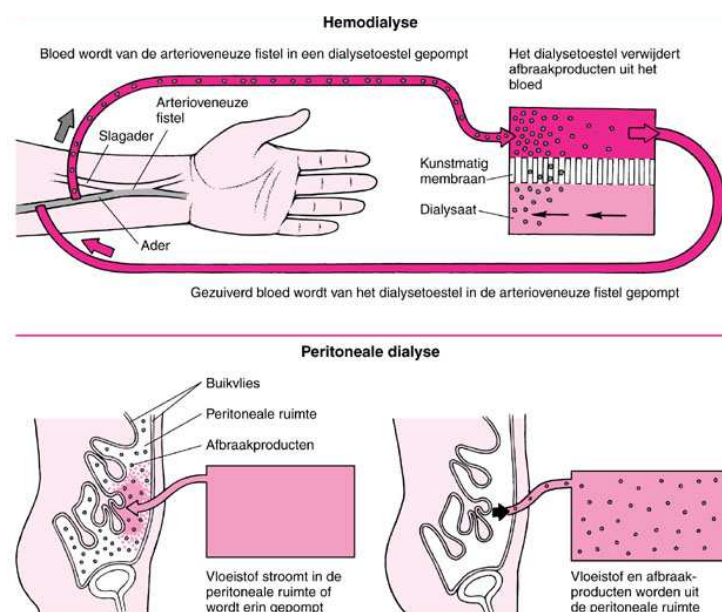
zijn. Falende nierfunctionaliteit wordt meestal pas opgemerkt door een afwijking in de samenstelling van het bloed of urine, bvb: een te hoge concentratie aan ureum in het bloed. [2][4][6]

### 2.2.2 Oorzaken van Chronic Kidney Disease

De meest voorkomende oorzaken van CKD zijn diabetes en een hoge bloeddruk. Doordat mensen met diabetes onvoldoende insuline produceren, hebben ze een hoger dan normale hoeveelheid suiker in hun bloed. Dit beschadigt de nieren, het hart en nog enkele andere organen. Een hoge bloeddruk beschadigt de bloedvaten in de nieren waardoor deze geen afvalstoffen en overtollig vocht meer kunnen afscheiden. Dit overtollig vocht zorgt dan weer voor een verhoogde bloeddruk, het is een vicieuze cirkel. Het is ook onder andere door deze verhoogde bloeddruk dat CKD bijna altijd gepaard gaat met cardiovasculaire aandoeningen. Deze cardiovasculaire aandoeningen zijn zelfs meestal de directe oorzaak van het overlijden van een patiënt met CKD. Enkele andere oorzaken van nierschade en daaraan gekoppeld CKD zijn nierstenen, glomerulonephritis, erfelijke aandoeningen,...[2][6]

### 2.2.3 Behandeling van Chronic Kidney Disease

Een arts zal in eerste instantie met medicijnen en een specifiek dieet proberen de aftakeling van de nieren in de patiënt af te remmen. Eenmaal de patiënt zich in stadium 5 van CKD bevindt moet er overgegaan worden tot niertransplantatie of dialyse. De beste oplossing is en blijft niertransplantatie. Daarbij wordt een gezonde donornier via een chirurgische operatie in het lichaam van een patiënt gebracht. Helaas is er een tekort aan donororganen met enorme wachtlijsten tot gevolg. Daarom ondergaan personen met vergevorderde CKD een dialysebehandeling. Er zijn twee soorten dialysebehandeling, hemodialyse en peritoneale dialyse (Figuur 2).



Figuur 2: Schematische voorstelling van hemodialyse en peritoneale dialyse

In hemodialyse wordt het bloed van een patiënt door een dialyseapparaat, in de volksmond een kunstnier, gepompt. Het bloed wordt over een semipermeabel membraan in contact gebracht met een speciale oplossing, het dialysaat. Diverse afvalstoffen en overtollig vocht diffunderen doorheen

dit membraan in het dialysaat en het gezuiverde bloed wordt terug in de patiënt gebracht. Deze behandeling duurt gemiddeld 3 tot 4 uur en moet 2 tot 3 maal per week herhaald worden, afhankelijk van de mate waarin de nieren reeds beschadigd zijn. Dit legt een enorme belasting op het persoonlijk leven van de patiënt aangezien deze constant moet terugkeren naar het dialysecentrum. Bij hemodialyse moet het dialyseapparaat dus aangesloten worden op de bloedbaan van de patiënt. Omdat een normaal bloedvat te snel beschadigd raakt en te klein is voor de gewenste stroomdoorgang wordt er een kunstmatige shunt bij de patiënt ingebracht. Een shunt maakt een verbinding tussen een ader en een slagader. Hierdoor verhoogt de bloeddruk in de ader en slagader waardoor ze gaan opzwellen. Dit proces wordt rijpen genoemd. Dit maakt de aders makkelijker aan te prikken.

Bij peritoneale dialyse wordt het dialysaat via een katheder in de buik gebracht. Het buikvlies fungeert als semipermeabel membraan in dit geval en afvalstoffen en vocht diffunderen erdoorheen. Na enkele uren wordt het dialysaat dan via dezelfde katheder uit de buik gelaten. Het grote voordeel tegenover hemodialyse is dat de samenstelling van het bloed stabiel is. Daarnaast kan deze methode ook in de thuisomgeving op automatische wijze 's nachts worden toegepast wat de levenskwaliteit van de patiënt ten goede komt.[7]

## 2.3 Uremische toxines

Door de afnemende nierfunctionaliteit gaan bepaalde stoffen zich opstapelen in het lichaam. Deze stoffen worden "uremic retention solutes" genoemd en in het geval ze biologisch actief zijn worden ze uremische toxines genoemd. Het zijn deze uremische toxines die aan de basis liggen van de meeste kwalen die gepaard gaan met CKD. De niet-toxische geretenteerde stoffen kunnen ook interessant zijn als merker voor andere wel-toxische stoffen.

In 2003 waren er ongeveer 90 uremische toxines gekend. Tegenwoordig zijn er iets meer dan 100 geïdentificeerd. Deze kunnen op verschillende manieren ingedeeld worden maar de meest gangbare classificatie is volgens hun fysisch-chemische eigenschappen en gedrag tijdens dialyse. Dit levert drie klassen uremische toxines op: de kleine wateroplosbare moleculen, de middelgrote moleculen en de proteïne-gebonden moleculen. De kleine wateroplosbare moleculen hebben een moleculair gewicht beneden de 500 Da. Deze bovengrens is arbitrair vastgelegd. Klassieke voorbeelden van kleine wateroplosbare moleculen zijn ureum en creatinine. Deze klasse van moleculen worden over het algemeen door alle dialysemethoden efficiënt verwijderd. Een typisch voorbeeld van een middelgrote molecuul is  $\beta_2$ -microglobuline. Deze hebben een arbitrair vastgelegd moleculair gewicht boven de 500 Da. Deze middelgrote moleculen kunnen enkel verwijderd worden door

dialysemembranen met grote poriën. Hun verwijdering wordt verder bevorderd door over te gaan van diffusieve verwijdering naar convectieve verwijdering. Hierbij vindt er een gedwongen beweging van vloeistoffen met de uremische toxines doorheen het dialysemembraan plaats onder invloed van een hydraulische of osmotische kracht. De derde klasse uremische toxines, de proteïne gebonden moleculen hebben doorgaans een laag moleculair gewicht. Fenolen en indolen zijn prototypevoorbeelden van deze klasse uremische toxines. Deze zijn moeilijk te verwijderen uit de bloedbaan met alle totnogtoe beschikbare dialysestrategieën. Hun binding met proteïnen verhindert een efficiënte eliminatie. Er wordt algemeen aangenomen dat vooral de moleculen die moeilijk verwijderbaar zijn via klassieke hemodialyse, de middelgrote en proteïne gebonden moleculen, verantwoordelijk zijn voor de toxische effecten en chronische cardiovasculaire schade toebrengen aan het lichaam. In Tabel 2 zijn alle totnogtoe gekende uremische toxines weergegeven per klasse. In Appendix A zijn alle uremische toxines nogmaals weergegeven met hun moleculair gewicht en, indien mogelijk, chemische structuur.[3][4][5][8][9]

De zoektocht naar andere uremische toxines of biomerkers voor CKD gaat nog altijd onverminderd verder. Dit omdat van de huidige behandelingsmethoden enkel een niertransplantatie de afgenomen nierfunctionaliteit voldoende herstelt. Dialyse bijvoorbeeld kan maar ten dele de nierfuncties overnemen. Ureum is de in klinische praktijk meest courante merker voor retentie en eliminatie van dialyse. Helaas wijkt het kinetisch gedrag van vele uremische toxines tijdens dialyse af van dat van ureum waardoor ureum dus weinig representatief is voor de mate waarin dialyse deze stoffen kan verwijderen uit de bloedsomloop. Daarom is het noodzakelijk om te blijven zoeken naar biomerkers om CKD in een zo vroeg mogelijk stadium op te sporen en eventueel nieuwe behandelingsmethoden te ontwikkelen.

Tabel 2: uremische retentiestoffen per klasse [21]

---

Kleine wateroplosbare moleculen

1-methyladenosine, 1-methylguanosine, 1-methylinosine, 8-OH-2'-deoxyguanosine, asymmetric dimethylarginine,  $\alpha$ -keto- $\delta$ -guanidinovalerate,  $\alpha$ -N-acetylarginine, arabinitol, argininic acid, benzylalcohol,  $\beta$ -guanidinopropionate, creatine, creatinine, cytidine, dimethylglycine, dimethylguanosine, erythritol,  $\gamma$ -guanidinobutyrate, guanidine, guanidinoacetate, guanidinosuccinate, guanilin, hypoxanthine, inosine, malondialdehyde, mannitol, methylguanidine, myoinositol, N,N-dimethylguanosine, N-acetylcytidine, N-methyl-2-pyridone-5-carboxamide, N-methyladenosine, N-threonylcarbamoyladenosine, nitrosodimethylamine, nitrosomethylamine, orotic acid, orotidine, oxalate, phenylacetylglutamine, phenylethylamine, pseudouridine, symmetric dimethylarginine, sorbitol, taurocyamine, thiocyanate, threitol, thymine, trimethylamine, uracil, ureum, uric acid, uridine, xanthine, xanthosine

Proteïne gebonden moleculen

2-methoxyresorcinol, 3-deoxyglucosone, 3-Carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropionic acid, fructoselysine, glyoxal, hippuric acid, homocysteine, hydroquinone, indole-3-acetate, indoxyl sulfate, kinurenine, kinurenic acid, melatonin, methylglyoxal, N-carboxymethyllysine, p-cresol, pentosidine, phenol, phenylacetic acid, p-OH hippurate, putrescine, quinolinic acid, spermidine, spermine

Middelgrote moleculen

adiponectin, adrenomedullin, atrial natriuretic peptide, basic fibroblast growth factor,  $\beta$ -microglobulin,  $\beta$ -endorphin,  $\beta$ -lipotropin, calcitonin-gene related peptide, cholecystokinin, Clara cell protein, complement factor D, cystatin C, desacylghrelin, dinucleoside polyphosphates, degranulation inhibiting protein I,  $\delta$ -sleep-inducing peptide, endothelin, ghrelin, hepcidin, hyaluronic acid, interleukin-1 $\beta$ , interleukin-6, interleukin-18,  $\kappa$ -Ig light chain,  $\lambda$ -Ig light chain, leptin, methionine-enkephalin, motiline, neuropeptide Y, octopamine, orexin A, parathyroid hormone, retinol binding protein, substance P, tumor necrosis factor- $\alpha$ , uridine adenosine tetraphosphate, uroguanylin, vasoactive intestinal peptide

---

# 3. Metabolomics in het biomerker ontdekkingsproces

---

## 3.1 Biomerkers

### 3.1.1 Algemeen

Een biomerker kan algemeen gedefinieerd worden als “een eigenschap die objectief meetbaar is en gebruikt kan worden als een indicator voor normale biologische processen, pathogene processen of farmaceutische responsen op een therapie”. Het woord biomerker is dus een heel ruim begrip en biomerkers komen voor in allerlei vormen. Zo is lichaamstemperatuur, in de vorm van koorts, een indicator voor ontstekingen. De bloeddruk en het cholesterolgehalte bijvoorbeeld van een persoon wijzen op een verhoogd risico op cardiovasculaire aandoeningen. Dergelijke biomerkers zijn al jaren, sommige zelfs eeuwen, in gebruik. Door de beschikbaarheid van steeds meer gesofisticeerde analysemethoden is het mogelijk geworden om steeds preciezer en gevoeliger biomerkers te detecteren en identificeren waardoor ook de kennis van de verschillende pathologische processen groeit. Hierdoor kunnen ziektes vroeger gedetecteerd worden, zijn de diagnoses preciezer en kan bij de ontwikkeling van medicijnen steeds gericht gewerkt worden.

Voor de ontdekking van biomerkers werd meestal uitgegaan van wat men al wist over de ziekte die men onderzocht. Biologische stoffen waarvan men wist dat ze met de ziekte van interesse te maken hadden werden onderzocht op hun bruikbaarheid als biomerker. Het nadeel van deze “hypothese gedreven” methode is natuurlijk dat men hiervoor sterk afhankelijk is van de reeds voorhanden zijnde kennis van de ziekte in kwestie. Door de sterk geavanceerde analysemethoden van tegenwoordig kunnen heel complexe mengsels zoals urine of bloed relatief snel geanalyseerd worden en kan er een grote hoeveelheid componenten geïdentificeerd worden. Hierdoor kan er een zogenaamde “open loop” ofwel “onbevooroordeelde” biomerker zoekmethode gebruikt worden door het metabool of proteoom te analyseren uit deze gemakkelijke beschikbare, niet invasieve bronnen zoals bloed.

Volgens Michael R. Bennett en Prasad Devarajan beantwoordt een ideale biomerker aan zeven criteria. (1)Hij is niet-invasief en gemakkelijk meetbaar, goedkoop en geeft snelle resultaten. (2)Hij is gemakkelijk beschikbaar uit bronnen zoals urine of bloed. (3)Hij kan met een grote gevoeligheid gemeten worden en er is geen overlap tussen de meetwaarden van zieke en gezonde personen. (4)Hij is heel specifiek, met andere woorden, de ziekte heeft een grote invloed op de meetwaarden en andere bijkomstige condities hebben geen invloed op de meetwaarde van de biomerker. (5)De

meetwaarden veranderen snel in respons op een toegepaste therapie. (6)De meetwaarden zijn bruikbaar om het risico dat een patiënt loopt in te schatten. (7)Ten laatste verschaft de biomerker een beter inzicht in het onderliggende mechanisme van de ziekte.[10]

### **3.1.2 De fasen van het biomerker ontwikkelingsproces**

Het biomerker ontwikkelingsproces kan algemeen in drie fasen gesplitst worden: de ontdekking van de biomerker, evaluatie van de performantie van de biomerker en ten laatste evaluatie van de impact van de biomerker in klinisch gebruik.

In de tweede fase, evaluatie van de performantie, ook wel validatiestap genoemd, wordt gekeken of de biomerker efficiënt onderscheid kan maken tussen zieke en gezonde personen, of de biomerker dat kan in een vroeger stadium dan de huidige diagnosemethoden en er wordt gekeken of de biomerker beïnvloed wordt door niet-ziekte gerelateerde parameters zoals leeftijd, ras, geslacht,... In de derde fase wordt dan gekeken naar de impact van de biomerker als hij geïmplementeerd wordt in klinisch gebruik en onder andere ook naar zijn kostenefficiëntie.

Het is in de eerste fase, de ontwikkeling van een methodologie voor de ontdekking van biomerkers voor chronische nierziekte, dat deze masterthesis zijn bijdrage levert.

In eerste instantie maakt men gebruik van een “non-targeted assay” om zoveel mogelijk informatie te vergaren. Omdat er dus zoveel mogelijk verschillende moleculen gemeten worden zijn deze non-targeted assays op zijn best semi-kwantitatief. Als er al veel informatie voorhanden is kan men overschakelen op een “targeted assay” waarbij gefocuseerd wordt op één bepaalde of enkele moleculen van interesse. Deze zijn wel kwantitatief maar hierbij loopt men het risico dat onbekende factoren en andere nuttige informatie over het hoofd worden gezien doordat er zodanig gefocuseerd wordt op die ene set moleculen.

In de biomerkerontdekkingsfase gaat men eerst uit van een non-targeted assay. In het specifieke geval van metabolomics wordt er gesproken over metabolic fingerprinting. Er worden zoveel mogelijk metabolieten gemeten om als het ware een vingerafdruk van een monster te maken. Monsters kunnen dan volgens hun vingerafdruk onderverdeeld worden in verschillende groepen, ziek en gezond bijvoorbeeld. In NMR spectroscopie wordt de vingerafdruk gegenereerd op basis van de chemische verschuiving en oppervlakte onder de signalen. In massaspectrometrie gebeurt dit op basis van de massa over lading verhouding en signaalintensiteit en in het geval dat er chromatografie voorafgaat aan de detectie geven de verschillende retentietijden extra informatie om de vingerafdrukken tussen monsters diverser te maken en zo dus de groepen monsters beter van elkaar te kunnen onderscheiden. Metabolic fingerprinting gebeurt puur op basis van patroonherkenning en

vergelijking tussen verschillende monsters. De identiteit van de metabolieten die aanleiding geven tot de signalen doen er in dit stadium niet toe. Dit geeft dus ook nog geen extra informatie over het ziektebeeld, de pathologische pathway, enzovoort.

Met statistische methodes, zoals bijvoorbeeld principale componenten analyse en kleinste kwadraten regressie, worden dan de signalen en pieken geïdentificeerd die het meest relevant zijn om de monsters in verschillende groepen in te delen. Deze metabolieten moeten dan gekarakteriseerd worden via verdere technieken zoals homo- en heteronucleaire 2D-NMR. In het ideale geval geeft de identiteit van deze relevante metabolieten, potentiële biomerkers, al meer inzicht in het ziektebeeld. Eens deze potentiële biomerkers geïdentificeerd zijn, kan overgegaan worden naar de tweede fase van het ontwikkelingsproces van een geslaagde biomarker.

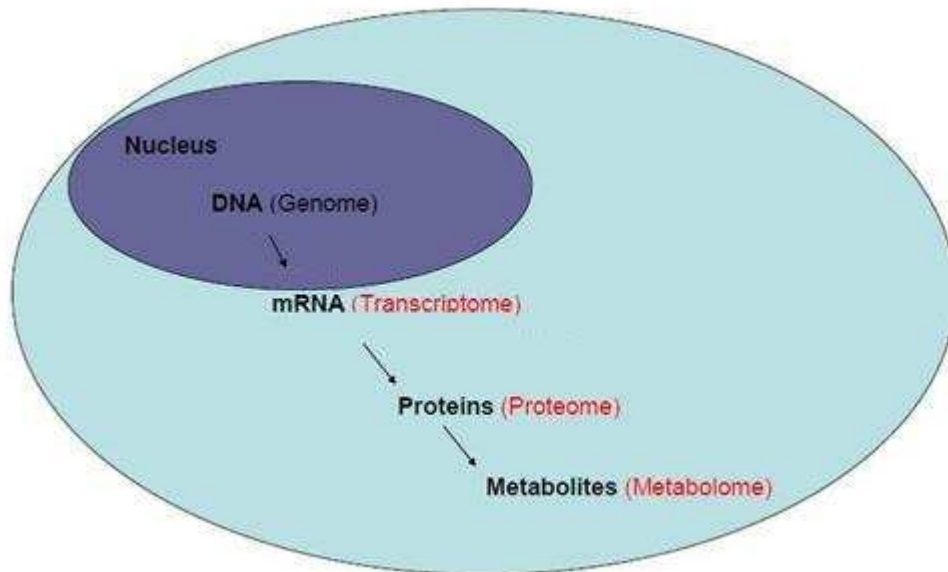
Er dient natuurlijk opgemerkt te worden dat er in de non-targeted assay getracht wordt zoveel mogelijk metaboleten op een globale oftewel “unbiased” manier te detecteren. Deze “unbiased” detectie bestaat echter alleen in theorie. Door de keuze van analysemethode alleen al wordt er al “bias” ingevoerd. Zo zal je met bijvoorbeeld GC-MS enkel metabolieten detecteren met relatief laag moleculair gewicht die vluchtig genoeg zijn of gemaakt kunnen worden via derivatisatie om in de gasfase over te gaan. Daarom is het aangeraden om een combinatie van technieken te gebruiken om een zo volledig mogelijk beeld te krijgen van het metaboolom. [10]

## 3.2 Metabolomics

### 3.2.1 Algemeen

Metabolomics is de laatste stap in de “omics-cascade” (Figuur 3). Metabolieten zijn de eindproducten van cellulaire processen. Hun concentratie kan dus gezien worden als de biologische respons van organismen op genetische mutaties of veranderende omgeving. In metabolomics wordt dus getracht alle metabolieten van een biologisch systeem in kaart te brengen. Het grote voordeel tegenover andere “omics” zoals bvb. proteomics is dat het metaboolom doorgaans veel eenvoudiger te analyseren valt. Zo wordt geschat dat het aantal metabolieten in een organisme wel tien- tot honderdmaal zo laag kan zijn als het aantal genen of proteïnen. Daarnaast kunnen kleine of complexe veranderingen ter hoogte van het genoom of proteoom moeilijk te detecteren vallen terwijl ze een grote impact hebben op het metaboolom en dus gemakkelijker kwantitatief gedetecteerd worden. Metabolomics kan je een overzicht geven van de toestand van een biologisch systeem of van globaal biochemische gebeurtenissen in het beschouwde biologische systeem. Het kan ook inzicht geven in bepaalde biologische pathways, de oorzaak van bepaalde ziektebeelden

achterhalen, respons op therapie weergeven, enzovoort. Dit alles maakt van metabolomics een uiterst interessante invalshoek om de problematiek van CKD verder te onderzoeken.



**Figuur 3: De "omics-cascade" die de informatiestroom in een cel schematisch weergeeft[11]**

Het metaboloom is natuurlijk enorm divers en kan bijgevolg niet geanalyseerd worden met één enkel systeem. Daarom wordt metabolomics in de praktijk meestal beperkt tot het volgen van één bepaalde biologische pathway of tot een klasse van metabolieten die specifiek interessant zijn voor het onderzoek in kwestie.

Er zijn enkele verschillende strategieën gangbaar in het metabolomics onderzoeksveld.

In **metabolic profiling** worden kwantitatieve analyses uitgevoerd van een set metabolieten in een bepaalde biologische pathway of een specifieke klasse metabolieten. Voorbeelden hiervan zijn aminozuren, nucleotiden, polyamines, intermediären van het koolstofmetabolisme,... Hiervoor zijn accurate en robuuste analysemethoden nodig.

In **target analysis** wordt er meer gefocust en wordt er maar een heel klein aantal metabolieten onderzocht. Deze zijn dikwijls gelinkt aan een genetische afwijking of zijn biomerkers voor een welbepaalde ziekte.

**Metabolic fingerprinting** is erop gericht om zoveel mogelijk metabolieten simultaan te detecteren. Deze aanpak wordt eerder gebruikt als een globale screening om monsters in klassen onder te verdelen gebaseerd op hun metabolisch profiel oftewel vingerafdruk.



**Metabolic footprinting** is heel gelijkaardig aan metabolic fingerprinting maar is gelimiteerd tot het analyseren van metabolieten uit celculturen. De redenering achter deze aanpak is dat de metabolieten uitgescheiden door de cel waardevolle inzichten kunnen leveren over de fysiologische toestand van de cel.[11][12]

## 3.2.2 Metabolomics met behulp van GC-MS

### 3.2.2.1 Algemeen

De meest courante technieken om metabolomicsonderzoek te doen zijn nucleaire magnetische resonantie spectroscopie (NMR), vloeistofchromatografie-massaspectrometrie (LC-MS), capillaire elektroforese-massaspectrometrie (CE-MS) en gaschromatografie-massaspectrometrie (GC-MS).

NMR gebaseerde beeldvormingstechnieken worden al relatief vaak gebruikt om metabolietniveaus in vitro, ex vivo en in vivo op niet invasieve wijze te monitoren. NMR heeft het grote voordeel dat het niet destructief is en in vivo metabolieten kan kwantificeren. In het geval van bloed- of serummonsters echter moet er een extractie plaatsvinden omdat anders macromoleculen kunnen interfereren met de signalen van laag moleculair gewicht metabolieten. Deproteïnisatie kan bijvoorbeeld uitgevoerd worden met acetonitril of methanol. De grote nadelen van NMR spectroscopie zijn de lage gevoeligheid: metabolieten moeten in concentraties van minstens 1  $\mu\text{mol/liter}$  aanwezig zijn, en de kleine hoeveelheid metabolieten, doorgaans slechts 20 tot 50, die simultaan kunnen gekwantificeerd worden. De gevoeligheid kan sterk verbeterd worden door onder andere het gebruik van cryoprobes, maar deze verbeterde gevoeligheid verbleekt nog altijd ten opzichte van massaspectrometrische technieken.

GC-MS is een zeer gevoelige techniek die tevens robuust en reproduceerbaar is en een hoog scheidend vermogen vertoont. De detectielimiet is in de orde van enkele nanomol/liter tot soms zelfs picomol/liter. Er kunnen in een doorsnee GC-MS analyse tussen de 100 en 300 moleculen geïdentificeerd en gekwantificeerd worden, maar dit kan door middel van deconvolutie software oplopen tot ongeveer 1000. Enkele nadelen zijn de relatief lange analysetijden, de nood aan derivatisatie voor analyse en de beperking tot vluchtige moleculen.

LC-MS heeft als groot voordeel tegenover GC-MS dat er geen uitvoerige derivatisatie nodig is voor de analyse. Daarnaast kan met LC-MS ook een bredere waaier aan metabolieten met meer uiteenlopende fysico-chemische eigenschappen geanalyseerd worden. Er kunnen in één LC-MS analyse tot wel 2000 metabolieten gedetecteerd worden. Het ionisatie- en fragmentatiepatroon in LC-MS is echter heel wat minder voorspelbaar en reproduceerbaar tegenover GC-MS zodat tot op

heden de opbouw van uitgebreide databases om analieten mee te vergelijken ter identificatie nog in zijn kinderschoenen staat in tegenstelling tot GC-MS waar dergelijke databases al lang in gebruik zijn.

De koppeling van capillaire elektroforese met massaspectrometrie zou in principe een zeer krachtige combinatie moeten zijn voor de analyse van metabolieten. Deze laatste zijn immers meestal geladen, of de pH van de analyse kan gemakkelijk aangepast worden om lading te induceren, en kunnen daarom dikwijls met zeer hoge efficiëntie geanalyseerd worden met deze techniek. Omdat deze geladen moleculen bovendien een goede respons geven in electrospray MS is de combinatie van beide technieken a priori zeer geschikt. Tot op heden lijdt de aanpak echter onder reproduceerbaarheidsproblemen zodat de combinatie niet als robuust genoeg beschouwd kan worden voor metabolomics toepassingen in uitgebreide meetcampagnes. Desondanks wordt het potentieel ervan vandaag uitgebreid onderzocht.

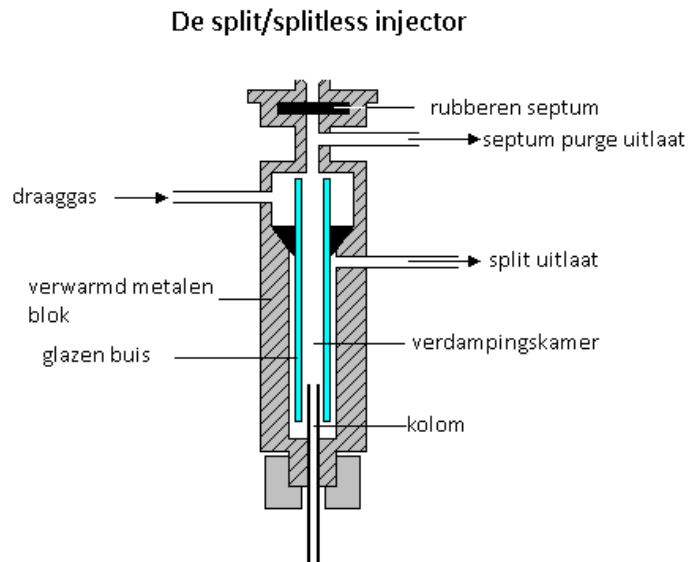
Omdat het in het kader van deze masterthesis onmogelijk is om het volledige metaboloom onder de loep te nemen in de zoektocht naar biomerkers voor CKD, wordt er gefocuseerd op GC-MS. Deze studie loopt parallel met een niet doelgerichte LC-MS studie die loopt in het kader van een doctoraat op dezelfde monsters. GC-MS is zoals hoger uiteengezet een heel gevoelige analysemethode om het deel van het metaboloom met laag moleculair gewicht te analyseren. In het onderzoek naar uremische toxines is GC-MS dus de techniek bij uitstek om de klasse van kleine, wateroplosbare moleculen te onderzoeken.[10]

### **3.2.2.2 Gaschromatografie-massaspectrometrie**

Het scheiden van moleculen in de gasfase door middel van chromatografie vandaag is sinds de jaren '50 geëvolueerd tot een uiterst efficiënte en gevoelige techniek. Vluchtige moleculen worden er in gescheiden volgens kookpunt of polariteit. Daartoe worden vandaag vrijwel exclusief open tubulaire of capillaire kolommen voor gebruikt.

De analieten verdelen zich over de stationaire fase (film op het kolomoppervlak) en de mobiele fase (draaggas). Polaire moleculen gaan minder gemakkelijk interacties aan met de stationaire waardoor ze sneller worden meegevoerd met het draaggas. Doorgaans wordt ook gebruik gemaakt van een temperatuursprogramma waardoor componenten met een laag kookpunt eerst van de kolom af komen. De stationaire fase bestaat bijna altijd uit polydimethylsiloxaan dat al dan niet gemodificeerd werd door vervanging van de methylgroepen door andere functionaliteiten. In metabolomics echter wordt meestal gebruik gemaakt van een kolom waarbij 5% van de vaste fase bestaat uit een fenylgroep.

In de meeste GC toestellen wordt gebruik gemaakt van de split/splitless interface (Figuur 4) om het monster te injecteren op de kolom. In split mode wordt slechts een deel van het monster op de kolom geïnjecteerd en de rest afgevoerd. Dit voorkomt dat te grote hoeveelheden monster de kolom zouden overbeladen wat de kwaliteit van de scheiding nadelig zou beïnvloeden. In splitless mode wordt echter het volledige monstervolume op de kolom gebracht. Dit is dan ook interessant



Figuur 4: De split/splitless injector

voor de analyse van spoorcomponenten waarvan de concentratie dicht bij de detectielimiet ligt. De gevoeligheid is namelijk beduidend beter in splitless mode. Er moet natuurlijk voor opgepast worden dat de kolom niet overbeladen wordt door andere analieten die wel in hogere concentratie aanwezig zijn in het monster.

De meest courant gebruikte detectoren zijn de vlamionisatiedetector (FID), die een signaal geeft proportioneel met het aantal koolstofatomen in een analiet, en de MS, die naast kwantitatieve informatie ook informatie geeft over de structuur van het analiet in kwestie. In metabolomics wordt meestal massaspectrometrie gebruikt voor detectie. Daarbij worden de analietmoleculen eerst geïoniseerd en daarna gescheiden volgens hun massa over lading verhouding. Voor GC-MS zijn er twee ionisatiemethoden courant, elektron impact ionisatie(EI) en chemische ionisatie(CI). In elektron impact ionisatie worden ionen geproduceerd door het verlies van een elektron door botsing met een elektronenbundel. Deze ionen worden dan versneld en gefocusseerd door een stel elektrostatische lenzen en in de eigenlijke massa analysator gevoerd. Door de hoogenenergetische ionisatie kan er fragmentatie van de moleculen optreden op verschillende plaatsen in de moleculen. Deze fragmenten kunnen handige informatie bevatten over de structuur van de moleculen. Meestal is de fragmentatie zo efficiënt dat het moleculair ion maar heel laag abundant aanwezig of zelfs helemaal niet aanwezig is in het spectrum. In chemische ionisatie wordt een reagens gas, meestal methaan of ammoniak, in contact gebracht met de elektronenbundel. Deze geïoniseerde gasmoleculen ioniseren dan op hun beurt de analietmoleculen. In deze methode wordt er veel minder energie overgedragen aan de analietmoleculen waardoor er veel minder fragmentatie optreedt. In chemische ionisatie is het moederion meestal het meest abundant in het spectrum.[13]

### 3.2.2.3 Derivatisatiestrategieën

Kleine niet polaire, hydrofobe metabolieten kunnen gemakkelijk met GC-MS geanalyseerd worden. Deze structuren zijn echter eerder een zeldzaamheid in biologische monsters zoals bloed of urine. Rechtstreekse analyse van dergelijke monsters zou leiden tot irreversibele absorptie in de kolom, contaminatie van het injectiesysteem en zou tot thermische degradatie van de polaire metabolieten in de injector leiden. Om deze laatste componenten ook te kunnen analyseren vereisen ze daarom derivatisatie. Derivatisatie zorgt er in eerste plaats voor dat componenten minder polair worden en dus ook vluchtiger waardoor analyse met gaschromatografie mogelijk wordt. Bovendien worden er over het algemeen hierbij ook betere piekvormen, betere signaal tot ruis verhoudingen, betere detectiegevoeligheid en verbeterde scheidingen bekomen. Dit is vooral belangrijk voor klassen van metabolieten die structureel sterk op elkaar lijken zoals het geval is met suikers. Een derivatisatiemethode moet snel, reproduceerbaar en tegenwoordig ook automatiseerbaar zijn. Het moet op efficiënte, volledige en eenduidige wijze alle polaire metabolieten omzetten.

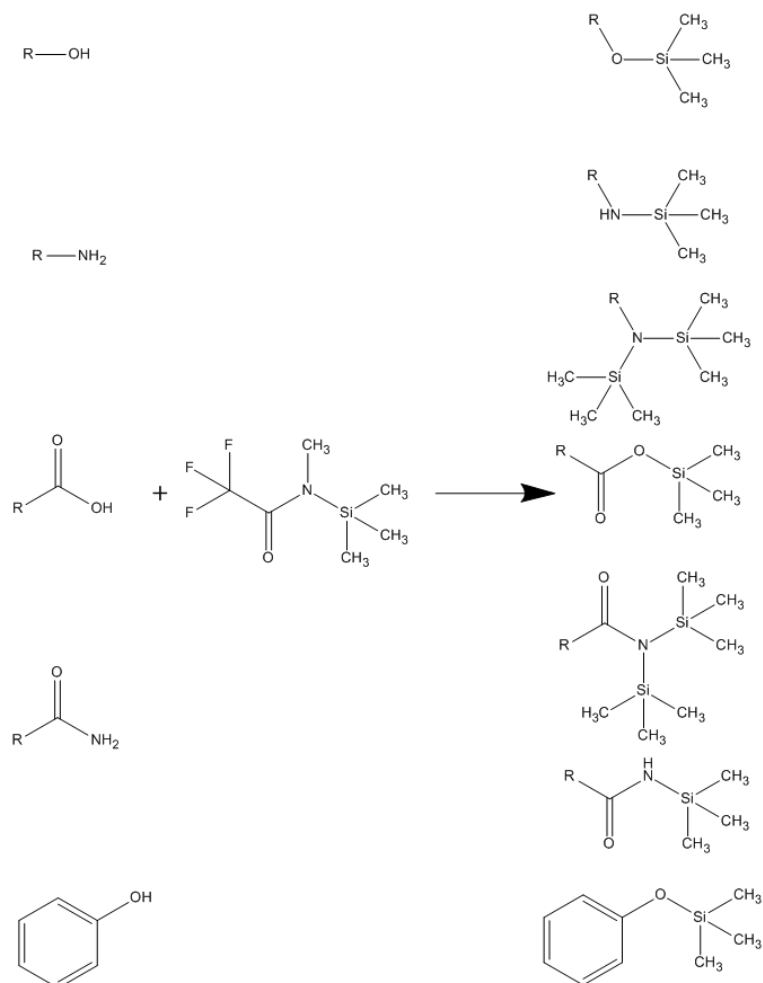
Algemeen gezien zijn er drie mogelijkheden om moleculen te derivatiseren: acylering, alkylering en silylering. De meest gebruikte van deze drie mogelijkheden in metabolomics is silylering omdat dit een brede waaier aan functionele groepen die voorkomen in metabolieten omzet.

In de silyleringsreactie (Figuur 5) wordt een actieve waterstof vervangen door een trimethylsilylgroep. Dit maakt de molecule minder polair en dus vluchtiger. De reactiviteit van functionele groepen voor silylering daalt in de volgorde:

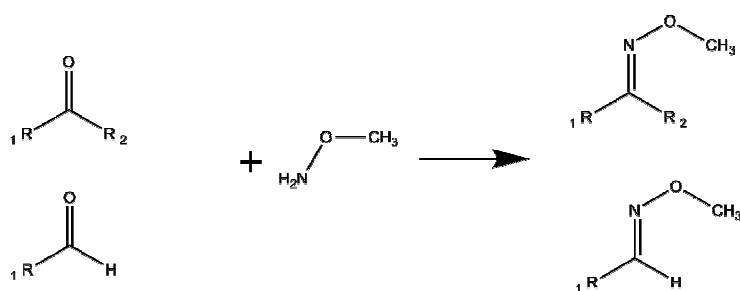
Alcoholen > phenolen > carbozuren ~ amines > amides

Aldehyden en ketonen kunnen ook gederiviseerd worden omdat deze in evenwicht zijn met hun enol vorm. Deze kunnen echter onstabiel zijn en daarom is het aangeraden om eerst een methoxymatie (Figuur 6) uit te voeren om ze om te vormen tot oximes en alkyloximes. Indien dit niet gedaan wordt, kan de derivatisatie onvolledig zijn wat aanleiding geeft tot meerdere pieken per component wat kwantificatie zeer moeilijk maakt. Het meest gebruikte reagens in metabolomics voor methoxymatie is methoxylamine hydrochloride in watervrij pyridine. Voor de silylering wordt doorgaans BSTFA [N,O-bis(trimethylsilyl) trifluoroacetamide] of MSTFA [N-methyl-N-(trimethylsilyl) trifluoroacetamide] gebruikt. De monsters moeten volledig droog zijn voor de silyleringsreactie. Solventen met actieve waterstoffen, zoals water en methanol, reageren namelijk ook met het silyleringsreagens. Daarom wordt er doorgaans ook een overmaat reagens gebruikt. Dit zorgt er ook

voor dat metabolieten met meerdere derivatiseerbare functionele groepen, zoals suikers, volledig omgezet worden tot één gederivatiseerde vorm.



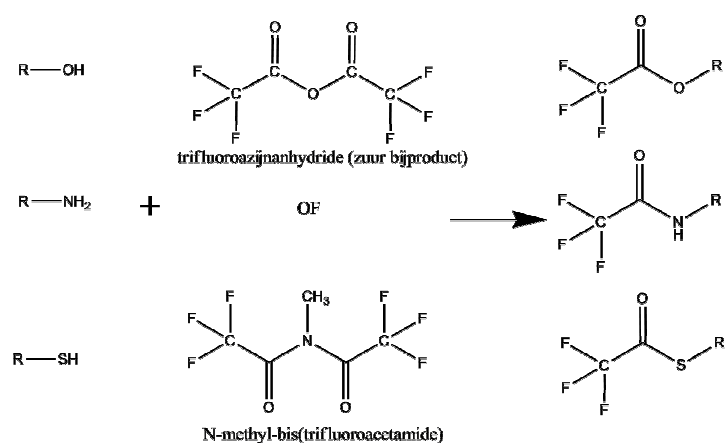
Figuur 5: Silyleringsreacties met MSTFA



Figuur 6: Methoxymatiering met methoxylamine

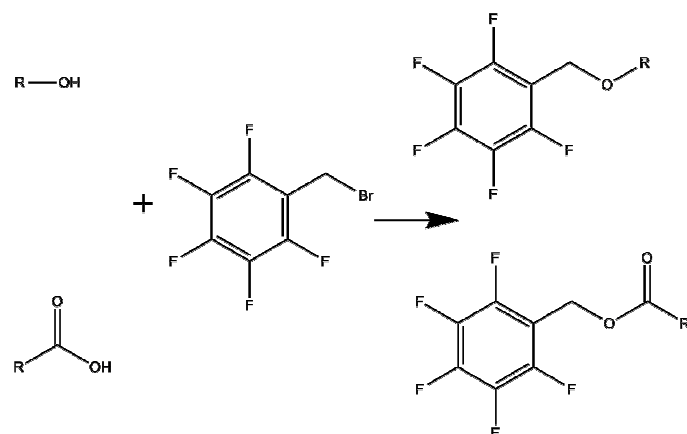
Bij acylering worden actieve waterstoffen (-NH, -OH, -SH) omgezet in amides, esters en thioesters door reactie met een carbonzuur of carbonzuurderivaat. Net zoals bij invoering van een trimethylsilylgroep verhoogt acylering ook de vluchtigheid van de polaire moleculen en verhoogt het de thermische stabiliteit van het eindproduct. Acyleringsreacties (Figuur 7) worden dikwijls uitgevoerd met perfluorozuur-anhydrides. Deze vormen echter zure bijproducten die voor analyse

moeten verwijderd worden om de kolom te beschermen. Daarom worden de reacties uitgevoerd in pyridine, tetrahydrofuran of een ander solvent dat de zure bijproducten kan opvangen. Dit probleem kan echter opgelost worden door te werken met een reagens zoals N-methyl-bis(trifluoroacetamide) (MTBTFA). Dit trifluoroacyleert amines, alcoholen en thiolen onder milde niet-zure condities en vormt als bijproduct N-Methyl-trifluoroacetamide. Dit bijproduct is vluchtig, stabiel en interfereert niet met de chromatografie.



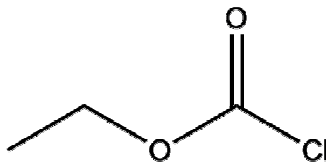
Figuur 7: Acyleringsreacties

Bij alkylering, wordt een actieve watersof vervangen door een alkylgroep met vorming van (thio)ethers, (thio)esters, n-alkylamines en n-alkylamides tot gevolg. Alkylering van zwak zure groepen, zoals alcoholen, vereist echter wel een sterke base om deze eerst te deprotoneren. Pentafluorobenzylbromide (Figuur 8) bijvoorbeeld kan gebruikt worden om ethers en esters te maken. Ketonen en aldehyden kunnen gederivatiseerd worden met o-alkylhydroxylamine HCl reagentia, zoals bijvoorbeeld methylhydroxylamine HCl. De lijst van mogelijke reagentia is zeer uitgebreid en het hangt af van de specifieke toepassing welk reagens het meest geschikt is voor de alkyleringsreactie.[14][15][16]



Figuur 8: Alkylering met pentafluorobenzylbromide

Chloroformingsreacties worden ook steeds meer naar voor geschoven als alternatieven voor bovenstaande reacties. Ethyl- en propylchloroformaten (Figuur 9) laten bijvoorbeeld toe om een brede waaier aan functionele groepen om te zetten en zijn dus ook toepasbaar in de analyse van complexe monsters zoals bloed. Propylchloroformaat wordt gebruikt in routinematige analyses van aminozuren in biologische monsters. In tegenstelling tot hoger beschreven derivatisaties kan de procedure met alkylchloroformaten uitgevoerd worden in waterige omstandigheden wat rechtstreekse derivatisatie toelaat. Omdat de toepasbaarheid minder is, wordt er echter meestal gopteerd voor silyleringstrategieën.[17][18]



Figuur 9: Ethylchloroformaat

## 4. Verwerking van de data

---

Hieronder worden kort enkele basisbegrippen uit de statistiek uiteengezet en de chemometrische methoden beschreven die gebruikt werden bij de verwerking van de data in dit werk.

### 4.1 Variantie

De variantie is het kwadraat van de standaardafwijking (standard deviation,  $S$ ). De standaardafwijking is een maat voor de spreiding van een veranderlijke. De relevante veranderlijken in dit werk zijn de oppervlaktes onder een piek en de retentietijden. De standaardafwijking kan berekend worden via:

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

met  $n$  = het aantal experimenten

$x_i$  = piekoppervlak of retentietijd van een individuele meting

$\bar{x}$  = de gemiddelde waarde van de piekoppervlaktes of retentietijden

De relatieve standaardafwijking (Relative standard deviation, RSD) wordt berekend als de procentuele verhouding van de standaardafwijking over het gemiddelde.[19][20]

$$RSD = 100\% \times \frac{S}{\bar{x}}$$

### 4.2 Voorafgaande databewerking

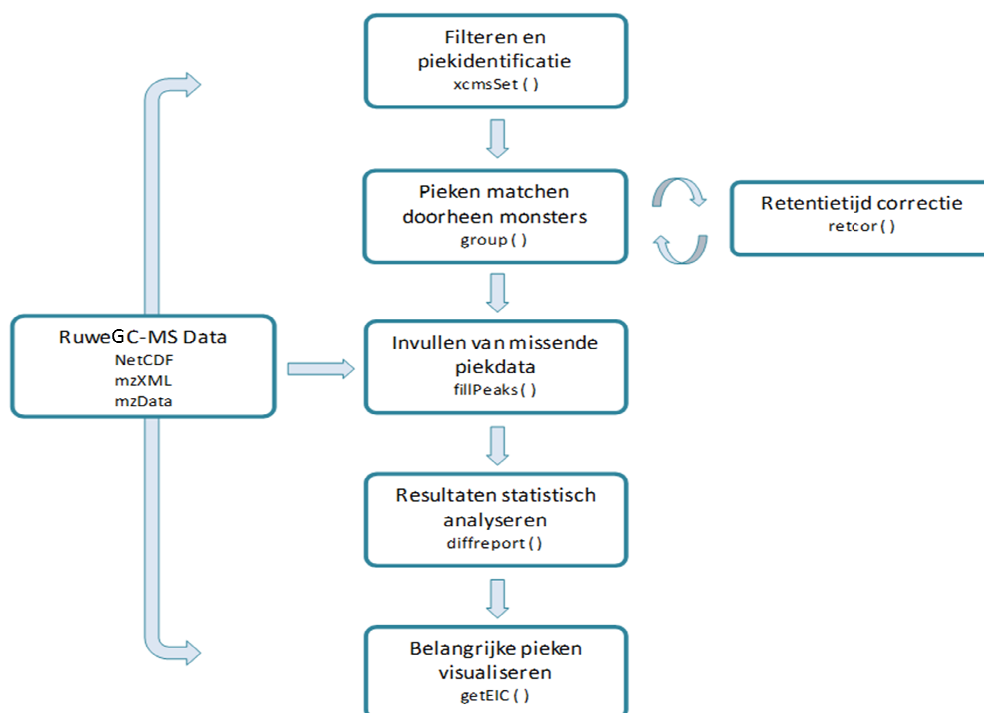
Wanneer de variantie tussen verschillende sets van monsters heel klein is op een paar al dan niet kleine pieken na, zoals het geval is bij de analyse van menselijk serum, is het aangewezen om de data op voorhand te bewerken om zoveel mogelijk variantie niet afkomstig van de analisten zelf te verwijderen. Hiervoor werd het vrij verkrijgbaar (<http://metlin.scripps.edu/xcms>), statistisch programma XCMS, dat geschreven is in de programmeertaal R, gebruikt. XCMS is speciaal ontworpen om de data van LC-MS of GC-MS analyses te verwerken (Figuur 10). Dit programma maakt gebruik van een algoritme, waar er hier niet verder op ingegaan wordt, dat pieken op een reproduceerbare manier detecteert in de driedimensionale ruimte (tijd, massa en intensiteit). Daarnaast moet het algoritme ook pieken met een laag signaal tot ruis verhouding kunnen onderscheiden van achtergrondruis. Een tweede belangrijke stap die XCMS uitvoert voor er kan overgegaan worden tot



de eigenlijke vergelijkende statistische analyse bestaat erin dat XCMS pieken die toebehoren aan hetzelfde analiet aan elkaar paart in de verschillende monsters.

In verschillende monsters kunnen pieken van eenzelfde analiet een licht verschillende retentietijd vertonen. Deze zogenaamde “retention time drift” kan opgelost worden door een aantal interne standaarden aan de monsters toe te voegen. De pieken die overeenkomen met deze toegevoegde standaarden worden dan geïdentificeerd en gebruikt om de drift in retentietijd te berekenen. Deze aanpak heeft echter twee grote nadelen. Ten eerste wordt er verondersteld dat de drifts in retentietijd lineair zijn, wat niet het geval is. Ten tweede vereist dit een extra stap in de monstervoorbereiding en kunnen de toegevoegde chemicaliën andere relevante analieten maskeren. Daarom zijn er ook weer verschillende algoritmes ontwikkeld die de drifts in retentietijd kunnen berekenen zonder toevoeging van interne standaarden en ook niet-lineaire afwijkingen toelaten.

Na al deze voorbereidende bewerking van de data kan er overgegaan worden op chemometrische methoden zoals principale componenten analyse en kleinste kwadraten regressie.[21]



Figuur 10: Organigram van de verschillende stappen die tijdens de databehandeling doorlopen worden met XCMS

### 4.3 T-toets

De t-toets is een statistische toets die gebruikt wordt om te achterhalen of het gemiddelde van een normaal verdeelde grootte afwijkt van een bepaalde waarde of, zoals het geval is in dit werk, of er een significant verschil is tussen de gemiddeldes van 2 groepen in een populatie.

Er wordt verondersteld dat de gemiddeldes van de 2 groepen gelijk zijn. De t-waarde wordt dan als volgt berekend.

$$t = \frac{(\bar{x}_1 - \bar{x}_2)}{\sqrt{\frac{\bar{s}_1^2}{n_1} + \frac{\bar{s}_2^2}{n_2}}}$$

Het aantal vrijheidsgraden wordt berekend volgens:

$$df = \frac{\left(\frac{s_1^2}{n_1} - \frac{s_2^2}{n_2}\right)^2}{\frac{s_1^4}{n_1^2(n_1 - 1)} + \frac{s_2^4}{n_2^2(n_2 - 1)}}$$

De kans dat de bekomen t-waarde groter is dan de getabelleerde waarde (voor het 95% confidentie-interval, bij een zelfde aantal vrijheidsgraden) wordt uitgedrukt door de significantie, dikwijls ook de p-waarde genoemd. Als deze kans, de p-waarde, groter is dan 5% wordt besloten dat het verschil tussen de twee gemiddeldes van de groepen te wijten is aan toevallige variatie. Is deze p-waarde kleiner dan 5% dan wordt besloten dat de twee gemiddeldes significant van elkaar verschillen (op het 95% betrouwbaarheidsniveau). [19][20]

#### 4.4 Principale componenten analyse

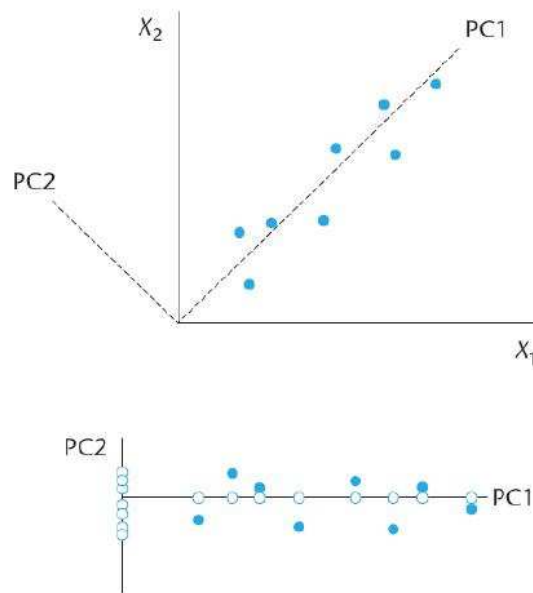
Principale componenten analyse (PCA) is een chemometrische techniek om data minder complex voor te stellen. Dit gebeurt door de p oorspronkelijke veranderlijken  $X_i$  te vervangen door p nieuwe veranderlijken  $Z_i$ . Deze nieuwe veranderlijken worden principale componenten genoemd. Deze principale componenten moeten voldoen aan enkele criteria.

- Ze zijn lineaire combinaties van de oorspronkelijke veranderlijken
- De eerste principale component bevat de meeste variantie en dus informatie, de tweede de tweede meeste, enz. De p-de principale component bevat dus de minste variantie en dus ook de minste informatie.
- De principale componenten zijn orthogonaal, met andere woorden, ze zijn niet gecorreleerd, ze bevatten geen overlap aan informatie.
- De oorspronkelijke veranderlijken moeten gecorreleerd zijn.

Een principale component wordt opgebouwd zoals hieronder weergegeven.

$$Z_i = a_{i1}X_1 + a_{i2}X_2 + \dots + a_{ip}X_p$$

De coëfficiënten  $a_{ij}$  zijn zodanig gekozen dat de principale componenten niet meer gecorreleerd zijn. Door de laatste principale componenten, met de minste variantie en dus minste informatie, weg te laten wordt de interpretatie van de data veel simpeler. Meestal kan uit de eerste drie principale componenten nagenoeg alle informatie gehaald worden. In Figuur 11 is een voorbeeld te zien van hoe PCA de variantie van 2 veranderlijken  $X$  maximaal bundelt in 2 principale componenten. [19][20]



Figuur 11: Voorbeeld van hoe PCA 2 veranderlijken  $X$  omzet in principale componenten [19]

## 4.5 Kleinste kwadraten regressie (PLS)

Kleinste kwadraten regressie (Partial Least Squares regression, PLS) is een chemometrische regressiemethode die probeert het aantal variabelen te reduceren. De volledige statistische achtergrond van PLS is hier van minder belang dus wordt de bespreking ervan beperkt tot een beschrijving van hoe PLS gebruikt wordt om de data in deze studie te interpreteren.

In deze studie zijn de variabelen pieken uit het chromatogram die gekarakteriseerd worden door hun massa over lading verhouding, hun retentietijd en de intensiteit. PLS maakt een lineaire combinatie van al deze variabelen om het onderscheid te maken tussen gezonde personen en personen met CKD of tussen de verschillende stadia van CKD. De variabelen die een hoge mate van correlatie vertonen met de respons (gezond of CKD) krijgen in de regressievergelijking een grotere coëfficiënt toegewezen. Zo kunnen de variabelen die het meest bijdragen tot het onderscheid maken tussen gezonde personen en personen met CKD geïdentificeerd worden. Deze variabelen kunnen dan weer

gelinkt worden aan een metabooliet. De op deze manier geselecteerde metaboolieten vertonen dus potentieel als biomerker.[19]

In dit werk zal gebruik gemaakt worden van PLS en niet van PCA. PCA is namelijk een ongesuperviseerde techniek die uitermate geschikt is om een reeks onbekende monsters te clusteren en zo informatie te verkrijgen over eventuele groepen in de monsters. In dit geval echter is de informatie over de groepering reeds voor handen. De monsters zijn reeds verdeeld in groepen (afkomstig van gezonde personen, afkomstig van personen met stadium 1 CKD,...). PLS is een gesuperviseerde, met informatie over de groepering dus, techniek die beter geschikt is om te achterhalen welke variabelen een grote invloed op de groepering en is dus beter geschikt om potentiële biomerkers te identificeren.

# 5. Experimenteel gedeelte

---

## 5.1 Op punt stellen van de derivatisatieprocedure

Vooraleer er overgegaan wordt tot het analyseren van bloedserum van mensen met CKD, wordt de effectiviteit van de derivatisatieprocedure eerst getest op een aantal functionele groepen, namelijk 3 verschillende aminozuren en een alcohol.

### 5.1.2 Gebruikte chemicaliën en instrumentatie

De gebruikte chemicaliën zijn van verschillende bronnen afkomstig. Octanol komt van Janssen Chimica. Phenylalanine, valine en MSTFA werden geleverd door Sigma-Aldrich. Methoxylamine HCl werd aangekocht bij Supelco. De solventen isopropanol en methanol werden verkregen bij Biosolve. De solventen isooctaan en watervrije pyridine zijn geleverd door Sigma-Aldrich. MSTFA werd opgeslagen bij 4°C.

De metingen werden uitgevoerd op een GC systeem 6890 van Agilent Technologies. Detectie gebeurde door middel van een quadrupool massaspectrometer van de 5973 serie van Agilent Technologies. De GC kolom is afkomstig van J&W Scientific. De kolom is 30 m lang, heeft een interne diameter 0,25 mm en een filmdikte van 0,25 µm. Ze is bestand tegen temperaturen die gaan van -60°C tot 325°C. De film bestaat uit polydimethylsiloxaan waarbij 5% van de methylgroepen vervangen is door een fenylgroep.

### 5.1.3 Instrumentele condities

Alle chromatogrammen in dit deel werden opgenomen onder de volgende instrumentele condities. Er werd telkens 1 µL van het monster geïnjecteerd. De injector had een temperatuur van 250°C zodat alles vervluchtigd werd. De injectie gebeurde in de splitless mode zoals beschreven in 3.2.2.2. Er werd gebruik gemaakt van helium als draaggas met een constant debiet van 1mL per minuut. De oven waarin de GC kolom zich bevond bleef 1 minuut bij 60°C waarna hij opwarmde aan 10°C per minuut tot 300°C waarna deze temperatuur nog 3 minuten aangehouden werd. De interface tussen de GC kolom en de ionisatiekamer van de massaspectrometer werd continu bij 280°C gehouden. De massaspectrometer detecteerde gevormde ionen tussen 35 en 500 m/z na een solvent delay van 4,3 minuten. De totale duur van één analyse was 28 minuten. Voor injectie werd de injectienaald 3 maal voorgespoeld met het solvent isooctaan en 2 maal met het monster. Na injectie werd de naald 3 maal gewassen met isooctaan en 3 maal met isopropanol.

### 5.1.4 Monstervoorbereiding

Voor de monstervoorbereiding van de testmonsters werd uitgegaan van de methode ontwikkeld door Fiehn et al. [22] Van de verschillende componenten werden stockoplossingen gemaakt in methanol. Van deze stockoplossingen werd een bepaalde hoeveelheid drooggeblazen zodat deze na heroplossing in 300  $\mu\text{L}$  solvent een concentratie van 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  gaf. Nadien werd er 70  $\mu\text{L}$  van een 20mg/mL methoxylamine HCl in watervrij pyridine oplossing aan toegevoegd. Dit werd even geschud en reageerde gedurende 90 minuten bij een temperatuur van 37°C. Na deze 90 minuten werd er 70  $\mu\text{L}$  N-methyl-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (MSTFA) aan toegevoegd. Dit werd opnieuw even geschud en reageerde gedurende 30 minuten bij 37°C. Tot slot werd er 160  $\mu\text{L}$  isooctaan toegevoegd om het totale volume tot 300  $\mu\text{L}$  te brengen. Van deze oplossingen werd dan 1  $\mu\text{L}$  geïnjecteerd op GC kolom. [22]

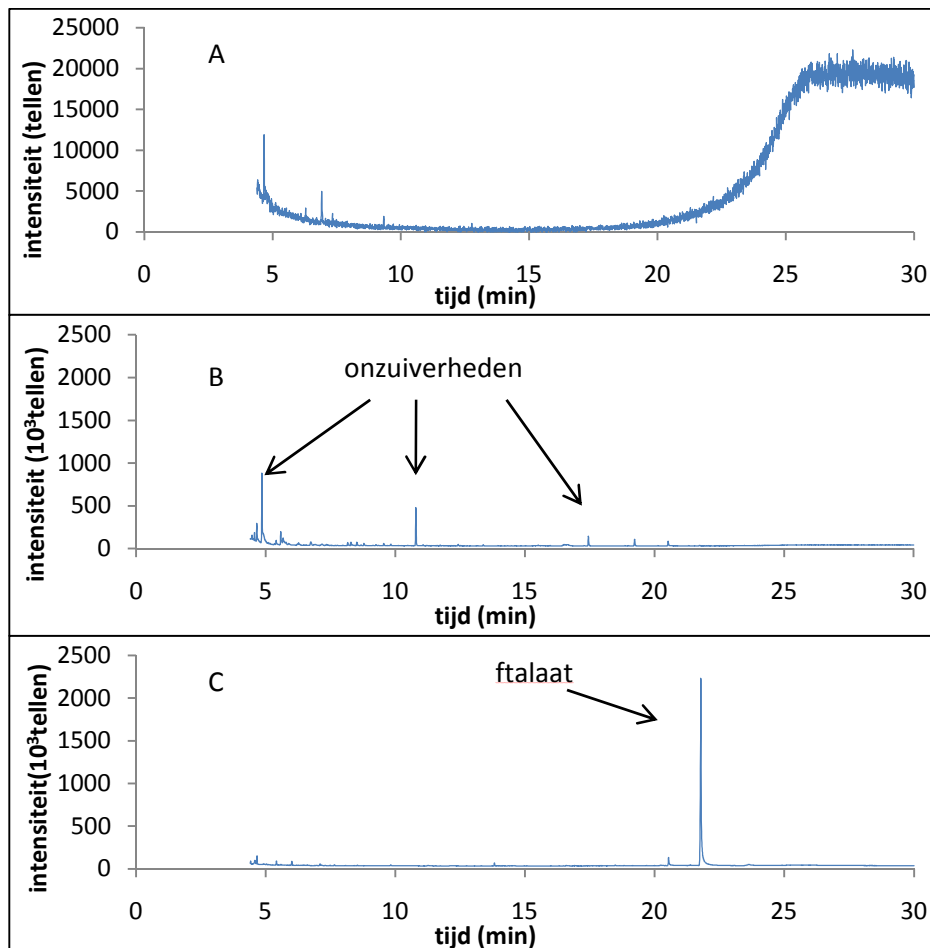
Deze procedure werd uitgevoerd met stockoplossingen van valine, proline, phenylalanine en octanol.

### 5.1.5 Resultaten

In Figuur 12 zijn de chromatogrammen van zuiver isooctaan, een oplossing van MSTFA in isooctaan en een oplossing van methoxylamine HCl in waterrijke pyridine weergegeven. De pieken die gedetecteerd worden in deze drie chromatogrammen zijn afkomstig van het solvent of de reagentia en mogen dus genegeerd worden in de opgenomen chromatogrammen van de testoplossingen. Merk op dat er een solvent delay werd gehanteerd van 4,3 minuten. Gedurende de eerste minuten van de analyse elueert het niet gedetecteerde solvent. De hoge stroom die deze grote overbeladen solventpiek zou produceren indien de ionisatiebron van de MS aangeschakeld is, verkort namelijk de levensduur van het ionisatie filament en van de elektronenvermenigvuldiger.

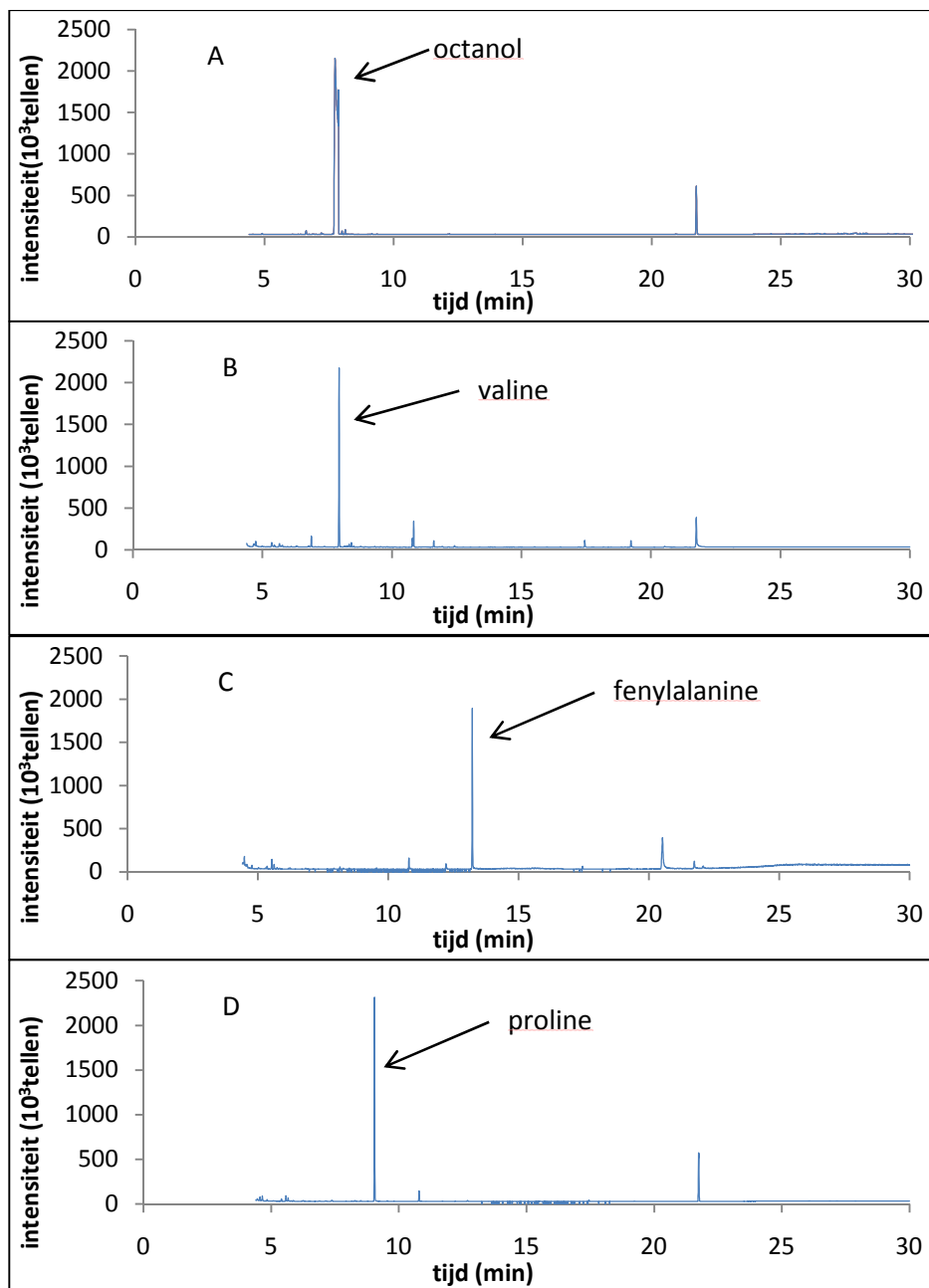
Op het chromatogram kan gezien worden dat het gebruikte isooctaan nagenoeg geen onzuiverheden bevat. De oplopende basislijn naar het einde van de analysetijd toe is te wijten aan de hoge temperaturen die op dat ogenblik bereikt worden waardoor kolomdegradatie gaat optreden met verhoogd achtergrondsignaal tot gevolg. In het chromatogram van MSTFA in isooctaan zijn enkele kleine (beneden de 1 miljoen tellen) pieken te zien. Naast deze kleine onzuiverheden is het chromatogram net als bij puur isooctaan zo goed als zuiver. Het chromatogram van methoxylamine HCl in waterrijke pyridine ziet er op één uitzondering na ook redelijk zuiver uit. Op 21,7 minuten is er een grote piek te zien. Het karakteristiek ion van 149 m/z dat in het corresponderende massa spectrum (niet weergegeven) te zien is suggereert een ftalaat, wat ook door de database aan massaspectra bevestigd wordt. Deze componenten zijn esters van ftaalzuur en verschillende alcoholen en ze worden, onder andere, uitgebreid gebruikt als weekmakers in plastics. Deze verontreiniging is dus waarschijnlijk afkomstig van de verpakking (deksel en/of septum) van het

watervrije pyridine. Er moet opgemerkt worden dat het methoxylamine HCl in watervrije pyridine onverdund geanalyseerd werd in tegenstelling tot het MSTFA monster dat 4 maal verdund werd. In de chromatogrammen bekomen bij analyse van de monsters zullen de pieken afkomstig van beide reagentia dus van dezelfde grootteorde zijn.



**Figuur 12: GC-MS chromatogram van A) zuiver isooctaan (100x ingezoomd) B) MSTFA in isooctaan C) methoxylamine HCl in watervrije pyridine**

In Figuur 13 zijn de chromatogrammen van de gesilyleerde testmoleculen weergegeven. Naast de pieken afkomstig van de reagentia die zojuist beschreven zijn, is in elk chromatogram één duidelijke piek te zien afkomstig van de gesilyleerde testmolecule. Dit wordt bevestigd door de database met massa spectra. Er is geen piek zichtbaar van overgebleven ongereageerde testmoleculen dus mag er besloten worden dat de silyleringsreactie volledig is doorgegaan. Nu de onzuiverheden afkomstig van de reagentie gelokaliseerd zijn, kan overgegaan worden tot het optimaliseren van de methode voor de analyse van menselijk serum.



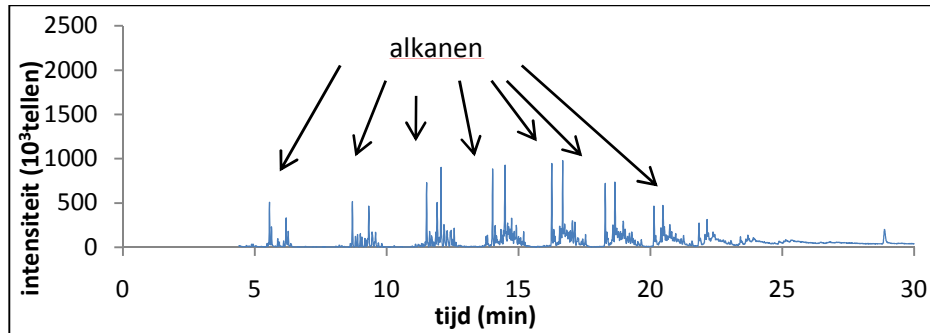
Figuur 13: GC-MS chromatogrammen van oplossingen (40  $\mu\text{g/ml}$ ) van de gesilyleerde testmoleculen A) octanol B) valine C) fenylalanine D) proline

### 5.1.6 Aandachtspunten

Gedurende de loop van de studie is gebleken dat er extra aandacht besteed dient te worden aan de keuze van vials waarin de monsters bereid worden. MSTFA reageert namelijk met de wanden van gewone glazen vials wat natuurlijk niet wenselijk is. Er kan ook niet gewerkt worden met plastic vials omdat er een hele reeks alkanen uit het plastic geloofd worden tijdens de monsterbereiding. Deze geven aanleiding tot een hele reeks ongewenste pieken in het chromatogram (Figuur 14). Daarom werd er voor deze thesis gebruik gemaakt van glazen vials met gedesactiveerde wanden van Agilent



(part nr. 5183-4497) zodat er geen ongewenste pieken verkregen werden en er geen silylerend reagens verloren ging.



Figuur 14: Chromatogram van puur isooctaan met vervuiling van alkanen afkomstig uit plastic vial

## 5.2 Optimalisatie van de analysemethode

### 5.2.1 Gebruikte chemicaliën en instrumentatie

De reagentia MSTFA en methoxylamine HCl zijn afkomstig van Sigma-Aldrich en Supelco, respectievelijk. De solventen methanol en isopropanol werden verkregen bij Biosolve. Heptaan en watervrij pyridine werden geleverd door Sigma-Aldrich. De dienst Nefrologie van het Universitair Ziekenhuis Gent leverde bloedserummonsters van zowel patiënten met CKD als van een gezonde controlegroep.

De metingen werden uitgevoerd op een GC systeem 7890A serie van Agilent Technologies. Detectie gebeurde met een quadropool massaspectrometer 5975C serie van Agilent Technologies. De GC kolom is hetzelfde type als beschreven in deel 5.1.2. De injectie vond plaats met een automatische injector 7683B serie van Agilent Technologies.

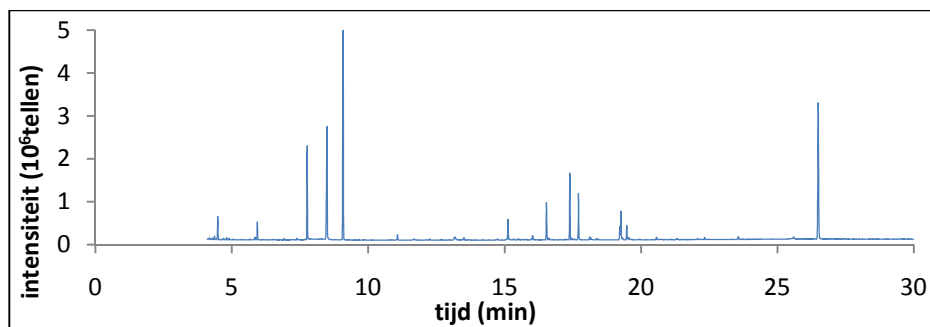
### 5.2.2 Optimalisatie van de extractie

Om zoveel mogelijk metabolieten uit de bloedserummonsters te extraheren werd uitgegaan van de methode voorgesteld door Jiye et al. [14] In die studie werd de efficiëntie van enkele populaire extractiesolventen (methanol, ethanol, aceton, acetonitril en chloroform) onderzocht en werd tot de conclusie gekomen dat methanol het meest geschikt is voor de extractie van hydrofobe moleculen met een laag moleculair gewicht uit bloedserum. Als compromis tussen maximale efficiëntie voor de extractie van hydrofobe en hydrofiële moleculen wordt een mengsel van methanol en water in 8:1 verhouding naar voor geschoven.[14]

Bloed werd afgenomen van patiënten en van de controlegroep in serumbuizen met gel. Deze serumbuizen werden gedurende 30 minuten op een bank gezet zodat stolling kon doorgaan. Daarna

werden ze gedurende 10 minuten gecentrifugeerd aan 3000 rpm bij kamertemperatuur. Het supernatans werd verdeeld in monsters van 500  $\mu\text{L}$  en verder bewaard bij  $-80^{\circ}\text{C}$ . Deze stappen werden uitgevoerd door de dienst Nefrologie van het Universitair Ziekenhuis te Gent.

Nadat het bloedserum ontdooid is, werd er 100  $\mu\text{L}$  bloedserum geëxtraheerd met 900  $\mu\text{L}$  methanol/water (8:1) en geschud gedurende 10 minuten. Dit werd vervolgens gedurende 15 minuten gecentrifugeerd aan 3000 rpm. Na het centrifugeren werd er 200  $\mu\text{L}$  van het supernatans genomen en drooggeblazen met een stikstofstroom. Eenmaal volledig drooggeblazen werd er 50  $\mu\text{L}$  van een 20 mg/mL methoxylamine HCl in watervrij pyridine oplossing toegevoegd en reageerde dit bij kamertemperatuur gedurende 24 uur. Daarna werd er 50  $\mu\text{L}$  MSTFA toegevoegd en reageerde dit gedurende 1 uur bij een temperatuur van  $37^{\circ}\text{C}$ . Na dit uur werd er nog 50  $\mu\text{L}$  heptaan toegevoegd aan het mengsel en gedurende 5 minuten geschud. Hiervan werd dan 1  $\mu\text{L}$  geïnjecteerd op de kolom. De instrumentele condities waren dezelfde zoals deze beschreven in deel 5.1.3.

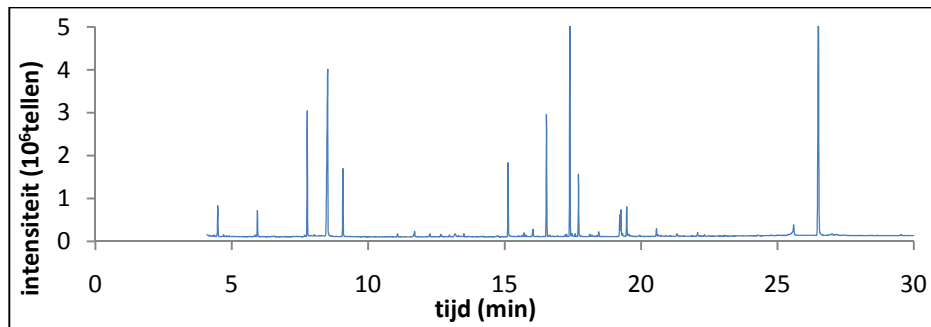


Figuur 15: GC-MS chromatogram van een bloedserummonster bereid volgens methode van Jiye et al. (piekidenticatie zie Figuur 25 en Tabel 3)

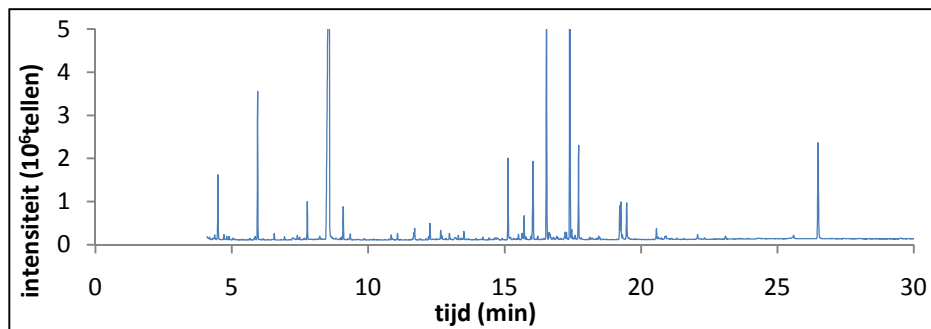
In Figuur 15 is een chromatogram te zien van een representatief bloedserummonster van een patiënt met CKD stadium 5 dat op deze manier werd voorbereid. In dit onderzoek werd er echter naar gestreefd om zoveel mogelijk metabolieten met een laag moleculair gewicht te detecteren. Daarom werd de extractieprocedure aangepast om meer en intensere pieken te verkrijgen in het opgenomen chromatogram. Dit werd gedaan door meer bloedserum te gebruiken in de extractiestap en door een grotere hoeveelheid van het supernatans te nemen na centrifugeren, dat daarna werd drooggeblazen.

In Figuren 16 en 17 zijn enkele chromatogrammen weergegeven van tussentijdse pogingen. Uiteindelijk werden goede resultaten bekomen met praktisch haalbare monstervolumes door te starten van 250  $\mu\text{L}$  bloedserum en dit te extraheren met 900  $\mu\text{L}$  methanol/water (8:1). Na centrifugeren werd dan 700  $\mu\text{L}$  van het supernatans genomen en gedroogd. De verdere procedure bleef identiek aan deze beschreven volgens Jiye et al. [14] In Figuur 18 is te zien dat deze aanpak

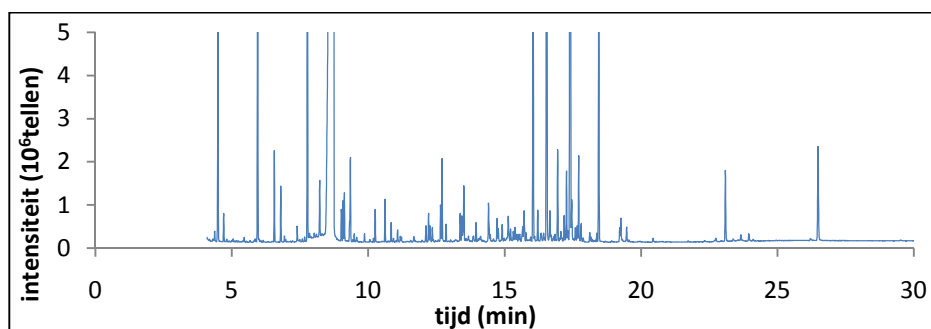
duidelijk aanleiding geeft tot veel meer gedetecteerde pieken. Merk op dat indien gewent de concentratie van de gedetecteerde metabolieten verder verhoogd zou kunnen worden door kleinere volumes van methoxylamine HCl in waterrijke pyridine en MSTFA te hanteren, wat zou leiden tot minder verdunning. Door de zeer vele signalen die reeds op deze manier reeds gedetecteerd konden worden leek dit echter niet nuttig op dit stadium van de studie. Bovendien werd er verwacht dat de uremische toxines en potentiële biomarkers in relatief hoge concentraties zouden voorkomen.



Figuur 16: GC-MS chromatogram van een bloedserummonster: 150 µL bloedserum + 900 µL methanol:water (8:1) ; 200 µL supernatans gedroogd na centrifugeren (piekidentificatie zie Figuur 25 en Tabel 3)



Figuur 17: GC-MS chromatogram van een bloedserummonster: 100 µL bloedserum + 900 µL methanol:water (8:1) ; 400 µL supernatans gedroogd na centrifugeren (piekidentificatie zie Figuur 25 en Tabel 3)



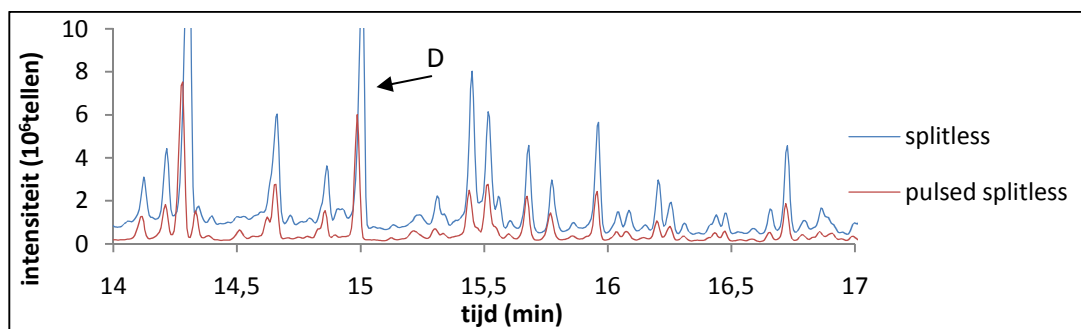
Figuur 18: GC-MS chromatogram van een bloedserummonster: zoals bekomen met de uiteindelijke extractieprocedure: 250 µL bloedserum + 900 µL methanol:water (8:1) ; 700 µL supernatans gedroogd na centrifugeren (piekidentificatie zie Figuur 25 en Tabel 3)

### 5.2.3 Optimalisatie van de instrumentele condities

Naast de extractieprocedure kunnen ook de instrumentele condities geoptimaliseerd worden. Er werd nagegaan of de resolutie van de meting kon verhoogd worden. Dit werd geprobeerd op twee manieren. Ten eerste door te werken met een pulsed splitless injectie in plaats van gewone splitless injectie. Ten tweede werd geprobeerd de resolutie te verhogen door te werken met een trager temperatuursprogramma dat aan 5°C per minuut opwarmt in plaats van aan 10°C per minuut waardoor de analysetijd wel dubbel zo lang werd. Naast het verhogen van de resolutie werd ook geprobeerd de analysetijd in te korten zonder aan resolutie in te boeten door de draaggassnelheid te verdubbelen van 1 mL per minuut naar 2 mL per minuut. Om al deze parameters te onderzoeken werd eenzelfde monster éénmaal geanalyseerd met alle verschillende instrumentele condities. Op deze manier zijn alle veranderingen in resolutie en piekintensiteit te wijten aan de gekozen instrumentele condities en niet aan de variabiliteit tussen 2 verschillende monsters.

#### 5.2.3.1 Splitless versus pulsed splitless

Eerst werd de vergelijking tussen gewone splitless injectie en pulsed splitless injectie beschouwd. In Figuur 19 wordt een overlay van beide chromatogrammen getoond waarbij er ingezoomd wordt op een representatieve fractie. Het valt op dat de pulsed splitless injectie methode (rode lijn) een lager achtergrondsignaal genereert dan de gewone splitless injectie methode (blauwe lijn). Daartegenover staat wel dat de piekhoogtes, gemeten vanaf de basislijn, beduidend kleiner zijn bij pulsed splitless injectie dan bij gewone splitless injectie. Zo bestaat het gevaar dat pieken die sowieso al klein zijn bij gewone splitless injectie helemaal niet meer zichtbaar zullen zijn wanneer pulsed splitless injectie toegepast wordt. Daarom werd ervoor gekozen om de gewone splitless injectie methode te blijven toepassen.

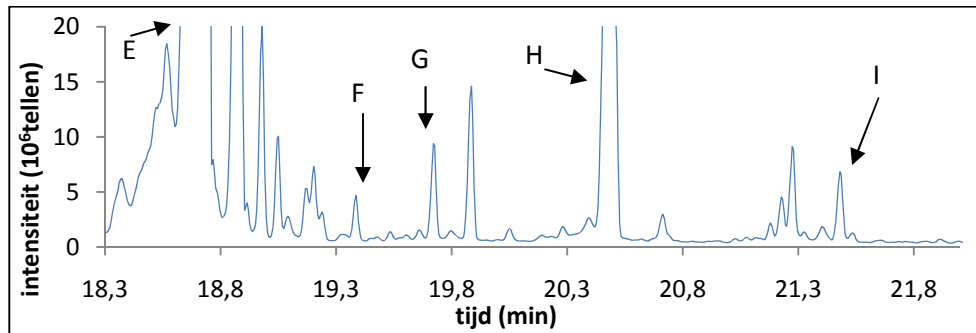


Figuur 19: Gewone splitless injectie (blauw) versus pulsed splitless injectie (rood) (piekidentificatie zie Figuur 25 en Tabel 3)

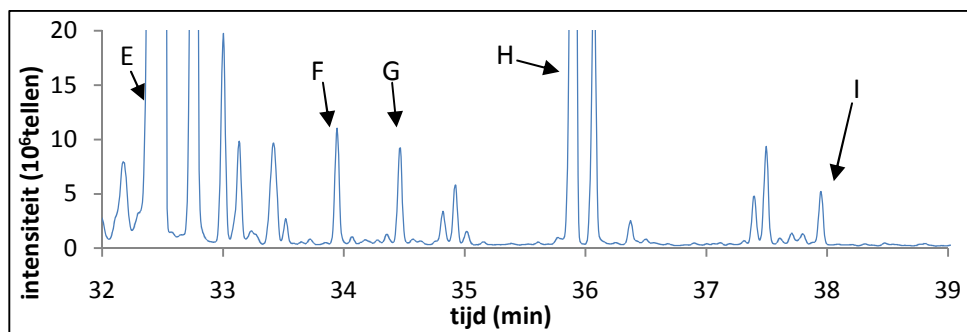
#### 5.2.3.2 Temperatuursprogramma

Als tweede punt werd de invloed van het temperatuursprogramma op de resolutie beschouwd. In Figuur 20 en 21 worden chromatogrammen weergegeven bekomen met de 2

temperatuursprogramma's. Uit de twee chromatogrammen valt te concluderen dat bij gebruik van het tragere temperatuursprogramma de verschillende pieken beter van elkaar gescheiden zijn en sommige volledig overlappende pieken geresolveerd worden. Omdat dit temperatuursprogramma reeds tot een analysetijd van een uur leidde en om te vermijden dat de analysetijd verder zou oplopen, werd er voor geopteerd om 5°C/min te hanteren in het verdere verloop van dit werk.



**Figuur 20:** Detail van chromatogram opgenomen met een temperatuursprogramma dat startte bij 40°C, daar gehouden werd gedurende 1 min, steeg aan 10°C/min tot 300°C en daar aangehouden werd gedurende 5 minuten (piekidentificatie zie Figuur 25 en Tabel 3)

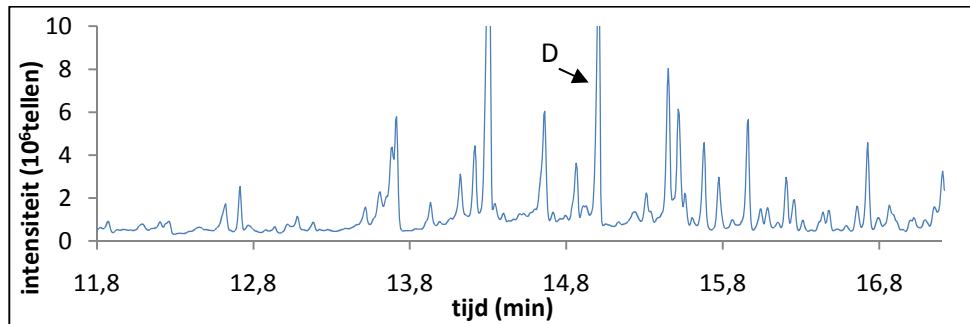


**Figuur 21:** Detail van chromatogram opgenomen met een temperatuursprogramma dat startte bij 40°C, daar gehouden werd gedurende 1 min, steeg aan 5°C/min tot 300°C en daar aangehouden werd gedurende 5 minuten. (piekidentificatie zie Figuur 25 en Tabel 3)

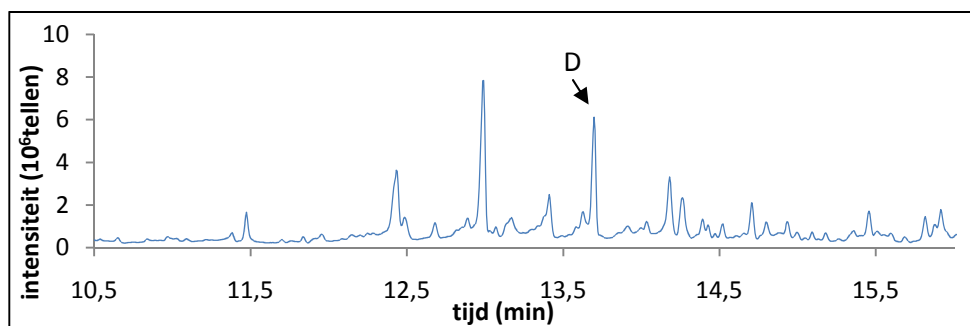
### 5.2.3.3 Draaggassnelheid

Als laatste instrumentele parameter werd de invloed van het debiet van het draaggas onderzocht. Alle GC analyses in dit werk werden uitgevoerd onder de constante flow mode, in tegenstelling tot de conventionele constante druk mode. Omdat een gas expandeert bij hogere temperaturen in de gradiënt zou het debiet bij constante druk verhogen tijdens het verloop van de analyses. Hierdoor is het niet mogelijk om steeds bij optimale flow rate te werken die rond de 30 cm/s (lineaire flow rate) of 1 mL/min (volumetrische flow rate) ligt voor dit type kolommen. In Figuur 22 en 23 worden de chromatogrammen weergegeven van respectievelijk de methode met een debiet van het draaggas van 1 mL/min en de methode met een debiet van het draaggas van 2 mL/min. Omdat echter de

temperatuursgradiënt hetzelfde is gebleven valt het op dat alle pieken ongeveer 1,3 minuten zijn opgeschoven naar een kortere retentietijd in het chromatogram met draaggassnelheid 2 mL/min en is te zien dat de pieken minder geresolveerd en ook minder intens zijn. Door de verwaarloosbare winst aan analyseduur die dit bovendien slechts levert wordt dus gebruik gemaakt van een debiet van het draaggas van 1 mL/min.



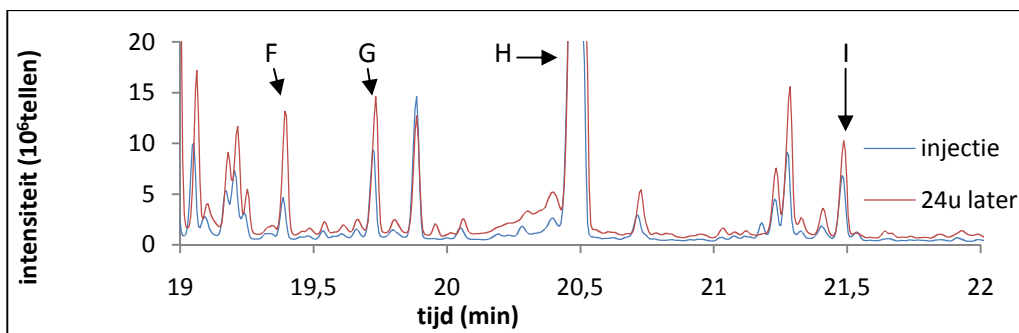
Figuur 22: Detail van chromatogram opgenomen met draaggassnelheid 1 mL/min (piekidentificatie zie Figuur 25 en Tabel 3)



Figuur 23: Detail van chromatogram opgenomen met draaggassnelheid 2 mL/min (piekidentificatie zie Figuur 25 en Tabel 3)

#### 5.2.3.4 Wachtijd tussen monstervoorbereiding en injectie

Tijdens het optimaliseren van de instrumentele condities kwam er nog een andere parameter aan het licht die controle vereiste, namelijk de tijd tussen het einde van de monstervoorbereiding en de eigenlijke injectie op de kolom. De gemeten intensiteit van de pieken werd namelijk merkbaar groter naarmate er meer tijd verstreek na de derivatisatie. Dit stabiliseert echter na 24 uur. In Figuur 24 wordt een overlay van twee chromatogrammen van hetzelfde monster getoond. In het blauw wordt het chromatogram opgenomen onmiddellijk na de monstervoorbereiding en in het rood hetzelfde monster maar 24 uur later geïnjecteerd op de kolom getoond. Daarom werd er beslist om steeds 24 uur te wachten na de monstervoorbereiding alvorens het monster te injecteren op de kolom. Daarbij werden er geen problemen met de stabiliteit van de gederivatiseerde monsters ondervonden.



Figuur 24: Overlay van detail van 2 GC-MS chromatogrammen van het zelfde monster; blauw: chromatogram opgenomen onmiddellijk na monstervoorbereiding; rood: chromatogram opgenomen 24 uur later (piekidentificatie zie Figuur 25 en Tabel 3)

## 5.2.4 Finale procedure

De uiteindelijke geoptimaliseerde procedure die in het verdere verloop van dit werk toegepast werd is de volgende.

Bloed werd afgenomen van patiënten en de controlegroep in serumbuizen met gel. Deze liet men 30 minuten staan zodat stolling kon doorgaan. Daarna werden ze gedurende 10 minuten gecentrifugeerd aan 3000 rpm bij kamertemperatuur. Het supernatans werd verdeeld in monsters van 500  $\mu$ L en verder bewaard bij  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Nadat ontdooiing van het bloedserum werd er 250  $\mu$ L van geëxtraheerd met 900  $\mu$ L methanol:water (8:1) en geschud gedurende 10 minuten. Daarna werd alles gecentrifugeerd aan 3000 rpm gedurende 15 minuten. Van het supernatans werd 700  $\mu$ L overgebracht in een glazen vial met gedesactiveerde wanden en drooggeblazen. Hierna werd 50  $\mu$ L van een 20 mg/ml methoxylamine HCl in watervrij pyridine oplossing in de vial gebracht. Dit reageerde gedurende 24 uur bij kamertemperatuur. Daarna werd er 50  $\mu$ L MSTFA in de vial gebracht en dit reageerde gedurende 1 uur bij een temperatuur van  $37^{\circ}\text{C}$ . Daarna werd nog 50  $\mu$ L heptaan toegevoegd. Na dit alles werd nog 24 uur gewacht alvorens het monster te injecteren op de kolom.

Alle chromatogrammen in dit deel werden opgenomen onder de volgende instrumentele condities. Er werd telkens 1  $\mu$ L van het monster geïnjecteerd. De injector had een temperatuur van  $250^{\circ}\text{C}$  zodat alles vervluchtigd werd. De injectie gebeurde in de splitless mode. Er werd gebruik gemaakt van helium als draaggas met een constant debiet van 1 mL per minuut. De oven waarin de GC kolom zich bevond bleef 1 minuut bij  $40^{\circ}\text{C}$  waarna hij opwarmde aan  $5^{\circ}\text{C}$  per minuut tot  $300^{\circ}\text{C}$  waarna deze temperatuur nog 5 minuten aangehouden werd. De interface tussen de GC kolom en de ionisatiekamer van de massaspectrometer werd continu bij  $280^{\circ}\text{C}$  gehouden. De massaspectrometer detecteerde gevormde ionen tussen de 35 en 500 m/z na een solvent delay van 6 minuten. De totale

duur van één analyse was 58 minuten. Voor injectie werd de injectienaald 3 maal voorgespoeld met het solvent heptaan en 2 maal met het monster. Na injectie werd de naald 3 maal gewassen met heptaan en 3 maal met isopropanol.



# 6. Resultaten

---

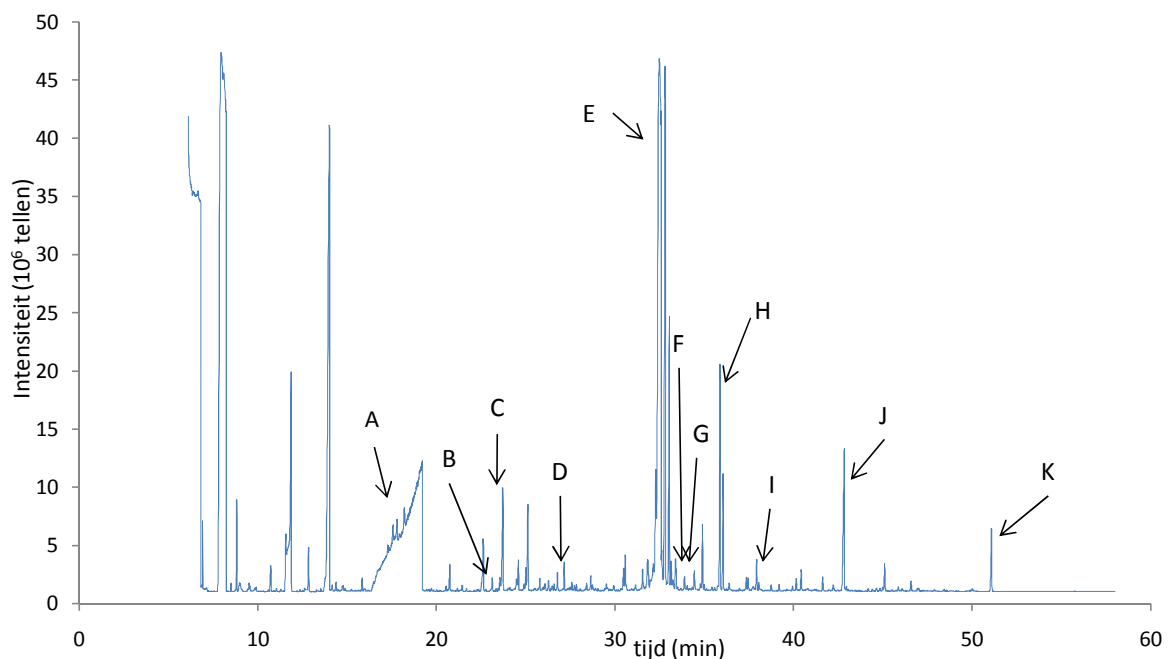
## 6.1 Samenstelling van de monsters van de meetcampagne

In het kader van deze thesis werd zoals eerder vermeld op zoek gegaan naar potentiële biomerkers voor Chronic Kidney Disease. Hiertoe werden bloedserummonsters van 64 personen geanalyseerd. Daarvan zijn er 10 personen per CKD stadium van waarbij de personen met stadium 5 CKD een hemodialyse therapie volgen. Daarnaast waren er ook nog bloedserummonsters voorhanden van 2 personen met stadium 5 CKD die peritoneale dialyse ondergingen en ook nog van 2 personen met stadium 5 CKD die nog geen dialysetherapie ondergingen. Tot slot bestond de gezonde controlegroep uit 10 personen. Alle bloedserummonsters in deze meetcampagne werden voorbereid en geanalyseerd zoals beschreven in deel 5.2.3. Alle bloedserumstalen werden voorzien van een cijfercode door het personeel van de dienst Nefrologie van het Universitair Ziekenhuis Gent zodat de identiteit van de personen uit deze meetcampagne beschermd bleef.

## 6.2 Identificatie met behulp van de database met massaspectra

Een belangrijke kwalitatieve test is de identificatie van een maximaal aantal structuren in de monsters. Daartoe wordt bekeken hoeveel metabolieten van een persoon met stadium 5 CKD kunnen geïdentificeerd worden aan de hand van de database met massaspectra (Figuur 25). In Tabel 3 zijn alle moleculen weergegeven die met een zekerheid van 80% of meer konden geïdentificeerd worden in het chromatogram van een persoon met stadium 5 CKD. Componenten die afkomstig zijn van de reagentia of kolomdegradatieproducten zijn als dusdanig niet interessant voor deze studie en zijn in het rood gemarkeerd. Er moet hierbij vermeld worden dat een aantal pieken met onvoldoende zekerheid of zelfs foutief geïdentificeerd zouden kunnen zijn omdat er veel overlapping optreedt en omdat veel metabolieten aanwezig in menselijk bloed nog niet vertegenwoordigd zijn in de bibliotheek van massaspectra. Dit toont aan dat spectrale identificatie aan de hand van databases een riskante onderneming blijft. Een veel grotere garantie van de identiteit van de moleculen zou bekomen kunnen worden indien een zuivere standaard aan het serum zou toegevoegd worden (spiken) en indien dit resulteert in een gelijkmatige verhoging van de beoogde piek. Omdat dit echter nog steeds niet uitsluit dat de “gespikete” molecule niet dezelfde is als de component die op dat tijdstip elueert, is het bovendien dan ook wenselijk om alle analyses nogmaals uit te voeren op een kolom die een sterk verschillende selectiviteit vertoont. Indien zowel de spectrale informatie als de retentietijden op die twee kolommen overeenkomen kan er met aanneembare garantie van een

positieve identificatie gesproken worden. Wegens het enorme aantal signalen aanwezig in de GC-MS chromatogrammen van menselijk serum is dit in dit werk wegens tijdsgebrek niet uitgevoerd.



**Figuur 25:** GC-MS chromatogram van een patiënt met stadium 5 CKD. Identificatie van geletterde pieken in Tabel 3.

**Tabel 3:** Lijst van moleculen die de database met massaspectra met 80% zekerheid of meer identificeert. Moleculen in het cursief zijn afkomstig van de reagentia of kolomdegradatieproducten. Moleculen met een letter zijn aangeduid in Figuur 25 ter illustratie.

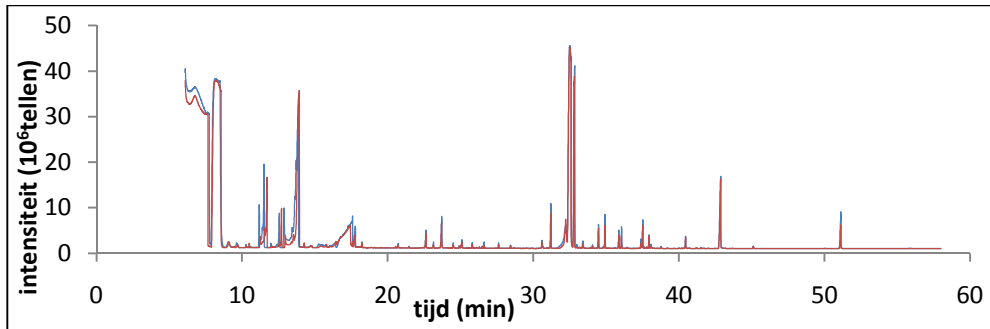
<b>Retentietijd (min)</b>	<b>Identificatie</b>	<b>Kwaliteit (%)</b>
6,95	<i>Acetamide, 2,2,2-trifluoro-N-methyl-N-(trimethylsilyl)-</i>	97
8,82	<i>Silanamine, N,N'-methanetetraylbis[1,1,1-trimethyl-</i>	95
10,93	<i>Methyltris(trimethylsiloxy)silane</i>	87
11,03	<i>Silane, trimethylphenoxy-</i>	91
12,51	<i>Silane, [(2-ethylhexyl)oxy]trimethyl-</i>	83
14,38	<i>Silane, [(1-methyl-1,3-propanediyl)bis(oxy)]bis[trimethyl-</i>	80
14,78	<i>Pentasiloxane, dodecamethyl-</i>	87
15,83	<i>L-Valine, N-(trimethylsilyl)-, trimethylsilyl ester</i>	94
14,10 -19,43	A <i>Urea, N,N'-bis(trimethylsilyl)-</i>	80
19,84	<i>Serine tritms</i>	80
20,53	<i>N,O,O-Tris(trimethylsilyl)-L-threonine</i>	91
21,69	<i>(R*,S*)-3,4-Dihydroxybutanoic acid triTMS</i>	83
22,77	B <i>Benzoic acid, 4-[(trimethylsilyl)oxy]-, methyl ester</i>	93
23,25	<i>p,.beta.-Dinitrostyrene</i>	86
23,72	C <i>N,O-Bis-(trimethylsilyl)-2-pyrrolidone carboxylic acid</i>	90
24,58	<i>2,3,4-Trihydroxybutyric acid tetrakis(trimethylsilyl) deriv.</i>	86
25,79	<i>Androstan-17-one, (5.beta.)-</i>	89

25,98		Benzoic acid, 4-[(trimethylsilyl)oxy]-, trimethylsilyl ester	95
26,27		Benzeneacetic acid, 3-[(trimethylsilyl)oxy]-, trimethylsilyl ester	83
26,50		2,5-Furandicarboxylic acid, bis(trimethylsilyl) ester	93
26,70		Tris(trimethylsilyloxy)ethylene	95
26,79	D	Butanedioic acid, 2,3-bis[(trimethylsilyl)oxy]-, bis(trimethylsilyl) ester, (R*,S*)-	94
27,16		3,4,5-Trihydroxypentanoic acid, tetrakis(trimethylsilyl)-	81
27,83		1H-Indole, 1-(trimethylsilyl)-5-[(trimethylsilyl)oxy]-	93
28,35		Quinolinic acid, bis(trimethylsilyl) ester	83
28,63		Xylitol, 1,2,3,4,5-pentakis-O-(trimethylsilyl)-	87
28,90		1-Propene-1,2,3-tricarboxylic acid, tris(trimethylsilyl) ester, (E)-	87
29,22		Trimethylsilyl [3-methoxy-4-(trimethylsilyloxy)phenyl]acetate	96
30,57		1,2,3-Propanetricarboxylic acid, 2-[(trimethylsilyl)oxy]-, tris(trimethylsilyl) ester	81
31,46		Galactonic acid, 2,3,5,6-tetrakis-O-(trimethylsilyl)-, lactone	86
31,55		D-Fructose, 1,3,4,5,6-pentakis-O-(trimethylsilyl)-, O-methyloxime	87
32,47	E	Glucose oxime hexakis(trimethylsilyl)	80
33,24		Trimethylsilyl ether of glucitol	91
33,70		D-Gluconic acid, 2,3,4,5,6-pentakis-O-(trimethylsilyl)-, trimethylsilyl ester	90
33,89	F	Erythrose, O-methyloxime, tris-O-(trimethylsilyl)-	90
34,33		D-Gluconic acid, 2,3,4,5,6-pentakis-O-(trimethylsilyl)-, trimethylsilyl ester	83
34,44	G	Hexadecanoic acid, trimethylsilyl ester	99
35,00		Glycine, N-[2-[(trimethylsilyl)oxy]benzoyl]-, trimethylsilyl ester	95
35,88	H	Myo-Inositol, 1,2,3,4,5,6-hexakis-O-(trimethylsilyl)-	81
36,46		1,3-Propanediamine, N'-phenyl-N,N-bis(trimethylsilyl)-	91
37,46		11-trans-Octadecenoic acid, trimethylsilyl ester	90
37,93	I	Octadecanoic acid, trimethylsilyl ester	98
39,19		7-Isopropenyl-1,4a-dimethyl-4,4a,5,6,7,8-hexahydro-3H-naphthalen-2-one	83
39,94		Alpha.-D-Glucopyranose, 1,2,3,4,6-pentakis-O-(trimethylsilyl)-	87
40,43		Hexanedioic acid, bis(2-ethylhexyl) ester	95
41,26		1,2-Bis(trimethylsilyloxy)cyclohexene	83
41,49		4,4-Difluororetinoic acid (all-trans)	90
42,22		Hydroxy proline dipeptide per-TMS? msl	93
42,84	J	1,2-Benzenedicarboxylic acid, diisooctyl ester	91
48,44		Maltose, octakis(trimethylsilyl)-	81
51,09	K	Cholesterol trimethylsilyl ether	99

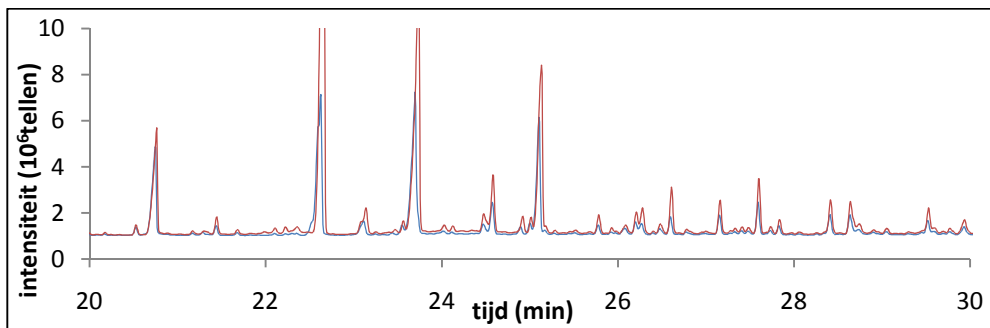
### 6.3 Studie van de herhaalbaarheid van de analyses

Om de herhaalbaarheid van de methode verder te bestendigen werd er gedurende het verloop van de meetcampagne serum van dezelfde patiënt verschillende malen op dezelfde wijze voorbereid en geanalyseerd. In Figuren 26 tot 29 worden overlays voorgesteld van enkele van deze analyses. Merk

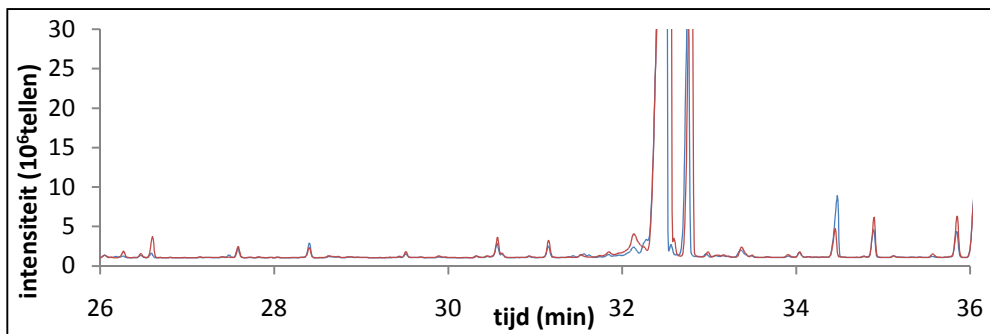
op dat deze chromatogrammen nog niet gecorrigeerd werden met XCMS voor eventuele retentietijd drift. Visueel is het echter duidelijk dat herhaalbaarheid behoorlijk is.



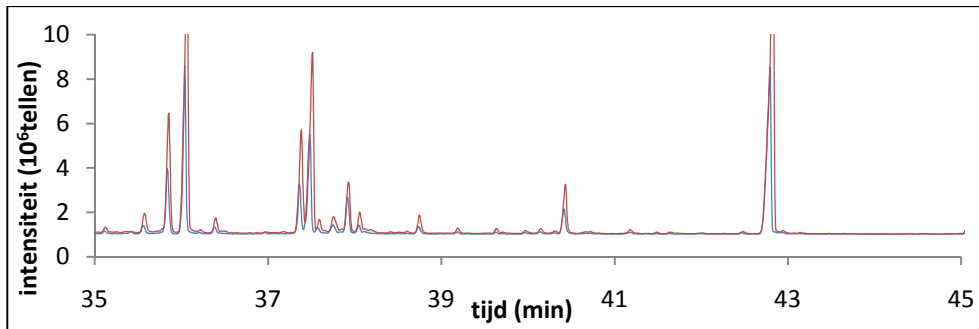
Figuur 26: Overlay van GC-MS chromatogrammen van 2 monsters van het bloedserum van persoon "gezond 002"



Figuur 27: Detail van overlay van GC-MS chromatogrammen van 2 monsters van het bloedserum van persoon "ckd5 hd 104"

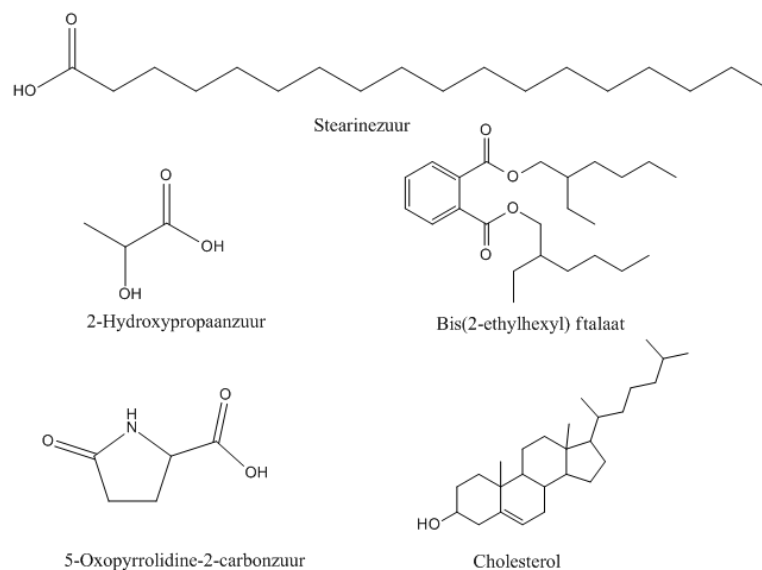


Figuur 28: Detail van overlay van GC-MS chromatogrammen van 2 monsters van het bloedserum van persoon "ckd3 027"



**Figuur 29: Detail van overlay van GC-MS chromatogrammen van 2 monsters van het bloedserum van persoon "ckd2 063"**

Om dit ook kwantitatief uit te drukken werden er 5 pieken, verspreid over de volledige analysetijd, uit die en andere representatieve chromatogrammen geselecteerd en werd de relatieve standaardafwijking (RSD) op retentietijd en piekoppervlakte ervan berekend. De 5 geselecteerde componenten komen voor in alle monsters en konden door de database met massa spectra van het GC systeem met hoge zekerheid (>90%) geïdentificeerd worden zodat er geen verwarring mogelijk is bij het lokaliseren van deze pieken over de verschillende monsters heen. De geselecteerde pieken zijn afkomstig van 2-hydroxypropaanzuur ( $\approx 11,6$  minuten), 5-oxopyrrolidine-2-carbonzuur ( $\approx 23,7$  minuten), stearinezuur ( $\approx 37,9$  minuten), bis(2-ethylhexyl) ftalaat ( $\approx 42,8$  minuten) en cholesterol ( $\approx 51,1$  minuten) (Figuur 30). Hoewel bis(2-ethylhexyl) ftalaat een contaminant is afkomstig van de plastic vials waarin de bloedserummonsters opgeslagen werden, werd deze ook geselecteerd voor deze herhaalbaarheidstudie omdat het net als de andere geselecteerde moleculen in alle monsters aanwezig is. De RSD op de retentietijd werd berekend over de verschillende monsters heen. De RSD op de piekoppervlakte kon slechts berekend worden voor elk paar dubbel uitgevoerde monsters. De resultaten worden weergegeven in Tabel 4 en 5.



**Figuur 30: Structuur van de moleculen gebruikt voor de berekening van de RSD (%)**

Het is duidelijk dat de herhaalbaarheid van de retentietijd zeer goed is. Slechts bij één component komt de RSD op de retentietijd boven de 1% uit. Voor de rest van de componenten is deze zelfs maar in de grootteorde van 0,1%. Die uitstekende herhaalbaarheid komt overeen met wat vandaag verwacht wordt in gaschromatografie. Merk op dat, door gebruik te maken van “retention time locking” de precisie van de retentietijden tot op 0,001 min correct gecontroleerd kan worden. Er werd in deze studie hier niet voor geopteerd omdat de retentietijden reeds zeer herhaalbaar waren en omdat de piekalignatie algoritmes in de XCMS software dit ook deels opvangen. De gemeten variabiliteit van de piekoppervlaktes ligt steeds een stuk hoger in gaschromatografie. In dit geval werden variabiliteiten tot 18% gemeten voor de piekoppervlaktes. Alhoewel dit verschillende oorzaken kan hebben, is de moeilijkheid om zeer accuraat 1 µL injectievolume af te meten hier waarschijnlijk de oorzaak. Bovendien zou, indien er meer monsters beschikbaar zouden zijn, een reproduceerbaarheidsstudie minstens 3 en liefst zelf 6 identieke monsters omvatten, wat de RSD's ook zou verlagen. Dit probleem zou gemakkelijk kunnen opgevangen worden door gebruik te maken van interne standaarden, zodat relatieve piekoppervlaktes uitgezet kunnen worden, of zoals het geval is in dit werk door normalisatie van de data.

**Tabel 4: RSD(%) berekening op de retentietijd**

Monster	retentietijd van de verschillende pieken (min)				
	2-hydroxypropaanzuur	5-oxopyrrolidine-2-carbonzuur	stearinezuur	bis(2-ethylhexyl)ftalaat	cholesterol
gezond 002 #1	11,51	23,71	37,95	42,86	51,12
gezond 002 #2	11,71	23,7	37,95	42,84	51,1
CKD2 103 #1	11,71	23,67	37,93	42,81	51,06
CKD2 103 #2	11,52	23,69	37,92	42,82	51,06
CKD2 O63 #1	11,4	23,65	37,92	42,79	51,04
CKD2 O63 #2	11,43	23,71	37,93	42,83	51,05
CKD3 027 #1	11,71	23,66	38,03	42,81	51,06
CKD3 027 #2	11,55	23,69	37,92	42,83	51,06
CKD4 118 #1	11,43	23,65	37,91	42,76	51,04
CKD4 118 #2	11,71	23,7	37,92	42,8	51,05
CKD5 hd 104 #1	11,77	23,7	37,91	42,84	51,09
CKD5 hd 104 #2	11,42	23,74	37,92	42,86	51,09
RSD(%)	1,21	0,11	0,09	0,07	0,05

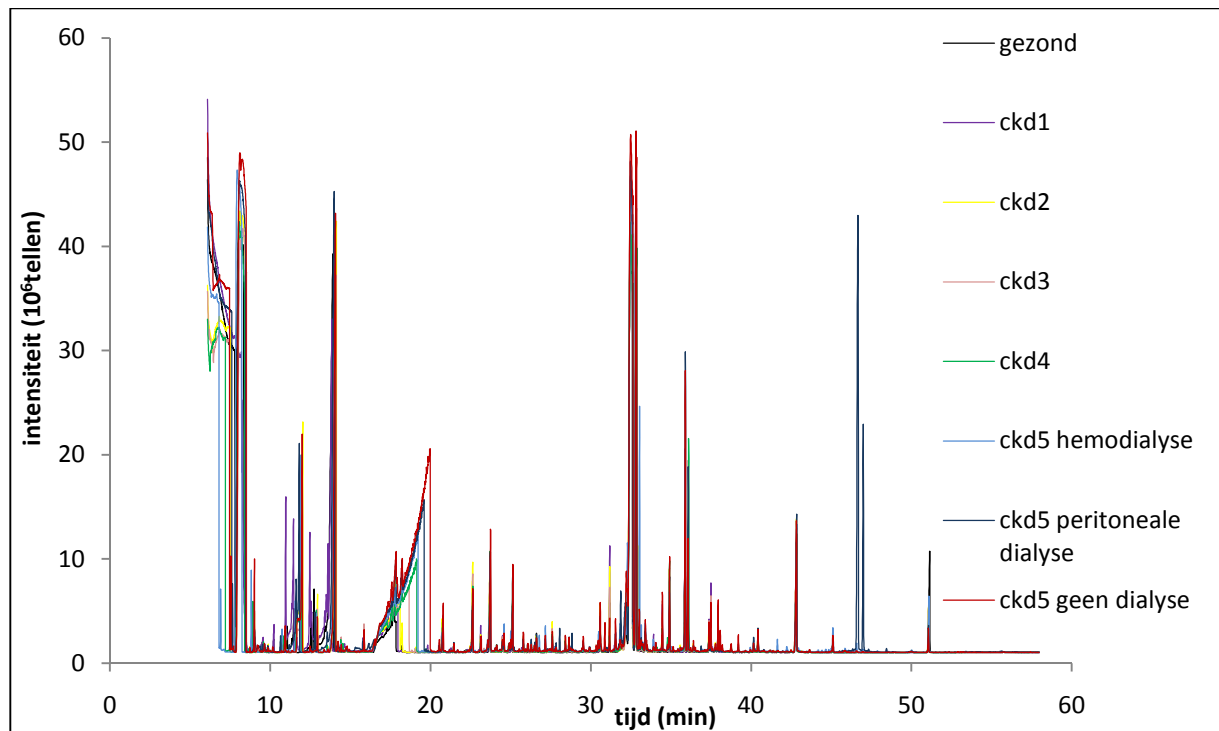
Tabel 5: RSD(%) berekening op de piekoppervlakte

Monster	2- hydroxypropaanzuur	RSD (%)	5- oxopyrrolidine- 2-carbonzuur	RSD(%)	stearinezuur	RSD(%)
gezond 002 #1	618807075		238204188		79727627	
gezond 002 #2	515744466	12,84	193571025	14,61	69886697	9,30
CKD2 103 #1	496432324		254598878		84845561	
CKD2 103 #2	395742807	15,96	296598240	10,77	71427429	12,14
CKD2 O63 #1	417678894		134073435		49161573	
CKD2 O63 #2	523288867	15,87	164573446	14,44	54489884	7,26
CKD3 027 #1	581775684		1211601370		3075552652	
CKD3 027 #2	453895807	17,46	1005746501	13,12	3805901102	15,00
CKD4 118 #1	179092939		94691096		9637546	
CKD4 118 #2	149898927	12,54	83360193	8,99	9971973	2,41
CKD5 hd 104 #1	1204381536		1535279963		1161161552	
CKD5 hd 104 #2	1371739676	9,18	1346501902	9,26	987708809	11,41
Monster	bis(2-ethylhexyl) ftalaat	RSD(%)	cholesterol	RSD(%)		
gezond 002 #1	716537745		383703680			
gezond 002 #2	621581621	10,03	343433220	7,83		
CKD2 103 #1	399019494		93938693			
CKD2 103 #2	305099390	18,86	83565688	8,26		
CKD2 O63 #1	267039563		38026506			
CKD2 O63 #2	209734613	16,99	44057665	10,39		
CKD3 027 #1	4117890553		6602034656			
CKD3 027 #2	4832283863	11,28	7088388288	5,02		
CKD4 118 #1	90567469		11999035			
CKD4 118 #2	80128947	8,64	10339206	10,50		
CKD5 hd 104 #1	4217502995		3753346937			
CKD5 hd 104 #2	4992006473	11,89	3574196337	3,45		

## 6.4 Kwalitatieve visuele evaluatie van de data

Vooraleer de data bewerkt worden met XCMS en verdere chemometrische methodes zoals PCA en PLS toe te passen, kunnen de data ook al visueel op een kwalitatieve manier bekeken worden.

Hiertoe wordt een overlay met het chromatogram van een monster van elke klasse voorgesteld in Figuur 31.

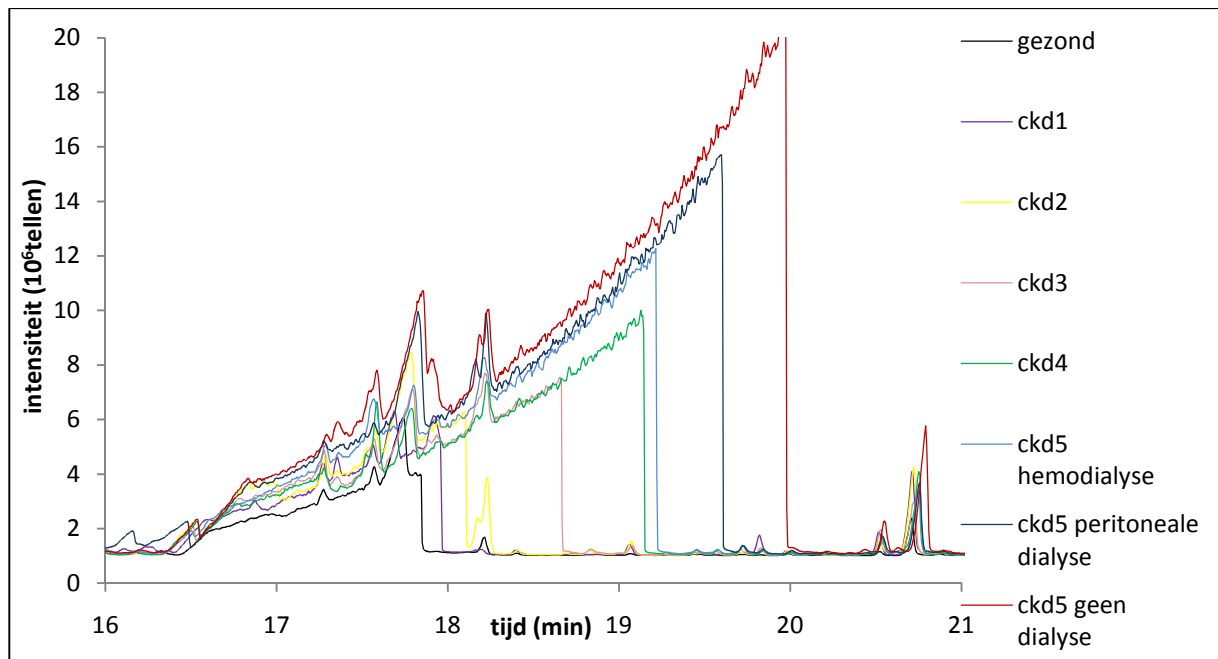


**Figuur 31: Overlay van de GC-MS chromatogrammen van bloedserum van een persoon uit elk van de 8 verschillende groepen**

Op het eerste zicht overlappen de chromatogrammen van de verschillende klassen heel sterk. Dit is ook te verwachten aangezien het metabooloom van verschillende mensen heel gelijkaardig is op een aantal subtiele verschillen na waarvoor doorgaans statistische methodes nodig zijn om ze te detecteren. Toch kunnen na visuele inspectie al enkele opmerkingen gemaakt worden.

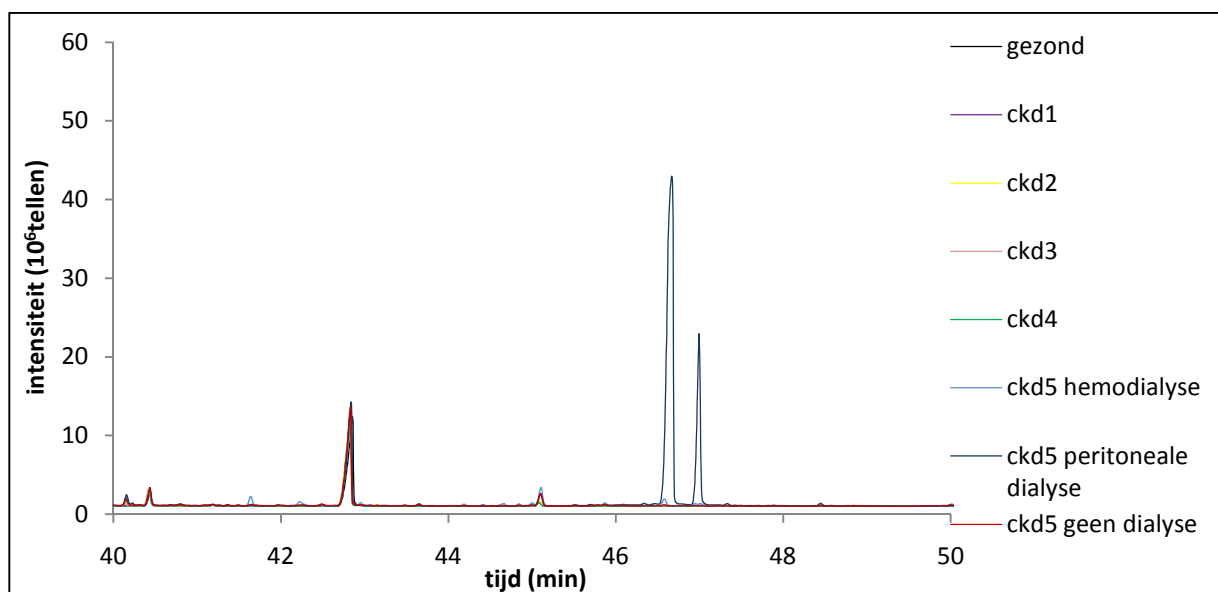
Zo valt op dat de brede piek tussen de 16<sup>e</sup> en 21<sup>e</sup> minuut van de analyse stelselmatig groter wordt bij toenemend stadium van CKD (Figuur 32). Dit signaal werd geïdentificeerd als ureum. Dit is een bekend uremisch toxine en tegenwoordig de in klinische praktijk meest courant gebruikte biomarker voor CKD. Dit is een indicatie van de bruikbaarheid van ureum als biomarker voor CKD. Het is dan ook logisch dat de intensiteit van deze piek het grootst is bij patiënten met stadium 5 CKD die nog geen dialyse ondergaan zijn en het kleinst is bij de gezonde controlegroep.





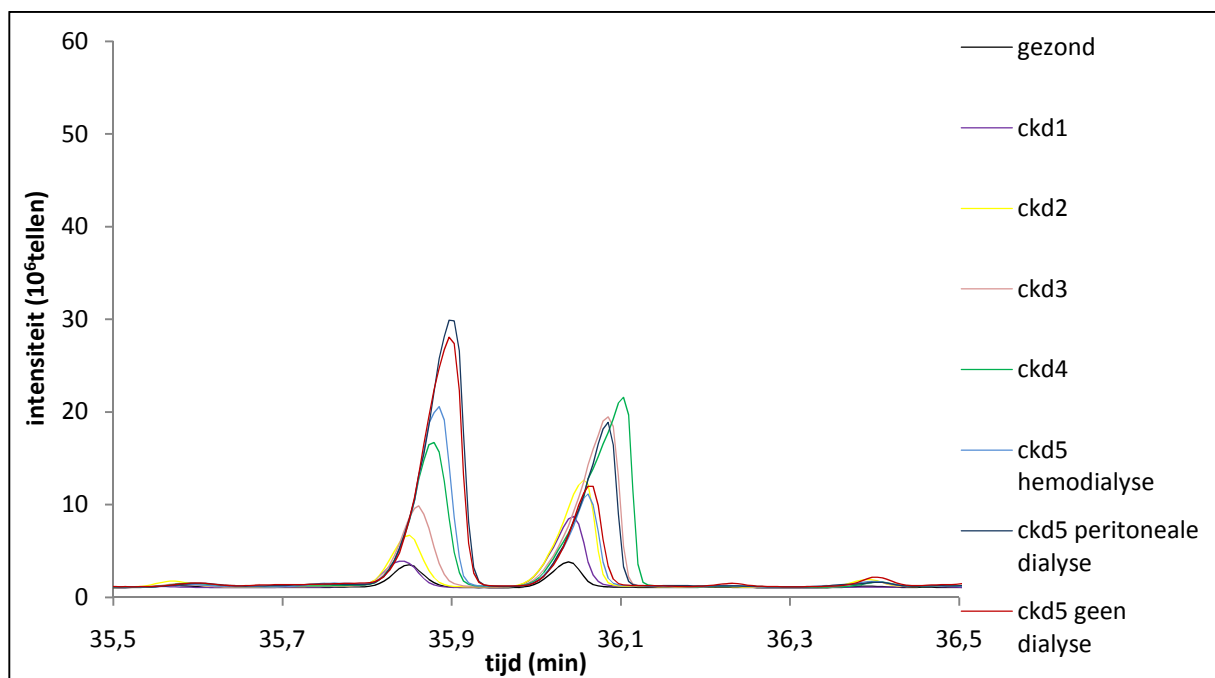
Figuur 32: Detail van Figuur 31; ingezoomd op het signaal van ureum

Interessant zijn ook de 2 pieken op 46,5 en 47 minuten (Figuur 33). Deze twee vrij intense pieken zijn enkel aanwezig in de chromatogrammen van patiënten die peritoneale dialyse ondergaan zijn. Ze zijn dus hoogstwaarschijnlijk afkomstig van de spoelvoelstof die bij deze behandeling gebruikt wordt en zo in de bloedbaan terecht zijn gekomen. De structuur van moleculen in kwestie konden niet met voldoende zekerheid bepaald worden maar het gaat hoogstwaarschijnlijk om moleculen met structuur gelijkaardig aan suikers.



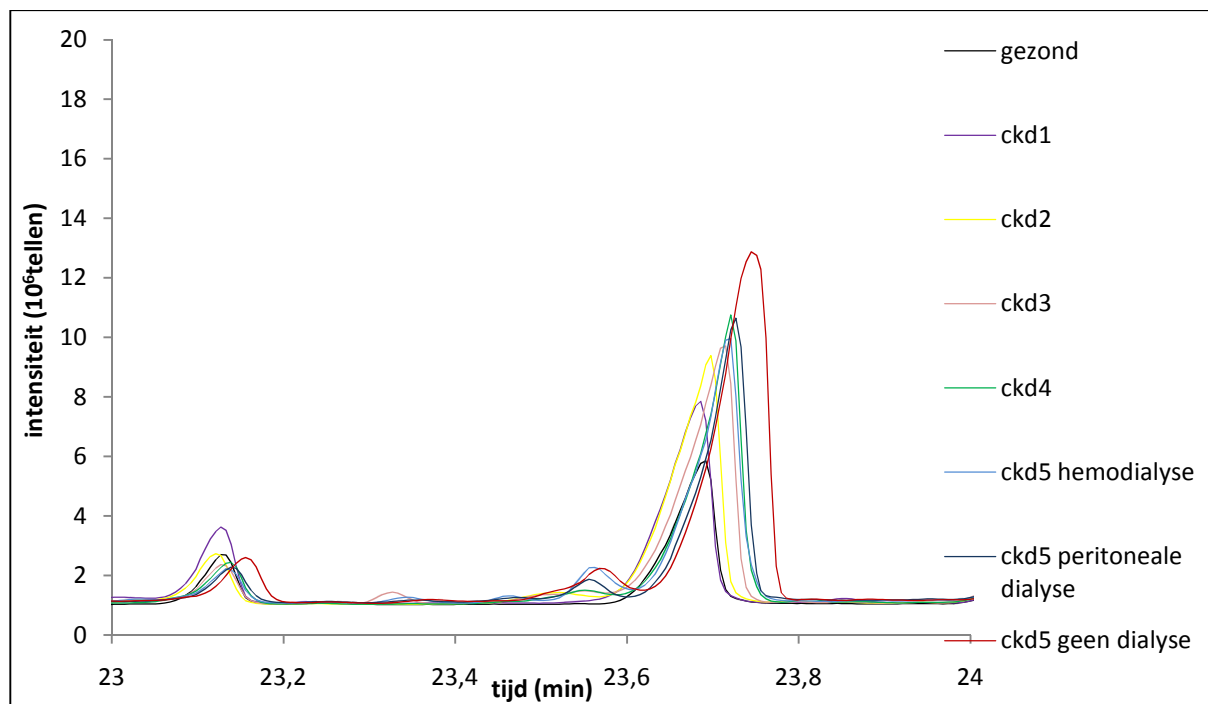
Figuur 33: Detail van Figuur 31; ingezoomd op 2 pieken die enkel aanwezig bij de peritoneale dialyse groep

Er zijn nog 2 interessante pieken zichtbaar op 35,9 en 36,1 minuten (Figuur 34). Deze signalen zijn afkomstig van respectievelijk myoinositol en urinezuur, beide bekende uremische toxines. Myoinositol vertoont net als bij ureum een rechtevenredig verband tussen de piekintensiteit en het stadium van CKD waar de patiënt zich in bevindt. Urinezuur vertoont een minder duidelijk verband tussen piekintensiteit en stadium van CKD, alhoewel er toch kan opgemerkt worden dat urinezuur nauwelijks aanwezig is in het chromatogram van de gezonde controlegroep en in alle stadia van CKD een beduidend hogere piekintensiteit kan waargenomen worden in vergelijking met de gezonde controlegroep.



**Figuur 34:** Detail van Figuur 31; ingezoomd op de signalen van myoinositol en urinezuur

Nog een dergelijk voorbeeld wordt gevonden in de piek op 23,7 minuten (Figuur 35). Hier is niettegenstaande enige retentietijd drift ook zichtbaar hoe de piekintensiteit toeneemt met toenemend CKD stadium. Dit signaal kon geïdentificeerd worden als 5-oxopyrrolidine-2-carbonzuur. Deze verbinding is tegenwoordig niet geclassificeerd als een uremisch toxine en daarom interessant. De identiteit van de molecule zou daarvoor echter eerst bevestigd moeten kunnen worden aan de hand van standaarden en de aanwezigheid in een grotere groep van CKD patiënten zou moeten gevalideerd worden. Dit viel echter buiten het kader van deze thesis.



Figuur 35: Detail van Figuur 31; ingezoomd op de piek afkomstig van 5-oxopyrrolidine-2-carbonzuur

Zo zijn er nog heel veel signalen die kwalitatief besproken kunnen worden. Omdat dit door de grote hoeveelheid data echter ook zeer tijdrovend zou zijn is het veel efficiënter om die vergelijking uit te voeren met metabolomics software pakketten zoals XCMS. Dit wordt verder uiteengezet.

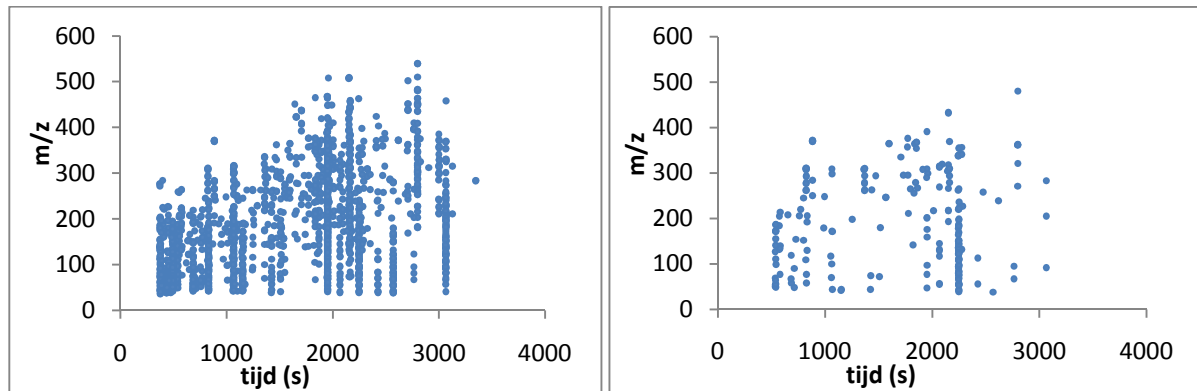
## 6.5 Statistische verwerking van de data

Vervolgens werden alle data verwerkt met het programma XCMS (<http://metlin.scripps.edu/xcms>) zoals beschreven in deel 4.2. Deze software corrigeert voor eventuele retentietijd drift en zet de data om tot ongeveer 2000 “features” per monster. Deze “features” worden gekenmerkt door een massa over lading verhouding, een retentietijd en een intensiteit. Deze “features” laten vergelijking tussen alle monsters toe. In deze studie wordt er hierop, zoals verder uitgelegd, kleinste kwadraten regressie uitgevoerd.

### 6.5.1 Evaluatie van de classificatie

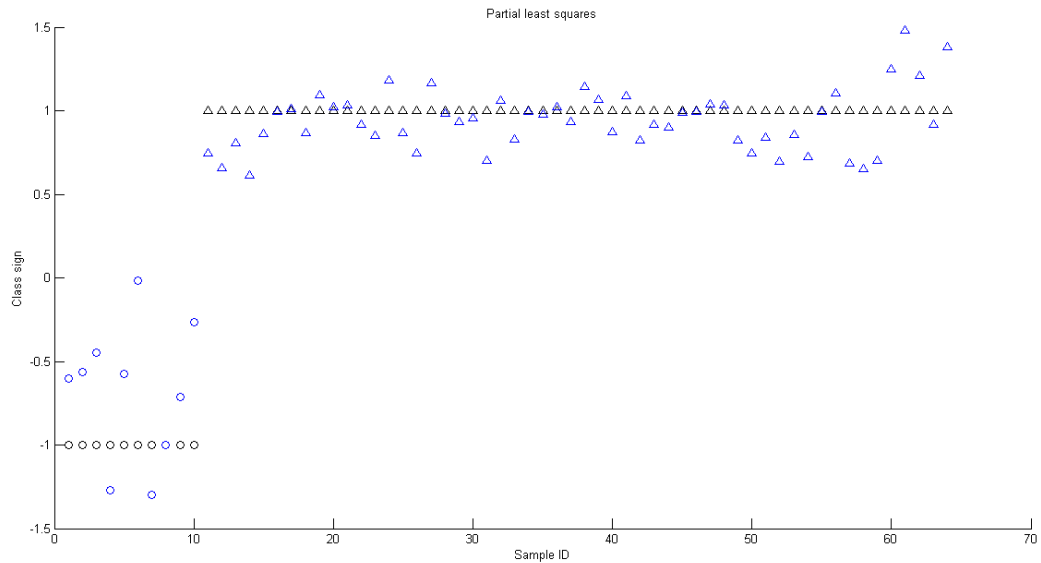
PLS is een chemometrische classificatiemethode. Met de “features” bekomen uit XCMS wordt een model, een regressievergelijking, opgesteld die toelaat om monsters te classificeren in 2 groepen, bvb, ziek en gezond of CKD stadium 1 en andere CKD stadia. In eerste instantie wordt een t-test uitgevoerd op het gemiddelde van de “features” tussen de 2 groepen. De “features” waarvan gevonden wordt dat ze niet significant verschillend zijn tussen de 2 groepen worden weggelaten. In deze studie worden er zo nog ongeveer 300 “features” overgehouden om de regressievergelijking mee op te bouwen (Figuur 36). Deze methode werd toegepast om de gezonde controlegroep te

onderscheiden van personen met CKD alsook om elk stadium van CKD apart te onderscheiden van de andere stadia. Wanneer de variantie tussen 2 groepen veel groter is dan de variantie binnen de groepen wordt er een goede classificatie verkregen. Wanneer dit niet het geval is, bestaat er een grote kans op overlap en bijgevolg een grote kans dat monsters in de verkeerde groep geïdentificeerd worden.



**Figuur 36:** Links: Alle features gegenereerd door XCMS uit de data; Rechts: De "features" geselecteerd door t-toets als significant genoeg voor de PLS analyse

Er werd aangenomen dat er geen variantie binnen de groepen is en alle gezonde personen werden gedefinieerd als een classificatie te hebben gelijk aan -1. De personen met CKD werden als dusdanig gedefinieerd als een classificatie te hebben gelijk aan +1. Aan de hand hiervan werd dus het model, de regressievergelijking, berekend en werd voor alle monsters hun classificatie opnieuw berekend volgens het bekomen model. Wanneer deze classificatieuitkomst dus kleiner is dan 0, dan wordt een monster geïdentificeerd als afkomstig van een gezond persoon. Is de classificatieuitkomst groter dan 0 dan wordt het monster geïdentificeerd als afkomstig van een persoon met CKD. Het resultaat van de classificatie tussen de gezonde groep en de groep met CKD wordt weergegeven in een plot zoals in Figuur 37. De bolletjes stellen de monsters van gezonde personen voor en de driehoekjes deze van personen met CKD. In het zwart is de gedefinieerde waarde weergegeven aan de hand waarvan het model werd opgesteld en in het blauw is de waarde weergegeven die voor dat monster berekend werd volgens het model.

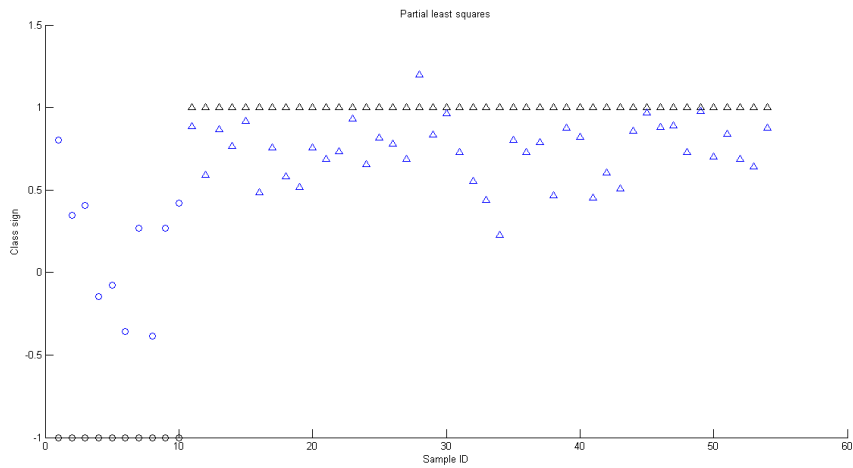


**Figuur 37: PLS classificatie van dataset in gezonde personen (bol) en alle personen met verschillende stadia van CKD (driehoek)**

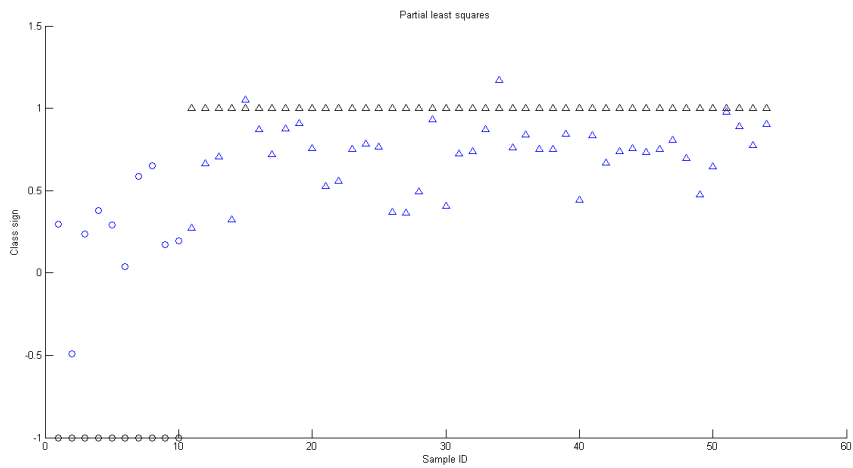
Op de figuur is te zien dat het model vrij goede resultaten oplevert met de bekomen dataset. Alle personen met CKD werden volledig correct geïdentificeerd en van de gezonde personen was er slechts één monster dat niet verkeerd werd geïdentificeerd. Merk echter op dat de nierfiltratie capaciteit van “gezonde” personen absoluut geen homogene groep is. Zo is het bijvoorbeeld normaal dat oudere personen minder actieve nieren hebben, zonder dat ze daarom als CKD patiënt beschouwd worden. De “features” die in dit model, deze regressievergelijking, de grootste coëfficiënten hebben, hebben de meeste invloed op het classificeren van de monsters. Grote positieve coëfficiënten wijzen op “features” die in verhoogde mate aanwezig zijn in de monsters van personen met CKD. Grote negatieve coëfficiënten wijzen op “features” die sterker aanwezig zijn bij gezonde personen of dus ten dele verdwenen zijn bij personen met CKD. Deze interessante “features” kunnen dan teruggekoppeld worden aan enkele metabolieten aanwezig in het bloedserum. Het zijn deze metabolieten die potentieel vertonen om na verdere studies als biomarker te functioneren.

Het effectief terugkoppelen van de interessante “features” naar hun metabolieten wordt in het volgende stuk besproken. Eerst worden de resultaten van de classificaties van elk CKD stadium afzonderlijk van de andere CKD stadia geëvalueerd. Deze resultaten zouden interessant kunnen zijn om te zien welke metabolieten en/of uremische toxines opduiken of verdwijnen in de verschillende stadia van CKD om zo een beter beeld te krijgen van het verloop van de ziekte. De resultaten worden weergegeven in Figuur 38 tot 44. Het afzonderlijk beschouwde CKD stadium is daarbij telkens

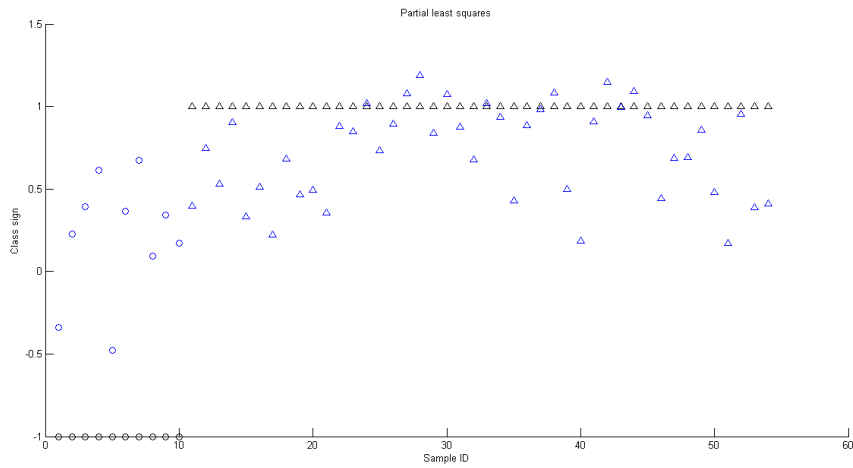
gedefinieerd als -1 en de rest van de stadia als +1. De kleur- en symboolcode stemt overeen met deze uit Figuur 37.



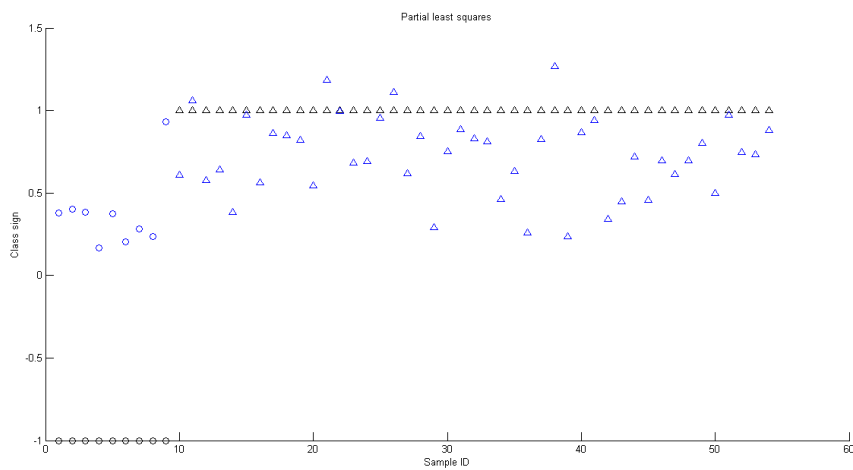
**Figuur 38: PLS classificatie van dataset in personen met stadium 1 CKD (bol) en personen met andere stadia van CKD (driehoek)**



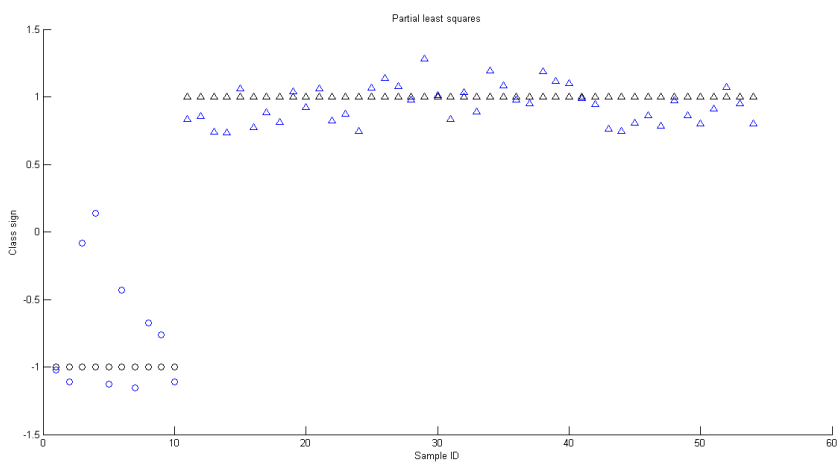
**Figuur 39: PLS classificatie van dataset in personen met stadium 2 CKD (bol) en personen met andere stadia van CKD (driehoek)**



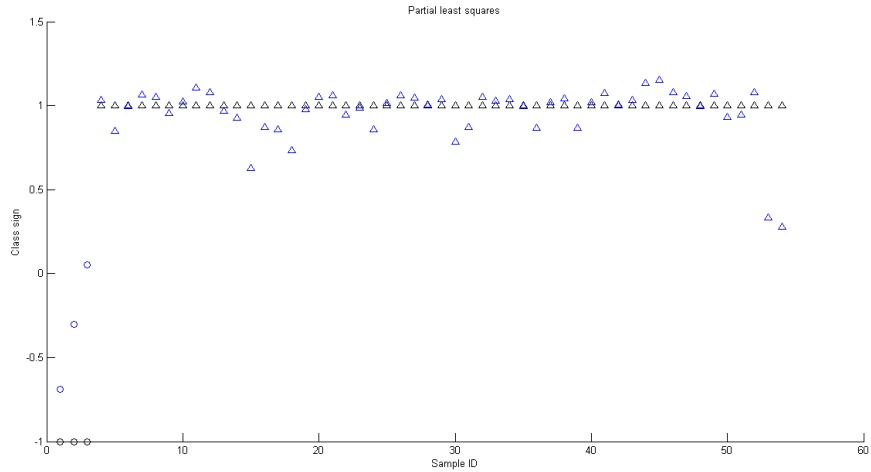
**Figuur 40: PLS classificatie van dataset in personen met stadium 3 CKD (bol) en personen met andere stadia van CKD (driehoek)**



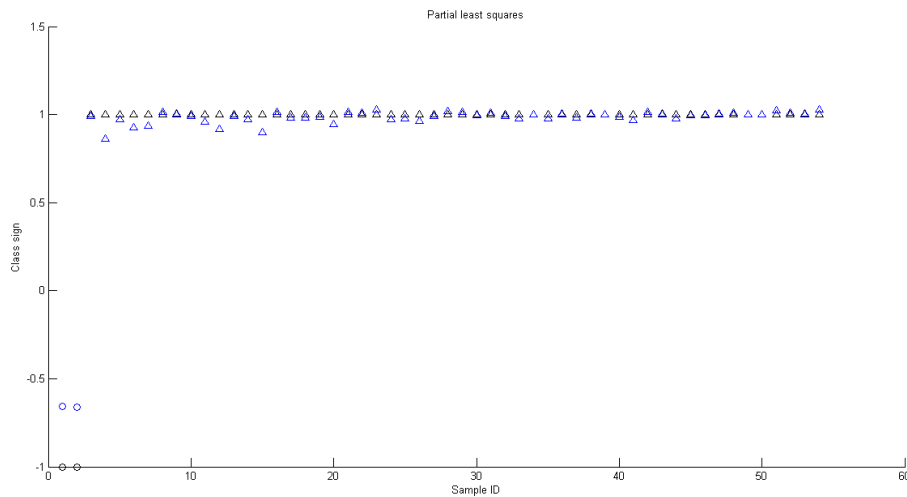
**Figuur 41: PLS classificatie van dataset in personen met stadium 4 CKD (bol) en personen met andere stadia van CKD (driehoek)**



**Figuur 42: PLS classificatie van dataset in personen met stadium 5 CKD (hemodialyse) (bol) en personen met andere stadia van CKD (driehoek)**



**Figuur 43: PLS classificatie van dataset in personen met stadium 5 CKD (geen dialyse) (bol) en personen met andere stadia van CKD (driehoek)**

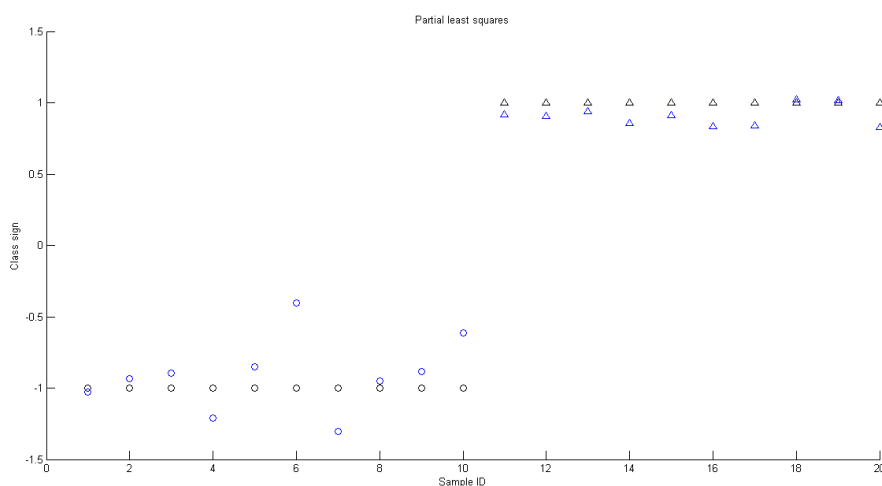


**Figuur 44: PLS classificatie van dataset in personen met stadium 5 CKD (peritoneale dialyse) (bol) en personen met andere stadia van CKD (driehoek)**

De modellen om stadium 1, 2, 3 en 4 CKD elk afzonderlijk te onderscheiden van de andere stadia zijn duidelijk ontoereikend. Meer dan de helft van de monsters die toebehoren aan het stadium dat afzonderlijk werd beschouwd, werd verkeerd geclassificeerd. Dit was dus ook enigszins te verwachten aangezien het gaat om een graduele verslechtering van de gezondheidstoestand van een persoon die arbitrair in stadia wordt verdeeld. Er is dus zeker sprake van enige overlap tussen de stadia waardoor correcte classificatie met PLS met de huidige parameters niet vanzelfsprekend is. De resultaten voor stadium 5 CKD zijn heel wat beter. Dit heeft waarschijnlijk te maken met het feit dat in stadium 5 de nierfunctionaliteit zo goed als volledig is weggevallen waardoor de concentraties aan uremische toxines in het bloed exponentieel stijgen ten opzichte van de vroegere stadia waardoor er een groter verschil is tussen stadium 5 CKD en stadium 4 CKD dan tussen bijvoorbeeld stadium 3 CKD en stadium 2 CKD. Voor personen met stadium 5 CKD die peritoneale dialyse ondergaan zijn de



classificatieresultaten zelfs uitzonderlijk goed. Dit komt hoogstwaarschijnlijk door de behandeling die een specifieke stempel drukt op het metaboolom (zoals reeds kort geïllustreerd in deel 6.4) waardoor ze gemakkelijk aan de hand van een klein aantal “features” kunnen onderscheiden worden van de rest van de dataset. Van deze modellen werden de “features” met de grootste coëfficiënten niet geïdentificeerd: enerzijds omdat de classificatie niet goed genoeg is en anderzijds omdat dit geen nuttige informatie verschaft. Het heeft geen nut te onderzoeken welke “features” stadium 5 CKD precies onderscheidt van de andere stadia aangezien CKD tegen dan vastgesteld is bij de patiënt en de progressie van de ziekte op andere manieren kan opgevolgd worden. Een belangrijke doelstelling van dit onderzoek was om een biomarker te vinden die toelaat om CKD vroeg en op een efficiëntere manier vast te stellen. Het was daarom zeer interessant om PLS uit te voeren met enkel de gezonde personen en de personen met stadium 1 CKD om uit te zoeken welke metabolieten toelaten om deze twee groepen van elkaar te scheiden en dus CKD in het vroegste stadium te kunnen vaststellen. Het resultaat daarvan is te zien in Figuur 45.



**Figuur 45: PLS classificatie tussen gezonde personen (bol) en personen met stadium 1 CKD (driehoek)**

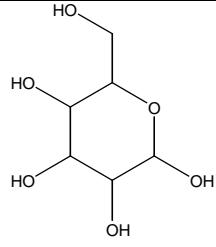
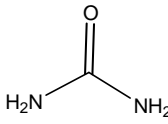
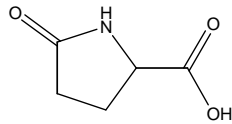
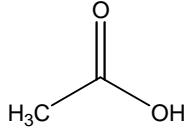
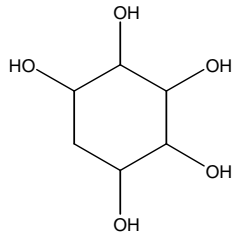
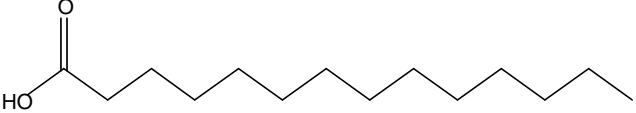
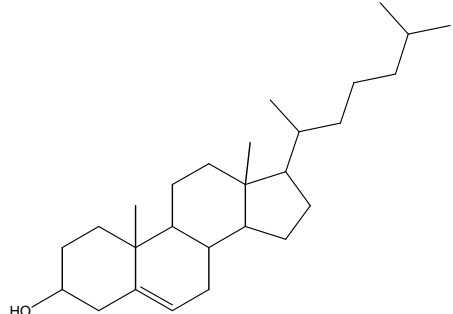
Dit model vertoont zeer goede classificatieresultaten. Gezonde personen zijn volledig en met marge gescheiden van personen met stadium 1 CKD. In het volgende deel wordt gekeken welke metabolieten aanleiding geven tot de “features” die de grootste invloed hebben op de regressievergelijking.

### 6.5.2 Identificatie van relevante metabolieten

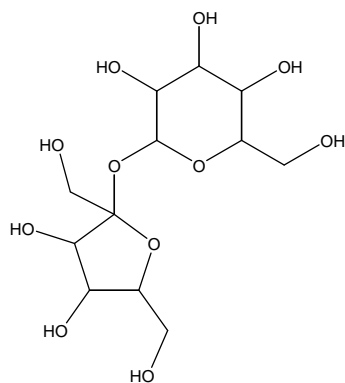
Enkel de resultaten van de PLS-classificatie tussen gezonde personen en personen met stadium 1 CKD worden hier beschouwd omdat deze het meest relevant zijn voor de zoektocht naar een biomarker om CKD zo vroeg mogelijk te kunnen opsporen. In deze regressievergelijking zijn er 236 “features” opgenomen. Er werd van deze “features” achterhaald van welk metaboliet ze afkomstig

zijn. De volledige lijst van gebruikte “features” en hun achterliggend metabool is te vinden in Appendix B. Niet al deze “features” zijn relevant voor de classificatie. “Features” met een relatief kleine coëfficiënt in de regressievergelijking hebben bijna geen invloed op de uitkomst van de classificatie. Daarom worden hier slechts de top 40 “features” met de grootste coëfficiënten beschouwd. In Tabel 6 zijn de metaboolen die aanleiding geven tot deze top 40 “features” weergegeven. In deze top 40 zitten helaas ook “features” die afkomstig zijn van kolomdegradatieproducten. Deze zijn irrelevant voor het zoeken naar een biomarker aangezien hun variatie te wijten is aan de tijd die tussen het analyseren van de 2 groepen zat. Deze kolomdegradatieproducten zijn dan ook weggelaten uit Tabel 6. Bis(2-ethylhexyl) ftalaat werd ook opgepikt als significante “feature” door de statistische analyse. Deze component is echter een bekende weekmaker in plastics, die gemakkelijk contaminatie vertoont met de gebruikte analyse techniek. Deze component werd daarom ook uit de lijst verwijderd.

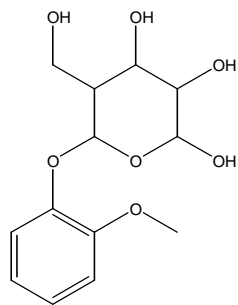
Tabel 6: Metabolieten die als potentiële biomerkers verder onderzocht kunnen worden in volgorde van hun invloed op de classificatie

Retentietijd (min)	Identificatie	kwaliteit (%)	structuur
32,50	Glucose	87	
16,56	Ureum	55	
23,71	2-Pyrrolidone, carbonzuur	96	
13,71	Azijnzuur	52	
43,63	5-Deoxy, myoinositol	43	
30,75	Tetradecaanzuur	58	
51,08	Cholesterol	99	

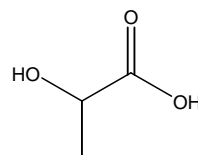
46,65      alfa, D-Glucopyranose-  
              beta,D-fructose            50



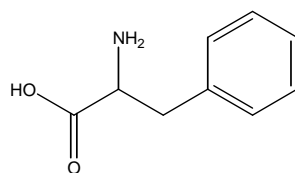
46,61      Guaicol-beta-D-  
              glucopyranoside            47



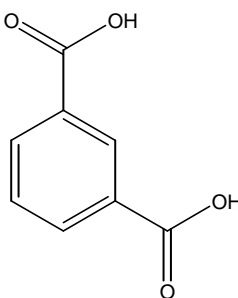
11,41      2-Hydroxypropaanzuur            76



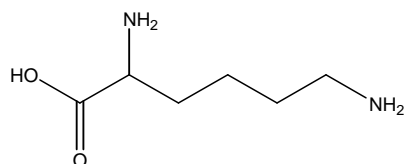
26,10      L-Fenylalanine                    46



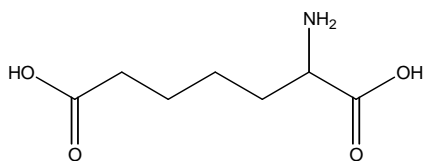
28,85      1,3-Benzeendicarbonzuur        90



30,86      L-Lysine                            40



29,55      Heptaandicarbonzuur-2-  
              amino                            43



Er moet wel bij opgemerkt worden dat de kwaliteit van sommige identificaties te wensen overlaat. Dit komt doordat de pieken van deze metabolieten in sommige gevallen heel weinig intens zijn waardoor vergelijking met de bibliotheek van de massaspectrometer minder goede resultaten oplevert. Dit komt ook doordat sommige pieken overlappen met pieken van andere niet relevante metabolieten of zelfs volledig gemaskeerd worden door deze laatste. Deze componenten dienen daarom bevestigd te worden door het spiken van de monsters met zuivere standaarden. Dit was echter niet meer mogelijk binnen de beschikbare tijdspanne van dit werk

## 7. Besluit

---

In deze thesis werd de oxymering- en silyleringsstrategie gevolgd door GC-MS analyse uitgetest in de zoektocht naar de bruikbaarheid voor het detecteren van tot op heden niet bekende biomerkers voor Chronic Kidney Disease. Daartoe werd er serum van gezonde en zieke personen geanalyseerd en werden zoveel mogelijk metabolieten in kaart gebracht. In eerste instantie werd de toepasbaarheid van de derivatisatieprocedure voor GC-MS getest op enkele eenvoudige testmoleculen. Er werd bevonden dat silylatie met MSTFA voorafgegaan door methoxymatie met O-methoxylamine HCl de testmoleculen volledig omzet tot één gederivatiseerde vorm die vluchtig genoeg is voor analyse met GC-MS.

De monstervoorbereiding van het serummonster werd vervolgens geoptimaliseerd. Een methanol:water oplossing (8:1) bleek het meest geschikte solvent om een maximaal aantal metabolieten te extraheren. De gevoeligheid van de analyse werd verder verhoogd door een grotere hoeveelheid supernatans van het centrifugeerde extractiesolvent te drogen vooraleer over te gaan tot derivatisatie.

De instrumentele condities werden geoptimaliseerd maar er was slechts een duidelijke verbetering van de resolutie van de meting zichtbaar wanneer de temperatuurgradiënt van de GC-oven vertraagd (van 10 tot 5°C/min) werd, wat gepaard ging met sterk verlengde analysetijd.

Er werden in totaal 64 serummonsters onderzocht: 10 van gezonde personen en 54 van personen in de verschillende stadia van CKD. De resultaten van deze metingen werden in een eerste stap verwerkt met XCMS-software om o.a. te corrigeren voor drifts in retentietijd. De resultaten werden verder onderzocht met kleinste kwadraten regressie om mogelijke biomerkers voor CKD te identificeren. Uit deze kleinste kwadraten regressie kwamen 15 metabolieten naar voor die potentieel hebben als biomarker om gezonde personen te kunnen onderscheiden van personen met stadium 1 CKD.

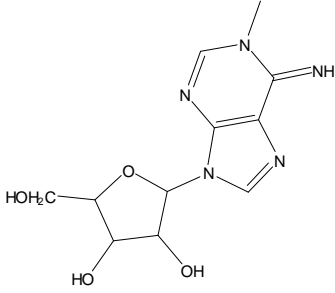
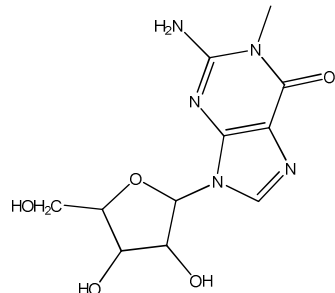
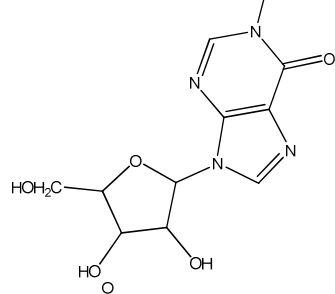
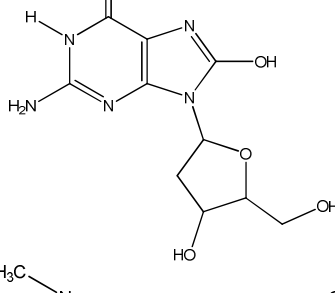
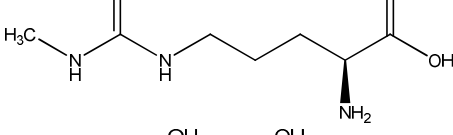
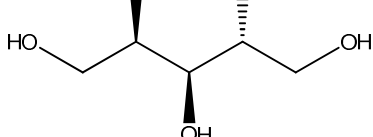
Deze metabolieten vereisen echter validatie in vervolgstudies vooraleer ze effectief kunnen beschouwd worden als biomarker. Zo moet de chemische identiteit ervan met een grotere zekerheid dan nu het geval is bepaald worden. Ook moet hun biologische activiteit en rol in de ontwikkeling van CKD onderzocht worden. Verder moet in eventuele toekomstige studies voor deze potentiële biomerkers ook een snelle, goedkope, gevoelige en specifieke analysemethode ontwikkeld worden die routinematig kan toegepast worden vooraleer deze biomerkers in klinische praktijk kunnen toegepast worden.

Verder is het ook aangeraden om in eventuele verdere biomerkerstudies voor CKD het ureumsignaal te onderdrukken door de monsters op voorhand te behandelen met urease. Zo komen misschien relevante metabolieten te voorschijn die in deze studie verborgen zitten onder de breed uitgesmeerde ureumpiek. Het is natuurlijk ook altijd aangeraden om met een groter aantal monsters dan in huidige studie te werken aangezien dit de kwaliteit van de statistische interpretaties ten goede komt.

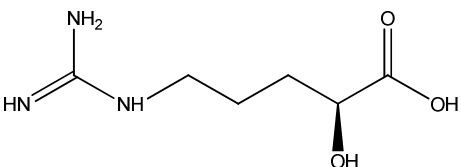
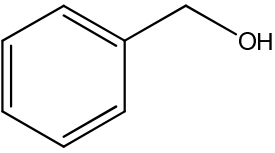
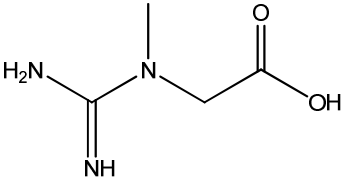
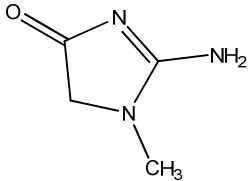
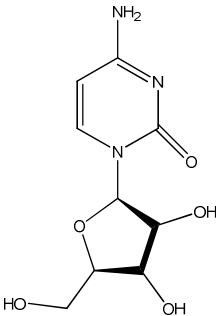
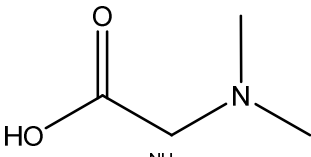
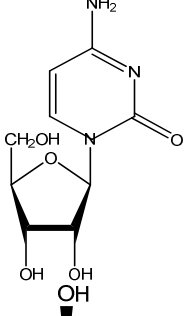
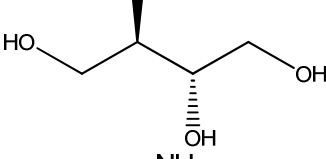
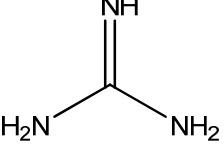
Ten slotte willen we nog opmerken dat het tweede luik van dit onderzoek namelijk profilering via LC-MS complementaire resultaten oplevert. Dit is het onderwerp van de doctoraatsstudie van Jente Boelaert

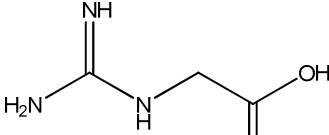
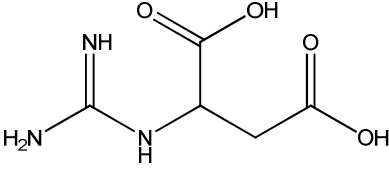
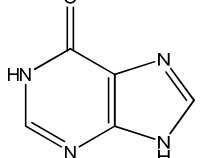
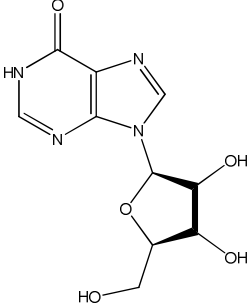
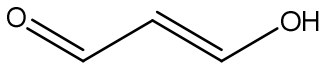
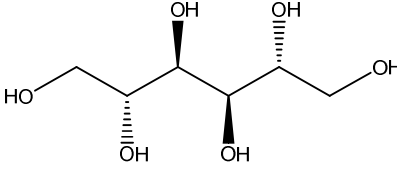
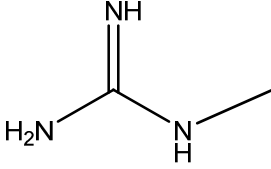
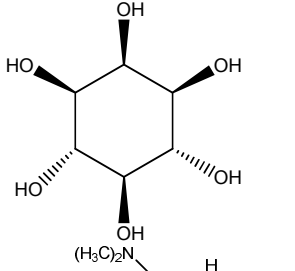
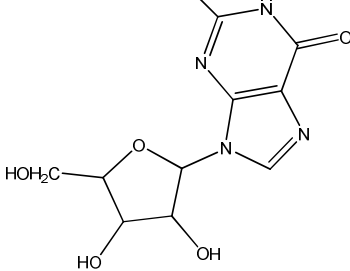
# Appendix A: Uremische toxines

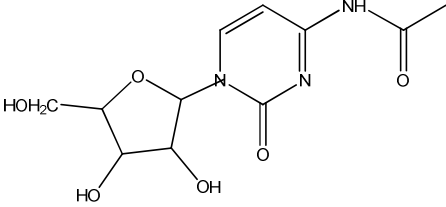
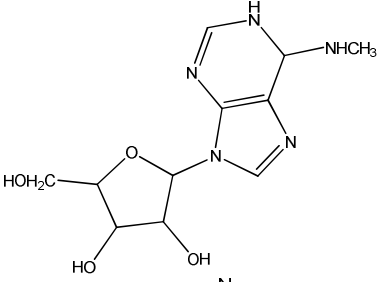
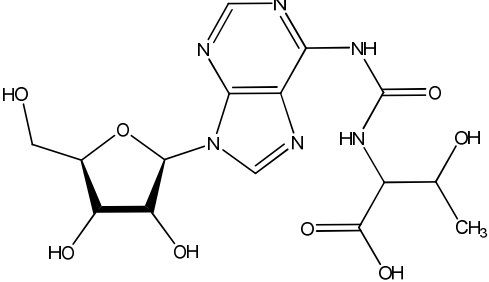
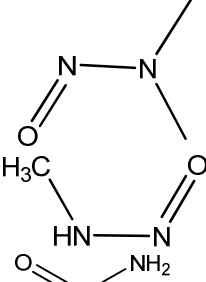
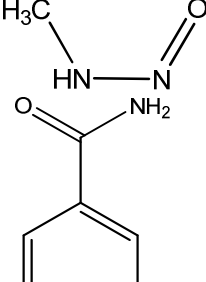
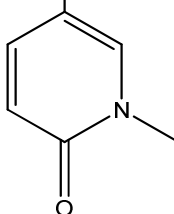
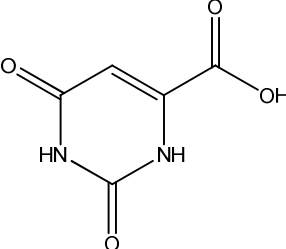
Tabel 7: lijst van uremische toxines met hun moleculair gewicht en (indien mogelijk) chemische structuur

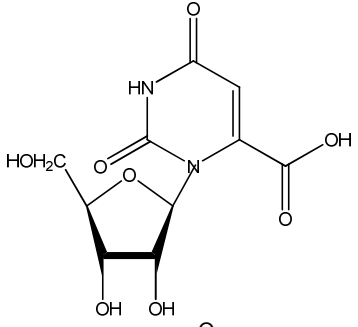
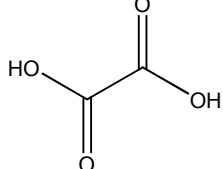
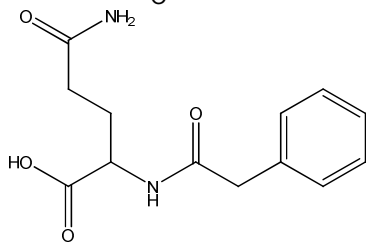
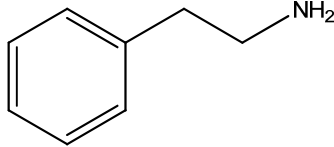
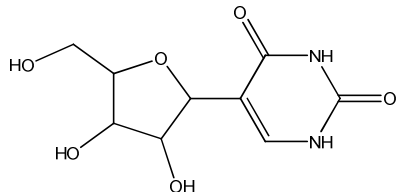
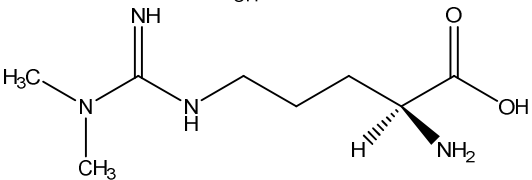
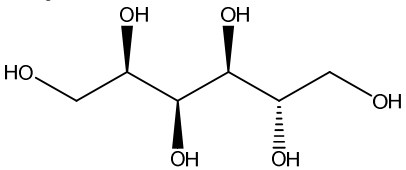
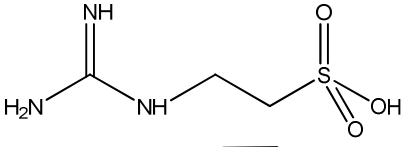
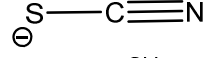
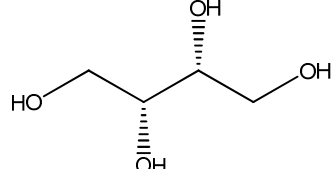
Naam	MW (Da)	Structuur
<b><u>Kleine wateroplosbare moleculen</u></b>		
1-Methyladenosine	281	
1-Methylguanosine	297	
1-Methylinosine	282	
8-OH-2'Deoxyguanosine	283	
Asymmetric dimethylarginine	202	
Arab(in)itol	152	

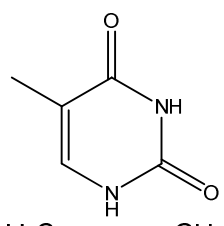
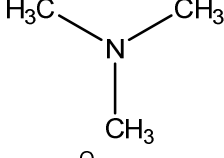
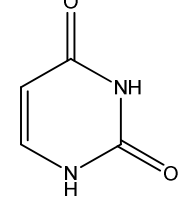
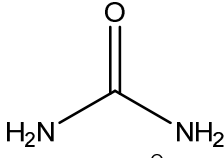
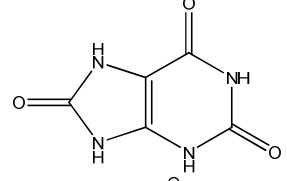
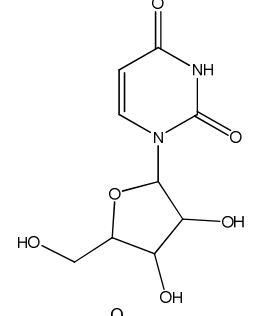
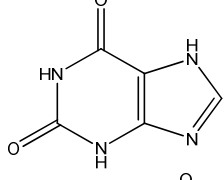
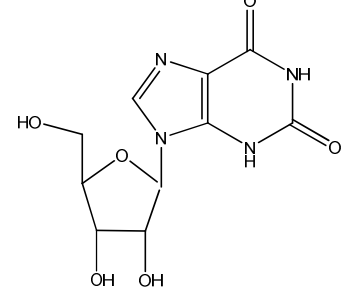


Argininic Acid	175	
Benzylalcohol	108	
Creatine	131	
Creatinine	113	
Cytidine	234	
Dimethylglycine	103	
Dimethylguanosine	257	
Erythritol	122	
Guanidine	59	

Guanidinoacetic acid	117	
Guanidonosuccinic acid	175	
Hypoxanthine	136	
Inosine	268	
Malondialdehyde	71	
Mannitol	182	
Methylguanidine	73	
Myoinositol	180	
N <sup>2</sup> ,N <sup>2</sup> -Dimethylguanosine	311	

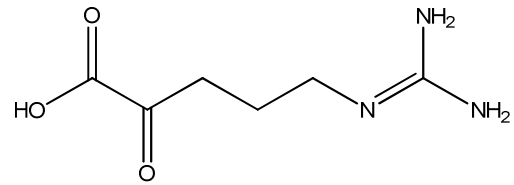
N <sup>4</sup> -Acetylcytidine	285	
N <sup>6</sup> -Methyladenosine	281	
N <sup>6</sup> - Threonylcarbamoyladeno sine	378	
Nitrosodimethylamine	74	
Nitrosomethylamine	60	
N-Methyl-2-pyridone- 5carboxamide	152	
Orotic acid	174	

Orotidine	288	
Oxalate	90	
Phenylacetylglutamine	264	
Phenylethylamine	121	
Pseudouridine	244	
Symmetric dimethylarginine	202	
Sorbitol	182	
Taurocyamine	174	
Thiocyanate	58	
Threitol	122	

Thymine	126	
Trimethylamine	59	
Uracil	112	
Urea	60	
Uric Acid	168	
Uridine	244	
Xanthine	152	
Xanthosine	284	

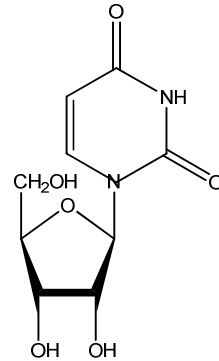
$\alpha$ -Keto- $\delta$ -  
guanidinovaleric acid

151



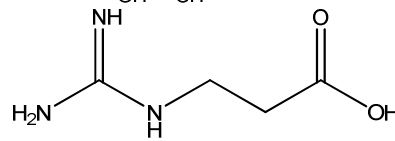
$\alpha$ -N-Acetylarginine

216



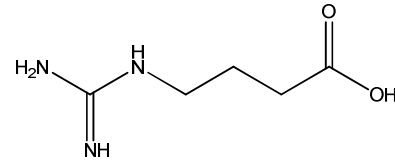
$\beta$ -Guanidinopropionic  
acid

131



$\gamma$ -Guanidinobutyric acid

145



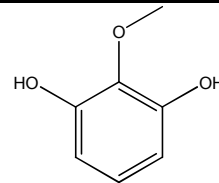
---

### Proteine gebonden moleculen

---

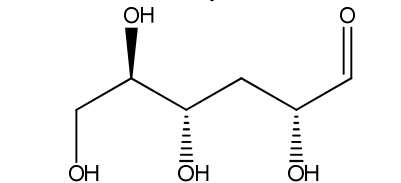
2-Methoxyresorcinol

140



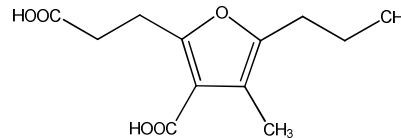
3-Deoxyglucosone

162



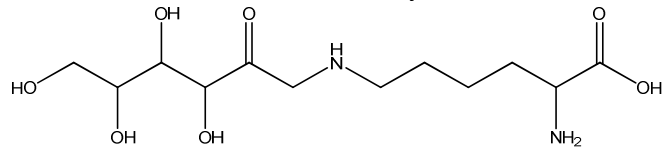
3-Carboxy-4-methyl-5-  
propyl-2-furanpropionic  
acid

240



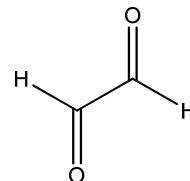
Fructoselysine

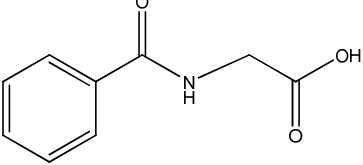
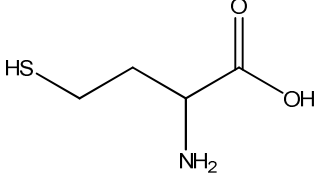
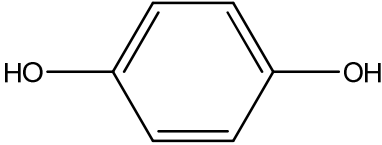
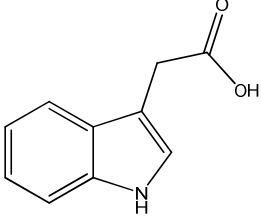
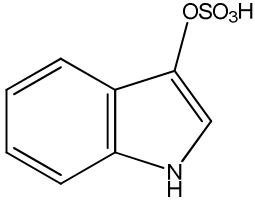
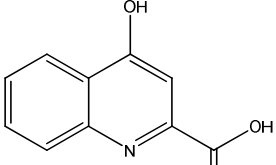
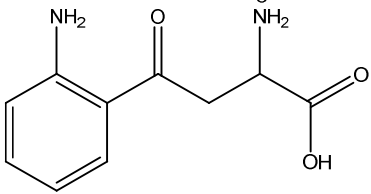
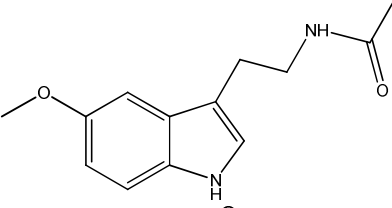
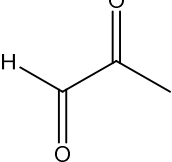
308



Glyoxal

58

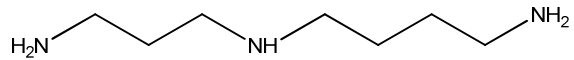


Hippuric acid	179	
Homocysteine	135	
Hydroquinone	110	
Indole-3-acetate	175	
Indoxyl sulfate	251	
Kinurenic acid	189	
Kinurenine	208	
Melatonin	126	
Methylglyoxal	72	

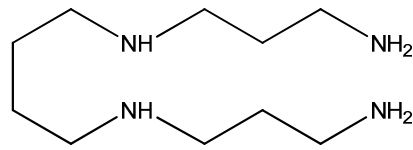
N <sup>ε</sup> -(Carboxymethyl)lysine	204	
Octopamine	153	
p-Cresol	108	
Pentosidine	342	
Phenol	94	
Phenylacetic acid	136	
p-OH Hippurate	195	
Putrescine	88	
Quinolinic acid	167	



Spermidine 145



Spermine 202




---

Middelgrote Moleculen

---

Adiponectin	180000 (hexamer) - 360000 (multimer)
Adrenomedullin	5729
Atrial natriuretic peptide	3080
Basic fibroblast growth factor	18000; 22000; 22500 of 24000 (afhankelijk van isoform)
Calcitonin-gene related peptide	3789
Cholecystokinin	3866
Clara cell protein	15800
Complement factor D	23750
Cystatin C	13300
Degranulation inhibiting protein	14100
Delta-sleep inducing peptide	848
Desacylghrelin	3244
Dinucleoside polyphosphates	800-1200
Endothelin	4283
Ghrelin	3370
Guanilin	10300
Hepcidin	2789
Hyaluronic acid	25000
Interleukin-18	18000
Interleukin-1 $\beta$	32000
Interleukin-6	24500
Leptin	16000
Leptin	16000
Methionine-enkephalin	555
Motiline	2698
Neuropeptide Y	4272
Orexin A	3561
Parathyroid hormone	9225
Retinol-binding protein	21200
Substance B	700
Tumor necrosis factor- $\alpha$	26000
uridine adenosine tetraphosphate	814
Uroguanylin	1667
Vasoactive intestinal peptide	3325
$\beta_2$ -Microglobuline	11818
$\beta$ -Endorphin	3465
$\beta$ -Lipotropin	461
$\lambda$ -Ig light chain	25000

---

# Appendix B: “Features” gebruikt in PLS-classificatie tussen gezonde personen en personen met stadium 1 CKD

Tabel 8: Lijst van gebruikte "features" voor PLS-classificatie tussen gezonde personen en personen met stadium 1 CKD gerangschikt volgens absolute waarde van hun coëfficiënt in de regressievergelijking

Coëfficiënt	feature	retentietijd(min)	Identificatie	kwaliteit (%)
-0,022573	M38T2568	42,80	1,2-Benzenedicarboxylic acid, diisooctyl ester	91
-0,019367	M77T826	13,77	Disiloxane ethylpentamethyl	50
-0,017367	M309T1950	32,50	Glucose oxime hexakis TMS	87
-0,016648	M201T1950	32,50	Glucose oxime hexakis TMS	87
-0,014447	M250T883	14,72	Pentasiloxane, dodecamethyl	91
-0,014410	M77T1950	32,50	Glucose oxime hexakis TMS	87
-0,014122	M248T994	16,57	Ureum N,N, bis TMS	87
-0,013991	M44T1423	23,72	N-O-Bis(TMS)-2-pyrrolidone, carboxylic acid	96
0,013369	M179T987	16,45	Ureum N,N, bis TMS	55
-0,012286	M202T1950	32,50	Glucose oxime hexakis TMS	87
-0,011998	M310T823	13,72	Acetic acid, (trimethylsilyl)oxy - TMS ester	52
-0,011982	M309T823	13,72	Acetic acid, (trimethylsilyl)oxy - TMS ester	52
-0,011932	M263T822	13,70	Acetic acid, (trimethylsilyl)oxy - TMS ester	52
-0,011921	M307T823	13,72	Acetic acid, (trimethylsilyl)oxy - TMS ester	52
-0,011868	M294T824	13,73	Disiloxane ethylpentamethyl	50
-0,011774	M239T2618	43,63	Myoinositol, 5-deoxy, pentakis-O-TMS	43
-0,011749	M292T824	13,73	Disiloxane ethylpentamethyl	50
-0,011728	M279T824	13,73	Disiloxane ethylpentamethyl	50
-0,011662	M261T823	13,72	Acetic acid, (trimethylsilyl)oxy - TMS ester	52
-0,011594	M277T822	13,70	Acetic acid, (trimethylsilyl)oxy - TMS ester	52
-0,011520	M309T1063	17,72	Silanol, trimethyl, phosphate [3:1]	83
-0,011299	M279T1845	30,75	Tetradecanoic acid TMS ester	58
0,011222	M132T572	9,53	Tris(trimethylsilyl)borate	91
-0,011108	M283T3065	51,08	Cholesterol TMS ester	99
0,011021	M363T2799	46,65	alpha-D-Glucopyranoside, 1,3,4,6-tetrakis-O-TMS-beta-D-Fructose 2,3,4,6-tetrakis-O-TMS	50
0,011006	M362T2797	46,62	Guaicol-beta-d-glucopyranoside, pentakis-O-TMS	47
-0,010984	M92T3065	51,08	Cholesterol TMS ester	99
0,010570	M361T2797	46,62	Guaicol-beta-d-glucopyranoside, pentakis-O-TMS	47
0,010285	M58T685	11,42	Propanoic acid, 2-((TMS)oxy)-TMS ester	76
0,010037	M246T1566	26,10	N-O-Bis-(TMS) phenylalanine	47
0,009931	M295T1731	28,85	1,3-Benzenedicarboxylic acid, bis(TMS)ester	90
0,009809	M368T1852	30,87	L-Lysine, N2,N6,N6-tris(TMS) - TMS ester	40
-0,009597	M311T823	13,72	Acetic acid, (trimethylsilyl)oxy - TMS ester	52
0,009538	M247T1567	26,12	N-O-Bis-(TMS) phenylalanine	47

-0,009486	M47T1950	32,50	Glucose oxime hexakis TMS	87
0,009437	M295T1773	29,55	Heptanedioic acid, 2-TMSamino-, bis(TMS)ester	43
0,009224	M205T573	9,55	Tris(trimethylsilyl)borate	91
-0,009197	M298T1065	17,75	Silanol, trimethyl, phosphate [3:1]	95
0,009039	M48T712	11,87	Propanoic acid, 2-(trimethylsilyloxy) - trimethylsilylester	81
0,008935	M206T833	13,88	Silane, 1,8-octanediylbis(trimethyl-	47
0,008908	M271T2798	46,63	D-Turanose, heptakis(TMS)	47
0,008890	M391T1950	32,50	Glucose oxime hexakis TMS	87
-0,008807	M50T535	8,92	Silanamine N,N-methanetetraylbis[1,1,1-trimethyl-	95
-0,008514	M100T1062	17,70	Silanol, trimethyl, phosphate [3:1]	83
0,008486	M267T1862	31,03	D-Erythrotetrofuranose, tris-O-TMS	62
0,008390	M206T760	12,67	Silane, [(2-ethylhexyl)oxy]trimethyl-	73
0,008338	M308T1912	31,87	D-Gluco-hexodialdose, 2,3,4,5,tetrakis-O-TMS	86
-0,008275	M70T1059	17,65	Silanol, trimethyl, phosphate [3:1]	83
-0,008207	M44T1068	17,80	Silanol, trimethyl, phosphate [3:1]	96
0,008181	M90T713	11,88	Propanoic acid, 2-(trimethylsilyloxy) - trimethylsilylester	81
0,008124	M364T1834	30,57	1,2,3-Propanetricarboxylic acid, 2-((TMS)oxy)- tris(TMS) ester	68
0,008040	M335T1706	28,43	2-Propenoic acid, 2,3,3-tris(TMS)oxy - TMS ester	14
0,007919	M319T2093	34,88	Glucopyranose, pentakis O-TMS	68
-0,007658	M205T3065	51,08	Cholesterol TMS ester	99
-0,007517	M154T727	12,12	Propanoic acid, 2-(trimethylsilyloxy) - trimethylsilylester	91
0,007468	M258T2475	41,25	Androstan-3-ol, 3(beta,5, beta)-	91
0,007380	M198T1253	20,88	Trimethyl 1,2,3-propanetricarboxylate	93
0,007239	M354T1852	30,87	L-Lysine, N2,N6,N6-tris(TMS) - TMS ester	40
0,007177	M480T2799	46,65	alpha-D-Glucopyranoside, 1,3,4,6-tetrakis-O-TMS- beta-D-fructose 2,3,4,6-tetrakis-O-TMS	50
-0,006905	M57T2067	34,45	Hexadecanoic acid TMS ester	98
-0,006635	M220T772	12,87	1-(3-Methylbutyl)-2,3,5,6 tetramethylbenzene	71
-0,006553	M172T1064	17,73	Silanol, trimethyl, phosphate [3:1]	95
-0,006461	M193T2151	35,85	(Myo)inositol, hexakis-O-TMS	70
0,006361	M321T2799	46,65	alpha-D-Glucopyranoside, 1,3,4,6-tetrakis-O-TMS- beta-D-fructose 2,3,4,6-tetrakis-O-TMS	50
-0,006293	M117T1053	17,55	Acetic acid, (trimethylsilyloxy) - TMS ester	59
0,006262	M357T1768	29,47	Phosphoric acid, bis(TMS), 2,3- bis(TMS)oxypropylester	93
-0,005928	M171T1068	17,80	Silanol, trimethyl, phosphate [3:1]	96
-0,005688	M152T798	13,30	Butanoic acid (2-methoxyimino)3-methyl- TMS ester	58
-0,005452	M245T799	13,32	Butanoic acid (2-methoxyimino)3-methyl- TMS ester	58
-0,005441	M279T2162	36,03	Uric acid N,O,O,tetrakis TMS	78
0,005315	M130T831	13,85	Ethanedioic acid bis(TMS)ester	50
0,005308	M142T1821	30,35	L-Ornithine, N2, N5, N5-tris(TMS)-TMS ester	94
0,005278	M367T1854	30,90	Benzenepropanoic acid, beta-(tert-butyl)dimethylsilyloxy)	16

0,005158	M176T1952	32,53	Glucose oxime hexakis TMS	87
-0,004996	M97T1951	32,52	Glucose oxime hexakis TMS	87
-0,004922	M218T2151	35,85	(Myo)inositol, hexakis-O-TMS	70
0,004901	M217T2011	33,52	D-Mannitol, hexakis O-TMS	53
0,004721	M72T1506	25,10	L-Proline-1-TMS-TMS ester	38
-0,004596	M294T1472	24,53	L-Cysteine, N,S-bis(TMS) TMS ester	53
-0,004572	M307T1364	22,73	Butanal, 2,3,4-((TMS)oxy)-O-methyloxime	64
-0,004560	M309T2158	35,97	Uric acid N,O,O,O-tetrakis TMS	59
-0,004488	M309T1364	22,73	Butanal, 2,3,4-((TMS)oxy)-O-methyloxime	64
-0,004461	M140T581	9,68	Tris(trimethylsilyl)borate	91
-0,004405	M184T572	9,53	Tris(trimethylsilyl)borate	91
-0,004400	M99T541	9,02	Silanamine N,N-methanetetraylbis[1,1,1-trimethyl-	95
-0,004304	M372T883	14,72	Pentasiloxane, dodecamethyl	91
-0,004089	M44T1151	19,18	Propanoic acid, 2,3-bis(TMS)oxy-TMS ester	91
-0,004033	M57T2248	37,47	Cis,6-octadecenoic acid, tMS ester	64
-0,003977	M370T883	14,72	Pentasiloxane, dodecamethyl	91
-0,003958	M284T883	14,72	Pentasiloxane, dodecamethyl	91
-0,003902	M263T1369	22,82	Butanal, 2,3,4-((TMS)oxy)-O-methyloxime	64
-0,003814	M77T579	9,65	Tris(trimethylsilyl)borate	91
-0,003723	M369T883	14,72	Pentasiloxane, dodecamethyl	91
-0,003703	M299T1958	32,63	Erythrose -O-methyloxime, tris-O-TMS	60
0,003683	M265T1797	29,95	9H-Purine, 9-(TMS)-6-((TMS)oxy)	86
-0,003660	M279T1368	22,80	Butanal, 2,3,4-((TMS)oxy)-O-methyloxime	64
-0,003625	M371T883	14,72	Pentasiloxane, dodecamethyl	91
-0,003617	M307T2151	35,85	(Myo)inositol, hexakis-O-TMS	70
0,003363	M211T1777	29,62	Arabino-hexonic acid, 2-deoxy, 3,5,6-tris-O-TMS	49
-0,003362	M42T2248	37,47	Cis,6-octadecenoic acid, tMS ester	64
-0,003341	M294T1369	22,82	Butanal, 2,3,4-((TMS)oxy)-O-methyloxime	64
-0,003277	M67T683	11,38	Propanoic acid, 2-((TMS)oxy)-TMS ester	76
-0,003266	M208T653	10,88	Propanoic acid, 2-methoxyimino,- TMS	80
-0,003168	M79T2246	37,43	9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z) TMS ester	91
-0,003166	M67T2763	46,05	Tetradecanoic acid tMS ester	43
-0,003116	M49T540	9,00	Silanamine N,N-methanetetraylbis[1,1,1-trimethyl-	95
-0,003081	M39T2247	37,45	4-Methyl-5-phenyl-imidazol-2(3H)-one	58
-0,003045	M65T2246	37,43	9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z) TMS ester	91
-0,002960	M95T2763	46,05	Tetradecanoic acid tMS ester	43
-0,002867	M132T2276	37,93	Octadecanoic acid TMS ester	98
-0,002799	M277T1368	22,80	Butanal, 2,3,4-((TMS)oxy)-O-methyloxime	64
-0,002761	M266T2151	35,85	(Myo)inositol, hexakis-O-TMS	70
0,002698	M256T1829	30,48	1,2,3-Propanetricarboxylic acid, 2-((TMS)oxy)- tris(TMS) ester	58
-0,002696	M214T581	9,68	Tris(trimethylsilyl)borate	91
-0,002675	M77T2246	37,43	9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z) TMS ester	91
-0,002613	M310T1369	22,82	Butanal, 2,3,4-((TMS)oxy)-O-methyloxime	64
-0,002601	M56T2249	37,48	Oleic acidTMS ester	94
0,002508	M364T1597	26,62	Butanoic acid, 2-methyl-3-(TMS)oxy, TMS ester	37

-0,002339	M43T2248	37,47	Cis,6-octadecenoic acid, tMS ester	64
-0,002319	M132T2067	34,45	Hexadecanoic acid TMS ester	98
-0,002311	M75T2247	37,45	4-Methyl-5-phenyl-imidazol-2(3H)-one	58
0,002286	M58T826	13,77	Disiloxane ethylpentamethyl	50
-0,002208	M290T1947	32,45	Glucose oxime hexakis TMS	80
-0,002169	M91T2246	37,43	9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z) TMS ester	91
-0,002135	M261T1368	22,80	Butanal, 2,3,4-((TMS)oxy)-O-methyloxime	64
0,002129	M356T2276	37,93	Octadecanoic acid TMS ester	98
-0,002126	M54T2247	37,45	4-Methyl-5-phenyl-imidazol-2(3H)-one	58
-0,002111	M55T2248	37,47	Cis,6-octadecenoic acid, tMS ester	64
-0,002104	M109T820	13,67	Acetic acid, (trimethylsilyl)oxy - TMS ester	52
-0,002084	M69T2248	37,47	Cis,6-octadecenoic acid, tMS ester	64
-0,001998	M221T2249	37,48	Oleic acidTMS ester	94
0,001984	M192T831	13,85	Ethanedioic acid bis(TMS)ester	50
-0,001976	M96T2248	37,47	Cis,6-octadecenoic acid, tMS ester	64
-0,001972	M263T1435	23,92	Pentanedioic acid, bis TMS ester	67
0,001972	M376T1771	29,52	Heptanedioic acid, 2-TMSamino-, bis(TMS)ester	43
-0,001943	M92T2246	37,43	9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z) TMS ester	91
-0,001925	M54T535	8,92	Silanamine N,N-methanetetraylbis[1,1,1-trimethyl-	95
-0,001909	M69T534	8,90	Silanamine N,N-methanetetraylbis[1,1,1-trimethyl-	95
-0,001903	M53T2247	37,45	4-Methyl-5-phenyl-imidazol-2(3H)-one	58
-0,001872	M84T2248	37,47	Cis,6-octadecenoic acid, tMS ester	64
-0,001856	M68T2246	37,43	9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z) TMS ester	91
-0,001811	M113T2425	40,42	Hexanedioic acid, bis(2-ethylhexyl)ester	99
-0,001810	M67T2246	37,43	9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z) TMS ester	91
-0,001766	M82T2246	37,43	9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z) TMS ester	91
-0,001723	M117T2067	34,45	Hexadecanoic acid TMS ester	98
-0,001675	M81T2246	37,43	9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z) TMS ester	91
0,001662	M74T1426	23,77	L-Proline-5-oxo	53
-0,001634	M304T2143	35,72	Heptadecanoic acid TMS	46
-0,001607	M112T2249	37,48	Oleic acidTMS ester	94
-0,001595	M315T2067	34,45	Hexadecanoic acid TMS ester	98
-0,001591	M111T2248	37,47	Cis,6-octadecenoic acid, tMS ester	64
-0,001573	M95T2246	37,43	9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z) TMS ester	91
-0,001568	M110T2247	37,45	4-Methyl-5-phenyl-imidazol-2(3H)-one	58
-0,001524	M314T2067	34,45	Hexadecanoic acid TMS ester	98
0,001515	M56T2425	40,42	Hexanedioic acid, bis(2-ethylhexyl)ester	99
-0,001506	M145T2067	34,45	Hexadecanoic acid TMS ester	98
-0,001496	M83T2248	37,47	Cis,6-octadecenoic acid, tMS ester	64
-0,001495	M313T2067	34,45	Hexadecanoic acid TMS ester	98
-0,001434	M123T2247	37,45	4-Methyl-5-phenyl-imidazol-2(3H)-one	58
0,001416	M180T1516	25,27	Cyclopentanecarboxylic acid, 1-amino-bis(TMS)	72
-0,001413	M93T2246	37,43	9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z) TMS ester	91
-0,001405	M109T2247	37,45	4-Methyl-5-phenyl-imidazol-2(3H)-one	58
-0,001374	M129T2248	37,47	Cis,6-octadecenoic acid, tMS ester	64
-0,001360	M94T2245	37,42	9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z) TMS ester	99

-0,001323	M433T2151	35,85	(Myo)inositol, hexakis-O-TMS	70
-0,001317	M127T534	8,90	Silanamine N,N-methanetetraylbis[1,1,1-trimethyl-	95
-0,001301	M55T2067	34,45	Hexadecanoic acid TMS ester	98
-0,001293	M269T2067	34,45	Hexadecanoic acid TMS ester	98
-0,001274	M217T2151	35,85	(Myo)inositol, hexakis-O-TMS	70
-0,001229	M125T2247	37,45	4-Methyl-5-phenyl-imidazol-2(3H)-one	58
-0,001222	M97T2248	37,47	Cis,6-octadecenoic acid, tMS ester	64
-0,001200	M137T2248	37,47	Cis,6-octadecenoic acid, tMS ester	64
-0,001193	M108T2246	37,43	9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z) TMS ester	91
-0,001180	M134T577	9,62	Tris(trimethylsilyl)borate	91
-0,001175	M121T2246	37,43	9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z) TMS ester	91
-0,001168	M124T2247	37,45	4-Methyl-5-phenyl-imidazol-2(3H)-one	58
-0,001154	M432T2151	35,85	(Myo)inositol, hexakis-O-TMS	70
-0,001152	M159T1952	32,53	Glucose oxime hexakis TMS	87
0,001120	M262T2242	37,37	9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z) TMS ester	99
-0,001093	M56T538	8,97	Silanamine N,N-methanetetraylbis[1,1,1-trimethyl-	95
-0,001046	M130T2248	37,47	Cis,6-octadecenoic acid, tMS ester	64
-0,000998	M152T2248	37,47	Cis,6-octadecenoic acid, tMS ester	64
-0,000988	M169T2248	37,47	Cis,6-octadecenoic acid, tMS ester	64
-0,000988	M187T2246	37,43	9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z) TMS ester	91
-0,000987	M122T2245	37,42	9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z) TMS ester	99
-0,000980	M227T2284	38,07	2-(3-Phenyl-piperidin-1-yl)ethylamine	50
-0,000950	M145T2248	37,47	Cis,6-octadecenoic acid, tMS ester	64
-0,000924	M185T2248	37,47	Cis,6-octadecenoic acid, tMS ester	64
-0,000901	M76T2247	37,45	4-Methyl-5-phenyl-imidazol-2(3H)-one	58
-0,000881	M318T2151	35,85	(Myo)inositol, hexakis-O-TMS	70
-0,000862	M138T2247	37,45	4-Methyl-5-phenyl-imidazol-2(3H)-one	58
-0,000858	M129T2067	34,45	Hexadecanoic acid TMS ester	98
-0,000850	M199T2249	37,48	Oleic acidTMS ester	94
-0,000847	M135T2245	37,42	9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z) TMS ester	99
0,000841	M337T2243	37,38	9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z) TMS ester	99
0,000801	M164T2243	37,38	9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z) TMS ester	99
-0,000770	M119T684	11,40	Propanoic acid, 2-((TMS)oxy)-TMS ester	76
-0,000743	M136T2244	37,40	9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z) TMS ester	99
-0,000730	M305T2151	35,85	(Myo)inositol, hexakis-O-TMS	70
0,000722	M178T2243	37,38	9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z) TMS ester	99
-0,000721	M98T2249	37,48	Oleic acidTMS ester	94
0,000697	M369T2162	36,03	Uric acid N,O,O,O-tetrakis TMS	78
-0,000682	M143T2247	37,45	4-Methyl-5-phenyl-imidazol-2(3H)-one	58
-0,000662	M223T2249	37,48	Oleic acidTMS ester	94
0,000598	M220T2245	37,42	9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z) TMS ester	99
-0,000591	M340T2249	37,48	Oleic acidTMS ester	94
-0,000586	M365T1596	26,60	Butanoic acid, 2-methyl-3-(TMS)oxy, TMS ester	37
0,000565	M294T2162	36,03	Uric acid N,O,O,O-tetrakis TMS	78
-0,000538	M151T2247	37,45	4-Methyl-5-phenyl-imidazol-2(3H)-one	58
-0,000532	M265T2249	37,48	Oleic acidTMS ester	94

-0,000499	M339T2249	37,48	Oleic acidTMS ester	94
-0,000496	M183T2248	37,47	Cis,6-octadecenoic acid, tMS ester	64
-0,000482	M222T2249	37,48	Oleic acidTMS ester	94
-0,000476	M187T540	9,00	Silanamine N,N-methanetetraylbis[1,1,1-trimethyl-	95
0,000444	M42T1148	19,13	Propanoic acid, 2,3-bis(TMS)oxy-TMS ester	91
0,000381	M155T539	8,98	Silanamine N,N-methanetetraylbis[1,1,1-trimethyl-	95
-0,000349	M236T2250	37,50	Trans-9-octadecenoic acid TMS ester	96
-0,000307	M310T2162	36,03	Uric acid N,O,O,O-tetrakis TMS	78
0,000291	M338T2242	37,37	9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z) TMS ester	99
0,000268	M80T2245	37,42	9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z) TMS ester	99
-0,000260	M186T539	8,98	Silanamine N,N-methanetetraylbis[1,1,1-trimethyl-	95
-0,000239	M111T539	8,98	Silanamine N,N-methanetetraylbis[1,1,1-trimethyl-	95
-0,000206	M341T2276	37,93	Octadecanoic acid TMS ester	98
-0,000191	M173T539	8,98	Silanamine N,N-methanetetraylbis[1,1,1-trimethyl-	95
-0,000185	M64T537	8,95	Silanamine N,N-methanetetraylbis[1,1,1-trimethyl-	95
0,000179	M141T539	8,98	Silanamine N,N-methanetetraylbis[1,1,1-trimethyl-	95
0,000168	M172T539	8,98	Silanamine N,N-methanetetraylbis[1,1,1-trimethyl-	95
0,000137	M171T539	8,98	Silanamine N,N-methanetetraylbis[1,1,1-trimethyl-	95
0,000131	M355T2249	37,48	Oleic acidTMS ester	94
-0,000112	M354T2249	37,48	Oleic acidTMS ester	94
-0,000087	M107T2246	37,43	9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z) TMS ester	91
0,000050	M197T2248	37,47	Cis,6-octadecenoic acid, tMS ester	64
-0,000010	M150T2243	37,38	9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z) TMS ester	99

# Lijst met afkortingen

---

BSTFA =	N,O-bis(trimethylsilyl) trifluoroacetamide
CE-MS =	Capillaire elektroforese- massaspectrometrie
CI =	Chemical ionisation
CKD =	Chronic Kidney Disease
EI =	Electron Impact (ionization)
FID =	Flame Ionisation Detector
GC =	Gaschromatograaf
GC-MS =	Gaschromatografie-massaspectrometrie
GFR =	Glomerular filtration rate
LC-MS =	Liquid Chromatography-Mass Spectrometry
mRNA =	messenger Ribose Nucleic Acid
MS =	Massaspectrometer
MSTFA =	N-methyl-N-(trimethylsilyl) trifluoroacetamide
MTBTFA =	N-methyl-bis(trifluoroacetamide)
NMR =	Nuclear Magnetic Resonance (spectroscopy)
PCA =	Principale Componenten Analyse
PLS =	Partial Least Squares (regression)
RSD =	Relative Standard Deviation



# Referenties

---

1. C. O'Callaghan. *The Kidney at a glance*. Oxford. Blackwell Science. **2000**
2. National Collaborating Centre for Chronic Conditions. *Chronic kidney disease: national clinical guideline for early identification and management in adults in primary and secondary care*. Londen. Royal College of Physicians. **2008**
3. R. Vanholder. *What is new in uremic toxicity?*. *Pediatric Nephrology*. **23**. 1211-1221. **2008**
4. R. Vanholder. *Review on uremic toxins: Classification, concentration and interindividual variability*. *Kidney International*. **63**. 1934-1943. **2003**
5. T. Niwa. *Update of uremic toxin research by mass spectrometry*. *Mass Spectrometry Reviews*. **30**. 510-521. **2011**
6. J. Boelaert. *Ontwikkelen van metabolome analytische platforms voor karakterisatie van uremische retentiestoffen*. IWT beursvoorstel. Universiteit Gent. **2009**
7. J.T. Daugirdas. *Handbook of dialysis*. Philadelphia. Lippincott Williams & Wilkins. **2001**
8. T. Niwa. *Mass spectrometry in the search for uremic toxins*. *Mass spectrometry reviews*. **16**. 307-332. **1997**
9. T. Niwa. *Recent Progress in the analysis of uremic toxins by mass spectrometry*. *Journal of chromatography B*. **877**. 2600-2606. **2009**
10. C.L. Edelstein. *Biomarkers of kidney disease*. Londen. Academic Press. **2011**
11. H. Kaspar. *Amino acid analysis in biological fluids by GC-MS*. Doctoraatsthesis. Universiteit Regensburg. **2009**
12. O. Fiehn. *Metabolite profiling in blood plasma*. Davis. UC Davis Genome Center. **2005**
13. F. Wang. *Biomarker methods in drug discovery and development*. Totowa. Humana Press. **2008**
14. N. De Brabanter. *Ontwikkeling van een aminozuuranalyse in een minimale hoeveelheid biologische vloeistof voor het opsporen van metabole storingen*. Master thesis. Universiteit Gent. **2009**
15. A. Jiye. *Extraction and GC/MS analysis of the human blood plasma metabolome*. *Analytical Chemistry*. **77**. 8086-8094. **2005**
16. N. Psychogios. *The human serum metabolome*. *PLoS ONE*. **6**. **2011**
17. Y. Qiu. *Application of ethyl chloroformate derivatization for gas chromatography–mass spectrometry based metabonomic profiling*. *Analytica Chimica Acta*. **583**. 277-283. **2006**

18. X. Tao. *GC-MS with ethyl chloroformate derivatization for comprehensive analysis of metabolites in serum and its application to human uremia*. Analytical and Bioanalytical Chemistry. **391**. 2881-2889. **2008**
19. P. Sabbe. *Ontwikkeling van een snelle LC-MS/MS methode voor het bestuderen van tryptofaan-depletie bij patiënten met een chronische inflammatoire darmziekte*. Master thesis. Universiteit Gent. **2010**
20. K. Strijckmans. *Chemometrie*. Universiteit Gent. **2009-2010**
21. C.A. Smith. *XCMS: Processing mass spectrometry data for metabolite profiling using nonlinear peak alignment, matching and identification*. Analytical Chemistry. **78**. 779-787. **2006**
22. O.Fiehn. *Identification of uncommon plant metabolites based on calculation of elemental compositions using gas chromatography and quadrupole mass spectrometry*. Analytical Chemistry. **72**. 3573-3580. **2000**

# Total Metabolite Profiling of Serum from Kidney Dialysis Patients by Gas Chromatography Coupled to Mass Spectrometry

D. Persyn<sup>a</sup>, J. Boelaert<sup>a</sup>, F. Lynen<sup>a</sup>; P. Sandra<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Department of Organic Chemistry, Ghent University, Krijgslaan 281, B-9000 Ghent

It is estimated that about one in nine adults above 20 years in the USA suffer from Chronic Kidney Disease (CKD). Unfortunately CKD is usually only detected in one of the later stages of the disease. In the search for biomarkers to detect CKD in an earlier stage a GC-MS method to detect an as large as possible part of the human metabolome was optimized. To accomplish this, metabolites in serum were derivatized by oxymation and silylation prior to analysis. The resulting data were pretreated with XCMS and a partial least squares regression was executed in order to identify possible biomarkers. Fourteen metabolites have been selected as potential biomarkers that need to be validated in future studies.

## Introduction

The kidneys fulfill a crucial role in the human body. They produce several essential hormones but most importantly they remove waste compounds from the bloodstream and excrete them into the urine.(1) When the kidneys lose their functionality for a prolonged length of time, a patient is known to be suffering from Chronic Kidney Disease (CKD). It is estimated that currently about one in nine adults above 20 years in the USA suffer from CKD. The most common causes of CKD are diabetes and high blood pressure. CKD is arbitrarily divided into 5 stages based on the glomerular filtration rate. Once a person reaches stage 5 CKD, the kidney can no longer support life and the patient has to follow a dialysis treatment routinely to replace the kidney functionality or receive a kidney transplant.(2)

The waste compounds that are normally removed by the kidneys from the bloodstream start to accumulate in the bloodstream when one suffers from CKD. These compounds are called uremic retention solutes and in the case that these are biologically active they are called uremic toxins. Urea and creatinine are a few well known examples of these uremic toxins. At present, ca. 100 uremic toxins have been identified. The uremic toxins are usually divided into 3 classes: the small water-soluble molecules with a molecular weight below 500 Da, the middle molecules with a molecular weight above 500 Da and the protein bound molecules.(3)(4)

Despite the wealth of information already available on CKD, it is usually only diagnosed in a late stage of the disease. This is because the kidneys have an enormous overcapacity for filtering the bloodstream so that symptoms of CKD only start appearing when the kidney functionality has already decreased considerably. Urea, the currently most commonly used biomarker for CKD, is also only representative for a part of all the uremic toxins. Quite a few exhibit completely different behavior than urea. Because of this, the search for new and improved (sets of) biomarkers for CKD continues to this day. The goal of this master project is to contribute to this search.(5)

A metabolomics approach was chosen in the search for new biomarkers for CKD. Blood serum from people suffering from CKD and from a healthy control group was analyzed. An

attempt was made to map out the metabolome of these people as completely as possible. Those metabolites which were the most helpful in distinguishing healthy people from people with CKD were identified with the help of chemometrics. These metabolites can then, in future studies, be examined for their potential to become an established biomarker for CKD. It is of course impossible to map out the entire metabolome of a human being in the given timeframe. GC-MS was chosen as the analytical platform on which to perform this study. This technique is used to analyze the part of the metabolome with a rather low molecular weight (<600 Da) that is volatile enough to go into the gas phase or can be made so through derivatization. Note that this contains the class of small water-soluble molecules of the uremic toxins.

## **Experimental**

### Chemicals and instrumentation

MSTFA, heptane and anhydrous pyridine were obtained from Sigma-Aldrich. O-methoxylamine HCl was obtained from Supelco. Biosolve provided the solvents methanol and isopropanol. The department of Nephrology of the University Hospital of Ghent provided this study with blood serum samples of both healthy people and people suffering from CKD. The GC-MS (quadrupole) system was purchased from Agilent Technologies. The GC column was obtained from J&W Scientific. The column length was 30 m, the internal diameter was 0,25 mm and the film thickness was 0,25  $\mu\text{m}$ . The stationary phase consisted of polydimethylsiloxane with 5% of the methyl functionalities replaced by phenyl groups. Helium was used as carrier gas.

### Sample preparation and instrumental conditions

250  $\mu\text{L}$  of serum is extracted with 900  $\mu\text{L}$  of a methanol:water (8:1) solution. The mixture is centrifuged at 3000rpm for 15 minutes and 700  $\mu\text{L}$  of the resulting supernatans is dried. To this dried residue 50  $\mu\text{L}$  of a 20mg/mL methoxylamine HCl in anhydrous pyridine solution is added. This is left to react for 24 h at room temperature. Afterwards 50  $\mu\text{L}$  N-methyl-N-(trimethylsilyl) trifluoroacetamide (MSTFA) is added and left to react for 24 h at 37°C. Finally 50  $\mu\text{L}$  of heptane is added to the mixture. 1  $\mu\text{L}$  of this mixture is injected onto the GC column.

The injection temperature was set at 250°C. The carrier gas flow rate was set to 1 mL/min in the continuous flow mode. The GC oven temperature program was started at 40°C and held there for 1 minute. Then it ramped up to 300°C at 5°C/min. It was finally held at 300°C for another 5 minutes. The MS detected ions in the range of 35 Da to 550 Da after a solvent delay of 6 minutes.

## **Results**

### Optimization of the sample preparation

The sample preparation was based on the method developed by Jiye et al (6). 100  $\mu\text{L}$  of serum is thereby extracted with 900  $\mu\text{L}$  of a methanol:water (8:1) solution. The mixture is centrifuged at 3000 rpm for 15 minutes and 200  $\mu\text{L}$  of the resulting supernatans is dried. To this dried residue 50  $\mu\text{L}$  of a 20 mg/mL methoxylamine HCl in anhydrous pyridine solution is added. This is left to react for 24h at room temperature. Afterwards 50  $\mu\text{L}$  N-methyl-N-

(trimethylsilyl) trifluoroacetamide (MSTFA) is added and left to react for 1 h at 37°C. Finally, 50  $\mu$ L of heptanes is added to the mixture. 1  $\mu$ L of this mixture is injected onto the GC column. The resulting chromatogram is shown in Figure 1.

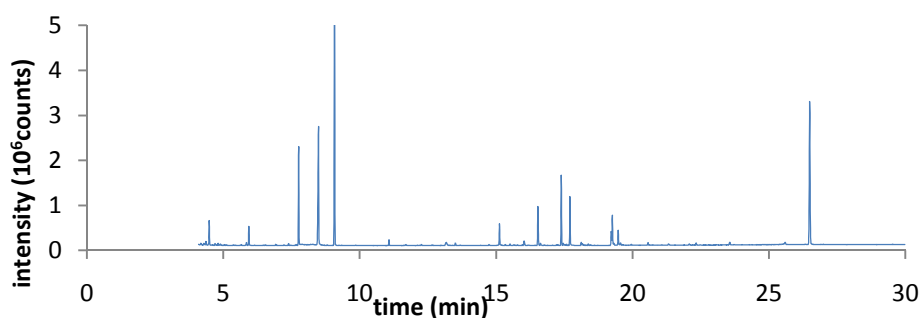


Figure 1. GC-MS chromatogram of a serum sample prepared according to the method developed by Jiye et al.[6]

This method was improved upon in order to be able to detect more metabolites in a single run. The best results were obtained when the extraction was started from 250  $\mu$ L of serum instead of 100  $\mu$ L and when 700  $\mu$ L of the supernatans after centrifugation was dried instead of 200  $\mu$ L. In addition, improved results were also obtained when the reaction time of the silylation with MSTFA was extended to 24 h instead of 1 h. The remaining parameters could not be significantly improved upon. The resulting chromatogram, recorded with the same instrumental conditions as the one in Figure 1, is shown in Figure 2.

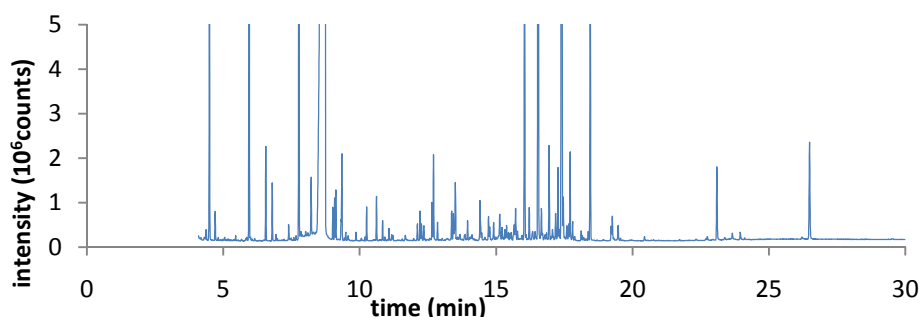


Figure 2. GC-MS chromatogram of a serum sample prepared according to the optimized method

#### Optimization of the instrumental conditions

It was attempted to obtain peaks that were better resolved in three different ways. First by changing the injection mode from splitless to pulsed splitless. Secondly by increasing the flow rate of the carrier gas. Finally by decreasing the rate at which the GC oven was heated. Neither the increased carrier gas flow rate or the pulsed splitless injection mode led to improved peak resolution. A slower temperature gradient, however, did lead to better separation. Unfortunately this also meant that the analysis time went up considerably. A heating rate of 5°C/min was therefore considered to be a good compromise between resolution and analysis time. A representative example of chromatogram of a serum sample prepared as described above and recorded with these instrumental conditions is shown in Figure 3.

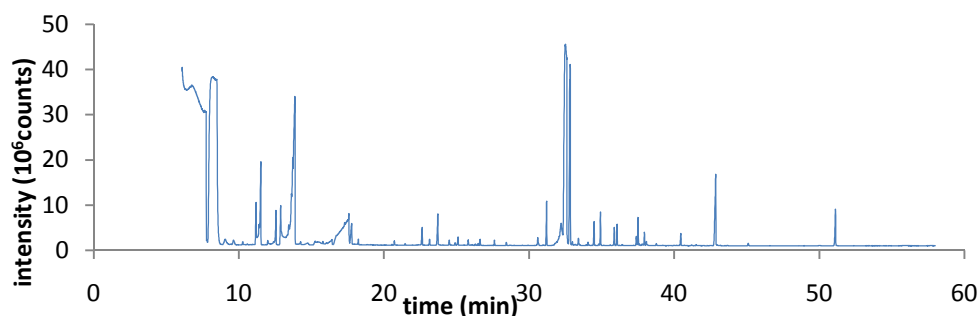


Figure 3. GC-MS chromatogram of a serum sample prepared according to the optimized method and analyzed with the optimized instrumental conditions

### Statistical interpretation of the data

A total of 64 serum samples were analyzed as described above. 10 samples were from the healthy control group and 54 samples from people with varying stages of CKD. The data were first pretreated with the statistical program XCMS. This program uses computational algorithms to detect peaks, to group peaks belonging to the same analyte across different samples and to correct for drifts in retention time. The software could detect an average of 2000 features, each characterized by a retention time, mass and peak area.

These features were further used in partial least squares (PLS) regression. First the number of features was reduced by performing a t-test between the 2 groups of interest, i.e. healthy and stage 1 CKD. Only those features of which the p-value was below 5% were selected for the PLS regression. With PLS a classification model is constructed to distinguish the samples into 2 groups. Those features with the highest coefficients, positive or negative, in the regression equation have the largest influence on the classification result of a given sample. In case of good classification results, it is very interesting to trace back the metabolites that lead to the rise of these features with high coefficients as this identifies those metabolites as being particularly useful for distinguishing one group from the other.

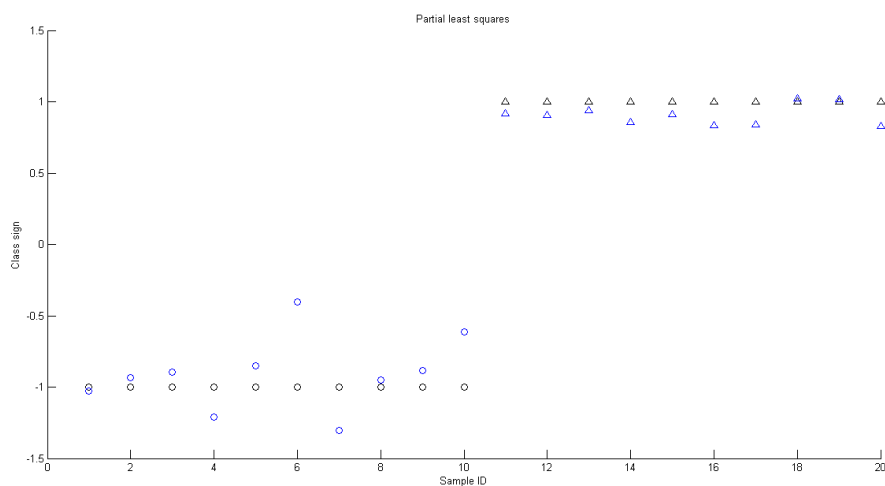


Figure 4. PLS Classification results for distinguishing the healthy control group (circles) from people with stage 1 CKD (triangles)

Good classification results were obtained for distinguishing the healthy control group from people with stage 1 CKD (Figure 4). The metabolites related to the top 40 features with

highest coefficients in the regression equation are shown in Table 1. These metabolites have the potential to be developed into a clinically useful biomarker to detect CKD in an early stage. It must, however, be noted that the identification of these metabolites is tentative. Comparison with the mass spectral libraries resulted in these identifications but they must be validated by other structure elucidating techniques such as NMR spectroscopy or by the use of pure standards. The different stages of CKD could not be sufficiently distinguished from one another. Too many samples thereof were classified into the wrong group with the reconstructed models. This was not so surprising considering the disease evolves gradually and is divided quite arbitrarily into the 5 stages, which means there is quite some overlap between 2 consecutive stages.

**Table 1.** Potential biomarkers for CKD selected through PLS regression

Potential biomarkers		
ureum	5-deoxy, myoinositol	propanoic acid-2-ol
alpha, D-glucopyranose-beta,D-fructose	tetradecanoic acid	L-phenylalanine
heptanedicarboxylic acid-2-amino	cholesterol	glucose
2-pyrrolidone, carboxylic acid	1,3-benzenedicarboxylic acid	L-lysine
guaicol-beta-D-glucopyranoside	acetic acid	

## Conclusion

An analysis method to detect polar metabolites in human serum by using GC-MS was optimized. A total of 64 serum samples were analyzed. Fourteen metabolites were found that show potential to become a biomarker for CKD. These require investigation and validation in followup studies.

## Acknowledgments

We would like thank Kai Chen for his help with the statistical analysis of the data. We also want to extend our thanks to the people of the Nephrology department of the UZ Gent for providing this study with the necessary serum samples.

## References

1. C. O'Callaghan. *The kidney at a glance*. Oxford. Blackwell Science. **2000**
2. National Collaborating Centre for Chronic Conditions. *Chronic kidney disease: national clinical guideline for early identification and management in adults in primary and secondary care*. Londen. Royal College of Physicians. **2008**
3. R. Vanholder. *Review on uremic toxins: Classification, concentration and interindividual variability*. *Kidney International*. **63**. 1934-1943. **2003**
4. T. Niwa. *Update of uremic toxin research by mass spectrometry*. *Mass Spectrometry Reviews*. **30**. 510-521. **2011**
5. C.L. Edelstein. *Biomarkers of kidney disease*. Londen. Academic Press. **2011**
6. A. Jiye. *Extraction and GC/MS analysis of the human blood plasma metabolome*. *Analytical Chemistry*. **77**. 8086-8094. **2005**