

3. Monsen AL, Refsum H, Markestad T, Ueland PM. Cobalamin status and its biochemical markers methylmalonic acid and homocysteine in different age groups from 4 days to 19 years. *Clin Chem* 2003; 49: 2067-75.
4. van Beynum I, den Heijer M, Thomas CM, Afman L, Oppenraay-van ED, Blom HJ. Total homocysteine and its predictors in Dutch children. *Am J Clin Nutr* 2005; 81: 1110-6.
5. te Poele-Pothoff MT, van den Berg M, Franken DG et al. Three different methods for the determination of total homocysteine in plasma. *Ann Clin Biochem* 1995; 32 (Pt 2): 218-20.
6. Blom HJ, van Rooij A, Hogeveen M. A simple high-throughput method for the determination of plasma methylmalonic acid by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Clin Chem Lab Med* 2007; 45: 645-50.
7. Bjorke Monsen AL, Ueland PM, Vollset SE et al. Determinants of cobalamin status in newborns. *Pediatrics* 2001; 108: 624-30.
8. Wiersinga WJ, de Rooij SE, Huijmans JG, Fischer C, Hoekstra JB. [Diagnosis of vitamin B12 deficiency revised]. *Ned Tijdschr Geneesk* 2005; 149: 2789-94.

Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk 2009; 34: 229-232

Analyse van plasmatryptofaan, -kynurenine en -3-hydroxykynurenine met behulp van XLC-MS/MS

W.H.A. de JONG, R. SMIT, E.G.E. de VRIES* en I.P. KEMA

Inleiding

Serotonine is een representant uit de groep van biogene aminen, die via enkele gelijkende stappen gevormd worden uit essentiële aminozuren en betrokken blijken te zijn bij vele fysiologische processen. Het aminozuur L-tryptofaan wordt in ons lichaam voor het grootste gedeelte gebruikt voor eiwitsynthese. Een klein variabel percentage wordt gebruikt als voorloper van serotonine. De belangrijkste metabole route van tryptofaan is de kynurenine-'pathway'. De eerste stap in deze route, vorming van kynurenine, wordt gekatalyseerd door twee heem-afhankelijke enzymen, tryptofaan-2,3-dioxygenase (TDO; EC 1.13.11.11) en indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO; EC 1.13.11.17). TDO komt vrijwel alleen in de lever voor terwijl IDO in de periferie en het centraal zenuwstelsel aanwezig is. De verhouding tussen tryptofaan en kynurenine weerspiegelt de IDO-activiteit en daarmee de beschikbaarheid van tryptofaan. Pro-inflammatoire stimuli als interferon- γ induceren IDO-expressie (1-3). Een belangrijke cytotoxische metabooliet van kynurenine is 3-hydroxykynurenine. De concentraties van deze stof in plasma zijn veel lager dan die van tryptofaan en kynurenine.

Variatie in tryptofaanconcentratie door IDO/TDO-inductie beïnvloedt de productie van serotonine. Analyse van tryptofaan en de kynureninemetaboolieten is daarom belangrijk voor onderzoek naar pathofysiologische condities waarbij serotonine een belangrijke rol speelt, zoals carcinoïd tumoren met excessieve serotonineproductie, stemmingsstoornissen zoals depressie met een verminderde serotonine beschikbaarheid, ontsteking, immunosuppressie, transplantatie en

zwangerschap (1, 2). Om de (patho)fysiologische mechanismen van dit metabolisme te kunnen bestuderen is het belangrijk dat tryptofaan en zijn grootse afbraakproduct (i.e. kynurenine) gemakkelijk kunnen worden gekwantificeerd in kleine volumina met hoge juistheid en precisie.

Deze studie beschrijft een sensitieve, specifieke, en geautomatiseerde high-throughput-methode bestaande uit onlinevastefase-extractie gekoppeld aan vloeistofchromatografie (LC) met tandem-massaspectrometrie (MS/MS) detectie (XLC-MS/MS) voor de simultane extractie, concentratie, scheiding, en massaselectieve detectie van tryptofaan en zijn metaboolieten kynurenine en 3-hydroxykynurenine in plasma. De tryptofaan-kynurenineratio in plasma wordt o.a. gebruikt bij onderzoek naar leukemie (4) en prostaatkanker (5). Omdat bij gebruik van deze markers in de diagnostiek, naast analytische variatie, ook de biologische variatie van belang is, hebben we in deze studie de biologische intra- en interdagvariatie van tryptofaan, kynurenine en hun ratio bepaald.

Materiaal en methoden

Reagentia, oplossingen en monsters

De gebruikte reagentia en oplossingen waren van HPLC-kwaliteit. L-tryptofaan, D,L-kynurenine en D,L-3-hydroxykynurenine waren van Sigma-Aldrich Ltd. De gedeutereerde interne standaard L-tryptofaan-2',4',5',6',7'-d5 was van C/D/N Isotopes en L-kynurenine-3',4',5',6'-d4 was van Buchem BV. 3-hydroxykynurenine-d2 werd zelfgemaakt (8).

Blancoplasma voor kalibratiecurves werd verkregen door dialyse van gepoold plasma. Bloed werd afgenomen door middel van venapunctie in 10-ml-vacutainerbuizen (Becton Dickinson) met K₂EDTA als anti-coagulans. Plasma werd opgeslagen bij -20°C.

Afdelingen Laboratorium Geneeskunde en Medische Oncologie*, Universitair Medisch Centrum, Groningen

E-mail: i.p.kema@lc.umcg.nl.

Monstervoorbewerking bestond uit het verdunnen van de plasmamonsters (250 µl) met 50 µl interne-standaardwerkoplossing (300 µmol/l in verdund azijnzuur voor tryptofaan en 5 µmol/l voor kynurenine en 3-hydroxykynurenine) en 200 µl water. 50 µl van elk monster (equivalent aan 25 µl plasma) werd in het geautomatiseerde systeem geïnjecteerd.

Instrumentatie

Een Spark Holland Symbiosis® online SPE-systeem gekoppeld aan LC-MS/MS werd gebruikt voor alle analyses, zoals eerder beschreven (6, 7). 'Strong cation exchange' Isolute® PRS(propylsulfonylzuur)-cartridges van 10 bij 1 mm (Argonaut) werden gebruikt voor SPE. Voor chromatografische scheiding werd een Atlantis dC18-kolom (3 µm, 100 mm x 2,1 mm i.d.; Waters) gebruikt. De tandem-massaspectrometer, een Quattro® Premier met een Z Spray® ionenbron (Waters) werd gebruikt in positieve elektro-spray-ionisatie.

Gedurende online-SPE werd het monster geladen met 0,01 mol/l HCl en geëluëerd met 300 µl 50 mM ammoniumformaat, pH 3. Het eluaat werd direct gemengd met de chromatografische mobiele fase. De binaire gradient bestond uit 0,2% (v/v) mierzuur in water (mobiele fase A) en acetonitril (mobiele fase B). Na een isocratische elutie met 100% A (0-1,5 min) werd een lineaire gradiënt toegepast naar 60% A in 2,5 min. Flowsnelheid was 0,30 ml/min. Gedurende de SPE-elutie met een flow rate van 0,25 ml/min werd de chromatografische flow rate aangepast tot 0,05 ml/min om dezelfde totale flow rate van 0,30 ml/min te kunnen handhaven.

Met positieve elektro-spray-ionisatie werden tryptofaan, kynurenine en 3-hydroxykynurenine (en hun gedeutereerde interne standaarden) geprotoneerd tot de volgende [M+H]⁺-ionen: tryptofaan: *m/z* 205, tryptofaan-d5: *m/z* 210; kynurenine: *m/z* 209, kynurenine-d4: 213, 3-hydroxykynurenine: *m/z* 225 en 3-hydroxykynurenine-d2: 227. Door collisione-geïnduceerde dissociatie (CID) worden uit deze precursor ionen karakteristieke productionen gevormd van *m/z* 188, *m/z* 192, *m/z* 94, *m/z* 98, *m/z* 110 en *m/z* 111, respectievelijk. Voor kwalificatiecontrole hebben we massaovergangen *m/z* 205→146 en 205→118 (tryptofaan), 209→192 en 209→146 (kynurenine), en 225→208 en 225→162 (3-hydroxykynurenine) toegevoegd (8).

Resultaten

De totale analysetijd per monster, van SPE tot detectie, was 8 min. Door middel van 'reversed phase'-chromatografie werd volledige scheiding van tryptofaan, kynurenine en 3-hydroxykynurenine verkregen. Vanwege massaspectrometrische detectie werden gedeutereerde interne standaarden gebruikt. Chromatogrammen worden hier niet getoond (8). Cartridges kunnen minstens 15 keer worden hergebruikt, zonder dat carryover optreedt (<0,1%).

De identiteit van de componenten werd bevestigd door standaard additie van het plasmamonster. Detectiegrenzen in plasmamonsters gemeten bij een signaal-ruisverhouding van 3 (LLOD) waren 30 nmol/l voor tryptofaan, 1 nmol/l voor kynurenine, en 5 nmol/l voor 3-hydroxykynurenine. De grenzen voor kwanti-

ficerings (bij een een signaal-ruisverhouding van 10) waren 110, 50, en 23 nmol/l, met variatiecoëfficiënten van 13,4%, 18,8%, en 19,7%, respectievelijk.

Plasmakalibratiecurves en controlemonsters werden in elke serie meegenomen. Uitstekende lineariteit werd verkregen in de gebruikte kalibratieranges (0-1200 µmol/l voor tryptofaan en 0-45 µmol/l voor kynurenine en 3-hydroxykynurenine) met correlatiecoëfficiënten (R^2) > 0,99 voor alle drie de componenten. Intra-assay-CV's voor controlemonsters (n=20) in zowel lage, gemiddelde en hoge concentraties waren 1,7%-3,6% (tryptofaan), 3,8%-7,2% (kynurenine), en 4,3%-8,8% (3-hydroxykynurenine). Interassay-CV's (n=20) waren 1,7%-7,0%, 2,9%-5,6%, en 5,3%-8,2%, respectievelijk. Relatieve recoveries (LC vs XLC van standaarden) waren 3,3%-4,1%, 37,8%-48,7%, en 30,9%-47,6%, respectievelijk. Plasmamonsters voor de meting van tryptofaan en kynurenine kunnen stabiel worden bewaard gedurende 7 dagen bij 10 °C, 4 °C of bij kamertemperatuur, voor 3-hydroxykynurenine geldt 3 dagen. Monsters zijn stabiel tot drie vries-dooicycli.

De biologische intradagvariatie werd bepaald uit plasmamonsters afkomstig van 26 gezonde personen (13 mannen, 13 vrouwen, in de leeftijd van 21 tot 59 jaar, mediane leeftijd 38 jaar) afgenomen op 5 tijdstippen gedurende 1 dag (figuur 1). Tryptofaanconcentraties zijn afhankelijk van het bloedafnametijdstip. Kynurenineconcentratie neemt significant af gedurende de dag. Hieruit volgt dat de tryptofaan-kynurenineratio significant toeneemt gedurende de dag. 3-Hydroxykynurenineconcentraties vertonen geen trend. Eenzijdig gepaarde t-toetsen werden gebruikt om de significantie ($p < 0,05$) te bepalen van longitudinale veranderingen in absolute analietconcentraties, gerelateerd aan de basislijnconcentraties en de voorafgaande concentraties.

Biologische intra-dag-CV's (n=26) waren 4,4-15,1% (tryptofaan), 2,4-17,1% (kynurenine), en 33,3-116,7% (3-hydroxykynurenine). Biologische interdagvariatie is bepaald door het analyseren van plasma afkomstig van 16 gezonde personen (12 mannen, 6 vrouwen, in de leeftijd van 20 tot 56 jaar, mediane leeftijd 35 jaar), op 5 achtereenvolgende dagen (om 09:00 h). Concentraties bleven constant gedurende de vijf achtereenvolgende dagen (data niet getoond). Biologische interdag-CV's (n=16) waren 2,7-10,6%, 5,1-15,7% en 33,3-169,9%, respectievelijk.

Referentiewaarden zijn gebaseerd op de analyse van 120 plasmamonsters met EP Evaluator. Deze monsters waren afkomstig van gezonde deelnemers (36 mannen, 84 vrouwen, in de leeftijd van 38 tot 83 jaar, mediane leeftijd 55) deelnemend aan de PREVEND-studie.

Referentie-intervallen waren 45,5 to 83,1 µmol/l (tryptofaan), 1,14 to 3,02 µmol/l (kynurenine), en <0,13 µmol/l (3-hydroxykynurenine). Tryptofaan-kynurenineratioreferentiewaarden waren 19,0-49,8.

Deze drie studies met monsters van vrijwilligers zijn goedgekeurd door de Medisch Ethische Commissie van ons instituut en uitgevoerd volgens de richtlijnen van de Declaratie van Helsinki. Alle deelnemers gaven schriftelijke toestemming.

Discussie

Deze studie toont aan dat tryptofaan, kynurenine en 3-hydroxykynurenine accuraat, precies en snel kunnen worden gemeten met online-SPE gekoppeld aan HPLC met MS/MS-detectie. Daarnaast is aangetoond dat bloedafname voor tryptofaan- en kynureninediagnostiek plaats moet vinden in de ochtend in nuchtere toestand, omdat beide markers significante biologische variatie vertonen gedurende de dag. Voor zover

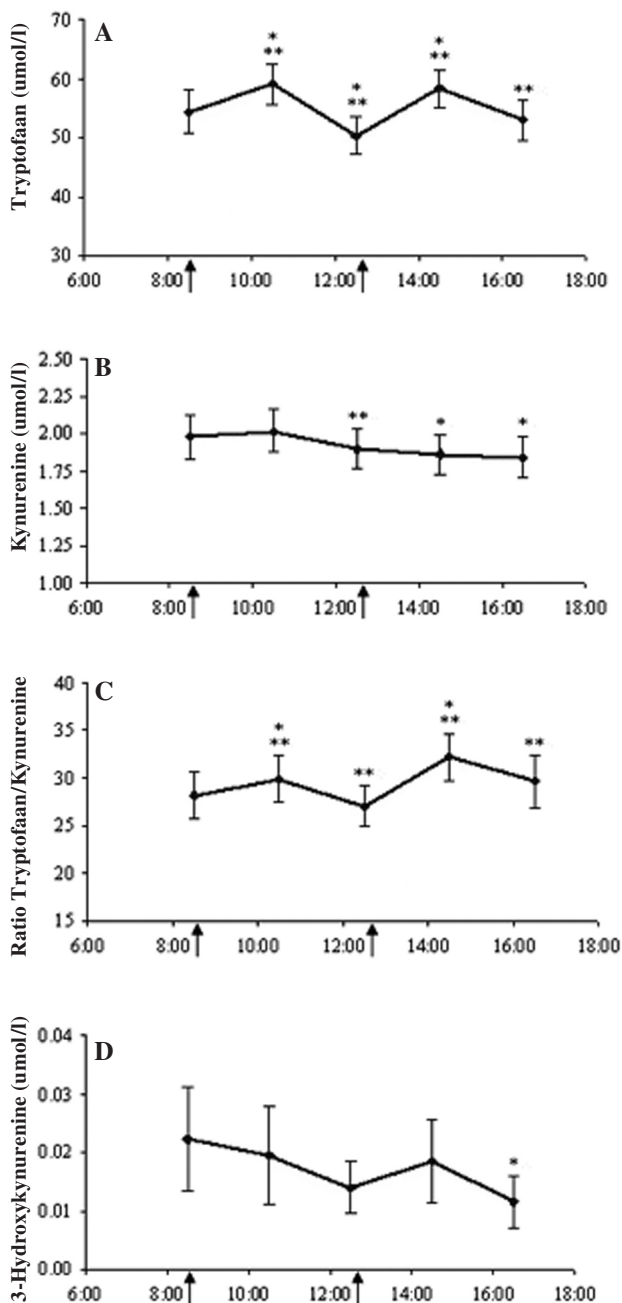


Figure 1. Biologische intradagvariatie van plasmatryptofaan (A), kynurenine (B), tryptofaan-kynurenineratio (C) en 3-hydroxykynurenine (D) in 26 gezonde personen. Plasmaconcentraties ($\mu\text{mol/l}$) zijn weergegeven als gemiddelde concentraties ($n=26$) met 95%-betrouwbaarheidsinterval op 5 tijdstippen gedurende één dag (8:30, 10:30, 12:30, 14:30 and 16:30 h). De eerste bloedafname vond in nuchtere toestand plaats. Pijlen geven aan wanneer broodmaaltijden werden genuttigd. *: Significant verschillend ($p < 0,05$) van basislijnwaarde (08:30 h); **: significant verschillend ($p < 0,05$) van voorafgaande waarde.

ons bekend is het afnemen van kynurenineconcentraties gedurende de dag een nieuwe bevinding, terwijl de biologische variatie in tryptofaan al eerder bekend was en overeenkomt met onze resultaten (9).

De meeste beschreven HPLC-methoden voor de detectie en kwantificering van tryptofaan en kynurenine zijn tijdrovend door handmatige voorbereiding en vereisen hoge monstervolumina (10). Met LC-MS/MS worden de meeste problemen overkomen, hoewel er nog steeds ruimte is voor verbetering met name op het gebied van analysetijd, reproduceerbaarheid en kosten per monster. Aangezien er nog geen snelle en gevoelige methode beschikbaar was voor de simultane meting van tryptofaan en kynurenine en er vanuit de kliniek aanvragen komen voor deze componenten, was onze opzet hiervoor een methode te ontwikkelen met online-SPE gekoppeld aan LC-MS/MS. Ook 3-hydroxykynurenine lijkt een veelbelovende marker voor met name de transplantatiegeneeskunde en aangezien het vrijwel dezelfde eigenschappen heeft als kynurenine is deze marker toegevoegd aan de analysemethode.

De drie componenten zijn zwakke basen met dezelfde geladen aminogroep, waardoor selectieve SPE met sterke kation-'exchangers' uitermate geschikt is voor opzuivering. Isolute PRS-cartridges zijn nauwelijks apolair en hebben een permanente negatieve lading op het sorbens (propylsulfonzuur). De gebruikte elutiefloeistof, met hoge ionsterkte voor verdringing van de analieten, is volledig polair. Dit sluit aan op de gebruikte 'reversed phase'-chromatografie, waarbij 100% waterfase wordt gebruikt voor complete scheiding van de componenten. De analytische kwaliteit van de XLC-MS/MS-methode is uitstekend. Een minpunt is de lage recovery van tryptofaan (<5%), doordat de methode geoptimaliseerd is voor kynurenine en 3-hydroxykynurenine. Echter, tryptofaanconcentraties zijn veel hoger dan kynurenine- en 3-hydroxykynurenineconcentraties, waardoor tryptofaan nog steeds een hogere respons geeft dan beide andere componenten. Logischerwijs is de LLOQ van tryptofaan minder laag, hoewel nog steeds lager dan niet-massaspectrometrische methoden

Een pluspunt van de methode is het lage benodigde monstervolume van 50 μl , waardoor analyse van monsters afkomstig van neonaten, maar ook van muizen, ratten of weefsels, mogelijk is. De methode is ook toepasbaar voor liquormonsters waarin alle componenten in voldoende hoge concentraties aanwezig zijn. De gevonden referentiewaarden komen overeen met eerder beschreven waarden (3). 3-hydroxykynurenineconcentraties in plasma van gezonde personen liggen vaak onder de detectiegrens.

Concluderend, plasmatryptofaan, -kynurenine en -3-hydroxykynurenine kunnen accuraat, precies en reproduceerbaar worden gemeten met XLC-MS/MS. Bloedafname dient plaats te vinden in nuchtere toestand. De werkelijke waarde van deze analyse in de kliniek moet nog verder worden onderzocht. In ieder geval maakt deze methode het mogelijk onderzoek te doen naar de (patho)fysiologie binnen het tryptofaanmetabolisme.

Referenties

1. Grohmann U, Fallarino F, Puccetti P. Tolerance, DCs and tryptophan: much ado about IDO. *Trends Immunol* 2003; 24: 242-8.
2. Ruddick JP, Evans AK, Nutt DJ, Lightman SL, Rook GA, Lowry CA. Tryptophan metabolism in the central nervous system: medical implications. *Expert Rev Mol Med* 2006; 8: 1-27.
3. Widner B, Werner ER, Schennach H, Fuchs D. An HPLC method to determine tryptophan and kynurenine in serum simultaneously. *Adv Exp Med Biol* 1999; 467: 827-32.
4. Hoshi M, Ito H, Fujigaki H, Takemura M, Takahashi T, Tomita E, et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase is highly expressed in human adult T-cell leukemia/lymphoma and chemotherapy changes tryptophan catabolism in serum and reduced activity. *Leuk Res* 2009; 33: 39-45.
5. Feder-Mengus C, Wyler S, Hudolin T, Ruzsat R, Bubendorf L, Chiarugi A, et al. High expression of indoleamine 2,3-dioxygenase gene in prostate cancer. *Eur J Cancer* 2008; 44: 2266-75.
6. de Jong WH, Graham KS, van der Molen JC, Links TP, Morris MR, Ross HA, et al. Plasma free metanephrine measurement using automated online solid-phase extraction HPLC tandem mass spectrometry. *Clin Chem* 2007; 53: 1684-93.
7. de Jong WH, Graham KS, De Vries EG, Kema IP. Urinary 5-HIAA measurement using automated on-line solid-phase extraction-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2008; 868: 28-33.
8. de Jong WH, Smit R, Bakker SJ, de Vries EG, Kema IP. Plasma tryptophan, kynurenine and 3-hydroxykynurenine measurement using automated on-line solid-phase extraction HPLC-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2009; 877: 603-9.
9. Eynard N, Flachaire E, Lestra C, Broyer M, Zaidan R, Claustrat B, et al. Platelet serotonin content and free and total plasma tryptophan in healthy volunteers during 24 hours. *Clin Chem* 1993; 39: 2337-40.
10. Amirkhani A, Heldin E, Markides KE, Bergquist J. Quantitation of tryptophan, kynurenine and kynurenic acid in human plasma by capillary liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2002; 78: 381-7.

Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk 2009; 34: 232-234

Diagnostic utility of multiparameter flow-cytometry analysis in myelodysplastic syndromes

E.W.M. KEMNA, J. SLOMP, M. de GROOT, J.G. te MARVELDE*, R. BROEKKAMP and I. VERMES

Introduction

The myelodysplastic syndromes (MDS) are a heterogeneous group of bone marrow (BM) disorders characterized by ineffective and dysplastic hematopoiesis in one or more blood cell lineages, increased apoptosis and hyper-proliferative BM. Furthermore, MDS has a high rate of transformation to acute myeloid leukemia (sAML). The WHO classification of MDS takes into account both morphologic and cytogenetic features and divides MDS into 8 subgroups. Currently, classification relies on combining clinical information with morphologic and cytogenetic features of peripheral blood and BM. However, cytogenetic abnormalities are found in only ~40% of the cases, while morphologic evaluation is subjective. It has been shown that flow-cytometry (FC) can reveal immunophenotypic aberrations in MDS compared to normal BM (1-4).

Furthermore, expansion of the knowledge regarding apoptosis and proliferation could lead to new insights in treatment, and may serve as an additional marker for the diagnosis of MDS. The aim of the present study was to improve the diagnosis and classification of MDS by quantitative assessment of hematopoietic differentiation pathways by multiparameter FC.

Methods

Twenty-five normal BM, obtained from patients who were subject to hip -or open heart surgery and 31 BM from patients with a suspicion for MDS were analyzed. Eleven of the 31 MDS suspicious BM were confirmed as MDS by morphologic and cytogenetic features. A panel of eight quadruple immunostainings was developed to characterize erythroid, granulocytic, monocytic and mono/myeloblasts differentiation pathways, according to the protocol of the Dutch working-group on MDS (chair Dr. Arjan A. van de Loosdrecht). Shortly, the following 4-colour panel was used; Erythroid differentiation: CD71/CD235a/CD34/CD117; Mono/myeloid blasts: CD34/CD117/CD45/CD13.33 and CD15/HLA-DR/CD45/CD11b; Monocytic differentiation: CD36/CD33/CD45/CD14; Myeloid blasts:

*Medisch Spectrum Twente Hospital Group, Enschede en *Erasmus MC, Department of Immunology, Rotterdam, The Netherlands*

E-mail: e.w.m.kemna@ewi.utwente.nl