



Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí

STUDIUM ÚČINKŮ – metabolity

Analýza malých molekul (metabolitů) v (eko)toxikologii

Lucie Bláhová, MU, RECETOX

Schéma přednášky

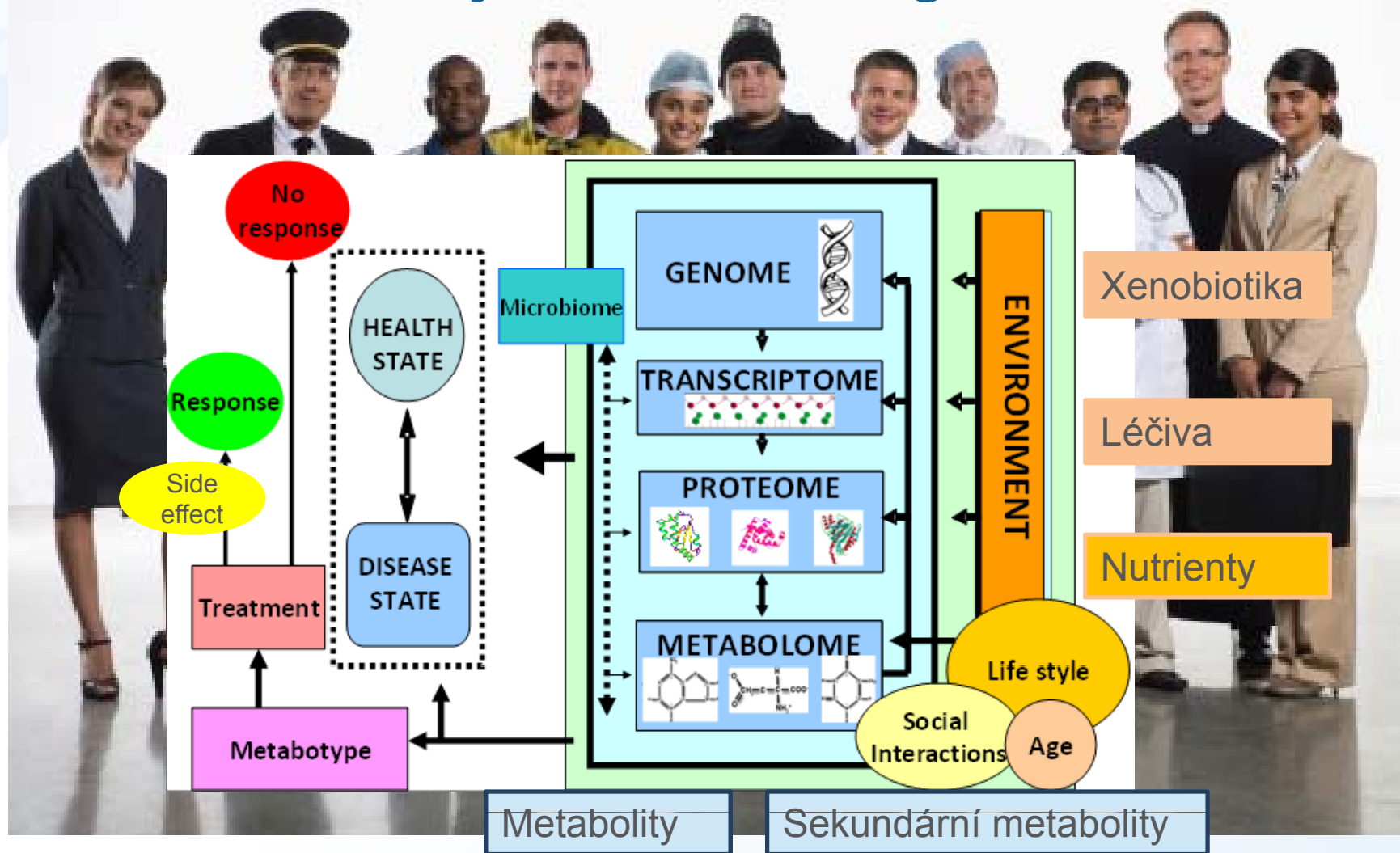
- Metabolity, metabolomika
- Příklady a význam vybraných metabolitů
- Příklady přírodních látek

- Metody stanovení
 - Extrakce → Separace → Detekce

- Vybrané příklady
 - Thioly (GSH)
 - Analýza lipidů

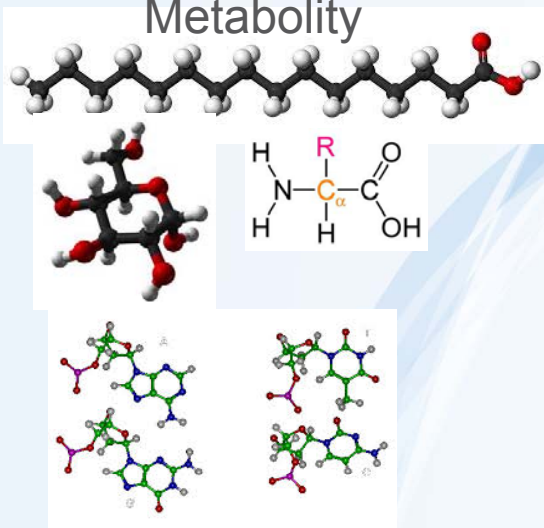


Systemová biologie

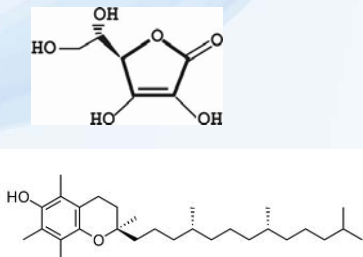


Metabolity a malé molekuly v organismech

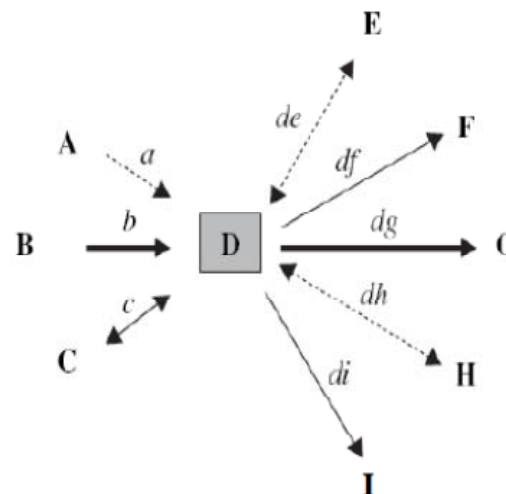
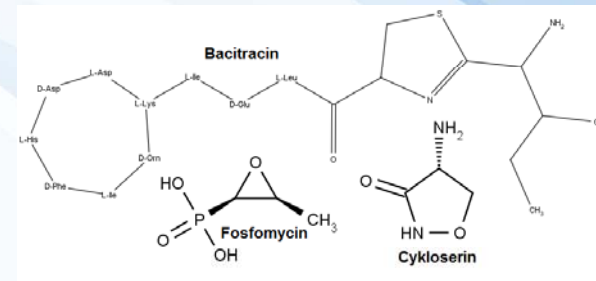
Metabolity



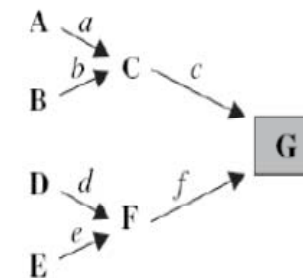
Nutrienty



Sekundární metabolity a Léčiva



Primární metabolismus



Sekundární metabolismus

METABOLOMIKA



Cent
toxi
v pr

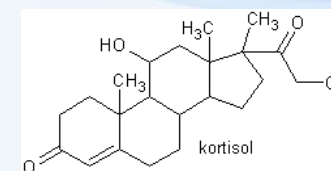
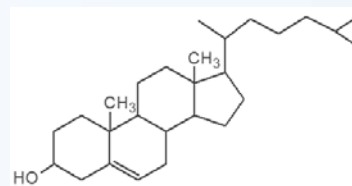
METABOLOM

Metabolit

- Produkt enzymové reakce
- Vyskytuje se převážně uvnitř buňky (!)
- Neakumuluje se
- Má biologickou funkci (na enzymatické i transkripční úrovni)
- Podobná struktura s prekurzorem
- Nízká koncentrace a malá MW

Příklad:

cholesterol-steroidní hormony
(kortisol - řízení metabolismu všech živin)



Metabolom

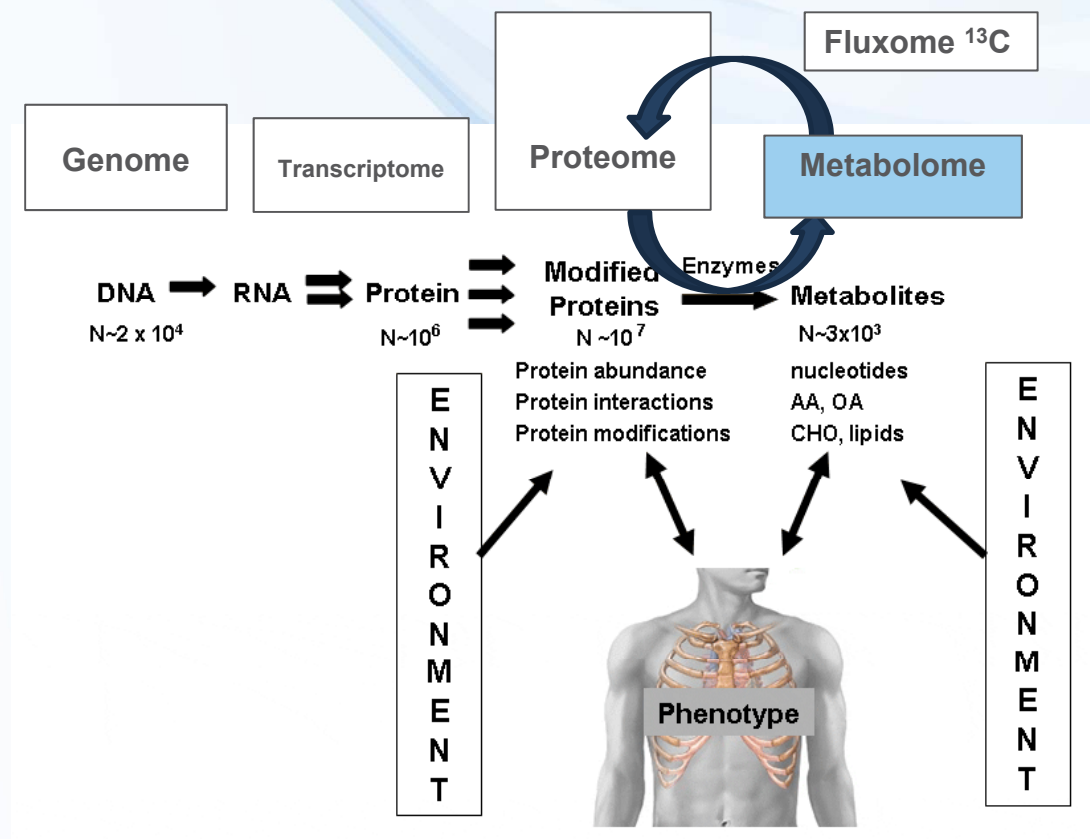
Soubor nízkomolekulárních meziproduktů a koncových produktů genové exprese a enzymatické aktivity v daném čase



METABOLOM – proč?

Proč využít metabolom?

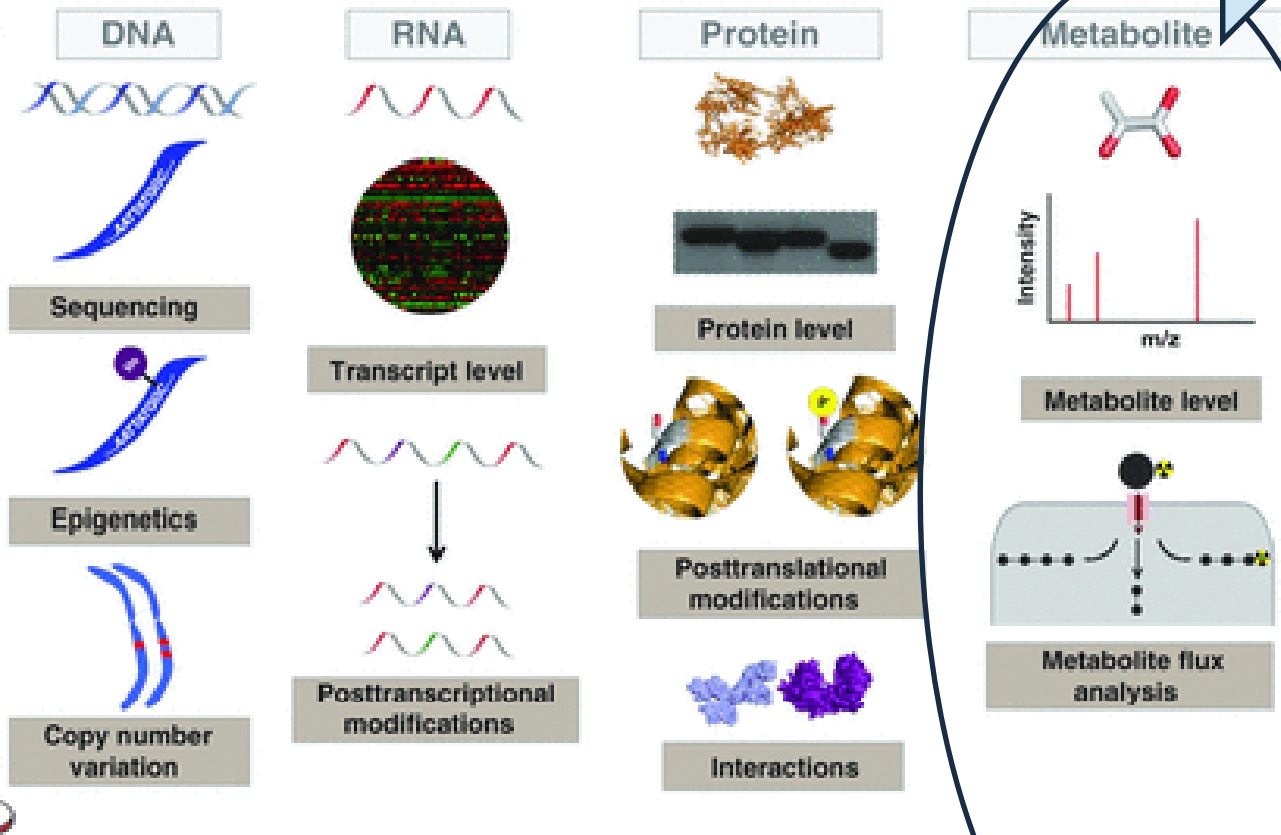
- Množství metabolitů obecně nižší než počet genů a proteinů v buňce (*S. cerevisiae* – 600 metabolitů pod MW -300 z 6000 genů)
 - Výjimky existují – např. u rostlin může být naopak – sekundární metabolity
- Analýzy časově méně náročné
 - ve srovnání s analýzou velkých makromolekul
- Změny v hladinách metabolitů:
 1. při nezměněné koncentraci enzymu
 2. násobně vyšší než změny exprese nebo koncentrace proteinů
 3. dány nejen úrovní exprese, ale i environmentálními vlivy, stádiem vývoje organismu, biol. cykly ...



METABOLOM – jak?

Klesá počet analyzovaných molekul ...

Roste chemická komplexnost analyzovaných sloučenin



RT-PCR
DNA Microarrays
Gene Chips

2D-PAGE MALDI-TOF
2D-LC-MS

NMR
GC-MS
LC-MS
CE-MS



Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí

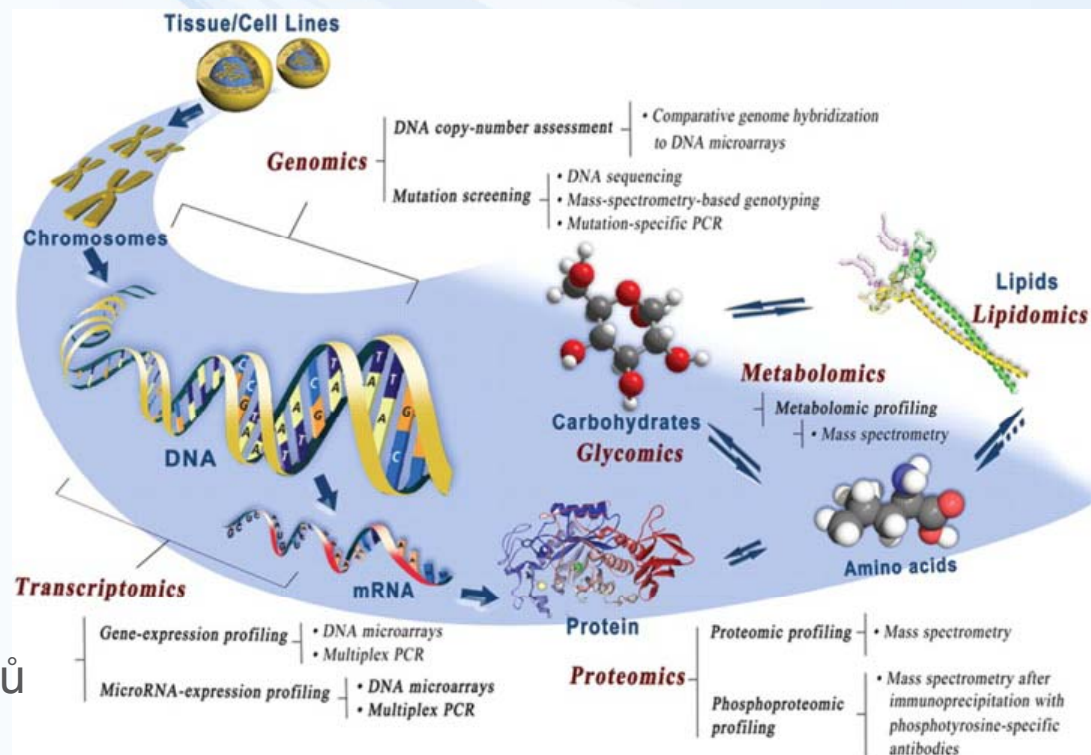
METABOLOMIKA

Metabolomika:

Kvantitativní i kvalitativní studium metabolitů <1 kDA (metabolomu) látkové přeměny živých systémů

Využití:

- Adaptace organismu na prostředí
- Odhad toxicity látek
- Vývoj nových léčiv
- Hledání metabolických biomarkerů a biomarkerů onemocnění
- Biomarkery průběhu terapie
- Charakterizace a identifiace buněk (savčí, rostlinné, GMO)



METABOLOMIKA - přístupy

Metabolite target analysis:

- kvantitativní i kvalitativní analýza substrátů nebo produktů metabolické dráhy, nízký LOD, náročná příprava vzorku

Metabolic profiling:

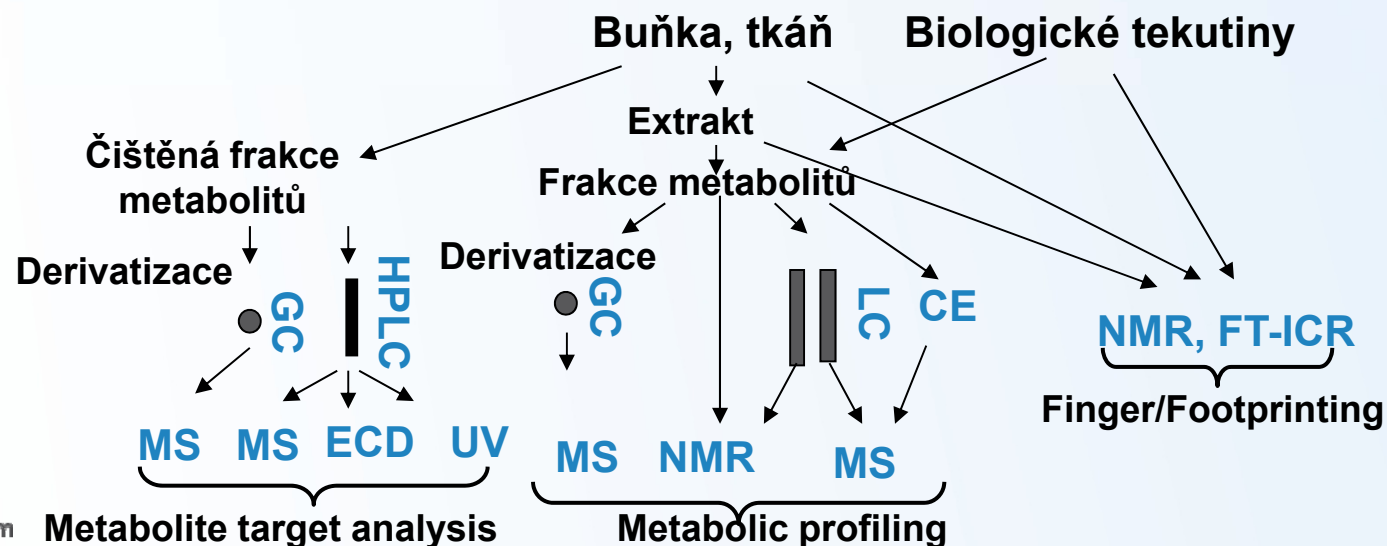
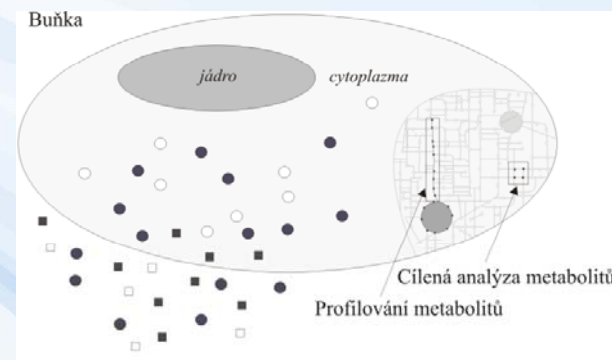
- semikvantitativní analýza více metabolitů s podobnými vlastnostmi (např. polární lipidy, isoprenoidy, sacharidy)

Finger / Footprinting:

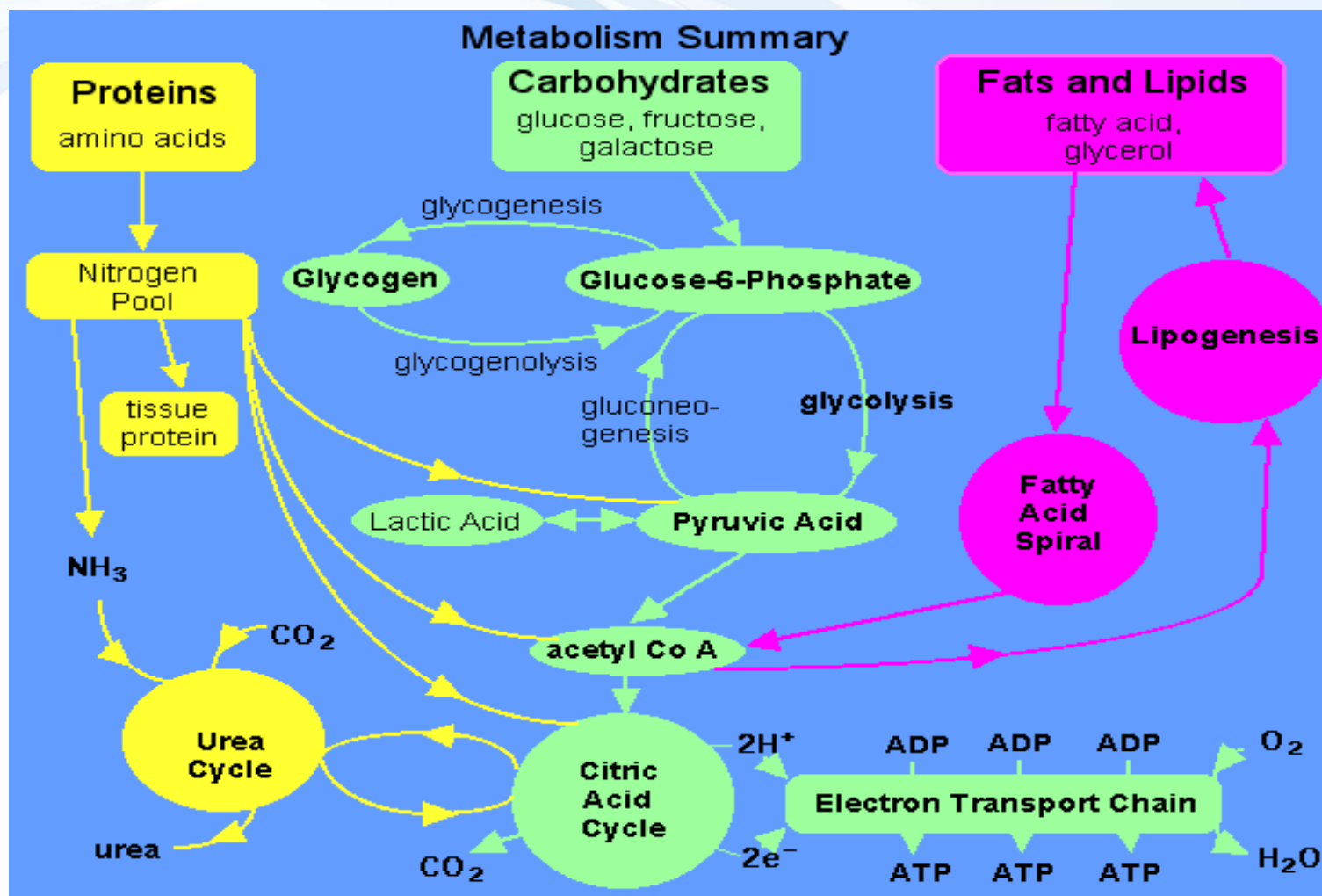
- komplexní analýza intra (finger-) a extracelulárních (foot-) metabolitů bez nutnosti kvantifikovat a identifikovat, screening

Metabonomics (definice není 100%ní!):

- podoba s fingerprinting, cílem je sledovat odpověď po expozici např. toxickou látkou (farmakologie, toxikologie)
- především analýza “metabolitů vznikajících z toxické látky”



Různé skupiny metabolitů



! Diskutován je heterotrofní metabolismus (živočichové, člověk)
(ne sinice, rostliny, a zvláštní typy bakterií ...)



METABOLITY LIPIDŮ



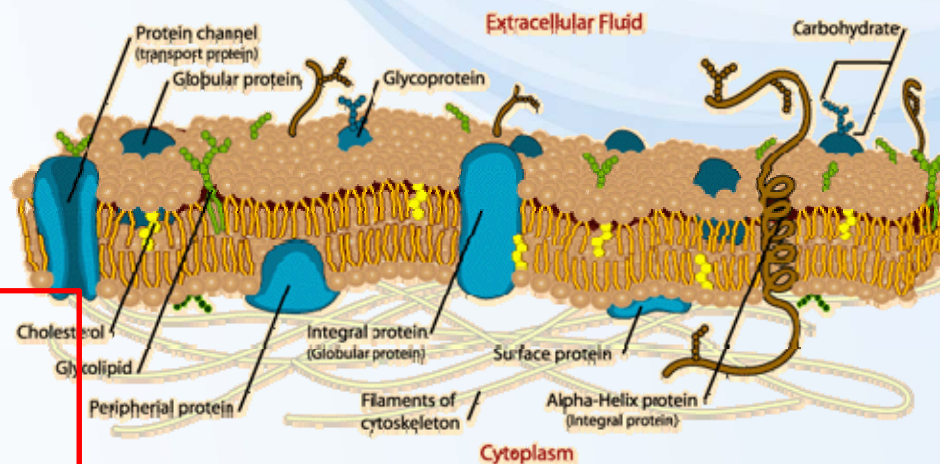
Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí

METABOLITY LIPIDŮ

Databáze Lipid MAPS (3.5.2013) – 37 500 biologicky relevantních lipidů

- Fatty acids 5795
- Glycerolipids 7538
- Sterol lipids 2678
- Prenol lipids 1200
- Sacccharolipids 1293
- Sphingolipids 4318
- **Glycerophospholipids 8001**
- Polyketides 6741

Nepolární lipidy



Polární lipidy



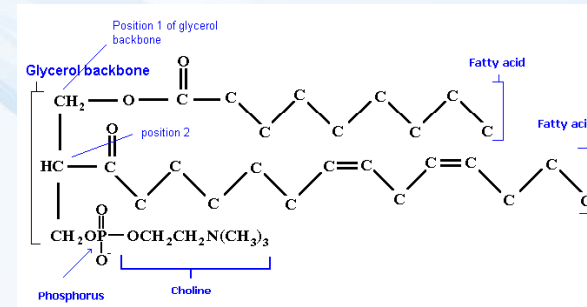
METABOLITY LIPIDŮ – dělení

Lipidy:

Polární x nepolární

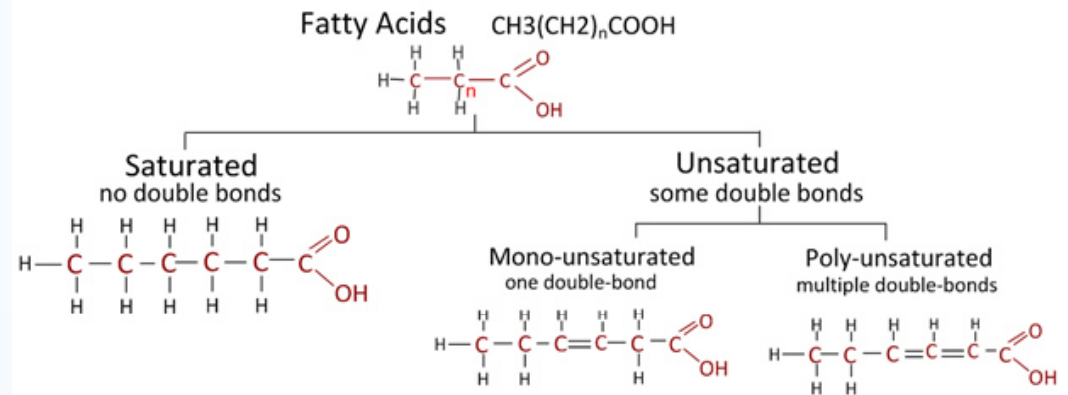
Jednoduché x složené x odvozené

Různé polohy acylů na glycerolu

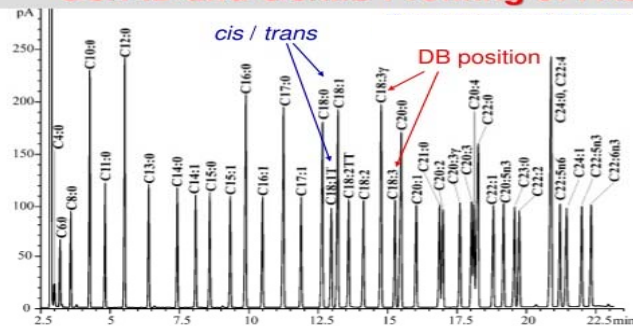


Mastné kyseliny:

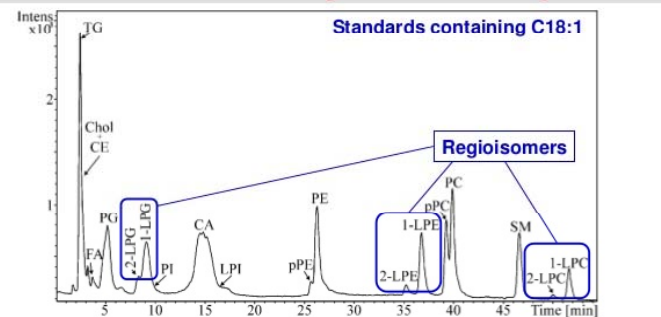
- Délka řetězce
- Počet dvojných vazeb a jejich umístění
- Stereoizomerie
- Regioizomerie
 - Stejná MW, ale různé polohy substituentů na řetězci



GC/FID and GC/MS Profiling of FAs



HILIC-LC/ESI-MS Analysis of Polar Lipids

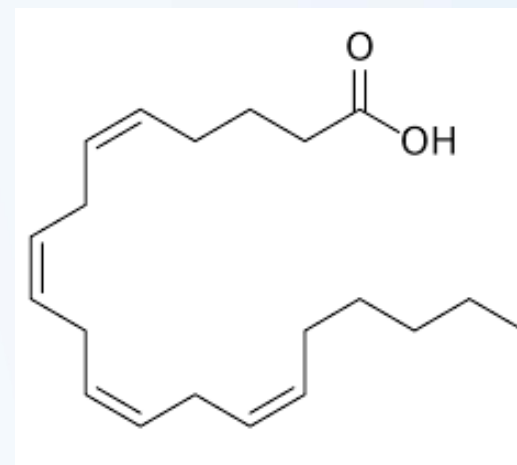
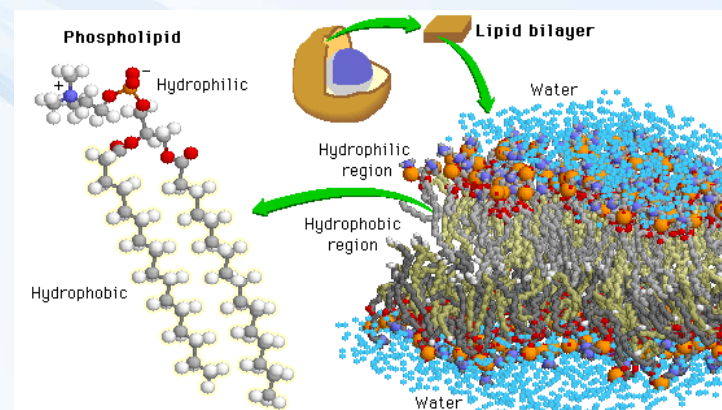


Fosfolipidy

Součást membrán

Složení

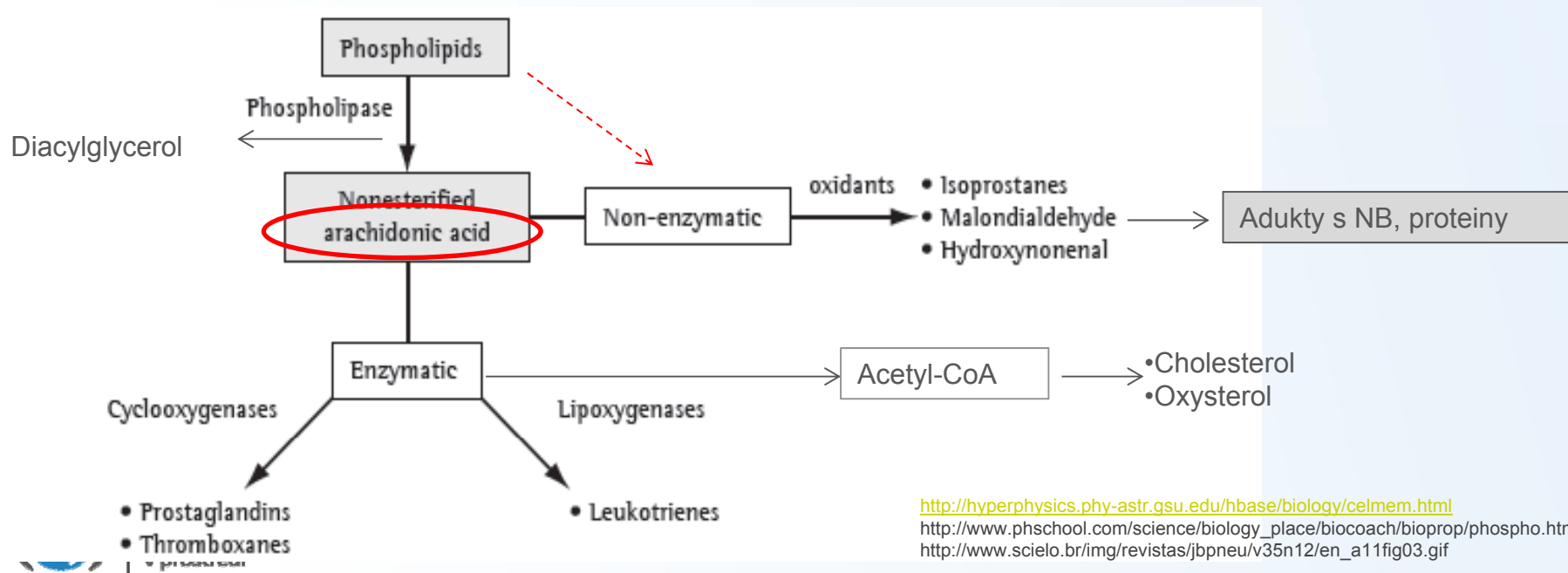
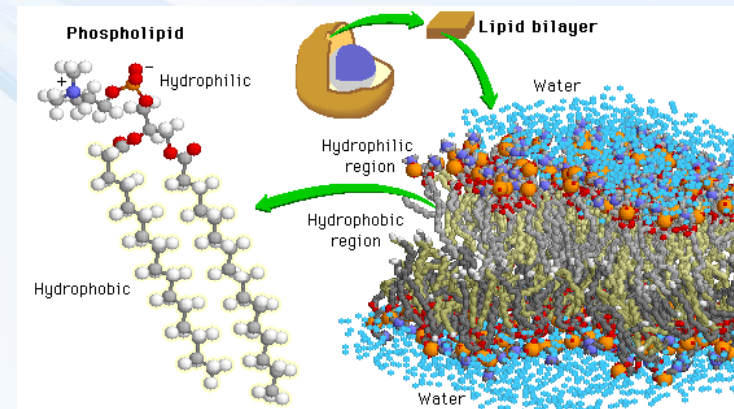
- Diacylglycerol-fosfát (může být esterifikován)
- Mastné kyseliny
 - Palmitová, oleová, arachidonová
- Nejvíce prostudované a biologicky významné
→ metabolity **kyseliny arachidonové (AA)**



METABOLITY FOSFOLIPIDŮ

Oxidace fosfolipidů

- nejčastější proces metabolizace
- ztráta funkčnosti membrán
- enzymaticky i neenzymaticky
- metabolity s fyziologickými účinky
- reaktivní metabolity



<http://hyperphysics.phy-astr.gsu.edu/hbase/biology/celmem.html>

http://www.phschool.com/science/biology_place/biocoach/bioprop/phospho.html

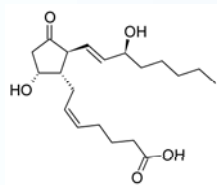
http://www.scielo.br/img/revistas/jbpneu/v35n12/en_a11fig03.gif

FOSFOLIPIDY – enzymatická oxidace

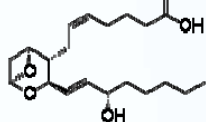
Eikosanoidy

20 C, deriváty AA

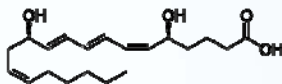
- Prostaglandiny



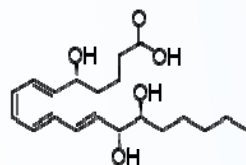
- Tromboxany



- Leukotrieny

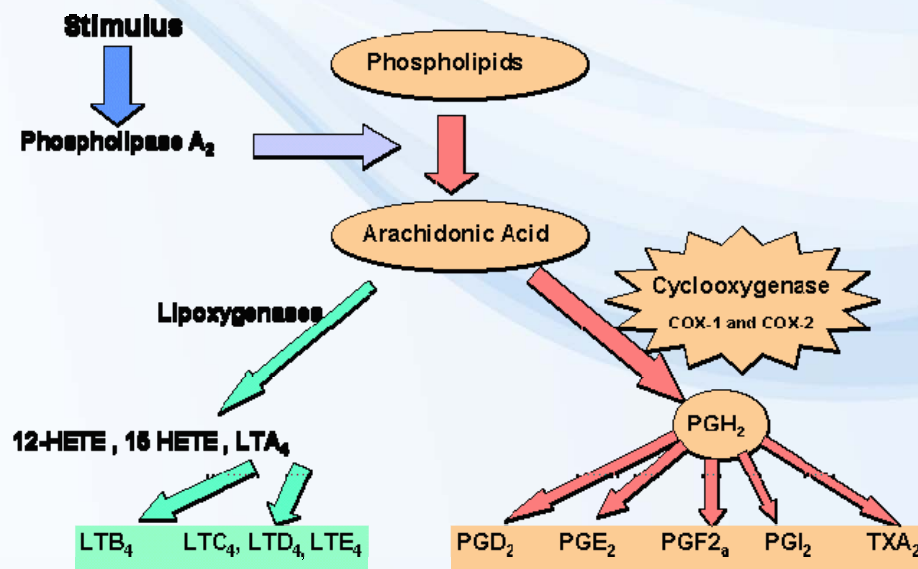
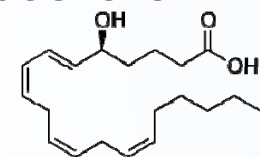


- Lipoxiny



- Hydroxyeikosatetraenové

kyseliny - HETE



Významné biologické funkce

- Zprostředkování zánětlivé odpovědi
- Buněčná signalizace
- Regulace krevního tlaku, koagulace, horečky, bolesti
- Řídí činnost ledvin
- Inhibice lipolýzy a sekrece trávicích šťáv



Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí

FOSFOLIPIDY – neenzymatická oxidace

Isoeikosanoidy

Produkty neenzymatické oxidace AA

Nejstudovanější – ISOPROSTANY

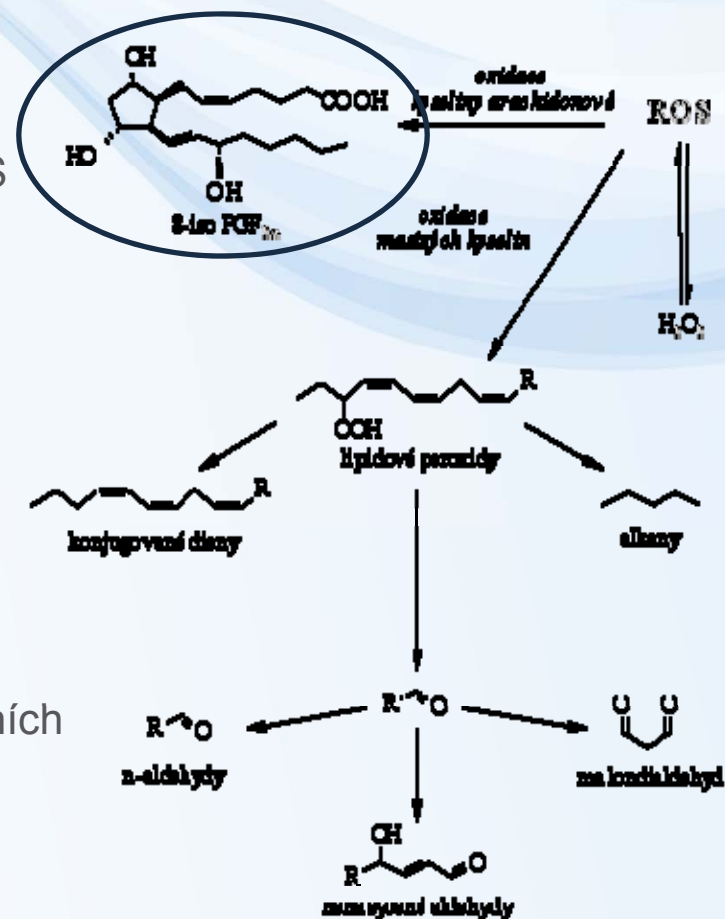
- Stabilní molekuly, specificky vznikají po ataku ROS
- Nejznámější **8-iso-PGF_{2α}**
(synonyma iPF_{2α}-III, iPF_{2α}-IV, 15-F_{2t}-IsoP)

Známé účinky 8-iso-PGF_{2α} :

- vasokonstrikce
- inhibice shlukování krevních destiček
- účast při zánětlivých procesech

Využití:

- biomarker oxidativního stresu a pracovní expozice
- biomarker neurodegenerativních a kardiovaskulárních onemocnění
- řízení terapeutického zásahu



FOSFOLIPIDY – neenzymatická oxidace

**Konečné produkty oxidace
= malé reaktivní aldehydy**

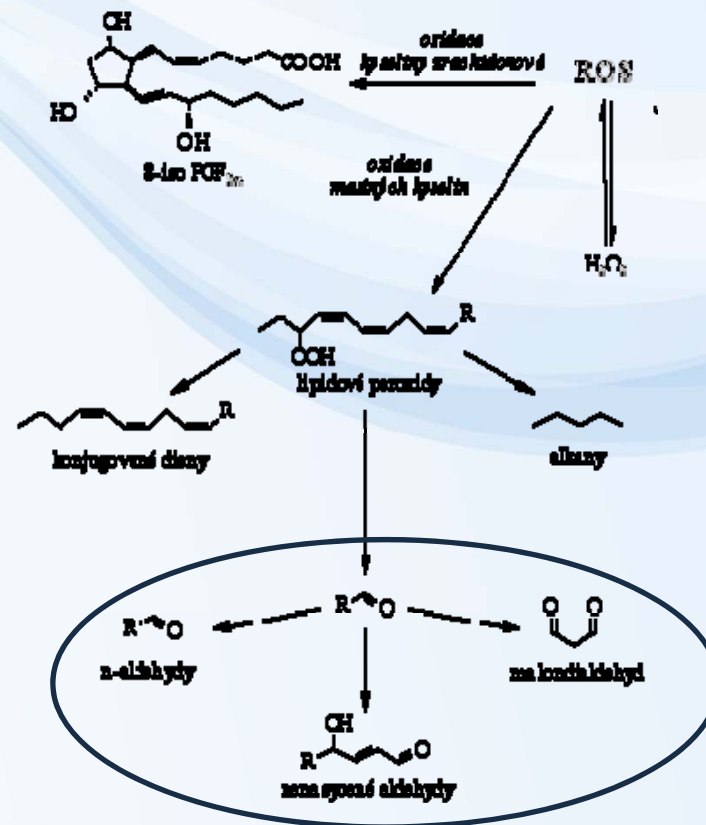
MDA – malondialdehyd (MW 72.07)

HNE – 4-hydroxynonenal (MW 156.22)

ONE – 4-oxononenal (MW 155.22)

ACR – acrolein (MW 56.06)

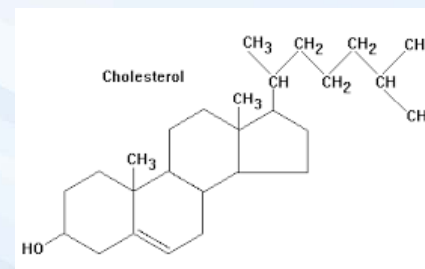
- koncové produkty oxidace i potravních lipidů
- reaktivní malé molekuly – tvorba aduktů s DNA, peptidy, GSH („mercapturomika“)
- biomarkery oxidativního stresu in vivo a vnější expozice
- biologické a toxické účinky



DALŠÍ METABOLITY LIPIDŮ

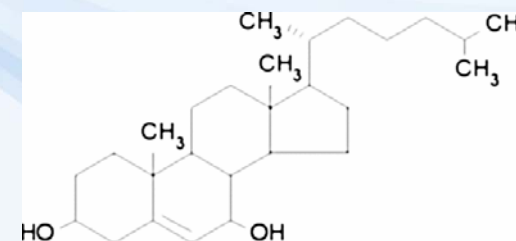
Cholesterol

- Součást membrán, prekurzor steroidních hormonů a žlučových kyselin



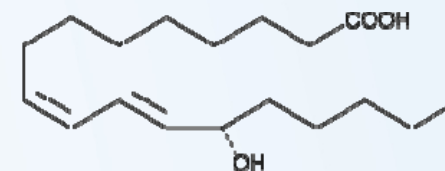
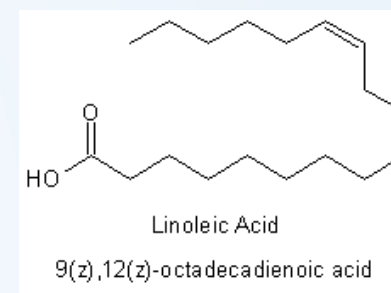
Oxysteroly (7b-hydroxycholesterol)

- produkt lipidní peroxidace cholesterolu, MW 402.65
- biomarker oxidativního stresu a různých onemocnění (diabetes, atherosclerosis, liver diseases, alzheimer)
- vysoká koncentrace v plasmě
- biologické účinky: apoptoza, agregace destiček, metabolismus sfingolipidů, cytotoxicita



t-HODE (hydroxyoctadecadienoic acid)

- produkt oxidace kyseliny linoleové,
- biomarker antioxidační kapacity a oxidativního stresu in vivo

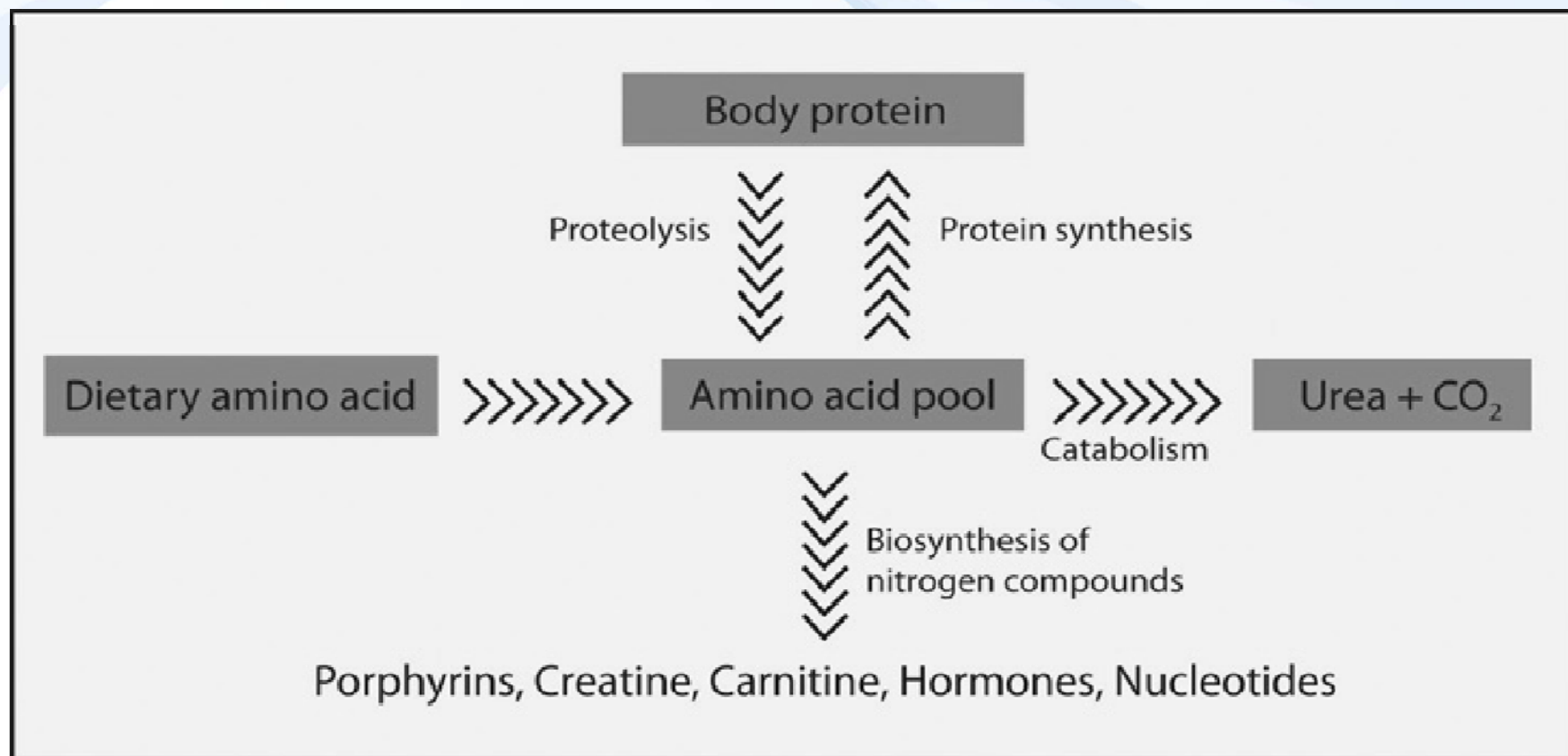


METABOLITY PEPTIDŮ



Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí

METABOLITY PEPTIDŮ



METABOLITY PEPTIDŮ (1)

Aminokyseliny a jejich deriváty:

Proteinogenní

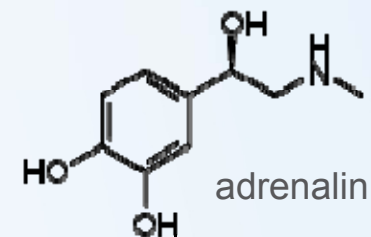
- 1) funkce strukturní (proteiny) – všechny aa
- 2) další funkce
 - př. přenos vzruchu v CNS - glycin, kyselina asparagová, kyselina glutamová

Neproteinogenní – specifické funkce

- * β -alanin, N-methyl-d-asparagová kyselina NMDA (stimulátor mozkových receptorů),
- * GABA (přenos vzruchu)

Metabolity aminokyselin:

- methylglycin (sarkosin - antinádorové účinky);
- kreatin (derivát glycinu);
- acetylcholin** (mediátor vzruchu), cholin, ethanolamin (derivát serinu);
- serotonin**, **melatonin** (derivát tryptofanu, regulační funkce);
- histamin** (derivát histidinu);
- hormony dřeně nadledvinek – př. **adrenalin** a štítné žlázy (deriváty tyrosinu);
- 3-nitrotyrosin, o-tyrosin, karboxymethyl nebo MDA adukt lysinu (biomarkery oxidativního stresu),
- močovina** (konečný metabolit degradace aminokyselin)



METABOLITY PEPTIDŮ (2)

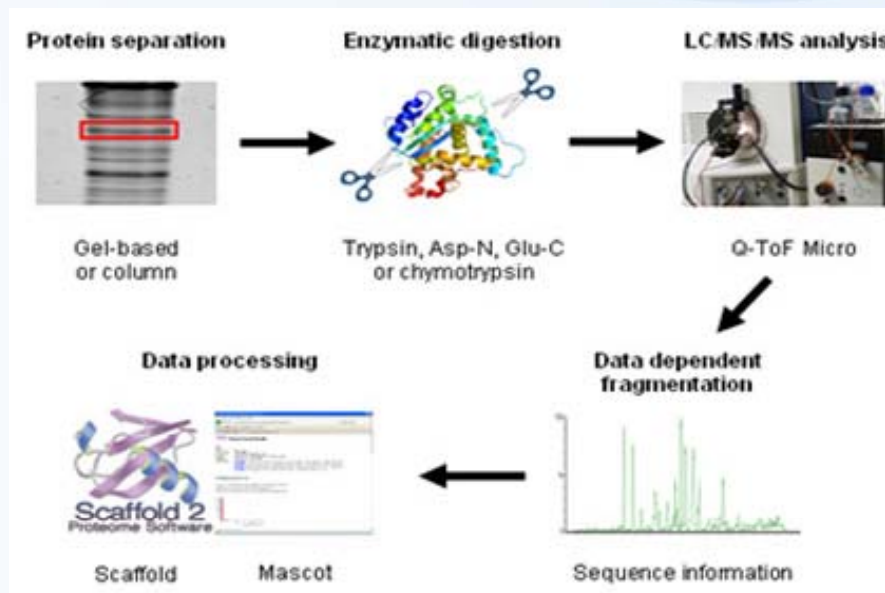
Konjugáty peptidů:

Glykosilace, Cysteinylace, Glutathionylace, Oxidační produkty (karboxymethyl), Ubiquitace, Adukty s reaktivními aldehydy

ANALÝZY peptidů – viz přednášky jinde (proteiny)

Příklad - kvantifikace oxidovaných proteinů

- homogenizace-
- 2Dgel **elektroforéza**
- immunoblotting nebo afinitní kolony-
- vyjmutí skvrn
- trypsin**
- redukce/derivatizace/značení biotinem-
- MS-protein indentifikace** (fingerprinting)



DALŠÍ KLÍČOVÉ METABOLITY (sacharidy, nukleotidy)

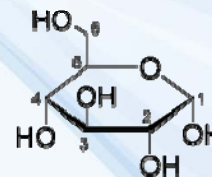


METABOLITY SACHARIDŮ

Jednoduché sacharidy:

Příklad: Glukóza

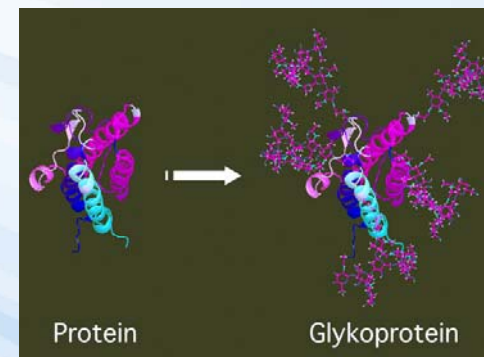
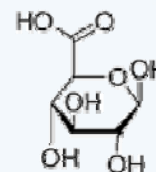
- Rozpustná ve vodě, zdroj energie, konstantní hladina v krvi
- Stanovení: enzymaticky, spektrofotometricky, amperometricky



Deriváty sacharidů:

Příklad: Kyselina glukuronová

- Konjugační agens v detoxikačních reakcích

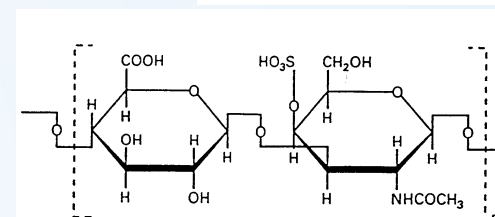
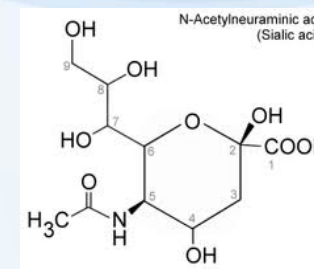


Konjugáty sacharidů - glykoproteiny a glykolipidy:

Stanovení obtížné (mnoho struktur s různými chemickými vlastnostmi, často větvené struktury, nízké koncentrace)

Příklad konjugujícího sacharidu: N-acetylglukosamin, glukóza, galaktóza, **sialové kyseliny**, **chondroitin sulfát** deriváty

- Účinky: účastní se imunitních reakcí, buněčné diferenciace, markery nádorových onemocnění, možná léčiva
- Stanovení: LC/MS, imunohistochemie, ELISA, microarray, elektroforéza s kys. jodistou a Ag⁺



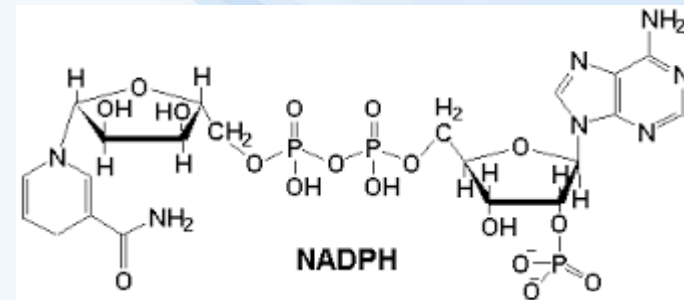
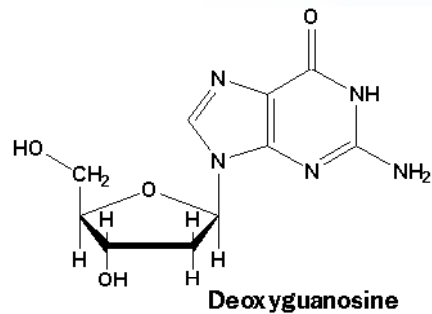
Repeating unit of chondroitin sulfate A



METABOLITY NUKLEOTIDŮ

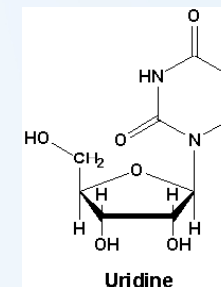
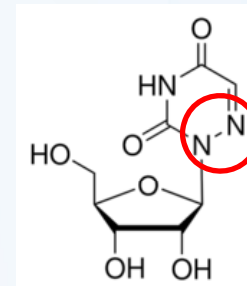
nukleotidy:

- **Adeninové nukleotidy a koenzymy** (ATP, ADP, AMP, NADPH, NADH)
- Adukty bazí (**8-oxodG**, 8-OH-dA, dT-glycol, and 5-hydroxy-methyl-dU, adukty s MDA-M1dG)



léčiva na bázi nukleotidů:

- 6-aza-uridin (cytostatika)-inhibice DNA syntézy

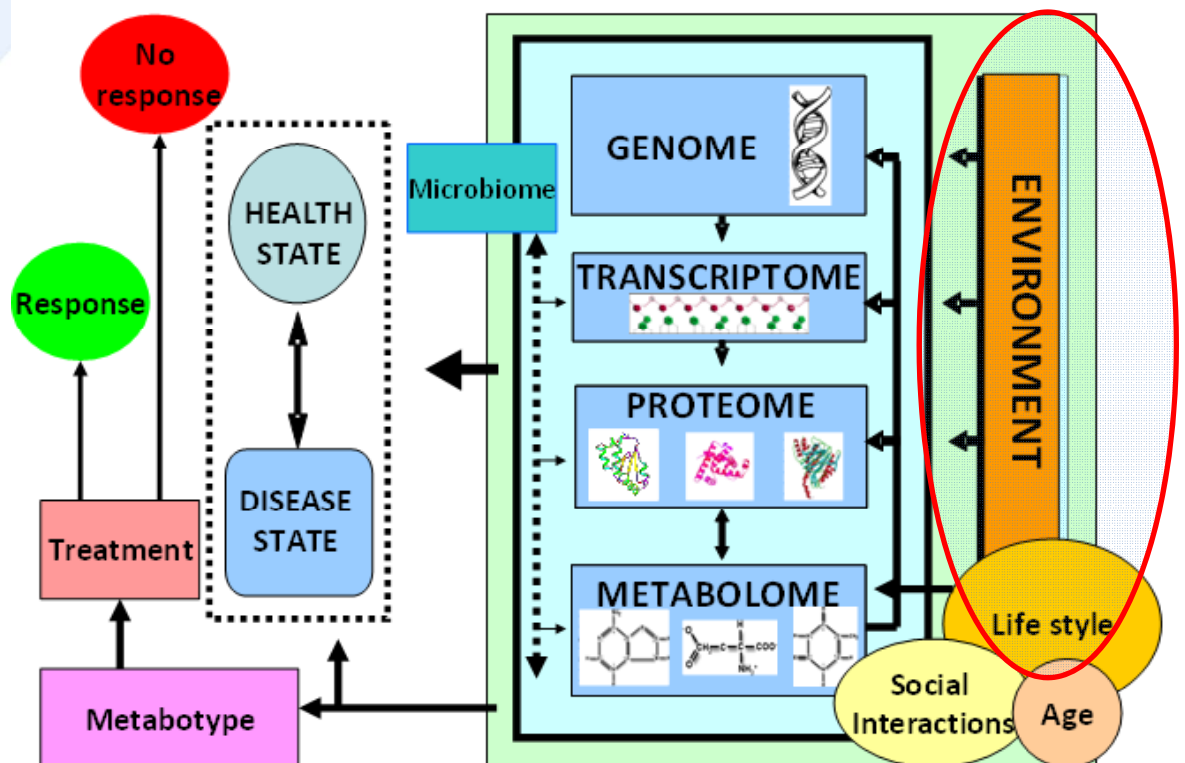


DALŠÍ “MALÉ MOLEKULY” V ORGANIZMU



Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí

MALÉ MOLEKULY V ORGANIZMU



- **Přírodní látky**
malé oligopeptidy,
biogenní aminy,
alkaloidy, polyfenoly,
barviva, glykosidy,
terpenoidy, sinicové
toxiny, mykotoxiny,
antibiotika, vonné látky

- Další (ne v této přednášce)
 - Farmaka -
antibiotika,
analgetika,
cytostatika
 - Nutrienty -
vitaminy, cukry,
mastné kyseliny

Kromě endogenních metabolitů mohou i cizorodé malé molekuly modulovat procesy na všech úrovních (fyziologické, buněčné a molekulární).



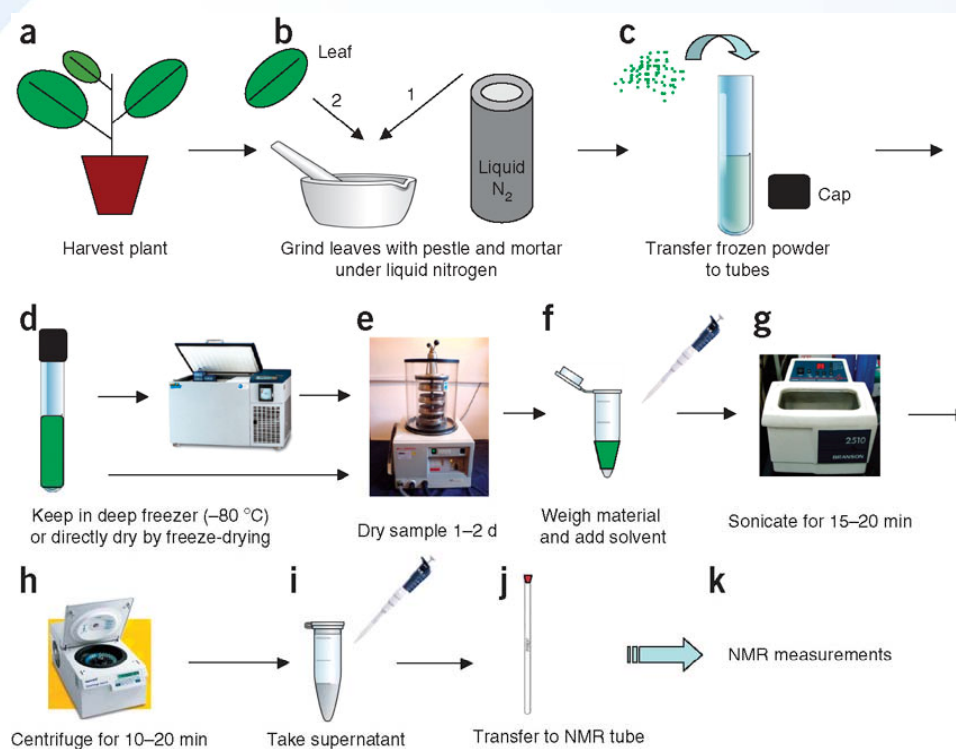


METODY STUDIA METABOLOMU



Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí

Stanovení metabolitů



Kultivace → Vzorkování →
Extrakce → Derivatizace
→ Zakoncentrování (SP(M)E)
→ Separace (GC, LC, CE)
→ Analýza (NMR, MS, DAD, FTICR)
→ Vyhodnocení
→ Statistická analýza



Metabolit x Matrice (vzorek)

Matrice:

krev (rozpuštěné proteiny, lipidy, soli, sacharidy, suspendované buňky)

plasma (centrifugací oddělené jen buňky (heparin, EDTA)

sérum (oddělené buňky a srážecí proteiny, cca 5%)

moč (soli, močovina, metabolity ve volné formě)

mléko (lipidy, proteiny, sacharidy)

tkáně (buňky, proteiny, lipidy, sacharidy)

dechový kondenzát (voda, částice)

sliny (99% voda, dále enzymy, soli, glykoproteiny)

Analyt:

nízkomolekulární látka

nízká a variabilní koncentrace v přítomnosti komplexní matrice

volná forma nebo vázané na proteiny (glucuronid, sulfát)

velká fyzikálně chemická variabilita



PŘÍPRAVA VZORKU



Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí

EXTRAKCE

Zastavení buněčného metabolismu (t=s)

Vzorkovací technika (tkáň, extracelulární médium)

Uvolnění analytu (homogenizace, rozbití, odstranění buněk)

Odstranění makromolekul, homogenizačního roztoku

Přečištění, zakoncentrování (SPE, LLE)

Derivatizace

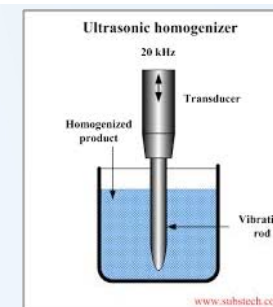
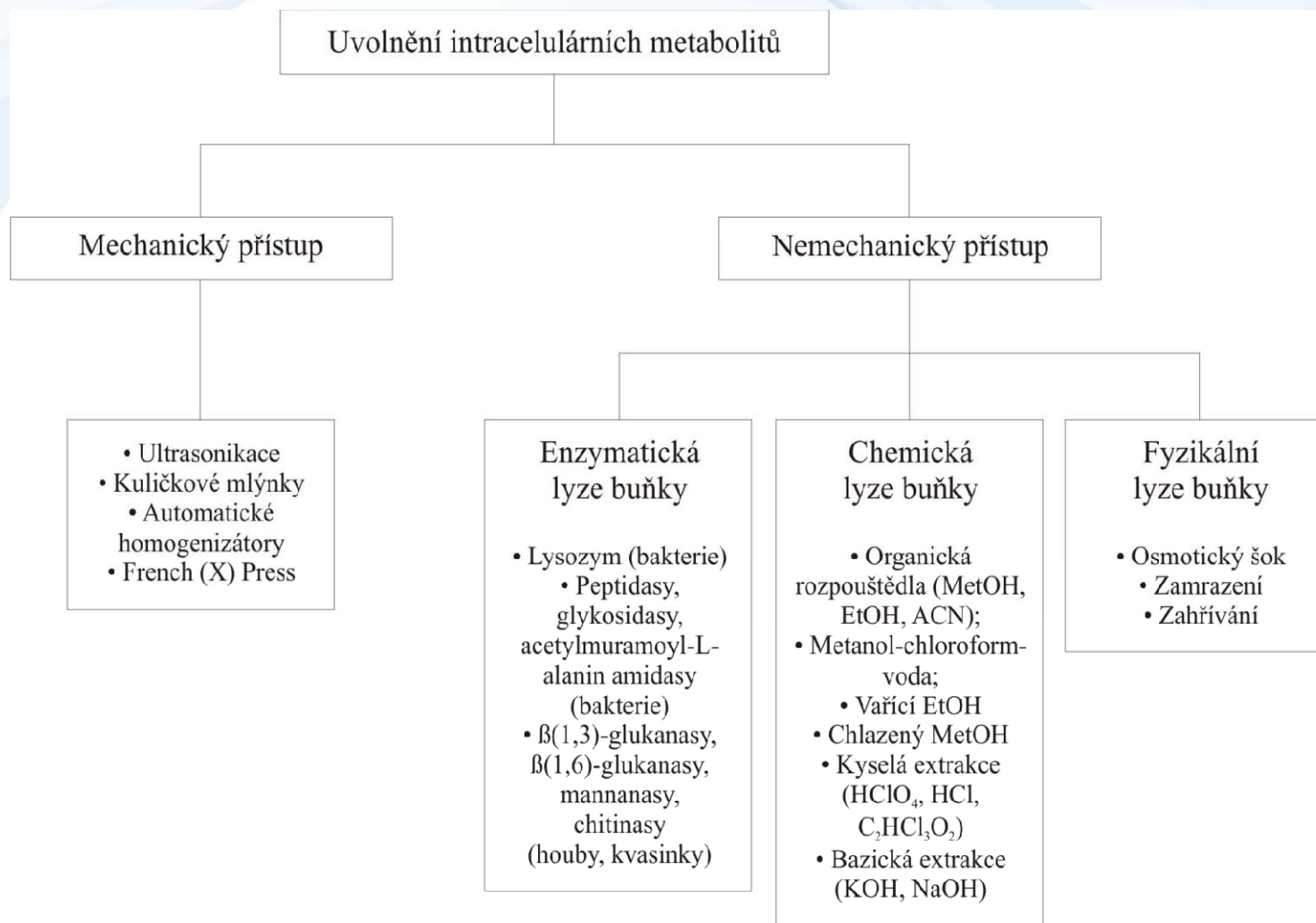
Výměna rozpouštědel

Separace (LC, CE, GC)

80% celkového času celkové analýzy



Homogenizace



Odstranění matrice

Odstranění **makromolekul**

- Klíčové je odstranění zejména peptidů/proteinů a lipidů
- Proteiny
 - Srážení
 - Hydrolýza (6N HCl, teplota, enzymaticky, mikrovlnná extrakce)
 - Ultrafiltrace
 - Centrifugace
- Lipidy
 - Gelová permeační chromatografie

Odstranění homogenizačního roztoku

- Lyofilizace
- Sušárna



Přečištění - Zakoncentrování

LLE - *extrakce kapalina-kapalina*



extrakce širokého množství látek, jednoduchá

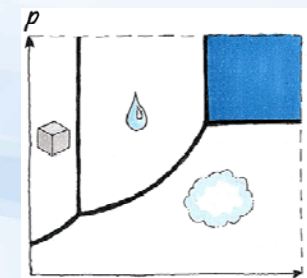


časová náročnost, variabilní výtěžnost, spotřeba materiálu

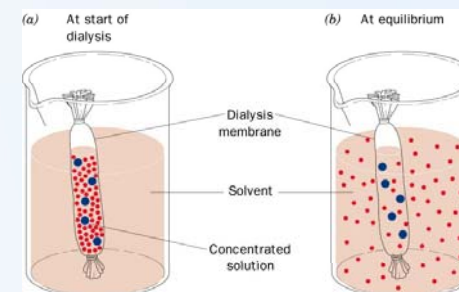


SFE - *superkritická fluidní extrakce*

CO₂ v nadkritickém stavu, kapalina s vlastnostmi plynu (viskozita, difuze)

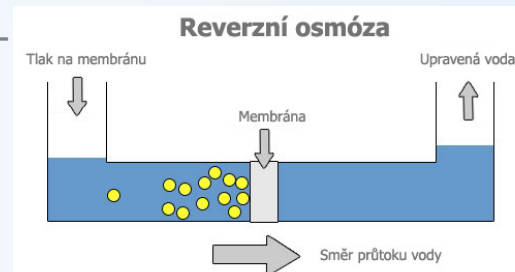


(Elektro)dialýza - *koncentrační rozdíl nebo rozdíl el. potenciálu na polopropustné membráně*



Reverzní osmoza, ultrafiltrace - *využití hydrostatického tlaku*

TLC – *tenkovrstvá kapalinová chromatografie* – *využití separace tříd lipidů před MALDI-MS*



Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí

Přečištění – Zakoncentrování: SPE

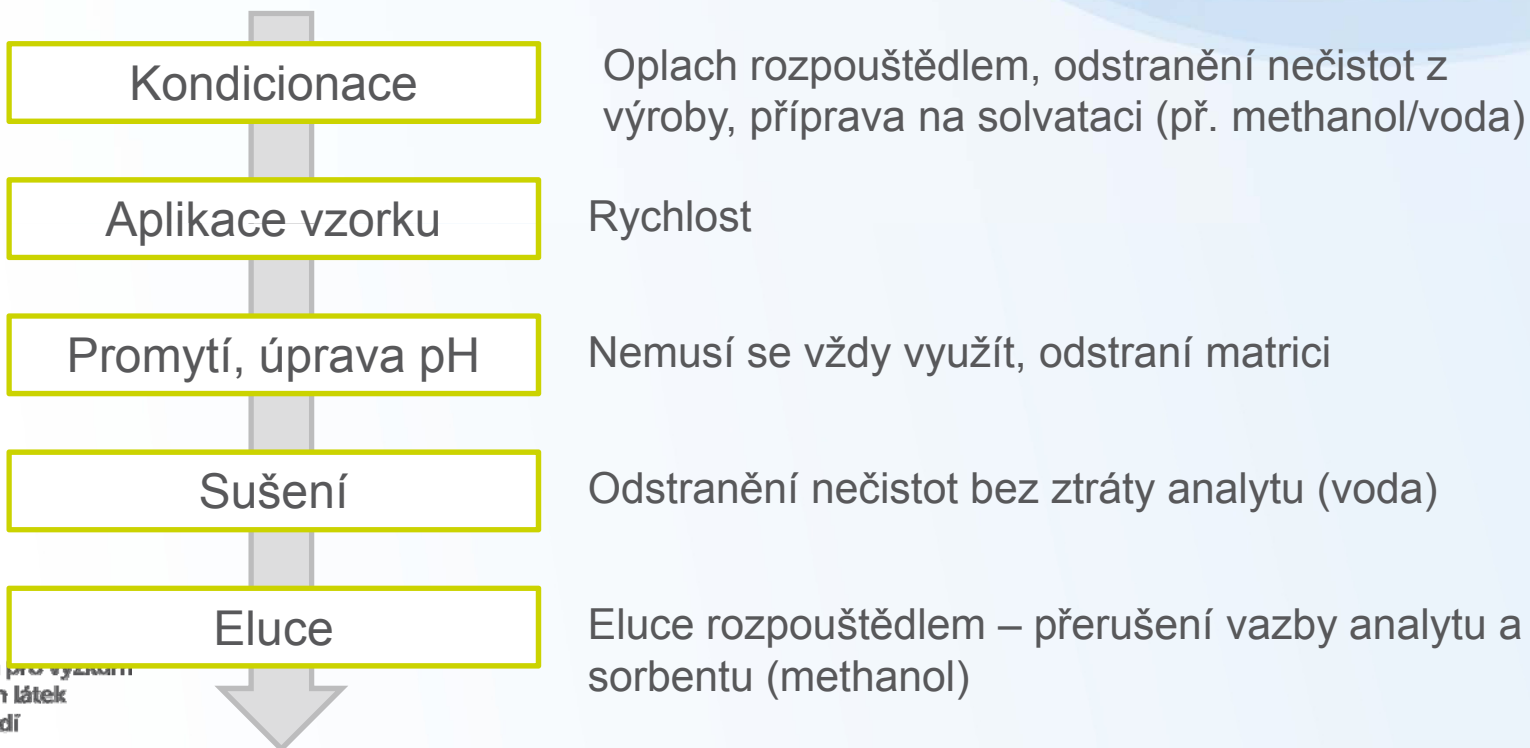
SPE - *extrakce na tuhé fázi* – často užívaná metoda (!)



selektivita, automatizace, reprodukovatelnost, časová nenáročnost, malá spotřeba rozpouštědel, miniaturizace, odsolení, výměna rozpouštědel, zakoncentrování, možnost frakcionace



různá kvalita sorbentu, ztráty analytu sorbcí nebo předčasnou elucí při promytí, horší reprodukovatelnost mezi laboratořemi, kolonky na jedno použití



Přečištění - Zakoncentrování: SPE

SPE výběr kolony (objem vzorku, vlastnosti matrice a analytu)

Nepolární interakce:

- **Reverzní fáze**, na pevné fázi navázány uhlovodíkové řetězce (C18, Ph, CN)
- Analyty - protonované nebo neutrální molekuly, aromáty, alifatické řetězce
- Eluce - nepolární až středně polární rozpouštědla

Polární interakce:

- **Normální fáze**, pevná fáze (silikagel) s modifikacemi
- Analyty - aminy, alkoholy, fenoly, karboxylové kyseliny, aromatické uhlovodíky, heterosloučeniny
- Eluce - středně polární až polární rozpouštědla

Iontově výměnné:

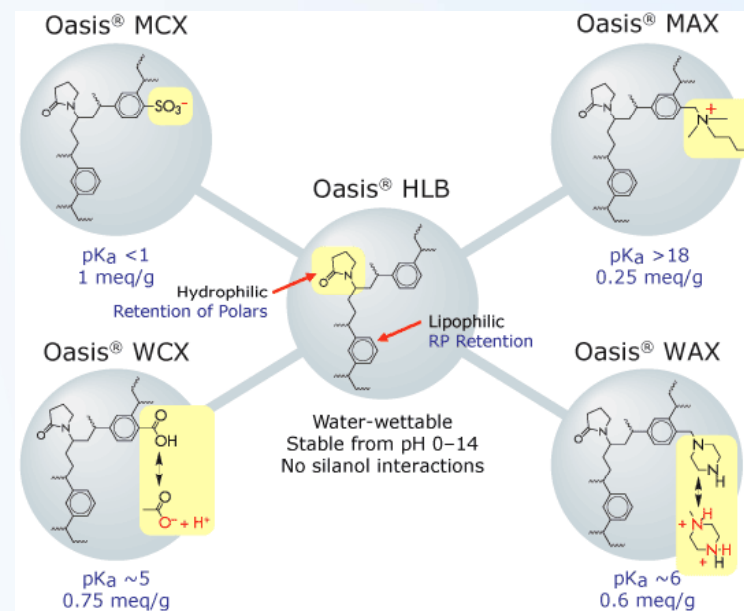
- Nabitý povrch částice (alkylsulfonáty, tetraalkylamoniová sůl)
- Analyty-organické kyseliny, mastné kyseliny
- Eluce – změna pH

Afinitní interakce:

- Imobilizovaný ligand (protilátky) reagující s analytem
- Analyty – léčiva, potravinářství

Mix interakcí:

- Reverzní fáze se silnými/slabými kationtově/aniontově výměnnými skupinami

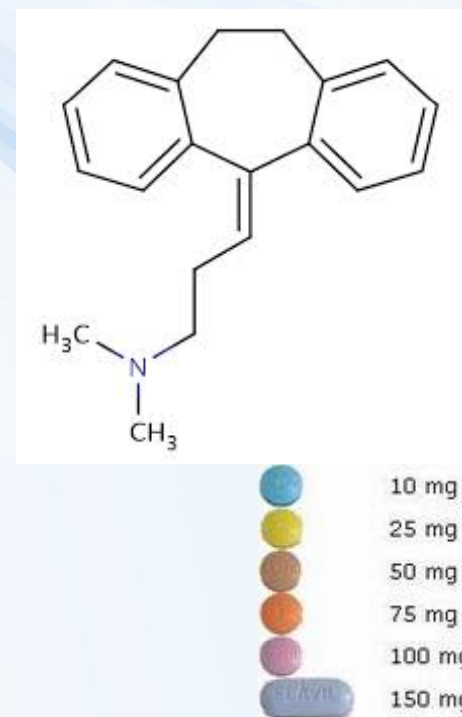


Extrakce



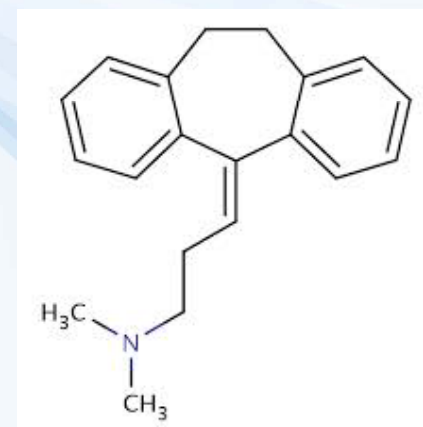
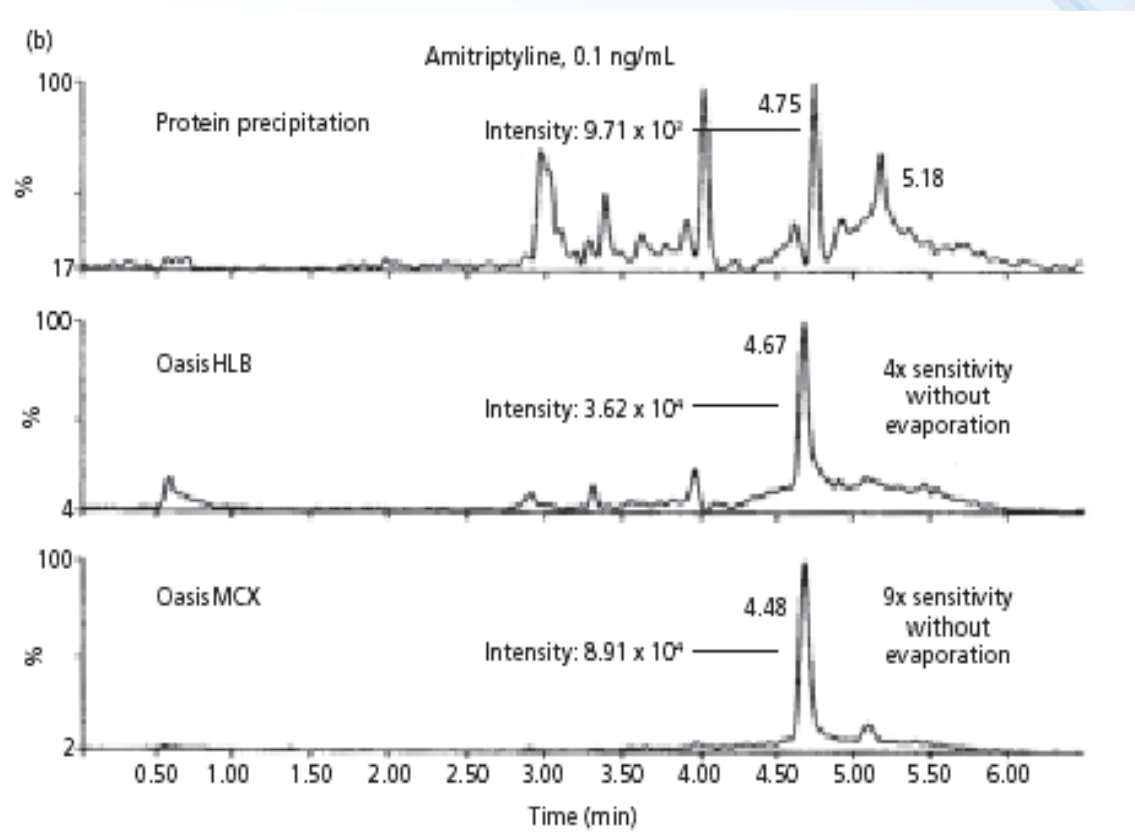
Extrakce – vliv extrakčního postupu na analýzu - příklad

Amitriptyline (antidepressivum, pKa 9.4, solubility 9.7 mg/L) v plasmě



Extrakce – vliv extrakčního postupu na analýzu - příklad

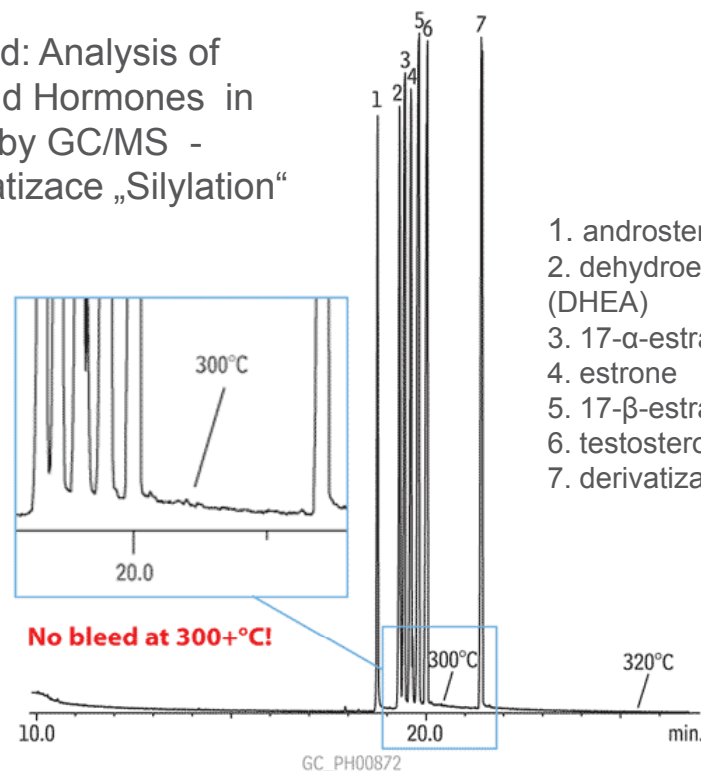
Amitriptyline (antidepresivum, pK_a 9.4, solubility 9.7 mg/L) v plasmě



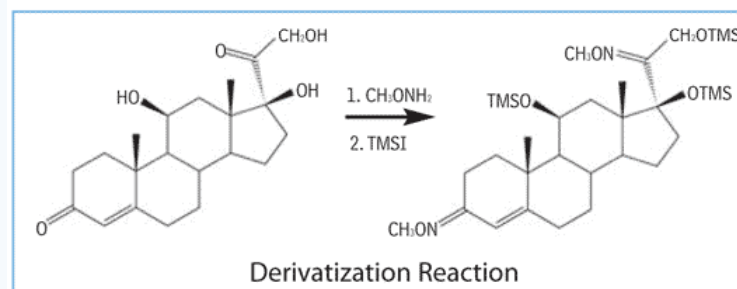
Derivatizace

- nezbytná pro GC
- stabilizuje molekuly
- vnáší chromo/elektrofory do molekuly analytu
- mění polární látky na více lipofilní
- zvyšuje sensitivitu signálu v MS

Příklad: Analysis of Steroid Hormones in urine by GC/MS - derivatizace „Silylation“



1. androsterone
2. dehydroepiandrosterone (DHEA)
3. 17- α -estradiol
4. estrone
5. 17- β -estradiol
6. testosterone
7. derivatization by-product



Více : Hanbook of sample preparation (2010) ISBN 978-0-470-09934-6



Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí

SEPARACE A ANALÝZA

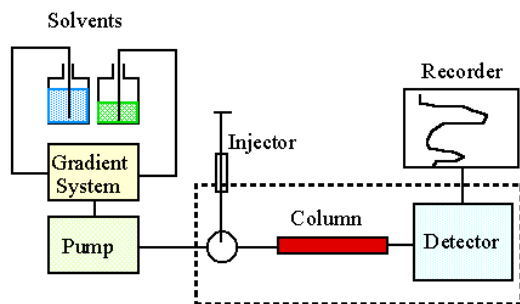


Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí

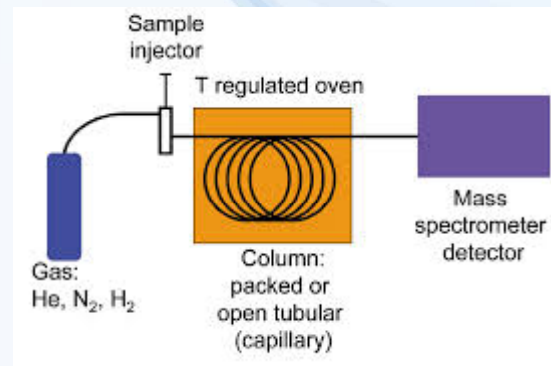
Separace

Chromatografie - dělení látek ze směsi mezi stacionární a mobilní fází

oddělí i isomery (různá struktura), isobary (různé molekuly)



Uspořádání
HPLC



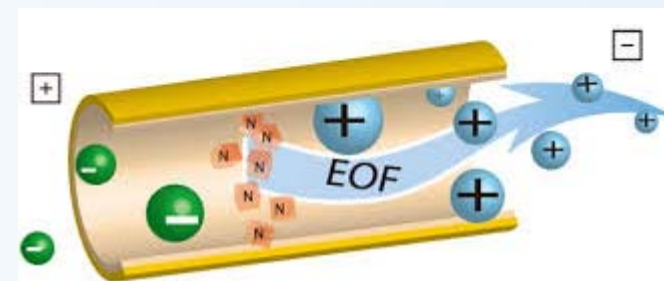
Uspořádání
GC

Elektroforéza - dělení na základě pohyblivosti nabitého analytu nebo micel v elektrickém poli (CZE, MEKC)

vhodné pro látky s nábojem

např. pro organické kys., nukleotidy,

měření obsahu látek v malém objemu



Separace

Mobilní fáze

- plyn
- kapalina
- gradient vs isokratika

Stacionární fáze

- Náboj – ionex
- Hydrofobicita – reverzní fáze, normální fáze, HILIC
- Biospecifická afinita – afinitní kolona
- Velikost a tvar molekuly – gelová kolona (sephadex, sepharoza)

tR retenční čas látky zdržující se v systému

tM retenční čas látky, která se pohybuje spolu s MF

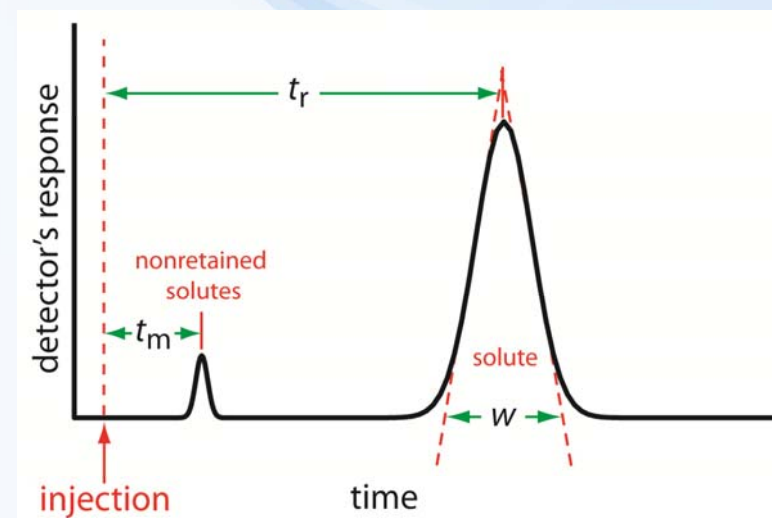
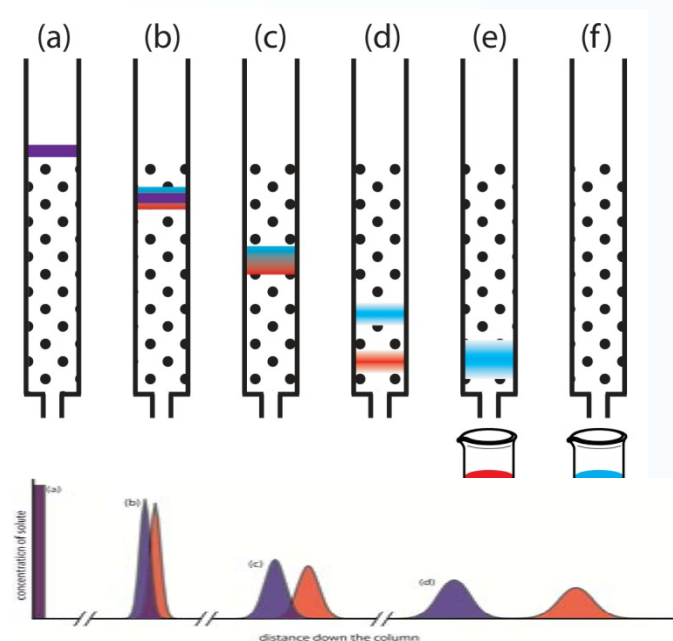
FM objem mobilní fáze za čas

VM mrtvý objem ($FM \cdot tM$)



LC - separace

Princip kapalinové chromatografie:



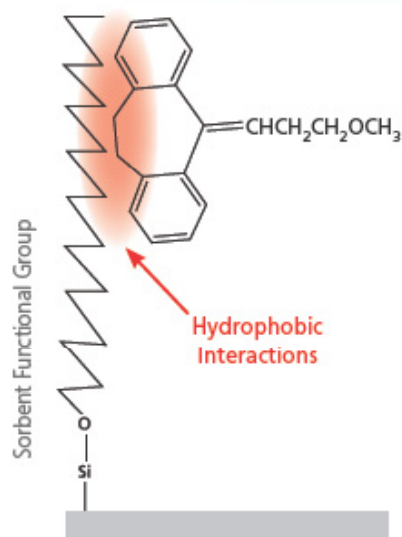
LC - separace

Stacionární fáze

- podobné principy s SPE
- U chromatografie je materiál homogenní, malé částice
- Opakované použití (vs SPE – single use only)

Reverzní fáze:

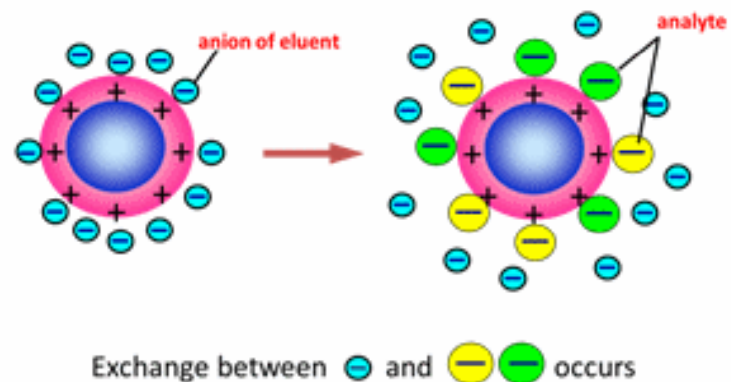
hydrofobní povrch; eluce zvýšením hydrofobicity, nejvyužívanější stacionární fáze



Ionex:

kationt-aniont exchange; eluce zvýšením iontové síly, změna pH

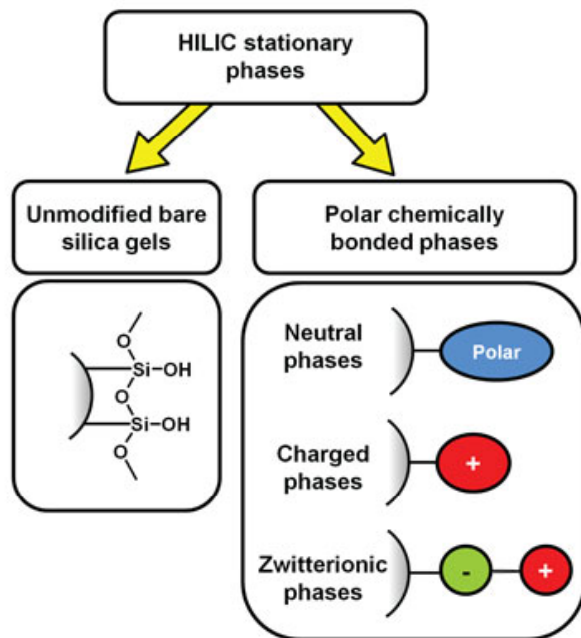
Ion exchange chromatography (eg. Anion exchange)



LC - separace

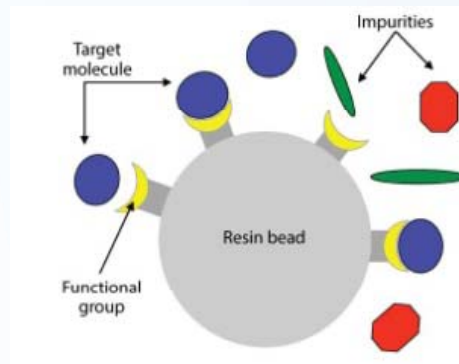
HILIC, NP kolona:

Hydrofilní polymery nebo silikagel s různými polymery, eluce zvýšeným podílem vody (př. analytu AK, sacharidy)



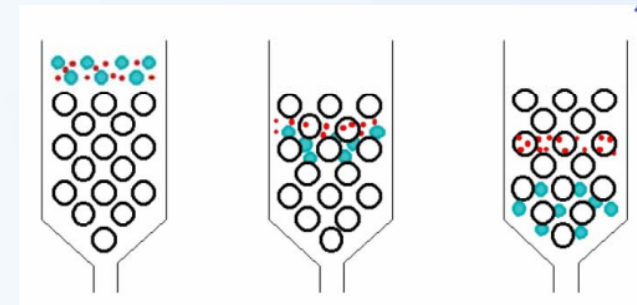
Afinitní kolona:

Specifický povrch; biochemické interakce, eluce nízkým pH, vyšší koncentrace soli, často v sérii s další kolonou



Gelová kolona:

Nálož tvoří silikagel nebo polymery, velké molekuly obtečou, malé se zdrží difúzí v pórech.



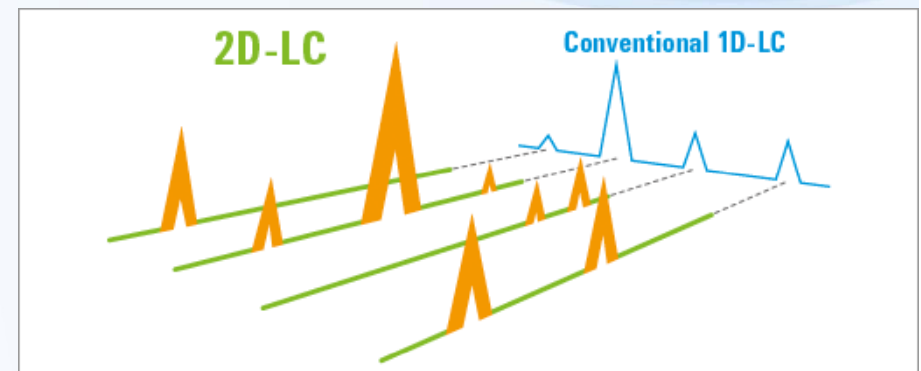
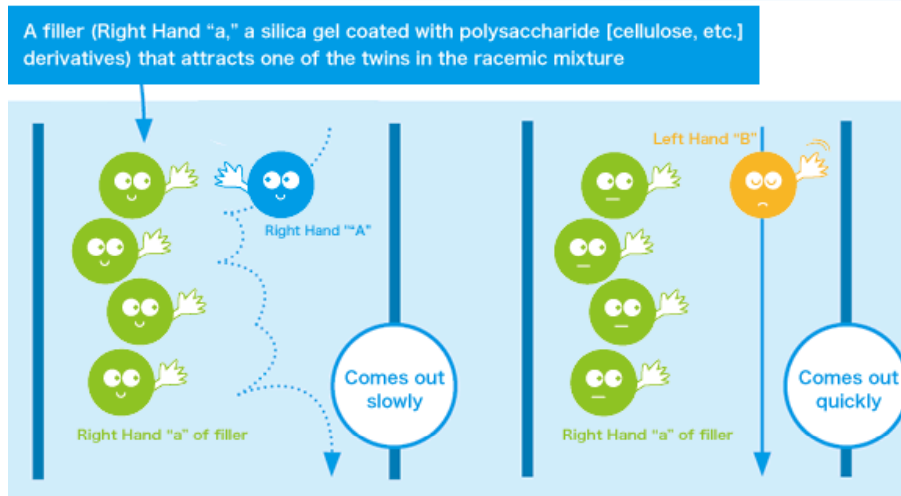
LC - separace

Chirální kolona:

Separuje enantiomery, využití například ve farmakologii

Využití více kolon:

Například 2D - LC uspořádání iontově výměnné a reverzní fáze (využití např. v proteomice)



GC – separace

MF: inertní plyn, N₂, Ar, He, CO₂, isokratika (konst. teplota plynu), gradient (teplotní gradient)

SF: kolonky (Al, Cu, Ni, sklo), 1-5 m s adsorbenty (silikagel, alumina, active carbon)

Analyt: těkavá a teplotně stabilní látka, často nutná derivatizace, nízký limit detekce

Ve spojení s MS v posledních letech velmi využívaná v metabolomice

→ knihovny hmotnostních spekter

(u LC – různá spektra za různých podmínek: tvorba knihoven omezená)

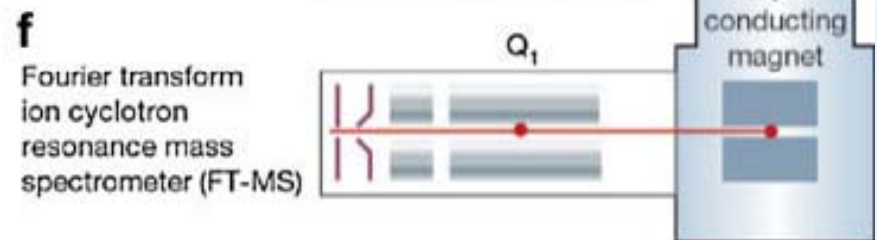
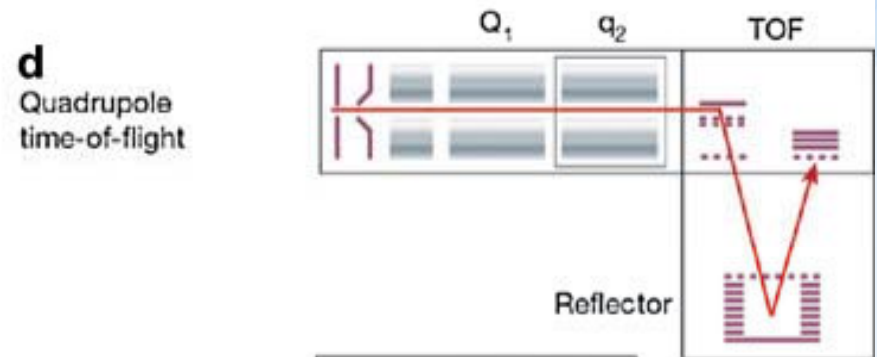
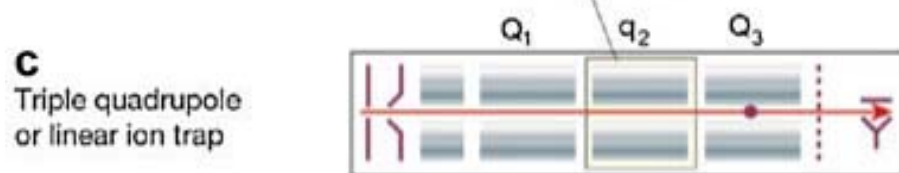
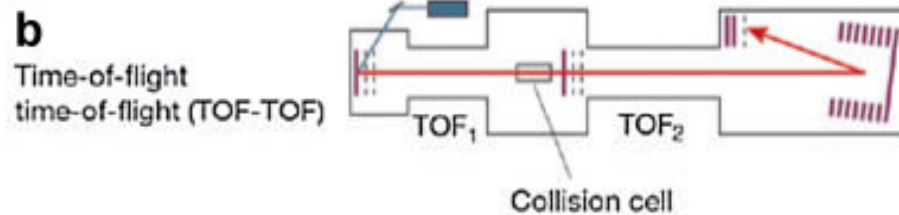
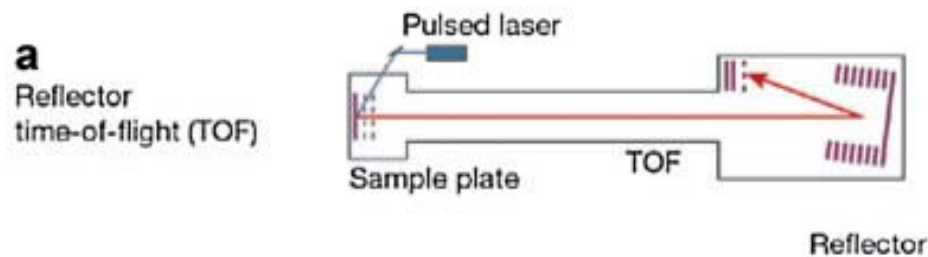
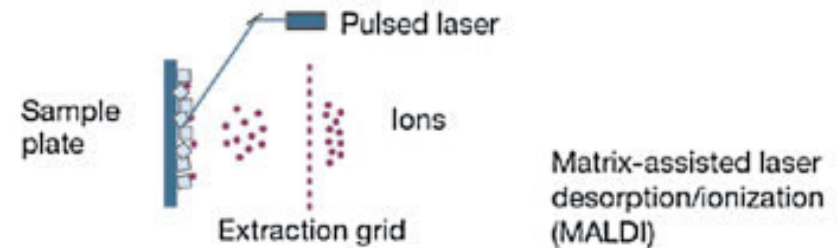
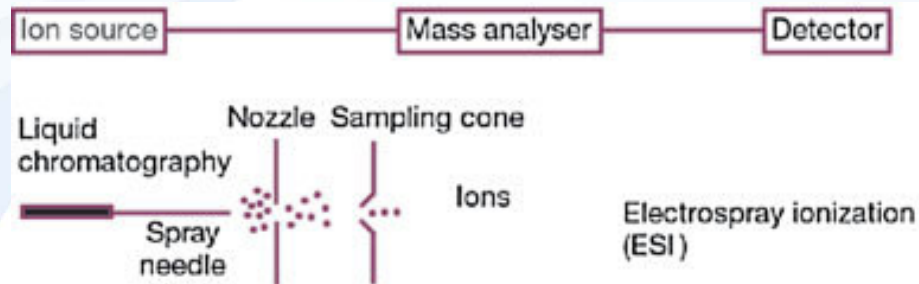


Analyzátory - Detektory

- fotometrický detektor
 - absorpce fotonů **chromoforem** (metabolity s dvojitými vazbami, aromatické sloučeniny, některé heteroatomy)
- fluorescenční detektor
 - **emise fotonů** z „excitovaných molekul“ (PAH a jejich deriváty, nebo metabolity po konjugaci – vnesení fluoroforu)
- elektrochemický detektor
 - změna elektrické veličiny **po elektrochemické reakci látky v cele detektoru** s elektrodami (látky lehce oxidovatelné, redukovatelné, fenoly, aromatické aminy, peroxidy, merkaptany, ketony, aldehydy, konjugované nitrily, aromatické halogenované sloučeniny)



Analyzátory – Detektory – Hmotnostní detekce



Analyzátory – Detektory – Hmotnostní detekce

Vznik iontů (zdroje iontů)

PI fotoionizace

EI elektronová ionizace - malé nepolární molekuly, spojení s GC

ESI elektrosprej – spojení s CE, LC

DESI desorpce elektrosprejem

APCI chemická ionizace

APPI fotoionizace UV zářením - hydrofobní látky – steroidy

MALDI desorpce a ionizace laserem za nebo bez účasti matrice

Analyzátory

TOF

napětí urychluje ionty, m/z malé, t krátký, vhodné pro analýzy směsí, ve spojení s MALDI identifikace proteinů, vysokorozlišovací

OrbiTrap

ionty oscilují v elektrostatickém poli a vytváří zaznamatelný proud úměrný jejich m/z , vysokorozlišovací

Kvadrupoly

změna radiofrekvenčního pole na elektrodách vytváří filtr pro dané m/z , ty se dělí v prostoru, omezený hmotnostní rozsah

Lineární a sférické iontové pasti

podobu s kvadrupoly, ionty zakoncentrovány a izolovány v čase

Principy MS analyzátorů - separace iontů dle jejich doby letu, zakřivení dráhy letu, oscilací, frekvencí cyklického pohybu a to v elektrických, elektromagnetických a nebo magnetických polích

→ **konečná detekce** – řada principů (měření hodnoty iontového proudu, detekce emitovaných částic-scintilace, elektronové násobiče, fotonásobiče), softwarové zpracování → **vyhodnocení**

Analyzátoři – detektory

NMR - Nukleární magnetická rezonance

Zlatý standard $^1\text{H-NMR}$

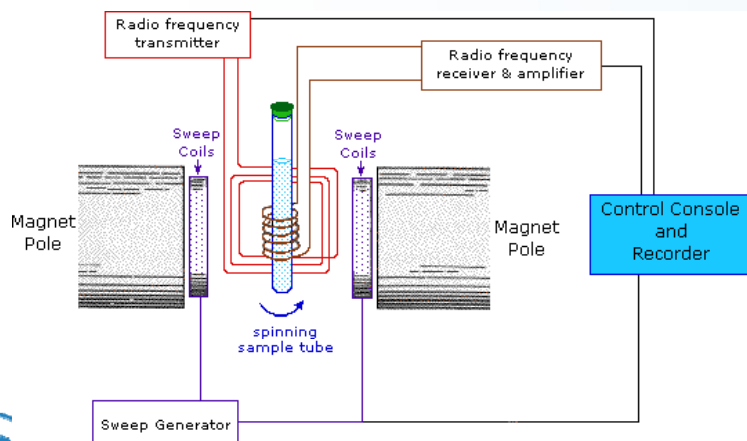
sleduje odezvy jader s nenulovým magnetickým momentem v silném magnetickém poli a jejich interakci s vysokofrekvenčním elektromagnetickým vlněním



nedestruktivní technika • minimální příprava vzorku před analýzou • snadná identifikace neznámých sloučenin • možnost měření in vivo • kvantifikovatelná • nevyžaduje derivatizaci



vyšší požadavky na množství vzorku • nízká citlivost



toxických látek
v prostředí

FTICR – Iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací

ionty v cele v silném magnetickém poli se pohybují v cyklech s frekvencí úměrnou jejich m/z , záznam frekvence se převádí FR na hmotnostní spektrum

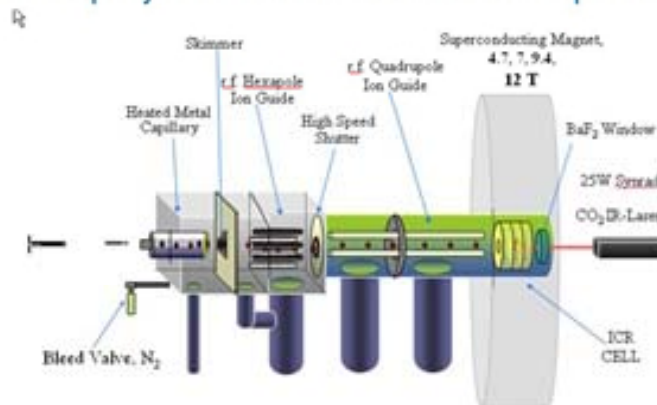


ultracitlivá MS • spektra s nejvyšším rozlišením a přesností • identifikace tisícovek metabolitů bez předchozí separace



nárok na prostor a vakuum • vysoká cena

Electrospray Ionization FT-ICR Mass Spectrometer



Analyzátoary

zobrazovací techniky

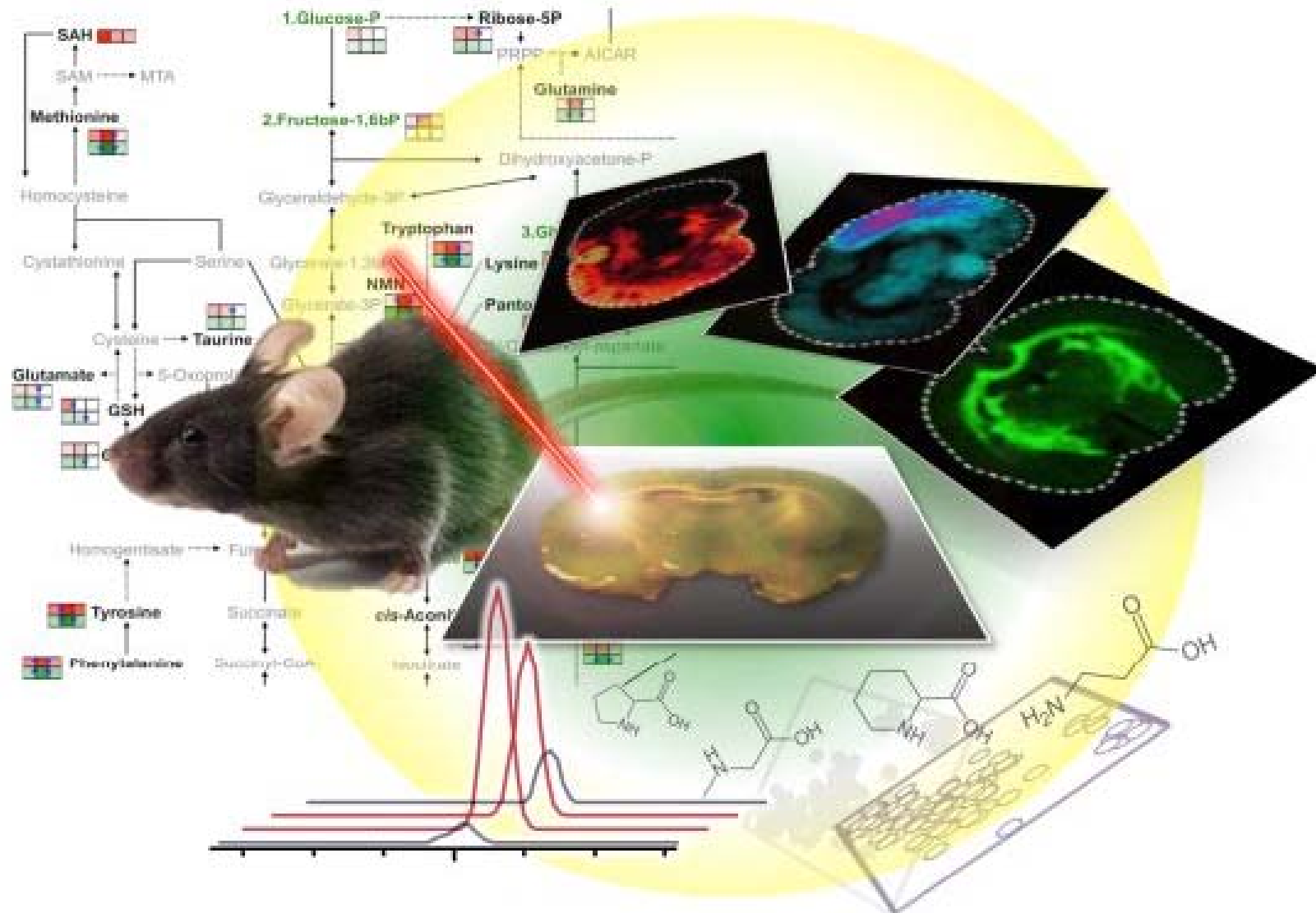
MSI – hmotnostně spektrometrické zobrazování

(Farmacie, medicína, hledání biomarkerů, objasnění biochemických pochodů)

Zobrazovací techniky	detekce	Info o molekulách
<i>(Optická mikroskopie)</i>	<i>(procházející “viditelné” záření)</i>	<i>(barvení: chemické reakce např. s proteiny ...)</i>
Elektronová mikroskopie	elektronů	Jen prvková analýza
Rentgenová spektroskopie	rentgen. záření	Jen prvková analýza
Autoradiografie	fotonů (IR)	Funkční skupiny
Pozitronová emisní tomografie	γ -záření	Značené molekuly
Fluorescenční mikroskopie	fotonů (UV, VIS)	Značené molekuly
Hmotnostní spektrometrie (MALDI, DESI-MSI)	(an)organické ionty	Ano



MSI



Imunoanalýza (immunoassays)

Reakce antigenu s protilátkou, kdy enzymově značené (ALP, HRP) nebo radioaktivně značené (^{125}I) antigeny nebo protilátky se měří pomocí fluorescence/absorbance/chemiluminiscence po reakci dodaného substrátu s enzymem (nebo v případě radioaktivního značení měřením scintilace).

Analyt:

steroidy, hormony, (glyko)lipidy, peptidy, sekundární metabolity

Protilátky polyklonální:

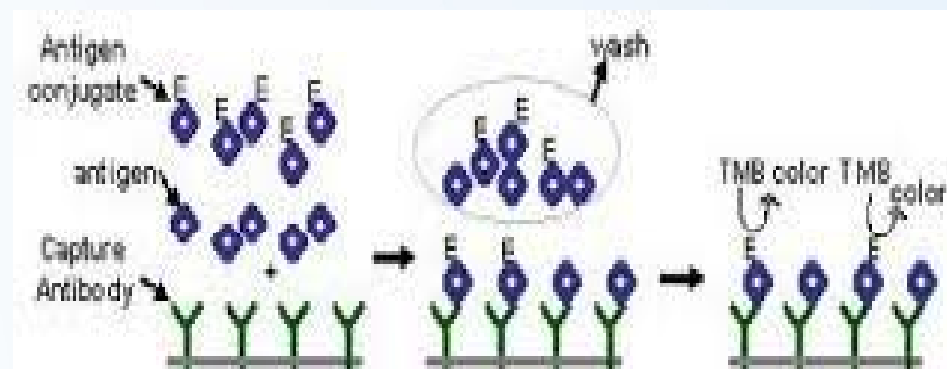
po imunizaci zvířete, protilátky proti různým epitopům, silná afinita

Protilátky monoklonální:

produkce buněčnými liniemi, proti jednomu epitopu, možná krosreaktivita

Kompetitivní EIA, RIA

(enzyme) radioimmunoassay

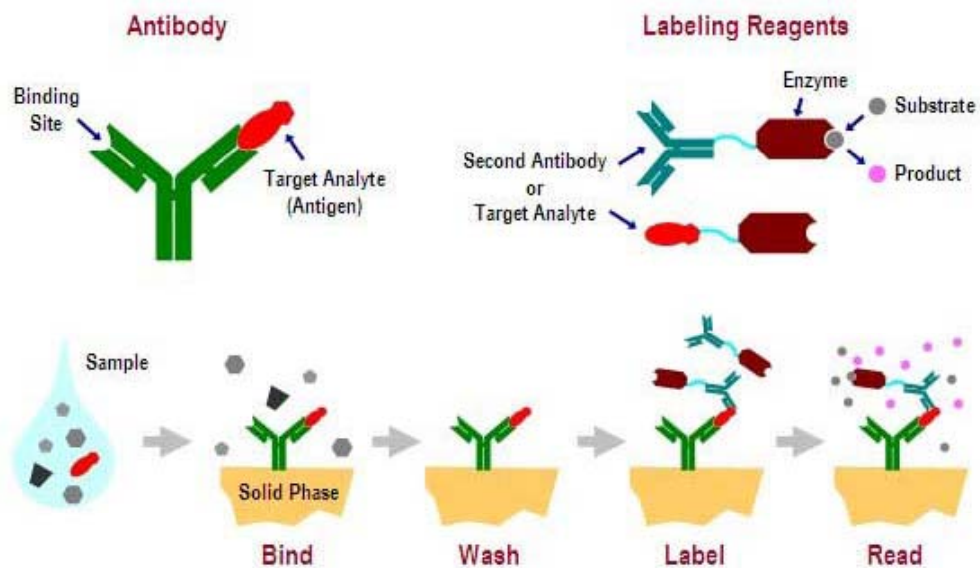


Imunoanalýza (immunoassays)

ELISA

Enzyme-linked immunosorbent assay

ELISA



Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí

Praktické poznámky, validace

Výběr vhodného blanku:

Kontrolní vzorek: čistá voda nebo arteficiální „tkáň“ (voda z „čisté“ lokality), rozpouštědlo (zjištění kontaminace během procesu), instrumentální blank (chování vzorku během analýzy, opakované měření mezi vzorky)

Výběr vhodné metody extrakce a analýzy:

Selektivita: schopnost nalézt a kvantifikovat analyt v matrici

Accuracy a Precision: měření známé koncentrace analytu v replikátu

Spike recovery: zjištění změny známé koncentrace analytu (surrogate standard) způsobené procesem extrakce, analýzy

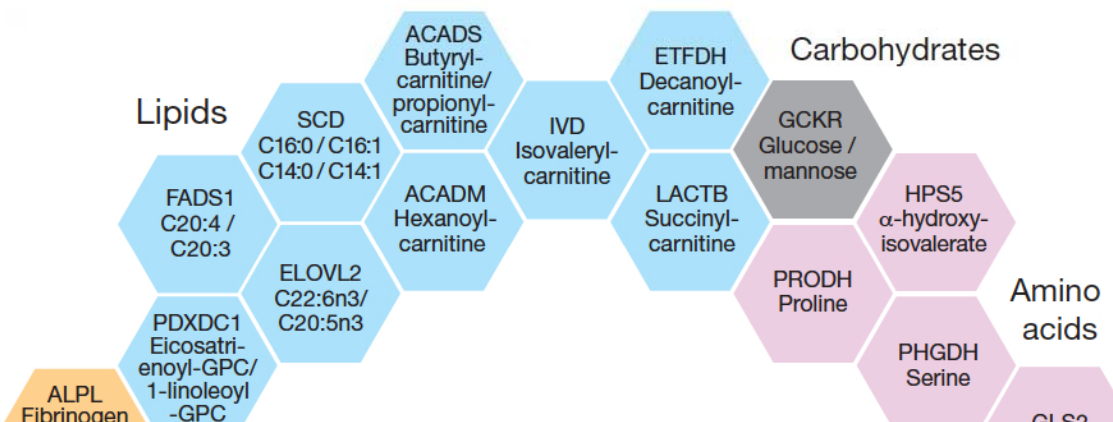
Kvantifikace:

Vhodná detekce (MS, DAD, ECD)

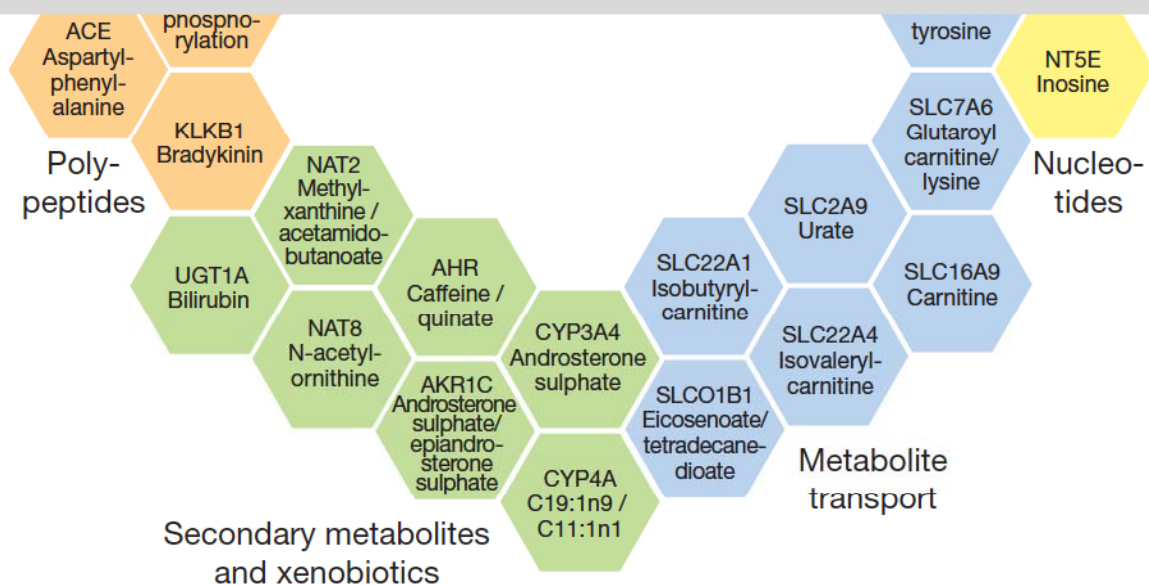
Kalibrace: interní, externí standard v čisté matrici nebo rozpouštědle

Snížení vlivu matrice: nízký nástřik, přítomný interní standard, standardní přídavek





Příklady stanovení metabolitů (př. – peptidy a lipidy)



Analýza metabolitů – thioly (příklad)

Stanovení thiolu

Stanovení GSH/GSSG (cytosol) a CyS/CySS (plasma), antioxidanty, chrání peptid před oxidací vratným navázáním na cystein

- Homogenizace-redukce S=S z peptidu (DTT)-srážení proteinů kyselinou-konjugace-SH skupiny (NEM, DTNB, DansylCl, IAA)- chromatografie-MS, spektrofotometrie, fluorometrie, elektrochemická detekce
- ELISA
- **Příklad stanovení volného GSH a GSSG ve tkáni**

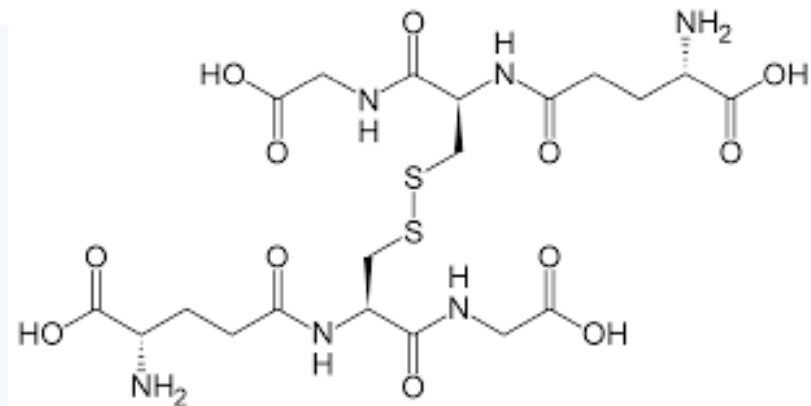
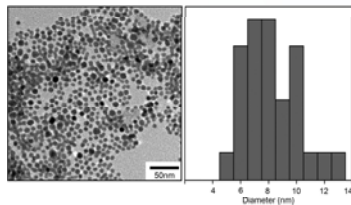
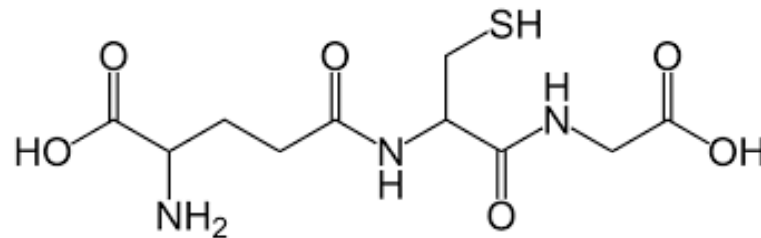


Modelový příklad – výzkumná studie

Vliv nanončástic Cd po respirační expozici u myší

- Expozice v izolovaných klecích 13 týdnů
- 5x Kontroly (K), dvě rostoucí “dávky” NPs (5x D1, 5x D2)
- Vyhodnocení fyziologických a toxikologických parametrů

Jedním z analytů – GSH / GSSG



Modelový příklad – výzkumná studie

1. Ukončení experimentu: na co dát pozor?

- VZORKOVÁNÍ

- Organizace odběrů

- 3 skupiny, zpracovávat “současně” (ne nejprve “K”, pak D1...)

- Typ orgánů-tkání pro analýzu

- Respirační cesta → primárně plíce, pak ostatní orgány

- Rychlost zpracování

- Velká rychlost nutná ! Malé molekuly - rychlý turnover

- Celý orgán ihned do tekutého dusíku

- Udržování a transport

- Stále v mraženém stavu



Modelový příklad – výzkumná studie

Zpracování vzorku – na co dát pozor ?

- **HOMOGENIZACE**

- Odběr části (aliquoty)
 - zmrzlá tkáň plic
 - vážení – hmotnost - orgánu
- Přidání homogenizačního roztoku
 - Kontrola pH – vodný **puf**r (GSH-GSSG dobře rozpustné ve vodě)
 - Teplota – chlazený (!)
- Homogenizace
 - Např. skleněné kuličky, vysokorychlostní třepání
 - Stálé chlazení, 2x 20s

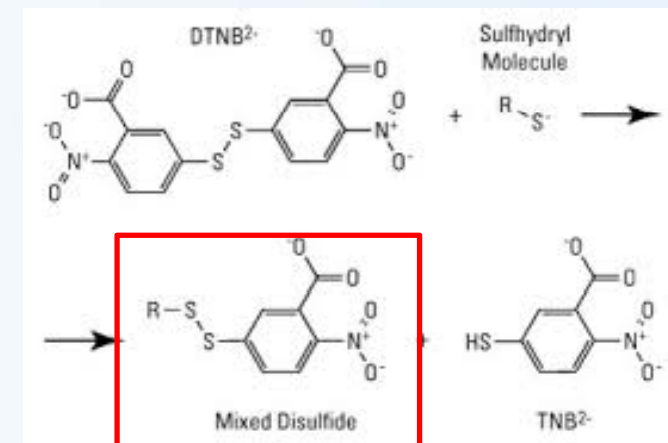
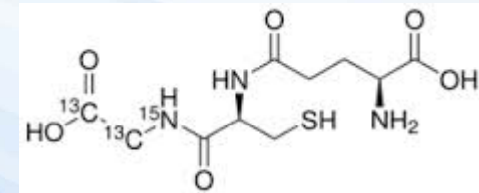


Modelový příklad – výzkumná studie

- Další úpravy vzorku – na co dát pozor ?

- Další kroky

- Vhodné pH
 - Zajištěno alkalickým pufrům (použit již pro extrakci)
- V jednom kroku
 - Přidání INTERNÍ STANDARD (13C 15N glutathione)
 - Přidání konjugačního činidla: blokování reaktivních –SH skupin (DTNB)
 - Inkubace □ konjugace (při T-lab)
- Vysrážení proteinů (znovu chlazení)
 - Přidání SSA (kys. sulfosalicylová)
 - Inkubace - srážení
- Centrifugace (chlazení) → supernatant
- Ředění mobilní fází LC (chlazení)
 - snížení “velmi vysoké” koncentrace (vysoké koncentrace i při malé navážce)
 - menší vliv matrice v analýze
- Zamražení -80°C – uchování k analýze

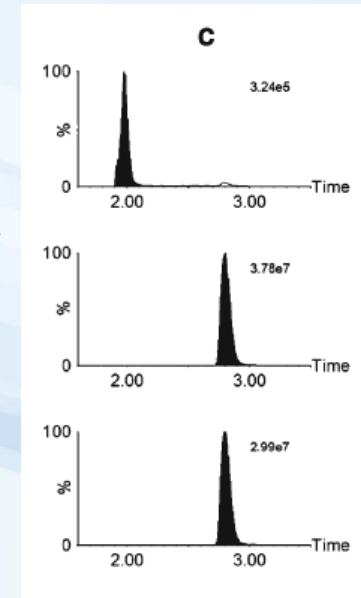


Modelový příklad – výzkumná studie

Analýza

- Důležité body
 - Typ separace – LC
 - Výběr kolony
 - Modifikovaná C18 (analyty jsou polární)
 - Detekce
 - Možná např. Elektrochemická (reakce na -SH)
 - Možná i UV-VIS (detekce konjugátu GSH-DTNB, ne! GSSG)
 - Využití hmotnostní detekce
 - Vlastní analýza
 - Detekce GSH-DTNB, ^{13}C - ^{15}N -GSH-DTNB, GSSG
 - Vyhodnocení → koncentrace v tkáních

Fig. 2 Representative LC MS/MS chromatograms: three figures in rows show GSSG (row 1), GSH (row 2), and GSH (I.S.) (row 3). Columns show a blank with GSH (I.S.), b a mixture of standards 0.02 μM GSSG and 0.02 μM GSH with GSH (I.S.), c extract of a lung tissue with GSH (I.S.): control sample from the chronic toxicity study after 5 weeks of exposure



Modelový příklad – výzkumná studie

Vyhodnocení

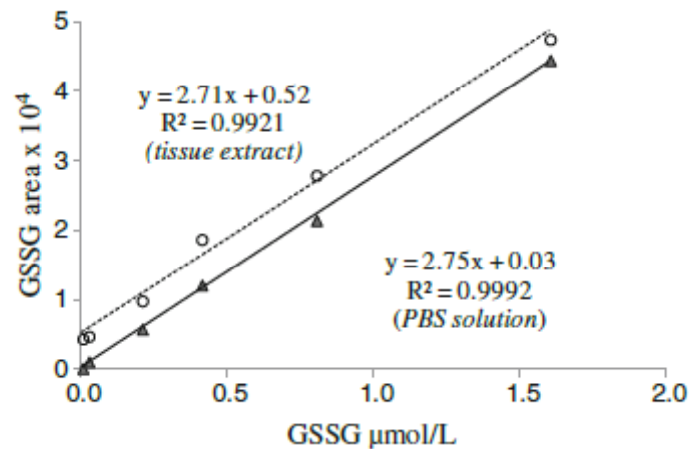
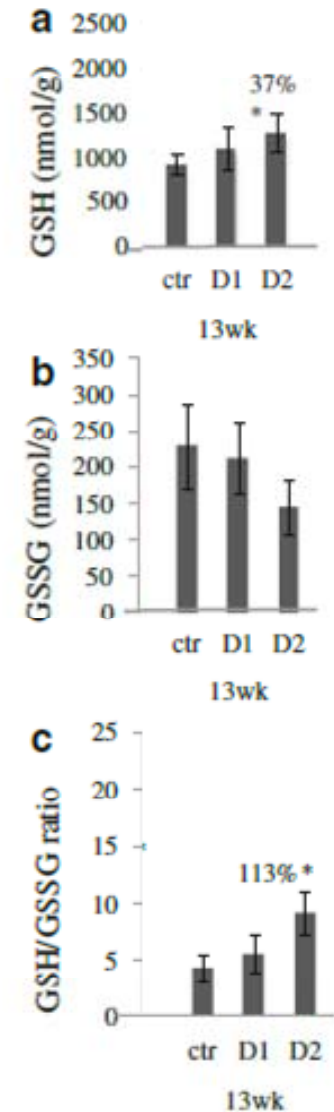
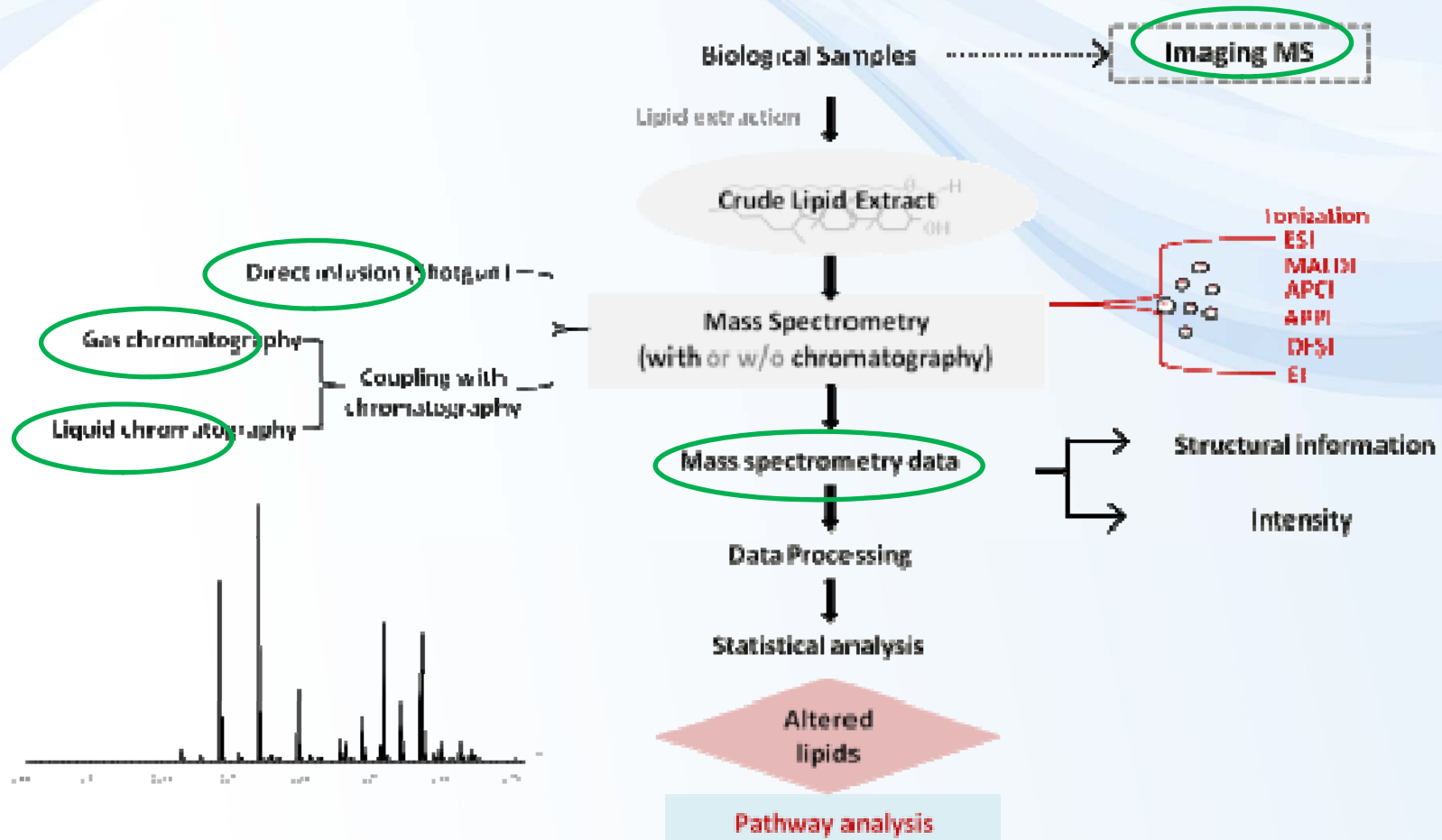


Fig. 3 Evaluation of matrix effects in LC MS/MS method for GSSG. Calibrations of GSSG (peak area vs concentration) prepared in PBS (triangles) and in the extract of lung tissue (circles). All samples were processed using the same protocol

Fig. 6 Content of GSH (a), content of GSSG (b), and GSH/GSSG ratio (c) in lung of mice after chronic exposure (1–13 weeks) to CdO nanoparticles at dose 1 (D1) and dose 2 (D2). Numbers with asterisk (*) in the graph indicate significant differences compared to the control variant within the respective week ($p < 0.05$; $N = 5$ animals)



Analýza metabolitů – lipidy

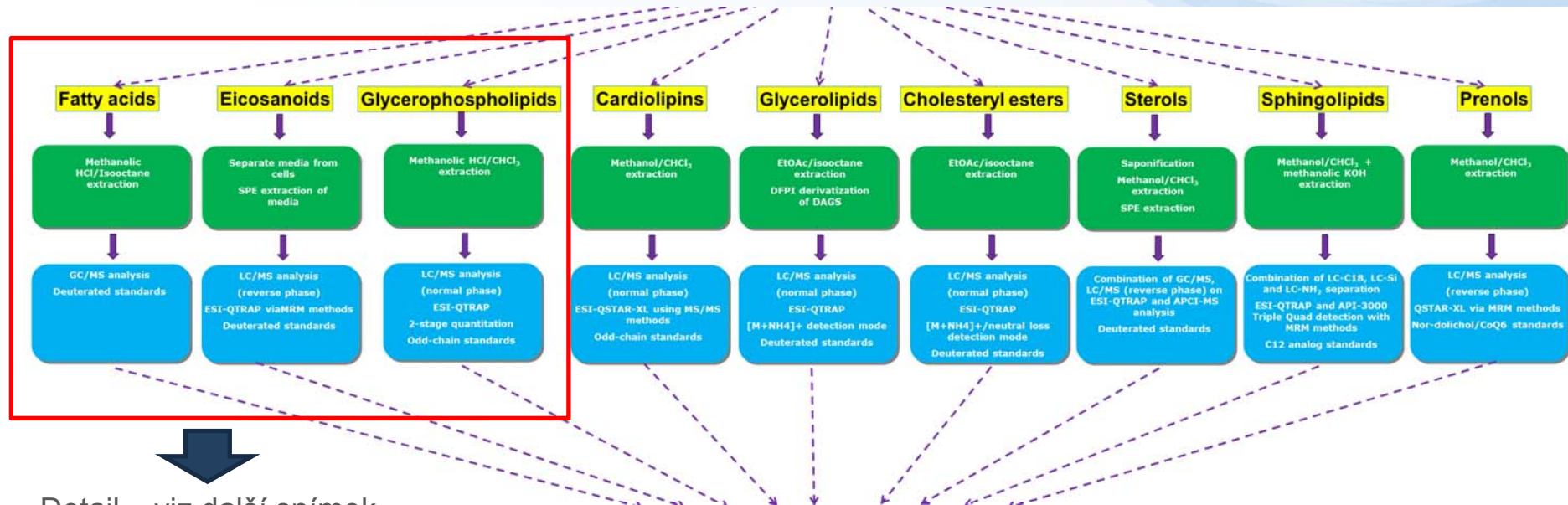


Analýza metabolitů – lipidy

Extrakce: různá pro různě polární lipidy, aditiva podporující rozpustnost, antioxidanty, práce ve skle, N₂, -80°C, využití interních standardů

Analýza: „Shotgun“ MS (bez separace), UHPLC MS, SFC MS

Extrakt, tkáň



Detail – viz další snímek

Bioinformatika (korekce dat, analýza dat-PCA, vizualizace, interpretace)



Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí

Fatty acids

Methanolic
HCl/Isooctane
extraction

GC/MS analysis
Deuterated standards

Eicosanoids

Separate media from
cells
SPE extraction of
media

LC/MS analysis
(reverse phase)
ESI-QTRAP viaMRM methods
Deuterated standards

Glycerophospholipids

Methanolic HCl/CHCl₃
extraction

LC/MS analysis
(normal phase)
ESI-QTRAP
2-stage quantitation
Odd-chain standards



Shrnutí

- Student(ka) by měl(a) znát
 - Co jsou to metabolity? Jaké existují typy a skupiny?
 - Jaké jsou klíčové kroky v jejich analýze?
Principy metod separace a detekce
 - U vybrané látky navrhnout a diskutovat přístup k analýze z biologického vzorku

