



Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí

STUDIUM ÚČINKŮ – metabolity

Analýza malých molekul v (eko)toxikologii

Lucie Bláhová, MU, RECETOX

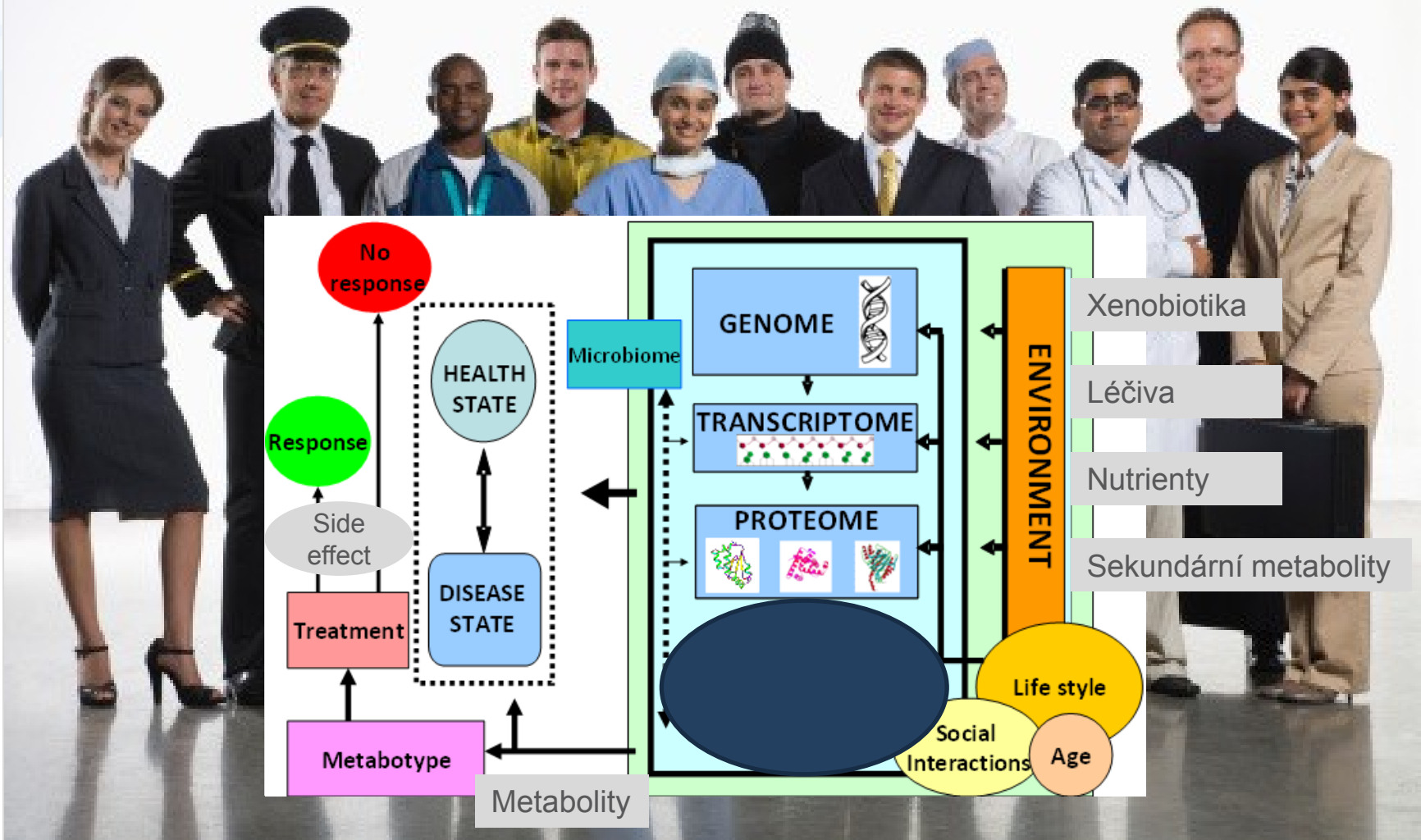
Schéma přednášky

- Metabolity a metabolomika
- Přírodní látky
- Význam vybraných metabolitů a přírodních látek

- Metody stanovení
 - Extrakce → Separace → Detekce

- Příklady
 - Thioly (GSH)
 - Analýza lipidů

Metabolity: část systémové biologie



Metabolism a malé molekuly



http://biosantee.com/yahoo_site_admin/assets/images/Fotolia_5028090_XS1.320213857_std.jpg

Bio/Pharma



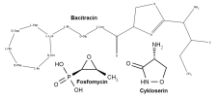
Life Sciences



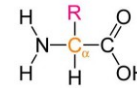
Clinical/Diagnostics



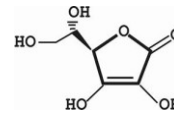
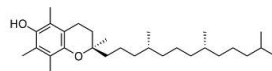
Environment



Small Molecule Profiling



Forensics/Toxicology



Petrochemicals



Agriculture

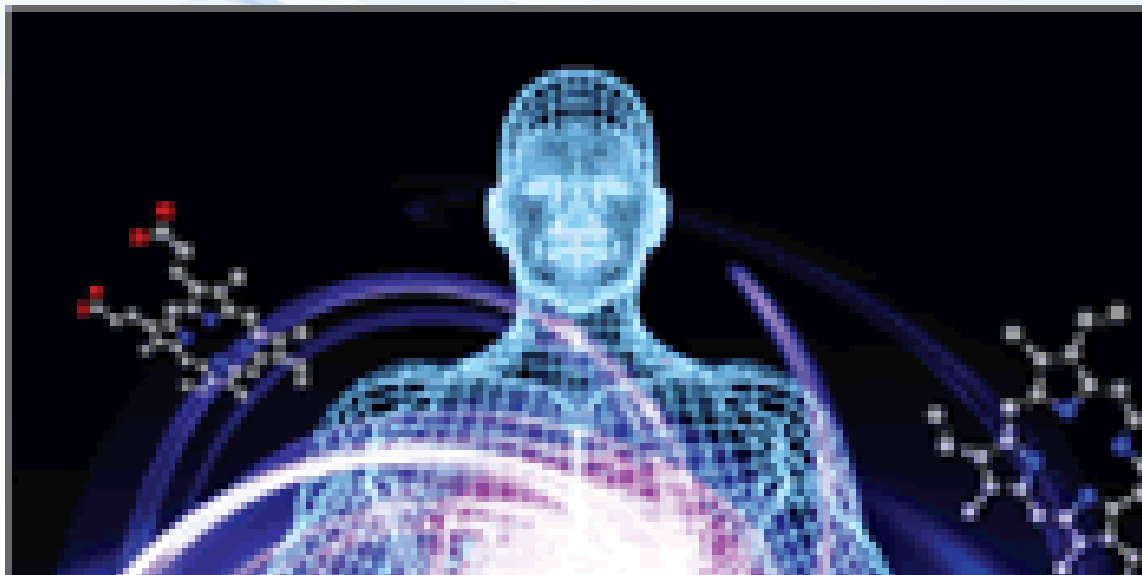


Nutrition

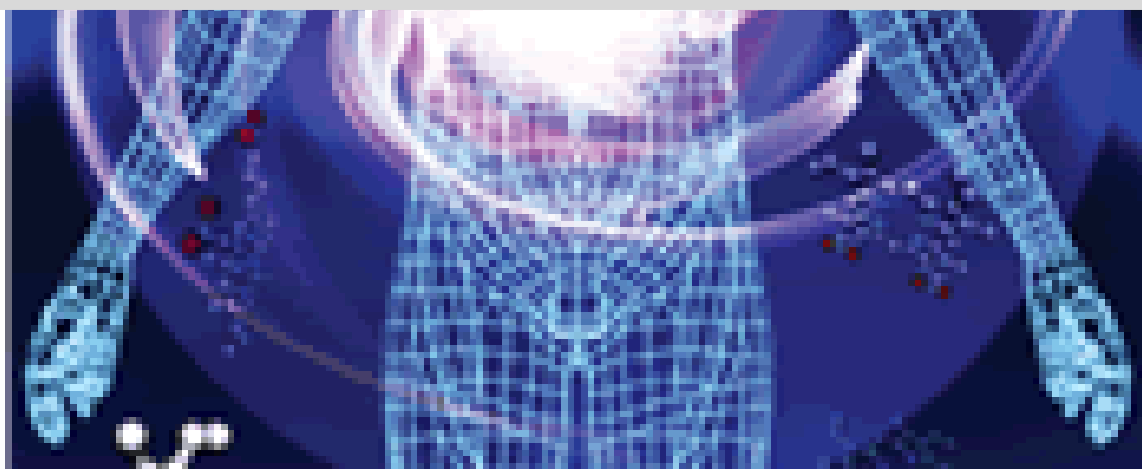


Consumer





METABOLOMIKA



METABOLOM

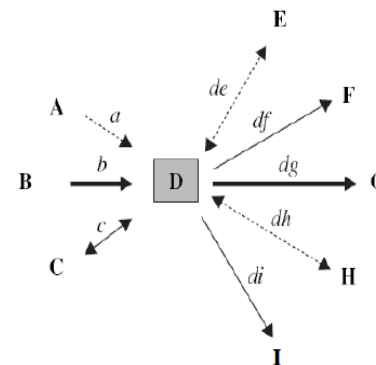
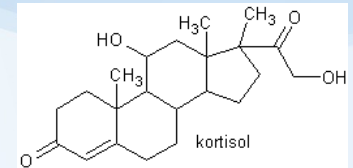
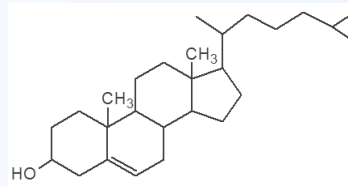
Metabolit

- 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

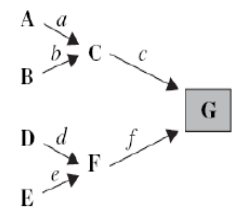
Metabolom

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

Příklad:
cholesterol (prekurzor)- kortisol (metabolit)
steroidní hormon - řízení metabolismu živin



Primární metabolismus

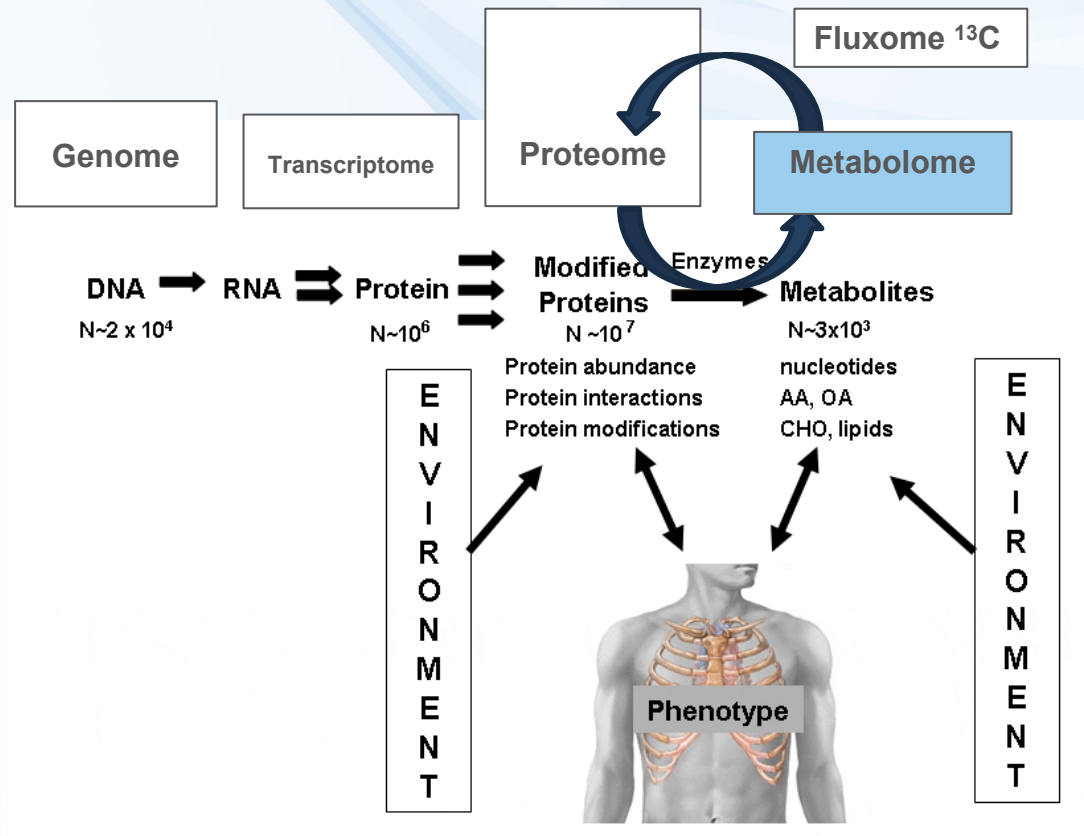


Sekundární metabolismus

METABOLOM – proč?

Využití metabolomu?

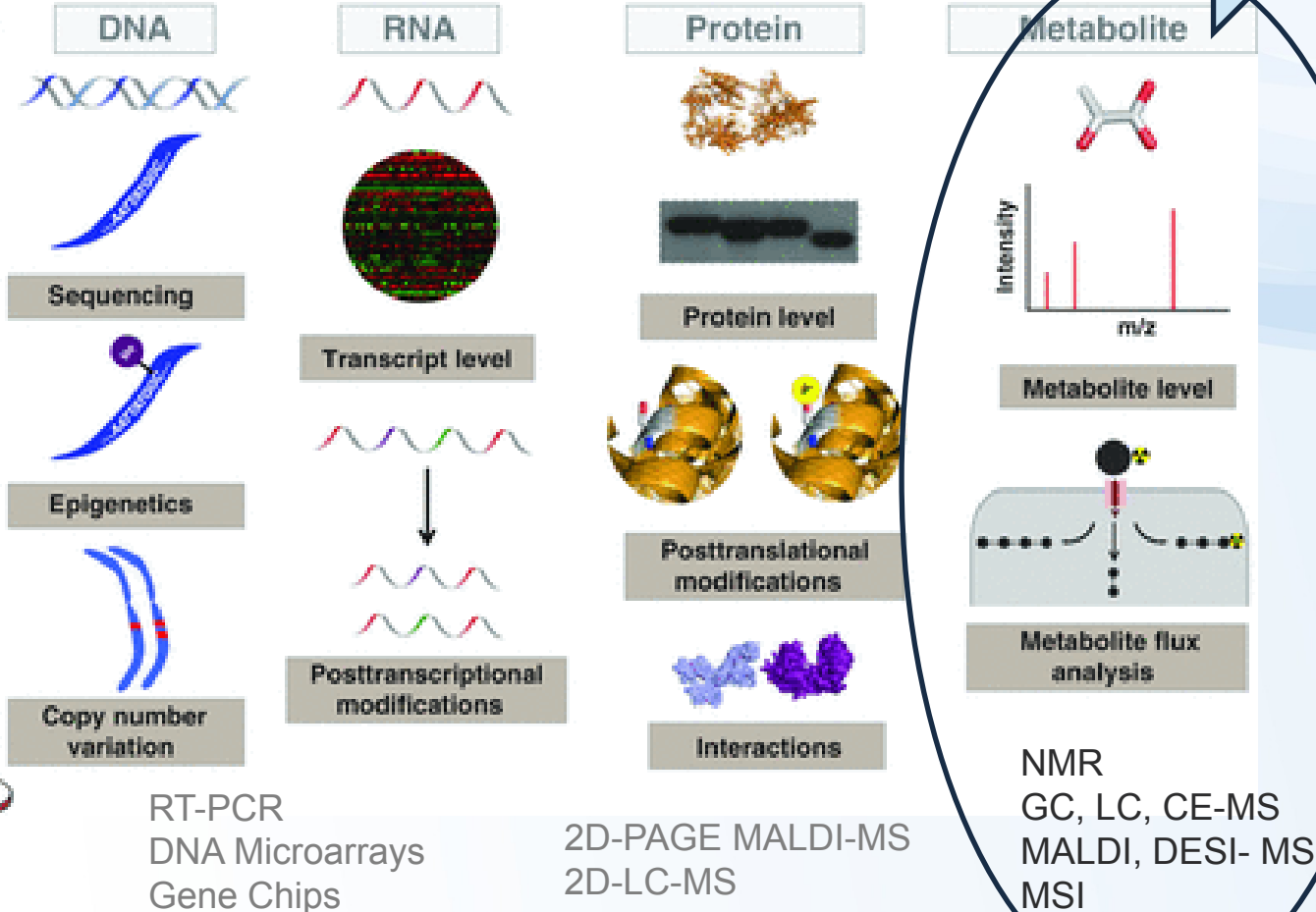
- Množství metabolitů obecně nižší než počet genů a proteinů v buňce (*S. cerevisiae* – 600 metabolitů MW <300 z 6000 genů)
 - Výjimkou sekundární metabolity – např. rostliny
- Analýzy časově méně náročné
 - ve srovnání s analýzou velkých makromolekul
- Změny v hladinách metabolitů
 - při nezměněné koncentraci enzymu
 - násobně vyšší než změny exprese nebo koncentrace proteinů
 - dány nejen úrovní exprese, ale i environmentálními vlivy, stádiem vývoje organismu, biol. cykly, aj.



METABOLOM – jak?

Klesá počet analyzovaných molekul

Roste chemická komplexnost analyzovaných sloučenin



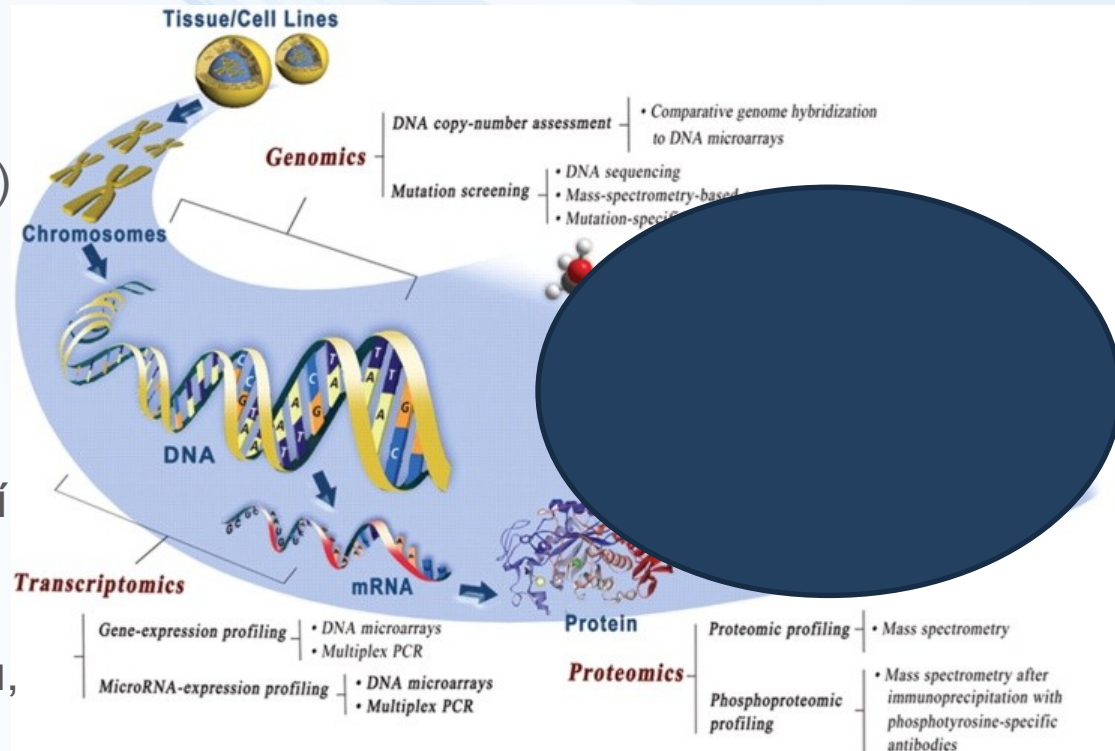
METABOLOMIKA

Metabolomika:

Kvantitativní i kvalitativní studium metabolitů <1000 Da (metabolomu) látkové přeměny živých systémů

Využití:

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



METABOLOMIKA - přístupy



METABOLOMIKA - přístupy

Metabolite target analysis:

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

Metabolic profiling:

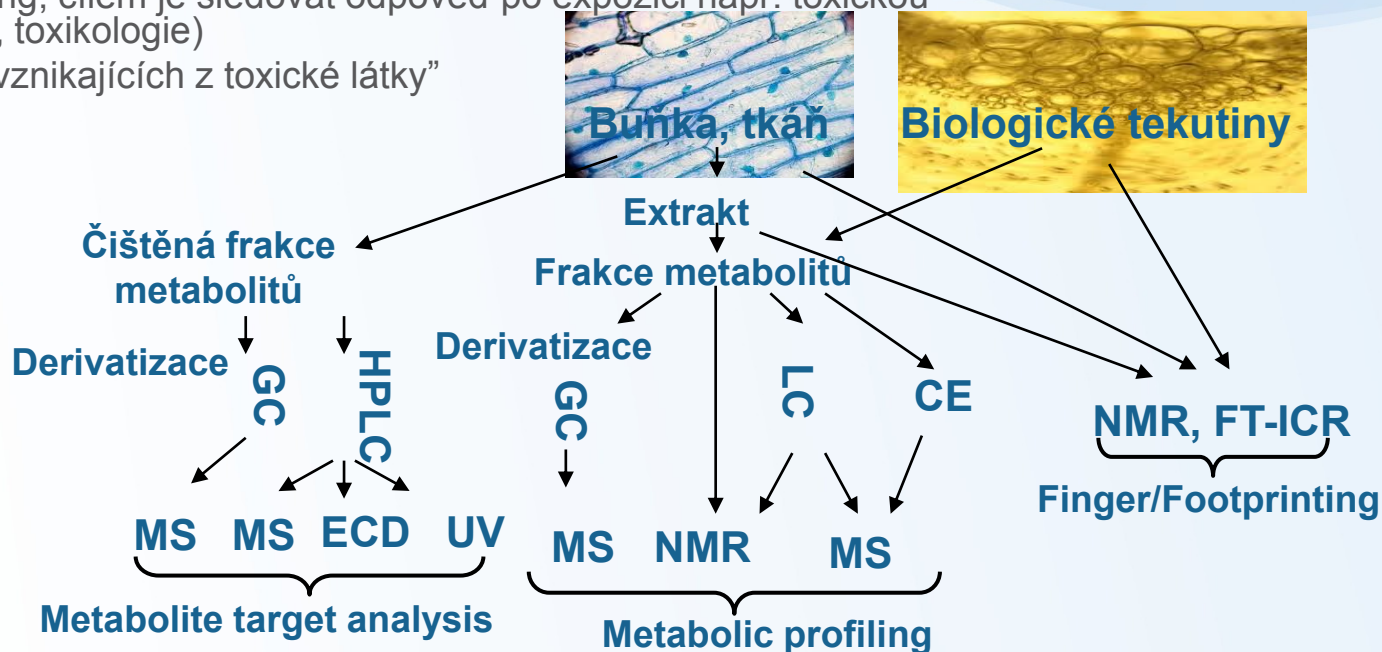
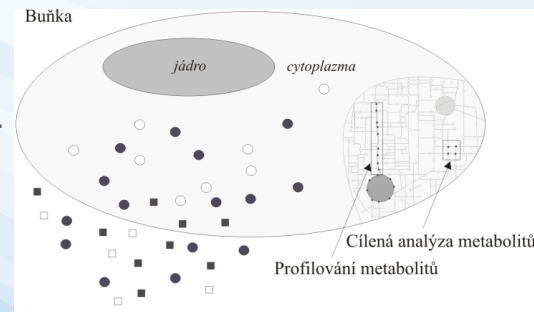
- semikvantitativní analýza více metabolitů s podobnými vlastnostmi (např. polární lipidy, isoprenoidy, sacharidy)

Untarget metabolomic (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)
- analýza “metabolitů vznikajících z toxické látky”



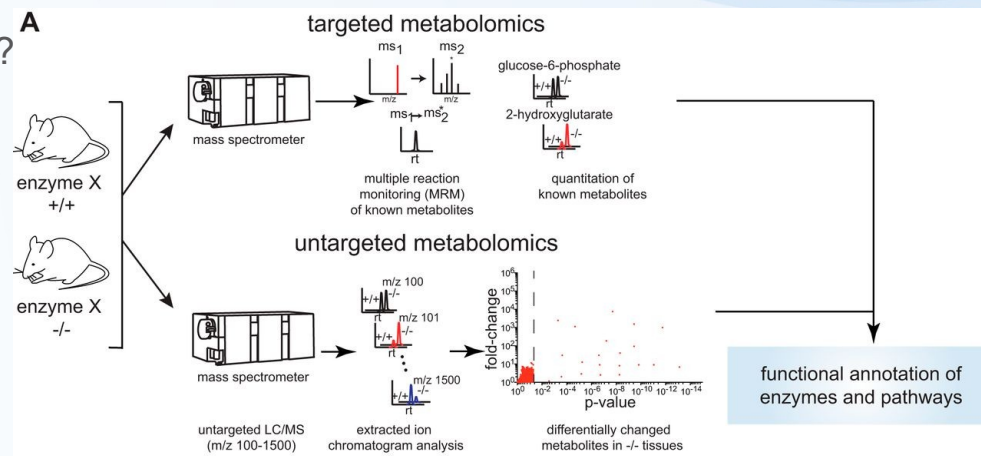
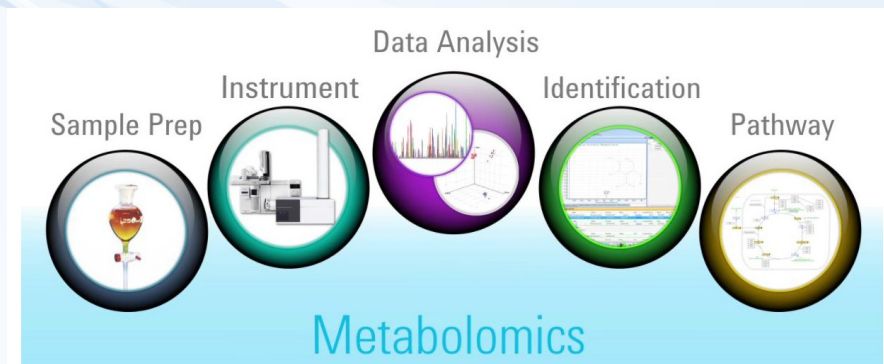
METABOLOMIKA - přístupy

Untargeted metabolomic

- Srovnáváme až 1000 molekul
- K většině nemáme standard
- Kvantifikace - relativní změna mezi skupinami
- Nutné znát hypotézu
- Pečlivá a jednotná příprava vzorků a analýza
- Neexistuje jednotná příprava všech skupin metabolitů (lipidomic, glycomic)
- Rychlost (peníze) vs. rozlišení (citlivost)?
- Nutné využívat statistiku (při designu i vyhodnocení experimentu)

Target metabolomics

- Srovnáváme až 100 molekul
- Existence databází známých molekul (*Metlin*)
- Existuje-li standard, možná kvantifikace
- Vyšší citlivost analytických metod (identifikace nízkých koncentrací)



Mulvihill, MM and Nomura DK. American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism (2014) 307/3, E237-E244. DOI: 10.1152/ajpendo.00228.2014

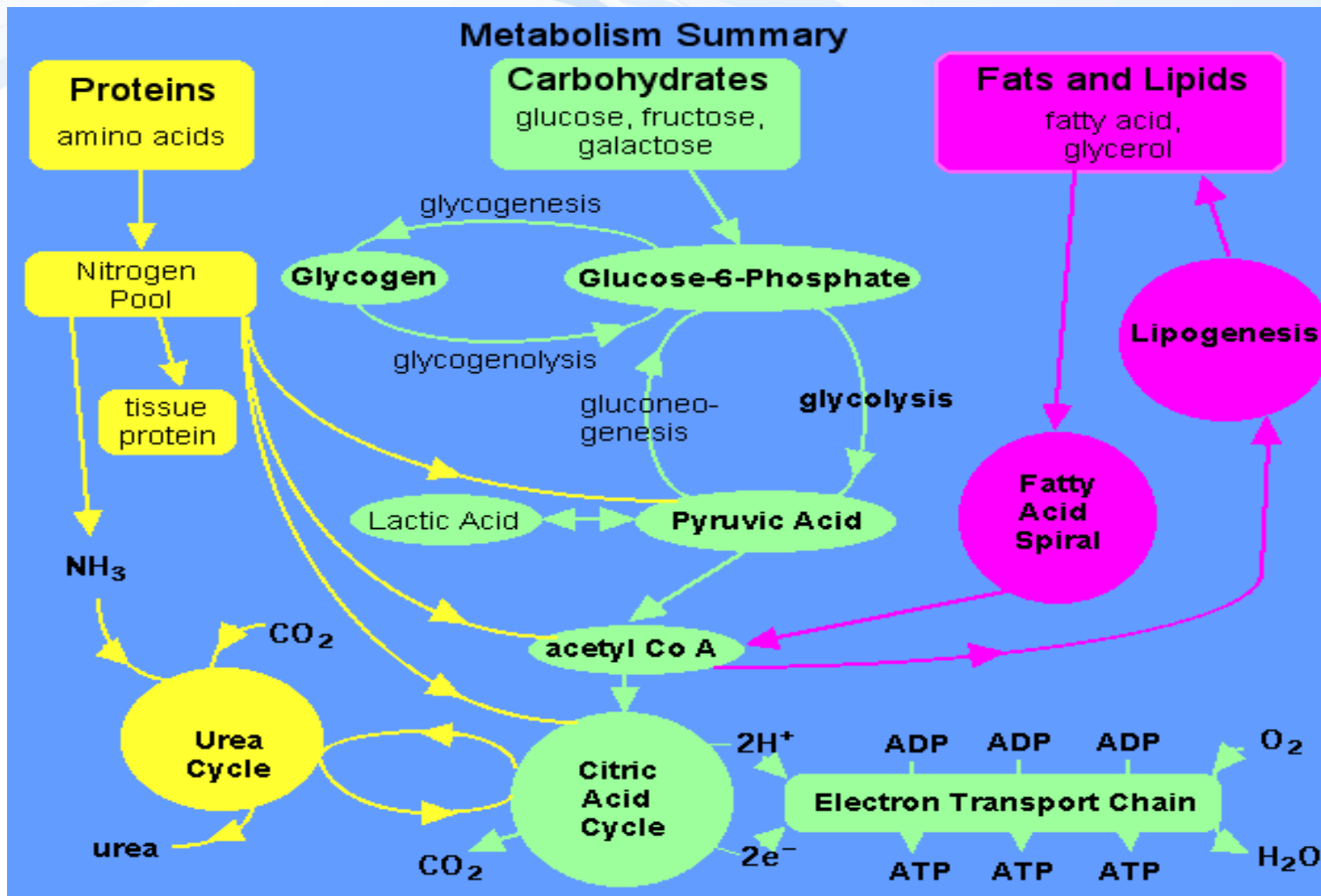
<https://masspec.scripps.edu/>

Data processing

- Input data format
- Peak finding
- Chromatogram alignment
- Data correction (missing values, empty rows..)
- Data processing
- Statistics
 - heat maps
 - PCA (principle component analyses)
 - CA (cluster analyses)
 - descriptive statistics
- Identification of metabolite (databases)



Hlavní skupiny metabolitů



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



METABOLITY LIPIDŮ



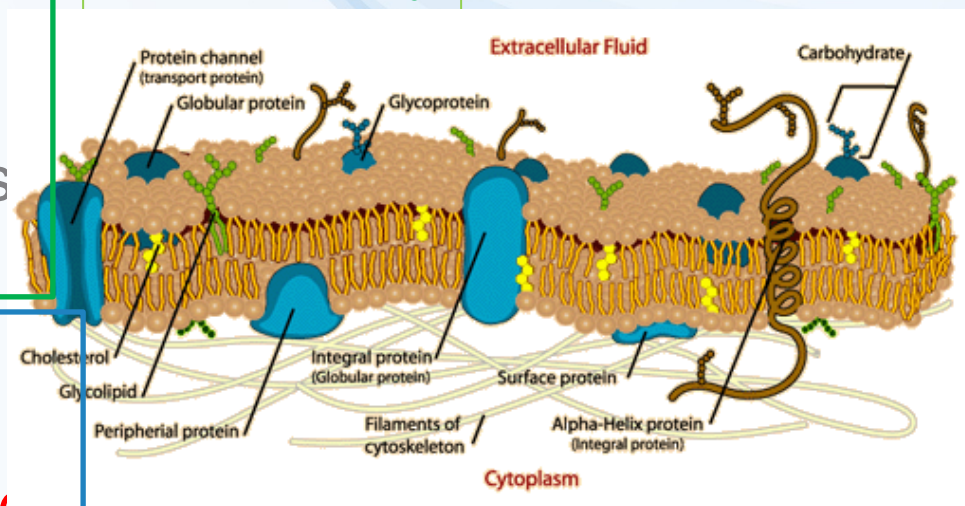
METABOLITY LIPIDŮ

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

- **Fatty acids** 5795
- Glycerolipids 7538 „fats“
- **Sterol lipids** 2678 „sterols“
- Prenol lipids 1200

- Sacccharolipids 1293
- Sphingolipids 4318
- **Glycerophospholipids** 800
- Polyketides 6741

Nepolární lipidy



Polární lipidy

Různorodá skupina sekundárních metabolitů



METABOLITY LIPIDŮ – dělení

Funkce:

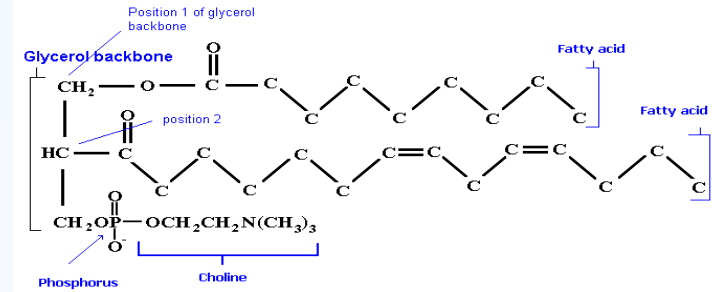
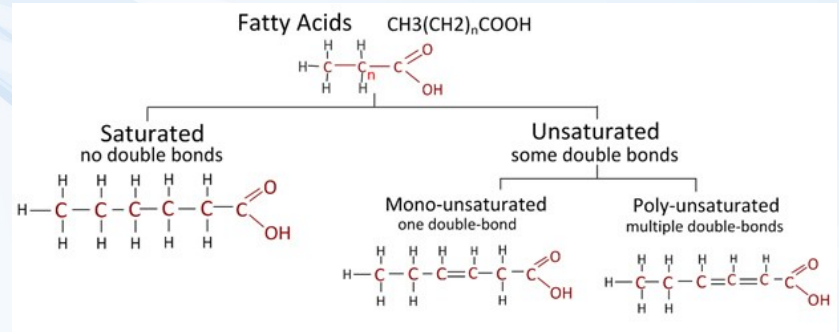
- Zásobárna energie
- Metabolické regulátory
- Strukturální komponenty
- Elektrické izolanty (nepolární lipidy)

Složení:

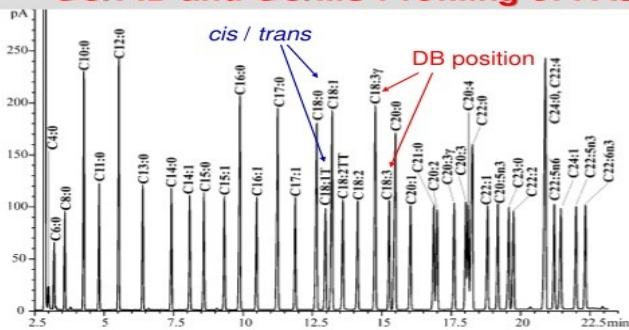
- Polární x nepolární
- Jednoduché x složené x odvozené

Mastné kyseliny:

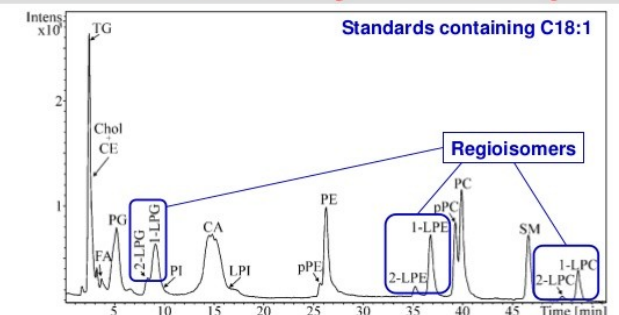
- Délka řetězce
- Počet dvojných vazeb a jejich umístění
- Stereoizomerie
- Regioizomerie



GC/FID and GC/MS Profiling of FAs



HILIC-LC/ESI-MS Analysis of Polar Lipids

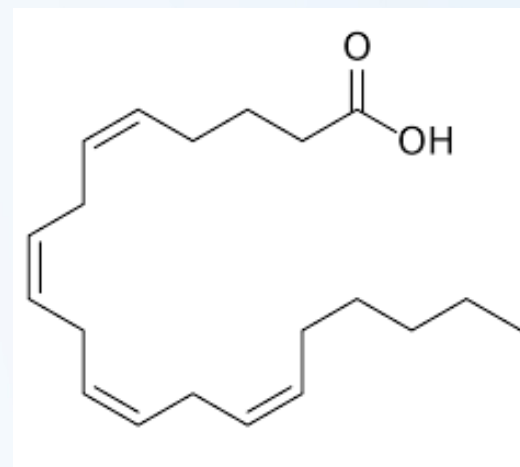
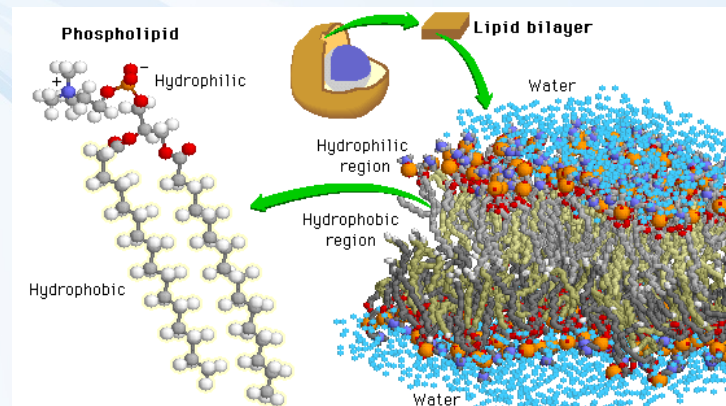


FOSFOLIPIDY

Součást membrán

Složení

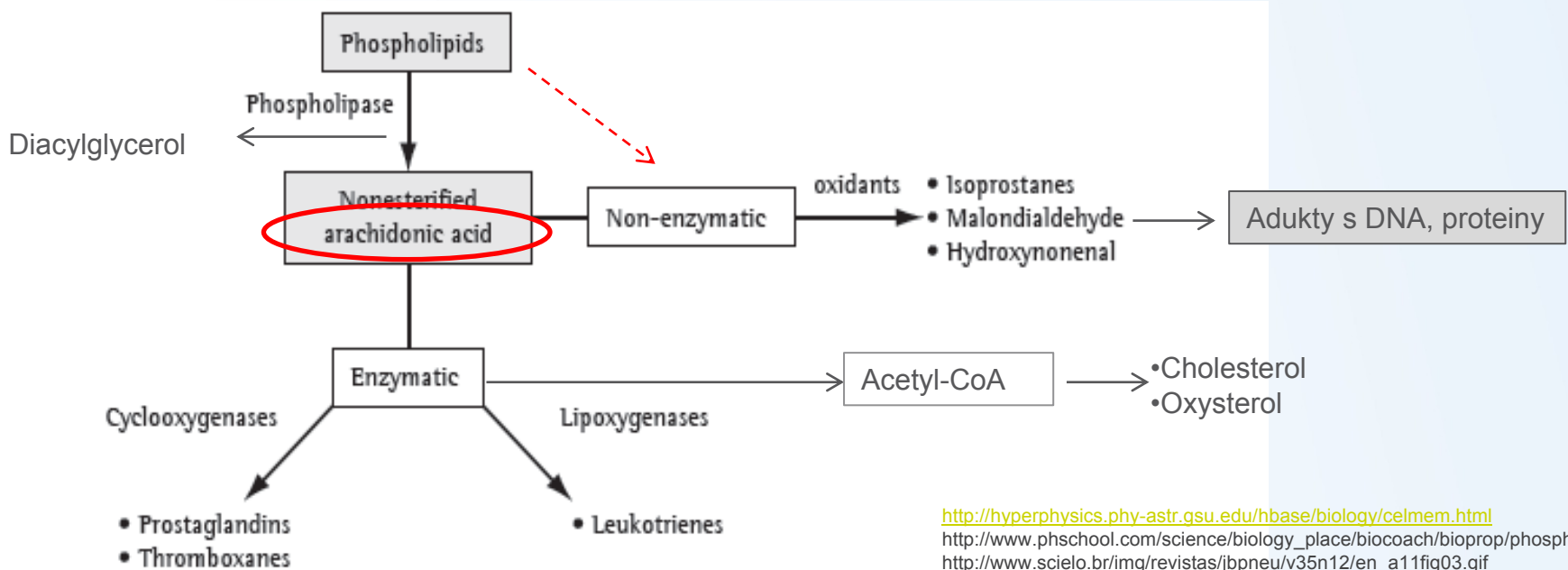
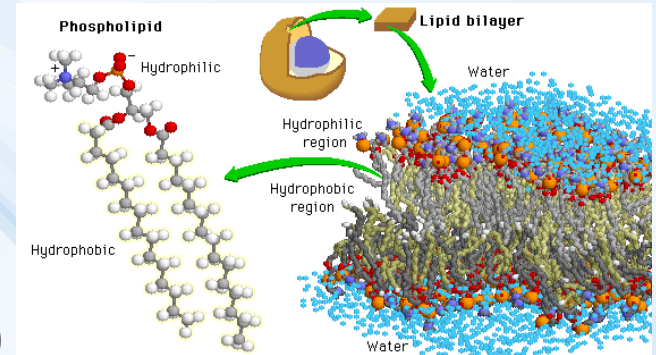
- Diacylglycerol-fosfát (může být esterifikován)
- Mastné kyseliny
 - palmitová, oleová, arachidonová
- Nejvíce prostudované a biologicky významné
 - metabolity **kyseliny arachidonové (AA)**



METABOLITY FOSFOLIPIDŮ

Oxidace fosfolipidů

- nejčastější proces
- ztráta funkčnosti membrán
- enzymaticky i neenzymaticky
- metabolity s fyziologickými účinky (eikosanoidy)
- reaktivní metabolity



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

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

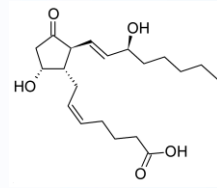
http://www.scielo.br/img/revistas/jbpneu/v35n12/en_a11fig03.gif

FOSFOLIPIDY – enzymatická oxidace

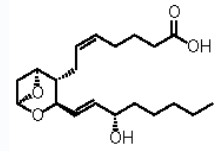
Eikosanoidy

20 C, deriváty AA

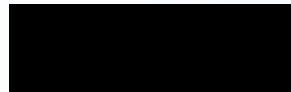
- Prostaglandiny PG



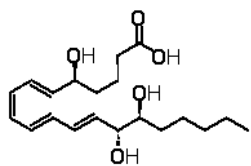
- Tromboxany TX



- Leukotrieny LT

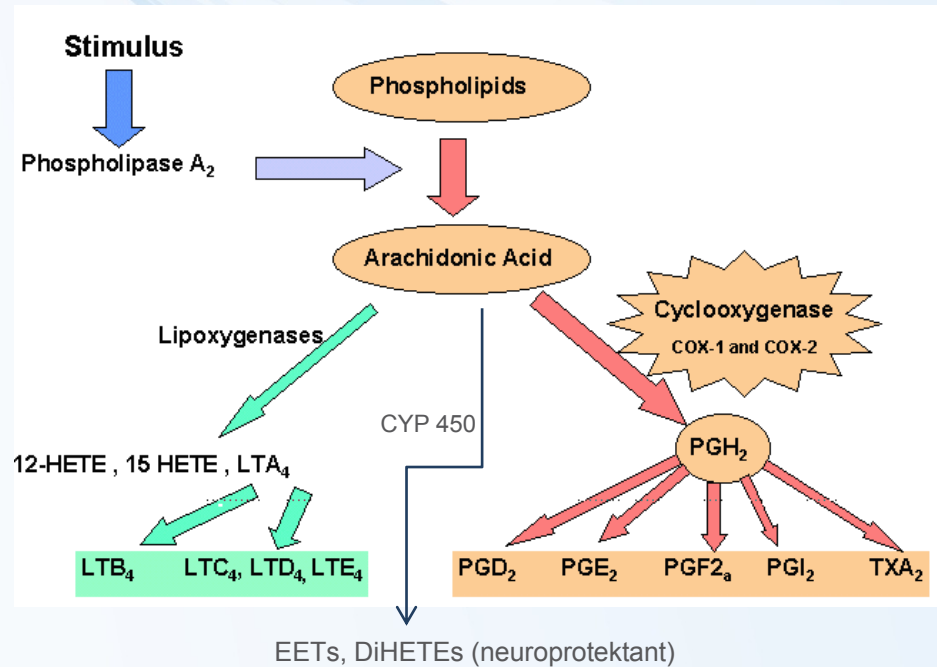
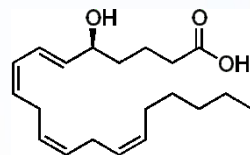


- Lipoxiny



- Hydroxyeikosatetraenové

kyseliny - HETE



Významné biologické funkce

- Zprostředkování zánětlivé odpovědi (COX 2-PG-horečka, bolest, zánět, aspirin-COX1-PG-sekret mucinu v žaludku-ibuprofen)
- Regulace krevního tlaku, koagulace, horečky, bolesti
- Buněčná signalizace
- Řídí činnost ledvin
- Inhibice lipolýzy a sekrece trávicích šťáv

FOSFOLIPIDY – neenzymatická oxidace

Isoeikosanoidy

Produkty neenzymatické oxidace AA

Nejstudovanější – Isoprostany

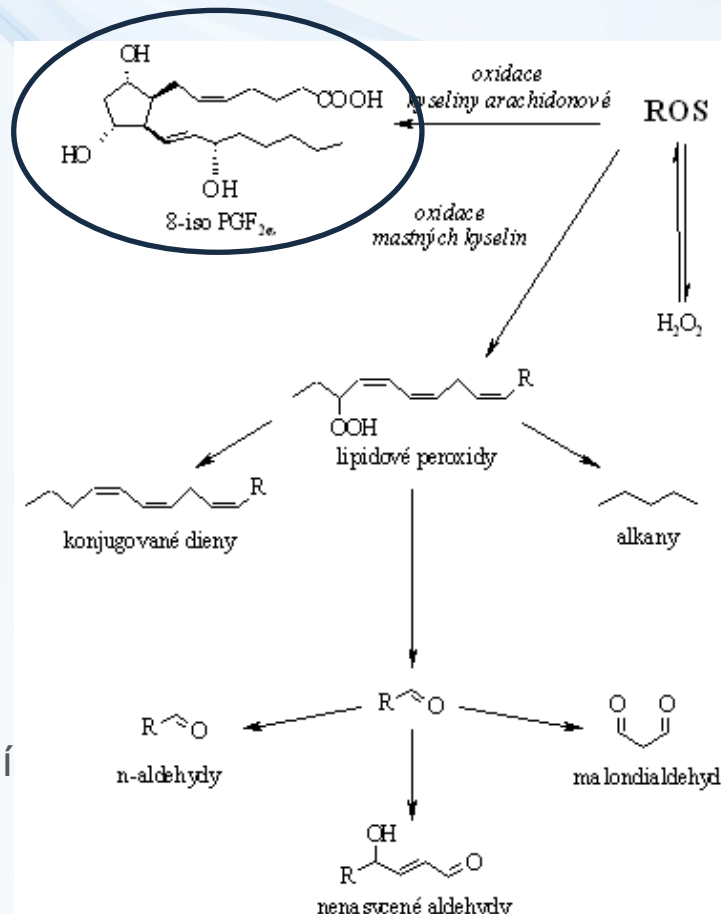
- Stabilní molekuly, vznikají po ataku ROS
- Nejznámější **8-iso-PGF_{2α}**
(synonyma iPF_{2α}-III, iPF_{2α}-IV, 15-F_{2t}-IsoP)

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 kardiovaskulární onemocnění
- řízení terapeutického zásahu



FOSFOLIPIDY – neenzymatická oxidace

Konečné produkty oxidace AA malé reaktivní aldehydy

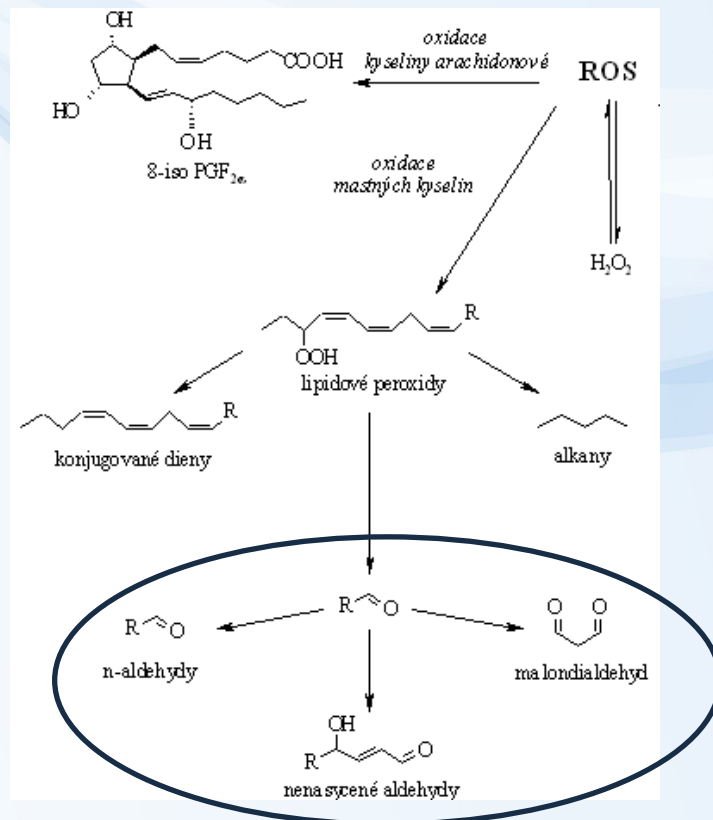
MDA – malondialdehyd (MW 72.07)

HNE – 4-hydroxynonenal (MW 156.22)

ONE – 4-oxononenal (MW 155.22)

ACR – acrolein (MW 56.06)

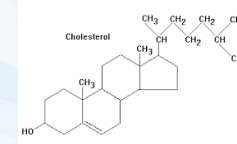
- koncové produkty oxidace i potravních lipidů
- reaktivní malé molekuly – tvorba aduktů s DNA, peptidy, s GSH („mercapturomika“)
- biomarkery oxidativního stresu in vivo a vnější expozice
- biologické a toxické účinky



DALŠÍ METABOLITY LIPIDŮ

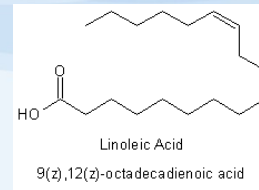
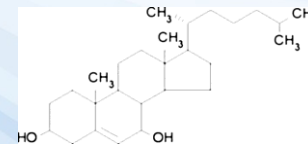
Cholesterol

- Součást membrán živočichů, prekurzor steroidních hormonů a žlučových kyselin



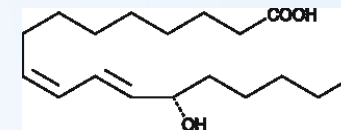
Oxysteroly (7 β -hydroxycholesterol)

- produkt lipidní peroxidace cholesterolu, MW 402.7
- biomarker oxidativního stresu a různých onemocnění (diabetes, atherosclerosis, liver diseases, alzheimer)
- vysoká koncentrace v plasmě
- biologické účinky: apoptoza, agregace destiček, metabolismus sfingolipidů, cytotoxicita



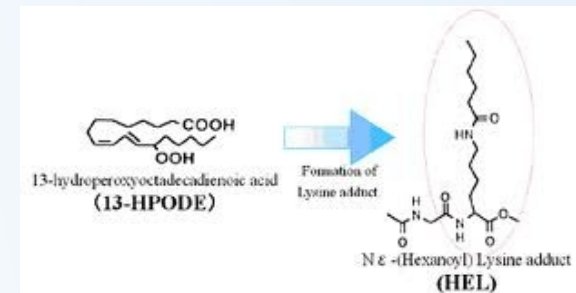
t-HODE (hydroxyoctadecadienoic acid)

- produkt oxidace kyseliny **linoleové C:20**,
- biomarker antioxidační kapacity a oxidativního stresu in vivo



HEL (hexanoyl-lysine adduct)

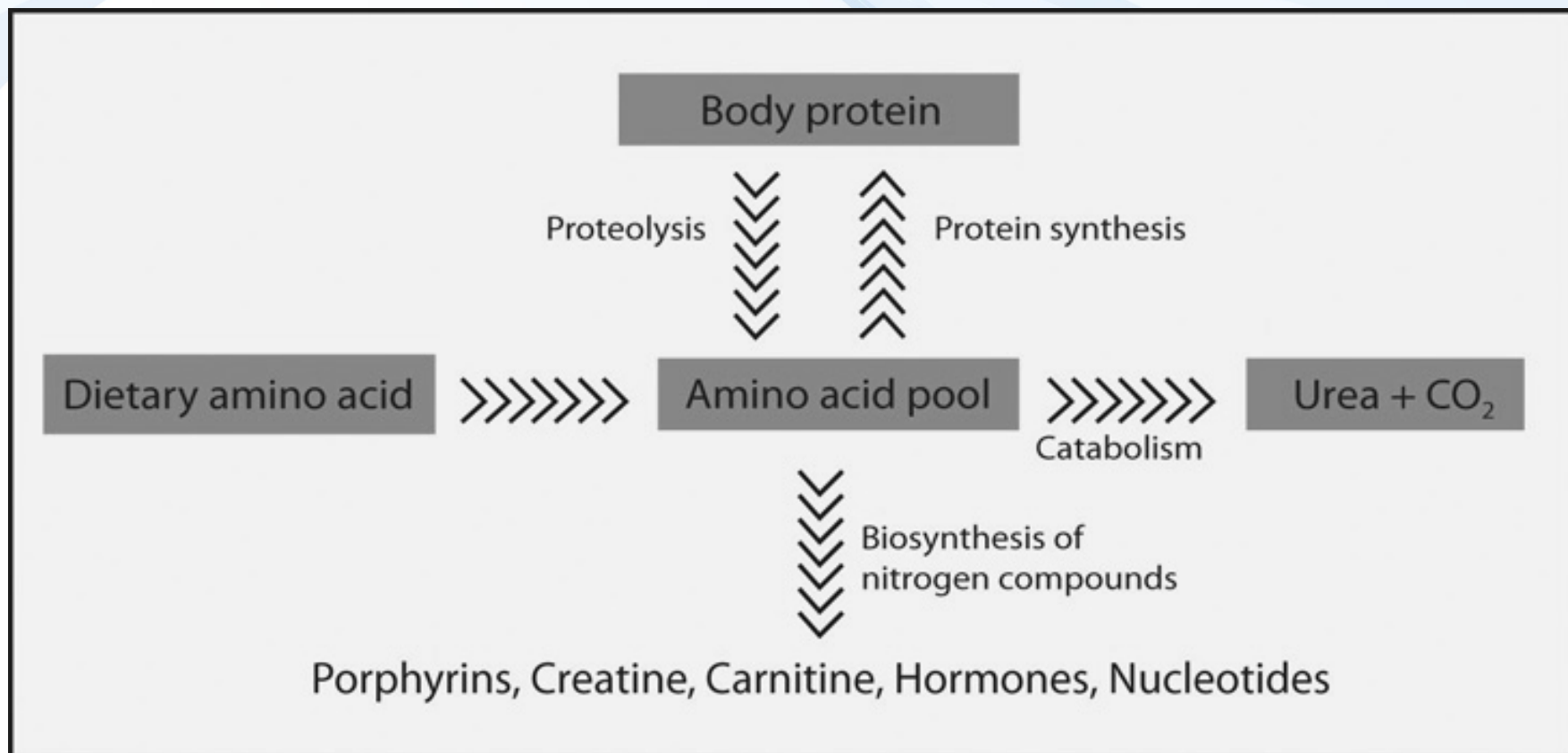
- Adukt lipid hydroperoxidu s lysinem, produkt peroxidace LA nebo AA
- biomarker lipidní peroxidace, detected in oxidatively modified LDL in human atherosclerotic lesions and in human urine



METABOLITY PEPTIDŮ



METABOLITY PEPTIDŮ



METABOLITY PEPTIDŮ (1)

Aminokyseliny a jejich deriváty:

Proteinogenní

1) funkce strukturní (proteiny)

2) další funkce

- př. přenos vzruchu v CNS - glycin, kyselina asparagová, kyselina glutamová

Neproproteinogenní – specifické funkce více: DOI 10.1007/s11104-010-0673-y

* 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);

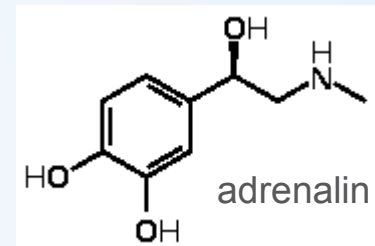
serotonin, **melatonin** (derivát tryptofanu, regulační funkce);

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)

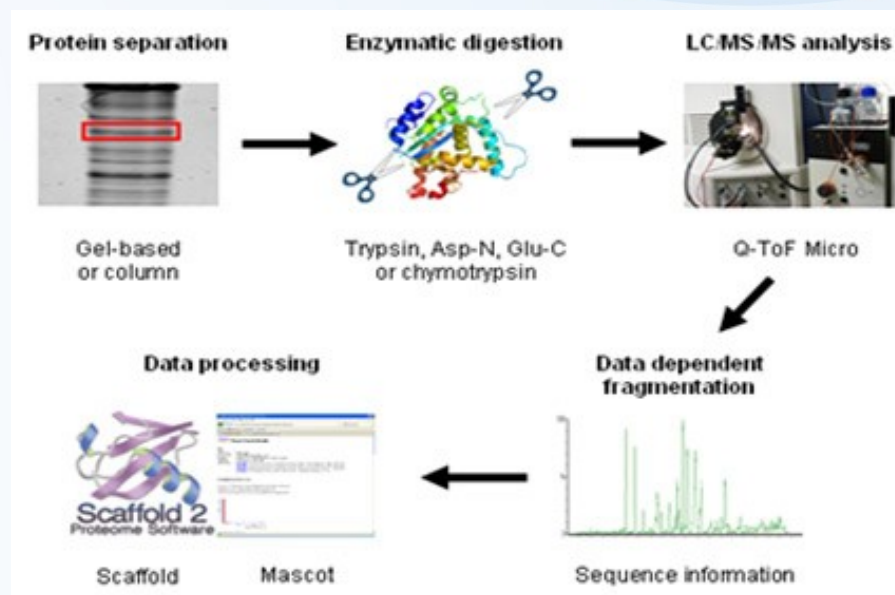
Konjugáty s peptidy:

Glykosilace, Cysteinylace, Glutathionylace, Oxidační produkty (karboxymethyl), Ubiquitace, Aduky 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-
- **protein indentifikace pomocí MS** (fingerprinting)
- statistické zpracování dat



DALŠÍ METABOLITY (sacharidy, nukleotidy)

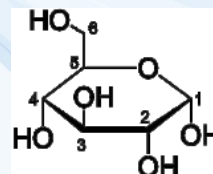


METABOLITY SACHARIDŮ

Jednoduché sacharidy:

Příklad: Glukóza

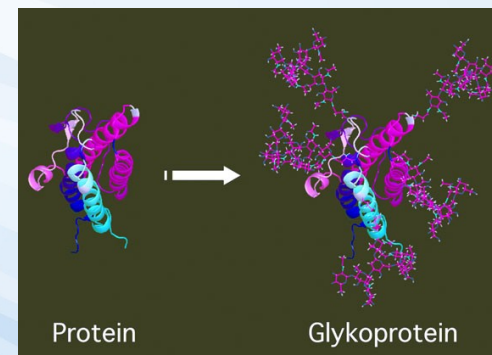
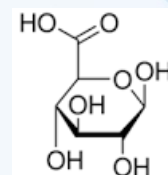
- Rozpustná ve vodě, zdroj energie, konstantní hladina v krvi
- Stanovení: enzymaticky, spektrofotometricky, amperometricky



Deriváty sacharidů:

Příklad: **Kyselina glukuronová**

- Konjugální agens v detoxikačních reakcích

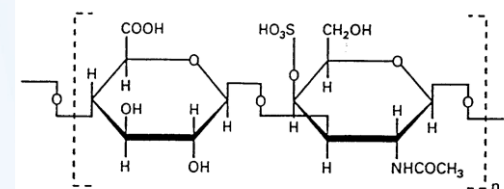
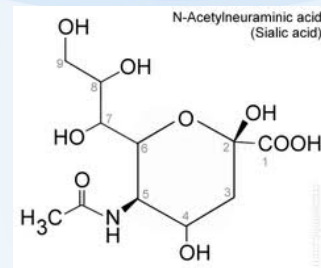


Konjugáty sacharidů - glykoproteiny a glykolipidy:

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, přítomné v buněčné membráně, možná léčiva
- Stanovení: LC/MS, imunohistochemie, ELISA, microarray, elektroforéza s kys. jodistou a Ag⁺

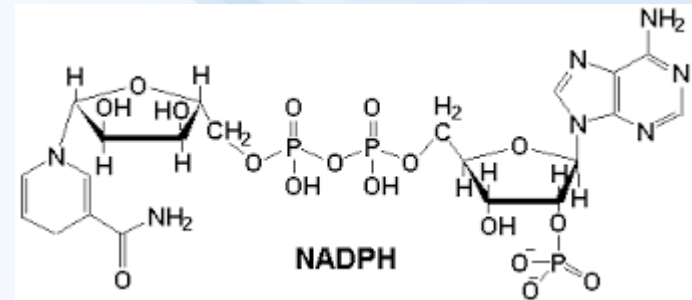
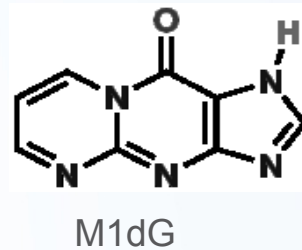
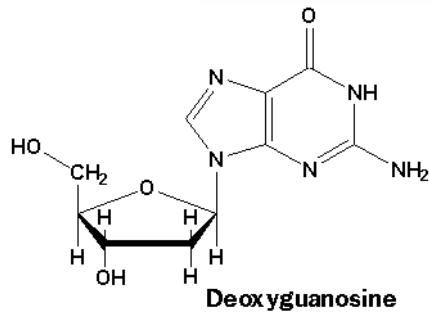


Repeating unit of chondroitin sulfáte A

METABOLITY NUKLEOTIDŮ

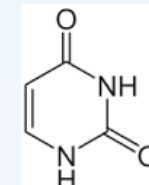
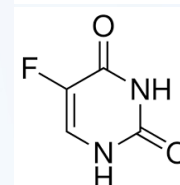
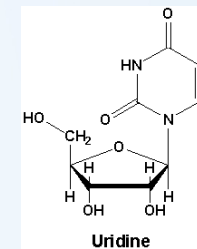
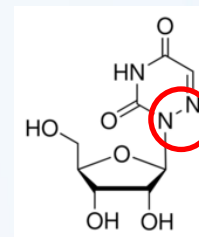
nukleotidy:

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



léčiva na bázi nukleotidů:

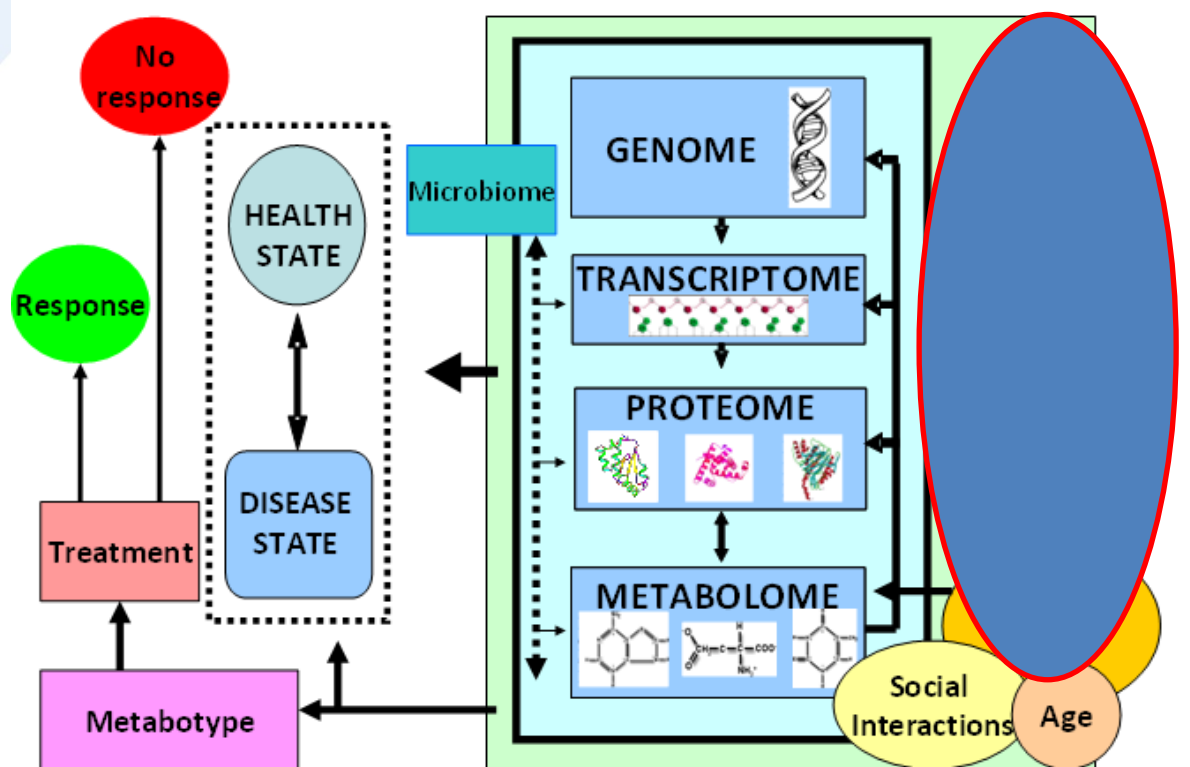
- 6-aza-uridin (cytostatika)-inhibice DNA syntézy
- 5-fluorouracil (antimetabolit, analog pyrimidinu)



DALŠÍ “malé molekuly” v ORGANIZMU



MALÉ MOLEKULY V ORGANIZMU



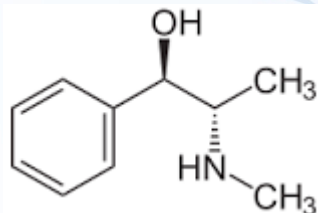
- **Přírodní látky**
malé oligopeptidy, biogenní aminy, alkaloidy, polyfenoly, barviva, glykosidy, terpenoidy, sinicové toxiny, mykotoxiny, antibiotika, vonné látky
- Další (ne v této přednášce)
 - Farmaka - antibiotika, analgetika, cytostatika
 - Nutrienty - vitaminy, cukry, mastné kyseliny
 - Environmentální látky - potravinová aditiva, pesticidy, cigaretový kouř

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

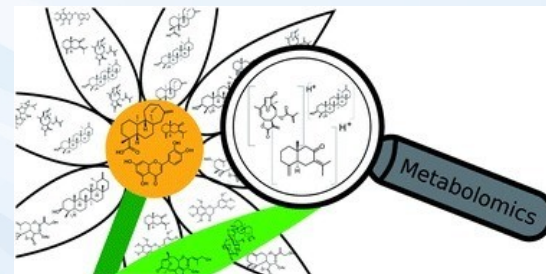
PŘÍRODNÍ LÁTKY - příklady

Biogenní aminy

- Dekarboxylace AA,
Efedrin, Histamin

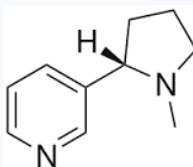


Efedrin

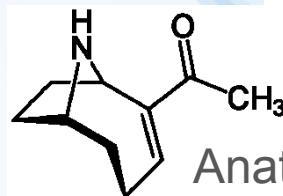


Alkaloidy

- Heterocykly – Nikotin
Anatoxin A



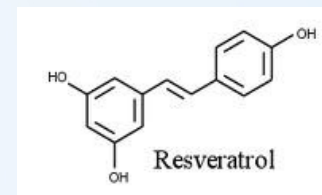
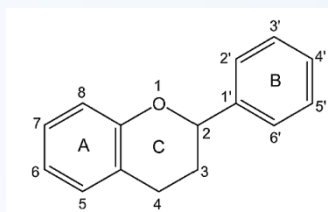
Nicotin



Anatoxin A

Polyfenoly

- Flavonoidy – antioxidanty,
pigmenty, UV ochrana, fytoestrogeny

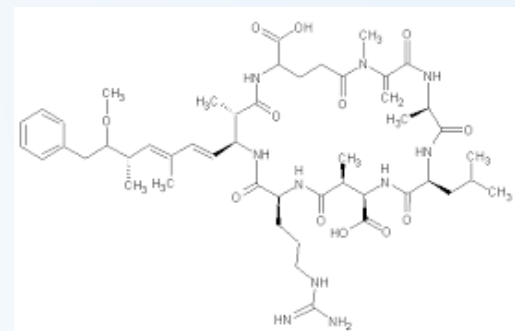


Resveratrol

Flavonová
struktura

Oligopeptidy

- Cyanobakteriální toxiny (microcystin)



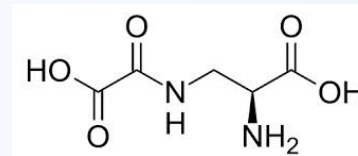
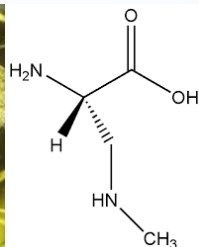
Microcystin



PŘÍRODNÍ LÁTKY - příklady

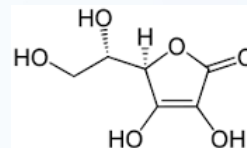
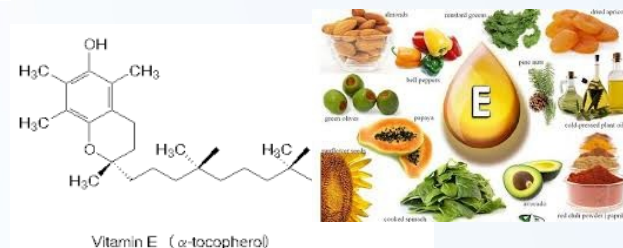
Neproteinogenní aminokyseliny

- Cyanobakteriální toxiny (domoic acid, BMAA)
- Rostlinný původ (L-DOPA, BOAA)
neurotoxické → kompetice s mediatory vzruchu
inkorporace do proteinů → nefunkční proteiny (patologie)



Vitamíny

- vit E (tokoferoly-**lipid**)
- vit C (kys. askorbová-**sacharid**)





METODY STUDIA METABOLOMU



Stanovení metabolitů

→ Kultivace

→ Vzorkování

→ Extrakce

→ Derivatizace

→ Zakoncentrování (SP(M)E)

→ Separace (GC, LC, CE, TLC)

→ Analýza (NMR, MS, DAD, FTICR, MALDI)

→ Vyhodnocení

→ Statistická analýza

PCA - principal component analyses, CA - clustre analyses,
heat map



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



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 analýzy



Homogenizace

Uvolnění intracelulárních metabolitů

Mechanický přístup

- Ultrasonikace
- Kuličkové mlýnky
 - Automatické homogenizátory
- French (X) Press

Nemechanický přístup

Enzymatická lyze buňky

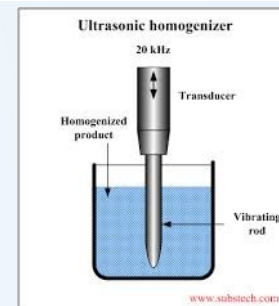
- Lysozym (bakterie)
 - Peptidasy, glykosidasy, acetylmuramoyl-L-alanin amidasy (bakterie)
- $\beta(1,3)$ -glukanasy, $\beta(1,6)$ -glukanasy, mannanasy, chitinasy (houby, kvasinky)

Chemická lyze buňky

- Organická rozpouštědla (MeOH, EtOH, ACN);
- Metanol-chloroform-voda;
 - Vařící EtOH
 - Chlazený MeOH
 - Kyselá extrakce (HClO_4 , HCl, $\text{C}_2\text{HCl}_3\text{O}_2$)
 - Bazická extrakce (KOH, NaOH)

Fyzikální lyze buňky

- Osmotický šok
 - Zamrazení
 - Zahřívání



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
 - Extrakce (LLE)
 - Vymražení

Odstranění homogenizačního roztoku

- Lyofilizace
- Sušárna

Přečištění - Zakoncentrování

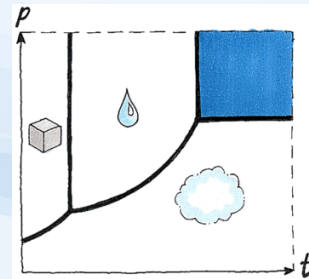
LLE - *extrakce kapalina-kapalina*

- ✓ extrakce širokého množství látek, jednoduchá
- ✗ časová náročnost, variabilní výtěžnost, spotřeba materiálu, vznik odpadů



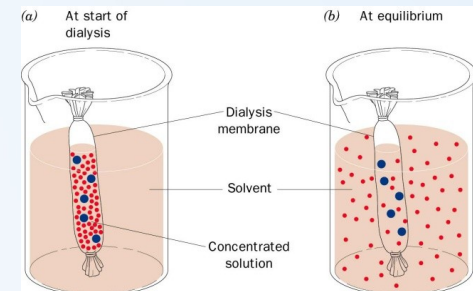
SFE - *superkritická fluidní extrakce*

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

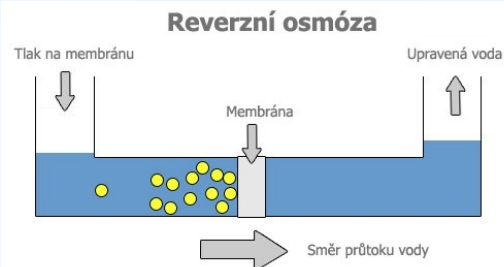


(Elektro)dialýza - *koncentrační rozdíl nebo rozdíl el. potenciálu na polopropustné membráně*

Reverzní osmoza, ultrafiltrace - *využití hydrostatického tlaku*





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

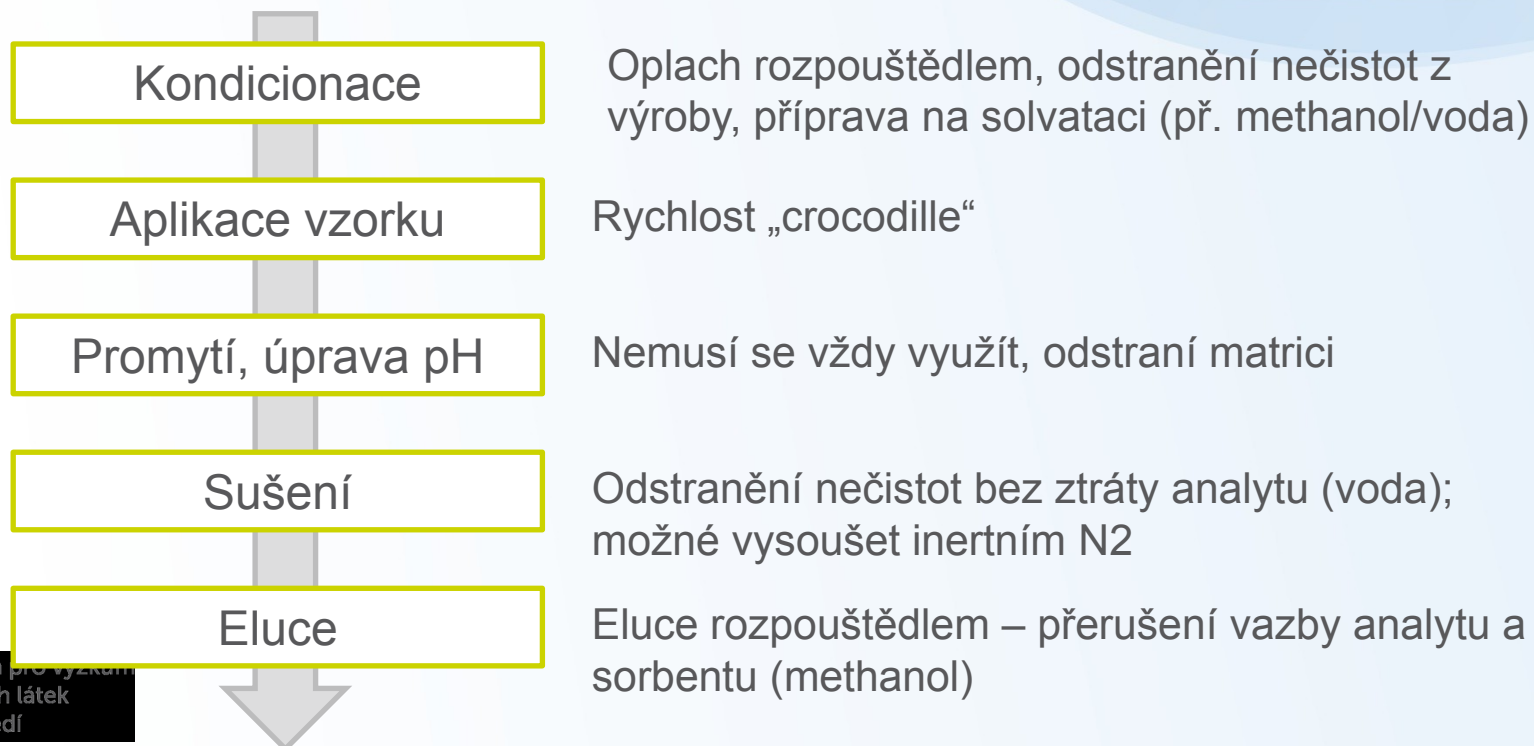


Přečištění – Zakoncentrování: SPE

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, heteroslučeniny
- Eluce - středně polární až polární rozpouštědla

Iontově výměnné interakce:

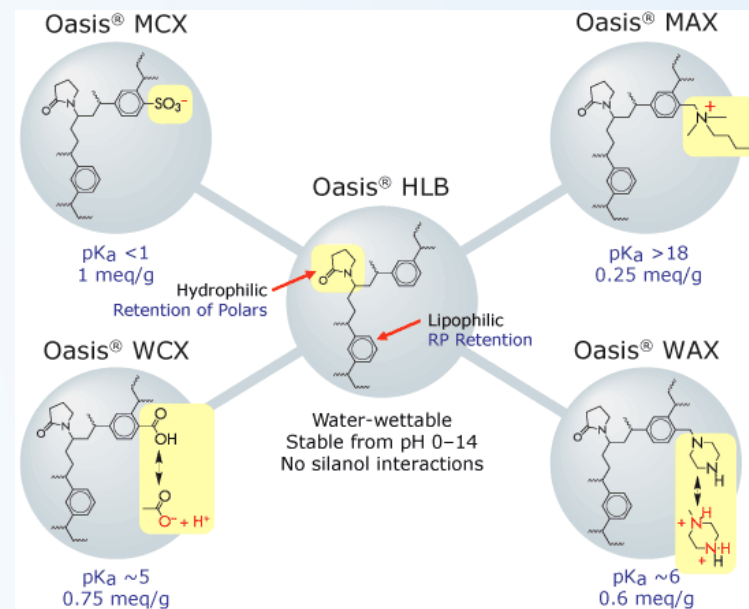
- Nabíý povrch částice (alkylsulfonáty, tetraalkylamoniová sůl)
- Analyty-organické kyseliny, mastné kyseliny
- Eluce – změna pH

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 postupu na analýzu - příklad

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

ABOUT 30% * DID YOU KNOW?

OF COLLEGE STUDENTS SUFFER FROM DEPRESSION.


"Stress can contribute to your risk for depression, and college is a stressful time for many young adults," says **Jason Hunziker, M.D.**, division chief of adult psychiatry at University of Utah Health Care.

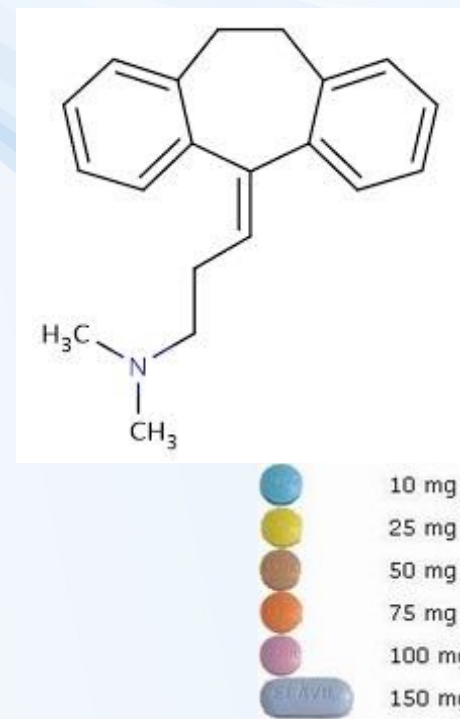
SIGNS MAY INCLUDE:

- » Slipping grades
- » Increase in risky behaviors, like binge drinking
- » Isolation and lack of interest in social activities

If you think you or a loved one may be dealing with depression, talk to a doctor.

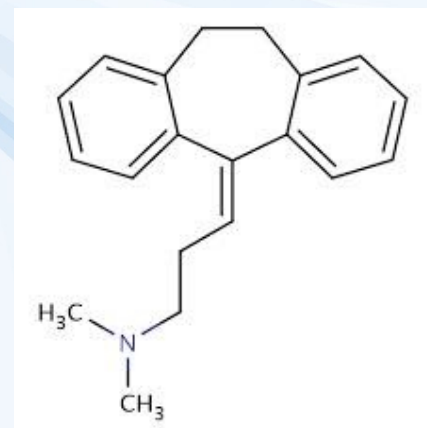
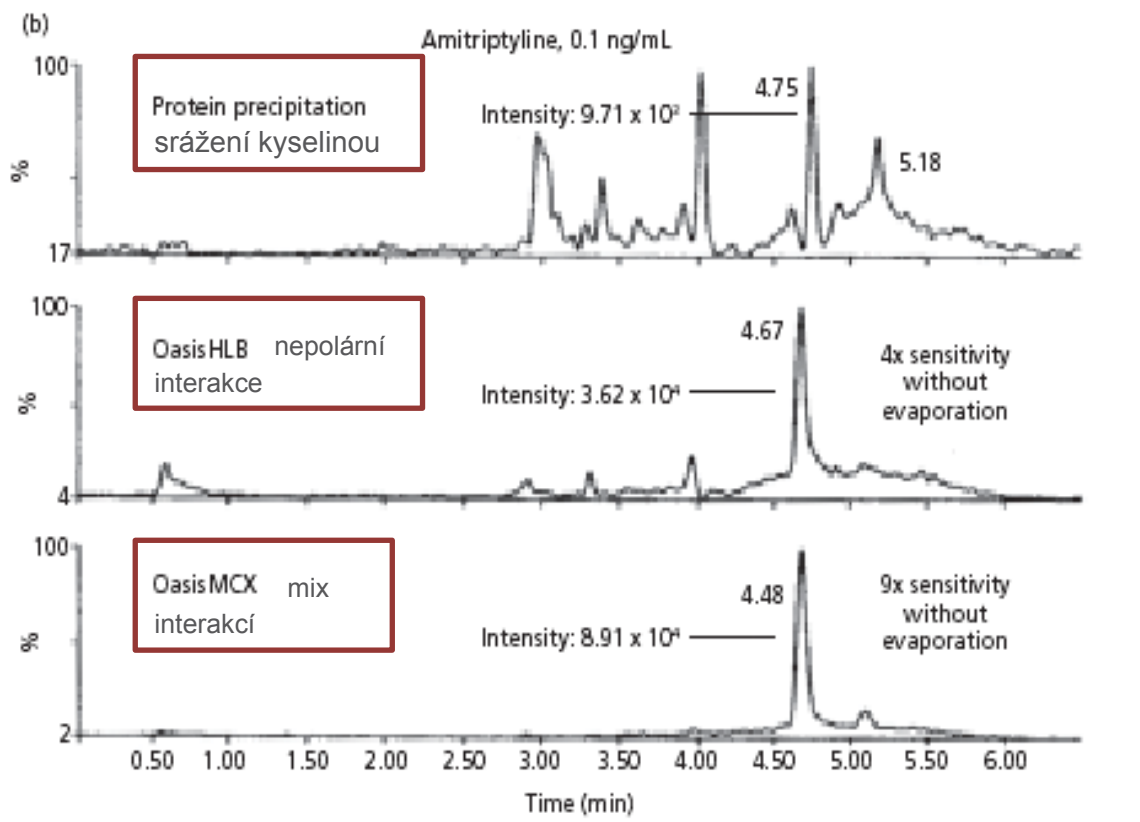
healthfeed.uofuhealth.org

 UNIVERSITY OF UTAH HEALTH CARE



Extrakce – vliv extrakčního postupu na analýzu - příklad

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



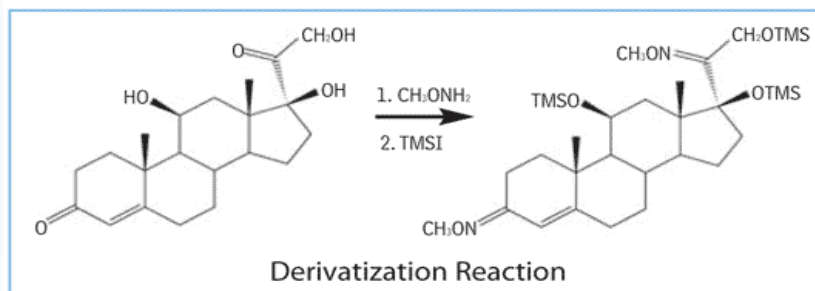
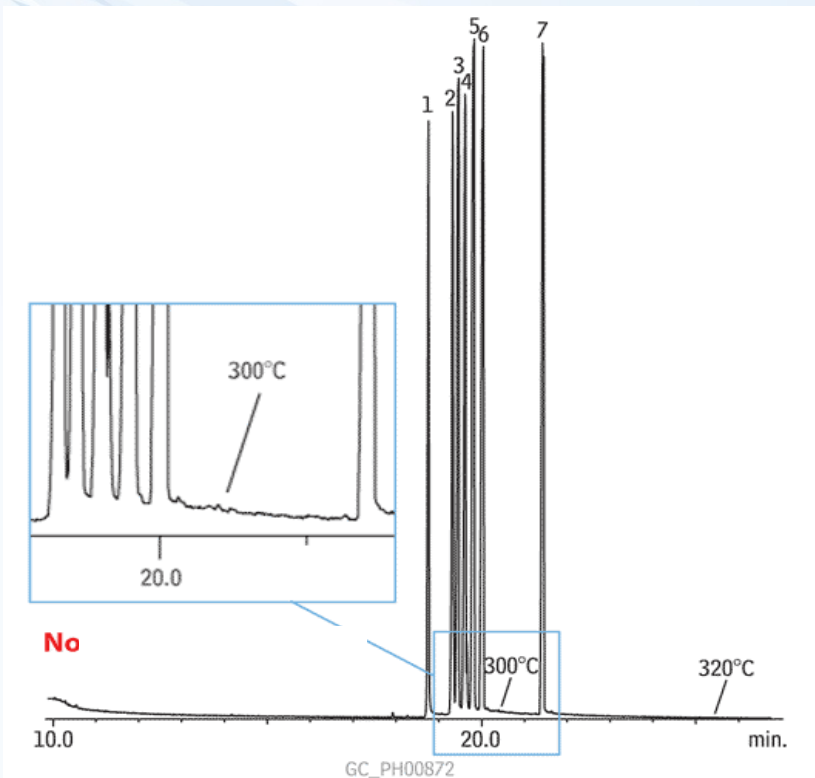
Derivatizace

- 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



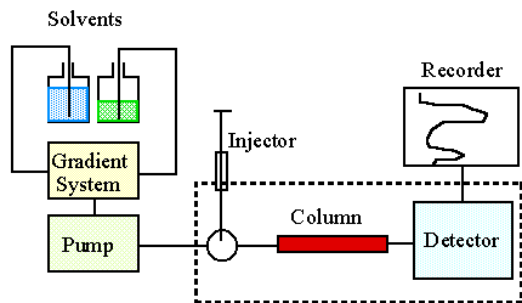
SEPARACE A ANALÝZA



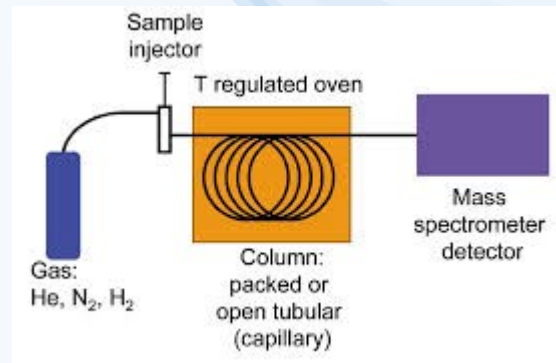
Separace

Chromatografie - dělení látek ze směsi mezi stacionární a mobilní fází

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



Uspořádání
HPLC



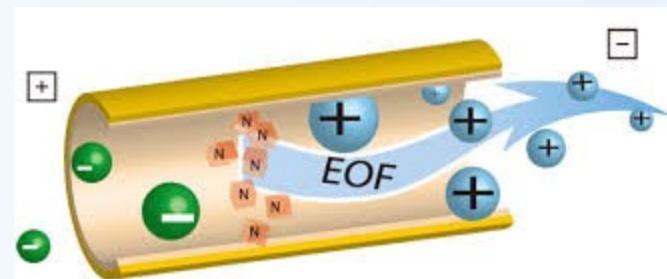
Uspořádání
GC

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, sepharosa)

tR retenční čas látky zdržující se v systému

tM retenční čas látky, která se pohybuje spolu s MF

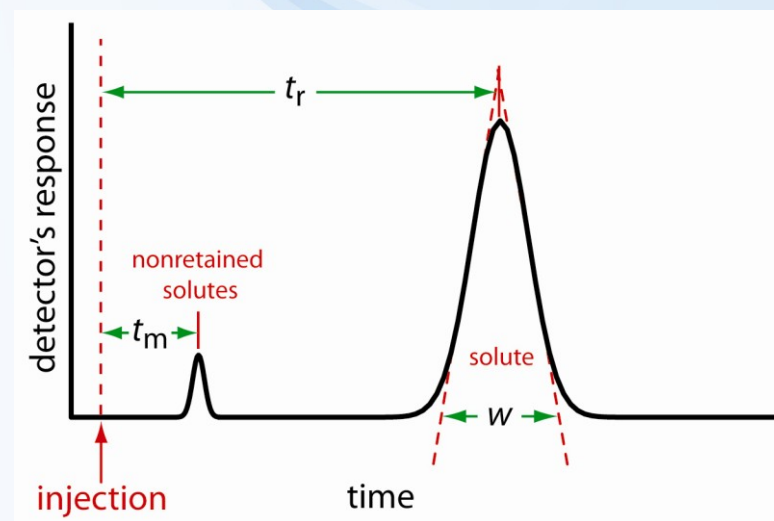
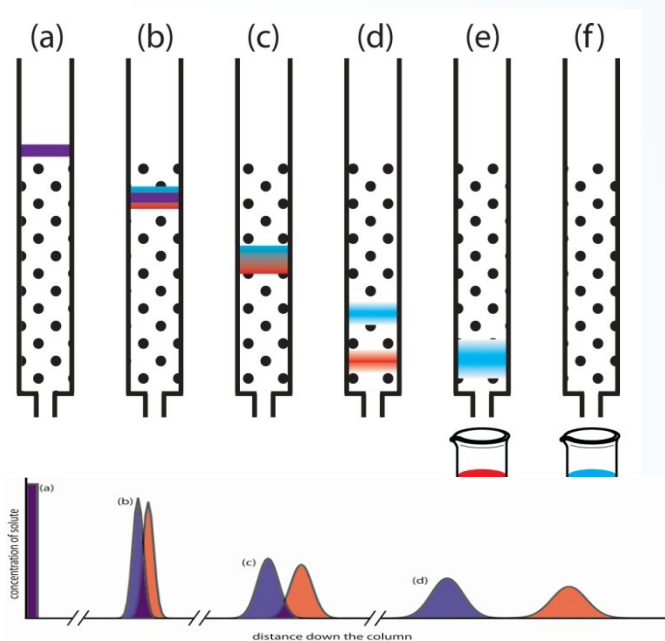
FM objem mobilní fáze za čas

VM mrtvý objem ($FM \cdot tM$)



LC - separace

Princip kapalinové chromatografie:



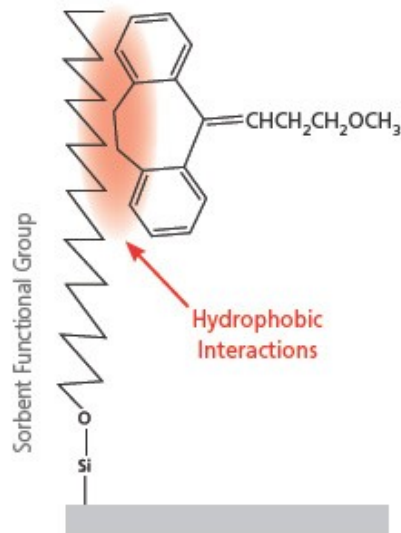
LC - separace

Stacionární fáze

- podobné principy s SPE
- materiál více homogenní, malé částice
- opakované použití (vs. SPE – single use only)

Reverzní fáze

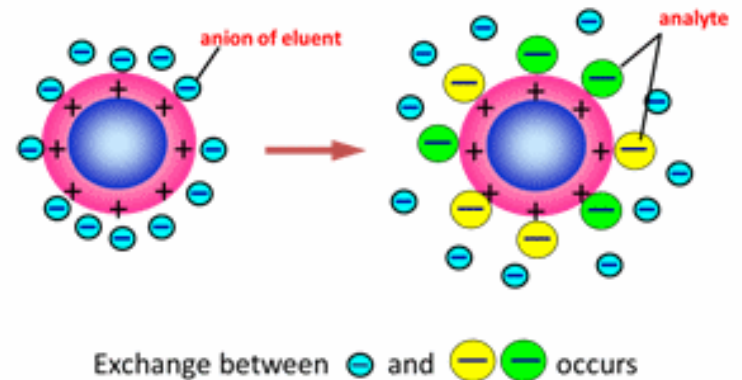
hydrofobní povrch; eluce zvýšením hydrofobicity, nejvyužívanější stacionární fáze



Ionex

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

Ion exchange chromatography (eg. Anion exchange)



LC - separace

HILIC, NP kolona

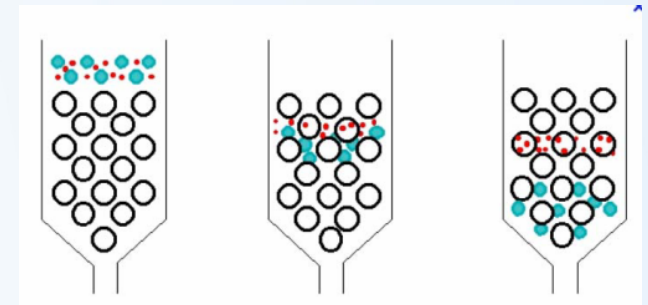
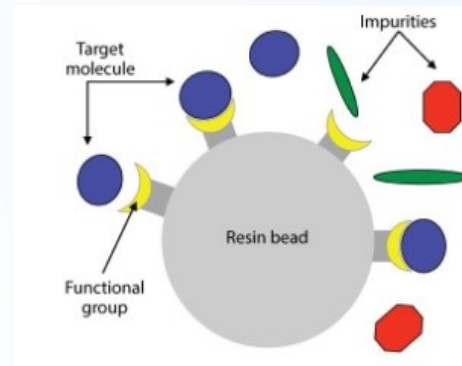
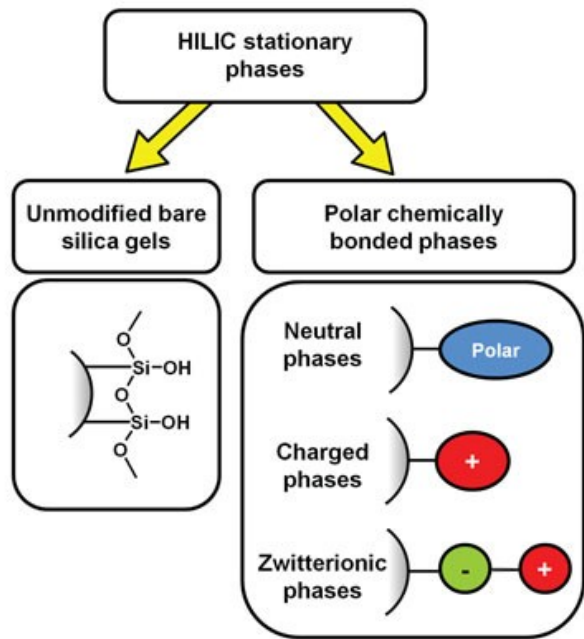
Hydrofilní polymery nebo silikagel s různými polymery, eluce zvýšeným podílem vody (př. dělení aminokyselin, sacharidů)

Afinitní kolona

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

Gelová kolona

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

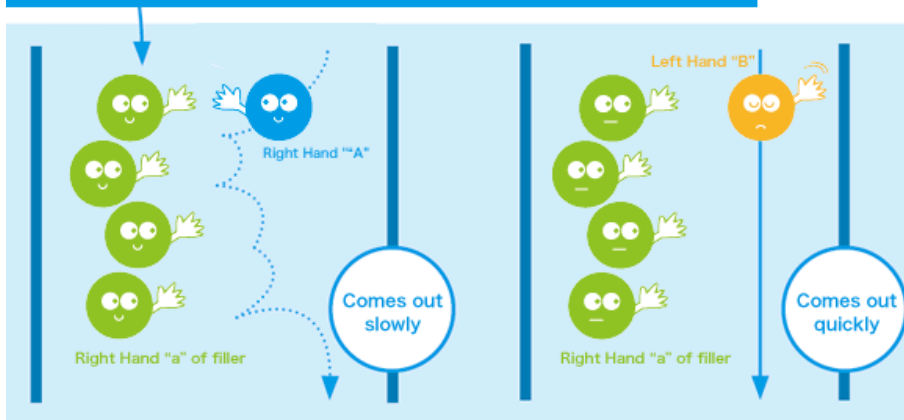


LC - separace

Chirální kolona

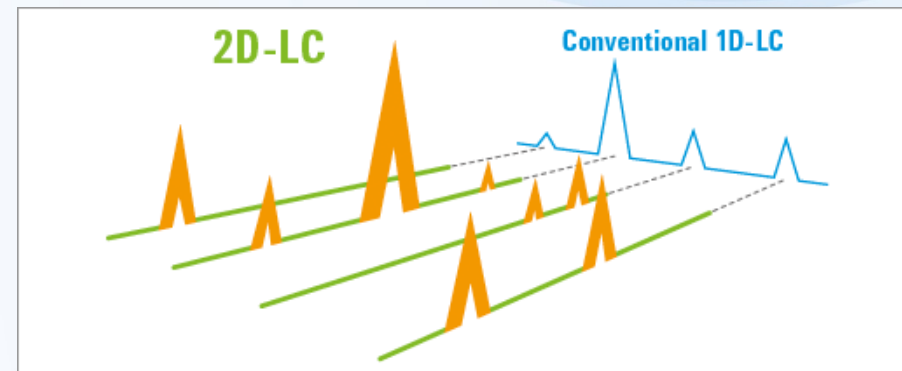
Separuje enantiomery, využití například ve farmakologii

A filler (Right Hand "a," a silica gel coated with polysaccharide [cellulose, etc.] derivatives) that attracts one of the twins in the racemic mixture



Využití více kolon

Například 2D - LC uspořádání nejprve iontově výměnné a pak 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)

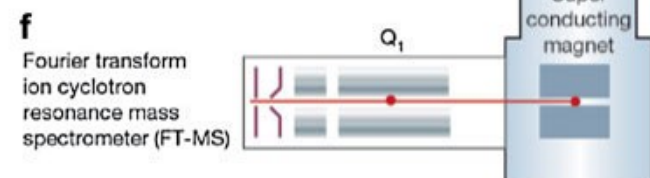
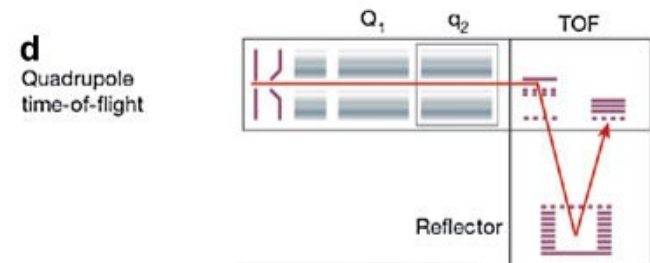
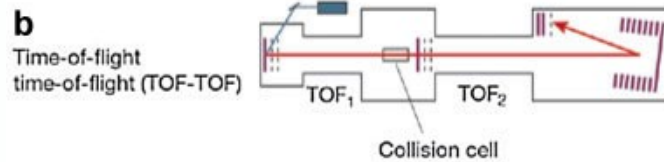
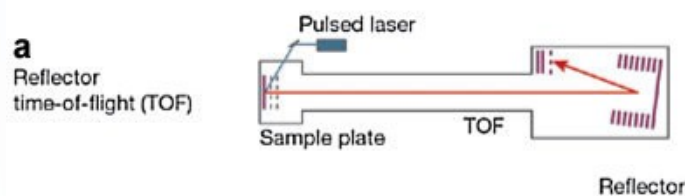
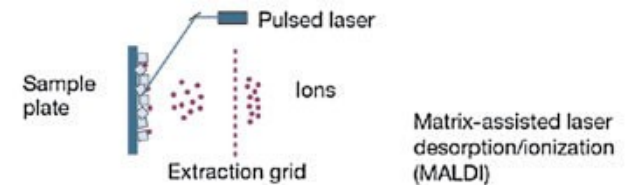
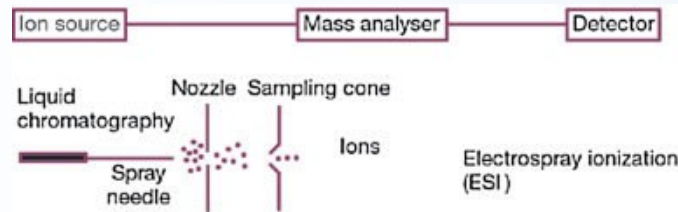
Analyzátoři - Detektory

- **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)

Analyzátoři – Detektory – Hmotnostní detekce

Nejvyužívanější

- targeted metabolomics: LC-MS, direct injection analysis-MS
- untargeted metabolomics: vysokorozlišovací MS (Orbitrap, QTOF)



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 – bez separace

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 detekce

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 ne v prostoru, ale 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** → **záznam (pík)** ☺

Analyzátoary – další detektory

NMR - Nukleární magnetická resonance

Zlatý standard $^1\text{H-NMR}$

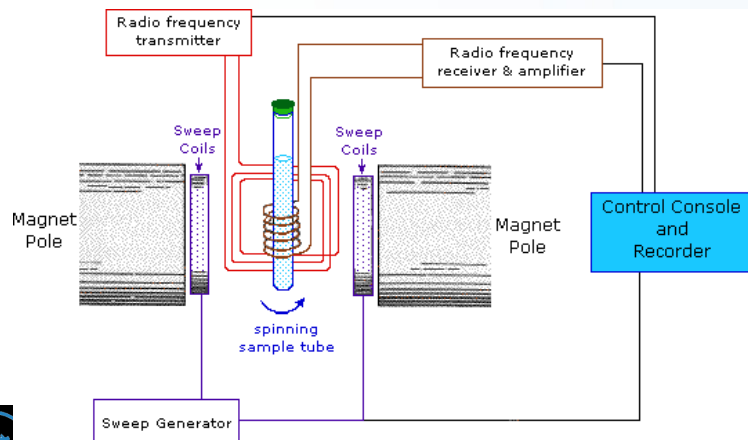
sleduje odezvy jader s nenulovým magnetickým momentem v silném magnetickém poli a jejich interakci s vysokofrekvenčním elektromagnetickým vlněním



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



FTICR – Ionová 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

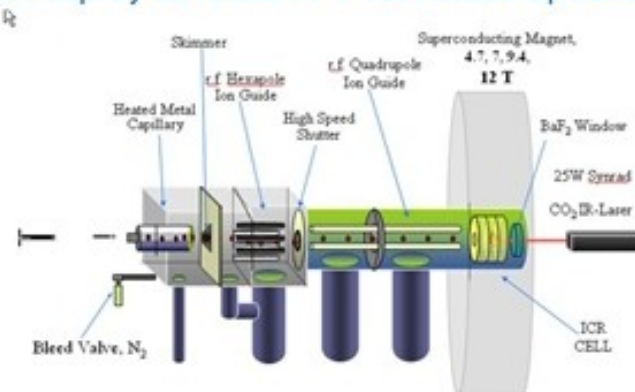


ultracitlivá MS • spektra s nejvyšším rozlišením a přesností • identifikace tisícovek metabolitů bez předchozí separace



nárok na prostor a vakuum • vysoká cena

Electrospray Ionization FT-ICR Mass Spectrometer



Analyzátory zobrazovací techniky

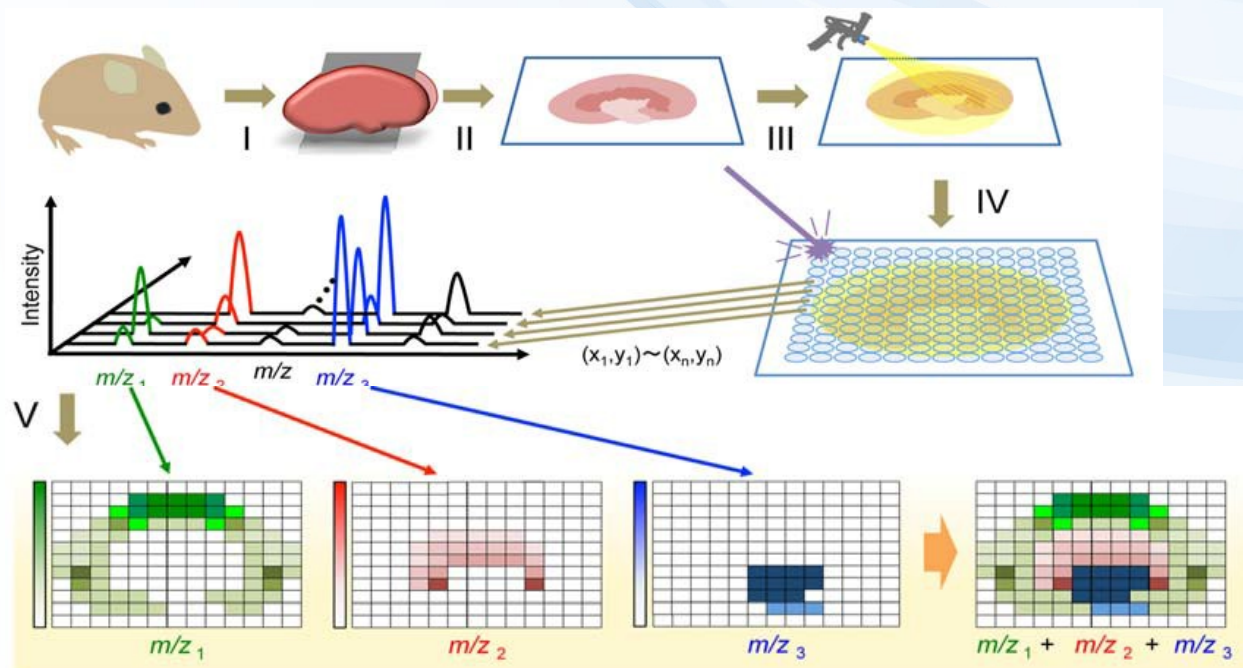
MSI – hmotnostně spektrometrické zobrazování

(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

Př. Analýza metabolitů lipidů v mozku - MALDI-MSI



- I Sacrifice and organ dissection II Cryosectioning and moving to ITO glass slide
III Matrix deposition IV MALDI laser 2D scanning
V Reconstruction of intensity image

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:

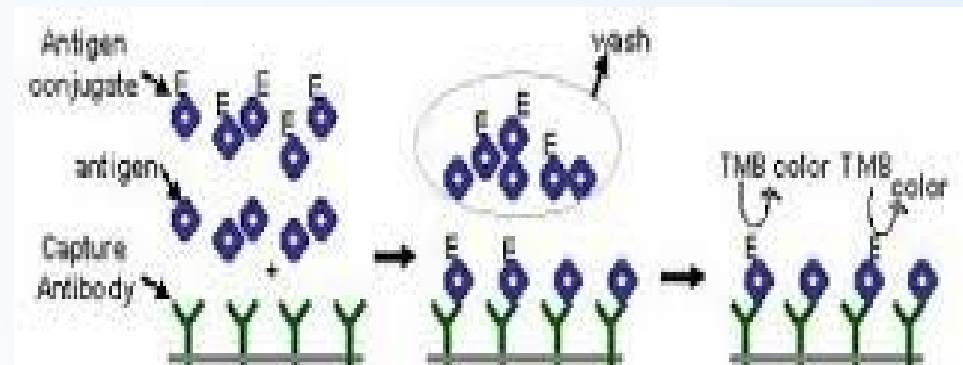
po imunizaci zvířete, protilátky proti různým epitopům, silná afinita

Protilátky monoklonální:

produkce buněčnými liniemi, proti jednomu epitopu, možná krosreaktivita

Kompetitivní EIA, RIA

(enzyme) radioimmunoassay

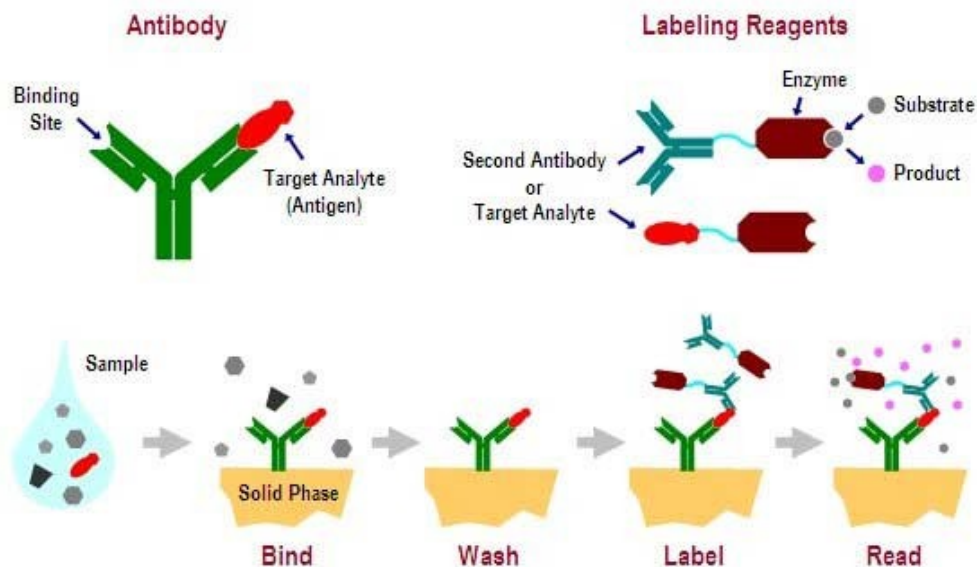


Imunoanalýza (immunoassays)

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“ (arteficiální moč, voda z „čisté“ lokality), rozpouštědlo (vyloučení 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

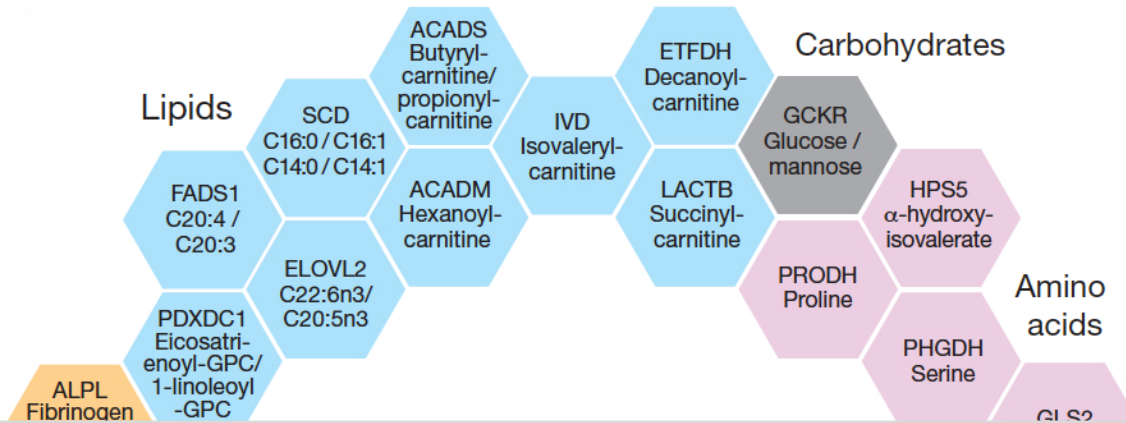
Kvantifikace:

Vhodná detekce (MS, DAD, ECD)

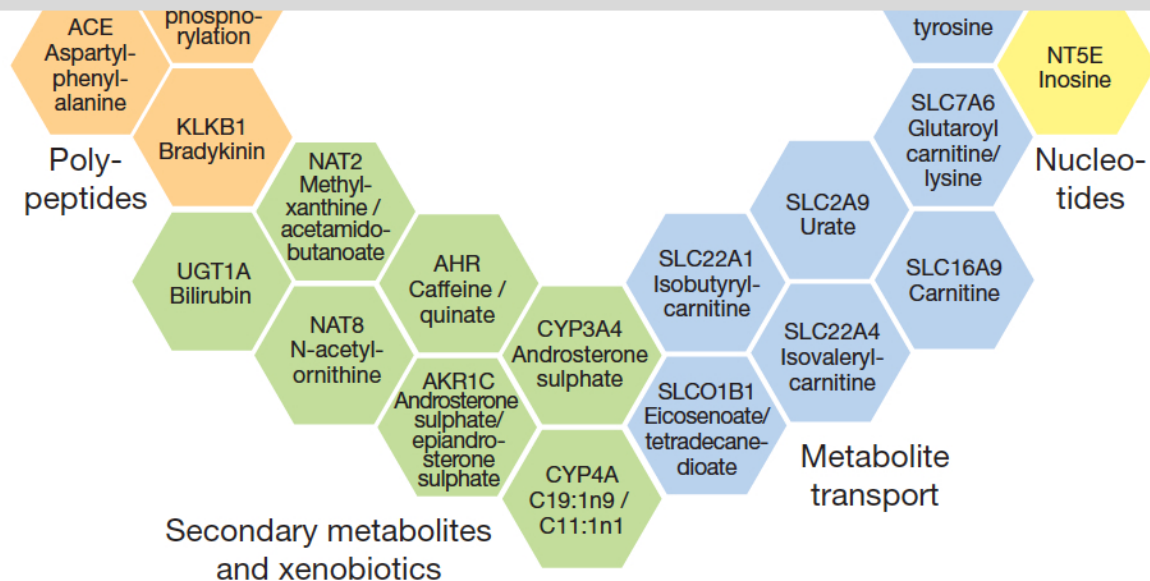
Kalibrace: interní, externí standard v čisté matrici nebo rozpouštědle

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





Příklady stanovení metabolitů (oligopeptidy a lipidy)



Analýza metabolitů – thioly (příklad)

Stanovení: thioly

Stanovení GSH/GSSG (cytosol) a CyS/CySS (plasma), GSH: antioxidant, kofaktor peroxidáz, reverzibilní oxidace na GSSG, konjugační agens pro xenobiotika i endogenní látky (chrání peptid před oxidací vratným navázáním na cystein), správný poměr GSH/GSSG důležitý pro homeostázu

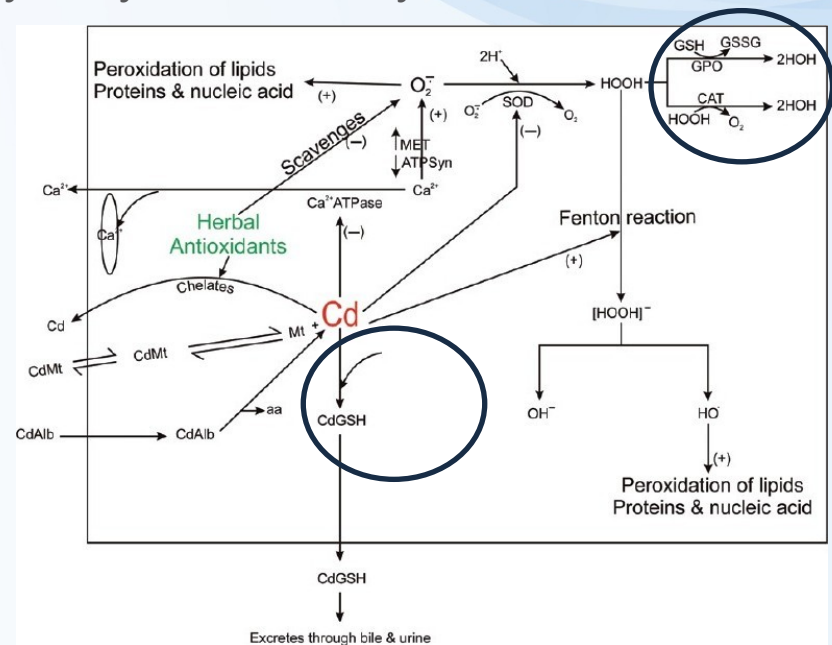
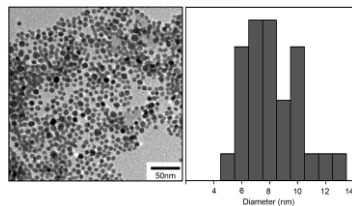
- Homogenizace-redukce S=S z peptidu (DTT)-srážení proteinů kyselinou-konjugace-SH skupiny (NEM, DTNB, DansylCl, IAA)- chromatografie-MS, spektrofotometrie, fluorometrie, elektrochemická detekce
- ELISA
- **Příklad stanovení volného GSH a GSSG ve tkáni**



Modelový příklad

Vliv nanončástic Cd po respirační expozici u myši

- Expozice 13 týdnů
- 5 myši: Kontroly (K), dvě „dávky“ Cd (D1, D2)
- Vyhodnocení fyziologických a toxikologických parametrů
 - PŘ.: peroxidace lipidů, změny enzymové aktivity, GSH / GSSG



Modelový příklad – výzkumná studie

Ukončení experimentu: na co dát pozor?

- VZORKOVÁNÍ

- Organizace odběrů

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

- Výběr tkání pro analýzu

- Respirační cesta → primárně plíce; pak orgány citlivé k Cd (ledviny, prostata, játra, kosti)

- Rychlost zpracování

- Velká rychlost nutná ! Malé molekuly - rychlý turnover
 - Celý orgán ihned do tekutého dusíku

- Udržování a transport

- Stále v mraženém stavu – 80 C

Modelový příklad – výzkumná studie

Zpracování vzorku: na co dát pozor?

- **HOMOGENIZACE**

- Odběr části (reprezentativní alikvot)
 - zmrzlá tkáň
 - vážení orgánu
- Přidání homogenizačního roztoku
 - kontrola pH, iontové síly – **vodný** pufr (GSH-GSSG dobře rozpustné ve vodě)
 - práce v ledu(!)
- Homogenizace
 - vysokorychlostní třepání (s)
 - stálé chlazení

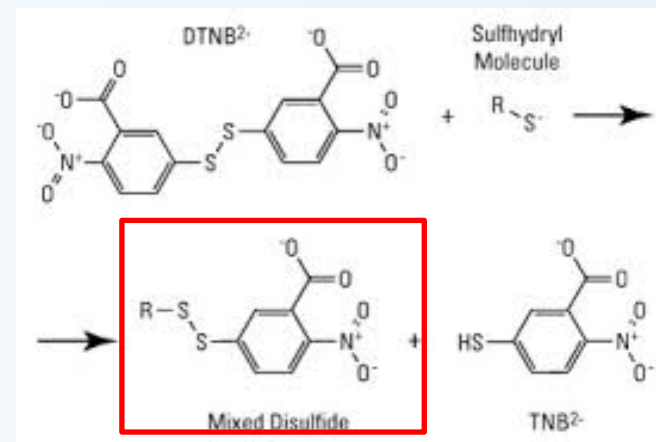
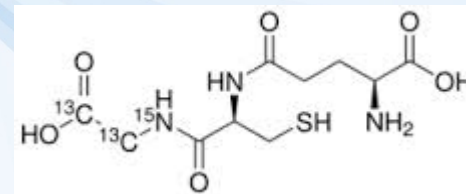


Modelový příklad – výzkumná studie

Další úpravy vzorku: na co dát pozor?

• EXTRAKČNÍ KROKY

- Vhodné pH
 - Zajištěno alkalickým pufrům (použit již pro extrakci)
- Reakce – co nejméně kroků, přesné pipetování
 - Přidání INTERNÍ STANDARD (izotopicky značený GSH)
 - Přidání konjugačního činidla: blokování reaktivních –SH skupin (DTNB)
 - Konjugace (T-lab, pH)
- Vysrážení proteinů
 - Přidání kys. Sulfosalicylové (pH)
 - Srážení (chlazení)
 - Centrifugace (chlazení)
- Ředění vzorku
 - Snížení „vysoké“ koncentrace GSH a zachování detekovatelnosti „nízké“ koncentrace GSSG
 - Menší vliv matrice
 - Analyt rozpuštěn v MF, lepší dělení při chromatografii
- Uchování k analýze -80 C

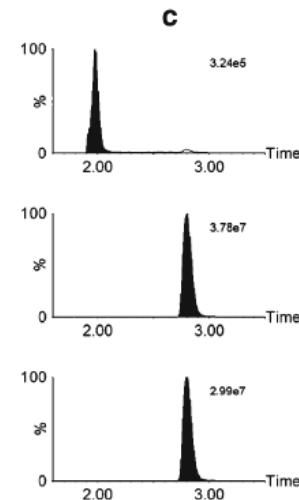


Modelový příklad – výzkumná studie

Analýza: na co dát pozor?

- Typ separace – LC, GC, bez separace
- Výběr kolony
 - Modifikovaná C18 (analyty jsou polárnější)
- Detekce
 - elektrochemická (redoxní reakce na -SH)
 - ELISA
 - UV-VIS (detekce barevného konjugátu GSH-DTNB , ne! GSSG)
 - hmotnostní detekce (GSH-DTNB (konjugovaný GSH), ^{13}C - ^{15}N -GSH-DTNB (konjugovaný interní standard), GSSG)
- Vyhodnocení (kalibrace s int. standardem)
- Koncentrace GSH/mg proteinů, mg tkáně; GSH/GSSG

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

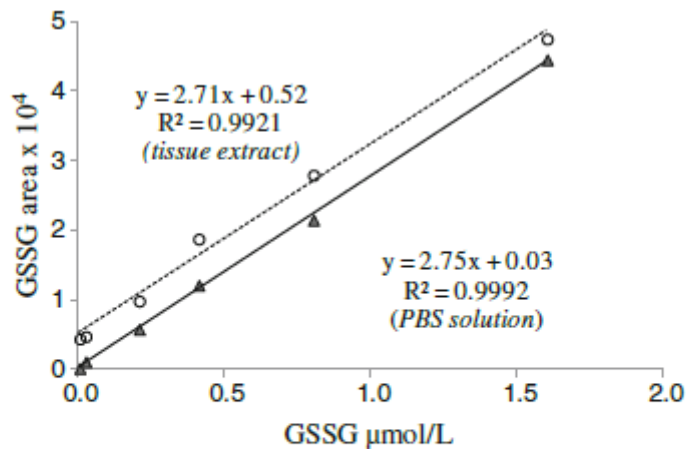
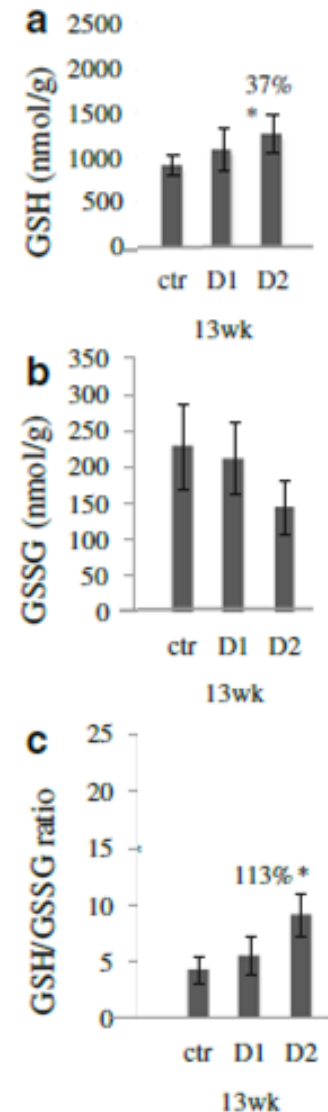
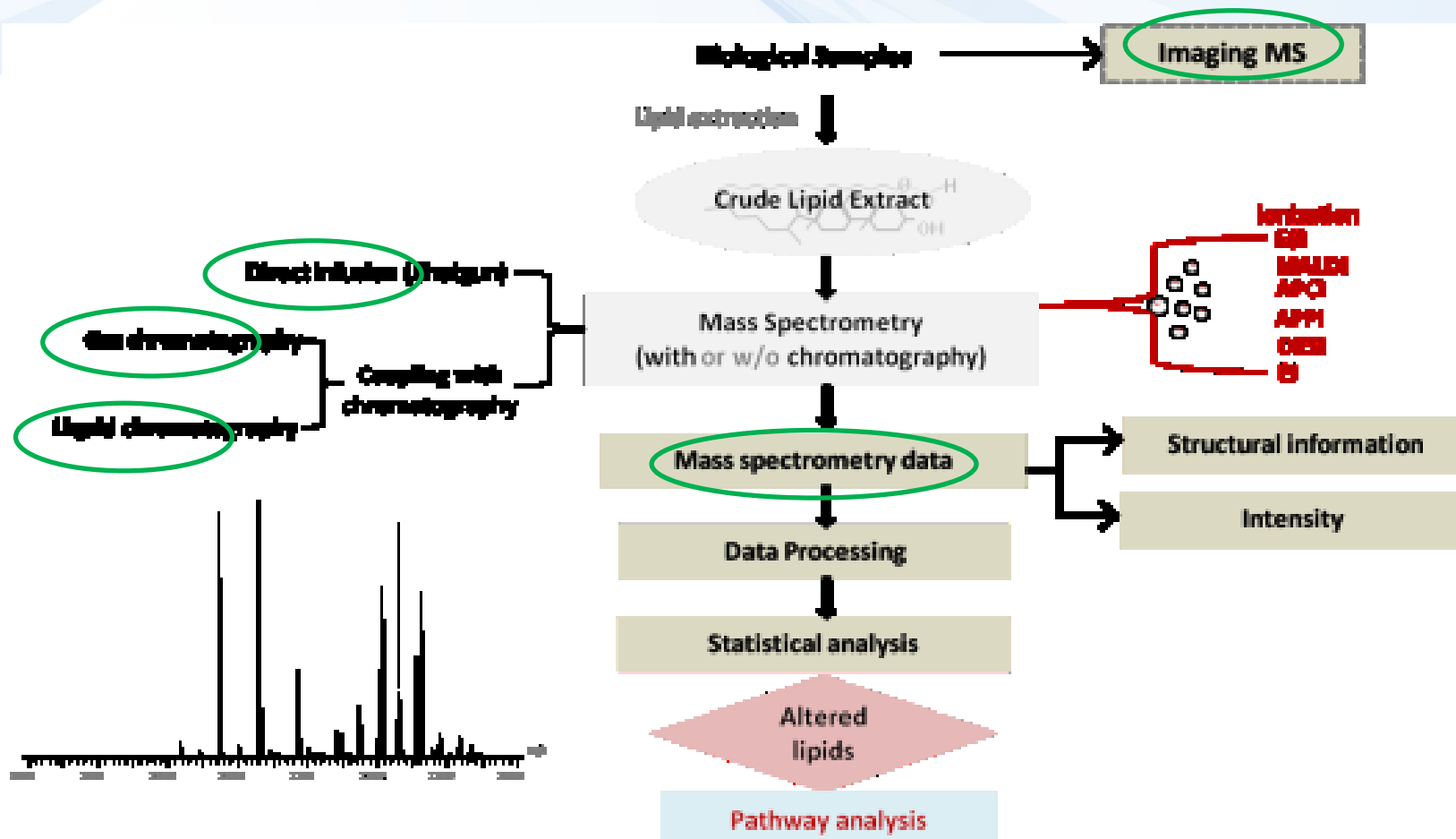


Fig. 3 Evaluation of matrix effects in LC MS/MS method for GSSG. Calibrations of GSSG (peak area vs concentration) prepared in PBS (triangles) and in the extract of lung tissue (circles). All samples were processed using the same protocol

Fig. 6 Content of GSH (a), content of GSSG (b), and GSH/GSSG ratio (c) in lung of mice after chronic exposure (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

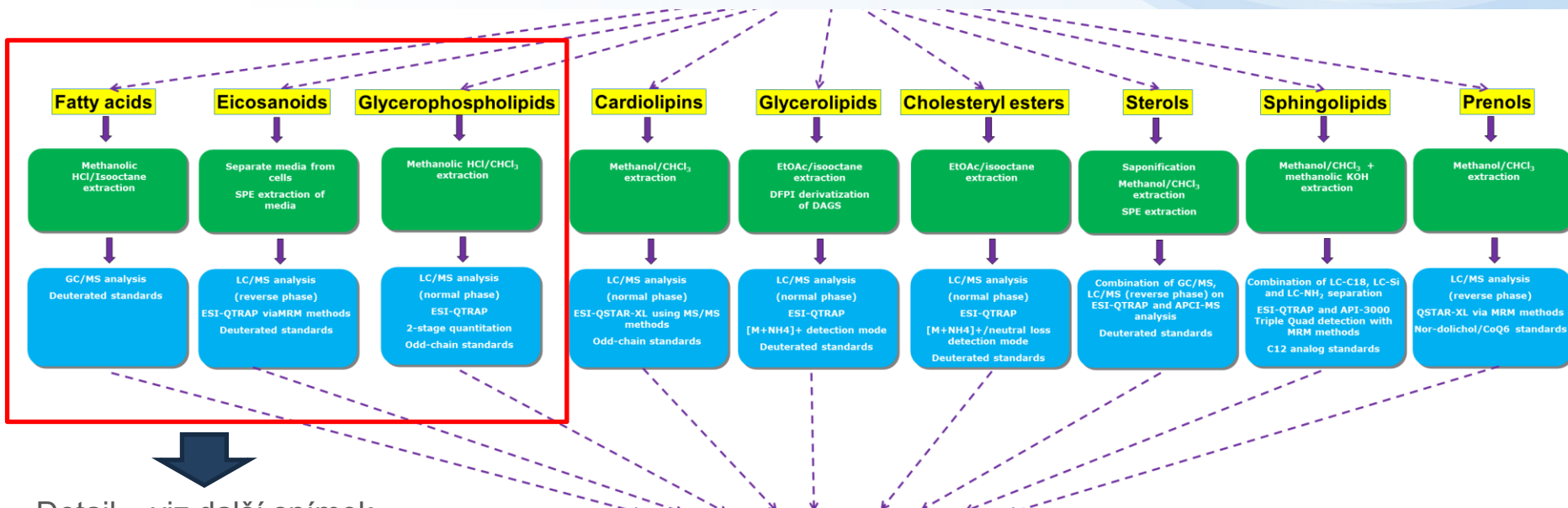


Analýza metabolitů – lipidy

Extrakce: různá pro různě polární lipidy, aditiva podporující rozpustnost, nutné antioxidanty, práce ve skle, inertní atmosféra 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)

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 je to metabolomika, principy stanovení metabolomu
 - Co jsou to metabolity? Jaké existují typy a skupiny? Významné metabolity lipidů, AA, NA
 - Jaké jsou klíčové kroky v jejich analýze? Principy metod extrakce, separace a detekce
 - U vybrané látky navrhnout a diskutovat přístup k analýze z biologického vzorku

