

UNIVERZITA KARLOVA
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Chemie
Studijní obor: Analytická chemie



Bc. Martina Mušutová

STUDIUM BIOSYNTÉZY LIPIDŮ PŘI HYPOXII POMOCÍ
CHROMATOGRRAFIE A HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE

Study of lipid biosynthesis during hypoxia using
chromatography and mass spectrometry

Diplomová práce

Vedoucí bakalářské práce: doc. RNDr. Josef Cvačka, Ph.D.

Konzultant: doc. MUDr. Jan Polák, Ph.D.

Praha 2018

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 16. května 2018

Poděkování

Tímto bych chtěla velice poděkovat svému školiteli doc. RNDr. Josefu Cvačkovi, PhD. a konzultantovi doc. MUDr. Janu Polákovi, Ph.D. za odbornou pomoc a vedení při tvorbě mé diplomové práce. Velký dík patří také mé rodině, a mému partnerovi, za nikdy nekončící podporu při mém studiu. Poslední poděkování patří Grantové agentuře Univerzity Karlovy za finanční podporu tohoto projektu č. 18217/2017.

Abstrakt

Tato diplomová práce se zabývá studium biosyntézy lipidů při hypoxii pomocí chromatografie a hmotnostní spektrometrie. První část práce vysvětluje teoretický základ provedeného výzkumu, který je zakotven ve studiu obstrukční spánkové apnoe a její souvislosti s diabetes mellitus 2. typu. Je předložena teorie, že hypoxie vede ke zvýšení biosyntézy mastných kyselin, a to prostřednictvím reverzní dráhy citrátového cyklu. Studium této reverzní dráhy bylo provedeno pomocí kultivovaných buněk, ke kterým byl přidán značený [5-¹³C] glutamin, jehož inkorporace mastných kyselin byla sledována pomocí GC-MS. Z buněčných vzorků byly extrahovány lipidy, z kterých byla pomocí tenkovrstvé chromatografie izolována frakce triacylglycerolů. Dále byla provedena transesterifikace na methylestery masných kyselin (FAME).

Ze získaných dat byl zjištěn nárůst FAME 16:0 o 91 % a FAME 16:1 o 102 % při hypoxických podmínkách oproti podmínkám kontrolním. Dále bylo zjištěno, že při hypoxii je ve vzorku o 5,9 % více [¹³C₁] FAME 16:0, o 12 % více [¹³C₁] FAME 16:1 a o téměř 3 % více [¹³C₂] FAME 16:1 oproti kontrolním vzorkům.

Klíčová slova

Biosyntéza lipidů, diabetes mellitus 2. typu, FAME, GC-MS, hypoxie, obstrukční spánková apnoe, 3T3-L1 preadipocyty, [5-¹³C] glutamin.

Abstract

The topic of this diploma thesis is the study of lipide biosynthesis in a hypoxic environment with the use of chromatography and mass spectrography. The first part of the thesis explains the theoretical basis for the research stipulated in the study of OSA and its connection to Type 2 diabetes mellitus. I propose the theory that hypoxia leads to the heightened biosynthesis of fatty acids by way of the reductive citric acid cycle. The research of this reductive citric acid cycle was done by means of cultivated cells with added labeled [5-¹³C] glutamine and its absorption into the fatty acids has been observed with the help of GC-MS. The lipides have been extracted from the cell samples, from which the fraction of triglyceride has been isolated with the help of thin layer chromatography. Furthermore, the transesterification to fatty acid methyl esters (FAME) has been performed.

The collected data showed a 91 % increase in FAME 16:0 and a 102 % increase in FAME 16:1 in a hypoxic environment compared to the control group. Furthermore, it has been found that samples in a hypoxic environment contained 5.9 % more [¹³C₁] FAME 16:0, 12 % more [¹³C₁] FAME 16:1 and almost 3 % more [¹³C₂] FAME 16:1 compared to the control group.

Keywords

Lipide biosynthesis, Type 2 diabetes mellitus, FAME, GC-MS, hypoxia, obstructive sleep apnea, 3T3-L1 preadipocytes, [5-¹³C] glutamine.

Obsah

1	Úvod	10
1.1	Cíle práce	10
2	Teoretická část	11
2.1	Syndrom spánkové apnoe	11
2.1.1	Klasifikace a definice syndromu spánkové apnoe.....	11
2.1.2	Patofyziologie vzniku obstrukční spánkové apnoe	11
2.1.3	Faktory přispívající ke vzniku OSA	12
2.1.4	OSA a diabetes mellitus 2. typu	12
2.2	Biosyntéza mastných kyselin a triacylglycerolů.....	13
2.3	Hypoxie a biosyntéza lipidů	15
2.3.1	Citrátový cyklus.....	15
2.3.2	Citrátový cyklus a hypoxie.....	15
2.3.3	Analýza reduktivní dráhy citrátového cyklu pomocí izotopového značení a GC-MS.....	16
2.4	Lipidy.....	18
2.4.1	Lipidy a jejich klasifikace.....	18
2.4.2	Chemické složení lipidů	18
2.5	Izolace a separace lipidů	18
2.5.1	Metody extrakce lipidů.....	18
2.5.2	Separace lipidů	19
2.6	Detekce lipidů pomocí hmotnostní spektrometrie	20
2.6.1	Základní principy hmotnostní spektrometrie.....	20
2.6.2	Instrumentace hmotnostní spektrometrie	21
2.6.3	Kombinovaný systém plynové chromatografie a hmotnostní spektrometrie	25
3	Experimentální část	26
3.1	Použité chemikálie	26

3.2	Použité přístroje a materiály	27
3.3	Metodika experimentu	27
3.4	Metody kultivace	28
3.4.1	Buněčná linie	28
3.4.2	3T3-L1 preadipocyty a jejich kultivace.....	29
3.4.3	Simulace hypoxických podmínek.....	30
3.4.4	Inkubace 3T3-L1 diferencovaných adipocytů s [5- ¹³ C] glutaminem.....	31
3.5	Extrakce lipidů z 3T3-L1 diferencovaných preadipocytů	31
3.6	Separace lipidů 3T3-L1 diferencovaných preadipocytů.....	31
3.6.1	TLC separace lipidů.....	31
3.7	Transesterifikace.....	33
3.7.1	Kyselá transesterifikace směsí metranol-HCl.....	34
3.7.2	Kyselá transesterifikace acetylchloridem	34
3.7.3	Zásaditá transesterifikace methoxidem sodným.....	34
3.8	Analýza vzorků pomocí GC-MS	35
3.8.1	Příprava interního standardu.....	36
3.8.2	Optimalizace teploty iontového zdroje.....	37
3.9	Vyhodnocení výsledků	37
4	Výsledky a diskuze.....	39
4.1	Analýza methyl esterů mastných kyselin metodou GC-MS.....	39
4.2	Optimalizace transesterifikace	41
4.3	Optimalizace teploty iontového zdroje	41
4.4	Profil mastných kyselin při hypoxii.....	42
4.5	Inkorporace značeného glutaminu ve vybraných mastných kyselinách.....	43
4.5.1	Inkorporace ¹³ C do methylesteru kyseliny hexadekanové	45
4.5.2	Inkorporace ¹³ C do methylesteru kyseliny hexadecenové.....	47
5	Závěr.....	51

6	Literatura	53
---	------------------	----

Seznam použitých zkratk a symbolů

ACP	protein nesoucí acyl
APCI	chemická ionizace za atmosférického tlaku
ATP	adenosintrifosfát
CE-MS	kapilární elektroforéza s hmotnostně spektrometrickou detekcí
CI	chemická ionizace
DM2T	diabetes mellitus 2. typu
EI	elektronová ionizace
ESI	elektrosprejová ionizace
FA	mastná kyselina
FADH ₂	riboflavinadenosindifosfát
FAME	methylester mastné kyseliny
GC	plynová chromatografie
GC-IR	plynová chromatografie s detekcí infračerveného záření
GC-MS	plynová chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí
HCD	horní cesty dýchací
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IDH1	izocitrátdehydrogenáza 1
IDH2	izocitrátdehydrogenáza 2
IH	intermitentní hypoxie
IS	interní standard
ISCD2	mezinárodní klasifikace poruch spánku a bdění
LC	kapalinová chromatografie
<i>m/z</i>	poměr hmotnosti a náboje
MALDI	laserová desorpce a ionizace za účasti matrice
NADH	nikotinamidadenindinukleotid
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NP-LC	kapalinová chromatografie s normální fází
OSA	obstrukční spánková apnoe
RP-LC	kapalinová chromatografie s reverzní fází
TCA	cyklus trikarboxylových kyselin – citrátový cyklus
TG	triacylglyceroly
TLC	chromatografie na tenké vrstvě

1 Úvod

Syndrom obstrukční spánkové apnoe (OSA) je onemocnění postihující až 7 % dospělých osob. Toto onemocnění je charakteristické opakovaným poklesem saturace hemoglobinu v krvi a následně i v cílových tkáních, v důsledku uzavření horních cest dýchacích v průběhu spánku. Tento stav označujeme jako hypoxii. Mnoho experimentálních studií uvádí spojitost mezi OSA a diabetes mellitus 2. typu, ale molekulární mechanismy vedoucí k rozvoji metabolického syndromu nejsou doposud objasněné. Jedním z možných biomechanismů je reduktivní dráha citrátového cyklu, která může mít za následek zvýšení hladiny lipidů u pacientů s obstrukční spánkovou apnoe, v důsledku čehož může dojít k rozvoji metabolického syndromu. Tato diplomová práce je zaměřena na studium biosyntézy lipidů při hypoxii pomocí plynové chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí. Pro studium reverzní dráhy citrátového cyklu budou kultivovány myší preadipocyty, pro které bude použito médium obohacené o izotopově značený glutamin, který umožní sledovat biosyntézu mastných kyselin.

1.1 Cíle práce

Cílem této diplomové práce je vypracování vhodného metodického postupu GC-MS analýzy mastných kyselin z diferenciovaných 3T3-L1 preadypocitů a následně postupu vyhodnocení izotopového obohacení vybraných mastných kyselin uhlíkem ^{13}C .

Dílní cíle práce jsou:

- Literární rešerše studovaného tématu,
- Extrakce lipidů z buněčných vzorků,
- Izolace TG pomocí tenkovrstvé chromatografie,
- Optimalizace pracovních podmínek,
- Analýza obsahu mastných kyselin v biologických vzorcích pomocí GC-MS vyhodnocení spekter a zpracování výsledků,
- Analýza izotopového obohacení biosyntetizovaných mastných kyselin pomocí GC-MS, vyhodnocení spekter a zpracování výsledků.

2 Teoretická část

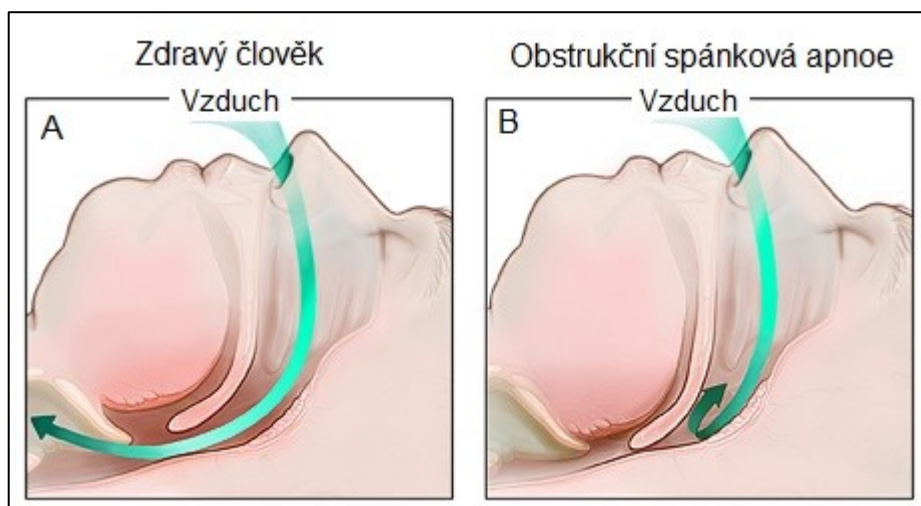
2.1 Syndrom spánkové apnoe

2.1.1 Klasifikace a definice syndromu spánkové apnoe

Syndrom spánkové apnoe je onemocnění, které se dle mezinárodní klasifikace poruch spánku a bdění (ICSD2) řadí mezi poruchy dýchání spojené se spánkem. Syndrom spánkové apnoe se vyznačuje zástavami dechu při spánku, přičemž tyto zástavy trvají minimálně deset sekund, s minimální frekvencí 5krát za hodinu spánku [1]. Dle příčin dělíme syndrom spánkové apnoe do tří skupin. Centrální syndrom spánkové apnoe je způsoben útlumem aktivity dechového centra v mozku a není při něm přítomno dechové úsilí. Obstrukční syndrom spánkové apnoe má svou příčinu v částečném nebo úplném uzavření horních cest dýchacích (HCD), kdy dochází k zástavám dechu při spánku, přestože není snížena aktivita v dechovém centru v mozku, při tomto typu spánkové apnoe je zachováno dechové úsilí. Posledním typem je smíšený syndrom spánkové apnoe, který je kombinací obou předchozích [2]. Nejčastnějším poruchou dýchání ve spánku je obstrukční spánková apnoe (OSA), a tato porucha je také předmětem této práce. Syndrom obstrukční spánkové apnoe je onemocnění postihující v běžné populaci přibližně 2 až 7 % dospělých osob [3].

2.1.2 Patofyziologie vzniku obstrukční spánkové apnoe

Pro zajištění správného dýchání ve spánku je klíčová dobrá průchodnost dýchacích cest. Horní cesty dýchací se skládají z dutiny nosní, nosohltanu, ústí část hltanu a hltanu. Prvním místem, kde může dojít k obstrukci je dutina nosní. Zde může být příčinou obstrukce například alergie či nadměrné užívání nosních kapek. Přestože je tato obstrukce možná, je často vyřešena dříve, než dojde k rozvoji OSA. To samé platí i pro nosohltan. Hlavní částí horních cest dýchacích, kde dochází k obstrukci vedoucí k OSA, je hltan. U zdravého člověka dochází při nádechu k zúžení průsvitu hltanu, průsvit hltanu je udržován svaly, které udržují určité napětí. Při OSA je toto napětí nižší a dochází tak ke kolapsu hltanu a výslednému zúžení HCD [4]. Normální stav HCD a stav při OSA zobrazuje obr. 2.1.



Obr. 2.1 Stav horních cest dýchacích u zdravého člověka a člověka trpícího OSA [5].

2.1.3 Faktory přispívající ke vzniku OSA

Mezi hlavní faktory vedoucí ke vzniku OSA patří pohlaví, kdy muži trpí tímto onemocněním až třikrát častěji než ženy [4]. Dalším faktorem je věk. Nejrizikovější skupinou jsou muži a ženy ve věku 61 až 100 let, kdy platí, že s přibývajícím věkem vzrůstá riziko onemocnění OSA [6] [7]. K rozvoji OSA dále přispívá tělesná hmotnost. Na základě epidemiologických studií je dokázáno, že obezita je velice významný faktor vedoucí k rozvoji obstrukční spánkové apnoe, a že až 60 % lidí trpících nadváhou či obezitou trpí některou formou syndromu spánkové apnoe. Mezi další faktory můžeme zařadit dědičnost, kouření a užívání alkoholu, či rasu [3].

2.1.4 OSA a diabetes mellitus 2. typu

Syndrom obstrukční spánkové apnoe, jak je již uvedeno výše, postihuje 2 až 7 % dospělých osob, zatímco u pacientů s diabetes mellitus 2. typu dosahuje prevalence OSA dle světových údajů až 70 % [8]. Kromě poklesu saturace hemoglobinu v krvi a následně i v cílových tkáních v důsledku uzavření HCD v průběhu spánku je druhým základním aspektem OSA spánková fragmentace, ke které dochází díky částečnému nebo kompletnímu probouzení ukončující jednotlivé apnoické epizody.

Četné studie provedené v posledních patnácti letech poukazují na možnou kauzální spojitost mezi OSA a vznikem inzulinové rezistence, porušené glukózové tolerance a konečně také rozvojem diabetes mellitus 2. typu (DM2T). Podstatné je, že tato asociace je

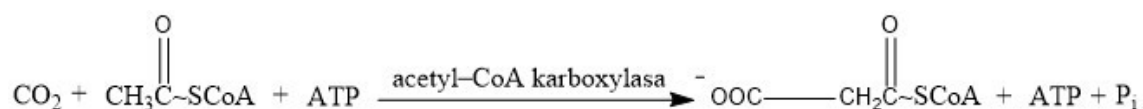
nezávislá na ostatních rizikových faktorech (obezita či věk) [9]. Přestože epidemiologická souvislost mezi syndromem obstrukční spánkové apnoe a rozvojem diabetes mellitus 2. typu je dobře popsána, konkrétní molekulární a endokrinní mechanismy, které kauzálně vedou k rozvoji metabolických poruch při OSA, nejsou dosud dostatečně objasněny a jsou předmětem intenzivního výzkumu.

Předchozí práce naznačují, že negativní metabolické projevy pozorované u OSA jsou (alespoň částečně) přímým následkem expozice hypoxii, která je typickým průvodním jevem při OSA, a dále poukázali na centrální úlohu tukové tkáně a adipocytů, které jsou významným cílovým orgánem při expozici hypoxii, která je charakteristickým znakem OSA [10].

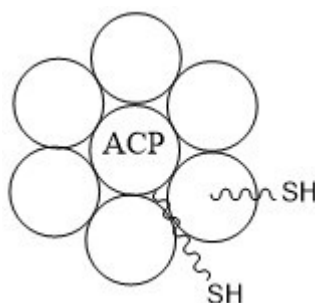
2.2 Biosyntéza mastných kyselin a triacylglycerolů

Základní stavební jednotkou pro de novo syntézu mastných kyselin je acetyl-CoA. Hlavním zdrojem acetyl-CoA je β -oxidace mastných kyselin (odbourávání FA) a glykolýza, kdy je výsledný pyruvát dekarboxylován enzymem pyruvát dehydrogenázou (aerobní odbourávání sacharidů) [11].

Principem syntézy FA je redukce acetylů na zbytky $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$, které vytvářejí kostru FA. Tyto zbytky nevznikají přímou redukcí acetylů, nýbrž z energeticky bohatšího malonyl-CoA který vzniká karboxylací acetyl-CoA, klíčovým enzymem této reakce je acetyl-CoA karboxyláza.

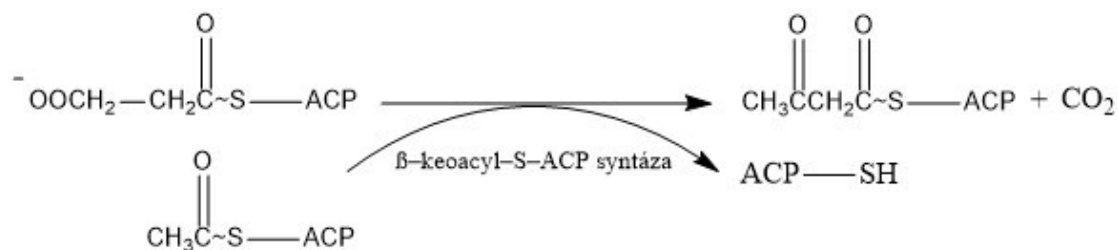


Vlastní biosyntéza FA probíhá na multienzymovém komplexu označovaném ACP, kdy doslovný překlad této zkratky znamená protein nesoucí acyl. Jedna molekula ACP obsahuje dvě thiolové skupiny (SH), které umožňují biosyntézu FA.

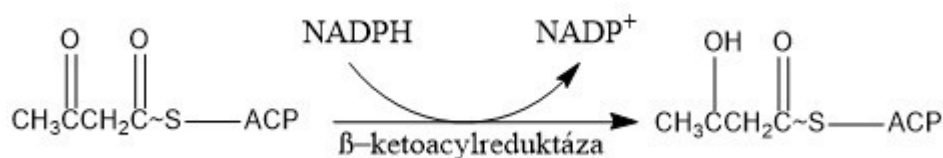


Biosyntéze FA probíhá v několika krocích:

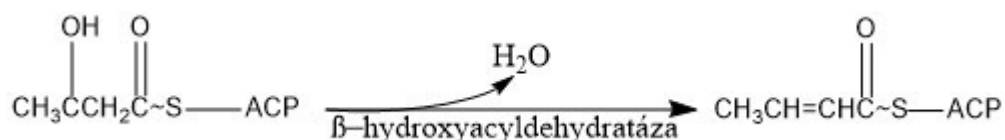
1. *Transacylace* → navázání malonylového (malonyltransferáza) a acetylového (acetyltransferáza) zbytku na ACP.
2. *Kondenzace malonyl-ACP s acetyl-ACP* → ke kondenzaci dochází za přítomnosti enzymu β -ketoacyl-ACP syntázy.



3. *První redukce* → redukce β -ketoxyacylové skupiny enzymem β -ketoacylreduktázou.



4. *Dehydratace* – působením β -hydroxyacyldehydratázou se odštěpí molekula vody a vznikne nenasycený acyl



5. *Další redukce* → redukce nenasyceného acylu na nasycený pomocí enzymu α, β -enoylreduktáza. Následuje nový cyklus reakcí 2 až 5, cykly se opakují do požadované délky řetězce (C_{16} kyselina), poté se proces zastaví allosterickou inhibicí.



6. Další přeměny palmitátu → biosyntetizovaná FA se uvolní z ACP a dále může být využita pro syntézu lipidů nebo prodloužena o další $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ zbytky [12].

Mastné kyseliny, jak již bylo napsáno, tvoří základ nejvíce zastoupené skupiny lipidů, triacylglycerolů. Kromě FA je hlavní stavební jednotkou těchto lipidů glycerol. Glycerol pro syntézu TG musí být nejdříve aktivován na *sn*-glycerol-3-fosfát. K této aktivaci dochází působením glycerolkinázy na glycerol. Následně jsou na OH skupiny aktivovaného glycerolu navázány acylové zbytky a vzniká tak fosfatidová kyselina, která je hlavním meziproduktem biosyntézy acylglyceridů.

TG vznikají z fosfatidové kyseliny ve dvou krocích:

1. Odštěpení fosfátového zbytku (fosfatidát fosfatáza) – vznik 1,2-diacylglycerolu
2. Přenesení acylového zbytku na OH skupinu (diacylglycerol acyltransferáza) [11].

2.3 Hypoxie a biosyntéza lipidů

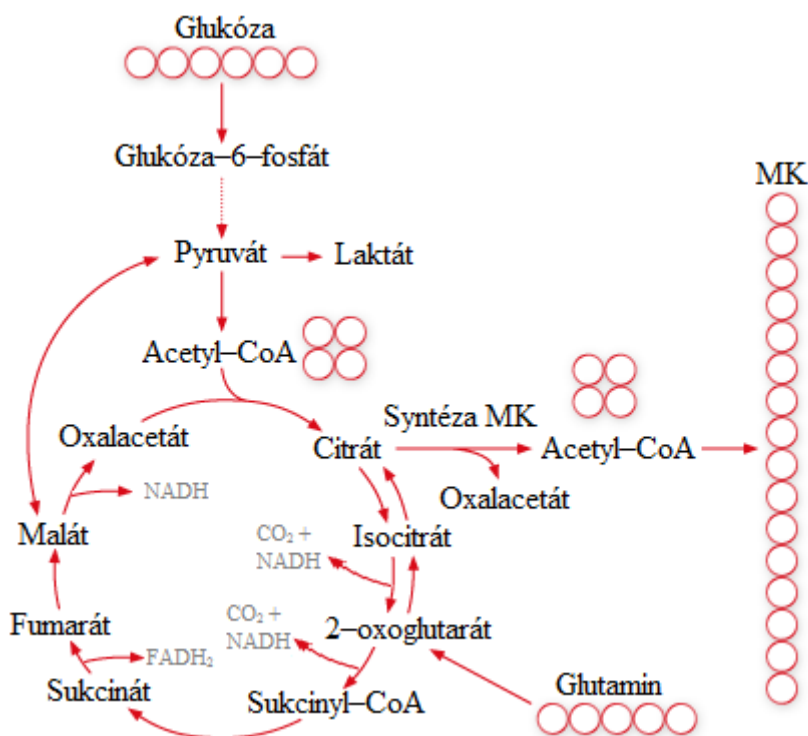
2.3.1 Citrátový cyklus

Cyklus trikarboxylových kyselin (TCA cyklus) neboli citrátový cyklus je cyklická metabolická dráha zodpovědná za oxidaci většiny sacharidů, mastných kyselin a aminokyselin. Citrátový cyklus je lokalizován ve vnitřním prostoru mitochondrie – matrix. Když buňky proliferují za normotvorných podmínek, glukóza poskytuje pyruvát, který se oxidační dekarboxylací přeměňuje na Acetyl-CoA, který jak již bylo uvedeno vzniká hojně i při β -oxidaci mastných kyselin. Acetyl-CoA kondenzuje s oxaloacetátem za vzniku citrátu a představuje tedy vstup do citrátového cyklu, kde se acyl přeměňuje na 2 molekuly CO_2 a dále poskytuje redukované formy koenzymů (NADH a FADH_2) potřebných pro tvorbu ATP v dýchacím řetězci [13].

2.3.2 Citrátový cyklus a hypoxie

Při syndromu obstrukční spánkové apnoe, jak již bylo vysvětleno, dochází v důsledku obstrukce horních cest dýchacích k zástavám dechu během spánku, v důsledku čehož klesá saturace kyslíku v krvi a následně v cílových tkáních. Tento stav označujeme jako hypoxii. Předchozí výzkumy ukazují, že některé hypoxické buňky jsou schopné udržet proliferaci buněk, i přes výrazné snížení produkce citrátu z aerobní glykolýzy. V těchto hypoxických buňkách je hlavním zdrojem citrátu glutamin. Na vzniku citrátu z glutaminu se podílí reduktivní dráha citrátového cyklu. V této části citrátového cyklu vzniká 2-oxoglutarát, odvozený z glutaminu. Ten je redukcí karboxylován za spotřeby NADPH enzymem izocitrátdehydrogenázou (IDH1 a IDH2) na isocitrát, který lze následně izomerovat na citrát. Redukční karboxylace glutaminu umožňuje za hypoxických podmínek proliferaci buněk,

a glutamin se stává zdrojem citrátu, který se zapojuje v syntéze mastných kyselin. Předchozí vědecké práce tedy podporují roli glutaminové karboxylace při udržování syntézy citrátu, FA a buněčného růstu za hypoxických podmínek. Obě dráhy citrátového cyklu, oxidativní a redukční, a jejich návaznost na syntézu mastných kyselin zobrazuje obr. 2.2 [14].



Obr. 2.2 Citrátový cyklus a vznik mastných kyselin prostřednictvím redukční karboxylace glutaminu [15].

2.3.3 Analýza redukční dráhy citrátového cyklu pomocí izotopového značení a GC-MS

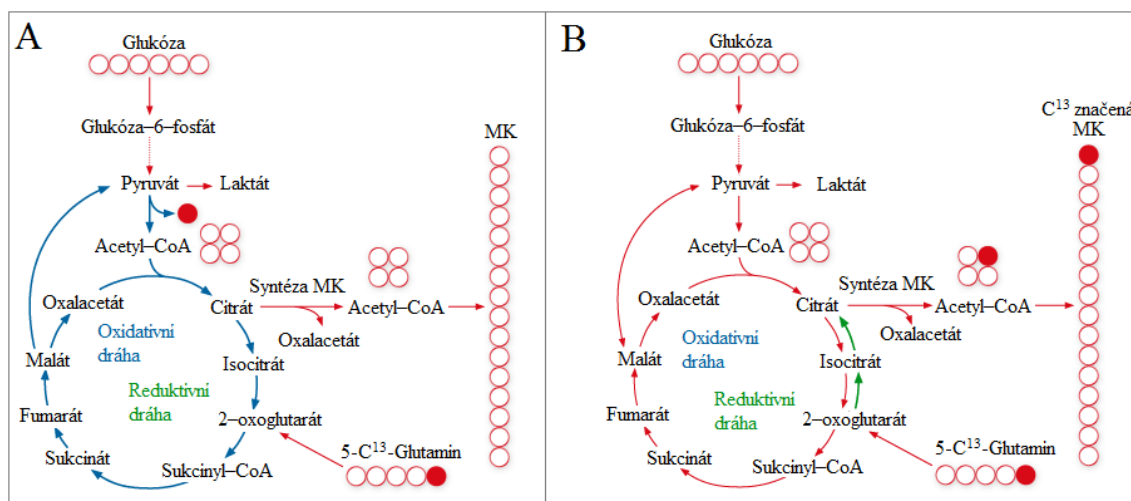
Mastné kyseliny hrají v buňkách významnou roli, podílejí se na výstavbě buněčných membrán, jsou zdrojem energie, a některé mají funkci signálních molekul. Změny jejich metabolismu jsou spojeny s některými civilizačními chorobami, jako je obezita či diabetes mellitus 2. typu, nejen z tohoto důvodu se stalo zkoumání metabolismu mastných kyselin předmětem mnoha výzkumů.

Jednou z nejčastěji využívaných metod pro objasnění metabolismu mastných kyselin je použití izotopově značeného substrátu. Často se pro tyto účely používá radioaktivní izotop ¹⁴C, jeho použití klade nízké nároky na přípravu vzorku a není potřebné využití

hmotnostní spektrometrie, avšak neposkytuje informace o izotopovém obohacení jednotlivých mastných kyselin.

Pro získání informací o jednotlivých mastných kyselinách a jejich izotopovém obohacení, se využívá izotop ^{13}C . Jak již bylo uvedeno, zdrojem pro biosyntézu mastných kyselin je acetyl-CoA, jehož zdrojem může glukóza, glutamin či acetát. Vhodným obohacením těchto substrátů o izotop ^{13}C lze sledovat metabolismus mastných kyselin, jelikož každý značený substrát, který bude metabolizovat na acetyl-CoA, se bude podílet na značení mastných kyselin [16].

Pro analýzu reduktivní dráhy citrátového cyklu je vhodným substrátem glutamin, jehož značená molekula se používá například pro analýzu metabolismu u hypoxických nádorových buněk [17]. glutamin může být značený několika způsoby. Obecně se využívá glutamin $[\text{U-}^{13}\text{C}_5]$, který má značený všechny uhlíky ve své molekule, takto značený glutamin poskytuje informaci o celkovém přínosu glutamin v citrátovém cyklu. Dále lze využít částečně značený glutamin, a to buď na prvním $[1\text{-}^{13}\text{C}]$ či na pátém $[5\text{-}^{13}\text{C}]$ uhlíku. Právě značený $[5\text{-}^{13}\text{C}]$ glutamin poskytuje informaci o zapojení reduktivní dráhy citrátového cyklu. Při oxidativní dráze citrátového cyklu se $[5\text{-}^{13}\text{C}]$ glutamin nepřeměňuje na acetyl-CoA a tudíž se značený uhlík na syntéze FA nepodílí, zatím co při reduktivní dráze se značený glutamin metabolizuje na acetyl-CoA, který poskytne ^{13}C značený uhlík pro syntézu mastných kyselin. Zapojení $[5\text{-}^{13}\text{C}]$ glutaminu zobrazuje obr. 2.3 [18].



Obr. 2.3 Zapojení $[5\text{-}^{13}\text{C}]$ glutaminu v oxidativní (A) a reduktivní (B) dráze citrátového cyklu a následné syntéze mastných kyselin [15].

2.4 Lipidy

2.4.1 Lipidy a jejich klasifikace

Lipidy lze definovat jako mastné kyseliny a jejich deriváty a látky biosynteticky nebo funkčně příbuzné těmto sloučeninám [19].

Na základě struktury se lipidy dělí na lipidy jednoduché, složené a odvozené. Mezi jednoduché lipidy řadíme estery mastných kyselin (FA) a alkoholu. Patří mezi ně acylglyceroly, kde alkohol tvoří glycerol, a vosky u nichž alkoholem je např. cerylalkohol (včelí vosk). Složené lipidy obsahují kromě alkoholu a FA ještě další složky např. nejčastější fosfolipidy jsou deriváty kyseliny fosfatidové. Lipidy odvozené jsou látky, které mají lipidický charakter, ale na základě své struktury je není možné řadit mezi lipidy jednoduché či složené. Příkladem odvozených lipidů jsou steroidy, lipofilní vitaminy či karotenoidy. Kromě struktury lze lipidy dělit i na základě chemických vlastností, a to na lipidy zmydelnitelné (triacylglyceroly) a nezmydelnitelné (isoprenoidy) či polární (fosfolipidy) a nepolární (jednoduché lipidy) [20].

2.4.2 Chemické složení lipidů

Základ velké části lipidů tvoří alifatické mastné kyseliny s jednou karboxylovou skupinou. Tyto mastné kyseliny mohou být nasycené či nenasycené, stejně jako mohou být větvené či naopak nevětvené. Délky uhlíkových řetězců mastných kyselin v molekulách lipidů jsou různé, většinou však dosahují sudého počtu uhlíků. Druhou součástí většiny lipidů jsou alkoholy vázané například esterovou vazbou. Nejvíce se v lipidech vyskytuje glycerol, sfingosin či aminoalkohol.

Nejčetnější lipidovou skupinou v tukové tkáni jsou acylglyceroly, které tvoří převážně triacylglyceroly. Triacylglyceroly (TG) jsou tvořeny jednou molekulou glycerolu s esterově navázanými třemi mastnými kyselinami [21].

2.5 Izolace a separace lipidů

2.5.1 Metody extrakce lipidů

Prvním krokem analýzy lipidů je jejich extrakce z matrice vzorku. Pro úspěšnou extrakci je nezbytné správné zacházení se získaným vzorkem, zejména pokud není možná okamžitá analýza vzorku, je třeba vzorek skladovat při nízkých teplotách a v uzavřené nádobě, aby bylo zamezeno kontaminaci a degradaci lipidů.

Extrakční metoda by měla splňovat několik parametrů. V první řadě by mělo dojít pouze k izolaci lipidů, přičemž by měla být zachována nativní struktura lipidů. Dále by mělo být zamezeno autooxidaci lipidů vzdušným kyslíkem [22]. Pro extrakci lipidů nejčastěji volíme extrakci organickými rozpouštědly [23].

Extrakčních metod lipidů je velké množství, daná metoda se volí na základě složení analyzovaného vzorku. Pro vzorky s nízkým obsahem vody se používá metoda podle Folche kdy dochází k extrakci směsí chloroform/methanol v poměru 2:1 a následné filtraci a reextrakci vodou [24]. Naopak pro vzorky s velkým obsahem vody je vhodná extrakce podle Bligha a Dyera, která používá opačný poměr směsi chloroform/methanol pro homogenizaci vzorku, než je mu u extrakce podle Folche s následným ředěním vodou a chloroformem [25]. Pro extrakci lipidů z biologických vzorků lze použít extrakci methyl-*tert*-butyletherem (MTBE). Lipidy, vyextrahované do organické fáze, tvoří díky nízké hustotě MTBE během fázové separace horní vrstvu, což umožňuje snadnější sběr a minimalizaci ztrát [26].

Pro vypracování této práce bude použita metoda extrakce příbuzná metodě dle Folche, kdy vzorek bude buněčný vzorek rozpuštěn ve směsi methanolu s fosfátovým pufrům (PBS) a extrahován do chloroformu [16].

2.5.2 Separace lipidů

V současné době existuje široké spektrum možností analýzy lipidů. K separaci jednotlivých lipidů či lipidových tříd se obecně využívají chromatografické metody, a to buď samostatně, či v kombinaci s další analytickou metodou. Mezi hlavní chromatografické metody využívané k analýze lipidů patří:

Chromatografie na tenké vrstvě

Chromatografie na tenké vrstvě (TLC) je rychlá a dobře zavedená analytická technika, která umožňuje rychlou detekci sledovaného vzorku. Umožňuje separaci většiny neutrálních lipidů. Jako stacionární fáze se nejčastěji používá polární silikagel (pórovitá forma oxidu křemičitého) a mobilní fáze je tvořena směsí nepolárních rozpouštědel, vybranou na základě analyzovaného vzorku. Pro identifikaci lipidových tříd se provádí analytická TLC s využitím vhodných standardů. Tenkovrstvou chromatografií lze použít k preparativním účelům pro malé objemy vzorku. Pro větší objemy vzorku se lépe hodí chromatografie kolonová [27].

Plynová chromatografie

Plynová chromatografie (GC) je analytická metoda umožňující separaci látek ve vzorku, který lze převést do plynného stavu. Separované sloučeniny musí být tepelně stabilní a s vysokou tenzí par, aby při vstřiku vzorku došlo k jejich vypaření, což limituje použitelnost této metody pro separaci lipidů. Toto omezení lze odstranit derivatizací vzorku. Příprava vzorku pro GC většinou zahrnuje předběžnou separaci lipidových tříd, hydrolýzu, derivatizaci či pyrolýzu. Tuhy a oleje převážně obsahují acylglyceroly – estery mastných kyselin glycerolu. Často používaným způsobem jejich deprivatizace je transesterifikace na deriváty mastných kyselin (FAME). K dělení FAME a jejich identifikaci se nejčastěji používá spojení GC-MS či GC-IR [28].

Kapalinová a vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Kapalinová chromatografie (LC) a vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) má v analýze lipidů mnohem širší využití než plynová chromatografie. Na základě složení mobilní a stacionární fáze rozlišujeme:

- a) LC s normální fází (NP-LC) – stacionární fáze je polární a mobilní fáze je nepolární. Využívá se pro separaci lipidů na základě tříd.
- b) LC s reverzní fází (RP-LC) – stacionární fáze je nepolární a mobilní fáze je polární. Využívá se k separaci polohových izomerů TG [29] či pro analýzu volných mastných kyselin a FAME [30].

Pro separaci lipidů se často používá argentační chromatografie. Tato metoda LC analýzy umožňuje separaci lipidů na základě počtu, typu a polohy nenasycených vazeb, a to na základě tvorby slabých reverzibilních komplexů π elektronů těchto vazeb s ionty stříbra [31].

2.6 Detekce lipidů pomocí hmotnostní spektrometrie

2.6.1 Základní principy hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie je fyzikálně chemická analytická metoda, která může být použita selektivně k detekci a stanovení daného analytu, nebo k určení elementárního složení a molekulární struktury analytu. Principem této metody je převedení molekul na ionty a následné rozdělení těchto iontů podle poměru hmotnosti a náboje (m/z). Hmotnostní spektrometrie je vysoce citlivá metoda a umožňuje analýzu velké skupiny látek. Metoda se využívá k analýze vzorků v pevném, plynném či kapalném skupenství. Nejčastěji se jedná

o látky organické nebo anorganické v biologických matricích či organických rozpouštědlech [32].

2.6.2 Instrumentace hmotnostní spektrometrie

Iontové zdroje

Iontový zdroj slouží k převedení neutrální analyzované látky do ionizovaného stavu. Ionizace, jakožto první krok analýzy, zásadně ovlivňuje citlivost a mez detekce měření. Možností ionizace analyzované látky je několik, a volba se odvíjí především od aplikace metody. K ionizaci neutrální molekuly je potřeba dodání energie. Množství energie potřebné k ionizaci analytu závisí na jeho složení. Na základě množství dodané energie lze ionizační techniky dělit na měkké a tvrdé. Měkké techniky ionizace se vyznačují tím, že dochází k zanedbatelné fragmentaci ionizované látky. Oproti tomu u technik tvrdých, ionizovaná molekula při ionizaci získá nadbytek vnitřní energie, což se projeví fragmentací molekulového iontu na fragmentové ionty. Mezi hlavní typy ionizací patří:

Elektronová ionizace (EI)

Jedná se o metodu ionizace řadící se mezi tvrdé ionizační techniky v plynné fázi. Principem je ionizace pomocí elektronů. Ionizace elektrony vede ke vzniku radikálkationtů, pro které je typická vysoká úroveň fragmentace. Zdrojem elektronů je nejčastěji žhavené wolframové nebo rheniové vlákno. Energie elektronů se volí zpravidla 70 eV, což je energie zajišťující vznik maximálního počtu iontů a vysokou úroveň fragmentace. Tato metoda se běžně využívá ve spojení GC-MS [33].

Chemická ionizace (CI)

Tato metoda, řadící se do skupiny měkkých ionizačních technik v plynné fázi, využívá k ionizaci, stejně jako EI, elektrony. Energie elektronů však není přenášena přímo na ionizovanou látku, jako je tomu u EI, ale prostřednictvím reakčního plynu. Výsledná ionizace je tedy jemnější, a vede k nízké fragmentaci. Konstrukce iontového zdroje s CI je podobná zdroji s EI. Velká část přístrojů proto obsahuje kombinovaný zdroj ionizace umožňující volbu mezi CI a EI [34].

Elektrosprejová ionizace (ESI)

Elektrosprejová ionizace je měkká ionizační technika probíhající za atmosférického tlaku. Tato technika ionizace je praktická pro analýzu velkých molekul ($\sim 10^5$ Da), jako jsou proteiny či polymery nukleových kyselin. Jedná se o iontový zdroj, který převádí nabitě ionty z kapalně fáze do plynné fáze. Principem je zmlžení roztoku vzorku na malé elektricky nabitě kapičky a následným uvolněním iontů, takto uvolněné ionty jsou poté transportovány z oblasti atmosférického tlaku do vakua v hmotnostním analyzátoru. Tento ionizační zdroj se nejčastěji využívá v LC-MS či CE-MS [34].

Chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI)

Tato metoda ionizace je po ESI druhá nejčastěji používaná metoda pro spojení LC-MS, ale nachází své využití i v kombinaci GC-MS. Oproti ESI se jedná o tvrdší ionizaci, jejíž principem je přívod kapalně fáze do pneumického rozprašovače, který je vyhříván na vysokou teplotu, díky čemuž dojde k rozprášení a odpaření vzorku. Následně prostřednictvím koronového výboje vzniká plazma, ve které dochází k přenosu protonu na analyt [35].

Laserová desorpce a ionizace za účasti matrice (MALDI)

Jedná se o měkkou metodu ionizace využívající laserového pulzu. Vzorek, společně s matricí je nanesen na MALDI terčik, kde je vystaven laserovému záření. Excitované molekuly matrice se stabilizují přenosem protonu na vzorek, a vzniklé ionty jsou urychleny do analyzátoru [36].

Tabulka 2.1 Přehled ionizačních technik používaných v hmotnostní spektrometrii a jejich základní parametry [37] [33].

Metoda	Typ vzorku	Hmotnostní rozsah [Da]	Tlak [Pa]	Technika ionizace
EI	těkavé látky	> 1000	$10^{-3} - 10^{-5}$	tvrdá
CI	těkavé látky	> 1000	50 – 100	měkká
ESI	látky středně polární až iontové	> 100 000	$1,05 \cdot 10^{-5}$	měkká
APCI	látky nepolární až středně polární	> 1500	$1,05 \cdot 10^{-5}$	měkká
MALDI	proteiny, lipidy, polymery	> 500 000	$10^{-3} - 1,05 \cdot 10^{-5}$	měkká

Hmotnostní analyzátory

Hmotnostní analyzátory slouží k dělení iontů na základě jejich poměru hmotnosti a náboje (m/z). Konstrukčně je analyzátor v hmotnostním spektrometru umístěn za iontovým zdrojem. Rozlišujeme několik analyzátorů, ve všech však dělení iontů probíhá za vysokého vakua.

Magnetický analyzátor

Jedná se o nejstarší typ analyzátoru, umožňující analýzy s vysokým rozlišením. Principem je průlet iontu magnetickým polem, přičemž dojde k zakřivení dráhy letu. Čím větší toto zakřivení je, tím je poměr m/z nižší (těžké ionty jsou zatíženy větší odstředivou silou) [38].

Kvadrupólový analyzátor

Kvadrupólový analyzátor funguje jako filtr, kdy jsou plynulou změnou hodnot stejnosměrného napětí U a amplitudy střídavého napětí V postupně na detektor propouštěny ionty s různým poměrem m/z . Konstrukčně se kvadrupólový analyzátor skládá ze čtyř kovových tyčí kruhového či hyperbolického průměru, které jsou připojeny ke zdrojům stejnosměrného a vysokofrekvenčního střídavého napětí. Tento analyzátor je často využíván ve spojení GC-MS či LC-MS [34].

Iontová past

Iontová past se skládá ze vstupní, výstupní a středové prstencové elektrody. Principem analyzátoru je nadávkování iontů pomocí krátkého napěťového pulzu otvorem vstupní elektrody do pasti, a pomocí vhodných poměrů napětí na elektrodách jsou ionty drženy uvnitř pasti. Nakonec jsou ionty změnou napětí na postupně otvorem ve výstupní elektrodě vypuzovány dle hodnot m/z na detektor. Iontové pasti jsou běžné ve spojení GC-MS a LC-MS [34].

Analyzátor doby letu

Jedná se o jednoduchý analyzátor, který je tvořen evakuovanou trubicí. Ionty jsou děleny dle poměru m/z na základě různé doby letu, kdy při stejné kinetické energii lehké ionty dorazí k detektoru dříve než ionty těžké. Průletový analyzátor vyžaduje spojení s iontovým zdrojem umožňujícím pulzní provedení. Nejčastější je spojení s LC-MS [38].

Tabulka 2.2 Přehled analyzátorů používaných v hmotnostní spektrometrii, a jejich základní parametry [38].

Analyzátor	Rozlišovací schopnost [10^4]	Rozsah hmotnosti m/z [10^4]	Lineární dynamický rozsah
Magnetický	10	1	$1 \cdot 10^9$
Kvadrupól	0,01 – 0,1	0,4	$1 \cdot 10^7$
Iontová past	0,1 – 1	0,4	$1 \cdot 10^2 - 1 \cdot 10^3$
Průletový	0,1 – 4	>10	$1 \cdot 10^6$

Detektory

Ionty separované hmotnostním analyzátozem jsou zaznamenány v detektoru. Pro hmotnostní spektrometrii můžeme detektory rozdělit do dvou skupin.

Detektory pro přímá měření

Principem je detekce elektrického proudu vzniklého při dopadu iontů. Využití mají například při určování stáří hornin, jelikož umožňují přesnou izotopovou analýzu zastoupené prvků. V běžných aplikacích MS se nevyužívají.

Násobičové detektory

Jsou nejběžnější komerčně využívané detektory. Principem je násobení elektronů vzniklých po dopadu iontů, které poskytují měřitelný signál. Do této skupiny patří detektory elektronnásobičové či fotonásobičové. Elektronnásobičový detektor rozlišujeme s diskretním dynodovým polem (série elektricky propojených dynod) nebo s kontinuální dynodou (zakřivená trubice s vysokým elektrickým odporem). Fotonásobičové detektory obsahují pomocnou kovovou elektrodu, na které jsou ionty převedeny na elektrony, které po dopadu na scintilační stínítko poskytují fotony. Tyto detektory jsou oproti elektronnásobičovým detektorům konstrukčně náročnější, ale mají vyšší životnost [32] [35].

2.6.3 Kombinovaný systém plynové chromatografie a hmotnostní spektrometrie

Kombinace plynové chromatografie a hmotnostní spektrometrie je jednou s nejvíce využívaných kombinovaných analytických technik pro identifikaci a kvantifikaci organických látek. Systém GC-MS našel své uplatnění v mnoha odvětvích, jako jsou environmentální vědy, biologický výzkum, forenzní vědy, ochrana zdraví či analýza potravin. Jedná se o kombinaci dvou metod, kdy plynová chromatografie slouží k separaci jednotlivých složek, a hmotnostní spektrometr poskytuje informaci o jejich struktuře. Z technického hlediska je hlavním problémem propojení těchto dvou přístrojů tlaková nekompatibilita, kdy plynová chromatografie probíhá přibližně za atmosférického tlaku, zatímco iontové zdroje používané pro GC-MS (především EI) pracují za vakua. Pro zabránění ionizace plynné mobilní fáze se využívají výkonná čerpadla, dále se používají kapilární kolony s průtokem v jednotkách $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$, které umožňují přímé spojení s iontovým zdrojem [35] [37].

3 Experimentální část

3.1 Použité chemikálie

Buněčná kultivace

Buněčné kultury a média (Zen-Bio, NC, USA)

- 3T3-L1 diferenciační médium
- 3T3-L1 diferenciační médium bez glutaminu
- 3T3-L1 myší preadipocyty
- AM-1-L1 3T3-L1 preadipocytární médium
- AM-1-L1 3T3-L1 preadipocytární médium bez glutaminu
- PM-1-L1 3T3-L1 preadipocytární médium

Chemikálie použité při kultivaci (Sigma Aldrich, Německo)

- Penicillin-Streptomycin
- Fyziologický roztok pufovaný fosfáty
- Trypsin
- [5-¹³C] glutamin 99 atom % ¹³C, 99% CP

Chemikálie použité pro přípravu vzorku k GC-MS analýze

Rozpuštědla (Merck, Německo pokud není uvedeno jinak)

- Diethylether dest.
- Etylalkohol p.a. 96% (Lachner s.r.o., Česká republika)
- Hexan \geq 97%
- Chloroform stabilizován 1 % ethanolu p.a. (Penta, Česká republika)
- Methanol \geq 99,9%
- Toluene \geq 99,9%

Ostatní chemikálie

- Acetylchlorid (Fluka, Švýcarsko)
- Kyselina chlorovodíková 35% p.a. (Penta, Česká republika)
- Kyselina octová 99% p.a. (Lachner s.r.o., Česká republika)
- Kyselina palmitová >99% (Nu Chek Prep, USA)
- Rhodamin 6G (Merck, Německo)
- Roztok methoxid sodného 0,5 M (Merck, Německo)
- Silica gel 60 G (Merck, Německo)
- Triolein >99% (Nu Chek Prep, USA)

3.2 Použité přístroje a materiály

Buněčná kultivace

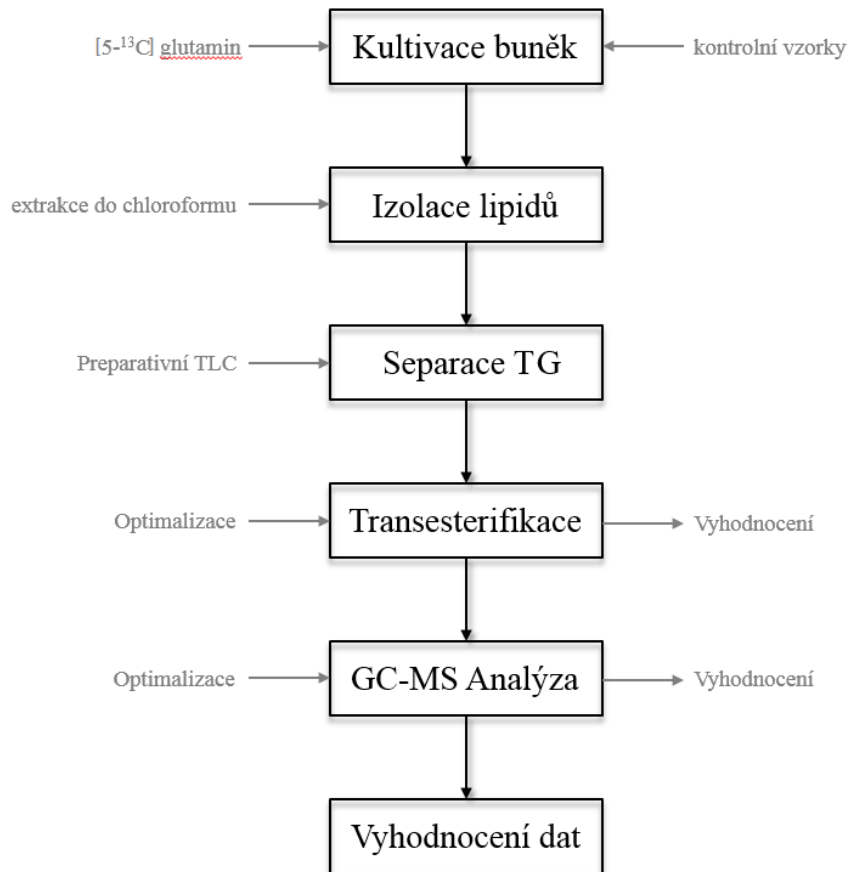
- Centrifuga NF 800 (MERCI, s.r.o., Česká republika)
- CO₂ inkubátor IG 150 (Thermo Fisher Scientific Inc.,USA)
- Desky pro kultivaci buněk D50 (Thermo Fisher Scientific Inc.,USA)
- Hypoxické komory (Del Mar, CA, USA)
- Kultivační lahve 75 cm² (Thermo Fisher Scientific Inc.,USA)
- Laminární box CS 1202 (Telstar, UK)
- Tlakové láhve (Linde Gas a.s., Česká republika)

Přístroje a software použité k GC-MS analýze (Agilent Technologies, USA)

- GC/MSD ChemStation Software
- Hmotnostní spektrometr 5975B inert XL MSD
- knihovna hmotnostních spekter NIST 02
- Plynový chromatograf 6890N Network GC

3.3 Metodika experimentu

Pro studium biosyntézy mastných kyselin při hypoxii pomocí GC-MS byl navržen experimentální model, zahrnující několik kroků, vedoucích k získání vzorku pro analýzu. Před samotnou analýzou musí vzorek získaný kultivací 3T3-L1 preadipocytů projít několika krokovou úpravou. Souhrn základních kroků vypracované metodiky zobrazuje obr. 3.1.



Obr. 3.1 Použitá metodika postupu studia biosyntézy FA při hypoxii pomocí GC-MS.

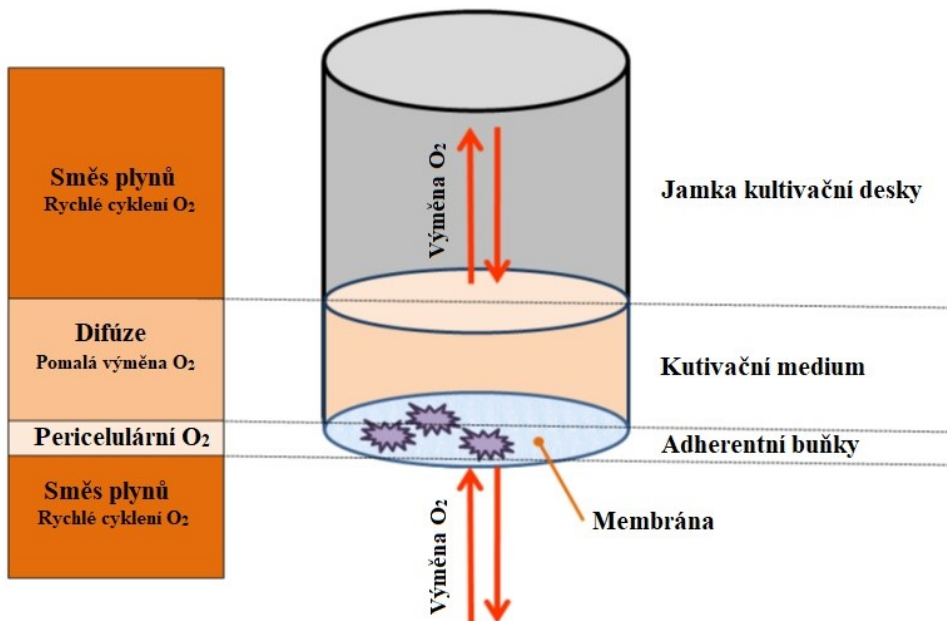
3.4 Metody kultivace

3.4.1 Buněčná linie

Pro experimenty byly použity 3T3-L1 myšičí adipocyty, které tvoří již desítku let základ výzkumu metabolických onemocnění. Tato buněčná linie, odvozena od tkáně švýcarských myšičích embryí, byla důležitou součástí mnoha výzkumů buněčných mechanismů zabývajících se diabetem, obezitou a dalšími poruchami spojenými s metabolismem tuků [39].

3.4.2 3T3-L1 preadipocyty a jejich kultivace

Myší 3T3-L1 preadipocyty byly kultivovány v CO₂ inkubátoru při teplotě 37 °C na speciálních kultivačních destičkách, které mají dno jamek tvořené z membrány. Ta umožňuje rychlou difúzi plynů skrze membránu k adherentním buňkám obr. 3.2, na základě čehož lze simulovat in-vitro stav intermitentní či setrvalé hypoxie.



Obr. 3.2 Difuze plynu v jamce membránovým dnem propustným pro plyny.

Pasážování buněk

Pro provedení experimentu byly použity buňky v pasáži 12 (P12), pro získání této pasáže byly použity buňky v pasáži 11 (P11). Buňky v P11 byly předem připraveny pasážováním z nižších pasáží, a zamrazeny v počtu $5 \cdot 10^5$ buněk na jednu vialku.

Zmražené buňky v P11 byly rychle rozmrazeny a následně přeneseny do laminárního boxu, kde byl buněčný obsah vialky kvantitativně přenesen do 10 ml kultivačního média. Následně byla zkumavka zcentrifugována při 20 °C po dobu 5 minut na 1500 rpm. Vzniklý supernatant byl opatrně odsát, a sedimentované buňky byly resuspendovány v 1 ml PM-1-L1 kultivačního média. Ze vzniklého roztoku bylo odebráno 15 μ l které byly smíchány s 15 μ l Trypanové modře pro spočítání buněk pomocí Bürkerovy komůrky. Následně byly buňky nasazeny do kultivačních T75 lahví s 11 ml kultivačního média v počtu $375 \cdot 10^3$ buněk na lahev. Buňky byly kultivačních lahví po dobu tří dní.

Sklizení buněk a jejich nasazení do kultivačních misek

Po třech dnech kultivace bylo z T75 lahve odsáto médium a narostlé buňky byly třikrát promyty 5 ml fyziologickým roztokem pufovaným fosfáty (PBS). Po promytí bylo veškeré PBS odsáto a buňky byly po dobu dvou minut inkubovány s 2 ml trypsinu pro oddělení ode dna lahve. Po uplynutí inkubační doby bylo do láhve přidáno 8 ml kultivačního média, aby bylo zamezeno dalšímu působení trypsinu. Vzniklý roztok byl přenesen do 50ml falkonky a zcentrifugován při 20 °C po dobu 5 minut na 1500 rpm. Vzniklý supernatant byl odsán, a sedimentované buňky byly resuspendovány a spočítány stejným způsobem jako v případě pasážování. Nakonec byly buňky sázeny do 7 ml kultivačního média v počtu $1 \cdot 10^5$ buněk na jednu kultivační misku a průměru 50 mm (D50).

Po dosažení konfluence (12 dní) bylo kultivační médium vyměněno za medium diferenciační na dobu tři dnů, které bylo následně vyměněno za médium adipocytární, a buňky byly po dobu 14 dnů exponovány hypoxickým nebo kontrolním podmínkám, s nebo bez příslušných chemikálií. Výměna média probíhala každé dva dny.

3.4.3 Simulace hypoxických podmínek

System pro expozici adherentních buněk intermitentní hypoxii je založen na difuzi plynů přes vysoce propustnou membránu přímo k buňkám, čímž je dosaženo požadované koncentrace O_2 v pericelulárním prostoru, kterou lze rychle a reprodučibilně měnit [40]. Výměna plynů je řízena mikroprocesorem, který ovládá solenoidní ventily tak, aby byly buňky vystaveny střídavě pericelulární koncentraci kyslíku o hodnotě 16 % a 1 % O_2 , při frekvenci 10 hypoxických epizod za hodinu. Koncentrace CO_2 byla stabilně udržována na hodnotě 5 %. Pro navození těchto podmínek byly využity premixované směsi plynů: 16 % O_2 + 5 % CO_2 a 1 % O_2 + 5 % CO_2 .

System pro expozici adherentních buněk setrvalé hypoxii byl realizován pomocí hypoxických komor, které byly napuštěny premixovanou směsí plynů 4 % O_2 + 5 % CO_2 odpovídající střední hypoxii. Tyto komory byly jednorázově napuštěny směsí plynů, a otevírány každé dva dny kvůli výměně kultivačního média. Pro kontrolní podmínky kultivace a expozice buněk probíhala stejným způsobem s tím rozdílem, že bylo využito pouze směsi 20 % O_2 + 5 % CO_2 .

3.4.4 Inkubace 3T3-L1 diferencovaných adipocytů s [5-¹³C] glutaminem

Média s glutamanem pro kontrolní vzorky obsahovala glutamin o koncentraci 2,5 mM. Pro studium biosyntézy mastných kyselin bylo při kultivaci buněk diferenciační a adipocytární médium vyměněno za speciální médium bez obsahu glutaminu. Médium s izotopovou značkou bylo připraveno o koncentraci [5-¹³C] glutaminu 2,5 mM. Další postup byl shodný s kultivací kontrolních vzorků.

3.5 Extrakce lipidů z 3T3-L1 diferencovaných preadipocytů

Poslední den kultivace bylo odsáto kultivační médium a buňky byly promyty 1 ml fyziologického roztoku PBS. Dále bylo do kultivační misky přidáno 750 μ l směsi methanol/PBS v poměru 1:1 (v/v) a miska byla umístěna po dobu 10 minut do -20 °C z důvodu zastavení metabolismu. Po deseti minutách byly desky vyndány a buňky byly seškrábnuty a společně s roztokem methanolu a PBS přeneseny do skleněné vialky. K této buněčné směsi bylo přidáno 500 μ l ledového chloroformu a směs byla jednu minutou vortexována a stočena na 500 x g po dobu 10 minut. Následně byla opatrně odebrána spodní chloroformová fáze pomocí mikrostříkačky Hamilton. Lipidový extrakt byl vysušen pod dusíkem čímž byl připraven k dalšímu zpracování.

3.6 Separace lipidů 3T3-L1 diferencovaných preadipocytů

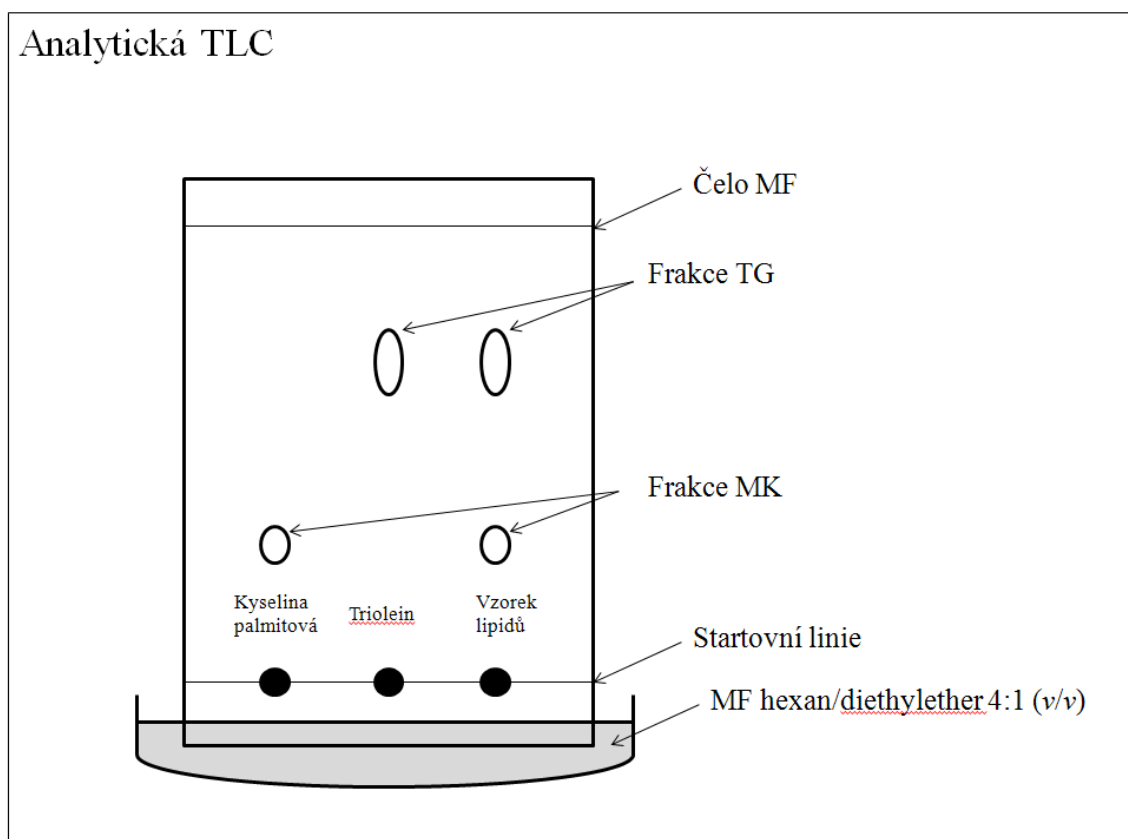
3.6.1 TLC separace lipidů

Pro tenkovrstvou chromatografii byly použity silikagelové desky o rozměru 6 x 7,5 cm připravované v laboratoři. Před nanesením vzorku byla vždy každá deska promyta směsí chloroform/methanol v poměru 2:1 (v/v). Po promytí a následném vyschnutí byla deska připravena k aplikaci vzorku.

Analytická TLC

Pro analytické účely byla provedena analytická tenkovrstvá chromatografie, díky které bylo možné určit polohu frakce TG a volných mastných kyselin. Vzorek vysušených lipidů byl zředěn roztokem směsi chloroform/methanol v poměru 3:2 (v/v) na koncentraci $c = 5 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$. Takto zředěný vzorek byl nanesen na TLC desku společně se standardy. Jako standardy byly zvoleny triolein a kyselina palmitová, koncentrace obou standardů byla $c = 10 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$. Po nanesení vzorku a vyschnutí TLC desky byla deska umístěna do TLC

vany s malým množstvím mobilní fáze a nasycenými parami mobilní fáze. Mobilní fáze byla tvořena směsí hexan/diethylether v poměru 4:1 (v/v). Po vyjmutí z TLC vany byla deska vysušena na vzduchu, a následně byly separované zóny vizualizovány. Pro detekci byla použita koncentrovaná kyselina sírová, kterou byla deska za pomoci proudu vzruchu postříkána, a zahřáta pomocí horkovzdušné pistole.

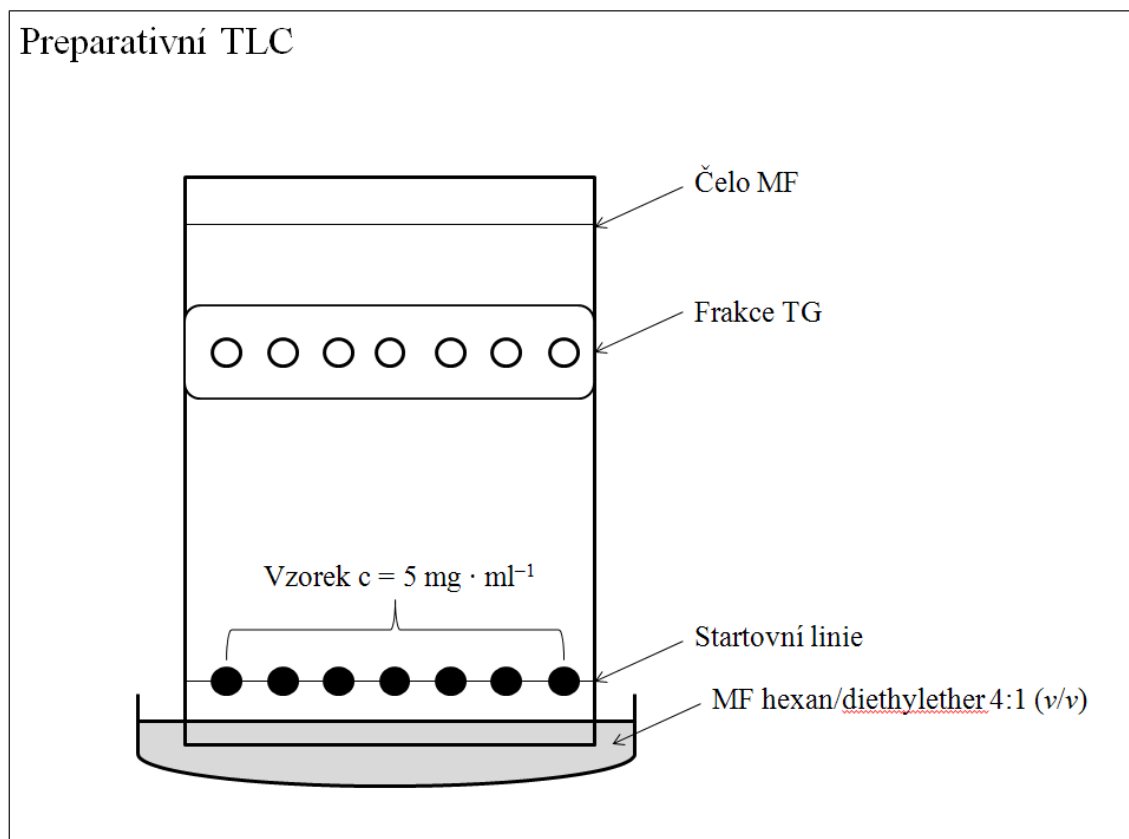


Obr. 3.3 Schéma provedení analytické tenkovrstvé chromatografie.

Preparativní TLC

Za účelem izolace frakce TG byla provedena preparativní tenkovrstvá chromatografie. Vzorek lipidů byl zředěn roztokem směsi chloroform/methanol 3:2 (v/v) na koncentraci $c = 5 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ a následně nanesen na vyčištěnou TLC desku. Do TLC vany byla přidána mobilní fáze tvořena směsí hexan/diethylether v poměru 4:1 (v/v), uzavřena víkem aby došlo k nasycení prostoru parami mobilní fáze, a následně byla přidána TLC deska s naneseným vzorkem, ten byl nanesen na start dle obr. 3.4. Po ukončení vyvíjení a vyjmutí desky byla opět deska vysušena na vzduchu. Po vyschnutí byla provedena vizualizace separovaných lipidů. Aby nedošlo k degradaci separovaných frakcí, jako je tomu při použití kyseliny sírové, byl pro vizualizaci použit 0,05% roztok rhodaminu v ethanolu, tento roztok byl

nastříkán na desku a lipidové zóny byly osvětleny pod UV lampou a označeny špachtlí. Část vyznačena špachtlí byla seškrábnuta do skleněné kolonky s vrstvou vaty a silikagelu. Frakce TG byla ze silikagelu vymyta 7 ml diethyletheru. Diethylether byl následně odpařen proudem dusíku do konstantní hmotnosti. Separované lipidy byly uchovány při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.



Obr. 3.4 Schéma provedení preparativní tenkovrstvé chromatografie.

3.7 Transesterifikace

Pro analýzu lipidů pomocí GC-MS je potřeba vzorek izolovaných TG získaný extrakcí z 3T3-L1 diferenciovaných preadipocytů dále upravit. Aby mohla být provedena analýza mastných kyselin včetně izotopového obohacení je potřeba provést derivatizaci. V této práci byla použita transesterifikace. Pro vypracování optimální metodiky analýzy byla provedena sada experimentů, kdy byly srovnány tři metody transesterifikace. Pro tuto optimalizaci byly izolovány lipidy 3T3-L1 diferenciovaných preadipocytů kultivovaných za kontrolních podmínek ($20\% \text{ O}_2$) z kterých byla izolována frakce TG. Celkem bylo připraveno 9 vzorků obsahujících 1 mg izolovaných TG, přičemž každá metoda byla provedena na třech vzorcích.

Pro vyhodnocení byly z naměřeného spektra integrací odečteny plochy píků, které byly následně vyhodnoceny, přičemž každý vzorek byl změřen třikrát.

3.7.1 Kyselá transesterifikace směsí metranol-HCl

K 1 mg vysušeného vzorku TG v skleněné vialce bylo přidáno 80 μl toluenu, 600 μl methanolu a 120 μl směsi methanol-HCl. Směs methanol-HCl byla připravena smícháním 970 μl koncentrované kyseliny chlorovodíkové s 4 ml methanolu, přičemž tato směs byla připravována vždy čerstvě. Takto připravený vzorek byl po dobu 60 minut zahříván na 100 °C a to za stálého protřepávání na 700 rpm. V dvacetiminutových intervalech byly vždy vialky otevřeny, aby došlo k uvolnění nahromaděných par, a snížení tlaku v nádobě, který by mohl vést k prasknutí a ztrátě vzorku. Po uplynutí 60 minut byly vzorky vyjmuty a po ochlazení na pokojovou teplotu bylo do každého vzorku přidáno 400 μl deionizované vody a 300 μl hexanu. Vzorky byly 5 minut protřepávány na 700 rpm a následně byla odebrána horní organická fáze, která byla použita k analýze GC-MS [16].

3.7.2 Kyselá transesterifikace acetylchloridem

Do skleněné vialky s 1 mg vysušených TG bylo přidáno 200 μl směsi methanol/chloroform v poměru 3:2 (v/v), tak aby vznikl roztok o koncentraci $c = 5 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$. Vzorek o této koncentraci byl přenesen do skleněné ampule a bylo k němu přidáno 30 μl acetylchloridu. Ihned po přidání acetylchloridu byl vzorek umístěn na předem připravený nadrcený suchý led a po zchlazení vzorku byla ampule pomocí plynového hořáku zatavena. Vzorek v uzavřené ampuli byl po dobu 60 minut umístěn do vodní lázně temperované na 70 °C. Po vyjmutí z lázně byla ampule otevřena a reakce byla ukončena přidáním uhličitanu stříbrného do neutrálního pH, pro jehož indikaci byl použit lakmusový papírek. Dále byl vzorek přenesen z ampule do skleněné vialky, zcentrifugován na 700 rpm po dobu dvou minut a odebrán do čisté vialky pro analýzu GC-MS.

3.7.3 Zásaditá transesterifikace methoxidem sodným

Ke vzorku 1 mg vysušených TG umístěného v skleněné vialce bylo přidáno 100 μl toluenu. Dále bylo ke vzorku přidáno 200 μl 0,5M metoxidu sodného v bezvodém methanolu. Tato směs byla po dobu 10 minut umístěna do temperované lázně na 50 °C. Po vyjmutí z lázně bylo ke vzorku přidáno 10 μl ledové kyseliny octové a 500 μl deionizované

vody. Dále byly methyl estery extrahovány dvakrát do 500 μl hexanu, výsledný vzorek byl odebrán a použit pro analýzu GC-MS.

3.8 Analýza vzorků pomocí GC-MS

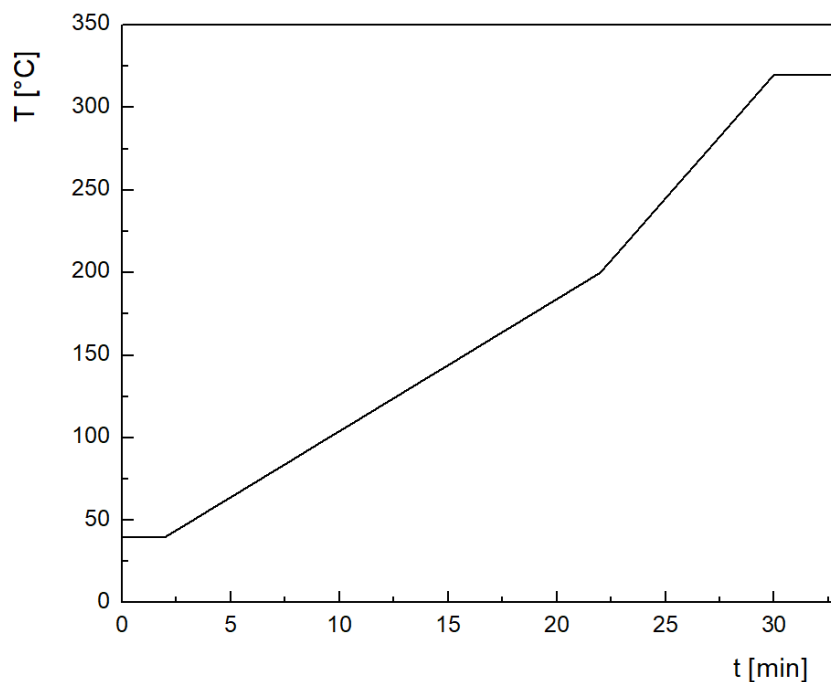
Analýza studovaných vzorků byla provedena na plynovém chromatografu Agilent 6890N Network GC ve spojení s hmotnostním spektrometrem Agilent 5975B inert XL MSD vybaveným kvadrupólovým hmotnostním analyzátozem. Základní parametry nastavení pracovních podmínek pro GC zobrazuje tabulka 3.1 a pro MS tabulka 3.2. Pro měření vzorků a jejich vyhodnocení byl použit GC/MSD ChemStation Software. Pro určení struktury jednotlivých látek byla použita knihovna hmotnostních spekter NIST 02.

Tabulka 3.1 Základní parametry GC

Chromatografická kolona	Agilent 19091S-433 (30,0 m x 250 μm x 0,25 μm)
Teplotní program	40 $^{\circ}\text{C}$ (2 min); 8 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ do 200 $^{\circ}\text{C}$ (22 min); 15 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ do 320 $^{\circ}\text{C}$ (33 min) viz obr. 3.5.
Tlak na koloně	7,06 psi
Nosný plyn	Helium
Průtok nosného plynu	36 $\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$
Injekční mód	Splitovací
Splitovací poměr	100:1
Teplota nástřiku	230 $^{\circ}\text{C}$
Dávkovaný objem	1 μl

Tabulka 3.2 Základní parametry MS

Ionizace	Elektronová ionizace
Iontový zdroj	70 eV, 230 $^{\circ}\text{C}$
Skenovací rychlost	4,32 scan $\cdot \text{s}^{-1}$
Počátek analýzy	4 min
Konec analýzy	33 min
Rozsah m/z	25 – 350



Obr. 3.5 Teplotní program použitý pro GC-MS.

3.8.1 Příprava interního standardu

Pro vyhodnocení optimalizace pracovních podmínek byl použit interní standard (IS), kterým byl methylester kyseliny heptadecylové. Jelikož každá provedená metoda transesterifikace zahrnovala jiné ředění vzorku vysušených TG, bylo potřeba toto ředění zohlednit i při přidávání IS. Nejprve byl připraven zásobní roztok standardu, a to jak v hexanu pro transesterifikaci methoxidem sodným a transesterifikaci směsí metanol-HCl, tak ve směsi methanol/chloroform v poměru 3:2 (v/v) pro transesterifikace acetylchloridem. Zásobní roztok interního standardu v hexanu (roztok A) byl připraven o koncentraci $c_{1,A} = 10 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ a ve směsi methanol/chloroform (roztok B) o koncentraci $c_{1,B} = 20 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$. Tyto zásobní roztoky byly použity k přípravě vzorku k GC-MS analýze. Ředění a finální koncentrace pro všechny typy transesterifikace zobrazuje tabulka 3.3.

Tabulka 3.3 Příprava vzorku k GC-MS analýze s přidavkem interního standardu (c_{IS}) je finální koncentrace interního standardu; $V_{1,A}$ objem zásobního roztoku A; $V_{1,B}$ objem zásobního roztoku B; V_{vz} objem měřeného vzorku).

Transesterifikace	c_{TAG} [mg · ml ⁻¹]	c_{IS} [mg · ml ⁻¹]	$V_{1,A}$ [μl]	$V_{1,B}$ [μl]	V_{vz} [μl]
Směsí metranol-HCl	1,25	0,83	8,3	0	91,7
Acetylchloridem	3,03	2,02	0	10,1	89,9
Methoxidem sodným	3,33	2,22	20,2	0	79,8

3.8.2 Optimalizace teploty iontového zdroje

Pro vyhodnocení inkorporace uhlíku ¹³C do mastných kyselin byly využity molekulové píky, jejichž intenzita je ovlivněna teplotou zdroje. Proto byla provedena optimalizace teploty iontového zdroje. Snížení teploty zdroje vede k potlačení fragmentace, což může mít za následek zvýšení intenzity molekulových píků. Pro optimalizaci teploty iontového zdroje byly nastaveny teploty 230, 200, 150 a 100 °C. Pro vyhodnocení byly odečteny výšky molekulového píku methylpalmitátu m/z 170,3 a fragmentu m/z 74,1.

3.9 Vyhodnocení výsledků

Metodika měření pomocí GC-MS zahrnovala tři opakovaná měření každého biologického vzorku, přičemž bylo statisticky vyhodnoceno šest biologicky rozdílných vzorků pro danou skupinu. Tímto postupem byla zahrnuta ve výsledku jak nepřesnost měřícího postupu, tak biologická variabilita. Dílčí výsledky tedy byly získány průměrem ze tří přístrojových opakování. Z těchto dílčích průměrů byl následně statistickým zpracováním určen průměr \bar{x} a směrodatná odchylka s .

K výpočtu zastoupení jednotlivých izotopů FAMEs ve vzorcích byl použit následující postup. Pro daný methylester byly nejprve pomocí programu Xcalibur (Thermo) namodelovány izotopové klastry molekulového iontu, a to pro molekuly obsahující 0 až 3 uhlíky ¹³C. Pro změřené poměry izotopů v reálných vzorcích pak byly počítány lineární kombinace těchto teoretických izotopových klastrů tak, aby co nejlépe odpovídaly experimentu. Pro určení koeficientů lineárních kombinací byla využita metoda nejmenších čtverců s podmínkou nezáporných koeficientů (nonnegative least squares, NNLS). Vypočítané koeficienty odpovídaly zastoupení jednotlivých izotopologů FAMEs ve vzorcích. K výpočtu byla využita funkce lsqnonneg v prostředí GNU Octave [41].

Vliv hypoxie na inkorporaci $^{13}\text{C}_5$ byl vyhodnocen pomocí jednofaktorové analýzy rozptylu na hladině pravděpodobnosti $\alpha = 0,05$ pomocí programu OriginPro.

4 Výsledky a diskuze

Tato část diplomové práce interpretuje získané výsledky v podobě grafů a tabulek. První část této kapitoly se zabývá prezentací výsledků separace lipidů pomocí plynové chromatografie, a výsledků optimalizace pracovních podmínek. V další části kapitoly je diskutován vliv hypoxie na tvorbu mastných kyselin. V závěrečné části kapitoly jsou diskutovány výsledky analýzy izotopového obohacení biologických vzorků.

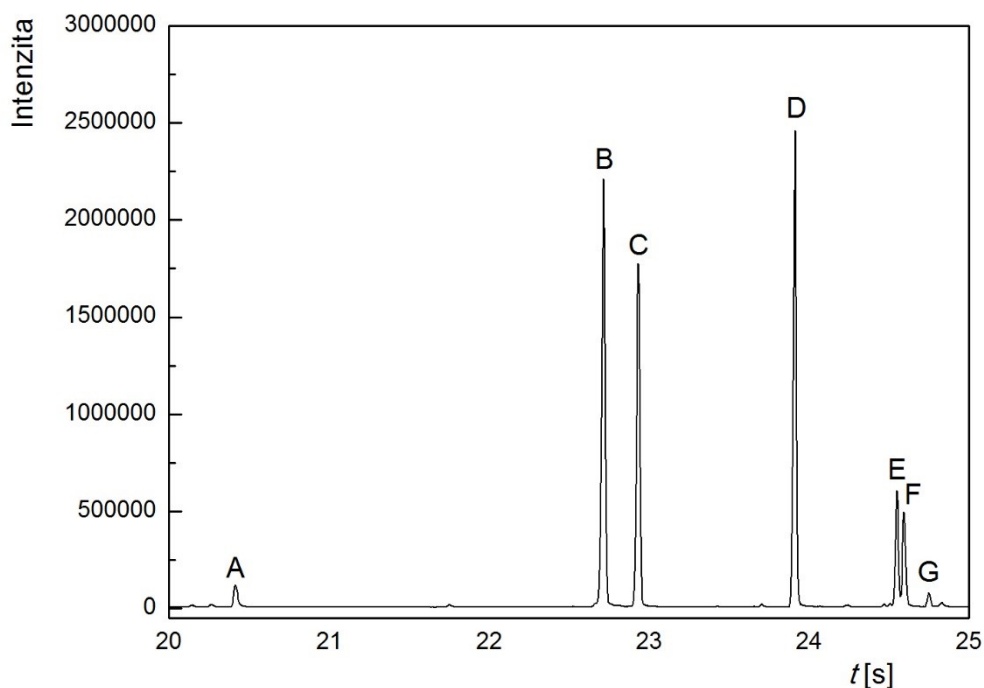
4.1 Analýza methyl esterů mastných kyselin metodou GC-MS

Obsah mastných kyselin v derivatizovaných vzorcích získaných extrakcí z buněčného materiálu byl studován metodou GC-MS. Naměřené výsledky byly vyhodnoceny za použití softwaru příslušícímu k GC-MS, pomocí kterého byla detekována přítomnost methylesterů mastných kyselin obsažených ve vzorcích. Na základě vyhodnocení byl sestaven seznam všech detekovaných látek, jak zobrazuje tabulka 4.1.

Tabulka 4.1 Souhrn detekovaných methyl esterů včetně základních charakteristik.

Název	Vzorec	Značka	t_r [s]
Methylester kyseliny tetradekanové	$C_{15}H_{30}O_2$	FAME 14:0	20,417
Methylester kyseliny hexadecenová	$C_{17}H_{32}O_2$	FAME 16:1	22,715
Methylester kyseliny hexadekanové	$C_{17}H_{34}O_2$	FAME 16:0	22,933
Methylester kyseliny heptadekanová	$C_{18}H_{36}O_2$	FAME 17:0	23,912
Methylester kyseliny oktadecenové	$C_{19}H_{36}O_2$	FAME 18:1a	24,549
Methylester kyseliny oktadecenové	$C_{19}H_{36}O_2$	FAME 18:1b	24,595
Methylester kyseliny oktadekanové	$C_{19}H_{38}O_2$	FAME 18:0	24,748

Obr. 4.1 zobrazuje chromatogram těchto methylesterů včetně přidaného interního standardu. Bylo dosaženo velmi dobré separace všech látek. Nejnižší rozlišení bylo u dvojce píků methylesteru kyseliny oktadecenové kdy se v čase 24,549 a 24,595 minut eluovaly methylestery lišící se polohou dvojně vazby ($R > 2$). Souhrn rozlišení pro sousedící píky v chromatogramu uvedeném na obr. 4.1 znázorňuje tabulka 4.2.



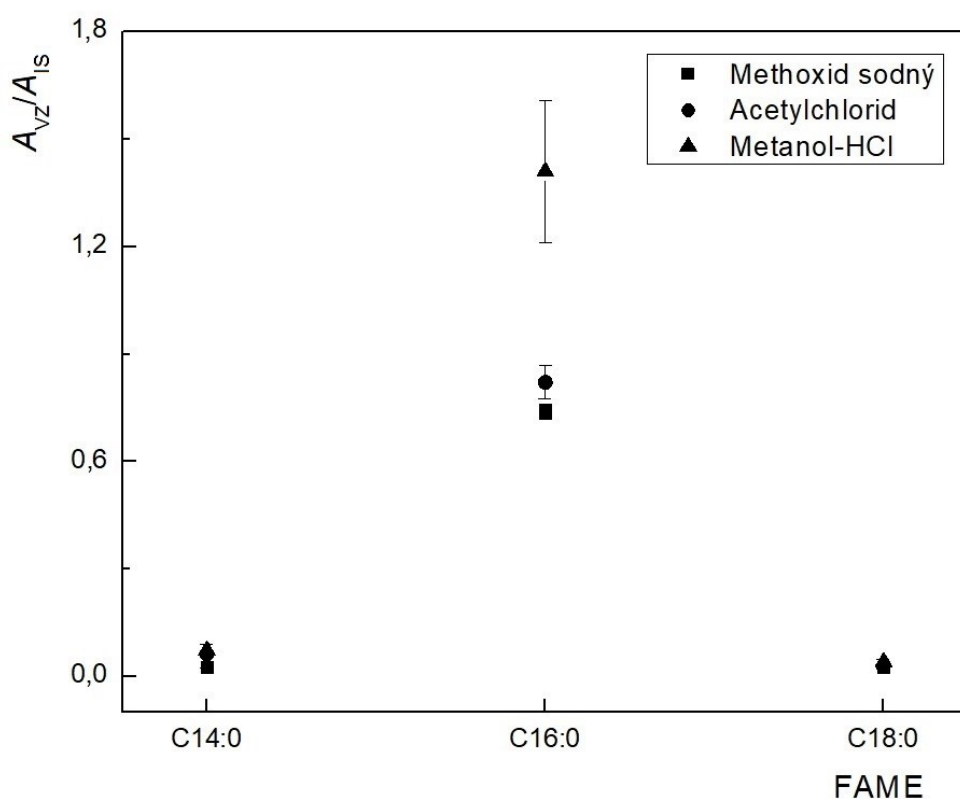
Obr. 4.1 Záznam chromatogramu methylesterů (A = FAME 14:0; B = FAME 16:1; C = FAME 16:0; D = FAME 17:0 (IS); E = FAME 18:1a; F = FAME 18:1b; G = FAME 18:0).

Tabulka 4.2 Rozlišení píků.

Rozlišení, $R_{1,2}$	
$R_{A,B}$	60,474
$R_{B,C}$	6,606
$R_{C,D}$	31,079
$R_{D,E}$	28,955
$R_{E,F}$	2,091
$R_{F,G}$	7,116

4.2 Optimalizace transesterifikace

Pro vyhodnocení účinnosti jednotlivých metod transesterifikace byly odečteny pro každý vzorek plochy píků (A_{VZ}), a to pro FAME 14:0; 16:0; 18:0 a pro interní standard FAME 17:0 (A_{IS}). Hodnoty ploch píků byly relativně vztaženy k ploše píku IS. Každý vzorek byl změřen třikrát a statisticky vyhodnocen. Z obr. 4.2 je patrné, že výrazného rozdílu bylo dosaženo pro methylester kyseliny hexadekanové, což odpovídá vysokému zastoupení této mastné kyseliny v analyzovaném vzorku. Nejvíce methylpalmitátu bylo získáno kyselou transesterifikací směsí methanol-HCl, a proto byla tato metoda zvolena jako optimální pro zpracování vzorku lipidů izolovaných z buněčného materiálu.

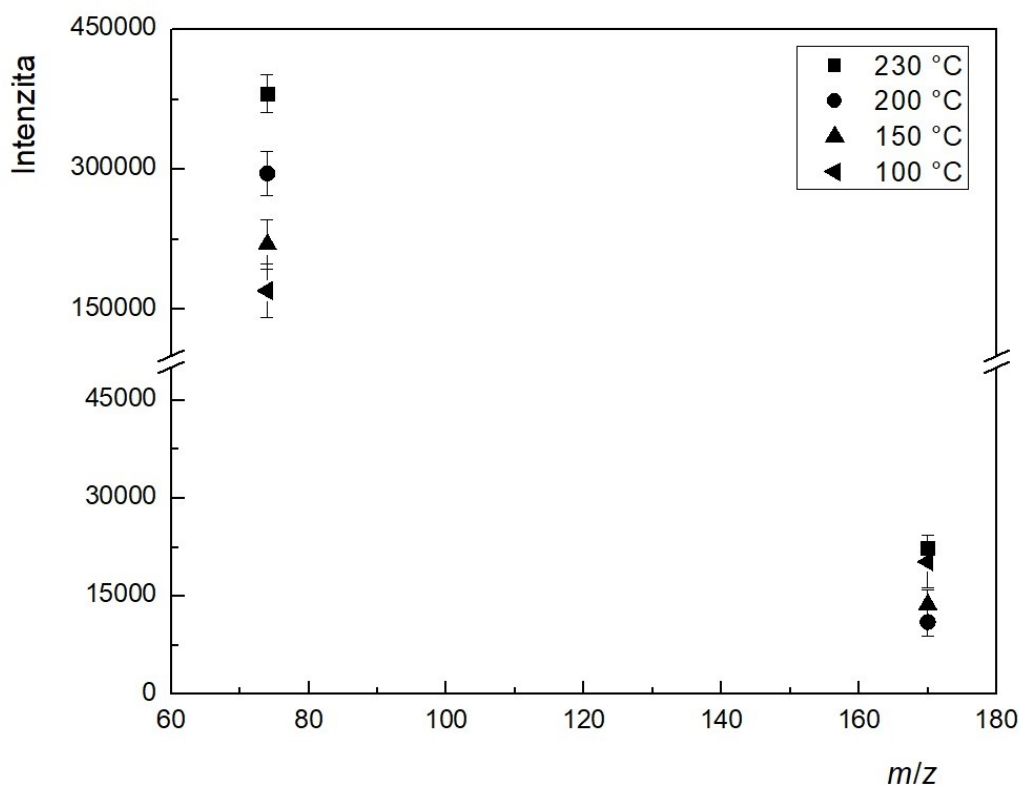


Obr. 4.2 Vyhodnocení optimalizace metody transesterifikace.

4.3 Optimalizace teploty iontového zdroje

Pro vyhodnocení vlivu teploty iontového zdroje na intenzitu molekulových píků byly odečteny výšky molekulového píku methylpalmitátu m/z 170,3 a fragmentu m/z 74,1. Obr. 4.3 zobrazuje intenzitu píků obou fragmentů pro jednotlivé teploty iontového zdroje. Z tohoto grafu je patrné, že snižování teploty iontového zdroje sice potlačuje fragmentaci,

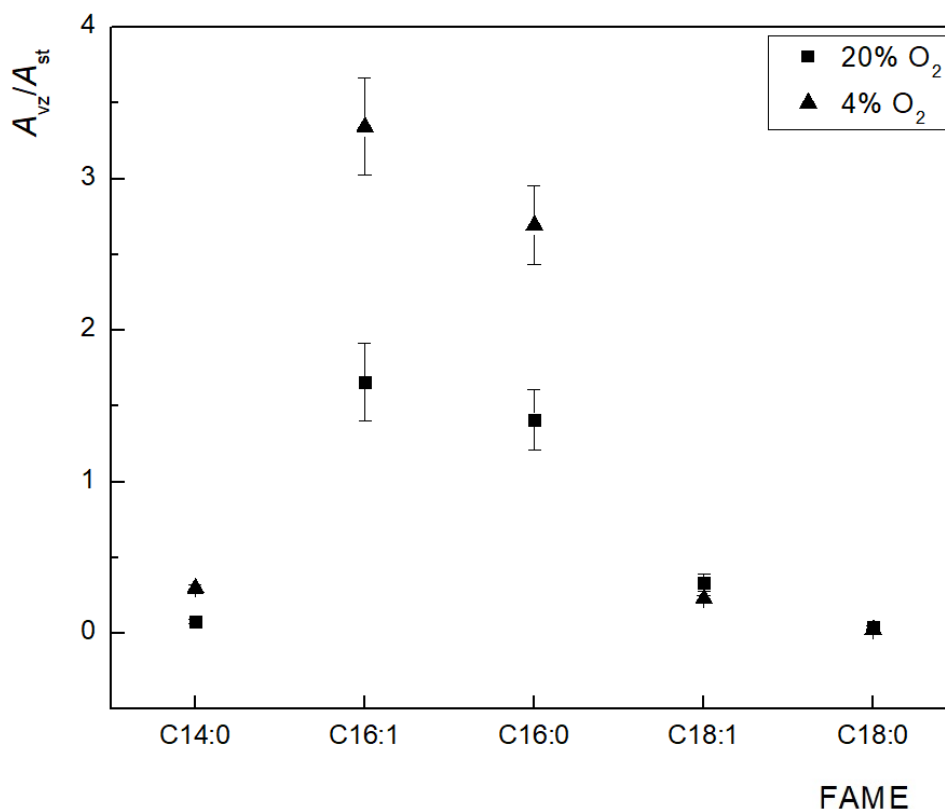
ale na zvýšení intenzity molekulového píku nemá výrazný vliv. Proto nadále bylo pracováno s teplotou iontového zdroje 230 °C, při které bylo dosaženo nejvyšší intenzity.



Obr. 4.3 Vyhodnocení optimalizace teploty iontového zdroje.

4.4 Profil mastných kyselin při hypoxii

Po optimalizaci pracovních podmínek bylo provedeno měření vzorků lipidů izolovaných z buněk kultivovaných za hypoxických (4 % O₂) a kontrolních podmínek (20 % O₂), přičemž při kultivaci těchto buněk bylo použito médium bez značeného glutaminu. U těchto vzorků bylo studováno jednotlivé zastoupení FAMEs, a to odečtením ploch píků pro jednotlivé FAMEs (14:0; 16:1; 16:0; 18:1a; 18:1b, 18:0) a jejich vztažení k internímu standardu FAME C17:0. Při hypoxii došlo k nárůstu FAME 16:1 o 102 % a FAME 16:0 o 91 %, jak zobrazuje obr. 4.4. Tyto výsledky plně podporují závěry předchozích studií, které říkají, že při hypoxii dochází ke zvýšení hladiny lipidů [10].

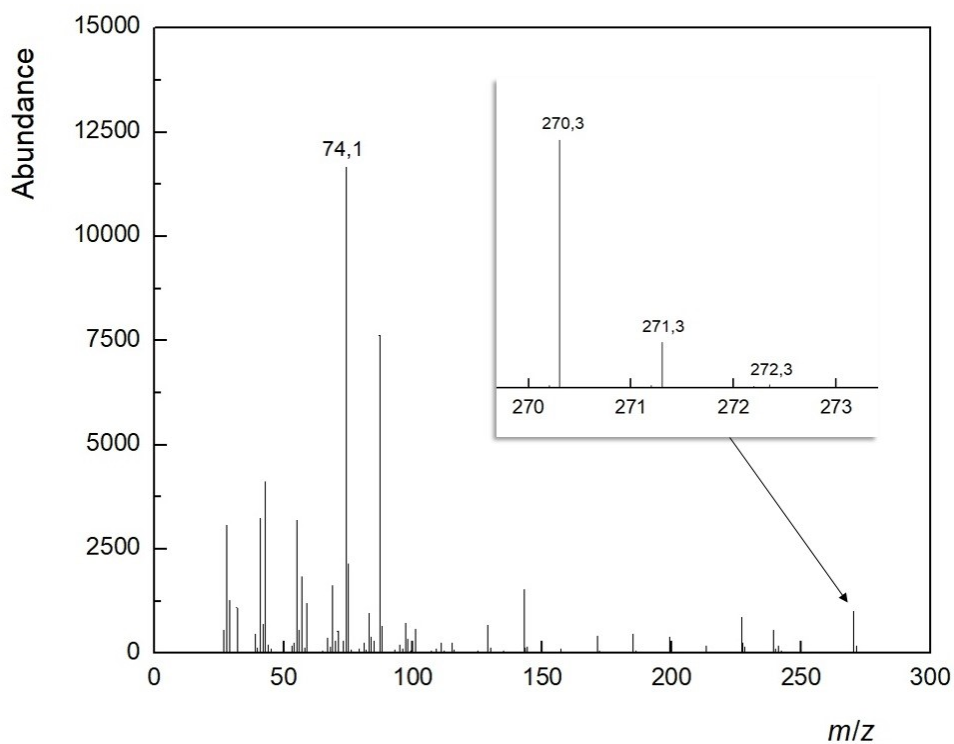


Obr. 4.4 Profil methyl esterů mastných kyselin při kontrolních a hypoxických podmínkách.

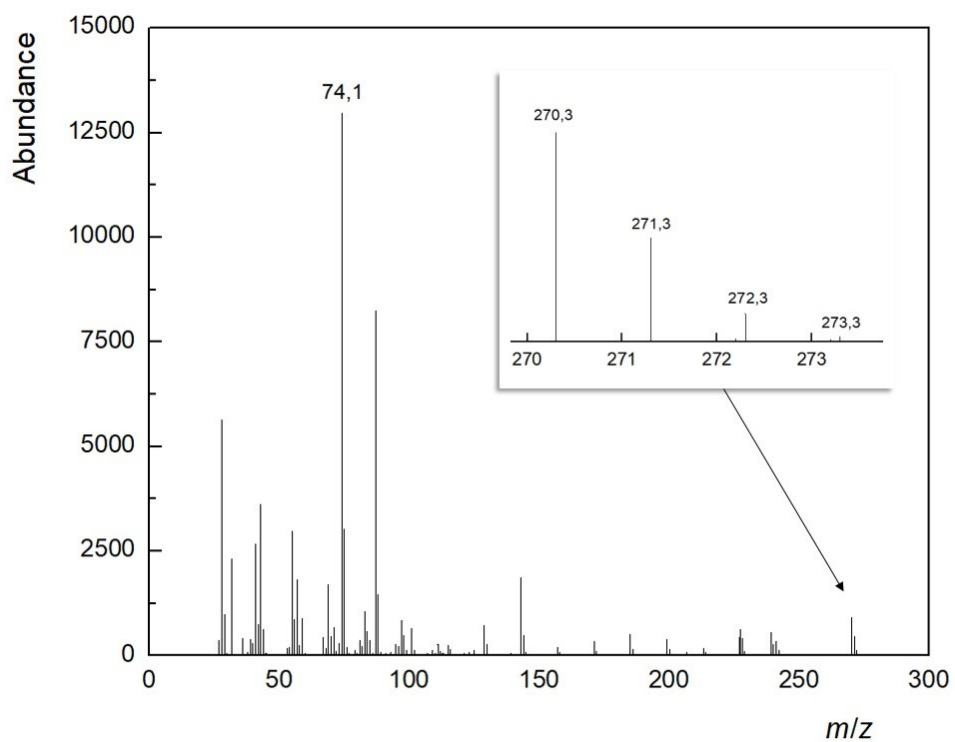
4.5 Inkorporace značeného glutaminu ve vybraných mastných kyselinách

Pro studium inkorporace značeného glutaminu do mastných kyselin prostřednictvím reverzní dráhy byly izolovány vzorky lipidů z buněk kultivovaných za hypoxických (4 % O₂) a kontrolních podmínek (20 % O₂), přičemž při kultivaci těchto buněk bylo použito médium se značeným glutaminu, dle postupu uvedeného v kapitole 3.4.4. Jako kontrolní vzorky sloužili vzorky lipidů izolovaných z buněk kultivovaných bez značeného glutaminu (20 % a 4 % O₂). Pro vyhodnocení byly odečteny výšky molekulových píků, do obohacení o tři ¹³C uhlíky. Tyto píky pro vzorky s [U-¹²C] a [5-¹³C] glutaminem zobrazuje obr. 4.5 a obr. 4.6. Izotopové zastoupení těchto molekulových píků bylo studováno pro FAMEs 16:1 a 16:0, jakožto nejvíce zastoupené FAMEs ve studovaných vzorcích. Celkem bylo pro každou skupinu připraveno šest vzorků biologických vzorků, přičemž každý byl změřen třikrát. Výsledky byly zpracovány na základě porovnání experimentálně získaných dat

s nasimulovanými teoretickými spektry pro studované molekulové píky. Takto získané výsledky byly graficky a statisticky zpracovány, a budou diskutovány níže.



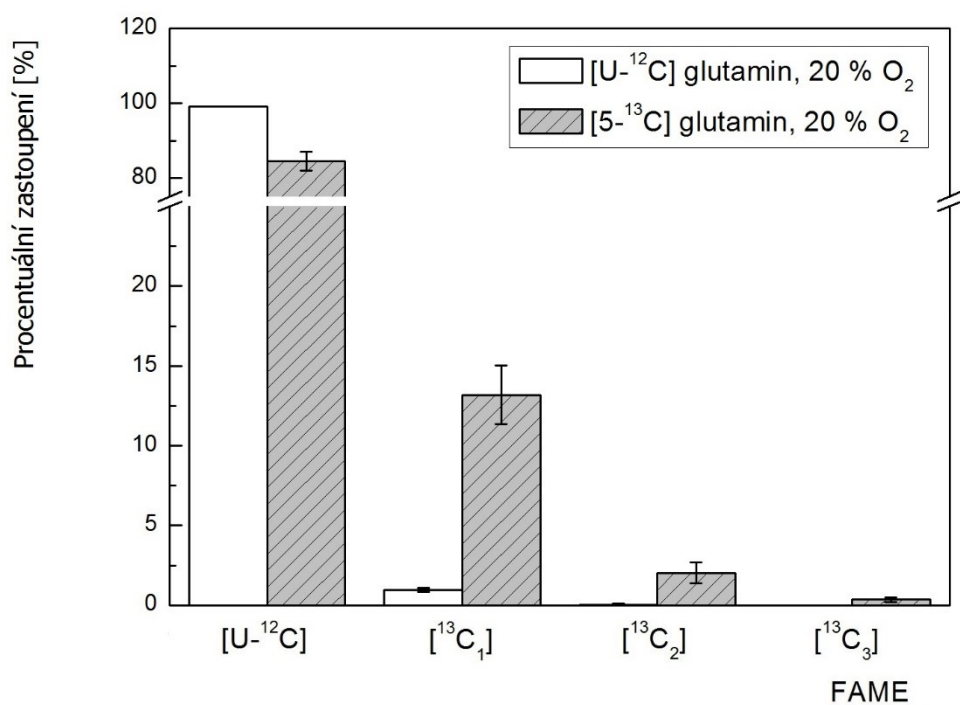
Obr. 4.5 Ukázka MS spektra pro vzorky s neznačeným glutaminem.



Obr. 4.6 Ukázka MS spektra pro vzorky se značeným glutaminem.

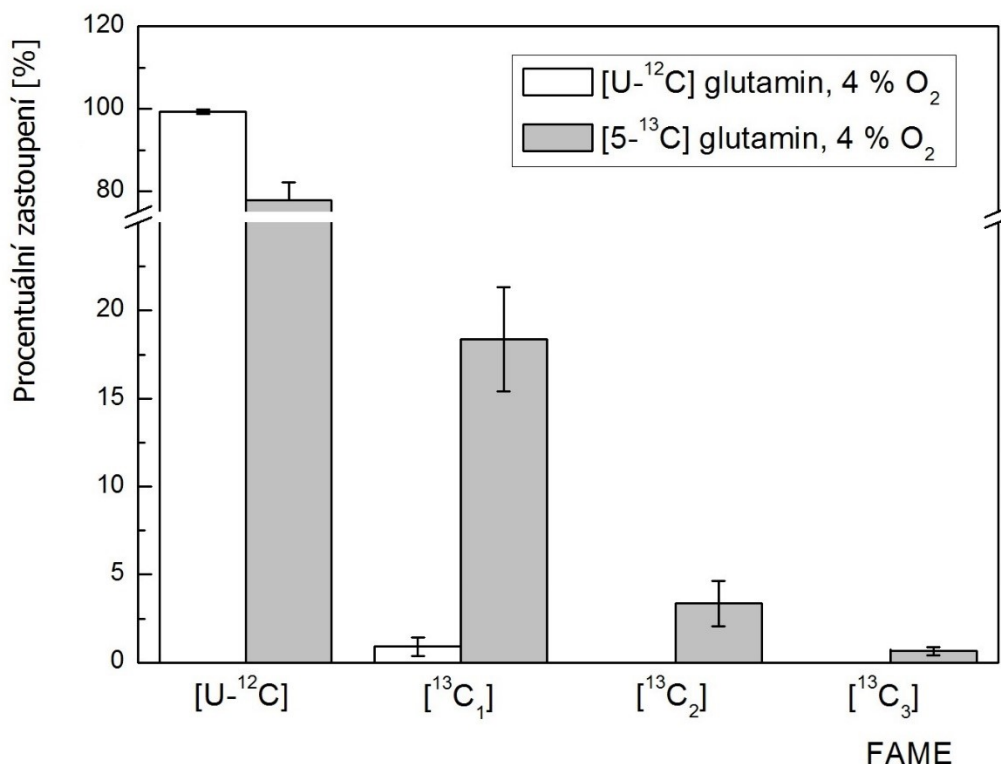
4.5.1 Inkorporace ^{13}C do methylesteru kyseliny hexadekanové

Nejprve byla vyhodnocena spektra vzorků kultivovaných při kontrolních podmínkách (20 % O_2) s nebo bez obsahu značeného glutaminu. Zastoupení jednotlivých FAME 16:0 zobrazuje obr 4.7. Vzorky kultivované se značeným glutaminem měly následující izotopové složení: $84,5\% \pm 2,6\%$ neobsahovalo žádný uhlík ^{13}C , kromě jeho přirozeného zastoupení, $13,2\% \pm 1,8\%$ 1 uhlík ^{13}C , $2,0\% \pm 0,6\%$ 2 uhlíky ^{13}C a $0,4\% \pm 0,2\%$ obsahovalo 3 uhlíky ^{13}C . Z tohoto grafu je patrné obohacení biosyntetizovaných mastných kyselin o uhlík ^{13}C získaný z $[5-^{13}\text{C}]$ glutaminu v kultivačním médiu. Tyto výsledky tedy poukazují na přirozené uplatnění reverzní dráhy citrátového cyklu či lze toto obohacení považovat za příspěvek jiné metabolické dráhy.



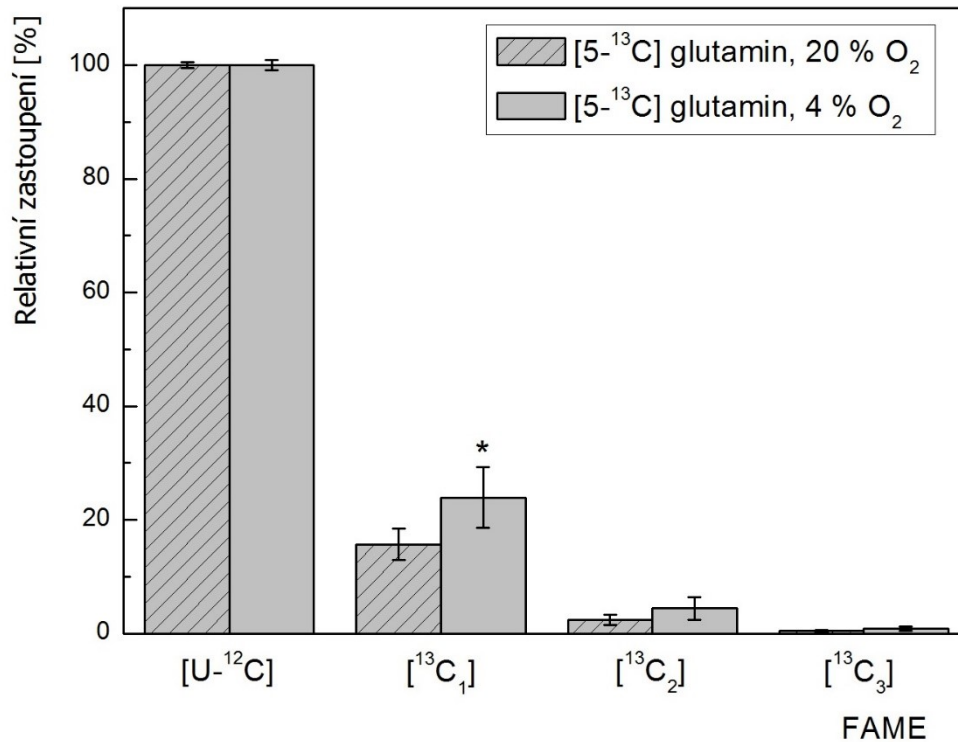
Obr. 4.7 Zastoupení jednotlivých FAME 16:0 ve vzorcích z buněk kultivovaných při 20 % O_2 (kontrolní podmínky) s $[\text{U-}^{12}\text{C}]$ nebo $[5-^{13}\text{C}]$ glutaminem.

Dále byla vyhodnocena spektra vzorků kultivovaných při hypoxických podmínkách (4 % O₂). Z obr. 4.8 je vidět, že i při hypoxických podmínkách dochází k inkorporaci ¹³C do methylesteru kyseliny hexadekanové. Vzorky kultivované se značeným glutaminem měly následující izotopové složení: 77,8 % ± 4,4 % neobsahovalo žádný uhlík ¹³C, kromě jeho přirozeného zastoupení, 18,4 % ± 2,9 % 1 uhlík ¹³C, 3,4 % ± 1,3 % 2 uhlíky ¹³C a 0,6 % ± 0,2 % obsahovalo 3 uhlíky ¹³C.



Obr. 4.8 Zastoupení jednotlivých FAME 16:0 ve vzorcích z buněk kultivovaných při 4 % O₂ (hypoxie) s [U-¹²C] nebo [5-¹³C] glutaminem.

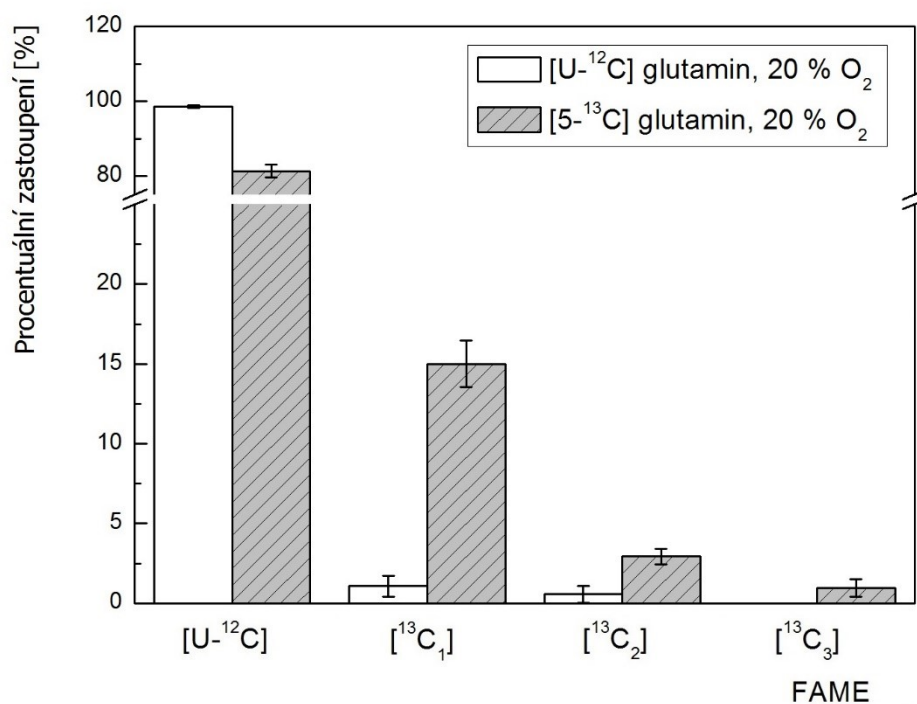
Z uvedených výsledků je patrné zapojení reverzní dráhy citrátového cyklu jak u hypoxie, tak u kontrolních podmínek. Pro zjištění vlivu hypoxie na inkorporaci značeného ¹³C uhlíku z glutaminu byla porovnána data naměřená pro skupinu vzorků, ke kterým byl přidáván značený glutamin. Z obr. 4.9 je vidět, že pro [¹³C₁] FAME 16:0 bylo dosaženo statisticky významného nárůstu inkorporace při hypoxických podmínkách. Tento nárůst činil 5,9 %.



Obr. 4.9 Vliv hypoxie na inkorporaci ¹³C uhlíku ze značeného glutaminu prostřednictvím reverzní dráhy citrátového cyklu pro FAME 16:0 (* pro p < 0,05).

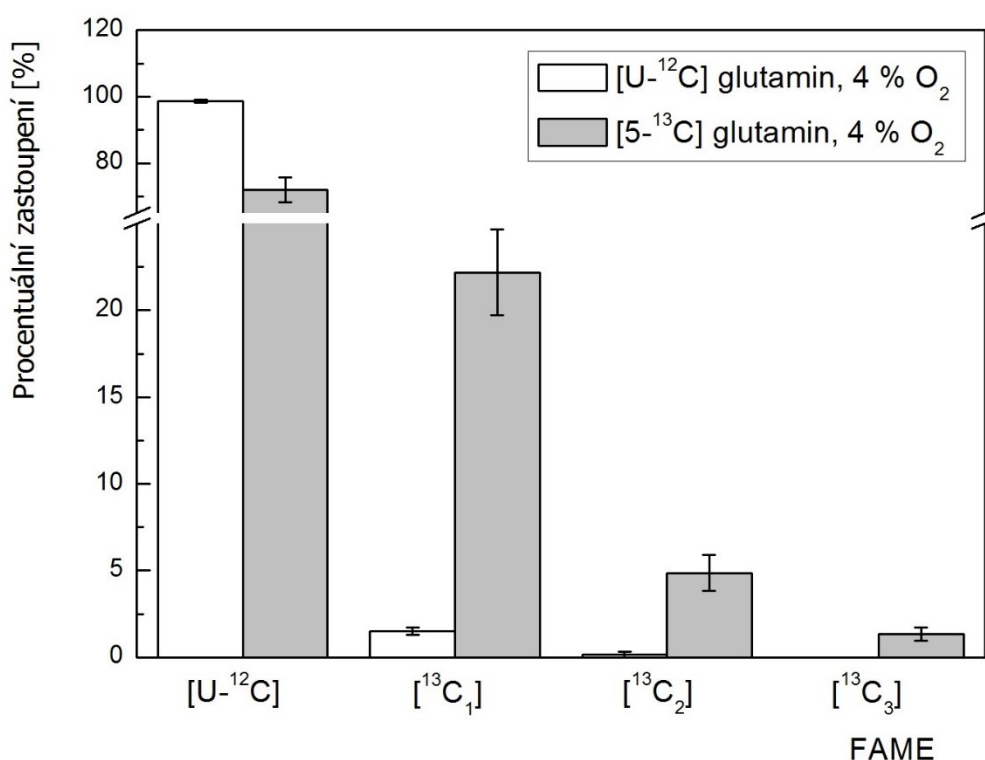
4.5.2 Inkorporace ¹³C do methylesteru kyseliny hexadecenové

Stejně jako pro methylester kyseliny hexadenkanové bylo nejprve vyhodnoceno spektrum pro kontrolní a hypoxické podmínky vzorků kultivovaných s nebo bez značeného glutaminu. Při kontrolních podmínkách kultivace s [5-¹³C] glutaminem (20 %) bylo zastoupení jednotlivých FAME 16:1: 81,3 % ± 1,7 % neobsahovalo žádný uhlík ¹³C, kromě jeho přirozeného zastoupení, 15,0 % ± 1,4 % 1 uhlík ¹³C, 2,9 % ± 0,5 % 2 uhlíky ¹³C a 1,0 % ± 0,5 % obsahovalo 3 uhlíky ¹³C. Tyto výsledky společně s výsledky pro vzorky bez přidaného [5-¹³C] glutaminu znázorňuje obr. 4.10.



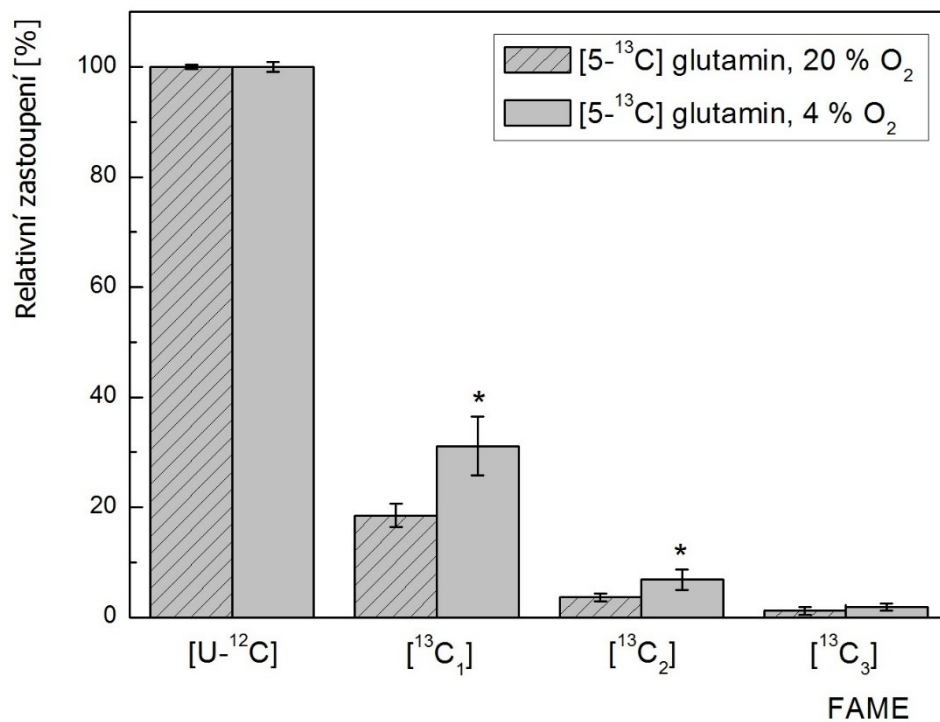
Obr. 4.10 Zastoupení jednotlivých FAME 16:1 ve vzorcích z buněk kultivovaných při 20 % O₂ (kontrolní podmínky) s [U-¹²C] nebo [5-¹³C] glutaminem.

Stejným způsobem byly zpracovány výsledky vzorků kultivovaných při hypoxických podmínkách (4 % O₂). Pro vzorky kultivované s [5-¹³C] glutaminem bylo zastoupení jednotlivých FAME 16:1 následující: 72,0 % ± 3,8 % neobsahovalo žádný uhlík ¹³C, kromě jeho přirozeného zastoupení 22,2 % ± 2,5 % 1 uhlík ¹³C, 4,9 % ± 1,0 % 2 uhlíky ¹³C a 1,3 % ± 0,4 % obsahovalo 3 uhlíky ¹³C. Tyto výsledky v porovnání se zastoupením FAME 16:1 u vzorků kultivovaných bez [5-¹³C] glutaminu znázorňuje obr. 4.11.



Obr. 4.11 Zastoupení jednotlivých FAME 16:1 ve vzorcích z buněk kultivovaných při 4 % O₂ (hypoxie) s [U-¹²C] nebo [5-¹³C] glutaminem.

Stejně jako pro methylester kyseliny hexadekanové byl i pro FAME 16:1 zjišťován vliv hypoxie na inkorporaci značeného ¹³C uhlíku z [5-¹³C] glutaminu. I v tomto případě byla porovnána data naměřená pro skupinu vzorků, ke kterým byl přidáván značený glutamin. Z obr. 4.12 je vidět, že pro [¹³C₁] FAME 16:1 a [¹³C₂] FAME 16:1 bylo dosaženo statisticky významného nárůstu inkorporace při hypoxických podmínkách, a to u [¹³C₁] FAME 16:1 o 12 % a u [¹³C₂] FAME 16:1 o téměř 3 %.



Obr. 4.12 Vliv hypoxie na inkorporaci ¹³C ze značeného glutaminu prostřednictvím reverzní dráhy citrátového cyklu pro FAME 16:1 (* pro p < 0,05).

5 Závěr

Předmětem této práce bylo studium biosyntézy mastných kyselin při hypoxii pomocí chromatografie a hmotnostní spektrometrie. Hlavním cílem této práce bylo vypracovat a optimalizovat metodiku zpracování buněčných kultur pro GS-MS analýzu a metodiku zpracování výsledných dat pro studium vlivu hypoxie na biosyntézu mastných kyselin a inkorporaci značeného glutaminu, který byl k buňkám přidáván při kultivaci.

Nejprve byly kultivovány buňky při kontrolní hodnotě kyslíku 20 % a bez přidaného [5-¹³C] glutaminu. Tyto vzorky sloužily k provedení optimalizace metody transesterifikace a zároveň jako kontrola pro vzorky obsahující značený glutamin. Dále byla provedena kultivace totožných neznačených vzorků, ale při hypoxických podmínkách. Nakonec proběhla kultivace buněk v podmínkách kontrolních i hypoxických a přidavkem [5-¹³C] glutaminu. Z takto získaných vzorků byly následně extrakčně izolované lipidy, z kterých byla pomocí tenkovrstvé chromatografie izolována frakce TG.

Dalším úkolem bylo změření vzorku a vyhodnocení chromatografických dat. Nejprve byla provedena transesterifikace na FAMES, a následně byl vzorek změřen pomocí plynové chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí. V naměřeném chromatogramu bylo detekováno šest FAMES. Jelikož separace byla pro další plánované analýzy více než uspokojivá, nebylo třeba separační proces dále optimalizovat, byla však provedena optimalizace metody transesterifikace, pro dosažení nejvyšší výtěžnosti methylesterů.

Byly testovány tři metody, a to pomocí směsi methanol-HCl, aceylchloridu a methoxidu sodného. Pro tyto metody byla sledována, výtěžnost vybraných FAMES. Z naměřených chromatogramů byly odečteny plochy píků vybraných methylesterů, které byly vztaženy k ploše píku interního standardu. Patrné rozdíly byly pozorovány u methylesteru kyseliny hexadekanové, kdy nejvyšší výtěžek poskytla transesterifikace pomocí směsi methanol-HCl, která byla nadále používána.

Dále byla optimalizována teplota iontového zdroje s cílem zvýšit intenzity molekulových píků. Při snižování teploty iontového zdroje došlo k očekávanému potlačení fragmentace, ale k významnému zvýšení molekulových píků snížením teploty nedošlo.

Po získání optimální metody zpracování a měření vzorku z buněčného materiálu pro analýzu GC-MS bylo provedeno měření vzorků kultivovaných při 20 % O₂ a 4 % O₂ (hypoxie) kultivovaných běžným médiem s obsahem neznačeného glutaminu. K těmto vzorkům byl přidán interní standard a stejně jako při optimalizaci transesterifikace byly odečteny plochy píků, které byly následně vyhodnocovány. Prostřednictvím těchto výsledků

byl sledován vliv hypoxie na biosyntézu mastných kyselin. Bylo zjištěno že při hypoxických podmínkách došlo k nárůstu FAME 16:1 o 102 % a FAME 16:0 o 91 %, u zbývajících detekovaných FAMEs nebyl zaznamenán výrazný rozdíl oproti kontrolním podmínkám (20 % O₂). Tyto výsledky jsou v souladu s předchozími studii na dané téma. Vzhledem k těmto výsledkům bylo izotopové obohacení studováno právě u methylesteru kyseliny hexadekanové a hexadecenové.

Další a závěrečná práce se zabývala studiem MS spekter FAME 16:0 a 16:1 u vzorků kultivovaných se značeným i neznačeným glutaminem, a to při 20 % a 4 % O₂. Data byla vyhodnocována prostřednictvím výšek molekulových piků M, M+1, M+2 a M+3. Z takto experimentálně získaných dat a dat teoretických, která byla získána simulováním spekter, bylo pomocí funkce `lsnonneg` v programu GNU Octave získáno procentuální zastoupení výskytu značených methylesterů. Pomocí této analýzy bylo zjištěno, že jak u FAME 16:0 tak i u FAME 16:1 došlo k nárůstu výskytu FAME obohacených o 1 až 3 uhlíky ¹³C oproti kontrolním vzorkům, které obsahovali jen přirozeně se vyskytující uhlíky ¹³C. Tento nárůst byl pozorován jak u vzorků buněk kultivovaných při 20 % O₂ tak při hypoxických podmínkách (4 % O₂). Z těchto výsledků lze usuzovat, že reverzní dráha citrátového cyklu se do jisté míry uplatňuje přirozeně, nebo se značený glutamin dostává do biosyntetizovaných mastných kyselin jinou metabolickou dráhou. Při studiu vlivu hypoxie bylo výše uvedeným způsobem a statistickým zpracováním pomocí jednofaktorové analýzy rozptylu na hladině pravděpodobnosti $\alpha = 0,05$, zjištěno u FAME 16:0, že statisticky významného rozdílu bylo dosaženo u [¹³C₁] FAME 16:0 kdy byla inkorporace při hypoxických podmínkách zvýšena o 5,9 %. To tedy znamená, že bylo téměř o 6 % více biosyntetizovaných mastných kyselin s obsahem jednoho uhlíku ¹³C při hypoxických podmínkách oproti podmínkám kontrolním. Tento nárůst lze tedy na základě studované literatury chápat jako příspěvek reverzní dráhy citrátového cyklu. Pro FAME 16:1 bylo dosaženo statisticky významného nárůstu při hypoxických podmínkách u [¹³C₁] FAME 16:1 o 12 % a u [¹³C₁] FAME 16:1 o 3 %.

V této práci byla vypracována zavedena a optimalizována metodika pro analýzu mastných kyselin získaných z diferenciovaných 3T3-L1 preadypocitů pomocí GC-MS s následnou analýzou izotopového obohacení vybraných mastných kyselin uhlíkem ¹³C, čímž byl splněn stanovený cíl diplomové práce. Tato práce dále poskytuje základ pro další výzkum dané problematiky.

6 Literatura

- [1] M. Hobzova, „Syndrom obstrukční spánkové apnoe,“ *Interní Med.*, p. 148–151, 2010.
- [2] V. Sedlák, V. Koblížek, M. Lánský, R. Šimek a P. Smolík, „Léčba syndromu obstrukční spánkové apnoe,“ *Med. Pro Prax.*, č. 124–128, 2006.
- [3] M. Naresh a Punjabi, „The Epidemiology of Adult Obstructive Sleep Apnea,“ *Proc. Am. Thorac Soc.*, p. 136–143, 2008.
- [4] D. Slouka, J. Holoubková a J. Frej, *Obstrukční syndrom spánkové apnoe*, Plzeň: Euroverlag s.r.o., Plzeň, 2016.
- [5] Healthwise Staff, „Obstructive Sleep Apnea: Blocked Upper Airway,“ 3. 25. 2017. [Online]. Available: <https://myhealth.alberta.ca>. [Přístup získán 12. 3. 2018].
- [6] E. Bixler, A. Vgontzas, T. Ten Have, K. Tyson a A. Kales, „Effects of age on sleep apnea in men: I. Prevalence and severity,“ *Am J Respir Crit Care Med.*, p. 144–148, 1998.
- [7] E. Bixler, A. Vgontzas, H. Lin, T. Ten Have, J. Rein, A. Vela-Bueno a A. Kales, „Prevalence of sleep-disordered breathing in women: effects of gender,“ *Am J Respir Crit Care Med.*, p. 608–613, 2001.
- [8] K. Westlake, A. Plihalova, M. Pretl, Z. Lattova a J. Polak, „Screening for Obstructive Sleep Apnea Syndrome in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus: A Prospective Study on Sensitivity of Berlin and STOP-Bang Questionnaires,“ *Sleep Medicine*, p. 71–76, 2016.
- [9] A. I. Pack, *Sleep Apnea: Pathogenesis, Diagnosis and Treatment*, London: Informa Healthcare, 2016.
- [10] M. Weiszenstein, M. Musutova, A. Plihalova, K. Westlake, M. Elkalaf, M. Koc, A. Prochazka, J. Pala, S. Gulati, J. Trnka a J. Polak, „Adipogenesis, lipogenesis and lipolysis is stimulated by mild but not severe hypoxia in 3T3-L1 cells,“ *Biochem Biophys Res Commun*, p. 727–732, 2016.
- [11] M. Kodíček, O. Valentová a R. Hynek, *Biochemie, chemický pohled na biologický svět*, Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2015.
- [12] Z. Vodrážka, *Biochemie*, Praha: Academia, 1999.
- [13] J. Koolman a K. H. Rohm, *Barevný atlas biochemie*, Praha: Grada Publishing, 2012.

- [14] D. R. Wise, P. S. Ward, J. E. S. Shay, J. R. Cross, J. J. Gruber, U. M. Sachdeva, J. M. Platt, R. G. DeMatteo, M. C. Simon a C. B. Thompson, „Hypoxia promotes isocitrate dehydrogenase-dependent carboxylation of α -ketoglutarate to citrate to support cell growth and viability,“ *PNAS*, p. 19611–19616, 2011.
- [15] AG, Biocrates Life Sciences, „Examples of isotope tracing and effects on fatty acid,“ [Online]. Available: <http://www.metanomics-health.com>. [Přístup získán 16. 1. 2018].
- [16] S. Tumanov, V. Bulusu a J. J. Kamphorst, „Analysis of Fatty Acid Metabolism Using Stable Isotope Tracers and Mass Spectrometry,“ *Methods in Enzymology*, pp. 197-217, 2015.
- [17] F. V. Filipp, D. A. Scott, Z. A. Ronai, A. L. Osterman a J. W. Smith, „Reverse TCA cycle flux through isocitrate dehydrogenases 1 and 2 is required for lipogenesis in hypoxic melanoma cells,“ *Pigment Cell Melanoma Res.*, p. 375–383, 27. 3. 2012.
- [18] J. Zhang, W. Suk Ahn, P. A. Gameiro, M. A. Keibler, Z. Zhang a G. Stephanopoulos, „ ^{13}C Isotope-Assisted Methods for Quantifying Glutamine Metabolism in Cancer Cells,“ *Methods Enzymol.*, p. 369–389, 10. 4. 2015.
- [19] W. Christie a X. Han, *Lipid analysis: Isolation, separation, identification and lipidomic analysis*, Bridgewater: The Oily Press, 2010.
- [20] C. C. Akoh a D. B. Min, *Food lipids: Chemistry, Nutrition, and Biotechnology*, Second Edition, New York: Marcel Dekker, Inc., 2002.
- [21] D. Sofrová, M. Tichá, J. Barthová a a. kolektiv, *Biochemie Základní kurz*, Praha: Nakladatelství Karolinum, 2009.
- [22] J. Velíšek a J. Hajšlová, *Chemie potravin 1*, Havlíčkův Brod: OSSIS, 2009.
- [23] F. Opekar, I. Jelínek, P. Rychlovský a Z. Plzák, *Základní analytická chemie*, Praha: Karolinum, 2007.
- [24] J. Folch, M. Lees a S. C. Sloane, „A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues,“ *J Biol Chem.*, p. 497–509, 1957.
- [25] E. G. Bligh a W. J. Dyer, „A Rapid Method of Total Lipid Extraction and Purification,“ *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, pp. 911-917, 1959.
- [26] V. Matyash, G. Liebisch, T. Kurzchalia, A. Shevchenko a D. Schwudke, „Lipid extraction by methyl-tert-butyl ether for high-throughput lipidomics,“ *Journal of Lipid Research*, sv. 49, pp. 1137-1146, 2008.

- [27] V. P. Skipski, A. F. Smolowe, R. C. Sullivan a M. Barclay, „Separation of lipid classes by thin-layer chromatography,“ *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*, pp. 386-396, 1965.
- [28] A. Carrasco-Pancorbo, N. Navas-Iglesias a L. Cuadros-Rodríguez, „From lipid analysis towards lipidomics, a new challenge for the analytical chemistry of the 21st century. Part I: Modern lipid analysis,“ *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, pp. 263-278, 2009.
- [29] J. Cvačka, O. Hovorka, P. Jiroš, J. Kindl, K. Stránský a I. Valterová, „Analysis of triacylglycerols in fat body of bumblebees by chromatographic methods,“ *Journal of Chromatography A*, sv. 1101, pp. 226-237, 2006.
- [30] J. Cvačka a V. Vrkoslav, „Identification of the double-bond position in fatty acid methyl esters by liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry,“ *Journal of Chromatography A*, sv. 1259, pp. 244-250, 2012.
- [31] L. J. Morris, „Separations of lipids by silver ion chromatography,“ *Journal of lipids research*, sv. 7, p. 717-732, 1966.
- [32] J. T. Watson a O. D. Sparkman, *Introduction to mass spectrometry*, West Sussex: John Wiley and Sons Ltd, 2007.
- [33] E. Hoffmann a V. Stroobant, *Mass Spectrometry principles and applications*, West Sussex : John Wiley & Sons Ltd, 2012.
- [34] J. Gross, *Mass Spectrometry*, Heidelberg: Springer, 2004.
- [35] K. Štulík a kolektiv, *Analytické separační metody*, Praha: Karolinum, 2004.
- [36] A. Manz, P. S. Dittrich, N. Pamme a D. Iossifidis, *Bioanalytical chemistry*, London: Imperial College Press, 2015.
- [37] O. D. Sparkman, Z. E. Penton a F. G. Kitson, *Gas Chromatography and mass Spectrometry a practical guide*, Oxford: Elsevier, 2011.
- [38] C. Barner-Kowollik, T. Gruending, J. Falkenhagen a S. Weidner, *Mass Spectrometry in Polymer Chemistry*, Hoboken: John Wiley & Sons, 2012.
- [39] I. Vala Sciences, „www.zen-bio.com,“ [Online]. Available: <http://www.zen-bio.com/products/cells/3T3L1.php>. [Přístup získán 15. 3. 2018].

- [40] J. Polák, K. Studer-Rabeler, H. McHugh, M. A. Hussain a L. A. Shimoda, „System for exposing cultured cells to intermittent hypoxia utilizing gas permeable cultureware,“ *Gen Physiol Biophys*, p. 235–247, 27. 3. 2015.
- [41] GNUOctave, „MATLAB-compatible syntax,“ [Online]. Available: <https://octave-online.net/>. [Přístup získán 2018 5. 4.].