

MIKRODIALÝZA A HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE JAKO KLÍČ K MONITOROVÁNÍ METABOLITŮ V NEZRALÉM MOZKU

KATEŘINA VONDRÁKOVÁ^{a,b,c}, LIBOR UTTL^{a,b,e}, HANA KUBOVÁ^b, GRYGORIY TSENOV^{a,b,d} a PETR KAČER^e

^a Národní ústav duševního zdraví, Klecany, ^b Oddělení vývojové epileptologie, Fyziologický ústav AV ČR, Praha, ^c Katedra fyziologie, Přírodovědecká fakulta Univerzita Karlova, Praha, ^d Lékařská fakulta, Univerzita Verona, Itálie, ^e Vysoká škola chemicko-technologická, Praha
Petr.Kacer@vscht.cz

Došlo 5.11.16, přijato 19.12.16.

Klíčová slova: mikrodialýza, nezralý mozek, HPLC-MS, aminokyseliny

Úvod

Perinatální období hlodavců, které začíná 22. týdnem těhotenství a končí 28. dnem života, je provázeno celou řadou masivních změn v mozku, jako je buněčná reorganizace, funkční změny neurotransmiterního systému, synaptogeneze, postupná myelinizace, vývoj imunitního systému a maturace vaskularizace¹. Mezi nejvýraznější příklady funkčních změn lze uvést přeměnu embryonální a raně postnatální excitační GABA transmise na inhibiční, dále např. změny katecholaminergní, serotonergní a cholinergní transmise². V souvislosti s těmito změnami dochází při vývoji mozku rovněž k významným změnám na molekulární úrovni. Příkladem může být změna exprese AMPA receptorů spojená se změnou propustnosti pro vápenaté ionty³, rozdílné složení podjednotek glutamátových a GABA ergních receptorů^{4,5}, z nichž některé se vyskytují v embryonálním a postnatálním mozku a během vývoje mozku jsou nahrazovány podjednotkami specifickými pro dospělý mozek, čímž dochází ke změnám afinity pro GABA či glutamát i ke změnám farmakologické citlivosti. Všechny tyto změny jsou nesmírně důležité pro vývoj a optimální fungování mozku. Perinatální období je spojeno s extrémně zvýšenou plasticitou a citlivostí ke změnám ve vnitřním prostředí i k působení zevních faktorů. Výchyly v těchto parametrech pak mohou vést k trvalým či přechodným změnám, které mohou být podkladem pro celou řadu funkčních změn centrálního nervového systému (CNS) či pro vznik neuropsychiatrických onemocnění. Příkladem může být vznik některých forem věkově vázaných epilepsií⁶, schizofrenie⁷ či cerebrální ischemie⁸, nejčastěji v důsledku porodních komplikací či amfetaminem

způsobené vývojové komplikace projevující se kognitivním deficitem⁹. Dlouhodobé negativní ovlivnění vývoje CNS a jeho důsledky pro další život postiženého jedince dokumentuje celá řada prací. Výsledky klinických studií jsou ovšem vysoce variabilní, ovlivněné řadou přídatných patologií a dalších faktorů, zvyšujících heterogenitu sledovaných souborů. Nejpřímější cestou, jak sledovat vliv jednotlivých faktorů na vývoj jedince, tak představují přesně charakterizované a validované animální modely, které mohou být použity nejen pro charakterizaci patofyziologických příčin daného onemocnění, ale i pro hledání nových terapeutických postupů či testování nových léčiv.

Většina terapeutických a diagnostických rozhodnutí se opírá o výsledky hladin endogenních molekul v tzv. „biofluids“ testech. Většina fyziologických a patofyziologických procesů a farmakologických interakcí se ovšem odehrává v tkáni a ne vždy se promítá do hladin biomarkerů, detegovatelných v tělních tekutinách, jako je krev či mozková tekutina (MMM). Stanovení koncentrace různých molekul přímo ve tkáních relevantních pro dané onemocnění je proto klíčové pro určení správné diagnózy či pro výběr optimální terapie.

Mikrodialýza (MD) je metodika umožňující *in vivo* sledování tkáňové biochemie v diskrétních oblastech nejrozličnějších tkání a orgánů. Jedná se o méně invazivní zákrok než biopsie či lumbální punkce. V nynější době se MD v klinické praxi používá při monitorování sekundární ischemie u dospělých pacientů po cévní mozkové příhodě, těžkém mozkovém traumatu či ke sledování výskytu vazospazmu u pacientů se subarachnoidálním krvácením na jednotkách intenzivní péče^{10,11}. V klinické praxi bývají analyzovanými látkami především laktát, glukosa, glycerol, urea, pyruvát a glutamát¹¹.

Klinické studie poukázaly na možné využití této techniky sledování neurochemických změn po neurochirurgických zákrocích. MD představuje další krok v rozvoji neurointenzivní péče a díky tomu se tato metoda stává stále rozšířenější i v českých nemocnicích, a je využívána především pro určení rozsahu či charakteru neuronálního poškození, stanovení progresu onemocnění, pro zjištění, které poškozující procesy stále probíhají a zhodnocení, zda došlo k natolik závažným tkáňovým změnám a je nutný terapeutický zásah.

I když řada studií mimo jiné ukázala, že sběr vzorků extracelulární tekutiny pomocí mikrodialýzy je možný i u novorozenců po chirurgickém zákroku¹², znalosti biochemie nezralého mozku jsou stále velmi omezené. Většina dostupných dat pochází ze 70.–80. let minulého století. Je nutno zdůraznit, že je velmi málo prací zabývajících se procesy v nezralém mozku, vývojovými změnami a profily vybraných látek, např. aminokyselin (AK), laktátu a monoaminů, přestože jsou neurochemické změny těchto látek klíčové pro celou řadu onemocnění¹¹ a jejich monitoring by mohl podhalit průběh daného onemocnění a usnadnit tak volbu optimálního terapeutického postupu. Důležitým faktem je, že se nezralý mozek v mnoha aspektech liší od dospělého, a proto je nezbytné upravit jak procedury odběru MD vzorků, tak i parametry analýzy vzorků odpo-

vídajících příslušnému vývojovému stádiu. To vše je klíčové pro získání reprodukovatelných výsledků a pro správnou interpretaci získaných dat.

Běžně probíhá analýza MD vzorků pomocí automatických analyzátorů či vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC). Zde je pravidlem, že HPLC metoda je pro detekci hladin metabolitů mnohem přesnější a citlivější, ovšem s ohledem na nutnou přípravu vzorků a trvání analýzy i mnohem náročnější metodou. Proto HPLC nachází uplatnění především v experimentálních studiích. Jako vysoce přesná a spolehlivá se ukázala kombinace HPLC s hmotnostní spektrometrií (MS). Především v raných stádiích postnatálního vývoje představuje kombinace MD a HPLC-MS precizní nástroj pro mapování hladiny metabolitů.

Cílem této práce bylo vyvinout a uzpůsobit metodické postupy pro mapování tkáňového metabolismu v nezralém mozku na bázi mikrodialyzační techniky v kombinaci s následnou analýzou metodou HPLC-MS.

Experimentální část

Mikrodialýza

Experimenty byly provedeny na dvanáctidenních (P12) potkanech kmene Albino Wistar pocházejících z chovů na Fyziologickém ústavu Akademie věd ČR. Den narození byl stanoven jako den 0. Zvířata byla chována v kontrolovaných podmínkách (teplota 22 ± 1 °C, vlhkost 50 až 60 %, světlo 6:00–18:00 h) s volným přístupem k vodě a potravě. Experimenty byly schváleny výborem pro ochranu zvířat na Fyziologickém ústavu Akademie věd České republiky (číslo schválení 095/2010 a 013/2012). Fyziologický Ústav vlastní NIH prohlášení o shodě s normami pro humánní péči a používání laboratorních zvířat č.j. 1396/2014-MZE-17214 platící do 31. prosince 2018. Péče o zvířata a experimentální postupy jsou prováděny v souladu s pokyny Evropského společenství (směrnice Rady 2010/63/EU). V experimentech bylo použito 10 pokusných zvířat.

Veškeré chirurgické zákroky byly prováděny při izofuranové anestezii (1,5–2,0 %; #B306, Abbot Laboratories, Queenborough, UK). Zvířata byla umístěna do stereotaktického aparátu a byl jim v lebce pomocí mikroskalpelu vytvořen otvor cca $0,5 \times 0,5$ mm, byly odtaženy mozkové obaly a byla jim zavedena mikrodialyzační sonda s membránou o délce 1 mm a propustnosti 6 kDa (#P000082; CMA7, CMA microdialysis, Švédsko) do pravého dorzálního hippokampu v souřadnicích přepočtených ze souřadnic dospělých zvířat dle vzdálenosti bregma-lambda (AP=4,2; L=3,5; H=4 mm podle¹³). MD sonda byla napojena na perfúzní pumpu (# 8003100) a chlazený kolektor (#8002770) pomocí mikrodialyzačních kapilár ("tubing"; #840950). Sonda byla promývána umělou mozkovou tekutinou (#P000151, vše CMA microdialysis, Švédsko) konstantní rychlostí $1,5 \mu\text{l min}^{-1}$. Vzorky byly odebírány sekvenčně do skleněných 0,2 ml mikrozkru-

mavek (Chromservis, Česká republika), a to každých 20 min po dobu 1 h po zavedení MD sondy. Během všech experimentů byla zvířata udržována při teplotě $34 \pm 0,5$ °C pomocí vyhřívané podložky s automatickým udržováním žádané teploty (Supratech engineering, Maďarsko). Na konci experimentu byla zvířata humaně usmrcena intraperitoneálním podáním uretanu (2 g/kg, i. p., #U2500, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), aniž by se probudila. Vzorky byly uskladněny při -80 °C do doby analýzy.

Analýza mikrodialyzačních vzorků

Roztok mikrodialyzátu byl podroben derivatizační reakci s oktanoyl chloridem (Sigma-Aldrich, Německo) za podmínek Schotten-Baumannovy reakce. Reakce probíhala v dvoufázovém systému dichlormethan/voda za intenzivního míchání. Součástí organické fáze byl oktanoyl chlorid, vodná fáze obsahovala přísadu hydroxidu sodného (p.a., Penta, ČR) pro neutralizaci vznikající kyseliny. Při této reakci se acylový zbytek váže na aminoskupinu aminokyseliny a látka přechází do organické fáze, ve vodné fázi zůstávají soli z mikrodialyzátu a sůl vznikající neutralizací kyseliny chlorovodíkové. Všechna rozpouštědla byla zakoupena od firmy Lachner, ČR; standardy analytů od firmy Sigma-Aldrich, Německo.

Pro chromatografickou separaci derivatizovaných analytů byla použita chromatografická kolona Luna C8(2) $150 \times 2,1$ mm ID, 2,6 μm , Phenomenex, Torrance, CA, USA) a gradientová eluce. Mobilní fázi tvořil acetonitril (A) a 0,1% vodný roztok kyseliny mravenčí (B) o průtoku $150 \mu\text{l min}^{-1}$. Eluční gradientový program byl následující: 0–3 min 50% A, 5 min 80% A, 25 min 50% A, 30 min 50% A. Čistota všech chemikálií použitých pro chromatografickou separaci byla stupně LC-MS (Fisher Chemical). HPLC kolona byla temperována na konstantní teplotu 25 °C. Nastříkovaný objem vzorku na kolonu byl 10 μl .

Vzorky byly temperovány v autosampleru na teplotu 4 °C. HPLC systém (pumpa Accela 600 a autosampler Accela Open AS (Thermo Scientific, San Jose, CA, USA)) byl spojen s hmotnostním spektrometrem LTQ Orbitrap Velos (Thermo Scientific, San Jose, CA, USA), který byl vybaven elektrosprejovou ionizací pracující v pozitivním (ESI⁺) i negativním (ESI⁻) ionizačním módu. Nastavení iontového zdroje: napětí jehly ± 3000 V, teplota kapiláry 300 °C, teplota ESI zdroje 300 °C; tlak nosného a pomocného plynu 35 psi (nosný plyn) a 10 ArbU (pomocný plyn). Rozsah měření hmotnostních spekter byl 100 až 1000 Da. Pro zpracování získaných dat byl použit software Xcalibur (Thermo Scientific, San Jose, CA, USA).

Výsledky a diskuse

Pomocí kombinace MD techniky a HPLC-MS analýzy byly zmapované bazální hladiny celé řady metabolitů v nezralém hipokampu dvanáctidenního potkana. HPLC-MS představuje vzhledem ke koncentračním hladinám, ve kterých se sledované látky v analyzovaných maticích

vyskytují, ideální nástroj pro jejich přesné, citlivé a rychlé stanovení. Prováděná derivatizace zlepšuje chromatografickou separaci a snižuje hodnoty LOD (limit detekce) a LOQ (limit kvantifikace).

V mikrodialyzátech byly sledovány změny koncentračních profilů těchto látek: α -alanin, β -alanin, arginin, aspartát, citrulin, dopamin, GABA, glutamát, glutamin, glycin, histidin, laktát, lysin, serin, tyrosin, valin, pyruvát, serotonin a taurin (viz tab. I).

Optimalizace a validace mikrodialyzačního odběru je ovšem primárním předpokladem pro získání vzorků, které jsou schopny podat validní výpověď o dějích odehrávajících se v mozku. Díky použití vhodné rychlosti průtoku umělého MDM přes MD sondu a také parametrů sondy samotné bylo dosaženo výtěžku (recovery) v rozsahu od 65 do 90 % (v závislosti na vlastnostech jednotlivých metabolitů v jejich fyziologických koncentracích v mozku). Jako důkaz spolehlivosti těchto výsledků může posloužit starší práce¹⁴, kde byly částečně zmapované zmíněné metabolity (viz tab. II) s podobnými výsledky.

Je ovšem nutno podotknout, že k analytickému stanovení byly dříve použity intaktní mozkové struktury, v kterých byly metabolity stanoveny odlišnými biochemickými metodami. Výsledek MD je ovšem závislý na vlastnostech samotné sondy (použité permeabilní membrány), proto musí být každá takto vyvinutá metodika s novou sondou vždy znovu revalidována. Dále je výsledek závislý na MD technice, která získává informaci z diskrétních mozkových regionů, čímž samozřejmě vzniká možnost cíleného mapování dané konkrétní oblasti mozku, a proto je těžko porovnatelná s jinak získaným výsledkem. Dalším faktem, který by mohl způsobit rozdíly mezi výsledky získanými zmíněnými metodikami, je, že u starší práce byla tkáň odebrána *post-mortem*, zatímco u MD se jedná o *in vivo* odběr, který přináší téměř *on-line* informaci a dovoluje tak neurokinetický monitoring, který je ovšem částečně ovlivněn použitou anestézií. Další rozdíly mezi mikrodialýzou a jinými metodikami lze vysvětlit tím, že metabolický profil se liší v souvislosti s mozkovou strukturou, podmínkami odběru a věkem experimentálního objektu, což již

bylo dříve diskutováno v některých experimentálních studiích¹⁴.

Metodika kombinující MD s HPLC-MS vykazuje na rozdíl od standardně dostupných analytických kitů např. ELISA podstatně vyšší selektivitu a často i citlivost. To je způsobeno nejen vysokou efektivitou MD – HPLC-MS metodiky, ale především skutečností, že metoda v sobě zahrnuje přidání deuteriem značených standardů do odběrové mikrozkušavky („ředění isotopicky značeným standardem“), které umožňuje následnou přesnou kvantifikaci. Díky tomu je možné vyvarovat se náhodné chyby ovlivněné kvantifikací v důsledku nežádoucího úbytku (degradace) aminokyselin (AK) spojeného například s dobou uchování vzorku a tudíž chyby ve výsledné koncentraci konkrétní AK. Další výhodou vyvinuté metodiky je eliminace chyby v důsledku přítomnosti sloučenin s analyticky podobným chováním, kdy se vznik této chyby minimalizuje využitím energetického rozlišení při kolizně-indukovaných disociacích, které vyloučí i chybu v důsledku přítomných isobarických sloučenin (např. leucin, isoleucin). Mimo jiné je vyvinutá metodika charakterizována nízkým limitem detekce, což může být uplatněno jak pro práci s relativně malým objemem mikrodialyzátu, tak i při výzkumu rychlých koncentračních změn sledovaných AK. Na druhé straně se musí brát v potaz i případné metodické limitace spojené s vlastnostmi samotné MD sondy a chemického složení umělého mozkomíšního moku a v neposlední řadě i metody přípravy vzorku.

Závěr

Byla vyvinuta metodika, která je schopná detegovat koncentrace metabolitů (aminokyselin, monoaminů a vybraných organických kyselin) v mozkovém dialyzátu získaného pomocí mikrodialýzy v kombinaci s vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií s hmotnostně spektrometrickou detekcí, což představuje slibnou metodiku umožňující precizně mapovat hladiny metabolitů v raných stadiích postnatálního vývoje. Naše výsledky mohou rov-

Tabulka I

Přehled koncentrací metabolitů (průměr \pm standardní odchylka) v dialyzátu z hipokampu 12denního potkana

Metabolit	$\mu\text{M ml}^{-1}$	Metabolit	$\mu\text{M ml}^{-1}$
Glutamát	$6,70 \pm 0,2$	A-Alanin	$0,421 \pm 0,009$
Glutamin	$0,323 \pm 0,004$	Histidin	$0,307 \pm 0,004$
Aspartát	$0,0061 \pm 0,0002$	Tyrosin	$0,2086 \pm 0,004$
GABA	$0,0179 \pm 0,0005$	Valin	$0,0496 \pm 0,0016$
Taurin	$0,385 \pm 0,006$	Lysin	$0,041 \pm 0,0012$
Glycin	$0,395 \pm 0,0036$	Dopamin	$0,174 \pm 0,0074$
Serin	$0,0529 \pm 0,0014$	5-HT	$0,612 \pm 0,0118$
Citrulin	$0,0172 \pm 0,0005$	Laktát	$3,9 \pm 0,0001$
Arginin	$0,4428 \pm 0,0097$	Pyruvát	$1,6 \pm 0,0000$

Tabulka II

Přehled koncentrací metabolitů (průměr) v mozkové tkáni potkana (převzato a upraveno z cit.¹⁴)

Metabolit	Koncentrace pro věk, $\mu\text{mol g}^{-1}$			
	P0	P1	P7	P14
Glutamin	2,7	2,5	1,65	4,1
Glutamát	4,95	5,4	5,75	6,6
Aspartát	1,5	1,6	1,5	2,7
GABA	1,2	1,3	1,7	2

něž pomoci rozšířit omezené současné znalosti vývoje biochemie mozku a její dynamiky. Výsledky této práce mohou být podkladem pro vývoj vhodných derivatizačních činidel s ohledem na detegované koncentrace, které by byly použitelné v klinické praxi a pro systémy automatické analýzy, jak je tomu v případě dospělých pacientů. Tyto poznatky bude možné později využít k rutinní analýze, vývoji diagnostických kitů pro pacienty v perinatálním období, dále pro definici nových markerů či určení dynamiky různých procesů u některých onemocnění za využití animálních modelů. Mimo jiné, vyvinutá metodika může být snadno aplikovatelná pro zjištění hladin metabolitů v tkáni jako takové (ať už získané pomocí biopsie či *post-mortem*).

Výzkum byl podpořen operačním programem “Praha-Konkurenceschopnost” (CZ.2.16/3.1.00/22197) a “Národní program udržitelnosti” NPU I (LO1215)MSMT-34870/2013.

Tato studie byla podpořena Grantovou agenturou Karlovy univerzity (projekt č. 165115), grantem GAČR GA14-20613S a projektem číslo LO1611 za finanční podpory MŠMT v rámci programu NPU I a projektu „Národní ústav duševního zdraví (NUDZ)“, registrační číslo ED2.1.00/03.0078, financovaného z Evropského fondu pro regionální rozvoj.

LITERATURA

1. Semple B. D., Blomgren K., Gimlin K., Ferriero D. M., Noble-Haeusslein L. J.: *Prog Neurobiol.* 106-107, 1 (2013).
2. Herlenius E., Lagercrantz H.: *Exp. Neurol.* 190, Suppl 1, S8-21 (2004).
3. Lujan R., Shigemoto R., Lopez-Bendito G.: *Neuroscience* 130, 567 (2005).
4. Ben-Ari Y., Cherubini E., Corradetti R., Gaiarsa J. L.: *J. Physiol.* 416, 303 (1989).

5. Wenzel A., Fritschy J. M., Mohler H., Benke D.: *J. Neurochem.* 68, 469 (1997).
6. Rakhade S. N., Jensen F. E.: *Nat. Rev. Neurol.* 5, 380 (2009).
7. Cannon M., Murray R.: *Arch. Dis. Child.* 78, 1 (1998).
8. Nelson K. B., Lynch J. K.: *Lancet Neurol.* 3, 150 (2004).
9. Jablonski S. A., Williams M. T., Vorhees C. V.: *Curr. Top. Behav. Neurosci.* 29, 183 (2016).
10. Müller M.: *Microdialysis. BMJ* 324 (7337), 588 (2002).
11. Ungerstedt U., Rostami E.: *Curr. Pharm. Des.* 10, 2145 (2004).
12. Hildingsson U., Sellden H., Ungerstedt U., Marcus C.: *Acta Paediatr.* 85, 589 (1996).
13. Paxinos G., Watson C.: *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates.* Academic Press, New York 2006.
14. Agrawal H. C., Davisand J. M., Himwich W. A.: *J. Neurochem.* 13, 607 (1966).

K. Vondráková^{a,b,c}, L. Uttl^{a,c,d}, H. Kubová^b, G. Tsenov^{a,b,d}, and P. Kačer^e (^a National Institute of Mental Health, Klecany; ^b Department of Evolution Epileptology, Pysiological Institute, ASCR, Prague; ^c Department of Physiology, Faculty of Science, Charles University, Prague; ^d Department of Neuroscience, Biomedicine and Motion Science, Faculty of Medicine, University of Verona, Italy; ^e University of Chemistry and Technology, Prague, Czech Republic): **Microdialysis and Mass Spectroscopy as a Key for Monitoring of Metabolites in Immature Brain**

The perinatal period of life is a critical moment for a proper development of CNS, however it is a risky period, which is associated with many pathologies. Hence, it is important to acquire knowledge and combine new methodologies for understanding the developmental aspects of physiology/pathophysiology of the brain. We have successfully developed and applied the method of monitoring a tissue metabolism in the immature brain. Using a combination of microdialysis technique and HPLC-MS basal levels of amino acids and other low molecular weight molecules in the hippocampus of immature rats (12-days-old) were mapped. Our results demonstrate the suitability of chosen parameters of sampling and analysis for the monitoring of tissue biochemistry and metabolomic mapping in immature brain. Moreover, a potential of the proposed method can found a place in clinical practice and for biomarkers monitoring of various CNS diseases.