

Závěrečná zpráva projektu specifického výzkumu zakázka č. 2106 / 2021

Název projektu: Vývoj metod pro analýzu a biochemické testování metabolitů, lipidů a xenobiotik

Specifikace řešitelského týmu

Odpovědný řešitel: Mgr. Petra Lišková, doc. Ing. Miroslav Lísa, Ph.D.

Studenti doktorského studia na UHK: Mgr. Petra Lišková

Studenti magisterského studia na PŘF UHK: Bc. Michaela Dohnalová, Bc. Eliška Hančová, Bc. Eliška Horáková, Bc. Tereza Langerová, Bc. Zdeňka Neuerová, Bc. Markéta Veselá

Další výzkumní pracovníci: PharmDr. Rudolf Andrýs, Ph.D., Ing. Eva Cífková, Ph.D., RNDr. Oleksandr Kozlov, Ph.D., doc. Ing. Miroslav Lísa, Ph.D., Mgr. Helena Řehulková, Ph.D.

Celková částka přidělené dotace: 197 630,00 Kč

Datum zahájení řešení projektu: 3. 3. 2021

Datum ukončení řešení projektu: 30. 11. 2022

Stručný popis postupu při řešení projektu (max. 2 strany).

Podobně jako analytická část katedry chemie se specifický výzkum zabývá vývojem metod pro analýzu metabolitů, mezi které patří široké spektrum nízkomolekulárních látek různé chemické povahy. Některé práce navazují na již probíhající výzkum a některé naopak otevírají novou kapitolu s inovativním přístupem k přípravě nebo analýze metabolitů. Nedílnou součástí studia o metabolitech je také biochemické testování vlivu xenobiotik na buněčné enzymy.

Gangliosidy představují důležité polární lipidy, které se účastní různých signálních procesů v buňkách a narušení jejich metabolismu má spojitost s řadou závažných onemocnění centrálního nervového systému. Jejich detailní analýza umožňuje popis jejich vlivu na vznik a průběh takových onemocnění. V rámci diplomové práce byla provedena optimalizace metody přípravy vzorku a podmínek LC/MS analýzy gangliosidů v mozku experimentálních zvířat. Metoda byla validována a použita pro charakterizaci zastoupení gangliosidů ve vybraných vzorcích. Získaná data byla zpracována v diplomové práci Mgr. Terezy Langerové obhájené v červnu 2022.

Spojení analytických metod SFC a MS má velký potenciál pro metabolomickou analýzu především středně polárních až nepolárních látek, protože umožňuje rychlou a detailní analýzu velkého množství vzorků. V rámci své diplomové práce provedla Mgr. Tereza Jiránková podrobnou optimalizaci podmínek SFC/MS analýzy s cílem separovat

jednotlivé třídy lipidů z celkového lipidického extraktu mozku. Metoda byla validována a aplikována na charakterizaci vybraných biologických vzorků. Článek byl publikován v časopise *Microchemical Journal* (2022). Problematikou frakcionace a analýzy lipidů pomocí SFC se zabývala ve své diplomové práci Mgr. Eliška Hančová. Práce byla úspěšně obhájena a výsledky publikovány také v časopise *Journal of Chromatography A* (2021).

V další práci se Mgr. Eliška Horáková zabývala syntézou a chirální SFC/MS analýzou izomerů monoacylglycerolů a diacylglycerolů, které jsou součástí metabolických drah zejména jako meziprodukty tvorby řady důležitých glycerolipidů. Informace o složení izomerů v biologické tkáni je důležitá z hlediska jejich rozdílných vlastností. V rámci práce byla provedena optimalizace podmínek syntézy izomerů diacylglycerolů na základě stereospecifické esterifikace glycerolu mastnou kyselinou. Připravené standardy byly použity pro optimalizaci chirální SFC/MS metody. Metoda byla validována a aplikována na charakterizaci vybraných biologických vzorků. Výsledky byly zpracovány v diplomové práci (obhajoba v červnu 2022).

Na rozdíl od předchozích prací se Bc. Markéta Veselá věnovala problematice imobilizace enzymů na povrch magnetických mikročásteček. Nejprve potvrdila možnost imobilizace lidské rekombinantní acetylcholinesterasy v aktivní formě na His-Trap magnetické mikročástečce a následně provedla i biochemické otestování takto imobilizovaného enzymu. Naměřená data se stala náplní její již úspěšně obhájené diplomové práce v roce 2021 a dále jsou součástí vědecké publikace s názvem *Immobilized human enzymes as a powerful biocatalysts and tool for inhibition mechanism studies*. Publikace se aktuálně zpracovává do finální podoby a bude publikována v časopisu *Sensors and Actuators B: Chemical* na konci roku 2022/začátku roku 2023.

Bc. Michaela Dohnalová se ve své diplomové práci zabývá vlivem halogenových substituentů na fyzikálně-chemické a biochemické vlastnosti oximů. Úspěšně již potvrdila vliv na hodnotu pKa i stabilitu za fyziologických podmínek. V následujících měsících provede zbylé experimenty zejména v oblasti biochemických vlastností analyzovaných oximů. Dosažené výsledky budou náplní její diplomové práce a zároveň se stanou součástí připravované vědecké publikace.

Studiem farmakokinetiky oximů v organismu se zabývala v rámci své diplomové práce Aneta Klusoňová. Věnovala se tématu enkapsulace oximů do kavity kukurbit[7]urilu (CB[7]) za účelem zlepšení biodostupnosti oximů v mozkové tkáni. Úspěšně zavedla extrakční protokol oximů a CB[7] z biologických matric a následně vytvořila LC-MS/MS metodu, díky čemuž mohlo být stanoveno ovlivnění farmakokinetiky vybraných oximů po enkapsulaci s CB[7] na myším modelu. Získaná data se stala náplní její úspěšně obhájené závěrečné práce a dále hlavní součástí vědecké publikace v impaktovaném časopise *Molecular Pharmaceutics* (2021).

Zcela nový přístup v přípravě vzorku přináší práce zabývající se purifikací celkového metabolického extraktu mozku. Metabolický extrakt obsahuje velké množství látek různé velikosti, struktury i chemické povahy, proto by bylo výhodné takový vzorek před samotnou analýzou zbavit balastů, které jsou ve vzorku nežádoucí a mohou způsobovat i znečištění přístroje nebo chromatografické kolony. Bc. Zdeňka Neuerová připravuje svépomocí minikolonky s různými typy stacionárních fází. Pomocí těchto kolonek je metabolický extrakt mozku purifikován a sebrané frakce jsou následně analyzovány

metodou LC/MS. Optimalizovaná metoda přípravy kolonek se sorbentem byla validována a výsledky zpracovány v diplomové práci (obhajoba 2022).

Splnění cílů řešení a přínos projektu.

Cíle projektu byly splněny. Úspěšně byly optimalizovány nové postupy přípravy vzorků i metody pro jejich analýzu. Pomocí validace byla ověřena spolehlivost těchto metod a jejich možné použití pro další biologické experimenty. Byla vyvinuta i zcela nová metoda purifikace metabolického extraktu, která by mohla být v budoucnu využita pro rychlou úpravu vzorků před LC/MS nebo SFC/MS analýzou.

Projekt celkově přispěl studentům magisterského studia k rozšíření odborných znalostí a k získání nových poznatků. Bylo dokončeno a úspěšně obhájeno 6 diplomových prací a několik magistrů pokračuje ve studiu svého tématu i v rámci doktorského studia na Katedře chemie.

Publikované články v časopisech typu Jimp (studenti zvýraznění):

1. Lísa, M.; Řehulková, H.; **Hančová, E.**; Řehulka, P. Lipidomic analysis using hydrophilic interaction liquid chromatography microgradient fractionation of total lipid extracts. *Journal of Chromatography A*. **2021**, vol. 1653, no. 462380. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2021.462380>
IF₂₀₂₁ = 4,759, Q1 13/78 (Biochemical Research Methods)
2. Andrýs, R.; **Klusoňová, A.**; Lísa, M.; Kassa, J.; Žďárová Karasová, J. Effect of Oxime Encapsulation on Acetylcholinesterase Reactivation: Pharmacokinetic Study of the Asoxime-Cucurbit[7]uril Complex in Mice Using Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. *Molecular Pharmaceutics*. **2021**, vol. 18(6), p. 2416-2427. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.1c00257>
IF₂₀₂₁ = 4,939, Q1 69/276 (PHARMACOLOGY & PHARMACY)
3. Lísa, M.; **Jiráňková, T.** Highly repeatable and selective ultrahigh-performance supercritical fluid chromatography - Mass spectrometry interclass separation in lipidomic studies. *Microchemical Journal*. 2022, vol.178, 107376. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2022.107376>
IF₂₀₂₁ = 5,304, Q1 17/87 (CHEMISTRY, ANALYTICAL)

Splnění kontrolovatelných výsledků řešení.

Uved'te jen výstupy, které vznikly na základě řešení tohoto projektu. Dále uved'te, zda byly publikace skutečně zadány do OBD s vazbou na RIV.

U výstupů Jimp a Jsc uveďte do závorky plánovaný a skutečný kvartil časopisu.

Tab. 1 Sumář výstupů řešení projektu

Typ výstupu	Plán	Skutečnost	Poznámka
Jimp (databáze WoS)	1	3	3xQ1
Jsc (databáze Scopus)			
B (recenzovaná odborná kniha)*			
C (kapitola v recenzované odborné knize)*			
D (článek ve sborníku ve WoS, Scopus)			
P (patent)			
Počet obhájených dizertačních prací			
Počet obhájených diplomových prací	6	6	
Počet výsledků	7	9	

Ke zprávě přiložte:

a) výpis z OBD – výstupy podpořené tímto projektem.

Datum: 29. 11. 2022

Podpis odpovědného řešitele:



* Pouze renomovaná nakladatelství Elsevier, Springer, Bentham apod.

Závěrečná zpráva grantového projektu zakázka č.2106
(specifický výzkum v roce 2021)

Název projektu: Vývoj metod pro analýzu a biochemické testování metabolitů, lipidů a xenobiotik

Výpis z OBD

[1] **Lísa, M., Řehulková, H., Hančová, E., Řehulka, P.** Lipidomic analysis using hydrophilic interaction liquid chromatography microgradient fractionation of total lipid extracts. *Journal of Chromatography A*. Elsevier, 2021. 7s.

ISSN: 0021-9673. Kód UT ISI: 000685249900001.

Granty: GA20-12289S.

Spec. výzkum: SV2106-2021.

Forma: J_ČLÁNEK V ODBORNÉM PERIODIKU

(ID: 43877947) (RIV ID: 50018337)

[2] **Andrýs, R., Klusoňová, A., Lísa, M., Kassa, J., Karasova, Žďárová, J.** Effect of Oxime Encapsulation on Acetylcholinesterase Reactivation: Pharmacokinetic Study of the Asoxime-Cucurbit[7]uril Complex in Mice Using Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. *Molecular Pharmaceutics*. Washington: Amer Chemical Soc., 2021. 12s.

ISSN: 1543-8384. Kód UT ISI: 000661309800026.

Granty: GA18-08937S.

Spec. výzkum: SV2106-2021.

Forma: J_ČLÁNEK V ODBORNÉM PERIODIKU

(ID: 43877835) (RIV ID: 50018225)

[3] **Lísa, M., Jiránková, T.** Highly repeatable and selective ultrahigh-performance supercritical fluid chromatography – Mass spectrometry interclass separation in lipidomic studies. *Microchemical Journal*. 2022, vol.178, 107376.

ISSN: 0026-265X. Kód UT ISI: 000793743900003.

Granty: GA20-12289S, VT2019-2021.

Spec. výzkum: SV2106-2021.

Forma: J_ČLÁNEK V ODBORNÉM PERIODIKU

(ID: 43878834)