

## METABOLOMIKA – ZÁKLADNÍ POJMY, STRATEGIE A METODOLOGIE

JINDRA MUSILOVÁ a ZDENĚK GLATZ

Ústav biochemie, Přírodovědecká fakulta a Středoevropský technologický institut, Masarykova univerzita, Kotlářská 2, 611 37 Brno  
 jmusilova@mail.muni.cz

Došlo 19.1.11, přijato 3.3.11.

Klíčová slova: metabolomika, metabolom, metabolismus, nukleární magnetická rezonance, hmotnostní spektrometrie, plynová chromatografie, kapalinová chromatografie, kapilární elektroforéza

### Obsah

1. Úvod
2. Strategie metabolomického výzkumu
3. Příprava vzorku
4. Analytické metody používané pro studium metabolomu
  - 4.1. Nukleární magnetická rezonance
  - 4.2. Hmotnostní spektrometrie
  - 4.3. Plynová chromatografie a její kombinace s hmotnostní spektrometrií
  - 4.4. Kapalinová chromatografie a její kombinace s hmotnostní spektrometrií
  - 4.5. Kapilární elektroforéza a její kombinace s hmotnostní spektrometrií
5. Praktické aplikace metabolomiky
6. Role metabolomiky v systémové biologii
7. Závěr

### 1. Úvod

Všechny buňky získávají energii, stavební i zásobní látky vzájemnou přeměnou chemických sloučenin. Těchto pro buňku nepostradatelných reakcí, které jsou organizované do sérií přeměn a nazývají se metabolické dráhy, se mohou účastnit rozdílné počty sloučenin. Souhrn těchto reakcí je označován jako metabolismus a sloučeniny do metabolismu zařazené se nazývají metabolity, jejichž komplexní sada je pak označována jako metabolom. Ten lze ještě přesněji definovat jako soubor všech intra- i extracelulárních nízkomolekulárních látek ( $MW < 1000$ ) v živém systému<sup>1</sup>, které se účastní metabolických reakcí, a které jsou nezbytné pro růst a normální funkci buňky<sup>2</sup>. Podobně jako u transkriptomu nebo proteomu, i metabolom může být definován na všech hladinách biologického systému – na úrovni organismu, tkáně i jediné buňky<sup>3</sup>. Velikost metabolomu se přitom mění v závislosti na studo-

vaném organismu. U mikroorganismů všeobecně platí, že obsahují méně metabolitů než genů<sup>4</sup>, např. bakterie *Escherichia coli* K12 obsahuje 4392 genů, ale produkuje pouze 794 metabolických sloučenin<sup>2</sup>. Oproti tomu, rostlinná říše je schopna produkovat mnohem více metabolitů než genů<sup>4</sup>, avšak velkou část z nich tvoří sekundární metabolity, které jsou specificky přítomny v relativně málo rostlinných druzích.

Dřívější vědecké studie se na analýzu metabolitů zaměřovaly pouze v limitovaném rozsahu, neexistoval tedy koncept stanovení všech intra- nebo extra-celulárních metabolitů současně<sup>5</sup>. Teprve v roce 1998 se poprvé o analýze metabolomu v kontextu s genomikou zmínil Oliver a spol.<sup>1</sup>, v tomtéž roce Tweeddale a spol. diskutoval o tomto termínu v souvislosti se studiem fenotypu bakterie *E. coli*<sup>6</sup>. Jako první pak detailněji definoval metabolomiku a její dílčí oblasti<sup>3</sup> v roce 2002 Fiehn. Ve srovnání s genomikou, transkriptomikou či proteomikou je tedy metabolomika poměrně „mladý“ obor.

Metabolomika, t.j. komplexní analýza metabolomu za konkrétního fyziologického nebo vývojového stádia organismu, tkáně či buňky, je důležitá zejména z důvodu porozumění buněčných funkcí, jelikož na rozdíl od jiných tzv. „omik“ více odráží aktuální stav buňky, který je vysoce dynamický<sup>7</sup>. Hladina metabolitů, čili metabolický „pool“, přitom není odpověď pouze genové exprese, ale i environmentálního a vývojového stimulu nebo důsledek genetické mutace. Metabolity a jejich koncentrace tedy musí být monitorovány jak prostorově, tak i časově. Nelze porozumět dynamickému chování metabolismu bez znalosti typů a množství jednotlivých sloučenin, které se vyskytují v žijících organismech či buňkách za různých podmínek<sup>7</sup>. Protože jednotlivé „omiky“ nepostačují na pochopení buněčné fyziologie a regulačních mechanismů, stále častěji se využívá jejich kombinovaná analýza, která je podstatou velmi rychle se rozvíjející vědní disciplíny – systémové biologie.

### 2. Strategie metabolomického výzkumu

Zatímco při analýze genomu, transkriptomu i proteomu je studium orientováno na chemicky vysoce podobné sloučeniny, biopolymery složené ze 4 různých nukleotidů v případě genomu a transkriptomu, nebo z 21 kódovaných aminokyselin v případě proteomu<sup>8</sup>, pokud se samozřejmě pominou jejich posttranslační modifikace, u metabolomu je situace mnohem složitější. V celém sortimentu metabolitů lze očekávat extrémní variabilitu chemických struktur a tím i fyzikálně-chemických vlastností. Některé metabolity jsou zapojeny do velkého počtu metabolických drah, zatímco jiné pouze do několika málo. Některé mohou v závislosti na změně životního prostředí kolísat ve velmi

nízkých koncentračních rozmezích, zatímco u jiných se tyto hladiny mění výrazně. Některé metabolity jsou v buňce zastoupeny v relativně velkém množství a jiné pouze ve stopovém. Např. glukosa je ve většině buněk přítomna v milimolárních koncentracích, zatímco některé signální molekuly jsou v jedné buňce zastoupeny pouze v desítkách molekul<sup>9</sup>. Další významnou charakteristikou metabolitů je, že mají omezený poločas života, z čehož vyplývá, že musí být buňkou nepřetržitě přijímány, přeměňovány, degradovány a vylučovány. Tato komplexnost samozřejmě znemožňuje analýzu celého metabolomu současně, proto byly pro analýzu a interpretaci hladin metabolitů v biologických vzorcích vyvinuty různé strategické přístupy (obr. 1). Jsou to:

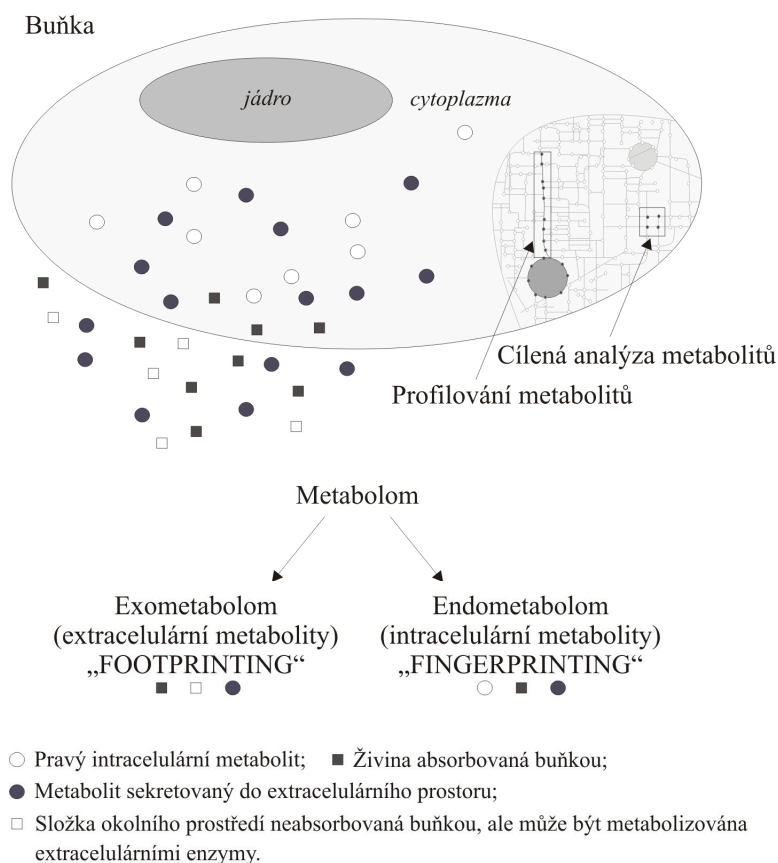
„Metabolic fingerprinting“ a „metabolic footprinting“ je rychlá a kompletní analýza vzorku bez nutné identifikace a kvantifikace jednotlivých metabolitů. V případě „fingerprintingu“ – otisku prstu je výsledkem analýzy informace o intracelulárních metabolitech – endometabolomu, a v případě „footprintingu“ – otisku nohy informace o extracelulárních metabolitech – exometabolomu. Analýza metabolitů v růstovém médiu může mít oproti analýze intracelulárních metabolitů některé výhody, odpadá např. požadavek na zhášení metabolismu a uvolnění metabolitů

z buňky, což je časově nejnáročnější krok celého extrakčního procesu.

„Metabolite profiling“ – profilování metabolitů oproti tomu zahrnuje identifikaci a částečnou kvantifikaci vybraného počtu metabolitů náležících do třídy chemicky podobných sloučenin (např. polární lipidy, isoprenoidy nebo sacharidy) nebo společně zapojených do specifické metabolické dráhy<sup>3,7,10,11</sup>.

„Metabolite target analysis“ – cílená analýza metabolitů je kvalitativní i kvantitativní analýza vzorku ještě více zaměřená na několik málo konkrétních metabolitů. Velká část dalších metabolických informací je tudíž obvykle ignorována. Příprava vzorku je z uvedených přístupů nejsložitější z důvodu nutné separace vybraných metabolitů od ostatních<sup>12</sup>.

„Metabonomics“ – metabonomika je způsobem analýzy vzorku velmi podobná „fingerprintingu“ metabolitů, avšak hlavním cílem analýzy je sledování metabolické odpovědi na podávání léčiv nebo přítomnosti toxických látek ve tkáních a tělních tekutinách (např. studie v oblasti toxikologie či farmakologie).



Obr. 1. Přehled metabolomických přístupů

### 3. Příprava vzorku

I když v současné době existují velmi přesné a spolehlivé analytické metody, kritickým bodem při analýze metabolomu často zůstává příprava vzorku, jenž je všeobecně považována za limitující krok komplexnosti stanovení a za zdroj nesprávných výsledků. Celý postup přípravy vzorku je často velmi složitý, obecně ho lze rozdělit do tří základních kroků<sup>9</sup>:

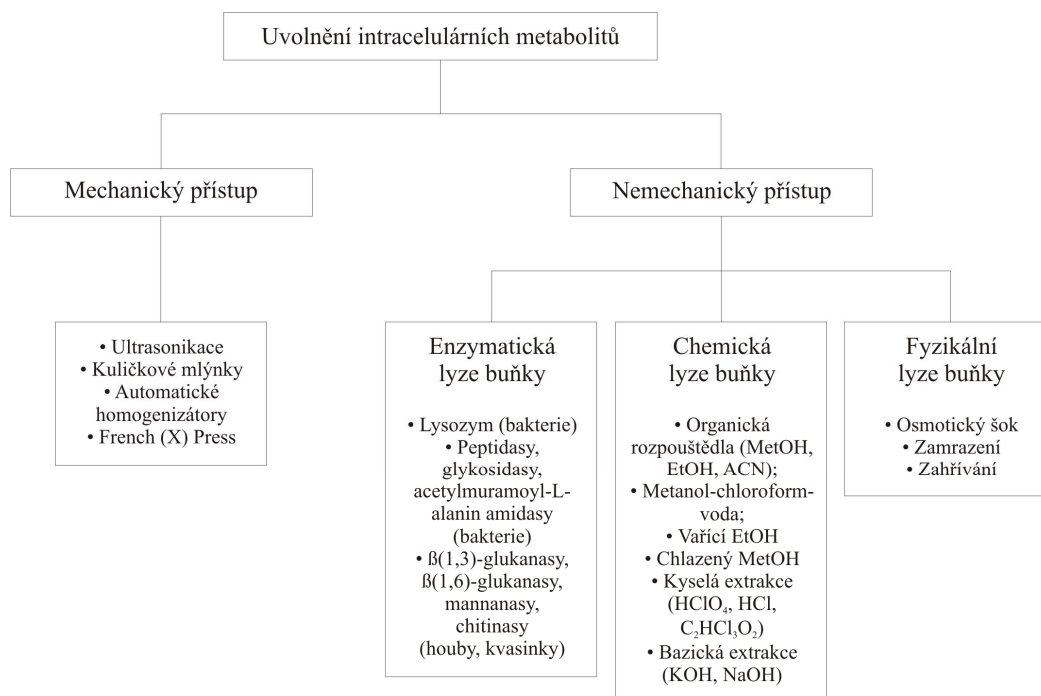
Zhášení metabolismu buněk – inaktivace veškerých biochemických procesů. Tento krok musí být dostatečně rychlý, aby nedocházelo k ovlivnění hladin metabolitů způsobené změnou okolního prostředí, ideálně se uvádí časové rozmezí jedné sekundy<sup>9</sup>. Analogicky lze tento proces přirovnat k pořizování fotografie, kde získanou momentkou je *in vivo* metabolomický stav organismu nebo buňky ve specifickém vývojovém stádiu a životním prostředí. Rychlost procesu je skutečně rozhodující, jelikož i velmi malé změny hladin metabolitů mohou poukazovat na významné změny v metabolismu<sup>9</sup>.

Rychlé inaktivace metabolismu lze obvykle dosáhnout náhlými změnami teplot (< -40 °C, >80 °C) nebo pH (v rozmezí 0–2, nebo 10–12). Avšak platí, že různé biologické vzorky vyžadují odlišné techniky k dosažení úplného zhášení metabolismu. U mikrobiálních a tkáňových kultur se např. nejčastěji používají vodné roztoky organických rozpouštědel, obvykle methanol, ethanol a acetonitril, velmi nízké nebo vysoké teploty, anebo kyselé roztoky, typicky HClO<sub>4</sub>. U rostlinných a živočišných tkání se metabolismus buněk nejčastěji inaktivuje rychlým zamrazením

vzorku kapalným dusíkem, roztoky HClO<sub>4</sub>, nebo vychlazeným methanolem<sup>9</sup>. Většina těchto postupů současně narušuje buněčnou stěnu, a proto je tento krok často vnímán již jako součást následujícího kroku – extrakce metabolitů.

Extrakce metabolitů – zpřístupnění intracelulárních metabolitů analytickým metodám za účelem jejich stanovení. Cílem extrakčních procedur je narušit strukturu buňky tak, aby došlo k uvolnění všech, nebo maximálního množství metabolitů v nezměněném stavu. Výběr extrakčního postupu je volen podle typu buněčných struktur a podle typu extrahovaných metabolitů. Snahou je dosáhnout minimálních ztrát bez chemické degradace nebo biochemické konverze<sup>9</sup>.

Intracelulární metabolity lze získat dvěma různými přístupy (obr. 2). Mechanický přístup využívá metod jako je ultrasonikace, anebo prostého narušení integrity buněk ručním rozemletím, kuličkovými mlýnkami, automatickými homogenizátory nebo pomocí tzv. French (X) Pressu<sup>9</sup>, kdy je zmražená buněčná suspenze protlačována malým otvorem. Nejčastěji používané techniky extrakce však zahrnují nemechanický přístup, který lze podle použitého postupu rozdělit na chemickou, fyzikální a enzymovou lyzi buňky. Enzymová a fyzikální lyze se běžně samostatně v metabolické analýze nepoužívají, ale často jsou kombinovány s chemickou lyzí za účelem zvýšení extrakční účinnosti vybraného postupu. Při enzymové lyzi buněk se využívají lytické enzymy, které k degradaci struktur buněčné stěny často vyžadují užití vodného média a mírných teplotních a pH podmínek, což je předpokladem nízké



Obr. 2. Možnosti zpřístupnění intracelulárních metabolitů analytickým technologiím

degradace získaných metabolitů. U fyzikálního postupu se používá osmotického nebo teplotního šoku. Mnohem častěji se však využívá chemického postupu, při kterém dochází k lyzi buňky a extrakci metabolitů užitím chemických činidel. Velmi často jsou k extrakci intracelulárních metabolitů využívána buď samotná, nebo vodou ředěná organická rozpouštědla, jako např. methanol, ethanol a acetonitril pro extrakci polárních metabolitů a chloroform, ethylacetát nebo hexan pro extrakci lipofilních sloučenin. Extrakce organickými rozpouštědly jsou velmi jednoduché, zejména z důvodu snadného odpaření rozpouštědla ze vzorku. Zahřívání ethanolu zvyšuje jeho extrakční účinnost a protein-denaturační sílu, avšak snižuje stabilitu získaných metabolitů. Naopak chlazený methanol a nízké teplotní podmínky během celé extrakce ( $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) zabraňují dalším biochemickým reakcím a degradacím termolabilních sloučenin. Kombinace rozpouštědel methanol-chloroform-voda má výhodu extrakce dvou velkých skupin metabolitů současně (nepolární i polární) a navíc selektivně do dvou fází (chloroform a methanol/voda) za velmi mírných podmínek. Využívá se zejména pro extrakci amino- a neaminokarboxylových kyselin, fosforečných esterů sacharidů, cukerných alkoholů a také nukleotidů, ale s nižší extrakční účinností<sup>9</sup>. Velmi šetrnou extrakční metodou je pak superkritická fluidní extrakce (SFE). Další možností chemické lyze je kyselá extrakce, která se nejčastěji provádí pomocí  $\text{HClO}_4$ , trichloroctové kyseliny, nebo  $\text{HCl}$ , a bazická extrakce pak pomocí  $\text{KOH}$  nebo  $\text{NaOH}$ . Zbytky buněk musí být následně z média odstraněny a pH neutralizováno. Tento typ extrakce patří mezi nejrychlejší nemechanické metody, ale díky extrémnímu pH není k získaným metabolitům příliš šetrný.

Zakonzentrování metabolitů – obohacení vzorku o vybrané metabolity. Většina extrakčních procedur způsobuje ředění metabolitů, čímž se tak jejich koncentrace mohou dostávat pod meze stanovitelnosti. Odpaření rozpouštědla se provádí nejčastěji za snížené teploty, aby nedocházelo k termální degradaci metabolitů, např. pomocí lyofilizace. Oblíbeným řešením tohoto problému je také zakonzentrování extraktu na pevné fázi – solid-phase extrakce (SPE), která využívá pevnou a kapalnou fázi k izolaci jednoho nebo jediného typu analytu, ať už s cílem tento analyt stanovit, nebo ho ze vzorku odstranit. SPE přitom využívá obdobných stacionárních fází, jako se používá u kapalinové chromatografie.

Výsledné extrakty mohou obsahovat soli, proteiny, lipidy, nebo dokonce některé metabolity zastoupené v příliš vysoké koncentraci. Tyto složky ve vzorku často zhoršují kvantifikaci požadovaných metabolitů.

#### 4. Analytické metody používané pro studium metabolomu

Metabolity jsou chemické entity, které mohou být analyzovány standardními nástroji chemické analýzy<sup>7</sup>. Současným trendem přitom je v jediné analýze stanovit co nejvíce metabolitů za užití vysoce standardizovaných

a efektivních metod, přechod z kvalitativního ke kvantitativnímu stanovení, organizace naměřených dat do knihoven a databází, využití bioinformatických postupů pro analýzu těchto dat, a nakonec integrace dat s výsledky získanými pomocí jiných „omických“ disciplín.

Jak již bylo zmíněno, problémem při kvantifikaci velkého počtu metabolitů je jejich fyzikálně-chemická variabilita a široké koncentrační rozmezí, přítomnost dalších sloučenin v buňce jako jsou DNA, mRNA a proteiny, a fyzické bariéry uvnitř buňky. Pro získání relevantních dat je pro metabolomickou analýzu důležitá zejména reprodukovatelnost jak použité analytické metody, tak i přípravy vzorku. Velké nároky jsou kladeny i na vysokou citlivost, jelikož hladiny zejména intracelulárních metabolitů jsou v relativně nízkých koncentračních rozmezích.

Obecně platí, že výběr metody pro analýzu metabolomu závisí na charakteru analyzovaného vzorku a komplexnosti analyzovaných metabolitů. Pokud je cílem analyzovat co nejvíce metabolitů bez nutnosti identifikace a kvantifikace všech detegovaných metabolitů tj. strategie „fingerprintingu“ či „footprintingu“, je nezbytné užití metody, které mají širší pokrytí, pokud jde o typ a koncentrační rozsah metabolitů<sup>7</sup>. Studie prováděné v posledních letech ukazují, že vedoucí roli v této oblasti má nukleární magnetická rezonance (NMR) a hmotnostní spektrometrie (MS) s přímou infuzí vzorku do iontového zdroje. Dále se pak využívá metod jako infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací (FTIR) nebo Ramanova spektrometrie. I přes značný význam analýz tohoto typu, důsledná identifikace a kvantifikace metabolitů ve vzorku nepochybně vede k lepší charakterizaci metabolomu a tím rozšiřuje znalosti o daném biologickém systému. Analytické metody pro takové přístupy studia metabolomu mnohem lépe monitorují specifické metabolity pomocí selektivních analýz<sup>7</sup>. Toho lze dosáhnout použitím běžných separačních metod, jako je plynová chromatografie (GC), vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) a kapilární elektroforéza (CE), kombinovaných s vhodným detekčním systémem především s MS. Kombinace těchto metod s MS navíc rozšiřuje schopnosti chemické analýzy vysoce komplexních biologických vzorků, neboť MS zde vlastně představuje další separační metodu. V tabulce I jsou srovnány výhody a nevýhody běžně používaných analytických metod při analýze metabolomu.

##### 4.1. Nukleární magnetická rezonance

NMR je spektroskopická metoda vyznačující se podstatnými výhodami oproti jiným v metabolomických studiích hojně využívaným metodám, jako jsou GC/MS nebo LC/MS. Je užitečná zejména pro charakterizaci struktur neznámých sloučenin typicky přímo z tělních tekutin, anebo hrubých buněčných a tkáňových extraktů, s minimální nebo téměř žádnou předúpravou vzorku. Navíc je nedestruktivní, snadno schopná kvantifikace a nevyžaduje chemickou derivatizaci. Značnou nevýhodou NMR je však její relativně nízká citlivost. Z tohoto důvodu jsou tyto studie velmi často doplněny přístupy s metodami na záklá-

Tabulka I  
Srovnání analytických technik využívaných při studiu metabolomu<sup>8</sup>

Technika	Výhody	Nevýhody
NMR	<ul style="list-style-type: none"> <li>• nedestruktivní technika</li> <li>• minimální příprava vzorku před analýzou</li> <li>• snadná identifikace neznámých sloučenin</li> <li>• možnost měření <i>in vivo</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• nízká citlivost</li> <li>• vyšší požadavky na objem vzorku</li> </ul>
MS	<ul style="list-style-type: none"> <li>• rychlý „screening“ metabolitů</li> <li>• vysoká citlivost</li> <li>• minimální příprava vzorku pro profilování metabolitů</li> <li>• doporučeno pro identifikaci neznámých sloučenin (MS-MS)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• identifikace metabolitů všeobecně vyžaduje MS-MS</li> <li>• efekty spojené s matricí</li> <li>• nekompatibilní s vysokou iontovou silou, (např. při některých extrakcích metabolitů)</li> </ul>
GC-MS	<ul style="list-style-type: none"> <li>• vysoká separační účinnost</li> <li>• ideální pro analýzu složitých směsí</li> <li>• umožňuje souběžnou analýzu různých tříd metabolitů</li> <li>• snadné rozhraní mezi GC a MS</li> <li>• reprodukovatelnost</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• neschopnost analyzovat termolabilní metabolity</li> <li>• vyžaduje derivatizaci netěkavých metabolitů</li> <li>• nesnadná identifikace neznámých sloučenin po derivatizaci</li> </ul>
LC-MS	<ul style="list-style-type: none"> <li>• vysoká citlivost</li> <li>• umožňuje analýzu termolabilních metabolitů</li> <li>• průměrné chromatografické rozlišení</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• efekty spojené s matricí vzorku</li> <li>• případné odsolování</li> <li>• omezené informace o struktuře</li> </ul>
CE-MS	<ul style="list-style-type: none"> <li>• minimální spotřeba vzorku i základního elektrolytu</li> <li>• vysoké rozlišení</li> <li>• užitečná pro analýzu složitých směsí</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• obtížné rozhraní CE s MS, nekompatibilita základních elektrolytů</li> <li>• složitá metodologie a kvantifikace</li> <li>• nízká citlivost</li> </ul>

dě MS (cit.<sup>13</sup>).

Nejčastější metabolomické využití NMR je při „fingerprintingu“ metabolitů<sup>14</sup> s významným cílem detekce biomarkerů. Většina studií v těchto případech pak užívá <sup>1</sup>H NMR jako sice nejméně selektivní metodu, avšak poskytující nejvyšší možnou citlivost<sup>15</sup>.

#### 4.2. Hmotnostní spektrometrie

MS je vysoce citlivá a efektivní metoda schopná potvrdit identitu sloučenin v komplexních biologických směsích a ve většině případů i identifikovat sloučeniny neznámé a neočekávané<sup>8</sup>. Z tohoto důvodu je její časté užití při detekci a identifikaci potencionálních biomarkerů. MS může sloužit buď jako samostatný analytický nástroj, nebo také jako univerzální detektor pro chromatografii či kapilární elektroforézu. Toto spojení může navíc řešit nevyho-

du samotné MS, tj. neschopnost přímo rozlišit enantiomery. Velkou budoucnost na poli metabolomiky má iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací (FT-ICR-MS), což je ultracitlivá hmotnostně spektrometrická metoda poskytující spektra s nejvyšším rozlišením a přesností<sup>16</sup>. Dovoluje tak identifikaci tisícovek metabolitů bez chromatografické či elektroforetické separace<sup>17</sup>.

#### 4.3. Plynová chromatografie a její kombinace s hmotnostní spektrometrií

GC/MS je v současnosti běžnou analytickou metodou, která kombinuje vysokou separační účinnost kapilární GC s vysoce citlivou detekcí. V počátcích vývoje metabolomiky patřila GC/MS mezi základní metabolomické metody<sup>18</sup>, pro analýzu těkavých, termostabilních a nízkomolekulárních sloučenin si zachovává primární postavení

i nadále. Avšak velké množství metabolitů těchto vlastností nedosahuje, a proto je nutné je chemicky modifikovat – derivatizovat. Časově náročná derivatizace vzorku a dlouhé chromatografické časy analýz jsou pak příčinou omezeného počtu analýz během dne. Standardem pro reprodukovatelnou identifikaci metabolitů je kombinace GC kolony, nebo ještě lépe dvou kolon lišících se stacionární fází, a MS nejčastěji s ionizační nárazem elektronů (EI) nebo chemickou ionizací (CI) a kvadrupólovým analyzátozem nebo analyzátozem doby letu (TOF)<sup>18</sup>. GC/MS má významné postavení i u kvantifikačních studií a to zejména z důvodu její selektivity a dostatečného lineárního rozsahu pro široké dynamické koncentrační rozmezí metabolitů. Představuje optimální metodu pro provedení metabolického profilování u rostlin, mikroorganismů, ale i u savců včetně člověka, např. se využívá ke „screeningu“ organických kyselin v moči pro diagnózu organické acidurie<sup>5,10,19</sup>. Nedávné inovace GC-TOF a GC x GC/MS slibují další zvýšení výkonu této metody. GC/MS tedy je a zůstane pro dohlednou budoucnost klíčovou metodou pro metabolické profilování<sup>20</sup>.

#### 4.4. Kapalinová chromatografie a její kombinace s hmotnostní spektrometrií

Nedostatky LC byly v počátcích dány zejména velmi nízkým rozlišením, a proto analýza komplexních směsí byla ve srovnání s GC nebo CE velice problematická. Spojení LC s MS a neustálé vylepšování stacionárních fází rozšířilo její analytické možnosti, zejména pak v profilování metabolitů. LC/MS nejprve separuje metabolity pomocí LC, následně jsou metabolity ionizovány elektrosprejem (ESI), nebo např. chemickou ionizací za atmosferického tlaku (APCI)<sup>10</sup>, a nakonec analyzovány iontovou pastí (IT), kvadrupólovým a především TOF typem analyzátoru hmotnostního spektrometru. Od GC/MS se liší výrazným způsobem. LC/MS nevyžaduje těkavost analytů, a proto lze užít nižších teplot během analýz. To je hlavní důvod, proč může být LC/MS využita na širokou řadu molekul včetně sekundárních metabolitů. Derivatizace vzorku tedy není všeobecně nutná, ačkoliv může být prospěšná pro zlepšení chromatografického rozlišení a především pak citlivosti, anebo může usnadnit ionizaci některých funkčních skupin metabolitů, které by byly jinak pomocí ESI-MS nedetegovatelné. LC/MS je navíc vysoce výkonná, s rozumným dynamickým rozsahem, není specifická ke konkrétním třídám sloučenin a může být extrémně citlivá. Současný výzkum je zejména zaměřen na aplikaci kapilárních kolon, ty slibují lepší rozlišení, citlivost a možnost plně kvantifikace, přináší však vyšší nároky na čas analýz a instrumentaci<sup>10</sup>.

Využití LC/MS v metabolomice je zaměřeno zejména na diagnostiku v oblasti medicíny, ideální je pro metabolické profilování některých tělních tekutin<sup>21</sup> s dobrým potenciálem identifikovat biomarkery<sup>10</sup>. Ve farmaceutickém průmyslu je LC/MS hojně využívána pro analýzu rostlinných extraktů<sup>21</sup>, velký význam má i v metabolickém profilování mikroorganismů<sup>22</sup>.

#### 4.5. Kapilární elektroforéza a její kombinace s hmotnostní spektrometrií

Kapilární elektroforéza (CE) se vyznačuje vysokou účinností, kratšími časy analýz a nižší provozní cenou spojenou s velmi malou spotřebou vzorku a základních elektrolytů. Nabízí rozmanité aplikační možnosti a tím umožňuje analýzu širokého spektra nabitých i nenabitých metabolitů. Hlavním nedostatkem CE s UV detekcí je však horší koncentrační citlivost způsobená dávkováním velmi malých objemů vzorku do kapiláry a krátkou absorpční dráhou detekčního paprsku, který je roven vnitřnímu průměru kapiláry. Pro řešení tohoto problému lze využít bublinkové nebo Z-kapiláry, které jsou v místě detekce rozšířeny, anebo citlivější detektory jako fluorescenční a elektrochemické, které je však možné aplikovat na méně typů analytů a to i po jejich modifikaci pomocí chemické derivatizace. Ekonomicky výhodnou a technicky nenáročnou cestou ke zvýšení detekční citlivosti CE analýz s UV detekcí přináší on-line prekoncentrační techniky. CE/MS pak navíc přináší vysokou citlivost a selektivitu. Největší výhodou CE v kombinaci s MS oproti jiným separačním metodám je extrémně vysoké rozlišení a možnost nadávkovat téměř každou nederivatizovanou nabitou sloučeninu z CE do MS<sup>23</sup>. Spojení však vyžaduje specifické rozhraní, které obvykle zahrnuje „obalovou kapalinu“ (sheath liquid), což přináší zředění analytů. Nejčastěji používanou ionizační technikou pak bývá ESI, přičemž jsou využívány téměř všechny hmotnostní analyzátozem – kvadrupol, IT či TOF. Základní elektrolyt pro CE analýzu a složení „obalové kapaliny“ však musí být zvoleny tak, aby byly kompatibilní s MS<sup>8</sup>.

Je zřejmé, že CE/MS má velký potenciál v metabolických studiích, zejména pak v profilování biologických systémů. Tyto studie jsou pak zaměřeny zejména na analýzu organických kyselin, aminokyselin, sacharidů a jejich derivátů, a nukleotidů<sup>24</sup>. V oblasti farmakologie se pak CE/MS využívá pro analýzu rostlinných sekundárních metabolitů<sup>25</sup>, velké množství aplikací je v současnosti zaměřeno i na bakteriální metabolomiku.

### 5. Praktické aplikace metabolomiky

V oblasti medicíny se metabolomika využívá zejména ke stanovení metabolických biomarkerů jako indikátorů různých chorob či odpovědí zprostředkované léčivem, dále při ohodnocení lidského zdraví pomocí srovnání metabolických profilů jednotlivých pacientů s profily pacientů s různými nemocemi uloženými v databázi. Tento postup srovnání pak umožňuje identifikovat pacientovu nemoc<sup>5</sup>. Nezastupitelný význam má metabolomika i ve farmakologii při vývoji nových léčiv.

Metabolomická informace je užitečná také v širokém spektru biotechnologických aplikací např. k charakterizaci bakterií, zlepšení procesů fermentace a tím i zvýšení výnosu cíleně šlechtěných mikroorganismů, stanovení efektů biochemických nebo environmentálních vlivů na rostliny

nebo mikroorganismy, ohodnocení bezpečnosti přijímané potraviny atd.<sup>10,15</sup>

## 6. Role metabolomiky v systémové biologii

Metabolomika má rovněž spolu s ostatními „omickými“ disciplínami nezastupitelné místo v systémové biologii. Systémová biologie, jak již bylo zmíněno, je novou disciplínou, jejíž vznik je datován na začátek 21. století. Snaží se pochopit vztah mezi genotypem a fenotypem na celobuněčné úrovni a kombinací matematického modelování a experimentální biologie předpovědět buněčné chování, které není zřejmé ze sledování samotných komponent<sup>18</sup>. Využití metabolomiky v systémové biologii je zejména orientováno na kvantifikaci metabolitů v čase, na tzv. metabolickou dynamiku, přičemž je na buňku nahlíženo jako na komplexní síť interakcí a vzájemných přeměn jejich molekulárních účastníků – DNA, mRNA, proteinů a metabolitů v daném životním prostředí<sup>17,18</sup>.

## 7. Závěr

V současné době lze sledovat neustále narůstající zájem o metabolomické analýzy napříč mnoha jinými disciplínami, včetně systémové biologie, funkční genomiky nebo např. farmakogenomiky. Hlavní význam metabolomiky tkví ve skutečnosti, že sleduje produkty funkce buňky a tím objasňuje děje na subcelulární úrovni. Ke kompletnímu popsaní metabolomu však stále vede dlouhá cesta, jelikož každá analytická metoda, ať už použitá samostatně, nebo v kombinaci s jinou, má své výhody i limity.

*Práce vznikla za finanční podpory grantu GA ČR P206/11/0009, výzkumného záměru č. MSM0021622413 a Výzkumného centra LC0602 obojí MŠMT.*

## LITERATURA

- Oliver S. G., Winson M. K., Kell D. B., Baganz R.: *Trends Biotechnol.* 16, 373 (1998).
- Harrigan G. G., Goodacre R. (ed.): *Metabolic Profiling: Its Role in Biomarker Discovery and Gene Function Analysis*. Kluwer Academic Publishers, Norwell 2004.
- Fiehn O.: *Plant Mol. Biol.* 48, 155 (2002).
- Schwab W.: *Phytochemistry* 62, 837 (2003).
- Tomita M., Nishioka T. (ed.): *Metabolomics: The Frontier of Systems Biology*. Springer-Verlag, Tokyo 2005.
- Tweeddale H., Notley-McRobb L., Ferenci T.: *J. Bacteriol.* 180, 5109 (1998).
- Goodacre R., Vaidyanathan S., Dunn W. B., Harrigan G. G., Kell D. B.: *Trends Biotechnol.* 22, 245 (2004).
- Villas-Bôas S. G., Mas S., Åkesson M., Smedsgaard J., Nielsen J.: *Mass Spectrom. Rev.* 24, 613 (2005).
- Villas-Bôas S. G., Roessner U., Hansen M. A. E., Smedsgaard J., Nielsen J. (ed.): *Metabolome analysis: An introduction*. J. Wiley, New Jersey 2007.
- Dunn W. B., Ellis D. I.: *Trends Anal. Chem.* 24, 285 (2005).
- Fiehn O.: *Comp. Funct. Genom* 2, 155 (2001).
- Terabe S., Markuszewski M. J., Inoue N., Otsuka K., Nishioka T.: *Pure Appl. Chem.* 73, 1563 (2001).
- Jankevics A., Liepinsh E., Liepinsh E., Vilskersts R., Grinberga S., Pugovics O., Dambrova M.: *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 97, 11 (2009).
- Defernez M., Colquhoun I. J.: *Phytochemistry* 62, 1009 (2003).
- Moco S., Bino R. J., De Vos R. C. H., Vervoort J.: *Trends Anal. Chem.* 26, 855 (2007).
- Boháč M., Ingendoh A., Fuchser J., Witt M.: *Chem. Listy* 99, 943 (2005).
- Kell D. B.: *Curr. Opin. Microbiol.* 7, 296 (2004).
- Nielsen J., Jewett M. C. (ed.): *Metabolomics: A Powerful Tool in Systems Biology*. Springer-Verlag, Berlin 2007.
- Fu X., Kimura M., Iga M., Yamaguchi S.: *J. Chromatogr., B* 758, 87 (2001).
- Vaidyanathan S., Harrigan G. G., Goodacre R. (ed.): *Metabolome Analyses: Strategies for Systems Biology*. Springer Science+Business Media, Inc., New York 2005.
- Jensen A. G., Ndjoko K., Wolfender J.-L., Hottelmann K., Camponovo F., Soldati F.: *Phytochem. Anal.* 13, 31 (2002).
- Ishii N., Soga T., Nishioka T., Tomita M.: *Metabolomics* 1, 29 (2005).
- Soga T., Ueno Y., Naraoka H., Ohashi Y., Tomita M., Nishioka T.: *Anal. Chem.* 74, 2233 (2002).
- Unger M., Stöckigt D., Belder D., Stöckigt J.: *J. Chromatogr., A* 767, 263 (1997).
- Soga T., Ohashi Y., Ueno Y., Naraoka H., Tomita M., Nishioka T.: *J. Proteome Res.* 2, 488 (2003).

**J. Musilová and Z. Glatz** (*Department of Biochemistry, Faculty of Science and Central European Technology Institute, Masaryk University, Brno*): **Metabolomics – Basic Concepts, Strategies and Methodologies**

This review defines metabolomics and clarifies its history and significance. Various strategies of metabolomics research are described together with their main application fields. The review focuses on the methods of sample preparation and on the analytical methodologies that are most frequently used in metabolomic studies – NMR, MS, GC/MS, HPLC/MS and CE/MS. Practical importance of metabolomics and its role in system biology are mentioned as well.