

ХИМИКОТЕХНОЛОГИЧЕН И МЕТАЛУРГИЧЕН УНИВЕРСИТЕТ

Факултет по химично и системно инженерство

Катедра „Биотехнология“

Инж. Климент Иванов Занов

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

на дисертация

**“Разработване на методология за изследване
на метаболитните промени в черния дроб
на хипотиреоидни организми”**

**за придобиване на образователната и научна степен „доктор”
по научна специалност**

**5.11. Биотехнологии (Биоорганична химия, химия на природните
и физиологично активните вещества)**

Научни ръководители: Проф. д-р инж. Любов Йотова
Проф. д-р Мария Клапа

Научно жури:

- 1. Проф. д-р инж. Любов Йотова**
- 2. Доц. д-р Данчо Даналев**
- 3. Доц. д-р Иванка Стойнева**
- 4. Проф. д-р Диана Петкова**
- 5. Доц. Д-р Недка Трифонова**

София, 2012

Дисертационния труд е изложен на 106 страници, включва 27 фигури и 10 таблици. Цитирани са 171 литературни източника. Резултатите са отразени в 2 научни публикации и са докладвани на 5 научни форума.

Представеният дисертационен труд е обсъден и приет за защита на заседание на разширен научен съвет на катедра „Биотехнология” при Химикотехнологичен и металургичен университет - София, състояло се на 24.07.2012 г.

Публичната защита на дисертационния труд ще се проведе на 15.11.2012 г. от 15 часа в зала 431 сграда А на Химикотехнологичния и металургичен университет-София.

Материалите са на разположение на интересующите се на интернет страницата на ХТМУ и в отдел „Научни дейности”, стая 406, етаж 4, сграда ”А” на ХТМУ.

Използвани съкращения

APCI	химическа йонизация при атмосферно налягане
APPI	фото йонизация при атмосферно налягане
AGC	Автоматично импулсно задържане на йони
ESI	Йонизация тип електроспрей
FDR	Вероятност за грешни отчитания
HCL	Йерархичен клъстерен анализ
LC-MS	течна хроматография с масспектрометрична детекция
Nle	Норлевцин
PCA	Анализ на принципни компоненти
SAM	Анализ на значими микромасиви
SIM	Следене на единичен йон
The	Теофилин
T4	Тироксин (3,3',5,5'-тетрайодотиронин)
T3	3,3',5,-трийодотиронин
rT3	3,5,3',-трийодотиронин
UV	ултравиолетов
%RSD	Относително стандартно отклонение, изразено в проценти

ВЪВЕДЕНИЕ

В развиващото се технологично общество ендокринните разстройства се увеличават с все по-бързи темпове. Докато някои заболявания на ендокринната система като диабет са изследвани отдавна и за тях вече има развити диагностични методики, други като хипотиреоидизма все още предизвикват дискусии по отношение на механизма си на възникване и фенотипната си проява. Учените в сферата на биоаналитичната химия работят върху разработването на методи за точно количествено определяне на хормоните на щитовидната жлеза, а физиолозите и ендокринолозите изучават ефектите на хипотиреоидизма върху бозайници, с цел изясняване на механизма на смущенията, настъпващи в хипотиреоидният организъм.

От началото на 90-те години на 20 век като клон на биоаналитичната химия, започва да се развива така наречената метаболомика. В това интердисциплинарно научно направление приложение намират биохимията, аналитичната химия, физиологията и статистиката. Подобно на геномиката и протеомиката, метаболомиката има за цел бърз мащабен анализ на нискомолекулните метаболити в организмите. Като се има предвид, че наборът от метаболити в даден орган на един организъм (метаболом) е пряко свързан със съответния геном, физиологията му и околната среда, метаболомиката дава възможност да се изследват взаимоотношенията генотип – фенотип и генотип – околна среда. Метаболомиката намира все по-голямо приложение във фармакологичните и предклиничните изпитвания, токсикологията, трансплантацията, неонатологията и клиничната химия.

В метаболитния анализ се използват бързи аналитични техники, осигуряващи широкообхватен анализ на метаболитния състав на даден орган. Подобни техники използват мощни детекторни подходи като масспектрометрия и ядрено-магнитен резонанс. Целта на метаболитния анализ е не само да се установят основните смущения в ендокринната система, но и съответните промени в метаболитния състав на засегнатите тъкани, като по този начин се придобие по-цялостна представа за механизма на възникване и ефекта на дадена болест, свързана с ендокринна, имунна и други системи. Широкообхватният метаболитен анализ осигурява едновременно количествено определяне на вещества от различни химични класове. Най-голямото преимущество на този анализ е, че дава разнородна информация за дадена проба в един и същ момент. При хормонални анализи това означава, че могат да се изследват различни класове хормони, техни метаболити и нискомолекулни съединения, свързани с хормоналната активност посредством един анализ. Резултатите от подобен анализ могат да бъдат възприети като “снимка” на метаболитното състояние на даден организъм. Сравняването на резултатите от изследвания на организми в различни физиологични състояния (контролно и нарушено) допринася за

изясняване на влиянието на хормоните върху метаболитните промени, които настъпват в органите с хормонални смущения. С помощта на статистическа обработка на резултатите се достига до изводи с биологично и клинично значение.

Намалената функция на щитовидната жлеза (хипотиреоидизъм) е хормонално заболяване, пряко свързано с метаболитни промени в различни органи, което влияе върху физиологичното състояние на организма, като засяга отделителната, опорно-двигателната и нервната система. Изучаването на това заболяване продължава и до днес. Освен нови диагностични подходи, се търсят и механизмите, по които се проявяват множеството “странични” нарушения в хипотиреоидния организъм.

Установено е, че в щитовидната жлеза се синтезират нискомолекулни хормони, които се разпространяват с кръвния поток из цялото тяло и навлизат в повечето клетки на бозайниците. Известно е, че метаболитните аномалии, свързани с намалена функция на жлезата, се дължат именно на тези молекули и техни производни метаболити. Непосредствените физиологични реакции от друга страна водят до определени метаболитни изменения в органите на хипотиреоидния организъм.

Метаболомиката, която предлага систематично изследване на широк спектър от метаболити, е едно от научните направления с потенциал за изясняване на механизмите на хипотиреоидизма и изграждане на хипотези, които може да доведат до по-ефективна диагностика и лечение на болестта.

ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ

Целта на настоящата дисертационна работа е да се създаде методика за количествен анализ на хормони на щитовидната жлеза, техни метаболити и други полярни нискомолекулни съединения, участващи в хормоналната регулация и вторичния метаболизъм. За да се постигне основната цел, бяха поставени следните конкретни задачи:

1. Да се разработи методика за екстракция на тъканни проби от бозайници за целите на широкообхватен анализ с течна хроматография с маспектрометрична детекция, целящ извличане на хормони на щитовидната жлеза и други метаболити, свързани с хормоналната регулация.
2. Да се дефинират и оптимизират инструменталните параметри за анализ на хормони на щитовидната жлеза и други нискомолекулни вещества чрез течна хроматография с маспектрометрична детекция.
3. Да се идентифицират максимално количество първични и вторични метаболити и да се изследва възможността за сравнителното им количествено определяне
4. Да се анализира събраната информация и да се дадат насоки за бъдещо развитие в сферата на клинични и научни изследвания на щитовидната жлеза.

ЕКСПЕРИМЕНТАЛНА ЧАСТ

1. Материали

- Хроматографските елуенти: вода, метанол, ацетонитрил бяха закупени от Fisher Scientific, Великобритания.
- Трифлуороцетна киселина, мравчена киселина и амониев хидроксид бяха закупени от Acros Organic, Белгия.
- Стандартни вещества тироксин, трийодотиронин, норлевцин, теофилин, глутамова киселина, глутамин, хистидин, метионин, допамин, аспарагин, аспартова киселина, изолевцин, левцин, аргинин, триптофан, тирозин и фенилаланин бяха закупени от Sigma Aldrich, Германия.
- Хексадеканова киселина, кетоглутарова киселина и аденин бяха закупени от Fluka, Германия. Тестостерон, холестерол, глюкозо-6-фосфат, пироглутамова киселина и N-ацетил глюкозамин бяха закупени от Alfa Aesar, Германия.

2. Апаратура

Лабораторен хомогенизатор – Eberbach (USA) Model 7265 ConTorque, САЩ
Вакуум изпарител – Savant SPD 400, Thermo Electron, Великобритания
Центрофуга – MP23i, Thermo Electron, Великобритания
Кватернерна течнхроматографска помпа Surveyor, Thermo Electron, САЩ
Ръчен инжектор - Rheodyne 7125, САЩ
Колонен термостат – LabAlliance Model 605 Scientific Systems, САЩ
Масспектрометър тип “йонен капан” – LSQ Advantage, Thermo Finnigan, САЩ
Ултразвукова вана – Elmasonic, Канада
pH метър – 781 pH/ion meter Metrohm, Швейцария

3. Методи

- 3.1 Еднофазна течна екстракция на метаболити от чернодробна тъкан
- 3.2 Количествено определяне с използване на вътрешен стандарт
- 3.3 Обратнoфазова течна хроматография с масспектрометрична детекция с масспектрометричен анализатор тип “йонен капан”
- 3.4 Йерархичен клъстерен анализ
- 3.5 Анализ на принципните компоненти
- 3.6 Анализ на значимите микромасиви

4. Използвани програмни продукти

За контрол и събиране на данни с LC-MS беше използван софтуерен пакет Xcalibur 1.3 LC Devices, Thermo Electron, САЩ.
За построяване на калибрационните криви и изчисляване на стандартни отклонения, средни стойности и относителни сигнали беше използван MS Excell.
За извършване на статистическа обработка на метаболитните профили бяха приложени алгоритми от софтуерния пакет TM4 MeV (v4.0).

РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ

1. Оптимизиране на пробоподготовката.

1.1.Избор на разтворител за хомогенизация и екстракция

При хомогенизация и екстракция бяха изпробвани различни екстракционни подходи. Използваният метанол е подходящ за денатуриране на тъканните ензими и екстракция на нискомолекулни метаболити, но за да се извлече по-голямо количество хормони на щитовидната жлеза, е нужно рН на екстракционната смес да бъде доведено до 11.5 [1]. Поради инструменталните ограничения, за модификация на рН беше използван 0.02N амониев хидроксид.

Таблица 1. Данни от експериментите извършени с цел избор на оптималния състав на хомогенизиращия разтворител

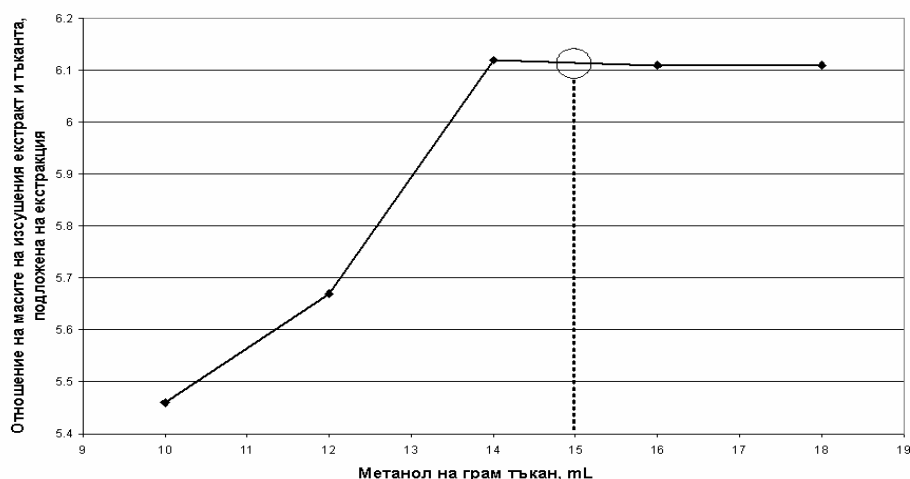
Хомогенизиращ разтворител	Тъкан, mg	Изушена супернатанта, mg	Тегловен % на екстракт	Забележки
80% Метанол, рН11.5	290,1	33,9	11,69	Наличие на високо молекулни комплекси в екстракта
100% Метанол	294,2	9,3	3,16	Т3 и Т4 не се откриват
100% Метанол и рН11.5	288,7	17,4	6,03	Т3 и Т4 се откриват

Беше приложена публикуваната през 1992 г. процедура за екстракция на Hendrich, но при прибавяне на 80% Метанол с рН 11.5 (коригирано с амониев хидроксид), получената супернатанта беше оцветена и опалесцираше. И след центрофугиране в нея се наблюдаваха високомолекулни агрегати. Това може да се обясни с произволните полимеризационни реакции по време на денатурация при повишено рН, които водят до формиране на заредени хидрофилни участъци на повърхността на денатурираните белтъци [2] и комплекси, образувани от електростатични взаимодействия между нискомолекулни вещества. Тези усложнения не се появиха когато пробата беше хомогенизирана в 100% метанол и след хомогенизация рН на хомогената беше коригирано до 11.5 с прибавяне на 0.02N амониев хидроксид. При тези условия супернатантата опалесцираше значително по-слабо и в същото време бяха осигурени условия за добра разтворимост на Т3, Т4 и други метаболити в тъканта. Изпробвана беше и екстракция с 100% метанол, предложена от Pinna през 1999 г. В този случай

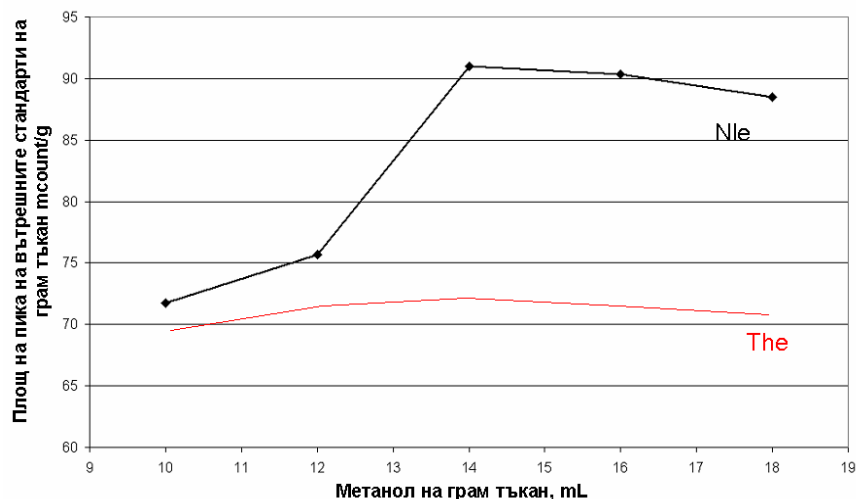
обработката на супернатантата беше най-бърза и улеснена, но в получения екстракт не бяха открити ТЗ и Т4 (таблица 1).

1.2. Оптимизиране на количеството разтворител

Разработената процедура за хомогенизация и екстракция беше приложена върху биологични тъкани. На фигура 1 са представени количествата на получените екстракти при използване на различни количества метанол при



Фигура 1. Оптимизиране на количеството метанол за хомогенизиране на чернодробна тъкан.

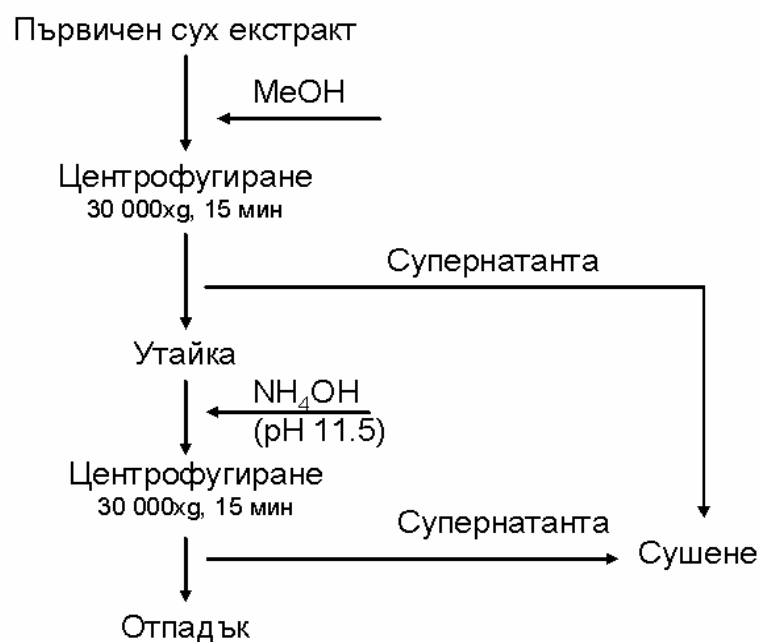


Фигура 2. Екстракционен добив на норлевцин (черно) и теофилин (червено), при използване на различни количества метанол за хомогенизация.

хомогенизация. С описания експеримент бяха проследени и екстракционните добиви на вътрешните стандарти. От фигура 2 се вижда, че промяната в екстракционните добиви на норлевцин и теофилин при различни количества метанол следва промяната в количеството получен сух екстракт. Оптималното количество метанол беше избрано така, че да се осигури максимално количество екстракт. Както се вижда от фигури 1 и 2, 15mL/g беше определено като оптимално количество метанол за хомогенизация и екстракция.

1.3. Повторна екстракция

Изсушеният екстракт беше в относително голямо количество и за разтварянето му беше нужно значително количество от избраните елуенти, което неминуемо се отразява върху концентрацията на анализите и възможността за последващата им детекция. Разработването на процедура беше базирано на публикувани методики, които предлагат повторна екстракция с водни буфери (pH 11.5)[3].



Фигура 3. Последователност на етапите на оптимизираната повторна екстракция

Тъй като при този тип екстракция много от аминокиселините, които също са цел на анализа остават в утайката, методиката беше модифицирана чрез добавяне на допълнителна стъпка във вторичната екстракция. Първо беше изпробвана двуфазна течна екстракция с метанол (pH 11.5): хлороформ 1:3. След

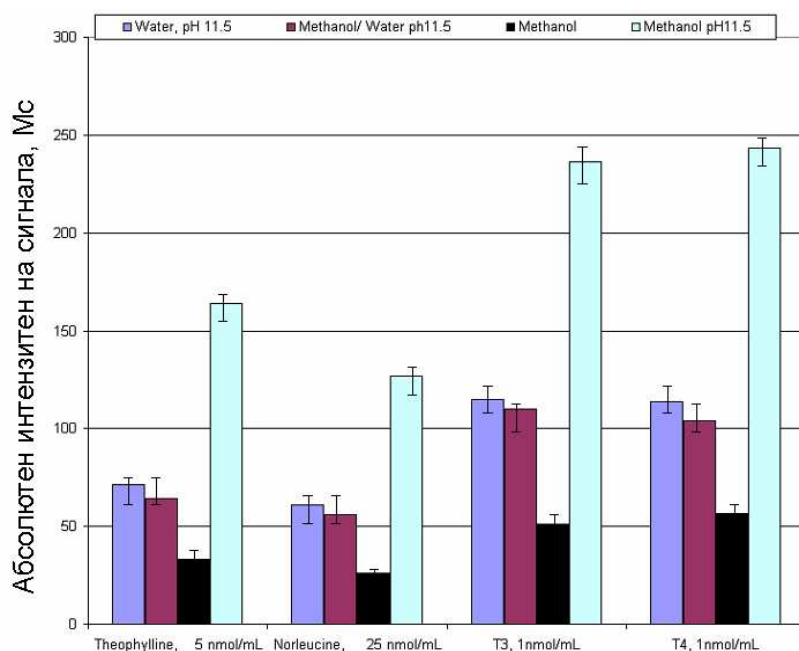
изсушаване на водно-метанолния слой и разтварянето му в елуенти, бяха отчетени слаби сигнали на T4 и липса на сигнал за T3. Идентичен беше и резултатът при екстракция с метанол: 0.02N амониев хидроксид 4:1. Успешни резултати бяха постигнати при екстракция с метанол и последваща екстракция с 0.02N амониев хидроксид (pH 11.5) – фиг. 3. Повторната екстракция доведе до намаляване на количеството екстракт с 30%, като в него се съдържаха в граници на откриване T3, T4, аминокиселини и други метаболити.

1.4. Валидиране на вътрешните стандарти

За валидиране на избора на използваните вътрешни стандарти беше проведен експеримент за оценка на абсолютна и сравнителна степен на екстракция при използване на различни разтворители. Бяха използвани стандартни разтвори на T3, T4, норлевцин и теофилин; бяха построени калибрационни криви на базата на двата стандарта.

1.4.1 Степен на екстракция

За регистриране на степента на екстракция беше използвано кратко изократно разделяне на стандартна смес и отчитане на абсолютните площи на сигналите на анализите.

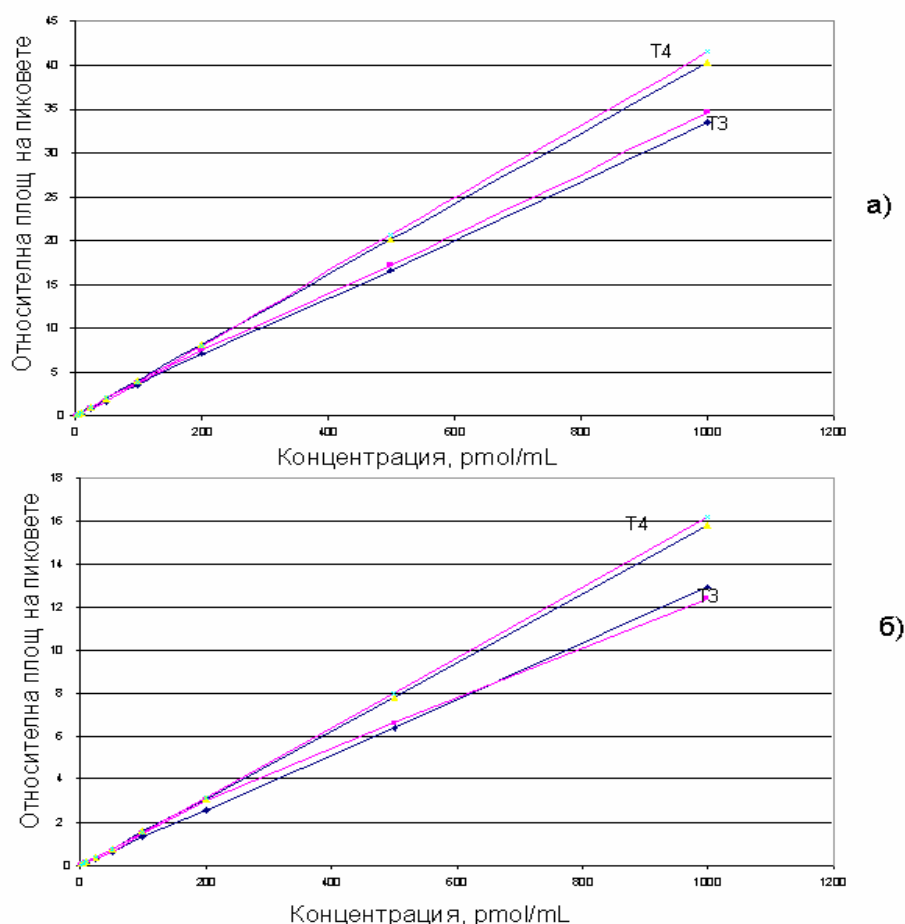


Фигура 4. Интензитет на сигналите на теофилин, норлевцин, T3 и T4, измерени при анализ на стандартни разтвори (5, 25, 1 и 1 pmol/mL, съответно) в различни разтворители, използвани при пробоподготовката

Както се вижда от фигура 4 резултатите за екстракционен добив на двата стандарта в различните разтворители, използвани в разработената методология, са аналогични с тези на T3 и T4. Експериментът показва добра разтворимост на всички молекули в разтвори с високо рН.

1.4.2 Построяване на калибрационни криви за T3 и T4

След като бяха установени инструменталните параметри (разгледани по-долу) беше изследван линейният диапазон на метода. Бяха построени две серии калибрационни криви (фиг. 5). За всяка точка от кривите беше използвана осреднена стойност от три измервания, като относителното стандартно отклонение на използваните площи на пикове не надвишаваше 3%. В диапазон 10-1000 pmol/mL кривите демонстрират отлична линейност ($r^2 > 0.99$).



Фигура 5. Калибрационни криви за T3 и T4

а) вътрешен стандарт теофиллин; б) вътрешен стандарт норлевцин.

В розово са обозначени кривите построени със стандартни разтвори,

а в синьо – кривите построени след прилагане на процедурата за екстракция

От фигура 5 се вижда, че калибрационните параметри не се влияят значително от пробоподготовката и най-вече от процедурите при повторната екстракция, което значително улеснява калибрирането при рутинни анализи.

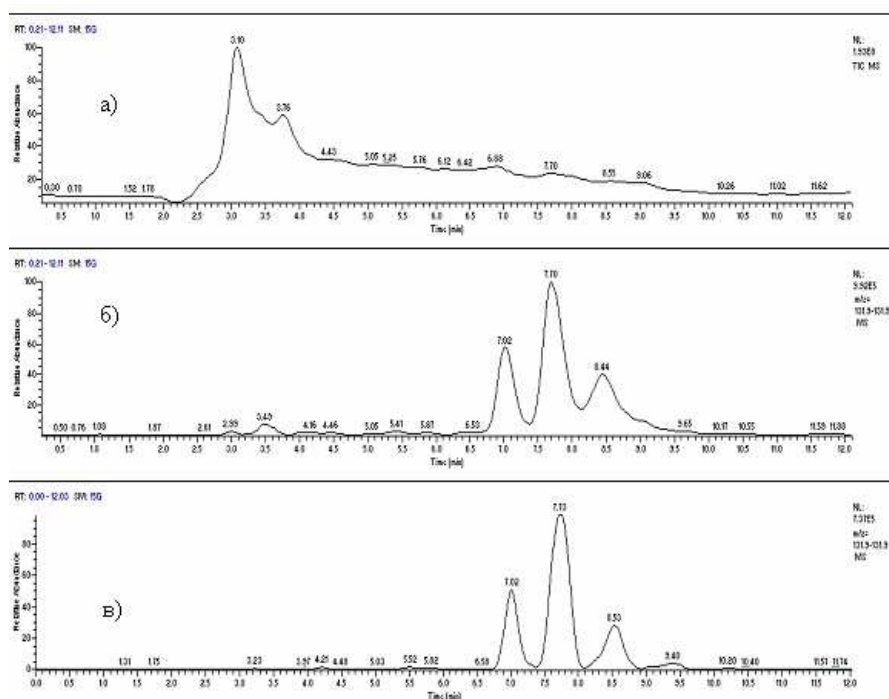
1.5. Параметри на хроматографското разделяне и масспектрометричната детекция

Теглото на крайния сух екстракт беше премерено, а съдържанието му беше разтворено в 10% амониев хидроксид: 90% метанол (pH 11.5) и за анализ бяха използвани 20 μL от получената смес.

Молекулите на Т3 и Т4 по-лесно образуват положителни йони, затова и йонизационният източник беше настроен в режим “положителна йонизация”. Скоростта на потока беше избрана така че да е с максимална стойност, предизвикваща минимално количество шум. Като критерий беше използвана минималната стойност на сигнал: шум при определяне на 100 nmol/mL норлевцин, 10 nmol/mL теофилин, 50 nmol/mL, 1 nmol/mL Т3 и Т4. Като оптимална скорост на потока беше избрана 0.5 mL/min. Тъй като в екстракта присъстват и хидрофилни молекули, хроматографското елуиране включваше изократна стъпка, като основната цел беше постигане на оптимално разделяне на трите изомера: левцин, норлевцин и изолевцин. За да се повлияе върху селективността в този случай беше приложен принципа на обратно-фазовото разделяне с йонни двойки [4]. При този тип разделяне към елуентите се прибавя вещество, което образува йонни комплекси със заредените аналити и внася допълнителни физикохимични свойства на аналитите, като подобрява разделянето им. В течната хроматография с масспектрометрична детекция се използват полярни летливи органични съединения. Когато йонизирането се извършва при положителен поляритет, се използват киселини, тъй като те не биха неутрализирали положително заредените йони, което от своя страна води до загуба на чувствителност и специфичност на анализа. Както вече беше споменато по-горе, за настоящата работа бяха използвани мравчена и трифлуороцетна киселина (TFA). Въпреки че съществуват публикации, в които се използва хептафлуоробутанова киселина [5] е доказано, че тя има ясно изразен негативен ефект върху образуването на йони, дори и да води до значително по-висока специфичност на разделянето. Бяха проведени два опита за разделяне на левцин, изолевцин и норлевцин от чернодробните екстракти, използвани при оптимизацията на пробоподготовка. В първия опит към елуентите А (вода) и В (метанол) беше добавена мравчена киселина до концентрация 0.1% (pH 3), а във втория към елуентите беше добавена TFA до концентрация 0.01%. На фигура 6 са сравнени изократните разделяния в двата случая. Забелязва се, че при използване на трифлуороцетна киселина се постига значително по-добро разделяне на изомерите като средната разделителна способност за трите пика е над 1.9.

Беше разработено елуиране от смесен тип с използването на екстракти от чернодробна тъкан на плъхове. За целта чрез стандартни разтвори бяха изготвени

библиотеки, използвани за идентификация. В елуирането бяха включени три изократни стъпки. Началният състав на подвижната фаза беше фиксиран с ниска концентрация на елуент В - 2% (въпреки че това води до бързо елуиране на хидрофилните аналити), тъй като в противен случай хидрофобните радикали в колоната могат да полепнат върху силициевите частици и да компрометират понататъшното разделяне [6]. Началната изократна стъпка на елуирането продължава 10 минути, за да се осигури пълно разделяне на изомерите на левцина. По време на тази стъпка се елуират повечето аминокиселини, моно- и олигозахариди, които почти не се задържат от колоната. Изократната стъпка е последвана от 32-минутно линейно увеличение на концентрацията на елуент В до 70%. По време на линейния градиент се елуират теофилин, ТЗ и Т4. Беше избран плавен линейен градиент с цел намаляване на шума при детекция на хормони на щитовидната жлеза. Концентрацията на елуент В остава постоянна (70%) във втората 10-минутна изократна стъпка.

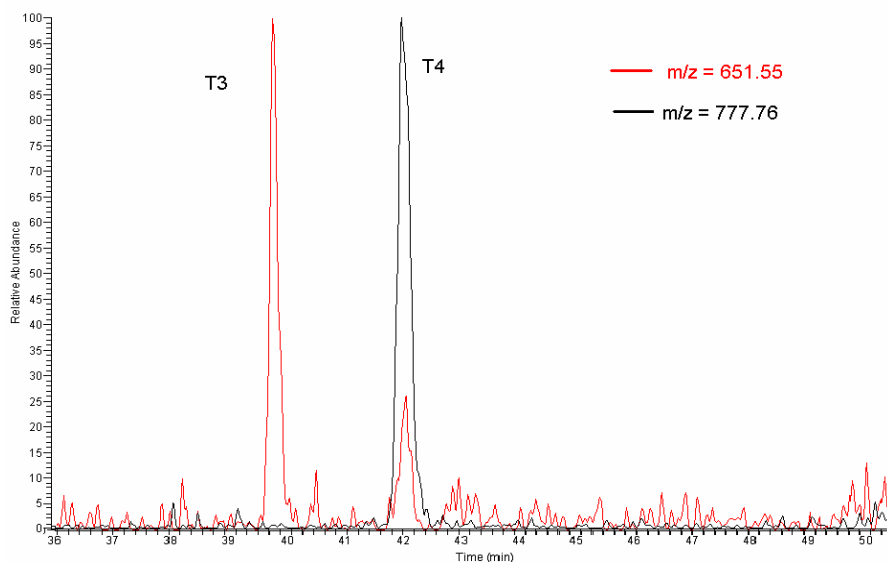


Фигура 6. Разделяне на изолевцин (Rt 7.00), левцин (Rt 7.70) и норлевцин(8.50).
а) Обща йонна хроматограма при използване на TFA и филтрирани хроматограми:
б) използване на мравчена киселина в елуентите; в) използване на TFA в елуентите

През този период се елуират силно хидрофобни метаболити. Следва рязко покачване на елуент В до 85% за 2 минути, като тази концентрация се задържа още 5 минути – трета изократна стъпка. Тъй като в последните две стъпки не се

очакваха значими метаболити, потокът от подвижна фаза беше отклонен от детектора, за да могат всички задържани йони да напуснат системата и тя по бързо да заеме изходните си параметри за следващ анализ. Опитът ни показва, че отклоняването на потока води до значително намаляване на шума при следваща инжекция. Като се добавят и допълнителни 8 минути за уравновесяване на колоната с изходните пропорции на елуентите, целият цикъл на хроматографско разделяне трае 68 минути.

Оптималното времетраене е от голямо значение, тъй като целта на разработения метод е да се прилага за широкообхватен анализ, за чийто статистически интерпретации са нужни редица експерименти и експериментални повторения.



Фигура 7. Наложени хроматограми за йоните на T3(m/z 651.55) и T4(m/z 777.76). Вижда се ясно наличие на йон m/z 651.55 при елуиране на T4

В процеса на разработване на методологията бяха изпробвани двете основни техники на йонизация: APCI и ESI. При използване на APCI се постига значително изчистена обща йонна хроматограма и се позволява по-бързо разделяне. Чрез химична йонизация беше постигната висока чувствителност при определянето на стероидни хормони и холестерол, но чувствителността спрямо T4 беше значително по-ниска отколкото при използване на ESI, което се дължи на загуба на един атом йод при йонизация (фиг. 7). Опитите за регулиране на коронния разряд на йонизационния източник не доведоха до успех, тъй като заедно с намаляване на фрагментацията намаляваше и интензитетът на сигналите на T3 и T4. Поради тези причини за настоящата работа беше избрана йонизация тип “електроспрей”.

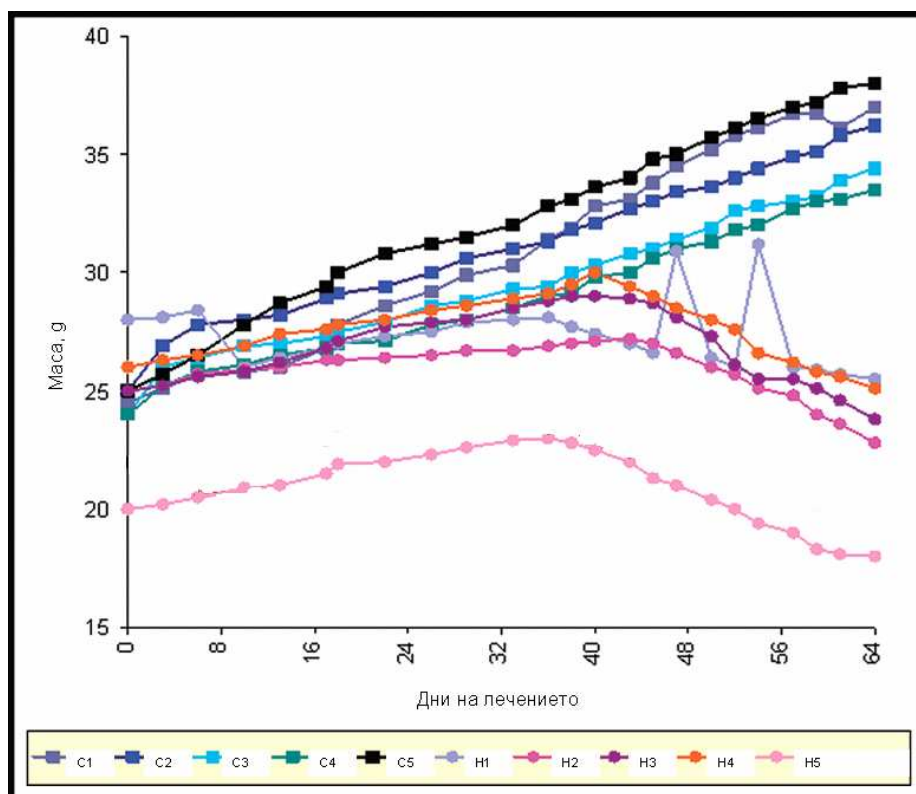
Калибрирането и настройването на масспектрометъра беше извършено със стандартна калибрационна смес за ESI йонизация (Thermo Fisher, САЩ). Разтворът беше използван пряко приготвен по рецептура на производителя. Калибрацията беше извършена чрез промяна на подаваното количество и промяна на приложените потенциали на електродите в йонния капан (AGC). На последната калибрация беше обърнато особено внимание, тъй като за количествено определяне на настоящия анализ се използват единично заредени йони без техните фрагменти. Бяха извършени и допълнителни полуавтоматизирани настройки на волтажите и потоците чрез инжектиране на стандартни разтвори на T3 и T4 в хроматографския поток директно към йонния източник. Точността на масите беше настроена спрямо йоните на норлевцина ($m/z - 131.88$), T3 ($m/z - 651.55$) и T4 ($m/z - 777.76$). В таблица 2 са обобщени оптималните параметри на масспектрометъра.

Таблица 2. Оптимизирани параметри на масспектрометъра

Параметър	Стойност
ESI (йонизационен източник)	Положителен поляритет
Температура на капиларата, °C	325
Пулверизиращ газ, L/min	12
Срязващ (противотоков) газ, L/min	10
Волтаж за йонизация, kV	3.5
Сила на тока, μA	70
Волтаж на капиларата, V	9
Йонна оптика	
Напрежение на входа на октапола, V	-3
Напрежение на изхода на октапола, V	-7
Напрежение между фрагментите на октапола, V	-16
Йонен Капан,	
Потенциал на радиочестотния генератор, Vp-p	200
Напрежение на входа на анализатора, V	-9
Автоматизирано импулсно задържане на йони (AGC)	Включено
Време на задържане на йони (AGC), ms	5

2. Приложение на разработената методика за метаболитен анализ на чернодробна тъкан

Разработената методология за определяне хормони на щитовидната жлеза и други метаболити беше приложена за изследване на метаболитните профили на контролни хипотиреоидни мишки.



Фигура 8. Промяна в телесното тегло на експерименталните организми по време на 64-дневното третиране с $KClO_4$. C1-5 – контролна група, H1-5 хипотиреоидна група Vab/cJ мишки.

Преди хомогенизация теглото на дробове беше измерено, като масата на всяка аликвота е приета за една трета от целия дроб (таблица 3).

Данните бяха сравнени с резултатите от следене на теглото на мишките през 64-дневното третиране на хипотиреоидната група с $KClO_4$ (фиг. 8). В края на третирането средната маса на хипотиреоидната група беше 68,8 % от средната за контролната група, в съответствие с установената методика за потвърждаване на развит хипотиреоидизъм [7].

Средната маса на черния дроб на хипотиреоидната група е по-ниска от тази на контролната група (91%), но разликата е значително по-малка в сравнение с разликата в телесната маса между двете групи (разликите са в рамките на

биологичната вариация). От таблицата се вижда, че процентното количество екстракт също е по-ниско при хипотиреоидната група (84.1%).

За да се провери дали тази разлика не се дължи на екстракционния добив, се изчисли относителното стандартно отклонение (RSD%) на площите на вътрешните стандарти (нормализирани с масата на пробите), получени при анализиране на контролната и хипотиреоидната група.

Таблица 3. Данни за масите на експерименталните аликвоти и относителното количество екстракт

Проба	Аликвота	Маса, mg	Екстракт, mg	Екстракт, %	Проба	Аликвота	Маса, mg	Екстракт, mg	Екстракт, %
C-1	C1-1	408.5	18.6	4.55	H-1	H1-1	395.8	11.7	2.96
	C1-2	408.5	16.7	4.09		H1-2	395.8	11.9	3.01
	C1-3	408.5	17.4	4.26		H1-3	395.8	12.3	3.11
C-2	C2-1	408.0	16.0	3.92	H-2	H2-1	513.1	17.9	3.49
	C2-2	408.0	15.0	3.68		H2-2	513.1	16.2	3.16
	C2-3	408.0	15.2	3.73		H2-3	513.1	16.5	3.22
C-3	C3-1	440.4	19.6	4.45	H-3	H3-1	511.3	16.7	3.27
	C3-2	440.4	18.3	4.15		H3-2	511.3	18.0	3.52
	C3-3	440.4	18.3	4.15		H3-3	511.3	17.5	3.42
C-4	C4-1	560.5	24.5	4.37	H-4	H4-1	363.8	11.9	3.27
	C4-2	560.5	23.2	4.14		H4-2	363.8	11.3	3.11
	C4-3	560.5	23.6	4.21		H4-3	363.8	11.0	3.02
C-6	C6-1	580.0	18.5	3.19	H-5	H5-1	397.7	14.5	3.65
	C6-2	580.0	18.2	3.14		H5-2	397.7	15.5	3.90
	C6-3	580.0	20.2	3.48		H5-3	397.7	15.8	3.97

За целта бяха използвани осреднените площи на пиковите на норлевцин и теофилин и осреднените маси на аликвотите за двете групи (A_C , m_C и A_H , m_H):

$$A^N_C = A_C/m_C \quad \text{и} \quad A^N_H = A_H/m_H$$

RSD% при използване на норлевцин и теофилин бяха съответно 5.1% и 3.2%, което потвърждава провеждането на екстракция до еднаква степен. Тъй като екстракцията беше оптимизирана за извличане на нискомолекулни метаболити, можем да предположим, че промените в черния дроб в хипотиреоидния организъм са по-скоро свързани с натрупване на биополимери, без да засягат значително масата на целия орган.

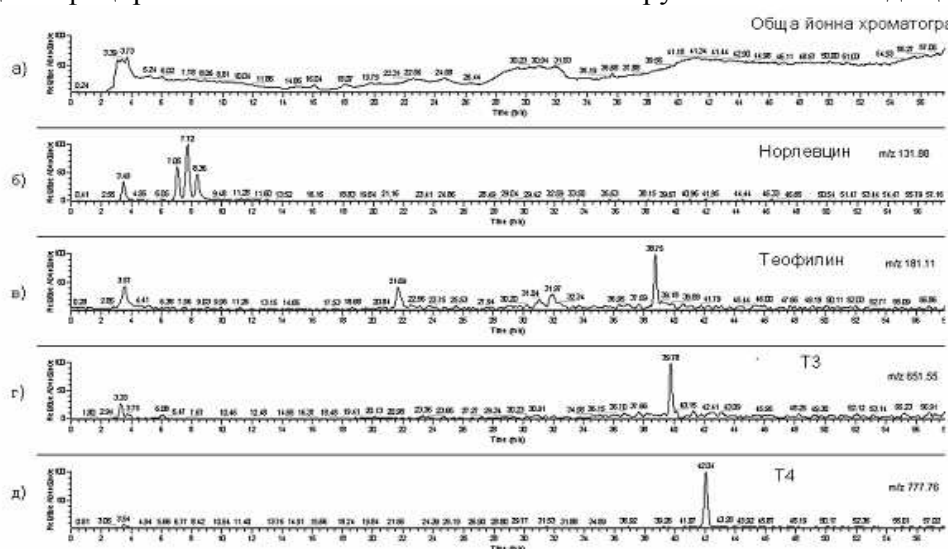
Общата йонна хроматограма, получена при анализ на единична експериментална аликуота, е показана на фигура 9а. За количествено определяне на всеки метаболит се следеше съответният $[M+1]$ йон. Фигури 9б-д представят филтрирани (по определени m/z стойности) хроматограми съответно за $M+1$ йоните на норлевцин, теофилин, ТЗ и Т4. При анализа бяха проследени общо 35 пика, като 22 от тях бяха идентифицирани със собствена библиотека, създадена със стандартни разтвори на различни метаболити (Таблица 4).

На фигура 10 е изобразена т. нар. йонна карта. Тя представлява триизмерен образ на хроматограма, на която по апликатата е показано разпределение на йоните по стойността на m/z . От йонната карта ясно се обособяват три фази в хроматограмата. Първата – на незадържаните и слабо задържани хидрофилни молекули - до 5 мин. Очаквано, в нея се откриват сигнали на захари, аминокиселини и някои мастни киселини. В тази група, след филтриране на резултата по определени m/z стойности, бяха определени значително количество анализи. Във втората фаза – от 5 до около 45 мин., елуират слабо и умерено хидрофобни вещества, като през този период стойностите за R (разделителна способност) на аналитичните пикове надминават 3.

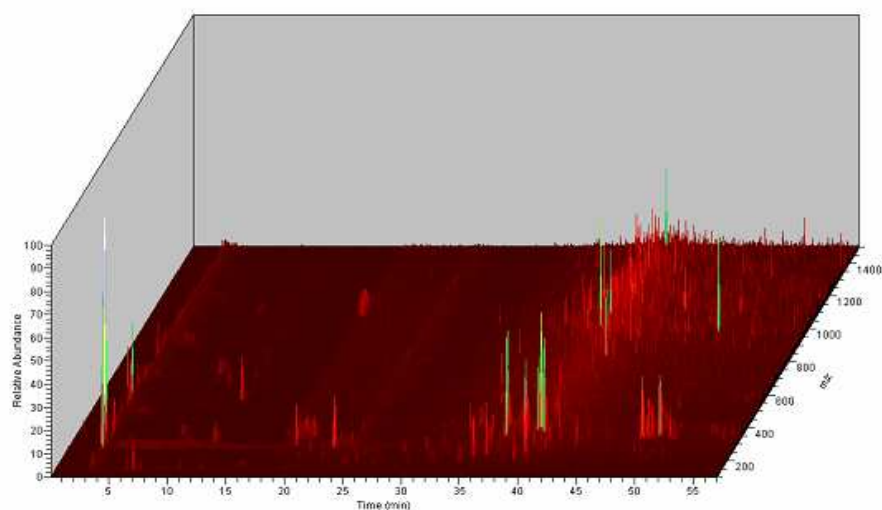
Таблица 4. Списък с идентифицираните анализи в чернодробен екстракт със съответни времена на задържане и $M+1$ йони.

№	Аналит	Rt, min	$[M+1]$
1	Глутамова киселина	3,1	148
2	Палмитинова киселина	3,3	258
3	N-ацетил-глюкозамин	3,4	222
4	α -кетоглутарова киселина	3,4	147
5	Глюкозамин	3,5	180
6	Аспартова	3,6	134
7	Хистидин	4,2	156
8	Глюкозо-6-фосфат	5,0	261
9	Метинин	5,3	150
10	Тирозин	7,0	182
11	Изолевцин	7,1	132
12	Аргинин	7,4	175
13	Левцин	7,7	132
14	Аденин	13,3	136
15	Фенилаланин	16,5	166
16	Допамин	17,2	154
17	Пироглутаминова киселина	20,6	130
18	Триптофан	22,1	205
19	ТЗ	39,7	652
20	Тестостерон	42,0	289
21	Т4	42,1	778
22	Холестерол	44,3	387

Впечатление прави постоянно повишеният интензитет на йон с m/z 268 (3-19 мин.). Подобни ефекти се предизвикват от наличието на нискомолекулни, дехидрирани продукти на липиди [8]. Въпреки постоянството на сигнала, интензитетът не пречи на определяне на анализите в този диапазон. Третата фаза (след елуиране на T4) включва сигналите на силно хидрофобни анализи. В тази област се наблюдават и сигнали със сравнително по-високи (>1000) стойности на m/z . В тази група бяха идентифицирани и сигналите на холестерол и тестостерон. Идентифицирането на повече метаболити от тази група е обект на бъдеща работа.



Фигура 9. Обща йонна хроматограма (а) и хроматограми за норлевцин (б), теофилин(в), T3(г), T4(д)



Фигура 10 Триизмерна йонна хроматограма (йонна карта)

2.1. Валидиране на метода

За валидиране на разработената методология беше изследвано относителното стандартно отклонение на аналитичните сигнали. Вниманието беше обърнато на възпроизводимостта между инжекции от една и съща аликвота, между всички инжекции от екстрактите на една и съща тъкан, както и между всички инжекции на чернодробни екстракти на различни организми от една група. Бяха проследени средното и общото относително стандартно отклонение на относителните площи на пиковите, нормализирани поотделно спрямо сигналите на теофилина и норлевцина. За онагледяване на валидирането са представени резултатите от анализа на чернодробна тъкан от контролната група Balb/cJ мишки.

На таблици 5 и 6 са показани коефициентите на вариация на относителните площи на пиковите (спрямо теофилин и норлевцин съответно), между инжекции от една и съща аликвота. На таблица 7 са показани коефициентите на вариация на относителните площи а) - спрямо теофилин и б) - спрямо норлевцин при следените пикове между всички инжекции на екстрактите от една и съща тъкан. На същата таблица е изразено и общото относително стандартно отклонение на относителните площи за всеки аналит, изчислено на базата на всички 45 инжекции за контролната група.

Освен идентифицираните молекули на таблици 5, 6 и 7 са представени и възпроизводимите сигнали на неизвестни аналити, обозначени с номер, съответстващ на m/z стойността на основния йон. По таблици 5 и 6 може да се съди за възпроизводителността на избраните инструментални параметри. В това число влизат ефективността на йонизация и настройката на волтажите на йонния капан. Всички стойности на RSD% са по-ниски от 10%, като средните за всички инжекции не надвишават 4 %. Резултатите показват отлична възпроизводимост за 34-те аналитични сигнала. При подбиране на различни вътрешни стандарти за определяне на различните аналити стойността на общото относително стандартно отклонение на резултатите, дължащо се на инструменталните колебания и пробоподаването, може да бъде сведено до под 3 %. Средните RSD% за всички аналити изчислени спрямо теофилин и норлевцин са съответно 2.46% и 2.85%.

За възпроизводимостта на пробоподготовката може да се съди по резултатите, представени в таблица 7. Всички стойности за RSD% (с изключение на "Неизвестен (1094) за Тъкан 1"), както и средните, са под 10%, което демонстрира задоволителна възпроизводимост на пробоподготовката. Очевидно е, че при използване на теофилин като вътрешен стандарт се постига по-добра възпроизводимост (средно RSD% 3.73). При сравняване на неидентифицираните пикове норлевцинът (средно RSD% 4.58) демонстрира по-добра възпроизводимост. От стойността на общото относително стандартно отклонение на аналитичните сигнали за всички инжекции (таблица 7) може да се провери дали данните отговарят на допустимата биологична вариация (20%) [9]. Интересно е, че при използване на норлевцина като вътрешен стандарт,

сигналите демонстрират много по-добра възпроизводимост от случаите, в които вътрешен стандарт е теофилин. Сигналят на α -кетоглутаровата киселина спрямо теофилина, демонстрира голямо отклонение (>30%) и поставя под съмнение адекватността на определянето ѝ, въпреки приемливите стойности спрямо норлевцина. Изборът на вътрешен стандарт за всеки аналит, беше воден от осреднените стойности на RSD% в Таблицы 5 и 6. По фигура 11 може да се съди за цялостната експериментална стабилност. Изобразени са абсолютните площи на сигналите на вътрешни стандарти получени при всички 90 експеримента. Изчислените коефициенти на вариация за теофилина (4,4%) и за норлевцина (5,7%) демонстрират постоянство на пробоподготовката и аналитичните параметри.

Таблица 5. Относително стандартно отклонение (RSD%) на площта на пикове (спрямо теофилина) на аналитите между различни инжекции в една експериментална аликвота.

Аналит	Тъкан 1			Тъкан 2			Тъкан 3			Тъкан 4			Тъкан 5			Средно
	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III	
T3	2.61	3.67	2.12	0.75	6.78	5.34	1.44	2.17	1.52	5.42	5.23	5.53	2.18	3.64	2.80	3.41
T4	0.99	2.41	1.38	2.46	0.65	0.51	1.74	2.20	3.68	2.16	0.75	2.38	3.27	0.97	1.41	1.80
Глутамов а киселина	0.49	2.09	1.20	1.03	2.29	1.36	2.36	1.34	3.20	1.43	1.61	2.43	0.98	1.45	1.42	1.65
Глюкозамин	0.66	1.73	3.56	2.79	0.75	1.72	3.43	3.09	1.88	2.22	1.15	1.69	1.55	1.28	0.55	1.87
Палмитинова киселина	1.36	3.95	2.83	2.47	2.25	1.66	2.25	6.01	8.06	0.71	0.49	1.64	1.55	1.06	0.34	2.44
Неизвестен (512)	5.98	6.73	5.68	6.26	2.11	2.02	1.21	0.51	6.70	3.23	0.83	1.71	0.79	1.10	1.04	3.06
α -кетоглутарова киселина	1.12	2.43	2.46	3.31	1.85	1.67	1.43	2.56	2.27	1.43	0.47	2.11	1.09	0.82	0.33	1.69
Аспартова киселина	1.17	3.00	1.82	2.91	3.99	2.41	2.29	2.95	1.66	0.50	1.78	2.98	0.91	0.35	1.75	2.03
N-ацетил-глюкозамин	2.26	0.96	2.64	1.94	4.02	2.57	2.66	3.34	1.55	1.49	3.64	1.67	5.04	0.87	1.83	2.43
Хистидин	0.81	4.49	1.69	0.36	0.69	1.11	1.17	1.68	4.16	0.67	1.18	1.38	0.97	0.79	0.81	1.46
Метонин	1.04	9.43	1.31	1.71	2.27	2.06	3.98	2.70	1.57	1.07	1.17	8.02	1.07	0.58	1.08	2.60
Глюкозо-6-фосфат	1.34	3.56	1.24	4.65	3.84	6.36	2.79	3.13	4.37	1.78	2.00	2.47	2.91	2.72	4.78	3.20
Допамин	1.91	5.31	3.19	2.12	2.34	2.16	3.53	1.63	2.06	1.36	0.49	2.29	2.45	0.15	1.44	2.16
Изолевцин	2.87	3.77	4.08	3.41	4.06	1.88	2.55	3.49	5.91	1.44	2.04	0.83	1.91	1.58	2.26	2.81
Левцин	2.32	4.29	1.30	2.80	3.36	1.49	0.77	3.04	2.10	1.27	1.76	2.51	1.66	2.42	2.01	2.21
Аргинин	2.55	1.58	1.96	2.87	3.37	0.36	3.16	2.33	2.45	1.75	3.68	0.49	1.76	0.95	4.13	2.23
Тирозин	0.10	2.24	1.99	2.01	0.81	1.65	1.44	1.83	3.03	1.27	3.03	2.73	1.55	6.79	0.77	2.08
Неизвестен (508)	6.75	1.83	1.91	1.62	2.97	4.62	1.70	5.25	1.75	0.14	0.84	1.53	1.43	1.03	1.03	2.29
Фенилаланин	3.55	4.45	1.64	2.75	2.46	3.89	4.91	1.78	3.91	2.63	1.74	2.55	0.82	2.71	1.50	2.75
Неизвестен (663)	6.10	3.21	1.20	2.45	4.46	4.76	2.32	3.40	1.82	2.39	1.73	3.81	2.05	0.61	4.38	2.98
Аденин	1.03	5.41	2.16	1.46	1.00	1.95	2.96	4.31	4.76	0.32	2.91	2.21	1.72	1.50	0.33	2.27
Неизвестен (231)	2.59	6.61	2.60	2.79	1.18	2.44	0.75	3.72	5.94	1.70	1.73	4.13	1.96	2.05	4.94	3.01
Неизвестен (573)	2.60	6.57	2.41	3.03	0.90	1.88	2.23	4.27	2.65	1.59	6.81	4.90	0.49	2.84	1.46	2.98
Неизвестен (313)	1.08	6.79	5.45	1.86	1.04	1.09	1.41	3.70	3.43	4.24	2.33	1.63	2.66	2.44	0.90	2.67
Неизвестен (1094)	2.39	13.82	3.00	2.18	6.18	2.82	3.42	0.36	3.08	2.39	2.35	0.75	1.07	0.60	1.09	3.03
Пиропутаминова киселина	2.49	2.83	3.51	1.98	0.55	0.95	2.01	1.40	2.03	0.62	3.44	2.01	3.54	4.11	2.43	2.26
Неизвестен (266)	1.01	2.68	5.77	2.56	1.50	1.28	0.59	3.11	2.18	1.83	1.10	0.59	1.97	1.90	1.40	1.96
Неизвестен (327)	0.40	1.24	2.56	2.71	3.21	1.95	1.87	3.44	2.79	3.23	3.34	1.79	1.69	2.29	2.15	2.31
Триптофан	0.55	2.36	2.28	2.05	1.66	2.65	5.51	4.78	1.19	3.73	0.83	7.33	0.94	0.89	1.29	2.53
Неизвестен (249)	1.94	3.31	3.34	2.64	2.17	2.19	2.03	2.90	2.43	0.66	3.37	1.61	1.01	0.95	2.76	2.22
Неизвестен (512)	1.77	5.47	2.51	2.34	2.72	1.90	0.50	3.37	2.41	1.52	1.71	1.42	3.07	2.85	0.74	2.29
Неизвестен (242)	0.90	1.79	4.39	4.21	1.88	1.02	7.20	5.12	4.05	0.95	1.16	3.48	5.69	6.18	4.16	3.48
Холестерол	1.59	3.48	2.82	4.07	0.24	1.41	0.37	2.87	1.32	1.65	2.97	3.97	2.21	0.93	0.75	2.04
Неизвестен (275)	1.31	1.60	5.79	4.93	3.97	5.79	5.10	0.97	2.76	0.98	4.90	2.29	3.46	1.69	4.97	3.37
Тестостерон	4.08	7.04	0.64	3.26	2.71	1.15	1.61	2.28	4.79	1.60	0.49	0.91	2.24	2.14	1.44	2.42

Таблица 6. Относително стандартно отклонение (RSD%) на площта на пиковите (спрямо норлевцина) на анализите между различни инжекции в една експериментална аликвота.

Анализ	Тъкан 1			Тъкан 2			Тъкан 3			Тъкан 4			Тъкан 5			Средно
	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III	
T3	5.18	1.82	1.92	1.85	5.60	6.68	1.11	1.68	3.00	2.45	2.82	5.87	0.84	2.85	0.84	2.97
T4	2.48	0.69	0.99	1.53	4.91	1.20	2.04	1.80	2.44	1.70	2.65	1.65	2.01	0.23	2.79	1.94
Глутамова киселина	3.08	2.23	0.79	2.23	6.38	2.00	2.56	0.80	3.87	2.78	0.99	1.75	1.11	0.64	2.82	2.27
Глюкозамин	3.82	2.94	3.14	1.47	5.74	1.07	3.74	2.19	2.77	4.99	3.22	1.29	1.85	0.64	2.69	2.77
Палмитинова киселина	2.12	1.79	2.60	0.74	6.90	0.96	2.32	5.28	8.78	2.59	2.22	0.86	1.32	0.31	2.48	2.75
Неизвестен (612)	2.53	5.27	6.10	5.91	5.56	0.95	0.92	0.71	9.38	2.83	1.73	1.45	0.76	1.62	2.46	3.21
α-кетоглутарова киселина	3.36	2.31	2.06	1.57	5.60	2.23	1.76	1.87	2.51	3.68	3.02	1.72	0.74	0.20	1.86	2.30
Аспартова киселина	3.12	0.23	1.39	1.06	3.91	3.20	2.62	1.89	2.38	3.49	1.37	2.19	0.97	0.49	2.51	2.03
N-ацетил-глюкозамин	5.58	2.80	2.29	2.31	6.85	3.64	2.84	2.32	4.21	4.48	5.85	0.88	3.68	0.95	2.44	3.41
Хистидин	4.29	2.81	1.42	2.23	6.39	1.06	1.49	0.57	1.70	3.00	1.40	0.84	0.46	0.39	2.61	1.97
Метионин	4.47	11.26	0.90	0.89	4.73	2.09	4.21	1.57	2.92	4.09	1.36	7.29	1.63	0.39	2.18	3.93
Глюкозо-6-фосфат	4.32	1.86	0.82	2.76	3.40	5.91	3.12	2.58	0.80	4.49	2.11	2.46	3.76	2.70	4.60	3.01
Допамин	5.04	3.93	2.77	0.92	5.44	3.74	3.80	0.64	2.93	2.90	2.11	1.56	1.17	0.97	3.54	2.76
Изопевцин	5.68	3.39	3.85	1.51	5.56	2.57	2.85	2.37	4.25	4.19	1.81	0.68	1.29	2.33	4.16	3.10
Левцин	3.04	1.61	1.42	0.29	8.11	1.09	0.74	1.94	4.65	3.39	2.76	1.84	1.83	3.24	3.30	2.62
Аргинин	1.04	1.35	1.95	1.45	5.72	1.40	3.23	1.33	3.04	3.76	5.46	0.78	1.90	0.60	4.47	2.45
Тирозин	3.36	1.82	1.64	1.76	5.01	1.64	1.72	0.77	2.78	3.53	0.70	2.36	0.46	6.35	2.84	2.45
Неизвестен (568)	9.20	3.85	1.71	3.22	2.69	4.51	2.04	4.27	2.73	3.14	2.22	0.98	0.97	1.27	3.05	3.06
Фенилаланин	6.80	6.72	1.46	0.40	7.28	4.33	4.63	1.95	1.14	0.62	3.36	2.11	0.88	2.94	3.60	3.20
Неизвестен (663)	2.54	1.99	1.14	1.42	0.83	3.73	2.37	2.51	4.36	5.32	1.07	4.50	2.85	0.79	3.15	2.56
Аденин	4.40	3.40	2.02	2.26	6.21	2.79	3.29	5.07	1.70	3.33	3.93	1.95	0.42	2.28	2.34	2.96
Неизвестен (231)	2.66	9.37	2.44	3.36	3.88	0.86	0.42	4.18	6.70	2.51	4.09	3.59	2.41	2.62	5.68	3.67
Неизвестен (673)	5.52	5.78	2.38	0.84	5.95	3.13	2.56	3.15	2.19	2.95	4.47	4.80	1.56	3.27	1.88	3.36
Неизвестен (313)	3.71	5.27	5.04	2.79	4.46	1.58	1.61	2.61	2.74	2.49	4.90	1.05	1.84	2.47	1.28	2.92
Неизвестен (1094)	3.09	12.71	2.68	0.69	10.43	4.01	3.37	1.45	2.50	3.80	0.97	0.15	2.38	1.38	3.02	3.51
Пироглутаминова киселина	5.74	1.13	3.11	0.78	4.54	0.91	2.35	0.92	4.44	3.44	4.50	2.78	3.66	4.89	4.53	3.21
Неизвестен (266)	3.55	1.21	5.38	4.34	6.48	2.07	0.32	2.44	4.19	4.26	2.00	1.16	1.32	1.28	0.76	2.85
Неизвестен (327)	3.43	2.42	2.21	0.47	7.51	2.18	1.78	2.86	1.41	1.33	4.99	1.00	0.83	1.51	3.72	2.49
Триптофан	3.65	1.50	2.15	0.61	6.96	4.18	5.85	3.90	3.78	5.61	1.71	8.10	0.75	1.73	3.07	3.50
Неизвестен (248)	5.34	3.11	3.30	2.66	4.82	0.62	2.29	1.78	2.38	3.64	0.97	0.88	0.60	1.26	1.42	2.33
Неизвестен (512)	5.16	2.83	2.11	1.78	5.51	2.91	0.77	2.24	2.53	4.05	2.19	1.29	4.36	2.23	2.41	2.83
Неизвестен (242)	2.98	2.34	4.00	1.66	6.78	0.57	7.53	4.22	2.47	3.76	1.79	3.68	5.08	5.38	5.91	3.80
Холестерол	4.27	1.57	2.95	3.22	5.26	2.08	0.56	2.06	3.62	1.49	1.10	3.59	0.89	0.85	1.82	2.36
Неизвестен (275)	4.40	1.66	5.37	2.42	7.40	5.71	4.99	2.06	1.53	3.03	3.03	1.57	3.38	2.52	4.65	3.60
Тестостерон	3.21	4.83	0.65	2.54	2.72	1.19	1.77	1.61	5.38	2.26	2.28	1.20	1.38	1.35	3.03	2.36

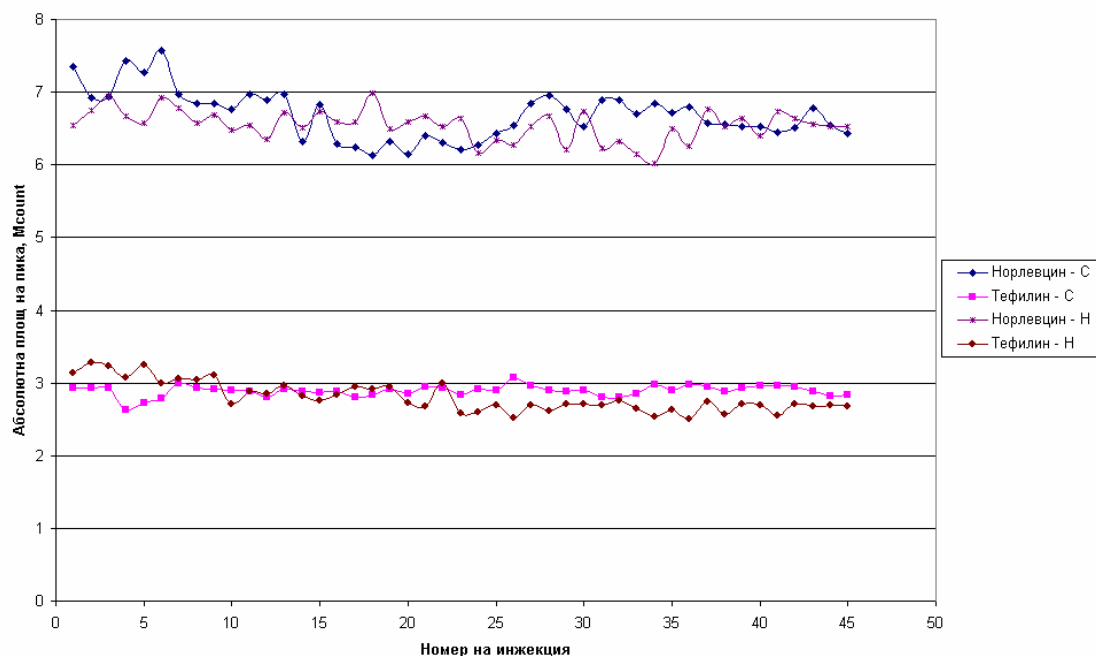
Таблица 7. Относително стандартно отклонение (RSD%) на площта на пиковите (а) спрямо теофилина и б) спрямо норлевцина) на анализите между инжекции на екстракти от една и съща тъкан.

а)

Анализ	Тъкан 1	Тъкан 2	Тъкан 3	Тъкан 4	Тъкан 5	Средно	Общо
T3	3.78	4.61	2.03	5.09	4.44	3.99	6.06
T4	3.86	2.00	2.72	2.60	3.41	2.92	5.60
Глутамова киселина	4.79	1.59	2.40	3.76	1.62	2.81	3.77
Глюкозамин	5.21	2.79	3.16	2.77	2.16	3.22	6.73
Палмитинова киселина	6.41	6.12	5.55	2.25	1.47	4.76	9.35
Неизвестен (612)	7.39	5.10	4.50	3.57	2.10	4.53	8.49
α-кетоглутарова киселина	3.81	3.54	2.27	2.19	1.51	2.66	30.58
Аспартова киселина	4.78	3.53	2.53	3.31	1.21	3.07	7.72
N-ацетил-глюкозамин	6.66	4.01	2.56	2.43	4.06	3.95	8.80
Хистидин	5.48	2.13	3.29	2.16	1.59	2.93	7.39
Метионин	7.36	2.64	5.81	6.18	0.89	4.70	8.84
Глюкозо-6-фосфат	5.17	4.48	3.18	2.82	3.73	3.88	6.39
Допамин	5.08	2.15	3.58	2.96	2.74	3.30	7.61
Изопевцин	5.75	3.30	4.98	2.76	2.60	3.88	7.53
Левцин	6.56	2.65	2.74	2.51	3.06	3.51	7.72
Аргинин	5.24	2.90	2.91	3.29	3.77	3.63	7.44
Тирозин	4.16	2.33	2.47	3.06	3.58	3.12	7.75
Неизвестен (568)	8.20	3.29	3.81	2.49	2.13	3.99	12.73
Фенилаланин	4.31	3.36	6.81	4.21	4.03	4.51	9.50
Неизвестен (663)	5.58	3.79	3.57	5.09	3.63	4.33	29.21
Аденин	4.64	1.37	3.72	3.26	2.94	3.06	5.50
Неизвестен (231)	6.97	2.75	4.33	2.42	2.99	3.89	5.31
Неизвестен (673)	5.60	2.47	4.26	5.50	3.40	4.25	8.29
Неизвестен (313)	6.17	3.86	2.86	4.88	3.89	4.33	9.70
Неизвестен (1094)	13.45	4.22	2.36	2.55	1.71	4.86	9.25
Пироглутаминова киселина	4.25	1.72	2.10	4.06	5.62	3.53	9.24
Неизвестен (266)	4.43	1.98	2.28	1.68	1.92	2.45	5.36
Неизвестен (327)	4.01	2.74	2.83	3.80	2.33	3.10	8.95
Триптофан	4.23	1.91	6.42	4.74	1.27	3.72	7.14
Неизвестен (248)	5.33	3.73	3.68	2.25	1.84	3.37	9.44
Неизвестен (512)	6.08	5.69	2.60	2.38	4.58	4.26	6.32
Неизвестен (242)	5.63	2.56	5.98	2.40	4.57	4.31	12.58
Холестерол	3.48	3.73	2.67	4.92	2.07	3.37	6.61
Неизвестен (275)	6.70	5.06	6.68	3.20	3.20	4.97	13.60
Тестостерон	5.18	2.95	3.70	2.80	3.03	3.37	4.78

б)

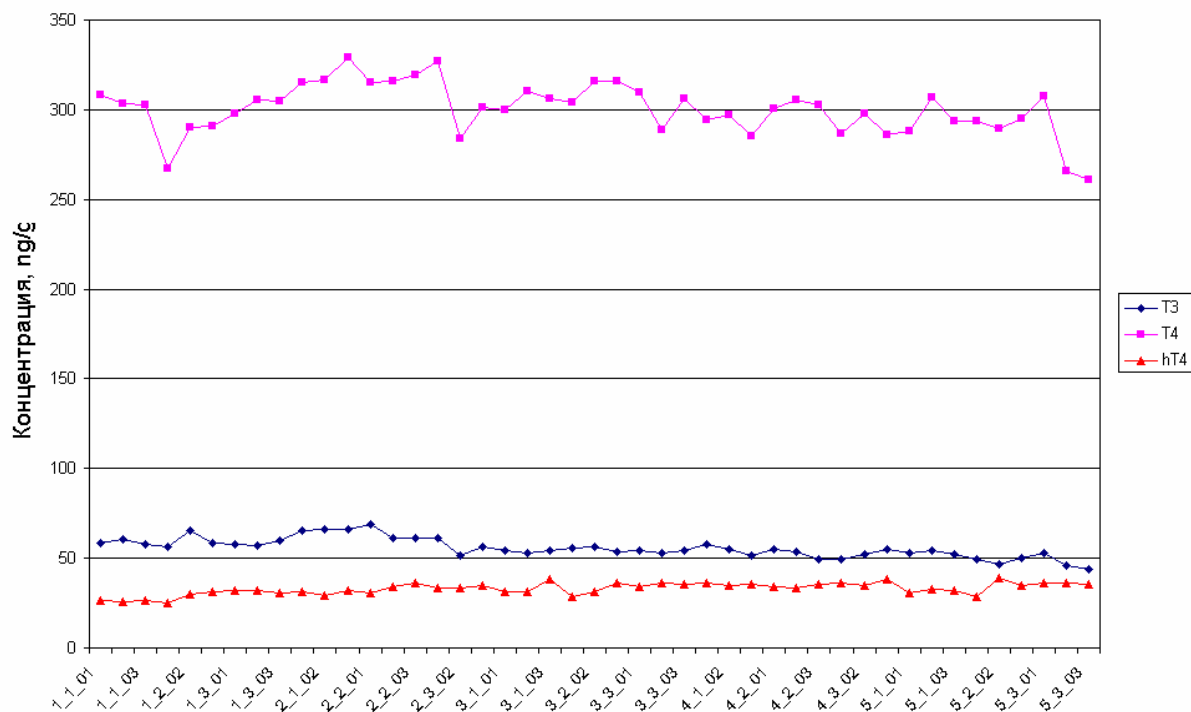
Анализ	Тъкан 1	Тъкан 2	Тъкан 3	Тъкан 4	Тъкан 5	Средно	Общо
T3	6.36	5.39	2.84	4.79	3.16	4.51	7.68
T4	3.80	6.03	3.16	2.41	1.99	3.48	6.36
Глутамова киселина	3.69	5.67	3.36	2.71	2.04	3.49	5.74
Глюкозамин	8.02	5.84	4.07	3.97	1.82	4.66	6.13
Палмитинова киселина	3.76	3.94	5.40	5.88	1.93	4.29	5.73
Неизвестен (612)	4.68	8.79	5.99	3.37	1.75	4.81	7.93
α-кетоглутарова киселина	4.93	7.61	2.27	2.68	1.39	3.76	9.48
Аспартова киселина	5.41	6.91	2.06	5.19	2.07	4.32	10.49
N-ацетил-глюкозамин	4.48	5.05	3.68	5.55	2.52	4.36	6.13
Хистидин	4.35	3.91	3.82	5.11	1.58	3.76	4.89
Метионин	8.52	6.85	6.77	4.27	2.59	5.76	9.48
Глюкозо-6-фосфат	4.85	4.92	3.14	6.78	3.29	4.56	9.69
Допамин	5.20	5.42	4.74	3.22	1.97	4.11	10.75
Изопевцин	5.82	6.88	4.68	6.68	2.49	5.27	9.79
Левцин	5.48	5.97	4.06	3.84	2.50	4.37	9.49
Аргинин	4.76	3.95	3.82	2.44	5.21	4.03	8.01
Тирозин	4.33	6.63	2.61	3.32	4.20	4.22	10.17
Неизвестен (568)	6.00	4.79	4.61	6.67	2.12	4.82	11.97
Фенилаланин	6.80	7.42	7.68	3.23	4.25	5.88	9.02
Неизвестен (663)	5.73	5.71	3.26	5.02	2.23	4.39	9.76
Аденин	4.64	5.36	3.24	5.60	3.05	4.36	5.74
Неизвестен (231)	9.18	6.21	5.33	7.07	4.59	6.48	6.24
Неизвестен (673)	5.16	4.52	5.00	4.25	2.37	4.26	8.21
Неизвестен (313)	5.70	7.89	3.02	7.04	3.30	5.40	10.63
Неизвестен (1094)	7.29	5.91	2.86	2.76	2.51	4.26	12.62
Пироглутаминова киселина	7.29	5.83	3.40	3.15	4.52	4.92	11.20
Неизвестен (266)	6.00	6.29	3.43	4.70	1.58	4.40	9.86
Неизвестен (327)	6.06	5.11	3.22	3.34	2.58	4.06	7.71
Триптофан	5.13	5.88	7.24	2.39	2.26	4.54	6.95
Неизвестен (248)	4.94	7.43	4.61	6.64	2.70	5.26	7.20
Неизвестен (512)	4.81	10.00	3.27	5.01	3.70	5.36	6.28
Неизвестен (242)	6.80	5.54	6.47	3.13	5.04	5.26	9.75
Холестерол	6.64	7.53	3.51	1.80	1.67	4.25	7.32
Неизвестен (275)	5.41	5.31	6.61	2.75	3.84	4.78	11.10
Тестостерон	5.26	6.43	4.56	1.91	1.95	4.02	7.74



Фигура 11. Интензитет на сигналите на вътрешните стандарти по време на целия експеримент С - резултати от контролна група; Н – резултати от хипотиреоидна група.

2.2. Определяне на абсолютното количество на хормоните на щитовидната жлеза

Разработеният аналитичен метод осигури условия за определяне на количеството Т3 и Т4 в контролната и на Т4 в хипотиреоидната група. Границата на количествено определяне за Т3 беше 2 ng/g, а за Т4 – 10 ng/g. Въпреки че в хипотиреоидната група не бяха отчетени сигнали за Т3, методът е подходящ за количествено определяне на хормоните на щитовидната жлеза в нормални физиологични граници. На базата на калибрационните криви бяха определени абсолютните количества на Т3 и Т4 в чернодробна тъкан (фиг. 12).



Фигура 12. Резултати от определяне на количеството на T3 и T4 в контролна тъкан и hT4 – тъкан от хипотиреоидната група.

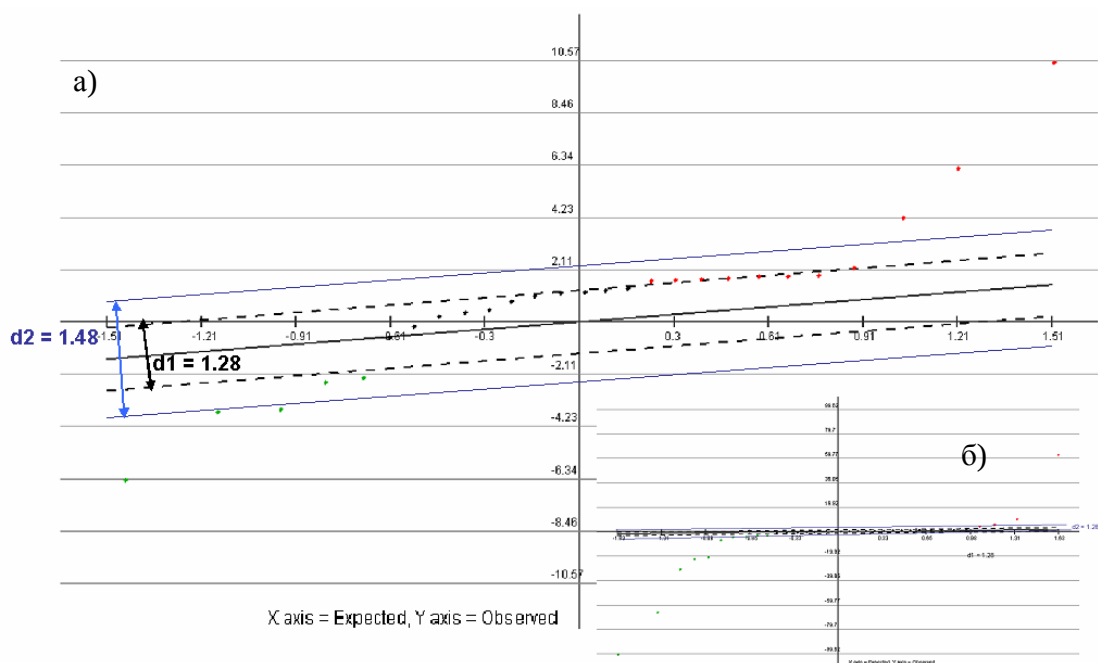
Средни стойности за количеството T3 на контролната група е 54.8 ng/g, определено с коефициент на вариация 6.5%, а за T4 е 298 ng/g при коефициент на вариация 14.6%. Резултатите потвърждават утвърдени данни постигнати с радиоимуноанализи [10] и следват задоволителна възпроизводимост.

В хипотиреоидната група T3 не се открива, а средното количество на T4 е почти 10 пъти по-ниски в сравнение с контролната група – 32 ng/g, определено с коефициент на вариация 3.34%. Очевидно е биологичното разнообразие при контролната група. Стойностите на концентрациите на T3 и T4 паралелно се повишават и намаляват, като вариацията им е в допустими граници. При хипотиреоидната група се наблюдава ясно изразена идентичност при различните тъкани спрямо концентрацията на T4. Предвид границите на откриване на T3, количеството му в чернодробната тъкан на хипотиреоидната група е повече от 30 пъти по-ниско в сравнение с това на контролната група.

2.3. Сравняване на метаболитните профили на черните дробове на контролни и хипотиреоидни мишки.

2.3.1 Статистическа обработка

С метаболитните профили на чернодробните екстракти на контролните и хипотиреоидните мишки беше извършен анализ на значимите микромасиви (SAM).



Фигура 13. Графика на SAM на сравняване на метаболитните профили на контролна и хипотиреоидна група:

а) без да са включени най-значимите метаболити - T3, T4, хексадеканова киселина;

б) с включени всички значими метаболити;

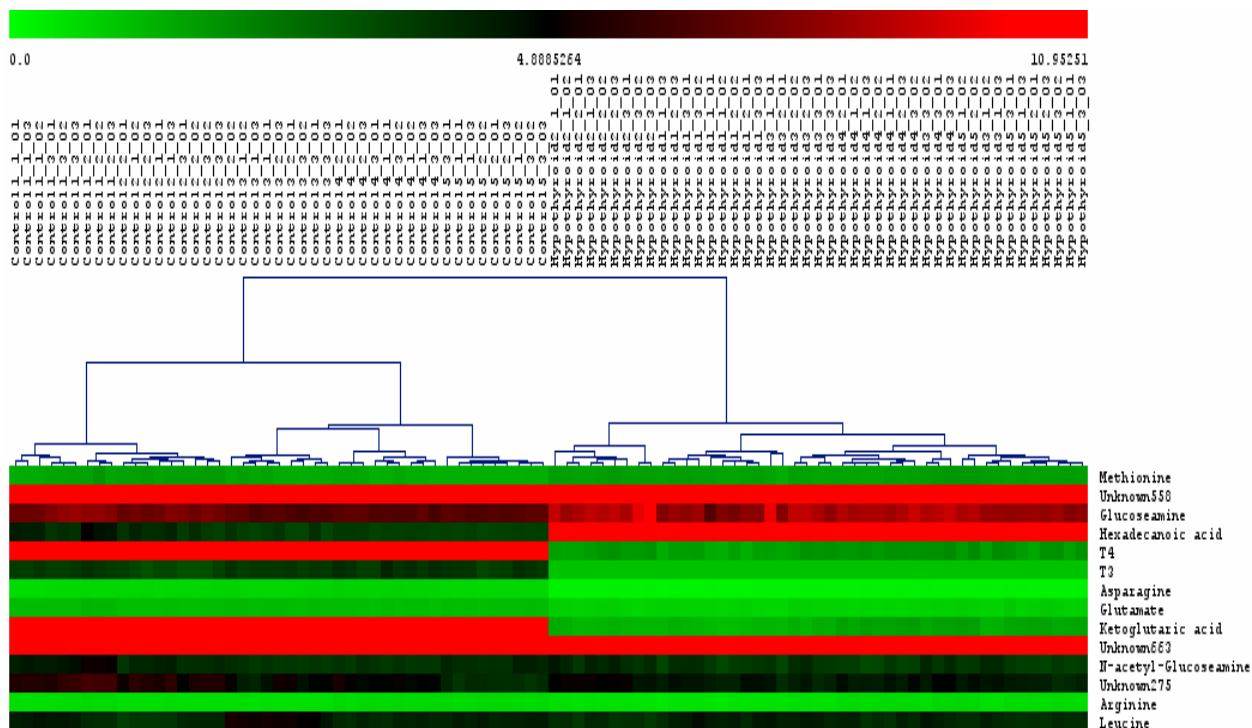
Червените и зелените точки представляват съответно положително и отрицателно значимите метаболити.

Анализът беше извършен при осреднен критерий на вероятността за грешно отчитане FDR (50%FDR) и при 90%FDR. При 50%FDR за праг на чувствителност беше определено $d1 = 1.28$, като в този случай бяха дефинирани 12 (5 от които неизвестни) положително значими метаболита, и 10 (2 от които неизвестни) отрицателно значими метаболита.

При 90% FDR (по-строг критерий за определяне на значимост), стойността на прага на чувствителност беше $d2 = 1.48$ (фиг. 13а).

Таблица 8. Списък на метаболитите, определени по SAM диаграма. Изразени са и двата прага на значимост, като метаболитите са подредени по намаляващ ред на значимостта.

	Но на отрицателно значим метаболит	Отрицателно значим метаболит	Но на положително значим метаболит	Положително значим метаболит	Ред на значимост
	1	T3			
			1	Палмитинова киселина	
	2	T4			
			2	Неизвестен 558	
	3	Аспартова киселина			
	4	Глутамова киселина			
			3	Глюкозамин	
	5	Неизвестен 663			
	6	α-кетоглутарова киселина			
	7	N-ацетил-глюкозамин			
			4	Метионин	
	8	Неизвестен 275			
	9	Аргинин			
	10	Левцин			
			5	Пироглутаминова киселина	
			6	Неизвестен 231	
			7	Хистидин	
			8	Холестерол	
			9	Тестостерон	
			10	Неизвестен 267	
			11	Неизвестен 249	
			12	Неизвестен 327	



Фигура 14. Йерархичен клъстерен анализ (с Евклидова дистанция) на получените при експеримента метаболитни профили, построен спрямо значимите метаболити, определени при $d=1.48$

В този случай бяха идентифицирани същите 10 отрицателно значими метаболита и 4 положително значими (Таблица 8).

От графиката на SAM (фиг. 136) ясно се открояват T3 и T4 (очаквано) като най-значими отрицателни метаболити (най-отдалечените зелени точки) и палмитиновата киселина като най-значим положителен метаболит (най-отдалечената червена точка). Разделянето на контролната от хипотиреоидната група се потвърждава и от йерархичния клъстерен анализ (фигура 14), където ясно се открояват двете групи, разпределени според специфичния си метаболитен профил.

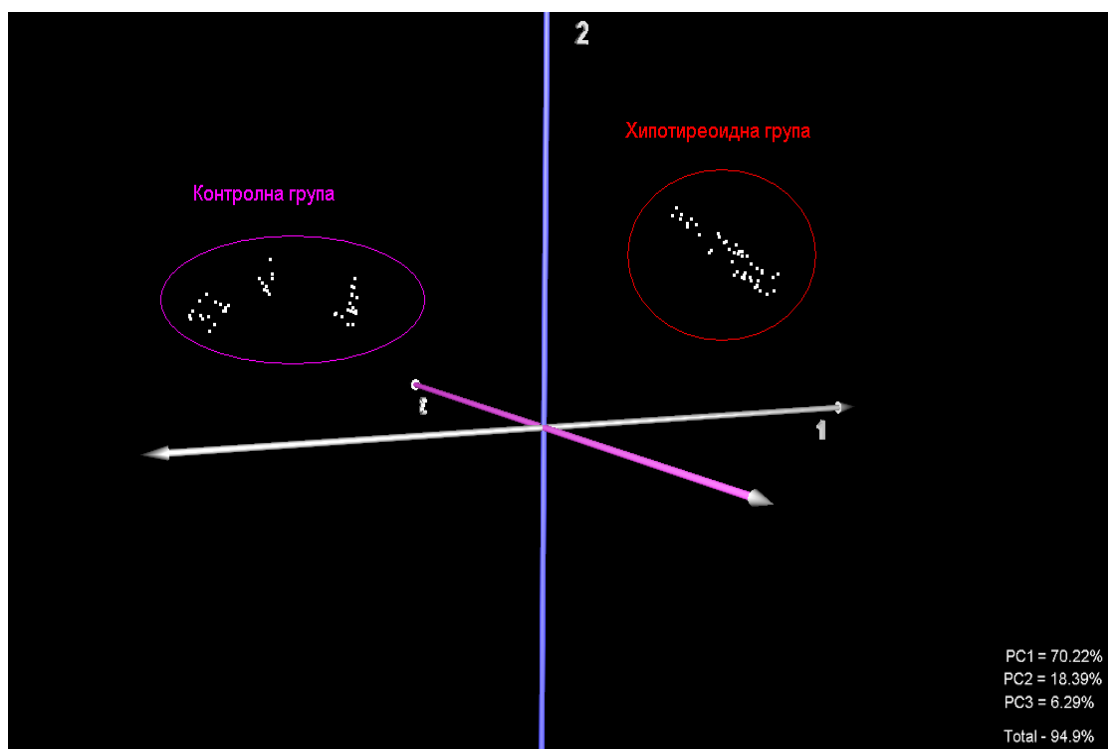
От клъстерите се вижда и групирането на аналитичните резултати от всеки организъм, като се обособяват пет експериментални клъстера на междинно ниво.

Всички данни от един и същ чернодробен екстракт от контролната група са в ясно обособени клъстери, докато при хипотиреоидната група клъстерите на същото ниво съдържат резултати от различни чернодробни екстракти.

Този факт отново ни насочва към идеята, че идентичността на метаболитните профили на различни хипотиреоидните организми е много по-ясно изразена в сравнение с контролните.

С така избраните значими метаболити ($d = 1.48$) беше извършен и анализ на принципните компоненти, като на графиката (фиг. 15) се вижда значителното отдалечаване на точките (метаболитните профили) на двете експериментални групи по принципен компонент 1.

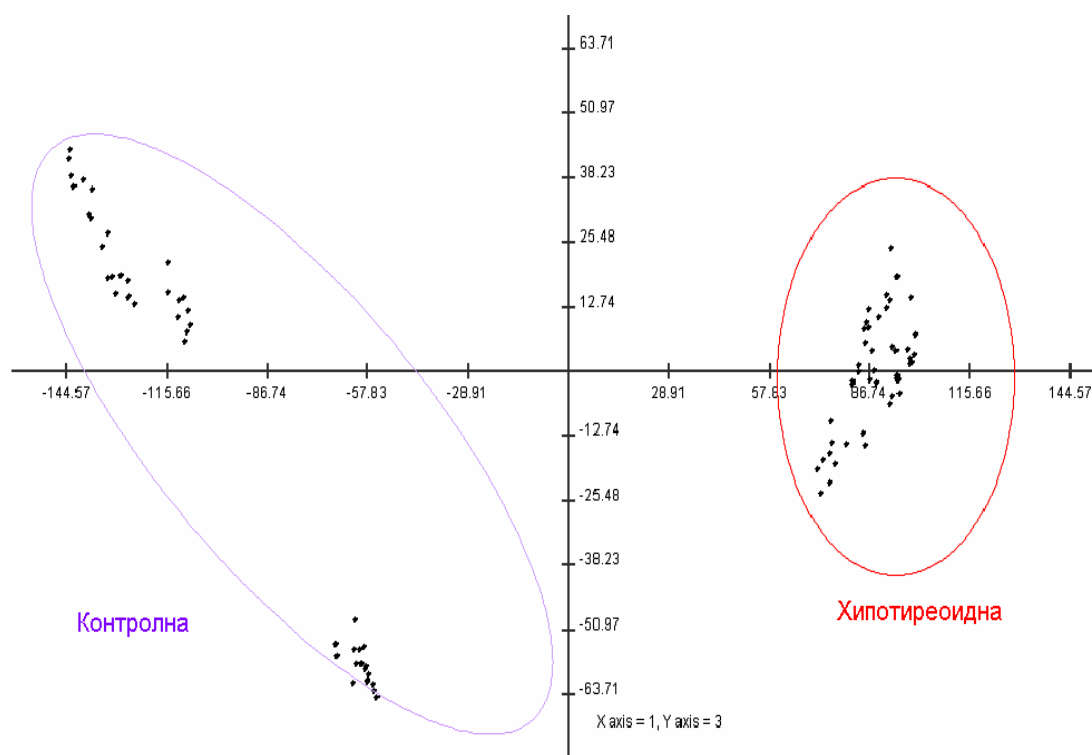
Интерес представлява и двуизмерното изображение на резултатите от анализа на принципните компоненти (фигура 16). В него отново се откроява вътрегруповото раздалечаване по компоненти PC1 и PC3 в контролната група, докато при хипотиреоидната група сходствата и по трите принципни компонента са значителни. Това отново потвърждава предположението за намаляване на биологичната вариация при хипотиреоидните организми.



Фигура 15. Триизмерно изображение на резултатите от анализа на принципните компоненти. Точките представляват експериментално определен метаболитен профил.

2.3.2. Биологична интерпретация

При сравняване на метаболитния състав на чернодробна тъкан на контролна и хипотиреоидна групи Balb/cJ мишки бяха открити 14 значими метаболита, като по-голямата част от тях (10) са с по-ниски концентрации при хипотиреоидната група. Това води до предположението, че при хипотиреоидизъм метаболитната активност в черният дроб намалява. Резултатите имат два основни приноса. Първо, доказват, че метаболизмът на черния дроб силно се влияе от хипотиреоидизма и второ, анализираният набор от метаболити може да се използва за интегриран анализ на изучените метаболитни пътища и промените, настъпващи в черния дроб при хипофункция на щитовидната жлеза. По този начин могат да се идентифицират и свържат различни метаболитни изменения в чернодробната тъкан и да се открият нови насоки за изследването на ефекта на хипотиреоидизма върху тъканите.



Фигура 16. Двумерно представяне на резултатите от PCA по принципни компоненти PC1 и PC3.

Основен интерес представлява влиянието върху цикъла на трикарбоксилите киселини при намаляване количеството на метаболити, които са свързани с него (фиг. 17). Аспартовата, α -кетоглутаровата и глутамовата киселини са сред най-значимите (отрицателни) метаболити при сравнителния анализ на контролна и хипотиреоидна група. Според литературата, аспартовата киселина нормално е в равновесие с количеството оксалоцетна киселина в цикъла на трикарбоксилите киселини [11]. Намаляването на количествата на аспартова/ оксалоцетна киселина неминуемо се отразява негативно върху анаплевротичните реакции (запълване на запаса малат/оксалацетат) и на системата за пренос на електрони между ябълчената и аспартовата киселина [12].

Намаляването на α -кетоглутарова, глутамова киселина и аргинин показва още едно сериозно нарушение в цикъла на трикарбоксилите киселини. Това може да доведе до последствия като намаляване на γ -аминомаслена киселина (като следствие от намаляването на глутамовата киселина), която освен невромедиатор е и предшественик на естествените молекули с антиоксиданти свойства – карнозин и ансерин [13]. Намаленото количество аргинин пък е сигнал за слаб процес на фиксиране на азот (орнитинов цикъл), което води до хепатотоксични ефекти. При нарушен орнитинов цикъл се намалява и синтезът на полиамини [12]. Все още е трудно да се свърже повишеното количество метионин при хипотиреоидните организми с физиологична реакция. За метионина се знае, че е предшественик на S-аденозилметионин, който участва в метилирането на много молекули, сред които са и невромедиаторите [11]. Повишеното ниво на метионина също така е възможна реакция за компенсация в нарушенията на цикъла на трикарбоксилите киселини.

Намаленото количество левцин, може да се дължи на намаленото му усвояване от кръвоносните съдове, което да е породено от дискутираното вече намаляване на глутамовата киселина. Левцинът е донор на аминогрупи при синтеза на глутамова киселина [14]. Съвместното намаляване на нивата на глутамовата и аспартовата киселина е ясна предпоставка за намаляване на белтъчния синтез в хипотиреоидните организми.

ИЗВОДИ

1. Разработване на методология за пробоподготовка, приложима при количественото определяне на хормоните на щитовидната жлеза и други първични и вторични метаболити в чернодробна тъкан.

1.1 Разработена беше методика за хомогенизация и денатурация на биологична тъкан, като модификацията на рН, нужна за екстракция на Т3 и Т4, беше извършена след хомогенизацията. Количеството използван разтворител също беше оптимизирано след серия експерименти.

1.2 Разработена беше цялостна методология за екстракция на хормони на щитовидната жлеза и други метаболити от чернодробна тъкан за целите на хроматографски анализ с маспектрометрична детекция. След първоначалната екстракция беше извършена повторна двуетапна екстракция с различни разтворители (амониев хидроксид и метанол).

1.3. Бяха избрани и валидирани два вътрешни стандарта за количествено определяне на максимален брой анализи – теофилин и норлевцин. В проведените с цел валидиране експерименти, стандартите демонстрираха идентично поведение спрямо Т3 и Т4. Построени бяха и калибрационни криви, съобразени с нивата на хормоните на щитовидната жлеза в тъкани.

2. Разработване на методология за метаболитен анализ на екстракти от тъкани с LC-MS

1. Беше разработена и оптимизирана процедура за обратно фазово хроматографско разделяне на набора от екстрахираните от чернодробна тъкан метаболити, чрез елуиране от смесен тип и добавка на трифлуороцетна киселина към елуентите.

2. Бяха подбрани и оптимизирани настройките на йонизационния източник и маснализатора с цел максимална чувствителност спрямо Т3 и Т4 и възпроизводимостта на сигналите им.

3. Валидиране и прилагане на разработената методология.

1. Развитата аналитична процедура беше приложена за анализ на серия екстракти от чернодробна тъкан на контролни и хипотиреоидни Balb/cJ мъжки мишки. В резултат на това бяха регистрирани 34 аналитични пика, като 22 от бяха идентифицирани със собствена библиотека. Бяха изчислени относителните стандартни отклонения на нормализираните площи на пиковите (спрямо вътрешните стандарти). Резултатите показват отлична възпроизводимост на всички регистрирани пикове спрямо двата стандарта.

2. Извършено беше количествено определяне на T3 в контролните и на T4 в контролните и хипотиреоидните проби.

3. Чрез статистически методи бяха определени значимите пикове от резултатите (10 положителни и 4 отрицателни). На базата на известни метаболитни пътища беше установено, че в хипотиреоидния организъм на молекулярно ниво се наблюдават следните аномалии:

- цикълът на трикарбоксилите киселини в черния дроб е сериозно нарушен и се регистрира спад в нивата на участващите в него метаболити и техни междинни продукти;
- засегнато е обезвреждането на азот и синтеза на естествени антиоксиданти;
- регистриран е спад и в количеството невромедиатори;
- има увеличение при метаболитите, свързани с обмяната на аминокиселини и мастни киселини.

ПРИНОСИ И БЪДЕЩИ НАСОКИ

1. Беше разработена методология за екстракция на хормони на щитовидната жлеза от черен дроб. Методологията е приложима и при екстракция на други тъкани и вече беше приложена за метаболитен анализ на мозъчна кора.
2. Беше разработен бърз хроматографски метод за количествено определяне на хормони на щитовидната жлеза, аминокиселини и други нискомолекулярни метаболити. Методът може да бъде прилаган за изследователски цели и клинични анализи на тъканни проби.
3. Бяха проследени 34 аналитични сигнала и бяха идентифицирани 22 метаболита, повечето от които хидрофилни. Предстои изследване на хидрофобните аналити, които се елуират в края на хроматографския градиент.
4. Установено беше, че хипотиреоидизма засяга цикъла на трикарбоксилите киселини в черния дроб. В настоящия труд са изказани хипотези за промените в синтеза на аминокиселини и мастни киселини, които ще бъдат допълнително изследвани в бъдеще.
5. Беше направена хипотеза за нарушенията в белтъчния синтез поради намаленото количество левцин и аспартова киселина, което създава предпоставки за по-нататъшен белтъчен анализ.

ЦИТИРАНА ЛИТЕРАТУРА

1. Hendrich C.E., Berdecia-Rodriguez J., Wiedmeier V.T., Porterfield S.P., 1992, **Method for the quantitation of iodothyronines in body tissues and fluids using high-performance liquid chromatography** *Journal of Chromatography*, 577:19-24
2. Goli K, Rojas O., Özçam A, Genzer J, 2012, **Generation of Functional Coatings on Hydrophobic Surfaces through Deposition of Denatured Proteins Followed by Grafting from Polymerization**, *Biomacromolecules*, 2012, 13 (5):1371–1382
3. Porterfield S., Hendrich C., 1992, **Tissue Iodothyronine Levels in Fetuses of Control and Hypothyroid Rats at 13 and 16 Days Gestation**, *Endocrinology* 131:195-200
4. Mikes O., 1988, **High-performance Liquid Chromatography of Biopolymers and Biooligomers: Principles, materials, and techniques**, *Elsevier*
5. Lanfranco S . Conte Moret S. Purcaro G. 2010 **Handbook of HPLC, Second Edition**, *CRC Press*
6. Snyder L., Dolan J. 2007 **High-Performance Gradient Elution: The Practical Application of the Linear-Solvent-Strength Model**, *John Wiley & Sons*
7. Freake, H. C.; Schwartz, H. L.; Oppenheimer, J. H. 1989, **The regulation of lipogenesis by thyroid hormone and its contribution to thermogenesis**. *Endocrinology*, 125, 2868–2874.
8. Butovich I., Arciniega J, Lu H, Molai M, 2012, **Evaluation and quantitation of intact wax esters of human meibum by gas-liquid chromatography-ion trap mass spectrometry**, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* :9333
9. Dimitrios J . Fletouris and Nikolaos A, 2000, **Botsoglou, Pharmacology: Food Safety, and Analysis In: Drug Residues in Foods**, *CRC Press*
10. Saad B, Maurel D., 2004, **Reciprocal Interaction Between Seasonal Testis and Thyroid Activity in Zembra Island Wild Rabbits (*Oryctolagus cuniculus*): Effects of Castration, Thyroidectomy, Temperature, and Photoperiod**, *Biology of Reproduction* 70:1001–1009
11. Siegel, G. J., Albers, R. W., Brady, S. T., Price, D. L., Eds., 2006 **Basic Neurochemistry, 7th ed.**; Elsevier Academic Press: Canada,
12. Gilad, G. M.; Wollam, Y.; Iaina, A.; Rabey, J. M., 1996 **Chernihovsky, T.; Gilad, V. H. Metabolism of agmatine into urea but not into nitric oxide in rat brain**. *NeuroReport*, 7, 1730–1732.
13. Min, J.; Senut, M. C.; Rajanikant, K.; Greenberg, E.; Bandagi, R.; Zemke, D.; Mousa, A.; Kassab, M.; Farooq, M. U.; Gupta, R.; Majid, A., 2008, **Differential neuroprotective effects of carnosine, anserine, and N-acetyl carnosine against permanent focal ischemia**. *J. Neurosci. Res.* 86, 2984–2991.
14. Kanamori, K.; Ross, B. D.; Kondrat, R. W., 2002, **Rate of Glutamate Synthesis from Leucine in Rat Brain Measured In Vivo by ^{17}N NMR**. *J. Neurochem.*, 70, 1304–1315
15. Iossa S, Barletta A, Liverini G., 1991, **The effect of thyroid state and cold exposure on rat liver oxidative phosphorylation.**, *Mol Cell Endocrinol.* 75(1):15-8.
16. Pucci E, Chiovato L, Pinchera A., 2000, **Thyroid and lipid metabolism**, *Int J Obes Relat Metab Disord.* 24 (2):S109-12.

Резултатите представени в настоящата дисертация

са обобщени в следните публикации в международни и национални специализирани списания:

1. **Kl. Zanolv**, L. Yotova and M. Klapa LC-MS, Quantification of Thyroid Hormones, Their Metabolites, Amino Acids and Neurotransmitters in Liver Tissue, **Kl. Zanolv**, L. Yotova and M. Klapa, Biotechnology & Biotechnological Equipment (IF – 0.76), Volume 23, Number 2, 2009, 818-822
2. **Kliment Zanolv**, Lubov Yotova and Maria I. Klapa, Journal of liquid Chromatography High-throughput metabolomic analysis of thyroid hormone action in tissues using Liquid Chromatography-Mass Spectrometry, **Kliment Zanolv**, Lubov Yotova and Maria I. Klapa, Journal of liquid Chromatography (IF – 3.84), in press, July 2011.
3. **Kl. Zanolv**, L. Yotova and M. Klapa, Quantification of Underivatized Amino Acids in Mammalian Tissue Using Liquid Chromatography-Mass Spectrometry, Journal of chromatographical science (IF – 1.07), Oxford Press. In press, August 2012, manuscript ID is JCS-12-407

и са представени на международни конференции и симпозиуми:

1. **Kliment Zanolv**, Examination of chromatographic conditions for the purpose of LC-MS analysis of PTC-amino acids, 20th Anniversary of MESBL, 18 December 2007, Patras, Greece;
2. **Kl. Zanolv**, L. Yotova and M. Klapa, LC-MS Quantification of Thyroid Hormones, Their Metabolites, Amino Acids and Neurotransmitters in Liver Tissue, May 2008, Sofia University.
3. **Kliment Zanolv**, Lubov Yotova and Maria I. Klapa. Development of metabolomic protocol for tissue analysis of thyroid hormones and their metabolites using Liquid Chromatography-Mass Spectrometry, 8th Panhellenic Conference of Clinical Chemistry, Patra, Greece, October 2-3, 2009 ;
4. **Kl. Zanolv**, L. Yotova and M. Klapa Developing experimental protocol for tissue analysis of thyroid hormones and their metabolites using Liquid Chromatography-Mass Spectrometry, 34th FEBS Congress, July 4-9, 2009, Prague Czech Republic;
5. **Kl. Zanolv**, L. Yotova and M. Klapa, Quantification of Underivatized Amino Acids in Mammalian Tissue Using Liquid Chromatography-Mass Spectrometry, VIIth scientific poster session, University of chemical technology and metallurgy, 19 May 2010, poster presentation, Sofia;