



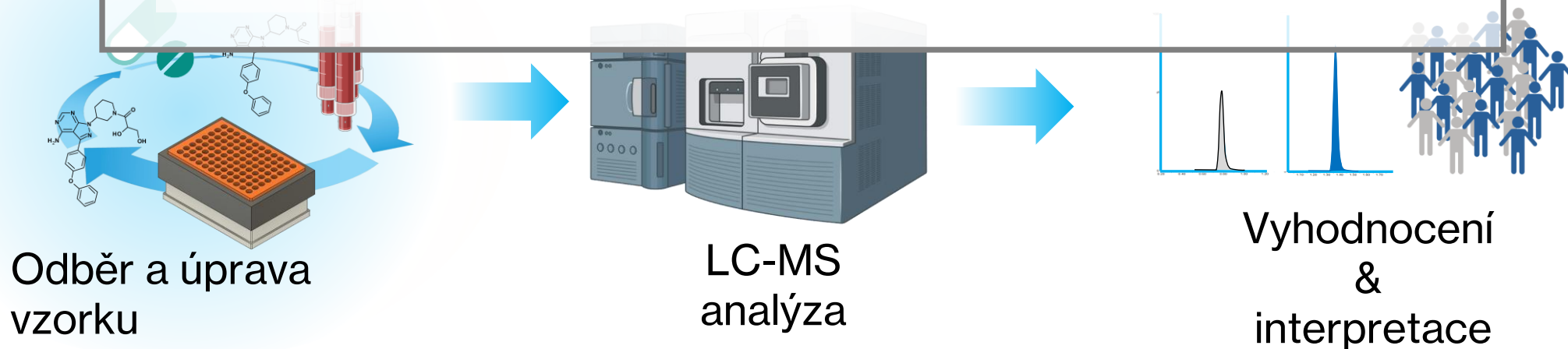
Separační techniky v medicině

KAPALINOVÁ
CHROMATOGRAPHIE
HMOTNOSTNÍ
SPEKTROMETRIE

Úvod

- Terapeutické monitorování léčiv (Therapeutic Drug Monitoring :: TDM)
- Diagnostika vrozených poruch metabolismu
- Toxikologický screening
- Metabolon

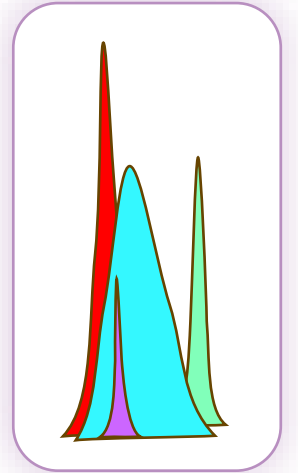
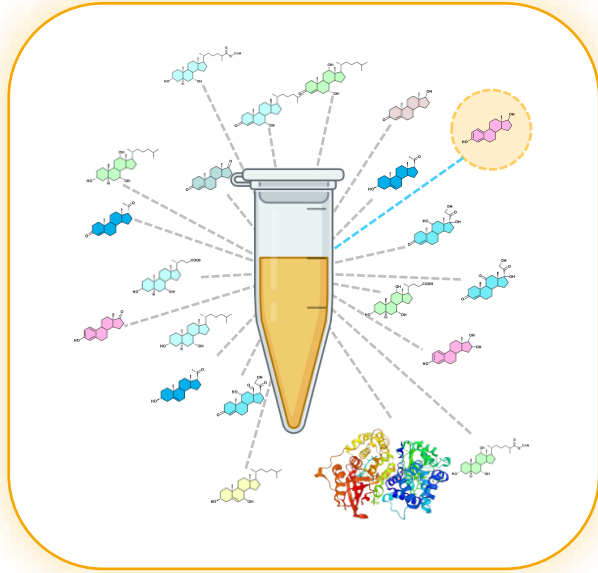
Kvantitativní a kvalitativní analýza látek v biologickém materiálu



Proč separace ?

Mnoho interferujících látek

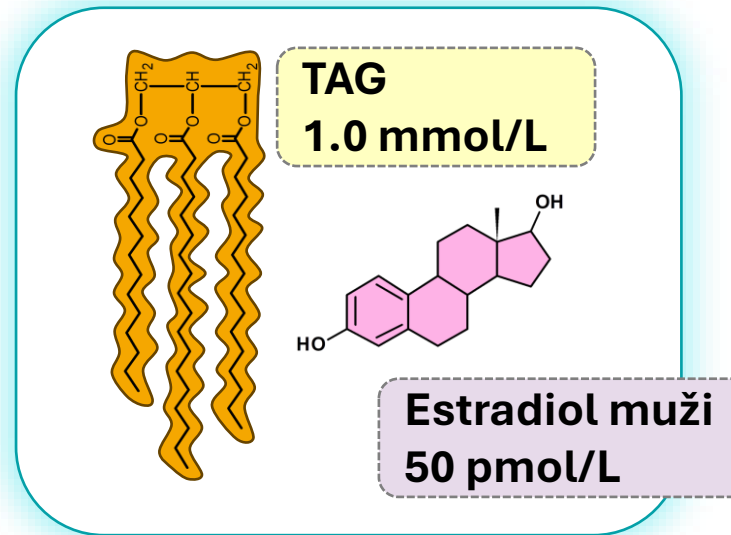
- Překryv signálů
- Matriční efekty



Komplexnost biol. vzorků

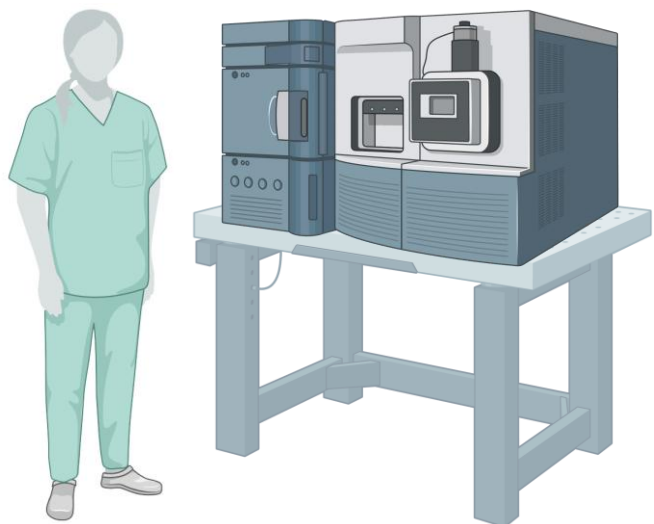
- tisíce látek
- velký rozsah M_r
- nízko i vysokomolekulární látky

**Mnohařádkové rozdíly
v koncentracích**



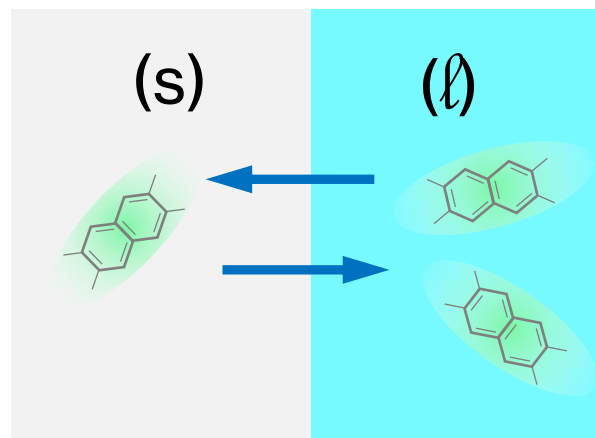
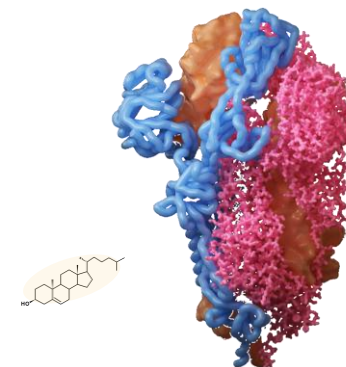
Pro spolehlivější a přesnější kvantifikaci, či identifikaci látek

Separace s využitím kapalinové chromatografie :: LC :: Liquid Chromatography



LC je nejběžnější chromatografická metoda v klinické laboratoři

Separace probíhá na základě rozdělování látek mezi dvě vzájemně nemísitelné fáze: (l)-(s), nebo (l)-(l)



Lze použít pro molekuly od nízkých až po vysoké M_r

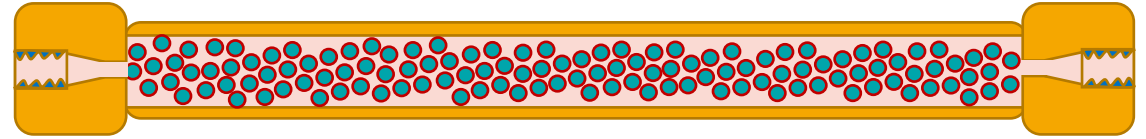
Stacionární a mobilní fáze v LC

**VŽDY 2 vzájemně
nemísitelné fáze !!!**

stacionární fáze je pevná

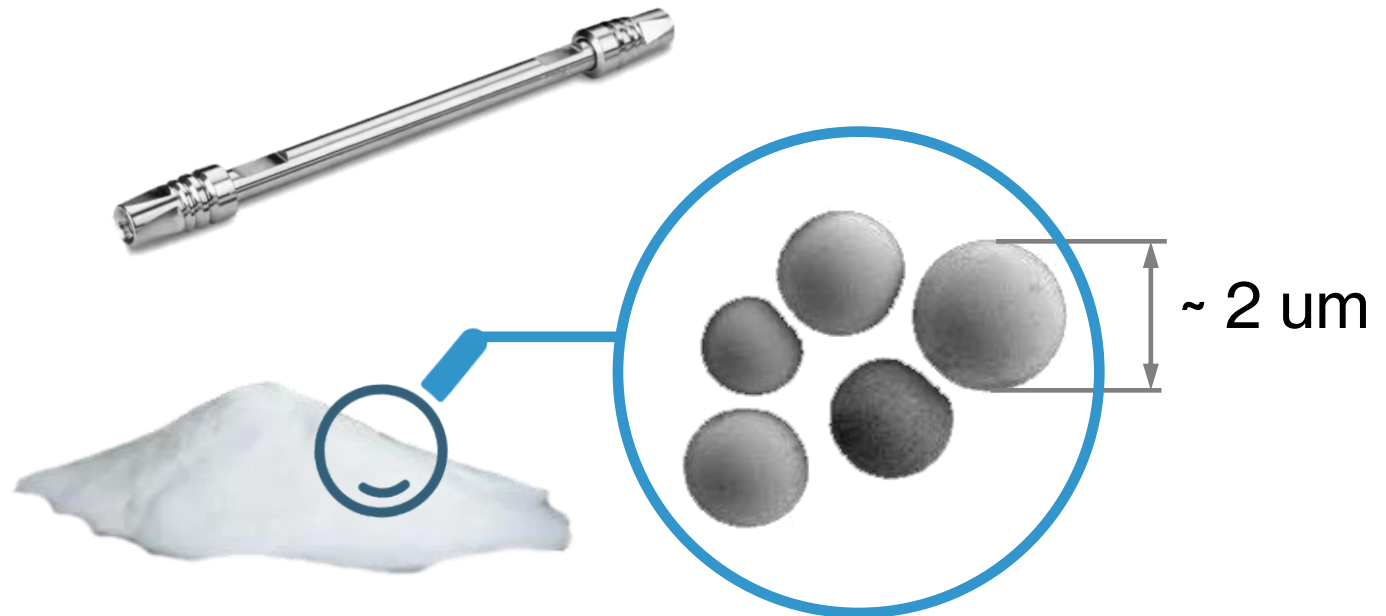
mobilní fáze je kapalná

Stacionární fáze



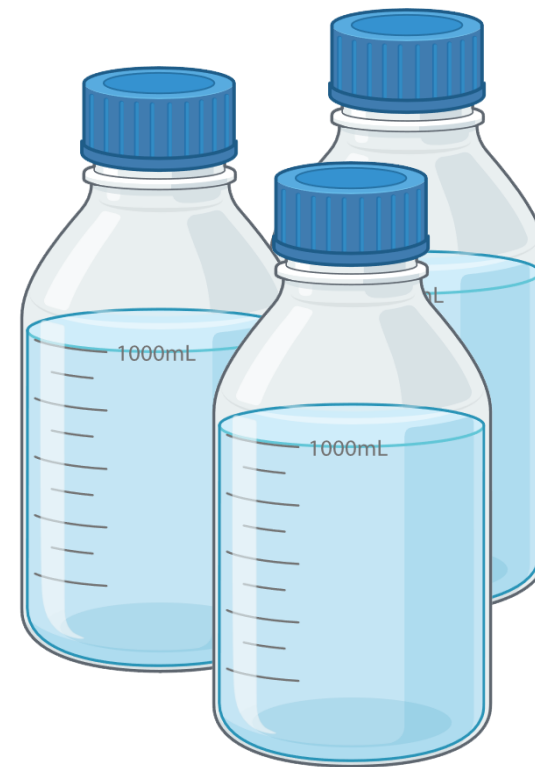
- **Stacionární fáze** :: plní se do chromatografických kolon
- **Kolona** :: nerezová trubice naplněná vhodným sorbentem
- **Sorbent** :: zpravidla porézní sférický na bázi silikagelu, často s chemicky modifikovaným povrchem

Sorbent zajišťuje interakci se separovanými látkami

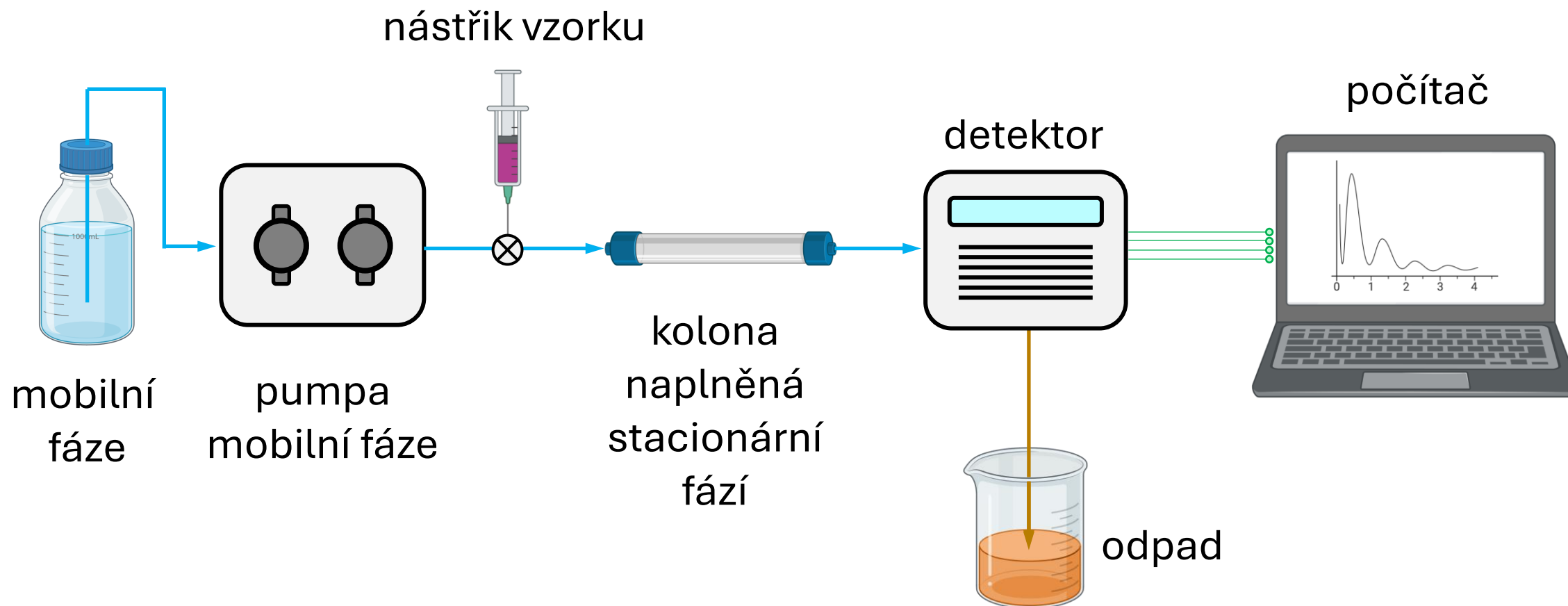


Mobilní fáze

- Mobilní fáze (MF) protéká (je pumpována) skrze kolonu
- Do jejího toku se nastříkuje vzorek určený k separaci
- Jednotlivé složky vzorku jsou unášeny přes kolonu, kde jsou rozděleny na základě svých fyz.-chem. vlastností
- MF zajišťuje interakci se separovanými látkami a unáší je chromatografickým systémem
- V bioanalýze většinou organická rozpouštědla mísitelná s vodou (methanol, acetonitril, izopropanol, + voda)



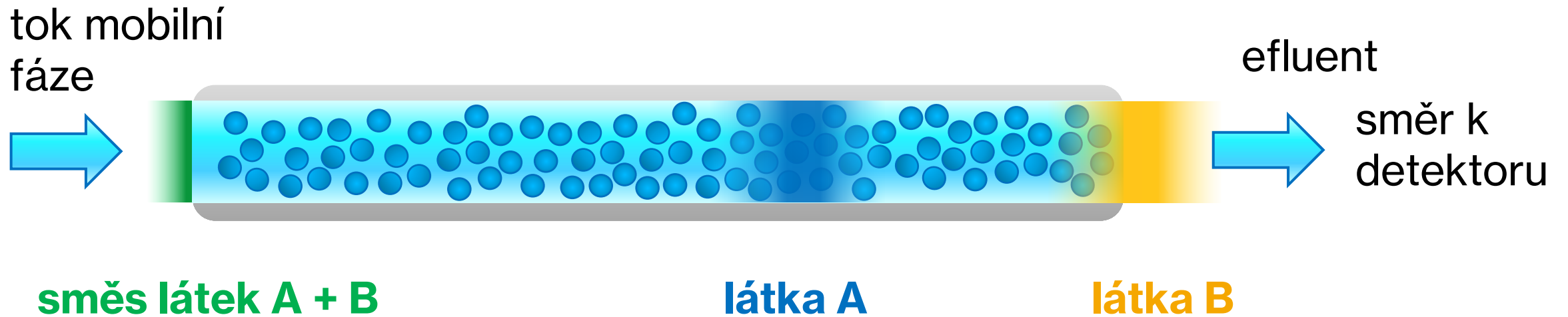
Základní schéma kapalinového chromatografu

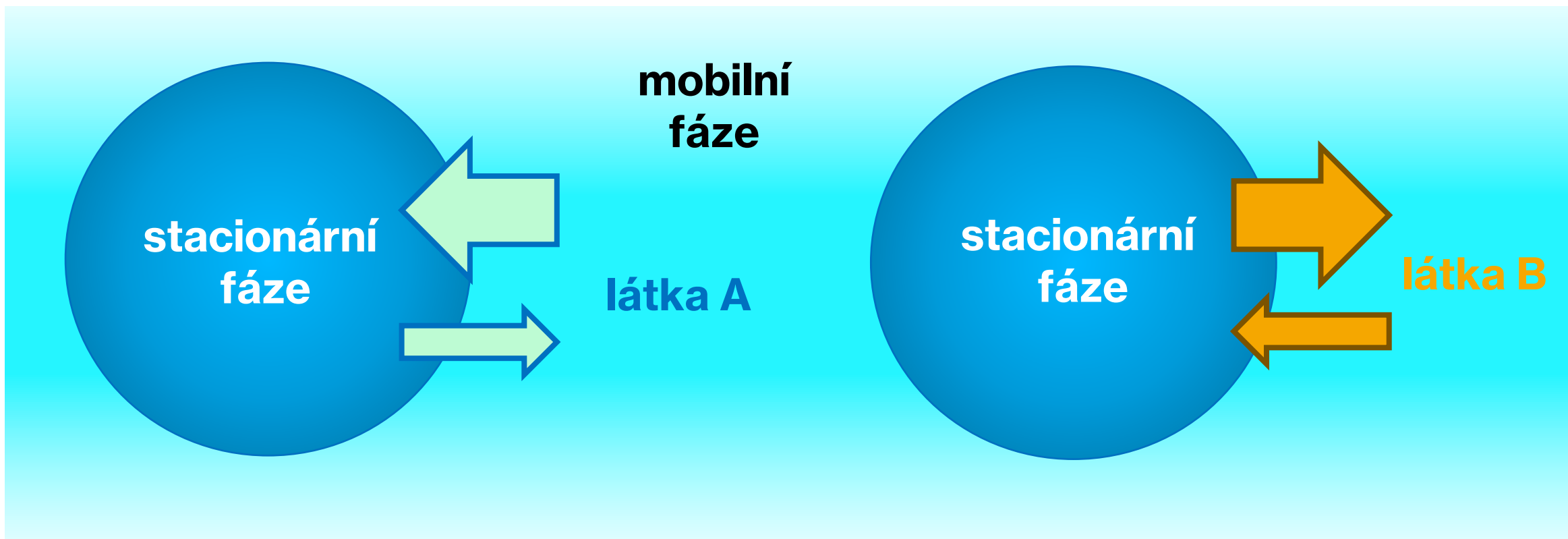
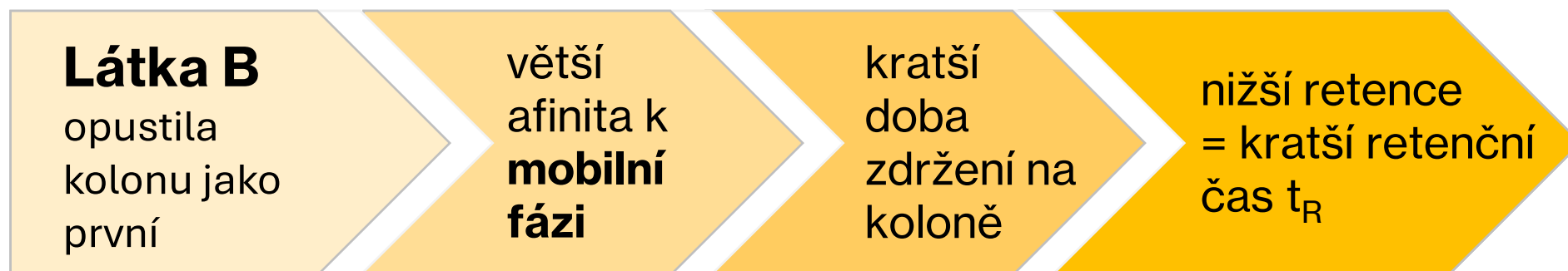


Jak vypadá chromatograf v reálném světě



Jak probíhá rozdělení - separace

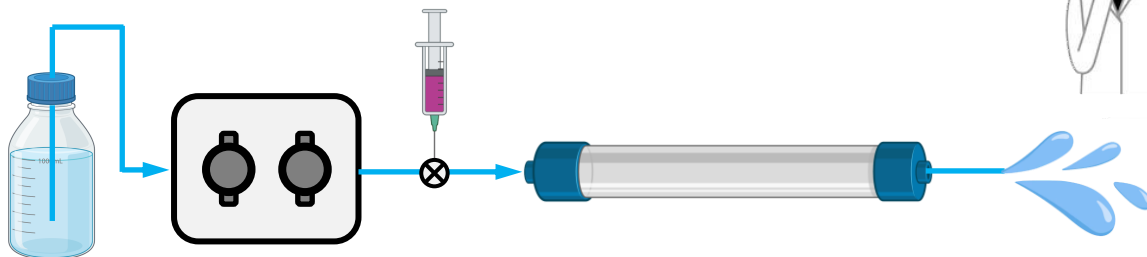
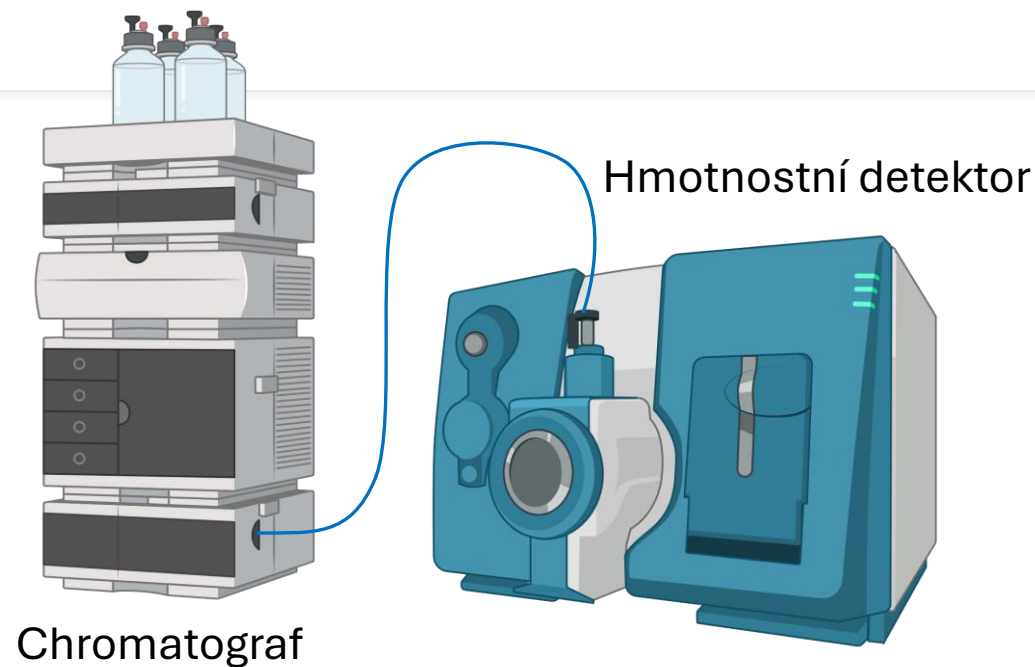




Detekce separovaných látek

Abychom byli schopni zjistit co nám po separaci opouští chromatograf, musíme mít možnost detekce látek v efluentu z kolony

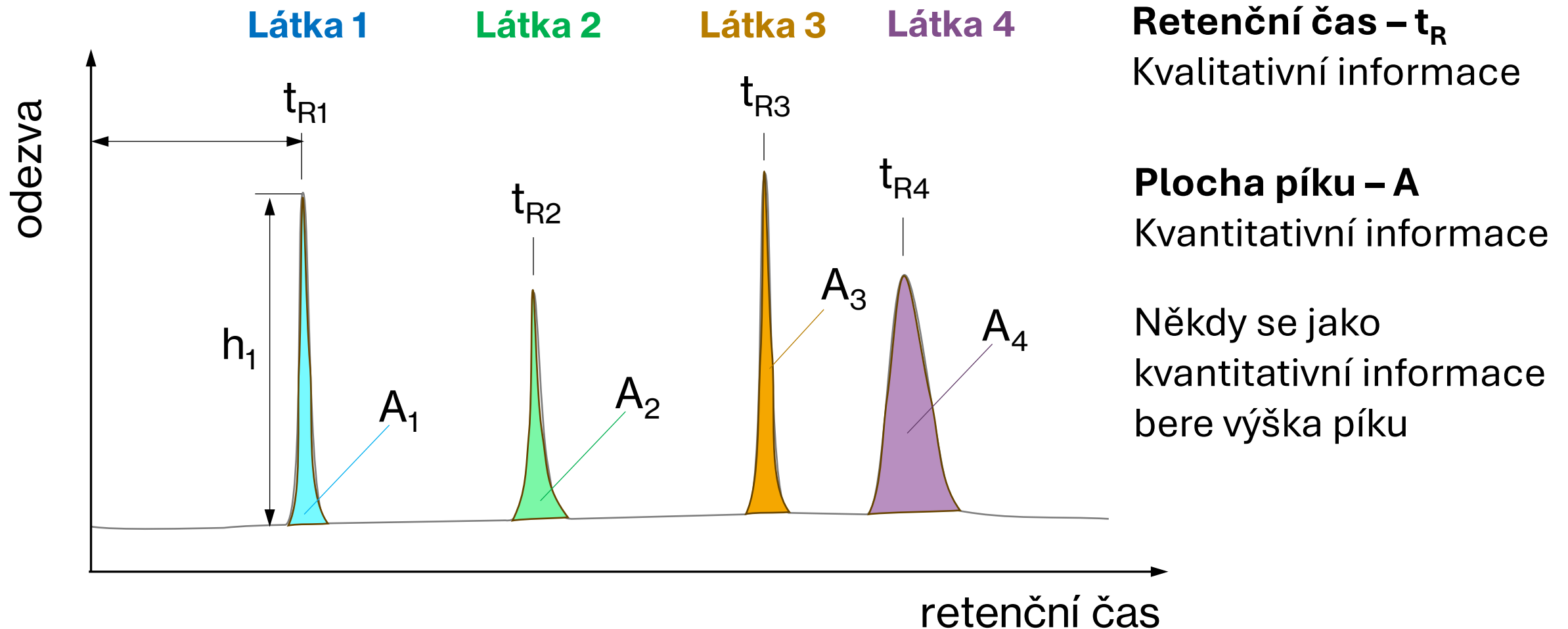
efluent = kapalina vytékající z kolony



Různé způsoby detekce:

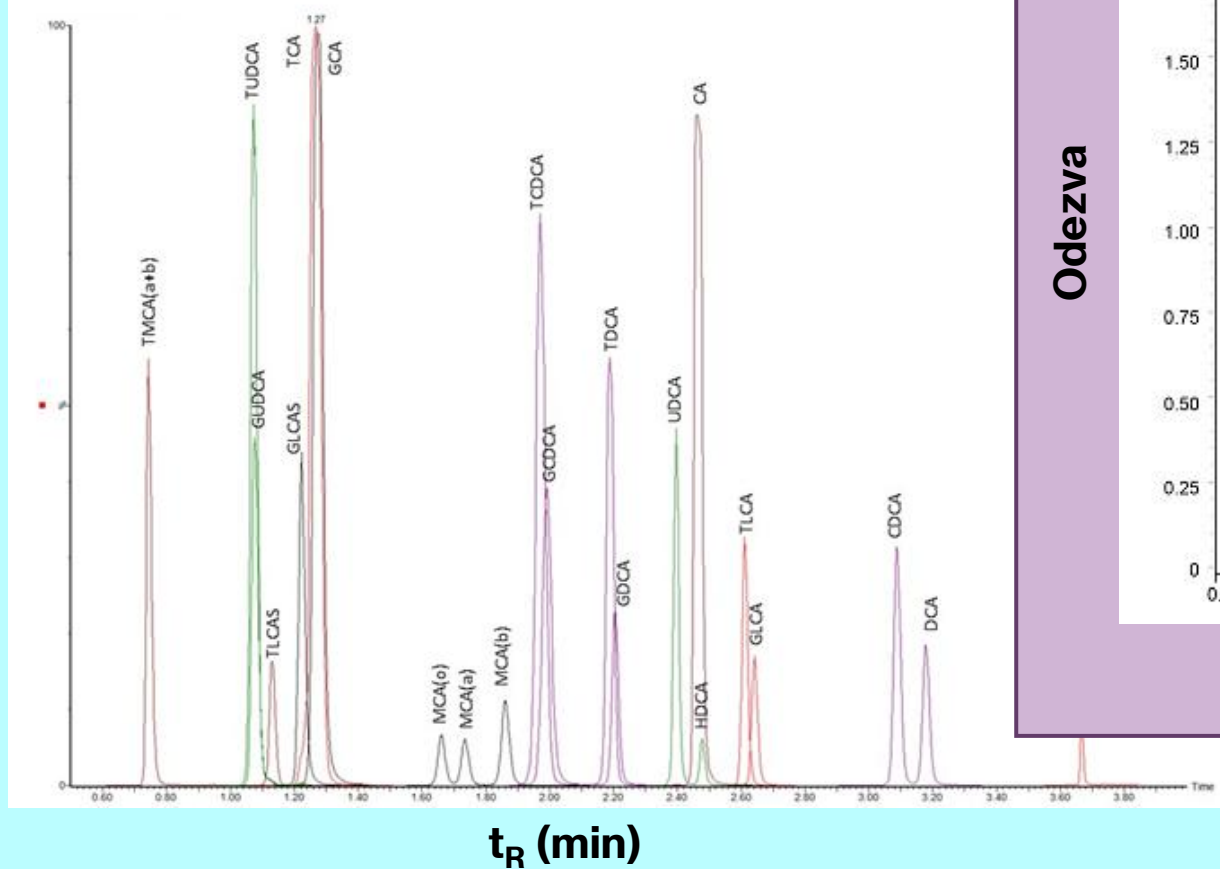
- Absorpce v UV/VIS
- Fluorescence
- **Hmotnostní detekce**

Chromatogram – záznam chromatografické separace z detektoru

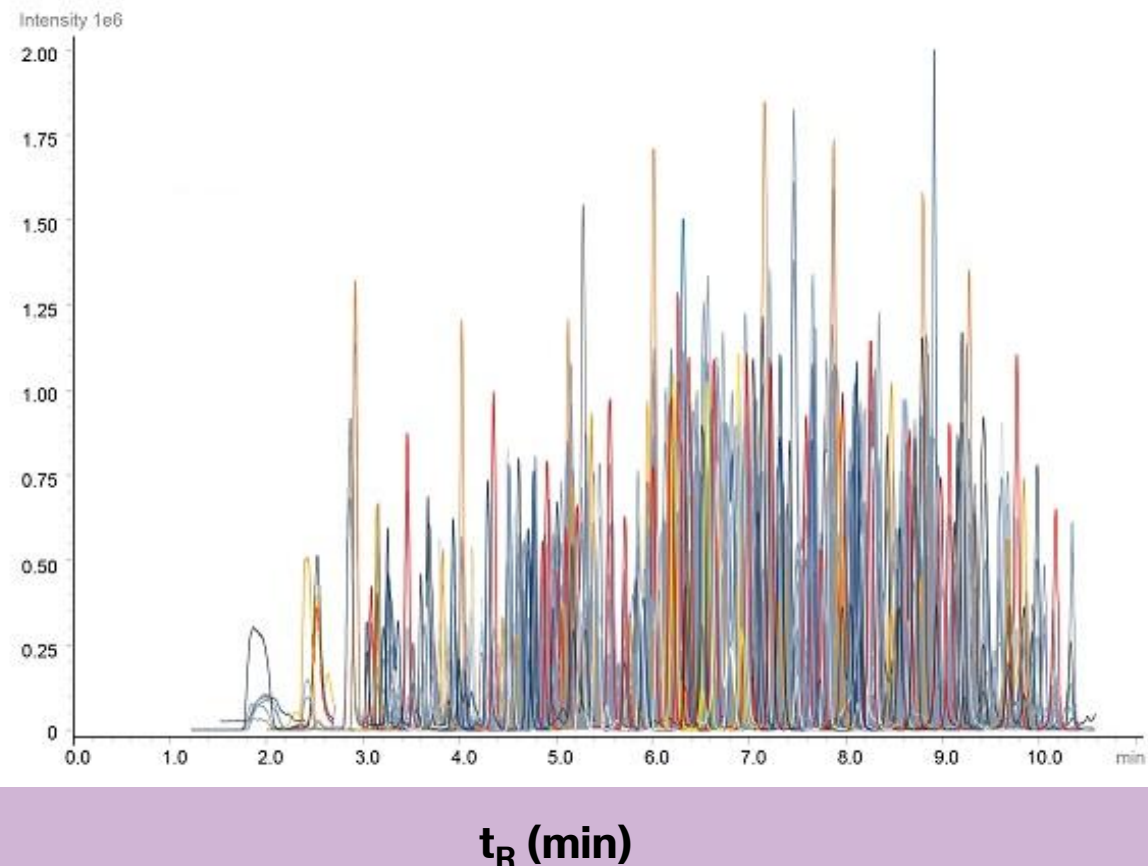


Ukázka reálného chromatogramu

Odezva



Odezva



Hmotnostní spektrometrie

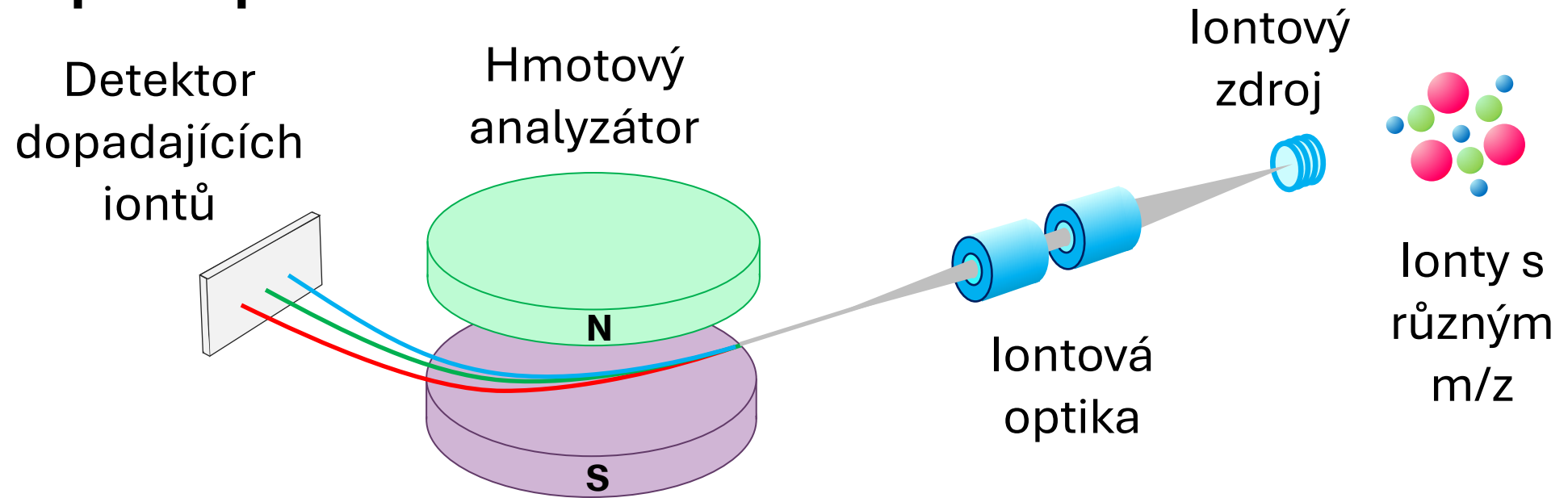
Hmotnostní spektrometrie umožňuje zjistit poměr hmoty/náboj (m/z) iontů pohybujících se v elektrickém, nebo magnetickém poli a jejich relativní množství.

Zkratka MS (**M**ass
Spectrometry)

Základní předpoklad pro detekci látky pomocí MS:

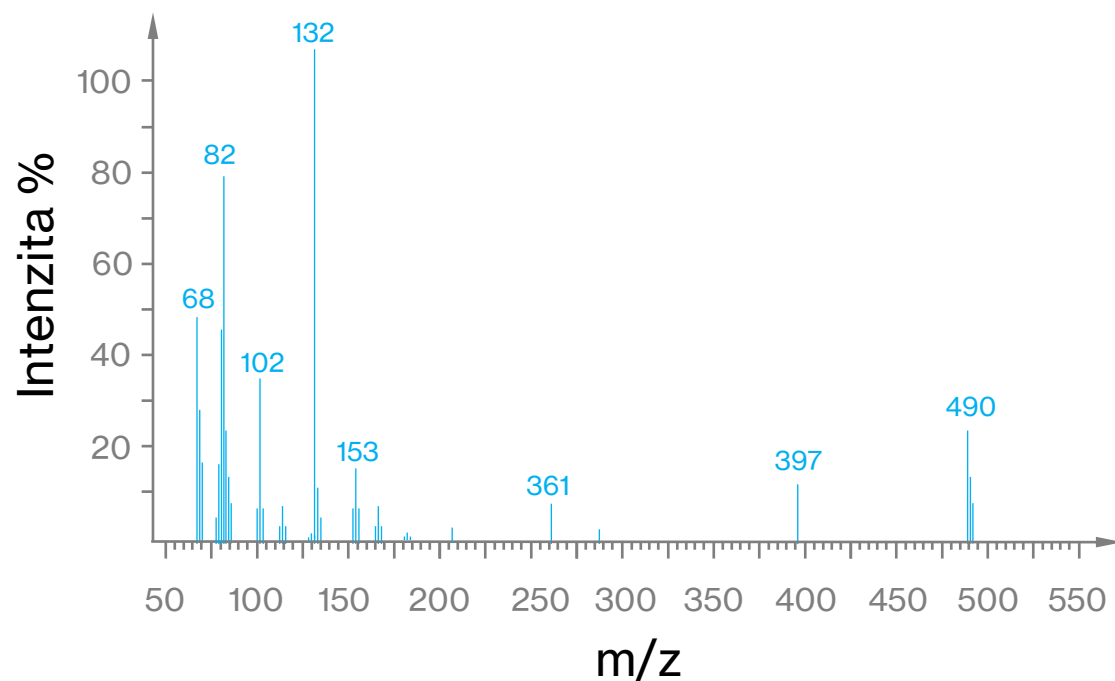
- **Analyt lze převést do plynné fáze**
- **Analyt se při převodu do plynné fáze nerozkládá**
- **Analyt je schopen tvořit ionty v plynné fázi**

Základní princip MS

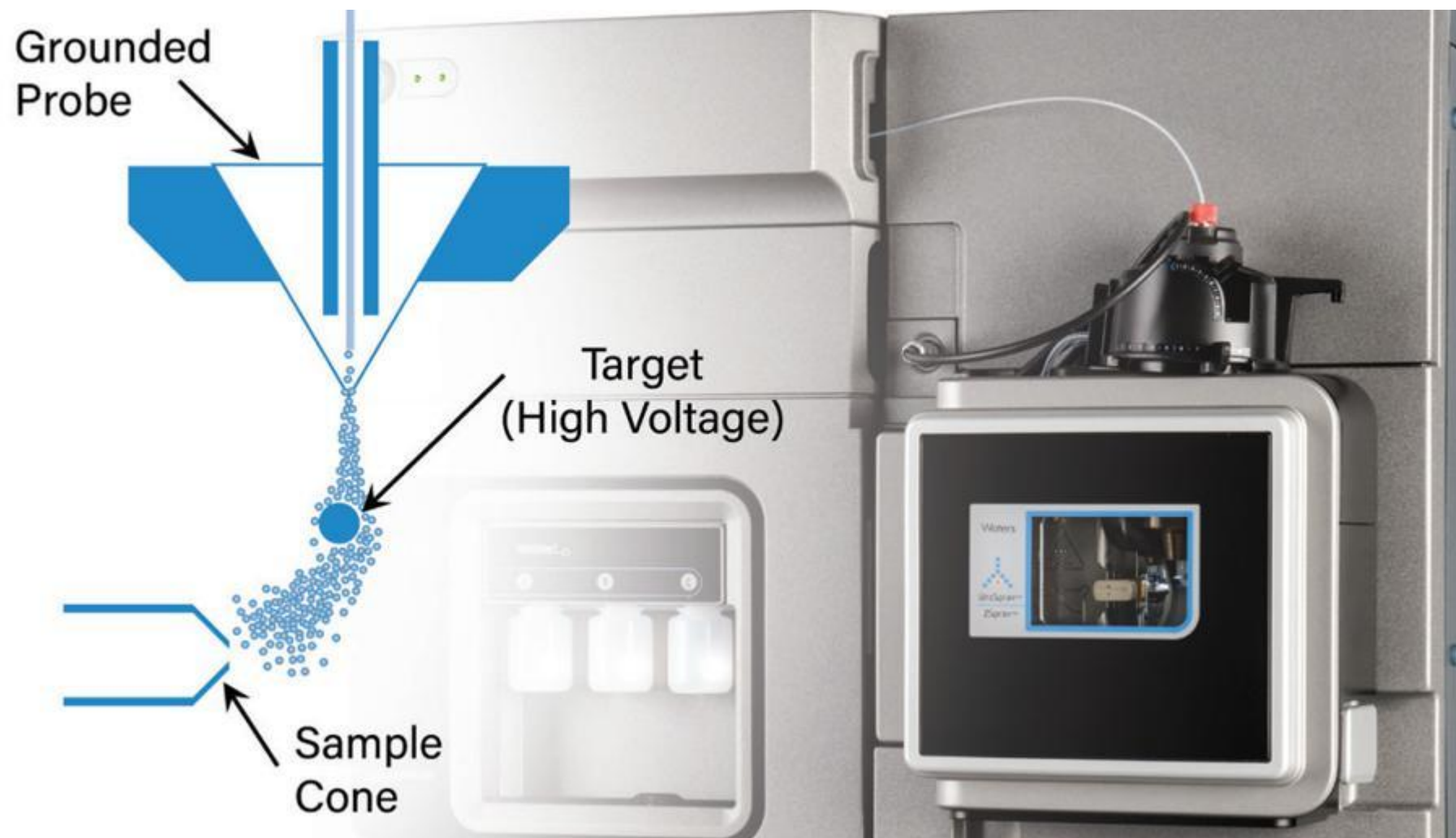


Hmotnostní spektrum

Záznam poměru m/z („hmoty“ iontu) vs. intenzita signálu



- Každý pík v hmotnostním spektru odpovídá iontu s určitou hodnotou m/z .
- Intenzita píků udává relativní počet těchto iontů zachycených detektorem.
- Ze spektra lze získat informace o struktuře a složení analyzované látky.



Výhody a nevýhody MS detekce

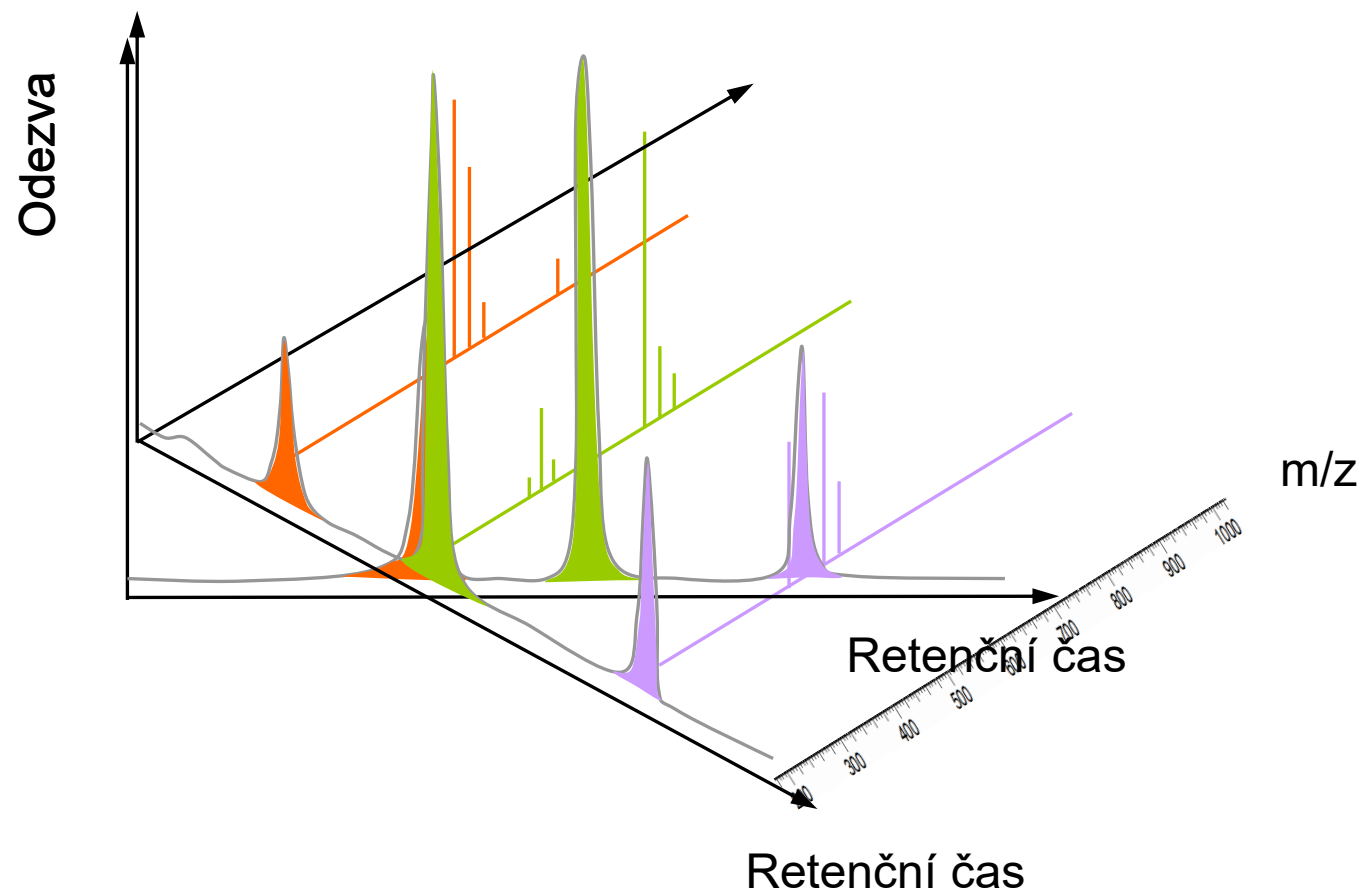
Výhody

- Vysoká selektivita
- Vysoká citlivost
- Možnost identifikace látek
- Univerzálnost - možnost analyzovat velmi širokou paletu látek

Nevýhody

- Extrémně drahá instrumentace
- Drahý provoz
- Nároky na odbornost personálu
- Náchylnost k matričním efektům
- Nižší stabilita odezvy

Jak vypadá záznam z LC-MS



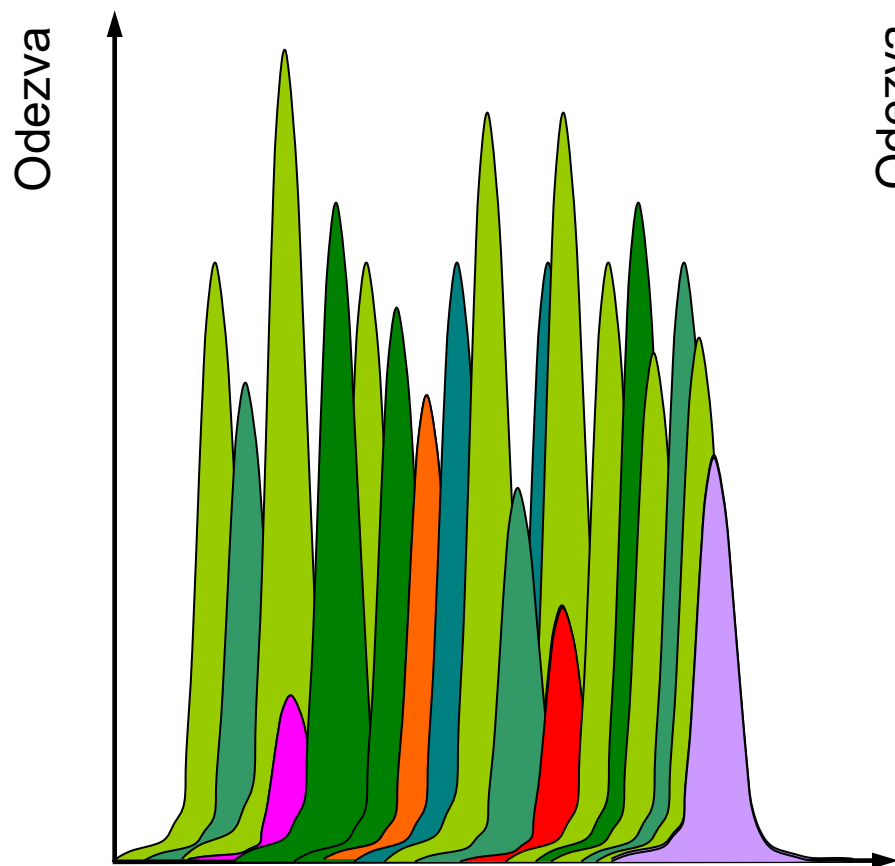
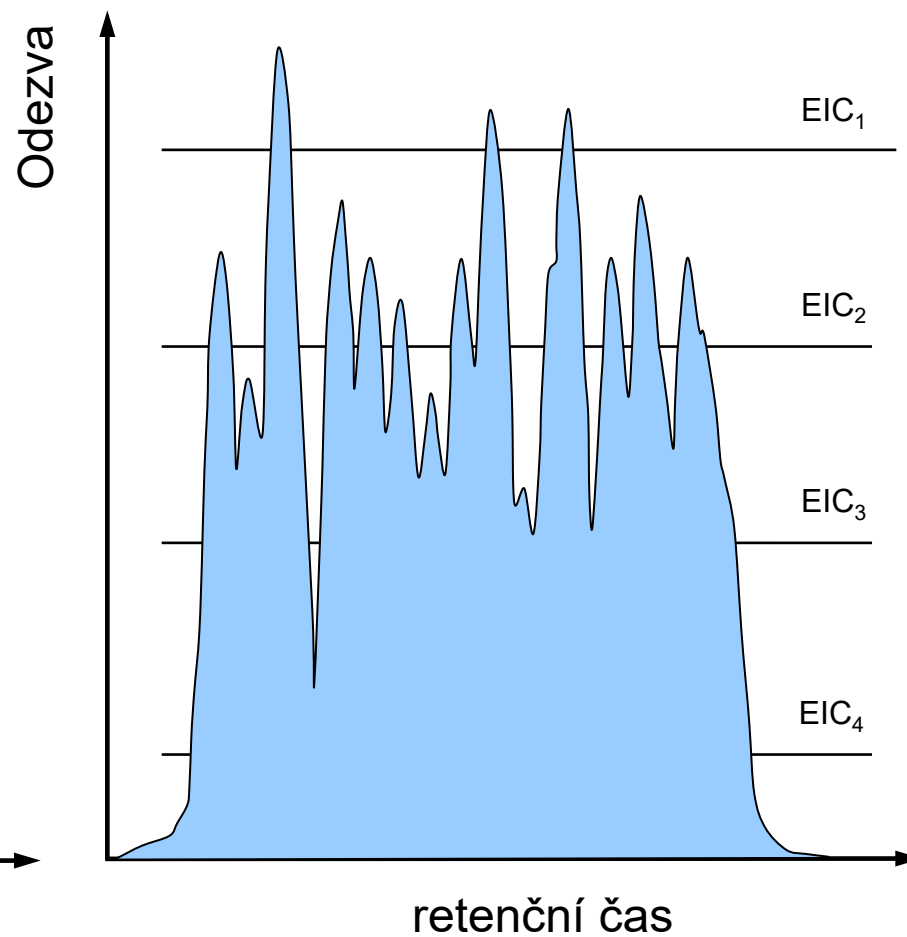
Výhody MS oproti klasickým detektorům

Lepší selektivita

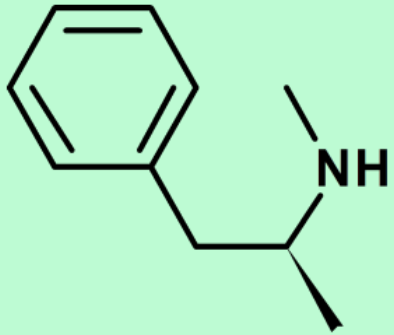
Vyšší citlivost

Usnadnění identifikace látek

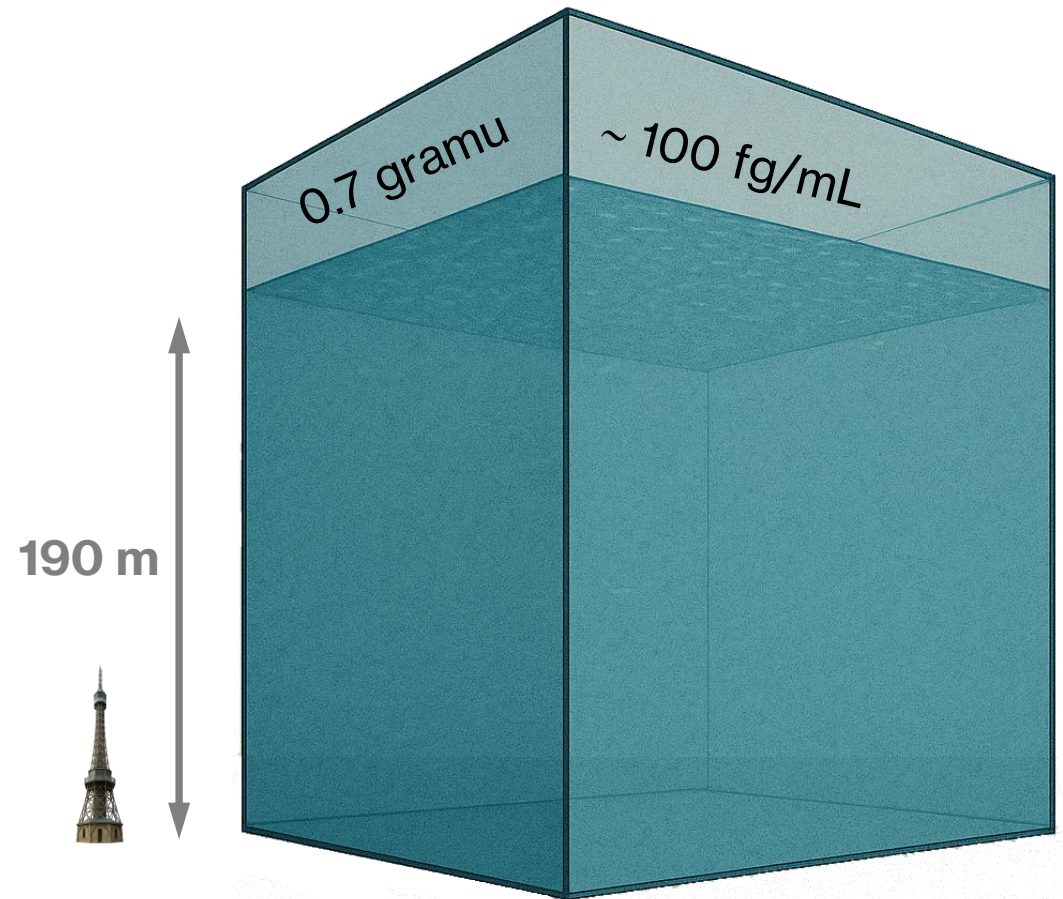
Selektivita stanovení



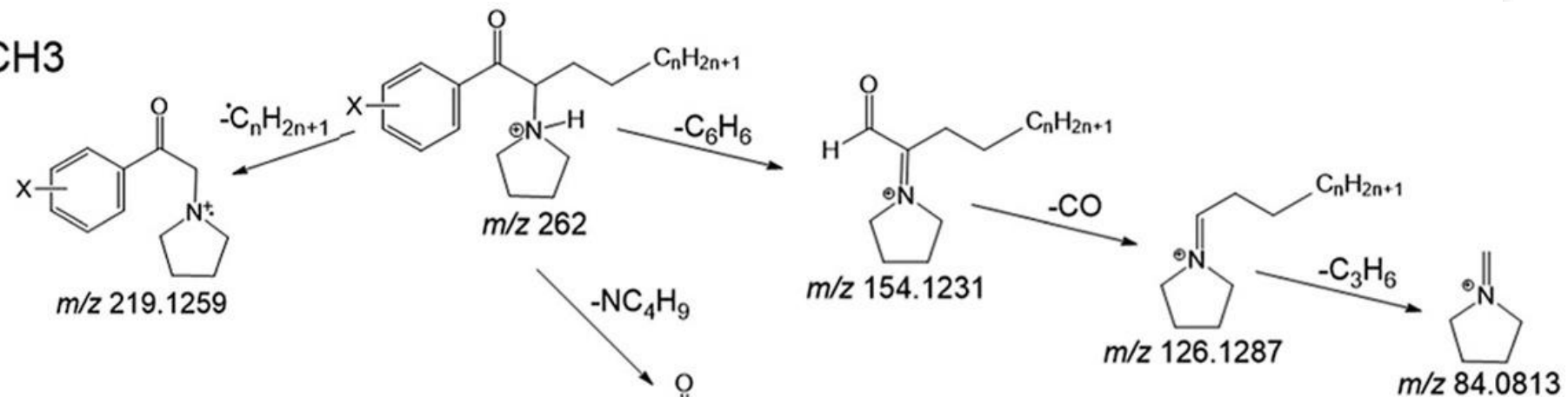
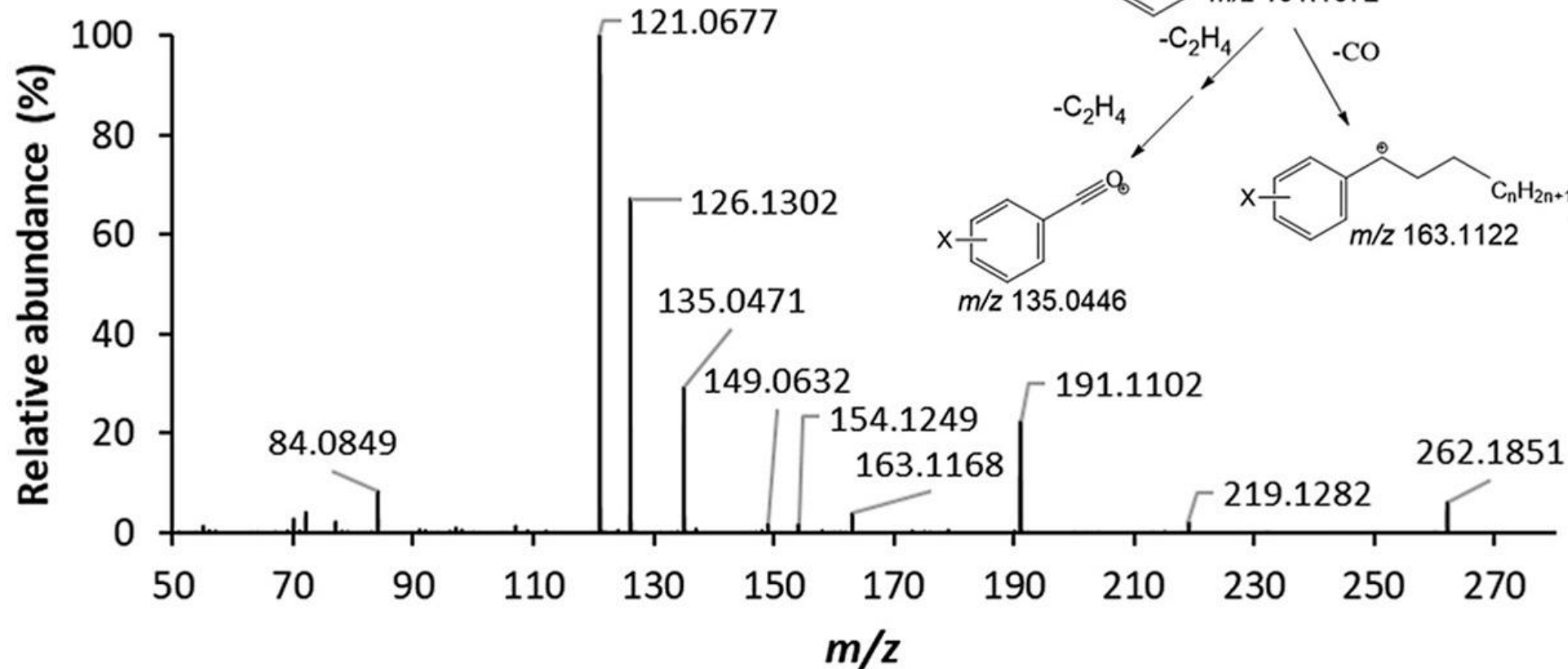
Citlivost



Metamphetamin



X = OCH₃



Co vše lze vyčíst z (HR)MS spektra

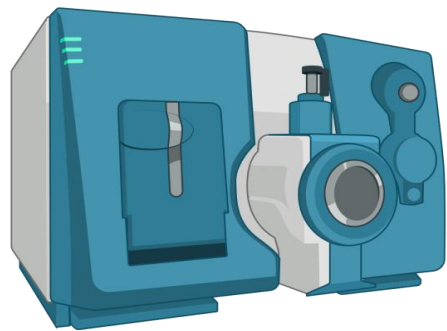
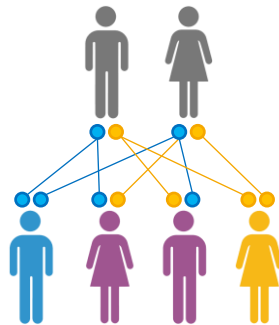
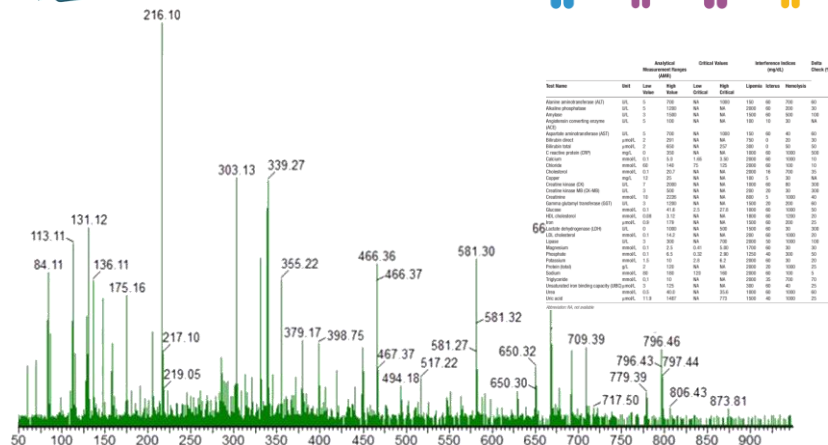
- **Monoisotopická hmota** → sumární vzorec sloučeniny, molekulová hmotnost
- **Tvar izotopického clusteru** → počet uhlíků, přítomnost Cl, Br, S
- **RDBE** :: Ring Double Bond Equivalent → minimální součet dvojných vazeb a kruhů v molekule
- **Fragmentační profil** → informace o struktuře

Klinické aplikace LC-MS na vybraných příkladech z praxe

- Novorozenecký screening dědičných metabolických poruch
- Personalizovaná farmakoterapie
 - ✓ Monitorování **farmakokinetiky** a terapeutických hladin
 - ✓ Stanovení **biomarkerů** účinnosti a toxicity léčby
 - ✓ Farmakogenomika v kombinaci s **fenotypizací**
- Toxikologický screening
- Omické metody pro hledání nových biochemických markerů



Novorozenecký screening dědičných metabolických poruch



- Oddělení klinické biochemie FN Olomouc :: prof. Friedecký
- Analýza ze suché kapky krve (**metoda DBS** : Dried Blood Spot)
- Odeběr mezi 48. a 72. hodinou života z
patičky novorozence
- Analýza metodou tandemové hmotnostní
spektrometrie

LOT

1234567 W123



Allow to dry for 15 minutes before closing cover

↑ Tuck Cover Here ↑

Name _____

Date of Birth (MM/DD/YYYY) _____

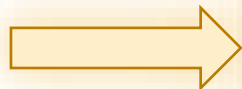
Date of Collection (MM/DD/YYYY) _____



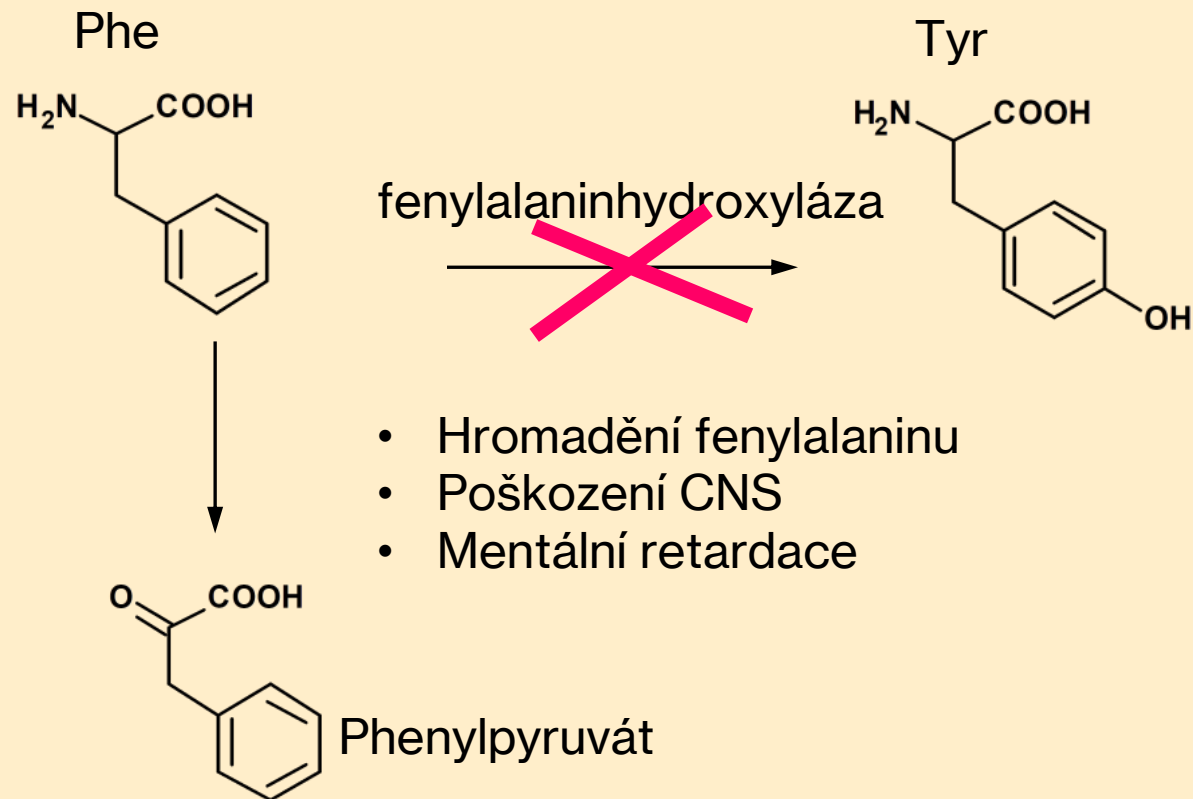
LC-MS se v ČR využívá pro plošný screening novorozenecký poruch metabolismu:

Aminokyselin

- Fenylketonurie
- Hyperfenylalaninémie
- Argininémie
- Citrulinémie typu I
- Leucinóza
- Homocystinurie
- Glutarová acidurie typ I
- Izovalerová acidurie



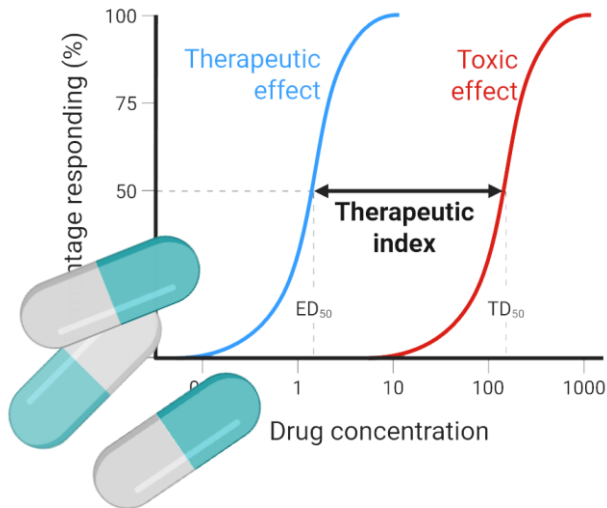
Fenylketonurie - autosomálně recesivní s frekvencí výskytu v ČR cca 1:6000





Personalizovaná farmakoterapie

Monitorování farmakokinetiky a terapeutických hladin



**Stanovení biomarkerů
onemocnění, účinnosti
a toxicity léčby**

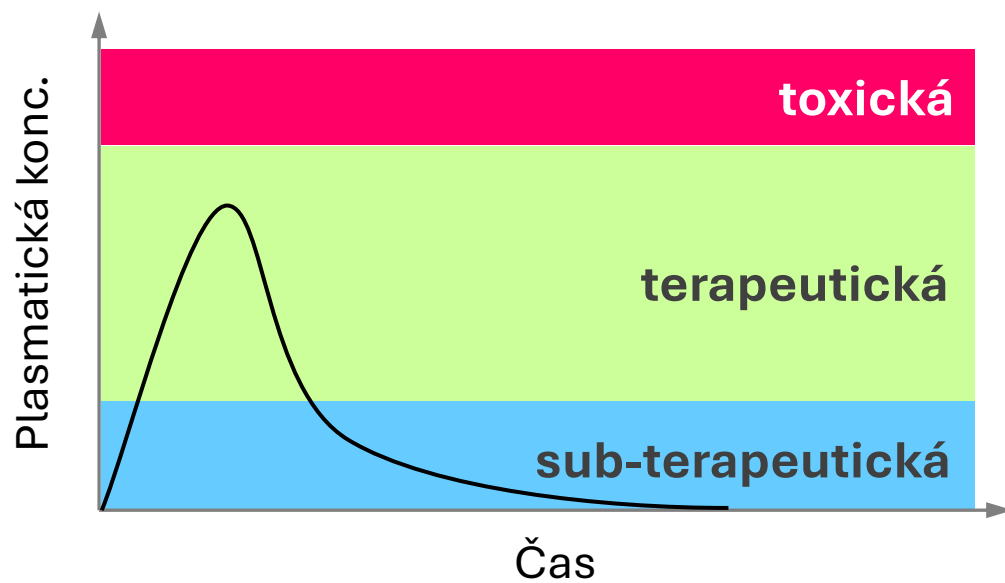
Farmakogenomika v kombinaci s fenotypizací



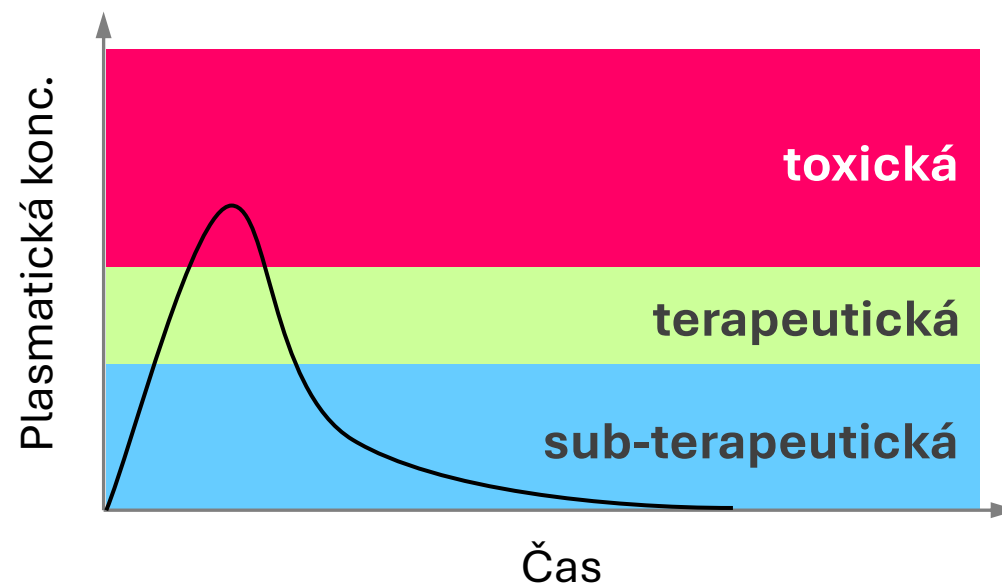
léčivo



Široké terapeutické okno



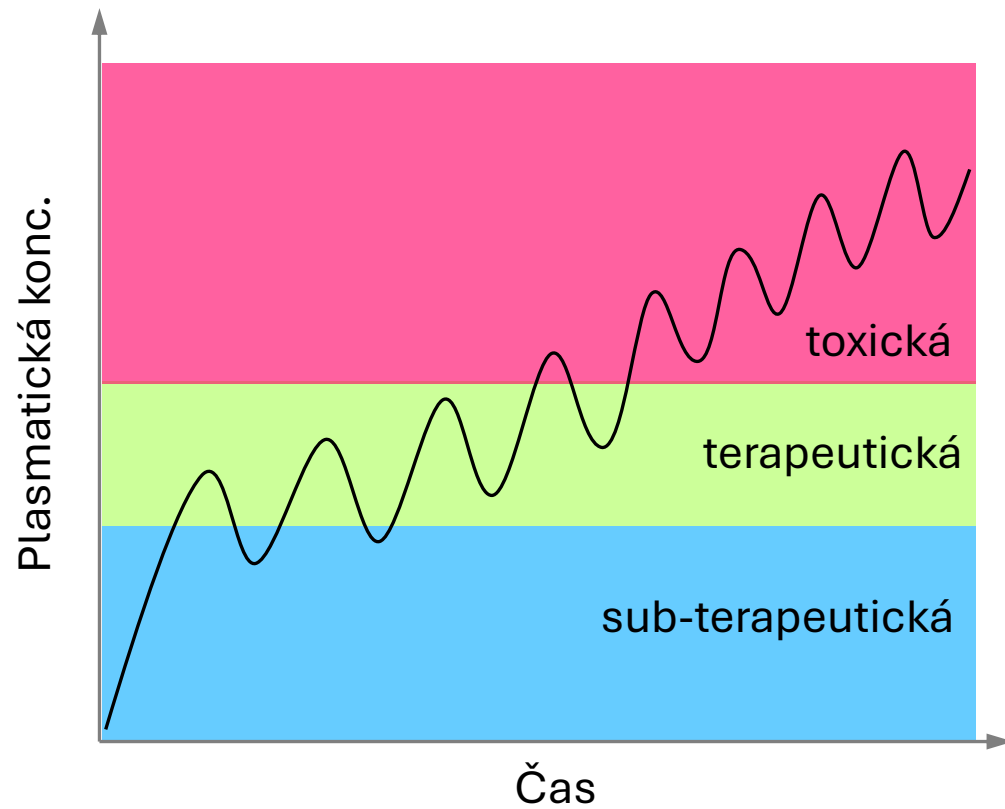
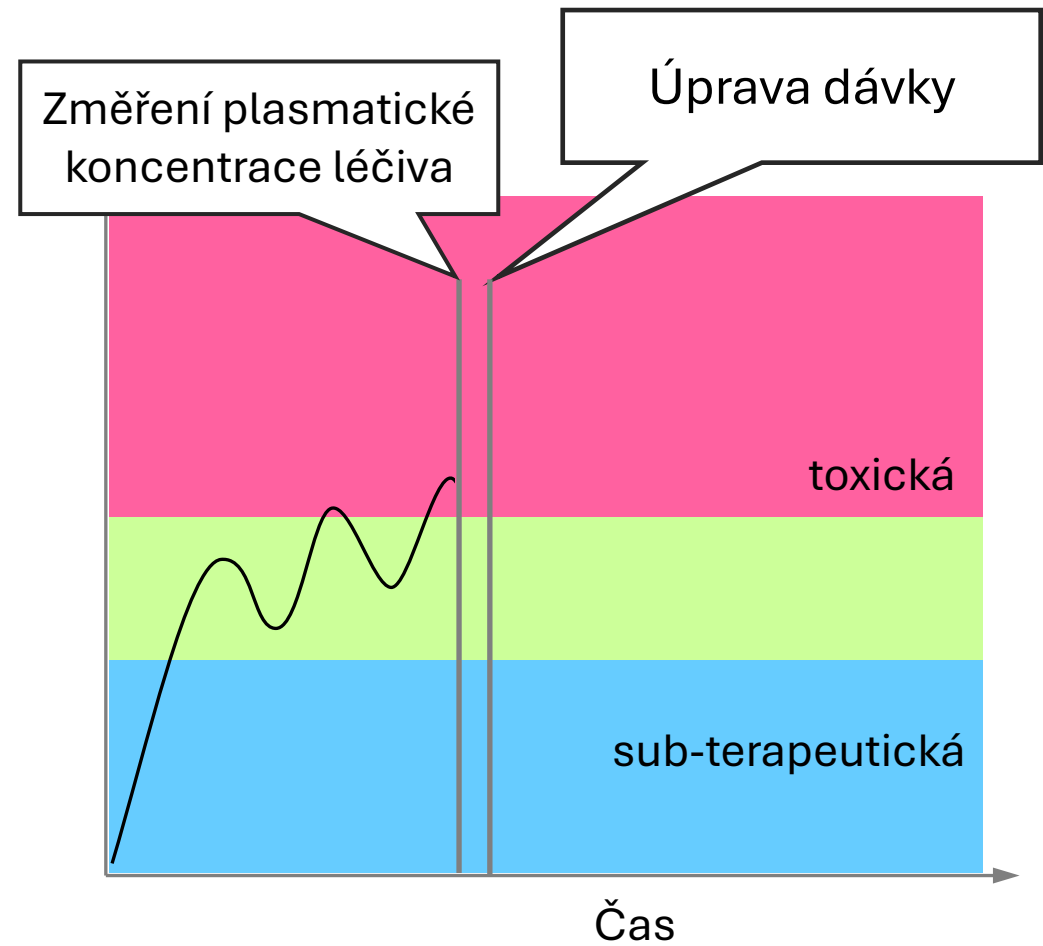
Úzké terapeutické okno



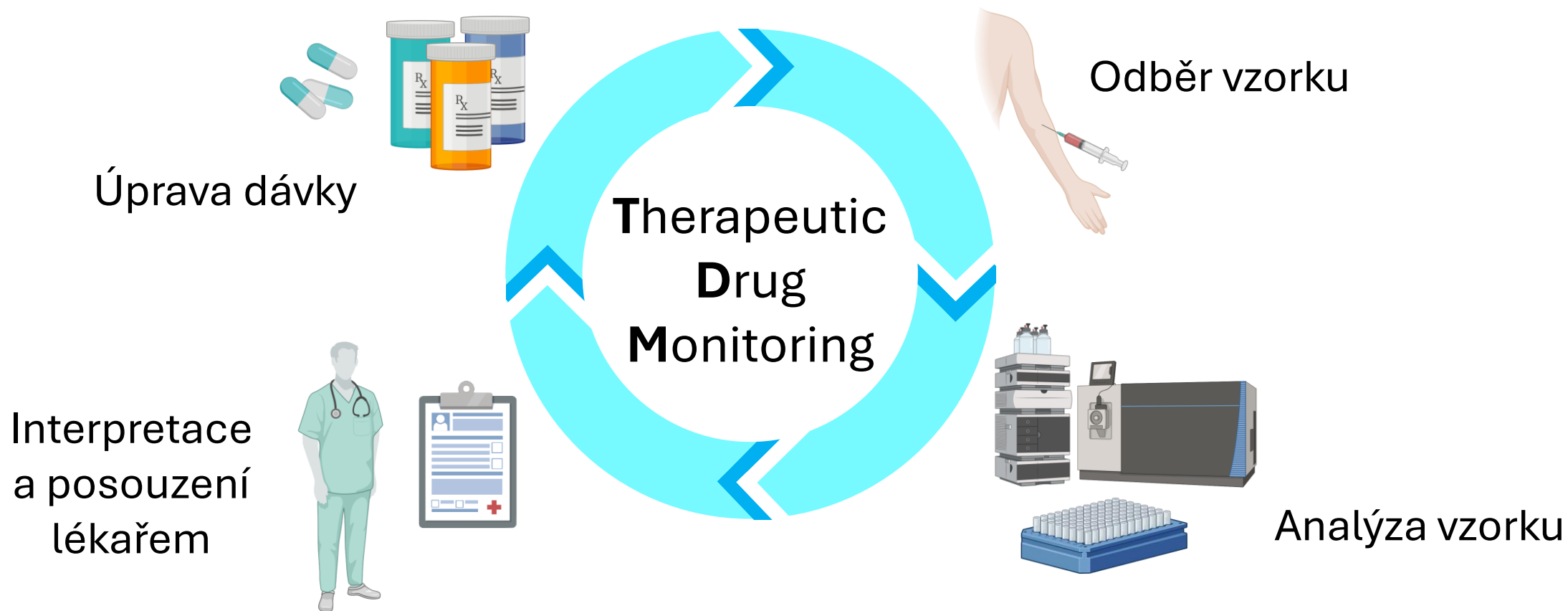
Úzké terapeutické okno

:: opakované podání

:: pomalý metabolizátor



Monitorování farmakokinetiky a terapeutických hladin - TDM



Příklad z praxe: *Farmakoterapie 6-merkaptopurinem u pacientů s Crohnovou chorobou - TDM a fenotypizace*

- U těžších forem Crohnovy choroby využíván **6-merkaptopurin/Azathioprin** k udržení remise
- **Genetický polymorfismus TPMT** – část pacientů potencionálně vystavena riziku závažných nežádoucích účinků
- U 20-30 % pacientů nevede dlouhodobé podávání AZA ke zřetelnému **klinickému efektu léčby**



Před zahájením terapie

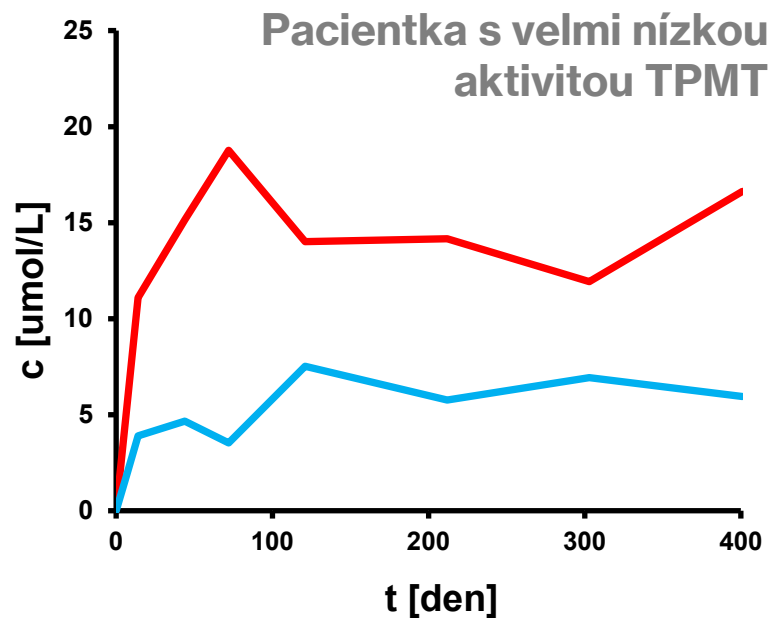
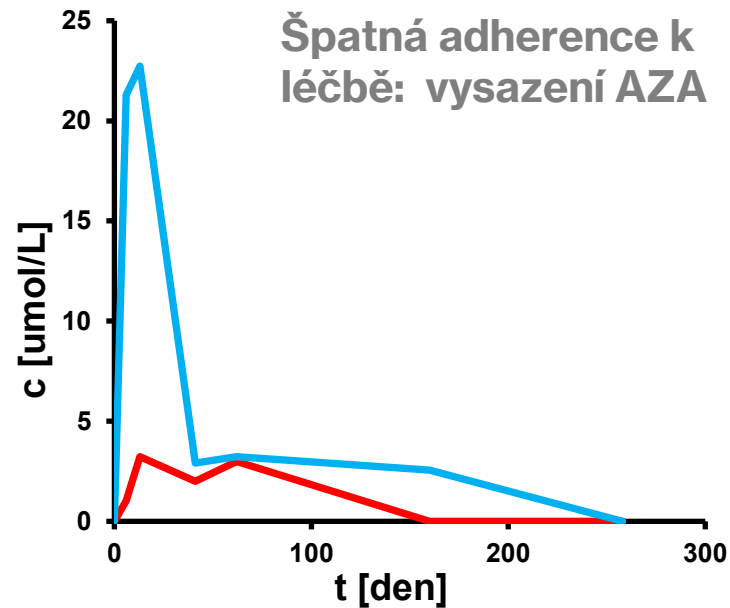
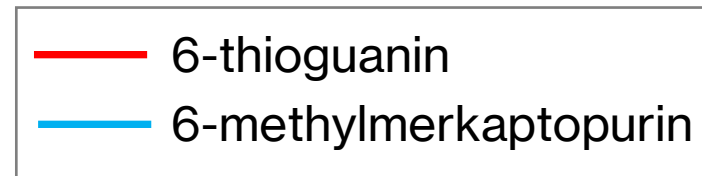
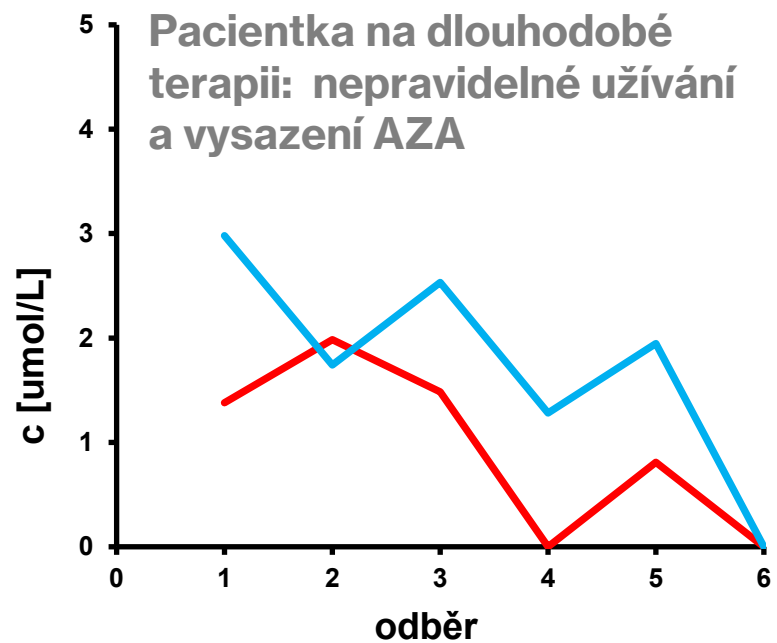
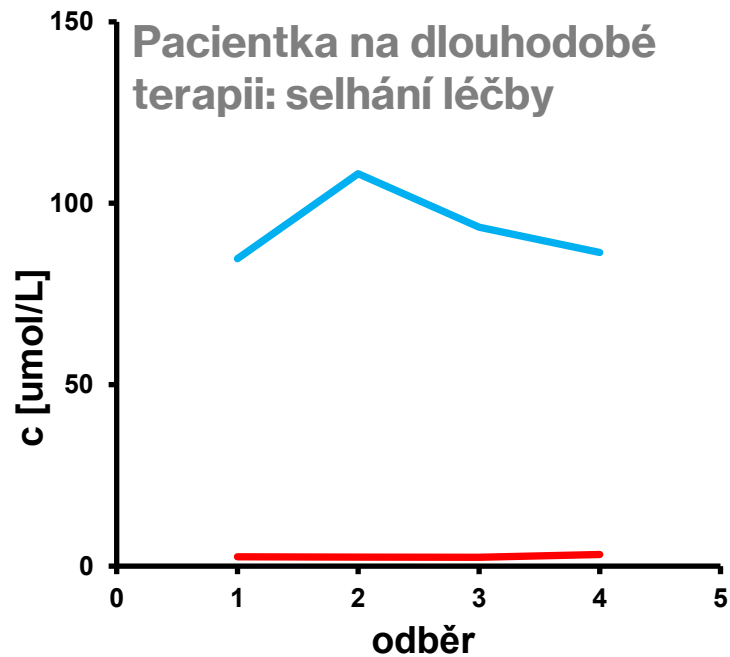
Vytipovat TPMT deficitní pacienty

- Riziko myelotoxicity způsobé vysokými koncentracemi aktivního metabolitu thioguaninu
- Provádí se před zahájením farmakoterapie

V průběhu terapie

Nalézt „non-adherentní“ pacienty

Pomocí běžných laboratorních vyšetření je poměrně obtížné zjistit, zda došlo k objektivnímu selhání léčby, či jde o nespolupráci pacienta



Léčiva, kde jsou běžně monitorovány plasmatické hladiny prostřednictvím LC-MS

Oblast / Léková skupina	Příklad léčiva	Přínos LC-MS pro personalizaci
Transplantologie	Takrolimus, cyklosporin, everolimus	Přesné TDM, optimalizace dávkování, snížení rizika rejekce a toxicity
Onkologie – cílená léčba	Imatinib, dasatinib, erlotinib, sorafenib	Monitorování plazmatických hladin, sledování rezistence, odhalení variability metabolismu
Psychiatrie / Neurologie	Antidepresiva (SSRI, SNRI), antipsychotika, antiepileptika	TDM, zjištění adherence, prevence toxicity a poddávkování
Imunosupresiva mimo Tx	Metotrexát (revmatologie), azathioprin	Individuální titrace dávky podle koncentrací a metabolitů
Antibiotika / antimykotika	Vankomycin, aminoglykosidy, azoly	TDM u kriticky nemocných, snížení nefrotoxicity, zajištění účinnosti
Kardiologie	Digoxin, antiarytmika, některá antikoagulancia	Přesné měření úzkého terapeutického okna, snížení rizika arytmí a krvácení
Antiretrovirotika	Efavirenz, lopinavir, darunavir	Sledování variability metabolismu, minimalizace nežádoucích účinků a rezistence
Farmakogenomika + fenotypizace	Test substrátů CYP2D6, CYP3A4	Kvantifikace metabolitů → odhad enzymové aktivity, kombinace s genetickým profilem
Pediatric / Geriatric	Široké spektrum léčiv	Farmakokinetika je v těchto skupinách vysoce variabilní. Monitoring vede k lepšímu a bezpečnějšímu nastavení dávkování
Metabolomika / biomarkery	Endogenní metabolity (lipidy, neurotransmitery, žlučové kyseliny)	Predikce odpovědi na léčbu, sledování toxicity, identifikace nových biomarkerů

Příklad z praxe: *Stanovení biomarkerů závažnosti onemocnění - Intrahepatální těhotenská cholestáza (ICP)*

Lipidomická analýza žlučových kyselin (BAs)

Základní výzkum

- Hodnocení závažnosti cholestázy a efektu farmakologické intervence
- Stanovení BAs z tělních tekutin a tkání na modelových systémech intra a extrahepatální cholestázy u potkana a myši

Klinický výzkum

- Spolupráce s pracovištěm FN Olomouc
- Screening intrahepatální těhotenské cholestázy (ICP)
- Stanovení profilu BAs ze vzorků krve a moči



Toxikologický screening



Klinická toxikologie

Monitorování

o

Vizualizace letální dávky pro vybrané tvrdé drogy

60 mm

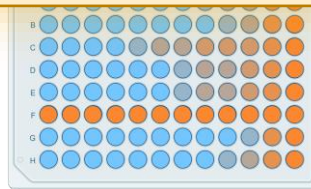


Pracovní-lékařská toxikologie

Kontrola expozice
pracovníků
průmyslovým
chemikáliím



Vyhledávání zcela
nových drog



Dopingová kontrola

Dopingová kontrola
zakázaných látek
a metabolitů



Toxikologie



Detekce a kvantifikace omamných
a psychotropních látek

Příklad z praxe: *Intoxikace tříletého chlapce*

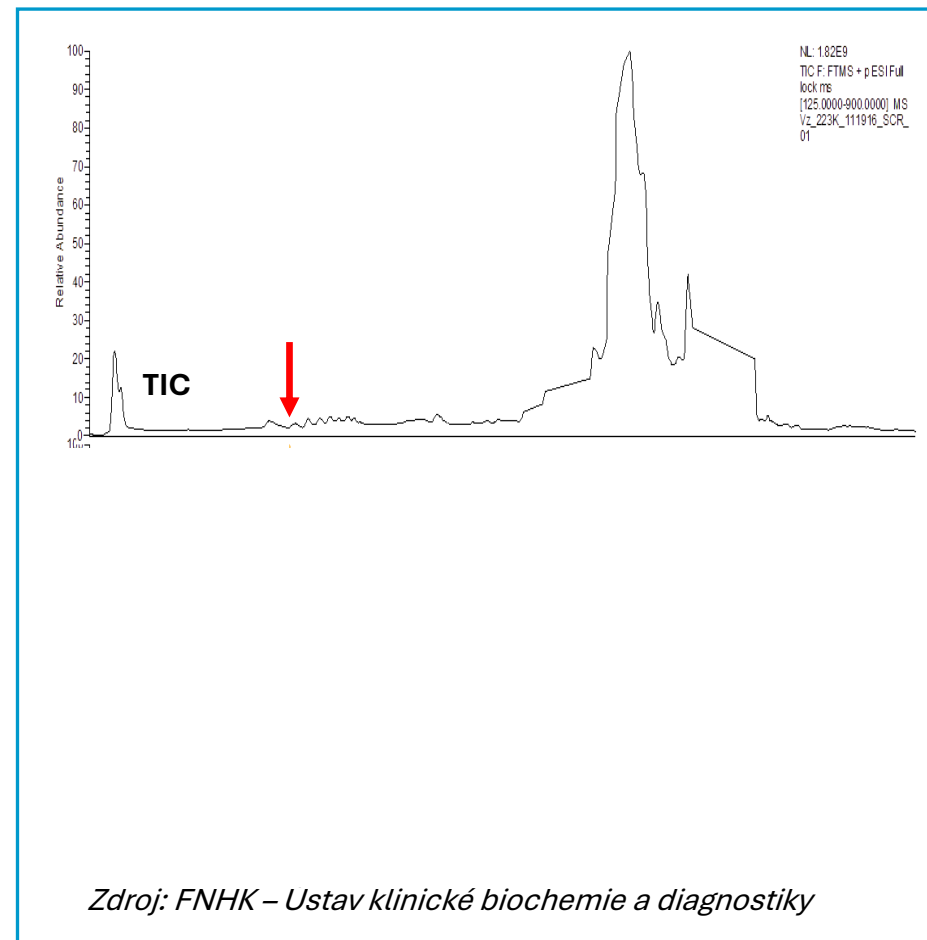
Úsek klinické a forenzní toxikologie ve FN HK

LC-HRMS metoda pro screening cca 1600 látek:

- Většina léčiv, které se vyskytují u nás na trhu
- Většina běžných i méně běžných drog, pesticidů a průmyslových látek

Tříletý pacient přijat ve FNHK s podezřením na intoxikaci

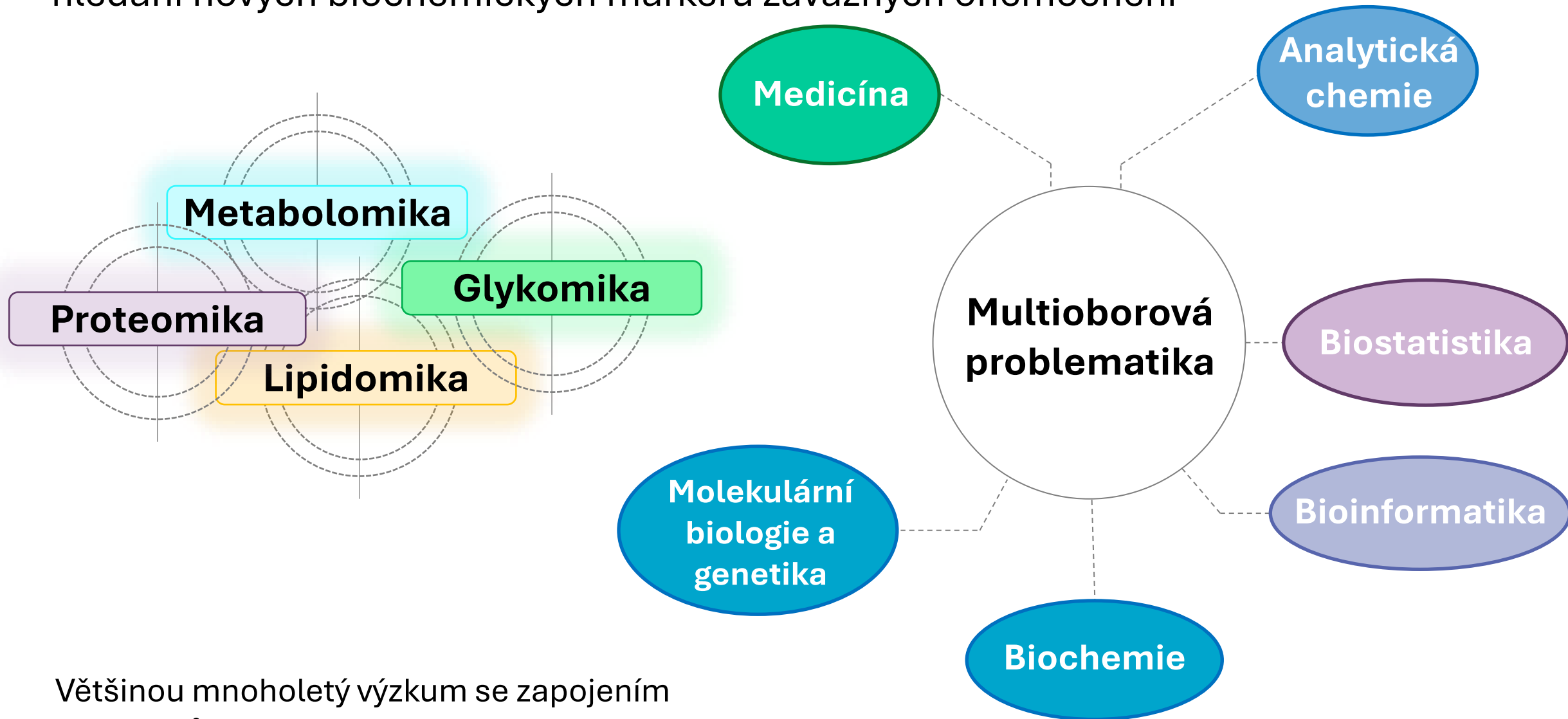
Technikou LC / HRMS zjištěna
intoxikace **METAMFETAMINEM !**





Omické metody

Omické metody v současné době zaujímají jedno z předních míst při hledání nových biochemických markerů závažných onemocnění

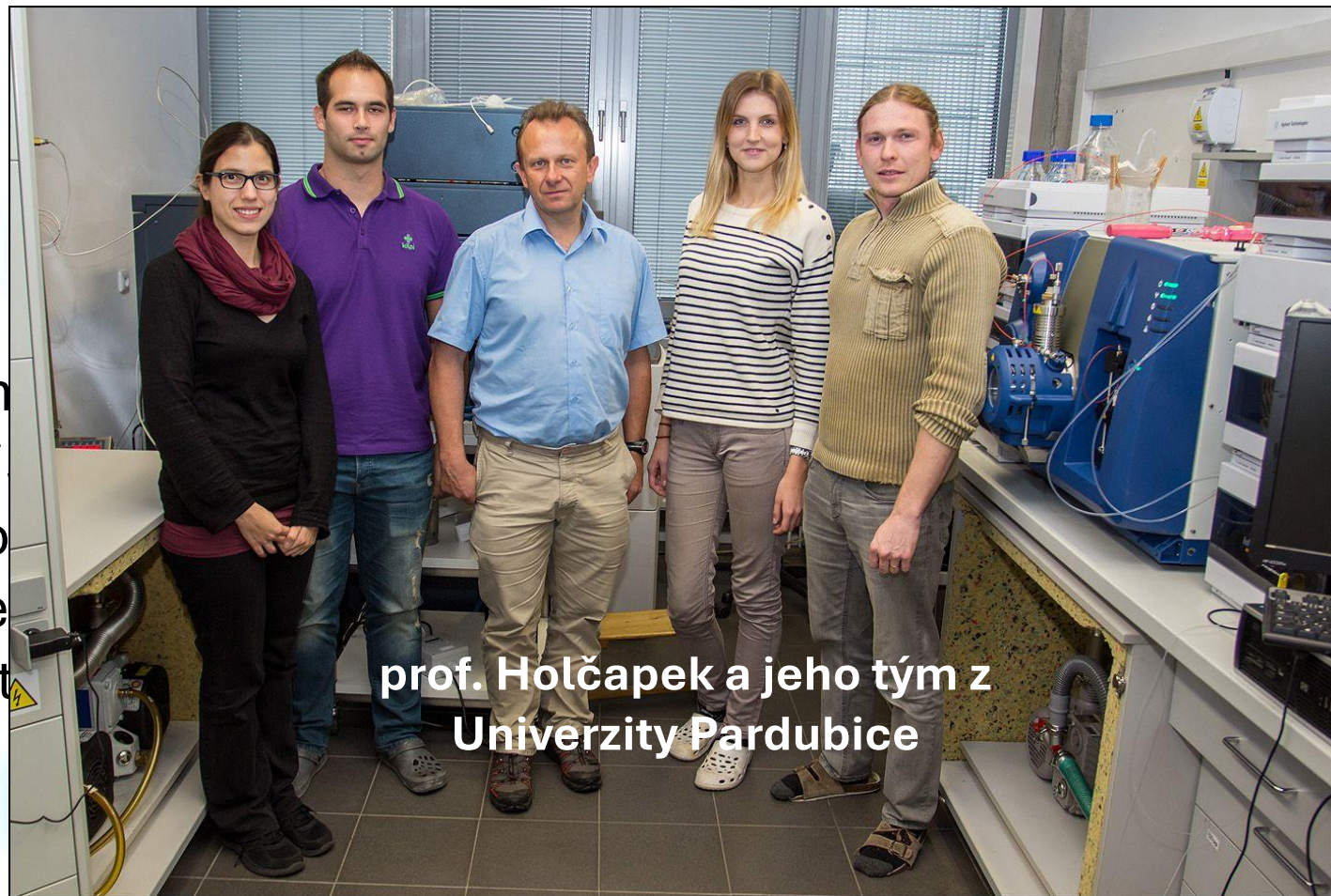


Většinou mnoholetý výzkum se zapojením odborníků z širokého okruhu specializací

Příklad z praxe: Časná diagnostika nádorů pankreatu pomocí lipidomické analýzy vzorku krve

Lipidomická analýza

- An
- Zji
- Po
- Ve
- řet



prof. Holčápek a jeho tým z
Univerzity Pardubice

M. Holčápek et al. Nature Communications. 2022 Jan 10;13:124.
Metoda patentována v ČR, Evropě, Japonsku a USA



ZÁVĚR

- Hlavní myšlenka: LC-MS kombinuje účinnou separaci látek s citlivou a selektivní detekcí
- Nezastupitelné pro moderní laboratorní medicínu
- Personalizovaná medicína, TDM, omické metody při hledání biomarkerů onemocnění, toxikologie, atd.