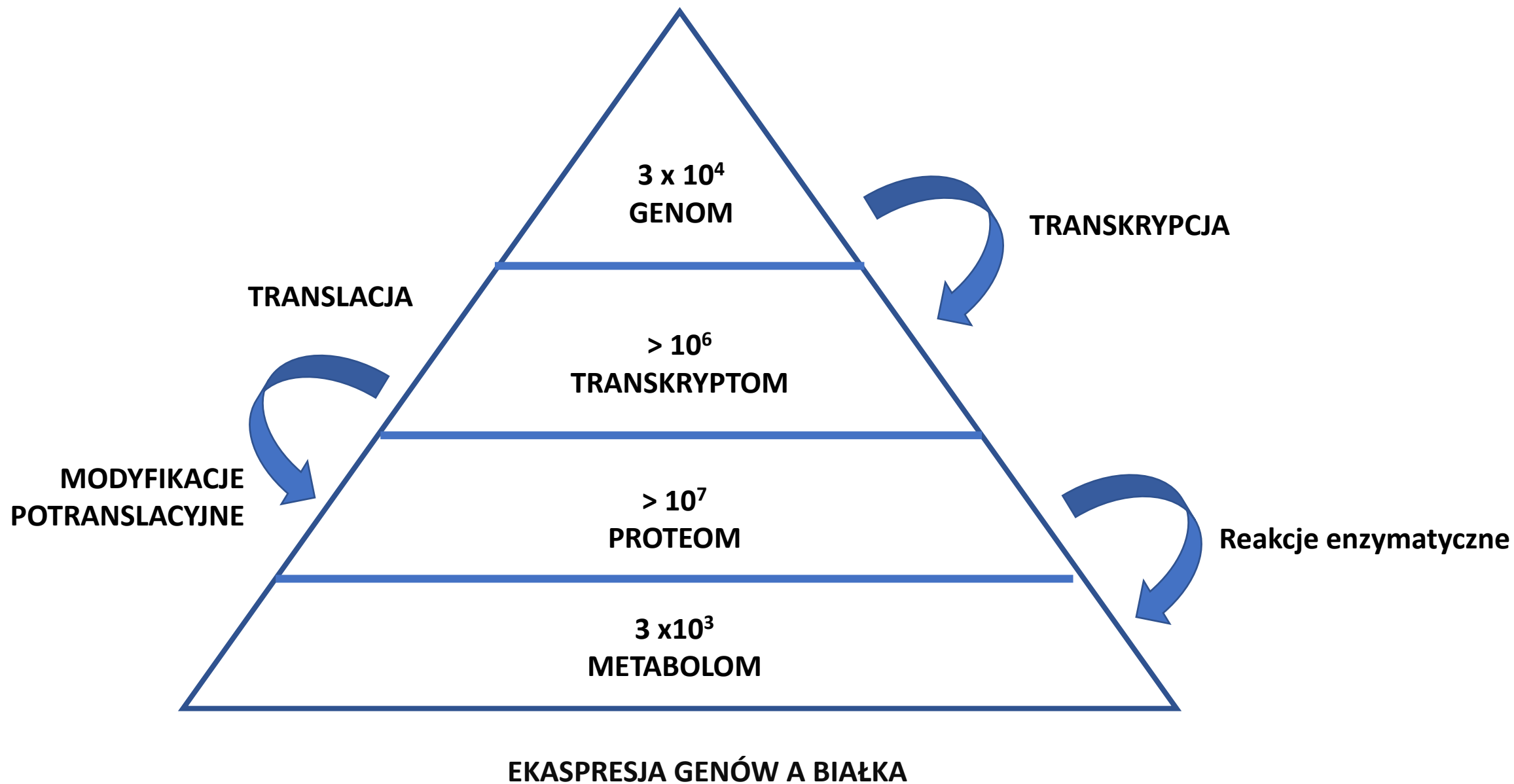




METABOLOMIKA W BADANIACH KLINICZNYCH

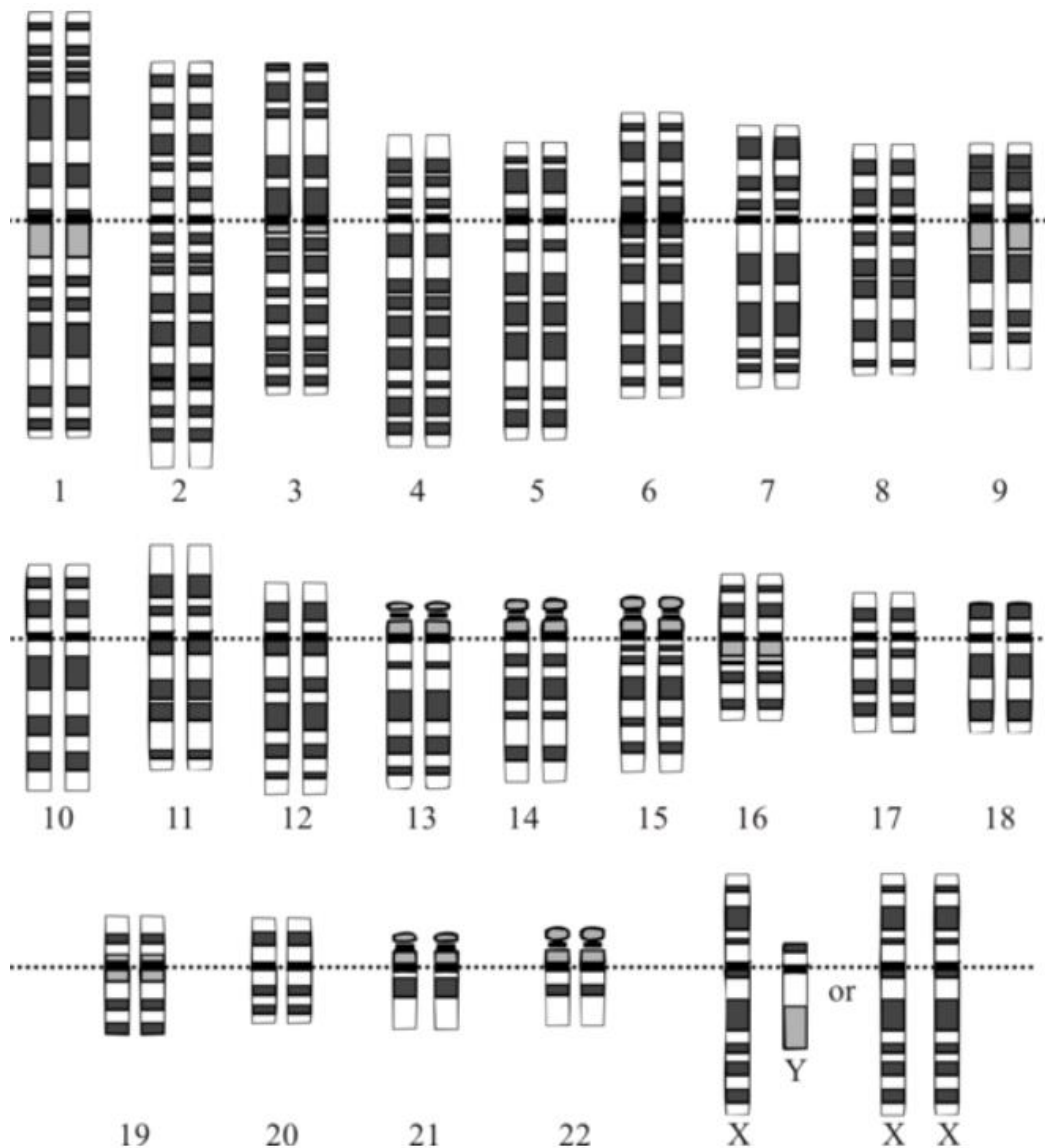
Techniki ,omiczne' rozwinęły się na szerszą skalę inspirowane badaniami nad genomem człowieka.



Naturalnym uzupełnieniem badań nad sekwencjonowaniem GENOMU było podjęcie prac nad identyfikacją białek.

Genom (nazwa z połączenia słów gen i chromosom) – kompletna informacja genetyczna żywego organizmu lub wirusa. W przypadku organizmów eukariotycznych termin ten odnosi się zwykle do materiału genetycznego zawartego w podstawowym, pojedynczym (haploidalnym) zespole chromosomów. W przypadku organizmów prokariotycznych odnosi się on do zawartego w nich pojedynczego chromosomu, a w przypadku wirusów – do ich cząsteczki materiału genetycznego.

Genom człowieka – składa się z 22 diploidalnych autosomów, 2 allosomów oraz MtDNA. Chromosomalny genom zawarty jest w jądrze w 23 parach chromosomów. Całkowita ilość informacji genetycznej zawartej w genomie człowieka jest mniejsza niż 800 MB. Autosomy oznaczane są kolejnymi numerami od 1 do 22. Allosomy to X i Y. Do 2018 roku odkryto 43 162 ludzkie geny w DNA jądrowym



Kariotyp – kompletny zestaw chromosomów komórki somatycznej organizmu. Kariotyp jest cechą charakterystyczną dla osobników tego samego gatunku, tej samej płci oraz dotkniętych tymi samymi aberracjami chromosomowymi (albo całkowicie zdrowymi). W kariotypie wyróżnia się autosomy (chromosomy nieróżniące się u osobników różnych płci) oraz chromosomy płci (allosomy). Prawidłowy kariotyp człowieka złożony jest z 22 par autosomów oraz 1 pary chromosomów płci, które oznaczane są symbolami X i Y.

Graficzna reprezentacja normalnego ludzkiego kariotypu.

Była to również konsekwencja stwierdzenia, że informacja zwarta w materiale genetycznym jest niewystarczająca do identyfikacji zjawisk zachodzących w komórce.

Była to również konsekwencja stwierdzenia, że informacja zawarta w materiale genetycznym jest niewystarczająca do identyfikacji zjawisk zachodzących w komórce.

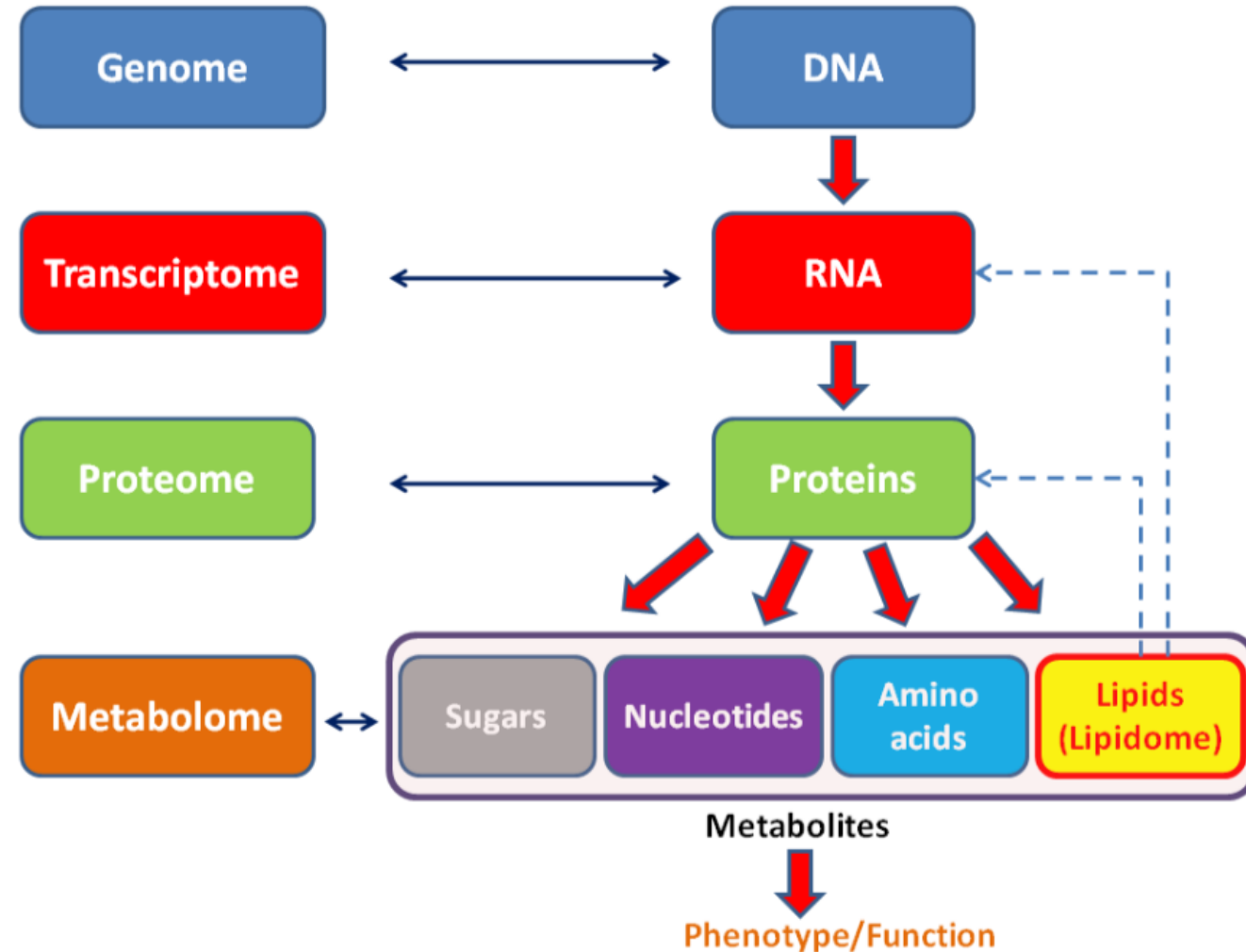
Dziedzina identyfikacji białek zyskała nazwę PROTEOMIKI.

PROTEOM to komponent białkowy kodowany przez GENOM.

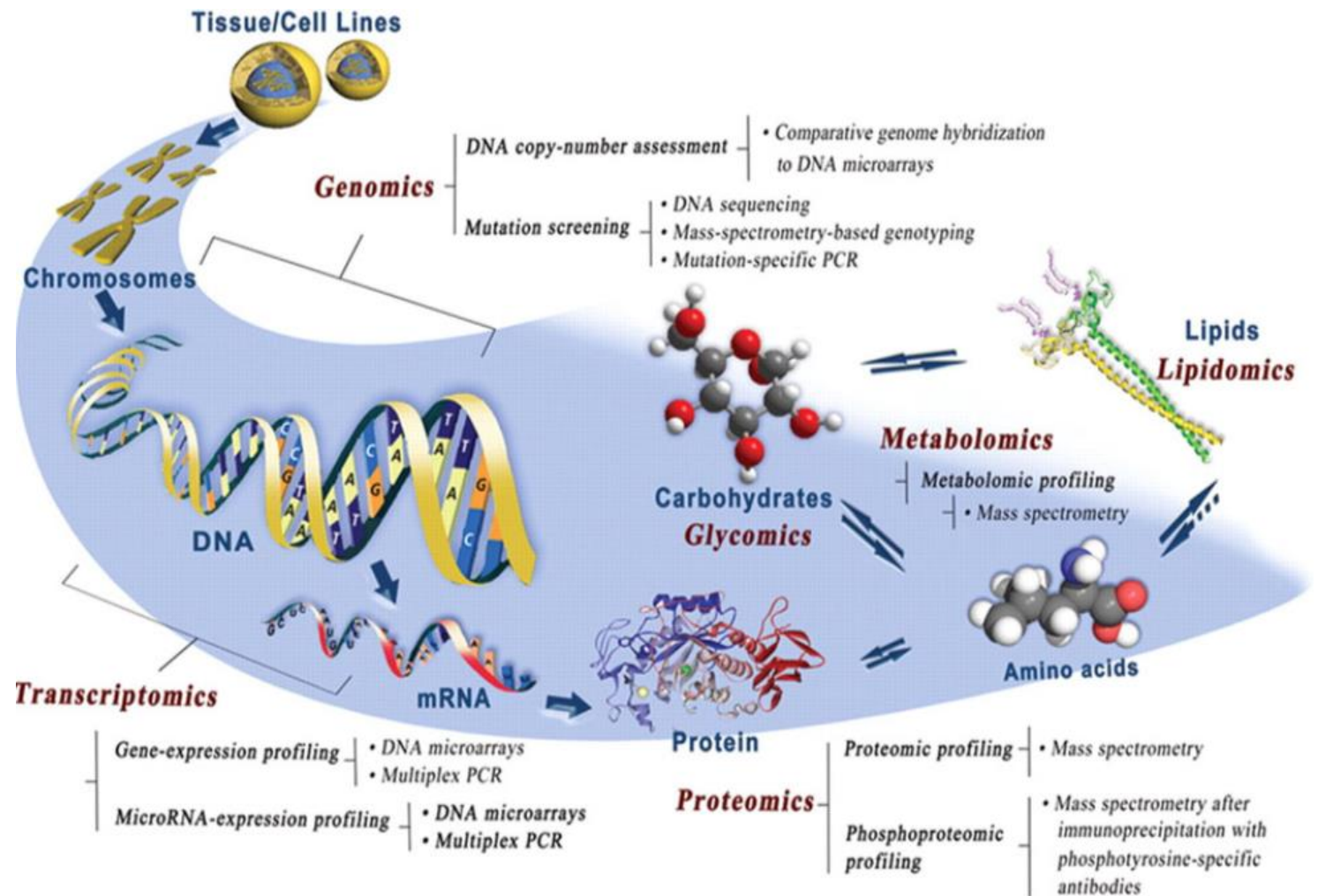
Metabolom – zestaw wszystkich metabolitów obecnych w organizmie, tkance, komórce lub przedziale komórkowym (np. pochodne aminokwasów, lipidów, węglowodanów, nukleotydów, drobnocząsteczkowych hormonów takich jak np. tyroksyna, testosteron, estradiol itp.). Badaniem metabolomu zajmuje się dziedzina nauki zwana **METABOLOMIKĄ**, która obok genomiki, transkryptomiki i proteomiki znajduje zastosowanie np. w biologii systemowej będącej między innymi działem biologii medycznej.

W 2007 r. po raz pierwszy przedstawiono zarys ludzkiego metabolomu i przez analogię do projektu poznania ludzkiego genomu nazwano **Projektem Ludzkiego Metabolomu**, gdzie skatalogowano i scharakteryzowano 6500 metabolitów, które znaleziono w ludzkim ciele.

- Identyfikacja nowych szlaków metabolicznych zaangażowanych w procesy chorobotwórcze
- Monitorowanie wrodzonych chorób metabolicznych
 - Modelowanie nowych leków
- Monitorowanie postępów terapii
- Monitorowanie poszczególnych faz testowania leków



- W odróżnieniu od GENOMU skład białkowy komórki nie jest stały.
- Analiza proteomu i metabolomu może być wykorzystana w badaniach dotyczących zmian chorobowych.
- Markerem chorobowym nie musi być pojedyncza cząsteczka może być to właśnie cały profil białkowy lub metaboliczny, pod warunkiem że będzie on powtarzalny.
- Projektowanie leków wymaga zaś dokładnej charakterystyki danego białka.



BIOLOGIA SYSTEMÓW korzysta w jednakowym stopniu z informacji genetycznej, proteomiki, metabolomiki i analiz funkcjonalnych (koncentrujących się na ustalaniu funkcji cząsteczek).

BIOLOGIA SYSTEMÓW

dziedzina nauki zajmująca się systemami biologicznymi



Jednym z podstawowych rodzajów sieci są sieci przedstawiające interakcje między białkami, które zachodzą w organizmie.

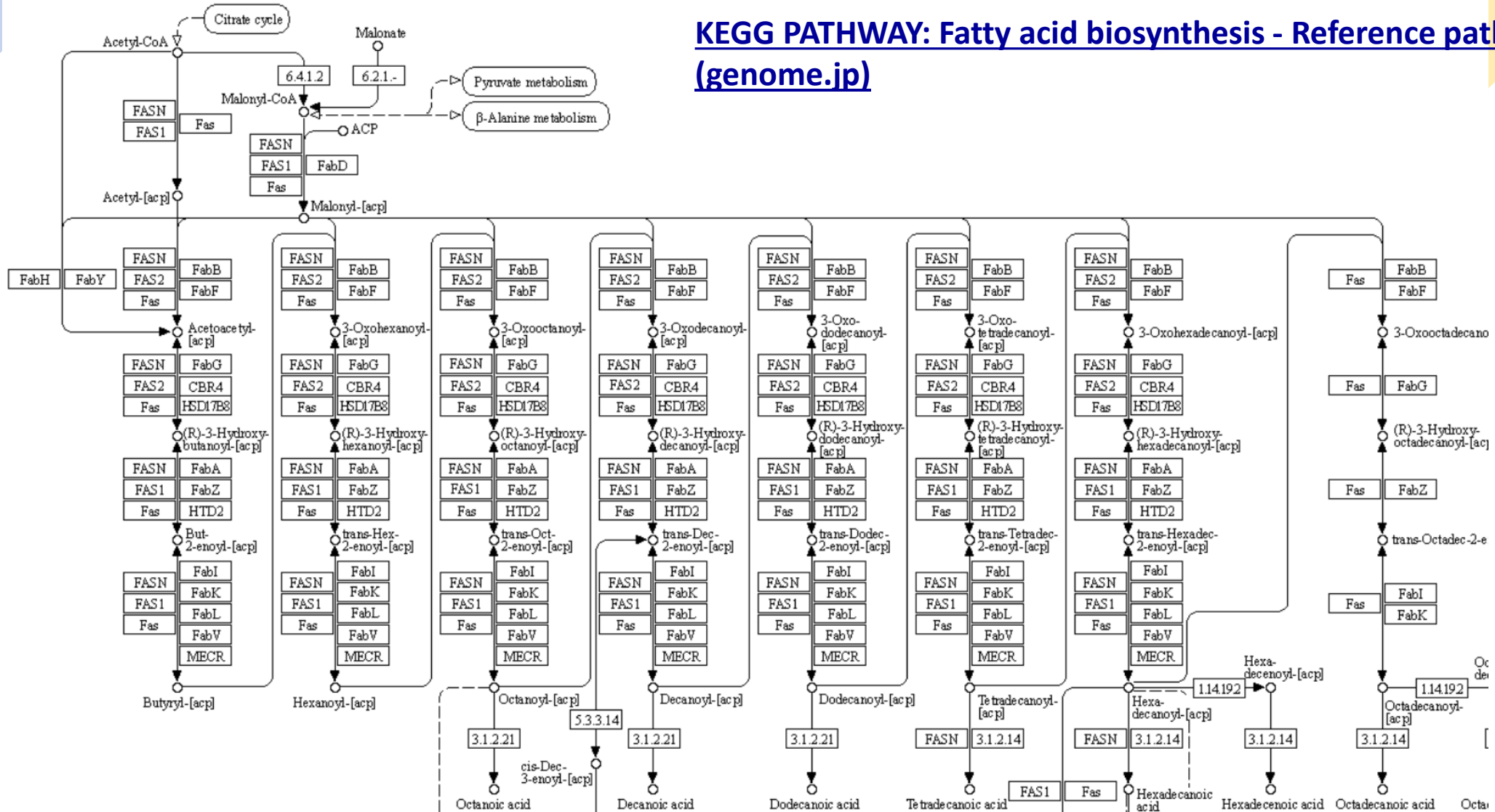


Sieci metaboliczne składają się ze szlaków metabolicznych; ilustrują kolejne reakcje, którym poddawane są metabolity i podają katalizujące je enzymy. Popularną bazą danych zawierającą m.in. sieci metaboliczne jest KEGG

[KEGG PATHWAY Database \(genome.jp\)](http://genome.jp/KEGG/PATHWAY)

PRZYKŁAD

FATTY ACID BIOSYNTHESIS



KEGG PATHWAY: Fatty acid biosynthesis - Reference pathway (genome.jp)

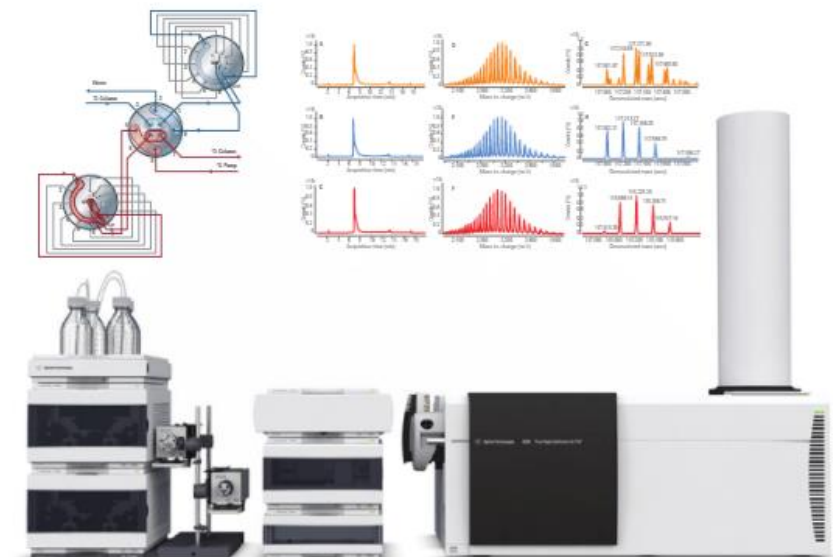
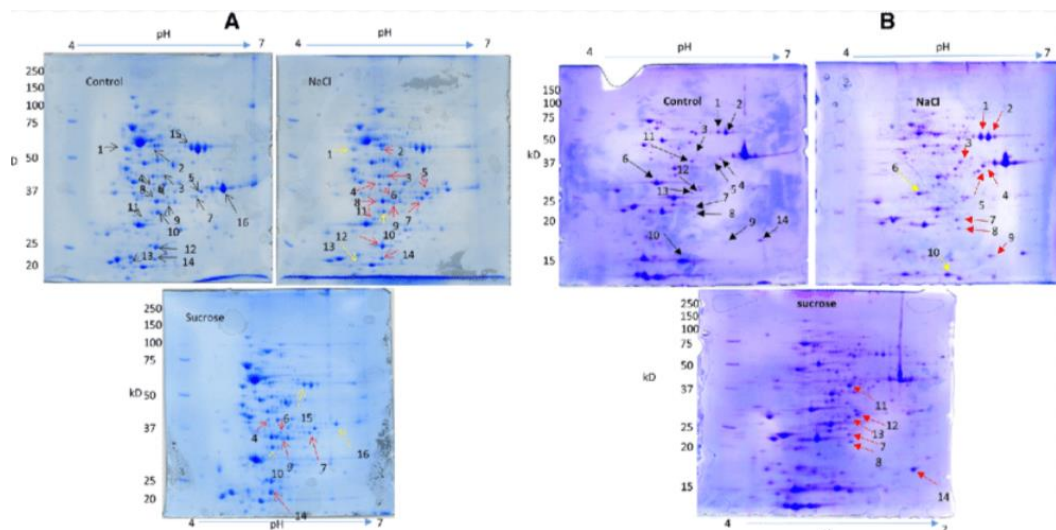
PROTEOMIKA

2D-PAGE

2D LC-MS/MS

MALDI-TOF

nanoESI



NARZĘDZIA ANALITYCZNE PROTEOMIKI

PROTEOMIKA

2D-PAGE

2D LC-MS/MS

MALDI-TOF

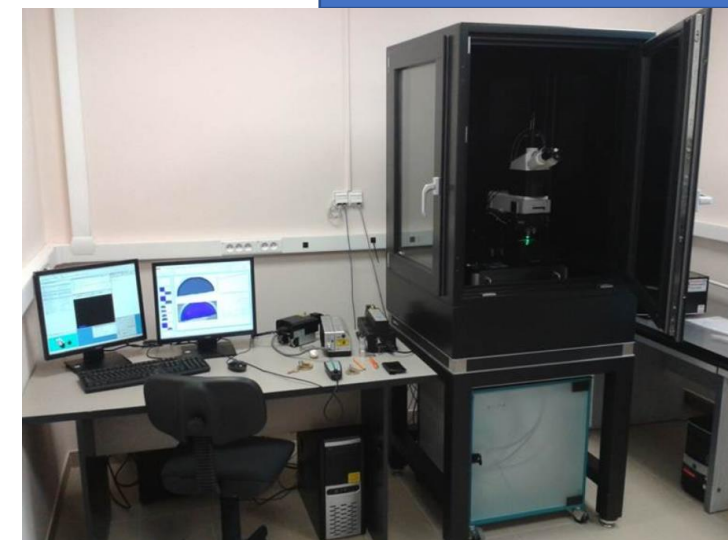
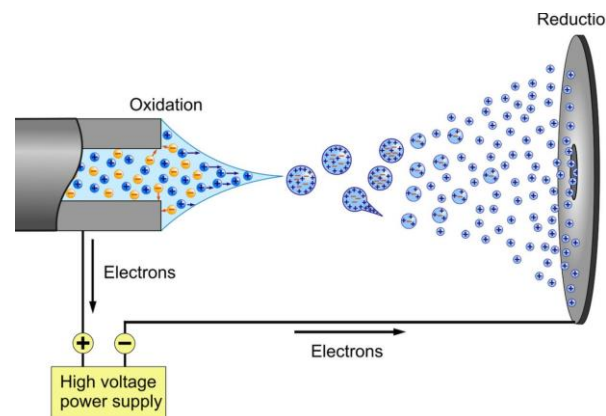
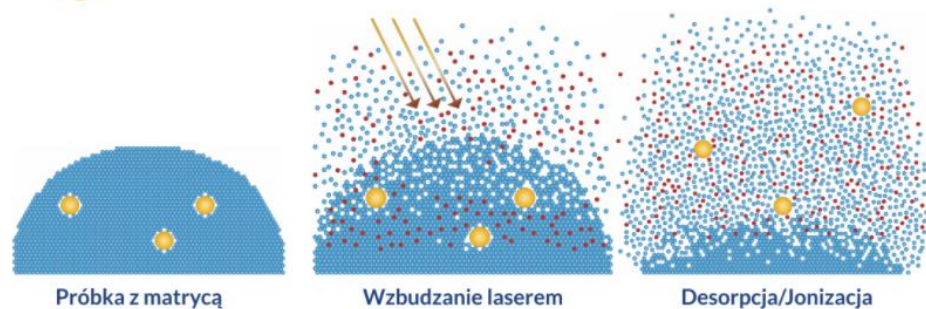
nanoESI

RAMAN

MALDI-TOF MS

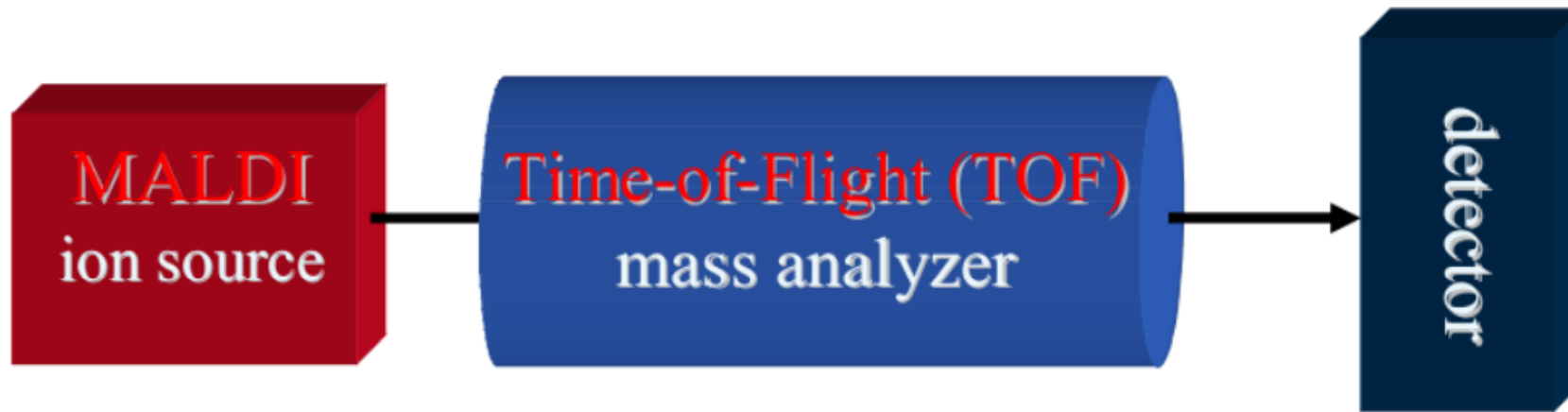
- ♦ MALDI (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization) – Desorpcja/Jonizacja laserem wspomagana matrycą
- ♦ TOF (Time of Flight) – Pomiar czasu przelotu jonów
- ♦ MS (Mass Spectrometry) – Spektrometria masowa

- cząstka matrycy
- wzbudzona cząstka matrycy
- cząstka badana



NARZĘDZIA ANALITYCZNE PROTEOMIKI

Idea działania spektrometru mas

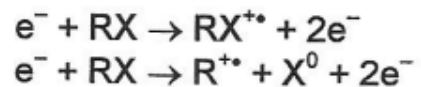
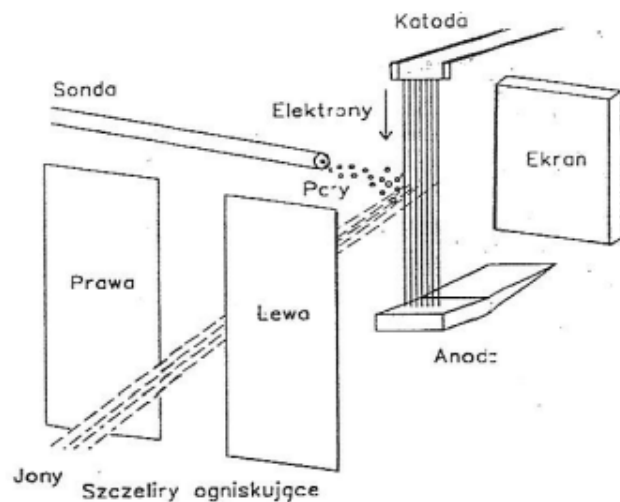


- źródło jonów – urządzenie, w którym następuje jonizacja cząsteczek przy użyciu różnorodnych technik, z których część prowadzi do pękania wiązań chemicznych na skutek czego dochodzi do ich podziału na mniejsze fragmenty. Inne techniki powodują tylko naładowanie cząsteczek bez ich fragmentacji,
- analizator – w którym wcześniej powstałe jony ulegają rozdziałowi na podstawie stosunku ich masy do ładunku.
- detektor – urządzenie "zliczające" jony napływające z analizatora.

Jonizacja próbki

EI

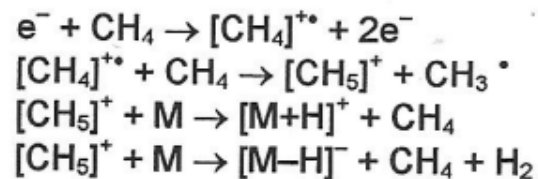
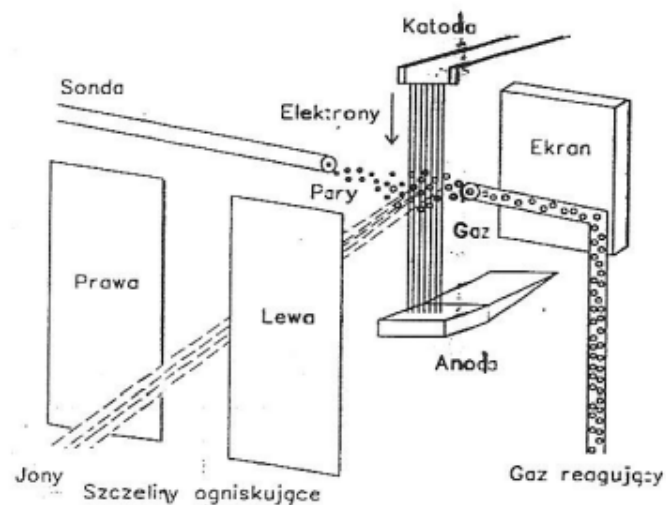
Electron Impact ionisation
Jonizacja wiązką elektronów



Twarda technika jonizacji
Jon molekularny typu $[M^+]$
Bogate widmo fragmentacyjne

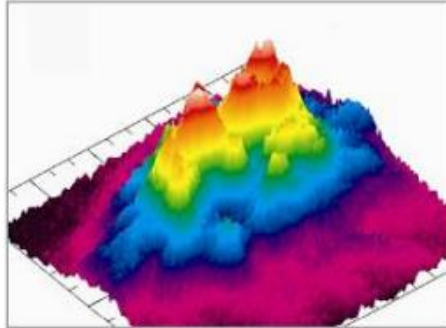
CI

Chemical Ionisation
Jonizacja chemiczna

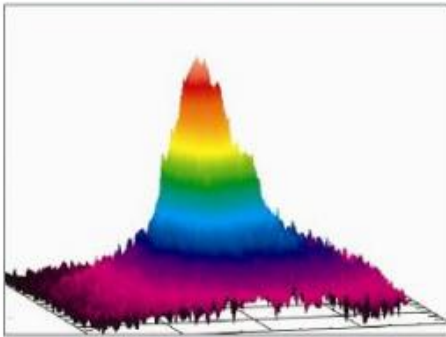


Łagodna technika jonizacji
Pozorny jon molekularny $[M+H]^+$ lub $[M-H]^-$
Brak fragmentacji

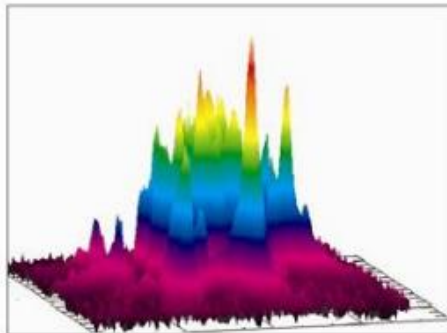
Jonizacja próbki – lasery używane w technice MALDI



Nitrogen laser:
pro: well structured energy profile
contra: slow (maximum 50Hz)



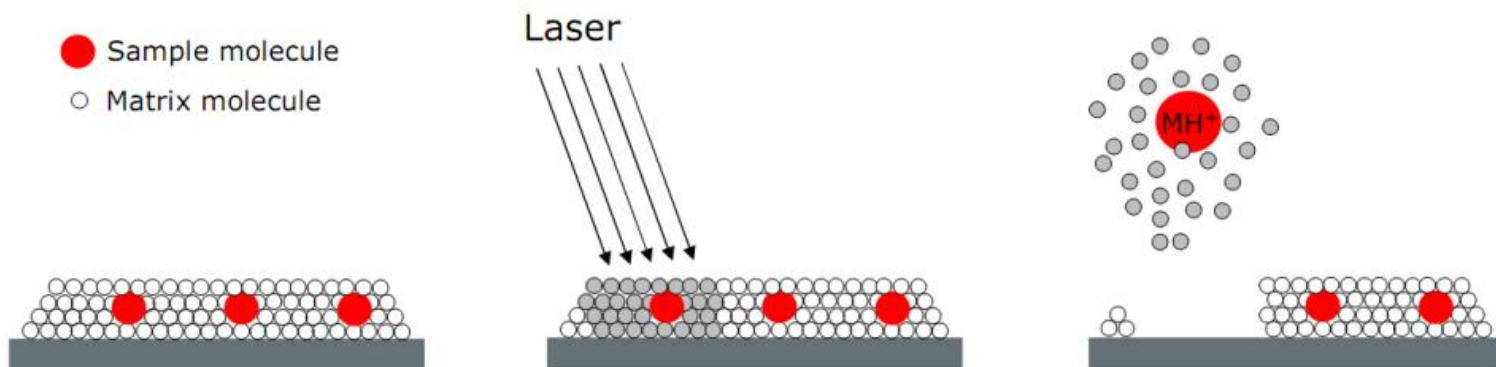
Nd:YAG laser:
pro: fast (up to 1000Hz)
contra: Gaussian energy profile (non-structured)



Smartbeam/Smartbeam II
(modified Nd:YAG laser):
pro: fast (up to 1000Hz)
pro: well structured energy profile

Matryce

- Sample molecule
- Matrix molecule



Procesy zachodzące pod wpływem impulsu laserowego

Absorpcja promieniowania głównie przez materiał matrycy.

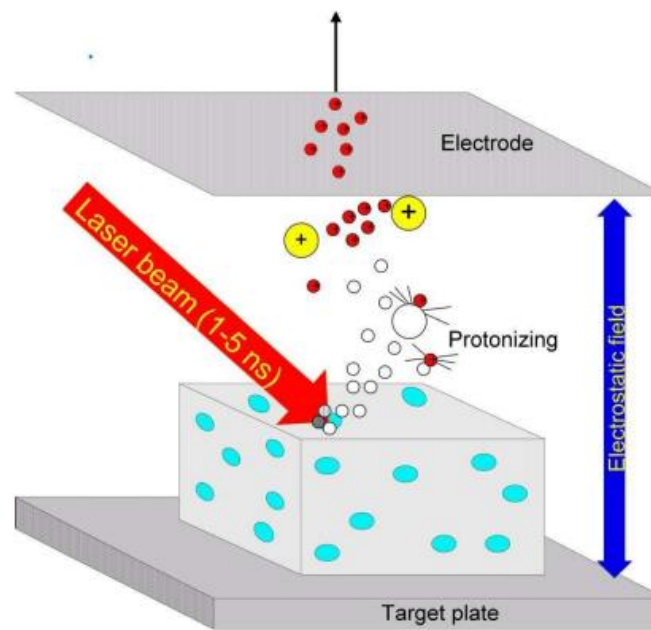
Odparowanie próbki na głębokość 2-3 λ i wyrzucenie strumienia gazów prostopadle do jej powierzchni.

Dysocjacja termiczna matrycy.

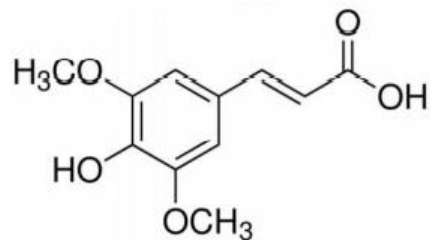
Tworzenie jonów (głównie H^+ , Na^+ , K^+).

Reakcje jonów z badaną substancją i matrycą. Możliwe drogi:

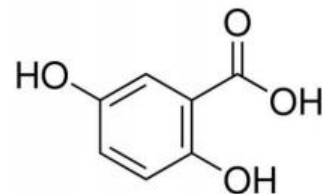
- dysocjacja termiczna z utworzeniem pary kation-anion
- oderwanie elektronu
- oderwanie bądź przyłączenie protonu
- przyłączenie kationu bądź anionu



Matryce



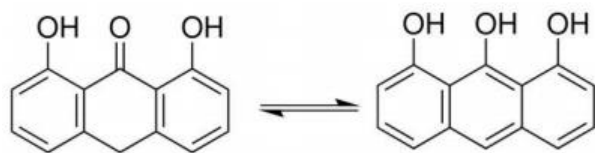
Sinapic acid
Kwas 3-5-dimetoksy-4-hydroksy cynamonowy
SINA
proteiny



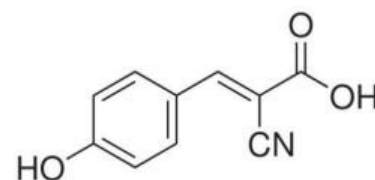
Gentisic acid
Kwas 2-5-dihydroksy benzoesowy
DHB
peptydy



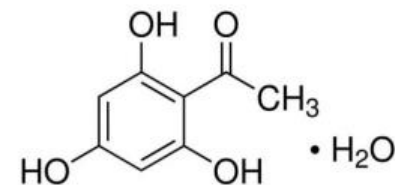
2-(4-Hydroxyphenylazo)benzoic acid
Kwas 2-(4-hydroksyfenylazo)- benzoesowy
HABA
Peptydy, polimery



Dithranol
1,8-Dihydroksyantracen-9(10H)-on
DIT
polimery



α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid
Kwas α -Cyano-4-hroksy cynamonowy
CHCA, α -CHCA
Peptydy, lipidy



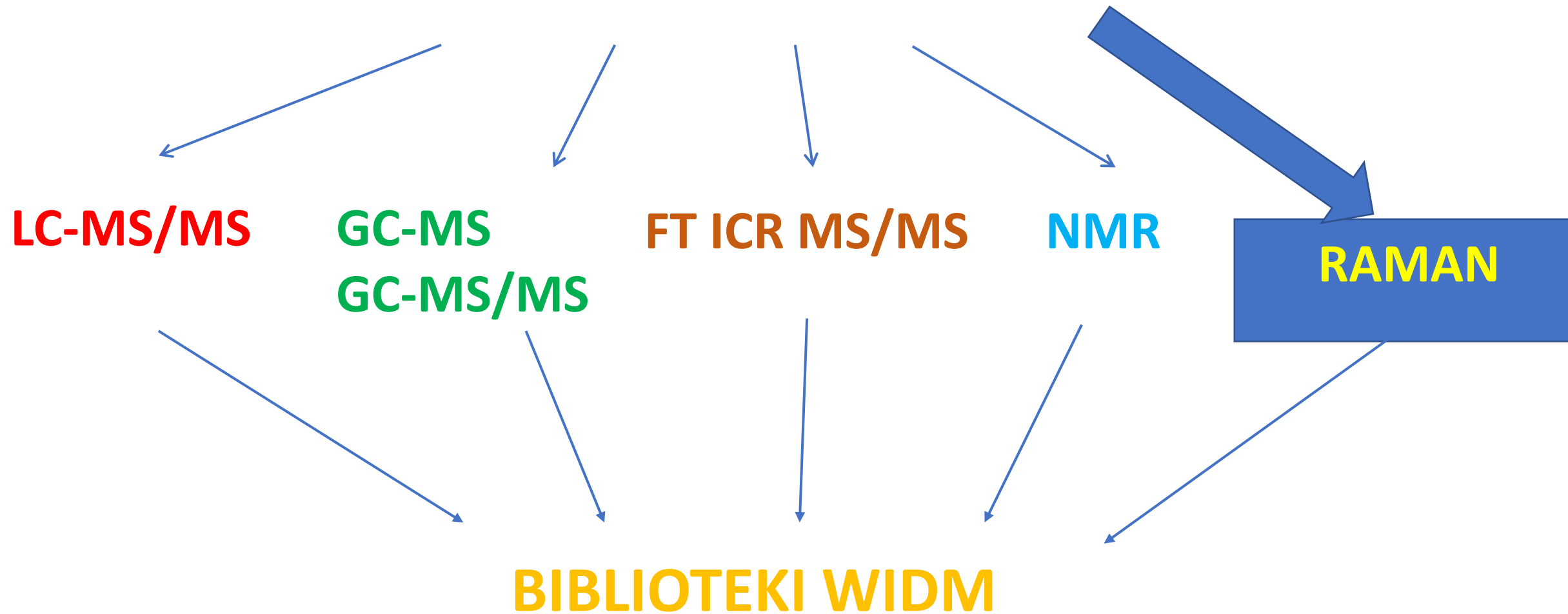
2,4,6-Trihydroxyacetophenone
2,4,6-trihroksy acetofenon
THAP
oligonukleotydy

Matryce

Pożądanymi cechami matrycy MALDI są:

- dość niska masa cząsteczkowa, co sprzyja łatwemu odparowaniu, ale wystarczająco duża, by odparowanie nie nastąpiło przed pomiarem, np. w czasie przygotowywania próbki;
- rozpuszczalność w rozpuszczalniku kompatybilnym z analitem;
- kwasowość, by ułatwić protonowanie cząsteczek analitu;
- obecność grup polarnych (hydrofilowych) w cząsteczce, co umożliwia rozpuszczanie matrycy w roztworach wodnych;
- stabilność w warunkach wysokiej próżni;
- wspomaganie jonizacji analitu;
- zdolność intensywnej absorpcji promieniowania UV lasera; zwykle wymóg ten spełnia związek, posiadający układ sprzężonych wiązań podwójnych $C=C$ (dlatego często matrycami są pochodne aromatycznych kwasów karboksylowych, często nienasyconych, np. kwasu cynamonowego).

METABOLOMIKA



NARZĘDZIA ANALITYCZNE METABOLOMIKI

METABOLOMIKA

BIOINFORMATYKA

Obejmuje rozwój metod obliczeniowych służących do badania i symulacji struktury, funkcji i ewolucji genów, genomów i białek. Tworzy metody wykorzystywane do analizy i zarządzania informacją biologiczną gromadzonej w toku badań genomicznych oraz badań prowadzonych z zastosowaniem wysokoprzepustowych technik eksperymentalnych. Z bioinformatyką powiązane

są: genomika, proteomika, lipidomika, metabolomika, transkryptomika.

W szerszym znaczeniu obejmuje także biokomputery i neuroinformatykę.

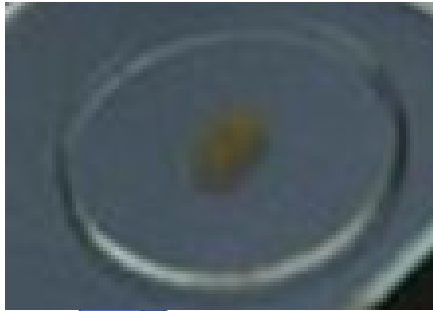
NARZĘDZIA ANALITYCZNE METABOLOMIKI

STRATEGIA IDENTYFIKACJI BIAŁEK

uzyskanie próbki

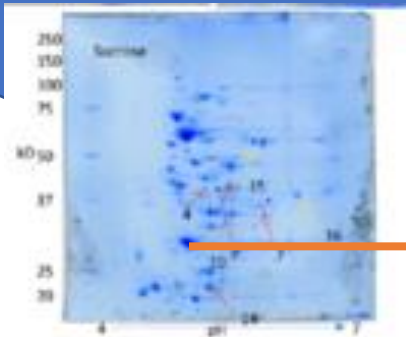


przygotowanie próbki

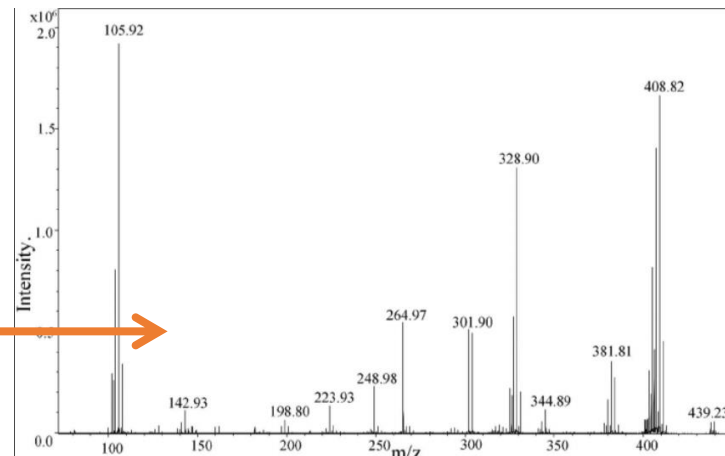


WALIDACJA

Selekcja
potencjalnych
biomarkerów

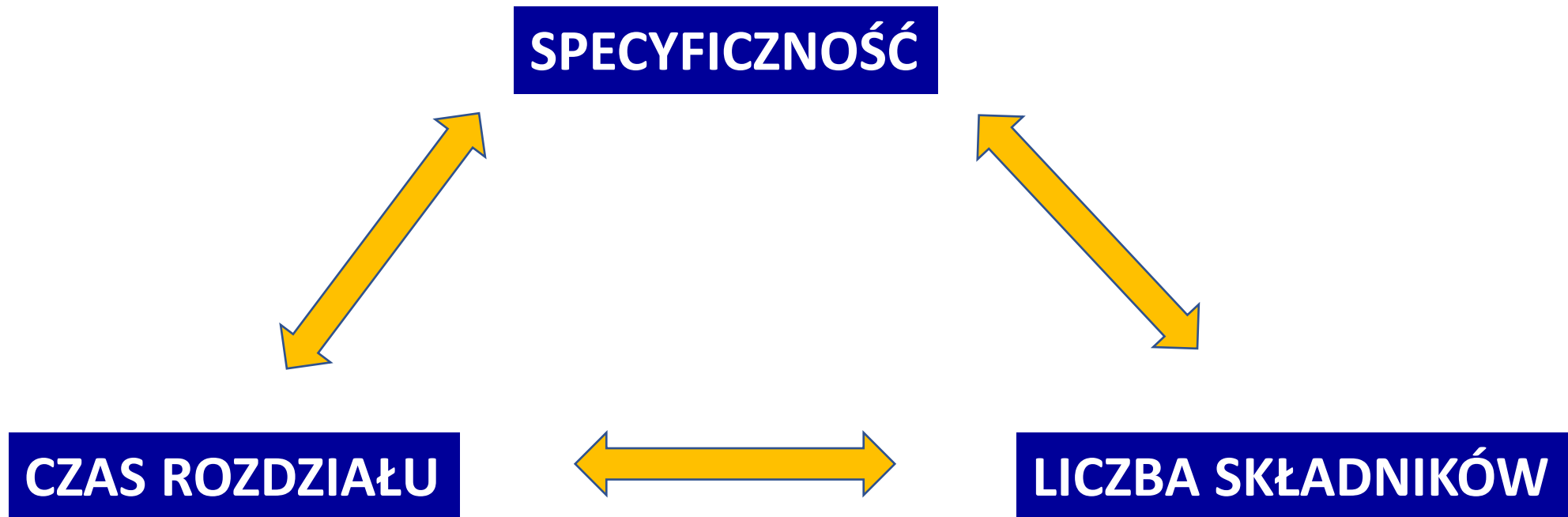


separacja poszczególnych
składników



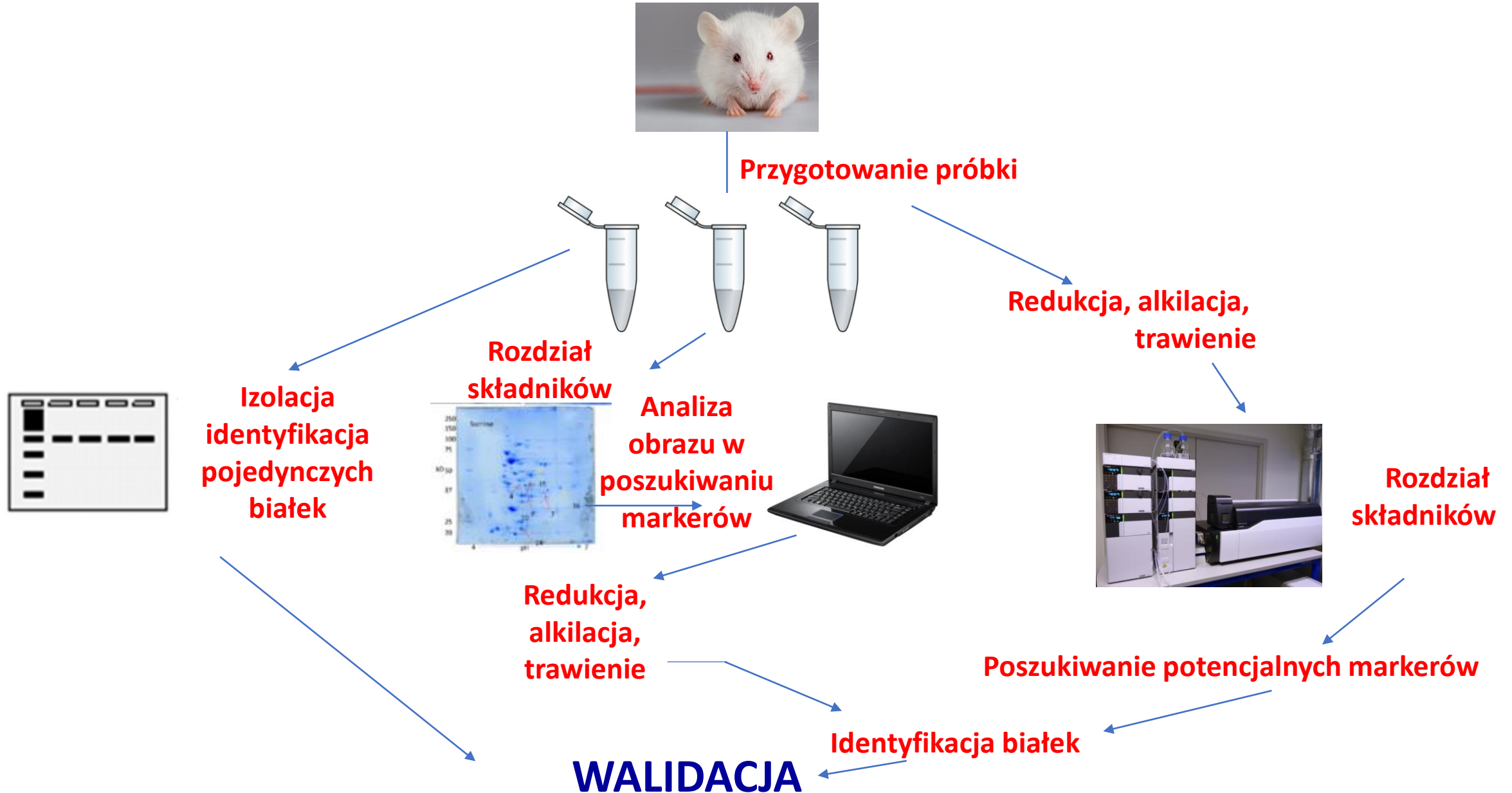
identyfikacja białek

ZALEŻNOŚĆ MIĘDZY PARAMETRAMI METODY SEPARACJI



Specyficzność (specifity) testu to liczba prawdziwie negatywnych klasyfikacji względem wszystkich (prawdziwie) negatywnych przypadków. Specyficzność informuje, jaką część wyników negatywnych wykrywa test albo jakie jest prawdopodobieństwo, że dla osoby zdrowej test wykaże, że osoba jest zdrowa.

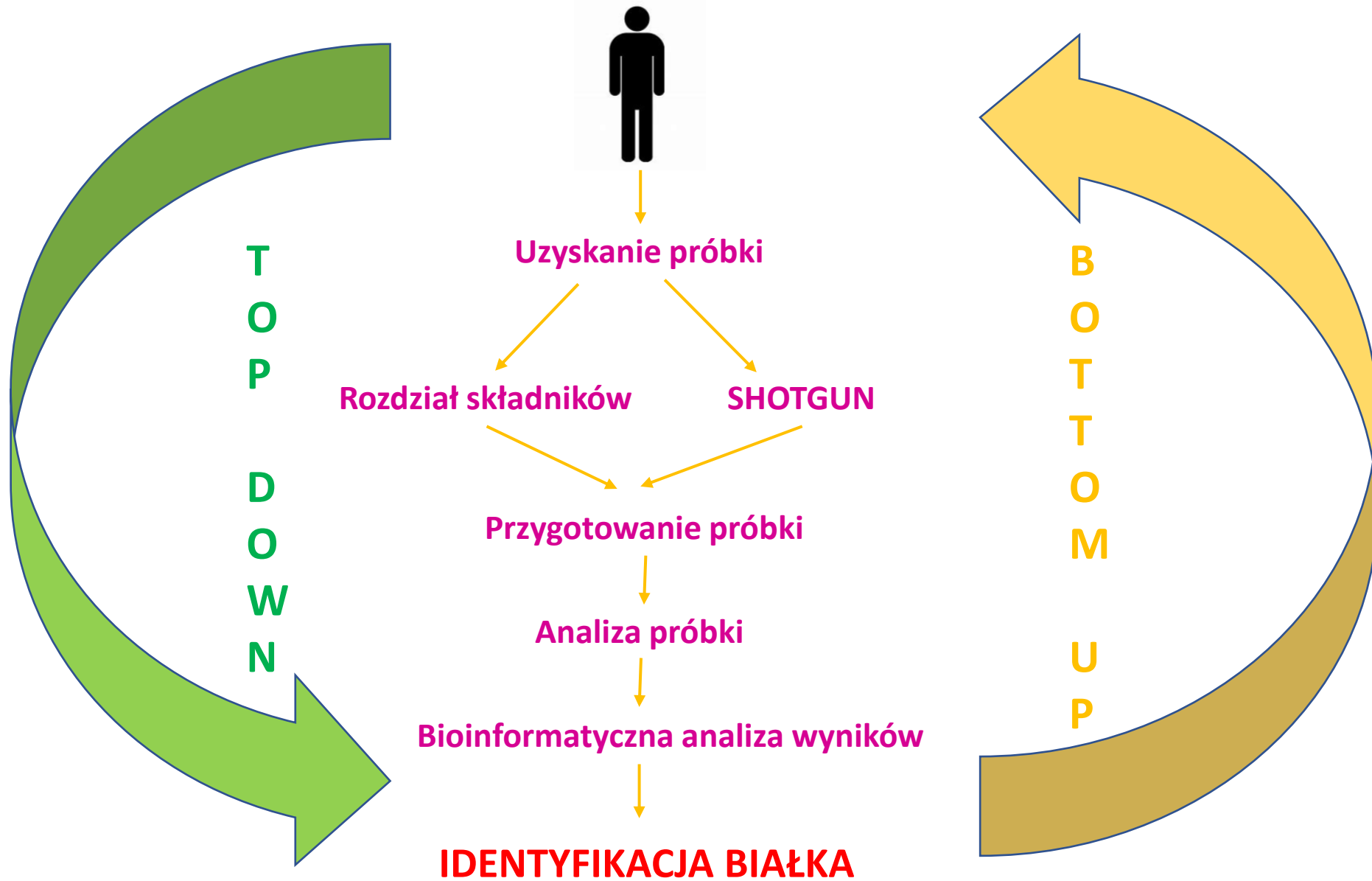
IDENTYFIKACJA BIAŁEK; MOŻLIWE SCHEMATY POSTĘPOWANIA

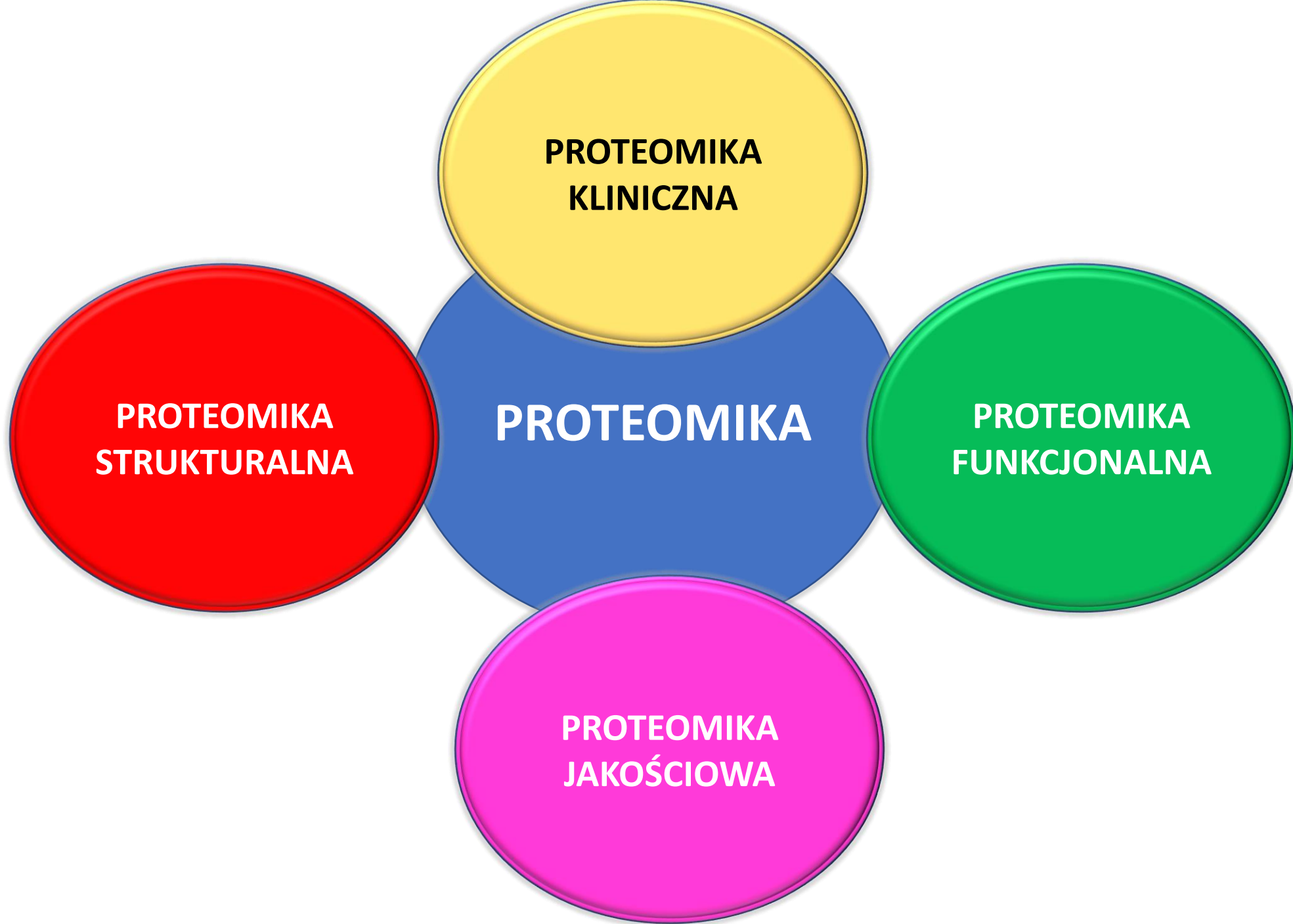


WYBÓR MATERIAŁU BIOLOGICZNEGO

PŁYN USTROJOWY	CHARAKTERYSTYKA
SUROWICA/PLAZMA KRWI	12 białek, w tym albumina i immunoglobuliny, stanowią ponad 96% wszystkich białek surowicy. Konieczność usunięcia białek za pomocą chromatografii powinowactwa, co jest bardzo kosztowne i powoduje równoczesne usunięcie innych składników
MOCZ	Łatwo dostępny, konieczność zagęszczania i normalizacji stężenia oznaczonych biomarkerów, np. stężenia kreatyny, bądź innych obecnych w moczu, ale nie reasorbowanych markerów. Obecność niektórych białek np. uromoduliny w wysokim stężeniu może utrudniać oznaczanie innych białek występujących w niskim stężeniu
ŚLINA	Duża zawartość oligosacharydów, materiał łatwo dostępny
PŁYN MÓZGOWO-RDZENIOWY	Odzwierciedla zmiany w ośrodkowym układzie nerwowym, małe stężenia składników białkowych i peptydowych, problemy techniczne i etyczne związane z pobieraniem materiału szczególnie od osób zdrowych

STRATEGIE PROTEOMICZNE



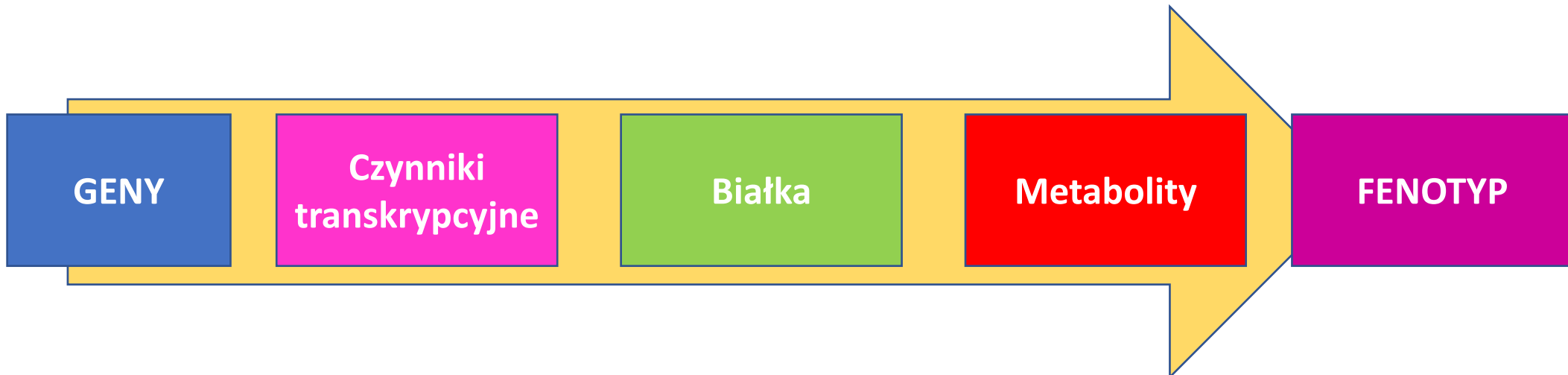


ANALIZA METABOLOMU – ZRÓŻNICOWANEJ CHEMICZNIE MATRYCY

METABOLOMIKA - jest nauka obejmującą wszechstronną, całościową analizę jakościową i ilościową oraz identyfikację endogennych, drobnocząsteczkowych związków – metabolitów.

METABOLOM – zbiór substancji drobnocząsteczkowych o różnych właściwościach fizyko-chemicznych, będących elementami szlaków metabolicznych w badanym systemie: organizmie, tkankach, komórkach.

W HMDB zidentyfikowano ponad 6500 metabolitów
Liczba metabolitów roślinnych wynosi około 200 000.

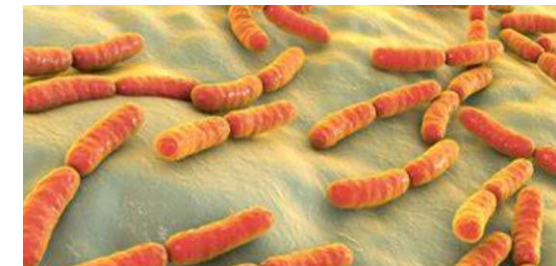
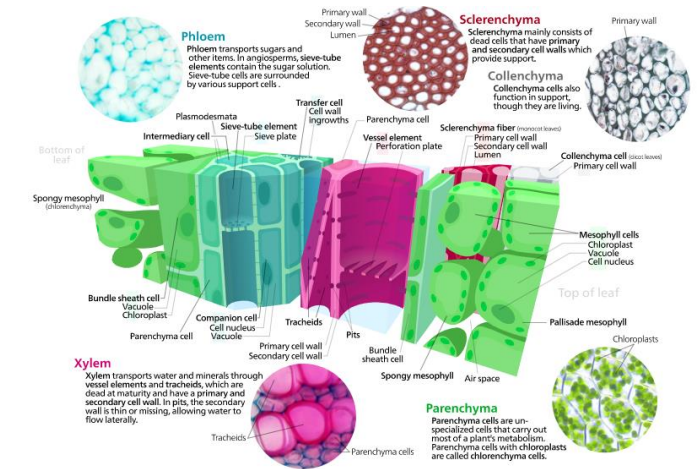
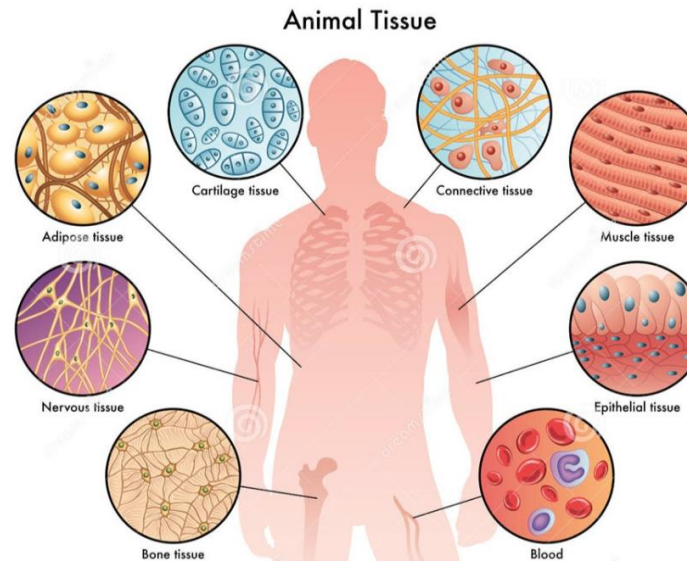


STRATEGIE STOSOWANE W ANALIZIE METABOLOMU (wg. Fiena, 2001)

- Analiza określonego metabolitu lub grupy metabolitów (ang. targetted analysis).
- Analiza ilościowa grupy metabolitów np. wyselekcjonowanego szlaku metabolitów (ang. metabolite profiling).
- Metabolomika: całościowa analiza ilościowa badanego organizmu, komórki.
- Analiza „odcisku palca” metabolitu (ang. Metabolite fingerprinting).

PODSTAWOWE ŹRÓDŁA PRÓBEK BIOLOGICZNYCH

- TKANKI ZWIERZĘCE
- TKANKI ROŚLINNE
- HODOWLE KOMÓRKOWE
- PŁYNY USTROJOWE
- BAKTERIE
- WIRUSY



KTÓRE SKŁADNIKI BADANEJ PRÓBKKI SĄ WAŻNE?



W surowicy krwi znajduje się 12 rodzajów białek organizmu stanowiących 96% wszystkich rodzajów białek, a różnica stężeń między nimi może wynosić nawet 10^6 . pozostałe 4% to składniki najistotniejsze dla diagnostyki.

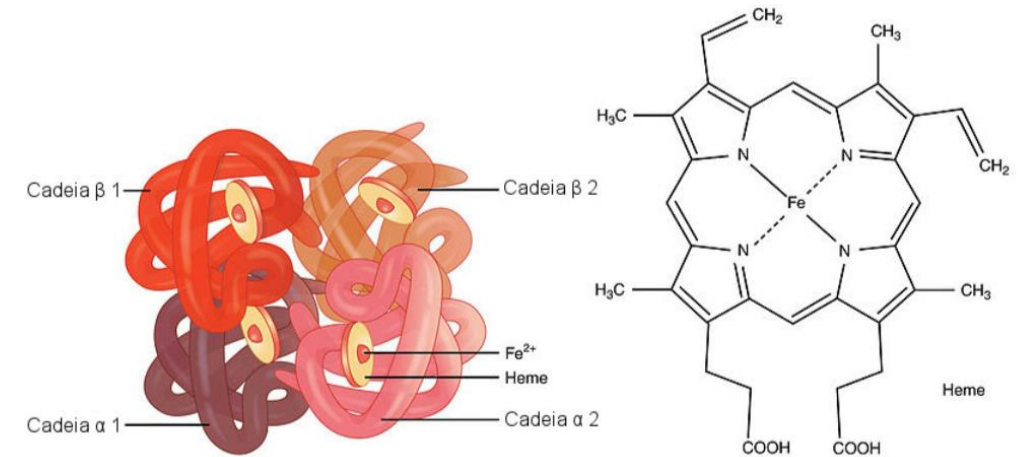
Usuwanie białek maskujących:

- chromatografia powinowactwa
- frakcjonowanie
- zbogacanie związków o małym stężeniu

**Wszystkie białka są ważne dla diagnostyki,
ale nie wszystkie możemy przeanalizować
w mieszaninie.**

ZANIECZYSZCZENIA – PODSTAWOWY PROBLEM ANALITYKA

- zanieczyszczenia elementami krwi - hemoglobina



- zanieczyszczenia kreatynami (stosowanie komór laminarnych)



- rodzaj probówek



ZANIECZYSZCZENIA BIAŁEK

RODZAJ ZANIECZYSZCZENIA	WYWOŁYWANE EFEKTY
SOLE	Uniemożliwiają analizę lub znacznie pogarszają warunki chromatograficzne, elektroforetyczne
KWASY NUKLEINOWE	Tworzą kompleksy z białkami, osłabiają ogniskowanie izoelektryczne, dają silne tło podczas wybarwiania srebrem
POLISACHARYDY	Pogorszenie rozdziału elektroforetycznego, „smużenie białek”, zatyka pory żelu
LIPIDY	Zmniejszają rozpuszczanie białek
PROTEINAZY	Degradują białka
DETERGENTY	Tworzą ujemnie naładowane kompleksy, uniemożliwiają 2-DE
ENDOGENNE, MAŁE JONY, NUKLEOTYDY, FOSFOLIPIDY	Zakłócają ogniskowanie izoelektryczne

SEPARACJA I IZOLACJA BIAŁEK

- LIZA KOMÓREK
- TECHNIKI SEPARACJI
- PROCES ROZPUSZCZANIA BIAŁEK
- OCZYSZCZANIE BIAŁEK
- ZAGĘSZCZANIE



SEPARACJA I IZOLACJA BIAŁEK

Dezintegracja tkanek:

- Homogenizacja
- Mineralizacja (tylko w połączeniu z analizą specyjną np. pierwiastków – metoda nieprzydatna w analizie proteomicznej)
- Wirowanie
- Sonifikacja
- Rozcieranie



SEPARACJA I IZOLACJA BIAŁEK

Dezintegracja tkanek:

- **Detergenty**

Detergenty powodują zwiększenie rozpuszczalności białek i zerwanie oddziaływań między białkami a lipidami (głównie dla białek błonowych)

Niejonowe: Triton X-100, Nonidet P-40, Tween 80,

Amforetyczne: CHAPS



SEPARACJA I IZOLACJA BIAŁEK

Dezintegracja tkanek:

- **Detergenty**

Detergenty powodują zwiększenie rozpuszczalności białek i zerwanie oddziaływań między białkami a lipidami (głównie dla białek błonowych)

Jonowe: cholan, deoksycholan sodu – forma natywna, denaturacja białek



SEPARACJA I IZOLACJA BIAŁEK

Liza komórek:

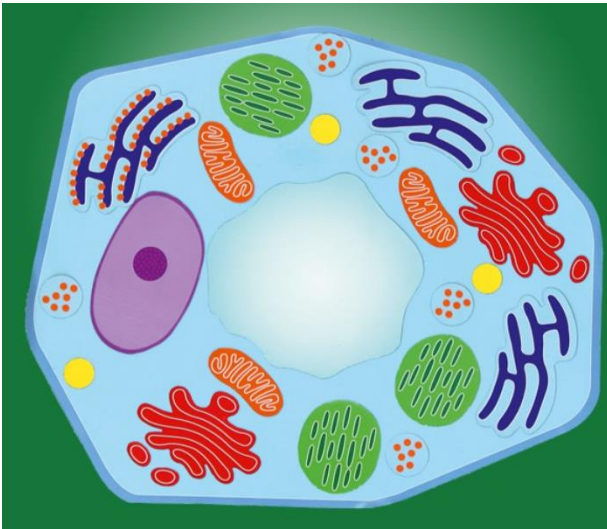
- Szok osmotyczny
- Homogenizacja w roztworze powodującym lizę
- Naprzemienne zamrażanie i rozmrażanie



SEPARACJA I IZOLACJA BIAŁEK

Techniki separacji

LIZA



Białka

Lipidy

Kwasy nukleinowe

Polisacharydy

2-DE

PROCES ROZPUSZCZANIA BIAŁEK

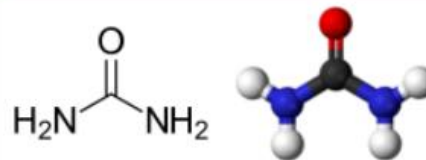
1. Czynniki chaotropowe

2. Detergenty

3. Odczynniki redukujące

4. Inhibitory proteazy

Mocznik



Próbka mocznika krystalicznego

Nazewnictwo

[pokaż]

Ogólne informacje

Wzór sumaryczny	$\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$
Inne wzory	$\text{CO}(\text{NH}_2)_2$, H_2NCONH_2
Masa molowa	60,06 g/mol
Wygląd	biały krystaliczny proszek o zapachu podobnym do amoniaku ^[2]

Tiomocznik



próbka związku

Nazewnictwo

[pokaż]

Ogólne informacje

Wzór sumaryczny	$\text{CH}_4\text{N}_2\text{S}$
Inne wzory	$(\text{H}_2\text{N})_2\text{C}=\text{S}$
Masa molowa	76,12 g/mol
Wygląd	białe krystaliczne ciało stałe ^[1]

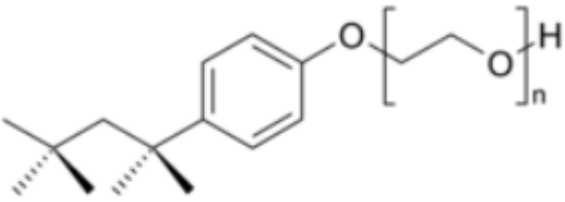
PROCES ROZPUSZCZANIA BIAŁEK

1. Czynniki chaotropowe

2. Detergenty

3. Odczynniki redukujące

4. Inhibitory proteazy

Triton X-100	
 $n = 9-10$	
Nazewnictwo	[pokaż]
Ogólne informacje	
Wzór sumaryczny	$C_{14}H_{21}(OC_2H_4)_nOH$; $n = 9-10$
Masa molowa	$n = 9$: 602,80 g/mol $n = 10$: 646,85 g/mol
Wygląd	bezbarwna lub lekko żółtawa, lepka, przezroczysta ciecz

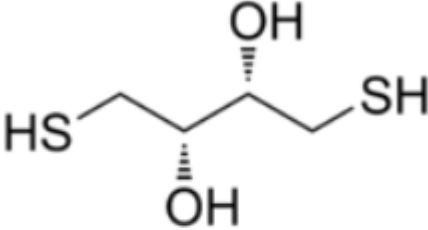
PROCES ROZPUSZCZANIA BIAŁEK

1. Czynniki chaotropowe

2. Detergenty

3. Odczynniki redukujące

4. Inhibitory proteazy

Ditiotreitol	
	
Nazewnictwo	[pokaż]
Ogólne informacje	
Wzór sumaryczny	$C_4H_{10}O_2S_2$
Masa molowa	154,25 g/mol
Wygląd	słabo higroskopijne igły ^[1]

PROCES ROZPUSZCZANIA BIAŁEK

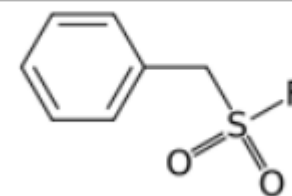
1. Czynniki chaotropowe

2. Detergenty

3. Odczynniki redukujące

4. Inhibitory proteazy

Fluorek fenylometylosulfonylu



Nazewnictwo [\[pokaż\]](#)

Ogólne informacje

Wzór sumaryczny	C ₇ H ₇ FO ₂ S
Masa molowa	174,19 g/mol
Wygląd	białe igły ^{[1][2]}

OCZYSZCZANIE BIAŁEK

ŁADUNEK

HYDROFOBOWOŚĆ

KSZTAŁT
CZĄSTECZKI

MASA MOŁOWA

ROZPUSSZCZALNOŚĆ

ZANIECZYSZCZENIA BIAŁEK

RODZAJ ZANIECZYSZCZENIA	WYWOŁYWANE EFEKTY
SOLE	Uniemożliwiają analizę lub znacznie pogarszają warunki chromatograficzne, elektroforetyczne
KWASY NUKLEINOWE	Tworzą kompleksy z białkami, osłabiają ogniskowanie izoelektryczne, dają silne tło podczas wybarwiania srebrem
POLISACHARYDY	Pogorszenie rozdziału elektroforetycznego, „smużenie białek”, zatyka pory żelu
LIPIDY	Zmniejszają rozpuszczanie białek
PROTEINAZY	Degradują białka
DETERGENTY	Tworzą ujemnie naładowane kompleksy, uniemożliwiają 2-DE
ENDOGENNE, MAŁE JONY, NUKLEOTYDY, FOSFOLIPIDY	Zakłócają ogniskowanie izoelektryczne

ZAGĘSZCZANIE

Odparowywanie buforu

WYTRĄCANIE

WIROWANIE

**ULTRAWIROWANIE-
SELEKTYWNE
MEMBRANY**

ZAGĘSZCZANIE

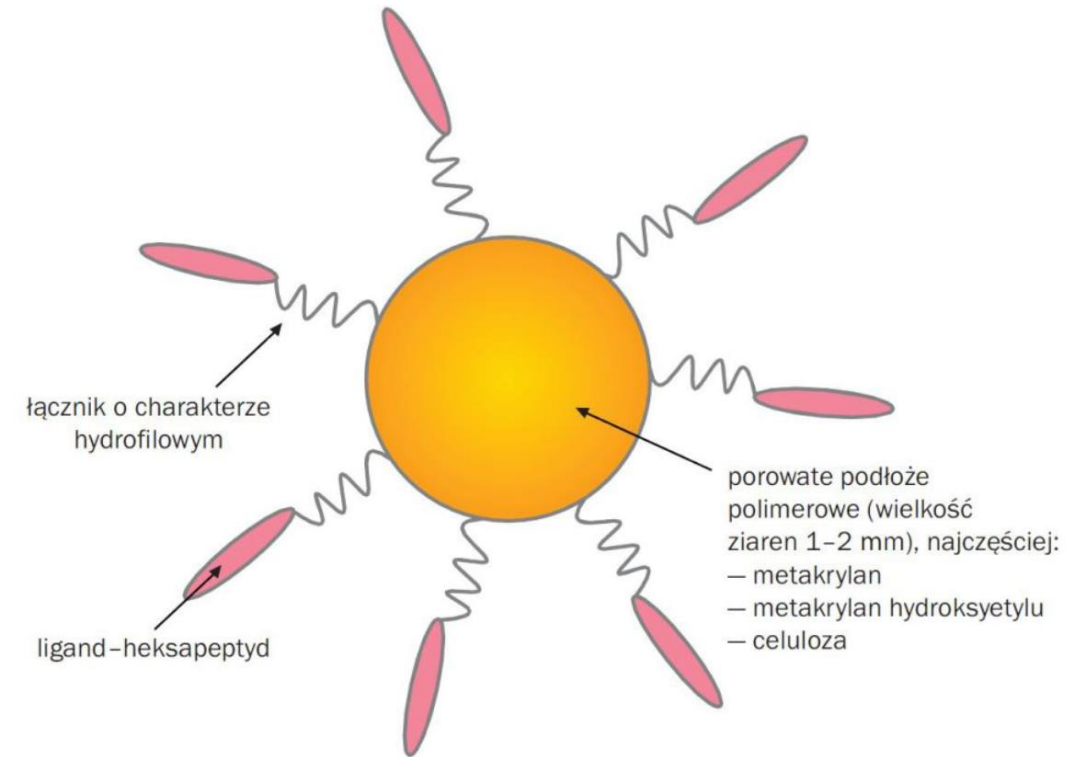
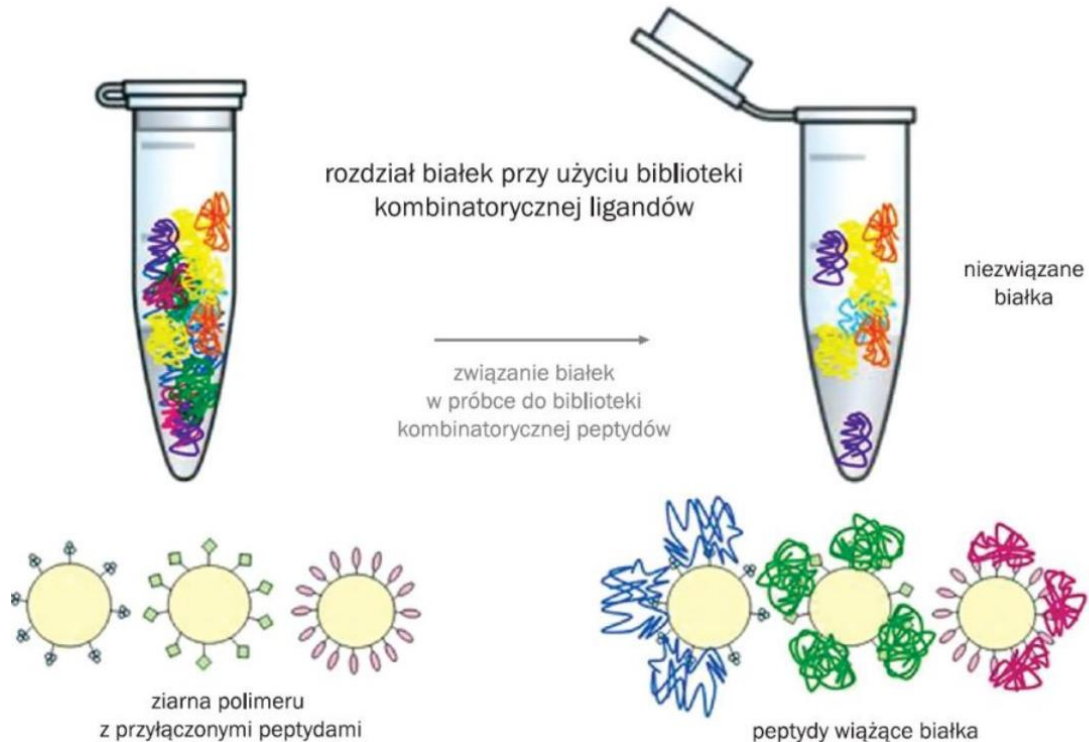
ELEKTROFOREZA

METODY
CHROMATOGRAFICZNE

WYRÓWNYWANIE
STĘŻEŃ

ZAGĘSZCZANIE

WYRÓWNYWANIE STĘŻEŃ

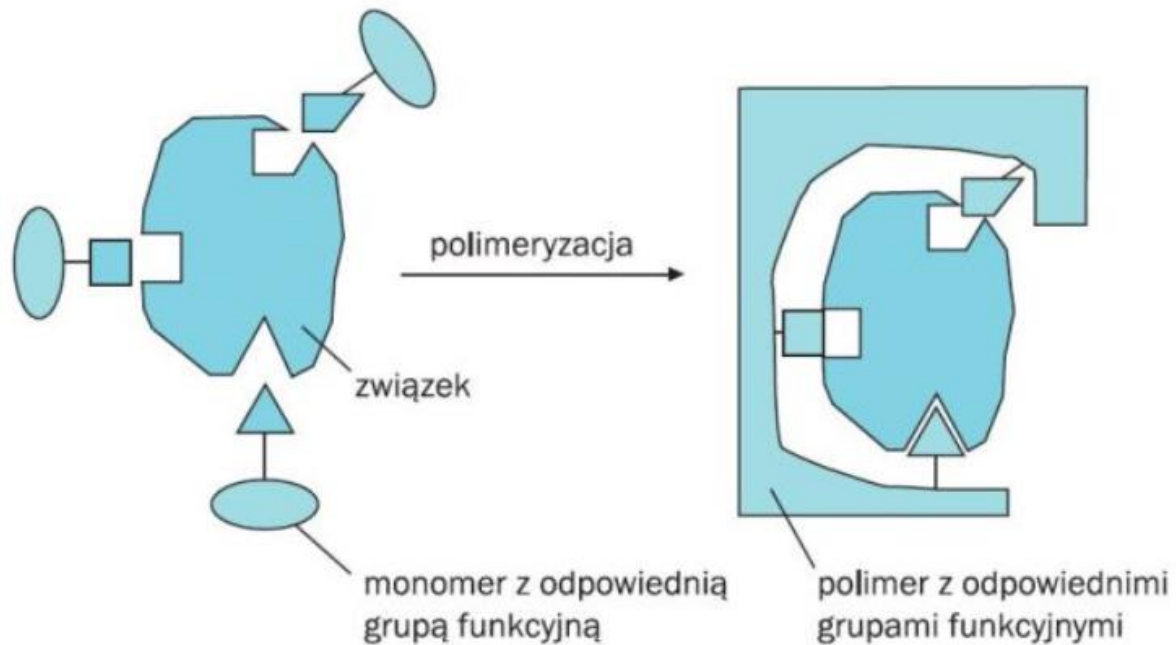


ZAGĘSZCZANIE

Kolumny do SPE

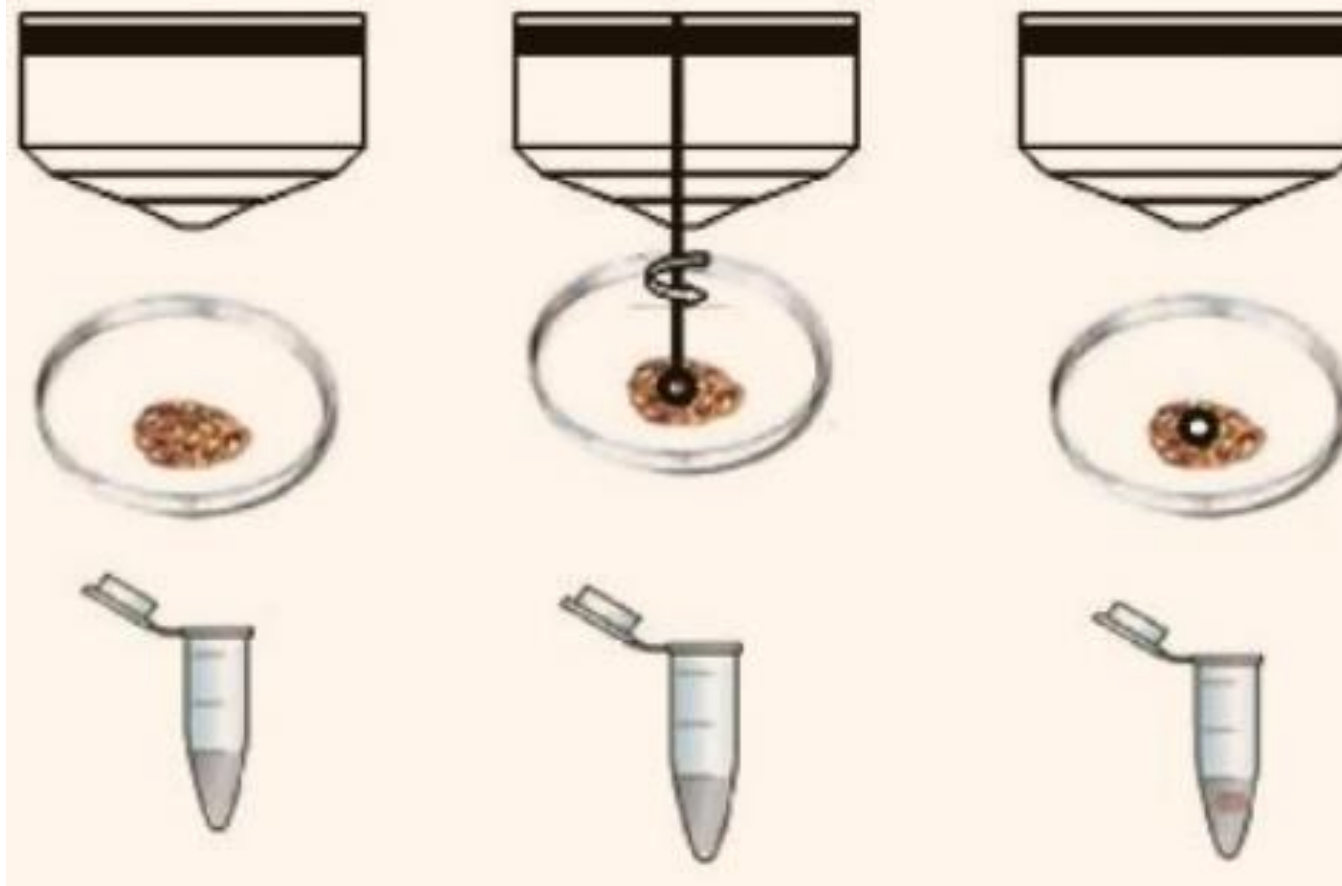


EKSTRAKCJA DO FAZY STAŁEJ



Polimery z pamięcią kształtu

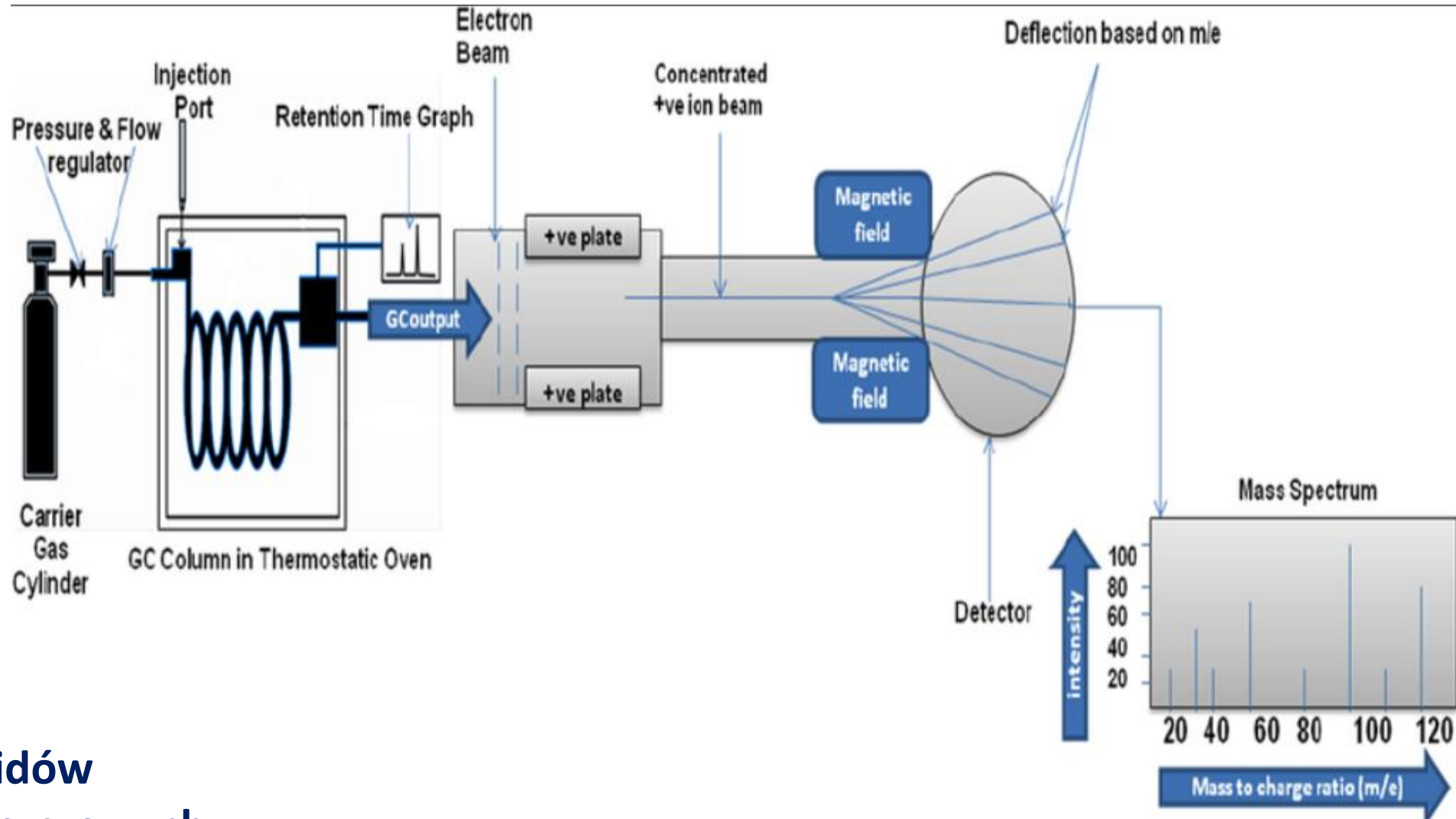
Laserowe pozyskiwanie mikroskrawków



Laserowe pozyskiwanie
mikroskrawków

Temat do opracowania:

GC-MS



Analiza
Neurosteroidów
Kwasów tłuszczowych

ELEKTROFOREZA

1-DE

2-DE

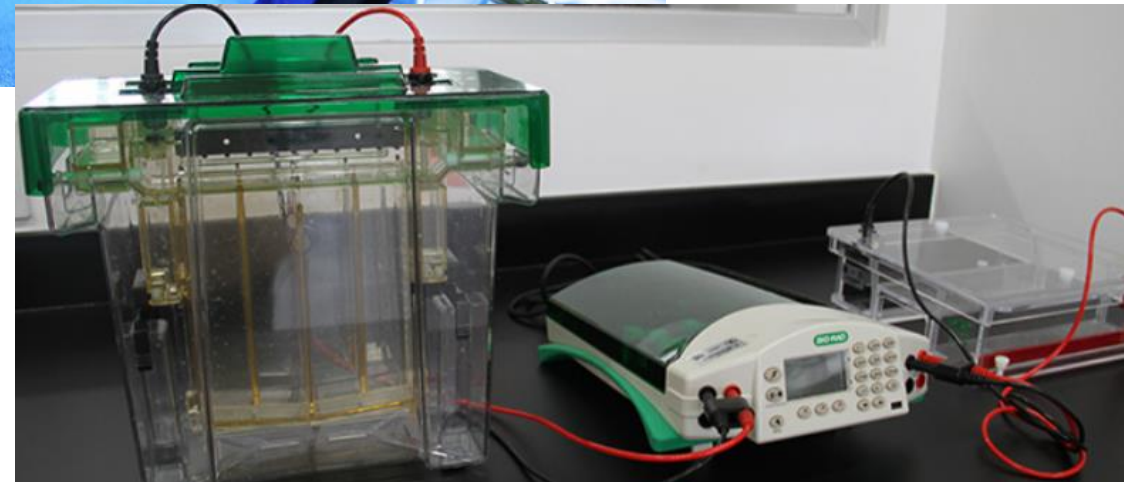
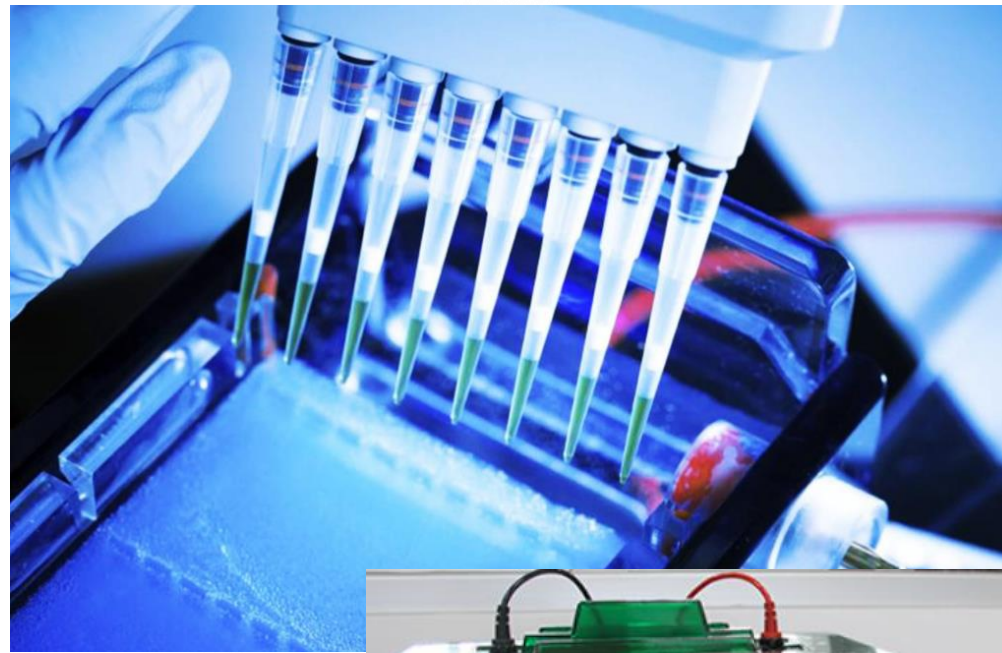
$$\mu = V/E = Z/f$$

V- prędkość z jaką porusza się cząsteczka

E -wartość natężenia pola elektrycznego

Z -ładunek całkowity cząsteczki

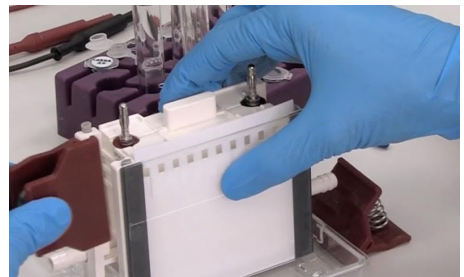
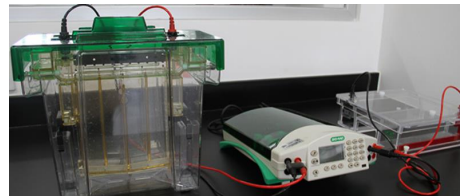
F-współczynnik tarcia zależy od kształtu i wielkości cząsteczki



ELEKTROFOREZA

1-DE

2-DE



$$\%T = \frac{\text{akrylamid} + \text{bisakrylamid} [g]}{\text{objętość roztworu} [ml]} \times 100$$

%T – całkowite stężenie akrylamidu

$$\%C = \frac{\text{bisakrylamid} [g] \times 100}{\text{akrylamid} + \text{bisakrylamid} [g]}$$

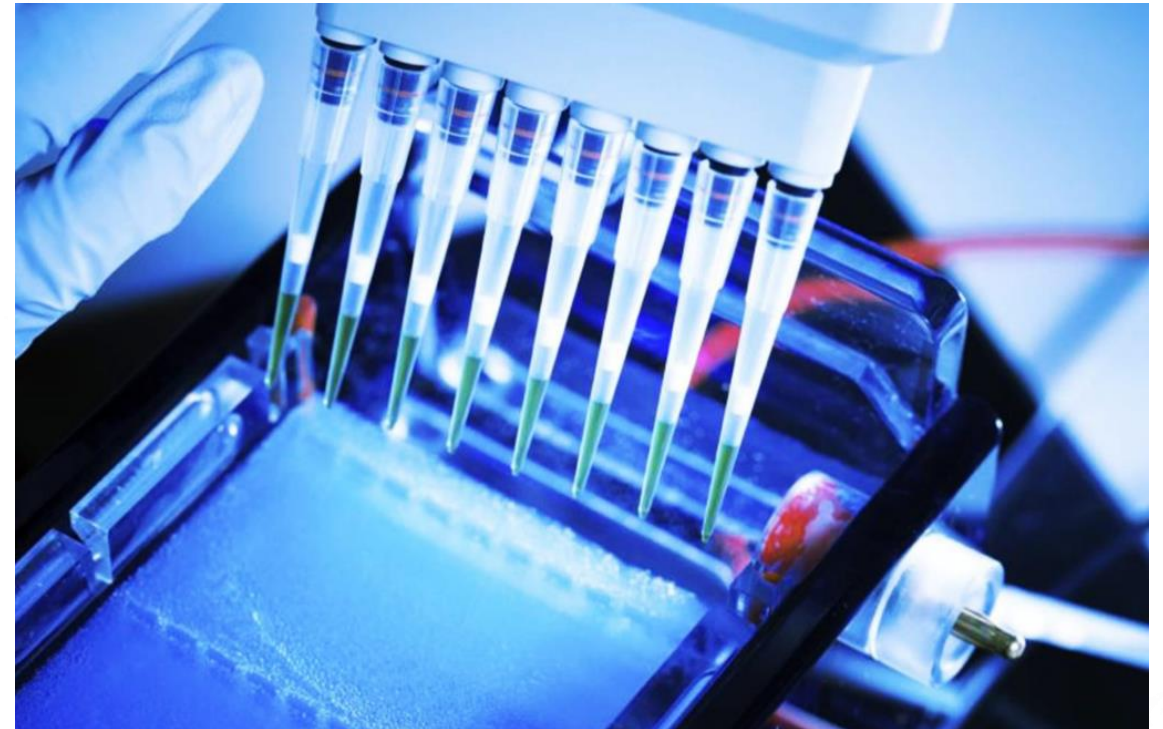
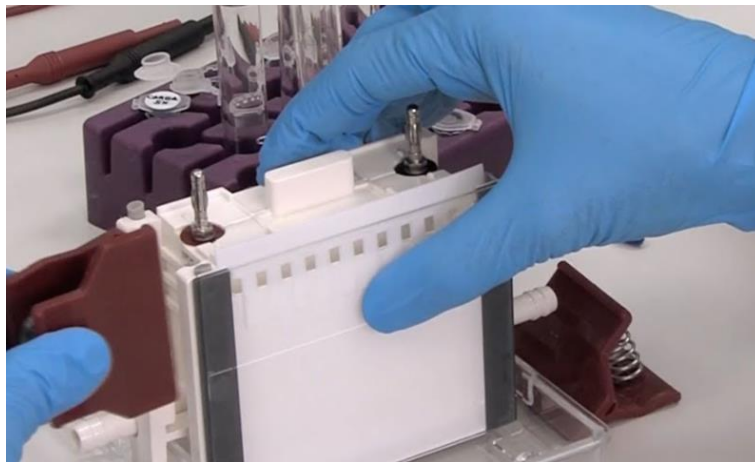
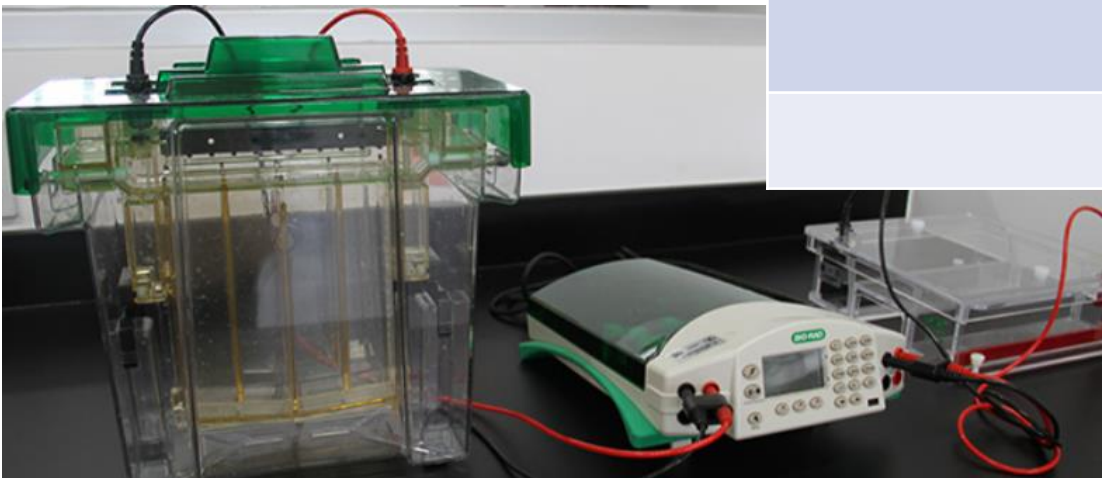
%C – stężenie substancji sieciującej

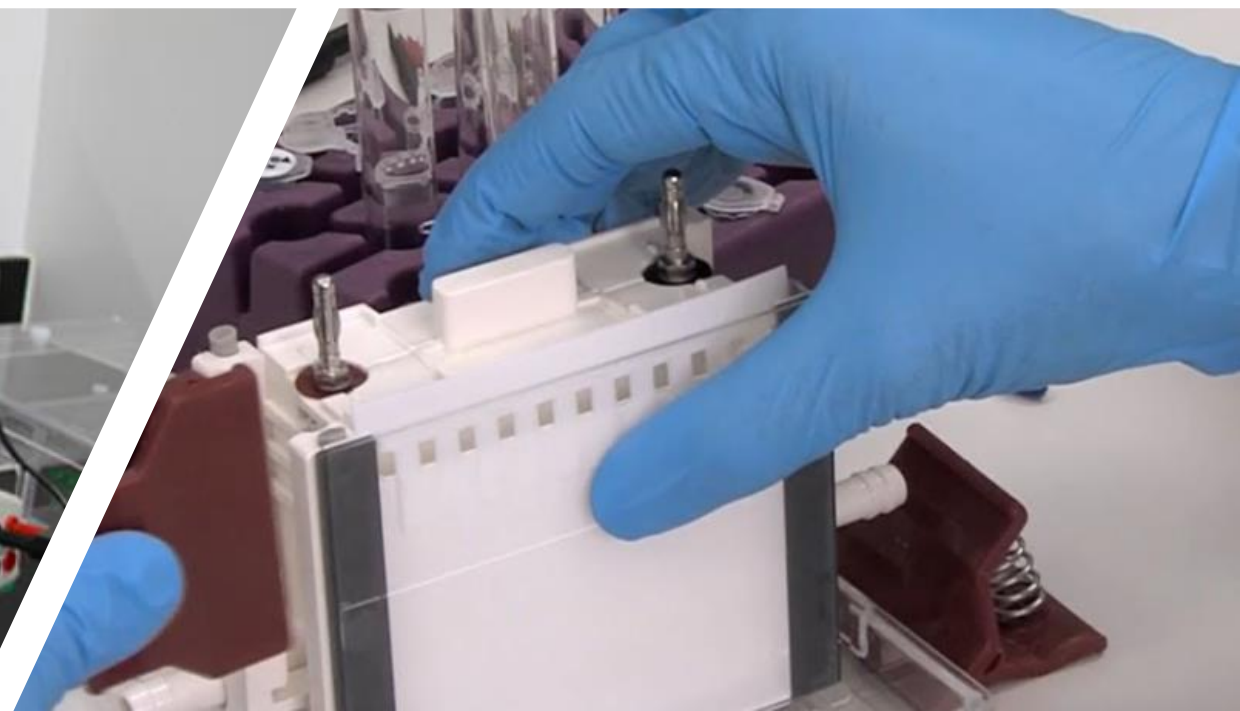
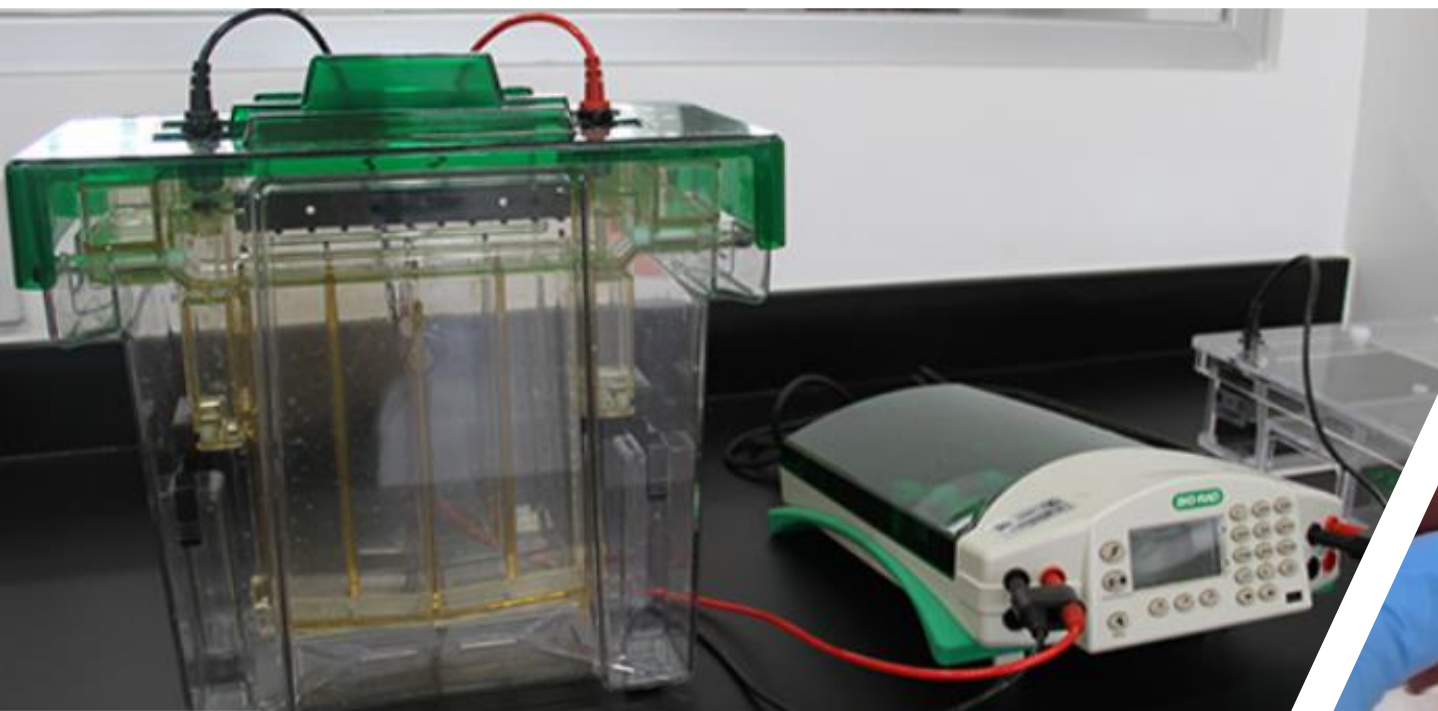
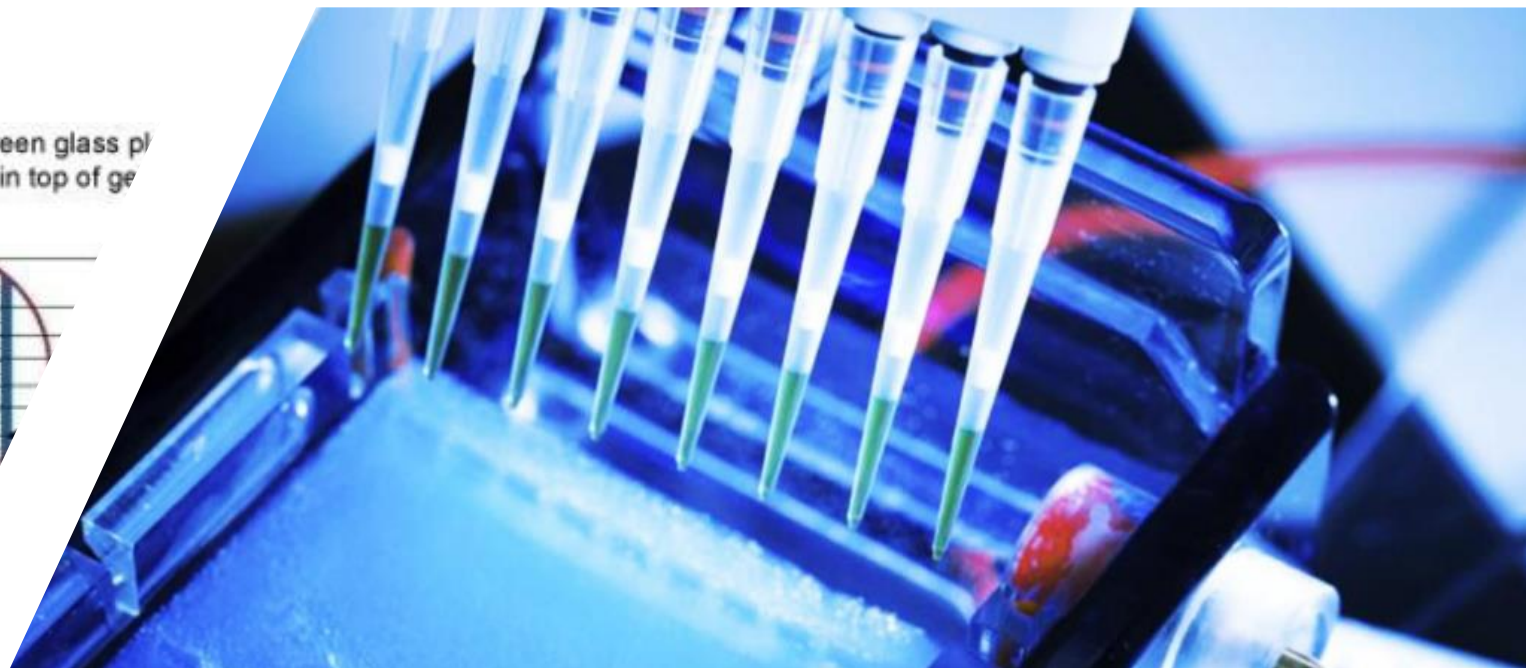
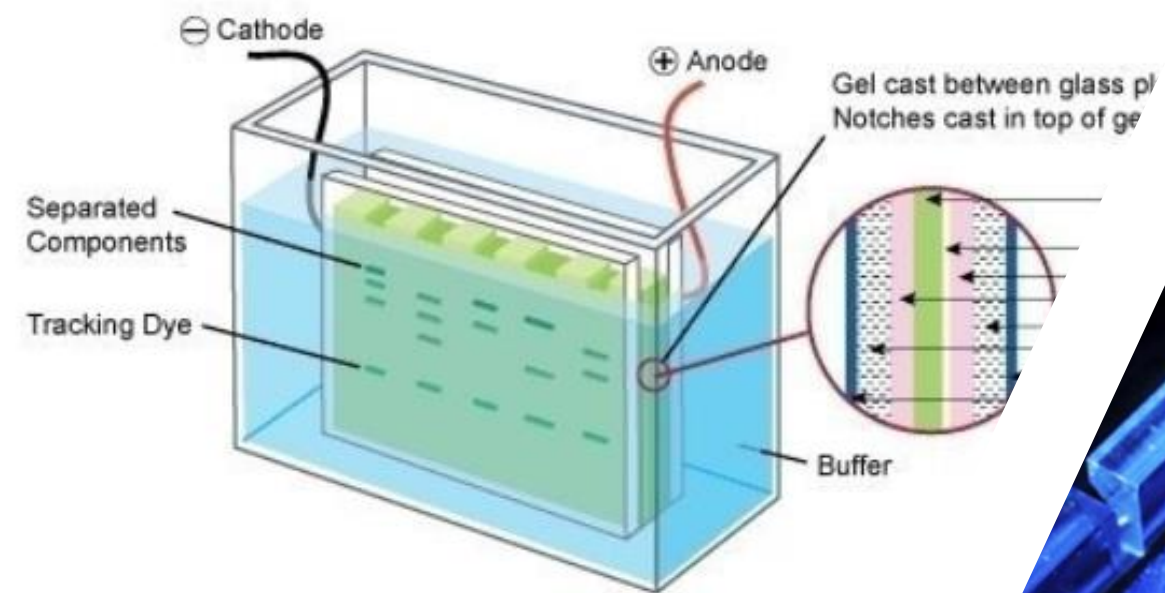
ELEKTROFOREZA

1-DE

2-DE

%C	Masa cząsteczkowa rozdzielanych substancji [kDa]
7	50-500
10	20-300
12	10-200
15	3-100

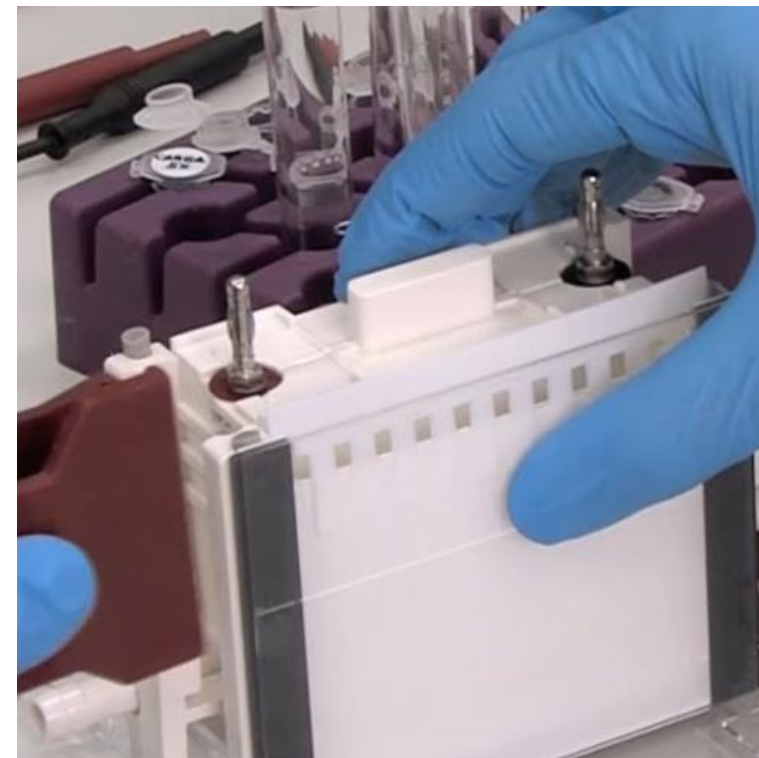
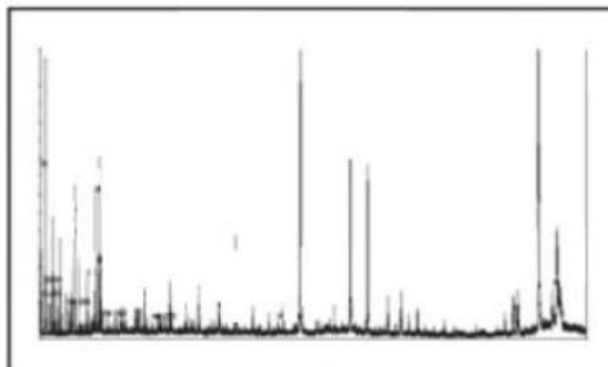
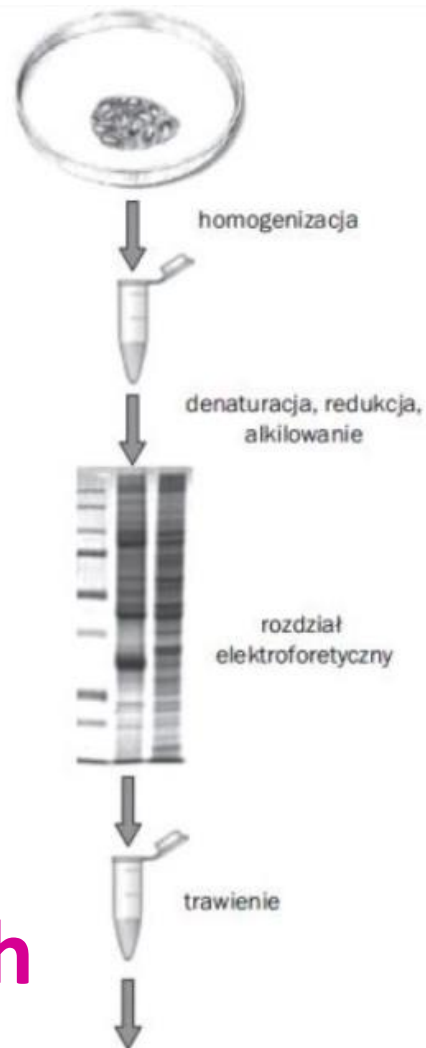




PRZYGOTOWANIE PRÓBK

ELEKTROFOREZA
w warunkach natywnych

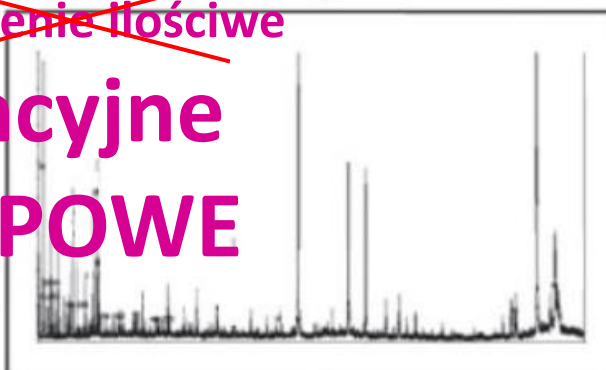
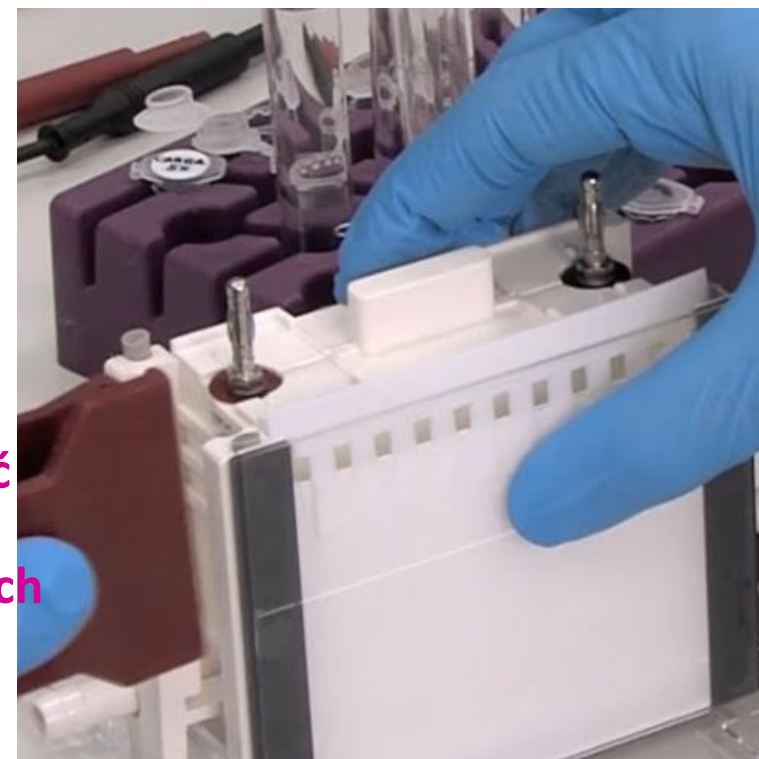
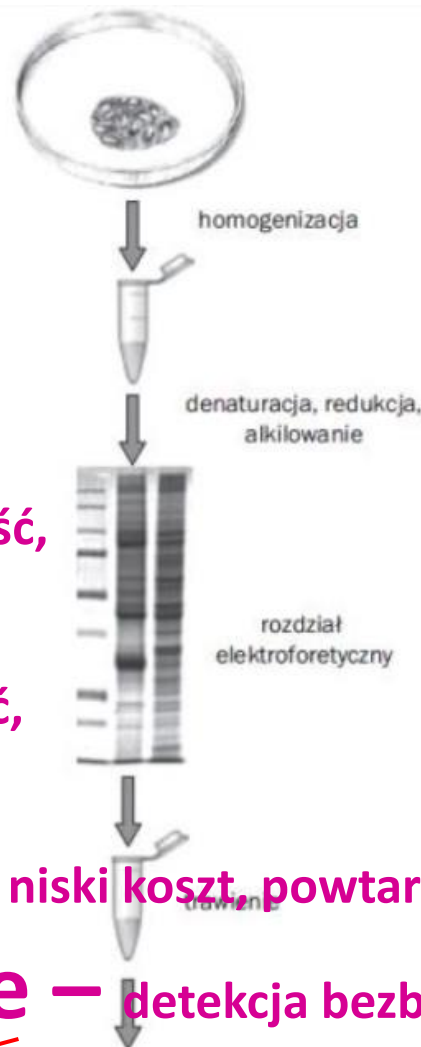
ELEKTROFOREZA
w warunkach denaturujących



ELEKTROFOREZA

BARWIENIA

- **CBB** — oznaczenia ilościowe, powtarzalność, niski koszt, wykrywalność MS
- **Sole srebra** — wysoka powtarzalność, analiza ilościowa, niski zakres liniowości
- **Czerń amidowa** — dobra czułość, niski koszt, powtarzalność
- **Sole cynku, SDS, imidazole** — detekcja bezbarwnych prążków na ciemnym tle (negatyw), ~~oznaczenie ilościowe~~
- **Barwienie fluorescencyjne**
- **ZNAKOWANIE IZOTOPOWE**



ELEKTROFOREZA

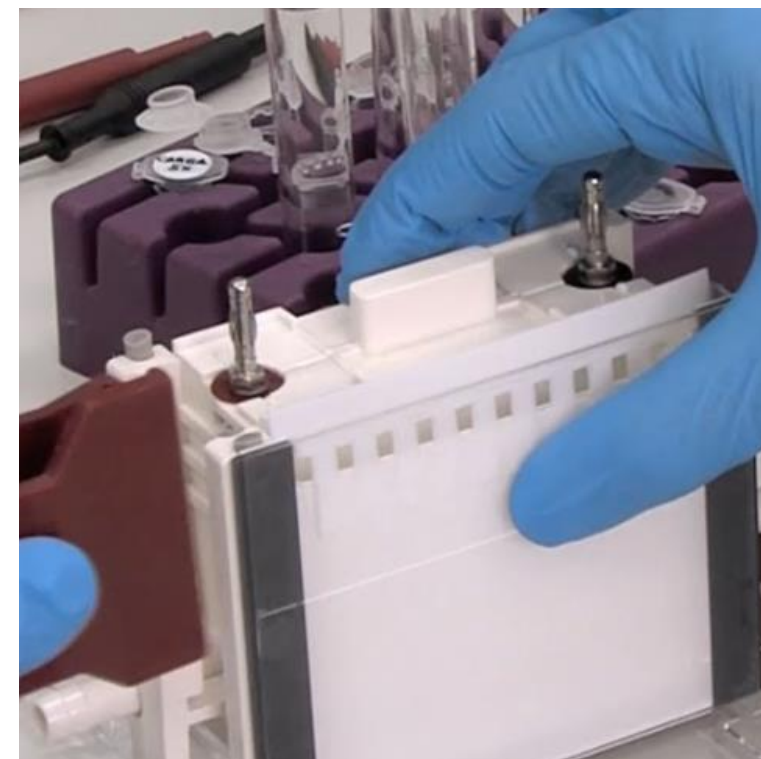
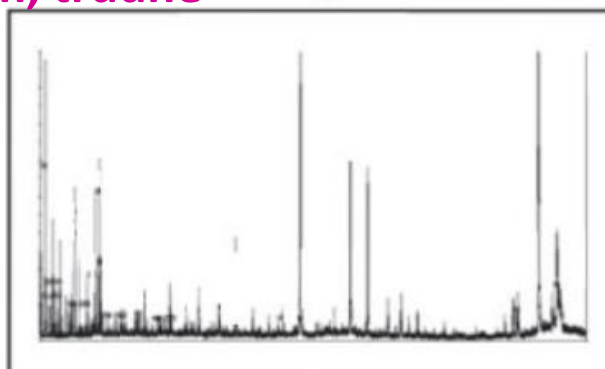
BARWIENIA

- **Barwienie fluorescencyjne**

odwracalne, szeroki zakres liniowości, do stosowania tak przed jak i po elektroforezie, limit detekcji 0.5 ng białka, koszt aparatury do odczytu wyników

- **ZNAKOWANIE IZOTOPOWE**

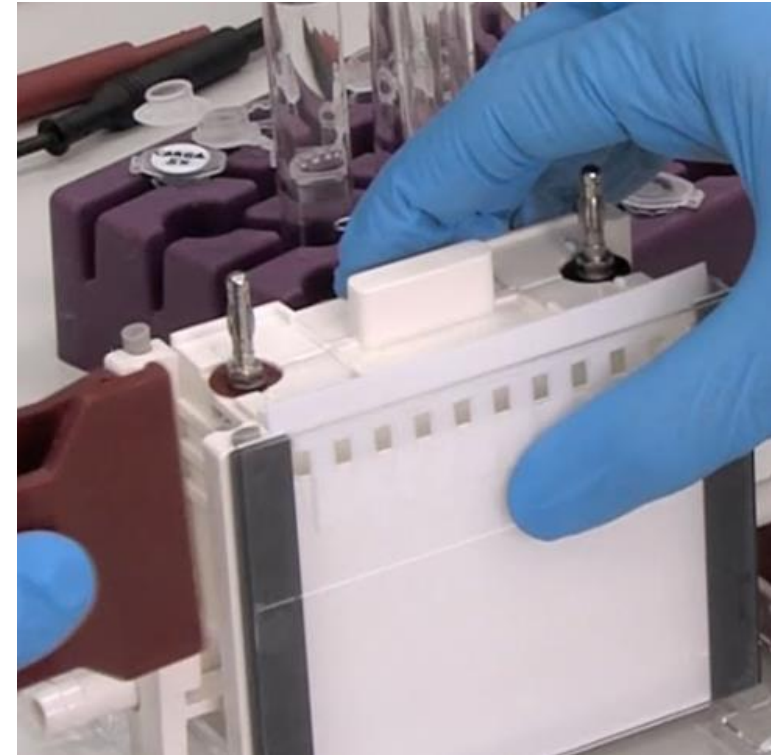
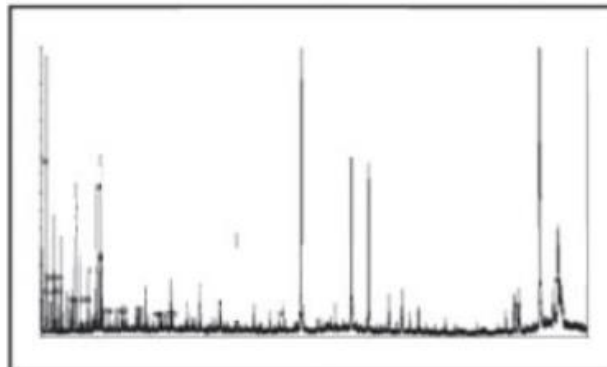
Zawsze przed rozdziałem elektroforetycznym, trudne warunki BHP, wysoka czułość, niska powtarzalność



ELKTROFOREZA 1-DE

Najczęstsze problemy oznaczenia:

- Żel nie polimeryzuje
- Obecność żelu wewnątrz studzienek
- Słabe barwienie
- Nierównomierne wybarwienie
- Żle rozdzielone prążki
- Smużenie prążków
- „Uśmiechnięte” prążki
- Rozlane prążki
- Zbyt szerokie prążki



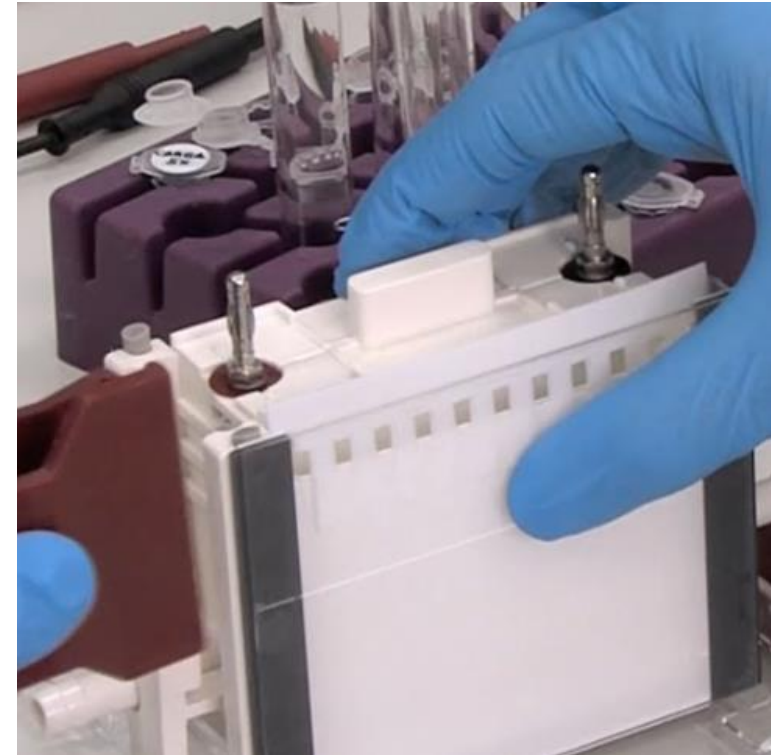
ELKTROFOREZA 2-DE

Rozdział kilkuset białek w warunkach denaturujących – 1975

- rozdział względem IP
- rozdział względem wielkości cząsteczek

Immobilizowane paski do ogniskowania tworzące stabilny gradient pH, rozdział około 5000 białek w jednym pomiarze

Elektroforeza różnicowa DIGE

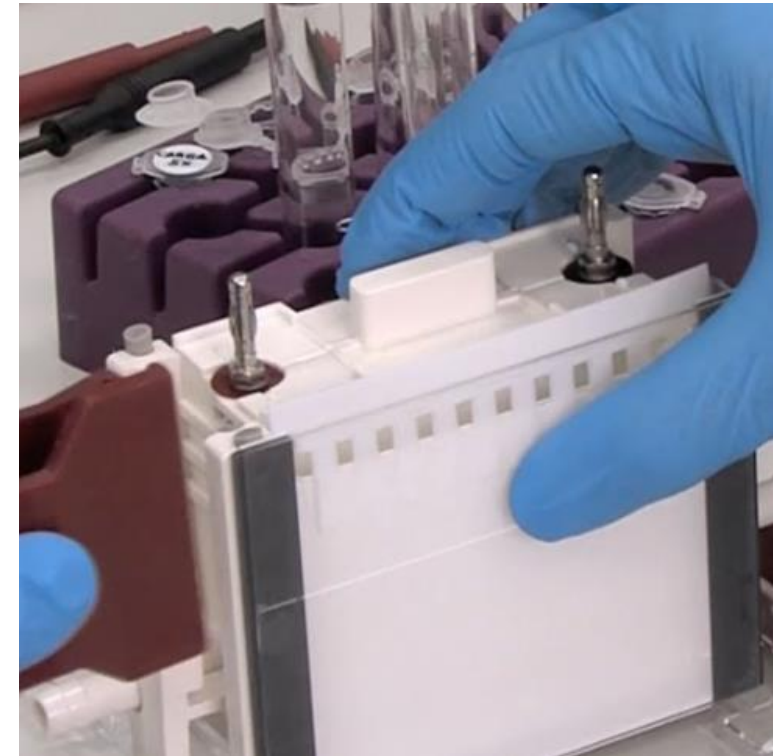


ELKTROFOREZA 2-DE

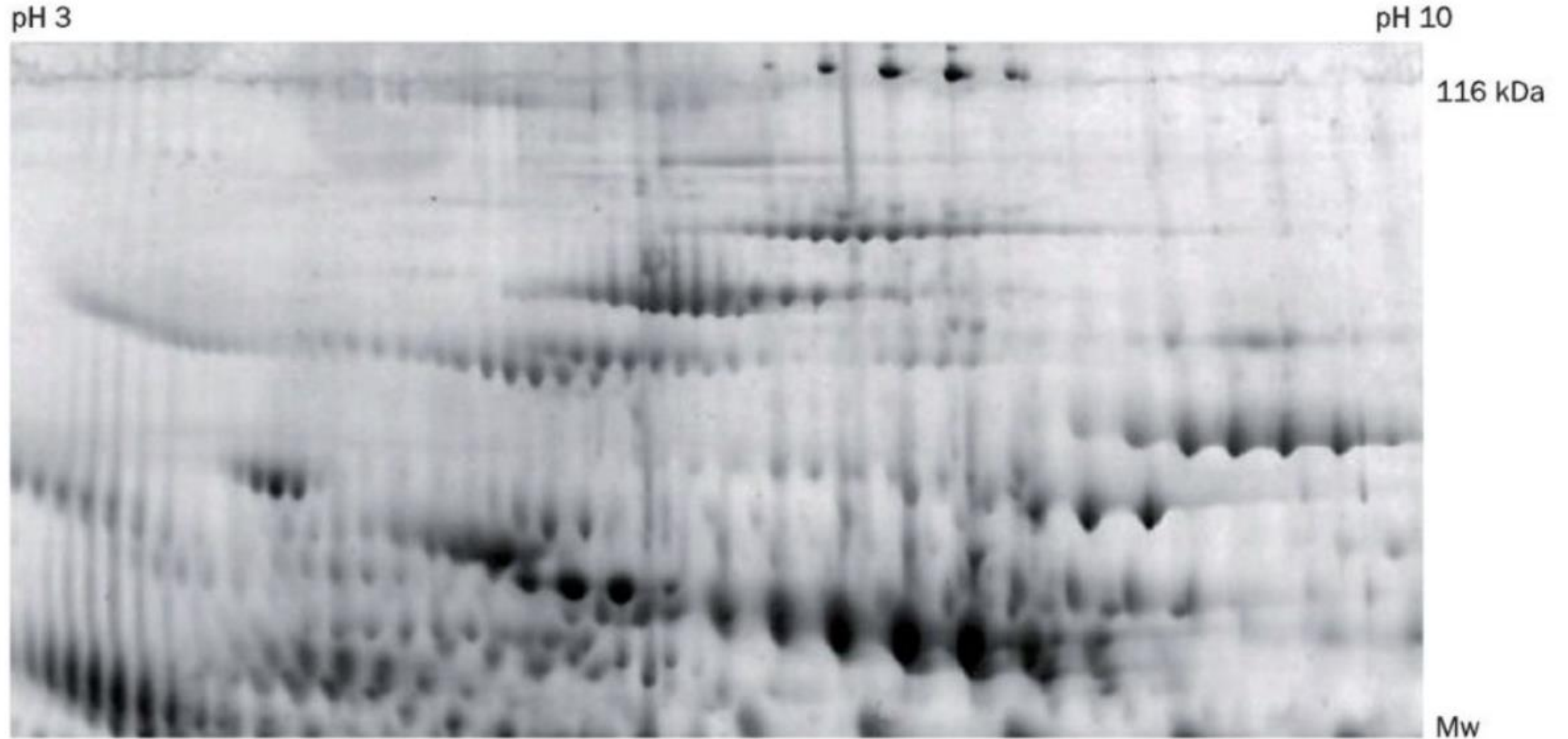
Dzięki 2 DE możliwa jest wizualizacja zmian posttranslacyjnych gdyż zmienia się wówczas masa oraz ładunek wypadkowy cząsteczki (łańcuszki na żelu).

Dla próbek biologicznych można obserwować więc zmianę lokalizacji prążków lub zmianę intensywności zabarwienia.

2DE rozdził cząsteczek o niezrównoważonym ładunku.



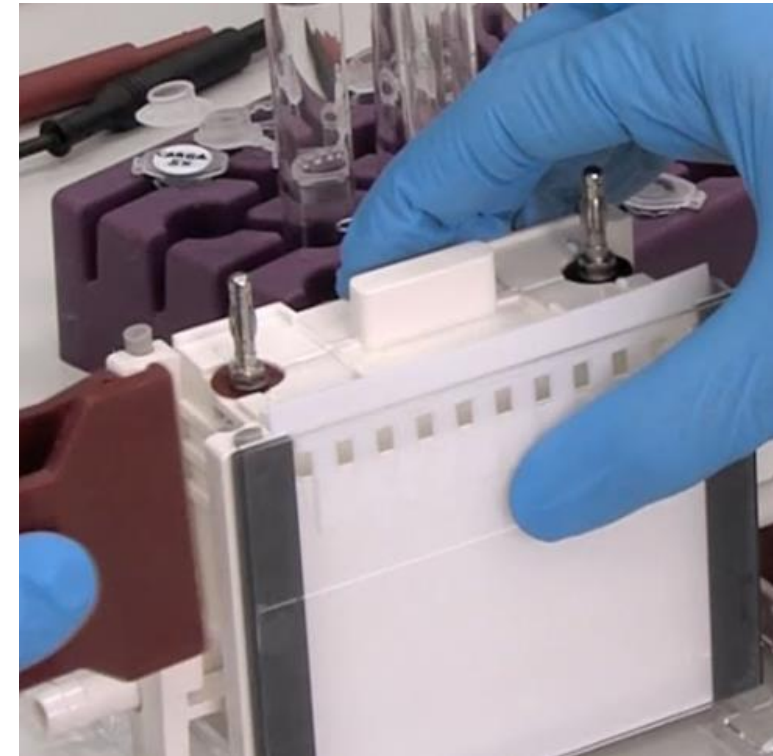
ELKTROFOREZA 2-DE



ELKTROFOREZA 2-DE

PRZYGOTOWANIE PRÓBKKI

- Homogenizacja
- Inaktywacja interferujących składników
- Rozpuszczanie
- PREFRAKCJNOWANIE
- Izolacja tylko określonych komórek z tkanki
- Rozdział organelli
- Sekwencyjna ekstrakcja
- Ekstrakcja w roztworach detergentów
- metodami chromatograficznymi



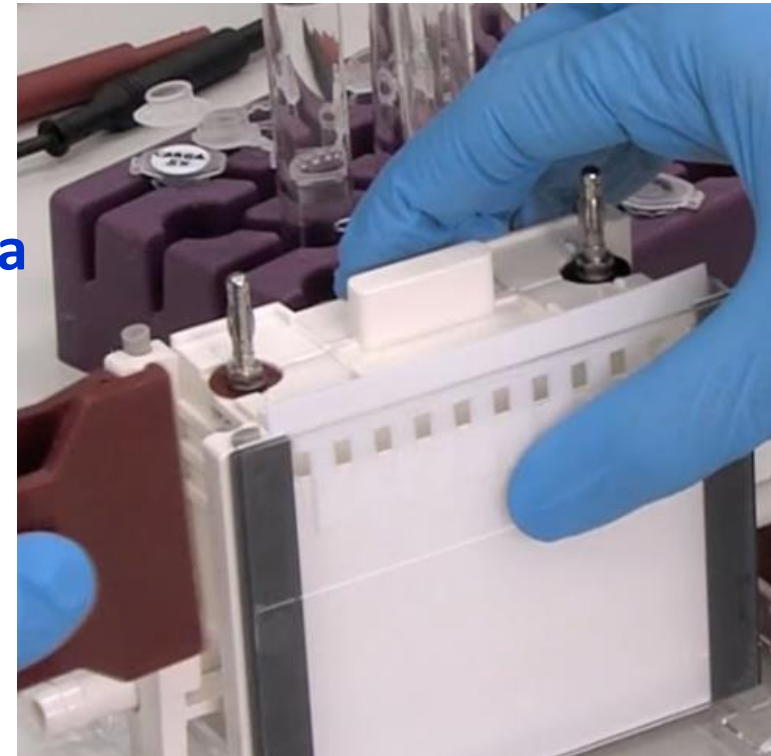
ELKTROFOREZA 2-DE

Pierwszy wymiar – **ogniskowanie izoelektryczne (IFE)**

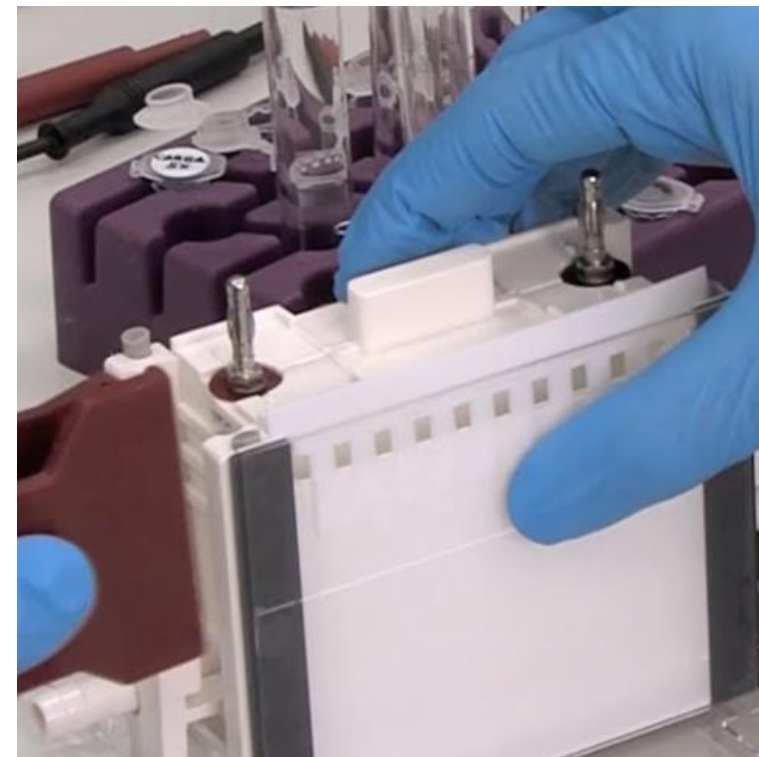
Błędy w IFE:

Poziome smużenie (precypitacja białek, utlenianie i odtworzenia mostków disiarczkowych, niewystarczające ogniskowanie, zbyt długie ogniskowanie, obecność zanieczyszczeń).

Pionowe smużenie (obecność soli w próbce, agregacja białek, krystalizacja mocznika, słaba rozpuszczalność próbki, zbyt duża ilość nałożonego białka, złe usieciowanie żelu).

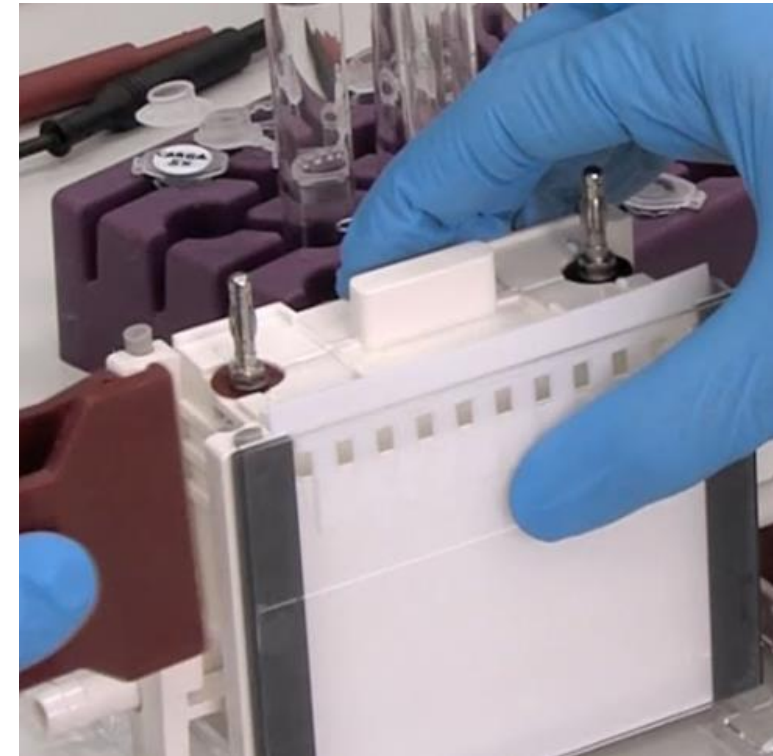
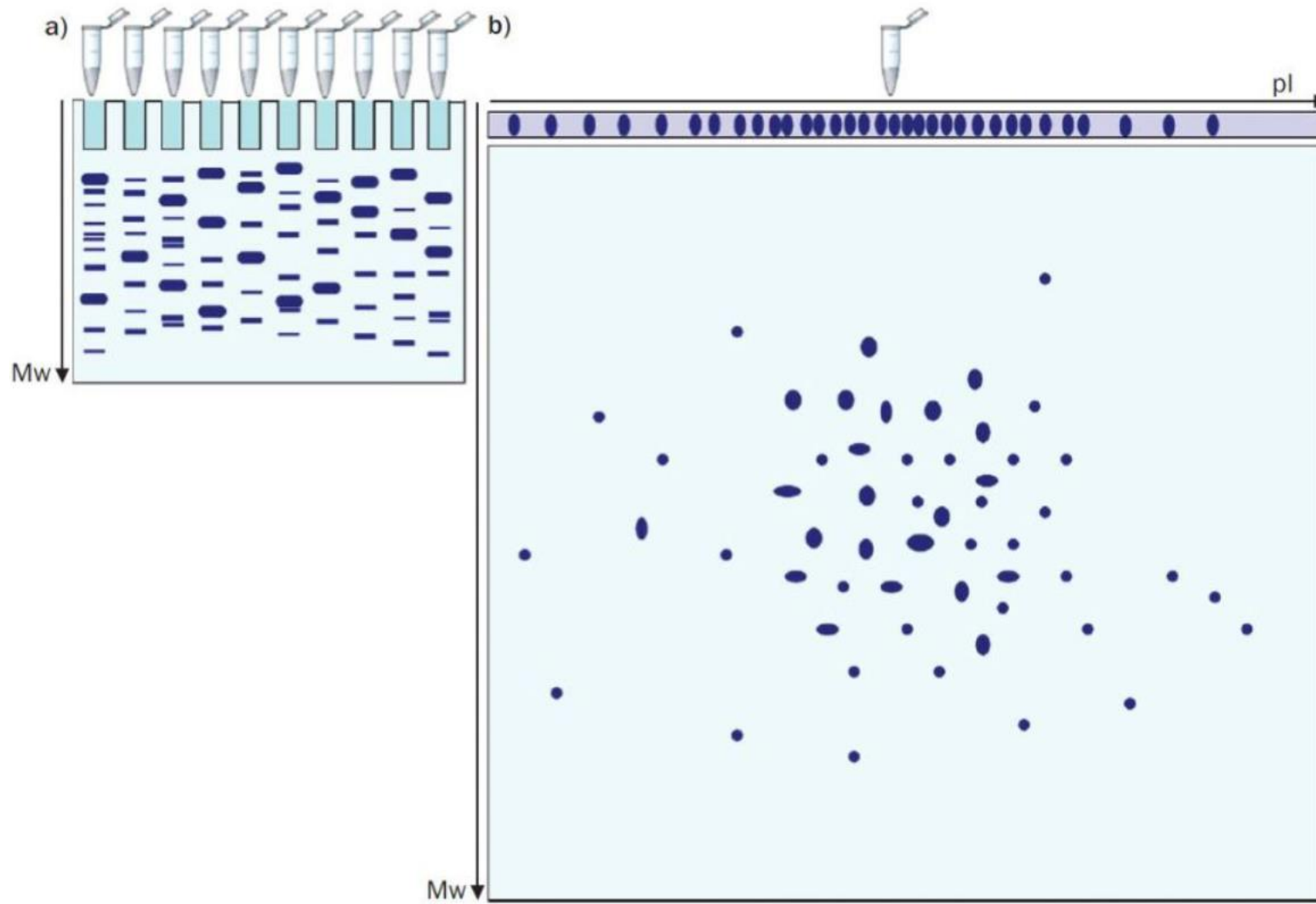


ELKTROFOREZA 2-DE



ELKTROFOREZA 2-DE

DRUGI WYMIAR



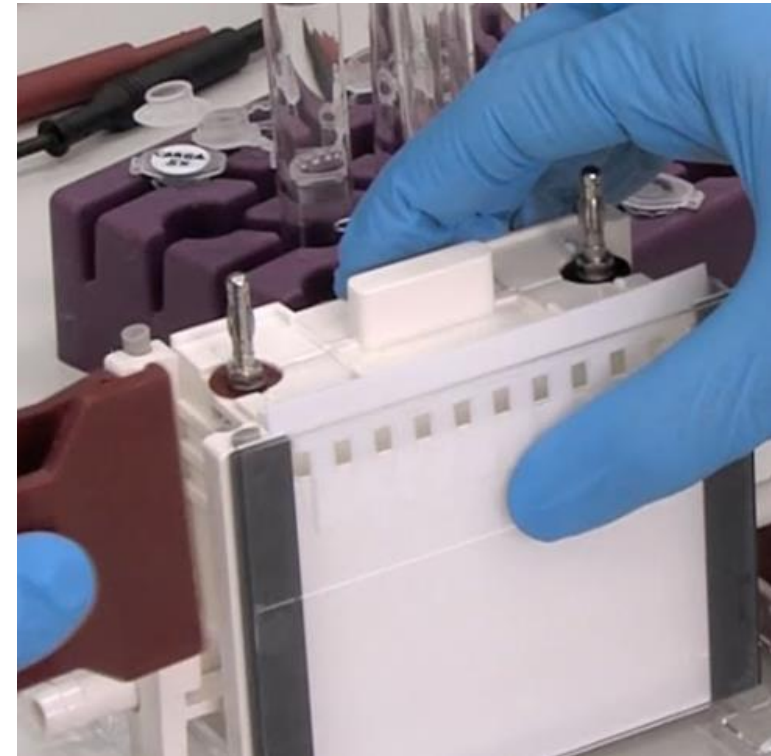
ELKTROFOREZA 2-DE

ZALETY:

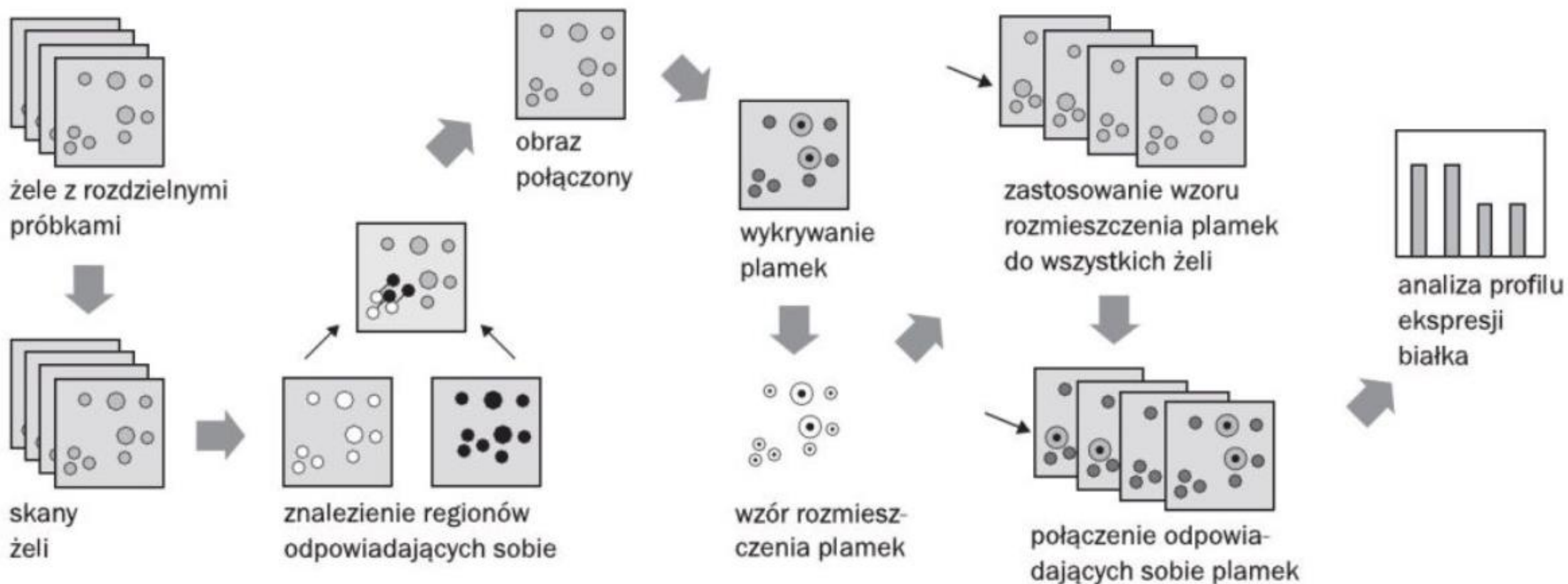
- obserwacja modyfikacja posttranslacyjnych
- częściowej proteolizy
- poziomu ekspresji białek
- rozdział kilku tys. białek jednocześnie
- detekcja 1 ng/prążek

WADY:

- ograniczona ilość próbki
- czasochłonność
- brak automatyzacji
- ograniczona powtarzalność



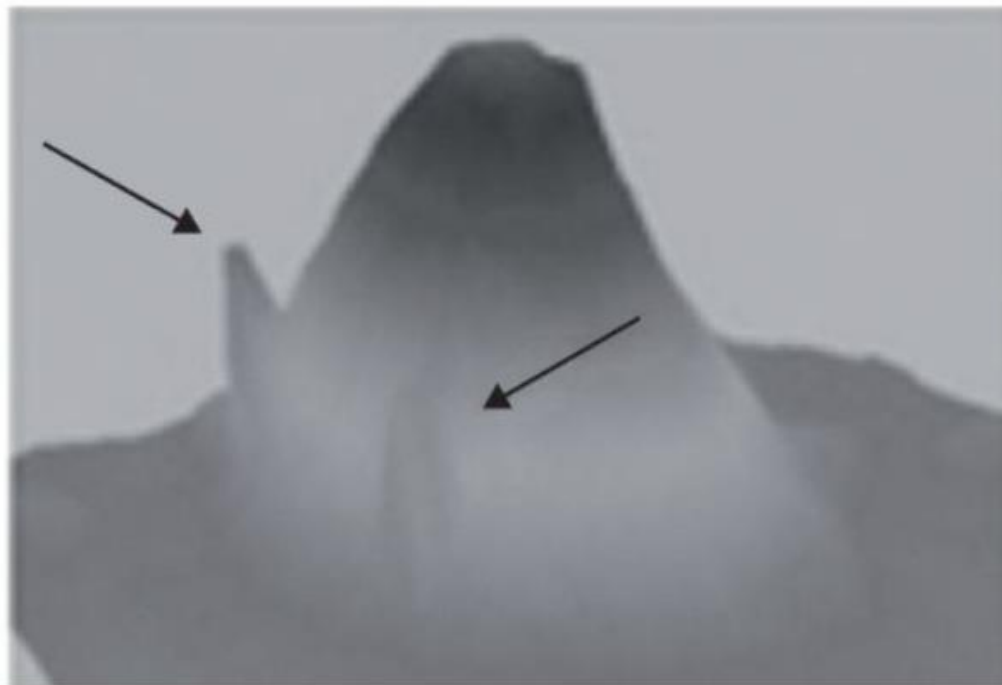
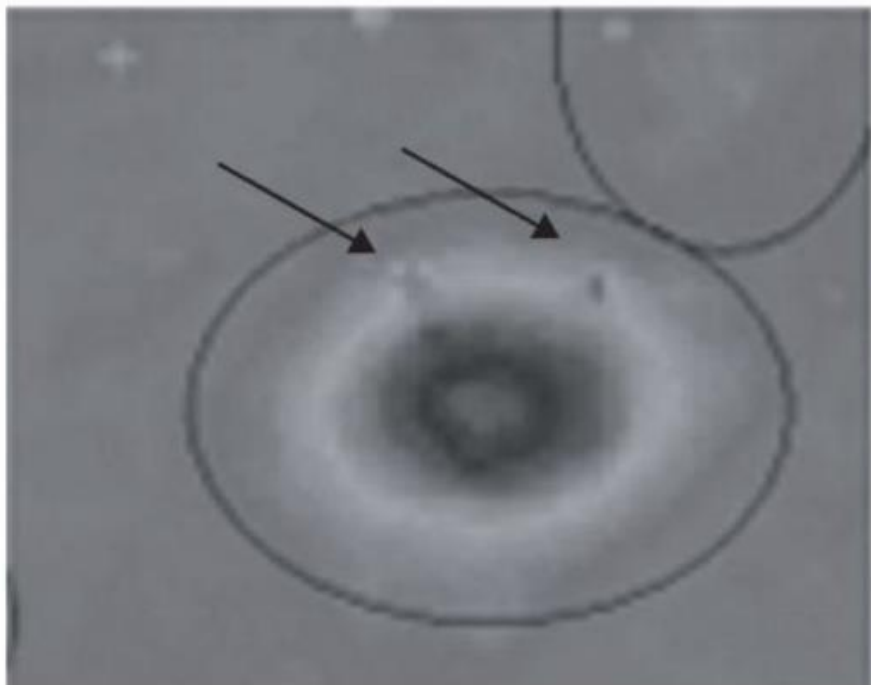
ELKTROFOREZA 2-DE – analiza komputerowa



ELKTROFOREZA 2-DE – analiza komputerowa

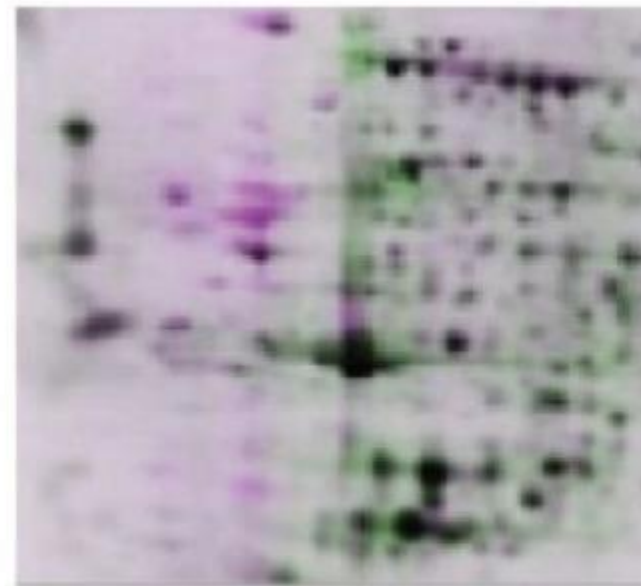
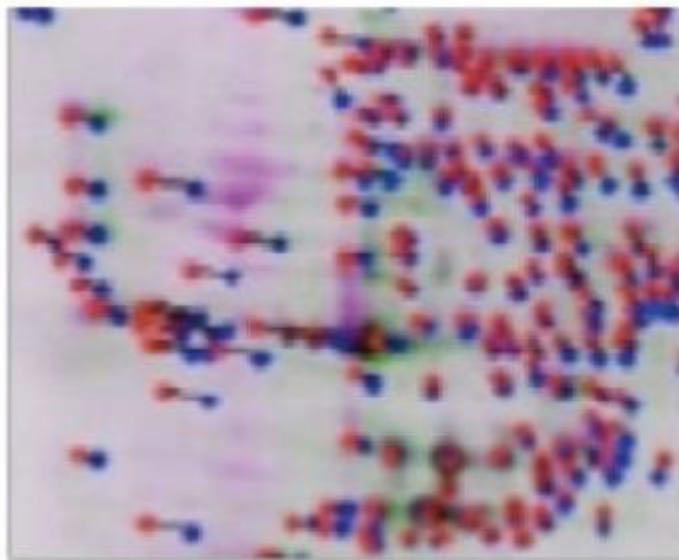
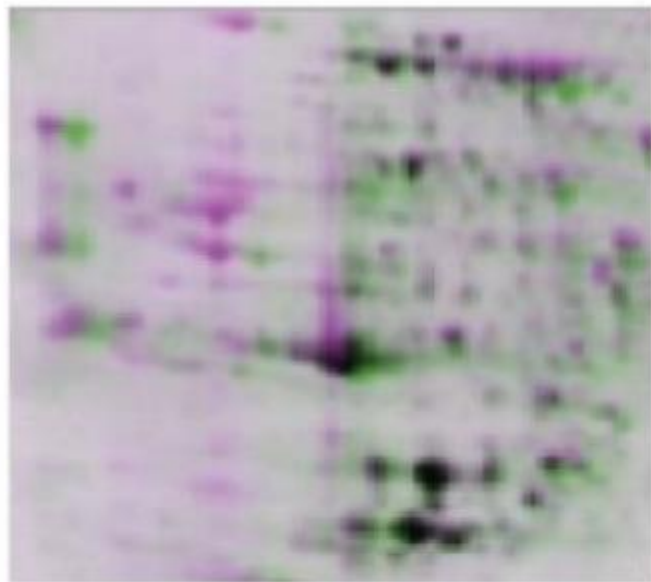


ELKTROFOREZA 2-DE – analiza komputerowa



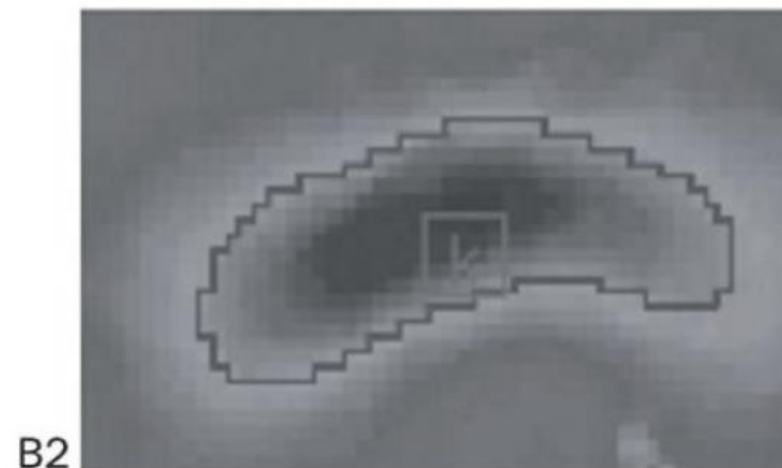
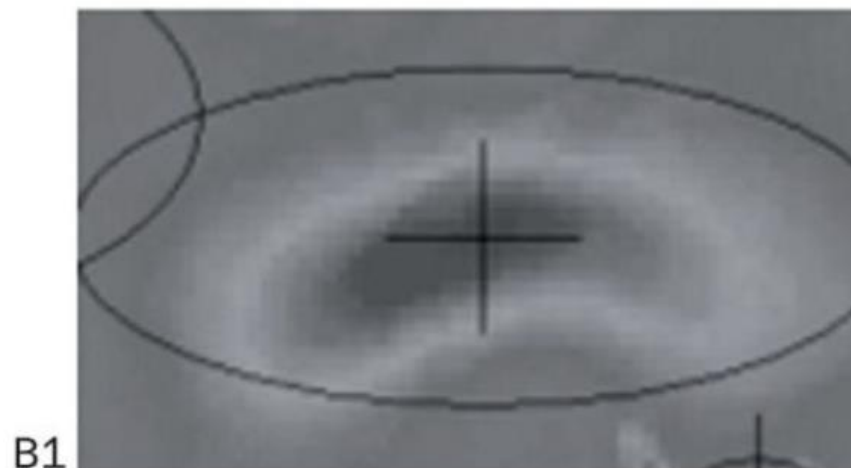
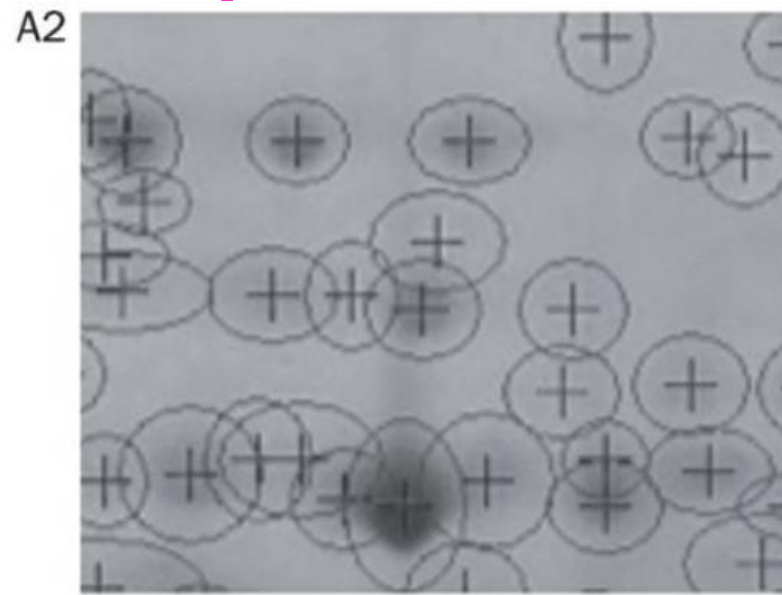
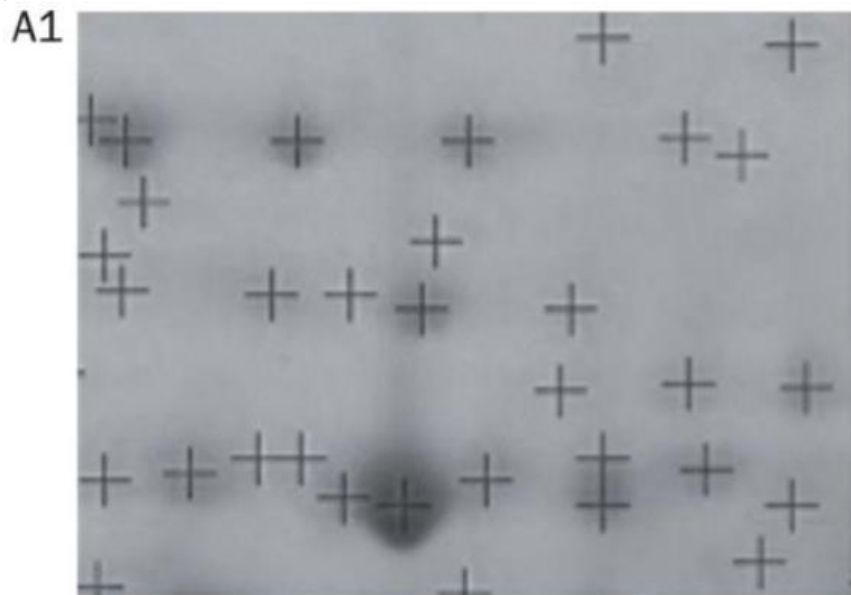
Na fragmencie obrazu żelu widać artefakty - drobinki barwnika, w postaci kropek. Obydwa artefakty weszły w granicę wykrytej plamki i mogą spowodować sztuczny wzrost intensywności jej zabarwienia (rysunek po lewej - widok fragmentu żelu, rysunek po prawej - ten sam fragment widziany w prezentacji 3D)

ELKTROFOREZA 2-DE – analiza komputerowa



Proces dopasowywania do siebie regionów na dwóch żelach. Pierwszy fragment to dwa nałożone na siebie obrazy zaznaczone na fioletowo i zielono (plamki z obydwu skanów nakładające się na siebie mają kolor czarny), drugi (przed dopasowaniem) przedstawia wygenerowane wektory, trzeci to dopasowane regiony (najwyraźniej widać to na plamkach z lewej strony żelu)

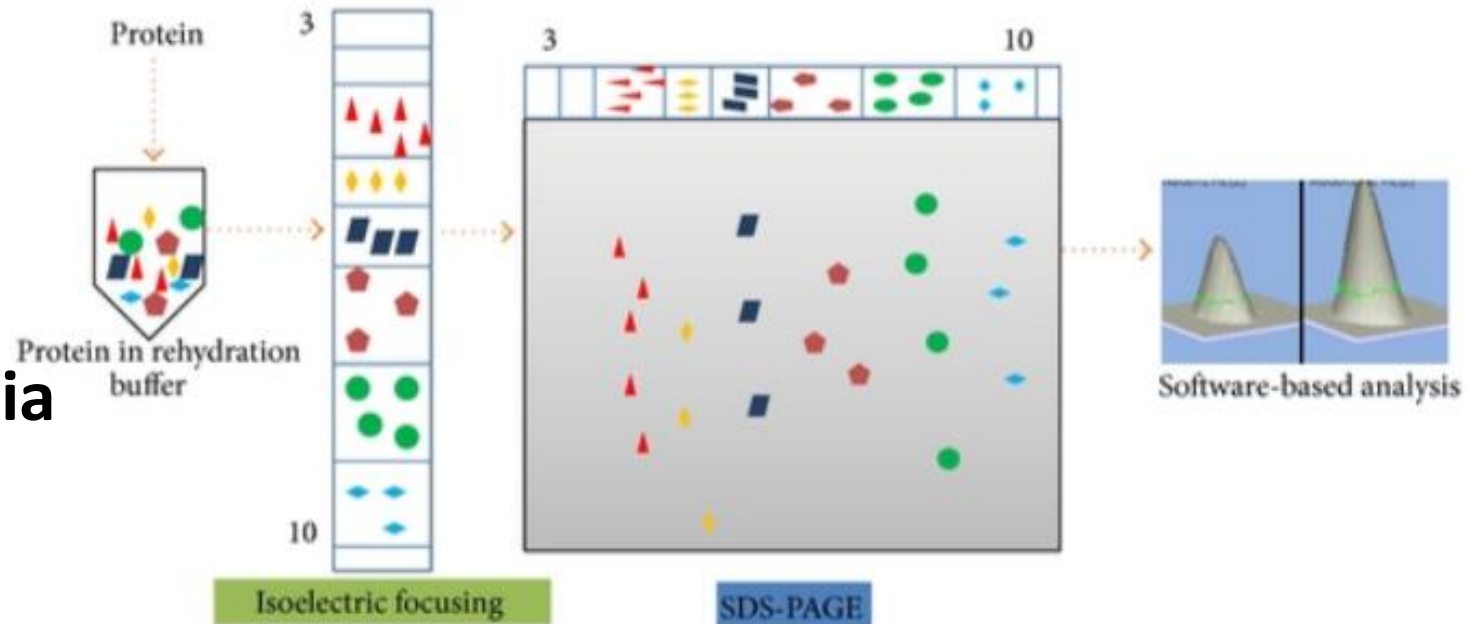
ELKTROFOREZA 2-DE – analiza komputerowa



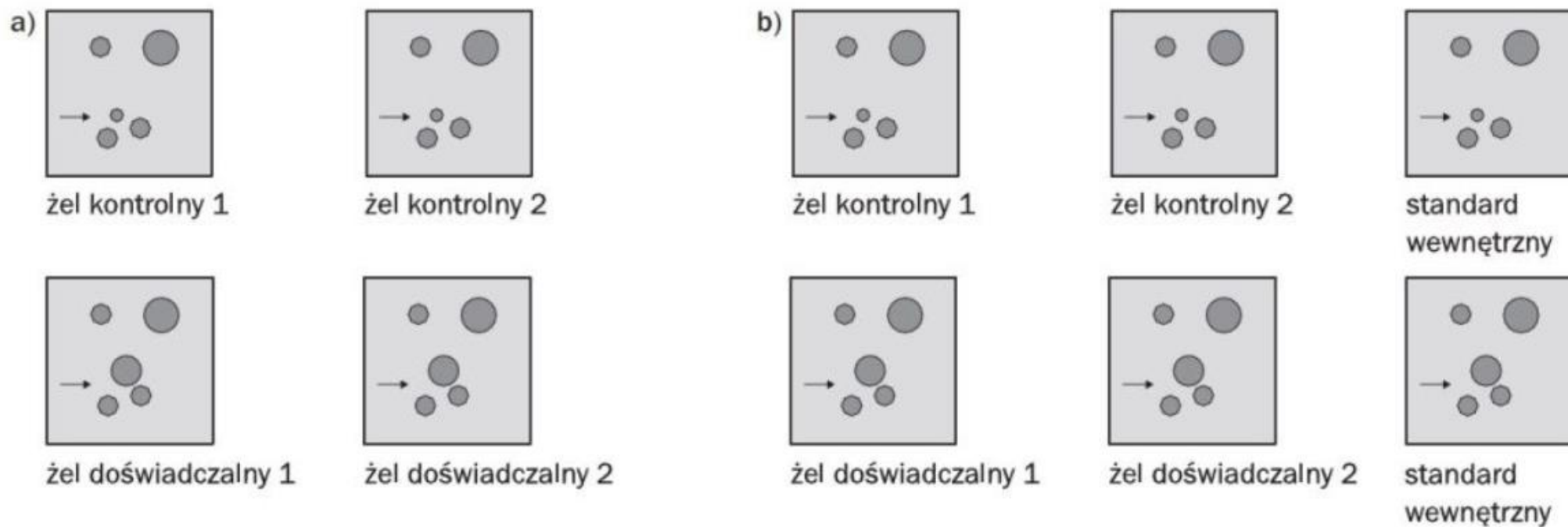
Fragmenty obrazów, na których przedstawiono znalezienie punktu centralnego dla danych plamek (A1), oraz opisanie ich granic przez model Gaussa (A2). Na obrazach B1, B2 przykład nieregularnej plamki, w przypadku której konieczna była manualna korekta granicy (schemat kolorów został tutaj tak zmieniony, aby łatwiej było obserwować granice plamek)

ELKTROFOREZA 2-DE – analiza ilościowa

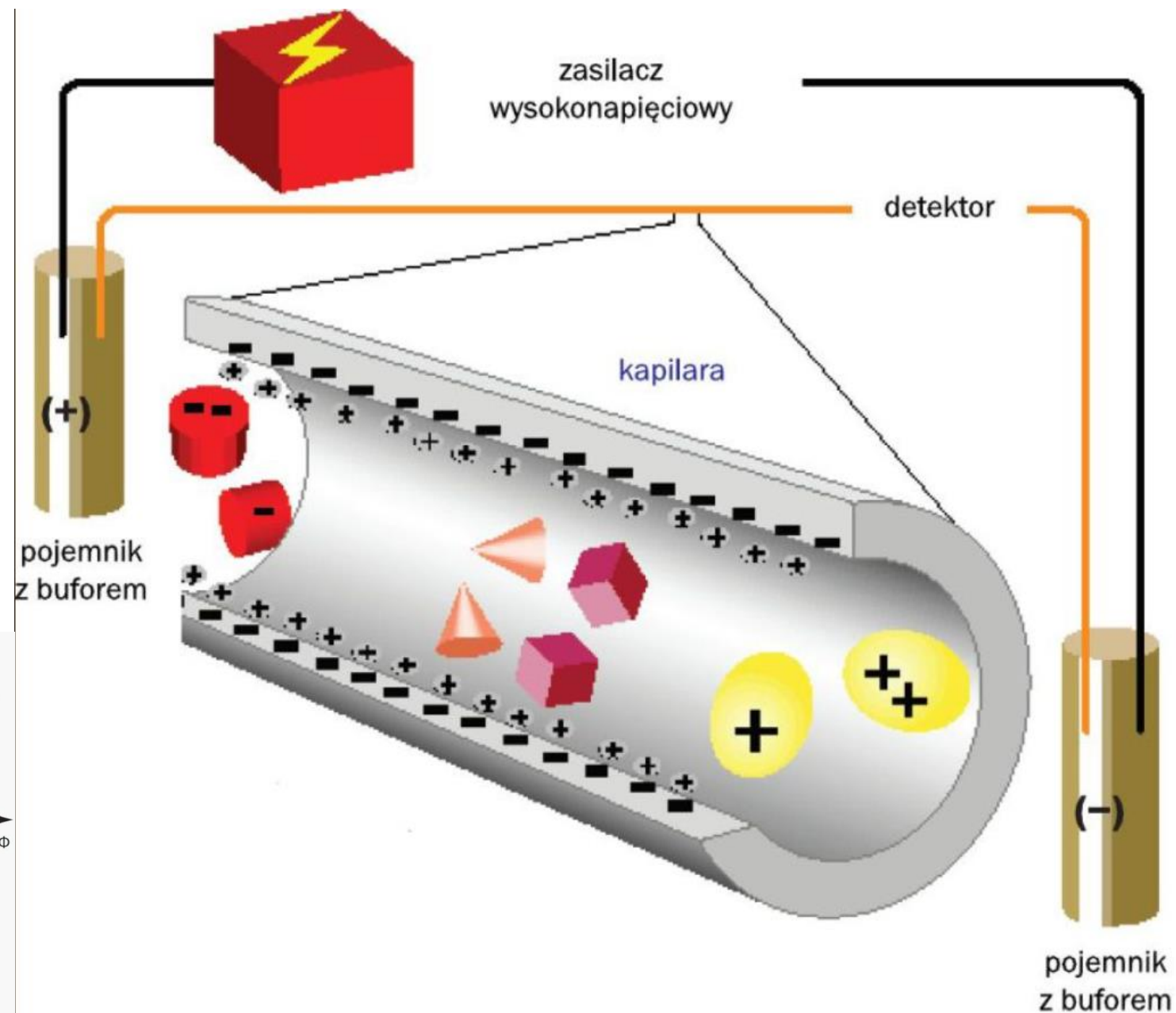
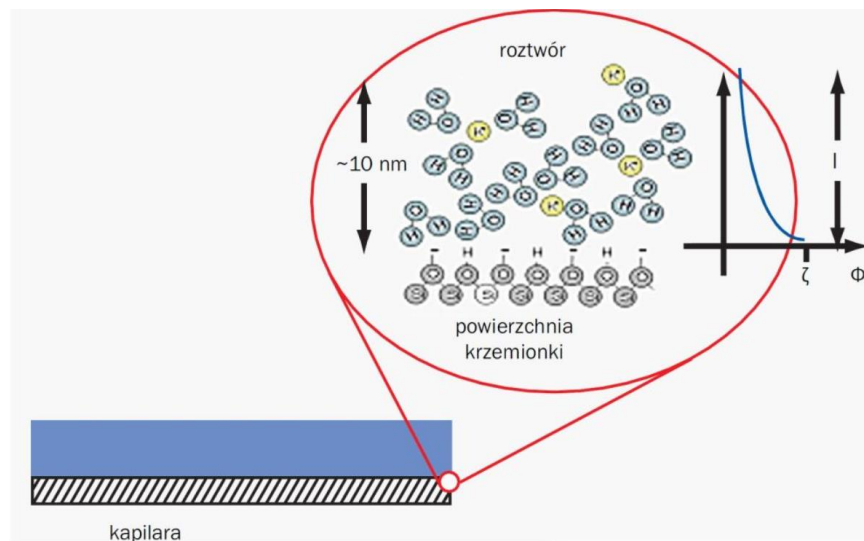
- Utrata próbki
- Wydajność transferu
- Utrata białka w czasie barwienia
- Wydajność barwienia
- Charakterystyka wybarwienia dla danego białka
- Utrata intensywności zabarwienia
- Zbyt duża intensywność barwienia



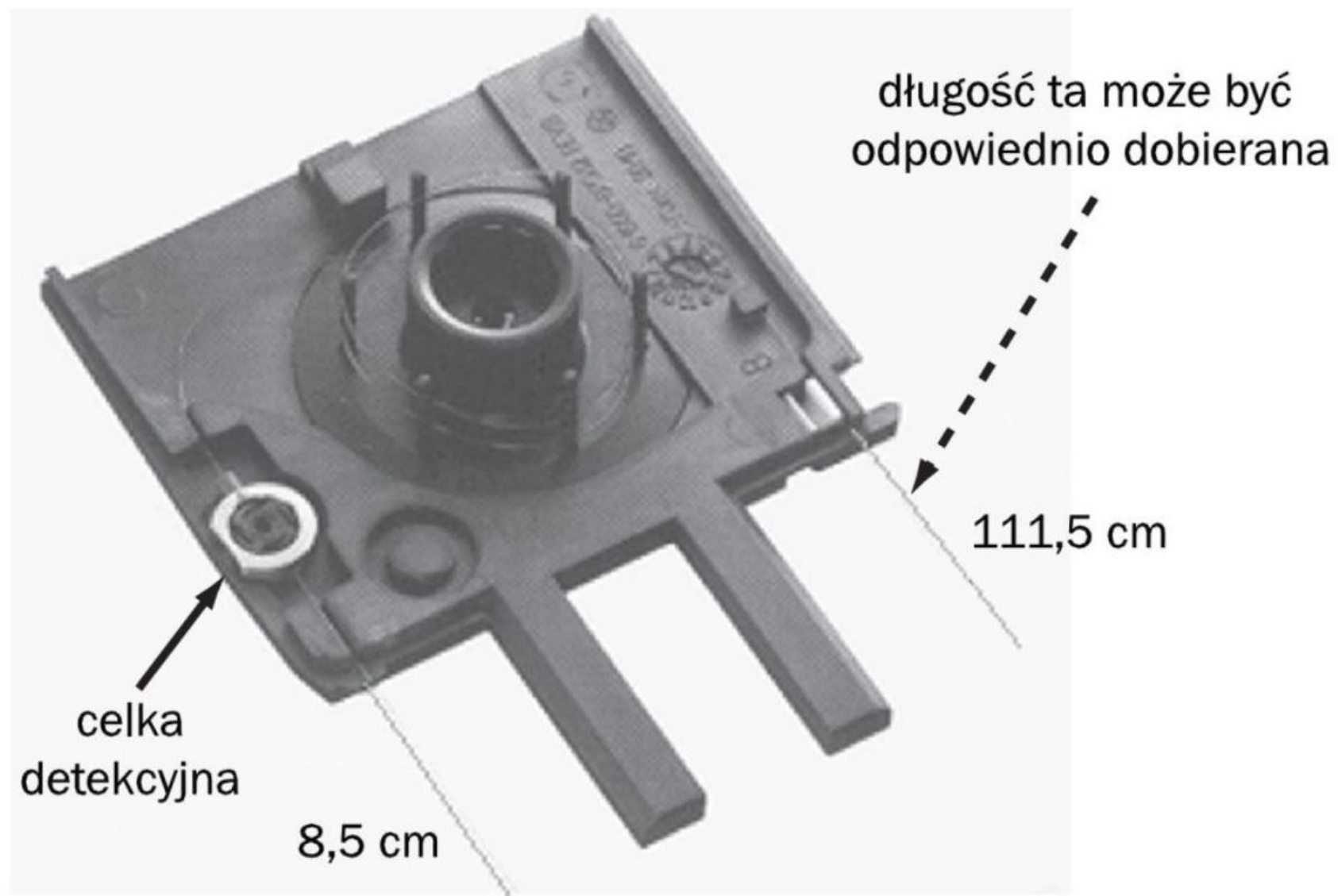
ELKTROFOREZA 2-DE – standard wewnętrzny



ELKTROFOREZA KAPILARNA



ELKTROFOREZA KAPILARNA

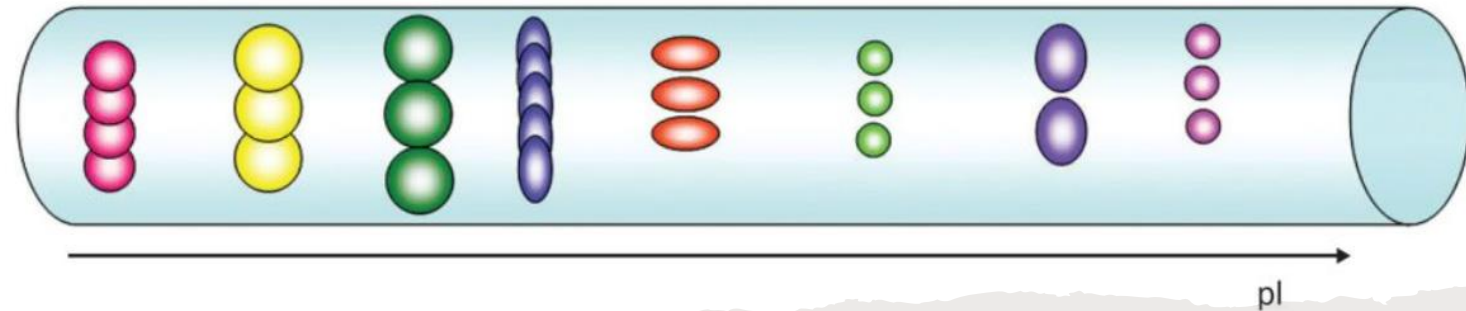
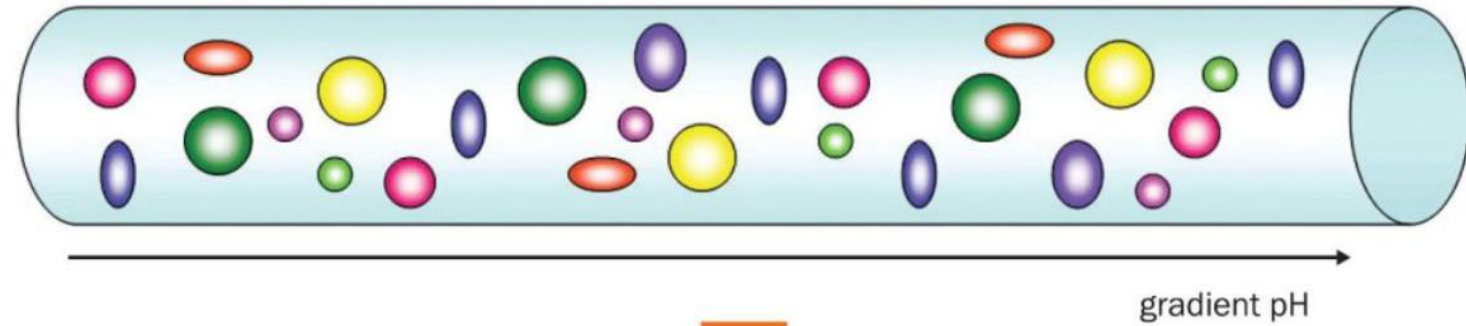


Kaseta z celką detekcyjną i nawiniętą kapilarą (wg: Hjertén, Kubo 1993)

ELKTROFOREZA KAPILARNA

Detektor	Granice wykrywalności
UV/VIS	10^{-13} - 10^{-16}
fluorescencyjny	10^{-14} - 10^{-16}
fluorescencyjny laserowy	10^{-18} - 10^{-20}
SM	10^{-16} - 10^{-19}
amperometryczny	10^{-18} - 10^{-19}
konduktometryczny	10^{-15} - 10^{-16}
refraktometryczny	10^{-14} - 10^{-16}

Ogniskowanie izoelektryczne

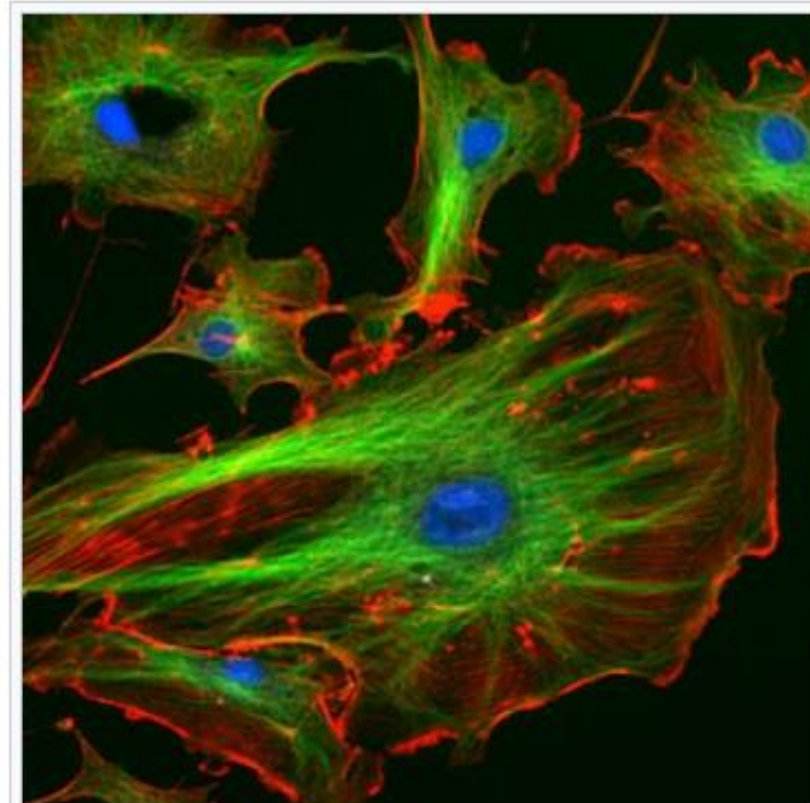


Ogniskowanie izoelektryczne



Białka znaczenie biomedyczne

- Białka pełnią wiele nadzwyczaj ważnych funkcji w organizmie:
- Wewnętrzna sieć białek tworzy cytoszkielet (zapewnia komórce kształt i spójność fizyczną)
- Filamenty aktyny i miozyny tworzą aparat kurczliwy mięśni
- Hemoglobina transportuje tlen
- Przeciwciała wyszukują „intruzów”
- Enzymy katalizują reakcje
- Receptory umożliwiają komórkom reakcję i odpowiedź na różne czynniki środowiskowe, hormony.



Szkielet komórki eukariotycznej:

- filamenty aktynowe
- mikrotubule
- jądro komórkowe

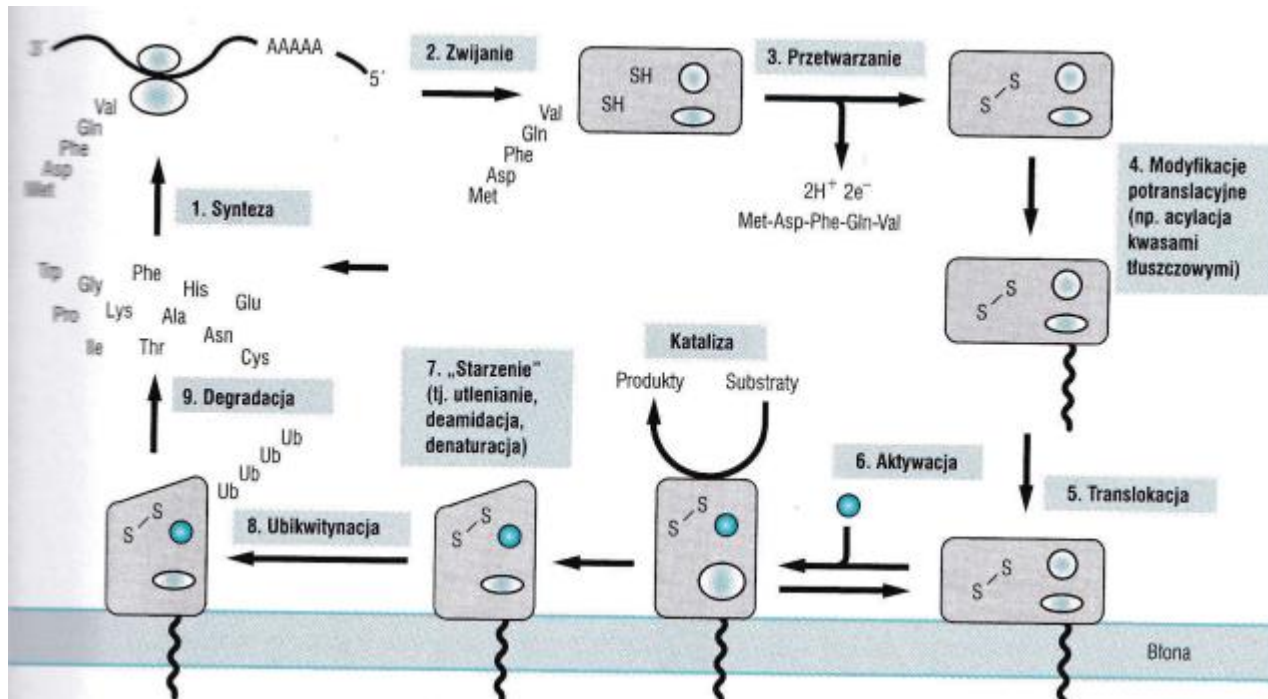
Translacja

Dojrzewanie w procesach
potranslacyjnych

Oscylacja między stanem
aktywnym i
spoczynkowym

Rozkład do aminokwasów

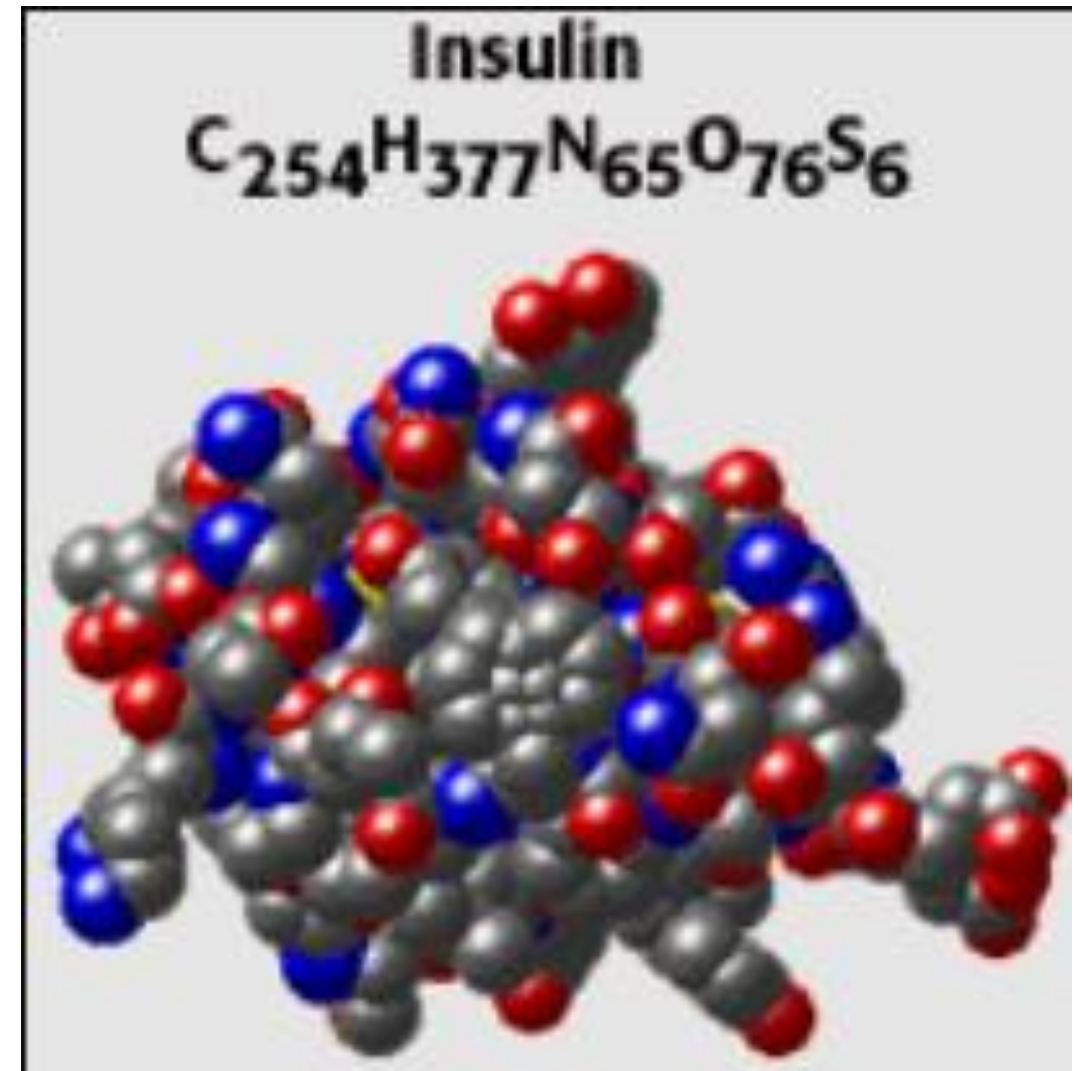
Starzenie (utlenianie,
deaminacja)



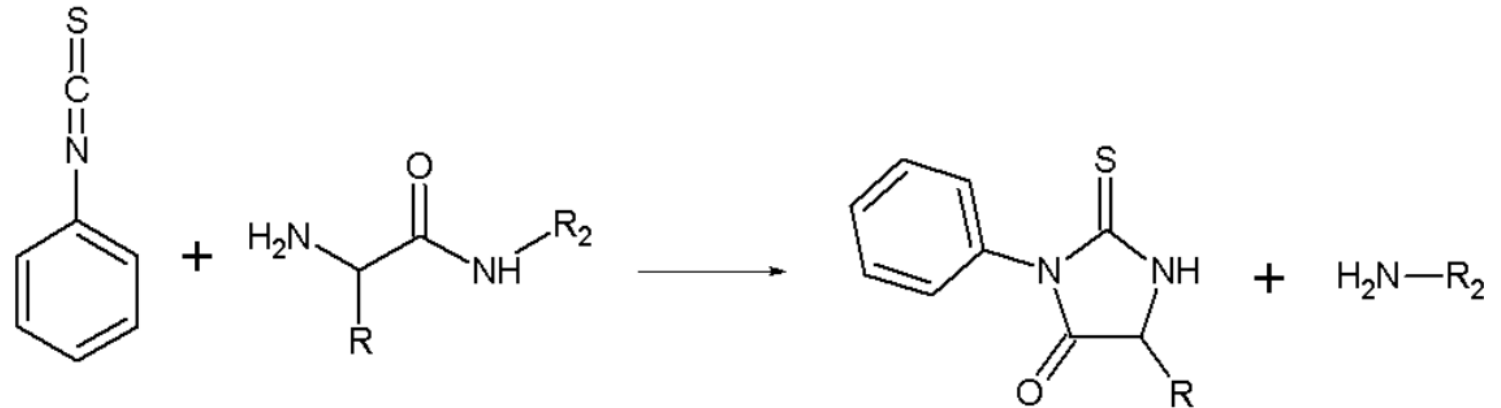
Ważnym celem medycyny molekularnej jest rozpoznanie białek i tych procesów w cyklu ich życia, których obecność lub brak bądź upośledzenie jest związane z określonym stanem fizjologicznym lub chorobowym.

Sanger jako pierwszy określił sekwencję polipeptydu

- Łańcuch A 21 reszt aminokwasowych
- Łańcuch B 30 reszt aminokwasowych
- Redukcja mostków disiarczkowych
- Proteoliza
- Hydroliza
- Reakcja z odczynnikiem Sangera
- Analiza sekwencji
- Nagroda NOBLA w 1958 roku.

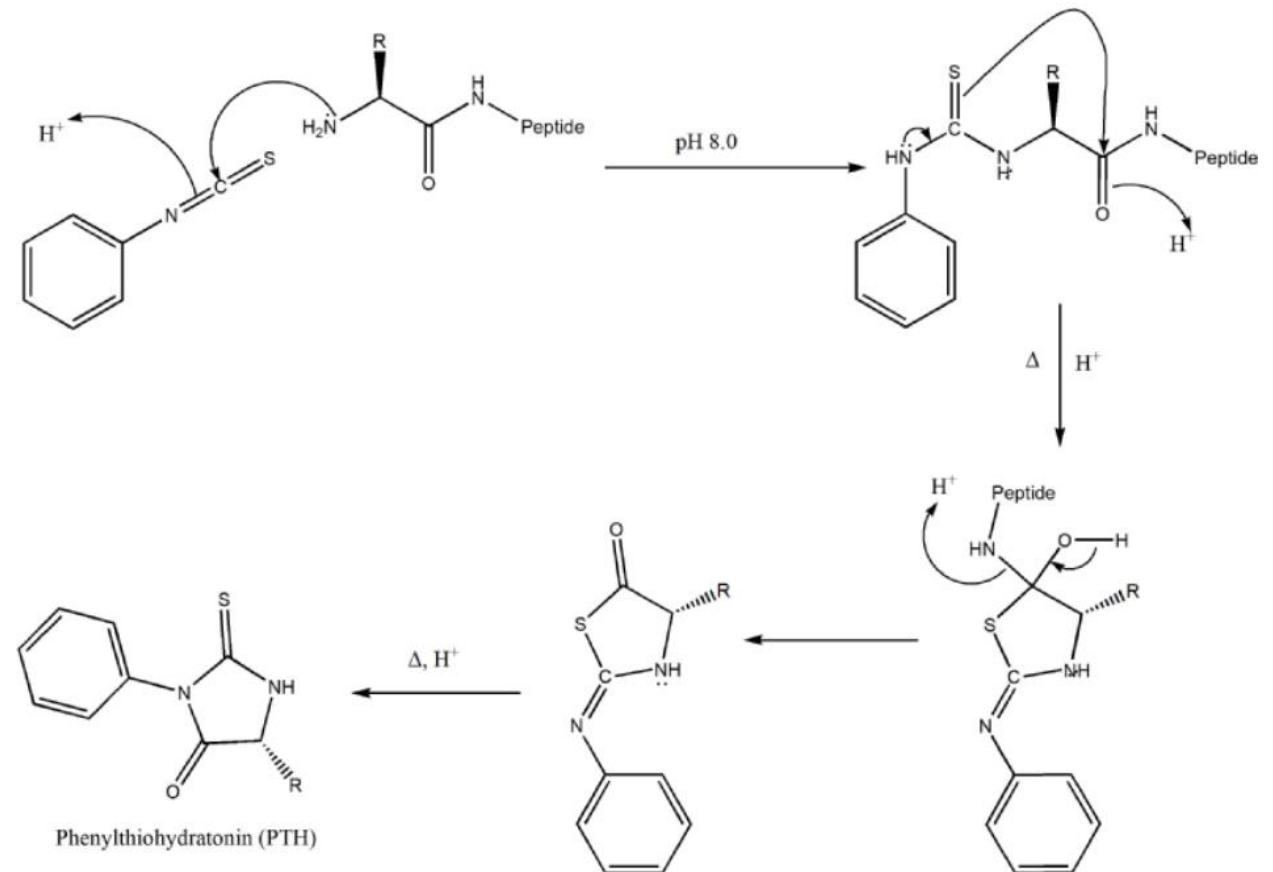


Degradacja Edmana

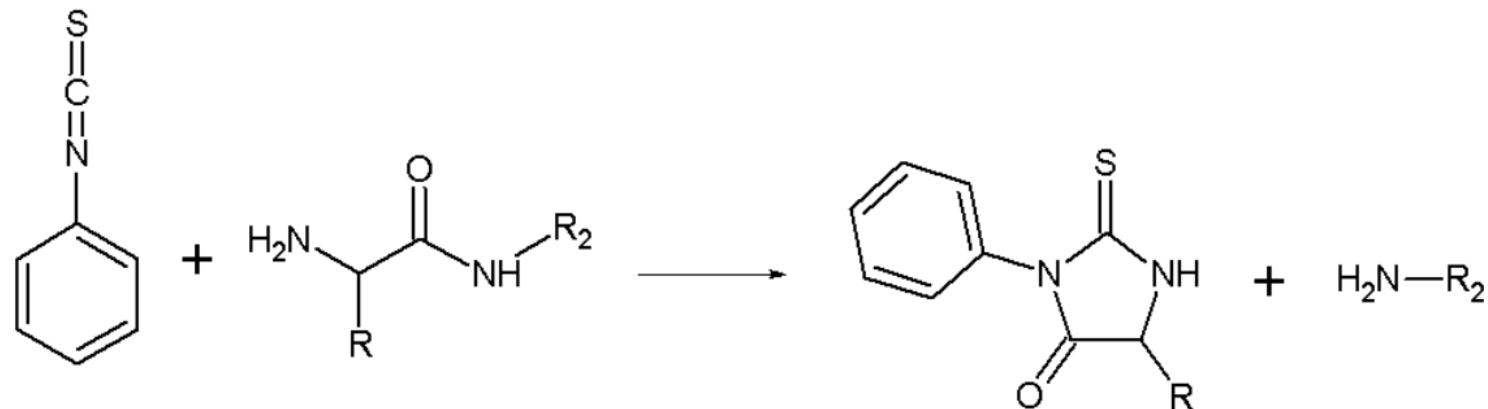


Degradacja Edmana - metoda sekwencjonowania peptydów polegająca na kolejnym odrywaniu oznakowanych aminokwasów z N-końca cząsteczki peptydu. Opracowana w roku 1950 przez szwedzkiego biochemika

Maksymalna długość sekwencjonowanego peptydu to 50-60 aminokwasów (ze względu na nieilościowy przebieg reakcji).
Sekwencjonowanie metodą Edmana może być wykonywane w sposób zautomatyzowany



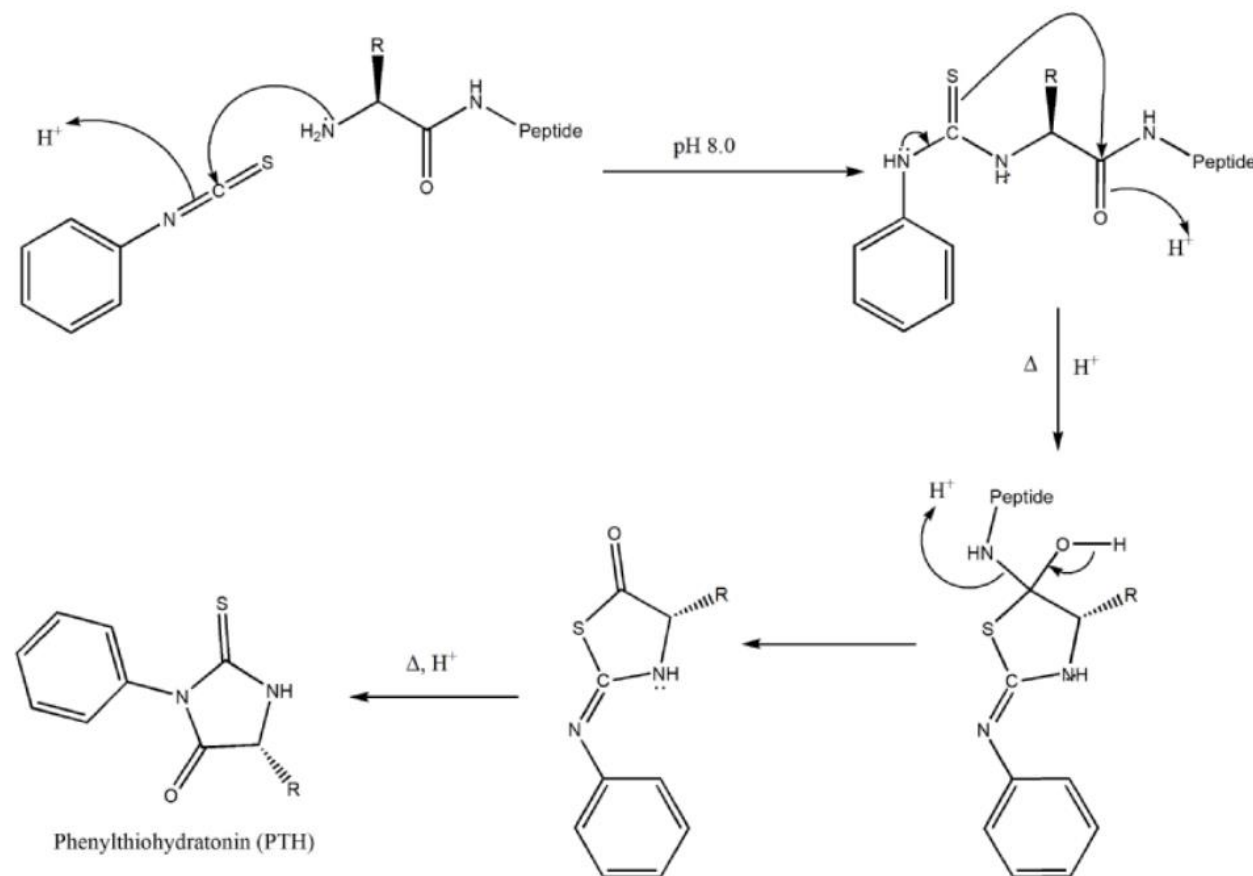
Degradacja Edmana



Degradacja Edmana - metoda sekwencjonowania peptydów polegająca na kolejnym odrywaniu oznakowanych aminokwasów z N-końca cząsteczki peptydu. Opracowana w roku 1950 przez szwedzkiego biochemika

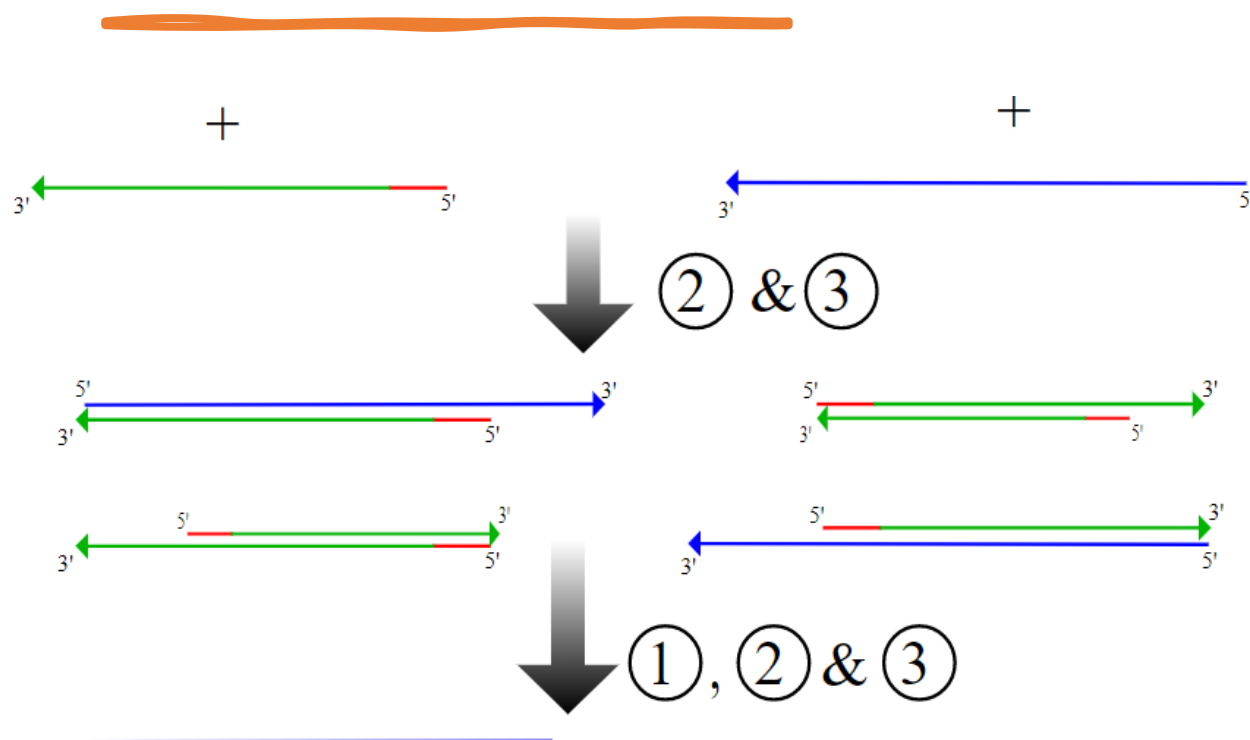
Maksymalna długość sekwencjonowanego peptydu to 50-60 aminokwasów (ze względu na nieilościowy przebieg reakcji).

Sekwencjonowanie metodą Edmana może być wykonywane w sposób zautomatyzowany

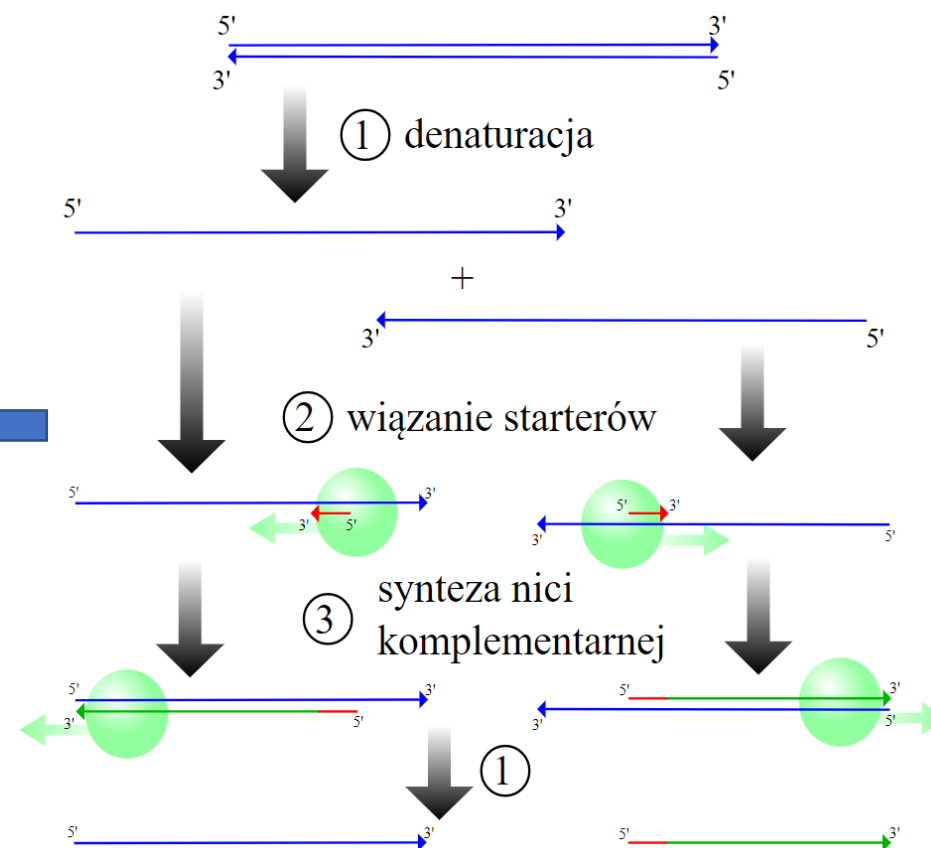


Biologia molekularna zrewolucjonizowała określanie struktury I- rzędowej polipeptydów

Znajomość sekwencji DNA pozwala określić
strukturę pierwszorzędową polipeptydów.



PCR



Metylacja, glikozylacja, fosforylacja, hydroksylacja reszt prolinowych i lizynowych - dojrzewanie białka

Biologia molekularna zrewolucjonizowała określanie struktury I- rzędowej polipeptydów

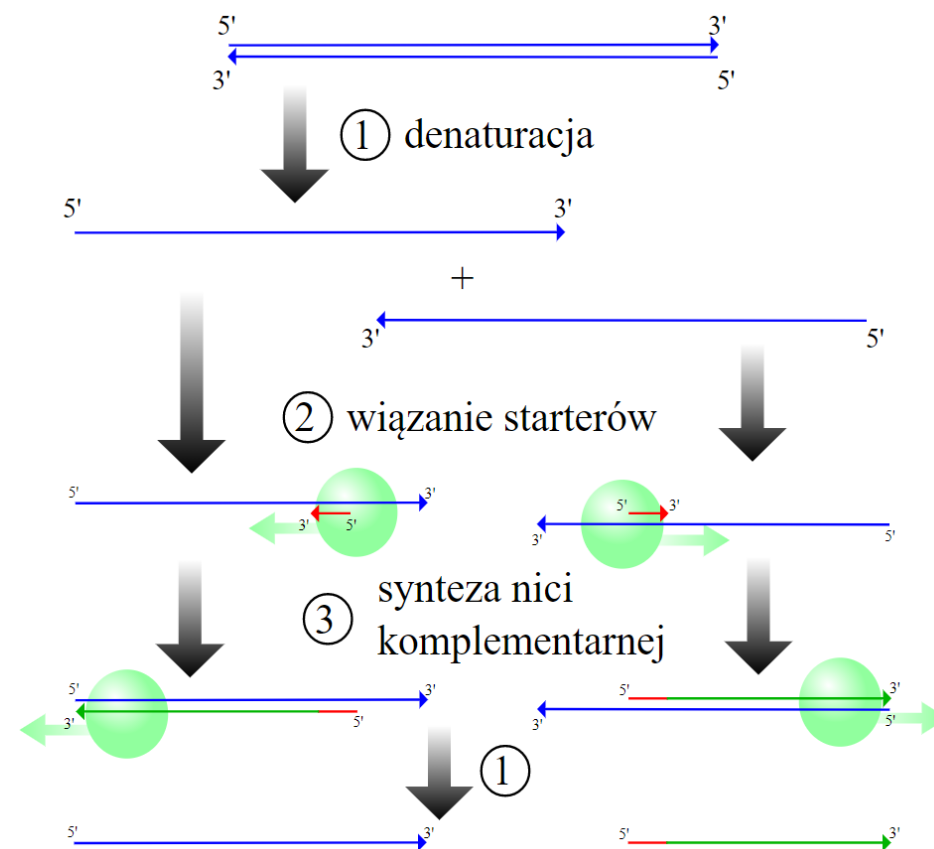
**Metylacja, glikozylacja, fosforylacja, hydroksylacja reszt
prolinowych i lizynowych - dojrzewanie białka**

Analiza MS

Modyfikacja potranslacyjna	Wzrost masy [kDa]
Fosforylacja	80
Hydroksylacja	16
Metylacja	14
Acetylacja	12
Glikozylacja	12

**Znajomość sekwencji DNA pozwala określić
strukturę pierwszorzędową polipeptydów.**

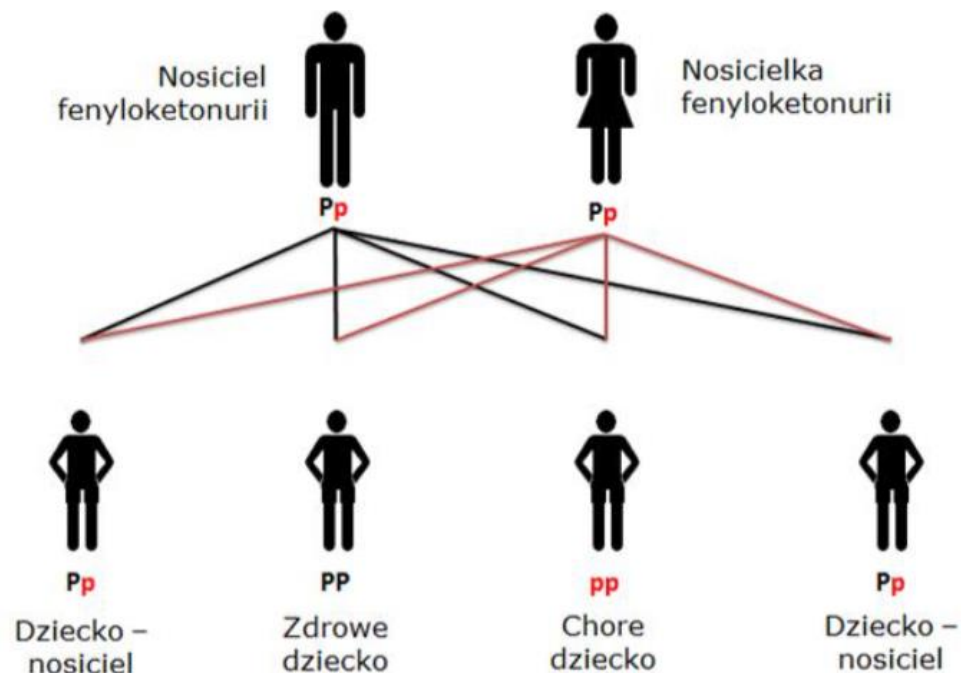
PCR



Tandemowa SM w analizie zaburzeń metabolicznych

Fenyloketonuria

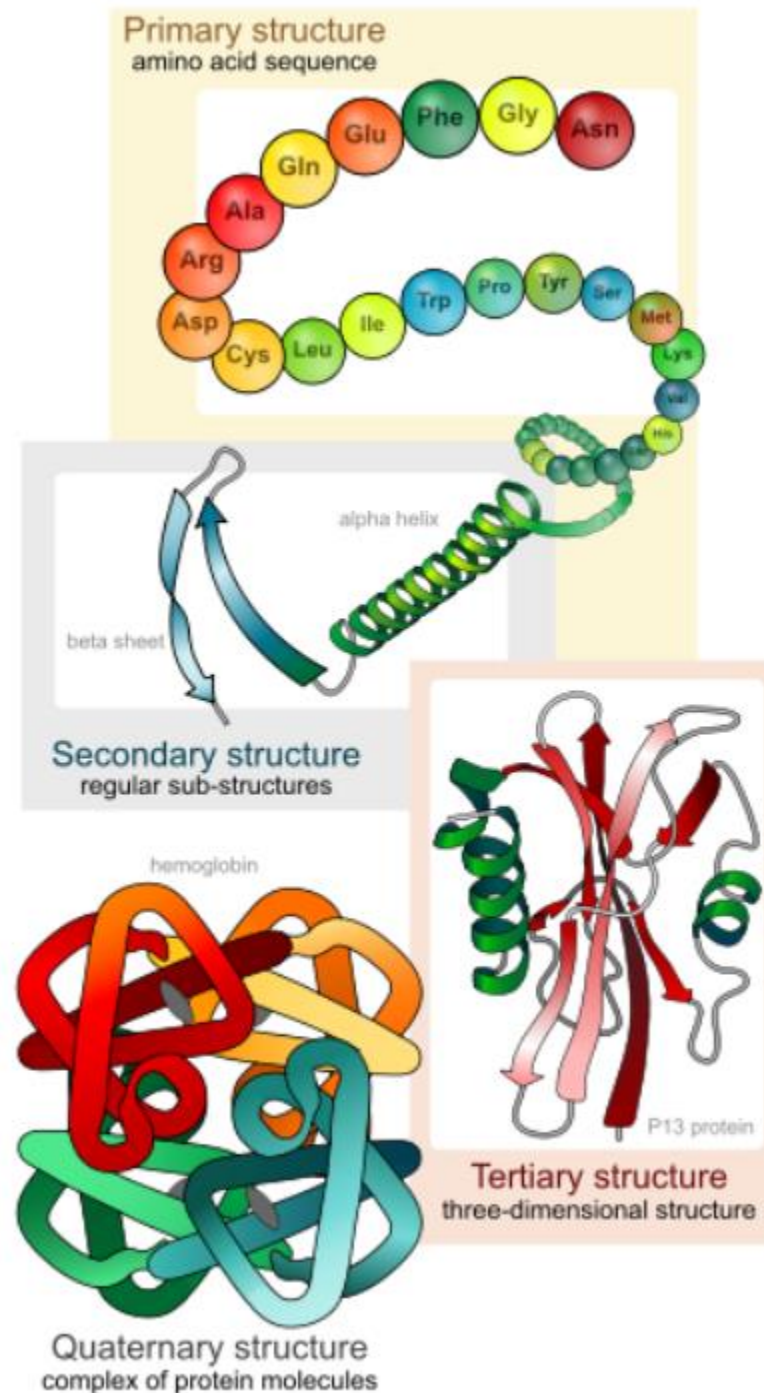
Encefalopatia
etylomalanowa



Kwasiaca glutarowa
typu 1.

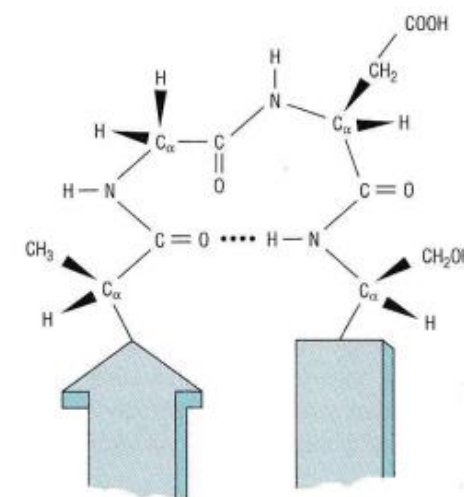
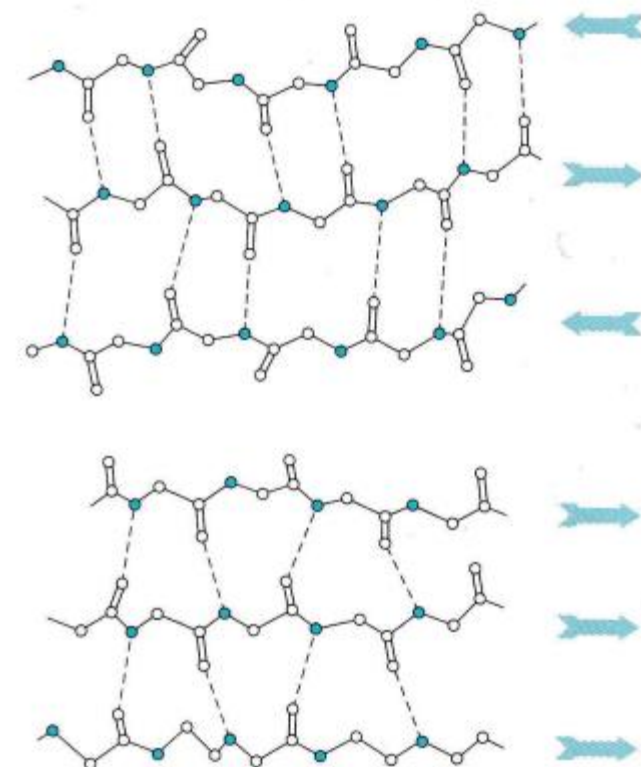
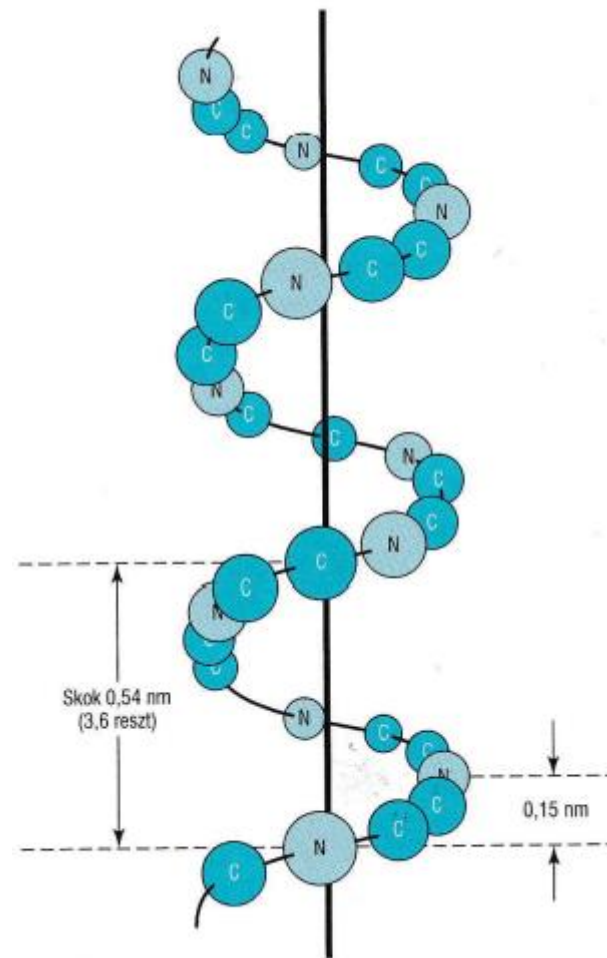
Helisa α , struktura β

Helisa alfa – struktura drugorzędowa białka (tak jak i harmonijka beta), stabilizowana przez wiązania wodorowe. Kształtem przypomina cylinder, tworzony przez ciasno, prawoskrętnie skręconą sprężynę. Ściany cylindra tworzy łańcuch polipeptydowy, a łańcuchy boczne (podstawniki) wystają na zewnątrz. Co cztery aminokwasy w łańcuchu polipeptydowym tworzone jest wiązanie wodorowe pomiędzy grupą karboksylową jednego aminokwasu a grupą aminową drugiego. Skok helisy następuje co 0,54 nm.



Helisa α , struktura β

Harmonijka beta (beta-kartka) – jedna z możliwych struktur drugorzędowych białka (inną jest helisa alfa). Ten sposób przestrzennego ułożenia aminokwasów w łańcuchu polipeptydowym przypomina wyglądem kartkę papieru połażowaną w harmonijkę. Kształt harmonijki beta stabilizowany jest poprzez wiązania wodorowe występujące pomiędzy sąsiednimi łańcuchami – beta nićmi. Beta nić jest to prawie całkowicie rozciągnięty fragment polipeptydu, zwykle o długości 5-10 aminokwasów. Występują harmonijki beta: równoległe, antyrównoległe i mieszane. Struktury te (w odróżnieniu od helis alfa zbudowanych z jednej ciągłej sekwencji) składają się z oddzielnych fragmentów łańcucha (nici beta) czasem znacznie od siebie oddalonych w sensie struktury pierwszorzędowej..



Fałdowanie białek

Białka cechuje dynamika konformacyjna. Ich łańcuchy mogą się fałdować i rozfałdowywać w czasie milisekund i robią to tysiące razy w swoim życiu.

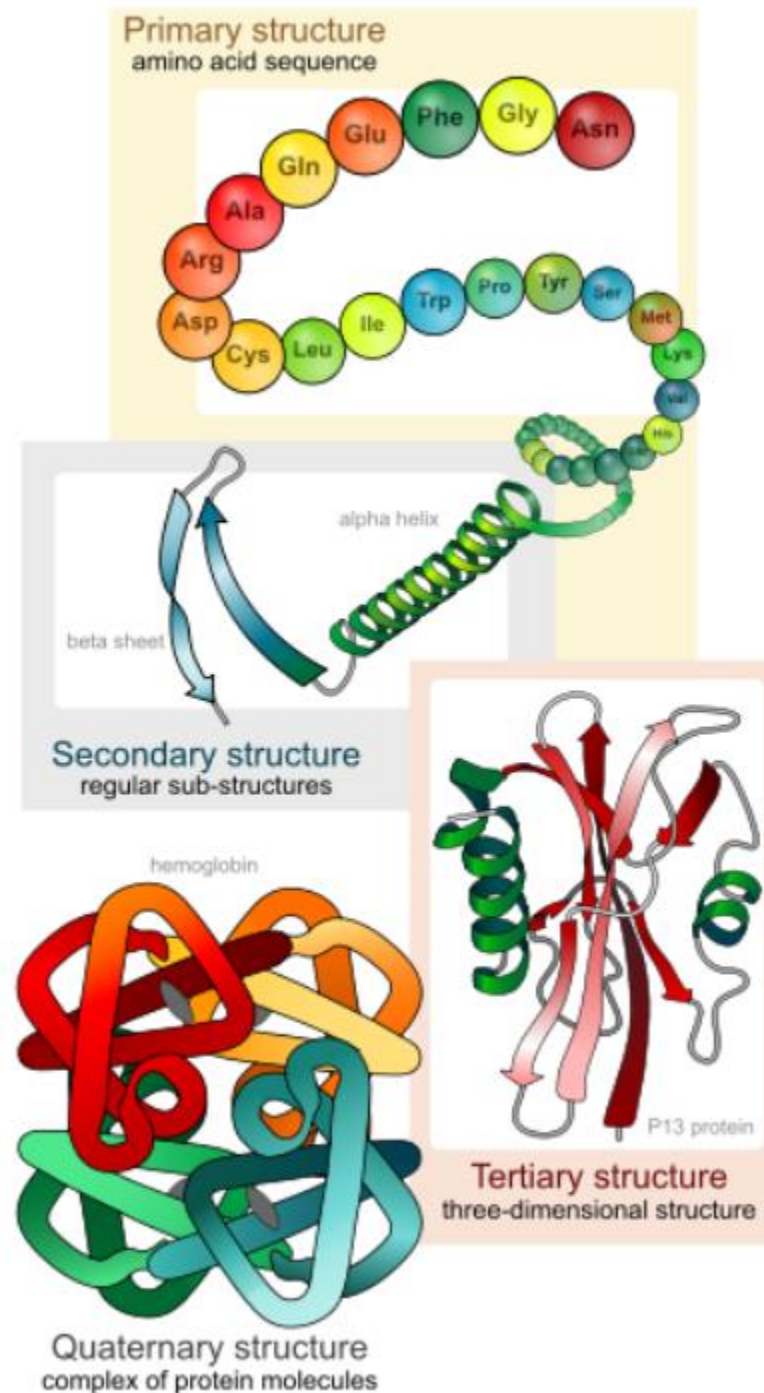
Natywna konformacja białek jest uprzywilejowana termodynamicznie.

Zwijanie modułowe.

Białka pomocnicze wspomagają zwijanie.

Białka opiekuńcze.

Izomeraza dwusiarczkowa białek.

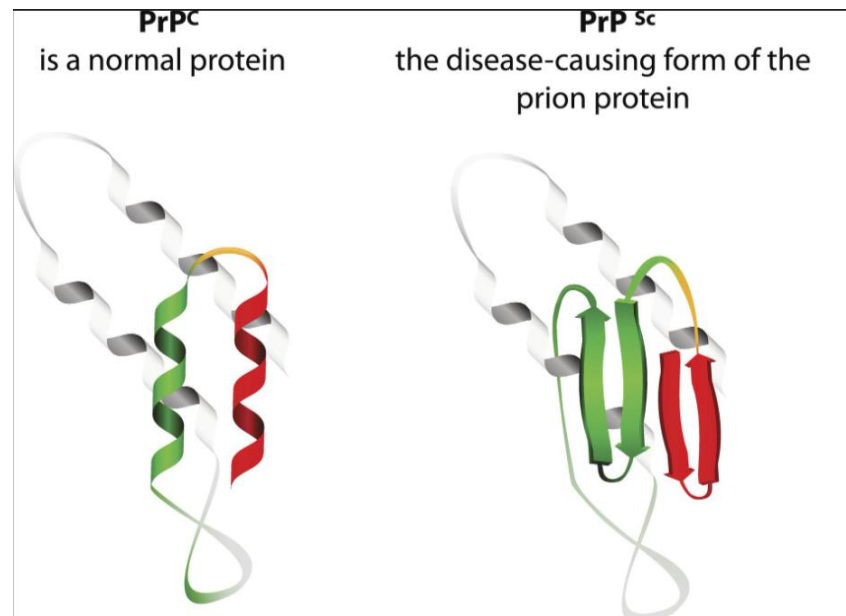


Patologiczne zaburzenia konformacyjne białek

Priony

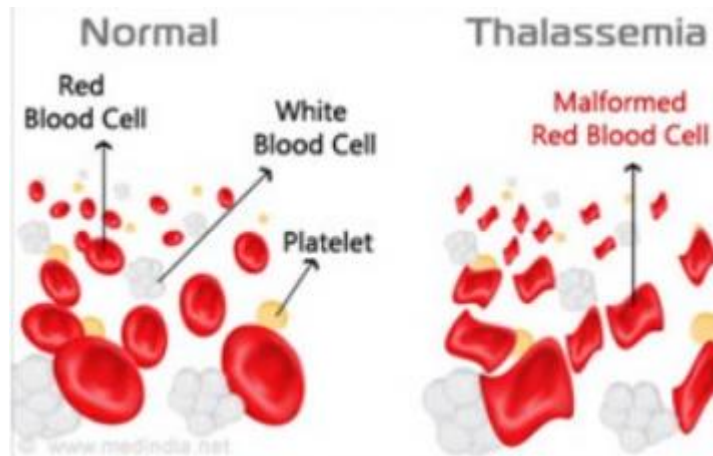
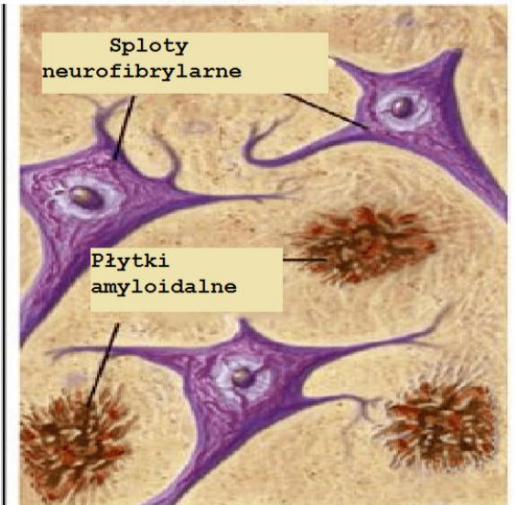
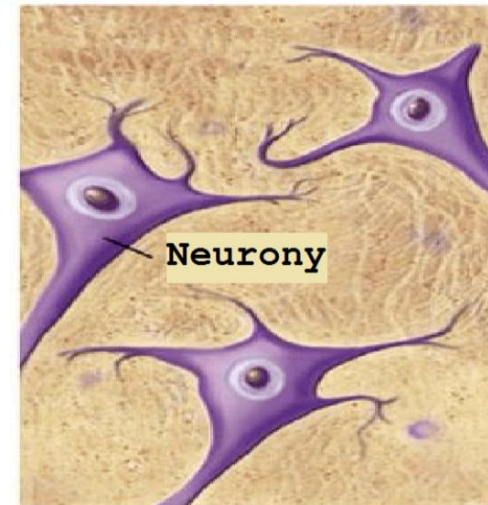
Choroba Alzheimer

Beta-talasemie



Zdrowy mózg

Choroba Alzheimer

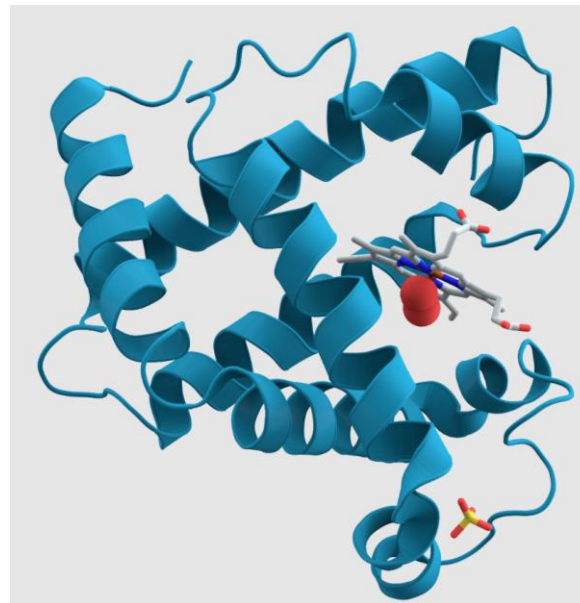


Mioglobina, hemoglobina

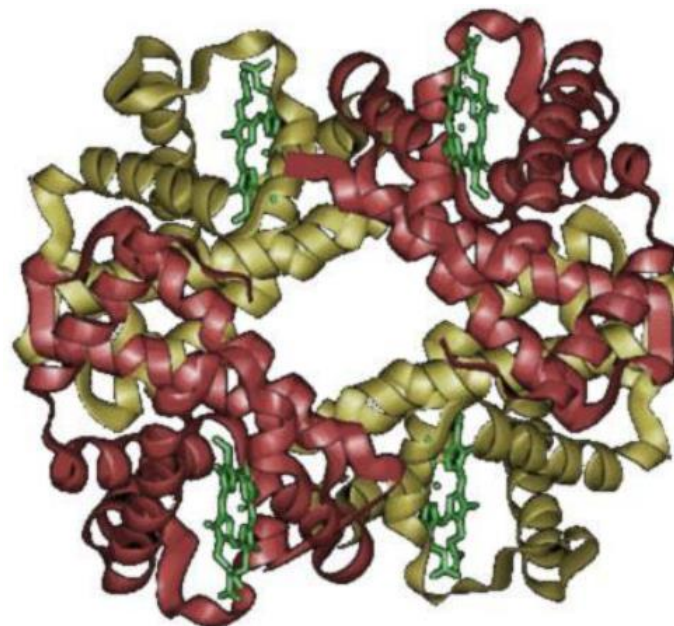
Mioglobinuria

Niedokrwistość
(anemie)

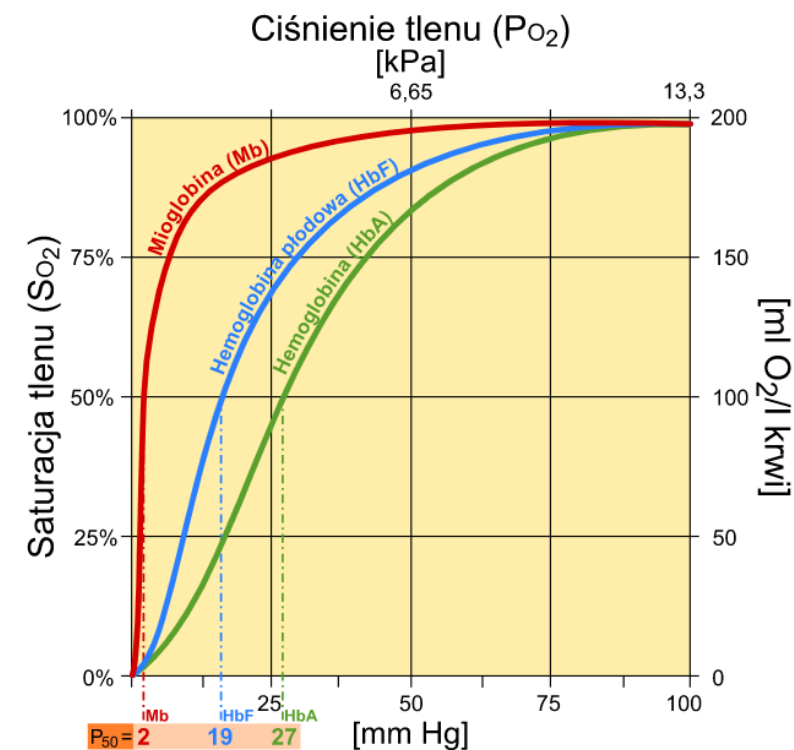
Beta-talasemie



mioglobina



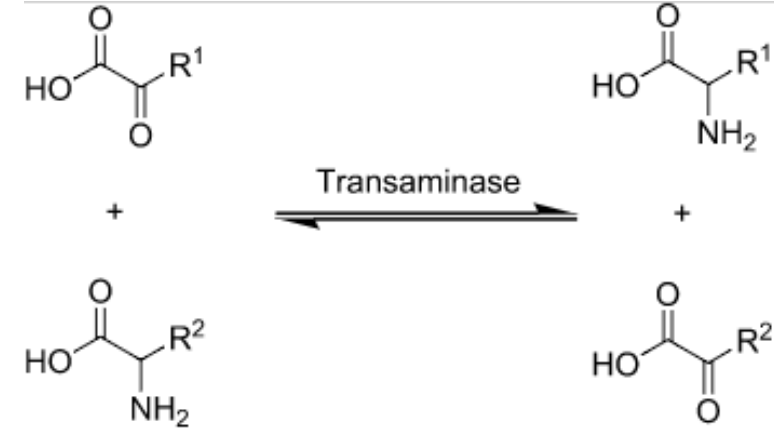
hemoglobina



Niefunkcjonalne enzymy osocza w diagnostyce

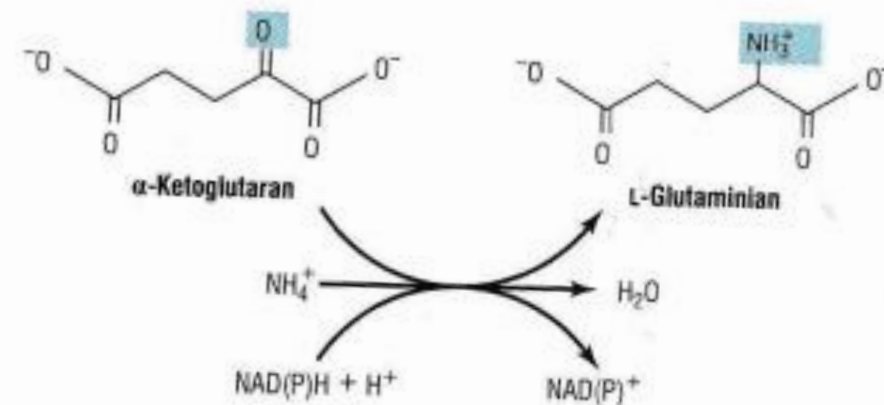
Izoenzymy dehydrogenazy mleczanowej	podjednostki
I1	HHHH
I2	HHHM
I3	HHMM
I4	HMMM
I5	MMMM

Enzym osocza	Główne zastosowania diagnostyczne
Aminotransferazy (asparaginianowa, AST; alaninowa, ALT)	Zawał serca, wirusowe zapalenie wątroby
amylaza	Ostre zapalenie trzustki
celuoplasmina	Zwrodnienie wątrobowo-soczewkowate (choroba Wilsona)
Fosfokinaza kreatynowa	Choroby mięśni, zawał serca
Dehydrogenaza mleczanowa	Zawał serca
Fosfataza kwasowa	Rak gruczołu krokowego
Fosfataza zasadowa	Choroby kości, wątroby z utrudnionym odpływem żółci

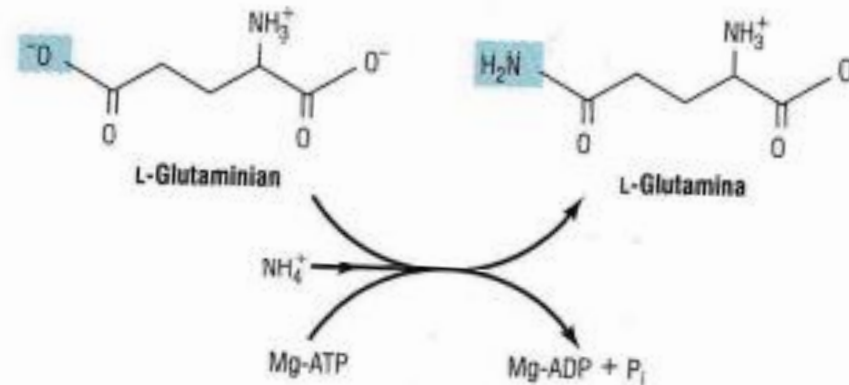


Biosynteza aminokwasów które nie muszą być dostarczane w pożywieniu

Aminokwasy, które muszą być dostarczone w pożywieniu	Aminokwasy, które nie muszą być dostarczone w pożywieniu
Arginina ¹	Alanina
Histydyna	Asparagina
Izoleucyna	Asparaginian
Leucyna	Cysteina
Lizyna	Glutaminian
Metionina	Glutamina
Fenylalanina	Glicyna
Treonina	Hydroksypolina ²
Tryptofan	Hydroksylizyna ²
Walina	Prolina
	Seryna
	Tyrozyna

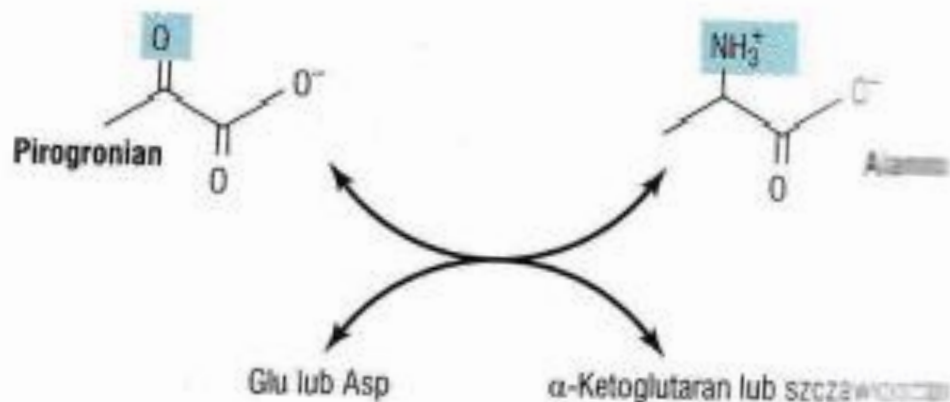


Reakcja dehydrogenazy glutaminianowej.

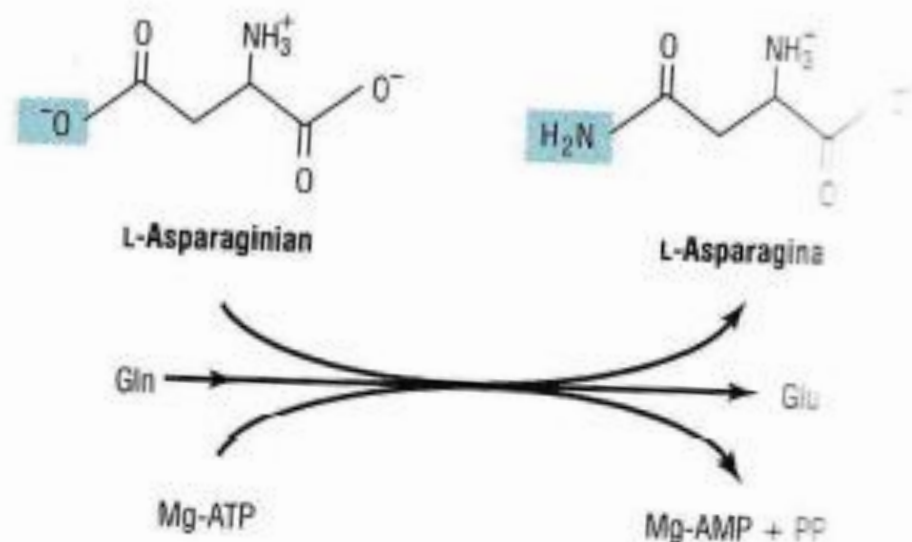


Reakcja syntetazy glutaminowej.

Biosynteza aminokwasów które nie muszą być dostarczane w pożywieniu

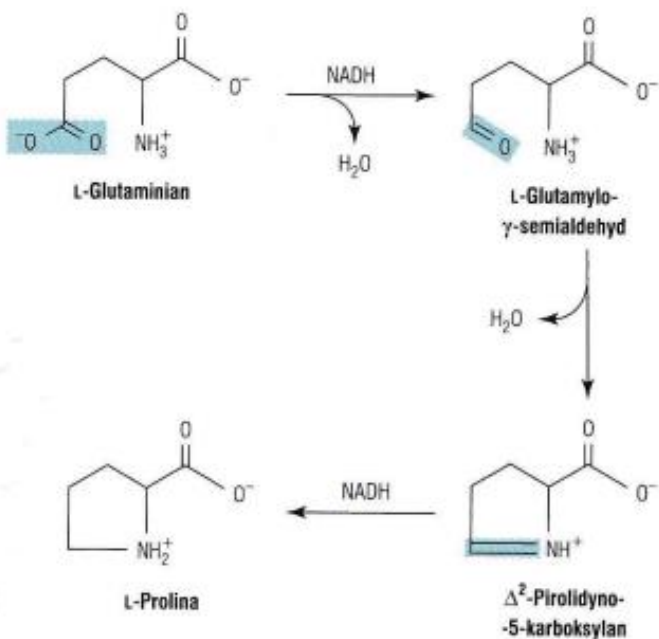


Tworzenie alaniny w reakcji transaminacji pirogronianu. Donorem grupy aminowej może być glutaminian lub asparaginian. Innym produktem jest α-ketoglutaran lub szczawian.

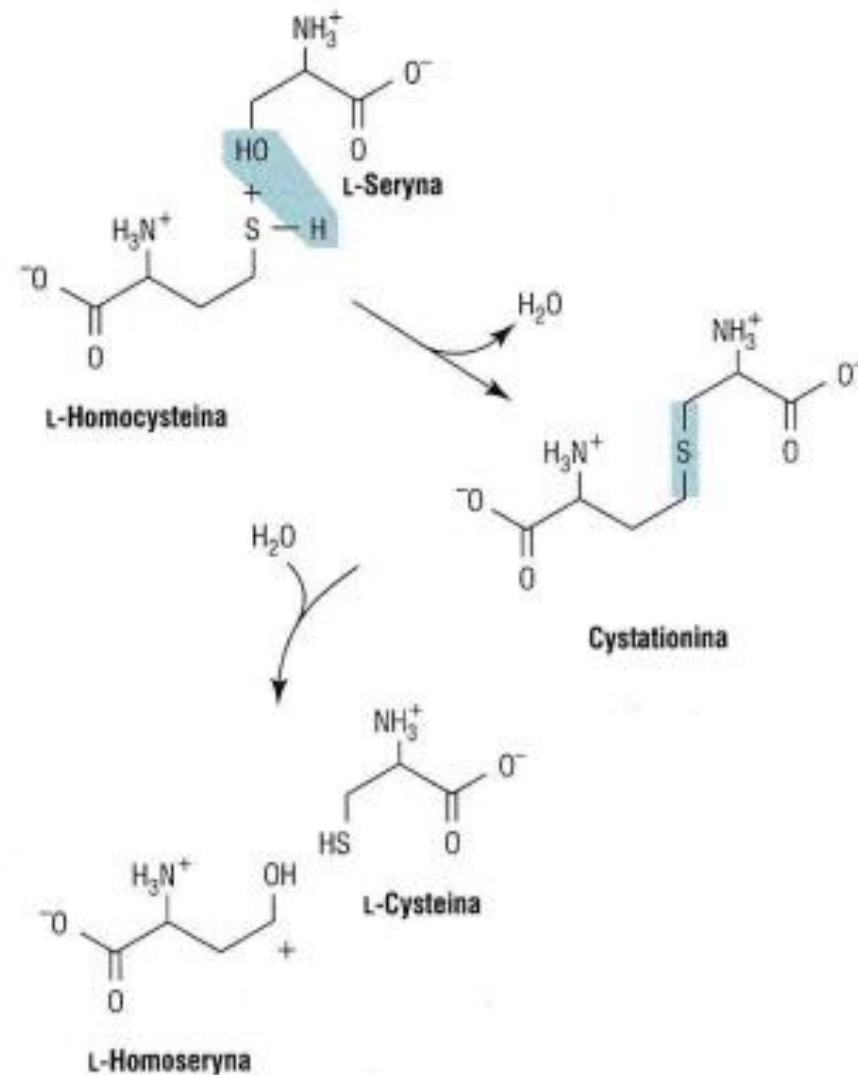


Reakcja syntetazy asparaginowej. Należy zwrócić uwagę na podobieństwa i różnice tej reakcji i reakcji syntetazy glutaminowej (ryc. 27-2).

Biosynteza aminokwasów które nie muszą być dostarczane w pożywieniu



Biosynteza proliny z glutaminianu przez odwrócenie reakcji katabolizmu proliny.



Przekształcenie homocysteiny i seryny w homose-
rynę i cysteinę. Siarka cysteiny pochodzi z metioniny, szkielet
węglowy z seryny.

Katabolizm szkieletów węglowych aminokwasów

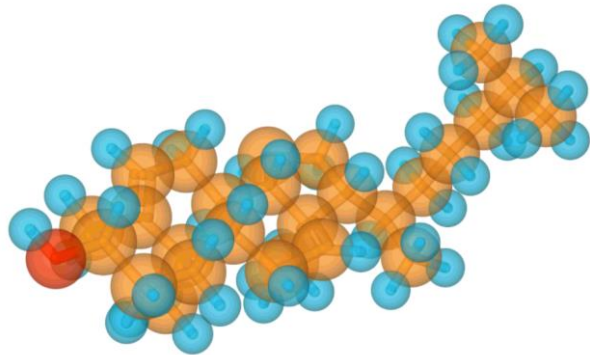


Katabolizm aminokwasów –aminokwasy są katabolizowane do amfibolicznych produktów pośrednich wykorzystywanych jako źródła energii lub do biosyntezy węglowodanów i lipidów.

- Transaminacja
- -Glicynuria, hiperoksaluria
- -cystyno-lizynuria, choroba spichrzeniowa cystyny, homocystynuria
- - tyrozynozą, zespół Richner-Hanharta, tyrozinemią, alkaptonuria
- -hiperlizynemia, amonemia
- -hiperwalinemia, choroba moczu o zapachu syropu klonowego, ketonuria

Lipidy o znaczeniu fizjologicznym

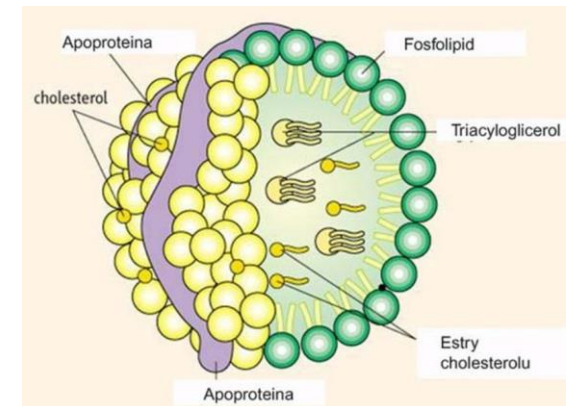
Tłuszcze
Steroidy
Woski
I ich pochodne



- nierozpuszczalność w wodzie
- rozpuszczalność w rozp. niepolarnych

☐ Lipoproteiny błony komórkowej, mitochondria, środki transportu lipidów w osoczu krwi.

- ☐ Otyłość
- ☐ Cukrzyca
- ☐ Miażdżycy



Lipidy o znaczeniu fizjologicznym

Lipidy

Lipidy proste

Lipidy złożone

Prekursory i pochodne lipidów

- ☐ Kw. Tłuszczowe
- ☐ Glicerol
- ☐ Steroidy
- ☐ Aldehydy tłuszczowe
- ☐ Ciała ketonowe

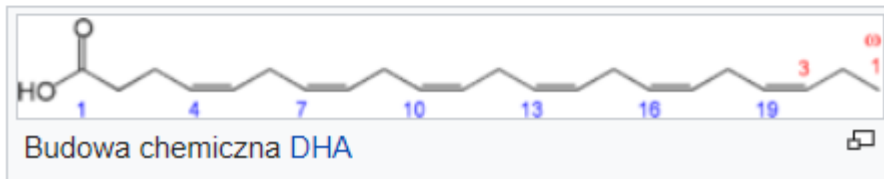
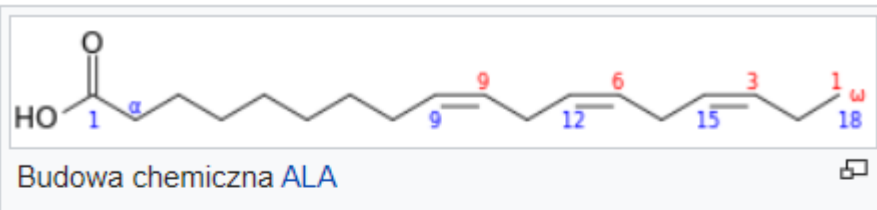
- ☐ Tłuszcze właściwe
- ☐ Woski

- ☐ fosfolipidy
- ☐ glikolipidy
- ☐ sulfolipidy,
- ☐ aminolipidy

Lipidy o znaczeniu fizjologicznym

Nasycone kwasy tłuszczowe

Nienasycone kwasy tłuszczowe



- ☐ Jednonienasycone
- ☐ Wielonienasycone
- ☐ Ikozanoidy
(prostaglandyny, tromboksany, leukotrieny)

Nienasycone kwasy tłuszczowe mające znaczenie fizjologiczne

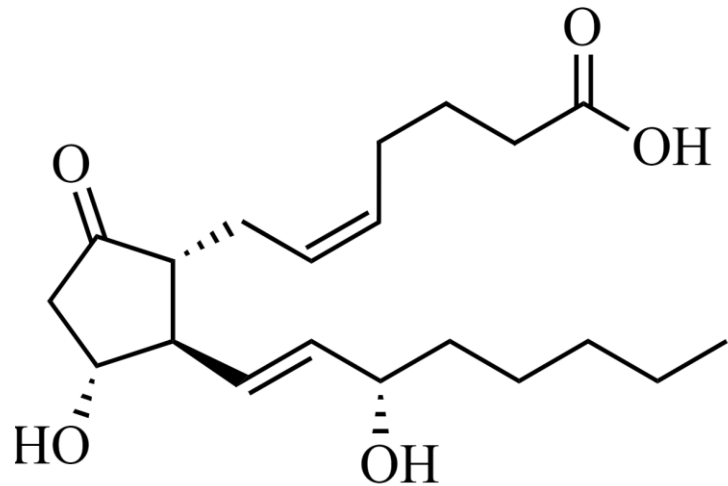
Większość
występujących
w naturze
nienasyconych
kw. tłuszczowych
zawiera podwójne
wiązanie cis

Najpopularniejsze nienasycone kwasy tłuszczowe

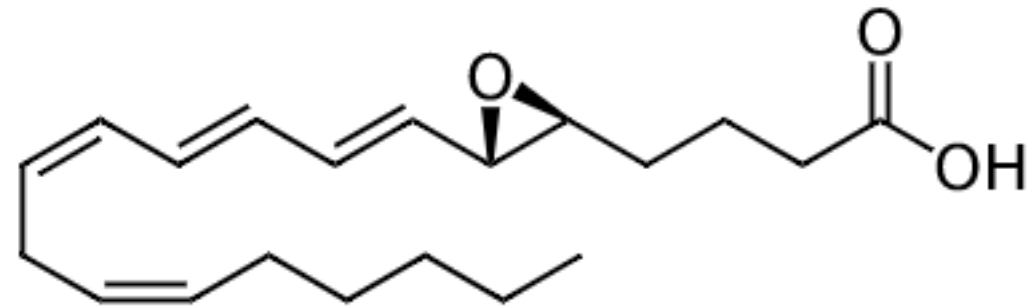
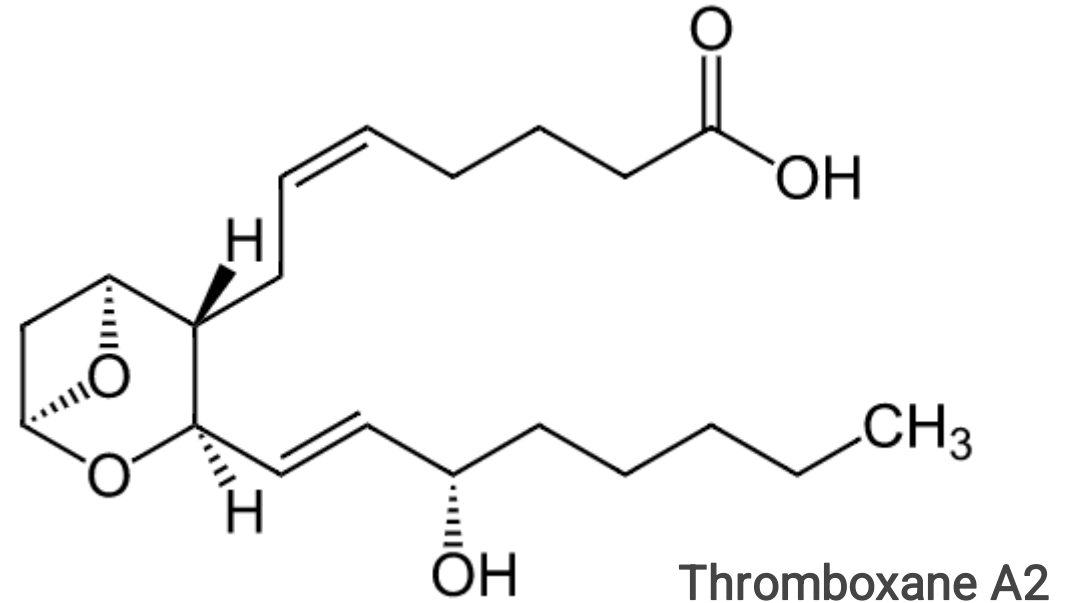
Nazwa zwyczajowa	Nazwa systematyczna	Wzór	Temp. topn. [°C]	Występowanie
Kwas undecylenowy	Kwas 10-undecenowy	$C_{11}H_{20}O_2$	24	
Kwas palmitoleinowy	Kwas (Z)-9-heksadekaenowy	$C_{16}H_{30}O_2$	0,5	olej zwierząt morskich, gadów i ptaków
Kwas oleinowy	Kwas (Z)-9-oktadekaenowy	$C_{18}H_{34}O_2$	16	oliwa z oliwek, tran
Kwas elaidynowy	Kwas (E)-9-oktadekaenowy	$C_{18}H_{34}O_2$	44	
Kwas petroselinowy	Kwas (Z)-6-oktadekaenowy	$C_{18}H_{34}O_2$	32	nasiona selera i niektórych bluszczów
Kwas wakcenyowy	Kwas (E)-11-oktadekaenowy	$C_{18}H_{34}O_2$	42	tłuszcze niektórych roślin i zwierząt
Kwas cytronelowy	Kwas 3,7-dimetylo-6-oktadekaenowy	$C_{20}H_{38}O_2$		drewno <i>Callitris glauca</i>
Kwas hydnoterpowy	Kwas 11-(3-cyklopentylo-)-undecenowy	$C_{16}H_{28}O_2$	58	olej nasion roślin tropikalnych z rodziny Flacourtiaceae
Kwas czoumugrowy	Kwas 13-(3-cyklopentylo-)-tridecenowy	$C_{18}H_{32}O_2$	69	
Kwas erukowy	Kwas (Z)-13-dokozenowy	$C_{22}H_{42}O_2$	33	olej rzepakowy i nasturcjowy
Kwas nerwonowy	Kwas (Z)-15-tetrakozenowy	$C_{24}H_{46}O_2$	44	składnik mielin, występuje razem z kwasem erukowym
Kwas linolowy	Kwas (Z,Z)-9,12-oktadekadienowy	$C_{18}H_{32}O_2$	-5 (-11)	powszechnie jako składnik lipidów
Kwas α-linolenowy	Kwas (Z,Z,Z)-9,12,15-oktadekatrienowy	$C_{18}H_{30}O_2$	-11	częsty składnik lipidów, w oleju lnianym i konopnym
Kwas γ-linolenowy	Kwas (Z,Z,Z)-6,9,12-oktadekatrienowy	$C_{18}H_{30}O_2$		olej z wiesiołka, ogórecznika i czarnej porzeczki
Kwas trans-linolenowy	Kwas (E,E,E)-9,12,15-oktadekatrienowy	$C_{18}H_{30}O_2$		powstaje w wyniku izomeryzacji kwasu α-linolenowego
Kwas oleostearynowy	Kwas (E,E,E)-9,11,13-oktadekatrienowy	$C_{18}H_{30}O_2$	71	olej tungowy
Kwas arachidonowy	Kwas (all-Z)-5,8,11,14-ejkozatetraenowy	$C_{20}H_{32}O_2$	-49	niektóre tkanki zwierzęce
Kwas klupanodonyowy	Kwas (all-Z)-4,8,12,15,19-dokozapentaenowy	$C_{22}H_{34}O_2$	-78	olej rybny
Kwas cerwonowy	Kwas (all-Z)-4,7,10,13,16,19-dokozaheksaenowy	$C_{22}H_{32}O_2$	-44	olej rybny
Kwas rycynolowy	Kwas (R)-12-hydroksy-(Z)-9-oktadekenowy	$C_{18}H_{34}O_3$	5	olej rycynowy

Nienasycone kwasy tłuszczowe mające znaczenie fizjologiczne

Nienasycone kwasy tłuszczowe mające znaczenie fizjologiczne



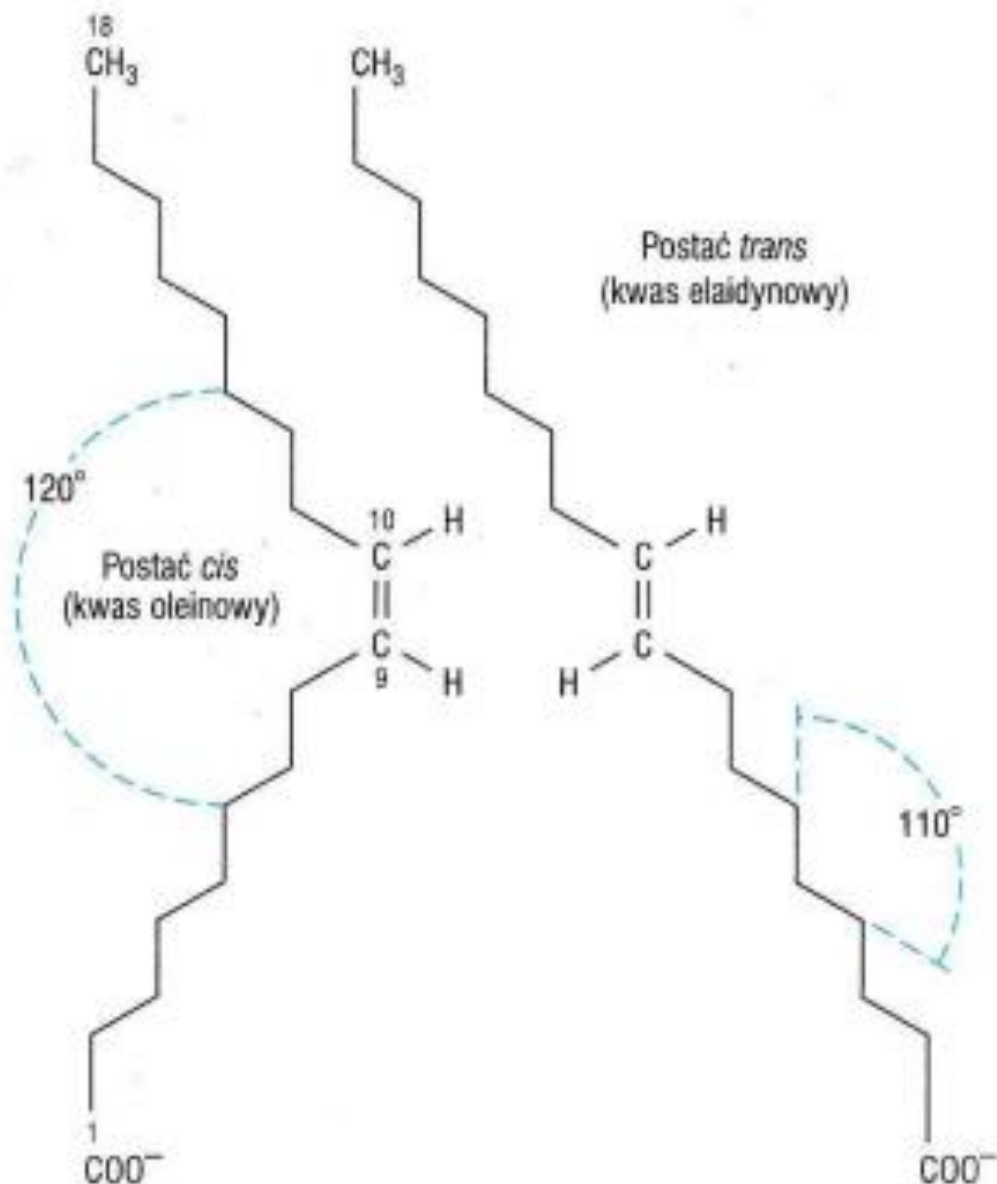
Prostaglandin E2



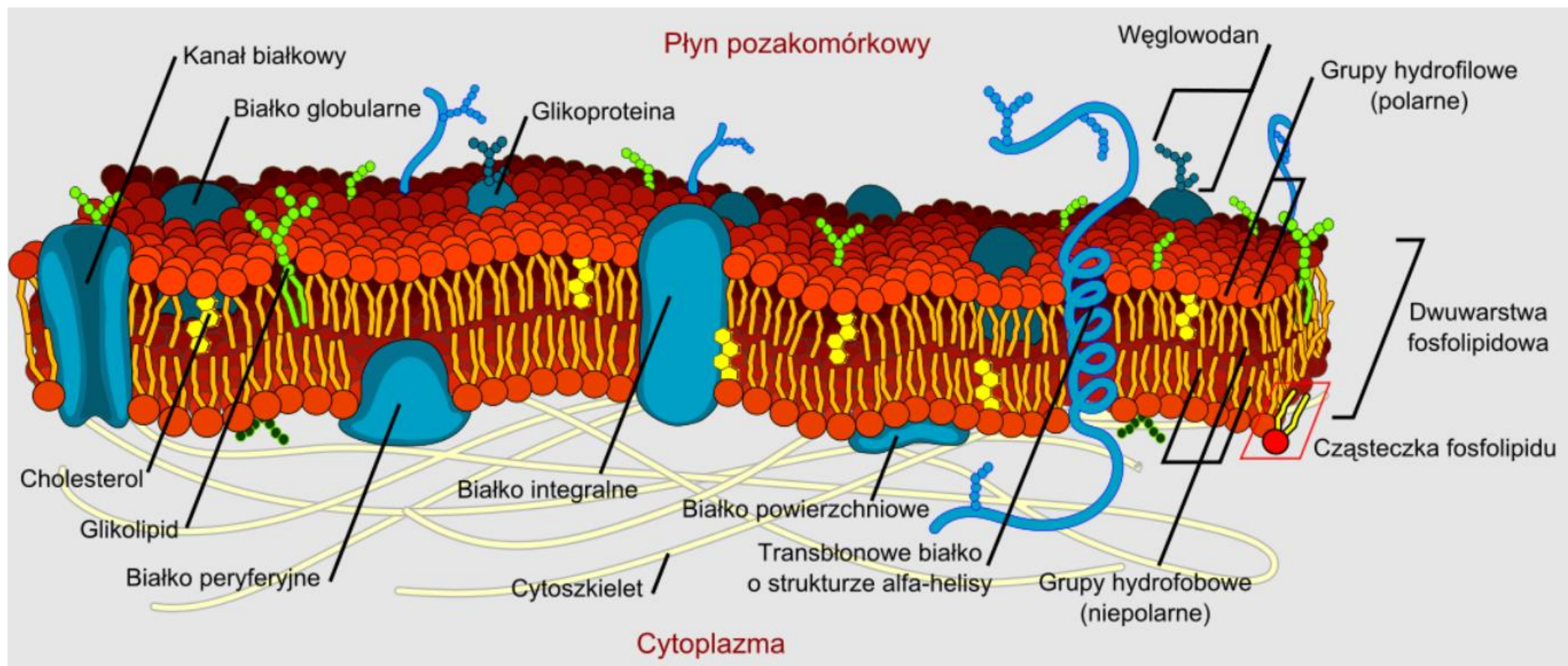
LTA₄

Nienasycone kwasy tłuszczowe mające znaczenie fizjologiczne

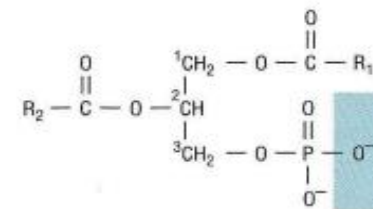
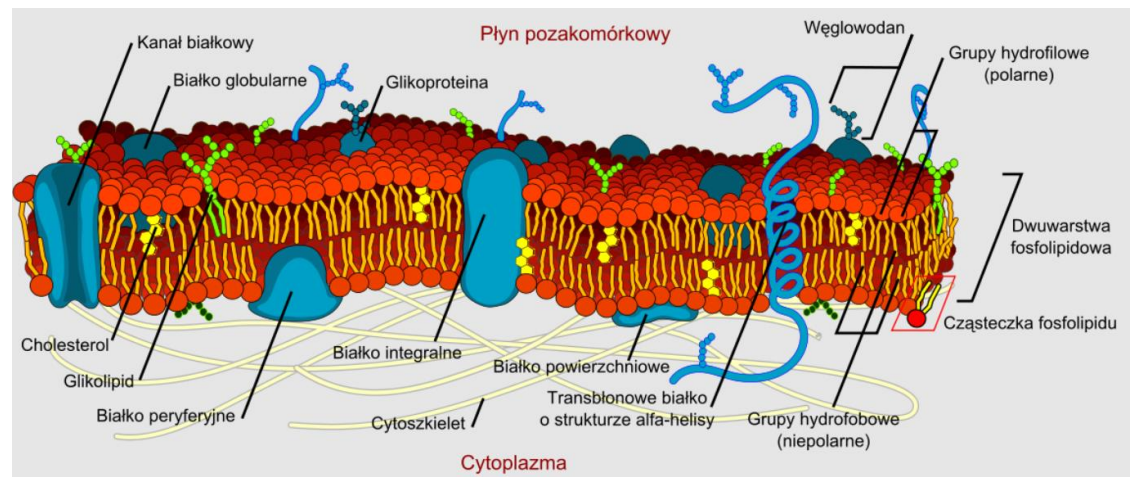
Większość występujących w naturze nienasyconych kw. tłuszczowych zawiera podwójne wiązanie cis



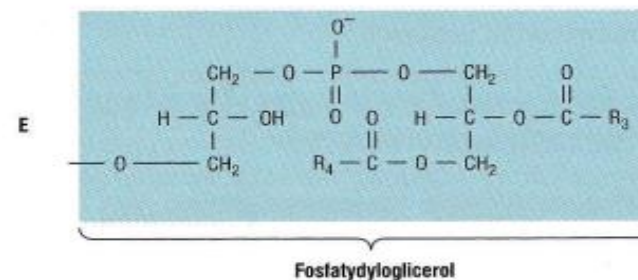
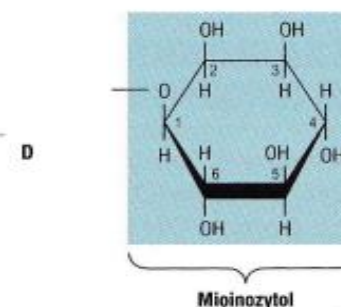
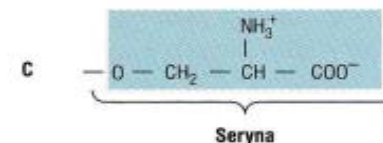
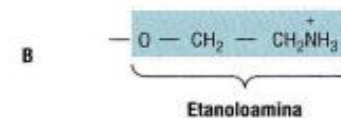
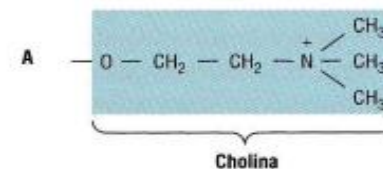
Fosfolipidy są głównymi składnikami błon biologicznych



Fosfolipidy są głównymi składnikami błon biologicznych

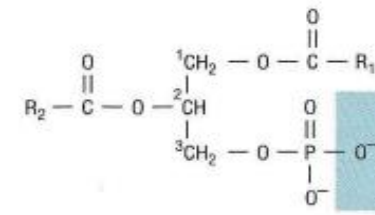
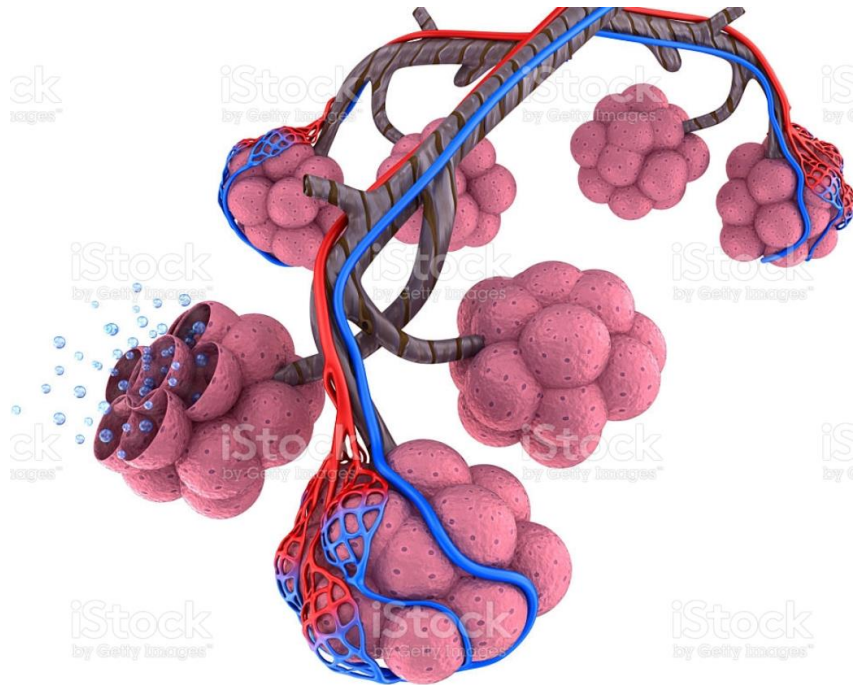


Kwas fosfadytowy

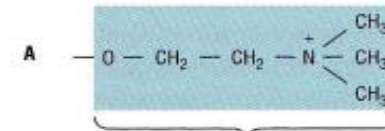


Lipidy o znaczeniu fizjologicznym

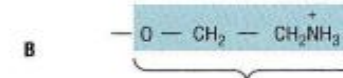
Dipalmitoilolecytyna



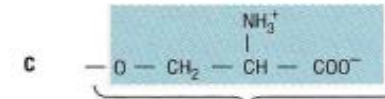
Kwas fosfadytowy



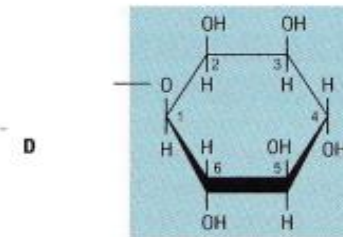
Cholina



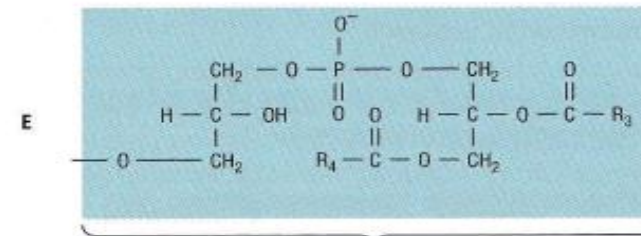
Etanoloamina



Seryna



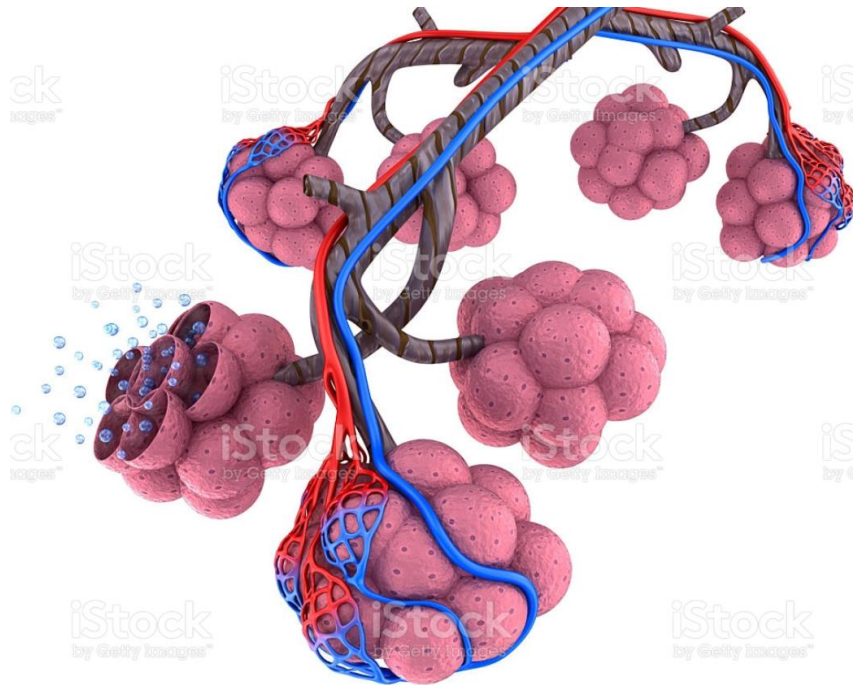
Mioinozytol



Fosfatydyloglicerol

Lipidy o znaczeniu fizjologicznym

Dipalmitoilolecytyna



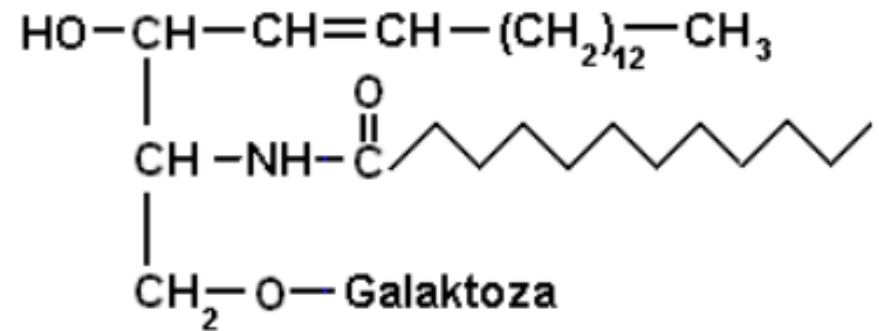
Fosfatydyloinozytol

Fosfatydyloinozytol - substancja z grupy fosfolipidów. Jego rola polega na modulowaniu funkcji układu nerwowego, m.in. wpływa na przepływ sygnałów pomiędzy komórkami nerwowymi. Rola w organizmie inozytolu jest dość szeroka: reguluje on równowagę pomiędzy minerałami jak miedź i cynk, wspomaga leczenie niepłodności u mężczyzn, wspiera prawidłowy rozwój szpiku kostnego i pracę wątroby.

Lipidy o znaczeniu fizjologicznym

Do najważniejszych glikolipidów zwierzęcych należą glikosfingolipidy. Zbudowane są one z ceramidu i jednej lub kilku cząsteczek cukru. Do glikolipidów o najprostszej budowie należą : glukozyloceramid i galaktozyloceramid. Galaktozyloceramid w niewielkich ilościach występuje prawie w każdej tkance, natomiast w dużej ilości obecny jest w tkance nerwowej i mózgu. Glukozyloceramid należy do grupy sfingolipidów i w dużej ilości występuje tkance pozanerwowej.

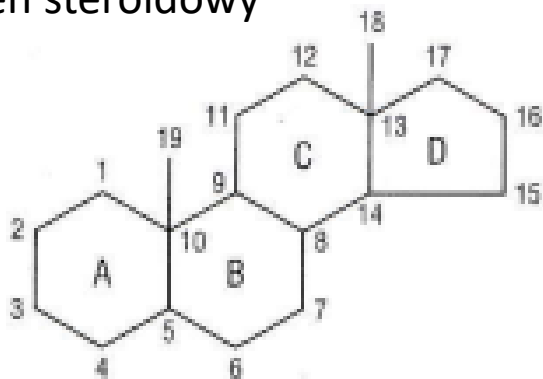
GLIKOLIPIDY, glikosfingolipidy



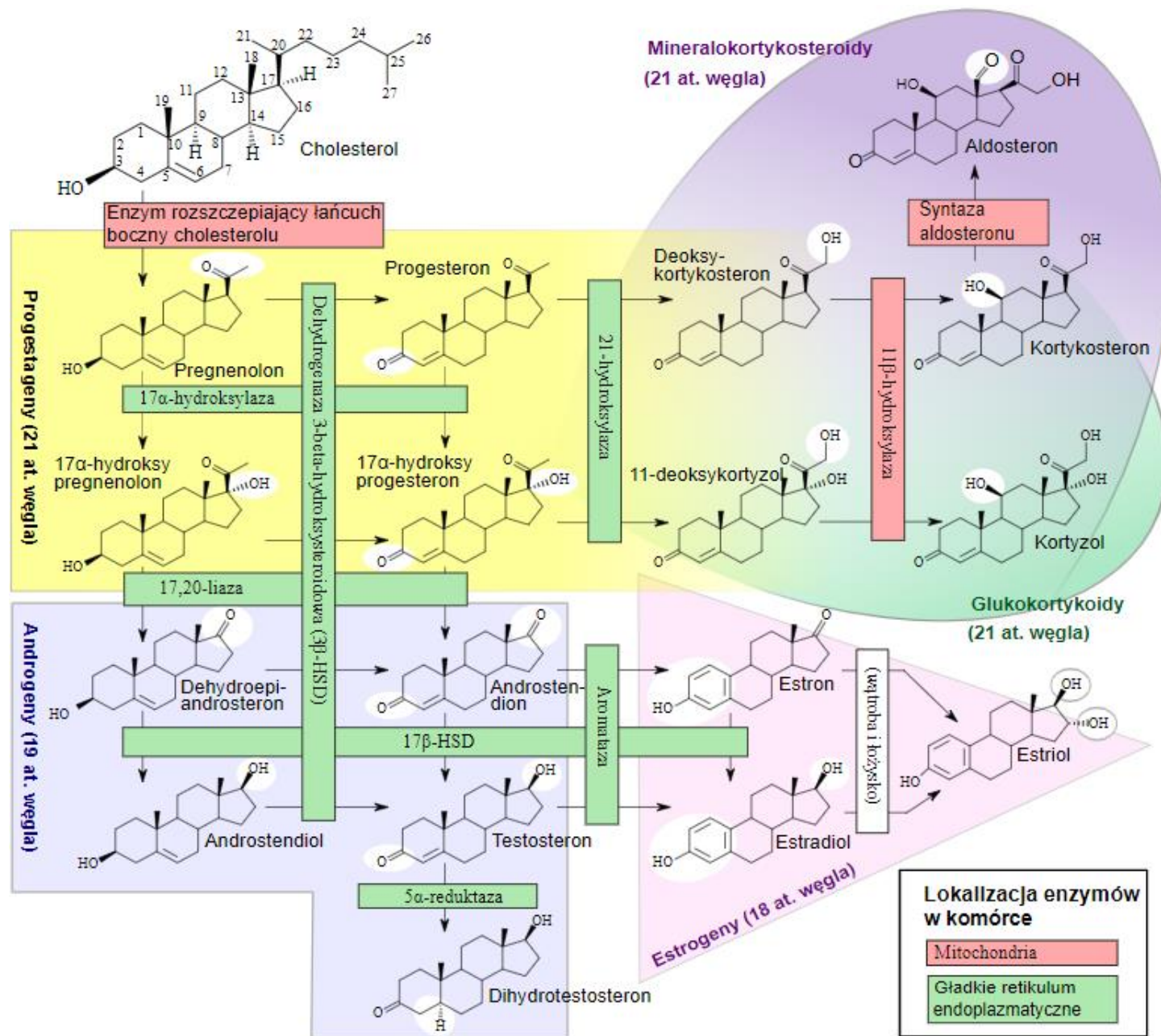
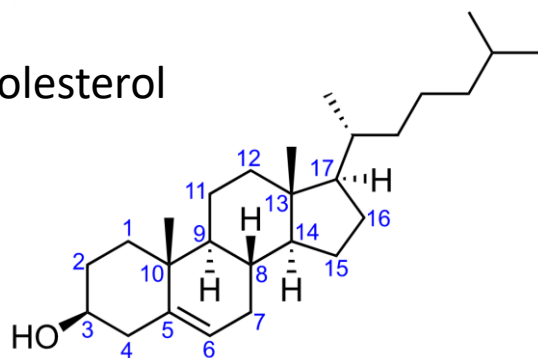
Galaktozyloceramid

Steroidy

Rdzeń steroidowy

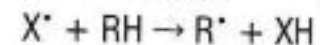


cholesterol

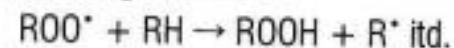
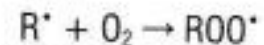


Peroksydacja lipidów

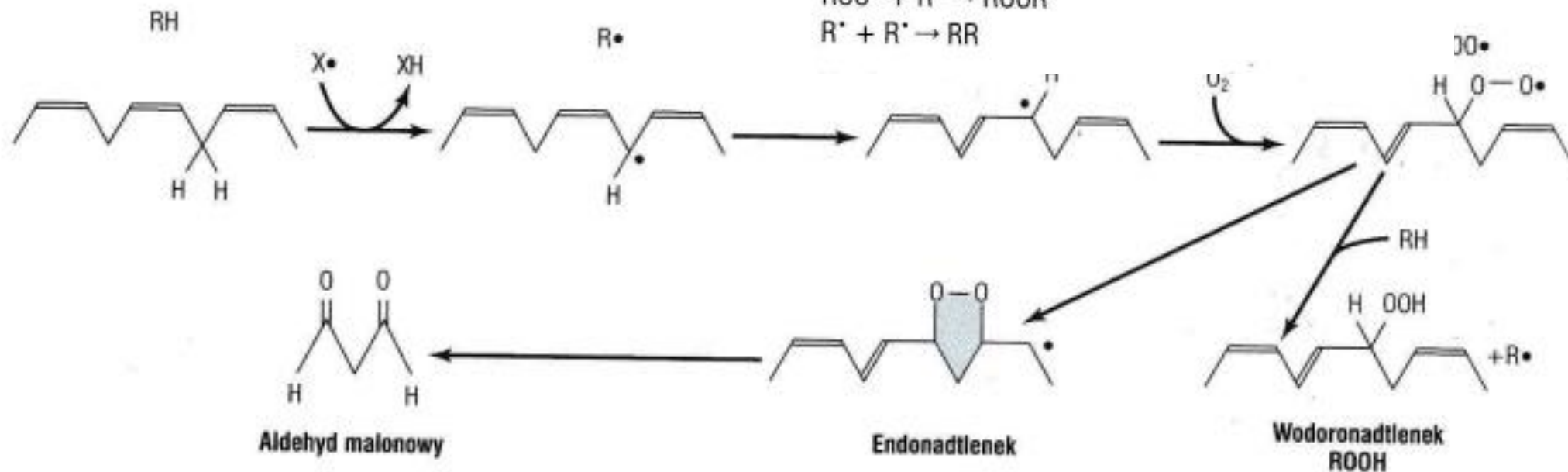
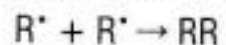
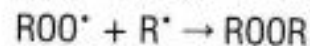
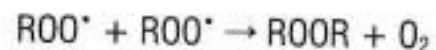
1. Inicjacja:



2. Rozprzestrzenianie (rozwijanie łańcucha reakcji):



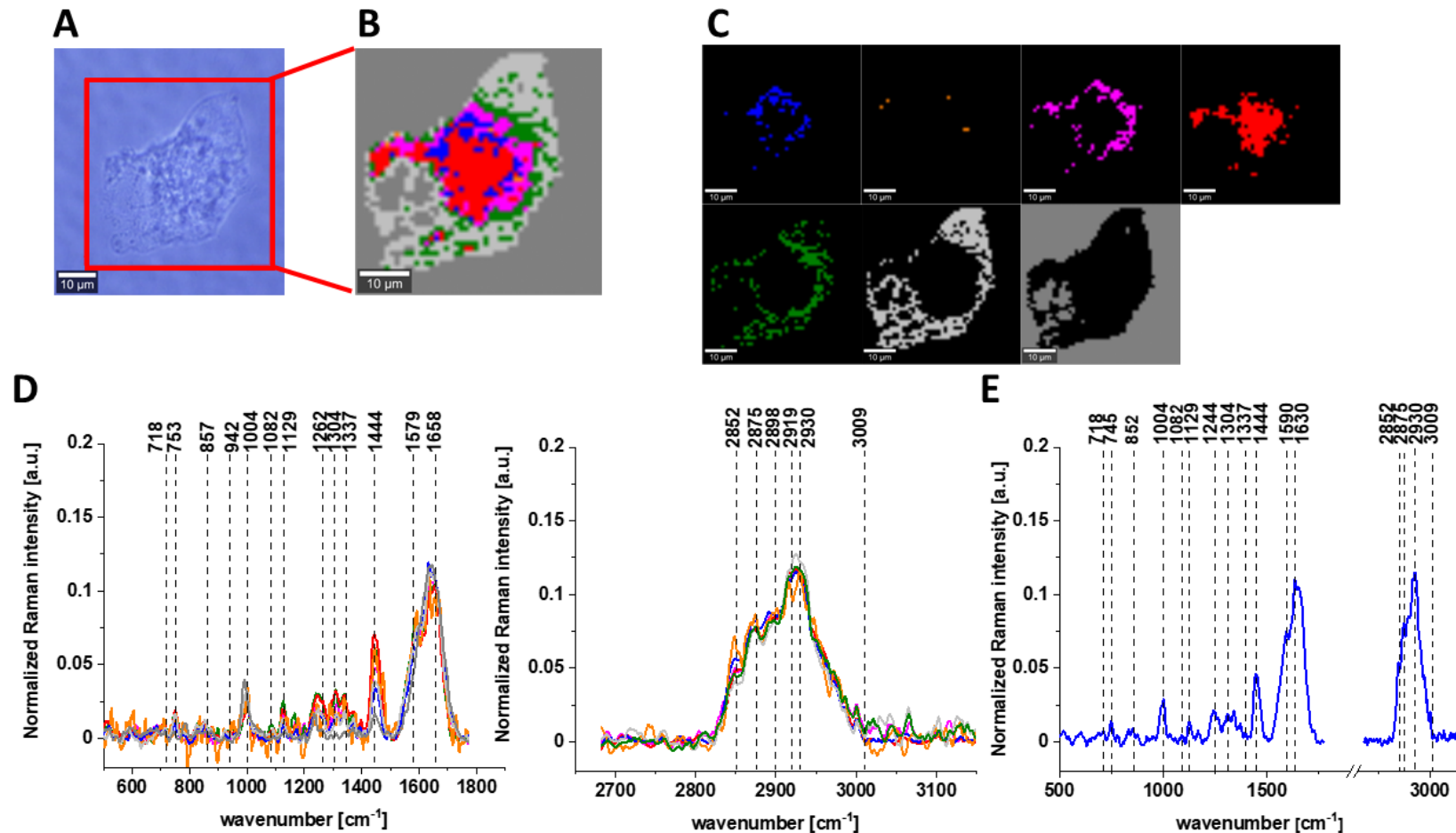
3. Zakończenie:



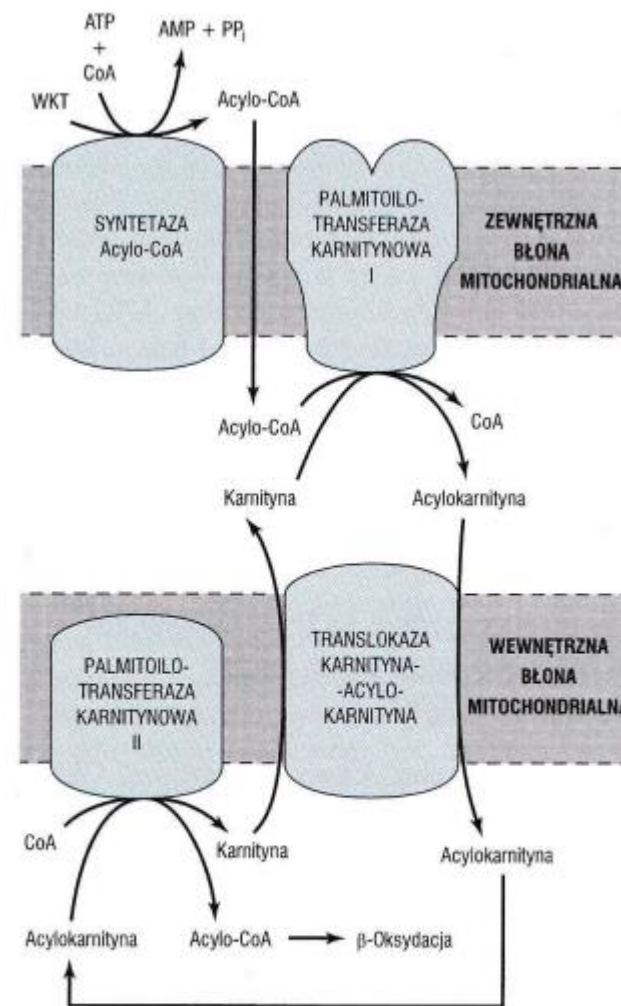
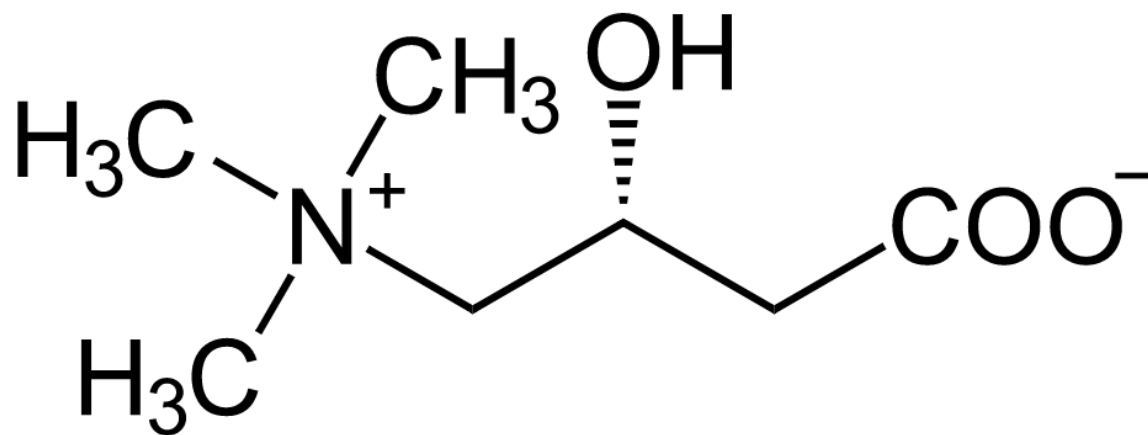
Schemat peroksydacji lipidów

Peroksydacja lipidów - antyoksydanty

Vit. E, vit. C, β -karoten



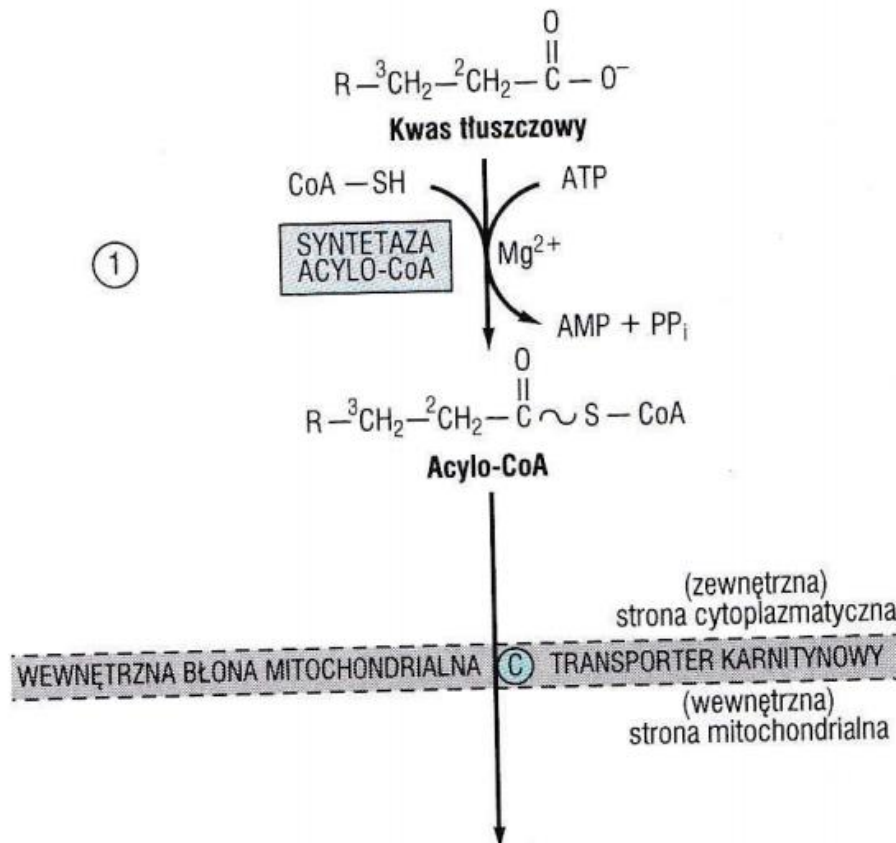
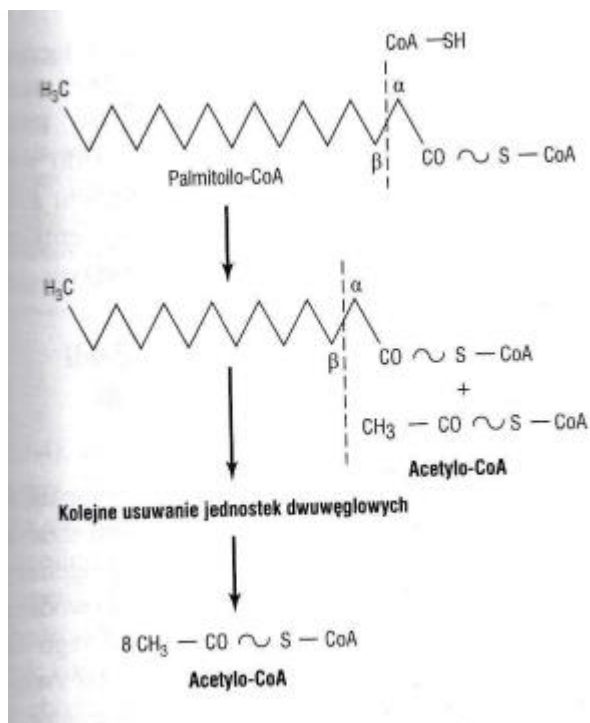
Długołańcuchowe kwasy tłuszczowe przenikają wew. błonę mitochondrialną jako pochodne karnityny



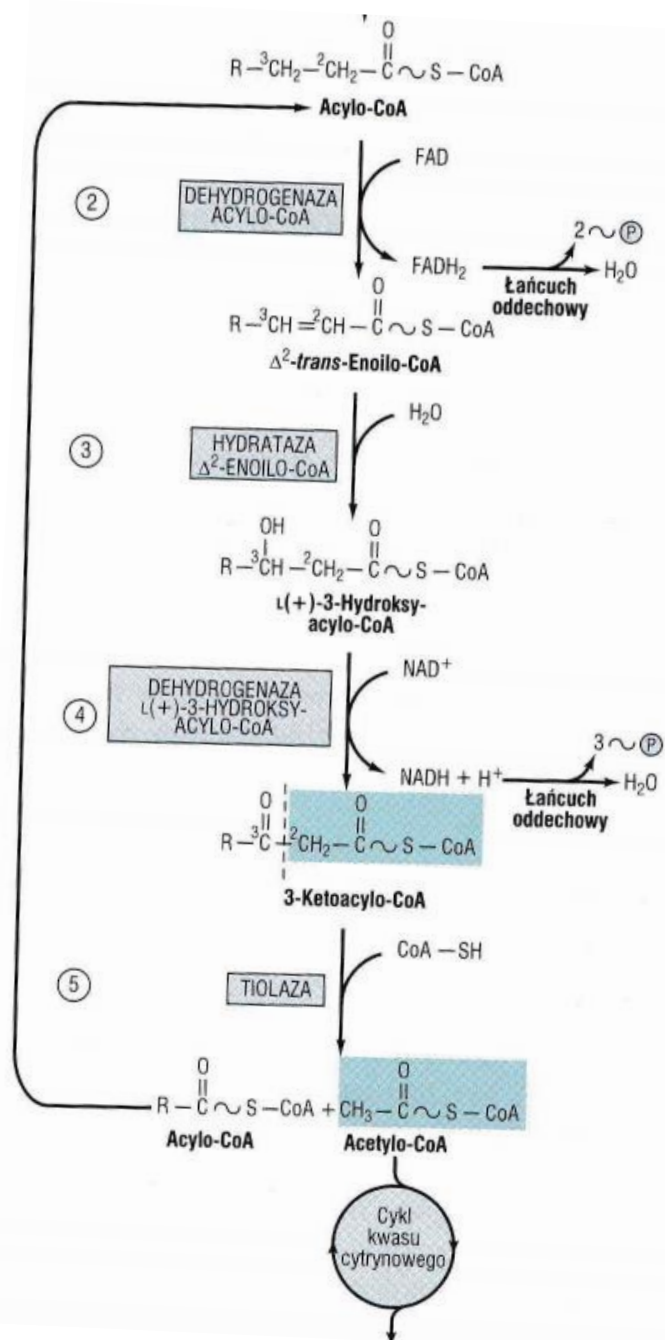
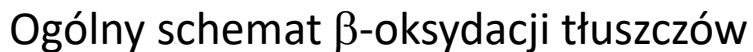
Rola karnityny w transporcie długołańcuchowych kwasów tłuszczowych przez wewnętrzną błonę mitochondrialną. Długołańcuchowy acylo-CoA nie może przenikać przez wewnętrzną błonę mitochondrialną, ale produkt jego metabolizmu – acylokarnityna – może.

Rola karnityny w transporcie kwasów tłuszczowych

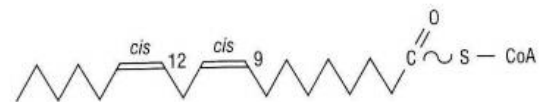
β -oksydacja tłuszczów



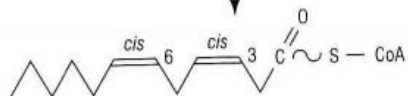
Ogólny schemat β -oksydacji tłuszczów



Peroksydacja lipidów - antyoksydanty

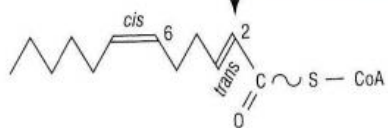


3 cykle
β-oksydacji



Δ^3 -cis- Δ^6 -cis-Dienoil-CoA

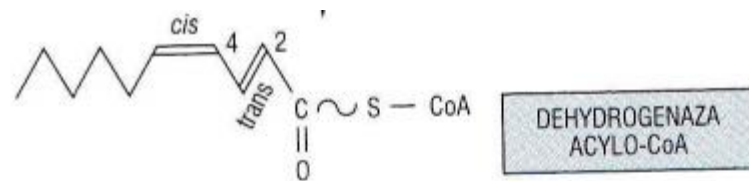
IZOMERAZA
 Δ^3 cis (albo trans) $\rightarrow$ Δ^2 -trans-ENOILO-CoA



Δ^2 -trans- Δ^6 -cis-Dienoil-CoA

(Etap β-oksydacji odpowiadający Δ^2 -trans-enoil-CoA)

1 cykl
β-oksydacji



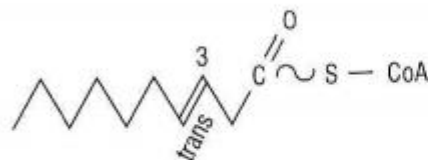
DEHYDROGENAZA
ACYLO-CoA

Δ^2 -trans- Δ^4 -cis-Dienoil-CoA $\leftarrow$ Δ^4 -cis-Enoil-CoA

$H^+ + NADPH \rightleftharpoons NADP^+$

REDUKTAZA

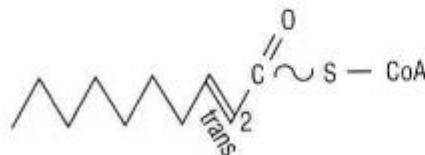
Δ^2 -trans- Δ^4 -cis-DIENOILO-CoA



Δ^3 -trans-Enoil-CoA

IZOMERAZA

Δ^3 -cis-(albo trans) $\rightarrow$ Δ^2 -trans-ENOILO-CoA



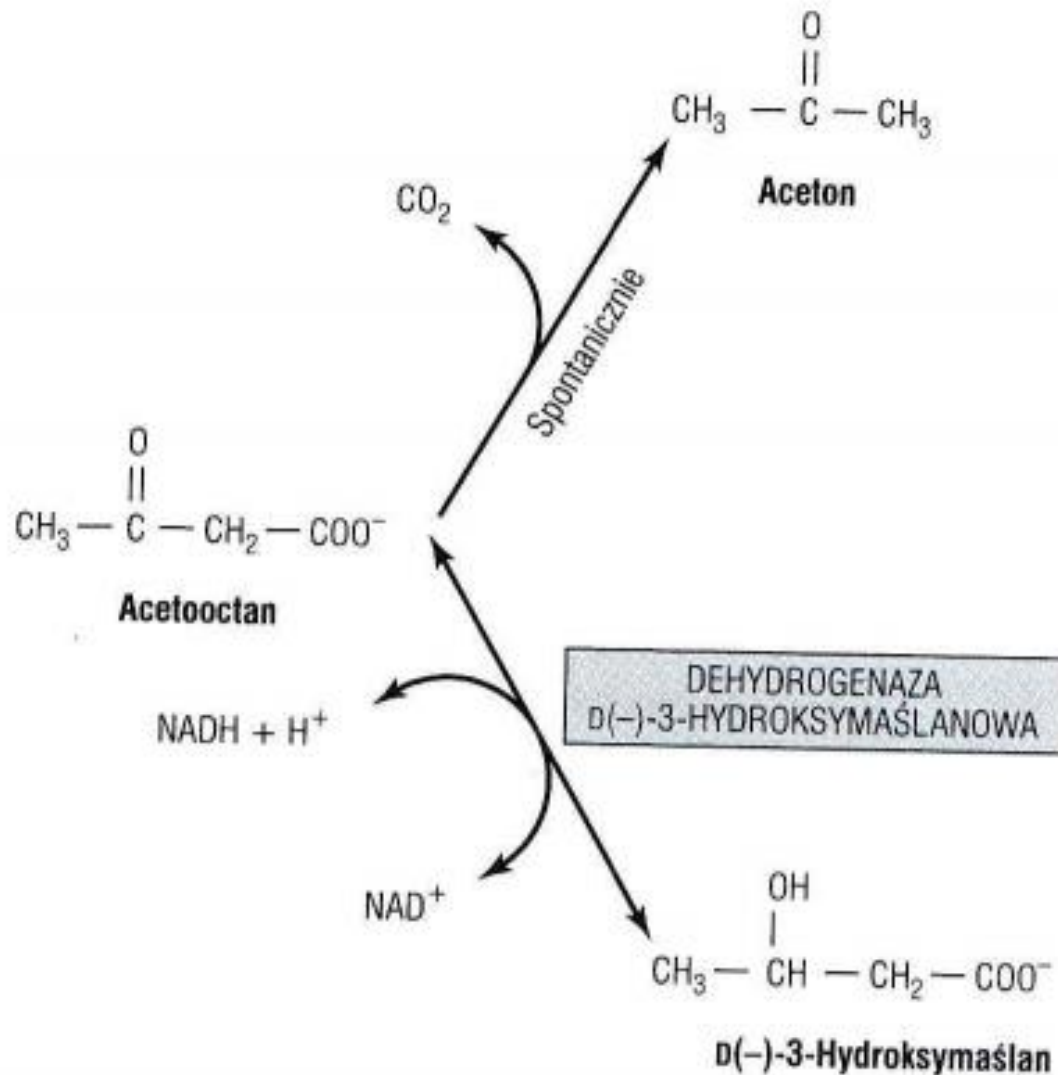
Δ^2 -trans-Enoil-CoA

4 cykle
β-oksydacji

5 Acetylo-CoA

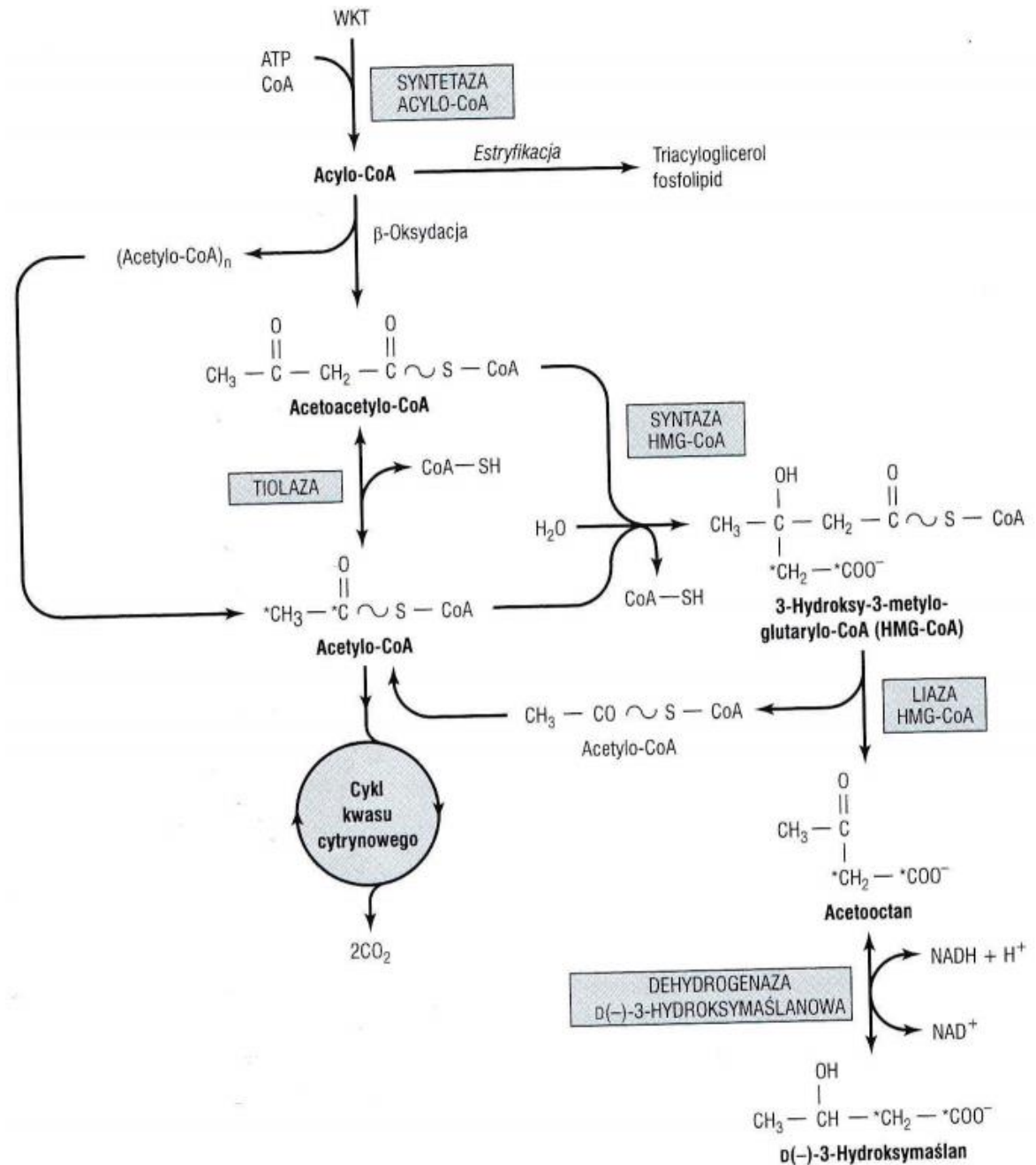
Utlenianie kwasów nienasyconych

Wzajemne zależności ciał ketonowych



Wzajemne zależności ciał ketonowych

Szlak ketogenezy w wątrobie



Szlak ketogenezy w wątrobie

Aspekty kliniczne



- **Niedobór karnityny**
- **Niedobór CPT-I**
- **Niedobór CPT-II**
- **Niedobór liaz**
- **Jamajska choroba wymiotna**
- **Acyduria dwukarboksylowa**
- **Choroba Refsuma**

Aspekty kliniczne

- **Zespół Zellwegera**

prezentacja choroby ma miejsce tuż po urodzeniu. U noworodka stwierdza się:

- zaćmę
- hepatomegalię
- torbielowatość nerek
- wrodzone wady serca
- zaburzenia mielinizacji nerwów obwodowych
- deformacje czaszki
- spodziectwo
- opóźniony rozwój psychoruchowy, drgawki
- niechęć do ssania, słaby przyrost masy ciała
- złogi wapniowe w szpiku kostnym.
- Śmierć na ogół następuje w ciągu kilku-kilkunastu tygodni, w okresie niemowlęcym).

Nieprawidłowy metabolizm
egzogennych kwasów
tłuszczowych występuje w
wielu chorobach



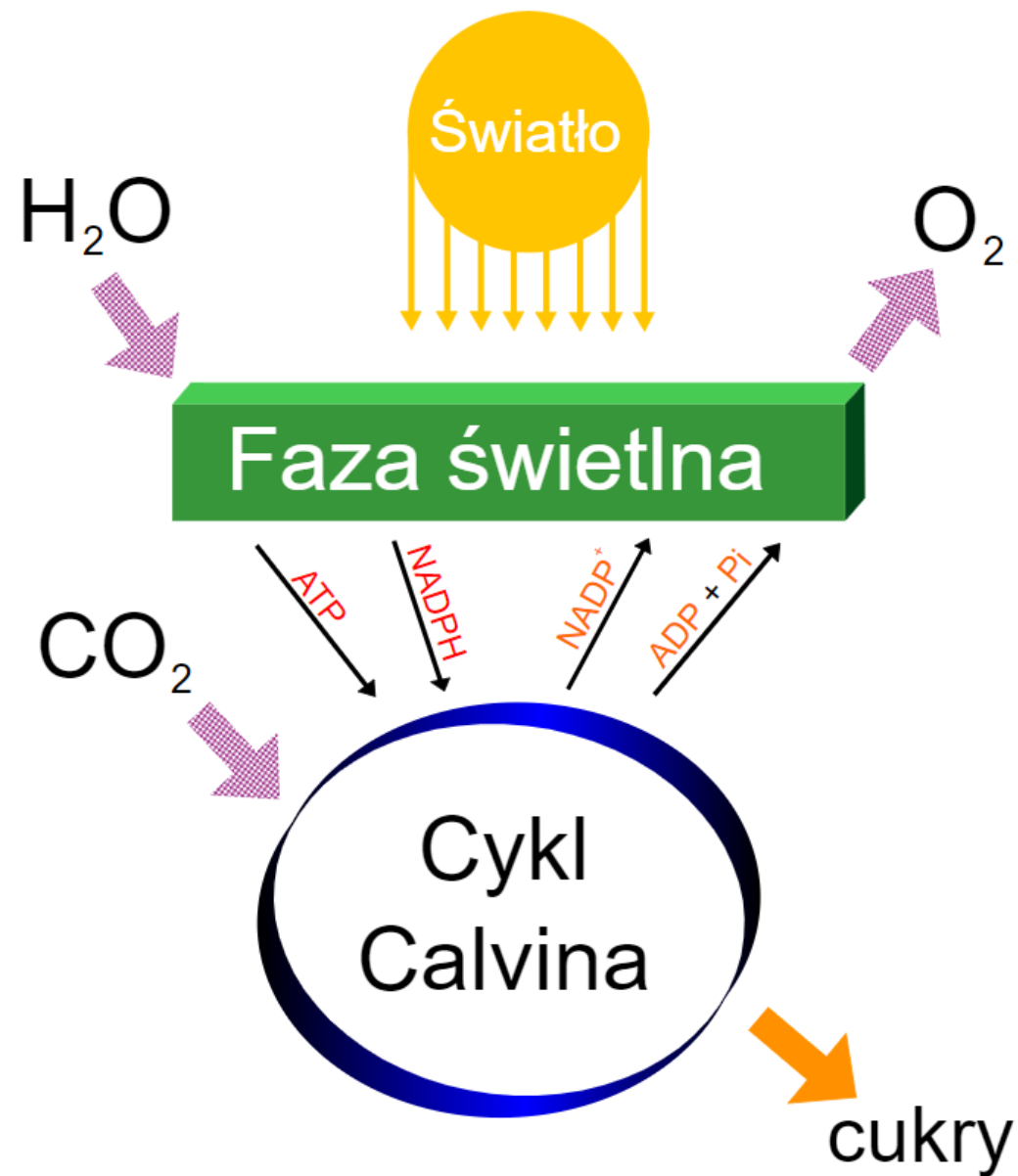
- Torbielowate zwłóknienie trzustki
- Zespół wątrobowo-nerkowy
- Zespół Sjogrena-Larsona
- Choroba Crohna
- Marskość wątroby
- Zespół Reye'a

Węglowodany o znaczeniu fizjologicznym

Węglowodany (cukry są bardzo rozpowszechnione w świecie zwierzęcym i roślinnym i odgrywają bardzo ważną rolę tak strukturalną jak i metaboliczną.

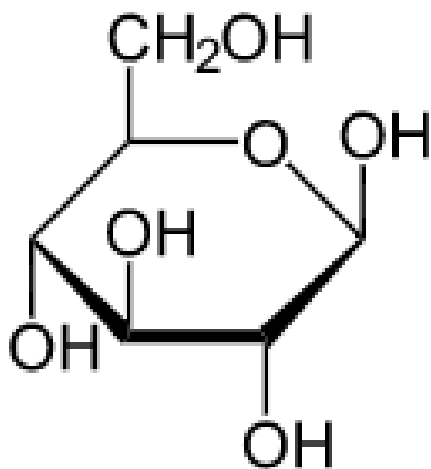
aminokwasy

poходzenie
roślinne



Węglowodany o znaczeniu fizjologicznym

GLUKOZA



Krystaliczna glukoza ma budowę cykliczną. Sześcioczłonowy pierścień hemiacetalu powstaje w wyniku reakcji grupy aldehydowej przy atomie węgla C1 z grupą hydroksylową przy atomie węgla C5 w łańcuchu. Możliwe są zatem dwa anomery – α oraz β w zależności od położenia grupy OH przy pierwszym atomie węgla formy cyklicznej.

W roztworze wodnym oba anomery mogą ulegać reakcji otwarcia pierścienia i ponownego zamknięcia z utworzeniem ponownie takiego samego lub przeciwnego anomeru. Proces taki nazywa się mutarotacją. Forma otwartołańcuchowa występuje wyłącznie w roztworze wodnym, a jej termodynamiczna stabilność jest znacznie mniejsza od formy cyklicznej, dlatego równowaga procesu mutarotacji przesunięta jest silnie w kierunku formy cyklicznej, która występuje w przewodzie.

W łańcuchowej formie glukozy znajdują się cztery asymetryczne atomy węgla (tj. C2, C3, C4 i C5), podczas gdy w formie cyklicznej występuje pięć takich atomów (dodatkowo asymetryczny jest węgiel anomeryczny, C1). W zależności od położenia grupy karbonylowej w łańcuchu i konfiguracji asymetrycznych atomów węgla, możliwych jest kilkadziesiąt izomerów glukozy (zob. heksozy). Jednym z często występujących naturalnie izomerów glukozy jest fruktoza, różniąca się położeniem grupy karbonylowej

Węglowodany o znaczeniu fizjologicznym

glukoza

glikogen

ryboza
i deoksyryboza

galaktoza

☐ Cukrzyca

☐ Galaktozemia

☐ Zaburzenia
spichrzania glikogenu

☐ Nietolerancja laktozy

14 listopada
Światowy Dzień Walki z Cukrzycą



Węglowodany są aldehydowymi
lub ketonowymi pochodnymi
alkoholi polihydroksylowych

monosacharydy

Triozy
Tetrozy
Pentozy
Heksozy
Heptozy

disacharydy

Maltoza
Sacharoza

Klasyfikacja ważniejszych cukrów

Cukry	Aldozy	Ketozy
Triozy ($C_3H_6O_3$)	Gliceroza (aldehyd glicerynowy)	Dihydroksyacetone
Tetrozy ($C_4H_8O_4$)	Erytroza	Erytruloza
Pentozy ($C_5H_{10}O_5$)	Ryboza	Rybuloza
Heksozy ($C_6H_{12}O_6$)	Glukoza	Fruktoza
Heptozy ($C_7H_{14}O_7$)	—	Sedoheptuloza

Aldozy
Ketozy

Węglowodany są aldehydowymi
lub ketonowymi pochodnymi
alkoholi polihydroksylowych

monosacharydy

Triozy
Tetrozy
Pentozy
Heksozy
Heptozy

Aldozy
Ketozy

oligosacharydy

disacharydy

Maltoza
Sacharoza

polisacharydy

skrobie
dekstryny

Pod względem biomedycznym
najważniejszym
monosacharydem jest glukoza

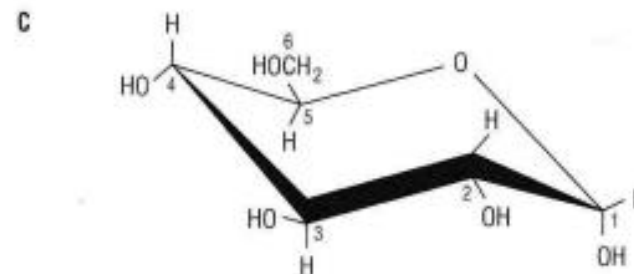
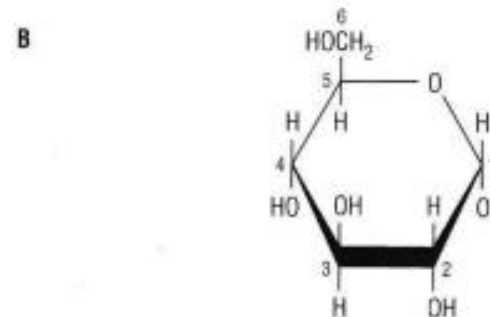
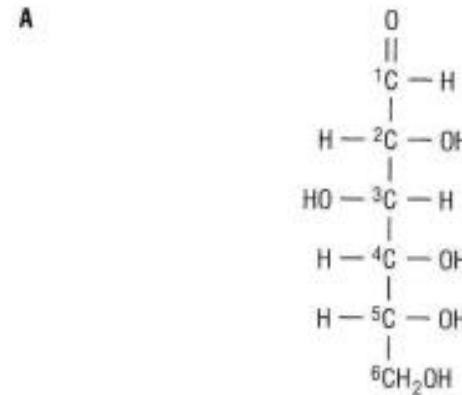
Izomery konfiguracyjne

Piranozowe i furanozowe formy pierścieniowe

Anomery alfa i beta

Epimery

Izomery aldoza-ketoza



D-Glukoza. **A** – forma łańcuchowa,
B – α-D-glukoza; wzór rzutowy Hawortha,
C – α-D-glukoza; konformacja krzeselkowa.

Pod względem biomedycznym
najważniejszym
monosacharydem jest glukoza

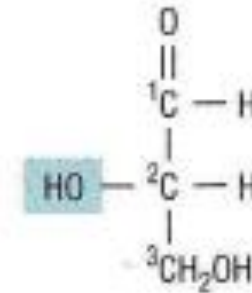
Izomery konfiguracyjne

Piranozowe i furanozowe formy pierścieniowe

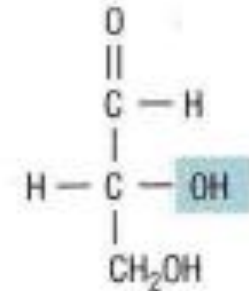
Anomery alfa i beta

Epimery

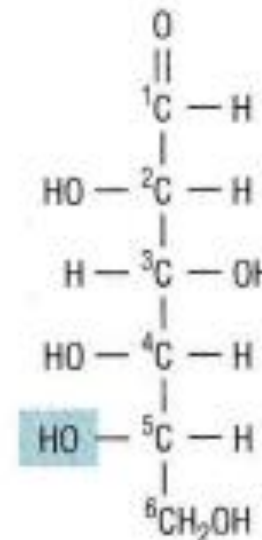
Izomery aldoza-ketoza



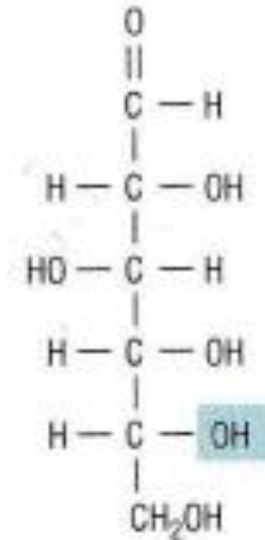
Aldehyd L-glicerynowy
(L-Gliceroza)



Aldehyd D-glicerynowy
(D-Gliceroza)



L-Glukoza



D-Glukoza

D- i L-Izomery aldehydu glicerynowego i glukozy.

Pod względem biomedycznym
najważniejszym
monosacharydem jest glukoza

Izomery konfiguracyjne

Piranozowe i furanozowe formy pierścieniowe

Anomery alfa i beta

Epimery

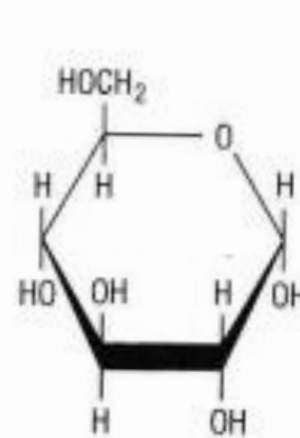
Izomery aldoza-ketoza



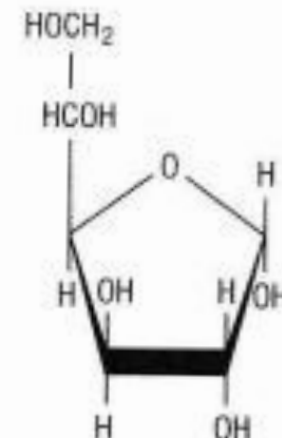
Piran



Furan



α -D-Glukopiranoza



α -D-Glukofuranoza

Postacie piranozowa i furanozowa glukozy.

Pod względem biomedycznym
najważniejszym
monosacharydem jest glukoza

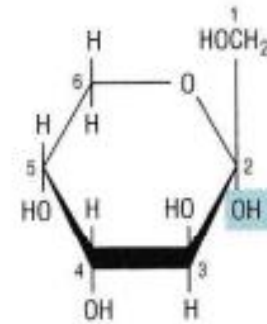
Izomery konfiguracyjne

Piranozowe i furanozowe formy pierścieniowe

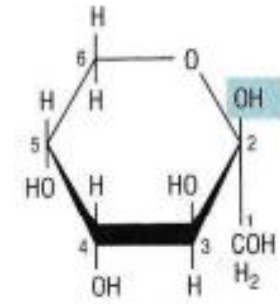
Anomery alfa i beta

Epimery

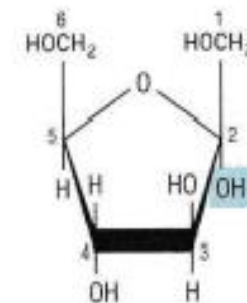
Izomery aldoza-ketoza



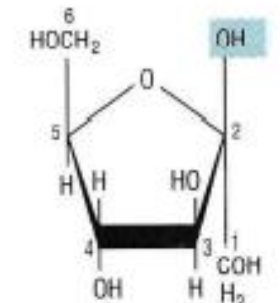
α -D-Fruktopiranoza



β -D-Fruktopiranoza



α -D-Fruktofuranaza

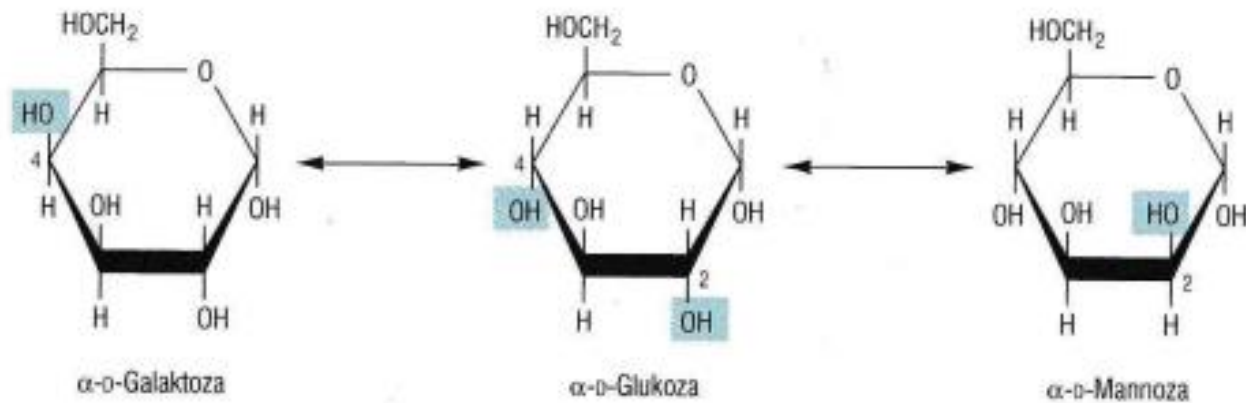


β -D-Fruktofuranaza

Postacie piranozowa i furanozowa fruktozy.

Pod względem biomedycznym
najważniejszym
monosacharydem jest glukoza

Epimery



Epimeryzacja glukozy.

Wiele monosacharydów to związki ważne pod względem fizjologicznym

Tabela 14-2. Pentozy o znaczeniu fizjologicznym

Cukier	Występowanie	Znaczenie biochemiczne i kliniczne
D-Ryboza	Kwasy nukleinowe i metabolit pośredni	Składnik strukturalny kwasów nukleinowych i koenzymów, np. ATP, NAD(P) ⁺ , oraz koenzymów flawinowych
D-Rybuloza	Powstaje w procesach metabolicznych	Metabolit pośredni w szlaku pentozaofosforanowym
D-Arabinoza	Gumy roślinne	Składnik glikoprotein
D-Ksyloza	Gumy roślinne, proteoglikany, glikozoaminoglikany	Składnik glikoprotein
L-Ksyluloza	Metabolit pośredni	Pojawia się w moczu w przypadku pentozurii wrodzonej

Tabela 14-3. Znaczenie fizjologiczne heksoz

Cukier	Występowanie	Znaczenie biochemiczne	Znaczenie kliniczne
D-Glukozę	Soki owocowe, hydrolizat skrobi, sacharozy, maltozy lub laktozy	Główne paliwo dla tkanek; „cukier krwi”	Pojawia się w moczu (glukozuria) w wyniku zwiększenia stężenia glukozy we krwi (hiperglikemia) w przypadku cukrzycy
D-Fruktoza	Soki owocowe, miód, hydrolizat sacharozy i inuliny, enzymatyczna izomeryzacja glukozy	Metabolizuje bezpośrednio lub po przekształceniu w glukozę	Dziedziczna nietolerancja fruktozy prowadzi do akumulacji fruktozy i hipoglikemii
D-Galaktoza	Hydrolizat laktozy	Ulega przekształceniu w glukozę; syntetyzowana w gruczole sutkowym jest substratem do syntezy laktozy mleka. Składnik glikolipidów i glikoprotein	Wrodzona galaktozemia w wyniku niewydajnego metabolizmu galaktozy prowadzi do zaćmy
D-Mannoza	Hydrolizat mannozanowych gum roślinnych	Składnik glikoprotein	

Cukry tworzą glikozydy w reakcji z innymi związkami lub między sobą

Glikozydy nasercowe

podgrupa glikozydów mająca zdolność pobudzania pracy serca. Zwiększają siłę skurczu mięśnia sercowego, a jednocześnie obniżają częstość tego skurczu.

Do glikozydów nasercowych zalicza się kardenolidy, w których występuje pięcioczłonowy pierścień laktonowy i glikozydy bufadienolidowe z sześcioczłonowym pierścieniem laktonowym. Związki te nie są stosowane w formie czystej jako leki nasercowe, lecz ich działaniu przypisuje się efekt leczniczy działania niektórych ziół.

Bogate w kardenolidy są wyciągi z liści:

Digitalis purpurea (naparstnica purpurowa)

Digitalis lanata (naparstnica wełnista)

Adonis vernalis (miłek wiosenny)

Urginea maritima (cebula morska)

Convallaria majalis (konwalia majowa)

Strophantus gratus (strofant wdzięczny)



Cukry tworzą glikozydy w reakcji z innymi związkami lub między sobą

Glikozydy nasercowe

Glikozydy nasercowe hamują działanie pompy sodowo-potasowej w sarkolemmie kardiomiocytów. Powodują przez to zwiększenie stężenia wewnątrzkomórkowego sodu i wapnia, przez co wywierają dodatni efekt inotropowy (zwiększają siłę skurczów). Na czynność naczyń i serca działają bezpośrednio i pośrednio, wpływając na układ nerwowy współczulny i przywspółczulny.

Wpływają na układ przywspółczulny, aktywując go. Zwiększenie napięcia nerwu błędnego wpływa hamująco na czynność węzła zatokowo-predsionkowego i węzła przedsionkowo-komorowego (efekt dromotropowy ujemny), i zwalnia ich rytm (efekt chronotropowy ujemny). Pośredni wpływ aktywacji nerwu błędnego powoduje też spadek kurczliwości mięśnia przedsionków serca, skrócenie okresu refrakcji i przyspieszenie przewodzenia impulsów w przedsionku. Glikozydy działając bezpośrednio wywołują przeciwstawne działanie, zwiększając kurczliwość mięśnia przedsionków, wydłużając okres refrakcji i zwalniając przewodzenie. Ponadto powodują zwiększenie automatyzmu przedsionków. Zwiększenie wydzielania noradrenaliny powoduje skrócenie okresu refrakcji włókien Purkiniego i zwiększenie ich automatyzmu. Takie same jest bezpośrednie działanie glikozydów na włókna Purkiniego. Działanie noradrenaliny i glikozydów na mięsień komór powoduje wzrost kurczliwości, skrócenie okresu refrakcji włókien mięśniowych i zwiększenie automatyzmu serca.

Glikozydy nasercowe zwiększają czułość baroreceptorów.

Glikozydy nasercowe zmniejszają napięcie układu współczulnego, powodując zmniejszenie oporu tętniczek obwodowych. Bezpośredni wpływ glikozydów jest przeciwstawny i powoduje zwiększenie oporu.

Cukry tworzą glikozydy w reakcji z innymi związkami lub między sobą

Glikozydy nasercowe

Glikozydy dobrze wchłaniają się z przewodu pokarmowego. Cechują się szeroką dystrybucją w tkance mięśniowej. Najbardziej stabilne warunki farmakokinetyczne ma digoksyna i metyldigoksyna. Glikozydy nasercowe cechują się stosunkowo niskim indeksem terapeutycznym przez co ustalenie właściwej dawki leku bywa trudne i co ogranicza stosowanie tych leków.

WSKAZANIA

przewlekła niewydolność serca z migotaniem bądź trzepotaniem przedsionków z szybką czynnością komór (lek z wyboru)

chorzy z przewlekłą niewydolnością serca, rytmem zatokowym, pozostający mimo leczenia w III klasie NYHA

chorzy w II klasie NYHA, z rytmem zatokowym, u których po leczeniu glikozydami nastąpiła poprawa i przejście do niższej klasy NYHA

Klasa NYHA	Objawy kliniczne
I	Chorzy z niewydolnością serca, która nie powoduje jednak u nich ograniczenia aktywności fizycznej. Zwykle codzienne czynności nie powodują nadmiernego zmęczenia, kołatania serca, duszności ani bólu dławicowego.
II	Chorzy z niewielkim upośledzeniem aktywności. Codzienne czynności powodują pojawienie się powyższych objawów. Dolegliwości nie występują w spoczynku.
III	Chorzy ze znacznie ograniczoną aktywnością, wskutek pojawiania się dolegliwości przy małych wysiłkach, takich jak mycie lub ubieranie się. Dolegliwości w spoczynku nie występują.
IV	Chorzy, u których najmniejszy wysiłek powoduje pojawienie się zmęczenia, duszności, kołatania serca lub bólu dławicowego, a dolegliwości pojawiają się także w spoczynku.

Cukry tworzą glikozydy w reakcji z innymi związkami lub między sobą

Glikozydy nasercowe

Glikozydy dobrze wchłaniają się z przewodu pokarmowego. Cechują się szeroką dystrybucją w tkance mięśniowej. Najbardziej stabilne warunki farmakokinetyczne ma digoksyna i metyldigoksyna. Glikozydy nasercowe cechują się stosunkowo niskim indeksem terapeutycznym przez co ustalenie właściwej dawki leku bywa trudne i co ogranicza stosowanie tych leków.

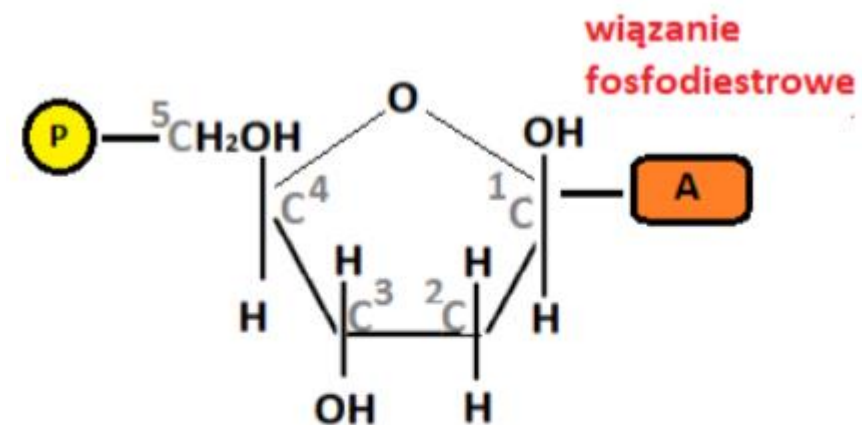
WSKAZANIA

przewlekła niewydolność serca z migotaniem bądź trzepotaniem przedsionków z szybką czynnością komór (lek z wyboru)
chorzy z przewlekłą niewydolnością serca, rytmem zatokowym, pozostający mimo leczenia w III klasie NYHA
chorzy w II klasie NYHA, z rytmem zatokowym, u których po leczeniu glikozydami nastąpiła poprawa i przejście do niższej klasy NYHA

PRZECIWWSKAZANIA

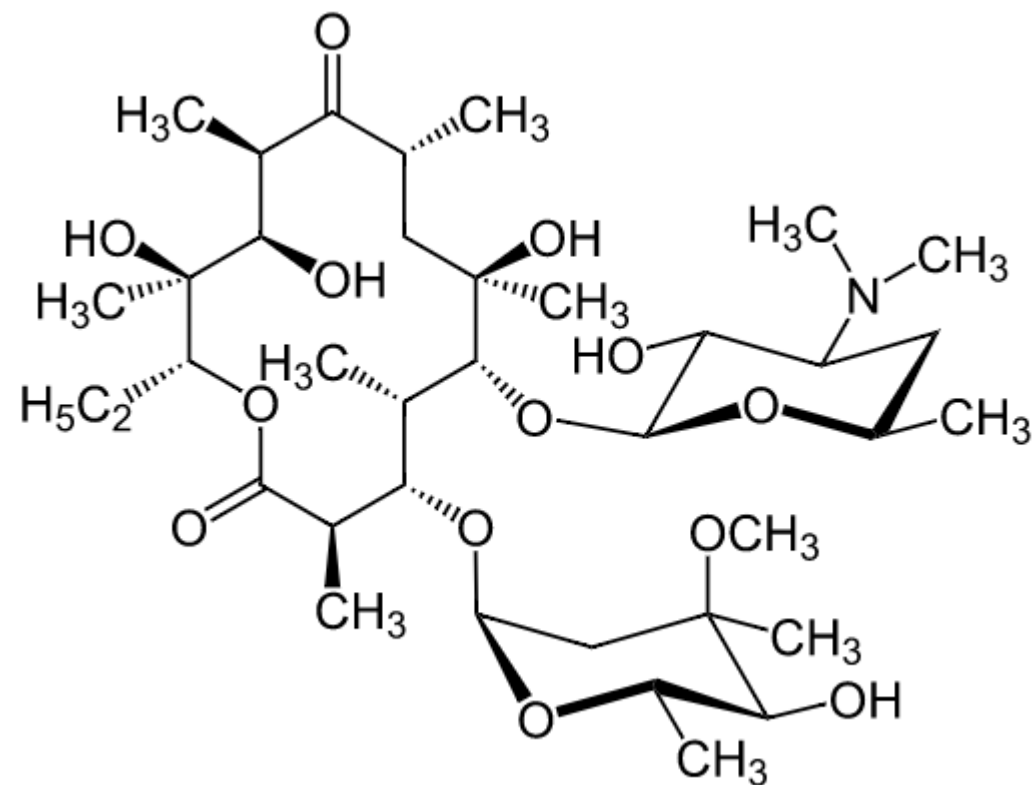
zaburzenia rytmu z bradykardią
bloki przedsionkowo-komorowe II i III°
zespół chorego węzła zatokowo-przedsionkowego
częstoskurcz komorowy
świeży zawał serca
kardiomiopatia przerostowa
zespół zatoki szyjnej

deoksyryboza



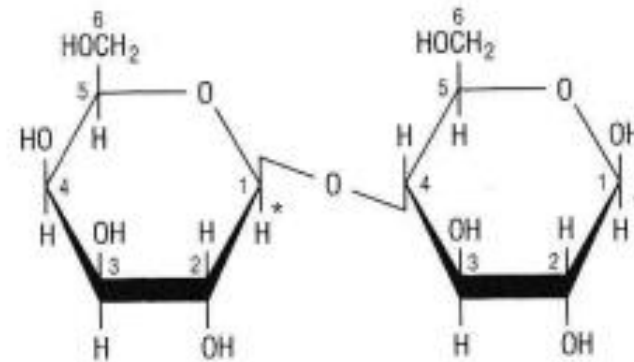
deoksyryboza

erytromycyna



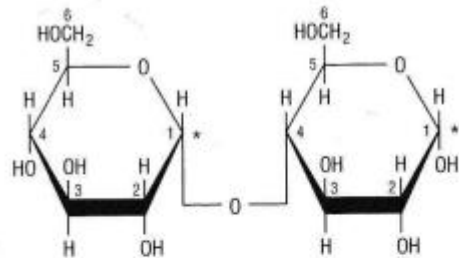
Maltoza, sacharoza są ważnymi disacharydami

Laktoza



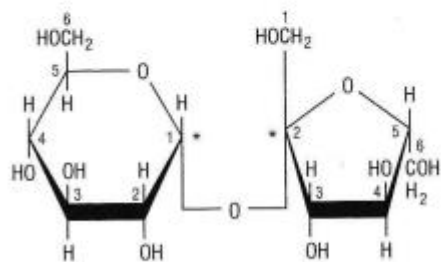
O-β-D-Galaktopiranozylo-(1 → 4)-β-D-glukopiranoza

Maltoza



O-α-D-Glukopiranozylo-(1 → 4)-α-D-glukopiranoza

Sacharoza



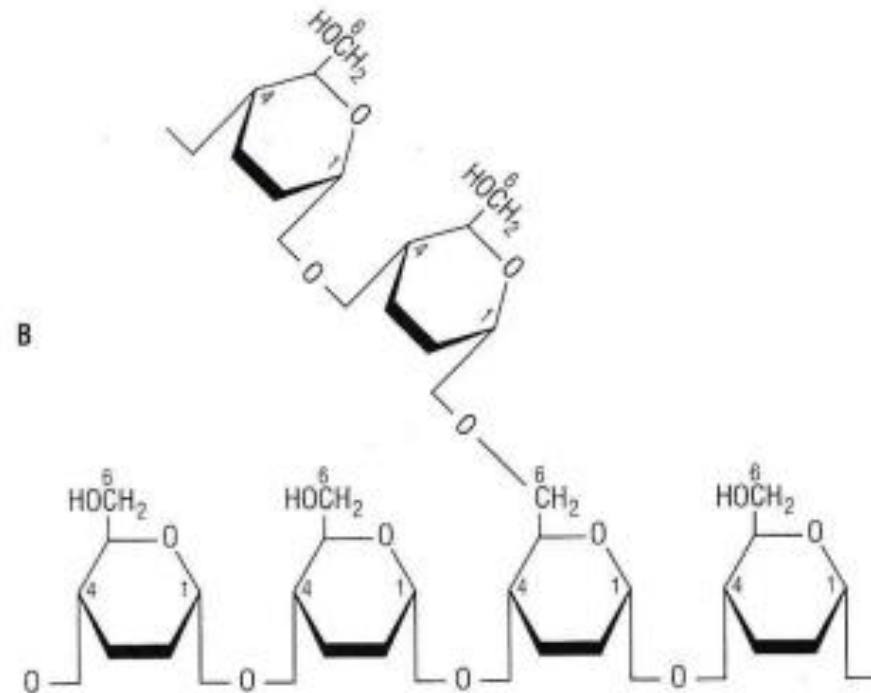
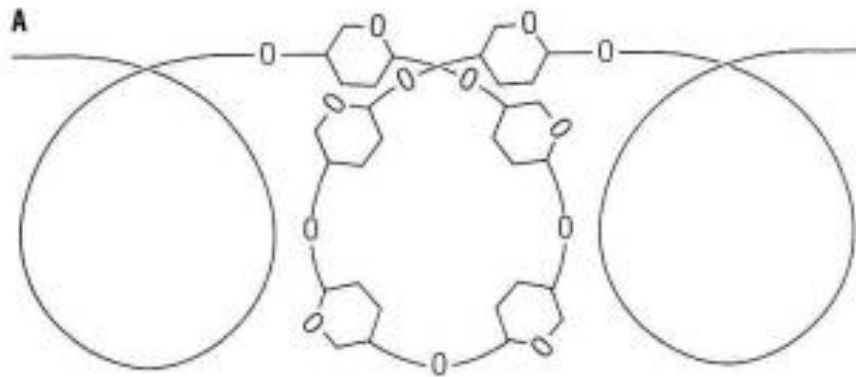
O-β-D-Fruktofuranazylo-(2 → 1)-α-D-glukopiranozyd

Laktoza

Cukier	Skład	Źródło	Znaczenie kliniczne
Izomaltoza	<i>O</i> -α-D-glukopiranozylo-(1→6)-α-D-glukopiranoza	Enzymatyczna hydroliza skrobi (amylopektyny)	
Maltoza	<i>O</i> -α-D-glukopiranozylo-(1→4)-α-D-glukopiranoza	Enzymatyczna hydroliza skrobi (amylaza); kielkujące ziarna zbóż i słód	
Laktoza	<i>O</i> -β-D-galaktopiranozylo-(1→4)-β-D-glukopiranoza	Mleko (oraz wiele preparatów farmaceutycznych)	Brak laktozy (alactasia) prowadzi do nietolerancji laktozy – efektem są biegunki i wzdęcia. Laktoza może pojawiać się w moczu podczas ciąży
Laktuloza	<i>O</i> -α-D-galaktopiranozylo-(1→4)-β-D-fruktofuranaza	Niewielkie ilości w gorącym mleku. Produkt syntetyczny	Niehydrolizowana przez enzymy jelitowe, ale ulega fermentacji przy udziale bakterii jelitowych. Używana jako łagodny osmotyczny środek przeczyszczający
Sacharoza	<i>O</i> -α-D-glukopiranozylo-(1→2)-β-D-fruktofuranozyd	Cukier trzcinowy i z buraków cukrowych, sorgo, niektóre owoce i warzywa	Przy niedoborze sacharazy dochodzi do nietolerancji sacharozy – zaburzenie wchłaniania prowadzi do biegunek i wzdęć
Trehaloza	<i>O</i> -α-D-glukopiranozylo-(1→1)-α-D-glukopiranozyd	Drożdże i grzyby; główny cukier hemolimfy owadów	

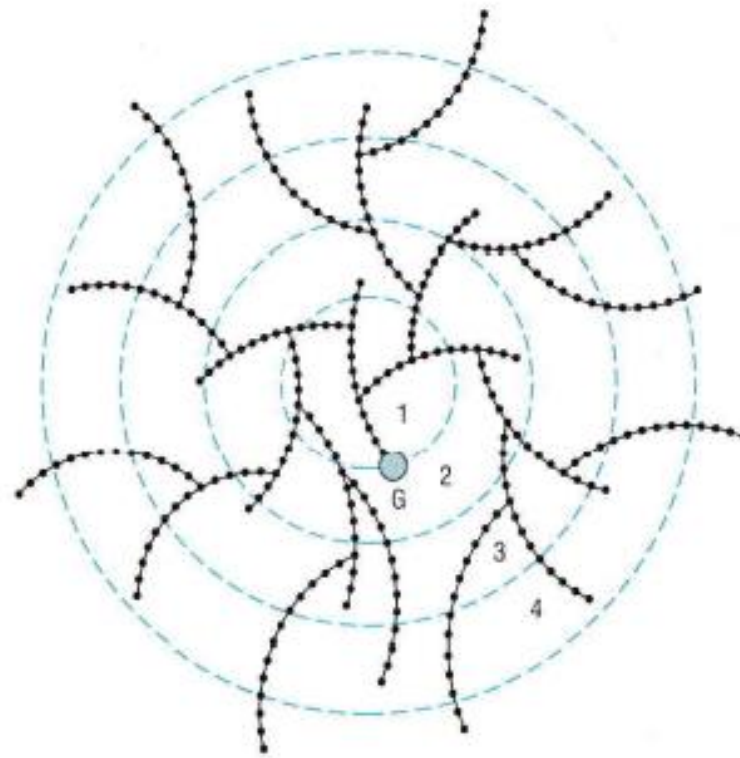
Polisacharydy pełnią funkcje zapasowe i strukturalne

Skrobia, glikogen, dekstryny, glikozoaminoglikany, glikoproteiny

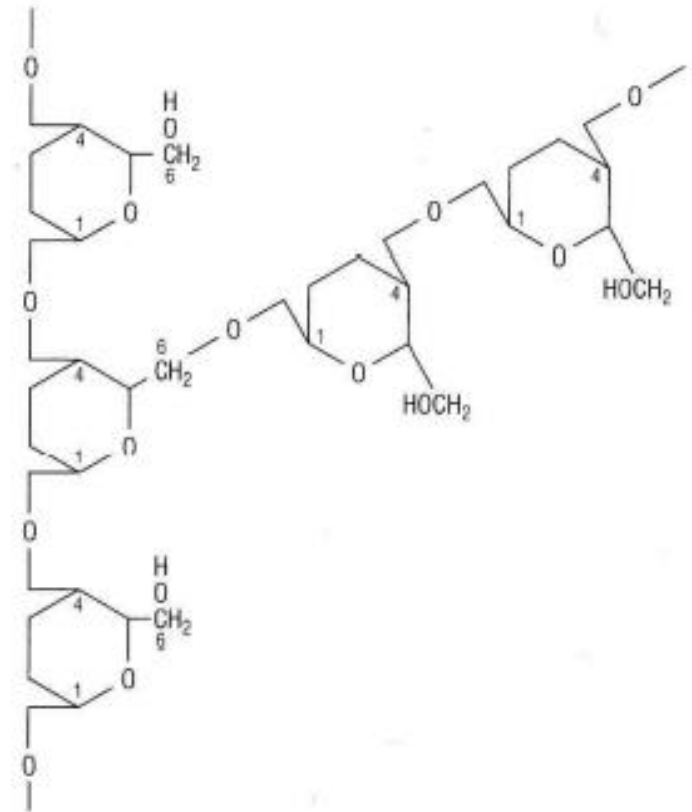


Polisacharydy pełnią funkcje zapasowe i strukturalne

Skrobia, glikogen, dekstryny, glikozoaminoglikany, glikoproteiny



A



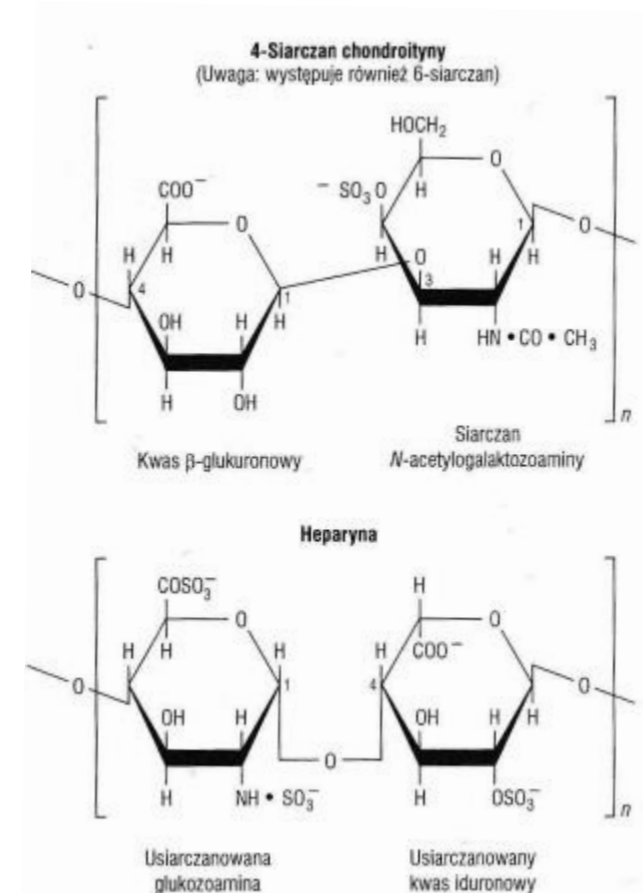
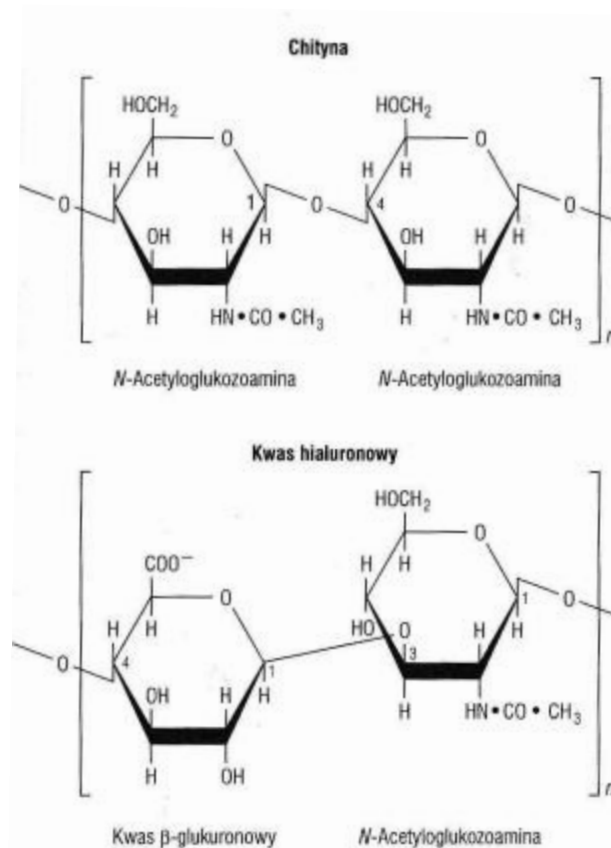
B

Polisacharydy pełnią funkcje zapasowe i strukturalne

Skrobia, glikogen, dekstryny, glikozoaminoglikany, glikoproteiny

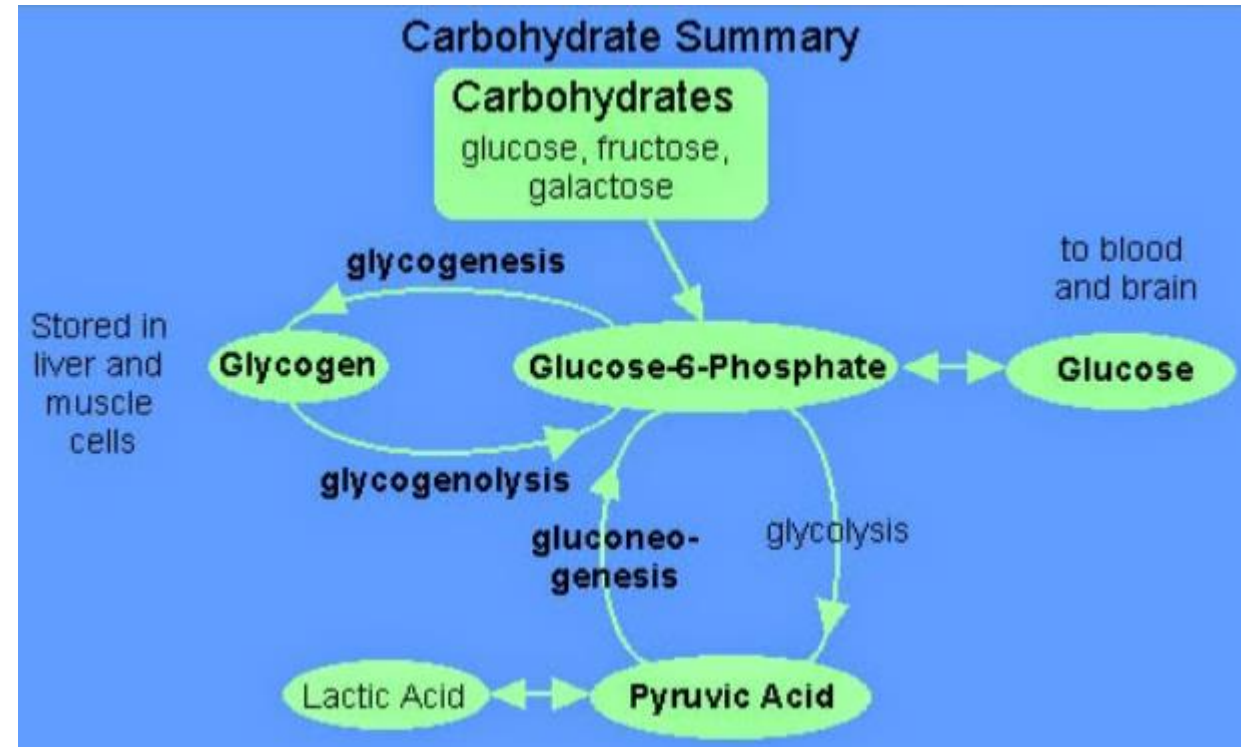
Węglowodany występujące w glikoproteinach

Heksozy	Mannoza (Man), Galaktoza (Gal)
Acetyloheksozoaminy	<i>N</i> -Acetyloglukozoamina (GlcNAc), <i>N</i> -Acetylogalaktozoamina (GalNAc)
Pentozy	Arabinoza (Ara), Ksyloza (Xyl)
Metylopentozy	L-Fukoza (Fuc; p. ryc. 14-15)
Kwasy sialowe	<i>N</i> -Acylpochodne kwasu neuraminowego; dominującym kwasem siałowym jest kwas <i>N</i> -acetylneuraminowy (NeuAc, p. ryc. 14-16)

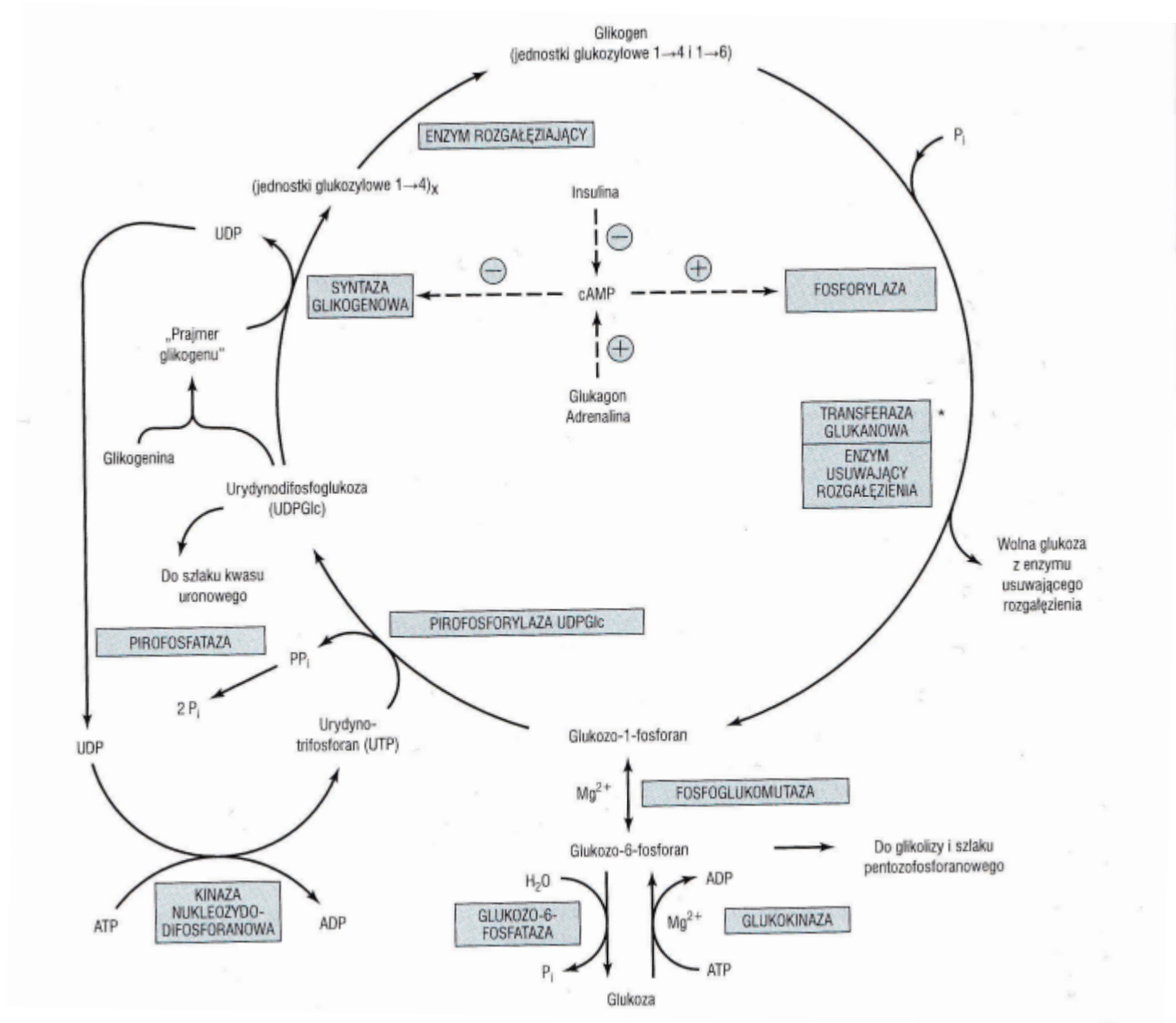


Magazynowanie węglowodanów

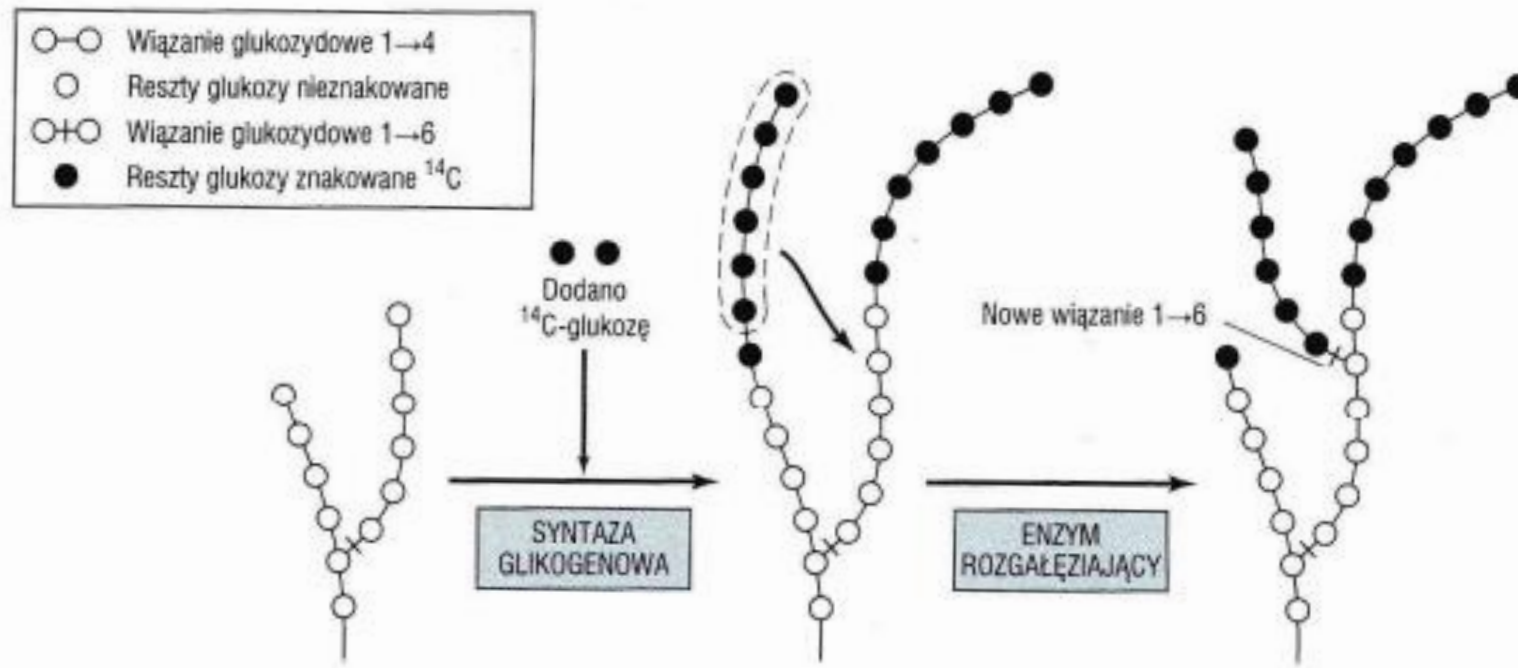
	Odsetek masy tkanki	Masa tkanki	Całkowita zawartość w organizmie
Glikogen wątroby	5,0	1,8 kg	90 g
Glikogen mięśni	0,7	35 kg	245 g
Zwnątrzkómór-kowa glukoza	0,1	10 L	10 g



Glikogeneza zachodzi głównie w mięśniach i wątrobie



Częścią mechanizmu rozgałęziania jest odłączanie istniejących już łańcuchów glikogenu



Biosynteza glikogenu. Mechanizm rozgałęzienia został wyjaśniony przez dodawanie glukozy znakowanej izotopem ^{14}C do diety zwierzęcia doświadczalnego i badanie glikogenu w odpowiednich odstępach czasu.

Choroby spichrzania glikogenu

Typ	Nazwa	Niedobór enzymu	Istota zaburzenia klinicznego
0	–	Syntaza glikogenowa	Hipoglikemia; hiperketonemia; wczesna śmierć
I	Choroba von Gierkego	Niedobór glukozy-6-fosfatazy	Nagromadzenie glikogenu w wątrobie i w komórkach kanalików nerkowych; hipoglikemia; hiperlaktacidemia; ketonemia; hiperlipidemia
II	Choroba Pompego	Niedobór lizosomalnej α -(1→4)- i α -(1→6)-glukozydazy (kwaśnej maltazy)	Nagromadzenie glikogenu w lizosomach; w odmianie młodzieńczej hipotonia mięśni, śmierć z powodu niedomogi serca w wieku ok. 2 lat; w odmianie dorosłych dystrofia mięśni
III	Dekstrynoza graniczna Choroba Forbesa lub choroba Corich	Brak enzymu usuwającego rozgałęzienia	Hipoglikemia głodowa; hepatomegalia w dzieciństwie; gromadzenie charakterystycznych rozgałęzionych polisacharydów
IV	Amylopektynozą Choroba Andersena	Brak enzymu rozgałęziającego	Hepatomegalia; nagromadzenie polisacharydu z niewieloma punktami rozgałęzienia; śmierć z powodu niedomogi wątroby lub serca w pierwszym roku życia
V	Niedobór miofosforylasy Syndrom McArdle'a	Brak fosforylasy glikogenowej w mięśniach	Zmniejszona zdolność do wysiłku fizycznego; mięśnie zawierają zbyt dużo glikogenu (2,5–4%); po wysiłku bardzo mało kwasu mlekowego we krwi
VI	Choroba Hersa	Niedobór fosforylasy glikogenowej w wątrobie	Hepatomegalia; nagromadzenie glikogenu w wątrobie; łagodna hipoglikemia; ogólnie dobre rokowanie
VII	Choroba Tarui	Niedobór fosfofruktokinazy-1 w mięśniach i erytrocytach	Zmniejszona zdolność do wysiłku fizycznego; mięśnie zawierają zbyt dużo glikogenu (2,5–4%); po wysiłku bardzo mało kwasu mlekowego we krwi; możliwość niedokrwistości hemolitycznej
VIII		Niedobór kinazy fosforylasy w wątrobie	Hepatomegalia; nagromadzenie glikogenu w wątrobie; łagodna hipoglikemia; ogólnie dobre rokowanie
IX		Niedobór kinazy fosforylasy w wątrobie i w mięśniach	Hepatomegalia; nagromadzenie glikogenu w wątrobie i w mięśniach; łagodna hipoglikemia; ogólnie dobre rokowanie
X		Niedobór zależnej od cAMP kinazy białek	Hepatomegalia; nagromadzenie glikogenu w wątrobie

Metabolomika zastosowania w chorobach onkologicznych

Przyjmuje się, że endogenne związki chemiczne uwalniane do płynów ustrojowych są lepszymi wyznacznikami biologicznego fenotypu organizmu niż ekspresja genów

Metabolomika jest nową dziedziną nauki zajmującą się badaniem oraz analizowaniem metabolitów powstających w żywych komórkach. Jej zadaniem jest oznaczenie całego zestawu produktów reakcji metabolicznych powstałych w wyniku przemian fizjologicznych lub patologicznych zachodzących w komórce, tkance lub w całym organizmie

Do tej grupy związków zaliczamy m.in. **aminokwasy**, **lipidy**, **peptydy**, **kwasy organiczne**, **węglowodany**.

Mogą one być zarówno pochodzenia endogennego, jak i egzogennego, np. lek

Metabolomika

zastosowania w chorobach onkologicznych

Podstawowymi płynami biologicznymi używanymi w metabolomice są: surowica, płyn mózgowo-rdzeniowy, ślina, mocz. Największy potencjał w wykrywaniu markerów chorób mają krew oraz mocz.

Profil metabolomiczny uwzględnia bowiem nie tylko fenotyp determinowany genetycznie, ale także różnice w ekspresji cech fenotypu uwarunkowane czynnikami środowiskowymi, takimi jak dieta, wiek, sprawność fizyczna. Jest to istotna przewaga metabolomiki nad genomiką, czyli analizowaniem materiału genetycznego. Badanie produktów przemian biologicznych może doprowadzić do poszerzenia wiedzy na temat procesów zachodzących w komórce, a ich ilościowe oznaczanie umożliwi zbadanie patomechanizmów powstawania chorób oraz szukanie potencjalnych wczesnych markerów zachorowania.

Rutynowa diagnostyka laboratoryjna moczu pozwala ocenić zawartość białek, ketonów, węglowodanów, leukocytów, erytrocytów, ale oceniany jest również kolor, osad i zapach moczu. Stwierdzenie nieprawidłowych wyników pozwala na zdiagnozowanie wielu chorób, np. cukrzycy.

Metabolomika

zastosowania w chorobach onkologicznych

Filtracja i zagęszczanie moczu w nerkach sprawiają, że produkty przemiany materii występujące w moczu ostatecznym są zazwyczaj **w wyższym stężeniu niż we krwi**, co ułatwia ich wykrycie. Dzięki użyciu nowoczesnych metod badawczych metabolity mogą być wykrywane w moczu już w śladowych ilościach. Ułatwia to znalezienie w próbce specyficznych substancji, które mogą świadczyć o zmianach chorobowych w organizmie.

Obecnie znanych jest około **3000** związków chemicznych w moczu. Powstają bazy zawierające listę związków zawartych w moczu, oznaczonych przy użyciu dostępnych technik. Jedną z nich jest The Urine Metabolome Database (**UMDB**). Zawiera ona listę metabolitów, informację o poziomie ich weryfikacji, miejscu występowania, stężeniu w moczu u osób zdrowych oraz powiązaniu ich z konkretną chorobą. Dla zobiektywizowania interpretacji wyników często stężenie związku chemicznego wykrytego w moczu podawane jest **w stosunku do stężenia kreatyniny**. Stężenie metabolitów wykrywanych w moczu u osób zdrowych zależy od rodzaju substancji macierzystej podlegającej metabolizmowi i jest zmienne w szerokich granicach: od +/- 50% dla części metabolitów do nawet 350%, np. dla normetanefryny – metabolitu noradrenaliny

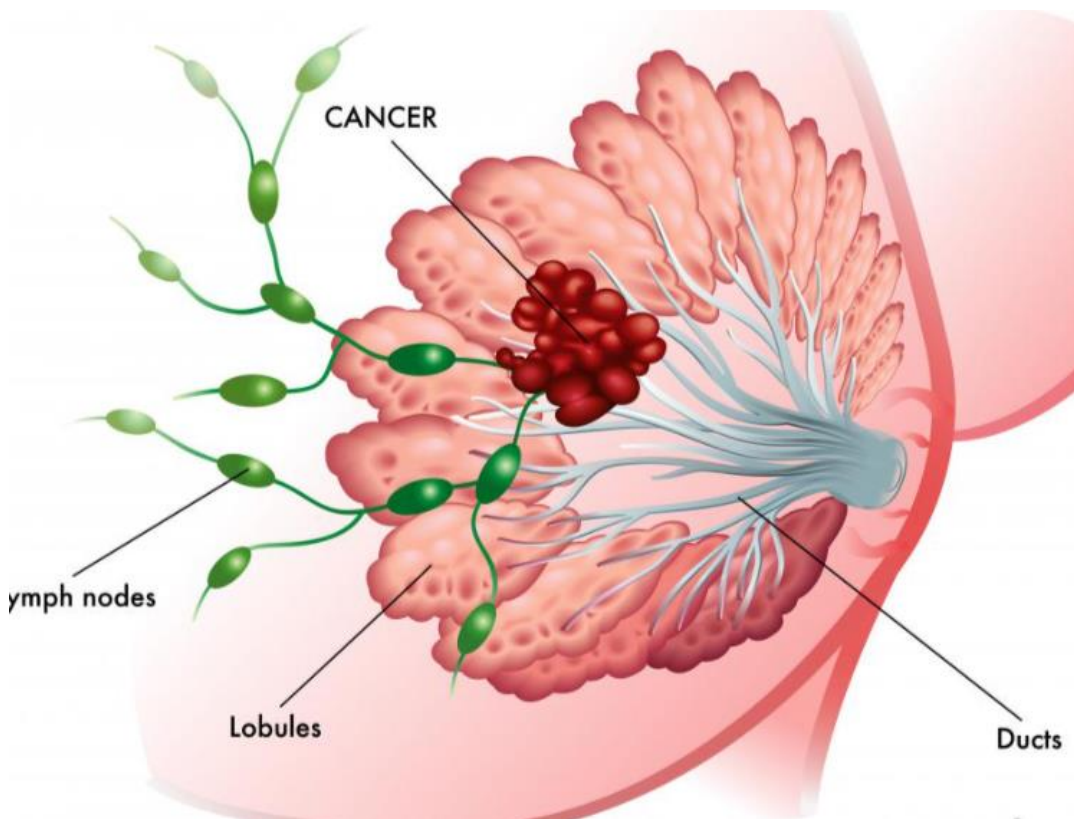
Metabolomika

zastosowania w chorobach onkologicznych



Innymi bazami danych zawierającymi informację na temat metabolitów są: The Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG), The Small Molecule Pathway Database (SMPDB), Madison Metabolomics Consortium Database (MMCD) oraz The METLIN Metabolite Database

Metabolomika zastosowania w chorobach onkologicznych



Rak piersi jest najczęstszym nowotworem u kobiet. Co roku w Polsce wykrywa się około 14 000 nowych zachorowań, a ponad 5000 chorych umiera. Najczęściej rozpoznawanym rakiem piersi jest rak przewodowy naciekający (75%), drugi co do częstości jest rak zrazikowy naciekający (10–15%), pozostałe typy histologiczne raka występują z częstością około 5%

Metabolomika

zastosowania w chorobach onkologicznych

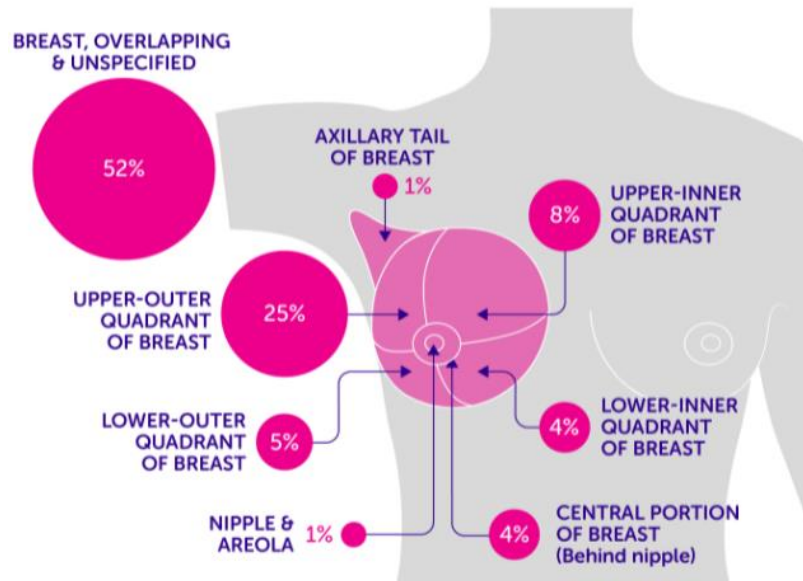
Jednocześnie dochodzi do zaburzeń liczby aminokwasów i enzymów cykli biochemicznych z nimi związanych, co objawia się **mniejszą zawartością aminokwasów** wykrytych w badaniu w porównaniu do zdrowych ludzi. Badanie moczu metodą spektroskopii NMR jest bardzo obiecujące, co potwierdzają wyniki badań, które cechowały się 98% i 100% czułością oraz 99% i 93% swoistością odpowiednio dla raka jajnika i raka piersi

Metabolomika moczu za pomocą spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego (MNR spectroscopy) jest badaniem nieinwazyjnym, nieszkodliwym dla zdrowia. Slusky i wsp. przeprowadzili badanie metabolitów moczu kobiet chorych na raka piersi i chorych na raka jajników przed operacjami oraz w grupie kontrolnej kobiet zdrowych. Spośród 67 oznaczonych w moczu metabolitów stężenia **etanoloaminy, uracylu, hipuranu, leucyny, asparginy i acetonu** znacząco różniły się między badanymi grupami. Obniżenie stężenia metabolitów **cyklu kwasów trójkarboksylowych** u chorych na nowotwór piersi związane jest ze zmianą sposobu zużycia glukozy, zgodnie z efektem Warburga. Twórca tej teorii twierdzi, że zmiana metabolizmu jest niezbędnym czynnikiem przemiany prawidłowej komórki w nowotworową.

Metabolomika

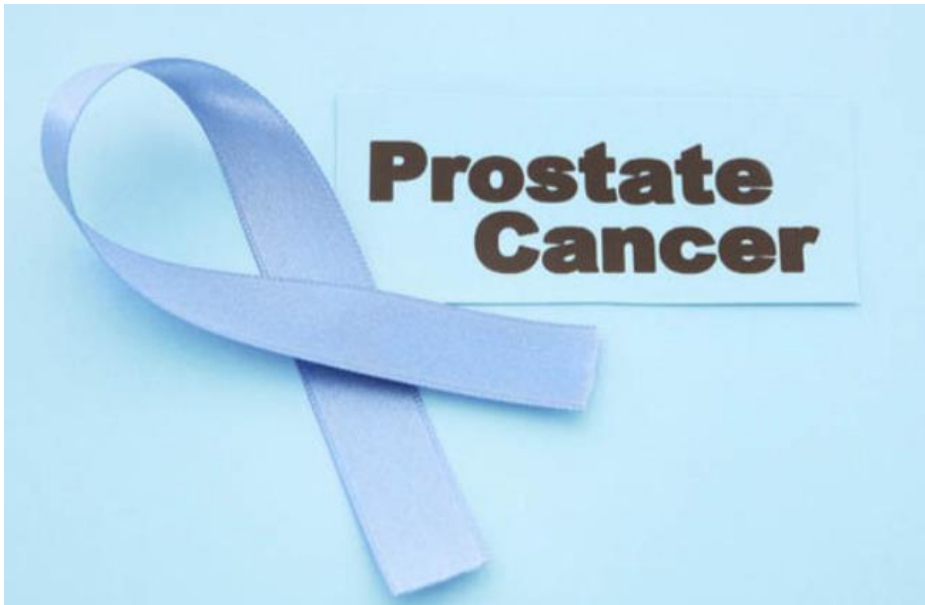
zastosowania w chorobach onkologicznych

INVASIVE BREAST CANCER CASES:
PERCENTAGE DISTRIBUTION BY ANATOMICAL SITE



Metodą metabolomiki można ocenić także wrażliwość estrogenową komórek nowotworowych; oceniane jest stężenie **β -alaniny, 2-hydroksyglutaranu, glutaminianu, ksantyny oraz glutaminy**. W przypadkach nowotworów estrogenoujemnych stężenie pierwszych czterech rośnie, a glutaminy maleje, a największą zmianę wykazuje stężenie β -alaniny. Ta ocena ułatwia wybór personalizowanej terapii u chorych, a także wytycza drogi do powstania nowych leków przeciwnowotworowych. Na przykład stwierdzenie obecności glutaminy utlenowanej i zredukowanej w komórkach estrogenoujemnych (ale nie w komórkach estrogenododatnich) doprowadziło do rozwoju badań i opracowania nowych leków z grupy inhibitorów glutaminazy

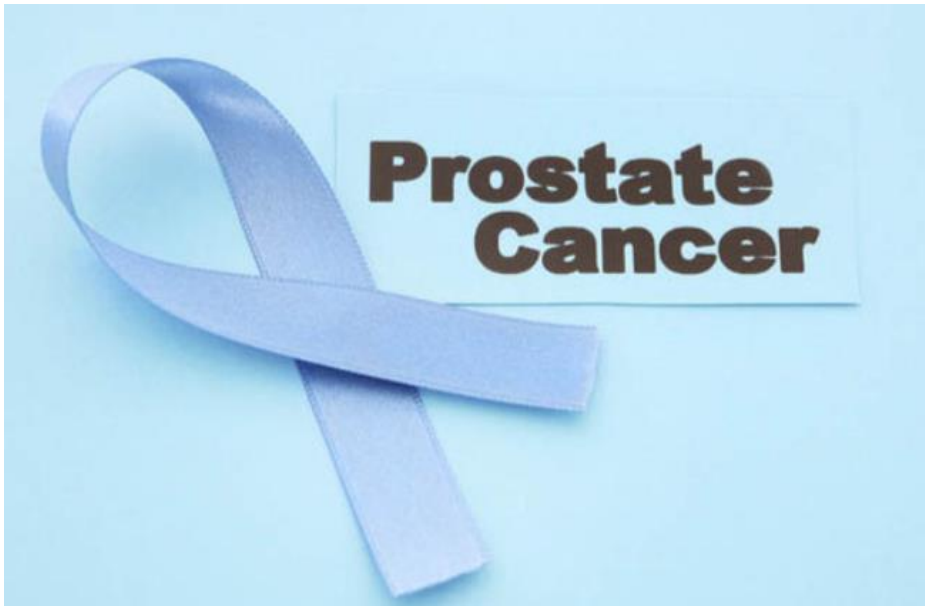
Metabolomika zastosowania w chorobach onkologicznych



U mężczyzn jednym z najczęstszych nowotworów jest rak prostaty. Badanie palpacyjne (per rectum) oraz ocena specyficznych markerów nowotworowych nie pozwalają jednoznacznie prognozować rozwoju raka prostaty oraz ocenić jego stadium. Najczęściej nowotwór prostaty wykrywany jest zaawansowanym stadium choroby, gdy obecne są już przerzuty do innych narządów. Nie bez znaczenia jest opór mężczyzn przed badaniem per rectum i niska świadomość zagrożenia tym nowotworem.

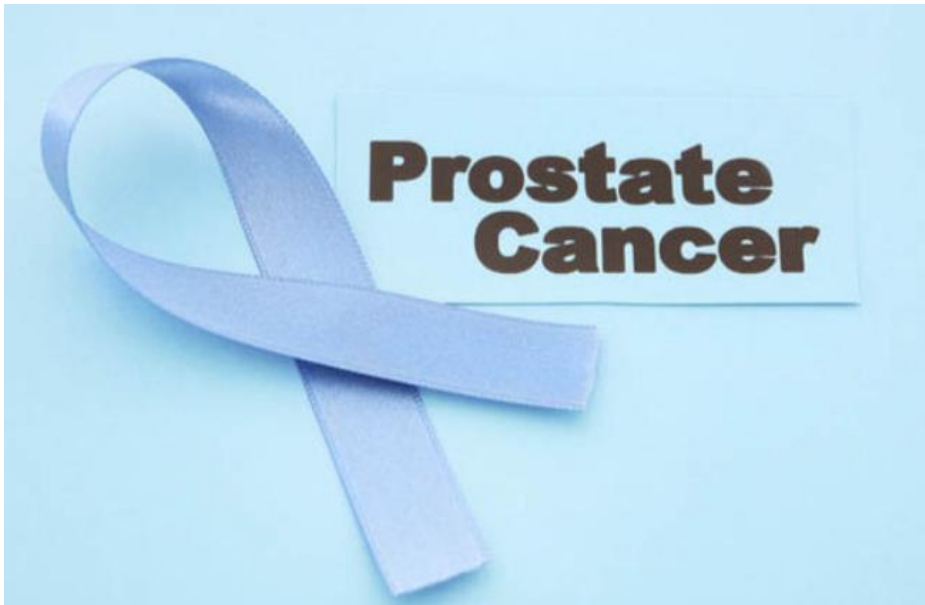
Metabolomika

zastosowania w chorobach onkologicznych



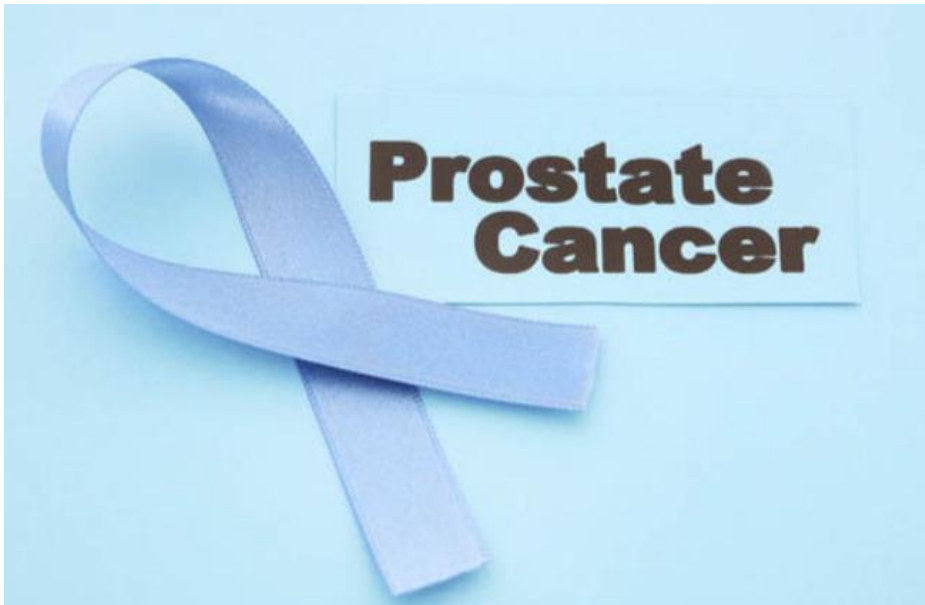
Dobrze udokumentowanym przykładem substancji markerowej raka prostaty jest **sarkozyna**. Jest to aminokwas, N-metylowa pochodna glicyny, powstająca w reakcji katalizowanej przez N-metyloglicyno-transferazę. Aminokwas ten jest wykrywany przy użyciu chromatografii gazowej ze spektroskopią mas (GC-MS). Stężenie tego aminokwasu w moczu **nieznacznie wzrasta w łagodnym przerście tkanki gruczołu krokowego, w raku prostaty jest wyraźnie podwyższone, a przy obecności przerzutów jest bardzo wysokie**. Także stężenie enzymu **N-metyloglicyno-transferazy zauważalnie wzrasta w chorobie nowotworowej**.

Metabolomika zastosowania w chorobach onkologicznych



Dobrze udokumentowanym przykładem substancji markerowej raka prostaty jest **sarkozyna**. Jest to aminokwas, N-metylowa pochodna glicyny, powstająca w reakcji katalizowanej przez N-metyloglicynotransferazę. Aminokwas ten jest wykrywany przy użyciu chromatografii gazowej ze spektroskopią mas (GC-MS). Stężenie tego aminokwasu w moczu nieznacznie wzrasta w łagodnym przerzucie tkanki gruczołu krokowego, w raku prostaty jest wyraźnie podwyższone, a przy obecności przerzutów jest bardzo wysokie. Także stężenie enzymu N-metyloglicynotransferazy zauważalnie wzrasta w chorobie nowotworowej **Stężenie sarkozyny można oceniać również we krwi, wydzielinie gruczołu krokowego, w nasieniu, a w przypadku przerzutów również w materiałach z biopsji, np. w tkankach kostnych**

Metabolomika zastosowania w chorobach onkologicznych



Do analizy metabolomicznej w raku prostaty wykorzystuje się chromatografię gazową ze spektroskopią mas (GC-MS) oraz wysokorozdzielczy jądrowy rezonans magnetyczny z wirowaniem pod magicznym kątem (HR-MAS NMR). **Oprócz sarkozyny innymi wykrywanymi substancjami są: cytrynian, cholina, spermina, aminokwasy i ich pochodne.**

Metabolomika zastosowania w chorobach onkologicznych

Narastającym problemem w onkologii jest zwiększająca się zapadalność i późna rozpoznawalność raka jajnika u kobiet.

Nabłonkowy rak jajnika (ovarian epithelial cancer, EOC) jest najczęstszym oraz najbardziej złośliwym nowotworem jajników i stanowi główną przyczynę zgonów wśród nowotworów ginekologicznych

OVARIAN CANCER: KNOW THE SIGNS

According to the Centers for Disease Control and Prevention, ovarian cancer may cause the following signs and symptoms:



- ⓘ Vaginal bleeding (especially after menopause) or vaginal discharge that is not normal for you
- ⓘ Pelvic pain/pressure
- ⓘ Abdominal/back pain
- ⓘ Bloating
- ⓘ Feeling full too quickly, or difficulty eating
- ⓘ Change in bathroom habits, such as more frequent or urgent need to urinate and/or constipation

Metabolomika

zastosowania w chorobach onkologicznych

Wykryto metabolity pozwalające na odróżnienie EOC od BOT. Należą do nich **cystationina i kwas n-acetyloneuraminowy**. Wykazano ponadto różnice w stężeniu **n-acetylocytydyny i kwasu bursztynowego** u pacjentek z EOC będących przed operacją i po operacji, a także stwierdzono, że stężenia **S-retikuliny, pseudourydyny oraz nikotynamidu monoklueotydowego** korelowały z etapami rozwoju nabłonkowego raka jajnika.

W moczu pacjentek zarówno z BOT, jak i z EOC wykryto podwyższone stężenie metabolitów **puryn i pirymidyn: N4-acetylocytydyny, pseudourydyny oraz 3-mocznikorybonukleozydów**.

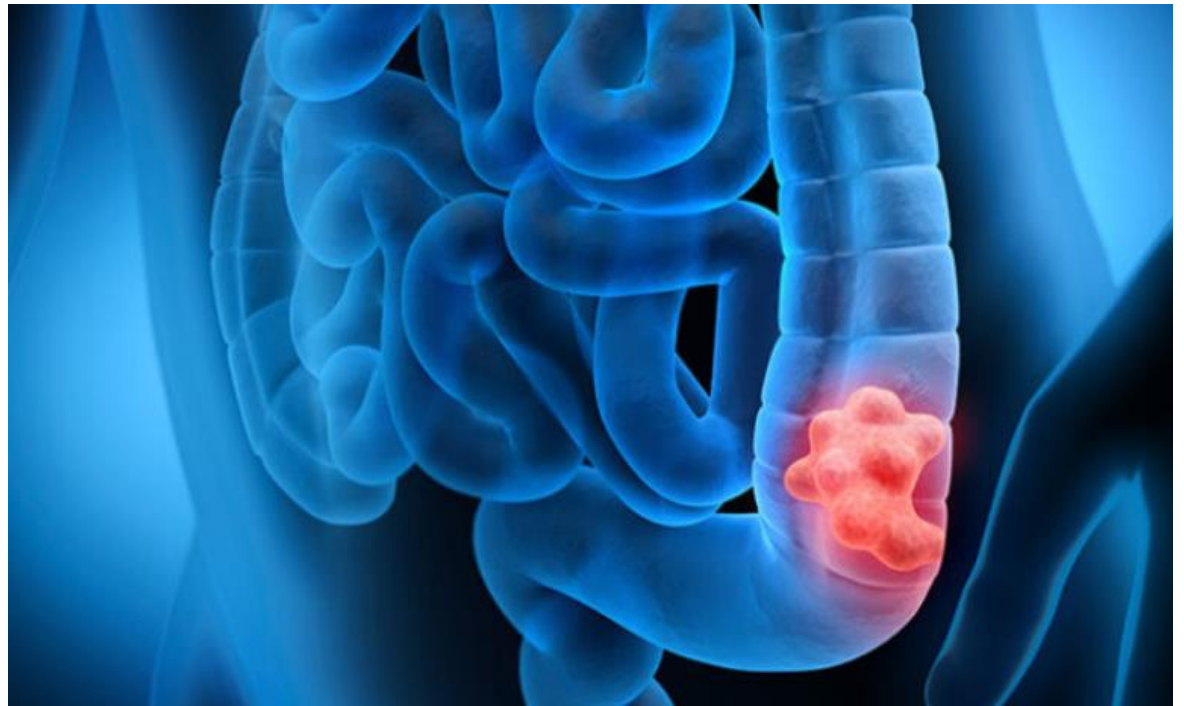
W grupie pacjentek z BOT i z EOC wykazano także niższe stężenia metabolitów **L-histydyny** oraz **N-acetyloglutaminy** w porównaniu do grupy kontrolnej.

Metabolomika

zastosowania w chorobach onkologicznych

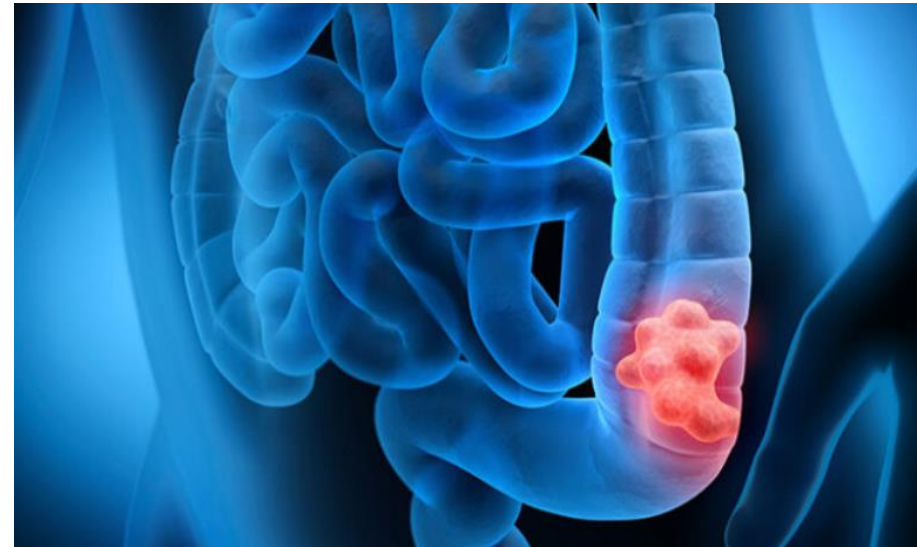
Denkert i wsp. opisali **51 metabolitów** o różnych stężeniach w guzach o złośliwości granicznej i w rakach jajnika przy użyciu bezkontaminacyjnego systemu wstrzykiwania, gazowej chromatografii połączonej ze spektrometrią i analizatorem czasu przelotu (gas chromatography – time of flight mass spectrometry, GC-TOF MS). W badaniach tych różnice stężeń czterech związków chemicznych: **cysteiny, kreatyny, fenyloalaniny oraz β -alaniny** miały wysoki poziom istotności statystycznej i te cztery związki mogą być uznane za potencjalne biomarkery stopnia inwazyjności raka jajnika. Badanie potwierdziło, że GC-TOF MS jest odpowiednią techniką do analizy świeżych tkanek z guzów jajników i może być pomocne zarówno przy monitorowaniu zmian biochemicznych, jak i w diagnostyce.

Metabolomika zastosowania w chorobach onkologicznych



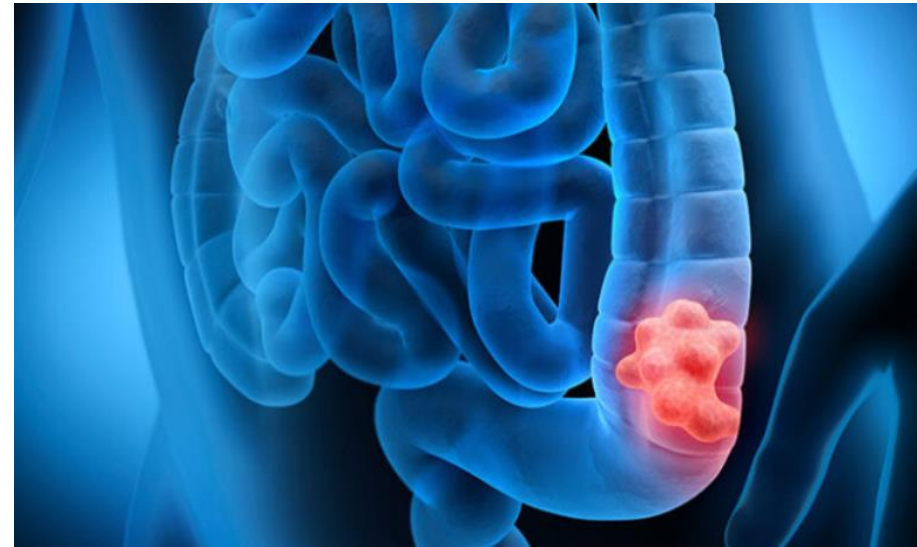
W badaniach metabolomiki raka okrężnicy Jimenez i wsp. przy zastosowaniu wysokorozdzielczego jądrowego rezonansu magnetycznego zwirowaniem pod „magicznym” kątem (HR-MAS NMR) wykazali w nowotworowo zmienionych fragmentach jelita grubego w porównaniu do zdrowych tkanek **niższe stężenia lipidów, w tym triglicerydów, oraz podwyższone stężenia izoglutaminy, choliny, fosfocholiny, tauryny, tyrozyny i fenyloalaniny**. Wyższe stężenie choliny i jej pochodnych ma związek z towarzyszącą nowotworom przyspieszoną regeneracją błon komórkowych, w których skład te związki wchodzi.

Metabolomika zastosowania w chorobach onkologicznych



Manna i wsp. w badaniach z zastosowaniem spektrometrii mas porównywali metabolity moczu i tkanek dzikiego szczepu myszy typu C57BL/6J oraz ApcMin/+ oraz ludzi z nowotworami jelita grubego i zdrowych. U myszy we wczesnym stadium proliferacji komórek nowotworowych znaleziono 13 biomarkerów związanych z metabolizmem poliamin, metabolizmem kwasów nukleinowych oraz procesami metylacji. W moczu pobranym od pacjentów z nowotworami jelita grubego wykazano 12 biomarkerów powiązanych z tymi samymi szlakami metabolicznymi co u myszy. W moczu zarówno ludzi, jak i myszy ze zmianami nowotworowymi zaobserwowano znacznie wyższe stężenia **proliny, treoniny, kwasu glutaminowego, argininy, N1--acetylospermidyny, ksantyny, uracylu, betainy, symetrycznej dimetyloargininy oraz niesymetrycznej dimetyloargininy** w porównaniu do stężenia tych związków w moczu ludzi zdrowych.

Metabolomika zastosowania w chorobach onkologicznych

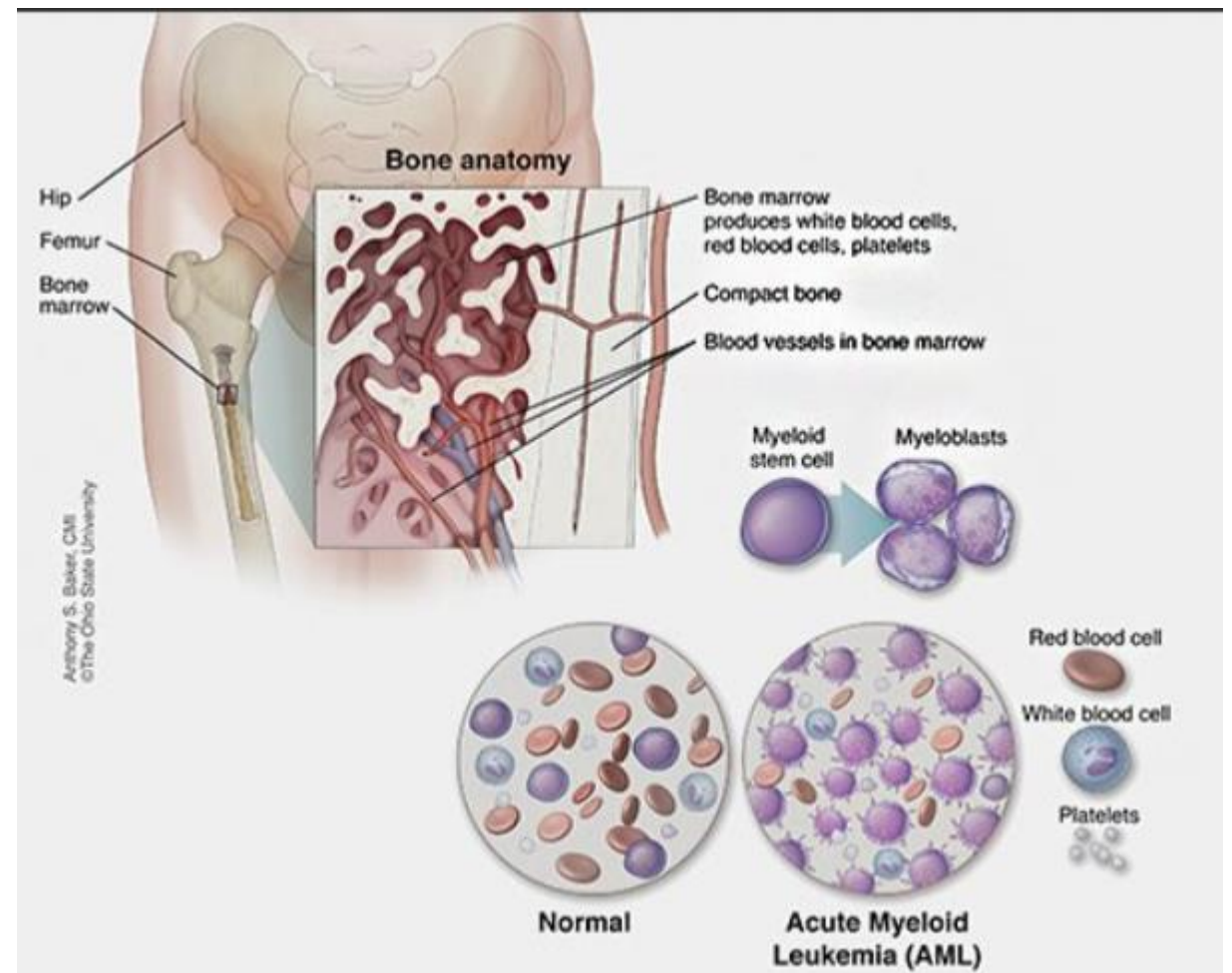


Leichtle et al. wykazał z zastosowaniem elektrorozpylającej tandemowej spektrometrii mas znaczące różnice stężeń 11 aminokwasów w surowicy krwi między grupą chorych na nowotwory jelita grubego a grupą kontrolną. **Szczególnie wysoką korelację stwierdzono między stężeniem glicyny a stadiem choroby.** Glicyna jest ważnym metabolitem kwasu foliowego, którego wytwarzanie jest zaburzone przy nowotworach jelita grubego. Także stężenia tyroksyny wykazywały znaczące różnice między osobami z nowotworem a grupą kontrolną. Wykrywanie zmian stężenia glicyny i tyroksyny w surowicy może być przydatnym wczesnym biomarkerem raka okrężnicy. Wykorzystując gazową chromatografię połączoną ze spektrometrią mas i analizatorem czasu przelotu (GC-TOF MS), Denkert i wsp. obserwowali u pacjentów z nowotworami jelita grubego **obniżenie stężenia związków pośrednich cyklu kwasów trikarboksylowych (TCA cycle), a podwyższone stężenia metabolitów cyklu mocznikowego, puryn, pirymidyn oraz aminokwasów.**

Metabolomika zastosowania w chorobach onkologicznych

Ostra białaczka szpikowa (AML)

W badaniu HNMR stwierdzono istotne różnice w aktywności szlaków glikolizy i glikoneogenezy w cyklu kwasów trikarboksylowych, biosyntezie w metabolizmie lipoprotein i kwasów tłuszczowych. Znaczne zmiany dotyczyły metabolizmu **choliny** (składnika błon komórkowych), której niskie stężenie



u pacjentów z AML może być skutkiem nadmiernej proliferacji komórek. Należy podkreślić, że wykryte zmiany dobrze korelowały z grupami cytogenetycznymi prognozowania ryzyka przebiegu AML

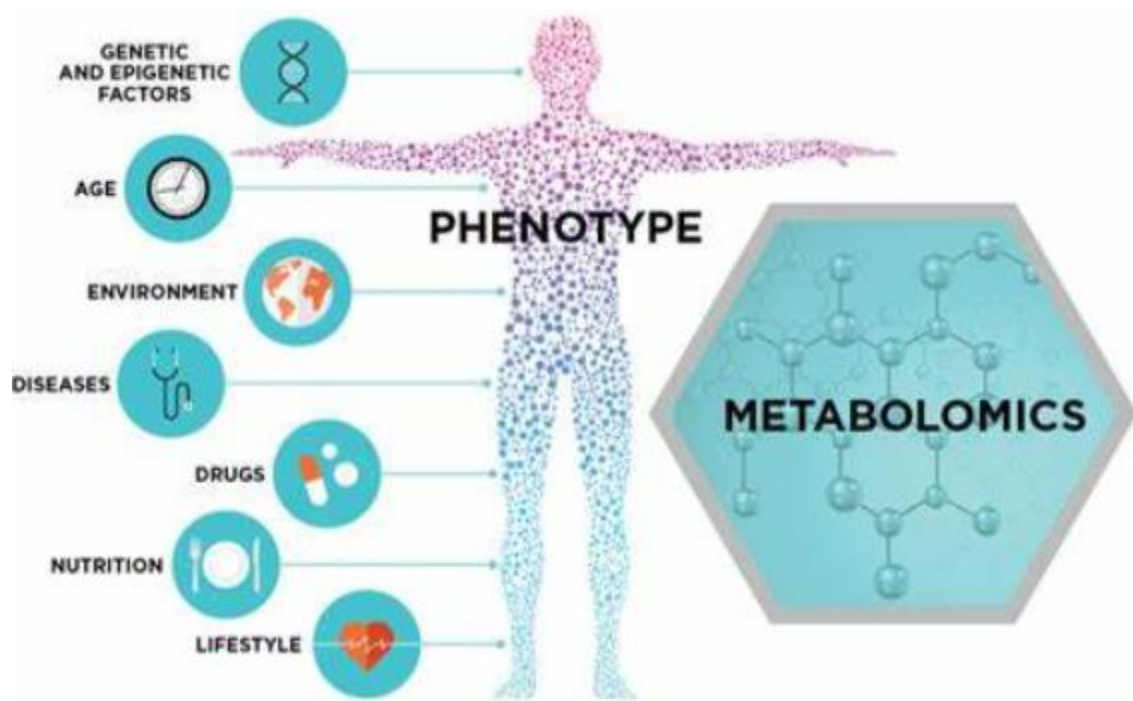
Metabolomika

zastosowania w chorobach onkologicznych

Metabolomika dostarczyła argumentów do nowego podejścia do patologii cukrzycy i umożliwiła wczesne wykrywanie zmian biochemicznych związanych z zagrożeniem cukrzycą typu 2. Znaczącymi markerami predykcyjnymi cukrzycy **okazały się aminokwasy aromatyczne oraz aminokwasy z rozgałęzionymi łańcuchami, tj. izoleucyna, leucyna, walina, tyrozyna i fenyloalanina**

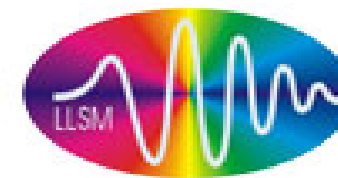


Podsumowanie

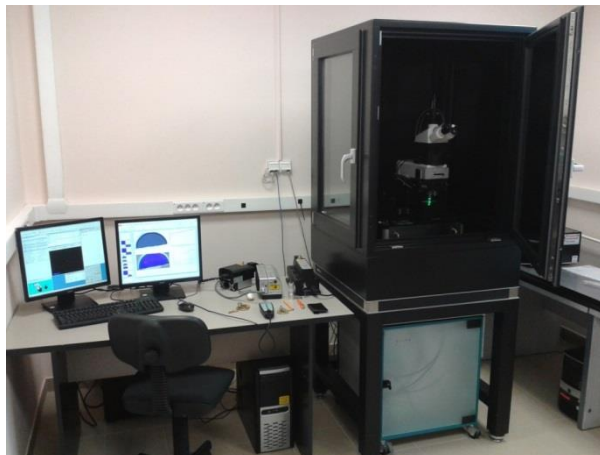


Większość obecnie dostępnych testów diagnostycznych opiera się na badaniu dobrze znanych pojedynczych markerów chorób, nie zawsze jednak są one wystarczająco wrażliwe i specyficzne dla danej jednostki chorobowej. Z pomocą przychodzi metabolomika, która umożliwia wykrycie specyficznych markerów występujących już we wczesnej fazie choroby, a także daje obraz zmian wielu parametrów metabolizmu – profilu metabolicznego danej choroby. Przyczynia się to do wczesnego diagnozowania, lepszego monitorowania i prognozowania wielu schorzeń, w tym również nowotworów

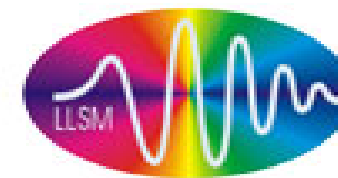
CEL BADAŃ



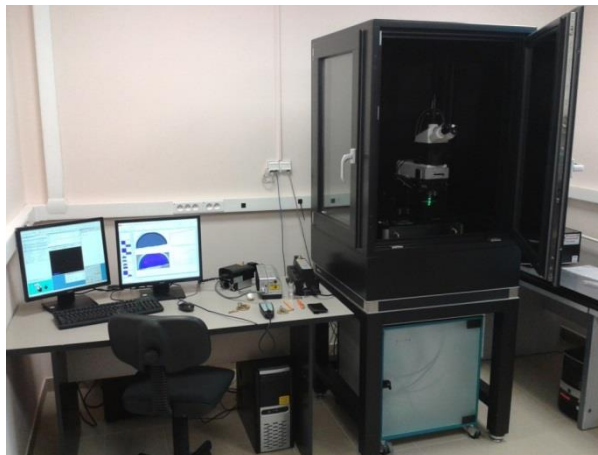
Obecnie stosowane metody analizy układów biologicznych obrazowania są bardzo często ograniczone ze względu na niedostateczną czułość, swoistość, a także rozdzielczość przestrzenną, czasową oraz spektralną.

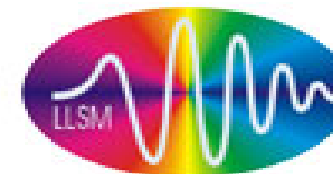


CEL BADAŃ

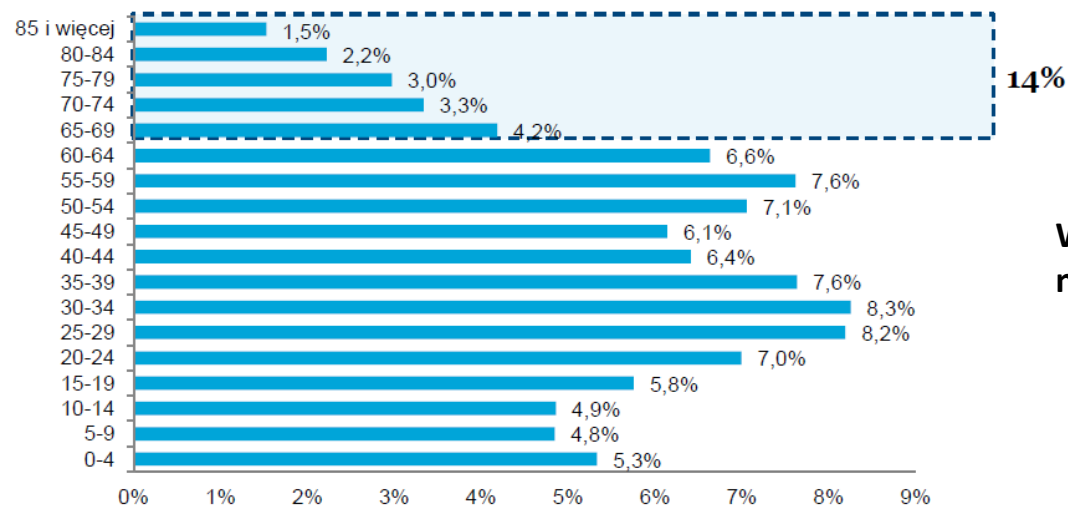


**IDENTYFIKACJA ZMIAN NOWOTWOROWYCH RÓŻNYCH NARZĄDÓW
CZŁOWIEKA: MÓZGU, PIERSI, PRZEWODU POKARMOWEGO,
ORANÓW GŁOWY-SZYI.**

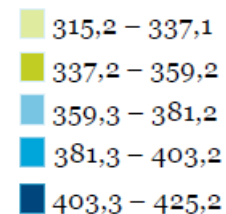
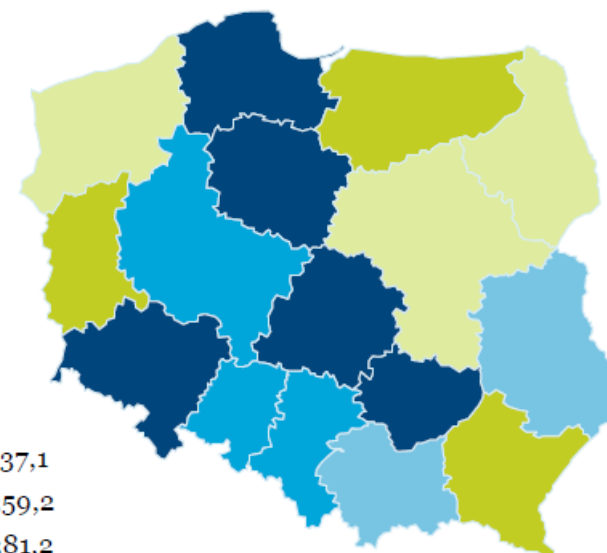




Struktura wiekowa w Polsce w roku 2012

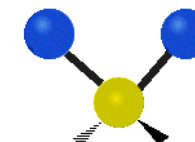
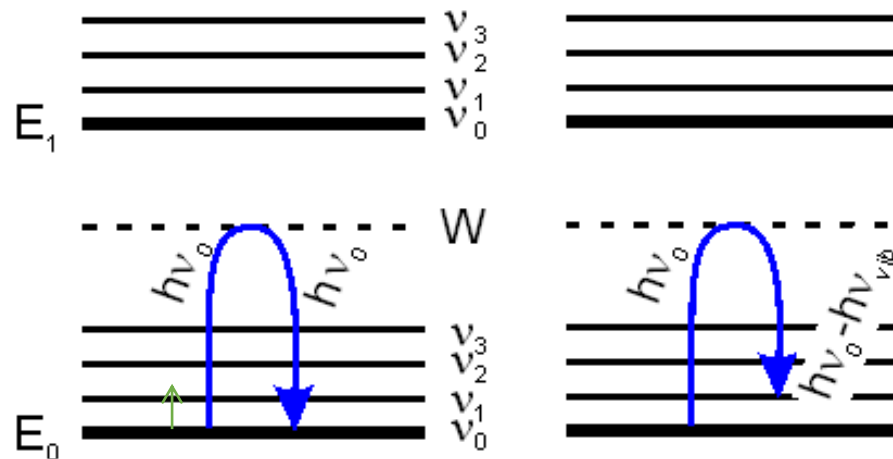
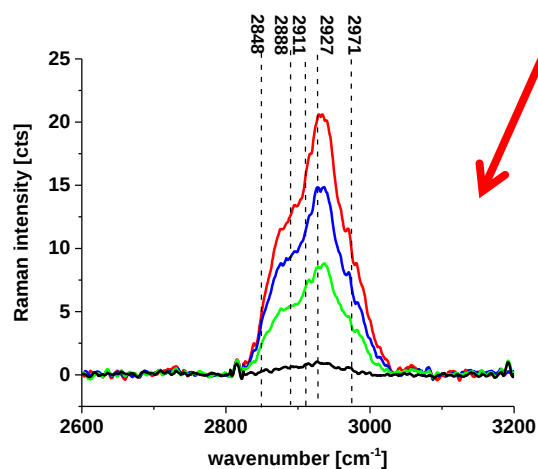
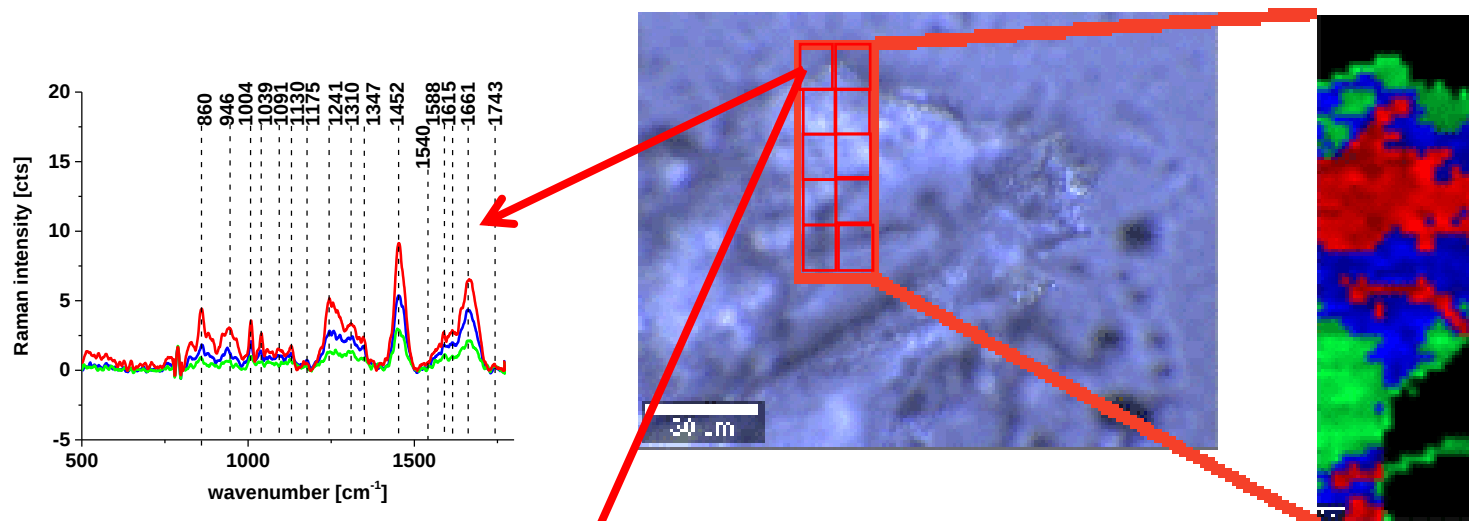
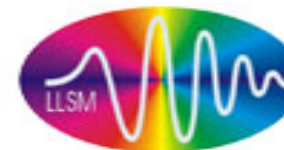


Współczynnik zachorowań na nowotwory złośliwe na 100 tys. mieszkańców w roku 2011

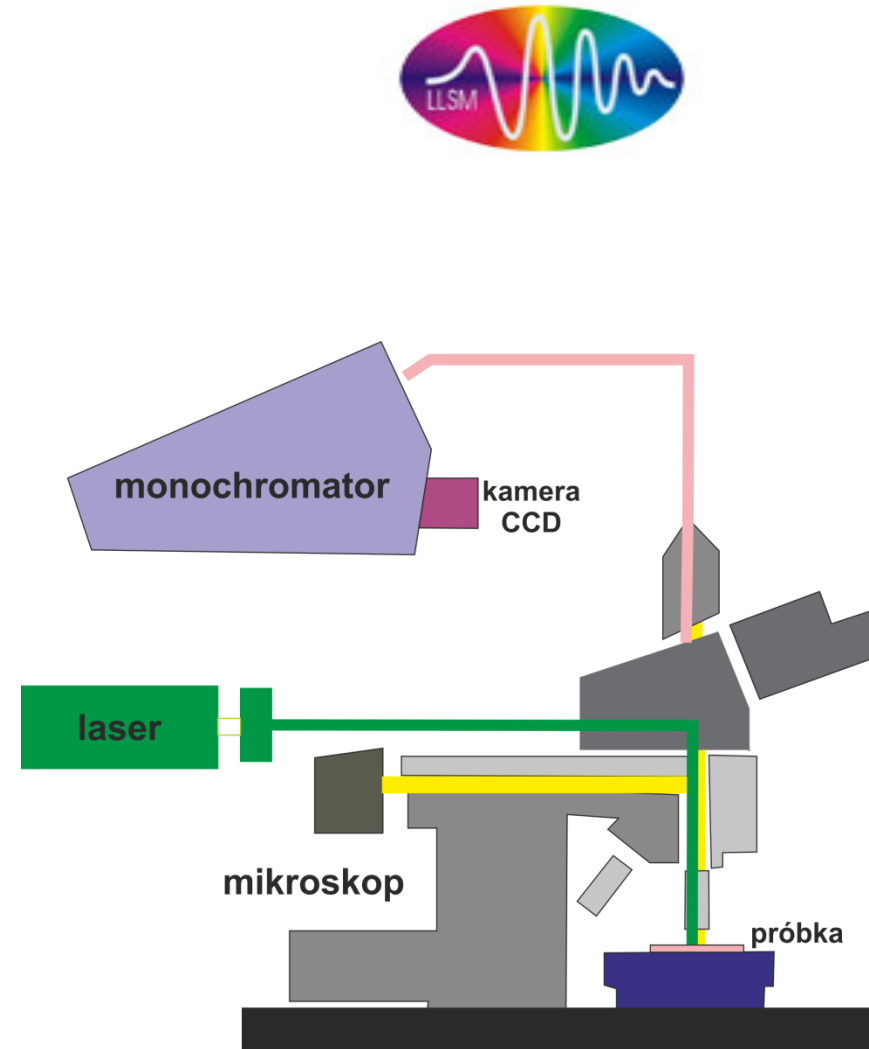
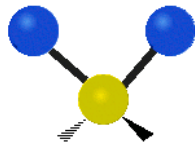
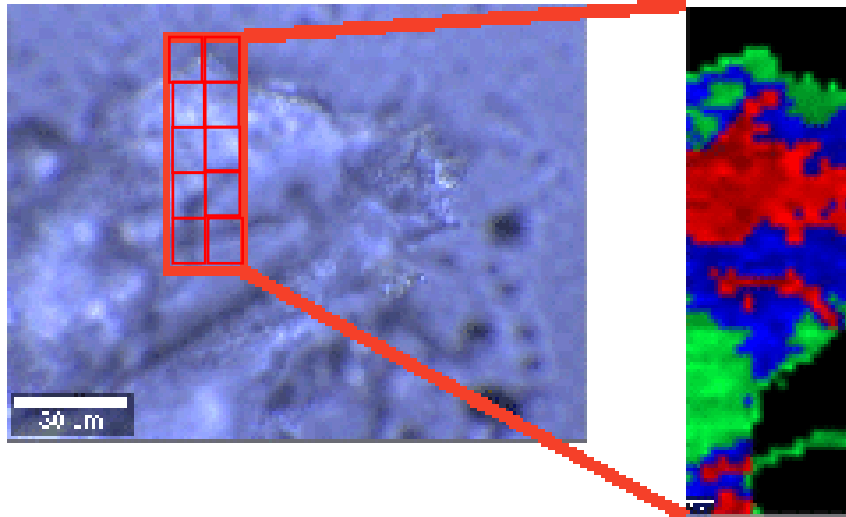


Nowotwory to schorzenia w głównej mierze osób starszych, przy starzejącym się społeczeństwie trzeba być przygotowanym na wzrost liczby zachorowań

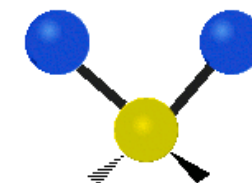
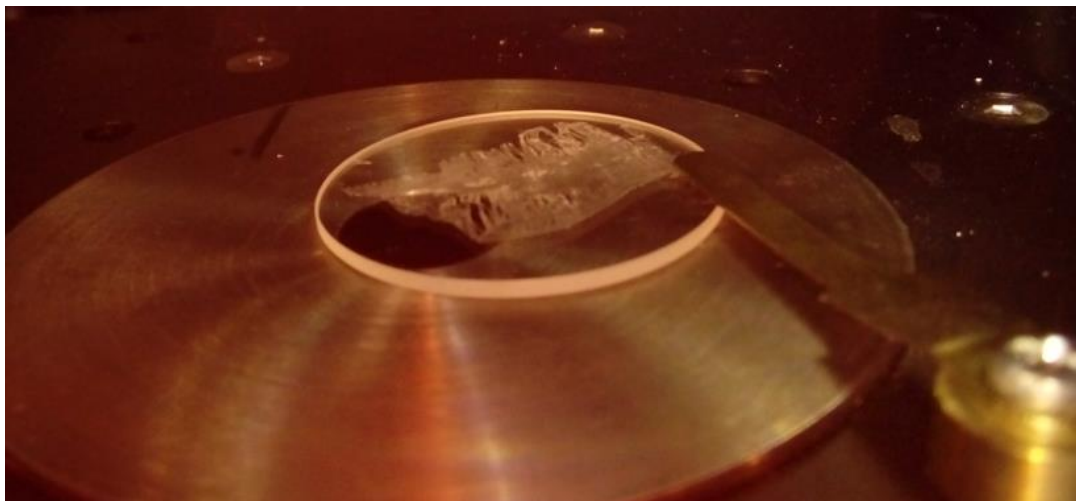
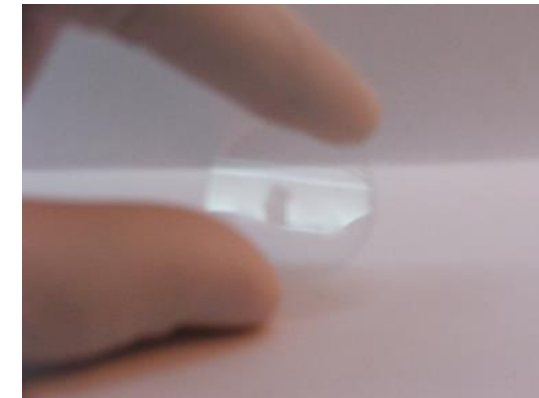
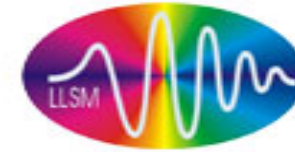
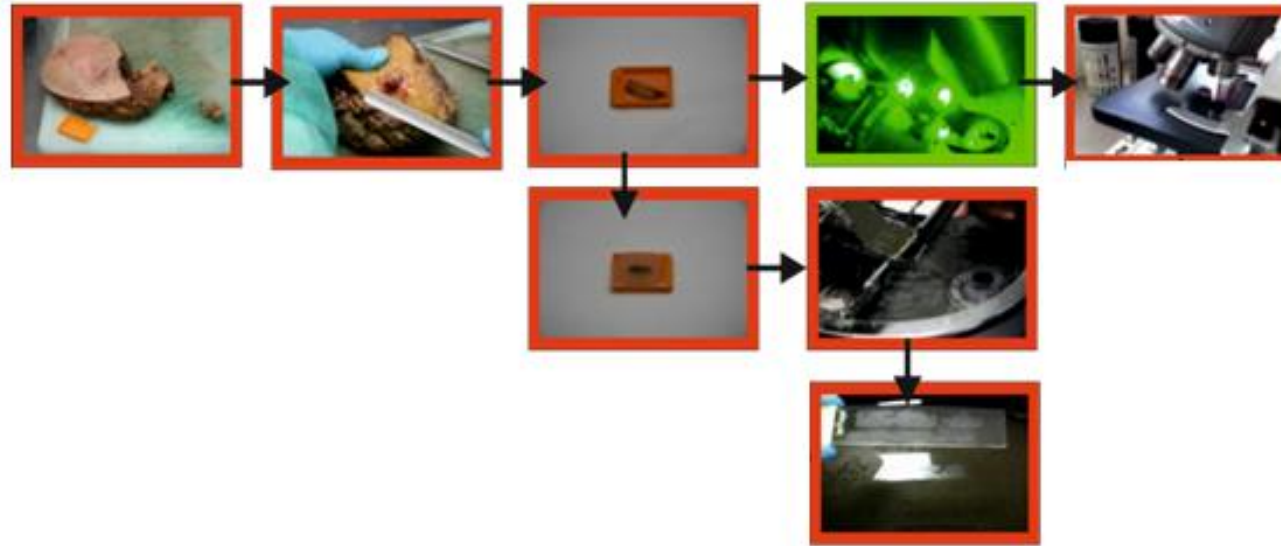
Spektroskopia i obrazowanie RAMANA



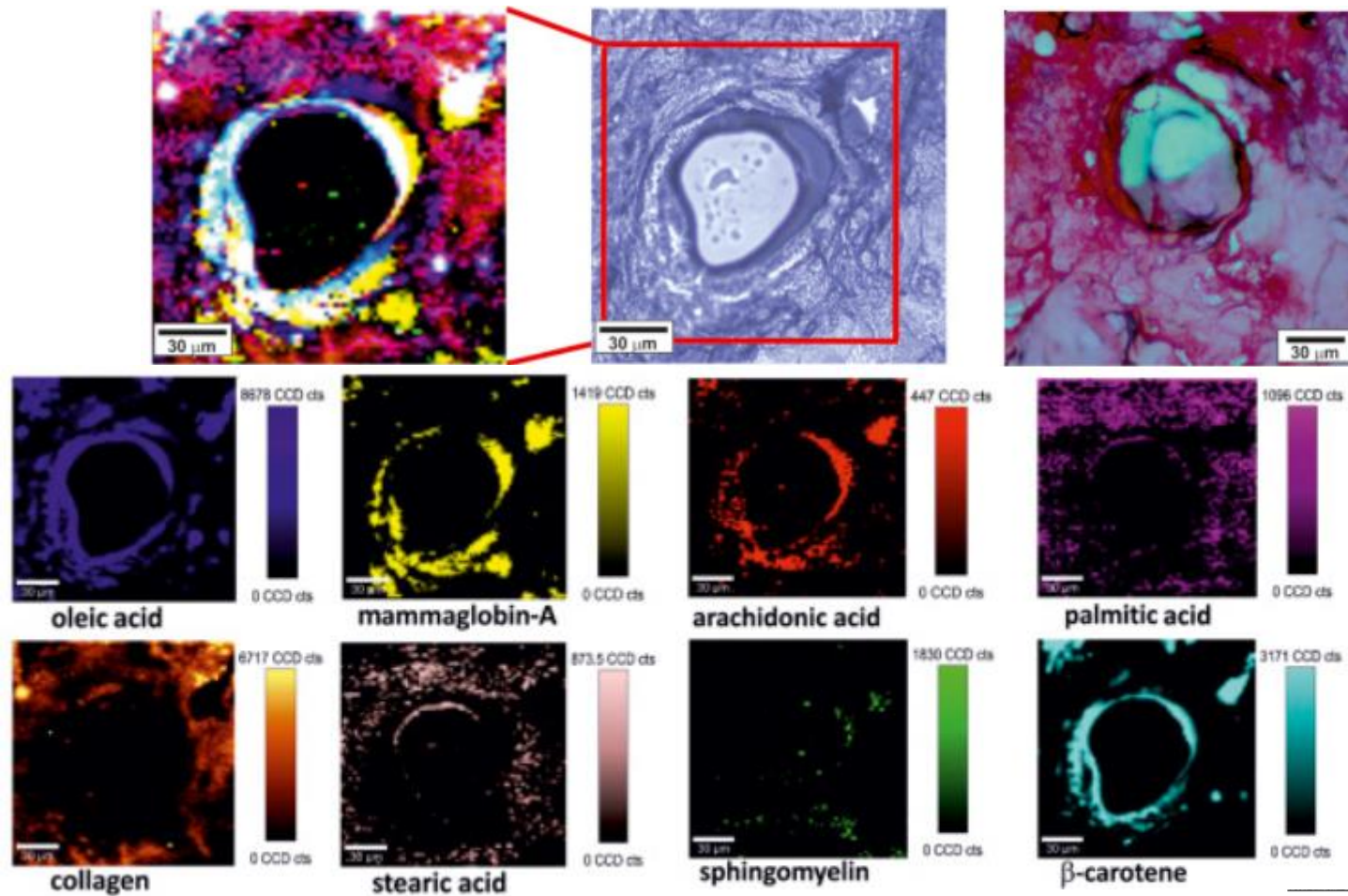
Spektroskopia i obrazowanie RAMANA



Spektroskopia i obrazowania Ramana w analizie chemicznej układów biologicznych



Obrazowanie Ramana tkanek ludzkiego gruczołu piersiowego



tkanka prawidłowa
pacjent P115

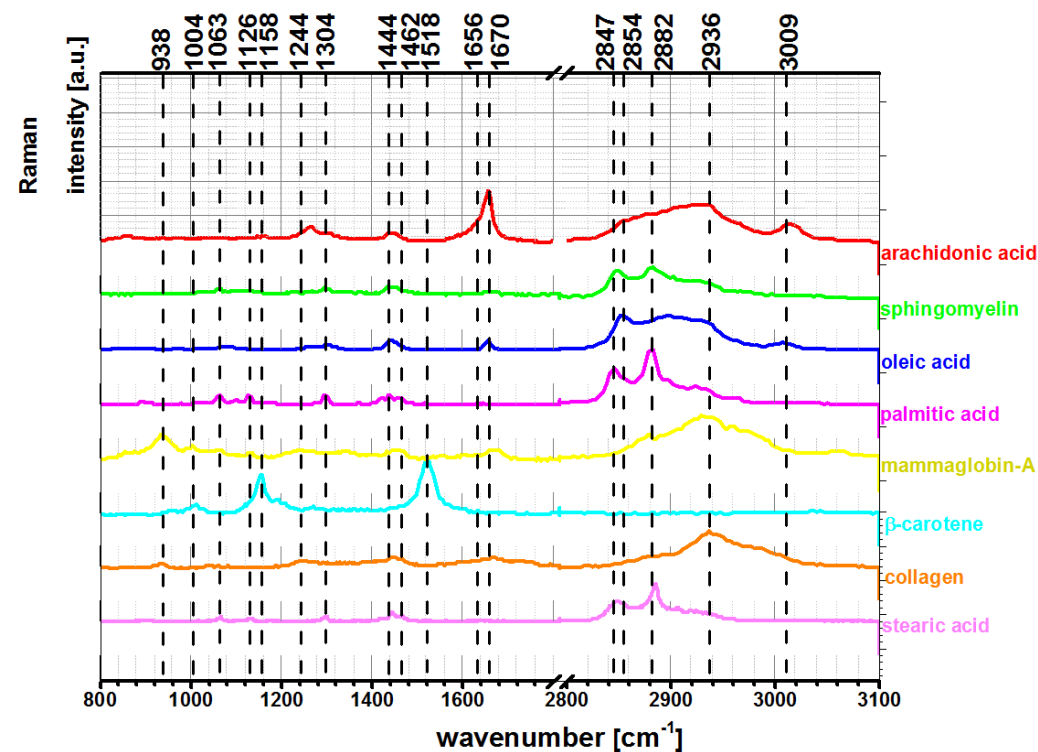
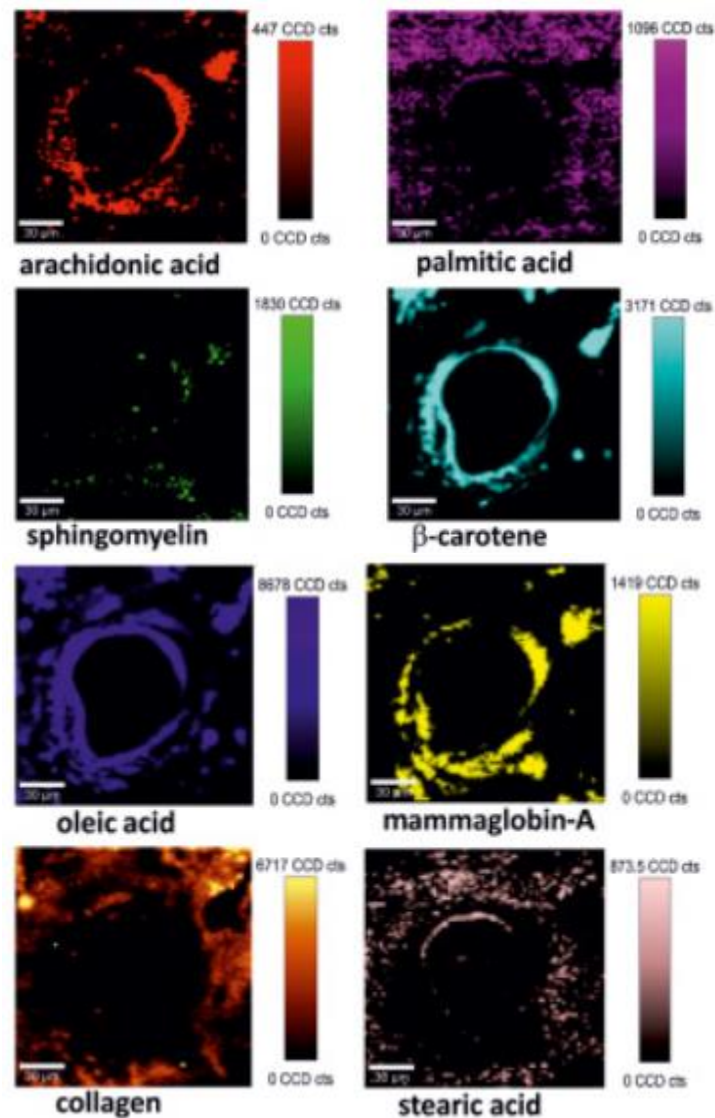
New look inside human breast ducts with Raman imaging. Raman candidates as diagnostic markers for breast cancer prognosis: Mammaglobin, palmitic acid and sphingomyelin

Halina Abramczyk^{*}, Beata Brozek-Pluska

Lodz University of Technology, Institute of Applied Radiation Chemistry, Laboratory of Laser Molecular Spectroscopy, Wroblewskiego 15, 93-590 Lodz, Poland



Obrazowanie Ramana tkanek ludzkiego gruczołu piersiowego



Contents lists available at ScienceDirect

Analytica Chimica Acta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/aca



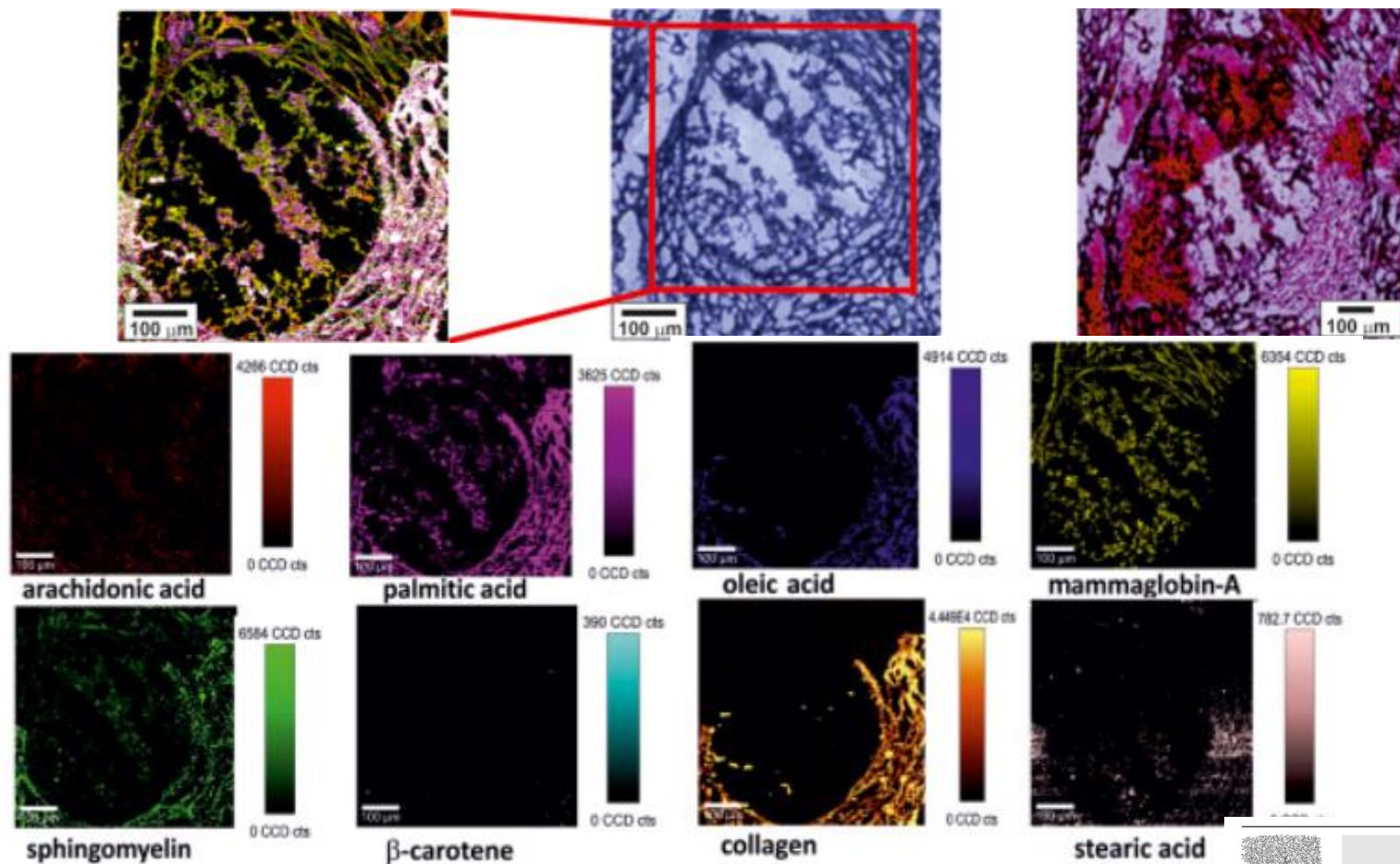
New look inside human breast ducts with Raman imaging. Raman candidates as diagnostic markers for breast cancer prognosis: Mammaglobin, palmitic acid and sphingomyelin

Halina Abramczyk*, Beata Brozek-Pluska

Lodz University of Technology, Institute of Applied Radiation Chemistry, Laboratory of Laser Molecular Spectroscopy, Wroblewskiego 15, 93-590 Lodz, Poland



Obrazowanie Ramana tkanek ludzkiego gruczołu piersiowego



*tkanka zmieniona nowotworowo
ductal carcinoma in situ, G1 and G2
pacjent P115*



Contents lists available at [ScienceDirect](https://www.sciencedirect.com)

Analytica Chimica Acta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/aca

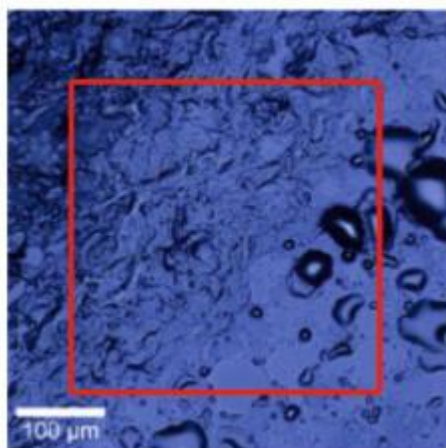
New look inside human breast ducts with Raman imaging. Raman candidates as diagnostic markers for breast cancer prognosis: Mammaglobin, palmitic acid and sphingomyelin

Halina Abramczyk*, Beata Brozek-Pluska

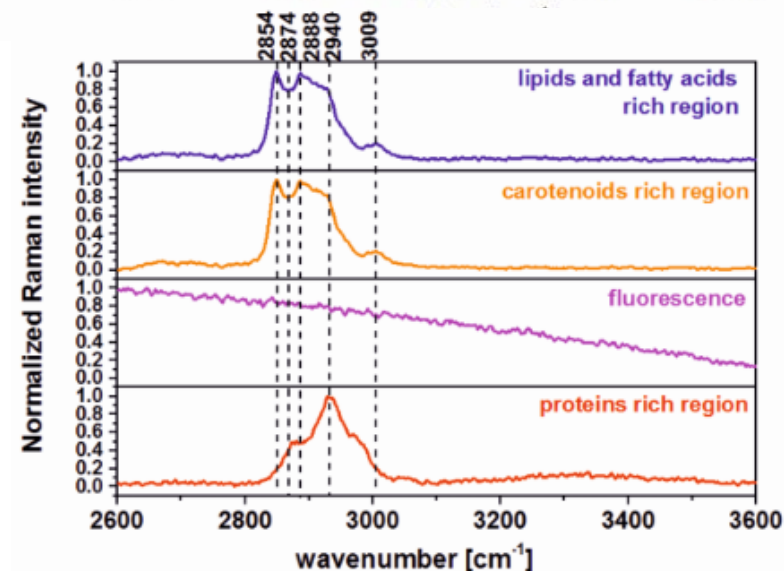
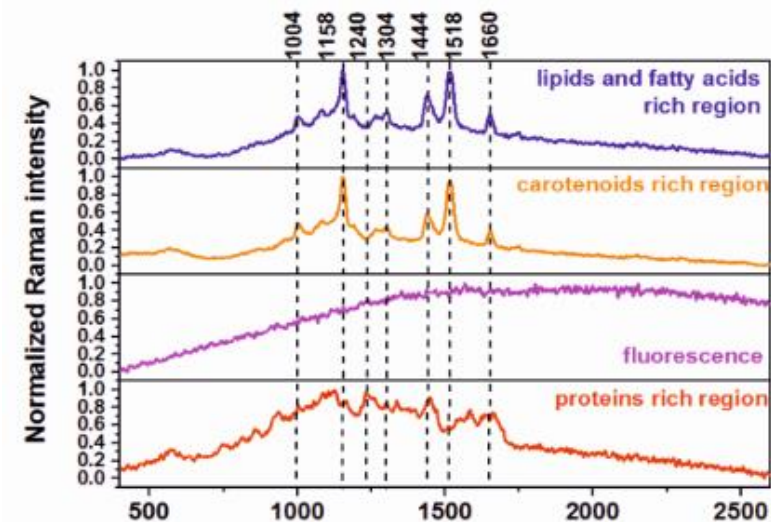
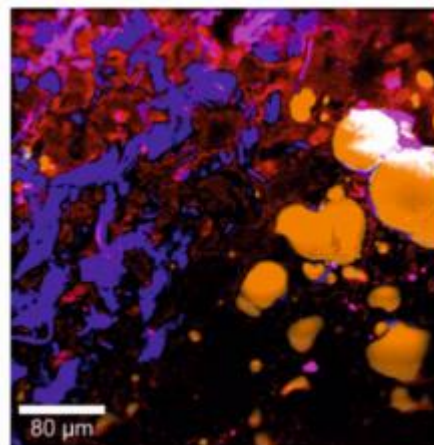
Lodz University of Technology, Institute of Applied Radiation Chemistry, Laboratory of Laser Molecular Spectroscopy, Wroblewskiego 15, 93-590 Lodz, Poland



Obrazowanie Ramana tkanek ludzkiego gruczołu piersiowego



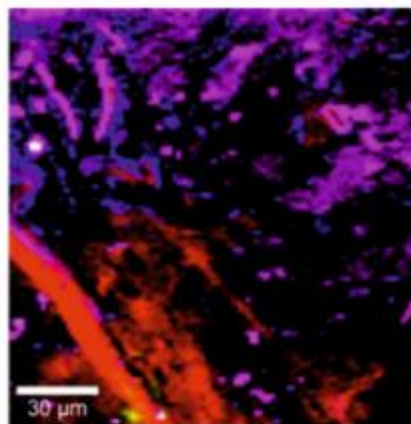
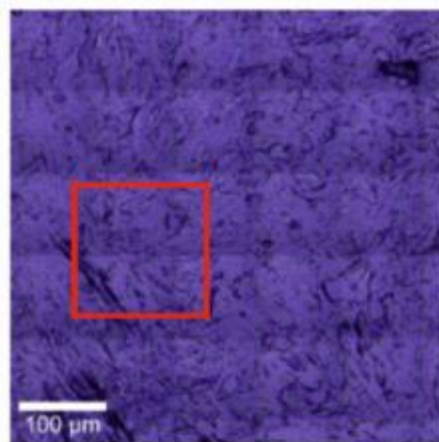
tkanka o utkaniu prawidłowym
pacjent P80



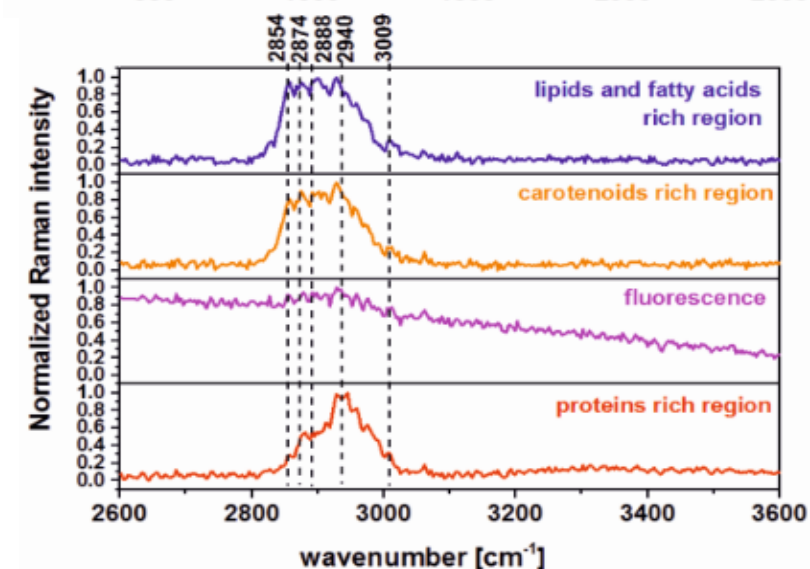
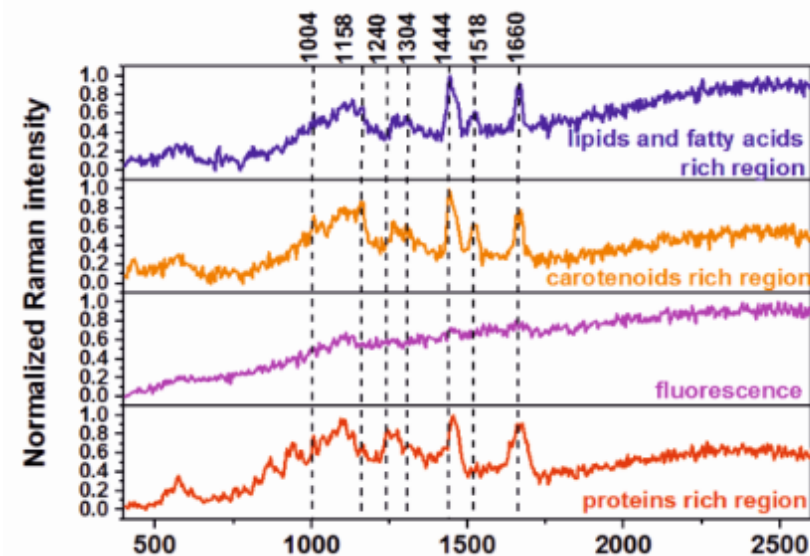
Raman microspectroscopy of noncancerous and cancerous human breast tissues. Identification and phase transitions of linoleic and oleic acids by Raman low-temperature studies†

Beata Brozek-Pluska,* Monika Kopec, Jakub Surmacki and Halina Abramczyk

Obrazowanie Ramana tkanek ludzkiego gruczołu piersiowego



tkanka zmieniona nowotworowo
IDC. łac. carcinoma ductale infiltrans mammae
pacjent P80

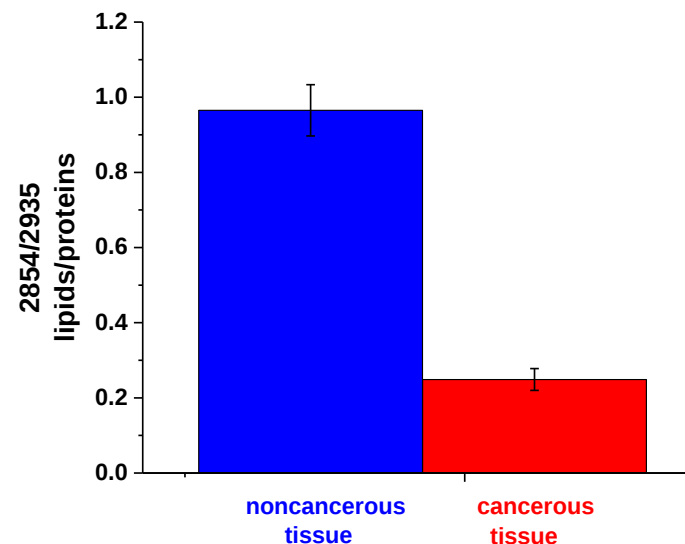
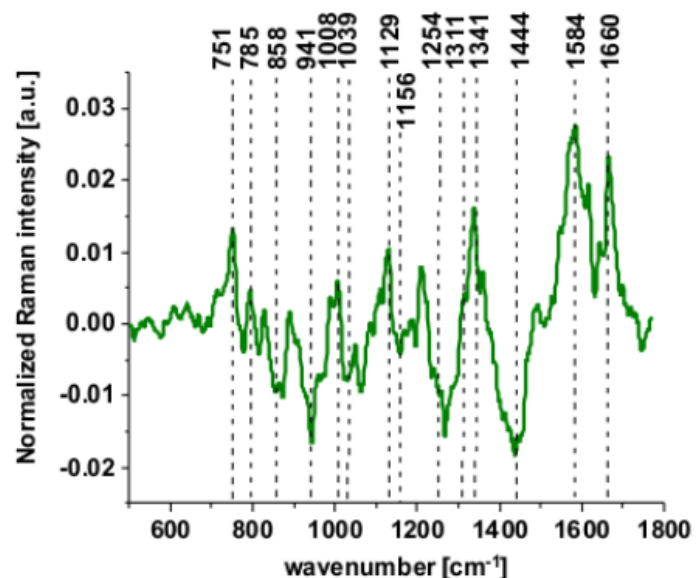


Raman microspectroscopy of noncancerous and cancerous human breast tissues. Identification and phase transitions of linoleic and oleic acids by Raman low-temperature studies†

Beata Brozek-Pluska,* Monika Kopec, Jakub Surmacki and Halina Abramczyk

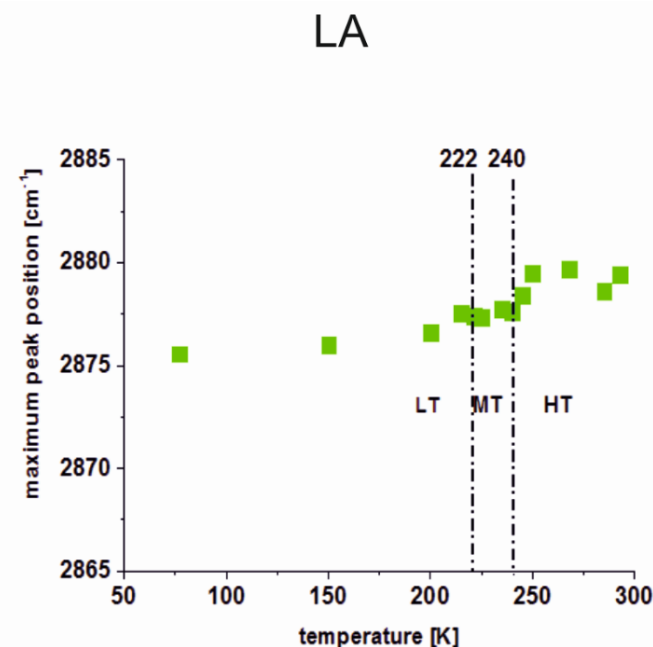
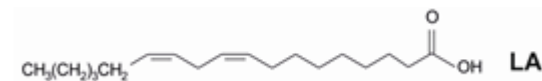
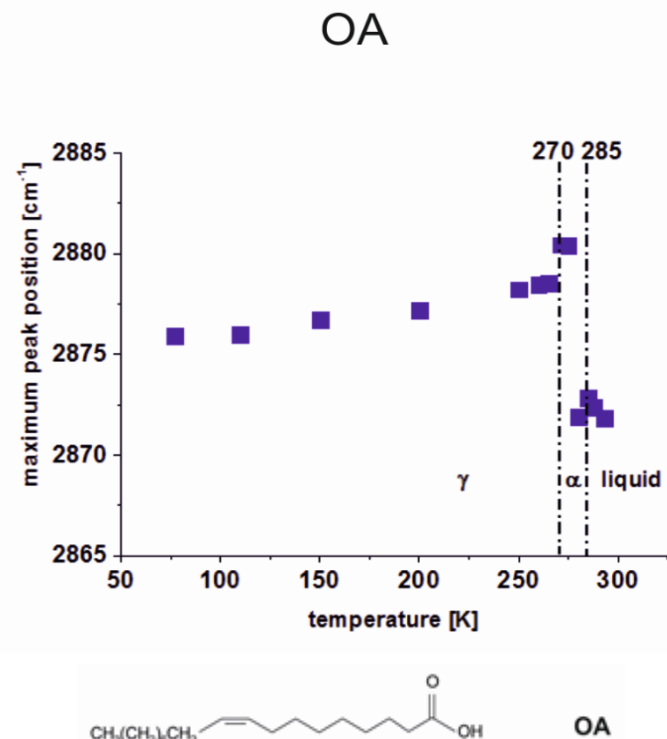
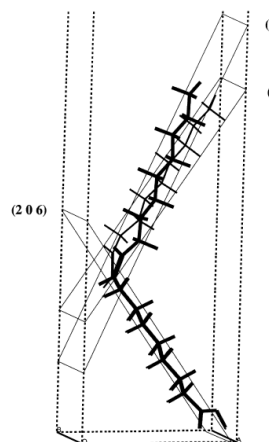
Przeprogramowanie metaboliczne lipidów w komórkach nowotworowych

Przez wiele lat fenotyp lipidów był ignorowany przez środowisko naukowe, które skupiało się niemal wyłącznie na biosyntezie białek i profilu proteomu, czyli kompletnego zestawu białek danego organizmu (z ang. protein complement of the genome), kodowanych przez genom.

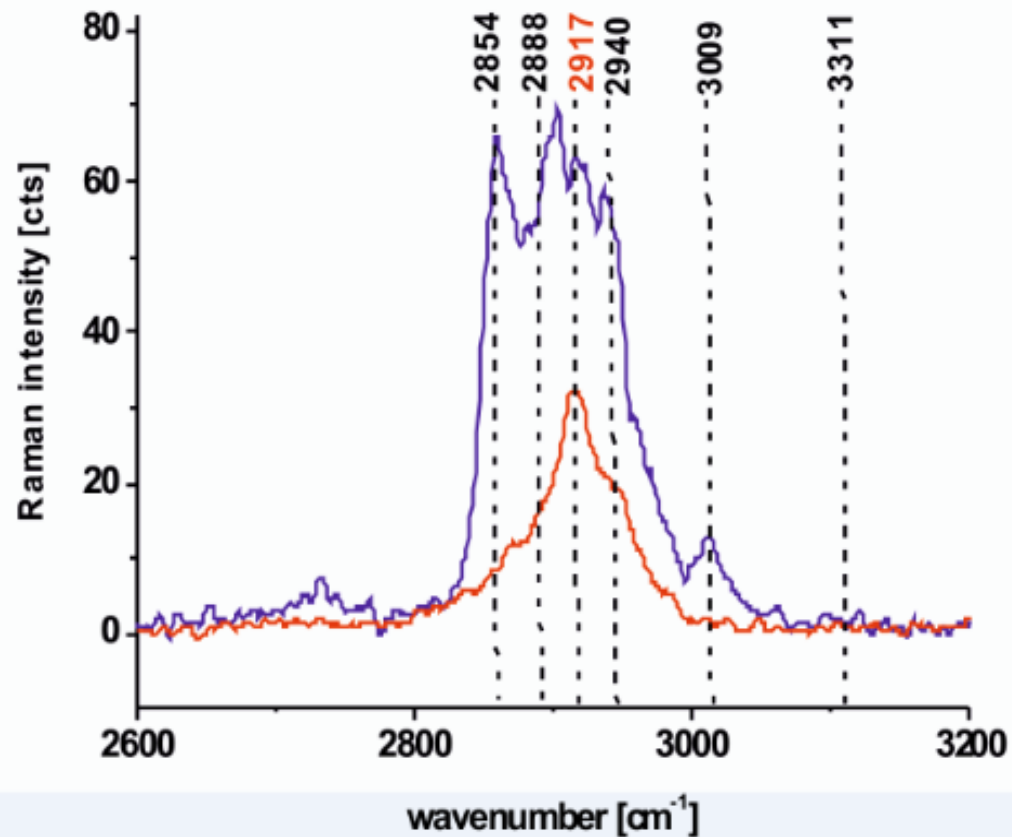
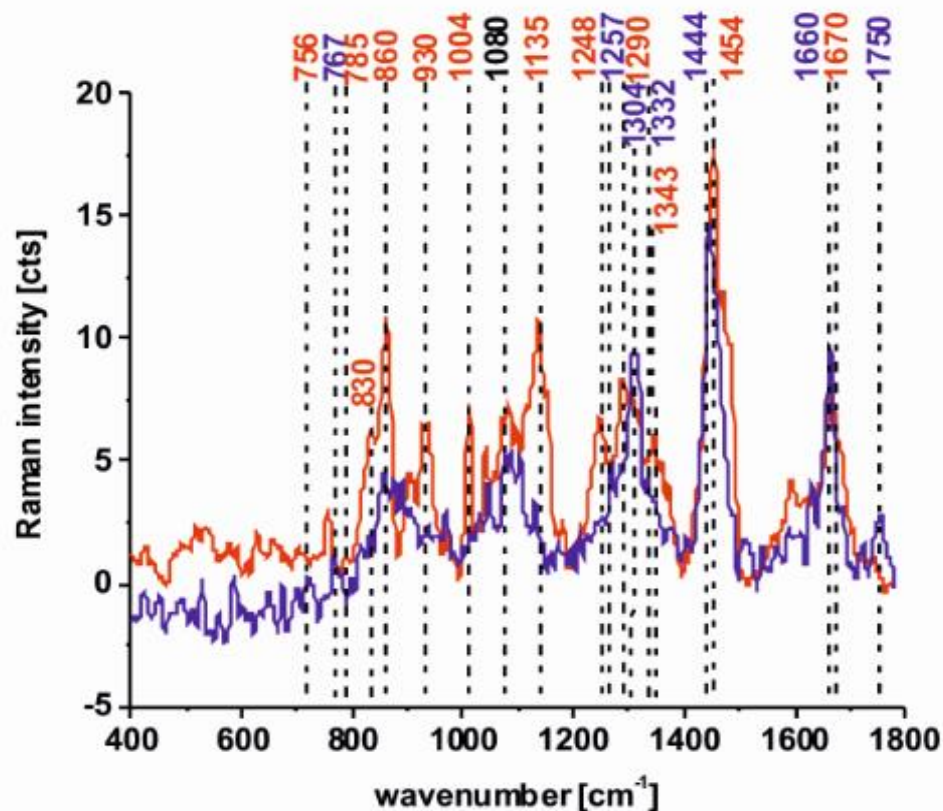


Analiza przejść fazowy kwasu oleinowego (OA) i linolowego (LA)

$\nu_s(\text{CH}_2)$



Obrazowanie Ramana ludzkich tkanek głowy i szyi - analiza konformacji białek



Label-free determination of lipid composition and secondary protein structure of human salivary noncancerous and cancerous tissues by Raman microspectroscopy

Beata Brożek-Pluska,^{a*} Monika Kopce,^a Izabela Niedzwiecka^b and Alina Morawiec-Stander^b

Chem. Abstr. Anal., 2015, 140, 2107

PAPER

Analyst

View Article Online

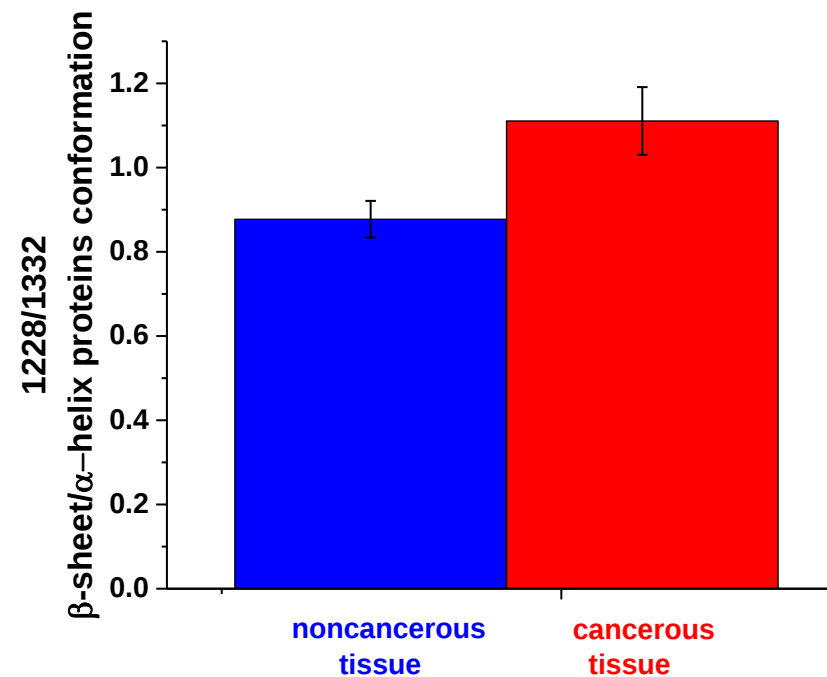
For full text of this article



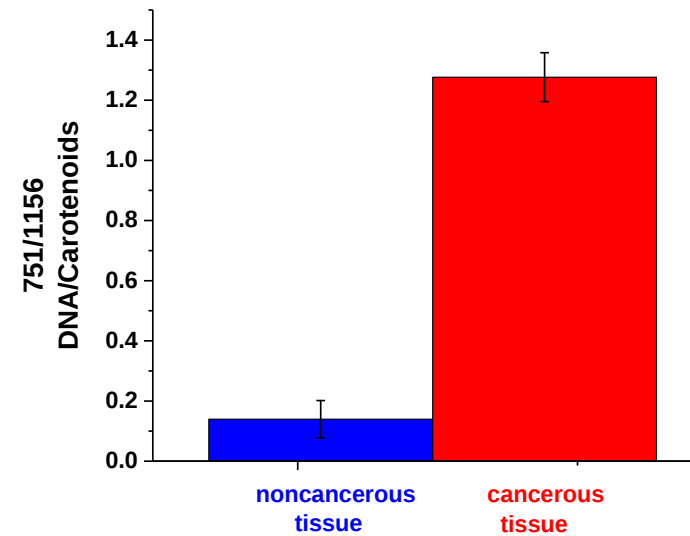
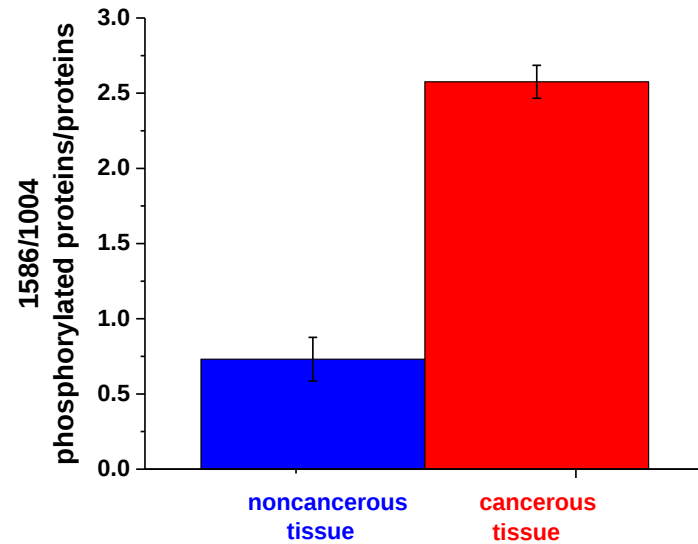
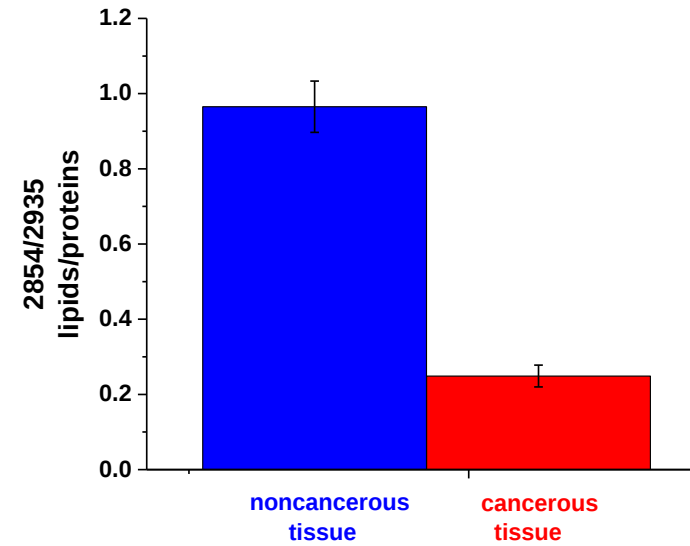
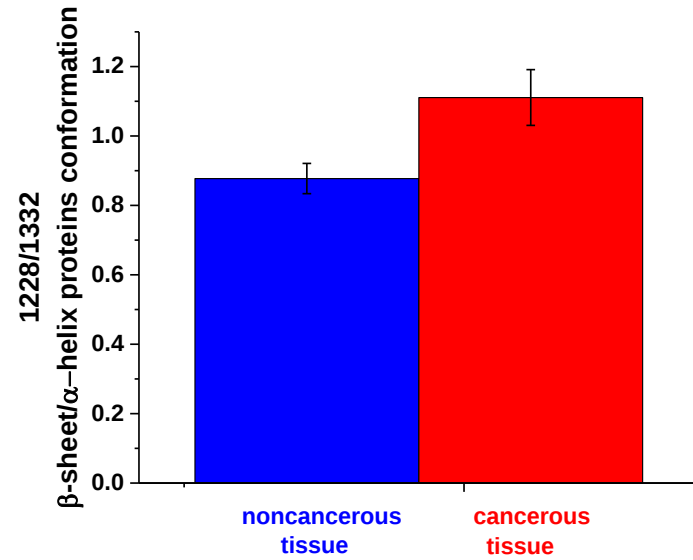
Przypisanie pasma Amidu I do różnych postaci struktury drugorzędowej białek

Goormaghtigh, E., Cabiaux, V. & Ruyschaert, J.-M.
Subcell. Biochem.

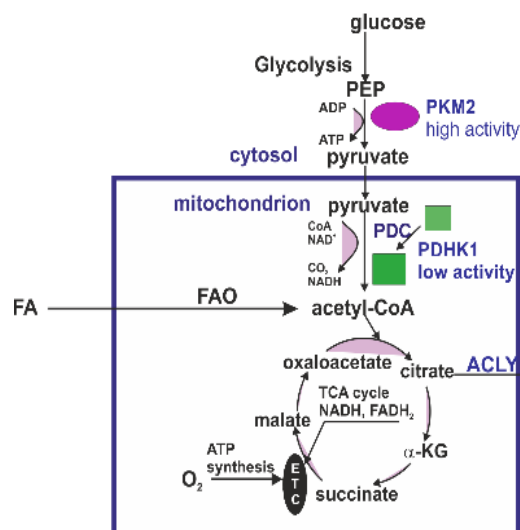
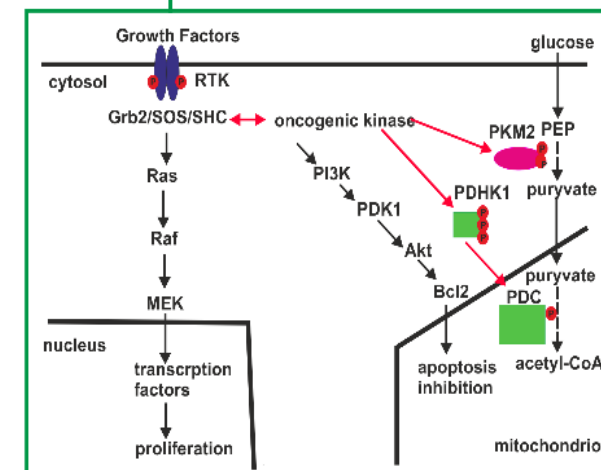
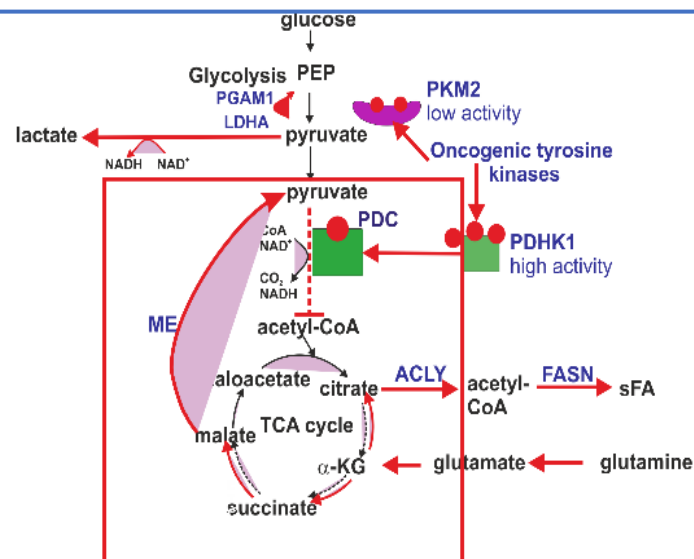
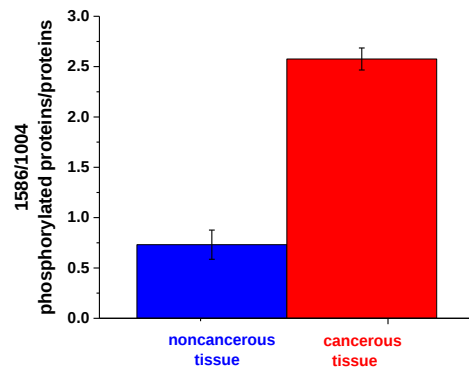
Struktura drugorzędowa	Położenie maximum [1/cm]	Zakres [1/cm]
α -helisa	1654	1648-1657
β -kartka	1633	1623-1641
β -kartka	1684	1674-1695
pętle	1672	1662-1686
Forma nieuporządkowana	1654	1642-1657



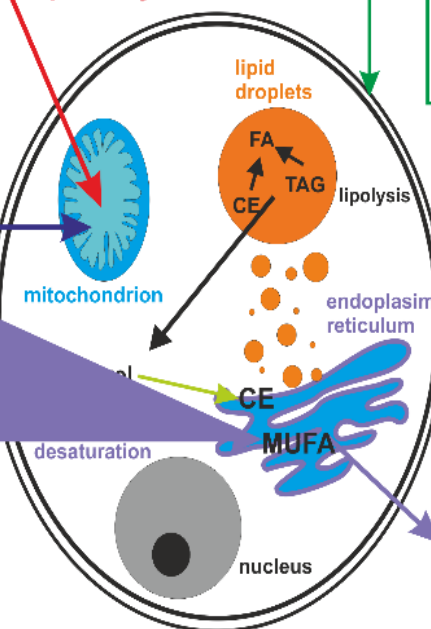
Spektroskopia i obrazowania Ramana w analizie chemicznej układów biologicznych



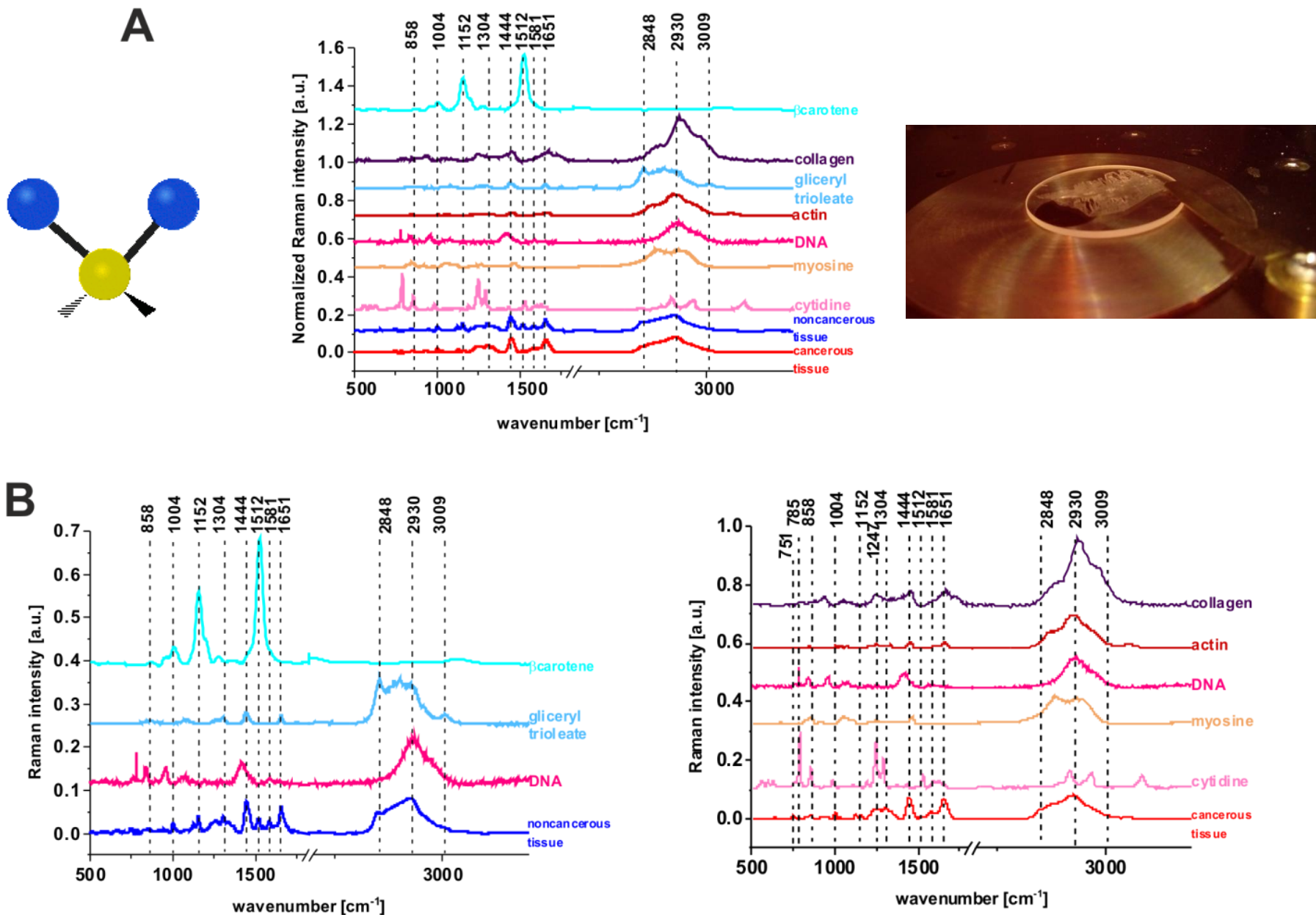
Spektroskopia i obrazowania Ramana w analizie chemicznej układów biologicznych



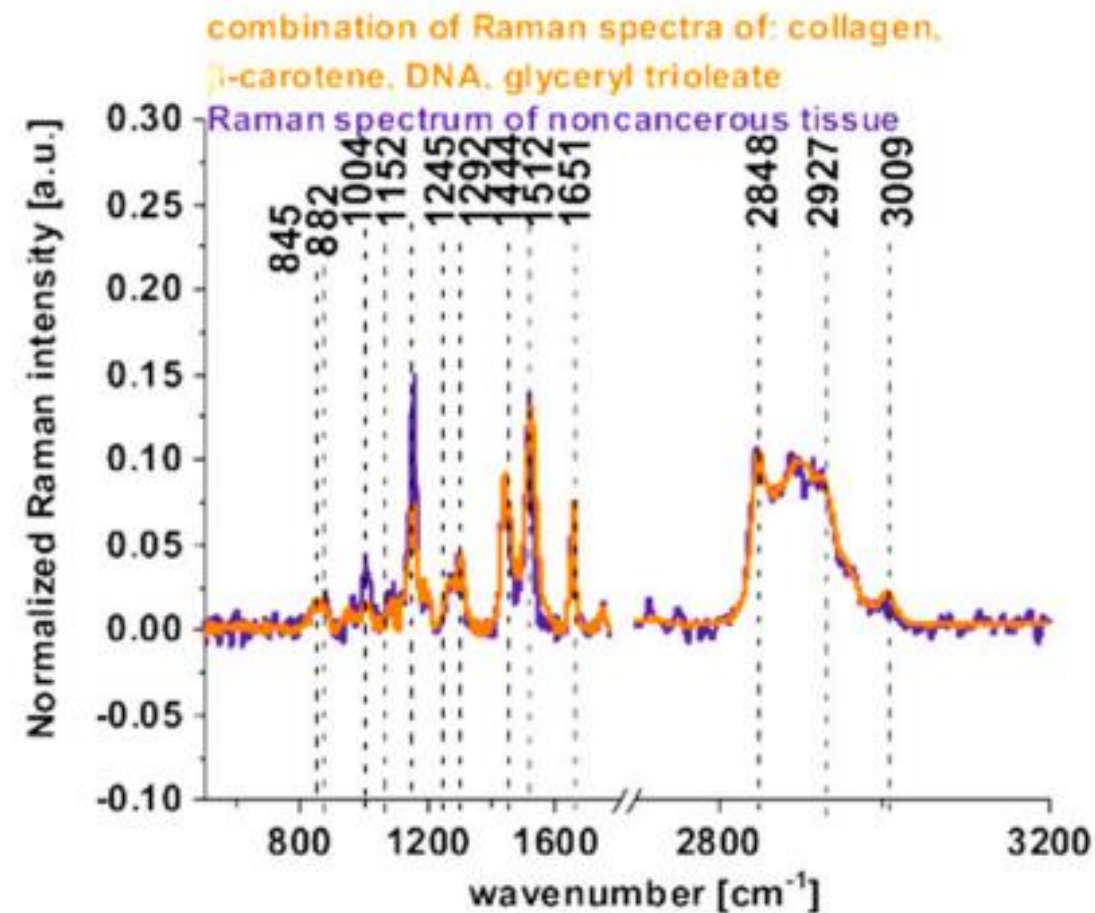
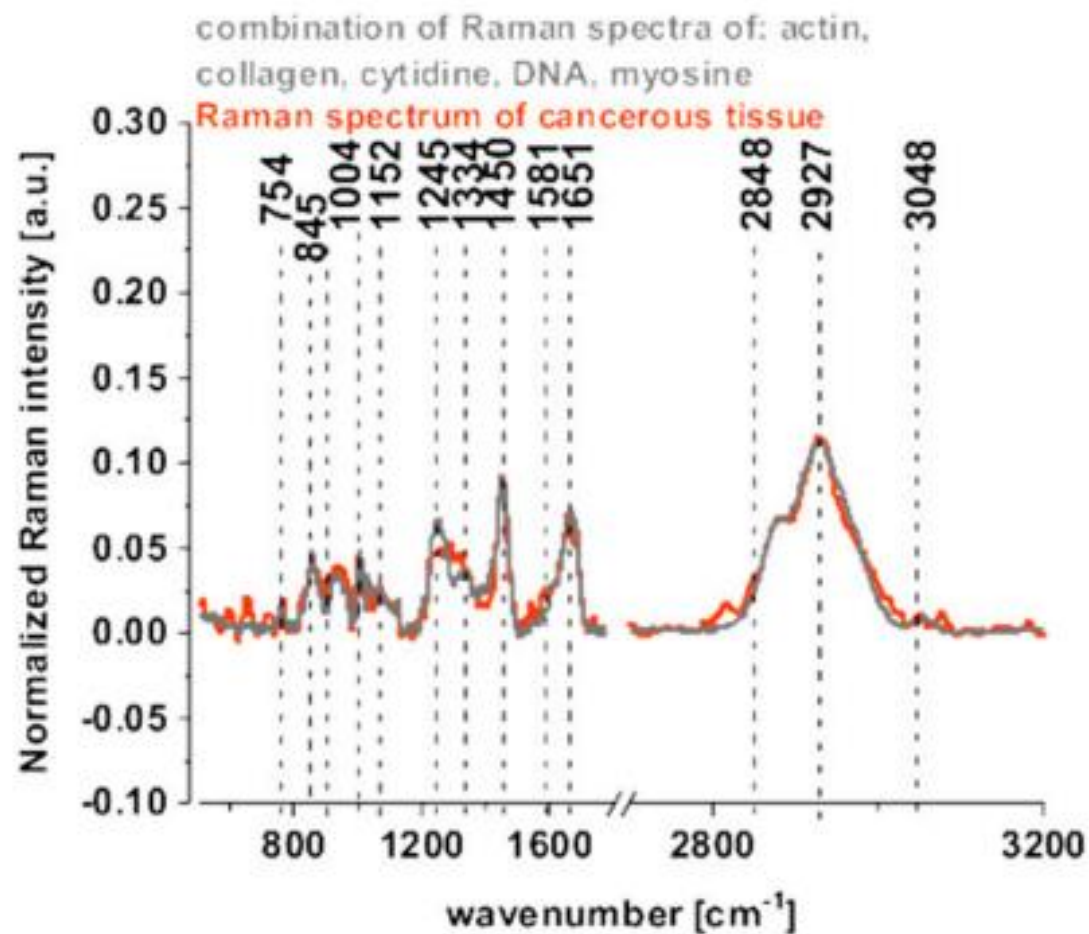
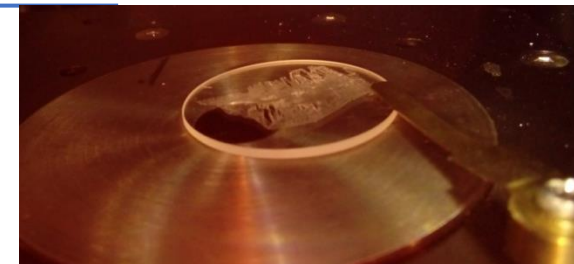
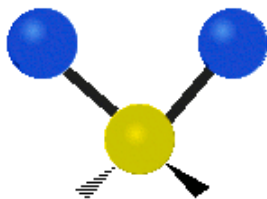
Normal mitochondrion pathways



Spektroskopia i obrazowania Ramana w analizie chemicznej układów biologicznych



Spektroskopia i obrazowania Ramana w analizie chemicznej układów biologicznych



Spektroskopia i obrazowania Ramana w analizie chemicznej układów biologicznych

Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy 188 (2018) 8–19

Contents lists available at ScienceDirect

Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy

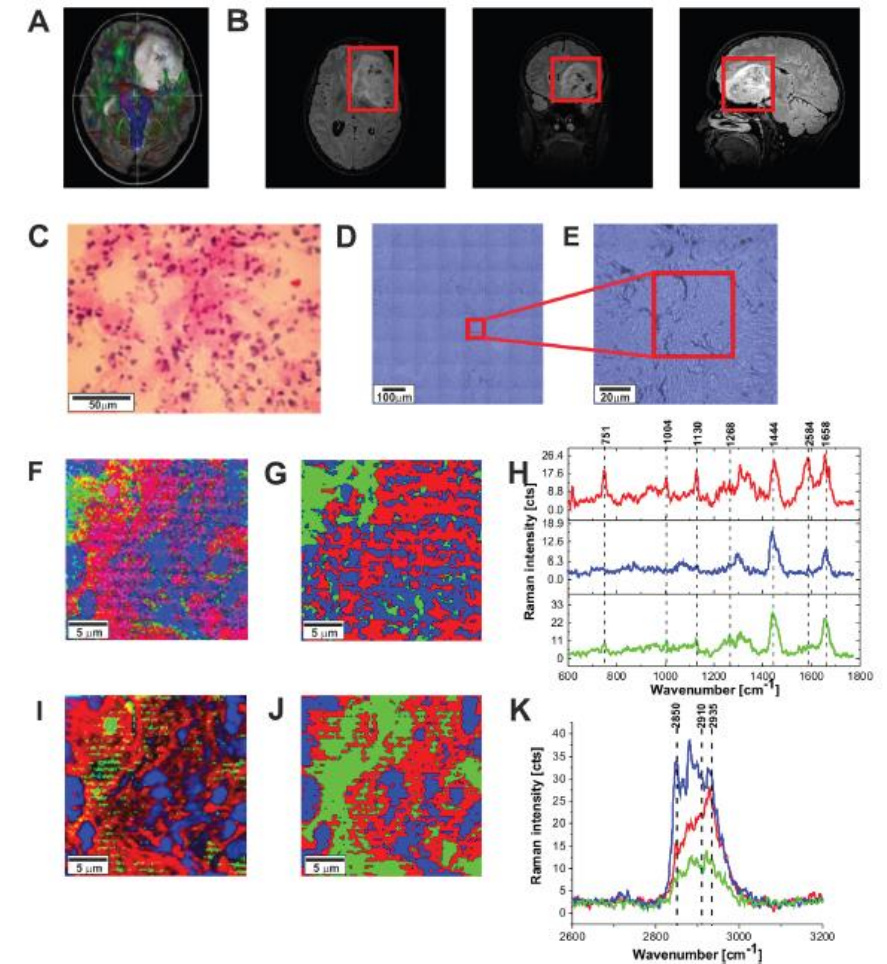
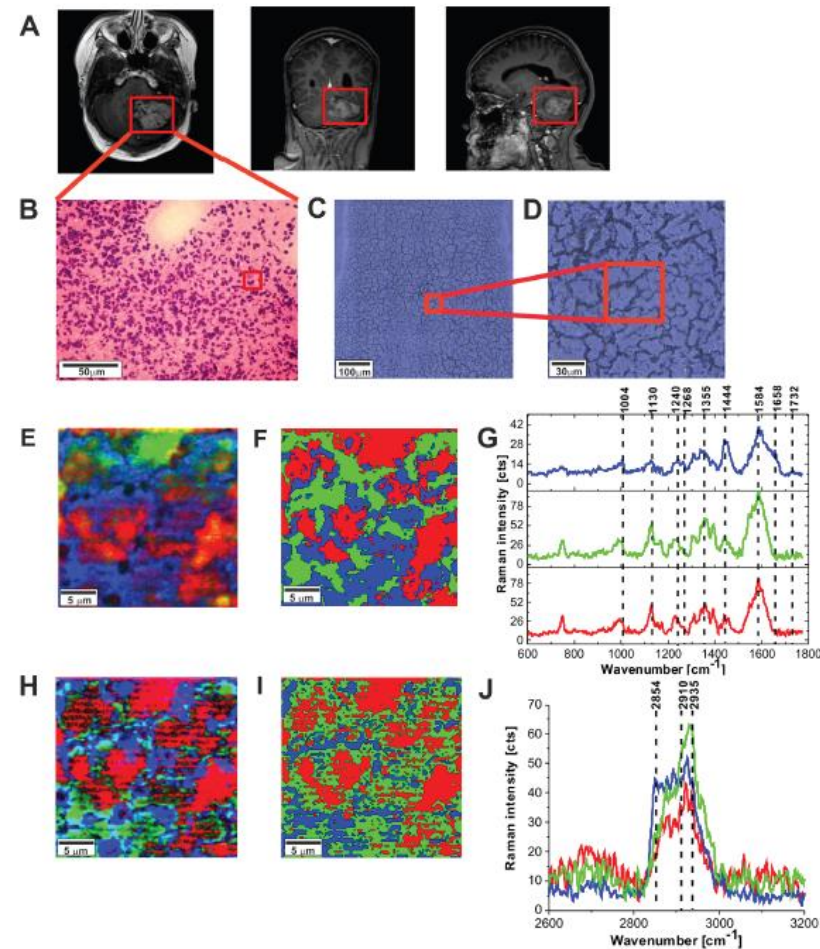
journal homepage: www.elsevier.com/locate/saa



The biochemical, nanomechanical and chemometric signatures of brain cancer

Halina Abramczyk*, Anna Imiela

Łódź University of Technology, Faculty of Chemistry, Institute of Applied Radiation Chemistry, Laboratory of Laser Molecular Spectroscopy, Wroblewskiego 15, 93-590 Łódź, Poland



Medulloblastoma , grade IV

Astrocytoma , grade II

www.impactjournals.com/oncotarget/

Oncotarget, 2017, Vol. 8, (No. 49), pp: 85290-85310

Research Paper

Novel strategies of Raman imaging for brain tumor research

Imiela Anna¹, Polis Bartosz², Polis Lech² and Abramczyk Halina¹

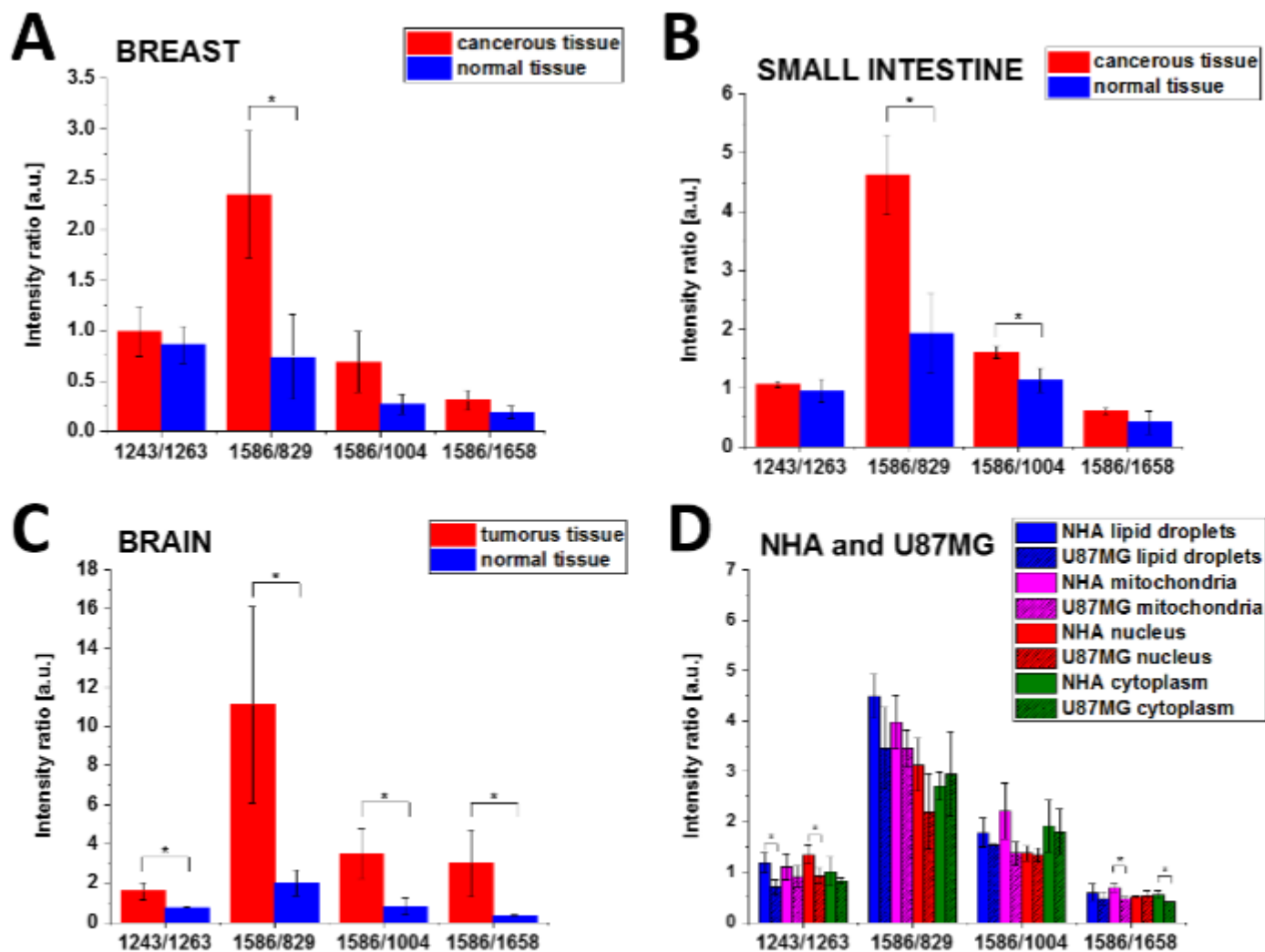
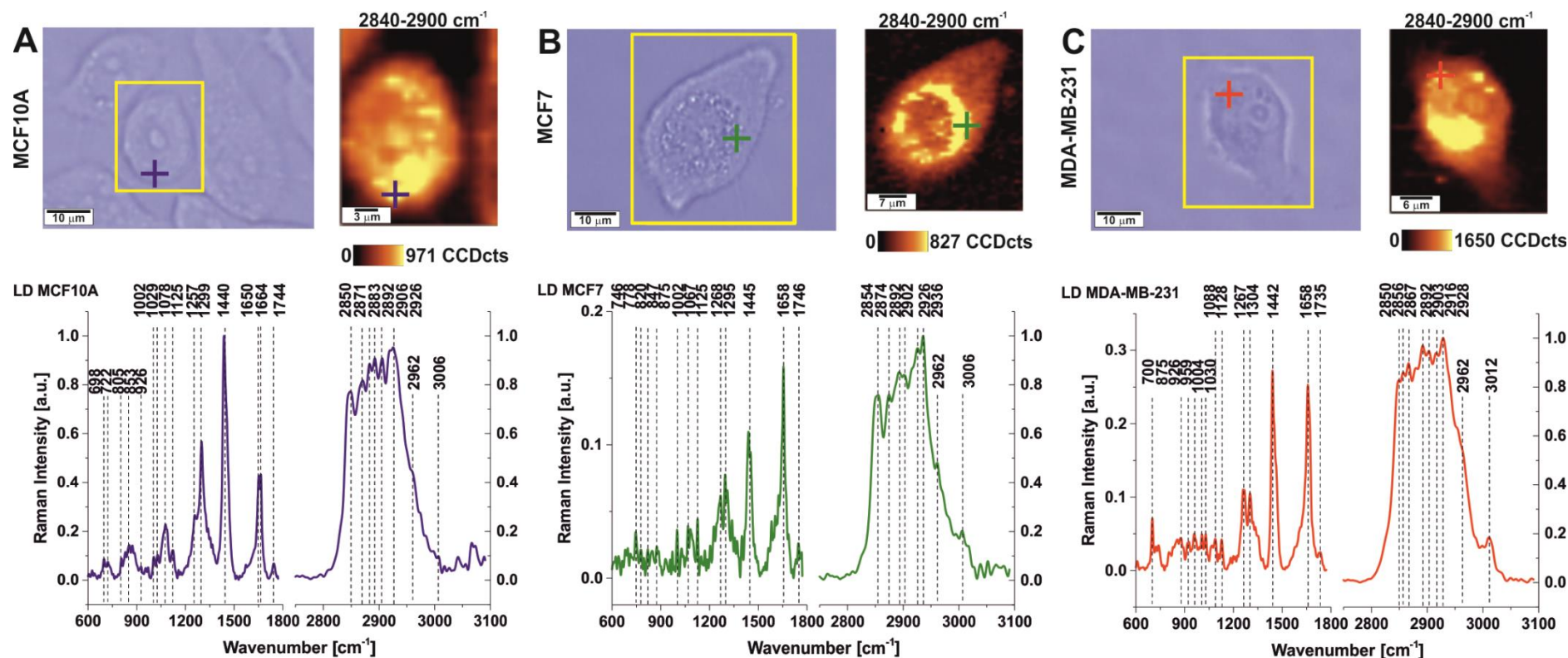


Figure 10. Schematic representation of the Raman intensity ratios, I_{1243}/I_{1263} , I_{1586}/I_{829} , I_{1586}/I_{1004} and I_{1586}/I_{1658} , for the analysed breast (A), small intestine (B), brain samples (C), NHA and U87-MG cell lines (D). The one-way ANOVA using the Tukey test was used to calculate the value significance, star * denotes that the differences are statistically significant, p Values ≤ 0.05 were accepted as statistically significant.

Obrazowanie Ramana linii komórkowych ludzkiego gruczołu piersiowego



MCF-10A

MCF-7

MDA-MB-231

Analyst

PAPER

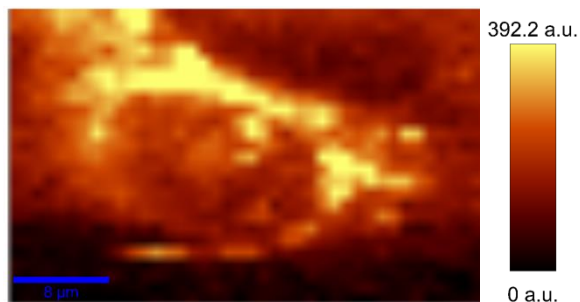
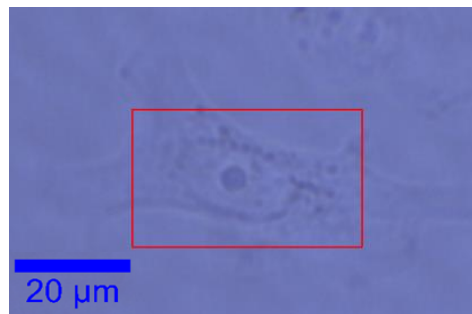
View Article Online
View Journal | View Issue



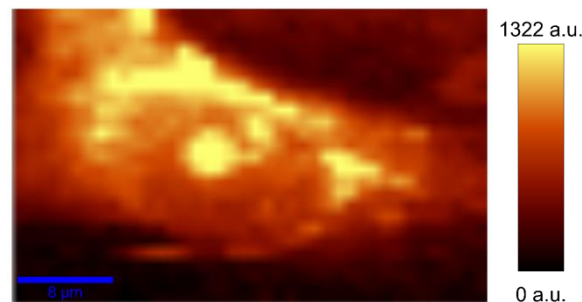
The role of lipid droplets and adipocytes in cancer. Raman imaging of cell cultures: MCF10A, MCF7, and MDA-MB-231 compared to adipocytes in cancerous human breast tissue

Halina Abramczyk,^{*,†} Jakub Surmacz,[‡] Monika Kopec,[§] Alicja Klaudia Olejnik,[‡] Katarzyna Lubecka-Pietruszewska[‡] and Krystyna Fabianowska-Majewska[‡]

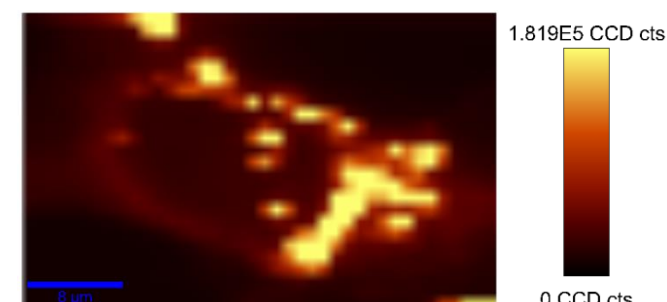
Obrazowanie Ramana linii komórkowych ludzkiego gruczołu piersiowego



**Lipid droplets
(2820-2870 $1/\text{cm}$)**



**Proteins/DNA
(2900-2980 $1/\text{cm}$)**



Fluorescence of Red Oil O

Analyst

PAPER

[View Article Online](#)
[View Journal](#) | [View Issue](#)

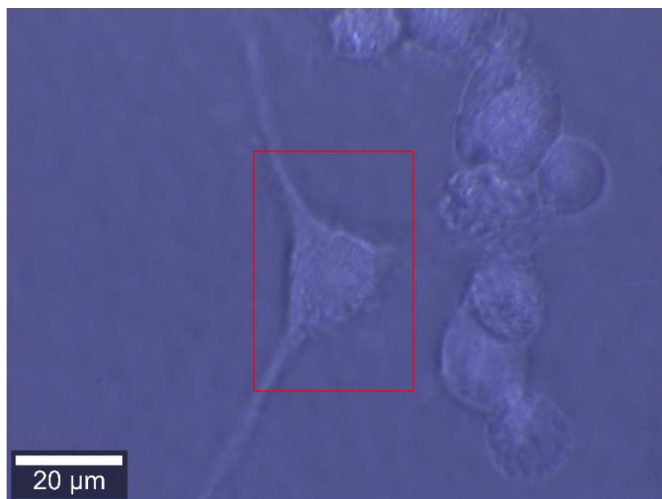
 CrossMark
Click for updates
Cite this: *Analyst*, 2015, 140, 2224

**The role of lipid droplets and adipocytes in cancer.
Raman imaging of cell cultures: MCF10A, MCF7,
and MDA-MB-231 compared to adipocytes in
cancerous human breast tissue**

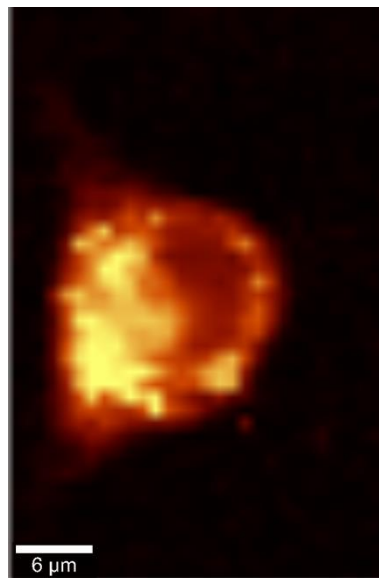
Halina Abramczyk,^{a,b} Jakub Surmacki,^a Monika Kopeć,^a Alicja Klaudia Olejnik,^a
Katarzyna Lubecka-Pietruszewska^b and Krystyna Fabianowska-Majewska^b



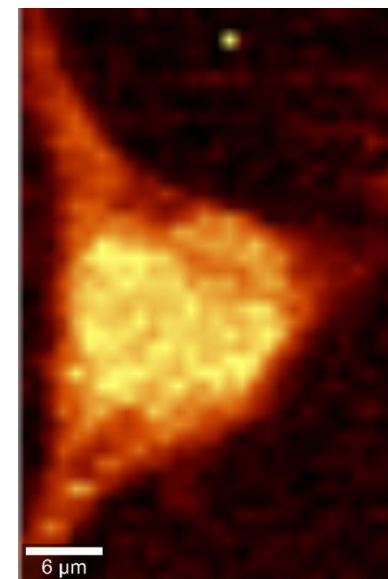
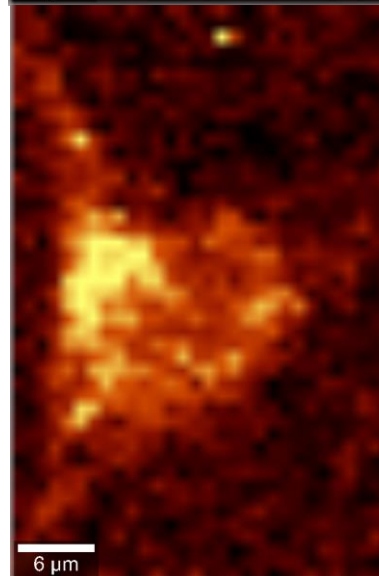
Obrazowanie Ramana linii komórkowych ludzkiego mózgu



Sum [1570 a.u. -> 1595
a.u.]

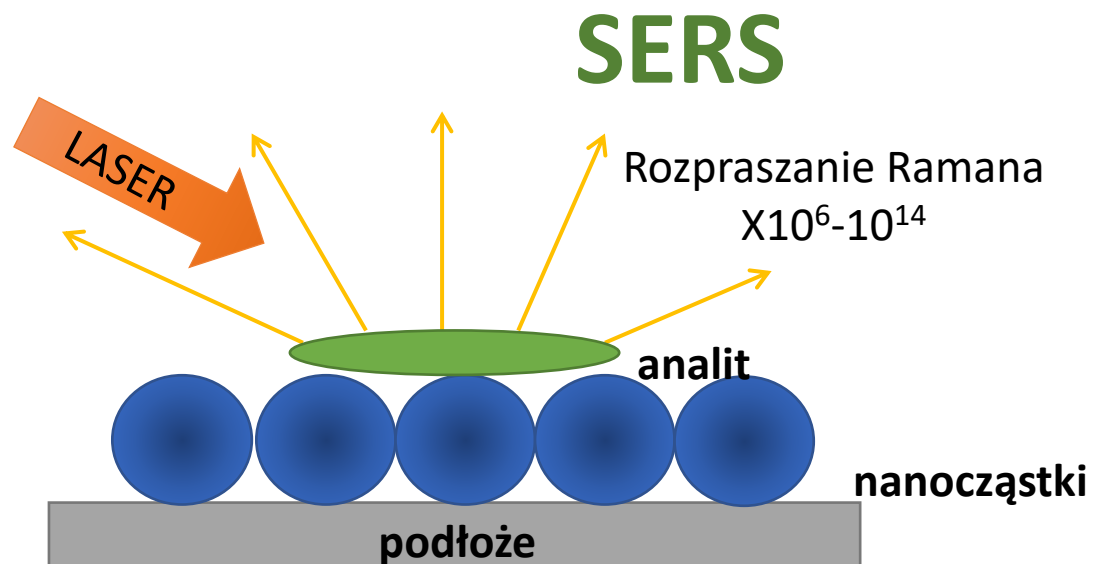


Sum [2840 a.u. -> 2900
a.u.]

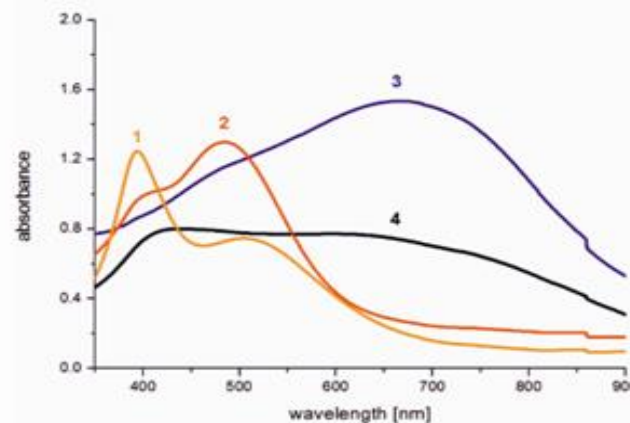
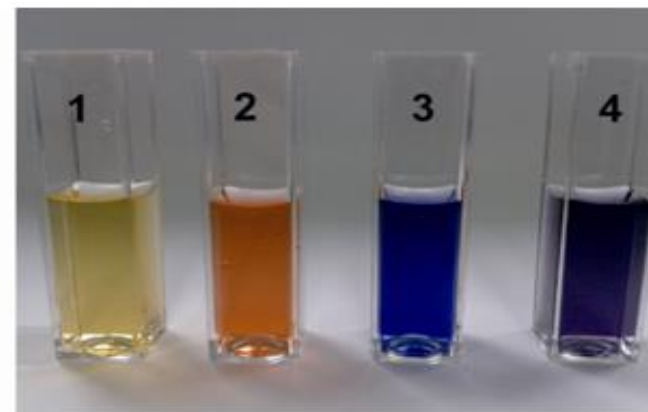


Sum [1630 a.u. -> 1685
a.u.]

SERS - Surfes Enhanced Raman Spectroscopy

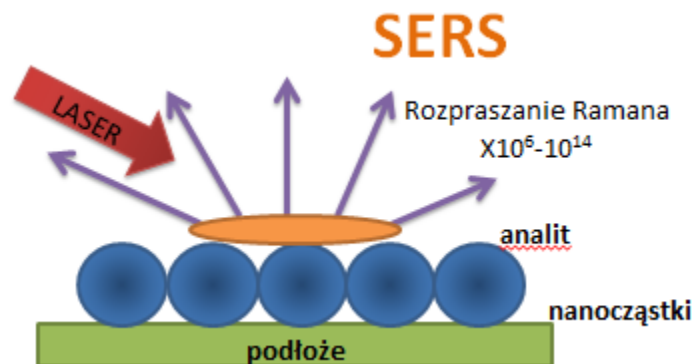


METODY REDUKCJI CHEMICZNEJ
METODY MIKROEMULSYJNE
METODY SONOCHEMICZNE
ABLACJA LASEROWA
METODY RADIACYJNE
TERMICZNA DEKOMPOZYCJA



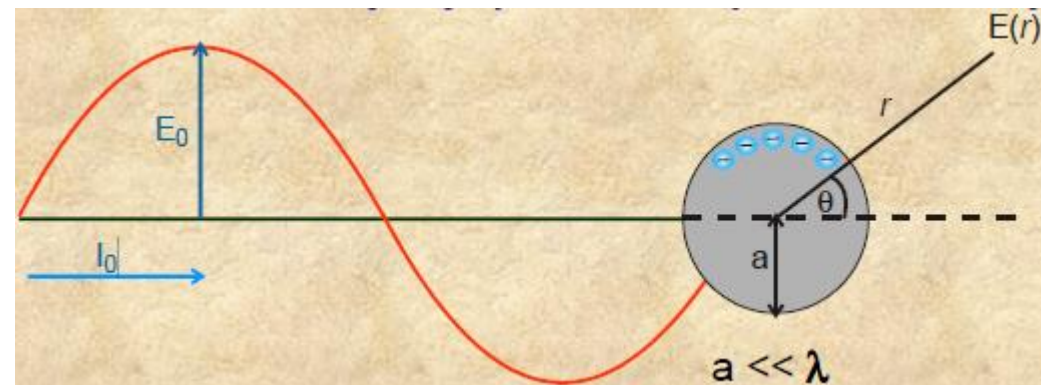
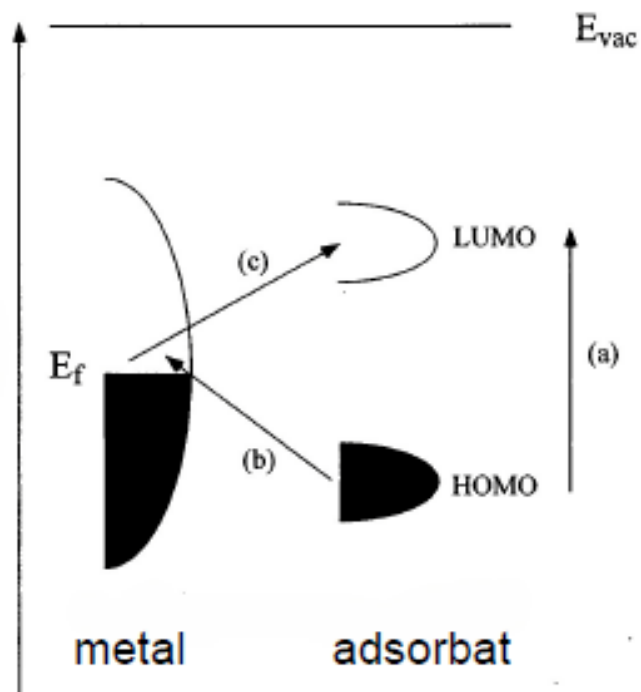
SERS - Surfes Enhanced Raman Spectroscopy

- Cząsteczki zaadsorbowane na chropowatych powierzchniach niektórych metali (Ag, Au, Cu) dają bardzo intensywny sygnał ramanowski.
- Wzmocnienie rozpraszania ramanowskiego w stosunku do zwykłych warunków rejestracji widma jest rzędu 10^6 lub większe.
- 1974- Pierwsza wzmianka o zaskakująco silnym rozproszeniu ramanowskim: Fleischmann *et al.* - rejestracja widm ramanowskich pirydyny zaadsorbowanej na elektrodzie srebrowej poddanej uprzednio kilkukrotnemu cyklowi utlenianie-redukcja
- 1977 - Jeanmaire & Van Duyne oraz Albrecht & Creighton wykazują, że obserwowane w tych warunkach silne wzmocnienia sygnału ramanowskiego nie da się wyjaśnić zwiększoną powierzchnią adsorpcyjną metalu.

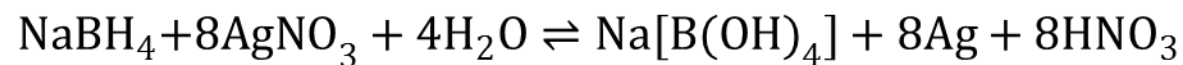
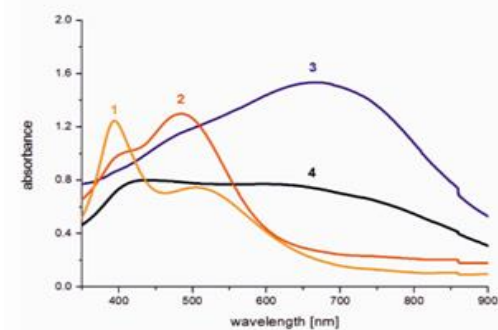
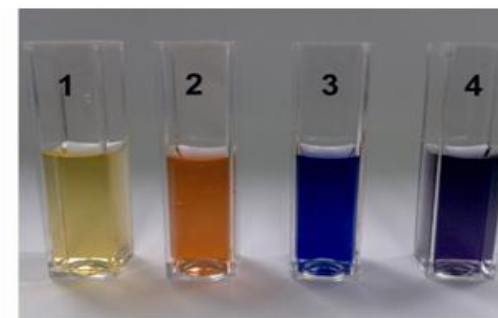
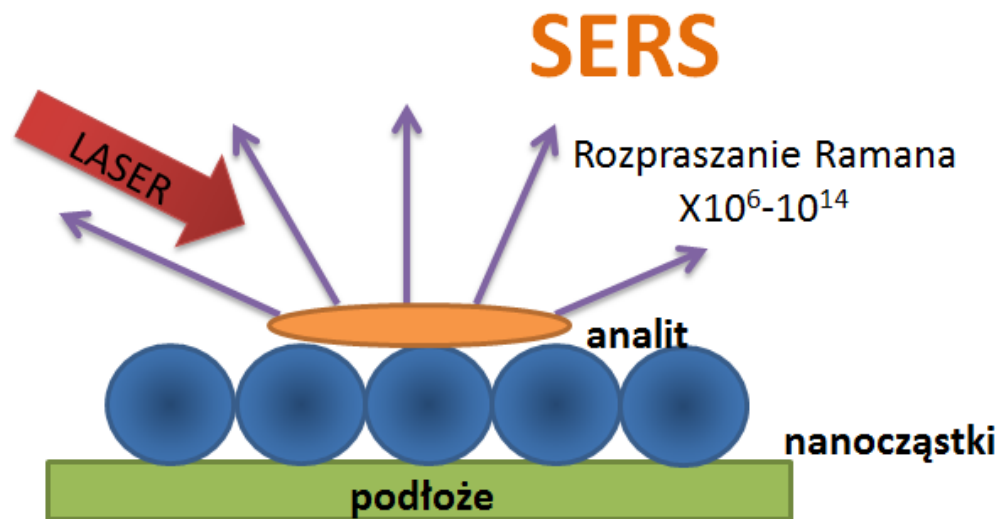


SERS - Surfes Enhanced Raman Spectroscopy

Obecnie przyjmuje się, że obserwowane wzmocnienie sygnału jest wypadkową dwóch mechanizmów: **wzmocnienia chemicznego** oraz **wzmocnienia pola elektromagnetycznego**.

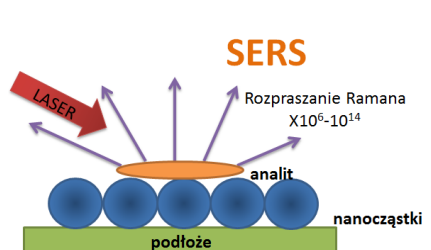


SERS - Surfes Enhanced Raman Spectroscopy



cytrynian sodu
bromek potasu
nadtlenek wodoru

SERS - Surfes Enhanced Raman Spectroscopy



Sample Details

Sample Name: seria_5_SiO2-MPTS_PO-MYCIU 3

SOP Name: mansettings.nano

General Notes: seria_5_SiO2-MPTS_PO-MYCIU_23.09.2013

File Name: seria_5_SiO2-MPTS_P...

Dispersant Name: etanol

Record Number: 5

Dispersant RI: 1,359

Material RI: 1,33

Viscosity (cP): 1,0780

Material Absorbance: 0,17

Measurement Date and Time: 23 września 2013 13:59:15

System

Temperature (°C): 25,0

Duration Used (s): 60

Count Rate (kcps): 441,4

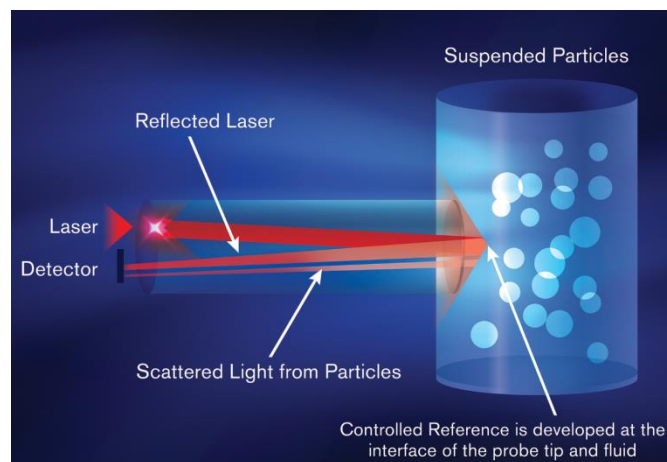
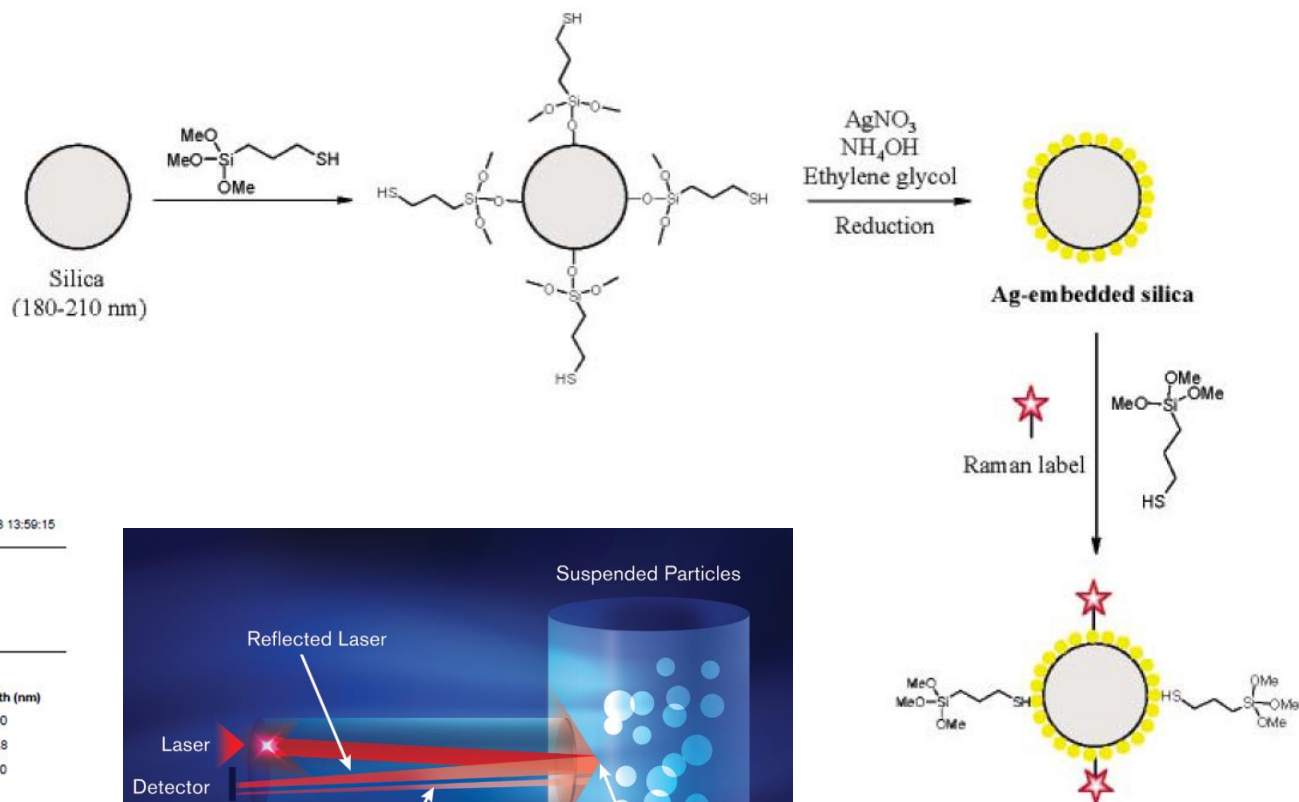
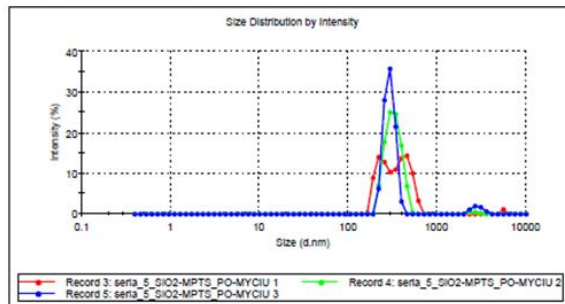
Measurement Position (mm): 0,45

Cell Description: Disposable sizing cuvette

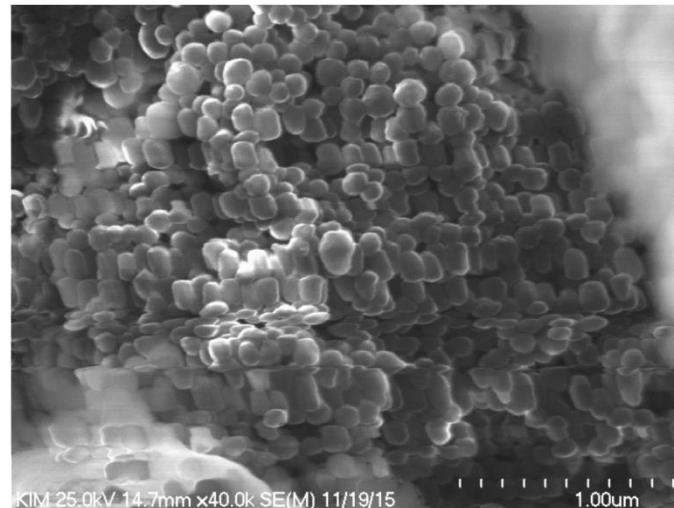
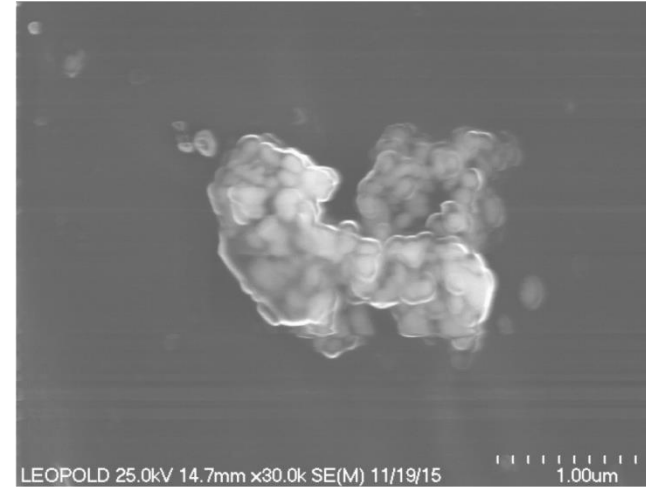
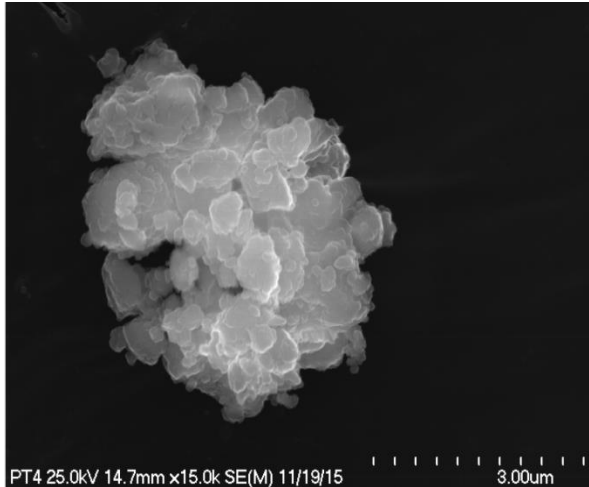
Attenuator: 4

Results

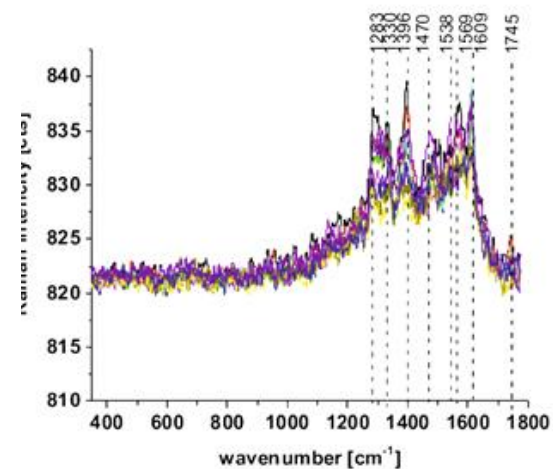
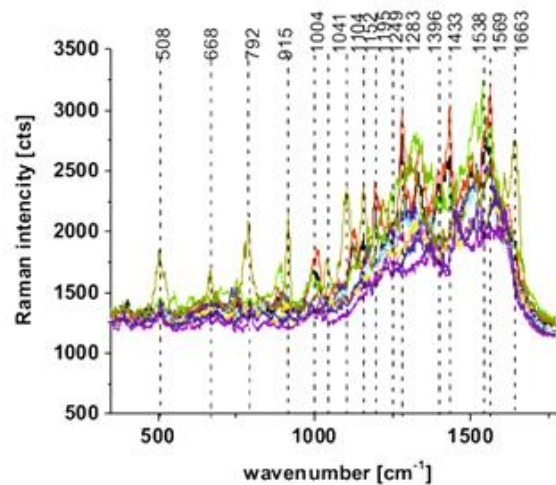
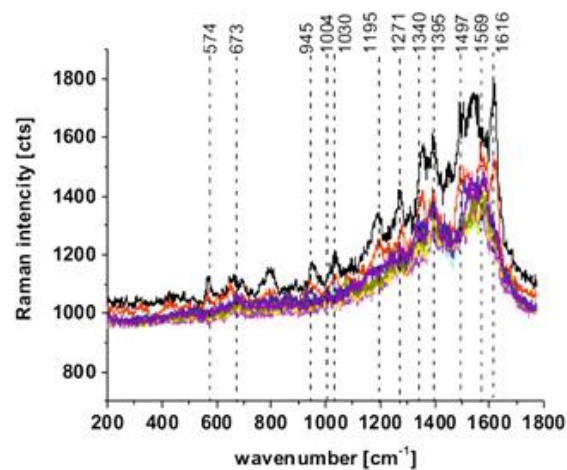
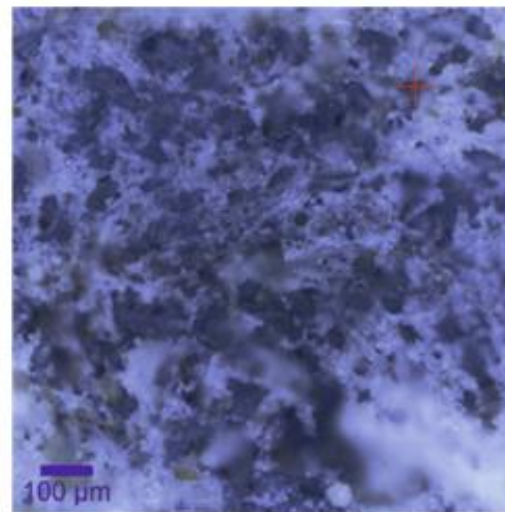
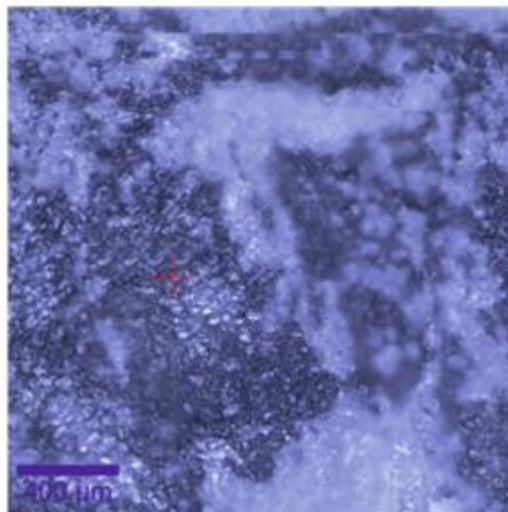
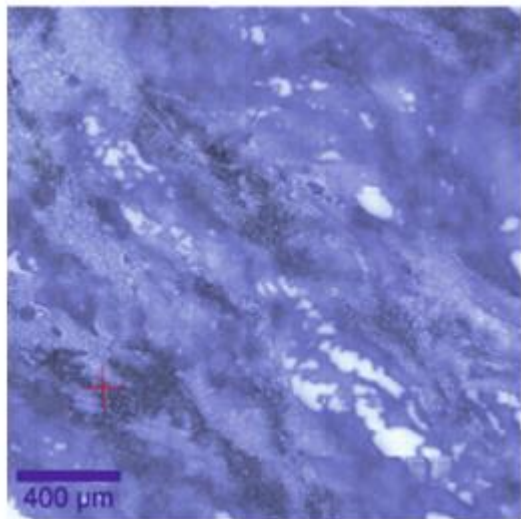
	Diam. (nm)	% Intensity	Width (nm)
Z-Average (d.nm): 384,4	Peak 1: 292,3	94,6	40,90
PdI: 0,394	Peak 2: 2836	5,4	393,8
Intercept: 0,016	Peak 3: 0,000	0,0	0,000
Result quality	Good		



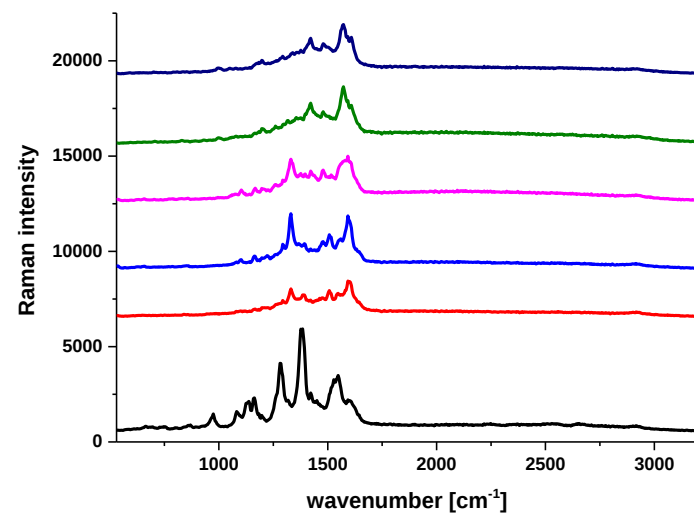
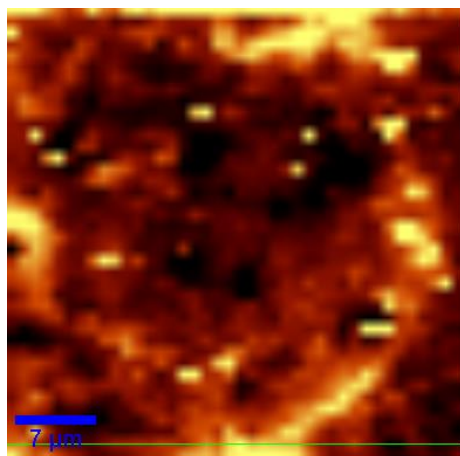
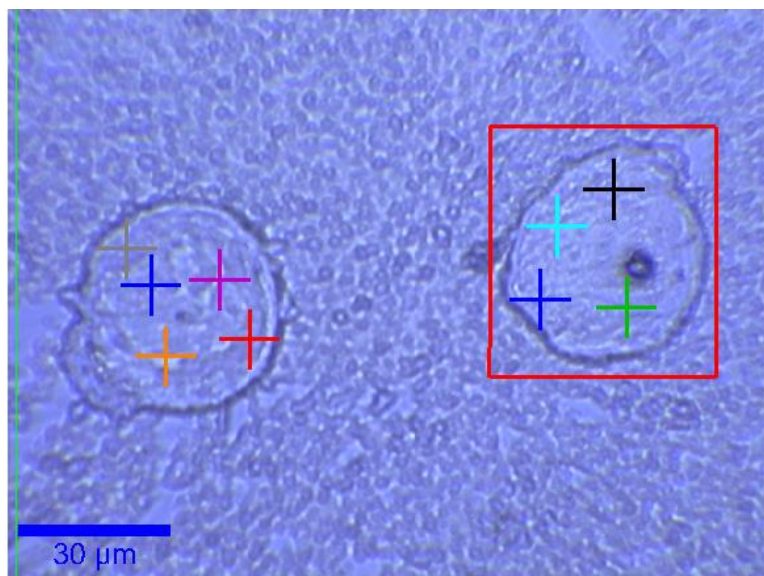
SERS - Surfes Enhanced Raman Spectroscopy



SERS Surfaces Enhanced Raman Spectroscopy

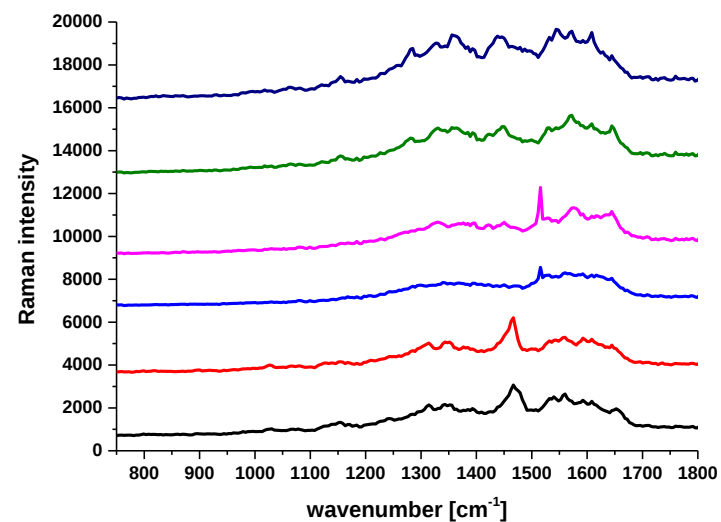


Obrazowanie Ramana ludzkich linii komórkowych SERS

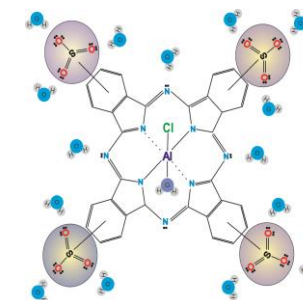
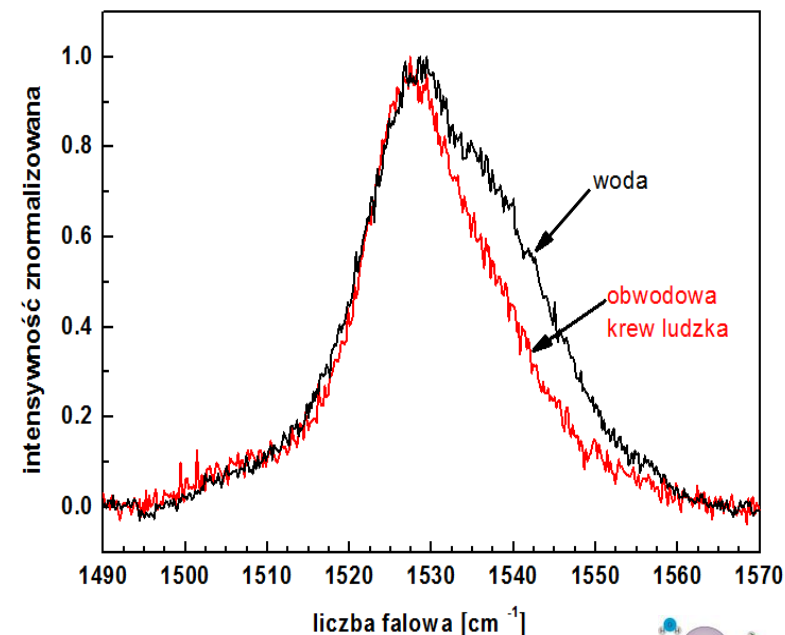
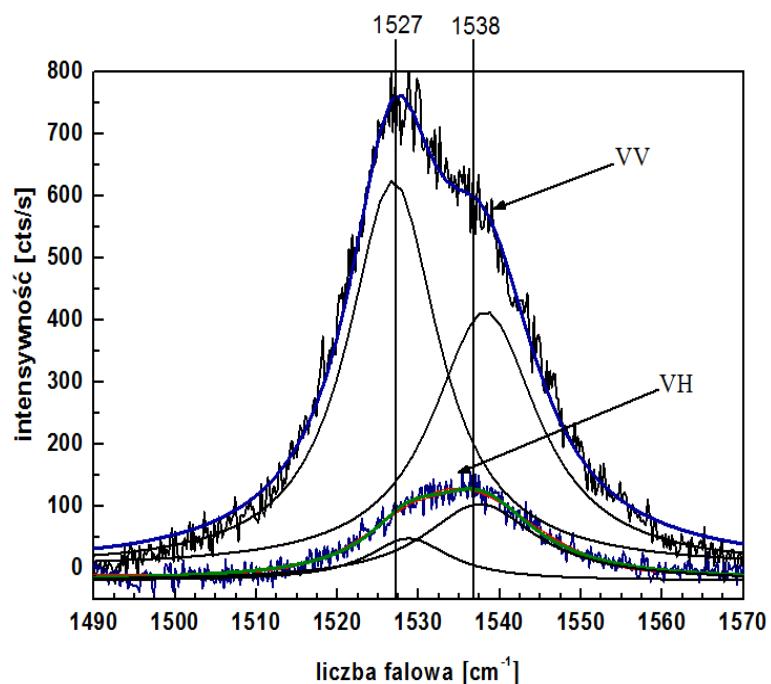


MCF7

**2 μW
0,1 sec**



Widma Ramana soli czterosodowej tetrasulfonowanej ftalocyjaniny miedzi w roztworze wodnym i krwi ludzkiej



Available online at www.sciencedirect.com

SCIENCE @ DIRECT[®]

Journal of Molecular Structure 744–747 (2005) 481–485

Journal of
MOLECULAR
STRUCTURE

www.elsevier.com/locate/molstruc

Raman spectroscopy of phthalocyanines and their sulfonated derivatives

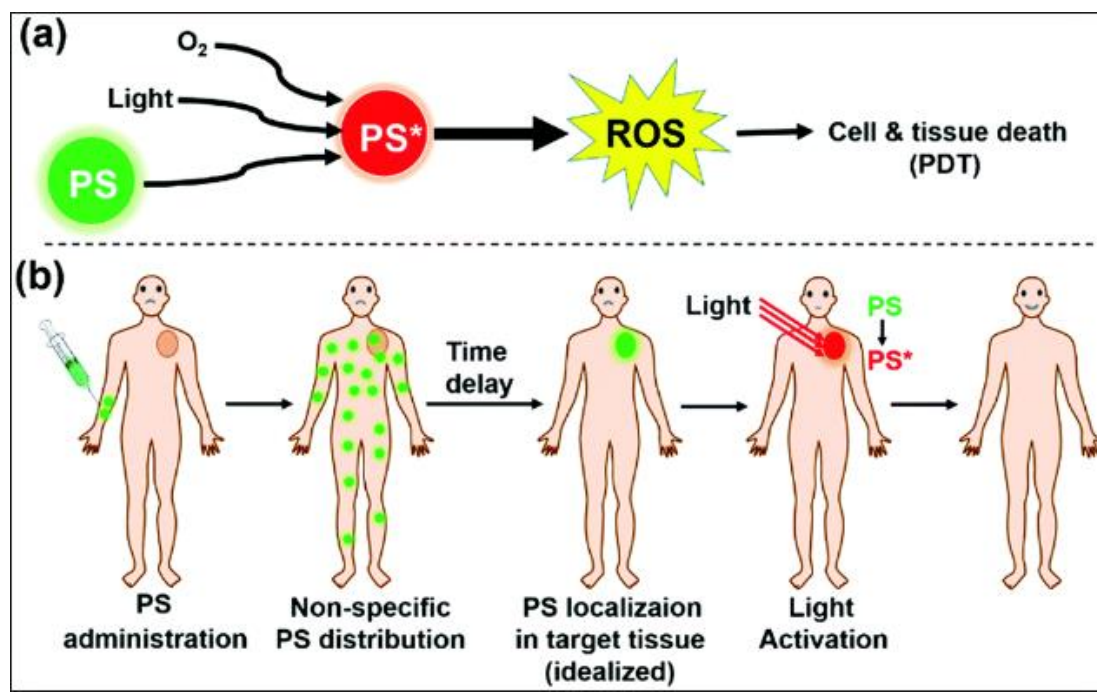
B. Brożek-Pluska^{*}, I. Szymczyk, H. Abramczyk

Technical University of Łódź, Institute of Applied Radiation Chemistry Laboratory of Molecular Laser Spectroscopy, Wroblewskiego 15 street, 93-590 Łódź;

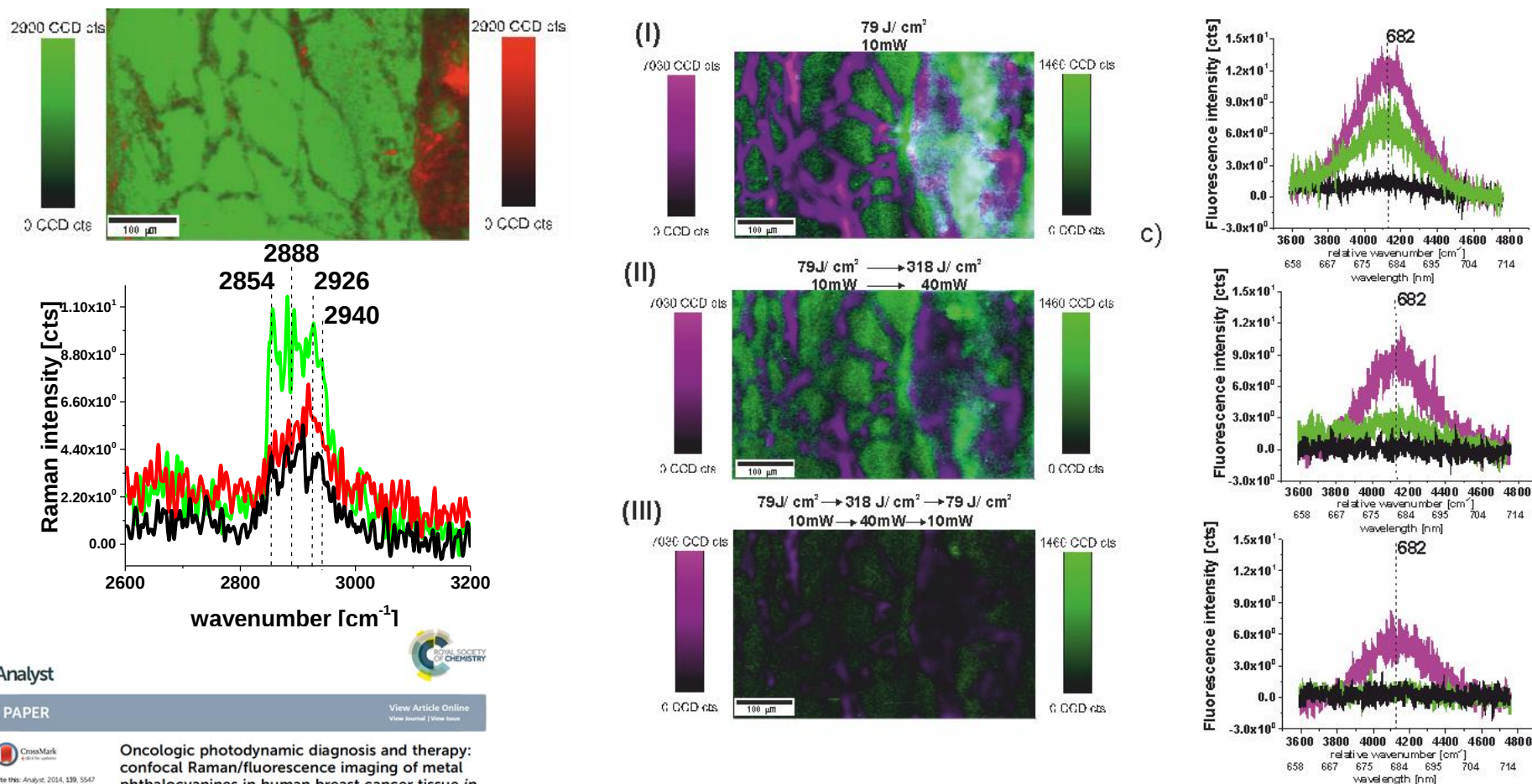
Received 18 October 2004; revised 21 December 2004; accepted 21 December 2004

Available online 3 March 2005

Mechanizm fotochemiczny oddziaływania promieniowania laserowego wykorzystuje się do biostymulacji i w metodzie fotodynamicznej. **Metoda terapii fotodynamicznej (PDT)** polega na selektywnym utlenianiu materiału biologicznego tkanki nowotworowej przez tlen singletowy lub formy rodnikowe. Pozwala, najogólniej mówiąc, na wybiórcze niszczenie tkanek nowotworowych, chroniąc jednocześnie tkanki zdrowe. Metoda ta jest stosowana w leczeniu nowotworów skóry, dróg moczowo – płciowych, płuc, przełyku, języka, gardła, jelit, pęcherza moczowego.

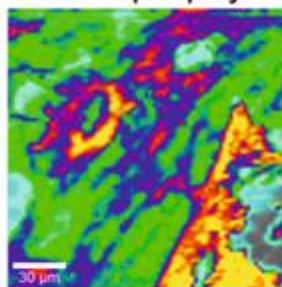


Obrazowanie Ramana tkanek ludzkiego gruczołu piersiowego zawierających ftalocyjaniny

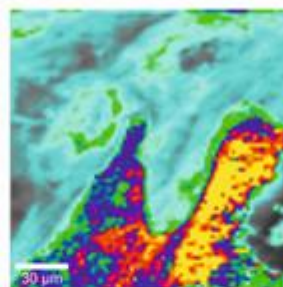


Obrazowanie Ramana tkanek ludzkiego gruczołu piersiowego zawierających porfiryny

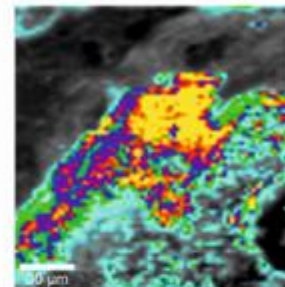
a) hematoporphyrin



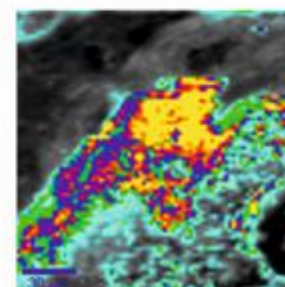
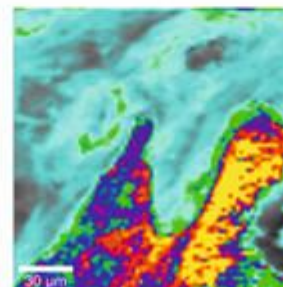
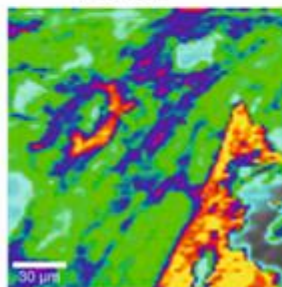
dose I



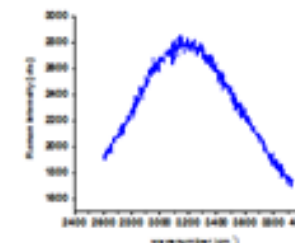
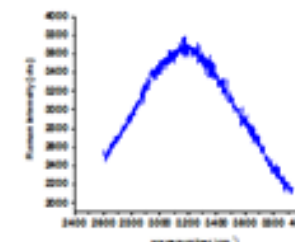
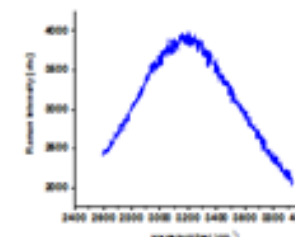
dose II



dose III



b) lipids/proteins



B. Brozek-Pluska, M.Kopec

Raman microspectroscopy of Hematoporphyrins. Imaging of the noncancerous and the cancerous human breast tissues with photosensitizers.

Spectrochimica Acta Part A, 2016 submmited

Obrazowanie Ramana



Obrazowanie Ramana

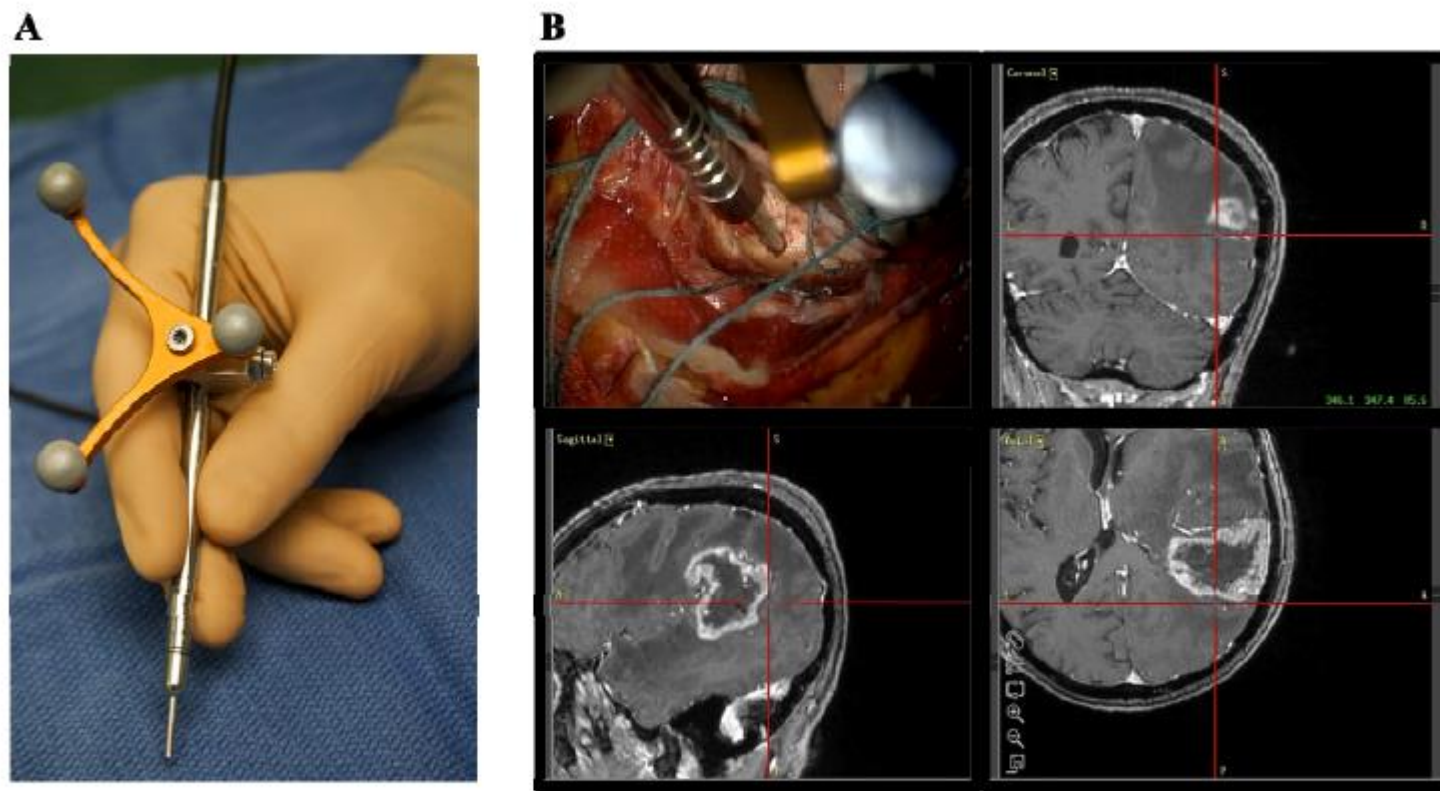
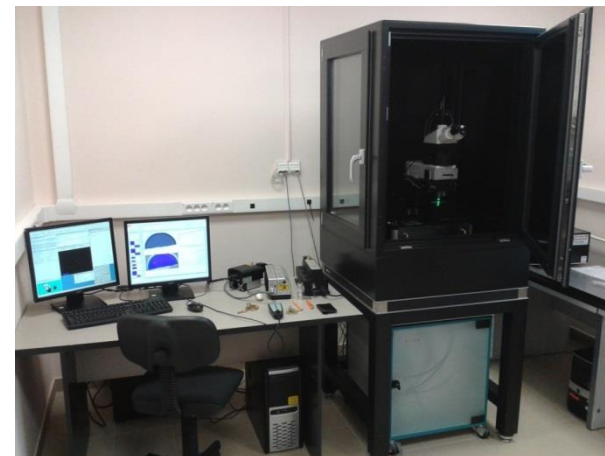
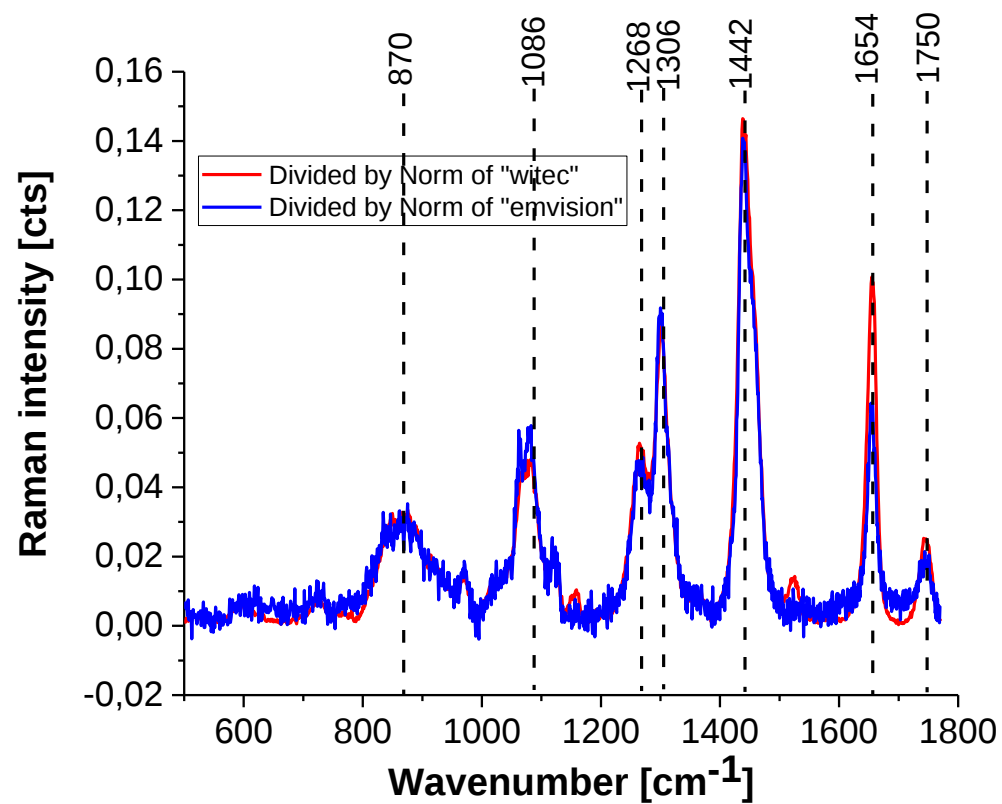
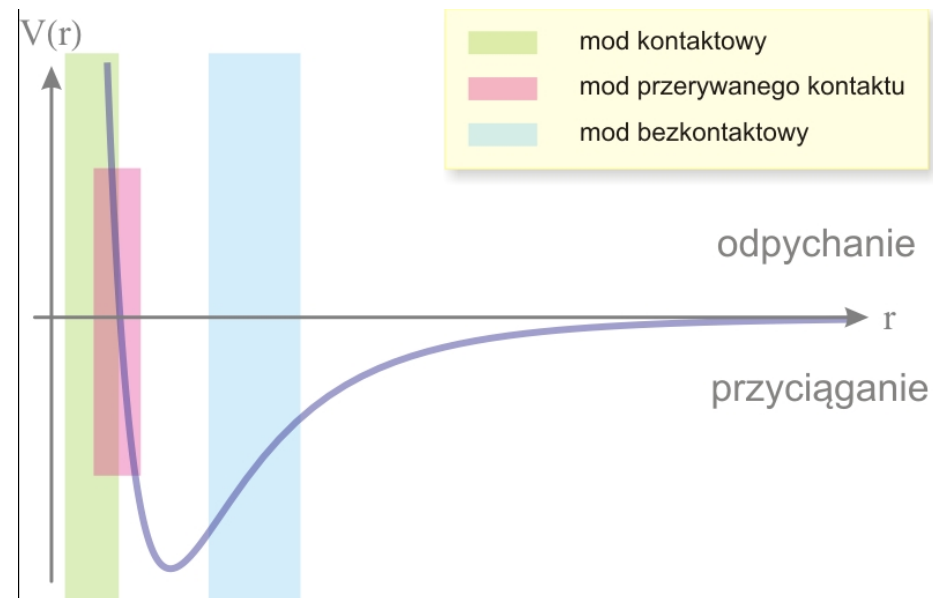
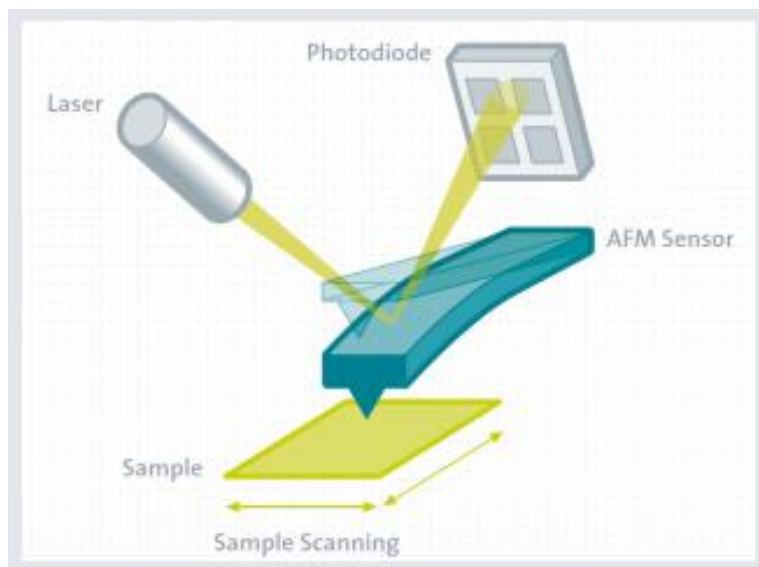


Fig. 1. Raman spectroscopy system for intraoperative detection (A) Photograph of the hand-held contact probe, with the attached neuronavigation tracking unit. (B) Illustration of the probe being used intraoperatively, with the neuronavigation system showing the location of the tip of the probe (cross hairs) on the preoperative MR images.

Obrazowanie Ramana

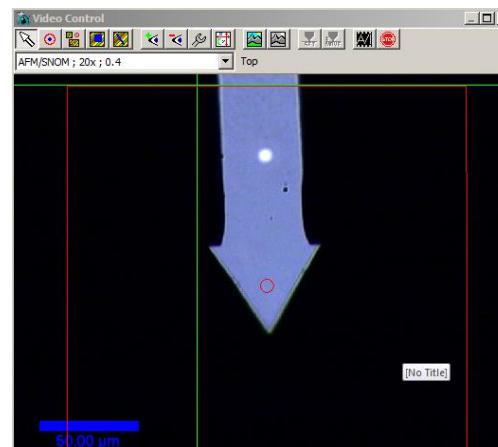


AFM



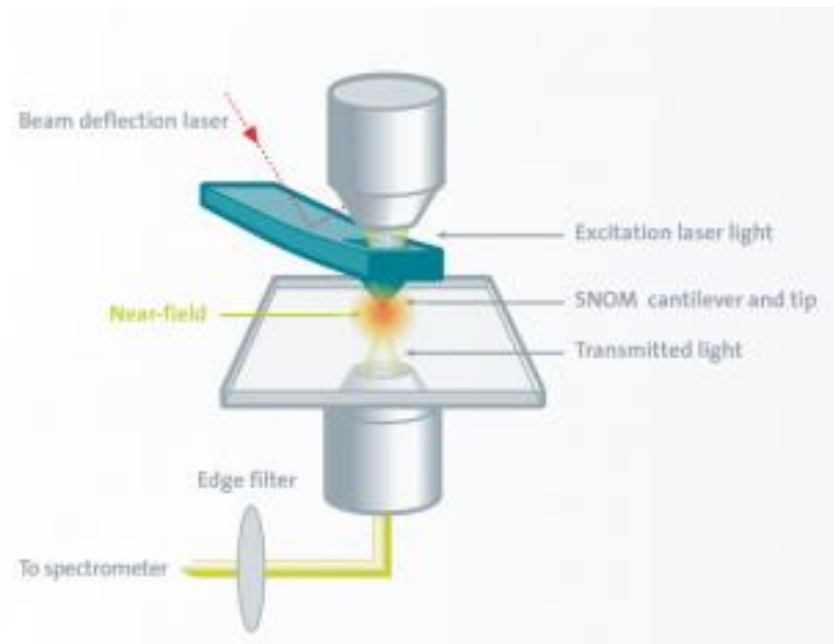
<http://www.witec.de/techniques/afm>

Tryb kontaktowy
Tryb bezkontaktowy
Tryb kontaktu przerywanego



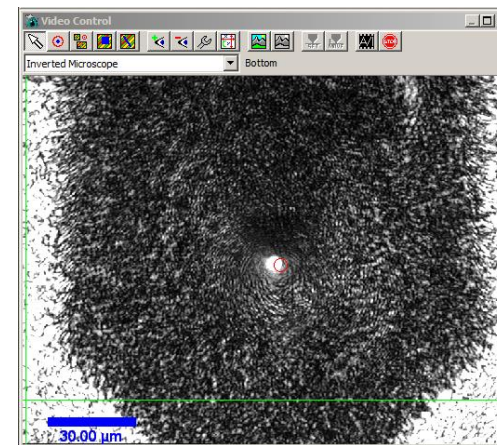
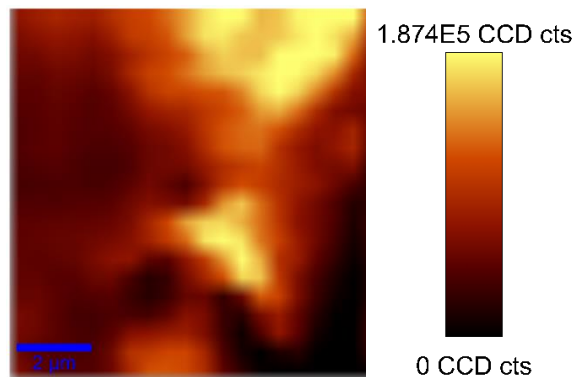
Strefy potencjału Lennarda-Jonesa wykorzystywanego przez podstawowe tryby pracy AFM-u

SNOM- scanning optical near field microscopy

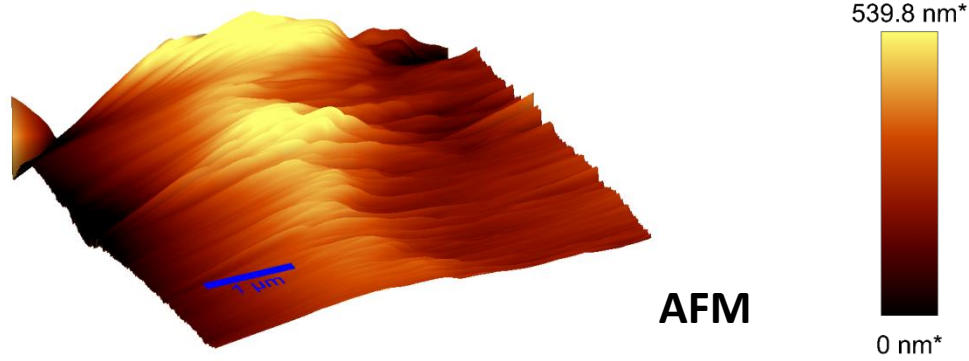
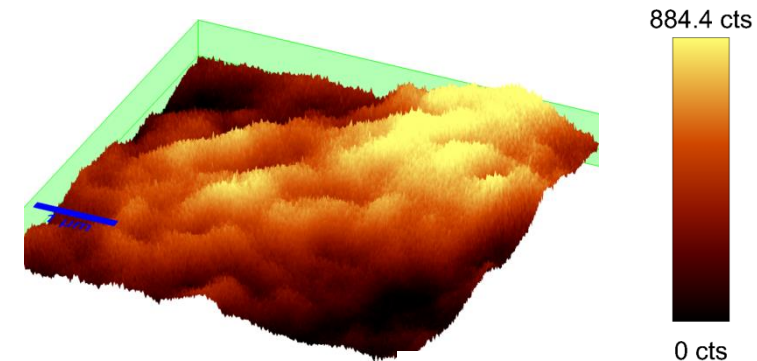


<http://www.witec.de/techniques/afm>

Raman

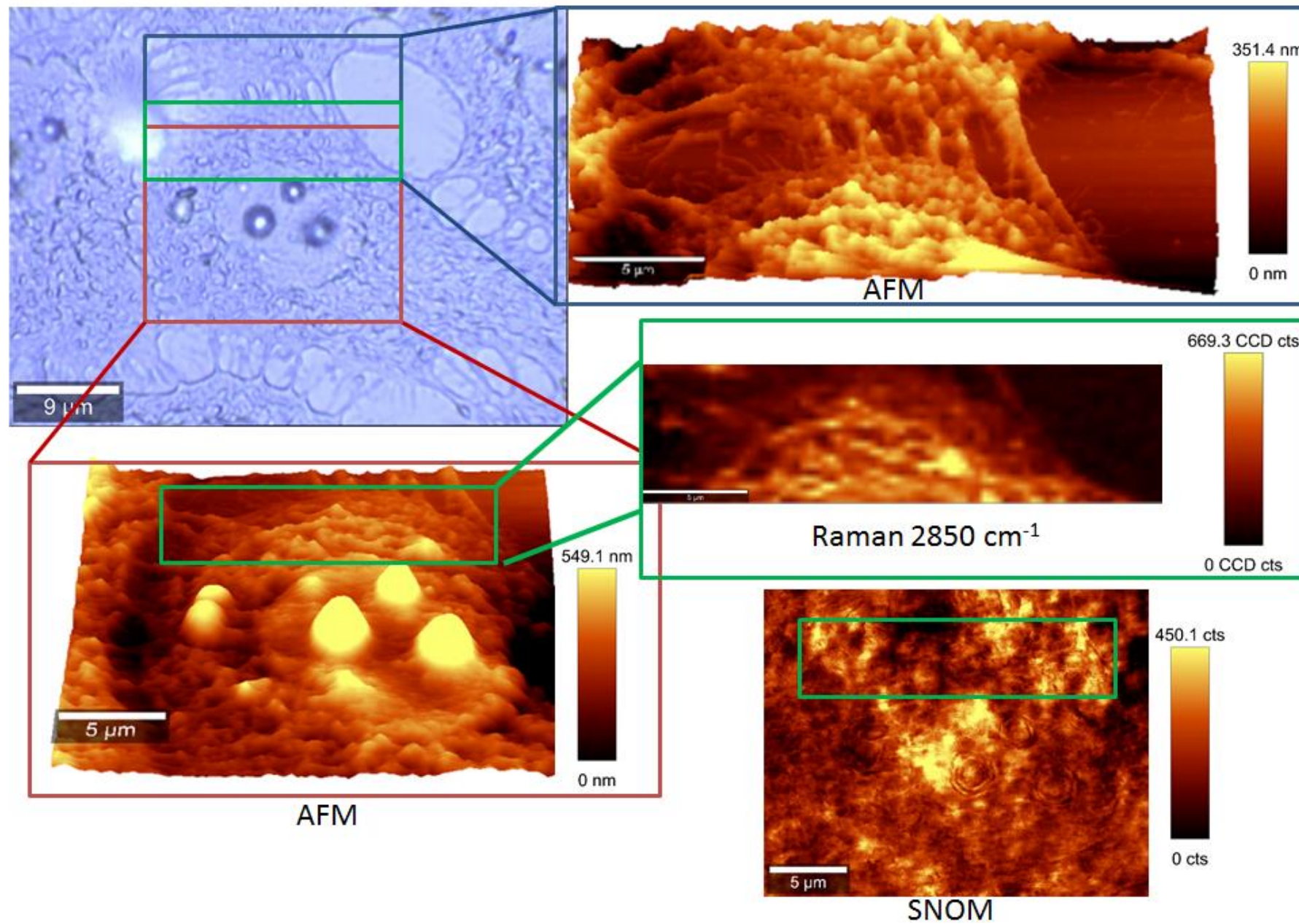


SNOM

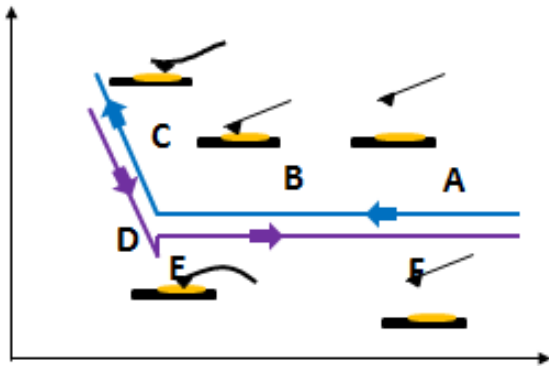


AFM

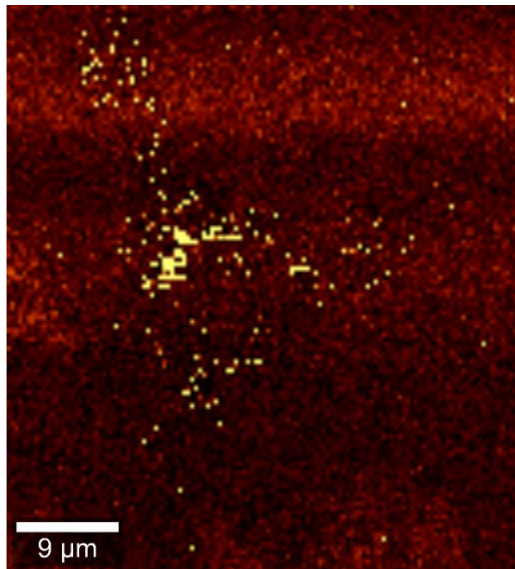
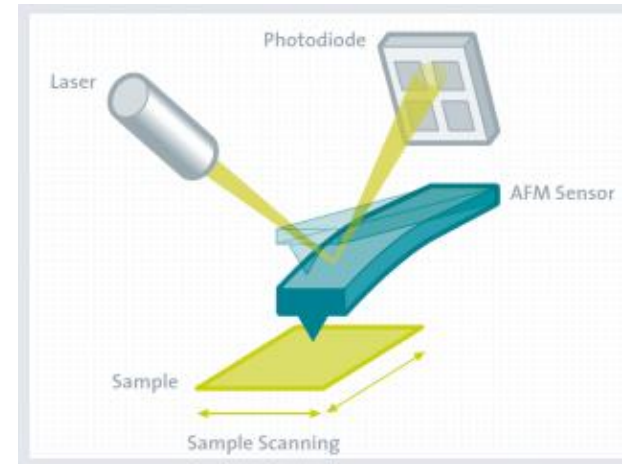
Spektroskopia i obrazowania Ramana w analizie chemicznej układów biologicznych



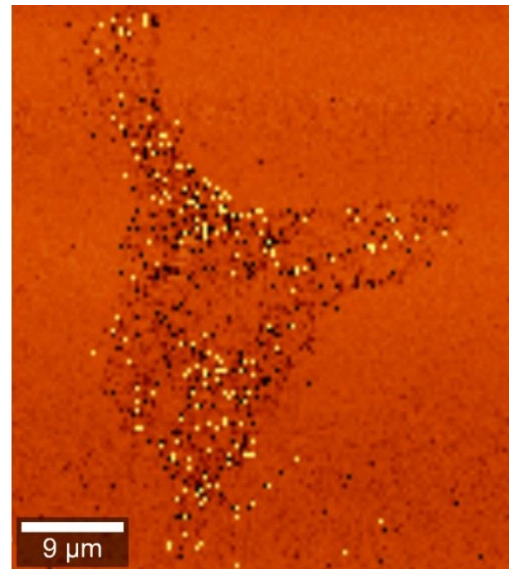
mitr.p.lodz.pl/raman



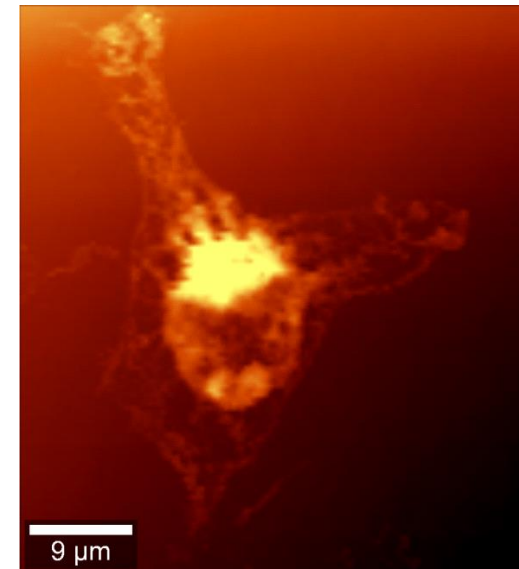
AFM



adhezja

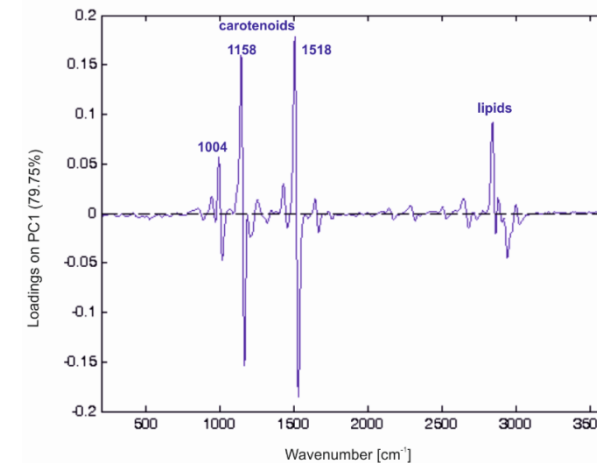
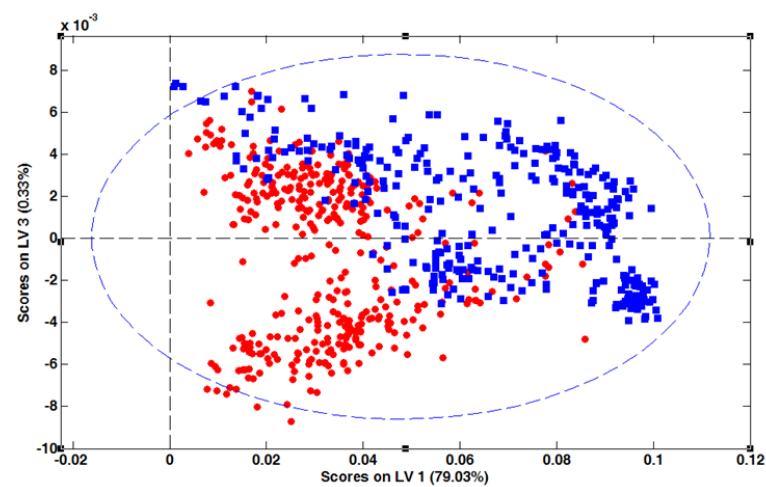
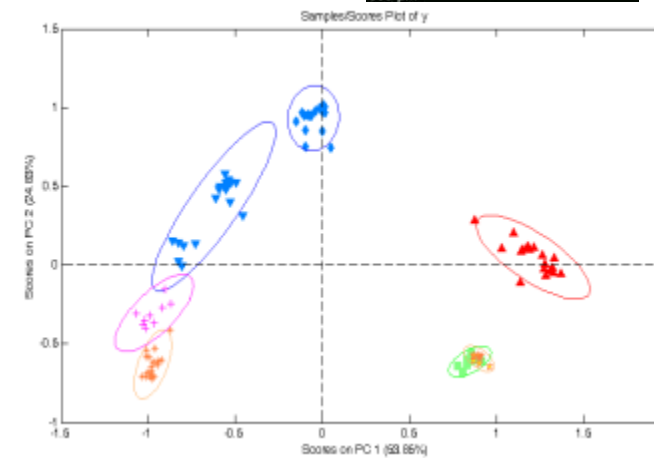
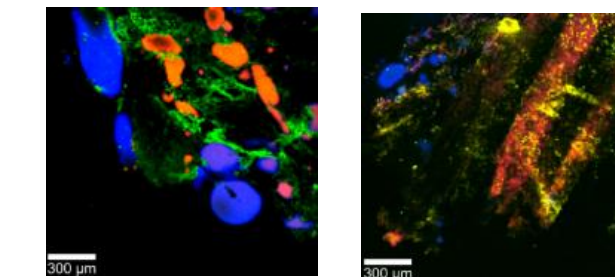
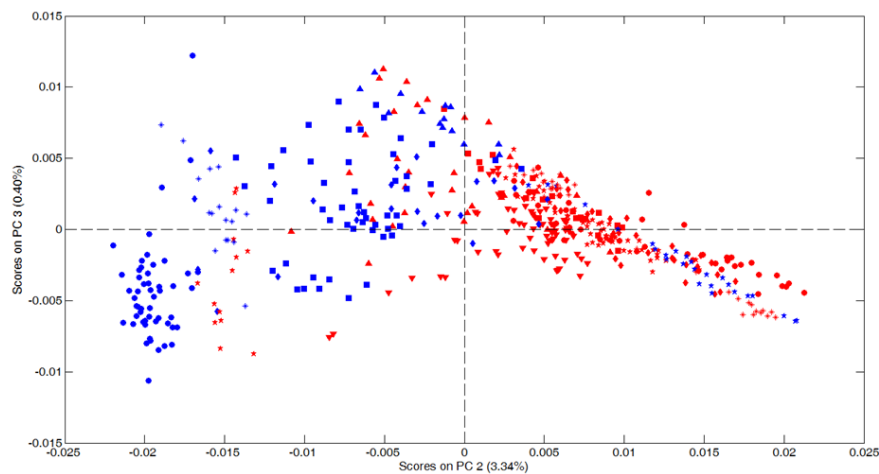


sztywność



topografia

Spektroskopia i obrazowania Ramana w analizie chemicznej układów biologicznych



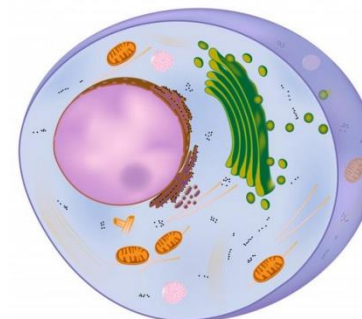
Spektroskopia i obrazowania Ramana w analizie chemicznej układów biologicznych



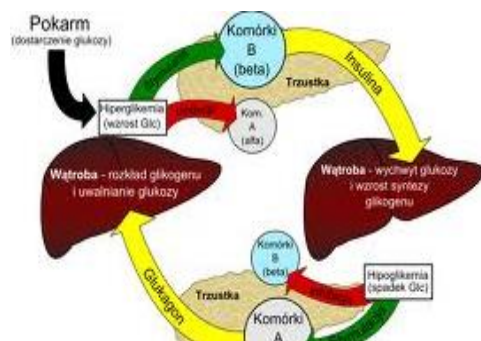
barwników



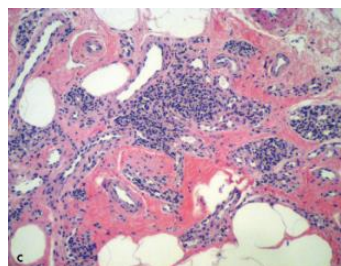
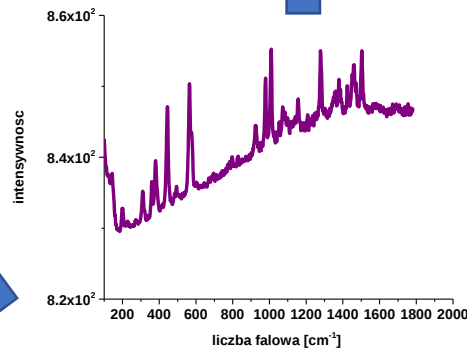
farmaceutyków



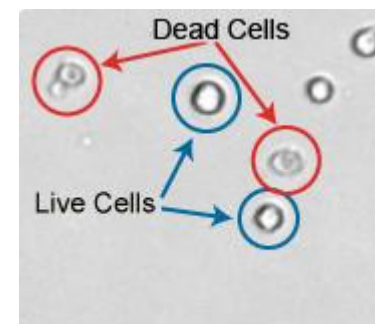
budowy komórek



metabolizmu



transformacji
nowotworowych



żywołności komórek

WNIOSKI

Zaprezentowane wyniki potwierdziły, że spektroskopia i obrazowanie Ramana jest metodą przydatną do:

- Śledzenia morfologii, biochemii oraz fotochemii wycinków ludzkiego gruczołu piersiowego oraz linii komórkowych
- wyznaczenia granicy marginesu bezpieczeństwa
- diagnostyki we wczesnych stadiach nowotworów
- wykorzystania w diagnostyce klinicznej
- dostarczenia informacji biochemicznej
- śledzenia dystrybucji różnych substancji w wycinkach ludzkiego gruczołu piersiowego oraz liniach komórkowych.