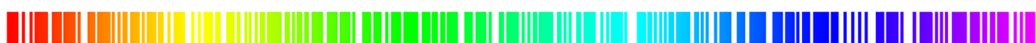


SPEKTROSKOPICKÁ SPOLEČNOST JANA MARKA MARCI



Abstrakty přednášek v sekci Mládí vpřed a plakátových sdělení

23. ročník Školy hmotnostní spektrometrie



Editoři: Josef Cvačka, Vladimír Vrkoslav, Martin Hubálek,
Mikuláš Vlk

Milovy, 5. - 9. září 2022



ÚOCHB ^{AV}_{ČR}
IOCB PRAGUE



Mládí vpřed

Mladí vězkuvníci budou prezentovat své výsledky formou krátkých přednášek v sekci Mládí vpřed ve čtvrtek 8. září 2022. Nejlepší přednáška bude oceněna „Cenou za nejlepší přednášku v sekci Mládí vpřed“. Výherce získává hrazenou účast na 24. Škole hmotnostní spektrometrie v roce 2023. Sponzorem soutěže o nejlepší přednášku v sekci "Mládí vpřed" je společnost Pragolab s.r.o.

- 16:30 - 16:45** **Aplikace hmotnostní spektrometrie v multimodální analýze metabolomu rostlinných mikrovzorků**
Petra Krejčí
- 16:45 - 17:00** **Lipidomická analýza infekčního zánětu v synoviální tekutině**
Aleš Kvasnička
- 17:00 - 17:15** **Chemical derivatization of lipids: Internal standard per each analyte**
Ondřej Peterka
- 17:15 - 17:30** **Hydrogen-deuterium exchange: The effect of domain order on modulation of fusion two-domain proteins structure and its dynamics**
Jakub Sýs
- 17:30 - 17:45** **Analýza steroidních hormonů v lidské plazmě, prostatické a testikulární tkáni**
Markéta Šimková
- 17:45 - 18:00** **Lipidomic Profiling of Biological Samples: Reversed-Phase UHPLC/MS as a Tool for Quantitative Analysis**
Zuzana Vaňková



APLIKACE HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE V MULTIMODÁLNÍ ANALÝZE METABOLOMU ROSTLINNÝCH MIKROVZORKŮ

PETRA KREJČÍ^A, JANA NÁDVORNÍKOVÁ^A, ZBYNĚK ŽINGOR^A, ŠTĚPÁN DOSTÁL^A, DOMINIKA
VYSLOUŽILOVÁ^A, LUCIE KOBRLOVÁ^B, PETR SMÝKAL^B A PETR BEDNÁŘ^A

^aKatedra analytické chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého, 17. listopadu 12, Olomouc, 771 46,
Česká republika

^bKatedra botaniky, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého, Šlechtitelů 27, 783 71, Olomouc, Česká
republika

email: petra.v.krejci@gmail.com

Vývoj nového spolehlivého protokolu pro multimodální analýzu metabolických změn rostlinných mikrovzorků byl stanoven jako hlavní cíl zde prezentovaného studentského výzkumu. Nezastupitelnou roli v určení a identifikaci celých skupin metabolitů a pozorování změn metabolomu v důsledku působení externích faktorů (např. UV záření) měla hmotnostní spektrometrie. Hmotnostní zobrazování s využitím laserové desorpce/ionizace (LDI-MSI) umožnilo rychlý screening povrchu studovaných mikrovzorků ve vztahu k degradačním procesům. Pokročilé hmotnostně spektrometrické zobrazování bylo umožněno využitím ionizace desorpčním elektrosprejem (DESI-MSI). Pro účely rychlé a přímé analýzy pevných mikrovzorků byla laboratorně modifikována próba pro hmotnostní spektrometrii se sondou pro analýzu pevných vzorků za atmosférického tlaku (ASAP-MS). Současně bylo využito spojení hmotnostní spektrometrie se separačními technikami - vysoko-účinnou kapalinovou chromatografií (HPLC/MS) a plynovou chromatografií (GC/MS) za účelem analýzy připravených mikroextraktů a pyrolýzní plynovou chromatografií (PyGC/MS) pro přímou analýzu mikrovzorků.

LDI-MSI analýza poskytla informaci o chemické odlišnosti hila (specifická oblast osemení s odlišnou strukturou a chemickým složením) izolovaného z hrachu setého oproti přilehlému pletivu. Na povrchu hila byly identifikovány rozmanité estery fenolických kyselin a alkoholů s dlouhými řetězci (20 - 28 uhlíků), příkladem takové struktury je ester kyseliny kávové a tetrakosanolu jehož signál se ztrácí v důsledku vystavení vzorků vnějším vlivům. Pomocí rychlé ASAP-MS analýzy byly identifikovány nejen výše uvedené estery, ale i další skupiny metabolitů, které jsou zapojeny v obranných procesech. Jedná se o mastné kyseliny s dlouhými řetězci a jejich hydroxylové deriváty (např. oktakosanová, hydroxy- a dihydroxyoktakosanová kyselina). Naopak mastné kyseliny s kratším řetězcem (palmitová, stearová atd.) byly ve vzorcích pozorovány i po působení vnějších faktorů bez změny intenzity signálů. Současně bylo nalezeno značné množství steroidních látek (β -sitosterol, stigmasterol atd.) vyskytujících se v mikrovzorcích osemení a s využitím cyklické iontové mobility (Cyclic IMS, Waters) byla identifikována celá řada fenolických látek (katechin, sinapová kyselina, luteolin atd.). Dosažené výsledky jsou v souladu s informacemi získanými ze separačních analýz. GC/MS analýza polárních mikroextraktů navíc poskytla doplňující informace o přítomnosti cukerných látek (např. arabinosa, erythritol a glukonová kyselina), zatímco HPLC/MS analýza pomohla odhalit látky jejichž normalizovaná intenzita signálu významně narostla (myricetin, xanthoxin atd.) nebo se naopak snížila (camalexin, robinetidinol atd.) v důsledku vystavení studovaného materiálu vnějším stresovým faktorům. Pokročilé DESI-MSI experimenty umožnily zobrazit rozložení vybraných skupin metabolitů na povrchu studovaných

mikrovzorků. PyGC/MS je v současnosti aplikována ke studiu cukerných složek buněčné stěny a dosažené výstupy jsou porovnávány s ASAP-MS technikou a GC/MS analýzou.

Využití hmotnostní spektrometrie v kombinaci s odlišnými ionizačními technikami a její spojení s technikami separačními se zdá být vhodným přístupem pro sledování metabolického profilu v multimodální analýze zahrnující v celém svém konceptu mikromanipulaci, mikroskopickou analýzu a neinvazivní a invazivní analytické techniky. Výstupy z jednotlivých přístupů se vzájemně doplňují a poskytují ucelenou informaci o metabolomu studovaného rostlinného materiálu. Současně jsou získávány cenné informace o ochranné funkci vybraných metabolitů v působení proti vnějším faktorům.

Poděkování patří OP RDE projektu DSGC-2021-0102: "Multimodal analysis of plant metabolites and their degradation products in microsamples" (CZ.02.2.69/0.0/0.0/19_073/0016713).

LIPIDOMICKÁ ANALÝZA INFEKČNÍHO ZÁNĚTU V SYNOVIÁLNÍ TEKUTINĚ

ALEŠ KVASNIČKA¹, DAVID FRIEDECKÝ¹, EVA KRIEHOVÁ², JIŘÍ GALLO³

¹Laboratoř dědičných metabolických poruch, Oddělení klinické biochemie, Fakultní nemocnice Olomouc a Lékařská fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci, Česká republika

²Ústav imunologie, Lékařská fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci, Česká republika

³Ortopedická klinika, Fakultní nemocnice Olomouc a Lékařská fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci, Česká republika

email: ales.kvasnicka@upol.cz

Synoviální tkáň je hlavním cílem zánětu u revmatoidní artritidy, spondyloartropatií, osteoartrózy (OA) i infekčních artritid. Odpovídá mimo jiné za tvorbu synoviální tekutiny, která je v těsném kontaktu se všemi kloubními kompartmenty. Tím se stává mimořádně užitečným materiálem ke klinické diagnostice i výzkumným účelům pro posouzení aktuálního stavu postiženého kloubu, ale i stupně jeho poškození. Ve výpotku se s narůstající intenzitou a typem zánětu mění množství a zastoupení imunitních buněk, synovialis hypertrofuje, dochází k proliferaci a hyperplazii buněk výstelkové vrstvy, k fibrotizaci a zvýšené vaskularitě podkladové vrstvy, což bývá spojené s invazí imunitních buněk. Rychlé a přesné odlišení infekčního od aseptického zánětu je klíčové pro správný léčebný postup.

S ohledem na komplexní patofyziologické změny v souvislosti se zánětem v synoviální tkáni a okolní tekutině se nabízí studovat tyto procesy z pohledu lipidomiky. Lipidy jsou bioaktivní molekuly, které se v buňkách podílí na signalizaci a regulaci mnoha procesů jako je buněčná smrt, proliferace nebo právě zánět. Dalším faktorem je vliv rezidentních nebo rekrutovaných imunitních buněk, které mohou v synoviální tkáni vylučovat bioaktivní lipidové mediátory. Mimo známé zástupce pro- a proti- zánětlivých lipidů jako jsou oxylipiny, nebo volné a vázané polynenasycené mastné kyseliny se v poslední době ubírá pozornost také ke glycerofosfolipidům a sfingolipidům, které byly v souvislosti se zánětem doposud studovány méně. V nedávných studiích byly objeveny některé prozánětlivé glycerofosfolipidy, ale také specifické ceramidy, které jsou při zánětlivých procesech zvýšené, zatímco jiné ceramidy, sfinganin a dihydroceramidy byly spojeny se snížením zánětu.

Cílem naší studie bylo vyhodnotit potenciál lipidomické analýzy synoviální tekutiny v diagnostice infekčního zánětu a na základě změn v lipidomu popsat jeho patobiochemický mechanismus na úrovni lipidů. V pilotní studii bylo analyzováno 14 vzorků s prokázaným infekčním zánětem a 96 vzorků synoviální tekutiny získané od pacientů s OA. Pomocí pseudocílené lipidomické analýzy RPLC(C8)-MS/MS(QTRAP) se simultánním přepínáním polarit bylo v synoviální tekutině identifikováno a semikvantifikováno přes 650 lipidů spadajících do 20 lipidových tříd a podtříd. Na základě supervizovaného vícerozměrného statistického modelu OPLS-DA byly vzorky s infekčním zánětem klasifikovány se 100 % úspěšností. Lipidom vzorků s infekčním zánětem vykazoval snížené hladiny specifických lysofosfatidylcholinů a hexosylceramidů a naopak zvýšené byly hladiny fosfatidylcholinů a lysofosfatidylcholinových plasmalogenů. Získané výsledky napomohou lepšímu porozumění patobiochemické a patofyziologické povahy infekčního procesu v synoviálním kloubu. V případě replikace našich výsledků se nabízí zavedení metody do klinické praxe, což by mohlo dále zpřesnit diagnostiku a terapii infekčních artritid.

Grantová podpora: MZ ČR AZV NU20-08-00367 a AZV NU21-06-00370.

CHEMICAL DERIVATIZATION OF LIPIDS: INTERNAL STANDARD PER EACH

ANALYTE

PETERKA O., JIRÁSKO R., VAŇKOVÁ Z., HOLČAPEK M.

University of Pardubice, Faculty of Chemical Technology, Department of Analytical Chemistry, Studentská 573,
532 10 Pardubice, Czech Republic

Chemical derivatization of lipid functional groups can improve extraction efficiency, chromatographic separation, and sensitivity. Benzoyl chloride is a non-hazardous derivatization agent with high reactivity for several functional groups producing esters with the hydroxyl group, amides with the amino group, and anhydrides with the carboxylic group. The benzoylation method increased the sensitivity 2 to 10-fold for almost all investigated lipid classes and even more than 100-fold for monoacylglycerols compared to the non-derivatization approach. Moreover, it helps to easier identification and accurate quantitation using H/D pooling, which means the mixing of non-labelled derivatives (H) and labelled derivatives (D) in the same ratio. Reversed-phase liquid chromatography enables to resolve isomeric lipids, such as the fatty acyl level and fatty acyl positions on the glycerol skeleton, but for accurate quantitation must be used a large number of internal standards. Our derivatization method creates an internal standard per each derivatized lipid and coelution of analyte and standard ($\Delta RT \pm 0.1$ min), ensuring the same matrix effect and ionization efficiency. Labeled derivatives are used as an internal standard mixture, producing the identical lipidomic profile and corresponding concentration for all analytes. The created doublets in the mass spectrum with known $\Delta m/z$ facilitate identification and bring the next parameter for a high confidence level of the identification. The method was validated and used for targeted quantitative analysis and lipidomic differences between healthy controls and cancer patients were investigated.

This work was supported by Czech Science Foundation (GAČR) project No. 21-20238S.

HYDROGEN-DEUTERIUM EXCHANGE: THE EFFECT OF DOMAIN ORDER ON MODULATION OF FUSION TWO-DOMAIN PROTEINS STRUCTURE AND ITS DYNAMICS

JAKUB SÝS^{1,2}, KRISTÝNA BOUŠOVÁ³, MARTIN HUBÁLEK², JIŘÍ VONDRÁŠEK³

¹ Department of Biochemistry and Microbiology, University of Chemistry and Technology Prague, Technická 5,
166 28 Prague 6, Czech Republic

² Mass Spectrometry, Institute of Organic Chemistry and Biochemistry of the Czech Academy of Science,
Flemingovo náměstí 542, Prague 6, Czech Republic

³ Bioinformatics, Institute of Organic Chemistry and Biochemistry of the Czech Academy of Science, Flemingovo
náměstí 542, Prague 6, Czech Republic

e-mail: jakub.sys@uochb.cas.cz

The properties of the majority of proteins are determined by protein domains embedded in their sequences and hypothetically, each domain structure or function could be more or less influenced by close domain neighbours. To address this hypothesis, we used hydrogen-deuterium exchange structural method (HDX-MS) to investigate possible perturbations in structure of PDZ3 domain of Zonula occludens-1 protein (PDZ3). This domain has a natural peptide ligand with known binding site. We took PDZ3 domain and fused with TrpCage, in silico designed artificial domain, in both forward (PDZ3-TrpCage: PsLT) and reverse (TrpCage-PDZ3: TILP) version of protein sequence. Our aim was to determine peptide regions directly influenced by TrpCage presence and find the differences between PsLT and TILP proteins. Using HDX-MS we identified the PDZ3 regions with increased accessibility in PsLT and TILP showing that TrpCage destabilizes the PDZ3 structure. Moreover, the PDZ3 peptides with different behaviour in PsLT compared to TILP were localized in ligand binding site suggesting that TrpCage affects also function of PDZ3. Subsequently, it was confirmed by further experiments with JAMAP6 ligand, which, surprisingly, counteract the effect of TrpCage more effectively in TILP compared to PsLT. According to our results, we suggest the methodology how to study the domain structural differences in the context of other domains using HDX-MS.

ANALÝZA STEROIDNÍCH HORMONŮ V LIDSKÉ PLAZMĚ, PROSTATICKE A TESTIKULÁRNÍ TKÁNI

MARKÉTA ŠIMKOVÁ^{A,B}, LUCIE KOLÁTOROVÁ^A, PAVEL DRAŠAR^B, JANA VÍTKŮ^A

^aEndokrinologický ústav, Národní 8, 11694, Praha

^bVysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 16628, Praha

email: msimkova@endo.cz

Vývoj robustní a rychlé metody s jednoduchou přípravou vzorků pro analýzu C₁₈-, C₁₉-, C₂₁-steroidů je předmětem zájmu mnoha výzkumných skupin. Je známo, že koncentrace steroidních hormonů v krvi plně nereflektují aktuální situaci v místě svého účinku. Analýza intraprostatických a intratestikulárních steroidů tak hraje zásadní roli v mapování patofyziologických stavů mužského reprodukčního systému

Cílem studie bylo vyvinout a validovat robustní LC-MS/MS metodu pro analýzu steroidních hormonů v lidské plazmě, a následně ji optimalizovat pro analýzu v prostatické a testikulární tkáni.

Vyvinutá metoda umožňuje kvantifikaci 22 steroidů bez nutnosti jakékoli derivatizace a dalších 10 steroidů derivatizovaných 2-fluor-1-methylpyridinium *p*-toluensulfonátem. Separace analytů bylo dosaženo na reverzní fázi s využitím kolony Kinetex C18 (100 mm × 3.0 mm, 2.6 μm) při gradientové eluci v systému methanol-voda s přidávkem 0,1% kyseliny mravenčí pro podporu pozitivní ionizace molekul.

Validace v plazmě prokázala, že metoda je použitelná pro kvantitativní analýzu dvou C₁₈-steroidů (estron, estradiol), devatenácti C₁₉-steroidů (testosteron, epitestosteron, dihydrotestosteron, 11-ketodihydrotestosteron, 11p-hydroxyandrostendion, 11p-hydroxytestosteron, 11-ketotestosteron, dehydroepiandrosteron (DHEA), 7α-hydroxyDHEA, 7β-hydroxyDHEA, 7-ketoDHEA, androsteron, epiandrosteron, androstendion, androstendiol, 5α-androstan-3α,17β-diol, 5α-androstan-3β,17β-diol, 3α,17β-diol, 5β-androstan-3β,17β-diol) a jedenácti C₂₁-steroidů (kortizol, 21-deoxykortizol, 11-deoxykortizol, kortizon, kortikosteron, 11-deoxykortikosteron, pregnenolon, progesteron, progesteron, progesteron, progesteron, 17-hydroxyprogesteron, 5α-dihydroprogesteron). Dolní limity kvantifikace v plazmě se pohybují od 0,017 do 7,32 ng/ml. Validací parametry (specifita, reprodukovatelnost, opakovatelnost, výtěžnost) a výsledky stabilitních testů jsou v souladu se směrnici FDA.

Byly testovány různé způsoby preanalytického zpracování tkání, optimalizované podmínky pro analýzu prostatické a testikulární tkáně budou diskutovány.

Šimková, M.; Kolátorová, L.; Drašar, P.; Vítků, J., An LC-MS/MS method for the simultaneous quantification of 32 steroids in human plasma. *Journal of chromatography B*, Volumes 1201–1202, 2022.

Podpořeno granty AZV ČR NU21J-01-00040 a MZ ČR – RVO (Endokrinologický ústav - EÚ, 00023761).

LIPIDOMIC PROFILING OF BIOLOGICAL SAMPLES: REVERSED-PHASE UHPLC/MS AS A TOOL FOR QUANTITATIVE ANALYSIS

ZUZANA VAŇKOVÁ, ONDŘEJ PETERKA, ROBERT JIRÁSKO, MICHAL HOLČAPEK

University of Pardubice, Faculty of Chemical Technology, Department of Analytical Chemistry, Studentská 573,
532 10 Pardubice, Czech Republic

Lipidomics is a subgroup of metabolomics aimed at the analysis of lipid species. Lipids play important roles in cells, and their dysregulation is related to serious diseases, e.g., various types of cancer. Mass spectrometry is the primary technique for lipid analysis, and the connection with separation methods enables the identification and quantification of a large number of lipids from various lipid categories. This work aimed to develop a robust and high-throughput quantitative method for the analysis of serum samples of pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) patients. The experiments were performed using reversed-phase ultrahigh performance liquid chromatography coupled with high-resolution mass spectrometry (RP-UHPLC/MS). The regular retention behavior of logical series differing in the number of carbon atoms or double bonds in RP mode supports highly confident identification. Moreover, this methodology can distinguish isobaric molecules and thus provide more comprehensive coverage of lipidomic quantitation in comparison to the lipid class separation approaches. For the quantification of individual lipids, a mixture of 29 internal standards from 14 lipid subclasses was used. Data were processed utilizing Waters tools. Simca software was applied for multivariate data analysis, where statistical projection methods (e.g., PCA, OPLS-DA, S-plot, VIP values, and box plots) were applied to visualize the results. A simplified lipid metabolism network (created in Cytoscape software) presents the T-test results used to compare healthy controls and cancer patients.

This work was supported by the Czech Science Foundation (GAČR) project No. 21-20238S.

SEKCE PLAKÁTOVÝCH SDĚLENÍ

Sdělení s lichými pořadovými čísly budou prezentována v úterý 6. září 2022, 13:00 - 13:45 a ve čtvrtek 8. září 2022, 18:30 - 19:15. Sdělení se sudými pořadovými čísly budou prezentována v úterý 6. září 2022, 18:15 - 19:00 a ve čtvrtek 8. září 2022, 13:00 - 13:45. Tři nejlepší plakátová sdělení budou oceněna „Cenou za nejlepší plakátové sdělení“. Výherci získají hrazený registrační poplatek na příští Školu hmotnostní spektrometrie v roce 2023. Sponzorem soutěže je společnost Pragolab s.r.o.

1. **Bednařík A.**, Koktavá M., Valášek J., Bezdeková D., Prysiazhyi V., Adamová B., Beneš P., Navrátilová J., Hendrych M., Vlček P., Preisler J.

Zobrazovací hmotnostní spektrometrie mastných kyselin a jejich izomerů metodou laserové ionizace za pomoci oxidu kovu.

2. **Bílková A.**, Knapová P., Jiroušová D.

Stanovení captanu metodou LC-MS/MS v jablkách

3. **Crha T.**, Pazourek J.

Determination of carbohydrates profile in milk and special infant's formulas by HPLC with ELS and MS detection

4. **Hladík P.**, Pěňčík A., Petřík I., Žukauskaite A., Novák O.

Kvantitativní analýza nových indolových sloučenin v rostlinách

5. **Hořejší K.**, Chunsheng J., Vaňková Z., Jirásko R., Strouhal O., Melichar B., Teneberg S., Holčapek M.

Comprehensive Characterization of Glycosphingolipids in Human Pancreatic Cancer Tissues Reveals Different Lipid Profiles

6. **Chmelařová H.**, Catapano M. C., Nováková L.

Porovnání profilů nečistot v přípravcích levothyroxinu s využitím UHPLC-DIA-HRMS

7. **Ivanovová E.**, Pisklákova B., Friedecká J., Krystyník O., Friedecký D., Karásek D.

LC-MS/MS analýza mastných kyselin s krátkým řetězcem a jejich derivátů v plasmě žen s gestačním *diabetes mellitus*

8. **Kaleta M.**, Oklešťková J., Novák O.

Simultaneous determination of neuroactive steroids in human serum by UHPLC-MS/MS

9. **Koktavá M.**, Bednařík A., Preisler J.

Porovnání dvou technik stanovení těžkých látek: ionizace pomocí iontů kovů a ionizace nízkoteplotním plazmatem

10. **Kolářová D.**, Peterka O., Jirásko R., Holčapek M.

Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography - Mass Spectrometry for Distinguishing Isomeric Classes of Sphingolipids in Human Plasma

11. **Kučera L.**, Moos M., Štětina T., Korbelová J., Vodrážka P., Des Marteaux L., Grgac R., Hůla P., Rozsypal J., Faltus M., Šimek M., Sedlacek R., Košťál V.

A mixture of innate cryoprotectants is key for freeze tolerance and cryopreservation of a drosophilid fly larva

12. **Machova L.**, Svarcova M., Jasica A., Awokunle Holla S., Grasserova A., Semerad J., Cmokova A., Kolarik M.

Solving the mystery of the intriguing odor of dermatophytes

13. **Meledina A.**

Vývoj proteomických technik pro rozlišení živočišného původu recentních a historických kostí

14. **Novotný O.**, Pejchar P., Pleskot R., Křenková A., Hubálek M., Kučková Š., Potocký M.

Proteomic analysis of phospholipid-binding proteins in the regulation of plant cell polarity

15. **Pečinka L.**, Moráň L., Březina A., Vesselá T., Gabrielová V., Havel J., Marchetti-Deschmann M., Hampl A., Vaňhara P.

Derivatization strategies for sensitive monitoring of small molecules on tissue samples

16. **Pilařová, V.**, Plachká, K., Gazárková, T., Nováková, L.

Make-Up Solvent Effect on SFC Response Using Single and Triple Quadrupole

17. Úlehlová J., **Pisklákova B.**, Ivanovová E., Procházková J., Bradáčová P., Kvasnička A., Friedecký D., Slavík L.

LC-MS/MS stanovení přímých perorálních antikoagulans v plasmě lupus pozitivních pacientů

18. **Plachká, K.**, Pilařová, V., Gazárková, T., Nováková, L.

The Effect of Make-Up Solvent Composition on SFC-MS Responses: Electrospray vs Unispray

19. **Řehulka P.**, Vozandychová V., Vykydalová I., Řehulková H., Klimentová J., Pudil R., Stulík J.

LC-MS analýza proteinových profilů plasmatických vzorků pacientů s dilatační kardiomyopatií pomocí isobarického značení peptidů

20. **Sedláčková S.**, Hubálek M., Vrkoslav V., Blechová M., Cvačka J.

Bottom-Up Proteomics by High-Performance Liquid Chromatography Atmospheric Pressure Chemical Ionization and Photoionization using Diethyl Ethoxymethylenemalonate Derivatization

21. **Seličová H.**

Vývoj metody pro sledování nespecifických proteinových markerů porušené střevní integrity u pacientů s IBD pomocí uHPLC-ESI-QqQ-MS/MS

22. **Smirnova T. A.**, Kučková Š.

Využití hmotnostní spektrometrie pro nalezení panelu potenciálních biomarkerů pro odhalení Alzheimerovy choroby

23. **Svojanovský V.**, Stiborek M., Krásenský P., Kroupa J., Houška P., Kanický V., Preisler J.

Detekce jednotlivých nanočástic v imunochemickém stanovení

24. **Šmak P.**, Gregorová J., Kubinyiová L., Štingl J., Peš O.
Chromatographic modeling as a tool in optimizing reversed-phase separation methods
25. **Tomaniecová A., Stráník J.**, Jindřichová L., Stiborek M., Pavlatovská B., Navrátilová J., Kroupa J., Houška P., Kanický V., Preisler J.
Imunohistochemické značení řezů sféroidů zlatými nanočásticemi a jejich detekce pomocí laserové ablace a zobrazovací hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem
26. **Valášek J.**, Nechvátalová M., Kubiš M., Urban J.
Optimalizace mikrokolonové chromatografie v proteomické analýze
27. **Vlk M.**, Hubálek M., Cvačka J.
Ion Mobility Mass Spectrometry Analysis of A β 42 Oligomers
28. **Zeman M.**, Rajova J., Vlasatikova L., Seidlerova Z., Kubasova T., Rychlik I.
Metabolism of Selected Members of Chicken Gut Microbiota *In vivo*

1. ZOBRAZOVACÍ HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE MASTNÝCH KYSELIN A JEJICH IZOMERŮ METODOU LASEROVÉ IONIZACE ZA POMOCI OXIDU KOVU

BEDNAŘÍK A.¹, KOKTAVÁ M.¹, VALÁŠEK J.¹, BEZDEKOVÁ D.¹, PRYSIAZHYY V.¹, ADAMOVÁ B.²,
BENEŠ P.², NAVRÁTILOVÁ J.², HENDRYCH M.³, VLČEK P.⁴, PREISLER J.¹

¹ Ústav chemie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Brno

² Ústav experimentální biologie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Brno

³ První ústav patologie, Fakultní nemocnice u sv Anny v Brně, Brno

⁴ První ústav chirurgie, Fakultní nemocnice u sv Anny v Brně, Brno

e-mail: buhbedna@gmail.com

Lipidy představují jednu ze základních složek živých organismů a slouží jako stavební prvky biologickým membrán, zásoba energie a podílejí se na celé řadě biochemických procesů včetně buněčné signalizace a exprese genů. Složení lipidů, včetně jejich izomerů, odráží aktuální stav organismu a detailní charakterizace lipidomických profilů může být klíčová při studiu nádorových onemocnění. K objasnění struktury izomerů lipidů se v dnešní době používají různé derivatizační metody (Paternò–Büchi reakce, ozonizace, epoxidace) nebo speciální disociační techniky (fotodisociace ultrafialovým světlem UVPD, elektronová disociace EI). Velký význam má také studium rozložení jednotlivých lipidů v tkáních, které umožňuje zobrazovací hmotnostní spektrometrie (MSI).

V této práci jsme vyvinuli techniku MSI mapování mastných kyselin a jejich izomerů v biologických tkáních. Technika využívá laserovou desorpci a ionizaci za účasti oxidu kovu (MOLI), konkrétně nanoprášku oxidu ceričitého, v kombinaci s off-line ozonizací ke stanovení mastných kyselin a jejich izomerů. Katalytické vlastnosti CeO₂ umožňují štěpení esterových vazeb fosfolipidů při ozáření UV laserem, což vede k produkci iontů mastných kyselin, které lze přímo sledovat v negativním MS módu. Během MOLI procesu po ozonizaci dochází také ke štěpení vzniklých ozonidů nenasycených mastných kyselin za vzniku specifických iontů umožňujících určit polohu dvojně vazby.

MOLI MSI bylo provedeno ve dvou krocích. Nejdříve byly řezy studovaných tkání (myší mozek a lidské střevo s adenokarcinomem) přesprejovány suspenzí CeO₂. Následně byla provedena první MOLI MSI analýza, která ukázala rozložení mastných kyselin ve vzorku. Následní byl vzorek vystaven působení ozonu produkovaném v množství 7 g/h po dobu 2 min. Po reakci s ozonem, který reaguje s nenasycenými mastnými kyselinami za vzniku ozonidů, byla provedena ze stejné tkáně druhé MOLI MSI analýza. Vzniklé ozonidy byly během MOLI procesu fragmentovány za vzniku 4 specifických iontů pro jednotlivé izomery lišící se polohou dvojně vazby. Následně byly rekonstruovány mapy ukazující poměr specifických iontů izomerní kyseliny olejové FA 18:1 ($\Delta 9$) a kyseliny vakcenové FA 18:1 ($\Delta 11$) a na základě modelových vzorků byl vypočítán procentuální obsah těchto izomerů ve vzorcích. Obsah kyseliny vakcenové v myším cerebellu byl $20 \pm 3\%$, v šedé hmotě $18 \pm 3\%$ a v bílé hmotě $13 \pm 2\%$. Ve zdravé tkáni lidského střeva byl vypočítán nižší obsah vakcenové kyseliny ($3.3 \pm 1.1\%$) v porovnání s adenokarcinomem ($4.3 \pm 1.1\%$).

Za finanční podporu děkujeme Grantové agentuře České republiky (19-20927Y) a Evropskému fondu pro regionální rozvoj (projekt ENOCH CZ.02.1.01/0.0/16_019/598 0000868).

2. STANOVENÍ CAPTANU METODOU LC-MS/MS V JABLKÁCH

BÍLKOVÁ A., KNAPOVÁ P., JIROUŠOVÁ D.

VÝZKUMNÝ A ŠLECHTITELSKÝ ÚSTAV OVOCNÁŘSKÝ HOLOVOUSY s.r.o.

e-mail: Aneta.Bilkova@vsuo.cz

Screening vzorků potravin na kontaminující látky, jako jsou pesticidy, vyžaduje použití technik GC-MS a LC-MS. Mezi problematické analyty pro GC-MS analýzu reziduí pesticidů patří thioftalimidové fungicidy. Účinná látka captan patří právě mezi fungicidy ze skupiny ftalimidů, která potlačuje růst mycelia a sporulaci houbových patogenů. Legislativně je definován jako „captan (suma captanu a THPI, vyjádřeno jako captan)“. Když je captan vystaven určitým fyzikálně-chemickým podmínkám, například vysoké teplotě nebo náhlé změně pH matrice, je degradován na metabolit tetrahydroftalimid (THPI). Při GC-MS nebylo možné stanovit captan, neboť pravděpodobně docházelo k rychlé degradaci v prostoru inletu za podmínek solvent vent nástřiku používaných pro multireziduální analýzu reziduí pesticidů. Byla tedy optimalizována a validována metoda LC-MS/MS pro stanovení captanu a THPI. Pro přípravu vzorků byla použita extrakční metoda QuEChERS. Identifikace a kvantifikace bylo dosaženo použitím ionizace elektrosprejem v režimu MRM v pozitivní (captan) a negativní (THPI) ionizaci. Limit kvantifikace (LOQ) byl pro captan 0,005 mg/kg a pro THPI 0,010 mg/kg, což je velice hluboko pod MLR pro jablka (10 mg/kg). Výtěžnosti při různých koncentracích (0,005; 0,010 a 0,080 mg/kg) se pro captan pohybovaly v rozmezí 91 až 97 % a pro THPI 93 až 101 % v jablkách. Opakovatelnost vyjádřená jako relativní směrodatná odchylka byla do 5,3 %. Pro kompenzaci matričních efektů byla použita matriční kalibrace. Z dosavadních zkušeností a výsledků mezilaboratorních porovnávacích zkoušek je zřejmé, že LC-MS/MS je vhodnou metodou pro analýzu reziduí captanu v ovocných extraktech.

Tato studie vznikla za podpory projektu Ministerstva zemědělství České republiky (RO1522).

3. DETERMINATION OF CARBOHYDRATES PROFILE IN MILK AND SPECIAL INFANT'S FORMULAS BY HPLC WITH ELS AND MS DETECTION

TOMAS CRHA¹, JIRI PAZOUREK¹

¹Department of Chemical Drugs, Faculty of Pharmacy, Masaryk University

Key words: HILIC; ELSD; MS; lactose; carbohydrates; milk; infant's formulas

Lactose is a disaccharide, commonly called "milk sugar", composed of galactose and glucose subunits. This disaccharide, present in a higher content among milk carbohydrates, is the most important carbohydrate for infants. When digested it is cleaved by lactase (a hydrolase) into the monosaccharides. The aim of this work was mainly to develop and apply an HPLC method for lactose determination. If the sample contains other sugars such as glucose, galactose, sucrose or maltodextrins, they can also be identified and quantified.

Lactose was determined in commercially available whole cow's milk samples and selected neonatal dairy diets. Milk treated with high temperature (UHT, ultra-high temperature; special types of milk) could contain lactulose, a synthetic isomer of lactose.

Today, HPLC in the HILIC mode (hydrophilic interaction liquid chromatography) is relatively often used in the pharmaceutical research. In HILIC mode polar analytes (in our case carbohydrates) can be retained and separated, which is not easy with normal reverse phase chromatography. The stationary phase used in the HILIC mode is silica, typically modified with polar groups (hydroxy, amine, amide, zwitterionic). The mobile phase is usually a mixture of water (or aqueous buffer) and excess of acetonitrile. After optimizing the composition of the mobile phase (acetonitrile-ammonium formate buffer, which is an MS-compatible mobile phase), carbohydrates can be quickly separated. However, since carbohydrates do not contain any suitable chromophore in their structure, a conventional UV-detector (without derivation) is unusable and thus, except an MS detection, an evaporative light-scattering detector (ELSD) can be advantageously used.

A HPLC-ELSD method was developed on a Dionex UltiMate 3000 HPLC system (ThermoFisher Scientific, USA) with a HALO Penta-HILIC 4.6 x 150 mm column (AMT, USA) with a stationary phase of modified silica particles with a maximum size of 2.7 µm and an ELS detector Varian 380-LC (Varian, USA). Chromeleon and MS Excel software were used to evaluate the obtained data.

The optimized conditions of the method were as follows: the column thermostat temperature was 10 °C, the mobile phase was acetonitrile mixed with 30 mmol/l ammonium formate buffer, flow-rate was 2 ml/min (gradient elution was used). Detection conditions ELSD nitrogen flow was 1 slm, temperature of the nebulizer and evaporator were 40 °C.

Under these conditions, the method can determinate lactose in 13 minutes with lactose-lactulose resolution 1.70; peak area repeatability 2.7%; lactose retention time repeatability 2,2%; LOD 60 mg/ml (LOQ 109 mg/ml), recovery (method of externally standard addition) 96,7-107,1%.

Detection sensitivity of the HPLC-ELSD method was compared to an alternative system of HPLC-MS (Agilent 6224 Accurate-Mass TOF LC-MS). Also a MALDI-TOF MS Autoflex Speed (Bruker, Germany) in positive linear and reflector modes and were used for maltodextrin profiling.

Acknowledgement: IGA project MUNI/A/1236/2021 of Masaryk University Brno, Czech Republic

4. KVANTITATIVNÍ ANALÝZA NOVÝCH INDOLOVÝCH SLOUČENIN V ROSTLINÁCH

P. HLADÍK¹, A. PĚNČÍK¹, I. PETŘÍK¹, A. ŽUKAUSKAITE², O. NOVÁK¹

¹Laboratoř růstových regulátorů, Ústav experimentální botaniky, Akademie věd České republiky & Univerzita Palackého, Přírodovědecká fakulta – Olomouc

²Oddělení Chemické biologie, Univerzita Palackého, Přírodovědecká fakulta – Olomouc

Růst a vývoj rostliny je stejně jako v živočišné říši řízen hormony. Nicméně zásadním rozdílem mezi rostlinnými (fytohormony) a živočišnými hormony je specifita jejich účinku. V rostlinách každý hormon ovlivňuje obrovské množství vývojových a fyziologických procesů v závislosti na jeho koncentraci, místě účinku a interakci s ostatními hormony. Jednou z nejvýznamnějších skupin fytohormonů jsou auxiny, konkrétně kyselina indol-3-octová (IAA), která v rostlině zodpovídá jak za reakce na vnější podmínky, tak i za její správný vývoj. Pro kontrolu těchto procesů je nezbytné v buňkách a pletivech udržovat stálou koncentraci IAA, jež je převážně regulována biosyntézou *de novo*, transportem a metabolismem. Při metabolismu dochází ke vzniku biologicky neaktivních molekul, které slouží jako skladovací, transportní nebo degradační formy IAA. Molekula IAA může být metabolizována několika dráhami, a to oxidací za vzniku 2-oxo-indol-3-octové kyseliny (oxIAA) nebo konjugací s glukosou nebo aminokyselinami (IAA-AMK). Tyto amidové konjugáty mohou být dále oxidovány za vzniku takzvaných oxIAA-aminokyselinových konjugátů. Zatímco IAA-AMK bylo objeveno velké množství, jejich oxidace byla dosud popsána pouze u IAA-aspartátu a IAA-glutamátu. Identifikaci dalších těchto molekul stěžuje rostlinná matrice, která obsahuje velké množství sekundárních metabolitů, které jsou v rostlinách v řádově vyšších koncentracích než tyto metabolity IAA. Sledované analyty často nepřesahují koncentrace vyšší než pmol.g^{-1} čerstvého rostlinného materiálu. Pro analýzu je tedy nutná velmi selektivní purifikace vzorku a detekce založená na citlivé hmotnostní spektrometrii. Přesnou kvantifikaci umožňuje použití izotopicky značených standardů těchto látek.

V této práci byla vyvinuta a validována nová HPLC-MS/MS metoda pro veškeré dosud známé a potenciálně přirozené metabolity IAA, ze kterých byl v rostlinách prvně identifikován a kvantifikován oxIAA-leucin a oxIAA-fenylalanin. Celý metabolický profil IAA byl poté změřen v kořenech, kotyledonech a stoncích huseníčku rolního, pšenice seté, hrachu setém a kukuřici seté. Profily byly poté porovnány v každém orgánu pro identifikaci hlavních metabolických drah IAA.

Naše výsledky ukazují, že oxIAA-aminokyseliny jsou důležitou součástí metabolismu auxinů a IAA je metabolizována rozdílnými dráhami napříč rostlinnými druhy a jejich jednotlivými orgány. Nicméně stále zůstává důležitou otázkou, zdali tyto látky slouží pouze jako dočasné skladovací formy a degradační produkty IAA nebo přispívají k regulaci rostlinného vývoje jinými, dosud nepopsanými cestami.

Tato práce byla realizována za podpory Interní grantové agentury Univerzity Palackého (projekt IGA_PrF_2022_016).

5. COMPREHENSIVE CHARACTERIZATION OF GLYCOSPHINGOLIPIDS IN HUMAN PANCREATIC CANCER TISSUES REVEALS DIFFERENT LIPID PROFILES

HOŘEJŠÍ K.^{1,2}, CHUNSHENG J.³, VAŇKOVÁ Z.¹, JIRÁSKO R.¹, STROUHAL O.⁴, MELICHAR B.⁴,
TENEBERG S.⁵, AND HOLČAPEK M.¹

¹University of Pardubice, Faculty of Chemical Technology, Department of Analytical Chemistry, Studentská 573, 532 10 Pardubice, Czech Republic

²University of South Bohemia in České Budějovice, Faculty of Science, Department of Chemistry, Branišovská 1760, 370 05 České Budějovice, Czech Republic

³ University of Gothenburg, Sahlgrenska Academy, Proteomics Core Facility, S-405 30 Göteborg, Sweden

⁴Palacký University Olomouc, Faculty of Medicine and Dentistry, Department of Oncology, I. P. Pavlova 6, 77520, Olomouc, Czech Republic

⁵ University of Gothenburg, Sahlgrenska Academy, Institute of Biomedicine, Department of Medical Biochemistry and Cell Biology, P.O.Box 440, S-405 30 Göteborg, Sweden

Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is one of the most common causes of cancer-related deaths worldwide with an average 5-year survival rate of less than 10%. PDAC exhibits aggressive biology resulting in the majority of PDAC patients having unresectable, locally advanced, or metastatic disease at the time of diagnosis, and even traditional treatments are highly resistant. Comprehensive lipid profiling and screening of potential biomarkers currently appear to be an auspicious way to allow early detection of PDAC or other cancers. In this study, we isolated, purified, and characterized complex glycosphingolipids (GSL) from tumor and surrounding normal pancreatic tissues of PDAC patients using a combination of thin-layer chromatography with chemical staining, carbohydrate-recognizing ligand binding assay, and liquid chromatography coupled with electrospray tandem mass spectrometry (LC/ESI-MS²). We identified GSL with terminal blood group A, B, H, Le^a, Le^b, Le^x, Le^y, P1, and PX2 determinants together with globo- (Gb₃, Gb₄), neolacto-series GSL (nLc₄, nLc₆), sulfatides, GM₃ gangliosides, and sialyl-nLc₄/nLc₆ and sialyl-Le^a/Le^x. The comprehensive analysis of GSL in human pancreatic cancer tissues presented in this study illustrates the differences in lipid profiles between normal and tumor pancreatic tissues, extends the coverage of GSL that are not routinely analyzed, and provides an important platform for further studies of GSL alterations, therefore, it might contribute to the development of new cancer biomarkers.

This work was supported by the Czech Science Foundation (Grant No. 21-20238S); the Czech Health Research Council (Grant No. NU21-03-00499); and the Swedish Cancer Foundation (Grant No. 20 0759 PjF 01 H to S.T.).

6. POROVNÁNÍ PROFILŮ NEČISTOT V PŘÍPRAVCÍCH LEVOTHYROXINU S VYUŽITÍM UHPLC-DIA-HRMS

HANA CHMELAROVÁ¹, MARIA CARMEN CATAPANO, LUCIE NOVÁKOVÁ¹

¹ Katedra analytické chemie, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova

e-mail: chmelarha@faf.cuni.cz

Levothyroxin je syntetický hormon, který se používá při léčbě pacientů s hypofunkcí štítné žlázy. Jelikož je to lék s úzkým terapeutickým rozmezím, i malá změna jeho koncentrace může mít významný vliv na terapeutickou aktivitu. Terapeutická aktivita může být ovlivněna i možnými interakcemi levothyroxinu s pomocnými látkami (tzv. excipienty) ^{1,2}. Existuje zde proto riziko nežádoucích účinků po přechodu z jednoho přípravku levothyroxinu na jiný či po změně složení výrobcem ³.

Cílem této studie bylo vyvinout analytickou metodu pro srovnání různých levothyroxinových přípravků a pro odhalení možných chemických změn. Pro tento účel byl použit necílový přístup využívající ultra vysoko účinnou kapalinovou chromatografii spojenou s vysokorozlišovací hmotnostní spektrometrií (ultra-high performance liquid chromatography with high-resolution mass spectrometry; UHPLC-HRMS) s akvizicí nezávislou na datech (data-independent acquisition; DIA). Tato technika poskytuje hmotnostní spektra všech ionizovatelných sloučenin a současně jejich příslušná fragmentační spektra. Kombinace těchto dat je pak užitečným nástrojem pro identifikaci nečistot a reakčních produktů z MS i MS/MS spekter.

V rámci prezentované studie bylo analyzováno celkem 46 vzorků levothyroxinu od šesti různých výrobců. Data získaná metodou UHPLC-DIA-HRMS byla zpracována pomocí analýzy hlavních komponent (principal component analysis; PCA) a ortogonální diskriminační analýzy částečných nejmenších čtverců (orthogonal partial least squares discriminant analysis; OPLS-DA) se zaměřením na výběr důležitých markerů pro klasifikaci vzorků a vyhodnocení rozdílů mezi tabletami s různým složením pomocných látek a také mezi jednotlivými šaržemi. Mezi identifikovanými markery byly skutečně produkty reakce mezi použitými excipienty v tabletách či mezi excipientem a aktivní látkou. Pozornost byla věnována také screeningu degradačních produktů levothyroxinu.

Závěrem lze konstatovat, že technika UHPLC-DIA-HRMS kombinovaná s multivariační analýzou dat je vhodná pro komplexní hodnocení vzorků a pro detekci změn, ke kterým v tabletách dochází. Tento přístup, ač není ve farmaceutické analýze běžný, může být užitečný při kontrole kvality a zlepšování bezpečnosti léků či nutraceutik.

¹ I. Ledeti, M. Romanescu, D. Cîrcioban D., *et al.*, *Pharmaceutics* 58 (2020) 12.

² H.-P. Lipp, U. Hostalek, *Current Medical Research and Opinion* 35:1 (2019) 147-150.

³ E.Fliers, B. Demeneix, A. Bhaseen, T. H. Brix, *Eur. Thyroid J.* 7 (2018) 238-242.

Tato práce vznikla za podpory projektu EFSA-CDN (No.CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_019/0000841) spolufinancovaného z ERDF.

7. LC-MS/MS ANALÝZA MASTNÝCH KYSELIN S KRÁTKÝM ŘETĚZCEM A JEJICH DERIVÁTŮ V PLASMĚ ŽEN S GESTAČNÍM *DIABETES MELLITUS*

ELIŠKA IVANOVOVÁ¹, BARBORA PISKLÁKOVÁ¹, JAROSLAVA FRIEDECKÁ¹, ONDŘEJ KRÝSTYNÍK²,
DAVID FRIEDECKÝ¹, DAVID KARÁSEK²

¹ Laboratoř dědičných metabolických poruch, Oddělení klinické biochemie, Fakultní nemocnice Olomouc a Lékařská fakulta Univerzity Palackého v Olomouci

² 3. Interní klinika – Nefrologie, Revmatologie a Endokrinologie, Fakultní nemocnice Olomouc a Lékařská fakulta Univerzity Palackého v Olomouci

Kontakt: eliska.ivanovova01@upol.cz

Gestační *diabetes mellitus* (GDM) představuje heterogenní skupinu hyperglykemických metabolických poruch, které jsou spojeny se zdravotními následky pro matky a jejich potomky. V současné době, diagnostika GDM je založena na opakovaném měření zvýšené plasmatické glukosy nalačno (FPG) nebo na základě výsledků ukazujících zvýšenou posprandiální plasmatickou glukosu (PPG). Poslední výzkumy se však zaměřují na studium změn ve střevním mikrobiomu žen během těhotenství. Metabolické změny mohou u těhotných žen způsobit střevní dysbiózu, a tím i rozvoj GDM. Produkty střevních bakterií, mastné kyseliny s krátkým řetězcem (SCFA) a jejich deriváty, mohou hrát v rámci diagnostiky GDM nezastupitelnou roli. Současné studie zabývající se důležitostí mastných kyselin při monitorování GDM využívají klasifikace žen s GDM zejména podle týdne/trimestru těhotenství. Tato práce však porovnává skupiny žen s GDM podle způsobu diagnostiky onemocnění. V rámci naší studie byla pro analýzu SCFA a jejich derivátů optimalizována LC-MS/MS metoda na základě dvou validovaných protokolů od Jaochico *et al.* (2019) and Shafaei *et al.* (2021). Plasmatické SCFA a jejich deriváty byly derivatizovány a separovány na kapalinové chromatografii s reverzní fází (RPLC) a detekovány hmotnostním spektrometrem s trojitým kvadrupólem (QqQ). Mastné kyseliny byly hodnoceny spolu se základními charakteristikami tělesného složení a biochemickými parametry u žen se třemi různými fenotypy GDM, zdravých těhotných a netěhotných žen. 3-hydroxybutyrát (3-OH-BA), 4-methylvalerát (4-MVA) a isovalerát (IVA) byly hodnoceny jako statisticky významné vůči vybraným parametrům. 3-OH-BA, odrážející ketogenní stav GDM, byl zvýšen u všech tří skupin žen s různými fenotypy GDM. Ve všech skupinách těhotných žen byly zjištěny zvýšené/snížené koncentrace 4-MVA/IVA. Kromě signifikantních změn SCFA, byly u žen s GDM pozorovány rozdíly také v základních charakteristikách tělesného složení a biochemických parametrech. Ve srovnání s dříve publikovanými studiemi jsme našli nové potenciální biomarkery pro GDM, 4-MVA a IVA.

Tento projekt byl podpořen Agenturou pro zdravotnický výzkum České republiky (NV18-01-00139).

8. SIMULTANEOUS DETERMINATION OF NEUROACTIVE STEROIDS IN HUMAN SERUM BY UHPLC–MS/MS

MICHAL KALETA^{1,2}, JANA OKLEŠŤKOVÁ¹, ONDŘEJ NOVÁK¹

¹Laboratory of Growth Regulators, Institute of Experimental Botany of the Czech Academy of Sciences & Faculty of Science, Palacky University, Šlechtitelů 27, 783 71, Olomouc, Czech Republic

²Department of Neurology, Faculty of Medicine and Dentistry, University Hospital, Palacky University, I. P. Pavlova 6, 775 20, Olomouc, Czech Republic

e-mail: michal.kaleta@upol.cz

Steroid hormones are mainly involved in human sexual development and reproduction or in the regulation of mineral, protein and carbohydrate metabolism. A lesser-known role of steroids is the ability of some of them to modulate nervous system function. Therefore, the group of these endogenous and exogenous substances has been named neuroactive steroids (NASs). Furthermore, steroidogenic tissues and organs such as the gonads and adrenal glands also include skin, adipose tissue, intestinal tissue, gut microbiota, as well as nervous tissue. This specific subgroup of NASs produced in the nervous system by neurons and glial cells is referred to as neurosteroids. The physiological levels of some NASs can be altered by a variety of pathological processes that affect the nervous system. These changes have been observed in diseases such as Alzheimer's disease, Parkinson's disease, multiple sclerosis, Huntington's disease, and in some nervous system injuries. This research presents a high-throughput method based on time-saving sample preparation and sensitive detection by ultra-high performance liquid chromatography combined with tandem mass spectrometry (UHPLC–MS/MS) that enables metabolic profiling of target neuroactive steroids in human blood serum. The selected analytes include nine steroids classified as androgens (testosterone, 5 α -dihydrotestosterone, androstenedione, dehydroepiandrosterone and epiandrosterone) and progestins (pregnenolone, progesterone and 5 α -dihydroprogesterone). The availability of new analytical methods that allow high-throughput and reliable determination of steroid substances could contribute to a deeper understanding of many diseases associated with changes in NAS levels. The acquired knowledge could be used to discover biomarkers for prevention, diagnosis, or monitoring of disease progression and to improve therapeutic approaches.

This work was supported by the student project IGA_PrF_2022_016 of the Palacky University in Olomouc and by ENOCH project "Molecular, Cellular and Clinical Approach to Healthy Aging" with registration number CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_019/0000868.

9. POROVNÁNÍ DVOU TECHNIK STANOVENÍ TĚKAVÝCH LÁTEK: IONIZACE POMOCÍ IONTŮ KOVŮ A IONIZACE NÍZKOTEPLTNÍM PLAZMATEM

KOKTAVÁ M., BEDNAŘÍK A., PREISLER J.

Ústav chemie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Brno

e-mail: koktava.monika@gmail.com

Těkavé organické látky se vyznačují vysokou tenzí par a nízkou rozpustností ve vodě, za běžné pokojové teploty se snadno odpařují. Běžné metody jejich stanovení využívají plynové chromatografie či hmotnostní spektrometrie.

V této práci představujeme metodu pro analýzu těkavých organických látek pomocí hmotnostní spektrometrie využívající reakci mezi ionty kovů v plynné fázi a těkavými látkami. Z nanovrstvy kovů byly pomocí laserové desorpce v komerčním duálním subatmosferickém MALDI/ESI zdroji generovány ionty kovů (Au, Ag, Cu) v plynné fázi. Standardy těkavých látek (alkoholy, ketony, diony, aldehydy, karboxylové kyseliny, uhlovodíky a terpenoidy) byly umístěny v permeačních trubičkách uvnitř vialek se septem promývaných proudem dusíku, který vedl těkavé látky do ESI vstupu hmotnostního spektrometru.

Stejně standardy těkavých látek byly stanoveny druhou metodou s využitím komerčního ionizačního zdroje SICRIT, který byl připojen na vstupní ESI kapiláru. SICRIT využívá k ionizaci studeného plazmatu. Těkavé látky byly do zdroje přiváděny stejným způsobem, tedy proudem dusíku vedeným přes vialku s permeační trubičkou.

Porovnáním výsledků poskytnutých oběma metodami bylo zjištěno, že každá z technik je vhodná pro analýzu jiných tříd těkavých látek. Tyto metody tak rozšiřují portfolio již zavedených technik jako jsou například sekundární ionizace elektrosprejem (SESI) či hmotnostní spektrometrie v proudové trubici s vybranými ionty (SIFT MS).

Děkujeme za finanční podporu Grantové agentury České republiky (21-12262S).

10. HYDROPHILIC INTERACTION LIQUID CHROMATOGRAPHY - MASS SPECTROMETRY FOR DISTINGUISHING ISOMERIC CLASSES OF SPHINGOLIPIDS IN HUMAN PLASMA

DENISA KOLÁŘOVÁ, ONDŘEJ PETERKA, ROBERT JIRÁSKO, AND MICHAL HOLČAPEK

University of Pardubice, Faculty of Chemical Technology, Department of Analytical Chemistry, Studentská 573, 532 10, Pardubice, Czech Republic

Lipidomics is an individual area of metabolomics that focuses on the analysis and description of lipids isolated from cells, body fluids, tissues, and other biological samples. Lipids are important endogenous biomolecules, and they are involved in many biochemical processes in all eucaryotic organisms. Sphingolipids contain a sphingoid base and, depending on the polarity of other substitutions, they are divided into polar and nonpolar classes. Recently, altered metabolism of sphingolipids has been observed in cancer, and their analysis is becoming increasingly popular with the aim to find potential cancer biomarkers. However, the application of a robust and high-throughput method is required to separate individual sphingolipid classes and generate reliable data within the measurement of large clinical cohorts.

In our work, hydrophilic interaction liquid chromatography – mass spectrometry (HILIC/MS) has been developed for the identification and quantitation of a wide range of sphingolipids in human plasma samples. Optimization of chromatographic conditions included selection of the column, composition of the mobile phase, suitable gradient, flow rate, and concentration of a buffer with the goal of achieving the best chromatographic resolution. The best resolution provided the column Acquity UPLC BEH HILIC (150 × 2.1 mm; 1.7 μm). Special attention was paid to distinguish isomeric classes, such as glucosylceramides from galactosylceramides and lactosylceramides from digalactosylceramides. Optimized and validated method was used to quantify sphingolipids in the standard reference material NIST SRM 1950 (NIST plasma). More than 100 sphingolipids from 8 lipid classes were quantified within 12 min run in the NIST plasma based on their retention time in the HILIC mode, high mass accuracy, and MS/MS fragmentation behaviour.

This work was supported by the project No. 21-20238S sponsored by the Czech Science Foundation (GAČR).

11. A MIXTURE OF INNATE CRYOPROTECTANTS IS KEY FOR FREEZE TOLERANCE AND CRYOPRESERVATION OF A DROSOPHILID FLY LARVA

LUKÁŠ KUČERA¹, MARTIN MOOS², TOMÁŠ ŠTĚTINA², JAROSLAVA KORBELOVÁ², PETR VODRÁŽKA², LAUREN DES MARTEAUX², ROBERT GRGAC³, PETR HŮLA^{2,3}, JAN ROZSYPAL², MILOŠ FALTUS⁴, PETR ŠIMEK², RADISLAV SEDLACEK¹, VLADIMÍR KOŠTÁL²

¹ Czech Centre of Phenogenomics, Institute of Molecular Genetics, Czech Academy of Sciences, 25250 Vestec, Czech Republic.

² Institute of Entomology, Biology Centre, Czech Academy of Sciences, 37005 České Budějovice, Czech Republic.

³ Faculty of Science, University of South Bohemia, 37005 České Budějovice, Czech Republic.

⁴ Crop Research Institute, 16106 Praha, Czech Republic.

Insects that naturally tolerate internal freezing produce complex mixtures of multiple cryoprotectants (CPs). Better knowledge on composition of these mixtures, and on the mechanisms of individual CP interactions, could inspire development of laboratory CP formulations optimized for cryopreservation of cells and other biological material. Here, we identify and quantify (using high resolution mass spectrometry) a range of putative CPs in larval tissues of a subarctic fly, *Chymomyza costata*, which survives long-term cryopreservation in liquid nitrogen. The CPs proline, trehalose, glutamine, asparagine, glycine betaine, glycerophosphoethanolamine, glycerophosphocholine and sarcosine accumulate in hemolymph in a ratio of 313:108:55:26:6:4:2.9:0.5 mmol l⁻¹. Using calorimetry, we show that artificial mixtures, mimicking the concentrations of major CPs in hemolymph of freeze-tolerant larvae, suppress the melting point of water and significantly reduce the ice fraction. We demonstrate in a bioassay that mixtures of CPs administered through the diet act synergistically rather than additively to enable cryopreservation of otherwise freeze-sensitive larvae. Using matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry imaging (MALDI-MSI), we show that during slow extracellular freezing trehalose becomes concentrated in partially dehydrated hemolymph where it stimulates transition to the amorphous glass phase. In contrast, proline moves to the boundary between extracellular ice and dehydrated hemolymph and tissues where it probably forms a layer of dense viscoelastic liquid. We propose that amorphous glass and viscoelastic liquids may protect macromolecules and cells from thermomechanical shocks associated with freezing and transfer into and out of liquid nitrogen.

12. SOLVING THE MYSTERY OF THE INTRIGUING ODOR OF DERMATOPHYTES

LENKA MACHOVA^{1,2}, MICHAELA SVARCOVA^{1,2}, ANDREJ JASICA^{1,2}, SANDRA AWOKUNLE
HOLLA^{1,2}, ALENA GRASSEROVA^{2,3}, JAROSLAV SEMERAD^{2,3}, ADELA CMOKOVA², MIROSLAV
KOLARIK²

¹Department of Genetics and Microbiology, Faculty of Science, Charles University in Prague, Vinicna 5, 128 44,
Prague 2, Czech Republic

²Institute of Microbiology of the Czech Academy of Sciences, Videnska 1083, 142 20, Prague 4, Czech Republic

³Institute for Environmental Studies, Faculty of Science, Charles University in Prague, Benatska 2, 128 01,
Prague 2, Czech Republic

email: lenka.machova@natur.cuni.cz

Keywords: dermatophytes, secondary metabolites, volatile organic compounds

Dermatophytes are a phylogenetically related group of filamentous fungi. This group is specialized in the degradation of keratin in skin and skin derivatives such as hair, claws, or horns. As such, dermatophytes are frequent skin pathogens of mammals including pet animals or men. During their growth, dermatophytes produce a whole range of secondary metabolites. Some of them can be characterized as volatile organic compounds (VOCs) and are responsible for a very strong and specific odor of these fungi. In various microorganisms, spectra of VOCs can be used for chemotaxonomy and species determination. Subsequently, they can be used for rapid recognition by gadgets referred to as “electronic noses”. However, a comparative database has not yet been created for dermatophytes. In our study, we use gas chromatography-mass spectrometry (GC-MC) for the separation and measurement of VOCs from more than 14 taxa of dermatophytes. Using this method, we found more than one hundred compounds, from which some are common for other filamentous fungi or yeasts, some were found for the first time to be produced by fungi and therefore might be dermatophyte specific. Certain compounds also show potential biological activity. By subsequent bioassays, we are trying to uncover the role of those compounds in infection and thus their role in the pathogenicity of dermatophytes.

This project (START/SCI/092) was supported by the project “Grant Schemes at CU” (reg. no. CZ.02.2.69/0.0/0.0/19_073/0016935).

13. VÝVOJ PROTEOMICKÝCH TECHNIK PRO ROZLIŠENÍ ŽIVOČIŠNÉHO PŮVODU RECENTNÍCH A HISTORICKÝCH KOSTÍ

ALENA MELEDINA

Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Fakulta potravinářské a biochemické technologie, Ústav biochemie a mikrobiologie

Kosterní pozůstatky obratlovců (včetně jejich fragmentů) patří mezi nejčastěji zastoupené organické nálezy na archeologických lokalitách. Určení zvířecího druhu, ze kterého pochází nalezený kostní vzorek, je důležité například pro vysvětlení postupů chovu v daném místě a historické době, odhalení klimatických podmínek v minulosti, pro zjištění vlivu člověka na životní prostředí nebo stavu ekosystému. Identifikace živočišného původu kostních materiálů je také velmi potřebná pro forenzní zkoumání a bezpečnost potravin (např. kontrolu dodržování obchodních norem pro masokostní moučku).

Bílkoviny jsou slibným prostředkem pro identifikaci živočišného původu kostí. Zejména kolageny, které jsou dominantními proteiny v kostech obratlovců, jsou známé svou dlouhodobou stabilitou mezi ostatními kostními proteiny. Kolagenová vlákna na rozdíl od molekul DNA udržují svou strukturu a vlastnosti pod vlivem různých drastických podmínek (vysoké teploty, vlhkosti, času atd.) díky minerálnímu obalu tvořenému krystaly fosforečnanu vápenatého a hydroxyapatitu.

Cílem této práce bylo pokusit se vyvinout nový proteomický přístup vhodný pro identifikaci živočišného původu kostí na základě jejich proteinového složení. Bylo vybráno devět recentních kostních vzorků zvířat, kteří patří mezi nejčastější kosterní nálezy na archeologických lokalitách v České republice: kapr, kráva, krůta, křepelka, ovce, pes, pstruh, slepice a vepř. Také byly zkoumány archeologické vzorky (kráva, pes, slepice a vepř) pocházející ze středověku (16. století).

V rámci projektu byly kostní vzorky analyzovány pomocí dvou technik hmotnostní spektrometrie – MALDI–TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization – Time of Flight) a LC–ESI–Q–TOF (Liquid Chromatography – Electrospray Ionization – Quadrupole – Time of Flight). Vzorky rozemletých kostí byly enzymaticky štěpeny trypsinem a purifikovány pomocí reverzní fáze ZipTip C18. Hmotnostní spektra získaná z MALDI–TOF MS byla nejprve zpracována analýzou hlavních komponent (PCA) a následně byly ve spektrech hledány unikátní markery v podobě m/z hodnot pro každý druh. Charakteristické markery představují spolehlivý nástroj umožňující rychlou identifikaci živočišného původu kostních vzorků. Díky datům z LC–ESI–Q–TOF byly identifikovány konkrétní proteiny a jejich peptidové fragmenty v podobě aminokyselinových sekvencí, ze kterých v budoucnu budou také vybrány specifické markery pro každé zvíře.

Ze získaných výsledků lze usoudit, že pomocí těchto dvou technik hmotnostní spektrometrie lze určit živočišný původ vzorků kostí na základě rozdílů v jejich proteinovém složení. Tyto informace lze využít k určení živočišného druhu, ze kterého nalezený archeologický kostní materiál pochází. Na základě nalezených charakteristických markerů lze vytvořit databázi, která umožní provádět identifikaci zvířecího původu neznámých vzorků rychleji a spolehlivěji, než současně využívané techniky (např. analýza DNA).

Tento výstup vznikl v rámci projektu Specifického vysokoškolského výzkumu – projekt č. A2_FPBT_2022_042 a č. A1_FPBT_2022_001.

14. PROTEOMIC ANALYSIS OF PHOSPHOLIPID-BINDING PROTEINS IN THE REGULATION OF PLANT CELL POLARITY

ONDŘEJ NOVOTNÝ^{1,2}, PŘEMYSL PEJCHAR¹, ROMAN PLESKOT¹, ALENA KŘENKOVÁ³, MARTIN HUBÁLEK³, ŠTĚPÁNKA KUČKOVÁ², MARTIN POTOCKÝ¹

¹ Laboratory of Cell Biology, Institute of Experimental Botany of the Czech Academy of Sciences, Rozvojová 263, Praha 6 – Lysolaje

² Laboratory of applied proteomy, Institute of Chemical Technology, Technická 5 Praha 6-Dejvice

³ Mass Spectrometry, Institute of Organic Chemistry and Biochemistry of the Czech Academy of Sciences, Flemingovo náměstí 542/2, Praha 6-Dejvice

Specific protein-lipid interactions regulate wide variety of biological functions, such as responses to pathogens, reproduction, growth and morphology. These interactions have not been satisfyingly described yet. Our laboratory has already proved that distribution and relative amount of anionic phospholipids, such as phosphatidylinositol phosphates, phosphatidylserine, and phosphatidic acid, on plasma membrane are affecting plant cell polarity and that exocytosis and endocytosis are enormously affected by the polarity of cell. We hypothesize that distinct combinations of anionic lipids are responsible for regulation of vesicular transport processes. Aim of this project is to identify peripheral membrane proteins interacting with anionic phospholipids and to analyse comparatively the specificity of these interactions towards distinct anionic lipids. We are reaching this aim by binding the proteins to prepared liposomes with various composition. After the binding, we isolate and analyze the proteins on LC-MS/MS. Sets of analysed proteins are suggesting that presence of anionic phospholipids are key to understanding targeting of the signal proteins and thus liposomes at least in endocytosis.

Julkowska M M, et al. (2013). In Munnik T., Heilmann I. (eds) Plant Lipid Signaling Protocols. Methods in Molecular Biology, vol 1009.

McLoughlin F, et al. (2013). Biochemistry Journal 450:573–581

Potocký M, Pleskot R, Pejchar P, Vitale N, Kost B a Žárský V (2014), Live-cell imaging of phosphatidic acid dynamics in pollen tubes visualized by Spo20p-derived biosensor. New Phytology, 203: 483-494. doi:10.1111/nph.12814

Grant support from Czech Science Foundation 19-21758S and VŠCHT grant A2_FPBT_2022_51

15. DERIVATIZATION STRATEGIES FOR SENSITIVE MONITORING OF SMALL MOLECULES ON TISSUE SAMPLES

PEČINKA L.^{1,2}, MORÁŇ L.^{3,4}, BŘEZINA A.^{1,5}, VESSELÁ T.³, GABRIELOVÁ V.³, HAVEL J.^{1,2},
MARCHETTI-DESCHMANN M.⁶, HAMPL A.^{2,3}, VAŇHARA P.^{2,3*}

¹ Faculty of Science, Masaryk University, Brno, Czech Republic,

² International Clinical Research Center, St. Anne's University Hospital Brno, Brno, Czech Republic,

³ Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno, Czech Republic,

⁴ Research Centre for Applied Molecular Oncology (RECAMO), Masaryk Memorial Cancer Institute, Brno, Czech Republic,

⁵ RECETOX Centre, Faculty of Science, Masaryk University, Brno, Czech Republic

⁶ Institute of Chemical Technologies and Analytics, Vienna University of Technology, Vienna, Austria.

e-mail: 436922@mail.muni.cz

Study of small molecules (mostly known as metabolites) for biomarker discovery consists of a complete set of metabolites in complex biological systems (databases contain ~ 115 000 metabolites). Metabolome is much smaller than proteome (1.8 million different proteins) making it relatively simple for data analysis. On the other hand, metabolites are chemically diverse compounds that occur at wide range of concentrations (ten orders of magnitude) which makes metabolomics analysis challenging. Gas/Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (GC/LC-MS) has become the gold standard for metabolome analyses of clinical samples. However, these approaches require tissue homogenization prior to analysis and they are only hardly able to provide information concerning the spatial localization molecules of interest. MALDI MSI offers a label-free, unbiased visualization of the spatial distributions of biomolecules without almost any sample preparation prior to analysis. This method easily correlates with different histopathological features of the tumor tissue, allowing further insights into the tumor environment.

Various chemical derivatization procedures have been extensively studied to enhance ionization efficacy, modify retention time, and shift molecular mass to a higher value. Functional groups including aldehyde, primary amines, carboxylic acid, and hydroxyl group have been targeted using derivatization strategies. Derivatization process can differ regarding sample types: in-solutions derivatization for the MS homogenous biological solutions (cell/tissue extract, plasma, and other biological fluids) or on-tissue derivatization concerning the spatial localization of biological markers - Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Mass Spectrometry Imaging (MALDI-MSI).

Herein, the method for the on-tissue derivatization of various small molecules has been tested and optimized for the salivary gland tissue. Three derivatization reagents have been used: Girard reagent T (GirT) – carbonyl group, coniferyl aldehyde (CA) – primary amine group, and 2-fluoro-1-methylpyridinium p-toluenesulfonate (FMP-TS) – hydroxy group. Spatial distribution of derivatized/non-derivatized molecules detected in MALDI-MSI has been visualized using commercial software as well as using in-house developed script in R and Python programming language. Mass spectra processing and exploratory analysis using commercial software were compared with in-house developed pipelines. MALDI-MSI spatial segmentation maps were compared with the histopathological annotation. These results underline the potential of on-tissue derivatization MALDI-MSI for sensitive detection of metabolite's spatial distribution on tissue samples.

Supported by the Masaryk University: project no. MUNI/A/1421/2021, MUNI/IGA/1208/2021, MUNI/A/1398/2021, and MUNI/11/ACC/3/2022.

16. MAKE-UP SOLVENT EFFECT ON SFC RESPONSE USING SINGLE AND TRIPLE QUADRUPOLE

PILAŘOVÁ, V., PLACHKÁ, K., GAZÁRKOVÁ, T., NOVÁKOVÁ, L.

Department of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Charles University, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové, Czech Republic

e-mail: pilarovv@faf.cuni.cz

The make-up solvent composition as a key parameter of ultra-high performance supercritical fluid chromatography (UHPSFC) hyphenated with mass spectrometry (MS strongly affects MS response. As the optimization of the make-up solvent composition is time-consuming and includes testing of variety different solvents, we proposed prediction equations simplifying this process in our previous study.¹ The original study focused on the results obtained by triple quadrupole (QqQ) with electrospray ionization (ESI). In this study, we aimed at simplifying of the optimization process and description of the correlation between MS responses when single quadrupole (Q) MS with ESI and various make-up solvents is used. Indeed, the effect of the make-up solvent can be different when the same ionization technique is used as the capillaries, splitting ratio, and MS set-up differ.

UHPSFC-ESI-Q-MS and UHPSFC-ESI-QqQ-MS were used for the analysis of a set of approximately 100 analytes using a generic gradient elution method, diol stationary phase, 2 organic modifiers: methanol and 10 mmol/L ammonia in methanol, and 24 different make-up solvent compositions including pure alcohols and methanol in combination with commonly used additives with variable concentrations. The obtained MS responses were corrected using QC samples to mitigate inter-day variability of MS instrumentation and adjusted to 100 μ L methanol entering the MS source to enable direct comparison. The obtained data were statistically evaluated using Pearson correlation test and regression analysis enabling to describe the correlations between used chromatographic conditions, physicochemical properties of analytes, and MS response and to define the differences between optimal conditions on the two tested analyzers.

¹ Plachká et al., *Analytical Chemistry* 2022, 94 (11), 4841-4849.

The study was supported by the STARSS project (Reg. No. CZ.02.1.01/0.0/0.0/15_003/0000465) co-funded by ERDF and by the Czech Science Foundation project GAČR n. 21-27270S.

17. LC-MS/MS STANOVENÍ PŘÍMÝCH PERORÁLNÍCH ANTIKOAGULANS V PLASMĚ LUPUS POZITIVNÍCH PACIENTŮ

JANA ÚLEHLOVÁ¹, BARBORA PISKLÁKOVÁ², ELIŠKA IVANOVOVÁ², JANA PROCHÁZKOVÁ¹,
PAVLA BRADÁČOVÁ¹, ALEŠ KVASNIČKA², DAVID FRIEDECKÝ², LUDĚK SLAVÍK¹

¹Hemato-onkologická klinika, Lékařská fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci a Fakultní nemocnice Olomouc, 779 00 Olomouc.

²Laboratoř dědičných metabolických poruch, Oddělení klinické biochemie, Univerzita Palackého v Olomouci a Fakultní nemocnice Olomouc, 779 00 Olomouc.

email: barbora.pisklakova@upol.cz

Přímá perorální antikoagulancia (DOAC) jsou cílené inhibitory koagulačních faktorů, které se běžně používají pro antikoagulační terapii. Pro jejich stanovení se používají funkční testy, u kterých je ovšem podezření na možnou interferenci s přítomnými protilátkami, zejména u pacientů, u nichž se vyvinuly lupus antikoagulans (LA). Alternativní možností stanovení DOAC je pomocí LC-MS, která by měla poskytovat správné výsledky nezatížené interferencemi. Za účelem vyhodnocení účinnosti léčby DOAC u lupus pozitivních pacientů bylo do této retrospektivní studie zařazeno 31 vzorků plasmy. Všechny vzorky pacientů byly obohaceny o tři typy DOAC (dabigatran, rivaroxaban a apixaban) v koncentraci, která významně ovlivnila screeningový test na LA, a může tak maskovat přítomnost LA. Stanovení hladin DOAC bylo provedeno jednak rutinně používanými funkčními testy a jednak námi vyvinutou LC-MS/MS metodou. Pro LC-MS/MS analýzu byl použit kapalinový chromatografický systém UltiMate 3000 RS (Dionex, Sunnyvale, Kalifornie) ve spojení s tandemovým hmotnostním spektrometrem na principu trojitého kvadrupólu Triple Quad 6500 (Sciex, Foster City, Kalifornie). Separace byla provedena pomocí polární kolony Luna Omega C18 (Phenomenex, Torrance, Kalifornie) během 3 minut. Tyto výsledky ukázaly významné rozdíly mezi oběma použitými metodami. Při jejich porovnání před a po navázání DOAC se poměry mediánů u funkčních testů pohybují v rozmezí 1,4-1,7, zatímco u LC-MS v rozmezí 62-183. Z této práce vyplývá, že přítomnost protilátek typu LA zásadně ovlivňuje stanovení DOAC funkčními testy a v tomto případě je nutné použít pro jejich stanovení metodu LC-MS/MS.

Grantová podpora: MZ ČR – RVO (FNOI, 00098892), MZ ČR AZV NU20-08-00367, doktorský studentský grant UPOL DSGC-2021-0098.

18. THE EFFECT OF MAKE-UP SOLVENT COMPOSITION ON SFC-MS RESPONSES: ELECTROSPRAY VS UNISPRAY

PLACHKÁ, K., PILAŘOVÁ, V., GAZÁRKOVÁ, T., NOVÁKOVÁ, L.

Department of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Charles University, Heyrovského
1203, 500 05 Hradec Králové, Czech Republic

e-mail: plachkka@faf.cuni.cz

The optimization of the make-up solvent composition is integral but time-consuming part of method development of supercritical fluid chromatography-tandem mass spectrometry (SFC-MS/MS) methods using triple quadrupole. In our previous work, we proposed prediction equations simplifying this process.¹ However, the original study focused solely on the results obtained using electrospray ionization (ESI). An alternative ionization technique, UniSpray (US), has been introduced by Waters. Although it is close to ESI, their ionization mechanisms differ as a high voltage is applied on emitter capillary in ESI, while this voltage is applied onto cylindrical stainless-steel rod in US. Thus, this study aimed to describe the differences in the effect of make-up solvent composition on MS response using US contrary to ESI and to propose a possibilities for the simplification of the optimization process. UHPSFC-UniSpray-QqQ was used for the analysis of a set of approximately 100 analytes using a generic gradient elution method, diol stationary phase, 2 organic modifiers: methanol and 10 mmol/L ammonia in methanol, and 24 different make-up solvent compositions including pure alcohols and methanol in combination with commonly used additives with variable concentrations. The obtained MS responses were corrected using QC samples to mitigate inter-day variability of MS instrumentation and adjusted to 100 μ L methanol entering the MS source to enable direct comparison. Subsequently, the correlations between physicochemical properties and the responses were calculated using the Pearson correlation test and the multi-linear regression analysis was carried out using 5 descriptors and stepwise selection of terms. The final models were validated using the determination of correlation coefficients between predicted and experimental values, the R^2 -predicted coefficients, and several probes. In the last step, the differences in the results obtained using UniSpray contrary to ESI were described in detail.

¹ Plachká et al., *Analytical Chemistry* **2022**, *94* (11), 4841-4849.

The study was supported by the STARSS project (Reg. No. CZ.02.1.01/0.0/0.0/15_003/0000465) co-funded by ERDF and by the Czech Science Foundation project GAČR n. 21-27270S.

19. LC-MS ANALÝZA PROTEINOVÝCH PROFILŮ PLASMATICKÝCH VZORKŮ PACIENTŮ S DILATAČNÍ KARDIOMYOPATIÍ POMOCÍ ISOBARICKÉHO ZNAČENÍ PEPTIDŮ

PAVEL ŘEHULKA¹, VĚRA VOZANDYCHOVÁ^{1,2}, IVA VYKYDALOVÁ¹, HELENA ŘEHULKOVÁ^{1,2},
JANA KLIMENTOVÁ^{1,2}, RADEK PUDIL², JIŘÍ STULÍK¹

¹Katedra molekulární patologie a biologie, Fakulta vojenského zdravotnictví, Univerzita obrany, Třebešská
1575, 50001 Hradec Králové

²I. Interní kardioangiologická klinika, Fakultní nemocnice Hradec Králové, Sokolská 581, 50005 Hradec Králové

e-mail: pavel.rehulka@unob.cz

Různá kardiovaskulární onemocnění představují jeden z nejzávažnějších zdravotních problémů v současné době. Mezi tato onemocnění patří i dilatační kardiomyopatie, která bývá často diagnostikována a jejíž včasné zjištění je velmi důležité pro zahájení vhodné léčby.

V této práci byla aplikována metoda isobarického značení peptidů s následnou LC-MS/MS analýzou plasmatických vzorků pacientů s dilatační kardiomyopatií za účelem relativní kvantifikace proteinových profilů těchto vzorků ve srovnání s kontrolní skupinou zdravých jedinců.

Vzorky plazmy od pacientů s dilatační kardiomyopatií a příslušných kontrol byly odebrány do odběrových zkumavek, depletovány od nejzastoupenějších plazmatických proteinů, redukovány, alkylovány, enzymaticky naštěpeny na peptidy a chemicky značeny isobarickými hmotnostními značkami. Peptidické směsi byly smíchány do jednoho vzorku, frakcionovány pomocí manuální gradientové chromatografie peptidů (reverzní fáze v bazickém pH, popř. iontoměničová chromatografie nebo HILIC) a jednotlivé frakce byly měřeny v nanoLC-MS/MS módu na reverzní fázi v kyselém pH pomocí vysokorozlišovacího tandemového hmotnostního spektrometru. Získaná data byla bioinformaticky zpracována pomocí příslušného programového vybavení. Tímto způsobem byly identifikovány proteiny, jež byly významně změněny u pacientů s dilatační kardiomyopatií.

Tato práce byla podpořena grantem č. NV19-02-00297 Ministerstva zdravotnictví České republiky.

20. BOTTOM-UP PROTEOMICS BY HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY ATMOSPHERIC PRESSURE CHEMICAL IONIZATION AND PHOTOIONIZATION USING DIETHYL ETHOXYMETHYLENEMALONATE DERIVATIZATION

SIMONA SEDLÁČKOVÁ^{1,2}, MARTIN HUBÁLEK¹, VLADIMÍR VRKOSLAV¹, MIROSLAVA BLECHOVÁ¹ AND JOSEF CVAČKA^{1,2}

¹ Institute of Organic Chemistry and Biochemistry of the Czech Academy of Sciences, Prague 160 00, Czech Republic

² Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Charles University, Prague 128 00, Czech Republic

e-mail: simona.sedlackova@uochb.cas.cz

In the common approach of bottom-up proteomics, proteins are enzymatically cleaved to create peptides, which are separated by reversed-phase HPLC and detected by electrospray (ESI). One of the main limitations is the insufficient separation of hydrophilic peptides. These peptides have a low affinity for reversed phases and often elute in the void volume. The insufficient ionization of some peptide species is also a problem.

Many methods have been developed to increase the retention of polar substances in reversed-phase chromatography. In this study, a strategy using the pre-column derivatization performed with diethyl ethoxymethylenemalonate DEEMM¹ was chosen. DEEMM reacts with a free amino group of peptides and introduces a hydrophobic group into the peptide structure to increase reversed-phase retention. Furthermore, its structure contains ionizable groups with electronegative oxygen to facilitate proton transfer in the gas phase. Atmospheric-pressure chemical ionization (APCI) and atmospheric-pressure photoionization (APPI) mass spectrometry were selected to detect derivatized peptides. Both ionizations proved to detect peptides that are not efficiently ionized in ESI².

Peptide standards of various sequences were derivatized and subjected to fragmentation. In full scans, neutral loss of ethanol typical for DEEMM derivatives was observed in APCI-MS. While the MS² spectra of the native peptides provided abundant *b* and *y* fragments and rarely *a* ions, the DEEMM derivatives yielded different types of fragments. Since the charge is fixed at the N-terminus of the derivatized peptides, *a*, *b*, and *c* ions are easily formed. Abundant *y* ions and moderately abundant *x* and *z* ions were also observed. With increasing probe temperature, higher intensities of $[M - C_2H_5OH + H]^+$ were detected, providing structural information in the MS² spectra. The composition of the mobile phase has an essential effect on the intensities of the individual ions as well as on the separation. The best results were obtained in aqueous methanol with buffer at high pH values.

¹ Alaiz, M. et al. *Journal of Chromatography* **1992**, 591, 181-185.

² Sedláčková, S. et. al *Separations* **2022**, 9, 42.

21. VÝVOJ METODY PRO SLEDOVÁNÍ NESPECIFICKÝCH PROTEINOVÝCH MARKERŮ PORUŠENÉ STŘEVNÍ INTEGRITY U PACIENTŮ S IBD POMOCÍ UHPLC-ESI-QQQ-MS/MS

HANA SELIČOVÁ, VOJTĚCH THON, VERONIKA VIDOVÁ

Ústav RECETOX, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Kamenice 753/5, pavilon D29, 625 00 Brno,
Česká republika

email: h.selicova@seznam.cz

Prevalence i incidence zánětlivých střevních onemocnění (IBD), mezi něž patří i Crohnova choroba a ulcerózní kolitida, celosvětově neustále narůstá. V roce 2020 těmito nemocemi v Evropě trpělo zhruba 0,2 % lidí. Jejich diagnostika je v současné době dosti pokročilá. Problém nastává u sledování stavu střeva již diagnostikovaných a léčených pacientů a tím monitorování úspěšnosti léčby na hojení zánětu. Vhodným ukazatelem probíhajících IBD by mohly být proteiny zánětu sledované ve stolici pacienta a proteiny charakterizující integritu střeva, která bývá v případě aktivního zánětu výrazně narušená. Cílem práce je rozšíření multiplexové metody analýzy proteinů zánětu (A1AT, CAL1, CAL2, MPO, IGHA1, IGHA2, ECP, EDN) ve stolici pomocí uHPLC-ESI-QqQ-MS/MS o proteinové markery integrity střeva (ZON, OCL, iFABP). Vyvinutá metoda byla aplikována na skupinu celiaků, kvůli charakteru onemocnění blízkému IBD, a skupinu zdravých dobrovolníků. Metoda byla využita ke sledování léčby pacienta s IBD.

22. VYUŽITÍ Hmotnostní SPEKTROMETRIE PRO NALEZENÍ PANELU POTENCIÁLNÍCH BIOMARKERŮ PRO ODHALENÍ ALZHEIMEROVY CHOROBY

SMIRNOVA T. A.¹, KUČKOVÁ Š.¹

¹Ústav biochemie a mikrobiologie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Česká republika

e-mail: smirnovt@vscht.cz

Alzheimerova choroba (AD) je degenerativní mozkové onemocnění, které často postihuje osoby ve věku nad 65 let. Charakteristickými znaky AD je tvorba amyloidních plaků a neurofibrilárních klubek v mozku, které způsobuje destrukci a smrt nervových buněk spojených s pamětí a dalšími kognitivními funkcemi.

V současné době mají velký potenciál proteinové biomarkery krevní plazmy, což je spojeno s tím, že progresse AD generuje korelované koncentrační změny nebo strukturální změny způsobené posttranslačními modifikacemi proteinů zapojených do procesu vývoje onemocnění. Jejich analýza metodami hmotnostní spektrometrie (MS) je cenným nástrojem hlavně díky své vysoké selektivitě a rychlosti, což umožňuje pak jejich využití v rutinním screeningu. Tyto biomarkery jsou užitečné nejen při hodnocení rizika onemocnění, ale jsou také neocenitelné v diagnostice procesu jeho vzniku, proto sestavení panelu biomarkerů by mohlo umožnit dřívější detekci AD.

Při analýze krevní plazmy naším týmem bylo zjištěno, že odstranění albuminu vede ke zlepšení rozlišení mezi skupinami pacientů (AD vs. zdravé kontroly (CS)) s analýzou pomocí hmotnostní spektrometrie Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization – Time of Flight (MALDI-TOF) s následným vyhodnocováním pomocí analýzy hlavních komponent. U takto připraveného vzorku pacienta bez anamnézy po štěpení trypsinem se podařilo zjistit AD, a tuto diagnózu později potvrdil i poskytovatel vzorků – Ústřední vojenská nemocnice v Praze.

Také námi bylo zjištěno, že odstranění lipidů z krevní plazmy vede k potlačení šumu spekter při měření vzorků pomocí MALDI-TOF, ale ke snížení úspěšnosti jejich klasifikace z 87 % na 67 % u výsledků získaných pomocí Liquid Chromatography Electrospray Ionization Quadrupole Time-of-Flight v kombinaci se zpracováním výsledků metodou nejmenších čtverců diskriminační analýzy.

Tento výstup vznikl v rámci projektu Specifického vysokoškolského výzkumu – projekt č. A2_FPBT_2022_041 a č. A1_FPBT_2022_001.

23. DETEKCE JEDNOTLIVÝCH NANOČÁSTIC V IMUNOCHEMICKÉM STANOVENÍ

SVOJANOVSKÝ V.¹, STIBOREK M.¹, KRÁSENSKÝ P.¹, KROUPA J.², HOUŠKA P.², KANICKÝ V.¹,
PREISLER J.¹

¹ Ústav chemie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Kamenice 5, 625 00 Brno, Česká republika
² Fakulta strojního inženýrství, Vysoké učení technické v Brně, Technická 2896/2, 616 69 Brno, Česká republika

e-mail: svojanovsk@gmail.com

Laserová desorpce za účasti substrátu (SALD) spojená s hmotnostní spektrometrií ICP MS je vhodnou technikou pro prvkovou analýzu vzorků nanosených na vhodných površích^{1,2}. Imunostanovení je univerzální metodou pro kvantitativní stanovení řady biologicky významných molekul (antigenů), na které je možná vazba vhodné protilátky. Toto stanovení využívá enzymatické nebo citlivé luminiscenční detekce imobilizovaných imunokomplexů na vhodný nosič.

V této práci zaměříme enzym v imunostanovení proteinu S1 RBD pocházející z viru SARS-CoV-2 za nanočástici a bude zkoumána možnost detekce jednotlivých značek, tedy i jednotlivých biomolekul pomocí ICP MS. Klíčovým úkolem je desorpce nepoškozených nanočástic pomocí laserové ablace do plazmatu. Vhodně zvolený materiál pro imunostanovení a laser pro ablací tohoto materiálu bude klíčem ke spojení imunochemické analýzy s vysoce citlivou detekcí pomocí ICP MS s nižším limitem detekce. Oproti komerční ELISA soupravě bylo v počátečních fázích experimentu dosaženo poklesnutí limitu detekce z 0,34 ng.ml⁻¹ na 0,32 ng.ml⁻¹.

¹ Peš, O. et al. Off-Line Coupling of Capillary Electrophoresis to Substrate-Assisted Laser Desorption Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. Anal. Chum. 80, 8725–8732 (2008).

² Benešová, I. et al. Direct Analysis of Gold Nanoparticles from Dried Droplets Using Substrate-Assisted Laser Desorption Single Particle-ICPMS. Anal. Chem. 88, 2576–2582 (2016).

Děkujeme za finanční podporu Grantové agentury ČR (21-12262S), Ministerstvu zdravotnictví (NU22-05-00042) a Ministerstvu školství, mládeže a tělovýchovy ČR (MUNI/A/1192/2020).

24. CHROMATOGRAPHIC MODELING AS A TOOL IN OPTIMIZING REVERSED-PHASE SEPARATION METHODS

ŠMAK P.¹, GREGOROVÁ J.¹, KUBINYIOVÁ L.², ŠTINGL J.¹, PEŠ O.¹

¹ Biochemický ústav, Lékařská fakulta, Masarykova univerzita, Kamenice 5, 625 00, Brno

² Ústav chemie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Kamenice 5, 625 00, Brno

e-mail: smaug@mail.muni.cz

Gradient elution can significantly enhance the separation in terms of the run time and peaks' shape in HPLC. However, optimizing a gradient elution method can be a laborious process, especially if a larger number of compounds, significantly differing in the chromatographic behavior, needs to be separated. Multiple approaches are employed in order to obtain an ideal gradient composition over time – ranging from the “trial and error” methods to complex mathematical models. These models often rely on the Snyder's equation and its modifications. In a typical setup, two or more separations are initially performed, and the results are fed to a software analysis tool, which tries to predict ideal conditions for the current system. Up to date available software tools for gradient run optimization lack either financial affordability or a feature-rich interface. A software tool developed in Python was developed, tested, and will be presented.

The work was supported by funds from the Specific University Research Grant of Medical Faculty Masaryk University (MUNI/A/1090/2021).

25. IMUNOHISTOCHEMICKÉ ZNAČENÍ ŘEZŮ SFÉROIDŮ ZLATÝMI NANOČÁSTICEMI A JEJICH DETEKCE POMOCÍ LASEROVÉ ABLACE A ZOBRAZOVACÍ HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE S INDUKČNĚ VÁZANÝM PLAZMATEM

TOMANIECOVÁ A.¹, STRÁNÍK J.¹, JINDŘICHOVÁ L., STIBOREK M., PAVLATOVSKÁ B.²,

NAVRÁTILOVÁ J.², KROUPA J.³, HOUŠKA P.³, KANICKÝ V.¹, PREISLER J.¹

¹Ústav chemie, Masarykova univerzita, Kamenice 5, 625 00 Brno, Česká republika

²Ústav experimentální biologie, Masarykova univerzita, Kamenice 5, 625 00 Brno, Česká republika

³Fakulta strojního inženýrství, Vysoké učení technické v Brně, Technická 2896/2, 616 69 Brno, Česká republika

Sféroidy jsou 3D buněčné modely simulující prostředí nádorové tkáně. Ve vnějších vrstvách sféroidu se nachází primárně aktivně proliferující buňky. Jádru naopak tvoří převážně buňky nekrotické, které odumírají kvůli sníženému přísunu živi a kyslíku do vnitřních částí sféroidu.

V tomto příspěvku bude popsán vývoj metody pro imunohistochemické značení proliferčního markéru Ki-67 sféroidu adenokarcinomu tlustého střeva z linie HT-29. Místo námi dříve používaného konjugačního systému streptavidin-biotin pro navázání protilátky na 20nm zlatou nanočástici, bude zkoumána přímá konjugace protilátky a nanočástice pomocí N-hydroxysukcinimidu. Jednodušší schéma konjugace potenciálně nabízí nižší nespecifické interakce a otevírá možnost simultánní analýzy více proteinů v jednom vzorku.

Děkujeme za finanční podporu Grantové agentury ČR (GA21-12262S) a Grantové agentury MU (MUNI/A/1539/2021)

26. OPTIMALIZACE MIKROKOLONOVÉ CHROMATOGRAFIE V PROTEOMICKÉ ANALÝZE

VALÁŠEK J.¹, NECHVÁTALOVÁ M.¹, KUBIŠ M.¹, URBAN J.¹

¹ Ústav chemie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Brno

e-mail: j.valasek@mail.muni.cz

Proteomická analýza je jednou z nejdůležitějších metod umožňujících rychlé a přesné stanovení aktivity a koncentrace proteinů v biologických vzorcích, umožňující včasnou diagnostiku onemocnění související s tvorbou specifických proteinů, jako je například nádorové onemocnění. Nejvíce využívaná metoda nano-flow LC-MS se vyznačuje vysokou citlivostí, avšak za cenu nižší robustnosti a tím spojenou obtížnou aplikací v klinické analýze. Vhodnou alternativou může být využití významně robustnější mikrokolonové LC-MS za použití matematického plánování pro optimalizaci chromatografického a spektrometrického systému.

Využití Boxova-Behnkenova modelu a regresní analýzy experimentálně získaných dat pomocí kvadratického polynomu umožnilo porovnání jednotlivých experimentálních faktorů na vybrané odezvy. Z chromatografického hlediska byl sledován vliv průtoku mobilní fáze, teploty a doby trvání gradientu na intenzitu signálu, počet MS/MS spekter a informaci týkající se pokrytí sekvence jednotlivých proteinů. Pro optimalizaci elektrospreje byl sledován vliv napětí, teploty a pozice kapiláry. Optimalizované matematické modely byly následně využity k předpovědi testovaných parametrů pro experimentální podmínky, které nejsou součástí původního modelu.

Děkujeme za finanční podporu Grantové agentury české republiky (20-21903S) a také prof. Preislerovi a Dr. Bednaříkovi.

27. ION MOBILITY MASS SPECTROMETRY ANALYSIS OF AB42 OLIGOMERS

MIKULÁŠ VLK^{A,B}, MARTIN HUBÁLEK^A, JOSEF CVAČKA^{A,B}

^a Institute of Organic Chemistry and Biochemistry of the Czech Academy of Sciences, Flemingovo náměstí
542/2. 16000, Prague, Czech Republic.

^b Department of Analytical Chemistry, Charles University, Hlavova 2030/8, Prague, Czech Republic

Amyloid beta is widely accepted as one of the main causes of Alzheimer's disease (AD). Amyloid beta (1-42) and (1-40) are major components of senile plaques typically present in the grey matter of AD patients. A β (1-42) in β -sheet conformation forms a nucleation seed and promotes further aggregation of A β (1-40). Neurotoxic early stage oligomers aggregate into protofibrils and further prolongate to form mature fibrils and plaque deposits. Thorough characterization of soluble A β (1-42) oligomers is vital to comprehensive understanding of the oligomerization process. Native mass spectrometry can be utilized for such analysis as it combines using non-denaturing conditions with soft ionization techniques, therefore maintains non-covalent interactions. Optimization of experimental and instrumental conditions was performed enabling detection of A β (1-42) oligomers formed *in vitro*. Moreover, ion mobility was used and optimized for separation of commonly occurring isobaric oligomer ions. Lower molecular weight oligomeric species up to hexamer (9 kDa – 27 kDa) were detected alongside the monomer.

This work was conducted in collaboration with Alzheon, Inc.

28. METABOLISM OF SELECTED MEMBERS OF CHICKEN GUT MICROBIOTA

IN VIVO

MICHAL ZEMAN, JANA RAJOVA, LENKA VLASATIKOVA, ZUZANA SEIDLEROVA, TEREZA

KUBASOVA, IVAN RYCHLIK

Veterinary Research Institute, Brno, Czech Republic

Introduction:

The commercial production of chickens dramatically differs from chickens raised in the backyards. This difference in their lifestyle influences also their gut microbiome. In commercial production, chickens are held without any contact with parent birds and the outdoor environment for their whole life. Missing vertical transfer of microbes from parents to offspring leaves an open niche for pathogenic bacteria. Higher susceptibility of commercially hatched chicks to infections leads to extensive use of antibiotics. The administration of probiotics can compensate for the lack of parents' microbiota, however, the development of optimal probiotic composition is still in progress.

Methods:

Commercial chicks (ISA-Brown egg-lying hybrid) were inoculated by individual strains from the set of 19 anaerobic bacteria isolated previously. By the use of 16S rRNA gene sequencing and Qiime2 analysis, we observed successful colonisation of inoculated bacteria in the chicken caecum. Protein sequences originated from the whole-genome shotgun-sequencing of tested bacteria and were annotated by Prokka using the Swiss-Prot and the HAMAP databases. Purified caecal proteins isolated from 8-day-old chicks were digested and their mass spectra were analysed by LTQ-Orbitrap VelosPro hybrid mass spectrometer. Protein data were processed in ProteomeDiscoverer and R statistical software. Metabolic pathways of detected proteins were searched in iPATH and MetaCyc.

Results:

Bacterial strains representing phyla Actinomycetota, Bacillota, Bacteroidota and Pseudomonadota were able to successfully colonize chicken caecum, however, they differed in overall abundance. The most effective colonisers belonged to the phylum Bacteroidota. Of tested bacteria, *Bifidobacterium* (Actinomycetota) strain expressed mostly proteins of fructose 6-phosphate pathway thus degrading saccharides to lactate and acetate. Dominant was also the capture of vitamin B12 from the environment in exchange for the release of vitamin B1 into the environment. Protein expression in Pseudomonadota differed for different strains. Sugar metabolism was suppressed and aminoacid degradation served as a source of carbon. Byproducts entered the Krebs cycle as fumarate. Bacillota expressed mainly oxidoreduction flavoproteins and proteins responsible for fatty acid production. Bacillota also imported sugars from the environment. High production of transport proteins for sugars and aminosugars were observed for Bacteroidota which were coupled with degradation machinery for saccharides. Proteins for fatty acid modifications also belonged among the most abundant.

Discussion:

A combination of next-generation sequencing and proteome analysis can be applied to the analysis of potential probiotic strains as well as particular strains found in complex samples. This approach based on an analysis of metabolism enables us to predict candidate strains suitable as chicken probiotics and shed light on how to cultivate yet uncultivable bacteria.