



Universiteit  
Leiden

The Netherlands

## Innovative (electro-driven) sample preparation tools for metabolomics study of muscle aging

He, Y.

### Citation

He, Y. (2023, January 11). *Innovative (electro-driven) sample preparation tools for metabolomics study of muscle aging*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3505583>

Version: Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/3505583>

**Note:** To cite this publication please use the final published version (if applicable).

## Nederlandse Samenvatting

Sarcopenie is een belangrijke oorzaak van het verlies van zelfstandigheid bij ouderen wereldwijd, en effectieve medicatie voor sarcopenie ontbreekt nog steeds. Oxidatieve stress, ontsteking, energieproductie, en voeding werden gerapporteerd in hoge mate gerelateerd te zijn aan sarcopenie, en dieetbeperking (DB) wordt beschouwd als een effectieve interventie om veroudering te verminderen en verouderingsgerelateerde ziekten, waaronder sarcopenie, te vertragen. Aan veroudering gerelateerde ziekten zijn uitgebreid onderzocht met behulp van een muismodel dat deficiënt is in het DNA-excisieherstelgen *Ercc1* (*Ercc1<sup>Δ/-</sup>*) of *Xpg* (*Xpg<sup>-/-</sup>*). Om bij te dragen aan de diagnose en behandeling van sarcopenie, streven we ernaar om metabolomics-benaderingen in dit muismodel te gebruiken om het mechanisme van voedingsbeperkingseffecten op sarcopenie te onderzoeken en om belangrijke biomarkers voor sarcopenie te identificeren. Het spierweefsel dat kan worden geïsoleerd uit *Ercc1<sup>Δ/-</sup>* en *Xpg<sup>-/-</sup>* muizen is echter beperkt in hoeveelheid, wat een uitdaging vormt voor de analyse ervan met behulp van meerdere metabolomics-platforms die een breed scala aan metabolieten profileren die verband houden met oxidatieve stress, ontsteking, energieproductie, en voeding. Daarom is het doel van dit proefschrift om in de eerste plaats innovatieve en geminiaturiseerde monstervoorbereidingsmethoden te ontwikkelen voor kleine hoeveelheden monsters, en ten tweede het toepassen van deze ontwikkelde methoden op de minuscule spierweefselmonsters van *Ercc1<sup>Δ/-</sup>* en *Xpg<sup>-/-</sup>* muizen voor het onderzoeken van de mechanismen die betrokken zijn bij sarcopenie.

In **Hoofdstuk 2** hebben we een handmatige monstervoorbereiding voor basisanalyten ontwikkeld door gebruik te maken van een nieuwe methode; driefasige elektroextractie (EE), die voordelen heeft voor de extractie van geladen analyten uit kleine hoeveelheden monsters, vooral monsters met analyten met een lage concentratie. Vier basismodelverbindingen, namelijk propranolol, amitriptyline, bupivacaïne, en oxeladine, werden gebruikt om de principiestudie van de driefasige EE-methode uit te voeren door verschillende parameters te optimaliseren, dat wil zeggen de typen en samenstelling van de organische fase, pH van het monster en acceptor fase, samenstelling van acceptorfase, extractiespanning en extractietijd. De resultaten toonden aan dat de soorten organische fase, pH van monster en acceptorfase, extractiespanning en tijd cruciaal zijn voor de driefasige EE-methode om een hoge extractie-efficiëntie voor basisanalyten te bereiken. De

geoptimaliseerde driefasige EE-methode werd met succes toegepast op menselijke urine- en plasmamonsters die slechts een kleine hoeveelheid monster verbruikten.

Om de cruciale parameters voor de driefasige EE-methode grondig te onderzoeken, werden zure modelverbindingen, d.w.z. naproxen, fenoprofen, flurbiprofen, en ibuprofen, gebruikt met een verbeterde handmatige EE-opstelling in **hoofdstuk 3**. Een Design of Experiment-benadering (Box-Behnken-ontwerp) werd gebruikt voor optimalisatie van de driefasige parameters, dwz het type organisch oplosmiddel, de pH van het monster en de acceptorfase, de extractiespanning en -tijd en de geoptimaliseerde methode werd met succes toegepast tot menselijke plasmamonsters met een beperkt volume. Onze resultaten lieten zien dat, net als bij de basische verbindingen die in hoofdstuk 2 zijn onderzocht, het type organisch oplosmiddel, de pH van het monster en de acceptorfase, het extractievoltage en de tijd cruciale parameters zijn voor de driefasige EE-methode.

Vanwege de benodigde tijd en moeite is de handmatige driefasige EE-configuratie beperkt in zijn toepassing tot een groot aantal sarcopeniemonsters. Automatisering is een effectieve oplossing voor deze uitdaging. De stabiliteit van de driefasige EE (acceptordruppel) op het geautomatiseerde platform, en hoe dit de driefasige EE-prestaties beïnvloedt, moet echter worden onderzocht voordat de geautomatiseerde driefasige EE op sarcopeniemonsters wordt toegepast. Daarom werd in de eerste fase van **hoofdstuk 4** een geautomatiseerde driefasige EE-opstelling met machinevisie ontwikkeld, en gebruikt voor de evaluatie van de stabiliteit van de acceptordruppels, en voor de schatting van de extractieprestaties door acht modelverbindingen en een Design of Experiment-benadering toe te passen (Box-Behnken-ontwerp). Een stabiele acceptordruppel werd waargenomen in de geautomatiseerde driefasige EE-opstelling onder verschillende omstandigheden, d.w.z. verschillende extractiespanning en pH van het monster. De geoptimaliseerde geautomatiseerde driefasige EE-methode toonde een hoog extractieherstel voor de modelverbindingen en werd met succes toegepast op menselijke urine- en plasmamonsters met lage detectielimieten (LODs).

De monsterplaat voor de geautomatiseerde driefasige EE-opstelling met machinevisie bevat slechts 3 monster reservoirs voor een duidelijke visualisatie van de acceptordruppel en eenvoudige fabricage van de plaat. Dit beperkte echter de doorvoer en toepassing van de opstelling. Om de geautomatiseerde driefasige EE-methode toe te passen op een groot aantal sarcopeniemonsters, werd in de tweede fase van **hoofdstuk 4** een high-throughput

en volledig geautomatiseerde driedfasige EE-opstelling ontwikkeld met behulp van een gemodificeerde plaat met 96 reservoirs met een zelfgemaakte bodemelektrode. Acylcarnitines spelen een belangrijke rol bij de  $\beta$ -oxidatie en energieproductie van vetzuren door vetzuren van het cytoplasma naar de mitochondriën te transporteren, wat sterk geassocieerd is met spierkracht en spierfunctie. Tien soorten acylcarnitines werden gebruikt als modelanalyten om de volledig geautomatiseerde en high-throughput driedfasige EE-opstelling te optimaliseren met behulp van een Design of Experiment-benadering (Box-Behnken-ontwerp). De geoptimaliseerde opstelling toonde goede extractieprestaties voor de acylcarnitines in zowel academische als menselijke plasmamonsters. Om referentie-informatie te leveren voor isolatie van muisspierweefsel (na dissectie van de muis) voor de sarcopenie-studie, werd de geoptimaliseerde opstelling toegepast op de progeroid (*Ercc1 $\Delta$* ) muisspier om af te leiden of snelle spierweefselisolatie noodzakelijk is voor acylcarnitine-stabiliteit. De resultaten toonden aan dat de isolatiesnelheid van spierweefsel geen invloed heeft op de stabiliteit van acylcarnitine, en de volledig geautomatiseerde en high-throughput driedfasige EE-opstelling kan worden gebruikt voor de analyse van sarcopenie-spierweefsel. Alleen geladen analyten kunnen worden geëxtraheerd door de geautomatiseerde en high-throughput driedfasige EE-opstelling, om meer metabolieten te analyseren voor de studie van het sarcopeniemechanisme, is een monstervoorbereidingsmethode voor ongeladen (polaire en niet-polaire) metabolieten noodzakelijk. In **hoofdstuk 5** worden twee vloeistof-vloeistofextractiemethoden (LLE) beschreven, BuOH-MTBE-Water (BMW) en BuOH-MTBE-More-Water (BMMW), en twee eerder gerapporteerde LLE-methoden, Bligh-Dyer (BD) en BuOH-MTBE-Citraat (BMC), werden vergeleken en geëvalueerd om de optimale methode te verkrijgen. Interne standaarden van metabolieten gerelateerd aan sarcopenie, d.w.z. oxidatieve stress, ontsteking, energieproductie, en voeding, werden gebruikt voor de evaluatie met varkensspier als surrogaatmatrix. De BMMW-methode toonde de beste extractieprestaties en werd toegepast op *Ercc1 $\Delta$*  muisspier om de isolatiesnelheid van spierweefsel op metabolietstabiliteit te onderzoeken. De resultaten toonden aan dat snelle monsterisolatie van cruciaal belang is voor de stabiliteit van deze metabolieten en voor het mechanistische onderzoek naar sarcopenie.

De ontwikkelde geminiaturiseerde monstervoorbereidingsmethode werd gebruikt in de studie van de effecten van dieetbeperking (DB) op sarcopenie in **hoofdstuk 6**, samen met meerdere geoptimaliseerde vloeistofchromatografie-massaspectrometrie (LC-MS)

metabolomics platforms. Hier hebben we aangetoond dat oxidatieve stress-gerelateerde, pro-inflammatoire en spiergroeistimulerende metaboliëten met name naar beneden werden gemoduleerd door DR, en de anti-ontstekings- en energieproductieroutes, en het energieverbruik van de energiebron significant werd opwaarts gemoduleerd door DR in *Ercc1<sup>Δ/-</sup>* en *Xpg<sup>-/-</sup>* muizen. De neerwaarts gemoduleerde metaboliëten van spiergroeistimulatie en het verbeterde verbruik van energiebronnen kunnen door DB een verminderd lichaamsgewicht (en mogelijk spiermassa) van de muis veroorzaken. De neerwaarts gemoduleerde oxidatieve stress, pro-inflammatoire metaboliëten en opwaarts gemoduleerde anti-inflammatoire metaboliëten droegen bij aan een lager energieverbruik door DB, wat kan resulteren in een verbeterde spierkwaliteit samen met de bijdrage van opwaarts gemoduleerde energieproductie. De betere spierkwaliteit kan worden geassocieerd met de onaangetaste grijpkracht en verbeterde motorische coördinatie en leerprestaties die worden gezien in de gedragsstudie van DB in *Ercc1<sup>Δ/-</sup>* en *Xpg<sup>-/-</sup>* muizen. Deze bevindingen bieden mechanisch inzicht in sarcopenie, leveren potentiële biomarkers voor toekomstige diagnose, preventie en behandeling van sarcopenie, en kunnen bijdragen aan gezond ouder worden in de wereld.