

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
Přírodovědecká fakulta
Laboratoř růstových regulátorů

**Analýza omega-3 mastných kyselin
z rybích extraktů**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor: **Sára Filipová**
Studijní program: B1501 Experimentální biologie
Studijní obor: Experimentální biologie
Forma studia: Prezenční
Vedoucí práce: **Mgr. Lukáš Najdekr, Ph.D.**
Termín odevzdání práce: 2023

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Sára Filipová
Název práce	Analýza omega-3 mastných kyselin z rybích extraktů
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Ústav molekulární a translační medicíny Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci, Laboratoř metabolomiky
Vedoucí práce	Mgr. Lukáš Najdekr, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2023
Abstrakt	Zájem o studium omega-3 mastných kyselin v posledních letech výrazně vzrostl v důsledku jejich příznivého vlivu na fyziologické funkce člověka. Zdrojem těchto esenciálních mastných kyselin jsou zejména ryby a mořské plody. Komerční řetězce nabízí velký výběr druhů ryb, přičemž jejich zpracování může ovlivnit obsah omega-3 mastných kyselin v jednotlivých výrobcích. S použitím necílené metabolomiky a statistických metod bylo porovnáno zastoupení omega-3 mastných kyselin a polynenasycených mastných kyselin mezi třemi druhy ryb s různými typy zpracování. Dále byla testována jejich stabilita po přidání antioxidantu BHT. K analýze byla použita metoda ultraúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí na principu orbitální iontové pasti.
Klíčová slova	nenasycené mastné kyseliny, necílená metabolomika, UHPLC, Orbitrap, statistická analýza, BHT
Počet stran	72
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Author's full name	Sára Filipová
Title of thesis	Analysis of Omega-3 fatty acids from fish extracts
Type of thesis	Bachelor
Department	Institute of Molecular and Translational Medicine Faculty of Medicine and Dentistry Palacky University Olomouc, Laboratory of metabolomics
Supervisor	Mgr. Lukáš Najdekr, Ph.D.
The year of presentation	2023
Abstract	Interest in the study of omega-3 fatty acids has increased significantly in recent years due to their beneficial effects on human physiological functions. The sources of these essential fatty acids are mainly fish and seafood. Commercial chains offer a wide range of fish species and types of processing of fish products, which can affect the representation of omega-3 fatty acids and polyunsaturated fatty acids. Using untargeted metabolomics and statistical methods was compared their abundance between three fish species in different types of processing. Furthermore, was tested their stability after the addition of the antioxidant BHT. The analysis was performed by ultra-high-performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry with Orbitrap ion detection.
Keywords	unsaturated fatty acids, untargeted metabolomics, UHPLC, Orbitrap, statistical analysis, BHT
Number of pages	72
Number of appendices	0
Language	Czech

„Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením odborného vedoucího Mgr. Lukáše Najdekra, Ph.D. a za použití citované literatury.“

V Olomouci dne

.....

Sára Filipová

Největší poděkování patří vedoucímu mé bakalářské práce Mgr. Lukášovi Najdekrovi, Ph.D. za odborné vedení, ochotu při konzultacích a zejména za velkou motivaci ke zpracování tohoto tématu. Taktéž bych na tomto místě ráda poděkovala své rodině, která mi byla po celou dobu oporou.

OBSAH

Seznam zkratk	3
Úvod	5
Cíle práce	6
TEORETICKÁ ČÁST	7
1 Biochemie lipidů a mastných kyselin	8
1.1 Mastné kyseliny	9
1.1.1 Zdroj biologicky aktivních mastných kyselin	10
1.1.2 Význam nenasycených mastných kyselin ve výživě	11
2 Metabolomika a lipidomika	13
2.1 Metabolomické přístupy a metody studia	15
2.2 Lipidomika a lipidomická analýza	16
3 Chromatografická separace lipidů	17
3.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie	17
3.1.1 Instrumentace HPLC	17
3.1.2 Chromatografické kolony pro HPLC	19
3.1.3 Systémy s reverzními fázemi	19
3.2 Ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie	20
4 Hmotnostní spektrometrie	21
4.1 Historie a vývoj hmotnostní spektrometrie	21
4.2 Separace iontů a instrumentace hmotnostního spektrometru	22
4.3 Orbitrap	24
4.3.1 Konstrukce a vstupní systém	24
4.3.2 Mechanismus spirálního pohybu iontů	25
4.4 Využití Orbitrapu jako detektoru v tandemové hmotnostní spektrometrii	27
4.4.1 DDA a DIA módy	29
5 Zpracování metabolických dat	31
5.1 Předzpracování dat	31
5.2 Metody statistického zpracování dat	32
5.2.1 Jednorozměrné metody statistické analýzy	32
5.2.2 Vícerozměrné metody statistické analýzy	33
EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	35
6 Materiál a metody	36
6.1 Analytická metoda	36
6.1.1 Měření fragmentačních hmotnostních spekter	37
6.2 Přístrojové vybavení	38
6.3 Biologický materiál	38
6.4 Použité chemikálie	39
6.5 Příprava vzorku	39
6.5.1 Jednofázová extrakce	39
6.5.2 Dvofázová extrakce	40
6.6 Příprava mobilních fází	41
7 Výsledky	42
7.1 Identifikace dat v necílené metabolomice	42
7.2 Optimalizace extrakční metody	43
7.3 Chromatografická separace	46
7.4 Vícerozměrná analýza jednotlivých vzorků rybí tkáně	50

8	Diskuze.....	55
9	Závěr.....	59
	Reference.....	60

Seznam zkratek

ACN	acetonitril
ALA	kyselina alfa-linolenová
ATP	adenosintrifosfát
BHT	butylhydroxytoluen
CER	ceramidy
CoA	koenzym A
DDA	datově závislý sběr dat
DHA	kyselina dokosahexaenová
DIA	datově nezávislý sběr dat
EPA	kyselina eikosapentaneová
FA	mastné kyseliny
FC	„Fold Change“
FWHM	„Full Width at Half Maximum“
GC	plynová chromatografie
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IPA	isopropylalkohol
LC	kapalinová chromatografie
LPC	lysofosfatidylcholiny
MK	mastná kyselina
MS	hmotnostní spektrometrie
MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie
MS ⁿ	tandemová hmotnostní spektrometrie
NMR	nukleární magnetická resonance
PC	fosfatidylcholiny
PCA	metoda hlavních komponent
PE	fosfatidylethanolaminy
PI	fosfatidylinositoly
PS	fosfatidylseriny
PUFA	polynenasyčené mastné kyseliny
QC	vzorek kontroly kvality
RP	system reverzních fází
SM	sfigomyeliny

TAG	triacylglycerol
TCA	cyklus trikarboxylových kyselin
TOF	analyzátor doby letu
UHPLC	ultraúčinná kapalinová chromatografie

Úvod

Biologicky aktivní mastné kyseliny se významně podílejí na zdraví člověka. Do této skupiny se řadí zejména nenasycené omega-3 (n-3) a omega-6 (n-6) mastné kyseliny, které jsou esenciální a získávají se tak pouze ze stravy. Ačkoliv jsou n-6 mastné kyseliny také významné pro fyziologické funkce v těle člověka, na rozdíl od n-3 mastných kyselin zvyšují riziko přítomnosti zánětů, nadváhy a s tím spojené riziko kardiovaskulárních onemocnění. Zabráněním těchto rizik lze dosáhnout udržováním správného poměru n-3 a n-6 v krvi. Nejefektivnějším řešením je tak úprava stravy a zařazení ryb a mořských plodů.

Aktuálně je na trhu dostupná široká škála jednotlivých druhů ryb a rybích výrobků, které se odlišují zpracováním, jako jsou výrobky mražené, chlazené a konzervované. Druh ryby a její následné zpracování může mít výrazný vliv na zastoupení n-3 nenasycených mastných kyselin.

Během skladování rybích tkání může dojít k nežádoucí autooxidaci lipidů. Přidáním antioxidantu je možné tuto oxidaci významně omezit. S pomocí necílené metabolické analýzy s využitím kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí (LC/MS) byly v této práci sledovány rozdíly v zastoupení nenasycených mastných kyselin mezi třemi druhy ryb v různých zpracováních. Dále byla testována jejich stabilita po přidání antioxidantu BHT během přípravy jednotlivých vzorků.

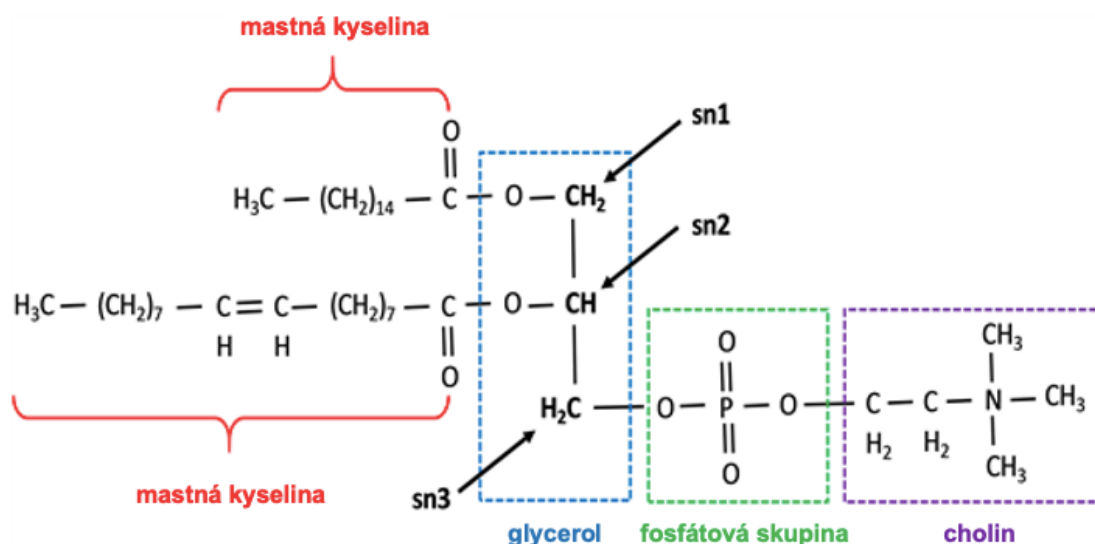
Cíle práce

- Vypracování literární rešerše na téma: lipidy a mastné kyseliny, metabolomika, vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC), hmotnostní spektrometrie (MS), statistická analýza dat
- Demonstrace rychlosti „MetID“ s použitím UHPLC-MS necílené metabolomiky
- Pochopení a „kvantifikace“ problému identifikace v necílené metabolomice
- Porovnat složení metabolitů v jednotlivých biologických vzorcích, výtěžnost extrakčních metod a stabilitu nenasycených mastných kyselin po přidání antioxidantu BHT
- Zpracování dat základními statistickými metodami

TEORETICKÁ ČÁST

1 Biochemie lipidů a mastných kyselin

Lipidy jsou skupina hydrofobních organických sloučenin s relativně nízkou molekulovou hmotností (do 1000 Da). Nejběžnější kategorie lipidů, zejména živočišné tuky a rostlinné oleje, obsahují ve své molekule nepolární mastné kyseliny vázané esterovou vazbou na glycerol nebo jiný alkohol. Chemicky lze popsat jako estery vyšších mastných kyselin a alkoholů. Jejich součástí mohou být také izoprenové jednotky s lineární nebo cyklickou strukturou a různým počtem substituentů (například karboxylové kyseliny, hydroxylové skupiny, heteroatomy) (Christie 2023). Na základní skelet může být kovalentně vázána i jiná polární molekula, například fosfát nebo sacharid, což zvyšuje amfifilní charakter molekul (Obrázek 1).



Obrázek 1: struktura fosfatidylcholinu, označení *sn 1, 2, 3* znázorňuje pozice jednotlivých substituentů, převzato a upraveno dle MacDonald et al. 2019

V důsledku velké rozmanitosti připojených aduktů a různého umístění dvojných vazeb v nepolárních řetězcích jsou lipidy značně heterogenní skupinou molekul. Přesný počet molekulárních druhů lipidů zatím není znám. Databáze Lipid Maps aktuálně obsahuje přes 47 tisíc známých lipidových struktur, které lze rozdělit do 8 kategorií (Tabulka 1).

Tabulka 1: rozdělení lipidů do 8 kategorií a jejich početné zastoupení dle databáze Lipid Maps (www.lipidmaps.org, citováno 6. 5. 2023)

Kategorie	kurátorované	počítačově generované	celkem
Mastné kyseliny	8677	1878	10555
Glycerolipidy	354	7379	7733
Glycerofosfolipidy	1747	8328	10075
Sfingolipidy	1801	3168	4969
Steroly	3651	0	3651
Prenoly	2405	0	2405
Sacharolipidy	51	1294	1345
Polyketidy	7151	0	7151
Celkem	25837	22047	47884

Lipidy jsou součástí tuků a olejů. Člověk je přirozeně získává ze stravy a většinu z nich je schopen i znovu syntetizovat. Mezi glycerolipidy se řadí triacylglyceroly, které jsou pro člověka významným zdrojem energie. Glycerofosfolipidy a sfingolipidy tvoří strukturální složku membrán, dále se podílejí na buněčné signalizaci a regulaci (Brown, Marnett 2011).

1.1 Mastné kyseliny

Zdrojem mastných kyselin (MK) je převážně oxidace triacylglycerolů (TAG). Další biochemickou přeměnou mohou být MK využity například pro tvorbu energie ve formě ATP nebo jsou zabudovány do fosfolipidů (Bergé, Barnathan 2005).

TAG jsou odbourávány buňkách jater při procesu trávení, kdy dochází k jejich hydrolytickému štěpení pomocí lipáz na monoacylglycerol nebo diacylglycerol a mastné kyseliny. Odbourávání mastných kyselin pak probíhá v matrix mitochondrií. K oxidaci dochází na tzv. beta-uhlíku, proto se proces nazývá beta-oxidace. Výsledným produktem beta-oxidace MK je pak acetylkoenzym A (acetyl-CoA). V myocytech slouží tento produkt jako substrát pro cyklus trikarboxylových kyselin (TCA) a k následné tvorbě energie ve formě ATP. V hepatocytech je acetyl-CoA využit pro syntézu ketoláték při hladovění po vyčerpání zásob glykogenu (Talley, Mohiuddin 2023).

Syntéza lipidů, neboli lipogeneze, zahrnuje procesy přeměňující uhlíkové produkty štěpení živin na znovu využitelné molekuly. Prvním krokem lipogeneze je biosyntéza mastných kyselin. V TCA cyklu v mitochondrii je citrát přeměněn a acetyl-CoA za katalýzy ATP-citrát lyázy. Ten je následně přeměněn pomocí acetyl-CoA karboxylázy na malonylkoenzym A (malonyl-CoA). Oba výsledné produkty jsou spojeny za účasti enzymového systému syntázy mastných kyselin (FAS – „Fatty acid synthase“). Opakováním kondenzací acetylových skupin vzniká základní 16 uhlíková nasycená MK - kyselina palmitová. Kyselina palmitová je dále prodlužována a desaturována za vzniku různých typů MK, které mohou být využity k syntéze dalších biomolekul, jako jsou TAG, fosfatidylcholinů (PC), fosfatidylethanolaminů (PE) nebo fosfatidylserinů (PS) (Baenke et al. 2013).

Mastné kyseliny jsou skupiny alifatických monokarboxylových kyselin tvořící nepolární část molekul lipidů. Obecně obsahují sudý počet atomů uhlíku, navíc mohou obsahovat nasycené nebo nenasycené dvojně vazby ve specifických polohách v *cis* konfiguraci. MK v živočišných tkáních obvykle obsahují 14-22 uhlíkových atomů v řetězci a 0-6 dvojných vazeb.

Na základě obsahu dvojných vazeb lze MK rozdělit na nasycené (SFA – „saturated fatty acids“), neobsahující žádnou dvojnou vazbu, mononenacené (MUFA – „monounsaturated fatty acids“) obsahující pouze jednu dvojnou vazbu a polynenasycené (PUFA – „polyunsaturated fatty acids“) s více než jednou dvojnou vazbou. PUFA obsahují obvykle 2-6 nenasycených dvojných vazeb (Christie, Bridgwater 1989).

Ačkoliv PUFA mohou mít různou délku, při číslování řetězců je v určité nomenklatuře poslední methylový uhlík označován řeckým písmenem omega ω , které představuje poslední písmeno řecké abecedy. Podle polohy dvojně vazby můžeme PUFA rozdělit na omega-3 (n-3) a omega-6 (n-6).

1.1.1 Zdroj biologicky aktivních mastných kyselin

Člověk přirozeně nedokáže syntetizovat dvojnou vazbu na pozici 6 a méně, proto se n-3 a n-6 MK řadí mezi esenciální, lze je získat pouze ze stravy (Ruiz-Rodriguez, Reglero, Ibañez 2010). Mezi zástupce n-6 MK patří například kyselina linolová (LA) a kyselina arachidonová (AA). Jednotlivé druhy n-3 MK jsou přehledně znázorněny v Tabulce 2.

Tabulka 2: rozdělení jednotlivých n-3 MK, jejich strukturní vzorce a běžně používané zkratky dle Shahidi, Ambigaipalan (2018)

Mastná kyselina	Zkratka	Vzorec
kyselina α -linolenová	ALA	18:3
kyselina stearová	SDA	18:4
kyselina eikosapentaenová	EPA	20:5
kyselina dokosapentaenová	DPA	22:5
kyselina dokosaheptaenová	DHA	22:6

Významným zdrojem AA a LA se skupiny n-6 MK jsou vejce, hovězí a jehněčí maso, dále sójový a slunečnicový olej (Mariamenatu, Abdu 2021).

Primárními producenty olejů bohatých na n-3 MK jsou většinou jednobuněční protisté a řasy, které jsou bohatým zdrojem zejména EPA a DHA. Tato protista jsou sbírána zooplanktonními koryši, kteří se živí filtrováním. Koryši jsou zase účinně sbíráni rybami, které se živí zooplanktonem. V těchto krátkých potravních řetězcích nedochází k biohydrogenačním reakcím, takže zastoupení biologicky významných MK zůstává v těle ryb zachováno.

Rozdělení ryb podle jejich výskytu na pelagické a hlubinné se obecně vztahuje na rozdělení tučných a méně tučných ryb. Zásoby olejů bohatých na n-3 MK jsou u pelagických ryb uloženy především ve svalovině (losos, makrela, sardinka). Zatímco oleje u hlubinných ryb jsou uloženy v játrech (treska). Z tohoto důvodu nejsou filety z tresky bohatým zdrojem EPA a DHA, zatímco tresčí játra obsahují podobné množství těchto MK jako filé lososa, makrely a sardinek (Sargent 1997).

Ačkoli hlavním zdrojem n-3 MK jsou mořské organismy, obsahují je také některá semena rostlin. Například semena lnu, chia a řepky obsahují ALA, která slouží jako prekurzor pro syntézu EPA a DHA. Nicméně tato biokonverze je v lidském těle omezená, proto je nutný příjem EPA a DHA zejména ze stravy (Shahidi, Ambigaipalan 2018).

1.1.2 Význam nenasycených mastných kyselin ve výživě

V současné době je moderní stravou získáváno větší množství n-6 MK a příjem n-3 je stále velmi omezen. Zatímco naši předkové konzumovali n-3 a n-6 MK

v poměru 1:1-2, v průběhu vývoje došlo ke značné změně stravovacích návyků a současný poměr n-3 a n-6 MK je 1:20-50. Tato změna negativně přispívá k prevalenci zánětů, nadváhy a s ní spojený vyšší výskyt hypertenze a kardiovaskulárních onemocnění (Mariamenatu, Abdu 2021).

Kyseliny n-3 a n-6 jsou kompetitivně oxidovány v játrech stejným souborem enzymů desaturáz za vzniku různých typů produktů, které mají v lidském těle antagonistické funkce. V důsledku vyššího příjmu n-6 MK ze stravy vzniká více eikosanoidů posilující zánět, agregaci krevních destiček, vazokonstrikci, navíc přispívají k nadváze. Naopak autakoidy odvozené od n-3 MK působí protizánětlivě, inhibují agregaci krevních destiček a přispívají k vazodilataci. Tyto faktory mají příznivý účinek u pacientů s různými onemocněními, jako jsou kardiovaskulární onemocnění (ateroskleróza, trombóza, infarkt myokardu), diabetes, rakovina. Příjem DHA olejů ze stravy těhotných a kojících žen má příznivý vliv na vývoj plodu a kojenců, zejména pro správnou funkci mozku a očí (Shahidi, Ambigaipalan 2018).

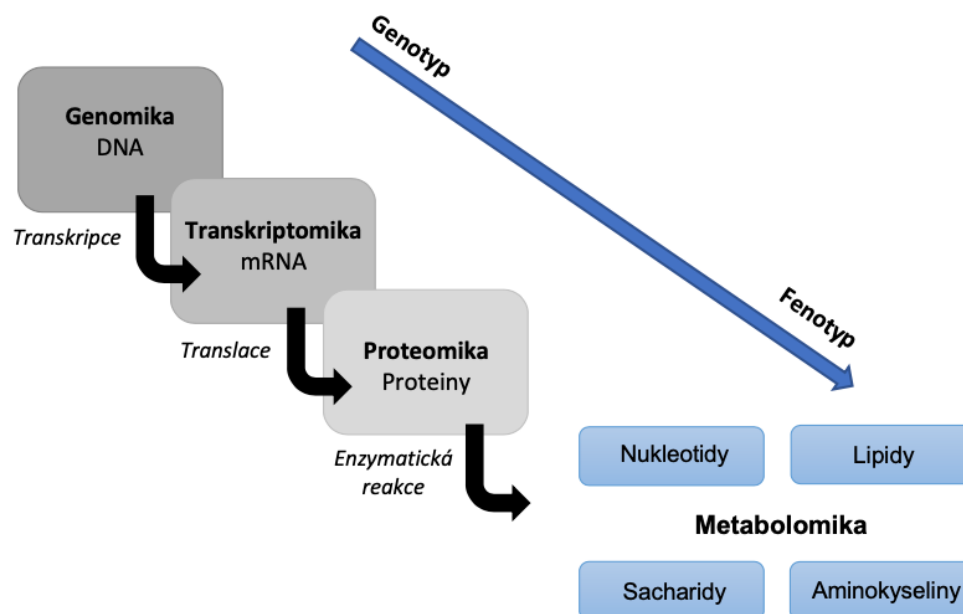
Ačkoliv vyšší zastoupení n-6 představuje značná rizika pro rozvoj onemocnění, jejich přítomnost v těle člověka je taktéž důležitá. Jejich zastoupení v buněčných membránách přispívá například ke zdravému vzhledu kůže nebo ke sníženému množství LDL lipoproteinů v krvi (Djuricic, Calder 2021). Správný poměr n-3 a n-6 MK získaný ze stravy je tedy nezbytný pro správné fungování organismu i pro prevenci před závažnými nemocemi.

Nejjednodušším řešením zvýšení poměru n-3 ku n-6 MK je jejich vyšší příjem ze stravy. Zdrojem n-3 PUFA a lipidů, které obsahují n-3 PUFA ve své struktuře jsou tedy převážně mořští obratlovci. U člověka se tyto molekuly hromadí ve fosfolipidech buněčných membrán, zejména v buňkách mozku, srdci a varlatech (Bergé, Barnathan 2005). Podle kanadských dietologů se doporučená hladina ALA pohybuje mezi 1,1 a 1,6 g/den v závislosti na věku a pohlaví. Kromě toho se také doporučuje příjem alespoň dvou porcí ryb týdně, čímž se zajistí 0,3-0,45 g EPA a DHA denně. Ryby jsou kromě významného zdroje n-3 PUFA také zdrojem vitamínů a minerálů, proteiny ryb mají navíc vysokou nutriční hodnotu (Shahidi, Ambigaipalan 2018).

2 Metabolomika a lipidomika

S nástupem systémové biologie, která zkoumá vliv interakcí biomolekul na funkčnost organismu bylo navrženo a zdokonaleno několik bioanalytických metod. Dříve se k získání informací o jednotlivých funkcích těchto makromolekul používaly zejména přístupy molekulární biologie a fyziologie, a to především techniky založené na chromatografii a ligandech (Hill 2009). Obě strategie však poskytovaly pouze omezené údaje o cílové biomolekule a její metabolické dráze a nebyly schopny charakterizovat biologický systém úplným a integrovaným způsobem (Klassen et al. 2017). Z tohoto důvodu se koncem 80. let 20. století začaly k přesnější identifikaci postupně vyvíjet jednotlivé omické strategie zahrnující technologie k určení celého souboru biomolekul obsažených ve tkáních, buňkách nebo tekutinách.

První omická strategie, genomika, umožnila úplné sekvenování lidského genomu a zajistila rychlé určení genových sekvencí proteinů a dalších makromolekul. Tyto převratné informace podnítily vědce, aby se posunuli za hranici genomu a začali se zabývat biologickou rolí genových produktů a jejich důsledků na organismus. Pokračující výzkum poté přinesl nové omické strategie, včetně transkriptomiky, proteomiky a metabolomiky. Spolu s pokroky v biostatistice a výpočetní technice umožňují detailně zkoumat složité biologické procesy s větší citlivostí a rozlišením ve srovnání s tradičními biochemickými metodami. Zatímco tradiční metody jsou zaměřeny na konkrétní cílovou molekulu, omické technologie nabízejí vysoce výkonné přístupy pro sledování několika cílů současně (McColl et al. 2019). Integrace umělé inteligence do omických strategií tak zajistila možnost generovat velké množství dat rychlým a efektivním způsobem (D'Adamo, Widdop, Giles 2021). Na Obrázku 2 je znázorněno, jak spolu korelují jednotlivé omické přístupy a jejich příslušné objekty (biomolekuly) studia.



Obrázek 2: korelace mezi jednotlivými omickými přístupy používaných při studiích v systémové biologii (převzato a upraveno z Metabolomics: From Fundamentals to Clinical Applications, Sussulini, 2017)

Metabolomika je nejnovějším vědním oborem v systémové biologii (Resurreccion, Fong 2022). V roce 2001 definoval Fiehn metabolomiku jako komplexní a kvantitativní analýzu metabolomu studovaného biologického systému. Jedná se o multidisciplinární přístup spojující analytickou chemii s disciplínami umožňující zpracovat surová data a následně tato data interpretovat (Fiehn 2001). Metabolom je soubor metabolitů představující jakékoliv chemické sloučeniny, endogenního i exogenního původu. Patří zde geneticky nezakódované nízkomolekulární látky, zejména substráty, produkty a meziprodukty metabolismu (Jewett, Hofmann, Nielsen 2006).

V porovnání s geny a proteiny, které poskytují rozsáhlé informace o genotypu a podléhají posttranslačním modifikacím, nejsou metabolity ovlivněny žádnými epigenetickými změnami. Množství určitých metabolitů tak lépe odráží činnost buňky a lze je snáze korelovat s fenotypem (Patti, Yanes, Siuzdak 2012)

Ačkoliv všechny omické přístupy lze aplikovat pro vysvětlení buněčných dějů, metabolomika poskytuje klíč pro stanovení přímých souvislostí mezi genotypem a fenotypem organismu. Její technologické přístupy se staly velmi účinnými nástroji pro interpretaci a odhalování biomarkerů. Metabolom je dynamický systém, který neustále mění své složení v závislosti na prostředí.

Změny v hladinách metabolitů jsou nejen výsledkem genové exprese, ale zároveň odpovědí buňky na určité podněty, jako je zavedení farmakologické léčby nebo změna stravy (Zampieri, Sauer 2017).

2.1 Metabolomické přístupy a metody studia

Na rozdíl od nukleonových kyselin a proteinů nemají metabolity pevnou strukturu, jsou heterogenní a liší se svými fyzikálními i chemickými vlastnostmi. V důsledku toho není možné změřit celý metabolom najednou jediným analytickým nástrojem. Proto se k jejich studiu využívá několik různých metod i přístupů. Obecně se využívají dva hlavní přístupy, a to přístup cílený a necílený (Lu et al. 2017).

Cílená metabolomická analýza se obecně zaměřuje na identifikaci a kvantifikaci již předem definovaného malého souboru metabolitů (v řádu desítek až stovek molekul).

Naopak necílená metabolomická analýza měří velkou škálu látek, a to jak již známých, tak neznámých. Vyhýbá se tak potřebě předem definovat specifickou hypotézu o konkrétním souboru metabolitů. Tímto přístupem je získán kompletní metabolický profil analyzovaného vzorku. Toho lze následně využít zejména pro identifikaci nových metabolitů a zkoumání nových známých i neznámých metabolických změn. Tyto dva přístupy je možné mezi sebou efektivně kombinovat – data z necílené analýzy lze použít pro stanovení nových hypotéz, které lze dále studovat cíleným přístupem (Schrimpe-Rutledge et al. 2016).

Pro metabolický výzkum se používají tři analytické techniky: metabolické profilování, „fingerprinting“ a „footprinting“.

Metabolické profilování umožňuje detekci širokého spektra metabolitů pomocí jedné analytické techniky (shotgun MS) nebo jejich kombinací (LC-MS, GC-MS), účelem je získat komplexní metabolický profil, který souvisí s určitou metabolickou dráhou.

Cílem metabolického „fingerprintingu“ není identifikace celého souboru metabolitů, ale získání a následné porovnání určitých vzorců (otisků) jednotlivých metabolitů, které se mění v reakci na změnu prostředí (například po expozici toxinů nebo léků). Otiskem každého metabolitu může být například NMR nebo

hmotnostní spektrum či chromatogram. Následné porovnání se provádí pomocí statistických nástrojů.

Zatímco u předchozích dvou přístupů se měří endogenní metabolity, tedy molekuly, které vznikly při metabolismu uvnitř buňky, metabolický „footprinting“ analyzuje především exogenní metabolity (tzv. exometabolom), které se nachází mimo vnitřní prostředí buňky v extracelulární tekutině (Dettmer, Hammock 2004; Vivanco et al. 2011).

2.2 Lipidomika a lipidomická analýza

Buněčné lipidy představují velmi komplexní a heterogenní skupinu metabolitů. Zatímco metabolomika se zaměřuje zejména na analýzu polárních hydrofilních látek (aminokyseliny, sacharidy, nukleotidy), lipidomika usiluje o komplexní identifikaci a kvantifikaci všech druhů lipidů, tedy látek nepolární hydrofobní povahy. Lipidomika je poměrně nová vědní disciplína, kterou v roce 2003 definovali Han a Gross a tradičně se řadí k jednomu z odvětví metabolomiky. Nicméně vzhledem ke strukturní i funkční rozmanitosti těchto látek spolu s jejich vysokým endogenním množstvím se lipidomika postupně stává samostatnou omikou (Wang et al. 2020). Lipidomické přístupy jsou obecně velmi podobné jako ty metabolomické s výjimkou extrakce, kdy je třeba oddělit polární a nepolární látky ze vzorku.

Integrace metabolomiky a lipidomiky do výzkumu přináší úplně nové informace ve smyslu hlubšího pochopení buněčných mechanismů. Vzhledem k tomu, že lipidy a polární metabolity jsou často součástí společných metabolických drah, může propojení těchto strategií sloužit k potvrzení jejich narušení. Zároveň je možné tyto přístupy využít k identifikaci klíčových metabolitů, jež jsou zodpovědné za biologické aberace, které jsou součástí buněčných procesů nebo onemocnění.

Velkou výzvou stále představuje identifikace/anotace metabolitů a lipidů, a to zejména v necílených přístupech při jejich studiu. Navzdory velkému technologickému pokroku v oblasti analytických přístrojů, který umožnil detekci tisíců metabolitů z velmi malých objemů vzorků, může při zpracování dat zůstat identifikována pouze velmi malá část. Možným důvodem obtížné identifikace je, že záleží na referenční shodě určitých vlastností, jako je poměr hmotnosti ku

náboji nebo retenční čas s aktuálně dostupnými databázemi, které jsou z velké části zatím neúplné (Belhaj, Lawler, Hoffman 2021).

3 Chromatografická separace lipidů

Pouze malá část měřících technik používaných pro chemickou analýzu je specifická pro jediný chemický druh. Z tohoto důvodu je potřeba izolovat analyt od interferujících složek, které mohou zeslabit signál a vytvořit nežádoucí pozadí. Cílem analytické separace je obvykle snížení nebo úplné odstranění balastních látek, aby bylo možné získat informace o studovaném analytu ze složitých směsí (Skoog 2014, s. 847).

3.1 Vysokoučinná kapalinová chromatografie

Ke snížení nebo úplnému odstranění interferencí lze využít širokou škálu metod. V posledních letech je nejpoužívanější metodou vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC – „High performance liquid chromatography“). Jde o typ analytické techniky založený na principu eluční chromatografie - složky směsi jsou přenášeny přes fixovanou stacionární fázi proudem mobilní fáze (tzv. elučním činidlem). Samotná separace analytu je založena na různých interakcích mezi stacionární a mobilní fází. HPLC systémy využívají ve stacionárních fázích velmi malé částice v řádech mikrometrů a díky tomu je možné použití menších chromatografických kolon. Efektivní průtok mobilní fáze přes kolonu pak zajistí výkonné vysokotlaké čerpadlo. Důsledkem takového uspořádání je zvýšený tlak v systému, což umožní zvýšit účinnost separace. (Skoog 2014, s. 847-854).

3.1.1 Instrumentace HPLC

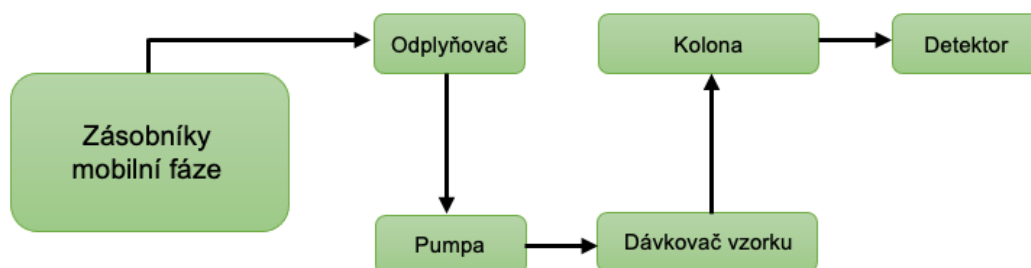
Na Obrázku 3 je schematicky znázorněno typické uspořádání HPLC systému. Moderní HPLC přístroj je běžně vybaven jedním nebo více skleněnými zásobníky s objemem od 500 ml. Součástí jsou vakuové odplyňovače (tzv. degasséry), odstraňující vzduchové plyny a prach z mobilní fáze, které mohou narušit průtokovou rychlost nebo odezvu detektoru. Tato zařízení mohou mít různá

uspořádání, například systém v němž jsou rozpuštěné plyny vytlačovány z roztoku jemnými bublinkami inertního plynu.

Mobilní fáze je poté dávkována do kolony pomocí ventilu, díky kterému lze dosáhnout různých typů eluce. Eluce rozpouštědlem konstantního složení (čistá látka nebo směs) se nazývá izokratická. Dalším typem je gradientová eluce, využívající dva a více typů rozpouštědel, které se výrazně liší polaritou. Složení směsi se během separace mění v určitém poměru předem naprogramovaným způsobem. Tento typ eluce často zlepšuje účinnost separace (Skoog 2014, s. 915).

Systém dále zahrnuje automatický dávkovač vzorku a vysokotlaké pumpy, které vytvářejí tlak až do 40 MPa, čímž umožní průtok kolonou od 0,1 do 10 ml/min. Mezi dávkovač a analytickou kolonu lze použít krátkou ochranou předkolonu obsahující stejnou stacionární fázi. Jejím účelem je zachytit nečistoty nebo pevné částice ze vzorku a zabránit tak kontaminaci kolony. U některých aplikací HPLC je navíc nutná kontrola teploty, k tomuto účelu slouží termostaty, které zajistí ohřev kolony na předem nastavenou teplotu. Vyšší teploty v chromatografickém systému mohou zkrátit separační čas, zvýšit účinnost separace a snížit protitlak kolony (Skoog 2014, s. 916-918).

Po separaci na chromatografické koloně se vzorek přesouvá na detektor. V současné době není pro HPLC k dispozici žádný vysoce citlivý univerzální detektorový systém, proto se využívají různé typy detektorů a jejich volba závisí na povaze vzorku. Nejčastěji se využívají UV-VIS detektory, spektrofotometry nebo kombinace s hmotnostní spektrometrií. Signál z detektoru je poté přenesen do počítače, výsledkem separace je chromatogram. (Skoog 2014, s. 919)



Obrázek 3: uspořádání jednotlivých komponent v HPLC systému

3.1.2 Chromatografické kolony pro HPLC

Odolnost chromatografických kolon proti vysokým tlakům zajišťují zejména kvalitní pevné materiály, obvykle se využívá nerezová ocel nebo polymerní materiály jako je PEEK (polyetheretherketon). Většina kolon pro HPLC má délku od 5 do 25 cm (Skoog 2014, s. 917).

Vnitřní prostředí analytické kolony tvoří materiál s velikostí částic od 3 do 5 μm . Náplň představuje tzv. stacionární fázi, neboli nepohyblivou složku chromatografického systému, na které dochází samotné separaci. Členění stacionárních fází není v dnešní době jednoznačné, protože použitý materiál náplně může vykazovat různé vlastnosti i použití. Velmi stručně lze rozdělit stacionární fáze podle skupenství na kapalné a tuhé, dále například podle chromatografického módu na systémy využívající normální nebo reverzní fázi.

Nejrozšířenějším polárním anorganickým sorbentem je silikagel. Používá se jak v nezměněné formě (pro normální fázi), tak i v chemicky modifikované formě (pro reverzní fázi) (Nováková, Douša 2013, s. 91, 152, 157).

3.1.3 Systémy s reverzními fázemi

V současné době je využívána široká škála separačních módů. Majoritní separační technikou je v poslední době separace v systému reverzních fází (RP-HPLC – „reversed phase HPLC“), která se používá ve více než 70% aplikací. Pro separaci v reverzním uspořádání jsou používány nepolární stacionární fáze. Povrch silikagelu je modifikován například navázáním alkylových řetězců. Tato modifikace způsobí změnu polaritu stacionární fáze, jejíž míra je určena délkou navázaného řetězce. Nejčastějšími zástupci komerčně dostupných stacionárních fází jsou nepolární fáze s alkylovými řetězci o délce C_2 až C_{30} .

Mobilní fáze má v tomto systému vodně-organickou povahu, tj. využívají se vodné roztoky polárních organických rozpouštědel, přičemž s klesající polaritou rozpouštědla se zvyšuje eluční síla mobilní fáze. Nejpoužívanějšími rozpouštědly pro RP-HPLC jsou alkoholy (např. methanol, acetonitril).

Povrch reverzní stacionární fáze je schopen interagovat pouze velmi slabými nesespecifickými interakcemi. Polární interakce, např. vodíkové vazby nebo interakce dipól-dipól, jsou silnější, proto polární analyty mají větší afinitu

k mobilní fázi a jsou ze systému eluovány jako první. Retence analytu na stacionární fázi je tedy řízena: (i) změnou interakce analytu s mobilní fází, (ii) délkou alkylového navázaného na povrch silikagelového nosiče, přičemž retence nepolárních látek roste s délkou alkylového, (iii) funkční skupinou analytů – čím má analyt vyšší počet polárních funkčních skupin (např. -NH₂, -OH, -COOH), tím je retence nižší (Nováková, Douša 2013, s. 216-229).

3.2 Ultra-vysokoučinná kapalinová chromatografie

Ultra-vysokoučinná kapalinová chromatografie (UHPLC – „Ultra-high performance liquid chromatography“) je jedním z trendů HPLC využívající k separaci částice menší než 2 μm. Důsledkem použití takto malých částic je pak mnohonásobně zvýšený tlak v systému (až na 150 MPa), který přináší značné výhody oproti klasickým metodám HPLC. Vlivem vyššího tlaku je zvýšená separační účinnost, rychlejší analýza a vyšší rozlišení chromatografických píků. Další praktickou výhodou je použití kratších analytických kolon. Výsledné průtoky mobilní fáze jsou velmi nízké, čímž dochází k výrazné úspoře použitých rozpouštědel (Lucie Nováková, Michal Douša 2013, s. 333-334).

4 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie (MS – „mass spektrometry“) je analytická technika pro určování hmot molekul a jejich částí. Iontově-optický přístroj pro tuto analýzu se nazývá hmotnostní spektrometr. Výstupem této analýzy je hmotnostní spektrum představující graf závislosti intenzity iontů na jejich poměru hmotnosti ku náboji (m/z) (Holčapek 2011, s. 6).

4.1 Historie a vývoj hmotnostní spektrometrie

Vznik MS se tradičně připisuje anglickému fyzikovi J. J. Thomsonovi, který na konci 19. století objevil elektron pomocí elektrického pole uvnitř katodové trubice. Tento objev vedl k vytvoření prvního „hmotnostního spektrografu“, který se používal k měření atomových hmotností prvků (Yates 2011).

Až do 40. let 20. století dominovalo používání MS ke studiu základních vlastností atomů. Postupným vylepšováním konstrukce tohoto zařízení vznikl sektorový hmotnostní spektrometr, který využíval jako hmotnostní analyzátor elektrický nebo magnetický sektor, případně jejich kombinaci. Americkému fyzikovi A. Nierovi se podařilo ukázat praktické využití této techniky, a to především výzkumem významných izotopů. Objevem izotopu uhlíku ^{13}C přispěl například ke studiu metabolických drah.

V období od 40. do poloviny 50. let se rozvíjel vývoj hmotnostních analyzátorů. V roce 1946 vytvořil W. E. Stephens úplně první hmotnostní analyzátor doby letu (TOF – „Time-Of-Flight“) a na začátku 50. let přispěl W. Paul vynálezem kvadrupólového analyzátoru (Stephens 1946).

Koncem 50. let využil biochemik Klaus Biemann MS poprvé ke studiu neznámých struktur přírodních látek, především steroidů.

S rychlým rozvojem chromatografických metod se začala MS využívat k detekci separovaných analytů. V roce 1959 se poprvé podařilo tuto techniku s propojit plynovou chromatografií (GC/MS – „Gas chromatography/mass spectrometry“) (Gohlke 1959). Propojení s kapalinovou chromatografií bylo složitější, jelikož nebylo možné převést separované analyty do plynné fáze. Až v roce 1973 se podařilo americkému chemikovi F. W. McLaffertymu propojit chromatografickou kolonu se zdrojem chemické ionizace pomocí kapiláry. Tímto

způsobem tedy vzniklo první propojení LC/MS („Liquid chromatography/mass spectrometry“), které umožnilo stejné analytické možnosti jako GC/MS (kvalitativní nebo kvantitativní analýzu), ale s omezením pouze na těkavé analyty a sloučeniny s nízkou molekulovou hmotností (Baldwin, McLafferty 1973).

Do 80. let 20. století se MS běžně využívala ke studiu malých organických molekul. Větší výzvu však představovaly makromolekuly, zejména velké proteiny a nukleonové kyseliny, které bylo velmi obtížné ionizovat v plynné fázi bez rozsáhlé fragmentace. V roce 1988 se pak téměř současně vyvinuly dvě nové ionizační techniky: ESI („Elektrospray ionisation“) a MALDI („Matrix assisted laser desorption/ionization“), které způsobily revoluci v biologickém výzkumu a dodnes jsou dominantní formou ionizace makromolekul (Griffiths 2008).

Koncem 20. století se postupně rozvíjelo spojování hmotnostních analyzátorů do hybridních systémů, především za účelem využití fragmentace ke studiu chemických struktur velkých biomolekul. Mezi první hybridní systémy patřil například TOF/TOF nebo kvadrupól-TOF.

MS je v dnešní době dynamicky rozvíjející technikou. Její velkou výhodou je nejen vysoká citlivost, ale i univerzální použití pro různé typy analytů. Aplikace se tak prolíná do různých oborů včetně klinické praxe.

4.2 Separace iontů a instrumentace hmotnostního spektrometru

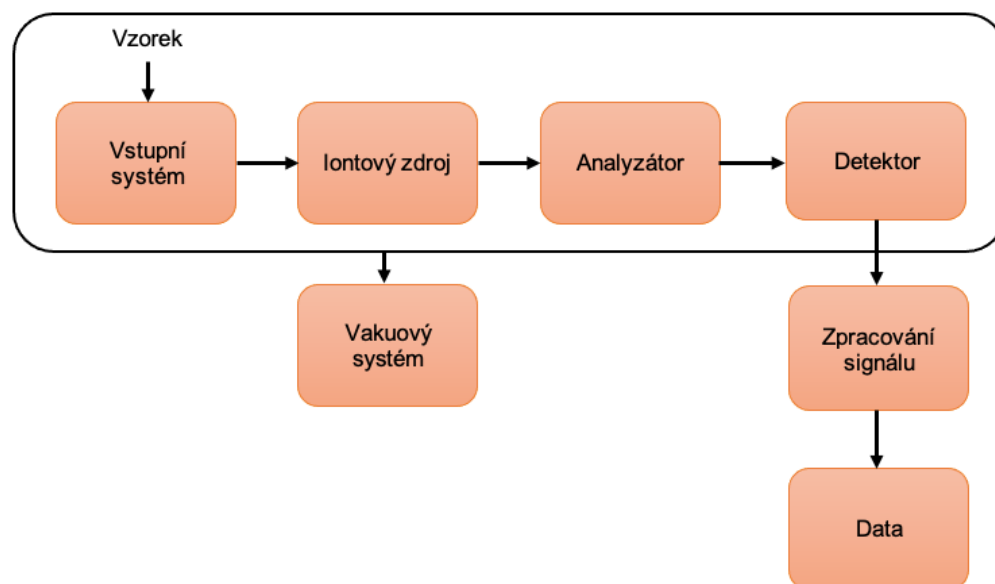
Měření probíhá ve třech základních krocích: (i) převod sloučenin na ionty v plynné fázi, (ii) separace iontů v hmotnostním analyzátoru podle hodnot poměru hmotností ku náboji (m/z), (iii) detekce separovaných iontů (Yates 2011).

Tvorba iontů je zajištěna v tzv. iontovém zdroji, kterému předchází vstupní systém zavádění vzorků, který se liší v závislosti na použité ionizační technice. Obecně lze rozdělit iontové zdroje podle měkké nebo tvrdé ionizace. Tvrdou ionizační technikou je například elektronová ionizace (EI) vyvolána proudem elektronů emitovaných katodou. Elektrony polarizují magnetické pole plynných molekul a dochází buď k zachycení elektronu (tvorba kationtů) nebo k odstranění elektronu (tvorba aniontů). Při EI se vytvářejí ionty s velkou zbytkovou energií, což způsobí jejich fragmentaci (Holčapek 2011, s. 11). Naopak měkké ionizační techniky tvoří ionty s nižší zbytkovou energií, proto je fragmentace méně pravděpodobná. Takové techniky, například elektrosprej (ESI) jsou vhodné pro

studium biologických vzorků, u kterých je důležitá jejich integrita (Gault et al. 2016).

Po ionizaci se molekuly v iontově optickém systému fokusují na úzký svazek a jsou převedeny do hmotnostního analyzátoru. Ionty jsou rozděleny za přítomnosti vysokého vakua na základě jejich poměru m/z . Toho lze dosáhnout na základě různých fyzikálních principů – různá stabilita oscilace iontů v kombinaci stejnosměrného a střídavého napětí (kvadrupól nebo iontová past), různá doba rychlosti letu iontů (analyzátor doby letu), různá frekvence harmonických oscilací v Orbitrapu a několik dalších. Kromě separace mohou být určité typy analyzátorů použity k fragmentaci (například kvadrupóly) (Holčapek 2011, s. 7-11).

Po hmotnostním analyzátoru většinou následuje samostatný detektor sloužící k určení relativní intenzity (četnosti) iontů v hmotnostním spektru. Používá se například elektronový násobič nebo Faradayův detektor. Výjimky tvoří Orbitrap a FTICR (iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací), kde zároveň se separací probíhá i detekce iontů (Gross 2011). Jednoduché schéma hmotnostního spektrometru znázorňuje Obrázek 4.



Obrázek 4: Základní schéma hmotnostního spektrometru

4.3 Orbitrap

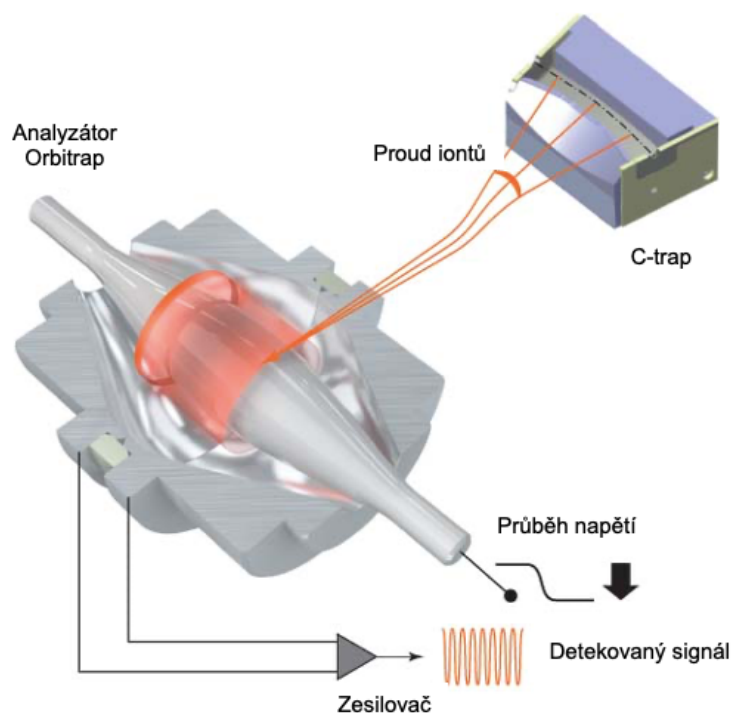
Orbitrap je v současné době nejnovějším hmotnostním analyzátozem s iontovou pastí. Koncept vyvinul na počátku 20. let 20. století K. H. Kingdon. Kingdonova past se skládala z vnější válcové elektrody a katody z tenkého drátu (centrální elektrody). Mezi drát a válcovou elektrodu bylo přivedeno stejnosměrné napětí, které vytvořilo radiální logaritmický potenciál a ionty začaly obíhat centrální elektrodu v kruhových trajektoriích (Perry, Cooks, Noll 2008).

Na tento základní koncept navázal na konci 90. let ruský fyzik A. Makarov, který zahájil technologická vylepšení Orbitrapu jež vyústila v komerční zavedení tohoto analyzátoru do hybridních přístrojů v roce 2005 (Hecht et al. 2019).

4.3.1 Konstrukce a vstupní systém

Hmotnostní analyzátor Orbitrap se skládá ze tří elektrod z nerezové oceli. Dvě vnější elektrody ve tvaru „pohárku“ jsou od sebe vzdáleny přibližně 100 μm a mezi nimi se nachází křemíkový dielektrický prstenec. Třetí je vřetenovitá centrální elektroda, na kterou je přivedeno napětí, zachycuje ionty při jejich orbitálním pohybu a drží past pohromadě (Hecht et al. 2019).

Ionty jsou dávkovány pulzním vstřikováním z externího zařízení C-past, které se skládá ze zakřivené elektrody a štěrbin orientované směrem k Orbitrapu (Obrázek 5). Zařízení účinně odděluje analyzátor od iontového zdroje, díky tomu lze k němu připojit další analyzátor separující prekurzorové ionty nebo jakoukoliv fragmentační techniku (Zubarev, Makarov 2013)



Obrázek 5: Průřez analyzátozem Orbitrap a zařízením C-past. Do tohoto zařízení přiveden dusík, který účinně ochlazuje ionty, po ochlazení se rapidně sníží amplituda radio-frekvenčního pole, což způsobí jejich kumulaci. Nakonec jsou na centrální elektrodu přivedeny pulzy stejnosměrného napětí. Ionty jsou fokusovány do úzkého svazku a vypuzeny kolmo k centrální elektrodě Orbitrapu (Perry, Cooks, Noll 2008, obrázek upraven podle Hecht et al. 2019)

4.3.2 Mechanismus spirálního pohybu iontů

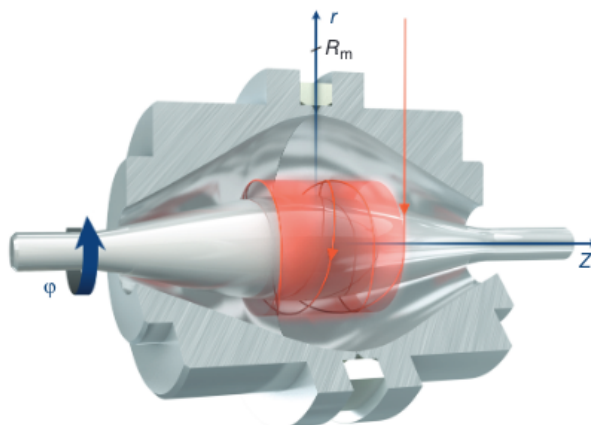
Ionty jsou vstřikovány kolmo k centrální elektrodě Orbitrapu (osa z). Po přivedení napětí vytvářejí osově symetrické elektrody kvadrologaritmický elektrostatický potenciál (Obrázek 6) (Zubarev, Makarov 2013).

$$U(r,z) = \frac{k}{2} \left(z^2 - \frac{r^2}{2} \right) + \frac{k}{2} (R_m)^2 \ln \left[\frac{r}{R_m} \right] + C$$

Obrázek 6: Obecná rovnice pro kvadrologaritmické rozložení potenciálu mezi elektrodami, kde r , z jsou cylindrické souřadnice, k je zakřivení pole a R_m popisuje charakteristický poloměr zakřivení, C je konstanta (Makarov 2000).

V důsledku elektrostatického pole a nenulové vzdálenosti iontů od osy z , zahájí ionty o stejné hodnotě poměru m/z svůj pohyb ve třech osách: (i) rotační pohyb kolem centrální elektrody (ii) radiální pohyb (iii) axiální oscilace podél centrální elektrody (Hecht et al. 2019).

Radiální elektrické pole ohýbá trajektorii iontů směrem k centrální elektrodě, zatímco tangenciální rychlost vytváří odstředivou sílu. Při správné volbě parametrů se vytváří rovnováha mezi přitažlivou silou iontů s elektrodou a odstředivou silou. Po splnění této podmínky zůstávají ionty uvnitř pasti a pohybují se po téměř kruhových trajektoriích (Obrázek 7). Zároveň axiální elektrické pole způsobené kuželovitým tvarem elektrod tlačí ionty směrem k nejširší části pasti a iniciuje harmonické axiální oscilace s frekvencí ω (Obrázek 8) (Zubarev, Makarov 2013).



Obrázek 7: pohled na průřez hmotnostního analyzátoru Orbitrap zobrazující stabilní spirálovou trajektorii iontů po ose z . Modrá šipka s označením φ představuje oběžnou trajektorii iontů, šipky r a z představují souřadnice (převzato od Hecht et al. 2019)

Frekvence pohybu iontů po rotační a radiální ose je nepřímo úměrná odmocnině poměru hmotnosti ku náboji (Obrázek 8), zatímco axiální frekvence je přímo úměrná tomuto poměru.

$$\omega = \sqrt{(q/m)k}$$

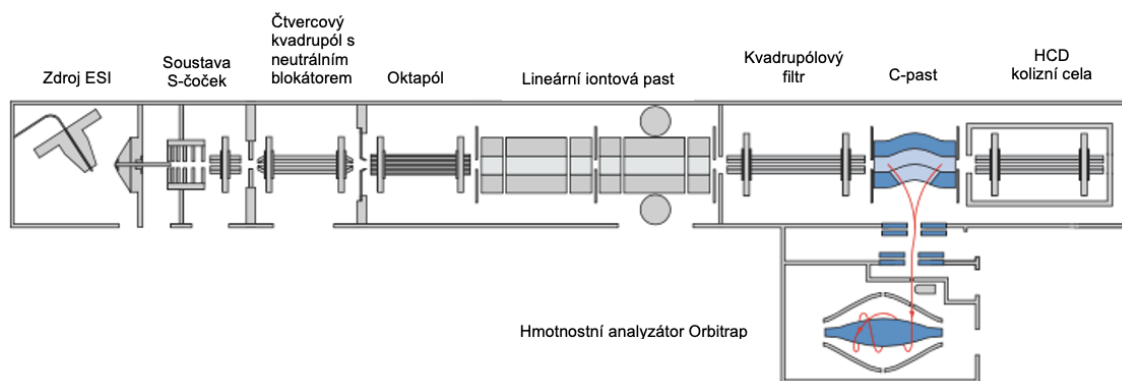
Obrázek 8: definice frekvence oscilací v ose (Makarov 2000).

Zjednodušeně je tedy velikost frekvence pohybu iontů podél axiální osy závislá na poměru hmotnosti ku náboji daného iontu. Tento pohyb iontů poté indukuje proud, který je zesilován a detekován vnějšími elektrodami. Digitalizovaný proud je poté převeden pomocí Fourierovy transformace na hmotnostní spektrum (Makarov 2000).

Použití axiální frekvence na rozdíl od rotační nebo radiální je zásadní, protože je zcela nezávislá na energii a prostorovém rozložení iontů. Tato nezávislost je příčinou vysokého hmotnostního rozlišení Orbitrapu (Makarov 2000). Hmotnostní analyzátor Orbitrap umožňuje analyzovat vzorky o velké molekulové hmotnosti. Zatímco hmotnostní rozsah je pro kvadrupól až 4000 m/z při rozlišení 2000 FWHM (při m/z 1000), pro Orbitrap je tento limit několikanásobně větší, a to od 50 000 m/z při rozlišení 100 000 FWHM (při m/z 1000) (Hoffmann, Stroobant 2007, s. 89). Vzhledem k tomu, že metabolity jsou většinou nízkomolekulární látky (<1 500 Da), avšak často ve velmi nízkých koncentracích, pro necílené metabolické analýzy se využívá spíše vysoké citlivosti detekce analyzátoru.

4.4 Využití Orbitrapu jako detektoru v tandemové hmotnostní spektrometrii

Tandemová hmotnostní spektrometrie (MS^n) je druh instrumentální analýzy, která využívá fragmentace prekurzorových iontů s využitím jednoho nebo více hmotnostních analyzátorů za účelem získání fragmentačních hmotnostních spekter molekul. Standardním postupem je připravit prekurzorové ionty v jiném hmotnostním analyzátoru a následně použít Orbitrap k detekci produktů fragmentace (Makarov et al. 2006). Příkladem takového uspořádání je Orbitrap Elite (Obrázek 9).



Obrázek 9: Schéma hmotnostního spektrometru Orbitrap Elite MS (převzato a upraveno dle Thermo Fisher Scientific Orbitrap Elite Hardware Manual, s. 13)

Hmotnostní spektrometr Orbitrap Elite se skládá ze čtyř hlavních částí: (i) dvojitlaká lineární iontová past, (ii) zakřivená C-past, (iii) hmotnostní analyzátor Orbitrap, (iv) HCD kolizní cela.

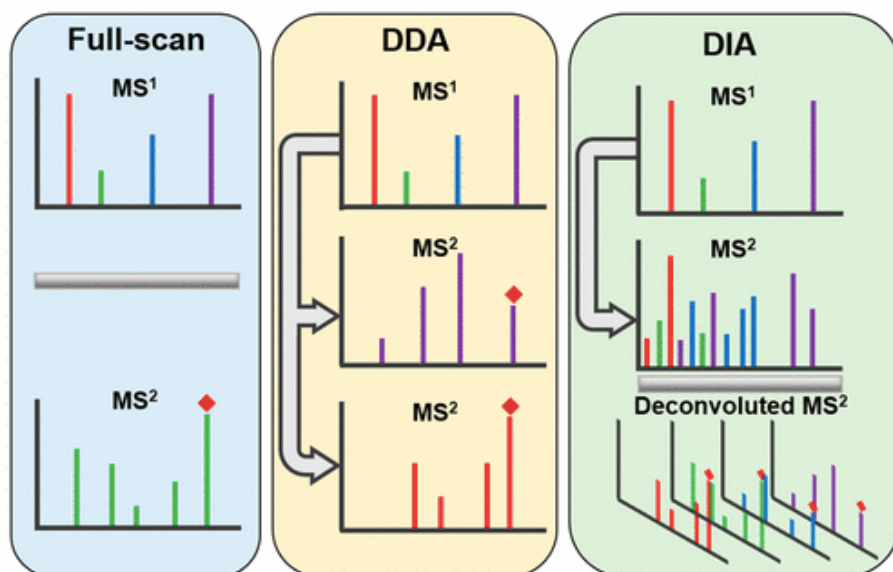
Systém využívá k ionizaci analyzovaných molekul různé techniky, například elektrosprej (ESI) nebo chemickou ionizaci za atmosférického tlaku (APCI). Vzniklé ionty jsou přeneseny přes čtvercový kvadrupól a oktapól do dvojitlaké lineární iontové pasti. V lineární pasti mohou být analyzovány MS i MSⁿ spektra molekul, ale s relativně nízkým rozlišením i přesností oproti Orbitrapu. Systém se skládá ze dvou kvadrupólových pastí, které jsou odděleny středovou čočkou. Na obě pasti působí střídavé napětí a zároveň nezávislé stejnosměrné napětí, které slouží k transportu iontů. V první vysokotlaké pasti jsou ionty ochlazovány a zpomalovány tokem hélia. V druhé nízkotlaké pasti jsou usměrněné ionty vypuzeny přes kvadrupólový filtr směrem k zakřivené C-pasti (Olsen et al. 2009). Kvadrupólový filtr slouží k izolaci a detekci prekurzorových iontů o požadované hodnotě m/z . V případě aplikace tohoto systému pro fragmentační analýzu jsou ionty přeneseny skrze C-past do HCD cely („Higher Energy Collisional Dissociation“). Tato cela představuje multipól, který je napájen srážkovým plynem (například dusíkem), který v cele zajistí zvýšený tlak. Napěťový posun urychlí prekurzorové ionty do kolizního plynu uvnitř HCD cely, dojde ke srážce a fragmentaci iontů. Produktové ionty se pak vracejí do C-pasti, kde jsou stabilizovány a přivedeny do hmotnostního analyzátoru Orbitrap k detekci. Výsledkem je fragmentační hmotnostní spektrum (Thermo Scientific 2011).

4.4.1 DDA a DIA módy

V současné době se využívají tři režimy získávání MS dat pro necílenou metabolomiku: úplné skenování, datově závislý sběr dat (DDA – „data dependent acquisition“) a datově nezávislý sběr dat (DIA – „data independent acquisition“). Obvykle je necílená metabolomika založená na LC-MS provádí v režimu úplného skenování. Tento postup však odděluje kvantifikaci od strukturního určení, což vyžaduje další čas na instrumentální analýzu i potřebné objemy vzorků.

Pro usnadnění byl zaveden časově efektivnější přístup pro získávání dat, a to DDA mód. V režimu DDA přístroj provede analýzu MS² ze seznamu prekurzorových iontů získaných z úplného skenování („full scan“). V tomto nastavení lze při stejné analýze získat jak kvantitativní (z úplného skenování), tak strukturní informace (získané z MS² spekter). Tento postup tak umožní současné zpracování dat a identifikaci metabolitů. Nevýhodou tohoto nastavení je, že výběr prekurzorových iontů pro MS² analýzu závisí na intenzitě iontů ve spektru. Může tedy nastat situace, že zájmové metabolické prvky s nízkou abundancí nemusí být vybrány pro fragmentaci a nebudou o nich získána MS² data.

Řešením tohoto omezení může být použití DIA módu. Zde jsou generována MS² spektra po všechny prekurzorové ionty, proto je možné identifikovat více metabolitů o nízké koncentraci a intenzitě. V režimu DIA se využívá například fragmentace všech iontů (AIF – „all-ion fragmentation“), kdy jsou fragmentovány všechny prekurzory, DIA teoreticky umožňuje kontinuální a nezkreslené získávání informací MS² spekter pro všechny metabolity. Přestože DIA je atraktivní strategií metabolického profilování, může být obtížné získat vazbu mezi MS spektrem prekurzoru a jejich MS² spektrem. To představuje velkou výzvu pro dekonvoluci nezpracovaných MS² spekter pro následnou identifikaci metabolitů. Vizuální srovnání všech režimů je na Obrázku 10.



Obrázek 10: srovnání tří režimů pro získávání dat v necílené metabolomice, převzato z Guo, Huan (2020)

V současné době zatím neexistuje přímé srovnání těchto tří režimů, které by určilo nejvhodnější způsob sběru dat bez ovlivnění kvality výsledků. Nyní se většina výzkumných laboratoří přiklání k režimu akvizice, který je již rutinně zaveden, a to bez zvažování, která metoda by mohla fungovat lépe. To může představovat určitou výzvu do budoucích výzkumů (Guo, Huan 2020).

Velká rozmanitost analytů i jejich široký koncentrační rozsah činí analýzu konvenčními hmotnostně spektrometrickými technikami zdlouhavou. Spojením kapalinové chromatografie s následnou detekcí pomocí hmotnostní spektrometrie využívající fragmentační techniku značně usnadňuje identifikaci a objasnění struktury velkého počtu metabolitů (Perry, Cooks, Noll 2008).

5 Zpracování metabolických dat

Použitím necíleného přístupu v metabolické analýze je získáno velké množství dat. Následnou vizualizací jsou získána přehledná data, která usnadní definovat závěry studie (Saccenti et al. 2013).

5.1 Předzpracování dat

Po získání dat pomocí metody měření založené na MS detekci je nutné převést surová data na extrahovaná data, které lze snadno zpracovat pomocí statistických nástrojů. Získání těchto dat zahrnuje několik obtížných kroků, v této kapitole je popsáno pouze pár základních postupů.

Prvním krokem je tzv. „peak picking“, který po nastavení určitých parametrů, zajistí integraci naměřených píků a značnou redukci šumu. K tomuto účelu se využívají jak freeware softwary např. MZmine (Pluskal et al. 2010) tak i komerční např. Compound Discoverer od firmy Thermo Fisher Scientific .

Dalším krokem je korekce systematických chyb, které mohou být způsobeny například interakcí složek vzorku s povrchem přístrojů, případně nestabilitou analytické platformy v čase. Systematické chyby značně ovlivňují naměřenou odezvu analytu a mohou tímto způsobem zkreslovat výsledky experimentu. K tomuto účelu se mezi sekvenci analyzovaných vzorků navíc vkládají vzorky kontroly kvality (QC – „quality control“). Samotná korekce se poté provádí softwarově s využitím algoritmů například pomocí spline křivky nebo lineární regrese (Gertsman, Barshop 2018).

Před samotnou vizualizací je vhodné data normalizovat a škálovat. Cílem normalizace je odstranit rozdíly související s odběrem vzorku např. vliv zředění. Příkladem může být normalizace PQN („Probabilistic Quotient Normalization“). Metoda PQN určuje ředící faktor každého vzorku porovnáním kvocientů mezi hmotnostním spektrem vzorku a referenčním hmotnostním spektrem, které představuje průměrný obsah lipidů ze všech vzorků (kromě slepých vzorků). Následná normalizace je pak provedena pomocí takto vypočítaného ředícího faktoru (Dieterle et al. 2006). Škálováním se pak eliminují rozdíly v koncentracích jednotlivých analytů (Hendriks et al. 2011).

5.2 Metody statistického zpracování dat

Statistická analýza je v metabolickém výzkumu zaměřena na identifikaci rozdílů mezi jednotlivými analyty ve velkých souborech předpracovaných dat (například z tabulky píků). V metabolomice jsou využívány jednorozměrné i vícerozměrné metody (Hendriks et al. 2011).

5.2.1 Jednorozměrné metody statistické analýzy

Rozdíl mezi jednorozměrnými a vícerozměrnými metodami je v počtu proměnných. V případě sledování pouze jedné proměnné se používá jednorozměrná analýza. Metody této analýzy lze rozdělit na základě charakteru pozorovaných dat na neparametrické a parametrické. Neparametrické metody nevyžadují žádné rozdělení pravděpodobnosti rozptylu sledovaných dat. Naopak parametrické metody vyžadují konkrétní rozdělení dat, např. Gaussovo rozdělení. Mezi parametrické metody patří například analýza rozptylu (ANOVA – „analysis of variance“) nebo t-test (Vinaixa et al. 2012) Data mohou být vizualizována pomocí krabicových grafů.

Krabicový graf znázorňuje pět hodnot: minimum, první kvartil, medián, třetí kvartil a maximum. Součástí diagramů mohou být také dvě úsečky směřující kolmo nahoru a dolů ke střední části. Úsečky znázorňují variabilitu dat pod prvním kvartilem a nad třetím kvartilem. Odlehle hodnoty jsou znázorněny jako body v okolí úseček (McGill, Tukey, Larsen 1978).

Součástí jednorozměrné analýzy je testování hypotéz. Výsledkem t-testu nebo ANOVA testu je p-hodnota, která se slouží k určení významnosti diskriminujících metabolitů. Ačkoliv je hladina p-hodnoty ovlivněna přítomností odlehlejších hodnot a počtem analyzovaných vzorků, obecná hranice, při které je biomarker významný je pod 0,05 (Berker, Muti, Cheng 2022).

Při analýze dat je možné se setkat se situací, kdy je potřeba testovat více hypotéz zároveň, nejen sledovat rozdíly mezi nulovou a alternativní hypotézou. V důsledku vysokého počtu testovaných hypotéz pak roste pravděpodobnost získání falešně pozitivních výsledků. To pak v praxi vede k tzv. problému násobného testování hypotéz („multiple testing problém“). Pokud tedy stanovíme mezní p-hodnotu pod 0,05, říkáme tím, že je 5% pravděpodobnost, že výsledek je falešně pozitivní. Například pokud na 2000 sloučenin v souboru použijeme test ANOVA, pak

můžeme očekávat, že 100 výsledků (neboli 5%) bude falešně pozitivních. Existuje řada přístupů jak tomuto problému zabránit a jejich společným rysem je korekce p-hodnoty. Příkladem je Bonferroniho korekce, která snižuje počet falešných výsledků, nicméně zároveň snižuje i počet pravdivých výsledků. Novějším přístupem je pak korekce typu FDR („false-discovery rate“). Tato korekce nicméně kontroluje očekávaná podíl falešných výsledků pouze mezi zamítnutými hypotézami. Tato metoda je méně striktní a poskytuje více opravdu pozitivních výsledků (www.nonlinear.com, citováno 9. 5. 2023).

Grafickým znázorněním významnosti může být vulkánový graf představující závislost p-hodnoty na „fold change“ (FC). Hodnota FC se vypočítá jako logaritmická transformace poměru mezi průměrným množstvím metabolitů mezi dvěma porovnávanými vzorky. Ve vulkánovém grafu je pak na ose x \log_2FC a na ose y p-hodnota. Metabolity, jejichž množství se mezi oběma vzorky výrazně nezměnilo se vykreslí jako body uprostřed grafu (nízká hodnota FC). Naopak metabolity s významnou p-hodnotou a tedy s významným zastoupením se vykreslí dál od středu. Zjednodušeně lze tedy říci, že body, které jsou vykresleny dál od středu významně odlišují dva pozorované vzorky (Hur et al. 2013).

5.2.2 Vícerozměrné metody statistické analýzy

Pokud jsou v průběhu experimentu měřeny dvě a více proměnných současně jsou výsledná data mnohorozměrná. Sledování několika proměnných navíc umožní identifikovat vztahové vzorce mezi nimi (Saccenti et al. 2013). Metody mnohorozměrné analýzy lze rozdělit na supervisované a nesupervisované (z anglického „supervised“ a „unsupervised“). Supervisované metody pracují s daty (vzorky), které jsou předem zařazeny do nám známých skupin, nesupervisované metody taková data nevyužívají.

V metabolomických studiích se nejčastěji setkáme s nesupervisovanou metodou hlavních komponent (PCA – „principal component analysis“). PCA se využívá pro sledování metabolických rozdílů mezi skupinami vzorků. Výsledkem je dvourozměrný nebo trojrozměrný shlukový graf, kde se jednotlivé vzorky představují body. Pokud tyto body (vzorky) mají podobný metabolický profil, shlukují se v grafu blíže k sobě. Odlehlé body od těchto shluků se naopak svým profilem liší.

Mezi supervisované statistické přístupy patří analýza nejmenších čtverců (PLS-DA – Partial Least Squares Discriminant Analysis) a její ortogonální forma (O-PLS-DA – Orthogonal Partial Least Squares Discriminant Analysis) (Worley, Powers 2016).

Numerické nebo vizuální výstupy komplexní statistické analýzy jsou důležitou součástí každého experimentu. Lze je efektivně uplatnit například při interpretaci dat v závěrech metabolomických studií.

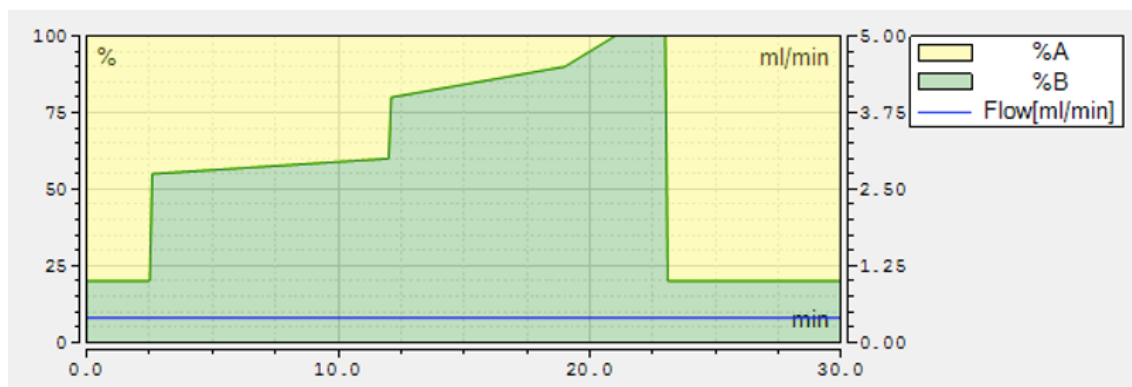
EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

6 Materiál a metody

6.1 Analytická metoda

Separace a identifikace jednotlivých lipidových frakcí byla provedena UHPLC-MS necílenou metabolickou analýzou dle metody publikované v roce 2021 (Jankevics et al. 2021). Pro separaci byl využit UHPLC systém Dionex Ultimate 3000 RS od firmy Thermo Scientific, CA, USA v reverzním uspořádání fází s použitou kolonou Accucore C30 (2,6 μ m, 250x2,1 mm, Thermo Fisher Scientific, MA, USA). Kolona byla temperována na teplotu 55 °C.

Separace složek byla provedena technikou gradientové eluce. Složení mobilní fáze A: 20 mM mravenčan amonný v poměru 60:40 acetonitril:voda (v:v). Složení mobilní fáze B: 20 mM mravenčan amonný v poměru 85,5:9,5:5 isopropanol:acetonitril:voda (v:v:v). Na Obrázku 11 je znázorněn průběh gradientové eluce mobilních fází A a B s průtokovou rychlostí 0,400 ml/min. Injekční objem vzorků byl nastaven na 2 μ l a separace probíhala 30 minut. Pro nastavení jednotlivých parametrů a ovládání přístrojů byly použity softwary Chromeleon a XCalibur (Thermo Scientific, USA).



Obrázek 11: průběh gradientové eluce

Analyty separované na chromatografické koloně byly následně detekovány pomocí hmotnostního spektrometru Orbitrap Elite (Thermo Fisher Scientific, MA, USA). Před samotnou detekcí byly molekuly ionizovány pomocí HESI (Heated Electrospray Ionization). Parametry iontového zdroje byly nastaveny následovně: průtok „sheath“ plynu 48 AU, průtok „aux“ plynu 15 AU, průtok „sweep“ plynu 0 AU, zdrojové napětí na kapiláře 3,2 kV pro pozitivní režim

a 2,7 kV pro negativní režim, teplota kapiláry 350 °C, teplota „aux gas heater“ 400 °C, S-lens RF level 60 RF. Data byla získána zvláště pro režim pozitivní a negativní ionizace s nastaveným hmotnostním rozsahem 150-2000 m/z a hmotnostním rozlišením 70 000 (FWHM při m/z 200).

6.1.1 Měření fragmentačních hmotnostních spekter

Plánovaný sběr MS/MS dat (Scheduled MS/MS ID) je modifikovaná DDA akvizice pro následnou identifikaci a kvantifikaci jednotlivých analytů. Navržený algoritmus umožňuje využití retenčních časů při monitorování více násobných reakcí, a to sledováním menšího rozsahu hmotnostních přechodů pouze kolem očekávaného elučního času určité třídy lipidů v rámci jediného nástřiku poolovaného QC vzorku. Během detekce separovaných molekul tak není nutné použití celého hmotnostního rozsahu prekurzorových oken (Jankevics et al. 2021).

První data byla získána úplným skenováním v souborech bez fragmentačních skenů. Nastavení bylo následující: hmotnostní rozlišení = 17 500 (FWHM při m/z 200); izolační šířka okna = 3,0 m/z ; „stepped normalised collision energies („stepped NCE“) = 20, 40, 100 pro režim pozitivní ionizace a „stepped NCE“ = 40, 60, 130 pro režim negativní ionizace.

Fragmentační spektra byla získána detekcí s různým nastavením hmotnostních rozsahů prekurzorů v různých částech chromatogramu, tyto rozsahy jsou přehledně znázorněny v Tabulce 3. Metoda byla nastavena v režimu "Discovery mode" s cyklem skenování 1 Full MS a 5 DDA MS/MS skenů (TopN = 5). Následné zpracování dat bylo provedeno pomocí programu Compound Discoverer 3.3 SP1 (Thermo Fisher Scientific, MA, USA).

Tabulka 3: nastavení hmotnostních rozsahů prekurzorů v různých částech chromatogramu

Čas	Hmotnostní rozsah (m/z)
0 - 6 min	150-1100
6 - 12 min	550-1250
12 - 17 min	550-1500
17 - 30 min	550-1100

Tento typ akvizice slouží jako účinný nástroj pro analýzu složitých směsí a zároveň pro anotaci lipidových tříd na základě MS/MS dat. Zároveň tato metoda vyžaduje menší objemy vzorku a pouze 40% času přístroje ve srovnání s klasickou analýzou DDA s více nástřiky.

6.2 Přístrojové vybavení

- analytické váhy Kern ABT 120-5DM (Kern, Německo)
- hmotnostní spektrometr Orbitrap Elite s elektrosprejovou ionizací (Thermo Scientific, MA, USA)
- homogenizátor (FastPrep 24-7 (, MP Biomedicals, CA, USA)
- chlazená centrifuga Rotina 420R (Hettich, Německo)
- chromatografická kolona Accucore C30 (2,6 μm , 2,1 mm,x 250,0 mm, Thermo Scientific, MA, USA).
- třepačka zkumavek Vortex Genius 3 (IKA, Německo)
- UHPLC systém Dionex Ultimate 3000 RS (Thermo Scientific, CA, USA)
- ultrazvuk Ultrasonic Cleaner PS-20 (Jeken, Japonsko, Německo)

6.3 Biologický materiál

Veškerý biologický materiál pro experimentální část bakalářské práce byl zakoupen v komerčních řetězcích. Vzorky se podařilo druhově sjednotit, kromě mraženého filé tresky aljašské (*Gadus chalcogrammus*), která nahradila mražené filé tresky obecné (*Gadus morhua*). Toto nahrazení vzorku bylo nutné vzhledem ke špatné dostupnosti této ryby v mraženém stavu.

- chlazený losos filet s kůží (*Salmon salar*, Albert rybí trh)
- mražený losos filet s kůží (*Salmon salar*, Mylord)
- konzervovaný losos v produktu Salmon pate (*Salmon salar*, Łosos Ustka, Albert)
- chlazený tuňák žlutoploutvý steak (*Thunnus albacares*, Albert rybí trh)
- mražený tuňák žlutoploutvý steak (*Thunnus albacares*, Mylord)
- konzervovaný tuňák žlutoploutvý kousky ve vlastní šťávě (*Thunnus albacares*, Gianna)
- chlazená treska obecná filé (*Gadus morhua*, Globus)

- mražená treska aljašská filé (*Gadus chalcogrammus*, Mylord)
- konzervovaná játra z tresky obecné ve vlastní šťávě (*Gadus morhua*, Gianna)

6.4 Použité chemikálie

Všechny použité chemikálie byly v čistotě vhodné pro LC-MS analýzu.

- acetonitril (ACN, Fluka Analytical, USA)
- BHT (Thermo Scientific, USA)
- chloroform (Sigma-Aldrich, USA)
- isopropanol (IPA, Honeywell, USA)
- methanol (VWR Chemicals, USA)
- mravenčan amonný (Sigma-Aldrich, USA)
- standard Splash Lipidomix Mass Spec Standard (Avanti, USA)
- voda (VWR Chemicals, USA)

6.5 Příprava vzorku

6.5.1 Jednofázová extrakce

Extrakce biologického vzorku pomocí organického rozpouštědla tvořící pouze jednu fázi. Výsledné složení vzorku by mělo být co nejvíce podobné iniciačním podmínkám mobilní fáze na LC.

Ke 30 mg biologického materiálu bylo přidáno 500 μ l vychlazeného roztoku IPA:H₂O (3:1, v:v) do předem připravených vychlazených mikrozkušavek se šroubovacím víčkem. Do každé mikrozkušavky byla přidána jedna lžička kuliček křemičitanu zirkoničitého o velikosti 2 mm, takto připravený vzorek byl homogenizován v homogenizátoru po dobu 20 s při rychlosti 6 m/s. Dále byly vzorky chlazeny 10 minut na ledu, následovala 30 s homogenizace na vortexu a dalších 5 minut byly vzorky opět chlazeny na ledu. Poté bylo odebráno 300 μ l z každého vzorku do čistých vychlazených mikrozkušavek. Takto připravené vzorky byly centrifugovány ve vychlazené centrifuze na teplotu 4 °C po dobu 20 minut při 24 400 g. Na závěr bylo přeneseno 150 μ l supernatantu z každého vzorku do předem popsanych a vychlazených HPLC vialek. Ze zbylého objemu byly připraveny poolované vzorky kontroly kvality (QC). Ze supernatantu každého

vzorku bylo odebráno 20 µl do jedné vychlazené mikrozkušavky, důkladně zvortexováno, a následně bylo přeneseno 65 µl do označených vialek. Slepý vzorek (blank) byl připraven stejným způsobem bez použití biologického materiálu.

Při použití antioxidantu butylhydroxytoluenu (BHT) bylo naváženo 30 mg BHT do kónické zkumavky. K navážce bylo přidáno 30 ml vychlazeného roztoku IPA:H₂O (3:1). Obsah zkumavky byl homogenizován v ultrazvuku po dobu 10 minut.

Pro kvantitativní analýzu bylo k roztoku obsahující IPA, vodu a BHT přidány následující interní standardy: 1,5 ml Splash mix; 18,72 µl FA 20:4, d8; 15,8 µl CER (d18:1), d7/15:0.

6.5.2 Dvoufázová extrakce

Extrakce biologického materiálu organickými rozpouštědly tvořící polární a nepolární fázi. Upraveno dle Blight, Dyer (1959).

K přibližně 30 mg biologického materiálu byla přidána směs methanol:voda (2:0,8), methanol v ekvivalentu 15 µl na mg tkáně a voda 6 µl na mg tkáně, přidaný objem byl normalizován dle navážky. Do každé mikrozkušavky byla přidána jedna lžička kuliček křemičitanu zirkoničitého o velikosti 2 mm, takto připravený vzorek byl homogenizován v homogenizátoru po dobu 20 s při rychlosti 6 m/s. Dále bylo odebráno maximální množství vzorku (včetně zbytků nehomogenizované rybí tkáně) do předem popsanych a vychlazených mikrozkušavek. Ke každému vzorku byl přidán chloroform v ekvivalentu 15 µl na mg tkáně a voda 7.5 µl na mg tkáně, přidaný objem byl normalizován dle navážky. Následovala homogenizace na vortexu 20 s, dále byly vzorky vychlazeny na ledu po dobu 10 minut. Po vychlazení byly vzorky centrifugovány ve vychlazené centrifuze na 4 °C, 10 minut, při 1735 g. Po centrifugaci byly vzorky stabilizovány 10 minut při pokojové teplotě. Poté byla odebrána spodní nepolární fáze do nové vychlazené mikrozkušavky, odebíraný objem odpovídal nejmenšímu přidanému objemu chloroformu. Na závěr byly vzorky zakoncertovány proudem dusíku a uloženy do mrazáku vychlazeného na -80°C. Následující den při re-suspendaci bylo ke všem vzorkům přidáno 150 µl roztoku, který je podobný iniciačním podmínkám mobilní fáze na LC, tedy IPA:H₂O (3:1),

vzorky byly udržovány po celou dobu na ledu a poté homogenizovány na vortexu 30 s.

Při použití antioxidantu BHT bylo naváženo přibližně 30 mg BHT do kónické zkumavky, poté bylo přidáno 30 ml vychlazeného roztoku methanol:voda (2:0,8) – 1 mg BHT/ 1 ml roztoku, objem roztoku byl normalizován dle navážky. Obsah zkumavky byl homogenizován v ultrazvuku 10 minut. Roztok obsahující methanol, vodu a BHT byl přidán ke vzorku při homogenizaci, přidaný objem byl normalizován dle navážky, tedy methanol v ekvivalentu 15 μ l na mg tkáně a voda 6 μ l na mg tkáně. Vzorky byly zakoncertovány proudem dusíku a uloženy do mrazáku vychlazeného na -80°C . Při re-suspendaci bylo přidáno 150 μ l roztoku obsahující IPA, vodu a BHT (příprava viz jednofázová extrakce).

Pro přípravu QC vzorků bylo odebráno 30 μ l od každého vzorku do jedné mikrozkuavky, obsah byl homogenizován na vortexu 30 s. Všechny vzorky (vzorky po homogenizaci i QC vzorky) byly centrifugovány 20 min, 24 000 g při 4°C .

Nakonec bylo odebráno 100 μ l vzorku do vychlazených HPLC vialek. Obsah mikrozkuavky pro QC vzorky byl rozdělen do 10 HPLC vialek (100 μ l na jeden vzorek, při nástřiku 2 μ l na jednu QC vialku). Slepý vzorek (blank) byl připraven stejným způsobem bez použití biologického materiálu.

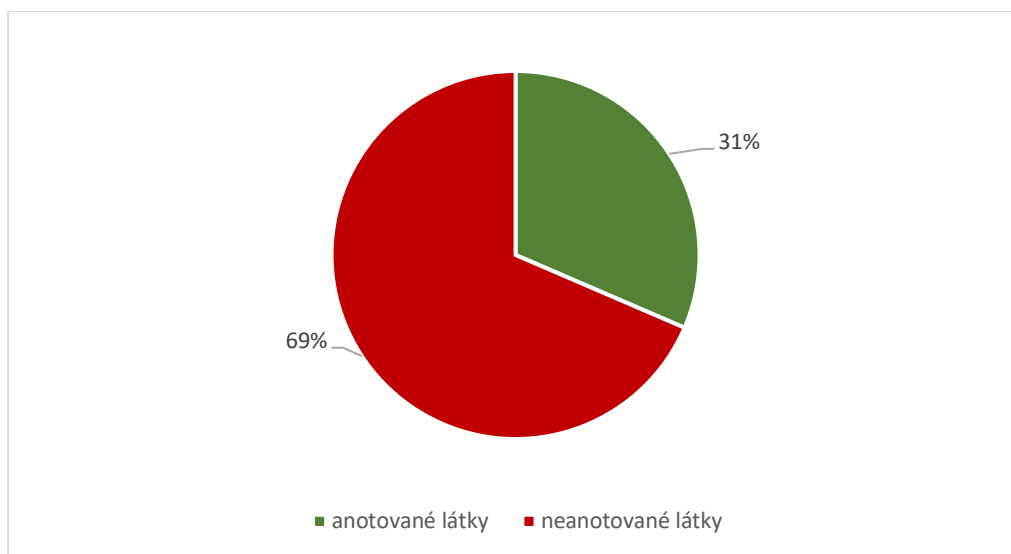
6.6 Příprava mobilních fází

Před přípravou mobilních fází byly láhve vypláchnuty LC-MS vodou a jednotlivé odměrné válce LC-MS organickými rozpouštědly. Pro přípravu 1 litru mobilní fáze A bylo smícháno 600 ml ACN, 350 ml vody a 50 ml 400 mM roztoku mravenčanu amonného. Pro přípravu 1 litru mobilní fáze B bylo smícháno 900 ml IPA se 100 ml ACN. Směs byla promíchána a následně bylo nahrazeno 50 ml směsi za 50 ml 400 mM roztoku mravenčanu amonného. Obě mobilní fáze byly homogenizovány v ultrazvukové lázni po dobu 30 minut. Nakonec byly směsi stabilizovány přes noc při laboratorní teplotě.

7 Výsledky

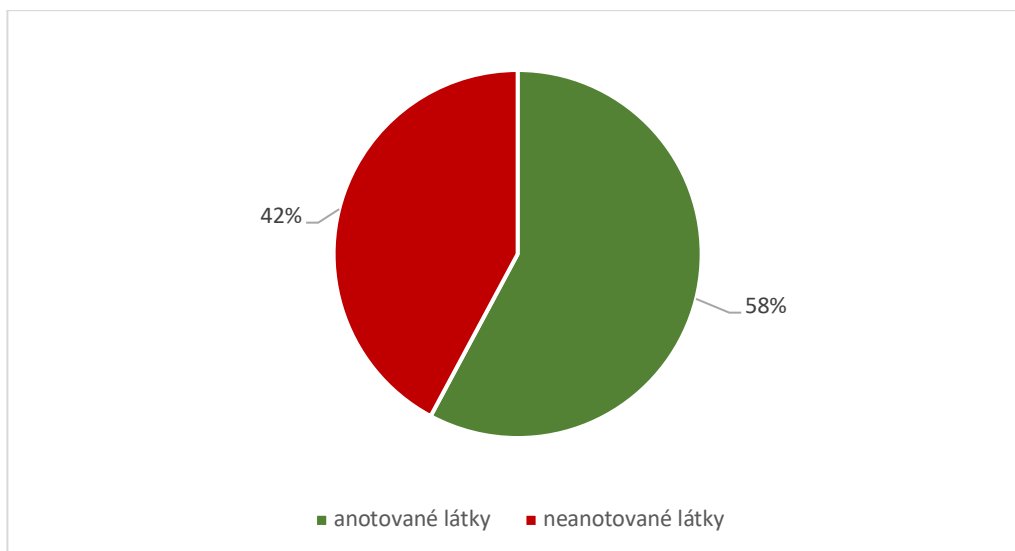
7.1 Identifikace dat v necílené metabolomice

Na následujících grafech jsou znázorněny procentuální podíly anotovaných a neanotovaných látek. V negativním módu ionizace (Obrázek 12) bylo detekováno celkem 340 metabolitů z lipidového extraktu lososa obecného (*Salmon salar*). Z toho 69 % látek bylo neanotovaných a 31 % látek bylo anotovaných podle databáze hmotnostních spekter s anotační chybou mezi -10 a 10 ppm.



Obrázek 12: podíl anotovaných (zelená) a neanotovaných látek (červená) v negativním módu ionizace

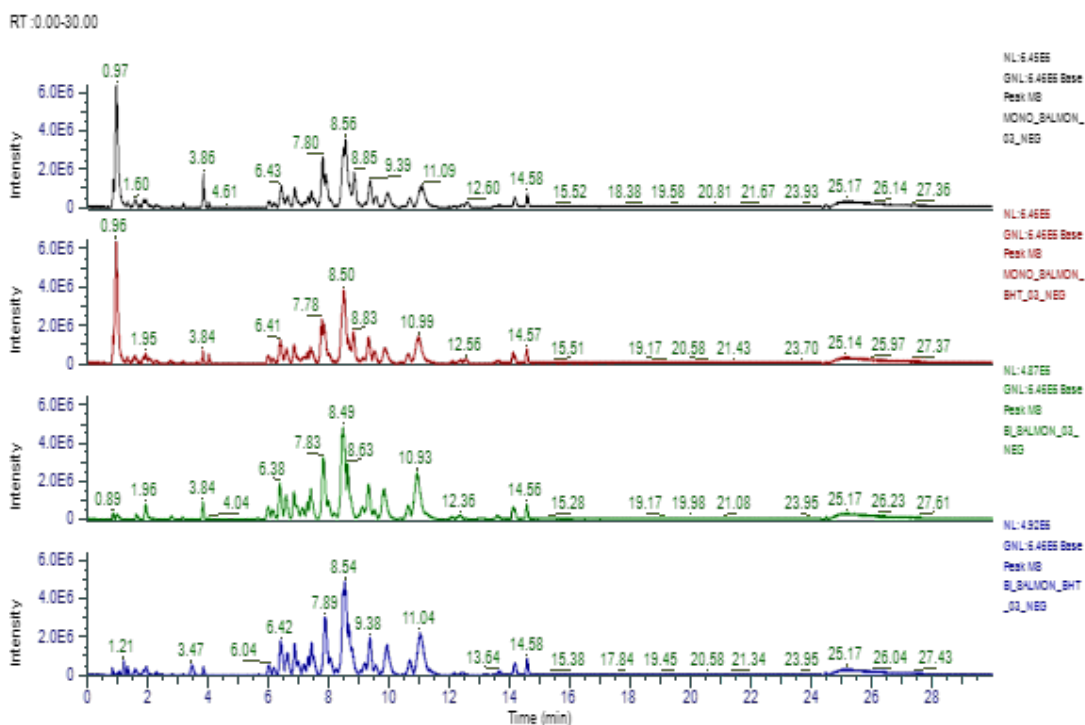
V pozitivním módu ionizace bylo detekováno celkem 3335 látek, z toho 42 % látek bylo neanotovaných a 58 % látek bylo anotovaných podle databáze hmotnostních spekter s anotační chybou mezi -10 a 10 ppm (Obrázek 13).



Obrázek 13: podíl anotovaných (zelená) a neanotovaných látek (červená) v pozitivním módu ionizace

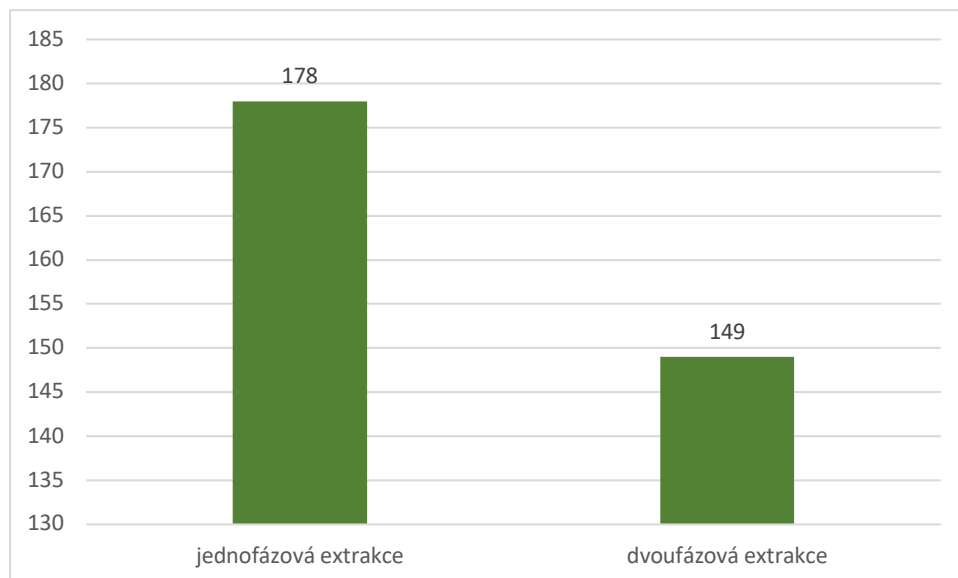
7.2 Optimalizace extrakční metody

Jedním z cílů práce bylo vyhodnotit vhodnou extrakční metodu pro analýzu lipidů obsahující PUFA a zda má nějaký vliv přidání antioxidantu BHT na výsledné analyty. Jelikož jsou mastné kyseliny viditelné převážně v negativním módu ionizace, bylo další vyhodnocení výsledků provedeno pro negativní ionizační mód. Po porovnání chromatogramů lipidového extraktu lososa obecného (*Salmon salar*) na Obrázku 14 bylo zjištěno, že při dvoufázové extrakci neobsahuje extrakt téměř žádné polární látky.



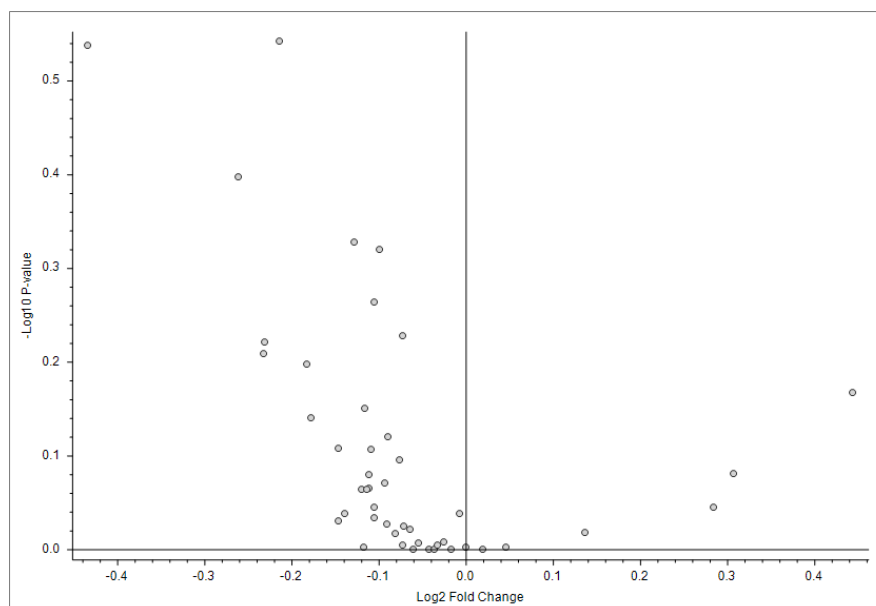
Obrázek 14: Záznam „base peak“ chromatogramu lipidového extraktu lososa obecného v negativním módu ionizace (*Salmon salar*) znázorňující porovnání mezi jednofázovou a dvoufázovou extrakcí, černý chromatogram – jednofázová extrakce bez BHT, červený chromatogram – jednofázová extrakce s obsahem BHT, zelený chromatogram – dvoufázová extrakce bez BHT, modrý chromatogram – dvoufázová extrakce s obsahem BHT.

Pomocí jednofázové extrakce jsme detekovali celkem 178 analytů a pomocí dvoufázové extrakce celkem 149 analytů. Rozdíl byl způsoben přítomností více polárních analytů v jednofázové extrakci (Obrázek 15).



Obrázek 15: počet detekovaných analytů pro jednofázovou a dvoufázovou extrakci

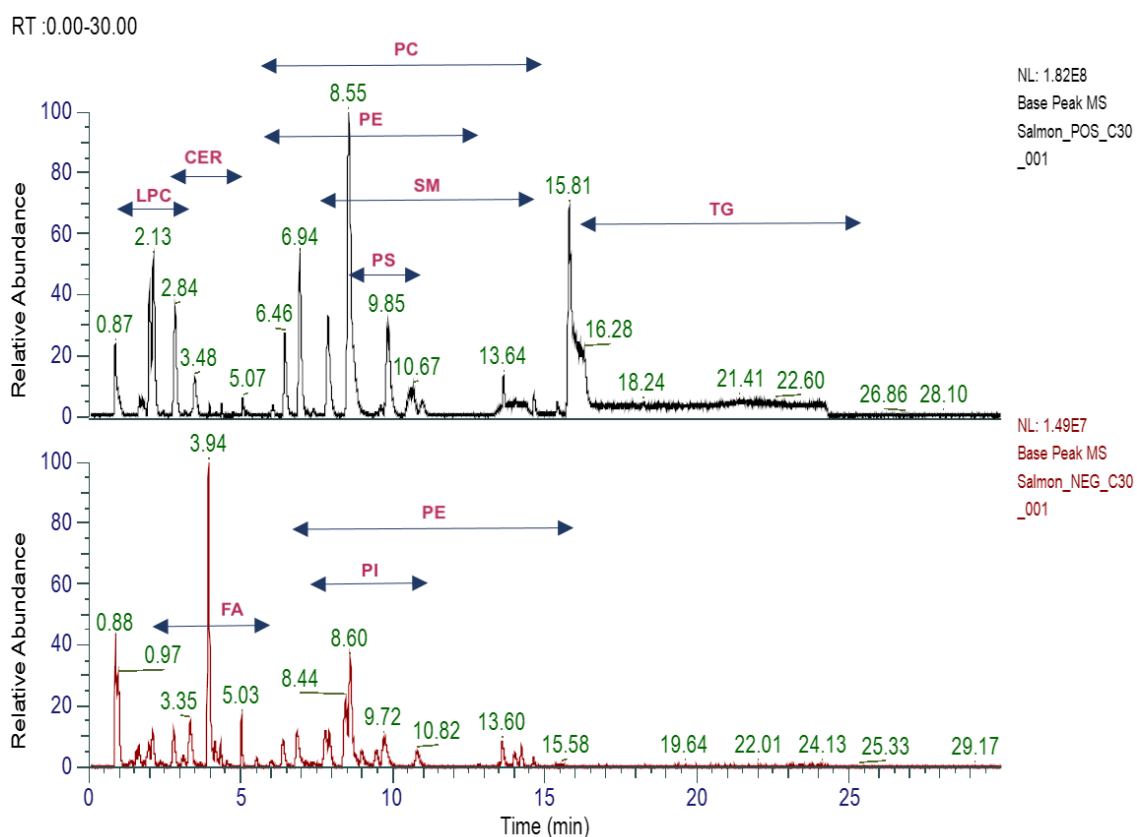
Dále byl vytvořen vulkánový graf porovnávající jednofázovou extrakci s obsahem BHT a bez BHT (Obrázek 16). Při tomto porovnání nebyly detekovány žádné metabolity s p -hodnotou $< 0,05$ nebo s $FC > 1$. Nakonec bylo zvoleno použití BHT při přípravě vzorků z důvodu očekávané lepší stability analytů v čase a během analýzy.



Obrázek 16: porovnání množství analytů ze třídy PUFA u jednofázové extrakce s přidáním antioxidantu BHT (vlevo od středové osy) a bez přidání BHT (vpravo od středové osy)

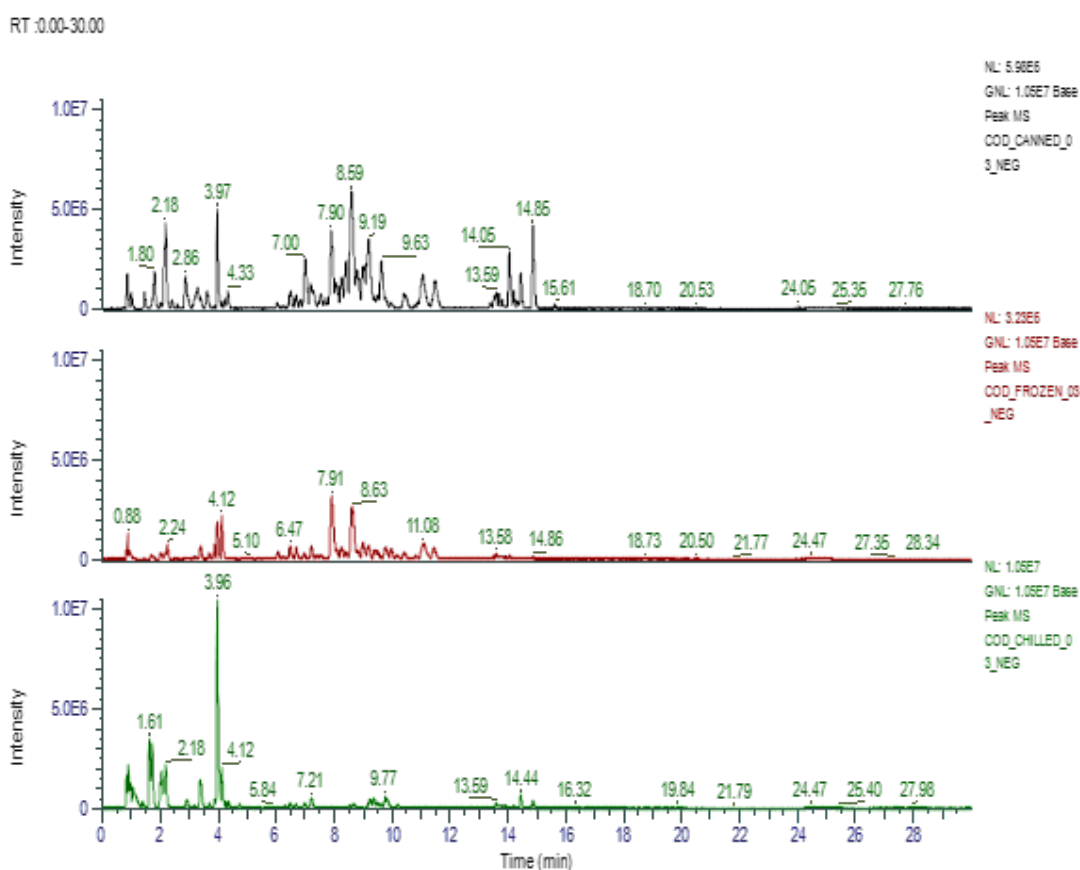
7.3 Chromatografická separace

Pomocí softwaru Compound Discoverer 3.3 SP1 a identifikace lipidů na základě jejich MS/MS spekter bylo možné vytvořit přibližné eluční intervaly pro běžně detekovatelné třídy lipidů včetně třídy mastných kyselin (Obrázek 17). V pozitivním módu ionizace bylo eluováno více tříd lipidů obsahující PUFA. V negativním módu ionizace byly v prvních 6 minutách eluovány volné MK, kde řadíme i n-3 nenasycené mastné kyseliny. Z tohoto důvodu byly následující výsledky vypracovány pouze pro negativní mód ionizace.



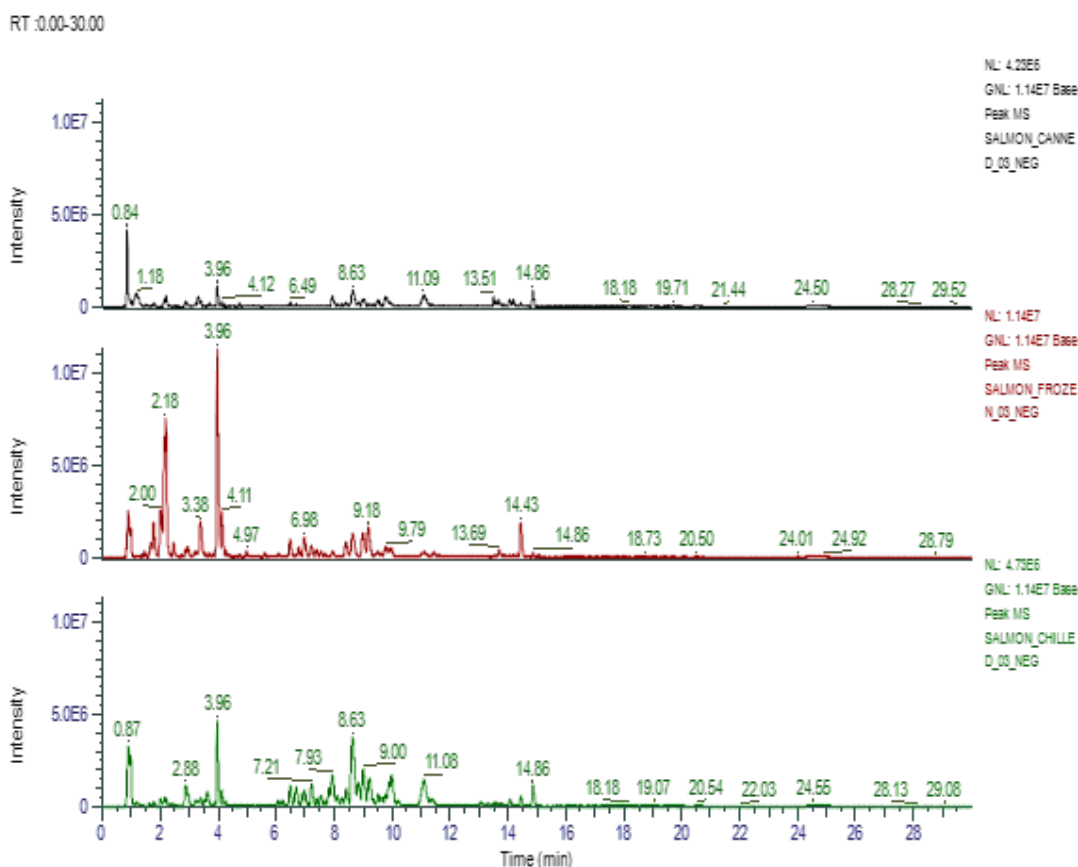
Obrázek 17: záznam „base peak“ chromatogramu lipidového extraktu lososa obecného (*Salmon salar*) znázorňující šířky elučních intervalů jednotlivých lipidických tříd po použití modifikované DDA akvizice plánovaného sběru dat při aplikaci pozitivního módu ionizace (černý chromatogram nahoře) a negativního módu ionizace (červený chromatogram dole). LPC – lysosfosfatidylcholiny, CER – ceramidy, PC – fosfatidylcholiny, PE – fosfatidylethanolaminy, SM – sfingomyeliny, PS – fosfatidylseriny, TG – triacylglyceroly, FA – mastné kyseliny, PI – fosfatidylinositoly

Následně byly porovnány tři druhy ryb a v různých typech zpracování. Porovnáním chromatogramů lipidového extraktu z chlazeného filé tresky obecné (*Gadus morhua*), mraženého filé tresky aljašské (*Gadus chalcogrammus*) a jater tresky obecné (*Gadus morhua*) jsou viditelné velké rozdíly (Obrázek 18). U vzorku konzervovaných jater tresky obecné (*Gadus morhua*) jsou viditelné nejvyšší intenzity v oblasti volných PUFA (prvních šest minut separace). Podobně je na tom vzorek chlazené tresky obecné (*Gadus morhua*), kde je viditelný intenzivní pík v čase 3,96 minut, který odpovídá n-3 mastné kyselině DHA. U vzorku mražené tresky aljašské (*Gadus chalcogrammus*) nejsou viditelné intenzivní píky v oblasti volných PUFA, nicméně u tohoto vzorku je více píků v oblasti lipidů, které obsahují PUFA ve své struktuře.



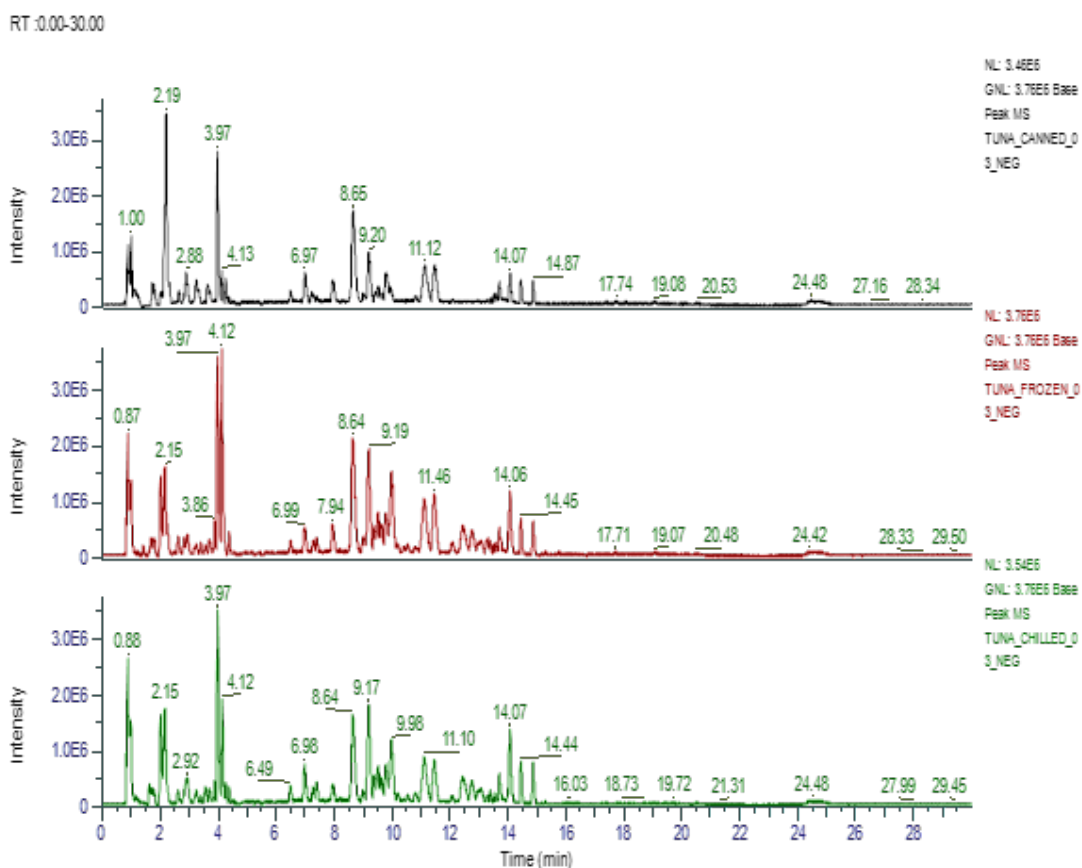
Obrázek 18: záznam „base peak“ chromatogramu lipidového extraktu tresky obecné (*Gadus morhua*) a tresky aljašské (*Gadus chalcogrammus*), černá – konzervovaná tresčí játra (treska obecná – *Gadus morhua*), červená treska mražená (treska aljašská – *Gadus chalcogrammus*), zelená treska chlazená (treska obecná – *Gadus morhua*)

Nejnižší intenzity lipidových molekul jsou viditelné u vzorku lososa obecného (*Salmon salar*) v konzervovaném zpracování (Obrázek 19). Nejvyšší intenzity volných PUFA jsou viditelné u vzorku mraženého filé, kde je opět viditelný intenzivní pík DHA. Na chromatogramu vzorku chlazeného filé jsou viditelné vysoké intenzity lipidů, ze třídy PC a PE, které mohou obsahovat PUFA ve své struktuře.



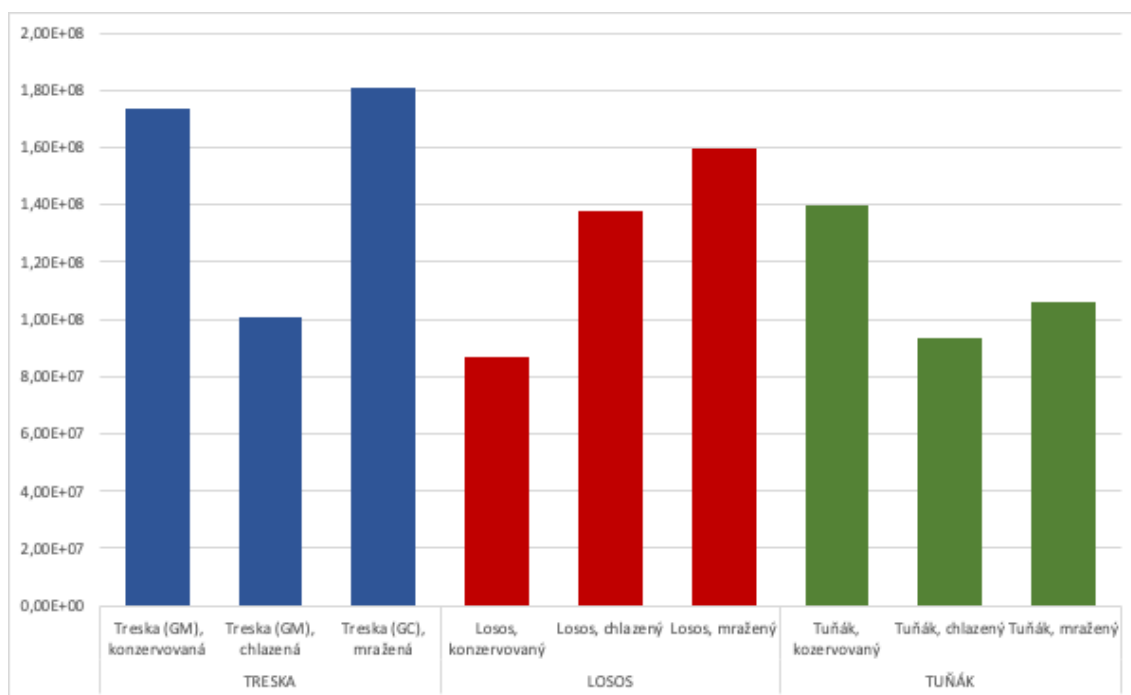
Obrázek 19: záznam „base peak“ chromatogramu lipidového extraktu lososa obecného (*Salmon salar*), černá – konzervované zpracování, červená – mražené zpracování, zelená – chlazené zpracování

Dále byly porovnány chromatogramy tuňáka žlutoploutvého (*Thunnus albacares*) (Obrázek 20). U všech typů zpracování jsou viditelné intenzivní píky jak v oblasti volných PUFA, tak v oblastech eluce lipidů obsahující PUFA ve své struktuře.



Obrázek 20: záznam „base peak“ chromatogramu lipidového extraktu tuňáka žlutoploutvého (*Thunnus albacares*), černá – konzervované zpracování, červená – mražené zpracování, zelená – chlazené zpracování

Na závěr byl z intenzit chromatografických píků vytvořen sloupcový graf představující relativní koncentrace lipidů obsahující PUFA (Obrázek 21).



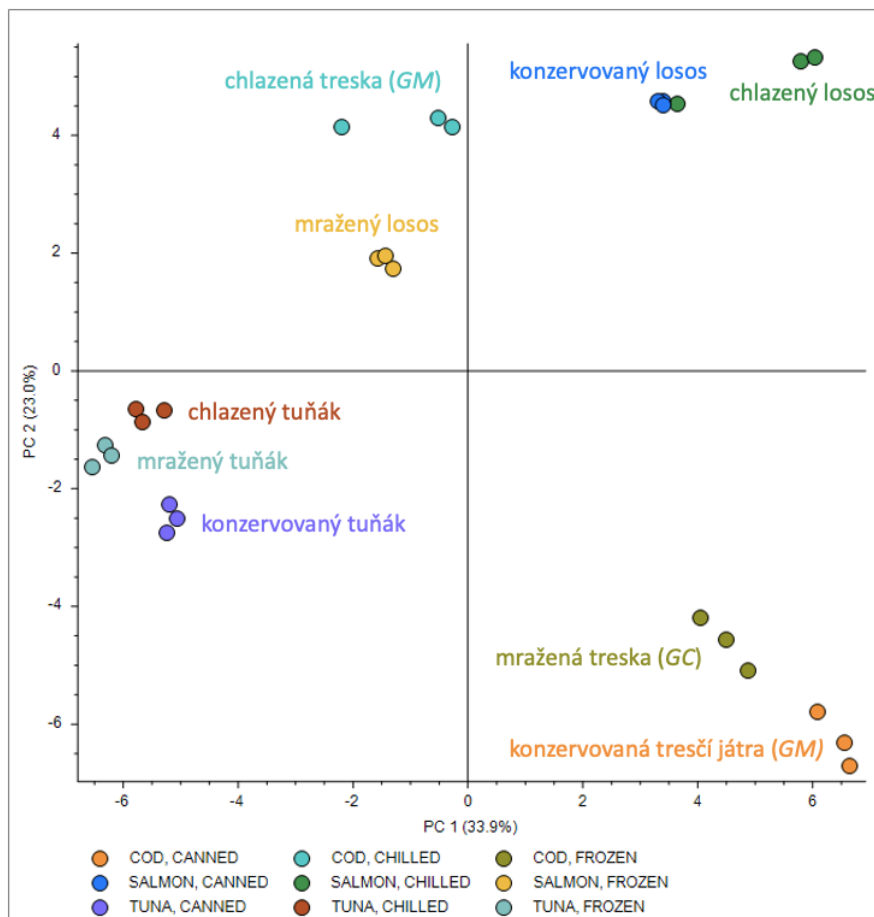
Obrázek 21: Relativní koncentrace lipidů obsahující PUFA, modrá – treska obecná (*Gadus morhua*) a treska aljašská (*Gadus chalcogrammus*), červená – losos obecný (*Salmon salar*), zelená - tuňák žlutoploutvý (*Thunnus albacares*)

7.4 Vícerozměrná analýza jednotlivých vzorků rybí tkáně

Ze všech detekovaných 671 látek bylo po vyfiltrování získáno 81 látek z 5 tříd lipidů obsahující PUFA ve své struktuře (třídy PC, LPC, PE, SM, CER). Srovnáním prvních dvou hlavních komponent PC1 a PC2 (Obrázek 22) se ukázalo, že složení lipidů obsahující PUFA ve vzorku jater tresky obecné (*Gadus morhua*, oranžové body) bylo podobné vzorku mražené tresky aljašské (*Gadus chalcogrammus*, světle zelené body). Vzorek chlazeného filé tresky obecné (*Gadus morhua*, tyrkysové body) se však obsahem lipidů podobal spíše lososu obecnému (*Salmon salar*) než-li tresce aljašské (*Gadus chalcogrammus*).

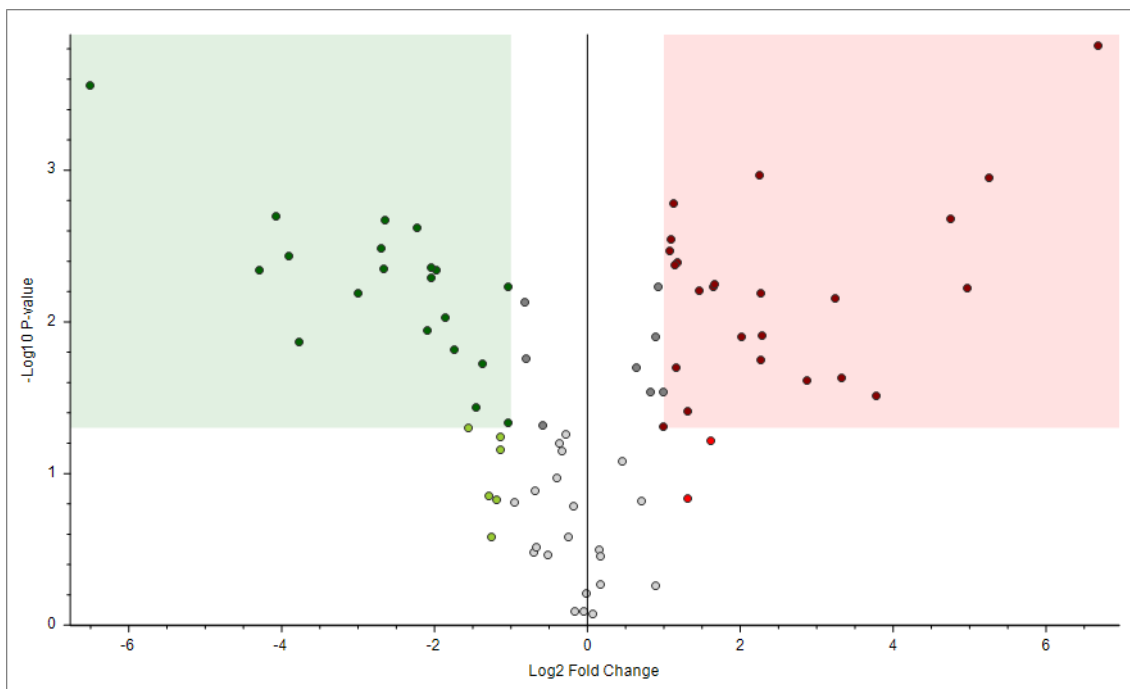
Dále byly porovnány vzorky lososa obecného (*Salmon salar*). Vzorky lososa v konzervovaném zpracování (tmavě modré body) a v chlazeném zpracování (tmavě zelené body) se ve složení lipidů shodovaly více než vzorek obsahující lososa v mraženém stavu (žluté body).

Nakonec byly porovnány vzorky tuňáka žlutoploutvého (*Thunnus albacares*). Vzorky ve všech stavech zpracování vykazovali nejmenší variability lipidového profilu v porovnání s ostatními rybami (fialové, světle modré a červené body).



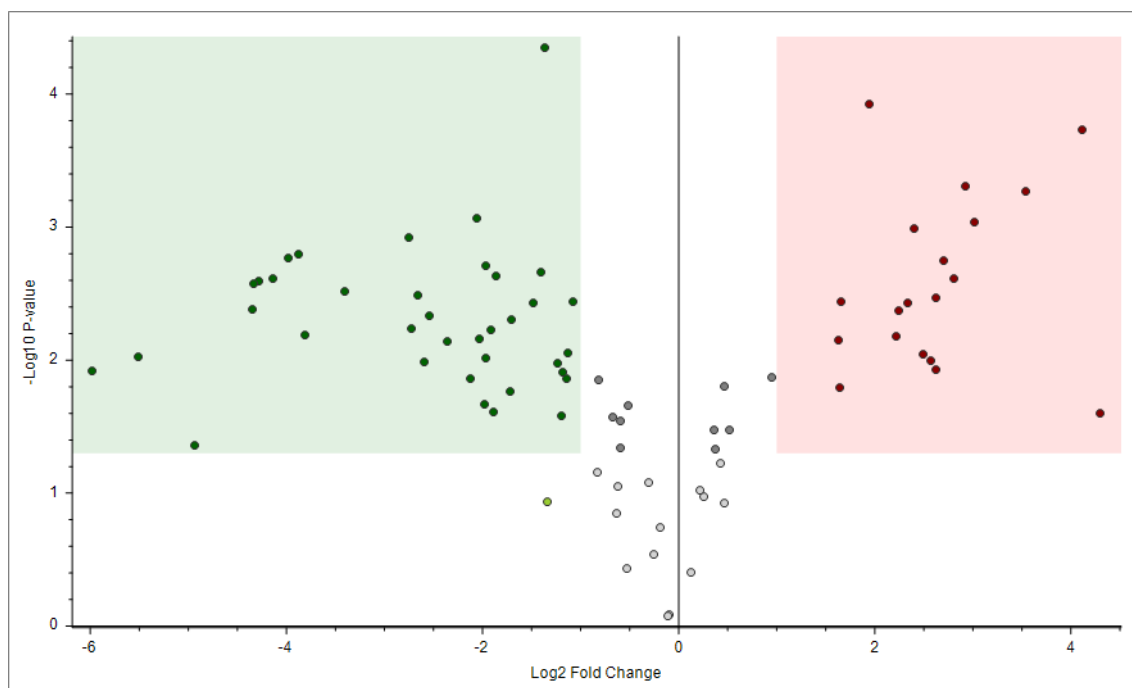
Obrázek 22: PCA graf srovnávající jednotlivé druhy ryb v různých zpracováních, Cod – treska obecná (*Gadus morhua*), mražená treska aljašská (*Gadus chalcogrammus*), Salmon – losos obecný (*Salmon salar*), Tuna – tuňák žlutoploutvý (*Thunnus albacares*), Canned – konzervované zpracování, Chilled – chlazené zpracování, Frozen – mražené zpracování

Pro porovnání lipidů obsahující PUFA mezi mraženým filé a konzervovanými játry bylo použito vulkánového grafu (Obrázek 23). U vzorku mraženého filé bylo pozorováno snížení 20 lipidů obsahující PUFA (10 ze třídy PC a LPC, 7 CER, 2 SM a 1 LPE), u vzorku jater bylo pozorováno 25 výrazně zvýšených lipidů (22 ze třídy PC a LPC, 1 SM, 1 CER, 1 PE).



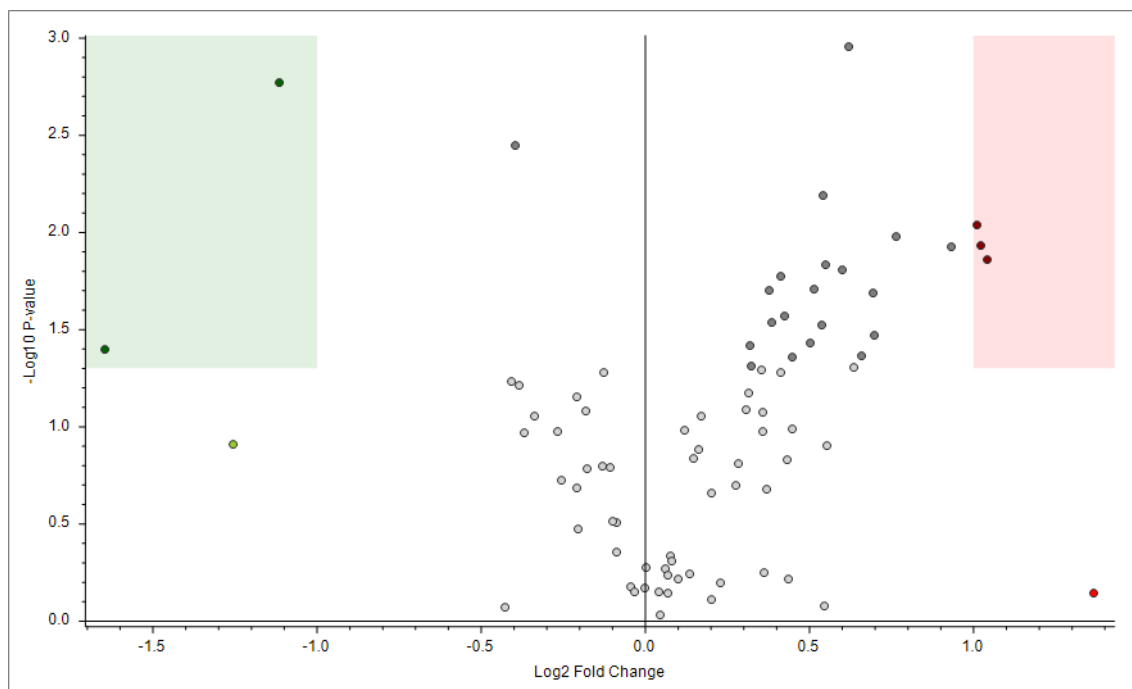
Obrázek 23: Porovnání metabolitů ze třídy PUFA u vzorku mraženého filé (zelená, vlevo od středové osy) a konzervovaných jater (červená, vpravo od středové osy) tresky obecné (*Gadus morhua*)

V dalším porovnání byl vzorek mraženého filé a chlazeného filé lososa obecného (*Salmon salar*). U vzorku mraženého filé bylo pozorováno snížení 37 lipidů obsahující PUFA (33 PC a LPC, 1 PE, 3 CER) u vzorku chlazeného filé bylo pozorováno zvýšení 19 lipidů obsahující PUFA (12 PC A LPC, 1 PE, 2 SM, 4 CER) (Obrázek 24).



Obrázek 24: Porovnání významných metabolitů ze třídy PUFA u vzorku mraženého filé (zelená, vlevo od středové osy) a chlazeného filé (červená, vpravo od středové osy) u lososa obecného (*Salmon salar*)

Nakonec byly porovnány vzorky mraženého filé a chlazeného filé tuňáka žlutoploutvého (*Thunnus albacares*). U vzorku mraženého filé byly významně sníženy 2 lipidy obsahující PUFA ze třídy PC a LPC a významně zvýšeny 3 lipidy obsahující PUFA ze třídy PC. (Obrázek 24).



Obrázek 25: Porovnání významných metabolitů ze třídy PUFA u vzorku mraženého steaku (zelená, vlevo od středové osy) a chlazeného steaku (červená, vpravo od středové osy) u tuňáka žlutoploutvého (*Thunnus albacares*).

8 Diskuze

Součástí tzv. „data processingu“ je identifikace a anotace molekul v naměřeném datasetu. Tato funkce je pro metabolomiku zásadní z důvodu uvedení dat do biologického kontextu. Dle Sumner et al. (2007) můžeme rozdělit zpracovaná data do 4 úrovní: (i) anotované sloučeniny (ii) domněle anotované sloučeniny (iii) domněle charakterizované třídy sloučenin (iv) neznámé sloučeniny. Domněle anotované sloučeniny jsou anotovány bez použití interních standardů, pouze na základě podobnosti spekter s knihovnou. Domněle charakterizované třídy sloučenin jsou charakterizovány na základě spektrální podobnosti se známými sloučeninami dané chemické třídy.

Identifikace metabolitů by měla být pečlivá a přísná, aby bylo možné identifikace validovat. Podle Kirwan et al. (2022) je možné lepší identifikace a následné správné interpretace dosáhnout zavedením QC vzorků, interních standardů a slepých vzorků. Interní standardy umožňují lépe kontrolovat chromatografický drift a zvyšovat kvalitu spekter. Slepé vzorky slouží ke zvýraznění kontaminantů, které jsou při zpracování surových dat odstraněny. V tomto experimentu byly použity všechny tři uvedené přístupy pro zlepšení identifikace metabolitů.

V negativním módu ionizace bylo anotováno 31 % látek. V pozitivním módu ionizace bylo detekováno 58 % látek (grafy na Obrázku 12 a 13). Důvodem proč v pozitivním módu bylo identifikováno více látek je značně vyšší počet detekovaných sloučenin (zejména látky ze skupiny triacylglycerolů) které jsou již dobře popsány v knihovně spekter). Porovnáním získaných analytů s rozsáhlou spektrální knihovnou pak přispívá ke úspěšné identifikaci.

Dále byla vyhodnocena vhodná extrakční metoda pro lipidy obsahující PUFA ve své struktuře. Lipidy jsou velmi heterogenní skupina organických látek a v současné době neexistuje jediná extrakční metoda, která by dokázala extrahovat všechny třídy lipidů z biologické matrice. Nejpoužívanější je extrakce typu kapalina-kapalina. Poměrně rychlou a jednoduchou metodou je použití vody a organických rozpouštědel (např. ACN) ke srážení proteinů a dalších nelipidových složek. V případě, že vzniká pouze jedna kapalná fáze obsahující lipidy a pevná frakce obsahující ostatní látky, jedná se o jednofázovou extrakci. Při použití extrakce dle Bligh, Dyer 1959 vznikají ve zkumavce fáze dvě, a to

horní polární (voda + metanol) a spodní nepolární (chloroform), které jsou odděleny pevnou proteinovou frakcí, jedná se o dvoufázovou extrakci. Úskalím dvoufázových extrakcí je však vysoká pravděpodobnost kontaminace vzorků kvůli nutnosti získat lipidy ze spodní vrstvy bohaté na chloroform (Gil et al. 2018).

Během přípravy a skladování extrahovaných vzorků tkání může dojít k autooxidaci lipidů, které by mohly být klinicky nebo statisticky významné. Přidáním vhodného antioxidantu je teoreticky možné tuto oxidaci omezit, a to zpomalením nebo inhibicí tvorby volných radikálů. Nejúčinnější antioxidanty obsahují aromatické kruhy, jelikož předávají vodík volným radikálům vznikajících při oxidaci a samy se stávají radikálem. Tímto procesem je možné přerušit řetězovou reakci volných radikálů (Yehye et al. 2015). Jednou z možných variant je přidání butylhydroxytoluenu (2,6-ditert-butyl-4-methylphenol, BHT). BHT je organická sloučenina rozpustná v tucích. Je přítomna v některých rostlinách a fytoplanktonu, většinou se však připravuje synteticky. Používá se především jako antioxidační přísada do potravin (E321), kosmetiky a léků (PubChem, National Library of Medicine (US), citováno 13. 4. 2023)

Po porovnání chromatogramů (Obrázek 14) lipidového extraktu lososa obecného (*Salmon salar*) mezi jednofázovou a dvoufázovou extrakcí s použitím BHT i bez byly viditelné intenzivnější píky u dvoufázové extrakce. Nicméně tento typ extrakce hůře extrahuje polárnější lipidy, kam řadíme taktéž mastné kyseliny (a jejich oxidované produkty), což je patrné také z chromatogramů na Obrázku 14. Pro experimenty s dalšími vzorky ryb byla vybrána jednofázová extrakce z důvodu většího počtu detekovaných lipidů (graf na Obrázku 15). K lipidovým extraktům byl přidán antioxidant BHT z důvodu očekávané lepší stability analytů během přípravy a měření vzorku, ačkoliv prvotní experiment neodhalil žádný významný efekt na námi sledované lipidy (graf na Obrázku 16).

Metodou dle Jankevics et al. (2021), byla provedena chromatografická separace jednotlivých lipidických tříd. Při separaci na reverzní fází se různé třídy lipidů eluují v různých retenčních časových oknech na základě jejich polarit (více polární analyty se eluují dříve a méně polární později – s klesající polaritou látek roste jejich retenční čas). Polaritu molekul a zároveň jejich retenční čas ovlivňuje rovněž počet alifatických řetězců přítomných v molekule. Molekuly s jednoduchým řetězcem (např. mastné kyseliny) se tak eluují dříve než molekuly až se třemi řetězci (např. triacylglyceroly). Zároveň snižuje retenci analytů počet

dvojných vazeb jelikož jejich přítomnost způsobuje „ohýbání“ molekuly a plocha interakce se stacionární fází je menší než u alifatického řetězce. MK ve své struktuře obsahují karboxylovou skupinu, proto se snáz ionizují jako anionty (ztráta H⁺, při daném pH) a jsou lépe viditelné v chromatogramu po použití negativní ionizace. Tuto teorii potvrzují taktéž dva výsledné chromatogramy (Obrázek 17), kde lze pozorovat eluci mastných kyselin v prvních 6 minutách separace v negativním módu a lipidy ze skupiny PE až od 6 do 16 minuty.

Dle Sargent (1997) by měly být vyšší koncentrace n-3 PUFA a lipidů obsahující n-3 PUFA ve své struktuře u jater hlubinných ryb, jako je například treska. Porovnáním relativních koncentrací mezi játry tresky obecné (*Gadus morhua*), chlazeným filé tresky obecné (*Gadus morhua*) a mraženým filé tresky aljašské (*Gadus chalcogrammus*) byly vypočítány rozdíly (graf na Obrázku 21). Ačkoliv jsou tedy tresčí játra považována za nejbohatší zdroj nenasycených mastných kyselin, nejvíce lipidů obsahující PUFA měl vzorek mražené tresky aljašské (*Gadus chalcogrammus*). I když vzorek tresčích jater měl v porovnání se vzorkem mraženého filé tresky menší relativní koncentraci lipidů s PUFA, u tresčích jater bylo pozorováno výrazné zvýšení u 25 lipidů, zejména ze třídy PC a LPC obsahující PUFA v porovnání se vzorkem mraženého filé, kde bylo pozorováno výrazné snížení 20 lipidů obsahující PUFA, zejména ze tříd PC a LPC (graf na Obrázku 23). Zvýšené množství těchto lipidů je dáno pravděpodobně typem tkáně. Na snížení látek může mít vliv typ mraženého zpracování, kdy mohlo dojít k hydrolýze lipidů během zpracování, ale také jiný druh ryby – mražené filé pocházelo z tresky aljašské (*Gadus chalcogrammus*). V případě porovnání relativní koncentrace lipidů s PUFA v rámci zpracování jednoho druhu, tedy tresky obecné (*Gadus morhua*), jsou bohatší na lipidy s PUFA játra této tresky v porovnání s chlazeným filé, které mělo ze všech vzorků nejmenší zastoupení lipidů s PUFA.

U vzorku lososa obecného (*Salmon salar*) byla relativní koncentrace lipidů obsahující PUFA nejvyšší u mraženého filé (graf na Obrázku 21). Nejmenší zastoupení lipidů s PUFA je u vzorku konzervovaného lososa, což je také zřejmé z chromatogramu na Obrázku 19. Námi testovaný vzorek pravděpodobně obsahoval velmi nekvalitní maso lososa obecného (*Salmon salar*).

Překvapivý výsledek přineslo porovnání vzorků tuňáka žlutoploutvého (*Thunnus albacares*), kde rybí maso v konzervovaném zpracování obsahovalo

nejvíce lipidů s PUFA (graf na Obrázku 21). U vzorku chlazeného filé bylo relativní zastoupení lipidu taktéž menší, stejně jako u chlazeného filé lososa obecného (*Salmon salar*). Možným důvodem, proč mohou být lipidy obsahující PUFA v chlazeném stavu zastoupeny v menším množství je nesprávná manipulace s rybími produkty a nedodržení postupu při zpracování, které je slibováno výrobcem. Zatímco mražené filé získané z ryby může být zpracováno a zamraženo ihned po odebrání, což může zachovat vyšší stabilitu lipidů s PUFA, v případě chlazeného filé, může dojít k delší manipulaci s masem, popřípadě k několika zmražením a rozmražením před uvedením produktu na pult. Tato špatná manipulace může způsobit hydrolýzy lipidů a degradovat tak volné i vázané PUFA.

Při porovnání chlazeného a mraženého stavu zpracování mezi lososem obecným (*Salmon salar*) a tuňákem žlutoploutvým (*Thunnus albacares*) je lépe zpracováno maso tuňáka žlutoploutvého (*Thunnus albacares*), jelikož porovnáním vzorků mezi chlazeným a mraženým stavem bylo pozorováno velmi malé snížení a zvýšení lipidů s PUFA (grafy na Obrázku 24 a 25), zároveň se vzorky tuňáka žlutoploutvého (*Thunnus albacares*) nijak výrazně neodlišovaly svým lipidovým profilem (graf na Obrázku 22) a taktéž měly všechny vzorky tuňáka žlutoploutvého (*Thunnus albacares*) intenzivní chromatografické píky u všech typů zpracování (chromatogram na Obrázku 20).

9 Závěr

Jedním z cílů práce bylo pochopení problému identifikace v necílené metabolomice. Z výsledných grafů v této práci je zřejmé, že velké procento dat není stále ještě možné s jistotou identifikovat a anotovat.

Jako vhodná metoda pro extrakci těchto lipidů byla zvolena jednofázová extrakce z důvodu lepší separace více polárních lipidů a tedy i volných PUFA a lipidů, které je obsahují ve své struktuře. Z důvodu očekávané větší stability extrahovaných lipidů byl přidán k extrakci antioxidant BHT.

Z výsledků a následné diskuze vyplývá, že mražené filé tresky aljašské (*Gadus chalcogrammus*) má nejvyšší relativní zastoupení lipidů s obsahem PUFA ze všech testovaných vzorků. Naopak nejmenší relativní zastoupení těchto lipidů měl vzorek konzervovaného lososa obecného (*Salmon salar*). U všech druhů ryb mělo vyšší zastoupení lipidů s PUFA mražené filé v porovnání s chlazeným filé. Velmi zajímavým závěrem však je, že dle lipidového profilu se nejvíce podobá chlazené filé tresky obecné (*Gadus chalcogrammus*) a mražené filé lososa obecného (*Gadus chalcogrammus*). Lipidový profil se nijak výrazně nelišil u vzorku tuňáka žlutoploutvého (*Thunnus albacares*), lze tedy říci, že při zpracování biologického materiálu nedochází k výrazným změnám v zastoupení lipidů při jeho zpracování.

Reference

- BAENKE F., PECK B., MIESS H., SCHULZE A. (2013) Hooked on fat: the role of lipid synthesis in cancer metabolism and tumour development. *Disease Models & Mechanisms*. vol. 6, no. 6, pp. 1353–1353
- BALDWIN M. A., MCLAFFERTY F. W. (1973) Liquid chromatography-mass spectrometry interface—I: The direct introduction of liquid solutions into a chemical ionization mass spectrometer. *Organic Mass Spectrometry*, vol. 7, no. 9, pp. 1111–1112.
- BELHAJ M. R., LAWLER N. G., HOFFMAN N. J. (2021) Metabolomics and Lipidomics: Expanding the Molecular Landscape of Exercise Biology. *Metabolites 2021*, vol. 11, no. 3, pp. 151.
- BERGÉ J. P., BARNATHAN G. (2005) Fatty acids from lipids of marine organisms: molecular biodiversity, roles as biomarkers, biologically active compounds, and economical aspects. *Adv Biochem Engin/Biotechnol.* vol. 96, pp. 49–125.
- BERKER Y., MUTI I. H., CHENG L. L. (2022) Visualizing metabolomics data with R. *NMR in Biomedicine*, pp. e4865.
- BLIGH, E. G., DYER, W. J. (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian journal of biochemistry and physiology*, vol. 37, no. 8, pp. 911–917.
- BROWN H. A., MARNETT L. J. (2011) Introduction to lipid biochemistry, metabolism, and signaling. *Chemical reviews*, vol. 111, no. 10, pp. 5817–5820.
- D'ADAMO G. L., WIDDOP J. T., GILES E. M. (2021) The future is now? Clinical and translational aspects of “Omics” technologies. *Immunology and Cell Biology*, vol. 99, no. 2, pp. 168–176.
- DETTMER K., HAMMOCK B. D. (2004) Metabolomics—a new exciting field within the „omics“ sciences. *Environmental health perspectives*, vol. 112, no. 7.
- DIETERLE F., ROSS A., SCHLOTTERBECK G., SENN H. (2006) Probabilistic quotient normalization as robust method to account for dilution of complex biological mixtures. Application in ¹H NMR metabonomics. *Analytical chemistry*, vol. 78, no. 13, pp. 4281–4290.

- DJURICIC I. , CALDER P. C. (2021) Beneficial Outcomes of Omega-6 and Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids on Human Health: An Update for 2021. *Nutrients*, vol. 13, no. 7.
- STEPHENS W. E. (1946) A Pulsed Mass Spectrometer with Time Disaersion. *Phys. Rev*, vol. 69, pp. 691
- FAHY E., SUBRAMANIAM S., ALEX BROWN H., GLASS C. K., MERRILL A. H, MURPHY C. R., RAETZ, C. H. R, RUSSELL D. W, SEYAMA, Y., SHAW W., SHIMIZU T., SPENER F., VAN MEER G. , VANNIEUWENHZE M. S., WHITE S. H., WITZTUM J. L., DENNIS E. A., SUBRAMANIAM, S, BROWN H. A., GLASS C. K., MERRILL A. H., MURPHY R. C., RAETZ C. R. H., RUSSELL, D. W., SEYAMA Y., SHAW W., SHIMIZU T., SPENER F., VAN MEER G., VANNIEUWENHZE M. S., WHITE S. H., WITZTUM J. L. a DENNIS A. E. A (2005) A comprehensive classification system for lipids 1. *Journal of Lipid Research*, vol. 46, no. 5, pp. 839–861.
- FIEHN O. (2001) Combining Genomics, Metabolome Analysis, and Biochemical Modelling to Understand Metabolic Networks. *Comparative and Functional Genomics*, vol. 2, no. 3, pp. 155.
- GAULT J., DONLAN J. A. C., LIKO I., HOPPER J. T. S., GUPTA K., HOUSDEN N. G., STRUWE W. B., MARTY M. T., MIZE T., BECHARA C., ZHU Y., WU B., KLEANTHOS C., BELOV M., DAMOC E., MAKAROV, A., ROBINSON C. (2016) High-resolution mass spectrometry of small molecules bound to membrane proteins. *Nature Methods*, vol. 13, no. 4, pp. 333–336.
- GERTSMAN I., BARSHOP B. A. (2018) Promises and Pitfalls of Untargeted Metabolomics. *Journal of inherited metabolic disease*, vol. 41, no. 3, pp. 355.
- GIL A., ZHANG W., WOLTERS J. C., PERMENTIER H., BOE T., HORVATOVICH P., HEINER-FOKKEMA M. R., REIJNGOUD D. J., BISCHOFF R. (2018) One- vs two-phase extraction: re-evaluation of sample preparation procedures for untargeted lipidomics in plasma samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 410, no. 23, pp. 5859–5870.

- GOHLKE, R. S. (1959) Time-of-Flight Mass Spectrometry and Gas-Liquid Partition Chromatography. *Analytical Chemistry*, vol. 31, no. 4, pp. 535–541.
- GRIFFITHS J. (2008) A Brief History of Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*, vol. 80, no. 15, pp. 5678–5683.
- GUO J., HUAN T. (2020) Comparison of Full-Scan, Data-Dependent, and Data-Independent Acquisition Modes in Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Based Untargeted Metabolomics. *Analytical Chemistry*, vol. 92, no. 12, pp. 8072–8080.
- HECHT E. S., SCIGELOVA M., ELIUK S., MAKAROV A. (2019) Fundamentals and Advances of Orbitrap Mass Spectrometry. *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. Wiley. pp. 1–40.
- HENDRIKS M. M. W. B., EEUWIJK F. A., JELLEMA R. H., WESTERHUIS J. A., REIJMERS T. H., HOEFSLOOT H. C. J., SMILDE A. K. (2011) Data-processing strategies for metabolomics studies. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, vol. 30, no. 10, pp. 1685–1698.
- HILL H. (2009) Development of bioanalysis: a short history. *Bioanalysis*, vol. 1, no. 1, pp. 3–7
- HOFFMANN E. a STROOBANT V. (2007) *Mass Spectrometry: Principles and Applications*, third edition, ISBN 978-0-470-03310-4.
- HUR M., CAMPBELL A. A., ALMEIDA-DE-MACEDO M., LI L., RANSOM N., JOSE A., CRISPIN M., NIKOLAU B. J., WURTELE E. S. (2013) A global approach to analysis and interpretation of metabolic data for plant natural product discovery. *Natural product reports*, vol. 30, no. 4, pp. 565.
- CHRISTIE W. W., BRIDGWATER S. (1989) *Gas Chromatography and Lipids: A Practical Guide*, The Oily Press, www.lipidlibrary.co.uk
- CHRISTIE W. W. (2023), *Lipids: Definitions, Classification and Nomenclature*, www.lipidmaps.org/resources/lipidweb/lipidweb_html/lipids/basics/Nomen/index.htm
- JANKEVICS A., JENKINS A., DUNN W. B., NAJDEKR L. (2021) An improved strategy for analysis of lipid molecules utilising a reversed phase C30 UHPLC column and scheduled MS/MS acquisition. *Talanta*, vol. 229, pp. 122262.

- JEWETT M. C., HOFMANN G., NIELSEN J. (2006) Fungal metabolite analysis in genomics and phenomics. *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 17, no. 2, pp. 191–197
- JÜRGEN H. G. (2011) *Mass Spectrometry*, 2nd edition, ISBN 978-3-642-10709-2.
- KIRWAN J. A., GIKA H., BEGER R. D., BEARDEN D., DUNN W. B., GOODACRE R., THEODORIDIS G., WITTING M. I., YU L. R., WILSON I. D. (2022) Quality assurance and quality control reporting in untargeted metabolic phenotyping: mQACC recommendations for analytical quality management. *Metabolomics*, vol. 18, no. 9, pp. 1–16.
- KLASSEN A., FACCIO A. T., CANUTO G. A. B., DA CRUZ P. L. R., RIBEIRO H. C., TAVARES M. F. M., SUSSULINI A. (2017), Metabolomics: Definitions and significance in systems biology. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol. 965, pp. 3–17.
- LIPID MAPS, www.lipidmaps.org/databases/lmsd/overview, citováno 6. 5. 2023
- LU W., SU X., KLEIN M. S., LEWIS I. A., FIEHN O. a RABINOWITZ J. D. (2017) Metabolite Measurement: Pitfalls to Avoid and Practices to Follow. *Annual review of biochemistry*, vol. 86, pp. 277.
- NOVÁKOVÁ L., DOUŠA M. (2013) *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I*. Praha, i.e. Hradec Králové, ISBN 978-80-260-4243-3.
- HOLČAPEK M (2011) *Spojení vysokoúčinné kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie (HPLC/MS)*, ISBN 80-7194-390-8.
- MACDONALD G. E., LADA R. R., CALDWELL C. D., UDENIGWE, C., MACDONALD M. T., (2019) Potential Roles of Fatty Acids and Lipids in Postharvest Needle Abscission Physiology. *American Journal of Plant Sciences*, vol. 10, no. 6, pp. 1069–1089
- MAKAROV A., DENISOV E., KHOLOMEEV A., BALSCHUN W., LANGE O., STRUPAT K., HORNING S. (2006) Performance evaluation of a hybrid linear ion trap/orbitrap mass spectrometer. *Analytical Chemistry*, vol. 78, no. 7, pp. 2113–2120.

- MAKAROV A. (2000) Electrostatic axially harmonic orbital trapping: A high-performance technique of mass analysis. *Analytical Chemistry*, vol. 72, no. 6, pp. 1156–1162.
- MARIAMENATU A, H., ABDU E. M. (2021) Overconsumption of Omega-6 Polyunsaturated Fatty Acids (PUFAs) versus Deficiency of Omega-3 PUFAs in Modern-Day Diets: The Disturbing Factor for Their “Balanced Antagonistic Metabolic Functions” in the Human Body. *Journal of Lipids*, vol. 2021, pp. 1–15.
- MCCOLL E. R., ASTHANA R., PAINE M. F., PIQUETTE-MILLER, M. (2019) The Age of Omics-Driven Precision Medicine. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, vol. 106, no. 3, pp. 477–481.
- MCGILL R., TUKEY J. W., LARSEN W. A. (1978) Variations of Box Plots. *The American Statistician*, vol. 32, no. 1, pp. 12–16.
- MCMURRY J. (2007) *Organická chemie*. VŠCHT Praha, ISBN 978-80-7080-637-1.
- OLSEN J. V., SCHWARTZ J. C., GRIEP-RAMING J., NIELSEN M. L., DAMOC E., DENISOV E., LANGE O., REMES P., TAYLOR D., SPLENDORE M., WOUTERS E. R., SENKO M., MAKAROV A., MANN, M., HORNING S. (2009). A dual pressure linear ion trap Orbitrap instrument with very high sequencing speed. *Molecular & cellular proteomics : MCP*, vol. 8, no. 12, pp. 2759–2769.
- PATTI G. J., YANES O., SIUZDAK G. (2012) Metabolomics: the apogee of the omics trilogy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 13, no. 4, pp. 263–269.
- PERRY R. H., COOKS R. G., NOLL R. J. (2008) Orbitrap mass spectrometry: Instrumentation, ion motion and applications. *Mass Spectrometry Reviews*, vol. 27, no. 6, pp. 661–699.
- PLUSKAL T., CASTILLO S., VILLAR-BRIONES A., OREŠIČ M. (2010) MZmine 2: Modular framework for processing, visualizing, and analyzing mass spectrometry-based molecular profile data. *BMC Bioinformatics*, vol. 11, no. 1, pp. 1–11.
- PUBCHEM, Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information (2004), PubChem Compound

Summary for CID 31404, Butylated Hydroxytoluene, https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2_6-ditert-butyl-4-methylphenol, citováno 13. 4. 2023

- RESURRECCION E. P., FONG K. W. (2022) The Integration of Metabolomics with Other Omics: Insights into Understanding Prostate Cancer. *Metabolites*, vol. 12, no. 6.
- RUIZ-RODRIGUEZ A., REGLERO G., IBAÑEZ E. (2010) Recent trends in the advanced analysis of bioactive fatty acids. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 51, no. 2, pp. 305–326.
- SACCENTI E., HOEFSLOOT H. C. J., SMILDE A. K., WESTERHUIS, J. A., HENDRIKS M. M. W. B. (2013) Reflections on univariate and multivariate analysis of metabolomics data. *Metabolomics*, vol. 10, no. 3, pp. 361–374.
- SARGENT J. R. (1997) Fish oils and human diet. *British Journal of Nutrition*, vol. 78, pp. 5–8
- SHAHIDI F., AMBIGAIPALAN P. (2018) Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids and Their Health Benefits. *Annual review of food science and technology*, vol 9, pp. 345–381
- SCHRIMPE-RUTLEDGE A. C., CODREANU S. G., SHERROD S. D. MCLEAN J. A. (2016) Untargeted metabolomics strategies – Challenges and Emerging Directions. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, vol. 27, no. 12, pp. 1897
- SKOOG D. A., WEST D. M., HOLLER F. J. CROUCH S. R. (2014) *Fundamentals of Analytical Chemistry*, 9th edition, ISBN 978-0495558286.
- SUMNER L. W., AMBERG A., BARRETT D., BEALE M. H., BEGER, R., DAYKIN C. A., FAN T. W. M., FIEHN O., GOODACRE R., GRIFFIN J. L., HANKEMEIER T., HARDY N., HARNLY J., HIGASHI R., KOPKA, J., LANE A. N., LINDON J. C., MARRIOTT P., NICHOLLS A. W., REILY, M. D., THADEN J. J., VIANT M. R. (2007) Proposed minimum reporting standards for chemical analysis Chemical Analysis Working Group (CAWG) Metabolomics Standards Initiative (MSI). *Metabolomics : Official journal of the Metabolomic Society*, vol. 3, no. 3, pp. 211–221.

- TALLEY J. T., MOHIUDDIN S. S. (2023) Biochemistry, Fatty Acid Oxidation. *StatPearls*, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK556002/>, citováno 9. 5. 2023
- THERMO SCIENTIFIC (2011) Orbitrap Elite Hardware Manual, Bremen, Německo.
- VINAIXA M., SAMINO S., SAEZ I., DURAN J., GUINOVART J. J., YANES, O. (2012) A Guideline to Univariate Statistical Analysis for LC/MS-Based Untargeted Metabolomics-Derived Data. *Metabolites*, vol. 2, no. 4, pp. 775
- VIVANCO F., BARDERAS M. G., LABORDE C. M., POSADA M., FERNANDO DE LA C., ZUBIRI I., ALVAREZ-LLAMAS G. (2011) Metabolomic profiling for identification of novel potential biomarkers in cardiovascular diseases. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, Vol. 2011, ID 790132
- WANG R., LI B., LAM S. M., SHUI G., (2020) Integration of lipidomics and metabolomics for in-depth understanding of cellular mechanism and disease progression. *Journal of Genetics and Genomics*, vol. 47, no. 2, pp. 69–83
- NONLINEAR, What are p-values, what are q-values, and why are they important?<https://www.nonlinear.com/transomics/metabolomics/v1.0/faq/pq-values.aspx>, citováno 9. 5. 2023
- WORLEY B., POWERS R. (2016) PCA as a practical indicator of OPLS-DA model reliability. *Current Metabolomics*, vol. 4, no. 2, pp. 97.
- YATES J. R. (2011) A century of mass spectrometry: from atoms to proteomes. *Nature Methods*, vol. 8, no. 8, pp. 633–637
- YEHYE W. A., RAHMAN N. A., ARIFFIN A., ABD HAMID S. B., ALHADI A. A., KADIR F. A., YAEGHOobi M. (2015) Understanding the chemistry behind the antioxidant activities of butylated hydroxytoluene (BHT): a review. *European journal of medicinal chemistry*, vol. 101, pp. 295–312.
- ZAMPIERI M., SAUER U. (2017) Metabolomics-driven understanding of genotype-phenotype relations in model organisms. *Current Opinion in Systems Biology*, vol. 6, pp. 28–36.

- ZUBAREV R. A., MAKAROV A. (2013) Orbitrap mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, vol. 85, no. 11, pp. 5288–5296.