

Univerzita Palackého v Olomouci  
Přírodovědecká fakulta  
Katedra buněčné biologie a genetiky



# Metabolomická analýza močí novorozenců s perinatální asfyxií

Diplomová práce

Michaela Galoczová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2015

Vedoucí práce: Mgr. Radana Karlíková

Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením Mgr. Radany Karlíkové, za použití citované literatury.

Olomouc 23. dubna 2015

.....

Michaela Galoczová

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucí své diplomové práce Mgr. Radaně Karlíkové za veškerou ochotu, trpělivost a čas, které mi věnovala, a také za její cenné rady a připomínky. Dále bych chtěla poděkovat RNDr. Davidu Friedeckému, Ph.D., prof. RNDr. Tomáši Adamovi, Ph.D za odborné rady, Mgr. Alžbětě Gardlo za pomoc se statistickým zpracováním a celému personálu a studentům Metabolomické laboratoře Ústavu molekulární a translační medicíny (ÚMTM) v Olomouci za jejich ochotu mi vždy pomoci. Mé velké díky rovněž patří mé rodině, přátelům a příteli, kteří mi poskytli zázemí při vypracovávání této práce a byli pro mě velkou oporou. Tato práce vznikla za podpory projektu, jehož infrastrukturální část (ÚMTM) byla podpořena Operačním programem Výzkum a vývoj pro inovace (projekt CZ.1.05/2.1.00/01.0030) a Národním programem udržitelnosti I (LO1304).

## SOUHRN

---

Perinatální asfyxie a hypoxicko-ischemická encefalopatie představují závažný problém postihující plod a novorozence. Metabolomika je vhodným nástrojem k hledání nových biomarkerů, které by mohly vést k lepšímu pochopení probíhajících patofyziologických mechanismů. Literární přehled této práce se zabývá perinatální asfyxií, hypoxicko-ischemickou encefalopatií a neuroprotekcí. Následuje část věnovaná metabolomice a necílené analýze vzorků moči, popisu hmotnostního spektrometru Orbitrap Elite a statistickému zpracování dat. Experimentální část se zabývá cílenou a necílenou metabolomickou analýzou vzorků moči asfyktických a zdravých novorozenců. Cílená analýza byla provedena za pomoci vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií, pro necílený přístup byla využita stejná separační technika a hybridní hmotnostní spektrometr Orbitrap Elite. Získané metabolické profily patientských a kontrolních vzorků byly srovnány pomocí statistických metod umožňujících nalezení diskriminujících metabolitů mezi porovnávanými skupinami. Byly také hledány metabolity, které souvisely s posouzením závažnosti neurologického poškození novorozence po prodělané perinatální asfyxii.

## SUMMARY

---

Perinatal asphyxia and hypoxic-ischemic encephalopathy significantly endangers the life of the fetus or newborn. Suitable tools for discovering new biomarkers that could lead to better understanding of the pathophysiological mechanisms is metabolomics. Literature overview of this work is about perinatal asphyxia, hypoxic-ischemic encephalopathy and neuroprotection. It is followed by a metabolomics part and an untargeted analysis of urine samples in particular. There is also a description of the mass spectrometer Orbitrap Elite and statistical data processing. The experimental part focuses on the application of targeted and untargeted metabolomics of urine samples from asphyxiated and healthy newborns. Targeted analysis was performed by using high performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry, untargeted approach used the same technique of separation and hybrid mass spectrometer Orbitrap Elite. Acquired metabolic profiles of patient and control samples were compared using statistical methods enable to found the most discriminating metabolites between the compared groups. There were also metabolites identified, which were related to the assessment of the severity of neurological impairment of newborn after perinatal asphyxia.

# OBSAH

---

Úvod.....	9
Literární přehled.....	11
1. Perinatální asfyxie.....	11
2. Hypoxicko-ischemická encefalopatie.....	13
2. 1 Fáze neuronálního poškození.....	14
2. 2 Typy buněčné smrti.....	19
2. 3 Neuroprotektce.....	20
2. 3. 1 Testované látky spojované s neuroprotektivními účinky.....	20
2. 3. 2 Hypotermie.....	21
3. Metabolomika.....	22
3. 1 Metabolomika perinatální asfyxie.....	23
3. 2 Necílená metabolomická analýza moči.....	24
3. 3 Hmotnostní spektrometrie.....	25
3. 3. 1 Orbitrap Elite.....	26
3. 4 Statistické zpracování dat.....	28
Experimentální část.....	30
1. Materiál a metodika.....	30
1. 1 Chemikálie a použité roztoky.....	30
1. 2 Přístrojové vybavení a software.....	30
1. 3 Biologický materiál.....	31
1. 4 Základní údaje o novorozencích.....	32
1. 5 Zpracování vzorku.....	33
1. 6 Cílená a necílená metabolomická analýza.....	34
1. 7 Zpracování dat a statistické vyhodnocení.....	35

2. Výsledky .....	37
2. 1 Cílená metabolomická analýza.....	37
2. 1. 1 Statistická analýza .....	38
2.1.1.1. Kontroly vs. čas 2 .....	38
2.1.1.2. Neurologické poškození.....	42
2. 2 Necílená metabolomická analýza .....	46
2. 2. 1 Statistická analýza .....	46
2.2.1.1. Kontroly vs. čas 2 .....	47
2.2.1.2. Neurologické poškození.....	53
3. Diskuze.....	57
Závěr .....	61
Literatura .....	62
1. Seznam použité literatury.....	62
2. Seznam hypertextových odkazů.....	68
Seznam použitých zkratk a symbolů .....	69
Přílohy	

## CÍLE PRÁCE

---

- vypracování literární rešerše na dané téma
- shromáždění klinických údajů novorozenců s perinatální asfyxií
- analýza močí asfyktických novorozenců a kontrol s využitím cílené a necílené metabolomiky
- statistické zpracování dat
- porovnání metabolomických profilů patientských a kontrolních vzorků (zjištění vlivu perinatální asfyxie na metabolom novorozenců, identifikace biomarkerů souvisejících s posouzením závažnosti asfyxie a prognózy dalšího vývoje novorozenců)



# ÚVOD

---

Perinatální asfyxie a její následek hypoxicko-ischemická encefalopatie, vznikající v důsledku přerušení dodávky kyslíku a krve do mozku, představují závažný problém postihující plod a novorozence (Kolářová *et al.*, 2011). Ačkoli jsou významnou příčinou úmrtí a trvalých neurologických následků, patofyziologické mechanismy zahrnující roli a interakce jednotlivých metabolických drah jsou stále neznámé a předmětem výzkumu (Reinke *et al.*, 2013). Obnovení dodávky okysličené krve je základním předpokladem pro přežití, neznamená však návrat do původního stavu. V prvních dnech po prodělané asfyxii může dojít k multiorgánovému selhání, nejčastěji postiženými orgány jsou srdce, plíce, ledviny a játra. Tyto komplikace akutně ohrožují život novorozence a musí být léčeny, v případě úspěšné léčby pak obvykle dochází během několika dní k obnovení jejich funkce (Kolářová *et al.*, 2011). U mozku je situace složitější, jeho poškození probíhá, spíše než jako samostatná událost, jako postupně rozvíjející se proces, charakterizovaný dvěma fázemi neuronálního poškození (James *et Patel*, 2014).

První část literárního přehledu se zabývá definováním perinatální asfyxie, hypoxicko-ischemickým poškozením mozku a neuroprotekcí. V posledních letech byl učiněn velký pokrok v porozumění mechanismům patofyziologie perinatální asfyxie a jejích následků, nicméně prediktivní diagnostika a personalizovaná terapeutická péče jsou stále na začátku. Důraz je nyní kladen zejména na vývoj neinvazivních diagnostických přístupů pro včasné předpovídání následků a také na identifikaci terapeutických cílů k zlepšení prognózy novorozenců (Morales *et al.*, 2011).

Druhá část literárního přehledu je věnována metabolomice, tedy analýze nízkomolekulárních látek (metabolitů), vyskytujících se v daném čase, v daném biologickém materiálu. Využití tohoto přístupu v neonatologii se zdá být velmi slibné. Získané metabolické profily poskytují informaci o normálním a patologickém fenotypu, jež je důležitá pro pochopení biochemických a patofyziologických mechanismů. V neonatologii je pro metabolomickou analýzu nejvhodnějším biologickým materiálem moč, z důvodu snadného a neinvazivního odběru (Fanos *et al.*, 2012). K metabolomice se dá přistupovat několika způsoby, s ohledem na experimentální část se literární přehled této práce zabývá necílenou metabolomikou, která využívá pro analýzu a detekci metabolitů nejčastěji hmotnostní spektrometrii s vysokým rozlišením. Obvykle následuje vícerozměrná statistická analýza dat, důležitá pro vizualizaci

a interpretaci výsledků. Teorie k cílenému metabolomickému přístupu byla zpracována v rámci bakalářské práce (Galoczová, 2013).

Experimentální část je zaměřena na cílenou a necílenou metabolomickou analýzu vzorků moči, které byly získány od novorozenců s perinatální asfyxií a také od zdravých kontrol. K cílené analýze byla využita kapalinová chromatografie ve spojení s tandemovým hmotnostním spektrometrem QTRAP 5500, necílená analýza byla provedena za pomoci stejné separační metody a hybridního hmotnostního spektrometru Orbitrap Elite.

# LITERÁRNÍ PŘEHLED

---

## 1. Perinatální asfyxie

Perinatální asfyxie (PA) představuje závažný problém, který postihuje plod či novorozence. Můžeme ji definovat jako poruchu výměny krevních plynů, tedy stav nedostatku kyslíku (hypoxie) a akumulace oxidu uhličitého (hyperkapnie), jenž je spojen s významnou metabolickou nebo smíšenou acidózou (Levene *et Chervenak*, 2009). Vymezení perinatálního období se v různých zdrojích liší, obecně se jedná o období před, během nebo po porodu (American Academy of Pediatrics *et al.*, 2006). Světová zdravotnická organizace (<http://www.who.int>, 2015) jej stanovuje od ukončeného 22. týdne (154. den) těhotenství do 7. dne po narození novorozence.

Udává se, že k perinatální asfyxii dochází v 51 % případů v období před porodem (prenatálně), ve 40 % během porodu (intrapartálně) a pouze v 9 % po porodu (postnatálně) (Menkes *et al.*, 2011). Nejčastějšími příčinami jsou pupečnickové a placentární komplikace. Jedná se zejména o přerušení průtoku krve pupeční šňůrou z důvodu komprese či uzlů, dále poruchu výměny plynů na úrovni placenty v případech vcestného lůžka (*placenta praevia*), jeho předčasného odloučení či insuficienci. Mezi placentární komplikace patří také špatné prokrvení mateřské strany lůžka z důvodu hypo/hypertenze matky či abnormálních děložních kontrakcí. Méně častými příčinami jsou onemocnění matky nebo plodu způsobující zhoršenou oxygenaci (srdeční či plicní onemocnění, anémie). Postnatální komplikace zahrnují různé stavy novorozence vedoucí k nedostatečnému provzdušnění a prokrvení plic po porodu (Hájek *et al.*, 2014).

Pro posouzení perinatální asfyxie v klinické praxi se používají kritéria, mezi která patří závažná metabolická nebo smíšená acidémie (pH < 7 v arteriální pupečnickové krvi), skóre podle Apgarové 0-3 po 5. minutě života novorozence, neurologické příznaky (např. záchvaty, kóma, hypotonie) a multiorgánové selhání (ledviny, plíce, játra, srdce, střeva) (American College of Obstetricians and Gynecologist, 2003).

V literatuře se můžeme často setkat s rozdělením perinatální asfyxie na mírnou, střední a závažnou. Některé výzkumné týmy používají pro klasifikaci skóre podle Apgarové, které poskytuje komplexní zhodnocení stavu novorozence v prvních minutách po narození a slouží zejména k posouzení odpovědi na mimoděložní prostředí,

popř. resuscitaci (Gardner *et al.*, 2010). Toto skóre hodnotí 5 kritérií (barva kůže, srdeční frekvence, reakce na podráždění, svalový tonus a dýchání). Každé z nich může být ohodnoceno skórem 1-3 (Stables *et Rankin*, 2010). Perinatální asfyxie je pak posuzována jako mírná pokud je novorozenec zhodnocen v 1. minutě po porodu skórem větším než 7, střední při skóre 4-6 a závažná pokud získá méně než 3 body (Shah *et al.*, 2005). Dalšími kritérii pro posouzení závažnosti asfyktického inzultu jsou přítomnost metabolické acidózy, stupeň neurologického poškození a také kardiovaskulární, respirační a ledvinové komplikace (Low, 1997).

Obecně platí, že poškození centrální nervové soustavy může být ireverzibilní, s dlouhodobými následky. U ostatních orgánů se funkce zpravidla upravují, v nejtěžších případech dítě umírá následkem multiorgánového selhání (Maršál *et al.*, 2006). U mozku dochází v důsledku přerušování dodávky kyslíku a krve k hypoxicko-ischemické encefalopatii. Z hlediska lokalizace a rozsahu poškození mozkové tkáně je důležitým měřítkem zejména čas, tedy délka trvání asfyktického inzultu, a také zralost centrální nervové soustavy novorozence. U donošených novorozenců jsou k asfyxii nejvíce náchylné některé části kortexu a hippokampus, u nedonošených dětí pak bílá hmota v okolí mozkové komory (Fellman *et Raivio*, 1997). O závažnosti poškození rozhoduje rovněž individuální vnímavost plodu/novorozence vůči asfyxii (Pasternak, 1993).

Mírná a střední asfyxie bývá spojována s kognitivními a behaviorálními problémy (hyperaktivita, autismus), poruchami pozornosti u dětí a dospívajících, nízkým inteligenčním kvocientem, schizofrenií a rozvojem psychotických poruch v dospívání. Závažná asfyxie pak mívá za následky mozkovou obrnu, mentální retardaci a epilepsii (Morales *et al.*, 2011).

## 2. Hypoxicko-ischemická encefalopatie

Hypoxicko-ischemická encefalopatie (HIE) patří mezi nejzávažnější důsledky proběhlé perinatální asfyxie u доноšeného novorozence. Centrální nervová soustava je náchylná na nedostatek kyslíku zejména díky vysoké energetické náročnosti pro udržení iontové homeostázy a také z toho důvodu, že disponuje pouze malým množstvím energetických zásob (Loidl, 1997). Hlavním zdrojem energie je katabolismus glukózy. Za normálních podmínek bývá energie získávána ve formě ATP mechanismy aerobní glykolýzy, kdy vzniklý pyruvát vstupuje ve formě acetyl-CoA do Krebsova cyklu a poté dochází k reoxidaci redukovaných koenzymů v dýchacím řetězci. Těmito procesy vzniká z 1 mol glukózy 38 mol ATP. V případě hypoxicko-ischemického poškození je energie získávána anaerobním odbouráváním glukózy, končícím na úrovni laktátu. V tomto případě na 1 mol glukózy připadá zisk pouze 2 mol ATP, což je zcela nedostatečné na pokrytí energetických potřeb mozku (Masopust *et* Průša, 1999). Během 2-3 minut dochází ke spotřebování zásob glukózy a také glykogenu. Mozek disponuje enzymem kreatinkinázou, který katalyzuje konverzi fosfokreatinu na kreatin za uvolnění ATP, což prodlouží dobu dostupnosti energie o cca 1 minutu. Dalším obranným mechanismem je adenylátkináza, která při zvýšení ADP v cytosolu přemění 2 molekuly ADP na ATP a AMP. Díky tomuto enzymu pak mozek získá cca 5-10 minut navíc, než spotřebuje veškeré energetické zásoby (Loidl, 1997).

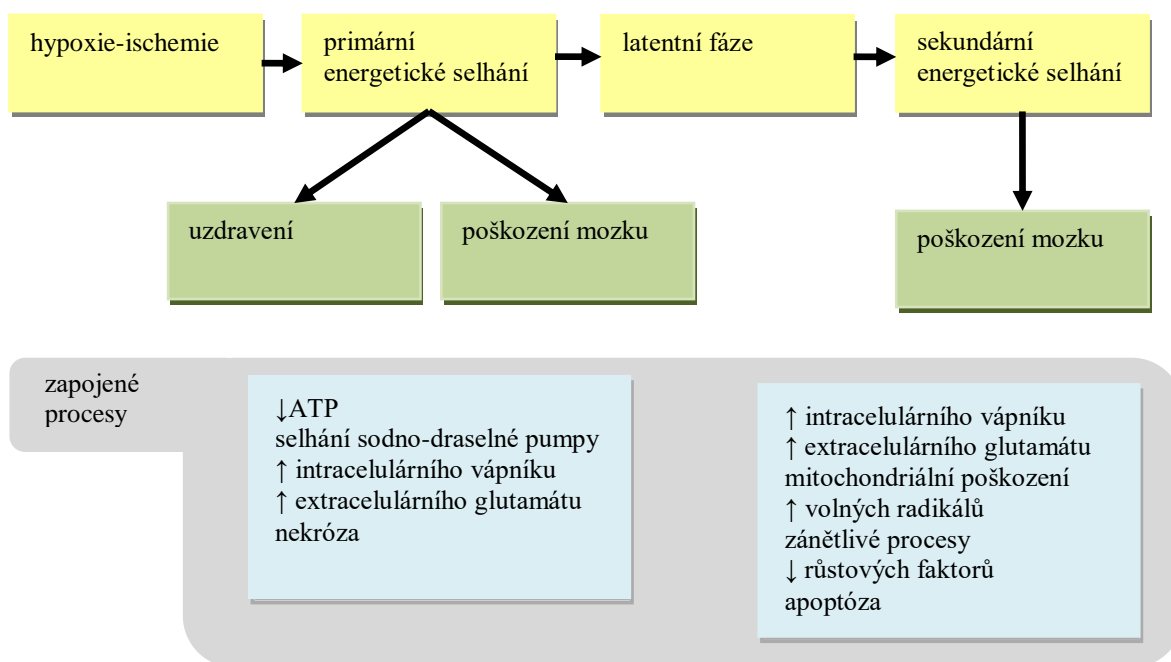
Hlavní funkcí lidského mozku je generování a přenos signálu. Tyto procesy vyžadují vytváření a udržování iontového gradientu skrze buněčnou membránu. Většina ATP v mozku je spotřebována pro pohyby iontů (sodíku, draslíku, chlóru, vápníku), které jsou aktivně transportovány přes membránu a dále pak k syntézám strukturních a funkčních proteinů, membránových lipidů a neurotransmiterů. Při snížení množství vysokoenergetických fosfátů dochází k rychlému selhání ATP-dependentních sodno-draselných pump, což vede ke snížení iontového gradientu a k rychle se šířící membránové depolarizaci (James *et* Cherian, 2010). Tato depolarizace je zprostředkovávána napěťově řízenými  $\text{Na}^+$  a  $\text{Ca}^{2+}$  kanály a způsobuje uvolnění excitačních neurotransmiterů (Bednařík *et al.*, 2010). Repolarizační schopnost neuronů je díky energetické depleci značně omezena, nadbytek excitačních neurotransmiterů pak způsobuje jejich excitotoxické poškození (Jedlička *et* Keller, 2005).

Je důležité upozornit na to, že plod/novorozenec je díky obranným mechanismům schopen tolerovat hypoxii po relativně dlouhou dobu. Reaguje

na ni tachykardií, zejména z důvodu zachování dostatečného prokrvení mozku. Pokud hypoxie pokračuje, je krevní průtok cíleně redistribuován do životně důležitých orgánů (mozek, srdce, játra, nadledviny) na úkor periferních orgánů. Této centralizace se dosáhne periferní vazokonstrikcí. Jakmile srdce vyčerpá své zásoby glykogenu a přestane být schopno pumpovat dostatečné množství krve, dochází k bradykardii, tlak krve se snižuje a k hypoxii se přidává také nedostatečné prokrvení až ischemie tkání a orgánů (Anslow, 1998). Redistribuci krevního toku můžeme pozorovat rovněž v mozku ve prospěch mozkového kmene na úkor mozkové kůry (Lou *et al.*, 1985).

## 2. 1 Fáze neuronálního poškození

Patofyziologie hypoxicko-ischemického poškození mozku je spojována se dvěma fázemi, a to s primárním a sekundárním energetickým selháním. **Primární energetické selhání** nastává, když z důvodu výrazného poklesu hladiny ATP dojde k selhání ATP-dependentní sodno-draselné pumpy, která udržuje membránový potenciál přenášením 3 molekul  $\text{Na}^+$  do extracelulárního a 2 molekul  $\text{K}^+$  do intracelulárního prostředí. Následkem tohoto selhání nastává depolarizace neuronů. Depolarizací se uvolní excitační aminokyseliny (a), v cytoplasmě se začnou akumulovat vápenaté ionty  $\text{Ca}^{2+}$  (b), což vede k aktivaci celé řady vápníkem ovlivňovaných enzymů. Nastává **latentní období** reperfúze, kdy bývají průtok krve a okysličení mozku obnoveny téměř k původnímu stavu. Hladina ATP a intracelulární pH se také navrácí k původním hodnotám. Druhý pokles hladiny ATP pak nastává 6-48 hodin po počátečním inzultu - **sekundární energetické selhání**. K tomuto energetickému selhání dochází také z důvodu mitochondriální dysfunkce a liší se od primárního tím, že nenastává acidóza. Patogeneze zahrnuje pokračování excitotoxických procesů - uvolnění excitačních aminokyselin, akumulaci vápníku, zvýšení hladin volných radikálů (c), zánětlivé procesy (d), pozměněné hladiny růstových faktorů (e) a změny v syntéze proteinů. S primárním energetickým selháním je spojována především buněčná nekróza, se sekundárním pak apoptóza. Typy buněčné smrti budou dále rozvedeny v samostatné kapitole 2.2. Aktuální terapie hypoxicko-ischemického poškození mozku se zaměřuje zejména na snahu předcházet mechanismům sekundárního energetického selhání během období reperfúze (James *et Patel*, 2014). Fáze neuronálního poškození a zapojené procesy jsou znázorněny na obrázku 1.



**Obrázek 1: Fáze neuronálního poškození (vytvořeno podle James *et* Cherian, 2010)**

### a) uvolnění excitačních aminokyselin

Mezi hlavní excitační aminokyseliny u člověka patří glutamát a také aspartát. Jak již bylo zmíněno, depolarizace neuronů způsobená selháním sodno-draselné pumpy vede k jejich nadměrnému uvolňování. Za normálních podmínek jsou excitační aminokyseliny uvolněny z presynaptického nervového zakončení a vyvolávají depolarizaci na postsynaptickém neuronu aktivací endogenních receptorů. Celá tato akce je ukončena jejich zpětným vychytáváním, tento proces je ovšem energeticky závislý (James *et* Cherian, 2010).

Bylo identifikováno několik endogenních receptorů, přes které zmíněné aminokyseliny působí, patří mezi ně metabotropní glutamátové receptory asociované s G proteinem a také, pro naši problematiku důležitější ionotropní receptory, vázané na iontové kanály. Tyto receptory odpovídají zejména na 3 typy molekul - N-methyl-D-aspartát (NMDA),  $\alpha$ -amino-hydroxy-5-methyl-izoxazol propionát (AMPA) a kainát. **Metabotropní receptory** aktivují fosfolipázu C, díky níž pak dochází ke generování inositoltrifosfátu a diacylglycerolu. Inositoltrifosfát mobilizuje zásoby intracelulárního vápníku z endoplasmatického retikula, diacylglycerol poté aktivuje proteinkinázu C a tím posiluje influx vápníku membránovými kanály (Bednařík *et al.*, 2010).

**NMDA receptory** aktivují vápenaté kanály, kterými vstupuje  $\text{Ca}^{2+}$  do buňky. Mají vysokou afinitu ke glutamátu a jako koagonistu vyžadují glycin. **AMPA** a **kainátové receptory** se uplatňují jako iontové kanály pro jednomocné ionty. Při nadměrné aktivaci těchto receptorů dochází k masivnímu influxu  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{K}^+$  iontů a také vody. Za patologických podmínek mohou AMPA receptory umožňovat také influx  $\text{Ca}^{2+}$  do buněk. V případě, že stimulace těchto receptorů přetrvává po delší dobu, vstup vody do buněk způsobuje osmotický otok (cytotoxický edém) až lyzi buněk (Bednařík *et al.*, 2010; James *et al.*, 2010; Loidl, 1997). Bylo prokázáno, že některé oblasti mozku jsou díky zvýšené expresi glutamátových receptorů náchylnější k hypoxicko-ischemickému poškození (James *et al.*, 2010).

#### **b) zvýšení intracelulární koncentrace vápníku**

Neuronální vápník se uplatňuje jako buněčný přenašeč signálu. Hraje důležitou roli v regulaci mnoha enzymatických reakcí, aktivuje například různé fosfolipázy, proteinázy, proteinkinázy a fosfatázy (Loidl, 1997). Patologický nárůst koncentrace intracelulárního vápníku je obvykle považován za klíčový děj vedoucí k pozdější smrti buňky. Za fyziologických podmínek bývá eventuální nadbytek vápníku v buňce kompenzován navázáním na intracelulární proteiny, zvýšeným transportem z buňky a přečerpáním do buněčných organel. V případě mozkové hypoxie a ischemie ovšem dochází k selhání těchto energeticky náročných kompenzačních mechanismů. Vápenaté ionty hromadící se v buňce vedou k nesprávné aktivaci enzymů, nastartovaná lipolýza způsobuje poruchu membránových funkcí, proteolýza vede k dezintegraci mikrotubulů a cytoskeletu, porucha proteinové fosforylace pak k narušení genové transkripce a zřejmě také k aktivaci apoptózy (Bednařík *et al.*, 2010). Vápenaté ionty vstupují do mitochondrií, kde zabraňují správnému průběhu oxidativní fosforylace a tím přispívají k dalšímu snížení produkce ATP. Intracelulární vápník hraje rovněž roli v aktivaci xantinoxidázy a syntázy oxidu dusnatého, což vede ke generování volných radikálů (James *et al.*, 2010).

#### **c) volné radikály**

Volné radikály jsou vysoce reaktivní sloučeniny s nepárovým elektronem. V progresi hypoxicko-ischemického poškození hrají roli zejména volné kyslíkové (ROS, reactive oxygen species) a dusíkové (RNS, reactive nitrogen species) radikály, které významně přispívají k destrukci mozkové tkáně.



## **ROS**

Během reperfuze se buňky poškozené hypoxií musí vyrovnat s normálním množstvím kyslíku. Dojde k obnovení mechanismů mitochondriální oxidativní fosforylace, náhlý přebytek kyslíku může ovšem přispět k hromadění volných kyslíkových radikálů (James *et* Patel, 2014). Během aerobních podmínek, bývají ROS rychle degradovány endogenními antioxidačními procesy - např. kyselinou askorbovou, aktivitou superoxiddismutázy, katalázy, endoperoxidázy a glutathionperoxidázy. Bazální aktivita zmíněných enzymů je ovšem v novorozeneckém mozku nízká a přispívá k jeho zranitelnosti vůči oxidačnímu poškození. Nejběžněji formovanými volnými radikály jsou - superoxidový ( $O_2^{\cdot-}$ ), hydrogenperoxidový ( $HO_2^{\cdot}$ ) a hydroxylový radikál ( $OH^{\cdot}$ ), které jsou v buňce generovány různými mechanismy (James *et* Cherian, 2010). Jedním z jejich hlavních zdrojů je kys. arachidonová, jež je degradovaná  $Ca^{2+}$ -aktivovanými enzymy jako jsou fosfolipáza A2, lipooxygenáza a cyklooxygenáza. Produkty kys. arachidonové (tromboxan A2, prostaglandiny, leukotrieny a mastné kyseliny) mohou dalšími procesy přispívat k tvorbě volných radikálů. Škodlivé vlivy ROS probíhají zejména přes peroxidaci lipidů, kdy jsou volné elektrony z radikálu přeneseny na nenasycené mastné kyseliny v lipidové membráně neuronů. Mezi lipidy v membráně dochází k řetězové oxidační reakci, která se může rozšířit dále na lipoproteiny, což vede k poškození iontových kanálů a ke změnám v membránových potenciálech. Tato reakce se může šířit dokonce na membrány sousedních buněk a buněk endotelia a tím přispívat k porušení hematoencefalické bariéry (Bednařík *et al.*, 2010). Dalšími mechanismy poškození pomocí ROS mohou být např. aktivace proapoptických mediátorů a přímé poškození DNA a proteinů. Mozek novorozence je obzvláště zranitelný vůči volným radikálům z důvodu vysoké koncentrace polynenasycených mastných kyselin (PUFA), a také vysokého obsahu volného železa, které může přispívat k jejich tvorbě reakcí s peroxidy za vzniku  $OH^{\cdot}$  (James *et* Cherian, 2010; James *et* Patel, 2014).

## **RNS**

Oxid dusnatý (NO) je v těle běžně vytvářen z aminokyseliny argininu syntázou oxidu dusnatého (NOS, nitric oxid synthase) (Saugstad, 1996). Za normálních podmínek je důležitým neuromodulátorem účastnícím se vývoje centrální nervové soustavy, vnímání bolesti, neuronální plasticity a mechanismů paměti. Podobně jako glutamát ovšem může být ve zvýšených koncentracích toxický (Bednařík *et al.*, 2010).

Byly identifikovány tři typy NO-syntázy - neuronální (nNOS), endoteliální (eNOS) a inducibilní (iNOS). nNOS a eNOS jsou aktivovány zvýšeným množstvím  $\text{Ca}^{2+}$ , naproti tomu iNOS je pod kontrolou cytokinů, není závislá na množství  $\text{Ca}^{2+}$  a produkuje NO jako odpověď na buněčný stres. Zdá se, že nNOS přispívá k produkci NO během ischemie a reperfúze a iNOS hlavně během reperfúze (James *et al.*, 2014; Loidl, 1997). Oxid dusnatý reaguje se superoxidovým radikálem za vzniku peroxynitritového radikálu ( $\text{ONO}_2\cdot$ ), který je pro mozkové buňky takéž toxický, narušuje totiž vnitřní mitochondriální membránu a elektronový transportní řetězec. Poškození mitochondrie probíhá buďto přímo anebo nepřímo, kdy oxid dusnatý stimuluje jaderný enzym poly-ADP-ribózopolymerázu (PARP-1) (James *et al.*, 2010; Saugstad, 1996). Tento enzym katalyzuje formování poly-ADP-ribózového polymeru (pADPr) z  $\text{NAD}^+$  a uvolňuje nikotinamid jako produkt. Poškození DNA indukuje navázání PARP-1 do DNA, kde spouští DNA opravné mechanismy (Morales *et al.*, 2011). V případě hypoxie a ischemie se stimulace PARP-1 ovšem jeví jako neurotoxická, jelikož spotřebovává  $\text{NAD}^+$  a cestou oxidativní fosforylace snižuje tvorbu ATP (Seidl *et al.*, 2000).

#### **d) zánět**

K mechanismům pozdní buněčné smrti dochází také z důvodu zánětlivé odpovědi. V případě, že se objeví mozkové poškození, jsou aktivovány mikroglie, zřejmě proto, že nekrotické buňky produkují určité signály poškození (DAMPs, damage-associated molecular pattern), které receptory na mikroglíích zachycují (TLRs, Toll-like receptors). Dojde k aktivaci hlavního transkripčního faktoru asociovaného se zánětlivou odpovědí NF- $\kappa$ B. Zvýšení NF- $\kappa$ B vede k expresi několika genů asociovanými s vrozenou imunitní odpovědí zahrnující prozánětlivé cytokiny jako jsou faktor nádorové nekrózy  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin 1- $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleukin 6 (IL-6), interleukin 10 (IL-10), interferon  $\gamma$  (INF- $\gamma$ ) a proteázy, např. matrix metaloproteináza 3 a 9 (MMP-3 a MMP-9) (Morales *et al.*, 2011). U člověka byl zjištěn vztah mezi hladinou prozánětlivých cytokinů v séru a následky perinatální asfyxie. Novorozenci s PA, kteří zemřeli, nebo se u nich vyvinulo těžké hypoxicko-ischemické poškození mozku, měli mnohem vyšší hladiny těchto cytokinů než novorozenci s lehčími následky (Foster-Barber *et al.*, 2000).

### e) změna hladin růstových faktorů

Během hypoxicko-ischemického poškození mozku dochází k transkripci série genů zapojených do erythropoézy, angiogeneze a anti-apoptických procesů. Klíčovým faktorem zprostředkovávajícím transkripci těchto genů je hypoxií-indukovatelný transkripční faktor  $1\alpha$  (HIF- $1\alpha$ ). Během hypoxie je HIF- $1\alpha$  heterodimerizován s HIF- $1\beta$  za tvorby HIF-1, který následně reguluje přes transkripční motiv HRE expresi cílových genů. HIF- $1\alpha$  má při hypoxii jak neuroprotektivní, tak neurotoxický efekt. Během mírné hypoxie se zapojuje do neuroprotektivních procesů, indukuje expresi genu pro erythropoetin (EPO), který se podílí v erythropoéze, dále expresi vaskulárního endoteliálního růstového faktoru (VEGF). VEGF je spojován s tvorbou a růstem nových kapilár v hypoxicko-ischemických oblastech mozku a také s anti-apoptickými procesy. Při závažné hypoxii ovšem aktivuje transkripci genů zapojených do apoptózy (BNIP-3, p53), interakcí s vápenatými ionty a enzymy kalpainy hraje pak i roli v nekróze (Fan *et al.*, 2009). Kalpainy jsou cytosolické proteázy aktivované vysokou koncentrací vápníku uvnitř buňky, nevratně poškozující cytoskelet a regulační proteiny (Bednařík *et al.*, 2010).

## 2. 2 Typy buněčné smrti

Mechanismy smrti neuronů po proběhlé perinatální asfyxii zahrnují nekrózu, apoptózu, autofágií a hybridní buněčnou smrt, kdy záleží zejména na závažnosti inzultu a na zralosti mozku novorozence. Zatímco nekróza nervových buněk bývá pozorována během několika minut, apoptické procesy se vyvíjí postupně (Bonfoco *et al.*, 1995). Nekróza je pasivním procesem charakterizovaným biochemickými událostmi vycházejícími ze selhání membránových iontových pump. Následuje osmóza, rozptýlení chromatinu, ztráta membránové integrity a lýza buňky, což může eventuálně způsobit zánět a fagocytózu - **časná buněčná smrt** (James *et Patel*, 2014). Apoptóza je vyvolána aktivací endogenních proteáz a kaspáz, vede k narušení cytoskeletu, smrštění buněk a k puchýřkovatění membrán. V jádře dojde ke kondenzaci chromatinu a k degradaci DNA endonukleázami (Yuan *et Yankner*, 2000). Apoptóza je proces, který vyžaduje energii, určujícím faktorem tohoto typu buněčné smrti tedy je schopnost mitochondrií poskytovat adekvátní množství ATP. Dalším faktorem přispívajícím k apoptóze je také ztráta neuronálních spojení, což může pokračovat dny až týdny po proběhnutí asfyxie (Northington *et al.*, 2007). Apoptóza je v perinatálním mozku

převládajícím typem **pozdní buněčné smrti**. Zapojují se zde kaspáza-dependentní i independentní mechanismy. Do apoptického procesu přispívají různé intracelulární faktory - anti-apoptický protoonkogen Bcl-2, proapoptický faktor BAX (Bcl-2 asociovaný X protein), BAD (Bcl-2 asociovaný promotor smrti), receptory smrti a kaspázy. Hypoxie a ischemie také zvyšují markery pro autofagozomy a lysosomální aktivitu v kortexu a hippocampu (Morales *et al.*, 2011). Byly popsány hybridní buňky, jejichž morfologie vykazovala jak známky nekrózy, tak apoptózy. Zatímco jádro s chromatinem mělo znaky podobné apoptóze, cytoplasma připomínala nekrotické neurony (James *et Patel*, 2014). Tento jev může být vysvětlen tím, že u některých buněk došlo k selhání apoptózy a indukci nekrózy z důvodu nedostatku energie a mitochondriální dysfunkce (Morales *et al.*, 2011).

## 2. 3 Neuroprotektce

Celosvětově nepříliš uspokojivé výsledky léčby hypoxicko-ischemického poškození po prodělané perinatální asfyxii vedou k hledání nových metod, které by mohly přispět k zlepšování prognózy pacientů. V závislosti na cílovém patologickém procesu jsou testovány různé terapeutické možnosti a látky (James *et Patel*, 2014). V současnosti je u donošených novorozenců běžně používána pouze léčba hypotermií. Mechanismy neuroprotektce pomocí hypotermie zatím nejsou plně pochopeny. Hypotermie zřejmě potlačuje některé patologické dráhy vedoucí k pozdní buněčné smrti. Pravděpodobně působí pozitivně proti energetické depleci, zvýšeným hladinám glutamátu a volných radikálů, zvýšenému riziku zánětu a procesům vedoucích k apoptóze (James *et Cherian*, 2010).

### 2. 3. 1 Testované látky spojované s neuroprotektivními účinky

Byla publikována celá řada studií, zabývajících se hledáním nových neuroprotektivních možností u novorozenců. Potenciální neuroprotektivní agens můžeme rozdělit do skupin podle primárního mechanismu účinku - **snižování excitotoxicity** způsobené zvýšeným uvolňováním glutamátu - patří zde zejména antagonisté NMDA receptorů - vzácné plyny - xenon (David *et al.*, 2008), argon (Ryang *et al.*, 2011), dále např. memantin (Chen *et Lipton*, 2006) a hořčík (Türkyilmaz *et al.*, 2002). Jako antagonisty AMPA, kainátových a také NMDA receptorů se testuje např.

topimarát (Rawls *et al.*, 2009). **Antioxidanty** působí proti škodlivým účinkům volných kyslíkových a dusíkových radikálů - allopurinol (Marro *et al.*, 2006), melatonin (Carloni *et al.*, 2009), deferoxamin (Hamrick *et al.*, 2005). **Protizánětlivé látky** blokuji aktivaci mikroglíí a uvolňování cytokinů - minocyklin (Cai *et al.*, 2006). **Inhibitory buněčné smrti** blokuji např. enzym PARP-1 či kaspázy - 3-aminobenzamid (Ducrocq *et al.*, 2000), MDL 28710 (Han *et al.*, 2002). Pro **podporu neurogeneze** se testují různé růstové faktory - erythropoetin (Sola *et al.*, 2005), vaskulární endoteliální růstový faktor VEGF (Zhang *et al.*, 2000), inzulinu podobný růstový faktor IGF-1 (Johnston *et al.*, 1996) či mozkový neurotrofní faktor BDNF (Cheng *et al.*, 1997). Pozitivní neurologické účinky u zvířecích modelů vykazuje také **transplantace nervových kmenových buněk**. Tyto buňky migrují a integrují se do míst poškozených ischemií a jsou schopny se diferencovat na různé typy mozkových buněk, jako jsou neurony, astrocyty či oligodendrocyty (Gonzalez *et Ferriero*, 2008).

### 2. 3. 2 Hypotermie

Léčba hypotermií je používána zejména k omezení škodlivých pochodů probíhajících v mozku po prodělané hypoxii a ischemii. Jedná se o cílené podchlazení teploty těla novorozence na  $34,0 \pm 0,5$  °C, při této teplotě je potom udržován po dobu 72 hodin. Následně je pozvolna ohříván na normální tělesnou teplotu (Kolářová *et al.*, 2011). Zatímco ochlazení probíhá najednou, zahřívání neboli „rewarming“ probíhá pomalu, po 72 hodinách bývá novorozenec zvolna zahříván o 0,5 °C za hodinu až na fyziologickou teplotu těla 36,5 °C. Novorozenecký mozek může být chlazen selektivním ochlazením těla, hlavy nebo těla a hlavy dohromady. Standardně se používá celotělové chlazení (Shankaran *et al.*, 2005).

V České republice doporučení pro zahájení a léčbu hypotermií vychází z protokolu TOBY - „total body hypothermia“ (Azzopardi *et al.*, 2008). Přestože zkušenosti s hypotermií jsou zatím omezené, Rada pro resuscitaci ji v roce 2010 zařadila do standardního postupu resuscitace novorozence. Zahájení léčby hypotermií je možné pouze u novorozence mladšího než 6 hodin bez vývojových vad. Během léčby hypotermií je doporučeno hodnotit v pravidelných intervalech stav novorozence klinickým pozorováním - Thompsonovo skóre (Thompson *et al.*, 1997), popř. modifikované skóre podle Sarnatových (Sarnat *et Sarnat*, 1976). Tyto skórovací systémy klasifikují hypoxicko-ischemickou encefalopatii na mírnou, střední a závažnou.

Provádí se také laboratorní testy a bakteriologické vyšetření dle zvyklosti pracoviště, pro zhodnocení novorozence se využívají zobrazovací techniky - RTG hrudníku a břicha, sonografie mozku a ledvin, aEEG, NMR (Kolářová *et al.*, 2011).

### 3. Metabolomika

Metabolomika se zabývá studiem metabolitů (nízkomolekulárních látek), které jsou chemicky transformovány (metabolizovány) a úzce korelují s fenotypem (Patti *et al.*, 2012).

Mezi metabolity se řadí široká škála látek, které se liší v mnoha chemických (molekulární hmotnost, polarita, rozpustnost) a fyzikálních vlastnostech (těkavost, náboj). Rozdíly jsou také v koncentracích, které se mohou pohybovat v řádech pmolů až mmolů (Barbas *et al.*, 2011).

K metabolomické analýze je možné přistupovat několika způsoby. Cílená metabolomická analýza - „target analysis“ je zaměřená na identifikaci a kvantifikaci určitého metabolitu nebo vybrané malé skupiny chemicky podobných metabolitů pomocí specializované a optimalizované metody, např. na základě MRM přechodů a retenčního času. Pomocí metabolitového profilování - „metabolite profiling“ jsou získávány informace o široké škále chemických tříd. Metoda však představuje kompromis a výsledky nebývají stejně kvalitní pro všechny analyzované skupiny látek. Přístup metabolitového otisku prstu - „metabolic fingerprinting“ poskytuje největší pokrytí, je ovšem vhodný pouze pro porovnávání profilů, nikoliv hladin metabolitů. Slouží především pro rychlou klasifikaci vzorku a screening (Fernández-Peralbo *et de Castro*, 2012; Trethewey, 2004). Některé zdroje rozlišují termíny „metabolic fingerprinting“, zabývající se intracelulárními metabolity a „metabolic footprinting“, tzv. otisk nohy, který se týká extracelulárních metabolitů (Mapelli *et al.*, 2008). Necílená metabolomická analýza - „untargeted metabolomics“ detekuje ionty v určitém rozsahu hmot a umožňuje jejich relativní kvantifikaci srovnáním rozdílných typů vzorků (Vinayavekhin *et al.*, 2009; Vinayavekhin *et Saghatelian*, 2010).

### 3. 1 Metabolomika perinatální asfyxie

Současné metabolomické studie perinatální asfyxie se zaměřují na různé otázky a využívají pro analýzu nejenom vzorky novorozenců, ale také různé zvířecí modely.

Beckstrom a kol. (2011) použili pro studium vlivu perinatální asfyxie na metabolom krevní vzorky primáta makaka vepřího (*Macaca nemestrina*). Pomocí komprehensivní dvourozměrné plynové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií (GCxGC-MS, comprehensive two-dimensional gas chromatography-mass spectrometry) potvrdili laktát a kreatinin jako hlavní markery PA a identifikovali další, mezi které patřil sukcinát, malát a také kys. arachidonová.

Atzori a kol. (2010) se na zvířecím modelu selátek zaměřili na jiné otázky - Může mít metabolický profil před indukcí hypoxie vliv na odpověď při reoxygenaci? Může odlišná koncentrace kyslíku vyvolat změny v metabolických drahách? Aplikací protonové nukleární magnetické rezonanční spektroskopie ( $^1\text{H}$  NMR-MS, proton nuclear magnetic resonance spectroscopy) na vzorky moči zjistili vliv rozdílu v metabolických profilech před indukcí hypoxie na přežití selátek, vysoké hodnoty hypoxantinu a kys. močové predikovaly úmrtí. Dále pozorovali rozdíly při reoxygenaci různými koncentracemi  $\text{O}_2$ . Diskriminujícími metabolity byly urea, kreatinin, malonát, methylguanidin a hydroxyisobutyát.

V nedávno publikované studii Longini a kol. (2015) hledali diskriminující metabolity mezi skupinou asfyktických a kontrolních novorozenců, rovněž pomocí  $^1\text{H}$  NMR spektroskopie vzorků moči. Jako nejvíce diskriminující metabolity určili laktát, glukózu, trimethylamin-N-oxid a threonin/3-hydroxyvalerát (nebyli schopni rozlišit). Určili také další metabolity, přispívající k dělení analyzovaných skupin - dimethylglycin, dimethylamin, kreatin, sukcinát, formát, kys. močová a akonitát.

Reinke a kol. (2013) využili stejnou analytickou techniku pro analýzu séra novorozenců s PA a také těch, u kterých se vyvinula HIE. Zjistili, že pozměněné hladiny 3-hydroxybutyrátu, glycerolu, O-fosfocholínu a sukcinátu souvisí se závažností neurologických následků.

Metabolity korelující se závažností HIE zjišťovali také Walsh a kol. (2012) kapalinovou chromatografií ve spojení s hmotnostní spektrometrií (LC-MS, liquid chromatography-mass spectrometry) vzorků pupečnickové krve. Těmito metabolity byly acylkarnitiny C10:1, C14:2, fosfatidylcholin acyl-alkyl C38:0, fenylalanin a prolin. Dále našli 29 látek z tří různých skupin (aminokyseliny, acylkarnitiny

a glycerofosfolipidy), jejichž hladiny byly výrazně pozměněny mezi studovanými skupinami (PA, HIE a zdravé kontroly).

Chu a kol. (2006) analyzovali pomocí plynové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií (GC-MS, gas chromatography-mass spectrometry) vzorky moči novorozenců s PA. Zvýšené koncentrace následujících metabolitů - glutarátu, methylmalonátu, 3-hydroxy-butyrate a orotátu, pozorovali u novorozenců s HIE nebo u těch, kteří zemřeli. Ethylmalonát, 3-hydroxy-3-methylglutarát, 2-hydroxyglutarát a 2-oxoglutarát pak byly výrazně zvýšené u novorozenců, u kterých se HIE nerozvinula.

### 3. 2 Necílená metabolická analýza moči

Necílený metabolický přístup poskytuje komplexní obraz analyzovaného vzorku (Commisso *et al.*, 2013). Postup experimentu můžeme rozdělit na několik kroků - přípravu vzorku, metabolickou analýzu, extrakci dat z chromatogramů, jejich zpracování a statistickou analýzu.

Moč obvykle obsahuje pouze malé množství proteinů či dalších sloučenin s vysokou molekulovou hmotností díky její filtraci přes renální mikrotubuly (Want *et al.*, 2010). Příprava vzorku je proto jednodušší než u ostatních biologických tekutin či tkání. Často se využívá pouze centrifugace pro odstranění nežádoucích částic následovaná zředěním vodou. Někdy se přidává také azid sodný jako prevence bakteriálního růstu během skladování (Vuckovic, 2012).

Po přípravě vzorku následuje jeho analýza zpravidla zahrnující hmotnostně-spektrometrickou (MS, mass spectrometry) detekci metabolitů. Vzorek může být přímo nastříknut do hmotnostního spektrometru (DIMS, direct-infusion mass spectrometry), většinou však MS analýze předchází chromatografická separace. Ze separačních metod se využívá plynová (GC, gas chromatography), kapalinová chromatografie (LC, liquid chromatography) či kapilární elektroforéza (CE, capillary electrophoresis) (Dunn *et al.*, 2013). Pro detekci se v necílené metabolomice používají hmotnostní analyzátoři s vysokým rozlišením - „high resolution mass spectrometry“. Patří zde analyzátoři doby letu (TOF, time-of-flight), analyzátoři typu iontové cyklotronové rezonance s Fourierovou transformací (FT-ICR, Fourier transform ion cyclotron resonance) nebo Orbitrap (Want *et al.*, 2010).

Data získaná pomocí LC-MS analýzy musí být nejdříve z chromatogramů extrahována, vzhledem ke své složité struktuře vyžadují úpravu před vlastním



statistickým zpracováním tzv. „data preprocessing“ (Patti *et al.*, 2012). Pro extrakci dat z chromatogramů a identifikaci izotopických paternů a aduktů se používají různé metabolomické softwary, např. MassHunter, MZmine či speciální balíčky (XCMS, CAMERA) využívané v R programovacím jazyku (Theodoridis *et al.*, 2012). Zpracování dat dále zahrnuje interpolaci, normalizaci, transformaci a škálování. Pomocí statistických metod jsou odhaleny potencionální metabolity - „metabolic features“ diskriminující jednotlivé skupiny vzorků. Tyto jsou na základě přesné hmoty hledány v elektronických databázích např. METLIN (<https://metlin.scripps.edu>), HMDB (<http://www.hmdb.ca>) nebo LipidMaps (<http://www.lipidmaps.org>). Takto je získán list potencionálních kandidátů každého hledaného metabolitu - pro potvrzení molekulární struktury musí být však provedena fragmentace molekulárních iontů v MS<sup>2</sup> nebo MS<sup>n</sup> módu (Dunn *et al.*, 2013). K usnadnění identifikace přispívají i další informace jako retenční čas, nicméně pro jednoznačnou identifikaci a ověření správnosti je zapotřebí srovnání naměřených dat s daty získanými analýzou standardní sloučeniny (Theodoridis *et al.*, 2012).

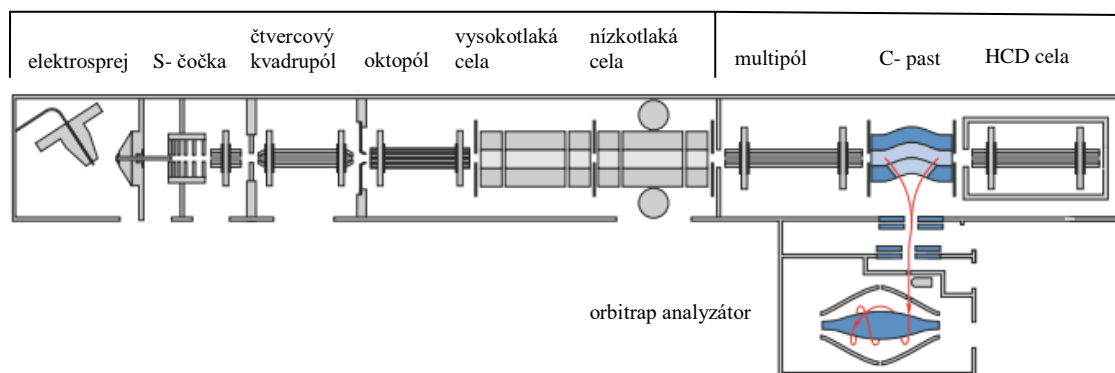
### 3. 3 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie je analytická metoda založená na principu měření hodnoty poměru hmoty a náboje  $m/z$ . Hmotnostní spektrometr se skládá ze tří hlavních komponent - iontového zdroje, hmotnostního analyzátoru a detektoru. Nedílnou součástí je rovněž vstupní systém přivádějící vzorek do iontového zdroje. Vlivem napětí a pomocných plynů dochází v iontovém zdroji k převodu kapalné mobilní fáze na plynnou. Hmotnostní analyzátor poté odděluje ionty na základě jejich poměru  $m/z$ , ty jsou dále přiváděny k detektoru, který umožňuje převod proudu iontů na elektrický signál, jenž je dále počítačem zpracováván na hmotnostní spektra. Součástí hmotnostního spektrometru je také vakuový systém, umožňující volný pohyb iontů bez nechtěných interakcí a kolizí s částicemi atmosféry (Dass, 2007).

V experimentální části byl pro necílenou metabolomickou analýzu využit hmotnostní spektrometr Orbitrap Elite, proto je mu věnována následující kapitola.

### 3. 3. 1 Orbitrap Elite

Orbitrap Elite je typ hybridního hmotnostního spektrometru kombinující analyzátor typu orbitrap s duálně tlakovou lineární iontovou pastí. Schematicky je přístroj znázorněn na obrázku 2.

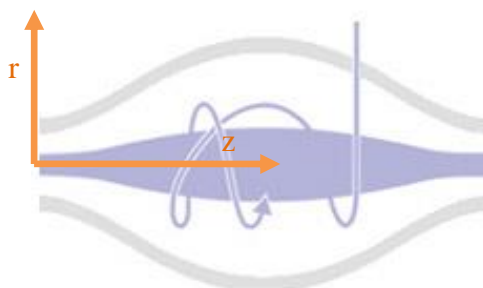


**Obrázek 2:** Schematické znázornění přístroje Orbitrap Elite (upraveno podle Makarov *et Scigelova*, 2010)

Orbitrap Elite nejčastěji využívá elektrosprejové ionizace, lze ovšem použít i jiné ionizační techniky jako fotoionizaci za atmosférického tlaku nebo chemickou ionizaci za atmosférického tlaku (Thermo Fisher Scientific, 2011). Ionty jsou vedeny přes S-čočku, což je radiofrekvenční zařízení umožňující fokusaci iontů do úzkého proudu. Pak jsou dále transportovány přes čtvercový kvadrupól s neutrálním blokátorem pro eliminaci nenabitých molekul a oktopól do duálně tlakové lineární iontové pasti (dual-pressure ion trap Velos Pro). Duální tlaková iontová past se skládá ze dvou cel, první využívá vysokého tlaku helia a druhá je nízkotlaká. Zatímco vysokotlaká cela umožňuje lepší zachytávání iontů a fragmentaci, nízkotlaká rychlé skenování a detekci iontů (Olsen *et al.*, 2009). Z této pasti pak ionty putují přes multipól do zakřivené C-pasti, kde dochází ke ztrátě jejich kinetické energie v důsledku srážek s dusíkem, jakožto kolizním plynem, vycházejícím z HCD kolizní cely (higher-energy collisional dissociation). Ve střední části C-pasti dochází k jejich shromažďování a poté jsou pulzně vstříknuty do orbitrap analyzátoru (Thermo Fisher Scientific, 2011).

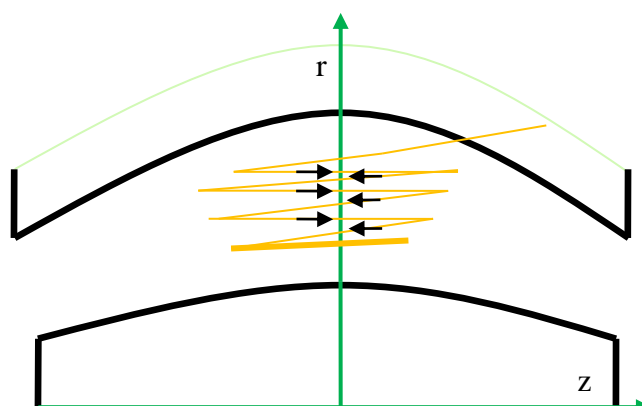
Orbitrap je typem hmotnostního analyzátoru s vysokým rozlišením, jenž byl navržen Alexandrem Makarovem v roce 2000. Koncept orbitrapu vychází především z Kingdonovy pasti z roku 1923 (Hu *et al.*, 2005). Jak již název napovídá, jedná se o iontovou past. Od konvenčních iontových pastí se ovšem liší tím, že zde nenajdeme žádnou radiovou frekvenci ani magnetické pole. Ionty jsou uvnitř

pasti drženy pomocí elektrostatického pole (Scigelova *et* Makarov, 2006). Orbitrap se skládá ze dvou elektrod, vnější soudkovité a vnitřní vřetenovité, které jsou umístěny podél osy přístroje. Ionty jsou do analyzátoru vstříkovány ve směru kolmo na tuto osu mezi elektrody a v elektrostatickém poli pak začínají rotovat v radiálním směru a zároveň axiálně oscilovat podél osy  $z$ ., viz obrázek 3.



**Obrázek 3: Pohyb iontů v orbitrap analyzátoru** (upraveno podle <http://www.thermoscientific.com>, 2015)

Následně je zvyšováno napětí na vnitřní elektrodě, což vede ke stlačování iontů směrem ke středu elektrody, a z nich k vytvoření tenkého rotujícího kroužku, který harmonicky osciluje s frekvencí  $(\frac{m}{z})^{\frac{1}{2}}$  (Makarov *et* Scigelova, 2010). Tento proces se nazývá elektromagnetický „squeezing“ a je znázorněn na obrázku 4. Z C-pasti jsou pak vstříkovány další ionty obvykle o větším poměru  $m/z$ . Jakmile do orbitrap analyzátoru vstoupí ionty o všech hodnotách  $m/z$  a dosáhnou své harmonické axiální frekvence, nastane stabilizace napětí na vnitřní elektrodě a započne detekce obrazu proudu - „image current detection“. Pro získání hodnot poměru  $m/z$  iontů se využívá axiální frekvence, jelikož je zcela nezávislá na energii a prostorovém šíření iontů (Makarov, 2000). Frekvence je převáděna na hmotnostní spektra pomocí Fourierovy transformace (Zubarev *et* Makarov, 2013).



**Obrázek 4: Princip elektromagnetického „squeezingu“** (vytvořeno podle Hu *et al.*, 2005)

### 3. 4 Statistické zpracování dat

Při metabolomickém experimentu je každý biologický vzorek (pozorování) charakterizován velkým počtem proměnných v podobě analyzovaných látek. Data s více než 6 proměnnými standardně řadíme mezi vícerozměrná, a je třeba na ně aplikovat vícerozměrné statistické metody, které mají za cíl zredukovat dimenzionalitu bez větší ztráty informace o datech (Wiklund, 2008). Jednou ze základních metod pro zjednodušení dat a určení vzájemných vazeb mezi pozorováními a proměnnými je analýza hlavních komponent (PCA, principal component analysis). Cílem této analýzy je najít v pozadí stojící, tedy skryté (latentní) proměnné, které dostatečně vysvětlují původní variabilitu souboru. Tyto nové proměnné získáme matematickou transformací původních korelovaných proměnných do hlavních komponent (PC), které spolu navzájem nekorelují a tím poskytují nezávislou informaci o systému. Základní charakteristikou každé PC je míra variability čili rozptyl. Komponenty se řadí v pořadí tak, že první vysvětluje největší procento celkové variability souboru, další pak co největší procento zbývajících variability atd. Většina informace je tedy obsažena v první komponentě (resp. v prvních několika komponentách). Původní zdrojová matice se rozkládá na matici komponentních skóre a komponentních zátěží. Grafickými výstupy pak jsou rozptylový diagram komponentních skóre - „scatter plot“, který zobrazuje komponentní skóre obyčejně pro první dvě hlavní komponenty u všech objektů a graf komponentních zátěží - „loadings plot“ zobrazující komponentní zátěže pro první dvě PC. Body grafu odpovídají pozorováním a porovnává se vzdálenost mezi nimi. Krátká vzdálenost znázorňuje silnou korelaci. Dvojný graf - „biplot“ je kombinací obou předchozích výstupů (Meloun *et* Militký, 2012).

Ke klasifikaci objektů používáme postupy, pomocí kterých se objekty zařadí do již existujících tříd (diskriminační analýza) nebo pomocí nichž lze neuspořádanou skupinu objektů uspořádat do několika vnitřně sourodých tříd či shluků (shluková analýza). Diskriminační analýza (DA, discriminant analysis) je postup, který umožňuje na základě předem daného pravidla zařadit objekt do skupin. Kromě matice X se zde uplatňuje také matice Y tzv. prediktorů (Meloun *et* Militký, 2012). Shluková analýza (CA, cluster analysis) slouží ke klasifikaci objektů do skupin (shluků), tak aby si objekty z jednoho shluku byly více podobné než objekty z dvou různých shluků. Grafickým znázorněním je dendrogram, kde každý uzel stromu představuje shluk.

Vodorovné úrovně stromu jsou stupně rozkladu shluků, svislý směr udává vzdálenost mezi shluky (Kučera, 2008).

Ke zjednodušení dat a získání latentních proměnných se používá také např. metoda dílčích nejmenších čtverců (PLS, partial least squares) nebo její varianta ortogonální metoda dílčích nejmenších čtverců (OPLS, orthogonal partial least squares), které kombinují rysy metody hlavních komponent a vícenásobné regrese (Geladi *et Kowalski*, 1986). Běžné je využití těchto metod v kombinaci s diskriminační analýzou - PLS-DA a OPLS-DA. Těmito přístupy je poté možno extrahovat informace z matice X, které korelují s proměnnými v matici Y. Místo proměnných se často používají binární vektory, skládající se z 0 a 1 (Putri *et al.*, 2013).

# EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

---

## 1. Materiál a metodika

### 1. 1 Chemikálie a použité roztoky

hydroxid amonný  $\text{NH}_4\text{OH}$  ( $\geq 25\%$ , Sigma-Aldrich, Německo)

kyselina octová  $\text{CH}_3\text{COOH}$  (Sigma-Aldrich, Německo)

LC-MS acetonitril - ACN (Sigma-Aldrich, Německo)

LC-MS voda (Sigma-Aldrich, Německo)

Mobilní fázi A, použitou pro analýzu, byl 20mM acetát amonný, pH 9,75. Roztok byl připraven přidáním 0,5725 ml kyseliny octové do 0,5 l LC-MS vody, pH pak bylo upraveno pomocí hydroxidu amonného. Mobilní organickou fází B byl acetonitril.

### 1. 2 Přístrojové vybavení a software

**HPLC systém** Ultimate 3000 RS (Dionex, USA)

řídící software: Chromeleon 6.80 SR10 (Dionex, USA)

chromatografická kolona: aminopropylová kolona Luna 3  $\mu\text{m}$   $\text{NH}_2$  100x2 mm (Phenomenex, USA)

**tandemový hmotnostní spektrometr** QTRAP 5500 (AB Sciex, USA)

ionizace elektrosprejem, přepínání pozitivního a negativního módu

detekce iontů: scheduled MRM mód - „multiple-reaction monitoring mode“

řídící software: Analyst 1.6.2 (AB Sciex, USA)

vyhodnocovací software: MultiQuant 3.0 (AB Sciex, USA)

**hybridní hmotnostní spektrometr** Orbitrap Elite (Thermo Scientific, USA)

ionizace elektrosprejem, měření v pozitivním módu

rozlišení: 60 000 FWHM

skenovací rozsah: 70-1000  $m/z$

zpracování dat: R software (<http://www.r-project.org>) s využitím softwarových nástaveb

XCMS (pro detekci a „matching“ píků) a CAMERA (pro zjištění izotopů a aduktů)

**elektromagnetická míchačka** Intelli-Stirrer MSH-300i (Biosan, Lotyšsko)

**chlazená centrifuga** Rotina 420R (Hettich Zentrifugen, Německo)

**pH metr** Cyber Scan pH 510 (Thermo Scientific, USA)

**vortex** V-1 plus (Biosan, Lotyšsko)

### 1. 3 Biologický materiál

Ve spolupráci s novorozeneckým oddělením Fakultní nemocnice Olomouc byly získány vzorky moči novorozenců s perinatální asfyxií a zdravých kontrol. Odběry byly provedeny na základě informovaného souhlasu schváleného etickou komisí Fakultní nemocnice Olomouc.

Moči asfyktických novorozenců byly sbírány v šesti časech (označení čas 1 - čas 6), viz tabulka 1. Kontrolní moči zdravých novorozenců byly odebrány pouze v jednom časovém intervalu a to 7-11,5 hodin po porodu (u asfyktických dětí tento rozsah odpovídá 3-5 hodinám po zahájení hypotermie - čas 2). Tento čas byl vybrán na základě předchozí studie (Galoczová, 2013).

**Tabulka 1: Časové intervaly odběrů vzorků moči** - moči byly odebírány v časech označených 1-6. První odběr v čase 1 byl proveden ihned po zahájení hypotermie.

odběr	označení	doba od porodu	doba od zahájení hypotermie	počet nasbíraných vzorků
1	čas 1	neuvedeno	0	1
2	čas 2	7-11,5 hod	3-5 hod	9
3	čas 3	27-32,5 hod	23-25 hod	9
4	čas 4	51-56,5 hod	47-49 hod	9
5	čas 5	75-80,5 hod	71-73 hod	9
6	čas 6	99-104,5 hod	95-97 hod	9

Odebraná moč byla přenesena do 2 ml plastových zkumavek, následovalo okamžité zamrazení na -20 °C v nádobě s methanolem a uložení do tekutého dusíku. Po transportu do laboratoře byly vzorky skladovány při -80 °C.

## 1. 4 Základní údaje o novorozencích

Údaje o novorozencích byly získány s povolením novorozeneckého oddělení Fakultní nemocnice Olomouc. Tabulka 2 shrnuje základní poznatky o kontrolních novorozencích, data o asfyktických pacientech jsou uvedena v tabulce 3.

**Tabulka 2: Základní údaje o kontrolních novorozencích** - chybějící hodnoty v tabulce znamenají, že se údaj u novorozence nepodařilo získat

označení vzorku	porodní hmotnost (g)	gestační věk (týdny)	skóre podle Apgarové (1-5-10 min)	porod
K1	-	39+0	-	cís. řez
K2	3830	38+3	10-10-10	cís. řez
K3	3280	39+3	10-10-10	cís. řez
K4	3300	40+1	10-10-10	spontánní
K7	2240	37+6	10-10-10	cís. řez
K8	2670	37+6	10-10-10	cís. řez
K9	3080	39+1	10-10-10	cís. řez
K10	3540	39+5	9-10-10	cís. řez
K11	3180	38+1	9-10-10	cís. řez
K12	2770	38+0	10-10-10	cís. řez
K13	2660	39+0	9-10-10	cís. řez
K14	3200	40+0	10-10-10	cís. řez
K15	3740	39+1	9-10-10	cís. řez
K16	2720	38+3	10-10-10	spontánní
K17	3670	40+5	10-10-10	spontánní
K18	3750	39+2	10-10-10	spontánní
K19	3140	40+5	10-10-10	spontánní
K20	3480	39+6	10-10-10	spontánní
K21	3540	38+1	10-10-10	spontánní
K22	2970	38+4	10-10-10	spontánní
K23	3250	39+3	10-10-10	spontánní
K24	2890	37+1	10-10-10	spontánní
K25	3340	38+2	10-10-10	spontánní



**Tabulka 3: Základní údaje o asfyktických novorozencích** - hodnocení neurologie probíhalo následovně - 1 normální nález, 2 lehké poškození, 3 těžké poškození. Dále se hodnotila přítomnost dětské mozkové obrny (DMO) a psychomotorická retardace (PRM). Nukleární magnetická rezonance (NMR), která byla u novorozenců provedena do týdne od zahájení hypotermie, měla klasifikační kritéria následující: 1 normální nález bez hypoxických změn, 2 hypoxické změny lehké, 3 hypoxické změny těžké, 4 krvácení, 5 jiné (trombóza). Chybějící hodnoty v tabulce znamenají, že se údaj u novorozence nepodařilo získat.

označení vzorku	porodní hmotnost (g)	gestační věk (týdny)	skóre podle Apgarové (1-5-10 min)	pH pupečnickové krve	BE <sup>1</sup>	porod	neurologie	NMR
P1	3660	40+0	3-4-6	6,9	-20,5	forceps <sup>2</sup>	2	1
P2	2530	39+0	0-3-6	6,8	-17,7	cís. řez	1	1, 5
P3	3140	40+0	9-10-10	-	-	spontánní	3, DMO	-
P4	3860	41+2	5-5-9	- /1 hod. po porodu 6,8	-27,8	spontánní	2	2, 4
P5	3780	40+5	0-2-2	6,8	-19,6	spontánní	3, DMO	3, 4
P6	3010	40+3	0-1-2	< 6,8	-	cís. řez	1	1
P7	2990	39+2	2 - -	7,1	-20	forceps	3, DMO, PRM	3
P8	3300	37+0	3 - -	6,8	-15,3	spontánní	1	3
P9	3720	40+0	1-3-3	7,1	-21,0	spontánní	3	3

## 1. 5 Zpracování vzorku

Vzorky byly připraveny dle protokolu Want a kol. (2010). Pro odstranění nežádoucích částic bylo 60 µl vzorku moči stočeno při 10 000 g, 4°C, po dobu 10 minut. Následně bylo odebráno 50 µl supernatantu a naředěno LC-MS vodou na základě známých hodnot kreatininu získaných ve spolupráci s Oddělením klinické biochemie Fakultní nemocnice Olomouc. Normalizace koncentrací na jednotnou hladinu kreatininu byla dále provedena úpravou nástřiku na kolonu, který se pohyboval v rozmezí 1,2-10 µl. Jako procesní blank bylo použito 150 µl LC-MS vody a bylo s ním nakládáno jako s reálnými vzorky. Vzorek kontroly kvality (QC) byl připraven smícháním 5 µl moči z každého vzorku, jeho nástřik činil 2,5 µl.

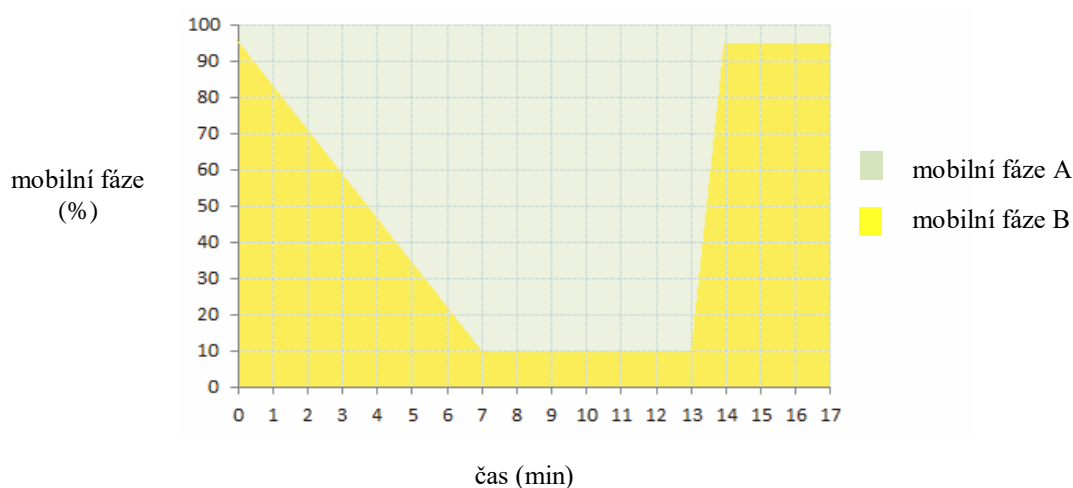
<sup>1</sup> BE (base excess) - přebytek bází, záporné hodnoty poukazují na metabolickou acidózu, kladné hodnoty na alkalózu

<sup>2</sup> forceps - porod pomocí porodnických kleští

## 1. 6 Cílená a necílená metabolická analýza

Metabolická analýza vzorků moči byla provedena pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve spojení se dvěma typy hmotnostních spektrometrů - tandemovým hmotnostním spektrometrem QTRAP 5500 (AB Sciex, USA) a s hmotnostním spektrometrem Orbitrap Elite (Thermo Fisher Scientific, USA), pracujícím při vysokém rozlišení. Analýza probíhala paralelně na obou strojích.

Chromatografická separace byla uskutečněna na přístroji UltiMate 3000 RS (Dionex, USA) s aminopropylovou kolonou Luna (Phenomenex, USA) s velikostí částic stacionární fáze 3  $\mu\text{m}$ , délkou 100 mm a průměrem 2 mm. Vyhřívání kolony bylo nastaveno na teplotu 35  $^{\circ}\text{C}$ . Pro separaci byla použita gradientová eluce, jejíž grafický průběh je znázorněn na obrázku 5, průtok mobilní fáze kolonou byl 0,3 ml/min. Jako mobilní fáze A byl použit octan amonný (20 mM, pH 9,75), mobilní fází B byl acetonitril.



**Obrázek 5: Průběh gradientové eluce systému HPLC** - mobilní fází A byl 20 mmol/l octan amonný (pH 9,45), mobilní fází B acetonitril. Na počátku analýzy bylo složení směsi mobilních fází 95 % B a 5 % A. Procento mobilní fáze B lineárně klesalo do 5. minuty na obsah 35 %. Od 5. do 7. minuty pak došlo k strmějšímu poklesu obsahu mobilní fáze B ve směsi na 10 % a toto složení zůstalo konstantní až do 13. minuty. Od 13. do 14. minuty došlo k prudkému zvýšení obsahu mobilní fáze B do iniciačního stavu, tedy 95 % B a 5% A, trvajících do konce analýzy.

Analýza vzorků probíhala v randomizovaném pořadí. Vzorek kontroly kvality byl do kolony vstřikován v pravidelných intervalech v průběhu celé analýzy.

Pro detekci iontů byl, v rámci **cílené metabolomické analýzy**, použit tandemový hmotnostní spektrometr QTRAP 5500 s ionizací elektrosprejem a s přepínáním pozitivního a negativního módu v jedné analýze. Použitá metoda vycházela z publikace Bajad a kol. (2006). Parametry MS/MS jsou uvedeny v tabulce 4. Identifikace metabolitů probíhala na základě známých MRM přechodů a retenčního času. V době analýzy umožňovala metoda detekci celkem 419 látek, z toho 187 v negativním a 232 v pozitivním módu.

**Tabulka 4: Parametry MS/MS**

parametr	hodnota	jednotka
rozlišení kvadrupólů	jednotkové	
napětí na kapiláře v iontovém zdroji	+/-4500	V
„pause time“	3	ms
tlak sušícího plynu	40	psi
tlak kolizního plynu	střední	psi
tlak „curtaingas“	30	psi
tlak zmlžujícího plynu	40	psi
teplota zmlžujícího plynu	400	°C

Jako řídicí systém pro získávání dat byl použit softwarový program Analyst 1.6.2 (AB Sciex, USA). Naměřená data cílené metabolomické analýzy byla zpracovávána pomocí programu MultiQuant 3.0 (AB Sciex, USA).

V případě **necílené metabolomické analýzy** byl jako detektor použit hmotnostní spektrometr Orbitrap Elite. Měření probíhalo pouze v pozitivním módu při rozlišení 60 000 FWHM a skenovacím rozsahu 70-1000  $m/z$ . Detekce píku z chromatogramu necílené analýzy byla provedena pomocí metabolomické programové knihovny XCMS (Benton *et al.*, 2010; Smith *et al.*, 2006; Tautenhahn *et al.*, 2008) ve statistickém softwaru „R“ (www.r-project.org), verze 3.1.2. Pro zjištění izotopických paternů a aduktů byla použita knihovna CAMERA (Kuhl *et al.*, 2012).

## 1. 7 Zpracování dat a statistické vyhodnocení

Ke konečnému statistickému zpracování byl v obou případech použit „R“ software. Pro odstranění systematické chyby byla provedena interpolace dat metodou LOESS (Cleveland *et Devlin*, 1988). Na základě QC vzorků byl pro jednotlivé metabolity spočítán variační koeficient (CV), látky s hodnotou CV vyšší než 30 % byly

z dalšího zpracování vyřazeny. V rámci každé skupiny byly chybějící hodnoty nahrazeny 2/3 hodnoty minimální. Na data byla následně aplikována clr transformace - „centered logratio“ a poté byla centrována na nulu. K datům bylo přistupováno jakožto ke kompozičním, neboť se jednalo o data, která poskytovala pouze relativní, nikoliv absolutní kvantitativní informaci. Data byla vizualizována pomocí vícerozměrných statistických metod shlukové analýzy, PCA, PLS-DA a OPLS-DA.

Jelikož se v odběrovém čase 1 podařilo získat pouze jeden vzorek, byl z následujícího statistického vyhodnocení vyřazen.

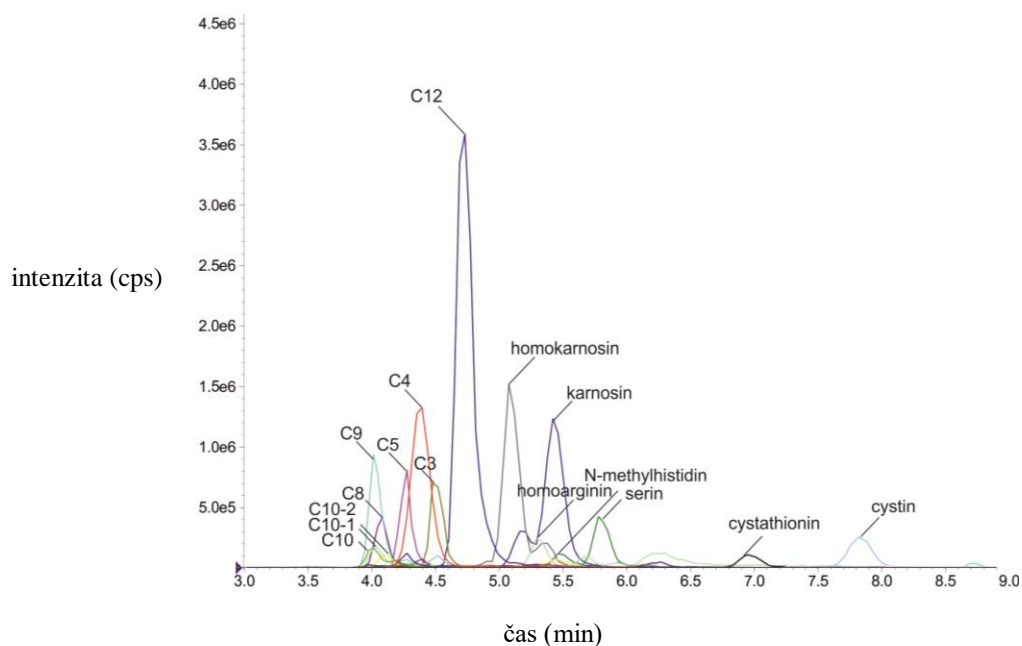
## 2. Výsledky

### 2. 1 Cílená metabolická analýza

Cílenou metabolickou analýzou bylo ve vzorcích moči novorozenců identifikováno 148 metabolitů (Příloha I.). Nalezené metabolity náležely do skupin aminokyselin, organických kyselin, acylkarnitinů, purinů, pyrimidinů, sacharidů, aminů, alkoholů a peptidů. Souhrnný počet identifikovaných metabolitů v jednotlivých skupinách je znázorněn v tabulce 5. Záznam chromatogramu moči asfyktického pacienta je uveden na obrázku 6.

**Tabulka 5: Souhrnná tabulka metabolitů identifikovaných v moči novorozenců - ve sloupcích jsou uvedeny počty metabolitů spadajících pod uvedenou skupinu**

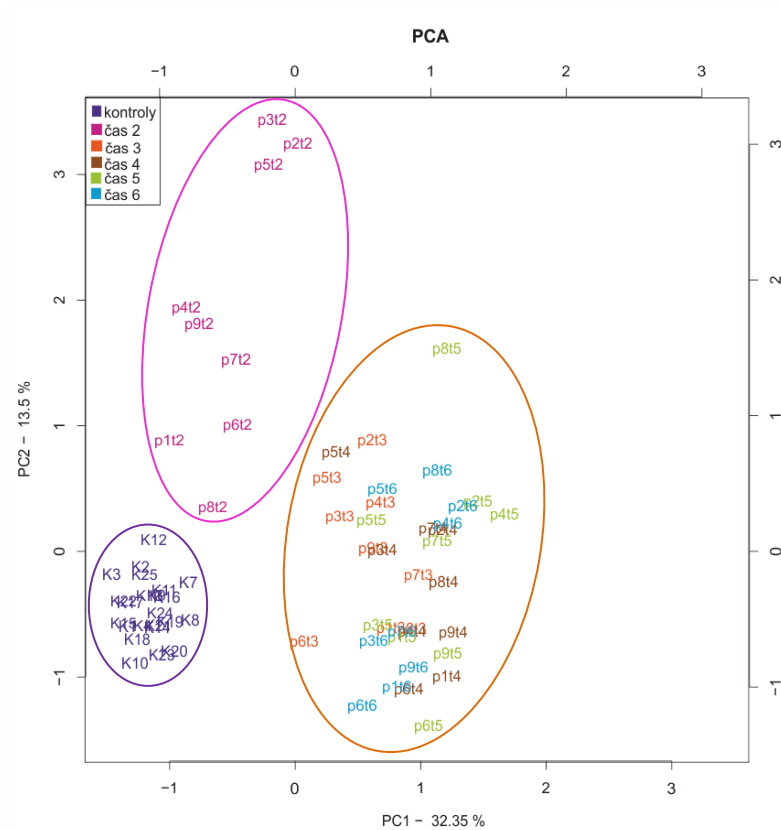
skupina	počet identifikovaných metabolitů
aminokyseliny	43
org.kyseliny	32
acylkarnitiny	28
puriny/pyrimidiny	18
sacharidy	11
aminy/alkoholy	10
peptidy	6



**Obrázek 6: Chromatogram vybraných metabolitů v negativním módu, které byly nalezeny ve vzorku moči asfyktického novorozence P9 v odběrovém čase 2 (t<sub>2</sub>) - zobrazena 3-9 minuta analýzy.**

## 2. 1. 1 Statistická analýza

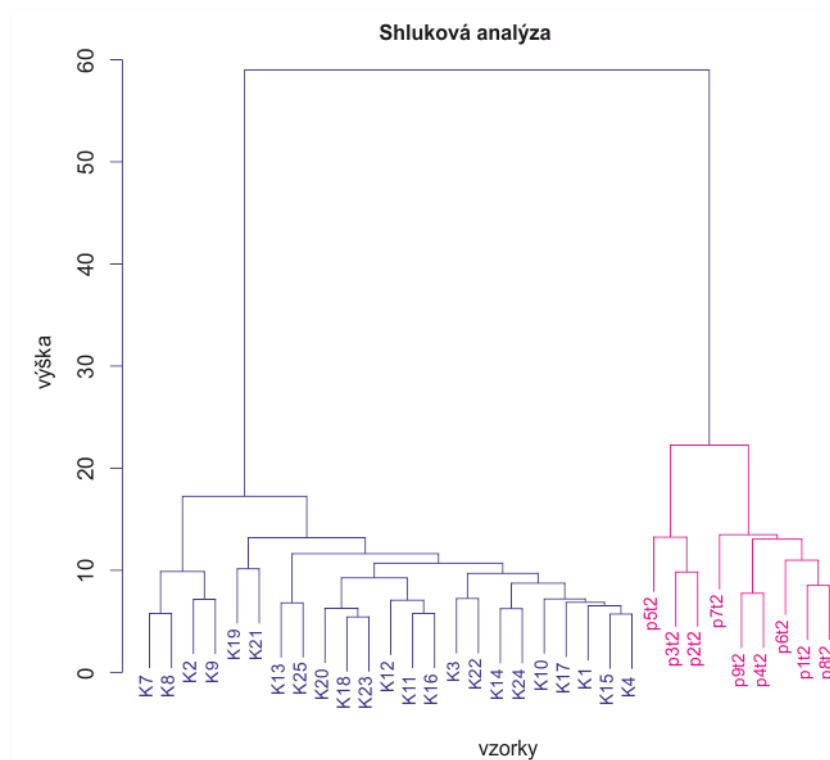
Pomocí PCA všech vzorků bylo možno pozorovat oddělení vzorků kontrolních novorozenců a také vzorků odebraných v čase 2 od ostatních časů (3-6), viz obrázek 7.



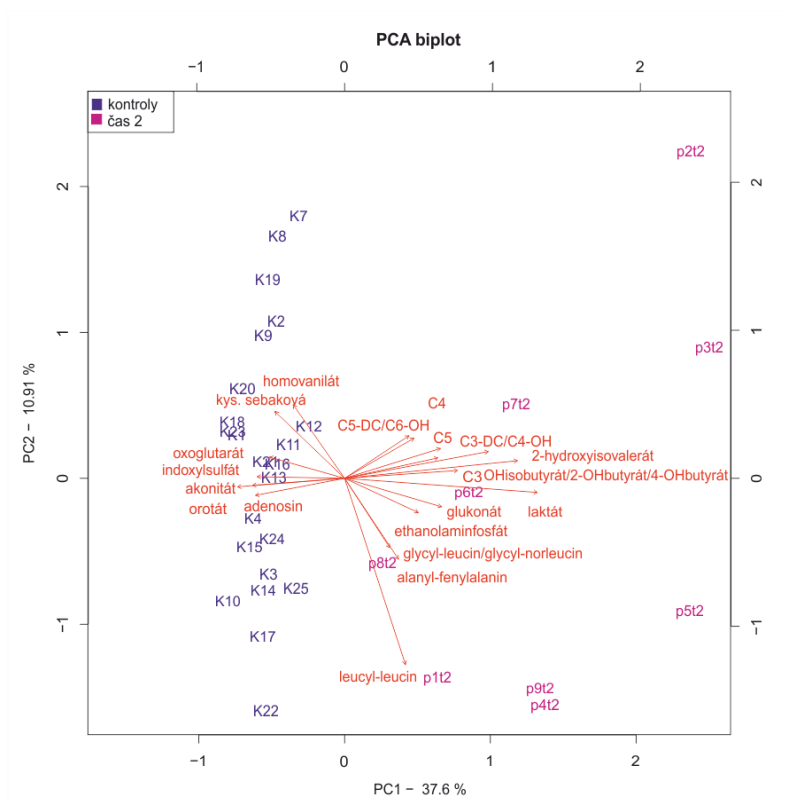
Obrázek 7: PCA analýza vzorků kontrolních (K1-K25) a asfyktických novorozenců (p1-p9) ve všech odběrových časech (t2-t6)

### 2.1.1.1. Kontroly vs. čas 2

V předchozí studii (Galoczová, 2013) bylo pozorováno oddělení vzorků v čase 2 od ostatních časů, což vedlo k závěru, že právě tato skupina je nejvíce zatížena předchozím asfyktickým inzuletem. Z tohoto důvodu byly kontrolní moči odebrány také v tomto čase. Oddělení vzorků asfyktických novorozenců v čase 2 od kontrol bylo patrné jak u shlukové analýzy (obrázek 8), tak z PCA a PLS-DA analýz. Ty jsou uvedeny ve formě biplotu, zobrazující 20 nejvíce diskriminujících metabolitů, viz obrázek 9 a 10. Na naměřená data byla aplikována rovněž metoda OPLS-DA. Jedním z možných grafických výstupů je S-plot, viz obrázek 11. Diskriminující metabolity jsou umístěny v levém dolním a pravém horním rohu S-plotu.



**Obrázek 8: Shluková analýza vzorků kontrolních (K1-K25) a asfytických novorozenců (p1-p9) v odběrovém čase 2 (t2)**



**Obrázek 9: PCA biplot vzorků kontrolních (K1-K25) a asfytických novorozenců (p1-p9) odebraných v odběrovém čase 2 (t2), znázorněno je 20 nejvíce diskriminujících metabolitů**



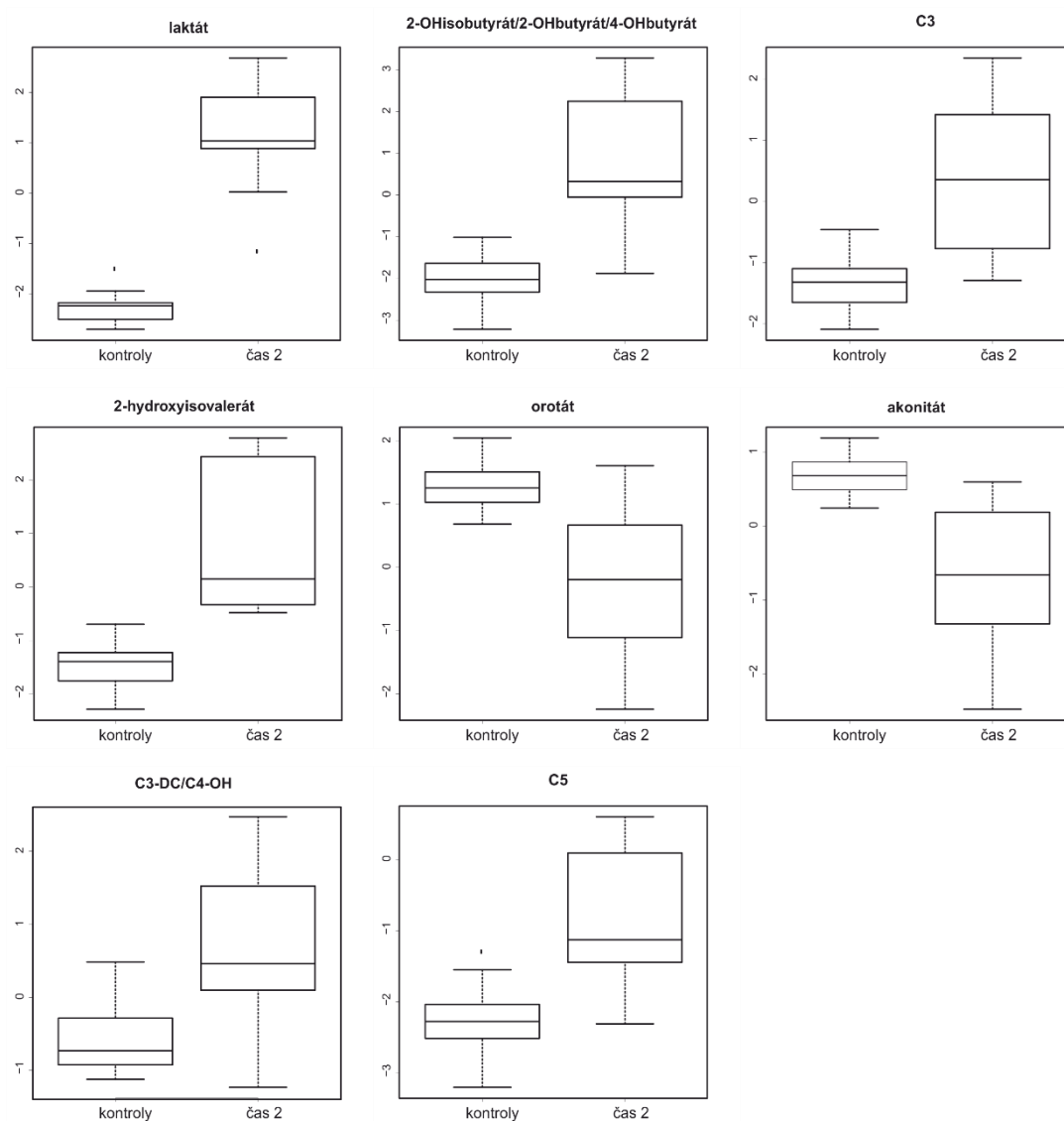


Dvacet nejvíce diskriminujících metabolitů, získaných pomocí tří výše zmíněných statistických přístupů - PCA, PLS-DA a OPLS-DA, je shrnuto v tabulce 6.

**Tabulka 6: Dvacet nejvíce diskriminujících metabolitů ve vzorcích kontrolních a asfyktických novorozenců v odběrovém čase 2, získané pomocí statistických přístupů PCA, PLS-DA, OPLS-DA -** metabolity společné pro všechny 3 přístupy jsou odděleny čarou, látky se stejným MRM přechodem a retenčním časem jsou uvedeny za sebou a odděleny středníkem

PCA	PLS-DA	OPLS-DA
2-hydroxyisobutyrát; 2-hydroxybutyrát; 4-hydroxybutyrát	2-hydroxyisobutyrát; 2-hydroxybutyrát; 4-hydroxybutyrát	2-hydroxyisobutyrát; 2-hydroxybutyrát; 4-hydroxybutyrát
2-hydroxyisovalerát	2-hydroxyisovalerát	2-hydroxyisovalerát
akonitát	akonitát	akonitát
C3	C3	C3
C3-DC; C4-OH	C3-DC; C4-OH	C3-DC; C4-OH
C5	C5	C5
laktát	laktát	laktát
orotát	orotát	orotát
2-oxoglutarát	2-oxoglutarát	5-methylthioadenosin
adenosin	adenosin	alanin; sarkosin; beta-alanin
C4	C4	cytosin
C5-DC; C6-OH	C5-DC; C6-OH	deoxyguanosin
ethanolaminfosfát	ethanolaminfosfát	hexanoylglycin
glukonát	glukonát	leucin; isoleucin; alloisoleucin; norleucin; hydroxyprolin
glycyl-leucin; glycyl-norleucin	glycyl-leucin; glycyl-norleucin	N,N-dimethylarginin
homovanilát	homovanilát	N-acetylputrescin
indoxylsulfát	indoxylsulfát	pseudouridin
kys. sebaková	kys. sebaková	ribitol; arabitol
leucyl-leucin	leucyl-leucin	threonát
alanyl-fenylalanin	kys. dokosaheptaenová	tyrosin

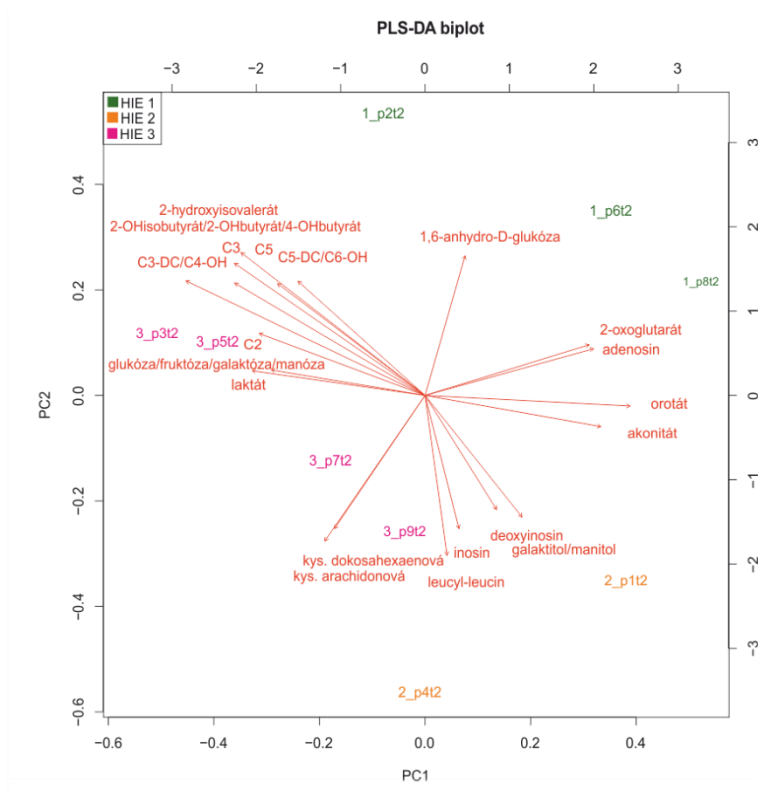
Boxploty diskriminujících látek společné všem třem statistickým přístupům jsou uvedeny na obrázku 12. U vzorků asfyktických novorozenců byly oproti vzorkům kontrolním výrazně zvýšeny hladiny - laktátu, 2-hydroxyisobutyrátu/2-hydroxybutyrátu/4-hydroxybutyrátu, C3, 2-hydroxyisovalerátu, C3-DC/C4-OH a C5. Výrazné snížení hladin pak bylo pozorováno u orotátu a akonitátu.



**Obrázek 12: Box-ploty diskriminujících metabolitů ve vzorcích kontrolních a asfyktických novorozenců odebraných v čase 2 - laktát, 2-hydroxyisobutyryát/2-hydroxybutyryát/4-hydroxybutyryát, C3, 2-hydroxyisovalerát, orotát, akonitát, C3-DC/C4-OH, C5. Látky jsou řazeny za sebou podle klesajícího rozdílu mediánu mezi uvedenými skupinami.**

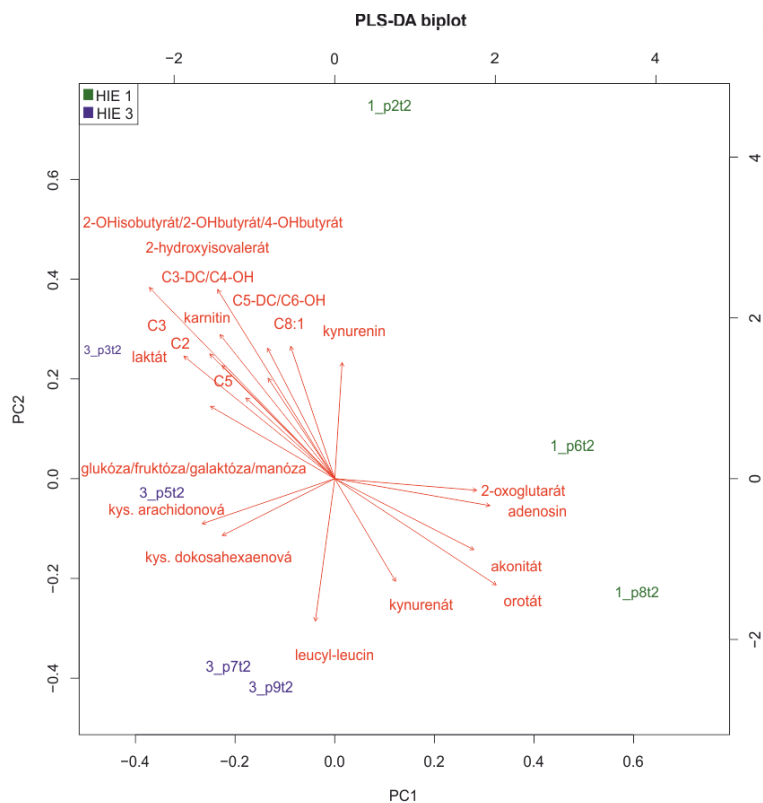
### 2.1.1.2. Neurologické poškození

Vzorky novorozenců s perinatální asfyxií byly rozděleny v závislosti na neurologickém poškození do tří skupin - normální nález (HIE 1), lehké (HIE 2) a těžké (HIE 3) poškození. Jednotlivé skupiny se nepodařilo oddělit nesupervizovanou PCA analýzou, proto je zde uvedena pouze metoda PLS-DA, která jejich oddělení prokázala, viz obrázek 13. Bohužel, počet nasbíraných vzorků není pro statistickou analýzu ideální, jedná se však o pilotní studii, na kterou bude navazovat studie nová s větším počtem vzorků.

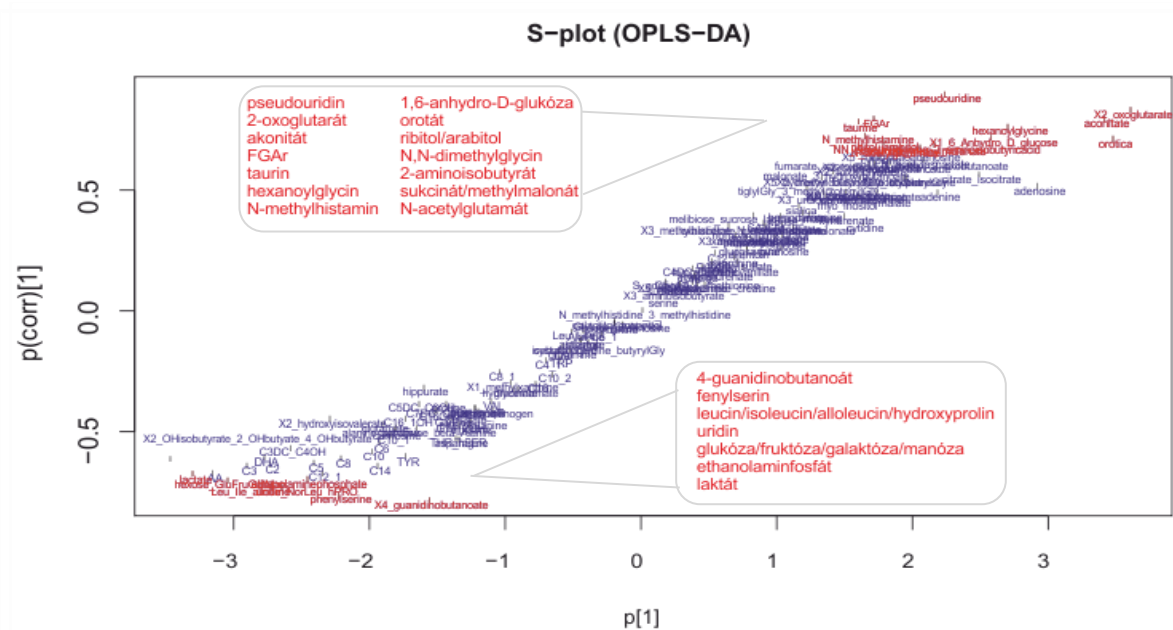


**Obrázek 13: PLS-DA biplot vzorků asfyktických novorozenců (p1-p9) v odběrovém čase 2 (t2) v závislosti na neurologickém poškození - normální nález (1), lehké (2) a těžké (3) poškození, znázorněno je 20 nejvíce diskriminujících metabolitů**

Pro zjištění nejvíce diskriminujících metabolitů přímo souvisejících se závažností neurologického poškození (srovnávání pacientů s normálním nálezem vůči těžkému poškození) byly aplikovány metody PLS-DA a OPLS-DA, viz obrázek 14 a 15.



Obrázek 14: PLS-DA biplot vzorků asfyktických novorozenců (p1-p9) v odběrovém čase 2 (t2) v závislosti na neurologickém poškození - normální nález (1), těžké poškození (3), znázorněno je 20 nejvíce diskriminujících metabolitů



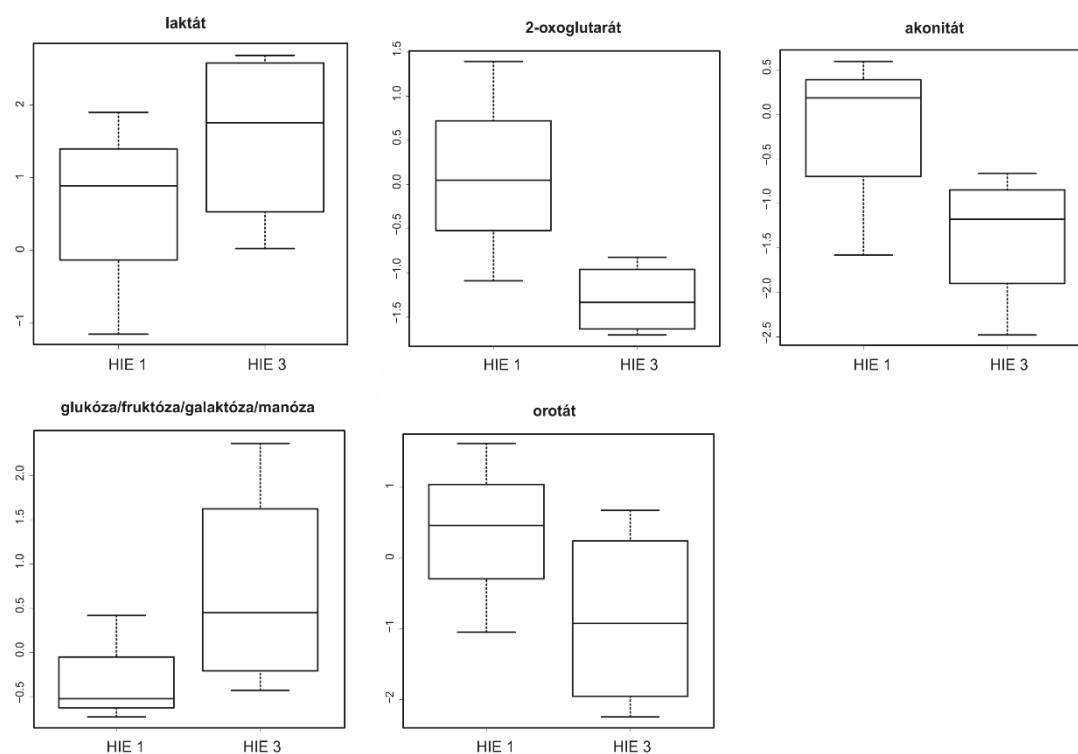
Obrázek 15: OPLS-DA S-plot vzorků asfyktických novorozenců (p1-p9) v odběrovém čase 2 (t2) v závislosti na neurologickém poškození - normální nález (1), těžké poškození (3), znázorněno je 20 nejvíce diskriminujících metabolitů. Zvýrazněné látky jsou řazeny za sebou podle klesající hodnoty p(corr).

Dvacet nejvýznamnějších metabolitů získaných pomocí PLS-DA a OPLS-DA přístupů je shrnuto v tabulce 7.

**Tabulka 7: Dvacet nejvíce diskriminujících metabolitů u vzorků asfyktických novorozenců v odběrovém čase 2 v závislosti na neurologickém poškození - normální nález vs. těžké poškození, získané pomocí statistických přístupů PLS-DA, OPLS-DA - metabolity společné pro oba přístupy jsou odděleny čarou, látky se stejným MRM přechodem a retenčním časem jsou uvedeny za sebou a odděleny středníkem**

PLS-DA	OPLS-DA
2-oxoglutarát	2-oxoglutarát
akonitát	akonitát
laktát	laktát
glukóza; fruktóza; galaktóza; manóza	glukóza; fruktóza; galaktóza; manóza
orotát	orotát
2-hydroxyisobutyrát; 2-hydroxybutyrát; 4-hydroxybutyrát	1,6-anhydro-D-glukóza
2-hydroxyisovalerát	4-guanidinobutanoát
adenosin	ethanolaminfosfát
C2	fenylserin
C3	FGAr
C3-DC; C4-OH	hexanoylglycin
C5	leucin; isoleucin; alloisoleucin; norleucin; hydroxyprolin
C5-DC; C6-OH	N,N-dimethylglycin; 2-aminoisobutyrát
C8:1	N-acetylglutamát
karnitin	N-methylhistamin
kynurenát	pseudouridin
kynurenin	ribitol; arabitól
kys. arachidonová	sukcinát; methylmalonát
kys. dokosaheptaenová	taurin
leucyl-leucin	uridin

Ve formě boxplotů jsou hladiny nejvíce diskriminujících metabolitů společných pro oba přístupy uvedeny na obrázku 16. U vzorků pacientů s těžkým poškozením byl oproti těm s normálním nálezem výrazně zvýšen laktát a hexózy - glukóza/fruktóza/galaktóza/manóza, snížen byl 2-oxoglutarát, akonitát a orotát.



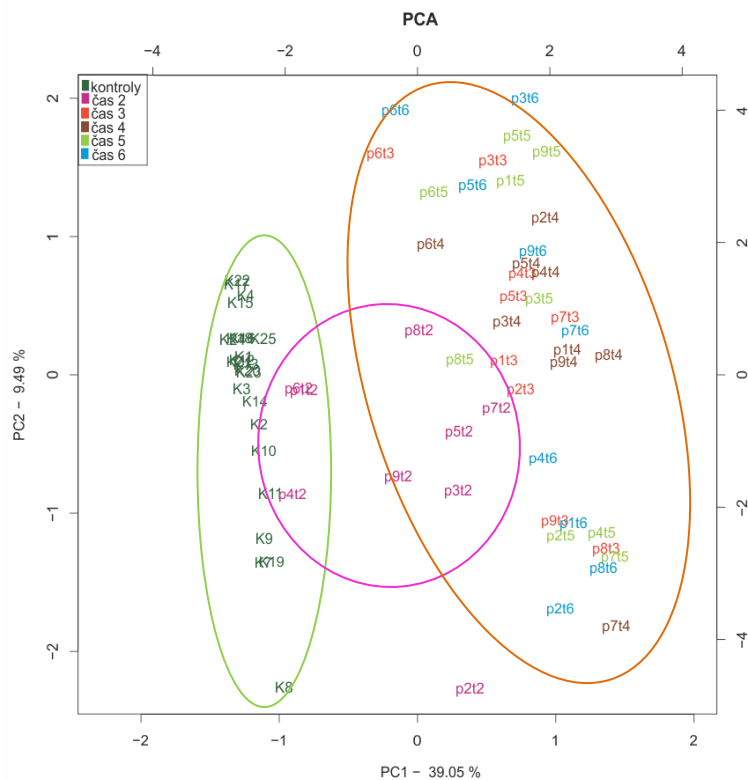
**Obrázek 16: Box-ploty diskriminujících metabolitů ve vzorcích asfyktických novorozenců s normálním nálezem a s těžkým poškozením - laktát, 2-oxoglutarát, akonitát, glukóza/fruktóza/galaktóza/manóza a orotát. Látky jsou seřazeny za sebou podle klesajícího rozdílu mediánu mezi uvedenými skupinami.**

## 2. 2 Necílená metabolická analýza

Necíleným metabolickým přístupem byly ve vzorcích detekovány látky v pozitivním módu při rozlišení 60 000 FWHM a skenovacím rozsahu 70-1000  $m/z$ . Následně byly vybrané potencionální metabolity identifikovány na základě hodnot  $m/z$  pomocí metabolické databáze METLIN (<http://metlin.scripps.edu>). Odchylka  $m/z$  vyjádřena pomocí  $\Delta ppm$  byla pro analýzu spočítána softwarem RawMeat, verze 2.1 (VAST Scientific, USA). Její hodnota se pohybovala do 4 ppm. Celkem bylo v rámci necílené analýzy nalezeno 1583 píků.

### 2. 2. 1 Statistická analýza

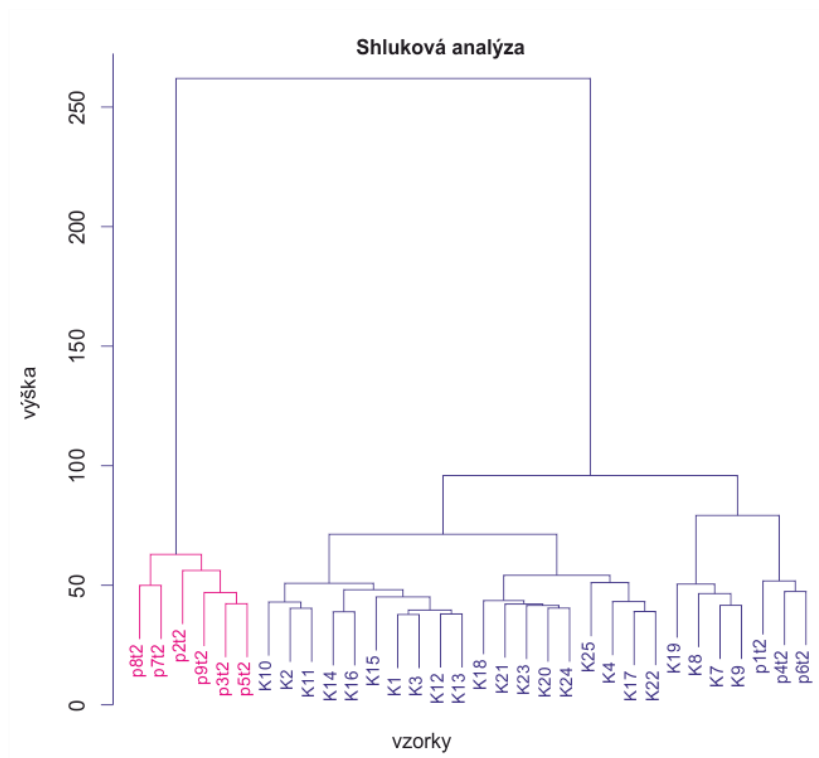
U necílené analýzy bylo rovněž pozorováno oddělení metabolických profilů vzorků kontrolních novorozenců od močí pacientů, odebraných v čase 2 a od ostatních časů (3-6) pomocí PCA analýzy, viz obrázek 17.



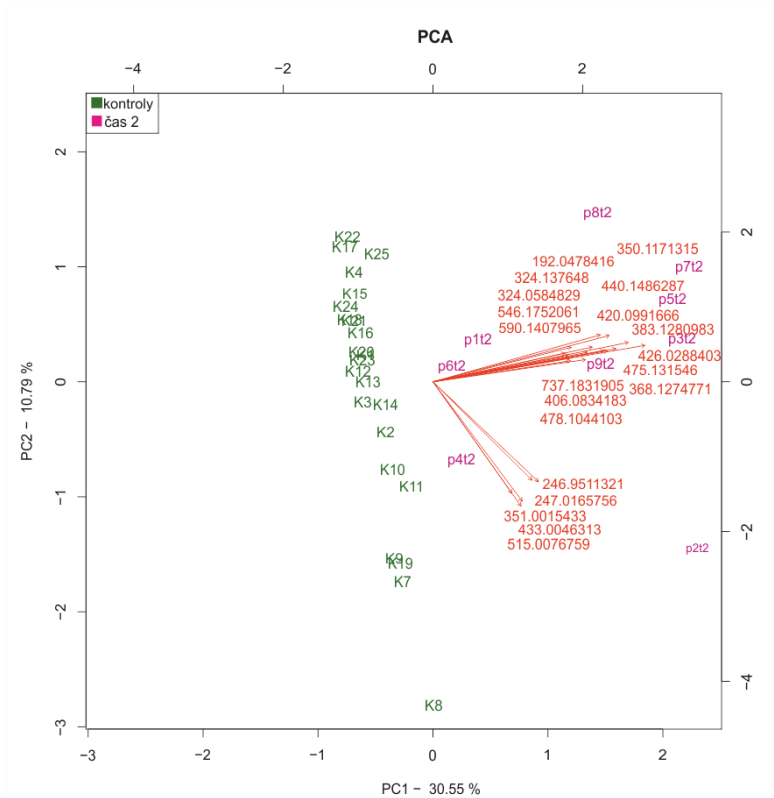
**Obrázek 17: PCA analýza vzorků kontrolních (K1-K25) a asfyktických novorozenců (p1-p9) ve všech odběrových časech (t2-t6)**

### 2.2.1.1. Kontroly vs. čas 2

Předmětem našeho zájmu bylo i v rámci necílené analýzy srovnat vzorky asfyktických pacientů v čase 2 se zdravými kontrolami. Oddělení těchto dvou skupin bylo pozorováno pomocí shlukové analýzy, viz obrázek 18, a také pomocí PCA a PLS-DA analýz, díky kterým bylo získáno 20 nejvíce diskriminujících  $m/z$ , viz obrázek 19 a 20. K získání těchto  $m/z$  byla použita rovněž metoda OPLS-DA, viz obrázek 21.

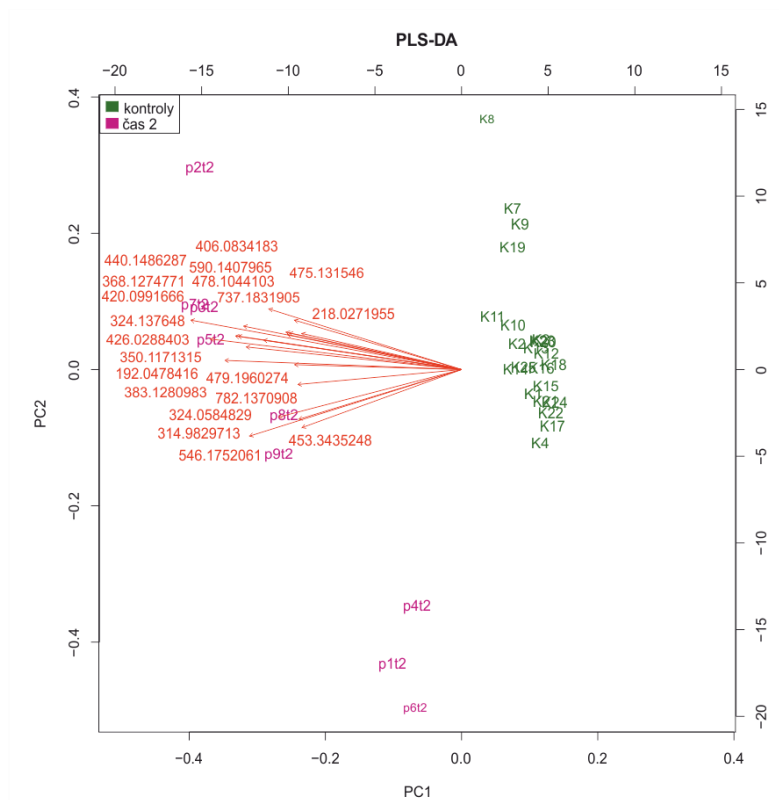


Obrázek 18: Shluková analýza vzorků kontrolních (K1-K25) a asfytických novorozenců (p1-p9) v odběrovém čase 2 (t2)

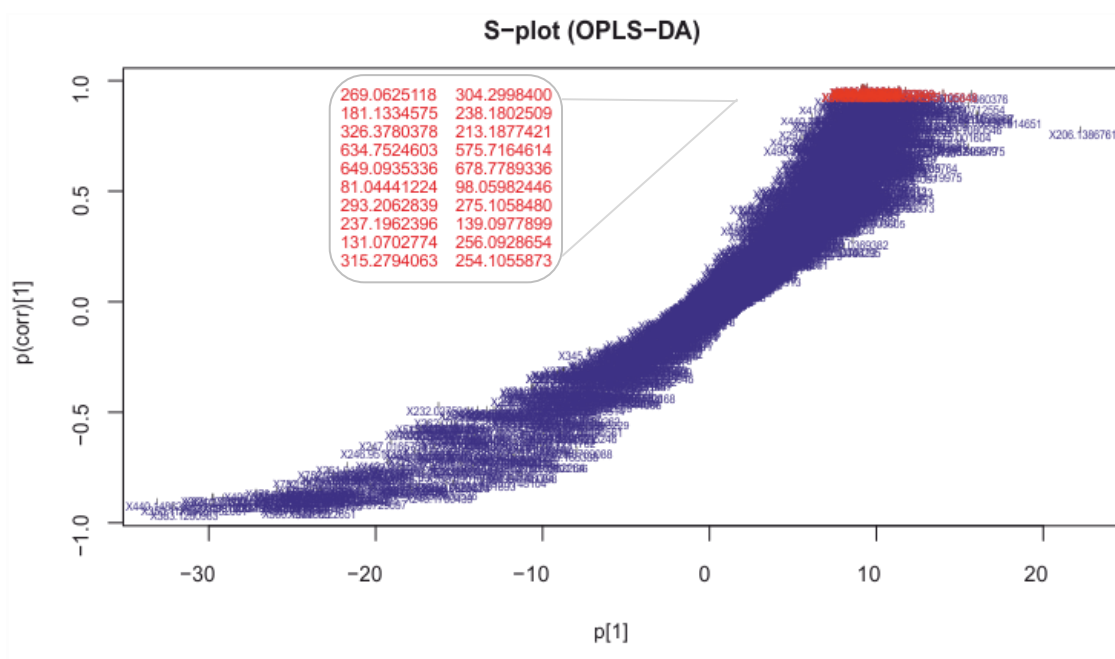


Obrázek 19: PCA biplot vzorků kontrolních (K1-K25) a asfytických novorozenců (p1-p9) v odběrovém čase 2 (t2), znázorněno je 20 nejvíce diskriminujících  $m/z$





Obrázek 20: PLS-DA biplot vzorků kontrolních (K1-K25) a asfyktických novorozenců (p1-p9) v odběrovém čase 2 (t2), znázorněno je 20 nejvíce diskriminujících m/z



Obrázek 21: OPLS-DA S-plot vzorků kontrolních a asfyktických novorozenců v odběrovém čase 2, zvýrazněno je 20 nejvíce diskriminujících m/z. Zvýrazněné hodnoty m/z jsou seřazeny za sebou podle klesající hodnoty p(corr).

Dvacet nejvíce diskriminujících  $m/z$  získaných pomocí tří výše zmíněných statistických přístupů - PCA, PLS-DA a OPLS-DA je shrnuto v tabulce 8.

**Tabulka 8: Dvacet nejvýznamnějších  $m/z$  u vzorků asfyktických novorozenců v odběrovém čase 2 oproti kontrolním, získané pomocí statistických přístupů PCA, PLS-DA, OPLS-DA**

PCA	PLS-DA	OPLS-DA
114.0660313	192.0478416	81.04441224
190.0125661	218.0271955	98.05982446
222.9066879	314.9829713	131.0702774
244.9540862	324.0584829	139.0977899
246.9511321	324.1376480	181.1334575
247.0165756	350.1171315	213.1877421
257.0035380	368.1274771	237.1962396
260.9279740	383.1280983	238.1802509
292.9596723	406.0834183	254.1055873
351.0015433	420.0991666	256.0928654
366.9754206	426.0288403	269.0625118
408.9601654	440.1486287	275.1058480
433.0046313	453.3435248	293.2062839
448.9787494	475.1315460	304.2998400
456.9658619	478.1044103	315.2794063
506.9913902	479.1960274	326.3780378
515.0076759	546.1752061	575.7164614
538.9689428	590.1407965	634.7524603
752.7864645	737.1831905	649.0935336
782.1370908	782.1370908	678.7789336

Identifikace nejvýznamnějších  $m/z$  plynoucích z OPLSDA analýzy byla provedena pomocí databáze METLIN, viz tabulka 9.

**Tabulka 9: Dvacet nejvíce diskriminujících  $m/z$  plynoucích z OPLS-DA analýzy vzorků kontrolních asfyktických novorozenců v odběrovém čase 2 s uvedením příkladů potencionálních metabolitů**

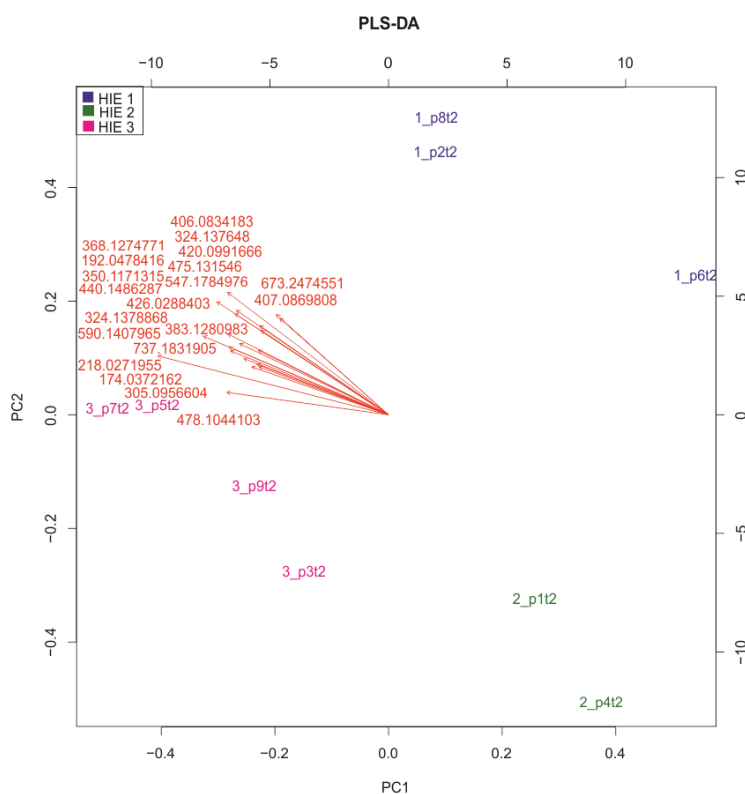
přesná $m/z$	teoretická $m/z$	potencionální metabolit	adukt	ppm
81.04441224	80.0374	pyrimidin	$[M+H]^+$	3
98.05982446	97.0528	1-kyano-2-hydroxy-3-buten	$[M+H]^+$	2
98.05982446	97.0529	2,4-dimethyloxazol	$[M+H]^+$	2
98.05982446	97.0530	2,5-dimethyloxazol	$[M+H]^+$	2
98.05982446	97.0531	4,5-dimethyloxazol	$[M+H]^+$	2
131.0702774	130.0634	(±)-mevalonolakton	$[M+H]^+$	0
131.0702774	130.0645	(4S,6S)-3,4,5,6-tetrahydro-4-hydroxy-6-methyl-2H-pyran-2-on	$[M+H]^+$	0
131.0702774	130.0635	(R)-pantolakton	$[M+H]^+$	0
131.0702774	130.0652	(S,R)-3-methyl-2-oxovalerová kys.	$[M+H]^+$	0
131.0702774	130.0639	1-oxa-2-oxo-3-hydroxycykloheptan	$[M+H]^+$	0
131.0702774	130.0640	2-hydroxyethylmethakrylát	$[M+H]^+$	0
131.0702774	130.0641	2-keto-n-kapronová kys.	$[M+H]^+$	0
131.0702774	130.0651	2-methyl-3-ketovalerová kys.	$[M+H]^+$	0
131.0702774	130.0649	3-ethyl-2-oxovalerová kys.	$[M+H]^+$	0
131.0702774	130.0631	3-keto-n-kapronová kys.	$[M+H]^+$	0
131.0702774	130.0630	3-oxo-4-methyl-valerová kys.	$[M+H]^+$	0
131.0702774	130.0632	4-keto-n-kapronová kys.	$[M+H]^+$	0
131.0702774	130.0642	5-ethoxy-4,5-dihydro-2(3H)furanon	$[M+H]^+$	0
131.0702774	130.0633	5-keto-n-kapronová kys.	$[M+H]^+$	0
131.0702774	130.0636	6-hydroxyhexan-6-olid	$[M+H]^+$	0
131.0702774	130.0646	acetoin acetát	$[M+H]^+$	0
131.0702774	130.0638	adipát semialdehyd	$[M+H]^+$	0
131.0702774	130.0643	ethylacetoacetát	$[M+H]^+$	0
131.0702774	130.0648	ketoleucin	$[M+H]^+$	0
131.0702774	130.0647	methyllevulinát	$[M+H]^+$	0
131.0702774	130.0653	solerol	$[M+H]^+$	0
131.0702774	130.0637	thyl-3-oxobutanoát	$[M+H]^+$	0
139.0977899	138.0905	pentetrazol	$[M+H]^+$	0
181.1334575	163.1000	(R)-2-methylimino-1-fenylpropan-1-ol	$[M+NH_4]^+$	0
181.1334575	163.1008	1-(2,3-dihydro-5-methyl-1H-pyrrolizin-7-yl)ethanon	$[M+NH_4]^+$	0
181.1334575	163.1004	2,3,4,5-tetrahydro-6-(5-methyl-2-furanyl)pyridin	$[M+NH_4]^+$	0
181.1334575	163.1003	2,3,6,7-tetrahydro-7-methylcyklopent[b]azepin-8(1H)-on	$[M+NH_4]^+$	0
181.1334575	163.1009	2,3-dihydro-5,6-dimethyl-1H-pyrrolizin-7-karboxaldehyd	$[M+NH_4]^+$	0
181.1334575	163.1005	2,3-dihydro-5-propanoyl-1H-pyrrolizin	$[M+NH_4]^+$	0
181.1334575	163.0997	2-fenylbutyramid	$[M+NH_4]^+$	0
181.1334575	163.1007	5-acetyl-2,3-dihydro-6-methyl-1H-pyrrolizin	$[M+NH_4]^+$	0
181.1334575	163.1006	5-acetyl-2,3-dihydro-7-methyl-1H-pyrrolizin	$[M+NH_4]^+$	0
181.1334575	163.1002	eikosapentaenová kys.	$[M+NH_4]^+$	0
181.1334575	163.0998	fenbutyramid	$[M+NH_4]^+$	0
181.1334575	163.0999	methkathinon	$[M+NH_4]^+$	0
181.1334575	163.1001	N-(2-fenylethyl)-acetamid	$[M+NH_4]^+$	0
181.1334575	180.1263	rilmidenin	$[M+H]^+$	0

**pokračování tabulky 9**

<b>přesná m/z</b>	<b>teoretická m/z</b>	<b>potencionální metabolit</b>	<b>adukt</b>	<b>ppm</b>
213.1877421	-	-	-	-
237.1962396	219.1623	(-)-sedamin	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	0
237.1962396	219.1624	fabianin	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	0
238.1802509	220.1470	(Z)-6-tetradeken-1,3-diyn-5,8-diol	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	0
238.1802509	220.1467	13-nor-6-eremofilen-8,11-dion	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	0
238.1802509	220.1471	13-tetradeken-1,3-diyn-6,7-diol	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	0
238.1802509	220.1465	2,6-di-tert-butylbenzoquinon	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	0
238.1802509	220.1469	2-fenylethyl hexanoát	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	0
238.1802509	220.1473	2-methyl-1-fenyl-2-propanyl butyrát	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	0
238.1802509	220.1472	3,4-dihydro-2,2,5,7,8-pentamethyl-2H-1-benzopyran-6-ol	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	0
238.1802509	220.1466	3-fenylpropylisovalerát	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	0
238.1802509	220.1464	glutinoson	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	0
238.1802509	220.1468	hexylfenylacetát	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	0
238.1802509	220.1463	oblongolid	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	0
254.1055873	236.0717	2-(4'-methylthio)butylmalát	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	0
254.1055873	236.0718	3-(4'-methylthio)butylmalát	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	0
254.1055873	236.0716	buturon	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	0
256.0928654	-	-	-	-
269.0625118	268.0552	homocystin	[M+H] <sup>+</sup>	0
269.0625118	268.0553	penicilamin cystein disulfid	[M+H] <sup>+</sup>	0
275.105848	257.0722	2-(ethylsulfonylemethyl)fenyl methylkarbamát	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	0
293.2062839	275.1733	N-(3S-hydroxydekanoyl)-L-serin	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	0
304.29984	303.2926	1-hexadekylpyridinium	[M+H] <sup>+</sup>	0
304.29984	303.2926	benzalkonium	[M+H] <sup>+</sup>	0
304.29984	303.2926	cetylpyridinium	[M+H] <sup>+</sup>	0
315.2794063	-	-	-	-
326.3780378	308.3443	13-(R,S)-methyl-6-(E,Z)-heneikosen	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	0
326.3780378	308.3447	dokosen	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	0
575.7164614	-	-	-	-
634.7524603	-	-	-	-
649.0935336	648.0865	kaylin-1	[M+H] <sup>+</sup>	0
678.7789336	-	-	-	-

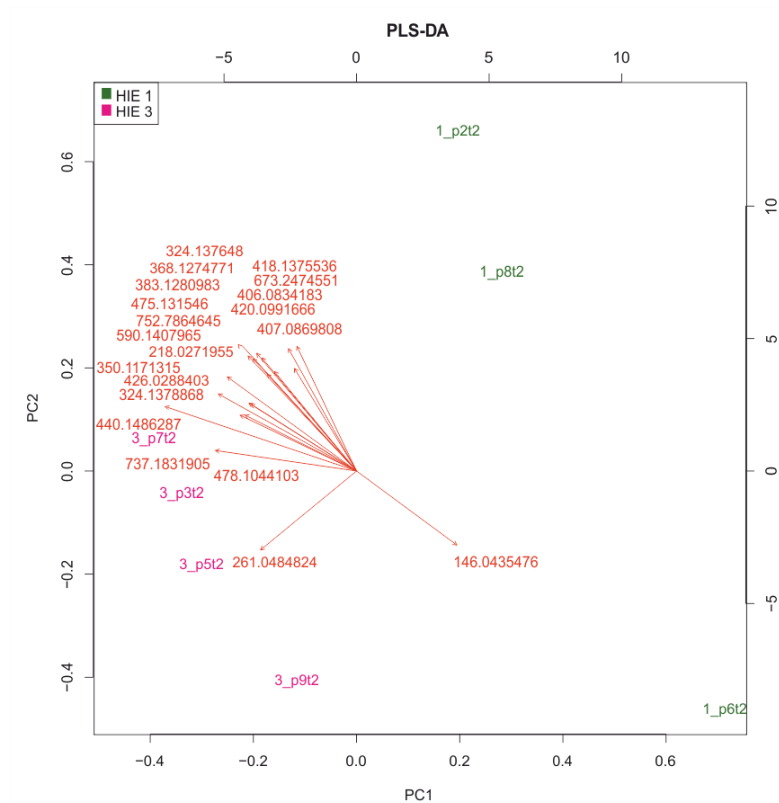
### 2.2.1.2. Neurologické poškození

Pro nalezení metabolických rozdílů ve vzorcích moči asfyktických novorozenců odebraných v čase 2 v závislosti na míře neurologického poškození byla použita metoda PLS-DA, viz obrázek 22.

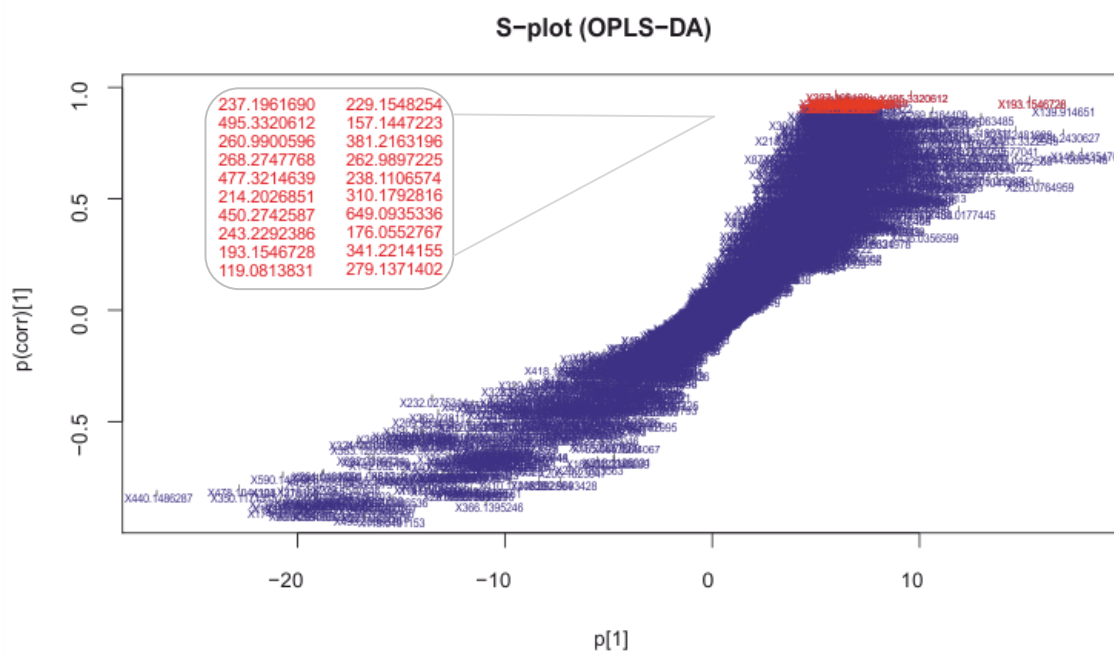


Obrázek 22: PLS-DA biplot vzorků asfyktických novorozenců (p1-p9) v odběrovém čase 2 (t2) v závislosti na neurologickém poškození - normální nález (1), lehké (2) a těžké (3), poškození, znázorněno je 20 nejvíce diskriminujících  $m/z$

Dále byly zjišťovány rozdíly v metabolických profilech mezi pacienty s normálním nálezem a s těžkým neurologickým poškozením. Oddělení těchto dvou skupin bylo prokázáno pomocí analýz PLS-DA a OPLS-DA, viz obrázek 23 a 24. Za jejich pomoci bylo také získáno 20 nejvíce diskriminujících metabolitů.



Obrázek 23: PLS-DA biplot vzorků moči asfyktických novorozenců (p1-p9) v odběrovém čase 2 (t2) v závislosti na neurologickém poškození - normální nález (1), těžké poškození (3), znázorněno je 20 nejvíce diskriminujících  $m/z$



Obrázek 24: OPLS-DA S-plot vzorků asfyktických novorozenců (p1-p9) v odběrovém čase 2 (t2) v závislosti na neurologickém poškození - normální nález (1), těžké poškození (3), znázorněno je 20 nejvíce diskriminujících metabolitů. Zvýrazněné hodnoty  $m/z$  jsou seřazeny za sebou podle klesající hodnoty  $p(\text{corr})$ .

K identifikaci potencionálních metabolitů bylo i v tomto případě použito 20 nejvýznamnějších  $m/z$  plynoucích z OPLS-DA analýzy, viz tabulka 10.

**Tabulka 10: Dvacet nejvýznamnějších  $m/z$  plynoucích z OPLS-DA analýzy s uvedením příkladů potencionálních metabolitů**

přesná $m/z$	teoretická $m/z$	potencionální metabolit	adukt	ppm
119.0813831	101.0477	1-aminocyklopropan-1-karboxylová kys.	$[M+NH_4]^+$	0
119.0813831	118.0742	2,4-diamino-butyrát	$[M+H]^+$	1
119.0813831	101.0477	2-aminobut-2-enoát	$[M+NH_4]^+$	0
119.0813831	118.0742	3-methylamino-L-alanin	$[M+H]^+$	1
119.0813831	101.0477	3-oxobutanamid	$[M+NH_4]^+$	0
119.0813831	101.0477	diacetylmonoxim	$[M+NH_4]^+$	0
119.0813831	101.0477	homoserin lakton	$[M+NH_4]^+$	0
119.0813831	101.0477	L-azetidin-2-karboxylová kys.	$[M+NH_4]^+$	0
119.0813831	101.0477	N-methylolakrylamid	$[M+NH_4]^+$	0
119.0813831	101.0477	t-4-aminokrotonová kys.	$[M+NH_4]^+$	0
157.1447223	139.1109	Na,Na-dimethylhistamin	$[M+NH_4]^+$	0
176.0552767	158.0215	(Z)-5-oxohex-2-enedioát	$[M+NH_4]^+$	0
176.0552767	158.0215	2,5-dihydro-4-hydroxy-2-methyl-5-oxo-2-furankarboxylová kys.	$[M+NH_4]^+$	0
176.0552767	175.0480	2-amino-3-oxo-adipát	$[M+H]^+$	0
176.0552767	158.0215	2-hydroxymukonát	$[M+NH_4]^+$	0
176.0552767	158.0215	2-methylen-4-oxo-glutarát	$[M+NH_4]^+$	0
176.0552767	158.0215	3-hydroxy-cis,cis-mukonát	$[M+NH_4]^+$	0
176.0552767	175.0480	dimethyloxaloylglycin	$[M+H]^+$	0
176.0552767	175.0480	D-N-(karboxyacetyl)alanin	$[M+H]^+$	0
176.0552767	158.0215	fumarylacetát	$[M+NH_4]^+$	0
176.0552767	175.0480	N-acetylaspartát	$[M+H]^+$	0
176.0552767	175.0480	N-formyl-L-glutamát	$[M+H]^+$	0
193.1546728	-	-	-	-
214.2026851	196.1688	4,5-dihydro-2,4(5)-dimethyl-1H-imidazol	$[M+NH_4]^+$	0
229.1548254	211.1208	isoproterenol	$[M+NH_4]^+$	0
229.1548254	228.1474	L-isoleucyl-L-prolin	$[M+H]^+$	0
229.1548254	228.1474	L-leucyl-L-prolin	$[M+H]^+$	0
229.1548254	211.1208	meskalin	$[M+NH_4]^+$	0
229.1548254	211.1208	metaproterenol	$[M+NH_4]^+$	0
229.1548254	211.1208	methoxamin	$[M+NH_4]^+$	0
237.196169	219.1623	(-)-sedamin	$[M+NH_4]^+$	0
237.196169	219.1623	fabianin	$[M+NH_4]^+$	0
238.1106574	-	-	-	-
243.2292386	-	-	-	-
260.9900596	-	-	-	-
262.9897225	-	-	-	-
268.2747768	250.2409	flegmarin	$[M+NH_4]^+$	0
279.1371402	278.13	panthetein	$[M+H]^+$	0
310.1792816	309.1729	zanthosimulin	$[M+H]^+$	2
341.2214155	340.2151	14,19-dihydroaspidospermatin	$[M+H]^+$	2
341.2214155	323.1885	piperidonát	$[M+NH_4]^+$	2
381.2163196	380.2100	bopindolol	$[M+H]^+$	2
381.2163196	363.1834	dioncofylin C	$[M+NH_4]^+$	2

<b>přesná <i>m/z</i></b>	<b>teoretická <i>m/z</i></b>	<b>potencionální metabolit</b>	<b>adukt</b>	<b>ppm</b>
450.2742587	-	-	-	-
477.3214639	476.3138	(-)-asbestinin 2	[M+H] <sup>+</sup>	0
477.3214639	459.2886	deoxytubulosin	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	1
477.3214639	476.3138	polyporusteron B	[M+H] <sup>+</sup>	0
477.3214639	476.3138	polyporusteron C	[M+H] <sup>+</sup>	0
495.3320612	494.3244	makisterone B	[M+H] <sup>+</sup>	0
495.3320612	494.3245	makisterone A	[M+H] <sup>+</sup>	0
649.0935336	648.0865	kaylin-1	[M+H] <sup>+</sup>	0



### 3. Diskuze

Tato práce byla zaměřena na zjištění rozdílů v metabolických profilech vzorků moči asfyktických a kontrolních novorozenců cíleným a necíleným metabolickým přístupem a nalezení potencionálních biomarkerů souvisejících se závažností hypoxicko-ischemického poškození mozku.

**Cílenou metabolickou analýzou** bylo v moči novorozenců identifikováno 148 metabolitů, které byly následně podrobeny statistické analýze. Metodami PCA, PLS-DA a OPLS-DA byly zjištěny nejvíce diskriminující metabolity perinatální asfyxie ve srovnání s kontrolními vzorky. U asfyktických novorozenců byly oproti kontrolám nejvíce zvýšeny hladiny **laktátu, 2-hydroxyisobutyátu/2-hydroxybutyrátu/4-hydroxybutyrátu, 2-hydroxyisovalerátu** a acylkarnitinů **C3, C3-DC/C4-OH, C5**. Nejvíce sníženy byly hladiny **akonitátu a orotátu**.

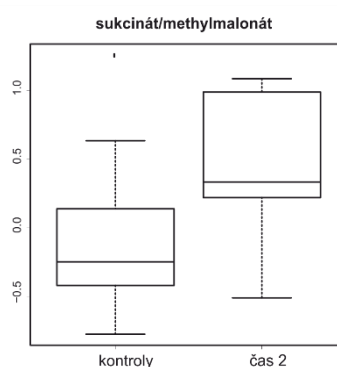
Zvýšené hladiny 2-hydroxybutyrátu a 2-hydroxyisovalerátu v moči jsou asociovány s laktátovou acidózou, ketoacidózou a také s těžkou asfyxií (Landaas *et Jacobs*, 1977; Pettersen *et al.*, 1973). **2-hydroxybutyrát** je primárně formován v játrech při katabolismu L-threoninu nebo při syntéze glutathionu. Při oxidativním stresu dochází ke zvýšení syntézy tohoto antioxidantu. Glutathion je tripeptid skládající se z kys. glutamové, glycinu a cysteinu. Zásoby cysteinu pro jeho syntézu jsou ovšem omezené, proto se využívá také homocystein, ze kterého je transulfurační dráhou tvořen cystathionin. 2-hydroxybutyrát je poté uvolňován jako vedlejší produkt při štěpení cystathioninu na cystein, který je dále inkorporován do glutathioninu (Gall *et al.*, 2010). Bylo zjištěno, že důležitým faktorem pro produkci 2-hydroxybutyrátu je zvýšený poměr  $\text{NADH}+\text{H}^+/\text{NAD}^+$  (Landaas *et Pettersen*, 1975). Tento poměr je zvýšen, neboť u asfyktických novorozenců dochází k selhání oxidativní fosforylace a tudíž touto cestou neprobíhá reoxidace NADH (Hanrahan *et al.*, 1998). **2-hydroxyisovalerát** pochází zejména z ketogeneze a metabolismu aminokyselin leucinu, isoleucinu a valinu. Normálně bývá v játrech oxidačně dekarboxylován dehydrogenázovým komplexem  $\alpha$ -ketokyselin s větveným řetězcem, jenž je rovněž inhibován vysokým  $\text{NADH}+\text{H}^+/\text{NAD}^+$  poměrem (Landaas *et Jacobs*, 1977).

**Acylkarnitiny** vznikají reverzibilní esterifikací karnitinu a jsou důležitými sloučeninami v metabolismu mastných kyselin (Christie, 2013). Při hypoxické ischemii dochází k snížení rychlosti procesu odbourávání mastných kyselin zřejmě díky změnám v poměrech  $\text{NADH}+\text{H}^+/\text{NAD}^+$  a  $\text{FADH}_2/\text{FAD}$  (Whitmer *et al.*, 1978). Walsh a kol.

(2012) udávají, že výsledkem může být hromadění acyl-CoA a acylkarnitinů s dlouhým řetězcem. U asfyktických novorozenců zjistili zvýšené hladiny některých acylkarnitinů, mimo jiné také **C4** a **C3-DC/C4-OH**, které byly diskriminující i v naší analýze. Obecně se udává, že s perinatální asfyxií souvisí zvýšení celkových acylkarnitinů (Meyburg *et al.*, 2001).

Snížené hladiny intermediátu Krebsova cyklu, **akonitátu**, pozorovali u vzorků moči asfyktických novorozenců Longini a kol. (2015). Akonitát je ve *trans* formě substrátem enzymu trans-akonitát-2-methyltransferázy, v *cis* formě pak intermediátem Krebsova cyklu vznikající dehydratací citrátu.

Další z meziproductů tohoto cyklu, **sukcinát**, bývá v literatuře často zmiňovaným potencionálním biomarkerem perinatální asfyxie. Beckstrom a kol. (2011) pozorovali jeho zvýšené koncentrace v krvi u primátů s PA. Reinke a kol. (2013) zjistili závislost zvyšující se hladiny sukcinátu na závažnosti hypoxicko-ischemické encefalopatie. Výsledky naší studie prokázaly u novorozenců s PA zvýšenou hladinu sukcinátu/methylmalonátu (v rámci analýzy se nepodařilo tyto látky rozlišit), viz obrázek 25. Chu a kol. (2006) identifikovali ve vzorcích moči methylmalonát jako organickou kyselinu, která byla výrazně zvýšena u novorozenců s PA oproti zdravým kontrolám a zároveň její hladiny byly mnohem vyšší u novorozenců s HIE nebo u těch, kteří zemřeli.



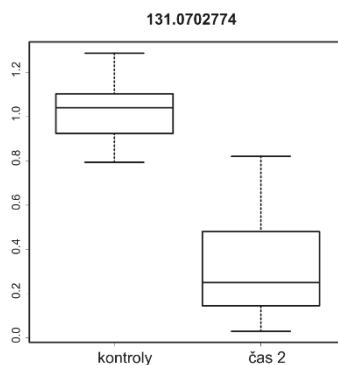
**Obrázek 25: Box-plot sukcinátu/methylmalonátu**

Jako biomarker perinatální asfyxie je v literatuře často uváděn **hypoxantin**. Jeho zvýšené hladiny v závislosti na prodělané hypoxii byly pozorovány v moči (Walker *et al.*, 1996) a také např. v plasmě (Thiringer *et al.*, 1980). V rámci naší cílené analýzy se sice podařilo hypoxantin identifikovat, ale z důvodu vysoké koncentrace byl

z konečného vyhodnocení vyřazen. Při asfyxii dochází k porušení rovnováhy mezi produkcí a spotřebou ATP a k zvýšené akumulaci produktů jeho degradace, jako je adenosin, hypoxantin a inosin. Hypoxantin bývá dále metabolizován xantinoxidázou na xantin, avšak za hypoxicko-ischemických podmínek tento proces neprobíhá (Basu *et al.*, 2008). Při reoxygenaci, kdy začne být xantinoxidáza aktivní, mohou vysoké hladiny hypoxantinu přispívat k progresi poškození tkání a orgánů, z důvodu generování velkého množství volných kyslíkových radikálů (Pietz *et al.*, 1988).

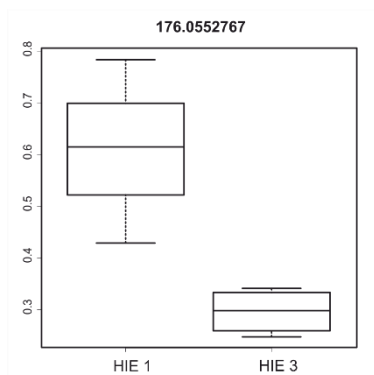
Pro získání diskriminujících metabolitů souvisejících se závažností hypoxicko-ischemického poškození mozku, byly statistické metody PLS-DA a OPLS-DA aplikovány také samostatně na vzorky pacientů odebrané v čase 2. Tyto vzorky byly rozděleny do tří skupin podle neurologických následků (normální nález, lehké a těžké poškození). U těžkého poškození byl oproti pacientům s normálním nálezem výrazně zvýšen laktát a některá z hexóz - glukóza/fruktóza/galaktóza/manóza, snížen byl 2-oxoglutarát, akonitát a orotát. Tento výsledek naznačuje výraznější preferenci anaerobní glykolýzy.

**Necílenou metabolomickou analýzou** bylo nalezeno celkem 1583 píků. Analýzou vzorků moči kontrolních a asfyktických novorozenců v čase 2 byl, s přesnou hmotou 131.0702774, jako potencionální metabolit identifikován ketoleucin (2-oxoisokapronová kys.) nebo 3-methyl-2-oxovalerát (2-oxo-3-methylvalerát). Obě tyto látky našli Walker a Mills (1992) ve své studii u asfyktických pacientů, ale nikoliv u kontrol. Naše výsledky ovšem ukázaly zvýšení hladiny této hmoty u kontrolních pacientů, viz obrázek 26.



**Obrázek 26: Box-plot přesné hmoty  $m/z$  131.0702774**

Při vzájemném srovnávání vzorků pacientů s normálním nálezem a s těžkým neurologickým poškozením byl, s přesnou hmotou  $m/z$  176.0552767, jako potenciální metabolit identifikován N-acetylaspartát. Jeho snížení bylo pozorováno u akutních stavů poškození mozku a obvykle je interpretováno jako známka ireverzibilní ztráty neuronů (Stefano *et al.*, 1995). Naše studie prokázala snížení hladiny této  $m/z$  u pacientů s normálním nálezem oproti těm s těžkým poškozením, viz obrázek 27.



**Obrázek 27: Box-plot přesné hmoty  $m/z$  176.0552767**

## ZÁVĚR

---

V rámci teoretické části byla vypracována literární rešerše na téma perinatální asfyxie, hypoxicko-ischemická encefalopatie a neuroprotektce. Navazující kapitoly se zabývaly metabolomikou a necíleným metabolomickým přístupem v analýze vzorků moči. Rozvedeno bylo také téma hmotnostní spektrometrie, kde byl popsán hybridní hmotnostní spektrometr Orbitrap Elite. Stručně byly zmíněny také některé statistické metody zpracování dat.

V experimentální části byla provedena cílená a necílená analýza vzorků moči za pomoci kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií. V rámci cílené analýzy bylo ve vzorcích moči novorozenců identifikováno 148 látek, necíleným přístupem bylo nalezeno celkem 1583 píků. Pomocí statistických přístupů bylo prokázáno odlišení metabolických profilů vzorků moči novorozenců s perinatální asfyxií, které byly odebrány v čase 2, tedy 7-11,5 hodin po porodu (3-5 hodin po zahájení hypotermie) od kontrolních vzorků odebraných v témže čase. Byly zjištěny nejvíce diskriminující metabolity pro skupinu asfyktických a zdravých novorozenců. Cílenou analýzou byly u asfyktických novorozenců oproti kontrolním nalezeny výrazně zvýšené hladiny laktátu, 2-hydroxyisobutyátu/2-hydroxybutyátu/4-hydroxybutyátu, 2-hydroxyisovalerátu a acylkarnitinů C3, C3-DC/C4-OH, C5. Sníženy byly hladiny orotátu a akonitátu. Mezi potencionálními metabolity identifikovanými necílenou analýzou byl ketoleucin a 3-methyl-2-oxovalerát, tyto látky byly již dříve nalezeny ve vzorcích moči v souvislosti s perinatální asfyxií. Pro nalezení biomarkerů vhodných pro posouzení závažnosti neurologického poškození byly statistické metody aplikovány také samostatně na vzorky pacientů odebraných v čase 2. Byly srovnávány metabolické profily pacientů s normálním nálezem a s těžkým poškozením. U pacientů s těžkým poškozením byl výrazně zvýšen laktát a některá z hexóz - glukóza/fruktóza/galaktóza/manóza, snížen byl 2-oxoglutarát, akonitát a orotát. Mezi nalezenými *m/z* byl identifikován mimo jiné N-acetylaspartát, spojovaný s akutním poškozením mozku.

Na tuto práci bude navazovat klinická studie, zahrnující větší počet kontrol a asfyktických pacientů.

# LITERATURA

---

## 1. Seznam použité literatury

American Academy of Pediatrics, Committee on Fetus and Newborn, American College of Obstetricians and Gynecologists, Committee on Obstetric Practice (2006): The Apgar score. *Pediatrics*, 117:1444-1447.

American College of Obstetricians and Gynecologists (2003): Neonatal encephalopathy and cerebral palsy: defining the pathogenesis and pathophysiology. American College of Obstetricians and Gynecologists, Washington D. C., 94 s.

Anslow P. (1998): Birth asphyxia. *European journal of radiology*, 26(2): 148-153.

Atzori L., Xanthos T., Barberini L., Antonucci R. Murgia F., Lussu M., Fanos V. (2010): A metabolomic approach in an experimental model of hypoxia-reoxygenation in newborn piglets: urine predicts outcome. *Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine*, 23(S3): 134-137.

Azzopardi D., Brocklehurst P., Edwards D., Halliday H., Levene M., Thoresen M., Whitelaw A. (2008): The TOBY Study. Whole body hypothermia for the treatment of perinatal asphyxial encephalopathy: a randomised controlled trial. *BMC pediatrics*, 8(1): 17.

Bajad S. U., Lu W., Kimball E. H., Yuan J., Peterson C., Rabinowitz J. D. (2006): Separation and quantitation of water soluble cellular metabolites by hydrophilic interaction chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1125(1): 76-88.

Barbas C., Morales E. P., Villasenor A. (2011): Capillary electrophoresis as a metabolomics tool for non-targeted fingerprinting of biological samples. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 55(4): 823-831.

Basu P., Som S., Choudhuri N., Das H. (2008): Correlation between Apgar score and urinary uric acid to creatinine ratio in perinatal asphyxia. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 23(4): 361-364.

Beckstrom A. C., Humston E. M., Snyder L. R., Synovec R. E., Juul S. E. (2011): Application of comprehensive two-dimensional gas chromatography with time-of-flight mass spectrometry method to identify potential biomarkers of perinatal asphyxia in a non-human primate model. *Journal of Chromatography A*, 1218(14): 1899-1906.

Bednařík J., Ambler Z., Růžička E. (2010): *Klinická Neurologie: část Speciální*. Triton, Praha, 975 s.

Benton H. P., Want E. J., Ebbels T. M. D. (2010): Correction of mass calibration gaps in liquid chromatography-mass spectrometry metabolomics data, *Bioinformatics*, 26: 2488.

Bonfoco E., Krainc D., Ankarcona M., Nicotera P., Lipton S. A. (1995): Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(16): 7162-7166.

Cai Z., Lin S., Fan L. W., Pang Y., Rhodes P. G. (2006): Minocycline alleviates hypoxic-ischemic injury to developing oligodendrocytes in the neonatal rat brain. *Neuroscience*, 137(2): 425-435.

Carloni S., Girelli S., Buonocore G., Longini M., Balduini W. (2009): Simvastatin acutely reduces ischemic brain damage in the immature rat via Akt and CREB activation. *Experimental neurology*, 220(1): 82-89.

- Cleveland W. S., Devlin S. J. (1988): Locally weighted regression: an approach to regression analysis by local fitting. *Journal of the American Statistical Association*, 83: 596-610.
- Commisso M., Strazzer P., Toffali K., Stocchero M., Guzzo F. (2013): Untargeted metabolomics: an emerging approach to determine the composition of herbal products. *Computational and structural biotechnology journal*, 4(5): 1-7.
- Dass C. (2007): *Fundamentals of contemporary mass spectrometry*. John Wiley and Sons, New Jersey, 512 s.
- David H. N., Haelewyn B., Rouillon C., Lecoq M., Chazalviel L., Apiou G., Abraini J. H. (2008): Neuroprotective effects of xenon: a therapeutic window of opportunity in rats subjected to transient cerebral ischemia. *The FASEB Journal*, 22(4): 1275-1286.
- Ducrocq S., Benjelloun N., Plotkine M., Ben-Ari Y., Charriaut-Marlangue C. (2000): Poly(ADP-ribose) synthase inhibition reduces ischemic injury and inflammation in neonatal rat brain. *Journal of Neurochemistry*, 74(6): 2504-2511.
- Dunn W. B., Erban A., Weber R. J., Creek D. J., Brown M., Breitling R., Viant M. R. (2013): Mass appeal: metabolite identification in mass spectrometry-focused untargeted metabolomics. *Metabolomics*, 9(1): 44-66.
- Fan X., Heijnen C. J., van der Kooij M. A., Groenendaal F., van Bel F. (2009): The role and regulation of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  expression in brain development and neonatal hypoxic-ischemic brain injury. *Brain research reviews*, 62(1): 99-108.
- Fanos V., Antonucci R., Barberini L., Noto A., Atzori L. (2012): Clinical application of metabolomics in neonatology. *Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine*, 25(S1): 104-109.
- Fellman V., Raivio K. O. (1997): Reperfusion injury as the mechanism of brain damage after perinatal asphyxia. *Pediatric research*, 41(5): 599-606.
- Fernández-Peralbo M. A., de Castro M. L. (2012): Preparation of urine samples prior to targeted or untargeted metabolomics mass-spectrometry analysis. *Trends in Analytical Chemistry*, 41: 75-85.
- Foster-Barber A., Dickens B., Ferriero D. M. (2000): Human perinatal asphyxia: correlation of neonatal cytokines with MRI and outcome. *Developmental neuroscience*, 23(3): 213-218.
- Gall W. E., Beebe K., Lawton K. A., Adam K. P., Mitchell M. W., Nakhle P. J., the RISC Study Group (2010):  $\alpha$ -Hydroxybutyrate is an early biomarker of insulin resistance and glucose intolerance in a nondiabetic population. *PLoS One*, 5(5): e10883.
- Galoczová M. (2013): *Metabolitové profilování moči novorozenců s perinatální asfyxií*. Univerzita Palackého Olomouc, 66 s.
- Gardner S. L., Carter B. S., Enzman-Hines M. I., Hernandez J. A. (2010): *Merenstein and Gardner's handbook of neonatal intensive care*. Elsevier Health Sciences, Philadelphia, 1040 s.
- Geladi P., Kowalski B. (1986): Partial Least-Squares Regression: a Tutorial. *Analytica chimica acta*, 185: 1-17.
- Gonzalez F. F., Ferriero D. M. (2008): Therapeutics for neonatal brain injury. *Pharmacology and therapeutics*, 120(1): 43-53.
- Hájek Z., Čech E., Maršál K. (2014): *Porodnictví*. Grada Publishing, Praha, 538 s.
- Hamrick S. E., McQuillen P. S., Jiang X., Mu D., Madan A., Ferriero D. M. (2005): A role for hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  in desferoxamine neuroprotection. *Neuroscience Letters*, 379(2): 96-100.

- Han B. H., Xu D., Choi J., Han Y., Xanthoudakis S., Roy S., Holtzman D. M. (2002): Selective, reversible caspase-3 inhibitor is neuroprotective and reveals distinct pathways of cell death after neonatal hypoxic-ischemic brain injury. *Journal of Biological Chemistry*, 277(33): 30128-30136.
- Hanrahan J. D., Cox I. J., Edwards A. D., Cowan F. M., Sargentoni J., Bell J. D., Azzopardi D. (1998): Persistent increases in cerebral lactate concentration after birth asphyxia. *Pediatric research*, 44(3): 304-311.
- Hu Q., Noll R. J., Li H., Makarov A., Hardman M., Cooks R. G. (2005): The Orbitrap: a new mass spectrometer. *Journal of mass spectrometry*, 40(4): 430-443.
- Chen H. S., Lipton S. A. (2006): The chemical biology of clinically tolerated NMDA receptor antagonists. *Journal of Neurochemistry*, 97(6): 1611-1626.
- Cheng Y., Gidday J. M., Yan Q., Shah A. R., Holtzman D. M. (1997): Marked age-dependent neuroprotection by brain-derived neurotrophic factor against neonatal hypoxic-ischemic brain injury. *Annals of neurology*, 41(4): 521-529.
- Christie W. W. (2013): Carnitine and acylcarnitines structure, occurrence, biology and analysis. [lipidlibrary.aocs.org/Lipids/carnitin/file.pdf](http://lipidlibrary.aocs.org/Lipids/carnitin/file.pdf), 1-4.
- Chu C. Y., Xiao X., Zhou X. G., Lau T. K., Rogers M. S., Fok T. F., Wang C. C. (2006): Metabolomic and bioinformatic analyses in asphyxiated neonates. *Clinical biochemistry*, 39(3): 203-209.
- James A., Cherian S. (2010): Pathophysiology of perinatal hypoxia-ischaemia. *Paediatrics and Child Health*, 20(8): 351-355.
- James A., Patel V. (2014): Hypoxic ischaemic encephalopathy. *Paediatrics and Child Health*, 24(9): 385-389.
- Jedlička P., Keller O. (2005): Speciální neurologie, Galén, Praha, 424 s.
- Johnston B. M., Mallard E. C., Williams C. E., Gluckman P. D. (1996): Insulin-like growth factor-1 is a potent neuronal rescue agent after hypoxic-ischemic injury in fetal lambs. *Journal of Clinical Investigation*, 97(2): 300.
- Kolářová R., Hálek J., Kantor L., Pokorná P., Vobruba V., Tkaczyk J., Zoban P. (2011): Řízená hypotermie v léčbě hypoxicko-ischemické encefalopatie. *Neonatologické Listy*, 17(2): 19-27.
- Kučera J. (2008): Metody kategorizace dat. Masarykova Univerzita Brno, 37 s.
- Kuhl C., Tautenhahn R., Boettcher C., Larson T. R., Neumann S. (2012): CAMERA: an integrated strategy for compound spectra extraction and annotation of liquid chromatography/mass spectrometry data sets. *Analytical Chemistry*, 84(1): 283-289.
- Landaas S., Jakobs C. (1977): The occurrence of 2-hydroxyisovaleric acid in patients with lactic acidosis and ketoacidosis. *Clinica Chimica Acta*, 78(3): 489-493.
- Landaas S., Pettersen J. E. (1975): Clinical conditions associated with urinary excretion of 2-hydroxybutyric acid. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, 35(3): 259-266.
- Levene M. I., Chervenak F. A. (2009): Fetal and neonatal neurology and neurosurgery. Elsevier Health Sciences, Philadelphia, 921 s.
- Loidl C. F. (1997): Asphyxia during birth: biochemical and morphological study in basal ganglia: implication of hypothermia. Universiteit Maastricht, 96 s.



- Longini M., Giglio S., Perrone S., Vivi A., Tassini M., Fanos V., Buonocore G. (2015): Proton nuclear magnetic resonance spectroscopy of urine samples in preterm asphyctic newborn: A metabolomic approach. *Clinica Chimica Acta*, 444: 250-256.
- Lou H. C., Tweed W. A., Davies J. M. (1985): Preferential blood flow increase to the brain stem in moderate neonatal hypoxia: reversal by naloxone. *European Journal of Pediatrics*, 144: 225-7.
- Low J. A. (1997): Intrapartum fetal asphyxia: definition, diagnosis, and classification. *American journal of obstetrics and gynecology*, 176(5): 957-959.
- Makarov A. (2000): Electrostatic axially harmonic orbital trapping: a high-performance technique of mass analysis. *Analytical chemistry*, 72(6): 1156-1162.
- Makarov A., Scigelova M. (2010): Coupling liquid chromatography to Orbitrap mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1217(25): 3938-3945.
- Mapelli V., Olsson L., Nielsen J. (2008): Metabolic footprinting in microbiology: methods and applications in functional genomics and biotechnology. *Trends in biotechnology*, 26(9): 490-497.
- Marro P. J., Mishra O. P., Delivoria-Papadopoulos M. (2006): Effect of allopurinol on brain adenosine levels during hypoxia in newborn piglets. *Brain research*, 1073: 444-450.
- Maršál K., Hájek Z., Kudela M., Čech E., Srp B., Nejtková J. (2006): *Porodnictví*. Grada Publishing, Praha, 544 s.
- Masopust J., Průša R. (1999): *Patobiochemie metabolických drah*, Univerzita Karlova Praha, 182 s.
- Meloun M., Militký J. (2012): *Kompendium statistického vypracování dat*. Karolinum, Praha, 982 s.
- Menkes J. H., Sarnat H. B., Maria B. L. (2011): *Dětská Neurologie*. Triton, Praha, 1069 s.
- Meyburg J., Schulze A., Kohlmüller D., Linderkamp O., Mayatepek E. (2001): Postnatal changes in neonatal acylcarnitine profile. *Pediatric research*, 49(1): 125-129.
- Morales M., Bustamante D., Espina-Marchant P., Neira-Peña T., Gutiérrez-Hernández M. A., Allende-Castro C., Rojas-Mancilla E. (2011): Pathophysiology of perinatal asphyxia: can we predict and improve individual outcomes? *EPMA Journal*, 2(2): 211-230.
- Northington F. J., Zelaya M. E., O'Riordan D. P., Blomgren K., Flock D. L., Hagberg H., Martin L. J. (2007): Failure to complete apoptosis following neonatal hypoxia-ischemia manifests as "continuum" phenotype of cell death and occurs with multiple manifestations of mitochondrial dysfunction in rodent forebrain. *Neuroscience*, 149(4): 822-833.
- Olsen J. V., Schwartz J. C., Griep-Raming J., Nielsen M. L., Damoc E., Denisov E., Horning S. (2009): A dual pressure linear ion trap Orbitrap instrument with very high sequencing speed. *Molecular and cellular proteomics*, 8(12): 2759-2769.
- Pasternak J. F. (1993): Hypoxic-ischemic brain damage in the term infant. Lessons from the laboratory. *Pediatric clinics of North America*, 40(5): 1061-1072.
- Patti G. J., Yanes O., Siuzdak G. (2012): Innovation: Metabolomics: the apogee of the omics trilogy. *Nature reviews Molecular cell biology*, 13(4): 263-269.
- Pettersen J. E., Landaas S., Eldjarn L. (1973): The occurrence of 2-hydroxybutyric acid in urine from patients with lactic acidosis. *Clinica Chimica Acta*, 48(2): 213-219.
- Pietz J., Guttenberg N., Gluck L. (1988): Hypoxanthine: a marker for asphyxia. *Obstetrics and Gynecology*, 72(5): 762-766.

- Putri S. P., Nakayama Y., Matsuda F., Uchikata T., Kobayashi S., Matsubara A., Fukusaki E. (2013): Current metabolomics: practical applications. *Journal of bioscience and bioengineering*, 115(6): 579-589.
- Rawls S. M., Thomas T., Adeola M., Patil T., Raymondi N., Poles A., Raffa R. B. (2009): Topiramate antagonizes NMDA-and AMPA-induced seizure-like activity in planarians. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 93(4): 363-367.
- Reinke S. N., Walsh B. H., Boylan G. B., Sykes B. D., Kenny L. C., Murray D. M., Broadhurst D. I. (2013): <sup>1</sup>H NMR Derived Metabolomic Profile of Neonatal Asphyxia in Umbilical Cord Serum: Implications for Hypoxic Ischemic Encephalopathy. *Journal of Proteome Research*, 12(9): 4230-4239.
- Ryang Y. M., Fahlenkamp A. V., Rossaint R., Wesp D., Loetscher P. D., Beyer C., Coburn M. (2011): Neuroprotective effects of argon in an in vivo model of transient middle cerebral artery occlusion in rats. *Critical care medicine*, 39(6): 1448-1453.
- Sarnat H. B., Sarnat M. S. (1976): Neonatal encephalopathy following fetal distress: a clinical and electroencephalographic study. *Archives of neurology*, 33(10): 696-705.
- Saugstad O. D. (1996): Mechanisms of tissue injury by oxygen radicals: implications for neonatal disease. *Acta Paediatrica*, 85(1): 1-4.
- Scigelova M., Makarov A. (2006): Orbitrap mass analyzer-overview and applications in proteomics. *Proteomics*, 6(S2): 16-21.
- Seidl R., Stöckler-Ipsiroglu S., Rolinski B., Kohlhauser C., Herkner K. R., Lubec B., Lubec G. (2000): Energy metabolism in graded perinatal asphyxia of the rat. *Life sciences*, 67(4): 421-435.
- Shah G. S., Singh R., Das B. K. (2005): Outcome of newborns with birth asphyxia. *Journal of Nepal Medical Association*, 44(158): 44-46.
- Shankaran S., Lupton A. R., Ehrenkranz R. A., Tyson J. E., McDonald S. A., Donovan E. F., Jobe A. H. (2005): Whole-body hypothermia for neonates with hypoxic-ischemic encephalopathy. *New England Journal of Medicine*, 353(15): 1574-1584.
- Smith C. A., Want E. J., O'Maille G., Abagyan R., Siuzdak G. (2006): XCMS: Processing mass spectrometry data for metabolite profiling using nonlinear peak alignment, matching and identification, *Analytical Chemistry*, 78: 779-787.
- Sola A., Rogido M., Lee B. H., Genetta T., Wen T. C. (2005): Erythropoietin after focal cerebral ischemia activates the janus kinase-signal transducer and activator of transcription signaling pathway and improves brain injury in postnatal day 7 rats. *Pediatric Research*, 57(4): 481-487.
- Stables D., Rankin J. (2010): *Physiology in childbearing: with anatomy and related biosciences*. Elsevier Health Sciences, 621-622.
- Stefano N. D., Matthews P. M., Arnold D. L. (1995): Reversible decreases in N-acetylaspartate after acute brain injury. *Magnetic Resonance in Medicine*, 34(5): 721-727.
- Tautenhahn R., Boettcher Ch., Neumann S. (2008): Highly sensitive feature detection for high resolution LC/MS *BMC Bioinformatics*, 9: 504.
- Theodoridis G. A., Gika H. G., Want E. J., Wilson I. D. (2012): Liquid chromatography-mass spectrometry based global metabolite profiling: a review. *Analytica chimica acta*, 711: 7-16.
- Thermo Fisher Scientific (2011): *Orbitrap Elite Hardware Manual (P/N 1288170, Revision A)*.
- Thiringer K., Saugstad O. D., Kjellmer I. (1980): Plasma hypoxanthine in exteriorized, acutely asphyxiated fetal lambs. *Pediatric Research*, 14: 905-909.

- Thompson C. M., Puterman A. S., Linley L. L., Hann F. M., Elst C. V. D., Molteno C. D., Malan A. F. (1997): The value of a scoring system for hypoxic ischaemic encephalopathy in predicting neurodevelopmental outcome. *Acta paediatrica*, 86(7): 757-761.
- Trethewey R. N. (2004): Metabolite profiling as an aid to metabolic engineering in plants. *Current opinion in plant biology*, 7(2): 196-201.
- Türkyilmaz C., Türkyilmaz Z., Atalay Y., Söylemezoglu F., Celasun B. (2002): Magnesium pre-treatment reduces neuronal apoptosis in newborn rats in hypoxia-ischemia. *Brain research*, 955(1): 133-137.
- Vinayavekhin N., Homan E. A., Saghatelian A. (2009): Exploring disease through metabolomics. *ACS chemical biology*, 5(1): 91-103.
- Vinayavekhin N., Saghatelian A. (2010): Untargeted metabolomics. *Current Protocols in Molecular Biology*, 30-1.
- Vuckovic D. (2012): Current trends and challenges in sample preparation for global metabolomics using liquid chromatography-mass spectrometry. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 403(6): 1523-1548.
- Walker V., Bennet L., Mills G. A., Green L. R., Gnanakumaran K., Hanson M. A. (1996): Effects of hypoxia on urinary organic acid and hypoxanthine excretion in fetal sheep. *Pediatric research*, 40(2): 309-318.
- Walker V., Mills G. A. (1992): Effects of birth asphyxia on urinary organic acid excretion. *Neonatology*, 61(3): 162-172.
- Walsh B. H., Broadhurst D. I., Mandal R., Wishart D. S., Boylan G. B., Kenny L. C., Murray D. M. (2012): The metabolomic profile of umbilical cord blood in neonatal hypoxic ischaemic encephalopathy. *PloS one*, 7(12): e50520.
- Want E. J., Wilson I. D., Gika H., Theodoridis G., Plumb R. S., Shockcor J., Nicholson J. K. (2010): Global metabolic profiling procedures for urine using UPLC-MS. *Nature protocols*, 5(6): 1005-1018.
- Whitmer J. T., Idell-Wenger J. A., Rovetto M. J., Neely J. R. (1978): Control of fatty acid metabolism in ischemic and hypoxic hearts. *The Journal of Biological Chemistry*, 253: 4305-4309.
- Wiklund S. (2008): *Multivariate Data Analysis for Omics*. Umetrics, Umeå, 228 s.
- Yuan J., Yankner B. A. (2000): Apoptosis in the nervous system. *Nature*, 407: 802-9.
- Zhang Z. G., Zhang L., Jiang Q., Zhang R., Davies K., Powers C., Chopp M. (2000): VEGF enhances angiogenesis and promotes blood-brain barrier leakage in the ischemic brain. *Journal of Clinical Investigation*, 106(7): 829.
- Zubarev R. A., Makarov A. (2013): Orbitrap mass spectrometry. *Analytical chemistry*, 85(11): 5288-5296.

## 2. Seznam hypertextových odkazů

<https://metlin.scripps.edu>

<https://xcmsonline.scripps.edu>

<http://www.hmdb.ca>

<http://www.lipidmaps.org>

<http://www.r-project.org>

<http://www.thermoscientific.com/en/community/metabolomics.html> [cit. 2015-04-15]

[http://www.who.int/maternal\\_child\\_adolescent/topics/maternal/maternal\\_perinatal/en](http://www.who.int/maternal_child_adolescent/topics/maternal/maternal_perinatal/en) [cit. 2015-02-18]

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

---

<sup>1</sup> H NMR-MS	protonová nukleární rezonanční spektroskopie (proton nuclear magnetic resonance spectroscopy)
ADP	adenosindifosfát
aEEG	amplitudou integrovaný elektroencefalogram
AMP	adenosinmonofosfát
AMPA	α-amino-hydroxy-5-methyl-izoxazol propionát
ATP	adenosintrifosfát
BAD	Bcl-2 - asociovaný promotér smrti (Bcl-2 associated death promoter)
BAX	Bcl-2 - asociovaný X protein (Bcl-2 associated X protein)
Bcl-2	lymfom B-buněk 2 (B-cell lymphoma 2)
BDNF	mozkový neurotrofní faktor (brain-derived neurotrophic factor)
BE	přebytek bází (base excess)
BNIP-3	Bcl-2/adenovirus E1B 19 kDa protein-interagující protein 3 (Bcl-2/adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 3)
C10	dekanoylkarnitin
C10:1	dekenoylkarnitin
C10:2	dekadienylkarnitin
C12	dodekanoylkarnitin
C12:1	dodekenoylkarnitin
C14	tetradekanoylkarnitin
C14:2	tetradekadienylkarnitin
C14:2-OH	hydroxytetradekadienylkarnitin
C16	hexadekanoylkarnitin
C16:1	hexadekenoylkarnitin
C16:1-OH	hydroxyhexadekenoylkarnitin
C16:2	hexadekadienylkarnitin
C16:2-OH	hydroxyhexadekadienylkarnitin
C2	acetylkarnitin
C3	propionylkarnitin
C3-DC; C4-OH	malonylkarnitin; hydroxybutyrylkarnitin
C4	butyrylkarnitin
C4:1	butenoylkarnitin
C4-DC; C5-OH	methylnalonylkarnitin; hydroxyvalerylkarnitin
C5	valerylkarnitin
C5:1	tiglylkarnitin
C5-DC; C6-OH	glutaryl karnitin; hydroxyhexanoylkarnitin
C6	hexanoylkarnitin
C6-1	hexenoylkarnitin
C7-DC; C8-OH	pimelylkarnitin; hydroxyoktanoylkarnitin
C8	oktanoylkarnitin
C8:1	oktenoylkarnitin
C9	nonanoylkarnitin
CA	shluková analýza (cluster analysis)
CE	kapilární elektroforéza (capillary electrophoresis)
CV	variační koeficient (coefficient of variation)
DA	diskriminační analýza (discriminant analysis)
DAMPs	molekulární vzory asociované s poškozením (damage-associated molecular patterns)
DIMS	hmotnostní spektrometrie s přímým nástřikem (direct-infusion mass spectrometry)
DMO	dětská mozková obrna
DNA	deoxyribonukleová kyselina
eNOS	endoteliální syntáza oxidu dusnatého (endothelial nitric oxid synthase)
EPO	erythropoetin
FAD	flavinadenindinukleotid
FADH <sub>2</sub>	redukovaný flavinadenindinukleotid
FGAr	fosforibosyl-N-formylglycinamid

FT-ICR	iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací (Fourier transform ion cyclotron resonance)
GC	plynová chromatografie (gas chromatography)
GC-MS	plynová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií (gas chromatography-mass spectrometry)
GCxGC-MS	komprehenzivní dvourozměrná plynová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií (comprehensive two-dimensional gas chromatography-mass spectrometry)
HCD	vysokoenergetická kolizní disociace (higher-energy collisional dissociation)
HIE	hypoxicko-ischemická encefalopatie
HIF-1 $\alpha$	hypoxií-indukovatelný transkripční faktor 1 alfa (hypoxia-inducible factor 1 alpha)
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (high performance liquid chromatography)
IGF-1	inzulinu podobný růstový faktor 1 (insulin-like growth factor 1)
IL-10	interleukin 10
IL-1 $\beta$	interleukin 1 beta
IL-6	interleukin 6
INF $\gamma$	interferon gamma
iNOS	inducibilní syntáza oxidu dusnatého (inducible nitric oxid synthase)
K1-K25	kontrolní vzorek 1-25
LC	kapalinová chromatografie (liquid chromatography)
LC-MS	kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií (liquid chromatography-mass spectrometry)
MMP-3	metaloproteináza 3
MMP-9	metaloproteináza 9
MRM	sledování produktu rozpadu molekulárního iontu (multiple reaction monitoring)
MS	hmotnostní spektrometrie (mass spectrometry)
MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie (tandem mass spectrometry)
NAD <sup>+</sup>	nikotinamid adenin dinukleotid
NADH	redukovaný nikotinamid adenin dinukleotid
NF- $\kappa$ B	jaderný faktor kappa B (nuclear factor kappa B)
NMDA	N-methyl-D-aspartát
NMR	nukleární magnetická rezonance (nuclear magnetic resonance)
nNOS	neuronální syntáza oxidu dusnatého (neuronal nitric oxid synthase)
NOS	syntáza oxidu dusnatého (nitric oxid synthase)
OPLS	ortogonální metoda dílčích nejmenších čtverců (orthogonal partial least squares)
OPLS-DA	ortogonální diskriminační analýza částečných nejmenších čtverců (orthogonal partial least squares discriminant analysis)
p1-p9	pacient 1-9
p53	protein 53
PA	perinatální asfyxie
pADPr	poly-ADP-ribózový polymer
PARP-1	poly-ADP-ribózopolymeráza 1
PC	hlavní komponenta (principal component)
PCA	analýza hlavních komponent (principal component analysis)
PLS	metoda dílčích nejmenších čtverců (partial least squares)
PLS-DA	diskriminační analýza nejmenších čtverců (partial least squares discriminant analysis)
PRM	psychomotorická retardace
PUFA	polynenasycené mastné kyseliny (polyunsaturated fatty acids)
QC	vzorek kontroly kvality (quality control)
RNS	volné dusíkové radikály (reactive nitrogen species)
ROS	volné kyslíkové radikály (reactive oxygen species)
RTG	rentgen
SAICAr	fosforibosylaminoimidazolesukcinokarboxamid
t1-t6	odběrový čas 1-6
TLRs	receptory podobné genu Toll (Toll-like receptors)
TNF $\alpha$	faktor nádorové nekrózy $\alpha$ (tumor necrosis factor $\alpha$ )
TOBY	celotělová hypotermie (total body hypothermia)
TOF	analýzátor doby letu (time-of-flight)
ÚMTM	Ústav molekulární a translační medicíny
VEGF	vaskulární endoteliální růstový faktor (vascular endothelial growth factor)

# PŘÍLOHY

## Příloha I.

**Tabulka 1: Metabolity identifikované v moči novorozenců - nerozlišitelné metabolity (stejný MRM přechod a stejný retenční čas) jsou uvedeny za sebou a odděleny středníkem**

acylkarnitiny	aminy/alkoholy	aminokyseliny	aminokyseliny
C10	3-methoxytyramin	2-aminoadipát	ornithin
C10:1	5-aminolevulinát; kreatin	2-furoylglycin	prolin
C10:2	normetanefrin	2-methylbutyrylglycin; isovalerylglycin	propionylglycin
C12	porfobilinogen	3-aminoisobutyrate	S-adenosyl-L-methionin
C12:1	spermin	alanin; sarkosin; beta-alanin	serin
C14	N-acetylputrescin	arginin	sukcinyladenoin
C14-2OH	N-methylhistamin	asparagin	taurin
C16	ethanolaminofosfát	aspartát	threonin; homoserin
C16:1	cholin	citruin	tiglylglycin; methylkrotonylglycin
C16:1-OH	myoinositol	cystathionin	tryptofan
C16:2		cystein	tyrosin
C16:2-OH		cystin	valin
C2		fenylalanin	
C3		fenylserin	
C3-DC; C4-OH		glutamát	
C4		glutamin	
C4:1		glycin	
C4-DC; C5-OH		hexanoylglycin	
C5		histidin	
C5:1		homoarginin	
C5-DC; C6-OH		isobutyrylglycin; butyrylglycin	
C6		kynurenin	
C6:1		leucin; isoleucin; alloisoleucin; norleucin; hydroxyprolin	
C7-DC; C8-OH		lysin	
C8		methionin	
C8:1		N,N-dimethylarginin	
C9		N,N-dimethylglycin; 2-aminoisobutyrate	
karnitin		N-acetylaspartát	
		N-acetylglutamát	
		N-methylhistidin; 3-methylhistidin	
		2-furoylglycin	

**pokračování tabulky 1**

<b>org.kyseliny</b>	<b>puriny/pyrimidiny</b>	<b>sacharidy</b>	<b>peptidy</b>
2-hydroxyglutarát	1-methylxanthin	1,6-anhydro-D-glukóza	alanyl-fenylalanin
2-hydroxyisobutyrát; 2-hydroxybutyrát; 4-hydroxybutyrát	5-methylthioadenosin	fukóza	glycyl-fenylalanin
2-hydroxyisovalerát	adenin	galaktitol; manitol	glycyl-leucin; glycyl-norleucin
2-oxoglutarát	adenosin	glukonát	homokarnosin
3-ureidopropionát	allantoin	glukosamin	karnosin
4-guanidinobutanoát	cytidin	glukóza; fruktóza; galaktóza; manóza	leucyl-leucin
5-hydroxyindolacetát	cytosin	glukuronát	
akonitát	deoxyguanosin	melibióza; sukróza; laktóza; maltóza	
citrát; isocitrát	deoxyinosin	ribitol; arabitol	
fumarát; kys. kapronová; 3-methyl- 2-oxobutanoát	FGAr	ribóza	
glycerát	guanosin	xylulóza	
guanidinoacetát	inosin		
hippurát	pseudouridin		
homovanilát	SAICAr		
hydrocinamát	uracil		
indoxylsulfát	uridin		
kynurenát	xanthin		
kys. arachidonová	xanthosin		
kys. dokosaheptaenová			
kys. sebaková			
kys. sialová			
laktát			
malát			
malonát; 3-hydroxybutanoát			
orotát			
oxaloacetát; glutarát; ethylmalonát			
suberát			
sukcinát; methylmalonát			
tartarát			
threonát			
vanilmandelát			
xanthurenát			