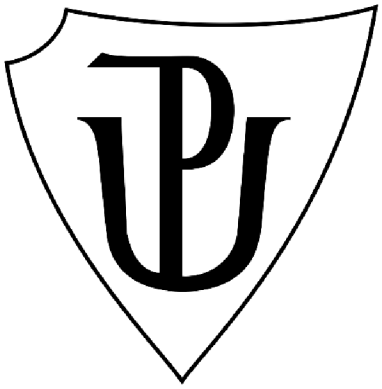
UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Vývoj LC-MS/MS metody pro stanovení biomarkerů atypické myopatie koní ze suché krevní skvrny

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	**Bc. Martina Kadláčková**
Studijní program:	N0512A130009 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	**Mgr. Dana Dobešová**
Konzultant:	**Mgr. Eliška Ivanovová**
Rok:	2024

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním diplomové práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne 22. 4. 2024 .....

Podpis studenta

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucí mé diplomové práce Mgr. Daně Dobešové za odborné vedení, cenné rady a připomínky, neuvěřitelnou ochotu a trpělivost. Velké díky patří rovněž Mgr. Elišce Ivanovové a prof. RNDr. Davidu Friedeckému, PhD. za pomoc a odborné rady při vývoji a validaci metody. Taktéž bych ráda poděkovala celému kolektivu Laboratoře dědičných metabolických poruch Fakultní nemocnice Olomouc za umožnění realizace mé diplomové práce a příjemné pracovní prostředí. Poděkování náleží i MVDr. Petru Jahnovi, CSc. z Veterinární univerzity Brno za konzultace týkající se pacientů a poskytnutí vzorků a fotodokumentace k diplomové práci.

Dále bych chtěla také poděkovat mému kolegovi Bc. Richardu Masařovi za psychickou podporu a pomoc během našeho studia. V neposlední řadě patří velké díky mé rodině, která mi při studiu byla velkou oporou.

Tato práce byla podpořena Ministerstvem zemědělství České republiky (projekt č. QL24010403 – Diagnostika a možnosti prevence atypické myopatie koní v podmínkách České republiky).

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Martina Kadláčková
Název práce	Vývoj LC-MS/MS metody pro stanovení biomarkerů atypické myopatie koní ze suché krevní skvrny
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Laboratoř dědičných metabolických poruch, Fakultní nemocnice Olomouc
Vedoucí práce	Mgr. Dana Dobešová
Rok obhajoby práce	2024

Abstrakt

Atypická myopatie (AM) je onemocnění provázené akutní rhabdomyolýzou postihující zejména koně. Pro pacienty je fatální a většina z nich umírá do pár dnů od prvních příznaků. S tím souvisí problematika rychlosti a dostupnosti diagnostiky, která je v progresi tohoto onemocnění stěžejní. Jednou z analytických technik, která odpovídá tomuto požadavku, je kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií (LC-MS/MS). Pro stanovení AM ve vzorcích suchých krevních skvrn (DBS) byla vyvinuta a částečně validována LC-MS/MS metoda bez derivatizace, která se vyznačuje snadnou a rychlou přípravou vzorku, krátkou dobou analýzy a nízkou finanční nákladovostí.

Aplikací této metody na DBS vzorky pacientů a vzorky suspektních případů koní byla potvrzena přítomnost diagnosticky významných markerů AM, hypoglycinu A a MCPA-karnitinu. Dále byly ve vzorcích pacientů významně zvýšeny koncentrace specifických acylkarnitinů a acylglycinů se středně dlouhým řetězcem. Rovněž byly studovány a interpretovány vzorky koní se zátěžovou myopatií. Mimo jiné byla také sledována dynamika změn koncentrací u opakovaných odběrů DBS vzorků pacienta s AM, u kterého byly zaznamenány trendy u zmíněných markerů.

Nově vyvinutá LC-MS/MS metoda bude po úplné validaci zavedena pro diagnostiku AM koní v České republice.

Klíčová slova	atypická myopatie koní, hypoglycin A, methylencyklopropylglycin, *Acer pseudoplatanus*, *Acer negundo*, β-oxidace mastných kyselin, kapalinová chromatografie, hmotnostní spektrometrie, validace
Počet stran	99
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Bc. Martina Kadláčková
Title	Development of LC-MS/MS method for the determination of biomarkers of equine atypical myopathy from dry blood spot
Type of thesis	Diploma
Department	Laboratory for inherited metabolic disorders, University Hospital Olomouc
Supervisor	Mgr. Dana Dobešová
The year of presentation	2024

Abstract

Atypical myopathy (AM) is a disease accompanied by acute rhabdomyolysis affecting mainly horses. It is fatal for patients and most die within a few days of first symptoms. This raises the issue of speed and availability of diagnosis, which is crucial in the progression of this disease. One of the analytical techniques that is suitable is liquid chromatography with tandem mass spectrometry (LC MS/MS). An LC-MS/MS method without derivatization has been developed and partially validated for the determination of AM in dry blood spot (DBS) samples, which is characterized by easy and rapid sample preparation, short analysis time and low financial cost.

By applying this method to DBS samples from patients and samples from suspected equine cases, the presence of diagnostically significant markers of AM, hypoglycin A and MCPA-carnitine was confirmed. Furthermore, concentrations of specific medium-chain acylcarnitines and acylglycines were significantly increased in patient samples. Samples from horses with exertional myopathy were also studied and interpreted. Among other things, the dynamics of changes in concentrations in repeated DBS samples from a patient with AM, in which trends in the mentioned markers were observed, were also studied.

The newly developed LC MS/MS method will be introduced for the diagnosis of equine AM in the Czech Republic after full validation.

Keywords	equine atypical myopathy, hypoglycin A, methylenecyclopropylglycine, *Acer pseudoplatanus*, *Acer negundo*, fatty acids beta-oxidation, liquid chromatography, mass spectrometry, validation
Number of pages	99
Number of appendices	0
Language	Czech

OBSAH

1 ÚVOD 1

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY 2

2.1 Atypická myopatie 2

2.1.1 Vývoj poznatků a výskyt atypické myopatie ve světě 4

2.1.2 Atypická myopatie v České republice 5

2.1.3 Příčiny a rozvoj onemocnění 5

2.1.3.1 Hypoglycin A 8

2.1.3.2 Methylencyklopropylglycin 11

2.1.3.3 Katabolismus mastných kyselin 12

2.1.3.4 Metabolické změny při atypické myopatii 17

2.1.4 Příznaky atypické myopatie 20

2.1.4.1 Klinické příznaky 20

2.1.4.2 Laboratorní ukazatele 22

2.1.4.3 Další změny v hladinách metabolitů 25

2.1.5 Prevence a léčba 26

2.1.6 Zvláštní případy atypické myopatie a podobná onemocnění 27

2.2 Současný stav diagnostiky atypické myopatie 28

2.3 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií 30

2.3.1 Kapalinová chromatografie 31

2.3.1.1 Instrumentace 32

2.3.2 Hmotnostní spektrometrie 34

2.3.2.1 Iontové zdroje 35

2.3.2.2 Hmotnostní analyzátory 37

2.3.2.3 Hmotnostní detektory 41

2.4 Validace bioanalytické metody 41

2.4.1 Selektivita a specifita 42

2.4.2 Kalibrační přímka a pracovní rozsah 42

2.4.3 Správnost a přesnost (opakovatelnost, mezilehlá přesnost a reprodukovatelnost) 43

2.4.4 Přenos vzorku (carry-over) 45

2.4.5 Integrita ředění 45

2.4.6 Matricové efekty 45

2.4.7 Stabilita 46

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST 47
3.1 Materiál a přístroje 47
3.1.1 Standardy 47
3.1.2 Interní standardy 47
3.1.3 Další chemikálie 47
3.1.4 Biologický materiál 48
3.1.5 Přístroje a pomůcky 49
3.2 Metody 50
3.2.1 Příprava zásobních roztoků standardů 50
3.2.2 Příprava zásobního roztoku interního standardu butyrylkarnitinu-D_3 50
3.2.3 Příprava náhradní matrice 50
3.2.4 Optimalizace MRM přechodů 50
3.2.5 Analýza směsi standardů 51
3.2.6 Příprava vzorků suché krevní skvrny 51
3.2.7 Validace metody – linearita, limit detekce a kvantifikace 53
3.2.7.1 Příprava kalibrační křivky 53
3.2.8 Aplikace metody 54
4 VÝSLEDKY 57
4.1 Finální LC-MS/MS metoda 57
4.2 Validace – linearita, limit detekce a kvantifikace 60
4.3 Aplikace metody 64
4.3.1 Diagnostika pacientů s atypickou myopatií 64
4.3.2 Dynamika metabolitů při opakovaných odběrech 68
5 DISKUSE 72
6 ZÁVĚR 77
7 LITERATURA 78
8 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK 86

CÍLE PRÁCE

- Vypracování literární rešerše s klíčovými slovy: atypická myopatie koní, hypoglycin A, methylencyklopropylglycin, *Acer pseudoplatanus*, *Acer negundo*, β-oxidace mastných kyselin, kapalinová chromatografie, hmotnostní spektrometrie, validace.
- Vývoj a validace LC-MS/MS metody bez derivatizace pro stanovení hypoglycinu A, methylencyklopropylglycinu a jejich metabolitů jako biomarkerů atypické myopatie u koní ze suché krevní skvrny.
- Vyhodnocení a interpretace výsledků validace LC-MS/MS metody.
- Aplikace metody na vzorky suchých krevních skvrn koní.

1 ÚVOD

Atypická myopatie (AM) je charakterizována jako akutní rhabdomyolýza postihující převážně koně. Toto onemocnění se vyskytuje zejména v podzimních a jarních měsících (Votion et al., 2020). Nemoc je provázena velkou úmrtností – nejméně 74 % koní umírá do 72 hodin od propuknutí prvních příznaků (van Galen et al., 2012a). Příčinou AM je pozření semen či semenáčků javoru klenu (*Acer pseudoplatanus*) (Unger et al., 2014) nebo javoru jasanolistého (*Acer negundo)* (Valberg et al., 2013). V těchto druzích javoru se vyskytují neproteinogenní aminokyseliny hypoglycin A (HGA) (Fowden & Pratt, 1973) a methylencyklopropylglycin (MCPrG) (Bochnia et al., 2019). Ty jsou v organismech přeměňovány na toxické metabolity (von Holt et al., 1964), které inhibují některé enzymy v β-oxidaci mastných kyselin (Bochnia et al., 2019; Wouters et al., 2021). V důsledku toho se v krvi a moči pacientů hromadí diagnosticky specifické acylkarnitiny a acylglyciny (Mathis et al., 2021; Wouters et al., 2021). Mezi typické klinické příznaky AM se řadí svalová ztuhlost a slabost, polehávání (Votion, 2016) a tmavě hnědá moč způsobená přítomností myoglobinu (van Galen et al., 2012a).

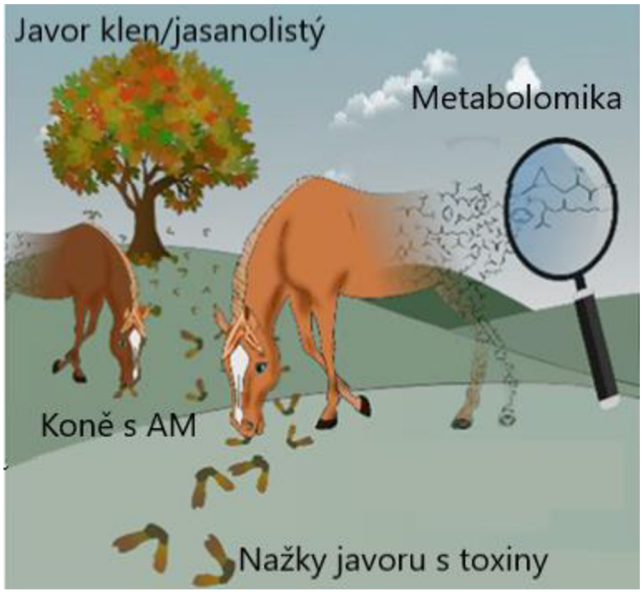
Počty koní zasažených AM každým rokem rostou (Votion et al., 2020). V současnosti se HGA a MCPrG spolu s jejich metabolity vyšetřují ze séra nebo moči technikou kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií (LC-MS/MS). Většina vyvinutých LC-MS/MS metod ale zahrnuje v preanalytické fázi derivatizaci, což je časově a finančně náročné (Doležal et al., 2020; Šamonilová et al., 2022). Cílem předložené práce bylo vyvinout a validovat LC-MS/MS metodu pro stanovení HGA, MCPrG, jejich metabolitů a dalších vybraných acylkarnitinů a acylglycinů v suché krevní skvrně koní. Nově vyvinutá metoda byla aplikována na vzorky koní s AM, suspektních pro AM, se zátěžovou myopatií (ZM) a zdravých koní.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Atypická myopatie

Atypická myopatie (AM) je onemocnění charakterizované jako akutní rhabdomyolýza. Onemocnění propuká u pasoucích se koní (*Equus caballus*) bez předchozí zátěže. Případy jsou evidovány hlavně na podzim a v menší míře na jaře (Votion et al., 2020). V USA se toto onemocnění nazývá sezónní pastevecká myopatie (Hirz et al., 2021). Etiologie obou onemocnění je však stejná. Rozdíl mezi AM a sezónní pasteveckou myopatií je pouze v počtu postižených koní. V USA se vyskytují ojedinělé případy, kdežto AM v Evropě postihuje nejčastěji vícero koní z jedné pastviny (Šamonilová et al., 2022). Biochemická podstata onemocnění byla odhalena už v roce 2007 (Westermann et al., 2007). Příčinu vzniku onemocnění se podařilo objevit až v roce 2013 (Valberg et al., 2013).

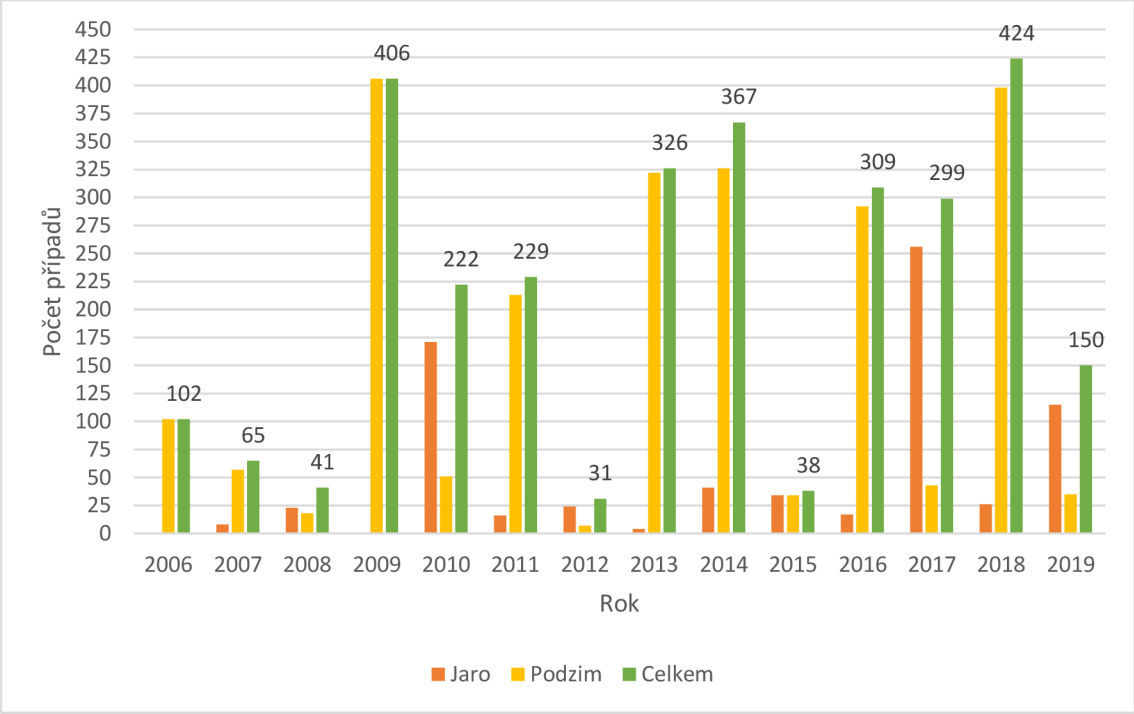
Příčinou AM (resp. sezónní pastevecké myopatie, Obr. 1) je akutní intoxikace způsobená požitím semen (nažek) či semenáčků některých druhů javoru (*Acer spp.*). Ty obsahují prekurzory toxicity, hypoglycin A (HGA) a methylencyklopropylglycin (MCPrG). Jejich požití vede k poruchám energetického metabolismu (Votion, 2016), kdy dochází k rozvoji mnohočetného deficitu acyl-CoA dehydrogenas (MADD). V důsledku toho je inhibována β-oxidace mastných kyselin a metabolismus aminokyselin (Unger et al., 2014).



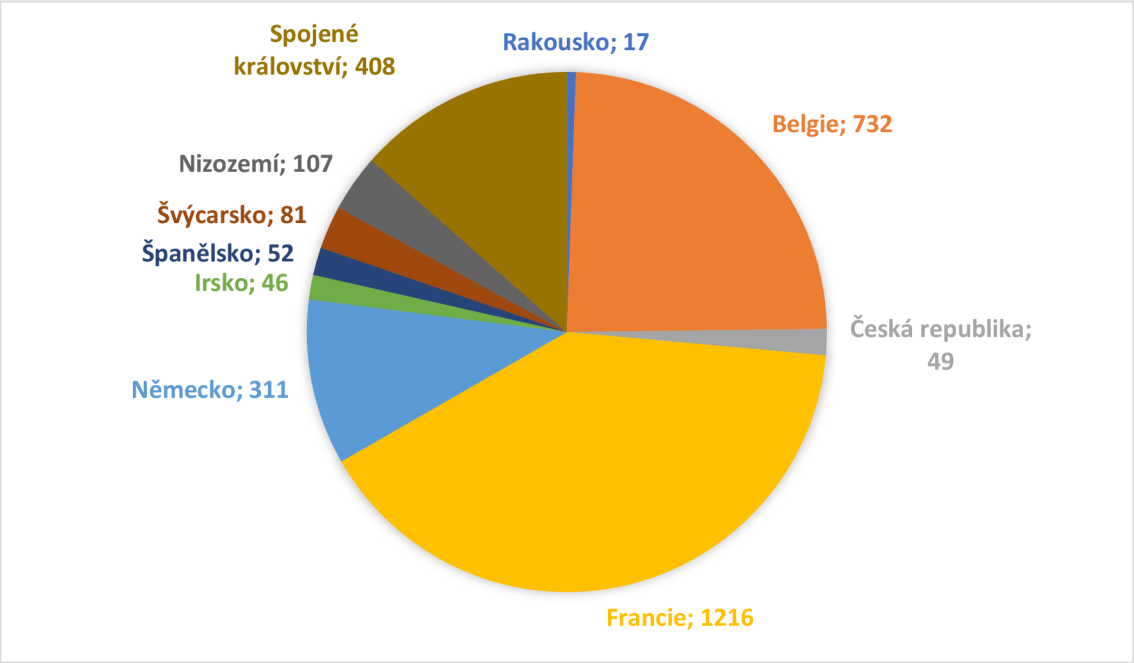
Obr. 1 Schéma vzniku atypické myopatie (AM). Převzato a upraveno dle Wouters et al. (2021).

AM postihuje koně bez jakékoliv predispozice k pohlaví, věku nebo plemeni (Votion & Serteyn, 2008). Van Galen et al. (2012a) ve své studii odhalili, že AM mohou být postihnuty všechny věkové kategorie včetně velmi starých koní. Je zajímavé, že v roce 2006 byli zasaženi AM zejména mladí koně do věku tří let (71 %), nyní tato kategorie čítá pouze 36 % koní. V současnosti tedy nelze tvrdit, že by určitá věková skupina měla k AM větší sklony (Votion et al., 2020). Ve výzkumu Votion et al. (2007) byli postiženi převážně koně v dobré tělesné kondici, a proto by neměla být AM brána za nemoc ohrožující hlavně oslabené koně.

Toto onemocnění je spojeno s vysokou mírou mortality, která se liší mezi roky (Obr. 2) i jednotlivými zeměmi (Obr. 3) (Votion et al., 2020). Van Galen et al. (2012a) sledovali případy AM v devíti evropských zemích a určili, že nejméně 74 % koní s AM umírá do 72 hodin od prvních příznaků. Oproti tomu mají hospitalizovaná zvířata vyšší šanci na přežití. Úmrtnost při hospitalizaci pak činí 56 % (Dunkel et al., 2018).



Obr. 2 Vývoj počtu případů atypické myopatie v Evropě od podzimu 2006 do listopadu 2019. V jednotlivých letech jsou graficky znázorněny výskyty na jaře a na podzim, číselně je uveden celkový počet případů za daný rok. Data převzata od Votion et al. (2020).



Obr. 3 Počet případů atypické myopatie v jednotlivých evropských zemích v období od podzimu 2006 do listopadu 2019. Do grafu nebyly zahrnuty tyto země: Dánsko (8 případů), Švédsko (7), Lucembursko (3) a Portugalsko (2). Data převzata od Votion et al. (2020).

AM postihuje i ostatní podrody koňovitých (*Equidae*), a to osly (*Asinus*) a zebry (*Hippotigris*) (van Galen et al., 2012a). Otrava HGA s patofyziologickým průběhem podobným AM byla dokonce hlášena u zvířat chovaných v zajetí, konkrétně u velblouda dvouhrbého (*Camelus bactrianus*) (Hirz et al., 2021), jelena milu (*Elaphurus davidianus*) (Bunert et al., 2018; Bochnia et al., 2021) a pakoně žíhaného (*Connochaetes taurinus taurinus*) (Renaud et al., 2022). U dalších přežvýkavců (vyjma výše zmíněných) nejsou dosud evidovány případy intoxikace HGA nebo MCPrG, i když toxické metabolity byly v krvi ovcí a skotu přítomny bez jakýchkoli příznaků onemocnění. Tato zvířata mají nejspíše minimální citlivost na tyto toxiny. Pravděpodobně dochází k transformaci těchto látek v bachoru před absorpcí v tenkém střevě (Engel et al., 2023).

2.1.1 Vývoj poznatků a výskyt atypické myopatie ve světě

AM u koní byla poprvé popsána v roce 1939 na severu Walesu (Bowen & Craig, 1942). Od roku 1984 byly hlášeny pravidelné výskyty AM ve Velké Británii (Votion et al., 2007). V roce 1995 bylo oznámeno první velké ohnisko na pastvinách v severním Německu, kde uhynulo více jak sto koní (Brandt et al., 1997). Později byly potvrzeny první výskyty nemoci v Belgii a Francii (Votion et al., 2007). Od roku 2004 funguje skupina veterinářů a výzkumníků AMAG (Atypical Myopathy Alert Group) vedená Dr. Votion na Univerzitě

v Lutychu (Votion, 2016). Účelem této skupiny je evidovat případy AM v Evropě a vydávat epidemiologické výstrahy a doporučení pro chovatele. Mezi podzimem 2006 a 2019 skupina AMAG evidovala celkem 3039 případů AM ve 14 evropských zemích (Obr. 3) (Votion et al., 2020), avšak celkový počet případů za uvedená léta bude ve skutečnosti vyšší (viz dále v kapitole 2.1.2). Hlášeny byly i výskyty AM v Lotyšsku a Norsku (Votion, 2012), nejnověji byl potvrzen případ na Slovensku (Pettenello et al., 2023). Kromě Evropy a USA byly výskyty AM hlášeny i na Novém Zélandu (McKenzie et al., 2015), v Austrálii a Kanadě (Votion, 2012).

V roce 2006 byla v USA pozorována poprvé nemoc podobná AM. Jednalo se o zmíněnou sezónní pasteveckou myopatii (Finno et al., 2006). V roce 2012 bylo toto onemocnění identifikováno jako americký protějšek k AM v Evropě. Liší se pouze místem výskytu a v počtu pacientů na jedné pastvině (Westermann et al., 2016).

2.1.2 Atypická myopatie v České republice

V České republice byl první případ AM u koní evidován v roce 2011. Předpokládá se však, že se AM vyskytla v ČR již dříve. Mezi lety 2011–2020 bylo potvrzeno celkem 112 případů u koní ve věku 0–25 let (Šamonilová et al., 2022). Zatímco skupině AMAG bylo chovateli v letech 2006–2019 oficiálně hlášeno pouze 49 případů (Votion et al., 2020). Celkem 74 případů se vyskytlo během září, října a listopadu, 32 případů v mezi březnem a květnem. Zbývajících šest případů bylo odhaleno v prosinci a lednu. Největší množství koní s AM (49) bylo zaznamenáno v roce 2018. Během uvedených let byla míra přežití koní 34 % (38 jedinců), eutanázii podstoupilo 20 % koní (22 jedinců) a 46 % koní uhynulo (52 jedinců) (Šamonilová et al., 2022).

2.1.3 Příčiny a rozvoj onemocnění

První hypotézy o příčinách AM vycházely ze zkoumání environmentálních a toxických faktorů (Whitwell et al., 1988). Zvýšený výskyt AM je spojován s předchozími specifickými klimatickými stavy, jako jsou zvýšené srážky a relativní vlhkost vzduchu, větrno, nepřítomnost silných mrazů a nedostatek slunečního záření (Votion & Serteyn, 2008). Jednou z hypotéz bylo, že nedostatek selenu nebo vitaminu E, který je spojován s myodegenerací, napomáhá rozvoji AM. U koní s AM nebyly však tyto deficity pozorovány (Whitwell et al., 1988).

V prvních studiích pracovali výzkumníci s domněnkou, že za rozvoj AM mohou požité nebo enterálně produkované toxiny bakterií, hub nebo rostlin. V USA byla vzhledem k rozvoji AM studována toxicita rostliny *Ageratina altissima* (nestarka bílá, starší název *Eupatorium rugosum*), která se vyskytuje volně v Severní Americe. Obsahuje jedovatou látku tremeton. Tato látka ale nebyla přítomna v jaterní tkáni ani moči koní s AM a s otravou tedy nesouvisela (Finno et al., 2006).

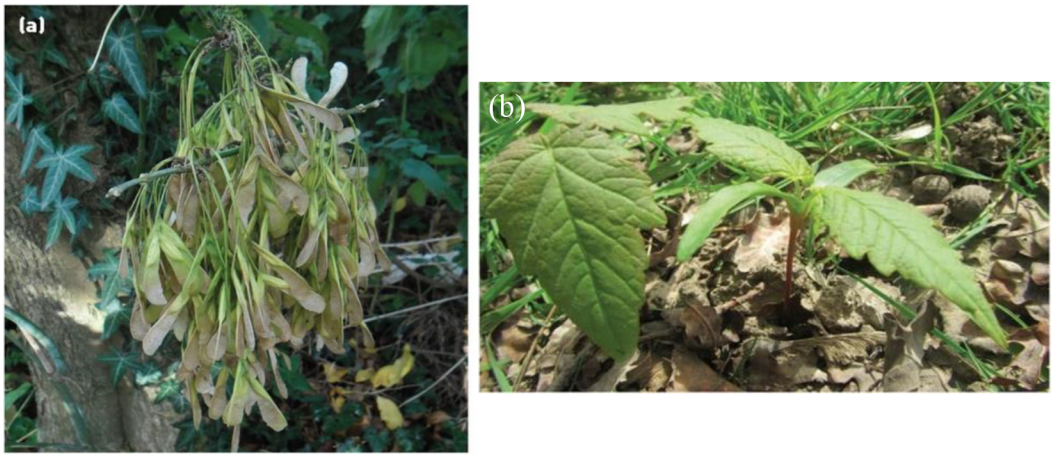
Další zvažovanou příčinou byla černá skvrnitost listů *A. pseudoplatanus* způsobená cizopasnou houbou *Rhystima acerinum* (svraštělka javorová). *R. acerinum* napadá javory v místech s nízkým výskytem kyselých dešťů. Mykotoxiny této houby se kovalentně vážou na mitochondriální dehydrogenasy, což způsobuje inhibici drah využívajících tyto enzymy. Navíc volné radikály vznikající činností této houby byly předpokládaným agens toxicity u koní (van der Kolk et al., 2010).

Ze strany bakteriálních toxinů byla monitorována možná souvislost AM s přítomností grampozitivních sporulujících bakterií *Clostridium sordellii* nebo *Clostridium bifermentans* v gastrointestinálním traktu koní. Toxin TcsL (z angl. *C. sordellii* lethal toxin) tvořený *C. sordellii* byl nalezen ve svalových vláknech postižených koní. To byl i hlavní důvod, proč byly toxiny těchto bakterií považovány za původce AM. Toxin TscL nepříznivě zasahuje do mitochondriální homeostázy, tvorby aktinových vláken a paracelulárního transportu endoteliálních buněk. U zdravých koní nebyly ve výkalech *C. sordellii* ani *bifermentans* přítomny (Unger-Torroledo et al., 2010). Tato hypotéza spojitosti AM s bakteriálními toxiny nebyla nikdy potvrzena.

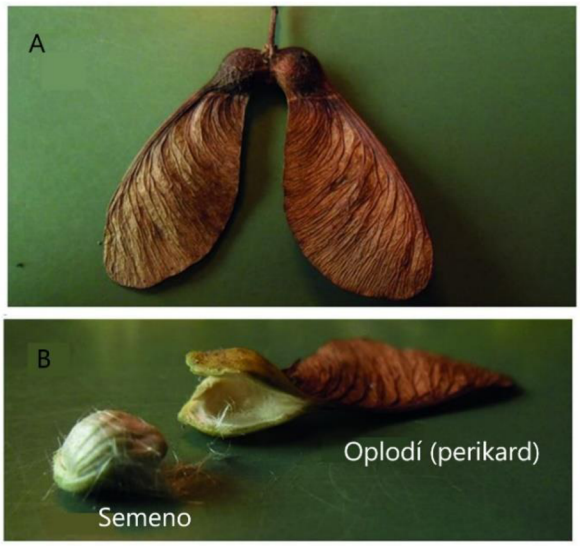
Van Galen et al. (2012a) provedli mezi roky 2006–2009 ve Francii, Belgii a Německu průzkum 600 koní s podezřením na AM. Monitorovali jak klinické příznaky a míru přežití nemocných koní, tak okolnosti a čas vzniku nemoci a životní podmínky koní. V 98 % případů se na pastvinách vyskytovaly stromy (van Galen et al., 2012a). V předchozím výzkumu z Belgie v letech 2000–2005 od Votion et al. (2007) bylo konstatováno, že se na pastvinách, kde se pásli koně s prokázanou AM, trvale vyskytovaly *Ranunculus repens* (pryskyřník plazivý) a *Acer pseudoplatanus* (javor klen). V té době však nebylo potvrzeno pro koně riziko vyplývající z požití částí *A. pseudoplatanus*. Zároveň žádný botanický monitoring z pastvin neidentifikoval další známou toxickou rostlinu schopnou rozvoje tohoto onemocnění.

Bez tušení spojitosti s AM Fowden & Pratt (1973) sledovali obsah HGA, MCPrG a jejich metabolitů v různých druzích javoru už v 70. letech. Potvrdili obsah těchto látek v semenech *A. pseudoplatanus* a *Acer negundo* (javor jasanolistý) (Obr. 4A), ale bez

důrazu na možné rozdíly v toxicitě během ročních období. *Acer platanoides* (javor mléč) a *Acer campestre* (javor babyka) tyto látky neobsahují. Až Valberg et al. (2013) nalezli v USA pravou příčinu rozvoje sezónní pastevecké myopatie v návaznosti na botanický monitoring a výše zmíněný článek od Fowden & Pratt (1973). Byly odebrány vzorky semen stromů vyskytujících se na severoamerických pastvinách, kde byly potvrzeny případy sezónní pastevecké myopatie. Ve vzorcích semen *A. negundo* byl nalezen HGA. Současně byl v séru koní se sezónní pasteveckou myopatií nalezen toxický metabolit HGA MCPA-karnitin (methylencyklopropylacetyl-karnitin) ve vysokých koncentracích a konjugáty MCPA v moči. Jelikož se příznaky sezónní pastevecké myopatie v USA a AM v Evropě shodovaly, byl v séru evropských koní postižených AM na základě těchto zjištění studován obsah MCPA-karnitinu. U všech koní byl tento toxin přítomen, jenže nebyl zkoumán jeho původ (Votion et al., 2014). Výsledky výzkumu Ungera et al. (2014) potvrdily, že zdrojem AM je vysoký obsah HGA v semenech *A. pseudoplatanus.* Křídlaté nažky (tzv. samary, Obr. 5A) obsahující semena padají ze stromu na podzim. Semena klíčí následující jaro, takže koně k nim mají přístup až do vyklíčení (Votion, 2016). Na jaře způsobuje AM zejména požití semenáčků *A. pseudoplatanus* (Obr. 4B), které také obsahují HGA (Baise et al., 2016). *A. negundo* nebyl zatím potvrzen jako zdroj intoxikace HGA v Evropě, i když byla tato dřevina do Evropy zavlečena v 17. století (Votion et al., 2019).



Obr. 4 Nažky se semeny (a) *Acer negundo* (javor jasanolistý) a semenáčky (b) *Acer pseudoplatanus* (javor klen). Převzato a upraveno dle Votion (2016).



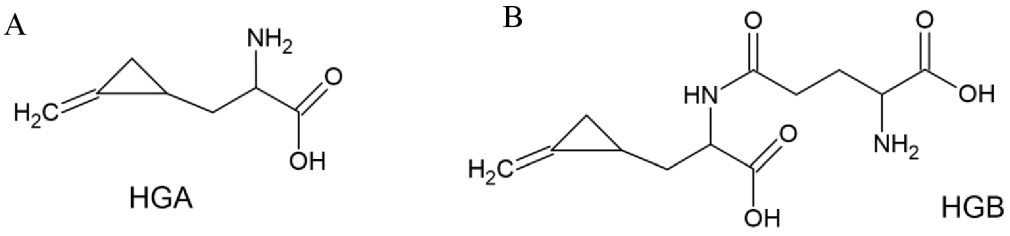
Obr. 5 Plod *Acer pseudoplatanus* (javor klen). Plodem je křídlatá nažka (A), neboli samara. Plod se skládá z oplodí (perikardu) a semena (B). Převzato a upraveno dle Votion et al. (2019).

MCPrG byl odhalen jakožto další marker AM až v roce 2019. MCPrG je obsažen v semenech a semenáčcích *A. pseudoplatanus* i *A. negundo*. V séru postižených koní se vyskytuje v malém množství, zatímco jeho metabolity byly detekovány ve vysokých koncentracích (Bochnia et al., 2019). Jako nový rizikový faktor se ukazuje i květenství *A. pseudoplatanus*, která obsahují detekovatelná množství HGA. Květenství mohou při zhoršených povětrnostních podmínkách opadávat a koně k nim mohou mít přístup (Votion et al., 2019).

HGA a MCPrG byly odhaleny rovněž v následujících druzích javoru: *Acer palmatum* (javor dlanitolistý), *Acer japonicum* (javor japonský), *Acer macrophyllum* (javor velkolistý), *Acer spicatum* (javor klasnatý), *Acer saccarinum* (javor stříbrný), *Acer saccharum* (javor cukrový). Jedná se o druhy *Acer* vyskytující se převážně v okrasných zahradách a parcích. Mohou se však šířit do okolí. Tyto druhy ale zatím nejsou známy jako zdroje intoxikace (Votion et al., 2020; Šamonilová et al., 2022).

2.1.3.1 Hypoglycin A

HGA (methylencyklopropylalanin, systematicky kyselina 2-amino-3-(2-methylencyklopropyl)propionová) je neproteinogenní aminokyselina, která ve své struktuře obsahuje cyklopropanový kruh a methylenovou skupinu (Obr. 6A) (Manchester, 1974).



Obr. 6 Strukturní vzorec hypoglycinu A (HGA; A) a hypoglycinu B (HGB; B).

Poprvé byl izolován z nezralých plodů ackee (*Blighia sapida*, systematicky poddužák lahodný) v roce 1954 (Hassall et al., 1954). Ackee patří do čeledi *Sapindaceae* (mýdelníkovité). Do stejné čeledi se řadí javor nebo liči (*Litchi*), ve kterých se HGA také vyskytuje (Engel et al., 2023).

Požití nezralých plodů ackee vyvolává u lidí hypoglykemii, těžkou metabolickou acidózu a nemoc zvanou jamajské zvracení. Jamajské zvracení začíná potížemi s gastrointenstinálním traktem a křečemi a často končí kómatem až smrtí (Golden et al., 2002; Valberg et al., 2013). Po požití HGA může docházet i k poruchám centrální nervové soustavy (Carlier et al., 2015). Kromě HGA se v semenech ackee vyskytuje i jeho γ-glutamylový konjugát dipeptid hypoglycin B (γ-glutamyl-hypoglycin, HGB, Obr. 6B). HGA se navíc vyskytuje i v dužninách plodů. Při zrání se mění vzájemná koncentrace HGA a HGB. Hladina HGA se v dužninách snižuje ve prospěch HGB v semenech za katalýzy enzymem (5-L-glutamyl)-peptid:aminokyselina-5-glutamyltransferasou (γ-glutamyltransferasa, GGT, EC 2.3.2.2). Posléze se konzumují pouze zralé dužniny ackee, takže nehrozí intoxikace HGB vyskytujícího se v semenech. HGB se tak podílí na detoxikaci plodů ackee při jejich dozrávání (Bowen-Forbes & Minott, 2011; Wray et al., 2020). HGB se vyskytuje rovněž v semenech a slupkách liči (Oulkar et al., 2022). Oproti HGA má HGB menší dopad na rozvoj hypoglykemie (El-Khatib et al., 2022).

HGB (Fowden & Pratt, 1973) a enzym γ-glutamyltransferasa (Young, 1973) byly detekovány také v některých druzích javoru. Do dnešní doby však nebyla zvažována role HGB vzhledem k rozvoji AM u koní. Zároveň není prozkoumaná transformace HGB v zažívacím traktu a játrech hospodářských zvířat a možná hydrolýza HGB na HGA při požití pasoucími se zvířaty (El-Khatib et al., 2022).

Obsah HGA se výrazně liší semeno od semene v rámci jedné pastviny i dvou rozdílných pastvin (Valberg et al., 2013). Tato variabilita může být způsobena různými faktory: zralostí semen, složením půdy a změnami počasí (z hlediska slunečního záření,

teplot a srážek). Nezralá semena *A. pseudoplatanus* mohou dokonce obsahovat méně HGA než listy odebrané ze stejného stromu (El-Khatib et al., 2022). Zároveň existují pastviny, na nichž nebyly evidovány případy AM, ale byly v rámci nich detekována semena *A. pseudoplatanus* s vysokým obsahem HGA (Unger et al., 2014).

Westermann et al. (2016) porovnávali výskyt HGA v semenech, semenáčcích a listech *A. pseudoplatanus* na jaře a na podzim (Tab. 1). Obsah HGA v semenech odpovídal prvotní studii obsahu HGA v tomto druhu javoru od Ungera et al. (2014). Lze si povšimnout, že semena byla nalezena především na podzim, kdežto semenáčky spíše na jaře.

V práci od Baise et al. (2016) bylo detekováno v semenáčcích až 3,40 ± 0,20 $\mu g \cdot mg^{-1}$ HGA. V květenstvích *A. pseudoplatanus* ze tří pastvin bylo nalezeno 0,174 ± 0,026 $\mu g \cdot mg^{-1}$ HGA (Votion et al., 2019). V oplodí nažek a v listech se vyskytují velmi malá množství hypoglycinu A (Unger et al., 2014). V jednom semeni *A. negundo* bylo nalezeno 3–160 µg HGA (průměrně 40 µg HGA na semeno) (Valberg et al., 2013).

Pro koně jsou nejnebezpečnější z hlediska průměrného obsahu HGA semenáčky *A. pseudoplatanus*, následované semeny a nejmenší riziko intoxikace představují listy. I tak ale podzimní případy AM převládají nad jarními. Nejspíše je to způsobené zvýšenou dostupností semen a preferencí jejich pozření oproti semenáčkům (Westermann et al., 2016). HGA se vyskytuje v semenáčcích i po použití herbicidů nebo sečení pastvin (Votion et al., 2020).

Tab. 1 Obsah hypoglycinu A ($\mu g \cdot mg^{-1}$) v semenech, semenáčcích a listech *A. pseudoplatanus* (javoru klenu) na pastvinách se zdravými koňmi a koňmi s atypickou myopatií (AM). Převzato a upraveno dle Westermann et al. (2016).

	Semena		**Semenáčky**		**Listy**	
	Zdraví	**AM**	**Zdraví**	**AM**	**Zdraví**	**AM**
A. pseudoplatanus na jaře						
n*	3	4	7	5	3	4
Rozpětí	0–0,110	0,146–3,683	0,484–1,584	0,097–2,539	0,005–0,066	0–0,271
A. pseudoplatanus na podzim						
n*	47	10	1	0	12	6
Rozpětí	0,008–2,518	0,025–1,804	1,119	-	0–0,148	0–0,035

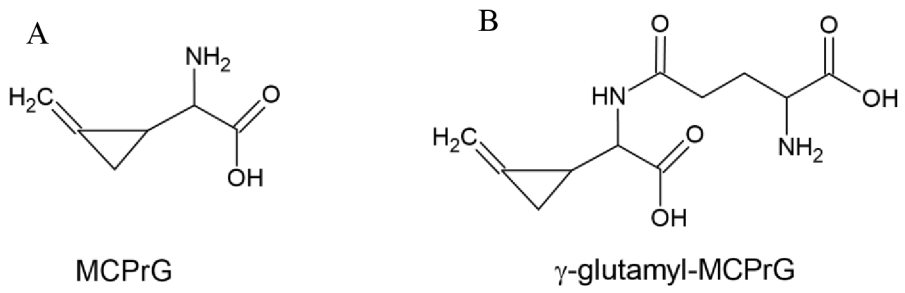
* Číslo udává počet pastvin, ze kterých byl rostlinný materiál získán.

Pro rozvoj intoxikace hypoglycinem A stačí pro 500kg koně dávka 26,5 mg (Valberg et al., 2013). Pokud by se v jednom semeni vyskytovalo 820,8 µg HGA (Unger et al., 2014), přibližně 32 semen by vyvolalo otravu (Doležal et al., 2020). Pro koně je maximální tolerovaná denní dávka HGA v 20 g nažek, 50 semenáčcích a 150 g květenství. Nicméně množství HGA, které způsobí otravu a rozvoj AM, je individuální. Jelikož je HGA rozpustný ve vodě, riziko skýtá i voda po kontaktu se semenáčky. Zde je maximální denní tolerovaná dávka 2 litry intoxikované vody (Votion et al., 2019).

HGA společně s MCPA-glycinem, MCPA-karnitinem a methylencyklopropylformylovými (MCPF-) konjugáty odvozenými od MCPrG (MCPF-glycin a MCPF-karnitin) byly nalezeny i v komerčně prodávaných vzorcích kobylího mléka a v mléce pro kojená jehňata a telata (El-Khatib et al., 2023). Kobylí mléko se kromě výživy pro hříbata využívá i v lidské populaci. Ve státech střední Asie se z kobylího mléka vyrábí fermentací mléčné alkoholické nápoje kumys a saumal. Tyto nápoje běžně používají lidé v Rusku a Mongolsku pro léčbu kardiovaskulárních a zažívacích potíží. V Itálii je kobylí mléko doporučováno jako náhrada za kravské mléko dětem s alergií na kravské mléko, která je zprostředkována imunoglobulinem E (IgE) (Musaev et al., 2021). Dále byly kobylí mléko a výrobky z něj doporučeny při léčbě chronické hepatitidy, žaludečních vředů, tuberkulózy, anémie, průjmu a zánětů žaludku a ledvin. Také toto mléko pozitivně stimuluje imunitní systém (Navrátilová et al., 2016). V Evropě se ve velmi malé míře přidává kobylí mléko do kosmetických přípravků (krémy, mýdla a hydratační krémy). Nebyly však potvrzeny žádné specifické účinky těchto přípravků oproti těm s kravským mlékem, které jsou i levnější (Doreau & Martin-Rosset, 2011).

2.1.3.2 Methylencyklopropylglycin

Methylencyklopropylglycin (MCPrG) (Obr. 7A) je stejně jako HGA neproteinogenní aminokyselina. Jedná se o homolog HGA kratší o jeden uhlík (Bochnia et al., 2019). MCPrG byl izolován později než HGA a to až v roce 1962 z plodů liči (Gray & Fowden, 1962).



Obr. 7 Strukturní vzorec methylencyklopropylglycinu (MCPrG, A) a γ-glutamyl-methylencyklopropylglycinu (γ-glutamyl-MCPrG, B).

MCPrG se stejně jako HGA vyskytuje v některých rostlinách rodu *Sapindaceae*, např. ackee, liči, longanu (*Dimocarpus longan*) a mamonciloos (*Melicoccus bijugatus*) včetně některých druhů javoru. Obsah MCPrG v plodech je závislý na stupni zralosti (Fowden & Pratt, 1973; Bochnia et al., 2019). MCPrG se nachází nejenom v semenech, ale také v dužnině liči. V semenech je jeho množství mnohem vyšší než ve zralé dužnině. V polozralé dužnině je obsah MCPrG čtyřikrát až pětkrát vyšší oproti zralé (Asthana et al., 2019). U lidí požití ackee nebo liči vyvolává tvorbu toxinů odvozených od MCPrG (Bochnia et al., 2021). Má se za to, že MCPrG obsažené v nezralém liči po požití způsobuje akutní encefalopatii asociovanou s hypoglykemií. Děje se to zejména u podvyživených hladovějících dětí, které navíc nejsou schopny rozeznat zralost plodů (John et al., 2016; Asthana et al., 2019).

Od MCPrG je odvozen γ-glutamylový konjugát γ-glutamyl-methylencyklopropylglycin (γ-glutamyl-MCPrG), vyobrazený na Obr. 7B. Nachází se jak v plodech ackee, tak v *A. pseudoplatanus* (El-Khatib et al., 2022).

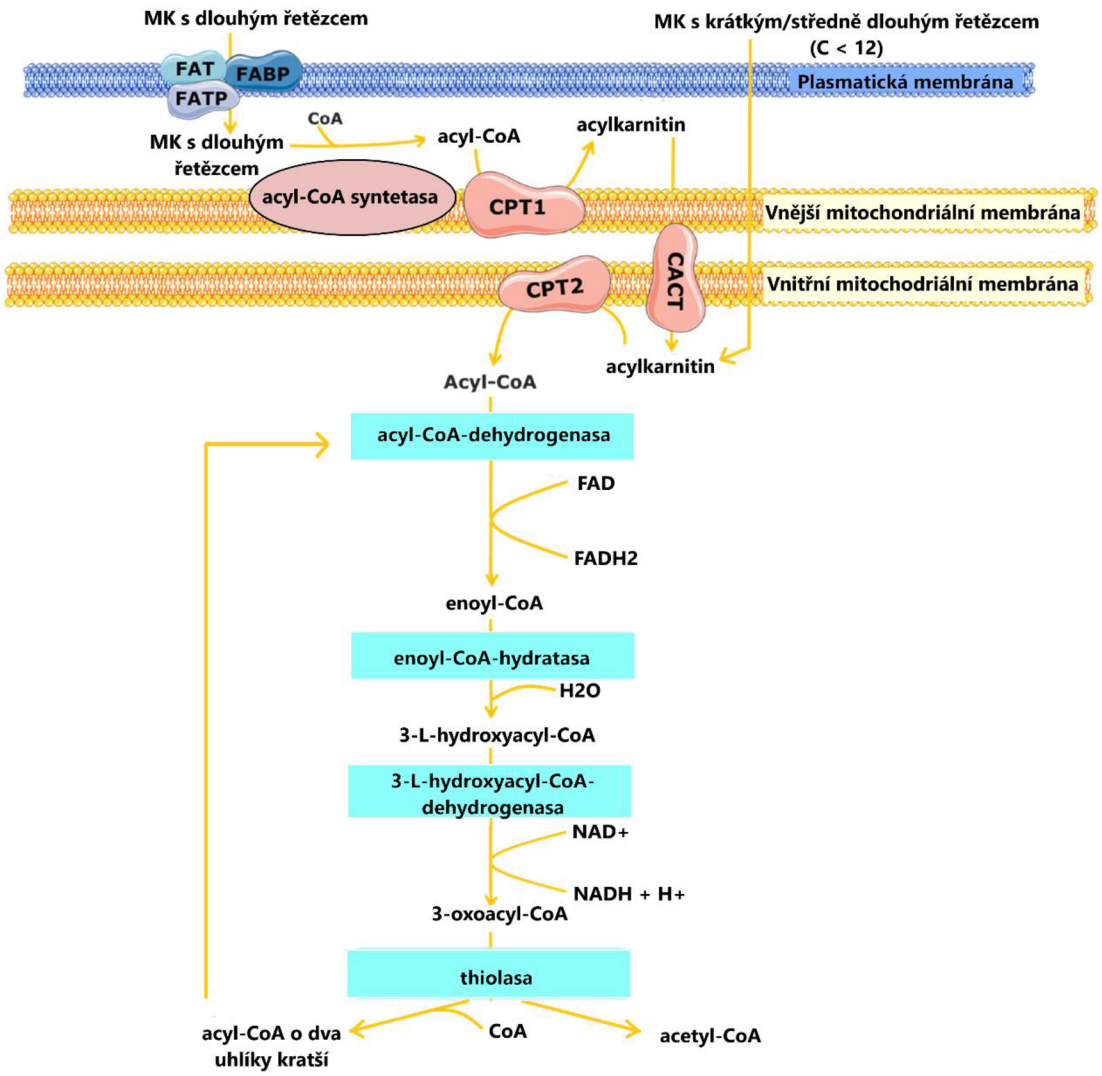
Koncentrace MCPrG v semenáčcích *A. pseudoplatanus* je 0,290–0,500 $\mu g \cdot mg^{-1}$, v semenech 0,035–0,267 $\mu g \cdot mg^{-1}$ a v listech 0,0063–0,1580 $\mu g \cdot mg^{-1}$ (El-Khatib et al., 2022). V květenstvích *A. pseudoplatanus* bylo nalezeno 0,200 ± 0,002 μg MCPrG na 1 mg suchého materiálu (Engel et al., 2023). Semena *A. negundo* obsahují 0,022–0,056 $\mu g \cdot mg^{-1}$ MCPrG a listy pouze 0,0027–0,0041 $\mu g \cdot mg^{-1}$ (El-Khatib et al., 2022).

2.1.3.3 Katabolismus mastných kyselin

Mastné kyseliny (s více než 12 uhlíky) se do buňky dostávají prostřednictvím specifických proteinů, např. FAT/CD36 nebo proteinu vázajícího mastné kyseliny FABP. Celé schéma transportu a katabolismu mastných kyselin je vyobrazeno na Obr. 8. Kvůli nízké reaktivitě jsou mastné kyseliny aktivovány za vzniku esterů acyl-CoA. Děj

katalyzuje vyšší mastná kyselina:CoA-ligasa (AMP-tvořící) (acyl-CoA syntetasa, EC 6.2.1.3). Na karboxylovou skupinu mastné kyseliny se nejprve váže adenosinmonofosfát (AMP) přes anhydridovou vazbu. Poté je AMP vyměněno za CoA. Acyl-CoA nejsou uzpůsobené pro průchod přes mitochondriální membránu, proto se v mitochondriích vyskytuje karnitinový systém (Houten et al., 2016; Kodíček et al., 2018). Mastné kyseliny kratší než 12 uhlíků prochází přes vnitřní mitochondriální membránu bez účasti tohoto systému. Až v matrix jsou aktivovány pomocí koenzymu A (CoA) (Harvey & Ferrier, 2011).

Palmitoyl-CoA:L-karnitin-*O*-palmitoyltransferasa (karnitinpalmitoyltransferasa, CPT, EC 2.3.1.21) je enzym existující ve dvou formách – CPT I a CPT II. CPT I je lokalizována ve vnější membráně mitochondrií, kde katalyzuje hydrolýzu CoA od mastné kyseliny (o 12–18 uhlících) a ke kyselině připojuje L-karnitin (Lopes et al., 2022). Acylkarnitin vstupuje přes vnitřní mitochondriální membránu do matrix za účasti karnitin-acylkarnitintranslokasy (CACT). Acylkarnitin je v tomto procesu translokován antiportem proti volnému L-karnitinu (Guerra et al., 2022). Uvolněný L-karnitin je posléze znovu využit pro transport mastných kyselin do mitochondrie (Joshi & Zierz, 2020). CPT II se nachází na vnitřní membráně ze strany matrix. CPT II transesterifikuje acylkarnitin opět na acyl-CoA, který vstupuje do β-oxidace mastných kyselin (Guerra et al., 2022).



Obr. 8 Schéma aktivace mastných kyselin, jejich transportu do mitochondrie a β-oxidace. Zkratky: FAT = transportér mastných kyselin, FATP = transportní protein pro mastné kyseliny, FABP = protein vážící mastné kyseliny, CPT1, CPT2 = karnitinpalmitoyltransferasa I/II, CACT = karnitin-acylkarnitintranslokasa. Převzato a upraveno dle Guerra et al. (2022).

Nejdůležitější dráhou pro katabolismus mastných kyselin je mitochondriální β-oxidace. Touto cestou buňka získává energii a udržuje svou homeostázu (Guerra et al., 2022). V mitochondriální β-oxidaci jsou odbourávány mastné kyseliny s krátkým, středním a dlouhým řetězcem. Nejčastěji se vyskytují mastné kyseliny s 12 až 18 uhlíky (Kyselová et al., 2022). β-oxidace mastných kyselin začíná dehydrogenací acyl-CoA na druhém a třetím uhlíku za účasti acyl-CoA:akceptor-2,3-oxidoreduktasy (acyl-CoA-dehydrogenasa, EC 1.3.8.1 pro krátké acyly, EC 1.3.8.7 pro střední acyly, EC 1.3.8.8 pro dlouhé acyly). Vzniká enoyl-CoA s dvojnou vazbou mezi druhým a třetím uhlíkem. Dva odtržené vodíky jsou přeneseny na prostetickou skupinu FAD. Redukovaný $FADH_2$ je dodáván do dýchacího řetězce přes komplex II a je opět oxidován. Dvojná vazba v enoyl-CoA je v druhém kroku hydratována, vytváří se 3-L-hydroxyacyl-CoA. Reakce je katalyzována enzymem (3*S*)-3-hydroxyacyl-CoA-hydrolyasou (enoyl-CoA-hydratasa, EC 4.2.1.17). Podle tohoto kroku se celá dráha nazývá β-oxidace. Poté dochází k další dehydrogenaci a vytváří se 3-oxoacyl-CoA. Oproti první reakci β-oxidace je odtržen vodík pouze z hydroxyskupiny na třetím uhlíku a tento vodík je přenášen na koenzym NAD^+. Redukovaný koenzym vstupuje do dýchacího řetězce přes komplex I. Tohoto kroku se účastní enzym (*S*)-3-hydroxyacyl-CoA: NAD^+-oxidoreduktasa (3-L-hydroxyacyl-CoA-dehydrogenasa, EC 1.1.1.35). Na závěr dochází k thiolytickému štěpení mezi uhlíky C2 a C3. Vytváří se acetyl-CoA a acyl-CoA o dva uhlíky kratší. Štěpení katalyzuje acyl-CoA:acetyl-CoA-C-acyltransferasa (thiolasa, EC 2.3.1.16, v případě finálního štěpení na dva acetyly acetyl-CoA:acetyl-CoA-C-acetyltransferasa, EC 2.3.1.9) (Kodíček et al., 2018; Adeva-Andany et al., 2019). Finální produkt acetyl-CoA může být následně plně oxidován v citrátovém cyklu a dýchacím řetězci. Výsledkem je tvorba energie ve formě adenosintrifosfátu (ATP) (Ma et al., 2018). Až 80 % energie získané oxidací acetyl-CoA a redukovaných kofaktorů využívají srdeční a kosterní svalovina a ledviny (Houten et al., 2016; Yu et al., 2022).

Acetyl-CoA může v rámci citrátového cyklu také reagovat s oxalacetátem za vzniku citrátu. Citrát je z mitochondrie exportován mitochondriálním citrátovým přenašečem do cytosolu výměnou za malát, kde může podléhat dvěma metabolickým cestám. Při první z nich je citrát je oxidován přes isocitrát na α-ketoglutarát. Reakce je katalyzována cytosolickou isocitrát:$NADP^+$-oxidoreduktasou ($NADP^+$-dependentní isocitrátdehydrogenasa, EC 1.1.1.42). Druhou možnou cestou je rozklad citrátu na oxalacetát a acetyl-CoA za katalýzy acetyl-CoA:oxalacetát C-acetyltransferasy

[(pro-S)-karboxymethyl tvořící, ADP-fosforylující] (ATP-citrát lyasa, ACLY, EC 2.3.3.8). Oxalacetát se přeměňuje na malát prostřednictvím NADP-dependentní malátdehydrogenasy (oxalacetát dekarboxylační) (malátdehydrogenasa, MDH, EC 1.1.1.40). Malát může vstupovat do mitochondrie opět výměnou za citrát. Acetyl-CoA vzniklý štěpením citrátu se podílí na biosyntéze mastných kyselin a cholesterolu. V určitých krocích obou cest citrátu v cytosolu se vytváří redukční ekvivalent NADPH. V důsledku toho se acetyl-CoA nepřímo podílí na udržování redoxní rovnováhy v buňkách (Carracedo et al., 2013; Williams & O'Neill, 2018).

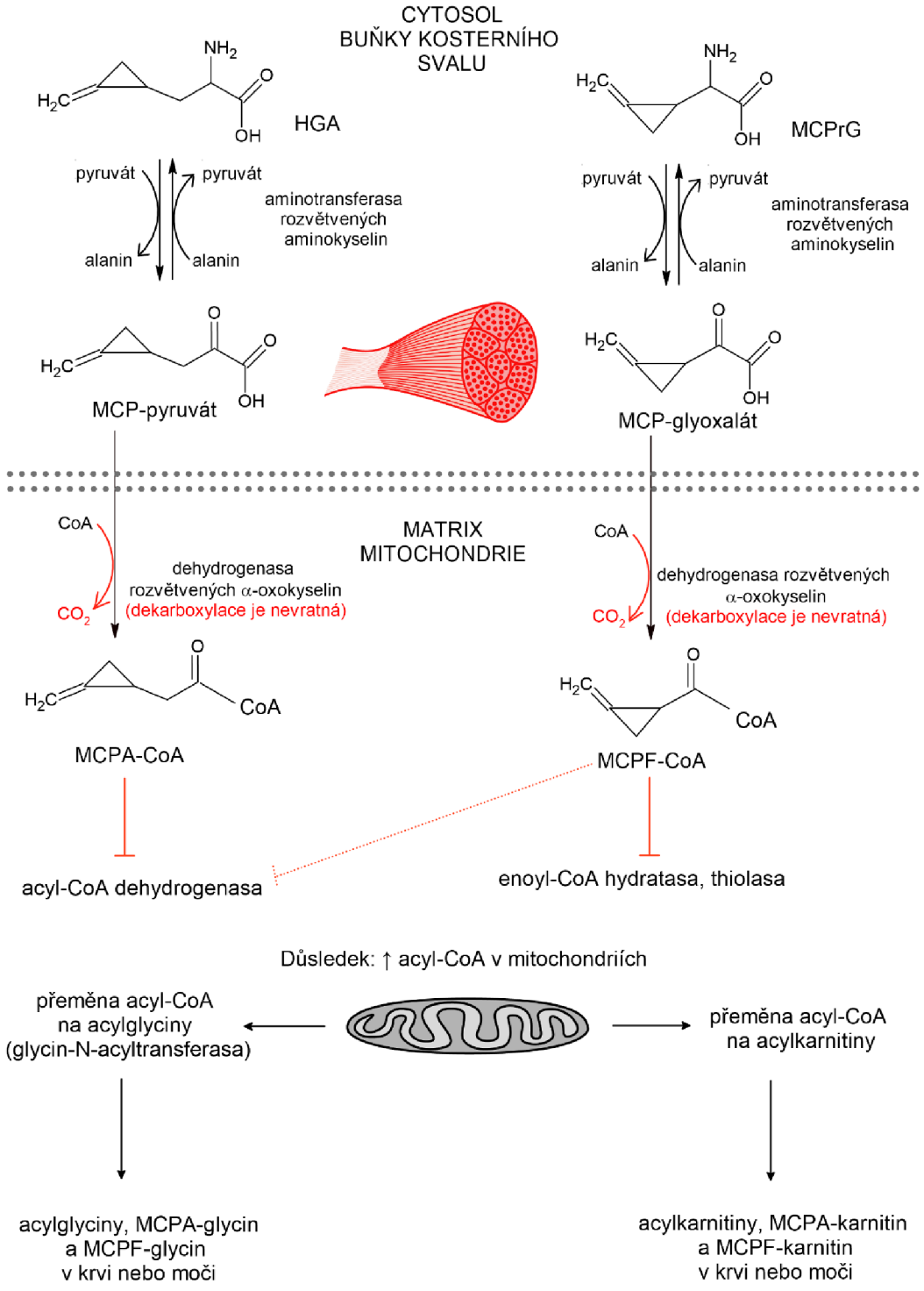
Kromě mitochondriální β-oxidace existuje i alternativní dráha β-oxidace v peroxisomech pro odbourávání mastných kyselin s velmi dlouhým řetězcem (nad 18 uhlíků). V tomto pochodu nevzniká ATP, protože se v peroxisomech v prvním kroku acyl-CoA oxiduje a místo redukovaného kofaktoru vzniká peroxid vodíku. Peroxisomy navíc nemají enzymy dýchacího řetězce (Nguyen et al., 2008). Zkrácené mastné kyseliny přechází do mitochondrií, kde se dále oxidují (Harvey & Ferrier, 2011). Další alternativní drahou je ω-oxidace cytochromem P450 monooxygenasou (CYP450, EC 1.14.-.-) v endoplasmatickém retikulu. Dochází k oxidaci posledního uhlíku acylu a vznikají dikarboxylové kyseliny (Voet & Voet, 1995). Mastné kyseliny s lichým počtem uhlíků rovněž podléhají β-oxidaci v mitochondriích. Finálním produktem je ale tříuhlíkatý propionyl-CoA. Propionyl-CoA může podléhat karboxylaci na methylmalonyl-CoA, jež je převáděn na sukcinyl-CoA , což je meziprodukt citrátového cyklu. Rozvětvené mastné kyseliny nejsou substrátem pro acyl-CoA-dehydrogenasu. Konkrétně u dvacetiuhlíkaté kyseliny fytanové je překážkou methylová skupina na β uhlíku. Kyselina fytanová tak podléhá α-hydroxylaci, které se účastní enzym fytanoyl-CoA, 2-oxoglutarát:kyslík-oxidoreduktasa (2-hydroxylující) (fytanoyl-CoA α-hydroxylasa, EC 1.14.11.18) (Harvey & Ferrier, 2011). U odbourávání nenasycených mastných kyselin se naskýtají dva problémy – většinou se tyto mastné kyseliny vyskytují v konfiguraci *cis* a některé obsahují dvojnou vazbu na sudém uhlíku (např. kyselina linolová). Změnu konfigurace *cis* dvojné vazby na třetím uhlíku (*cis*-Δ^3) na *trans* na druhém uhlíku (*trans*-Δ^2) katalyzuje enzym (3*Z*/3*E*)-alk-3-enoyl-CoA (2*E*)-isomerasa (enoyl-CoA-isomerasa, také 3,2-dienoyl-CoA isomerasa, EC 5.3.3.8). *Trans* isomer je pak vhodným substrátem pro enoyl-CoA-hydratasu. Dále vzniká problém při vzniku 2,4-dienoyl-CoA. Aby jej rozeznala enoyl-CoA-hydratasa, je zapotřebí jej v savčích organismech upravit v přítomnosti dvou enzymů. Nejprve se dvojná vazba na čtvrtém uhlíku redukuje za účasti

(3*E*)-3-enoyl-CoA:NADP$^+$ 4-oxidoreduktasy (*trans*-2,4-enoyl-CoA reduktasa, EC 1.3.1.124) a vzniká trans-3-enoyl-CoA. Ten je poté isomerován na trans-2-enoyl, reakce je katalyzována 3,2-dienoyl-CoA isomerasou. Potom může pokračovat β-oxidace (Voet & Voet, 1995).

2.1.3.4 Metabolické změny při atypické myopatii

HGA je absorbován v jejunu (lačníku) tenkého střeva koní. Na apikální straně se vstřebává pomocí transportérů a na bazolaterální prostřednictvím antiportu a facilitované difúze (Krägeloh et al., 2017). HGA i MCPrG nejsou po požití samy o sobě toxické. K jejich přeměně na toxické metabolity dochází především v buňkách kosterního svalstva (Obr. 9). Jejich metabolizace v prvních dvou krocích odpovídá dějům katabolismu aminokyselin s rozvětveným řetězcem (Sander et al., 2023).

Do buněk kosterního svalstva se HGA dostává skrze LAT1 transportér (Sander et al., 2023). První krok metabolizace HGA zahrnuje reverzibilní α-oxidaci v cytosolu za vzniku methylencyklopropyl-pyruvátu (MCP-pyruvátu), reakci katalyzují aminotransferasy rozvětvených aminokyselin (BCAT, EC 2.6.1.42). MCP-pyruvát je přenášen do mitochondrie, kde je nevratně dekarboxylován a reverzibilně esterifikován v přítomnosti komplexu dehydrogenas rozvětvených α-oxokyselin (BCKDH komplex) a koenzymu A na MCPA-CoA (Melde et al., 1991; Sarkar et al., 2020; Wouters et al., 2021). Ke vzniku MCPA-CoA dochází v mitochondriální matrix (Salaün, 2000). Tím, že je CoA využíván pro esterifikaci MCPA, narušuje se transport mastných kyselin (C > 12) přes karnitin-acyl-CoA systém (Valberg et al., 2013). *In vivo* se dále MCPA-CoA váže na prostetickou skupinu FAD za tvorby aduktů a nevratně inhibuje acyl-CoA-dehydrogenasy pro krátké a středně dlouhé acyly mastných kyselin. Enzymy jsou tak vazbou MCPA-CoA zablokovány a nemohou být využity pro první krok mitochondriální β-oxidace (Sander et al., 2016). β-oxidace se postupně zpomaluje a mohou být odbourávány acyl-CoA obsahující acyly s nejvíce čtyřmi uhlíky (tj. po buturyl-CoA) (Salaün, 2000). MCPA-CoA inhibuje také některé FAD-dependentní dehydrogenasy zapojené do odbourávání rozvětvených aminokyselin (Kruse et al., 2021). V mitochondriích jsou to enzymy 3-methylbutanoyl-CoA:akceptor oxidoreduktasa (isovaleryl-CoA dehydrogenasa, EC 1.3.8.4), 2-methylbutyryl-CoA:akceptor oxidoreduktasa (2-methylbutyryl-CoA dehydrogenasa, EC 1.3.8.5) (Bochnia et al., 2019) a glutaryl-CoA:akceptor oxidoreduktasa (glutaryl-CoA dehydrogenasa, EC 1.3.8.6) (Valberg et al., 2013).



Obr. 9 Metabolizace hypoglycinu A (HGA) a methylencyklopropylglycinu (MCPrG) v buňkách kosterního svalstva a jejich vliv na β-oxidaci mastných kyselin. Zkratky: MCP- = methylencyklopropyl-, MCPA- = methylencyklopropylacetyl-, MCPF- = methylencyklopropylformyl-. Převzato a upraveno dle Melde et al. (1991) a Bochnia et al. (2019).

Aktivní toxickou formou MCPrG je MCPF-CoA (Bochnia et al., 2019). Přeměna MCPrG na MCPF-CoA probíhá analogicky jako u HGA na MCPA-CoA (Obr. 9). Nejdříve je MCPrG v cytosolu reverzibilně transaminován na MCP-glyoxalát.

MCP-glyoxalát je přenášen do mitochondrie, kde podléhá dekarboxylaci a reverzibilní esterifikaci a vzniká toxický metabolit MCPF-CoA (Melde et al., 1991). MCPF-CoA inhibuje enzymy druhého a posledního kroku β-oxidace mastných kyselin, konkrétně enoyl-CoA-hydratasu a thiolasu (Wouters et al., 2021). MCPF-CoA se vyskytuje v *R* a *S* enantiomerech. Oba tyto enantiomery inhibují stejně účinně enoyl-CoA hydratasu v mitochondriích, jenže v peroxisomech při inhibici (3*R*)-3-hydroxyacyl-CoA-hydrolyasy (enoyl-CoA-hydratasy II, EC 4.2.1.119) je účinnější enantiomer *R* (Sarkar et al., 2020). Toxin může být rovněž slabým inhibitorem acyl-CoA dehydrogenas v prvním kroku β-oxidace (Bochnia et al., 2019).

Jelikož je zablokován metabolismus mastných kyselin a degenerované svaly nemohou využívat kyslík, organismus využívá anaerobní glykolýzy pro zisk energie. Kvůli tomu dochází k rychlému vyčerpání zásob glykogenu ve svalu, hypoglykemii a k laktátové acidóze. U koní s AM je ale pozorována většinou hyperglykémie. Důvodem je nejspíše vyšší mobilizace glukosy z jaterních zásob glykogenu ve prospěch svalů (Sponseller et al., 2012).

Inhibicí β-oxidace se také netvoří acetyl-CoA a jeho množství v organismu se snižuje (Sarkar et al., 2020). Přebytečné hromadící se acyl-CoA, které nemohou vstoupit do β-oxidace mastných kyselin, prochází zpětně karnitinovým přenašečem, čímž se přeměňují na acylkarnitiny. Acylkarnitiny jsou ve zvýšené míře vylučovány z buněk do séra. Dále se mohou acyl-CoA přeměňovat na acylglyciny, čímž se zvýší jejich polarita pro usnadnění exkrece močí. Reakci acyl-CoA s glycinem zprostředkovává enzym acyl-CoA:glycin N-acyltransferasa (glycin-N-acyltransferasa, EC 2.3.1.13), který se nachází v buňkách jaterní a ledvinné tkáně (Sponseller et al., 2012; Unger et al., 2014; Karlíková et al., 2016; Sander et al., 2016).

Předpokládá se, že při lehkém průběhu AM napomáhají alternativní cesty (β-oxidace v peroxisomech a ω-oxidace v endoplasmatickém retikulu) snížit množství acylkarnitinů na obvyklé koncentrace. Při těžkém průběhu otravy je však kapacita těchto cest nedostačující (Karlíková et al., 2016).

V konečném důsledku se v kosterním a srdečním svalstvu hromadí tuky (Hirz et al., 2021), které narušují buněčné membrány svalových buněk (El-Khatib et al., 2023). Lipidy se akumulují především v myokardu a posturálních (tonických) a dýchacích svalech (Sponseller et al., 2012). Postiženy jsou hlavně svalová vlákna prvního typu, které obsahují velké množství mitochondrií a energii získávají pomocí oxidativní fosforylací (Westermann et al., 2008).

2.1.4 Příznaky atypické myopatie

AM nastupuje náhle s příznaky akutní myopatie (Cassart et al., 2007). Ne všichni koně na stejné pastvině jsou náchylní k rozvoji AM. Někteří koně zůstávají zdraví, i když se pasou společně s jedinci, u nichž byla AM prokázána. Mechanismy odolnosti stále nejsou odhaleny (Wouters et al., 2021). Nemoc není spojována s předchozí zátěží (Palencia & Rivero, 2007). Koně jsou při nástupu nemoci klidní a zůstávají při vědomí (Votion & Serteyn, 2008).

2.1.4.1 Klinické příznaky

Většina klinických příznaků navazuje na poškození určitých svalových skupin, zejména dýchacích a posturálních svalů. Svaly zajišťující pohyb jsou poškozeny minimálně nebo vůbec. Mezi první vnější projevy se řadí svalová ztuhlost a slabost a neschopnost stát (Palencia & Rivero, 2007; Votion, 2016). Pacient trpí samovolnými svalovými záškuby a abnormálním stylem chůze (Cassart et al., 2007). To vše ústí v polehávání intoxikovaného zvířete (Votion, 2016). Při pohybu je zřetelný svalový třes a nadměrné pocení (Obr. 10) (Votion & Serteyn, 2008). U koní panuje nechuť k pohybu a obtížně vstávají (Votion et al., 2007). Srdeční funkce jsou ve fyziologickém stavu nebo se mohou projevit tachykardie (zvýšená tepová frekvence, tzn. více jak 45 tepů za minutu) (Votion, 2016). U koní byla také pozorována deprese, což se projevuje straněním vůči ostatním koním a lidem, poklesem zájmu o potravu a obvyklé aktivity, pacient špatně spí a méně se pohybuje.

Obr. 10 Koně s atypickou myopatií obvykle vykazují celotělové pocení. Fotografie poskytnuta MVDr. Petrem Jahnem, CSc. z Veterinární univerzity Brno.

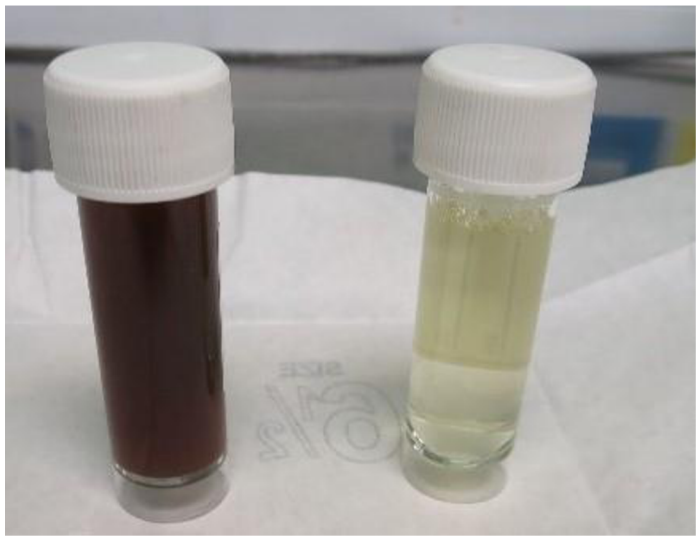
Dalšími příznaky AM jsou překrvené sliznice a tmavě hnědá moč (Obr. 11), která je zbarvená kvůli obsahu myoglobinu (myoglobinurie) (van Galen et al., 2012a). Myoglobin se uvolňuje z důvodu rhabdomyolýzy svalové tkáně. Myoglobinurie je však pouze orientační příznak. Myoglobin může být vylučován při jiných nemocech a zároveň nepřítomnost myoglobinurie nevylučuje AM (Votion, 2016). Všechny doposud uvedené příznaky byly pozorovány u více jak 50 % koní s AM (van Galen et al., 2012a).

U téměř poloviny koní (49 %) byla pozorována dyspnoe (dušnost) (van Galen et al., 2012a). Kůň vykazující dyspnoi má zhoršenou prognózu a je obvykle hlavním důvodem eutanázie (Votion, 2016).

Sekundárně zůstávají pacienti stát se stočenou hlavou dolů (ventroflexe), což může být doprovázeno podkožními otoky hlavy a krku. Pokud se koním podaří vstát, nevydrží to obvykle déle jak několik minut (Votion & Serteyn, 2008).

U 60 % postižených koní je tělesná teplota normální (37–38,5 °C), hypotermii vykazovala přibližně třetina koní a hypertermii pouze desetina (van Galen et al., 2012a). Hypotermie se zlepšuje ustájením koně v teple (Votion et al., 2007).

U čtvrtiny koní byly pozorovány problémy s polykáním (dysfagie), která může být doprovázena obstrukcí jícnu. Koně jsou během nemoci výjimečně anorektičtí až hladovějící (van Galen et al., 2012a), chuť k jídlu může být ale i zachována nebo dokonce být zvýšena (Votion & Serteyn, 2008).



Obr. 11 Moč pacienta s atypickou myopatií (vlevo) obsahující myoglobin, vpravo je moč zdravého jedince. Fotografie poskytnuta MVDr. Petrem Jahnem, CSc. z Veterinární univerzity Brno.

Dalšími příznaky jsou distenze (roztažení) močového měchýře močí při rektální palpaci (vyšetření konečníku pohmatem; u 58 % případů) se současnou dysurií, neprůchodnost tlustého (a)nebo tenkého střeva (38 %) (van Galen et al., 2012a), apatie (Šamonilová et al., 2022), zarudlé spojivky a srdeční šelesty (Votion, 2016). Právě plný močový měchýř způsobuje příznaky koliky (Sponseller et al., 2012). Majitelé při mylné domněnce, že mají koně koliku, nutí zvířata k pohybu. To však zhoršuje prognózu, protože pohyb vyvolává další poškození svalů (Šamonilová et al., 2022).

U jednotek případů bylo pozorováno: mírný průjem, suchá nebo hlenem pokrytá stolice, posun tlustého střeva, bolest v okolí ledvin, snížený tonus konečníku, prolaps penisu, nekróza a ulcerace (zvředovatění) sliznice ústní dutiny, pokles očního víčka, křeče žvýkacích svalů, schvácení kopyt (laminitida, jedná se o zánět stěnové škáry kopyta) a příznaky městnavého srdečního selhání (van Galen et al., 2012a).

2.1.4.2 Laboratorní ukazatele

Koně při nástupu příznaků AM trpí většinou hyperglykemií a mají zvýšenou hladinu laktátu a triacylglycerolů v krvi (Dunkel et al., 2018). Jsou také zaznamenány nižší hladiny vápníku v séru (Boemer et al., 2017). Další markery poškození svalu, jako jsou zvýšená hladina fosforu a draslíku a snížený obsah sodíku a chloru v krvi, nebyly pozorovány (Votion et al., 2007). U koní s AM byly nalezeny i zvýšené plasmatické koncentrace troponinu I, jakožto specifického markeru poškození srdečního svalu. Toxicitu vůči myokardu nejspíše zapříčiňují acylkarnitiny s dlouhým řetězcem (Lemieux et al., 2016). V krvi je též zvýšený obsah myoglobinu, což je nefrotoxin uvolňovaný z poškozených svalů (Fabius & Westermann, 2018). U AM však není akutní selhání ledvin způsobené myoglobinem příčinou úmrtí (Brandt et al., 1997).

Z hematologického hlediska mají pacienti zvýšené hladiny leukocytů kvůli neutrofilii (Votion & Serteyn, 2008; Jahn et al., 2022), zvýšený hematokrit (Brandt et al., 1997) a vyšší hodnotu PCV (objem červených krvinek) (Dunkel et al., 2018).

Pro určení diagnózy AM se v dnešní době stanovuje aktivita kreatinkinasy, koncentrace toxinů (HGA a MCPrG), jejich metabolitů (konjugátů MCPA a MCPF s karnitinem nebo glycinem) a acylkarnitinů (Wouters et al., 2021). AM je rovněž doprovázena zvýšenou hladinou acylglycinů (Karlíková et al., 2016).

Při nástupu klinických příznaků jsou pozorovány výrazně zvýšené aktivity enzymů ATP:kreatin N-fosfotransferasy (kreatinkinasa, CK, EC 2.7.3.2), dále pak L-aspartát:2-oxoglutarát aminotrasferasy (aspartátaminotransferasa, AST, 2.6.1.1)

(Palencia & Rivero, 2007) a (*S*)-laktát:NAD^+ oxidoreduktasy (laktátdehydrogenasa, LD, LDH, EC 1.1.1.27) (Bochnia et al., 2015). Zvyšující se aktivita kreatinkinasy v séru je spojována s negativní prognózou týkající se přežití (González-Medina et al., 2017). Maximum sérové aktivity CK nastává 6–12 hodin po svalovém poranění, přičemž poločas rozpadu tohoto enzymu je 12 hodin. Referenční mez pro aktivitu CK je 110–250 $IU \cdot l^{-1}$ (Jahn et al., 2022). Při prvních příznacích AM přesahuje aktivita CK často 10 000 $IU \cdot l^{-1}$, neobvyklé nejsou ani hodnoty ve stovkách tisíc jednotek (Votion & Serteyn, 2008). U koní, kteří přežijí AM, je dosažen vrchol aktivity kreatinkinasy přibližně po 24 hodinách od propuknutí prvních příznaků. Od čtvrtého dne začíná aktivita každý den klesat o polovinu oproti předchozímu dni (Jahn et al., 2022). V práci od Karlíkové et al. (2016) byl popsán případ koně, u něhož ještě ve 48. hodině po propuknutí příznaků vzrůstala aktivita CK. Tento kůň musel podstoupit eutanázii. V tomto výzkumu se závislost úmrtnosti (resp. eutanázie) na vzrůstající aktivitě kreatinkinasy u jednotlivců odlišovala.

V moči a v plasmě koní se nachází ve zvýšené míře acylkarnitiny s krátkým (C2–C5), středně dlouhým (C6–C12), dlouhým (C14–C20) a velmi dlouhým řetězcem (C22–C26), ale také acylkarnitiny odvozené od nenasycených, dikarboxylových a hydroxy- kyselin (Westermann et al., 2008; Karlíková et al., 2016). Zvýšené hladiny dikarboxylových kyselin jsou způsobené aktivací alternativní ω-oxidace, která tyto metabolity vytváří (Boemer et al., 2015). Ze skupiny acylkarnitinů byly navrženy jako nejlepší potenciální biomarkery AM acylkarnitiny o délce čtyř až deseti uhlíků. Zároveň počáteční koncentrace acylkarnitinů C4 a C5 by mohli být používány jako prediktivní ukazatele přežití (Mathis et al., 2021). Acylkarnitiny nejspíše přispívají k rozvoji hyperglykémie u pacientů, protože se podílí na inzulínové rezistenci ve svalech (Lemieux et al., 2016).

Westermann et al. (2008) odhalili zvýšené hladiny konjugátů glycinu v moči postižených koní. Konkrétně se jedná o valerylglycin, isovalerylglycin, butyrylglycin a hexanoylglycin. Karlíková et al. (2016) zmíněné acylglyciny potvrdili i v séru a dále zaznamenali zvýšení isobutyrylglycinu, fenylpropionylglycinu a suberylglycinu v séru a v moči, furoylglycin a propionylglycin se nacházel pouze v moči. Největší rozdíl v koncentracích acylglycinů v moči mezi zdravými a nemocnými koňmi nastal u butyrylglycinu a hexanoylglycinu (Mathis et al., 2021).

Naměřené koncentrace HGA v krvi se pohybují od 0,230 $\mu mol \cdot l^{-1}$ (Carlier et al., 2015) do 60,170 $\mu mol \cdot l^{-1}$ (Bochnia et al., 2015). Stanovení HGA avšak nemá výpovědní hodnotu pro průběh onemocnění a šanci na přežití, protože obsah HGA v krvi koní je

velmi variabilní. Kinetika HGA u koní stále není dobře prostudována (Boemer et al., 2017). Bochnia et al. (2019) stanovili obsah HGA v moči na 0,064–3,405 mmol na 1 mol kreatininu. Hladiny MCPA-karnitinu v séru se pohybují v rozmezí 0,950 nmol·l^{-1} (Votion et al., 2014) až 1,180 µmol·l^{-1} (Sander et al., 2016), v moči je to 0,133–2,754 mmol na 1 mol kreatininu (Bochnia et al., 2019). Rozpětí koncentrace glycinového konjugátu s MCPA v moči činí 0,200 mmol (Sander et al., 2016) až 192,704 mmol na 1 mol kreatininu, v séru byla nejvyšší detekovaná hladina MCPA-glycinu 4,649 µmol·l^{-1} (Bochnia et al., 2019).

MCPrG se u postižených koní nachází v daleko nižších koncentracích než HGA a zároveň je obsah MCPrG velmi variabilní (Bochnia et al., 2019). Koncentrace MCPrG a jeho metabolitů v séru a v moči jsou uvedeny v Tab. 2. Jahn et al. (2022) detekovali u koně s AM nižší hladinu MCPF-karnitinu v krvi ve srovnání s údaji v Tab. 2, konkrétně 0,208 µmol·l^{-1}. Současně nenalezli v krvi koně jak MCPrG, tak jeho metabolit MCPF-glycin. Navíc detekovali přítomnost HGA v krvi sledovaného koně ještě 15. den od hospitalizace, MCPA-karnitin ve 4. dni, MCPA-glycin ve 3. dni a MCPF-karnitin 5. den (Jahn et al. 2022).

Tab. 2 Koncentrace methylencyklopropylglycinu (MCPrG) a jeho metabolitů v séru a v moči. Zkratky: MCPF- = methylencyklopropylformyl-. Převzato a upraveno dle Bochnia et al. (2019).

Metabolit	**Sérum [µmol·l^{-1}]**	**Moč [mmol na 1 mol kreatininu]**
MCPrG (isomer A)	0,004–1,623	0,001–0,026
MCPrG (isomer B)	0,003–0,228	0,003–0,051
MCPF-karnitin	0,990–18,903	5,380–29,378
MCPF-glycin	0,052–1,180	1,771–16,058

2.1.4.3 Další změny v hladinách metabolitů

V séru a v moči koní s AM již byla provedena řada metabolomických studií, kde byly pozorovány změny hladin metabolitů značící poruchy metabolismu organických kyselin a aminokyselin, purinů, pyrimidinů a vitaminů (Karlíková et al., 2016).

V moči koní s AM byly nalezeny zvýšené hladiny organických kyselin, konkrétně ethylmalonové, methylsukcinové, mléčné (Westermann et al., 2008), glutarové (Valberg et al., 2013), adipové (Sponseller et al., 2012), pyrohroznové, suberové a 2-hydroxyglutarové (Mathis et al., 2021). U pacientů s AM byly oproti zdravé populaci významně zvýšené koncentrace kyseliny 2-hydroxyglutarové a ethylmalonové (Mathis et al., 2021). V séru postižených koní byl nalezen i snížený citrát, isocitrát a akonitát a zvýšený 2-oxoglutarát, což je nejspíše způsobeno nedostatkem acetyl-CoA, který není produkován β-oxidací (Karlíková et al., 2016).

V moči a v séru bylo u pacientů pozorováno výrazné zvýšení proteinogenních aminokyselin (alaninu, aspartátu a leucinu), β-alaninu a sarkosinu (Karlíková et al., 2016). Sarkosin se přeměňuje na glycin za přítomnosti enzymu sarkosin:akceptor oxidoreduktasy (demethylující) (sarkosindehydrogenasa, EC 1.5.8.3), která je FAD-dependentní, tudíž MCPA-karnitin nejspíše inhibuje i tento enzym. Na rozdíl od toho koncentrace methioninu, argininu, serinu a kreatininu zahrnuté do metabolismu glycinu byly sníženy (Wouters et al., 2021). Leucin (a jeho 2-oxo derivát) byl jedinou rozvětvenou aminokyselinou, která byla pozorována jako zvýšená. Změna koncentrací valinu a isoleucinu u pacientů oproti zdravým koním nebyla. Enzymy pro metabolizaci rozvětvených aminokyselin a HGA s MCPrG jsou shodné. Jelikož jsou hladiny valinu a isoleucinu nezměněné, BCAT a BCKDH jsou nejspíše schopné katalyzovat reakce toxinů i těchto aminokyselin (Karlíková et al., 2016; Wouters et al., 2021).

V séru byly nalezeny výrazně snížené koncentrace purinů: adeninu, adenosinu, guanosinu, hypoxanthinu, inosinu a xantinu. Meziprodukty *de novo* syntézy purinů byly výrazně zvýšeny, to je způsobeno degradací purinových nukleotidů uvolněných z myocytů při myopatii. V moči byly již rozdíly jak v purinech, tak v pyrimidinech. Byla odhalena snížená hladina adenosinu, cytosinu, cytidinu, uracilu, dihydrouracilu a thymidinu, zvýšeny byly akorát xantin a xantosin (Karlíková et al., 2016). U rhabdomyolýzy obecně dochází k hyperurikémii (Wouters et al., 2021).

Hladiny některých vitaminů a jejich derivátů byly rovněž pozměněné. V séru i v moči byl snížen riboflavin (vitamin B_2) a trigonelin (N-methylovaný vitamin B_3). Pouze

v moči byl snížen panthotenát (vitamin B_5) a pyridoxát (produkt rozkladu vitaminu B_6) (Karlíková et al., 2016).

V plasmě koní byly odhaleny i intracelulární metabolity, které se uvolňují při rhabdomyolýze. Jedná se o kreatin, taurin, karnosin a již zmíněný sarkosin. Karnosin a taurin jsou specifické ukazatele poškození svalových vláken I. nebo II. typu u koňovitých. Taurin se se vyskytuje převážně ve svalových vláknech I. typu, karnosin je zase ukazatelem poškození myokardu (Wouters et al., 2021).

2.1.5 Prevence a léčba

Jelikož neexistuje specifická léčba a nemoc je spjata s vysokou úmrtností, o to důležitější je dodržování preventivních opatření. Týkají se jednak managementu okolo koní, jednak sledování pastvin (Votion et al., 2020).

Před zjištěním pravé příčiny AM Votion et al. (2009) doporučovali preventivně ustájit koně během nepříznivého počasí, poskytovat jim solná lízátka, celoroční přikrmování (ječmen, oves, kukuřice, seno, sláma, kompletní směs) a dostupnost vody z rozvodné sítě. Také zjistili, že odčervení a pravidelné očkování (např. proti chřipce, tetanu nebo herpesvirům), snižuje riziko AM. Naopak opakované rozmetání hnoje a bránování pastvin napomáhá rozvoji AM. Van Galen et al. (2012b) dále radili omezit pastvu na podzim a na jaře, odstraňovat z pastvin odumřelé listy a dřevo a preferovat pastviny bez stromů. Alespoň v rizikových obdobích navrhovali dodávat koním doplňkové krmivo. V krmivu se nachází substráty, vitaminy (zejména riboflavin, ze kterého se tvoří FAD) a antioxidanty, které příznivě pomáhají prognóze koně zasaženého AM (Votion et al., 2020). Přikrmovaní koně toho navíc méně sní na pastvině (Šamonilová et al., 2022).

Nejrizikovějšími měsíci jsou říjen, listopad a prosinec, posléze na jaře to jsou březen, duben a květen (Šamonilová et al., 2022). V dnešní době se majitelům koní doporučuje zamezit styku koní s *A. pseudoplatanus* nebo *A. negundo* a odstraňovat jejich semena a semenáčky z pastvin. Zároveň se mohou dostat do vody a krmiva pro koně. Nepříznivým faktorem je trvalá pastva na vlhké půdě. Ukazuje se, že pokud se koně pasou méně jak šest hodin denně v lokalitách, kde se blízko vyskytují nažky, mají lepší šanci na přežití než ti, kteří se pasou déle (Votion et al., 2020). Roznosu nažek napomáhá silný vítr. Nažky mohou dolétnout až 200 metrů od stromu, tudíž nepřítomnost javoru přímo v bezprostřední blízkosti pastviny není dostatečnou prevencí (Votion, 2016).

Symptomatická léčba koně s AM je založena na odstranění akutní rhabdomyolýzy a léčbě poruch metabolismu lipidů. Kůň by primárně měl být v teple a měl by se co

nejméně hýbat a stresovat (Šamonilová et al., 2022). Prvotní a nejdůležitější fází léčby je infuzní terapie, čímž se obnoví objem cirkulující krve a acidobazická a elektrolytová rovnováha, kůň se současně rehydratuje (Witkowska-Pilaszewicz et al., 2019). Energie pro poškozené svaly je dodávána prostřednictvím infúze 5% glukosy společně s insulinem, aby se zabránilo rozvoji další hyperglykemie a dehydratace. Pro zlepšení prognózy pacientů je vhodné podávat *per os* kombinaci karnitinu, vitaminu E, riboflavinu a selenu (u karnitinu a riboflavinu možnost i intravenózního podání). Aplikací karnitinu se lépe eliminují toxiny a toxické metabolity. Selen s vitaminy podporují mitochondriální funkce. Pro snížení bolesti se využívají nesteroidní protizánětlivá léčiva. Dále se doporučuje koním podávat laxativa nebo aktivní uhlí. U pacientů je také typický nafouklý močový měchýř, což vyvolává příznaky koliky. Je proto zapotřebí kontrola a katetrizace močového měchýře. Pro zamezení rozvoje proleženin u ležícího koně je třeba pravidelného polohování. V neposlední řadě se radí insuflace kyslíku (zavádění plynu do tělní dutiny) (Fabius & Westermann, 2018; Šamonilová et al., 2022).

2.1.6 Zvláštní případy atypické myopatie a podobná onemocnění

Existují případy koní, kteří se pásli na pastvinách s *A. pseudoplatanus* nebo *negundo*, kdy byl v krvi zjištěn obsah HGA i přes to, že neměli klinické příznaky AM. Samotné požití HGA tak nemusí vyvolat u všech koní AM, což poukazuje na další možné mechanismy patogeneze AM (Baise et al., 2016), které je potřeba ještě prozkoumat.

Byl již popsán případ rozvoje AM u novorozeného hříběte, jehož matka prodělala AM v šestém měsíci březosti (Karlíková et al., 2018). Přesná patogeneze však ještě nebyla potvrzena, ale nejspíše se HGA a jeho metabolity nahromadily v placentě klisny a následně se přenesly na plod, nebo byly sloučeniny vylučovány do mléka klisny (Karlíková et al., 2018). Již byl potvrzen vertikální přenos HGA, některých acylkarnitinů a toxinů MCPA-karnitinu, MCPF-karnitinu, MCPA-glycinu a MCPF-glycinu do mléka březích klisen, které byly vystaveny přítomnosti nažek nebo semenáčků javoru (Renaud et al., 2021; Sander et al., 2021).

U koní jsou evidovány nejrůznější druhy myopatií, mezi nejvýznamnější se řadí zátěžová myopatie (ZM), polysacharidová myopatie (PSSM) a nutriční myodegenerace (NMD). U koní se mohou projevit klinické příznaky AM, i když u nich není indikována přítomnost HGA nebo se nepasou na pastvinách s výskytem javorů. Toto onemocnění se nazývá ZM. Jde o onemocnění vyvolané fyzickou námahou, při níž se degenerují kosterní svaly. U tohoto typu myopatie dochází k postižení svalových vláken druhého typu, kdežto

u AM jsou to vlákna prvního typu. Svalová vlákna typu II jsou přizpůsobena na rychlé kontrakce, na druhou stranu se rychleji unaví. Převládá u nich anaerobní metabolismus s nízkou oxidační kapacitou (McEwen & Hulland, 1986). PSSM je geneticky podmíněným druhem myopatie projevujícím se poruchami ukládání glykogenu. Jedná se o autozomálně dominantní onemocnění. Zasažena jsou pouze určitá plemena koní. Klinické příznaky zahrnují projevy námahové rhabdomyolýzy, bolest svalů, ztuhlost, pocení, slabost a neochotu k pohybu (Finno et al., 2009). NMD, známá také pod anglickým názvem „white muscle disease“, je způsobená nedostatkem selenu a vitaminu E, které působí jako antioxidanty. Při deficitu těchto látek dochází k rhabdomyolýze vyvolané radikály. Postiženy jsou hlavně svaly zapojené do pohybu a myokard (Delesalle et al., 2017).

I u lidí byl zaznamenán MADD, známý pod názvem glutarová acidurie typu II. Toto onemocnění je na rozdíl od AM autozomálně recesivně dědičné a jedná se o poruchu mitochondriálního flavoproteinového řetězce pro přenos elektronů v dýchacím řetězci. Tento řetězec je akceptorem elektronů pro některé mitochondriální FAD-dependentní dehydrogenasy. To pak zasahuje do metabolismu mastných kyselin, rozvětvených aminokyselin, organických kyselin a cholinu (Karlíková et al., 2016; Sousa Martins et al., 2022).

2.2 Současný stav diagnostiky atypické myopatie

Před zjištěním pravé příčiny AM byla diagnóza založena na anamnéze koně, jeho klinických příznacích, laboratorních nálezech a histologii (Votion, 2012). Na základě toho van Galen et al. (2012a) vytvořili algoritmus pro diagnostiku případů AM. Laboratorní vyšetření pro potvrzení AM zahrnovalo stanovení profilu acylkarnitinů v krvi a moči a glycinových konjugátů a organických kyselin v moči (Votion, 2012).

V dnešní době se vyvíjejí metody pro snadné a rychlé stanovení HGA a jeho metabolitů v séru nebo moči postižených koní. Důvodem je každoroční zvyšování počtu případů AM, ale rovněž to, že koně většinou umírají do 12 hodin od propuknutí prvních příznaků (Doležal et al., 2020).

V preanalytické fázi se pro extrakci metabolitů nejčastěji používá extrakce pevná fáze-kapalina (SLE) nebo extrakce pevnou fází (SPE) (Doležal et al., 2020).

Prvotní metody, které se využívají i dnes, zahrnují kroky derivatizace (González-Medina et al., 2021). Valberg et al. (2013) v průlomové studii použili pro stanovení obsahu toxinů plynovou chromatografii s předkolonovou derivatizací s hmotnostní

spektrometrií (GC-MS). MCPA-glycin stanovovali po derivatizaci na jeho trimethylsilylový derivát. MCPA-karnitin byl analyzován ultraúčinnou kapalinovou chromatografií s tandemovou hmotnostní spektrometrií (UHPLC-MS/MS) po butyrylaci (HCl v butanolu).

Poslední dobou jsou snahy vyvíjet metody LC-MS/MS bez derivatizace. Důvody zahrnují zejména časovou a finanční náročnost (González Medina et al., 2018). První metodu bez derivatizace uvedl Rudolph et al. (2018). Mez detekce (LOD, také nazývaná limit detekce) v koňském séru pro HGA stanovili na 50,0 $ng \cdot ml^{-1}$ a pro MCPA-karnitin 2,5 $ng \cdot ml^{-1}$. Později byl LOD prezentován pro HGA v séru 0,055 $ng \cdot ml^{-1}$ a pro MCPA-karnitin 0,078 $ng \cdot ml^{-1}$ (González-Medina et al., 2021). V Tab. 3 jsou shrnuty LOD některých metabolitů v moči a v mléce ve studii od El-Khatiba et. al (2023).

Tab. 3 Limity detekce (LOD) některých metabolitů v moči a mléce krav. Zkratky: HGA = hypoglycin A, MCPrG = methylencyklopropylglycin, MCPA- = methylencyklopropylacetyl-, MCPF- = methylencyklopropylformyl-. Převzato a upraveno dle El-Khatib et al. (2023).

Metabolit	**LOD v moči [$\mu g \cdot l^{-1}$]**	**LOD v mléce [$\mu g \cdot l^{-1}$]**
HGA	20,70	0,34
MCPrG	33,20	2,63
MCPA-glycin	23,90	0,30
MCPF-glycin	12,60	0,33
MCPA-karnitin	15,80	0,23

Analýza konjugátů s glycinem nebo karnitinem není běžně dostupná jako součást rutinního laboratorního vyšetření ve veterinárních laboratořích (Jahn et al., 2022). Sander et al. (2018) vyvinuli metodu s derivatizací pro rychlou diagnostiku některých acylkarnitinů ze suché krevní skvrny (DBS, z angl. dry blood spot). DBS se běžně využívají v laboratořích pro novorozenecký screening a jejich výhodou je snadná manipulace při odběru, skladování a stabilita analytů.

V případě detekce HGA v rostlinných materiálech se dříve využívaly techniky papírové a iontově výměnné chromatografie. S rozvojem kapalinové chromatografie se začalo využívat derivatizace *o*-ftaldialdehydem, fenylisothiokyanátem nebo dansylchloridem. Detekce se prováděla pomocí spektrofotometrie ultrafialovým a viditelným světlem (UV/VIS), avšak v dnešní době, stejně jako u živočišného materiálu, se využívá kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií. I u rostlinného materiálu jsou vyvíjeny metody bez derivatizačního kroku (González Medina et al., 2018).

2.3 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií

Kombinací technik vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC, z angl. high-performance liquid chromatography) a MS dostáváme o analytu informace týkající se jeho molekulové hmotnosti, struktury, ale rovněž kvantitativní data (Skoog et al., 2022). LC-MS lze využít pro identifikaci neznámých sloučenin z komplexních matric (např. potravin, biologických vzorků). Předností spojení LC s MS je zejména vysoká citlivost a nízká spotřeba vzorku. Zároveň LC-MS umožňuje rozlišit stejně se eluující se látky (tzv. koeluenty), které mají sice stejný retenční čas, ale liší se v poměrech *m/z* (da Silva Bezerra, 2023).

Spojením LC a MS však vzniká nekompatibilita z hlediska skupenství vzorku vstupujícího do MS a tlaku v HPLC systému. Z kapalinového chromatografu odchází kapalný roztok s eluovanými analyty, navíc HPLC pracuje s vysokými tlaky. To představuje problém pro hmotnostní spektrometr, ve kterém je třeba mít ionty v plynné fázi ve vakuu. Průměrný průtok mobilních fází v HPLC je 1 $ml \cdot min^{-1}$, což představuje zhruba stonásobek, než může hmotnostní spektrometr pojmout. Všechny tyto problémy se dají vyřešit použitím ionizačních technik, které produkují ionty v plynné fázi za atmosférického tlaku. Konkrétně to jsou elektrosprej (ESI), chemická ionizace za

atmosférického tlaku (APCI), fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI) nebo termosprej (TSP) (De Hoffmann & Stroobant, 2007; Skoog et al., 2022; da Silva Bezerra, 2023).

Spojením LC a MS se sice dosahuje velká selektivita, zato můžou nastat potíže s rozlišením. Z toho důvodu se pro spojení s LC využívá vícero hmotnostních analyzátorů za sebou (tzv. tandemová hmotnostní spektrometrie, MS/MS). Nejčastěji se lze setkat s trojitým kvadrupólem (QqQ), kvadrupólem s iontovou pastí (Q-Trap) nebo analyzátorem doby letu (Q-TOF) (Skoog et al., 2022).

2.3.1 Kapalinová chromatografie

Společným rysem chromatografických technik je využití nepohyblivé stacionární a pohyblivé mobilní fáze. Složky vzorku vykazují různou retenci ve stacionární fázi a zároveň jsou unášeny fází mobilní (Skoog et al., 2022). Analyty jsou tak různě distribuovány mezi obě fáze. Interakcí jednotlivých složek vzorku se stacionární fázi dochází k jejich separaci. Látky více zadržované stacionární fází budou eluovány později jak látky interagující méně (Nováková et al., 2021a).

HPLC je aktuálně nejpoužívanější a nejuniverzálnější metodou pro separaci analytů v organickém, anorganickém a biologickém materiálu (Skoog et al., 2022). Využití nalezla jak ve výzkumu, tak při rutinních analýzách napříč laboratořemi různého zaměření (např. v oblasti klinických výzkumů, forenzní analýzy, analýzy potravin nebo rostlinného materiálu) (Nováková et al., 2021a). Oproti plynové chromatografii (GC) je použitelná pro netěkavé a tepelně nestabilní látky, ale také pro anorganické ionty (Skoog et al., 2022).

V HPLC tvoří mobilní fázi kapalina unášející vzorek s rozpuštěnými analyty. Tato fáze musí procházet kolonou pod tlakem jednotek až desítek megapascalů (MPa), aby byl zachován dostatečný průtok kapaliny. Stacionární fází je buď kapalina, nebo tuhá látka v závislosti na druhu HPLC separace. Všeobecně stacionární fáze obsahuje náplně s velmi malými částicemi o velikosti několika jednotek mikrometrů (Skoog et al., 2022).

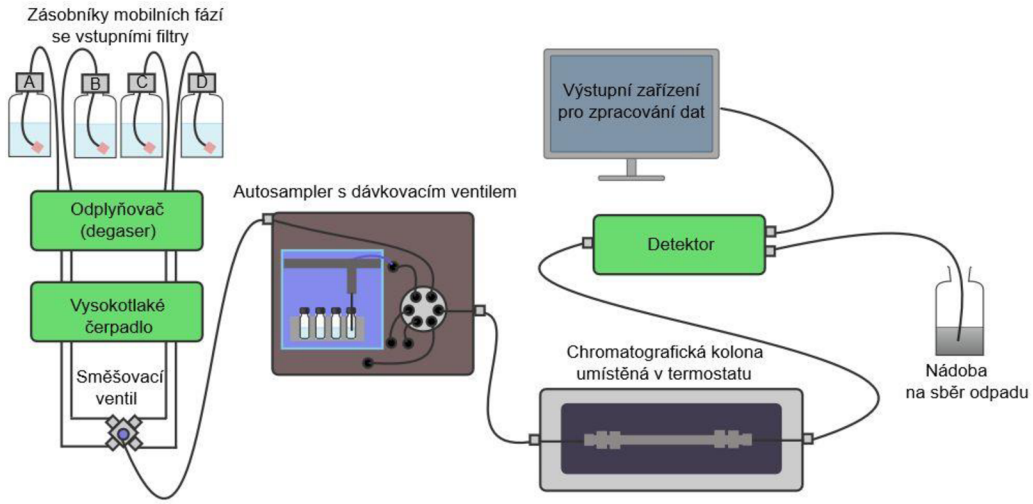
V HPLC se eluce děje za konstantního nebo proměnlivého složení mobilní fáze během separace. Při konstantním složení mobilní fáze se hovoří o izokratické eluci. Využívá se pouze jednoho rozpouštědla po celou dobu separace nebo směsi mobilních fází o konstantním složení. Při gradientové eluci se používají nejméně dvě mobilní fáze, které se výrazně liší svou polaritou (tj. eluční silou). Jejich vzájemný poměr zastoupení se během separace mění (Skoog et al., 2022). Izokratické eluce se využívá v případě, že

separované látky mají podobné fyzikálně-chemické vlastnosti. Pokud by však tuhle podmínku separované látky nesplňovaly, byla by izokratická eluce časově náročná, a proto se běžně přistupuje ke gradientové eluci (Nováková et al., 2021a).

2.3.1.1 Instrumentace

HPLC byla poprvé představena v 70. letech minulého století. Od té doby byl vývoj HPLC zaměřen hlavně na zmenšování rozměrů kolon a velikosti částic v nich, na nové typy kolon (např. monolitické) a na vývoj nových detektorů (Nováková et al., 2021a). Speciálním typem HPLC je UHPLC (ultra-high performance liquid chromatography). Výhodami UHPLC vůči HPLC jsou významně větší účinnost, úspora rozpouštědel a zkrácení doby analýzy, která trvá v řádu minut (Skoog et al., 2022).

Přístroje v HPLC obsahují pět základních částí (Obr. 12): sektor pro uchovávání a transport mobilních fází, dávkovací ventil, chromatografickou kolonu, detektor a datovou stanici (Nováková et al., 2021a).



Obr. 12 Schéma instrumentace vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC). Převzato a upraveno dle Nováková et al. (2021a) a Skoog et al. (2022).

Do HPLC přístroje se mobilní fáze dostává ze zásobníků obsahujících vstupní porézní filtry (Nováková et al., 2021a). V mobilních fázích je nežádoucí obsah rozpuštěného plynu a prachových částic. Mobilní fáze jsou proto odplyněny v odplyňovači (degaseru). Plyn obsažený v mobilní fázi by způsoboval nereprodukovatelnost průtoku, rozšiřování zón analytu (Skoog et al., 2022) a zavzdušnění čerpadla (Nováková et al., 2021a). Prachové částice zase rychle zanáší HPLC systém. Oba tyto faktory negativně ovlivňují stav kolony a činnost detektoru. Mobilní fáze jsou do HPLC přístroje nejčastěji vháněny pístovým čerpadlem. Mobilní fáze je nejprve nasávána do komory čerpadla a posléze vytlačena periodickým pohybem pístu (Skoog et al., 2022). Čerpadla musí být schopna reprodukovatelně a přesně čerpat mobilní fázi při tlaku do 40 MPa pro HPLC a do 150 MPa pro UHPLC. Pro mísení mobilních fází se využívá směšovače (Nováková et al., 2021a). Nespornou výhodou pístových čerpadel je právě snadná adaptace systému na gradientovou eluci. Navíc tato čerpadla poskytují konstantní průtok (Skoog et al., 2022).

Mobilní fáze dále vstupuje do místa chromatografu, kde se dávkuje vzorek. V moderních přístrojích je vialka se vzorkem umístěna v autosampleru s automatickým dávkovačem. Dávkování vzorku o objemech 1–100 µl umožňuje dávkovací smyčka (angl. sampling loop) (Skoog et al., 2022).

Vzorek je po vstupu do chromatografického systému unášen mobilní fází na kolonu. HPLC kolony se vyrábí zejména z nerezové oceli a jsou přímé (Skoog et al., 2022). V dnešní době se využívají kolony o průměru 2,1−5 mm a délce 1−30 cm. Velikost částic stacionární fáze se pohybuje v rozmezí 1 až 5 µm (Nováková et al., 2021a). Před kolonou může být napojena předkolona se stejným složením jako analytická kolona. Jejím hlavním úkolem je zabránit případným nečistotám vstoupit do kolony, tudíž aby nedošlo k její kontaminaci (Skoog et al., 2022).

Ve zhruba 90 % HPLC separací se využívají kolony s reverzní fází (RP-HPLC) (Žuvela et al., 2019), jejichž stacionární fáze je nepolární (hydrofobní). V praxi lze nejčastěji v laboratořích narazit na kolony s oktadecylovou vazbou (C18) a oktylsilanem (C8). Obecně existují kolony s alkyly C1 až C30, další skupinou jsou kolony s fenyl- a aryl-vázanými stacionárními fázemi. Umožňují separaci polárních, nepolárních, ionizovatelných a iontových sloučenin současně. Obvykle jedna z mobilních fází obsahuje vodu (resp. pufr) a druhá je tvořena organickou látkou mísitelnou s vodou, např. methanolem nebo acetonitrilem. Retence látek ve stacionární fází se zvyšuje, pokud se zvyšuje hydrofobicita separovaných látek nebo stacionární fáze (a)nebo pokud se

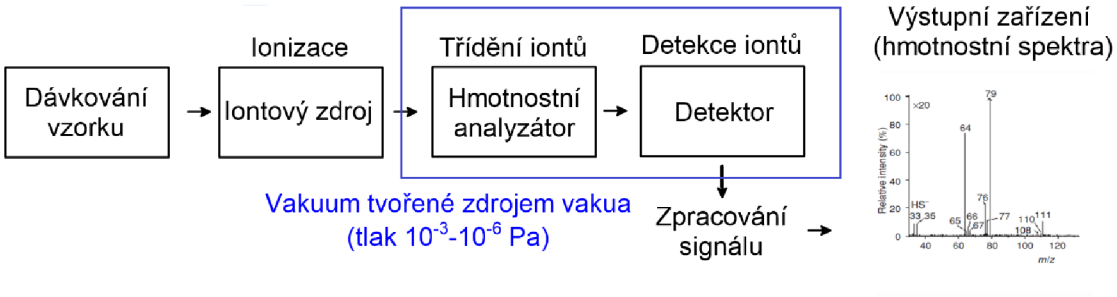
zvyšuje polarita mobilní fáze. Jinak řečeno první se budou eluovat látky spíše hydrofilní (polární) a až poté hydrofobní (nepolární) (Žuvela et al., 2019).

Pro detekci ve všech typech HPLC neexistuje žádný vysoce citlivý univerzální detekční systém (Skoog et al., 2022). Minoritně se používají detektory fluorescenční, elektrochemické, refraktometrické, chemiluminiscenční nebo vodivostní (11,9 %). V posledním desetiletí je nejvyužívanějším detektorem hmotnostní spektrometr (57,2 %) následovaný UV detektorem (detektorem diodového pole; 30,9 %) (Nováková et al., 2021a). Hmotnostní spektrometr umožňuje detekovat látky v množstvích menších jak 1 pg. Rozsah detekce může být lineární v rozpětí až pěti koncentračních řádů (Skoog et al., 2022).

Signál z detektoru je zaznamenáván v datové stanici a vyhodnocován speciálními chromatografickými programy. Za detektorem se může nacházet nádoba na odpad nebo sběrač jednotlivých frakcí (Nováková et al., 2021a).

2.3.2 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie je technika, při které se sleduje interakce iontů v plynné fázi s elektrickým nebo magnetickým polem ve vakuu (Faull et al., 2008; Friedecký & Lemr, 2012). Zjednodušené schéma hmotnostního spektrometru je uvedeno na Obr. 13. Vzorek je do evakuované části přístroje dávkován pomocí dávkovacího zařízení. Lze dávkovat vzorky v plynném, kapalném i pevném skupenství. Molekuly jsou nejprve převedeny na ionty v iontovém zdroji prostřednictvím ionizačních technik. Při nich se využívá bombardování elektrony, fotony, ionty nebo molekulami. Po ionizaci mají ionty kladný nebo záporný náboj. Tyto ionty jsou vháněny do hmotnostního analyzátoru, kde dochází k jejich rozdělení na základě různých poměrů jejich hmotnosti ku náboji (m/z). Po kontaktu iontů s detektorem se vytváří signál, který je zaznamenávaný počítačem (výstupním zařízením). Aby nedocházelo ke ztrátám iontů a jejich odchýlení z dráhy, musí hmotnostní analyzátory a detektory pracovat ve vakuu. Na rozdíl od toho ionizace probíhá buď za sníženého, nebo atmosférického tlaku. Výstupem je hmotnostní spektrum, které zobrazuje relativní četnost signálů jednotlivých iontů dle poměru m/z (Ho et al., 2003; Skoog et al., 2022).



Obr. 13 Blokové schéma hmotnostního spektrometru. Převzato a upraveno dle Skoog et al. (2022).

Hmotnostní spektrometrie našla využití jak v kvalitativní, tak kvantitativní analýze analytů ve složitých směsích. Slouží k identifikaci analytů a strukturní charakterizaci neznámých sloučenin. Může poskytovat informace o molekulové hmotnosti nebo empirickém vzorci látek, jejich funkčních skupinách, izotopových poměrech a stereochemii (da Silva Bezerra, 2023).

2.3.2.1 Iontové zdroje

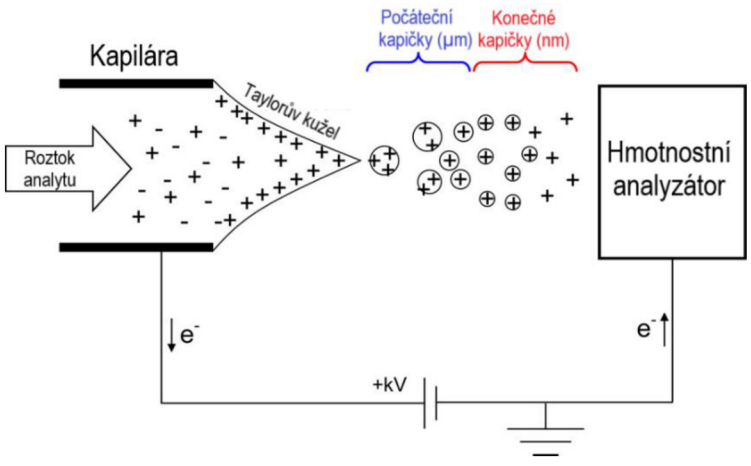
Cílem ionizace je získat ionty analytu v plynném skupenství. Mezi ionizační techniky pro vzorky v plynném skupenství se řadí ionizace nárazem elektronu (EI) a chemická ionizace (CI). Při těchto technikách je vzorek nejprve odpařen a až poté je ionizován (Skoog et al., 2022). EI je tzv. tvrdou ionizační technikou, při které letící elektrony předávají svojí energii molekulám analytu. Vznikají bohatá fragmentační spektra umožňující identifikaci sloučeniny. Oproti tomu CI je zařazena mezi měkké ionizační techniky. Nejprve dochází k ionizaci reakčního plynu a až potom je energie předána molekulám analytu. Při CI není předávaná energie tak vysoká jako u EI, vznikají proto méně fragmentovaná spektra (Friedecký & Lemr, 2012). Využití EI a CI je však pouze pro těkavé a tepelně stabilní sloučeniny (De Hoffmann & Stroobant, 2007).

Sloučeniny, které netěkají nebo jsou tepelně labilní, musí být extrahovány z kondenzované fáze do kapalné. Vzorky v kapalné fázi (nejčastěji ve formě roztoku) jsou ionizovány za atmosférického tlaku prostřednictvím ESI, APPI nebo APCI. V iontových zdrojích pro pevné látky se analyt nachází na pevném povrchu. Společně s analytem se desorbuje z povrchu také matrice, kterou je pevná látka nebo viskózní tekutina. Takovouto ionizační technikou je např. laserová desorpce a ionizace analytu za účasti matrice (MALDI) (De Hoffmann & Stroobant, 2007). Ionizační techniky ESI a MALDI přinesly revoluci v ionizaci velkých molekul, např. proteinů. Proteiny jsou polární, netěkavé a teplotně nestabilní, tudíž pro techniky CI a EI naprosto nevhodné. Navíc by

použitím EI a CI docházelo k degradaci jejich struktury (Banerjee & Mazumdar, 2012; Nováková et al., 2021a).

ESI (Obr. 14) byla vyvinuta v 80. letech a je široce užívanou citlivou technikou pro produkci iontů v plynné fázi z netěkavých molekul v komplexním biologickém vzorku (Ho et al., 2003). ESI se nejdříve využívala na analýzu proteinů, postupně se její využití rozšířilo i pro analýzu dalších biomolekul a malých polárních látek. ESI lze jednoduše propojit s HPLC nebo kapilární elektroforézou (De Hoffmann & Stroobant, 2007).

Studovaný roztok je nasáván do ústí kapiláry, na které je přiváděno napětí 2,5 až 6 kV (Ho et al., 2003). Na ústí kapiláry vzniká kapka, která se vlivem tlaku způsobeném nahromaděnými náboji prodlužuje. Jakmile je porušeno povrchové napětí kapky, dochází ke vzniku Taylorova kužele a je vytvářen sprej (De Hoffmann & Stroobant, 2007). Vznikající kapičky aerosolu jsou vlivem elektrického pole nabité a mají stejnou polaritu jako napětí na kapiláře. Při kontaktu s protiproudem plynu o vyšší teplotě (např. dusíkem) se začne z kapiček odpařovat rozpouštědlo. Jak se zmenšuje objem kapiček, zvyšuje se v nich hustota povrchového náboje (Ho et al., 2003; Faull et al., 2008). V momentě, kdy je elektrické pole na povrchu kapiček dostatečně velké, dochází ke coulombické explozi a z povrchu kapiček se uvolňují ionty. Při ionizaci velkých molekul (o hmotnosti více jak 5 až 10 kDa) však nedochází k uvolňování samotných molekul, ale tyto molekuly se uvolňují vlivem odpařování rozpouštědla (De Hoffmann & Stroobant, 2007). Vzniklé ionty jsou poté urychlovány do analyzátoru. ESI umožňuje analýzu vzorků o mikrolitrových objemech s koncentrací analytů v řádu femtomolů (Ho et al., 2003; Faull et al., 2008).



Obr. 14 Princip ionizace elektrosprejem (pozitivní mód ionizace). Převzato a upraveno dle Konermann et al. (2013).

Ionty vzniklé ESI mohou být vícenásobně nabité. Zároveň nenastává jejich fragmentace či rozpad původního analytu. Pozitivní mód ionizace (ESI+), při kterém vznikají kladně nabité ionty ($[M+nH]^{n+}$), se využívá ve většině případů při spojení LC s ESI/MS (Liigand et al., 2017). V tomto módu je na ústí kapiláry přiváděn kladný potenciál, k nabíjení vzniklých iontů dochází prostřednictvím protonizace. Při negativním módu ionizace se přivádí na ústí kapiláry záporný potenciál a ionty vznikají deprotonizací ($[M-nH]^{n-}$). Výhodou negativního módu ionizace (ESI-) je, že poskytuje nižší šum pozadí. Jak v pozitivním, tak v negativním módu ionizace však nevznikají pravé molekulární ionty, ale spíše protonované či deprotonované molekuly. Pravé molekulární ionty by se tvořily ztrátou nebo ziskem elektronu (Banerjee & Mazumdar, 2012; Liigand et al., 2017).

2.3.2.2 Hmotnostní analyzátory

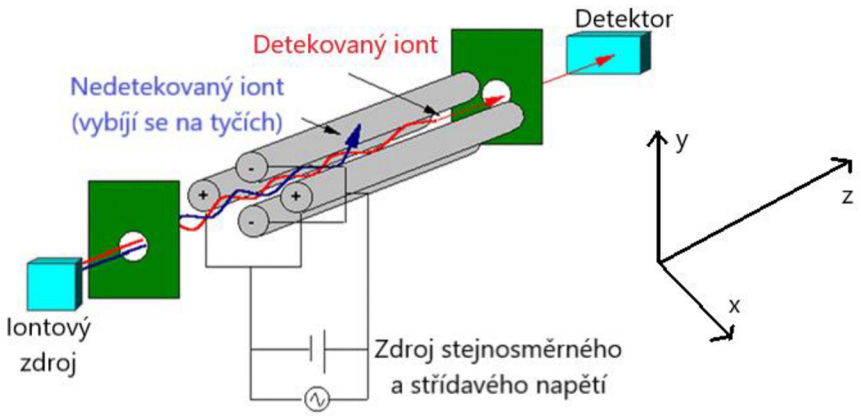
Po ionizaci směřují vzniklé ionty do hmotnostního analyzátoru, kde dochází k jejich rozdělení na základě různých poměrů *m/z*. Jelikož v ESI nevznikají ionty s nábojem z = 1, ale vícenásobně nabité ionty, neodpovídá poměr *m/z* jejich skutečné hmotnosti (De Hoffmann & Stroobant, 2007). Úkolem hmotnostních analyzátorů je rozlišit ionty v čase (a)nebo prostoru, aby byla umožněna jejich nezávislá detekce (Faull et al., 2008). Hmotnostní analyzátory pracují s magnetickým nebo elektrickým polem, která mohou být statická či dynamická. Jednotlivé hmotnostní analyzátory se liší ve využití těchto polí, popř. v jejich kombinování. Dle toho se pak v těchto analyzátorech využívá různého způsobu separace. V Tab. 4 jsou shrnuty nejběžnější typy hmotnostních analyzátorů a princip jejich fungování (De Hoffmann & Stroobant, 2007).

Tab. 4 Přehled hmotnostních analyzátorů a využívaných principů separace. Zkratky: *m/z* = poměr hmotnosti ku náboji. Převzato a upraveno dle De Hoffmann & Stroobant (2007).

Hmotnostní analyzátor	**Označení**	**Princip separace**	**Rozlišení**
Elektrický sektorový analyzátor	E nebo ESA	Kinetická energie	-
Magnetický sektorový analyzátor	B	Magnetický moment	100 000
Kvadrupól	Q	*m/z* (stabilita trajektorie)	2 000
Iontová past	IT	*m/z* (rezonanční frekvence)	4 000
Analyzátor doby letu	TOF	Rychlost (doba letu)	5 000
Iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací	FT-ICR	*m/z* (rezonanční frekvence)	500 000
Orbitrap s Fourierovou transformací	FT-OT	*m/z* (rezonanční frekvence)	100 000

Základními parametry hmotnostních analyzátorů jsou rozlišení, správnost určení *m/z*, hmotnostní rozsah, transmise a rychlost. Rozlišení (rozlišovací schopnost) je schopnost analyzátoru rozeznat odlišné signály pro dva ionty s podobnými *m/z*. V Tab. 4 jsou uvedena rozlišení jednotlivých hmotnostních analyzátorů. Správnost určení *m/z* popisuje rozdíl mezi teoretickým *m/z* a experimentálně zjištěným *m/z*. Hmotnostní rozsah vymezuje rozpětí *m/z*, ve kterých je hmotnostní analyzátor schopen pracovat. Transmise vyjadřuje poměr iontů dopadajících na detektor vůči iontům vstupujícím do hmotnostního analyzátoru. Jedná se tedy o parametr, který dává informaci o ztrátách iontů v částech hmotnostního analyzátoru. Posledním parametrem je rychlost skenování určitého rozsahu *m/z* (De Hoffmann & Stroobant, 2007).

Kvadrupól (Obr. 15) je nejpoužívanějším hmotnostním analyzátorem ve spojení se separačními metodami jako GC nebo HPLC. Disponuje velkou citlivostí, ale malým rozlišením (1 Da), které však stačí pro jeho použití s chromatografickými technikami. Z hlediska konstrukce je tvořen čtyřmi tyčemi s nejčastěji kruhovým nebo ideálně hyperbolickým průřezem. Tyto tyče jsou vůči sobě v rovnoběžném uspořádání se stejnou úhlopříčnou vzdáleností (jsou umístěny do vrcholů pomyslného čtverce). Na tyče je přiváděno stejnosměrné a vysokofrekvenční střídavé napětí. Na dvě protilehlé tyče působí vždy napětí stejné polarity. Ionty prochází podél tyčí ve směru osy z a působí na ně přitažlivá síla té tyče, která má opačný náboj než samotný iont. Znaménko elektrické síly se na tyčích periodicky mění, a proto i ionty periodicky mění směr svého pohybu vůči osám x a y (De Hoffmann & Stroobant, 2007; Faull et al., 2008; Friedecký & Lemr, 2012; Gross, 2017; Skoog et al., 2022).

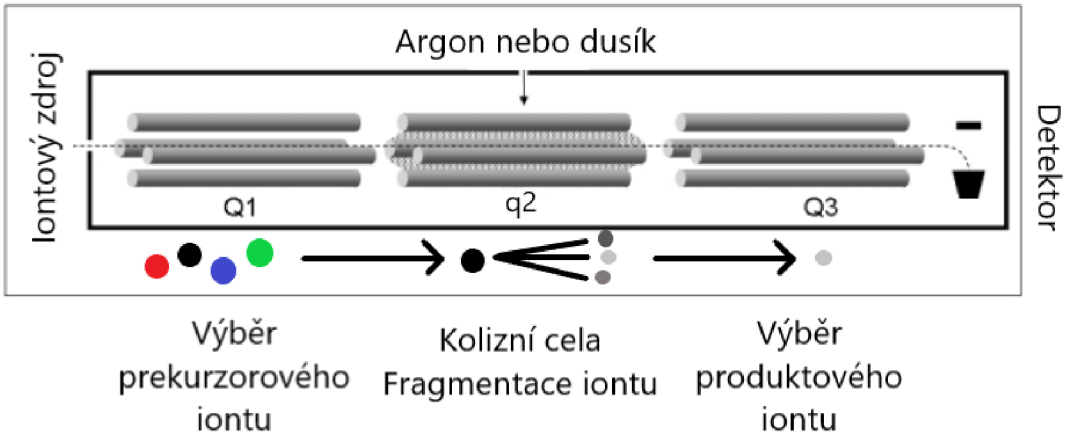


Obr. 15 Schéma kvadrupólového analyzátoru. V pravé části obrázku znázorněny osy šíření iontů podél tyčí. Převzato a upraveno z Chromservis (2023).

Pokud mají ionty o určitém poměru *m/z* prolétnout systémem k detektoru, musí být pro ně vhodně nastavena amplituda střídavého napětí a velikost stejnosměrného napětí. Tyto ionty pak s omezenou výchylkou oscilují kolem svého šíření bez dotyku tyčí. Ionty, které mají jiný poměr *m/z*, budou při těchto napětích více oscilovat ve směru os x a y vůči svému šíření. Vlivem gradientu napětí se oscilace iontu postupně zvětšuje, až iont narazí na tyč, jež je opačně nabitá než samotný iont. Tímto se iont vybije a k detektoru nedolétne. Jestliže tyč změní polaritu dříve, než se na ni iont stihne vybít, iont změní svůj směr pohybu. Kvadrupólový analyzátor tak funguje jako filtr iontů o určitém *m/z*. Výhodami tohoto analyzátoru je nízká pořizovací cena, vysoká rychlost skenování, malé rozměry, mechanická jednoduchost a snadné ovládání elektrického pole oproti přístrojům využívajících magnetické pole (De Hoffmann & Stroobant, 2007; Faull et al., 2008; Friedecký & Lemr, 2012; Gross, 2017; Skoog et al., 2022).

V biologických a chemických analýzách našly uplatnění tandemové hmotnostní analyzátory (MS^n), ve kterých se kombinuje dva a více hmotnostních analyzátorů. Mohou to být analyzátory stejného (trojitý kvadrupól), ale i různého typu (kvadrupól s iontovou pastí nebo kvadrupól s analyzátorem doby letu). Využití tandemové hmotnostní spektrometrie je zejména u složitých vzorků s interferencemi (Li et al., 2021)

V analytických aplikacích jsou běžně využívány hmotnostní spektrometry s trojitým kvadrupólem (QqQ) (Gross, 2017). Trojitý kvadrupól je schematicky vyobrazen na Obr. 16.



Obr. 16 Schéma trojitého kvadrupólu. Zkratky: Q/q = kvadrupól. Převzato a upraveno dle Pitt (2009).

První (Q_1) a třetí kvadrupól (Q_3) slouží k selekci iontů o určitých poměrech *m/z*, jak je popsáno výše, a fungují jako hmotnostní filtry. Kvadrupól mezi nimi (q_2) však neposkytuje selekci iontů, zato má funkci kolizní cely na bázi tzv. kolizně indukované disociace (CID). Do druhého kvadrupólu je přiváděno pouze vysokofrekvenční střídavé napětí (tzv. oblast bez pole) a vyskytuje se zde kolizní plyn (dusík nebo argon) o tlaku 0,1 až 0,3 Pa (Gross, 2017). Ionty přicházející z prvního kvadrupólu (prekurzorové ionty) jsou urychlené elektrickým polem a kolidují s částicemi kolizního plynu. Srážkou dochází ke zvýšení vnitřní energie iontů a jejich fragmentaci. Vznikající produktové ionty vstupují do třetího kvadrupólu. Trojitý kvadrupól pracuje ve čtyřech režimech, které jsou shrnuty v Tab. 5. Výhodami trojitého kvadrupólu jsou vysoká citlivost, specifita a robustnost, ale také cenová dostupnost. Trojitý kvadrupól se využívá pro kvantitativní analýzu složitých biologických matric (Friedecký & Lemr, 2012). Praktický význam má v klinických výzkumech nebo pro stanovení stopových množství látek (např. pesticidů, nepovolených látek v potravinách a metabolitů léčiv) (Li et al., 2021).

Tab. 5 Přehled skenovacích režimů trojitého kvadrupólu. Zkratky: CID = kolizně indukovaná disociace, *m/z* = poměr hmotnosti ku náboji, Q/q = kvadrupól. Převzato a upraveno dle Friedecký & Lemr (2012) a Gross (2017).

Režim	**Q_1**	**q_2**	**Q_3**
Sken produktových iontů (definován poměr m_1/z)	Bez skenování Selekce a propuštění iontu o určitém poměru m_1/z	CID	Skenování iontů do definovaného poměru m_1/z pro sledování produktových iontů
Sken prekurzorových iontů (definován poměr m_2/z)	Skenování od definovaného poměru m_2/z výše kvůli pokrytí potenciálních prekurzorů	CID	Bez skenování Výběr produktového iontu s definovaným poměrem m_2/z
Sken neutrálních ztrát (definován rozdíl poměrů *m/z*)	Skenování iontů s konstantní diferencí *m/z*	CID	Skenování iontů s konstantní diferencí *m/z*
Sledování rozpadu iontu (SRM, single reaction monitoring)	Bez skenování Výběr prekurzorového iontu	CID	Bez skenování Výběr nejintenzivnějšího produktu za podmínek optimální kolizní energie

2.3.2.3 Hmotnostní detektory

Poslední částí hmotnostního spektrometru je hmotnostní detektor. Funkcí detektoru je detekovat ionty prošlé analyzátorem a transformovat detekovaný signál pro výstupní zařízení (De Hoffmann & Stroobant, 2007).

Rozlišují se typově dvě skupiny detektorů. První skupina detekuje všechny ionty bez zohlednění *m/z*. Do této skupiny se řadí násobiče elektronů (angl. electron multiplier), se kterými je možné se nejčastěji setkat v přístrojích s kvadrupólem nebo iontovou pastí. Analyzátory obecně opouští malé množství iontů, proto je nutná jejich amplifikace (De Hoffmann & Stroobant, 2007; Friedecký & Lemr, 2012; Skoog et al., 2022). Po dopadu elektronu či iontu o velké energii na katodu dojde k uvolnění elektronů. Elektrony jsou urychlovány a množeny systémem diskrétních dynod, což kaskádovým efektem amplifikuje intenzitu signálu. Z jednoho vstupujícího elektronu může po 12stupňovém zesílení vzniknout až milion dalších elektronů (Faull et al., 2008). Dalším takovým detektorem je Faradayův detektor (De Hoffmann & Stroobant, 2007). Druhý typ detektorů zaznamenávají ionty ve vztahu k jejich *m/z*. Takovými detektory jsou např. iontová cyklotronová rezonance (FT-ICR) a orbitrap (FT-OT) ve spojení s Fourierovou transformací (Friedecký & Lemr, 2012).

2.4 Validace bioanalytické metody

Klíčovým krokem při vývoji nové bioanalytické metody je její validace. Pojmem validace se rozumí zaručení určitého stupně jistoty, že metoda poskytuje při měřeních spolehlivé výsledky (Kruve et al., 2015a). Cílem validace je prokázat, že je metoda vhodná pro zamýšlený účel (EMA, 2022).

Pro validaci metod existuje celá řada pokynů a předpisů od různých mezinárodních organizací. V laboratořích je možné narazit na harmonizované předpisy ICH (The International Conference of Technical Requirements fo Registration of Pharmaceuticals for Human Use) nebo směrnice od IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry). V Evropské unii byly vydány v roce 2022 aktualizované pokyny pro validaci organizací EMA (European Medicines Agency). Pro USA platí pokyny od FDA (Food and Drug Administration). Vydané dokumenty se liší svými validačními požadavky, avšak jsou využitelné pro validaci jakékoli metody (Kruve et al., 2015a).

Úplná validace dle EMA musí obsahovat tyto validační parametry: selektivitu, specifitu, matricové efekty, kalibrační přímku a pracovní rozsah, správnost a přesnost, carry-over (přenos vzorku), integritu ředění, stabilitu a reprodukovatelnost (EMA, 2022).

2.4.1 Selektivita a specifita

Pokud se v biologickém materiálu (matrici) vyskytují látky, které by mohly potenciálně interferovat s analyty, je třeba tyto látky od analytů rozlišit. Schopnost metody odlišit a změřit analyty v přítomnosti interferujících látek vyjadřuje selektivita analytické metody (method selectivity) (Nováková et al., 2021b; EMA, 2022).

Terminologicky bývá selektivita někdy nesprávně označována jako specifita (Nováková et al., 2021b). Z hlediska specifity je metoda schopna odlišit analyt od jiných látek včetně látek příbuzných. Příbuznými látkami se myslí látky strukturně podobné analytu, izomery, nečistoty nebo degradační produkty vzniklé při přípravě vzorku (EMA, 2022).

Při hodnocení selektivity se vychází z nejméně šesti slepých vzorků z různých zdrojů. Jedná se tedy o vzorky bez přídavku analytu nebo interního standardu. V těchto vzorcích by v retenčních časech jednotlivých analytů nebo vnitřních standardů neměla být přítomna žádná významná odezva způsobená interferujícími látkami. Na hladině LLOQ (dolní mezí stanovitelnosti, lower limit of quantitation) by jejich odezva neměla přesáhnout 20 % odezvy analytu a 5 % odezvy interního standardu ve vzorku LLOQ. Stejná pravidla pro odezvu interferujících látek platí v případě při hodnocení specifity (EMA, 2022).

2.4.2 Kalibrační přímka a pracovní rozsah

Linearita popisuje schopnost metody poskytnout lineární vztah mezi odezvou detektoru a koncentracemi analytů v kalibračních roztocích nebo reálných vzorcích (Kruve et al., 2015b). Vyjádřením linearity je kalibrační přímka, která pokrývá celý kalibrační rozsah. Charakteristickými parametry kalibrační přímky jsou její směrnice (slope) a průsečík na ose y (intercept). Kalibrační roztoky se připravují smícháním matrice (nejlépe stejného typu jako reálné vzorky) se známým množstvím analytů. Pro každý analyt a každou analytickou sérii by měla existovat jedna kalibrační přímka. Dle nařízení EMA by měla každá kalibrační přímka obsahovat alespoň šest kalibračních bodů. Tyto přímky se získávají prostřednictvím tří nezávislých analýz v průběhu několika dní (EMA, 2022).

Některé závislosti ovšem nemají lineární průběh, a proto jsou data transformovány a linearizovány pomocí jedné z proměnných. Nejčastěji se využívá logaritmických nebo mocninných transformací (Nováková et al., 2021b; EMA, 2022).

Linearitu lze hodnotit tzv. korelačním koeficientem (R), jež představuje těsnost vzájemné závislosti dvou náhodných proměnných. V ideálním případě je hodnota korelačního koeficientu větší jak 0,9990. Závislost proměnných je tím těsnější, čím více se korelační koeficient přibližuje hodnotě jedna (Nováková et al., 2021b).

Pracovní rozsah (range) je ohraničen nejnižším bodem kalibrační přímky – LLOQ, a nejvyšším bodem kalibrační přímky – horní mezí stanovitelnosti (ULOQ, upper limit of quantitation) (EMA, 2022). V tomto rozpětí je nejistota měření přijatelná (Nováková et al., 2021b).

LOD označuje nejnižší koncentraci analytu ve vzorku, kterou je možné spolehlivě ještě detekovat a identifikovat (Kruve et al., 2015a). Jinak řečeno signál analytu se významně odlišuje od šumu. Výška píku signálu analytu by měla být alespoň třikrát vyšší než linie šumu (Nováková et al., 2021b). Není však možné analyt při této koncentraci kvantifikovat. Oproti tomu mez stanovitelnosti (LOQ, limit of quantitation), také nazývána jako limit kvantifikace, určuje nejnižší koncentraci analytu, kterou lze stanovit s přijatelnou opakovatelností a správností (Kruve et al., 2015a). V případě LOQ by měla být výška píku signálu analytu aspoň desetkrát vyšší než linie šumu. LOQ je vždy zahrnuto v pracovním rozsahu metody a zároveň často bývá prvním bodem kalibrační přímky (Nováková et al., 2021b).

2.4.3 Správnost a přesnost (opakovatelnost, mezilehlá přesnost a reprodukovatelnost)

Správnost (accuracy) výsledku měření se definuje jako těsnost shody mezi experimentálně naměřenou hodnotou a přijatou referenční hodnotou. Správnost tak určuje schopnost metody poskytovat přesné výsledky. Přesnost (precision) měření udává těsnost shody mezi naměřenými hodnotami, které jsou získány nezávislými opakovanými měřeními za předem stanovených podmínek, a nezávisí na referenčních hodnotách. Přesnost charakterizuje náhodnou chybu měřicího systému a je součástí nejistoty měření (Kruve et al., 2015b; Nováková et al., 2021b). Přesnost také udává, zdali je metoda schopna poskytovat konzistentní měření (Fanali et al., 2013). Dále je definována též výtěžnost (návratnost, recovery) metody, avšak ta není pokyny EMA vyžadována. Jde

o poměr množství analytu zjištěného analytickou metodou k přijaté referenční hodnotě (Nováková et al., 2021b; EMA, 2022).

Jestliže existuje rozdíl mezi přijatou referenční hodnotou a naměřenou hodnotou, označujeme tento rozdíl jako chybu výsledku. Tyto chyby zahrnují chyby systematické (soustavné) nebo náhodné. Pokud se chyby během jednotlivých měření nemění (jsou konstantní) nebo se mění předvídatelně (tzv. proporcionální chyby), jedná se o chyby systematické. Systematické chyby charakterizuje výchylka (bias), což je rozdíl přijaté referenční hodnoty a střední hodnoty výsledků měření. Chyby měření, které nelze předvídat a zároveň nijak odstranit, jsou chyby náhodné (Nováková et al., 2021b).

Správnost hodnotí přítomnost (popř. nepřítomnost) soustavných chyb. Tento typ chyb lze statisticky zpracovat, nejčastěji se tak děje Studentovým t-testem. Přesnost metody vychází z náhodných chyb, což se vyjadřuje mírou přesnosti. Míra přesnosti v sobě zahrnuje opakovatelnost, mezilehlou přesnost a reprodukovatelnost (Nováková et al., 2021b).

Opakovatelnost metody (repeatibility) odráží schopnost metody poskytovat konzistentní výsledky v rámci daného cyklu nebo sekvence vzorků (Fanali et al., 2013). Pro hodnocení opakovatelnosti metody se nezávisle na sobě připraví dílčí vzorky z homogenního vzorku jedním pracovníkem v rámci jednoho dne (nebo krátkého časového intervalu) za použití stejného přístroje a stejných činidel (Kruve et al., 2015b). Při mezilehlé přesnosti se vychází z měřeních provedených stejným postupem v delším časovém rozmezí v téže laboratoři. Rozdílem mezi měřeními je např. jiná obsluha nebo nová kalibrace (Nováková et al., 2021b). Reprodukovatelnost hodnotí míru přesnosti mezi výsledky měření získanými v různých laboratořích v různém čase, přičemž tu samu metodu provádí odlišná obsluha za použití rozdílných přístrojů. Reprodukovatelnost je důležitou součástí validace, pokud se uvažuje, že se metoda bude využívat i v jiných laboratořích. Není tak nutná pro validaci v rámci jedné laboratoře (Kruve et al., 2015b).

Pro hodnocení správnosti a přesnosti se využívají vzorky kontrol kvality (QC) minimálně čtyř koncentračních úrovní. Kontroly kvality obsahují matrici obohacenou známým množstvím analytu a uchovávají se za stejných podmínek jako reálné vzorky. První kontrola kvality by měla být na úrovni koncentrace LLOQ, poté trojnásobku LLOQ (nízká kontrola kvality), v úrovni 30–50 % rozsahu kalibrační přímky (střední kontrola kvality) a poslední na úrovni nejméně 75 % koncentrace ULOQ (vysoká kontrola kvality) (EMA, 2022).

2.4.4 Přenos vzorku (carry-over)

Jestliže v měřícím systému zůstane po předchozím vzorku zbytkový analyt, tento analyt tvoří tzv. přenos, anglicky carry-over (EMA, 2022). Jinými slovy přenos vzorku zkresluje kvantifikaci následujícího vzorku (Zeng et al., 2006).

Jsou rozeznávány dva typy přenosů vzorků: klasický nebo konstantní. Pokud po vzorku následuje sekvence slepých vzorků (bez obsahu analytu) a odezva zbylého analytu se snižuje, jedná se o klasický přenos. V případě konstantního přenosu však k tomuto snižování nedochází a i u slepých vzorků se vyskytují v chromatogramu píky se stále stejnou intenzitou. Tento přenos je způsoben kontaminací měřícího systému nebo slepého vzorku. U konstantního přenosu tak nelze hovořit o skutečném přenosu (Jogpethe et al., 2022).

Při validaci se přenos vzorku hodnotí analýzou slepých vzorků po kalibračním standardu na úrovni ULOQ. Odezva analytu ve slepém vzorku by neměla být vyšší jak 20 % odezvy analytu v rámci kalibračního standardu na úrovni LLOQ. Jestliže je přenos vzorku nevyhnutelný, je doporučováno zařadit slepý vzorek mezi vzorek s vysokou koncentrací analytu a následující vzorek (EMA, 2022).

2.4.5 Integrita ředění

Občas při analýzách nastává situace, kdy je koncentrace cílového analytu ve vzorku vyšší než ULOQ. Je tedy zapotřebí ředit tento vzorek slepou matricí, aby koncentrace cílového analytu spadala do koncentračního rozsahu měření (Woolf et al., 2014). Integritou ředění se posuzuje, jestli při zvoleném postupu ředění vzorku nedochází k ovlivnění správnosti a přesnosti měřené koncentrace analytu (EMA, 2022).

Kontroly kvality jsou pro hodnocení integrity ředění připravovány jako roztoky s předem známými koncentracemi analytu (vyššími jak ULOQ) v matrici. Vzorky QC jsou postupně ředěny slepou matricí. V jedné sérii se testuje nejméně pět opakování pro každý ředicí faktor (EMA, 2022).

2.4.6 Matricové efekty

Matricové efekty způsobují změnu odezvy analytu (EMA, 2022). Dochází k rozdílu v odezvě zkoumaného analytu při měření standardního roztoku a reálného vzorku (analyt je v příslušné biologické matrici). Matricové efekty v důsledku ovlivňují citlivost

a selektivitu metody, čímž se snižuje její správnost, přesnost a robustnost (Panuwet et al., 2015).

Matricové efekty jsou vyvolávány rušivými a často neidentifikovatelnými složkami v matrici vzorku (EMA, 2022). Zdrojem matricových efektů v LCMS metodách jsou jak endogenní, tak exogenní látky. Mezi endogenní látky přispívající k matricovým efektům patří- lipidy, peptidy nebo sacharidy, ale také soli, aminy, močovina atd. Z exogenních látek jsou to zejména složky mobilních fází (např. kyselina trifluoroctová a pufrovací látky), dále též plastické materiály či antikoagulanty (lithium, heparin). Všeobecně tyto látky ovlivňují chromatografické chování cílových analytů a jejich ionizaci, čímž se potlačuje nebo zesiluje jejich odezva na detektoru (Panuwet et al., 2015).

Vliv matrice se hodnotí nejméně třemi opakováními měření nízkých a vysokých QC. Tyto QC jsou připraveny z matric z nejméně šesti zdrojů. Správnost pro každou jednotlivou matrici by měla být v rozmezí ±15 % nominální koncentrace a přesnost by neměla být vyšší jak 15 % (EMA, 2022).

2.4.7 Stabilita

Aby se ověřilo, zda každý krok preanalytické fáze neovlivňuje koncentraci analytu, je třeba hodnotit stabilitu vzorku. Tu ovlivňuje doba a teplota skladování vzorků, matrice vzorku, případné antikoagulanty a materiál nádoby, ve které je vzorek uchováván (EMA, 2022). Pokud by byl analyt nestabilní, docházelo by k jeho rozkladu, a to by ovlivňovalo správnost a přesnost postupu. Rovněž se musí uvažovat i rozklad analytu ve standardech. Rychlost rozkladu závisí např. na používané matrici, přístupu kyslíku, teplotě nebo světlu (Kruve et al., 2015b).

Vliv skladování se hodnotí na vzorcích kontroly kvality, které jsou uchovávány po dobu stejnou nebo delší, než je doba skladování studovaných vzorků (EMA, 2022). Pro hodnocení stability analytu v matrici se používají QC s nízkou a vysokou koncentrací. Alikvóty těchto QC se analyzují v nulovém čase a po uplynutí určitých podmínek skladování (minimálně tři zátěžové testy pro každou koncentrační úroveň QC). Hodnotí se stabilita analytu v matrici při zmrazení a rozmrazení (obvykle po třech cyklech), krátkodobá (při pokojové teplotě) a dlouhodobá (stabilita při všech teplotách využívaných pro skladování vzorků) stabilita v matrici, stabilita analytu ve zpracovaných vzorcích, stabilita analytu a vnitřních standardů v zásobních a pracovních roztocích a stabilita analytu v plné krvi (Kruve et al., 2015b; EMA, 2022).

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiál a přístroje

3.1.1 Standardy

- Acetylkarnitin (Sigma Aldrich, Darmstadt, Německo)
- Butyrylglycin (VU University Medical Center, Amsterdam, Nizozemsko)
- Butyryl-L-karnitin (Sigma Aldrich, Darmstadt, Německo)
- Dekanoyl-L-karnitin (Sigma Aldrich, Darmstadt, Německo)
- Hexanoylglycin (VU University Medical Center, Amsterdam, Nizozemsko)
- Hexanoyl-L-karnitin (Sigma Aldrich, Darmstadt, Německo)
- Hypoglycin A (TRC Canada Inc, Toronto, ON, Kanada)
- L-karnitin (Sigma Aldrich, Darmstadt, Německo)
- MCPA-karnitin (TRC Canada Inc, Toronto, ON, Kanada)
- Oktanoyl-L-karnitin (Sigma Aldrich, Darmstadt, Německo)
- Propionylglycin (VU University Medical Center, Amsterdam, Nizozemsko)
- Propionyl-L-karnitin (Sigma Aldrich, Darmstadt, Německo)
- Valerylglycin (VU University Medical Center, Amsterdam, Nizozemsko)
- Valeryl-L-karnitin (Sigma Aldrich, Darmstadt, Německo)
- α-(methylencyklopropyl)glycin (směs diastereomerů) (TRC Canada Inc, Toronto, ON, Kanada)

3.1.2 Interní standardy

- Butyrylkarnitin-D_3 (Merck s. r. o., Praha, Česká republika)
- Směs interních standardů z kitu od MassChrom Amino Acids and Acylcarnitines from Dried Blood/Non Derivatised – LC-MS/MS(Chromsystems Instruments & Chemicals GmbH, Gräfelfing, Německo)

3.1.3 Další chemikálie

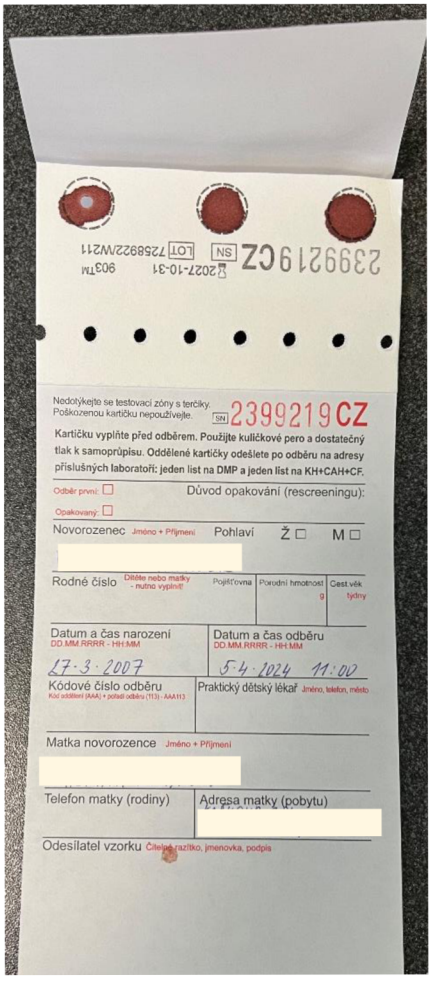
- Hovězí sérový albumin (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)
- Kyselina mravenčí (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)
- LC-MS methanol (VWR Chemicals International, Oslo, Norsko)
- LC-MS voda (VWR Chemicals International, Rosny-sous-Bois, Francie)

- Mravenčan amonný (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)
- PBS pufr, 50 mmol·l^{-1}, pH = 7,4 (Lékárna Fakultní nemocnice Olomouc, Olomouc, Česká republika)

3.1.4 Biologický materiál

Tato metoda byla optimalizována a vyvíjena pro vzorky DBS, které byly vytvořeny nakapáním periferní krve koní na novorozenecké screeningové karty (Obr. 17). Celkem se jednalo o 40 DBS vzorků od koní s již diagnostikovanou AM, suspektní AM, zátěžovou AM a zdravých jedinců bez klinických příznaků. Podrobnější přehled je uveden v kapitole 3.2.7.

Všechny vzorky byly poskytnuty Klinikou chorob koní působící na Fakultě veterinárního lékařství Veterinární univerzity Brno.



Obr. 17 Odběrová karta pro novorozenecký screening se suchou krevní skvrnou.

3.1.5 Přístroje a pomůcky

- Analytické váhy A&D HR-120 (A&D Company, Tokio, Japonsko)
- Automatické pipety Eppendorf Research Plus 0,5−10 µl; 2−20 µl; 10−100 µl; 10−200 µl; 100−1000 µl (Eppendorf AG, Hamburg, Německo)
- Centrifuga Hermle Z 216 MK (Hermle Labortechnik GmbH, Wehingen, Německo)
- Děrovací kleště průměru 3,2 mm (McGill Inc.)
- Hmotnostní spektrometr s trojitým kvadrupólem Triple Quad 6500 (SCIEX, Framingham, MA, USA)
- Kapalinový chromatograf Ultimate™ 3000RS (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA)
- Karty pro novorozenecký screening (Eastern Business Forms Inc., Mauldin, USA)
- Kolona s reverzní fází BEH C18 (délka 100 mm, průměr 2,1 mm, velikost částic 1,7 µm) s VanGuard předkolonou (délka 5 mm, průměr 2,1 mm, velikost částic 1,7 µm) (Waters™ Corporation, Framingham, Massachusetts, USA)
- Lyofilizační systém FreeZone 2,5 l (Labconco, Kansas City, MO, USA)
- Mikrozkumavky 1,5 ml a 2 ml Eppendorf (Eppendorf AG, Hamburg, Německo)
- Mrazicí box pro velmi nízké teploty MDF-DU702VX TwinGuard (-80 °C) (Panasonic Health Care Biomedical, Sakada, Japonsko)
- Mraznička AFG 7050, teplota -20 °C (Whirpool, Michigan, USA)
- Sanyo Ultra Low Temp Freezer, teplota -80 °C (Sanyo, Ósaka, Japonsko)
- Špičky pro pipety Eppendorf (Eppendorf AG, Hamburg, Německo)
- Vakuová pumpa Edwards RV5 (Edwards, Burgess Hill, Velká Británie)
- Vialky s insertem 0,9 ml ND9 (VWR International GmbH, Darmstadt, Německo)
- Vortex MIX ARGOlab (ARGOlab, Carpi, Itálie)

3.2 Metody

3.2.1 Příprava zásobních roztoků standardů

Zásobní roztoky většiny standardů byly připraveny v LC-MS vodě. Zásobní roztoky standardů acylkarnitinů byly připraveny o koncentraci 10 $mmol \cdot l^{-1}$ a acylglycinů o koncentraci 30 $mmol \cdot l^{-1}$. Zásobní roztok standardu HGA měl koncentraci 6 $mmol \cdot l^{-1}$ a MCPrG 5 $mmol \cdot l^{-1}$. Zásobní roztok MCPA-karnitinu byl jako jediný připraven v methanolu s finální koncentrací 2 $mmol \cdot l^{-1}$. Všechny zásobní roztoky byly uchovávány v mrazicím boxu při teplotě -80 °C.

3.2.2 Příprava zásobního roztoku interního standardu butyrylkarnitinu-D_3

Roztok interního standardu butyrylkarnitinu-D_3 v LC-MS methanolu byl připraven o koncentraci 50 $\mu mol \cdot l^{-1}$ a byl uchováván v mrazicím boxu při -80 °C.

3.2.3 Příprava náhradní matrice

Dle doporučení EMA (2022) by kalibrační křivka měla být připravena ve stejné biologické matrici, jako jsou poté připravovány reálné vzorky. Zároveň by však tato matrice neměla obsahovat validované analyty. Jelikož se v krvi fyziologicky vyskytují acylkarnitiny a acylglyciny, bylo zapotřebí připravit umělou náhradní matrici. Komerčně však není plná krev ve formě náhradní matrice dostupná, pouze její složky (plasma nebo sérum). Na základě literární rešerše Leaney et al. (2020) byla zvolena náhradní matrice v tomto složení: 5% hovězí sérový albumin (BSA) ve fosfátovém pufru (PBS) (*w/v*). Z připravené náhradní matrice byly připraveny alikvóty o objemu 1,5 ml a uchovávány v lednici při 4 °C.

3.2.4 Optimalizace MRM přechodů

Vývoj metody spočíval v optimalizaci MRM (multiple reaction monitoring) přechodů pro vybrané analyty, tedy v získání informací o prekurzorovém iontu, produktovém iontu, deklasteračním potenciálu (DP), vstupním potenciálu (EP), kolizní energii (CP) a výstupním potenciálu (CXP). Pro získání těchto parametrů bylo provedeno ladění pro následující analyty: MCPrG, valerylkarnitin (AC05), oktanoylkarnitin (AC08) a propionylglycin (AG03). Pro analyty HGA, MCPA-karnitin, L-karnitin (AC00),

acetylkarnitin (AC02), propionylkarnitin (AC03), butyrylkarnitin (AC04), hexanoylkarnitin (AC06), dekanoylkarnitin (AC10), butyrylglycin (AG04), valerylglycin (AG05) a hexanoylglycin (AG06) byly MRM přechody převzaty od Sander et al. (2016), Karlíková et al. (2018), El-Khatib et al. (2022) a Piskláková et al. (2023).

Pro ladění byly ze zásobních roztoků zmíněných analytů připraveny roztoky o koncentraci 1 $\mu mol \cdot l^{-1}$ ředěním v mobilní fázi A a B (1:1). Mobilní fázi A tvořil 5$mmol \cdot l^{-1}$ mravenčan amonný s 0,1% kyselinou mravenčí ve vodě. Mobilní fází B byl 100% methanol. Připravené roztoky byly vstříknuty přímo do hmotnostního spektrometru. V softwaru Analyst (Sciex, verze 1.6.2) bylo provedeno nejdříve manuální a posléze automatické ladění. Pro každý analyt bylo získáno šest +/-MRM přechodů, které byly použity při sestavování metody v další fázi vývoje metody.

3.2.5 Analýza směsi standardů

Pro získání informace o separačním chování (retenční čas) acylkarnitinů byla provedena LC-MS/MS analýza směsi značených interních standardů aminokyselin a acylkarnitinů MassChrom v methanolu. Ve směsi byly sledovány následující interní standardy: L-karnitin-D_9, acetylkarnitin-D_3, propionylkarnitin-D_3, butyrylkarnitin-D_3, valerylkarnitin-D_9, hexanoylkarnitin-D_3, oktanoylkarnitin-D_3 a dekanoylkarnitin-D_3.

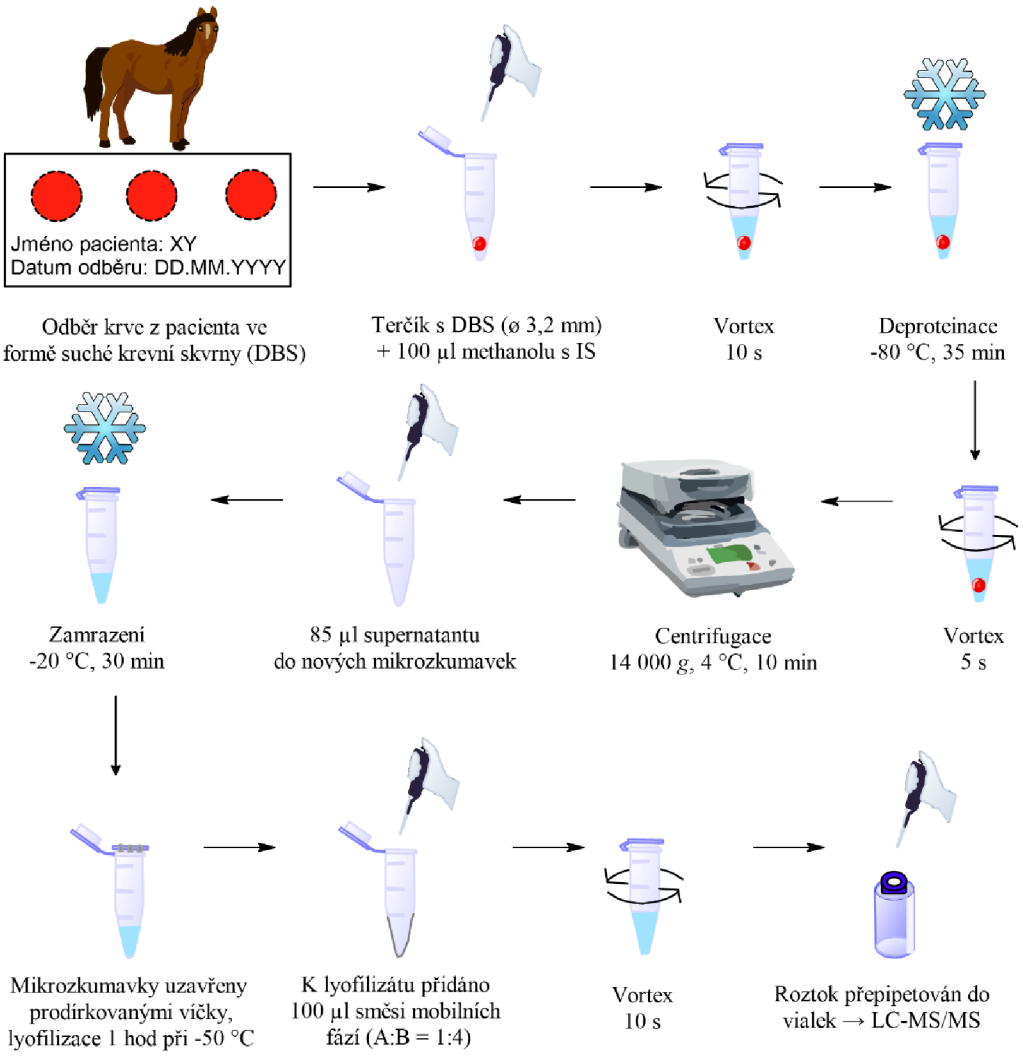
Retenční časy acylglycinů, HGA a MCPA-karnitinu byly získány analýzou směsí standardů připravených ze zásobních roztoků. Koncentrace jednotlivých acylglycinů ve směsi ředěné vodou byly 30 $\mu mol \cdot l^{-1}$, HGA 60 $\mu mol \cdot l^{-1}$ a MCPA-karnitinu 2 $\mu mol \cdot l^{-1}$. Retenční čas MCPrG byl získán analýzou jeho roztoku o koncentraci 50 $\mu mol \cdot l^{-1}$, který byl ředěn 80% methanolem.

U MCPrG, AC05, AC08 a AG03 byl pro jednotlivé přechody vyhodnocen poměr signálu k šumu (S/N, z angl. signal to noise ratio) v softwaru Analyst. Nejcitlivější MRM přechody laděných analytů byly přidány ke zbývajícím (již publikovaným) a byla sestavena finální metoda.

3.2.6 Příprava vzorků suché krevní skvrny

Grafické schéma přípravy vzorků pacientů a kontrol z DBS je uvedeno na Obr. 18. Tento postup byl použit i při přípravě vzorků pro validaci. Optimalizace tohoto postupu vycházela z publikace Sander et al. (2016).

Z karet obsahujících DBS byly děrovacími kleštěmi vyříznuty terčíky o průměru 3,2 mm. Do mikrozkumavky s vyříznutým terčíkem bylo přidáno 100 µl 100% methanolu s interním standardem (IS) butyrylkarnitinem-D_3 o koncentraci 25 nmol·l^{-1}. Poté byl obsah zkumavky promíchán na vortexu (10 s). Následovala deproteinace při -80 °C po dobu 35 minut. Vzorky byly znovu promíchány na vortexu (5 s) a poté centrifugovány (4 °C, 14 000 *g*, 10 min). Ze supernatantu bylo přepipetováno 85 µl do nové mikrozkumavky. Vzorky byly zamrazeny na -20 °C po dobu 30 minut. Následně byly mikrozkumavky uzavřeny děrovanými víčky. Vzorky byly podrobeny lyofilizaci po dobu 1 hodiny při -50 °C. Ke vzorkům bylo přidáno 100 µl směsi mobilních fází (A:B = 1:4, *v/v*). Mobilní fáze A obsahovala 5mmol·l^{-1} mravenčan amonný s 0,1% kyselinou mravenčí ve vodě, zatímco mobilní fází B byl 100% methanol. Obsah mikrozkumavek byl po promíchání na vortexu (10 s) přepipetován do vialek s insertem a podroben LC-MS/MS analýze.



Obr. 18 Schéma přípravy vzorku ze suché krevní skvrny (DBS). Zkratky: IS = interní standard, LC-MS/MS = kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií.

3.2.7 Validace metody – linearita, limit detekce a kvantifikace

Vyvinutá metoda byla částečně validována dle doporučení EMA (2022). Z validačních parametrů byla stanovena linearita, která zahrnovala pracovní rozsah, LOD a LOQ.

Validace zahrnovala patnáct diagnosticky významných analytů pro AM. Jednalo se o HGA, MCPA-karnitin a MCPrG, dále osm acylkarnitinů a čtyři acylglyciny.

3.2.7.1 Příprava kalibrační křivky

Na základě rozsahů fyziologických a patologických koncentrací jednotlivých analytů v krvi byl zvolen příslušný pracovní rozsah.

Byla připravena směs standardů ze zásobních roztoků (kap. 3.2.1) v LC-MS vodě tak, aby jejich finální koncentrace ve směsi byly dvakrát větší než bod horní meze

stanovitelnosti (ULOQ). Z této směsi byla binárním ředěním 5% BSA v PBS pufru (náhradní matrice, viz kapitola 3.2.3) připravena desetibodová kalibrační řada.

Z každého kalibračního bodu bylo automatickou pipetou nakapáno 25 µl na kartu pro novorozenecký screening. Po nakapání se nechaly skvrny zaschnout 1 hodinu při laboratorní teplotě a následně byly ponechány 24 hodin v mrazáku při -20 °C. Dále bylo pokračováno v pracovním postupu, který je uveden výše v kap. 3.2.6. Jedná se o stejný postup, při kterém jsou zpracovávány vzorky DBS koní.

Linearita a pracovní rozsah byly analyzovány v celkem třech nezávislých opakováních a následně vyhodnoceny v softwaru Sciex OS (verze 2.0.0.45330) a Analyst.

3.2.8 Aplikace metody

Částečně validovaná metoda byla použita pro diagnostiku AM koní z DBS. Byly použity čtyři vzorky pacientů s laboratorně potvrzenou AM a 14 vzorků koní s podezřením na AM (tzv. suspektní případy). Dále byly analyzovány tři vzorky pacientů se zátěžovou myopatií (Tab. 6) a 15 kontrolních vzorků od zdravých koní bez příznaků AM (Tab. 7). Vzorky pacientů byly sbírány v průběhu let 2020−2024 a uchovávány při -20 °C. Tyto vzorky byly následně analyzovány vyvinutou metodou spolu s kalibrační řadou pro následnou kvantifikaci analytů v SciexOS software. Získané koncentrace analytů byly logaritmovány a vizualizace byla provedena pomocí krabicových grafů v GraphPad Prism software (verze 9.4.1).

Tab. 6 Vzorky suchých krevních skvrn koní s potvrzenou a suspektní atypickou myopatií (AM) a koní se zátěžovou myopatií (ZM).

ID vzorku	Klinický stav	Pohlaví	Věk
AM01	AM	klisna	2 roky
AM02	AM	hřebec	*
AM03	AM	hřebec	2 roky
AM04	AM	klisna	6 let
AM05	suspektní AM	klisna	12 let
AM06	suspektní AM	*	*
AM07	suspektní AM	hřebec	17 let
AM08	suspektní AM	klisna	6 let
AM09	suspektní AM	hřebec	4 roky
AM10	suspektní AM	klisna	17 let
AM11	suspektní AM	hřebec	2 roky
AM12	suspektní AM	hřebec	*
AM13	suspektní AM	klisna	15 let
AM14	suspektní AM	klisna	*
AM15	suspektní AM	hřebec	8 měsíců
AM16	suspektní AM	hřebec	6 měsíců
AM17	suspektní AM	klisna	12 let
AM18	suspektní AM	klisna	17 let
ZM01	ZM	klisna	8 let
ZM02	ZM	hřebec	8 let
ZM03	ZM	klisna	13 let

*neuvedeno

Tab. 7 Vzorky suchých krevních skvrn zdravých koní. Zkratky: CTRL = kontrola, AM = atypická myopatie.

ID vzorku	Klinický stav	Pohlaví	Věk
CTRL01	zdravý, bez příznaků AM	klisna	19 dní
CTRL02	zdravý, bez příznaků AM	klisna	3 měsíce
CTRL03	zdravý, bez příznaků AM	klisna	3 roky
CTRL04	zdravý, bez příznaků AM	klisna	4 roky
CTRL05	zdravý, bez příznaků AM	klisna	5 let
CTRL06	zdravý, bez příznaků AM	klisna	5 let
CTRL07	zdravý, bez příznaků AM	klisna	6 let
CTRL08	zdravý, bez příznaků AM	klisna	9 let
CTRL09	zdravý, bez příznaků AM	klisna	18 let
CTRL10	zdravý, bez příznaků AM	klisna	15 let
CTRL11	zdravý, bez příznaků AM	klisna	14 let
CTRL12	zdravý, bez příznaků AM	hřebec	5 let
CTRL13	zdravý, bez příznaků AM	hřebec	5 let
CTRL14	zdravý, bez příznaků AM	hřebec	5 let
CTRL15	zdravý, bez příznaků AM	hřebec	5 let

Pro sledování dynamiky a s ní souvisejících změn koncentrací metabolitů v průběhu času byly u jednoho koně s AM provedeny opakované odběry během čtyř dnů (Tab. 8).

Tab. 8 Přehled opakovaných odběrů pacienta s atypickou myopatií (AM) pro sledování dynamiky metabolitů. Referenční mez pro aktivitu kreatinkinasy (CK) je 2−14 μkat·l^{-1}.

ID vzorku	Datum odběru	Klinický stav	Aktivita CK [μkat·l^{-1}]	Pohlaví	Věk
AM_A1	10. 11. 2020	AM	55	hřebec	7 měsíců
AM_A2	11. 11. 2020		8142		
AM_A3	12. 11. 2020		16607		
AM_A4	13. 11. 2020		17342		

4 VÝSLEDKY

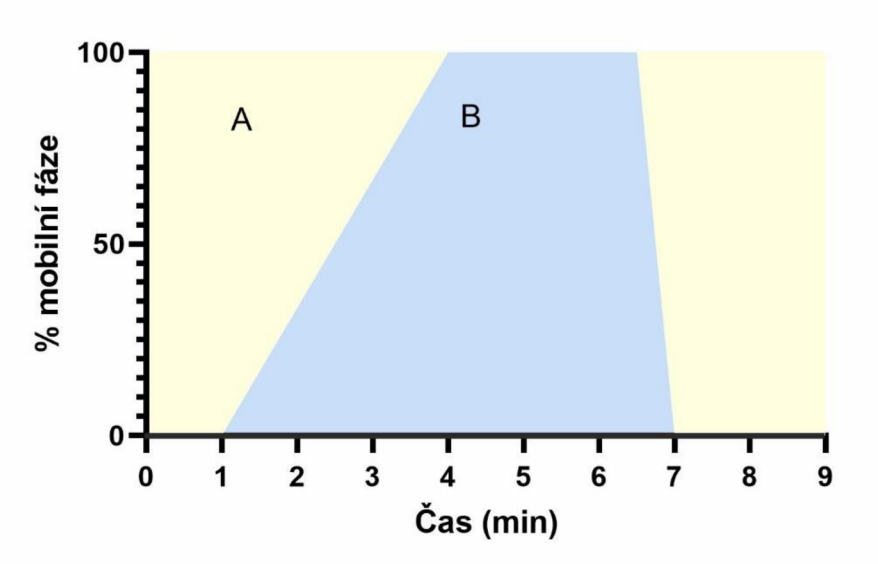
4.1 Finální LC-MS/MS metoda

Finální metoda byla optimalizována dle Sander et al. (2016), Karlíková et al. (2018) a El-Khatib et al. (2022).

Pro chromatografickou separaci byla použita kolona s reverzní fází BEH C18 Waters (100 mm, 2,1 mm, 1,7 µm), která byla doplněna o Acquity UPLC BEH C18 VanGuard Waters předkolonu (5 mm, 2,1 mm, 1,7 µm). Separace byla provedena na kapalinovém chromatografu UltiMate 3000 RS. Detekce byla zprostředkována hmotnostním spektrometrem s trojitým kvadrupólem Triple Quad 6500.

Mobilní fázi A tvořil 5mmol·l^{-1} mravenčan amonný s 0,1% kyselinou mravenčí ve vodě. Mobilní fází B byl 100% methanol. Eluční gradient (Obr. 19) probíhal následovně: 0−1 min: 0 % B; 1−4 min: 0 % → 100 % B; 4−6,5 min: 100 % B; 6,5−7 min: 100 % → 0 % B, 7−9 min: 0 % B. Nástřik vzorku činil 6 µl a průtok byl nastaven na 0,3 ml·min^{-1}. Kolona byla vyhřívána na 40 °C. Celková doba jedné analýzy činila 9 minut.

Ionizace byla provedena pomocí elektrospreje v pozitivním a negativním módu. Detekce probíhala v režimu MRM přechodů pomocí trojitého kvadrupólu, nejprve v módu non-scheduled a poté byla vytvořena scheduled metoda s časovými okny. Všechny MRM přechody a potenciály nastavené ve finální metodě jsou shrnuty v Tab. 9. Ostatní nastavení tandemové hmotnostní spektrometrie je uvedeno v Tab. 10.



Obr. 19 Schéma elučního gradientu.

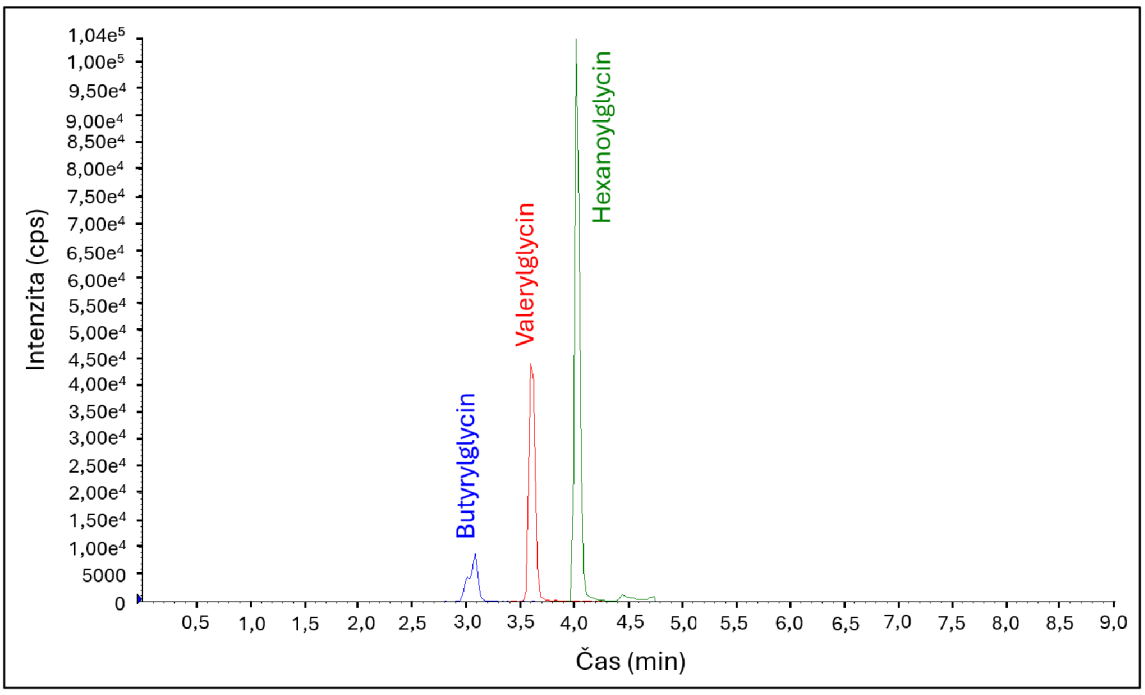
Tab. 9 Přehled MRM přechodů a retenčního chování analytů ve finální LC-MS/MS scheduled metodě. Zkratky: HGA = hypoglycin A, MCPA-karnitin = methylencyklopropylacetyl-karnitin, MCPrG = methylencyklopropylglycin, Q_1 = prekurzorový iont, Q_3 = produktový iont, DP = deklasterační potenciál, EP = vstupní potenciál, CE = kolizní energie, CXP = výstupní potenciál.

Analyt	Q_1 [Da]	Q_3 [Da]	Retenční čas [min]	Časové okno vybrané reakce [s]	Vážení vybrané reakce	DP [V]	EP [V]	CE [V]	CXP [V]
HGA	142,0	73,9	2,2	120	0,3	15	2,6	11	8
MCPA-karnitin	256,3	84,9	3,4	30	0,3	81	10	25	10
MCPrG	128,2	82,0	1,0	50	1,0	56	10	11	10
L-karnitin	162,1	85,0	0,9	30	0,3	51	10	29	16
Acetylkarnitin	204,2	85,0	1,5	50	0,3	51	10	27	16
Propionylkarnitin	218,1	85,0	2,8	50	0,3	51	10	27	16
Butyrylkarnitin	232,1	85,0	3,2	70	0,3	56	10	29	16
Butyrylkarnitin-D_3	235,1	85,0	3,2	40	0,3	56	10	19	16
Valerylkarnitin	246,3	85,0	3,5	40	0,3	61	10	25	12
Hexanoylkarnitin	260,1	85,0	3,8	40	0,3	51	10	31	16
Oktanoylkarnitin	288,4	84,9	4,3	40	0,3	81	10	27	12
Dekanoylkarnitin	316,2	85,0	4,6	40	0,3	79	10	38	16
Propionylglycin	132,2	76,0	2,0	100	0,3	6	10	11	14
Butyrylglycin	143,9	74,0	3,1	30	0,3	-20	-10	-16	-9
Valerylglycin	157,9	74,0	3,6	30	0,3	-30	-10	-16	-9
Hexanoylglycin	171,9	74,0	4,0	30	0,3	-30	-10	-18	-9

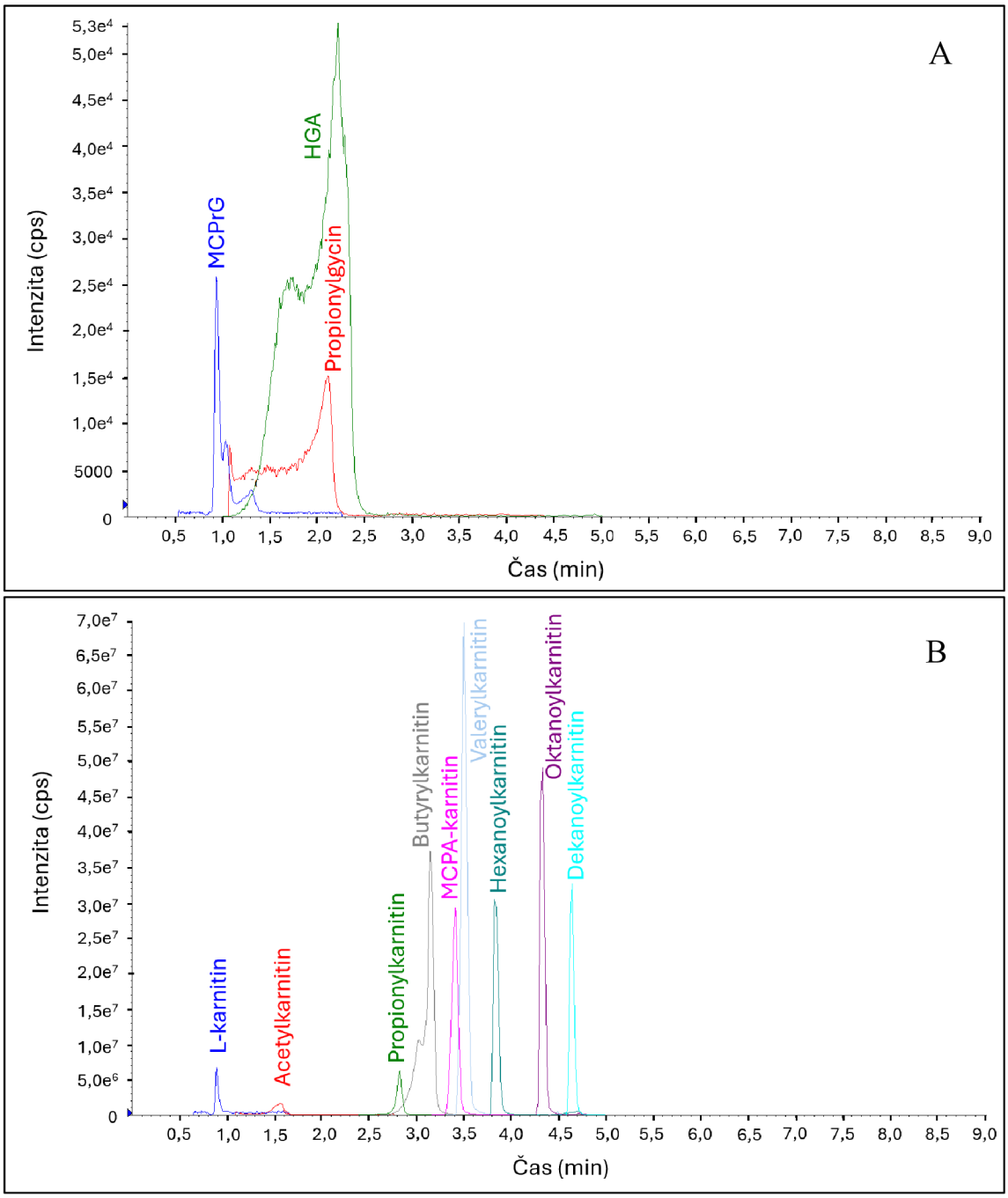
Tab. 10 Nastavení parametrů pro tandemovou hmotnostní spektrometrii (MS/MS).

Parametr	Nastavená hodnota
Napětí elektrospreje	+/- 4500 V
Teplota iontového zdroje	400 °C
Tlak clonícího plynu	35 arb
Tlak kolizního plynu	6 arb
Tlak zmlžujícího plynu	40 arb
Tlak pomocného plynu	40 arb
Čas mezi měřeními	5 ms

Finální metoda umožňuje detekovat 3 analyty v negativním módu (tři acylglyciny) (Obr. 20) a 12 analytů v pozitivním módu (HGA, MCPA-karnitin, MCPrG, osm acylkarnitinů a propionylglycin) (Obr. 21 A a B).



Obr. 20 Chromatogram standardů acylglycinů o koncentracích na úrovni ULOQ (-MRM).



Obr. 21 Chromatogramy standardů o koncentraci na úrovni ULOQ methylencyklopropylglycinu (MCPrG), hypoglycinu A (HGA) a propionylglycinu (A) a MCPA-karnitinu (methylencyklopropyl-karnitin) s ostatními acylkarnitiny (B) (+MRM).

4.2 Validace – linearita, limit detekce a kvantifikace

Pracovní rozsah (Tab. 11) kalibračních křivek jednotlivých analytů byl na základě literární rešerše zvolen tak, aby přibližně pokrýval koncentrace analytů za fyziologického i patologického stavu popsaného u koní. Pro určení pracovního rozsahu byly využity informace o koncentracích sledovaných analytů s využitím publikací Votion et al. (2014),

Bochnia et al. (2015), Carlier et al. (2015), Karlíková et al. (2016), Sander et al. (2016), Bochnia et al. (2019) a Mathis et al. (2021).

Tab. 11 Zvolené pracovní rozsahy na základě fyziologických a patologických koncentrací analytů. Zkratky: HGA = hypoglycin A, MCPA-karnitin = methylencyklopropyl-karnitin, MCPrG = methylencyklopropylglycin.

Analyt	Pracovní rozsah [μmol·l^{-1}]
HGA	0,059−30,000
MCPA-karnitin	0,031−16,000
MCPrG	0,059−30,000
L-karnitin	0,059−30,000
Acetylkarnitin	0,078−40,000
Propionylkarnitin	0,039−20,000
Butyrylkarnitin	0,078−40,000
Valerylkarnitin	0,098−50,000
Hexanoylkarnitin	0,031−16,000
Oktanoylkarnitin	0,039−20,000
Dekanoylkarnitin	0,039−20,000
Propionylglycin	0,039−20,000
Butyrylglycin	0,039−20,000
Valerylglycin	0,039−20,000
Hexanoylglycin	0,039−20,000

Vyhodnocení kalibračních křivek a limitu detekce a kvantifikace bylo provedeno v softwaru Sciex OS a Analyst. Získané píky analytů na každém kalibračním bodě byly automaticky zintegrovány a následně byla integrace manuálně zkontrolována. Každý analyt byl integrován vůči internímu standardu butyrylkarnitinu-D_3. Pro každý analyt kromě MCPrG a AC00 byla získána minimálně šestibodová kalibrační řada, což odpovídá validačním pokynům EMA (2022). Zároveň byly splněny podmínky, že správnost určení koncentrace každého zpětně vypočteného kalibračního bodu má být v rozmezí ± 20 % nominální koncentrace na úrovni LLOQ a ± 15 % u ostatních koncentračních hladin. Pro vyhodnocení lineární regrese bylo použito vážení 1/x s tím, že kalibrační přímka procházela počátkem. Byly získány rovnice lineární regrese ve tvaru $y = ax$. Koeficient determinace (R^2) ve všech případech dosahoval hodnot vyšších jak 0,99. Posléze byly z koncentrací na úrovni LLOQ a poměru S/N vypočítány LOD a LOQ pro jednotlivé analyty kromě již zmíněného MCPrG a AC00. LOD se rovná trojnásobku šumu základní linie a LOQ desetinásobku šumu základní linie:

$$\mathrm{LOD} = 3 \cdot \frac{\mathrm{N}}{\mathrm{S}} \cdot \mathrm{LLOQ}$$

$$\mathrm{LOQ} = 10 \cdot \frac{\mathrm{N}}{\mathrm{S}} \cdot \mathrm{LLOQ} = \frac{10}{3} \cdot \mathrm{LOD}$$

Získané výsledky (LLOQ, ULOQ, LOD, LOQ, rovnice lineární regrese a koeficient determinace) jsou shrnuty v Tab. 12.

U AC00 a MCPrG se opakovaně nepodařilo dosáhnout linearity pro alespoň šest kalibračních bodů. Při následné aplikaci metody na reálné vzorky byly proto tyto analyty hodnoceny pouze kvalitativně.

Tab. 12 Výsledky validace linearity a limitu detekce a kvantifikace. V tabulce jsou uvedeny: dolní mez stanovitelnosti (LLOQ), horní mez stanovitelnosti (ULOQ), limit detekce (LOD), limit kvantifikace (LOQ), regresní rovnice a koeficient determinace (R^2). Linearita byla analyzována ve třech opakováních (n = 3). Zkratky: HGA = hypoglycin A, MCPA-karnitin = methylencyklopropylacetyl-karnitin, MCPrG = methylencyklopropylglycin, n. = nestanoven.

Analyt	LLOQ [µmol·l^{-1}]	ULOQ [µmol·l^{-1}]	Počet kalibračních bodů	LOD [µmol·l^{-1}]	LOQ [µmol·l^{-1}]	Regresní rovnice	Koeficient determinace (R^2)
HGA	0,234	30,000	8	0,094	0,314	y = 0,00385x	0,9973
MCPA-karnitin	0,031	16,000	10	0,003	0,011	y = 0,63709x	0,9989
MCPrG	n.	n.	n.	n.	n.	n.	n.
L-karnitin	n.	n.	n.	n.	n.	n.	n.
Acetylkarnitin	0,625	40,000	7	0,171	0,570	y = 0,02465x	0,9965
Propionylkarnitin	0,625	20,000	6	0,017	0,058	y = 0,09722x	0,9977
Butyrylkarnitin	0,156	40,000	9	0,006	0,018	y = 0,47986x	0,9984
Valerylkarnitin	1,563	50,000	6	0,009	0,028	y = 0,45584x	0,9986
Hexanoylkarnitin	0,031	16,000	10	0,002	0,005	y = 0,55812x	0,9990
Oktanoylkarnitin	0,625	20,000	6	0,002	0,008	y = 0,68556x	0,9985
Dekanoylkarnitin	0,078	20,000	9	0,001	0,003	y = 0,38264x	0,9976
Propionylglycin	0,625	20,000	6	0,293	0,976	y = 0,00065x	0,9952
Butyrylglycin	0,156	20,000	8	0,044	0,147	y = 0,00019x	0,9975
Valerylglycin	0,078	20,000	9	0,019	0,063	y = 0,00068x	0,9976
Hexanoylglycin	0,078	20,000	9	0,015	0,048	y = 0,00130x	0,9972

4.3 Aplikace metody

4.3.1 Diagnostika pacientů s atypickou myopatií

Vyvinutou a částečně validovanou LC-MS/MS metodou byly analyzovány vzorky 4 koní s již laboratorně ověřenou AM, 14 vzorků koní suspektních na AM, 3 vzorky koní se zátěžovou myopatií (ZM) a 15 vzorků zdravých koní (CTRL). Vztažením na kalibrační křivky byly jednotlivé analyty plně kvantifikovány. Výjimkou byly MCPrG a AC00, u kterých bylo provedeno kvalitativní vyhodnocení.

U skupiny koní se suspektní AM bylo u 7 z původních 14 případů detekováno HGA a MCPA-karnitin podobně jako u zmíněných 4 AM pacientů. Vzorky těchto pacientů byly sloučeny do jedné skupiny AM a dále byly hodnoceny společně. Zbylé suspektní případy nebyly dále interpretovány. Vzorky pacientů s AM tedy obsahovaly HGA v rozpětí koncentrací 0,474−25,122 $\mu mol \cdot l^{-1}$ a MCPA-karnitin v rozsahu 0,078−0,831 $\mu mol \cdot l^{-1}$.

MCPrG, stejně jako AC00, nebyl přítomen jak u skupiny koní s AM, tak ani u skupiny ZM a zdravých kontrol.

U poslední hodnocené skupiny koní – ZM, nebyly odhaleny žádné toxiny, které by prokazovaly rozvoj AM. U těchto koní byly v DBS vzorcích kvantifikovány pouze acylkarnitiny a acylglyciny, které byly rovněž pozorovány u AM a kontrolních koní.

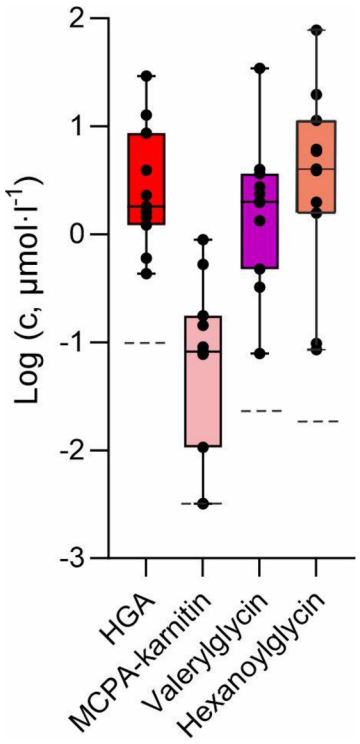
V Tab. 13 jsou shrnuta zjištěná rozpětí koncentrací (v podobě mediánu a hodnot na 2,5. a 97,5. percentilu) studovaných metabolitů u koní s AM (n = 11), se ZM (n = 3) a kontrolních koní (n = 15).

Tab. 13 Rozpětí koncentrací metabolitů ve vzorcích a koní s atypickou (AM) a zátěžovou (ZM) myopatií a kontrolních zdravých koní (CTRL). Koncentrace jsou uvedeny v jednotkách $\mu mol \cdot l^{-1}$. Zkratky: HGA = hypoglycin A, MCPA-karnitin = methylencyklopropyl-karnitin, <LOD = pod limitem detekce.

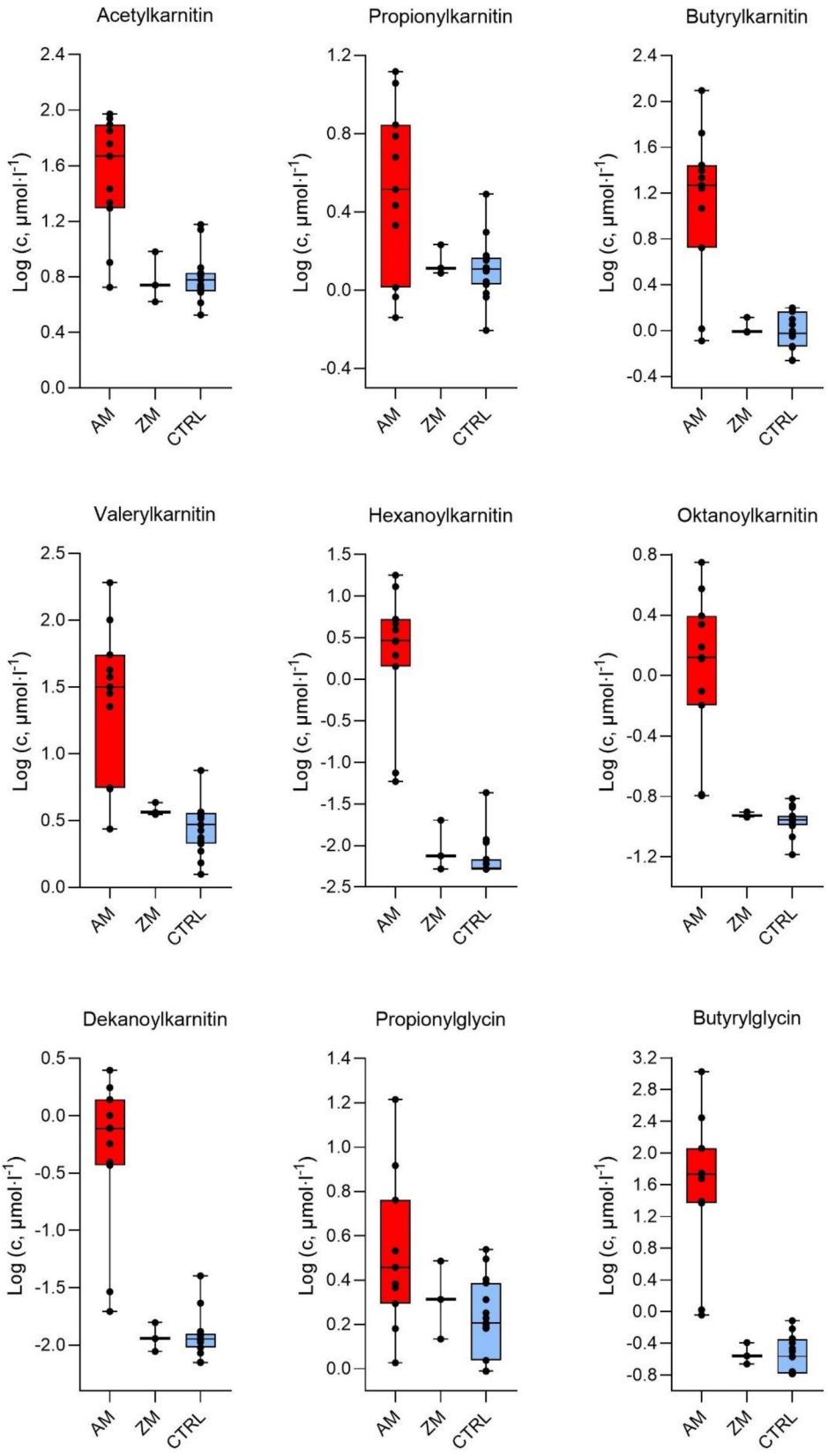
Analyt	Koně s AM (n = 11)			Koně se ZM (n = 3)			CTRL (n = 15)		
	Medián	Min	Max	Medián	Min	Max	Medián	Min	Max
HGA	1,813	0,474	25,122	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
MCPA-karnitin	0,117	0,078	0,831	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Acetylkarnitin	46,622	5,988	92,121	5,499	4,237	9,367	6,002	3,617	14,577
Propionylkarnitin	3,280	0,775	12,697	1,296	1,227	1,687	1,284	0,728	2,708
Butyrylkarnitin	18,629	0,871	106,756	0,981	0,972	1,293	0,945	0,551	1,580
Valerylkarnitin	31,610	3,418	168,256	3,626	3,525	4,291	2,949	1,347	6,154
Hexanoylkarnitin	2,910	0,063	16,721	0,008	0,005	0,020	0,005	0,005	0,032
Oktanoylkarnitin	1,319	0,161	5,149	0,118	0,116	0,125	0,111	0,072	0,148
Dekanoylkarnitin	0,776	0,022	2,316	0,011	0,009	0,015	0,011	0,007	0,034
Propionylglycin	2,868	1,179	14,377	2,058	1,397	3,011	1,739	1,210	3,365
Butyrylglycin	54,409	0,945	867,671	0,277	0,222	0,400	0,330	0,167	0,725
Valerylglycin	1,999	0,140	26,816	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Hexanoylglycin	4,017	0,088	63,369	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD

Pro snazší charakterizaci koncentrací HGA, MCPA-karnitinu, acylkarnitinů a acylglycinů u AM a ZM koní v porovnání s kontrolní skupinou byly výsledky vizualizovány v podobě krabicových grafů (Obr. 22−23). Ty vyjadřují distribuci koncentrací (v logaritmickém měřítku) z každé z pozorovaných skupin.

Kvantifikovatelné hladiny HGA, MCPA-karnitinu, AG05 a AG06 byly sledovány pouze u skupiny pacientů s AM. V případě ZM a kontrolních koní byla koncentrace těchto analytů <LOD. Tyto metabolity tak byly pro lepší názornost sloučeny do jednoho grafu (Obr. 22).



Obr. 22 Distribuce koncentrace hypoglycinu A (HGA), MCPA-karnitinu, valerylglycinu a hexanoylglycinu v krví koní s atypickou myopatií. Přerušovaná čára znázorňuje limit detekce (LOD) analytu.



Obr. 23 Distribuce koncentrace acylkarnitinů, propionylglycinu a butyrylglycinu u skupin pacientů s atypickou myopatií (AM; n = 11), zátěžovou myopatií (ZM; n = 3) a zdravých kontrol (CTRL; n = 15).

V rámci analyzovaných acylkarnitinů byly sledovány zvýšené hladiny u AM pacientů ve srovnání s kontrolami (Obr. 23). Největší nárůst koncentrace byl sledován u AC06, poté u AC10 a AC04. Při porovnání mediánů koncentrace v pacientských a kontrolních vzorcích došlo u AC06 k více jak 500násobnému zvýšení, koncentrace AC10 se zvýšila přibližně sedmdesátkrát a AC04 dvacetkrát. Zhruba desetinásobný nárůst koncentrace oproti kontrolám byl sledován v pacientských vzorcích u AC08 a AC05. Nejmenším změnám v koncentracích acylkarnitinům podléhaly acylkarnitiny s kratší délkou řetězce, tedy AC02 a AC03. Koncentrace AC03 se zvyšuje přibližně třikrát, v případě AC02 bylo zaznamenáno v pacientských vzorcích osminásobné zvýšení koncentrace (Tab. 13).

Stejně jako u acylkarnitinů došlo k nárůstu mediánu koncentrací acylglycinů u pacientů s AM v porovnání s kontrolními vzorky (Obr. 23). Medián AG04 byl v pacientských vzorcích zvýšen 165krát oproti kontrolám. Nejmenší změny byly pozorovány u AG03, kde došlo pouze ke zvýšení o 65 % (Tab. 13).

U pacientů se ZM nedošlo k tak zřetelnému zvýšení hladin acylkarnitinů jako je tomu u pacientů s AM (Obr. 23). Mírně vyšší koncentrace byly sledovány u AC05 (nárůst koncentrace přibližně o pětinu vůči kontrolám) a AC06 (zvýšení koncentrace o 60 % vůči kontrolám). Na rozdíl od pacientů s AM došlo u pacientů se ZM k poklesu obsahu jednoho z acylkarnitinů, konkrétně u AC02 o přibližně desetinu (Tab. 13).

Při porovnání změny hladin acylglycinů u pacientů se ZM s kontrolami nedošlo k výrazným změnám (Tab. 13).

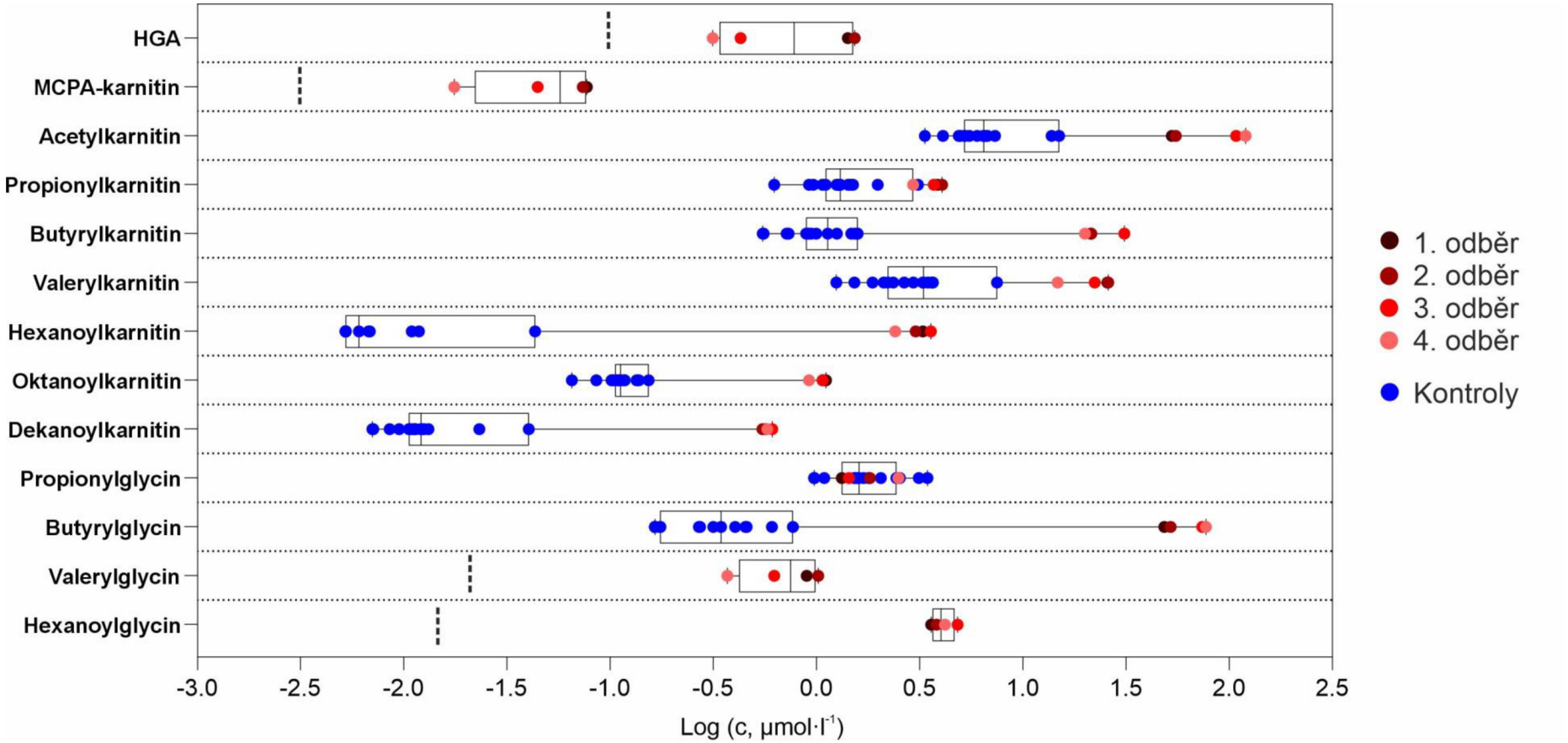
4.3.2 Dynamika metabolitů při opakovaných odběrech

U vybraného pacienta s laboratorně potvrzenou AM na pracovišti Klinicky chorob koní v Brně byly provedeny čtyři opakované odběry krve během několika dnů. U těchto DBS vzorků byla monitorována dynamika změn koncentrací jednotlivých metabolitů v průběhu času (Tab. 14). Sledovaná dynamika byla porovnávána se skupinou 15 kontrolních koní hodnocených v předchozí kapitole.

Pro komplexní vizualizaci byla dynamika koncentrací sledovaných metabolitů vyjádřena pomocí krabicových grafů (Obr. 24).

Tab. 14 Koncentrace metabolitů při čtyřnásobném odběru u pacienta s atypickou myopatií (AM). Koncentrace jsou uvedeny v jednotkách $\mu mol \cdot l^{-1}$. Zkratky: CTRL = kontrola, HGA = hypoglycin A, MCPA-karnitin = methylencyklopropyl-karnitin, <LOD = pod limitem detekce.

Vzorek	**A1**	**A2**	**A3**	**A4**	**CTRL**
Datum odběru	**10. 11.**	**11. 11.**	**12. 11.**	**13. 11.**	**Medián**
Den	**1.**	**2.**	**3.**	**4.**	**n = 15**
HGA	1,419	1,531	0,428	0,309	<LOD
MCPA-karnitin	0,077	0,074	0,045	0,018	<LOD
Acetylkarnitin	52,639	55,064	108,155	120,157	6,002
Propionylkarnitin	3,857	4,059	3,705	2,939	1,284
Butyrylkarnitin	21,358	21,442	31,020	20,013	0,945
Valerylkarnitin	25,665	25,905	22,311	14,770	2,949
Hexanoylkarnitin	3,276	3,020	3,589	2,410	0,005
Oktanoylkarnitin	1,111	1,072	1,070	0,921	0,111
Dekanoylkarnitin	0,568	0,546	0,610	0,578	0,011
Propionylglycin	1,327	1,814	1,435	2,494	1,739
Butyrylglycin	48,550	52,092	74,088	77,134	0,330
Valerylglycin	0,898	1,019	0,625	0,370	<LOD
Hexanoylglycin	3,600	3,828	4,833	4,194	<LOD



Obr. 24 Dynamika koncentrací metabolitů (v logaritmickém měřítku) u sledovaného AM koně při odběrech v rámci čtyř po sobě následujících dnů. V odstínech červené jsou znázorněny opakované odběry pacienta s AM a modře kontroly (n = 15). Přerušovaná čára znázorňuje limit detekce (LOD) analytu.

Největší koncentrace HGA byla zaznamenána během prvních dvou dnů, přičemž maxima bylo dosaženo ve 2. dni. Posléze následoval pokles koncentrace HGA. Vůči 2. dni došlo ve 3. dni k trojnásobnému poklesu koncentrace HGA. Oproti tomu MCPA-karnitin dosahoval maxima už během 1. dne, ve druhém jeho koncentrace mírně klesla a razantní pokles byl sledován stejně jako u HGA až ve 3. a 4. dni (Tab. 14 a Obr. 24). MCPrG ani AC00 nebyly přítomny.

Koncentrace AC02 v průběhu dní kontinuálně rostla, kdežto u AC05 byla během prvních dvou dnů podobná a posléze od 3. dne klesala. Stejná situace nastala u AC08, který měl nejvyšší koncentraci v 1. dni. U ostatních acylkarnitinů (AC04, AC06 a AC10) došlo k vrcholu jejich koncentrací až během 3. dne. Jediným acylkarnitinem, u něhož nedošlo k výraznému zvýšení koncentrací oproti kontrolám a zároveň nebyly sledovány velké změny v průběhu dní, byl AC03.

V porovnání s mediánem kontrol u AM pacienta nedocházelo k velkému zvýšení koncentrace AG03. U AG04 nastalo maximum ve 4. dni, u AG05 ve 2. dni a u AG06 ve třetím.

5 DISKUSE

Od roku 2011, kdy se AM vyskytla v České republice poprvé, je každým rokem evidováno průměrně deset nových případů, a to zejména v jarních a podzimních měsících (Šamonilová et al., 2022). Nemoc se vyznačuje vysokou letalitou, přibližně tři čtvrtiny intoxikovaných koní umírají do tří dnů (van Galen et al., 2012a). V klinických příznacích se AM podobá kolice, neuropatii a myopatiím jiného druhu. Při kolice se doporučuje chovatelům nutit koně k pohybu, což naopak neplatí kvůli rhabdomyolýze pro pacienty trpící AM. Z toho vyplývá, že je nezbytné onemocnění co nejdříve rozlišit (Šamonilová et al., 2022). U koní s klinickými příznaky AM je nejprve stanovena aktivita CK v séru. Aktivita tohoto enzymu bývá mimořádně zvýšená z důvodu probíhající rhabdomyolýzy. Pro potvrzení AM se vyšetřuje přítomnost zejména HGA, MCPrG a MCPA-karnitinu v séru, méně často v moči. Dále mohou být vyšetřovány MCPF-karnitin a MCPF-glycin a glycinový konjugát od MCPA (MCPA-glycin). Analýza těchto látek však není běžnou součástí rutinních vyšetření v laboratořích (Bochnia et al., 2015; Jahn et al., 2022). V České republice je v současné době možné vyšetřit přítomnost HGA a MCPA-karnitinu v krvi koní v Laboratoři dědičných metabolických poruch ve Fakultní nemocnici Olomouc (LDMP FNOL) nebo v sérových vzorcích v toxikologické laboratoři Ústavu ochrany a welfare zvířat a veřejného veterinárního lékařství Veterinární univerzity Brno (Šamonilová et al., 2022). Při AM dochází taktéž ke zvýšení koncentrací acylkarnitinů. Pro jejich analýzu v krvi nalezly využití vzorky DBS, z nichž se acylkarnitiny vyšetřují v rámci novorozeneckého screeningu (Sander et al., 2018). Nicméně zatím nebyly snahy analyzovat z DBS i HGA a MCPrG a jejich toxické metabolity.

V současné době je LC-MS/MS nejrozšířenější metodou pro stanovení zmíněných látek. Při přípravě vzorku je však v současnosti ve většině případů stále využívána derivatizace. Derivatizací se odstraňují problémy se selektivitou, zlepšuje se stabilita, separace a míra detekce analytů, současně se zvyšuje odezva signálu vůči šumu. Nevýhodou jsou ale velké finanční náklady, časově náročná příprava vzorku a riziko spojené s nakládáním se samotnými derivatizačními činidly (Doležal et al., 2020; González-Medina et al., 2021). Zejména časová náročnost přípravy vzorku je vzhledem k rychlé progresi tohoto onemocnění kritická. První LC-MS/MS metodu bez derivatizace uvedli v roce 2018 Rudolph et al. (2018), avšak metoda vykazovala vysoké hodnoty LOD a LOQ a špatnou výtěžnost pro HGA i MCPA-karnitin. Později byly publikovány LC-MS/MS metody bez derivatizace s vyšší citlivostí. V těchto metodách ale byly

používanými matricemi sérum (González-Medina et al., 2021), moč a mléko (El-Khatib et al., 2023).

V LDMP FNOL byla donedávna pro stanovení acylkarnitinů z DBS využívána průtoková injekční analýza s hmotnostní spektrometrií (FIA-MS). Používaným hmotnostním spektrometrem byl trojitý kvadrupól a ionizace probíhala za atmosférického tlaku (API). FIA-MS je běžně využívána při novorozeneckém screeningu. Při přípravě vzorků pro detekci HGA, MCPrG a konjugátů MCPA a MCPF s glycinem a karnitinem byla využívána derivatizace butanolem o koncentraci 3 $mol \cdot l^{-1}$ v kyselině chlorovodíkové. Následně byly butyrylované vzorky analyzovány prostřednictvím LC-MS/MS (trojitý kvadrupól, ESI) (Karlíková et al., 2018). Analýza acylkarnitinů a HGA a MCPrG s jejich toxickými metabolity tak byla rozdělena do dvou rozdílných protokolů přípravy a analýzy. Doba přípravy vzorku pro LC-MS/MS analýzu trvala dva dny, samotná analýza 10 minut. Jedním z cílů předložené diplomové práce byl vývoj komplexní LC-MS/MS metody bez derivatizačního kroku v přípravě vzorků, která bude po kompletní validaci využívána v LDMP FNOL pro rutinní stanovení případů AM. Vyvinutá metoda bez derivatizace je cenově přijatelnější, rychlá a umožňuje zároveň analyzovat jak HGA, MCPrG a MCPA-karnitin, tak acylkarnitiny, a dokonce acylglyciny, které v diagnostice AM mohou hrát roli. Doba přípravy vzorku se pohybuje v rozmezí čtyř hodin a samotná LC-MS/MS analýza trvá 9 minut.

Během vývoje metody byly snahy o zahrnutí i ostatních metabolitů HGA a MCPrG, tedy MCPA-glycinu, MCPF-karnitinu a MCPF-glycinu. Nakonec to však nebylo možné, protože pro tyto 3 metabolity nejsou v současné době komerčně dostupné standardy. I přes absenci standardů byly na základě literární rešerše prováděny experimenty využívající MRM přechody s příslušnými potenciály pro LC-MS/MS analýzu (Sander et al., 2016; Jahn et al., 2022). Přesto se u těchto analytů nepodařilo bez standardů získat optimální MS/MS podmínky.

V posledních dvou letech byly publikovány články o výskytu glutamylových konjugátů HGA a MCPrG – HGB a γ-glutamyl-MCPrG, v semenech a semenáčcích *A. pseudoplatanus*. Byla zkoumána jejich přítomnost v kravském mléce, protože se v něm vyskytovaly metabolity od HGA a MCPrG. Zároveň byly v semenech javoru na pastvinách detekovány právě glutamylové konjugáty. Navzdory jejich přítomnosti v rostlinném materiálu se ale nepodařilo jejich výskyt v mléce potvrdit (El-Khatib et al., 2022; Engel et al., 2023). V ostatních biologických matricích nebyla doposud přítomnost glutamylových konjugátů zkoumána. Při vývoji metody byly v rámci této diplomové

práce zkoušeny a upravovány publikované MRM přechody pro tyto dva glutamylové konjugáty, avšak ani v tomto případě nebyly nalezeny optimální MS/MS podmínky. Důvodem může být, že není zatím jasná jejich transformace v trávicím traktu zvířat. Jednou z hypotéz je, že vlivem nízké stability dochází k hydrolýze glutamylového řetězce za vzniku HGA či MCPrG (El-Khatib et al., 2022).

Vyvinutá metoda umožňuje sledovat HGA, MCPrG, MCPA-karnitin, osm acylkarnitinů a čtyři acylglyciny. Byly zvoleny acylkarnitiny s krátkým a středně dlouhým řetězcem, které by dle Mathis et al. (2021) mohly být nejlepší potenciální biomarkery AM. Analýza acylglycinů se provádí hlavně v moči (Westermann et al., 2008). Do vyvinuté metody byly ale čtyři acylglyciny o délce řetězce tří až šesti uhlíků rovněž zahrnuty, protože Karlíková et al. (2016) tyto acylglyciny v séru koní zasažených AM detekovali.

Při částečné validaci bylo provedeno zhodnocení linearity, LOD a LOQ jmenovaných analytů. Linearity bylo dosaženo u celkem třinácti analytů, koeficient determinace ve všech případech dosahoval hodnoty $R^2 > 0,99$. Výjimkou byly MCPrG a AC00, u nichž se nepodařilo získat kalibrační přímku o alespoň šesti bodech, které jsou nutností při validaci metod dle EMA (2022). Důvodem je nejspíše nekompatibilita eluce těchto analytů vůči gradientu mobilních fází a jejich brzký retenční čas. Tyto dva analyty byly vyhodnoceny kvalitativně (přítomen či nepřítomen).

Vyvinutá metoda byla použita pro analýzu vzorků koní s potvrzenou AM, suspektní AM a ZM a vzorků kontrolních koní. Ze čtrnácti suspektních případů AM byla u sedmi pacientů diagnostikována AM na základě přítomnosti HGA a MCPA-karnitinu. Celkově tak bylo k dispozici 11 pacientů s AM. Tito pacienti měli v krvi HGA v rozmezí koncentrací 0,474−25,122 $\mu mol \cdot l^{-1}$. Toto rozpětí odpovídá publikovaným hodnotám v článcích od Carlier et al. (2015), který publikoval nejnižší koncentraci HGA (0,230 $\mu mol \cdot l^{-1}$), a Bochnia et al. (2015), jenž zveřejnil nejvyšší stanovenou koncentraci HGA u koně s AM (60,170 $\mu mol \cdot l^{-1}$). Rovněž stanovené koncentrace MCPA-karnitinu (0,078−0,831 $\mu mol \cdot l^{-1}$) v pacientských vzorcích odpovídají rozpětí koncentrací publikovaných v článcích, konkrétně od Votion et al. (2014) a Sander et al. (2016). Tito autoři zaznamenali u koní s AM koncentrací MCPA-karnitinu mezi 0,001 až 1,180 $\mu mol \cdot l^{-1}$. Nicméně Votion et al. (2014), Bochnia et al. (2015) i Sander et al. (2016) stanovují HGA a MCPA-karnitin v séru, nikoli v plné krvi, takže srovnání s výsledky dosaženými v této diplomové práci je pouze orientační. MCPrG nebylo u pacientů s AM detekováno. MCPrG se nachází v semenech a semenáčcích *A. pseudoplatanus* přibližně

v desetkrát menším množství jak HGA (Westermann et al., 2016; El-Khatib et al., 2022; Engel et al., 2023). To může být příčinou, proč nebylo MCPrG v pacientských vzorcích nalezeno.

Při AM dochází vlivem tvorby toxických metabolitů odvozených od HGA a MCPrG k inhibici β-oxidace mastných kyselin. Acyl-CoA nemohou do β-oxidace vstupovat, takže dochází k jejich opětovnému přenesení do krve. To se děje prostřednictvím karnitinového přenašeče, acyl-CoA se přeměňují zpět na acylkarnitiny (Sponseller et al., 2012). U zkoumaných pacientů s AM bylo pozorováno zvýšení hladin acylkarnitinů ve vzorcích DBS. Nejvýraznější změna koncentrace oproti kontrolám byla zaznamenána u AC06, poté u AC10 a AC04. Zřetelnému zvýšení podléhaly také acylkarnitiny AC05 a AC08. Méně výrazné změny koncentrací acylkarnitinů byly sledovány v případě AC02 a AC03. Dosažené výsledky odpovídají zjištěním v různých publikacích (Boemer et al., 2017; Mathis et al., 2021; Jahn et al., 2022).

Pro zvýšení polarity a usnadnění exkrece močí mohou být v játrech či ledvinách acyl-CoA přeměňovány na acylglyciny za katalýzy enzymem glycin-N-acyltransferasou (Sponseller et al., 2012). V krvi studovaných pacientů s AM byly stanoveny zvýšené hladiny především AG04, AG05 a AG06, přičemž poslední dva zmíněné nebyly v krvi zdravých koní přítomny. Zvýšené koncentrace AG05 a AG06 v séru koní s AM publikoval Bochnia et al. (2019). Nepatrná změna koncentrace vůči kontrolám byla zaznamenána u AG03. Toto zjištění je v souladu s článkem od Karlíková et al. (2016), kde rovněž došlo k nepatrnému zvýšení koncentrace AG03 u pacientů vůči kontrole.

Pro srovnání hladin studovaných metabolitů byly do analýzy zařazeny i pacientské vzorky ZM. Tento typ myopatie se na rozdíl od AM rozvíjí po předchozí fyzické námaze a není způsoben toxiny javoru (McEwen & Hulland, 1986). Acylkarnitiny byly zvýšeny v řádu nižších desítek procent. Z hlediska acylglycinů nebyly sledovány žádné změny. V článku od Scholte et al. (1991) bylo konstatováno, že při ZM nedochází k poruchám mitochondriálního metabolismu a změnám v koncentracích acylkarnitinů. Pro ZM tudíž není charakteristické zvyšování hladin acylkarnitinů nebo acylglycinů v krvi, jako je tomu u AM.

Pro sledování dynamiky změn koncentrací metabolitů v průběhu času byl vybrán pacient s atypickou myopatií, u kterého byly zajištěny postupné odběry krve ve čtyřech dnech. U pacienta došlo ke kulminaci koncentrace HGA ve druhém dni. Tento toxin byl přítomen v DBS ze všech odběrů. Jahn et al. (2022) ve své publikaci sledovali dynamiku změn metabolitů pacienta s AM v průběhu 15 dnů. V této studii bylo HGA v krvi AM

pacienta přítomno během všech sledovaných dnů s maximem v prvním dni a posléze jeho koncentrace klesaly a MCPA-karnitin byl detekován až do 4. dne. Takové závěry odpovídají i výsledkům předložené diplomové práce. Oproti tomu MCPrG nebylo detekováno ani v jednom dni.

Při porovnání dynamiky koncentrací acylkarnitinů nastala podobná situace jako u HGA a MPCA-karnitinu. Acylkarnitiny svých maxim dosáhly během prvních čtyřech dnů. To, že koncentrace acylkarnitinů korelují s dynamikou HGA v krvi AM koní v průběhu dní, publikovali už ve své práci i Jahn et al. (2022). K nejvýraznějšímu nárůstu koncentrací acylkarnitinů v průběhu dní docházelo u AC04, AC06, AC08 a AC10. Koncentrace AC03 byla oproti kontrolám beze změn.

V rámci acylglycinů nebyla u pacienta v případě AG03 zaznamenána žádná změna koncentrací. Oproti tomu se AG04, AG05 a AG06 u pacienta vyskytovalo ve vyšších koncentracích během všech dnů. Zatím však nebyly publikovány žádné studie, ve kterých by byly sledovány změny v hladinách acylglycinů v průběhu dní u pacientů s AM.

6 ZÁVĚR

V první části diplomové práce byla zpracována literární rešerše zaměřená na AM, její příčiny, příznaky, průběh, prevenci a léčbu. Další část byla věnována diagnostice AM, LC-MS/MS a problematice validací nově vyvíjených metod.

V experimentální části byla vyvinuta LC-MS/MS metoda bez derivatizace pro diagnostiku AM z DBS. Nová metoda umožňuje stanovení toxinů způsobující AM, HGA a MCPrG, dále toxického metabolitu od HGA – MCPA-karnitinu, osmi acylkarnitinů a čtyř acylglycinů. Metoda se vyznačuje jednoduchou přípravou vzorku, krátkou dobou analýzy (9 min) a nízkou finanční nákladovostí. Po optimalizaci byla metoda částečně validována. Kromě MCPrG a AC00 bylo dosaženo pro všechny analyty linearity s $R^2 > 0,99$, byl stanoven limit detekce a limit kvantifikace dle pokynů EMA (2022). Metoda byla aplikována na vzorky koní s AM, suspektních pro AM, ZM a zdravých kontrol. U koní s AM byla odhalena patologická přítomnost HGA a MCPA-karnitinu. Dále bylo pozorováno výrazné zvýšení acylkarnitinů a acylglycinů v jejich krvi z důvodu inhibice β-oxidace mastných kyselin. U jednoho pacienta s AM byl proveden vícenásobný odběr. Během všech čtyřech dnů byla v krvi pacienta prokázána přítomnost jak HGA, tak MCPA-karnitinu. Maximální koncentrace těchto toxinů bylo dosaženo již v prvních dvou dnech, stejně jako u většiny acylkarnitinů.

Validace metody bude v budoucnu dokončena a poté bude metoda zavedena pro diagnostiku AM v České republice. Její zavedení do praxe umožní rychlou diagnostiku AM a následně včasnou léčbu, což příznivě ovlivní progresi tohoto onemocnění u koní.

7 LITERATURA

Adeva-Andany, M., Carneiro-Freire, N., Seco-Filgueira, M., Fernández-Fernández, C., & Mouriño-Bayolo, D. (2019). Mitochondrial β-oxidation of saturated fatty acids in humans. *Mitochondrion*, *46*, 73-90. https://doi.org/10.1016/j.mito.2018.02.009

Asthana, S., Dixit, S., Srivastava, A., Kumar, A., Singh, S., Tripathi, A., & Das, M. (2019). Methylenecyclopropyl glycine, not pesticide exposure as the primary etiological factor underlying hypoglycemic encephalopathy in Muzaffarpur, India. *Toxicology Letters*, *301*, 34-41. https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2018.10.033

Baise, E., Habyarimana, J., Amory, H., Boemer, F., Douny, C., Gustin, P., Marcillaud-Pitel, C., Patarin, F., Weber, M., & Votion, D. (2016). Samaras and seedlings of *Acer pseudoplatanus* are potential sources of hypoglycin A intoxication in atypical myopathy without necessarily inducing clinical signs. *Equine Veterinary Journal*, *48*(4), 414-417. https://doi.org/10.1111/evj.12499

Banerjee, S., & Mazumdar, S. (2012). Electrospray Ionization Mass Spectrometry: A Technique to Access the Information beyond the Molecular Weight of the Analyte. *International Journal of Analytical Chemistry*, *2012*, 1-40. https://doi.org/10.1155/2012/282574

Boemer, F., Deberg, M., Schoos, R., Baise, E., Amory, H., Gault, G., Carlier, J., Gaillard, Y., Marcillaud-Pitel, C., & Votion, D. (2015). Quantification of hypoglycin A in serum using aTRAQ® assay. *Journal of Chromatography B*, *997*, 75-80. https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2015.06.004

Boemer, F., Detilleux, J., Cello, C., Amory, H., Marcillaud-Pitel, C., Richard, E., van Galen, G., van Loon, G., Lefère, L., Votion, D., et al. (2017). Acylcarnitines profile best predicts survival in horses with atypical myopathy. *PLOS ONE*, *12*(8). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182761

Bochnia, M., Ziegler, J., Sander, J., Uhlig, A., Schaefer, S., Vollstedt, S., Glatter, M., Abel, S., Recknagel, S., Schusser, G., Wensch-Dorendorf, M., Zeyner, A., & Munderloh, U. (2015). Hypoglycin A Content in Blood and Urine Discriminates Horses with Atypical Myopathy from Clinically Normal Horses Grazing on the Same Pasture. *PLOS ONE*, *10*(9). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136785

Bochnia, M., Sander, J., Ziegler, J., Terhardt, M., Sander, S., Janzen, N., Cavalleri, J., Zuraw, A., Wensch-Dorendorf, M., Zeyner, A., & Lightfoot, D. (2019). Detection of MCPG metabolites in horses with atypical myopathy. *PLOS ONE*, *14*(2). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0211698

Bochnia, M., Ziemssen, E., Sander, J., Stief, B., & Zeyner, A. (2021). Methylenecyclopropylglycine and hypoglycin A intoxication in three Pére David's Deers (Elaphurus davidianus) with atypical myopathy. *Veterinary Medicine and Science*, *7*(3), 998-1005. https://doi.org/10.1002/vms3.406

Bowen-Forbes, C., & Minott, D. (2011). Tracking Hypoglycins A and B over Different Maturity Stages: Implications for Detoxification of Ackee (*Blighia sapida K.D. Koenig*) Fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *59*(8), 3869-3875. https://doi.org/10.1021/jf104623c

Bowen, J., & Craig, J. (1942). Myoglobinuria in horses. *Vet Rec*, *35*(54), 354-355.

Brandt, K., Hinrichs, U., Glitz, F., Landes, E., Schulze, C., Deegen, E., Pohlenz, J., & Coenen, M. (1997). Atypical myoglobinuria in grazing horses. *Pferdeheilkunde Equine Medicine*, *13*(1), 27-34. https://doi.org/10.21836/PEM19970104

Bunert, C., Langer, S., Votion, D., Boemer, F., Müller, A., Ternes, K., & Liesegang, A. (2018). Atypical myopathy in Père David's deer (Elaphurus davidianus) associated with ingestion of hypoglycin A. *Journal of Animal Science*, *96*(8), 3537-3547. https://doi.org/10.1093/jas/sky200

Carlier, J., Guitton, J., Moreau, C., Boyer, B., Bévalot, F., Fanton, L., Habyarimana, J., Gault, G., & Gaillard, Y. (2015). A validated method for quantifying hypoglycin A in whole blood by UHPLC–HRMS/MS. *Journal of Chromatography B*, *978-979*, 70-77. https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2014.11.029

Carracedo, A., Cantley, L., & Pandolfi, P. (2013). Cancer metabolism: fatty acid oxidation in the limelight. *Nature Reviews Cancer*, *13*(4), 227-232. https://doi.org/10.1038/nrc3483

Cassart, D., Baise, E., Cherel, Y., Delguste, C., Antoine, N., Votion, D., Amory, H., Rollin, F., Linden, A., Coignoul, F., et al. (2007). Morphological alterations in oxidative muscles and mitochondrial structure associated with equine atypical myopathy. *Equine Veterinary Journal*, *39*(1), 26-32. https://doi.org/10.2746/042516407X157765

da Silva Bezerra, K. (2023). Perspective Chapter: High-Performance Liquid Chromatography Coupled to Mass Spectrometry – The Advance in Chemical Analysis. In O. Núñez, S. Sentellas, M. Granados & J. Saurina (Eds.), *High Performance Liquid Chromatography - Recent Advances and Applications*. IntechOpen. https://doi.org/10.5772/intechopen.110880

De Hoffmann, E., & Stroobant, V. (2007). *Mass spectrometry: principles and applications* (3rd ed.). John Wiley & Sons.

Delesalle, C., de Bruijn, M., Wilmink, S., Vandendriessche, H., Mol, G., Boshuizen, B., Plancke, L., & Grinwis, G. (2017). White muscle disease in foals: focus on selenium soil content. A case series. *BMC Veterinary Research*, *13*(1). https://doi.org/10.1186/s12917-017-1040-5

Doležal, P., Doležalová, J., Morávková, T., & Stupka, R. (2020). Optimised method for determination hypoglycine A in maple plant material by multidimensional gas chromatography/mass spectrometry. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, *77*, 103354. https://doi.org/10.1016/j.etap.2020.103354

Doreau, M., & Martin-Rosset, W. (2011). Animals that Produce Dairy Foods | Horse. In *Encyclopedia of Dairy Sciences* (2nd, pp. 358-364). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374407-4.00040-6

Dunkel, B., Ryan, A., Haggett, E., & Knowles, E. (2018). Atypical myopathy in the South-East of England: Clinicopathological data and outcome in hospitalised horses. *Equine Veterinary Education*, *32*(2), 90-95. https://doi.org/10.1111/eve.12895

El-Khatib, A., Engel, A., & Weigel, S. (2022). Co-Occurrence of Hypoglycin A and Hypoglycin B in Sycamore and Box Elder Maple Proved by LC-MS/MS and LC-HR-MS. *Toxins*, *14*(9), 608. https://doi.org/10.3390/toxins14090608

El-Khatib, A., Lamp, J., & Weigel, S. (2023). A sensitive LC–MS/MS method for the quantification of the plant toxins hypoglycin A and methylenecyclopropylglycine and their metabolites in cow's milk and urine and application to farm milk samples from Germany. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *415*(10), 1933-1942. https://doi.org/10.1007/s00216-023-04607-9

EMA. (2022). ICH M10 on bioanalytical method validation - Scientific guideline. https://www.ema.europa.eu/en/ich-m10-bioanalytical-method-validation-scientific-guideline.

Engel, A., El-Khatib, A., Klevenhusen, F., Weiss, M., Aboling, S., Sachse, B., Schäfer, B., Weigel, S., Pieper, R., & Fischer-Tenhagen, C. (2023). Detection of Hypoglycin A and MCPrG Metabolites in the Milk and Urine of Pasture Dairy Cows after Intake of Sycamore Seedlings. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *71*(28), 10751-10760. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.3c01248

Fabius, L., & Westermann, C. (2018). Evidence-based therapy for atypical myopathy in horses. *Equine Veterinary Education*, *30*(11), 616-622. https://doi.org/10.1111/eve.12734

Fanali, S., Haddad, P., Poole, C., Schoenmakers, P., & Lloyd, D. (2013). *Liquid Chromatography: Applications* (1 ed.). Elsevier.

Faull, K., Dooley, A., Halgand, F., Shoemaker, L., Norris, A., Ryan, C., Laganowsky, A., Johnson, J., & Katz, J. (2008). Chapter 1 An Introduction to the Basic Principles and Concepts of Mass Spectrometry. In *Protein Mass Spectrometry* (pp. 1-46). Elsevier. https://doi.org/10.1016/S0166-526X(08)00201-8

Finno, C., Valberg, S., Wünschmann, A., & Murphy, M. (2006). Seasonal pasture myopathy in horses in the midwestern United States: 14 cases (1998–2005). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, *229*(7), 1134-1141. https://doi.org/10.2460/javma.229.7.1134

Finno, C., Spier, S., & Valberg, S. (2009). Equine diseases caused by known genetic mutations. *The Veterinary Journal*, *179*(3), 336-347. https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2008.03.016

Fowden, L., & Pratt, H. (1973). Cyclopropylamino acids of the genus *Acer* : Distribution and biosynthesis. *Phytochemistry*, *12*(7), 1677-1681. https://doi.org/10.1016/0031-9422(73)80387-5

Friedecký, D., & Lemr, K. (2012). Úvod do hmotnostní spektrometrie. *Klinická biochemie a metabolismus*, *20*(41), 152-157.

Golden, K., Williams, O., & Bailey-Shaw, Y. (2002). High-Performance Liquid Chromatographic Analysis of Amino Acids in Ackee Fruit with Emphasis on the Toxic Amino Acid Hypoglycin A. *Journal of Chromatographic Science*, *40*(8), 441-446. https://doi.org/10.1093/chromsci/40.8.441

González-Medina, S., Ireland, J., Piercy, R., Newton, J., & Votion, D. (2017). Equine atypical myopathy in the UK: Epidemiological characteristics of cases reported from 2011 to 2015 and factors associated with survival. *Equine Veterinary Journal*, *49*(6), 746-752. https://doi.org/10.1111/evj.12694

González Medina, S., Hyde, C., Lovera, I., Piercy, R., & Lightfoot, D. (2018). Detection of equine atypical myopathy-associated hypoglycin A in plant material: Optimisation and validation of a novel LC-MS based method without derivatisation. *PLOS ONE*, *13*(7). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199521

González-Medina, S., Hyde, C., Lovera, I., & Piercy, R. (2021). Detection of hypoglycin A and MCPA-carnitine in equine serum and muscle tissue: Optimisation and validation of a LC-MS–based method without derivatisation. *Equine Veterinary Journal*, *53*(3), 558-568. https://doi.org/10.1111/evj.13303

Gray, D., & Fowden, L. (1962). α-(Methylenecyclopropyl)glycine from Litchi seeds. *Biochemical Journal*, *82*(3), 385-389. https://doi.org/10.1042/bj0820385

Gross, J. (2017). *Mass Spectrometry* (3rd edition). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-54398-7

Guerra, I., Ferreira, H., Melo, T., Rocha, H., Moreira, S., Diogo, L., Domingues, M., & Moreira, A. (2022). Mitochondrial Fatty Acid β-Oxidation Disorders: From Disease to Lipidomic Studies—A Critical Review. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(22), 13933. https://doi.org/10.3390/ijms232213933

Harvey, R., & Ferrier, D. (2011). *Lippincott's illustrated reviews: Biochemistry* (5th ed.). Wolters Kluwer Health.

Hassall, C., Reyle, K., & Feng, P. (1954). Hypoglycin A,B: Biologically Active Polypeptides from *Blighia sapida*. *Nature*, *173*(4399), 356-357. https://doi.org/10.1038/173356b0

Hirz, M., Gregersen, H., Sander, J., Votion, D., Schänzer, A., Köhler, K., & Herden, C. (2021). Atypical myopathy in 2 Bactrian camels. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, *33*(5), 961-965. https://doi.org/10.1177/10406387211020721

Ho, C., Lam, C., Chan, M., Cheung, R., Law, L., Lit, L., Ng, K., Suen, M., & Tai, H. (2003). Electrospray Ionisation Mass Spectrometry: Principles and Clinical Applications. *Clin Biochem Rev.*, *24*(1), 3-12. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1853331/

Houten, S., Violante, S., Ventura, F., & Wanders, R. (2016). The Biochemistry and Physiology of Mitochondrial Fatty Acid β-Oxidation and Its Genetic Disorders. *Annual Review of Physiology*, *78*(1), 23-44. https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021115-105045

Jahn, P., Dobešová, D., Brumarová, R., Tóthová, K., Kopecká, A., & Friedecký, D. (2022). Dynamics of acylcarnitines, hypoglycin A, méthylènecyclopropylglycine and their metabolites in a Kladruber stallion with atypical myopathy. *Veterinary Quarterly*, *42*(1), 183-191. https://doi.org/10.1080/01652176.2022.2126537

Jogpethe, A., Jadav, T., Rajput, N., Kumar Sahu, A., Tekade, R., & Sengupta, P. (2022). Critical strategies to pinpoint carryover problems in liquid chromatography-mass spectrometry: A systematic direction for their origin identification and mitigation. *Microchemical Journal*, *179*, 107464. https://doi.org/10.1016/j.microc.2022.107464

John, T., Das, M., & Vashishtha, V. (2016). Outbreaks of hypoglycemic encephalopathy in Muzzaffarpur, India: Are these caused by toxins in litchi fruit?. *Indian Pediatrics*, *53*(5), 399-402. https://doi.org/10.1007/s13312-016-0861-9

Joshi, P., & Zierz, S. (2020). Muscle Carnitine Palmitoyltransferase II (CPT II) Deficiency: A Conceptual Approach. *Molecules*, *25*(8), 1784. https://doi.org/10.3390/molecules25081784

Karlíková, R., Široká, J., Jahn, P., Friedecký, D., Gardlo, A., Janečková, H., Hrdinová, F., Drábková, Z., & Adam, T. (2016). Equine atypical myopathy: A metabolic study. *The Veterinary Journal*, *216*, 125-132. https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2016.07.015

Karlíková, R., Široká, J., Mech, M., Friedecký, D., Janečková, H., Mádrová, L., Hrdinová, F., Drábková, Z., Dobešová, O., Adam, T., et al. (2018). Newborn foal with atypical myopathy. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, *32*(5), 1768-1772. https://doi.org/10.1111/jvim.15236

Kodíček, M., Valentová, O., & Hynek, R. (2018). *Biochemie: chemický pohled na biologický svět* (2. přepracované vydání). Vysoká škola chemicko-technologická v Praze.

Konermann, L., Ahadi, E., Rodriguez, A., & Vahidi, S. (2013). Unraveling the Mechanism of Electrospray Ionization. *Analytical Chemistry*, *85*(1), 2-9. https://doi.org/10.1021/ac302789c

Krägeloh, T., Cavalleri, J., Ziegler, J., Sander, J., Terhardt, M., Breves, G., & Cehak, A. (2017). Identification of hypoglycin A binding adsorbents as potential preventive measures in co-grazers of atypical myopathy affected horses. *Equine Veterinary Journal*, *50*(2), 220-227. https://doi.org/10.1111/evj.12723

Kruse, C., Stern, D., Mouithys-Mickalad, A., Niesten, A., Art, T., Lemieux, H., & Votion, D. (2021). In Vitro Assays for the Assessment of Impaired Mitochondrial Bioenergetics in Equine Atypical Myopathy. *Life*, *11*(7), 719. https://doi.org/10.3390/life11070719

Kruve, A., Rebane, R., Kipper, K., Oldekop, M., Evard, H., Herodes, K., Ravio, P., & Leito, I. (2015a). Tutorial review on validation of liquid chromatography–mass spectrometry methods: Part II. *Analytica Chimica Acta*, *870*, 8-28. https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.02.016

Kruve, A., Rebane, R., Kipper, K., Oldekop, M., Evard, H., Herodes, K., Ravio, P., & Leito, I. (2015b). Tutorial review on validation of liquid chromatography–mass spectrometry methods: Part I. *Analytica Chimica Acta*, *870*, 29-44. https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.02.017

Kyselová, L., Vítová, M., & Řezanka, T. (2022). Very long chain fatty acids. *Progress in Lipid Research*, *87*, 101180. https://doi.org/10.1016/j.plipres.2022.101180

Leaney, A., Horner, C., Grace, P., & Mawson, D. (2020). Selection of a surrogate matrix for the quantification of an endogenous analyte in dried whole blood. *Bioanalysis*, *12*(6), 409-418. https://doi.org/10.4155/bio-2020-0012

Lemieux, H., Boemer, F., van Galen, G., Serteyn, D., Amory, H., Baise, E., Cassart, D., van Loon, G., Marcillaud-Pitel, C., & Votion, D. (2016). Mitochondrial function is altered in horse atypical myopathy. *Mitochondrion*, *30*, 35-41. https://doi.org/10.1016/j.mito.2016.06.005

Li, C., Chu, S., Tan, S., Yin, X., Jiang, Y., Dai, X., Gong, X., Fang, X., & Tian, D. (2021). Towards Higher Sensitivity of Mass Spectrometry: A Perspective From the Mass Analyzers. *Frontiers in Chemistry*, *9*, 813359. https://doi.org/10.3389/fchem.2021.813359

Liigand, P., Kaupmees, K., Haav, K., Liigand, J., Leito, I., Girod, M., Antoine, R., & Kruve, A. (2017). Think Negative: Finding the Best Electrospray Ionization/MS Mode for Your Analyte. *Analytical Chemistry*, *89*(11), 5665-5668. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b00096

Lopes, V., Filho, A., Yoshinaga, M., Hirata, M., & Ferreira, G. (2022). Carnitine palmitoyl transferase I: Conformational changes induced by long-chain fatty acyl CoA ligands. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, *112*. https://doi.org/10.1016/j.jmgm.2022.108125

Manchester, K. (1974). Biochemistry of hypoglycin. *FEBS Letters*, *40*(1), S128-S132. https://doi.org/10.1016/0014-5793(74)80696-4

Mathis, D., Sass, J., Graubner, C., & Schoster, A. (2021). Diagnosis of atypical myopathy based on organic acid and acylcarnitine profiles and evolution of biomarkers in surviving horses. *Molecular Genetics and Metabolism Reports*, *29*, 100827. https://doi.org/10.1016/j.ymgmr.2021.100827

Ma, Y., Temkin, S., Hawkridge, A., Guo, C., Wang, W., Wang, X., & Fang, X. (2018). Fatty acid oxidation: An emerging facet of metabolic transformation in cancer. *Cancer Letters*, *435*, 92-100. https://doi.org/10.1016/j.canlet.2018.08.006

McEwen, S., & Hulland, T. (1986). Histochemical and Morphometric Evaluation of Skeletal Muscle from Horses with Exertional Rhabdomyolysis (Tying-up). *Veterinary Pathology*, *23*(4), 400-410. https://doi.org/10.1177/030098588602300409

McKenzie, R., Hill, F., Habyarimana, J., Boemer, F., & Votion, D. (2015). Detection of hypoglycin A in the seeds of sycamore (*Acer pseudoplatanus*) and box elder (*A. negundo*) in New Zealand; the toxin associated with cases of equine atypical myopathy. *New Zealand Veterinary Journal*, *64*(3), 182-187. https://doi.org/10.1080/00480169.2015.1123123

Melde, K., Jackson, S., Bartlett, K., Sherratt, H., & Ghisla, S. (1991). Metabolic consequences of methylenecyclopropylglycine poisoning in rats. *Biochemical Journal*, *274*(2), 395-400. https://doi.org/10.1042/bj2740395

Musaev, A., Sadykova, S., Anambayeva, A., Saizhanova, M., Balkanay, G., & Kolbaev, M. (2021). Mare's Milk: Composition, Properties, and Application in Medicine. *Arch Razi Inst.*, *76*(4), 1125-1135. https://doi.org/10.22092/ari.2021.355834.1725

Navrátilová, P., Borkovcová, I., & Pospíšil, J. (2016). Nutriční a terapeutické vlastnosti kobylího mléka. *Mlékařské listy*, *27*(158), 16-19. http://www.mlekarskelisty.cz/upload/soubory/pdf/2016/158-159/veda_15816-19.pdf

Nguyen, P., Leray, V., Diez, M., Serisier, S., Bloc'h, J., Siliart, B., & Dumon, H. (2008). Liver lipid metabolism. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, *92*(3), 272-283. https://doi.org/10.1111/j.1439-0396.2007.00752.x

Nováková, L., Douša, M., & Česla, P. (2021a). *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I.* (2. přepracované a rozšířené vydání). Česká chromatografická škola, zapsaný spolek.

Nováková, L., Douša, M., & Česla, P. (2021b). *Moderní HPLC separace v teorii a praxi II.* (2. přepracované a rozšířené vydání). Česká chromatografická škola, zapsaný spolek.

Oulkar, D., Singh, K., & Narayan, B. (2022). Characterization of different parts of litchi fruit using UHPLC-QExactive Orbitrap. *Journal of Food Science and Technology*, *59*(12), 4889-4906. https://doi.org/10.1007/s13197-022-05577-z

Palencia, P., & Rivero, J. (2007). Atypical myopathy in two grazing horses in northern Spain. *Veterinary Record*, *161*(10), 346-348. https://doi.org/10.1136/vr.161.10.346

Panuwet, P., Hunter, R., D'Souza, P., Chen, X., Radford, S., Cohen, J., Marder, M., Kartavenka, K., Ryan, P., & Barr, D. (2015). Biological Matrix Effects in Quantitative Tandem Mass Spectrometry-Based Analytical Methods: Advancing Biomonitoring. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, *46*(2), 93-105. https://doi.org/10.1080/10408347.2014.980775

Pettenello, M., Čriepoková, Z., Rovňanová, N., Kostolániová, V., Valocký, I., & Hura, V. (2023). Atypical myopathy in a horse: first confirmed case in Slovakia. *Acta Veterinaria Brno*, *92*(3), 267-270. https://doi.org/10.2754/avb202392030267

Piskláková, B., Friedecká, J., Ivanovová, E., Hlídková, E., Bekárek, V., Prídavok, M., Kvasnička, A., Adam, T., & Friedecký, D. (2023). Rapid and efficient LC-MS/MS diagnosis of inherited metabolic disorders: a semi-automated workflow for analysis of organic acids, acylglycines, and acylcarnitines in urine. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*, *61*(11), 2017-2027. https://doi.org/10.1515/cclm-2023-0084

Pitt, J. (2009). Principles and Applications of Liquid Chromatography-Mass Spectrometry in Clinical Biochemistry. *Clin Biochem Rev.*, *30*(1), 19-34. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2643089/

Popis GC/MS-TOF. https://www.chromservis.eu/gc-ms-tof-description (26. 11. 2023).

Renaud, B., François, A., Boemer, F., Kruse, C., Stern, D., Piot, A., Petitjean, T., Gustin, P., & Votion, D. (2021). Grazing Mares on Pasture with Sycamore Maples: A Potential Threat to Suckling Foals and Food Safety through Milk Contamination. *Animals*, *11*(1), 87. https://doi.org/10.3390/ani11010087

Renaud, B., Kruse, C., François, A., Grund, L., Bunert, C., Brisson, L., Boemer, F., Gault, G., Ghislain, B., Petitjean, T., et al. (2022). *Acer pseudoplatanus*: A Potential Risk of Poisoning for Several Herbivore Species. *Toxins*, *14*(8), 512. https://doi.org/10.3390/toxins14080512

Rudolph, W., Remane, D., Wissenbach, D., Klein, C., Barnewitz, D., & Peters, F. (2018). Development and validation of an ultrahigh performance liquid chromatography-high resolution tandem mass spectrometry quantification method for hypoglycin A and methylene cyclopropyl acetic acid carnitine in horse serum in cases of atypical myopathy. *Drug Testing and Analysis*, *10*(5), 814-820. https://doi.org/10.1002/dta.2337

Salaün, J. (2000). Cyclopropane Derivatives and their Diverse Biological Activities. In A. de Meijere (Ed.), A. de Meijere, *Small Ring Compounds in Organic Synthesis VI* (vol 207, pp. 1-67). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/3-540-48255-5_1

Sander, J., Cavalleri, J., Terhardt, M., Bochnia, M., Zeyner, A., Zuraw, A., Sander, S., Peter, M., & Janzen, N. (2016). Rapid diagnosis of hypoglycin A intoxication in atypical myopathy of horses. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, *28*(2), 98-104. https://doi.org/10.1177/1040638715624736

Sander, J., Terhardt, M., Sander, S., & Janzen, N. (2018). Use of a Standard Newborn Screening Test for the Rapid Diagnosis of Inhibited ß-Oxidation in Atypical Myopathy in Horses. *Journal of Equine Veterinary Science*, *67*, 71-74. https://doi.org/10.1016/j.jevs.2018.03.010

Sander, J., Terhardt, M., & Janzen, N. (2021). Detection of maple toxins in mare's milk. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, *35*(1), 606-609. https://doi.org/10.1111/jvim.16004

Sander, J., Terhardt, M., Janzen, N., Renaud, B., Kruse, C., François, A., Wouters, C., Boemer, F., & Votion, D. (2023). Tissue Specific Distribution and Activation of Sapindaceae Toxins in Horses Suffering from Atypical Myopathy. *Animals*, *13*(15), 2410. https://doi.org/10.3390/ani13152410

Sarkar, A., Datta, D., Datta, S., & John, T. (2020). Acute encephalopathy in children in Muzaffarpur, India: a review of aetiopathogenesis. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, *114*(9), 704-711. https://doi.org/10.1093/trstmh/traa036

Scholte, H., Verduin, M., Ross, J., van den Hoven, R., Wensing, T., Breuking, H., & Meijer, A. (1991). Equine exertional rhabdomyolysis: activity of the mitochondrial respiratory chain and the carnitine system in skeletal muscle. *Equine Veterinary Journal*, *23*(2), 142-144. https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.1991.tb02740.x

Skoog, D., West, D., Holler, F., & Crouch, S. (2022). *Fundamentals of Analytical Chemistry* (10th ed.). Cengage.

Sousa Martins, R., Guimas, A., Rocha, S., Ribeiro, R., Martins, E., Almeida, M., & Quelhas, D. (2022). Glutaric Aciduria Type 2 Presenting in Adult Life With Hypoglycemia and Encephalopathic Hyperammonemia. *Journal of Medical Cases*, *13*(2), 56-60. https://doi.org/10.14740/jmc3840

Sponseller, B., Valberg, S., Schultz, N., Bedford, H., Wong, D., Kersh, K., & Shelton, G. (2012). Equine Multiple Acyl-CoA Dehydrogenase Deficiency (MADD) Associated with Seasonal Pasture Myopathy in the Midwestern United States. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, *26*(4), 1012-1018. https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2012.00957.x

Šamonilová, E., Jahn, P., Tůmová, P., Novotná, T., Maršálek, P., Brumarová, R., Friedecký, D., & Dobešová, D. (2022). Atypická myopatie – nové poznatky a výskyt v České republice za období 2011–2020. *Veterinářství*, *72*(3), 164-170.

Unger, L., Nicholson, A., Jewitt, E., Gerber, V., Hegeman, A., Sweetman, L., & Valberg, S. (2014). Hypoglycin A Concentrations in Seeds of *Acer Pseudoplatanus* Trees Growing on Atypical Myopathy-Affected and Control Pastures. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, *28*(4), 1289-1293. https://doi.org/10.1111/jvim.12367

Unger-Torroledo, L., Straub, R., Lehmann, A., Graber, F., Stahl, C., Frey, J., Gerber, V., Hoppeler, H., & Baum, O. (2010). Lethal toxin of Clostridium sordellii is associated with fatal equine atypical myopathy. *Veterinary Microbiology*, *144*(3-4), 487-492. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.01.024

Valberg, S., Sponseller, B., Hegeman, A., Earing, J., Bender, J., Martinson, K., Patterson, S., & Sweetman, L. (2013). Seasonal pasture myopathy/atypical myopathy in North America associated with ingestion of hypoglycin A within seeds of the box elder tree. *Equine Veterinary Journal*, *45*(4), 419-426. https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.2012.00684.x

van der Kolk, J., Wijnberg, I., Westermann, C., Dorland, L., de Sain-van der Velden, M., Kranenburg, L., Duran, M., Dijkstra, J., van der Lugt, J., Wanders, R., et al. (2010). Equine acquired multiple acyl-CoA dehydrogenase deficiency (MADD) in 14 horses associated with ingestion of Maple leaves (*Acer pseudoplatanus*) covered with European tar spot (*Rhytisma acerinum*). *Molecular Genetics and Metabolism*, *101*(2-3), 289-291. https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2010.06.019

van Galen, G., Marcillaud Pitel, C., Saegerman, C., Patarin, F., Amory, H., Baily, J., Cassart, D., Gerber, V., Hahn, C., Harris, P., et al. (2012a). European outbreaks of atypical myopathy in grazing equids (2006-2009): Spatiotemporal distribution, history and clinical features. *Equine Veterinary Journal*, *44*(5), 614-620. https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.2012.00556.x

van Galen, G., Saegerman, C., Marcillaud Pitel, C., Patarin, F., Amory, H., Baily, J., Cassart, D., Gerber, V., Hahn, C., Harris, et al. (2012b). European outbreaks of atypical myopathy in grazing horses (2006-2009): Determination of indicators for risk and prognostic factors. *Equine Veterinary Journal*, *44*(5), 621-625. https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.2012.00555.x

Voet, D., & Voet, J. (1995). *Biochemie* (1. vyd.). Victoria Publishing.

von Holt, C., Chang, J., von Holt, M., & Böhm, H. (1964). Metabolism and metabolic effects of hypoglycin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, *90*(3), 611-613. https://doi.org/10.1016/0304-4165(64)90242-9

Votion, D., Linden, A., Saegerman, C., Engels, P., Erpicum, M., Thiry, E., Delguste, C., Rouxhet, S., Demoulin, V., Navet, R., et al. (2007). History and Clinical Features of Atypical Myopathy in Horses in Belgium (2000-2005). *Journal of Veterinary Internal Medicine*, *21*(6), 1380-1391. https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2007.tb01962.x

Votion, D., & Serteyn, D. (2008). Equine atypical myopathy: A review. *The Veterinary Journal*, *178*(2), 185-190. https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2008.02.004

Votion, D., Linden, A., Delguste, C., Amory, H., Thiry, E., Engels, P., van Galen, G., Navet, R., Sluse, F., Serteyn, D., & et al. (2009). Atypical myopathy in grazing horses: A first exploratory data analysis. *The Veterinary Journal*, *180*(1), 77-87. https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2008.01.016

Votion, D. (2012). The Story of Equine Atypical Myopathy: A Review from the Beginning to a Possible End. *ISRN Veterinary Science*, *2012*, 1-14. https://doi.org/10.5402/2012/281018

Votion, D., van Galen, G., Sweetman, L., Boemer, F., de Tullio, P., Dopagne, C., Lefèbre, L., Mouithys-Mickalad, A., Patarin, F., Rouxhet, S., et al. (2014). Identification of methylenecyclopropyl acetic acid in serum of European horses with atypical myopathy. *Equine Veterinary Journal*, *46*(2), 146-149. https://doi.org/10.1111/evj.12117

Votion, D. (2016). Atypical myopathy: an update. *In Practice*, *38*(5), 241-246. https://doi.org/10.1136/inp.i1859

Votion, D., Habyarimana, J., Scippo, M., Richard, E., Marcillaud-Pitel, C., Erpicum, M., & Gustin, P. (2019). Potential new sources of hypoglycin A poisoning for equids kept at pasture in spring: a field pilot study. *Veterinary Record*, *184*(24), 740-740. https://doi.org/10.1136/vr.104424

Votion, D., François, A., Kruse, C., Renaud, B., Farinelle, A., Bouquieaux, M., Marcillaud-Pitel, C., & Gustin, P. (2020). Answers to the Frequently Asked Questions Regarding Horse Feeding and Management Practices to Reduce the Risk of Atypical Myopathy. *Animals*, *10*(2), 365. https://doi.org/10.3390/ani10020365

Westermann, C., de Sain-van der Velden, M., van der Kolk, J., Berger, R., Wijnberg, I., Koeman, J., Wanders, R., Lenstra, J., Testerink, N., Vaandrager, A., et al. (2007). Equine biochemical multiple acyl-CoA dehydrogenase deficiency (MADD) as a cause of rhabdomyolysis. *Molecular Genetics and Metabolism*, *91*(4), 362-369. https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2007.04.010

Westermann, C., Dorland, L., Votion, D., de Sain-van der Velden, M., Wijnberg, I., Wanders, R., Spliet, W., Testerink, N., Berger, R., Ruiter, J., et al. (2008). Acquired multiple Acyl-CoA dehydrogenase deficiency in 10 horses with atypical myopathy. *Neuromuscular Disorders*, *18*(5), 355-364. https://doi.org/10.1016/j.nmd.2008.02.007

Westermann, C., van Leeuwen, R., van Raamsdonk, L., & Mol, H. (2016). Hypoglycin A Concentrations in Maple Tree Species in the Netherlands and the Occurrence of Atypical Myopathy in Horses. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, *30*(3), 880-884. https://doi.org/10.1111/jvim.13927

Whitwell, K., Harris, P., & Farrington, P. (1988). Atypical myoglobinuria: An acute myopathy in grazing horses. *Equine Veterinary Journal*, *20*(5), 357-363. https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.1988.tb01545.x

Williams, N., & O'Neill, L. (2018). A Role for the Krebs Cycle Intermediate Citrate in Metabolic Reprogramming in Innate Immunity and Inflammation. *Frontiers in Immunology*, *9*, 141. https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00141

Witkowska-Pilaszewicz, O., Kaszak, I., Zmigrodzka, M., Winnicka, A., Sacharczuk, M., Szczepaniak, J., & Cywinska, A. (2019). Equine atypical myopathy – A review. *Animal Science Paper and Reports*, *37*(3), 233-242.

Woolf, E., McDougall, S., Fast, D., Andraus, M., Barfield, M., Blackburn, M., Gordon, B., Hoffman, D., Inoue, N., Marcelin-Jimenez, G., et al. (2014). Small Molecule Specific Run Acceptance, Specific Assay Operation, and Chromatographic Run Quality Assessment: Recommendation for Best Practices and Harmonization from the Global Bioanalysis Consortium Harmonization Teams. *The AAPS Journal*, *16*(5), 885-893. https://doi.org/10.1208/s12248-014-9633-4

Wouters, C., Toquet, M., Renaud, B., François, A., Fortier-Guillaume, J., Marcillaud-Pitel, C., Boemer, F., De Tullio, P., Richard, E., & Votion, D. (2021). Metabolomic Signatures Discriminate Horses with Clinical Signs of Atypical Myopathy from Healthy Co-grazing Horses. *Journal of Proteome Research*, *20*(10), 4681-4692. https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.1c00225

Wray, D., Goldson-Barnaby, A., & Bailey, D. (2020). Ackee (*Blighia Sapida KD Koenig*) - A Review of Its Economic Importance, Bioactive Components, Associated Health Benefits and Commercial Applications. *International Journal of Fruit Science*, *20*(2), S910-S924. https://doi.org/10.1080/15538362.2020.1772941

Young, M. (1973). Studies on the Growth in Culture of Plant Cells. *Journal of Experimental Botany*, *24*(6), 1172-1185. https://doi.org/10.1093/jxb/24.6.1172

Yu, H., Ok, S., Kim, S., & Sohn, J. (2022). Anesthetic management of patients with carnitine deficiency or a defect of the fatty acid β-oxidation pathway. *Medicine*, *101*(7). https://doi.org/10.1097/MD.0000000000028853

Zeng, W., Musson, D., Fisher, A., & Wang, A. (2006). A new approach for evaluating carryover and its influence on quantitation in high-performance liquid chromatography and tandem mass spectrometry assay. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, *20*(4), 635-640. https://doi.org/10.1002/rcm.2353

Žuvela, P., Skoczylas, M., Jay Liu, J., Bączek, T., Kaliszan, R., Wong, M., & Buszewski, B. (2019). Column Characterization and Selection Systems in Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography. *Chemical Reviews*, *119*(6), 3674-3729. https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00246

8 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

AC00	L-karnitin
AC02	acetylkarnitin
AC03	propionylkarnitin
AC04	butyrylkarnitin
AC05	valerylkarnitin
AC06	hexanoylkarnitin
AC08	oktanoylkarnitin
AC10	dekanoylkarnitin
ACLY	ATP-citrát lyasa
AG03	propionylglycin
AG04	butyrylglycin
AG05	valerylglycin
AG06	hexanoylglycin
AM	atypická myopatie
AMAG	Atypical Myopathy Alert Group
AMP	adenosinmonofosfát
APCI	chemická ionizace za atmosférického tlaku
API	ionizace za atmosférického tlaku
APPI	fotoionizace za atmosférického tlaku
AST	aspartátaminotransferasa
ATP	adenosintrifosfát
B	magnetický sektorový analyzátor
BCAT	aminotransferasy rozvětvených α-oxokyselin
BCKDH	dehydrogenasy rozvětvených aminokyselin
BSA	hovězí sérový albumin
CACT	karnitin-acylkarnitintranslokasa
CI	chemická ionizace
CID	kolizně indukovaná disociace
CK	kreatinkinasa
CoA	koenzym A
CP	kolizní energie
CPT I/II	karnitinpalmitoyltransferasa I/II

CPX	výstupní potenciál
CTRL	kontrola
DBS	suchá krevní skvrna (angl. dry blood spot)
DP	deklasterační potenciál
E nebo ESA	elektrický sektorový analyzátor
EC	Enzyme Commission
EI	ionizace nárazem elektronů
EMA	European Medicines Agency
EP	vstupní potenciál
ESI	ionizace elektrosprejem
FABP	protein vážící mastné kyseliny
FAD/$FADH_2$	flavinadenindinukleotid oxidovaný/redukovaný
FAT	transportér mastných kyselin
FATP	transportní protein pro mastné kyseliny
FDA	Food and Drug Administration
FIA	průtoková injekční analýza
FT-ICR	iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací
FT-OT	orbitrap s Fourierovou transformací
γ-glutamyl-MCPrG	γ-glutamyl-methylencyklopropylglycin
GC	plynová chromatografie
GC-MS	plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií
HGA	hypoglycin A
HGB	hypoglycin B
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IgE	imunoglobulin E
ICH	The International Conference of Technical Requirements fo Registration of Pharmaceuticals for Human Use
IT	iontová past
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
LC	kapalinová chromatografie

LC-MS/MS	kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií
LDH, LD	laktátdehydrogenasa
LLOQ	dolní mez stanovitelnosti
LOD	mez detekce
LOQ	mez kvantifikace
m/z	poměr hmotnosti ku náboji
MADD	mnohočetný deficit acyl-CoA dehydrogenas
MALDI	laserová desorpce a ionizace analytu za účasti matrice
MCP-	methylencyklopropyl-
MCPA-	methylencyklopropylacetyl-
MCPF-	methylencyklopropylformyl-
MCPrG	methylencyklopropylglycin
MDH	malátdehydrogenasa
MRM	multiple reaction monitoring
MS	hmotnostní spektrometrie
MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie
NAD^+/NADH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát oxidovaný/redukovaný
NMD	nutriční myodegenerace
PBS	fosfátový pufr
PCV	objem červených krvinek
PSSM	polysacharidová myopatie
Q	kvadrupól
QC	kontroly kvality
QqQ	trojitý kvadrupól
Q-TOF	kvadrupól s analyzátorem doby letu
Q-Trap	kvadrupól s iontovou pastí
R^2	koeficient determinace
RP	reverzní fáze
S/N	poměr signálu vůči šumu
SLE	extrakce pevná fáze-kapalina
SPE	extrakce pevnou fází

TcsL	*C. sordellii* lethal toxin
TOF	analyzátor doby letu
TSP	ionizace termosprejem
UHPLC	ultraúčinná kapalinová chromatografie
ULOQ	horní mez stanovitelnosti
UV	viditelné světlo
UV/VIS	spektrofotometrie v ultrafialovém a viditelném světle
ZM	zátěžová myopatie