

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Použití lipidových profilů k charakterizaci
kardiovaskulárních onemocnění**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Richard Masař
Studijní program:	N0512A130009
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Lukáš Najdekr, Ph.D.
Rok:	2024

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval 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. Byl jsem seznámen 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

.....

Podpis studenta

Poděkování

Tímto bych rád poděkoval svému vedoucímu diplomové práce Mgr. Lukášovi Najdekrovi Ph.D. za odborné vedení, vytvoření příjemného pracovního prostředí a trpělivost při vyhodnocování dat. Také bych chtěl poděkovat MUDr. Štěpánovi Hudcovi, MUDr. Martinovi Radovi a celému oddělení I. interní kliniky – kardiologické FNOL za poskytnutí patientských vzorků. Poděkování patří i Mgr. Veronice Kučerové a prof. Davidu Friedeckému z oddělení Klinické Biochemie FNOL za poskytnutí kontrolních vzorků. Rovněž bych chtěl poděkovat kolegyni Bc. Martině Kadláčkové za psychickou podporu a ochotu se mnou o dané problematice diskutovat.

Diplomová práce vznikla v rámci projektu Národního ústavu pro výzkum rakoviny (Program EXCELES, ID: LX22NPO5102) – Financováno Evropskou unií – Next Generation EU.

Diploma thesis was written as part of the project of National Institute for Cancer Research (Programme EXCELES, ID Project No. LX22NPO5102) - Funded by the European Union – Next Generation EU.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Richard Masař
Název práce	Použití lipidových profilů k charakterizaci kardiovaskulárních onemocnění
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Ústav molekulární a translační medicíny Olomouc
Vedoucí práce	Mgr. Lukáš Najdekr Ph.D.
Rok obhajoby práce	2024

Abstrakt

Kardiovaskulární onemocnění (KVO) jsou nejčastější příčinou úmrtí v rozvinutých i rozvojových zemích a každoročně si vyžádají přibližně 20,5 milionů životů. Teoretická část diplomové práce byla věnována kardiovaskulárnímu systému a diagnostice kardiovaskulárních onemocnění se zaměřením na akutní koronární syndromy (ACS). Dále byly popsány analytické a statistické metody, které jsou nezbytné pro lipidomické experimenty. V experimentální části bylo pomocí kapalinové chromatografie v systému s reverzní fází ve spojení s hmotnostním spektrometrem Orbitrap Exploris 480 analyzováno devět vzorků pacientů a devět kontrolních vzorků. Cílem experimentální části bylo prostřednictvím necíleného lipidomického postupu identifikovat co největší počet lipidů ve vzorcích s následným zacílením na jednotlivé třídy lipidů. Ze získaných výsledků se mezi nejvíce diskriminující skupiny ve vzorcích pacientů a kontrol řadí glycerolfosfolipidy a sfingolipidy. Pomocí diskriminační analýzy nejmenší částečných čtverců a vulkánových grafů byly jako nejsignifikantnější sloučeniny ve vzorcích pacientů vyhodnoceny ceramidy (konkrétně Cer(d18:1/16:0), Cer(d18:1/24:1) a Cer(d18:2/24:1) a fosfatidylcholin (PC 16:0_22:5). V nedávných studiích bylo definováno několik lipidových sloučenin souvisejících s KVO. Zejména ceramidy a další jednotlivé plazmatické lipidy jsou součástí diagnostických testů, například testu CERAM využívaného na Mayo Clinic. Výsledky naznačují, že molekulární profilování lipidů se zdá být slibným nástrojem pro diagnostiku KVO.

Klíčová slova	Kardiovaskulární onemocnění, diagnostika ACS, klasifikace lipidů, LC-MS, necílená lipidomika
Počet stran	85
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Bc. Richard Masař
Title	Application of lipid profiles for the characterisation of cardiovascular diseases
Type of thesis	Diploma
Department	Department of biochemistry
Supervisor	Mgr. Lukáš Najdekr Ph.D.
The year of presentation	2024

Abstract

Cardiovascular diseases (CVDs) are the leading cause of death in the developed and developing countries, taking approximately 20.5 million lives each year. The theoretical part of the thesis was dedicated to the cardiovascular system and the diagnosis of cardiovascular diseases. The main focus was on acute coronary syndromes (ACS). Analytical and statistical methods essential for lipidomic experiments were also described. In the experimental part, nine patient samples and nine control samples were analysed using reversed-phase liquid chromatography coupled with an Orbitrap Exploris 480 mass spectrometer. The aim of the experimental part was to identify as many lipids as possible in the samples using an untargeted lipidomic approach, with a subsequent targeting on individual lipid classes. From the results obtained, glycerophospholipids and sphingolipids were among the most discriminating groups in the patient and the control samples. Using partial least squares discriminant analysis and volcano plots, ceramides (specifically, Cer(d18:1/16:0), Cer(d18:1/24:1), and Cer(d18:2/24:1)) and phosphatidylcholine (PC 16:0_22:5) were evaluated as the most significant compounds in patient samples. Several lipid compounds related to CVDs have been defined in recent studies. In particular, ceramides and other individual plasma lipids are part of diagnostic tests, such as the CERAM test used at the Mayo Clinic. The results suggest that molecular lipid profiling appears to be a promising tool for diagnosing CVDs.

Keywords	Cardiovascular disease, ACS diagnosis, lipid classification, LC-MS, untargeted lipidomics
Number of pages	85
Number of appendices	0
Language	Czech

OBSAH

1	ÚVOD	1
2	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	3
2.1	Kardiovaskulární systém.....	3
2.1.1	Kardiovaskulární onemocnění	5
2.1.1.1	Ateroskleróza	5
2.1.1.2	Akutní koronární syndromy	6
2.1.1.3	Infarkt myokardu.....	8
2.1.2	Metody a biomarkery v diagnostice AIM	8
2.1.2.1	Kardiální troponiny	10
2.1.2.2	Natriuretické peptidy.....	10
2.2	Klasifikace a názvosloví lipidů	10
2.2.1	Acyly mastných kyselin	12
2.2.2	Glycerolipidy	13
2.2.3	Glycerolfosfolipidy	14
2.2.4	Sfingolipidy.....	15
2.2.5	Sterolové lipidy	16
2.2.6	Prenolové lipidy, sacharolipidy a polyketidy	17
2.3	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie	17
2.3.1	Chromatografické systémy s reverzními fázemi.....	18
2.4	Hmotnostní spektrometrie.....	19
2.4.1	Hmotnostní spektrometry s vysokým rozlišením.....	20
2.4.1.1	Orbitrap	21
2.4.1.2	Orbitrap Exploris 480 MS.....	23
2.4.1.3	Orbitrap Tribrid Ascend	24
2.5	Metabolomika	26
2.5.1	Lipidomika	26
2.5.2	Cílená lipidomika.....	28
2.5.3	Necílená lipidomika	29
2.5.4	Zpracování dat a anotace sloučenin	31
2.5.5	Statistická analýza dat – statistické metody	32
2.5.5.1	Jednorozměrné statistické metody	32
2.5.5.2	Vícerozměrné statistické metody	33
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	35
3.1	Materiál a přístroje	35
3.1.1	Chemikálie	35
3.1.2	Přístroje a pomůcky	35
3.1.3	Biologický materiál.....	35
3.2	Metody	36
3.2.1	Příprava zásobního roztoku mravenčanu amonného	36
3.2.2	Příprava extrakčního činidla s interními standardy.....	36
3.2.3	Příprava mobilních fází	36
3.2.4	Příprava vzorků	36
3.2.5	Příprava vzorků kontroly kvality	37
3.2.6	Analýza pomocí LC-MS	38

3.2.7	Zpracování a analýza dat.....	39
4	VÝSLEDKY	41
4.1	Chromatografický záznam po instrumentální analýze.....	41
4.2	Filtrování dat v programu Compound Discoverer 3.3	43
4.3	Analýza hlavních komponent.....	44
4.4	Diskriminační analýza.....	47
4.5	Strukturní identifikace vybraných ceramidů pomocí fragmentačních spekter.....	53
4.6	Molekulární síť a analýza metabolických drah	57
5	DISKUSE	61
6	ZÁVĚR.....	65
7	LITERATURA	66
8	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	74
9	PŘÍLOHY	77

CÍLE PRÁCE

- Literární rešerše na téma aplikace přístupu necílené lipidomiky pro analýzu kardiovaskulárních onemocnění (KVO)
- Osvojit si principy kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie v lipidomice
- Seznámení se s programovacím jazykem R a jeho aplikace při vyhodnocování dat
- Vyhodnocení použitelnosti lipidových profilů pro diagnostiku KVO se zaměřením na diagnózu STEMI

1 ÚVOD

Správné fungování kardiovaskulárního systému je pro člověka z hlediska jeho funkce nezbytné. Kardiovaskulární systém je především zodpovědný za dodávku živin a kyslíku orgánům, tkáním a buňkám. Mezi stěžejní části kardiovaskulárního systému se řadí srdce, krev a cévy, které podle orgánových potřeb regulují průtok krve (Labrosse, 2018).

Kardiovaskulární onemocnění (KVO) jsou globálně nejčastější příčinou úmrtí na světě (Lindstrom et al., 2022). Avšak správným vyhodnocováním rizik a zaváděním nových citlivějších biomarkerů lze předčasným úmrtím na KVO předejít (<https://world-heart-federation.org/> (30. 3. 2024)). Pojem KVO nezahrnuje pouze jedno konkrétní onemocnění. Nejčastější příčinou KVO je zpravidla ischemická choroba srdeční spojená s akutními koronárními syndromy (ACS) (Bergmark et al., 2022). ACS zapříčiňují zástavu krevního průtoku v důsledku koronárního uzavření, který vede k poškození srdeční svaloviny, tj. myokardu (Collet et al., 2021; Bhatt et al., 2022). Diagnostika KVO je založena na kvantifikaci biomarkerů (především kardiálních troponinů I a T), vyšetření elektrické aktivity pomocí elektrokardiografie a příznaků souvisejících s KVO. Konečnou diagnózou může být akutní infarkt myokardu projevující se elevací (zvýšeným) ST úsekem na elektrokardiogramu. Jakmile nedochází k elevaci ST úseku, jedná se o infarkt myokardu bez ST elevací (zvýšené hladiny troponinů) nebo nestabilní anginu pectoris (bez zvýšené hladiny troponinů) (White & Chew, 2008; Bob-Manuel et al., 2017; Bergmark et al., 2022).

Lipidomika je definována jako vědní disciplína, pomocí níž mohou být popsány změny v metabolismu lipidů a signálních procesů zprostředkovaných lipidy (Han & Gross, 2003). V diplomové práci byl použit necílený lipidomický přístup, který umožňuje identifikaci co největšího počtu lipidů v extrahovatelné biologické matici (dos Santos & Vuckovic, 2024).

Pro analýzu širokého spektra lipidů se jako nejvhodnější metoda nabízí vysokoúčinná kapalinová chromatografie na stacionární reverzní fázi C₃₀ ve spojení s hmotnostní spektrometrií s vysokým rozlišením. Výhodami použití C₃₀ kolony je detekce většího množství lipidů než při použití C₈ a C₁₈ fází, účinnější separace podobných lipidových struktur a rozlišení *cis/trans* izomerů (Narváez-Rivas & Zhang, 2016; Pham et al., 2019; Jankevics et al. 2021).

Necílená lipidomika přináší velké množství dat ke zpracování. Statistická analýza je v lipidomice nezbytným krokem pro vyhodnocení těchto dat i následnou interpretaci

získaných výsledků. Postupy statistické analýzy zahrnují jednorozměrné a vícerozměrné metody, které se dále dělí na nesupervizované (např. analýza hlavních komponent) a supervizované (např. diskriminační analýza pomocí nejmenších částečných čtverců) (Chen et al., 2022; Ni et al., 2023).

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Kardiovaskulární systém

Kardiovaskulární systém (tj. oběhová nebo cévní soustava) je složen ze srdce, krve a sítě cév. Tyto tři základní složky kardiovaskulárního systému jsou zodpovědné za regulaci průtoku krve podle potřeb jednotlivých orgánů. Hlavní funkcí kardiovaskulárního systému je zásobení orgánů, tkání a buněk nezbytnými živinami a kyslíkem. Současně je zodpovědný za odstranění odpadních metabolitů a oxidu uhličitého (Labrosse, 2018; Sucusky et al., 2020).

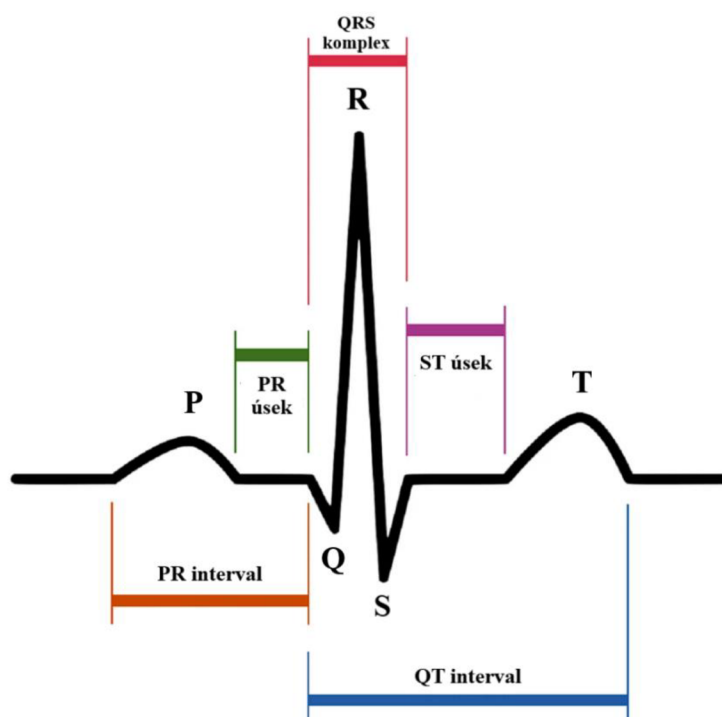
Lidské srdce (*cor*) je uzavřeno v tenkém a zároveň pevném vazivovém obalu nazývaném osrdečník (perikard). Osrdečník chrání a fixuje srdce v hrudní dutině. Srdce je sestaveno ze dvou pump ležících na pravé a levé straně. Pravá strana srdce (pravá komora a pravá předsíň) pohání odkysličenou krev plicním oběhem prostřednictvím plicních tepen do plic. Levá strana srdce naopak sbírá krev okysličenou z plicních žil a zajišťuje průtok krve přes systémový oběh aortou do tělesných tkání (Labrosse, 2018; Sucusky et al., 2020). Výsledkem koordinovaného otevírání a zavírání čtyř srdečních chlopní, resp. dvou cípatých (atrioventrikulárních) a dvou poloměsíčitých (semilunárních) chlopní, je zajištění neustálého jednosměrného průtoku neustále krve vpřed (Sucusky et al., 2020).

Kardiální (srdeční) cyklus se skládá z diastoly (relaxace, uvolnění myokardu) a systoly (kontrakce, stah myokardu). Doba trvání jednoho cyklu je zhruba 800 ms. Diastolická fáze obvykle trvá přibližně 500 ms. Avšak se zvýšením srdeční tepové frekvence dochází k výraznému zkrácení diastolické fáze. Během relaxace přijímají srdeční předsíně krev ze žilního systému a díky dostatečnému tlaku jsou atrioventrikulární chlopně otevřené. V důsledku dochází k průtoku krve přes předsíně až do komor (Labrosse, 2018).

Levá a pravá proximální koronární (věnčitá) tepna společně zajišťují dostatečnou výživu a přísun kyslíku pro srdeční svalovinu (myokard). Během systoly srdeční svaloviny jsou cévy svalem stlačovány. Přibližně 70 % koronárního průtoku tak musí probíhat během diastoly. K poškození srdeční svaloviny může docházet při neuspokojení metabolické potřeby (např. ucpáním koronární tepny při ischemii) (Labrosse, 2018; Al-Sakini, 2022).

Elektrická aktivita srdce je měřena metodou elektrokardiografie (EKG). Elektrokardiogram pak znázorňuje časový záznam pomocí EKG křivek. Obvykle jsou na EKG zaznamenány tři stěžejní vlny (Obr. 1). První z nich, vlna P, reprezentuje

depolarizaci předsíní. Depolarizace spouští jejich následný stah, s čímž souvisí posun krve do komor. Elektrická aktivita je následně zaznamenána komplexem QRS. Komplex QRS je nejvyšší vrchol na záznamu EKG. Komplex QRS představuje depolarizaci s následnou kontrakcí komor, aby došlo k pumpování krve ze srdce. Bezprostředně po QRS komplexu následuje krátký úsek ST, kde by za normálních podmínek neměla být pozorována žádná elektrická aktivita. Vlna T snímá repolarizaci komor, po níž se spouští jejich relaxace. Pomocí abnormálních křivek na EKG lze diagnostikovat srdeční arytmie či ischemické choroby srdeční (ICHS) (Labrosse, 2018).



Obr. 1: Popis EKG křivky. Převzato a upraveno podle Aziz et al. (2021).

2.1.1 Kardiovaskulární onemocnění

Pojem kardiovaskulární onemocnění (KVO) neoznačuje jen jedno konkrétní onemocnění, ale jedná se o obecný název pro poruchy kardiovaskulárního systému. Mezi KVO se řadí např. ICHS, ateroskleróza, mrtvice či srdeční selhání (Labrosse, 2018). KVO jsou globálně nejčastější příčinou úmrtí na světě. V roce 2021 zemřelo na KVO přibližně 20,5 milionů lidí, což představuje takřka jednu třetinu všech celosvětových úmrtí (Lindstrom et al., 2022). Za téměř polovinu těchto úmrtí je zodpovědná ICHS (Bergmark et al., 2022). Dalších přibližně 620 milionů lidí má problémy s onemocněním srdce a oběhového systému (Lindstrom et al., 2022).

2.1.1.1 Ateroskleróza

Ateroskleróza (kornatění tepen) je imunitně-zánětlivé onemocnění velkých a středně velkých tepen, které je zodpovědné za infarkt myokardu, cévní mozkovou příhodu i ischemii končetin (Epstein & Ross, 1999; Björkegren & Lusic, 2022). Aterosklerotické léze jsou vyznačovány celoživotním hromaděním a přeměnou plazmatických lipoproteinů a lipoproteinů s nízkou hustotou (LDL – „Low density lipoproteins“) na vnitřním endotelu arteriální stěny (Björkegren & Lusic, 2022). Základ vzniku aterosklerotických lézí a později plátů je postaven na průchodu tukových látek endotelem (Racek et al., 2021). Také je charakterizován snížením tvorby oxidu dusnatého a uvolněním prozánětlivých cytokinů. Tvorba aterosklerotického plátu je rovněž podpořena adhezí monocytů a T-lymfocytů (Saucy et al., 2020). Krevní monocyty jsou následně vázány na endoteliální adhezní molekuly. Monocyty slouží k produkci kyslíkových radikálů, které oxidují LDL částice. Samotné monocyty se později diferencují na makrofágy. Makrofágy poté fagocytují lipoproteiny v prostoru pod endotelem, což vede ke vzniku tzv. pěnových buněk s estery cholesterolu (Epstein & Ross, 1999; Björkegren & Lusic, 2022).

Vytvořený aterosklerotický plát pak může být nestabilní. K ischemii dojde, pokud nestabilní aterosklerotický plát praskne, tzn. dochází k ruptuře plátu. Vytvoření lokální sraženiny (trombu) v koronárních tepnách může vést k úplnému zastavení průtoku krve do srdce, což je příčinou infarktu myokardu. Sraženina se může rovněž dostat i do mozku, kde může zapříčinit mrtvici (Björkegren & Lusic, 2022).

Vznikající lipidové ložisko na vnitřní stěně tepen je způsobeno jak ovlivnitelnými, tak neovlivnitelnými rizikovými faktory aterosklerózy. Mezi rozhodující neovlivnitelné faktory patří především věk, pohlaví a genetická predispozice ke KVO. Ovlivnitelnými

faktory mohou být např. kouření, obezita, zvýšený tlak (hypertenze), *diabetes mellitus* nebo nedostatek pohybové aktivity (Labrosse, 2018; Racek et al., 2021).

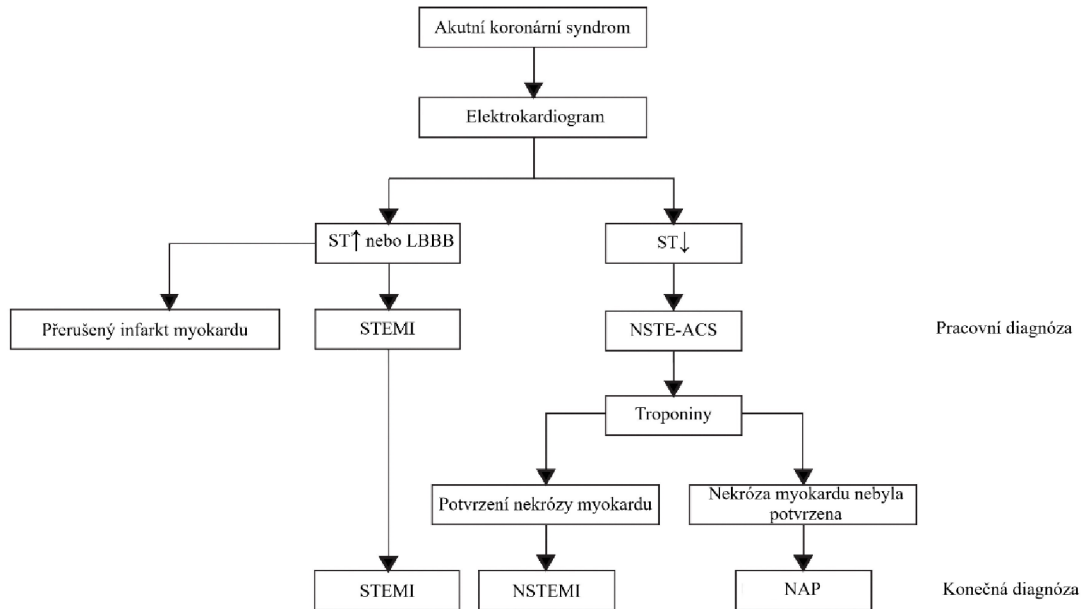
2.1.1.2 Akutní koronární syndromy

Akutní koronární syndromy (ACS – „acute coronary syndromes“) jsou charakterizovány zástavou srdce kvůli nedostatku krevního zásobení (Collet et al., 2021; Bhatt et al., 2022). Klinický obraz ACS je však širší a v důsledku probíhající ischemie může zahrnovat elektrické a hemodynamické nestability s kardiogenním šokem. Dále může jít i o mechanické komplikace zahrnující např. nedomykavost mitrální chlopně, která zabraňuje zpětnému krevnímu toku do levé předsíně při stahu levé komory srdce (El Sabbagh et al., 2018; Collet et al., 2021). Klíčovým symptomem pro zahájení diagnostiky u pacientů s podezřením na ACS je akutní diskomfort hrudníku. Nežádoucí stav na hrudi se projevuje jeho svíravou bolestí, tlakem nebo pálením. U pacientů, kteří mají podezření na ACS, je stanovena finální diagnóza jako akutní infarkt myokardu (AIM – „Acute myocardial infarction“) nebo nestabilní angina pectoris (Byrne et al., 2024). Nestabilní angina pectoris je méně závažným typem ACS, u něhož není potvrzeno akutní poškození myokardu nebo jeho nekróza (Bergmark et al., 2022; Kristensen et al., 2022). Zjednodušené schéma diagnostiky ACS je znázorněno na Obr. 2.

Diagnostický postup při ACS se opírá jak o výše zmíněné příznaky, tak o měření elektrické aktivity srdce na 12svodovém elektrokardiografu. EKG je prvním nástrojem pro hodnocení pacientů s podezřením na ACS. ACS se mohou projevovat charakteristickou přítomností diagnostických elevací ST úseku na elektrokardiogramu nazývané jako STEMI („ST elevation myocardial infarction“). Pro pacienty, kteří trpí STEMI, je typická nekróza myokardu a zvýšená hladina kardiálních troponinů (Bergmark et al., 2022; Byrne et al., 2024).

Existují ovšem případy, kdy se ACS elevací ST úseku na EKG neprojevují. V tomto případě se mluví o tzv. NSTEMI („Non-ST elevation myocardial infarction“). U pacientů s ACS bez projevů ST elevace (NSTE-ACS – „Non-ST elevation-acute coronary syndrome“) dochází ke dvěma možným variantám NSTEMI. V prvním případě se jedná o nekrózu srdečního svalu, která je dostačující k uvolnění kardiálního biomarkeru. Druhou možností je nestabilní angina pectoris bez detekce zvýšeného troponinu (Bob-Manuel et al., 2017; Bergmark et al., 2022). Na EKG vykazují pacienti s diagnózou NSTE-ACS určité změny zahrnující např. přechodné elevace či deprese (poklesy) úseku

ST a abnormality T vln. V jiných případech může být EKG zcela v normě (Byrne et al., 2024).



Obr. 2: Zjednodušené schéma diagnostiky akutního koronárního syndromu. Pozn.: NAP – nestabilní angina pectoris, LBBB – blokáda levého Tawarova raménka („left bundle branch block“). Převzato a upraveno podle White & Chew, (2008).

2.1.1.3 Infarkt myokardu

Čtvrtá univerzální klinická definice infarktu myokardu označuje přítomnost akutního poškození srdeční svaloviny, který je potvrzen abnormálními srdečními biomarkery při prokázané ischemii myokardu. Klinicky je infarkt myokardu klasifikován na pět typů (Thygesen et al., 2019).

Nejčastější příčinou AIM je především ruptura nebo eroze aterosklerotického plátu či endotelu koronární tepny (Reed et al., 2017). Toto vede ke snížení krevního průtoku srdeční svalovinou a následně k nekróze myokardu. Takto je klasifikován infarkt myokardu typu 1 (Thygesen et al., 2019).

Infarkt myokardu typu 2 má odlišnou patologii. Ischemická destrukce myokardu nastává v důsledku nerovnováhy mezi příjmem a potřebou kyslíku myokardu. Za sníženou dodávku kyslíku může být zodpovědný např. spasmus (křeč, sevření) koronárních tepen, trombus na arteriální vnitřní stěně, chudokrevnost (anémie) či hypertenze. U infarktu myokardu typu 2 byla rovněž pozorována vyšší prevalence a mortalita pacientů než u infarktu myokardu typu 1 (White & Chew, 2008; Thygesen et al., 2019).

Infarkt myokardu typu 3 zahrnuje pacienty, kteří předčasně podleli ischemii srdce a není možné jim odebrat vzorky ke stanovení biomarkerů. Tito pacienti však vykazovali příznaky ischemie doprovázené novými ST elevacemi nebo fibrilacemi komor (White & Chew, 2008; Champion et al., 2017).

Infarkt myokardu typu 4 se dělí na 2 typy, a to na typ 4a a typ 4b. Typ 4a souvisí s perkutánní koronární intervencí, kdy je cílem uvolnit neprůchodnou koronární tepnu a zlepšit tak prokrvení. Typ 4b je asociovaný se sraženinou v koronárním stentu. Stent je malá kovová síťka, která se vkládá do oblasti tepny s cílem obnovit normální průtok krve a zabránit dalšímu zúžení tepny (White & Chew, 2008; Champion et al., 2017; Scafa Udriște et al., 2021).

Pacienti s infarktem myokardu typu 5 mají operativně přemostěnou postiženou koronární tepnu (tzn. koronární bypass) (White & Chew, 2008; Champion et al., 2017).

2.1.2 Metody a biomarkery v diagnostice AIM

Jak je výše popsáno, nejdůležitější metodou pro diagnostikování AIM je EKG. Vyšetření pacientů a interpretace výsledků na EKG by měla ideálně proběhnout do 10 minut od kontaktu s pacientem (Racek et al., 2021; Byrne et al., 2024). Mezi další rutinně používané zobrazovací metody v diagnostice AIM patří echokardiografie, magnetická

rezonance srdce či koronární výpočetní tomografie (CCTA – „Coronary computed tomography angiography“). Echokardiografie poskytuje hodnocení struktury a funkce srdce, zejména srdeční tloušťky a pohybu myokardu (Thygesen et al., 2019). Echokardiografie je důležitá pro diagnostiku neischemických příčin hrudního diskomfortu, jako je onemocnění chlopní, kardiomyopatie či plicní embolie. Méně často se používá magnetická rezonance srdce, která je však užitečná pro hodnocení míry poškození srdeční svaloviny (Vafaie, 2016). Metoda CCTA (tj. koronarografie) zprostředkovává neinvazivní zobrazení koronárních tepen. Rozšířené je použití CCTA na pohotovosti, jelikož s její pomocí jde velmi přesně vyloučit ischemickou chorobu srdeční. Díky tomu může dojít k rychlejšímu propouštění pacientů a zároveň tak ušetření nákladů na jejich léčbu (Dedic et al., 2016).

Pro hodnocení rizika onemocnění a jeho diagnostiky se v klinické praxi stalo nezbytné měření biomarkerů. Biomarkery jsou snadno měřitelné a kvantifikovatelné biologické parametry (Chan & Ng, 2010; Strimbu & Tavel, 2010). Dobrý biomarker s vysokou specifíčností a senzitivitou odhaluje nebo předvídá riziko onemocnění. Také by biomarker měl podávat reprodukovatelné výsledky a jeho měření by mělo být ekonomicky výhodné (Chan & Ng, 2010). Nejpoužívanějšími biomarkery v laboratorní diagnostice AIM se staly kardiální troponiny (cTns – „Cardiac troponins“). Kardiální troponiny vytlačily v diagnostice AIM dříve používaný myoglobin a kreatinkinasu (CK – „creatine kinase“), resp. myokardiální isoenzym CK-MB. Důvodem je, že exprese myoglobinu neprobíhá pouze v myokardu. Z toho vyplývá, že specifita a pozitivní prediktivní hodnota myoglobinu je poměrně nízká. Hodnocení CK-MB pro diagnostiku AIM už rovněž není doporučováno z podobných důvodů jako u myoglobinu, i když při odhadu rozsahu AIM může mít stále své místo (Wang et al., 2020; Tilea et al., 2021).

Určitou roli při diagnostice AIM můžou mít i další biomarkery. Patří mezi ně např. neuroendokrinní biomarkery jako natriuretické peptidy a copeptin. Dále za zmínku stojí biomarkery zánětu jako C-reaktivní protein (CRP), interleukin-6 (IL-6) a faktor nádorové nekrózy α (TNF- α) a markery destabilizace plaku (např. myeloperoksidasa) (Tilea et al., 2021).

Podle zprávy „World Heart Federation“ lze však správným zaváděním specifitějších nástrojů pro diagnostiku předejít až 80 % předčasných infarktů a mrtvic (<https://world-heart-federation.org/> (4. 3. 2024)).

2.1.2.1 Kardiální troponiny

Kardiální troponiny I (cTnI – „Cardiac troponin I“) a T (cTnT – „Cardiac troponin T“) jsou součástí kontraktálního aparátu myokardu. Předpoklad je, že cTns jsou exprimovány prakticky pouze v srdci. Situace je složitější u cTnT, kdy jejich zvýšená hladina může pramenit z poraněného kosterního svalu. Vzhledem k této skutečnosti jsou výrazně doporučovány vysoce citlivé testy pro cTns. Poškození myokardu je stanoveno, pokud je hladina cTns zvýšena nad 99. percentil referenční populace. Dynamické zvýšení (a)nebo snížení hladiny cTns poukazuje na akutní poškození myokardu, zatímco chronické poškození je dáno trvale zvýšenou hladinou cTns (Thygesen et al., 2019).

2.1.2.2 Natriuretické peptidy

Mozkový natriuretický peptid (BNP – „Brain natriuretic peptide“) je biomarker biomechanické zátěže. BNP je secernován komorami, které reagují na tenzi kardiomyocytů (Chan & Ng, 2010). Krevní hladiny BNP a N-terminálního fragmentu proBNP (NT-proBNP – „N-terminal pro B-type natriuretic peptide“) jsou v klinické praxi používané pro diagnostiku a posouzení rizika srdečního selhání. Doporučeno je použití BNP nebo NT-proBNP především u pacientů, u kterých se neprojevuje ST elevace na EKG (Wang et al., 2020).

2.2 Klasifikace a názvosloví lipidů

Lipidy jsou malé hydrofobní či amfipatické molekuly. Jejich společnou vlastností je relativní nerozpustnost ve vodě a zároveň rozpustnost v nepolárních organických rozpouštědlech. Lipidy jsou zásadními součásti výživy. Rovněž jsou podstatné pro pochopení mnoha důležitých patologických stavů organismu. Dysregulace metabolismu lipidů je spojena se závažnými lidskými onemocněními jako rakovina, Alzheimerova choroba nebo KVO (Holčápek et al., 2018; Meikle et al., 2021).

Lipidy označují heterogenní skupinu sloučenin, pro niž bylo nutné vytvořit komplexní klasifikační systém. Poprvé byl klasifikační systém lipidů představen kolektivem autorů Fahy et al. (2005), který rozdělil lipidy do osmi tříd. Rozdělení do jednotlivých tříd s příklady zástupců je ilustrováno v Tab. 1. Systém klasifikace, názvosloví a chemické struktury lipidů jsou k dispozici ve strukturní databázi „LIPID MAPS Structure Database“ (LMSD). Jednotlivé lipidové třídy mají další subklasifikační hierarchii, která je rovněž zaznamenaná v LMSD. V současnosti LMSD čítá přes 48 000 lipidových struktur a je tak největší lipidovou databází na světě (<https://www.lipidmaps.org/>, (5. 3. 2024)).

Tab. 1: Jednotlivé třídy lipidů a příklady sloučenin náležejících do určité třídy. Převzato a upraveno podle Fahy et al. (2005).

Třída	Zkratka	Příklad sloučeniny
Acylly mastných kyselin	Acyl-FA	dodekanová kyselina
Glycerolipidy	GL	1-hexadekanoyl-2-(9Z-oktadecenoyl)- <i>sn</i> -glycerol
Glycerolfosfolipidy	GP	1-hexadekanoyl-2-(9Z-oktadecenoyl)- <i>sn</i> -glycero-3-fosfocholin
Sfingolipidy	SP	N-(tetradekanoyl)-sfing-4-enin
Sterolové lipidy	ST	cholest-5-en-3 β -ol
Prenolové lipidy	PR	2 <i>E</i> ,6 <i>E</i> -farnesol
Sacharolipidy	SL	UDP-3-O-(3R-hydroxy-tetradekanoyl)- α D-N-acetylglukosamin
Polyketidy	PK	aflatoxin B ₁

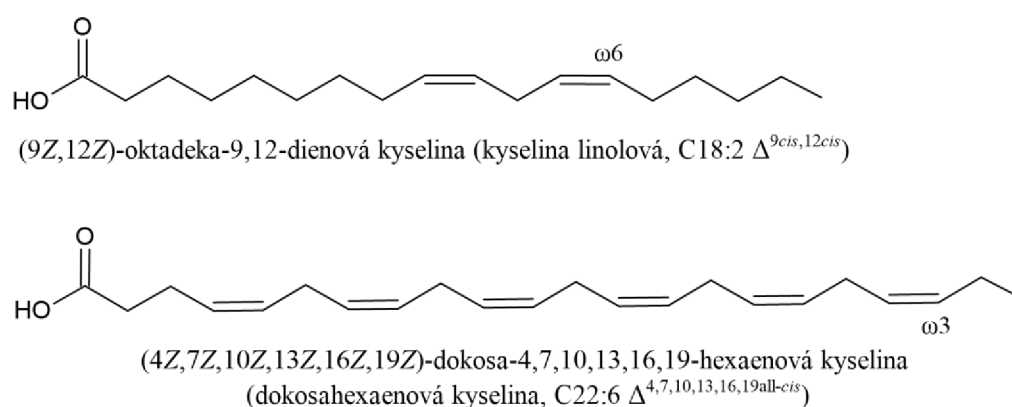
Za dobu existence klasifikačního systému v něm bylo provedeno mnoho revizí a aktualizací, které jsou zahrnuty ve článcích týmů Fahy et al. (2009), Liebisch et al. (2013), Liebisch et al. (2020). Kolektiv autorů Liebisch et al. (2013) zavedl standardizovaný zkrácený zápis lipidových tříd za účelem přesné anotace struktur lipidových druhů odvozených z hmotnostně spektrometrických analýz. Níže je uveden výčet pravidel dle platné nomenklatury, který je nezbytný k pochopení jednotlivých názvů lipidů uvedených v diplomové práci:

- Obecně je první uvedena zkratka lipidové skupiny. Po ní následuje počet uhlíkových atomů a počet dvojných vazeb, mezi nimiž je umístěna dvojtečka (př. FA 18:1). V případě, že je znám počet uhlíků a dvojných vazeb na dalších acylových řetězcích, je mezi jednotlivými acylovými řetězci znázorněno podtržítko (Př. PE 16:0_18:1, TG 14:0_16:0_16:1).
- Poloha dvojných vazeb je uvedena v závorce za počtem dvojných vazeb. Číslování je dle Δ -nomenklatury (neznámá geometrie př. FA 18:1(9)). Pokud je konformace známa (*Z* pro *cis*, *E* pro *trans*), je uvedena společně s číslem v závorce (př. FA 18:1(9*E*)).
- Zkratky případných funkčních skupin (OH – hydroxyl, O – keto skupina, Me – methyl) jsou uváděny podle toho, zda je známá jejich poloha. Při neznámé poloze funkčních skupin je to např. takto: FA 16:0_Me4, při známé poloze funkčních skupin např. tímto způsobem: FA 16:0(3Me,7Me,11Me,15Me).
- U tříd GL a GP *sn*-pozice (*sn*-1, *sn*-2 a *sn*-3) označuje uhlík v molekule glycerolu. Označení *sn* („stereospecific numbering“) lze použít pro zápis polohy substituentu při vazbě na glycerolovou kostru.

- V případě sfingolipidů je anotace zkratky dána počtem hydroxylů ve sfingoidní kostře (m pro mono, d pro di, t pro tri) před počtem uhlíků a dvojných vazeb (př. zápisu ceramidů (Cer): Cer(d18:1/16:0) nebo Cer 18:1;2O/16:0).

2.2.1 Acyly mastných kyselin

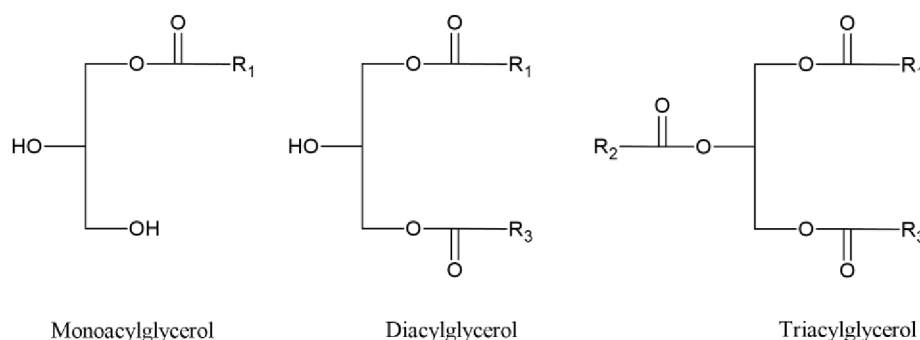
Acyly mastných kyselin společně s mastnými kyselinami a jejich konjugáty tvoří nejzákladnější a nejpočetnější třídu lipidů. Mastné kyseliny (FA – „Fatty acids“) jsou karboxylové kyseliny s více jak čtyřmi uhlíky (tj. od kyseliny máselné). FA disponují různou délkou dlouhých nerozvětvených alifatických řetězců, které jsou zodpovědné za jejich hydrofobní charakter. FA jsou převážně přítomny v esterifikované formě s glycerolem či cholesterolem (Fahy et al., 2005; Tabassum & Ripatti, 2021). FA můžeme dále dělit na nasycené (obsahují pouze jednoduché vazby mezi uhlíky) a nenasycené s jednou (MUFA – „Monounsaturated fatty acids“) nebo více dvojnými vazbami (PUFA – „polyunsaturated fatty acids“). Za zmínku stojí kyselina linolová (omega-6 PUFA) a kyselina linolenová (omega-3 PUFA), jež patří mezi esenciální FA, které si lidské tělo není schopné syntetizovat. Tyto dvě kyseliny jsou prekurzory pro tvorbu dalších omega-6 a omega-3 PUFA, které zastávají důležitou roli při regulaci metabolismu lipidů a aterosklerózy (Tabassum & Ripatti, 2021). S rizikem KVO jsou spojovány vyšší koncentrace omega-6 PUFA, celkových PUFA a omega-3 mastné kyseliny dokosahexaenové (Würtz et al., 2015). Strukturální vzorce vybraných omega-3 a omega-6 mastných kyselin jsou ilustrovány na Obr. 3.



Obr. 3: Příklady strukturálních vzorců sloučenin náležejících do skupin omega-3 a omega-6 mastných kyselin. Obrázek autora inspirovaný strukturální databází LMSD. Strukturální vzorce byly nakresleny v programu ACD/ChemSketch.

2.2.2 Glycerolipidy

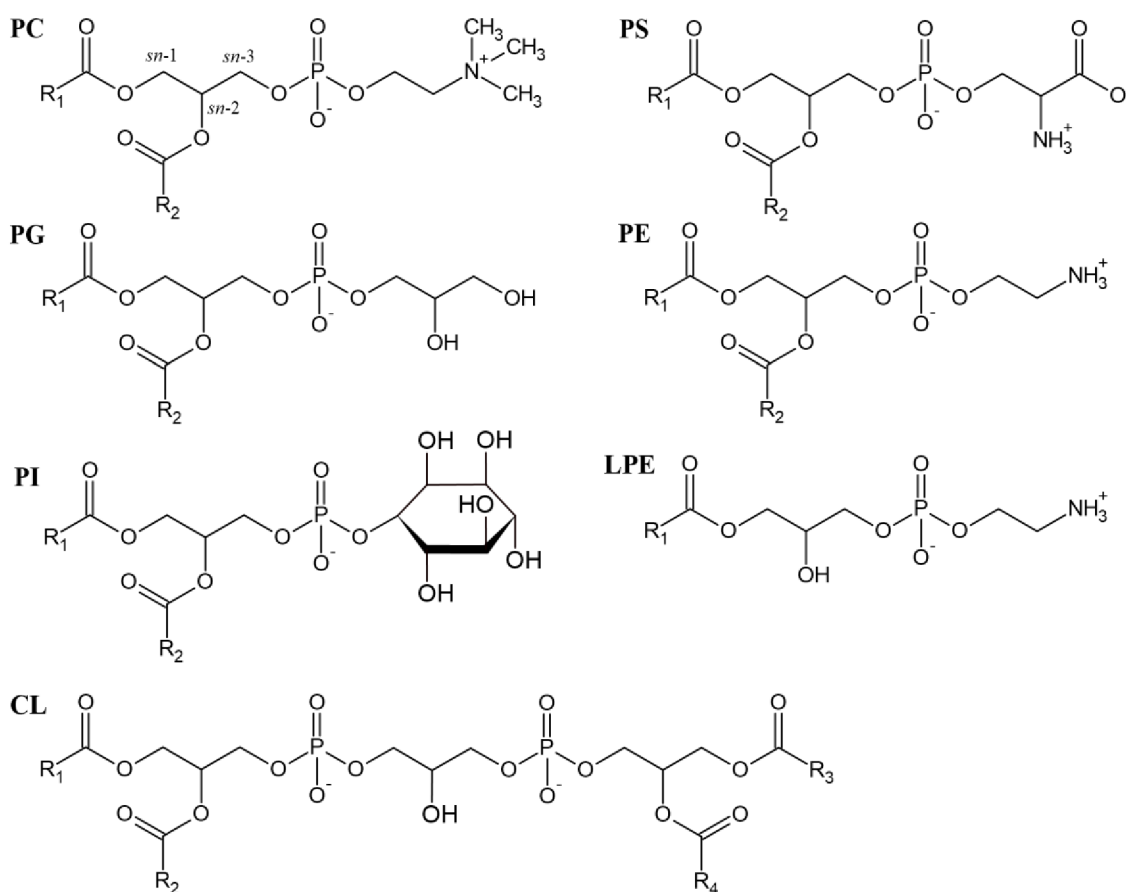
Glycerolipidy vznikají esterifikací glycerolu jednou, dvěma nebo třemi FA. Podle toho jsou glycerolipidy (Obr. 4) rozříděny na monoacylglyceroly (MG), diacylglyceroly (DG) a triacylglyceroly (TG). Glycerolipidy jsou oproti ostatním lipidovým třídám velmi hojně zastoupeny v plazmě. Nejrozšířenějšími glycerolipidy jsou TG, které tvoří převážnou součást zásobního tuku ve tkáních. MG a DG pak reprezentují meziprodukty při biosyntéze či hydrolyze TG a jejich funkce spočívá v přenosu signálu ve formě druhých posílů (Tabassum & Ripatti, 2021). Jednotlivé TG hrají roli i při charakterizaci metabolického syndromu a KVO. Skupina nasycených a mononenasycených TG byla asociována s vyšším rizikem KVO (Stegemann et al., 2014). Rovněž byla popsána souvislost mezi zvýšenou hladinou TG a sníženou hladinou cholesterolu v lipoproteinech o vysoké hustotě (HDL-C – „High-density lipoprotein cholesterol“). Poměr TG/HDL-C byl korelován s inzulinovou rezistencí a androidní obezitou, které mohou zvyšovat riziko KVO (Kosmas et al., 2023).



Obr. 4: Základní strukturní skelety pro jednotlivé glycerolipidy nakreslené v programu ACD/ChemSketch. Obrázek autora inspirovaný strukturní databází LMSD. Pozn., R₁ až R₃ ve vzorcích značí mastnou kyselinu.

2.2.3 Glycerolfosfolipidy

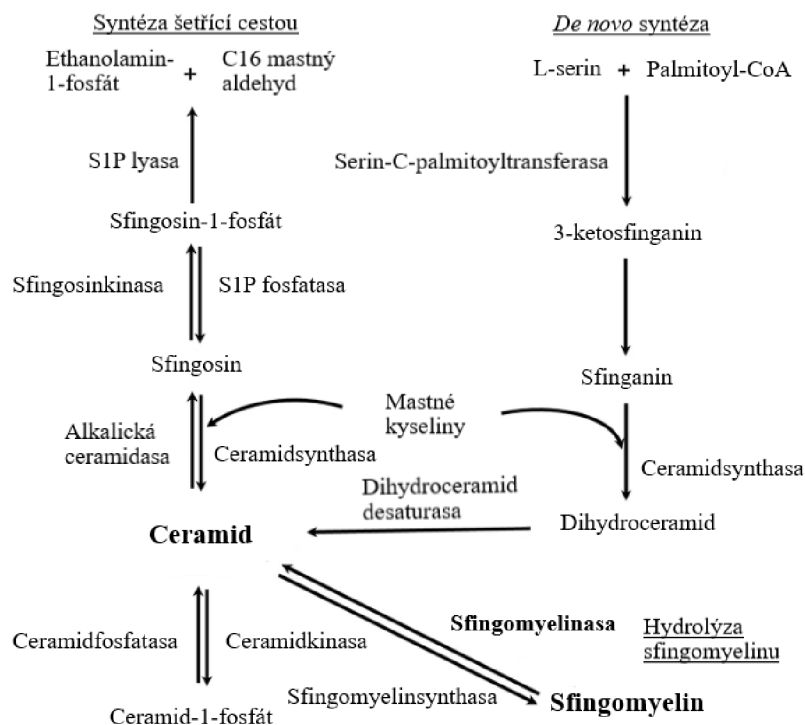
Glycerolfosfolipidy, též zkráceně fosfolipidy, jsou DG (FA připojené v polohách *sn*-1 a *sn*-2 v molekule glycerolu) s fosfatidylesterem připojeným v poloze *sn*-3. Jedná se o deriváty kyseliny fosfatidové a dle koncové esterové skupiny jsou dále děleny. Mezi glycerolfosfolipidy se řadí fosfatidylcholin (PC), fosfatidylserin (PS), fosfatidylethanolamin (PE), fosfatidylinositol (PI), fosfatidylglycerol (PG) a kardiolipin (CL). Mezi GP rovněž patří lysofosfolipidy, které vznikají hydrolyzou jedné z FA fosfolipidu pomocí enzymu fosfatidylcholin 2-acylhydrolasy (fosfolipasa A₂, EC 3.1.1.4). GP jsou ústředními složkami buněčných membránových struktur a mají významnou roli při buněčné signalizaci a jako zásobárna FA (Stephenson et al., 2017; Tabassum & Ripatti, 2021). Strukturální vzorce vybraných glycerolfosfolipidů a lysofosfatidylethanolaminu (LPE) jsou znázorněny na Obr. 5.



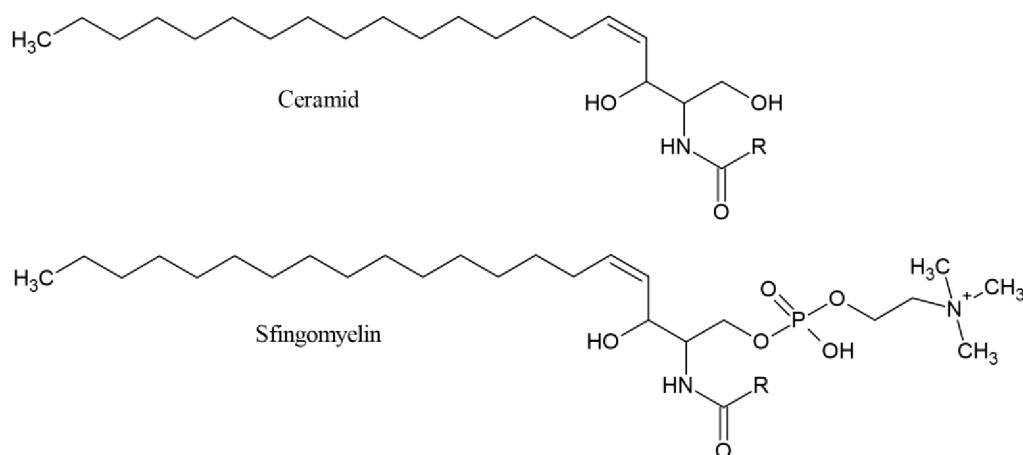
Obr. 5: Strukturální vzorce vybraných glycerolfosfolipidů s vyznačenými *sn* polohami u PC. Obrázek autora inspirovaný strukturální databází LMSD. Strukturální vzorce byly nakresleny v programu ACD/ChemSketch. Pozn., R₁ až R₄ ve vzorcích značí zbytek mastné kyseliny.

2.2.4 Sfingolipidy

Společným znakem sfingolipidů je sfingoidní kostra, která vzniká *de novo* syntézou ze serinu a mastného acyl-CoA s dlouhým řetězcem (Obr. 6). Následně je přeměněna na ceramidy (sfingoidní báze s amidovou vazbou FA), které jsou prekurzory pro syntézu složitějších sfingolipidů, resp. fosfosfingolipidů a glykosfingolipidů (Fahy et al., 2005; Choi et al., 2021). K syntéze ceramidů přispívají i další dvě dráhy (Obr. 6): syntéza šetřící cestou a hydrolýza sfingomyelinu (SM) za katalýzy enzymu sfingomyelin fosfodiesterasy (sfingomyelinasa, EC 3.1.4.12) (Kitatani et al., 2008). Sfingolipidy oplývají rozmanitými strukturními a signálními funkcemi. V organismu navíc plní zásadní biologickou roli. Například zvýšené hladiny ceramidů byly spojovány s inzulinovou rezistencí a jaterní steatózou (ztučnění jater) (Kolak et al., 2007; Raichur et al., 2019). Zvýšené hladiny plazmatických ceramidů a enzymu sfingomyelinasy mají rovněž negativní dopad na kardiovaskulární systém. Ceramidy jsou zodpovědné za zadržování lipoproteinů v cévní stěně, zhoršenou relaxaci srdečního svalu a indukci programované buněčné smrti (apoptózy) kardiomyocytů (Pan et al., 2014; Poss et al., 2020). Strukturní vzorce ceramidu a sfingomyelinu jsou vyobrazeny na Obr. 7.



Obr. 6: Schematické znázornění třech hlavních cest, které řídí hladinu ceramidů v srdci a cévním endotelu. Pozn.: S1P – Sfingosin-1-fosfát. Převzato a upraveno podle Choi et al., (2021) a Tabassum & Ripatti, (2021).

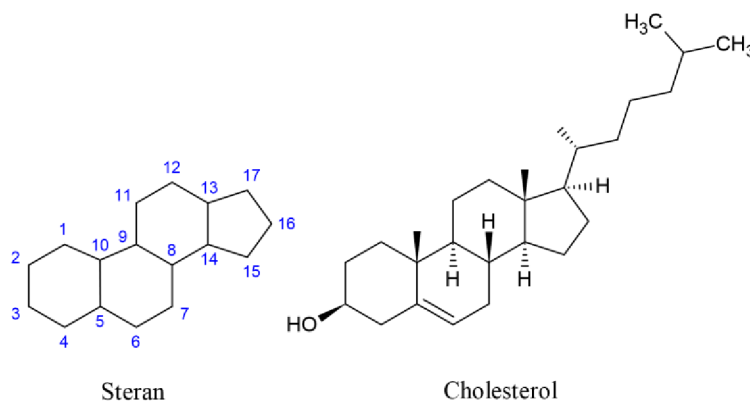


Obr. 7: Strukturní vzorce ceramidu a sfingomyelinu nakreslené v programu ACD/ChemSketch. Obrázek autora inspirovaný strukturální databází LMSD. Pozn.: R značí zbytek mastné kyseliny.

2.2.5 Sterolové lipidy

Sterolové lipidy jsou tvořeny sterolovým jádrem složeným ze čtyř spojených uhlíkových kruhů (tzv. steran) (Obr. 8). Na pozici 3 kruhu A je charakteristicky připojena hydroxylová skupina.

Cholesterol (Obr. 8) tvoří více než 99 % všech plazmatických sterolů u savců. Je to nejjednodušší a nejčastěji stanovovaný sterolový lipid v klinické praxi. Cholesterol se může vyskytovat jak ve volné, tak v esterifikované formě. Estery cholesterolu, jež jsou ve spojení především s lipoproteiny. Cholesterol je klíčovým modulátorem fluidity živočišných membrán. Cholesterol zvyšuje propustnost membrány a na dvě molekuly fosfolipidů připadá jedna molekula cholesterolu. Zároveň cholesterol slouží jako prekurzor pro syntézu steroidních hormonů, vitamínu D a žlučových kyselin (Stephenson et al., 2017; Racek et al., 2021; Tabassum & Ripatti, 2021).



Obr. 8: Strukturní vzorce steranového skeletu sterolových lipidů a cholesterolu. Strukturní vzorce byly nakresleny pomocí programu ACD/ChemSketch.

2.2.6 Prenolové lipidy, sacharolipidy a polyketidy

Nedostatečnému prozkoumání pomocí lipidomických analýz čelí další tři lipidové třídy, a to prenoly, sacharolipidy a polyketidy (Stephenson et al., 2017).

Syntéza prenolových lipidů je odvozena z pětiuhlíkatých prekurzorů isopentenylidifosfátu a dimethylallylpyrofosfátu. Mezi prenolové lipidy se řadí několik významných sloučenin. Příkladem mohou být vitamíny A, E a jejich izoprenoidní prekurzory, např. karotenoidy, jež jsou důležitými antioxidanty (Fahy et al., 2005). V literatuře však zatím není popsáno, že by prenolové lipidy měly vliv na vznik nebo progresi KVO (Bhargava et al., 2022).

Sacharolipidy jsou třídou lipidů, která obsahuje sacharidovou část navázanou k acylovým řetězcům. Sacharidová část nahrazuje glycerolové části molekuly, které jsou součástí glycerolipidů a glycerolfosfolipidů. Sacharolipidy tvoří struktury, jež jsou kompatibilní s membránovými dvojvrstvami. Nejznámějšími sacharolipidy jsou acylované glukosaminové prekurzory lipidové složky A, která je součástí lipopolysacharidů vnější membrány gramnegativních bakterií (Fahy et al., 2005).

Polyketidy jsou tvořeny alespoň dvěma karbonylovými skupinami, které jsou propojeny uhlíkem. Syntéza polyketidů probíhá v houbách či bakteriích a některé z nich disponují vlastnostmi, díky nimž nachází využití v klinické praxi (Stephenson et al., 2017). Příkladem může být využití statinů (např. lovastatinu) ke snížení morbidity a mortality KVO. U pacientů s vyšším rizikem KVO je obvykle jako první využita právě léčba pomocí statinů. Statiny jsou inhibitory (*R*)-mevalonát:NADP⁺ oxidoreduktasy (CoA acylované) (hydroxymethylglutaryl-CoA reduktasa, HMG-CoA reduktasa, EC 1.1.1.34). HMG-CoA reduktasa je ústřední enzym pro endogenní biosyntézu cholesterolu. Účinek pak vyvolá snížení hladiny LDL-cholesterolu přibližně o 20 % až 60 %. Zároveň dochází i k menšímu poklesu hladiny TG a mírnému nárůstu HDL-cholesterolu v krvi (Racek et al., 2021).

2.3 Vysokoučinná kapalinová chromatografie

Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC – „High performance liquid chromatography“) je nejpoužívanější typ eluční chromatografie. HPLC je metoda, která je využívána pro separaci v organických, anorganických i biologických materiálech. Mobilní fázi při HPLC je typicky kapalina obsahující vzorek jako směs rozpuštěných látek (Skoog et al., 2022). Separace a eluce jednotlivých analytů z chromatografického systému je ovlivněna nejen povahou mobilní fáze, ale i nepohyblivé stacionární fáze.

Vzorek je nanášen na začátek stacionární fáze a pohybem mobilní fáze je unášen chromatografickou kolonou. Jednotlivé složky vzorku jsou při průchodu systémem různě zadržovány prostřednictvím interakcí se stacionární fází. Čím déle látky se stacionární fází interagují, tím více jsou zadržovány a mají větší retenční čas. Eluce jednotlivých analytů je provedena za použití izokratické nebo gradientové eluce. Izokratická eluce se vyznačuje mobilní fází o neměnném složení. Gradientová eluce má mobilní fází, jejíž eluční síla se zvyšuje kvůli měnícímu se složení mobilní fáze v čase. Následně jsou detektorem zaznamenány separované zóny analytů, které jsou eluovány z kolony. Detekovaný signál je převeden do eluční křivky, tzv. chromatogramu. Chromatogram je dvourozměrný graf znázorňující závislost intenzity signálu na čase analýzy, který je sledován detektorem. Záznam z chromatografu je charakterizován křivkami Gaussovského tvaru, které jsou obecně označovány jako píky (Nováková et al., 2021a).

2.3.1 Chromatografické systémy s reverzními fázemi

Chromatografie v systému s reverzní fází (RP-HPLC – „Reversed-phase chromatography“) je nejuniverzálnější separační technikou HPLC používanou k separaci mnoha typů sloučenin. Sloučeniny vhodné pro separaci pomocí RP-HPLC by měly ve své struktuře obsahovat hydrofobní části. Avšak i v případě přítomnosti polárních částí v molekule je možné RP-HPLC pro separaci využít (Moldoveanu & David, 2022). Při RP-HPLC dochází nejprve k eluci nejpolárnější složky vzorku. Eluční čas může být prodloužen zvýšením polaritativy mobilní fáze (Skoog et al., 2022).

Mobilní fáze má v reverzním uspořádání typicky polárnější charakter než stacionární fáze. Mobilní fáze má typicky vodně-organickou povahu. Vodná složka sestává z vody, případně může být tvořena i zředěnými vodnými roztoky kyselin či bází, anebo pufrů. Organickou složku tvoří polární organické rozpouštědlo mísitelné s vodou. Charakteristicky se jedná o polární sloučeniny jako methanol či acetonitril, ale také méně polární isopropanol a tetrahydrofuran (Nováková et al., 2021a).

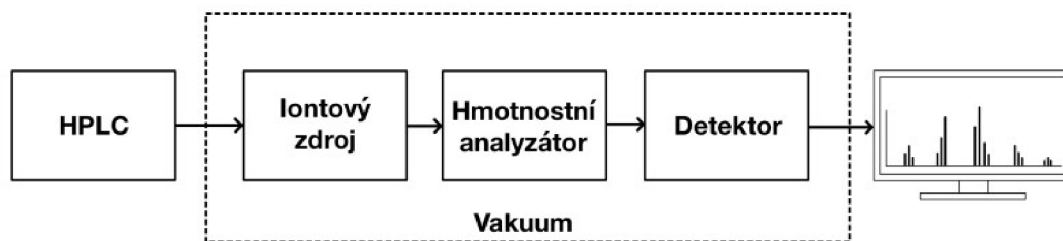
Stacionární fáze pro RP-HPLC jsou hydrofobního charakteru. Dlouhé uhlíkaté řetězce vázané na povrch sorbentu (nejčastěji na silikagel či jiné kovové oxidy) jsou hlavními stacionárními fázemi pro RP-HPLC. Reverzní fáze na bázi silikagelu jsou nejvíce rozšířeným typem nosičů v HPLC (Nováková et al., 2021a). Nejběžnějšími nepolárními vázanými fázemi jsou oktadecylová (C₁₈) a oktylová (C₈). Mezi další stacionární fáze patří fáze s krátkým alkylovým řetězcem (C₁, C₂ a C₄) a dlouhé alkylové fáze (C₂₇ či C₃₀) používané pro speciální aplikace. Mezi stacionární fáze vykazující specifické vlastnosti

se řadí např. fluorované nebo fenylové fáze. Fenylové fáze jsou také hydrofobního charakteru, ale při separaci vyvíjejí speciální π - π interakce s procházejícím vzorkem. Prostředníkem mezi hydrofilními a hydrofobními fázemi jsou kyanopropylové fáze (Moldoveanu & David, 2022).

Stacionární fáze disponující delším alkylovým řetězcem (především C_{30}) jsou užitečné pro separaci částečně nepolárních komponent. Tyto fáze také vykazují větší retenci pro polární i nepolární molekuly než většina C_{18} fází (Moldoveanu & David, 2022). Na základě vlastností by stacionární fáze C_{30} měla mít slibné využití v lipidomické analýze biologických vzorků. Stacionární fáze C_{30} v porovnání se stacionárními fázemi C_8 a C_{18} mohou poskytovat větší počet teoretických pater (užší píky), jelikož zajišťují interakci mezi hydrofobními postranními řetězci a stacionární fází. Při použití fáze C_{30} se zvyšuje i délka eluce gradientu, která většinou trvá od 10 do 30 minut. Díky tomu jsou stacionární fáze C_{30} vhodné pro separaci lipidů z důvodu vzájemné podobnosti lipidových struktur náležející stejné lipidové třídě. Chromatografie na reverzní fázi C_{30} s hmotnostními spektrometry s vysokým rozlišením je rovněž vhodná pro detekci největšího možného počtu lipidů, rozlišení izobarických iontů a *cis/trans* izomerů lipidů (Narváez-Rivas & Zhang, 2016; Pham et al., 2019; Jankevics et al. 2021).

2.4 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie (MS – „Mass spectrometry“) je metoda, pomocí níž se měří poměr hmotnosti molekuly a jejího náboje (m/z). Hmotnostní spektrometr je uzpůsobený k analýze směsi, což je vhodné pro studium biologických materiálů. Instrumentace hmotnostního spektrometru je schematicky ilustrována na Obr. 9. Instrumentace hmotnostních spektrometrů je prakticky neměnná a skládá se z iontového zdroje, hmotnostního analyzátoru a detektoru. Všechny tři jmenované prvky hmotnostního spektrometru pracují ve vakuových podmínkách s výjimkou iontových zdrojů pracujících za atmosférického tlaku (De Hoffmann & Stroobant, 2007; Gross 2017; Smoluch et al., 2019).



Obr. 9: Základní prvky hmotnostního spektrometru.

Analýza v hmotnostním spektrometru začíná produkcí iontů z analyzovaného vzorku v iontovém zdroji. V současnosti se využívá především měkkých ionizačních technik. Při metabolomických experimentech využívajících kapalinovou chromatografii ve spojení s hmotnostní spektrometrií (LC-MS – „Liquid chromatography-mass spectrometry“) dominuje ionizace pomocí elektrospreje (ESI – „Electrospray ionization“). ESI účinně ionizuje polární až středně polární vzorky. Dále se často využívá také technik komplementárních k ESI, a to chemické ionizace za atmosférického tlaku (APCI – „Atmospheric pressure chemical ionization“) a fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI – „Atmospheric pressure photoionization“), které jsou vhodné pro ionizaci analytů s nižší polaritou (Perez de Souza et al., 2021).

Následně hmotnostní analyzátor rozdělí produkované ionty podle jejich m/z . V případě tandemové hmotnostní spektrometrie (MS/MS – „Tandem mass spectrometry“) jsou vybrané ionty dále fragmentovány a analyzovány až druhým analyzátozem. Každému fragmentu je přiřazen poměr m/z vztažený k m/z pekurzorového iontu (De Hoffmann & Stroobant, 2007; Smoluch et al., 2019).

Detekce iontů je rozhodující pro citlivost hmotnostního spektrometru. Pomocí detektoru se měří množství vystupujících iontů z analyzátoru a převádí je na elektrický signál. Zpracované signály jsou zaznamenány ve výstupním zařízení, který umožní sestavení hmotnostního spektra. Hmotnostní spektrum je dvourozměrný graf reprezentující poměr m/z vůči intenzitě signálu (De Hoffmann & Stroobant, 2007; Gross 2017; Smoluch et al., 2019).

2.4.1 Hmotnostní spektrometry s vysokým rozlišením

Hmotnostní spektrometry s vysokým rozlišením (HRMS – „High resolution mass spectrometry“) se vyznačují vysokou přesností určení m/z (s hmotnostní chybou menší než 1 ppm) (Smoluch et al., 2019). HRMS přístroje jsou často používány v „omických“

disciplínách při analýze molekul s vyšší hmotností (proteiny), ale i při analýze malých molekul a lipidů (Schweppe et al., 2019; da Silva et al., 2021). Rozlišovací schopnost („resolving power“) hmotnostního analyzátoru je nutná k oddělení dvou píků s mírně rozdílnými hodnotami m/z (tzv. izobarické hmotnostní píky). Formálně tyto dva píky odpovídají iontům s různými molekulovými vzorci, ale stejnou nominální hmotností. Rozlišovací schopnost je dána pro každý hmotnostní spektrometr na základě určení rozlišení píku v polovině maxima (FWHM – „Full width at half maximum“). Vysoká hodnota rozlišení umožňuje lepší oddělení hmotnostních píků a zvýšení počtu detekovaných látek. Striktní hranice mezi hodnotami pro nízkou či vysokou rozlišovací schopnost neexistuje, avšak obecně mezi HRMS přístroje patří ty, jež mají rozlišovací schopnost větší než 10 000. Mezi HRMS s ultravysokým rozlišením řadíme přístroje s rozlišovací schopností vyšší než 100 000, kam spadá iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací (FT ICR – „Fourier transform ion cyclotron resonance“), hmotnostní analyzátor na principu orbitální pasti (Orbitrap) a novější přístroje na principu analyzátoru doby letu (TOF – „Time-of-flight“) (De Hoffmann & Stroobant, 2007; Najdekr et al., 2016; Deschamps et al., 2023).

2.4.1.1 Orbitrap

Orbitrap je hmotnostní analyzátor s elektrostatickou iontovou pastí, který byl poprvé představen ruským fyzikem Alexanderem Makarovem (Makarov, 2000). Orbitrap je řazen mezi nejnovější hmotnostní analyzátoři, ačkoliv jeho základy sahají do minulého století do roku 1923, kdy byl poprvé Kingdonem popsán princip orbitální pasti (Kingdon, 1923).

Obecně se Orbitrap skládá z jedné centrální a dvou vnějších elektrod. Vnější elektrody ve tvaru pohárku jsou směřovány dovnitř a zajišťuje je středový prstenec z dielektrika. Vřetenovitá centrální elektroda pak udržuje strukturu pasti pohromadě a vyrovnává ji prostřednictvím koncových dielektrických prvků. Do prostoru mezi centrální a vnější elektrodou jsou injektovány ionty. Jakmile je mezi elektrody přivedeno napětí, tak elektrické pole bude podél osy striktně lineární. Z toho vyplývá, že oscilace iontů budou v tomto směru harmonické a ve stejném čase budou ionty přitahovány k centrální elektrodě v důsledku radiální složky pole. Vnější elektrody slouží jako detektor obrazového proudu oscilujících iontů. Obrazový proud v časové oblasti je následně pomocí Fourierovy transformace převeden do frekvenční oblasti (Zubarev & Makarov, 2013; Hecht et al., 2019).

První přístroj LTQ Orbitrap pracující na principu orbitální pasti byl zkonstruován firmou Thermo Electron (v současnosti Thermo Fisher Scientific, Brémy, Německo) a v roce 2005 byl uveden na trh (Zubarev & Makarov, 2013). Následně byl vývoj Orbitrapu směřován k citlivějším analýzám, čímž došlo k vylepšení C-pasti („C-trap“) tak, aby poskytovala vyšší propustnost iontů (LTQ Orbitrap XL). Přidání kolizní cely za C-past mělo za cíl dosáhnout disociace indukované vyššími energetickými srážkami (HCD – „Higher-energy collisional dissociation“). Díky tomu bylo možné získávat strukturní informace o sloučeninách, které dříve při nízkoenergetické fragmentaci CID („Collision-induced dissociation“) nebyly dosažitelné (McAlister et al., 2007; Zubarev & Makarov, 2013). Další součástí Orbitrapu se stal skládaný radiofrekvenční iontový vodič, tzv. S-čočka („S-lens“). S-čočka téměř desetinásobně zvýšila efektivitu přenosu v režimu MS/MS a až pětinasobně zvýšila analýza celého skenu („full-scan“) hmotnostních spekter (Zubarev & Makarov, 2013). V roce 2011 byl představen přístroj Orbitrap Elite. Rozlišovací schopnost byla oproti předchozímu přístroji Orbitrapu zvětšena čtyřikrát na hodnotu 240 000 při m/z 400 se standardním přechodem 768 ms (Michalski et al., 2012).

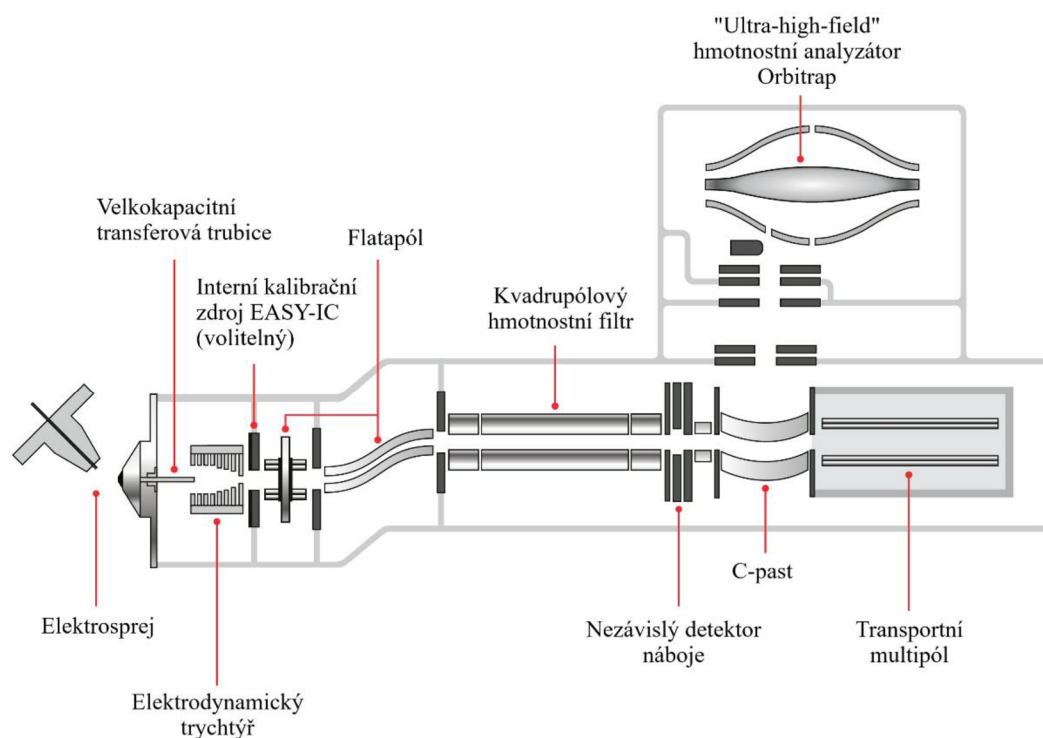
Vzhledem k rozšíření použití Orbitrapu v rutinních analýzách byla potřeba vývoje jednodušších a levnějších přístrojů (Hecht et al., 2019). Orbitrap Exactive představovaly novou rodinu jednodušších, stolních přístrojů, které našly místo v proteomických a lipidomických studiích (Kelstrup et al., 2018; Zhang et al., 2021). Obrovský růst zaznamenaly přístroje Q Exactive, kde v rámci jejich instrumentace přibyl vstříkovací flatapól se schopností selektovat ionty a kvadrupólový hmotnostní filtr. Flatapól má schopnost selektovat ionty s nízkým rozlišením ještě před selekcí iontů při vyšším rozlišení v rámci kvadrupólu. Přístroj je rovněž vybaven kompaktním „ultra high-field“ analyzátozem Orbitrap (Q Exactive HF). Ten umožňuje vyšší frekvenci oscilace iontů, což vede ke dvojnásobnému zvýšení rozlišení při totožném čase skenování oproti přístroji Orbitrap Elite. Rovněž lze alternativně i zdvojnásobit rychlost skenování při zachování stejného rozlišení jako u Orbitrap Elite (Scheltema et al., 2014).

Nejnovější orbitrapové zařízení pracují na platformě Tribid. V jednom integrovaném zařízení řady Tribid je zprostředkováno zapojení tří různých hmotnostních analyzátorů. Generace Tribid kombinuje Orbitrap, kvadrupól a iontovou past. Izolace iontů může probíhat v kvadrupólu nebo v hmotnostním analyzátoru na principu iontové pasti. Fragmentace iontů probíhá na libovolné úrovni vícestupňových experimentů MS (MS^n), kde je umožněna opětovná fragmentace produktových iontů z MS/MS. Fragmenty iontů můžeme generovat pomocí HCD, CID a na některých přístrojích vybavených disociací

přenosem elektronů (ETD – „Electron transfer dissociation“). Na závěr jsou prekurzorové a fragmentační ionty detekovány přímo v analyzátoru Orbitrap, popřípadě je možné využití iontové pasti (Hecht et al., 2019; He et al., 2023).

2.4.1.2 Orbitrap Exploris 480 MS

Přístroje Orbitrap Exploris patří mezi další generaci s dvěma hmotnostními analyzátorů v jednom zařízení. Na Obr. 10 je vyobrazena instrumentace přístroje Orbitrap Exploris 480 MS. První součástí je elektrosprej, kde vznikají ionty analytů, které prolétávají skrz vyhřívanou transferovou trubici do rozhraní mezi atmosférou a vakuem. Toto je zajištěno pomocí elektrodynamického trychtýře s radiofrekvenčním napájením. Poté jsou ionty přeneseny přes hmotnostně selektivní vstřikovací filtr s přepínatelnými frekvencemi. Mezi elektrodynamickým trychtýřem a injekčním filtrem je umístěn iontový zdroj EASY-IC, jenž poskytuje stabilní tok kalibračních iontů fluoranthenu. Fluoranthenové ionty mají dané hodnoty m/z pro pozitivní ($m/z = 202,0777$) a negativní ionizační mód ($m/z = 202,0788$). To umožňuje autodiagnostiku a udržení stabilní úrovně ppm po několik dní. Ionty dále prolétají axiálním elektrickým polem přes zahnutý flatapól. Po srážkovém ochlazení (snížení kinetické energie iontů), ke kterému dochází ve flatapólu, jsou ionty přeneseny skrz urychlovací čočku do kvadrupólu. Při opuštění kvadrupólového hmotnostního filtru je svazek iontů dělenou čočkou propouštěn, blokován nebo případně vychylován na povrch elektrometru. V režimu transmise ionty pronikají transportním multipólem přes C-past do kolizní cely (IRM – „Ion Routing Multipole“) naplněné dusíkem. V IRM jsou ionty zachyceny a dle potřeby fragmentovány. Lze také fragmentovat více prekurzorových iontů postupně na základě jejich optimálních srážkových energií. Přenos iontů zpět z IRM do C-pasti je zajištěn použitím pulsu. Puls snižuje stejnosměrný posun tyčí IRM, čímž dojde k odsunu všech iontů nacházejících se blízko vstupní čočky IRM. Uvnitř C-pasti dochází k snížení kinetické energie iontů a napětí na všech elektrodách je zvýšeno na optimální úroveň pro vstřikování iontů do Orbitrapového analyzátoru. Silná fokusace iontů s minimálními ztrátami je zajištěna aplikací stejného extrakčního napětí na všechny elektrody kromě šterbinové výsuvné elektrody (Hauschild et al., 2020).



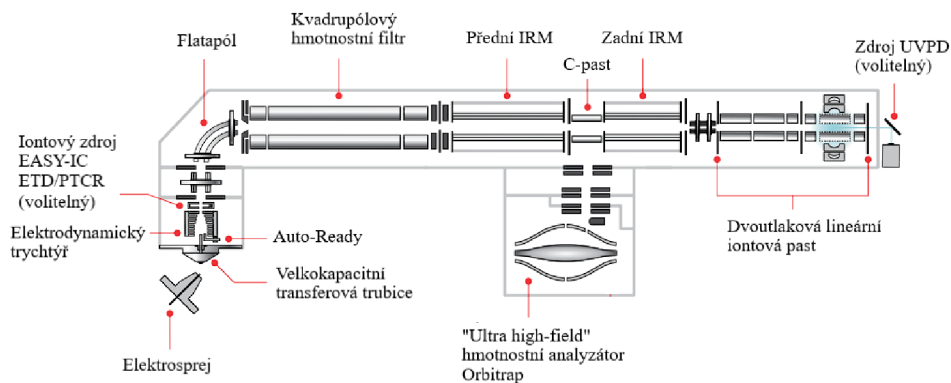
Obr. 10: Instrumentace přístroje Orbitrap Exploris 480 MS. Převzato a upraveno podle Hauschild et al. (2020).

V případě Orbitrapu Exploris 480 jsou ionty detekovány při napětí 4 kV, jež je přivedeno mezi centrální a vnější elektrodu. Rovněž přístroj díky nastavitelnému počátečnímu napětí a kapacitě disponuje širokým hmotnostním rozsahem („Mass range“) m/z 40–8 000. Pro celý hmotnostní rozsah je umožněno použití jednoho kalibračního napětí. Standardní Orbitrap Exploris 480 dosahuje rozlišovacími schopnostmi od 7 500 do 480 000 při hodnotě m/z 200 (Hauschild et al., 2020). Kolektiv autorů Denisov et al. (2021) ve své práci zkoušeli analýzu i s vyšším rozlišením. S použitím 2 048, 4 096 a 8 192 ms přechodů by rozlišovací schopnost činila kolem 1 až 2 milionů při m/z 200 (Denisov et al., 2021).

2.4.1.3 Orbitrap Tribid Ascend

Nejnovějším přírůstkem do rodiny přístrojů Tribid se stal Orbitrap Ascend. Konstrukce přístroje Orbitrap Ascend (Obr. 11) je vylepšena přidáním druhého IRM před C-past. Dva IRM společně zvyšují rychlost a citlivost skenování. To následně vede ke generování většího počtu kvalitnějších MS/MS spekter. Další součástí je iontový zdroj „Auto-Ready“, který slouží jako automatický kalibrátor. Alternativní fragmentace iontů pro lipidomické (a)nebo proteomické experimenty je umožněno pomocí ultrafialové fotodisociace (UVPD – „Ultraviolet photodissociation“). Fragmentace iontů pomocí

UVPD může probíhat v libovolném stupni MSⁿ s následnou detekcí v iontové pasti nebo Orbitrapu. Díky generování bohatých fragmentačních vzorů by UVPD měla přinášet informace o stěžejních strukturních rysech sloučenin (He et al., 2023; <https://www.thermofisher.com/cz/en/home.html/> (8. 3. 2024)). UVPD byla použita např. k lokalizaci dvojných vazeb v acylových řetězcích lipidů či *sn*-polohy v rámci acylových řetězců u fosfolipidů (Brodbelt et al., 2020).



Obr. 11: Instrumentace přístroje Orbitrap Ascend Tribid. Převzato a upraveno podle <https://www.thermofisher.com/cz/en/home.html/> (8. 3. 2024).

2.5 Metabolomika

Metabolomika je definována jako komplexní analýza nízkomolekulárních sloučenin přítomných v biologickém systému. Metabolomika byla poprvé definována koncem 90. let 20. století (Oliver et al., 1998). Metabolomika nachází využití především v oblastech botaniky, farmakologie, medicíny a v posledních letech i při výzkumu životního prostředí (Hajjar et al., 2023). Metabolomika vedle genomiky, transkriptomiky a proteomiky patří mezi tzv. „omické“ vědy. Díky moderním metodám „omických“ věd v kombinaci s bioinformatickými nástroji jsme schopni získávat širší znalosti o patofyziologických, molekulárních a funkčních změnách v biologickém systému (Jacob et al., 2019; Müller et al., 2021). Metabolomika umožňuje měření velkého množství metabolitů v biologických vzorcích jako je krevní plazma, moč nebo jednotlivé tkáně (Müller et al., 2021). Tyto informace o metabolických stavech by mohly sloužit ke zlepšení diagnózy, prognózy a identifikaci časných specifických změn při vzniku a progresi kardiovaskulárních onemocnění (Beger et al., 2016; Müller et al., 2021). Kliničtí lékaři dodnes zachycují rutinně jen úzký soubor metabolitů k posouzení zdravotního stavu pacienta. Příkladem může být stanovení cholesterolu a poměru HDL/LDL pro hodnocení kardiovaskulárního zdraví (Beger et al., 2016; Meikle et al., 2021).

2.5.1 Lipidomika

Lipidomika je vědecká disciplína zabývající se identifikací změn v lipidovém metabolismu a signálních procesů zprostředkovaných lipidy, které regulují homeostázu ve zdravém i nemocném organismu. Lipidomika byla poprvé představena v roce 2003 (Han & Gross, 2003).

V lipidomice se prakticky výhradně používá analýza pomocí elektrosprejové hmotnostní spektrometrie (ESI-MS). Díky ESI-MS jsem schopni identifikovat velké množství jednotlivých druhů lipidů zařazených do několika tříd (Reis et al., 2015). V lipidomice se pak využívají tři hlavní analytické techniky zahrnující „shotgun“ lipidomiku bez chromatografické separace, vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií ve spojení s hmotnostní spektrometrií (HPLC-MS) a hmotnostně spektrometrické obrázkování (MSI – „MS imaging“) (Holčapek et al., 2018). Stručný přehled pracovního postupu využívaného při lipidomických experimentech je ilustrován na Obr. 12.



Obr. 12: Přehled pracovního postupu v klinické lipidomice. Převzato a upraveno podle Kvasnička et al. (2023) a Rakusanova et al. (2023).

V případě „shotgun“ lipidomiky se přivádí surový lipidový extrakt rovnou do MS. Při přímém skenování hmotnostních spekter je třeba využívat HRMS přístroje, případně lze použít MS s nízkým rozlišením ve spojení s iontovou mobilitou (DIMS – „Differential ion mobility spectrometry“) (Lintonen et al., 2014, Holčapek et al., 2018). Metoda „shotgun“ lipidomiky se využívá především díky jednoduchosti provedení experimentu, účinnosti a cenové dostupnosti. Všechny druhy lipidů náležejících určité třídě je možné detekovat v rámci jedné akvizice MS/MS přímo ze surového lipidového extraktu (Cajka & Fiehn, 2016). „Top-down“ a „bottom-up“ lipidomika jsou dva způsoby, kterými lze lipidy analyzovat pomocí přímé infuze do MS (Eggers & Schwudke, 2018). „Top-down“ přístup umožňuje přesné stanovení hmotnosti a určení chemického složení. Obsah

heteroatomů je charakteristický pro spoustu lipidových tříd. Třídy lipidů jsou následně typicky determinovány obsahem heteroatomů a druhy lipidů lze přiřadit podle délky alifatických řetězců a počtu dvojných vazeb (Kim et al., 2013, Reis et al., 2015, Eggers & Schwudke, 2018). Základním principem „bottom-up“ analýzy je identifikace specifických fragmentů polární části určitých tříd lipidů a mastných kyselin v MSⁿ. (Eggers & Schwudke, 2018, Schuhmann et al., 2019).

Lipidomická analýza prováděná pomocí HPLC-MS má v porovnání se „shotgun“ lipidomikou několik výhod. Hlavní výhodou HPLC-MS je široký výběr chromatografických separačních systémů, které lze uzpůsobit prakticky všem typům existujících izomerů lipidů. Dalšími výhodami je potlačení efektu iontové suprese a možnost separace jednotlivých molekul na základě fyzikálně-chemických vlastností (Cajka & Fiehn, 2016; Holčapek et al., 2018; Nováková et al., 2021b). Nejčastěji je využívána HPLC separace v systému reverzních fází, kde jsou lipidy rozděleny na základě lipofility, která je řízena acylovým řetězcem nebo počtem dvojných vazeb (Triebel et al., 2017; Nováková et al., 2021b). Dále je možné používat hydrofilní interakční chromatografii (HILIC – „Hydrophilic interaction chromatography“), kde dochází k separaci lipidů podle polaritativy funkčních skupin (Pham et al., 2019; Nováková et al., 2021b). Podle počtu a polohy dvojných vazeb lze pak také využít argentační chromatografii (Ag-HPLC – „Silver ion high performance liquid chromatography“) (Řezanka et al., 2014; Nováková et al., 2021b).

MSI se využívá k získání cenných informací o distribuci molekul v tkáních. MSI je využívána pro necílenou analýzu bez značení a s vysokou citlivostí například poskytuje vizualizaci různých tříd lipidů v podobě molekulární mapy. Molekulární mapy přispívají k pochopení metabolismu na základě snížených či zvýšených regulací jednotlivých molekul. Pro MSI se používají techniky jako laserová desorpce/ionizace za přítomnosti matrice (MALDI – „Matrix assisted laser desorption/ionization“), hmotnostní spektrometrie sekundárních iontů (SIMS – „Secondary Ion Mass Spectrometry“) a desorpční ionizace elektrosprejem (DESI – „Desorption electrospray ionization“) (Lanekoff et al., 2014; Bednařík et al., 2022).

2.5.2 Cílená lipidomika

Cílený lipidomický přístup se využívá, pokud je potřeba identifikovat a kvantifikovat předem definované skupiny lipidů (Xu et al., 2020; Reinicke et al., 2022). Při analýze založené na MS dochází k selektivnímu výběru známé molekuly lipidu nebo skupiny

lipidů pomocí monitorování vícenásobných reakcí (MRM – „Multiple reaction monitoring“) a monitorování paralelních reakcí (PRM – „Parallel reaction monitoring“) (Khan et al., 2020). PRM nebo také MRM s vysokým rozlišením jsou strategií, kde dochází k izolaci prekurzorového iontu v rámci prvního hmotnostního spektrometru (MS_1) a jeho fragmentaci v rámci druhého hmotnostního spektrometru (MS_2). Veškeré fragmentové ionty MS/MS jsou paralelně sledovány na hmotnostní analyzátoru s vysokým rozlišením a „full-scanem“ (Zhou et al., 2016). Cílený přístup má především výhodu v jeho vysoké specifitě, selektivitě a přesné kvantifikaci. Velké množství neznámých metabolitů však zůstává nedetekováno, čímž tento přístup ztrácí potenciál v nalezení nových druhů lipidů (Khan et al., 2020). Necílené HRMS metody jsou stále daleko od zavedení v klinické rutině, proto jsou nejčastěji v klinické praxi prováděny cílené metody založené na LC-MS/MS (Salihovic et al., 2023).

2.5.3 Necílená lipidomika

Necílený lipidomický přístup je optimalizován tak, aby byl identifikován co největší počet lipidů přítomných v analyzovaném biologickém materiálu. Aplikace necíleného přístupu může přinést nové znalosti o mechanismech onemocnění, včetně objevení potenciálních biomarkerů pro prevenci, diagnostiku nebo léčbu lidských onemocnění (dos Santos & Vuckovic, 2024).

Pro identifikaci lipidů jsou nezbytné čtyři analytické parametry. Těmi čtyřmi parametry jsou retenční čas, přesné určení m/z prekurzorového iontu, izotopový poměr a porovnání dat MS/MS s referenčními databázemi (Magny et al., 2020). K měření MS/MS a MS^n dat slouží dva hlavní přístupy: akvizice závislá na datech (DDA – „Data-dependent acquisition“) a nezávislá na datech (DIA – „Data-independent acquisition“).

Při přístupu DDA se získávají MS/MS spektra výběrem prekurzorových iontů z „full-scanu“ (MS_1 , Full-MS). Prekurzorové ionty vybrané při skenování v rámci MS_1 jsou následně izolovány a fragmentovány za zisku MS_2 spekter. V rámci DDA se prekurzorové ionty vybírají pomocí malého izolačního okna (obvykle do 1 Da). Díky tomu přístup DDA poskytuje informativnější a čistší (jednodušší) MS/MS spektra. Další výhodou DDA ve srovnání s DIA je, že MS/MS spektra jsou rovnou připravena k zpracování, protože nemusí procházet dekonvolucí. Dekonvoluce je proces, kdy dochází k oddělení spektrálního překryvu společně eluovaných komponent. Nevýhodou je fragmentace omezeného počtu iontů v rámci jednoho nástřiku (Barbier Saint Hilaire et

al., 2020; Guo & Huan, 2020; Davies et al., 2021; Defossez et al., 2023). Výběr prekurzorových iontů může při DDA také vést k nízké reprodukovatelnosti, jelikož je upřednostněn k fragmentaci výběr biologicky méně relevantních iontů (Barbier Saint Hilaire et al., 2020). Tyto nevýhody se však dají obejít pomocí inteligentního DDA měření, tzv. AcquireX (Thermo Fisher Scientific) (Schwaiger-Haber et al., 2021; Cooper & Yang, 2024).

Přístup DIA je méně selektivní než DDA. S pomocí DIA lze teoreticky generovat MS/MS spektra pro všechny prekurzorové ionty. To souvisí s detekcí a následnou identifikací většího množství metabolitů, které jsou v nižších koncentracích. Oblíbenou metodou DIA je SWATH („Sequential Window Acquisition of all THEoretical fragment-ion spectra“). Pomocí SWATH je možno pokrýt celý rozsah hmotností výběrem širokého rozsahu m/z prekurzorových iontů a izolačních oken v rozmezí přibližně mezi 10 až 50 Da. Všechny ionty v rámci izolačních oken jsou fragmentovány současně. Vzhledem k šířce rozsahu m/z a izolačních oken může dojít ke ztrátě informací o prekurzorovém iontu a jeho odpovídajícímu fragmentu. Zpracování s následnou anotací sloučenin z MS/MS spekter je tak obtížnější než u postupů DDA (Barbier Saint Hilaire et al., 2020; Guo & Huan, 2020). Vhodným programem pro zpracování dat z DIA může být MS-DIAL (<http://prime.psc.riken.jp/>). MS-DIAL napomáhá k spektrální dekonvoluci. MS/MS spektra jsou po dekonvoluci čistší a může tak dojít k lepší anotaci neznámých sloučenin (Davies et al., 2021)

Použití molekulární sítě (MN – „Molecular network“) se ukázalo jako vhodný nástroj pro hledání struktur neznámých sloučenin. MN představují výpočetní strategii, která se zaměřuje na organizaci a vizualizaci velkého počtu strukturně příbuzných molekul pomocí jejich MS/MS nebo MS^n spekter. Předpokladem je, že příbuzné molekuly mají podobná produktová iontová spektra. Pomocí online platformy GNPS („Global Natural Products Social Molecular Networking“, <https://gnps.ucsd.edu/>) jsme schopni vizualizovat soubor molekul se strukturní podobností do MN (Magny et al., 2020).

Necílený přístup může rovněž přinášet kvantitativní informace o lipidech na základě relativního množství nebo semikvantifikace pomocí stabilních značených standardů (Kvasnička et al., 2023; dos Santos & Vuckovic, 2024). Informace o kvantitě hrají důležitou roli pro posouzení velikosti biologického účinku. Umožňují také srovnávání souborů získaných dat, které byly vytvořeny za pomoci různých technologických platforem (Reisz et al., 2019). Vzhledem k chemické rozmanitosti a velkému množství lipidů je jejich absolutní kvantifikace komplikovaná (Rampler et al., 2018). Většinou je

kvantifikace provedena přidáním alespoň jednoho vnitřního standardu o dané koncentraci pro každou podtřídu lipidů. Vnitřní standardy jsou přidávány ke vzorku v malých objemech, případně jsou součástí extrakčních rozpouštědel (Zhang et al., 2022; Rakusanova et al., 2023).

2.5.4 Zpracování dat a anotace sloučenin

Nedílnou součástí lipidomických experimentů je zpracování souboru dat po instrumentální analýze. Strategie pro zpracování a interpretaci dat snižují počet falešně pozitivních (FPV) a falešně negativních výsledků (FNV). Rovněž by měly přinášet informace o lipidových strukturách a jejich případně zvýšenou či sníženou hladinu ve vzorcích (Ulmer et al., 2017).

Obecný postup („pipeline“) pro zpracování dat zahrnuje několik kroků, jako je filtrování dat, detekce metabolitů („features“), zarovnání chromatografických píků napříč vzorky, doplnění chybějících píků, které algoritmus minul („gap filling“), sestavení a vyhlazení chromatogramů. Rovněž by pomocí „pipeline“ měla být splněna deizotopizace, resp. odstranění ^{13}C konkrétních metabolitů, a anotace aduktů (např. $[\text{M}+\text{H}]^+$ či $[\text{M}+\text{Na}]^+$). Soubor dat je dále filtrován i podle slepého vzorku metody („blank“) a vzorků kontroly kvality (QC – „Quality Control“) (Ulmer et al., 2017; Rakusanova et al., 2023). Pro zpracování dat existuje několik možných programů jako např. XCMS (<https://xcmsonline.scripps.edu/>), MZmine 3 (<https://mzmine.github.io/>) nebo CompoundDiscoverer 3.3 SP3 (CD 3.3, <https://mycompounddiscoverer.com/>). XCMS disponuje online prostorem pro zpracování dat a skriptem v softwaru R (<https://www.r-project.org/>) pro statistickou analýzu a grafickou interpretaci dat (Smith et al., 2006). „Open-source“ software MZmine je pro lipidomiky zajímavý tím, že má vestavěné funkce pro anotaci a identifikaci lipidů (od verze 2.34). Rovněž MZMine představuje možnost sledovat příslušné produktové ionty MS/MS sloužící k lokalizaci polohy dvojně vazby (Korf et al., 2019). Software CD 3.3 sbírá nezpracovaná data pro každý analyzovaný vzorek. CD 3.3 slouží k zarovnání a normalizaci chromatografických píků, porovnává referenční MS/MS spektra pro anotaci sloučenin. Rovněž lze v softwaru provést základní statistická vyhodnocení (např. posouzení relativních rozdílů mezi vzorky nebo poukázání na signifikantní komponenty v určitých skupinách vzorků) (Cooper & Yang, 2024).

2.5.5 Statistická analýza dat – statistické metody

Výzkum v oblasti „omických“ věd přináší velké soubory dat, které je nutné dále nechat podrobit statistické analýze (Ni et al., 2023). Statistická analýza je velmi kritickým krokem v oblasti „omických“ věd. Existuje široký výběr statistických metod pro vyhodnocení dat, které mají své výhody a nevýhody v závislosti na typu datového souboru a cíli studie. Statistické metody můžeme rozdělit do dvou skupin: jednorozměrné (univariační) a vícerozměrné (multivariační), které se dále dělí na nesupervizované a supervizované (Chen et al., 2022; Ni et al., 2023).

2.5.5.1 Jednorozměrné statistické metody

Jednorozměrná statistika je definována jako analýza pouze jedné proměnné. Univariační analýza většinou podává přehled o charakteristice dat, které mohou být stěžejní pro identifikaci studovaných podmínek (Chen et al., 2022). Vzhledem ke generování multidimenzionálních dat u „omických“ věd je použití univariační statistiky omezeno (Wojtowicz et al., 2013). Mezi univariační metody se řadí např. t-test či analýza rozptylu (ANOVA – „Analysis of variance“). ANOVA a t-test jsou parametrické testy, což znamená, že jsou založené na předpokladech o parametrech rozdělení pravděpodobnosti (Checa et al., 2015). Tyto testy nalézají využití při testování statistické významnosti a porovnávání průměrů definovaných souborů vzorků (např. kontrolní vzorky proti vzorkům pacientů) (Saccenti et al., 2014; Ni et al., 2023). Test ANOVA je používán při porovnávání více než dvou skupin (Chen et al., 2022). Lze však použít i neparametrické testy, pokud nejsou splněny předpoklady o normálním rozdělení dat. Mezi neparametrické testy, které pracují s hodnocenými proměnnými, se řadí Mann-Whitney U test, Wilcoxonův či Kruskal-Wallisův test (Checa et al., 2015).

Biologické vzorky obsahují velký počet metabolitů (lipidů), přičemž každý metabolit je podroben samostatnému statistickému testu. Značný počet proměnných zvyšuje šanci nalezení FPV (Chen et al., 2022; Ni et al., 2023). Pro snížení rizika FPV je nutno použít korekci pro násobné testování hypotéz. Běžně využívané jsou Bonferroniho a Benjaminiho-Hochbergova korekce, které korigují hladinu významnosti (p-hodnota – „p-value“) (Saccenti et al., 2014; Ni et al., 2023). Benjaminiho-Hochbergova korekce umožňuje kontrolovat míru falešných objevů (FDR – „False discovery rate“) u všech významných výsledků (Chen et al., 2022).

2.5.5.2 Vícerozměrné statistické metody

Výsledkem necílených lipidomických experimentů jsou mnohorozměrná data s dvěma či více proměnnými. Aby byly analyzovány všechny proměnné současně, je nutné využít vícerozměrných statistických metod (Saccenti et al., 2014). Metody vícerozměrné analýzy využívají vážené průměry, aby původní proměnné byly shrnuty do menšího počtu proměnných (Chen et al., 2022).

Ve většině případů se jako první krok při statistické analýze „omických“ dat používá analýza hlavních komponent (PCA – „Principal component analysis“). PCA je nesupervizovaná metoda, což znamená, že nemá předchozí znalosti o souboru dat. Prakticky PCA vede k projekci dat do redukovaného prostoru definovaného proměnnými, jež se nazývají hlavní komponenty. PCA se snaží zachovat co nejvíce relevantních informací o datech, resp. vysvětluje jejich pozorovanou variabilitu (Bro & Smilde, 2014; Saccenti et al., 2014; Ni et al., 2023). PCA může být použito např. k odhalení vztahů mezi proměnnými či vzorky a k nalezení odlehlých vzorků („outliers“) (Bro & Smilde, 2014).

Intepretace PCA ve většině případů probíhá grafickým znázorněním skóre („score plots“) a zatížení („loading plots“). V grafu skóre se obvykle pozoruje podobnost mezi vzorky. Za ideální situaci lze považovat, pokud dojde k zřetelnému oddělení kontrolních a ošetřených vzorků (Checa et al., 2015). Proměnné s větším významem v každé hlavní komponentě lze odhalit pomocí grafu zatížení. Současné posouzení grafů skóre a zatížení (společně vytváří tzv. biplot) vede k informacím o vztazích mezi vzorky a proměnnými (Bro & Smilde, 2014; Checa et al., 2015).

Shluková (klastrová) analýza (CA – „Cluster analysis“) je rovněž řazena mezi nesupervizované statistické metody. Cílem CA je v souboru dat seskupovat jednotlivé vzorky do skupin, tzv. shluků. Vzorky patřící do rozdílných shluků se mezi sebou liší více než pokud jsou součástí stejného shluku (Checa et al., 2015; Wierzchoń & Kłopotek, 2018). V rámci lipidomiky může odpovídat např. na to, jaké lipidy vytváří rozdíly mezi skupinami vzorků nebo jaké lipidy se ve studii společně mění (Niemelä et al., 2009). Výsledkem hierarchického shlukování je strukturovaný graf ve tvaru stromu označovaný jako dendrogram. Dendrogramy se mohou zobrazovat i jako teplotní mapy („heat mapy“) s cílem poskytnout informace o vlastnostech, které jsou zodpovědné za shlukování (Checa et al., 2015; Wierzchoń & Kłopotek, 2018).

Používaným nástrojem při analýze „omických“ dat je diskriminační analýza metodou nejmenších částečných čtverců (PLS-DA – „Partial least-square discriminant analysis“).

PLS-DA je supervizovanou metodou, kterou je vhodné použít jednak pro redukci dimenzionality dat a jednak pro selekci a klasifikaci komponent (Ruiz-Perez et al., 2020). Metoda PLS-DA pracuje se dvěma datovými maticemi X a Y, kde X odpovídá matici experimentálních dat a Y odpovídá matici skupiny, do které budou jednotlivé proměnné příslušet. Účelem PLS-DA je spojení X a Y pomocí malého počtu latentních proměnných, které odpovídají maximální kovarianci mezi X a Y (Checa et al., 2015).

Oblíbenou variantou PLS-DA je její ortogonální varianta (OPLS-DA – „Orthogonal partial least-square discriminant analysis“). Její využití má opodstatnění především ve snazší interpretaci oproti metodě PLS-DA (Checa et al., 2015). Hlavním výstupem metody OPLS-DA je graf, označovaný jako „S-plot“. V rámci „S-plotu“ je zobrazovaná na ose x modelovaná kovariance a na ose y modelovaná korelace zasazená do rozptylového grafu. Za nejvýznamnější proměnné jsou považovány metabolity, které disponují nejvyššími hodnotami kovariance a korelace. Tyto metabolity jsou pak vyhodnoceny jako nejvíc diskriminantní mezi pozorovanými skupinami vzorků (Shyti et al., 2015).

Rovněž lze z váhových vektorů PLS-DA získat hodnotu důležitosti proměnných na projekci (VIP skóre), který usnadňuje diskriminaci proměnných. VIP skóre propůjčují bodovou hodnotu každé proměnné a tyto proměnné jsou řazeny podle jejich důležitosti v modelu PLS-DA. Z toho vyplývá, že čím vyšší je VIP skóre proměnné, tím je v daném modelu důležitější (Checa et al., 2015).

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiál a přístroje

3.1.1 Chemikálie

Acetonitril kvality HPLC LC-MS (Honeywell, USA)

Interní standard Cer (d18:1-d7/15:0) (MERCK KGaA, Německo)

Interní standard FA 20:4 d8 (MERCK KGaA, Německo)

Interní standard SPLASH Lipidomix (MERCK KGaA, Německo)

Isopropanol (Honeywell, USA)

Mravenčan amonný (MERCK KGaA, Německo)

Voda kvality HPLC LC-MS (VWR BDH Chemicals, Francie)

3.1.2 Přístroje a pomůcky

Analytická váha KERN (Kern, Německo)

Automatické pipety Eppendorf (Eppendorf, Německo)

Centrifuga Rotina 420R (Hettich Zentrifugen, Německo)

Hmotnostní spektrometr Orbitrap Ascend Tribrid (Thermo Fisher Scientific, USA)

Hmotnostní spektrometr Orbitrap Exploris 480 MS (Thermo Fisher Scientific, USA)

HPLC Chromatograf Dionex UltiMate™ 3000 Rapid Separation (Thermo Fisher Scientific, USA)

HPLC Vialky (Chromservis (Simax), Česká republika)

Kolona Accucore-C₃₀ (Thermo Fisher Scientific, USA)

Mikrozkumavky 2,0 ml (Eppendorf, Německo)

Odměrné válce (P-Lab, Česká republika)

Orbitální třepačka IKA Vortex Genius 3 (IKA, Německo)

Ultrazvukový desintegrátor (PS-40, Čína)

3.1.3 Biologický materiál

Pro analýzu bylo použito devět vzorků plazmy pacientů s diagnózou STEMI, které byly poskytnuty oddělením kardiologie fakultní nemocnice Olomouc (FNOL). Celkem devět vzorků plazmy kontrolní skupiny byly pro analýzu poskytnuty oddělením klinické biochemie FNOL. Kontrolní skupina byla vybrána tak, aby odpovídala věkem a pohlavím pacientům. Všichni účastníci této studie jsou/byli pacienti FNOL a podepsali informovaný souhlas. Dostupná jsou všechna potřebná meta-data ke studii. Studie byla schválena etickou komisí LF UPOL v rámci projektu AZV NU22J-02-00067 a AZV

NU23-02-00479. V rámci ochrany citlivých informací bylo v této práci použito zaslepení vzorků, aby nebylo možné jednotlivé účastníky studie vyhledat na základě předložené diplomové práce.

3.2 Metody

3.2.1 Příprava zásobního roztoku mravenčanu amonného

Zásobní roztok mravenčanu amonného o koncentraci $400 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ byl připraven tak, že bylo na analytické váze naváženo 5,04 g mravenčanu amonného ($M_r = 63,06 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$), který byl rozpuštěný ve 200,0 ml LCMS vody. Roztok byl následně sonikován v ultrazvukovém desintegrátoru po dobu 30 min.

3.2.2 Příprava extrakčního činidla s interními standardy

Extrakční činidlo bylo připraveno smícháním 28,5 ml isopropanolu s 1,5 ml interního standardu SPLASH Lipidomix. SPLASH Lipidomix obecně zahrnuje všechny hlavní třídy lipidů v poměru k lidské plazmě. Následně bylo k extrakčnímu činidlu pipetováno 18,72 μl deuterovaného interního standardu FA 20:4-d8 a 15,8 μl deuterovaného interního standardu Cer(d18:1-d7/15:0).

3.2.3 Příprava mobilních fází

Mobilní fáze A pro oba ionizační módy se skládala z $20 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ roztoku mravenčanu amonného v 60 % acetonitrilu/ 40 % vodě. Mobilní fáze A o objemu 500,0 ml byla připravena smícháním 300 ml acetonitrilu se 175 ml LCMS vody. K mobilní fázi A bylo přidáno 25 ml $400 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ roztoku mravenčanu amonného.

Mobilní fáze B pro oba ionizační módy se skládala z $20 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ roztoku mravenčanu amonného v 85,5 % isopropanolu/ 9,5 % acetonitrilu/ 5 % vodě. Mobilní fáze B o objemu 500,0 ml připravena smícháním 450 ml isopropanolu s 50 ml acetonitrilu. Následně byla mobilní fáze B promíchána. Z mobilní fáze B bylo odpipetováno 25 ml s následným nahrazením 25 ml $400 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ roztoku mravenčanu amonného do celkového objemu 500,0 ml.

Mobilní fáze byly sonikovány po dobu 30 min a přes noc se nechaly stabilizovat při laboratorní teplotě.

3.2.4 Příprava vzorků

Do mikrozkušavky byl nejprve odebrán alikvot plazmy o objemu 50 μl . Vzorek plazmy byl extrahován přidáním 150 μl isopropanolu, který byl připraven smícháním společně s výše zmíněnými interními standardy. Všechny vzorky byly 20 s vortexovány a následně

se nechaly centrifugovat (20 min, $\sim 21\,000 \times g$, 4 °C). Po centrifugaci bylo pipetováno 150 μl supernatantu každého vzorku do HPLC vialky.

Dále byly připraveny dva slepé vzorky tzv. blanky (jeden na začátek a druhý na konec analýzy vzorků na chromatografické koloně). Místo 50 μl plazmy bylo použito 50 μl vody, k níž bylo přidáno 150 μl isopropanolu. Další postup byl stejný jako u biologických vzorků.

3.2.5 Příprava vzorků kontroly kvality

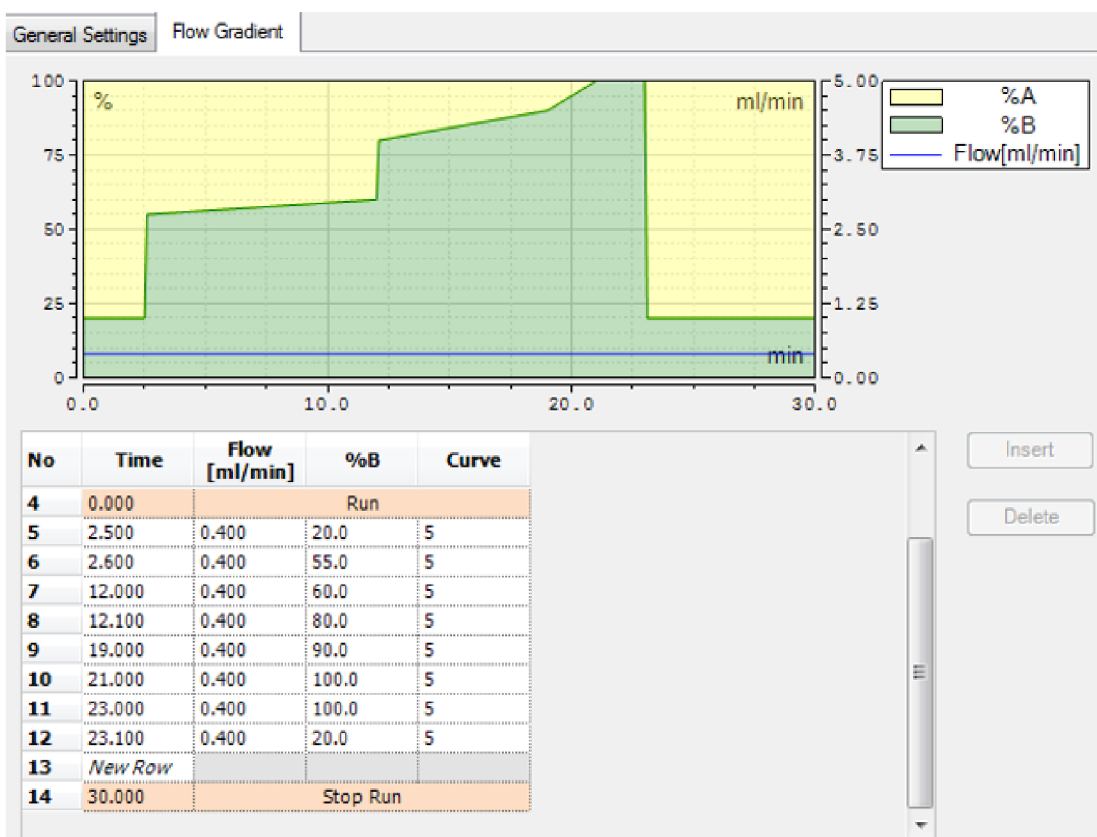
Vzorky kontroly kvality (QC) jsou souhrnným vzorkem, který reprezentuje celý soubor vzorků. Vzorky QC byly připraveny smícháním 50 μl každého vzorku pacienta, resp. kontroly do mikrozkuhavky. Smíchaný vzorek QC (tj. „pool“) v mikrozkuhavce byl po dobu 2 min vortexován. Poté bylo připraveno 15 alikvotů vzorků QC pipetováním 50 μl z připraveného „poolu“. Alikvoty vzorků QC byly následně zpracovány stejně jako vzorky plazmy a blank. Všechny vzorky včetně vzorků QC a blanku byly připravovány a následně nastříkovány v randomizovaném pořadí (Obr. 13).

QC_01 – QC_05
Blank_01
QC_06 – QC_10
Pacient_06
Kontrola_06
Pacient_01
Kontrola_07
Pacient_08
QC_11
Kontrola_09
Pacient_07
Kontrola_08
Pacient_09
Kontrola_05
QC_12
...
QC_14
QC_15
Blank_02

Obr. 13: Ukázka randomizovaného pořadí nástřiku jednotlivých vzorků na chromatografickou kolonu.

3.2.6 Analýza pomocí LC-MS

Separace byla provedena v chromatografickém uspořádání HPLC v systému s reverzní fází s připravenými mobilními fázemi na koloně Accucore-C₃₀ (150 mm x 2.1 mm, velikost částic 2.6 μm). Gradientová eluce (Obr. 14) probíhala následovně: po dobu 2,5 min při 20 % B, strmý nárůst obsahu B do 12 min na 60 %, nárůst obsahu B pokračoval až na 100 % do 23 min s následným prudkým poklesem obsahu B na 20 %, který byl udržen do konce separace. Doba jedné separace činila 30 min s nástřikem 2 μl vzorku. Po celou dobu separace byl nastaven průtok na hodnotu 400 μl·min⁻¹ a hodnota teploty činila 55 °C. Vzorky byly nástřikovány v randomizovaném pořadí, aby nedocházelo k tvorbě nežádoucího efektu v rámci posunu signálů během detekce v MS (Jankevics et al., 2021).



Obr. 14: Grafické znázornění gradientového průtoku při RP-HPLC za použití kolony Accucore-C₃₀.

Detekce proběhla v rámci hmotnostního spektrometru Orbitrap Exploris 480 MS s elektrosprejem jako iontovým zdrojem. Analýza probíhala v pozitivním i negativním ionizačním módu. Detekce proběhla ve „fullscanu“ s rozsahem m/z 150-2 000 při hmotnostním rozlišením 120 000 při MS₁ skenech a 15 000 při MS₂ skenech. Doba cyklu jednoho skenu trvala 0,8 s. Zdroj EASY-IC byl zapnut. Radiofrekvence S-čočky byla nastavena na 70 %. U MS₂ skenů hodnota m/z izolačního okna činila 2,5. Mód srážkové energie (HCD) byl odstupňován (%): 20, 40 a 100.

Všechny datové soubory byly nahrány v profilovém módu. Hodnota napětí v ESI byla nastavena na 3,5 kV pro pozitivní mód a 2,7 kV pro negativní mód. Byly nastaveny parametry tlaku plynů: „sheath gas“ = 45 arb, „aux gas“ = 8 arb a „sweep gas“ = 1 arb. Teplota na kapiláře činila 350 °C a teplota iontové přenosové trubice 300 °C.

Na dvou připravených vzorcích plazmy pacientů s diagnostikou STEMI byla rovněž provedena metoda k vytvoření MSⁿ spekter cílového seznamu ceramidů. Pro analýzu byl využit přístroj Orbitrap Tribrid Ascend, který umožňuje vícestupňové fragmentace pomocí HCD i UVPD.

3.2.7 Zpracování a analýza dat

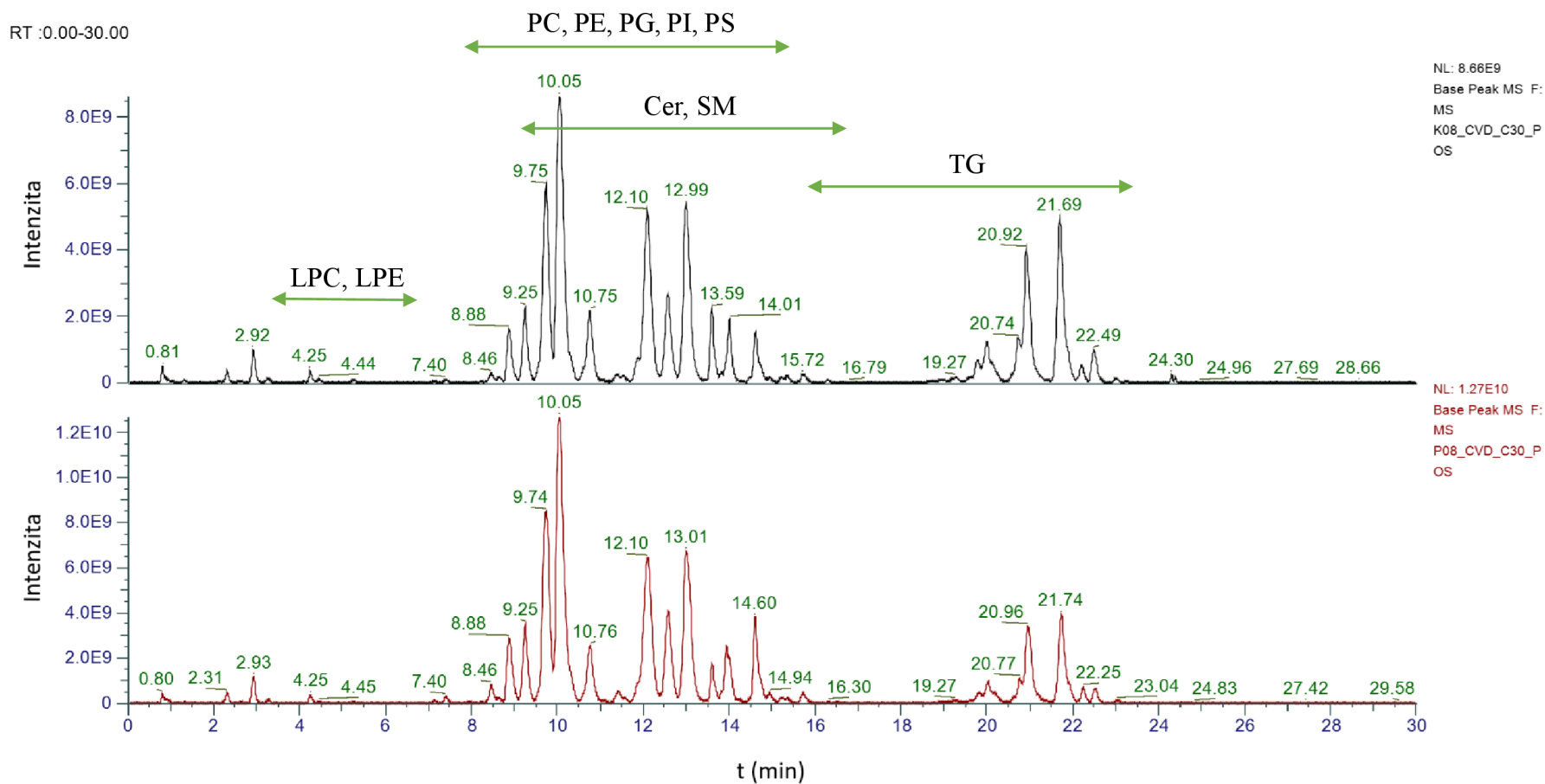
Pro nastavení metody a ovládání kapalinové chromatografu s hmotnostním spektrometrem byl použit program XCalibur (Thermo Fisher Scientific). Chromatogramy byly zpracovány v programu FreeStyle 1.8 (Thermo Fisher Scientific). „Processing“ získaných dat z instrumentální analýzy byl proveden v softwaru Compound Discoverer 3.3 SP3. Navržené identifikované sloučeniny byly porovnány s hodnotami z MS/MS spekter z databází, které jsou kompatibilní s CD 3.3 (např. mzCloud, mzVault, LipidSearch, LipidBlast nebo ChemSpider). Všechny názvy lipidů, které jsou uvedeny ve výsledcích, byly identifikovány programem CD 3.3 na základě srovnání MS/MS spekter z výše uvedených databází. První filtrování dat proběhlo na základě rozpětí hmotnostní chyby (od -5 do 5 ppm). Pro zmenšení počtu detekovaných sloučenin bylo provedeno filtrování pomocí hodnocení chromatografických píků („peak rating“). Filtr „peak rating“ umožňuje odstranit chromatografické píky nízké kvality, aniž by se musel nastavovat omezující filtr pro prahovou hodnotu intenzity píků. Pro zacílení na jednotlivé třídy a podtřídy lipidů byly použity filtry, které zahrnují pouze určitou třídu lipidů, popřípadě pouze jen její malou část. Vizualizace a grafické zpracování dat proběhlo rovněž v softwaru CD 3.3 a pomocí programovacího jazyku R (<https://www.r-project.org/>).

Molekulární síť PCs byla vytvořena v programu GNPS. Analýza lipidových drah byla provedena pomocí nástroje BioPAN (<https://lipidmaps.org/biopan/>).

4 VÝSLEDKY

4.1 Chromatografický záznam po instrumentální analýze

Na Obr. 15 jsou zobrazeny chromatogramy po LC-MS analýze jednoho kontrolního (nahore) a jednoho patientského vzorku (dole). Rovněž jsou na Obr. 15 zahrnuty přibližné retenční časy vybraných podtříd lipidů.

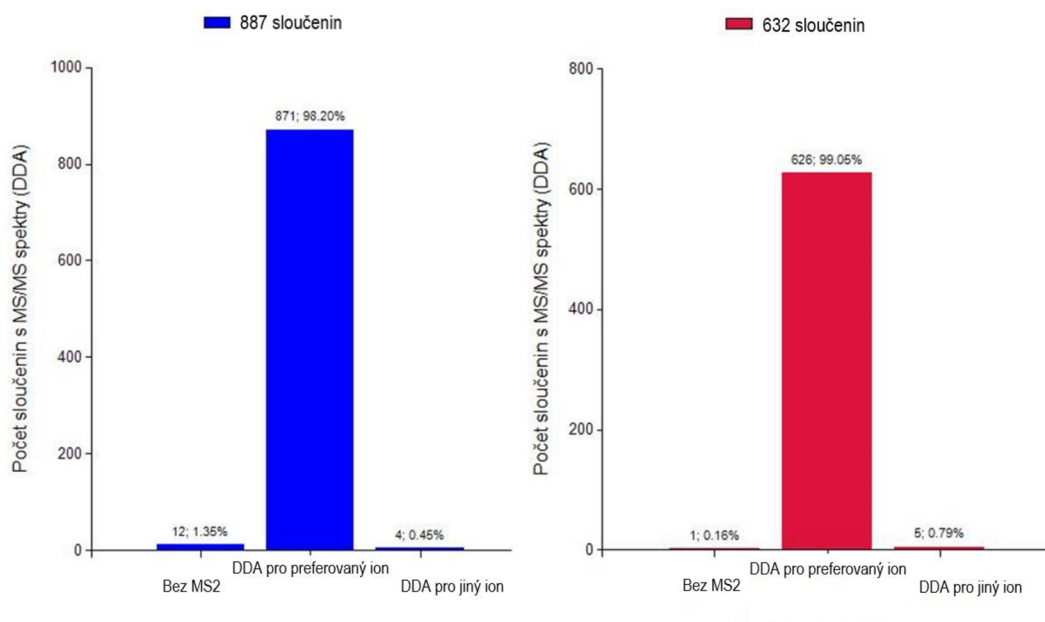


Obr. 15: Výsledný chromatogram kontrolního vzorku (nahore) a vzorku pacienta (dole) společně s vyznačením přibližného rozsahu retenčních časů různých podtříd lipidů.

4.2 Filtrování dat v programu Compound Discoverer 3.3

Necíleným lipidomickým přístupem bylo po zpracování a prvním filtrování dat detekováno v pozitivním módu 1 790 sloučenin z 5 717 navržených po procesování dat před použitím filtru. V negativním módu bylo po nastavení filtru ponecháno 1 122 sloučenin z 3 568 navržených rovněž po procesování dat před jejich filtrováním.

Kvůli vysokému počtu komponent, které by byly součástí analýzy, byl použit filtr hodnotící kvalitu chromatografických píků, tzv. „peak rating“. V pozitivním módu bylo po „peak rating“ filtru a vyloučení sloučenin bez anotovaných MS/MS spekter detekováno 875 sloučenin a v negativním módu činil počet 631 sloučenin (Obr. 16). Mezi vyfiltrovanými sloučeninami jsou zahrnuty struktury lipidů, léky podávané pacientům i sloučeniny, jež mají přiřazený sumární vzorec bez znalosti názvu.



Obr. 16: Počty sloučenin v pozitivním módu (vlevo) a negativním módu (vpravo), které prošly „peak rating“ filtrem. Sloučeniny, kterým nebyly nalezeny programem MS/MS spektra byly z analýzy vyřazeny.

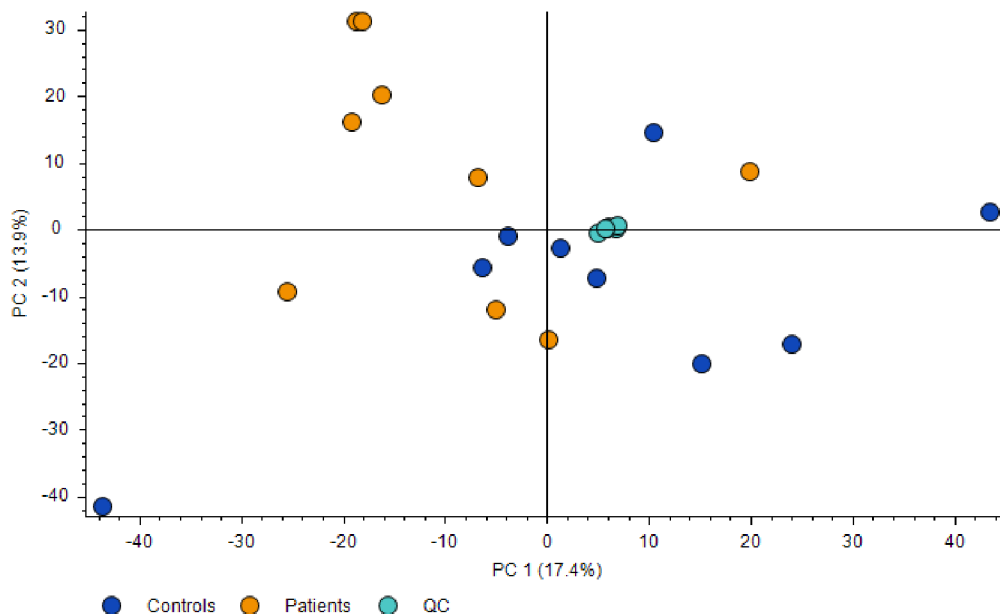
4.3 Analýza hlavních komponent

Vzorky pacientů a kontrol byly analyzovány společně se vzorky QC přístupem necílené lipidomiky. K prvotní charakterizaci vzorků byla využita nesupervizovaná statistická metoda PCA pro všechny sloučeniny po prvním filtrování na základě hmotnostní chyby. Skupiny jednotlivých vzorků byly vyneseny do dvourozměrného rozptylového diagramu skóre o nejvyšší možné kumulativní vysvětlené variabilitě 31,3 % v pozitivním módu (Obr. 17) a 27,2 % v negativním módu ionizace (Obr. 18).

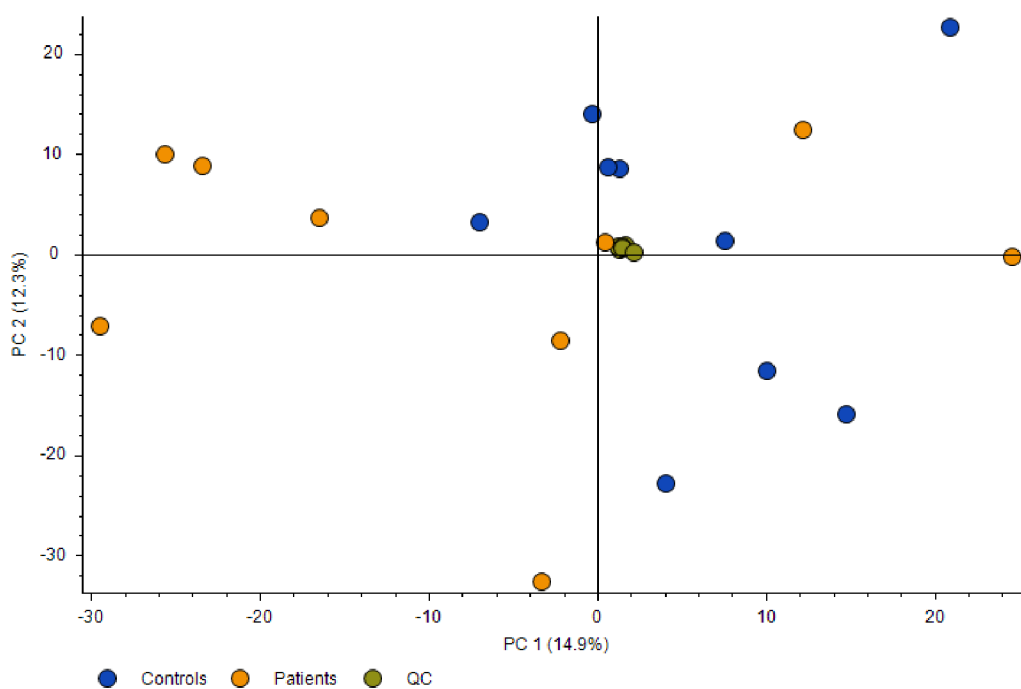
Pro anotované ceramidy a struktury odvozené od ceramidu jsou vyobrazeny ve dvourozměrných rozptylových diagramech skóre v pozitivním módu (Obr. 19), resp. negativním módu (Obr. 20). Struktury odvozené od ceramidu zahrnují hexosylceramidy a 1-O-eikosanoyl-Cer(d18:1/16:0) v pozitivním módu. V negativním módu se jednalo rovněž o hexosylceramidy a PEs spojené s ceramidy (př. PE-Cer 20:2;20/24:1). Nejvyšší možná kumulativní variabilita mezi skupinami vzorků činila 47,4 % v pozitivním módu a 63,6 % v negativním módu. Skupina vzorků kontrol či pacientů se k sobě dostatečně neshlukují, respektive od sebe neoddělují. Rozdíly mezi skupinami vzorků je tak vhodné dále analyzovat pomocí supervizovaných statistických metod. Zároveň se předpokládá, že ne všechny ceramidy jsou zvýšeny právě ve vzorcích pacientů.

PCA byla také provedena pro anotované TG v pozitivním módu (Obr. 21). V tomto případě lze pozorovat zajímavý trend blízkého shlukování patientských vzorků, který je spojen s parenterální výživou pacientů v nemocnici.

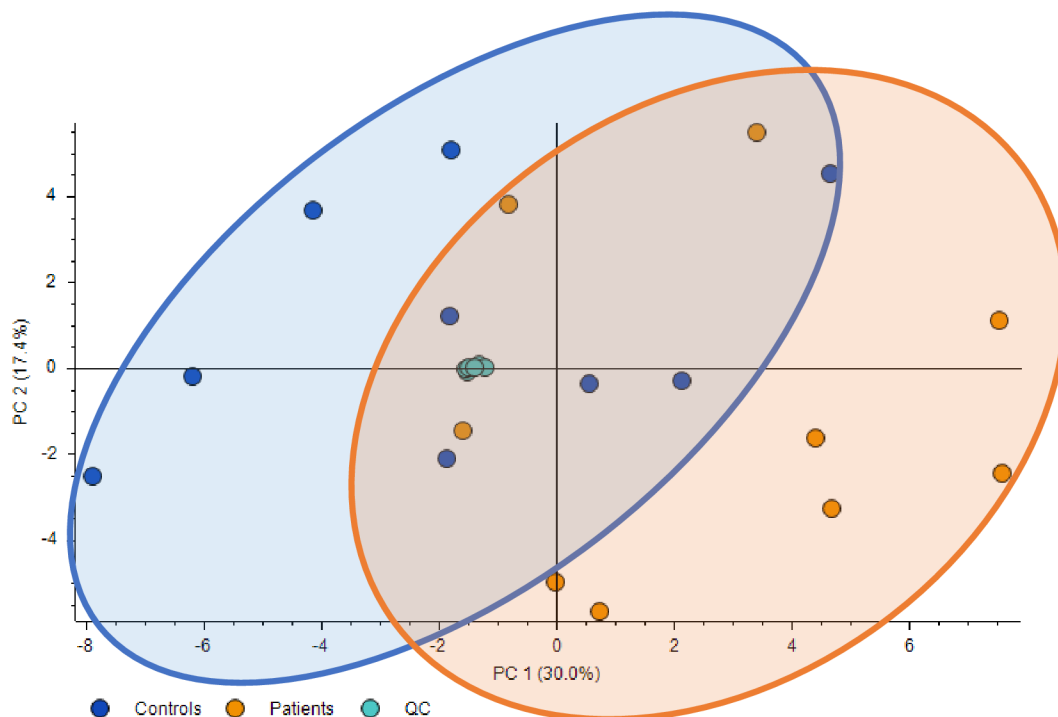
Ve všech případech dochází k těsnému shlukování vzorků QC, což poukazuje na dobrou stabilitu analytického systému v průběhu měření.



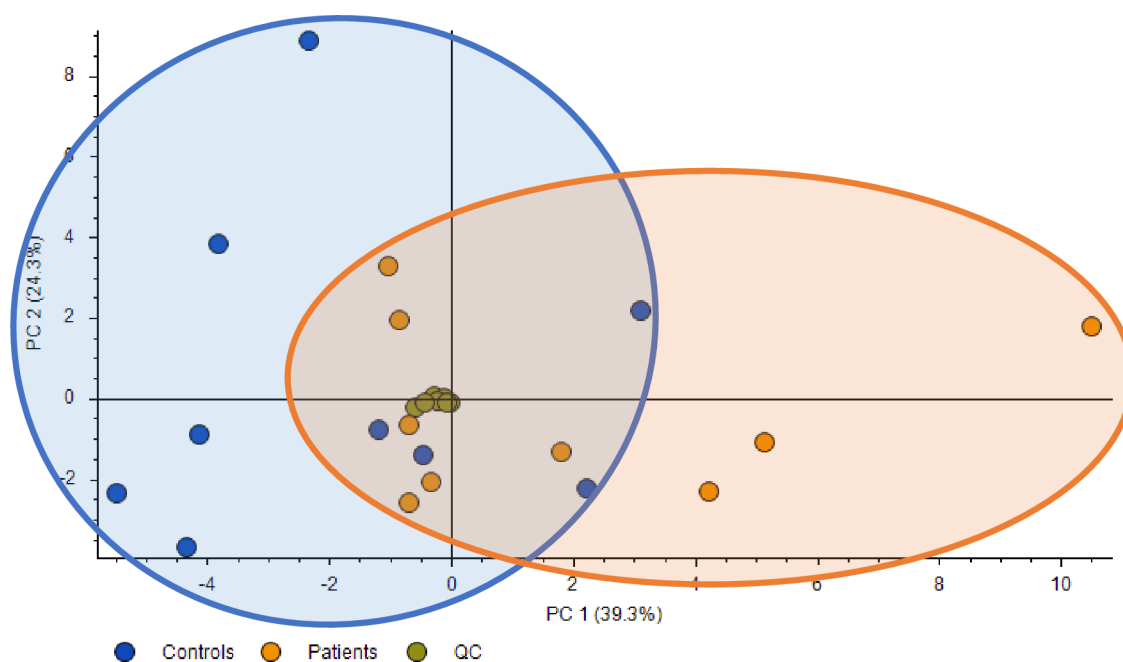
Obr. 17: Dvourozměrný rozptylový diagram komponentních skóre pro skupiny vzorků pacientů a kontrol v pozitivním módu pro všechny identifikované sloučeniny po filtrování. Pro sestrojení diagramu bylo použito centrování a škálování s normalizovanými oblastí.



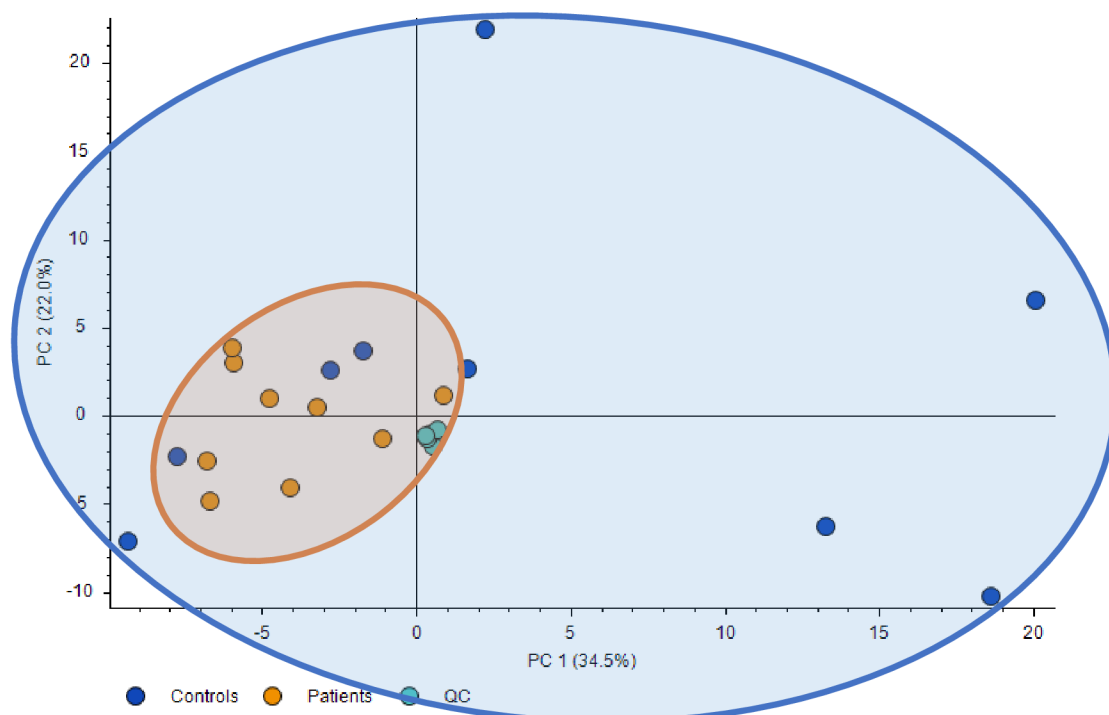
Obr. 18: Dvourozměrný rozptylový diagram komponentních skóre pro skupiny vzorků pacientů a kontrol v negativním módu pro všechny identifikované sloučeniny po filtrování. Pro sestrojení diagramu bylo použito centrování a škálování s normalizovanými oblastí.



Obr. 19: Dvourozměrný rozptylový diagram komponentních skóre pro skupiny vzorků pacientů a kontrol v pozitivním módu. PCA byla provedena pouze pro anotované ceramidové komponenty. Pro sestrojení diagramu bylo použito centrování a škálování s normalizovanými oblastí.



Obr. 20: Dvourozměrný rozptylový diagram komponentních skóre pro skupiny vzorků pacientů a kontrol v negativním módu. PCA byla provedena pouze pro anotované ceramidové komponenty. Pro sestrojení diagramu bylo použito centrování a škálování s normalizovanými oblastí.

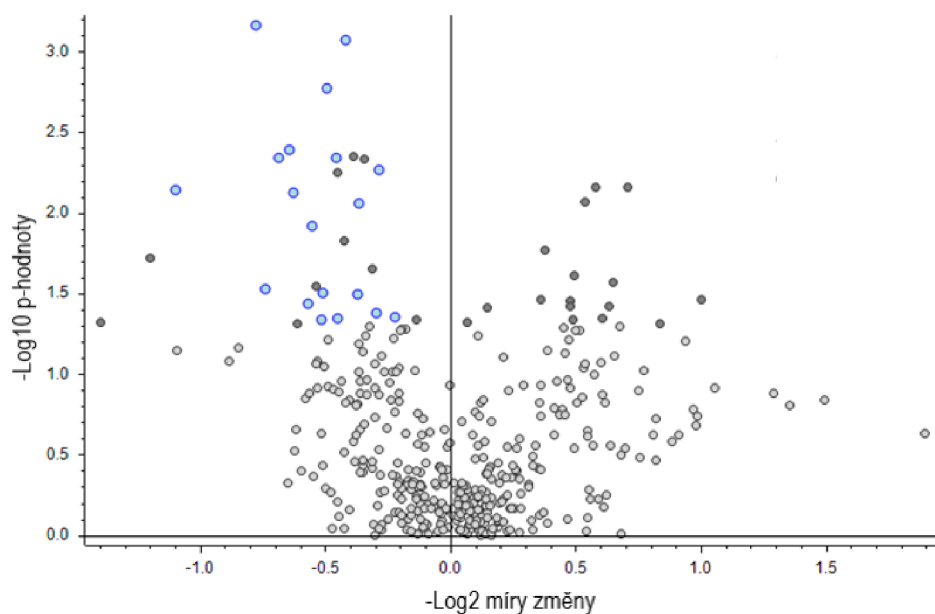


Obr. 21: Dvourozměrný rozptylový diagram komponentních skóre pro skupiny vzorků pacientů a kontrol v pozitivním módu. PCA byla provedena pouze pro anotované triacylglyceroly. Pro sestavení diagramu bylo použito centrování a škálování s normalizovanými oblastmi.

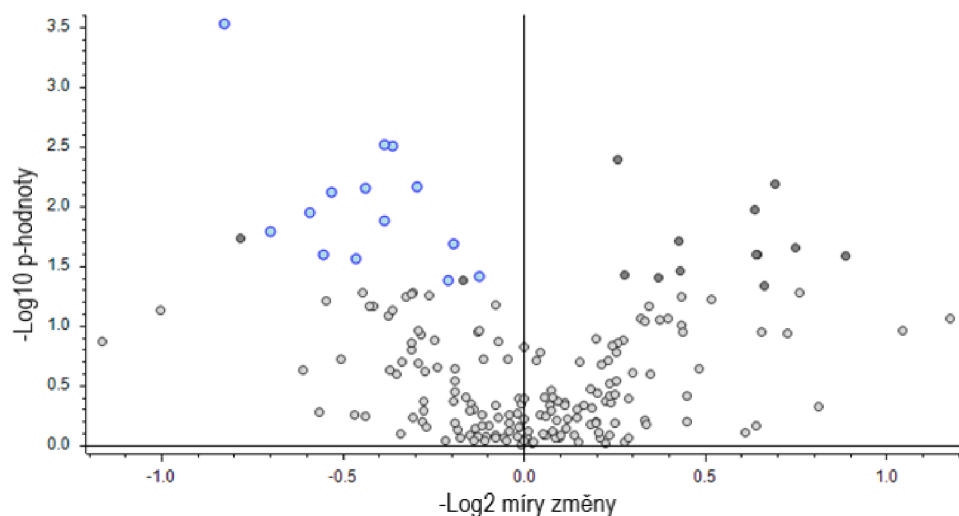
4.4 Diskriminační analýza

Diskriminační analýza byla provedena pomocí metody diferenční analýzy zobrazující vulkánový graf („volcano plot“) a metody PLS-DA, resp. její ortogonální varianty OPLS-DA.

Všechny detekované lipidy, které prošly „peak rating“ filtrem byly v pozitivním módu vyobrazeny pomocí datových bodů ve vulkánovém grafu (Obr. 22). Bylo detekováno 29 lipidů, jejichž hladiny byly ve vzorcích pacientů zvýšeny ($p < 0,05$). Modré datové body odpovídají lipidové třídě sfingolipidů, konkrétně sloučeninám ceramidů a sfingomyelinů. Na levé straně grafu (Obr. 22) jsou rovněž zobrazeny tmavé datové body, které znázorňují podtřídou glycerolfosfolipidů, konkrétně PC a PE a navíc i jednu molekulu TG (TG 17:1_18:1_18:1). Stejným způsobem byl vynesena vulkánový graf v negativním módu (Obr. 23). V negativním módu bylo detekováno 16 lipidů, jejichž hladiny byly ve vzorcích pacientů zvýšeny ($p < 0,05$). Modré datové body odpovídají lipidové třídě sfingolipidů, konkrétně sloučeninám ceramidů a sfingomyelinů. Tmavé datové body na levé straně grafu (Obr. 23) vyobrazují lipidy PC 16:0_20:4 a PC 17:0_18:1.



Obr. 22: Vulkanový graf pro všechny detekované lipidy v pozitivním módu po „peak rating“ filtru. V grafu je vyneseno na ose x záporný logaritmus se základem 2 míry změny a ortogonálně k němu záporný dekadický logaritmus p-hodnoty (zvolená hodnota $p < 0,05$).



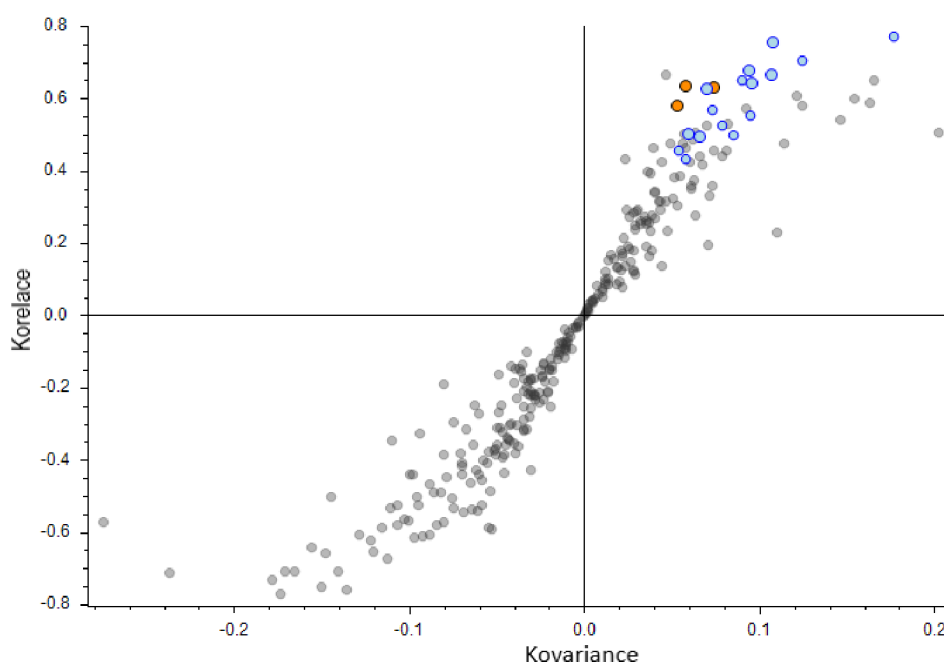
Obr. 23: Vulkanový graf pro všechny detekované lipidy v negativním módu po „peak rating“ filtru. V grafu je vyneseno na ose x záporný logaritmus se základem 2 míry změny a ortogonálně k němu záporný dekadický logaritmus p-hodnoty (zvolená hodnota $p < 0,05$).

Na Obr. 24 je ilustrován „S-plot“ pro pozitivní mód ionizace. V grafu jsou zobrazeny glycerolfosfolipidy a sfingolipidy, které podle vulkánového grafu nejvíce diskriminují od sebe vzorky kontrol a pacientů. Konkrétně jde o podtřídy ceramidů, sfingomyelinů, fosfatidylcholinů a fosfatidylethanolaminů. Za pomoci „S-plotu“ jsou vizualizovány

sloučeniny, které zapříčiňují jakékoli pozorované seskupení vzorků. K rozlišení vybraného studijního faktoru, tj. diagnostiky STEMI, bylo pomocí CD 3.3 vybráno 10 lipidů z výše zmíněných tříd. Větší modré a oranžové datové body znázorňují 10 nejsignifikantnějších lipidů nejvíce odlišující vzorky pacientů a kontrol. Menší modré datové body rovněž označují významně zvýšené hladiny ceramidů a sfingomyelinů u vzorků pacientů ($p < 0,05$) Oranžové datové body reprezentují PC 16:0_22:5 a PC 37:5 a PC 39:5.

Statistická specifikace lipidů, jež jsou na Obr. 24 vyobrazeny pomocí barevných datových bodů, je zaznamenána v Tab. 2. Pro výpočet p-hodnoty, které slouží k porovnání významnosti lipidů mezi dvěma skupinami, byl použit dvouvýběrový Studentův t-test.

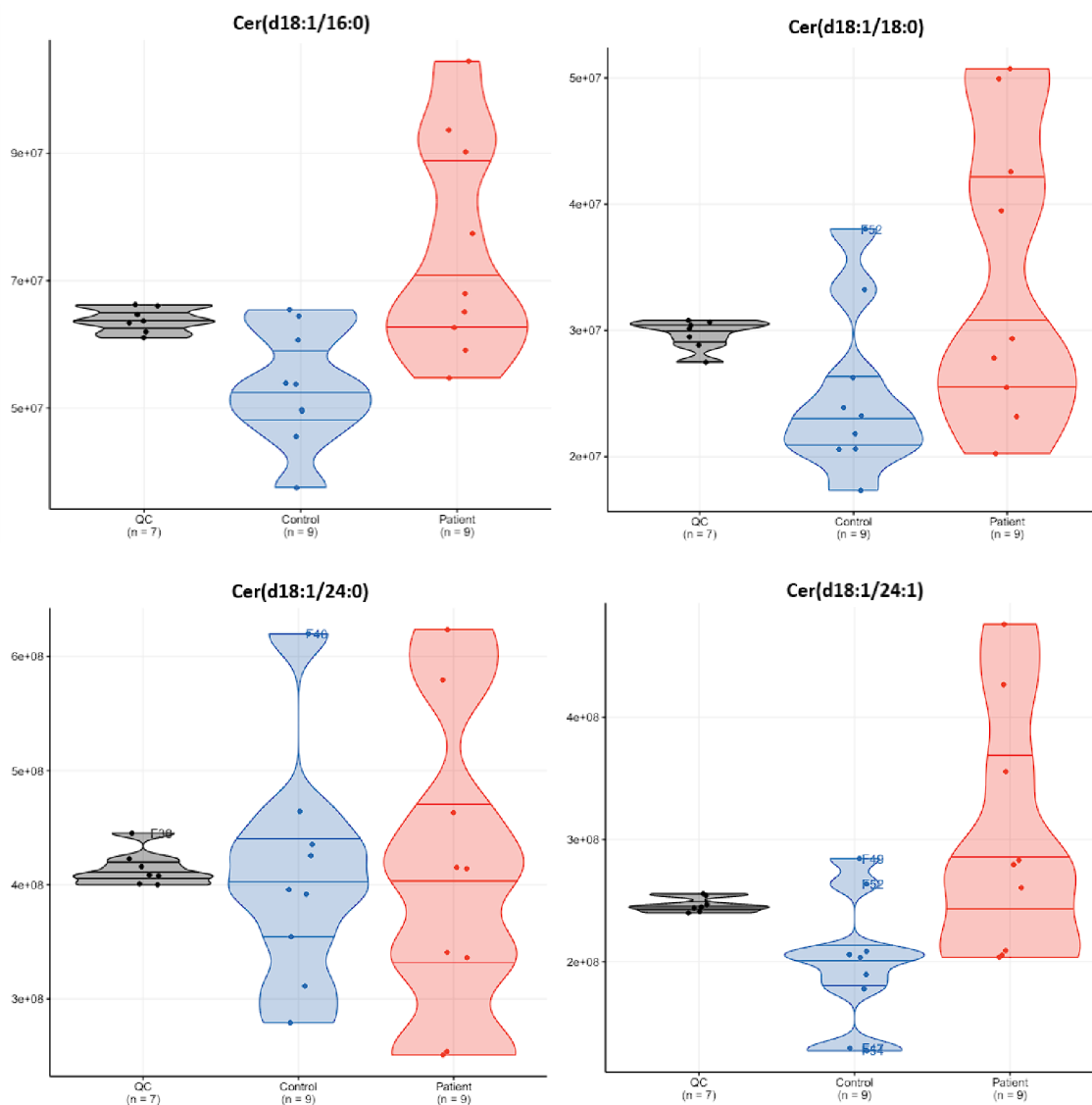
Pomocí „violin-plots“, které jsou graficky informativnější alternativou krabicových grafů, byla srovnána relativní koncentrace jednotlivých ceramidů mezi vzorky pacientů a kontrolní skupiny (Obr. 25). „Violin-plots“ zobrazují tvar podle rozložení dat, což je vhodné především pro větší soubory dat. Ve „violin-plots“ byly vyneseny ceramidy, které jsou předmětem diskuse a diagnostických testů.



Obr. 24: „S-plot“ vycházející z metody OPLS-DA v pozitivním módu pro podtřídy lipidů (GP, SP), jejichž hladiny se potenciálně zvyšují ve vzorcích pacientů při kardiovaskulárních onemocněních. Větší modré a oranžové datové body znázorňují 10 nejsignifikantnějších lipidů nejvíce odlišující vzorky pacientů a kontrol. Menší modré datové body rovněž označují významně zvýšené hladiny ceramidů a sfingomyelinů u vzorků pacientů ($p < 0,05$) Oranžové datové body znázorňují PCs.

Tab. 2: Statistická specifikace lipidů, které podle diskriminačních analýz nejvíce od sebe rozdělují vzorky pacientů a kontrol v pozitivním módu ionizace ($p < 0,05$). Pozn. SM 34:2;3O značí dva různé lipidy, jejichž přesný strukturní vzorec nebyl anotován.

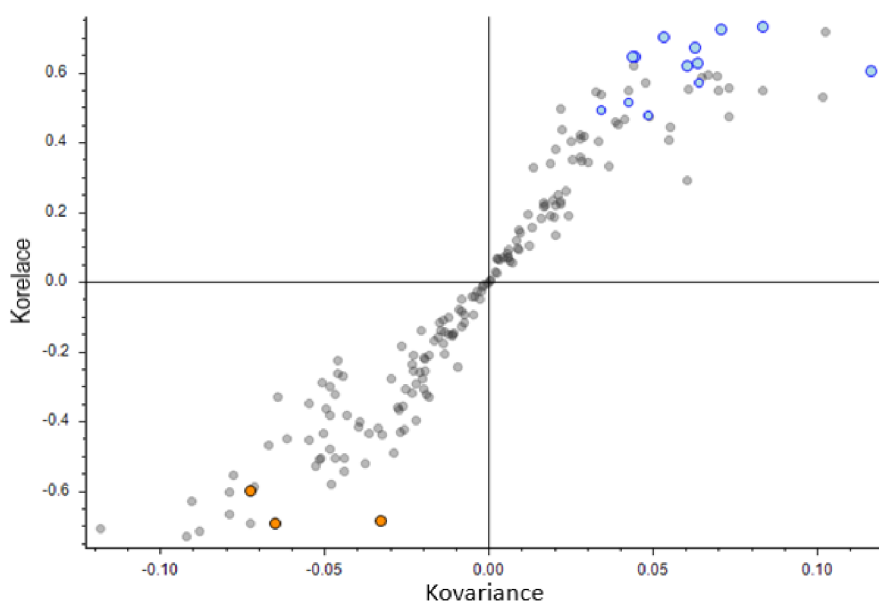
Lipidy	p-hodnota (t-test)	Míra změny (Fold change, K/P)
Cer 42:5;2O	0,032	-0,37
Cer 43:5;2O	7,5E-3	-0,63
Cer 18:1;2O/16:0	8,5E-4	-0,42
Cer 18:1;2O/18:0	0,032	-0,52
Cer 18:1;2O/24:1	1,7E-3	-0,49
Cer 18:1;2O/24:2	7,2E-3	-1,10
Cer 18:2;2O/23:0	0,030	-0,74
Cer 18:2;2O/24:1	6,9E-4	-0,77
Cer 18:2;2O/25:0	4,5E-3	-0,69
Hex3Cer 18:1;2O/24:1	5,4E-3	-0,28
PC 39:5	4,5E-3	-0,39
PC 16:0_22:5	4,6E-3	-0,34
PC 37:5	5,6E-4	-0,45
SM 34:2;3O	0,045	-0,22
SM 40:3;3O	0,041	-0,29
SM 42:3;3O	4,5E-3	-0,46
SM 42:4;3O	0,012	-0,55
SM 43:3;3O	4,1E-3	-0,64
SM 34:2;3O	8,7E-3	-0,37



Obr. 25: „Violin-plots“ vygenerované programovacím jazykem R pro porovnání relativních koncentrací vybraných ceramidů v jednotlivých skupinách vzorků. V grafech jsou na osách x zobrazeny skupiny vzorků společně s jejich počtem. Na ose y pak intenzita plochy chromatografického píku.

Na Obr. 25 je vyobrazen „S-plot“ metody OPLS-DA pro negativní ionizační mód. V grafu jsou zobrazeny glycerolfosfolipidy a sfingolipidy, které nejvíce diskriminují od sebe vzorky kontrol a pacientů. Konkrétně jde o podtřídy ceramidů, sfingomyelinů, fosfatidylcholinů a fosfatidylethanolaminů. Větší modré a oranžové datové body znázorňují 10 nejsignifikantnějších lipidů nejvíce odlišující vzorky pacientů a kontrol. Oranžové datové body (programem vyhodnocené jako signifikantní) značí lipidy podtřídy PC (PC 18:0_18:2, PC 18:0_20:2) a sloučenina N-acyllysofosfatidylethanolaminu (LNAPE 18:2/N-20:0), jež disponují vyššími hladinami ve vzorcích kontrol.

Statistická specifikace lipidů, jež jsou na Obr. 25 vyobrazeny pomocí barevných datových bodů (mimo oranžových), je zaznamenána v Tab. 3. Pro výpočet p-hodnoty byl použit dvouvýběrový Studentův t-test.



Obr 26: „S-plot“ vycházející z metody OPLS-DA v negativním módu pro podtřídy lipidů (GP, SP), jejichž hladiny se potenciálně zvyšují/snižují ve vzorcích pacientů při kardiovaskulárních onemocněních. Větší modré a oranžové datové body znázorňují 10 nejsignifikantnějších lipidů nejvíce odlišující vzorky pacientů a kontrol. Oranžové datové body značí lipidy podtřídy PC a lipid LNAPE.

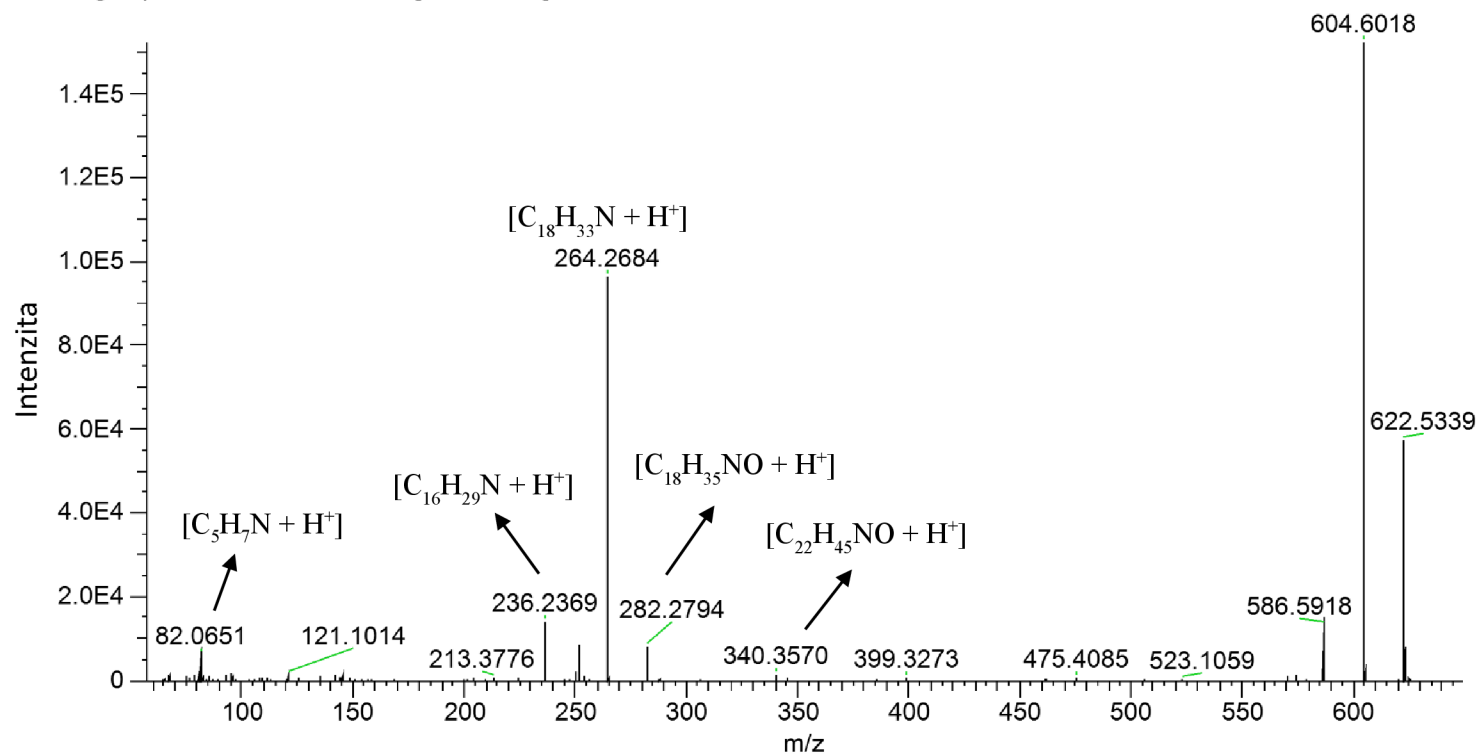
Tab. 3: Statistická specifikace lipidů, které podle diskriminačních analýz nejvíce od sebe rozdělují vzorky pacientů a kontrol v negativním módu ionizace ($p < 0,05$).

Lipidy	p-hodnota (t-test)	Míra změny (Fold change, K/P)
Cer 18:1;2O/24:1	7,7E-3	-0,53
Cer 18:2;2O/24:1	2,9E-4	-0,83
Cer 40:2;2O	0,021	-0,19
Cer 41:2;2O	0,011	-0,59
Cer 41:2;2O	0,027	-0,46
GlcCer(d18:1(8Z)/16:0(2OH[R]))	0,013	-0,39
PE-Cer 16:2;2O/26:0	6,9E-3	-0,29
PE-Cer 20:2;2O/24:1	3,0E-3	-0,39
SM 41:3;3O	0,016	-0,70
SM 18:2;2O/16:0	0,038	-0,12
SM 18:2;2O/24:1	3,2E-3	-0,36
SM 34:1;3O	0,042	-0,21
SM 34:2;3O	7,1E-3	-0,44

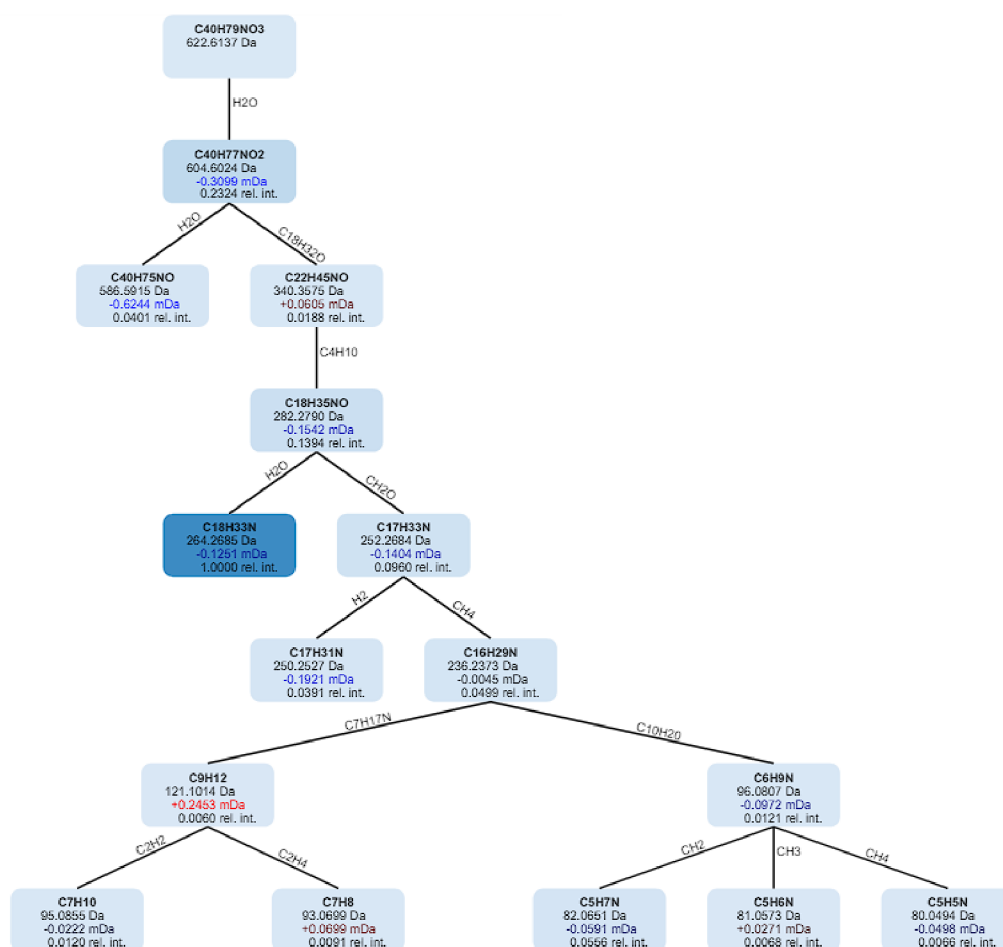
4.5 Strukturální identifikace vybraných ceramidů pomocí fragmentačních spekter

Fragmentační hmotnostní spektra pomáhají při strukturální identifikaci lipidů a umožňují tak potvrzení informací o komponentech získaných necíleným lipidomickým přístupem, např. u lipidů, které nejsou v programech ke zpracování dat anotovány. MS/MS fragmentační spektra byla vytvořena pomocí nové technologie ultrafialové disociace (UVPD). Na Obr. 27 je zobrazeno MS/MS spektrum Cer(d18:1/22:0) ($m/z = 622,6136$) se sumárními vzorci fragmentů v pozitivním ionizačním módu ($[M+H]^+$). Cer(18:1) po ztrátě zbytku FA vytváří charakteristický produktový iont s m/z 264 a 282, kdy hodnota m/z 264 $[C_{18}H_{33}N + H^+]$ je dána odštěpením H_2O ze struktury s m/z 282 $[C_{18}H_{35}NO + H^+]$. Zbytek mastné kyseliny $[C_{22}H_{45}NO + H^+]$ je zaznamenán produktovým iontem (m/z 340), který má však nízký poměr signálu k šumu (S/N – „Signal to noise ratio“). Produktové ionty s hodnotami m/z 604 a 586 jsou dány ztrátou vody $[M-H_2O+H^+]$ při fragmentaci mateřského iontu. Na Obr. 28 je ilustrován fragmentační strom Cer(d18:1/22:0) ze strukturální databáze SIRIUS (<https://bio.informatik.uni-jena.de/sirius/>). SIRIUS je nástroj, který napomáhá strukturální anotaci sloučenin a je schopen porovnáváním MS/MS spekter s jinými databázemi získávat sumární vzorce po jednotlivé produktové ionty.

CVD_08_C30_POS_012 # 1707 - 2490 RT: 10.94-15.34 AV: 6 NL: 1.53E5
T: Average spectrum MS2 622.6136 [1707-2490]



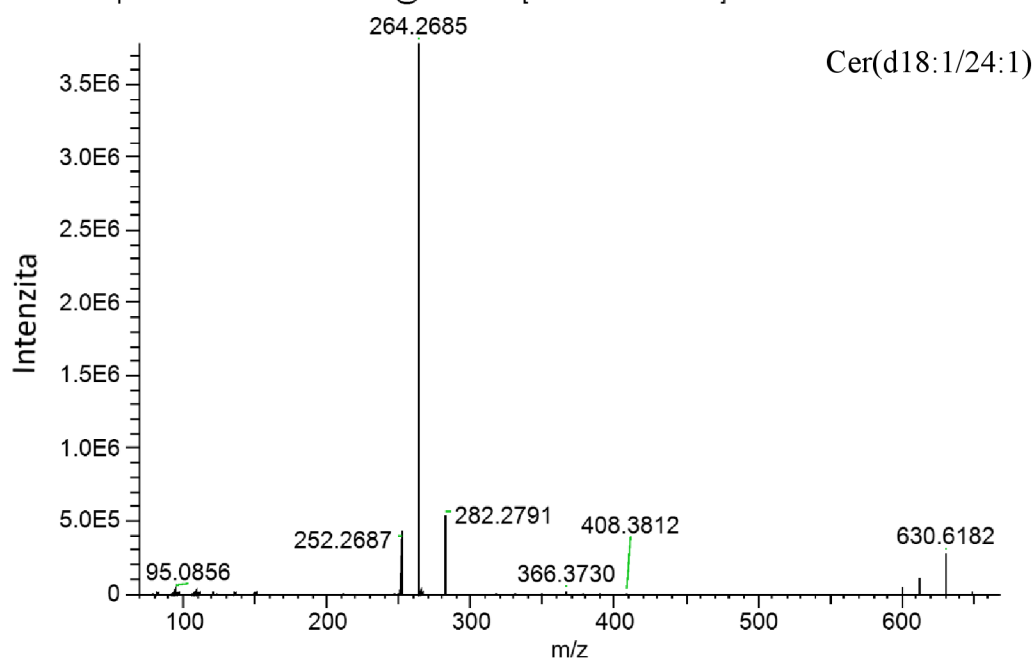
Obr. 27: Fragmentační MS/MS spektrum Cer(d18:0/22:1) s vyznačenými sumárními vzorci fragmentů.



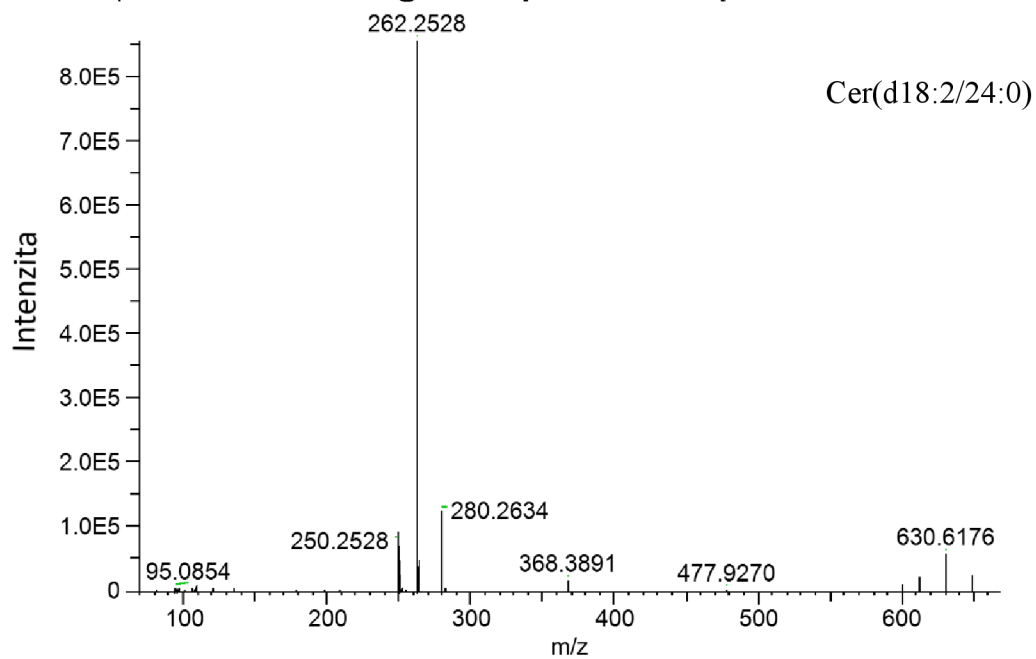
Obr. 28: Fragmentační strom Cer(d18:1/22:0) ze strukturní databáze SIRIUS, který odhaduje strukturu, molekulovou hmotnost a relativní intenzitu na základě fragmentačních MS/MS spekter.

Více stejných lipidů může disponovat stejnými molekulovými hmotnostmi. Na základě fragmentačních hmotnostních spekter lze ve většině případů přesně určit strukturní vzorec dané sloučeniny. Na Obr. 29 je vyobrazeno MS/MS spektrum dvou různých ceramidů se stejnou molekulovou hmotností (nahore Cer(d18:1/24:1) a dole Cer(d18:2/24:0)). Hodnota m/z 366 náleží zbytku FA (24:1) a stejný charakteristický prekurzorový iont m/z 264. V případě Cer(d18:2/24:0) je díky dvojně vazbě hodnota m/z ceramidového zbytku 262 [$C_{18}H_{31}N + H^+$] a naopak zbytek FA [$C_{24}H_{49}NO + H^+$] má m/z o dvě vyšší, resp. 368.

CVD_08_C30_POS_006 # 7394 RT: 15.01 AV: 1 NL: 3.79E6
T: FTMS + p ESI d Full ms2 648.6290@hcd30.00 [75.0000-659.0000]



CVD_08_C30_POS_006 # 7514 RT: 15.28 AV: 1 NL: 8.58E5
T: FTMS + p ESI d Full ms2 648.6294@hcd30.00 [75.0000-659.0000]

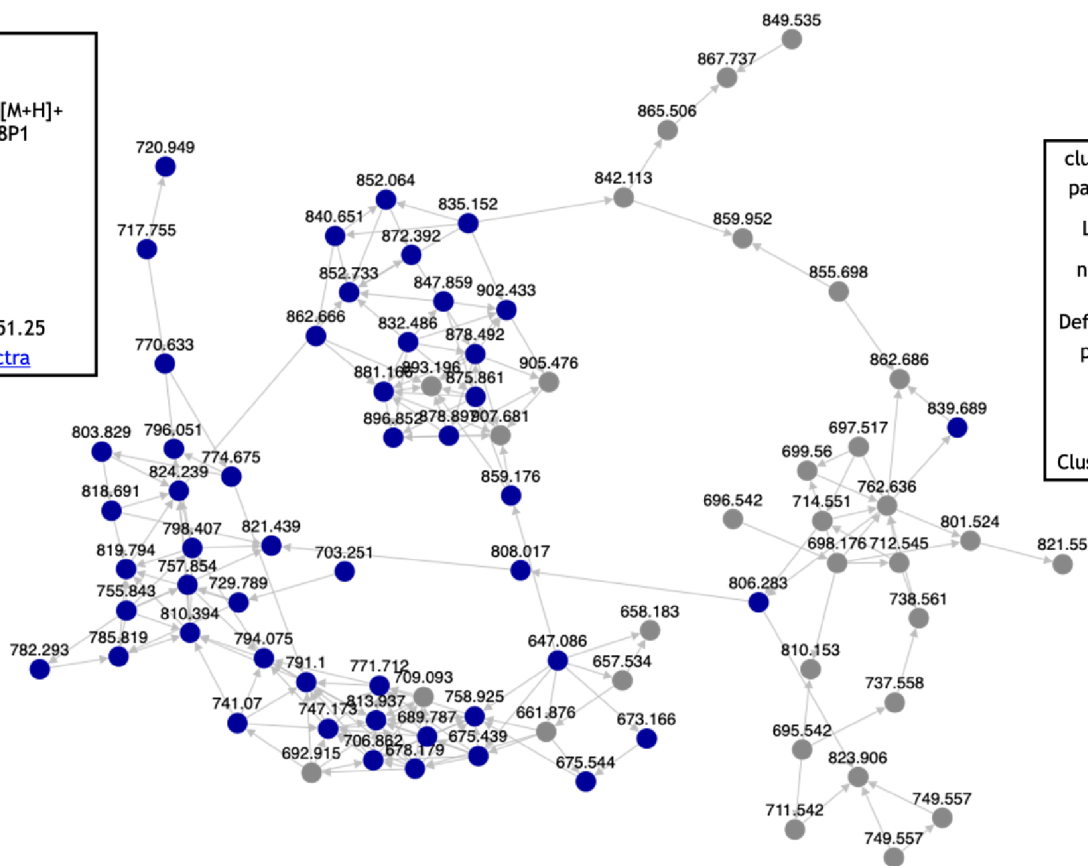


Obr. 29: Srovnání dvou fragmentačních MS/MS spekter ceramidů se stejnou molekulovou hmotností. Konkrétně se jedná o Cer(d18:1/24:1) nahoře a Cer(d18:2/24:0) dole.

4.6 Molekulární síť a analýza metabolických drah

Na Obr. 30 lze vidět molekulární síť fosfatidylcholinů s příslušnými molekulovými hmotnostmi, která slouží jako doplněk ke studiu zastoupení dalších PCs v lipidomu pacientů. Modré uzly reprezentují již anotované PCs programem CD 3.3. Uzly, které nedisponují modrou barvou, jsou podobné struktury PCs již k známým PCs. Tyto podobné struktury mají tendenci vytvářet podobné vzory ve fragmentační hmotnostních spektrech (MS_2). Tato síť je tedy obohacena o anotaci experimentálních MS_2 spekter PCs vůči MS_2 spektrálním databázím.

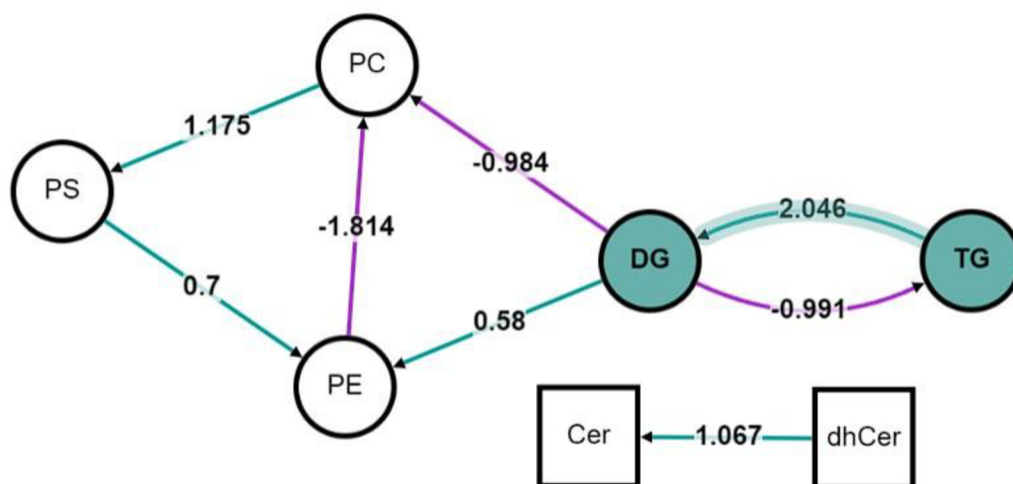
cluster index	2537
parent mass	803.829
LibraryID	PC(16:1/22:6); [M+H] ⁺ C46H79N1O8P1
number of spectra	228
DefaultGroups	G1
precursor charge	1
Peptide	
RT Info	676.05, $\sigma = 151.25$
ClusterSpectra	Cluster Spectra



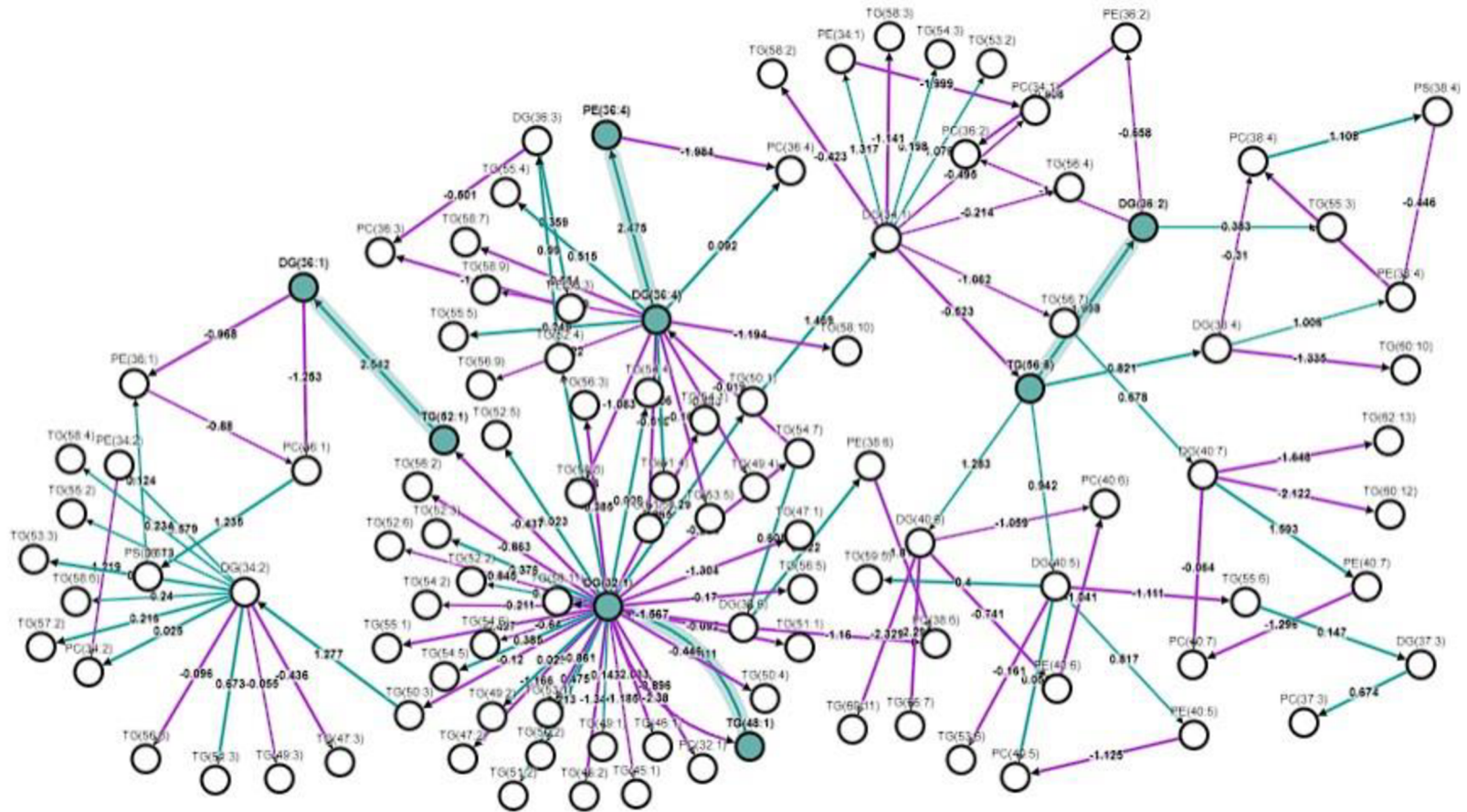
cluster index	2792
parent mass	835.152
LibraryID	PC(20:2/20:4); [M+H] ⁺ C48H85N1O8P1
number of spectra	160
DefaultGroups	G1
precursor charge	1
Peptide	
RT Info	747.87, $\sigma = 99.00$
ClusterSpectra	Cluster Spectra

Obr. 30: Molekulární síť fosfatidylcholinů s jejich molekulovými hmotnostmi. Molekulární síť byla vygenerována v programu GNPS.

Pomocí nástroje BioPAN byla vytvořena mapa analýzy lipidomických drah, pomocí níž byly vyhledávány vztahy obecně mezi lipidovými podtřídami (Obr. 31) i mezi jednotlivými vyfiltrovanými lipidy (Obr. 32). BioPAN je schopen vypočítat statistické skóre pro všechny možné lipidové dráhy, které jsou aktivní nebo potlačené ve vzorcích pacientů oproti kontrolní skupině. Pracovní postup se opírá o tzv. Z-skóre, které zohledňuje průměr a směrodatnou odchylku experimentu. Z-skóre se používá k předpovědi, zda se určitá reakce významně mění (zvolená hodnota $p < 0,001$) mezi patientskou a kontrolní skupinou. Zelené uzly reprezentují aktivní lipidy. Zeleně stínované šipky náležejí aktivním drahám a disponují pozitivním Z-skóre. Fialové šipky mají naopak negativní Z-skóre, což znamená, že se jedná o méně aktivní dráhu ve skupině pacientů. Navíc je nástroj BioPAN schopen pro reakční řetězec předpovědět, jaké enzymy jsou jeho součástí a do jaké míry jsou zodpovědné za rozdíly mezi sledovanými skupinami.



Obr. 31: Výstup z analýzy lipidomických drah, které reprezentují vztahy mezi jednotlivými podtřídami lipidů vyplívajících ze studovaných skupin vzorků.



Obr. 32: Reprezentativní výstup z analýzy lipidomických drah pro jednotlivé lipidy. Na obrázku je zobrazena pouze část dráhy. Z důvodu velikosti mapy všech lipidů a shlukování lipidů a jejich drah v určitých místech mapy není možno generovat obrázek v lepší kvalitě.

5 DISKUSE

Pokrok v technikách založených na hmotnostní spektrometrii umožnil identifikovat velké množství lipidů obsažených v lidské plazmě. V současnosti necílený lipidomický přístup umožňuje detekci a identifikaci stovek až tisíců lipidů. To může vést k odhalení užitečných informací spojených s dysregulací metabolismu lipidů. Právě dysregulace určitých lipidů může hrát klíčovou roli při patofyziologii KVO. Necílený lipidomický přístup lze např. využít k objevení potenciálních lipidových biomarkerů předpovídajících riziko onemocnění, které budou citlivější než současně používané biomarkery. Rovněž může sloužit k nalezení nových metabolických drah lipidů, které mohou souviset s patogenezi onemocnění (Brown & Hazen, 2014; Ding & Rexrode, 2020).

Na základě výsledných chromatogramů a retenčních časů lipidů z jednotlivých lipidových tříd se podařilo pomocí stacionární fáze C₃₀ separovat třídy lipidů jako ve zmíněných studiích Narváez-Rivas & Zhang (2016) a Jankevics et al. (2021).

Pro hodnocení rizika a diagnostiku KVO jsou stěžejní lipidové třídy glycerolfosfolipidů a sfingolipidů. Kolektiv autorů Sigrüener et al. (2014) se své studii (LURIC – Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health) zaměřily na ESI-MS/MS analýzu plazmatických lipidů a jejich souvislost s celkovou úmrtností pacientů a mortalitou zapříčiněnou ACS. Dle výsledků studie Sigrüener et al. (2014) byl s mortalitou pacientů nejvíce spojován PC 32:0 (pravděpodobně PC 16:0_16:0), SM(d18:1/16:0), SM(d18:1/24:1), Cer(d18:1/16:0) a Cer(d18:1/24:1). Z výsledku diplomové práce je patrné, že Cer(d18:1/16:0) a Cer(d18:1/24:1) jsou signifikantně zvýšeny ve vzorcích pacientů ve srovnání s kontrolami. Dva výše zmíněné sfingomyeliny byly v rámci experimentální části diplomové práce detekovány také. Avšak nebyly vyhodnoceny jako diskriminantní lipidy, jejichž relativní koncentrace by ve vzorcích pacientů byly významně zvýšeny. Rovněž byl identifikován se zvýšenou hladinou v patientských vzorcích PC 16:0_16:0 (PC 32:0). Hladiny PC 16:0_16:0 byly mírně zvýšeny ve vzorcích pacientů s hodnotou $p = 0,046$ a mírou změny (K/P) $-0,13$. Tyto hodnoty však nebyly dostačující, aby byl PC 16:0_16:0 v rámci metody OPLS-DA vybrán jako signifikantní.

Postupně se výzkumné skupiny začaly zajímat o třídu sfingolipidů, zejména o podtřídu ceramidů a jejich souvislosti s KVO. Laaksonen et al. (2016) byli průkopníky ve vývoji ceramidového testu (CERT1 – „Coronary Event Risk Test 1“) pro predikci kardiovaskulárního rizika. Autoři této studie prokázali, že některé ceramidy obsažené

v séru mohou sloužit jako potenciální biomarkery rizika pacientů se stabilní ICHS a ACS. V případě pacientů s infarktem myokardu (studie Corogene) byly významně zvýšeny ($p < 0,001$) koncentrace N-palmitoyl-sfingosinu (Cer(d18:1/16:0)), N-stearoyl-sfingosinu (Cer(d18:1/18:0)) a N-nervonoyl-sfingosinu (Cer(d18:1/24:1)) ve srovnání s kontrolní skupinou. Mediány u jednotlivých případů činily +17,0 %, +10,3 % a +11,2 % vůči kontrolám. To je potvrzeno i u pacientů s diagnostikou STEMI v rámci výsledků diplomové práce (mediány vypočtené z hodnot ploch („areas“) chromatografických píků činí +33,7 % pro Cer(d18:1/16:0), +42,4 % pro Cer(d18:1/18:0) a +40,9 % pro Cer(d18:1/24:1) oproti kontrolní skupině vzorků). Na druhou stranu u N-lignoceroyl-sfingosinu (Cer(d18:1/24:0)) byl ve studii Laaksonen et al. (2016) pozorován odlišný trend. Vypočtený medián pro vzorky pacientů byl o 14,9 % menší než u kontrol. V předložené diplomové práci byla relativní koncentrace Cer(d18:1/24:0) vyšší ve vzorcích pacientů (medián +7,4 % oproti kontrole), avšak na základě statistické analýzy nebyl tento ceramid vyhodnocen jako signifikantní ($p = 0,97$, míra změny (K/P) = -0,10). Na základě ploch chromatografických píků se navíc jedná o nejvíce zastoupený ceramid jak v kontrolní, tak v patientské skupině. Cer(d18:1/24:0) je zastoupen u zdravých i nemocných jedinců a jedná se tak o užitečný normalizační faktor pro intraindividuální variabilitu ceramidových koncentrací (Meeusen et al., 2018; <https://www.mayoclinic.org/> (15. 4. 2024)).

Kolektiv autorů Meeusen et al. (2018) se snažil ověřit užitečnost plazmatických ceramidů pro predikci závažných KVO u pacientů po koronarografii. Konkrétně se zaměřili na čtyři výše zmíněné ceramidy z práce autorů Laaksonen et al. (2016). Podle výsledků potvrdili, že Cer(d18:1/16:0), Cer(d18:1/18:0) a Cer(d18:1/24:1) jsou významně prognostické pro kombinovaný výsledek infarktu myokardu, cévní mozkové příhody, revaskularizace a úmrtí z jakékoli příčiny po čtyřech letech analýzy patientských vzorků. Cer(d18:1/24:0) nebyl vyhodnocen jako prediktivní. Poměry těchto signifikantně prediktivních ceramidů s Cer(d18:1/24:0) však zvýšily souvislost se závažnými kardiovaskulárními příhodami. Autoři však uvádějí, že ceramidy nebyly významně spojeny s koronárním onemocněním (Meeusen et al., 2018).

Podobných výsledků bylo dosaženo i při prospektivní studii autorů Havulinna et al., 2016 (FINRISK MACE – „Major Adverse Cardiovascular Event“). Sérové koncentrace Cer(d18:1/16:0), Cer(d18:1/18:0) a Cer(d18:1/24:1) byly v případě pacientů vyšší než u kontrolní skupiny: mediány +11,4 %, +21,3 % a +17 % ($p < 0,001$ pro všechny Cer).

Poměry ceramidů Cer(d18:1/18:0)/Cer(d18:1/24:0) a Cer(d18:1/24:1)/Cer(d18:1/24:0) byly rovněž vyšší u pacientů se závažnými nežádoucími KVO (Havulinna et al., 2016).

Kolektiv autorů Pan et al. (2020) pomocí jednorozměrné regresní analýzy ukázal, že koncentrace plazmatických Cer(d18:1/16:0), Cer(d18:1/18:0), Cer(d18:1/24:0) a Cer(d18:1/24:1) byly signifikantně vyšší u pacientů s diagnostikovaným STEMI než u kontrol a pacientů se stabilní anginou pectoris ($p < 0,001$ pro všechny Cer).

Konkrétně pacientům se STEMI byla věnována další studie, kde se autoři zabývali ceramidy jako prognostickými biomarkery velké zátěže trombu. Zátěž trombu je hodnocena pomocí výsledků z angiografie. Na základě analýzy ROC („Receiver operating characteristic“) určili citlivost (senzitivitu) a specifitu ceramidů vzhledem k tvorbě intrakoronárního trombu. Sérové hladiny Cer(d18:1/24:0) a Cer(d18:1/24:1) byly autory vyhodnoceny jako významné prediktory. Senzitivita 80 % a specifita 66 % byla vyhodnocena pro Cer(d18:1/24:0) s koncentrací $6,77 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Senzitivita a specifita Cer(d18:1/24:1) s koncentrací $2,71 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ činila 85 % a 75 %. Jako nesignifikantní prognostický biomarker u pacientů se STEMI byl vyhodnocen Cer(d18:1/16:0) i přes zvýšené hladiny ve vzorcích pacientů (Karagiannidis et al., 2021).

Autoři Hilvo et al. (2020) se ve své práci zabývali vývojem a validací nového rizikového skóre CERT2 („Coronary Event Risk Test 2“). Jejich výzkum byl zaměřen na studium kombinace ceramidů s fosfatidylcholinu, které budou vhodné k prognostickému hodnocení KVO u pacientů s ACS. V rámci rizikového skóre CERT2 jsou vyhodnocovány dva poměry Cer/PC (Cer(d18:1/16:0)/PC 16:0_22:5 a Cer(d18:1/18:0)/PC 14:0_22:6), jeden poměr Cer(d18:1/24:1)/Cer(d18:1/24:0) a samostatně PC 16:0_16:0 (diskutován výše). Autoři na základě získaných výsledků tvrdí, že komponenty testu CERT2 vykazují vyšší poměry rizik („hazard ratios“) než dříve publikované testy založené pouze na ceramidech a jejich poměrech ve všech třech zkoumaných prospektivních studiích. Ve výsledcích diplomové práce byl PC 16:0_22:5 vedle ceramidů vyhodnocen jako jeden z nejsignifikantnějších lipidů, jehož hladiny jsou v patientských vzorcích významně zvýšeny (medián o 26,8 % vyšší než u kontrol). PC 14:0_22:6, který je v rámci CERT2 využit v poměru s ceramidem, byl v diplomové práci zvýšen v kontrolní skupině vzorků (medián o 57,3 % vyšší než u pacientů).

Pro rutinní klinickou analýzu Cer(d18:1/16:0), Cer(d18:1/18:0), Cer(d18:1/24:0) a Cer(d18:1/24:1) v plazmě byla validována LC-MS/MS metoda, která je vhodná k diagnostickému použití (Kauhanen et al., 2016). Analýza je navíc poměrně rychlá (5 min na vzorek) a vykazuje vysokou citlivost. Autoři studie dospěli k závěru, že tato

metoda poskytne zlepšenou diagnostiku pacientů s koronárními onemocněními. Rovněž by měla vést k pochopení role vybraných plazmatických ceramidů vzhledem ke KVO (Kauhanen et al., 2016).

V rámci sítě nemocnic Mayo Clinic (<https://www.mayoclinic.org/>) se v současnosti využívá tzv. CERAM test, známý také jako „MI Heart Ceramides“. CERAM test zahrnuje kvantifikaci hladin ceramidů v plazmě založenou LC-MS/MS metodě. Jedná se o první klinicky využívaný test na bázi lipidových biomarkerů AIM a ACS. Pro vyhodnocení rizik závažných nežádoucích KVO během jednoho až pěti let jsou využívány hladiny Cer(d18:1/16:0), Cer(d18:1/18:0), a Cer(d18:1/24:1) a jejich poměry s Cer(d18:1/24:0) (<https://www.mayoclinic.org/> (15. 4. 2024)).

6 ZÁVĚR

Tato diplomová práce byla zaměřena na lipidové profilování plazmatických vzorků pacientů s diagnostikou STEMI a kontrolní skupiny. Teoretická část diplomové práce byla primárně věnována kardiovaskulárnímu systému, jeho poruchám, diagnostice ACS a pracovnímu postupu při lipidomických analýzách. Rovněž byl zpracován přehled o analytických metodách. Konkrétně byla pospána metoda HPLC-MS se zaměřením na používané kolony pro separaci jednotlivých lipidových tříd a na vývoj a instrumentaci hmotnostního analyzátoru na principu orbitální pasti.

V experimentální části bylo za pomoci necíleného lipidomického přístupu analyzováno 9 vzorků pacientů s diagnostikou STEMI a 9 vzorků kontrolní skupiny populace bez diagnózy STEMI.

K charakterizaci naměřeného souboru vzorků byly použity supervizované i nesupervizované statistické metody.

Jako nejvíce diskriminující třídy lipidů byly vyhodnoceny glycerolfosfolipidy (především podtřída PC) a sfingolipidy (zejména ceramidy a sfingomyeliny). Ve vzorcích pacientů se STEMI byly zaznamenány signifikantně zvýšené ceramidy Cer(d18:1/16:0), Cer(d18:1/18:0), a Cer(d18:1/24:1). To potvrzuje výsledky většiny studií, ve kterých se autoři zaměřují na lipidové biomarkery v souvislosti s KVO. Stejný výsledek byl potvrzen pro PC 16:0_22:5, který je součástí vyhodnocovacího testu CERT2.

Souhrnně lze konstatovat, že necílený lipidomický přístup se zdá být vhodným nástrojem pro hledání potenciálních nových biomarkerů. Dostatečné zacílení na tyto jednotlivé lipidy a jejich absolutní kvantifikace by mohla přinést přesnější výsledky, se kterými by se dále mohlo pracovat jako s potenciálními biomarkery onemocnění. Avšak pro aplikaci komplexních lipidových profilů, které by sloužily k diagnostice onemocnění v klinické praxi, je zapotřebí analyzovat více vzorků a ideálně i více diagnóz.

7 LITERATURA

- Al-Sakini, N. (2022). Anatomy of the heart. *Medicine*, 50(6), 317-321. <https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2022.03.014>
- Aziz, S., Ahmed, S., & Alouini, M. -S. (2021). ECG-based machine-learning algorithms for heartbeat classification. *Scientific Reports*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-97118-5>
- Barbier Saint Hilaire, P., Rousseau, K., Seyer, A., Dechaumet, S., Damont, A., Junot, C., & Fenaille, F. (2020). Comparative Evaluation of Data Dependent and Data Independent Acquisition Workflows Implemented on an Orbitrap Fusion for Untargeted Metabolomics. *Metabolites*, 10(4). <https://doi.org/10.3390/metabo10040158>
- Bednařík, A., Prysiazny, V., Bezdeková, D., Soltwisch, J., Dreisewerd, K., & Preisler, J. (2022). Mass Spectrometry Imaging Techniques Enabling Visualization of Lipid Isomers in Biological Tissues. *Analytical Chemistry*, 94(12), 4889-4900. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.1c05108>
- Beger, R. D., Dunn, W., Schmidt, M. A., Gross, S. S., Kirwan, J. A., Cascante, M., Brennan, L., Wishart, D. S., Oresic, M., Hankemeier, T., et al. (2016). Metabolomics enables precision medicine: “A White Paper, Community Perspective”. *Metabolomics*, 12(9). <https://doi.org/10.1007/s11306-016-1094-6>
- Bergmark, B. A., Mathenge, N., Merlini, P. A., Lawrence-Wright, M. B., & Giugliano, R. P. (2022). Acute coronary syndromes. *The Lancet*, 399(10332), 1347-1358. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02391-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02391-6)
- Bhargava, S., de la Puente-Secades, S., Schurgers, L., & Jankowski, J. (2022). Lipids and lipoproteins in cardiovascular diseases: a classification. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 33(6), 409-423. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2022.02.001>
- Bhatt, D. L., Lopes, R. D., & Harrington, R. A. (2022). Diagnosis and Treatment of Acute Coronary Syndromes. *JAMA*, 327(7). <https://doi.org/10.1001/jama.2022.0358>
- Björkegren, J. L. M., & Lusis, A. J. (2022). Atherosclerosis: Recent developments. *Cell*, 185(10), 1630-1645. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.04.004>
- Bob-Manuel, T., Ifedili, I., Reed, G., Ibebuogu, U. N., & Khouzam, R. N. (2017). Non-ST Elevation Acute Coronary Syndromes: A Comprehensive Review. *Current Problems in Cardiology*, 42(9), 266-305. <https://doi.org/10.1016/j.cpcardiol.2017.04.006>
- Bro, R., & Smilde, A. K. (2014). Principal component analysis. *Anal. Methods*, 6(9), 2812-2831. <https://doi.org/10.1039/C3AY41907J>
- Broadbelt, J. S., Morrison, L. J., & Santos, I. (2020). Ultraviolet Photodissociation Mass Spectrometry for Analysis of Biological Molecules. *Chemical Reviews*, 120(7), 3328-3380. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.9b00440>
- Brown, J. M., & Hazen, S. L. (2014). Seeking a Unique Lipid Signature Predicting Cardiovascular Disease Risk. *Circulation*, 129(18), 1799-1803. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.114.009224>
- Byrne, R. A., Rossello, X., Coughlan, J. J., Barbato, E., Berry, C., Chieffo, A., Claeys, M. J., Dan, G. -A., Dweck, M. R., Galbraith, M., et al. (2024). 2023 ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes. *European Heart Journal: Acute Cardiovascular Care*, 13(1), 55-161. <https://doi.org/10.1093/ehjacc/zuad107>
- Cajka, T., & Fiehn, O. (2016). Toward Merging Untargeted and Targeted Methods in Mass Spectrometry-Based Metabolomics and Lipidomics. *Analytical Chemistry*, 88(1), 524-545. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b04491>
- Campion, E. W., Anderson, J. L., & Morrow, D. A. (2017). Acute Myocardial Infarction. *New England Journal of Medicine*, 376(21), 2053-2064. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1606915>
- Chan, D., & Ng, L. L. (2010). Biomarkers in acute myocardial infarction. *BMC Medicine*, 8(1). <https://doi.org/10.1186/1741-7015-8-34>
- Checa, A., Bedia, C., & Jaumot, J. (2015). Lipidomic data analysis: Tutorial, practical guidelines and applications. *Analytica Chimica Acta*, 885, 1-16. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.02.068>
- Chen, Y., Li, E. -M., & Xu, L. -Y. (2022). Guide to Metabolomics Analysis: A Bioinformatics Workflow. *Metabolites*, 12(4). <https://doi.org/10.3390/metabo12040357>

- Choi, R. H., Tatum, S. M., Symons, J. D., Summers, S. A., & Holland, W. L. (2021). Ceramides and other sphingolipids as drivers of cardiovascular disease. *Nature Reviews Cardiology*, 18(10), 701-711. <https://doi.org/10.1038/s41569-021-00536-1>
- Collet, J. -P., Thiele, H., Barbato, E., Barthélémy, O., Bauersachs, J., Bhatt, D. L., Dendale, P., Dorobantu, M., Edvardsen, T., Folliguet, T., et al. (2021). 2020 ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation. *European Heart Journal*, 42(14), 1289-1367. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehaa575>
- Cooper, B., & Yang, R. (2024). An assessment of AcquireX and Compound Discoverer software 3.3 for non-targeted metabolomics. *Scientific Reports*, 14(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-024-55356-3>
- da Silva, K. M., Iturraspe, E., Heyrman, J., Koelmel, J. P., Cuykx, M., Vanhaecke, T., Covaci, A., & van Nuijs, A. L. N. (2021). Optimization of a liquid chromatography-ion mobility-high resolution mass spectrometry platform for untargeted lipidomics and application to HepaRG cell extracts. *Talanta*, 235. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.122808>
- Davies, V., Wandy, J., Weidt, S., van der Hooft, J. J. J., Miller, A., Daly, R., & Rogers, S. (2021). Rapid Development of Improved Data-Dependent Acquisition Strategies. *Analytical Chemistry*, 93(14), 5676-5683. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c03895>
- De Hoffmann, E., & Stroobant, V. (2007). *Mass spectrometry: principles and applications* (Third edition). John Wiley.
- Dedic, A., Lubbers, M. M., Schaap, J., Lammers, J., Lamfers, E. J., Rensing, B. J., Braam, R. L., Nathoe, H. M., Post, J. C., Nielen, T., et al. (2016). Coronary CT Angiography for Suspected ACS in the Era of High-Sensitivity Troponins. *Journal of the American College of Cardiology*, 67(1), 16-26. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2015.10.045>
- Defosse, E., Bourquin, J., von Reuss, S., Rasmann, S., & Glauser, G. (2023). Eight key rules for successful data-dependent acquisition in mass spectrometry-based metabolomics. *Mass Spectrometry Reviews*, 42(1), 131-143. <https://doi.org/10.1002/mas.21715>
- Denisov, E., Damoc, E., & Makarov, A. (2021). Exploring frontiers of orbitrap performance for long transients. *International Journal of Mass Spectrometry*, 466. <https://doi.org/10.1016/j.ijms.2021.116607>
- Deschamps, E., Calabrese, V., Schmitz, I., Hubert-Roux, M., Castagnos, D., & Afonso, C. (2023). Advances in Ultra-High-Resolution Mass Spectrometry for Pharmaceutical Analysis. *Molecules*, 28(5). <https://doi.org/10.3390/molecules28052061>
- Ding, M., & Rexrode, K. M. (2020). A Review of Lipidomics of Cardiovascular Disease Highlights the Importance of Isolating Lipoproteins. *Metabolites*, 10(4). <https://doi.org/10.3390/metabo10040163>
- dos Santos, A. C. A., & Vuckovic, D. (2024). Current status and advances in untargeted LC-MS tissue lipidomics studies in cardiovascular health. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 170. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2023.117419>
- Eggers, L. F., & Schwudke, D. (2018). Shotgun Lipidomics Approach for Clinical Samples. In M. Giera (Ed.), *Clinical Metabolomics* (pp. 163-174). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7592-1_12
- El Sabbagh, A., Reddy, Y. N. V., & Nishimura, R. A. (2018). Mitral Valve Regurgitation in the Contemporary Era. *JACC: Cardiovascular Imaging*, 11(4), 628-643. <https://doi.org/10.1016/j.jcmg.2018.01.009>
- Epstein, F. H., & Ross, R. (1999). Atherosclerosis — An Inflammatory Disease. *New England Journal of Medicine*, 340(2), 115-126. <https://doi.org/10.1056/NEJM199901143400207>
- Fahy, E., Subramaniam, S., Brown, H. A., Glass, C. K., Merrill, A. H., Murphy, R. C., Raetz, C. R. H., Russell, D. W., Seyama, Y., Shaw, W., et al. (2005). A comprehensive classification system for lipids. *Journal of Lipid Research*, 46(5), 839-861. <https://doi.org/10.1194/jlr.E400004-JLR200>
- Fahy, E., Subramaniam, S., Murphy, R. C., Nishijima, M., Raetz, C. R. H., Shimizu, T., Spener, F., van Meer, G., Wakelam, M. J. O., & Dennis, E. A. (2009). Update of the LIPID MAPS comprehensive classification system for lipids. *Journal of Lipid Research*, 50, S9-S14. <https://doi.org/10.1194/jlr.R800095-JLR200>

- Gross, J. H. (2017). *Mass Spectrometry: A Textbook* (Third edition). Springer.
- Guo, J., & Huan, T. (2020). Comparison of Full-Scan, Data-Dependent, and Data-Independent Acquisition Modes in Liquid Chromatography–Mass Spectrometry Based Untargeted Metabolomics. *Analytical Chemistry*, *92*(12), 8072-8080. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b05135>
- Hajjar, G., Barros Santos, M. C., Bertrand-Michel, J., Canlet, C., Castelli, F., Creusot, N., Dechaumet, S., Diémé, B., Giacomoni, F., Giraudeau, P., et al. (2023). Scaling-up metabolomics: Current state and perspectives. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, *167*. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2023.117225>
- Han, X., & Gross, R. W. (2003). Global analyses of cellular lipidomes directly from crude extracts of biological samples by ESI mass spectrometry: a bridge to lipidomics. *Journal of Lipid Research*, *44*(6), 1071-1079. <https://doi.org/10.1194/jlr.R300004-JLR200>
- Hauschild, J.; Peterson, A.C.; Couzijn, E.; Denisov, E.; Chernyshev, D.; Hock, C.; Stewart, H.; Hartmer, R.; Grinfeld, D.; Thoeing, C., et al. (2020). A Novel Family of Quadrupole-Orbitrap Mass Spectrometers for a Broad Range of Analytical Applications. *Preprints*. <https://doi.org/10.20944/preprints202006.0111.v1>
- Havulinna, A. S., Sysi-Aho, M., Hilvo, M., Kauhanen, D., Hurme, R., Ekroos, K., Salomaa, V., & Laaksonen, R. (2016). Circulating Ceramides Predict Cardiovascular Outcomes in the Population-Based FINRISK 2002 Cohort. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *36*(12), 2424-2430. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.116.307497>
- He, Y., Shishkova, E., Peters-Clarke, T. M., Brademan, D. R., Westphall, M. S., Bergen, D., Huang, J., Huguet, R., Senko, M. W., Zabrouskov, V., et al. (2023). Evaluation of the Orbitrap Ascend Tribid Mass Spectrometer for Shotgun Proteomics. *Analytical Chemistry*, *95*(28), 10655-10663. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.3c01155>
- Hecht, E. S., Scigelova, M., Eliuk, S., & Makarov, A. (2019). Fundamentals and Advances of Orbitrap Mass Spectrometry. In *Encyclopedia of Analytical Chemistry* (2006-09-15). Wiley. <https://doi.org/10.1002/9780470027318.a9309.pub2>
- Hilvo, M., Meikle, P. J., Pedersen, E. R., Tell, G. S., Dhar, I., Brenner, H., Schöttker, B., Lääperi, M., Kauhanen, D., Koistinen, K. M., et al. (2020). Development and validation of a ceramide- and phospholipid-based cardiovascular risk estimation score for coronary artery disease patients. *European Heart Journal*, *41*(3), 371-380. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehz387>
- Holčápek, M., Liebisch, G., & Ekroos, K. (2018). Lipidomic Analysis. *Analytical Chemistry*, *90*(7), 4249-4257. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b05395>
- Jacob, M., Lopata, A. L., Dasouki, M., & Abdel Rahman, A. M. (2019). Metabolomics toward personalized medicine. *Mass Spectrometry Reviews*, *38*(3), 221-238. <https://doi.org/10.1002/mas.21548>
- Jankevics, A., Jenkins, A., Dunn, W. B., & Najdekr, L. (2021). An improved strategy for analysis of lipid molecules utilising a reversed phase C30 UHPLC column and scheduled MS/MS acquisition. *Talanta*, *229*. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.122262>
- Karagiannidis, E., Papazoglou, A. S., Stalikas, N., Deda, O., Panteris, E., Begou, O., Sofidis, G., Moysidis, D. V., Kartas, A., Chatzinikolaou, E., et al. (2021). Serum Ceramides as Prognostic Biomarkers of Large Thrombus Burden in Patients with STEMI: A Micro-Computed Tomography Study. *Journal of Personalized Medicine*, *11*(2). <https://doi.org/10.3390/jpm11020089>
- Kauhanen, D., Sysi-Aho, M., Koistinen, K. M., Laaksonen, R., Sinisalo, J., & Ekroos, K. (2016). Development and validation of a high-throughput LC–MS/MS assay for routine measurement of molecular ceramides. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *408*(13), 3475-3483. <https://doi.org/10.1007/s00216-016-9425-z>
- Kelstrup, C. D., Bekker-Jensen, D. B., Arrey, T. N., Högbe, A., Harder, A., & Olsen, J. V. (2018). Performance Evaluation of the Q Exactive HF-X for Shotgun Proteomics. *Journal of Proteome Research*, *17*(1), 727-738. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.7b00602>
- Khan, M. J., Codreanu, S. G., Goyal, S., Wages, P. A., Gorti, S. K. K., Pearson, M. J., Uribe, I., Sherrod, S. D., McLean, J. A., Porter, N. A., et al. (2020). Evaluating a targeted multiple reaction monitoring approach to global untargeted lipidomic analyses of human plasma. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, *34*(22). <https://doi.org/10.1002/rcm.8911>

- Kim, K. H., Lee, J. Y., Lim, S., & Moon, M. H. (2013). Top-down lipidomic analysis of human lipoproteins by chip-type asymmetrical flow field-flow fractionation-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, *1280*, 92-97. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.01.025>
- Kingdon, K. H. (1923). A Method for the Neutralization of Electron Space Charge by Positive Ionization at Very Low Gas Pressures. *Physical Review*, *21*(4), 408-418. <https://doi.org/10.1103/PhysRev.21.408>
- Kitatani, K., Idkowiak-Baldys, J., & Hannun, Y. A. (2008). The sphingolipid salvage pathway in ceramide metabolism and signaling. *Cellular Signalling*, *20*(6), 1010-1018. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2007.12.006>
- Kolak, M., Westerbacka, J., Velagapudi, V. R., Wågsäter, D., Yetukuri, L., Makkonen, J., Rissanen, A., Häkkinen, A. -M., Lindell, M., Bergholm, R., et al. (2007). Adipose Tissue Inflammation and Increased Ceramide Content Characterize Subjects With High Liver Fat Content Independent of Obesity. *Diabetes*, *56*(8), 1960-1968. <https://doi.org/10.2337/db07-0111>
- Korf, A., Jeck, V., Schmid, R., Helmer, P. O., & Hayen, H. (2019). Lipid Species Annotation at Double Bond Position Level with Custom Databases by Extension of the MZmine 2 Open-Source Software Package. *Analytical Chemistry*, *91*(8), 5098-5105. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b05493>
- Kosmas, C. E., Rodriguez Polanco, S., Bousvarou, M. D., Papakonstantinou, E. J., Peña Genao, E., Guzman, E., & Kostara, C. E. (2023). The Triglyceride/High-Density Lipoprotein Cholesterol (TG/HDL-C) Ratio as a Risk Marker for Metabolic Syndrome and Cardiovascular Disease. *Diagnostics*, *13*(5). <https://doi.org/10.3390/diagnostics13050929>
- Kristensen, A. M. D., Pareek, M., Kragholm, K. H., Sehested, T. S. G., Olsen, M. H., & Prescott, E. B. (2022). Unstable Angina as a Component of Primary Composite Endpoints in Clinical Cardiovascular Trials: Pros and Cons. *Cardiology*, *147*(3), 235-247. <https://doi.org/10.1159/000524948>
- Kvasnička, A., Najdekr, L., Dobešová, D., Pisklákova, B., Ivanovová, E., & Friedecký, D. (2023). Clinical lipidomics in the era of the big data. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*, *61*(4), 587-598. <https://doi.org/10.1515/cclm-2022-1105>
- Laaksonen, R., Ekroos, K., Sysi-Aho, M., Hilvo, M., Vihervaara, T., Kauhanen, D., Suoniemi, M., Hurme, R., März, W., Scharnagl, H., et al. (2016). Plasma ceramides predict cardiovascular death in patients with stable coronary artery disease and acute coronary syndromes beyond LDL-cholesterol. *European Heart Journal*, *37*(25), 1967-1976. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehw148>
- Labrosse, M. R. (2018). *Cardiovascular Mechanics* (First edition). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/b21917>
- Lanekoff, I., Thomas, M., & Laskin, J. (2014). Shotgun Approach for Quantitative Imaging of Phospholipids Using Nanospray Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*, *86*(3), 1872-1880. <https://doi.org/10.1021/ac403931r>
- Liebisch, G., Vizcaino, J. A., Köfeler, H., Trötzmüller, M., Griffiths, W. J., Schmitz, G., Spener, F., & Wakelam, M. J. O. (2013). Shorthand notation for lipid structures derived from mass spectrometry. *Journal of Lipid Research*, *54*(6), 1523-1530. <https://doi.org/10.1194/jlr.M033506>
- Liebisch, G., Fahy, E., Aoki, J., Dennis, E. A., Durand, T., Ejsing, C. S., Fedorova, M., Feussner, I., Griffiths, W. J., Köfeler, H., et al. (2020). Update on LIPID MAPS classification, nomenclature, and shorthand notation for MS-derived lipid structures. *Journal of Lipid Research*, *61*(12), 1539-1555. <https://doi.org/10.1194/jlr.S120001025>
- Lindstrom, M., DeCleene, N., Dorsey, H., Fuster, V., Johnson, C. O., LeGrand, K. E., Mensah, G. A., Razo, C., Stark, B., Varieur Turco, J., et al. (2022). Global Burden of Cardiovascular Diseases and Risks Collaboration, 1990-2021. *Journal of the American College of Cardiology*, *80*(25), 2372-2425. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2022.11.001>
- Lintonen, T. P. I., Baker, P. R. S., Suoniemi, M., Ubhi, B. K., Koistinen, K. M., Duchoslav, E., Campbell, J. L., & Ekroos, K. (2014). Differential Mobility Spectrometry-Driven Shotgun Lipidomics. *Analytical Chemistry*, *86*(19), 9662-9669. <https://doi.org/10.1021/ac5021744>

- LIPID MAPS Structure Database. <https://www.lipidmaps.org/> (5. 3. 2023)
- Magny, R., Regazzetti, A., Kessal, K., Genta-Jouve, G., Baudouin, C., Mélik-Parsadaniantz, S., Brignole-Baudouin, F., Laprévotte, O., & Auzeil, N. (2020). Lipid Annotation by Combination of UHPLC-HRMS (MS), Molecular Networking, and Retention Time Prediction: Application to a Lipidomic Study of In Vitro Models of Dry Eye Disease. *Metabolites*, 10(6). <https://doi.org/10.3390/metabo10060225>
- Makarov, A. (2000). Electrostatic Axially Harmonic Orbital Trapping: A High-Performance Technique of Mass Analysis. *Analytical Chemistry*, 72(6), 1156-1162. <https://doi.org/10.1021/ac991131p>
- Mayo Clinic. <https://www.mayoclinic.org/> (15. 4. 2024)
- McAlister, G. C., Phanstiel, D., Good, D. M., Berggren, W. T., & Coon, J. J. (2007). Implementation of Electron-Transfer Dissociation on a Hybrid Linear Ion Trap–Orbitrap Mass Spectrometer. *Analytical Chemistry*, 79(10), 3525-3534. <https://doi.org/10.1021/ac070020k>
- Meikle, T. G., Huynh, K., Giles, C., & Meikle, P. J. (2021). Clinical lipidomics: realizing the potential of lipid profiling. *Journal of Lipid Research*, 62. <https://doi.org/10.1016/j.jlr.2021.100127>
- Meeusen, J. W., Donato, L. J., Bryant, S. C., Baudhuin, L. M., Berger, P. B., & Jaffe, A. S. (2018). Plasma Ceramides: A Novel Predictor of Major Adverse Cardiovascular Events After Coronary Angiography. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 38(8), 1933-1939. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.118.311199>
- Michalski, A., Damoc, E., Lange, O., Denisov, E., Nolting, D., Müller, M., Viner, R., Schwartz, J., Remes, P., Belford, M., et al. (2012). Ultra High Resolution Linear Ion Trap Orbitrap Mass Spectrometer (Orbitrap Elite) Facilitates Top Down LC MS/MS and Versatile Peptide Fragmentation Modes. *Molecular & Cellular Proteomics*, 11(3). <https://doi.org/10.1074/mcp.O111.013698>
- Moldoveanu, S. C., & David, V. (2022). *Essentials in Modern HPLC Separations* (Second edition). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/C2020-0-04542-1>
- Müller, J., Bertsch, T., Volke, J., Schmid, A., Klingbeil, R., Metodiev, Y., Karaca, B., Kim, S. -H., Lindner, S., Schupp, T., et al. (2021). Narrative review of metabolomics in cardiovascular disease. *Journal of Thoracic Disease*, 13(4), 2532-2550. <https://doi.org/10.21037/jtd-21-22>
- Narváez-Rivas, M., & Zhang, Q. (2016). Comprehensive untargeted lipidomic analysis using core-shell C30 particle column and high field orbitrap mass spectrometer. *Journal of Chromatography A*, 1440, 123-134. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.02.054>
- Najdekr, L., Friedecký, D., Tautenhahn, R., Pluskal, T., Wang, J., Huang, Y., & Adam, T. (2016). Influence of Mass Resolving Power in Orbital Ion-Trap Mass Spectrometry-Based Metabolomics. *Analytical Chemistry*, 88(23), 11429-11435. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b02319>
- Ni, Z., Wölk, M., Jukes, G., Mendivelso Espinosa, K., Ahrends, R., Aimo, L., Alvarez-Jarreta, J., Andrews, S., Andrews, R., Bridge, A., et al. (2023). Guiding the choice of informatics software and tools for lipidomics research applications. *Nature Methods*, 20(2), 193-204. <https://doi.org/10.1038/s41592-022-01710-0>
- Niemelä, P. S., Castillo, S., Sysi-Aho, M., & Orešič, M. (2009). Bioinformatics and computational methods for lipidomics. *Journal of Chromatography B*, 877(26), 2855-2862. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2009.01.025>
- Nováková, L., Douša, M., & Česla, P. (2021a). *Moderní HPLC separace v teorii a praxi* (2. přepracované a rozšířené vydání). Česká chromatografická škola, zapsaný spolek.
- Nováková, L., Douša, M., & Česla, P. (2021b). *Moderní HPLC separace v teorii a praxi* (2. přepracované a rozšířené vydání). Česká chromatografická škola, zapsaný spolek.
- Oliver, S. G., Winson, M. K., Kell, D. B., & Baganz, F. (1998). Systematic functional analysis of the yeast genome. *Trends in Biotechnology*, 16(9), 373-378. [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(98\)01214-1](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(98)01214-1)
- Pan, W., Yu, J., Shi, R., Yan, L., Yang, T., Li, Y., Zhang, Z., Yu, G., Bai, Y., Schuchman, E. H., et al. (2014). Elevation of ceramide and activation of secretory acid sphingomyelinase in patients with acute coronary syndromes. *Coronary Artery Disease*, 25(3), 230-235. <https://doi.org/10.1097/MCA.0000000000000079>

- Pan, W., Sun, M., Wu, J., Dong, H., Liu, J., Gao, R., Fang, S., Xing, L., Hu, S., & Yu, B. (2020). Relationship between elevated plasma ceramides and plaque rupture in patients with ST-segment elevation myocardial infarction. *Atherosclerosis*, *302*, 8-14. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2020.04.008>
- Perez de Souza, L., Alseekh, S., Scossa, F., & Fernie, A. R. (2021). Ultra-high-performance liquid chromatography high-resolution mass spectrometry variants for metabolomics research. *Nature Methods*, *18*(7), 733-746. <https://doi.org/10.1038/s41592-021-01116-4>
- Pham, T. H., Zaem, M., Fillier, T. A., Nadeem, M., Vidal, N. P., Manful, C., Cheema, S., Cheema, M., & Thomas, R. H. (2019). Targeting Modified Lipids during Routine Lipidomics Analysis using HILIC and C30 Reverse Phase Liquid Chromatography coupled to Mass Spectrometry. *Scientific Reports*, *9*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41556-9>
- Poss, A. M., Maschek, J. A., Cox, J. E., Hauner, B. J., Hopkins, P. N., Hunt, S. C., Holland, W. L., Summers, S. A., & Playdon, M. C. (2020). Machine learning reveals serum sphingolipids as cholesterol-independent biomarkers of coronary artery disease. *Journal of Clinical Investigation*, *130*(3), 1363-1376. <https://doi.org/10.1172/JCI131838>
- Racek, J., Rajdl, D., Brož, P., Cibulka, R., & Šlechtová, J. (2021). *Klinická biochemie* (Třetí, přepracované a rozšířené vydání). Galén.
- Raichur, S., Brunner, B., Bielohuby, M., Hansen, G., Pfenninger, A., Wang, B., Bruning, J. C., Larsen, P. J., & Tennagels, N. (2019). The role of C16: 0 ceramide in the development of obesity and type 2 diabetes. *Molecular Metabolism*, *21*, 36-50. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2018.12.008>
- Rakusanova, S., Fiehn, O., & Cajka, T. (2023). Toward building mass spectrometry-based metabolomics and lipidomics atlases for biological and clinical research. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, *158*. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2022.116825>
- Rampler, E., Criscuolo, A., Zeller, M., El Abiead, Y., Schoeny, H., Hermann, G., Sokol, E., Cook, K., Peake, D. A., Delanghe, B., et al. (2018). A Novel Lipidomics Workflow for Improved Human Plasma Identification and Quantification Using RPLC-MSn Methods and Isotope Dilution Strategies. *Analytical Chemistry*, *90*(11), 6494-6501. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b05382>
- Reed, G. W., Rossi, J. E., & Cannon, C. P. (2017). Acute myocardial infarction. *The Lancet*, *389*(10065), 197-210. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)30677-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)30677-8)
- Reinicke, M., Shamkeeva, S., Hell, M., Isermann, B., Ceglarek, U., & Heinemann, M. L. (2022). Targeted Lipidomics for Characterization of PUFAs and Eicosanoids in Extracellular Vesicles. *Nutrients*, *14*(7). <https://doi.org/10.3390/nu14071319>
- Reis, A., Rudnitskaya, A., Chariyavilaskul, P., Dhaun, N., Melville, V., Goddard, J., Webb, D. J., Pitt, A. R., & Spickett, C. M. (2015). Top-down lipidomics of low density lipoprotein reveal altered lipid profiles in advanced chronic kidney disease. *Journal of Lipid Research*, *56*(2), 413-422. <https://doi.org/10.1194/jlr.M055624>
- Reisz, J. A., Zheng, C., D'Alessandro, A., & Nemkov, T. (2019). Untargeted and Semi-targeted Lipid Analysis of Biological Samples Using Mass Spectrometry-Based Metabolomics. In A. D'Alessandro (Ed.), *High-Throughput Metabolomics* (pp. 121-135). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9236-2_8
- Ruiz-Perez, D., Guan, H., Madhivanan, P., Mathee, K., & Narasimhan, G. (2020). So you think you can PLS-DA? *BMC Bioinformatics*, *21*(S1). <https://doi.org/10.1186/s12859-019-3310-7>
- Řezanka, T., Nedbalová, L., Procházková, L., & Sigler, K. (2014). Lipidomic profiling of snow algae by ESI-MS and silver-LC/APCI-MS. *Phytochemistry*, *100*, 34-42. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2014.01.017>
- Saccenti, E., Hoefsloot, H. C. J., Smilde, A. K., Westerhuis, J. A., & Hendriks, M. M. W. B. (2014). Reflections on univariate and multivariate analysis of metabolomics data. *Metabolomics*, *10*(3), 361-374. <https://doi.org/10.1007/s11306-013-0598-6>
- Salihovic, S., Lamichane, S., Hyötyläinen, T., & Orešič, M. (2023). Recent advances towards mass spectrometry-based clinical lipidomics. *Current Opinion in Chemical Biology*, *76*. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2023.102370>

- Scafa Udriște, A., Niculescu, A. -G., Grumezescu, A. M., & Bădilă, E. (2021). Cardiovascular Stents: A Review of Past, Current, and Emerging Devices. *Materials*, *14*(10). <https://doi.org/10.3390/ma14102498>
- Shyti, R., Kohler, I., Schoenmaker, B., Derks, R. J. E., Ferrari, M. D., Tolner, E. A., Mayboroda, O. A., & van den Maagdenberg, A. M. J. M. (2015). Plasma metabolic profiling after cortical spreading depression in a transgenic mouse model of hemiplegic migraine by capillary electrophoresis – mass spectrometry. *Molecular BioSystems*, *11*(5), 1462-1471. <https://doi.org/10.1039/C5MB00049A>
- Scheltema, R. A., Hauschild, J. -P., Lange, O., Hornburg, D., Denisov, E., Damoc, E., Kuehn, A., Makarov, A., & Mann, M. (2014). The Q Exactive HF, a Benchtop Mass Spectrometer with a Pre-filter, High-performance Quadrupole and an Ultra-high-field Orbitrap Analyzer. *Molecular & Cellular Proteomics*, *13*(12), 3698-3708. <https://doi.org/10.1074/mcp.M114.043489>
- Schuhmann, K., Moon, H. K., Thomas, H., Ackerman, J. M., Groessl, M., Wagner, N., Kellmann, M., Henry, I., Nadler, A., & Shevchenko, A. (2019). Quantitative Fragmentation Model for Bottom-Up Shotgun Lipidomics. *Analytical Chemistry*, *91*(18), 12085-12093. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b03270>
- Schwaiger-Haber, M., Stancliffe, E., Arends, V., Thyagarajan, B., Sindelar, M., & Patti, G. J. (2021). A Workflow to Perform Targeted Metabolomics at the Untargeted Scale on a Triple Quadrupole Mass Spectrometer. *ACS Measurement Science Au*, *1*(1), 35-45. <https://doi.org/10.1021/acsmesuresciau.1c00007>
- Schweppe, D. K., Prasad, S., Belford, M. W., Navarrete-Perea, J., Bailey, D. J., Huguet, R., Jedrychowski, M. P., Rad, R., McAlister, G., Abbatiello, S. E., et al. (2019). Characterization and Optimization of Multiplexed Quantitative Analyses Using High-Field Asymmetric-Waveform Ion Mobility Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*, *91*(6), 4010-4016. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b05399>
- Sigruener, A., Kleber, M. E., Heimerl, S., Liebisch, G., Schmitz, G., Maerz, W., & Calabresi, L. (2014). Glycerophospholipid and Sphingolipid Species and Mortality: The Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health (LURIC) Study. *PLoS ONE*, *9*(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085724>
- Skoog, D. A., West, D. M., Holler, F. J., & Crouch, S. R. (2022). *Fundamentals of Analytical Chemistry* (Tenth edition). Cengage.
- Smith, C. A., Want, E. J., O'Maille, G., Abagyan, R., & Siuzdak, G. (2006). XCMS: Processing Mass Spectrometry Data for Metabolite Profiling Using Nonlinear Peak Alignment, Matching, and Identification. *Analytical Chemistry*, *78*(3), 779-787. <https://doi.org/10.1021/ac051437y>
- Smoluch, M., Grasso, G., Suder, P., & Silberring, J. (2019). *Mass spectrometry: an applied approach* (Second edition). Wiley.
- Stegemann, C., Pechlaner, R., Willeit, P., Langley, S. R., Mangino, M., Mayr, U., Menni, C., Moayyeri, A., Santer, P., Rungger, G., et al. (2014). Lipidomics Profiling and Risk of Cardiovascular Disease in the Prospective Population-Based Bruneck Study. *Circulation*, *129*(18), 1821-1831. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.113.002500>
- Stephenson, D. J., Hoferlin, L. A., & Chalfant, C. E. (2017). Lipidomics in translational research and the clinical significance of lipid-based biomarkers. *Translational Research*, *189*, 13-29. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2017.06.006>
- Strimbu, K., & Tavel, J. A. (2010). What are biomarkers? *Current Opinion in HIV and AIDS*, *5*(6), 463-466. <https://doi.org/10.1097/COH.0b013e32833ed177>
- Sucosky, P., Shar, J. A., & Barrientos, J. (2020). Cardiovascular Mechanics and Disease. In *Mechanobiology* (pp. 23-45). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817931-4.00002-9>
- Tabassum, R., & Ripatti, S. (2021). Integrating lipidomics and genomics: emerging tools to understand cardiovascular diseases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *78*(6), 2565-2584. <https://doi.org/10.1007/s00018-020-03715-4>
- Thygesen, K., Alpert, J. S., Jaffe, A. S., Chaitman, B. R., Bax, J. J., Morrow, D. A., White, H. D., Thygesen, K., Alpert, J. S., Jaffe, A. S., et al. (2019). Fourth universal definition of myocardial infarction (2018). *European Heart Journal*, *40*(3), 237-269. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehy462>

- Tilea, I., Varga, A., & Serban, R. C. (2021). Past, Present, and Future of Blood Biomarkers for the Diagnosis of Acute Myocardial Infarction—Promises and Challenges. *Diagnostics*, 11(5). <https://doi.org/10.3390/diagnostics11050881>
- Triebel, A., Trötz Müller, M., Hartler, J., Stojakovic, T., & Köfeler, H. C. (2017). Lipidomics by ultrahigh performance liquid chromatography-high resolution mass spectrometry and its application to complex biological samples. *Journal of Chromatography B*, 1053, 72-80. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2017.03.027>
- Ulmer, C. Z., Patterson, R. E., Koelmel, J. P., Garrett, T. J., & Yost, R. A. (2017). A Robust Lipidomics Workflow for Mammalian Cells, Plasma, and Tissue Using Liquid-Chromatography High-Resolution Tandem Mass Spectrometry. In S. K. Bhattacharya (First edition), *Lipidomics* (pp. 91-106). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6996-8_10
- Vafaie, M. (2016). State-of-the-art diagnosis of myocardial infarction. *Diagnosis*, 3(4), 137-142. <https://doi.org/10.1515/dx-2016-0024>
- Wang, X. -Y., Zhang, F., Zhang, C., Zheng, L. -R., & Yang, J. (2020). The Biomarkers for Acute Myocardial Infarction and Heart Failure. *BioMed Research International*, 1-14. <https://doi.org/10.1155/2020/2018035>
- White, H. D., & Chew, D. P. (2008). Acute myocardial infarction. *The Lancet*, 372(9638), 570-584. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(08\)61237-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(08)61237-4)
- Wierzczoń, S. T., & Kłopotek, M. A. (2018). Cluster Analysis. In *Modern Algorithms of Cluster Analysis* (pp. 9-66). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-69308-8_2
- Wojtowicz, P., Janečková, H., Friedecký, D. a Adam, T. (2013). Techniky metabolomiky v biomedicině. *Chemické listy*. 107(1), 3-11. http://chemicke-listy.cz/docs/full/2013_01_3-11.pdf
- World Heart Federation. <https://world-heart-federation.org/> (4. 3. 2024)
- Würtz, P., Havulinna, A. S., Soininen, P., Tynkkynen, T., Prieto-Merino, D., Tillin, T., Ghorbani, A., Artati, A., Wang, Q., Tiainen, M., et al. (2015). Metabolite Profiling and Cardiovascular Event Risk. *Circulation*, 131(9), 774-785. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.114.013116>
- Xu, T., Hu, C., Xuan, Q., & Xu, G. (2020). Recent advances in analytical strategies for mass spectrometry-based lipidomics. *Analytica Chimica Acta*, 1137, 156-169. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.09.060>
- Zhang, D., Duan, X., Shang, B., Hong, Y., & Sun, H. (2021). Analysis of lipidomics profile of rice and changes during storage by UPLC-Q-extractive orbitrap mass spectrometry. *Food Research International*, 142. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110214>
- Zhang, N. R., Hatcher, N. G., Ekroos, K., Kedia, K., Kandebo, M., Marcus, J. N., Smith, S. M., Bateman, K. P., & Spellman, D. S. (2022). Validation of a multiplexed and targeted lipidomics assay for accurate quantification of lipidomes. *Journal of Lipid Research*, 63(6). <https://doi.org/10.1016/j.jlcr.2022.100218>
- Zhou, J., Liu, H., Liu, Y., Liu, J., Zhao, X., & Yin, Y. (2016). Development and Evaluation of a Parallel Reaction Monitoring Strategy for Large-Scale Targeted Metabolomics Quantification. *Analytical Chemistry*, 88(8), 4478-4486. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b00355>
- Zubarev, R. A., & Makarov, A. (2013). Orbitrap Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*, 85(11), 5288-5296. <https://doi.org/10.1021/ac4001223>

8 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

ACS	Akutní koronární syndromy
Ag-HPLC	Argentační chromatografie
AIM	Akutní infarkt myokardu
ANOVA	Analýza rozptylu
APCI	Chemická ionizace za atmosférického tlaku
APPI	Fotoionizace za atmosférického tlaku
BNP	Mozkový natriuretický peptid
CA	Shluková (klastrová) analýza
CCTA	Koronární výpočetní tomografie (koronární angiografie)
CD 3.3	Compound Discoverer 3.3
Cer	Ceramid
CID	Kolizí indukovaná disociace
CK	Kreatinkinasa
CK-MB	Kreatinkinasa (myokardiální isoenzym)
CL	Kardiolipin
CRP	C-reaktivní protein
cTns	Kardiální troponiny
DDA	Akvizice závislá na datech
DESI	Desorpční ionizace elektrosprejem
DG	Diacylglyceroly
DIA	Akvizice nezávislá na datech
DIMS	Hmotnostní spektrometrie s diferenciální iontovou mobilitou
EKG	Elektrokardiografie
ESI	Elektrosprej
ETD	Disociace přenosem elektronů
FA	Mastné kyseliny
FDR	Míra falešných objevů
FNV	Falešně negativní výsledky
FPV	Falešně pozitivní výsledky
FT ICR	Iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací
FWHM	Rozlišení píku v polovině maxima
GL	Glycerolipidy

GNPS	Global Natural Products Social Molecular Networking
GP	Glycerolfosfolipidy
HCD	Disociace indukovaná vyšší energií
HDL	Lipoproteiny s vysokou hustotou
HDL-C	HDL cholesterol
HILIC	Hydrofilní interakční chromatografie
HPLC	Vysokoučinná kapalinová chromatografie
HRMS	Hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením
ICHS	Ischemická choroba srdeční
IL-6	Interleukin 6
IRM	Transportní multipól pro ionty
KVO	Kardiovaskulární onemocnění
LBBB	Blokáda levého Tawarova raménka
LC-MS	Kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií
LDL	Lipoproteiny s nízkou hustotou
LMSD	Strukturní databáze LIPID MAPS
LNAPE	N-acyl-lysofosfatidylethanolamin
MALDI	Laserová desorpce/ionizace za přítomnosti matrice
MG	Monoacylglyceroly
MN	Molekulární síť
MRM	Monitorování vícenásobných reakcí
MS	Hmotnostní spektrometrie
MS/MS	Tandemová hmotnostní spektrometrie
MSI	Hmotnostně spektrometrické obrazy
MUFA	Mononenasyčené mastné kyseliny
NAP	Nestabilní angina pectoris
NSTE-ACS	Akutní koronární syndrom bez elevace ST úseku
NSTEMI	Infarkt myokardu bez elevace ST úseku
NT-proBNP	N-terminální fragment proBNP
OPLS-DA	Ortogonalní diskriminační analýza nejmenších částečných čtverců
QC	Vzorový kontrolní kvalita
PC	Fosfatidylcholin
PCA	Analýza hlavních komponent
PE	Fosfatidylethanolamin

PG	Fosfatidylglycerol
PI	Fosfatidylinositol
PLS-DA	Diskriminační analýza nejmenších částečných čtverců
PRM	Monitorování paralelních reakcí
PS	Fosfatidylserin
PUFA	Polynenasycené mastné kyseliny
RP-HPLC	HPLC v systému s reverzní stacionární fází
SIMS	Hmotnostní spektrometrie sekundárních iontů
SM	Sfingomyelin
SP	Sfingolipidy
STEMI	Infarkt myokardu projevující se elevací ST úseku
SWATH	Sekvenční akvizice oken všech teoretických hmotnostních spekter
TG	Triacylglyceroly
TNF- α	Faktor nádorové nekrózy α
TOF	Hmotnostní analyzátor doby letu
UVPD	Fragmentace iontů pomocí ultrafialové fotodisociace

9 PŘÍLOHY