

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Lipidomická analýza krevních skvrn pacientů
s deficitem acyl-CoA dehydrogenasy mastných
kyselin s krátkým řetězcem**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Aleš Kvasnička
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	doc. RNDr. David Friedecký, Ph.D.
Rok:	2020

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním bakalářské 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:

Nejprve bych chtěl poděkovat doc. RNDr. Davidu Friedeckému, Ph.D. za aktivní vedení a odborné rady, Mgr. Štěpánovi Kouřilovi a Radaně Brumarové, Ph.D. za jejich ochotu kdykoliv diskutovat o tématech a připomínkách spjatých s problematikou této práce. Dále bych chtěl poděkovat Prof. Michaeli Lämmerhoferovi, Bernhardu Drotleffovi, Ph.D. a všem ostatním lidem, s nimiž jsem mohl spolupracovat při mé stáži v Institute of Pharmaceutical sciences při Eberhard Karls Universtiy Tübingen v Německu. V neposlední řadě bych chtěl poděkovat své rodině a snoubence, kteří mi byli během studia vždy oporou.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Aleš Kvasnička
Název práce	Lipidomická analýza krevních skvrn pacientů s deficitem acyl-CoA dehydrogenasy mastných kyselin s krátkým řetězcem
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Laboratoř dědičných metabolických poruch
Vedoucí práce	doc. RNDr. David Friedecký, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2020

Abstrakt

V rámci této diplomové práce bylo zkoumáno lipidové složení vzorků pacientů s dědičnou metabolickou poruchou způsobenou deficitem acyl-CoA dehydrogenasy mastných kyselin s krátkým řetězcem. Byly srovnány dva metabolické přístupy a to cílená lipidomická analýza, která byla optimalizována za účelem zajištění kompatibility s odlišným typem kapalinového chromatografu a hmotnostního spektrometru, než byl využit v původní publikované metodě. Dále byly vzorky podrobeny necílené lipidomické analýze, která byla uskutečněna v rámci stáže v Institute of Pharmaceutical sciences při Eberhard Karls Universität Tübingen v Německu. Shodné závěry výsledků cílené i necílené analýzy, která byla provedena s časovým odstupem na jiném přístroji v jiné zemi a při níž byl použit nový vzorek suché krevní skvrny a také jiný postup extrakce dokazují reprodukovatelnost a validitu provedených analýz. U pacientů byly pozorovány systematické změny v lipidomu u většiny lipidových tříd (LPC, LPE, PC, PC-O, SM, PE, CAR, FA). Oproti kontrolní skupině byly u skupiny pacientů zvýšeny lipidy s acyly o délce 16 uhlíků (LPC, PC, LPE, PE) a dále lipidy s arachidonylovým zbytkem (PC) a naopak mezi lipidy o snížené koncentraci patřily lipidy s acyly o délce 18 uhlíků (LPC, PC, LPE, PE). Tyto změny byly popsány v literatuře v souvislosti s remodelačními mechanismy mitochondriálního kardiolipinu a dále vlivem změny metabolické preference (Warburgův efekt) způsobené zvýšeným oxidativním stresem v buňce. V rámci necílené lipidomické analýzy byly dále identifikovány některé oxidované lipidy, nicméně nebyl dokázán jejich původ a role v patobiochemickém mechanismu onemocnění SCADD a k jejichž specifické identifikaci by bylo nutno necílenou lipidomickou metodu příslušně modifikovat.

Klíčová slova	Dědičné metabolické poruchy, lipidomika, metabolomika, hmotnostní spektrometrie, cílená analýza, necílená analýza, deficit acyl-CoA dehydrogenasy mastných kyselin s krátkým řetězcem, SCADD
Počet stran	123
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and Bc. Aleš Kvasnička
surname

Title Lipidomic Analysis of Dry Blood Spots of Patients
with Short-Chain Acyl-CoA Dehydrogenase
Deficiency

Type of thesis Diploma

Department Laboratory of inherited metabolic diseases

Supervisor doc. RNDr. David Friedecký, Ph.D.

The year of presentation 2020

Abstract

Main focus of this diploma thesis is the analysis of the lipid composition of samples from patients with an inherited metabolic disorder caused by a short-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. Two metabolomic approaches have been compared, namely targeted lipidomic analysis, which has been optimized to ensure compatibility with a different type of liquid chromatograph and mass spectrometer than the setup used in the originally published method. Furthermore, the samples have been subjected to non-targeted lipidomic analysis, which has been carried out during an Erasmus + traineeship at the Institute of Pharmaceutical Sciences at Eberhard Karls University in Tübingen, Germany. The nearly identical conclusions of the results of the targeted and non-targeted analysis, which has been performed with a time interval on another instrument in another country and using a new dry blood spot sample as well as a different extraction procedure, prove the reproducibility and validity of the performed analyses. In patients, systematic changes in the lipidome were observed in most lipid classes (LPC, LPE, PC, PC-O, SM, PE, CAR, FA). Compared to the control group, lipids with acyls chains with a length of 16 carbons (LPC, PC, LPE, PE) and lipids with arachidonyl group (PC) were increased in the group of patients, and lipids with reduced concentrations included lipids with acyl chains with a length of 18 carbons (LPC, PC, LPE, PE). These changes have been described in the literature in connection with the remodeling mechanisms of mitochondrial cardiolipin and also due to the metabolic switch (namely Warburg effect) caused by increased oxidative stress in the cell. In the non-targeted lipidomic analysis, some oxidized lipids have been further identified, however, their origin and role in the pathobiochemical mechanism of SCADD disease

was not proven and the non-targeted lipidomic method would need to be modified accordingly.

Keywords	Inherited metabolic diseases, lipidomics, metabolomics, mass spectrometry, targeted analysis, untargeted analysis, short-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency, SCADD
Number of pages	123
Number of appendices	0
Language	Czech

Obsah

1	ÚVOD	11
2	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	12
2.1	Dědičné metabolické poruchy	12
2.2	Výskyt dědičných metabolických poruch	13
2.2.1	Novorozenecký screening dědičných metabolických poruch	14
2.2.2	Dědičné metabolické poruchy oxidace mastných kyselin	17
2.2.2.1	Poruchy transportu mastných kyselin	18
2.2.2.2	Poruchy β -oxidace mastných kyselin	20
2.2.2.3	Deficience Acyl-CoA-dehydrogenasy mastných kyselin s krátkým řetězcem (SCADD)	22
2.2.2.3.1	Enzym acyl-CoA-dehydrogenasa mastných kyselin s krátkým řetězcem	22
2.2.2.3.2	Genetická a molekulární charakterizace SCADD	23
2.2.2.3.3	Diagnostika a biomarkery onemocnění SCADD	25
2.2.2.3.4	Klinické projevy a patofyziologie onemocnění SCADD	26
2.3	Metabolomika	26
2.3.1	Lipidomika	27
2.3.1.1	Chemická struktura lipidů a jejich klasifikace	28
2.3.1.1.1	Acyly mastných kyselin (FA)	29
2.3.1.1.2	Glycerolipidy (GL)	30
2.3.1.1.3	Glycerofosfolipidy (GP)	31
2.3.1.1.4	Sfingolipidy (SP)	34
2.3.1.1.5	Prenolové lipidy (PR) a sterolové lipidy (ST)	34
2.3.1.1.6	Sacharolipidy (SL) a polyketidy (PK)	36
2.4	Metody lipidomické analýzy	36
2.4.1	Extrakční techniky v lipidomické analýze	37
2.4.2	Separační techniky v lipidomické analýze	38
2.4.3	Hmotnostní spektrometrie v lipidomické analýze	38
2.4.3.1	Kvadrupólové analyzátory	40
2.4.3.2	Hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením	42
2.4.3.2.1	Analyzátor doby letu s vysokým rozlišením (QTOF)	43
2.4.3.3	Cílená lipidomická analýza	46
2.4.3.4	Necílená lipidomická analýza	46
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	48

3.1	Materiál	48
3.1.1	Chemikálie	48
3.1.2	Biologický materiál	49
3.1.3	Přístrojové vybavení	49
3.2	Metody	49
3.2.1	Souhrn pracovního postupu (lipidomického „workflow“)	49
3.2.2	Příprava vzorků	50
3.2.2.1	Příprava vzorků k optimalizaci metody cílené lipidomické analýzy	50
3.2.2.2	Příprava vzorků suchých krevních skvrn novorozenců s poruchou SCADD	51
3.2.3	Optimalizace cílené lipidomické metody (LC-MS)	52
3.2.4	Cílená lipidomická analýza vzorků suchých krevních skvrn novorozenců s poruchou SCADD	53
3.2.5	Necílená lipidomická analýza suchých krevních skvrn novorozenců s poruchou SCADD	54
3.2.6	Statistické a komparativní vyhodnocení dat	55
4	VÝSLEDKY	57
4.1	Optimalizace cílené lipidomické metody	57
4.2	Srovnání výsledků cílené a necílené analýzy vzorků suchých krevních skvrn pacientů se SCADD	64
4.3	Strukturní identifikace neznámých metabolitů analýzou fragmentačních spekter	82
5	DISKUZE	93
6	ZÁVĚR	98
6.1	Optimalizace cílené lipidomické analýzy	98
6.2	Cílená a necílená analýza suchých krevních skvrn pacientů s nemocí SCADD.	98
7	LITERATURA	99
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	110
9	PŘÍLOHY	112

Cíle práce

- Vypracování literární rešerše o vybraných dědičných poruchách (DMP), o aktuálních poznatcích k onemocnění způsobeným defektem v enzymu acyl-CoA dehydrogenasy mastných kyselin s krátkým řetězcem (SCADD).
- Vypracování literární rešerše k aktuálnímu stavu metod lipidomické analýzy se zaměřením na hmotnostní spektrometrii v cílené a necílené analýze.
- Extrakce lipidů ze vzorků suchých krevních skvrn pacientů s onemocněním SCADD a jejich následná analýza cíleným a necíleným přístupem.
- Procesování naměřených cílených a necílených LC/MS lipidomických dat.
- Statistická analýza pomocí metod mnohorozměrné a jednorozměrné analýzy.
- Vyhodnocení výsledků a biochemická interpretace změn v lipidovém profilu ve vztahu k patobiochemickému mechanismu onemocnění SCADD.

1 ÚVOD

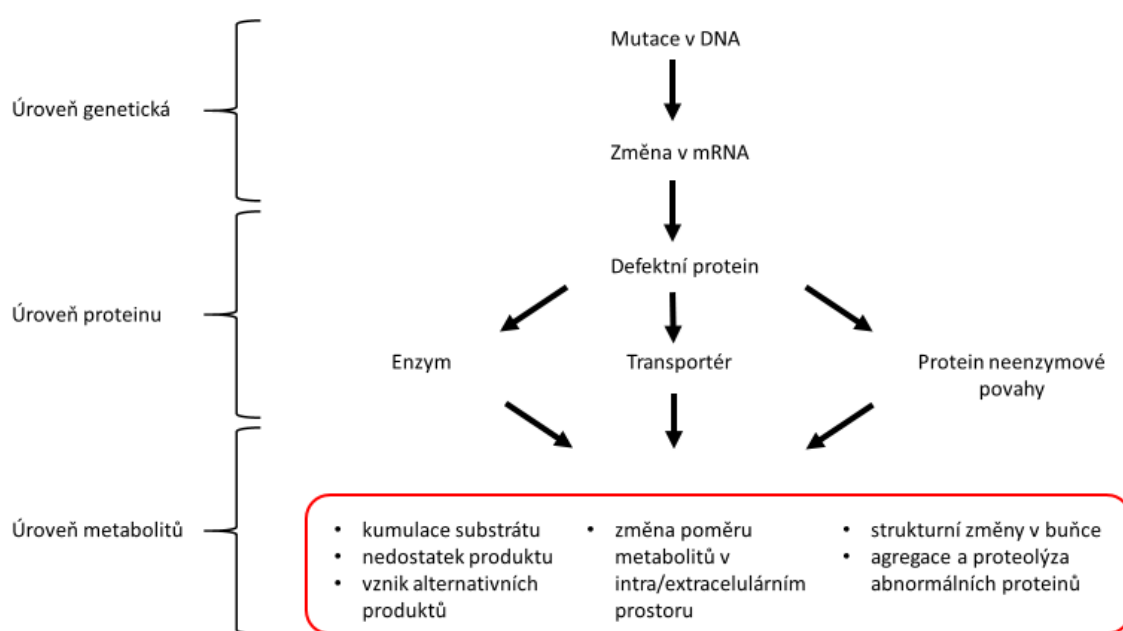
Lipidomika je dynamicky se rozvíjející podobor metabolomiky, který díky neustálému vývoji možností hmotnostních spektrometrů a příslušného software v posledním desetiletí upevnil svou pozici mezi ostatními „omickými“ přístupy. Změny v lipidomu jsou asociovány s buněčnou signalizací, vesikulárním transportem, organizací lipidových raftů a dalšími fyziologickými procesy, přičemž u řady onemocnění (ateroskleróza, rakovina, diabetes, Alzheimerova choroba, chronická renální nedostatečnost) byly prokázány systematické změny napříč lipidovými třídami. Obsáhlé lipidové profilování nabízí šanci odhalit nové biomarkery specifických chorob, ale také rozkrýt komplexní mechanismy patobiochemického stavu v dané organele, buňce a potažmo taky celém organismu. Interpretace změn v lipidomu patří stále mezi zásadní výzvy v lipidomických studiích především kvůli biologické variabilitě a vlivu environmentálních faktorů na složení a koncentraci jednotlivých lipidů a dále také možnostmi, jak tyto změny hodnotit (na úrovni: složení acylů, délky a saturace řetězců, jednoho konkrétního lipidu, lipidových tříd). S každým dalším experimentem a odhalením lipidomického profilu napříč onemocněními je využití lipidomiky v klinické diagnostice a příbuzných oborech stále upevňováno a konkretizováno.

Poruchy β -oxidace mastných kyselin patří k dědičným poruchám metabolismu s nejvyšší prevalencí, přičemž u určitých minoritních skupin populace se jedná o nejčastější vzácná dědičná onemocnění (Pedersen *et al.*, 2008; Therrell *et al.*, 2014; Lisyova *et al.*, 2018). Deficit acyl-CoA dehydrogenasy mastných kyselin s krátkým řetězcem (SCADD) je i přes dobrou metabolickou charakterizaci, znalost patobiochemických mechanismů a biomarkerů onemocněním s několika otazníky. U pacientů se symptomatickým průběhem onemocnění dochází k vážným zdravotním komplikacím, které zahrnují postižení nervové a svalové soustavy (opožďení vývoje, myopatie, epilepsie, záchvaty), zatímco někteří pacienti zachycení novorozeneckým screeningem zůstávají asymptomatictí. Byly popsány asociace některých z mnoha desítek patologických variant genu *ACADS* se zhoršeným či mírným průběhem onemocnění, nicméně stále dochází k objevování nových patologických mutací, čímž narůstá počet potenciálních genetických kombinací na obou alelách. Vzhledem k tomu, že SCADD není typickou poruchou β -oxidace (nedochází k energetické deficienci nedostatkem acetyl-CoA) a biomarkery nejsou dostatečně specifické, nebývá tato choroba obvykle zařazena do novorozeneckého screeningu.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Dědičné metabolické poruchy

Dědičné poruchy metabolismu (DMP) mají obvykle příčinu v defektu jediného genu, který kódoval funkční protein úzce spojený s konkrétní metabolickou drahou. Tímto funkčním proteinem může být enzym, membránový transportér, či protein vykonávající jinou roli v dané metabolické dráze či jiném fyziologickém procesu (Obr. 1). Nefunkčnost takového proteinu se obvykle projeví akumulací substrátu tohoto enzymu, či molekuly, která měla být přes membránu přenesena, přičemž jeho zvyšující se koncentrace se stává toxickou pro buňku, či organelu, ve které se proces odehrává (Garrod, 1996; Burton, 1998). Dalším důsledkem DMP může být nedostatek produktu určité metabolické dráhy, kdy je tento produkt nezbytný pro správný chod buňky nebo jejího kompartmentu. Zjednodušeně se dají DMP kategorizovat do tří skupin a to poruchy: spojené s defektem v metabolismu komplexních molekul, vedoucí k intoxikaci substrátem, anebo poruchy spojené s energetickou deficiencí (Saudubray *et al.*, 2016).



Obr. 1 Schéma důsledku defektu v DNA kódující funkční protein.

Autosomálně recesivní dědičnost patří mezi hlavní způsob přenosu metabolické poruchy z rodičů na potomka, který musí od každého z nich získat jednu defektní alelu genu (Garrod, 1996). Onemocnění bude manifestovat pouze u homozygota, zatímco

heterozygot, mající schopnost částečné syntézy normálního proteinu, figuruje pouze jako přenašeč defektního genu. Existují i autosomálně dominantní, gonosomálně recesivní a gonosomálně dominantní způsoby přenosu, nicméně se vyskytují poměrně vzácně (Racek *et al.*, 1999). Specifickým případem dědičnosti jsou poruchy na mitochondriální úrovni, jelikož mitochondrie obsahuje vlastní mitochondriální genom (mtDNA), ale exprese mnoha mitochondriálních proteinů je pod kontrolou jaderného genomu. Defekty v mtDNA vykazují dědičnost pouze po mateřské linii (maternální dědičnost) (Couser a Gucsavas-Calikoglu, 2017), protože mitochondrie spermie jsou po splnutí vajíčka a spermie zničeny organismem matky ve fázi časně embryogeneze (Thompson *et al.*, 2003).

Illsinger a Das (2010) uvádějí, že bylo k roku 2010 charakterizováno více než 700 dědičných metabolických poruch, přičemž jejich počet bude pravděpodobně v dalších letech narůstat. Existuje mnoho způsobů, jak jednotlivé DMP klasifikovat například podle organely, ve které se nachází defektní protein, nebo podle metabolické dráhy v níž defektní enzym figuruje (klasifikace biochemická).

2.2 Výskyt dědičných metabolických poruch

Dědičné metabolické poruchy se řadí mezi nemoci vzácné, vyznačující se populačním výskytem nižším než 1:2000 (Kožich a Zeman, 2010). K posouzení prevalence těchto onemocnění lze využít dat z programů novorozeneckého screeningu (dále NS), ze kterých vyplývá, že prevalence DMP u novorozenců se liší v závislosti na skupině testovaných DMP a demografii, nicméně lze ji odhadovat mezi 1:900 až 1:2000 (Applegarth *et al.*, 2000; Berry *et al.*, 2010; Alratrout a Altammim, 2014; Therrell *et al.*, 2014). Na základě dat z NS v České republice mezi lety 2009-2017 je celková incidence 15 testovaných metabolických poruch uváděna jako 1:2500 (Pešková *et al.*, 2018). Celková kumulativní incidence všech DMP včetně těch, které nejsou zařazené do NS, se pohybuje okolo 1:500, ale vzhledem k absenci relevantních dat (neznámý počet pacientů bez diagnózy, problematika diagnostiky stovek potenciálních DMP) se jedná spíše o odhad (Kožich a Zeman, 2010).

2.2.1 Novorozenecký screening dědičných metabolických poruch

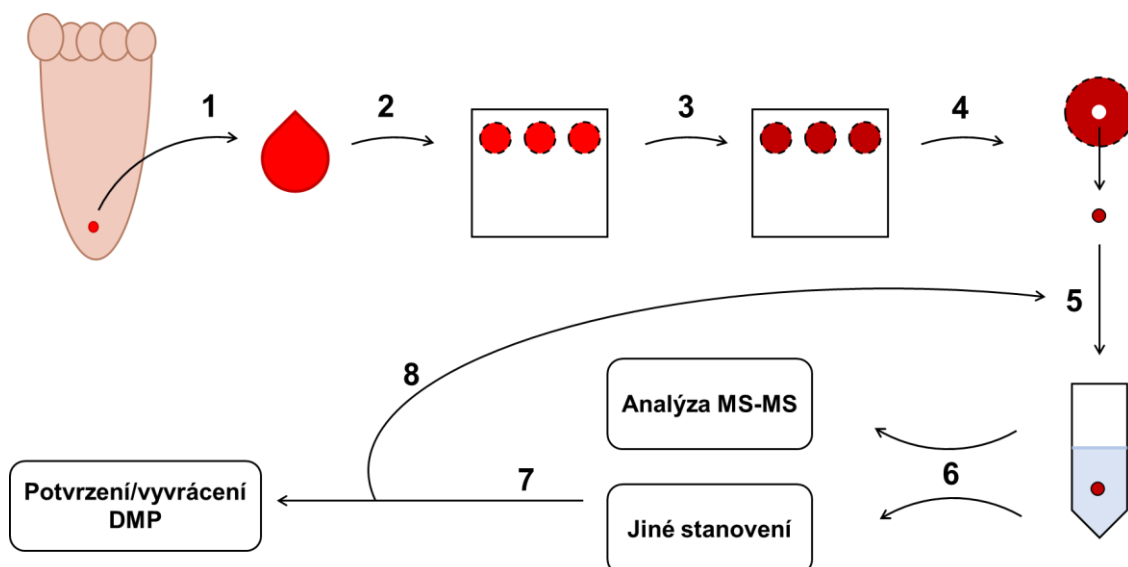
Cíl NS spočívá v identifikaci novorozenců s DMP dříve, než by se mohly projevit následky a komplikace spojené s danou poruchou. Za průkopníka NS se považuje Robert Guthrie, který představil jednoduchý, reprodukovatelný a levný test pro diagnostiku fenylyketonurie, která bez včasné léčby způsobuje nenávratné neurologické změny a mentální retardaci (Welsh *et al.*, 1990). Screening fenylyketonurie se v 70. letech 20. století rychle celosvětově rozšířil a byl doprovázen intenzivním výzkumem dalších DMP vhodných pro screening, přičemž největší průlom přišel až v letech 90. s rozvojem tandemové hmotnostní spektrometrie (Naylor a Chace, 1999; Korenev *et al.*, 2019).

Existují určité předpoklady k tomu, aby byla DMP zařazena do novorozeneckého screeningu. Tyto kritéria definoval Wilson a Jungner (1968) s následným přijetím světovou zdravotnickou organizací a dají se shrnout do sedmi bodů:

1. Onemocnění musí představovat významný zdravotní problém.
2. Vyšetřované onemocnění musí být jasně definované.
3. Onemocnění má dostatečnou frekvenci výskytu (uvažuje se alespoň 1:50 000 až 1:100 000, nicméně s rozvojem tandemové hmotnostní spektrometrie, kdy je možné v 1 analýze stanovit desítky metabolitů, není toto kritérium striktně dodržováno).
4. Včasná diagnóza a následná léčba zásadním způsobem pozitivně ovlivní průběh onemocnění. Léčba musí být efektivní, běžně dostupná a zajistitelná pro všechny zachycené jedince.
5. Onemocnění je detekovatelné obecně uznaným laboratorním testem standardně odebraného materiálu (suché krevní skvrny) a splňuje kritéria: jasně definované rozhodovací rozmezí („cut off“), hodnoty falešné negativity a pozitivity, obecně přijatelnou zátěží zdravé populace vyjádřenou frekvencí opakování odběru pro nejasný výsledek („recall-rate“).
6. Ekonomická a organizační stránka laboratorního testu a následné péče o zachycené pacienty umožňuje společnosti provádět novorozenecký screening všem svým novorozencům.
7. Novorozenecký screening musí být efektivní a účinný a musí docházet k pravidelnému vyhodnocování těchto kritérií.

Organizace NS v České republice je definována podle Věstníku MZ ČR (2016). Metodický návod obsahuje výčet DMP zahrnutých do screeningů, informace k odběru krve a odesílání vzorků, postup screeningových laboratoří a zajištění následné péče o děti s DMP. Obecný postup NS probíhá následovně (schéma je dále uvedeno na Obr. 2):

1. Nejprve je proveden odběr krve novorozence mezi 48-72 hodinou po narození vpichem do paty sterilní lancetou.
2. První kapka krve se otře sterilním tamponem a další velká kapka krve se přenesse na screeningovou kartu, tak aby zcela zaplnila předtištěné kolečko. Krev se dále odebírá do dalších pozic.
3. Po zaplnění všech kroužků se screeningová karta nechá schout po dobu 4 hodin při laboratorní teplotě v horizontální poloze tak, aby nedošlo k otření, nebo jiné interakci s krví.
4. Po zaschnutí se může odebrat vzorek krevní skvrny vyražením terčíku o definovaném průměru ze středu skvrny.
5. Následuje příprava vzorku, která obvykle zahrnuje extrakční krok.
6. Extrakt je analyzován tandemovou hmotnostní spektrometrií, imunochemickým stanovením proteinů/hormonů, či jinou metodou.
7. Následuje kontrola výsledků a porovnání hodnot s „cut-off“ hodnotami.
8. Pokud není výsledek průkazný, může se měření opakovat s další suchou krevní skvrnou a opětovnou analýzou. V případě průkazných hodnot je pacient shledán bez DMP nebo s podezřením na DMP, které se musí dále prokázat genetickými testy.



Obr. 2 Schéma průběhu novorozeneckého screeningu (číslování koresponduje s detailním popisem průběhu NBS uvedeného výše v kapitole 2.2.1. Krev je odebrána vpichem do paty (1), je zachytávána na screeningovou kartu (2), dále je vzorek sušen (3), k analýze je ze suché krevní skvrny vyražen terčík o definovaném průměru (4), terčík je extrahován (5) a analyzován (7) k potvrzení či vyvrácení diagnózy, s případným opakováním analýzy v případě nejasných výsledků (8). Obrázek autora. Zpracováno dle Věstníku MZ ČR (2016).

V České republice byl NS zaveden v roce 1975 a prvním testovaným onemocněním byla fenylketonurie. Další DMP byly do NS přidány v letech 1985 (kongenitální hypotyreóza), 2006 (kongenitální adrenální hyperplazie), 2009 (cystická fibróza a dalších 9 DMP) a poslední rozšíření v roce 2016 (dalších 5 DMP). Aktuální seznam chorob zahrnutých do NS v České republice obsahuje 15 DMP a 2 endokrinní onemocnění (kongenitální hypotyreóza a kongenitální adrenální hyperplazie) a cystickou fibrózu. Seznam DMP zahrnutých do NS v České republice je uveden v tabulce (Tab. 1) (Pešková *et al.*, 2018).

Tab. 1 Dědičné metabolické poruchy zahrnuté do novorozeneckého screeningu v ČR a jejich incidence v rámci NS v období 10/2009-12/2017 (*poruchy zahrnuté do NS od 06/2016)

Skupina onemocnění	Onemocnění	Výskyt v populaci
<i>Dědičné poruchy metabolismu aminokyselin</i>	Fenylketonurie a hyperfenylalaninemie	1:5 500
	Homocystinurie z deficitu cystathionin- β -syntasy*	1:180 000
	Homocystinurie z deficitu methylenetetrahydrofolátreduktasy*	-
	Glutarová acidurie typ I	1:150 000
	Isovalerová acidurie	1:180 000
	Leucinóza (nemoc javorového sirupu)	1:130 000
	<i>Dědičné poruchy cyklu močoviny</i>	Citrulinémie I. typu*
Argininémie*		1:90 000
<i>Dědičné poruchy metabolismu mastných kyselin</i>	Deficit acyl-CoA-dehydrogenasy mastných kyselin se středně dlouhým řetězcem	1:22 000
	Deficit 3-hydroxyacyl-CoA-dehydrogenasy mastných kyselin s dlouhým řetězcem	1:77 000
	Deficit acyl-CoA-dehydrogenasy mastných kyselin s velmi dlouhým řetězcem	1:230 000
	Deficit karnitinpalmitoyltransferasy typ I	-
	Deficit karnitinpalmitoyltransferasy typ II	-
	Deficit karnitinacylkarnitintranslokasy	-
	<i>Dědičná porucha metabolismu vitaminů</i>	Deficit biotinidasy*

2.2.2 Dědičné metabolické poruchy oxidace mastných kyselin

Během hladovění, zvýšené svalové aktivity, při stresových stavech a nemocech představuje mitochondriální oxidace mastných kyselin (dále MK) důležitý zdroj energie, přičemž energetické potřeby srdečního svalu, kosterních svalů a jater jsou z ní pokryty až z 80 % (Eaton *et al.*, 1996). Ve srovnání s glykolýzou, která poskytuje na zhruba 38 molů ATP na mol glukosy, je výtěžek jednoho molu palmitátu podrobeného beta-oxidaci

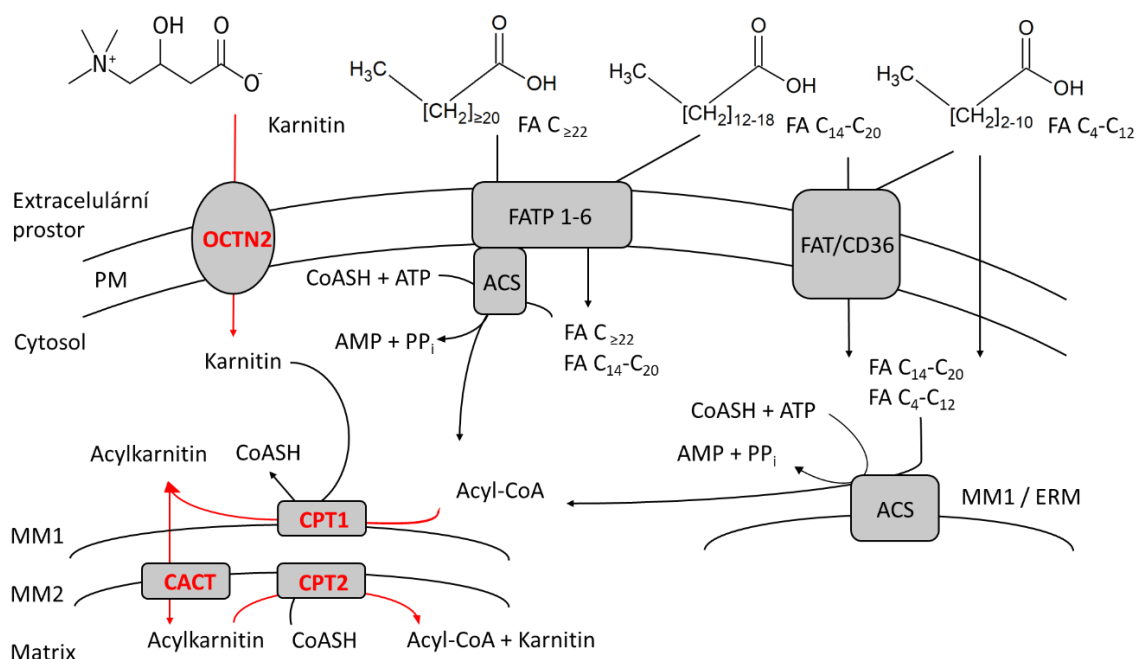
v matrix mitochondrie roven zhruba 129 molům ATP (Blanco a Blanco, 2017), proto je defekt v tomto metabolickém procesu spjat se závažnou energetickou dekompenzací (Houten a Wanders, 2010). DMP spojené s oxidací MK lze rozdělit na poruchy transportu mastných kyselin do matrix mitochondrie a na poruchy samotné β -oxidace mastných kyselin.

2.2.2.1 Poruchy transportu mastných kyselin

MK se v lidském organismu vyskytují v zásobní formě triacylglycerolů v adipocytech (univakuolární zásobní buňky), v krvi ve formě lipoproteinových částic anebo jako volné mastné kyseliny navázané na albumin v poměru 8-9:1 (Blanco a Blanco, 2017). Cesta mastných kyselin z adipocytů až do matrix mitochondrie zahrnuje řadu kroků (Obr. 3):

1. MK jsou v adipocytech uvolněny z triacylglycerolů hydrolyzou za katalýzy intracelulární hormon-senzitivní lipasou (EC 3.1.1.79), která je aktivována hormonem glukagonem (a katecholaminy) a inhibována inzulinem (a prostaglandiny).
2. Volné MK s krátkým až středně dlouhým řetězcem (C_4 - C_{12}) se dostávají do tkáňových buněk difuzí skrze cytoplasmatickou membránu.
3. Volné MK s dlouhým a velmi dlouhým řetězcem (C_{14} - C_{20}) jsou přes cytoplasmatickou membránu přenášeny transportéry mastných kyselin (rodina šesti homologních proteinů FATP1-FATP6), které mohou MK přímo aktivovat (Acyl-CoA-synthetasová aktivita; EC 6.2.1.3) (Mashek *et al.*, 2007) a dále také translokasou mastných kyselin (Glatz *et al.*, 2006; Doege a Stahl, 2006).
4. MK jsou dále aktivovány přímo na vnější mitochondriální membráně Acyl-CoA-synthetasou (ACS, EC 6.2.1.3) (Farstad *et al.*, 1967). Tato reakce probíhá ve dvou krocích: na karboxylovou skupinu mastné kyseliny je navázán anhydridovou vazbou adenosylmonofosfát (za vzniku acyladenylátu a pyrofosfátu), který je ve druhém kroku zaměněn za koenzym A.
5. MK s dlouhým řetězcem (C_{12} - C_{18}) ve formě Acyl-CoA jsou před vstupem do matrix mitochondrie přeneseny z koenzymu A na karnitin za katalýzy karnitinpalmitoyltransferasou I (CPT I; EC 2.3.1.21), která je lokalizovaná na vnější straně mitochondriální membrány. MK s velmi dlouhým řetězcem podléhají před vstupem do mitochondrie peroxisomální β -oxidaci (Reddy a

Mannaerts, 1994). Acyl-karnitiny následně prochází skrz vnitřní mitochondriální membránu specifickým antiportem (karnitin-acylkarnitintranslokasa; CACT) výměnou za volný karnitin. V matrix mitochondrie jsou pak Acyl-karnitiny opět přeměněny na Acyl-CoA za katalýzy karnitinpalmitoyltransferasy II (CPT II; EC 2.3.1.21).



Obr. 3 Zjednodušené schéma transportu mastných kyselin z extracelulárního prostoru do matrix mitochondrie s vyznačenými proteiny (červeně) souvisejícími s DMP (detailní popis viz kapitola 2.1.4.1). Plasmatická membrána (PM), karnitinový přenašeč (OCTN2), membrána endoplasmatického retikula (ERM), vnější mitochondriální membrána (MM1), vnitřní mitochondriální membrána (MM2), acyl-CoA-synthetasa (ACS). Obrázek autora vytvořený na základě zdrojů uvedených v kapitole 2.1.4.1.

Specifické symptomy poruchy transportu MK lze zobecnit na: intoleranci k hladovění, hypoketotickou hypoglykemií, záchvaty, koma, myoglobinurii, selhání srdce a jater (Vishwanath, 2016). Diagnostika těchto onemocnění v rámci novorozeneckého screeningu spočívá v analýze volných karnitinů a organických kyselin pomocí tandemové hmotností spektrometrie, jejíž výhoda tkví především v simultánní analýze několika desítek látek v jednom vzorku a dále ve vysoké citlivosti analýzy (Rashed, 2001). V případě primárního deficitu karnitinu (deficience karnitinového transportéru – OCTN2) slouží jako biomarker onemocnění velmi nízká koncentrace volného L-karnitinu, celkových karnitinů a zvýšená aktivita kreatinkinasy (Magoulas a El-Hattab, 2012). Porucha CACT a CPT II se projevuje zvýšenou koncentrací

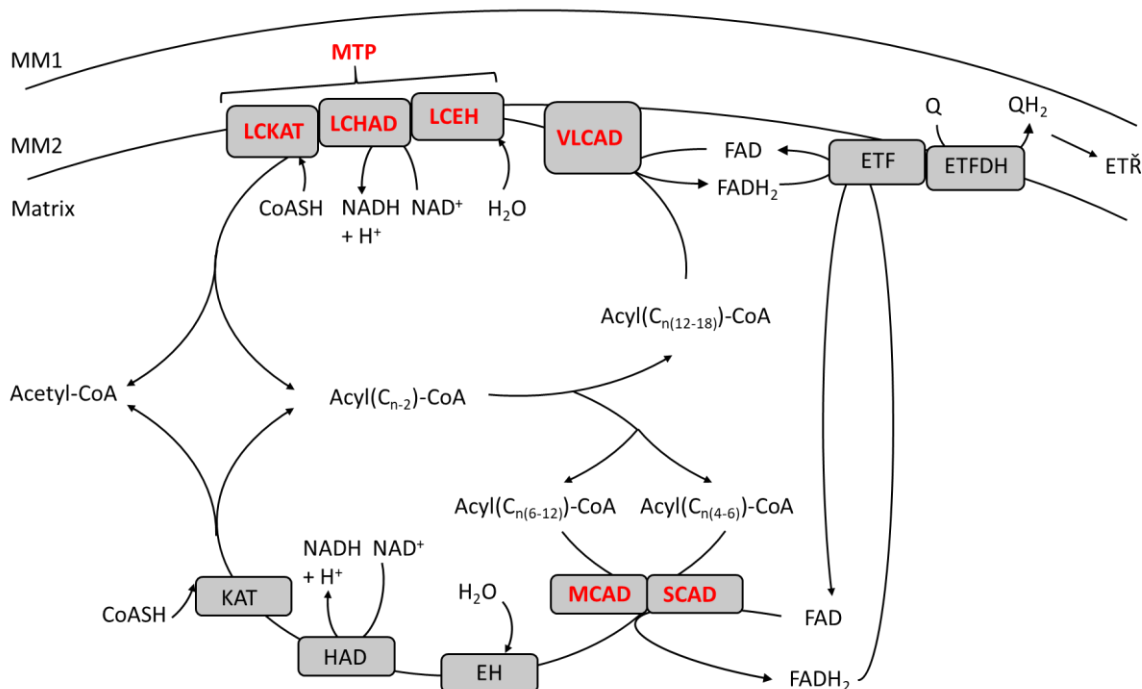
acylkarnitinů s delším řetězcem (C16, C18, C18:1) a z profilu acylkarnitinů je obtížné tyto dvě poruchy odlišit, přičemž u poruchy CACT jsou časté zvýšené hodnoty amoniaku a pro poruchu CPT II je typická zvýšená aktivita kreatinkinasy. Deficit CPT I vykazuje typický profil acylkarnitinů: zvýšený L-karnitin, snížený karnitin C16 a C18 (Rashed *et al.*, 1995; Jones a Bennett, 2017).

2.2.2.2 Poruchy β -oxidace mastných kyselin

Acylyl-CoA mastných kyselin v matrix mitochondrie jsou podrobeny cyklické oxidaci (β -oxidace) za vzniku acetyl-CoA a příslušného acyl-CoA s řetězcem o 2 uhlíky kratším, který je opět oxidován do úplné degradace na acetyl-CoA (propionyl-CoA v případě acyl-CoA s lichým počtem uhlíků acylového řetězce). Acyl-CoA s dlouhým řetězcem (více než 12 uhlíků) je nejprve dehydrogenován na trans-2-enoyl-CoA za katalýzy acyl-CoA dehydrogenasou mastných kyselin s velmi dlouhým řetězcem (VLCAD z anglického very long-chain acyl-CoA dehydrogenase; EC 1.3.8.9), která se nachází ve vnitřní mitochondriální membráně (Souri *et al.*, 1998). V případě acyl-CoA se středně dlouhým (8-12 uhlíků) a krátkým řetězcem (4-6 uhlíků) je první krok β -oxidace katalyzován příslušnými acyl-CoA dehydrogenasami mastných kyselin se středně dlouhým (MCAD z anglického medium-chain acyl-CoA dehydrogenase; EC 1.3.8.7) a krátkým řetězcem (SCAD z anglického short-chain acyl-CoA dehydrogenase; EC 1.3.8.1), přičemž oba tyto enzymy se vyskytují volně v matrix mitochondrie. Uvolněné atomy vodíku jsou ve formě redukovaných ekvivalentů FADH₂ (prostetická skupina acyl-CoA dehydrogenas) dále přenášeny elektrony-přenášejícím flavoproteinem (ETF) na ubiquinon za katalýzy membránovou elektrony-přenášející-flavoproteinovou dehydrogenasou (ETF₂FDH, EC 1.5.5.1) (Beckmann a Frerman, 1985; Roberts *et al.*, 1996).

Dále je produkt této reakce hydratován na L-3-hydroxy-acyl-CoA, opět dehydrogenován na 3-keto-acyl-CoA a nakonec thiolyticky rozštěpen za vzniku acetyl-CoA. V případě acyl-CoA s dlouhým řetězcem jsou tyto reakce katalyzované jediným membránovým proteinem – mitochondriální trifunkční protein (MTP), který vykazuje aktivitu enoyl-CoA-hydratasy (LCEH, EC 4.2.1.17), 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenasy mastných kyselin s dlouhým řetězcem (LCHAD, EC 1.1.1.211) a acetyl-CoA-C-acyltransferasy (LCKAT, thiolasa I; EC 2.3.1.16). V případě acyl-CoA se středně dlouhými a krátkými řetězci figurují tyto enzymy samostatně volně v matrix

mitochondrie s širokou specifitou k délce acylového řetězce. Schéma β -oxidace je uvedeno na následujícím obrázku (Obr. 4).



Obr. 4 Zjednodušené schéma β -oxidace mastných kyselin s vyznačenými enzymy (červeně) souvisejícími s DMP (detailní popis viz kapitola 2.1.4.2). Vnější mitochondriální membrána (MM1), vnitřní mitochondriální membrána (MM2), acyl-CoA dehydrogenasa MK s dlouhým (VLCAD), středně dlouhým (MCAD) a krátkým (SCAD), mitochondriální trifunkční protein (MTP), enoyl-CoA-hydratasa (LCEH/EH), 3-hydroxyacyl-CoA-dehydrogenasa (LCHAD/HAD), acetyl-CoA-C-acyltransferasa (LCKAT, KAT), elektrony-přenášející flavoprotein (ETF), elektrony přenášející-flavoproteinivová dehydrogenasa (ETFDH), ubiquinon (Q), elektronový transportní řetězec (ETŘ). Obrázek autora vytvořený na základě zdrojů uvedených v kapitole 2.1.4.2.

Stejně jako u DMP spojených s přenosem mastných kyselin do matrix mitochondrie představují DMP β -oxidace mastných kyselin riziko především při delším hladovění a stavech zvýšených energetických nároků (Wanders *et al.*, 1999). Mezi typické klinické prezentace této skupiny onemocnění patří jaterní disfunkce projevující se hypoketotickou hypoglykemií a příznaky Reyova syndromu (metabolická encefalopatie). Mezi další příznaky patří srdeční projevy jako hypertrofická kardiomyopatie a arytmie (Merritt *et al.*, 2018). Deficience enzymu β -oxidační dráhy se může projevit také v pozdějším věku a je obvykle indukována při intenzivním fyzickém výkonu, nebo delším hladovění a projevuje se myopatií, či rhabdomyolýzou (Rinaldo a Matern, 2002). Spolehlivými biomarkery onemocnění jsou volné acylkarnitiny, přičemž zvýšená koncentrace

acylkarnitinů s delším řetězcem a několika dvojnými vazbami (C14:1, C14:2) odpovídá profilu deficiencie VLCAD, zvýšené acylkarnitiny C8, C10 a C10:1 odpovídají profilu deficiencie MCAD a zvýšená koncentrace butyrylkarnitinu (C4) je typickým markerem deficiencie SCAD. Deficiencie MTP či podjednotky LCHAD se projevuje zvýšenými hydroxyacylkarnitiny C16-OH a C18:1-OH (Rashed *et al.*, 1995; Jones a Bennett, 2017)

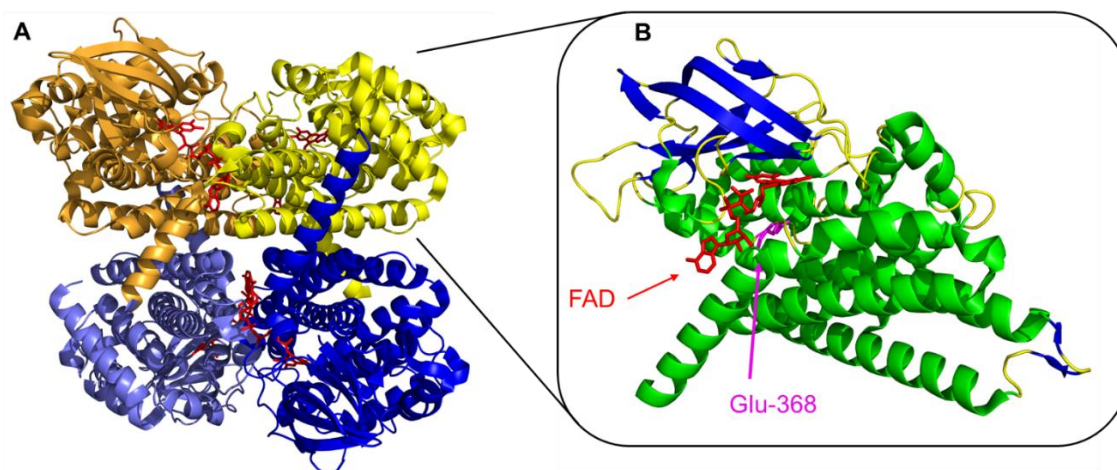
2.2.2.3 Deficiencie Acyl-CoA-dehydrogenasy mastných kyselin s krátkým řetězcem (SCADD)

Jedná se o autosomálně recesivní onemocnění charakterizované mutací v genu *ACADS*, která způsobuje deficienci acyl-CoA-dehydrogenasy mastných kyselin s krátkým řetězcem. Prevalence tohoto onemocnění se pohybuje mezi 1:35000 až 1:50000 (Tonin *et al.*, 2016), přičemž zvýšená prevalence byla pozorována v některých etnických skupinách jako jsou aškenázští židé (Tein *et al.*, 2008) či romové na Slovensku (Lisyova *et al.*, 2018). Vzhledem k vysokému množství asymptomatických jedinců, nedostatečné znalosti možných léčebných opatření a absenci dlouhodobých studií zaměřených na jedince s defektem SCAD není tato DMP typicky zahrnuta do NBS programů (van Maldegem *et al.*, 2006). SCADD byla zahrnuta do několika pilotních rozšířených screeningových programů v USA a Austrálii (Wilcken *et al.*, 2003) a nově také na Slovensku (Dluholucky a Knapkova, 2017). Oproti typickým hodnotám prevalence této choroby byla na Slovensku stanovena prevalence SCADD v majoritní populaci na 1:9745 a v romské menšině na 1:1000, což znamená, že SCADD je nejfrekventovanější metabolickou poruchou této etnické skupiny (Dluholucky a Knapkova, 2017).

2.2.2.3.1 Enzym acyl-CoA-dehydrogenasa mastných kyselin s krátkým řetězcem

SCAD je flavoproteinová dehydrogenasa, která je kódována jaderným genomem, přičemž prekursorový protein syntetizovaný v cytosolu obsahuje na N-konci signální peptidovou sekvenci (24 aminokyselin), díky níž je translokován do mitochondrie (Naito *et al.*, 1989). Rentgenostrukturní analýzou krystalu krysího enzymu SCAD (struktura lidského enzymu je popsána v databázích, nicméně studie nebyla publikována) bylo zjištěno, že se jedná o homotetramer (dimer z dimerů) o molekulové hmotnosti 168 kDa s vysoce konzervovanou strukturou v porovnání s bakteriální obdobou toho enzymu či s

MCAD (Battaile et al., 2002). V aktivním místě enzymu figuruje aminokyselinové residuum kyseliny glutamové v pozici 368 jako katalytická báze iniciující dehydrogenasovou reakci, přičemž mutace měnící smysl kodonu z Glu 368 na Gln či Ala, vede ke ztrátě enzymové aktivity (Kim et al., 1994). Každá monomerní jednotka obsahuje nekovalentně vázanou molekulu FAD, která je stěžejní pro správné složení proteinu (Nagao a Tanaka, 1992) (Obr. 5).

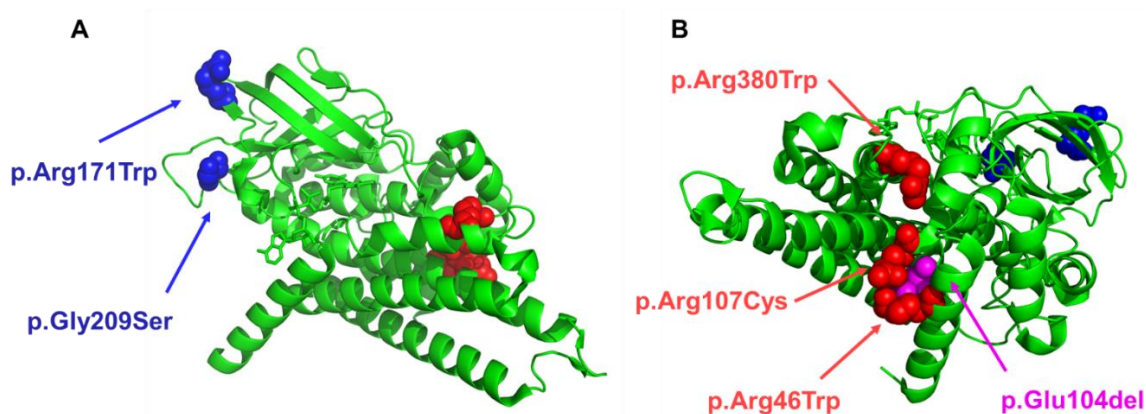


Obr. 5 Molekulární struktura lidského enzymu SCAD. **A** tetramerní struktura s barevně odlišenými monomerními řetězci a červeně zvýrazněným kofaktorem FAD. **B** detail na jednu monomerní jednotku s označením sekundární struktury: alfa-helix (zeleně), beta listy (modře), smyčky (žlutě), kofaktor FAD (červeně) a katalytické residuum Glu-368 (fialově). Obrázek autora vygenerován a upraven v programu PyMol, struktura byla stažena z databáze UniProt (kód P16219).

2.2.2.3.2 Genetická a molekulární charakterizace SCADD

Lidský gen *ACADS* se nachází na chromosomu 12 (přesná lokalizace 12q24.31), obsahuje 10 exonů a celkově 1 239 nukleotidů (dle databáze KEGG: https://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?hsa:35). Momentálně bylo popsáno více než 70 vzácných a 2 běžné mutace v genu *ACADS* a z většiny se jedná o bodové substituční „missence“ mutace (Gregersen *et al.*, 1998; Corydon *et al.*, 2001; Pedersen *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2016; Tonin *et al.*, 2016). Mezi běžné mutace v genu *ACADS* řadíme mutaci c.511C>T (p.Arg171Trp) s 3-8% výskytem v populaci a c.625G>A (p.Gly209Ser) s 21-26% výskytem v populaci (Nagan *et al.*, 2003; Pedersen *et al.*, 2008). Tyto mutace samy o sobě souvisejí s klinickou manifestací SCADD pouze v kombinaci s dalšími faktory (environmentální, genetické), anebo v případě složené heterozygoty s některou ze vzácných patologických variant genu (Gregersen *et al.*, 1998). Jako příklad

patogenní mutace lze uvést c.136C>T (p.Arg46Trp) a c.319C>T (p.Arg107Cys), které byly identifikované v kombinaci s běžnými mutacemi (Gregersen *et al.*, 1998) ale také u stejného pacienta – případ složené heterozygoty (Naito *et al.*, 1990). Některé nejčastěji se vyskytující běžné a patologické mutace jsou uvedeny na obrázku (Obr. 6). V nedávné době byla registrována vysoká frekvence (64 % z 56 testovaných novorozenců) vzácné deleční mutace c.310_312delGAG (p.Glu104del) u novorozenců testovaných ve studii na Slovensku (Lisyova *et al.*, 2018) a celkově byla SCADD diagnostikována 85 % testovaným novorozencům romské etnicity.

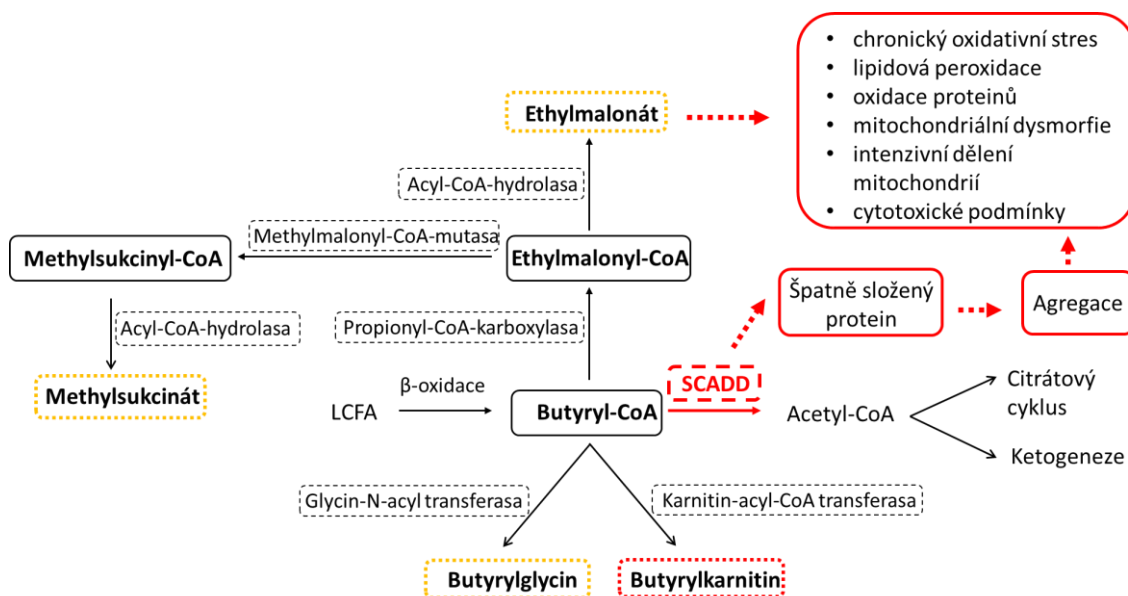


Obr. 6 Molekulární struktura lidské SCAD s vyznačením některých doposud popsanych mutací souvisejících se SCADD. Běžné mutace (modře), patogenní mutace (červeně) a patogenní deleční mutace (fialově). Obrázek autora vygenerován a upraven v programu PyMol, struktura byla stažena z databáze UniProt (kód P16219) a informace o mutacích byly převzaty z (Nochi *et al.*, 2017) a zdrojů uvedených v kapitole 2.1.4.3.2.

Zmíněné mutace byly nalezeny také u dalších pacientů (Corydon *et al.*, 2001; Tein *et al.*, 2008) a z molekulárních studií izolovaných mitochondrií vyplývá, že tyto a jim podobné mutace nezpůsobují změnu aktivního, či vazebného místa enzymu, nýbrž dochází k normální produkci a translokaci prekurzorového proteinu do mitochondrie a až následně je protein po neúspěšném složení proteolyticky degradován (Pedersen *et al.*, 2003; Schmidt *et al.*, 2011). Molekuly špatně složeného proteinu mohou také agregovat s dalšími proteiny v mitochondrii a zvyšovat koncentraci reaktivních kyslíkových radikálů, což má za následek chronický oxidační stres v buňce (Pedersen *et al.*, 2003; Olsen *et al.*, 2015)

2.2.2.3.3 Diagnostika a biomarkery onemocnění SCADD

Biochemické markery onemocnění SCADD zahrnují zvýšené koncentrace kyseliny ethylmalonové (EMA), methylsukcinátu a butyrylglycinu v moči a v plasmě je pozorována vyšší koncentrace butyrylkarnitinu (Corydon *et al.*, 1996). Methylsukcinát je v moči detekován především v případech metabolického stresu (hladovění, oxidační stres) jako produkt hydrolýzy methylmalonylu-CoA, který vzniká isomerizací ethylmalonylu-CoA za katalýzy methylmalonyl-CoA-mutasou (EC 5.4.99.2) (Bhala *et al.*, 1995) a shrnující schéma je uvedeno na obrázku (Obr.7). Mezi další metabolické parametry, které by měly být stanoveny pro jasnou diagnostiku SCADD, patří profil organických kyselin v moči, profil acylkarnitinů v plasmě a koncentrace karnitinu v plasmě (Jethva *et al.*, 2008). Ribes *et. al.* (1998) uvádějí, že se koncentrace mnohých biomarkerů zvyšuje až při stresových situacích (stres, hladovění, nemoc) a bez těchto stavů se metabolický profil jeví bez indikace SCADD. Samotný nálezn vysoké koncentrace EMA v moči nelze brát jako definitivní potvrzení diagnózy SCADD, protože existuje více onemocnění projevujících se ethylmalonovou acidurií jako například: EMA encefalopatie (Nowaczyk *et al.*, 1998) či glutarová acidurie druhého typu (Saral *et al.*, 2018).



Obr. 7 Schéma alternativních biochemických přeměn butyryl-CoA s vyznačenými patobiochemickými důsledky SCADD (v plných červených obdélnících). Příslušné enzymy jsou ohraničeny obdélníkem s přerušovanou čarou a dále jsou uvedeny metabolity zvýšené v moči (žluté obdélníky) a krvi (červený obdélník s přerušovanou čarou). Schéma je převzato, upraveno a doplněno dle (Nochi *et al.*, 2017). Detailní popis viz kapitoly 2.1.4.3.3 a 2.1.4.3.4.

2.2.2.3.4 Klinické projevy a patofyziologie onemocnění SCADD

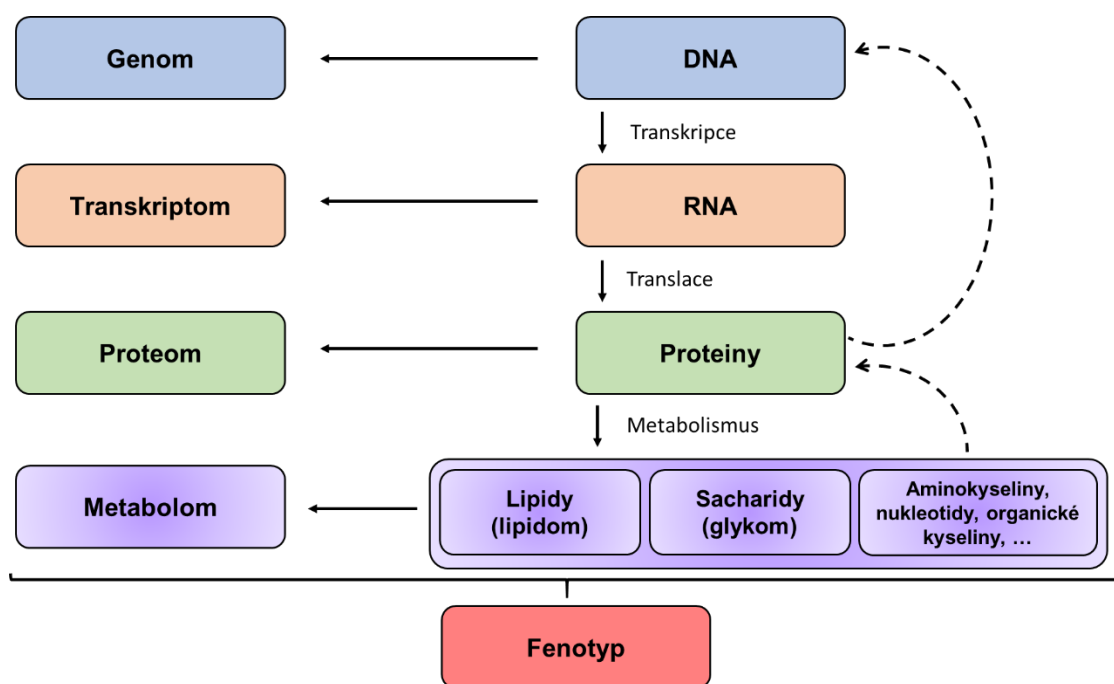
Klinické projevy SCADD jsou individuální a rozmanité, ale obecně je lze shrnout jako metabolickou acidózu, ketotickou hypoglykémii, letargii a epilepsii. Mezi obvyklé nálezy u pacientů s deficiencí enzymů zapojených do β -oxidace MK patří hypoketotická hypoglykémie, rhabdomyolýza či kardiomyopatie, nicméně tyto projevy nelze řadit za běžné u pacientů s onemocněním SCADD (Jethva *et al.*, 2008). Birkebaek *et al.* (2002) prezentují kazuistiku 14měsíčního chlapce (pacienta s onemocněním SCADD) s hypoglykemií, ale také ketonurií poukazující na to, že SCADD nemusí mít nutně vliv na tvorbu ketolátek. Je pravděpodobné, že β -oxidace mastných kyselin se středně dlouhým a dlouhým řetězcem poskytuje dostatek redukovaných ekvivalentů NADH a acetyl-CoA pro tvorbu ketolátek.

Dalším projevem odlišujícím SCADD od jiných poruch β -oxidace MK je opožděný vývoj pacientů (Bhala *et al.*, 1995). Spekuluje se, že klíčovým metabolitem způsobujícím patogenezi SCADD je právě jeden z markerů této choroby – kyselina ethylmalonová. EMA, která má vliv na fyziologické procesy na molekulární úrovni jako: inhibice aktivity elektronového transportního řetězce (*in vitro*) (Barschak *et al.*, 2006) či inhibice aktivity pouze mozkového isoenzymu kreatinkinasy (CK-1, EC 2.7.3.2) (Gregersen *et al.*, 1998) a zvýšená peroxidace lipidů v mozkové kůře a kosterním svalstvu (Schuck *et al.*, 2015). EMA neprostupuje hematoencefalickou bariérou, nicméně může vznikat z butyryl-CoA za katalýzy propionyl-CoA-karboxylasou (EC 6.4.1.3) a acyl-CoA-hydrolasou (EC 3.1.2.1) v astrocytech (Nochi *et al.*, 2017). Samotný butyrát prostupuje hematoencefalickou bariérou a při zvýšené koncentraci figuruje jako modulátor genové exprese inhibicí histondeacetylasy (Chen *et al.*, 2003). Všechny faktory zmíněné v tomto odstavci ukazují na komplexní příčinu opoždění neurologického vývoje novorozenců se SCADD.

2.3 Metabolomika

Metabolomika je vědní obor zabývající se metabolismem, tedy procesy spojenými se získáním energie, přeměnou látek a organizací těchto reakcí do vzájemně propojených metabolických drah. Metabolom je komplexní sada nízkomolekulárních látek (obvykle o hmotnosti nižší než 1000 Da), které se přímo účastní metabolické přeměny, přičemž se může jednat o látky extra- i intracelulární (Ivanisevic a Thomas, 2018). Genomika nám

dává informaci o tom, jaké geny mohou být exprimovány a co můžeme v organismu očekávat. Proteomika udává jaké geny (nesoucí informaci o proteinech) se exprimovaly a co se v buňce doopravdy vyskytuje za funkční či strukturní proteiny. Metabolomika nám však dává informaci o tom, co tyto exprimované funkční proteiny doopravdy metabolicky přeměnily (či transportovaly), případně zdali byly inhibovány. Studium metabolismu dostáváme informaci o aktuálním dění v buňce, jelikož aktuální přítomnost a koncentrace jednotlivých metabolitů neodráží pouze možnosti genové exprese, či přítomnost proteinů, ale informuje nás o tom, jaký mohla mutace genu, či environmentální faktory mít na aktuální stav v buňce vliv (Obr. 8). Metabolomika je z jednotlivých „omických“ přístupů nejkompexnější už jen z toho důvodu, že se nemůžeme spoléhat na 4 nukleotidy nebo 20 běžně se vyskytujících proteinogenních aminokyselin, ale nalézáme plejádu různě modifikovaných a navzájem konjugovaných metabolitů (Musilová a Glatz, 2011).



Obr. 8 Schéma „omických“ oborů poukazující na komplexní provázanost všech úrovní od DNA až po samotné projevy fenotypu. Metabolity mohou figurovat jako aktivátory/inhibitory proteinů a potažmo jako regulátory exprese genů. Obrázek autora.

2.3.1 Lipidomika

Jedno z nově se rozvíjejících odvětví metabolomiky představuje lipidomika – obor zabývající se kvalitativní a kvantitativní analýzou lipidů v biologických vzorcích. Díky

velmi intenzivnímu zdokonalování hmotnostních analyzátorů a separačních technik je možné metabolické analýzy ještě více konkretizovat na další příslušné „omické“ odvětví jako je již zmíněná lipidomika (Wenk, 2005), nebo glykomika (Hart a Copeland, 2010). Lipidy tvoří majoritní komponentu všech biologických membrán, slouží jako zásobárna energie pro organismus a dále také zastávají funkci signálních molekul. Přítomnost některých lipidů v biologických vzorcích nám může přinést podstatné informace o zdravotním stavu pacienta, průběhu léčby, nebo může dokonce sloužit jako biomarker určitého onemocnění. Lipidomický profil (či konkrétní lipidové individuum) může být charakteristický pro nejrůznější onemocnění jako: rakovina (Patel *et al.*, 2014), kardiovaskulární onemocnění (Kostara *et al.*, 2014; Dai *et al.*, 2018) či neuropsychiatrické poruchy (Panchal *et al.*, 2014; Lam *et al.*, 2014).

Velká strukturní variabilita lipidů může být značnou komplikací při vyhodnocování výsledků lipidomických analýz, a proto byl zaveden klasifikační systém, který rozděluje lipidy do několika tříd (viz kapitola 2.3.1.1) (Fahy *et al.*, 2005). Předpokládá se, že mezi lipidy lze řadit 10-100 tisíc chemických individuí (Wenk, 2010), přičemž v lidské plasmě bylo úspěšně kvantifikováno přes 500 lipidových individuí (Quehenberger *et al.*, 2010).

2.3.1.1 Chemická struktura lipidů a jejich klasifikace

Jako lipidy označujeme skupinu látek obecně hydrofobních a rozpustných v nevodných organických rozpouštědlech, nicméně nelze obecně definovat jejich chemickou strukturu. Na rozdíl od proteinů či nukleových kyselin jsou lipidy z chemické podstaty velmi heterogenní skupinou metabolitů a je pro ně potřeba dodržovat standardizovaný klasifikační systém. Fahy *et al.* (2005) představili klasifikační systém, který lipidy rozděluje do celkem osmi skupin a to na: acyly mastných kyselin (FA), glycerolipidy (GL), glycerofosfolipidy (GP), sfingolipidy (SP), sterolové lipidy (ST), prenolové lipidy (PR), sacharolipidy (SL) a polyketidy (PK). Každá z těchto skupin je dále rozdělena na několik tříd, které mohou být dále tříděny a vzhledem ke komplexní organizaci je toto členění zavedeno v online databázi LIPID MAPS Structure database (LMSD), která čítá 43659 unikátních lipidových struktur (k datu 16.11.2019) (Sud *et al.*, 2007).

Protože stěžejní metodou lipidomické analýzy je hmotností spektrometrie, byl za účelem srovnatelnosti použité nomenklatury v jednotlivých studiích zaveden zjednodušený systém pro tvorbu názvu lipidů (Liebisch *et al.*, 2013):

- První část názvu lipidu obsahuje zkratkovité označení skupiny, následuje číslo odpovídající celkovému počtu uhlíkových atomů a dvojtečka za níž je číslo představující počet dvojných vazeb.
- Konkretizace názvu lipidu musí odpovídat možnostem analýzy: například pozice dvojných vazeb na acylu mastné kyseliny se v názvu lipidu vyskytuje pouze tehdy, pokud je to v možnostech metody.
- Za zkratkou skupiny lipidu je v závorce uveden celkový počet uhlíků acylových řetězců a počet dvojných vazeb ve formátu (XX:YY) (počet uhlíků:počet dvojných vazeb). Pokud je známo kolik uhlíků a dvojných vazeb je na každém samostatném acylovém řetězci mění se formát na (XX:YY_XX:YY). Pokud je známa přesná pozice acylů pak se znak _ mění na / a acyl na pozici sn-1 je uveden před lomítkem a sn-2 za lomítkem (XX:YY/XX:YY) pro lipidy s třemi substituenty je za druhým lomítkem uvedena kompozice acylu na pozici sn-3 (XX:YY/XX:YY/XX:YY).
- Detailní struktura lipidu včetně stereochemie je v souladu s nomenklaturou databáze LIPID MAPS.

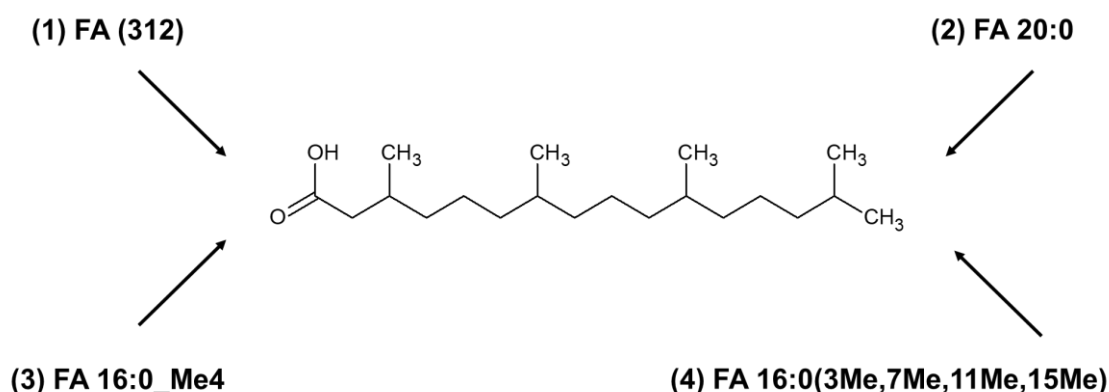
V následujících kapitolách bude rozebrána struktura lipidů v jednotlivých skupinách a jejich biochemická důležitost s ohledem na metabolismus a patobiochemii člověka.

2.3.1.1.1 Acyly mastných kyselin (FA)

Tato skupina představuje důležitý stavební kámen dalších skupin lipidů, v nichž se mastné kyseliny (FA) vážou převážně esterovou, amidovou, či etherovou vazbou. Mimo vázané FA zde řadíme mastné kyseliny ve volné formě (free fatty acid – FFA či pouze FA) a nalezneme zde také velké množství biologicky aktivních zástupců jako: leukotrieny, thromboxany, kyselinu lipoovou, biotin, kyselinu jasmonovou, acylkarnitiny, acyladenyláty a acylCoA (Fahy *et al.*, 2005).

Pokud je na mastné kyselině v neznámé pozici ketoskupina, zápis názvu by měl být uveden jako: FA XX:YY_O (O je označení pro ketoskupinu) a v případě přesně známé pozice ketoskupiny je název pozměněn na: FA XX:YY(ZO), kde Z odpovídá pořadí uhlíku, na němž se ketoskupina nachází. Obdobně se označují i další substituenty jako hydroxylová skupina (OH), nebo methylová skupina (Me). Označení mastné kyseliny se

může lišit podle toho, jak konkrétní informaci o její struktuře lze danou metodou zjistit (viz Obr. 9) (Liebisch *et al.*, 2013).

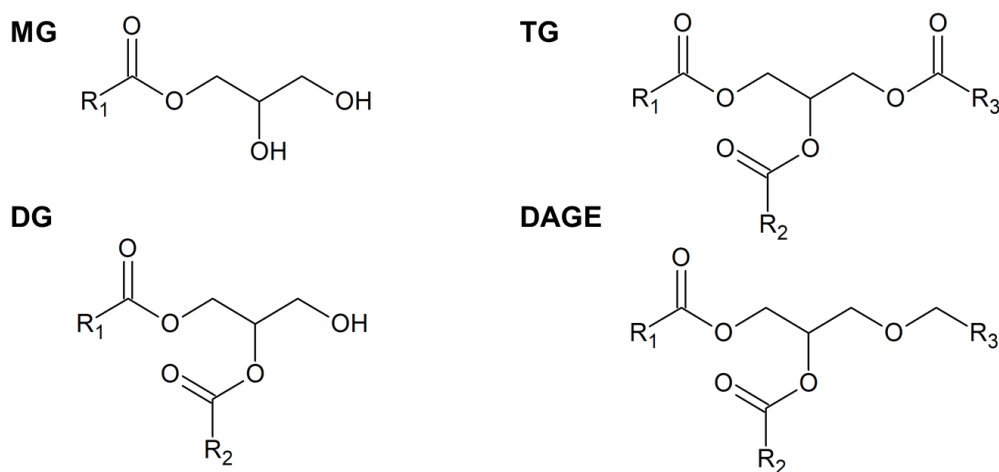


Obr. 9 Různá nomenklatura pro označení kyseliny 3,7,11,15-tetramethylhexadecanové podle pravidel dle (Fahy *et al.*, 2005) a (Liebisch *et al.*, 2013) se vzrůstající konkretizací názvu této kyseliny. (1) nejjednodušší specifikace FA například hmotnostním spektrometrem s nízkým rozlišením, kdy číslo v závorce odpovídá nominální hmotnosti lipidu v Da, (2) konkrétní specifikace počtu uhlíků a počtu dvojných vazeb FA, (3) informace o substituentech na řetězci FA, (4) kompletní název popisující strukturu FA dle databáze LIPID MAPS. Názvy 1-3 odpovídají také jiným FA a pouze název 4 zcela popisuje strukturu vyobrazené FA.

2.3.1.1.2 Glycerolipidy (GL)

Zástupci této skupiny lipidů představují základní složky zásobního tuku a dále se podílejí na buněčné signalizaci. Jedná se o všechny lipidy jejichž základní kostru tvoří glycerol, který je mono-, di-, či tri-substituován estery mastných kyselin (acylglyceroly), ethery mastných kyselin, či substituenty s jiným typem vazby. Nejdůležitější zástupce tvoří triacylglyceroly (TG), diacylglyceroly (DG) a monoacylglyceroly (MG) (Obr. 10). Mimo svou funkci jako molekuly energetické zásoby jsou triacylglyceroly spojeny s řadou metabolických a patobiochemických dějů jako je obezita, ateroskleróza, insulinová rezistence a kardiovaskulární choroby (Talayero a Sacks, 2012; Berglund *et al.*, 2012; Hegele *et al.*, 2014). Diacylglyceroly figurují jako sekundární poslové allosterickou aktivací proteinkinasy C (EC 2.7.11.13) (Newton, 1997), jsou spojovány s insulinovou resistencí (Timmers *et al.*, 2008) a slouží jako stavební kámen pro glycerofosfolipidy (kapitola 2.3.1.1.3) (Holmsen *et al.*, 1992). Monoacylglyceroly aktivují sekreci inkretinů ve střevě (Hansen *et al.*, 2011) a jsou intenzivně zkoumány pro potenciální terapeutické využití v léčbě obezity a střevního zánětu (Hansen a Vana, 2019). Pokud je jeden z esterů mastné kyseliny v TG nahrazen ethericky vázaným řetězcem vznikají

diacylglycerylethers (DAGE), které jsou terapeuticky zajímavé pro své imunitu stimulující, protirakovinné a další fyziologické účinky (Iannitti a Palmieri, 2010).

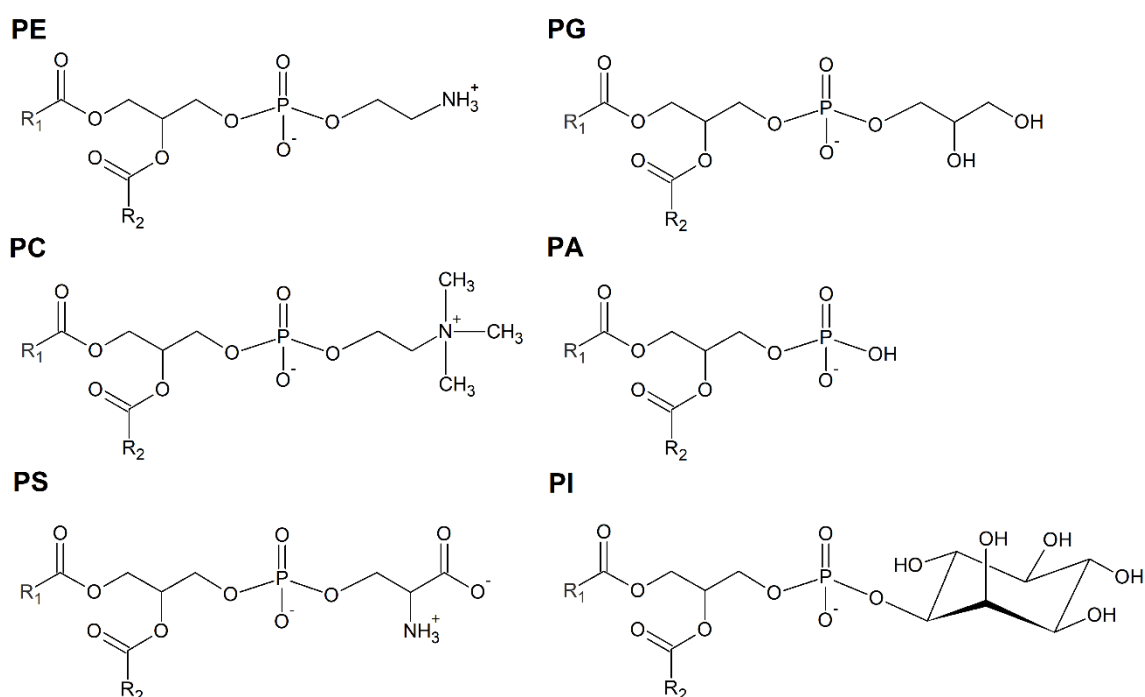


Obr. 10 Chemická struktura vybraných zástupců glycerolipidů (GL) zahrnující: monoacylglyceroly (MG), diacylglyceroly (DG), triacylglyceroly (TG) a diacylglycerylethery (DAGE). Obrázek autora inspirovaný strukturami v databázi LMSD (Sud et al., 2007).

2.3.1.1.3 Glycerofosfolipidy (GP)

Jedná se o nejpočetnější skupinu lipidů (obsahující 21 tříd a 117 podtříd), které na základě chemické struktury „polární hlavice“ rozlišujeme nejdůležitější zástupce: fosfatidylcholin (PC), fosfatidylethanolamin (PE), fosfatidylglycerol (PG), fosfatidylserin (PS) a fosfatidylinositol (PI) (Obr. 11). Glycerofosfolipidy představují základ všech buněčných membrán, jsou zapojeny v signálních drahách, regulují zánětlivé procesy a stále se objevují jejich další funkce v lidském organismu. Zatímco fosfatidylcholin a v menší míře fosfatidylethanolamin jsou přítomny ve všech buněčných membránách, kardiolipin je specifický výhradně pro mitochondriální membrány a sfingolipidy (SP; kapitola 2.3.1.1.4) pak nalézáme v membránách golgiho aparátu a endoplasmatického retikula. Nerovnoměrná distribuce fosfatidylserinů v plasmatické membráně (PM) působí celkovým záporným nábojem na vnitřní (cytosolické) straně PM, zatímco na vnější (extracelulární) straně se nachází neutrálně nabitý PC a SP. (van Meer *et al.*, 2008). Až 30 % šedé kůry mozkové je tvořeno 1-stearoyl-2-docosahexanoyl-sn-glycerofosfatidylserinem (PS 40:6, PS 18:0/22:6), přičemž jeho snižující se koncentrace v myelinových membránách souvisí se stárnocími či patologickými procesy v mozku a exogenní suplementace tohoto PS způsobila u

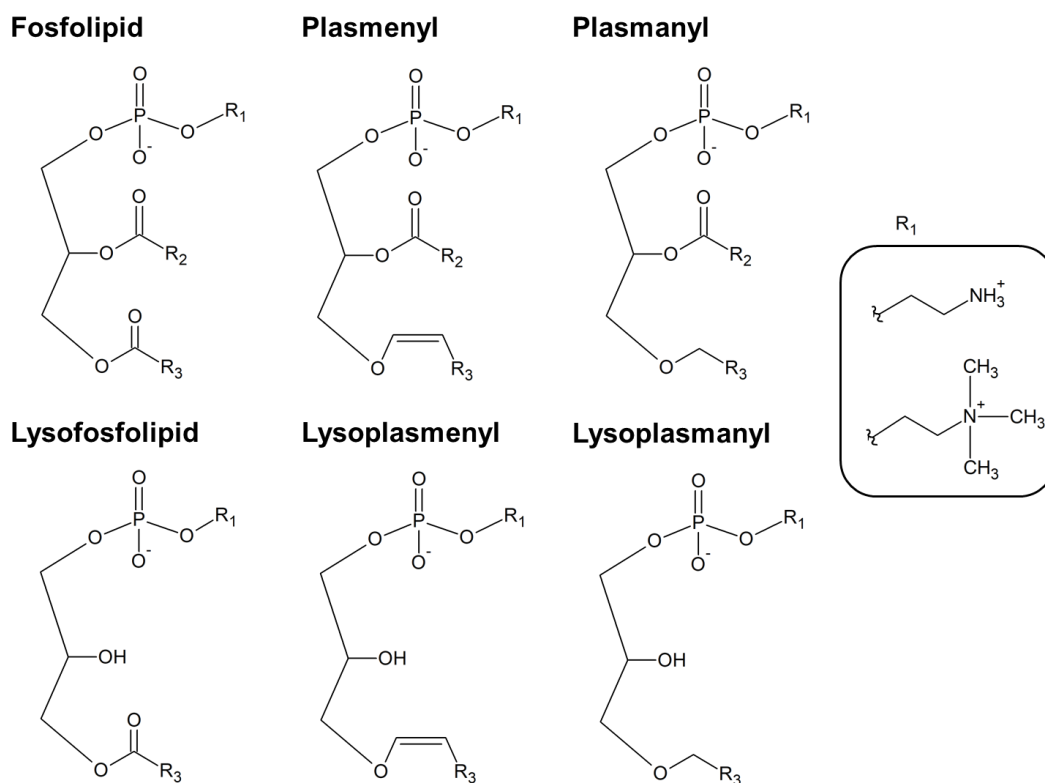
starších jedinců výrazné zlepšení v testech paměti, učení, verbálního projevu a pozornosti (Kato-Kataoka *et al.*, 2010; Vauzour *et al.*, 2017). Fosforylované PI figurují jako kotvící molekuly pro enzymy signálních kaskád na vnitřní straně PM a také se signalizace samy účastní štěpením na DG a inositol-1,4,5-trifosfát za katalýzy fosfolipázou C (EC 3.1.4.3), které dále fungují jako sekundární poslové. PE jsou prekursorem endogenního kanabinoidu anadamidu (Jin *et al.*, 2007) a účastní se procesů ferroptózy, což je specifický druh programované buněčné smrti s potenciálním využitím v alternativní léčbě rakoviny (Kagan *et al.*, 2017). PG jsou důležitou součástí plicního surfaktantu (Hallman a Gluck, 1976), ve kterém fungují jako protizánětlivá složka (Numata *et al.*, 2010) a v případech chronických zánětů PG snižují negativní vliv oxidativního stresu v mitochondriích inkorporací do vnitřní mitochondriální membrány (Chen *et al.*, 2018).



Obr. 11 Chemická struktura vybraných zástupců glycerofosfolipidů (GP) zahrnující: fosfatidylethanolaminy (PE), fosfatidylcholiny (PC), fosfatidylseriny (PS), fosfatidylglyceroly (PG), kyselina fosfatidová (PA) a fosfatidylinositoly (PI). Obrázek autora inspirovaný strukturami v databázi LMSD (Sud *et al.*, 2007).

Mimo GP s dvěma esterově vázanými acylovými řetězci se však hojně vyskytují také další typy vazeb řetězce na glycerolovou kostru. GP s ethericky vázaným alkylovým řetězcem v pozici sn-1 a esterově vázaným acylovým řetězcem v pozici sn-2 se nazývají plasmanyly a pokud je v pozici sn-1 ethericky navázána aleknylová skupina (vinyl-etherová vazba) hovoříme o plasmenylech. Obě skupiny se souborně nazývají

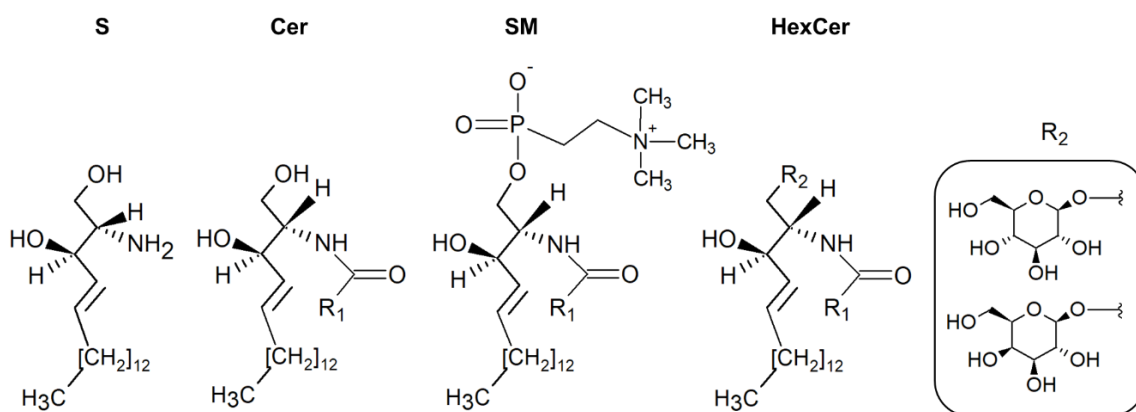
plasmalogeny a mezi nejčastější zástupce patří plasmenyl/plasmanyl-choliny/ethanolaminy (viz. Obr. 12) (Wanders a Brites, 2010). Plasmalogeny jsou důležité složky lipidových raftů, účastní se buněčné signalizace, fungují jako aktivátory destiček (Zimmerman *et al.*, 2002) a v nedávné době se prokázala asociace změny metabolismu plasmalogenů s vývojem rakoviny (Nagan *et al.*, 2003; Messias *et al.*, 2018). Hydrolýzou acylu v pozici sn-1 či sn-2 příslušného PC či PE vznikají lysofosfolipidy (LP), nejčastěji se jedná o lysofosfatidylcholiny (LPC) a lysofosfatidylethanolaminy (LPE) a dle typu vazby řetězce v pozici sn-1 rozlišujeme jejich plasmalogenové deriváty (viz. Obr. 12) (Liebisch *et al.*, 2013). LP jsou spojovány s vývojem zánětu (Rivera a Chun, 2008), obezity (del Bas *et al.*, 2016) a mohly by také sloužit jako biomarkery brzké aterosklerózy (Yan *et al.*, 2019)



Obr. 12 Chemická struktura vybraných zástupců plasmalogenů a lysofosfolipidů (LP) zahrnující: plasmenyl-ethanolamin/cholin (PE-P, PC-P), plasmanyl-ethanolamin/cholin (PE-O, PC-O), lysofosfatidylethanolaminy (LPE), lysofosfatidylcholiny (LPC), lysoplasmenyl-ethanolamin/cholin (LPE-P, LPC-P), plasmanyl-ethanolamin/cholin (LPE-O, LPC-O). Obrázek autora inspirovaný strukturami v databázi LMSD (Sud *et al.*, 2007).

2.3.1.1.4 Sfingolipidy (SP)

Základní strukturu sfingolipidů tvoří sfingoidní báze (alifatický aminoalkohol), která vzniká na membráně endoplasmatického retikula konjugací serinu s palmitoyl-CoA za katalýzy enzymem serinpalmitoyltransferasou 1 (EC 2.3.1.50) (Han *et al.*, 2009). Výsledný sfingosin je dále metabolicky modifikován acylací přes volnou aminoskupinu amidovou vazbou za vzniku ceramidů (Cer), fosfosfingolipidů – sfingomyelinů (SM; vazba kyseliny fosforečné a cholinu přes terminální hydroxyskupinu) a glykosfingolipidů – cerebrosidů (HexCer; vazba sacharidu přes terminální hydroxyskupinu) (Gordon, 2003). Sfingomyeliny se vyskytují v buněčných membránách, a to především v červených krvinkách (Liao *et al.*, 2018) a nervových buňkách (Ramstedt a Slotte, 2002) a jejich hydrolýzou za katalýzy enzymem sfingomyelinasou (EC 3.1.4.12) vznikají ceramidy, které se účastní signálních drah spojených s apoptózou, zánětlivými procesy a stresovými podmínkami (Obeid *et al.*, 1993; Hannun, 1996; Spiegel a Milstien, 2003). Cerebrosidy se dělí na dvě základní skupiny glukocerebrosidů a galaktocerebrosidů, přičemž druhé zmíněné jsou majoritní lipidovou komponentou myelinových membrán, kde zajišťují rychlost saltatorní kondukce nervových vzruchů (Neishabouri a Faisal, 2014).



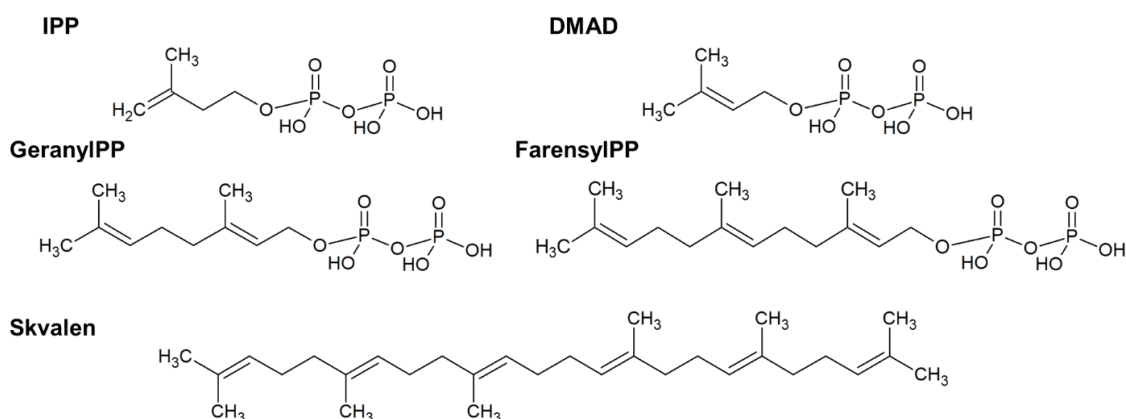
Obr. 13 Chemická struktura sfingolipidů: sfingosin (S), ceramidy (Cer), sfingomyeliny (SM), gluko/galaktocerebrosidy (HexCer). Obrázek autora inspirovaný strukturami v databázi LMSD (Sud *et al.*, 2007).

2.3.1.1.5 Prenolové lipidy (PR) a sterolové lipidy (ST)

Prenolové lipidy jsou rozděleny na základě počtu základních stavebních jednotek – pětiuhlíkatých prekurzorů isopentenylidifosfátu (či dimethylallyldifosfátu), ze kterých

jsou složeny. Isopentenyldifosfát a jeho izomer dimethylallyldifosfát vznikají z acetyl-CoA a acetoacetyl CoA mevalonátovou drahou (MVA) (Goodman a Popjak, 1960). Dále jsou pětiuhlíkaté prekurzory repetitivně připojovány příslušnými synthasami za vzniku geranyldifosfátu (C10) a farensyldifosfátu (C15). Kondenzací dvou molekul farensyldifosfátů za katalýzy skvalensynthasou (EC 2.5.1.21) vzniká skvalen (C30), jehož cyklizací, oxidací a další přestavbou vzniká cholesterol (Beytia et al., 1969; Kuzuyama a Seto, 2003).

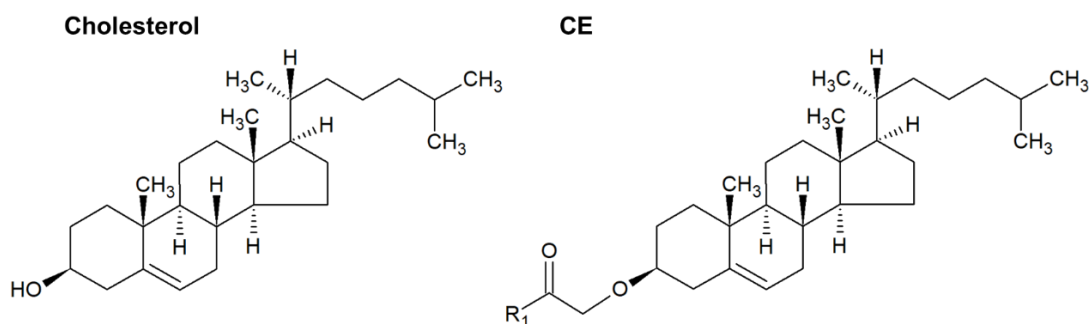
Prenolové lipidy jsou důležité v procesech prenylace proteinů za účelem jejich ukotvení v membráně (například skupina malých signálních GTPas z rodiny Rho a Ras) (Hodges-Loaiza *et al.*, 2011). Dále se do této skupiny lipidů řadí také chinony a hydrochinony (ubichinony, vitamin E, vitamin K) a dále také polyprenoly. Polyprenoly nalézáme jak u bakterií, u nichž se podílejí na syntéze extracelulárních polysacharidů (ve struktuře peptidoglykanu), tak u živočišných buněk, kde se setkáme například s dolicholy (membránové kotvy pro syntézu oligosacharidů) (Rip et al., 1985).



Obr. 14 Chemická struktura prenylových lipidů (PR): isopentenyldifosfát (IPP), dimethylallyldifosfát (DMAD, geranyldifosfát (GPP), farensyldifosfát (FPP), skvalen. Struktury byly staženy z databáze LMSD (Sud et al., 2007).

Steroly a deriváty cholesterolu se buněčných membránách podílejí na tvorbě lipidových ostrůvků – raftů, které mohou sloužit jako fixace pro membránové proteiny, například receptory spojené s diferenciací buňky, či s buněčným s transportním systémem (Brown a London, 1998). Dále v této skupině nacházíme zástupce steroidních hormonů jako C₁₈ estrogény, C₁₉ androgeny (zde řadíme testosteron a androsteron) a C₂₁ (progesterony, glukokortikoidy a mineralokortikoidy) (Tsai a Omalley, 1994). Dalšími neopomenutelnými zástupci této skupiny jsou sekosteroidy (vitamin D) a žlučové kyseliny. Připojením acylového řetězce FA esterovou vazbou přes hydroxyskupinu

cholesterolu vznikají cholesterylestery (CE), jejichž metabolismus je spojován s uskladněním cholesterolu v buňce, ale také s patobiochemickými mechanizmy kardiovaskulárních chorob a rakoviny (Tosi a Tugnoli, 2005; Gerl *et al.*, 2018).



Obr. 15 Chemická struktura cholesterolu a cholesterylesteru (CE). Obrázek autora inspirovaný strukturami v databázi LMSD (Sud *et al.*, 2007).

2.3.1.1.6 Sacharolipidy (SL) a polyketidy (PK)

V sacharolipidech je glycerol nahrazen sacharidem, na jehož hydroxylové skupiny jsou navázány zbytky mastných kyselin, či jiných derivátů (Fahy *et al.*, 2005). Za jedny z nejznámějších sacharolipidů lze považovat acylované glukosaminy – prekursor lipidu A, který slouží jako kotvicí komponenta lipopolysacharidů ve vnější membráně gram-negativních bakterií (Raetz a Whitfield, 2002).

Polyketidy představují nejrůznorodější skupinu lipidů z pohledu struktury a také z toho důvodu, že do této kategorie látek spadají rovněž polyethery, polyfenoly, makrolidy a další metabolity pocházející z jednoduchého prekursoru – kyseliny octové. Lidský metabolismus není schopen syntetizovat složité polyketidové lipidy, ale hrají pro něj důležitou roli jako farmaceutika: antibiotika, cytostatika, anticholesteremika, a další (Hertweck, 2009). Existují taky endogenní polyketidy syntetizované symbiotickými organismy střevní mikroflóry, které podléhají intenzivnímu výzkumu (Donia a Fischbach, 2015; Garcia-Gutierrez *et al.*, 2019).

2.4 Metody lipidomické analýzy

První pokusy o kvantitativní popis lipidomu se datují více než čtyřicet let zpátky, kdy byly analýzou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s UV detekcí separovány a analyzovány fosfolipidy, volné mastné kyseliny a lysofosfolipidy (Cooper a Anders, 1975; Gross a Sobel, 1980). Tyto techniky byly časově náročné a přinášely významné

kumulativní odchylky díky vícezkrokové přípravě a separaci a v neposlední řadě se potýkaly s nízkou citlivostí. V dnešní době patří mezi hlavní analytickou techniku v lipidomice hmotnostní spektrometrie (viz kapitola 2.4.3) obvykle ve spojení s kapalinovou či plynovou chromatografií zajišťující efektivní separaci komplexních lipidových směsí (viz kapitola 2.4.2) (Holcapek *et al.*, 2018). Potenciální využití některých technik jako nukleární magnetické rezonance (NMR) (Li *et al.*, 2017), Ramanovy spektroskopie (RS) a infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací (FT-IR) (Matthäus *et al.*, 2012) je také diskutováno především díky nedestruktivní analýze vzorku (Jurowski *et al.*, 2017b). Důležitým předpokladem pro lipidomickou analýzu je efektivní a selektivní extrakční technika přípravy vzorku (viz kapitola 2.4.1).

2.4.1 Extrakční techniky v lipidomické analýze

Příprava lipidového extraktu o dostatečné čistotě a koncentraci je kritickým krokem lipidomické analýzy. Od počátků studia lipidů bylo představeno velké množství extrakčních protokolů sestávajících se obvykle ze dvou kroků: a) přidavek extrakčního činidla dobře mísitelného se vzorkem (předpokládáme-li obsah vody ve vzorku), což zaručí dostatečnou interakci mezi rozpouštědlem a matricí vzorku, b) přidavek organického činidla či jeho roztoku za vzniku dvou fází za účelem separace lipidové frakce (organická fáze) od ostatních složek (vodná fáze). Mezi dobře popsané a v publikacích se vyskytující protokoly patří extrakční systémy: $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ (Folch *et al.*, 1957; Bligh a Dyer, 1959), Hexan:isopropanol: H_2O (Hara a Radin, 1978) a v nedávné době taky methyl-terc-butylether(MTBE): $\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ (Matyash *et al.*, 2008). V lipidomických publikacích se ohledně poměrů jednotlivých složek extrakčních systémů nedochází k obecnému konsensu a extrakční efektivita těchto systémů se neustále porovnává (Jurowski *et al.*, 2017a).

Jako srovnatelnou alternativou k dvoufázovým extrakčním systémům se v nedávné době osvědčil jednofázový systém isopropanol(IPA): H_2O a to především díky snadnému provedení, nízké toxicitě (v porovnání s chlorovanými alkany), nízkými ekonomickými a časovými náklady, přičemž hodnoty návratnosti jsou pro všechny skupiny lipidů srovnatelné ne-li lepší než konvenčními extrakčními systémy (Sarafian *et al.*, 2014; Calderon *et al.*, 2019). Použití roztoků IPA je někdy kritizováno, jelikož extrakce jednofázovým systémem není dostatečně specifická, nicméně za použití chromatografické separace s reversní fází eluují polární interferenty v první minutě

analýzy, avšak výběr extrakčního systému se odvíjí také od čistoty samotného vzorku (Jurowski *et al.*, 2017a).

2.4.2 Separační techniky v lipidomické analýze

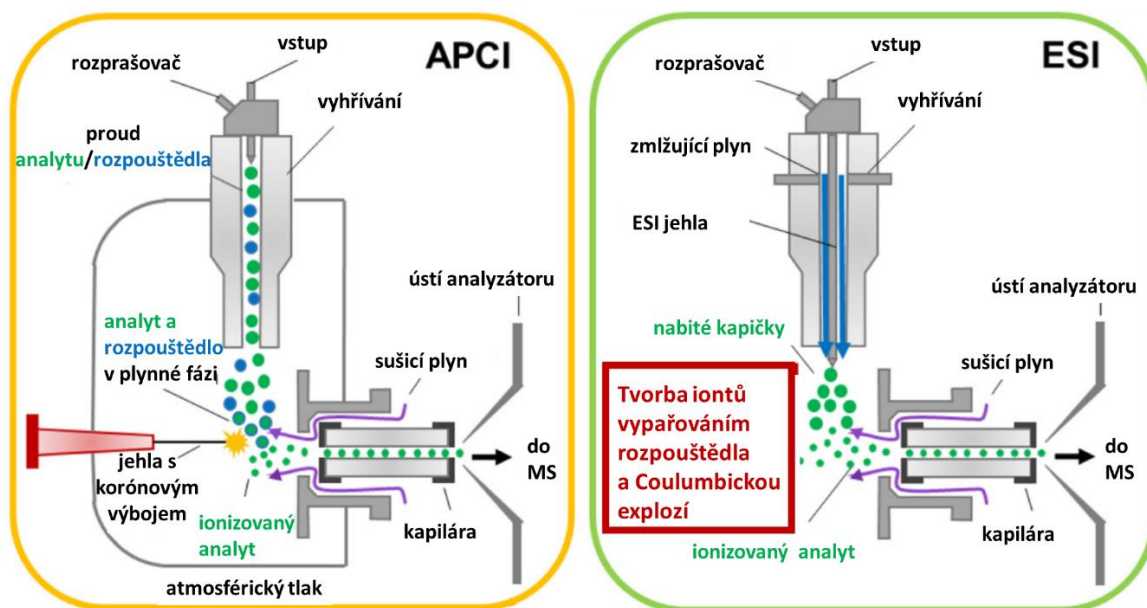
K separaci lipidů lze využít plynovou chromatografii například k analýze celkových mastných kyselin za předpokladu jejich derivatizace na příslušné estery s tou nevýhodou, že tímto preparativním krokem dochází ke ztrátě informace o intaktních lipidech (Quehenberger *et al.*, 2011). Chromatografie na tenké vrstvě je využívána především k preparativním účelům a izolaci lipidových tříd, anebo s následným spojením se zobrazovací hmotnostní spektrometrií (Goto-Inoue *et al.*, 2009). Klíčovou separační technikou v lipidomické analýze je kapalinová chromatografie, která nevyžaduje agresivní podmínky přípravy vzorku a díky velké variabilitě využívaných kolon lze docílit separace „ušité na míru“ potřebám analýzy. Nejčastěji jsou využívány kolony s reversní fází (RP), které umožňují separaci lipidů na základě délky jejich acylových skupin a dále na základě počtu a pozic dvojných vazeb (Ovčáčiková *et al.*, 2016). Jinou strategií je využití kolon na principu hydrofilních interakcí (HILIC), které separují lipidy na základě lipidových tříd (dle charakteru „polárních hlavic“ lipidů) a jsou také vhodné pro kvantitativní analýzu (Cífková *et al.*, 2015). Díky různým možnostem RP a HILIC kolon lze využít oba přístupy ve dvoudimenzionálním uspořádání (Rampler *et al.*, 2018; Pham *et al.*, 2019). Velké naděje se vkládají do superkritické fluidní chromatografie (SFC) za využití oxidu uhličitého jako mobilní fáze, nicméně i přes výhody rychlé analýzy, vysoké separační efektivity a nízké spotřeby organické mobilní fáze se aplikace SFC potýká s problémy se sensitivitou a rozšiřováním píků (Lísa a Holčápek, 2015; Chollet *et al.*, 2019).

2.4.3 Hmotnostní spektrometrie v lipidomické analýze

Zásadní průlom v lipidomické analýze přinesla hmotnostní spektrometrie, která spočívá v určení poměru hmotnosti ku náboji (m/z) ionizovaných atomů a molekul v elektromagnetickém poli ve vakuu. Analyty musí být nejprve ionizovány v plynné fázi, k čemuž slouží iontové zdroje. Kladné a záporné ionty mohou vzniknout ionizací samotné molekuly (molekulární ionty) anebo vznikem aduktů s doprovodnými složkami vzorku (aduktové ionty) (Gross, 2011). Mezi nejčastější iontové zdroje využívané v lipidomice

patří měkké ionizační techniky: ionizace elektrosprejem (ESI) a chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI) (schéma viz Obr. 16) (Gross, 2017b; Han a Gross, 2003).

Princip ESI spočívá v transformaci proudu kapaliny (z LC nebo přímé injekce) do aerosolu nabitých kapiček při průchodu nabitou elektrodou (o napětí až 5 kV) ve tvaru duté jehly. Na hrotu jehly vznikají jednotlivé nabité kapičky, které se díky proudu sušícího plynu (N_2) vypařují a tím dochází k zvyšování poměru náboje k povrchu kapičky. Jakmile tento poměr překoná určitou hranici dochází k repulzi – Coulombické explozi, při níž vznikají ještě menší kapičky a při opakování tohoto procesu i jednotlivé nabité atomy a molekuly (Siuzdak, 2004). Proud kapiček a posléze iontů je usměřován do hmotnostního analyzátoru zmlžujícím plynem a elektrostatickými silami, proti nimž proudí sušící plyn v ortogonálním uspořádání (Hoffmann a Stroobant, 2007). ESI je kompatibilní s průtoky do 1 ml/min a vyznačuje se vysokou citlivostí ve smyslu koncentrace analytu. Jako negativum ESI lze uvést vliv matrice na tvorbu iontů, k němuž dochází při koeluci konkurenčních látek ovlivňujících efektivitu ionizace a tvorbu kapiček, což vyústí v potlačení nebo podpoření (ion suppression / enhancement) tvorby iontů (Mei *et al.*, 2003). Tento efekt není tak zásadní při APCI díky jinému mechanismu ionizace. Při APCI se proud kapaliny zmlžuje a prochází vyhřívanou keramickou trubicí. Plyn následně putuje k jehle o vysokém napětí, kde dochází ke korónovému výboji a vzniku ionizované plasmy, ve které se přenáší náboj na analyt (Gross, 2011). APCI vykazuje lepší ionizační efektivitu pro nepolární látky o molekulové hmotnosti do 1,5 kDa a vysokou citlivost ve smyslu hmotnosti analytu (Trufelli *et al.*, 2011).

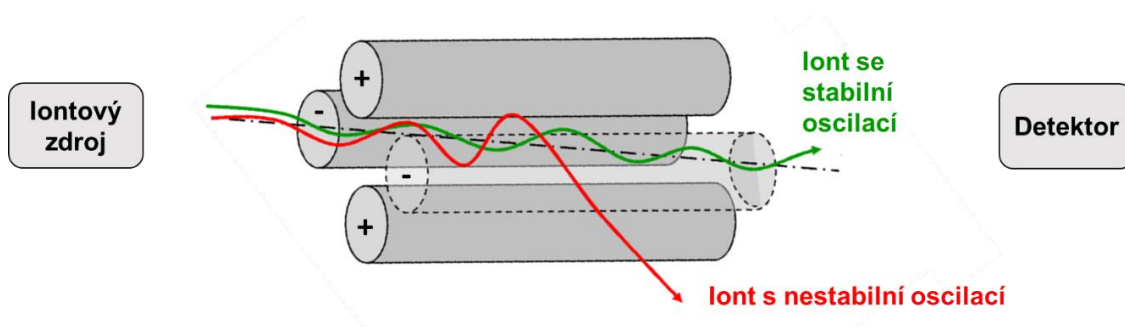


Obr. 16 Schéma ionizace elektrosprejem (ESI) a chemické ionizace za atmosférického tlaku (APCI) s detailním popisem v kapitole 2.4.3 (výše). Obrázek byl převzat a upraven dle (Parr et al., 2018).

Od průlomu hmotnostní spektrometrie a měkkých ionizačních technik se přístupy v lipidomické analýze rozdělily do několika odvětví, a to především na cílenou a necílenou analýzu, kterým budou věnovány následující kapitoly. V následujících kapitolách budou popsány hmotnostní analyzátoři, které byly využity v experimentální části této práce.

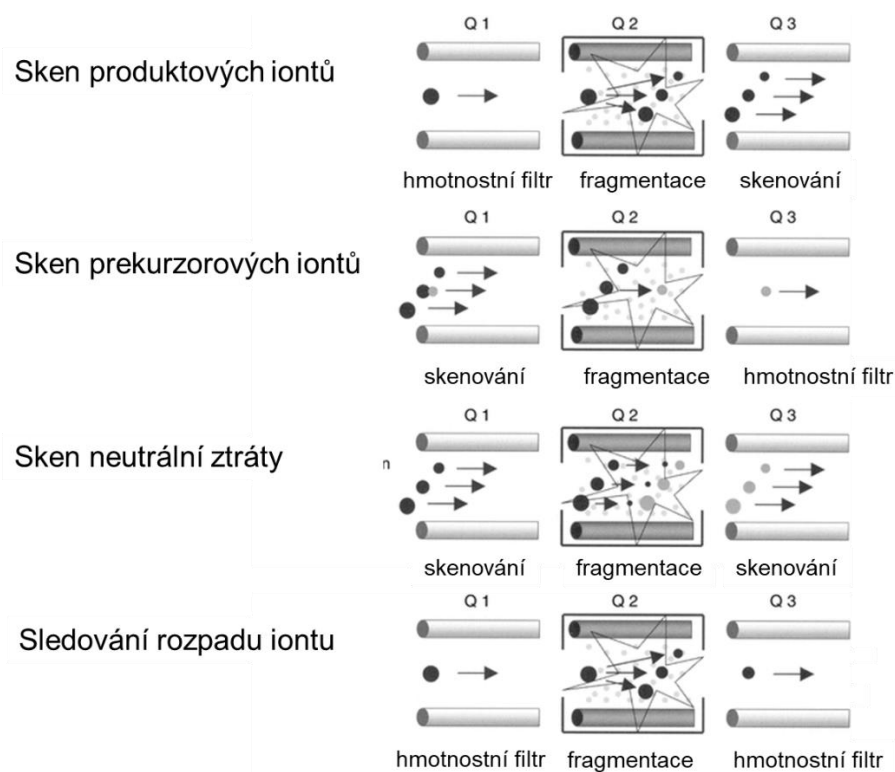
2.4.3.1 Kvadrupólové analyzátoři

Kvadrupólový analyzátoř se skládá ze čtyř paralelních kovových tyčí ve čtvercovém uspořádání, na které je přivedeno stejnosměrné napětí (DC) (kladné a záporné vždy na protilehlých tyčích) a na všechny tyče je superponováno vysokofrekvenční střídavé napětí (RF). Ionty procházející kvadrupólem interagují s vytvořeným elektromagnetickým polem a oscilují, přičemž v určitý časový okamžik je trajektorie oscilace stabilní jen pro ionty o určitém m/z a ty poté míří dále do detektoru. Ionty nevyhovující parametrům kvadrupólu mají nestabilní trajektorii oscilace a jsou zachyceny na některé z tyčí kvadrupólu (viz Obr. 17) (Gross, 2011).



Obr. 17 Schéma kvadrupólu s vyznačenou trajektorií iontu vyhovujícímu parametrům DC a RF pro stabilní oscilaci (zeleně) a iontu s nestabilní oscilací (červeně). Obrázek byl převzat a upraven dle (Downard, 2007).

Trojité kvadrupól se skládá ze tří kvadrupólových analyzátorů v sekvenčním uspořádání, kde prostřední kvadrupól slouží jako kolizní cela, v níž je možné provádět fragmentace interakcí urychlených iontů s kolizním plynem za vzniku produktových iontů. Prekursorové ionty z prvního kvadrupólu jsou v kolizní cele urychleny a tento parametr – kolizní energie (CE), je optimálně nastaven pro každý iont či skupinu iontů zvlášť. Trojitý kvadrupól může pracovat v několika módech v závislosti na tom, zdali první a třetí kvadrupól fungují ve skenovacím režimu nebo jako hmotnostní filtr (na základě parametrů DC a RF). Jednotlivé módy jsou detailně popsány na obrázku (Obr. 20). Mezi výhody trojitého kvadrupólu patří vysoká citlivost, široký lineární dynamický rozsah, vysoká rychlost měření, ale nevýhodou je nízké rozlišení hodnot m/z (obvykle v desetinách Da) (Yost a Enke, 1978; Gross, 2011).



Obr. 18 Přehled jednotlivých módů, ve kterých může pracovat trojitý kvadrupól. Sken produktových iontů: první kvadrupól (Q1) propouští iont o definovaném m/z a po fragmentaci se v Q2 skenují produkty této fragmentace v určitém rozsahu m/z . Sken prekurzorových iontů: Q1 skenuje a propouští všechny ionty, ze kterých se po fragmentaci ve Q2 filtruje právě jeden specifický fragment. Sken neutrální ztráty: Q1 i Q2 operují ve skenovacím módu a sleduje se změna m/z jednoho iontu po fragmentaci díky ztrátě neutrálního fragmentu. Sledování rozpadu iontu: Q1 filtruje iont o definovaném m/z a po fragmentaci je v Q2 sledován právě jeden fragment, přičemž tento hmotnostní přechod je důležitým kvalitativním parametrem pro citlivou kvantifikaci metabolitů. Obrázek byl převzat a upraven dle (Gross, 2017a).

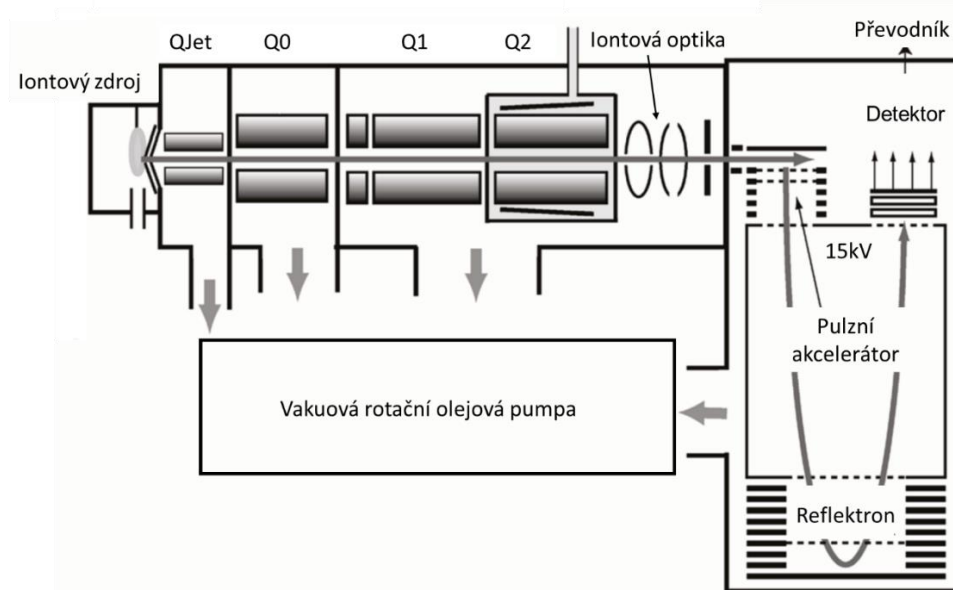
2.4.3.2 Hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením

Rozlišení hmotnostních analyzátorů spočívá v jejich schopnosti od sebe rozlišit dva píky o rozdílné hodnotě m/z a lze jej definovat jako šířku píku v polovině jeho maximální výšky (full width at half maximum – FWHM). Mezi analyzátoři s vysokým rozlišením (high resolution mass spectrometers – HRMS) řadíme iontový rezonanční cyklotron s Fourierovou transformací (FTICR), elektrostatickou orbitální past (Orbitrap) a také vysokorozlišující průletový analyzátor s dobou letu (HRTOF, či QTOF) (Pleil a Isaacs, 2016). U FTICR dosahujeme rozlišení v milionech FWHM, Orbitrap dosahuje obvykle sta tisíc až půl milionu FWHM a u analyzátoru QTOF lze měřit s rozlišením desítek až sta tisíc FWHM. HRMS mají ještě jednu nepostradatelnou vlastnost, a to měření přesné hmotnosti iontu, které je stěžejní pro identifikaci látek o shodné hodnotě nominální hmotnosti. Pomocí HRMS jsme schopni stanovit hmotnost s přesností na jednotky ppm

(obvykle mezi 2-5 ppm), což v praxi znamená měření hmotnosti iontu na desetitisíciny daltonů (Olsen *et al.*, 2005). S takto přesným měřením hmotnosti lze od sebe odlišit jednotlivé izobary, tedy látky o shodné průměrné (či nominální) hmotnosti, ale s různými sumárními vzorci (Stock, 2017).

2.4.3.2.1 Analyzátor doby letu s vysokým rozlišením (QTOF)

Analyzátor doby letu s vysokým rozlišením se skládá ze dvou kvadrupólů (pomineme-li další kvadrupóly určené pouze k usměrnění toku iontů), kde první kvadrupól (Q_1) funguje jako hmotnostní filtr a druhý kvadrupól (Q_2) funguje jako kolizní cela. Oba kvadrupóly mohou fungovat také v otevřeném módu, který dovolí průchod všech iontů až do analyzátoru doby letu (TOF). Princip analyzátoru je založen na určení doby letu iontu, který byl akcelerován elektrickým polem do vakuovaného analyzátoru. Hodnota m/z je následně spočtena z doby letu a délky trajektorie k detektoru, přičemž pro ionty s větším m/z bude doba letu delší než pro ionty s nižším m/z (Kinsel, 1998). Ionty při pulsní akceleraci vykazují kinetickou a prostorovou inkohereci, kvůli níž mohou ionty o stejném m/z dosahovat jiné doby letu. Kvůli těmto jevům je QTOF opatřen reflektronem, který funguje jako iontové zrcadlo obracející směr trajektorie o téměř 180° , přičemž rozdílné kinetické energie iontů se srovnávají různou hloubkou dopadu a následného odrazu od reflektronu (Scherer *et al.*, 2006).

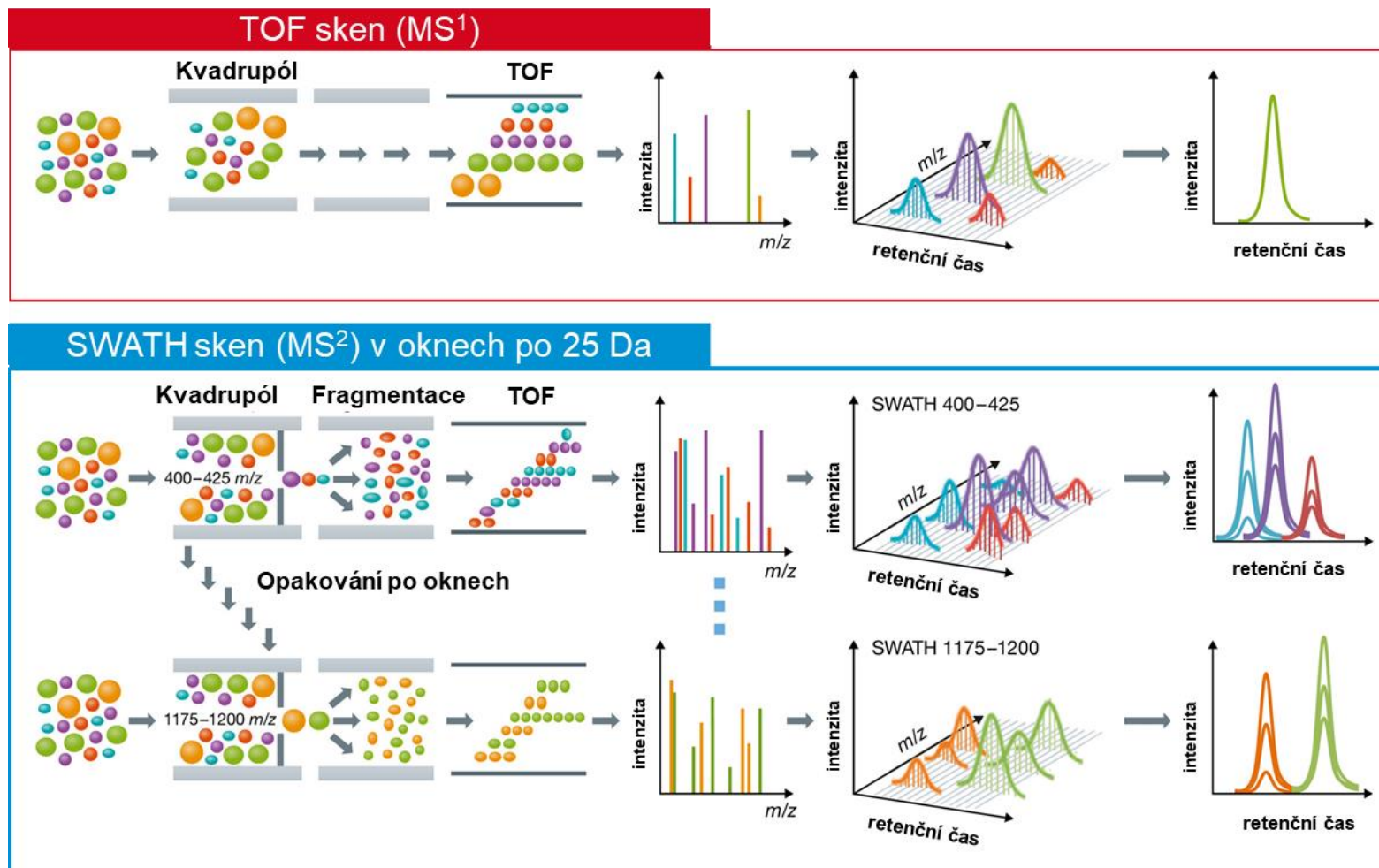


Obr. 19 Schéma analyzátor doby letu s vysokým rozlišením (QTOF) dle specifikace konkrétního přístroje TripleTOF 5600 (Sciex). QJet a Q0 jsou kvadrupóly usměrňující tok iontů. Šedé široké šipky ukazují směr odvodu plynu k tvorbě vakua. Detailní popis viz výše. Obrázek převzat a upraven dle (Andrews *et al.*, 2011)

Jedna ze strategií využití QTOF pro necílenou lipidomickou analýzu (kapitola 2.4.3.4) spočívá na datově závislé analýze (data-dependent acquisition – DDA). DDA funguje jako dynamický sken produktových iontů, který je iniciován po dosažení přednastavených kritérií experimentu. Během analýzy propouští kvadrupóly všechny ionty, které jsou analyzovány v TOF, avšak jakmile určitý iont nebo ionty překročí definovanou hranici intenzity, dojde k přepnutí Q_1 do módu hmotnostního filtru a q_2 do módu kolizní cely. Pro abundantní ionty bude výsledné hmotnostní spektrum obsahovat také informaci o fragmentačním hmotnostním spektru (MS^2) (Decaestecker *et al.*, 2000). Nevýhodou tohoto přístupu je ztráta některých potenciálně relevantních prekurzorových iontů o nízké intenzitě.

Další přístupem je datově nezávislá analýza (data-independent acquisition, DIA), která umožňuje globální fragmentaci všech prekurzorových iontů. Jednou z možností je tzv. MS^E přístup, ve kterém je provedena jedna TOF-MS analýza s nízkou kolizní energií (CE) (detekce prekurzorů) na q_2 a druhá s vysokou CE (detekce fragmentů) (Wilson *et al.*, 2005). Tento přístup generuje složitá kompozitní hmotnostní spektra a je závislý na efektivní a reprodukovatelné chromatografické separaci, bez níž výsledná spektra vyžadují dekonvoluční úpravu.

V poslední době se osvědčila datově nezávislá metoda SWATH (sequential windowed data independent acquisition of total high resolution mass spectra). Nejprve je proveden TOF-MS sken, ve kterém kvadrupóly propouštějí všechny ionty (detekce prekurzorů). Další sken je rozdělen do několika experimentů, v nichž je celá škála m/z rozdělena na menší okna o 5-30 Da. Kvadrupól Q_1 funguje jako hmotnostní filtr, který propouští ionty v oblasti m/z daného hmotnostního rozmezí a propouští je dále do kolizní cely q_2 a TOF analyzátoru (Hopfgartner *et al.*, 2012). Využívá se měřicí rychlosti QTOF, kdy celkový čas prekurzorového skenu a SWATH MS-MS skenů trvá méně než 1 sekundu (podle počtu oken a akumulací doby), což zajišťuje dostatečné množství bodů na jeden pík. K ideálnímu množství a rozmezí jednotlivých hmotnostních oken reflektující množství iontů v daném rozsahu m/z lze využít bioinformatický software jako swathTUNER (Zhang *et al.*, 2015). Metoda SWATH generuje obsáhlá MS a MS/MS spektra, z nichž lze extrahovat iontové chromatogramy (EIC), což je plně využitelné pro citlivou kvantifikaci analytů a poskytuje lepší identifikaci a pokrytí analytů než metody DDA a ostatní DIA přístupy (Álvarez-Ruiz a Picó, 2019). Přiřazení správných fragmentů k prekurzorovým iontům je docíleno dekonvolucí pomocí příslušného software jako například MS-DIAL (viz kapitola 2.3.3.1).



Obr. 20 Schéma průběhu datově nezávislé metody SWATH. V prvním skenu (červený obdélník) propouštějí oba kvadrupóly ionty do TOF (prekurzorový sken). Následně probíhá SWATH sken (modrý obdélník), kde jsou ionty po rozmezech (oknech) fragmentovány a analyzovány v TOF (produktový sken). Detailní popis je uveden výše. Obrázek byl převzat a upraven dle (Ludwig et al., 2018)

2.4.3.3 Cílená lipidomická analýza

V metodách cílené lipidomické analýzy je informace o lipidech zájmu předefinovaná, například jako hodnota hmotnosti ku náboji (m/z) prekurzorového iontu a m/z fragmentu tohoto iontu (sledování rozpadu ionu). Velmi často se využívá kapalinové chromatografie ve spojení s tandemovou hmotností spektrometrií LC-MS/MS, přičemž zlatým standardem je hmotnostní analyzátor typu trojitý kvadrupól (QqQ) (Lu *et al.*, 2008).

K tomu abychom mohli lipidy analyzovat cíleně pomocí hmotnostní spektrometrie, je nutné znát m/z jejich prekurzorových iontů a specifických fragmentů, přičemž tyto parametry lze zjistit fragmentačními experimenty se standardy lipidů, výpočty *in silico* nebo necílenou analýzou. V této práci je cílená lipidomická metoda převzata od (Xuan *et al.*, 2018), kteří pomocí necílené analýzy HRMS identifikovali ve vzorcích tkání (myší mozek a játra), plasem a sér přes 1463 lipidových individuí (anotace byla provedena pomocí software LipidSearch) včetně jejich MS^2 spekter. Z těchto informací byl vytvořen soubor lipidových iontových párů (prekurzoru a produktu) a tento seznam byl doplněn o další predikované (a v biologických tkáních se vyskytující) lipidy *in silico*, přičemž takto bylo charakterizováno celkem 3377 lipidových iontových párů (2846 v pozitivním módu a 531 v negativním módu). Vzhledem k faktu, že každý charakterizovaný lipidový iontový pár představuje sumu několika možných strukturních variant (délka a kombinace acylových řetězců, poloha dvojných vazeb), bylo autory popsáno přibližně 7000 lipidových struktur spadajících do 19 lipidových podtříd. Informace z necílené metabolické analýzy byly následně použity na cílenou identifikaci lipidů pomocí LC-MS(QqQ).

2.4.3.4 Necílená lipidomická analýza

Necílený přístup se zaměřuje na identifikaci (a semikvantifikaci) co největšího množství metabolitů/lipidů (features) a jedná se o obsáhlou analýzou, kterou získáme profil jednotlivých features v daném vzorku. Profily vzorků zájmu (například pacientů) se následně porovnávají s profily vzorků kontrolních a na základě relativních změn mezi profily lze utvářet hypotézy (Schrimpe-Rutledge *et al.*, 2016). Informace získané necíleným přístupem lze následně uplatnit v cílené analýze (viz kapitola 2.4.3.3).

Lipidy jsou identifikovány na základě m/z prekurzorového iontu a na základě hmotnostního spektra fragmentů tohoto iontu (MS^2), nebo libovolného množství dalších

fragmentačních experimentů (MSⁿ). Pokud je vzorek nejprve separován kapalinovou chromatografií, dostáváme další parametr – retenční čas, který může usnadnit identifikaci. Hmotnostní spektra a další parametry lze následně porovnat s databází a vyhodnotit o jaký lipid se jedná (Contrepolis *et al.*, 2018). Pro necílenou lipidomiku byly navrženy různé software, například MS-DIAL, který umožňuje srovnání hmotnostních spekter s *in silico* databází lipidů, fragmentů a retenčních časů a na základě uživatelem nastavených parametrů provádí identifikaci lipidů (Tsugawa *et al.*, 2015). Téměř nezbytné je použití hmotnostního analyzátoru s vysokým rozlišením, který usnadňuje identifikaci lipidů díky velmi přesnému stanovení m/z.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiál

3.1.1 Chemikálie

Acetonitril (MeCN, Ultra LC-MS grade, Carl Roth, Karlsruhe, Německo)

Methanol (MeOH, Ultra LC-MS grade, Carl Roth, Karlsruhe, Německo)

Methyl terc-butyl ether (MTBE, Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA)

2-propanol (IPA, Ultra LC-MS grade, Carl Roth, Karlsruhe, Německo)

Kyselina mravenčí (98%, w/v, ACS grade, Carl Roth, Karlsruhe, Německo)

Mravenčan amonný (s, 99% p.a., Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA)

Octan amonný (s, 99% p.a., Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA)

Směs standardů SPLASH® LIPIDOMIX® Mass Spec Standard (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL, USA) (přesné složení a koncentrace jednotlivých deuterovaných standardů je uvedena v příloze (Příloha 1).

Směs standardů EquiSPLASH® LIPIDOMIX® Mass Spec Standard (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL, USA) (přesné složení a koncentrace jednotlivých deuterovaných standardů je uvedena v příloze (Příloha 2).

Deuterovaný standard kyseliny arachidonové (d11) (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA)

Deuterovaný standard butyrylkarnitinu (d3) a palmitoyl karnitinu (d3) (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA)

Deionizovaná voda (připravena v laboratoři systémem ELGA, LabWater, Celle, Německo)

Mobilní fáze pro cílenou lipidomickou analýzu:

A: Acetonitril:H₂O (6:4, v/v)

B: Isopropanol:Acetonitril (9:1, v/v)

Obě mobilní fáze obsahovaly octan amonný v koncentraci 10 mmol/l.

Mobilní fáze pro necílenou lipidomickou analýzu:

A: Acetonitril:H₂O (6:4, v/v)

B: Isopropanol:Acetonitril:H₂O (90:9:1, v/v)

Obě mobilní fáze obsahovaly mravenčan amonný v koncentraci 10 mmol/l a 0,1% kyselinu mravenčí

3.1.2 Biologický materiál

Suché krevní skvrny pacientů s onemocněním SCADD byly poskytnuté Dětskou fakultní nemocnicí v Banské Bystrici (specifikace v kapitole 3.2.1.2).

Vzorek plasmy poskytnutý oddělením klinické biochemie Fakultní nemocnice Olomouc.

Vzorek čerstvých vepřových jater

3.1.3 Přístrojové vybavení

Vysokoúčinný kapalinový chromatograf UltiMate 3000 Rapid Separation system (Dionex, Sunnyvale, CA, USA)

Kolona s reverzní fází C8 BEH (2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm, Waters, Milford, MA, U.S.A.), temperována na 55 °C

Hmotnostní spektrometr s trojitým kvadrupólem s elektrosprejem (Triple Quad 6500; SCIEX, Framingham, MA, USA)

1290 Infinity UHPLC system (Agilent Technologies, Waldbronn, Německo) s autosamplerem HTS PAL (CTC Analytics, Zwingen, Švýcarsko)

Kolona s reverzní fází C18 CSH Acquity UPLC (100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm, 130 Å) s předkolonou VanGuard Acquity UPLC CSH C18 (5 mm × 2.1 mm, 1.7 μm, 130 Å) (Waters, Milford, MA, USA)

Vysokorozlišující hmotnostní spektrometr s kvadrupólem a analyzátozem doby letu TripleTOF 5600+ s elektrosprejem (DuoSpray ESI source) (Sciex, Framingham, MA, USA)

Centrifuga Eppendorf 5427R s chlazením (Eppendorf, Hamburg, Německo)

Vakuový odpařovač EZ-2 GeneVac (GeneVac SP scientific, Ipswich, Velká Británie)

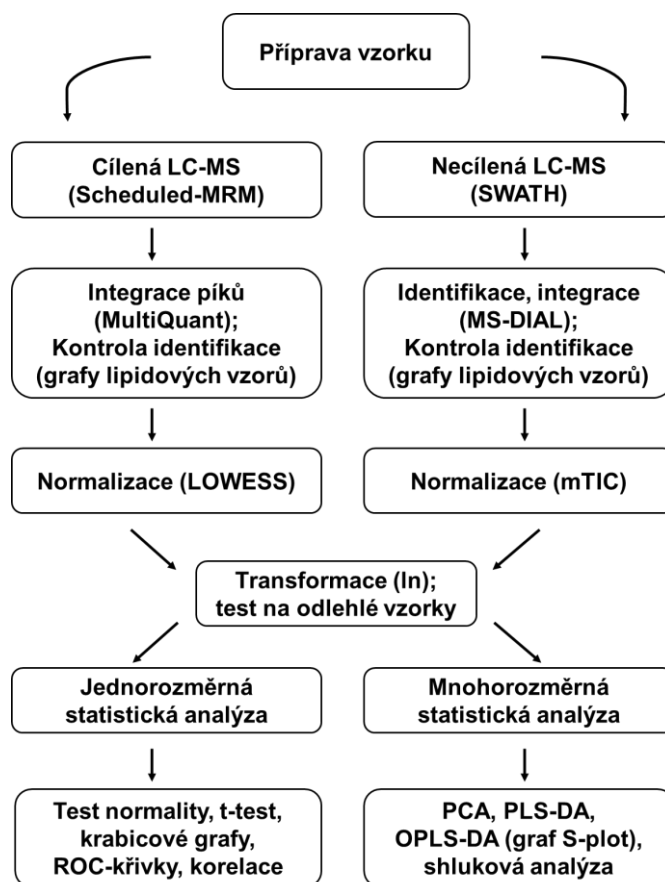
Temperovatelná lázeň s ultrazvukem Elmasonic P60H (Geo Reinigungstechnik GmbH, Ahaus, Německo)

3.2 Metody

3.2.1 Souhrn pracovního postupu (lipidomického „workflow“)

Pro přehlednost celkového pracovního postupu od zpracování vzorků až po statistické vyhodnocení dat je na následujícím obrázku uvedeno schéma lipidomického „workflow“

využitého v této práci (Obr. 21). Jednotlivé části tohoto postupu budou detailněji popsány v následujících kapitolách.



Obr. 21 Schéma souhrnného pracovního postupu (lipidomického „workflow“) pro cílenou i necílenou analýzu od přípravy vzorku po statistické vyhodnocení dat. Metody uvedené ve schématu jsou detailně popsány v následujících kapitolách.

3.2.2 Příprava vzorků

3.2.2.1 Příprava vzorků k optimalizaci metody cílené lipidomické analýzy

Lipidový extrakt jater byl připraven z 25 mg tkáně, ke kterým byl přidáno 320 μ l směsi MTBE:MeOH (5:1, v/v). Následně byla směs intenzivně protřepána 3×1 minutu a poté byla 1 hodinu třepána při laboratorní teplotě. Poté bylo ke směsi přidáno 80 μ l deionizované vody a 10 minut byla třepána při laboratorní teplotě. Směs byla centrifugována po 10 min při $14000 \times g$ při 4°C . Po centrifugaci bylo odpipetováno 200 μ l horní organické vrstvy a extrakt byl lyofilizován přes noc. Zbytek po lyofilizaci byl rozpuštěn ve 100 μ l směsi isopropanol:acetonitril:H₂O (2:1:1, v/v/v).

Lipidový extrakt plasmy byl připraven ze 40 μl plasmy, ke kterým bylo přidáno 160 μl isopropanolu a směs byla ponechána přes noc při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (deproteinace). Poté byl roztok centrifugován $14000 \times g$ při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ a 100 μl bylo přepipetováno do vialky.

Lipidový extrakt suché krevní skvrny byl připraven vyražením terčíku o průměru 3,2 mm ze středu suché krevní skvrny, ke kterému bylo připipetováno 100 μl směsi isopropanol:H₂O (8:2, v/v) a směs byla ponechána přes noc při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (deproteinace). Poté byl roztok centrifugován $14000 \times g$ při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ a 100 μl bylo přepipetováno do vialky.

Lipidový extrakt plasmy použitý pro kontrolu programované analýzy (viz kapitola 3.2.2) byl připraven z 10 μl plasmy, ke kterým bylo přidáno 90 μl směsi isopropanolu s 1% obsahem interního standardu (SPLASH® LIPIDOMIX® Mass Spec Standard, Avanti USA, specifikace viz kapitola Chemikálie 3.1.1) a směs byla ponechána přes noc při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (deproteinace). Poté byl roztok centrifugován $14000 \times g$ při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ a 100 μl bylo přepipetováno do vialky.

3.2.2.2 Příprava vzorků suchých krevních skvrn novorozenců s poruchou SCADD

Vzorky od pacientů trpících dědičnou metabolickou poruchou SCADD byly obdrženy ve formě suchých krevních skvrn. Počty vzorků pacientů a kontrol jsou charakterizovány v následující tabulce (Tab. 2). Vzorky byly získány odběrem krve z patičky novorozenců a kapky krve byly zachytávány na testovací kartu z filtračního papíru dle standardního protokolu novorozeneckého screeningu (www.novorozeneckyscreening.cz/podrobny-popis-odberu-ns citováno: 04.06.2019). Tento postup provedlo zdravotnické zařízení a v laboratoři byl již testován samotný materiál. Ze suché krevní skvrny na testovací kartě byl vyražen terčík o průměru 3,2 mm. Vzorky k cílené analýze byly zpracovány následovně: k terčíku v mikrozkuhavce bylo připipetováno 100 μl extrakční směsi MeOH:H₂O (9:1, v/v) s 1% obsahem interního standardu (SPLASH® LIPIDOMIX® Mass Spec Standard, Avanti USA) a extrakce probíhala na třepače po dobu 1 hodiny. Vzorky byly centrifugovány po 10 minut při $14000 \times g$ při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Po centrifugaci bylo z každého vzorku bylo odebráno 6 μl do směsného vzorku pro kontrolu kvality (quality control – QC).

Vzorky k necílené analýze byly připraveny vyražením nového terčíku z krevní skvrny, ke kterému bylo připipetováno 200 μl extrakční směsi isopropanol:H₂O (9:1, v/v) s obsahem interních standardů (o koncentraci všech složek 1000 ng/ml, podrobnosti viz

Příloha 2). Vzorky byly sonikovány v ultrazvukové lázni pro dobu 30 minut, ponechány na třepačce po dobu 1 hodiny, přepipetovány (150 µl) do nové mikrozkušavky a odpařeny v dusíkové atmosféře za laboratorní teploty a sníženého tlaku. Odparky byly rekonstituovány v 75 µl roztoku isopropanol:H₂O (9:1, v/v), promíchány na minitřepačce a centrifugovány při 14000 × g při 4 °C. Po centrifugaci bylo z každého vzorku bylo odebráno 6 µl do směsného vzorku pro kontrolu kvality (quality control – QC).

Tab. 2 Specifikace vzorků pacientů s onemocněním SCADD

Rok odběru	Skupina	Počet
2018	pacienti	11
	kontroly	11
2019	pacienti	9
	kontroly	8

3.2.3 Optimalizace cílené lipidomické metody (LC-MS)

Cílenou lipidomickou metodou dle Xuan (Xuan *et al.*, 2018) popsanou v kapitole 2.4.3.3 byly analyzovány vzorky jater, plasmy a krevní skvrny za účelem potvrzení kompatibility této metody se systémem kapalinové chromatografie UHPLC (UltiMate 3000 RS, Dionex Sunnyvale, CA, USA) s kolonou s reverzní fází C8 BEH (2.1 mm ×100 mm, 1.7 µm, Waters, Milford, MA, U.S.A.) ve spojení s tandemovým hmotnostním spektrometrem (Triple Quad 6500, SCIEX, Framingham, MA, USA). Metoda byla doplněna o přechody odpovídající deuterovaným standardům (Tab.3). Složení mobilní fáze A a B je specifikováno v kapitole Chemikálie (3.1.1). Kolona byla temperována na 55 °C. Eluční gradient byl zpočátku separace nastaven na 32 % B do 1,5 min a poté lineárně stoupal až k 85 % B v 15,5 min a nakonec na 97 % B v 15,6 min až do 18 min. V 18,1 min byl gradient opět na 32 % B až do 20 min pro ekvilibraci kolony.

Měření probíhalo v pozitivním a negativním módu v režimu „Non-scheduled Multiple-Reaction Monitoring“ (non-scheduled MRM). V tomto režimu byla intenzita každého přechodu (sledování produktu rozpadu prekurzorového iontu) sledována po celou dobu analýzy (20 minut). Kvůli velkému množství přechodů byla analýza rozdělena do 13 metod v pozitivním módu a 3 metod v negativním módu.

Data byla následně zpracována v programu MultiQuant (verze 3.0, Sciex, Foster City, CA, USA), kdy byl nejprve porovnán posun retenčních časů deuterovaných standardů od jejich teoretického retenčního času. Následně byly vyhodnoceny chromatogramy pro každý přechod, na základě následujících parametrů: posun retenčního času o +/- 0,5 min od teoreticky stanovené hodnoty (nebo na základě posunu deuterovaného standardu), intenzita píku, profil píku. V případě větších odchylek o teoretického retenčního času, nižší intenzity píku než 1000 cps (counts per second) a nestandardního profilu píků (více vrcholů na pík) byly lipidy odpovídající těmto přechodům vyřazeny z dalšího vyhodnocení.

Dále byly zkonstruovány korelační přímky experimentálně stanoveného retenčního času ku teoretickému retenčnímu času pro každou skupinu lipidů zvlášť a dále také Bland-Altmanovy grafy, na jejichž základě byly odchylky porovnány. Teoretické retenční časy byly korigovány na základě rovnic korelačních přímek pro danou skupinu lipidů. Hodnoty m/z ku retenčním časům jednotlivých lipidů (dle lipidových tříd) byly následně vyneseny do grafů. Na těchto grafech lze pozorovat lipidové vzory (lipid patterns), které popisují retenční chování lipidů podle počtu uhlíků a dvojných vazeb na jejich acylových řetězcích, a které sloužily jako další konfirmační mechanismus identifikace lipidů.

Z korigovaných retenčních časů pro daný přechod byla vytvořena nová cílená programovaná lipidomická metoda v režimu „Scheduled Multiple Reaction Monitoring“ (scheduled MRM) s velikostí časového okna 2 minuty (+/- 1 minuta od korigovaného retenčního času), ve kterém byl vždy daný přechod měřen. Díky tomuto časovému programování došlo ke zmenšení počtu metod potřebných k měření všech přechodů v pozitivním módu na 2 metody a v negativním módu na 1 metodu. Programovaná MRM metoda byla otestována na vzorku plasmy s přidavkem interního standardu (specifikace viz kapitola 3.2.1.1) za účelem sledování posunu retenčních časů vlivem matrice (viz Tab. 3 a Obr. 21).

3.2.4 Cílená lipidomická analýza vzorků suchých krevních skvrn novorozenců s poruchou SCADD

K identifikaci a relativnímu vyhodnocení obsahu lipidů ve vzorcích extraktů krevních skvrn pacientů se SCADD byly výše zmíněné poznatky využity následovně. Nejprve byly pomocí programované MRM metody (2 metody v pozitivním módu a 1 metoda

v negativním módu) analyzovány směsné vzorky kontroly kvality (QC). Do finální metody pro následné analýzy samotných vzorků pacientů a kontrol byly vybrány pouze přechody těch lipidů, které byly identifikovány ve vzorcích QC. Vzorky byly před měřením randomizovány a vzorek QC byl měřen po každých 5 reálných vzorcích. Výsledné chromatogramy byly integrovány v programu MultiQuant (verze 3.0, Sciex, Foster City, CA, USA) a surová data (plochy píků) byla následně statisticky zpracována.

3.2.5 Necílená lipidomická analýza suchých krevních skvrn novorozenců s poruchou SCADD

K necílené analýze byla využita metoda dle Tsugawa *et al.* (2015) využívající separaci na C18 koloně s vlastní analýzou hmotnostním spektrometrem TripleTOF 5600+ (přesné specifikace kolony a hmotnostního analyzátoru jsou uvedeny v kapitole 3.1.3). Gradient (0.0 min, 15% B; 2.0 min, 30% B; 2.5 min, 48% B; 11.00 min, 82% B; 11.50 min, 99% B; 12.00 min, 99% B; 12.10 min, 15% B, 15.00 min, 15% B) byl udržován za průtoku 0.6 ml/min a za stálé teploty kolony 65 °C. Necílená lipidomická metoda SWATH (popsána v kapitole 2.4.3.2.1) byla upravena (počet a rozsah měřicích oken) pomocí programu SWATHtuner zvláště pro pozitivní a negativní mód (Zhang *et al.*, 2015) a konkrétní specifikace měření jsou uvedeny v příloze (Příloha 3). Vzorky byly před měřením randomizovány a vzorek QC byl měřen po každých 5 reálných vzorcích.

Surová data (výšky píků) z necílené analýzy byla transformována pomocí programu ABF converter (Reifycs, Tokyo, Japonsko) a následně byla zpracována v programu MS-DIAL (verze 4.12) (Tsugawa *et al.*, 2015), ve kterém byla provedena identifikace lipidů (na základě retenčního času, přesné hmotnosti prekurzorového iontu a jeho fragmentačního spektra ve srovnání s databází LipidBlast) (Kind *et al.*, 2013), integrace píků, zarovnání píků (alignment), dekonvoluce fragmentů, odečtení metabolitů přítomných v blank vzorcích a další parametry. Přesné parametry nastavení programu MS-DIAL jsou uvedeny v příloze (Příloha 4 a5). Ke kontrole správnosti identifikace a k vyhodnocení neidentifikovaných metabolitů (features) byly využity grafy lipidových vzorů (příloha X), program PeakView 2.2 (Sciex) a skript CROP (programovací jazyk R) (Kouřil *et al.*, 2020), který byl použit k odstranění zmnožených features (např. více možných aduktů) a také k identifikaci features, které mezi sebou vykazují korelaci.

3.2.6 Statistické a komparativní vyhodnocení dat

Statistické vyhodnocení bylo provedeno v programovacím jazyku R (verze 3.6.2) v programu RStudio verze 1.2.1 (programovací jazyk a prostředí určené pro statistickou analýzu dat a jejich grafické zobrazení; www.r-project.org). Vzorky QC sloužily k monitorování odezvy analyzátoru v průběhu celého měření, kde k odstranění systémové chyby byla data normalizována, přičemž optimální metoda normalizace byla vyhodnocena pomocí skriptu (programovací jazyk R) dle Drotleff a Lämmerhofer (2019) a výstupy z této normalizace jsou uvedeny v příloze (Příloha 6 a 7). Data z cílené analýzy byla normalizována metodou LOWESS a transformována logaritmicky (přirozený logaritmus) (Gardlo, 2019). Data z necílené analýzy byla normalizována metodou mTIC (metoda spočívá v normalizaci pomocí sumy výšky píků všech identifikovaných lipidů v daném vzorku) a transformována logaritmicky (přirozený logaritmus) (Fiehn, 2016; Drotleff a Lämmerhofer, 2019).

Statistické zpracování dat spočívalo ve srovnání skupin kontrol a pacientů pomocí přístupů jednorozměrné a mnohorozměrné statistické analýzy. K vizualizaci celkového souboru dat byly využity přístupy mnohorozměrné (multivariantní) statistiky. Analýza hlavních komponent (PCA – Principal Component Analysis) byla využita jako objektivní analýza k porovnání celého souboru dat z toho důvodu, že nezahrnuje informaci o skupině, do které vzorek přísluší (nesupervizovaná analýza) a výstupy z této analýzy byly dále využity pro identifikaci odlehlých vzorků (outliers). Supervizované přístupy jako PLS-DA (Partial Least Squares-Discriminant Analysis), OPLS-DA (Orthogonal Projections to Latent Structures Discriminant Analysis) byly využity k identifikaci těch lipidů, které nejvíce rozdělují (diskriminují) jednotlivé skupiny (pacienty a kontroly) a pomáhají popisovat klastrování vzorků do skupin. K ověření separace obou skupiny byly sestrojeny grafy na základě permutačních testů. Byly sestrojeny grafy S-plot, které jsou výstupem analýzy OPLS-DA zobrazující relativní příspěvek jednotlivých proměnných ke klastrování vzorků do skupin a dále byla provedena klastrová analýza. Po vyhodnocení nejvíce diskriminujících lipidů byly rozdíly mezi intenzitami těchto lipidů porovnány jednorozměrnou statistikou pomocí krabicových grafů a po testu normality také studentovým t-testem. Hladina významnosti byla upravena na základě Bonferroniho korekce pro každou analýzu zvlášť. K vyhodnocení schopnosti daného lipidů rozdělit skupiny pacientů a kontrol byly sestrojeny také ROC křivky (Receiver Operating Characteristic), ukazující pravděpodobnost skutečně pozitivních nálezů a

pravděpodobnost falešně pozitivních nálezů. K porovnání výsledků cílené a necílené analýzy byl využit program Cytoscape 3.7.2 (Shannon *et al.*, 2003) a jeho aplikace MetScape 3.1.3 (Karnovsky *et al.*, 2011), pomocí kterých byly vytvořeny korelační mapy signifikantně zvýšených či snížených lipidů.

4 VÝSLEDKY

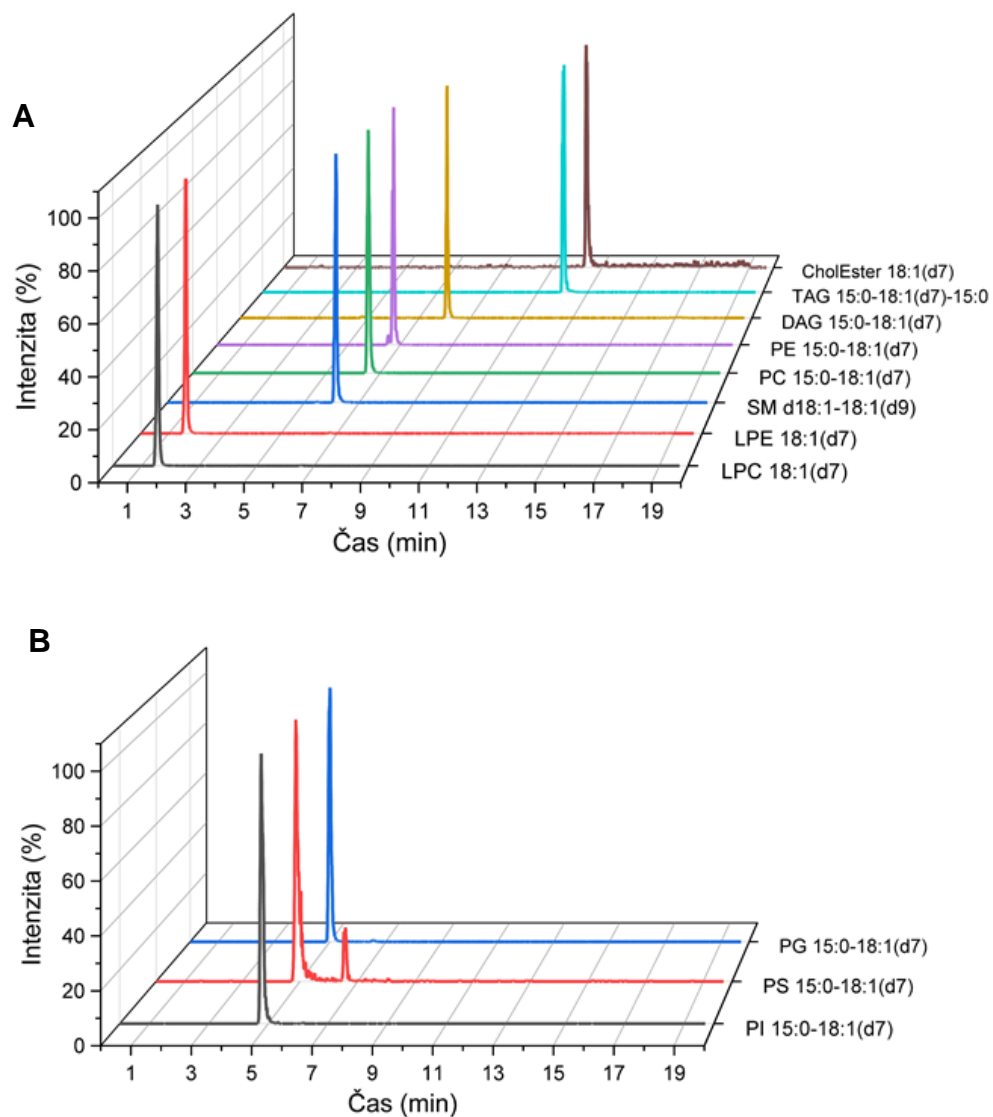
4.1 Optimalizace cílené lipidomické metody

K objektivnímu srovnání posunu retenčních časů byl využit 1% roztok deuterovaných standardů lipidů (DSTD_L, SPLASH® LIPIDOMIX® Mass Spec Standard, Avanti USA) v methanolu (viz Tab. 3) a jednotlivé přechody byly monitorovány po celou dobu analýzy (non-scheduled MRM analýza). Retenční časy jednotlivých DSTD_L byly srovnány s teoreticky predikovaným retenčním časem dle Xuan (2018). Pro programovanou (scheduled MRM) analýzu DSTD_L v methanolu a ve vzorku plasmy byl retenční čas zvolen na základě průměru retenčních časů dvou non-scheduled MRM analýz. Konečný korigovaný retenční čas je průměrem tří programovaných měření (scheduled MRM) methanolickeho roztoku DSTD_L. Shrnutí všech hodnot retenčních časů včetně vlivu matrice (plasma) na jejich posun je uveden v tabulce (Tab. 3).

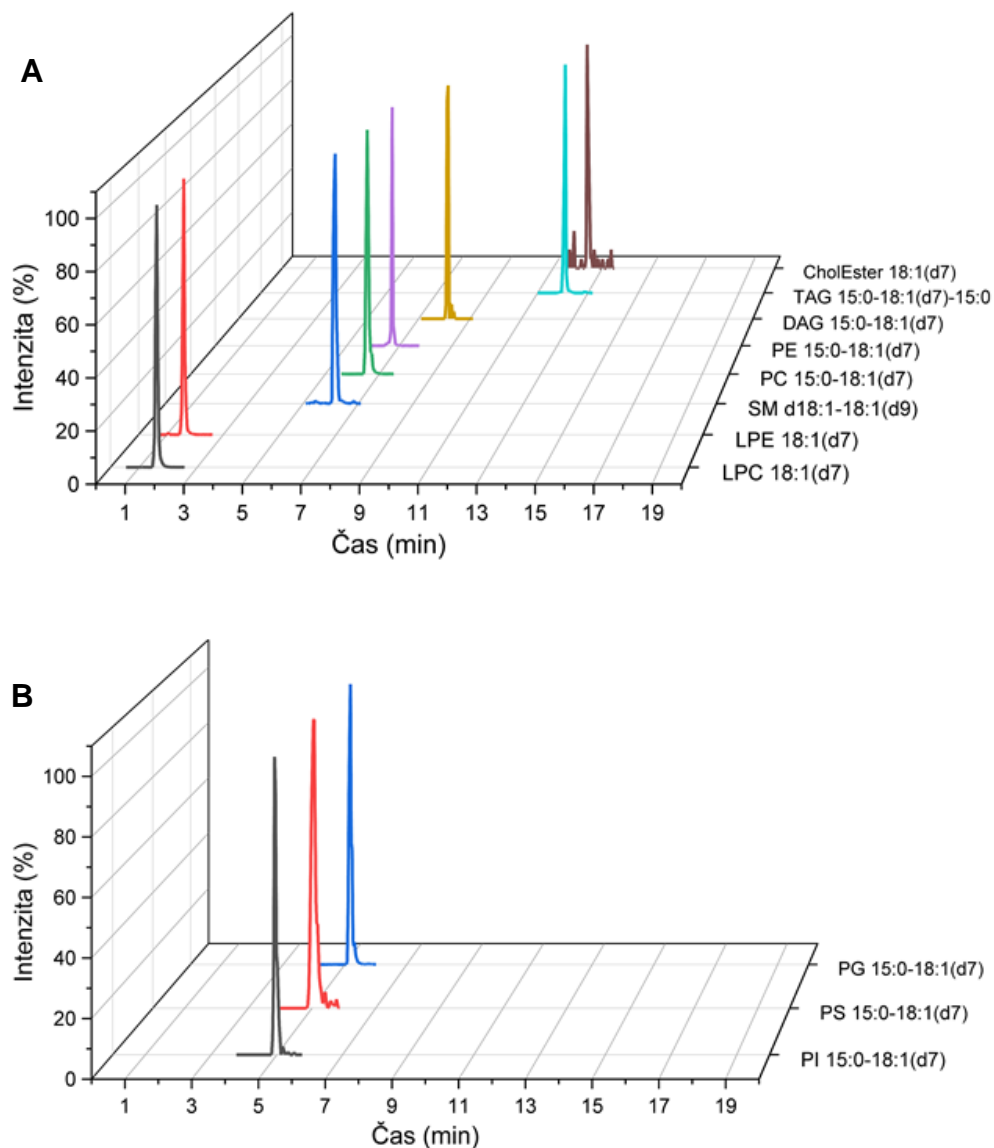
Jednotlivé extrahované iontové chromatogramy (vybraných přechodů Q1→Q3) pro non-scheduled MRM analýzu methanolickeho roztoku DSTD_L a scheduled MRM analýzu DSTD_L plasmě jsou shrnuty na obrázku (Obr. 22 a 23).

Tab. 3 Specifikace deuterovaných lipidových standardů (SPLASH® LIPIDOMIX®) a parametrů pro jejich analýzu v pozitivním módu (LPC, LPE, PC, PE, DG, TG, CE, SM) a v negativním módu (PG, PI, PS). Hodnota m/z pro měření prekurzorového iontu (Q1) a m/z fragmentu (Q3). Teoretický retenční čas rt(T), retenční čas methanolického roztoku DSTDL při scheduled metodě rt(S) a při non-scheduled metodě rt(NS). Retenční čas korigovaný rt(K) a retenční čas DSTDL ve vzorku plasmy rt(PL).

Deuterovaný standard	Monoizotopická hmotnost (Da)	Aduktový ion	m/z (Q1)	m/z (Q3)	rt(T) (min)	rt(S) (min)		rt(NS) (min)			rt(K) (min)	t(PL) (min)
						1	2	Opakování				
						1	2	1	2	3		
SM 18:1(d9)	737.63972	[M+H] ⁺	738.7	184.2	6.40	6.15	6.10	6.11	6.12	6.11	6.11	6.15
CE 18:1(d7)	657.64412	[M+NH ₄] ⁺	675.7	369.4	12.50	12.36	12.36	12.39	12.36	12.37	12.37	12.42
TG 15:0-18:1(d7)-15:0	811.76463	[M+NH ₄] ⁺	829.4	570.5	12.10	12.03	12.03	12.05	12.05	12.03	12.04	12.08
DG 15:0-18:1(d7)	587.55061	[M+NH ₄] ⁺	605.5	346.3	8.30	8.09	8.05	8.09	8.08	8.08	8.08	8.13
PC 15:0-18:1 (d7)	752.60609	[M+H] ⁺	753.6	184.1	6.80	6.56	6.53	6.53	6.53	6.53	6.53	6.56
PE 15:0-18:1(d7)	710.55914	[M+H] ⁺	711.5	570.5	7.00	6.75	6.70	6.7	6.71	6.71	6.71	6.73
LPC 18:1(d7)	528.39208	[M+H] ⁺	529.4	184.1	1.60	1.56	1.55	1.56	1.56	1.56	1.56	1.60
LPE 18:1(d7)	486.34513	[M+H] ⁺	487.3	346.3	1.60	1.61	1.60	1.60	1.60	1.60	1.60	1.62
PG 15:0-18:1(d7)	741.55373	[M-H] ⁻	740.6	288.3	5.40	4.99	4.95	5.18	5.16	5.16	5.17	5.17
PI 15:0-18:1(d7)	829.56977	[M-H] ⁻	828.6	288.3	5.10	4.77	4.72	4.96	4.94	4.93	4.94	4.95
PS 15:0-18:1(d7)	754.54897	[M-H] ⁻	753.6	288.3	5.50	4.86	4.83	5.05	5.05	5.01	5.04	5.05



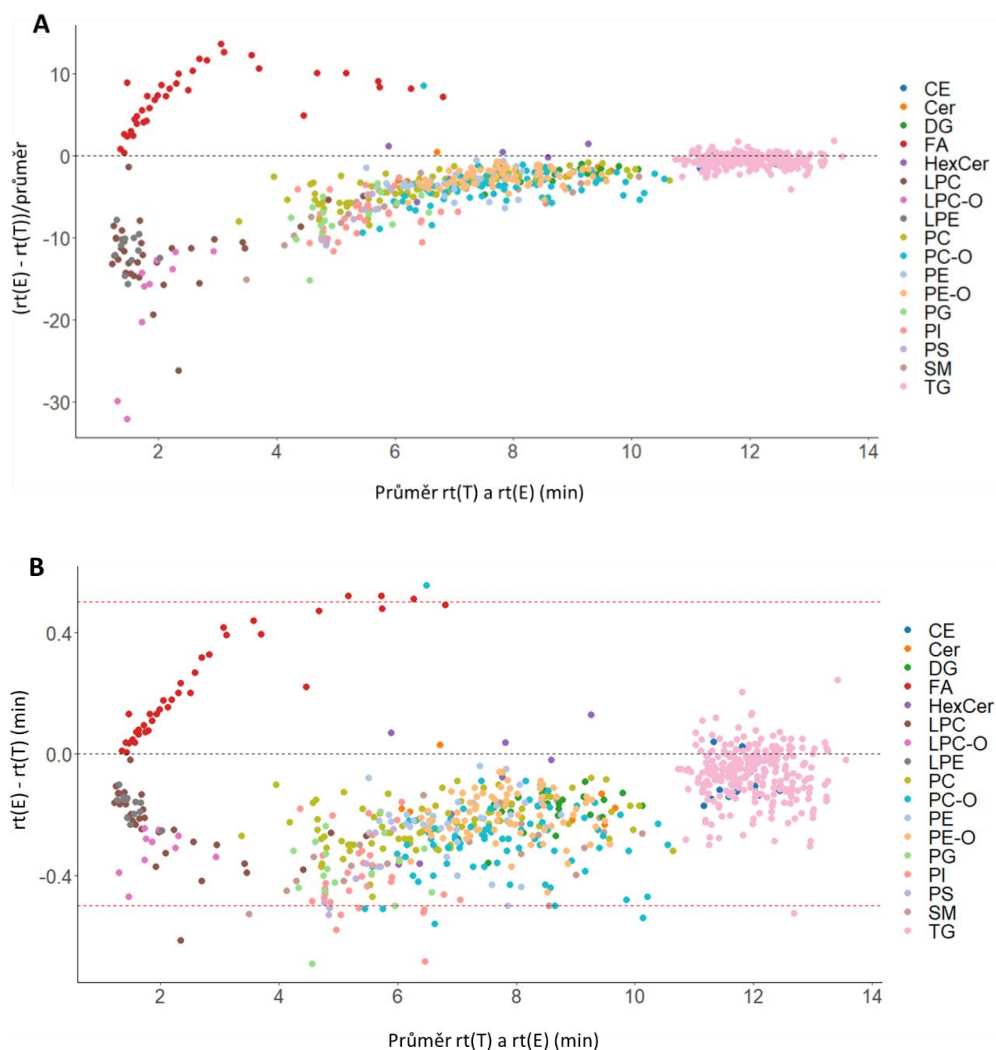
Obr. 22 Chromatogramy lipidových standardů DSTDL (definovaných v Tab. 3) v methanolicém roztoku měřením non-scheduled MRM metodou. Chromatogramy jsou rozděleny podle módu měření na pozitivní (A) a negativní mód (B).



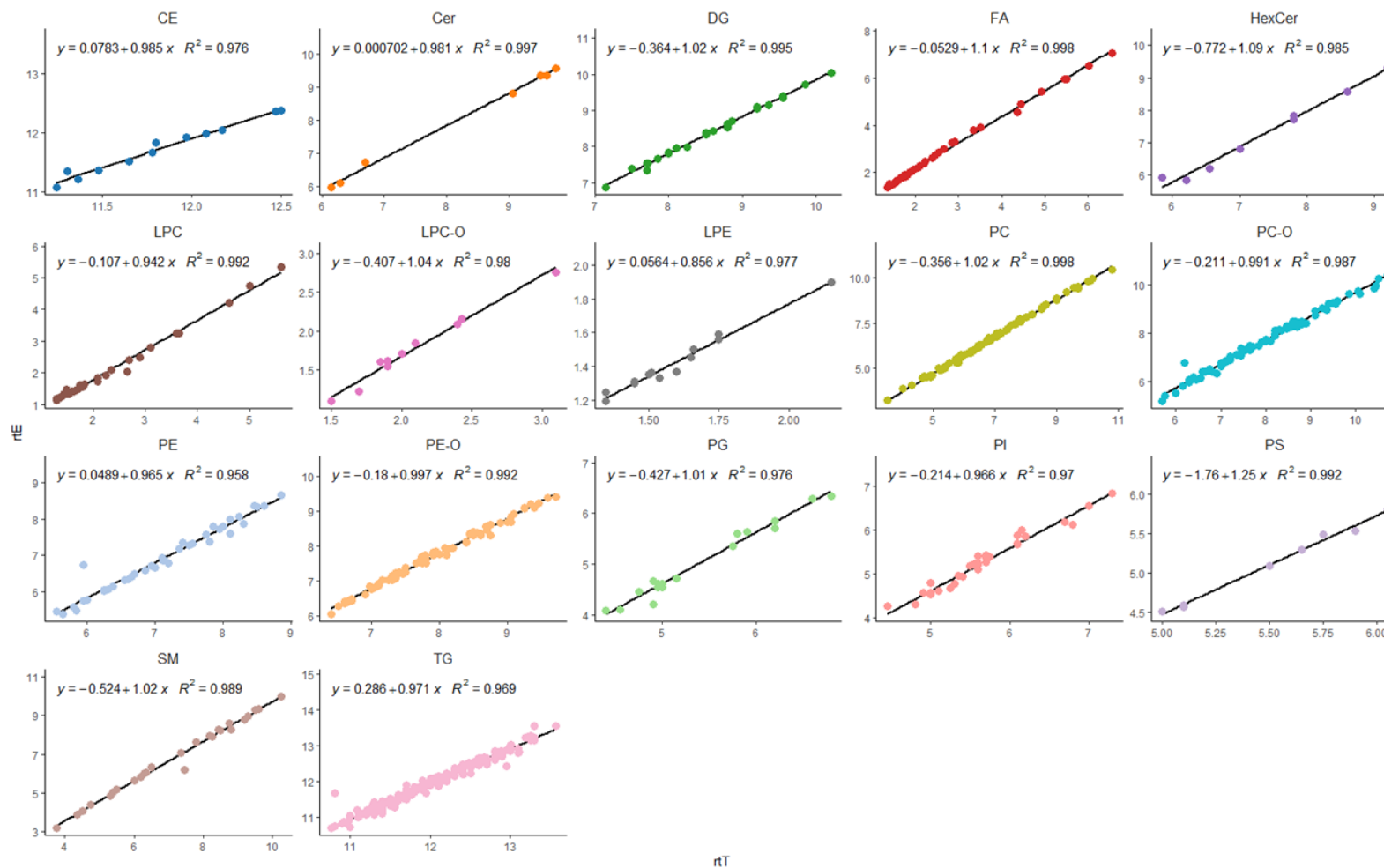
Obr. 23 Chromatogramy lipidových standardů DSTDL (definovaných v Tab. 3) ve vzorcích plasmy, měřením scheduled MRM metodou. Chromatogramy jsou rozděleny podle módu měření na pozitivní (A) a negativní mód (B).

Pro vyhodnocení posunu retenčních časů konkrétních lipidových individuí byly non-scheduled MRM analýze podrobeny vzorky plasmy, jater a suché krevní skvrny (specifikace v kapitole 3.2.1.1). Pravidla pro integraci a identifikaci píků jsou uvedeny v kapitole 3.2.2. Celkem bylo identifikováno 830 lipidů v pozitivním módu a 119 lipidů v negativním módu spadajících do 17 lipidových tříd. Korelační přímky byly zkonstruovány vynesáním experimentálně získaných hodnot retenčních časů pro daný lipid (průměrná hodnota pro vzorek plasmy, jater a suché krevní skvrny) ku predikovaným hodnotám retenčních časů dle Xuan (2018) (Obr. 23) a stejným způsobem byly zkonstruovány také Bland Altmanovy grafy (Obr. 24). Konečný korigovaný retenční

čas (k vytvoření scheduled MRM metody) byl vypočítán na základě rovnic korelačních průmek pro danou skupinu lipidů (viz Obr. 25).

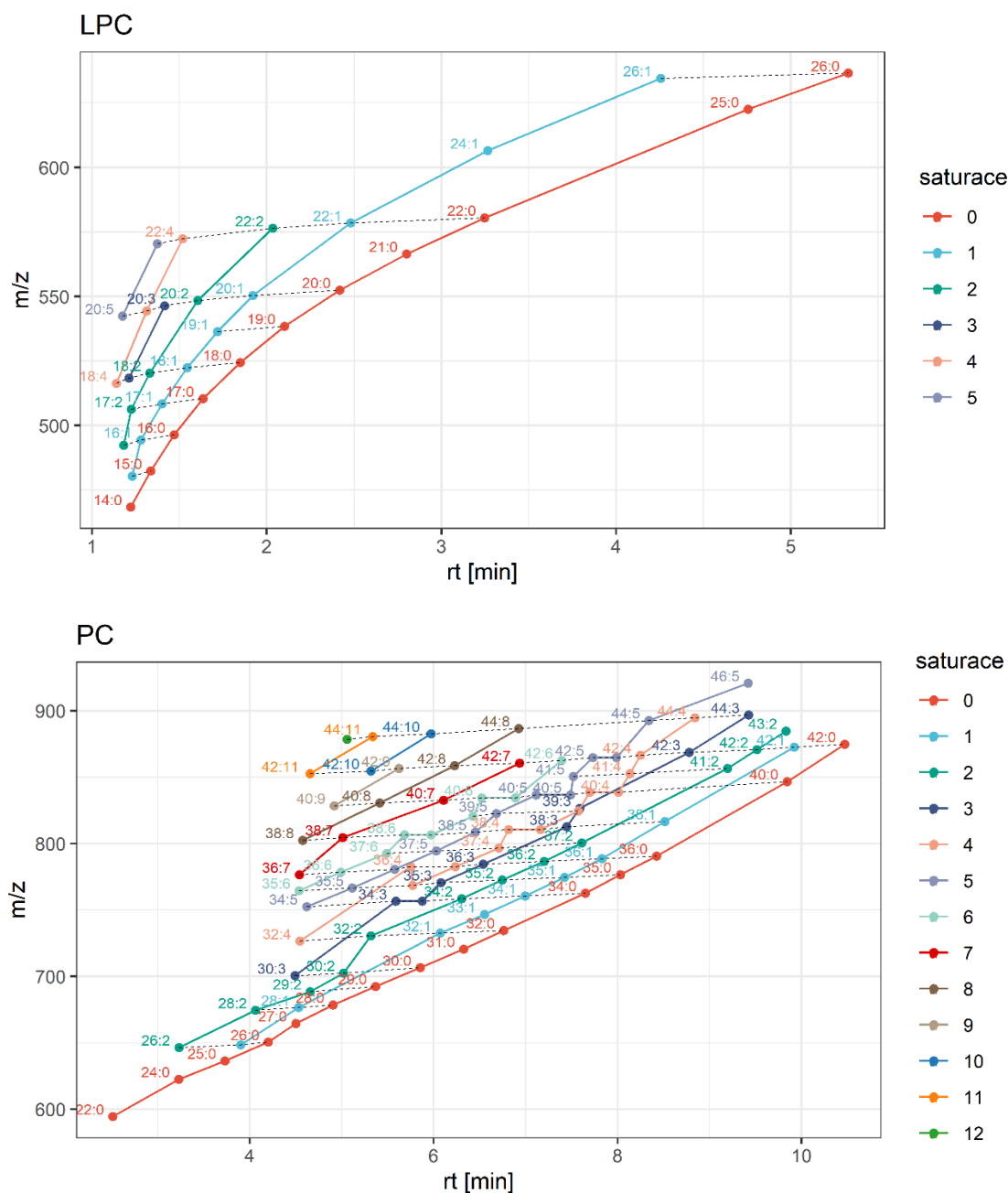


Obr. 24 Bland-Altmanovy grafy porovnávající změnu experimentálně zjištěného retenčního času jednotlivých lipidů $rt(E)$ s retenčním časem teoretickým $rt(T)$. Osa y v grafu A vyjadřuje procentuální rozdíl mezi $rt(T)$ a $rt(E)$ (A) a graf B vyjadřuje pouze rozdíl $rt(T)$ a $rt(E)$ s „cut-off“ přímkami (červená přerušovaná čára) v rozmezí $\pm 0,5$ min. Názvy lipidových skupin odpovídají standardní nomenklatuře (viz kapitola 2.3.1.1).



Obr. 25 Korelační přímky jednotlivých lipidových skupin s rovnicemi přímek, na jejichž základě byly korigovány retenční časy pro scheduled MRM metodu. Teoretický retenční čas $rt(T)$ na ose x a experimentálně naměřený retenční čas $rt(E)$ na ose y je uveden v minutách. Názvy lipidových skupin odpovídají standardní nomenklatuře (viz kapitola 2.3.1.1).

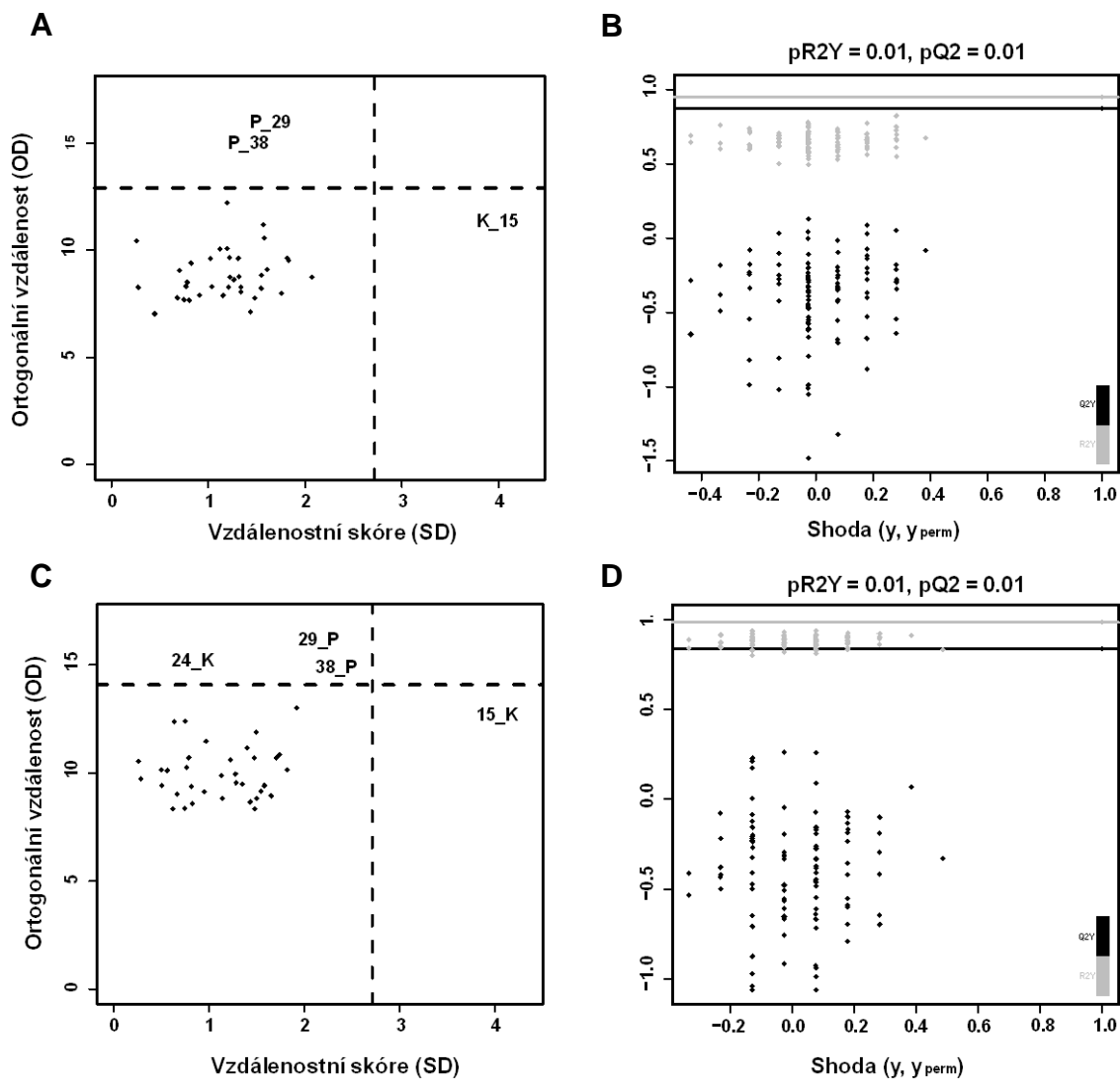
Následně byly pro lipidy všech tříd (alespoň s 5 identifikovanými zástupci) zkonstruovány grafy lipidových vzorů. Niže jsou pro příklad uvedeny tyto grafy pro skupinu LPC a PC (Obr. 26) ostatní grafy lipidových tříd jsou uvedeny v příloze (Příloha 8-12). Mimo potvrzení správné identifikace je možné na těchto grafech pozorovat různé eluční trendy dle počtu dvojných vazeb a počtu uhlíků lipidů a dále také rozdílnou funkci závislost m/z na retenčním čase pro více polární lipidové skupiny (např LPC, LPE, FA), méně polární (PC, PE, SM, PI, PS) a nepolární (TG, DG, CE).



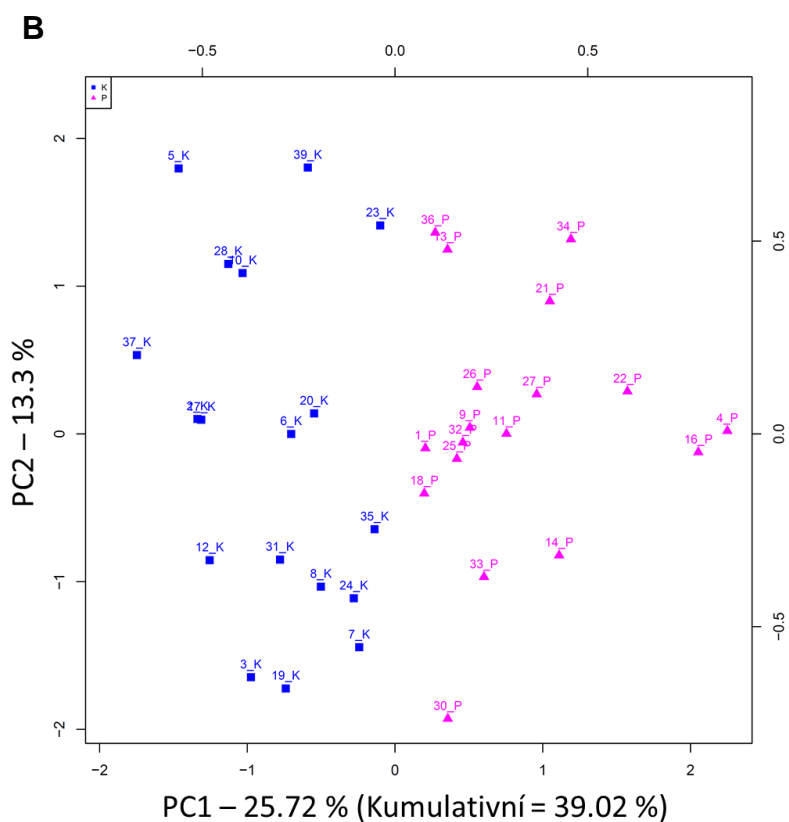
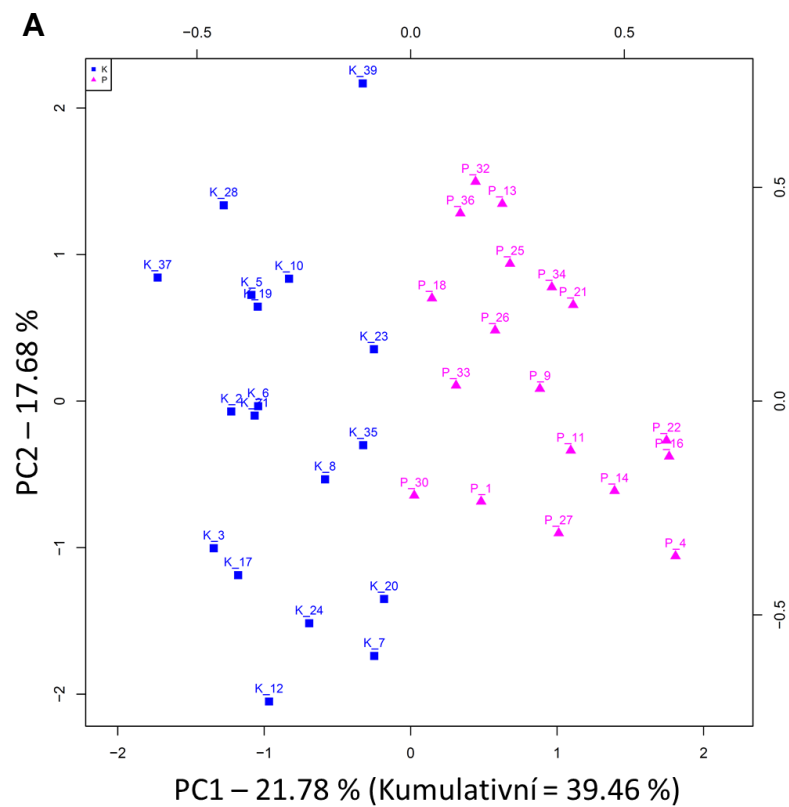
Obr. 26 Lipidové vzory pro vybrané lipidové skupiny LPC a PC (nomenklatura dle kapitoly kapitoly 2.3.1.1). Grafy jsou konstruovány jako závislost m/z na retenčnímu čase během non-scheduled MRM analýzy. Saturace odpovídá počtu dvojných vazeb na acylových řetězcích vyobrazených lipidů.

4.2 Srovnání výsledků cílené a necílené analýzy vzorků suchých krevních skvrn pacientů se SCADD

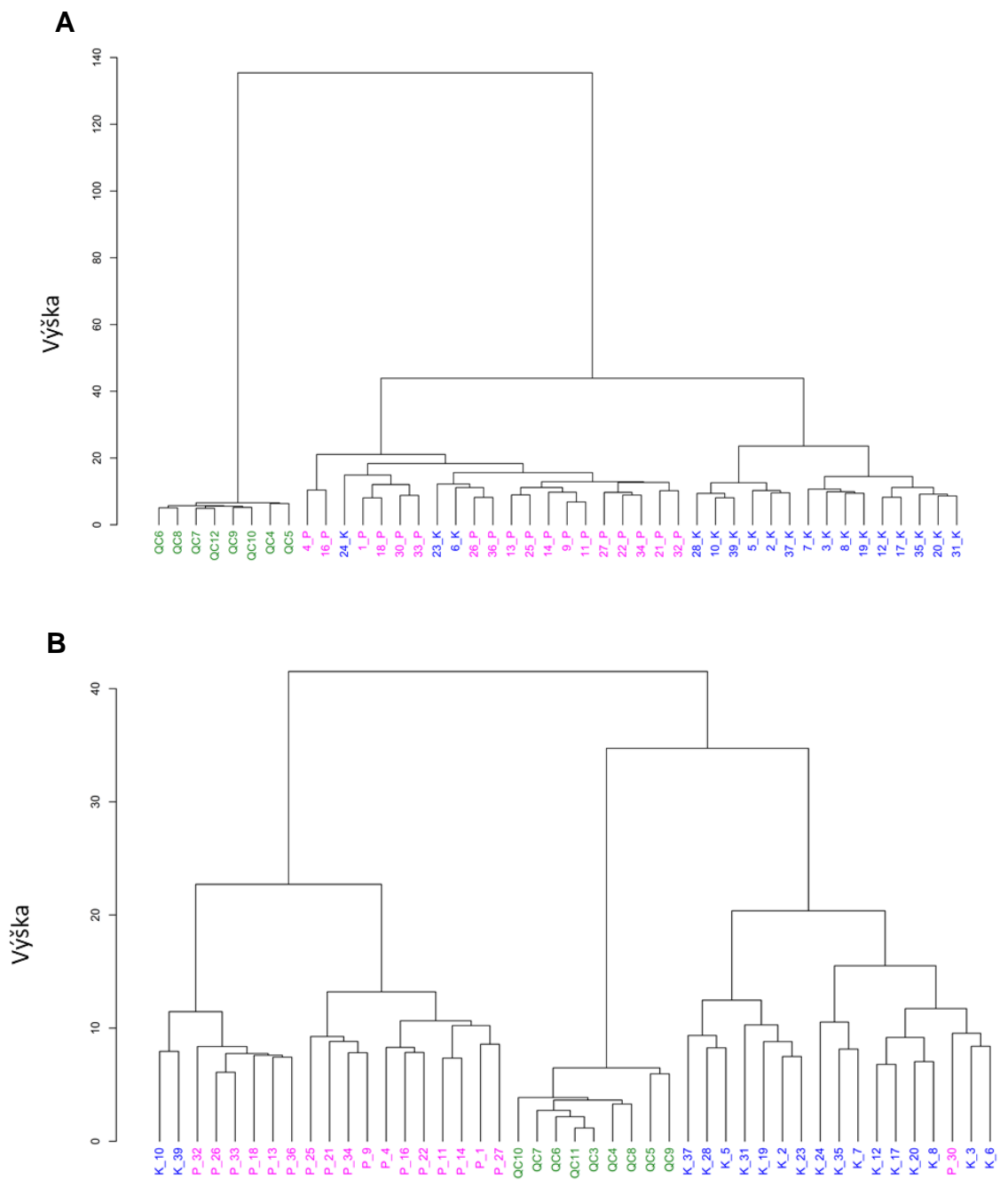
Cílenou lipidomickou bylo identifikováno 361 lipidů (v pozitivním a negativním módu) spadajících celkem do 15 lipidových tříd. Necílenou lipidomickou metodou bylo celkem nalezeno (po odečtu features přítomných v blank vzorcích) 3232 features, z čehož bylo následně identifikováno 364 unikátních lipidů (445 včetně aduktů) spadajících do 26 lipidových tříd. Potenciální misidentifikace byly odhaleny pomocí grafů lipidových vzorů a porovnání výsledků obou metod bylo provedeno následovně. Nejprve byly na základě výstupů z analýzy hlavních komponent (Obr. 27 a Obr. 28) analyzovány oba soubory dat pro odhalení odlehlých výsledků (outliers). Po odstranění odlehlých vzorků byl proveden permutační test na potvrzení separace skupin pacientů (P) a kontrol (K) (Obr. 27) a dále byla provedena shluková analýza (Obr. 29). Lipidy s největším příspěvkem k separaci skupin pacientů a kontrol byly vybrány na základě výstupu z OPLS-DA (S-plot graf) a dalších parametrů jednorozměrné statistiky (t-test, rozdíl v mediánech) (Obr. 30 a Tab. 4-5). Komplexní srovnání relativní koncentrace jednotlivých lipidů mezi analýzami bylo provedeno pomocí korelačních sítí signifikantně snížených nebo zvýšených lipidů (po Bonferroniho korekci) a dále také pomocí krabicových grafů a ROC křivek (Obr. 31-49).



Obr. 27 Test na odhalení odlehlých vzorků využívající výstupy z analýzy hlavních komponent pro cílenou analýzu (A) a necílenou analýzu (C). Permutační test (100 náhodných permutací) pro cílenou analýzu (B) a necílenou analýzu (D).

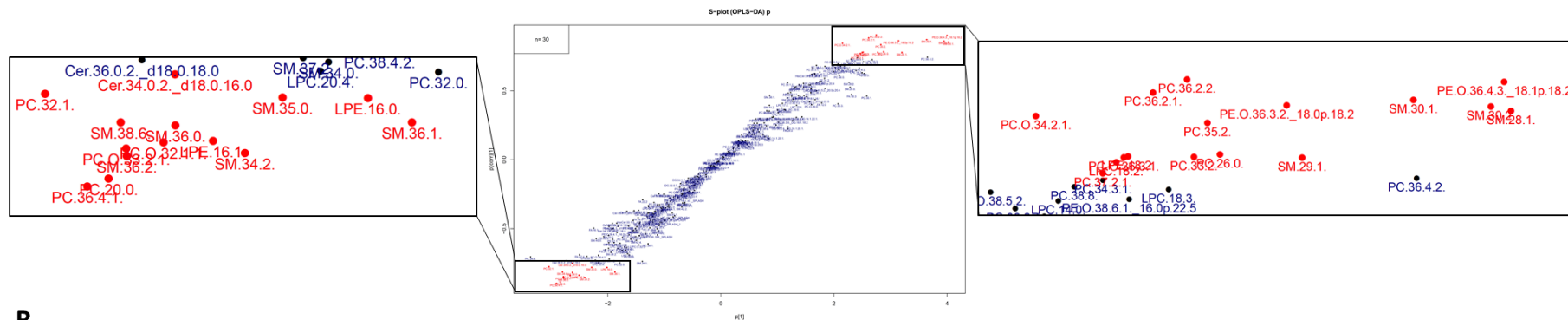


Obr. 28 Analýza hlavních komponent (PCA): pro cílenou analýzu po odebrání odlehlých vzorků (A) a pro necílenou analýzu zahrnující pouze identifikované lipidy (364) po odebrání odlehlých vzorků (B). Vzorky pacientů jsou uvedeny jako růžové trojúhelníky a vzorky kontrol jsou uvedeny jako modré čtverce.

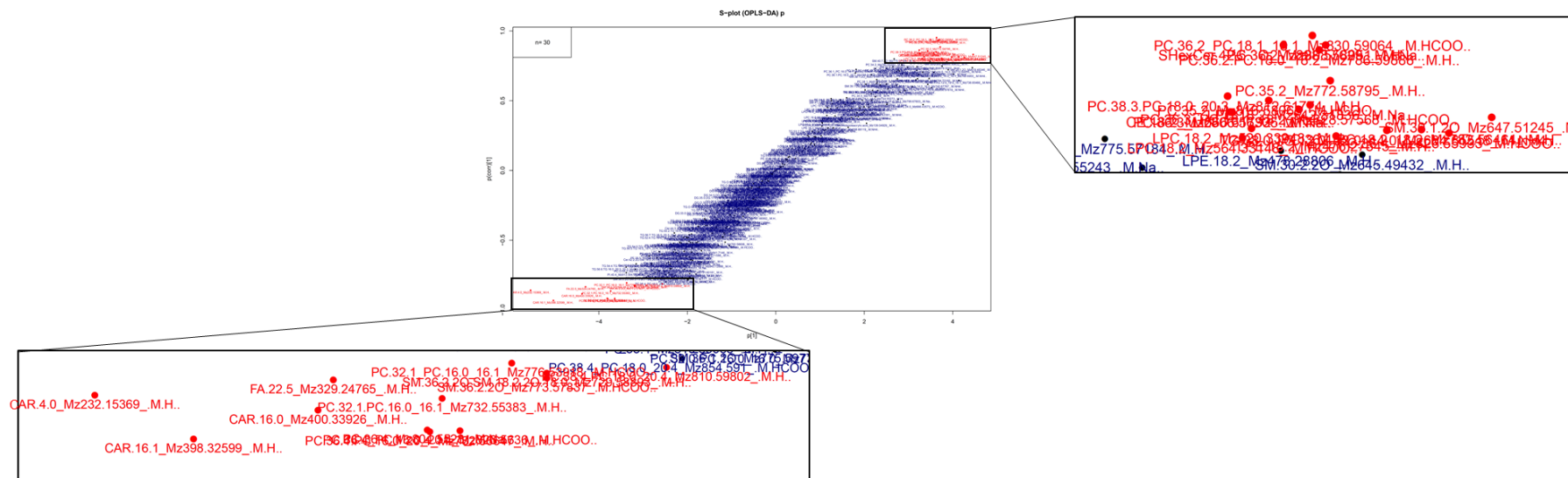


Obr. 29 Shluková analýza pro cílenou analýzu včetně vzorků kontroly kvality (A) a pro necílenou analýzu včetně vzorků kontroly kvality (B)

A



B



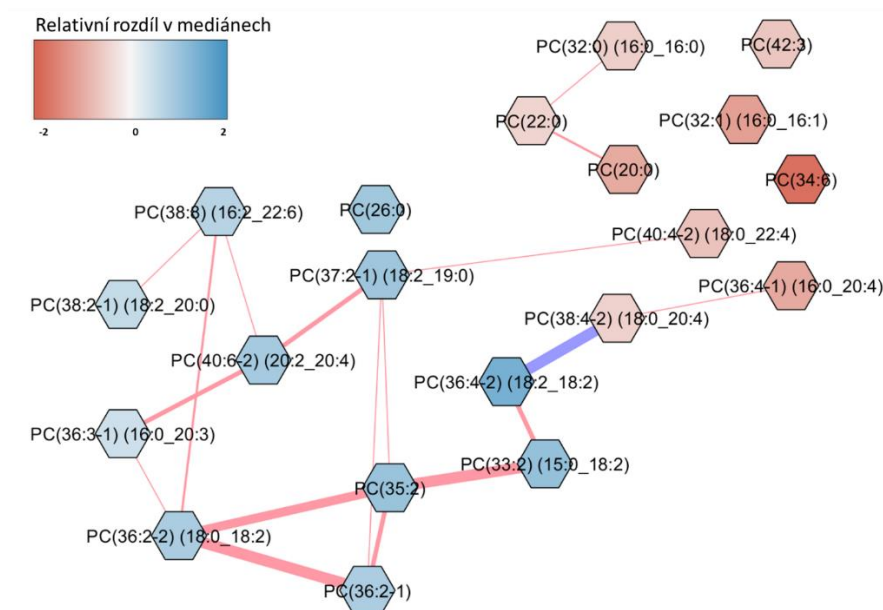
Obr. 30 Výstup z mnohorozměrné analýzy OPLS-DA (S-plot graf) pro cílenou (A) a necílenou (B) analýzu, zobrazující lipidy nevíce diskriminující od sebe skupinu pacientů a kontrol. Červeně zvýrazněné lipidy patří mezi prvních 30 lipidů dle korelované hodnoty p_1 .

Tab. 4 Statistická specifikace 30 lipidů z cílené analýzy s nejvyšším absolutním skóre (p1) z OPLS-DA řazených dle lipidových tříd.

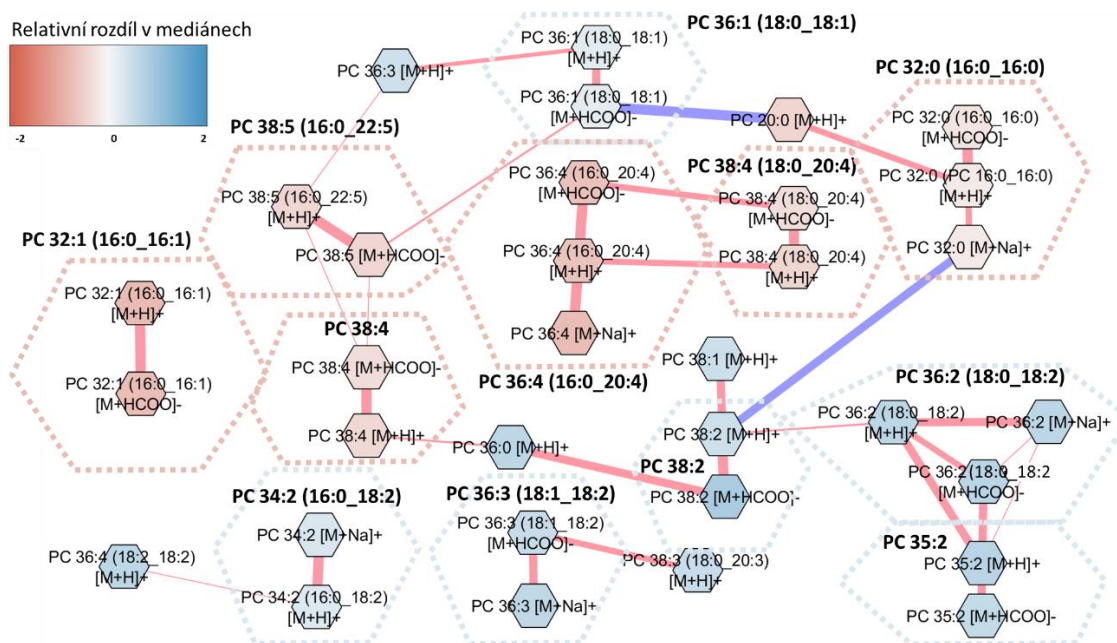
Lipid	p1 (S-plot)	P-value (t-test)	Míra změny (fold change, P/K)
<i>Cer(34:0-2) d18:0/16:0</i>	-2.63	9.48E-08	2.09
<i>LPC(18:2)</i>	2.47	1.45E-05	0.67
<i>LPE(16:0)</i>	-2.01	9.72E-07	1.43
<i>LPE(16:1)</i>	-2.50	7.81E-09	1.66
<i>LPE(18:2)</i>	2.52	3.17E-05	0.64
<i>PC(20:0)</i>	-2.84	1.62E-10	1.81
<i>PC(26:0)</i>	2.88	1.68E-05	0.57
<i>PC(32:1) 16:0_16:1</i>	-3.04	3.18E-07	1.96
<i>PC(33:2) 15:0_18:2</i>	2.78	1.43E-05	0.53
<i>PC(35:2)</i>	2.83	5.73E-08	0.54
<i>PC(36:2-1)</i>	2.61	1.65E-09	0.61
<i>PC(36:2-2) 18:0_18:2</i>	2.75	4.53E-10	0.61
<i>PC(36:4-1) 16:0_20:4</i>	-2.90	7.57E-10	1.83
<i>PC(37:2-1) 18:2_19:0</i>	2.42	7.49E-07	0.56
<i>PC(O-32:1-1)</i>	-2.66	3.72E-09	1.76
<i>PC(O-33:2-1)</i>	-2.78	1.25E-08	1.76
<i>PC(O-34:2-1)</i>	2.15	4.92E-07	0.69
<i>PC(O-36:3-1)</i>	2.50	1.10E-06	0.63
<i>PE(O-36:3-2) 18:0p/18:2</i>	3.14	1.12E-09	0.42
<i>PE(O-36:4-3) 18:1p/18:2</i>	4.00	9.29E-12	0.31
<i>SM(28:1)</i>	4.03	3.22E-07	0.31
<i>SM(29:1)</i>	3.20	2.56E-05	0.48
<i>SM(30:1)</i>	3.64	2.76E-07	0.45
<i>SM(30:2)</i>	3.95	2.22E-06	0.32
<i>SM(34:2)</i>	-2.40	1.35E-08	1.56
<i>SM(35:0)</i>	-2.28	2.96E-07	1.44
<i>SM(36:0)</i>	-2.62	1.17E-07	1.73
<i>SM(36:1)</i>	-1.87	4.94E-10	1.36
<i>SM(36:2)</i>	-2.78	2.57E-09	1.73
<i>SM(38:6)</i>	-2.80	6.34E-09	2.21

Tab. 5 Statistická specifikace 30 lipidů z necílené analýzy s nejvyšším absolutním skóre (p1) dle OPLS-DA řazených dle lipidových tříd.

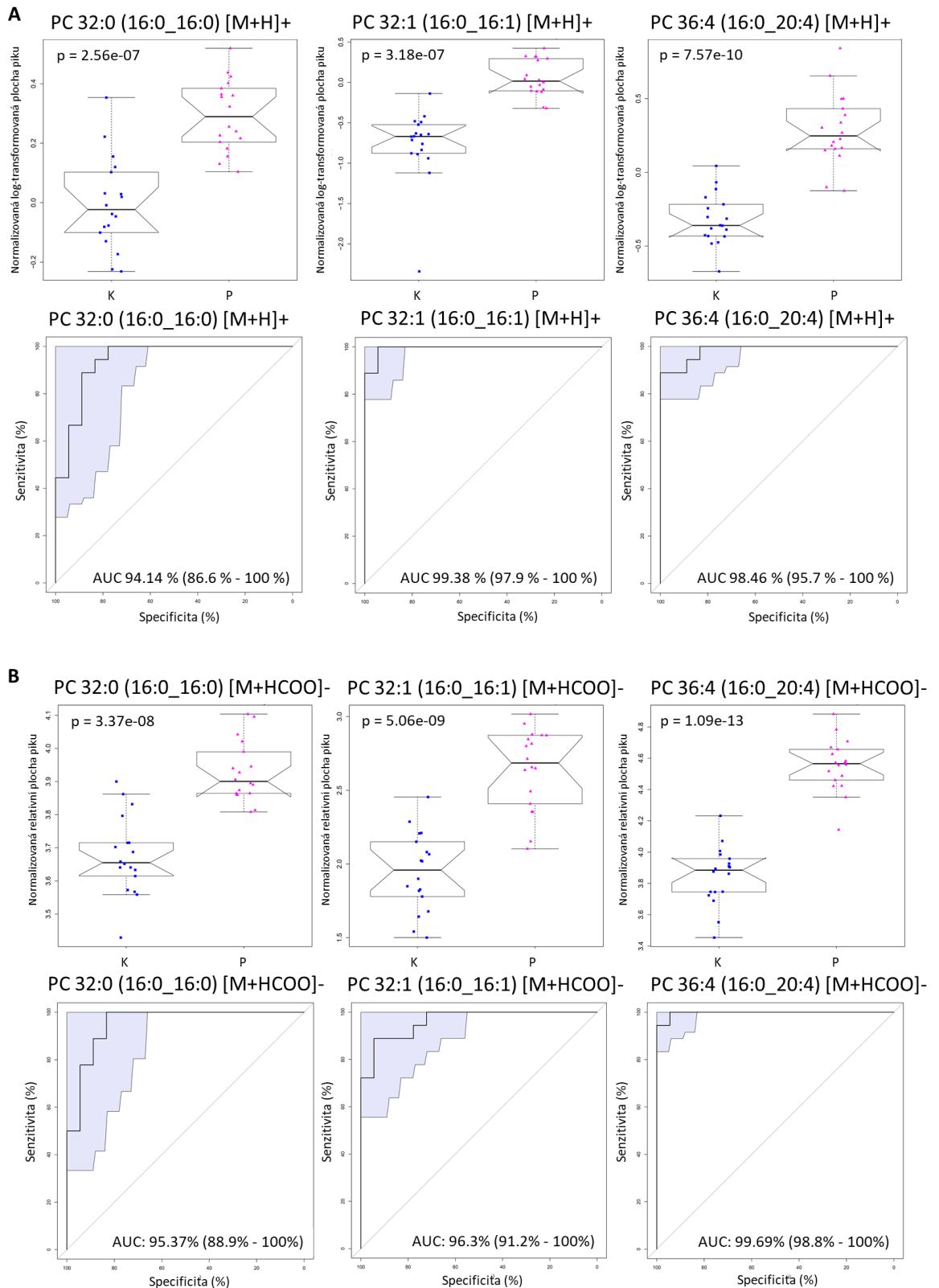
Lipid	p1 (S-plot)	P-value (t-test)	Míra změny (fold change, P/K)
<i>CAR 16:0</i>	-4.38	5.01E-09	2.75
<i>CAR 16:1</i>	-5.03	1.91E-13	3.57
<i>CAR 4:0</i>	-5.54	6.74E-16	6.87
<i>CE 18:2</i>	3.26	1.48E-10	0.50
<i>FA 22:5</i>	-4.30	1.54E-09	3.36
<i>LPC 18:2 [M+H]⁺</i>	3.35	3.84E-06	0.62
<i>LPC 18:2 [M+HCOO]⁻</i>	3.31	1.40E-05	0.65
<i>LPC 18:2 [M+Na]⁺</i>	3.62	1.04E-06	0.56
<i>LPE 18:2</i>	3.74	3.67E-05	0.51
<i>PC 32:1 (16:0_16:1) [M+H]⁺</i>	-3.73	1.10E-10	2.15
<i>PC 32:1 (16:0_16:1) [M+HCOO]⁻</i>	-3.37	5.06E-09	2.06
<i>PC 35:2 [M+H]⁺</i>	3.72	1.30E-09	0.52
<i>PC 35:2 [M+HCOO]⁻</i>	3.43	2.39E-07	0.58
<i>PC 36:2 (18:0_18:2) [M+H]⁺</i>	3.67	1.04E-10	0.54
<i>PC 36:2 (PC 18:1_18:1) [M+HCOO]⁻</i>	3.63	7.48E-11	0.53
<i>PC 36:2 [M+Na]⁺</i>	3.70	1.50E-11	0.55
<i>PC 36:3 (18:1_18:2) [M+HCOO]⁻</i>	3.57	1.97E-05	0.61
<i>PC 36:3 [M+Na]⁺</i>	3.26	1.33E-06	0.57
<i>PC 36:4 (16:0_20:4) [M+H]⁺</i>	-3.80	1.46E-11	1.93
<i>PC 36:4 (16:0_20:4) [M+HCOO]⁻</i>	-3.64	1.09E-13	1.96
<i>PC 36:4 (18:2_18:2) [M+H]⁺</i>	4.14	6.71E-05	0.56
<i>PC 36:4 [M+HCOO]⁻</i>	4.27	1.81E-04	0.53
<i>PC 36:4 [M+Na]⁺</i>	-3.81	3.21E-12	2.09
<i>PC 38:3 (18:0_20:3) [M+H]⁺</i>	3.24	1.35E-07	0.62
<i>PC 38:4 (18:0_20:4) [M+H]⁺</i>	-2.57	1.29E-06	1.52
<i>SHexCer-O 42:5</i>	3.50	7.69E-10	0.58
<i>SM 30:1</i>	4.46	2.53E-06	0.41
<i>SM 36:2</i>	-3.19	9.63E-08	1.78
<i>SM 36:2</i>	-3.19	1.84E-08	1.69
<i>TG 38:0 (12:0_12:0_14:0)</i>	3.98	2.34E-05	0.45



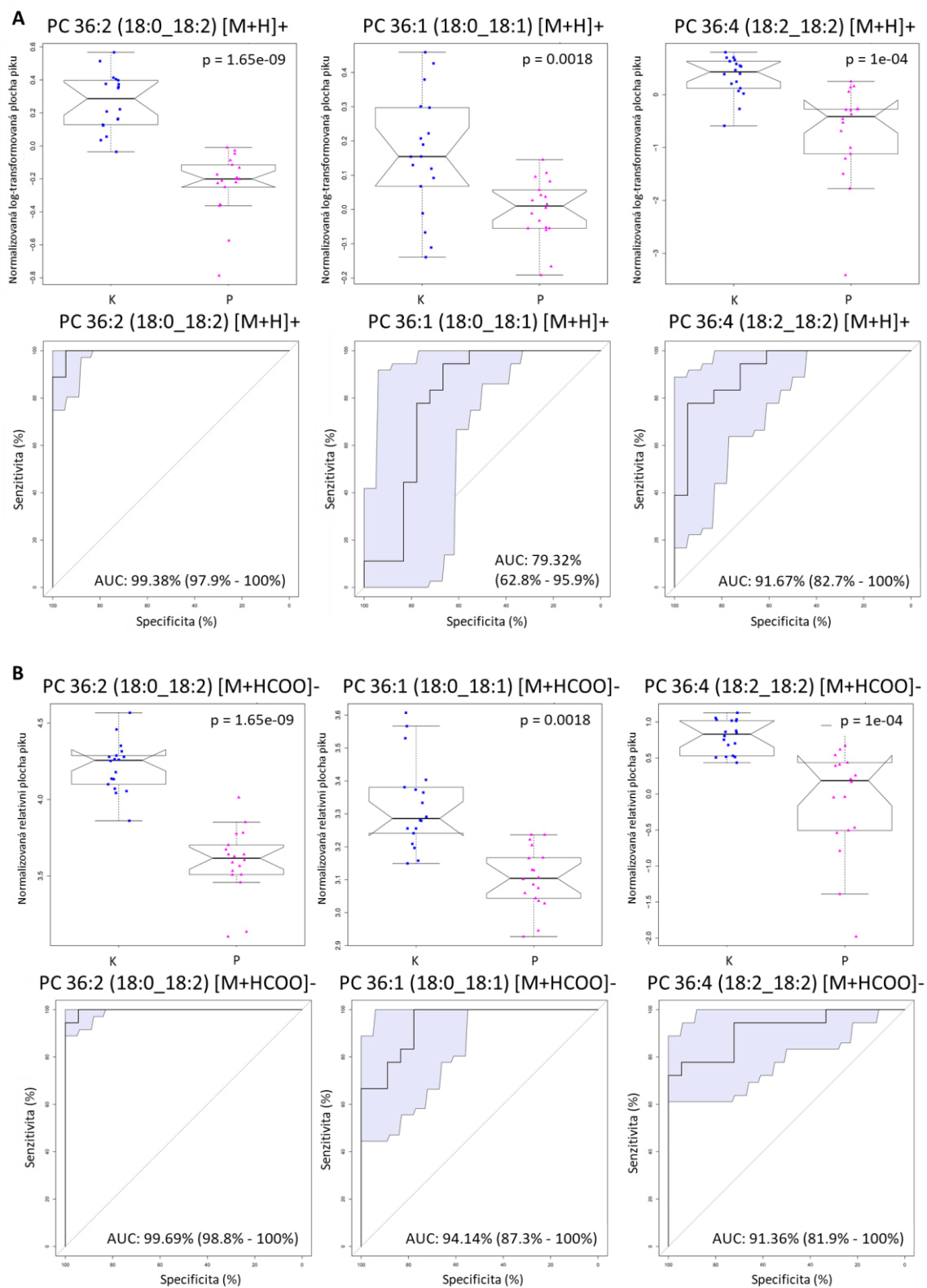
Obr. 31 Korelační síť fosfatidylcholinů (PC) pro cílenou analýzu. Šestiúhelníková buňka představuje identifikovaný lipid. Barva buňky koresponduje s relativní změnou v mediánu uvedenou v legendě (snížené lipidy u pacientů modře a zvýšené červeně). Spojující čáry představují korelace mezi lipidy, kdy modře jsou zobrazeny negativní korelace a červeně pozitivní korelace.



Obr. 32 Korelační síť fosfatidylcholinů (PC) pro necílenou analýzu. Šestiúhelníková buňka představuje identifikovaný lipid, obdélníky přerušovanou čarou představují lipidové individuuum (soubor identifikovaných aduktů). Barva buňky koresponduje s relativní změnou v mediánu uvedenou v legendě (snížené lipidy u pacientů modře a zvýšené červeně). Spojující čáry představují korelace mezi lipidy, kdy modře jsou zobrazeny negativní korelace a červeně pozitivní korelace.

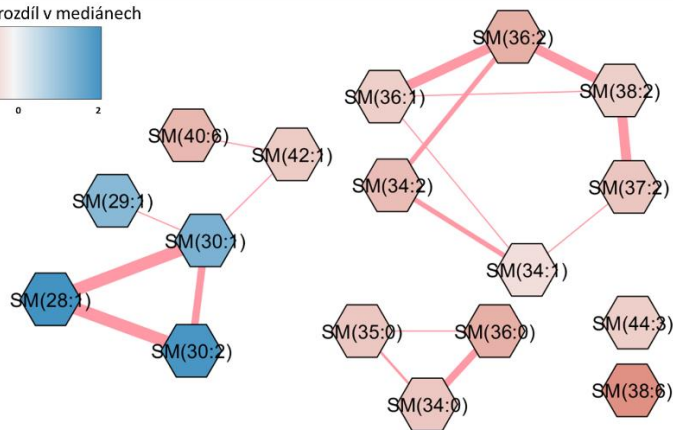
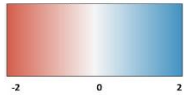


Obr. 33 Krabicové grafy (s uvedením p-value t-testu v levém horním rohu grafu) a ROC křivky (s hodnotami AUC v pravém dolním rohu grafu) signifikantně zvýšených fosfatidylcholinů (PC) u skupiny pacientů (P) pro cílenou analýzu (A) a necílenou analýzu (B).



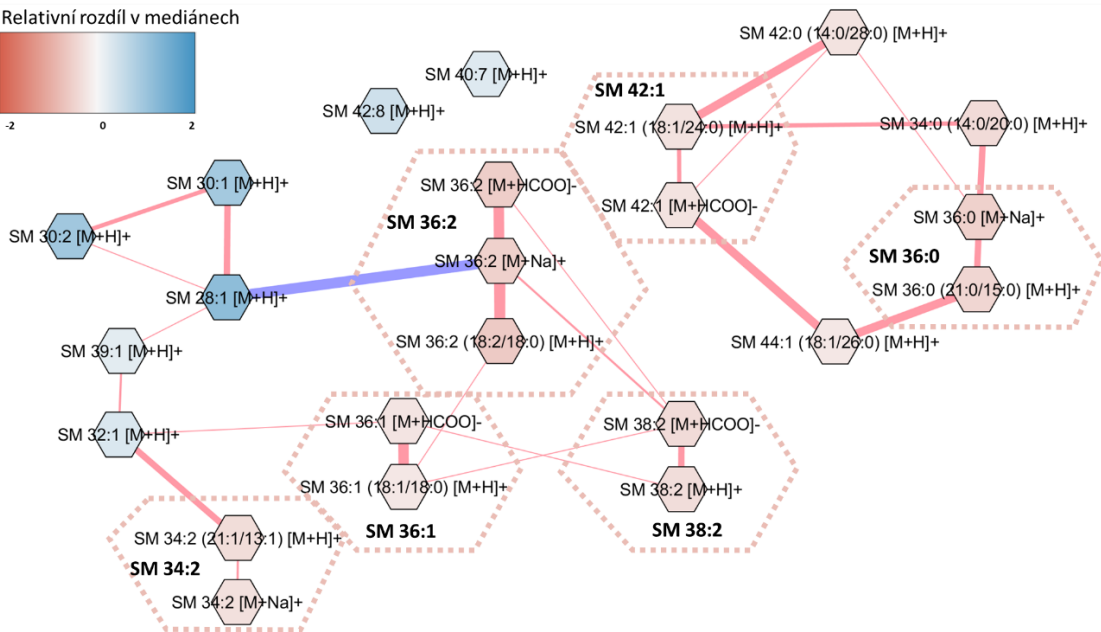
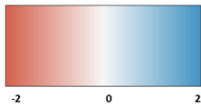
Obr. 34 Krabicové grafy (s uvedením p-value t-testu v pravém horním rohu grafu) a ROC křivky (s hodnotami AUC v pravém dolním rohu grafu) signifikantně snížených fosfatidylcholinů (PC) u skupiny pacientů (P) pro cílenou analýzu (A) a necílenou analýzu (B).

Relativní rozdíl v mediánech

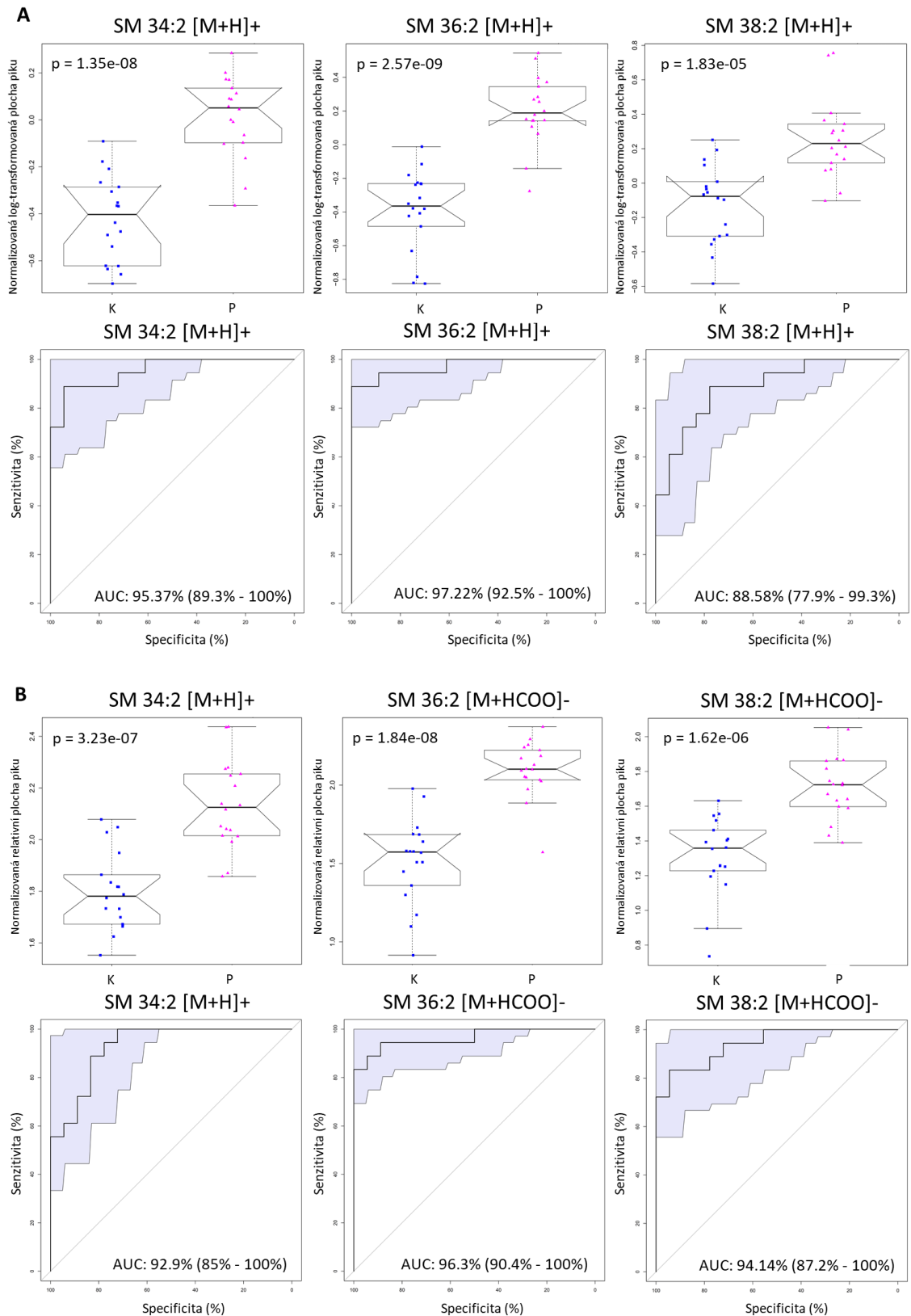


Obr. 35 Korelační síť sfingomyelinů (SM) pro cílenou analýzu. Šestiúhelníková buňka představuje identifikovaný lipid. Barva buňky koresponduje s relativní změnou v mediánu uvedenou v legendě (snížené lipidy u pacientů modře a zvýšené červeně). Spojující čáry představují korelace mezi lipidy, kdy modře jsou zobrazeny negativní korelace a červeně pozitivní korelace.

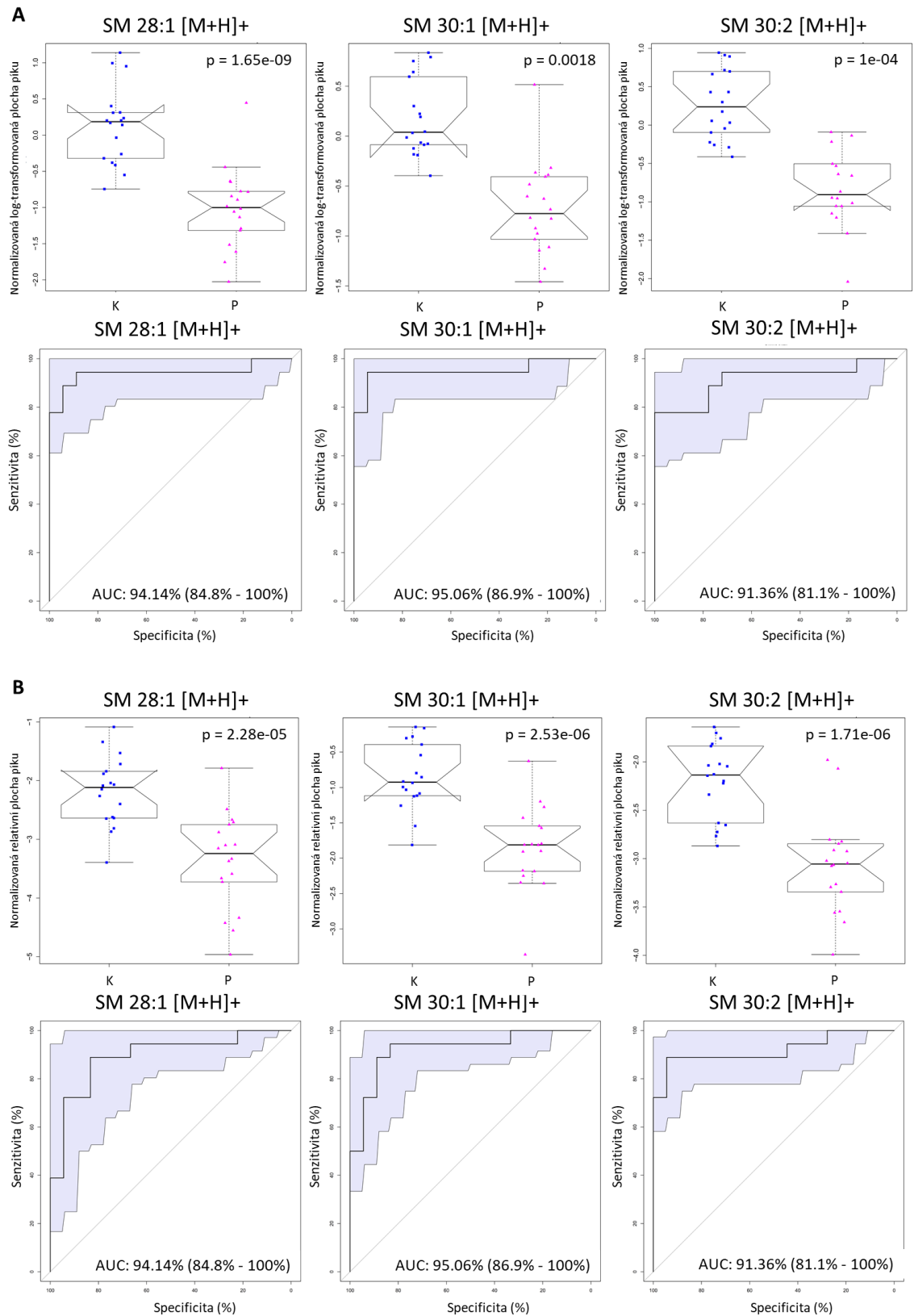
Relativní rozdíl v mediánech



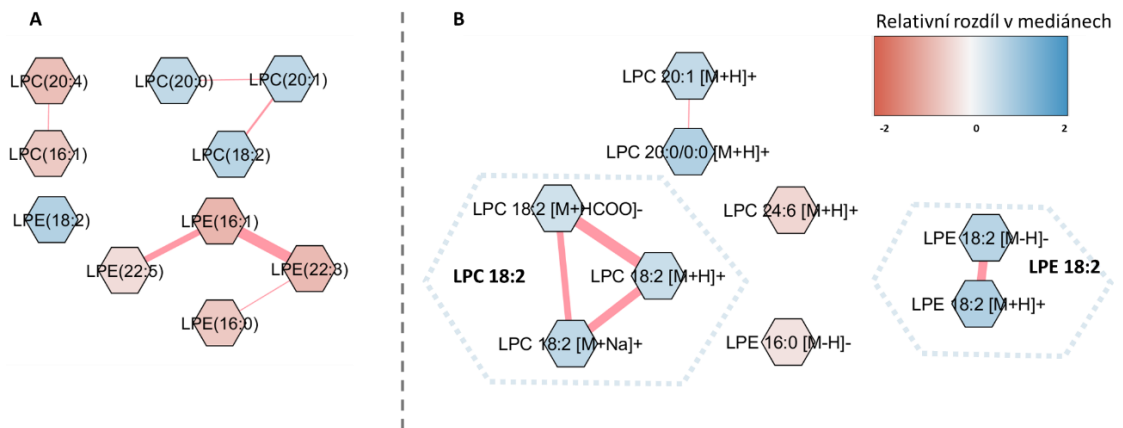
Obr. 36 Korelační síť sfingomyelinů (SM) pro necílenou analýzu. Šestiúhelníková buňka představuje identifikovaný lipid, obdélníky přerušovanou čarou představují lipidové individuuum (soubor identifikovaných aduktů). Barva buňky koresponduje s relativní změnou v mediánu uvedenou v legendě (snížené lipidy u pacientů modře a zvýšené červeně). Spojující čáry představují korelace mezi lipidy, kdy modře jsou zobrazeny negativní korelace a červeně pozitivní korelace.



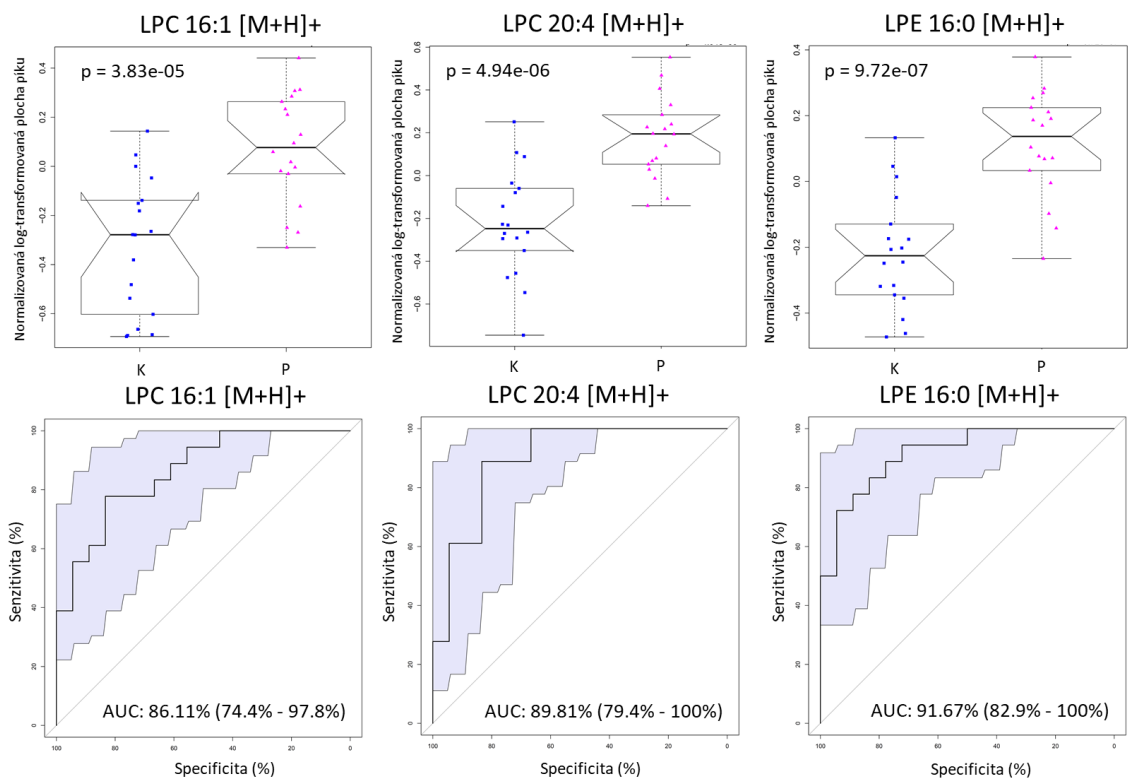
Obr. 37 Krabicové grafy (s uvedením p-value t-testu v levém horním rohu grafu) a ROC křivky (s hodnotami AUC v pravém dolním rohu grafu) signifikantně zvýšených sfingomyelinů (SM) u skupiny pacientů (P) pro cílenou analýzu (A) a necílenou analýzu (B).



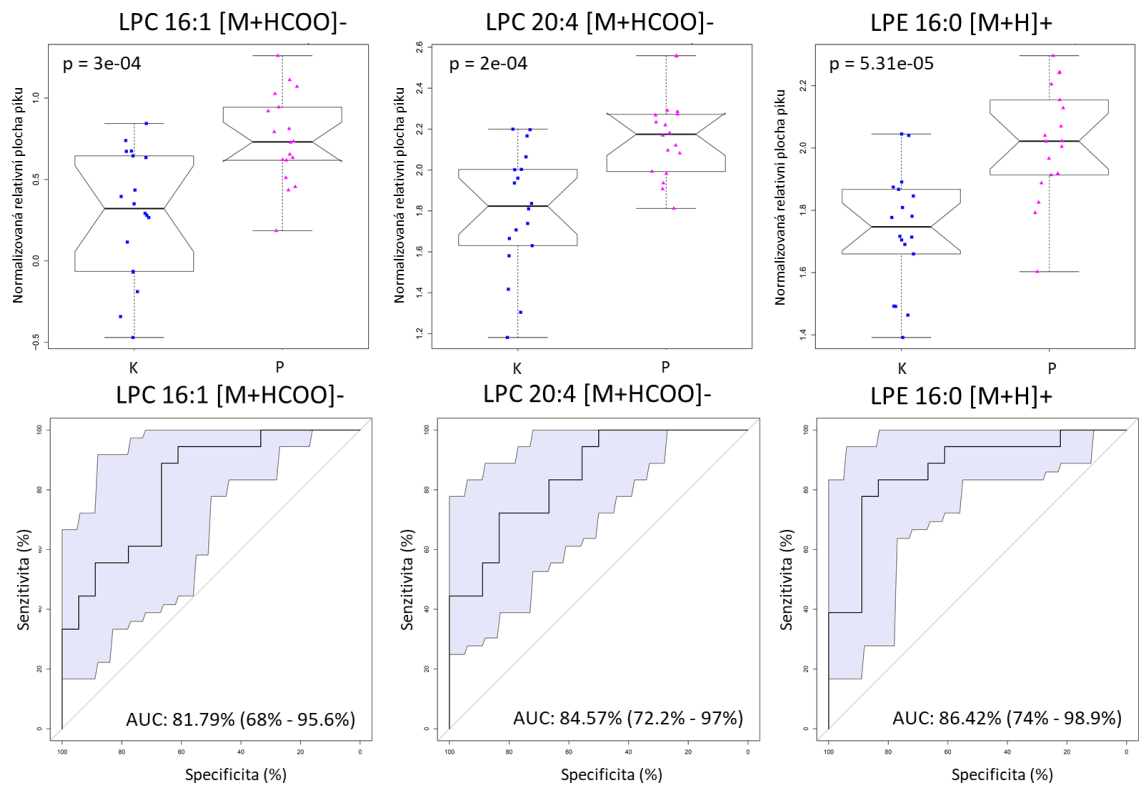
Obr. 38 Krabicové grafy (s uvedením p-value t-testu v pravém horním rohu grafu) a ROC křivky (s hodnotami AUC v pravém dolním rohu grafu) signifikantně snížených sfingomyelinů (SM) u skupiny pacientů (P) pro cílenou analýzu (A) a necílenou analýzu (B).



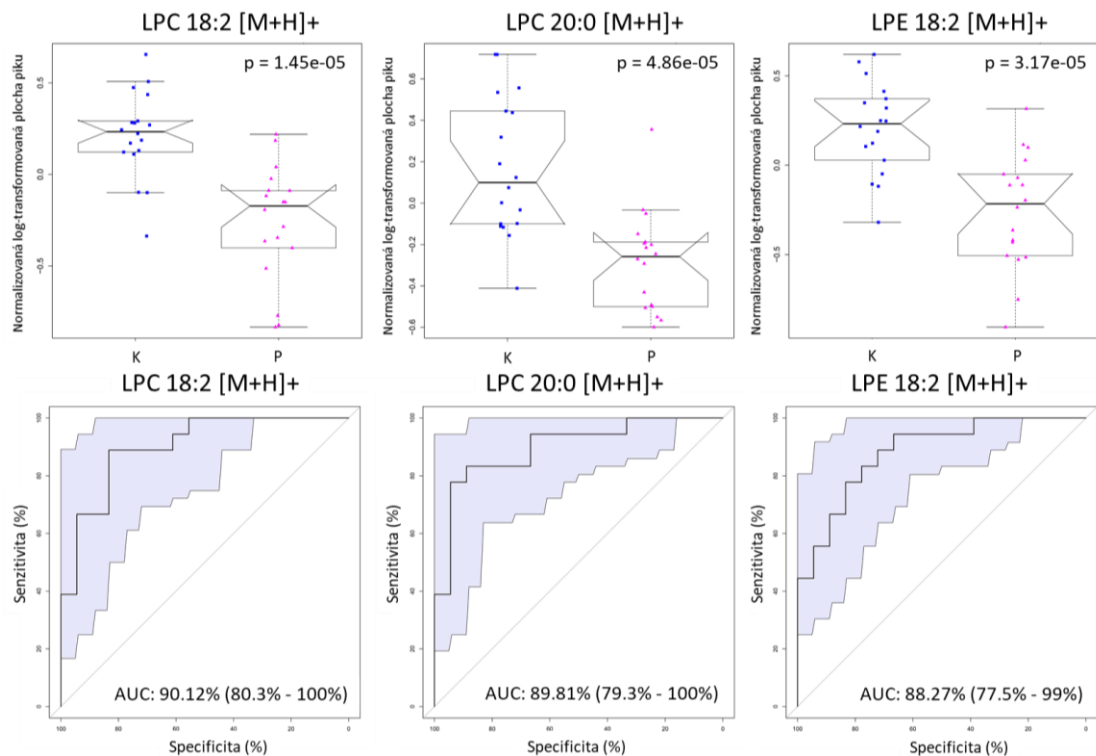
Obr. 39 Korelační síť lysofosfatidylcholinů (LPC) a lysofosfatidylethanolaminů (LPE) pro cílenou (A) necílenou analýzu (B). Šestiúhelníková buňka představuje identifikovaný lipid, obdelníky přerušovanou čarou představují lipidové individuum (soubor identifikovaných aduktů). Barva buňky koresponduje s relativní změnou v mediánu uvedenou v legendě (snížené lipidy u pacientů modře a zvýšené červeně). Spojující čáry představují korelace mezi lipidy, kdy modře jsou zobrazeny negativní korelace a červeně pozitivní korelace.



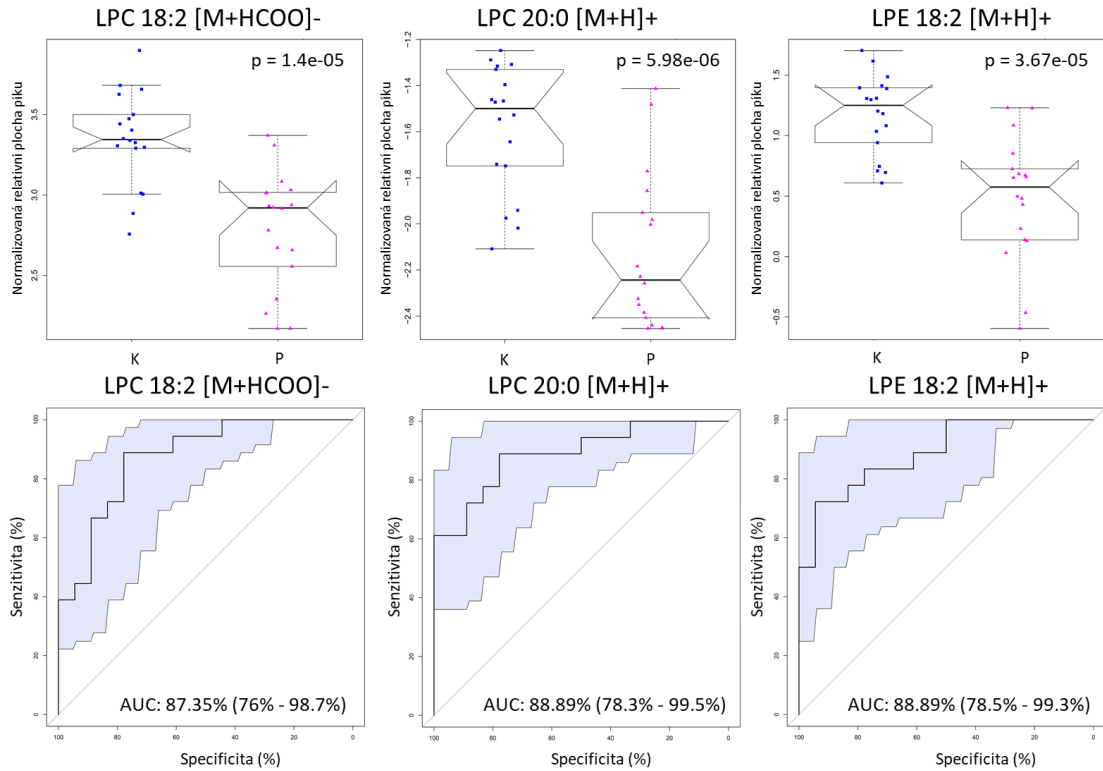
Obr. 40 Krabicové grafy (s uvedením p-value t-testu v levém horním rohu grafu) a ROC křivky (s hodnotami AUC v pravém dolním rohu grafu) signifikantně zvýšených lysofosfatidylcholinů (LPC) a lysofosfatidylethanolaminů (LPE) u skupiny pacientů (P) pro cílenou analýzu.



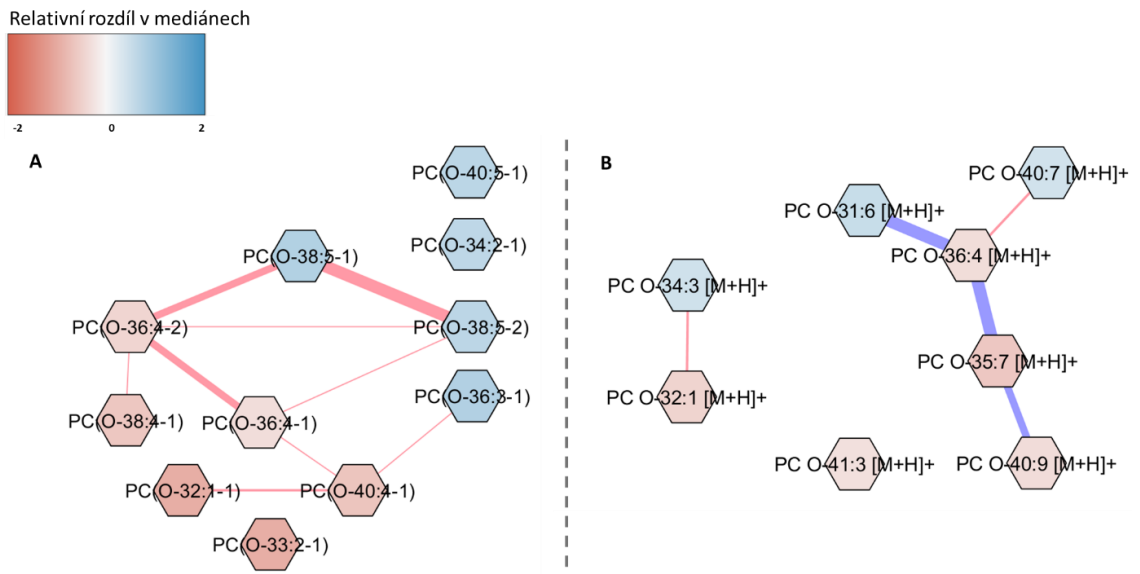
Obr. 41 Krabicové grafy (s uvedením p-value t-testu v levém horním rohu grafu) a ROC křivky (s hodnotami AUC v pravém dolním rohu grafu) signifikantně zvýšených lysofosfatidylcholinů (LPC) a lysofosfatidylethanolaminů (LPE) u skupiny pacientů (P) pro a necílenou analýzu (B).



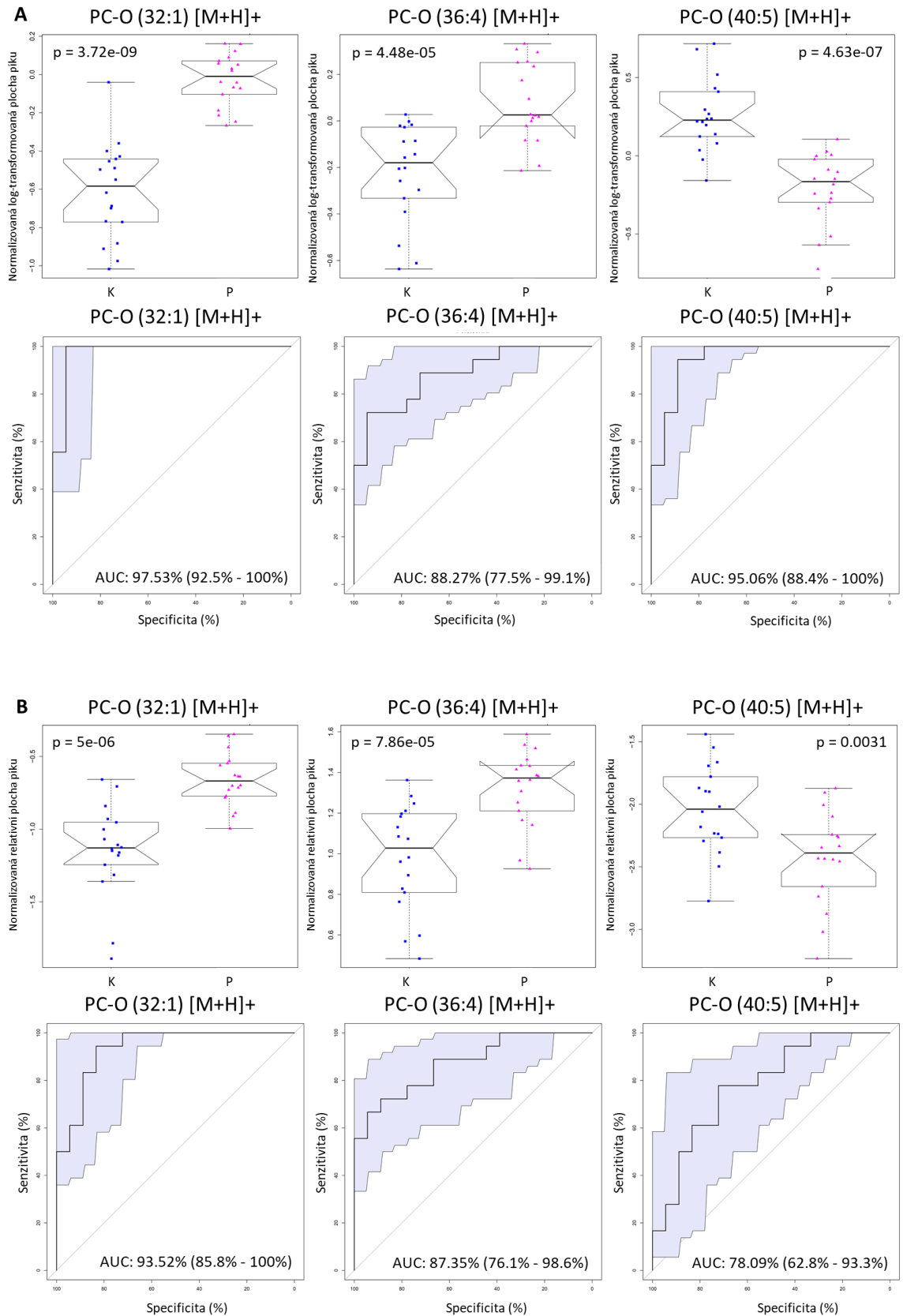
Obr. 42 Krabicové grafy (s uvedením p-value t-testu v levém horním rohu grafu) a ROC křivky (s hodnotami AUC v pravém dolním rohu grafu) signifikantně snížených lysofosfatidylcholinů (LPC) a lysofosfatidylethanolaminů (LPE) u skupiny pacientů (P) pro cílenou analýzu (B).



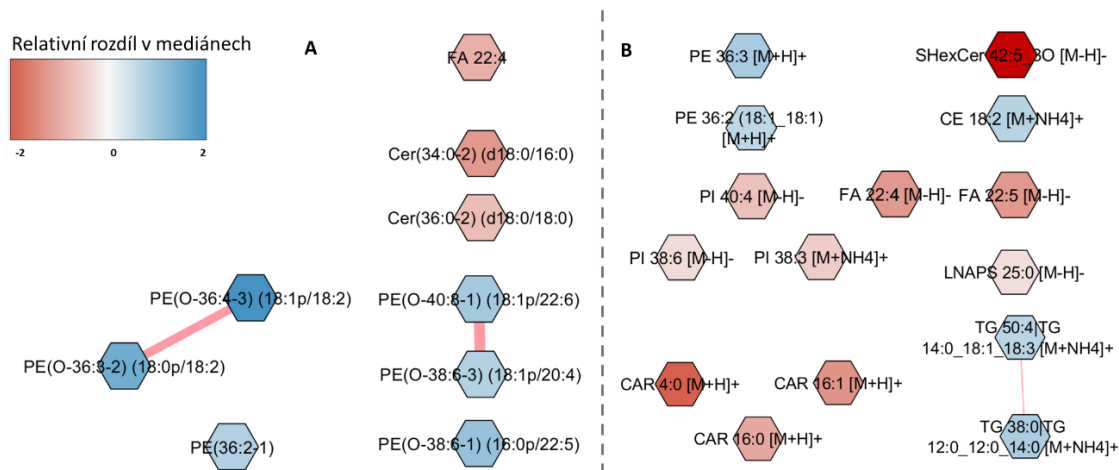
Obr. 43 Krabicové grafy (s uvedením p-value t-testu v pravém horním rohu grafu) a ROC křivky (s hodnotami AUC v pravém dolním rohu grafu) signifikantně snížených lysofosfatidylcholinů (LPC) a lysofosfatidylethanolaminů (LPE) u skupiny pacientů (P) pro necílenou analýzu.



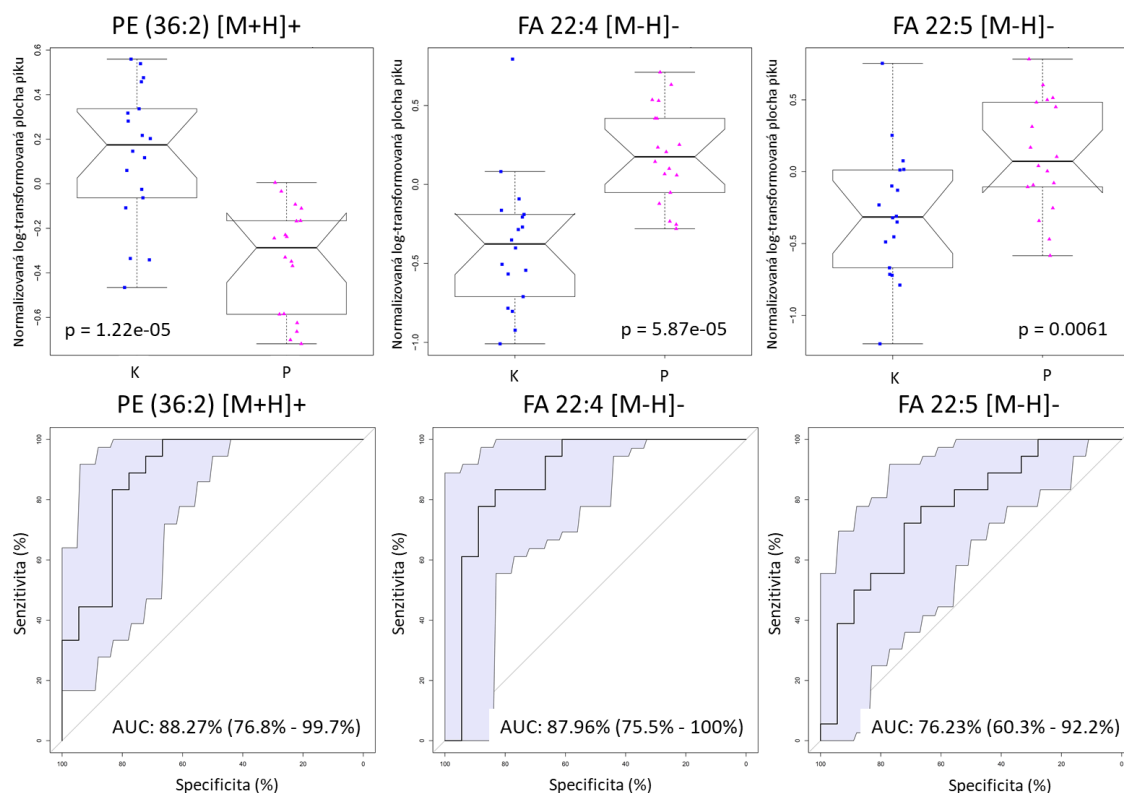
Obr. 44 Korelační síť plasmalogenů (PC-O) pro cílenou analýzu (A) a necílenou analýzu (B). Šestiúhelníková buňka představuje identifikovaný lipid. Barva buňky koresponduje s relativní změnou v mediánu uvedenou v legendě (snížené lipidy u pacientů modře a zvýšené červeně). Spojující čáry představují korelace mezi lipidy, kdy modře jsou zobrazeny negativní korelace a červeně pozitivní korelace.



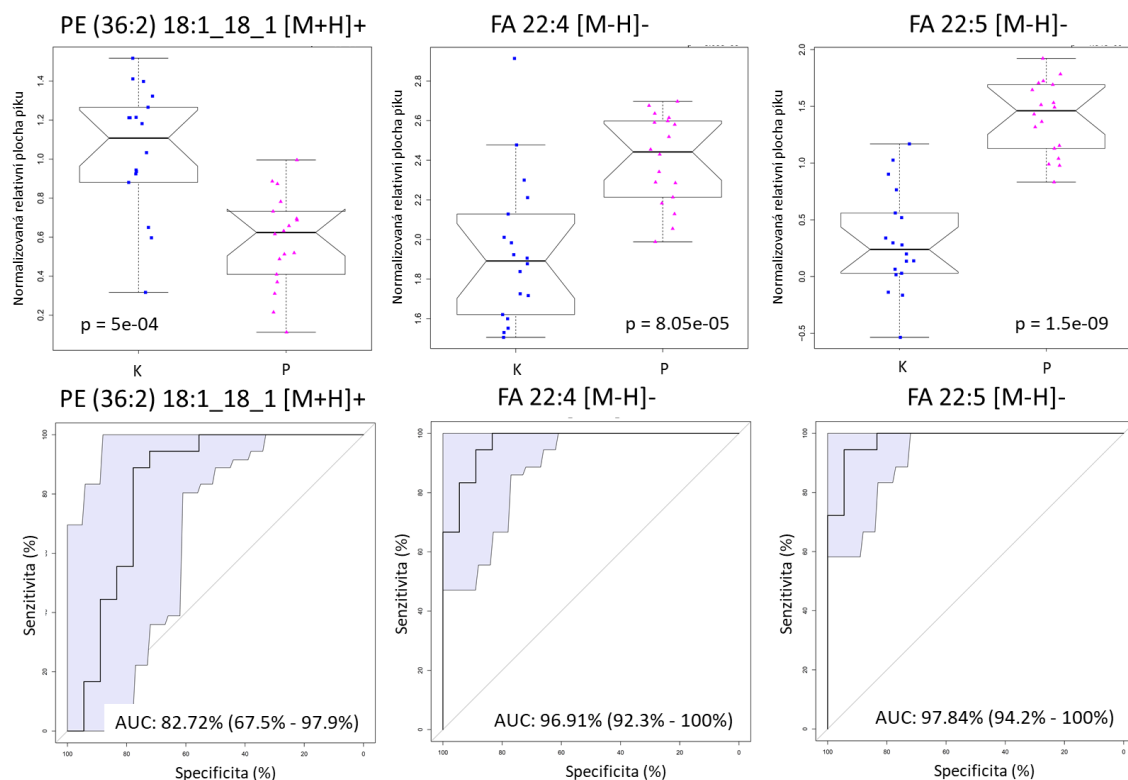
Obr. 45 Krabicové grafy (s uvedením p-value t-testu v horní části grafu) a ROC křivky (s hodnotami AUC v pravém dolním rohu grafu) signifikantně zvýšených a snížených plasmalogenů (PC-O) u skupiny pacientů (P) pro cílenou analýzu (A) a necílenou analýzu (B).



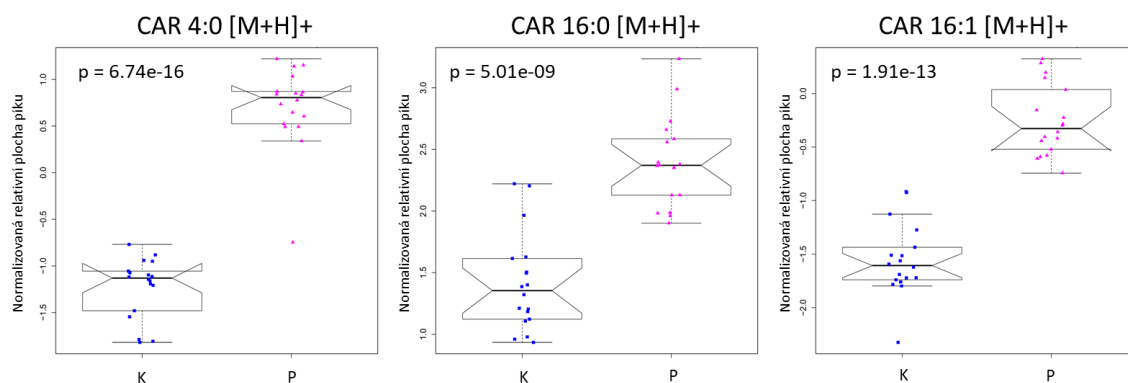
Obr. 46 Korelační síť ostatních signifikantně snížených a zvýšených lipidů. Šestiúhelníková buňka představuje identifikovaný lipid. Barva buňky koresponduje s relativní změnou v mediánu uvedenou v legendě (snížené lipidy u pacientů modře a zvýšené červeně). Spojující čáry představují korelace mezi lipidy, kdy modře jsou zobrazeny negativní korelace a červeně pozitivní korelace.



Obr. 47 Krabicové grafy (s uvedením p-value t-testu v dolní části grafu) a ROC křivky (s hodnotami AUC v pravém dolním rohu grafu) signifikantně zvýšených a snížených lipidů z ostatních lipidových skupin pro cílenou analýzu.



Obr. 48 Krabicové grafy (s uvedením p-value t-testu v dolní části grafu) a ROC křivky (s hodnotami AUC v pravém dolním rohu grafu) signifikantně zvýšených a snížených lipidů z ostatních lipidových skupin pro necílenou analýzu.



Obr. 49 Krabicové grafy (s uvedením p-value t-testu v levém horním rohu grafu) signifikantně zvýšených acylkarnitinů (CAR) identifikovaných necílenou analýzou.

4.3 Strukturní identifikace neznámých metabolitů analýzou fragmentačních spekter

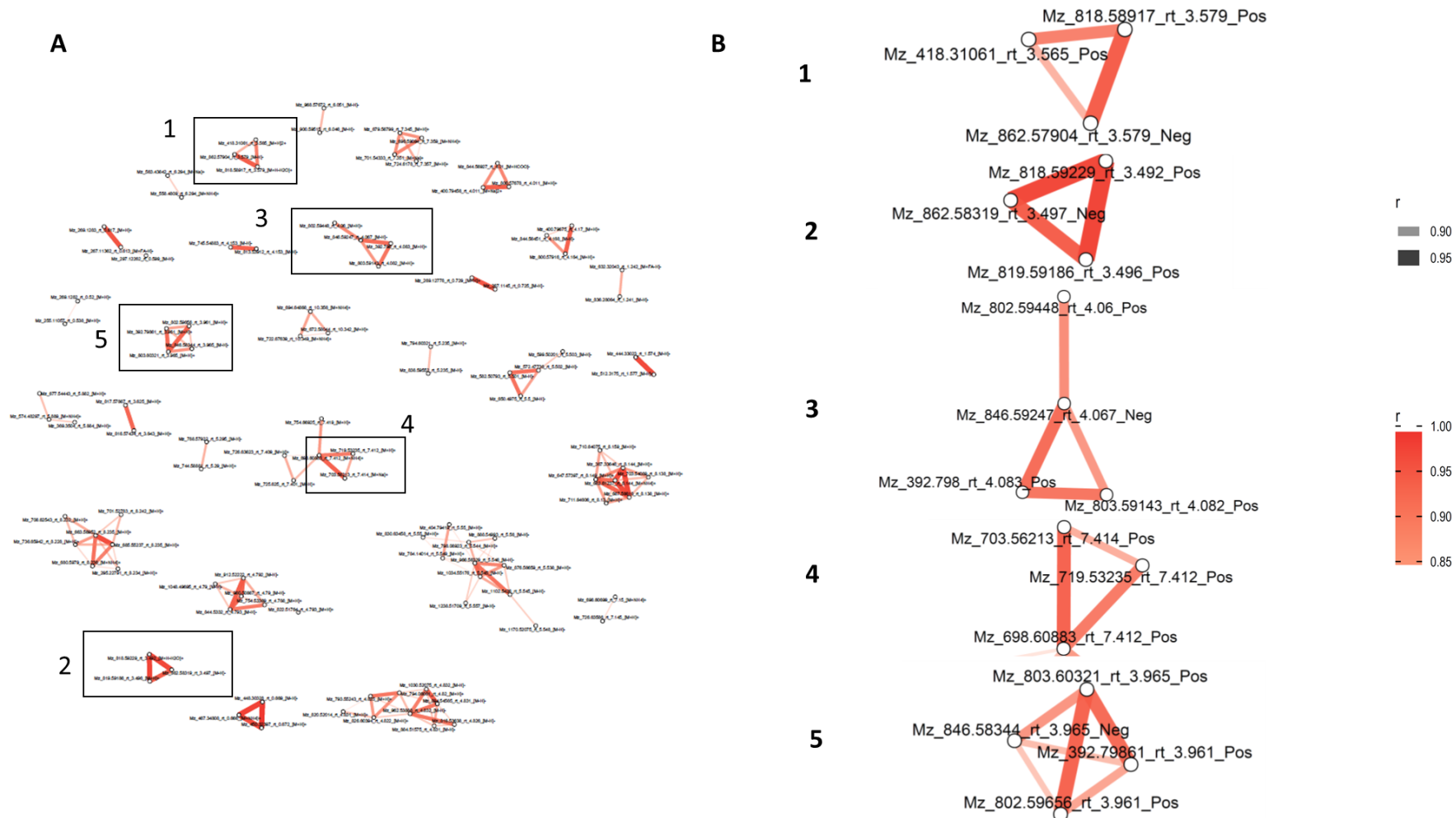
Mimo identifikované lipidy bylo necílenou analýzou zachyceno 2788 neznámých metabolitů (features), které nebyly identifikovány automaticky pomocí programu MS-DIAL (kapitola 3.2.4, parametry jsou specifikovány příloze 4 a 5). Signifikantní features byly vybrány dle nejvyššího skóre na základě výstupu z OPLS-DA (S-plot graf,

korelovaná absolutní hodnota p_1) a dalších parametrů jednorozměrné statistiky (t-test, rozdíl v mediánech). Z 2788 neznámých metabolitů, 205 vykazovalo v t-testu nižší hodnotu p-value než $1,55 \cdot 10^{-5}$ (korigovaná hodnota p-value Bonferroniho korekcí dle všech zachycených metabolitů; $\frac{0,05}{3230} = 1,55 \cdot 10^{-5}$). Pro snadnější identifikaci neznámých features byl využit skript CROP, k redukci multiplicitně identifikovaných metabolitů (vlivem kombinací aduktových iontů, nábojem a fragmentacemi v iontovém zdroji) vytvořením korelační mapy těchto signifikantních metabolitů (viz Obr. 50). U signifikantních features spadajících do korelačních klastrů byly blíže zkoumány isotopické vzory a fragmentace k identifikaci neznámých lipidů.

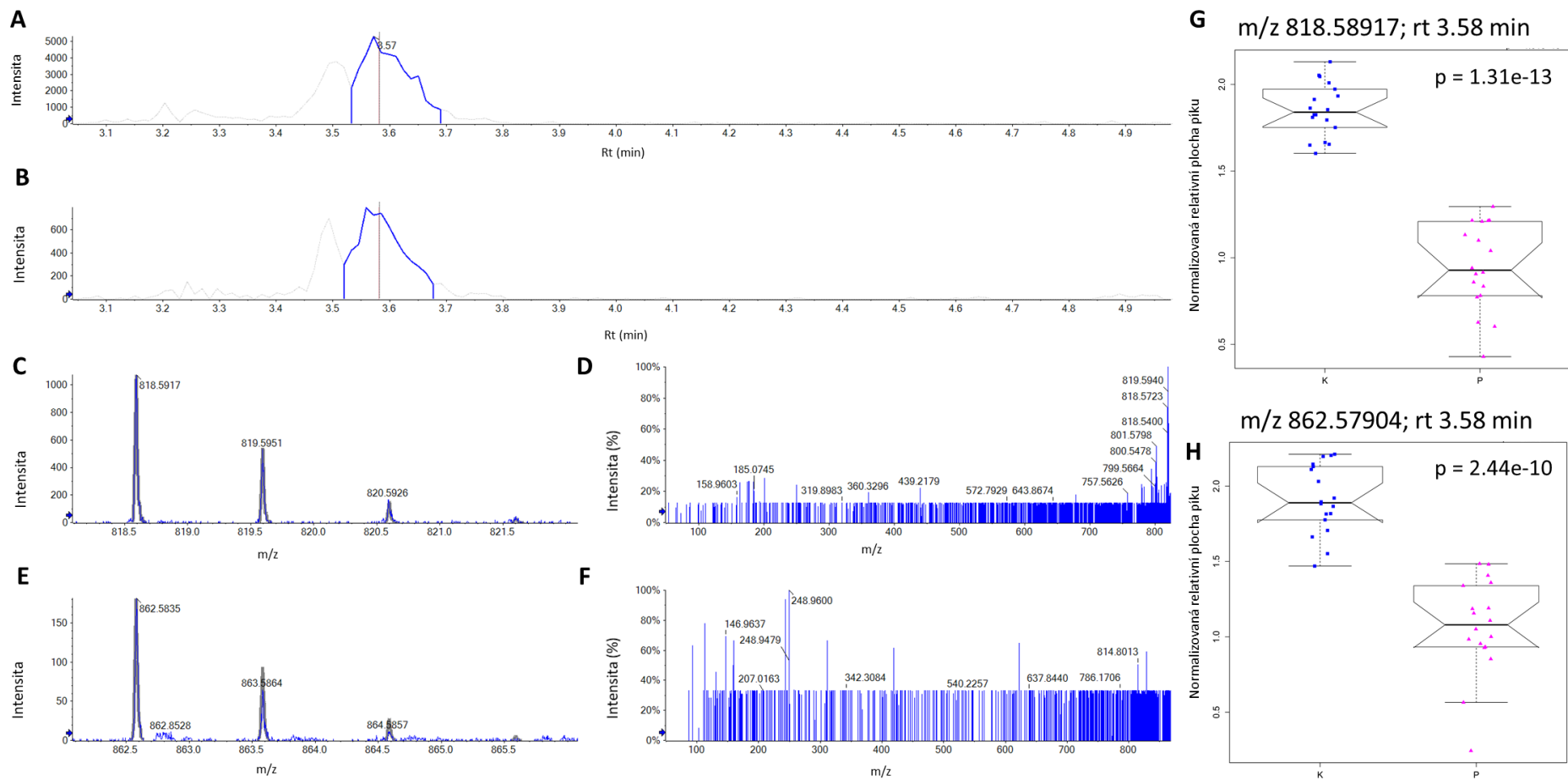
Tab. 6 Seznam neznámých features řazených dle korelačních shluků (klastrů) s uvedením hodnot m/z , retenčního času (Rt), absolutní korelované hodnoty dle grafu S-plot (abs corr p_1), p-value a relativního rozdílu v mediánech.

Klastr	m/z	Měřicí mód	Rt (min)	abs corr p_1 (S-plot)	p-value (t-test)	Míra změny (fold change, P/K)
1	818.5892	+	3.58	0.96	1.31E-13	0.40
	862.5790	-	3.58	0.94	2.44E-10	0.45
	418.3106	+	3.57	0.88	9.61E-11	0.36
2	818.5923	+	3.49	0.95	1.81E-14	0.42
	819.5919	+	3.50	0.94	3.56E-13	0.40
	862.5832	-	3.50	0.93	1.19E-11	0.39
3	802.5945	+	4.06	0.93	2.98E-10	0.49
	392.7980	+	4.08	0.93	5.85E-11	0.48
	803.5914	+	4.08	0.91	7.74E-10	0.45
	846.5925	-	4.07	0.89	1.27E-07	0.43
4	703.5621	+	7.41	0.92	7.00E-11	0.45
	698.6088	+	7.41	0.92	1.17E-11	0.39
	719.5324	+	7.41	0.83	2.49E-10	0.32
5	803.6032	+	3.97	0.89	1.13E-08	0.50
	802.5966	+	3.96	0.89	8.04E-09	0.48
	846.5834	-	3.97	0.89	2.43E-08	0.48
	392.7986	+	3.96	0.85	1.91E-08	0.41

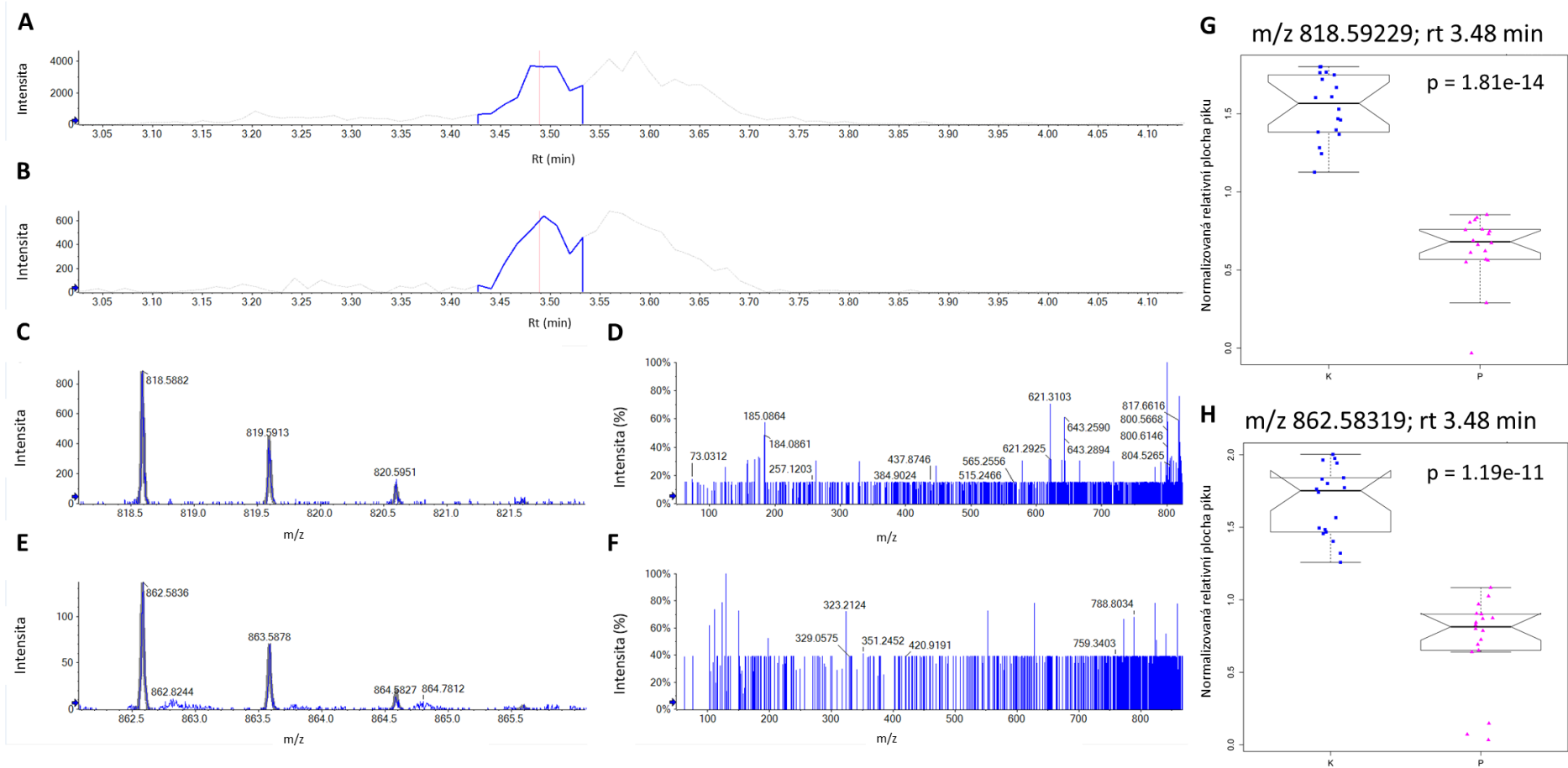
Vzhledem k podobnosti retenčních časů a hodnot m/z mezi features v klastru 1 a 2 a dále mezi features v klastru 3 a 5, byly tyto klastry blíže zkoumány dohromady. V obou případech nedošlo k separaci píků na základní linii chromatogramu (viz Obr. 51 a 52), což vedlo k předpokladu, že se jedná o isomerní formu téhož lipidu. Ačkoliv byla fragmentační spektra špatně čitelná (vysoký poměr šumu), bylo možné v pozitivním módu identifikovat fragment 184 typický pro třídy LPC, PC a SM (Cajka a Fiehn, 2014). Na základě srovnání s databází LIPID MAPS (m/z , retenční čas, fragmentace) byly lipidy blíže identifikovány jako oxidované fosfatidylcholiny (OxPC, viz Tab. 7).



Obr. 50 Korelační mapa vybraných neznámých features vytvořená skriptem CROP se zvýrazněním pěti nejvíce signifikantních klastrů dle tabulky Tab. 6 (A). Přiblížení pěti nejvíce signifikantních klastrů s uvedením hodnoty m/z (Mz_), retenčního času (rt_) a polarity analýzy (Pos – pozitivní mód, Neg – negativní mód) (B). Tloušťka a barva spojovacích čar odpovídá korelaci dle legendy.



Obr. 51 Specifikace vybraných features v korelovaném klastru 1. Vlevo nahoře jsou uvedeny chromatogramy v pozitivním (A) a negativním (B) módu, dole jsou uvedeny isotopické vzory v pozitivním (C) a negativním (E) módu a fragmentační spektra v pozitivním (D) a negativním (F) módu. Vlevo jsou uvedeny krabicové grafy neznámého lipidu definovaného klastrem 1 v pozitivním (G) a negativním módu (H) s uvedením p-value (t-test) v pravém horním rohu (kontroly – K, pacienti – P). Experimentální data jsou reprezentována kontrolním vzorkem 20.



Obr. 52 Specifikace vybraných features v korelovaném klastru 2. Vlevo nahoře jsou uvedeny chromatogramy v pozitivním (A) a negativním (B) módu, dole jsou uvedeny isotopické vzory v pozitivním (C) a negativním (E) módu a fragmentační spektra v pozitivním (D) a negativním (F) módu. Vlevo jsou uvedeny krabicové grafy neznámého lipidu definovaného klastrem 1 v pozitivním (G) a negativním módu (H) s uvedením p-value (t-test) v pravém horním rohu (kontroly – K, pacienti – P). Experimentální data jsou reprezentována kontrolním vzorkem 17.

Tab. 7 Srovnání hodnot m/z a retenčního času vybraných lipidů v klastrech 1,2,3 a 5 s databází LIPID MAPS.

Klastr	Experimentální m/z	Referenční m/z	Rozdíl v m/z (ppm)	Aduktový iont	Název lipidu	Vzorec	Experimentální retenční čas (min)	Referenční retenční čas (min)
1	818.5892	818.5906	1.71	[M+H] ⁺			3.5	3.6
	862.5790	862.5815	2.90	[M+HCOO] ⁻	PC(18:0/DiHODE) nebo PC(18:1/DiHOME)	C ₄₄ H ₈₄ NO ₁₀ P		
2	818.5923	818.5906	2.08	[M+H] ⁺			3.6	
	862.5832	862.5815	1.97	[M+HCOO] ⁻				
3	802.5945	802.5956	1.37	[M+H] ⁺			4.1	4.4
	846.5925	846.5866	6.97	[M+HCOO] ⁻	PC(18:0/EpOME) nebo PC(18:0/HODE) nebo PC(18:1/HOME)	C ₄₄ H ₈₄ NO ₉ P		
5	802.5966	802.5956	1.25	[M+H] ⁺			4.0	
	846.5834	846.5866	3.78	[M+HCOO] ⁻				

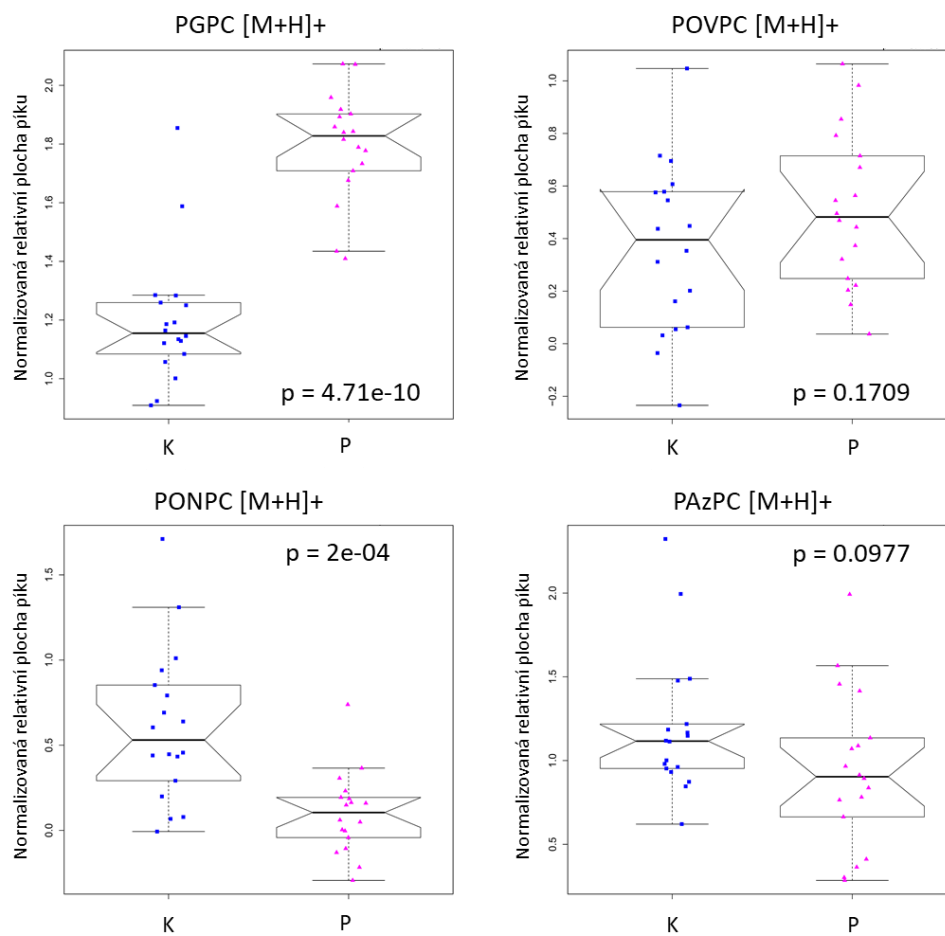
K identifikaci dalších oxidovaných lipidů byly využity poznatky ze studie Schlotterbeck *et al.* (2019) využívající podobné parametry necílené lipidomické metody (totožné MS parametry a modifikované LC parametry) využitě v této práci (dodatečná data k identifikaci oxidovaných fostatidylcholinů byla poskytnuta autorem na vyžádání). Ve zmíněné studii byly identifikovány oxidované fosfatidylcholiny (OxPC):

- 1-palmitoyl-2-(5-oxovaleroyl)-sn-glycero-3-fosfatidylcholin (POVPC),
- 1-palmitoyl-2-(9-oxononanoyl)-sn-glycero-3-fosfatidylcholin (PONPC),
- 1-palmitoyl-2-azelaoyl-sn-glycero-3-fosfatidylcholin (PAzPC), a
- 1-palmitoyl-2-glutaryl-sn-glycero-3-fosfatidylcholin (PGPC).

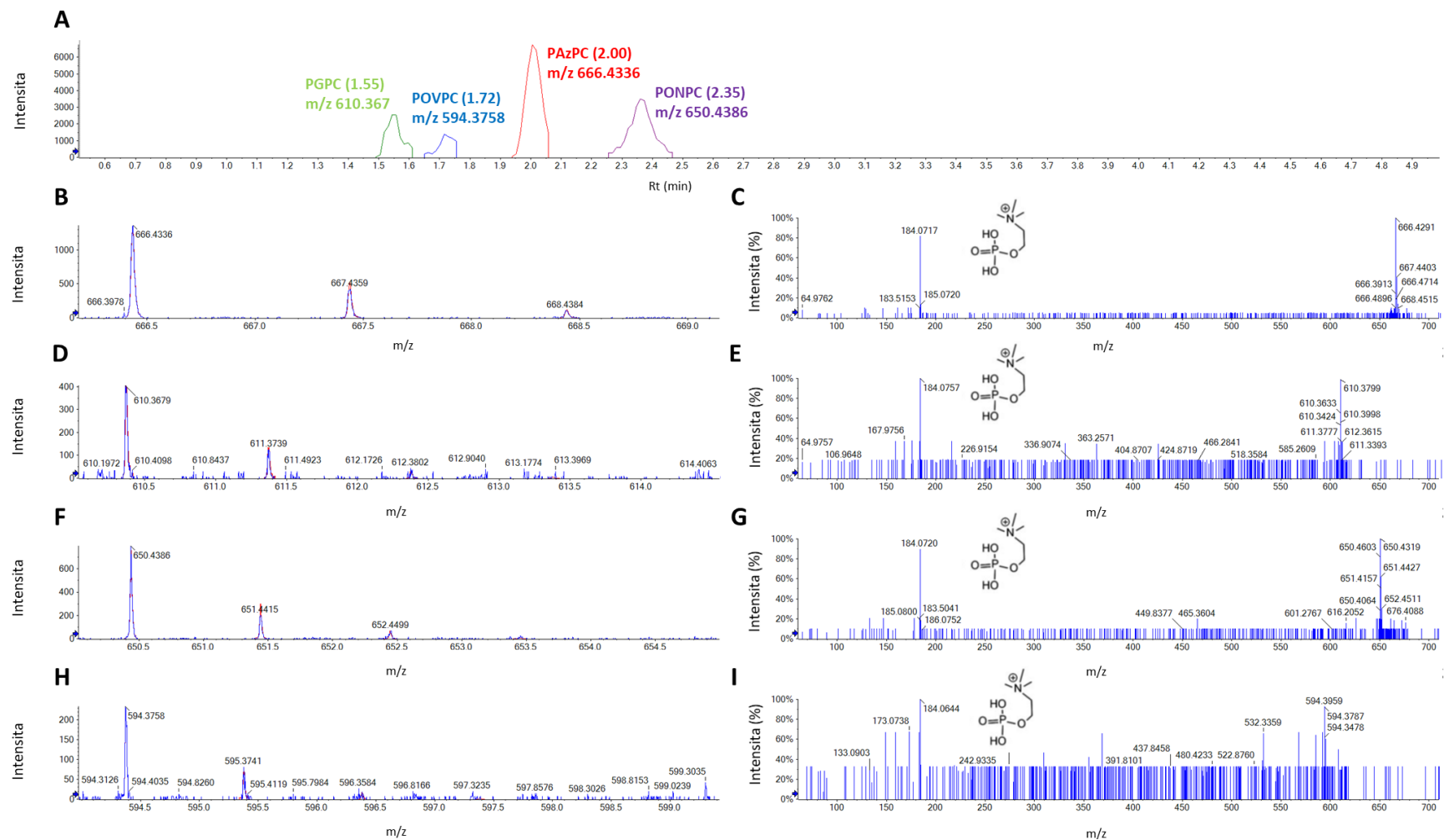
Autoři studie srovnali retenční časy, fragmentační spektra a další parametry těchto OxPC s jejich deuterovanými standardy. Dle těchto informací byly OxPC identifikovány a specifikace je uvedena v Tab. 8. K dalšímu vyhodnocení byla vybrána data z analýzy v pozitivním módu (vyšší intenzita píků a kvalitnější fragmentační spektra) uvedena na obrázku (Obr. 54) a příslušné krabicové grafy jsou uvedeny na obrázku (Obr. 53).

Tab. 8 Srovnání hodnot m/z a retenčního času identifikovaných OxPC s databází LIPID MAPS a poznatky dle Schlotterbeck *et al.* (2019).

OxPC	Referenční m/z [M+H] ⁺	Experimentální m/z [M+H] ⁺	Rozdíl v m/z (ppm)	Referenční retenční čas (min)	Experimentální retenční čas (min)
PGPC	610.3715	610.3709	0.97	1.52	1.55
POVPC	594.3765	594.3752	2.12	1.70	1.73
PONPC	650.4391	650.4376	2.28	2.35	2.36
PAzPC	666.4341	666.4327	2.13	2.00	2.01

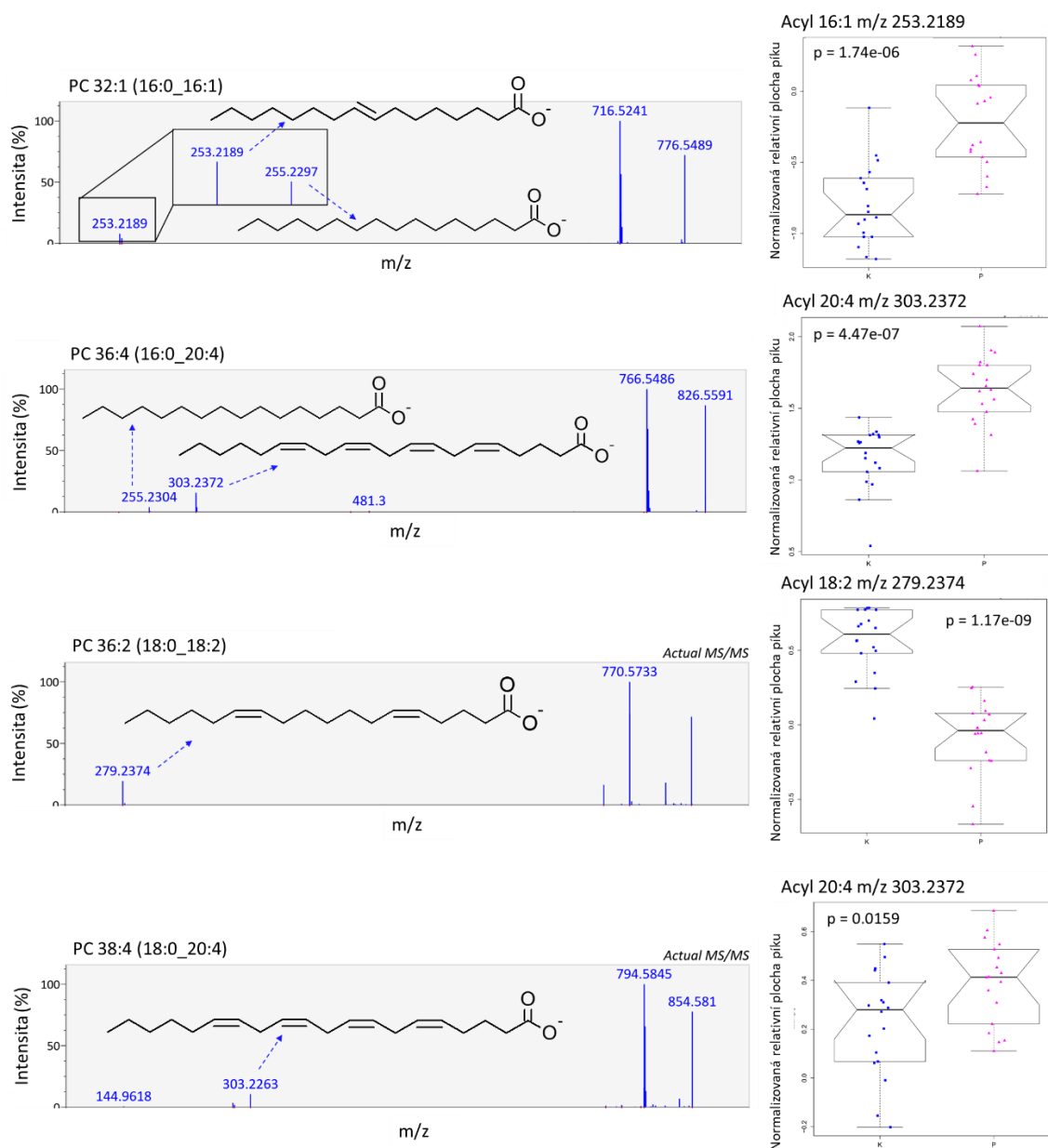


Obr. 53 Krabicové grafy (s uvedením p-value t-testu v pravé části grafu) pro oxidované fosfatidylcholinu (kontroly – K, pacienti – P).



Obr. 54 Chromatogram (A), isotopické vzory (B, D, F, H) a fragmentační spektra (C, E, G, I) vybraných oxidovaných fosfatidylcholinů (OxPC) analyzovaných v pozitivním módu. Hmotnostní spektra odpovídají OxPC následovně: PAzPC (B, C), PGPC (D, E), PONPC (F, G), POVPC (H, I). U fragmentačních spekter je zobrazena struktura fosfocholinového fragmentu (m/z 184). Experimentální data jsou reprezentována kontrolním vzorkem 7.

K další strukturní confirmaci signifikantně snížených či zvýšených fosfatidylcholinů byly kvantifikovány jednotlivé fragmenty v negativním módu. Fragmentační produkty fosfatidylcholinů v negativním módu obsahují také volné acylové řetězce (aduktový iont [M-H]⁻), usnadňující strukturní identifikaci těchto lipidů (Obr. 55).



Obr. 55 Fragmentační spektra vybraných fosfatidylcholinů v negativním módu (vlevo) s vyobrazením struktury acylových fragmentů. Krabicové grafy vybraných fragmentů (vpravo) s uvedením p-value (t-test) v horní části grafu korespondují s daným lipidem (nalevo). Fragmentační spektra byla vyhodnocena pomocí MS-DIAL, se zohledněním všech analyzovaných vzorků (zarovnávací soubor – alignment file, specifikace v kapitole 3.2.4).

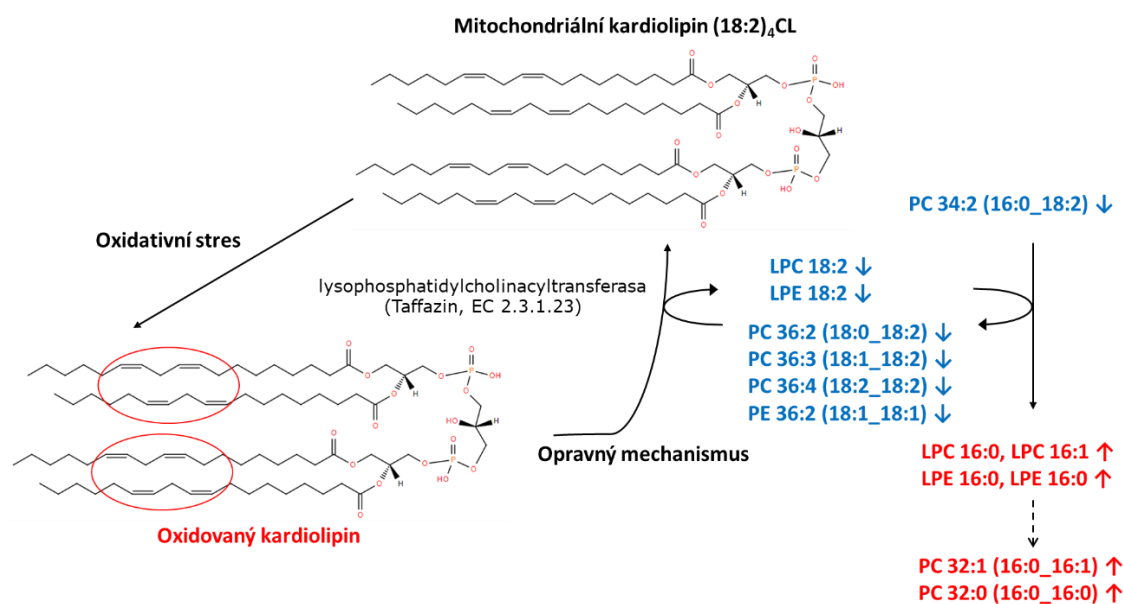
5 DISKUZE

V úvodu experimentální části této práce byla optimalizována cílená lipidomická metoda dle Xuan *et al.* (2018). Optimalizace spočívala především v korekci retenčních časů jednotlivých lipidů a verifikaci identifikace těchto lipidů. Užitečnou pomůckou se staly grafy lipidových vzorů, na kterých lze snadno rozlišit odchylky od predikovaného retenčního chování lipidů. Autoři cílené lipidomické metody uvádějí tyto lipidové vzory pouze částečně pro skupinu PC. Pomocí lipidových vzorů byla odhalena nejasnost v nomenklatuře původní metody pro skupinu plasmalogenových fosfatidylcholinů, kdy byly obě podskupiny PC-O (plasmanyly) a PC-P (plasmenyly) souhrnně označeny jako PC-O a při identifikaci byla v lipidovém vzoru pro PC-O zřetelná přítomnost dvou překrývajících se lipidových tříd. Po korekci byla skupina PC-O v optimalizované metodě rozdělena na podskupiny PC-O a PC-P. Obdobně byla v původní metodě sdružena skupina plasmalogenových fosfatidylethanolaminů PE-O, nicméně v této skupině nebyly trendy v překryvu podskupin PE-O a PE-P zřetelné natolik, aby bylo možné je od sebe oddělit.

Ve druhé třetině experimentální části práce byla rozebrána samotná analýza vzorků pacientů se SCADD s porovnáním výsledků metod optimalizované cílené a necílené lipidomické analýzy. Mezi oběma analýzami byl téměř půlroční časový rozestup, jelikož necílená lipidomická analýza byla uskutečněna na stáži v Institute of Pharmaceutical sciences při Eberhard Karls Universtiy Tübingen v Německu. Reprodukovatelnost výsledků byla dále zajištěna odděleným zpracováním vzorků pro každou analýzu zvlášť (ze suchých krevních skvrn byl vyražen terčík pro každou analýzu zvlášť, viz kapitola 3.2.1.2) a jejich zpracováním těsně před samotnou analýzou. Relativní změna koncentrace jednoho konkrétního lipidového individua je vzhledem k biochemické interpretaci obtížná, a proto byly tyto změny srovnávány systematicky dle lipidových tříd pomocí korelačních map (Obr. 31-49). Lipidy signifikantně zvýšené u skupiny pacientů, spadající do tříd PC, LPC a LPE vykazovaly trend v délce acylových řetězců, přičemž se jednalo o acyly s délkou 16 uhlíků (C16). Konkrétně jde například o lipidy LPC 16:1, LPE 16:0, PC 32:0 (16:0_16:0), PC 32:1 (16:0_16:1). Stejný trend vykazovaly také acylkarnitiny CAR 16:0 a CAR 16:1 stejně jako diagnostický marker CAR 4:0 (acylkarnitiny byly analyzovány pouze necílenou analýzou.). Dále byly u skupiny pacientů zvýšeny také lipidy s acylem 20:4 (arachidonylová skupina) jako PC

36:4 (16:0_20:4) a PC 38:4 (18:0_20:4). Co se týče lipidů snížených u skupiny pacientů, jednalo se převážně o lipidy s kombinací acylů o délce 18 uhlíků (C18). Trend byl pozorován především u skupin PC, LPC, LPE a PE a konkrétně se jednalo například o lipidy: LPC 18:2, LPE 18:2, PC 36:2 (18:0_18:2), PC 36:1 (18:0_18:1), PC 36:4 (18:2_18:2), PE 36:2 (18:1_18:1). Tyto trendy nebyly pozorovány u skupiny volných mastných kyselin, u kterých však byly pozorovány signifikantně zvýšené polynenasycené mastné kyseliny o 22 uhlících, a to konkrétně FA 22:4 a FA 22:5 (FA 22:4 nebyla signifikantní u cílené analýzy po Bonferroniho korekci, Obr. 46). U skupiny SM byly u skupiny pacientů signifikantně snížené SM s nízkým celkovým počtem uhlíků (C28-C32) a to konkrétně SM 28:1, SM 30:1 a SM 30:2, naopak zvýšené byly SM 34:2, SM 36:2 a SM 38:2.

Souvislost mezi nerovnováhou acylů C16 a C18 a poruchou mitochondriálních onemocnění β -oxidace nebyla doposud v literatuře popsána. Klíčovým lipidem vnitřní mitochondriální membrány (VMM) je kardiolipin (tvoří 15-20 % z celkových lipidů VMM), přičemž snížená koncentrace kardiolipinu (CL), nebo remodelace acylů kardiolipinu je spojena s patologiemi a ztrátou biofyzikální organizace VMM (Pennington *et al.*, 2019). Kardiolipin vykazuje preferenci k C18 acylům především v mitochondriích srdečního svalu a jater, kde se vyskytuje výhradně ve formě (18:2)₄CL (Han *et al.*, 2006; Schlame *et al.*, 2005). Tato preference k acylům C18 je regulována acyl-remodelačními mechanismy, které zajišťují opravu acylů poškozených oxidativním stresem uvnitř mitochondrie (Li *et al.*, 2010; Ma, 2012; Claypool a Koehler, 2012; Paradies *et al.*, 2014). Jedním z mechanismů patobiochemie onemocnění SCADD je zvýšený oxidativní stres uvnitř mitochondrie způsobený akumulací butyryl-CoA a agregací špatně složených proteinů defektního enzymu SCAD (Olsen *et al.*, 2015; Nochi *et al.*, 2017). Oxidativně poškozené acyly C18 mitochondriálního kardiolipinu mohou být opraveny výměnou za acyl C18 z PC či PE přítomných ve VMM přímou transacylační reakcí katalyzovanou enzymem taffazinem (EC 2.3.1.23) (Schlame, 2013; Xu *et al.*, 2003). Schéma mechanismu vysvětlující nerovnoměrné zastoupení acylů C16 a C18 u skupin PC, PE, LPC, LPE je uvedeno na Obr. 56. Acylové složení lipidů uváděné u cílené analýzy vychází z nejpravděpodobnější varianty lipidu v daném retenčním čase (dle informací autorů cílené lipidomické metody) a bylo nutné toto složení dále potvrdit. Konfirmace acylového složení v lipidech byla provedena na základě informací z necílené analýzy v negativním módu (fragmentační spektra) a ve vybraných případech také kvantifikací samotných acylových fragmentů (blíže popsáno v kapitole 4.3).



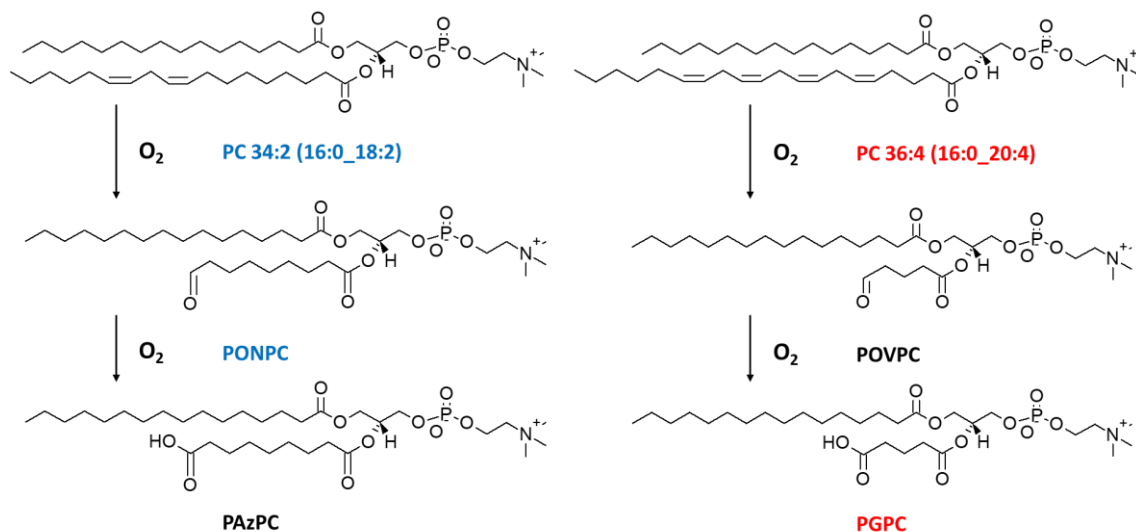
Obr. 56 Potenciální vysvětlení nerovnoměrného zastoupení acylů C16 a C18 u PC, PE, LPC a LPE související s remodelačními mechanismy opravy mitochondriálního kardiolipinu. Modře jsou uvedeny lipidy signifikantně snížené u skupiny pacientů a červeně jsou uvedeny lipidy signifikantně zvýšené u skupiny pacientů.

Zvýšená koncentrace PC 32:1 (16:0_16:1) byla zaznamenána u pacientů s kolorektálním karcinomem v souvislosti se zvýšenou expresí acyl-remodelačních enzymů (Kurabe *et al.*, 2013). Vysvětlením stejného trendu u pacientů se SCADD může být metabolické přeprogramování typu Warburgova efektu, který byl popsán u metabolismu rakovinných buněk (Warburg *et al.*, 1927). Přechod od oxidativní fosforylace k neoxidativní glykolýze i za přítomnosti kyslíku byl pozorován u pacientů se SCADD s mutací c.625G > A (Pedersen *et al.*, 2010) a také u dalších onemocnění spojených s mitochondriální disfunkcí a oxidativním stresem v buňce (Yu-Ting *et al.*, 2014).

Mitochondrie pacientů s onemocněním SCADD vykazují abnormální tvar a tendenci k častějšímu dělení (Schmidt *et al.*, 2010), které může být způsobeno také složením mitochondriální membrány (Frohman, 2015). Zvýšená koncentrace nenasycených mastných kyselin zabudovaných do mitochondriální membrány ve formě acylů ve fosfolipidech má zásadní vliv na fluiditu a zakřivení buněčných membrán. Větší fluiditu například vykazují membrány se zvýšeným obsahem arachidonylových fosfolipidů jako PC 36:4 (16:0_20:4) a PC 38:4 (18:0_20:4), které byly oba signifikantně zvýšeny u skupiny pacientů se SCADD analyzovaných v této práci (Lev, 2012). Zvýšená fluidita souvisí se snazším dělením buňky/organely a také se zvýšeným pasivním transportem volných mastných kyselin (Youle a van der Blik, 2012; Li *et al.*, 2015).

Dále je kyselina arachidonová inkorporovaná do fosfolipidu přímo nedostupná jako substrát pro biosyntézu lipidových prozánětlivých mediátorů a signalizačních molekul (Rong *et al.*, 2015).

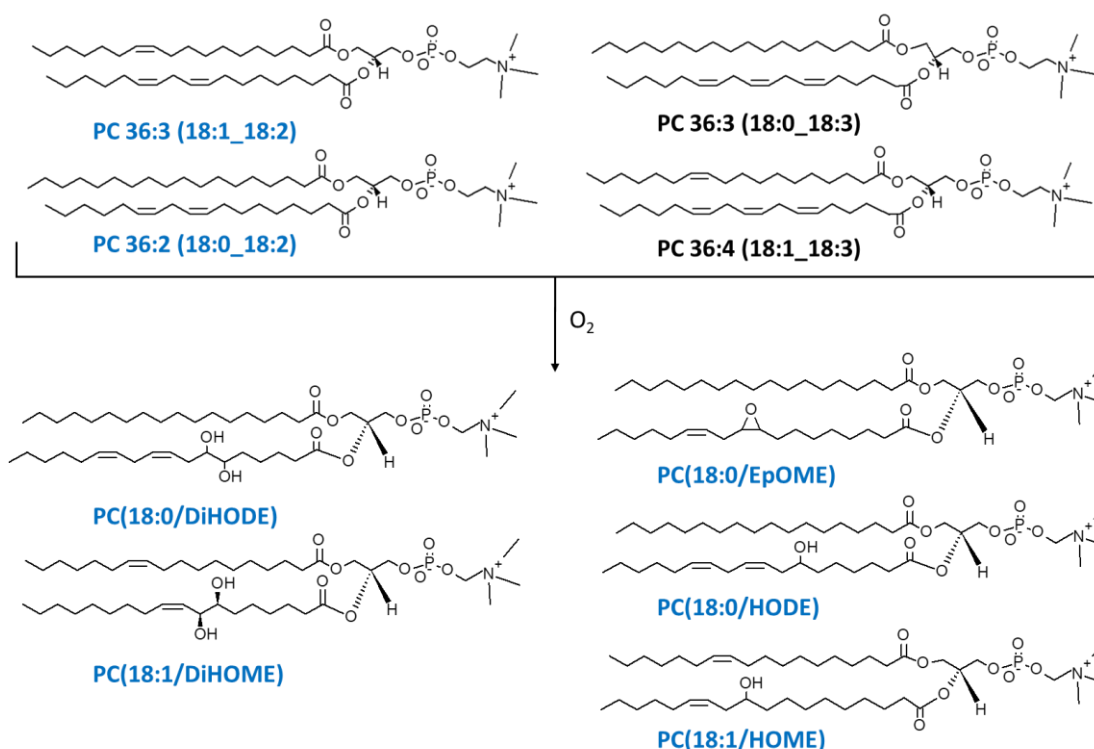
Poslední kapitola experimentální části práce se zabývá identifikací neznámých features, mezi nimiž byly identifikovány převážně produkty neenzymatické oxidace fosfatidylcholinů. Lipidomická analýza suchých krevních skvrn pacientů s onemocněním MCADD poukázala zvýšené koncentrace oxidovaných lipidů a produktů oxidace polyneenasycených fosfolipidů jako například 1-palmitoyl-2-azelaoyl-sn-glycero-3-fosfatidylcholin (PAzPC) (Najdekr *et al.*, 2015), který však nebyl signifikantně zvýšený u skupiny pacientů se SCADD dle výsledků této práce. PAzPC je produktem oxidace fosfatidylcholinu PC 34:2 (16:0_18:2), který byl u skupiny pacientů signifikantně snížený, přičemž meziprodukt této oxidace 1-palmitoyl-2-(9-oxo-nonanoyl)-sn-glycero-3-fosfocholin (PONPC) byl také snížený. Oxidační produkt prekurzoru lipidu PC 36:4 (16:0_20:4), 1-palmitoyl-2-glutaryl-sn-glycero-3-fosfatidylcholin (PGPC) byl u skupiny pacientů signifikantně zvýšený stejně jako samotný prekurzor (Obr. 57).



Obr. 57 Oxidované fosfatidylcholinu a jejich prekurzory identifikované necílenou analýzou. Brava názvu lipidu odpovídá signifikantnímu snížení (modrá) a zvýšení (červená) koncentrace lipidu u skupiny pacientů.

Necílenou analýzou byly identifikovány také oxidační produkty fosfatidylcholinů PC 36:2, PC 36:3 a PC 36:4 uvedené na obrázku (Obr. 58), které byly stejně jako jejich prekurzory signifikantně snížené u pacientů. Mimo tyto uvedené OxPC lze uvažovat o dalších variantách polohových izomerů těchto lipidů se shodným sumárním vzorcem

$C_{44}H_{84}NO_{10}P$ a $C_{44}H_{84}NO_9P$, které není možné za použití stávajících chromatografických parametrů odlišit.



Obr. 58 Oxidované fosfatidylcholinu a jejich prekurzory identifikované necílenou analýzou. Lipidy signifikantně snižené u pacientů jsou uvedeny modrou barvou. DiHODE (dihydroxylinolová kyselina), DiHOME (dihydroxyolejová kyselina), EpOME (epoxyolejová kyselina), HODE (hydroxylinolová kyselina), HOME (hydroxyolejová kyselina).

Dle těchto výsledků není jisté, zda-li je přítomnost oxidovaných produktů těchto fosfatidylcholinů způsobena oxidačním stresem vlivem onemocnění SCADD a nebo jestli oxidované produkty vznikly při zpracování vzorků, kdy jsou suché krevní skvrny po odebrání krve 4 hodiny sušeny za přítomnosti vzduchu, jelikož je vždy mimo produkt oxidace zvýšen také prekurzor těchto OxPC. Ke spolehlivé identifikaci a kvantifikaci oxidovaných lipidů by bylo zapotřebí získat materiál nepodléhající dlouhému sušení za přítomnosti vzduchu (například vzorky plasmy). Dále by bylo vhodné použít metodu s lepší separací oxidovaných lipidů, jelikož metoda dle (Tsugawa *et al.*, 2015) není k těmto účelům dostačující.

6 ZÁVĚR

Tato diplomová práce se zabývala lipidomickou analýzou suchých krevních skvrn pacientů s dědičnou metabolickou poruchou SCADD. V teoretické části práce byly shrnuty aktuální poznatky problematiky onemocnění SCADD, jeho patobiochemického mechanismu, dále byl představen obor lipidomiky a běžně užívané metody v lipidomické analýze. Na základě výsledků této práce byly formulovány následující závěry.

6.1 Optimalizace cílené lipidomické analýzy

Cílená lipidomická metoda dle Xuan (2018) byla úspěšně optimalizována a lze ji tedy využít na jiném typu kapalinového chromatografu (konkrétně UltiMate 3000 Rapid Separation system; Dionex) a hmotnostního spektrometru (Triple Quad 6500; SCIEX) s nutností úpravy retenčních časů lipidů za pomoci značených standardů a grafů lipidových vzorů. K nevýhodám a potenciálním místům ke zlepšení této metody patří nedokonalé oddělení plasmanylových a plasmenylových podskupin fosfoglycerolipidů a dále by mohla být v analýze dále zařazena acylová identifikace v negativním módu (metodu lze navrhnout dle poznatků z necílené analýzy uvedené v této práci).

6.2 Cílená a necílená analýza suchých krevních skvrn pacientů s nemocí SCADD.

Pomocí komplexní lipidomické analýzy zahrnující cílený a necílený přístup za využití kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií byly identifikovány změny v lipidomu, které lze vysvětlit patobiochemickými mechanismy nemoci SCADD. U skupiny pacientů došlo ke zvýšení koncentrace lipidů (konkrétně skupiny PC, PE, LPC, LPE) s obsahem acylů o šestnácti uhlících, a naopak lipidy obsahující acyly o délce osmnácti uhlíků vykazovaly nižší koncentrace. Změny byly pozorovány také u skupin SM, FA, PC-O a CAR. U skupiny acylkarnitinů (CAR) byl u skupiny pacientů zvýšen diagnostický marker CAR 4:0 (butyrylkarnitin) a dále také acylkarnitiny CAR 16:1 a CAR 16:0. Koherenci výsledků podporují shodné závěry cílené i necílené analýzy, která byla uskutečněna s časovým odstupem na jiném přístroji v jiné zemi a při níž byl použit nový vzorek suché krevní skvrny a také jiný postup extrakce. Nerovnoměrné zastoupení délky acylových řetězců v lipidech nebylo u této DMP dříve v literatuře popsáno.

7 Literatura

- Alratrout R., Altammim W. (2014): Reduction in the overall incidence of inborn errors of metabolism in the eastern province of Saudi Arabia. *Clinical Biochemistry* **47**, 766-766.
- Álvarez-Ruiz R., Picó Y. (2019): Sequential window acquisition of all theoretical fragments versus information dependent acquisition for suspected-screening of pharmaceuticals in sediments and mussels by ultra-high pressure liquid chromatography-quadrupole time-of-flight-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1595**, 81-90.
- Andrews G. L., Simons B. L., Young J. B., Hawkridge A. M., Muddiman D. C. (2011): Performance characteristics of a new hybrid quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometer (tripletof 5600). *Analytical Chemistry* **83**, 5442-5446.
- Applegarth D. A., Toone J. R., Lowry R. B. (2000): Incidence of inborn errors of metabolism in British Columbia, 1969-1996. *Pediatrics* **105**, art. no.-e10.
- Barschak A. G., Ferreira G. D., Andre K. R., Schuck P. F., Viegas C. M., Tonin A., Dutra C. S., Wyse A. T. S., Wannmacher C. M. D., Vargas C. R., Wajner M. (2006): Inhibition of the electron transport chain and creatine kinase activity by ethylmalonic acid in human skeletal muscle. *Metabolic Brain Disease* **21**, 11-19.
- Beckmann J. D., Frerman F. E. (1985): Electron-transfer flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase from pig-liver - purification and molecular, redox, and catalytic properties. *Biochemistry* **24**, 3913-3921.
- Berglund L., Brunzell J. D., Goldberg A. C., Goldberg I. J., Sacks F., Murad M. H., Stalenhoef A. F. H. (2012): Evaluation and treatment of hypertriglyceridemia: An endocrine society clinical practice guideline. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **97**, 2969-2989.
- Berry S. A., Jurek A. M., Anderson C., Bentler K., Region 4 Genetics Collaborative P. (2010): The inborn errors of metabolism information system: A project of the region 4 genetics collaborative priority 2 workgroup. *Genetics in Medicine* **12**, S215-S219.
- Bhala A., Willi S. M., Rinaldo P., Bennett M. J., Schmidtsommerfeld E., Hale D. E. (1995): Clinical and biochemical characterization of short-chain acyl-coenzyme-a dehydrogenase-deficiency. *Journal of Pediatrics* **126**, 910-915.
- Birkebaek N. H., Simonsen H., Gregersen N. (2002): Hypoglycaemia and elevated urine ethylmalonic acid in a child homozygous for the short-chain acyl-coa dehydrogenase 625g > a gene variation. *Acta Paediatrica* **91**, 480-482.
- Blanco A., Blanco G. 2017. Lipid metabolism. *Medical biochemistry*. London, United Kingdom: Academic Press, an imprint of Elsevier.
- Bligh E. G., Dyer W. J. (1959): A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* **37**, 911-917.
- Brown D. A., London E. (1998): Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **14**, 111-136.
- Burton B. K. (1998): Inborn errors of metabolism in infancy: A guide to diagnosis. *Pediatrics* **102**, art. no.-e69.
- Cajka T., Fiehn O. (2014): Comprehensive analysis of lipids in biological systems by liquid chromatography-mass spectrometry. *Trac-Trends in Analytical Chemistry* **61**, 192-206.
- Calderon C., Sanwald C., Schlotterbeck J., Drotleff B., Lammerhofer M. (2019): Comparison of simple monophasic versus classical biphasic extraction protocols for comprehensive uhplc-ms/lipidomic analysis of HeLa cells. *Analytica Chimica Acta* **1048**, 66-74.
- Cífková E., Holčápek M., Lísá M., Vrána D., Melichar B., Študent V. (2015): Lipidomic differentiation between human kidney tumors and surrounding normal tissues using HILIC-HPLC/ESI-MS and multivariate data analysis. *Journal of Chromatography B* **1000**, 14-21.
- Claypool S. M., Koehler C. M. (2012): The complexity of cardiolipin in health and disease. *Trends in Biochemical Sciences* **37**, 32-41.
- Contrepois K., Mahmoudi S., Ubhi B. K., Papsdorf K., Hornburg D., Brunet A., Snyder M. (2018): Cross-platform comparison of untargeted and targeted lipidomics approaches on aging mouse plasma. *Scientific Reports* **8**, 9.

- Corydon M. J., Gregersen N., Lehnert W., Ribes A., Rinaldo P., Kmoch S., Christensen E., Kristensen T. J., Andresen B. S., Bross P., Winter V., Martinez G., Neve S., Jensen T. G., Bolund L., Kolvraa S. (1996): Ethylmalonic aciduria is associated with an amino acid variant of short chain acyl-coenzyme a dehydrogenase. *Pediatric Research* **39**, 1059-1066.
- Corydon M. J., Vockley J., Rinaldo P., Rhead W. J., Kjeldsen M., Winter V., Riggs C., Babovic-Vuksanovic D., Smeitink J., De Jong J., Levy H., Sewell A. C., Roe C., Matern D., Dasouki M., Gregersen N. (2001): Role of common gene variations in the molecular pathogenesis of short-chain acyl-coa dehydrogenase deficiency. *Pediatric Research* **49**, 18-23.
- Couser N., Gucsavas-Calikoglu M. (2017): *Mitochondrial disorders*, Elsevier Science Bv, Amsterdam, 167-190.
- Čr M. Z. (2016). Věstník - metodický návod k zajištění novorozeneckého laboratorního screeningu a následné péče. *Secondary*. Praha.
- Dai W., Long J. K., Cheng Y., Chen Y. Q., Zhao S. P. (2018): Elevated plasma lipoprotein(a) levels were associated with increased risk of cardiovascular events in chinese patients with stable coronary artery disease. *Scientific Reports* **8**, 9.
- Decaestecker T. N., Clauwaert K. M., Van Bocxlaer J. F., Lambert W. E., Van Den Eeckhout E. G., Van Peteghem C. H., De Leenheer A. P. (2000): Evaluation of automated single mass spectrometry to tandem mass spectrometry function switching for comprehensive drug profiling analysis using a quadrupole time-of-flight mass spectrometer. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **14**, 1787-1792.
- Del Bas J. M., Caimari A., Rodriguez-Naranjo M. I., Childs C. E., Chavez C. P., West A. L., Miles E. A., Arola L., Calder P. C. (2016): Impairment of lysophospholipid metabolism in obesity: Altered plasma profile and desensitization to the modulatory properties of n-3 polyunsaturated fatty acids in a randomized controlled trial. *American Journal of Clinical Nutrition* **104**, 266-279.
- Dluholucky S., Knapkova M. (2017): The first results of extended newborn screening in slovakia: Differences between the majority and the roma ethnic group. *International Journal of Neonatal Screening* **3**.
- Doerge H., Stahl A. (2006): Protein-mediated fatty acid uptake: Novel insights from in vivo models. *Physiology* **21**, 259-268.
- Donia M. S., Fischbach M. A. (2015): Human microbiota. Small molecules from the human microbiota. *Science (New York, N.Y.)* **349**, 1254766-1254766.
- Downard K. (2007): *Mass spectrometry: A foundation course*, Royal Society of Chemistry, Cambridge,
- Drotleff B., Lämmerhofer M. (2019): Guidelines for selection of internal standard-based normalization strategies in untargeted lipidomic profiling by lc-hr-ms/ms. *Analytical Chemistry* **91**, 9836-9843.
- Eaton S., Bartlett K., Pourfarzam M. (1996): Mammalian mitochondrial beta-oxidation. *Biochemical Journal* **320**, 345-357.
- 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., Shimizu T., Spener F., Van Meer G., Vannieuwenhze M. S., White S. H., Witztum J. L., Dennis E. A. (2005): A comprehensive classification system for lipids. *Journal of Lipid Research* **46**, 839-861.
- Farstad M., Bremer J., Norum K. R. (1967): Long-chain acyl-coa synthetase in rat liver - a new assay procedure for enzyme and studies on its intracellular localization. *Biochimica Et Biophysica Acta* **132**, 492-+.
- Fiehn O. (2016): Metabolomics by gas chromatography-mass spectrometry: Combined targeted and untargeted profiling. *Current protocols in molecular biology* **114**, 30.34.31-30.34.32.
- Folch J., Lees M., Stanley G. H. S. (1957): A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry* **226**, 497-509.
- Frohman M. A. (2015): Role of mitochondrial lipids in guiding fission and fusion. *Journal of Molecular Medicine* **93**, 263-269.
- Garcia-Gutierrez E., Mayer M. J., Cotter P. D., Narbad A. (2019): Gut microbiota as a source of novel antimicrobials. *Gut Microbes* **10**, 1-21.
- Gardlo A. (2019): Metabol: First version (version v1.0.0). *Zenodo*.

- Garrod A. E. (1996): The incidence of alkaptonuria: A study in chemical individuality (reprinted from lancet, vol 2, pg 1616-1620, 1902). *Molecular Medicine* **2**, 274-282.
- Gerl M. J., Vaz W. L. C., Domingues N., Klose C., Surma M. A., Sampaio J. L., Almeida M. S., Rodrigues G., Araujo-Goncalves P., Ferreira J., Borbinha C., Marto J. P., Viana-Baptista M., Simons K., Vieira O. V. (2018): Cholesterol is inefficiently converted to cholesteryl esters in the blood of cardiovascular disease patients. *Scientific Reports* **8**, 11.
- Glatz J. F. C., Bonen A., Ouwens D. M., Luiken J. (2006): Regulation of sarcolemmal transport of substrates in the healthy and diseased heart. *Cardiovascular Drugs and Therapy* **20**, 471-476.
- Goodman D. S., Popjak G. (1960): Synthesis of allyl pyrophosphates from mevalonate with liver enzymes and their relation to biosynthesis of squalene. *Biochemical Journal* **74**, P35-P35.
- Gordon M. H. 2003. Fats | classification. In: Caballero, B. (ed.) *Encyclopedia of food sciences and nutrition (second edition)*. Oxford: Academic Press.
- Goto-Inoue N., Hayasaka T., Taki T., Gonzalez T. V., Setou M. (2009): A new lipidomics approach by thin-layer chromatography-blot-matrix-assisted laser desorption/ionization imaging mass spectrometry for analyzing detailed patterns of phospholipid molecular species. *Journal of Chromatography A* **1216**, 7096-7101.
- Gregersen N., Winter V. S., Corydon M. J., Corydon T. J., Rinaldo P., Ribes A., Martinez G., Bennett M. J., Vianey-Saban C., Bhala A., Hale D. E., Lehnert W., Kmoch S., Roig M., Riudor E., Eiberg H., Andresen B. S., Bross P., Bolund L. A., Kolvraa S. (1998): Identification of four new mutations in the short-chain acyl-coa dehydrogenase (scad) gene in two patients: One of the variant alleles, 511c -> t, is present at an unexpectedly high frequency in the general population, as was the case for 625g -> a, together conferring susceptibility to ethylmalonic aciduria. *Human Molecular Genetics* **7**, 619-627.
- Gross J. H. (2011): *Mass spectrometry*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg,
- Gross J. H. 2017a. Tandem mass spectrometry. *Mass spectrometry*. Cham: Springer International Publishing.
- Gross R. W. (2017b): The evolution of lipidomics through space and time. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids* **1862**, 731-739.
- Hallman M., Gluck L. (1976): Phosphatidylglycerol in lung surfactant .3. Possible modifier of surfactant function. *Journal of Lipid Research* **17**, 257-262.
- Han G., Gupta S. D., Gable K., Niranjanakumari S., Moitra P., Eichler F., Brown R. H., Harmon J. M., Dunn T. M. (2009): Identification of small subunits of mammalian serine palmitoyltransferase that confer distinct acyl-coa substrate specificities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 8186-8191.
- 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**, 1071-1079.
- Han X., Yang K., Yang J., Cheng H., Gross R. W. (2006): Shotgun lipidomics of cardiolipin molecular species in lipid extracts of biological samples. *Journal of Lipid Research* **47**, 864-879.
- Hannun Y. A. (1996): Functions of ceramide in coordinating cellular responses to stress. *Science* **274**, 1855-1859.
- Hansen H. S., Vana V. (2019): Non-endocannabinoid n-acylethanolamines and 2-monoacylglycerols in the intestine. *British Journal of Pharmacology* **176**, 1443-1454.
- Hansen K. B., Rosenkilde M. M., Knop F. K., Wellner N., Diep T. A., Rehfeld J. F., Andersen U. B., Holst J. J., Hansen H. S. (2011): 2-oleoyl glycerol is a gpr119 agonist and signals glp-1 release in humans. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **96**, E1409-E1417.
- Hara A., Radin N. S. (1978): Lipid extraction of tissues with a low-toxicity solvent. *Analytical Biochemistry* **90**, 420-426.
- Hart G. W., Copeland R. J. (2010): Glycomics hits the big time. *Cell* **143**, 672-676.
- Hegele R. A., Ginsberg H. N., Chapman M. J., Nordestgaard B. G., Kuivenhoven J. A., Aversa M., Boren J., Bruckert E., Catapano A. L., Descamps O. S., Hovingh G. K., Humphries S. E., Kovanen P. T., Masana L., Pajukanta P., Parhofer K. G., Raal F. J., Ray K. K., Santos R. D., Stalenhoef A. F. H., Stroes E., Taskinen M. R., Tybjrg-Hansen A., Watts G. F., Wiklund O.,

- European Atherosclerosis Soc C. (2014): The polygenic nature of hypertriglyceridaemia: Implications for definition, diagnosis, and management. *Lancet Diabetes & Endocrinology* **2**, 655-666.
- Hertweck C. (2009): The biosynthetic logic of polyketide diversity. *Angewandte Chemie-International Edition* **48**, 4688-4716.
- Hodges-Loaiza H. B., Parker L. E., Cox A. D. 2011. Chapter 3 - prenylation and phosphorylation of ras superfamily small gtpases. *In: Hrycyna, C. A., Bergo, M. O. & Tamanoi, F. (eds.) The enzymes*. Academic Press.
- Hoffmann E. D., Stroobant V. (2007): *Mass spectrometry: Principles and applications*, J. Wiley, Chichester, West Sussex, England ; Hoboken, NJ, 489.
- Holcapek M., Liebisch G., Elcroos K. (2018): Lipidomic analysis. *Analytical Chemistry* **90**, 4249-4257.
- Holmsen H., Hindenes J. O., Fukami M. (1992): Glycerophospholipid metabolism - back to the future. *Thrombosis Research* **67**, 313-323.
- Hopfgartner G., Tonoli D., Varesio E. (2012): High-resolution mass spectrometry for integrated qualitative and quantitative analysis of pharmaceuticals in biological matrices. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **402**, 2587-2596.
- Houten S. M., Wanders R. J. A. (2010): A general introduction to the biochemistry of mitochondrial fatty acid beta-oxidation. *Journal of Inherited Metabolic Disease* **33**, 469-477.
- Chen J. S., Faller D. V., Spanjaard R. A. (2003): Short-chain fatty acid inhibitors of histone deacetylases: Promising anticancer therapeutics? *Current Cancer Drug Targets* **3**, 219-236.
- Chen W. W., Chao Y. J., Chang W. H., Chan J. F., Hsu Y. H. H. (2018): Phosphatidylglycerol incorporates into cardiolipin to improve mitochondrial activity and inhibits inflammation. *Scientific Reports* **8**, 14.
- Chollet C., Boutet-Mercey S., Laboureur L., Rincon C., Méjean M., Jouhet J., Fenaille F., Colsch B., Touboul D. (2019): Supercritical fluid chromatography coupled to mass spectrometry for lipidomics. *Journal of Mass Spectrometry* **54**, 791-801.
- Iannitti T., Palmieri B. (2010): An update on the therapeutic role of alkylglycerols. *Marine Drugs* **8**, 2267-2300.
- Illsinger S., Das A. M. (2010): Impact of selected inborn errors of metabolism on prenatal and neonatal development. *Iubmb Life* **62**, 403-413.
- Ivanisevic J., Thomas A. (2018): Metabolomics as a tool to understand pathophysiological processes. *Methods in Molecular Biology* 3-28.
- Jethva R., Bennett M. J., Vockley J. (2008): Short-chain acyl-coenzyme a dehydrogenase deficiency. *Molecular Genetics and Metabolism* **95**, 195-200.
- Jin X. H., Okamoto Y., Morishita J., Tsuboi K., Tonai T., Ueda N. (2007): Discovery and characterization of ca²⁺-independent phosphatidylethanolamine n-acyltransferase generating the anandamide precursor and its congeners. *Journal of Biological Chemistry* **282**, 3614-3623.
- Jones P. M., Bennett M. J. (2017): *Disorders of mitochondrial fatty acid beta-oxidation*, Elsevier Science Bv, Amsterdam, 87-101.
- Jurowski K., Kochan K., Walczak J., Baranska M., Piekoszewski W., Buszewski B. (2017a): Comprehensive review of trends and analytical strategies applied for biological samples preparation and storage in modern medical lipidomics: State of the art. *Trac-Trends in Analytical Chemistry* **86**, 276-289.
- Jurowski K., Kochan K., Walczak J., Barańska M., Piekoszewski W., Buszewski B. (2017b): Analytical techniques in lipidomics: State of the art. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* **47**, 418-437.
- Kagan V. E., Mao G. W., Qu F., Angeli J. P. F., Doll S., St Croix C., Dar H. H., Liu B., Tyurin V. A., Ritov V. B., Kapralov A. A., Amoscato A. A., Jiang J. F., Anthonymuthu T., Mohammadyani D., Yang Q., Proneth B., Klein-Seetharaman J., Watkins S., Bahar H., Greenberger J., Mallampalli R. K., Stockwell B. R., Tyurina Y. Y., Conrad M., Bayir H. (2017): Oxidized arachidonic and adrenic pes navigate cells to ferroptosis. *Nature Chemical Biology* **13**, 81-90.
- Karnovsky A., Weymouth T., Hull T., Tarcea V. G., Scardoni G., Laudanna C., Sartor M. A., Stringer K. A., Jagadish H. V., Burant C., Athey B., Omenn G. S. (2011): *Metscape 2*

- bioinformatics tool for the analysis and visualization of metabolomics and gene expression data. *Bioinformatics* **28**, 373-380.
- Kato-Kataoka A., Sakai M., Ebina R., Nonaka C., Asano T., Miyamori T. (2010): Soybean-derived phosphatidylserine improves memory function of the elderly japanese subjects with memory complaints. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition* **47**, 246-255.
- Kim Y. M., Cheon C. K., Park K. H., Park S. W., Kim G. H., Yoo H. W., Lee K. A., Ko J. M. (2016): Novel and recurrent acads mutations and clinical manifestations observed in korean patients with short-chain acyl-coenzyme a dehydrogenase deficiency. *Annals of Clinical and Laboratory Science* **46**, 360-366.
- Kind T., Liu K.-H., Lee D. Y., Defelice B., Meissen J. K., Fiehn O. (2013): Lipidblast in silico tandem mass spectrometry database for lipid identification. *Nature Methods* **10**, 755-758.
- Kinsel G. R. (1998): Time-of-flight mass spectrometry: Instrumentation and applications in biological research by robert j. Cotter (the johns hopkins university). Acs: Washington, dc. 1997. Xvi + 326 pp. \$119.95. Isbn 0-8412-3474-4. *Journal of the American Chemical Society* **120**, 4256-4257.
- Korenev S., Lemonde H., Maureen C., Chakrapani A. (2019): Newborn screening for inborn errors of metabolism. *Paediatrics and Child Health* **29**, 105-110.
- Kostara C. E., Papathanasiou A., Psychogios N., Cung M. T., Elisaf M. S., Goudevenos J., Bairaktari E. T. (2014): Nmr-based lipidomic analysis of blood lipoproteins differentiates the progression of coronary heart disease. *Journal of Proteome Research* **13**, 2585-2598.
- Kouřil Š., De Sousa J., Václavík J., Friedecký D., Adam T. (2020): Crop: Correlation-based reduction of feature multiplicities in untargeted metabolomic data. *Bioinformatics*.
- Kožich V., Zeman J. (2010): Dědičné metabolické poruchy v pediatrii. *Postgraduální medicína* **12**, 793-800.
- Kurabe N., Hayasaka T., Ogawa M., Masaki N., Ide Y., Waki M., Nakamura T., Kurachi K., Kahyo T., Shinmura K., Midorikawa Y., Sugiyama Y., Setou M., Sugimura H. (2013): Accumulated phosphatidylcholine (16:0/16:1) in human colorectal cancer; possible involvement of lpcat4. *Cancer Science* **104**, 1295-1302.
- Lam S. M., Wang Y. T., Duan X. R., Wenk M. R., Kalaria R. N., Chen C. P., Lai M. K. P., Shui G. H. (2014): The brain lipidomes of subcortical ischemic vascular dementia and mixed dementia. *Neurobiology of Aging* **35**, 2369-2381.
- Lev S. (2012): Nonvesicular lipid transfer from the endoplasmic reticulum. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **4**, a013300.
- Li J., Romestaing C., Han X., Li Y., Hao X., Wu Y., Sun C., Liu X., Jefferson L. S., Xiong J., Lanoue K. F., Chang Z., Lynch C. J., Wang H., Shi Y. (2010): Cardiolipin remodeling by alcat1 links oxidative stress and mitochondrial dysfunction to obesity. *Cell Metabolism* **12**, 154-165.
- Li J., Vosegaard T., Guo Z. (2017): Applications of nuclear magnetic resonance in lipid analyses: An emerging powerful tool for lipidomics studies. *Progress in Lipid Research* **68**, 37-56.
- Li Z., Jiang H., Ding T., Lou C., Bui H. H., Kuo M.-S., Jiang X.-C. (2015): Deficiency in lysophosphatidylcholine acyltransferase 3 reduces plasma levels of lipids by reducing lipid absorption in mice. *Gastroenterology* **149**, 1519-1529.
- Liao H. W., Lin S. W., Lin Y. T., Lee C. H., Kuo C. H. (2018): Identification of potential sphingomyelin markers for the estimation of hematocrit in dried blood spots via a lipidomic strategy. *Analytica Chimica Acta* **1003**, 34-41.
- Liebisch G., Vizcaino J. A., Kofeler H., Trotschmuller 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**, 1523-1530.
- Lísa M., Holčapek M. (2015): High-throughput and comprehensive lipidomic analysis using ultrahigh-performance supercritical fluid chromatography–mass spectrometry. *Analytical Chemistry* **87**, 7187-7195.
- Lisyova J., Chandoga J., Jungova P., Repisky M., Knapkova M., Machkova M., Dluholucky S., Behulova D., Saligova J., Potocnakova L., Lysinova M., Bohmer D. (2018): An unusually high frequency of scad deficiency caused by two pathogenic variants in the acads gene and its relationship to the ethnic structure in slovakia. *Bmc Medical Genetics* **19**, 12.

- Lu W., Bennett B. D., Rabinowitz J. D. (2008): Analytical strategies for lc-ms-based targeted metabolomics. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences* **871**, 236-242.
- Ludwig C., Gillet L., Rosenberger G., Amon S., Collins B. C., Aebersold R. (2018): Data-independent acquisition-based swath-ms for quantitative proteomics: A tutorial. *Molecular Systems Biology* **14**, e8126.
- Ma Z. A. (2012): The role of peroxidation of mitochondrial membrane phospholipids in pancreatic β -cell failure. *Current diabetes reviews* **8**, 69-75.
- Magoulas P. L., El-Hattab A. W. (2012): Systemic primary carnitine deficiency: An overview of clinical manifestations, diagnosis, and management. *Orphanet journal of rare diseases* **7**, 68-68.
- Mashek D. G., Li L. O., Coleman R. A. (2007): Long-chain acyl-coa synthetases and fatty acid channeling. *Future Lipidology* **2**, 465-476.
- Matthäus C., Krafft C., Dietzek B., Brehm B. R., Lorkowski S., Popp J. (2012): Noninvasive imaging of intracellular lipid metabolism in macrophages by raman microscopy in combination with stable isotopic labeling. *Analytical Chemistry* **84**, 8549-8556.
- Matyash V., Liebisch G., Kurzchalia T. V., Shevchenko A., Schwudke D. (2008): Lipid extraction by methyl-tert-butyl ether for high-throughput lipidomics. *Journal of Lipid Research* **49**, 1137-1146.
- Mei H., Hsieh Y., Nardo C., Xu X., Wang S., Ng K., Korfmacher W. A. (2003): Investigation of matrix effects in bioanalytical high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometric assays: Application to drug discovery. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **17**, 97-103.
- Merritt J. L., Norris M., Kanungo S. (2018): Fatty acid oxidation disorders. *Annals of Translational Medicine* **6**, 14.
- Messias M. C. F., Mecatti G. C., Priolli D. G., Carvalho P. D. (2018): Plasmalogen lipids: Functional mechanism and their involvement in gastrointestinal cancer. *Lipids in Health and Disease* **17**, 12.
- Musilová J., Glatz Z. (2011): Metabolomika - základní pojmy, strategie a metodologie. *Chemické listy* **105**, 745-751.
- Nagan N., Kruckeberg K. E., Tauscher A. L., Bailey K. S., Rinaldo P., Matern D. (2003): The frequency of short-chain acyl-coa dehydrogenase gene variants in the us population and correlation with the c-4-acylcarnitine concentration in newborn blood spots. *Molecular Genetics and Metabolism* **78**, 239-246.
- Nagao M., Tanaka K. (1992): Fad-dependent regulation of transcription, translation, posttranslational processing, and post-processing stability of various mitochondrial acyl-coa dehydrogenases and of electron-transfer flavoprotein and the site of holoenzyme formation. *Journal of Biological Chemistry* **267**, 17925-17932.
- Naito E., Indo Y., Tanaka K. (1990): Identification of 2 variant short chain acyl coenzyme-a dehydrogenase alleles, each containing a different point mutation in a patient with short chain acyl coenzyme-a dehydrogenase-deficiency. *Journal of Clinical Investigation* **85**, 1575-1582.
- Naito E., Ozasa H., Ikeda Y., Tanaka K. (1989): Molecular-cloning and nucleotide-sequence of complementary dnas encoding human short chain acyl-coenzyme-a dehydrogenase and the study of the molecular-basis of human short chain acyl-coenzyme-a dehydrogenase-deficiency. *Journal of Clinical Investigation* **83**, 1605-1613.
- Najdekr L., Gardlo A., Madrova L., Friedecky D., Janeckova H., Correa E. S., Goodacre R., Adam T. (2015): Oxidized phosphatidylcholines suggest oxidative stress in patients with medium-chain acyl-coa dehydrogenase deficiency. *Talanta* **139**, 62-66.
- Naylor E. W., Chace D. H. (1999): Automated tandem mass spectrometry for mass newborn screening for disorders in fatty acid, organic acid, and amino acid metabolism. *Journal of Child Neurology* **14**, S4-S8.
- Neishabouri A., Faisal A. A. (2014): Saltatory conduction in unmyelinated axons: Clustering of na⁺ channels on lipid rafts enables micro-saltatory conduction in c-fibers. *Frontiers in Neuroanatomy* **8**, 10.

- Newton A. C. (1997): Regulation of protein kinase c. *Current Opinion in Cell Biology* **9**, 161-167.
- Nochi Z., Olsen R. K. J., Gregersen N. (2017): Short-chain acyl-coa dehydrogenase deficiency: From gene to cell pathology and possible disease mechanisms. *Journal of Inherited Metabolic Disease* **40**, 641-655.
- Nowaczyk M. J. M., Lehotay D. C., Platt B. A., Fisher L., Tan R., Phillips H., Clarke J. T. R. (1998): Ethylmalonic and methylsuccinic aciduria in ethylmalonic encephalopathy arise from abnormal isoleucine metabolism. *Metabolism-Clinical and Experimental* **47**, 836-839.
- Numata M., Chu H. W., Dakhama A., Voelker D. R. (2010): Pulmonary surfactant phosphatidylglycerol inhibits respiratory syncytial virus-induced inflammation and infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 320-325.
- Obeid L. M., Linardic C. M., Karolak L. A., Hannun Y. A. (1993): Programmed cell-death induced by ceramide. *Science* **259**, 1769-1771.
- Olsen J. V., De Godoy L. M. F., Li G. Q., Macek B., Mortensen P., Pesch R., Makarov A., Lange O., Horning S., Mann M. (2005): Parts per million mass accuracy on an orbitrap mass spectrometer via lock mass injection into a c-trap. *Molecular & Cellular Proteomics* **4**, 2010-2021.
- Olsen R. K. J., Cornelius N., Gregersen N. (2015): Redox signalling and mitochondrial stress responses; lessons from inborn errors of metabolism. *Journal of Inherited Metabolic Disease* **38**, 703-719.
- Ovčáčíková M., Lída M., Cífková E., Holčápek M. (2016): Retention behavior of lipids in reversed-phase ultrahigh-performance liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1450**, 76-85.
- Panchal M., Gaudin M., Lazar A. N., Salvati E., Rivals I., Ayciriex S., Dauphinot L., Dargere D., Auzeil N., Masserini M., Laprevote O., Duyckaerts C. (2014): Ceramides and sphingomyelinases in senile plaques. *Neurobiology of Disease* **65**, 193-201.
- Paradies G., Paradies V., Ruggiero F. M., Petrosillo G. (2014): Oxidative stress, cardiolipin and mitochondrial dysfunction in nonalcoholic fatty liver disease. *World journal of gastroenterology* **20**, 14205-14218.
- Parr M. K., Wüst B., Teubel J., Joseph J. F. (2018): Splitless hyphenation of sfc with ms by apci, appi, and esi exemplified by steroids as model compounds. *Journal of Chromatography B* **1091**, 67-78.
- Patel N., Vogel R., Chandra-Kuntal K., Glasgow W., Kelavkar U. (2014): A novel three serum phospholipid panel differentiates normal individuals from those with prostate cancer. *Plos One* **9**, 9.
- Pedersen C. B., Bross P., Winter V. S., Corydon T. J., Bolund L., Bartlett K., Vockley J., Gregersen N. (2003): Misfolding, degradation, and aggregation of variant proteins - the molecular pathogenesis of short chain acyl-coa dehydrogenase (scad) deficiency. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 47449-47458.
- Pedersen C. B., Kolvraa S., Kolvraa A., Stenbroen V., Kjeldsen M., Ensenauer R., Tein I., Matern D., Rinaldo P., Vianey-Saban C., Ribes A., Lehnert W., Christensen E., Corydon T. J., Andresen B. S., Vang S., Bolund L., Vockley J., Bross P., Gregersen N. (2008): The acads gene variation spectrum in 114 patients with short-chain acyl-coa dehydrogenase (scad) deficiency is dominated by missense variations leading to protein misfolding at the cellular level. *Human Genetics* **124**, 43-56.
- Pedersen C. B., Zolkipli Z., Vang S., Palmfeldt J., Kjeldsen M., Stenbroen V., Schmidt S. P., Wanders R. J. A., Ruiten J. P. N., Wibrand F., Tein I., Gregersen N. (2010): Antioxidant dysfunction: Potential risk for neurotoxicity in ethylmalonic aciduria. *Journal of Inherited Metabolic Disease* **33**, 211-222.
- Pennington E. R., Funai K., Brown D. A., Shaikh S. R. (2019): The role of cardiolipin concentration and acyl chain composition on mitochondrial inner membrane molecular organization and function. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* **1864**, 1039-1052.

- Pešková K., Chrastina P., Adam T., Votava F., Honzík T., Kožich V. (2018): Novorozenecký screening dědičných metabolických poruch v české republice. *Česko-Slovenská pediatrie* **73**, 390-394.
- Pham T. H., Zaeem 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**, 5048.
- Pleil J. D., Isaacs K. K. (2016): High-resolution mass spectrometry: Basic principles for using exact mass and mass defect for discovery analysis of organic molecules in blood, breath, urine and environmental media. *Journal of Breath Research* **10**, 10.
- Quehenberger O., Armando A. M., Brown A. H., Milne S. B., Myers D. S., Merrill A. H., Bandyopadhyay S., Jones K. N., Kelly S., Shaner R. L., Sullards C. M., Wang E., Murphy R. C., Barkley R. M., Leiker T. J., Raetz C. R. H., Guan Z. Q., Laird G. M., Six D. A., Russell D. W., McDonald J. G., Subramaniam S., Fahy E., Dennis E. A. (2010): Lipidomics reveals a remarkable diversity of lipids in human plasma. *Journal of Lipid Research* **51**, 3299-3305.
- Quehenberger O., Armando A. M., Dennis E. A. (2011): High sensitivity quantitative lipidomics analysis of fatty acids in biological samples by gas chromatography-mass spectrometry. *Biochimica Et Biophysica Acta* **1811**, 648-656.
- Racek J., Eiselt J., Friedecký B., Holeček V., Nekulová M., Pittrová H., Rušavý Z., Senft V., Šavlová M., Těšínský P., Verner M. (1999): *Klinická biochemie*, Galén, Praha, 329.
- Raetz C. R. H., Whitfield C. (2002): Lipopolysaccharide endotoxins. *Annual Review of Biochemistry* **71**, 635-700.
- Rampl E., Schoeny H., Mitic B. M., El Abiead Y., Schwaiger M., Koellensperger G. (2018): Simultaneous non-polar and polar lipid analysis by on-line combination of hilic, rp and high resolution ms. *Analyst* **143**, 1250-1258.
- Ramstedt B., Slotte J. P. (2002): Membrane properties of sphingomyelins. *Febs Letters* **531**, 33-37.
- Rashed M. S. (2001): Clinical applications of tandem mass spectrometry: Ten years of diagnosis and screening for inherited metabolic diseases. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **758**, 27-48.
- Rashed M. S., Ozand P. T., Bucknall M. P., Little D. (1995): Diagnosis of inborn-errors of metabolism from blood spots by acylcarnitines and amino-acids profiling using automated electrospray tandem mass-spectrometry. *Pediatric Research* **38**, 324-331.
- Reddy J. K., Mannaerts G. P. (1994): Peroxisomal lipid-metabolism. *Annual Review of Nutrition* **14**, 343-370.
- Ribes A., Riudor E., Garavaglia B., Martinez G., Arranz A., Invernizzi F., Briones P., Lamantea E., Sentis M., Barcelo A., Roig M. (1998): Mild or absent clinical signs in twin sisters with short-chain acyl-coa dehydrogenase deficiency. *European Journal of Pediatrics* **157**, 317-320.
- Rinaldo P., Matern D. (2002): Fatty acid oxidation disorders. *Annual Review of Physiology* **64**, 477-502.
- Rivera R., Chun J. 2008. Biological effects of lysophospholipids. In: Amara, S. G., Fleischmann, B., Hebert, S. C., Lederer, W. J., Miyajima, A. & Zechner, R. (eds.) *Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology, vol 160*. Berlin: Springer-Verlag Berlin.
- Roberts D. L., Frerman F. E., Kim J. J. (1996): Three-dimensional structure of human electron transfer flavoprotein to 2.1-Å resolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 14355-14360.
- Rong X., Wang B., Dunham M. M., Hedde P. N., Wong J. S., Gratton E., Young S. G., Ford D. A., Tontonoz P. (2015): Lpcat3-dependent production of arachidonoyl phospholipids is a key determinant of triglyceride secretion. *eLife* **4**, e06557.
- Sarafian M. H., Gaudin M., Lewis M. R., Martin F. P., Holmes E., Nicholson J. K., Dumas M. E. (2014): Objective set of criteria for optimization of sample preparation procedures for ultra-high throughput untargeted blood plasma lipid profiling by ultra performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Analytical Chemistry* **86**, 5766-5774.
- Saral N. Y., Aksungar F. B., Aktuglu-Zeybek C., Coskun J., Demirelce O., Serteser M. (2018): Glutaric acidemia type ii patient with thalassemia minor and novel electron transfer

- flavoprotein-a gene mutations: A case report and review of literature. *World Journal of Clinical Cases* **6**, 786-790.
- Saudubray J. M., Anderson K. E., Arnoux J.-B., Artuch R., Aubourg P., Baumgartner M. R., Berry G. T., Blom H. J., Walter J., Brown G., Burgard P., Clayton P. T., Dulac O., Fowler B., Garcia-Cazorla A., Cazorla G. A., Sedel F., Mochel F., Touati G., Rabier D., Schiff M., Dionisi-Vici C. (2016): *Inborn metabolic diseases: Diagnosis and treatment*, Springer, Berlin, 655.
- Shannon P., Markiel A., Ozier O., Baliga N. S., Wang J. T., Ramage D., Amin N., Schwikowski B., Ideker T. (2003): Cytoscape: A software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome research* **13**, 2498-2504.
- Scherer S., Altwegg K., Balsiger H., Fischer J., Jäckel A., Korth A., Mildner M., Piazza D., Reme H., Wurz P. (2006): A novel principle for an ion mirror design in time-of-flight mass spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry* **251**, 73-81.
- Schlame M. (2013): Cardiolipin remodeling and the function of tafazzin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* **1831**, 582-588.
- Schlame M., Ren M., Xu Y., Greenberg M. L., Haller I. (2005): Molecular symmetry in mitochondrial cardiolipins. *Chemistry and Physics of Lipids* **138**, 38-49.
- Schlotterbeck J., Chatterjee M., Gawaz M., Lämmerhofer M. (2019): Comprehensive ms/ms profiling by uhplc-esi-qtof-ms/ms using swath data-independent acquisition for the study of platelet lipidomes in coronary artery disease. *Analytica Chimica Acta* **1046**, 1-15.
- Schmidt S. P., Corydon T. J., Pedersen C. B., Bross P., Gregersen N. (2010): Misfolding of short-chain acyl-coa dehydrogenase leads to mitochondrial fission and oxidative stress. *Molecular Genetics and Metabolism* **100**, 155-162.
- Schmidt S. P., Corydon T. J., Pedersen C. B., Vang S., Palmfeldt J., Stenbroen V., Wanders R. J. A., Ruiter J. P. N., Gregersen N. (2011): Toxic response caused by a misfolding variant of the mitochondrial protein short-chain acyl-coa dehydrogenase. *Journal of Inherited Metabolic Disease* **34**, 465-475.
- Schrimpe-Rutledge A. C., Codreanu S. G., Sherrod S. D., Mclean J. A. (2016): Untargeted metabolomics strategies-challenges and emerging directions. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **27**, 1897-1905.
- Schuck P. F., Milanez A. P., Felisberto F., Galant L. S., Machado J. L., Furlanetto C. B., Petronilho F., Dal-Pizzol F., Streck E. L., Ferreira G. C. (2015): Brain and muscle redox imbalance elicited by acute ethylmalonic acid administration. *Plos One* **10**, 13.
- Siuzdak G. (2004): An introduction to mass spectrometry ionization: An excerpt from the expanding role of mass spectrometry in biotechnology, 2nd ed.; mcs press: San diego, 2005. *Journal of the Association for Laboratory Automation* **9**, 50-63.
- Souri M., Aoyama T., Hoganson G., Hashimoto T. (1998): Very-long-chain acyl-coa dehydrogenase subunit assembles to the dimer form on mitochondrial inner membrane. *Febs Letters* **426**, 187-190.
- Spiegel S., Milstien S. (2003): Sphingosine-1-phosphate: An enigmatic signalling lipid. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **4**, 397-407.
- Stock N. L. (2017): Introducing graduate students to high-resolution mass spectrometry (hrms) using a hands-on approach. *Journal of Chemical Education* **94**, 1978-1982.
- Sud M., Fahy E., Cotter D., Brown A., Dennis E. A., Glass C. K., Merrill A. H., Murphy R. C., Raetz C. R. H., Russell D. W., Subramaniam S. (2007): Lmsd: Lipid maps structure database. *Nucleic Acids Research* **35**, D527-D532.
- Talayero B. G., Sacks F. M. (2012): The role of triglycerides in atherosclerosis. *Current Cardiology Reports* **13**, 544-552.
- Tein I., Elpeleg O., Ben-Zeev B., Korman S. H., Lossos A., Lev D., Lerman-Sagie T., Leshinsky-Silver E., Vockley J., Berry G. T., Lamhonwah A. M., Matern D., Roe C. R., Gregersen N. (2008): Short-chain acyl-coa dehydrogenase gene mutation (c.319c > t) presents with clinical heterogeneity and is candidate founder mutation in individuals of ashkenazi jewish origin. *Molecular Genetics and Metabolism* **93**, 179-189.

- Therrell B. L., Lloyd-Puryear M. A., Camp K. M., Mann M. Y. (2014): Inborn errors of metabolism identified via newborn screening: Ten-year incidence data and costs of nutritional interventions for research agenda planning. *Molecular Genetics and Metabolism* **113**, 14-26.
- Thompson W. E., Ramalho-Santos J., Sutovsky P. (2003): Ubiquitination of prohibitin in mammalian sperm mitochondria: Possible roles in the regulation of mitochondrial inheritance and sperm quality control. *Biology of Reproduction* **69**, 254-260.
- Timmers S., Schrauwen P., De Vogel J. (2008): Muscular diacylglycerol metabolism and insulin resistance. *Physiology & Behavior* **94**, 242-251.
- Tonin R., Caciotti A., Funghini S., Pasquini E., Mooney S. D., Cai B. H., Proncopio E., Donati M. A., Baronio F., Bettocchi I., Cassio A., Biasucci G., Bordugo A., La Marca G., Guerrini R., Morrone A. (2016): Clinical relevance of short-chain acyl-coa dehydrogenase (scad) deficiency: Exploring the role of new variants including the first scad-disease-causing allele carrying a synonymous mutation. *Bba Clinical* **5**, 114-119.
- Tosi M. R., Tugnoli V. (2005): Cholesteryl esters in malignancy. *Clinica Chimica Acta* **359**, 27-45.
- Trufelli H., Palma P., Famigliani G., Cappiello A. (2011): An overview of matrix effects in liquid chromatography-mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews* **30**, 491-509.
- Tsai M. J., Omalley B. W. (1994): Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annual Review of Biochemistry* **63**, 451-486.
- Tsugawa H., Cajka T., Kind T., Ma Y., Higgins B., Ikeda K., Kanazawa M., Vandergheynst J., Fiehn O., Arita M. (2015): Ms-dial: Data-independent ms/ms deconvolution for comprehensive metabolome analysis. *Nature Methods* **12**, 523-+.
- Van Maldegem B. T., Duran M., Wanders R. J. A., Niezen-Koning K. E., Hogeveen M., Ijlst L., Waterham H. R., Wijburg F. A. (2006): Clinical, biochemical, and genetic heterogeneity in short-chain acyl-coenzyme a dehydrogenase deficiency. *Jama-Journal of the American Medical Association* **296**, 943-952.
- Van Meer G., Voelker D. R., Feigenson G. W. (2008): Membrane lipids: Where they are and how they behave. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **9**, 112-124.
- Vauzour D., Camprubi-Robles M., Miquel-Kergoat S., Andres-Lacueva C., Banati D., Barberger-Gateau P., Bowman G. L., Caberlotto L., Clarke R., Hogervorst E., Kiliaan A. J., Lucca U., Manach C., Minihane A. M., Mitchell E. S., Perneczky R., Perry H., Roussel A. M., Schuermans J., Sijben J., Spencer J. P. E., Thuret S., Van De Rest O., Vandewoude M., Wesnes K., Williams R. J., Williams R. S. B., Ramirez M. (2017): Nutrition for the ageing brain: Towards evidence for an optimal diet. *Ageing Research Reviews* **35**, 222-240.
- Vishwanath V. A. (2016): Fatty acid beta-oxidation disorders: A brief review. *Annals of Neurosciences* **23**, 51-55.
- Věstník MZ ČR č. 6/2016 (2016) Metodický návod k zajištění novorozeneckého laboratorního screeningu a následná péče, Ministerstvo zdravotnictví, Praha, Česká republika, 16 stran.
- Wanders R. J. A., Brites P. (2010): Biosynthesis of ether-phospholipids including plasmalogens, peroxisomes and human disease: New insights into an old problem. *Clinical Lipidology* **5**, 379-386.
- Wanders R. J. A., Vreken P., Den Boer M. E. J., Wijburg F. A., Van Gennip A. H., Ijlst L. (1999): Disorders of mitochondrial fatty acyl-coa beta-oxidation. *Journal of Inherited Metabolic Disease* **22**, 442-487.
- Warburg O., Wind F., Negelein E. (1927): The metabolism of tumors in the body. *The Journal of General Physiology* **8**, 519-530.
- Welsh M. C., Pennington B. F., Ozonoff S., Rouse B., McCabe E. R. B. (1990): Neuropsychology of early-treated phenylketonuria - specific executive function deficits. *Child Development* **61**, 1697-1713.
- Wenk M. R. (2005): The emerging field of lipidomics. *Nature Reviews Drug Discovery* **4**, 594-610.
- Wenk M. R. (2010): Lipidomics: New tools and applications. *Cell* **143**, 888-895.
- Wilcken B., Wiley V., Hammond J., Carpenter K. (2003): Screening newborns for inborn errors of metabolism by tandem mass spectrometry. *New England Journal of Medicine* **348**, 2304-2312.

- Wilson I. D., Nicholson J. K., Castro-Perez J., Granger J. H., Johnson K. A., Smith B. W., Plumb R. S. (2005): High resolution “ultra performance” liquid chromatography coupled to oa-tof mass spectrometry as a tool for differential metabolic pathway profiling in functional genomic studies. *Journal of Proteome Research* **4**, 591-598.
- Wilson J. M. G., Jungner G. (1968): Principles and practice of screening for disease. *Boletin De La Oficina Sanitaria Panamericana* **65**, 281-+.
- Xu Y., Kelley R. I., Blanck T. J. J., Schlame M. (2003): Remodeling of cardiolipin by phospholipid transacylation. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 51380-51385.
- Xuan Q. H., Hu C. X., Yu D., Wang L. C., Zhou Y., Zhao X. J., Li Q., Hou X. L., Xu G. W. (2018): Development of a high coverage pseudotargeted lipidomics method based on ultra-high performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Analytical Chemistry* **90**, 7608-7616.
- Yan Y. F., Du Z. F., Chen C., Li J. X., Xiong X., Zhang Y., Jiang H. L. (2019): Lysophospholipid profiles of apolipoprotein e-deficient mice reveal potential lipid biomarkers associated with atherosclerosis progression using validated uplc-qtrap-ms/ms-based lipidomics approach. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **171**, 148-157.
- Yost R. A., Enke C. G. (1978): Selected ion fragmentation with a tandem quadrupole mass spectrometer. *Journal of the American Chemical Society* **100**, 2274-2275.
- Youle R. J., Van Der Blik A. M. (2012): Mitochondrial fission, fusion, and stress. *Science* **337**, 1062.
- Yu-Ting W., Shi-Bei W., Yau-Huei W. (2014): Metabolic reprogramming of human cells in response to oxidative stress: Implications in the pathophysiology and therapy of mitochondrial diseases. *Current Pharmaceutical Design* **20**, 5510-5526.
- Zhang Y., Bilbao A., Bruderer T., Luban J., Strambio-De-Castillia C., Lisacek F., Hopfgartner G., Varesio E. (2015): The use of variable q1 isolation windows improves selectivity in lc-swath-ms acquisition. *Journal of Proteome Research* **14**, 4359-4371.
- Zimmerman G. A., McIntyre T. M., Prescott S. M., Stafforini D. M. (2002): The platelet-activating factor signaling system and its regulators in syndromes of inflammation and thrombosis. *Critical Care Medicine* **30**, S294-S301.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ACS	acyl-CoA-synthetasa
CACT	karnitin-acylkarnitintranslokasa
CAR	karnitin
CE	cholesterylester, ve vybraných případech také kolizní energie
Cer	ceramid
CK	kreatinkinasa
CPTI a CPT II	karnitinpalmitoyltransferasa I a II
DDA	analýza závislá na datech (data dependent acquisition)
DIA	analýza nezávislá na datech (data independent acquisition)
DMP	dědičná metabolická porucha
DSTD	roztok deuterovaných standardů lipidů
EIC	extrahovaný iontový chromatogram
EMA	kyselina ethylmalonová
FA či MK	mastná kyselina volná či vázaná
FATP1-6	transportéry mastných kyselin
FWHM	rozlišení hmotnostního spektrometru (full width at half maximum)
HRMS	hmotnostní analyzátor s vysokým rozlišením
LCKAT	acetyl-CoA-C-acyltransferasa
LCHAD	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenasa mastných kyselin s dlouhým řetězcem
LMSD	databáze LIPID MAPS
LPC	lysofosfatidylcholin
LPC-O/P	lysofosfatidylcholin (plasmany/plasmenyl)
LPE	lysofosfatidylethanolamin
LPE-O/P	lysofosfatidylethanolamin (plasmany/plasmenyl)
M/D/T-AG	mono/di/tri-acylglycerol
MCAD	acyl-CoA dehydrogenasa mastných kyselin se středně dlouhým řetězcem
MRM	multiple reaction monitoring
MTP	mitochondriální trifunkční protein
MZ ČR	ministerstvo zdravotnictví ČR

NS	novorozenecký screening
OPLS-DA	orthogonal projections to latent structures discriminant analysis
PC	fosfatidylcholin
PCA	analýza hlavních komponent
PE	fosfatidylethanolamin
PG	fosfatidylglycerol
PI	fosfatidylinositol
PLS-DA	partial least squares-discriminant analysis
PS	fosfatidylserin
Q1, Q2, Q3	první kvadrupól, druhý kvadrupól (kolizní cela), třetí kvadrupól
QTOF	hmotnostní analyzátor doby letu s vysokým rozlišením
ROC	receiver operating characteristic
SCAD	acyl-CoA dehydrogenasa mastných kyselin s krátkým řetězcem
SCADD	Deficit acyl-CoA dehydrogenasy mastných kyselin s krátkým řetězcem
SM	sfingomyelin
SWATH	metoda necílené analýzy (sequential windowed data independent acquisition of total high resolution mass spectra)
VLCAD	acyl-CoA dehydrogenasa mastných kyselin s velmi dlouhým řetězcem

9 PŘÍLOHY

Lipidový standard	Molekulová hmotnost	Přesná hmotnost	Vzorec	Koncentrace (µg/ml)
15:0-18:1(d7) PC	753.11	752.61	C ₄₁ H ₇₃ D ₇ NO ₈ P	150.6
15:0-18:1(d7) PE	711.03	710.56	C ₃₈ H ₆₇ D ₇ NO ₈ P	5.3
15:0-18:1(d7) PS (Na Salt)	777.02	776.53	C ₃₉ H ₆₆ D ₇ NNaO ₁₀ P	3.9
15:0-18:1(d7) PG (Na Salt)	764.02	763.54	C ₃₉ H ₆₇ D ₇ NaO ₁₀ P	26.7
15:0-18:1(d7) PI (NH₄ Salt)	847.13	846.60	C ₄₂ H ₇₅ D ₇ NO ₁₃ P	8.5
15:0-18:1(d7) PA (Na Salt)	689.94	689.50	C ₃₆ H ₆₁ D ₇ NaO ₈ P	6.9
18:1(d7) Lyso PC	528.72	528.39	C ₂₆ H ₄₅ D ₇ NO ₇ P	23.8
18:1(d7) Lyso PE	486.64	486.35	C ₂₃ H ₃₉ D ₇ NO ₇ P	4.9
18:1(d7) Chol Ester	658.16	657.64	C ₄₅ H ₇₁ D ₇ O ₂	329.1
18:1(d7) MAG	363.59	363.34	C ₂₁ H ₃₃ D ₇ O ₄	1.8
15:0-18:1(d7) DAG	587.98	587.55	C ₃₆ H ₆₁ D ₇ O ₅	8.8
15:0-18:1(d7)-15:0 TAG	812.37	811.77	C ₅₁ H ₈₉ D ₇ O ₆	52.8
d18:1-18:1(d9) SM	738.12	737.64	C ₄₁ H ₇₂ D ₉ N ₂ O ₆ P	29.6
Cholesterol (d7)	393.71	393.40	C ₂₇ H ₃₉ D ₇ O	98.4

Příloha 1 Specifikace směsi deuterovaných lipidových standardů (SPLASH® LIPIDOMIX® Mass Spec Standard) s uvedením molekulové hmotnosti, přesné hmotnosti, vzorce a koncentrace jednotlivých složek. Převzato a přeloženo dle informačního manuálu výrobce.

Lipidový standard	Vzorec	Koncentrace (µg/ml)	Koncentrace (µmol/l)	Přesná hmotnost
15:0-18:1(d7) PC	$C_{41}H_{73}D_7NO_8P$	100	133	752.6061
18:1(d7) Lyso PC	$C_{26}H_{45}D_7NO_7P$	100	189	528.3921
15:0-18:1(d7) PE	$C_{38}H_{67}D_7NO_8P$	100	141	710.5591
18:1(d7) Lyso PE	$C_{23}H_{39}D_7NO_7P$	100	205	486.3451
15:0-18:1(d7) PG	$C_{39}H_{68}D_7O_{10}P$	100	131	741.5537
15:0-18:1(d7) PI	$C_{42}H_{72}D_7O_{13}P$	100	118	829.5698
15:0-18:1(d7) PS	$C_{39}H_{67}D_7NO_{10}P$	100	129	754.5490
15:0-18:1(d7)-15:0 TAG	$C_{51}H_{89}D_7O_6$	100	123	811.7646
15:0-18:1(d7) DAG	$C_{36}H_{61}D_7O_5$	100	170	587.5506
18:1(d7) MAG	$C_{21}H_{33}D_7O_4$	100	275	363.3366
18:1(d7) Chol Ester	$C_{45}H_{71}D_7O_2$	100	152	657.6441
d18:1-18:1(d9) SM	$C_{41}H_{72}D_9N_2O_6P$	100	135	737.6397
C15 Ceramide-d7	$C_{33}H_{58}D_7NO_3$	100	188	530.5404

Příloha 2 Specifikace směsi deuterovaných lipidových standardů (EquiSPLASH® LIPIDOMIX® Mass Spec Standard) s uvedením molekulové hmotnosti, přesné hmotnosti, vzorce a koncentrace jednotlivých složek. Převzato a přeloženo dle informačního manuálu výrobce.

Positivní mód analýzy				Negativní mód analýzy			
ID cyklu	Typ měření	Počáteční hodnota m/z	Konečná hodnota m/z	ID cyklu	Typ měření	Počáteční hodnota m/z	Konečná hodnota m/z
0	SCAN	50	1250	0	SCAN	50	1250
1	SWATH	50	119.1	1	SWATH	50	131.5
2	SWATH	118.1	158.5	2	SWATH	130.5	163.3
3	SWATH	157.5	214.1	3	SWATH	162.3	189
4	SWATH	213.1	217.1	4	SWATH	188	230.4
5	SWATH	216.1	268.7	5	SWATH	229.4	266.1
6	SWATH	267.7	303.3	6	SWATH	265.1	297.7
7	SWATH	302.3	327.8	7	SWATH	296.7	315.2
8	SWATH	326.8	343.8	8	SWATH	314.2	339.2
9	SWATH	342.8	358.8	9	SWATH	338.2	363.7
10	SWATH	357.8	375.8	10	SWATH	362.7	377.8
11	SWATH	374.8	388.8	11	SWATH	376.8	395.2
12	SWATH	387.8	408.4	12	SWATH	394.2	412.6
13	SWATH	407.4	433.8	13	SWATH	411.6	432.8
14	SWATH	432.8	485.9	14	SWATH	431.8	466.3
15	SWATH	484.9	535.8	15	SWATH	465.3	523.4
16	SWATH	534.8	577.1	16	SWATH	522.4	575.4
17	SWATH	576.1	616.4	17	SWATH	574.4	614
18	SWATH	615.4	649.1	18	SWATH	613	640.6
19	SWATH	648.1	677.7	19	SWATH	639.6	668.1
20	SWATH	676.7	708.4	20	SWATH	667.1	694.6
21	SWATH	707.4	745.1	21	SWATH	693.6	744.5
22	SWATH	744.1	776.6	22	SWATH	743.5	790.1
23	SWATH	775.6	815.7	23	SWATH	789.1	830.6
24	SWATH	814.7	878.3	24	SWATH	829.6	861.7
25	SWATH	877.3	1250	25	SWATH	860.7	1250

Příloha 3 Specifikace parametrů rozdělení měřicích oken v necílené metodě SWATH pro pozitivní a negativní mód analýzy.

Data collection	Peak detection	MS2Dec	Identification	Adduct	Alignment	Mobility	Isotope tracking
<i>Mass accuracy</i>							
MS1 tolerance:	<input type="text" value="0.01"/>						Da
MS2 tolerance:	<input type="text" value="0.025"/>						Da
⤴ Advanced							
<i>Data collection parameters</i>							
Retention time begin:	<input type="text" value="0.3"/>						min
Retention time end:	<input type="text" value="13"/>						min
Mass range begin:	<input type="text" value="50"/>						Da
Mass range end:	<input type="text" value="1250"/>						Da
<i>Isotope recognition</i>							
Maximum charged number:	<input type="text" value="2"/>						
Consider Cl and Br elements:	<input type="checkbox"/>						
<i>Multithreading</i>							
Number of threads:	<input type="text" value="4"/>						
<i>Execute retention time corrections</i>							
<input type="checkbox"/>							
<i>Peak detection parameters</i>							
Minimum peak height:	<input type="text" value="200"/>						amplitude
Mass slice width:	<input type="text" value="0.1"/>						Da
⤴ Advanced							
Smoothing method:	Linear weighted moving average						
Smoothing level:	<input type="text" value="1"/>						scan
Minimum peak width:	<input type="text" value="5"/>						scan
<i>Deconvolution parameters</i>							
Sigma window value:	<input type="text" value="0.5"/>						
MS/MS abundance cut off:	<input type="text" value="0"/>						amplitude
⤴ Advanced							
Exclude after precursor ion:	<input checked="" type="checkbox"/>						
Keep the isotopic ions until:	<input type="text" value="0.5"/>						Da
Keep the isotopic ions w/o MS2Dec:	<input type="checkbox"/>						
<i>MSP file and MS/MS identification setting</i>							
MSP file:	<input type="text" value="D:\Programs\MSDIAL ver 4.12\LipidMsmsBinaryDB-VS66-FiehnO.lbm2"/>						Select
Retention time tolerance:	<input type="text" value="1"/>						min
Accurate mass tolerance (MS1):	<input type="text" value="0.01"/>						Da
Accurate mass tolerance (MS2):	<input type="text" value="0.05"/>						Da
Identification score cut off:	<input type="text" value="80"/>						%
Use retention time for scoring:	<input checked="" type="checkbox"/>						
Use retention time for filtering:	<input checked="" type="checkbox"/>						
<i>Alignment parameters setting</i>							
Result name:	<input type="text" value="alignmentResult_2020_5_11_11_0_41"/>						
Reference file:	36_QC8_vial1						
Retention time tolerance:	<input type="text" value="0.1"/>						min
MS1 tolerance:	<input type="text" value="0.015"/>						Da
⤴ Advanced							
Retention time factor:	<input type="text" value="0.5"/>						(0-1)
MS1 factor:	<input type="text" value="0.5"/>						(0-1)
Peak count filter:	<input type="text" value="0"/>						%
N% detected in at least one group:	<input type="text" value="25"/>						%
Remove features based on blank information:	<input checked="" type="checkbox"/>						
Sample max / blank average:	<input type="text" value="5"/>						fold change
Keep 'identified' metabolite features:	<input type="checkbox"/>						
Keep 'annotated (wo MS2)' metabolite features:	<input type="checkbox"/>						
Keep removable features and assign the tag:	<input checked="" type="checkbox"/>						
Gap filling by compulsion:	<input checked="" type="checkbox"/>						

Příloha 4 Specifikace a nastavení programu MS-DIAL pro zpracování a vyhodnocení dat z necílené analýzy v pozitivním módu.

Data collection Peak detection MS2Dec Identification Adduct Alignment Mobility Isotope tracking

Mass accuracy

MS1 tolerance: Da

MS2 tolerance: Da

⤴ Advanced

Data collection parameters

Retention time begin: min

Retention time end: min

Mass range begin: Da

Mass range end: Da

Isotope recognition

Maximum charged number:

Consider Cl and Br elements:

Multithreading

Number of threads:

Execute retention time corrections

Peak detection parameters

Minimum peak height: amplitude

Mass slice width: Da

⤴ Advanced

Smoothing method:

Smoothing level: scan

Minimum peak width: scan

Deconvolution parameters

Sigma window value:

MS/MS abundance cut off: amplitude

⤴ Advanced

Exclude after precursor ion:

Keep the isotopic ions until: Da

Keep the isotopic ions w/o MS2Dec:

MSP file and MS/MS identification setting

MSP file:

Retention time tolerance: min

Accurate mass tolerance (MS1): Da

Accurate mass tolerance (MS2): Da

Identification score cut off: %

Use retention time for scoring:

Use retention time for filtering:

Alignment parameters setting

Result name:

Reference file:

Retention time tolerance: min

MS1 tolerance: Da

⤴ Advanced

Retention time factor: (0-1)

MS1 factor: (0-1)

Peak count filter: %

N% detected in at least one group: %

Remove features based on blank information:

fold change

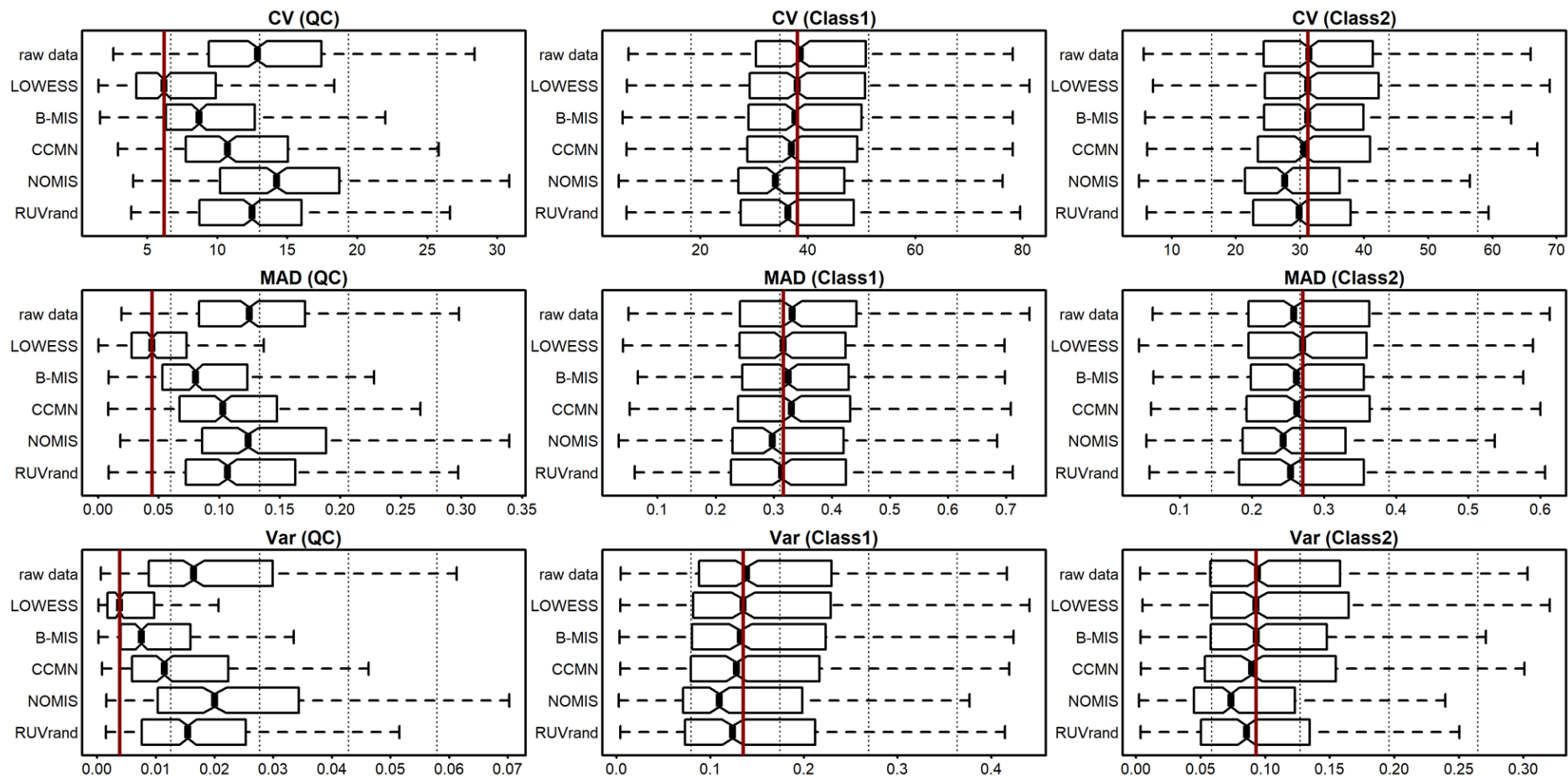
Keep 'identified' metabolite features:

Keep 'annotated (wo MS2)' metabolite features:

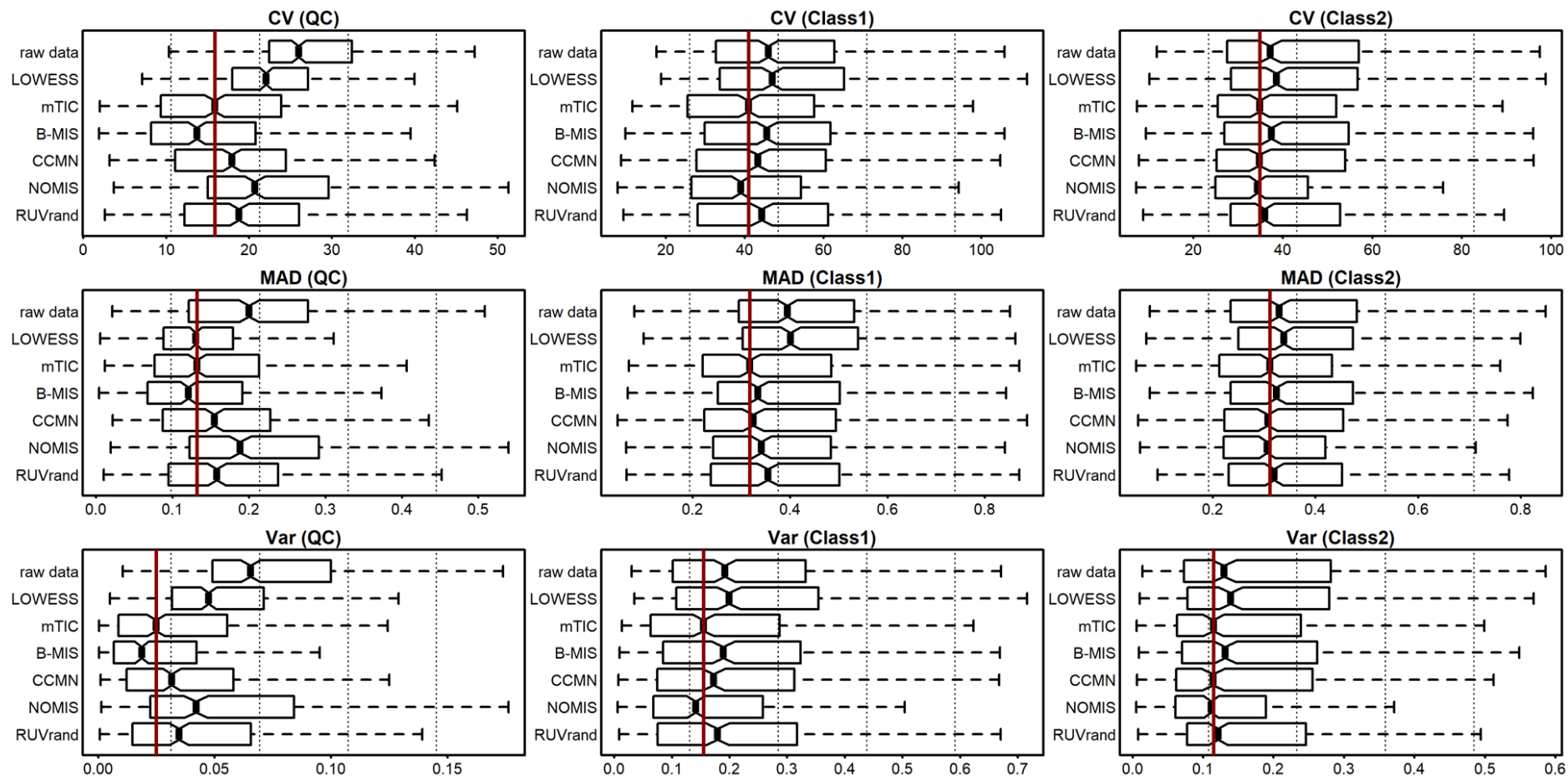
Keep removable features and assign the tag:

Gap filling by compulsion:

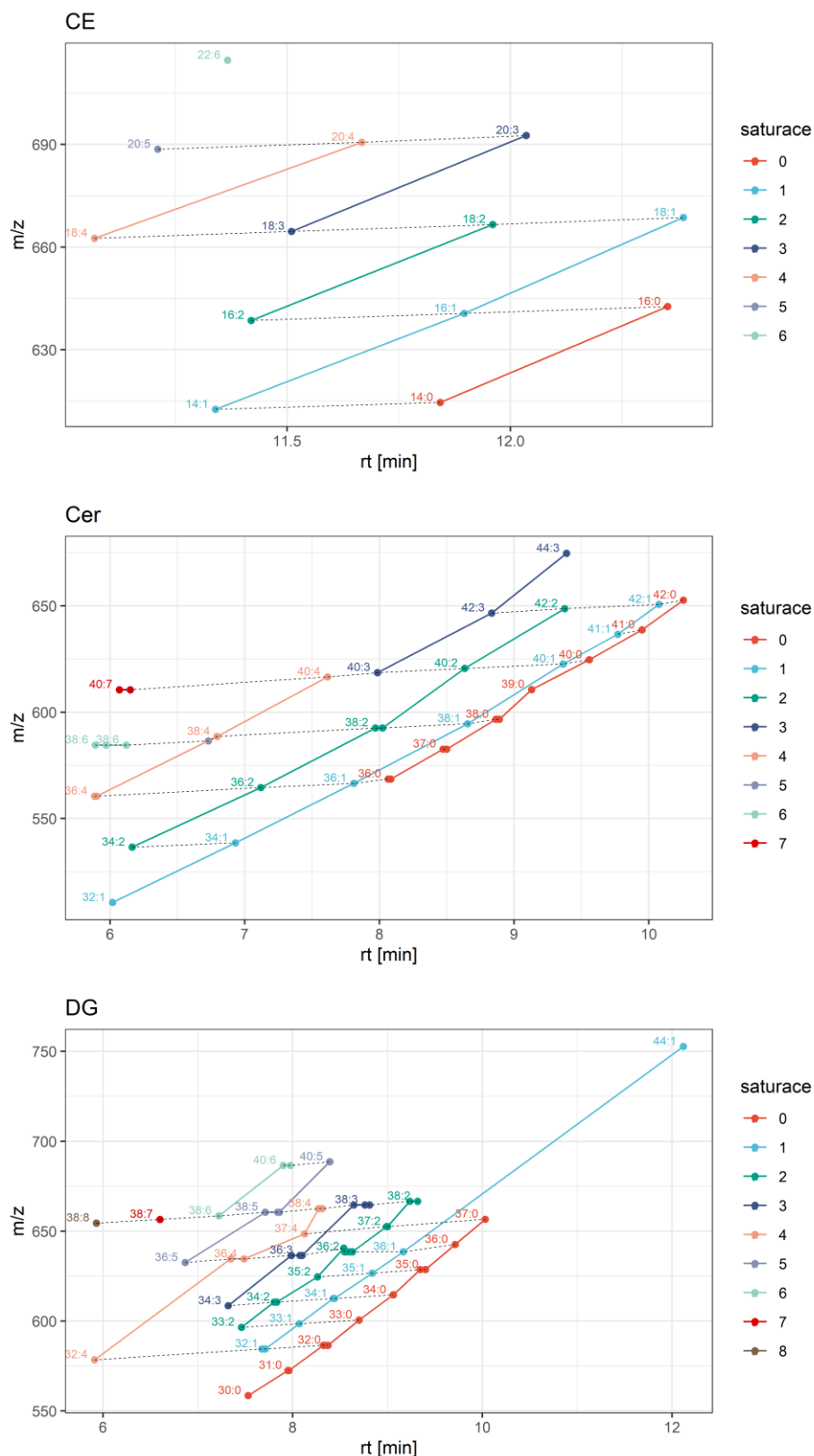
Příloha 5 Specifikace a nastavení programu MS-DIAL pro zpracování a vyhodnocení dat z necílené analýzy v negativním módu.



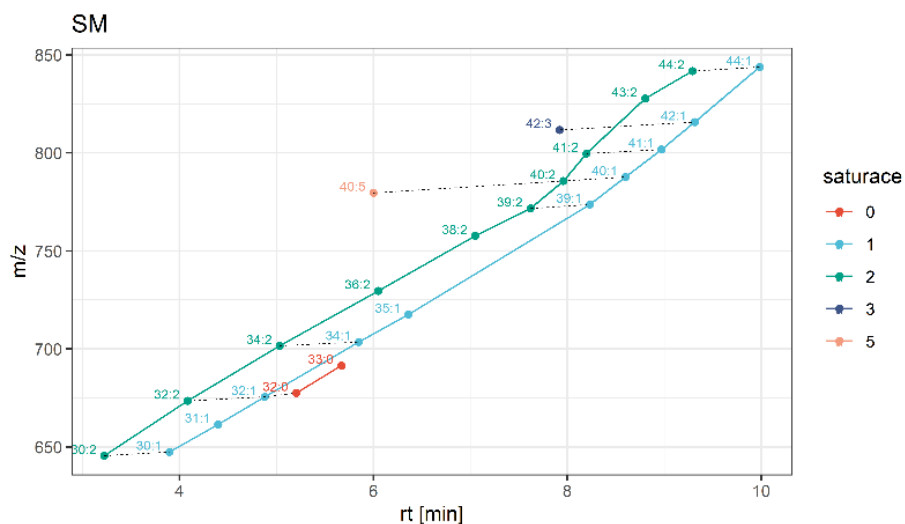
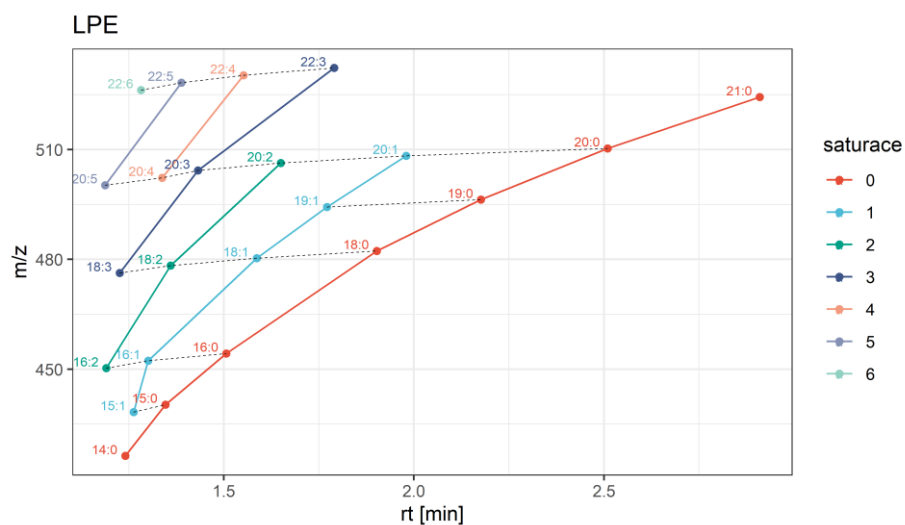
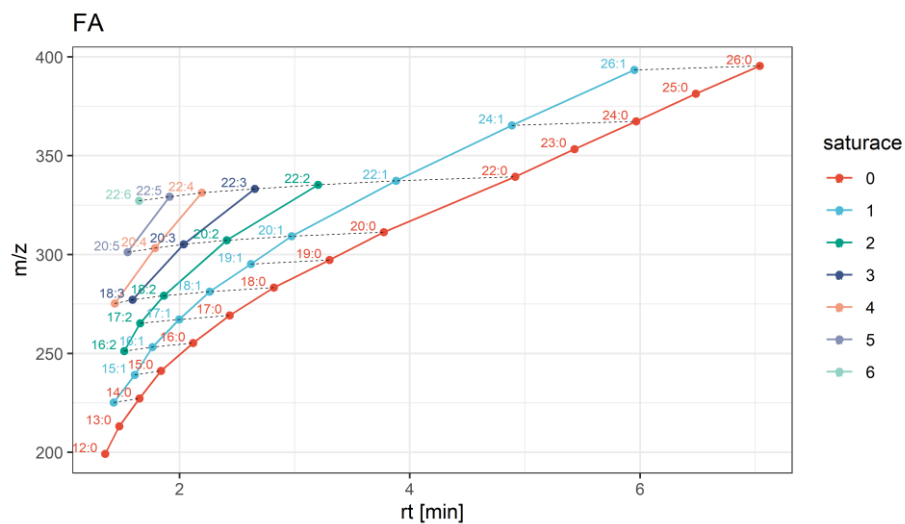
Příloha 6 Výstup ze statistické analýzy optimální metody normalizace dat z cílené analýzy. Byly porovnány skupiny vzorků kontroly kvality (QC), pacientů (Class1) a kontrol (Class2). Byly otestovány normalizační metody LOWESS, B-MIS, CCMN, NOMIS a RUVrand, kdy specifikace těchto normalizačních přístupů a pravidla k vyhodnocení jsou blíže popsána autory původní publikace dle Drotleff a Lämmerhofer (2019).



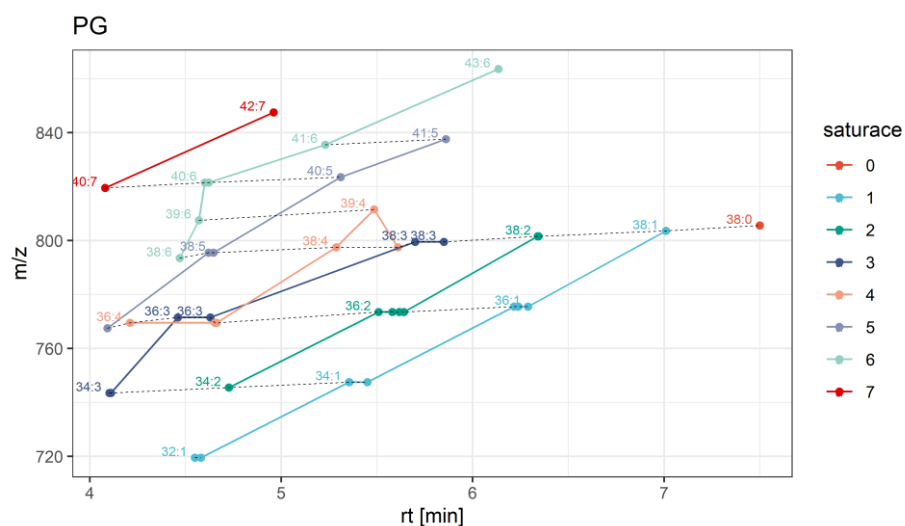
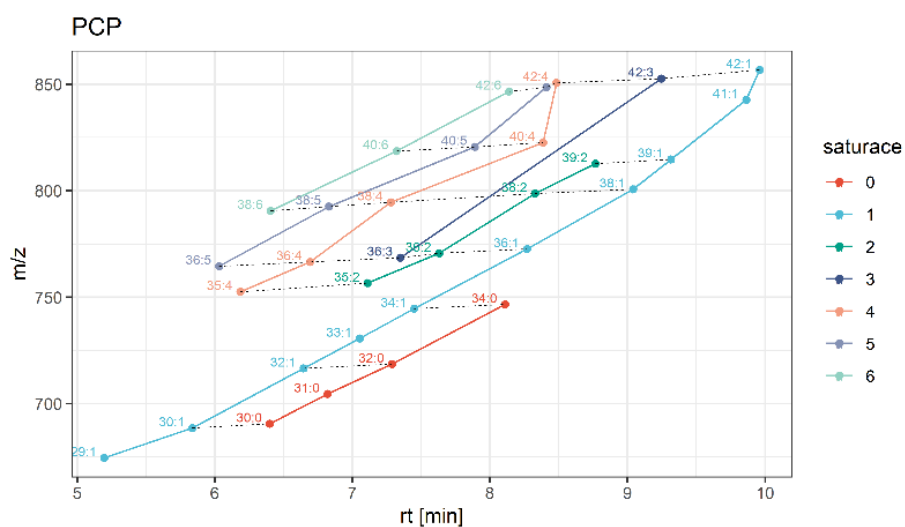
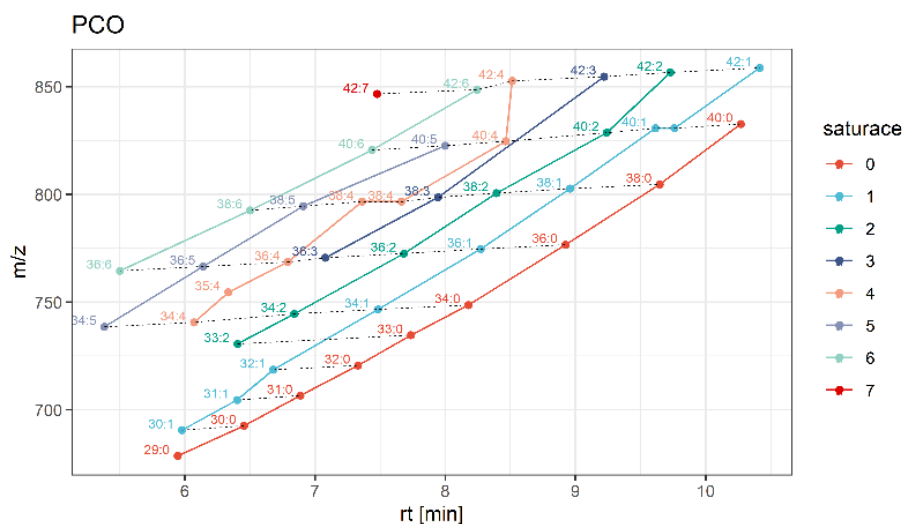
Příloha 7 Výstup ze statistické analýzy optimální metody normalizace dat z necílené analýzy. Byly porovnány skupiny vzorků kontroly kvality (QC), pacientů (Class1) a kontrol (Class2). Byly otestovány normalizační metody LOWESS, mTIC, B-MIS, CCMN, NOMIS a RUVrand, kdy specifikace těchto normalizačních přístupů a pravidla k vyhodnocení jsou blíže popsána autory původní publikace dle Drotleff a Lämmerhofer (2019).



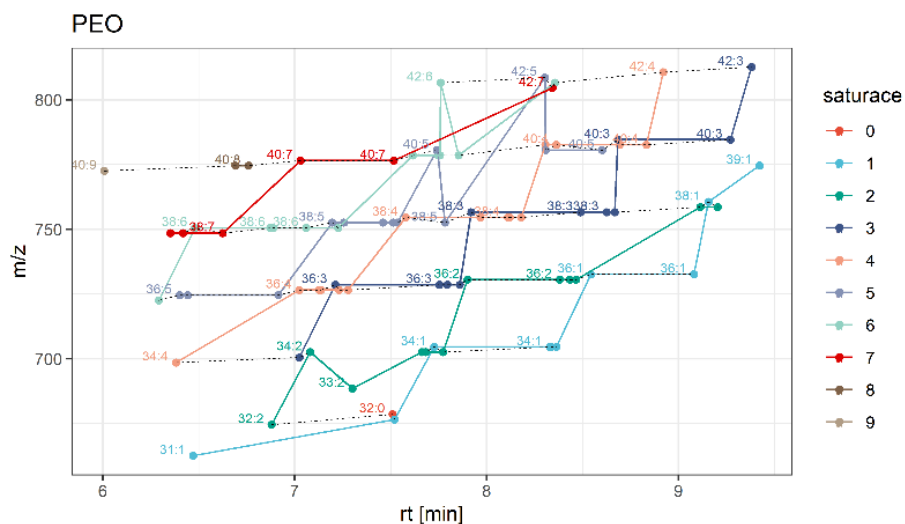
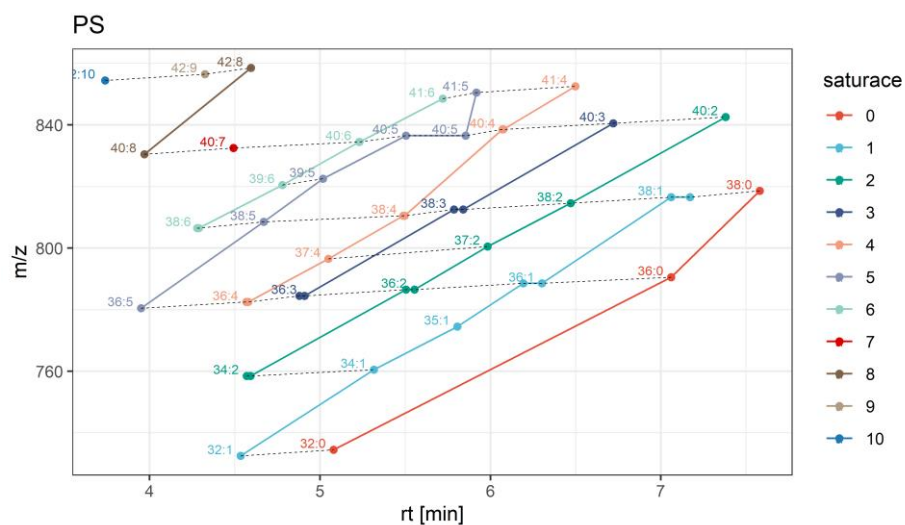
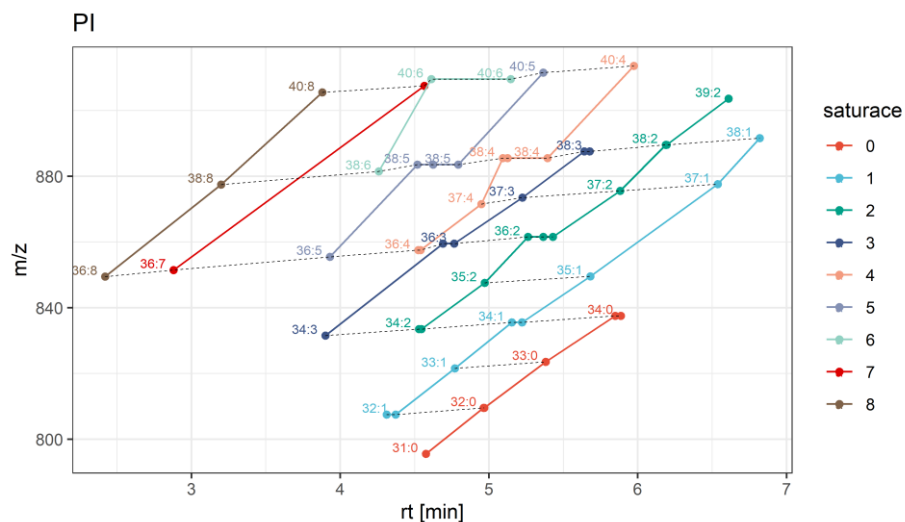
Příloha 8 Lipidové vzory pro lipidové skupiny CE, Cer, DG (nomenklatura dle kapitoly 2.3.1.1). Grafy jsou konstruovány jako závislost m/z na retenčním čase během non-scheduled MRM analýzy. Saturace odpovídá počtu dvojných vazeb na acylových řetězcích vyobrazených lipidů.



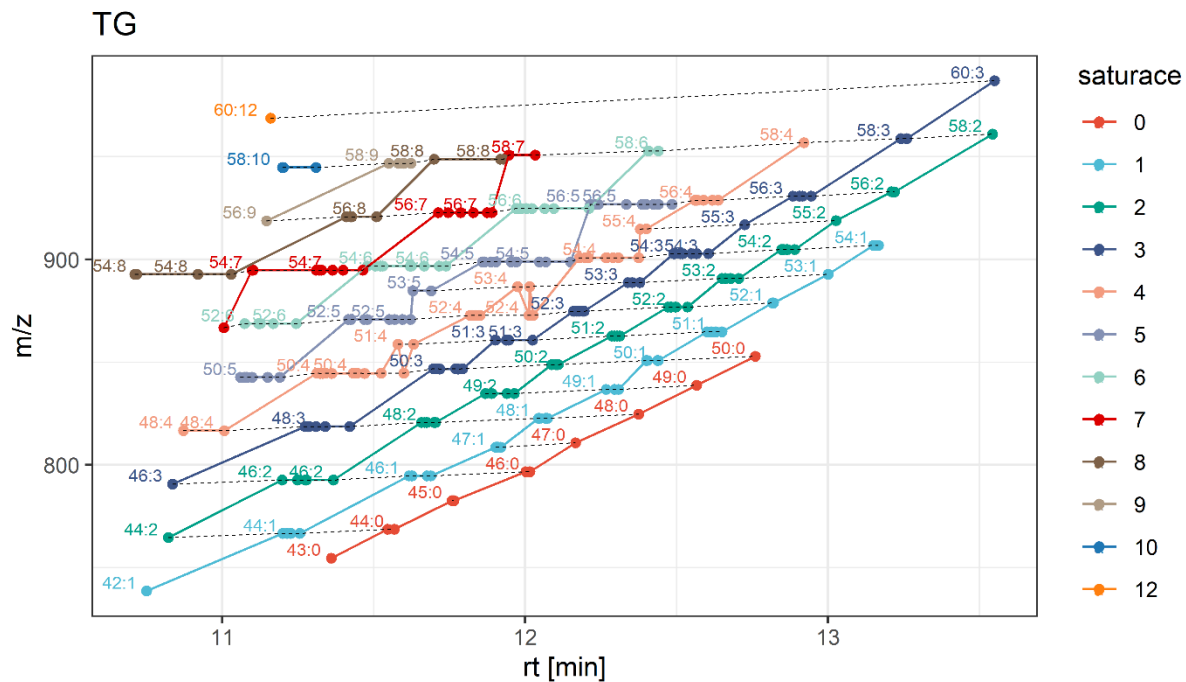
Příloha 9 Lipidové vzory pro lipidové skupiny FA, LPE, SM (nomenklatura dle kapitoly 2.3.1.1). Grafy jsou konstruovány jako závislost m/z na retenčnímu čase během non-scheduled MRM analýzy. Saturace odpovídá počtu dvojných vazeb na acylových řetězcích vyobrazených lipidů.



Příloha 10 Lipidové vzory pro lipidové skupiny PC-O, PC-P, PG (nomenklatura dle kapitoly 2.3.1.1). Grafy jsou konstruovány jako závislost m/z na retenčním čase během non-scheduled MRM analýzy. Saturace odpovídá počtu dvojných vazeb na acylových řetězcích vyobrazených lipidů.



Příloha 11 Lipidové vzory pro lipidové skupiny PI, PS, PE-O (nomenklatura dle kapitoly 2.3.1.1). Grafy jsou konstruovány jako závislost m/z na retenčním čase během non-scheduled MRM analýzy. Saturace odpovídá počtu dvojných vazeb na acylových řetězcích vyobrazených lipidů.



Příloha 12 Lipidový vzor triacylglycerolů (TG). Graf je konstruován jako závislost m/z na retenčním čase během non-scheduled MRM analýzy. Saturace odpovídá počtu dvojných vazeb na acylových řetězcích vyobrazených lipidů.