

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Cílená metabolická analýza vzorků krevních skvrn pacientů s deficitem acyl-CoA-dehydrogenasy mastných kyselin s krátkým řetězcem (SCADD)

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Kateřina Zuzaňáková
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Radana Karlíková
Rok:	2018

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala 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. Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne

Poděkování

Velmi ráda bych tímto poděkovala Mgr. Radaně Karlíkové, vedoucí mé bakalářské práce, za odborné vedení, vstřícný přístup, a hlavně za množství času a poskytnuté konzultace, které mi věnovala, a tím pomohla k vypracování teoretické a experimentální části mé bakalářské práce. Také bych ráda poděkovala za spolupráci celému kolektivu z Ústavu molekulární a translační medicíny Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci a dále screeningovému centru novorozenců SR při Dětské fakulní nemocnici v Bánské Bystrici za poskytnutí vzorků krevních skvrn.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Kateřina Zuzaňáková
Název práce	Cílená metabolomická analýza vzorků krevních skvrn pacientů s deficitem acyl-CoA-dehydrogenasy mastných kyselin s krátkým řetězcem (SCADD)
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Ústav molekulární a translační medicíny Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci, Laboratoř metabolomiky
Vedoucí práce	Mgr. Radana Karlíková
Rok obhajoby práce	2018

Abstrakt

Deficit acyl-CoA dehydrogenasy mastných kyselin s krátkým řetězcem (SCADD) se řadí mezi autosomálně recesivní poruchy mitochondriální β -oxidace. Je způsoben mutacemi v genu *ACADS*. Onemocnění je doprovázeno různými klinickými symptomy (např. metabolickou acidosou, opožděným vývojem, záchvaty), případně mohou být pacienti zcela asymptomatictí. Vzdává proto potřeba zavést SCADD mezi onemocnění, která se vyšetřují v rámci novorozeneckého screeningu České republiky.

V praktické části byly cílenou metabolomickou analýzou, za využití kapalinové chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií, hledány nové biomarkery onemocnění. Byly porovnávány suché krevní skvrny získané od novorozenců s diagnosou SCADD a kontrol. Data byla zpracována a statisticky vyhodnocena. Změny byly nalezeny v hladinách acylkarnitinů (butyrylkarnitin, decanoylkarnitin, decenoylkarnitin), organických kyselin (ethylmalonát, betain) a purinů (inosin, hypoxanthin, IMP). Kombinace těchto metabolitů může vést ke zvýšení selektivity pro záchyt onemocnění.

Klíčová slova	Beta-oxidace mastných kyselin, SCADD, hmotnostní spektrometrie, metabolomika, statistická analýza
Počet stran	56

Počet příloh

0

Jazyk

Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Kateřina Zuzanáková
Title	Targeted metabolomic analysis of dry blood spots from patients with short-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency (SCADD)
Type of thesis	Bachelor
Department	Institute of Molecular and Translational Medicine Faculty of Medicine and Dentistry Palacky University Olomouc, Laboratory of metabolomic
Supervisor	Mgr. Radana Karlíková
The year of presentation	2018

Abstract

Short-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency (SCADD) belongs to autosomal recessive disorders of mitochondrial β -oxidation. It is caused by mutations in the *ACADS* gene. The disease is accompanied by a variety of clinical signs (eg. metabolic acidosis, developmental delay, seizures), or patients may be completely asymptomatic. There is a growing need to introduce SCADD among the diseases that are being investigated in the neonatal screening of the Czech republic.

In the practical part, target metabolomic analysis was used to find new biomarkers of the disease. Dry blood spots obtained from neonates with SCADD and controls were analysed by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. The data was processed and statistically evaluated. Changes were found in the levels of acylcarnitines (butyrylcarnitine, decanoylcarnitine, decenoylcarnitine), organic acids (ethylmalonate, betaine) and purines (inosine, hypoxanthine and IMP). Combination of these metabolites may lead to an increased selectivity of disease detection.

Keywords	Beta-oxidation of fatty acids, SCADD, mass spectrometry, metabolomics, statistical analysis
Number of pages	56
Number of appendices	0

Language

Czech

Obsah

1. Úvod.....	11
2. Mastné kyseliny	12
2.1 Charakteristika mastných kyselin.....	12
2.2 Odbourávání MK.....	12
2.2.1 Aktivace MK a transport do mitochondrií	13
2.2.2 Vlastní průběh β -oxidace	14
2.2.2.1 Odbourávání mastných kyselin s lichým počtem uhlíků	16
2.2.2.2 Odbourávání nenasycených mastných kyselin	16
3. Dědičné metabolické poruchy	18
3.1 Poruchy mitochondriální β -oxidace mastných kyselin	18
3.1.1 Deficit acyl-CoA dehydrogenasy s krátkým řetězcem.....	21
3.1.1.1 Enzym acyl-CoA dehydrogenasa pro krátký řetězec.....	21
3.1.1.2 Klinické projevy	23
3.1.1.3 Laboratorní nálezy	23
3.1.1.4 Léčba.....	23
3.1.2 Deficit acyl-CoA dehydrogenasy se středně dlouhým řetězcem	24
3.1.3 Deficit 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenasy s dlouhým řetězcem.....	24
3.1.4 Deficit acyl-CoA dehydrogenasy s velmi dlouhým řetězcem.....	25
4. Novorozenecký screening	26
5. Metabolomika	27
6. Hmotnostní spektrometrie	28
6.1 Ionizace a iontové zdroje.....	29
6.1.1 Ionizace elektrosprejem	29
6.2 Hmotnostní analyzátory	29
6.2.1 Kvadrupólový analyzátor	30
6.3 Detektory	30

6.4	Tandemová hmotnostní spektrometrie	30
7.	Experimentální část	32
7.1	Materiál	32
7.1.1	Chemikálie	32
7.1.2	Přístrojové vybavení.....	32
7.1.3	Biologický materiál.....	32
7.1.4	Příprava mobilní fáze	34
7.1.5	Příprava vzorků	34
7.2	Metody.....	34
7.2.1	Cílená metabolomická analýza	34
7.2.2	Statistická analýza.....	35
8.	Výsledky a diskuze	36
8.1	Cílená metabolomická analýza.....	36
8.1.1	Statistické analýza.....	37
9.	Závěr.....	51
10.	Literatura.....	52
11.	Seznam použitých zkratek.....	56

Cíle práce

Vypracování literární rešerše o onemocnění SCADD.

Metabolomická analýza vzorků krevních skvrn pacientů a kontrol pomocí metody LC-MS/MS

Vyhodnocení metabolických dat.

Nalezení nových biomarkerů vhodných pro rozšíření novorozeneckého screeningu

1. Úvod

Mastné kyseliny jsou velmi důležitým zdrojem energie v období katabolického stresu spojeným s hladověním, tělesnou aktivitou nebo horečnatým onemocněním. Jedná se o karboxylové kyseliny mající různě dlouhé uhlovodíkové řetězce. Součástí odbourávání mastných kyselin je enzym acyl-CoA dehydrogenasa se specifitou pro různé délky řetězců, který se účastní prvního kroku β -oxidace mastných kyselin.

Bakalářská práce pojednává o onemocnění týkající se deficitu acyl-CoA dehydrogenasy pro krátký řetězec mastných kyselin (SCADD). Jedná se o autosomálně recesivní vrozenou poruchu metabolismu mastných kyselin. Porucha je způsobena mutacemi v genu *ACADS*. Pacienti mohou být zcela asymptomatictí, nebo se u nich projevují různé klinické symptomy. Hlavním biomarkerem sledovaným v krvi pacientů je zvýšena hladina butyrylkarnitinu. V současné době není onemocnění součástí novorozeneckého screeningu.

Vzhledem k různým klinickým symptomům a variantám v mutacích genu *ACADS*, může rozšíření známých biomarkerů vést ke zvýšení selektivity a včasnému záchytu onemocnění.

2. Mastné kyseliny

2.1 Charakteristika mastných kyselin

Mastné kyseliny (MK) jsou karboxylové kyseliny s různě dlouhým uhlovodíkovým řetězcem, které se vyskytují volně či v podobě esterů s glycerolem, sfingosinem a cholesterolem. Obsahují většinou sudý počet uhlíkových atomů a bývají nevětvené. Podle přítomnosti dvojně vazby je dělíme na nasycené a nenasycené a podle délky řetězce na MK s krátkým ($C_4 - C_6$), středním ($C_8 - C_{10}$), dlouhým ($C_{12} - C_{18}$) a velmi dlouhým řetězcem ($>C_{18}$). Přítomnost dvojně vazby umožňuje *cis* a *trans* izomerii. V lipidech se vyskytují nenasycené MK většinou v *cis*-konfiguraci, což má význam pro prostorové uspořádání molekul lipidů v buněčných membránách (Matouš *et al.*, 2010; Murray *et al.*, 1998; Novák, 2002; Voet a Voetová, 1995).

Syntéza MK probíhá v cytosolu. Je významná v játrech, ledvinách, mozku, tukové tkáni a mléčné žláze. Pro její průběh je nutná přítomnost NADPH, ATP, Mg^{2+} , biotinu a HCO_3^- . Primárním substrátem biosyntézy je acetyl-koenzym A (CoA), který je postupně přeměňován na volný palmitát. Z něj jsou pak tvořeny MK s velmi dlouhým řetězcem (Matouš *et al.*, 2010).

V krevní plazmě mohou být transportovány volně (MK s krátkým a středně dlouhým řetězcem), ve vazbě na albumin (MK s dlouhým a velmi dlouhým řetězcem) nebo ve formě triacylglycerolů v lipoproteinech (Murray *et al.*, 1998).

MK jsou důležitým zdrojem energie v období katabolického stresu spojeného se zvýšenou tělesnou aktivitou, hladověním nebo horečnatým onemocněním. Důležitou roli hrají u novorozenců, kteří mají zvýšený metabolický obrat, ale současně i omezené zásoby glykogenu (Rinaldo *et al.*, 2002).

2.2 Odbourávání MK

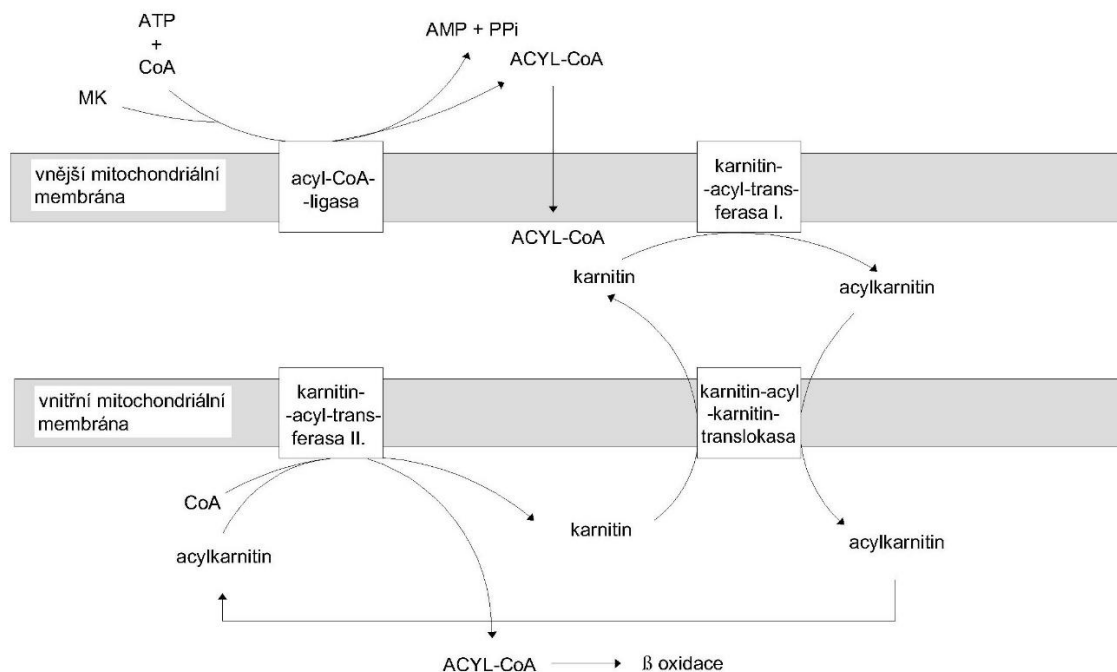
Odbourávání MK probíhá v peroxisomech, mitochondriích, vzácněji pak na endoplasmatickém retikulu. Produkty β -oxidace jsou dále využity pro tvorbu ATP (acetyl-CoA v citrátovém cyklu a redukované kofaktory NADH a $FADH_2$ v dýchacím řetězci). Slouží tak jako zdroj energie mezi příjmem potravy, v játrech jsou využity pro tvorbu ketolátek.

Pro urychlení mitochondriální β -oxidace jsou nejprve MK s dlouhým a velmi dlouhým řetězcem zkráceny v peroxisomech. Do peroxisomů difundují volně, následně jsou aktivovány peroxisomální acyl-CoA syntetasou (EC 6.2.1.3.). Prvního kroku

peroxisomální β -oxidace se účastní FAD dependentní acyl-CoA dehydrogenasa, která přenáší 2 elektrony na kyslík za tvorby peroxidu vodíku. Peroxid vodíku je účinkem peroxisomální katalasy (EC 1.11.1.6) disproportionován na vodu a kyslík. Konečné produkty (acetyl-CoA, zkrácené MK) jsou z peroxisomů přenášeny do mitochondrií ve vazbě na karnitin, kde podléhají další oxidaci (Murray *et al.*, 1998; Voet a Voetová, 1995).

2.2.1 Aktivace MK a transport do mitochondrií

MK s krátkým a středně dlouhým řetězcem difundují do matrix mitochondrie volně. Po vstupu jsou aktivovány acyl-CoA ligasou za účasti ATP a CoA na acyl-CoA. MK s délkou řetězce C_{12} – C_{18} prochází přes vnější mitochondriální membránu volně, nicméně vnitřní membrána je pro ně nepropustná. Využívají proto karnitinový přenašeč. Na vnější mitochondriální membráně dochází k jejich aktivaci acyl-CoA syntetasou za spotřeby ATP. Vzniklý acyl-CoA je následně konjugován s karnitinem za uvolnění CoA. Tento proces katalyzuje karnitinacyltransferasa I (CPT I – EC 2.3.1.21). Dalším krokem je transport přes tzv. karnitinový cyklus na vnitřní mitochondriální membránu, kde dochází k výměně acylkarnitinu za karnitin pomocí karnitin-acylkarnitintranslokasy (CACT). Prostřednictvím karnitinacyltransferasy II (CPT II – EC 2.3.1.21) dochází k přenosu MK z acylkarnitinu na CoA a k uvolnění acyl-CoA do matrix, který je dále zpracován v β -oxidaci. Proces vstupu MK do mitochondrie je popsán na Obr. 1. (Matouš *et al.*, 2010; Voet a Voetová, 1995; www.fblt.cz, 20. 2. 2018).



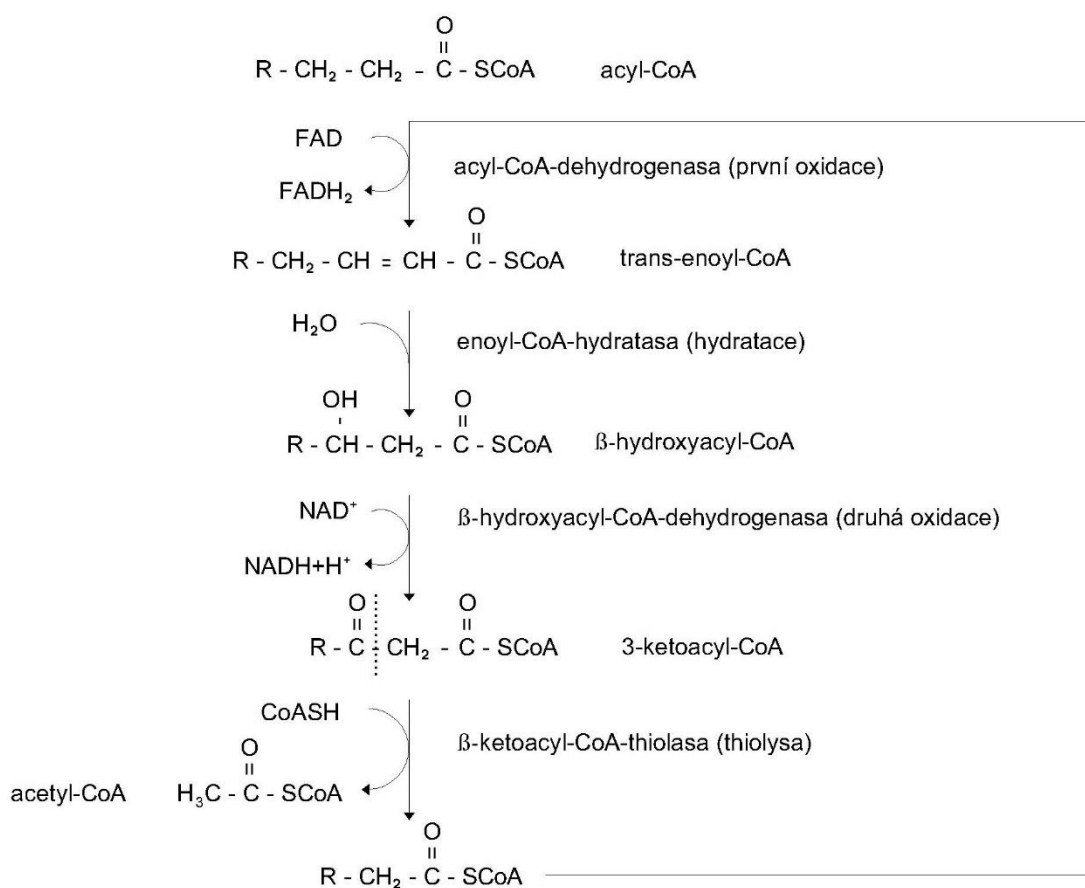
Obr. 1 Úloha karnitinu při transportu mastných kyselin do mitochondrie (upraveno podle Matouš *et al.*, 2010).

2.2.2 Vlastní průběh β -oxidace

β -oxidace v matrix mitochondrií (Obr. 2) je zahájena dehydrogenací acyl-CoA za vzniku Δ^2 -enoyl-CoA s dvojnou vazbou mezi 2. (α) a 3. (β) uhlíkem v pozici *trans*. Acyl-CoA dehydrogenasa, jejíž kofaktorem je flavoprotein obsahující prostetickou skupinu FAD, přenáší vodíkové atomy za vzniku FADH_2 . Podle specifity k určité délce řetězce rozlišujeme acyl-CoA dehydrogenasu pro krátký (SCAD, EC 1.3.8.1.), střední (MCAD, EC 1.3.8.7.), dlouhý (LCAD, EC 1.3.8.8.) a velmi dlouhý (VLCAD, EC 1.3.8.9.) řetězec. Následuje krok hydratace, kdy dochází k adici molekuly vody na dvojnou vazbu enoyl-CoA za vzniku L- β -hydroxyacyl-CoA. Reakce je katalyzována Δ^2 -enoyl-CoA hydratasou (EC 4.2.1.17). V další reakci se -OH skupina na 3. (β) uhlíku dehydrogenuje na karbonylovou skupinu účinkem β -hydroxyacyl-CoA dehydrogenasy (EC 1.1.1. 35.) za účasti koenzymu NAD^+ . Vzniká β -ketoacyl-CoA, který je v posledním kroku rozštěpen β -ketoacyl-CoA-thiolasou (EC 2.3.1.16.) na acetyl-CoA a acyl-CoA kratší o dva uhlíky. Pro celkové odbourání MK musí celý cyklus proběhnout několikrát. Vzniklý produkt

acetyl-CoA může být dále metabolizován v citrátovém cyklu (TCA) (Matouš *et al.*, 2010).

Pro regulaci β -oxidace je důležitým faktorem poměr NAD^+/NADH . Pokud nedochází ke spotřebě NADH v dýchacím řetězci, je zastaven TCA a také zpomalena či zastavena β -oxidace (Matouš *et al.*, 2010).



Obr. 2 Průběh β oxidace (upraveno podle Matouš *et al.*, 2010).

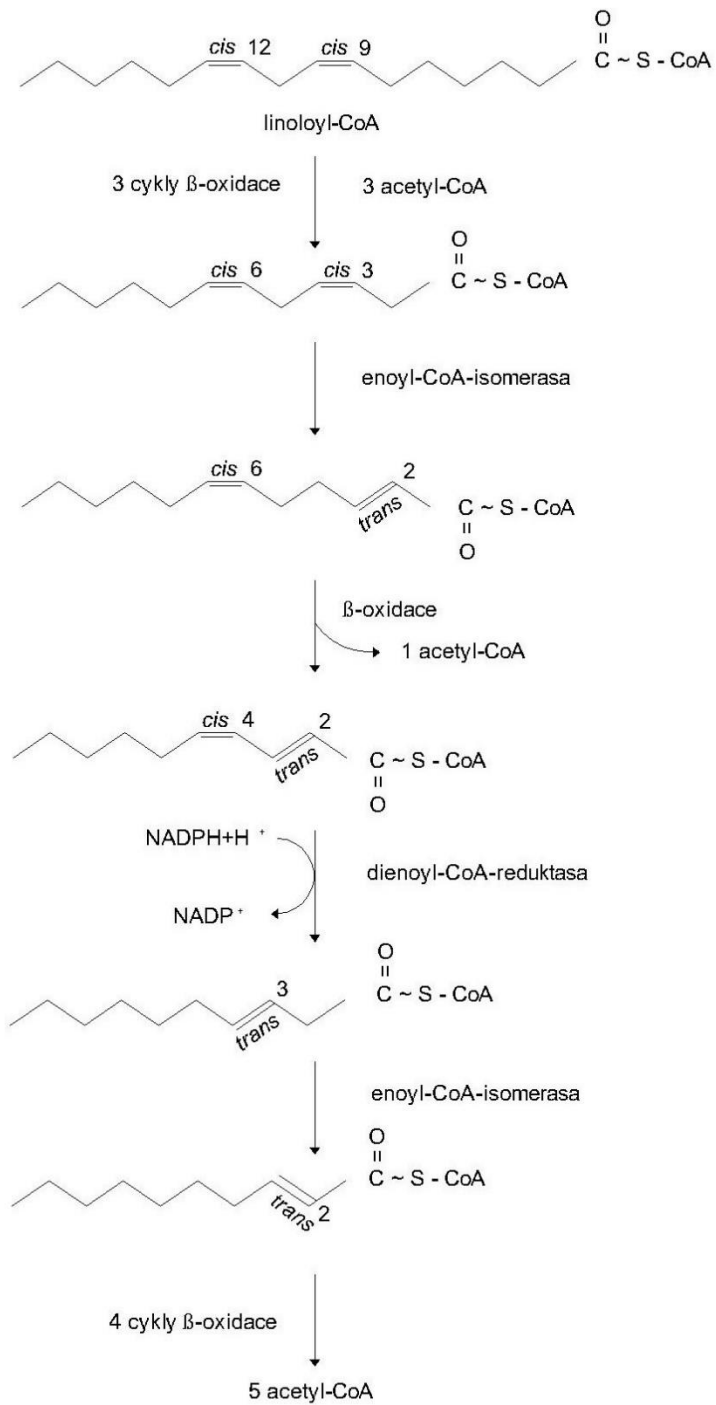
2.2.2.1 Odbourávání mastných kyselin s lichým počtem uhlíků

Odbourávání MK s lichým počtem uhlíků probíhá stejně jako β -oxidace MK se sudým počtem uhlíků, ale jako výsledný produkt vzniká kromě acetyl-CoA také propionyl-CoA. Propionyl-CoA je dále přeměněn na sukcinyl-CoA, který poté vstupuje do TCA (Voet a Voetová, 1995).

2.2.2.2 Odbourávání nenasycených mastných kyselin

Mezi nenasycené MK patří např. kyselina olejová a linolová. Obvykle obsahují dvojně vazby v pozici *cis* mezi uhlíky C₉ a C₁₀. Oxidace probíhá klasickým způsobem až do třetího kroku, kdy vzniká enoyl-CoA s dvojnou vazbou *cis* v pozici β a γ . Enzym enoyl-CoA isomerasa (EC 5.3.3.8) přemění vazbu *cis* na stabilnější *trans*-izomer. Proces oxidace dále probíhá klasickým způsobem (Matouš *et al.*, 2010, Voet a Voetová, 1995).

U kyseliny linolové (Obr. 3) vzniká během páté obrátky β -oxidace 2,4-dienoyl-CoA. Enzym 2,4-dienoyl-CoA-reduktasa (EC 1.3.1.34), vyžadující přítomnost NADPH+H⁺, redukuje dvojnou vazbu na *trans*-3-enoyl-CoA, který je dále izomerován na *trans*-2-enoyl-CoA enzymem 3,2-enoyl-CoA-isomerasou. Dále probíhají klasické reakce β -oxidace (Matouš *et al.*, 2010; Voet a Voetová, 1995).



Obr. 3 Oxidace kyseliny linolové (upraveno podle Matouš *et al.*, 2010).

3. Dědičné metabolické poruchy

Dědičné metabolické poruchy spadají do skupin genetických poruch, jež ovlivňují lidský metabolismus. Vyznačují se mutacemi obvykle v jednom genu jaderné nebo mitochondriální DNA. Mutace mohou být důsledkem delece jednoho nebo i více párů nukleotidů DNA, změny umístění části chromozomu na jinou pozici (translokace), opakování určitých sekvencí (repetice), vyštěpení části chromozomu, jeho obrácením a následným zpětným napojením (inverzí) aj. V důsledku těchto změn dochází k chybným přepisům do mRNA (transkripce) a rovněž k nesprávné tvorbě proteinů (translace) (Fryčák *et al.*, 2003; Racek *et al.*, 2006).

Defekt může nastat u enzymů, krevních bílkovin, strukturních proteinů buněčné membrány, receptorů, proteinů tvořících součást iontových kanálů a regulačních proteinů. Narušením jejich funkce se substrát nemůže přeměnit standardní cestou, dochází k jeho hromadění v buňce. Alternativními dráhami se často tvoří vedlejší metabolity, které mohou vést k toxicitě. Současně nevzniká potřebný produkt některé z metabolických drah, které se protein účastní. Existuje tedy velká variabilita klinických projevů jednotlivých onemocnění (Fryčák *et al.*, 2003; Racek *et al.*, 2006).

Dědičné poruchy jsou převážně autosomálně recesivní. Defekt se tedy projeví u homozygota, který zdědil dvě defektní alely. Heterozygot bývá přenašečem defektního genu a klinické projevy se nemusí vůbec vyskytnout, jelikož bývá zachována částečná syntéza proteinu. Mezi vzácnější způsoby dědičného přenosu řadíme autosomálně dominantní, gonosomálně recesivní a gonosomálně dominantní (Racek *et al.*, 2006).

3.1 Poruchy mitochondriální β -oxidace mastných kyselin

Existuje okolo dvaceti autosomálně recesivních poruch týkajících se transportu a mitochondriální β -oxidace mastných kyselin (FAOD - „Fatty Acid Oxidation Disorder“) (Shekhawat *et al.*, 2005). Tyto poruchy zahrnují libovolnou část mitochondriální dráhy β -oxidace ovlivňující funkce plazmatické membrány, mitochondriální transport MK nebo také dráhu β -oxidace MK pro krátký, střední, dlouhý a velmi dlouhý řetězec (Rinaldo *et al.*, 2002).

Poruchy spojené s transportem MK přes mitochondriální membránu jsou způsobeny genetickými mutacemi ovlivňujícími enzymy karnitinového cyklu (CPT I, CACT a CPT II). Genetické mutace a s tím spojené deficity jsou známé také pro enzymy SCAD, MCAD, LCAD a VLCAD, které jsou součástí metabolismu MK. Další poruchy oxidace mastných kyselin, způsobující klinické příznaky, zahrnují deficit trifunkčního

proteinu (MTP), L-3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenasy pro dlouhý (LCHAD), střední a krátký řetězec (SCHAD) a 3-ketoacyl-CoA thiolasy středně dlouhého řetězce (MCKAT) (Rinaldo *et al.*, 2002). Příklady poruch včetně genových mutací a biomarkerů pro tato onemocnění jsou uvedeny v Tab. 1.

FAOD se mohou projevovat různými symptomy. V některých případech dochází již po narození k hyperamonémii, hypoglykémii, metabolické acidose, kardiomyopatii a náhlému úmrtí novorozence. Pozdějšími příznaky mohou být neuropatie, myopatie a retinopatie (Shekhawat *et al.*, 2005). V těhotenství může u matek nastat preeklampsie, akutní jaterní poruchy a HELLP syndrom (hemolýza, zvýšené jaterní enzymy, nízká hodnota krevních destiček). V dnešní době se většina případů FAOD zachytí novorozeneckým screeningem využívající hmotnostní spektrometrii. Jako vzorky jsou použity krevní skvrny novorozenců odebrané podle předpisu pro novorozenecký screening 48–72 hodin po narození (Preece *et al.*, 2002).

Tab. 1 Dědičné poruchy beta-oxidace mastných kyselin (vytvořeno podle: Saudubray J.-M. *et al.*, 2012; Rinaldo *et al.*, 2008; www.novorozeneckyscreening.cz, 15. 3. 2018; www.ghr.nlm.nih.gov, 21. 3. 2018).

Typy poruch	Deficit	Gen	Zvýšené acylkarnitiny v plasmě	Zvýšené acylglyciny v moči
Porucha transportu MK přes mitochondriální membránu	CPT I	<i>CPT1A</i>	volný karnitin	
	CACT	<i>SLC25A20</i>	palmitoyl-	
	CPT II	<i>CPT2</i>	palmitoyl-	
Porucha β -oxidace MK s dlouhým řetězcem	VLCAD	<i>ACADVL</i>	tetradecenoyl-	
	LCHAD	<i>HADHA</i>	3-hydroxypalmitoyl- 3-hydroxyoleoyl- 3-hydroxylinoleoyl-	
	LCAD	<i>ACADL</i>		
Porucha β -oxidace MK se středně dlouhým řetězcem	MCAD	<i>ACADM</i>	oktanoyl- decenoyl- hexanoyl-	hexanoyl- suberyl- fenylpropionyl-
	SCHAD	<i>HADH</i>	hydroxybutyryl.	
	MCKAT	<i>T2</i>	hydroxybutyryl-	
Porucha β -oxidace MKs krátkým řetězcem	SCAD	<i>ACASD</i>	butyryl-	butyryl-

3.1.1 Deficit acyl-CoA dehydrogenasy s krátkým řetězcem

Deficit acyl-CoA dehydrogenasy mastných kyselin s krátkým řetězcem („Short-Chain Acyl-CoA Dehydrogenase Deficiency“ – SCADD) je autosomálně recesivní vrozená porucha spojená s mutacemi v genu *ACADS* (Lampret *et al.*, 2015). Onemocnění bývá doprovázeno různými klinickými fenotypy od fatální metabolické dekompenzace v dětství až po asymptomatické jedince (Kim *et al.*, 2011).

Deficit aktivity SCAD byl poprvé popsán a enzymaticky potvrzen v kožních fibroblastech dvou novorozenců, kteří měli zvýšenou exkreci ethylmalonové kyseliny (EMA) v moči spojenou s metabolickou acidosou, letargií a hypertonií (Amendt *et al.*, 1987). U jednoho z pacientů byla diagnóza později geneticky potvrzena přítomností heterozygotních variant alel c.136C > T + 319C > T (Naito *et al.*, 1990).

Existuje velká variabilita mutací zmíněného genu vedoucí k onemocnění SCADD. Genotyp symptomatických pacientů může být homozygotní i heterozygotní (Nochi *et al.*). Převládá přítomnost dvou variant - mutace c.511C>T lokalizována na exonu 5 a c.625G>A lokalizována na exonu 6 (Gregersen *et al.*, 1998, Corydon *et al.* 2001). Vyskytuje se také velké množství vzácných variant genu, které bývají spojeny s vysokou exkrecí EMA (Jethva *et al.*, 2008).

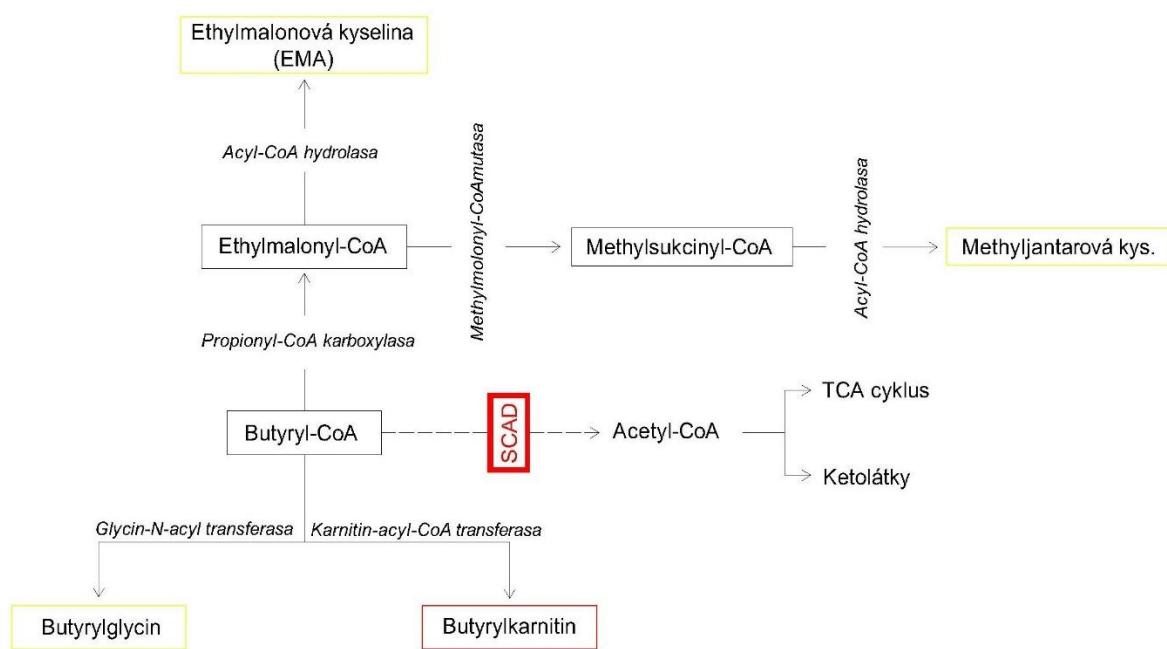
3.1.1.1 Enzym acyl-CoA dehydrogenasa pro krátký řetězec

Enzym SCAD se řadí do skupiny flavinadeninukleotid (FAD) dependentních acyl-CoA dehydrogenas. Katalyzuje dehydrogenaci acyl-CoA s krátkým řetězcem (C₄ a C₆) vedoucí ke vzniku odpovídajících enoyl-CoA. Finálně je tvořen acetyl-CoA, který se dále účastní TCA nebo tvorby ketolátek (Jethva *et al.*, 2008). Elektrony z redukované formy FAD (FADH₂) v SCAD jsou přenášeny do elektronového transportního řetězce (ETC) přes flavoprotein, který je lokalizován v matrix mitochondrií. Ten přenáší elektrony na elektronový flavoproteinový přenašeč ubichinonoxidoreduktasu (ETF-QO) a dále do ETC komplexu III přes koenzym Q10. Přenesením elektronů na O₂ přes ETC dochází k uvolnění energie ve formě ATP (Berg *et al.*, 2002; Nelson *et al.*, 2005).

Gen pro SCAD, *ACADS*, je lokalizován na dlouhém raménku lidského chromozomu 12 v pozici 12q24.31 (Naito *et al.*, 1990). Je znám od roku 1989 (Naito *et al.*, 1989). Délka tohoto genu je 13 kb a skládá se z 10 exonů se 1238 nukleotidy kódující sekvence (Corydon *et al.*, 1997). Prekurzorový protein pro SCAD je syntetizován

v cytosolu. Jeho součástí je *N*-koncový vedoucí peptid o délce 24 aminokyselin, který je využit k mitochondriální translokaci. V mitochondriích dochází k odštěpení *N*-koncové cílové sekvence a SCAD je sestaven do biologicky aktivní formy (Corydon *et al.*, 1997; Naito *et al.*, 1990).

Vlivem výskytu různých variant genu *ACADS* může docházet k toxické akumulaci substrátů, metabolitů alternativních drah a ke vzniku defektního enzymu, což iniciuje nadprodukcí reaktivních forem kyslíku (ROS). Nadměrná produkce ROS může vést k chronickému oxidačnímu stresu, k buněčné toxicitě a k nedostatku energie (Olsen *et al.*, 2013). Následkem těchto pochodů může docházet k aktivaci drah mitochondriální a buněčné kontroly a cest pro adaptaci na oxidační stres. Vysoké hodnoty ROS mohou poškodit buňku a vyvolat buněčnou smrt (Gregersen *et al.*, 2006). Zvýšený oxidační stres někdy koreluje se sníženou aktivitou CoQ10 účastnícím se přenosu elektronů (Lee *et al.*, 2012).



Obr. 4 Biochemické dráhy pro alternativní metabolismus butyryl-CoA. Koncentrace butyrylkarnitinu (červený rámeček) je zjišťována v krvi a koncentrace EMA, butyrylglycinu a methyljantarové kys. (žluté rámečky) jsou sledovány v moči. (upraveno podle Nochi *et al.*, 2017). Červeně je zvýrazněn enzym SCAD, u kterého dochází k deficitu.

3.1.1.2 Klinické projevy

Klinické projevy SCADD jsou rozmanité díky různým variantám *ACADS* mutací. Mezi příznaky řadíme celkové neprospívání, metabolickou acidosu, epilepsii, ketonovou hypoglykémii, opožděný vývoj, letargii, záchvaty, dystonii, myopatii a hypotonii (Coates *et al.*, 1988; Corydon *et al.*, 2001; Pedersen *et al.*, 2008; Sewell *et al.*, 1993). Mnoho pacientů může být asymptomatických, nicméně diagnózu je možné zachytit novorozeneckým screeningem (Lampret *et al.*, 2015).

3.1.1.3 Laboratorní nálezy

Přítomností SCADD dochází k akumulaci butyryl-CoA a odvozených meziproductů, jako jsou butyrylkarnitin, butyrylglycin, EMA a kys. methyljantarová. Jejich koncentrace je stanovována v krvi, moči, popř. v buňkách (Corydon *et al.*, 1996). Charakteristickým znakem SCADD je akumulace EMA, která vzniká karboxylací nadbytku butyryl-CoA v reakci katalyzované propionyl-CoA-karboxylasou a acyl-CoA hydrolasou (Lane *et al.*, 1960). Meziproduct této reakce (ethylmalonyl-CoA) může být přeměněn na kyselinu methyljantarovou pomocí methylmalonyl-CoA mutasy (Obr. 4).

Primární diagnóza je indikována zvýšenou koncentrací butyrylkarnitinu v krvi pomocí FIA analýzy (Flow Injection Analysis) a analýzou organických kyselin pomocí plynové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií (GC/MS). Diagnóza je následně potvrzena analýzou DNA (Bok *et al.*; 2003, Pedersen *et al.*; 2008, Waisbren *et al.*, 2008). Prevalence symptomatických pacientů byla na základě biochemických a molekulárních kritérií vypočtena na 1:35 000 v USA (Gallant *et al.*, 2012) a 1:50 000 v Nizozemsku (van Maldegren *et al.*, 2006).

3.1.1.4 Léčba

V současnosti není k dispozici dostatek výzkumů a dlouhodobých studií, a proto neexistuje komplexní doporučení vhodné terapie pro pacienty se SCADD (Nochi *et al.*, 2017). K dispozici jsou pouze preventivní opatření, která doporučují nehladovět déle než 12 h, což by mohlo vést u postiženého jedince k hypoglykémii, dehydrataci a metabolické acidose. Tyto příznaky mohou nastat již u kojenců a batolat, a proto je doporučena pouze krátkodobá doba hladovění odpovídající jejich věku. K opatřením zatím nepatří strava s nízkým obsahem tuků (Bennet, 2010; van Maldegem *et al.*, 2010a). Primární léčba v průběhu akutní metabolické acidosis spočívá v intravenózním podání tekutin s vysokou koncentrací dextrosy (obvykle 10% roztok k dosažení 8-10 mg/kg/min glukosy)

s obsahem inzulínu, nebo bez něj. Tato léčba je zvláště důležitá při nevolnostech a zvracení (Jethva *et al.*, 2008).

3.1.2 Deficit acyl-CoA dehydrogenasy se středně dlouhým řetězcem

Deficit acyl-CoA dehydrogenasy se středně dlouhým řetězcem („Medium-Chain Acyl-CoA Dehydrogenase Deficiency“ – MCADD) je způsoben mutací v genu *ACADM* (Dessein *et al.*, 2010). Incidence tohoto onemocnění v Evropě, Austrálii a USA je přibližně 1:10000 (Blau *et al.*, 2014). Mezi biomarkery se řadí zvýšený oktanoylkarnitin (C8) v krvi a vylučování hexanoylglycinu močí, které však nemusí být detekováno u všech fenotypů (Blau *et al.*, 2014).

Pacienti s MCADD mohou být po narození bez jakýchkoliv známek onemocnění. Nemoc nejčastěji propuká v prvních dvou letech života při zvýšeném stresu, např. infekcí vyvolanými projevy, jako je hladovění nebo zvracení. Obvykle se objeví hypoglykémie a poruchy vědomí nebo kóma nastávající v období akutní dekompenzace. Ta souvisí se změnami stravování po odstavení kojence. Může být také způsobena infekcí horních cest dýchacích a gastroenteritidou. Mezi další příznaky se řadí kardiomegalie (obvykle hypertrofická), arytmie nebo myopatie (Dessein *et al.*, 2010).

3.1.3 Deficit 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenasy s dlouhým řetězcem

Onemocnění deficit 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenasy s dlouhým řetězcem („Long-Chain 3-Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase Deficiency“ – LCHAD) je způsobeno mutací v genu *HADHA* kódující α podjednotku mitochondriálního trifunkčního enzymu (www.ghr.nlm.nih.gov, 21. 3. 2018). Mezi známky onemocnění mohou patřit zvýšené jaterní transaminasy, bilirubin, laktát, amoniak a kreatinkinasa. V krvi je snížena koncentrace volného karnitinu a zvýšený podíl acylovaného/volného karnitinu (novorozeneckyscreening.cz, 15. 3. 2018).

První symptomy se objevují v raném dětství a mohou být aktivovány zvýšeným stresem, lačněním a virovými infekcemi. Mezi projevy onemocnění patří problémy s přijímáním potravy, letargie, hypoglykémie a hypotonie. Dále také problémy s játry a abnormální citlivost na světlo (retinopatie). V pozdějším věku se může projevit svalová slabost, ztráta citlivosti v pažích a nohách (periferní neuropatie). Je zde také riziko srdečních onemocnění, potíží s dýcháním, kóma a náhlé úmrtí novorozenců (https://ghr.nlm.nih.gov, 21. 3. 2018).

3.1.4 Deficit acyl-CoA dehydrogenasy s velmi dlouhým řetězcem

Podezření na diagnózu deficitu acyl-CoA dehydrogenasy s velmi dlouhým řetězcem („Very Long Chain Acyl-CoA Dehydrogenase Deficiency“ – VLCAD) je navrženo u jedinců s abnormální hladinou tetradecenoylkarnitinu (C14.1). Bývá potvrzeno speciálními biochemickými a molekulárně genetickými testy (analýzou mutací v genu *ACADVL*) (Nancy *et al.*, 2009).

Již v prvních měsících života může docházet k závažným srdečním a multiorgánovým selháním. Projevuje se hypertrofická nebo dilatační kardiomyopatie, perikardiální výpotek a arytmie. Dále také hypotonie, hepatomegalie a hypoglykémie (Nancy *et al.*, 2009). Projevy onemocnění se mohou objevit až v dospělosti přerušovanou rhabdomyolýzou vyvolanou cvičením, svalovou únavou a křečemi. V dospělosti se obvykle srdeční potíže a hypoglykémie již neobjevují (Hoffmann *et al.*, 2006).

4. Novorozenecký screening

Novorozenecký screening je aktivní a celoplošné vyhledávání chorob v jejich raném, preklinickém stádiu. Díky včasné diagnostice je možné zahájit léčbu a předejít tak prvním projevům onemocnění a nevratnému poškození zdraví dítěte. Odběr krve se provádí na speciální screeningovou kartičku z paty dítěte 48–72 hodin po narození. Pro analýzu se z kartičky se suchou krevní skvrnou (DBS – „Dry Blood Spot“) vyřadí terčík o průměru 3,2 mm. Následuje extrakce metabolitů v methanolu nebo ethanolu. Vzorky jsou posléze analyzovány technikou FIA, kterou jsou sledovány koncentrace acylkarnitinů a aminokyselin. Pro analýzu organických kyselin se využívá GC-MS. Diagnóza je potvrzena molekulárně genetickými metodami (Sim *et al.*, 2002; novorozeneckyscreening.cz, 21. 3. 2018).

V České republice se od 1. 6. 2016 vyšetřuje těchto 18 onemocnění:

- Kongenitální hypotyreóza
 - Kongenitální adrenální hyperplazie
 - Argininémie
 - Citrulinémie I. typu
 - Deficit MCAD
 - Deficit VLCAD
 - Deficit biotinidasy
 - Deficit LCHAD
 - Deficit CPT 1
 - Deficit CPT 2
 - Deficit CACT
 - Fenylketonurie a hyperfenylalaninémie
 - Glutarová acidurie 1
 - Homocystinurie z deficitu
 - Homocystinurie z deficitu
 - Izovalerová acidurie
 - Leucinóza
 - Cystická fibróza
- (novorozeneckyscreening.cz, 21. 3. 2018)

5. Metabolomika

Metabolomika je vědní disciplína, která se zabývá analýzou nízkomolekulárních látek (metabolitů) za fyziologického či patologického stavu organismu. Řadí se do tzv. “omických“ vědních oborů, mezi které patří také genomika, proteomika a transkriptomika. Odráží aktuální stav buňky, který je velmi dynamický. Metabolom lze definovat jako kvalitativní a kvantitativní souhrn metabolitů účastnících se metabolických procesů. Počet metabolitů, resp. metabolický profil není stálý, je ovlivňován genetickými změnami, onemocněním a faktory vnějšího prostředí (Dettmer & Hammock, 2004).

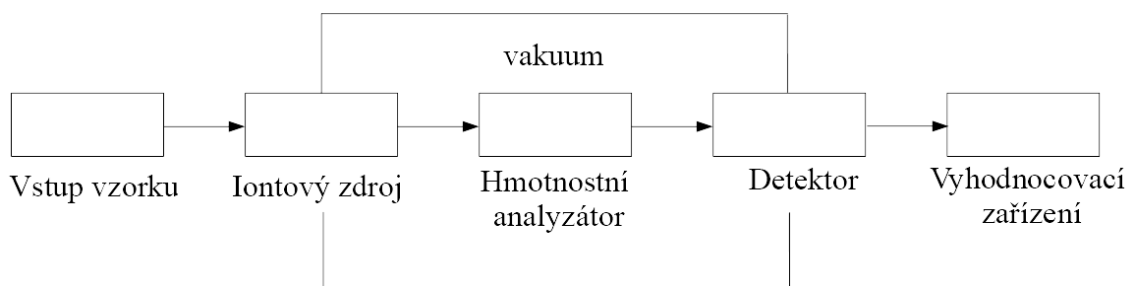
Rozlišujeme metabolomiku necílenou a cílenou. Pomocí necíleného přístupu jsme schopni detekovat analyty v určitém rozsahu m/z , včetně neznámých chemických látek. Následuje identifikace fragmentací a srovnání s databázemi. Pomocí cílené analýzy hledáme předem definované skupiny metabolitů, které lze rovnou kvantifikovat přidávkem interních standardů (Roberts *et al.*, 2012).

Pro studium metabolitů jsou využívány vzorky biologických tekutin (krev, plazma, moč) a tkáňové a buněčné lyzáty (Patti *et al.*, 2012). Mezi nejpreferovanější experimentální metody metabolomiky se řadí MS a nukleární magnetická rezonance (NMR). Tyto metody pracují při vysokém rozlišení. Umožňují detekci jednotlivých chemických sloučenin v krátkém časovém intervalu a s minimální přípravou vzorků. Po změření následuje identifikace s využitím databází (Boiteau *et al.*, 2018). Další používanou technikou je kapilární elektroforéza. Kombinací metod můžeme detekovat široké spektrum metabolitů (Baker, 2011).

6. Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie (MS) je analytická technika založená na interakci nabitých částic s elektrickým nebo magnetickým polem ve vakuu (Friedecký *et al.*, 2012). Využívá se pro studium chemických látek (k detekci a kvantifikaci), určení struktur molekul, zjištění izotopového zastoupení atomů v molekulách atd. Principem MS je separace iontů vzniklých ve zdroji následována jejich detekcí (de Hoffmann a Stroobant., 2007).

Hmotnostní spektrometry jsou tvořeny třemi základními částmi: iontový zdroj, hmotnostní analyzátor a detektor částic (Obr. 5). Látky obsažené ve vzorku jsou převedeny do plynné fáze a posléze ionizovány v iontovém zdroji. Následně putují do hmotnostního analyzátoru, ve kterém za vakua dochází k separaci iontů na základě poměru hmotnosti a náboje (m/z). Vybrané ionty jsou zaznamenány detektorem a signál je převeden na hmotnostní spektrum (závislost relativní intenzity iontového proudu na m/z) (de Hoffmann a Stroobant, 2007; Klouda, 2003).



Obr. 5 Základní schéma hmotnostního spektrometru (upraveno podle Klouda, 2003).

6.1 Ionizace a iontové zdroje

Iontové zdroje lze obecně rozdělit na tzv. „měkké“ a „tvrdé“. „Tvrdou“ ionizační technikou dochází k absorpci záření molekulami, vedoucí nejčastěji k fragmentaci. Patří zde elektronová ionizace (EI), při které je předána energie elektronů molekulám analytu. Získáme převážně kladně nabitě radikály a fragmentační spektra (de Hoffmann a Stroobant, 2007). Tzv. „měkkými“ technikami jsou např. chemická ionizace (CI), ionizace elektrosprejem (ESI) nebo desorpce laserem za účasti matrice (MALDI). U CI dochází nejprve k ionizaci reakčního plynu a až následně jsou ionizovány molekuly analytu. Nedochozí tedy k tak rozsáhlé fragmentaci. „Měkké“ techniky převážně poskytují molekulární ionty, adukty se složkami mobilní fáze či matrice (Fenn *et al.*, 1989; Friedecký *et al.*, 2012; Tanaka *et al.*, 1988).

6.1.1 Ionizace elektrosprejem

Jedná se o typ ionizace využívající k převodu iontů z roztoku do plynné fáze silné elektrické pole. Pomocí této techniky jsou ionizovány látky se středně až velmi polárním charakterem.

Vzorek je rozpuštěn ve vhodném eluentu. Po aplikaci elektrického pole (2-5 kV) na vstupní elektrodu vznikají za atmosférického tlaku nabitě kapičky. Kapky jsou vstříkovány do plynu o vyšší teplotě (nejčastěji dusík) a rozpouštědlo je postupně odpařováno. Současně se zvyšuje se povrchový náboj kapek. Překonáním povrchového napětí nastává Coulombická exploze. Dochází k uvolnění iontů, které v plynné fázi vstupují do hmotnostního analyzátorů (de Hoffmann a Stroobant, 2007).

6.2 Hmotnostní analyzátoary

K separaci iontů na základě poměru m/z dochází za vakua v hmotnostních analyzátoarech. Analyzátoary využívají statické nebo dynamické elektrické/magnetické pole případně jejich kombinaci. Existují různé typy hmotnostních analyzátoarů. Některé v čase kontinuálně separují a vysílají k detektoru ionty s určitou hodnotou m/z tzv. skenující analyzátoary (kvadrupólové analyzátoary, sektorové přístroje) (de Hoffmann a Stroobant, 2007), u jiných vstupují všechny ionty současně do letové trubice, kde následně dochází k jejich separaci na základě rozdílné doby letu k detektoru (průletové analyzátoary-TOF) (Stephens, 1946). V klinické biochemii se nejčastěji používá tzv. kvadrupólový hmotnostní analyzátoar a kvadrupólová iontová past.

6.2.1 Kvadrupólový analyzátor

Kvadrupólový analyzátor obsahuje dva páry rovnoběžných tyčových elektrod, na které je přiváděn stejnosměrný proud a zároveň vysokofrekvenční střídavé napětí. Protější elektrody mají vždy stejnou polaritu. Změnami velikosti stejnosměrného napětí a amplitudy střídavého proudu je určována trajektorie drah jednotlivých iontů s různými hodnotami m/z pohybujících se směrem k detektoru. U iontů s nestabilní trajektorií dochází k vychýlení a nedorazí tak k detektoru (Klouda, 2003).

6.3 Detektory

Po průchodu hmotnostním analyzátozem dopadají ionty na detektor, který je převádí na proud elektronů. Záznam elektrického proudu je úměrný počtu iontů a specifické hodnotě m/z (de Hoffmann a Stroobant, 2007).

6.4 Tandemová hmotnostní spektrometrie

Tandemové uspořádání je dnes velmi využíváno v novorozeneckém screeningu dědičných metabolických poruch. Jedním z nejčastějších uspořádání je kombinace dvou kvadrupólů, mezi kterými se nachází kolizní cela tzv. trojitý kvadrupól (QqQ - Obr. 6). Analyzované ionty se nejprve selektují v prvním kvadrupólu (Q1) podle definovaných hodnot m/z . Dále vstupují do kolizní cely (q2), kde dochází ke srážce s kolizním plynem a k jejich fragmentaci. Jedná se o tzv. kolizně indukovanou disociaci (CID). Fragmentované ionty vstupují do druhého kvadrupólu (Q3), kde se znovu selektují podle poměru m/z a nakonec dopadají na detektor. Mezi další tandemová uspořádání patří kombinace kvadrupólu s průletovým analyzátozem (QqTOF), kvadrupólu s orbitrapem, iontové pasti s iontovou cyklotronovou rezonancí (IT-ICR) a další (Ho *et al.*, 2003).



Obr. 6 Schéma trojitého kvadrupólu (upraveno podle www.en.wikipedia.org, 19. 4. 2018).

7. Experimentální část

7.1 Materiál

7.1.1 Chemikálie

Kyselina octová, hydroxid amonný, acetonitril a methanol byly v LC-MS kvalitě zakoupeny od firmy Sigma Aldrich USA.

7.1.2 Přístrojové vybavení

Centrifuga (Sigma 3 - 16KL, Osterode am Harz, Německo), třepačka (Biosan, typ PST-60HL plus Thermo Shaker, Riga, Latvia), hmotnostní spektrometr Triple Quad 6500 (SCIEX, Framingham, MA, USA), kapalinový chromatograf UltiMate 3000RS (Dionex, Sunnyvale, CA, USA)

7.1.3 Biologický materiál

Pro cílenou metabolickou analýzu bylo použito 284 DBS pacientů a kontrol, které byly odebrány v rámci novorozeneckého screeningu ve spolupráci se Screeningovým centrem novorozenců SR při Dětské fakultní nemocnici Banská Bystrica. Odběr vzorků byl proveden v letech 2013–2017. Od pacientů se SCADD bylo odebráno 162 suchých krevních skvrn a 122 jich bylo získáno od kontrol. Informace o vzorcích jsou uvedeny v Tab. 2.

Tab. 2 Přehled počtu jednotlivých kontrolních a patientských vzorků.

Rok odběru		2013/14			2015			2016/17		
		pacienti		kontroly	pacienti		kontroly	pacienti		kontroly
Pohlaví		muži	ženy	-	muži	ženy	-	muži	ženy	-
Celkem		10	8	27	38	32	42	41	33	54
Mutace	m0	6	3	-	7	3	-	9	3	-
	m1	0	1	-	6	3	-	2	4	-
	m2	3	2	-	15	10	-	19	16	-
	m3	1	1	-	10	16	-	8	10	-
	m4	0	0	-	0	0	-	1	0	-
	m5	0	0	-	0	0	-	1	0	-
	m6	0	1	-	0	0	-	1	0	-

m0 – mutace nebyla uvedena m1 – c.1138C>T/c.1138C>T m2 – c.310_312delGAG/c.310_312delGAG m3 – c.310_312delGAG/c.1138C>T
m4 – c.625G>A/c.310_312delGAG m5 – c.328G>A/c.1138C>T m6 – c.625G>A/c.625G>A

7.1.4 Příprava mobilní fáze

Mobilní fáze A (20 mmol/l acetát amonný o pH 9,75) byla připravena smícháním 0,5 l LC-MS vody a přidáním 572,5 µl kyseliny octové. Roztok byl titrován hydroxidem amonným (25% vodný roztok) na pH 9,75.

7.1.5 Příprava vzorků

Z každé screeningové karty se suchou krevní skvrnou byl vyražen terčík o průměru 3,2 mm (ekvivalent 8 µl krve), ke kterému bylo přidáno 100 µl 80 % methanolu. Následně byly vzorky třepány při 600 RPM, 26 °C po dobu 20 minut a centrifugovány při 200 RPM, 4 °C, po dobu 10 minut. Vzorky byly poté rozpipetovány do vialek. Z každého vzorku bylo odebráno 4,5 µl pro vzorek kontroly kvality (QC).

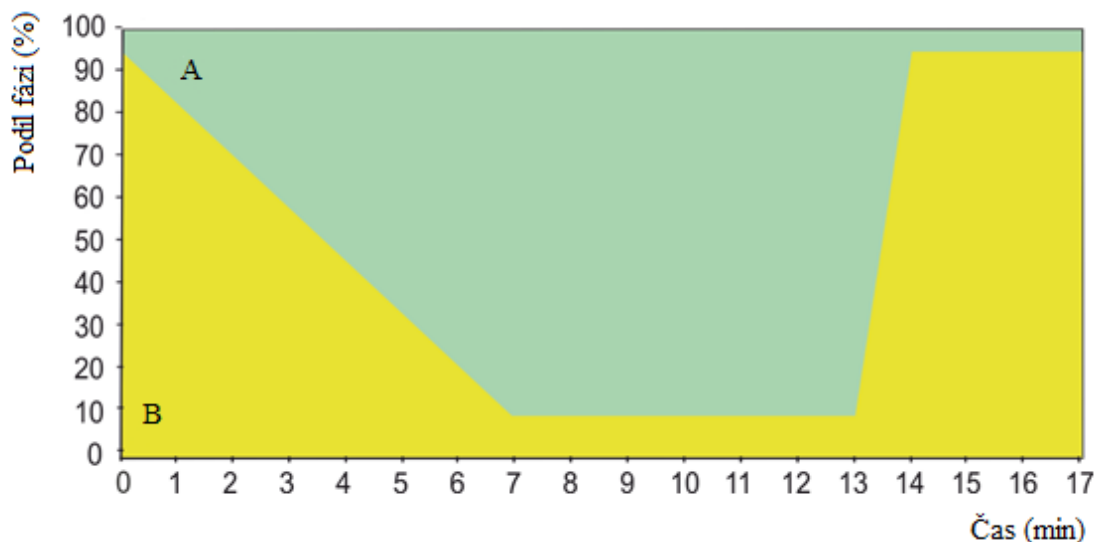
7.2 Metody

7.2.1 Cílená metabolomická analýza

Cílená metabolomická analýza byla provedena vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií (HPLC-MS/MS).

Chromatografická separace probíhala na přístroji UltiMate 3000 RS (Dionex, Sunnyvale, CA, USA) za použití aminopropylové kolony Luna – 3-µm NH₂, 2 x 100 mm (Phenomex, Torrance, CA, USA) vyhřívané na 35 °C. Gradientová eluce probíhala o průtokové rychlosti 0,3 ml/min (Obr. 7). Mobilní fáze A byla tvořena octanem amonným (20 mmol/l, pH 9,45). Pro mobilní fázi B byl použit acetonitril.

Následnou detekce probíhala pomocí tandemového hmotnostního spektrometru Triple Quad 6500 s ionizací elektrosprejem a přepínáním pozitivního a negativního módu v rámci jedné analýzy. Nastavení parametrů hmotnostního spektrometru je uvedeno v Tab. 3. Všechny vzorky byly měřeny v jedné sérii a náhodném pořadí. Nástřik vzorků byl 5 µl. Naměřená data byla zpracována v softwaru MultiQuant™ 3.0 (AB Sciex, Framingham, MA, USA).



Obr. 7 Průběh gradientové eluce v chromatografickém systému u cílené metabolické metody. Mobilní fáze A: 20 mmol/l octan amonný (pH 9,75), mobilní fáze B: acetonitril. Podíl mobilních fází na začátku analýzy byl 5 % A a 95 % B. Tento poměr klesal lineárně po dobu 7 minut na hodnotu 10 % B, která byla konstantní až do 13 minuty. Během 1 minuty se systém vrátil k iniciačním podmínkám.

Tab. 3 Parametry MS/MS použité v cílené metabolické analýze.

parametr	hodnota	jednotka
tlak „curtain gas“	40	psi
tlak iontového plynového zdroje	40	psi
teplota zamlžujícího plynu	400	°C
napětí na kapiláře v iontovém zdroji	+5500/- 4500	V

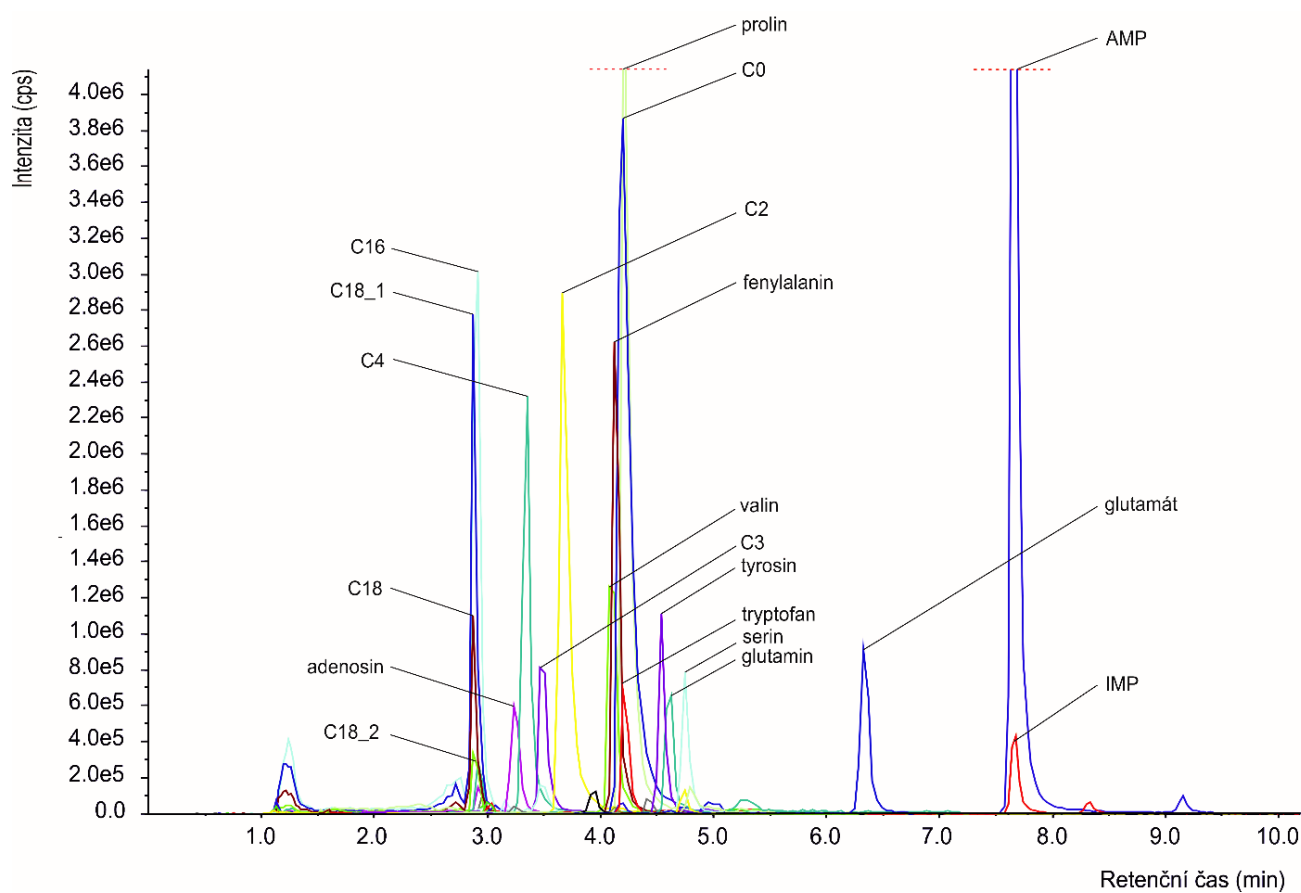
7.2.2 Statistická analýza

Pro zpracování dat a statistickou analýzu byl použit „R“ program verze 3.2.1. (Sumner *et al.*, 2007; www.r-project.org, 2017). Metodou LOESS „locally weighted regression“ byla provedena interpolace dat k odstranění systémové chyby. Ze vzorků QC byl vypočítán variační koeficient (CV). Metabolity s CV nad 30 % byly z vyhodnocení odstraněny. Na data byla aplikována tzv. „clr“ transformace (centred logratio) a následně byla centrována na nulu. Grafickým výstupem byla analýza hlavních komponent (PCA – „Principal component analysis“), supervizovaná ortogonální diskriminační analýza nejmenších čtverců (OPLS-DA – „Orthogonal Partial Least Squares Discriminant Analysis“) a krabicové grafy.

8. Výsledky a diskuze

8.1 Cílená metabolická analýza

Pomocí cílené metabolické analýzy bylo nalezeno celkem 127 metabolitů ze skupin acylkarnitinů, aminokyselin, organických kyselin, cukrů, purinů a pyrimidinů. Na obrázku 8 je uveden chromatogram vzorku pacienta s vyobrazením separace vybraných látek.



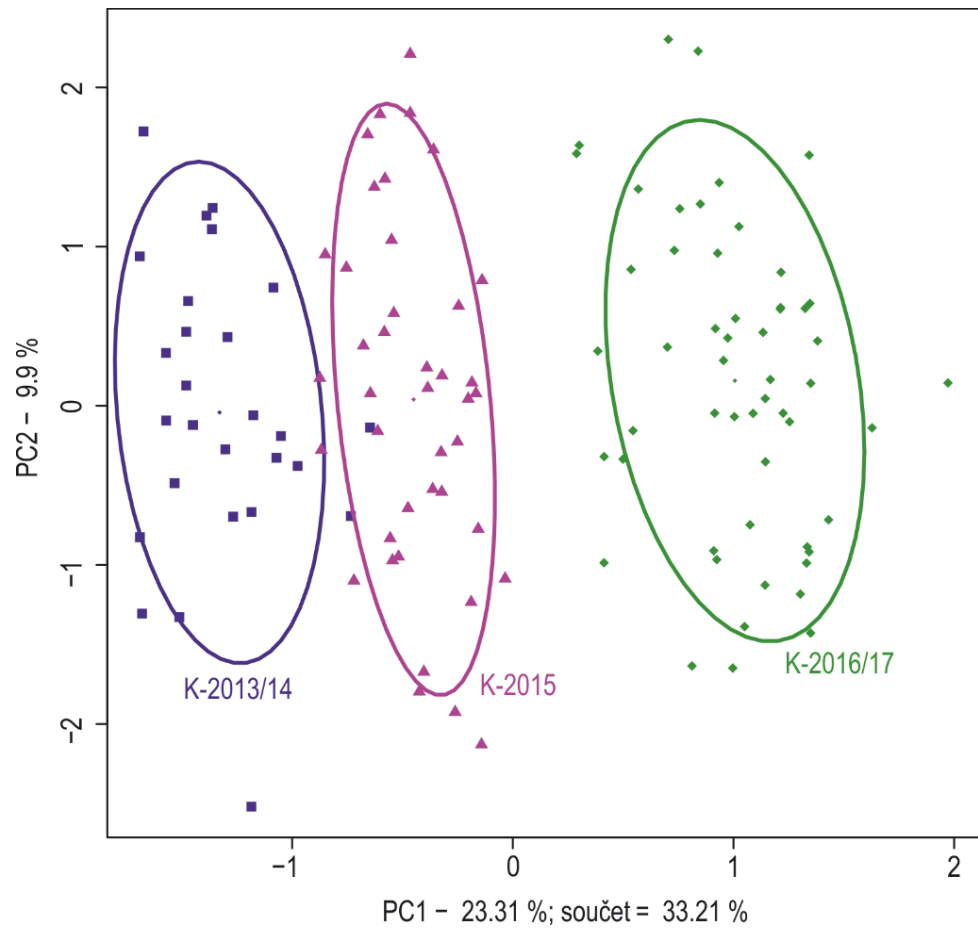
Obr. 8 Ukázkový chromatogram vybraných látek vzorku pacienta s diagnózou SCADD.

8.1.1 Statistické analýza

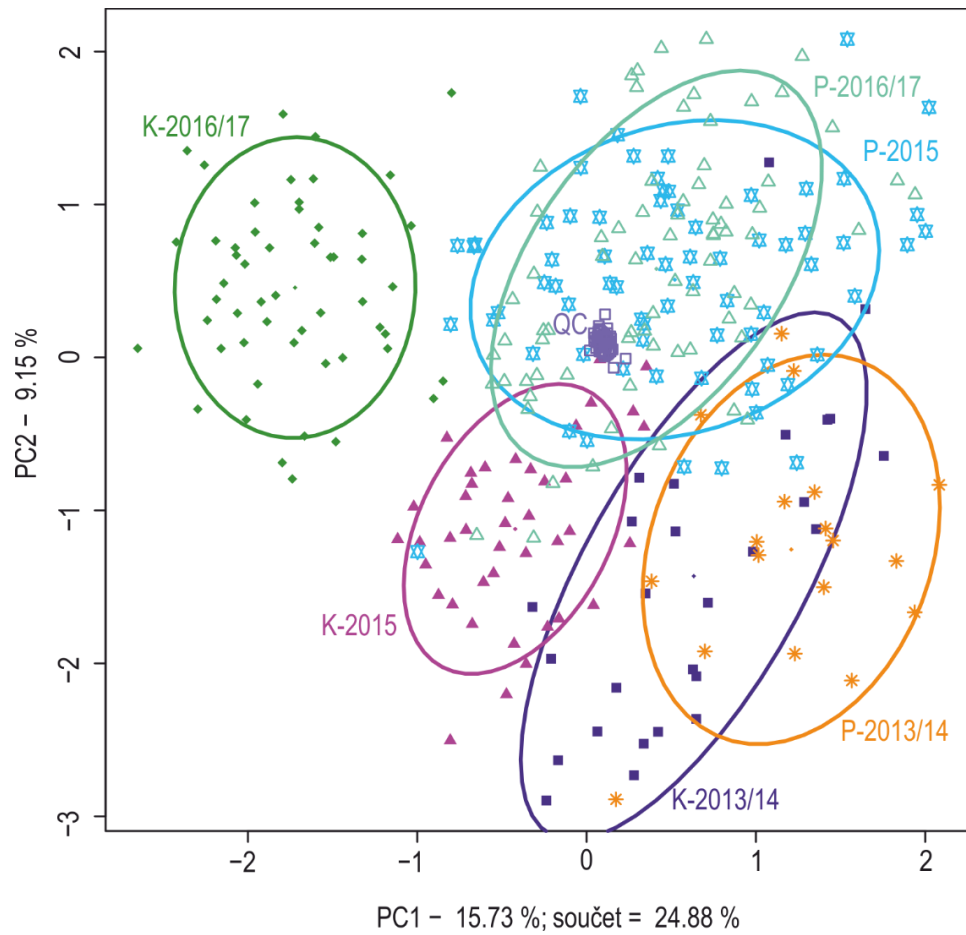
Cílenou metabolomickou analýzou bylo nalezeno celkem 127 metabolitů. Na obrázcích 9 až 25 jsou uvedeny grafické výstupy ze statistického vyhodnocení cílené metabolomické analýzy. PCA odhalila klastrování kontrolních vzorků podle roku odběru (Obr. 9). Proto bylo následné vyhodnocení dat provedeno s ohledem na stáří vzorků.

Graf PCA zobrazující kontrolní (K) a patientské (P) vzorky podle jednotlivých let odběru tj. (2013/2014, 2015 a 2016/2017) je uveden na Obr. 10. Z grafu je patrná odlišnost jednotlivých metabolických profilů. U nejstarších vzorků (rok odběru 2013/2014) se profily patientských a kontrolních vzorků částečně překrývají. Naopak vzorky z let 2016/2017 se klastrují odděleně. Toto pozorování může být vysvětleno degradací diskriminujících, avšak nestabilních metabolitů. V grafu jsou rovněž zobrazeny vzorky QC, znázorňující reprezentativnost měření v průběhu celé metabolomické analýzy. Vysvětlená variabilita datového souboru byla 24,88 %.

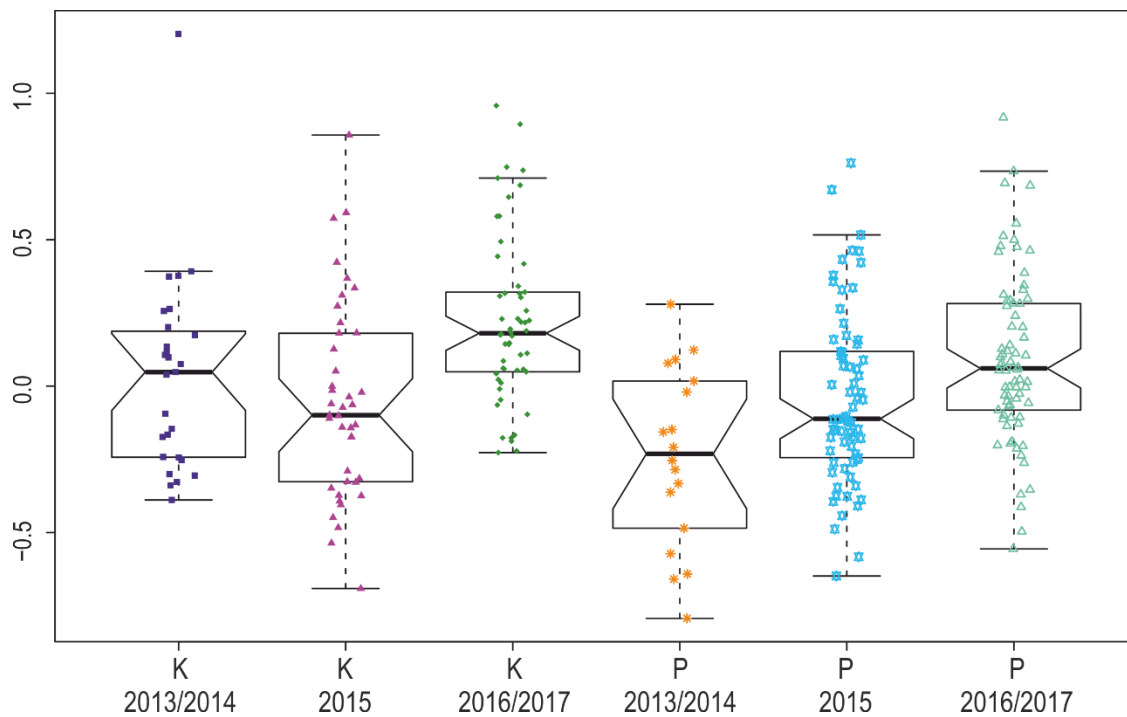
K enzymatické degradaci nestabilních analytů může docházet při sušení krevních skvrn na screeningové kartě (Garcia Boy *et al.*, 2008). Vzorky krevních skvrn bývají uchovávány většinou při pokojové teplotě. Při dlouhodobém skladování acylkarnitinů za pokojové teploty dochází k jejich hydrolytické degradaci za tvorby volného karnitinu C0 a odpovídajících MK. Rychlost rozpadu závisí na délce řetězce, kratší acylované karnitiny jsou méně stabilní než dlouhé (Fingerhut *et al.*, 2009). Ke změnám koncentrací dochází také v případě aminokyselin. Největší rozdíly v koncentracích během pěti let skladování byly popsány pro glycin a ornitin (Strnadová *et al.*, 2007). V našem experimentu patřil mezi nejméně stabilní glutamin. Grafy výše uvedených metabolitů jsou zobrazeny na Obr. 11-13. Vzhledem k nestabilním analytům, mezi které se řadí například acylkarnitiny, je výhodnější skladovat vzorky při nižších teplotách (≤ -18 °C) (Fingerhut *et al.*, 2009).



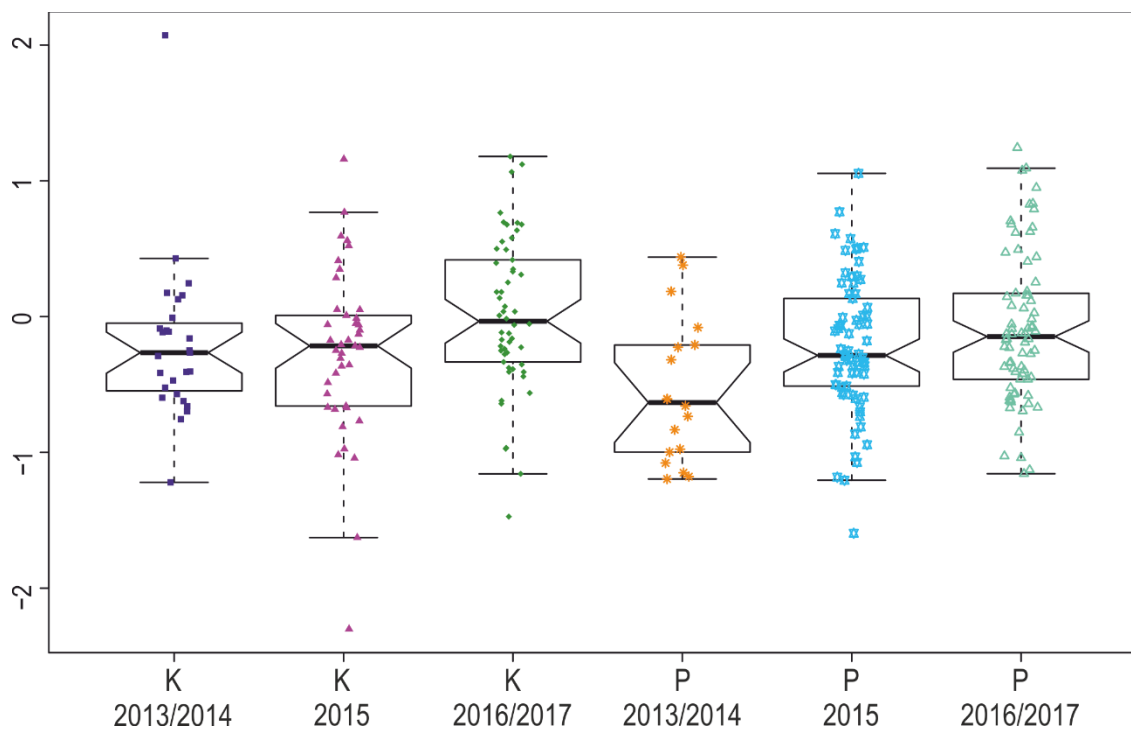
Obr. 9 PCA kontrolních vzorků znázorňující dělení celkového metabolického profilu podle roku odběru.



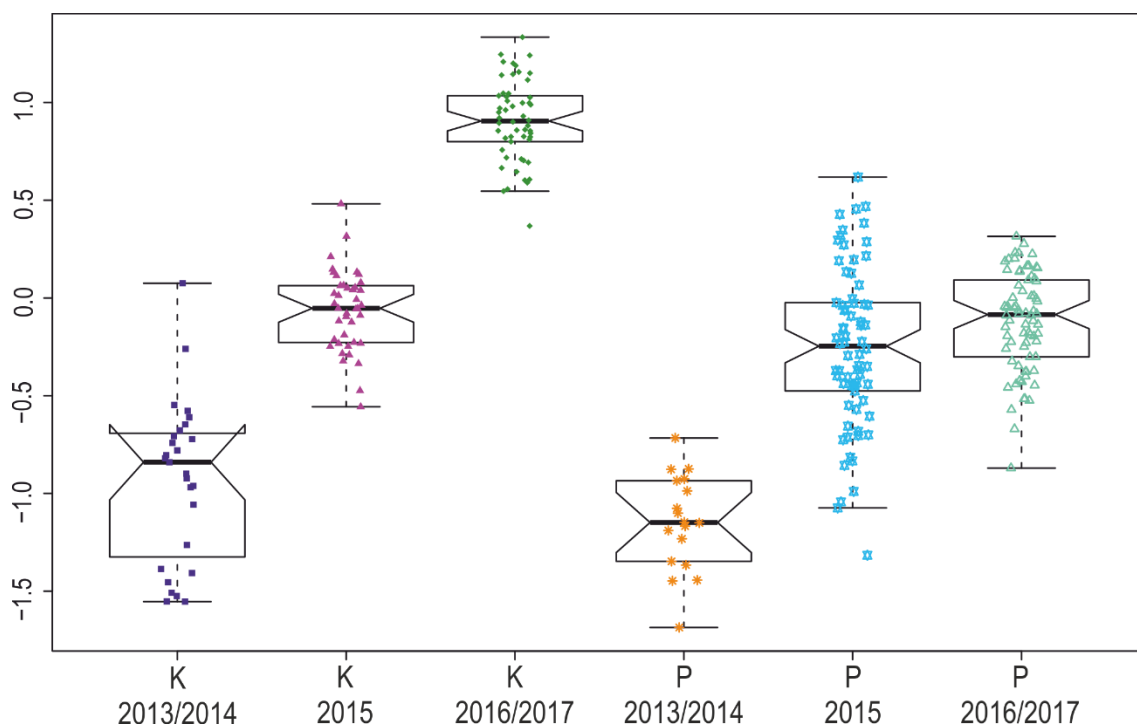
Obr. 10 PCA vzorků pacientů s diagnózou SCADD a kontrol. Vzorky jsou barevně rozlišeny podle roku odběru. P – vzorky pacientů, K – vzorky kontrol, QC – vzorky vyjadřující stabilitu měření.



Obr. 11 Krabicový graf znázorňující hladinu glycinu v průběhu let.



Obr. 12 Krabicový graf znázorňující hladinu ornitinu v průběhu let.



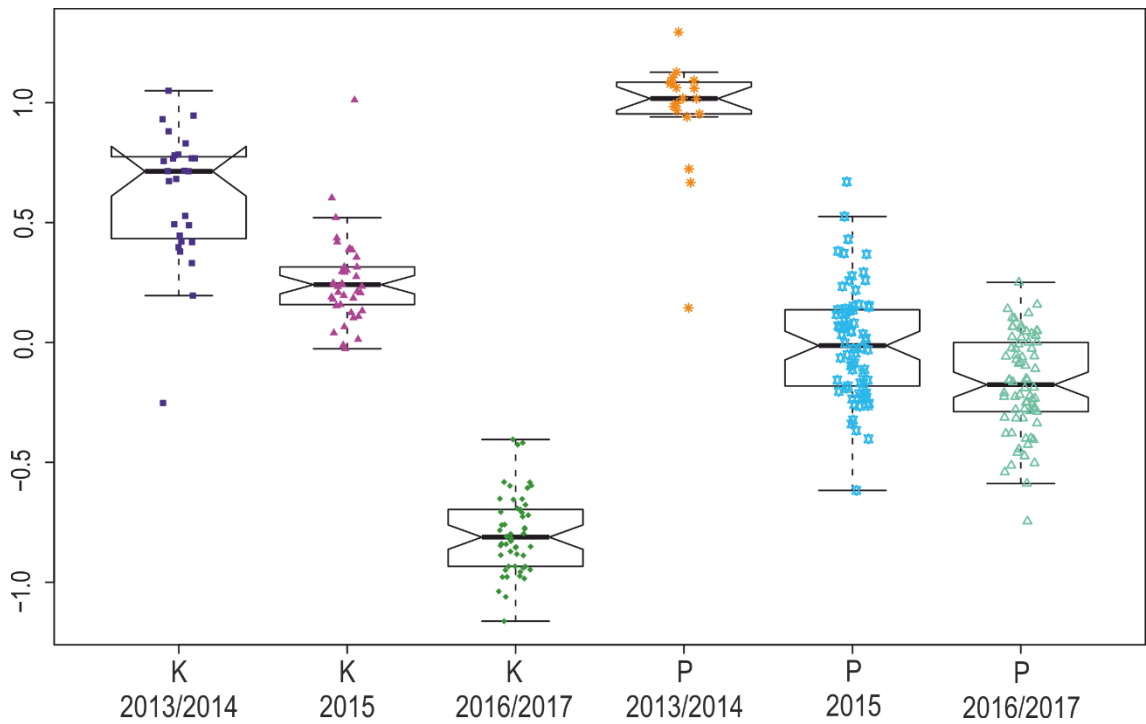
Obr. 13 Krabicový graf znázorňující hladinu glutaminu v průběhu let.

Dvacet nejvýznamnějších metabolitů oddělujících skupiny pacientů a kontrol dle OPLS-DA S plot analýzy je uvedeno v tabulce 4. Barevně jsou odlišeny shodné metabolity napříč roky. Mezi diskriminujícími látkami, které se objevují napříč jednotlivými roky odběru 2013/2014, 2015 a 2016/2017, jsou butyrylkarnitin C4, oxalacetát/glutarát/ethylmalonát a adenosin. Butyrylkarnitin a ethylmalonát jsou známými biomarkery onemocnění. Hladina adenosinu je ve formě krabicových grafů zobrazena na Obr. 14. U starších vzorků je nárůst hladiny adenosinu pravděpodobně důsledkem degradace nestabilních ADP a ATP (Obr. 15).

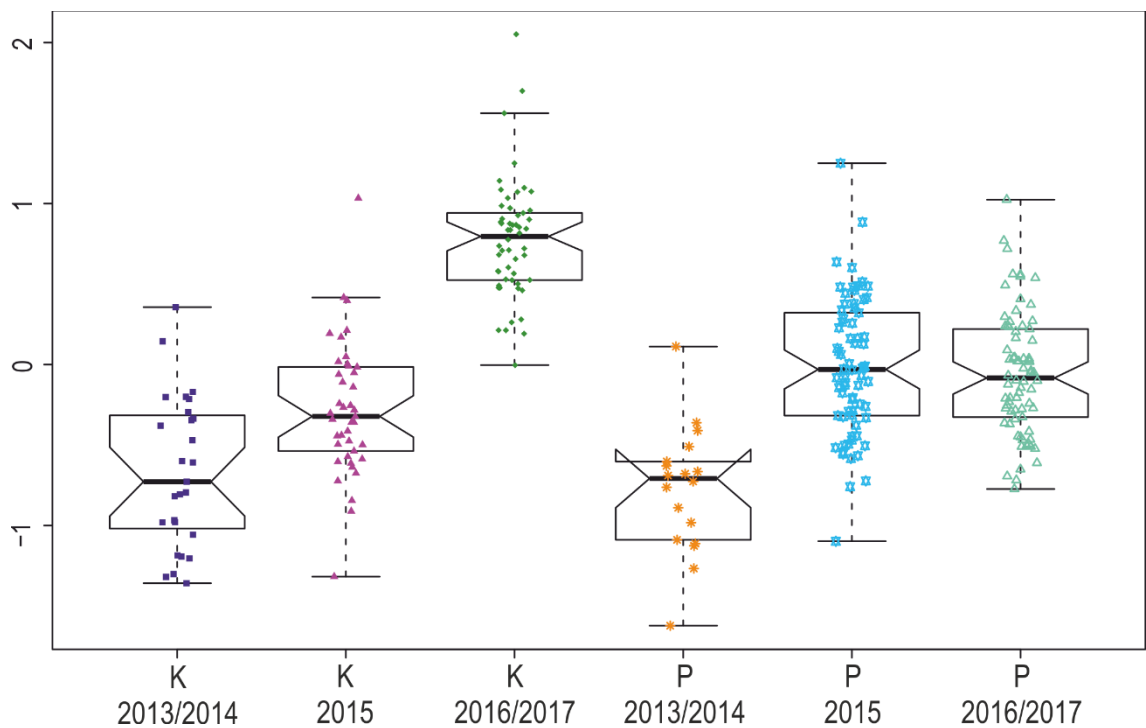
Další metabolity se napříč roky odběru vyskytovaly mezi dvaceti nejvýznamnějšími v metodě OPLS-DA dvakrát, případně jen jednou. Některé z nich jsou dále vyobrazeny v krabicových grafech.

Tab. 4 Nejvýznamnější metabolity zjištěné metodou OPLS-DA S plot, zelená barva–výskyt ve všech letech, šedá barva–výskyt ve dvou letech, růžová barva–výskyt pouze v jednom roce.

2013/2014	p1	pcorr1	2015	p1	pcorr1	2016/2017	p1	pcorr1
C4	-1,59	-0,82	hypoxanthin	-1,51	-0,84	glutamin	1,93	0,91
oxalacetát/glutarát/ethylmalonát	-1,41	-0,77	inosin	-1,78	-0,83	adenosin	-1,42	-0,83
deoxycytidinmonofosfát	-0,66	-0,61	inosinmonofosfát	-1,25	-0,77	oxalacetát/glutarát/ethylmalonát	-2,16	-0,82
serin	0,96	0,60	C4	-1,55	-0,76	methionin	1,85	0,80
adenosin	-0,68	-0,59	guanosin	-1,25	-0,75	C4	-1,93	-0,78
glycin	0,69	0,57	oxalacetát/glutarát/ethylmalonát	-1,41	-0,74	4-hydroxybenzaldehyd	-0,95	0,78
dokosahexaenová kys.	0,60	0,55	sukcinát/methylmalonát	0,68	0,66	UDP-galaktosa/UDP-glukosa	1,61	-0,76
galaktitol/manitol	-0,72	-0,54	akonitát	0,71	0,61	leucinát	-1,46	0,76
ornitin	0,81	0,51	malonát-3-hydroxybutyrát	0,60	0,59	adenosin trifosfát	1,57	0,74
CDP-cholin	-0,81	-0,51	adenylosukcinát	-0,73	-0,54	guanosin	-1,72	-0,73
C10	0,68	0,51	cysteát	0,54	0,53	C2	1,56	0,72
C12:1	0,79	0,51	cholin	-0,61	-0,52	inosin	-2,00	-0,72
adenosinmonofosfát	-0,44	0,50	S-adenosylhomocystein	-0,63	-0,51	hypoxanthin	-1,54	-0,68
guanosinmonofosfát	-0,57	-0,49	adenosin	0,56	0,51	kreatin-5-aminolevulinát	0,88	0,66
glycerát	-0,41	-0,47	C3DC/C4OH	0,73	0,47	arachidonová kys.	-0,93	-0,62
C12	0,49	0,47	glycerát	0,46	0,47	C3	1,20	0,61
threonin/homoserin	0,62	0,47	threonát	0,43	0,47	C14:2	0,98	0,60
C14:2	0,58	0,46	guanosinmonofosfát	0,53	0,44	alanin/sarkosin/beta-alanin	0,80	0,59
C14:1	0,59	0,46	C12:1	0,65	0,40	C3DC/C4OH	1,11	0,58
cytidinmonofosfát	-0,44	-0,45	betain	0,43	0,40	N-acetylglutamová kys.	-0,88	-0,58



Obr. 14 Krabicový graf znázorňující hladinu adenosinu u K a P vzorků v průběhu let.



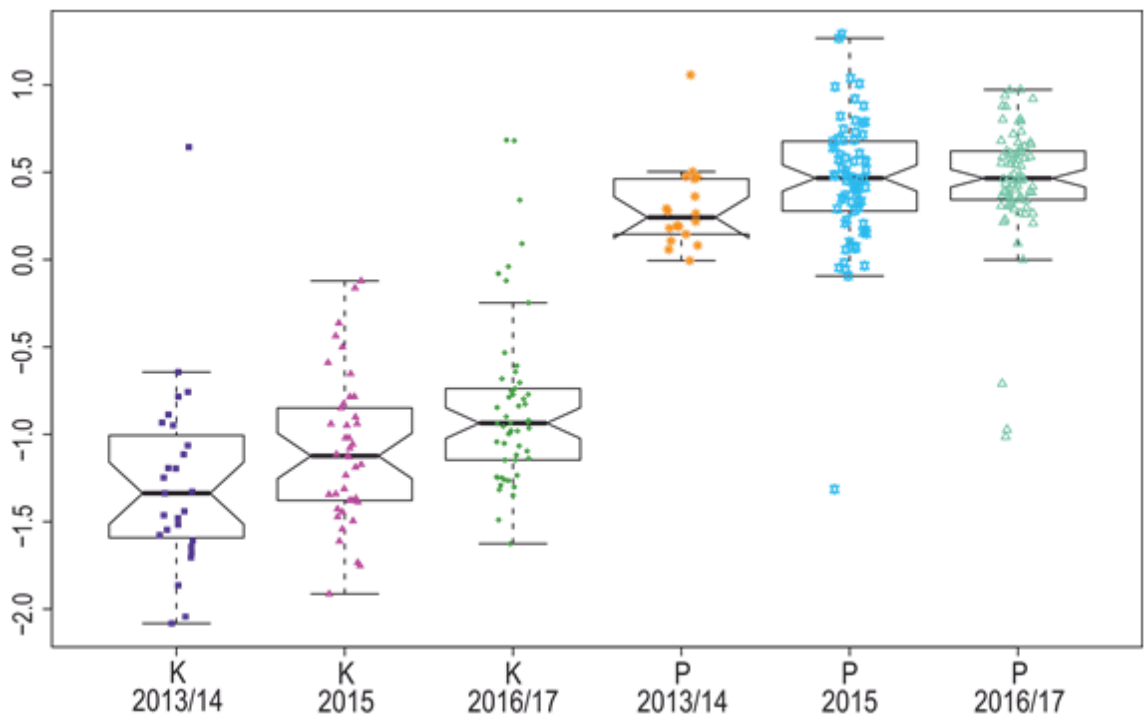
Obr. 15 Krabicový graf znázorňující hladinu ATP v průběhu let.

Data byla vizualizována ve formě krabicových grafů, pomocí nichž byly odhaleny největší rozdíly mezi vzorky pacientů a kontrol. Jedná se o 11 metabolitů uvedených na obrázcích 16 až 25.

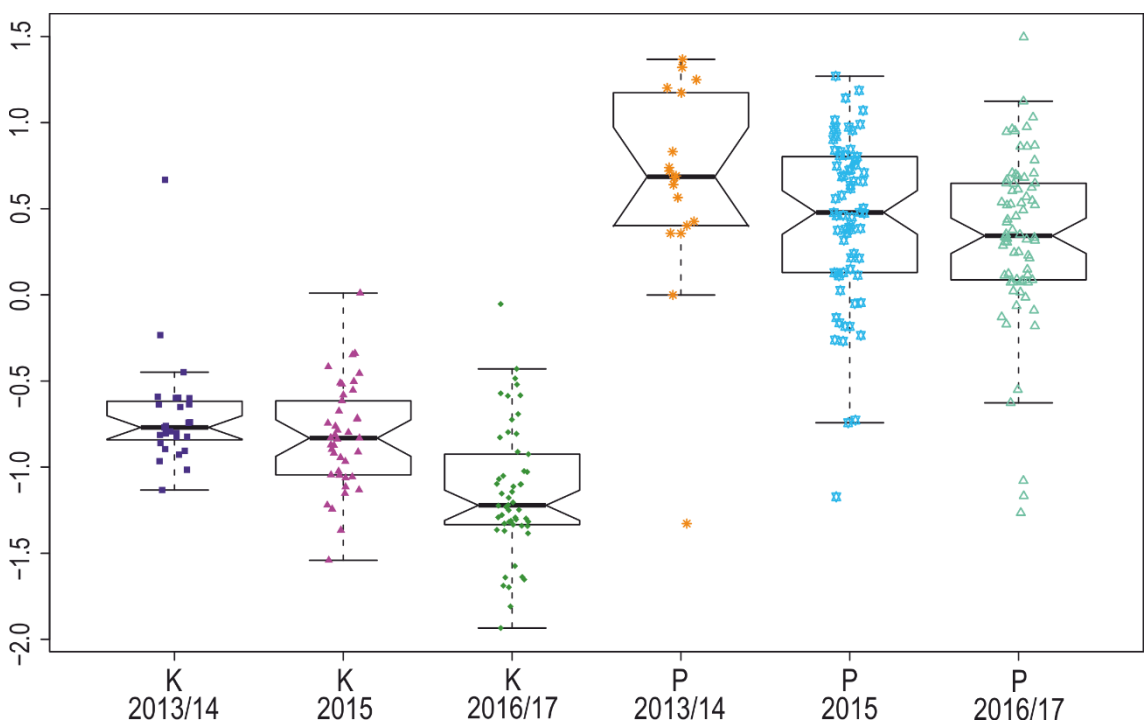
U patientských vzorků byla nalezena zvýšená hladina metabolitů butyrylkarnitinu (C4), oxalacetát/glutarát/ethylmalonátu, hypoxantinu, inosinu a inosinmonofosfátu (IMP). Naopak acylkarnitiny decanoylkarnitin (C10), decenoylkarnitin (C10:1), dodecenoylkarnitin (C12:1), tetradecenoylkarnitin (C14:1) a dále betain byly u vzorků pacientů sníženy.

Butyrylkarnitin je hlavním biomarkerem přítomným v krvi pacientů se SCADD (Bok *et al.*, 2003; Pedersen *et al.*, 2008; Waisbren *et al.*, 2008). Jeho zvýšená hladina byla pozorována i v našem případě. Dále bývá jeho koncentrace zvýšena u novorozenců s akutní acidosou a svalovou slabostí a u pacientů středního věku s chronickou myopatií lokalizovanou ve svalech (www.hmdb.ca, 6. 5. 2018). Oproti butyrylkarnitinu (Obr. 16) byl u karnitinů C10, C10:1, C12:1 a C14:1 zjištěn pokles hladiny skupin P oproti K (Obr. 18–21). Karnitin C10 bývá jako biomarker spojován s poruchami oxidace MK, především s VLCAD, deficiencí karnitinpalmitoyltransferasy I a II, a také s celiakií, jako vrozenou vadou metabolismu. Zvýšená koncentrace C10:1 se obvykle vyskytuje u MCAD. Karnitin C12:1 je nejčastěji spojován s glutarovou acidurií. Karnitin C14:1 se účastní oxidace MK s velmi dlouhým řetězcem. Je tedy hlavním biomarkerem VLCAD a současně je spojován s glutarovou acidurií II (Rinaldo *et al.*, 2008; www.hmdb.ca, 6. 5. 2018). Snížená hladina výše uvedených středně dlouhých a dlouhých acylovaných karnitinů může být způsobena jejich zvýšeným katabolismem za tvorby acetyl-CoA jako zdroje energie.

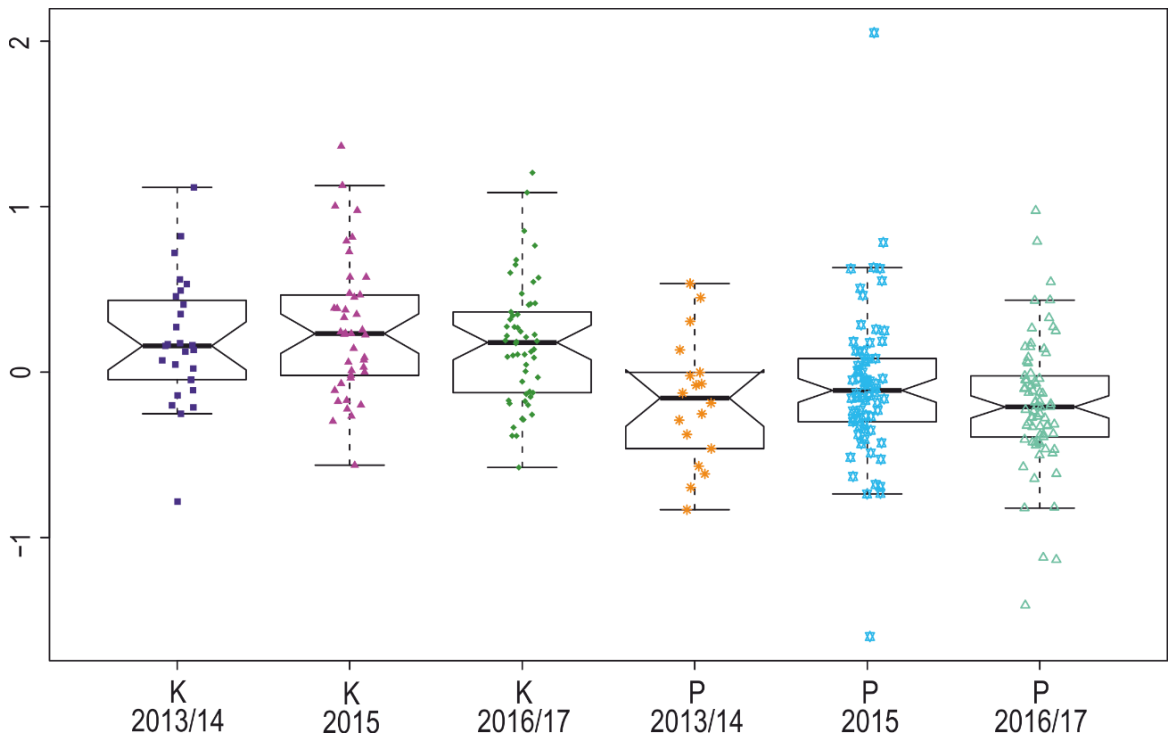
Výrazná změna v poměru P a K byla potvrzena také u ethylmalonátu, jako důležitého biomarkeru pro stanovení SCADD (Obr. 17.).



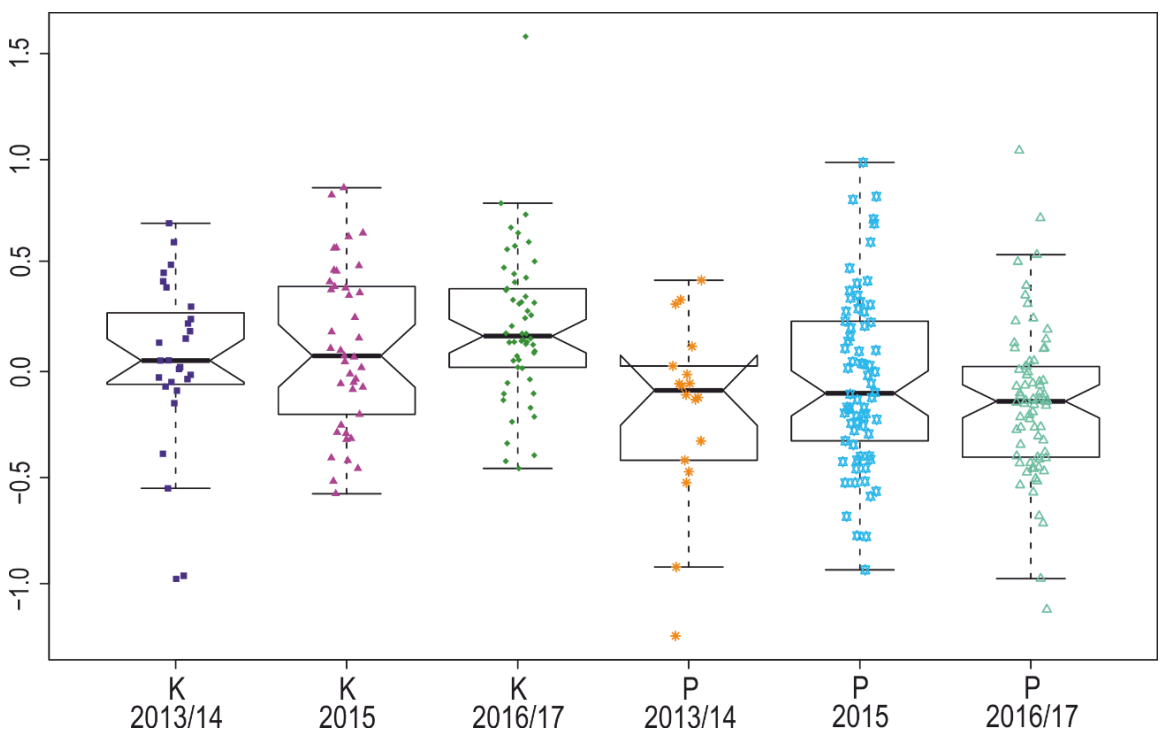
Obr. 16 Krabicový graf znázorňující hladiny K a P vzorků metabolitu C4.



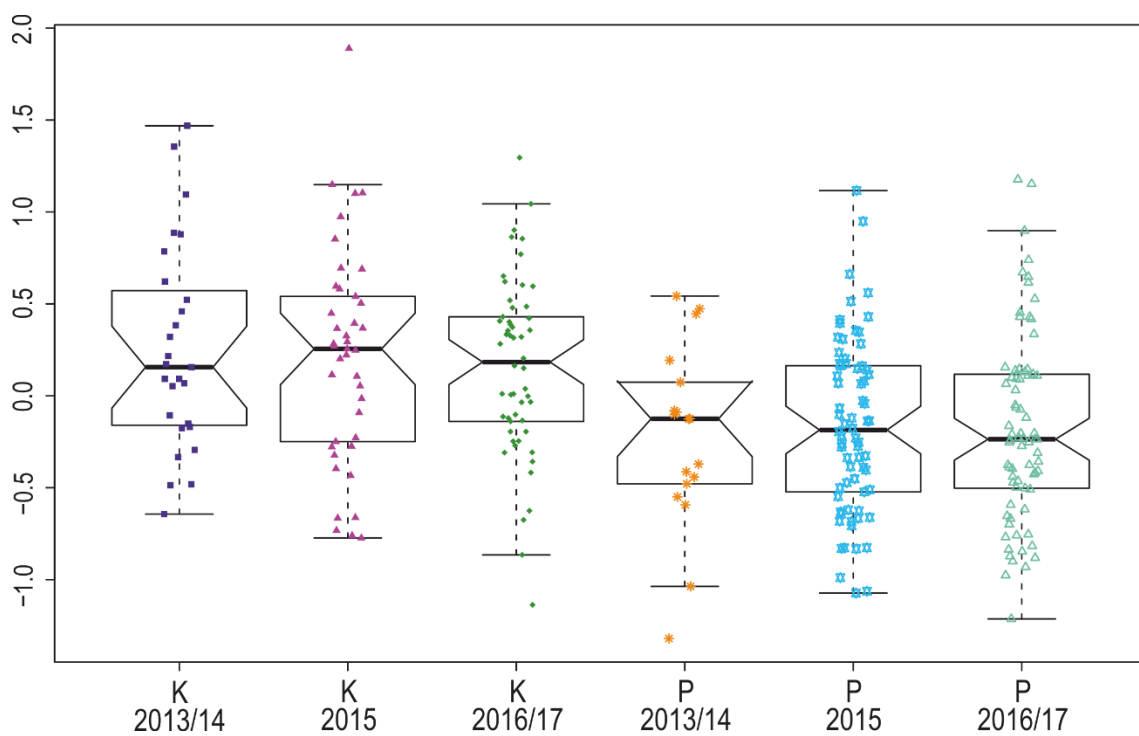
Obr. 17 Krabicový graf znázorňující hladiny K a P vzorků oxalacetátu/glutarátu/ethylmalonátu.



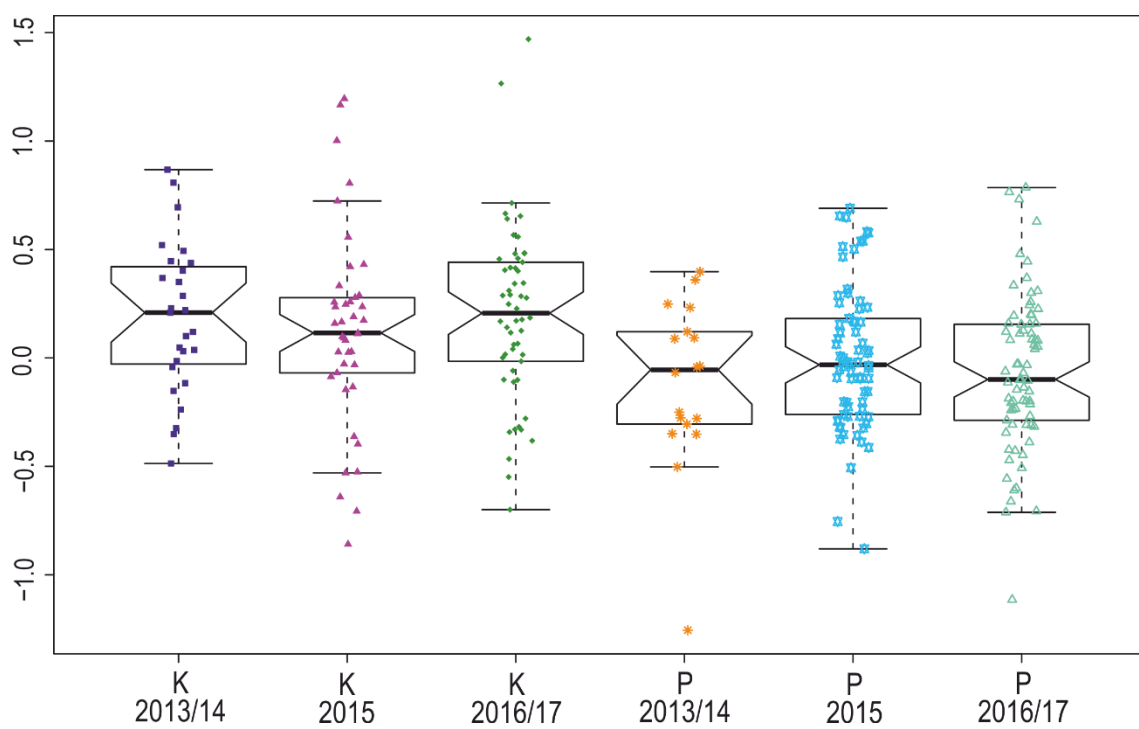
Obr. 18 Krabicový graf znázorňující hladiny K a P vzorků metabolitu C10.



Obr. 19 Krabicový graf znázorňující hladiny K a P vzorků metabolitu C10:1.

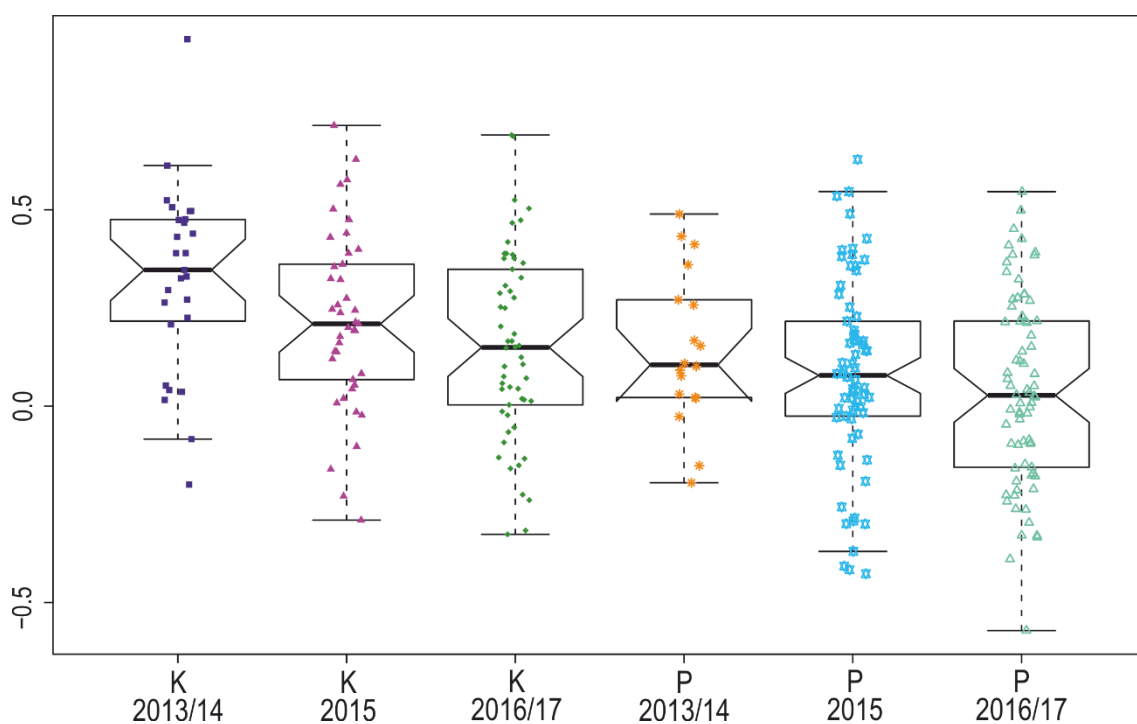


Obr. 20 Krabicový graf znázorňující hladiny K a P vzorků metabolitu C12:1.



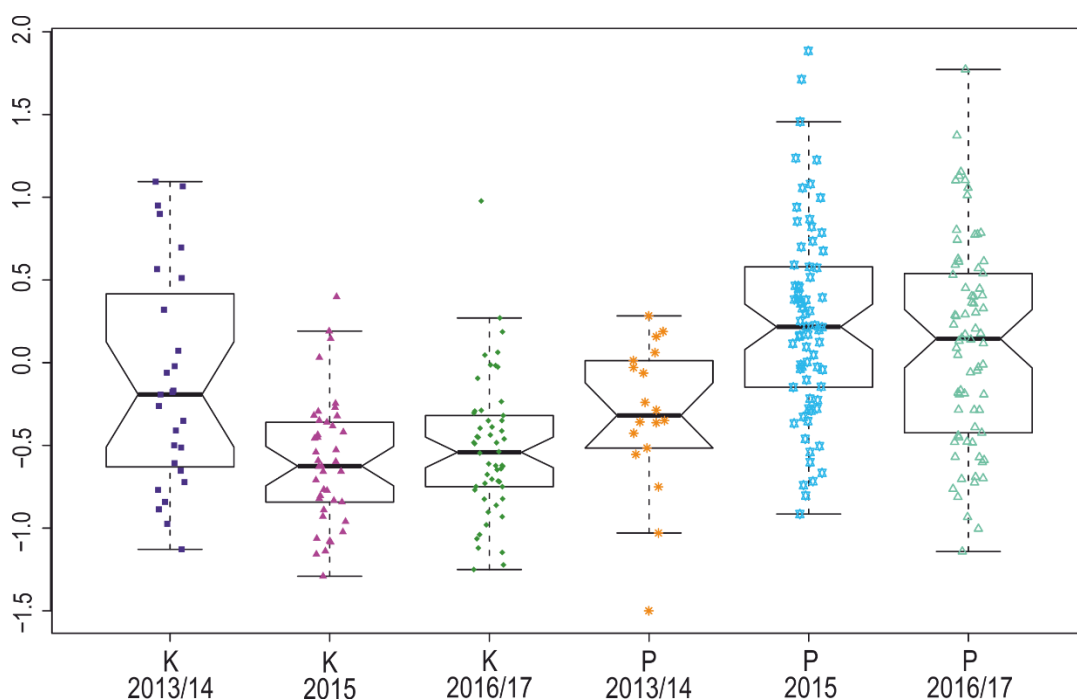
Obr. 21 Krabicový graf znázorňující hladiny K a P vzorků metabolitu C14:1.

Betain je methylderivátem aminokyseliny glycinu známým také pod názvy trimethylglycin, glycin betain, lycin a oxyneurin (Yancey *et al.*, 1980). Je akumulován v mnoha tkáních, kde působí jako intracelulární osmolyt regulující objem buňky a působí tak jako ochrana proti osmotickému stresu. Je také zdrojem methylových skupin v mnoha biochemických drahách (Slow *et al.*, 2009). Mimo jiné se také účastní biosyntézy karnitinu, kreatinu a fosfolipidů. Lze jej získat z potravy nebo oxidací cholinu. Snížená koncentrace betainu, bývá spojována s metabolickým syndromem, poruchami metabolismu lipidů (snížení exprese lipoproteinové lipasy, translokasy MK, protein vázající MK a transportního proteinu MK) a diabetem. (Sisi *et al.*, 2017; www.hmdb.ca, 6. 5. 2018). Snížená koncentrace betainu patientských vzorků SCADD (Obr. 22) může být způsobena jeho využitím pro tvorbu karnitinu, který je spotřebován za vzniku butyrylkarnitinu, který je u pacientů SCADD akumulován.

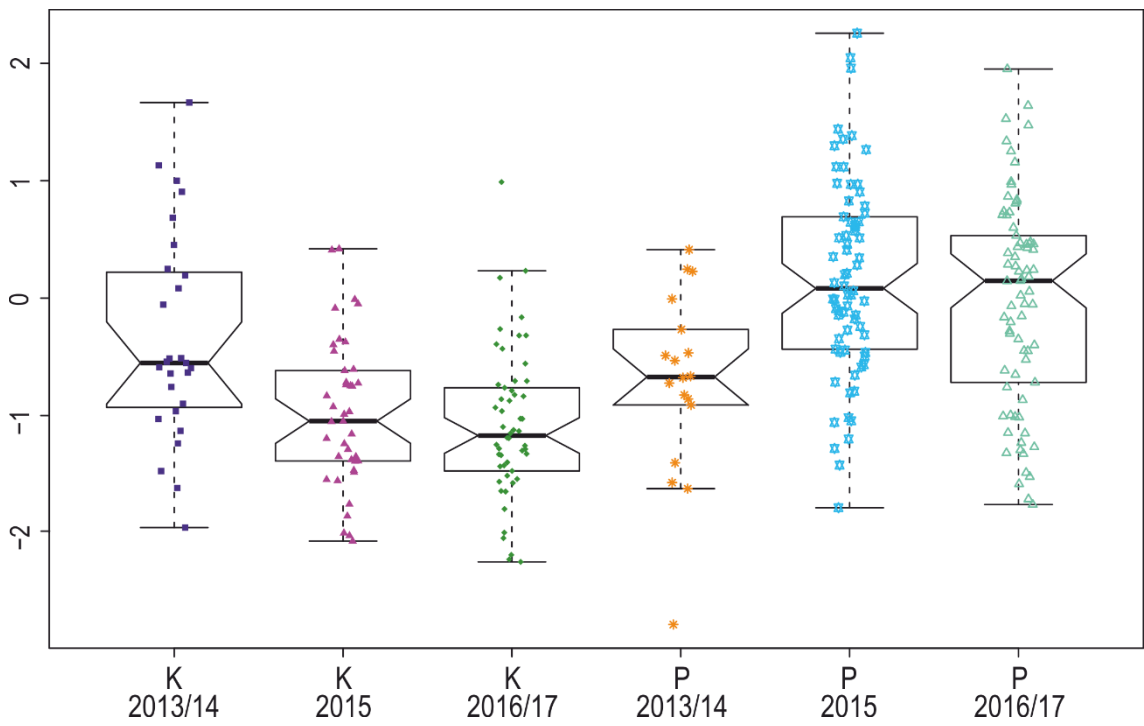


Obr. 22 Krabicový graf znázorňující hladiny K a P vzorků metabolitu betainu.

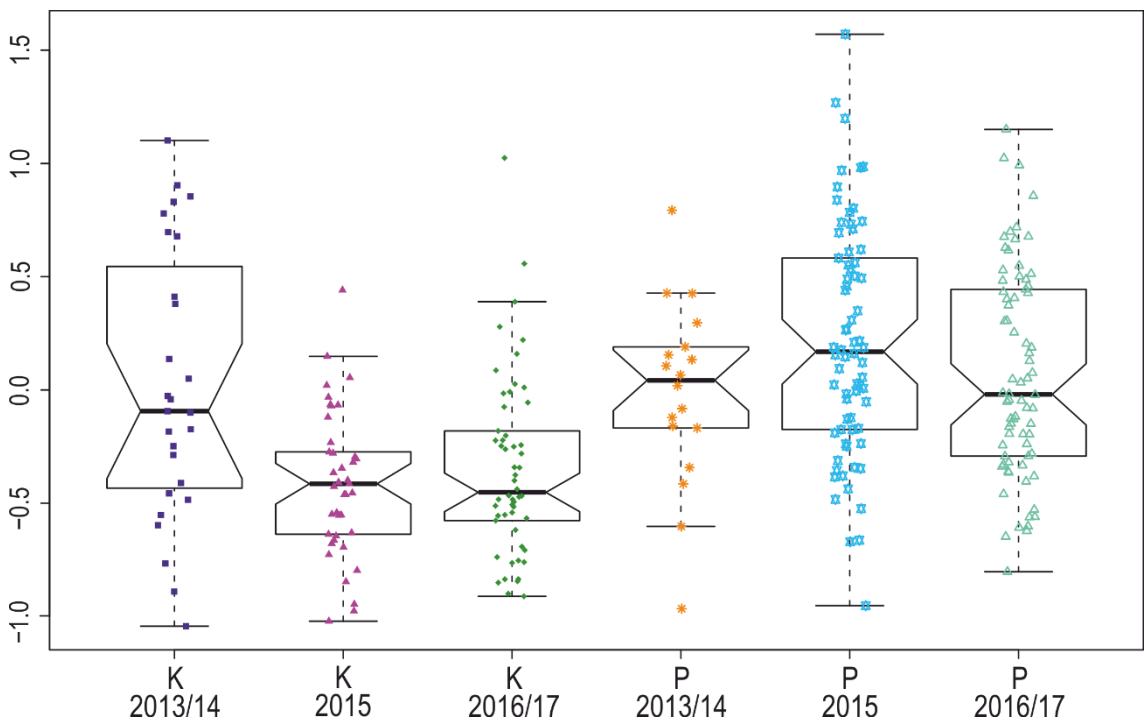
Hypoxantin se řadí mezi puriny a je produkován při oxidativní deaminaci adeninu. Společně s ribosou tvoří nukleosid zvaný inosin. Hypoxantin může být přeměněn na IMP enzymem hypoxantin-guanin-fosforibosyltransferasou (EC 2.4.2.8) (Zoref-Shani *et al.*, 1992; www.hmdb.ca, 6. 5. 2018). Hladina hypoxantinu (Obr. 23), inosinu (Obr. 24) a IMP (Obr. 25) byla zvýšená u P v letech odběru 2015 a 2016/2017. V letech 2013/2014 však byla téměř totožná, mohlo dojít k jejich degradaci. Vysvětlením tohoto pozorování může být zvýšený katabolismus purinových bází.



Obr. 23 Krabicový graf znázorňující hladiny K a P vzorků metabolitu hypoxantinu.



Obr. 24 Krabicový graf znázorňující hladiny K a P vzorků metabolitu inosinu.



Obr. 25 Krabicový graf znázorňující hladiny K a P vzorků metabolitu IMP.

9. Závěr

V teoretické části bakalářské práce byla vypracována literární rešerše týkající se vrozených poruch β -oxidace mastných kyselin se zaměřením na onemocnění SCADD. Součástí práce je pohled na současný stav řešené problematiky, klinické a fyziologické projevy onemocnění a také dosavadní postupy léčby.

V praktické části byla provedena cílená metabolomická analýza metodou LC-MS/MS za využití suchých krevních skvrn novorozenců s diagnosou SCADD a kontrol. Pomocí následné statistické analýzy byly hledány významné biomarkery onemocnění. Byly odhaleny změny v metabolických profilech vzorků v průběhu let. Následné statistické vyhodnocení bylo proto provedeno pro jednotlivé roky odběru zvlášť. Byly potvrzeny zvýšené hladiny butyrylkarnitinu a ethylmalonátu jako hlavních biomarkerů u pacientů SCADD.

Mezi nejvýznamnějšími nalezenými metabolity dělicí vzorky pacientů a kontrol byly acylkarnitiny C10, C10:1, C12:1 a C14:1, betain, a také hypoxantin, inosin a IMP. Vzorky budou do budoucna dále zpracovány necílenou a lipidomickou analýzou.

10. Literatura

- Baker, M. (2011): Metabolomics: from small molecules to big ideas. *Nature Methods* 8, 117-121.
- Repic Lampret B., Murko S., Debeljak M., Zerjav Tansek M., Fister P., Battelino T. (2015): A case report of short-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency (SCADD). *Biochemica medica*. **25(2)**, 279-284.
- Bennett M. J. (2010): Pathophysiology of fatty acid oxidation disorders. *J Inherit Metab Dis* **33(5)**, 533–537.
- Berg J. M., Tymoczko J. L., Stryer L. (2002): *Biochemistry*. Freeman. New York.
- Blau N., Duran M., Gibson K. M., et al. (2014): Physician's Guide to the Diagnosis, Treatment and Follow-Up of Inherited Metabolic Diseases. *Springer* pp. 247–264.
- Boiteau R. M., Hoyt D. W., Nicora C. D., Kinmonth-Schultz H. A., Ward J. K., Bingol K. (2018): Structure Elucidation of Unknown Metabolites in Metabolomics by Combined NMR and MS/MS Prediction. *Metabolites* **8**:1.
- Bok L. A., Vreken P., Wijburg F. A. et al. (2003): Short-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency: studies in a large family adding to the complexity of the disorder. *Pediatrics* **112(5)**, 1152-1155.
- Coates P. M., Hale D. E., Finocchiaro G., Tanaka K., Winter S. C. (1988): Genetic deficiency of short-chain acyl-coenzyme a dehydrogenase in cultured fibroblasts from a patient with muscle carnitine deficiency and severe skeletal muscle weakness. *J Clin Invest* **81(1)**, 171–175.
- Corydon M. J., Gregersen N., Lehnert W. et al. (1996): Ethylmalonic aciduria is associated with an amino acid variant of short chain acyl-coenzyme a dehydrogenase. *Pediatric Research* **39(6)**, 1059-1066.
- Corydon M. J., Andresen B.S., Bross P. et al (1997): Structural organization of the human short-chain acyl-CoA dehydrogenase gene. *Mamm Genome* **8(12)**, 922–926.
- Corydon M. J., Vockley J., Rinaldo P. et al (2001): Role of common gene variations in the molecular pathogenesis of short-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency *Pediatr Res* **49(1)**, 18–23.
- de Hoffmann E., Stroobant V. (2007): Mass spectrometry, principles and application. 3rd ed. John Wiley & Sons Ltd, England, 489 stran.
- Dessein A. F., Fontaine M., Andresen B. S., et al. (2010): A novel mutation of the ACADM gene (c.145C>G) associated with the common c.985A>G mutation on the other ACADM allele causes mild MCAD deficiency: a case report. *Orphanet J Rare Dis*. **5**, 26.
- Dettmer K., Hammock B. D. (2004): Metabolomics – A new exciting field within the "omics" sciences. *Environ Health Perspect* **112**, 396-7.
- Fenn, J. B., Mann, M., Meng, C. K. et al. (1989): Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* **246**, 64.
- Fingerhut R., Ensenuer R., Röschinger W., Arnecke R., Olgemöller B., Roscher A. A. (2009): Stability of acylcarnitines and free carnitine in dried blood samples: implications for retrospective diagnosis of inborn errors of metabolism and neonatal screening for carnitine transporter deficiency. *Analytical Chemistry* **81** (9), 3571-3575.
- Friedecky D., Lemr K. (2012): Úvod do hmotnostní spektrometrie. *Klin. Biochem. Metab.* **20** (41), 154-159.
- Fryčák P., Lemr K., Adam T., Hušková R. (2003): Diagnostika vybraných dědičných metabolických poruch tandemovou hmotnostní spektrometrií s využitím moderních ionizačních technik. *Chem. Listy* **97**, 93–100.
- Gallant N. M., Leydiker K., Tang H. et al (2012): Biochemical, molecular, and clinical characteristics of children with short chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency detected by newborn screening in California. *Mol Genet Metab* **106(1)**, 55–61.
- Garcia Boy R., Henseler J., Mattern R., Skopp G. (2008): Determination of morphine and 6-acetylmorphine in blood with use of dried blood spots. *Therapeutic Drug Monitoring* **30** (6), 733-739.

- Gregersen N., Winter V. S., Corydon M. J. et al (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. *Hum Mol Genet* **7**(4), 619–627.
- Gregersen N., Bross P., Vang S., Christensen J. H. (2006): Protein misfolding and human disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet* **7**, 103–124.
- Ho C. S., Lam C. W. K., Chan M. H. M., Cheung R. C. L., Law L. K., Lit L. C. W., Ng K. F., Suen M. W. M., Tai H. L. (2003): Electrospray ionization mass spectrometry: principles and clinical applications. *Clin Biochem Rev* **24**, 3-12.
- Hoffman J. D., Steiner R. D., Paradise L, Harding C. O., Ding L., Strauss A. W., Kaplan P. (2006): Rhabdomyolysis in the military: recognizing late-onset very long-chain acyl CoA dehydrogenase deficiency. *Mil Med.* **171**, 657–658.
- Jethva R., Bennett M. J., Vockley J. (2008): Short-chain acyl-coenzyme a dehydrogenase deficiency. *Molecular Genetics and Metabolism* **95**(4), 195-200.
- Kim S. H., Park H. D., Sohn Y. B., Park S. W., Cho S. Y., Ji S., et al. (2011): Mutations of ACADS gene associated with short-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency. *Ann Clin Lab Sci.* **41**, 84–88.
- Klouda P. (2003): Hmotnostní spektrometrie. In: *Moderní analytické metody*. Druhé vydání. Pavel Klouda, Ostrava, 50-53.
- Lampret B. R., Murko S., Debeljak M., Tansek M.Z., Fister P., Battelino T. (2015): A case report of short-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency (SCADD). *Biochem Med (Zagreb)* **25**(2),279–284.
- Lane M. D., Halenz D. R., Kosow D. P., Hegre C. S. (1960): Further studies on mitochondrial propionyl carboxylase. *J Biol Chem* **35**, 3082-3086.
- Lee B. J., Huang Y. C., Chen S.J., Lin P.T. (2012): Coenzyme Q10 supplementation reduces oxidative stress and increases antioxidant enzyme activity in patients with coronary artery disease. *Nutrition* **28**(3), 250–255.
- Matouš B. et al. (2010): Lipidy. In: *Základy lékařské chemie a biochemie*. První vydání. (Houdek L.), Galén, Praha, 59.
- Matouš B. et al. (2010): Metabolismus lipidů. In: *Základy lékařské chemie a biochemie*. První vydání. (Houdek L.), Galén, Praha, 151-175.
- Murray R. K. (1998): Bioenergetika a metabolismus sacharidů a lipidů. In: *Harperova Biochemie*. (Kraml J. ed.), Praha, 223-278.
- 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. *J Clin Invest* **83**(5), 1605–1613.
- Naito E., Indo Y., Tanaka K. (1990): Identification of two 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. *The Journal of Clinical Investigation* **85**(5), 1575-1582.
- Nancy D., Leslie, M., Valencia A., Strauss A., Zhang K. (2009): Very Long-Chain Acyl-Coenzyme A Dehydrogenase Deficiency. *GeneReviews*.
- Nelson D. L., Cox M. M., Lehninger A. L. (2005): *Lehninger principles of biochemistry*. Freeman, New York.
- Nochi Z., Olsen R. K. J., Gregersen N. (2017): Short-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *Journal of Inherited Metabolic Disease* **40**, 641-655.
- Novák F. (2002): Lipidy. In *Úvod do klinické biochemie*. Nakladatelství Karolinum, Praha, 181-188.
- Olsen R. K., Cornelius N., Gregersen N. (2013): Genetic and cellular modifiers of oxidative stress: what can we learn from fatty acid oxidation defects. *Mol Genet Metab* **110**, S31–S39.

- Patti, G. J., Yanes, O., Siuzdak, G. (2012): Metabolomics: the apogee of the omics trilogy. *Nature Reviews* **13**, 263-269.
- Pedersen C. B., Kolvraa S., Kolvraa A. et al (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**(1), 43-56.
- Pena L. D., van Calcar S. C., Hansen J., Edick M. J., Walsh Vockley C., Leslie N., Cameron C., Mohsen A. W., Berry S. A., Arnold G. L., Vockley J. (2016): Outcomes and genotype-phenotype correlations in 52 individuals with VLCAD deficiency diagnosed by NBS and enrolled in the IBEM-IS database. *Molecular genetics and metabolism* **118**, 272–281.
- Preece M. A., Green A. (2002): Pregnancy and inherited metabolic disorders: maternal and fetal complications. *Ann Clin Biochem* **39**, 444–455.
- Racek J. et al. (2006): In: *Klinická biochemie*. Galén, Praha, 259-267.
- Rinaldo P., Matern D., Bennett M. J. (2002): Fatty acid oxidation disorders. *Annual Review of Physiology* **64**, 477–502.
- Rinaldo P., Cowan T. M., Matern D. (2008): Acylcarnitine profile analysis. *Genetics in Medicine*. **10**, 151-156.
- Roberts L. D., Souza A. L., Gerszten R. E., Clish C. B. (2012): Targeted Metabolomics. *Current Protocols in Molecular Biology*. 30.2.
- Saudubray J-M., van den Berghe G. (2012): Disorders of Mitochondrial Fatty Acid Oxidation and Related Metabolic Pathways. In: *Inborn Metabolic Diseases*. Fifth Edition, (Walter J. H. ed.), Springer, Berlin, 201-214.
- Sewell A. C., Herwig J., Bohles H., Rinaldo P., Bhala A., Hale D. E. (1993): A new case of short-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency with isolated ethylmalonic aciduria. *Eur J Pediatr* **152**(11), 922–924.
- Shekhawat P. S., Matern D., Strauss A. W. (2005): Fetal fatty acid oxidation disorders, their effect on maternal health and neonatal outcome: impact of expanded newborn screening on their diagnosis and management. *Pediatr Res* **57**, 78R-86R.
- Sim K. G., Hammond J., Wilcken B. (2002): Strategies for the diagnosis of mitochondrial fatty acid beta-oxidation disorders. *Clin Chim Acta* **323**, 37–58.
- Sisi L., Wang H., Wang X., Wang Y., Feng J. (2017): Betaine affects muscle lipid metabolism via regulating the fatty acid uptake and oxidation in finishing pig. *J Anim Sci Biotechnol*. **8**, 72
- Slow S., Lever M., Chambers S. T., George P. M. (2009): Plasma dependent and independent accumulation of betaine in male and female rat tissues. *Physiol Res* **58**, 403-410.
- Stephens W. E. (1946): A pulsed mass spectrometer with time dispersion. *Phys. Rev.* **69**, 691
- Strnadová K. A., Holub M., Mühl A., Heinze G., Ratschmann R., Mascher H., Stöckler-Ipsiroglu S., Waldhauser F., Votava F., Lebl J., Bodamer O. A. (2007): Long-Term Stability of Amino Acids and Acylcarnitines in Dried Blood Spots. *Clinical Chemistry* **53**(4), 717-722.
- Sumner L. W. et al. (2007): Proposed minimum reporting standards for chemical analysis, Chemical Analysis Working Group (CAWG), Metabolomics Standards Initiative (MSI). *Metabolomics* **3**(3), 211-221.
- van Maldegem B. T., Duran M., Wanders R. J. et al (2006): Clinical, biochemical, and genetic heterogeneity in short-chain acyl-coenzyme a dehydrogenase deficiency. *JAMA* **296**(8), 943–952.
- Tanaka T., Waki H., Ido Y. et al. (1988): Protein and polymer analyses up to m/z 100,000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom* **2**, 151.
- van Maldegem B. T., Duran M., Wanders R. J. et al (2006): Clinical, biochemical, and genetic heterogeneity in short-chain acyl-coenzyme a dehydrogenase deficiency. *JAMA* **296**(8),943–952.
- van Maldegem B. T., Duran M., Wanders R. J. et al (2010a): Fasting and fatloading tests provide pathophysiological insight into short-chain acyl-coenzyme a dehydrogenase deficiency. *J Pediatr* **156**(1), 121–127.

- Vishwanath V. A. (2016): Fatty Acid Beta-Oxidation Disorders: A Brief Review. *Annals of Neurosciences* **23(1)**, 51-55.
- Voet D., Voetová J. G. (1995): Metabolismus lipidů. In: *Biochemie*. Victoria publishing Praha, 692-755.
- Waisbren S. E., Levy H. L., Noble M. et al (2008): Short-chain acyl-CoA dehydrogenase (SCAD) deficiency: an examination of the medical and neurodevelopmental characteristics of 14 cases identified through new-born screening or clinical symptoms. *Mol Genet* **95(1-2)**, 39-45.
- Yancey P. H., Clark M. E., Hand S. C., Bowlus R. D., Somero G. N. (1980): Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Science* **217**, 1214-1222.

Internetové zdroje

- Funkce buněk a lidského těla: <http://fbt.cz/skripta/ii-premena-latek-a-energie-v-bunce/11-odbouravani-lipidu-a-metabolismus-ketolatek/> (20. 2. 2018).
- Genetics Home Reference: <https://ghr.nlm.nih.gov/condition/long-chain-3-hydroxyacyl-coa-dehydrogenase-deficiency#> (21. 3. 2018).
- Novorozenecký screening: www.novorozeneckyscreening.cz (15. 3. 2018).
- R Project for Statistical Computing, A language and environment fo statistical computing. Vienna: R foundation for Statistical Computing, 2015. <https://www.r-project.org/>. Accessed 13 Spt 2017.
- The Human Metabolome Database: www.hmdv.ca/metabolites (6. 5. 2018).
- Wikipedia: https://en.wikipedia.org/wiki/File:Triple_quadrupole_schematic.jpeg (19. 4. 2018).

11. Seznam použitých zkratek

CACT	karnitinacylkarnitintransferasa
CI	chemická ionizace
CID	kolizně indukovaná disociace
CPT I	karnitinpalmotoyltransferasa I
CPT II	karnitinpalmityltransferasa II
DBS	suché krevní skvrny
EI	elektronová ionizace
ESI	ionizace elektrosprejem
ETC	elektronový transportní řetězec
ETF-QO	elektronový flavoproteinový přenašeč ubichinoxidoreduktasa
FAOD	poruchy oxidace mastných kyselin
Q	kvadrupól
QC	kontrola kvality
QqQ	trojitý kvadrupól
QqTOF	kvadrupól s průletovým analyzátozem
IT-ICR	iontová past s cyklotronovou rezonancí
LCAD	acyl-CoA dehydrogenasa pro dlouhý řetězec
LCHAD	L-3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenasa pro dlouhý řetězec
MCAD	acyl-CoA dehydrogenasa pro středně dlouhý řetězec
MK	mastné kyseliny
MS	hmotnostní spektrometrie
ROS	reaktivní formy kyslíku
SCAD	acyl-CoA dehydrogenasa pro krátký řetězec
SCHAD	L-3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenasa pro krátký řetězec
VLCAD	acyl-CoA dehydrogenasa pro velmi dlouhý řetězec