

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
Lékařská fakulta



**Diagnostika dědičných metabolických poruch
použitím metabolomických nástrojů**

Disertační práce

Mgr. Hana Janečková

Školitel: prof. RNDr. Tomáš Adam, Ph.D.
Konzultant: RNDr. David Friedecký, Ph.D.

Olomouc 2013

Poděkování

Touto cestou bych ráda poděkovala svému školiteli prof. RNDr. Tomáši Adamovi, Ph.D. za odborné vedení, podnětné rady a připomínky při zpracování této disertační práce. Poděkování patří také RNDr. Davidu Friedeckému, Ph.D. a Mgr. Petru Wojtowiczovi za poskytnuté cenné konzultace. Děkuji také RNDr. Karlu Hronovi, Ph.D. a Mgr. Alžbětě Kalivodové za pomoc v oblasti statistické analýzy dat. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat celému kolektivu Laboratoře metabolomiky a Laboratoře dědičných metabolických poruch za všestrannou pomoc a vytvoření příjemného pracovního prostředí. Zvláštní poděkování bych chtěla věnovat své rodině za podporu při studiu.

Tato práce vznikla za podpory Studentské grantové soutěže Univerzity Palackého v Olomouci, č. projektu LF 2013-010 a grantu IGA MZČR NT12218. Infrastrukturální část projektu (Ústav molekulární a translační medicíny) byla podpořena Operačním programem Výzkum a vývoj pro inovace (projekt CZ.1.05/2.1.00/01.0030).

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto disertační práci vypracovala samostatně s použitím uvedené literatury pod vedením školitele doc. RNDr. Tomáše Adama Ph.D. a uvádím v ní pouze výsledky své vlastní výzkumné práce.

V Olomouci 30. 6. 2013

Mgr. Hana Janečková

OBSAH

| | | |
|------------|--|-----------|
| 1 | ÚVOD | 6 |
| 1.1 | Dědičné metabolické poruchy | 6 |
| 1.1.1 | Podstata | 6 |
| 1.1.2 | Projevy a léčba | 8 |
| 1.1.3 | Diagnostika | 10 |
| 1.1.4 | Poruchy purinové <i>de novo</i> syntézy | 14 |
| 1.2 | Metabolomika | 15 |
| 1.2.1 | Definice | 15 |
| 1.2.2 | Historie metabolomiky | 17 |
| 1.2.3 | Metabolomické strategie | 19 |
| 1.2.4 | Analytické techniky | 21 |
| 1.2.5 | Zpracování dat | 26 |
| 2 | CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE | 28 |
| 3 | MATERIÁL A METODY | 29 |
| 3.1 | Diagnostika defektů purinové <i>de novo</i> syntézy | 29 |
| 3.1.1 | Studované ribosidy | 29 |
| 3.1.2 | Příprava vzorků | 29 |
| 3.1.3 | LC-MS/MS metoda | 30 |
| 3.1.4 | Validace metody | 31 |
| 3.2 | Použití cíleného metabolomického přístupu pro diagnostiku DMP | 32 |
| 3.2.1 | Chemikálie | 32 |
| 3.2.2 | Vzorky plazem | 32 |
| 3.2.3 | Cílená metabolomická analýza | 32 |
| 3.2.4 | Statistické vyhodnocení | 33 |
| 3.3 | Použití necíleného metabolomického přístupu pro diagnostiku DMP | 33 |
| 3.3.1 | Biologický materiál | 33 |
| 3.3.2 | Necílená metabolomická analýza | 34 |
| 3.3.3 | Zpracování dat a statistické vyhodnocení | 35 |
| 3.4 | Vývoj a aplikace cílené metabolomické metody | 36 |

| | | |
|------------|--|------------|
| 3.4.1 | Tvorba databáze OIMeDa..... | 36 |
| 3.4.2 | Příprava a uchování standardů..... | 37 |
| 3.4.3 | Optimalizace MS parametrů | 38 |
| 3.4.4 | Optimalizace HPLC podmínek | 39 |
| 3.4.5 | Analýza směsí standardů..... | 40 |
| 3.4.6 | Metabolitové profilování biologických materiálů | 41 |
| 4 | VÝSLEDKY A DISKUZE..... | 49 |
| 4.1 | Diagnostika defektů purinové <i>de novo</i> syntézy | 49 |
| 4.1.1 | Parametry a validace metody | 49 |
| 4.1.2 | Klinické aplikace | 51 |
| 4.2 | Použití cíleného metabolomického přístupu pro diagnostiku DMP | 54 |
| 4.2.1 | Vzorky plazem | 54 |
| 4.2.2 | Statistické vyhodnocení a opakovatelnost..... | 54 |
| 4.2.3 | Poruchy aminokyselin | 59 |
| 4.2.4 | Organické acidurie a mitochondriální poruchy..... | 65 |
| 4.3 | Použití necíleného metabolomického přístupu pro diagnostiku DMP | 71 |
| 4.3.1 | Biologický materiál..... | 71 |
| 4.3.2 | Zpracování dat a statistické vyhodnocení | 73 |
| 4.4 | Cílená metabolomická metoda a její aplikace..... | 83 |
| 4.4.1 | Databáze OIMeDa | 83 |
| 4.4.2 | Optimalizace MS parametrů | 87 |
| 4.4.3 | Optimalizace HPLC podmínek | 92 |
| 4.4.4 | Analýza směsí standardů..... | 93 |
| 4.4.5 | Metabolitové profilování biologických materiálů | 113 |
| 5 | SOUHRN | 117 |
| 6 | SUMMARY..... | 119 |
| 7 | PŘEHLED POUŽITÝCH ZKRATEK..... | 121 |
| 8 | SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY | 129 |
| 9 | SEZNAM PUBLIKACÍ..... | 140 |

1 ÚVOD

1.1 Dědičné metabolické poruchy

1.1.1 Podstata

Dědičné metabolické poruchy (DMP), dříve nazývány též jako vrozené vady metabolismu, patří mezi poměrně vzácná onemocnění. Nicméně jako soubor představují rozsáhlou a různorodou skupinu genetických onemocnění, která jsou významnou příčinou morbidity a mortality převážně u dětí¹. V současné době je již známo více než 900 těchto onemocnění, představujících přibližně 15 % všech vzácných onemocnění². Hlavní skupiny jsou uvedeny v Tab. 1. Kumulativní incidence se obvykle uvádí mezi 1/700 až 1/800 narozených dětí³. Skutečný stav však může být podhodnocen a to vzhledem k mimořádné heterogenitě DMP, obtížím při jejich rozpoznávání a zvyšujícímu se počtu nových popsanych poruch. Chybí též důkladné epidemiologické údaje o celkovém výskytu¹. Současné odhady dokonce hovoří o kumulativní incidenci DMP nejméně 1/500⁴.

DMP jsou způsobeny mutacemi v jaderných genech s vysokou penetrancí, i když v několika případech se jedná o mutace v mitochondriální DNA. U DMP se vyskytují převážně bodové mutace zahrnující delecii, inzerci či substituci jedné báze v jediném genu. Mutace však mohou zahrnovat i větší delece, které mohou postihnout pouze část genu, celý gen nebo dokonce soubor více genů. V některých situacích se tedy může stát, že pacient trpí kombinací dvou či více metabolických poruch.

Tabulka č. 1: Klasifikace DMP (upraveno dle Pampols ¹)

| |
|--|
| Poruchy v metabolismu aminokyselin |
| Poruchy močovinového cyklu |
| Poruchy membránového transportu |
| Poruchy v metabolismu organických kyselin |
| Poruchy v metabolismu cukrů |
| Kongenitální poruchy glykosylace |
| Poruchy oxidace mastných kyselin |
| Deficit pyruvátdehydrogenasy a poruchy Krebsova cyklu |
| Mitochondriální poruchy dýchacího řetězce |
| Deficity kreatinu v mozku |
| Poruchy purinového a pyrimidinového metabolismu |
| Lysosomální onemocnění |
| Peroxisomální onemocnění |
| Poruchy v metabolismu lipoproteinů a ostatní lipidemie |
| Poruchy metabolismu sterolů |
| Poruchy v kovech |
| Poruchy v porfyrinu a hemu |
| Poruchy týkající se vitaminů |
| Poruchy týkající se hormonů |
| Poruchy v metabolismu neurotransmiterů |
| Krevní poruchy |
| Ostatní |

Následkem genové mutace vzniká odpovídající genový produkt (protein), který může být defektní a jeho funkce může být poškozena. Podle funkce tohoto proteinu v metabolismu nebo stavbě organismu se odvíjí klinické projevy onemocnění. U DMP je genovým produktem enzym nebo transportní protein. Ztráta jeho funkce poté může způsobit zastavení metabolické dráhy v určitém místě, to mívá za následek hromadění metabolitů (před danou blokadou), produkci nežádoucích toxických sloučenin či nedostatek syntézy důležitých produktů. V některých případech může být naopak DMP charakterizována zvýšenou aktivitou enzymu či nadměrnou tvorbou funkčního proteinu.

DMP patří mezi monogenní onemocnění a to z toho důvodu, že jeden gen hraje hlavní roli při vzniku poruchy. Většina DMP se dědí autosomálně recesivně, menší část patří mezi autosomálně dominantní poruchy. Velice málo DMP je X-vázaných nebo jsou spojeny s mitochondriální dědičností¹. Pacienti s autosomálně recesivní poruchou mají zřídka stejné mutované alely. Tyto případy se vyskytují pouze v situaci, kdy pacient je potomek příbuzných rodičů nebo když jsou jednotlivé alely v dané populaci přítomny ve vysoké frekvenci. Pacienty, kteří mají dvě odlišné mutace (jednu zděděnou po otci, druhou po matce), pak označujeme za složené heterozygoty. V rodinách s gonosomálně recesivním typem dědičnosti jsou nemocí postiženi hemizygotní chlapci, u heterozygotních dívek se může onemocnění projevit v případě vyšší míry inaktivace zdravého chromosomu X.

1.1.2 Projevy a léčba

Rozsah klinických projevů DMP je velice široký a zahrnuje rozmanitou škálu symptomů. Mohou se objevit v kterémkoliv věku, nejčastěji však v dětství. Jejich následkem může být v řadě případů i smrt v novorozeneckém či pozdějším dětském věku. Méně časté je pozorování prvních příznaků v adolescenci či dospělosti. DMP se však mohou projevit i prenatalně, například hydropsem plodu.

Jen málo klinických příznaků je vysoce specifických pro určitou DMP (např. třeshňová skvrna na očním pozadí u gangliosidosy-GM1). Většina projevů je nespecifických a jsou přítomny u řady DMP (např. mentální retardace, hepatopatie, křeče)⁵. Ani pacienti se stejnou DMP nemusí vykazovat stejné projevy. V některých případech může mít dokonce totožná mutace u sourozenců za následek rozdílné klinické prezentace.

Klinické projevy lze též rozdělit do dvou skupin podle toho, jestli dochází ke hromadění malých či komplexních molekul. Nemoci malých molekul, které jsou obvykle způsobeny poruchami metabolismu přiváděných stravou, se v některých případech manifestují akutně již v novorozeneckém období. Mohou být pozorovány opakované déle trvající poruchy vědomí, ataky acetonemického zvracení, metabolické acidózy a mnoho dalších projevů. Nemoci komplexních molekul, způsobené poruchou tvorby, transportu nebo odbourávání endogenně syntetizovaných složitých makromolekul (např. glykosaminoglykanů, glykoproteinů, glykolipidů), se především projevují abnormalitami buněčných membrán a organel (zejména lysosomů a peroxisomů). Často je pozorováno chronicky progredující strukturální postižení orgánů s kraniofaciální dysmorfii, organomegalii nebo postižení centrální nervové soustavy^{2,4}.

Spektrum mechanismů DMP je široké, aby mohla být tudíž nalezena adekvátní terapie, je velice důležité usilovat o lepší porozumění komplexní patofyziologie jednotlivých DMP. V současnosti je odhadováno, že úspěšná terapie může být nabídnuta pouze v případě 12 % DMP, částečný přínos je pozorován ve 54 % DMP. Pro zbývajících 34 % však neexistuje úspěšná terapie⁶.

Často se jedná pouze o symptomatickou léčbu, kterou se zmírňují projevy onemocnění (např. křeče). Některé DMP, zvláště poruchy metabolismu aminokyselin, sacharidů a mastných kyselin, jsou léčitelné speciálními dietami nebo podáváním vitaminových kofaktorů⁷. Další možností léčby může být u některých DMP transplantace orgánů, příkladem může být transplantace jater v případě poruch syntézy močoviny^{8,9}. U lysosomálních poruch se v současnosti využívá terapie náhradou enzymu^{10,11}. Další možnosti léčby DMP byly nedávno přehledně shrnuty⁴ a zahrnují např. podporu stability a funkce mutantního enzymu pomocí farmakologických chaperonů, korekce mutací přímo v genu nebo ovlivnění exprese genů na úrovni promotorů.

1.1.3 Diagnostika

Laboratorní diagnostika se provádí na třech odlišných úrovních – genů, proteinů a metabolitů. Jednotlivé úrovně mají v diagnostickém procesu u jednotlivých DMP různou specifickou hodnotu. Ideálním stavem je pak možnost identifikovat poruchu na více úrovních, což dává největší stupeň jistoty správné diagnózy^{1,5}.

Velice často se jako první uplatňuje přístup na úrovni metabolitů. Konkrétně je vyšetření založeno na detekci hromadícího se substrátu či chybějícího produktu, které vznikají následkem nefunkčního enzymu. Snahou je, aby vyšetření bylo pro pacienta co nejméně invazivní, proto se pro analýzu nejčastěji využívají vzorky tělních tekutin (moč a krev, popř. cerebrospinální tekutina). Významnou vstupní informaci může přinést i rutinní biochemické vyšetření (Tab. 2), hematologické vyšetření či zobrazovací metody⁵. Poté následují specifická vyšetření na konkrétní DMP (Tab. 3).

Tabulka č. 2: Rutinní biochemické vyšetření - biochemické symptomy u DMP (upraveno dle Šťastná⁵).

| Vyšetření | Nálezy |
|------------------|---|
| glukosa | hypoglykemie, hyperglykemie, glykosurie |
| amoniak | hyperamonemie |
| laktát | hyperlaktacidemie, hyperlaktacidurie |
| kyselina močová | hyperurikemie, hypourikemie |
| ketolátky | hyperketotické stavy, hypoketonemie nalačno |
| transaminasy | hepatocelulární dysfunkce |
| bilirubin | hyperbilirubinemie |
| cholesterol | hypercholesterolemie, hypocholesterolemie |
| triacylglyceroly | hypertriacylglycerolemie |
| kreatinin | hypokreatininemie |
| myoglobin | myoglobinemie, myoglobinurie |
| oxaláty | hyperoxalurie |
| sacharidy | melliturie |

Tabulka č. 3: Specifické biochemické vyšetření DMP (upraveno dle Šťastná⁵) (k., kyselina; VLCFA, velmi dlouhé mastné kyseliny).

| DMP | Vyšetření |
|---|--|
| Aminoacidopatie a organické acidurie | aminokyseliny, fenylalanin a tyroxin, biotinidasa, disulfidy, homocitrulin, homocystein, organické kyseliny, sukcinylaceton |
| Poruchy v metabolismu sacharidů | galaktitol, galaktosa/galaktosa-1-fosfát, glykogen, redukující látky, sacharidy |
| Poruchy v metabolismu purinů, pyrimidinů a pterinů | k. močová, k. orotová, profil purinů a pyrimidinů, uromodulin, profil pterinů |
| Mukopolysacharidosy a glykoproteinosy | mukopolysacharidy, oligosacharidy |
| Mitochondriální onemocnění | laktát, pyruvát, 3-hydroxybutyrát |
| Peroxisomální poruchy | VLCFA, k. fyтанová |
| Poruchy metabolismu kreatinu | guanidinoacetát |
| Poruchy oxidace mastných kyselin | karnitin, acylkarnitiny |

Diagnostiku DMP na úrovni metabolitů můžeme též rozdělit podle příčiny provedení vyšetření na novorozenecký a selektivní screening.

Pojmem novorozenecký screening se označuje aktivní, celoplošné vyhledávání vrozených a dědičných onemocnění či poruch v jejich časném, preklinickém stadiu dříve, než se stačí klinicky projevit a nenávratně poškodit zdraví či dokonce způsobit úmrtí novorozence¹². V České republice se od roku 1975 začala screenovat fenylketonurie¹³, postupně se přidávaly další onemocnění. Od 1. října 2009 zahrnuje novorozenecký screening v České republice detekci třinácti onemocnění¹⁴, z nichž deset patří ke skupině DMP (Tab. 4). Kumulativní prevalence všech těchto onemocnění činí 1/1200, v případě DMP je to 1/4000¹². V rámci vyšetřování DMP jsou odebírány suché kapky krve (*dry blood spots*, DBS) z patičky mezi 48.-72. hod života novorozence, které jsou následně analyzovány pomocí

tandemové hmotnostní spektrometrie (*tandem mass spectrometry*, MS/MS).

Selektivní screening se provádí u vybraných pacientů, kteří se již vyznačují klinickými příznaky, jenž mohou vést k podezření na DMP. Nejjednodušší a nejefektivnější diagnostické možnosti se nabízí na úrovni metabolitů (Tab. 3) při uplatnění různých analytických přístupů, z nichž každý umožňuje diagnostiku více onemocnění. Mezi užívané techniky se řadí již zmiňovaná tandemová hmotnostní spektrometrie, kapalinová a plynová chromatografie, kapilární elektroforeza, tenkovrstevná chromatografie či různé radiochemické a imunologické testy.

Diagnostika DMP na úrovni proteinů je spojena s měřením aktivity odpovídajících enzymů. Obvykle jsou prováděna vyšetření v krevních buňkách, hlavně leukocytech a erytrocytech, dále v kultivovaných kožních fibroblastech a pokud je to nezbytně nutné i z biopsií tkání (např. svalu). Analýzy enzymů jsou značně náročné, a protože je mezinárodně počet požadavků na jejich vyšetření za rok relativně nízký, dochází k soustředění těchto analýz pouze do několika málo laboratoří na světě.

Tabulka č. 4: Onemocnění zařazená do novorozeneckého screeningu od 1. 10. 2009 v České republice. Poruchy metabolismu aminokyselin (1. oddíl), organické acidurie (2. oddíl), poruchy metabolismu (3. oddíl) a transportu (4. oddíl) mastných kyselin, ostatní onemocnění (5. oddíl)¹⁴.

| |
|--|
| Fenylketonurie, hyperfenylalaninemie |
| Leucinoso |
| Glutarová acidurie I. typu |
| Isovalerová acidurie |
| Deficit acyl-CoA dehydrogenasy mastných kyselin (MK) se středně dlouhým řetězcem |
| Deficit 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenasy MK s dlouhým řetězcem |
| Deficit acyl-CoA dehydrogenasy MK s velmi dlouhým řetězcem |
| Deficit karnitinpalmitoyltransferasy I |
| Deficit karnitinpalmitoyltransferasy II |
| Deficit karnitinacylkarnitintranslokasy |
| Kongenitální hypotyreosa (vrozená snížená funkce štítné žlázy) |
| Kongenitální adrenální hyperplazie (vrozená nedostatečnost tvorby hormonů v nadledvinkách) |
| Cystická fibrosa (vrozená porucha ovlivňující vazkost hlenu) |

Jakmile je DMP identifikována, následuje její potvrzení na úrovni genu. To může být rozhodující pro stanovení korelace mezi genotypem a fenotypem, dále určení spolehlivosti v determinaci či vyloučení heterozygotů (především pro X-vázané poruchy), prenatální diagnostiku, popř. budoucí požadavky pro preimplantační genetickou diagnostiku¹.

1.1.4 Poruchy purinové *de novo* syntézy

Purinové nukleotidy představují základ naší genetické informace, jsou totiž základními stavebními složkami nukleových kyselin. Dále hrají významnou roli v mnoha biochemických reakcích, např. v syntéze nukleových kyselin, energetickém metabolismu či regulaci mnoha metabolických drah. Jsou syntetizovány *de novo* nebo jsou recyklovány tzv. salvage (záchrannými) drahami. Purinová *de novo* syntéza (PDNS) je velice energeticky náročná, proto je ve zralých buňkách preferováno zužitkování purinů prostřednictvím záchranných drah.

V současnosti jsou v PDNS známy genetické dysfunkce dvou enzymů. Deficit adenylosukcinátlyasy (ADSL, EC 4.3.2.2, OMIM 608222) byl poprvé popsán v roce 1984¹⁵ a dosud bylo diagnostikováno 76 pacientů s tímto onemocněním (<http://www1.lf1.cuni.cz/udmp/adsl/>). V roce 2004 byl popsán první a zároveň jediný případ pacientky s deficitem bifunkčního enzymu ATIC (OMIM 608688), který zajišťuje aktivitu AICAR-transformylasy (AICARFT, EC 2.1.2.3) a IMP-cyklohydrolasy (IMPCH, EC 3.5.4.10)¹⁶. Toto onemocnění bylo pojmenováno jako AICA-ribosidurie. Žádné z těchto dvou onemocnění není charakterizováno specifickými klinickými symptomy, i když u obou dochází zejména k postižení centrální nervové soustavy.

Klíčovým biochemickým projevem těchto poruch jsou abnormální koncentrace enzymových substrátů v buňkách a jejich exkrece do tělních tekutin v defosforylovaných (ribosidových) formách. Sukcinylpuriny sukcinyladenosin (SAdo) a 5-aminoimidazol-4-(N-sukcinylkarboxamid)ribosid (SAICAr) se hromadí u pacientů s deficitem ADSL a 5-aminoimidazol-4-karboxamidribosid (AICAr) u pacientů s AICA-ribosidurií. Vysoké koncentrace ribosidů jsou hlavně přítomny v moči a cerebrospinální tekutině (CSF, likvor). Obecně jsou pacienti s deficitem ADSL klasifikováni podle věku, kdy se u nich defekt projeví, a vážností klinických projevů. Bylo zjištěno, že stav pacienta

souvisí s poměrem SAdo/SAICAr. Čím nižší je tento poměr, tím se vyskytují vážnější projevy tohoto onemocnění.

Pro diagnostiku poruch v purinovém a pyrimidinovém metabolismu byly již uplatněny různé analytické techniky, např. vysokoúčinná kapalinová chromatografie^{17,18}, kapilární elektroforéza^{19,20}, nukleární magnetická rezonance²¹ či vysokoúčinná kapalinová chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií^{22,23,24}. Pro diagnostiku neobjevených poruch v PDNS však byla popsána pouze jediná metoda a to pomocí kapilární elektroforezy²⁵. Byly též vyvinuty screeningové metody založené na tenkovrstevné chromatografii či spektrofotometrii^{26,27,28}.

1.2 Metabolomika

1.2.1 Definice

Metabolity

Biologické systémy (organely, buňky, tkáně, orgány a organismy) fungují prostřednictvím vzájemné interakce čtyř hlavních biochemických složek – genů, transkriptů, proteinů a metabolitů^{29,30}. Metabolity mají jedinečnou pozici, protože jsou stavebními kameny pro všechny ostatní biochemické komponenty a struktury (proteiny se např. skládají z aminokyselin, geny a transkripty z nukleotidů).

Metabolity jsou definovány jako nízkomolekulární organické a anorganické sloučeniny, které jsou výchozími látkami, meziprodukty či produkty různých enzymových reakcí. Většina metabolitů je organického původu, ale neměla by se opomíjet ani důležitost anorganických metabolitů (např. železa)³¹.

Metabolity se vyznačují širokým rozsahem fyzikálně-chemických vlastností. Jejich molekulová hmotnost může být v rozsahu od několika Da až do 2000 Da (např. lipidy, malé peptidy). Metabolity se mohou lišit svou polaritou, vyskytují se vysoce polární metabolity (např. nukleotidy) nebo naopak nepolární (lipidy). Dále se odlišují metabolity kyselé (různé organické kyseliny) a alkalické povahy (např. amoniak). Metabolity se také mohou vyznačovat různou těkavostí, například v dechu přítomné látky mají nízký bod varu (např. isopren, oxid uhličitý) oproti lipidům s vysokou molekulovou hmotností.

Metabolomika

Metabolomika může být definována jako komplexní analytický přístup pro studium všech nízkomolekulárních metabolitů přítomných v daném biologickém systému³².

Metabolomika se stává v postgenomické éře klíčovou vědeckou disciplínou, která je komplementární k ostatním funkčním úrovním, tj. genomu, transkriptomu a proteomu³³. Studium metabolomu může být uplatněno samostatně nebo též ve spojení s ostatními funkčními úrovněmi – v rámci tzv. systémové biologie³⁰.

Složitost a velikost metabolomu závisí na organismu a typu vzorků. U kvasinek bylo např. odhadnuto, že jejich metabolom tvoří 1 100 metabolitů³⁴. U rostlinného metabolomu se očekává, že vytváří mnohem větší komplex. Dokonce se odhaduje, že rostlinná říše obsahuje více než 200 000 různých metabolitů³⁵. V případě lidského metabolomu se v současnosti předpokládá, že zahrnuje více než 40 000 látek³⁶. Součástí jsou různé aminokyseliny, nukleové kyseliny, cukry, organické kyseliny, peptidy, lipidy, vitaminy, minerály, potravinové doplňky, léčiva, toxiny, škodliviny a téměř jakékoliv ostatní látky (s molekulovou hmotností < 2000 Da), které lidé stráví, metabolizují, katabolizují či přicházejí s nimi do kontaktu³⁶.

Metabolom může být též klasifikován podle původu metabolitů. Endometabolom je spojován s intracelulárním metabolismem, na rozdíl od exometabolomu, který odráží extracelulární metabolom.

U člověka může být metabolom popsán v různých typech vzorků. Jedná se např. o sérum (nebo plazmu), moč, CSF, dech, slzy, sliny či různé tkáně. Sérum či moč reflektuje fyziologické procesy mnoha tkání a orgánů. Tato skutečnost přináší výhodu ve zkoumání těchto snadno dostupných tělních tekutin, kdy je možné získat metabolický obraz lidského organismu jako celku. Důležitou roli hraje též interakce mezi lidskými metabolity a metabolomem střevní mikroflóry³⁰.

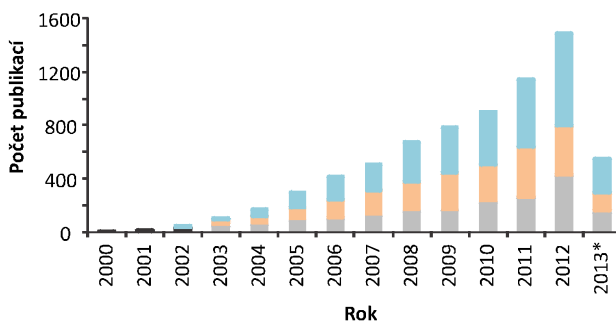
Metabolom je složen z metabolitů, které pochází z řady procesů. Metabolismus zahrnuje jednak katabolismus (rozklad a tvorba energie) a anabolismus (biosyntéza) metabolitů. Z toho hlediska se rozlišují endogenní metabolity, které jsou syntetizovány a spotřebovány uvnitř biologického systému, od exogenních metabolitů (např. léky a živiny z potravy), které jsou do biologického systému dopraveny a následně metabolizovány³⁰.

1.2.2 Historie metabolomiky

Již v minulosti existovaly myšlenky, že změny v tkáních a biologických tekutinách mohou svědčit o různých nemocech. V letech 2000-1500 před Kristem tradiční čínští doktoři používali mravence k detekci vysokých hladin glukosy v moči, identifikovali tak diabetické pacienty²⁹. Ve středověku zase byly různé poruchy spojovány s charakteristickými vlastnostmi vzorků močí (barva, chuť a vůně)³⁷. Důležitým krokem na cestě k moderní metabolomice bylo vyvinutí prvního hmotnostního spektrometru J. J. Thomsonem v roce 1905²⁹.

Počátky komplexní studie metabolitů byly pozorovány v 60. a 70. letech 20. století, kdy docházelo k rychlému technologickému rozvoji. Poprvé bylo uplatněno spojení technik plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (*gas chromatography-mass spectrometry*, GC-MS) pro získání metabolitových profilů lidské krve a výparů moče^{38,39}. Současně se rychle rozvíjela i technologie spektroskopie nukleární magnetické rezonance (*nuclear magnetic resonance*, NMR), která byla objevena ve 40. letech 20. století. V 80. letech byla tato technika již dostatečně citlivá k identifikování metabolitů v biologických vzorcích⁴⁰.

Pojem „metabolom“ byl poprvé definován v roce 1998 dvěma výzkumnými skupinami, konkrétně Oliver a spol.⁴¹ a Ferenci a spol.⁴². Tyto dvě publikace jsou považovány za průkopnické články v metabonomice, respektive v metabolomice³⁰. V roce 1999 dále Nicholson a spol.⁴³ publikovali práci definující metabonomiku a uplatnění NMR při studiu lidských tělních tekutin. V roce 2000 pak Fiehn a spol. publikovali výzkum definující použití GC-MS ve studiu metabolomu rostlin³⁵. Od té doby počet publikací zabývajících se metabolomickou analýzou významně roste (Obr. 1), většina těchto studií jsou s uplatněním MS nebo NMR spektroskopie. Ve srovnání s proteomikou a transkriptomikou je však metabolomika stále poměrně mladým vědním oborem.



Obrázek č. 1: Vzrůst počtu publikací vyhledaných na Web of Knowledge zabývajících se metabolikou (použití hesel metabolomics* OR metabonomics*). Modře jsou vyznačeny publikace s aplikací MS, oranžově NMR a šedou barvou ostatní (*aktuálně do 23. 6. 2013)

1.2.3 Metabolomické strategie

Objasnění genomu, transkriptomu a proteomu je založeno na cílené analýze biopolymerů složených ze čtyř rozdílných nukleotidů (genom a transkriptom) nebo 22 aminokyselin (proteom). Tyto sloučeniny si jsou chemicky vysoce podobné, což v některých případech usnadňuje jejich studium. Naproti tomu metabolom zahrnuje spektrum značně rozdílných chemických sloučenin. Tato komplexnost pak vede ke skutečnosti, že je prakticky nemožné v jedné analýze určit kompletní metabolom. Je proto důležité studovat metabolom s předchozí účinnou přípravou vzorku a vhodnou extrakcí v kombinaci s rozdílnými analytickými technikami, to vše za účelem dosažení co nejvíce informací⁴⁴. Různé strategie, které jsou používány v metabolomických experimentech, shrnuje Tab. 5.

Tabulka č. 5: Definice termínů a strategií používaných v metabolických experimentech (modifikováno dle Dunn³⁰)

| Strategie | Vysvětlení |
|------------------------------------|---|
| <i>Metabolomika</i> | Studium kvantitativního složení metabolitů v biologickém systému a změn v koncentracích metabolitů nebo toků spojených s genetickými či environmentálními poruchami. Původně se jedná o studie typicky holistické, ačkoliv pojem metabolomika zahrnuje i cílené studie. |
| <i>Metabonomika</i> | Kvantitativní měření dynamické metabolické odpovědi živého organismu na patofyziologické podněty nebo genetické modifikace. Často (ačkoli ne výhradně) zaměřené na analýzu tělních tekutin pro sledování systémového metabolismu. |
| <i>Metabolické profilování</i> | Holistická studie složení metabolitů biologického systému za účelem definování relativních odlišností při měření odezvy či změny v koncentracích metabolitů. Je vyžadován odpovídající návrh experimentu a analytické strategie k zajištění detekce stovek až tisíců metabolitů validním a robustním způsobem. Tento termín se často rovná <i>metabolitovému profilování</i> , které vzniklo a bylo uplatněno ve farmaceutickém průmyslu při studiu metabolismu léčiv. |
| <i>Metabolitový fingerprinting</i> | Komplexní analýza intracelulárního metabolomu získaná typicky pomocí holistických a rychlých analytických přístupů. Je analyzován kompletní vzorek nebo surový extrakt. Kvantifikace a chemická identifikace není zpravidla dostupná. Je aplikována jako screeningová strategie pro stovky až tisíce vzorků před dalšími cílenými studiemi zahrnující metabolické profilování. Poskytuje „snímek“ metabolismu v jednom okamžiku. |
| <i>Metabolický footprinting</i> | Komplexní analýza extracelulárního metabolomu, tzn. metabolitů vylučovaných z biologického systému (zpravidla z buňky a tkáně), nebo změn v metabolitech spotřebovaných z exometabolomu. Metabolom měří „otisk nohy“ (footprint) v intracelulárním metabolismu vlivem extracelulárního prostředí. Výhodou je zpravidla snadnější získání a příprava vzorků než v případě buněk a tkání. Poskytuje zobrazení metabolických změn vyskytujících se v průběhu času. Za metabolické footprinty se mohou považovat sérum, moč, dech či CSF. |
| <i>Cílená analýza</i> | Kvantitativní analýza malého počtu metabolitů, které jsou si zpravidla podobné (chemicky či biologicky). Analytické metody zahrnují separaci analytů od matrice vzorku, též se provádí sestavení kalibračních křivek a kvantifikace metabolitů. |

1.2.4 Analytické techniky

Z důvodu široké rozmanitosti fyzikálně-chemických vlastností metabolitů a jejich rozdílným koncentračním rozsahům v různých biologických materiálech je zkoumání metabolomu velice náročné a je zapotřebí mnoha strategií, které umožní jeho komplexní analýzu. To zahrnuje použití různých analytických technik. Mezi nejvíce používané se řadí NMR spektroskopie a MS často ve spojení s chromatografií. Tato práce je zaměřena na uplatnění kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií (*liquid chromatography-mass spectrometry*, LC-MS), proto jsou těmto technikám věnovány následující odstavce.

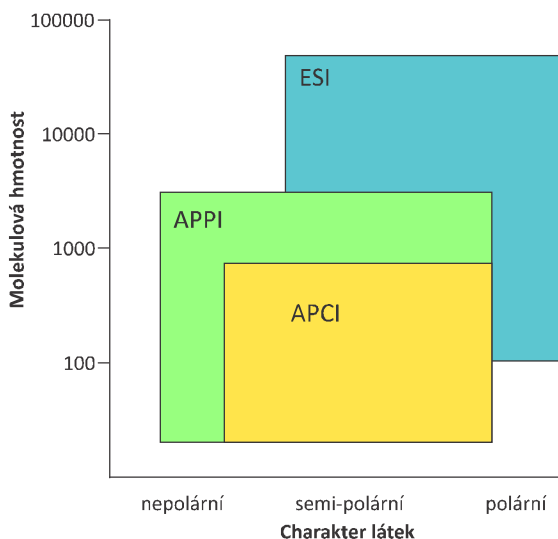
Vysokoučinná kapalinová chromatografie (*high performance liquid chromatography*, HPLC) je společně s GC v současnosti nejvíce používanou separační technikou. Spojením s hmotnostní spektrometrií se pak stává účinným nástrojem, který dovoluje separaci a charakterizaci mnoha metabolitů. HPLC může být použita k separaci široké škály sloučenin, a to jak látek hydrofilní, tak i hydrofobní povahy, solí, kyselin, bází apod., protože není limitována pouze jedním mechanismem separace. HPLC může být zaměřena na separaci specifické třídy sloučenin, přičemž se k tomu využívají různé systémy např. na reverzní fázi⁴⁵, normální fázi či hydrofilní interakční chromatografie (*hydrophilic interaction liquid chromatography*, HILIC)⁴⁶ nebo se využívá jejich kombinace⁴⁷.

Většina publikovaných metabolomických studií používá konvenční HPLC systém s pumpami, které jsou omezeny tlakem 400 bar, a kolonami mající 3–5 μm částice, které poskytují relativně málo účinný systém. Se snahou o vyšší účinnost byly vyvíjeny separační kolony obsahující částice menší než 2 μm , s tím však souvisel nutný vývoj přístrojů, které by umožnily separaci při vysokých tlacích, které vznikají při použití kolon s takto malými částicemi. Byla vyvinuta tzv. ultraúčinná kapalinová chromatografie (*ultra high performance liquid*

chromatography, UHPLC), která dokáže pracovat při tlacích až 1000 bar. Výhodou ve srovnání s konvenční HPLC je zkrácení doby analýzy, zvýšení rozlišení, vyšší senzitivita a reprodukovatelnost. Dosud bylo publikováno několik klinických studií, v nichž byla UHPLC uplatněna. Příkladem může být studie, kde byla využita k metabolické analýze moči k porovnání pacientů s rakovinou tlustého střeva⁴⁸.

Využití LC-MS v metabolomice již bylo několikrát přehledně shrnuto⁴⁹⁻⁵². Nejvíce je využívána ionizace elektrosprejem (*electrospray ionization*, ESI), chemická ionizace za atmosférického tlaku (*atmospheric-pressure chemical ionization*, APCI) a fotoionizace za atmosférického tlaku (*atmospheric pressure photoionization*, APPI). V důsledku rozličných chemických vlastností metabolitů se často vyžaduje analyzovat biologický vzorek v pozitivních i negativních módech k docílení pokrytí celého metabolomu.

Ionizace elektrosprejem je nejvíce vhodná pro semi-polární a polární látky (Obr. 2), užívá se ve většině metabolických studií. APCI a APPI se používají především pro látky nepolární (Obr. 2), jako jsou lipidy. APCI ionizace byla např. využita při analýze steroidních hormonů v séru za účelem diagnostiky a monitorování endokrinních onemocnění⁵³. V dnešní době se stává trendem kombinace dvou ionizačních technik, především se jedná o kombinace ESI a APCI nebo ESI a APPI.

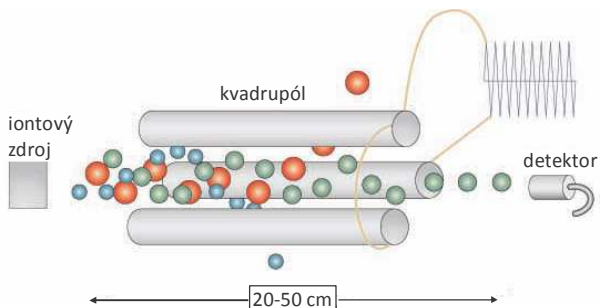


Obrázek č. 2: Rozsah použití ionizačních technik (ESI, APPI a APCI) z hlediska molekulové hmotnosti a polarity látky (upraveno dle Zhou⁵⁰)

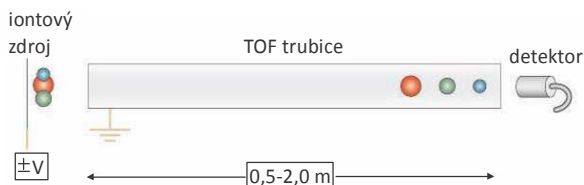
Hmotnostní analyzátoři mohou být rozděleny do několika typů, mezi něž patří kvadrupól (Q) (Obr. 3), iontová past (*ion trap*, IT), průletový analyzátor (*time-of-flight analyzer*, TOF) (Obr. 4), orbitální past a iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací (*Fourier transform ion cyclotron resonance*, FT-ICR). Hybridní či tandemové hmotnostní spektrometry jsou pak kombinací dvou nebo více analyzátorů.

LC-MS umožňuje cílenou i necílenou analýzu metabolomu. Při cílené analýze se využívají hlavně IT a trojitě kvadrupóly (QqQ), kde druhý kvadrupól slouží jako kolizní cela. Tento systém je zde uplatňován hlavně díky svým možnostem kvantifikace, nejvíce se využívá analýz v tzv. *multiple-reaction monitoring* (MRM, sledování produktu rozpadu molekulárního iontu) módu (Obr. 5). Příkladem

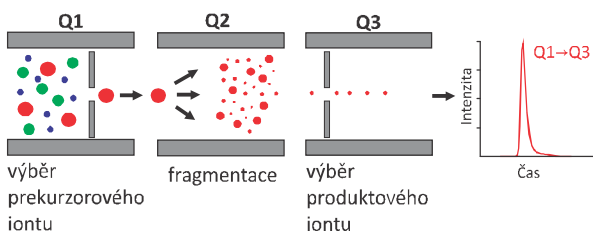
může být studie, která se zaměřila na hodnocení methylace argininu a kardiovaskulárních rizik⁵⁴.



Obrázek č. 3: Schéma kvadrupólového analyzátoru; správná velikost frekvence a stejnosměrného napětí aplikovaného na tyče dovolí iontům s konkrétním poměrem m/z udržet stabilní trajektorii od iontového zdroje k detektoru, zatímco ionty s odlišným poměrem m/z jsou zachyceny na tyčích (upraveno dle Glish a Vachet⁵⁵).



Obrázek č. 4: Schéma TOF analyzátoru; ionty s odlišným poměrem m/z mají různou rychlost, proto dolétají k detektoru v různých časech (upraveno dle Glish a Vachet⁵⁵).



Obrázek č. 5: Schéma detekce v MRM režimu pomocí trojitého kvadrupólu. Nejdříve dochází k výběru konkrétního molekulárního (tzv. rodičovského) iontu v prvním kvadrupólu (Q1), poté k jeho fragmentaci v kolizní cele (Q2) a následné detekci specifického fragmentu (tzv. dceřiného iontu) v třetím kvadrupólu (Q3).

Necílený přístup lze provádět především pomocí technik TOF, orbitální pasti a FT-ICR. Všechny tyto techniky charakterizuje vysoká rozlišovací schopnost a také vysoká přesnost určení hmoty (v současnosti i nižší než 3 ppm). Tento přístup nám umožňuje identifikovat nové markery různých onemocnění, např. některých typů rakoviny⁵⁶, diabetu⁵⁷, či ischemických chorob srdečních⁵⁸. Dalším příkladem může být i využití v diagnostice dědičných metabolických poruch. Skupina prof. Siuzdaka⁵⁹ ukázala užitečnost necílené metabolomiky pro rozlišení pacientů s methylmalonovou a propionovou acidemií. Touto studií potvrdili, že společným markerem těchto onemocnění je propionylkarnitin.

V některých studiích jsou použity oba zmiňované přístupy. Příkladem může být studie, která se zabývala identifikací sérových biomarkerů rakoviny tlustého střeva⁶⁰. Necílená analýza byla uplatněna prostřednictvím FT-ICR a cílená pomocí Q-TOF a QqQ. Bylo zjištěno, že novými specifickými markery tohoto onemocnění mohou být snížené hladiny hydroxylovaných mastných kyselin s velmi dlouhým řetězcem.

I když se u většiny metabolomických analýzách využívá před hmotnostní detekcí chromatografická separace, byly též publikovány studie, kdy byla hmotnostní spektrometrie použita samostatně⁶¹. Příkladem mohou být studie zabývající se dědičnými metabolickými poruchami^{62,63} či kardiovaskulárními chorobami⁶⁴.

1.2.5 Zpracování dat

Předúprava dat

Důležitou součástí metabolomických experimentů je zpracování velkého množství naměřených dat, které se provádí pomocí specializovaných softwarů (např. R, Statistica, MZmine). V případě cíleného přístupu je situace jednodušší v tom, že se vyhodnocují pouze předem definované metabolity. U necíleného přístupu se nejdříve provádí hledání píků v jednotlivých analýzách vzorků, poté následuje jejich vzájemné srovnání, tzv. alignment, kterým se synchronizují nalezené píky (tzv. features, znaky) adjustací retečních časů a m/z .

U obou přístupů je potřeba data konvertovat do tvaru matice $X(M \times N)$, kde M je počet metabolitů (nebo znaků) a N je počet biologických vzorků. Před statistickou analýzou jsou data dále normalizována, škálována nebo transformována³⁰.

Statistické vyhodnocení

Statistické nástroje lze rozdělit do dvou skupin, na nesupervizované („unsupervised“) a supervizované („supervised“). První skupina zahrnuje zejména metody redukce dimenze dat a metody shlukovací. Nejpoužívanější metodou redukující data je analýza hlavních komponent (*principal component analysis*, PCA). V tomto případě se jedná o transformaci původních dat do nové soustavy malého počtu proměnných (hlavní komponenty, *principal components*, PC), které však vystihují velké množství původní variability a navzájem nekorelují, a tudíž poskytují nezávislé informace o systému. Grafickým výstupem PCA je rozptylový diagram komponentních skór (score plot, zobrazuje průmět objektů do roviny zvolených PC) a graf komponentních zátěží (loadings plot, vyjadřuje vztah proměnných k novým PC). Jinou možností je tzv. biplot, kde jsou kombinovány oba předchozí způsoby^{65,66}.

Do nesupervizovaných metod patří též shluková analýza (*cluster analysis*, CA), pomocí níž se vyhledávají podobnosti mezi jednotlivými objekty nebo proměnnými na základě jejich definované vzdálenosti v multidimenzionálním prostoru. Grafickým výstupem CA je tzv. dendrogram, vývojový strom zobrazující průběh shlukování^{65,66}.

U supervizovaných postupů se kromě matice \mathbf{X} pracuje i s \mathbf{Y} maticí tzv. prediktorů, tj. známá příslušnost objektu k dané skupině. Pro lidskou metabolomiku se může jednat např. o věk, krevní tlak, pohlaví nebo rozdělení do skupin zdravý/nemocný. Úkolem těchto metod je zejména problém regrese (numerický výstup) a klasifikace (identifikace tříd). Metody částečných nejmenších čtverců (*partial least square*, PLS) a její varianta ortogonální-PLS (OPLS) zahrnují mnohonásobné lineárně regresní postupy založené na PCA, které kvantifikují vztah mezi \mathbf{X} a \mathbf{Y} . V případě klasifikace existují příslušné metody diskriminační analýzy (*discriminant analysis*, DA) – PLS-DA, OPLS-DA^{65,66}.

2 CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE

1. Diagnostika defektů purinové *de novo* syntézy pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií
2. Diagnostika dědičných metabolických poruch cílenou metabolomickou analýzou plazmy metodou přímého nástřiku ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií
3. Diagnostika dědičných metabolických poruch necíleným metabolomickým přístupem prostřednictvím technik vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií s vysokým rozlišením
4. Vývoj cílené metabolomické metody pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií pro její využití v klinických studiích

3 MATERIÁL A METODY

3.1 Diagnostika defektů purinové *de novo* syntézy

3.1.1 Studované ribosidy

AICAr byl zakoupen u firmy Toronto Research Chemicals Inc. (North York, Kanada). Ostatní ribosidy musely být syntetizovány, protože nejsou komerčně dostupné. 5-formaminoimidazol-4-karboxamidribosid (FAICAr), aminoimidazolkarboxyribosid (CAIr), 5-aminoimidazolribosid (Alr) byly syntetizovány a přečišťovány podle dříve popsaných postupů⁶⁷. FAICAr byl připraven formylací AICAr, CAIr alkalickou hydrolyzou AICAr a Alr dekarboxylací CAIr. Sukcinylpuriny SAICAr a SAdo byly syntetizovány pomocí rekombinantního enzymu⁶⁸ a obdrženy od Ing. Marie Zikánové, Ph.D. (Ústav dědičných metabolických poruch v Praze, Všeobecná fakultní nemocnice Praha). Autorka jí tímto děkuje za poskytnutí.

Stabilní izotopově značené standardy odpovídající studovaným ribosidům též nejsou dostupné pro žádné studované ribosidy, proto byl jako interní standard vybrán [1'-¹³C]adenosin (13C-Ado) a to z důvodu jeho podobnosti ve struktuře a fragmentačním chování ve srovnání se studovanými ribosidy. Byl zakoupen u firmy Cambridge Isotope Laboratories Inc (Andover, MA, USA).

3.1.2 Příprava vzorků

Vzorky močí byly naředěny mobilní fází A na finální koncentraci kreatininu 0,5 mmol/l, vortexovány (15 s) a centrifugovány (5 min, 14 500 x g).

Mozkové tkáně byly extrahovány použitím methanol-chloroform-vody⁶⁹. Zmražené vzorky (Tab. 6) byly rozmělněny ve 3 ml směsi methanol/chloroform (1:1 v/v), dále byl přidán 1 ml chloroformu

a 1 ml vody. Následně byly vzorky sonifikovány (15 min) a centrifugovány (20 min, 10 000 x g). Horní vrstva methanol/voda byla odpipetována, odfoukána pod dusíkem a rozpuštěna ve 100 µl vody.

Tabulka č. 6: Přehled analyzovaných vzorků mozkových tkání

| Pacient | Typ vzorku | Mokrá váha vzorku (mg) |
|---------|--------------|------------------------|
| A | bílá hmota | 22,2 |
| A | šedá hmota | 41,3 |
| D | mozková tkáň | 29,0 |

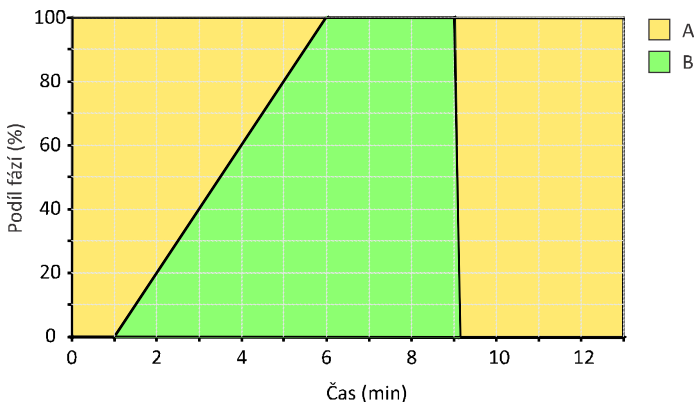
Vzorky CSF (50 µl) byly deproteinovány 100 µl trichloroctové kyseliny (TCA, 1 mol/l), sonifikovány (1 min), vortexovány (1 min) a centrifugovány (10 min, 14 500 x g). TCA byla poté ze vzorku dvakrát zpětně extrahována 1 ml diethyletheru (20 s při vortexování). Zbytek etheru byl odpařen v digestoři (15 min) při laboratorní teplotě.

Ke každému vzorku (90 µl) bylo přidáno 10 µl interního standardu ¹³C-Ado (500 µmol/l).

3.1.3 LC-MS/MS metoda

Analýza 6 ribosidů vztažených k deficitům v purinové *de novo* syntéze (Alr, CAIr, SAICAr, AICAr, FAICAr a SAdo) byla provedena pomocí HPLC (Ultimate 3000, Dionex) ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií (API 4000, AB Sciex) za použití ionizace elektrosprejem. Chromatografická separace probíhala na koloně s reverzní fází Kinetex 2,6 µm, C18, 2,1 x 150 mm (Phenomenex, Torrance, CA) při 40 °C s aplikací gradientové eluce při průtoku 0,15 ml/min. Mobilní fáze A obsahovala mravenčan amonný (20 mmol/l; pH 3,5), mobilní fáze B se skládala z mobilní fáze A a methanolu (1: 1, v/v). Gradientová eluce (Obr. 6) začala s 0 % B, 1 min po nástřihu se začal během 5 min zvyšovat podíl B na 100 % B. Tento

stav byl konstantní po dobu 3 min, poté byl během 0,1 min snížen podíl B na 0 %. Kolona byla před dalším nástřikem ekvilibrována po dobu 3,9 min. Celková doba analýzy byla 13 min. Nástřik vzorku činil 5 μ l. Látky byly analyzovány pomocí pozitivní ionizace v MRM módu. Princip postupu MS optimalizace je podrobně uveden v kapitole 3.4.3.



Obrázek č. 6: Průběh gradientové eluce při analýze ribosidů purinové *de novo* syntézy.

3.1.4 Validace metody

Pro kvantifikaci všech studovaných ribosidů byl použit stabilní izotopově značený interní standard ^{13}C -Ado, byly vyhodnocovány poměry ploch analytu vůči internímu standardu. Linearita byla zjišťována použitím směsného vzorku moče (tzv. poolovaná moč) s přidáním každého ribosidu v rozsahu koncentrací 1–500 μ mol/l. Ke stanovení opakovatelnosti a mezilehlé preciznosti byly ke směsné moči přidány ribosidy v koncentraci 0, 5, 15 and 50 μ mol/l. Návratnosti byly hodnoceny analýzou 8 odlišných vzorků močí v triplikátu před a po přidání každého ribosidu v koncentraci 5 a 15 μ mol/l.

3.2 Použití cíleného metabolického přístupu pro diagnostiku DMP

3.2.1 Chemikálie

Ethanol (HPLC), methanol (LC-MS), voda (LC-MS), pyridin (p. a.), octan amonný (LC-MS), fosfátový pufr (p. a.) a fenylisothiokyanát byly zakoupeny u firmy Sigma-Aldrich (St. Louis, USA).

3.2.2 Vzorky plazem

Jako kontrolní vzorky byly použity vzorky plazem od pacientů, které byly zaslány do Laboratoře dědičných metabolických poruch s podezřením na DMP, ale u nichž byla DMP vyloučena. Dále byly analyzovány vzorky plazem od pacientů, u nichž byla DMP předem potvrzena na základě biochemického vyšetření, měření enzymové aktivity a molekulárně-genetické analýzy. Vzorky plazem byly uchovávány při -20 °C. Před vlastní přípravou byly vzorky roztáty při pokojové teplotě.

3.2.3 Cílená metabolická analýza

Cílená metabolická analýza byla provedena pomocí AbsoluteIDQ p150 kitu (BIOCRATES Life Sciences AG, Rakousko). Vzorky byly zpracovány podle postupu uvedeném v uživatelském návodu. Zpracování vzorku bylo provedeno na 96-jamkové mikrotitrační destičce s filtrem obsahujícím 27 izotopově značených interních standardů. Vzorky plazem (10 µl) byly derivatizovány fenylisothiokyanátem a extrahovány organickým rozpouštědlem. Vzorky byly analyzovány metodou přímého nástřiku ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií za použití elektrosprejové ionizace (QTRAP 5500, AB SCIEX, USA). Detekce probíhala v MRM režimu v pozitivním i negativním módu, nástřik vzorku činil v obou případech 20 µl.

Analýzy byly vyhodnocovány použitím softwaru MetIQ, který byl součástí AbsoluteIDQ kitu. Celkem bylo kvantifikováno 163 látek z různých tříd metabolitů, konkrétně se jednalo o 14 aminokyselin, sumu hexos, 41 acylovaných karnitinů, 15 sfingolipidů a 92 glycerofosfolipidů.

3.2.4 Statistické vyhodnocení

Data byla statisticky zpracována použitím softwaru R. Před statistickým vyhodnocením byla na data aplikována „centred logratio“ transformace (CLR)⁷⁰. Byly aplikovány statistické nástroje PCA a klastrová analýza.

3.3 Použití necíleného metabolického přístupu pro diagnostiku DMP

3.3.1 Biologický materiál

Vzorky DBS byly připraveny stejným způsobem, jako se provádí při novorozeneckém screeningu v Laboratoři dědičných metabolických poruch. K terčíku o průměru 3,2 mm (odpovídá cca 4 μ l krve) DBS bylo přidáno 100 μ l methanolu obsahující vybrané značené aminokyseliny a acylované karnitiny (Tab. 7). Extrakce probíhala po dobu 30 min na vortexu, poté byl vzorek centrifugován (10 min, 14 500 x g) a supernatant analyzován. Nástřik vzorku činil 10 μ l.

Vzorky močí byly ředěny směsí mobilních fází A a B (1:1) na koncentraci kreatininu 0,5 mmol/l. Byly nastříkovány 2 μ l naředěného vzorku moče.

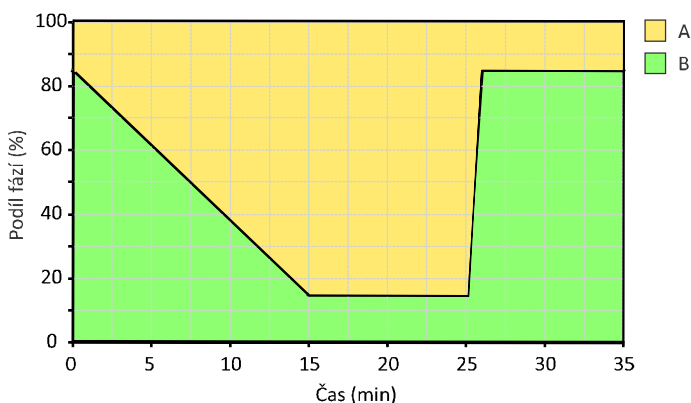
Tabulka č. 7: Přehled značených standardů přítomných v extrakčním činidle používaného v rámci novorozeneckého screeningu

| Značené aminokyseliny | Koncentrace látky ve vzorku (μmol/l) | Značené karnitiny | Koncentrace látky ve vzorku (μmol/l) |
|-----------------------|--------------------------------------|-------------------|--------------------------------------|
| Alanin-D4 | 402 | C0-D9 | 24,03 |
| Arginin-D7 | 99 | C2- D3 | 10,32 |
| Aspartát-D3 | 409 | C3- D3 | 2,71 |
| Citrullin-D2 | 105 | C4- D3 | 1,30 |
| Glutamát-D5 | 377 | C5- D3 | 1,39 |
| Glycin-13C2, 15N | 699 | C5DC-D6 | 1,04 |
| Leucin-D3 | 410 | C6- D3 | 1,32 |
| Methionin-D3 | 153 | C8- D3 | 1,33 |
| Ornithin-D6 | 244 | C10-D3 | 1,43 |
| Fenylalanin-D5 | 206 | C12-D3 | 1,32 |
| Tyrosin-D4 | 287 | C14-D3 | 1,22 |
| Valin-D8 | 305 | C16-D3 | 2,56 |
| | | C18-D3 | 2,38 |

3.3.2 Necílená metabolická analýza

Separace byly provedeny pomocí UHPLC Agilent 1200 Series na aminopropylové koloně Luna 3 μm NH₂, 2×150 mm (Phenomenex, Torrance, CA), jednalo se o modifikaci dříve publikované metody^{71,72}. Mobilní fáze A se skládala z octanu amonného (20 mmol/l, pH 9,45) a mobilní fáze B z acetonitrilu. Byla použita lineární gradientová eluce (Obr. 7) při průtoku 0,25 ml/min. Analýza začala s 85 % B, podíl B byl snižován po dobu 15 min na 15 %. Tento stav byl udržován po dobu 10 min, poté byl zvýšen během 1 min na 85 % B. Před dalším nástřikem byla kolona ekvilibrována po dobu 9 min. Celková doba analýzy činila 35 min.

Detekce s přesností 5 ppm a rozlišením až 20 000 byla provedena pomocí Q-TOF Agilent G6520A s ionizací elektrosprejem v pozitivním módu.



Obrazek č. 7: Průběh gradientové eluce při necílené metabolické analýze.

3.3.3 Zpracování dat a statistické vyhodnocení

Naměřená data byla zpracována a statisticky vyhodnocena pomocí softwaru R (www.r-project.org). Data byla extrahována z původních souborů (mzdata) pomocí XCMS knihovny R (<http://metlin.scripps.edu/xcms/>). Po extrakci byla data korigována na základní linii, normalizována na celkový iontový proud (*total ion current*, TIC) a statisticky normována (centrována a škálována).

Data byla statisticky vyhodnocena pomocí PCA, klastrové analýzy a diskriminační analýzy založené na PCA (PCA-DA). Na základě PLS regrese pak byly zjištěny nejvíce diskriminující látky. Identifikace metabolitů na základě přesné hmoty byla provedena pomocí PUTMEDID_LCMS⁷³ a též pomocí internetových databází METLIN (<http://metlin.scripps.edu>) a HMDB (*Human metabolome database*, <http://www.hmdb.ca>). Konfirmace identifikovaných metabolitů byla poté prováděna na základě srovnání retenčního chování s příslušným standardem.

3.4 Vývoj a aplikace cílené metabolické metody

3.4.1 Tvorba databáze OIMeDa

Databáze OIMeDa (tzn. Olomoucká metabolická databáze) zprvu vycházela z KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) databáze (<http://www.kegg.com>), kdy byly do databáze OIMeDa vloženy všechny metabolity účastníci se jednotlivých metabolismů, jako je např. metabolismus cukrů, nukleotidů, aminokyselin či energetický metabolismus. U každého metabolitu bylo současně uvedeno jeho příslušné KEGG číslo a metabolismy, kterých se účastní. Poté následoval výběr metabolitů, které se vyskytují v lidském organismu.

Vybrané metabolity byly následně vyhledány v databázi HMDB za účelem zjištění HMDB čísla a tím lepší charakterizaci daného metabolitu. OIMeDa byla též doplněna o metabolity, které jsou spojeny s určitou metabolickou poruchou a zároveň nebyly zahrnuty v KEGG databázi (neměly KEGG číslo). Do databáze byly též doplněny další informace o metabolitech, jako je např. sumární vzorec, chemická struktura, InChI kód a v některých případech i dostupná MS spektra.

Standardům metabolitů přítomným v naší laboratoři a zároveň se vyskytujícím v databázi OIMeDa bylo přiřazeno dle pořadí interní číslo „STxxx“ (např. valin má číslo ST001) a zapsáno do databáze. Následně byla u ostatních látek vyhledána jejich dostupnost u různých poskytovatelů, především se jednalo o firmu Sigma Aldrich. Byly doplněny informace o katalogovém čísle, množství či čistotě daného standardu. Po objednání a dodání bylo každému standardu přiřazeno číslo „STxxx“ a bylo zapsáno přesné umístění originálního produktu dle doporučeného způsobu uchovávání. Standardy, které se mohly uchovávat při pokojové teplotě, se uložily do označeného boxu P1. Označení boxu P2 znamenalo uchovávání při 4 °C a P3 při -20 °C. Pro snadnější hledání byly standardy uchovávány v boxech v oddělených zásuvkách označených písmeny (A, B, C atd.). To

znamená, že označení přesného umístění originálního standardu pak mohlo být např. P2-G.

Do databáze OIMeDa byly také dopisovány další informace z různých publikovaných studií. K jednotlivým metabolitům byl doplněn například biologický materiál (konkrétní tělní tekutiny, buňky), ve kterém byly již identifikovány, případně jakou technikou byly analyzovány s definovaným limitem detekce.

3.4.2 Příprava a uchování standardů

Nejdříve byla u každé látky označené číslem „STxxx“ vyhledána informace o její rozpustnosti, většinou se jednalo o látky polární, tudíž rozpustné ve vodě. Standardy látek byly poté naváženy (dle vypočítané navážky) a rozpuštěny v daném objemu příslušného rozpouštědla. V odměrných baňkách byly připraveny zásobní roztoky standardů s výslednou koncentrací 100 $\mu\text{mol/l}$.

Dále byl vytvořen systém pro uskladnění již rozpuštěných standardů při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Připravené zásobní roztoky byly vždy rozděleny na menší alikvoty. Bylo připraveno dvanáct 200 μl -zkumavek, do každé bylo napipetováno 200 μl zásobního roztoku, všechny tyto zkumavky byly poté vloženy do jedné 15ml-falkonky. Dále bylo do pěti šroubovacích 2ml-zkumavek napipetováno 1,7 ml zásobního roztoku. Všechny standardy byly uchovávány při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ v papírových boxech, které byly označeny podle toho, které standardy přesně obsahovaly (Obr. 8). Jedna krabička vždy obsahovala dvacet připravených standardů – buď po pěti 2ml-zkumavkách (celkem 100 zkumavek) a dále ve 20 falkonkách, každá s vloženými dvanácti malými zkumavkami. Všechny zkumavky (2ml a 15 ml) byly označeny štítkem s čárovým kódem a odpovídajícím číslem „STxxx“, který obsahoval informaci o látce a jejím uložení (Obr. 9).

METABOLOMIKA, zásobní standardy
200 µl ependorfky; 01/02/11/ST201-220

METABOLOMIKA, zásobní standardy
2 ml zkumavky; 01/02/11/ST201-220

Obrázek č. 8: Ukázka označení papírových boxů pro uchovávání zásobních roztoků standardů o koncentraci 100 µmol/l ve 200 ul-ependorfkách a 2 ml-zkumavkách. Konkrétně tento box se standardy ST201-ST220 obsahoval převážně purinové a pyrimidinové látky.



ST206

Obrázek č. 9: Ilustrativní ukázka označení zkumavek se zásobním roztokem standardu o koncentraci 100 µmol/l štítkem s čárovým kódem a odpovídajícím číslem „STxxx“, v tomto případě se jedná o látku ST206 - adenin.

3.4.3 Optimalizace MS parametrů

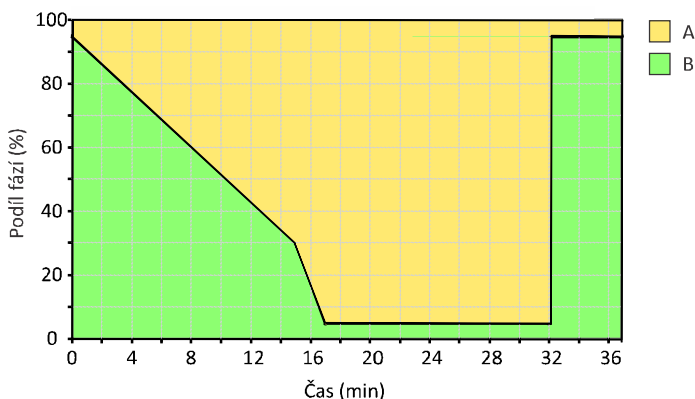
K měření byl použit tandemový hmotnostní spektrometr QTRAP 5500 (AB Sciex, Foster City, CA, USA). Za účelem optimalizace MS parametrů pro každou látku byly vytvořeny směsi deseti strukturně podobných látek (aminokyseliny, organické kyseliny, nukleotidy atd.). Složení bylo zvoleno tak, aby se v jedné směsi nevyskytovaly látky s podobnou monoizotopovou hmotností (rozdíl alespoň 2 Da). Tyto směsi byly naředěny alkalickým pufrům (20 mmol/l octan amonný, pH 9,45; acetonitril; 1 : 1), dle potřeby buď na výslednou koncentraci 0,1 či 1 µmol/l. Takto připravené směsi byly dávkovány pomocí syringe

pumpy (součástí hmotnostního spektrometru) o průtoku 7 μ l/min přímo do iontového zdroje MS. Na základě monoizotopových hmotností se hledalo zpravidla pět nejintenzivnějších MRM přechodů pro každou studovanou látku. Přístroj provedl také automatickou optimalizaci podmínek, při nichž tyto přechody vznikaly. Byl optimalizován deklasterační potenciál (*declustering potential*, DP), kolizní energie (*collision energy*, CE), vstupní potenciál (*entrance potential*, EP) a výstupní potenciál kolizní cely (*collision cell exit potential*, CXP). Optimalizace studovaných látek probíhala v pozitivním i negativním módu. Naměřená spektra jednotlivých metabolitů byla uložena do databáze OIMeDa.

3.4.4 Optimalizace HPLC podmínek

Pro analýzu studovaných látek pomocí HPLC byla modifikována již dříve publikovaná metoda^{71,72}. Bylo optimalizováno pH mobilních fází, podmínky gradientové eluce (složení, průtok), teplota kolony a množství nastříkovaného vzorku.

Pro separaci byl použit přístroj UltiMate 3000 RS (Dionex, Sunnyvale, CA). Chromatografické separace byly prováděny při 25 °C na aminopropylové koloně Luna 3 μ m NH₂, 2×150 mm (Phenomenex, Torrance, CA). Byla aplikována gradientová eluce při průtokové rychlosti 0,3 ml/min při použití mobilní fáze A – 20 mmo/l octan amonný (pH 9,45) a mobilní fáze B - acetonitril (Obr. 10). Podíl mobilních fází na začátku analýzy byl 95 % B a 5 % A. Tento podíl klesal lineárně po dobu 15 min na hodnotu 30 % B a v dalších 2 min klesal až na hodnotu 5 % B, která byla do 32. min konstantní. Poté během 0,1 min došlo k navrácení systému k iniciálním podmínkám (95 % B). Celkový čas analýzy byl 37 min.



Obrázek č. 10: Průběh gradientové eluce při cílené metabolické analýze.

3.4.5 Analýza směsí standardů

Pro zjištění retenčních časů a zvolení jednoho MRM přechodu pro jednotlivé látky byly analyzovány připravené směsi deseti standardů o finální koncentraci 10 $\mu\text{mol/l}$. Analýza probíhala za optimalizovaných podmínek a každá studovaná látka byla identifikována pomocí 5 MRM přechodů, které byly zjištěny v rámci MS optimalizace. Nástřik připravených směsí standardů činil 5 μl .

Pro MS metodu v pozitivním i negativním módu byly použity doporučené hodnoty tlaku kolizního plynu (*collision gas pressure*, CAD), zmlžujícího (*nebulizing gas*, GS1) a sušícího plynu (*heater gas*, GS2), „curtain gas“ (CUR), teploty zmlžujícího plynu (*source temperature*, TEM) a napětí na kapiláře v iontovém zdroji (*ion spray voltage*, IS). Hodnoty jednotlivých parametrů jsou shrnuty v Tab. 8.

Tabulka č. 8: Parametry MS/MS použité při cílené metabolické analýze

| Parametr | Hodnota |
|--------------------------------------|----------------|
| tlak „curtain gas“ | 30 psi |
| tlak kolizního plynu | medium psi |
| tlak sušícího plynu | 40 psi |
| tlak zmlžujícího plynu | 40 psi |
| teplota zmlžujícího plynu | 400 °C |
| napětí na kapiláře v iontovém zdroji | +/-4500 V |
| rozlišení kvadrupólů | jednotkové |

Po výběru jednoho MRM přechodu pro každou látku byly další analýzy prováděny v tzv. scheduled MRM módu, kdy do metody byla vložena informace o retenčním čase každého sledovaného přechodu. Každý MRM přechod byl sledován pouze v určitém časovém úseku, čímž byla zvýšena citlivost analýzy. Časový úsek pro každý přechod byl nastaven na 360 s, doba cyklu činila 1,9 s. Dále byla metoda upravena tak, aby docházelo k přepínání pozitivní a negativní ionizace během jedné analýzy⁷⁴. Doba přepínání polarity (tzv. setting time) byla 50 ms, pauza mezi jednotlivými hmotnostními rozsahy byla nastavena na 3 ms.

3.4.6 Metabolitové profilování biologických materiálů

Finální metoda byla aplikována na řadu biologických materiálů, jednalo se např. o vzorky močí, sér, suchých krevních skvrn, dechů, slz, extraktů fibroblastů a dalších.

Ve snaze získat validní výsledky pro metabolickou studii byl vypracován standardní operační postup, který zahrnuje metabolitové profilování biologických materiálů od přípravy roztoků a vzorků až k analýze vzorků a zpracování dat. Je popsán v následujících kapitolách.

Příprava mobilní fáze

Mobilní fáze A (MFA, 20 mmol/l octan amonný, pH 9,45) se připraví přidáním 572,5 µl kyseliny octové do 500 ml LC-MS vody. Poté se mobilní fáze vytitruje hydroxidem amonným (25% vodný roztok) na pH 9,45 (pH metr CyberscanpH 510, Thermo scientific, Waltham, MA, USA). Kalibrace se provádí na kalibrační roztoky pH 7 a 10. Pokud se použije dříve připravená MFA, je vždy nutné zkontrolovat pH. Stabilita připravené MFA je pouze 14 dní. Mobilní fáze B obsahuje pouze acetonitril. Připravené mobilní fáze necháme 5 min sonifikovat v ultrazvukové lázni.

Příprava vzorků

Vzorky plazem a sér

Zpracování vzorků plazem či sér se provádí podle dříve popsaného postupu⁷⁵. Plazma/sérum se nechá roztát na ledu při 4 °C po dobu 30–60 minut. K 50 µl vzorku se přidá 150 µl methanolu, směs se nechá vortexovat (15 s) a centrifugovat (15 min, 14 500 x g) při 20 °C. Supernatant se přepipetuje přímo do vialky s inzertem a analyzuje. Nástřik vzorku je 2 µl.

Pokud je k dispozici malé množství vzorku plazmy/séra, provádí se objemově minimální alternativa téhož postupu. Ke 2 µl vzorku se přidá 8 µl vody a 30 µl methanolu (je dodržen stejný poměr vodné a organické části). Poté se pokračuje stejným způsobem (viz výše). Nástřik vzorku činí 10 µl.

Vzorky močí

Vzorky močí se připravují dle dříve popsaného postupu⁷⁶. Samotná moč (60 μ l) se nejdříve centrifuguje (10 min, 14 500 x g), poté je 50 μ l moče naředěno 100 μ l vody, vortexováno (15 s) a znovu centrifugováno (5 min, 14 500 x g). Supernatant se přenesení do vialky s inzertem a je podroben analýze. Množství nastříkovaného vzorku se upravuje dle předem zjištěné koncentrace kreatininu v moči. Vzorky močí s kreatininem nižším než 1 μ mol/l se neředí, provádí se pouze úprava nástříku.

Suspenní a adherentní buňky

Pro zpracování suspenzních a adherentních buněk jsou modifikovány dříve popsané postupy^{77,78}. K 5 ml buněčné suspenze se nalije 25 ml quenčovacího roztoku (60% methanol s přidavkem hydrogenuhličitanu amonného ve výsledné koncentraci 8,5 g/l) vychlazeného na -50 °C. Poté se vzorky centrifugují (400 x g, 5 min). Supernatant se slijí a metabolity jsou extrahovány resuspendováním buněčné pelety v 500 μ l extrakčního roztoku (80% methanol vychlazený na -50 °C) a rychle zchlazen v kapalném dusíku. Následně je vzorek rozmrazen na ledu, peleta je rozklepáním resuspendována a centrifugována (1700 x g, 5 min). Supernatant je odebrán a ponechán k analýze. Zbylá peleta je stejným způsobem znovu extrahována, aby byl získán co největší podíl intracelulárních metabolitů. Supernatanty z obou extrakcí jsou spojeny a lyofilizovány.

V případě adherentních buněk⁷⁹ se slijí médium, případně se nechá odsát vakuem. Poté jsou buňky propláchnuty quenčovacím roztokem (60% methanol s přidavkem hydrogenuhličitanu amonného ve výsledné koncentraci 8,5 g/l, vychlazený na -50 °C) pomocí stříkačky se zahnutou jehlou. Přidá se 1 ml extrakčního roztoku (80% methanol, -80 °C), buňky se seškrábou škrabkou a následně přenesou do falkonky (15 ml). Extrakce se stejným způsobem opakuje. Obě

methanolové frakce (buněčné suspenze) jsou spojeny a centrifugovány (1800 x g, 5 min, 4 °C). Supernatant se slije do nových falkonek a poté je lyofilizován.

V obou případech se lyofilizát rozpustí ve 100 µl 50% methanolu, vortexuje se (15 s) a centrifuguje (10 min, 14 500 x g). Supernatant (90 µl) je přenesen do vialky s inzertem a analyzován. Nástřík vzorku činí 5 µl.

Příprava vzorků kontroly kvality

Pro analýzu plazem a močí se používá jako kontrola kvality (*quality control*, QC) směsná plazma/moč všech vzorků, která se zpracuje stejným způsobem jako zkoumané vzorky. V případě extraktů buněk se vytvoří směs alikvotů všech rozpuštěných lyofilizátů vzorků.

Připravuje se pouze jeden vzorek kontroly kvality, ze kterého se nastříkuje opakovaně mezi studovanými vzorky dle připraveného pořadí (Tab. 9).

Procesní blank

Blank se připraví podle postupu přípravy vzorků ovšem bez samotného biologického vzorku.

Směs standardů

Směs standardů (STD) obsahuje čtyři vybrané standardy (adenosin, GMP, ADP a GTP) ve finální koncentraci 25 µmol/l. Alikvoty (50 µl) této směsi jsou uchovávány při -20 °C.

Analýza LC-MS

Vzorky jsou analyzovány dle uvedeného pořadí (Tab. 9) „scheduled MRM“ metodou. Tento způsob řazení analýz byl aplikován na základě dříve popsaného postupu⁷⁵.

Pro ověření chování analytického systému před samotnou analýzou vzorků je nejprve nastříkována dvakrát směs STD. Ve druhé analýze této směsi se kontroluje retenční chování jednotlivých standardů a tlak na koloně. Iniciální tlak je 70 bar.

Poté se pokračuje s analýzou 10 vzorků kontroly kvality (QC1-QC10) za účelem ekvibrace analytického systému. Následuje znovu analýza směsi STD a posléze už jednotlivých studovaných vzorků, jejichž pořadí musí být náhodné a odlišné od pořadí jejich sběru a zpracování. QC vzorek je nastříkovan opakovaně v průběhu celé sady analýz (po každém třetím zkoumaném vzorku) a to z důvodu posouzení opakovatelnosti během měření (posun retenčního času či změna v intenzitě signálu) a následné korekci signálu jednotlivých studovaných látek (viz dále). Do série měřených vzorků je také dvakrát vložen procesní blank.

Tabulka č. 9: Pořadí analýz vzorků v rámci metabolického experimentu

| Pořadí analýz | Označení vzorku | Pořadí analýz | Označení vzorku | Pořadí analýz | Označení vzorku |
|---------------|-----------------|---------------|-----------------|---------------|-----------------|
| 1. | Směs STD | 34. | QC 15 | 67. | QC 23 |
| 2. | Směs STD | 35. | Vzorek 16 | 68. | Vzorek 40 |
| 3. | QC 1 | 36. | Vzorek 17 | 69. | Vzorek 41 |
| 4. | QC 2 | 37. | Vzorek 18 | 70. | Vzorek 42 |
| 5. | QC 3 | 38. | QC 16 | 71. | QC 24 |
| 6. | QC 4 | 39. | Vzorek 19 | 72. | Vzorek 43 |
| 7. | QC 5 | 40. | Vzorek 20 | 73. | Vzorek 44 |
| 8. | QC 6 | 41. | Vzorek 21 | 74. | Vzorek 45 |
| 9. | QC 7 | 42. | QC 17 | 75. | QC25 |
| 10. | QC 8 | 43. | Vzorek 22 | 76. | Vzorek 46 |
| 11. | QC 9 | 44. | Vzorek 23 | 77. | Vzorek 47 |
| 12. | QC 10 | 45. | Vzorek 24 | 78. | Vzorek 48 |
| 13. | Směs STD | 46. | QC 18 | 79. | QC26 |
| 14. | Vzorek 1 | 47. | Vzorek 25 | 80. | Vzorek 49 |
| 15. | Vzorek 2 | 48. | Vzorek 26 | 81. | Vzorek 50 |
| 16. | Vzorek 3 | 49. | Vzorek 27 | 82. | Vzorek 51 |
| 17. | QC 11 | 50. | QC 19 | 83. | QC 27 |
| 18. | Blank 1 | 51. | Vzorek 28 | 84. | Vzorek 52 |
| 19. | Vzorek 4 | 52. | Vzorek 29 | 85. | Vzorek 53 |
| 20. | Vzorek 5 | 53. | Vzorek 30 | 86. | Vzorek 54 |
| 21. | Vzorek 6 | 54. | QC 20 | 87. | QC 28 |
| 22. | QC 12 | 55. | Vzorek 31 | 88. | Vzorek 55 |
| 23. | Vzorek 7 | 56. | Vzorek 32 | 89. | Vzorek 56 |
| 24. | Vzorek 8 | 57. | Vzorek 33 | 90. | Vzorek 57 |
| 25. | Vzorek 9 | 58. | QC 21 | 91. | QC 29 |
| 26. | QC 13 | 59. | Vzorek 34 | 92. | Vzorek 58 |
| 27. | Vzorek 10 | 60. | Vzorek 35 | 93. | Vzorek 59 |
| 28. | Vzorek 11 | 61. | Vzorek 36 | 94. | Vzorek 60 |
| 29. | Vzorek 12 | 62. | QC 22 | 95. | QC 30 |
| 30. | QC 14 | 63. | Vzorek 37 | 96. | Blank 3 |
| 31. | Vzorek 13 | 64. | Blank 2 | 97. | Blank 4 |
| 32. | Vzorek 14 | 65. | Vzorek 38 | 98. | Směs STD |
| 33. | Vzorek 15 | 66. | Vzorek 39 | | |

Vyhodnocení dat

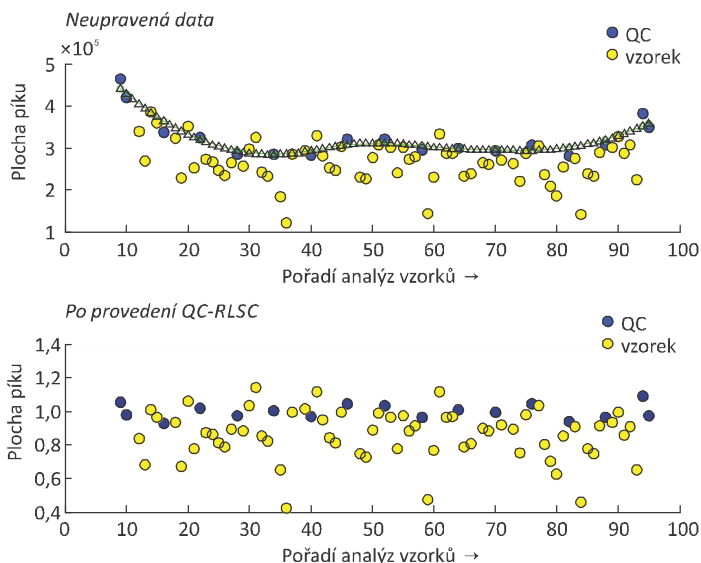
Vyhodnocování dat se provádí v softwaru MultiQuant™ 2.1.1 (AB Sciex, Framingham, Massachusetts, USA), který je nadstandardní součástí ovládacího softwaru Analyst 6.1 (AB Sciex, Framingham, Massachusetts, USA). V tomto softwaru se aplikuje metoda pro automatickou integraci ploch jednotlivých analyzovaných metabolitů, jejíž parametry jsou uvedeny v Tab. 10. Poté je nutné provést manuální kontrolu integrovaných píků. Pokud není pík přítomen, je zapotřebí integrovat šum (výskyt nul způsobuje problémy při statistickém vyhodnocení).

Tabulka č. 10: Nastavení metody pro automatickou integraci píků v softwaru MultiQuant (RT, *retention time*, retenční čas)

| Parametr | Nastavení |
|---------------------------|-----------|
| Integrační algoritmus | MQ4 |
| Stupeň vyhlazení | 1,0 |
| Možné odchýlení RT | 90 s |
| Aktualizovat očekávaný RT | ne |
| Zaznamenat největší pík | ne |
| Minimální šířka píku | 3 body |
| Minimální výška píku | 750 |
| Šum | 40 % |
| Základní podokno | 2 min |
| Rozdělení píku | 2 body |

Pro další zpracování dat se využívá software R (www.r-project.org). Nejdříve se odstraní prvních osm analýz vzorku QC, které sloužily pouze pro ekvilibraci analytického systému. Za účelem korekce signálu je následně aplikován přístup tzv. quality control-based robust LOESS (locally estimated scatterplot smoothing) signal correction (QC-RLSC)⁷⁵, v rámci něhož je provedena interpolace všech ploch píků metabolitů u vzorků na odpovídající plochy analytů v QC vzorcích. Pro každou látku je QC vzorky proložena "korekční"

křivka (Obr. 11). Na základě této křivky jsou všechny analyty interpolovány s cílem odstranit vliv systematických chyb. Dále se vyhodnocují pouze plochy metabolitů, které vykazují u vzorků QC relativní směrodatnou odchylku nižší než 30 %.



Obrázek č. 11: Ukázka QC-RLSC přístupu za účelem korekce signálu – proložení QC vzorků korekční křivkou (nahore), interpolace ploch na základě korekční křivky (dole) (upraveno dle Dunn⁷⁵)

Před statistickou analýzou je na data aplikována CLR transformace⁷⁰, dále je provedeno centrování dat. Pro porovnání jednotlivých vzorků jsou uplatňovány různé statistické nástroje - PCA, PCA-DA či klastrová analýza.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Diagnostika defektů purinové *de novo* syntézy

Cílem této studie bylo vyvinout diagnostickou metodu pro známé či dosud nepopsané poruchy v druhé části PDNS. Pro nové defekty byl očekáván podobný mechanismus jako v případech již popsanych poruch, proto byla vyvíjená metoda založena na detekci defosforylovaných meziproduktů v moči. Metoda byla též aplikována na vzorky CSF a mozkových tkání od pacientů s deficitem ADSL.

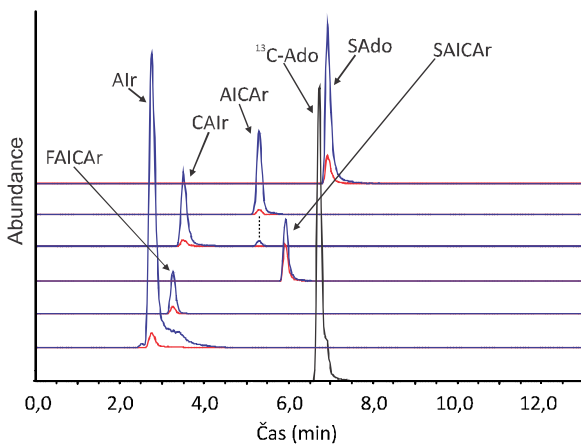
4.1.1 Parametry a validace metody

Nejdříve byly pro každý ribosid optimalizovány MS/MS podmínky, jednalo se o výběr MRM přechodu, hodnotu deklasteračního potenciálu a kolizní energie (Tab. 11). Pro zvýšení specifity stanovení byly pro každý studovaný ribosid vybrány dvě tranzice, které vykazovaly nejvyšší intenzitu signálu a zároveň u nich nebyly pozorovány interference s jinými látkami. Pro kvantifikaci byl použit první přechod. Druhá tranzice byla použita ke confirmaci v případě pozitivního výsledku. Na Obr. 12 je ukázána chromatografická separace studovaných ribosidů.

Limity detekce byly v rozsahu 0,005-0,150 $\mu\text{mol/l}$ (Tab. 12). Návratnosti byly v rozmezí 81,7-119,0 %. Variační koeficient pro měření opakovatelnosti byl v rozsahu 0,8-4,7 %, v případě měření mezilehlé preciznosti to bylo 5,6-12,6 % .

Tabulka č. 11: MRM tranzice (Q1→Q3) ribosidů s optimalizovaným DP a CE; (tučně zvýrazněna kvantifikační tranzice)

| Ribosid | Q1 (Da) | Q3 (Da) | DP (V) | CE (V) |
|---------------------|---------|--------------|--------|--------|
| AICAr | 259,1 | 110,0 | 41 | 31 |
| | | 133,0 | | 19 |
| SAICAr | 375,1 | 243,0 | 66 | 19 |
| | | 110,0 | | 47 |
| SAdo | 384,1 | 252,0 | 61 | 25 |
| | | 162,0 | | 51 |
| Alr | 216,1 | 84,0 | 31 | 19 |
| | | 125,9 | | 17 |
| CAIr | 260,1 | 110,0 | 41 | 33 |
| | | 132,9 | | 19 |
| FAICAr | 287,1 | 138,0 | 36 | 31 |
| | | 110,0 | | 51 |
| ¹³ C-Ado | 269,1 | 136,0 | 56 | 23 |



Obrázek č. 12: Chromatografická separace studovaných ribosidů ; modře - kvantifikační tranzice, červeně - konfirmační tranzice.

Tabulka č. 12: Limity detekce (LOD) a horní referenční limity (HRL) pro studované ribosidy

| Ribosid | LOD ($\mu\text{mol/l}$) | HRL($\mu\text{mol/mmol}$ kreatininu) |
|---------|---------------------------|---------------------------------------|
| AICAr | 0,084 | 1,13 |
| SAICAr | 0,113 | 0,75 |
| SAdo | 0,045 | 5,24 |
| Alr | 0,005 | pod LOD |
| CAIr | 0,150 | 0,33 |
| FAICAr | 0,113 | pod LOD |

4.1.2 Klinické aplikace

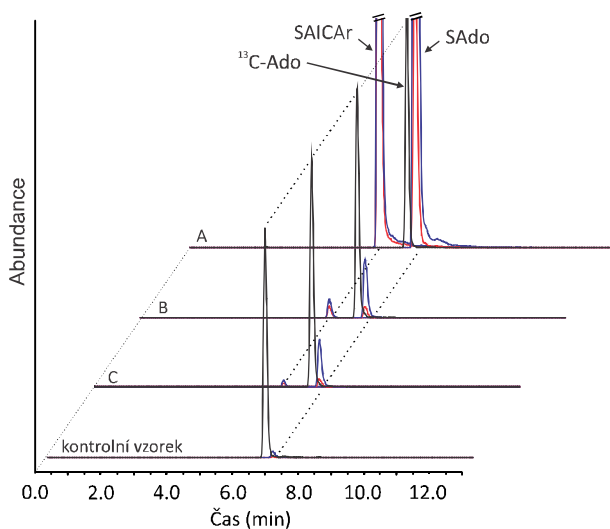
Pro každý ribosid bylo stanoveno referenční rozmezí na 50 vzorcích močí od zdravých dětí (22 žen a 28 mužů), (Tab. 12). Celkem byly analyzovány 3 vzorky močí od pacientů s deficitem ADSL, jeden vzorek CSF a 3 extrakty mozkové tkáně. Ve všech těchto analyzovaných vzorcích od pacientů s deficitem ADSL (Tab. 13 A) byly pozorovány vysoké koncentrace SAICAr a SAdo (Tab. 13 B). Obr. 13 ukazuje srovnání vzorků močí od pacientů s deficitem ADSL a kontrolního vzorku. Pacient A s neonatální fatální formou měl poměr SAdo/SAICAr 0,8. U pacientů B a C s mírnou formou tohoto onemocnění byly zjištěny poměry SAdo/SAICAr 2,6 a 6,1. Tímto byla potvrzena souvislost mezi poměrem SAdo/SAICAr a závažnosti projevu onemocnění.

Tabulka č. 13 A: Klinické a molekulárně genetické nálezy u pacientů s deficitem ADSL (PMR, psychomotorická retardace).

| Pacient | A | | B | | C |
|------------------|---|-------|--------------------------|-------|--------------------------|
| Pohlaví | M | | M | | Ž |
| Začátek projevů | při narození | | 4. měsíc | | 6. měsíc |
| První příznaky | křeče | | PMR | | PMR |
| Ostatní symptomy | hypotonie, multiorgánové selhání - smrt | | hypotonie, hyperaktivita | | hypotonie, hyperaktivita |
| ADSL mutace | Y114H | R426H | Y114H | R190Q | Y114H R190Q |

Tabulka č. 13 B: Biochemické nálezy u pacientů s deficitem ADSL (kreat., kreatinin).

| Pacient | Vzorek | SAICAr | SAdo | | SAdo/SAICAr |
|---------|--------------|--------|-------|-------------------|-------------|
| B | moč | 1,8 | 11,1 | mmol/mol kreat. | 6,1 |
| C | moč | 16,1 | 41,7 | mmol/mol kreat. | 2,6 |
| A | moč | 1018,3 | 809,2 | mmol/mol kreat. | 0,8 |
| | CSF | 2949,4 | 903,1 | mmol/l | 0,3 |
| | bílá hmota | 36,0 | 6,2 | mmol/g mokré váhy | 0,2 |
| | šedá hmota | 11,6 | 2,5 | mmol/g mokré váhy | 0,2 |
| D | mozková tkáň | 5,5 | 2,6 | mmol/g mokré váhy | 0,5 |



Obrázek č. 13: Srovnání analýz vzorků moči od pacientů s deficitem ADSL a kontrolního vzorku

V této studii bylo potvrzeno, že v tělních tekutinách (moč, CSF) získaných od pacientů s deficitem ADSL dochází k akumulaci sukcinylribosidů (Tab. 13B). Velmi vysoké koncentrace SAdo a SAICAr byly též nalezeny v mozkových tkáních pacientů s deficitem ADSL (Tab. 13B)⁸⁰.

Tato metoda umožňuje kvantitativní analýzu všech studovaných ribosidů. Podařilo se též analyzovat SAICAr navzdory tomu, že dříve bylo diskutováno, že SAICAr nebyl ionizovatelný nebo byl nestabilní v iontovém zdroji²². Dosud byla diagnostika deficitu ADSL pomocí HPLC-MS/MS založena pouze na detekci SAdo v moči^{22,23,24}. Námí vyvinutá metoda však umožňuje stanovení koncentrace obou sukcinylpurinů a tím určení jejich vzájemného poměru. V současnosti byla publikována pouze jediná metoda HPLC-MS/MS pro diagnostiku AICA-ribosidurie založená na detekci AICAr v moči²³, hmotnostní spektrum této látky však bylo publikováno i ve studii zabývající se antidopingovou kontrolou⁸¹. Skupina dr. Hartmanna²² diagnostikovala AICA-ribosidurii pouze na základě zvýšených koncentrací SAdo.

4.2 Použití cíleného metabolického přístupu pro diagnostiku DMP

4.2.1 Vzorky plazem

Celkem bylo analyzováno 50 kontrolních vzorků plazem a 34 vzorků od pacientů trpících různými dědičnými metabolickými poruchami (Tab. 14), které byly z části poskytnuty z různých pracovišť České republiky zabývajících se DMP⁸². U všech pacientů byla diagnóza předem potvrzena na základě biochemických vyšetření, enzymových zkoušek a molekulárně-genetickými metodami (Tab. 15A, B). Vzorky s označením MSUD 1 a 2, dále MSUD 3 a 4 a PA 2 a 3 byly odebrány stejným pacientům, ale v různých časech.

4.2.2 Statistické vyhodnocení a opakovatelnost

V PCA byly všechny vzorky od pacientů trpících DMP odlišeny od kontrolních vzorků. Také pacienti se stejnou DMP byli rozpoznáni pomocí PCA a též v klastrové analýze. Příslušné výsledky jsou ukázány v následujících kapitolách.

Opakovatelnost byla určována na šestnácti vzorcích směsné plazmy. Koncentrace jednotlivých metabolitů ($n = 163$) u každého páru technických replikátů byly porovnávány použitím Spearmanova korelačního koeficientu. Rozsah koeficientů byl vyšší než 0,92 (Obr. 14).

Tabulka č. 14: Přehled studovaných aminoacidurii, organických acidurii a mitochondriálních poruch s jejich plazmatickými primárními a sekundárními markery (C0, karnitin; C2, acetylkarnitin; C3, propionylkarnitin; C5, valerylkarnitin; C5-DC, glutaryl-karnitin; C5-M-DC methylglutaryl-karnitin; C3-DC-M, methylmalonyl-karnitin; C5-OH, hydroxyvaleryl-karnitin; C6, hexanoyl-karnitin; C8, oktanoyl-karnitin; C10, dekanoyl-karnitin; C10:1, decenoyl-karnitin; C16, hexadekanoyl-karnitin; C18, oktadekanoyl-karnitin; C18:1, oktadecenoyl-karnitin; Ala, alanin; Arg, arginin; Asn, asparagin; Cit, citrulin; Gln, glutamin; Gly, glycin; Leu, leucin; Met, methionin; Orn, ornithin; Phe, fenylalanin; Tyr, tyrosin; Val, valin).

| Porucha | Primární markery | Sekundární markery |
|---------|-----------------------------|--|
| PKU | ↑ Phe a ↑ Phe/Tyr | |
| MSUD | ↑ Leu a ↑ Leu/Ala | ↑ Leu/Phe ↑ Val |
| Tyr I | ↑ Tyr | ↑ alfa-fetoprotein ↑ Met |
| Hcys | ↑ Met | ↑ homocyst(e)in, volný/celkový ↓ cystin |
| OTC | ↑ Gln | ↓ Cit ↑ Orn ↑ Ala ↑ Asn |
| CPS | ↑ Gln | ↓ Cit ↑ Ala ↑ Asn |
| Arg | ↑ Arg | |
| NKH | ↑ Gly | |
| MMA | ↑ C3 | ↑ C3-DC-M |
| PA | ↑ C3 | ↑ C3/C2 |
| HMG | ↑ C5-M-DC | ↑ C5-OH |
| IV A | ↑ C5 a ↑ C5/C8 | ↑ C5/C2 |
| GA I | ↑ C5-DC a ↑ C5-DC/C8 | ↑ C5-DC/C16 |
| MCAD | ↑ C8 a ↑ C8/C2 | ↑ C10 ↑ C18 |
| CPT II | ↑ (C16+C18:1)/C2 a ↑ C16 | ↑ C10:1 ↑ C6 ↑ C18:1 ↓ C0 |

Tabulka č. 15 A: Přehled studovaných pacientů s dědičnou poruchou v metabolismu aminokyselin (klas., klasický; Ž, žena; HSM, hepatosplenomegalie; HPA, hyperfenylalaninémie; Ile, isoleucin; Hcys, homocystein; M, muž, MR, mentální retardace; PMV, psychomotorický vývoj; neresp., neresponzivní)

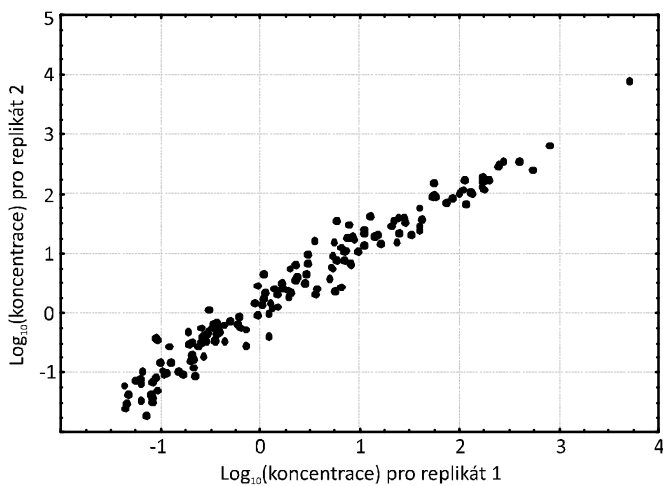
| Pacient | Forma | Pohlaví | Věk | Mutace | Klinický status | Předchozí biochemické nálezy ve vzorku plazmy (μmol/L) |
|---------------------|------------------|---------|-----|--------------------------|------------------------------------|--|
| PKU 1 | klas. | M | 18 | p.R158Q/p.A395P | přerušená dieta bez obsahu Phe | ↑ Phe 1674 |
| PKU 2 | mírná HPA | M | 28 | p.I306V/neznámo | bez diety | ↑ Phe 441 |
| PKU 3 | klas. | Ž | 22 | P.R408W/p.R408W | dieta bez obsahu Phe | ↑ Phe 805 |
| PKU 4 | mírná | M | 20 | p.R408W/neznámo | dieta bez obsahu Phe | ↑ Phe 629 |
| PKU 5 | klas. | Ž | 19 | p.R408W/c.1066-3C>T | dieta bez obsahu Phe | ↑ Phe 272 |
| PKU 6 | klas. | M | 14 | p.R261Q/p.I65T | dieta bez obsahu Phe | ↑ Phe 1168 |
| MSUD 1 ^a | klas. | Ž | 20 | neznámo | mírná MR | ↑ Leu 1130, Ile 285, Val 532 |
| MSUD 2 ^a | klas. | Ž | 20 | neznámo | mírná MR | ↑ Leu 1314, Ile 302, Val 789 |
| MSUD 3 ^b | intermitentní | M | 18 | neznámo | hepatopatie | ↑ Leu 312, Ile 152, Val 1064 |
| MSUD 4 ^b | intermitentní | M | 18 | neznámo | hepatopatie | ↑ Leu 379, Ile 226; Val 930 |
| MSUD 5 | těžká | Ž | 20 | neznámo | ataky dekompenzace, střední MR | ↑ Leu 836, Ile 142, Val 393 |
| Tyr 1 1 | klas. | Ž | 8 | c. 1062+5G>A/c. 1210 G>a | HSM bez ložisek, hraniční intelekt | ↑ Tyr 828 |
| Tyr 1 2 | klas. | M | 6 | c. 554-1G>T/c. 680G>T | HSM bez ložisek, normální PMV | ↑ Tyr 328 |
| Hcys 1 | klas. B6 neresp. | M | 31 | neznámo | mírná MR | ↑ Hcys 159, Met 109 |
| Hcys 2 | klas. B6 neresp. | M | 30 | neznámo | MR | ↑ Hcys 62, Met 508 |
| NKH | atypická | M | 14 | neznámo | epilepsie, těžká MR | ↑ Gly 987 |
| Arg | středně těžká | M | 27 | neznámo | epilepsie, diparéza | ↑ Arg 363, Gln 669 |
| CPS | těžká | Ž | 2 | neznámo | dobry | ↑ Gln 945; ↓ Cit 3 |
| OTC 1 | těžká | Ž | 15 | IVS7+1G>T | dobry | ↑ Gln 1011, Gly 631; ↓ Orn 42 |
| OTC 2 | těžká | Ž | 18 | neznámo | hraniční MR | ↑ Gln 1370; ↓ Cit 0 |

^aVzorky MSUD 1 a 2 byly odebrány stejné pacientce v různém čase; ^bVzorky MSUD 3 a 4 byly též odebrány stejnému pacientovi v různém čase

Tabulka č. 15 B: Přehled studovaných pacientů s organickou acidurií nebo mitochondriální poruchou (Kreat., kreatinin; dekomp., dekompenzace; Ž, žena; M, muž; mma, methylmalonát; PMV, psychomotorický vývoj; MR, mentální retardace; opak., opakovaný; U, moč; nov, novorozenecká; DMO, dětská mozková obrna; nezn, neznámo; inf., infantilní).

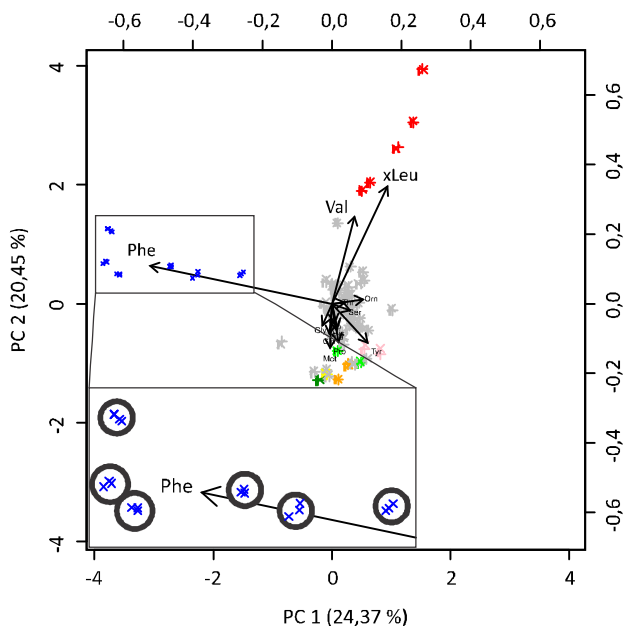
| Pacient | Forma | Pohlaví | Věk | Mutace | Klinický status | Předchozí biochemické nálezy ve vzorku plazmy (μmol/L) |
|-------------------|------------------|---------|-----|-------------------|---|--|
| MMA 1 | těžká | Ž | 5 | nezn | dobrý | nezn |
| MMA 2 | těžká nov. | M | 7 | nezn | těžká MR | nezn |
| MMA 3 | těžká inf. | M | 2 | c. A655T/c. A655T | těžké ataky dekomp., mírná MR | nezn; *U ↑ mma 2853 mg/g kreat. |
| PA 1 | těžká časně inf. | Ž | 4 | nezn | normální PMV, obezita, stenóza trachey, opak. cystitidy | nezn |
| PA 2 ^a | mírná pozdě inf. | Ž | 24 | nezn | 2x porucha vědomí, epilepsie, lehká MR, ataky panické úzkosti | nezn; *DBS ↑ C3 18,4; C3/C2 1,5 |
| PA 3 ^a | mírná pozdě inf. | Ž | 24 | nezn | 2x porucha vědomí, epilepsie, lehká MR, ataky panické úzkosti | nezn; *DBS ↑ C3 23,6; C3/C2 1,7 |
| PA 4 | těžká nov. | M | 4 | nezn | MR | nezn |
| MCAD 1 | klasická | M | 1 | c. A985G/c. A985G | asymptomatický | nezn; *DBS ↑ C8 3,8; C8/C2 0,4 |
| MCAD 2 | klasická | M | 4 | c. A985G/c. A985G | 1x bezvědomí s hypoglykemií, epilepsie, přechodný regres PMV | ↓ CO; celkový karnitin |
| MCAD 3 | klasická | Ž | 9 | nezn | dobrý | ↓ CO 18,9 |
| GA I | inf. | M | 1 | nezn | asymptomatický | nezn; *DBS ↑ C5DC 2,2 |
| HMG | pozdní | M | 6 | nezn | mírná MR | ↑CO 77,1 |
| IV A | těžká nov. | M | 29 | nezn | opak. ataky dekomp., střední MR | nezn |
| CPT II | nov. | M | 8 | nezn | epilepsie, kvadruparetická DMO | ↓CO 6,4 |

^aVzorky PA 2 and 3 byly odebrány stejné pacientce ale v různém čase; * U pacienta ostatní biochemické nálezy (v moči a DBS)



Obrázek č. 14: Opakovatelnost metabolického profilování. Jsou ukázány koncentrace metabolitů ve vzorcích plazmy u 2 technických replikátů. Spearmanův korelační koeficient mezi technickými replikáty byl vyšší než 0,92. Tento diagram zobrazuje dva replikáty s nejslabší korelací.

Opakovatelnost byla též viditelná v samotné PCA analýze (Obr. 15), kde je vyznačeno překrývání tří odlišných měření vzorků plazem od pacientů s fenylketonurií.



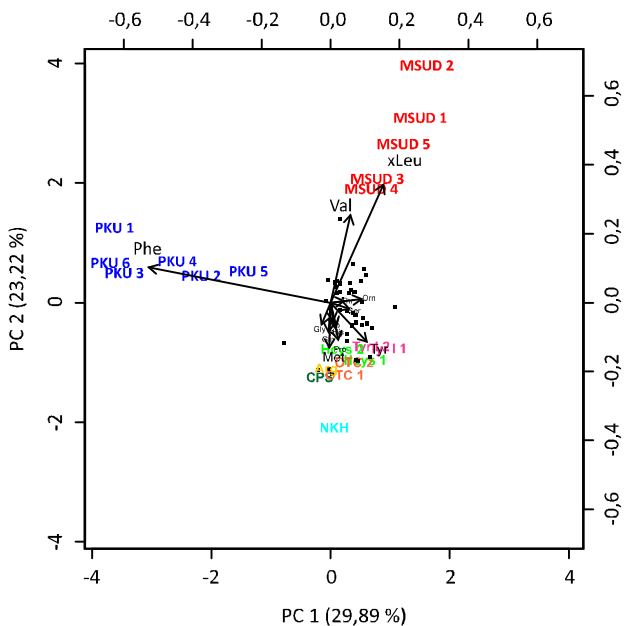
Obrázek č. 15: Opakovatelnost metabolického profilování pomocí PCA analýzy všech vzorků plazem a všech analyzovaných aminokyselin. Ve výřezu jsou vyznačeny tři odlišné měření stejných vzorků plazem od pacientů s PKU.

4.2.3 Poruchy aminokyselin

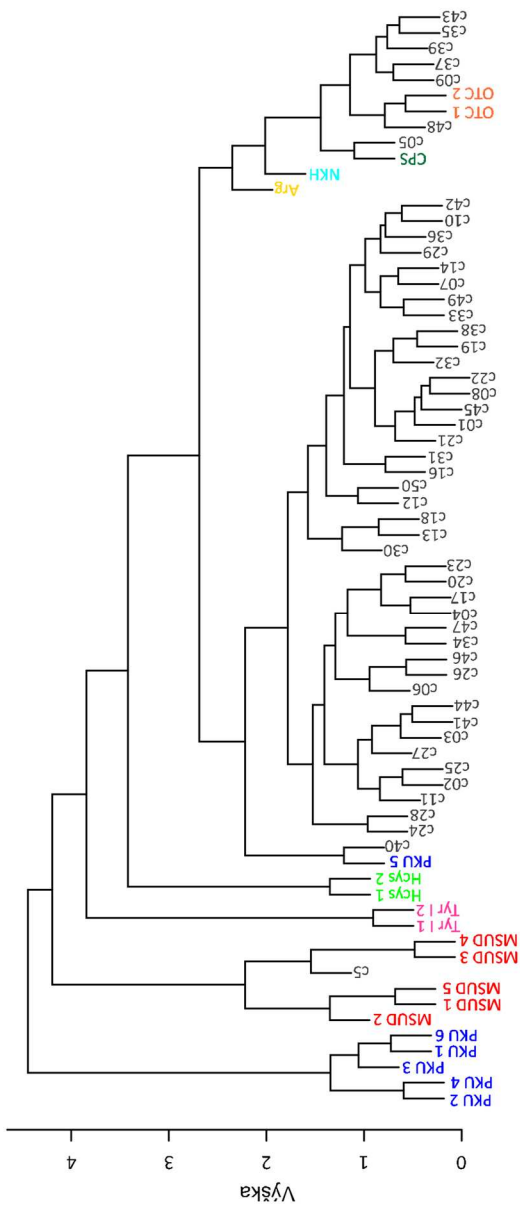
Celkem bylo zkoumáno 20 vzorků od pacientů trpících osmi odlišnými poruchami v metabolismu aminokyselin (Tab. 15A). Konkrétně se jednalo o fenylketonurii (PKU), nemoc javorovového sirupu (MSUD, leucinoso), tyrosinemii typu I (Tyr I), argininemii (ARG), deficit karbamoylfosfátsynthetasy (CPS), homocystinurii (Hcys), neketotickou hyperglycinemii (NKH), deficit ornithintranskarbamylasy (OTC).

Fenylketonurie (OMIM 261600) je způsobena deficitem fenylalaninhydroxylasy (EC 1.14.16.1) a má za následek hromadění fenylalaninu (Tab. 14).

V PCA analýze bylo všech 6 vzorků od pacientů s PKU jasně rozlišeno, všechny klastrovaly díky výše zmíněnému fenylalaninu (Obr. 16). V případě shlukové analýzy byl vzorek *PKU5* oddělen od ostatních pacientů s PKU (Obr. 17). Nicméně tyto výsledky korespondovaly s předchozími nálezy, kdy bylo zjištěno, že tento vzorek měl nejnižší koncentraci fenylalaninu ve srovnání s ostatními pacienty s PKU (Tab. 15 A).



Obrázek č. 16: PCA analýza všech vzorků plazem a všech analyzovaných aminokyselin.



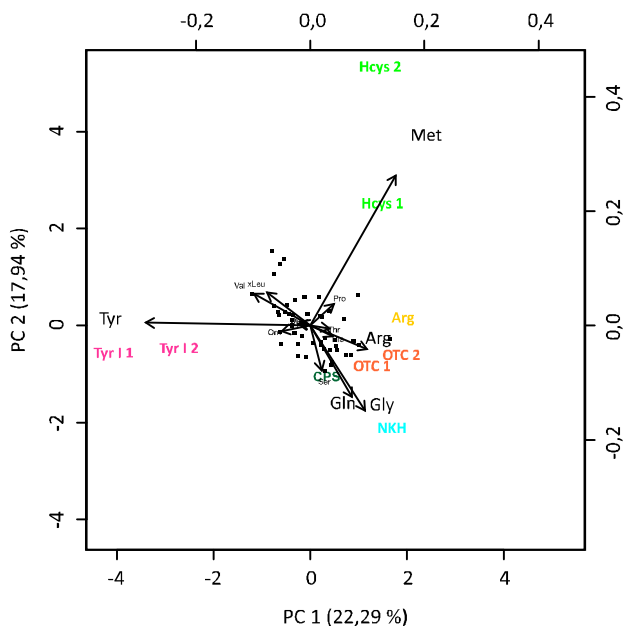
Obrázek č. 17: Klastrová analýza všech vzorků plazem a všech analyzovaných aminokyselin.

Leucinosa

Leucinosa (OMIM 248600), taktéž zvaná jako nemoc javorového sirupu (MSUD, maple syrup urine disease), je způsobena deficitem dehydrogenasy větvených alfa-ketokyselin. Porucha tohoto enzymu způsobuje nadměrné zvýšení větvených aminokyselin (např. leucin, isoleucin, valin) v plazmě.

Celkem bylo analyzováno 5 vzorků plazmy získaných od pacientů s leucinosou. Použitím PCA analýzy byly všechny tyto vzorky jasně odlišeny a shlukovaly se k sobě díky sumě leucinu, isoleucinu a alloisoleucinu (xLeu) a valinu (Obr. 16). Stejně výsledky byly získány klastrovou analýzou (Obr. 17).

Pro hodnocení dalších poruch byly v PCA analýze vzorky s PKU a MSUD odstraněny (Obr. 18), protože markery těchto onemocnění (fenylalanin, leucin, valin) byly tak významné, že potlačovaly variabilitu ostatních metabolitů.



Obrázek č. 18: PCA analýza všech analyzovaných aminokyselin a všech vzorků plazem po odstranění vzorků s PKU a MSUD s velmi vysokou variabilitou.

Tyrosinemie typu I

Tyrosinemie typu I (OMIM 276700) je onemocnění způsobené deficitem fumarylacetoacetáthydrolysy (EC 3.7.1.2) a má za následek vysokou akumulaci tyrosinu.

V této studii byly analyzovány dva vzorky plazmy od pacientů s uvedenou poruchou. Oba byly rozlišeny od kontrolních vzorků v PCA analýze (Obr. 18) a taktéž se spolu klastrovaly ve shlukové analýze (Obr. 17). Bylo to díky zvýšeným koncentracím tyrosinu v plazmě ve srovnání s kontrolními vzorky.

Homocystinurie

Homocystinurie je způsobena deficitem cystathionin- β -synthasy (EC 4.2.1.22). Diagnostika tohoto onemocnění je založena na výrazně zvýšených koncentracích homocystinu, celkového homocysteinu, homocystein-cystein disulfidu a methioninu v plazmě. V této studii byl použit methionin jako marker pro toto onemocnění.

Oba vzorky od pacientů s homocystinurií byly v PCA analýze jasně rozpoznány od kontrolních vzorků a to s ohledem na vysokou koncentraci methioninu (Obr. 18). Také bylo pozorováno jednoznačné klastrování obou těchto vzorků v dendrogramu (Obr. 17).

Deficit ornithintranskarbamylasy

Deficit ornithintranskarbamylasy (EC 2.1.3.3, OMIM 311250) je charakterizován zvýšenou hladinou glutaminu a sníženými koncentracemi citrulinu a ornithinu.

V PCA analýze byly oba vzorky s touto poruchou rozlišeny od kontrolních vzorků díky zvýšeným koncentracím glutaminu (Obr. 18), též v dendrogramu k sobě vzorky klastrovaly (Obr. 17). U těchto vzorků byla též předem zjištěna vysoká koncentrace glycinu (Tab. 15 A), to korespondovalo i s našimi výsledky, kdy v biplotu glycin koreloval s glutaminem (Obr. 18).

Ostatní poruchy metabolismu aminokyselin

V této studii byl rovněž analyzován jeden vzorek plazmy od pacienta s neketotickou hyperglycinemií (OMIM 605899) způsobený poruchou enzymového komplexu „glycine cleavage system“, dále jeden vzorek pacienta s argininemií (OMIM 207800) s deficitem arginasy (EC 3.5.3.1) a též plazma pacienta s deficitem karbamoylfosfátsynthetasy (EC 6.3.4.16; OMIM 237300). Markery těchto onemocnění jsou shrnuty v Tab. 14.

Pacient s neketotickou hyperglycemií byl jasně rozpoznán díky vysoké koncentraci glycinu. Ačkoli to nebylo jednoznačné, tak se podařilo mírně rozlišit i pacienty s argininemií a deficitem karbamoylfosfátsynthetasy oproti kontrolním vzorkům a to díky příslušným markerům (Obr. 18).

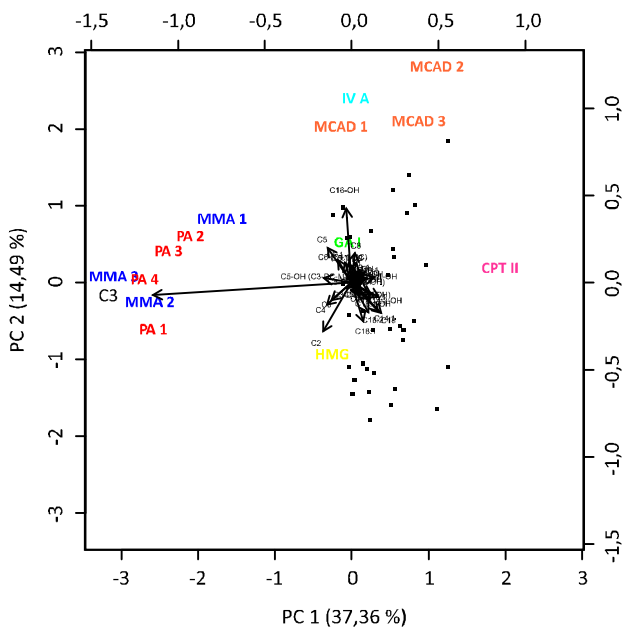
4.2.4 Organické acidurie a mitochondriální poruchy

Celkem bylo analyzováno 14 vzorků plazem od pacientů trpících sedmi různými organickými aciduriemi a mitochondriálními poruchami (Tab. 15 B). Konkrétně se jednalo o methylmalonovou acidurii (MMA), propionovou acidurii (PA), glutarovou acidurii typu I (GA I), 3-hydroxy-3-methylglutarovou acidurii (HMG), isovalerovou acidurii (IV A), deficit karnitinpalmitoyltransferasy typu II (CPT II) a deficit acyl-CoA dehydrogenasy mastných kyselin se středně dlouhým řetězcem (MCAD).

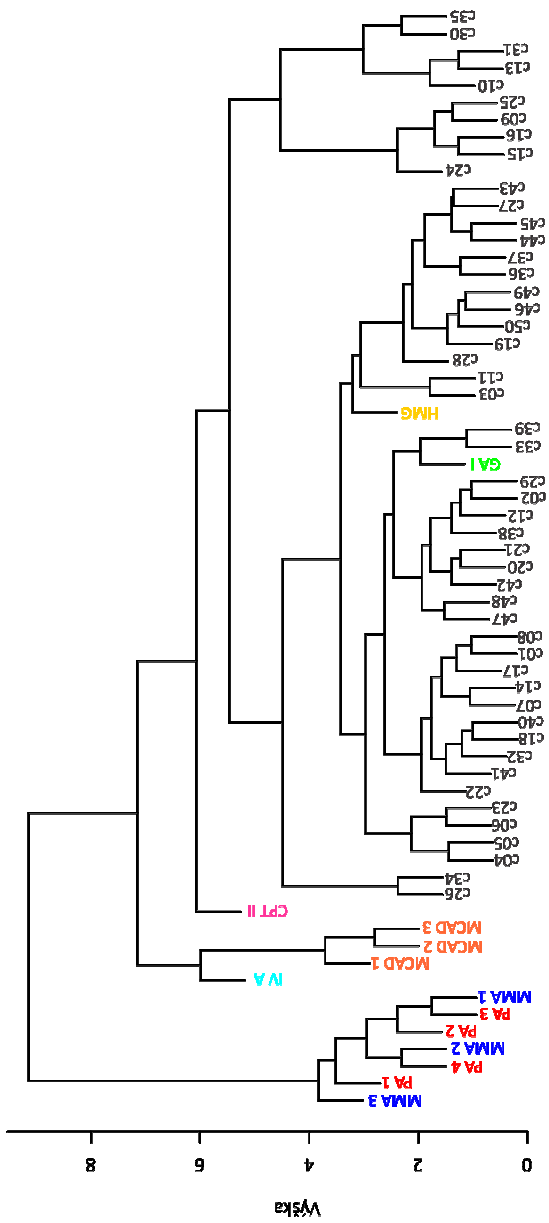
Methylmalonová a propionová acidurie

Methylmalonová acidurie (OMIM 25100) je způsobena deficitem methylmalonyl-CoA-mutasy (EC 5.4.99.2) a propionová acidurie (OMIM 606054) deficitem propionyl-CoA-karboxylasy (EC 6.4.1.3). Propionyl-CoA a methylmalonyl-CoA jsou meziprodukty v metabolismu některých aminokyselin (valin, isoleucin, methionin, threonin), cholesterolu a mastných kyselin s lichým počtem uhlíků. Obě tyto poruchy jsou charakterizovány zvýšeným hromaděním propionylkarnitinu v krvi (Tab. 14).

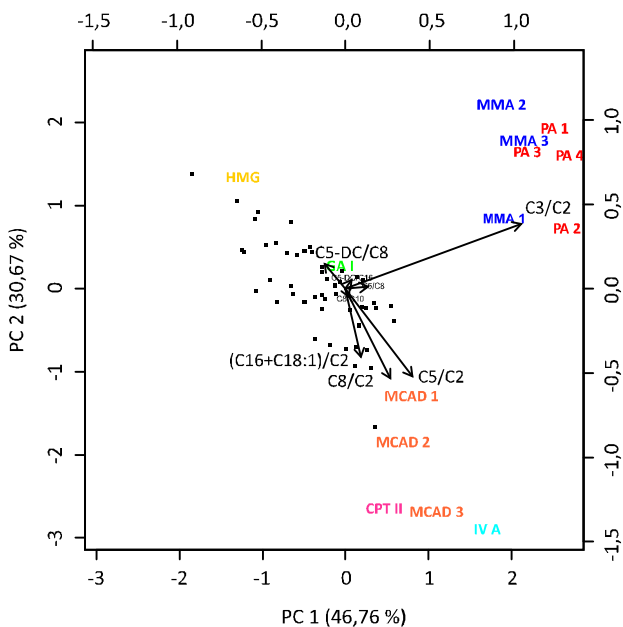
V této studii byly celkem analyzovány tři vzorky plazem od pacientů s MMA a čtyři vzorky s PA. Všechny vzorky spolu korelovaly v PCA analýze (Obr. 19) a klastrovaly se spolu v CA (Obr. 20). Identické výsledky byly pozorovány též v případě vyhodnocování poměrů metabolitů (Obr. 21), všechny vzorky pacientů se shlucovaly na základě poměru C3/C2.



Obrázek č. 19: PCA analýza všech vzorků plazem a všech analyzovaných acylovaných karnitinů.

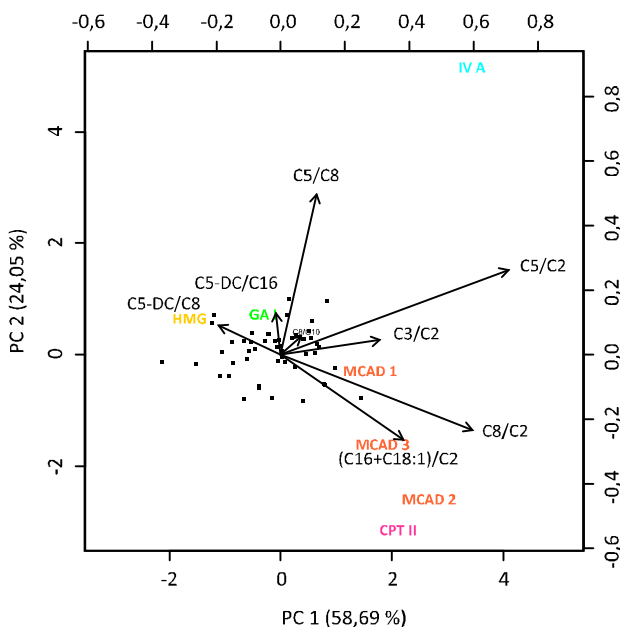


Obrázek č. 20: Klastrová analýza všech vzorků plazem a všech analyzovaných acylovaných karnitinů.



Obrázek č. 21: PCA analýza všech vzorků plazem a specifických poměrů analyzovaných acylovaných karnitinů (Tab. 7).

Ostatní metabolity (i jejich poměry) byly minoritní a měly nízkou variabilitu ve srovnání s C3, respektive C3/C2, proto byly vzorky s PA a MMA pro vyhodnocování dalších poruch pomocí PCA analýzy vyloučeny (Obr. 22).



Obrázek č. 22: PCA analýza specifických poměrů analyzovaných acylovaných karnitinů (Tab. 14) a všech vzorků plazem po odstranění vzorků s PA a MMA s velmi vysokou variabilitou.

Deficit deficit acyl-CoA dehydrogenasy mastných kyselin se středně dlouhým řetězcem

Deficit acyl-CoA dehydrogenasy mastných kyselin se středně dlouhým řetězcem (EC 1.3.99.3; OMIM 201450) je nejčastěji vyskytující se poruchou oxidace mastných kyselin. Toto onemocnění je hlavně charakterizováno zvýšenou koncentrací oktanoylkarnitinu (C8). Ostatní markery jsou ukázány v Tab. 14.

Všechny tři vzorky od pacientů s MCAD spolu klastrovaly (Obr. 20), ačkoli C8 nebyl dostatečně specifický pro toto onemocnění. Bylo prokázáno, že hodnocení poměrů acylovaných karnitinů je

mnohem důležitější. Pacienti s MCAD byli diskriminováni na základě poměru C8/C2 (Obr. 22).

Ostatní poruchy

Další čtyři poruchy byly zastoupeny pouze jedním příslušným vzorkem plazmy. Byl analyzován jeden vzorek s deficitem karnitinpalmitoyltransferasy typu II (EC 2.3.1.21; OMIM 255110), dále s isovalerovou acidurií (OMIM 243500) způsobenou deficitem isovaleryl-CoA-dehydrogenasy (EC 1.3.99.10), 3-hydroxy-3-methylglutarou acidurií (OMIM 246450) vyznačovanou deficitem 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA-lyasy (EC 4.1.3.4) a glutarovou acidurií (OMIM 231670) charakterizovanou deficitem glutaryl-CoA-dehydrogenasy (EC 1.3.99.7).

Všechny vzorky byly rozlišeny s ohledem na charakteristické poměry acylovaných karnitinů. Poměr (C16+C18:1)/C2 byl specifický pro CPT II, poměry C5/C8 a C5/C2 byly charakteristické pro IV A. Méně významný byl poměr C5-DC/C16 pro GA I a C5-DC/C8 pro HMG (Obr. 22).

V této studii se podařilo úspěšně uplatnit cílený metabolický přístup v diagnostice dědičných metabolických poruch. Všech 34 pacientů trpících různými DMP se podařilo rozlišit od 50 kontrolních vzorků na základě nesupervizovaného statistického zpracování dat.

4.3 Použití necíleného metabolického přístupu pro diagnostiku DMP

Cílem této studie bylo uplatnit necílený metabolický přístup pro diagnostiku dědičných metabolických poruch a navázat tak na skupinu prof. Siuzdaka⁵⁹, která tento přístup představila při diagnostice methylmalonové a propionové acidemie.

Tato studie byla prováděna ve spolupráci se dvěma zahraničními institucemi. Vzorky byly analyzovány u prof. P. Bruheima (Department of Biotechnology, Norwegian University of Science and Technology, Trondheim, Norsko) ve spolupráci s dr. A. Brunsvikem (SINTEF, Department of Biotechnology, Trondheim, Norsko). Data byla poté zpracovávána a statisticky vyhodnocována ve spolupráci se skupinou prof. Goodacre (School of Chemistry and Manchester Interdisciplinary Biocentre, University of Manchester, Manchester, UK), především za pomoci statistika E. Correa a odborníka na LC-MS A. Vaughana.

4.3.1 Biologický materiál

Necílený metabolický přístup pro diagnostiku DMP byl studován na vzorcích suchých krevních skvrn a vzorcích močí. Celkem bylo analyzováno dvacet kontrolních a šest defektních vzorků DBS - tři od pacientů s PKU a tři od pacientů s MSUD. Markery pro obě studované poruchy jsou uvedeny v Tab. 16, přehled vzorků pacientů znázorňuje Tab. 17. Vzorky DBS s označením *MSUD 3* a *PKU 3* byly poskytnuty od dr. Mariny Stopsack z Univerzitní kliniky Carl Gustav Carus v Drážďanech.

Tabulka č. 16: Přehled studovaných aminoacidurií a jejich markerů v DBS

| Porucha | Markery v DBS |
|---------|---------------|
| PKU | ↑ Phe |
| MSUD | ↑ xLeu, ↑Val |

Tabulka č. 17: Přehled analyzovaných vzorků suchých krevních skvrn od pacientů s dědičnou metabolickou poruchou (Ž, žena; M, muž; nezn., neznámo)

| Pacient | Pohlaví | Věk (hod) | Porodní váha (g) | Předchozí biochemické nálezy ve vzorku DBS (μmol/l) |
|---------|---------|-----------|------------------|---|
| MSUD 1 | Ž | 9 let | nezn. | nezn. |
| MSUD 2 | Ž | 72 | 2500 | Leu 500, Val 250 |
| MSUD 3 | nezn. | nezn. | nezn. | Leu 280 |
| PKU 1 | M | 48 | 3570 | Phe 490 |
| PKU 2 | Ž | 72 | 4100 | Phe 203 |
| PKU 3 | nezn. | nezn. | nezn. | Phe 850 |

Dále bylo porovnáváno 14 kontrolních vzorků močí s 21 vzorky močí od 9 různých pacientů trpících čtyřmi odlišnými DMP. Konkrétně se jednalo o vzorky od pacientů s cystinurií (CYS), MSUD, galaktosemií (GALT) a deficitem ADSL. Tab. 18 shrnuje markery pro všechny studované poruchy v moči, v Tab. 19 je uveden přehled analyzovaných vzorků pacientů.

Tabulka č. 18: Přehled studovaných DMP a jejich markerů v moči

| Porucha | Markery v DBS |
|---------|--|
| ADSL | ↑ SAICAr, SAdo |
| GALT | ↑ galaktosa, galaktitol |
| CYS | ↑ ornithin, lysin, arginin, cystin, cystein-homocystein disulfid |
| MSUD | ↑ k. 3-hydroxybutanová, 2-oxoisovalerová, 2-hydroxyisovalerová, 2-oxo-3-methylvalerová, 2-oxoisokapronová, 2-hydroxy-3-methylvalerová, 2-hydroxyisokaproová, xLeu, valin |

Tabulka č. 19: Přehled analyzovaných vzorků močí od pacientů s dědičnou metabolickou poruchou (Ž, žena; M, muž; nezn., neznámo)

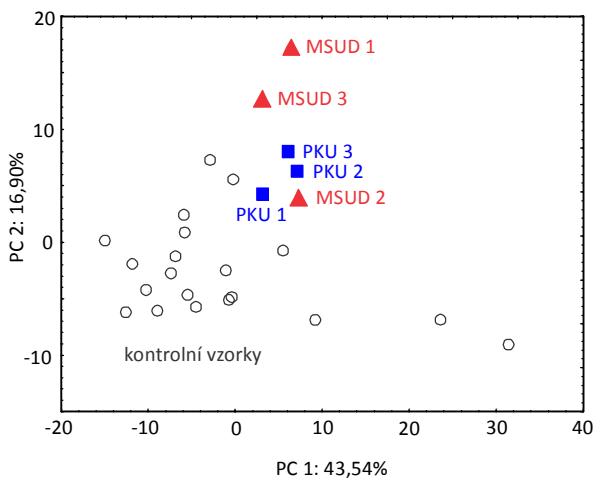
| Pacient | Pohlaví | Věk (rok) | Předchozí biochemické nálezy ve vzorku moče (μmol/mmol kreat.) |
|---------|---------|-----------|--|
| ADSL 1 | M | 20 | SAICAr 1,7; SAdo 13,8 |
| ADSL 2a | Ž | 21 | SAICAr 9,3; SAdo 27,8 |
| ADSL 2b | Ž | 22 | SAICAr 10,5; SAdo 30,3 |
| ADSL 2c | Ž | 22 | SAICAr 6,2; SAdo 17,0 |
| CYS 1a | M | nezn. | Cys 225, Orn 75, Lys 554, Arg 231 |
| CYS 1b | M | 13 | nezn. |
| CYS 1c | M | nezn. | nezn. |
| CYS 2a | Ž | nezn. | Arg 1190, Cys 352, Orn 420, Lys 1060 |
| CYS 2b | Ž | nezn. | Arg 1120, Cys 760, Orn 710, Lys 2110 |
| CYS 2c | Ž | nezn. | Arg 750, Cys 315, Orn 290, Lys 800 |
| CYS 3a | M | nezn. | Cys 73, Gly 480, Lys 400, Arg 15 |
| CYS 3b | M | 14 | Cys 58, Gly 480, Lys 235 |
| GALT 1a | M | 16 | Galaktitol 84 |
| GALT 1b | M | 16 | Hypoaminoacidurie |
| GALT 1c | M | 15 | Galaktitol 100 |
| GALT 2a | M | 32 | Galaktitol pod LOD |
| GALT 2b | M | 32 | Galaktitol pod LOD |
| MSUD 1 | Ž | 8 | Leu 42, Ile 12 |
| MSUD 2a | Ž | 18 | Val 13, Ile 10, Leu 35 |
| MSUD 2b | Ž | 16 | nezn. |
| MSUD 2c | Ž | 17 | nezn. |

4.3.2 Zpracování dat a statistické vyhodnocení

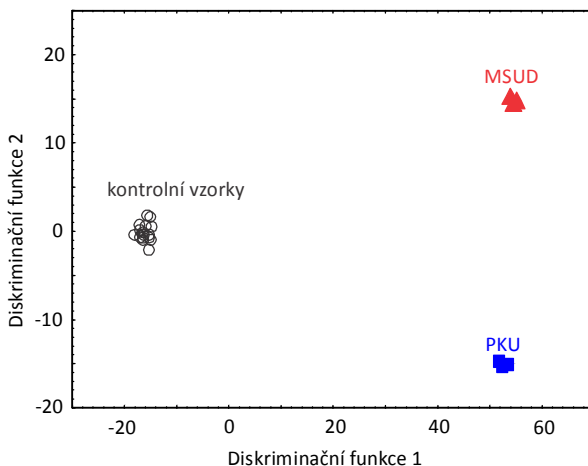
Ve vzorcích DBS bylo celkem identifikováno a zpracováváno 296 znaků, které byly charakterizovány přesnou hmotou (m/z) a retenčním časem (rt). V rámci statistického vyhodnocení byla nejdříve provedena nesupervizovaná PCA. Již v této metodě došlo k patrnému oddělení vzorků pacientů od kontrolních (Obr. 23), i když bylo zřejmé, že je potřeba naznačenou klasifikaci dále analyzovat.

Jednoznačné výsledky byly následně získány pomocí supervizované metody PCA-DA, kdy došlo k jasnému rozlišení všech 3 studovaných skupin - kontrol a pacientů s PKU a MSUD (Obr. 24).

Po následné identifikaci metabolitů bylo zjištěno, že tomu tak bylo díky příslušným markerům jednotlivých onemocnění.



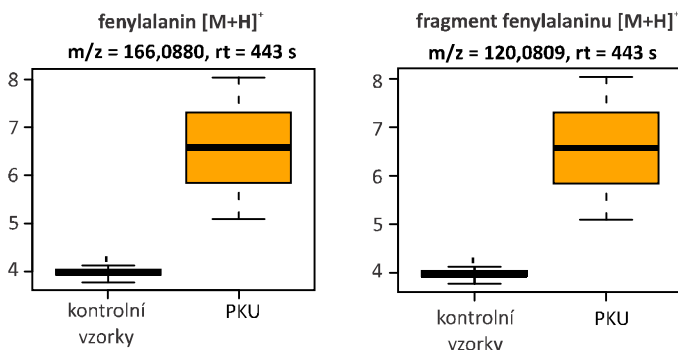
Obrázek č. 23: PCA analýza vzorků DBS.



Obrázek č. 24: PCA-DA analýza vzorků DBS.

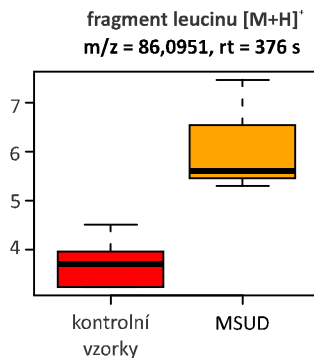
Na základě PLS regrese byl vytvořen seznam dvaceti znaků, které se nejvíce rozlišovaly u dané poruchy ve srovnání s kontrolními vzorky. U prvních dvanácti byly vytvořeny krabicové grafy.

U pacientů s PKU byla zjištěna nejvíce diskriminující látka fenylalanin (m/z 166,0880; rt 443 s), což je hlavní marker tohoto onemocnění (Tab. 16). Druhým nejvíce diskriminujícím znakem byl softwarem identifikován parametr s m/z 120,0809, který měl stejný reteční čas, následně byl identifikován jako produkt fragmentace fenylalaninu ve zdroji. Na krabicových grafech (Obr. 25) lze vidět, že u pacientů s PKU byly oba tyto znaky výrazně zvýšené ve srovnání s kontrolními vzorky.



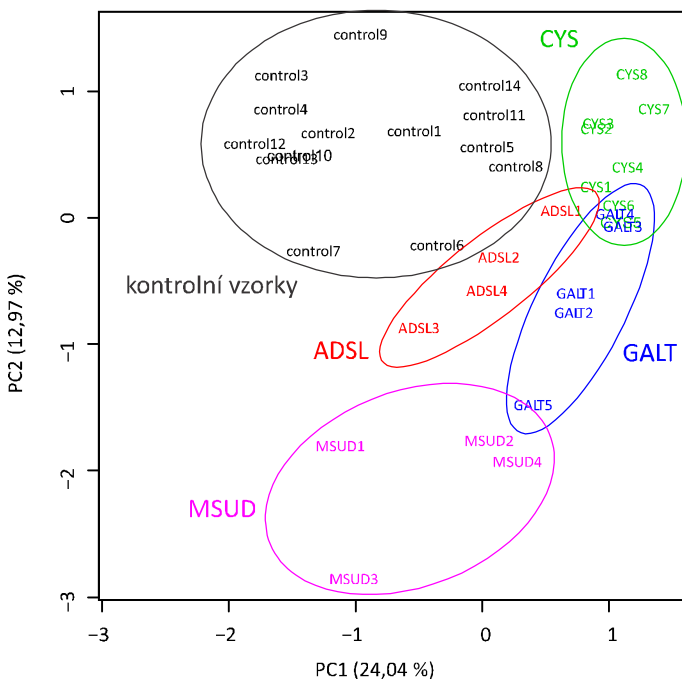
Obrázek č. 25: Krabicový diagram pro fenylalanin a jeho fragment, jedná se o nejvíce diskriminující znaky pro vzorky od pacientů s PKU.

U pacientů s MSUD se leucin (m/z 132,1014; rt 376 s), hlavní marker tohoto onemocnění, umístil též mezi nejvýznamnějšími znaky. Jeho fragment s m/z 86,0951 se dokonce jevil jako více diskriminující. Krabicový graf ukazující rozdíly mezi vzorky pacientů a kontrolními vzorky je zobrazen na Obr. 26.

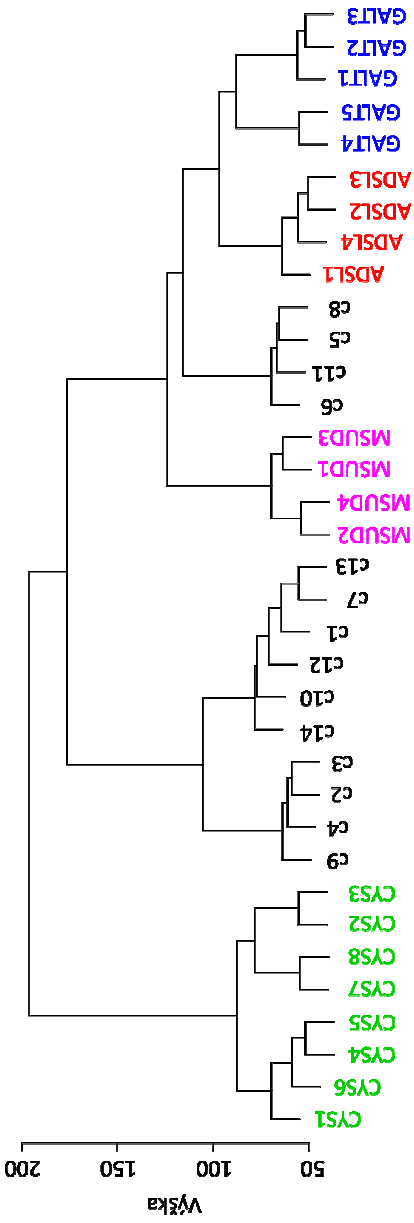


Obrázek č. 26: Krabicový diagram pro fragment leucinu, nejvíce diskriminující identifikovaný znak pro pacienty s MSUD.

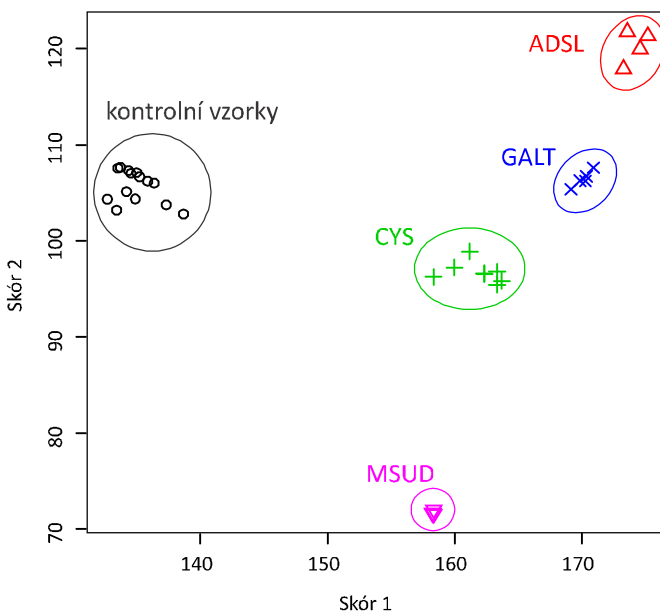
Ve vzorcích močí bylo celkem identifikováno 1492 znaků, které byly dále zpracovávány. Opět byly nejdříve na data aplikovány nesupervizované statistické nástroje. V PCA se podařilo rozlišit vzorky pacientů od kontrolních (Obr. 27). Ve shlukové analýze všechny vzorky se stejnou poruchou jasně klastrovaly a byly též rozlišeny od kontrolních vzorků (Obr. 28). Odlišení všech 5 studovaných skupin (kontrolní vzorky, CYS, MSUD, ADSL a GALT) bylo jednoznačně potvrzeno na základě supervizované PCA-DA (Obr. 29).



Obrázek č. 27: PCA vzorků močí



Obrázek č. 28: Klastrová analýza vzorků moči



Obrázek č. 29: PCA-DA vzorků močí

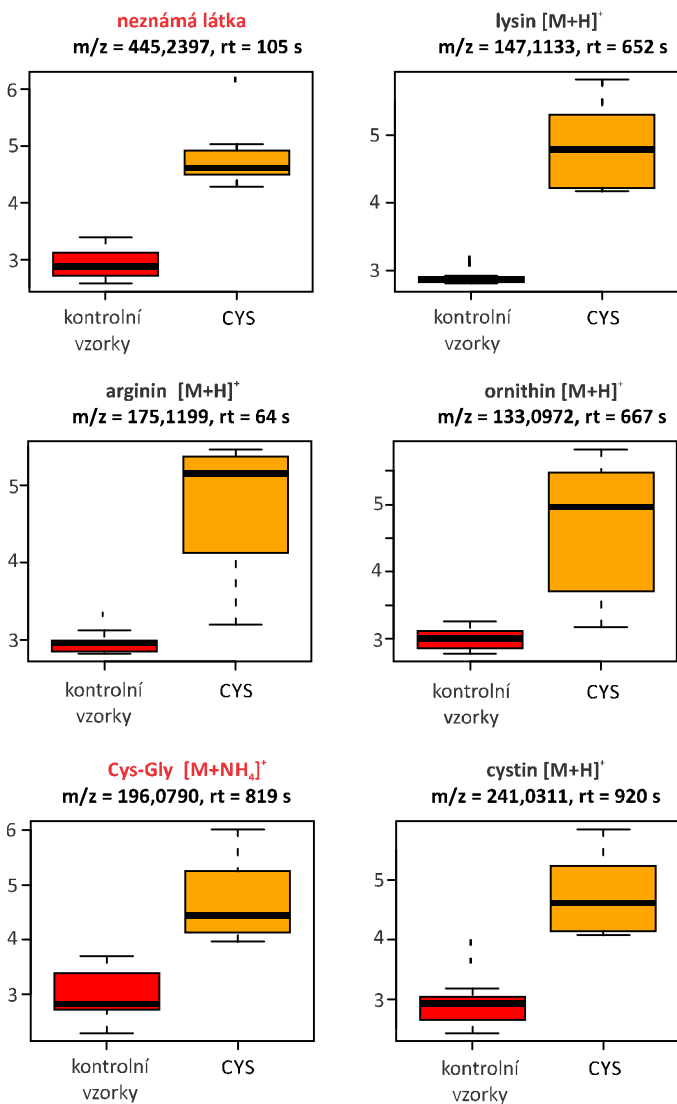
Pomocí PLS regrese bylo následně opět zjištěno 20 nejvíce diskriminujících znaků pro jednotlivá onemocnění. Nejlepší výsledky byly získány u pacientů s cystinurií. Toto onemocnění je totiž charakterizováno několika biochemickými markery (Tab. 18), které lze snadno analyzovat použitou metodou. Většina těchto markerů byla potvrzena, byla totiž mezi deseti nejvíce diskriminujícími znaky (Tab. 20). Na krabicových grafech (Obr. 30) jsou ukázány aminokyseliny lysin, arginin, ornithin, a cystin. Nejvíce diskriminující znak s retenčním časem kolem mrtvého objemu se nám nepodařilo dosud identifikovat. Znak charakterizovaný m/z 196,0790 a rt 819 s byl identifikován jako cysteinyl-glycin (Cys-Gly). Identita této látky byla následně potvrzena analýzou odpovídajícího standardu.

Tabulka č. 20: Seznam deseti nejvíce diskriminujících látek pro vzorky močí od pacientů s cystinurií.

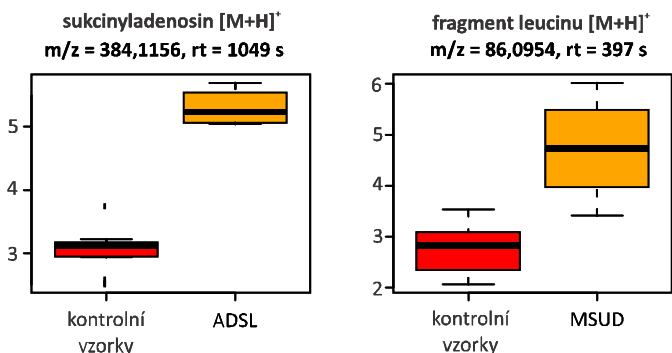
| Pořadí | Rt (s) | m/z | m/z | Identifikace |
|--------|--------|----------|------------|---|
| | | naměřené | teoretické | |
| 1 | 105 | 445,2397 | - | neznámá látka |
| 2 | 652 | 147,1133 | 147,1128 | lysin [M+H] ⁺ |
| 3 | 604 | 175,1199 | 175,1190 | arginin [M+H] ⁺ |
| 4 | 667 | 133,0972 | 133,0972 | ornithin [M+H] ⁺ |
| 5 | 652 | 84,0812 | 84,0809 | fragment lysinu |
| 6 | 651 | 169,0973 | 169,0947 | lysin [M+Na] ⁺ |
| 7 | 603 | 176,1213 | 176,1224 | izotop argininu [M+H] ⁺ |
| 8 | 651 | 130,0865 | 130,0861 | fragment lysinu [M+H] ⁺ |
| 9 | 819 | 196,0790 | 196,0750 | Cys-Gly [M+NH ₄] ⁺ |
| 10 | 920 | 241,0311 | 241,0311 | cystin [M+H] ⁺ |

U pacientů s deficitem ADSL byl potvrzen jeden z jeho známých markerů - sukcinyladenosin (Tab. 18), který byl přítomen u pacientů ve výrazně vyšších hladinách, než tomu bylo u kontrolních vzorků (Obr. 31). Mezi třemi nejvíce diskriminujícími znaky byly ty, které odpovídaly m/z sukcinyladenosinu [M+H]⁺ (m/z 384,1156), dále jeho izotopu [M+H]⁺ (m/z 385,1175) a jeho fragmentu [M+H]⁺ (m/z 340,1329). Ve všech třech případech byl pozorován stejný retenční čas 1050 s, který byl shodný s příslušným standardem. SAICAR, druhý marker této poruchy, nebyl vůbec ve vzorcích identifikován, možným důvodem může být jeho nestabilita v iontovém zdroji²².

Vzorky močí od pacientů s MSUD se vyznačují hlavně zvýšenými hladinami různých organických kyselin (Tab. 18). Protože měření probíhalo v pozitivním módu, nebyla jejich analýza dostatečně citlivá. Mezi deseti nejvíce diskriminujícími látkami byl však potvrzen fragment leucinu s m/z 86,0954, jehož retenční čas odpovídal analyzovanému standardu leucinu. Na krabicovém grafu lze vidět jeho zvýšení u pacientů s MSUD ve srovnání s kontrolními vzorky (Obr. 31).



Obrázek č. 30: Krabicový diagram pro nejvíce diskriminující látky ve vzorcích moči u pacientů s cystinurií.



Obrázek č. 31: Krabicový diagram pro nejvíce diskriminující identifikované látky pro pacienty s deficitem ADSL a MSUD

V této studii bylo prokázáno, že lze pro diagnostiku dědičných metabolických poruch uplatnit i necílený metabolomický přístup. Všechny vzorky od pacientů trpících různými dědičnými metabolickými poruchami se podařilo rozlišit od kontrolních vzorků uplatněním různých statistických nástrojů. Na základě diskriminační analýzy byly dále prokázány známé markery jednotlivých onemocnění. Také byl nalezen nový potenciální marker pro cystinurii - zvýšení Cys-Gly v moči. Tento nález je však nutné potvrdit na větším souboru dat, to znamená analyzovat více vzorků močí od cystinuriků a zároveň i vzorky od kontrolních jedinců.

4.4 Cílená metabolická metoda a její aplikace

4.4.1 Databáze OIMeDa

V rámci metabolického projektu byla vytvořena databáze OIMeDa, která integruje data z databáze KEGG (<http://www.kegg.com/>), HMDB (<http://www.hmdb.ca/>) a další zdroje. Ukázky databáze OIMeDa jsou zobrazeny na Obr. 32-35. Vytvořená databáze obsahuje obecné informace o každém příslušném metabolitu, jakou je např. sumární vzorec, chemická struktura, InCHI kód a v některých případech i dostupná publikovaná MS spektra. Každý metabolit v databázi je charakterizován KEGG a HMDB číslem. Všechny standardy metabolitů, které byly dostupné v laboratoři či byly následně dokoupeny a zahrnuty do vyvíjené cílené metabolické metody, byly označeny číslem „STxxx“. Tyto metabolity obsahují v databázi další údaje, jako je přesné místo uskladnění standardu či vlastní naměřená hmotnostní spektra.

Databáze OIMeDa byla průběžně aktualizována o nové standardy. Při výběru nakupovaných standardů se vycházelo z různých studií, kde se zabývali stanovením metabolitů v různých biologických materiálech. Nejdříve se vycházelo ze studie, která se zabývala analýzou ve vodě rozpustných metabolitů v extraktech *Escherichia coli* pomocí HILIC ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií⁷¹. Byly vybrány pouze metabolity vztahující se k lidskému organismu. Dále byly doplněny metabolity, které byly v jedné studii měřeny v rámci metabolického profilování močí, plazem a tkání⁸³. Také se braly v úvahu studie, které se zabývaly konkrétní skupinou látek, např. aminokyselinami⁸⁴ purinovými a pyrimidinovými látkami¹⁸ či organickými kyselinami⁸⁵.

| ID. M. # | ID. Name | ID. KEG | ID. HMDB | ID. MW | ID. Formula | ID. InChI | ID. Metabolism | ID. Pathway |
|----------|----------------|---------|---|--------|-------------|-----------------------------------|---------------------------------------|---|
| S7001 | L-Valine | C00183 | http://hmdb.ca/metabolites/HMDB008883 | 117.1 | C5H11NO2 | InChI=1/C5H11NO2/c1-3(2)4(6)5 | Amino Acid Metabolism | Valine, Iucaine and isoleucine degradation |
| S7002 | L-Tyrosine | C00082 | http://hmdb.ca/metabolites/HMDB001558 | 181.2 | C9H9NO3 | InChI=1/C9H9NO3/c1-9(11)8(10)12 | Amino Acid Metabolism | Tyrosine metabolism |
| S7003 | L-Tryptophan | C00078 | http://hmdb.ca/metabolites/HMDB009279 | 204.2 | C11H12N2O2 | InChI=1/C11H12N2O2/c4(2)-9(11)10 | Amino Acid Metabolism | Tryptophan metabolism |
| S7004 | Beta-Alanine | C00188 | http://hmdb.ca/metabolites/HMDB001627 | 119.1 | C4H9NO3 | InChI=1/C4H9NO3/c1-3(16)15(16)7 | Amino Acid Metabolism | Valine, Iucaine and isoleucine biosynthesis |
| S7005 | L-Serine | C00099 | http://hmdb.ca/metabolites/HMDB000555 | 89.1 | C4H9NO3 | InChI=1/C4H9NO3/c4-2(1)-13(16)7 | Metabolism of Other Amino Acids | beta-Alanine metabolism |
| S7006 | L-Proline | C00148 | http://hmdb.ca/metabolites/HMDB001187 | 105.1 | C5H9NO2 | InChI=1/C5H9NO2/c2(5)-8(16)2-1(3) | Amino Acid Metabolism | Citrullino acid metabolism |
| S7007 | Paracetamol | C00854 | http://hmdb.ca/metabolites/HMDB002012 | 115.1 | C8H9NO2 | InChI=1/C8H9NO2/c1-9(7)5-1(11) | Metabolism of Co-factors and Vitamins | Paracetamol and CoA biosynthesis |
| S7008 | Methionine | C01933 | http://hmdb.ca/metabolites/HMDB001645 | 131.2 | C6H13NO2S | InChI=1/C6H13NO2S/c1-2,3,4,5(7)7 | Metabolism of Co-factors and Vitamins | Methionine metabolism |
| S7009 | L-Methionine | C00730 | http://hmdb.ca/metabolites/HMDB006986 | 149.2 | C7H14NO2S | InChI=1/C7H14NO2S/c1-9,3-2,4(6) | Amino Acid Metabolism | Biosynthesis of Steroids |
| S7010 | L-Homocysteine | C00431 | http://hmdb.ca/metabolites/HMDB008226 | 140.3 | C6H13NO2S | InChI=1/C6H13NO2S/c1-18(19)8,6,9 | lipid Metabolism | Cysteine metabolism |
| S7011 | Serotonin | C00780 | http://hmdb.ca/metabolites/HMDB001159 | 176.2 | C10H11NO2 | InChI=1/C10H11NO2/c5(7)-1(3)9 | Amino Acid Metabolism | Tryptophan metabolism |
| S7012 | Homocystine | C0187 | http://hmdb.ca/metabolites/HMDB003373 | 286.4 | 2H11N2O4S2 | InChI=1/C8H11NO2S2/c5-7(11)8 | Amino Acid Metabolism | Methionine metabolism |
| S7013 | Homocysteine | C00135 | http://hmdb.ca/metabolites/HMDB001172 | 155.2 | C6H9NO2S | InChI=1/C6H9NO2S/c2-1(4)9(11) | Amino Acid Metabolism | lipid Metabolism |
| S7014 | Homocystine | C00258 | http://hmdb.ca/metabolites/HMDB008358 | 324.9 | C8H13NO4S2 | InChI=1/C8H13NO4S2/c2-1(4)9(11) | Metabolism of Co-factors and Vitamins | Lysine biosynthesis |
| S7015 | Homocystine | C00532 | http://hmdb.ca/metabolites/HMDB002325 | 160.1 | C6H8NO5 | InChI=1/C6H8NO5/c6-3(15)10(1) | Metabolism of Co-factors and Vitamins | Lysine biosynthesis |
| S7016 | Homocystine | C00536 | http://hmdb.ca/metabolites/HMDB002325 | 160.1 | C6H8NO5 | InChI=1/C6H8NO5/c6-3(15)10(1) | Metabolism of Co-factors and Vitamins | Lysine biosynthesis |
| S7017 | Homocystine | C00536 | http://hmdb.ca/metabolites/HMDB002325 | 160.1 | C6H8NO5 | InChI=1/C6H8NO5/c6-3(15)10(1) | Metabolism of Co-factors and Vitamins | Lysine biosynthesis |
| S7018 | Homocystine | C00536 | http://hmdb.ca/metabolites/HMDB002325 | 160.1 | C6H8NO5 | InChI=1/C6H8NO5/c6-3(15)10(1) | Metabolism of Co-factors and Vitamins | Lysine biosynthesis |
| S7019 | Homocystine | C00536 | http://hmdb.ca/metabolites/HMDB002325 | 160.1 | C6H8NO5 | InChI=1/C6H8NO5/c6-3(15)10(1) | Metabolism of Co-factors and Vitamins | Lysine biosynthesis |
| S7020 | Homocystine | C00536 | http://hmdb.ca/metabolites/HMDB002325 | 160.1 | C6H8NO5 | InChI=1/C6H8NO5/c6-3(15)10(1) | Metabolism of Co-factors and Vitamins | Lysine biosynthesis |
| S7021 | Homocystine | C00536 | http://hmdb.ca/metabolites/HMDB002325 | 160.1 | C6H8NO5 | InChI=1/C6H8NO5/c6-3(15)10(1) | Metabolism of Co-factors and Vitamins | Lysine biosynthesis |
| S7022 | Homocystine | C00536 | http://hmdb.ca/metabolites/HMDB002325 | 160.1 | C6H8NO5 | InChI=1/C6H8NO5/c6-3(15)10(1) | Metabolism of Co-factors and Vitamins | Lysine biosynthesis |
| S7023 | Homocystine | C00536 | http://hmdb.ca/metabolites/HMDB002325 | 160.1 | C6H8NO5 | InChI=1/C6H8NO5/c6-3(15)10(1) | Metabolism of Co-factors and Vitamins | Lysine biosynthesis |
| S7024 | Homocystine | C00536 | http://hmdb.ca/metabolites/HMDB002325 | 160.1 | C6H8NO5 | InChI=1/C6H8NO5/c6-3(15)10(1) | Metabolism of Co-factors and Vitamins | Lysine biosynthesis |
| S7025 | Homocystine | C00536 | http://hmdb.ca/metabolites/HMDB002325 | 160.1 | C6H8NO5 | InChI=1/C6H8NO5/c6-3(15)10(1) | Metabolism of Co-factors and Vitamins | Lysine biosynthesis |
| S7026 | Homocystine | C00536 | http://hmdb.ca/metabolites/HMDB002325 | 160.1 | C6H8NO5 | InChI=1/C6H8NO5/c6-3(15)10(1) | Metabolism of Co-factors and Vitamins | Lysine biosynthesis |
| S7027 | Homocystine | C01456 | http://hmdb.ca/metabolites/HMDB003012 | 151.2 | C6H11NO4 | InChI=1S/C9H11NO3/c1(6)-6-8(11)1 | Amino Acid Metabolism | Lysine biosynthesis |
| S7028 | Homocystine | C01132 | http://hmdb.ca/metabolites/HMDB008353 | 221.2 | 2H11NO6 | InChI=1/C8H15NO6/c1-3-11(9)5-7 | Carbohydrate Metabolism | Galactose metabolism |
| S7029 | Homocystine | C05145 | http://hmdb.ca/metabolites/HMDB009311 | 103.1 | C4H9NO6 | InChI=1/C4H9NO6/c2-3(2)-5(4)6(7) | Nucleotide Metabolism | Pyrimidine metabolism |
| S7030 | Homocystine | C00898 | http://hmdb.ca/metabolites/HMDB009356 | 150.1 | C4H9NO6 | InChI=1/C4H9NO6/c5-1(3)7(8)7,6(4) | Carbohydrate Metabolism | Glyoxylate and dicarboxylate metabolism |
| S7031 | Homocystine | C00035 | http://hmdb.ca/metabolites/HMDB000727 | 165.6 | C6H11NO3 | InChI=1/C6H11NO3/c6-9(5)-3-1 | Amino Acid Metabolism | Lysine degradation |
| S7032 | Homocystine | C00077 | http://hmdb.ca/metabolites/HMDB003329 | 145.3 | C7H11NO3 | InChI=1/C7H11NO3/c6-4-1-2-5-10 | Amino Acid Metabolism | Urea cycle and metabolism of amino groups |
| S7033 | Homocystine | C00077 | http://hmdb.ca/metabolites/HMDB003329 | 145.3 | C7H11NO3 | InChI=1/C7H11NO3/c6-4-1-2-5-10 | Amino Acid Metabolism | Glyoxylate and dicarboxylate metabolism |
| S7034 | Homocystine | C00077 | http://hmdb.ca/metabolites/HMDB003329 | 145.3 | C7H11NO3 | InChI=1/C7H11NO3/c6-4-1-2-5-10 | Amino Acid Metabolism | Arginine and proline metabolism |
| S7035 | Homocystine | C00589 | http://hmdb.ca/metabolites/HMDB002014 | 188.6 | 2H11NO2 | InChI=1/C9H12NO2/c6-3-1-4-4(1) | Amino Acid Metabolism | Tyrosine metabolism |
| S7036 | Homocystine | C00310 | http://hmdb.ca/metabolites/HMDB016444 | 157.1 | C8H11NO5 | InChI=1/C9H13NO5/c6-1-3(8)9(10) | Carbohydrate Metabolism | Penicillin and Alcuronate Interconversions |
| S7037 | Homocystine | C00383 | http://hmdb.ca/metabolites/HMDB006991 | 104.1 | C3H4O4 | InChI=1/C3H4O4/c4-2(1)-3(1)7 | Nucleotide Metabolism | Pyrimidine metabolism |

Obrazek č. 32: Ukázka databáze OIMeDa – ilustrativní ukázka skupiny metabolitů seřazených dle čísla „STxxx“ (konkrétně ST001-ST037) s dalšími informacemi o látce (KEGG číslo, molekulová hmotnost, sumární vzorec, InChI kód, odpovídající metabolismus a dráha).

| Compound | | L-Kynurenine | | | | | |
|-----------|-------------|--------------|--------------|-------|-------|-------|-------|
| ID | Body Fluids | Company | Published MS | MS_KP | MS_KN | MS_AP | MS_AN |
| Blood | | Y | | | | | |
| Urine | | Y | | | | | |
| technique | | LC | | | | | |
| sample | | T U P | | | | | |
| Human | | H | | | | | |

Obrázek č. 34: Ukázka databáze OIMeDa – zobrazení konkrétního metabolitu, záložka obsahující informace o biologických materiálech, ve kterých byly již identifikovány, případně jakou technikou byly analyzovány.

| Compound | | L-Kynurenine | | | | | |
|----------------|-------------|--------------|--------------|-------|-------|-------|-------|
| ID | Body Fluids | Company | Published MS | MS_KP | MS_KN | MS_AP | MS_AN |
| Cat, No, | | K8625-25MG | | | | | |
| Name | | L-Kynurenine | | | | | |
| Grade | | crystalline | | | | | |
| price | | 25,4 | | | | | |
| Metabolite | | L-Kynurenine | | | | | |
| Mr (g/mol) | | 208,21 | | | | | |
| Catalog number | | K8625-25G | | | | | |
| Producer | | Sigma | | | | | |
| Purity | | | | | | | |
| Quantity | | 25 mg | | | | | |
| Group | | P1-C | | | | | |

Obrázek č. 35: Ukázka databáze OIMeDa – zobrazení konkrétního metabolitu, záložka obsahující informace o jeho dostupnosti, katalogovém čísle, množství či čistotě daného standardu, též přesné umístění originální produktu.

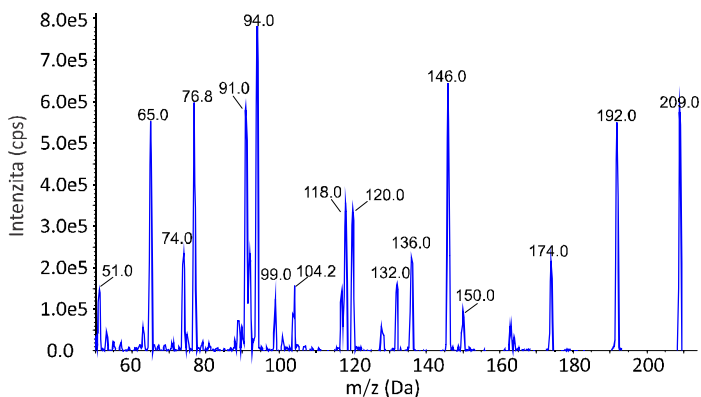
V současné době databáze OIMeDa obsahuje celkem 1370 metabolitů. Z tohoto celkového počtu bylo vybráno 447 metabolitů, jejichž odpovídající standardy byly zakoupeny, rozpuštěny, optimalizovány a zahrnuty do vyvíjené cílené metabolické metody.

4.4.2 Optimalizace MS parametrů

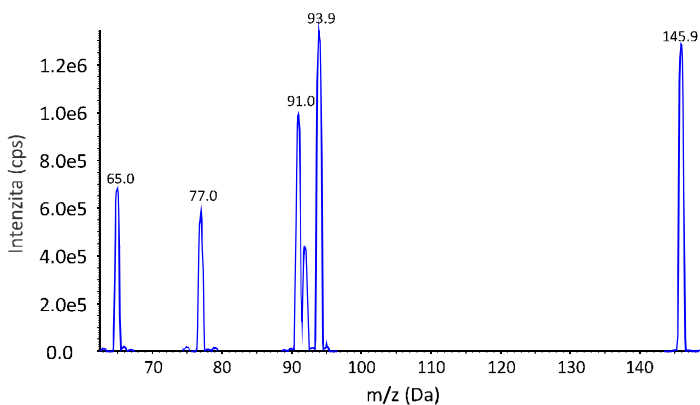
Nejdříve bylo nutné pro každou látku optimalizovat MS parametry. Směsi standardů v alkalické mobilní fázi byly přímo dávkovány do iontového zdroje MS/MS a měřeny v pozitivním a negativním módu, jak je uvedeno v kapitole 3.4.3. Při automatické MS optimalizaci byly zadány monoizotopové hmotnosti jednotlivých standardů ve směsi. Nejdříve byl pro každou hmotu optimalizován deklasterační potenciál, poté byla produkována hmotnostní spektra, která již byla generována za optimální hodnoty DP. Z hmotnostního spektra bylo automaticky vybíráno pět neintenzivnějších fragmentů, u nichž byla dále optimalizována hodnota kolizní energie, vstupního potenciálu a výstupního potenciálu kolizní cely. Fragmentační spektra byla poté produkována již za optimálních hodnot všech parametrů.

Na ukázkou je uvedena MS optimalizace kynureninu v pozitivním módu, který má monoizotopovou hmotnost 208. Při optimalizaci byla nejdříve nastavena minimální hodnota m/z fragmentu 50 Da, bylo získáno hmotnostní spektrum (Obr. 36) a následně fragmentační spektrum obsahující pět neintenzivnějších vzniklých fragmentů (Obr. 37), jednalo se konkrétně o fragmenty s hodnotou m/z 65, 77, 91, 94 a 146. Pro získání větší specifičnosti tranzice byla snaha získat a optimalizovat vznik fragmentů s větší hodnotou m/z , proto byla provedena znovu MS optimalizace, tentokrát však s nastavením minimální hodnoty m/z fragmentu 120. Opět bylo získáno hmotnostní (Obr. 38) a fragmentační (Obr. 39) spektrum. Při tomto nastavení byly automaticky vybrány fragmenty s hodnotou m/z 132, 136, 146, 174 a 192. Optimalizace DP je ukázána na Obr. 40. Optimalizace CE pro 6 vybraných fragmentů je zobrazena na Obr. 41.

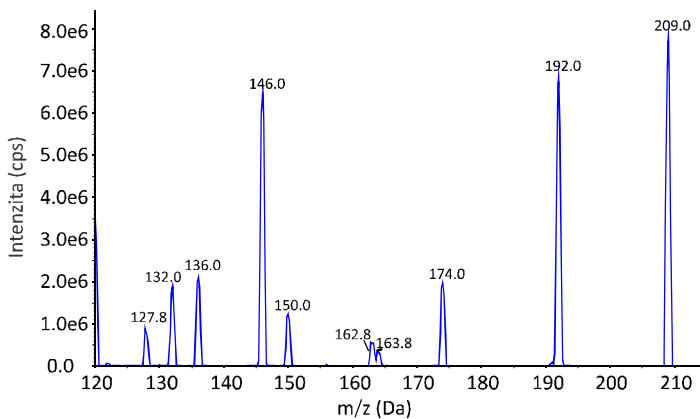
Správnost provedené MS optimalizace byla porovnávána s dostupnou literaturou^{71,72, 84,85}. Získaná hmotnostní spektra byla též porovnávána se spektry uvedenými v databázi HMDB a METLIN. Je opět uvedeno hmotnostní spektrum kynureninu v databázi HMDB (Obr. 42) a METLIN (Obr. 43). V obou případech byla pozorována většina fragmentů shodných s našimi získanými výsledky. Tímto bylo potvrzeno, že získané fragmenty jsou správné a že je lze použít pro další analýzu. Tento postup byl následně aplikován na všechny látky zahrnuté do metody.



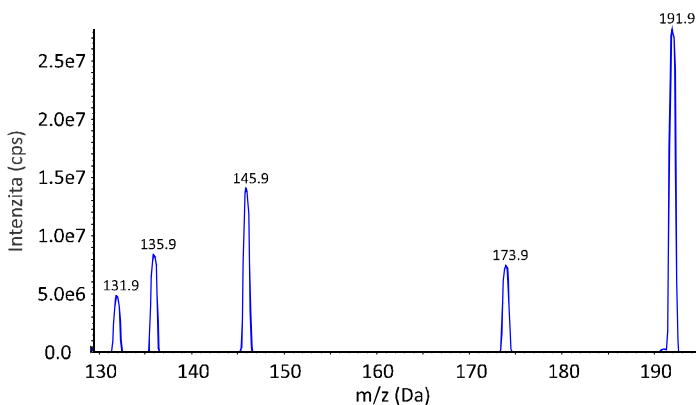
Obrázek č. 36: Hmotnostní spektrum kynureninu v pozitivním módu získané z automatické MS optimalizace při nastavení rozsahu od m/z 50 Da.



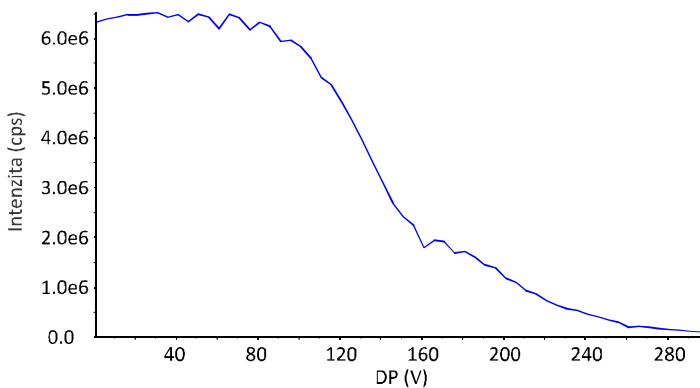
Obrázek č. 37: Fragmentační spektrum molekulového iontu kynureninu v pozitivním módu při optimální hodnotě DP a CE (získáno z automatické MS optimalizace při nastavení výběru 5 nejintenzivnějších fragmentů a minimální hodnoty m/z fragmentu 50 Da).



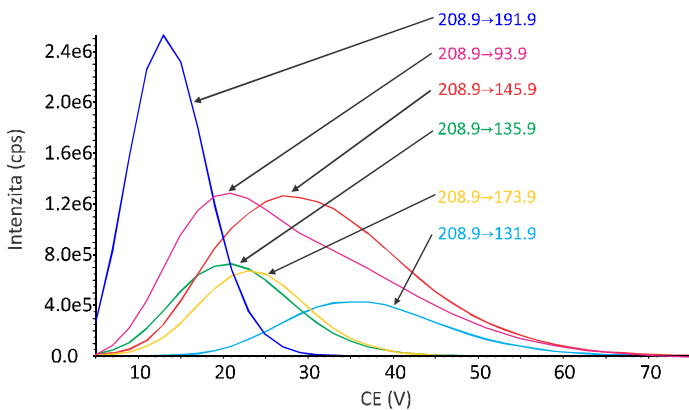
Obrázek č.38: Hmotnostní spektrum kynureninu v pozitivním módu získané z automatické MS optimalizace při nastavení rozsahu od m/z 120 Da.



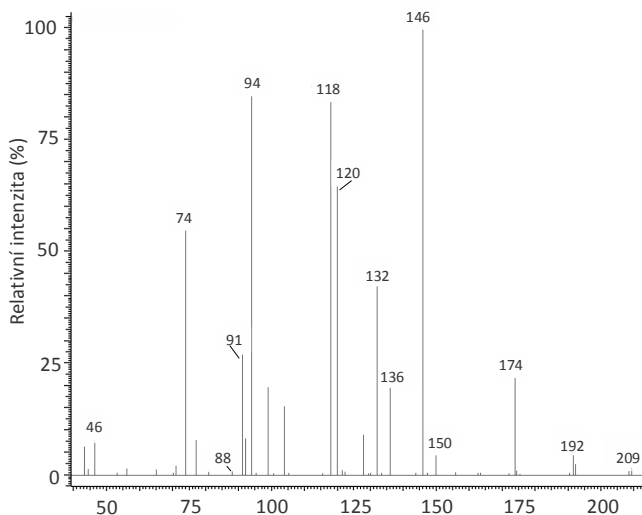
Obrázek č. 39: Fragmentační spektrum molekulového iontu kynureninu v pozitivním módu při optimální hodnotě DP a CE (získáno z automatické MS optimalizace při nastavení výběru 5 nejintenzivnějších fragmentů a minimální hodnoty m/z fragmentu 120 Da).



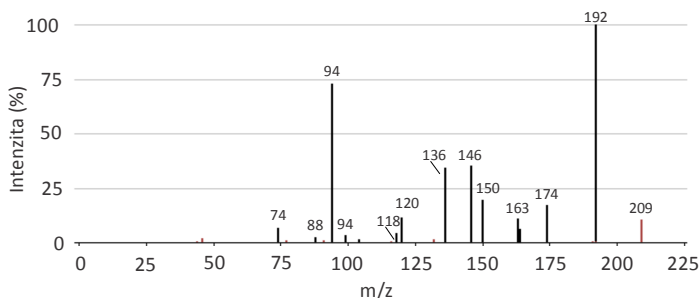
Obrázek č. 40: Optimalizace DP pro molekulární ion kynureninu v pozitivním módu.



Obrázek č. 41: Optimalizace CE pro šest nejintenzivnějších fragmentů kynureninu v pozitivním módu.



Obrázek č. 42: Hmotnostní spektrum kynureninu uvedené v databázi HMDB (při hodnotě CE 25 V v pozitivním módu).



Obrázek č. 43: Hmotnostní spektrum kynureninu uvedené v databázi METLIN (při hodnotě CE 10 V v pozitivním módu).

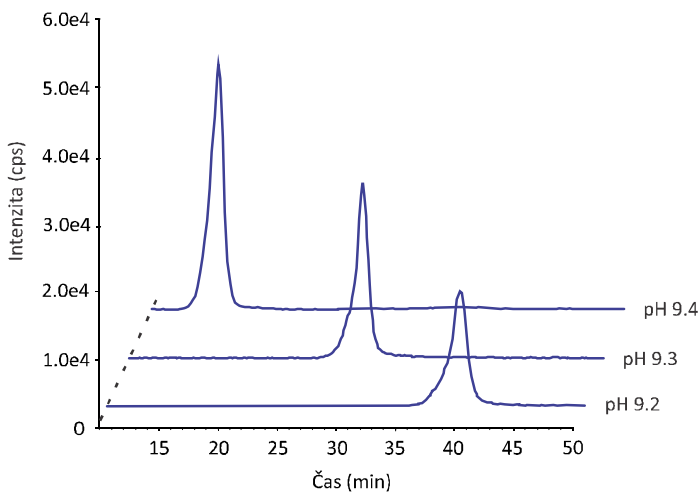
4.4.3 Optimalizace HPLC podmínek

Pro analýzu studovaných látek pomocí HPLC byla modifikována již dříve publikovaná metoda^{71,72}. Bylo optimalizováno pH mobilních fází, podmínky gradientové eluce (složení, průtok), teplota kolony a množství nastříkovaného vzorku.

Byla zvolena aminopropyllová kolona, tj. systém HILIC (polární stacionární fáze a polární mobilní fáze), protože byla snaha analyzovat i velice polární látky, včetně nukleotidů. Metoda umožňuje analýzu široké škály tříd metabolitů, byly analyzovány různé aminokyseliny a jejich deriváty, oligopeptidy, organické kyseliny, purinové a pyrimidinové látky, cukry atd.

Jedním z důležitých parametrů byl výběr pH mobilní fáze A (20 mmol/l octan amonný), které nejvíce ovlivňovalo separaci nukleotidtrifosfátů. Při pH nižším než 9,3 se trifosfáty zadržovaly na koloně velmi silně a nestačila ani doba 30 min při 95 % podílu mobilní fáze A k jejich eluci z kolony. Se zvyšujícím se pH se jejich retence snižovala (Obr. 44). Jako optimální pH bylo zvolena hodnota 9,45.

Po výběru pH mobilní fáze A byl gradient ještě pozměněn a to s cílem od sebe rozdělit např. monofosfáty se stejným MRM přechodem. Podmínky jsou popsány v kapitole 3.4.4.

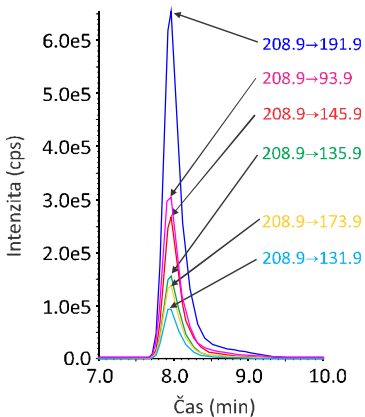


Obrázek č. 44: Vliv pH na retenční čas dITP

4.4.4 Analýza směsí standardů

Směsi standardů byly analyzovány metodou HPLC-MS/MS za optimalizovaných podmínek a bylo zjištěno retenční chování všech studovaných standardů. Nejdříve byly standardy identifikovány více MRM přechody získanými z MS/MS optimalizace a poté už pouze jedním vybraným MRM přechodem, který se vyznačoval nejvyšším poměrem signálu k šumu a zároveň u něj nebyla pozorována interference.

Na ukázkou je uvedena separace kynureninu, který byl nejdříve identifikován pomocí šesti vybraných MRM přechodů (Obr. 45). Retenční čas této látky činil 7,9 min. Do finální metody byla vybrána tranzice 208,9→93,9, která se vyznačovala nejvyšším podílem signálu ku šumu.



Obrázek č. 45: LC-MS analýza kynureninu pomocí 6 vybraných MRM přechodů, pro další analýzu vybrán přechod 208,9→93,9 (nejvyšší poměr signál ku šumu).

Metoda celkem zahrnuje sledování 222 přechodů v pozitivním módu a 188 přechodů v negativním módu (Tab. 21).

Tabulka č. 21: Tabulka upřesňující počty metabolitů z jednotlivých skupin látek, které jsou analyzovány cílenou metabolickou analýzou.

| Skupina | Pozitivní | Negativní |
|---|-----------|-----------|
| | mód | mód |
| Aminokyseliny a jejich deriváty | 59 | 19 |
| Oligopeptidy | 28 | 6 |
| Sacharidy a jejich konjugáty | 3 | 33 |
| Organické kyseliny | 3 | 50 |
| Purinové a pyrimidinové báze a ribosidy | 21 | 15 |
| Nukleotidy a jejich deriváty | 14 | 45 |
| Látky z ostatních skupin | 39 | 20 |
| Acylované karnitiny | 55 | - |

Konkrétní metabolity s jejich vybraným přechodem (Q1→Q3), optimalizovaným DP a CE a dále zjištěným retečním časem (RT) jsou shrnuty v tabulkách dle charakterizující skupiny, do které jsou řazeny, a též podle módu, ve kterém jsou analyzovány (Tab. 22–29). Hodnota EP a CXP byla pro každý MRM přechod nastavena na 10 V pro pozitivní mód a na -10 V pro negativní mód. Optimalizace vybraných skupin látek byly náplní jedné bakalářské (skupina nukleotidů)⁸⁶ a diplomové práce (výběr aminokyselin a oligopeptidů)⁸⁷.

Některé MRM přechody představují více metabolitů se stejnou molekulovou hmotností, které se z důvodu podobné struktury nepodařilo rozlišit na základě fragmentace ani retenčního času (látky vyznačeny modře). Jedná se např. o cukry glukosa/fruktosa/galaktosa/manosa či citrát/isocitrát nebo sukcinát/methylmalonát.

V Tab. 22–29 si lze všimnout, jak se v HILIC systému jednotlivé látky separují podle své polaritě a polaritě mobilní fáze. Retence se snižuje s rostoucí polaritou mobilní fáze, tedy se zvyšujícím se podílem

vodné mobilní fáze A (20mmol/l octan amonný, pH 9,45) k organickému rozpouštědлу (acetonitril) a naopak se zvyšuje s rostoucí polaritou dané látky. Mezi méně polární metabolity se mohou řadit např. dihydrouracil a thymin, které se eluují z kolony do 3. min (Tab. 30). Naopak nukleotidy se na koloně zdržují nejsilněji, kdy na retenci má největší vliv počet fosfátů v molekule. Monofosfáty se eluují přibližně v 18. min, difosfáty 21. min a trifosfáty až po 23. min (Tab. 32a, 32b).

Do metody byly též zařazeny syntetizované ribosidy PDNS (Tab. 30 a 31) (viz kapitola 3.1.1). Metoda umožňuje i analýzu acylovaných karnitinů (Tab. 36a,b). Od většiny z nich nebyly dostupné standardy, proto jejich optimalizované MS parametry a retenční časy byly zjišťovány na základě analýzy směsi jejich stabilně značených analogů, které se používají pro kvantifikaci v rámci novorozeneckého screeningu (Tab. 7). Charakteristický fragment pro všechny acylované karnitiny měl hodnotu 85 Da. Dále si lze všimnout, že jejich retence se snižovala s prodlužujícím se acylovaným řetězcem. Acetylkarnitin (C2) se eluoval v čase 7,4 min, naopak acylkarnitin s nejdelším acylovaným řetězcem hexakosandioylkarnitin (C26-DC) se eluoval v čase 5,1 min.

Za účelem zlepšení citlivosti jsou analýzy finálně prováděny v „scheduled MRM“ módu. Každý MRM přechod je sledován v separačním okně eluovaného píku metabolitu. Toto nastavení umožňuje zvýšení poměru signálu k šumu, protože se maximalizuje čas měření příslušného přechodu (dwell time). Také je možno zkrátit celkový čas měření všech přechodů a tím zlepšit profil píku díky vyššímu počtu bodů.

V metodě je dále nastaveno automatické přepínání pozitivní a negativní ionizace během jedné analýzy, tím dochází k polovičnímu zkrácení celkové doby analýzy jednoho vzorku a prodloužení životnosti použité kolony (viz kapitola 3.4.5.)

Tabulka č. 22a: Aminokyseliny a jejich deriváty analyzované LC-MS/MS metodou v pozitivním módu – s RT do 9,1 min (metabolity označené modře nelze od sebe rozlišit).

| Metabolit | RT (min) | Q1 | Q3 | DP (V) | CE (V) |
|--|---------------------|-----------|-----------|-------------------|-------------------|
| N-acetyltirosin | 1,9 | 224,0 | 135,9 | 26 | 25 |
| kyselina pikolinová | 6,5 | 123,9 | 106,0 | 16 | 15 |
| betain | 7,0 | 118,0 | 58,1 | 161 | 39 |
| leucin / isoleucin / alloile | 7,6 | 132,0 | 85,9 | 46 | 15 |
| pipekolát | 7,8 | 129,9 | 84,1 | 51 | 23 |
| kynurenin | 7,9 | 208,9 | 93,9 | 56 | 21 |
| N,N-dimethylglycin / 2-aminoisobutanoát | 8,0 | 103,9 | 58,0 | 63 | 18 |
| fenylalanin | 8,0 | 165,9 | 119,9 | 36 | 19 |
| homocystein | 8,0 | 135,9 | 91,0 | 136 | 33 |
| valin | 8,1 | 117,9 | 72,1 | 56 | 17 |
| selenomethionin | 8,1 | 197,9 | 108,8 | 56 | 31 |
| hexanoylglycin | 8,2 | 173,9 | 75,9 | 51 | 13 |
| methionin | 8,2 | 149,9 | 104,0 | 41 | 15 |
| tryptofan | 8,2 | 204,9 | 145,8 | 41 | 25 |
| cysteát | 8,3 | 169,9 | 105,8 | 96 | 27 |
| 5-aminolevulinát / kreatin | 8,3 | 131,9 | 89,9 | 61 | 19 |
| prolin | 8,5 | 115,9 | 69,9 | 31 | 21 |
| fenylserin | 8,6 | 181,9 | 118,0 | 36 | 21 |
| benzoylalanin | 8,6 | 193,9 | 105,0 | 46 | 23 |
| guanidinoacetát | 8,7 | 117,9 | 75,9 | 51 | 17 |
| 3-aminoisobutanoát | 8,8 | 104,0 | 86,1 | 56 | 11 |
| tiglylglycin / 3-methylkrotonylglycin | 8,8 | 157,9 | 83,0 | 40 | 13 |
| 4-hydroxyprolin | 8,9 | 131,9 | 85,8 | 41 | 19 |
| hippurát | 8,9 | 179,8 | 104,9 | 36 | 19 |
| alanin / sarkosin | 8,9 | 89,9 | 44,1 | 51 | 23 |
| 4-guanidinobutanoát | 9,0 | 145,9 | 86,9 | 51 | 21 |
| 3-methylhistidin | 9,1 | 169,9 | 123,9 | 46 | 21 |
| tyrosin | 9,1 | 181,9 | 136,0 | 46 | 19 |

Tabulka č. 22b: Aminokyseliny a jejich deriváty analyzované LC-MS/MS metodou v pozitivním módu – s RT od 9,3 min (metabolity označené modře nelze od sebe rozlišit).

| Metabolit | RT (min) | Q1 | Q3 | DP (V) | CE (V) |
|---------------------------|---------------------|-----------|-----------|-------------------|-------------------|
| kanavanin | 9,3 | 177,1 | 76,0 | 31 | 21 |
| asparagin | 9,3 | 132,9 | 74,1 | 36 | 21 |
| 5-oxoprolin | 9,3 | 129,9 | 84,0 | 51 | 19 |
| 5-hydroxytryptofan | 9,4 | 220,9 | 161,9 | 46 | 25 |
| β-alanin | 9,4 | 89,9 | 71,9 | 26 | 13 |
| threonin / homoserin | 9,4 | 119,9 | 73,9 | 41 | 15 |
| N-acetylornitin | 9,6 | 174,9 | 114,9 | 51 | 17 |
| 4-aminobutanoát | 9,6 | 104,0 | 68,9 | 56 | 21 |
| glutamin | 9,6 | 146,9 | 83,9 | 66 | 25 |
| glycin | 9,7 | 75,9 | 29,9 | 41 | 27 |
| 6-aminohexanoát | 9,7 | 132,0 | 79,0 | 36 | 23 |
| serin | 9,8 | 105,8 | 60,0 | 16 | 15 |
| histidin | 10,0 | 155,9 | 110,0 | 46 | 19 |
| homoarginin | 10,1 | 188,9 | 84,0 | 76 | 31 |
| N-methylhistidin | 10,1 | 169,9 | 96,0 | 41 | 27 |
| β-alanyl-N-methylhistidin | 10,3 | 240,8 | 108,8 | 46 | 33 |
| S-adenosylhomocystein | 10,3 | 384,9 | 135,9 | 56 | 29 |
| lysin | 11,2 | 146,9 | 84,0 | 66 | 23 |
| ornitin | 11,2 | 132,9 | 115,6 | 51 | 13 |
| homocystin | 12,0 | 268,9 | 135,9 | 56 | 15 |
| cystathionin | 12,7 | 222,9 | 88,1 | 51 | 41 |
| glutamát | 14,4 | 147,8 | 83,9 | 41 | 23 |
| 2-aminoadipát | 14,5 | 161,8 | 98,0 | 56 | 21 |
| sacharopin | 14,7 | 276,9 | 129,9 | 76 | 23 |
| cystin | 14,8 | 240,9 | 151,8 | 36 | 19 |
| cystein | 15,2 | 121,9 | 58,9 | 156 | 31 |
| fosfokreatin | 17,0 | 211,7 | 90,1 | 26 | 21 |
| N-acetylaspartát | 17,2 | 175,8 | 134,0 | 36 | 15 |
| O-fosfo-L-serin | 18,2 | 186,0 | 87,8 | 31 | 17 |
| S-adenosyl-L-methionin | 19,1 | 399,0 | 250,1 | 26 | 23 |
| xanthurenát | 20,7 | 205,9 | 159,9 | 26 | 27 |

Tabulka č. 23: Aminokyseliny a jejich deriváty analyzované LC-MS/MS metodou v negativním módu (metabolity označené modře nelze od sebe rozlišit).

| Metabolit | RT (min) | Q1 | Q3 | DP (V) | CE (V) |
|--|---------------------|-----------|-----------|-------------------|-------------------|
| 2-furoylglycin | 8,1 | 168,0 | 124,2 | -45 | -14 |
| fenylpropionylglycin | 8,2 | 205,9 | 73,9 | -50 | -20 |
| 2-methyl-butrylgljycin/ isovalerylgljycin | 8,6 | 157,9 | 73,9 | -35 | -18 |
| N-acetylmethionin | 9,0 | 189,9 | 141,9 | -20 | -16 |
| isobutrylgljycin / butrylgljycin | 9,0 | 143,9 | 74,0 | -15 | -16 |
| taurin | 9,1 | 123,8 | 79,9 | -45 | -28 |
| triiodothyronin | 9,1 | 649,4 | 126,8 | -110 | -76 |
| N-acetyl-L-alanin | 9,1 | 130,0 | 88,1 | -5 | -16 |
| 5-oxoprolin | 9,3 | 128,0 | 82,0 | -60 | -18 |
| citrulin | 9,4 | 174,0 | 131,2 | -40 | -16 |
| propionylgljycin | 10,0 | 129,9 | 74,0 | -30 | -16 |
| N,N-dimethylarginin | 10,0 | 200,9 | 156,2 | -10 | -16 |
| kynurenát | 10,4 | 187,8 | 144,0 | -45 | -20 |
| arginin | 11,3 | 173,0 | 131,1 | -55 | -22 |
| aspartát | 11,7 | 132,0 | 88,1 | -35 | -16 |
| N-argininosukcinát | 15,3 | 288,9 | 132,0 | -70 | -28 |
| suberylgljycin | 17,0 | 229,9 | 74,0 | -50 | -24 |
| N-acetylglutamát | 17,1 | 187,9 | 102,0 | -45 | -24 |
| 3-sulfinoalanin | 17,9 | 150,8 | 89,0 | -35 | -16 |

Tabulka č. 24: Oligopeptidy analyzované LC-MS/MS metodou v negativním módu.

| Metabolit | RT (min) | Q1 | Q3 | DP (V) | CE (V) |
|----------------------------|---------------------|-----------|-----------|-------------------|-------------------|
| Leu-Leu | 6,9 | 243,1 | 130,2 | -60 | -24 |
| Gly-aminobutyrová kyselina | 10,9 | 158,9 | 101,9 | -45 | -18 |
| Gly-Met | 12,2 | 204,8 | 101,9 | -35 | -26 |
| Cys-Gly | 15,5 | 177,0 | 143,0 | -150 | -12 |
| Asp-Phe | 15,8 | 279,1 | 164,0 | -45 | -20 |
| Leu-Gly | 17,8 | 186,8 | 124,9 | -30 | -20 |

Tabulka č. 25: Oligopeptidy analyzované LC-MS/MS metodou v pozitivním módu.

| Metabolit | RT (min) | Q1 | Q3 | DP (V) | CE (V) |
|---------------------|---------------------|-----------|-----------|-------------------|-------------------|
| Gly-Gly-ethylester | 2,2 | 161,0 | 104,0 | 26 | 15 |
| g-Glu-Cys | 6,5 | 251,0 | 149,0 | 61 | 29 |
| Ala-Phe | 8,7 | 236,9 | 166,0 | 46 | 17 |
| Leu-Tyr | 8,9 | 295,0 | 182,0 | 56 | 17 |
| Gly-Phe | 9,0 | 222,9 | 119,9 | 61 | 29 |
| Ala-Met | 9,0 | 220,9 | 149,8 | 61 | 17 |
| Ala-Val | 9,2 | 188,9 | 117,9 | 41 | 15 |
| Gly-Leu | 9,3 | 188,9 | 132,0 | 45 | 17 |
| Leu-Gly-Gly | 9,4 | 245,9 | 86,0 | 51 | 21 |
| Gly-Val | 9,8 | 174,9 | 118,0 | 51 | 17 |
| Gly-Trp | 10,1 | 261,9 | 188,0 | 56 | 25 |
| Ala-Ala | 10,3 | 160,9 | 89,9 | 66 | 15 |
| Ala-Pro | 10,3 | 186,8 | 104,8 | 66 | 23 |
| Gly-Ser | 10,7 | 162,9 | 84,1 | 41 | 25 |
| homokarnosin | 10,8 | 240,8 | 155,9 | 41 | 15 |
| karnosin | 10,9 | 226,9 | 109,9 | 86 | 33 |
| Gly-Ala | 11,1 | 146,9 | 89,9 | 56 | 15 |
| Gly-Tyr | 11,2 | 238,9 | 136,0 | 1 | 27 |
| Ala-Asn | 11,3 | 203,9 | 133,1 | 46 | 17 |
| Ala-Gly-Gly | 11,5 | 203,9 | 129,0 | 36 | 13 |
| Gly-Gly | 11,7 | 132,9 | 75,9 | 51 | 15 |
| Gly-Asp | 11,9 | 189,9 | 132,9 | 31 | 19 |
| Gly-Gly-Gly | 12,1 | 189,6 | 114,8 | 46 | 13 |
| Gly-Gly-Gly-Gly | 12,2 | 246,9 | 115,1 | 56 | 25 |
| His-His | 13,2 | 293,0 | 110,1 | 61 | 37 |
| S-laktoylglutathion | 14,9 | 380,3 | 233,0 | 56 | 23 |
| glutathion | 15,9 | 307,9 | 178,9 | 41 | 17 |
| glutathion disulfid | 18,8 | 612,9 | 484,0 | 56 | 27 |

Tabulka č. 26: Sacharidové složky analyzované LC-MS/MS metodou v pozitivním módu (metabolity označené modře nelze od sebe rozlišit).

| Metabolit | RT (min) | Q1 | Q3 | DP (V) | CE (V) |
|---|---------------------|-----------|-----------|-------------------|-------------------|
| N-acetylglukosamin/ N-acetylgalaktosamin/ N-acetylmanosamin | 6,9 | 221,9 | 138,1 | 41 | 23 |
| glukosamin | 7,8 | 179,9 | 84,0 | 51 | 19 |
| galaktosamin | 7,8 | 180,0 | 72,0 | 21 | 21 |

Tabulka č. 27a: Sacharidové složky analyzované LC-MS/MS metodou v negativním módu - s RT do 10 min (metabolity označené modře nelze od sebe rozlišit).

| Metabolit | RT (min) | Q1 | Q3 | DP (V) | CE (V) |
|--|---------------------|-----------|-----------|-------------------|-------------------|
| erythritol | 2,1 | 121,0 | 59,1 | -15 | -14 |
| 1,6-anhydro- β -D-glukosa | 3,8 | 161,0 | 101,1 | -25 | -10 |
| xylulosa | 4,7 | 148,9 | 71,0 | -5 | -24 |
| ribosa | 5,3 | 148,8 | 88,9 | -30 | -14 |
| glukono-1,5-laktone I | 5,4 | 176,9 | 129,0 | -10 | -12 |
| xylosa | 5,9 | 149,9 | 89,9 | -15 | -8 |
| fukosa | 5,9 | 162,8 | 59,1 | -28 | -20 |
| ribitol/arabitol | 6,5 | 150,9 | 71,0 | -38 | -24 |
| glukosa / fruktosa / galaktosa / manosa | 7,1 | 178,9 | 88,9 | -40 | -12 |
| galaktitol | 7,3 | 180,8 | 100,8 | -35 | -16 |
| manitol | 7,4 | 180,9 | 89,1 | -35 | -18 |
| laktosa / maltosa | 8,8 | 340,9 | 161,0 | -55 | -12 |
| melibiosa / sacharosa | 9,0 | 340,9 | 179,0 | -100 | -18 |
| melezitosa | 9,3 | 502,9 | 323,0 | -160 | -30 |
| rafinosa | 9,5 | 502,8 | 179,0 | -160 | -30 |
| maltotriosa | 9,9 | 502,9 | 341,0 | -100 | -12 |

Tabulka č. 27b: Sacharidové složky analyzované LC-MS/MS metodou v negativním módu - s RT od 10 min (metabolity označené modře nelze od sebe rozlišit).

| Metabolit | RT (min) | Q1 | Q3 | DP (V) | CE (V) |
|-------------------------------|---------------------|-----------|-----------|-------------------|-------------------|
| stachyosa | 10,3 | 664,8 | 383,0 | -185 | -44 |
| glycerát | 11,2 | 104,9 | 58,8 | -5 | -18 |
| threonát | 11,3 | 135,0 | 75,1 | -40 | -18 |
| kyselina sialová | 13,2 | 309,0 | 87,0 | -125 | -20 |
| glukonát | 13,4 | 194,8 | 129,0 | -40 | -18 |
| glukono-1,5-laktone II | 13,5 | 176,9 | 129,1 | -10 | -12 |
| glukuronát | 14,3 | 192,8 | 113,0 | -50 | -16 |
| ribosa-5-P / xylulosa-5-P | 17,4 | 228,8 | 96,8 | -45 | -20 |
| erytroza-4-P | 17,5 | 198,9 | 96,8 | -20 | -14 |
| sorbitol-6-P | 17,5 | 260,8 | 78,8 | -40 | -66 |
| glukosa-1-P/ galaktosa-1-P | 17,6 | 258,8 | 78,9 | -40 | -58 |
| N-acetylglukosamin-6-P | 17,6 | 299,8 | 78,8 | -55 | -74 |
| glycerol-3-P | 17,7 | 170,9 | 78,9 | -35 | -34 |
| glukosamin-6-P | 17,7 | 257,8 | 78,9 | -40 | -72 |
| glukosa-6-P / fruktosa-6-P | 18,7 | 258,9 | 96,8 | -30 | -22 |
| 3-fosfoglycerát | 20,5 | 184,8 | 78,9 | -20 | -50 |
| deoxyribosa-5-P | 21,3 | 212,8 | 97,0 | -35 | -20 |

Tabulka č.28: Organické kyseliny analyzované LC-MS/MS metodou v pozitivním módu.

| Metabolit | RT (min) | Q1 | Q3 | DP (V) | CE (V) |
|---------------------------------|---------------------|-----------|-----------|-------------------|-------------------|
| 1-aminocyklopropan-1-karboxylát | 10,0 | 101,9 | 56,0 | 31 | 17 |
| 3-ureidopropionát | 12,8 | 132,9 | 72,0 | 41 | 17 |
| 4-hydroxycyklohexylacetát | 14,1 | 158,9 | 98,8 | 81 | 17 |

Tabulka č.29a: Organické kyseliny analyzované LC-MS/MS metodou v negativním módu – s RT do 11 min (metabolity označené modře nelze od sebe rozlišit).

| Metabolit | RT (min) | Q1 | Q3 | DP (V) | CE (V) |
|--|---------------------|-----------|-----------|-------------------|-------------------|
| palmitát | 6,5 | 255,1 | 45,1 | -145 | -54 |
| 3-methyl-2-oxobutanoát | 6,5 | 114,9 | 71,1 | -20 | -12 |
| 3-fenylpropanoát | 6,8 | 149,0 | 105,1 | -50 | -14 |
| fenyllaktát | 6,9 | 165,0 | 101,1 | -30 | -38 |
| fenylacetát | 7,3 | 135,0 | 91,1 | -35 | -12 |
| 2-hydroxyisokapronát | 7,4 | 130,8 | 84,7 | -5 | -16 |
| salicylát / 4-hydroxybenzoát | 7,4 | 136,9 | 92,9 | -35 | -22 |
| 2-hydroxyfenylacetát | 7,5 | 150,8 | 106,9 | -5 | -18 |
| 3-indolpropionát | 7,7 | 187,8 | 116,2 | -65 | -18 |
| indollaktát | 7,8 | 203,6 | 128,1 | -40 | -30 |
| askorbát | 7,8 | 174,9 | 114,9 | -15 | -16 |
| 3-(3-hydroxyfenyl)propanoát | 8,3 | 165,0 | 106,1 | -15 | -30 |
| levulinát | 8,4 | 115,0 | 71,1 | -40 | -14 |
| 2-hydroxyisovalerát | 8,4 | 116,9 | 71,1 | -55 | -16 |
| indol-3-acetát | 8,6 | 173,9 | 130,1 | -10 | -16 |
| benzoát | 8,7 | 120,9 | 76,9 | -15 | -16 |
| 2-hydroxyisobutanoát / 2-hydroxybutanoát | 9,0 | 102,9 | 57,0 | -35 | -16 |
| glyoxylát | 9,1 | 72,9 | 55,2 | -45 | -22 |
| sukcinylacetón | 9,1 | 156,9 | 99,0 | -25 | -14 |
| 2,3-dihydroxybenzoát / 2,5-dihydroxybenzoát | 9,2 | 152,9 | 108,0 | -37 | -32 |
| kyselina tropová | 10,0 | 164,9 | 102,9 | -20 | -14 |
| 2-oxobutanoát / acetoacetát / sukcinát semialdehyd | 10,2 | 100,8 | 57,0 | -30 | -12 |
| laktát | 10,4 | 88,9 | 43,0 | -30 | -16 |
| oxalát | 10,5 | 88,9 | 70,9 | -45 | -14 |
| 2-oxoglutarát | 10,5 | 144,9 | 101,0 | -30 | -10 |
| porfobilinogen | 10,6 | 224,8 | 98,9 | -30 | -20 |
| pantothénát | 10,9 | 217,9 | 88,0 | -75 | -20 |

Tabulka č. 29b: Organické kyseliny analyzované LC-MS/MS metodou v negativním módu – RT od 11 min (metabolity označené modře nelze od sebe rozlišit).

| Metabolit | RT (min) | Q1 | Q3 | DP (V) | CE (V) |
|--|---------------------|-----------|-----------|-------------------|-------------------|
| homovanilát | 11,5 | 180,8 | 122,1 | -40 | -20 |
| vanilmandelát | 11,6 | 196,8 | 138,0 | -45 | -18 |
| 2-oxoadipát | 11,7 | 158,9 | 58,9 | -40 | -18 |
| 4-hydroxybutanoát | 11,8 | 102,9 | 56,9 | -30 | -18 |
| chinát | 12,4 | 191,0 | 93,1 | -105 | -30 |
| pyruvát | 14,8 | 86,925 | 43,1 | -45 | -12 |
| sebakát | 17,0 | 200,9 | 139,0 | -65 | -26 |
| 5-hydroxyindolacetát | 17,1 | 189,8 | 144,0 | -45 | -30 |
| suberát | 17,2 | 172,9 | 111,0 | -35 | -20 |
| 2-hydroxyglutarát | 17,3 | 146,9 | 128,9 | -25 | -16 |
| oxaloacetát / glutarát | 17,3 | 130,8 | 86,8 | -37 | -16 |
| glutakonát / ketoleucin / mevalonolakton/ 3-methyl-2-oxopentanoát | 17,3 | 128,9 | 85,0 | -36 | -12 |
| malát | 17,5 | 132,9 | 71,1 | -35 | -20 |
| hydroxypyruvát | 17,5 | 102,8 | 59,0 | -35 | -12 |
| ethylmalonát | 17,6 | 130,8 | 86,8 | -37 | -16 |
| fumarát / kapronát | 17,6 | 114,9 | 71,0 | -38 | -13 |
| sukcinát / methylmalonát | 17,6 | 116,8 | 73,0 | -35 | -14 |
| malonát / 3-hydroxybutanoát | 17,7 | 102,9 | 59,0 | -30 | -14 |
| 3-merkaptolaktát | 18,3 | 120,9 | 77,0 | -10 | -16 |
| tartarát | 18,7 | 148,9 | 87,0 | -40 | -18 |
| akonitát | 20,6 | 172,9 | 84,9 | -35 | -18 |
| citrát / isocitrát | 20,7 | 190,8 | 110,9 | -40 | -18 |
| fosfoenolpyruvát | 20,8 | 166,8 | 78,9 | -35 | -24 |

Tabulka č 30: Purinové a pyrimidinové složky analyzované LC-M/MS metodou v pozitivním módu.

| Metabolit | RT (min) | Q1 | Q3 | DP (V) | CE (V) |
|-----------------------|---------------------|-----------|-----------|-------------------|-------------------|
| dihydrouracil | 2,3 | 114,9 | 72,9 | 91 | 17 |
| thymin | 2,8 | 126,9 | 109,9 | 96 | 23 |
| thymidin | 3,7 | 242,9 | 126,8 | 61 | 17 |
| deoxyuridin | 4,4 | 228,9 | 113,0 | 91 | 23 |
| 5'-methylthioadenosin | 4,5 | 297,9 | 135,9 | 51 | 27 |
| deoxyadenosin | 5,0 | 251,9 | 118,9 | 26 | 59 |
| adenosin | 5,9 | 267,9 | 118,9 | 41 | 67 |
| Alr | 6,1 | 216,2 | 84,0 | 46 | 19 |
| cytosin | 6,2 | 111,9 | 94,8 | 96 | 27 |
| adenin | 6,5 | 135,9 | 118,9 | 171 | 31 |
| AICAr | 6,7 | 259,1 | 110,0 | 61 | 31 |
| cytidin | 7,0 | 244,0 | 111,9 | 31 | 27 |
| FAICAr | 7,1 | 287,1 | 138,0 | 56 | 31 |
| guanin | 7,7 | 152,0 | 81,9 | 76 | 37 |
| deoxyinosin | 8,1 | 252,9 | 136,9 | 51 | 19 |
| hypoxanthin | 8,4 | 136,9 | 109,9 | 136 | 29 |
| guanosin | 8,5 | 284,0 | 151,9 | 51 | 27 |
| inosin | 9,1 | 268,9 | 136,9 | 81 | 21 |
| dihydrothymidin | 10,1 | 128,8 | 62,0 | 111 | 37 |
| xanthosin | 14,7 | 284,9 | 152,9 | 96 | 15 |
| CAIr | 16,7 | 260,2 | 128,1 | 36 | 17 |

Tabulka č 31: Purinové a pyrimidinové báze a ribosidy analyzované LC-MS/MS metodou v negativním módu.

| Metabolit | RT (min) | Q1 | Q3 | DP (V) | CE (V) |
|-----------------------|---------------------|-----------|-----------|-------------------|-------------------|
| uracil | 3,4 | 110,952 | 42,1 | -35 | -22 |
| 5-hydroxymethyluracil | 5,5 | 140,9 | 80,0 | -80 | -24 |
| 7-methylguanin | 5,8 | 164,0 | 106,1 | -5 | -32 |
| uridin | 5,8 | 242,8 | 110,0 | -95 | -22 |
| adenosin | 5,9 | 265,9 | 133,7 | -60 | -10 |
| FGAr | 6,0 | 233,0 | 143,1 | -30 | -14 |
| alantoin | 6,3 | 156,9 | 114,1 | -30 | -16 |
| pseudouridin | 7,7 | 242,8 | 153,0 | -35 | -20 |
| deoxyguanosin | 7,7 | 265,8 | 150,0 | -20 | -28 |
| 1-methylxanthin | 7,9 | 164,9 | 108,0 | -60 | -26 |
| kyselina močová | 10,0 | 166,9 | 59,9 | -30 | -46 |
| kyselina orotová | 11,6 | 154,9 | 110,9 | -15 | -16 |
| xanthin | 11,7 | 150,9 | 108,0 | -55 | -24 |
| SAdo | 17,9 | 381,8 | 134,0 | -65 | -46 |
| SAICAr | 18,6 | 373,2 | 241,1 | -45 | -24 |

Tabulka č.32a: Nukleotidy a jejich deriváty analyzované LC-MS/MS metodou v negativním módu – s RT do 18,2 min (metabolity označené modře nelze od sebe rozlišit).

| Metabolit | RT (min) | Q1 | Q3 | DP (V) | CE (V) |
|----------------------------------|---------------------|-----------|-----------|-------------------|-------------------|
| 2',3'-cyklické CMP | 13,6 | 303,8 | 109,9 | -50 | -22 |
| NAD ⁺ | 14,3 | 662,7 | 540,9 | -55 | -20 |
| CDP-cholin | 14,3 | 486,8 | 427,9 | -155 | -20 |
| UDP-N-acetyl-D-glukosamin | 17,5 | 605,7 | 384,9 | -85 | -38 |
| NADH | 17,7 | 663,7 | 397,0 | -35 | -44 |
| UDP-D-galaktosa / UDP-glukosa | 17,8 | 564,7 | 322,9 | -75 | -34 |
| dTMP | 17,9 | 320,8 | 194,9 | -35 | -24 |
| dCMP | 18,0 | 305,8 | 194,9 | -55 | -24 |
| CMP | 18,0 | 321,8 | 96,8 | -55 | -28 |
| FMN | 18,1 | 454,9 | 139,0 | -75 | -26 |
| dUMP | 18,2 | 306,8 | 195,0 | -50 | -22 |

Tabulka č. 32b: Nukleotidy a jejich deriváty analyzované LC-MS/MS metodou v negativním módu – s RT od 18,2 min.

| Metabolit | RT (min) | Q1 | Q3 | DP (V) | CE (V) |
|------------------|---------------------|-----------|-----------|-------------------|-------------------|
| UMP | 18,4 | 322,8 | 210,9 | -65 | -22 |
| dAMP | 18,4 | 329,8 | 134,0 | -65 | -32 |
| AMP | 18,4 | 345,8 | 133,9 | -90 | -46 |
| adenylylsulfát | 18,6 | 425,8 | 346,0 | -50 | -26 |
| GDP-L-fukosa | 18,9 | 587,7 | 441,9 | -95 | -34 |
| GDP-manosa | 19,0 | 603,7 | 423,9 | -35 | -42 |
| dGMP | 19,6 | 345,8 | 150,0 | -35 | -34 |
| ADP-ribosa | 19,6 | 557,7 | 346,0 | -45 | -36 |
| GMP | 19,7 | 361,8 | 211,0 | -45 | -26 |
| IMP | 20,2 | 346,8 | 96,9 | -60 | -28 |
| NADP* | 20,6 | 742,7 | 620,9 | -70 | -24 |
| UDP-glukuronát | 20,8 | 578,7 | 402,9 | -70 | -34 |
| CDP | 20,8 | 401,8 | 158,9 | -60 | -32 |
| dCDP | 20,8 | 385,8 | 158,9 | -30 | -30 |
| dTDP | 21,0 | 400,8 | 158,8 | -60 | -34 |
| UDP | 21,2 | 402,9 | 158,8 | -70 | -34 |
| ADP | 21,4 | 425,8 | 133,9 | -95 | -32 |
| dADP | 21,4 | 409,8 | 158,8 | -30 | -32 |
| SAMP | 21,6 | 461,8 | 96,8 | -55 | -30 |
| NADPH | 22,4 | 743,7 | 425,9 | -30 | -42 |
| dGDP | 22,4 | 425,8 | 158,9 | -70 | -32 |
| GDP | 22,6 | 441,8 | 158,8 | -95 | -36 |
| IDP | 22,8 | 426,8 | 134,9 | -75 | -32 |
| UTP | 23,0 | 482,7 | 158,7 | -80 | -48 |
| dCTP | 23,2 | 465,7 | 158,9 | -65 | -36 |
| CTP | 23,3 | 481,7 | 158,9 | -70 | -44 |
| dTTP | 23,5 | 480,7 | 158,8 | -70 | -46 |
| dUTP | 24,0 | 466,7 | 158,9 | -55 | -36 |
| ATP | 24,0 | 505,7 | 158,8 | -75 | -40 |
| dATP | 25,0 | 489,7 | 158,7 | -60 | -36 |
| GTP | 27,0 | 521,6 | 158,8 | -90 | -50 |
| dITP | 27,0 | 490,7 | 158,8 | -65 | -40 |
| ITP | 28,0 | 506,7 | 158,7 | -60 | -48 |
| dGTP | 28,0 | 505,7 | 158,9 | -70 | -38 |

Tabulka č. 33: Nukleotidy a jejich deriváty analyzované LC-M/MS metodou v pozitivním módu.

| Metabolit | RT (min) | Q1 | Q3 | DP (V) | CE (V) |
|---------------------------|---------------------|-----------|-----------|-------------------|-------------------|
| nikotinamid mononukleotid | 14,8 | 334,9 | 123,0 | 36 | 23 |
| CMP-N-acetylneuraminát | 17,2 | 615,1 | 323,9 | 56 | 19 |
| FAD | 17,9 | 785,8 | 347,9 | 1 | 31 |
| dCMP | 18,0 | 307,9 | 112,0 | 56 | 19 |
| CMP | 18,0 | 323,8 | 111,9 | 46 | 21 |
| AICAR | 18,3 | 339,0 | 109,9 | 131 | 45 |
| dAMP | 18,4 | 331,9 | 135,9 | 41 | 23 |
| AMP | 18,4 | 348,0 | 135,9 | 116 | 27 |
| dGMP | 19,5 | 348,1 | 80,9 | 1 | 31 |
| GMP | 19,7 | 363,8 | 151,9 | 36 | 25 |
| IMP | 20,2 | 349,0 | 136,9 | 31 | 19 |
| SAMP | 21,7 | 464,1 | 251,9 | 71 | 31 |
| CoA | 22,2 | 767,6 | 261,0 | 56 | 39 |
| SAICAR | 22,3 | 455,0 | 243,0 | 86 | 25 |

Tabulka č. 34a: Látky z ostatních skupin analyzované LC-MS/MS metodou v pozitivním módu – s RT do 5 min.

| Metabolit | RT (min) | Q1 | Q3 | DP (V) | CE (V) |
|-----------------------|---------------------|-----------|-----------|-------------------|-------------------|
| ubichinon | 1,6 | 250,9 | 218,9 | 76 | 19 |
| vitamin K | 1,7 | 172,6 | 105,0 | 191 | 27 |
| vitamin D2 | 1,7 | 397,2 | 91,1 | 66 | 85 |
| 11-deoxykortikosteron | 1,8 | 331,1 | 109,0 | 111 | 25 |
| topiramarát | 1,8 | 340,1 | 263,9 | 136 | 13 |
| cholesterol | 1,9 | 387,1 | 105,0 | 146 | 21 |
| 2-aminofenol | 2,1 | 109,9 | 65,1 | 71 | 29 |
| 6-hydroxymelatonin | 2,1 | 248,9 | 189,9 | 51 | 23 |
| benzylamin | 2,2 | 108,0 | 65,1 | 36 | 37 |
| nikotinamid | 2,4 | 122,9 | 79,9 | 1 | 27 |
| N-acetylserotonin | 2,5 | 218,9 | 159,9 | 101 | 21 |

Tabulka č. 34b: Látky z ostatních skupin analyzované LC-MS/MS metodou v pozitivním módu – s RT od 5 min (metabolity označené modře nelze od sebe rozlišit).

| Metabolit | RT (min) | Q1 | Q3 | DP (V) | CE (V) |
|---|---------------------|-----------|-----------|-------------------|-------------------|
| 3-methoxytyramin | 5,1 | 167,9 | 119,0 | 41 | 25 |
| kreatinin | 5,2 | 113,9 | 86,0 | 46 | 15 |
| normetanephrin | 5,8 | 183,9 | 134,0 | 51 | 27 |
| riboflavin | 5,8 | 376,9 | 243,0 | 11 | 33 |
| 4-pyridoxát | 6,3 | 184,0 | 148,2 | 56 | 29 |
| pyridoxin | 6,7 | 169,9 | 133,9 | 121 | 29 |
| spermin | 6,7 | 203,9 | 138,0 | 66 | 17 |
| metanephrin | 6,7 | 197,9 | 165,0 | 36 | 25 |
| serotonin | 6,9 | 176,9 | 114,9 | 36 | 39 |
| thiamin | 7,1 | 265,9 | 123,0 | 36 | 25 |
| pyridoxal | 7,6 | 167,9 | 93,9 | 31 | 31 |
| trigonelin | 7,6 | 138,0 | 92,1 | 1 | 29 |
| taurocholát | 8,3 | 516,0 | 337,1 | 186 | 33 |
| N-acetylputrescin | 8,4 | 131,0 | 71,9 | 76 | 21 |
| karnitin | 8,6 | 161,9 | 102,9 | 56 | 23 |
| protoporfyrin | 8,7 | 563,0 | 445,2 | 231 | 67 |
| N-methylhistamin | 8,8 | 125,9 | 109,0 | 56 | 19 |
| 7,8-dihydroneopterin | 9,1 | 256,0 | 164,9 | 21 | 31 |
| cholin | 10,0 | 104,3 | 60,0 | 36 | 23 |
| biotin | 11,1 | 244,7 | 227,0 | 61 | 21 |
| <i>p</i> -benzenediol / pyrokatechol | 14,3 | 110,9 | 83,0 | 126 | 14 |
| adrenalin | 14,8 | 183,9 | 100,8 | 61 | 23 |
| biliverdin | 17,1 | 583,1 | 297,1 | 116 | 45 |
| bilirubin | 17,2 | 585,1 | 299,2 | 26 | 39 |
| 5-methyltetrahydrofolát | 18,8 | 460,0 | 313,0 | 56 | 27 |
| 5-formyltetrahydrofolát | 19,0 | 473,9 | 299,0 | 61 | 45 |
| dihydrofolát | 21,3 | 444,0 | 177,9 | 61 | 19 |
| acetyl-CoA | 22,1 | 809,7 | 303,0 | 36 | 41 |

Tabulka č. 35: Látky z ostatních skupin analyzované LC-MS/MS metodou v negativním módu (metabolity označené modře nelze od sebe rozlišit).

| Metabolit | RT (min) | Q1 | Q3 | DP (V) | CE (V) |
|---------------------------------------|---------------------|-----------|-----------|-------------------|-------------------|
| 4-hydroxybenzaldehyd | 4,9 | 120,8 | 92,0 | -15 | -32 |
| indoxylsulfát | 5,8 | 212,0 | 81,0 | -25 | -20 |
| vitamin D3 | 6,4 | 383,2 | 83,1 | -55 | -28 |
| tetrahydrobiopterin | 7,6 | 239,8 | 179,9 | -20 | -10 |
| prostaglandin E2 | 7,8 | 350,9 | 270,9 | -60 | -22 |
| ofloxacin | 7,9 | 360,1 | 275,2 | -140 | -26 |
| cholát | 7,9 | 407,2 | 289,3 | -170 | -54 |
| myo-inositol | 8,4 | 178,9 | 124,9 | -85 | -20 |
| antranilát | 9,0 | 135,9 | 92,0 | -25 | -20 |
| 7,8-dihydroneopterin | 9,0 | 253,9 | 194,0 | -40 | -14 |
| sfingosin 1-fosfát | 10,2 | 377,9 | 78,6 | -90 | -90 |
| nikotinát | 10,5 | 121,9 | 77,9 | -30 | -18 |
| šikimát | 13,3 | 173,0 | 93,0 | -45 | -22 |
| ethanolaminfosfát | 16,5 | 139,8 | 78,9 | -20 | -16 |
| acetylfosfát | 16,6 | 138,9 | 79,1 | -20 | -22 |
| fenylacetaldehyd / merkaptopyruvát | 17,7 | 118,9 | 95,8 | -80 | -29 |
| thiamindifosfát | 17,8 | 423,8 | 302,9 | -65 | -20 |
| pyridoxaminfosfát | 18,2 | 246,8 | 229,9 | -35 | -14 |
| glyceronfosfát | 18,3 | 168,9 | 79,0 | -5 | -34 |
| pyridoxalfosfát | 18,4 | 245,8 | 96,8 | -40 | -20 |

Tabulka č. 36a: Acylované karnitiny analyzované LC-MS/MS metodou v pozitivním módu – s RT do 5,4 min.

| Metabolit | RT (min) | Q1 | Q3 | DP (V) | CE (V) |
|------------------|-----------------|-----------|-----------|-------------------|-------------------|
| C26-DC | 5,1 | 570,9 | 85,0 | 112 | 69 |
| C26 | 5,1 | 540,9 | 85,0 | 112 | 69 |
| C26-1 | 5,1 | 538,9 | 85,0 | 112 | 69 |
| C26-2 | 5,1 | 536,9 | 85,0 | 112 | 69 |
| C22-DC | 5,1 | 514,7 | 85,0 | 106 | 65 |
| C20-DC | 5,1 | 486,7 | 85,0 | 103 | 62 |
| C22 | 5,1 | 484,7 | 85,0 | 106 | 65 |
| C22-1 | 5,1 | 482,7 | 85,0 | 106 | 65 |
| C22-2 | 5,1 | 480,7 | 85,0 | 106 | 65 |
| C22-5 | 5,1 | 474,7 | 85,0 | 106 | 65 |
| C20 | 5,1 | 456,7 | 85,0 | 100 | 60 |
| C20-1 | 5,1 | 454,7 | 85,0 | 102 | 60 |
| C20-2 | 5,1 | 452,7 | 85,0 | 102 | 60 |
| C18-1OH | 5,1 | 442,4 | 85,1 | 92 | 57 |
| C18 | 5,1 | 428,4 | 85,1 | 96 | 63 |
| C18-1 | 5,1 | 426,4 | 85,1 | 89 | 55 |
| C18-2 | 5,1 | 424,3 | 85,1 | 89 | 54 |
| C18-3 | 5,1 | 422,6 | 85,0 | 98 | 57 |
| C18-4 | 5,1 | 420,6 | 85,0 | 98 | 57 |
| C16-OH | 5,2 | 416,3 | 85,1 | 87 | 53 |
| C16-1OH | 5,2 | 414,3 | 85,1 | 87 | 53 |
| C16:2-OH | 5,2 | 412,3 | 85,1 | 86 | 53 |
| C16 | 5,2 | 400,3 | 85,1 | 84 | 51 |
| C16-1 | 5,2 | 398,3 | 85,1 | 84 | 51 |
| C16:2 | 5,2 | 396,3 | 85,1 | 83 | 51 |
| C14-1OH | 5,2 | 386,3 | 85,1 | 81 | 50 |
| C14-2OH | 5,2 | 384,3 | 85,1 | 81 | 49 |
| C12-DC | 5,2 | 374,3 | 85,1 | 86 | 45 |
| C14 | 5,2 | 372,3 | 85,1 | 86 | 45 |
| C14-1 | 5,2 | 370,3 | 85,1 | 78 | 47 |
| C14-2 | 5,2 | 368,3 | 85,1 | 78 | 47 |
| C12 | 5,3 | 344,3 | 85,1 | 73 | 44 |
| C12:1 | 5,3 | 342,3 | 85,1 | 73 | 44 |
| C10 | 5,4 | 316,2 | 85,1 | 56 | 37 |
| C10-1 | 5,4 | 314,2 | 85,1 | 68 | 40 |
| C10-2 | 5,4 | 312,2 | 85,1 | 67 | 40 |

Tabulka č. 36b: Acylované karnitiny analyzované LC-MS/MS metodou v pozitivním módu – s RT od 5,5 min (metabolity označené modře nelze od sebe rozlišit).

| Metabolit | RT (min) | Q1 | Q3 | DP (V) | CE (V) |
|--------------|----------|-------|------|-----------|-----------|
| C7-DC | 5,5 | 304,2 | 85,1 | 66 | 39 |
| C9 | 5,5 | 302,2 | 85,1 | 66 | 39 |
| C6-DC, C7-OH | 5,5 | 290,2 | 85,1 | 63 | 37 |
| C8 | 5,6 | 288,2 | 85,1 | 66 | 33 |
| C8-1 | 5,6 | 286,2 | 85,1 | 63 | 37 |
| C5DC | 5,9 | 276,2 | 85,1 | 61 | 35 |
| C5:1-DC | 5,9 | 274,1 | 85,1 | 60 | 35 |
| C4-DC,C5-OH | 5,9 | 262,2 | 85,1 | 58 | 33 |
| C6 | 5,9 | 260,2 | 85,1 | 56 | 27 |
| C6:1 | 5,9 | 258,2 | 85,1 | 57 | 33 |
| C3-DC,C4-OH | 6,1 | 248,1 | 85,1 | 55 | 32 |
| C5 | 6,1 | 246,2 | 85,1 | 46 | 29 |
| C5-1 | 6,1 | 244,2 | 85,1 | 55 | 31 |
| C3-OH | 6,8 | 234,1 | 85,1 | 53 | 30 |
| C4 | 6,4 | 232,2 | 85,1 | 46 | 29 |
| C4:1 | 6,4 | 230,1 | 85,1 | 52 | 29 |
| C3 | 6,8 | 218,1 | 85,1 | 46 | 29 |
| C3:1 | 6,8 | 216,1 | 85,1 | 49 | 27 |
| C2 | 7,4 | 204,1 | 85,1 | 41 | 27 |

4.4.5 Metabolitové profilování biologických materiálů

Dosud bylo provedeno několik experimentů, které využívaly vyvinutou cílenou metabolomickou metodu pomocí HPLC-MS/MS. Všechny tyto studie se řídily pokyny standardního operačního postupu a byly náplní jedné bakalářské⁸⁸ a čtyř diplomových prací⁸⁹⁻⁹².

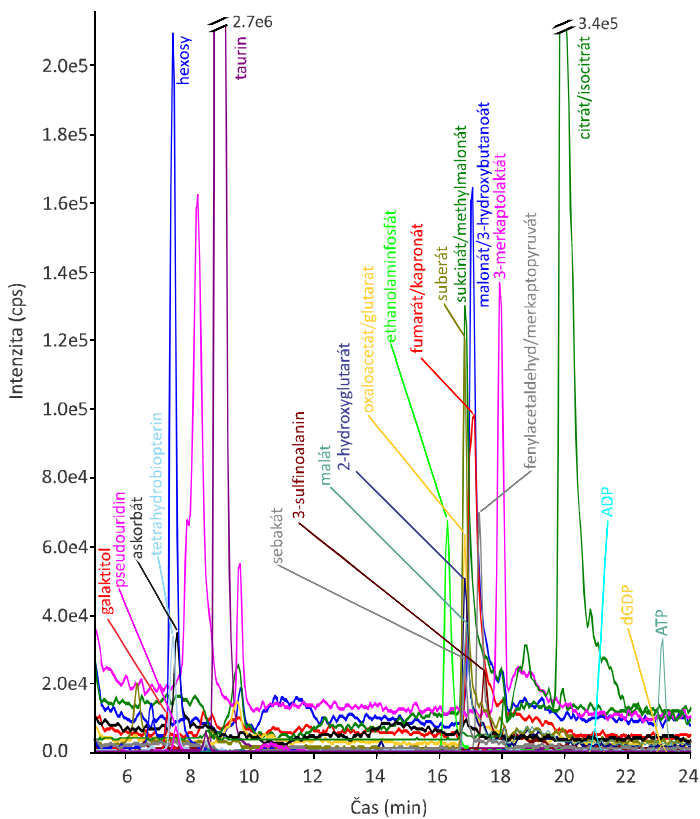
Při analýze leukocytů byl například sledován vliv imatinibu na jejich metabolismus u pacientů s chronickou myeloidní leukemií⁸⁹, v extraktech leukocytů bylo celkem identifikováno 87 studovaných látek (Obr. 46).

Dále byly analyzovány kondenzáty dechu za účelem porovnat metabolomické profily od pacientů s cystickou fibrózou, astmatem a astmatiků léčených glukokortikosteroidy vůči zdravým jedincům⁹⁰. Celkem bylo v kondenzátech dechu identifikováno 42 metabolitů (Obr. 47).

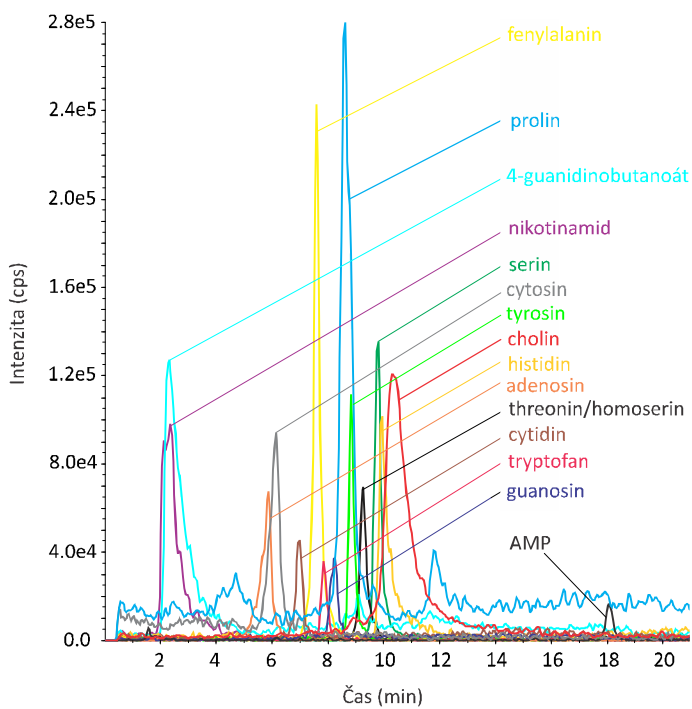
Pomocí cílené metabolomické metody byl také zkoumán vliv látek s potenciálním protirakovinným účinkem na metabolismus rakovinných buněk (T lymfoblastická leukemie, linie CCRF-CEM)⁹¹. V tomto typu buněk bylo celkem prokázáno 179 metabolitů (Obr. 48).

Také byly analyzovány vzorky moči novorozenců s perinatální asfyxií za účelem sledování metabolických změn v průběhu několika hodin po porodu⁸⁸. Celkem bylo ve vzorcích moči identifikováno 124 metabolitů (Obr. 49).

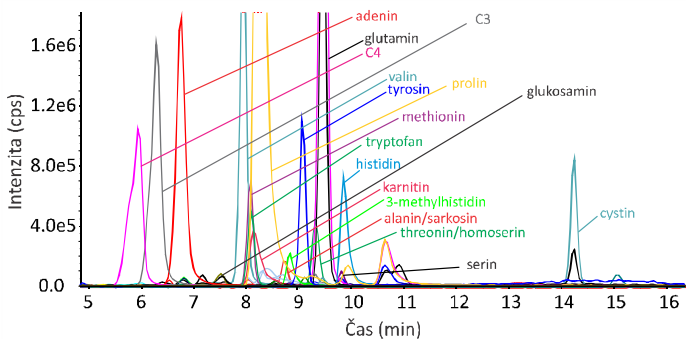
Vyvinutá metoda byla též uplatněna při analýze vzorků plazem od myší, u kterých byl knockoutován gen *CFTR* (*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*) způsobující cystickou fibrózu⁹². Celkem bylo nalezeno ve vzorcích myších plazem 124 látek.



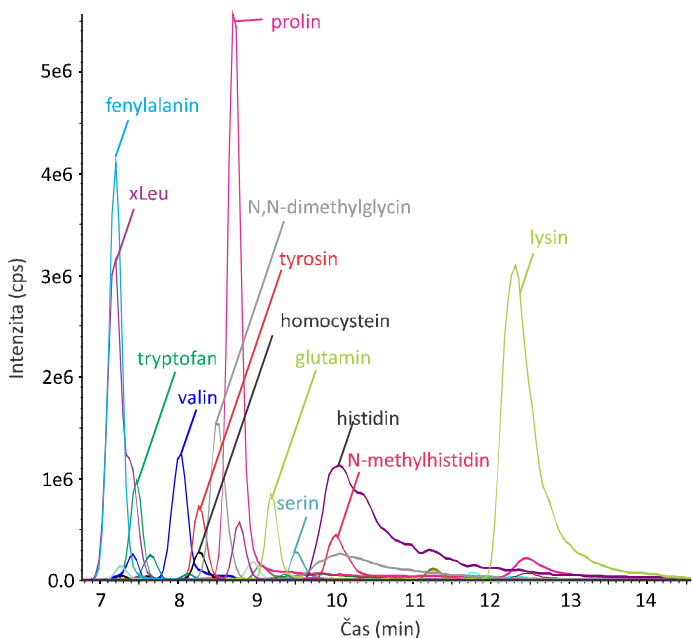
Obrázek č. 46: Ukázka analýzy extraktů leukocytů v negativním módu.



Obrázek č. 47: Ukázka analýzy kondenzátu dechu v pozitivním módu (převzato z Karlíková⁹⁰ a upraveno).



Obrázek č. 48: Ukázka analýzy extraktů CEM buněk v pozitivním módu (převzato z Halířová⁹¹ a upraveno).



Obrázek č. 49: Ukázka analýzy moče v pozitivním módu (převzato z Galociová⁸⁸ a upraveno).

5 SOUHRN

Metabolomika je nově se rozvíjející vědní disciplína, která studuje komplexní profil nízkomolekulárních metabolitů přítomných v biologickém vzorku v definovaném čase. Našla své uplatnění v mnoha oborech a stává se důležitým nástrojem i v klinickém výzkumu a diagnostice lidských onemocnění. Pro metabolomické experimenty založené na měření hmotnostní spektrometrií lze použít dva hlavní přístupy, tzv. cílený a necílený. Cílený přístup využívá předem definovaných metabolitů, které jsou analyzovány charakteristickými přechody v tandemovém hmotnostním spektrometru. Necílený přístup používá data z analyzátorů založených na měření přesné hmoty a retenčního času, přičemž analyzované látky jsou *a priori* neznámé. Metabolomická data jsou matematicky upravena a statisticky zpracována především za použití vícerozměrných statistických analýz.

Cílem této práce bylo uplatnit metabolomické přístupy pro diagnostiku dědičných metabolických poruch za použití kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie, to znamenalo nalézt změny v hladinách metabolitů, které nejlépe odlišují pacienty od zdravých jedinců.

Byla vyvinuta metoda pomocí HPLC-MS/MS pro kvantitativní analýzu ribosidů druhé části purinové *de novo* syntézy, která umožňuje diagnostiku známých či dosud nepopsaných poruch. Metoda byla aplikována na vzorky močí, likvorů a mozkových tkání od pacientů s deficitem adenylosukcinátlyasy.

V další studii se podařilo úspěšně uplatnit cílený metabolomický přístup v diagnostice dědičných metabolických poruch metodou přímého nástřiku vzorků plazem ve spojení s MS/MS. Podařilo se rozlišit 34 pacientů od 50 kontrolních vzorků na základě nesupervizovaného statistického zpracování dat.

Necílený metabolomický přístup byl testován na vzorcích suché krevní kapky a moči technikou HPLC-TOF-MS. Bylo prokázáno, že tento

přístup lze uplatnit pro diagnostiku dědičných metabolických poruch. Vzorky od pacientů se podařilo rozlišit od kontrolních vzorků uplatněním různých statistických nástrojů. Na základě diskriminační analýzy byly prokázány známé i potenciálně nové markery jednotlivých onemocnění.

V rámci dalšího projektu byla vyvíjena cílená metabolická metoda pomocí HPLC-MS/MS, která umožňuje analýzu celkem 410 metabolitů v pozitivním a negativním módu. Metoda byla uplatněna pro analýzy močí, sér, kondenzátů dechu, extraktů leukocytů a CEM buněk.

6 SUMMARY

Metabolomics is a new developing science which studies complex profile of low-molecular weight metabolites present in a biological sample in defined time. It has applied in many fields and it has become an important tool in clinical research and in diagnosis of human diseases. Two main approaches (targeted and untargeted) can be used for metabolomic experiments based on measurements by mass spectrometry. Targeted approach is based on predefined metabolites, which are analyzed by characteristic transitions in tandem mass spectrometry. Untargeted approach uses data from analyzers based on exact mass and retention time measurement whereas analyzed compound are *a priori* unknown. Metabolomic data are mathematically and statistically processed mainly using multivariate statistical analyses.

The aim of this study was to apply metabolomic approaches for the diagnosis of inherited metabolic disorders using liquid chromatography and mass spectrometry. It meant to find changes in the levels of metabolites that best distinguish patients from healthy individuals.

A method using HPLC-MS/MS for the quantitative analysis of ribosides in the second part of purine *de novo* synthesis was developed. It enables the diagnosis of known or thus far unidentified disorders. The method was applied to urine, cerebrospinal fluid and brain tissue samples from patients with adenylosuccinate lyase deficiency.

In another study a targeted metabolomic approach was successfully applied in the diagnosis of inherited metabolic disorders using flow injection analysis of plasma samples coupled with MS/MS. All 34 patient samples were distinguished from 50 control samples based on unsupervised statistical data processing.

Untargeted metabolomic approach was tested on dried blood spots and urine samples by HPLC-TOF-MS technique. It was demonstrated that this approach can be applied for the diagnosis of inherited metabolic disorders. Patient samples were distinguished from control samples using various statistical tools. Known markers of diseases were confirmed and also new potential suggested based on discriminant analysis

The next project was focused on development of targeted metabolomic HPLC-MS/MS method that allows analysis of a total of 410 metabolites in positive and negative mode. The method was applied in the analysis of urine, serum, breath condensates, extracts of leukocytes and CEM cells.

7 PŘEHLED POUŽITÝCH ZKRATEK

| | |
|---------------|--|
| 13C-Ado | [1'-13C]adenosin |
| ADP | adenosin-5'-difosfát |
| ADSL | adenylosukcinátlyasa |
| AICAr | 5-aminoimidazol-4-karboxamidribosid |
| AICAR | 5-aminoimidazol-4-karboxamidribotid |
| Alr | 5-aminoimidazolribosid |
| Ala | alanin |
| AMP | adenosin-5'-monofosfát |
| APCI | <i>atmospheric-pressure chemical ionization</i> ; chemická ionizace za atmosférického tlaku |
| APPI | <i>atmospheric pressure photoionization</i> , fotoionizace za atmosférického tlaku |
| Arg | arginin/arginemie |
| Asn | asparagin |
| Asp | aspartát |
| ATIC | AICAR-transformylasa/IMP-cyklohydrolasa |
| ATP | adenosin-5'-trifosfát |
| C0 | karnitin |
| C10 | dekanoylkarnitin |
| C10-1 (C10:1) | decenoylkarnitin |
| C10-2 | dekadienylkarnitin |
| C12 | dodekanoylkarnitin |
| C12:1 | dodecenoylkarnitin |
| C12-DC | dodekandioylkarnitin |
| C14 | tetradekanoylkarnitin |
| C14-1 | tetradecenoylkarnitin |
| C14-10H | hydroxytetradecenoylkarnitin |
| C14-2 | tetradekadienylkarnitin |
| C14-20H | hydroxytetradekadienylkarnitin |
| C16 | hexadekanoylkarnitin (palmitoylkarnitin) |

| | |
|--------------|--|
| C16:2 | hexadekadienylkarnitin |
| C16:2-OH | hydroxyhexadekadienykarnitin |
| C16-1 | hexadecenoylkarnitin |
| C16-1OH | hydroxyhexadecenoylkarnitin |
| C16-OH | hydroxyhexadekanoylkarnitin |
| C18 | oktadekanoylkarnitin |
| C18-1(C18:1) | oktadecenoylkarnitin |
| C18-1OH | hydroxyoktadecenoylkarnitin |
| C18-2 | oktadekadienylkarnitin |
| C18-3 | oktadekatrienylkarnitin |
| C18-4 | oktadekatetraenylkarnitin |
| C2 | acetylkarnitin |
| C20 | eikosanoylkarnitin |
| C20-1 | eikosenoylkarnitin |
| C20-2 | eikosadienylkarnitin |
| C20-DC | eikosandioylkarnitin |
| C22 | dokosadekanoylkarnitin |
| C22-1 | dokosadecenylkarnitin |
| C22-2 | dokosadienylkarnitin |
| C22-5 | dokosapentaenylkarnitin |
| C22-DC | dokosadekandioylkarnitin |
| C26 | hexakosanoylkarnitin |
| C26-1 | hexakosenoylkarnitin |
| C26-DC | hexakosandioylkarnitin |
| C3 | propionylkarnitin |
| C3:1 | propeonylkarnitin |
| C3-DC/C4-OH | malonylkarnitin/hydroxybutyrylkarnitin |
| C3-DC-M | methylmalonylkarnitin |
| C3-OH | hydroxypropionylkarnitin |
| C4 | butyrylkarnitin |
| C4:1 | butenylkarnitin |
| C4-DC | sukcinylkarnitin |

| | |
|-------------|---|
| C5 | valerylkarnitin |
| C5:1-DC | glutakonylkarnitin |
| C5-1 | tiglylkarnitin |
| C5-DC | glutarylkarnitin |
| C5-M-DC | methylglutarylkarnitin |
| C5-OH | hydroxyvalerylkarnitin |
| C6 | hexanoylkarnitin |
| C6:1 | hexenoylkarnitin |
| C6-DC/C7-OH | hexandioylkarnitin (adipoyl; methylglutaryl) |
| C7-DC | pimelylkarnitin (heptandioylkarnitin) |
| C8 | oktanoylkarnitin |
| C8-1 | oktenoylkarnitin |
| C9 | nonanoylkarnitin |
| CA | <i>cluster analysis</i> ; klastrová analýza |
| CAIr | aminoimidazolkarboxyribosid |
| CDP | cytidin-5'-difosfát |
| CE | <i>collision energy</i> ; kolizní energie |
| Cit | citrulin |
| CoA | koenzym A |
| CLR | „centred logratio“ transformace |
| CMP | cytidin-5'-monofosfát |
| CSF | cerebrospinální tekutina |
| CoA | koenzym A |
| CPS | deficit karbamoylfosfátsynthetasy |
| CPT II | deficit karnitinpalmitoyltransferasy typu II |
| CTP | cytidin-5'-trifosfát |
| Cys | cystein |
| CYS | cystinurie |
| CXP | <i>collision cell exit potential</i> ; výstupní potenciál kolizní cely |
| DA | <i>discriminant analysis</i> ; diskriminační analýza |
| dADP | 2'-deoxyadenosin-5'-difosfát |

| | |
|---------|---|
| dAMP | 2'-deoxyadenosin-5'-monofosfát |
| dATP | 2'-deoxyadenosin-5'-trifosfát |
| DBS | <i>dry blood spots</i> ; suché kapky krve |
| dCDP | 2'-deoxycytidin-5'-difosfát |
| dCMP | 2'-deoxycytidin-5'-monofosfát |
| dCTP | 2'-deoxycytidin-5'-trifosfát |
| dekomp. | dekompenzace |
| dGDP | 2'-deoxyguanosin-5'-difosfát |
| dGMP | 2'-deoxyguanosin-5'-monofosfát |
| dGTP | 2'-deoxyguanosin-5'-trifosfát |
| DMO | dětská mozková obrna |
| DMP | dědičná(é) metabolická(é) porucha(y) |
| DNA | deoxyribonukleová kyselina |
| dITP | 2'-deoxyinosin-5'-trifosfát |
| DP | <i>declustering potential</i> , deklasterační potenciál |
| dTDP | 2'-deoxythymidin-5'-difosfát |
| dTMP | 2'-deoxythymidin-5'-monofosfát |
| dTTP | 2'-deoxythymidin-5'-trifosfát |
| dUMP | 2'-deoxyuridin-5'-monofosfát |
| dUTP | 2'-deoxyuridin-5'-trifosfát |
| EP | <i>entrance potential</i> ; vstupní potenciál |
| ESI | <i>electrospray ionization</i> ; ionizace elektrosprejem |
| FAD | flavinadenindinukleotid |
| FAICAr | 5-formaminoimidazol-4-karboxamidribosid |
| FGAr | formylglycinamidribosid |
| FMN | flavinmononukleotid |
| FT-ICR | <i>Fourier transform ion cyclotron resonance</i> ; iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací |
| GA I | glutarová acidurie typu I |
| GALT | galaktosemie |
| GC | <i>gas chromatography</i> ; plynová chromatografie |
| GDP | guanosin-5'-difosfát |

| | |
|--------|--|
| Gln | glutamin |
| Glu | glutamát |
| Gly | glycin |
| GMP | guanosin-5'-monofosfát |
| GTP | guanosin-5'-trifosfát |
| Hcys | homocystein |
| HCYS | homocystinurie |
| HILIC | <i>hydrophilic interaction liquid chromatography</i> , hydrofilní interakční chromatografie |
| His | histidin |
| HMDB | <i>The Human Metabolome Database</i> |
| HMG | 3-hydroxy-3-methylglutarová acidurie |
| HPA | hyperfenylalaninemie |
| HPLC | <i>high performance liquid chromatography</i> ; vysokoúčinná kapalinová chromatografie |
| HRL | horní referenční limit |
| HSM | hepatosplenomegalie |
| IDP | inosin-5'-difosfát |
| Ile | isoleucin |
| IMP | inosin-5'-monofosfát |
| InCHI | <i>IUPAC International Chemical Identifier</i> , Mezinárodní chemický identifikátor IUPAC |
| inf. | infantilní |
| ITP | inosin-5'-trifosfát |
| IV A | isovalerová acidurie |
| IT | <i>ion trap</i> ; iontová past |
| k. | kyselina |
| KEGG | „Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes“ |
| Klas. | klasický |
| kreat. | kreatinin |
| LC | <i>liquid chromatography</i> ; kapalinová chromatografie |
| Leu | leucin |

| | |
|-------------------|---|
| LOD | limit detekce |
| LOESS | <i>locally estimated scatterplot smoothing</i> |
| Lys | lysin |
| M | muž |
| MCAD | deficit acyl-CoA dehydrogenasy mastných kyselin se středně dlouhým řetězcem |
| Met | methionin |
| MFA | mobilní fáze A |
| MK | mastné kyseliny |
| MMA | methilmalonová acidurie |
| mma | methilmalonát |
| MR | mentální retardace |
| MRM | <i>multiple reaction monitoring</i> ; sledování produktu rozpadu molekulárního iontu |
| MS | <i>mass spectrometry</i> ; hmotnostní spektrometrie |
| MS/MS | <i>tandem mass spectrometry</i> ; tandemová hmotnostní spektrometrie |
| MSUD | nemoc javorového sirupu (leucinoso) |
| m/z | poměr hmotnosti a náboje |
| NAD ⁺ | nikotinamidadeninukleotid (oxidovaný) |
| NADH | nikotinamidadeninukleotid (redukovaný) |
| NADP ⁺ | nikotinamidadeninukleotidfosfát (oxid.) |
| NADPH | nikotinamidadeninukleotidfosfát (red.) |
| neresp. | neresponzivní |
| nezn. | neznámo |
| NKH | neketotická hyperglycinemie |
| NMR | <i>nuclear magnetic resonance</i> ; nukleární magnetická rezonance |
| nov. | novorozenecká |
| OlMeDa | Olomoucká metabolomická databáze |
| OMIM | <i>Online mendelian inheritance in man</i> |
| opak. | opakovaný |

| | |
|---------|---|
| OPLS | ortogonální-PLS |
| Orn | ornithin |
| OTC | ornithintranskarbamylasa |
| P | fosfát |
| PA | propionová acidurie |
| PC | <i>principal components</i> ; hlavní komponenty |
| PCA | <i>principal component analysis</i> ; analýza hlavních komponent |
| PCA-DA | DA založená na PCA |
| PDNS | purinová <i>de novo</i> syntéza |
| Phe | fenylalanin |
| PKU | fenylketonurie |
| PLS | <i>partial least square</i> ; metoda částečných nejmenších čtverců |
| PMR | psychomotorická retardace |
| PMV | psychomotorický vývoj |
| Pro | prolin |
| Q | kvadrupól |
| Q1 | první kvadrupól |
| Q2 | kolizní cela |
| Q3 | třetí kvadrupól |
| QqQ | trojitý kvadrupól |
| QC | <i>quality control</i> ; kontrola kvality |
| QC-RLSC | <i>quality control-based robust LOESS signal correction</i> |
| RT, rt | <i>retention time</i> ; retenční čas |
| SAdo | sukcinyladenosin |
| SAICAr | 5-aminoimidazol-4-(N-sukcinylkarboxamid)ribosid |
| SAICAR | 5-aminoimidazol-4-(N-sukcinylkarboxamid)ribotid |
| SAMP | sukcinyladenosinmonofosfát |
| Ser | serin |
| TCA | trichlooctová kyselina |
| TIC | <i>total ion current</i> ; celkový iontový proud |

| | |
|-------|--|
| TOF | <i>time-of-flight analyzer</i> , analyzátor doby letu |
| Trp | tryptopfan |
| Tyr | tyrosin |
| Tyr I | tyrosinémie typu I |
| U | <i>urine</i> , moč |
| UHPLC | <i>ultra high performance liquid chromatography</i> ultraúčinná kapalinová chromatografie |
| UDP | uridin-5'-difosfát |
| UMP | uridin-5'-monofosfát |
| UTP | uridin-5'-trifosfát |
| Val | valin |
| VLCFA | velmi dlouhé mastné kyseliny |
| xLeu | suma leucinu, isoleucinu a alloisoleucinu |
| Ž | žena |

8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Pampols T. Inherited Metabolic Rare Disease. In: Posada de la Paz M, Groft SC, editors. Rare diseases epidemiology. Dordrecht, Heidelberg, London, New York: Springer; 2010. p. 397-431.
2. Honzík H. Klinické příznaky dědičných metabolických poruch u dětí. *Pediatr. praxi* 2011; 12(5):314-319.
3. Sanderson S, Green A, Preece MA, Burton H. The incidence of inherited metabolic disorders in the West Midlands, UK. *Arch Dis Child*. 2006;91(11):896-9.
4. Kožich V, Zeman J. Dědičné metabolické poruchy v pediatrii. *Postgraduální medicína* 2010; 12(7): 793–800.
dědičných metabolických poruch. *Medicína pro praxi* 5(6):274-276.
6. Tracy EP, Valle D, Scriver ChR. Treatment of genetic diseases. In: Scriver ChR, Beaudet AL, Valle D, Sly WS, Childs B, Kinzley KW, Vogelstein B, editors . The metabolic and molecular bases of inherited disease, New York: McGraw-Hill, Inc.; 2001. pp 175-192.
7. Alfadhel M, Al-Thihli K, Moubayed H, Eyaid W, Al-Jeraisy M. Drug treatment of inborn errors of metabolism: a systematic review. *Arch Dis Child*. 2013 J;98(6):454-61.
8. Saudubray JM, Touati G, Delonlay P, Jouvét P, Narcy C, Laurent J, Rabier D, Kamoun P, Jan D, Revillon Y. Liver transplantation in urea cycle disorders. *Eur J Pediatr*. 1999;158 Suppl 2:S55-9.
9. Kim IK, Niemi AK, Krueger C, Bonham CA, Concepcion W, Cowan TM, Enns GM, Esquivel CO. Liver transplantation for urea cycle disorders in pediatric patients: a single-center experience. *Pediatr Transplant*. 2013;17(2):158-67.
10. Sillence D, Waters K, Donaldson S, Shaw PJ, Ellaway C. Combined Enzyme Replacement Therapy and Hematopoietic Stem Cell Transplantation in Mucopolysaccharidosis Type VI. *JIMD Rep*. 2012;2:103-6.

11. Stirnemann J, Belmatoug N, Vincent C, Fain O, Fantin B, Mentré F. Bone events and evolution of biologic markers in Gaucher disease before and during treatment. *Arthritis Res Ther.* 2010;12(4):R156.
12. Votava F, Kožich V, Šťastná S, Chrastina P, Adam T, Friedecký D, Vinohradská H, Kračmar P, Chovancová B, Balaščaková M, Piskáčková T, Macek M, Gaillyová R, Valášková I, Švagera Z, Truellová I. Novorozenecký screening v České republice. *Postgraduální medicína* 2010;12(7), 785-795.
13. Čechák P, Hejmanová L, Procházková D, Pijáčková A, Šťastná S, Hyjánek J, Ploticová V, Pekárková H. Výsledky screeningu hyperfenylalaninemií v českých zemích v letech 1970-2000. *Československá pediatrie* 2001;56(11), 667-670.
14. Metodický návod k zajištění celoplošného novorozeneckého laboratorního screeningu a následné péči. *Věstník Ministerstva zdravotnictví ČR.* 2009;6:7-14.
15. Jaeken J, Van den Berghe G. An infantile autistic syndrome characterised by the presence of succinylpurines in body fluids. *Lancet.* 1984;2(8411):1058-61.
16. Marie S, Heron B, Bitoun P, Timmerman T, Van Den Berghe G, Vincent MF. AICA-ribosiduria: a novel, neurologically devastating inborn error of purine biosynthesis caused by mutation of ATIC. *Am J Hum Genet.* 2004;74(6):1276-81.
17. Simmonds HA, Duley JA, Davies PM. Analysis of purine and pyrimidines in blood, urine, and other physiological fluids. In: *Hommes FA editor. Techniques in diagnostic human biochemical genetics - a laboratory manual.* New York: Wiley-Liss; 1991. p. 397-424.
18. Lazzarino G, Amorini AM, Di Pietro V, Tavazzi B. HPLC analysis for the clinical-biochemical diagnosis of inborn errors of metabolism of purines and pyrimidines. *Methods Mol Biol.* 2011;708:99-117.
19. Adam T, Friedecký D, Fairbanks LD, Ševčík J, Barták P. Capillary electrophoresis for detection of inherited disorders of purine and pyrimidine metabolism. *Clin Chem.* 1999;45(12):2086-93.

20. Friedecký D, Adam T, Barták P. Capillary electrophoresis for detection of inherited disorders of purine and pyrimidine metabolism: a selective approach. *Electrophoresis*. 2002;23(4):565-71.
21. Wevers RA, Engelke UF, Moolenaar SH, Bräutigam C, de Jong JG, Duran R, de Abreu RA, van Gennip AH. ¹H-NMR spectroscopy of body fluids: inborn errors of purine and pyrimidine metabolism. *Clin Chem*. 1999;45(4):539-48.
22. Hartmann S, Okun JG, Schmidt C, Langhans CD, Garbade SF, Burgard P, Haas D, Sass JO, Nyhan WL, Hoffmann GF. Comprehensive detection of disorders of purine and pyrimidine metabolism by HPLC with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Clin Chem*. 2006;52(6):1127-37.
23. la Marca G, Casetta B, Malvagia S, Pasquini E, Innocenti M, Donati MA, Zammarchi E. Implementing tandem mass spectrometry as a routine tool for characterizing the complete purine and pyrimidine metabolic profile in urine samples. *J Mass Spectrom*. 2006;41(11):1442-52.
24. Ito T, van Kuilenburg AB, Bootsma AH, Haasnoot AJ, van Cruchten A, Wada Y, van Gennip AH. Rapid screening of high-risk patients for disorders of purine and pyrimidine metabolism using HPLC-electrospray tandem mass spectrometry of liquid urine or urine-soaked filter paper strips. *Clin Chem*. 2000;46(4):445-52.
25. Hornik P, Vyskočilová P, Friedecký D, Janostáková A, Adamová K, Adam T. Analysis of aminoimidazole ribosides by capillary electrophoresis--diagnosing defects in second part of purine biosynthetic pathway. *Clin Chim Acta*. 2007;376(1-2):184-9.
26. Vyskočilová P. Defekty purinové de novo syntézy. Disertační práce, Lékařská fakulta Univerzity Palackého v Olomouci 2011.
27. Krätschmerová H. Screening dědičných metabolických poruch purinové de novo syntézy. Diplomová práce, Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého v Olomouci 2009.

28. Krätschmerová H, Vyskočilová P, Adam T. Screening dědičných metabolických poruch purinové de novo syntézy. *Chem. Listy* 2009; 103(s2):s172-s174.
29. Fanos V, Antonucci R, Barberini L, Atzori L. Urinary metabolomics in newborns and infants. *Adv Clin Chem.* 2012;58:193-223.
30. Dunn WB, Broadhurst DI, Atherton HJ, Goodacre R, Griffin JL. Systems level studies of mammalian metabolomes: the roles of mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Chem Soc Rev.* 2011;40(1):387-426.
31. Kell DB. Iron behaving badly: inappropriate iron chelation as a major contributor to the aetiology of vascular and other progressive inflammatory and degenerative diseases. *BMC Med Genomics.* 2009;2:2.
32. Vuckovic D. Current trends and challenges in sample preparation for global metabolomics using liquid chromatography-mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem.* 2012;403(6):1523-48.
33. Goodacre R, Vaidyanathan S, Dunn WB, Harrigan GG, Kell DB. Metabolomics by numbers: acquiring and understanding global metabolite data. *Trends Biotechnol.* 2004;22(5):245-52.
34. Herrgård MJ, Swainston N, Dobson P, Dunn WB, Arga KY, Arvas M, Blüthgen N, Borger S, Costenoble R, Heinemann M, Hucka M, Le Novère N, Li P, Liebermeister W, Mo ML, Oliveira AP, Petranovic D, Pettifer S, Simeonidis E, Smallbone K, Spasić I, Weichart D, Brent R, Broomhead DS, Westerhoff HV, Kirdar B, Penttilä M, Klipp E, Palsson BØ, Sauer U, Oliver SG, Mendes P, Nielsen J, Kell DB. A consensus yeast metabolic network reconstruction obtained from a community approach to systems biology. *Nat Biotechnol.* 2008;26(10):1155-60.
35. Fiehn O, Kopka J, Dörmann P, Altmann T, Trethewey RN, Willmitzer L. Metabolite profiling for plant functional genomics. *Nat Biotechnol.* 2000;18(11):1157-61.

36. Wishart DS, Jewison T, Guo AC, Wilson M, Knox C, Liu Y, Djoumbou Y, Mandal R, Aziat F, Dong E, Bouatra S, Sinelnikov I, Arndt D, Xia J, Liu P, Yallou F, Bjorndahl T, Perez-Pineiro R, Eisner R, Allen F, Neveu V, Greiner R, Scalbert A. HMDB 3.0--The Human Metabolome Database in 2013. *Nucleic Acids Res.* 2013;41(Database issue):D801-7.
37. Nicholson JK, Lindon JC. Systems biology: Metabonomics. *Nature.* 2008;455(7216):1054-6.
38. Horning EC, Horning MG. Metabolic profiles: gas-phase methods for analysis of metabolites. *Clin Chem.* 1971;17(8):802-9.
39. Pauling L, Robinson AB, Teranishi R, Cary P. Quantitative analysis of urine vapor and breath by gas-liquid partition chromatography. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1971;68(10):2374-6.
40. Bales JR, Higham DP, Howe I, Nicholson JK, Sadler PJ. Use of high-resolution proton nuclear magnetic resonance spectroscopy for rapid multi-component analysis of urine. *Clin Chem.* 1984;30(3):426-32.
41. Oliver SG, Winson MK, Kell DB, Baganz F. Systematic functional analysis of the yeast genome. *Trends Biotechnol.* 1998;16(9):373-8.
42. Tweeddale H, Notley-McRobb L, Ferenci T. Effect of slow growth on metabolism of *Escherichia coli*, as revealed by global metabolite pool ("metabolome") analysis. *J Bacteriol.* 1998;180(19):5109-16.
43. Nicholson JK, Lindon JC, Holmes E. 'Metabonomics': understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. *Xenobiotica.* 1999;29(11):1181-9.
44. Villas-Bôas SG, Mas S, Akesson M, Smedsgaard J, Nielsen J. Mass spectrometry in metabolome analysis. *Mass Spectrom Rev.* 2005;24(5):613-46.
45. Lehmann R, Zhao X, Weigert C, Simon P, Fehrenbach E, Fritsche J, Machann J, Schick F, Wang J, Hoene M, Schleicher ED, Häring HU, Xu G, Niess AM. Medium chain acylcarnitines dominate the metabolite pattern in humans under moderate intensity exercise and support lipid oxidation. *PLoS One.* 2010;5(7):e11519.

46. Cubbon S, Bradbury T, Wilson J, Thomas-Oates J. Hydrophilic interaction chromatography for mass spectrometric metabonomic studies of urine. *Anal Chem.* 2007;79(23):8911-8.
47. Lewis GD, Wei R, Liu E, Yang E, Shi X, Martinovic M, Farrell L, Asnani A, Cyrille M, Ramanathan A, Shaham O, Berriz G, Lowry PA, Palacios IF, Taşan M, Roth FP, Min J, Baumgartner C, Keshishian H, Addona T, Mootha VK, Rosenzweig A, Carr SA, Fifer MA, Sabatine MS, Gerszten RE. Metabolite profiling of blood from individuals undergoing planned myocardial infarction reveals early markers of myocardial injury. *J Clin Invest.* 2008;118(10):3503-12.
48. Ma YL, Qin HL, Liu WJ, Peng JY, Huang L, Zhao XP, Cheng YY. Ultra-high performance liquid chromatography-mass spectrometry for the metabolomic analysis of urine in colorectal cancer. *Dig Dis Sci.* 2009;54(12):2655-62.
49. Juo CG, Chiu DT, Shiao MS. Liquid chromatography-mass spectrometry in metabolite profiling. *Biofactors.* 2008;34(2):159-69.
50. Zhou B, Xiao JF, Tuli L, Ressom HW. LC-MS-based metabolomics. *Mol Biosyst.* 2012;8(2):470-81.
51. Roux A, Lison D, Junot C, Heilier JF. Applications of liquid chromatography coupled to mass spectrometry-based metabolomics in clinical chemistry and toxicology: A review. *Clin Biochem.* 2011;44(1):119-35.
52. Becker S, Kortz L, Helmschrodt C, Thiery J, Ceglarek U. LC-MS-based metabolomics in the clinical laboratory. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2012;883-884:68-75.
53. Ceglarek U, Kortz L, Leichtle A, Fiedler GM, Kratzsch J, Thiery J. Rapid quantification of steroid patterns in human serum by on-line solid phase extraction combined with liquid chromatography-triple quadrupole linear ion trap mass spectrometry. *Clin Chim Acta.* 2009;401(1-2):114-8.

54. Wang Z, Tang WH, Cho L, Brennan DM, Hazen SL. Targeted metabolomic evaluation of arginine methylation and cardiovascular risks: potential mechanisms beyond nitric oxide synthase inhibition. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009;29(9):1383-91.
55. Glish GL, Vachet RW. The basics of mass spectrometry in the twenty-first century. *Nat Rev Drug Discov.* 2003;2(2):140-50.
56. Chen J, Zhang X, Cao R, Lu X, Zhao S, Fekete A, Huang Q, Schmitt-Kopplin P, Wang Y, Xu Z, Wan X, Wu X, Zhao N, Xu C, Xu G. Serum 27-nor-5 β -cholestane-3,7,12,24,25 pentol glucuronide discovered by metabolomics as potential diagnostic biomarker for epithelium ovarian cancer. *J Proteome Res.* 2011 6;10(5):2625-32.
57. Kim K, Aronov P, Zakharkin SO, Anderson D, Perroud B, Thompson IM, Weiss RH. Urine metabolomics analysis for kidney cancer detection and biomarker discovery. *Mol Cell Proteomics.* 2009;8(3):558-70.
58. Liu G, Snapp HM, Ji QC, Arnold ME. Strategy of accelerated method development for high-throughput bioanalytical assays using ultra high-performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry. *Anal Chem.* 2009;81(22):9225-32.
59. Wikoff WR, Gangoiti JA, Barshop BA, Siuzdak G. Metabolomics identifies perturbations in human disorders of propionate metabolism. *Clin Chem.* 2007;53(12):2169-76.
60. Ritchie SA, Ahiahonu PW, Jayasinghe D, Heath D, Liu J, Lu Y, Jin W, Kavianpour A, Yamazaki Y, Khan AM, Hossain M, Su-Myat KK, Wood PL, Krenitsky K, Takemasa I, Miyake M, Sekimoto M, Monden M, Matsubara H, Nomura F, Goodenowe DB. Reduced levels of hydroxylated, polyunsaturated ultra long-chain fatty acids in the serum of colorectal cancer patients: implications for early screening and detection. *BMC Med.* 2010;8:13.
61. Draper J, Lloyd AJ, Goodacre R, Beckmann M. Flow infusion electrospray ionisation mass spectrometry for high throughput, non-targeted metabolite fingerprinting: a review. *Metabolomics* 2013;9(1): S4–S29.

62. Jansson J, Willing B, Lucio M, Fekete A, Dicksved J, Halfvarson J, Tysk C, Schmitt-Kopplin P. Metabolomics reveals metabolic biomarkers of Crohn's disease. *PLoS One*. 2009;4(7):e6386.
63. Dénes J, Szabó E, Robinette SL, Szatmári I, Szőnyi L, Kreuder JG, Rauterberg EW, Takáts Z. Metabonomics of newborn screening dried blood spot samples: a novel approach in the screening and diagnostics of inborn errors of metabolism. *Anal Chem*. 2012;84(22):10113-20.
64. Turer AT, Stevens RD, Bain JR, Muehlbauer MJ, van der Westhuizen J, Mathew JP, Schwinn DA, Glower DD, Newgard CB, Podgoreanu MV. Metabolomic profiling reveals distinct patterns of myocardial substrate use in humans with coronary artery disease or left ventricular dysfunction during surgical ischemia/reperfusion. *Circulation*. 2009;119(13):1736-46.
65. Wojtowicz P, Janečková H, Friedecký D, Adam T. Techniky metabolomiky v biomedicíně. *Chem listy* 2013;107(1): 3-11.
66. Miller JN, Miller JC. *Statistics and chemometrics for analytical chemistry*. 5th ed. Edinburgh: Pearson Education Limited;2005 pp. 213-227.
67. Vyskocilová P, Hornik P, Friedecký D, Frycák P, Lemr K, Adam T. Synthesis and mass spectrometric fragmentation characteristics of imidazole ribosides-analogs of intermediates of purine *de novo* synthetic pathway. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. 2006;25(9-11):1237-40.
68. Zikánová M, Krijt J, Hartmannová H, Kmoch S. Preparation of 5-amino-4-imidazole-N-succinocarboxamide ribotide, 5-amino-4-imidazole-N-succinocarboxamide riboside and succinyladenosine, compounds usable in diagnosis and research of adenylosuccinate lyase deficiency. *J Inherit Metab Dis*. 2005;28(4):493-9.
69. Le Belle JE, Harris NG, Williams SR, Bhakoo KK. A comparison of cell and tissue extraction techniques using high-resolution ¹H-NMR spectroscopy. *NMR Biomed*. 2002;15(1):37-44.

70. Hron K, Filzmoser P, Thompson K. Linear regression with compositional explanatory variables. *J Appl Stat.* 2012;39(5):1115-28.
71. Bajad SU, Lu W, Kimball EH, Yuan J, Peterson C, Rabinowitz JD. Separation and quantitation of water soluble cellular metabolites by hydrophilic interaction chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 2006;1125(1):76-88.
72. Bajad S, Shulaev V. LC-MS-based metabolomics. *Methods Mol Biol.* 2011;708:213-28.
73. Brown M, Wedge DC, Goodacre R, Kell DB, Baker PN, Kenny LC, Mamas MA, Neyses L, Dunn WB. Automated workflows for accurate mass-based putative metabolite identification in LC/MS-derived metabolomic datasets. *Bioinformatics.* 2011;27(8):1108-12.
74. Yuan M, Breitkopf SB, Yang X, Asara JM. A positive/negative ion-switching, targeted mass spectrometry-based metabolomics platform for bodily fluids, cells, and fresh and fixed tissue. *Nat Protoc.* 2012;7(5):872-81.
75. Dunn WB, Broadhurst D, Begley P, Zelena E, Francis-McIntyre S, Anderson N, Brown M, Knowles JD, Halsall A, Haselden JN, Nicholls AW, Wilson ID, Kell DB, Goodacre R. Human Serum Metabolome (HUSERMET) Consortium. Procedures for large-scale metabolic profiling of serum and plasma using gas chromatography and liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Nat Protoc.* 2011;6(7):1060-83.
76. Want EJ, Wilson ID, Gika H, Theodoridis G, Plumb RS, Shockcor J, Holmes E, Nicholson JK. Global metabolic profiling procedures for urine using UPLC-MS. *Nat Protoc.* 2010;5(6):1005-18.
77. Sellick CA, Hansen R, Maqsood AR, Dunn WB, Stephens GM, Goodacre R, Dickson AJ. Effective quenching processes for physiologically valid metabolite profiling of suspension cultured Mammalian cells. *Anal Chem.* 2009;81(1):174-83.

78. Dettmer K, Nürnberger N, Kaspar H, Gruber MA, Almstetter MF, Oefner PJ. Metabolite extraction from adherently growing mammalian cells for metabolomics studies: optimization of harvesting and extraction protocols. *Anal Bioanal Chem.* 2011;399(3):1127-39.
79. Wojtowicz P, Zrostlíková J, Šťastná V, Dostálová E, Žídková L, Bruheim P, Adam T. Comprehensive two-dimensional gas Chromatography coupled to time-of-Flight mass spectrometry in human metabolomics. In: Salih B, Çelikbiçak Ö, editors. *Gas Chromatography - Biochemicals, Narcotics and Essential Oils.* Rijeka: InTech; 2012. p. 29-50.
80. Žídková L. Metabolická analýza kultivovaných lidských buněk. Disertační práce, Lékařská fakulta Univerzity Palackého v Olomouci 2011.
81. Thevis M, Thomas A, Kohler M, Beuck S, Schänzer W. Emerging drugs: mechanism of action, mass spectrometry and doping control analysis. *J Mass Spectrom.* 2009;44(4):442-60.
82. Janečková H, Hron K, Wojtowicz P, Hlídková E, Barešová A, Friedecký D, Zídková L, Hornik P, Behúlová D, Procházková D, Vínohradská H, Pešková K, Bruheim P, Smolka V, Šťastná S, Adam T. Targeted metabolomic analysis of plasma samples for the diagnosis of inherited metabolic disorders. *J Chromatogr A.* 2012;1226:11-7.
83. Sreekumar A, Poisson LM, Rajendiran TM, Khan AP, Cao Q, Yu J, Laxman B, Mehra R, Lonigro RJ, Li Y, Nyati MK, Ahsan A, Kalyana-Sundaram S, Han B, Cao X, Byun J, Omenn GS, Ghosh D, Pennathur S, Alexander DC, Berger A, Shuster JR, Wei JT, Varambally S, Beecher C, Chinnaiyan AM. Metabolomic profiles delineate potential role for sarcosine in prostate cancer progression. *Nature.* 2009;457(7231):910-4.
84. Piraud M, Ruet S, Boyer S, Acquaviva C, Clerc-Renaud P, Cheillan D, Vianey-Saban C. Amino acid profiling for the diagnosis of inborn errors of metabolism. *Methods Mol Biol.* 2011;708:25-53.

- 85 la Marca G, Rizzo C. Analysis of organic acids and acylglycines for the diagnosis of related inborn errors of metabolism by GC- and HPLC-MS. *Methods Mol Biol.* 2011;708:73-98.
86. Fikarová I. Vliv imatinibu na metabolismus buněk v buněčné kultuře chronické myeloidní leukemie. Bakalářská práce, Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého v Olomouci 2011.
87. Konvalinová H. Diagnostika metabolických poruch aminokyselin a peptidů metodou UHPLC-MS/MS. Diplomová práce, Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého v Olomouci 2011.
88. Galoczová M. Metabolitové profilování močí novorozenců s perinatální asfyxií. Bakalářská práce, Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého v Olomouci 2013.
89. Fikarová I. Stanovení vlivu imatinibu na metabolismus buněk chronické myeloidní leukemie metodou HPLC-MS/MS. Diplomová práce, Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého v Olomouci 2013.
90. Karlíková R. Metabolomická analýza kondenzátu dechu pacientů s astmatem a cystickou fibrózou. Diplomová práce, Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého v Olomouci 2013.
91. Halířová B. Vliv kancerostatik na intracelulární metabolom. Diplomová práce, Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého v Olomouci 2013.
92. Šťastná V. Metabolomická analýza myší plasmy za použití aminopropylové kolony a TripleQ-MS. Diplomová práce, Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého v Olomouci 2013.

9 SEZNAM PUBLIKACÍ

I. Práce související s disertační prací

a) Původní vědecké publikace uveřejněné v časopisech s IF

Janečková H, Hron K, Wojtowicz P, Hlídková E, Barešová A, Friedecký D, Zídková L, Hornik P, Behúlová D, Procházková D, Vinohradská H, Pešková K, Bruheim P, Smolka V, Šťastná S, Adam T. Targeted metabolomic analysis of plasma samples for the diagnosis of inherited metabolic disorders. J Chromatogr A. 2012;1226:11-7.

IF 4,612

b) Původní vědecké publikace v recenzovaných časopisech

Janečková H, Wojtowicz P, Hron K, Friedecký D, Adam T. Necílená metabolická analýza suchých krevních skvrn pro diagnostiku dědičných metabolických poruch. Klin Biochem Metab 2012; 20(41):165-7.

c) Přehledné články uveřejněné v časopisech s IF

Wojtowicz P, Janečková H, Friedecký D, Adam T. Techniky metaboliky v biomedicině. Chem listy 2013;107(1): 3-11.

IF 0,453

d) Publikovaná abstrakta

Krätschmerová H, Hlídková E, Hron K, Wojtowicz P, Friedecký D, Hornik P, Behúlová D, Procházková D, Vinohradská H, Šťastná S, Kožich V, Adam T. Targeted metabolomics for diagnosing of inherited metabolic disorders. Clin Bioch 2011;44(7): 520.

IF 2,076

Krätschmerová H, Hlídková E, Hron K, Wojtowicz P, Barešová A, Friedecký D, Hornik P, Behúlová D, Procházková D, Vinohradská H, Pešková K, Adam T. Diagnosis of inherited metabolic disorders using a targeted metabolomic approach. *J Inher Metab Dis* 2011;34(Suppl 3):S269.

IF 3,577

Krätschmerová H, Hron K, Wojtowicz P, Barešová A, Hlídková E, Friedecký D, Hornik P, Behúlová D, Procházková D, Vinohradská H, Pešková K, Adam T. Widely targeted metabolomics for diagnosing inherited metabolic disorders. *Klin Biochem Metab.* 2011;19(40):208.

e) Přednášková činnost

Krätschmerová H, Friedecký D and Adam T. Diagnosis of enzyme defects in purine *de novo* synthesis by UHPLC-tandem mass spectrometry. Conference vědeckých prací studentů DSP 2010, Olomouc 7.–8. 9. 2010.

Krätschmerová H, Friedecký D, Adam T. Diagnosis of enzyme defects in purine *de novo* synthesis by UHPLC-tandem mass spectrometry. The 7th International Medical Postgraduate Conference, Hradec Králové 18.–20. 11. 2010.

Krätschmerová H, Hron K, Wojtowicz P, Hlídková E, Barešová A., Friedecký D, Hornik P, Behúlová D, Procházková D, Vinohradská H, Pešková K, Šťastná S, Adam T. Diagnosis of inherited metabolic disorders using a targeted metabolomic approach. Conference vědeckých prací studentů DSP 2011, Olomouc 6.–7. 9. 2011.

Janečková H, Wojtowicz P, Hron K, Hlídková E, Friedecký D, Adam T. Targeted metabolomics for diagnosing inherited metabolic diseases. 1. Konference České společnosti pro hmotnostní spektrometrii, Hradec Králové 19.–21. 10. 2011.

Janečková H, Wojtowicz P, Hron K, Brunsvik A, Correa E, Vaughan A, Friedecký D, Bruheim P, Goodacre R and Adam T. Untargeted metabolomics for diagnosing inborn errors of metabolism. 27. pracovní dny Dedičné metabolické poruchy, Košice, Slovensko, 16.–18. 5. 2012.

Janečková H, Wojtowicz P, Hron K, Brunsvik A, Correa E, Vaughan A, Friedecký D, Bruheim P, Goodacre R and Adam T. Untargeted metabolomic analysis of urine samples for diagnosing inherited metabolic disorders. 2. Konference České společnosti pro hmotnostní spektrometrii, Hradec Králové 17.–19. 10. 2012.

f) Posterové prezentace

Krätschmerová H, Friedecký D, Adam T. Diagnosis of enzyme defects in the second part of purine *de novo* synthesis by UHPLC-tandem mass spectrometry. 25th International symposium on microscale bioseparations, Praha 21. - 25. 3. 2010.

Krätschmerová H, Friedecký D, Adam T. Diagnosis of enzyme defects in purine *de novo* synthesis by UHPLC-tandem mass spectrometry. 25. pracovní dny Dedičné metabolické poruchy Trenčianské Teplice, Slovensko 5.–7. 5. 2010.

Krätschmerová H, Friedecký D and Adam T. UHPLC-MS/MS for diagnosing of enzyme defects in purine *de novo* synthesis. FONS 2010, Hradec Králové 20.– 21.9. 2010.

Krätschmerová H, Friedecký D and Adam T. Diagnosis of purine *de novo* synthesis enzyme defects by UHPLC-MS/MS. 1st AB SCIEX European conference on MS/MS. Noordwijkerhout, The Netherlands 6.–7. 10. 2010.

Krätschmerová H, Friedecký D, Adam T. Diagnosis of enzyme defects in purine *de novo* synthesis by UHPLC-MS/MS. Advances in Metabolic Profiling, European Biomarkers Summit, Mass Spec Europe and Advances in Protein Crystallography 2010 conferences. Florence, Italy 9.–7. 11. 2010.

Krätschmerová H, Hlídková E, Hron K, Wojtowicz P, Barešová A, Friedecký D, Hornik P, Behúlova D, Procházková D, Vinohradská H, Pešková K, Adam T. Targeted metabolomic analysis of plasma samples for diagnosing of inherited metabolic disorders. 1st Joint Congress Symposium, San Diego, USA 1.–5. 5. 2011.

Janečková H, Hron K, Wojtowicz P, Hlídková E, Barešová A, Friedecký D, Hornik P, Behúlová D, Procházková D, Vinohradská H, Pešková K, Šťastná S, Adam T. Diagnosis of inherited metabolic disorders using a targeted metabolomics by flow injection analysis - tandem mass spectrometry. 27th Asilomar Conference on Mass Spectrometry - Metabolomics. Pacific Grove, CA 30. 9. – 4. 10. 2011.

Janečková H, Friedecký D, Wojtowicz P, Hron K, Brunsvik A, Correa E, Vaughan A, Micová K, Najdekr L, Bruheim P, Goodacre R, Adam T. Untargeted metabolomics for diagnosing inherited metabolic diseases. 27th International symposium on microscale bioseparations and analyses, Geneva, Switzerland 12.–15. 2. 2012.

Janečková H, Hron K, Wojtowicz P, Brunsvik A, Correa E, Vaughan A, Friedecký D, Bruheim P, Goodacre R and Adam T. Untargeted metabolomic analysis of urine samples for diagnosing inherited metabolic disorders. 30th Informal Meeting on Mass Spectrometry. Olomouc 29.4. – 3.5. 2012.

Janečková H, Wojtowicz P, Correa E, Friedecký D, Bruheim P, Goodacre R and Adam T. Diagnosing inherited metabolic disorders using an untargeted metabolomic approach. XXXIII Nordic Congress in Clinical Chemistry. Reykjavik, Island 12.–15. 6. 2012.

f) Vybrané posterové prezentace jako spoluautor

Adam T, Wojtowicz P, Krätschmerová H, Saitz J, Generová M, Friedecký D. Neonatal onset ADSL deficiency – case report. 25. pracovní dny Dědičné metabolické poruchy Trenčianské Teplice, Slovensko 5.–7. 5. 2010.

Friedecký D, Krätschmerová H, Barešová A, Prachařová J, Mičová K and Adam T. Human cellular metabolome of fibroblasts by UHPLC-MS/MS. FONS 2010, Hradec Králové, 20.–21. 9. 2010.

Friedecký D, Krätschmerová H, Mičová K, Wojtowicz P, Adamova K, Brunsvik A, Bruheim P, Adam T. Diagnosing of inherited metabolic disorders by LC-QTOF analysis of cultured skin fibroblasts. Advances in Metabolic Profiling, European Biomarkers Summit, Mass Spec Europe and Advances in Protein Crystallography 2010 conferences. Florence, Italy 9.–7. 11. 2010.

Friedecký D., Krätschmerová H, Mičová K., Wojtowicz P., Brunsvik A., Bruheim P., Adam T. Diagnosing of inherited metabolic disorders by high resolution mass spectrometry; 26. pracovní dny Dědičné metabolické poruchy, Mikulov, 11.–13. 5. 2011.

I. Ostatní publikace

a) Původní vědecké publikace uveřejněné v časopisech s IF

Krätschmerová H, Vyskočilová P, Adam T. Screening dědičných metabolických poruch purinové *de novo* syntézy. Chem. Listy 2009; 103:s172-4.

b) Publikovaná abstrakta

Barešová A, Friedecký D, Krätschmerová H, Mičová K, Adam T. UHPLC-TMS method for screening of multiple inherited metabolic disorders. J Inher Metab Dis. 2011;34 (Suppl 3): S269.

IF 3,577

c) Přednášková činnost

Krätschmerová H, Vyskočilová P, Adam T, Screeningový test pro defekty druhé poloviny purinové *de novo* syntézy, Pracovní den - Laboratorní vyšetření v péči o matku a dítě, Olomouc 5. 11. 2009.

d) Posterové prezentace

Krätschmerová H, Barešová A, Friedecký D, Mičová K, Adam T. Screening of multiple inborn errors of metabolism in urine by UHPLC-MS/MS; 26. pracovní dny Dědičné metabolické poruchy, Mikulov 11.–13. 5. 2011.

Janečková H, Friedecký D, Hlídková E, Kittlová L, Semeniuk T, Zábanská A, Mičová K, Najdekr L and Adam T. Diagnosing multiple inborn errors of metabolism in urine by UHPLC-TMS. 27. pracovní dny Dědičné metabolické poruchy, Košice, Slovensko, 16.–18. 5. 2012.