

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**

**Přírodovědecká fakulta**

**Laboratoř růstových regulátorů**



**Lipidomická analýza mozkového kmene transgenního modelu  
pro tauopatie**

## **DIPLOMOVÁ PRÁCE**

Autor: **Bc. Petra Šťastná**

Studijní program: 1501T019 Experimentální biologie

Studijní obor: Experimentální biologie

Forma studia: Prezenční

Vedoucí práce: **doc. RNDr. David Friedecký, Ph.D.**

Termín odevzdání práce: 1. 6. 2020

## Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Petra Šťastná
Název práce	Lipidomická analýza mozkového kmene transgenního modelu pro tauopatie
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce	doc. RNDr. David Friedecký, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2020
Abstrakt	<p>Tauopatie se řadí mezi neurodegenerativní onemocnění, které jsou spojené s akumulací tau proteinu v neuronech a gliích. K lepšímu pochopení mechanismů patogeneze onemocnění je zapotřebí komplexní studie lipidového metabolismu k čemuž mohou napomoci přístupy lipidomické analýzy. Tato práce se zabývá cílenou lipidomickou analýzou vzorků zadního mozkového kmene transgenního modelu pro tauopatii v porovnání s kontrolou. Pomocí hmotnostní spektrometrie ve spojení s kapalinovou chromatografií bylo identifikováno 891 lipidů. Následně byla data podrobena statistické analýze použitím metod jednorozměrné a vícerozměrné analýzy. Byly sledovány změny v lipidomickém profilu skupin vzorků napříč věkovým spektrem (4-14 měsíců) a na základě přítomnosti/nepřítomnosti daného onemocnění.</p>
Klíčová slova	Neurodegenerativní onemocnění, tauopatie, tau protein, Alzheimerova demence, lipidomika, statistická analýza
Počet stran	91
Počet příloh	3
Jazyk	Český

## **Bibliographical identification**

Author's name and surname	Bc. Petra Šťastná
Title of thesis	Lipidomic analysis of the brain stem of the transgenic model for tauopathy
Type of thesis	Master
Department	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor	doc. RNDr. David Friedecký, Ph.D.
The year of presentation	2020
Abstract	<p>Tauopathy is one of the neurodegenerative disease associated with accumulation of tau protein in neurons and glia. For better understanding the mechanisms of disease pathogenesis it is used comprehensive study of lipid metabolism by lipidomic analysis approaches. This theses is dealing with targeted lipidomic analysis of posterior brain stem samples for transgenic model of tauopathy in comparison with the control. 891 lipids were identified based on the liquid chromatography coupled with mass spektrometry. Subsequently, the data were subjected for statistical analysis by providing one-dimensional and multidimensional analysis methods. Changes in samples group from lipidomic profile were rated across the age spectrum (4-14 months) and based on the presence / absence profile.</p>
Keywords	Neurodegenerative diseases, tauopathy, tau protein, Alzheimer's dementia, lipidomics, statistical analysis
Number of pages	91
Number of appendices	3
Language	Czech

„Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením doc. RNDr. Davida Friedeckého, Ph.D. za použití citované literatury.“

V Olomouci dne 1. 6. 2020

*Ráda bych poděkovala svému vedoucímu diplomové práce doc. RNDr. Davidovi Friedeckému, Ph.D. za odborné vedení, pomoc při vypracování experimentální i teoretické části práce, a především za obrovskou laskavost a vstřícnost. Dále bych poděkovala i Mgr. Štěpánovi Kouřilovi a Radaně Brumarové, Ph.D. za poskytnuté informace, ochotu a pomoc.*

## Obsah

<b>1. Cíle práce .....</b>	<b>8</b>
<b>2. Úvod.....</b>	<b>9</b>
<b>3. Seznam použitých zkratk.....</b>	<b>10</b>
<b>4. Teoretická část.....</b>	<b>12</b>
<b>4.1. Neurodegenerativní onemocnění .....</b>	<b>12</b>
<b>4.1.1. Tauopatie a tau protein .....</b>	<b>12</b>
<b>4.1.2. Transgenní model pro tauopatie – SHR 24 .....</b>	<b>16</b>
<b>4.1.3. Amyloidózy .....</b>	<b>17</b>
<b>4.1.4. Synukleinopatie .....</b>	<b>17</b>
<b>4.2. Demence .....</b>	<b>17</b>
<b>4.2.1. Alzheimerova demence .....</b>	<b>18</b>
<b>4.3. Lipidomika .....</b>	<b>19</b>
<b>4.3.1. Cílená a necílená lipidomika .....</b>	<b>19</b>
<b>4.3.2. Přístupy pro extrakci lipidů.....</b>	<b>20</b>
<b>4.3.3. Analýza lipidů.....</b>	<b>21</b>
<b>4.4. Statistická analýza.....</b>	<b>22</b>
<b>4.4.1. Vícerozměrná statistická analýza.....</b>	<b>23</b>
<b>4.4.1.1. Nesupervizované metody MVDA .....</b>	<b>23</b>
<b>4.4.1.2. Supervizované metody MVDA .....</b>	<b>24</b>
<b>5. Praktická část .....</b>	<b>26</b>
<b>5.1. Materiál .....</b>	<b>26</b>
<b>5.1.1. Chemikálie .....</b>	<b>26</b>
<b>5.1.2. Přístrojové vybavení a software.....</b>	<b>26</b>
<b>5.1.3. Biologický materiál .....</b>	<b>26</b>

<b>5.2. Příprava vzorků, vzorků kontroly kvality, blanku .....</b>	<b>28</b>
<b>5.3. Použité metody.....</b>	<b>30</b>
<b>5.4. Vyhodnocení dat.....</b>	<b>32</b>
<b>6. Výsledky.....</b>	<b>33</b>
<b>6.1. Výsledky z integrace a procesování dat .....</b>	<b>33</b>
<b>6.2. Statistické výsledky .....</b>	<b>36</b>
<b>7. Diskuze .....</b>	<b>51</b>
<b>8. Závěr .....</b>	<b>54</b>
<b>9. Použitá literatura .....</b>	<b>55</b>
<b>10. Přílohy.....</b>	<b>60</b>

### 1. Cíle práce

- Teoretická část
  - Vypracování literární rešerše na témata: neurodegenerativní onemocnění, tauopatie, lipidomika a statistická analýza.
- Praktická část
  - Extrakce lipidů se zadní části mozkového kmene zdravých potkaních modelů SHR a transgenních modelů pro tauopatie SHR24.
  - Analýza série vzorků od zdravých kontrol SRH a transgenních modelů SHR24 cílenou lipidomickou LC-MS metodou.
  - Vyhodnocení dat pomocí metod jednorozměrné a vícerozměrné statistiky. Porovnání kontrol a transgenních modelů.
  - Sledování lipidomického profilu v průběhu stárnutí a v závislosti na přítomnosti daného onemocnění.



## 2. Úvod

Neurodegenerativní onemocnění představují velkou skupinu neurologických poruch s klinickými symptomy a patologickými nálezy, včetně změn v metabolickém profilu. Mezi nejběžnější neurodegenerativní poruchy patří tauopatie. Za fyziologických podmínek protein tau stabilizuje mikrotubuly a je součástí mezibuněčného transportu. Hyperfosforylovaný protein tau za patologického stavu mění svoji afinitu vůči mikrotubulům. Dochází k jeho uvolnění a k následné agregaci do neurofibrilárních klubíček (NFT).

Lipidomika, jakožto odvětví metabolomiky, má velký potenciál vysvětlit celou řadu molekulárních a biochemických otázek. Onemocnění často vedou k deregulaci lipidového metabolismu. A právě pomocí cílených a necílených přístupů lipidomické analýzy, lze na tyto změny upozornit a případně odhalit nové biomarkery jednotlivých chorob.

V experimentální části této diplomové práce byla provedena extrakce lipidů ze vzorků zadního mozkového kmene potkaních transgenních modelů SHR24 pro tauopatie a kontrolních SHR potkanů. Ti byli ve věkovém rozpětí 4-14 měsíců. Pomocí kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií (LC-MS) byly tyto vzorky analyzovány. A následně byly hledány změny v lipidových profilech na základě přítomnosti onemocnění a napříč věkovým spektrem potkanů pomocí metod jednorozměrné a vícerozměrné analýzy.

### 3. Seznam použitých zkratek

A $\beta$	amyloid beta
AD	Alzheimerova demence
AMK	aminokyseliny
APCI	chemická ionizace pomocí atmosférického tlaku
APP	amyloidový prekurzorový protein
APPI	fotoionizace pomocí atmosférického tlaku
CA	shluková analýza
CE	estery cholesterolu
CE	kolizní energie
Cer	ceramidy
CN	kontrolní vzorky
CSF	mozkomíšní mok
CXP	výstupní potenciál kolizní cely
DA	diskriminační analýza
DG	diacylglyceroly
DP	deklasterační potenciál
ESI	ionizace elektrosprejem
FA	mastné kyseliny
FID	plamenový ionizační detektor
GL	glycerolipidy
GP	glycerofosfolipidy
Hex2Cer	dihexosylceramidy
HexCer	hexosylceramidy
HRMS	hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením
IS	interní standard
LC-MS	kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií
LDA	lineární diskriminační analýza
LPC	lysofosfatidylcholiny
LPC-O	lysofosfatidylcholiny s alkylovými substituenty
LPE	lysofosfatidylethanolaminy
LPE-O	lysofosfatidylethanolaminy s alkylovými substituenty

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

MALDI	laserová desorpční ionizace s pomocí matrice
MAP	protein asociovaný s mikrotubuly
MRM	sledování produktu rozpadu molekulárního iontu
MVDA	vícerozměrná analýza dat
NFT	neurofibrilární klubíčka
NMR	nukleární magnetická rezonance
OPLS-DA	ortogonální diskriminační analýza nejmenších čtverců
PC	fosfatidylcholin
PCA	analýza hlavních komponent
PC-O	fosfatidylcholin s alkylovými substituenty
PE	fosfatidylethanolaminy
PE-O	fosfatidylethanolaminy s alkylovými substituenty
PG	fosfatidylglyceroly
PHF	párové helikální filamenty
PI	fosfatidylinositoly
PK	polyketidy
PLS-DA	diskriminační analýza metodou dílčích nejmenších čtverců
PLS-R	regrese metodou dílčích nejmenších čtverců
PR	prenolipidy
PS	fosfatidylseriny
PSP	progresivní supranukleární paralýza
QC	vzorek kontroly kvality
SL	sacharolipidy
SM	sfingomyeliny
SP	sfingolipidy
ST	sterolové lipidy
TG	transgenní vzorky
TG	triacylglyceroly

## 4. Teoretická část

### 4.1. Neurodegenerativní onemocnění

Etymologicky je slovo neurodegenerace složeno z předpony „neuro-“, která pojmenovává nervové buňky, a „-degenerace“, která v biologickém významu označuje proces ztráty struktury nebo funkce.

Neurodegenerativní onemocnění představují velkou skupinu neurologických poruch s heterogenními klinickými a patologickými projevy, které ovlivňují specifické podskupiny neuronů (Przedborski, 2003). Počet neurodegenerativních onemocnění se v současné době odhaduje na několik stovek a je zřejmé, že mnoho z nich se vzájemně klinicky a patologicky překrývá. I přes tyto komplikace lze neurodegenerace klasifikovat dle primárních klinických rysů, anatomického rozložení nebo dle hlavní molekulární abnormality.

Mezi hlavní histopatologické znaky, které jsou nezbytné pro specifickou diagnostiku, patří abnormální proteinové konformace. Akumulace proteinů v neuronech představují neurofibrilární spleti (NFT), Pickova tělíska, Lewyho tělíska a  $\alpha$ -synuklein. Všechny neurodegenerativní poruchy postupují pomalu v průběhu času, často trvá i několik let než se postižený pacient dostane do konečného stádia (Dugger, 2017). Tauopatie, amyloidózy a  $\alpha$ -synukleinopatie se řadí mezi nejběžnější neurodegenerativní poruchy, a právě jimi se budou následující kapitoly zabývat.

#### 4.1.1. Tauopatie a tau protein

Poruchy spojené s patologickou akumulací tau proteinu v neuronech a gliích se označují jako tauopatie. Tato skupina zahrnuje více než 20 onemocnění. Ačkoli členění tauopatií do jednotné klasifikace je v současné době předmětem značné debaty, lze tauopatie mimo jiné rozlišit na primární nebo sekundární. Dělení je na základě toho, zda je patologie tau hlavním rysem, nebo zda se vyskytuje v kombinaci s další patologií. (Hampel, 2010). Příklady tauopatií zahrnující Alzheimerovu chorobu, Pickovu chorobu, progresivní supranukleární paralýzu a mnoho dalších, jsou uvedeny v Tab 1.

## TEORETICKÁ ČÁST

Klinicky mohou tauopatie vykazovat celou řadu fenotypů, které zahrnují jak poruchy pohybu, tak kognitivní nebo nespecifické příznaky v pokročilém věku. Současné výzkumné úsilí je tedy zaměřeno na zlepšení diagnostiky tauopatií *ante mortem*, včetně předklinických stádií onemocnění (Irwin 2016).

**Tab 1.** Seznam neurodegenerativních poruch spojených s patologií proteinu tau. (Přepřevzato podle Arendt, 2016)

<b>Primární tauopatie (tau je primární patologie)</b>	<b>Sekundární tauopatie (spojeno s další patologií)</b>
Progresivní supranukleární paralýza	Alzheimerova choroba
Argyrofilní onemocnění zrna	Downův syndrom
Kortikobazální degenerace	Demence s Lewyho tělísky
Pickova choroba	Prionová onemocnění
Frontotemporální demence a parkinsonismus spojený s chromozomem 17	Familiární britská demence a familiární dánská demence
Postencefalitický parkinsonismus	Chronická traumatická encefalopatie
Parkinsonův demenční komplex Guam	Myotonické dystrofie
Parkinsonismus Guadeloupean	Niemann-Pickova choroba typu C
Globální gliové tauopatie	Subakutní sklerotizující panencefalitida
Astrogliopatie tau spojená se stárnutím	Difúzní neurofibrilární spleti s kalcifikací

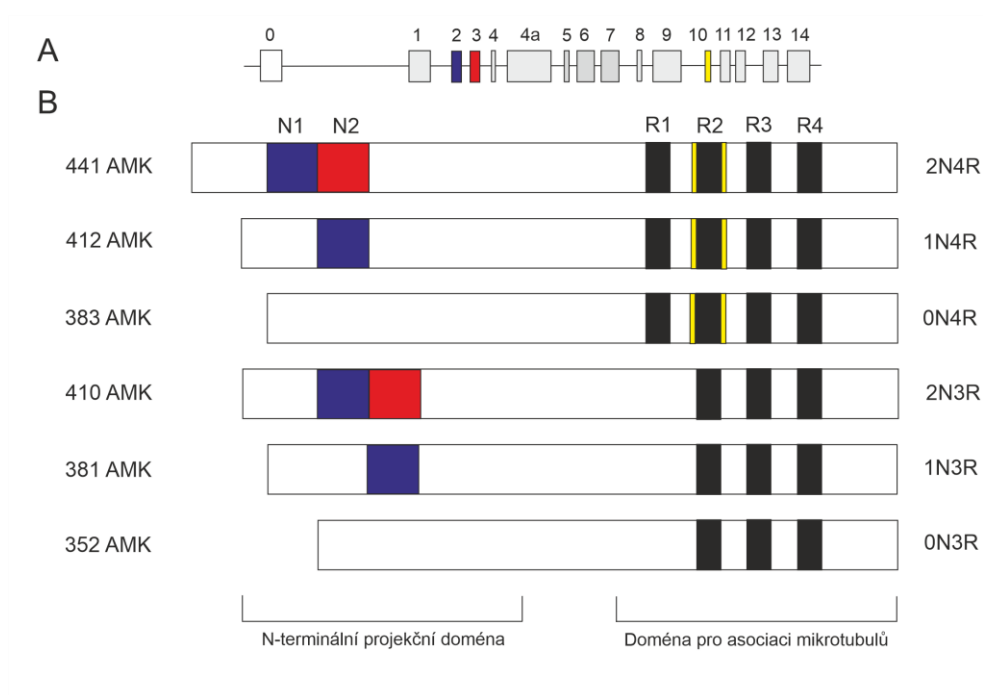
## TEORETICKÁ ČÁST

Tau protein (z angl. Tubulin-Associated Unit) patří do rodiny proteinů spojených s mikrotubuly (MAP, Mikrotubule-Associated Protein), kam mimo jiné můžeme zařadit i proteiny MAP1A, MAP1B, MAP2, MAP4 a MAP6. Tato proteinová skupina byla identifikována již v roce 1975 (Weingarten, 1975). Tau protein se primárně podílí na stabilizaci mikrotubulů. Dále podporuje anterográdní a retrográdní transport řady proteinů (Hampel, 2010).

Tau protein se skládá ze čtyř domén: N-terminální oblast, centrální oblast bohatá na prolin, mikrotubulární vazebná doména a C-terminální oblast. Tau je kódován genem *MAPT* umístěným na chromozomu 17q21, který obsahuje 16 exonů. Existují dva hlavní haplotypy genu H1 a H2, které udávají odlišnou náchylnost k neurodegeneraci (Wofle, 2012). Alternativní sestřih exonů 2, 3 a 10 vede ke vzniku 6 izoform. Tyto izoformy jsou typické pro centrální nervovou soustavu. Obsahují 352 až 441 aminokyselin (AMK). Tři izoformy obsahují tři vazebné domény pro mikrotubuly (3R), zatímco ostatní mají domény 4 (4R). Izoforma 4R převládá v určitých tauopatiích jako je progresivní supranukleární paralýza, zatímco 3R tau je spojen s Pickovou chorobou (Andreadis, 1992).

Protein tau podléhá za fyziologického i patologického stavu řadě posttranslačních modifikací. Za zmínku stojí acetylace, glykace, ubikvitinilace a především fosforylace (Morris, 2011). Fosforylace výrazně snižuje afinitu k mikrotubulům. V každé izoformě tau se nachází okolo 30 možných fosforylačních míst (Buée, 2000). Při plném nasycení fosforylovaných míst – hyperfosforylaci – tak dochází k narušení dynamiky mikrotubulu a k usnadnění vzniku tau inkluzí (Wang, 2008). Je známo mnoho kináz, které hrají důležitou roli ve fosforylaci tau. Jedná se především o proteinové kinázy: glykogensyntáza kináza-3, cyklin-dependentní proteinkináza-5 a mitogen aktivované proteinkinázy a lymfocytově specifická proteinová tyrosinkináza (Farwa, 2019).

## TEORETICKÁ ČÁST

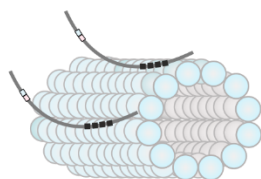


**Obr 1.** Schématické znázornění lidského genu pro tau protein (A) a jeho šest proteinových izoform (B). (Převzato z Arendt, 2016, Karlíková, 2018).

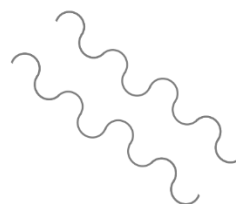
Positivně nabitě oblasti tau proteinu se za fyziologických podmínek připojují k negativně nabitým tubulům (Spillantini, 2013). Kvůli strukturním změnám způsobených fosforylací, se mění afinita tau vůči mikrotubulům a dochází k uvolnění tau proteinu. Důsledkem toho je, že se volný modifikovaný tau protein agreguje do dimerů a oligomerů. Právě oligomery jsou základem pro tvorbu párových helikálních filament (PHF), které pak vedou ke vzniku neurofibrilárních klubíček (NFT). Narušení struktury mikrotubulů vede k disfunkci organel a ovlivnění axonálního transportu (Reddy, 2011).

## TEORETICKÁ ČÁST

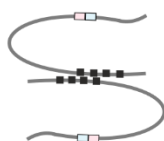
### 1. Protein tau vázaný na mikrotubuly



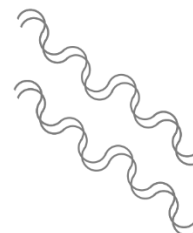
### 4. Tau protomer



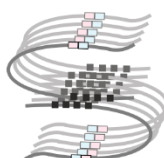
### 2. Konformační změna vyvolaná patologickým stavem za vzniku dimeru



### 5. Párové helikální filamenty (PHF)



### 3. Tau oligomer



### 6. Neurofibrilární klubička (NFT)



**Obr 2.** Schématické znázornění agregace modifikovaného tau proteinu. (Převzato z Martin 2011, Karlíková 2018).

### 4.1.2. Transgenní model pro tauopatie – SHR 24

Transgenní modely mohou přispět k pochopení vzniku řady onemocnění. Mohou být také přínosné pro identifikaci nových biomarkerů a potenciálních terapeutických cílů. V experimentální části této diplomové práce byly použity transgenní modely: SHR kontrolní potkani (staří 4-14 měsíců) a SHR 24 (staří 4-14 měsíců) k simulaci procesu tauopatie. Typ potkanů SHR 24 exprimuje nemutovaný, zkrácený tau protein (151-391, 3R). U těchto modelů se rozvíjí progresivní neurofibrilární degenerace již ve věku 9 měsíců (Zilka, 2016). Neurofibrilární patologie však vede ke zkrácení doby života. Typ SHR („Spontaneously Hypertensive Rat“) byl zvolen pro své predispozice k rozvoji AD (chronická hypertenze, metabolický syndrom s inzulínovou rezistencí) (Do Carmo, 2013).



### 4.1.3. Amyloidózy

Amyloidový prekurzorový protein (APP) představuje jeden z nejhojnějších glykoproteinů v centrálním nervovém systému. Je všudypřítomně exprimován v lidských tkáních. Vyskytuje se nejen v plazmatické membráně ale i v dalších důležitých organelách jako jsou endoplazmatické retikulum, Golgiho aparát a mitochondrie (Rhein 2007). APP je metabolizován dvěma odlišnými a vzájemně se vylučujícími cestami. Za fyziologických podmínek se přednostně využívá metabolizace pomocí sekreční dráhy, kde dochází ke štěpení pomocí  $\alpha$ -sekretázy. Druhá – amyloidní cesta používá alternativního štěpení p-sekretázou a následně y-sekretázou. Konečným produktem při tomto typu metabolizace je amyloid  $\beta$ . Jedná se o heterogenní skupinu peptidů s různou délkou v rozmezí 38-43 aminokyselin. Ačkoli není přesně známa funkce, pravděpodobně se podílí na synaptické plasticitě. Obecně mohou proteiny s velkým počtem aromatických vedlejších skupin tvořit amyloidní fibrily v důsledku interakce  $\pi$ - $\pi$ , ke které dochází mezi n-orbitaly struktury benzenového kruhu (Masters, 2015). Dochází k tomu, že se amyloidní monomery mohou vázat k sobě navzájem a tvořit oligomery a následně až amyloidní plaky, které pak přispívají k neurodegenerativním procesům (De-Paula, 2012).

### 4.1.4. Synukleinopatie

Tato třída neurodegenerativních onemocnění je charakterizována agregací proteinu  $\alpha$ -synukleinu v neuronech a gliích. Jedná se o cytosolový protein obsahující 140 AMK. Nejvíce se exprimuje v mozku, dále pak v placentě, plicích a v srdci (Dugger, 2017). Fyziologická role  $\alpha$  synukleinu není zcela objasněna, několik studií však naznačuje, že by se mohl podílet na regulaci uvolňování a transportu dopaminu. Za patologických podmínek se  $\alpha$ -synuklein sestavuje do oligomerů a fibril bohatých na  $\beta$ -list. Mezi nejčastější synukleinopatie patří Parkinsonova choroba. Synukleinopatie má dále souvislost s demencí s Lewyho tělísky a PD demencí (Spillantini, 2016).

## 4.2. Demence

Na celém světě trpí demencí přibližně 50 milionů lidí. Předpokládá se, že celkový počet lidí s demencí dosáhne v roce 2030 82 milionů. Je způsobena různými chorobami a stavy, které vedou k poškození mozkových buněk. Pro tuto diagnózu musí být splněna následující kritéria: musí zahrnovat pokles funkce paměti a alespoň některé omezení kognitivních

## TEORETICKÁ ČÁST

schopností. Mezi kognitivní schopnosti patří: vytvářet koherentní řeč, porozumět mluvenému nebo psanému projevu, rozpoznávat nebo identifikovat objekty za předpokladu neporušené smyslové funkce, provádět motorické činnosti, schopnost abstraktně myslet, dělat rozumné úsudky a plánovat a provádět složité úkoly. Jednotlivci jsou zmatení, mají zhoršený úsudek, potíže s vyjadřováním, dezorientaci s ohledem na čas a prostor (Alzheimer's Association, 2015). Alzheimerova choroba (AD) je zdaleka nejčastější příčinou demence a představuje až 80 % všech diagnóz demence (Femminella, 2018).

### 4.2.1. Alzheimerova demence

Alzheimerova choroba je smíšená neuropatologie charakterizovaná progresivním kognitivním poklesem, včetně ztráty paměti, behaviorálních a psychologických symptomů a změn osobnosti. Mezi klinické projevy patří postupné zhoršování epizodické paměti a dalších intelektuálních schopností. Většina případů onemocnění začíná po 65. roku života (tj. AD s pozdním nástupem). Některé případy se projevují naopak i u mladších subjektů (tj. AD s časným nástupem). Nejdůležitějšími rizikovými faktory jsou především věk, nízká úroveň vzdělání, dále pak traumata hlavy se ztrátou vědomí a v neposlední řadě také přítomnost alely  $\epsilon 4$  genu pro apolipoprotein E (de-Paula, 2009). ApoE je glykoprotein, který je exprimován nejvíce v játrech a následně v mozku (Kim, 2009). Za fyziologických podmínek se jedná o ligand v receptorem zprostředkované endocytóze lipoproteinových částic. Některé studie naznačují, že právě interakce apoE a amyloidu  $\beta$  hraje důležitou roli v patogenezi AD (Dorszewska, 2016).

Mezi další charakteristické znaky AD patří přítomnost senilních plaků a neurofibrilárních spleť spolu se ztrátou neuronů, dystrofickými neurity a gliózou. Neurotické plaky jsou extracelulární léze a jejich hlavní složkou je amyloid  $\beta$ . Neurofibrilární spleť jsou intracelulární léze skládající se z hyperfosforylovaného proteinu tau (de-Paula, 2009). Patologie AD postihuje široké oblasti mozkové kůry a hippocampu. Poprvé byla patologie detekována ve frontálních a temporálních lalocích a postupující do neokortexu (Masters, 2015).

### 4.3. Lipidomika

Lipidomika je intenzivně se rozvíjející odvětví metabolomiky, jejíž cílem je kvalitativní a kvantitativní analýza lipidů. Lipidy jsou definovány jako hydrofobní nebo amfipatické molekuly, které vznikají částečně kondenzací thioesterů (mastné kyseliny, polyketidy) nebo kondenzací izoprenových jednotek (prenoly, steroly) (Fahy, 2005). Jedná se o různorodou a všudypřítomnou skupinu sloučenin, které mají mnoho klíčových biologických funkcí. Jsou nedílnou strukturální složkou buněčných membrán, slouží jako zdroj energie, účastní se signálních drah a tvoří prostředí pro správné fungování mnoha enzymů (Fahy, 2011).

V roce 2005 konsorcium LIPID MAPS vyvinulo klasifikační systém pro lipidy. Druhy lipidů jsou zařazeny do osmi kategorií: mastné kyseliny (FA), glycerolipidy (GL), glycerofosfolipidy (GP), sfingolipidy (SP), sterolové lipidy (ST), prenelipidy (PR), sacharolipidy (SL) a polyketidy (PK). Jednotlivé kategorie lipidů lze poté dále rozčlenit na podtřídy: ceramidy (Cer), hexosylceramidy (HexCer), dihexosylceramidy (Hex2Cer), sfingomyeliny (SM), lysofosfatidylcholiny (LPC), LPC s alkylovými substituenty (LPC-O), fosfatidylcholiny (PC), alkylové a alkenové substituenty PC (PC-O), lysofosfatidylethanolaminy (LPE), LPE s alkylovými substituenty (LPE-O), fosfatidylethanolaminy (PE), alkylové a alkenové substituenty PE (PE-O), fosfatidylglyceroly (PG), fosfatidylinositoly (PI), fosfatidylseriny (PS), diacylglyceroly (DG), triacylglyceroly (TG) a estery cholesterolu (CE) (Fahy, 2005). Z důvodu velkého množství lipidových struktur vycházejících především z lipidomických analýz využívající hmotnostní spektrometrii, byl v roce 2013 zaveden zjednodušený systém pro tvorbu názvu lipidů (Liebisch, 2013).

Deregulace lipidového metabolismu souvisí s různými typy onemocnění jako jsou například AD, nádorová a kardiovaskulární onemocnění (Fahy 2005). A právě pokroky v lipidomické analýze by mohly osvětlit celou řadu molekulárních a biochemických otázek spjatých s touto tematikou.

#### 4.3.1. Cílená a necílená lipidomika

Lipidomické přístupy lze rozdělit na necílené a cílené, z nichž každý má své vlastní výhody a omezení. Necílená lipidomika se zaměřuje na analýzu všech detekovatelných lipidů ve vzorku. V mnoha případech se využívají platformy s vysokým rozlišením HRMS pro určení přesné molekulové hmotnosti. Následná fragmentace píků vede k rozlišení

## TEORETICKÁ ČÁST

každého lipidového druhu. Naproti tomu cílená lipidomika měří specifické lipidy předem definovaných prekurzorových a produktových iontů (Min Li, 2014). Pro cílenou lipidomiku se nejčastěji využívá hmotnostní spektrometrie s trojitým kvadrupólem, která poskytuje vysokou citlivost, selektivitu a široký dynamický rozsah.

V nedávné době vyšla studie, která zavedla pojem „pseudocílená“ lipidomická analýza s vysokým pokrytím. Jedná se o kombinace výhod z cílených a necílených metod. Nejprve dochází k lipidové analýze UHPLC-HRMS v režimu úplného skenování. Cílem je dosáhnout co největší pokrytí profilování lipidů, získat MS/MS fragmenty, přesné hmoty a retenční čas. Dále byly hledány dosud nedetekované, ale teoreticky existující lipidy. A v neposlední řadě došlo na základě charakteristických fragmentačních iontů a odpovídajících rodičovských iontů k vytvoření tzv. iontových lipidových párů. Následovala analýza v MRM režimu (Xuan, 2018). Na základě této studie, byla tato již optimalizovaná metoda využita v experimentální části diplomové práce.

Pracovní postup pro lipidomickou analýzu zahrnuje přípravu biologického materiálu, následně detekci založenou primárně na hmotnostní spektrometrii a zpracování dat.

### 4.3.2. Přístupy pro extrakci lipidů

Extrakce lipidů ze složitých biologických matric se provádí z toho důvodu, aby se během analýzy dosáhlo obstojných výsledků. Cílem extrakce je zakoncentrování a odstranění interferujících látek jako jsou sacharidy, proteiny nebo jiné malé molekuly. Lze využít převážně dvou metod a to: extrakce kapalina-kapalina (LLE) a extrakce na pevné fázi (SPE) (Wang, 2019; Min Li 2014).

V roce 1957 vyvinul Folch extrakční metodu za použití chloroformu/methanolu (2:1) (Folch, 1957). Tato metoda byla později modifikována Blighem a Dyerem o přídavek vody a použití menšího množství činidla (chloroform/methanol), které vedlo ke zvýšení výtěžku a zabránění degradaci lipidů. Metoda se velmi osvědčila pro extrakci semi-polárních a nepochárních lipidů s jejich schopností proniknout do buněčných membrán, vyšší polaritou a silnou interakcí s vodíkovými vazbami (Bligh, 1959).

Další metoda, která je méně toxická, je založena na systému hexan/isopropanol (3:2). Avšak přijata nebyla z důvodu nízké účinnosti extrakce. V roce 2008 byla vyvinuta metoda založená na methyl-terc-butyletheru (MTBE). Tento přístup, díky nízké hustotě MTBE

## TEORETICKÁ ČÁST

značně zjednodušuje separaci lipidů a současně lze extrahovat i různé třídy metabolitů (Matyash, 2008).

### 4.3.3. Analýza lipidů

Lipidy lze analyzovat separačními a spektrálními technikami. Mezi separační techniky patří tenkovrstvá chromatografie (TLC), plynová chromatografie (GC) ve spojení s FID nebo MS, dále pak vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC), která se řadí mezi nejpoužívanější separační přístupy především kvůli velké variabilitě detektorů (MS, UV, RI, ...) a v neposlední řadě superkritická fluidní chromatografie (SFC). Za spektrální techniky se považují hmotnostní spektrometrie (HPLC/MS, Shotgun MS) a nukleární magnetická rezonance (NMR) (Holčapek, 2018).

HPLC separace může probíhat několika způsoby. Chromatografie na reverzní fázi (RP) separuje molekuly podle rostoucí hydrofobicity, probíhá na nepolárních stacionárních fázích a používá se k oddělení jednotlivých druhů lipidů podle délky mastného acylového řetězce. Sorbentem pro chromatografie na normální fázi (NP) je polární složka a slouží pro separaci nepolárních látek. Při hydrofilní chromatografii (HILIC) se využívá normální fáze rozšířená o vodní mobilní fázi. Biomolekuly jsou separovány na základě polárních a hydrofilních interakcí (Buszewski, 2012)

Superkritická fluidní chromatografie je technika, během které se jako mobilní fáze používá superkritická tekutina (SF). Ta se vyznačuje nízkou viskozitou a vysokou difuzivitou. Nejčastěji se využívá superkritický oxid uhličitý, protože je chemicky inertní, nehořlavý, má nízkou polaritu, a proto je účinný pro analýzu hydrofobních sloučenin (Bamba, 2012).

Nejvýznamnější metodou, pro svoji robustnost, univerzálnost, vysokou citlivost a široký dynamický rozsah měření, je hmotnostní spektrometrie. Ionizace vzorku patří mezi hlavní procesy v MS. V závislosti na vlastnostech lipidů lze využít technik následujících: ESI (analýza polárních lipidů), APCI a APPI (analýza nepolárních lipidů), DESI (analýza bez předchozí úpravy složitých vzorků) a MALDI (Min Li, 2014). Shotgun představuje další z přístupů analýzy lipidů. Analýza probíhá pomocí MS a MS/MS bez předchozí separace vzorků. Nejčastěji se využívá měkkých ionizačních technik, a to buď ESI nebo MALDI. Výsledkem analýzy, během které je koncentrace lipidů konstantní, je jedno spektrum, obsahující všechny lipidy v rámci třídy. Pro kvantitativní analýzu lipidů se nejčastěji využívá

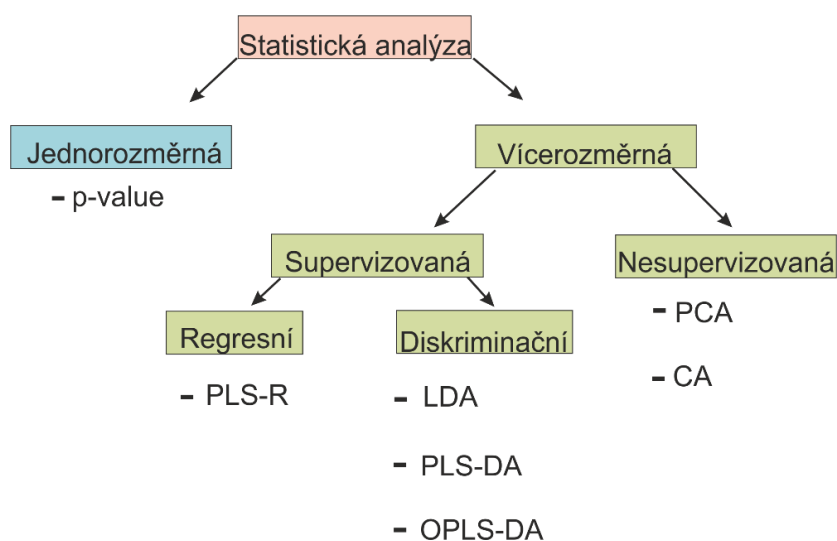
## TEORETICKÁ ČÁST

charakteristických fragmentových iontů a neutrálních ztrát lipidových tříd. Výhodou metody je časová nenáročnost a snazší automatizace, naopak jako omezující je bráno obtížnější identifikace izomerů (Holčapek, 2018).

Další analytickou metodou, kterou lze využít pro měření intaktních biologických materiálů, je NMR spektrometrie. Využívá se primárně pro určování struktury nových lipidů. Mezi výhody patří relativně snadná příprava vzorku naopak limitující faktory jsou vysoká pořizovací cena, nízká senzitivita a obtížná interpretace naměřených spekter (Chetwynd, 2017).

### 4.4. Statistická analýza

Současné analytické metody poskytují obrovské množství údajů. Volba vhodné statistické analýzy je nezbytná k získání informací ze surových dat, které jsou důležité v konečné interpretaci lipidomických výsledků. K testování vztahů a významnosti jednotlivých lipidomických profilů se v rámci jedné dimenze využívá jednorozměrná statistika. Tu lze také použít i pro potvrzení výsledků vícerozměrné statistické analýzy. Nejčastěji jsou používány: t-test, Pearsonův korelační koeficient, Wilcoxonův test, Spearmanova korelace aj. Metody vícerozměrné analýzy nahlíží na soubor dat v rámci vícedimenzionálního prostoru (Karlíková, 2018; Kirwan, 2013) Těmto metodám bude věnována následující kapitola.



**Obr 3.** Schématické znázornění rozdělení statistické analýzy (Převzato z Granato, 2018).

### 4.4.1. Vícerozměrná statistická analýza

Metody vícerozměrné analýzy (MVDA – MultiVariate Data Analysis) zahrnují analýzu rozsáhlého souboru dat s několika proměnnými. Cílem metod je prozkoumat strukturu závislosti, vztahy mezi zahrnutými proměnnými a neposlední řadě zachovat jejich variabilitu (Worley, 2013).

Metody MVDA lze dále rozčlenit na nesupervizované a supervizované. Rozdílem je způsob diferenciací vzorků. Nesupervizované metody dělí vzorky do shluků bez předem známých informací o rozdělení, naopak supervizované metody dělí vzorky do skupin na základě informací o příslušnosti vzorků ke skupinám. Informace jsou předem známé a týkají se například stáří, stavu nemoci atd. (Worley, 2016; Granato, 2018)

Analýza hlavních komponent (PCA – Principal Component Analysis) a shluková analýza (CA – Cluster Analysis) patří mezi nesupervizované metody. Mezi supervizované metody se řadí diskriminační analýza metodou dílčích nejmenších čtverců (PLS-DA – Partial Least Squares Discriminant Analysis) a ortogonální diskriminační analýza metodou dílčích nejmenších čtverců (OPLS-DA – Orthogonal Partial Least Squares Discriminant Analysis). Kombinace nesupervizovaných a supervizovaných metod se využívá pro zvýšení spolehlivosti výsledků MVDA (Worley, 2016; Granato, 2018).

#### 4.4.1.1. Nesupervizované metody MVDA

Analýza hlavních komponent je jedna z nejstarších a nejvíce používaných statistických metod. Slouží zejména k redukci dimenze a k zjednodušení popisu skupin vzájemně korelovaných znaků v mnohorozměrné analýze dat (Pearson, 1901).

Principem PCA je nahradit množství proměnných výrazně menším počtem nových proměnných. Nové proměnné si uchovávají maximum informací z původní datové matice a nazývají se hlavní komponenty (PCs – Principal Components). Matematicky se jedná o lineární kombinaci původních proměnných. Hlavní komponenty jsou na sobě nezávislé – ortogonální. Právě díky PCs dochází k redukci dimenzionality, kdy počtu dimenzí odpovídá počet hlavních komponent (Granato, 2018). Charakteristické pro každou hlavní komponentu je její rozptyl neboli míra variability. První hlavní komponenta nahrazuje největší část variability původních dat, druhá hlavní komponenta nahrazuje největší část rozptylu původních dat, která nejsou obsažena v první hlavní komponentě atd. Hlavní

## TEORETICKÁ ČÁST

komponenty jsou tedy seřazeny od největší variability po nejmenší. Grafickými výstupy PCA jsou bodové diagramy a zátěžové grafy (Meloun, 1998).

Mezi další nesupervizované metody patří shluková analýza. Hlavním cílem je uspořádat objekty, které jsou charakterizovány sadou proměnných, na základě určité podobnosti do jednotlivých skupin – shluků. Metoda CA využívá dva postupy dělení vzorků: hierarchické a nehierarchické. Shlukování podle hierarchie může mít dva algoritmy – aglomerační a divizní. Nové shluky podle aglomeračního algoritmu vznikají na základě největší podobnosti a poté lze s každou skupinou pracovat jako se samostatným objektem až do chvíle, kdy zůstane pouze jedna skupina vzorků. Divizní shlukování má přesně opačný postup.

Grafickým výstupem CA je dendrogram. Jedná se o diagram závislosti relativní vzdálenosti mezi jednotlivými skupinami vzorků na míře shlukování (Oliveri 2016, Granato 2018).

### 4.4.1.2. Supervizované metody MVDA

Mezi supervizované metody patří zpravidla kombinace diskriminační a regresní analýzy. Cílem metod je vizualizace rozsáhlého souboru dat a vyhledávání závislostí mezi proměnnými (Worley, 2013).

Diskriminační analýza (DA – Discriminant Analysis) slouží k rozlišování a ke klasifikaci vzorků do skupin. Nejběžnější metodou pro hodnocení klasifikace je lineární diskriminační analýza (LDA – Linear Discriminant Analysis), ta se snaží nalézt lineární kombinace proměnných pomocí diskriminační funkce neboli tzv. kánonické variace. Diskriminační funkcí se rozumí rozdělení vzorků do jednotlivých skupin dle podobnosti v rámci celku. Pro vysoce dimenzionální data trpí LDA tzv. prokletím dimenzionality (Oliveri, 2016).

Regresní analýza se zaměřuje spíše na závislosti mezi proměnnými. Jedním z typů regresní analýzy je vícerozměrná lineární regrese (MLR – Multiple Linear Regression), která hledá lineární závislost mezi větším počtem závislých a nezávislých proměnných (Oliveri, 2016). Kombinací metod PCA a MLR vznikla metoda PLS-regrese (PLS-R – Partial Least Squares-Regression). Tato metoda analyzuje v souboru dat kvantitativní závislosti mezi dvěma skupinami proměnných (World, 2001).



## TEORETICKÁ ČÁST

Metoda částečné diskriminační analýzy nejmenších čtverců překonává omezení metody LDA při řešení velkého počtu proměnných. Jedná se o spojení metod LDA s PLS-R. PLS-DA vyhledává kvantitativní závislosti mezi proměnnými a zároveň slouží k diskriminaci vzorků do skupin (Chung, 2010). Hlavní výhodou přístupu PLS-DA je dostupnost a schopnost zpracovat vysoce kolineární a tzv. hlučná data. Ortogonální projekce OPLS-DA používá oproti PLS-DA korekci pomocí ortogonálního signálu (OSC – Orthogonal Signal Correction). OSC je používán jako filtr, který při konstrukci druhé, ortogonální komponenty systematicky odstraňuje část variability, která souvisela s první komponentou (Gromski,2015; Worley 2016).

Křížová validace neboli permutační test s parametry  $R^2$  a  $Q^2$  se využívá k ověřování kvality a správnosti rozsáhlých výstupných modelů metod PLS-DA a OPLS-DA. Parametr  $R^2$  testuje správnost rozdělení vzorků do skupin, zatímco  $Q^2$  určuje prediktivní schopnost modelu. Pokud se  $R^2$  rovná 1, dochází k ideálnímu rozdělení.  $Q^2 = 1$  značí ideální předvídatelnost modelu pro rozdělení vzorků do skupin (Triba, 2015).

## 5. Praktická část

### 5.1. Materiál

#### 5.1.1. Chemikálie

Acetonitril LC-MS (ACN,  $\geq 99,9\%$ ), methanol LC-MS ( $\geq 99,9\%$ ) byly zakoupeny u firmy Fluka (Německo). Isopropanol LC-MS (IPA,  $\geq 99,9\%$ ), methyl terc-butyl ether (MTBE,  $\geq 99,9\%$ ) byly zakoupeny u firmy Sigma Aldrich (USA). Standard SPLASH<sup>®</sup> LIPIDOMIX<sup>®</sup> Mass Spec Standard, obsahující všechny hlavní třídy lipidů, byl zakoupen u firmy Sigma Aldrich (USA).

Pro přípravu všech roztoků byla použita LC-MS voda, která byla zakoupena u společnosti Sigma Aldrich (USA).

#### 5.1.2. Přístrojové vybavení a software

Studované látky byly analyzovány pomocí kapalinového chromatografu Ultimate 3000 RS (Dionex, USA), ve spojení s hmotnostním spektrometrem Triple Quad 6500 (SCIEX, Framingham USA). Dále byly použity Vortex V-1 (BioSan, ČR), centrifuga Mikro 120 (Hettich zentrifugen, Německo), chlazená centrifuga Rotina 410 (Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Německo), třepačka PSU-10i (Biosan, Lotyšsko), lyofilizátor FastPrep (Labconco, USA).

Naměřená data byla dále zpracovávána pomocí softwarů Analyst (AB Sciex Framingham MA, USA), MultiQuant<sup>™</sup> 3.0 (AB Sciex, Framingham, MA, USA), R softwaru verze 3.5 (programovací jazyk a prostředí určené pro statistickou analýzu dat a jejich grafické zobrazení; [www.r-project.org](http://www.r-project.org)) a v software Cytoscape 3.7.2. (tvorba lipidových map).

#### 5.1.3. Biologický materiál

K analýze byl použit zadní mozkový kmen transgenních potkanů SHR 24 a kontrolní vzorky SHR. Vzorky byly poskytnuty PharmDr. Andrejem Kováčem, PhD. z Institutu neuroimunologie Slovenské akademie věd. Všechna zvířata byla chována ve standardních laboratorních podmínkách s volným přístupem k vodě a potravě. Byly dodržovány i světelné podmínky (12hodinový cyklus světlo/tma).

## PRAKTICKÁ ČÁST

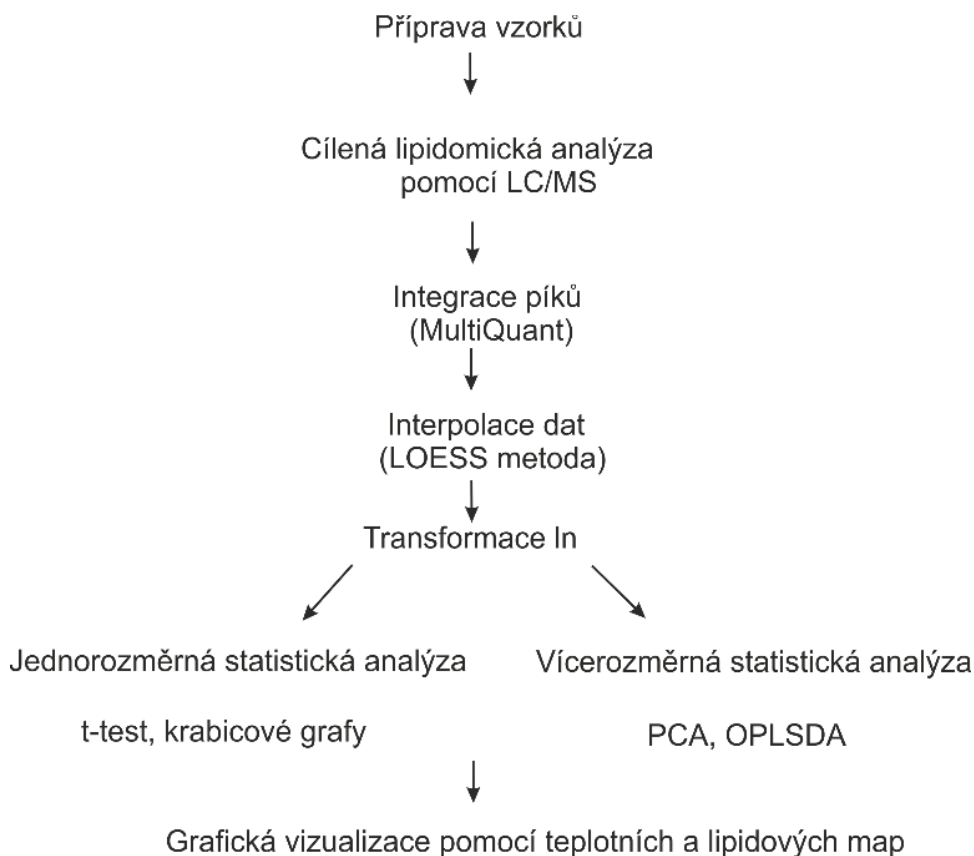
Všechny experimenty byly provedeny v souladu se Směrnicemi Slovenského a Evropského společenství se souhlasem Etické komise Neuroimunologického ústavu a Státní veterinární a potravinářské správy Slovenské republiky.

**Tab 2.** *Specifikace vzorků*

<b>Stáří [měsíc]</b>	<b>CN [počet]</b>	<b>TG [počet]</b>
<b>4</b>	10	10
<b>6</b>	13	12
<b>8</b>	10	10
<b>10</b>	10	6
<b>12</b>	10	12
<b>14</b>	8	14

## 5.2. Příprava vzorků, vzorků kontroly kvality, blanku

Pro přehlednost celého pracovního postupu je na následujícím obrázku uvedené schéma (Obr 4.) pracovního postupu.



**Obr 4.** Pracovní postup celé praktické části.

Jelikož je klasifikace lipidů velice obsáhlá lze využít schématickou nomenklaturu. Formát (XX:YY) udává počet uhlíků v acylovém řetězci a počet dvojných vazeb. Pokud víme, kolik uhlíků a dvojných vazeb je na samotném acylovém řetězci využívá se formátu (XX:YY\_XX:YY). A když je známá i přesná pozice acylů lze použít následující formáty (XX:YY/XX:YY), (XX:YY/XX:YY/XX:YY) (Liebisch, 2013). Toto značení je využíváno v celé diplomové práci.

## PRAKTICKÁ ČÁST

### **Příprava vzorků:**

Vzorky pro cílenou lipidomickou analýzu byly připraveny navážením  $50 \pm 5$  mg zadního mozkového kmene, následně bylo přidáno 300  $\mu$ L MeOH s přidavkem interního standardu SPLASH<sup>®</sup> LIPIDOMIX<sup>®</sup> (na přípravu 40 mL zásobního roztoku MeOH bylo použito 250  $\mu$ L standardu) a ocelové homogenizační kuličky. Tato část experimentu byla prováděna na suchém ledu. Následovala homogenizace tkáně 60 s/ 20 Hz v homogenizátoru FastPrep. Do směsi byl přidán 1 mL MTBE, následovalo zvortexování a přidání 300  $\mu$ L H<sub>2</sub>O. Vzorky byly umístěny na 15 min na třepačku (240 rpm) a následně 10 minut do ledničky při 4 °C. Následovala centrifugace při 4 °C 15 min x 10 000 g. Poté bylo odebráno 400  $\mu$ L oddělené horní vrstvy. Směs byla umístěna na 20 minut do mrazáku na -80°C. Dalším krokem byla lyofilizace vzorků přes noc. Pro konečnou analýzu byl lyofilizát rekonstituován ve 100  $\mu$ L roztoku ACN/IPA/H<sub>2</sub>O (2:2:1), zvortexován, zcentrifugován při 20 °C 10 min x 10 000 g a následně došlo k odebrání 80  $\mu$ L čirého supernatantu do HPLC vialek.

### **Příprava vzorků kontroly kvality (QC) a blanku:**

Pro přípravu QC vzorku bylo odebráno 5  $\mu$ L čirého supernatantu z každého vzorku do mikrozkuřavky. Poté následovala centrifugace 5 min x 10000 g.

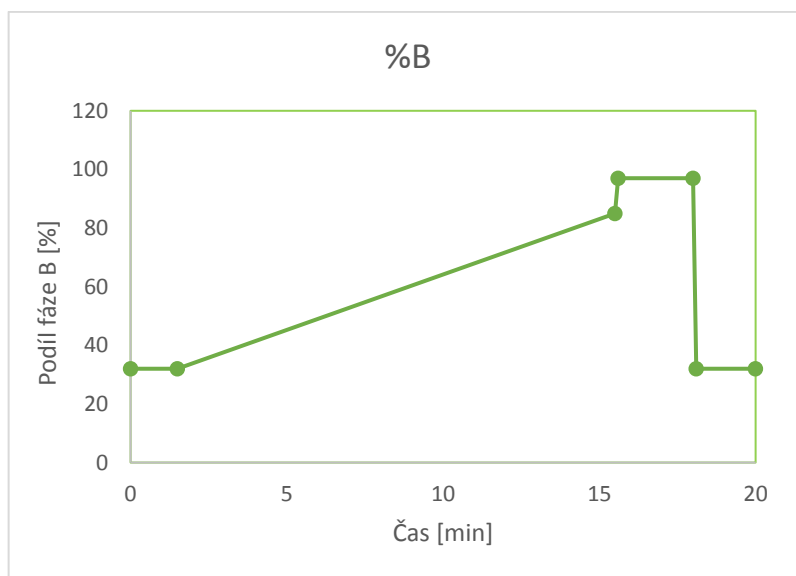
### **Příprava blanku:**

Pro blank bylo místo vzorku použito 50  $\mu$ L vody a 300  $\mu$ L MeOH s IS. Další postup byl stejný jako při přípravě vzorků.

### 5.3. Použité metody

Použitá metoda vycházela ze studie Xuan a kol. (Xuan, 2018). Cílená lipidomika byla provedena pomocí kapalinové chromatografie (Ultimate 3000 RS Dionex, USA) ve spojení s tandemovým hmotnostním spektrometrem Triple Quad 6500 (SCIEX, Framingham USA). Separace probíhala na koloně Acquity UPLC BEH C8 (2,1x100mm, Waters, Milford, MA, USA). Pro přípravu mobilní fáze A bylo použito IPA + ACN v poměru 9:1. Mobilní fáze B obsahovala ACN + H<sub>2</sub>O v poměru 6:2. Do obou fází byl přidán 10 mM octan amonný.

Gradient mobilní fáze byl následující: 0-1,5 minuty, 32 % B; 1,5-15,5 min, zvyšování koncentrace B z 32 % na 85 %; 15,5-15,6 min růst koncentrace B z 85 % na 97 %; 15,6-18,0 min, 97 % B; 18,0-18,10 min, návrat na počáteční podmínky z 97 % na 32 % B; 18,10-20 min, reekvilibrace kolony při 32 % B. Průtok mobilní fáze byl 0,35 mL/min. Separace probíhala při tlaku 400 barů. Nástřik vzorku byl 0,3 μL.



**Obr 5.** Schéma gradientové eluce. Procentuální zastoupení mobilní fáze B v rámci celé analýzy (20minut).

Nastavení parametrů iontového zdroje hmotnostního spektrometru Triple Quadu 6500 je shrnuto v Tab 2. Měření probíhalo ve dvou pozitivních a v jednom negativním módu v režimu „scheduled multiple reaction monitoring“ (scheduled MRM). V tomto režimu docházelo k měření každého lipidu pouze 100 s. Nastavení MRM přechodů vycházelo z předchozí studie (Xuan, 2018). Do finální metody byly vybrány přechody pouze těch lipidů, které se nacházely ve vzorcích QC. Jednotkové rozlišení bylo aplikováno na oba kvadrupóly (Q1, Q3). Byl aplikován kolizní plyn „medium“.

*Tab 3. Parametry iontového zdroje*

<b>Napětí zdroje [V]</b>	+5500/-4500
<b>Teplota v iontovém zdroji [°C]</b>	500
<b>Tlak sušícího plynu [arb.]</b>	50
<b>Tlak zmlžujícího plynu [arb.]</b>	60
<b>Tlak clonícího plynu [arb.]</b>	50
<b>Čas přepínání polarit [ms]</b>	10
<b>Pauza mezi měřeními [s]</b>	3
<b>Celkový cyklus [s]</b>	2

Důležité je zmínit i hodnoty kolizní energie (CE), hodnoty deklasteračního potenciálu (DP) a výstupní potenciál kolizní cely (CXP). Tyto parametry spolu s počtem nalezených analytů v negativním a pozitivním módu rozdělených dle lipidových tříd jsou uvedeny v Tab. 4. Celkový počet lipidů je 1088 v pozitivním módu a 237 v módu negativním. Rozšířené tabulky všech nalezených lipidů včetně retenčních časů se nachází v kapitole Přílohy – Příloha 1. Parametry negativního módu, Příloha 2. Parametry pozitivního módu.

*Tab 4. Parametry pozitivního a negativního módu včetně počtu analytů v lipidových třídách*

Lipidové třídy	Pozitivní mód			Negativní mód		
	DP [V]	CE [V]	Počet	DP [V]	CE [V]	Počet
<b>FA</b>				- 80	- 25	32
<b>PG</b>				- 80	- 45	64
<b>PI</b>				- 70	- 60	61
<b>PS</b>				- 50	- 35	77
<b>CE</b>	100	20	4			

## PRAKTICKÁ ČÁST

---

<b>Cer/HexCer/Hex2Cer</b>	100	40/45	84/51/5
<b>DG</b>	100	30	105
<b>LPC/LPC-O</b>	110/110	40	38/10
<b>LPE/LPE-O</b>	100	25/30	24/3
<b>PC/PC-O</b>	100	40/60	148/ 107
<b>PE/PE-O</b>	100	30/50	82/129
<b>SM</b>	110	40/60	64
<b>TG</b>	100	35	235

---

### 5.4. Vyhodnocení dat

Pomocí cíleného lipidomického přístupu bylo analyzováno 125 vzorků. Zpracování dat zahrnovalo integraci, interpolaci a transformaci dat. V konečné fázi byla data podrobena statistické analýze.

Byla provedena integrace ploch píků naměřených lipidů v softwaru MultiQuant (verze 3.0, Sciex, Foster City, CA, USA). Poté následovalo zpracování dat v R programu: 1) interpolace dat pomocí metody „locally weighted regression“ (LOESS) (Gardlo, 2019); 2) u QC byl vzorků vypočítán variační koeficient s cílem odstranit systematické chyby; 3) logaritmičká transformace dat; 4) výpočet Mahalanobisovy vzdálenosti pro vyloučení odlehlých vzorků.

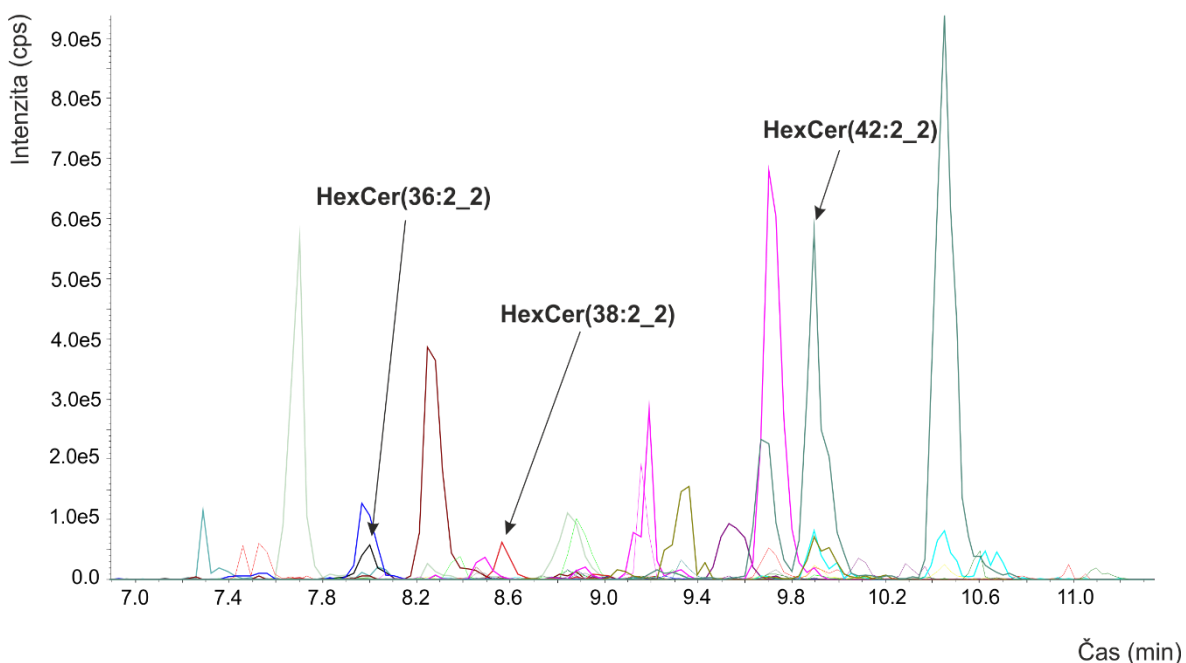
Ke statistickému hodnocení a vizualizaci dat byly použity metody jednorozměrné analýzy (t-test, teplotní mapy, krabicové grafy), nesupervizované metody mnohorozměrné analýzy PCA, metody supervizované OPLS-DA (VIP a skórové grafy) a lipidové mapy.



## 6. Výsledky

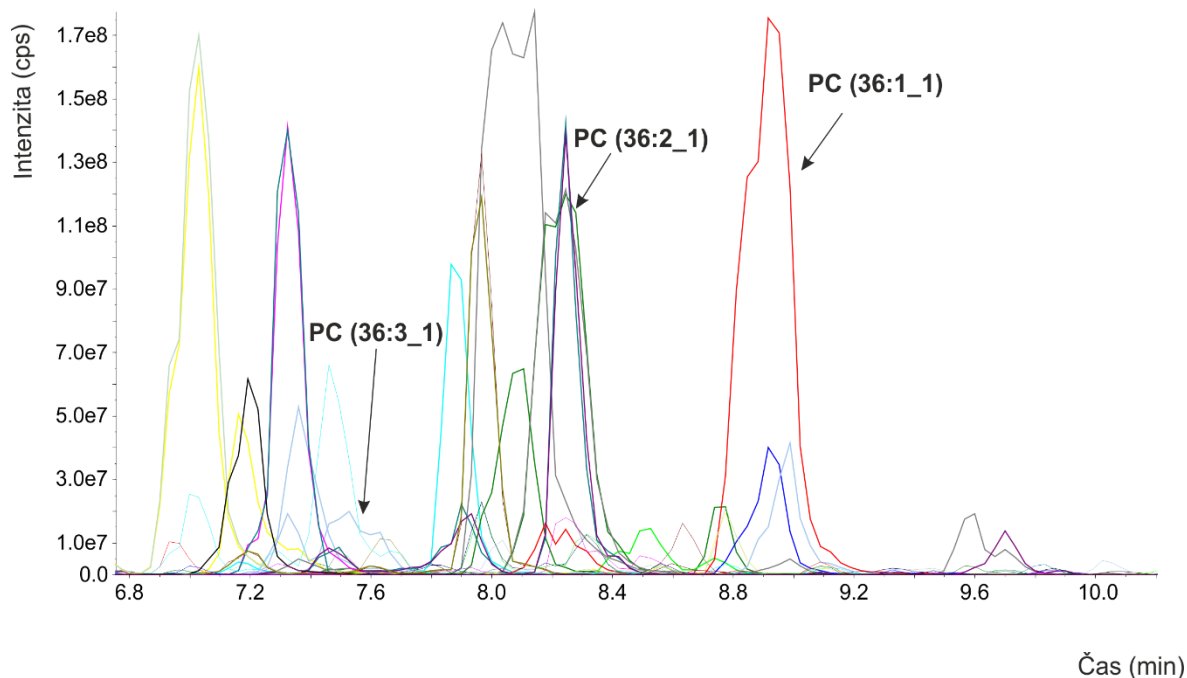
### 6.1. Výsledky z integrace a procesování dat

Z 1325 navrhovaných látek v pozitivním a negativním módu se zpracovávalo 891 lipidů. Výstupem HPLC-MS analýzy je soubor detekovaných analytů ve formě chromatografických záznamů. Obr. 4 a 5 ukazují záznamy náhodně vybraných tříd lipidů v určitých retenčních časech pro ně typických.



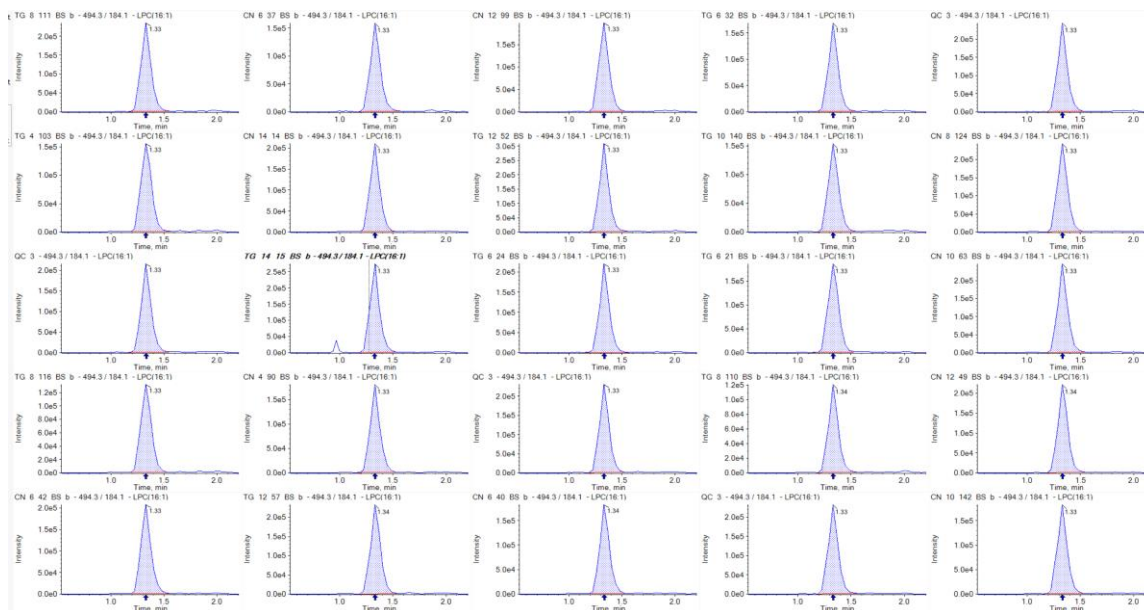
**Obr 6.** Chromatografický záznam pro lipidomickou podtřidu hexosylceramidů (HexCer). Viditelná je závislost intenzity na počtu uhlíků v acylovém řetězci.

## VÝSLEDKY



**Obr 7.** Chromatogram s příkladem separace pro lipidomickou podtřidu fosfatidylcholinů (PC). Viditelná je závislost retenčního času na délce acylového řetězce a dvojných vazeb. Dochází k dřívější eluci lipidů s nižším počtem uhlíků v atomu a vyšším počtem násobných vazeb.

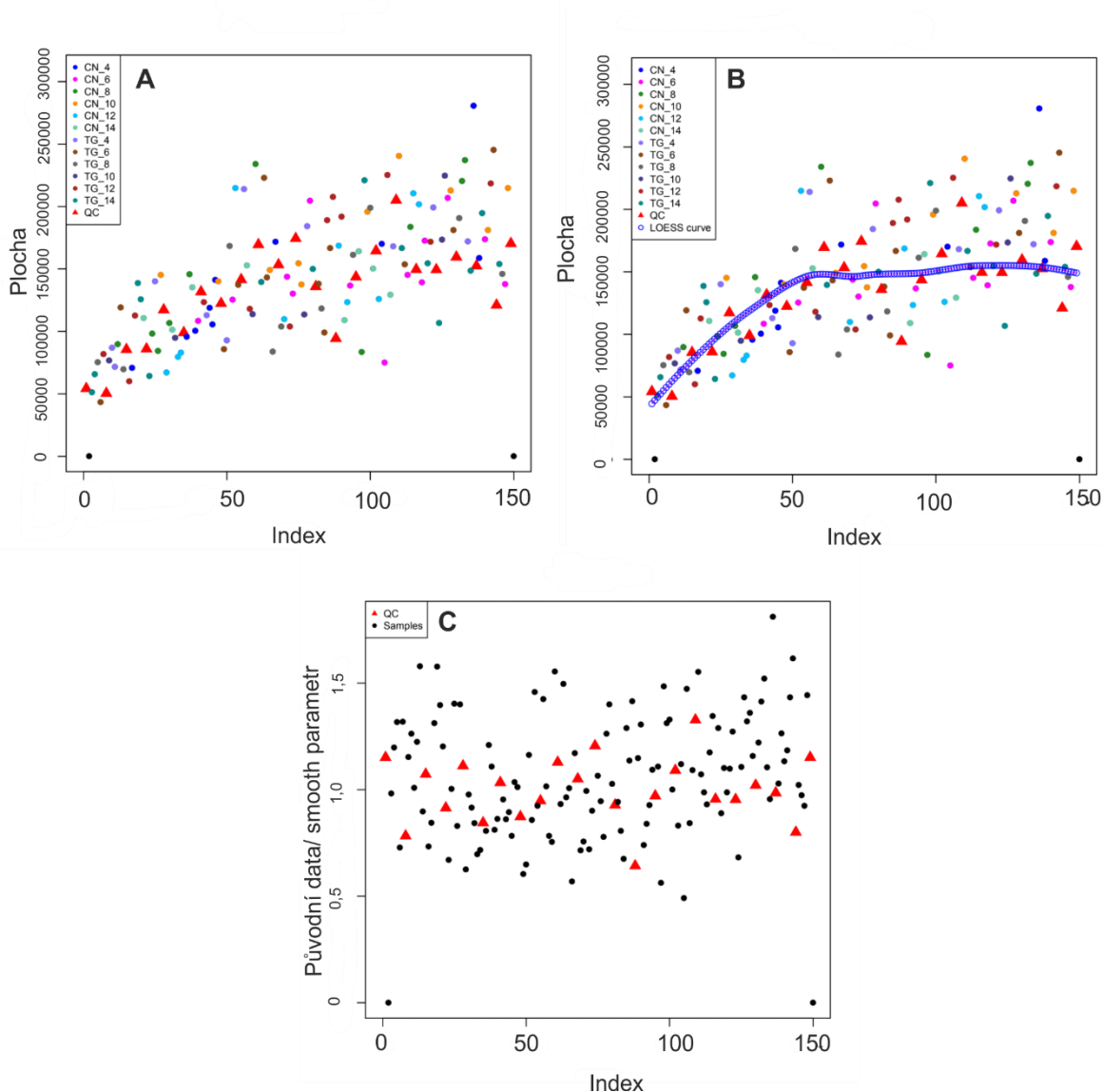
Integrace ploch píků je nedílnou součástí zpracování naměřených dat. Během vlastní integrace dat v softwaru MultiQuant dochází k porovnání retenčních časů, ke kontrole profilu a intenzity píků, k odintegrování duplikátů látek. Intenzita píku byla minimálně 5x intenzita šumu blanku.



**Obr 8.** Příklad integrace píků v programu Multiquant u náhodně vybraného fosfatidylethanolaminu LPC (16:1).

## VÝSLEDKY

Dalším krokem byla interpolace dat, kde se využívají vzorky QC. Ty slouží k monitorování odezvy intenzity látky v průběhu analýzy. Všemi QC vzorky byla proložena LOESS křivka a následně byla data na ni narovnána. Aplikování LOESS metody je znázorněno na Obr 7. Následně byl u QC vypočítán variační koeficient (CV). Analyty s CV vyšší než 30 % byly z analýzy automaticky vyřazeny.



**Obr 9.** Příklad interpolace dat za použití LOESS metody u fosfatidylcholinů PC 30:3; A: původní surová data se systematickou chybou; B: prokládání loess křivky; C: konečné narovnění dat.

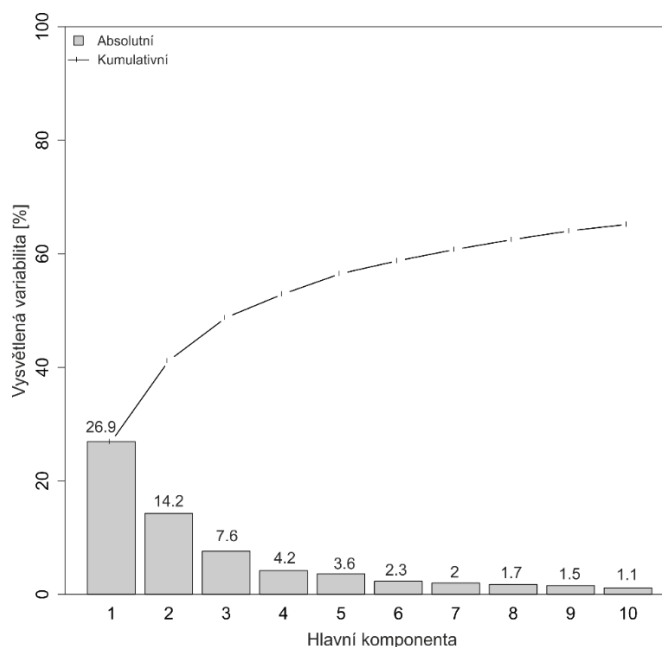
## VÝSLEDKY

Následovala logaritmická (přirozený logaritmus) transformace dat. Pomocí hodnoty Mahalanobisovy vzdálenosti, což je pravděpodobnostní vzdálenost od průměru, došlo k vyřazení odlehlých vzorků. Jedná se o ty, které se vydělují od dané skupiny a mohou ovlivnit správnost dat. V našem případě došlo k vyřazení jednoho vzorku ze skupiny 6měsíčních potkanů s tauopatií. Hodnota Mahalanobisovy vzdálenosti byla 43,2, což dvojnásobně převyšovalo doporučenou maximální hodnotu, která byla 23,3.

### 6.2. Statistické výsledky

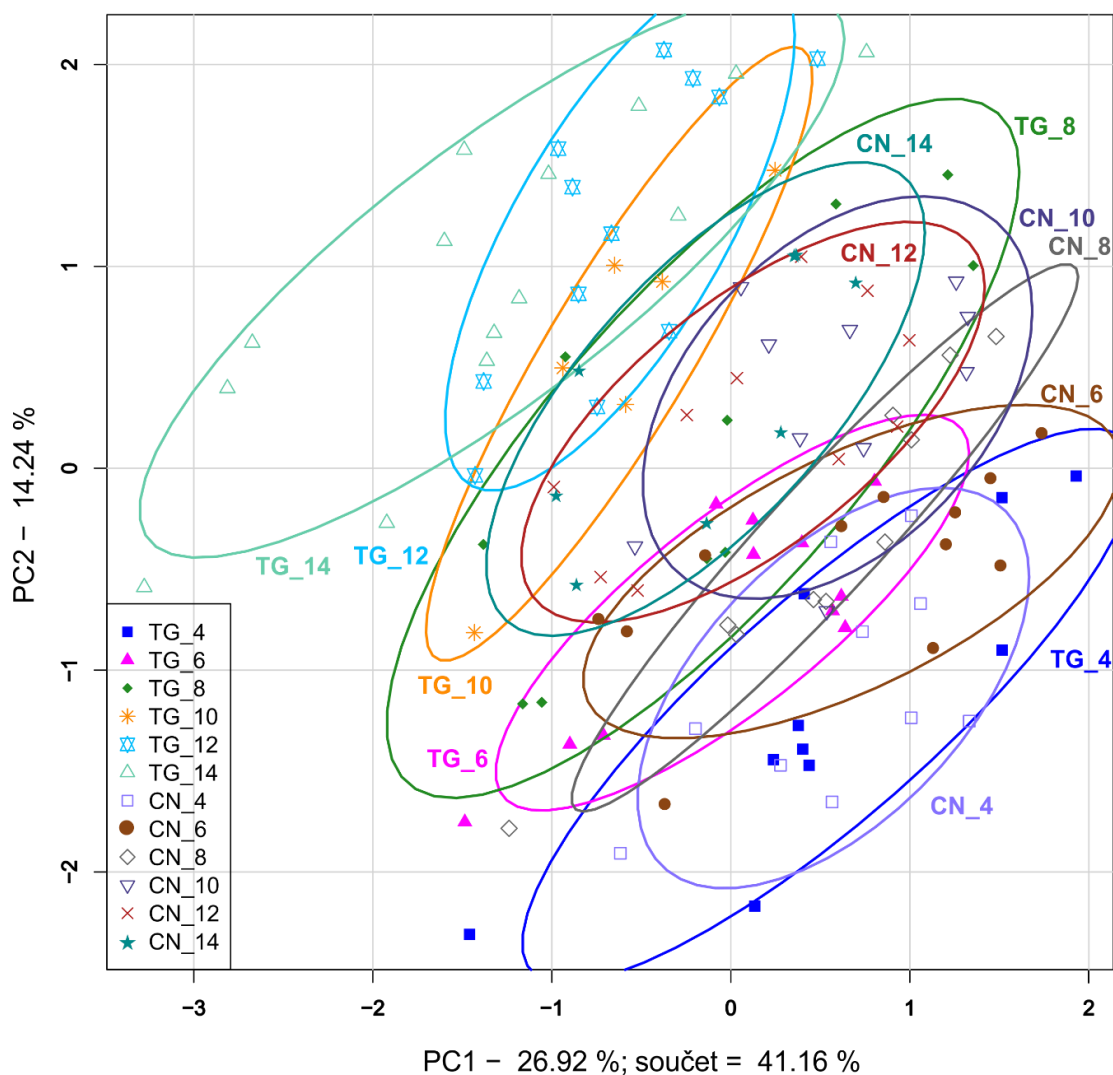
Statistické vyhodnocení spočívalo v porovnání skupin kontrol (CN) a transgenních potkanů (TG) s to nejen na základě ne/přítomnosti onemocnění ale také napříč věkovým spektrem (6 skupin CN 4-14 měsíců a 6 skupin TG 4-14 měsíců).

Jako objektivní nesupervizovaná metoda byla aplikována analýza hlavních komponent PCA, která porovnává celý soubor dat a dívá se na rozdíly mezi vzorky nikoli mezi zadanými skupinami, jak je běžné např. u PLS-DA. Z Obr 10. vyplývá, že PC1 odpovídá 26,9 % a PC2 14,2 %. Vysvětlená variabilita datového souboru pro první dvě dimenze byla v součtu 41,1 %.



**Obr 10.** Výstup z mnohorozměrné analýzy hlavních komponent. Hodnoty vysvětlené variability datového souboru pro jednotlivé komponenty.

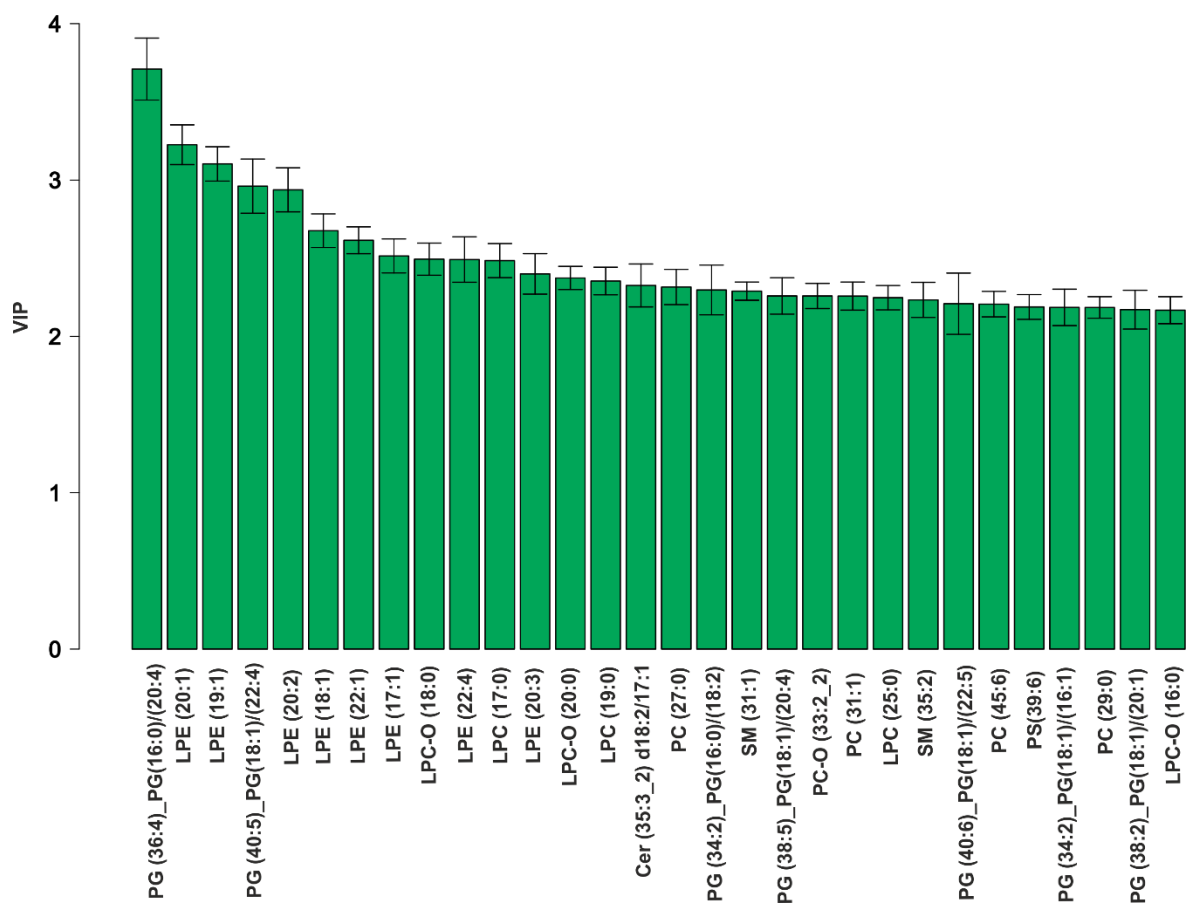
## VÝSLEDKY



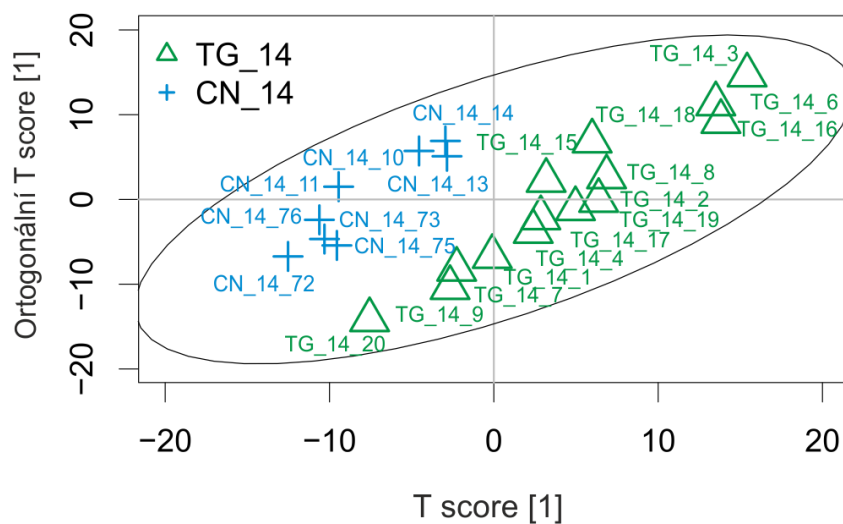
*Obr 11. Výstup z mnohorozměrné analýzy hlavních komponent (PCA). Barevně jsou odlišeny jednotlivé skupiny vzorků CN\_4-14 a TG\_4-14.*

Následně byla aplikována supervizovaná metoda vícerozměrné analýzy – OPLS-DA. Jedním z výstupů OPLS-DA jsou VIP („Variable Importance for the Projection“) grafy (Obr 12., Obr 14., Obr 16.) a skórové grafy (Obr 13., Obr 15., Obr 17.). Na VIP grafech je znázorněno třicet nejvíce diskriminujících lipidů oddělující jednotlivé skupiny. V první řadě se porovnávala data na základě přítomnosti onemocnění srovnáním SHR24 s odpovídající kontrolní skupinou stejného věku (Obr 12., Obr 13.), později pak napříč věkovým spektrem (Obr 14.-17.)

## VÝSLEDKY

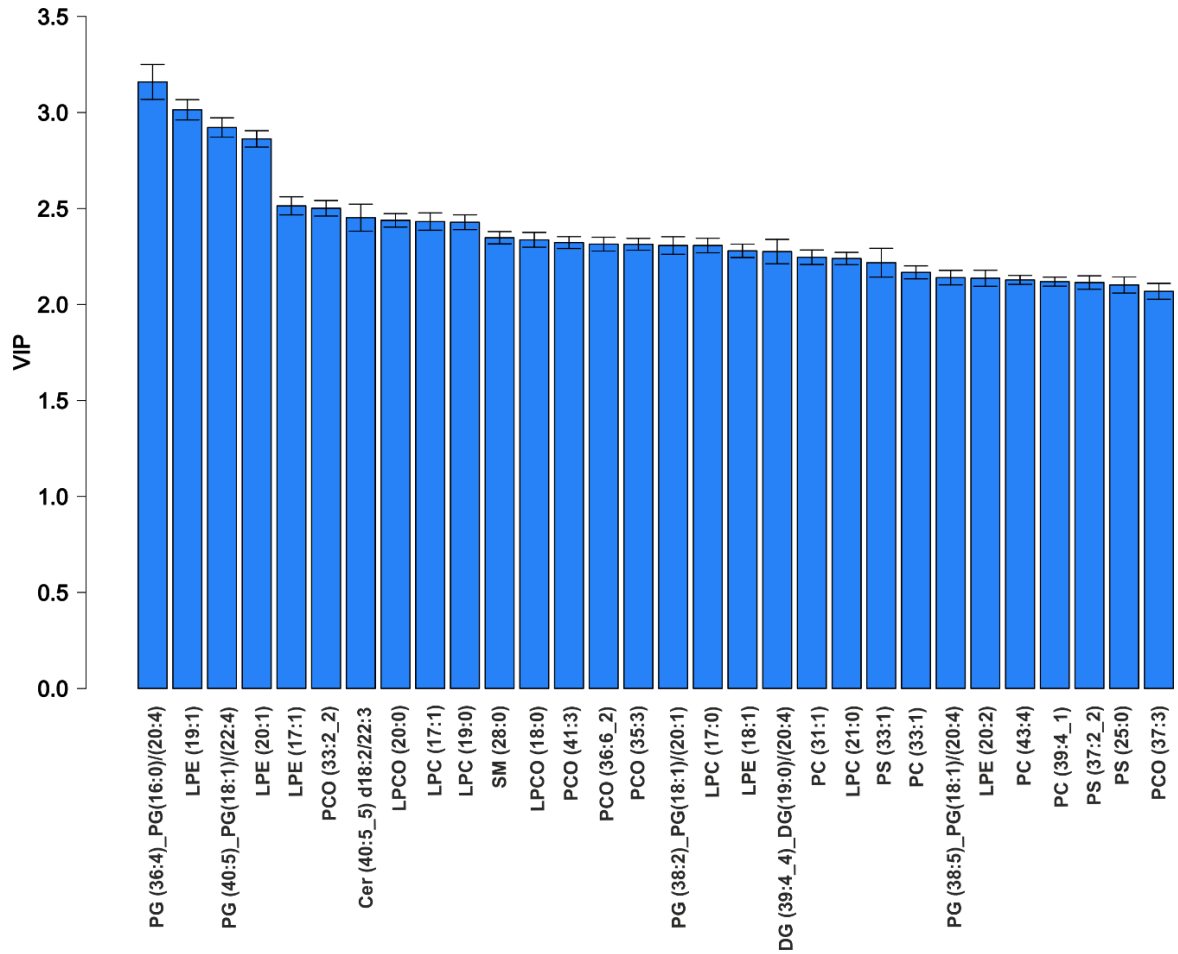


**Obr 12.** Výstup z mnohorozměrné analýzy OPLS-DA (VIP graf). Jedná se o porovnání skupin TG<sub>14</sub> a CN<sub>14</sub>. Zmíněné lipidy u transgenických potkanů 14 měsíců starých vykazují vyšší hodnoty oproti kontrolám.

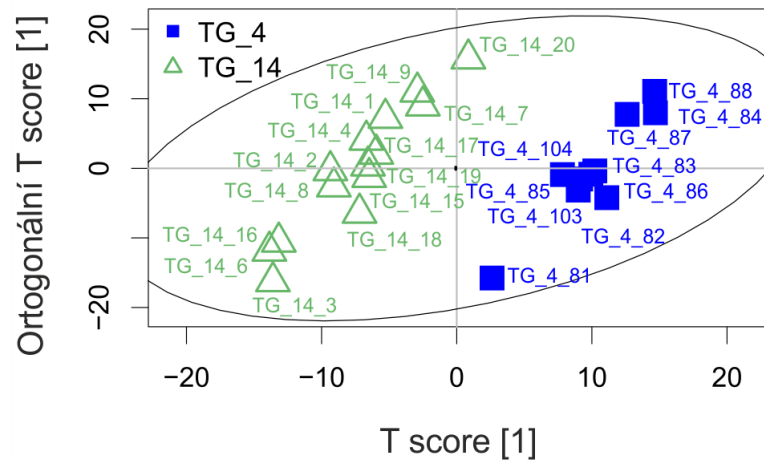


**Obr 13.** Výstup z mnohorozměrné analýzy OPLS-DA (skórový graf). Vzorky CN<sub>14</sub> jsou uvedeny jako modré křížky a vzorky TG<sub>14</sub> jsou zelené trojúhelníky.

## VÝSLEDKY

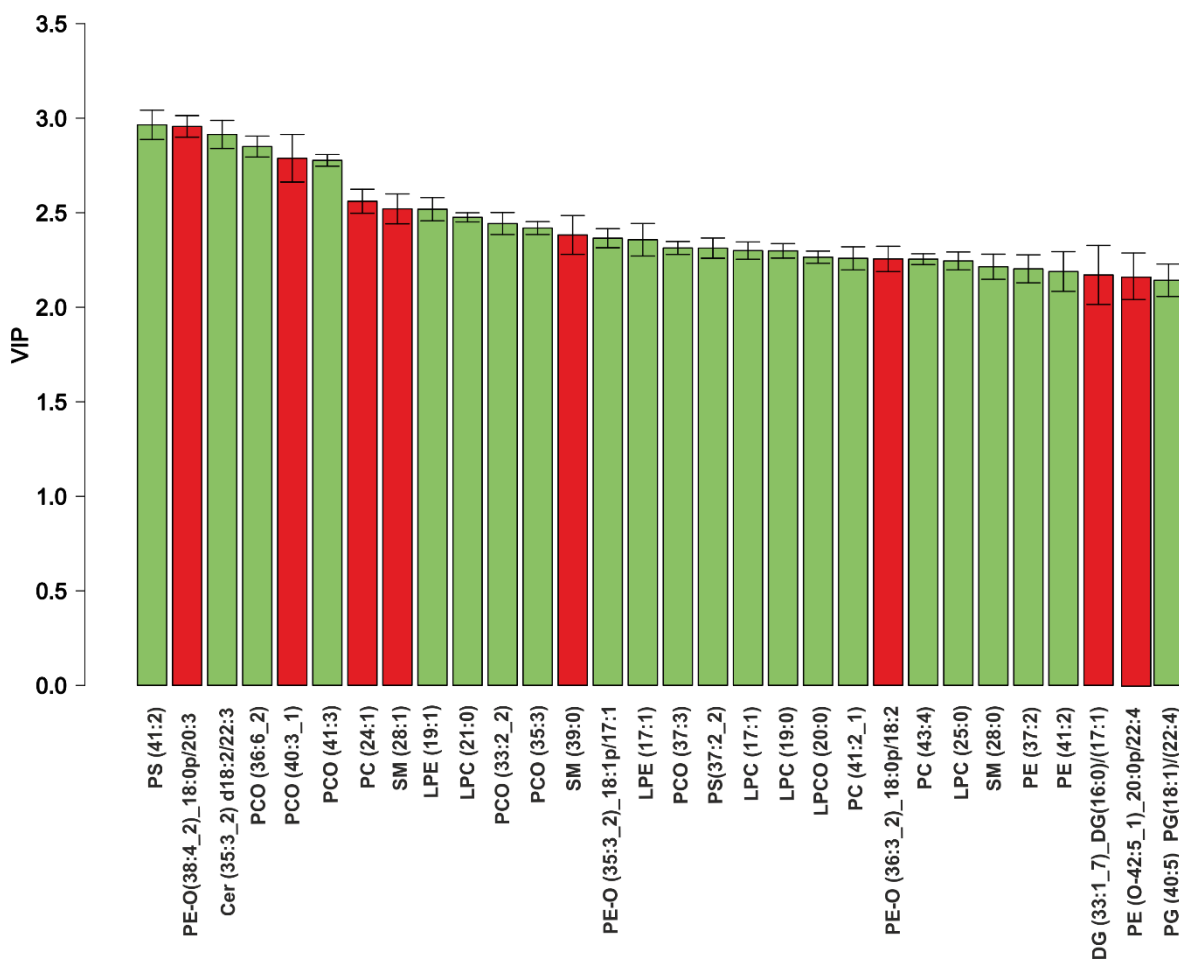


*Obr 14. Výstup z mnohorozměrné analýzy OPLS-DA (VIP graf). Jedná se o porovnání skupin TG<sub>14</sub> a TG<sub>4</sub>. Modrá barva znázorňuje zvýšení u TG<sub>14</sub> vůči skupině TG<sub>4</sub>.*

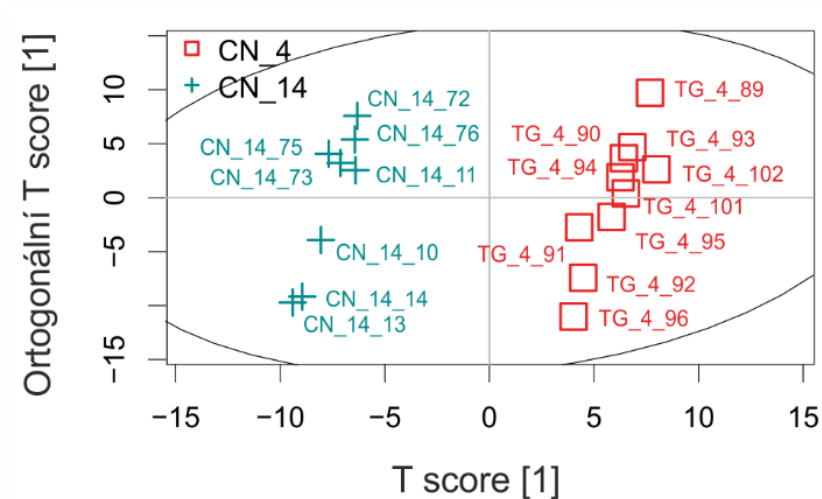


*Obr 15. Výstup z mnohorozměrné analýzy OPLS-DA (skórový graf). Vzorky TG<sub>4</sub> jsou uvedeny jako modré čtverce a vzorky TG<sub>14</sub> jsou zelené trojúhelníky*

## VÝSLEDKY



**Obr 16.** Výstup z mnohorozměrné analýzy OPLS-DA (VIP graf). Jedná se o porovnání skupin CN<sub>14</sub> a CN<sub>4</sub>. Zelená barva znázorňuje zvýšení ve skupině CN<sub>14</sub> oproti skupině CN<sub>4</sub>. Červená barva naopak zvýšení ve skupině CN<sub>4</sub> oproti CN<sub>14</sub>.

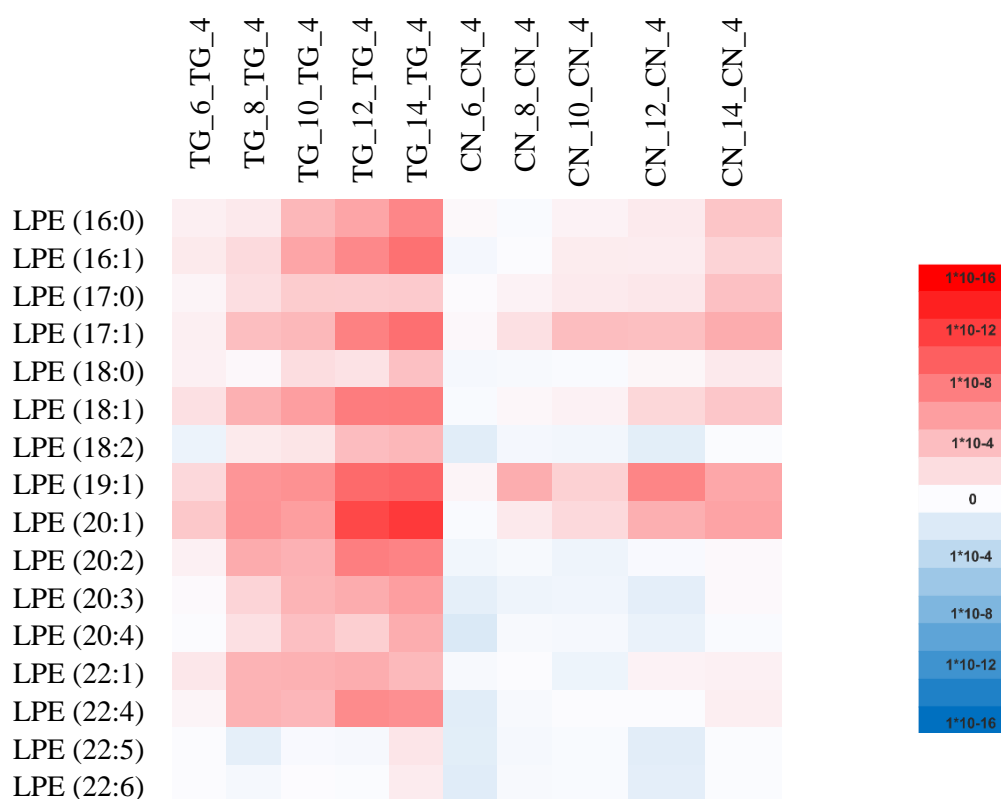


**Obr 17.** Výstup z mnohorozměrné analýzy OPLS-DA (skórový graf). Vzorky CN<sub>4</sub> jsou uvedeny jako červené čtverce a vzorky CN<sub>14</sub> jsou zelené křížky.



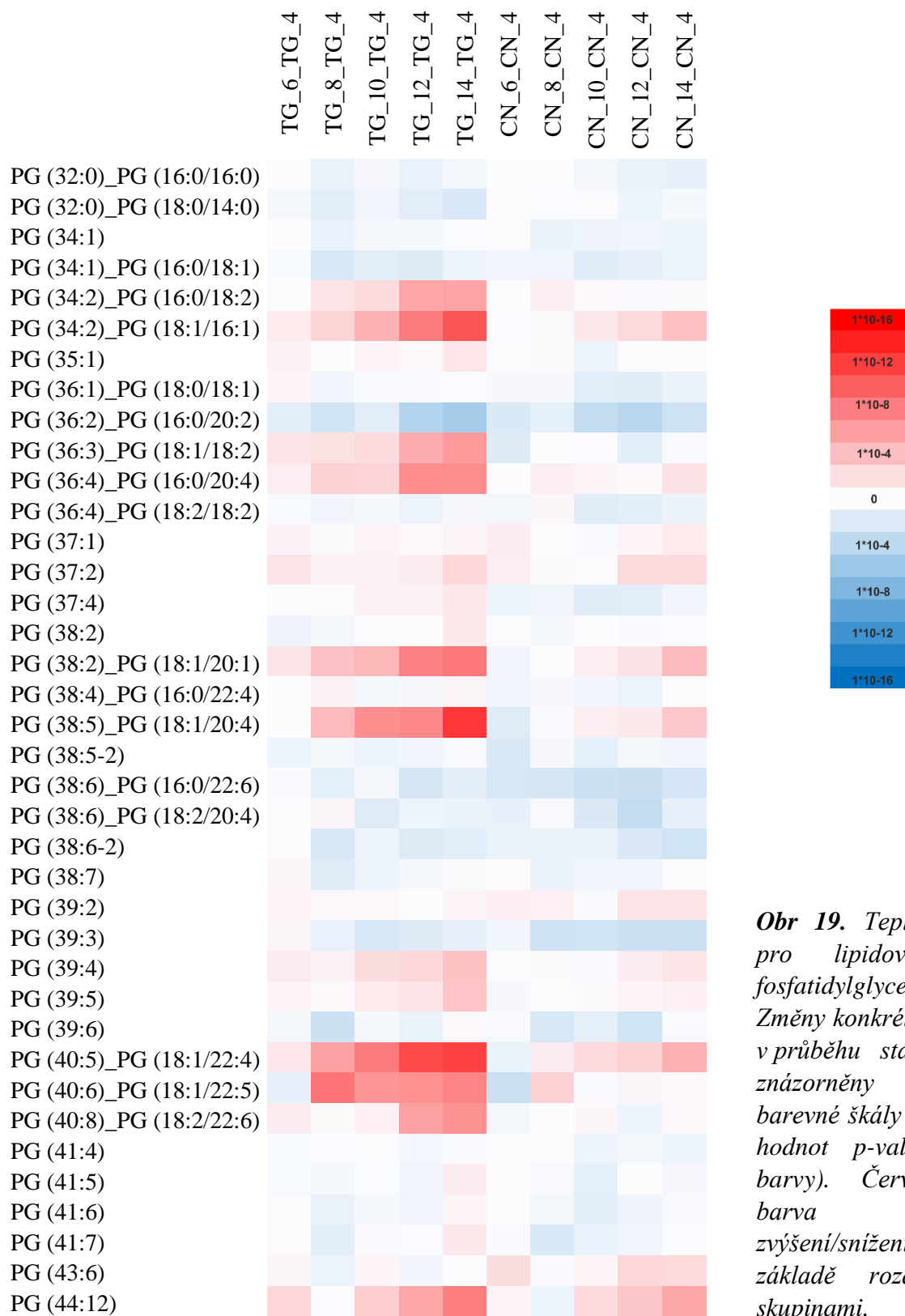
## VÝSLEDKY

Na základě informací z OPLS-DA byly pro potvrzení vytvořeny teplotní mapy. Byly zhotoveny pro následující skupiny: fosfatidylethanolaminy (LPE), fosfatidylglyceroly (PG), sfingomyeliny (SM), fosfatidylcholinu (PC). Poslední zmíněná je pro velký rozměr obsažena v kapitole Přílohy – Příloha 3. Teplotní mapy jsou vytvořeny na základě hodnot „p-value“, které byly vypočítány parametrickým t-testem. Nižší hodnota „p-value“ je znázorněna vyšší intenzitou zbarvení. Hodnota „foldchange“ naopak udává, rozdíly mediánů mezi jednotlivými skupinami. Modrá barva značí snížení. Červená naopak zvýšení změn u dané skupiny vzorků.



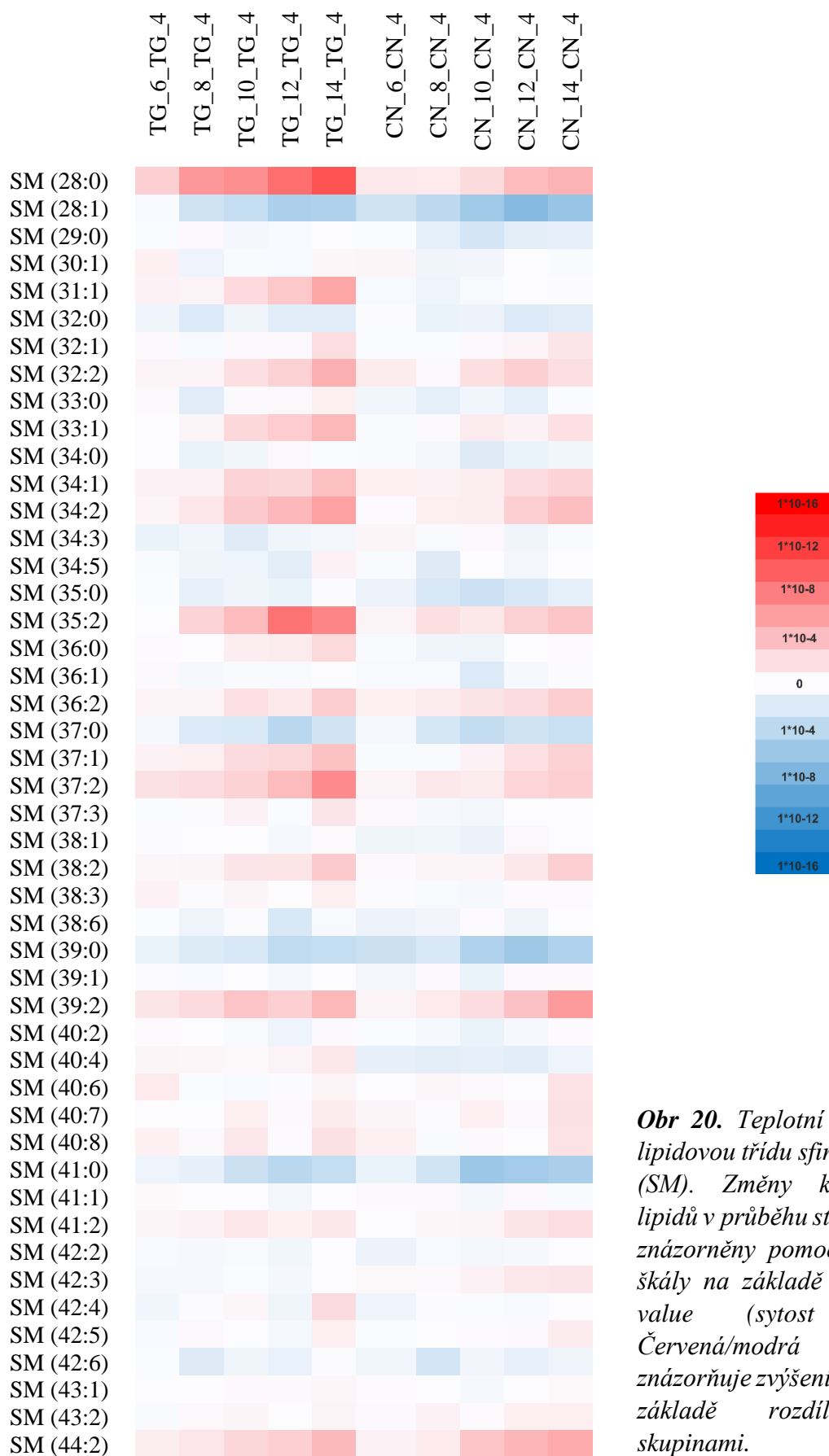
**Obr 18.** Teplotní mapa pro lipidovou třídu lysosfosfatidylethanolaminy (LPE). Změny konkrétních lipidů v průběhu stárnutí jsou znázorněny pomocí barevné škály na základě hodnot p-value (sytnost barvy). Červená/modrá barva znázorňuje zvýšení/snížení na základě rozdílu mezi skupinami.

## VÝSLEDKY



**Obr 19.** Teplotní mapa pro lipidovou třídu fosfatidylglyceroly (PG). Změny konkrétních lipidů v průběhu stárnutí jsou znázorněny pomocí barevné škály na základě hodnot p-value (sytost barvy). Červená/modrá barva znázorňuje zvýšení/snížení na základě rozdílu mezi skupinami.

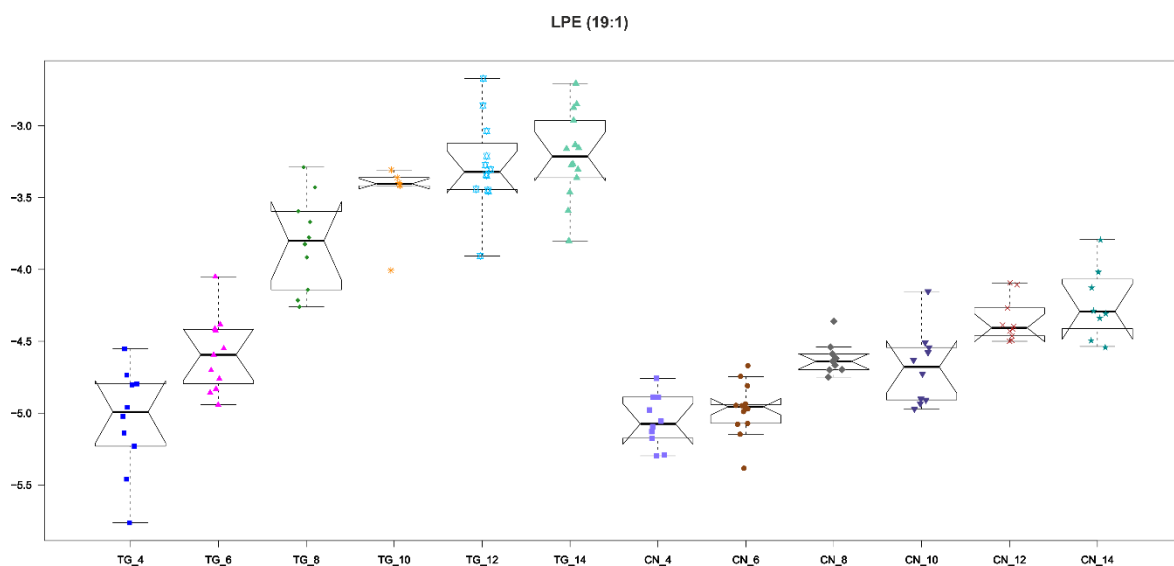
## VÝSLEDKY



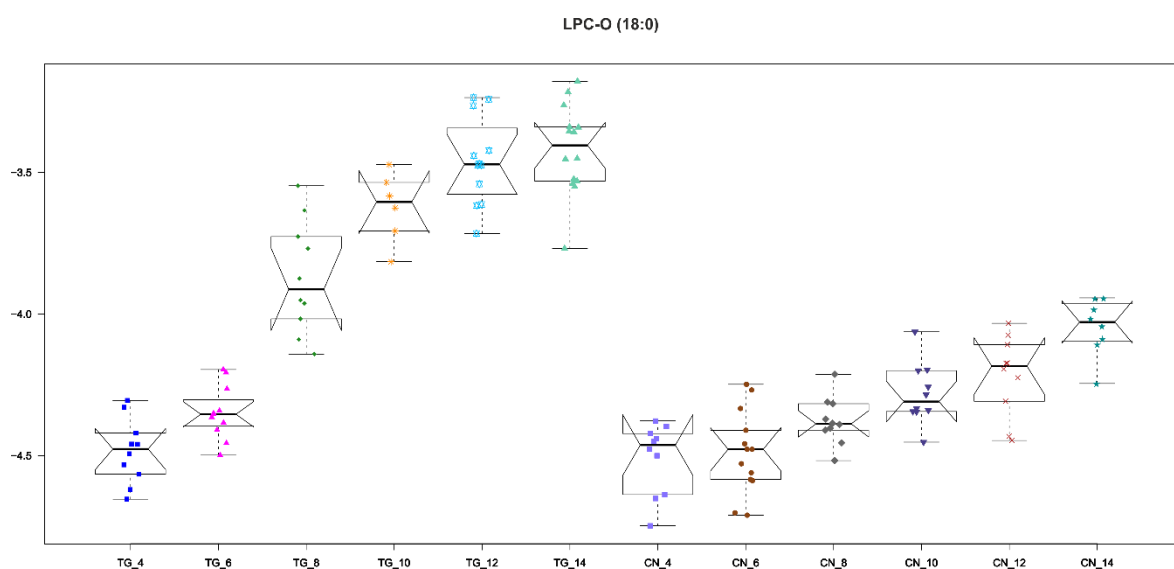
**Obr 20.** Teplotní mapa pro lipidovou třídu sfingomyeliny (SM). Změny konkrétních lipidů v průběhu stárnutí jsou znázorněny pomocí barevné škály na základě hodnot p-value (sytost barvy). Červená/modrá barva znázorňuje zvýšení/snížení na základě rozdílu mezi skupinami.

## VÝSLEDKY

Pomocí krabicových grafů byly zobrazeny všechny nalezené lipidy. Touto jednorozměrnou analýzou došlo k potvrzení výsledků z OPLS-DA metody. Krabicové grafy se zářezy znázorňují významnost změny mediánu mezi porovnávanými skupinami. V případě nepřekrývání zářezů dvou krabicových grafů existuje statisticky významný rozdíl mezi mediány. Jako příklad jsou uvedeny: LPC (19:1), LPC-O (18:0), PS (41:2) PC (41:6) a PC (45:5). Dle překrývání zářezů se určovala významnost změn.

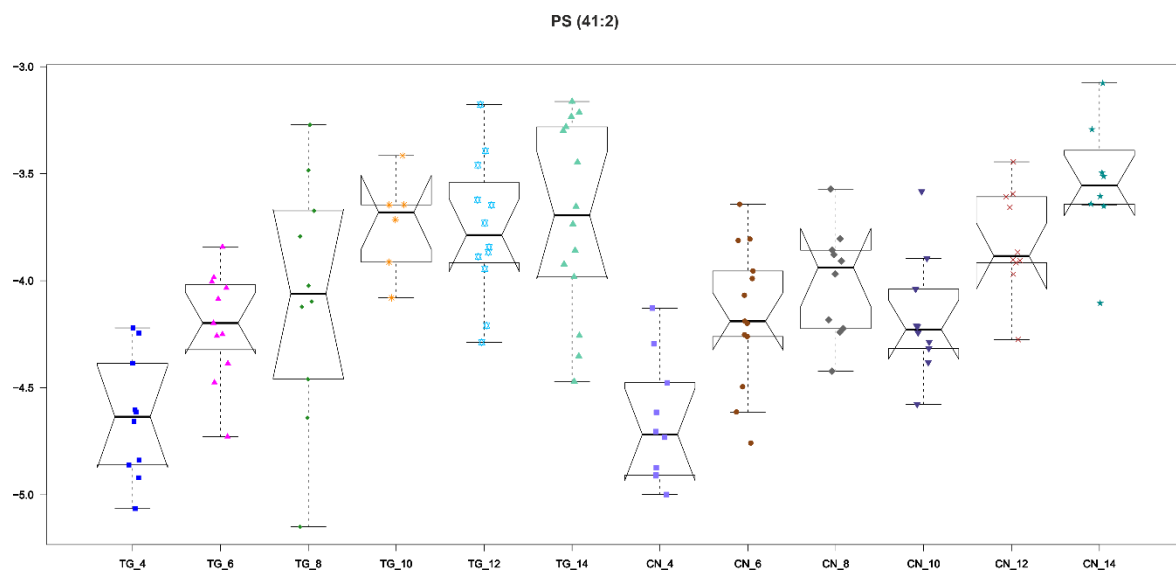


**Obr 21.** Krabicové grafy vybraného fosfatidylethanolaminu LPE (19:1). Lipid vybrán na základě VIP grafu TG\_14\_CN\_14. Znázorňující porovnání různě starých transgennů a kontrol.

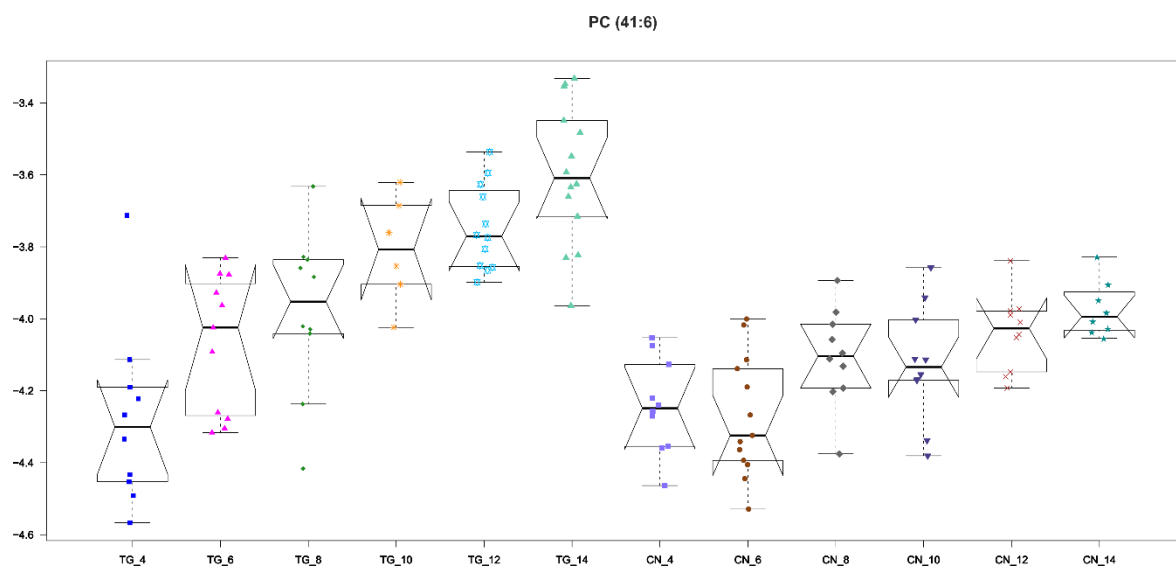


**Obr 22.** Krabicové grafy vybraného lysofosfatidylcholinu s alkylovými zbytky LPC-O (18:0). Lipid vybrán na základě VIP grafu TG\_14\_TG\_4. Znázorňující porovnání různě starých transgennů a kontrol.

## VÝSLEDKY

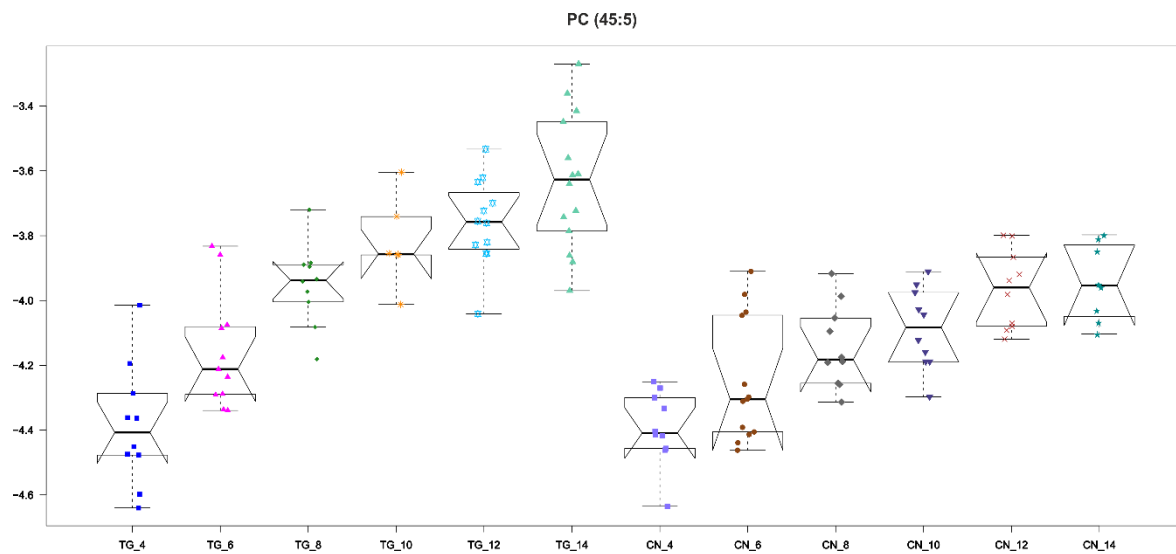


*Obr 23. Krabicové grafy vybraného fosfatidylserinu PS (41:2). Lipid vybrán na základě VIP grafu CN\_14\_CN\_4. Znárodnující porovnání různě starých transgenů a kontrol.*



*Obr 24. Krabicové grafy náhodně vybraného fosfatidylcholinu PC (41:6). Znárodnující porovnání různě starých transgenů a kontrol.*

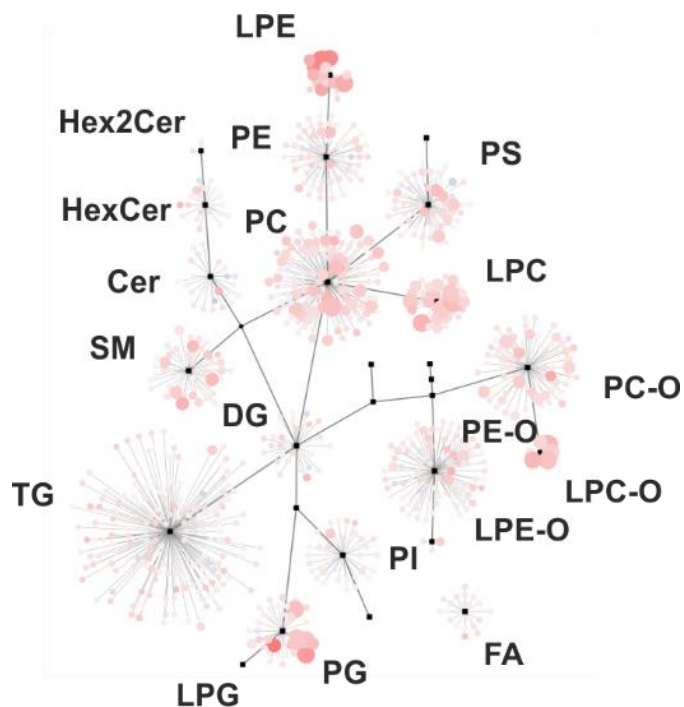
## VÝSLEDKY



*Obr 25. Krabicové grafy náhodně vybraného fosfatidylcholinu PC (45:5). Znáznorňující porovnání různě starých transgennů a kontrol.*

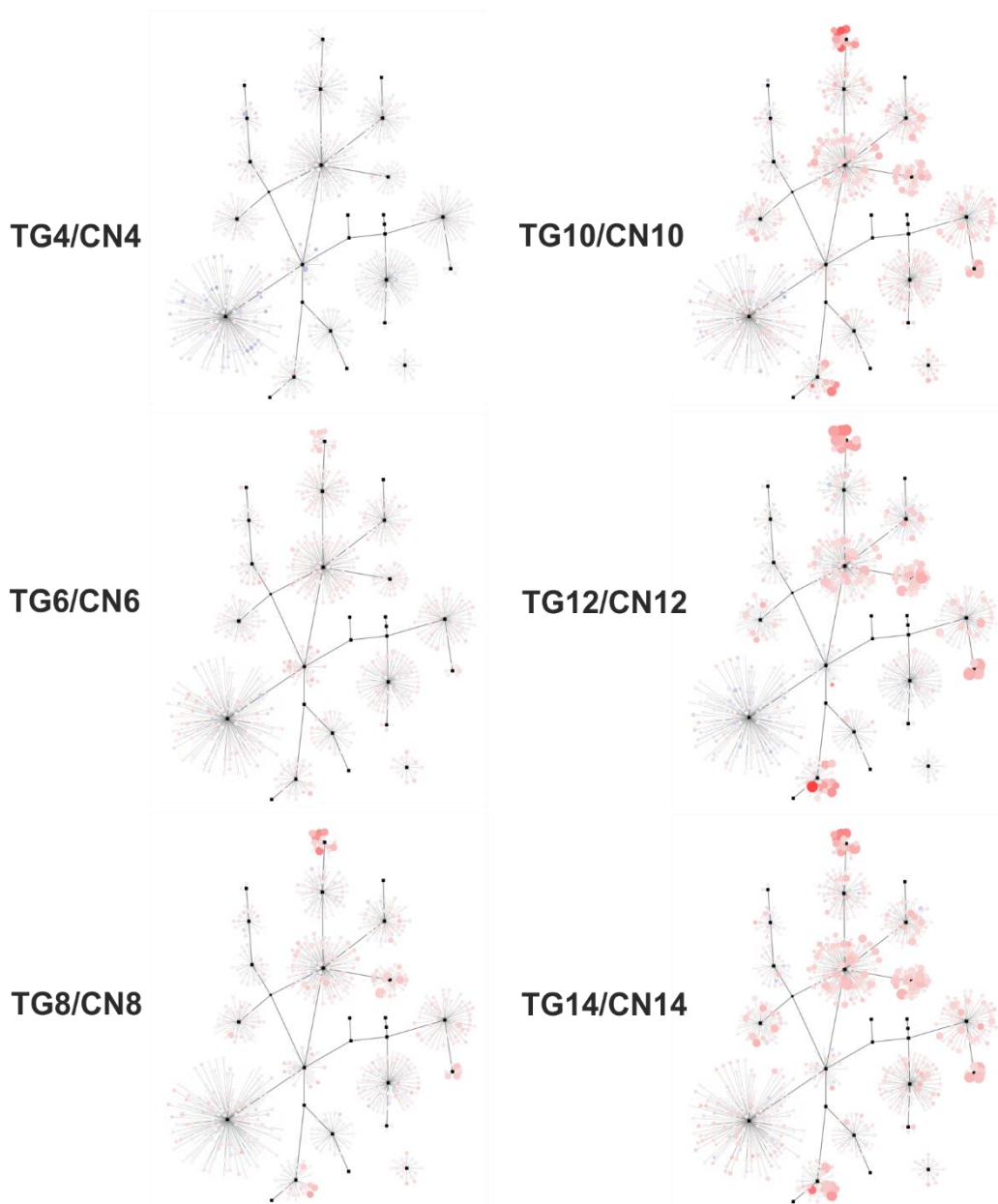
## VÝSLEDKY

Následně byla provedena grafická vizualizace celkových změn v lipidovém profilu pomocí lipidových map v softwaru Cytoscape.



**Obr 26.** *Legenda k následujícím lipidovým mapám ukazující polohu jednotlivých lipidových tříd v závislosti na možných biochemických přeměnách.*

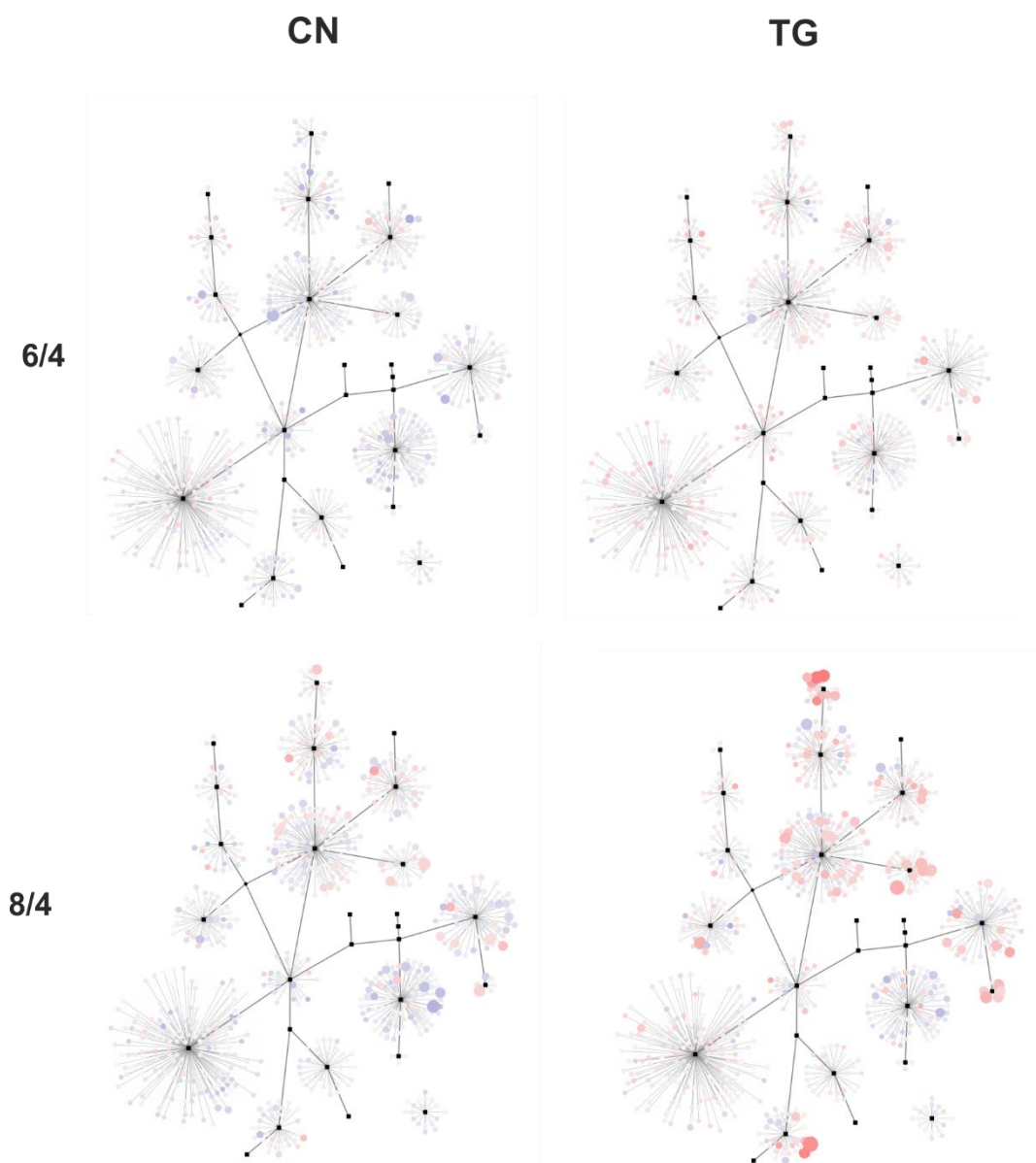
## VÝSLEDKY



**Obr 27.** Grafická vizualizace pomocí lipidových map. Jedná se o znázornění, které zohledňuje přítomnost onemocnění, kdy dochází k porovnávání stejně starých skupin v rámci kontrol a transgennů. Legenda viz Obr 26.

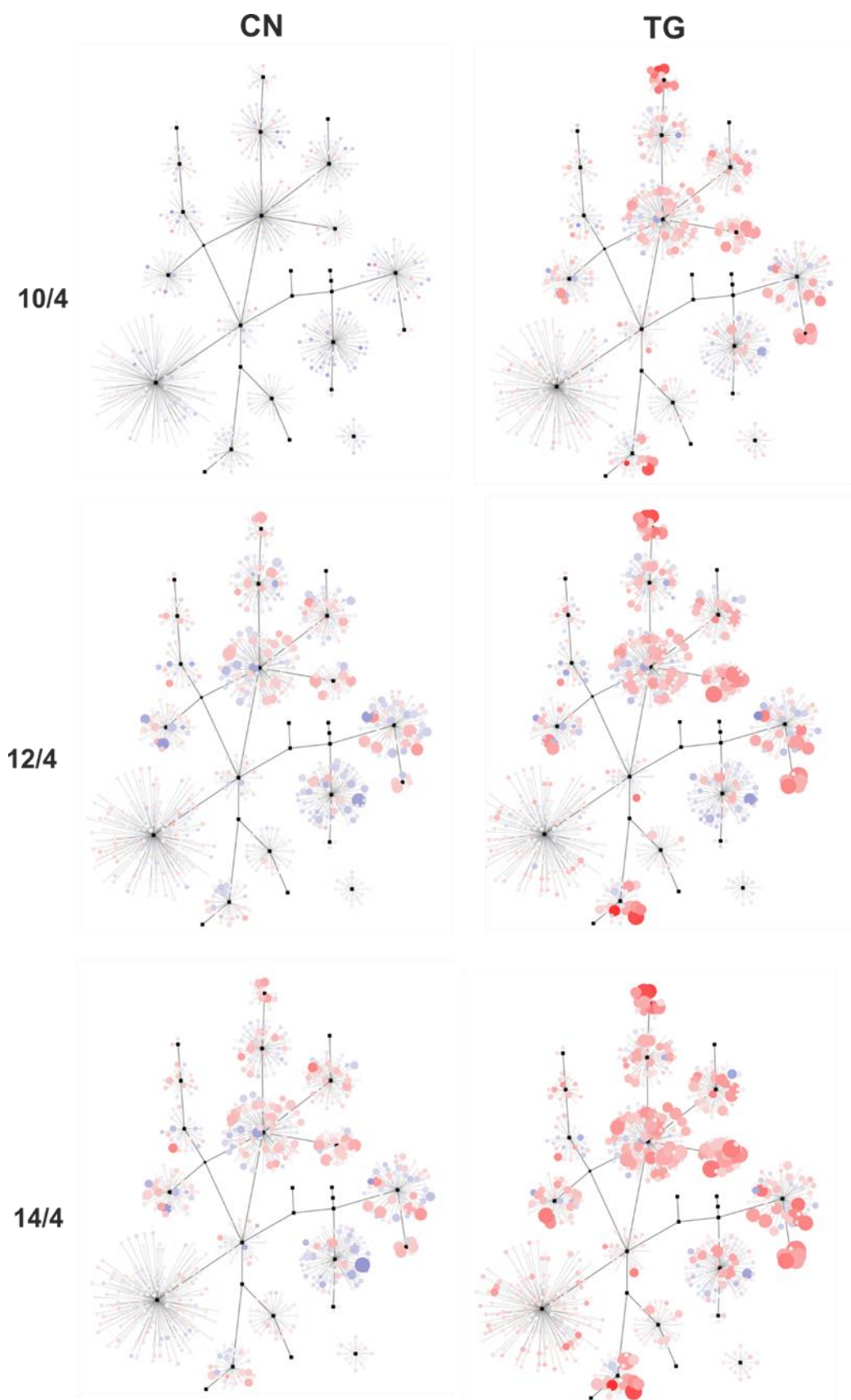


## VÝSLEDKY



**Obr 28.** Grafická vizualizace pomocí lipidových map. Jedná se o znázornění změn v rámci stárnutí, kdy dochází k porovnávání 6/8 měsíců vůči 4 měsícům starým vzorků uvnitř skupiny. Legenda viz Obr 26.

## VÝSLEDKY



Obr 29. Grafická vizualizace pomocí lipidových map. Jedná se o znázornění změn v rámci stárnutí, kdy dochází k porovnávání 10/12/14 měsíců vůči vzorkům 4 měsíce starým uvnitř skupiny. Legenda viz Obr 26.

## 7. Diskuze

Cílem diplomové práce bylo porovnání a objasnění změn v lipidovém profilu u transgenních modelů pro tauopatie SHR 24 a zdravých kontrol SHR. Vzorky potkanů byly rozděleny do podskupin na základě věkového spektra 4-14 měsíců. Jednalo se celkem o 12 skupin obsahujících 6-14 vzorků. Celkově bylo analyzováno 125 vzorků.

V experimentální části byly nejprve extrahovány lipidy ze vzorků zadní části mozkového kmene. Následně byla provedena cílená lipidomická analýza LC-MS. Metoda vycházela z nedávné studie Xuan (2018). V prvním kroku měření probíhalo ve dvou pozitivních a v jednom negativním módu v režimu scheduled MRM, kde byly následně vybrány do finální metody 1325 lipidů. V konečné fázi bylo detekováno a následně zpracováno 891 lipidů ze 17 lipidových podtříd. Po procesování byla data podrobena statistické analýze použitím metod jednorozměrné a vícerozměrné analýzy zahrnující také jejich vizualizaci. V konečné fázi byly sledovány změny lipidového profilu napříč stářími potkanů, poté pak na základě ne/přítomnosti/ daného onemocnění.

V případě nesupervizované vícerozměrné analýzy hlavních komponent (Obr 11.) jsou patrné znatelné rozdíly v lipidovém profilu mezi skupinami CN a TG ve věkovém stádiu 8, 10, 12 a 14 měsíců. Pro nalezení nejvíce diskriminujících lipidů se vycházelo z VIP grafů OPLS-DA a následně bylo pozorování potvrzeno jednorozměrnou statistickou analýzou za pomoci t-testu (teplotní mapy) a krabicových grafů.

Stárnutí jako komplexní proces vede k degeneraci buněk. Důsledkem toho se postupně a nevratně zhoršuje struktura a funkce orgánů. Transgenní modely vykazovali změnu oproti kontrolám už od 8 měsíce věku, a lišili se převážně u lysofosfatidylethanolaminy a fosfatidylglyceroly, v 10 měsících se přidávají změny u sfingomyelinů a ve 12 a 14 pak u fosfatidylethanolaminů a fosfatidylcholinů. Tři nejvíce diskriminující lipidy u transgenních vzorků v porovnání 14 a 4 měsíce (Obr 14.) byly: PG (36:4)\_PG (16:0)(20:4), LPE (19:1) a PG (40:5)\_PG (18:1)(22:4).

## DISKUZE

Změnám v lipidových profilech v závislosti na stárnutí se věnuje studie (Tu, 2018), kde byly pozorovány dramatické změny. Výchozím biologickým materiálem byla mozková tkáň myších modelů (1-13 měsíce staří). Z výsledků je patrné, že dochází ke snížení hodnot u glycerofosfolipidů, a naopak ke zvýšení u třídy sfingolipidů. Konkrétně u nich byly pozorovány změny v závislosti na délce acylového řetězce. Lipidy s delšími acylovými řetězci vykazují tendenci se hromadit v mozcích starších potkanů, zatímco hodnoty u SL s kratšími řetězci klesají. Což bylo v souladu s našimi výsledky. V naší studii byly zjištěny signifikantní změny u sfingomyelinů, a to konkrétně u SM (32:2), SM (34:2) SM (35:2), SM (37:2), SM (39:2) a SM (44:2).

Ceramidy, které jsou také součástí metabolismu sfingolipidů, hrají důležitou roli v mnoha základních buněčných procesech (růst, stárnutí, apoptóza). Zvýšené hladiny byly detekovány u krysích modelů pro stárnutí (Mullen, 2012). Rozdíly Cer byly zjištěny i ve studii Filippova (Filippov, 2013), který pro analýzu použil lidskou mozkovou tkáň s AD. Významné zvýšení bylo detekováno konkrétně u Cer16, Cer18 s Cer20. Dále literatura uvádí, že stárnutí je doprovázeno změnami i v lipidovém metabolismu cholesterolu a fosfatidylinositolů (Ledesma, 2012). Postupný pokles hladin u PI potvrzuje i výše zmíněná studie, která ještě navíc uvádí změny u fosfatidylserinů a fosfatidylethanolaminů (Tu, 2018). Hodnoty ceramidů a fosfatidylinositolů v našem případě žádné signifikantní změny nevykazovaly.

V druhé části práce byl porovnáván lipidový profil s ohledem na ne/přítomnost daného onemocnění. Při srovnání kontrol a transgenních vzorků (14 měsíců), je patrné, že jsou hladiny lipidů z následujících tříd: fosfatidylglycerolů, lysofosfatidylethanolaminů, lysofosfatidylcholinů s alkylovými substituenty, fosfatidylcholinů a sfingomyelinů výrazně zvýšené u transgennů. Dále lze říct, že signifikantní změny v lipidovém profilu se vyskytují převážně až od 8 měsíce stáří transgenních potkanů. Kontrolní vzorky vykazují změny spíše až v měsíci 12.

V současné době převládají studie, kde je hlavním oblastí sekundární tauopatie – Alzheimerova demence. Ve studii Whiley a kol. (Whiley, 2013) byly analyzovány vzorky lidské plasmy s AD a bylo prokázáno významné snížení hodnot u fosfatidylcholinů (PC), a to konkrétně u PC (16:0/22:6), PC (16:0/22:6) a PC (18:0/22:6). Fosfatidylcholin, jakožto nejhojnější glycerofosfolipidy v buněčné membráně, které jsou zapojeny do signalizace, se zabývá i práce Grimma (Grimm, 2011). V tomto případě byla výchozím materiálem

## DISKUZE

mozková tkáň s AD. Zmiňuje kromě signifikantně snížených hladin PC i změny u podtřídy LPC. Toto není v souladu s našimi výsledky, jelikož profil fosfatidylcholinů ve většině konkrétních lipidů vykazoval zvýšené hodnoty.

Studie Wonga (Wong, 2017) upozorňuje na možné rozdíly v lipidových profilech při zkoumání různých oblastí mozku a v různém stupni AD. Dále je nutné neopomíjet skutečnost že, v patologii AD se vyskytuje abnormálně hyperfosforylovaný tau a jeho inkluze i amyloid  $\beta$ . Tudíž nelze přesně říct, se kterou proteinovou abnormalitou daná změna souvisí a nelze zcela srovnávat data u tauopatických studií.

Přímo studiem tauopatií se zabýval nedávný metabolomický výzkum, který analyzoval plazmu, mozkomíšní mok (CSF) a mozkovou tkáň transgenních potkanů SHR 72 (Karlíková, 2018). Přestože se studie zabývala celým metabolomem, byly zjištěny mezi diskriminujícími látkami i některé třídy lipidů. Konkrétně v plazmě a CSF se vyskytovaly zejména fosfatidylcholinu (PC). Konkrétně lipidy PC (20:2), PC (20:0) LPC (20:3), a LPC (22:5) vykazovaly u plazmatických vzorků snížené hodnoty. Zmíněné lipidy nebyly v naší práci nalezeny.

Experiment diplomové práce je součástí velké lipidomické a metabolomické studie ve spolupráci s Institutem neuroimunologie Slovenské akademie věd. Ta má v plánu porovnávat lipidový profil v rámci různých tkání transgenních potkanů a kontrolních vzorků. Dále bude sledována plazma, CSF, přední mozkový kmen a mozková kůra. Hledány budou změny v lipidech mezi normálně stárnoucími potkany a potkany s neurodegenerací. Tato komplexní studie má do budoucna velký potenciál objasnit celou řadu biochemických otázek v patologii tauopatií a objevit spolehlivý biomarker daného onemocnění.

## 8. Závěr

Tato diplomová práce byla zaměřena na cílenou lipidomickou analýzu zadního mozkového kmene transgenních potkanů SHR24 a SHR pro tauopatie. Pro analýzu byla použita technika vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostním spektrometrem Triple Quad 6500.

V teoretické části této práce byla vypracována literární rešerše na téma: neurodegenerativní onemocnění, tauopatie a protein tau, lipidomika včetně nejpoužívanějších přístupů a statistická analýza.

V experimentální části byla popsána příprava série vzorků, která byla analyzována přístupem cílené lipidomiky. Měření probíhalo ve dvou pozitivních a v jednom negativním módu v režimu scheduled MRM. Výsledná data byla podrobena procesování, během kterého došlo k integraci píků, aplikování LOESS metody v průběhu interpolace a transformování dat pomocí přirozeného logaritmu. Následně došlo k vizualizaci dat pomocí metod jednorozměrné (teplotní mapy, krabicové grafy) a vícerozměrné analýzy (PCA, OPLS-DA, lipidové mapy).

Lipidový profil se měnil v závislosti na přítomnosti onemocnění. Signifikantní změny se projeví u 8 měsíce stáří transgenních potkanů, a to ve skupinách lysofosfatidylethanolaminy, fosfatidylglyceroly, fosfatidylcholiny a lysofosfatidylcholiny. Při sledování změn na základě stárnutí byl 8. měsíc také klíčový. Zde se vyskytovala variabilita ve skupinách lysofosfatidylethanolaminy, fosfatidylglyceroly, fosfatidylethanolaminy, fosfatidylcholiny a sfingomyeliny.

## 9. Použitá literatura

- Andreadis A., Brown W.M., Kosik K.S., Structure and novel exons of the human  $\tau$  gene, *Biochemistry*, 31(43), 10626–10633, 1992
- Arendt T., Stieler J. T., Holzer M., Tau and tauopathies, *Brain Res. Bull* 126, 238–292, 2016
- Bamba T., Lee J. W., Matsubara A., Fukusaki E., Metabolic profiling of lipids by supercritical fluid chromatography/mass spectrometry. *J Chromatogr A.*, 1250, 212-219, 2012
- Bligh E. G., Dyer W. J., A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* 37, 911-917, 1959
- Buée L., Bussièrè T., Buée-Scherrer V., Delacourte A., Hof P.R., Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders, *Brain Res* 33(1), 95-130, 2000
- Buszewski B, Noga S., Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)- a powerful separation technique. *Anal Bioanal Chem.*, 402(1), 231-247, 2014
- De Paula V. J., Guimarães F. M., Diniz B. S., Forlenza O. V., Neurobiological pathways to Alzheimer's disease: Amyloid-beta, TAU protein or both? *Dementia & neuropsychologia* vol. 3(3), 188-194, 2009
- De-Paula V. J., Radanovic M., Diniz B. S., Forlenza O. V., Alzheimer's disease. *Subcell Biochem.*, 65, 329-352, 2012
- Do Carmo S., Cuello A.C., Modeling Alzheimer's disease in transgenic rats, *Mol Neurodegeneration* 8, 37, 2013
- Dorszewska J., Predecki M., Oczkowska A., Dezor M., Kozubski W., Molecular Basis of Familial and Sporadic Alzheimer's Disease. *Curr Alzheimer Res.*, 13(9), 952-963, 2016
- Dugger B.N., Dickson D.W., Pathology of Neurodegenerative Diseases. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 9(7), 2017
- Fahy E. et al., A comprehensive classification system for lipid, *The Journal of Lipid Research* 46, 839-862, 2005
- Fahy E., Cotter D., Sud M., Subramaniam S., Lipid classification, structures and tools. *Biochimica et biophysica acta*, 1811(11), 637–647, 2011

## POUŽITÁ LITERATURA

- Farwa A., Keith J., Rare Tauopathies, *Seminars in Neurology* 39, 264-273, 2019
- Femminella G. D., Thayanandan T., Calsolaro V., Imaging and Molecular Mechanisms of Alzheimer's Disease, A Review. *Int J Mol Sci.*,19(12), 3702, 2018
- Filippov V., Song M. A., Zhang K., Increased ceramide in brains with Alzheimer's and other neurodegenerative diseases. *J Alzheimers Dis.*, 29(3), 537-547, 2012
- Folch J., Lees M., Stanley G. H. S., A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry* 226, 497-509, 1957
- Gardlo A., *Metabol: First version (version 1.0.0.)*, Zenodo, 2019
- González-Domínguez R., García-Barrera T., Gómez-Ariza J.L., Combination of metabolomic and phospholipid-profiling approaches for the study of Alzheimer's disease. *J Proteomics*, 104, 37-47. 2014
- Granato D., Santos J. S., Escher G. B., Ferreira B. L., Maggio R. M., Use of principal component analysis (PCA) and hierarchical cluster analysis (HCA) for multivariate association between bioactive compounds and functional properties in foods: A critical perspective. *Trends in Food Science & Technology* 72, 83-90, 2018
- Grimm M. O., Grösgen S., Riemenschneider M., Tanila H., Grimm H. S., Hartmann T., From brain to food: analysis of phosphatidylcholins, lyso-phosphatidylcholins and phosphatidylcholin-plasmalogens derivates in Alzheimer's disease human post mortem brains and mice model via mass spectrometry., *J Chromatogr A.* 1218(42), 7713-7722, 2011
- Gromski P.S., Muhamadali H., Ellis D.I., Xu Y., Correa E., Turner M. L., Goodacre R., Metabolomics and partial least squares-discriminant analysis – a marriage of convenience or a shotgun wedding., *Analitica Chimica Acta* 879, 10-23, 2015
- Hampel H., Blennow K., Shaw L.M., Hoessler Y.C., Zetterberg H., Trojanowski J.Q., Total and phosphorylated tau protein as biological markers of Alzheimer's disease, *Exp. Gerontol* 45(1), 30-40, 2010
- Holčapek M., Liebisch G., Ekroos K., Lipidomic Analysis. *Anal Chem.*, 90(7), 4249-4257, 2018
- Chetwynd A. J., Dunn W. B., Rodriguez-Blanco G., Collection and Preparation of Clinical Samples for Metabolomics. *Adv Exp Med Biol.*, 965, 19-44, 2017
- Chung D., Keles S., Sparse partial least squares classification for high dimensional data. *Stat Appl Genet Mol Biol.* 9(1), 2010



## POUŽITÁ LITERATURA

- Irwin D.J., Tauopathies as clinicopathological entities. *Parkinsonism Relat Disord*, 22(1), 29-33, 2016
- Jianing Wang, Chunyan Wang, Xianlin Han, Tutorial on lipidomics, *Analytica Chimica Acta* 1061, 28-41, 2019
- Karlíková R., Mičová K., Najdekr L., et al., Metabolic status of CSF distinguishes rats with tauopathy from controls, *Alzheimers Res Ther.* 9(1), 78, 2017
- Karlíková R., Význam metabolomiky pro objasnění patobiochemie onemocnění, 2018
- Kim J., Basak J. M., Holtzman D. M., The role of apolipoprotein E in Alzheimer's Disease, *Neuron* 63(3), 287-303, 2009
- Kirwan J., Metabolomics for the practising vet. In *Practice* 35, 438-445, 2013
- Ledesma M. D., Martin M. G, Dotti C. G., Lipid changes in the aged brain: Effect on synaptic function and neuronal survival, *Progress in Lipid Research*, 51(1), 23-35, 2012
- Martin L., Latypova X., Terro F., Post-translational modifications of tau protein: Implications for Alzheimer's disease, *Neurochem. Int.*, 58(4), 458-471, 2011.
- Masters C. L., Bateman R., Blennow K., Rowe C. C., Sperling R. A., Cummings J. L., Alzheimer's disease. *Nat Rev Dis Primers.*1, 15056, 2015
- Matyash V., Liebisch G., Kurzchalia T.V., Shevchenko A., Schwudke D., Lipid extraction by methyl-tert-butyl ether for high-throughput lipidomics., *J Lipid Res.*, 49(5), 1137-1146, 2008
- Meloun M., Militký J. *Kompendium statistického zpracování dat – metody a řešené úlohy včetně CD*, 213-350, Academia, Praha, 2002
- Min Li, Li Yang, Yu Bai, Huwei Liu, Analytical Methods in Lipidomics and Their Applications, *Analytical Chemistry* 86 (1), 161-175, 2014
- Morris M., Maeda S., Vossel K., Mucke L., The many faces of tau, *Neuron*, 70(3), 410-426, 2011
- Mullen T. D., Hannun Y. A., Obeid L. M., Ceramide synthases at the centre of sphingolipid metabolism and biology., *Biochem J.*, 441(3), 789-802, 2012
- Oliveri P., Simonetti R., Chemometrics for food authenticity applications. In: *Advances in food authenticity testing*, 1st ed., (Downey G. ed), Woodhead Publishing, Cambridge, United Kingdom, 701-728, 2016

## POUŽITÁ LITERATURA

- Pearson K., On lines and planes of closest fit to systems of points in space., *Philosophical Magazine* 2, 559-572, 1901
- Przedborski S., Vila M., Jackson-Lewis V., Neurodegeneration: What is it and where are we?, *J. Clin. Invest* 111(1), 3-10, 2003
- Reddy P.H., Abnormal tau, mitochondrial dysfunction, impaired axonal transport of mitochondria, and synaptic deprivation in Alzheimer's disease. *Brain Res.*1415,136-148, 2011.
- Rhein V., Eckert A. Effects of Alzheimer's amyloid-beta and tau protein on mitochondrial function-role of glucose metabolism and insulin signalling., *Arch Physiol Biochem.*, 113(3), 131-141, 2007
- Spillantini M. G, Goedert M., Synucleinopathies: past, present and future, *Neuropathol Appl Neurobiol.* 42, 3-5, 2016
- Stozicka Z., Zilka N., Novak P., Kovacech B., Bugos O., Novak M., Genetic background modifies neurodegeneration and neuroinflammation driven by misfolded human tau protein in rat model of tauopathy: Implication for immunomodulatory approach to Alzheimer's disease, *J. Neuroinflammation* 7, 64, 2010.
- Triba M. N., Le Moyec L., Amathieu R., Goossens C., Bouchemal N., Nahon P., Rutledge D. N., Savatin P., PLS/OPLS models in metabolomics: The impact of permutation of dataset rows on the K-fold cross-validation quality parameters., *Molecular Biosystems* 11, 13-19, 2015
- Tu, J., Yin, Y., Xu, M., Absolute quantitative lipidomics reveals lipidome-wide alterations in aging brain., *Metabolomics* 14(5), 2018
- Weingarten M. D., Lockwood A. H., Hwo, S. Y., Kirschner M. W., A protein factor essential for microtubule assembly., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 72(5), 1858-1862., 1975
- Whiley L., Sen A., Heaton J., Evidence of altered phosphatidylcholine metabolism in Alzheimer's disease., *Neurobiol Aging*, 35(2), 271-278, 2014
- Wold S., Sjöström M., Eriksson L., PLS-regression: a basic tool of chemometrics., *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 58, 109-130, 2001
- Wolfe M. S., The role of tau in neurodegenerative diseases and its potential as a therapeutic target., *Scientifica (Cairo)*, 796024, 2012

## POUŽITÁ LITERATURA

- Wong M. W., Braidy N., Poljak A., Pickford R., Thambisetty M., Sachdev P. S., Dysregulation of lipids in Alzheimer's disease and their role as potential biomarkers., *Alzheimers Dement*, 13(7), 810-827, 2017
- Worley B., Powers R., Multivariate analysis in metabolomics., *Current Metabolomics* 1, 92-107, 2013
- Worley B., Powers R., PCA as a practical indicator of OPLS-DA model reliability., *Current Metabolomics* 4, 97-103, 2016
- Xuan Q, Hu C, Yu D, et al., Development of a High Coverage Pseudotargeted Lipidomics Method Based on Ultra-High Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry., *Anal Chem.*, 90(12), 7608-7616, 2018
- Zilka N., Truncated tau from sporadic Alzheimer's disease suffices to drive neurofibrillary degeneration in vivo, *FEBS Lett.*, 580(15), 3582–3588, 2006.

## 10. Přílohy

Příloha 1. Parametry MRM přechodů negativního módu.

ID	Q1	Q3	RT [min]	DP [V]	CE [V]	CXP [V]
15:0-18:1(d7)						
PG_SPLASH_1	740.552	288.298	5.49	-80	-50	-15
15:0-18:1(d7)						
PG_SPLASH_2	740.552	153	5.49	-80	-50	-15
15:0-18:1(d7) PI_SPLASH_2	828.56	241	5.27	-80	-50	-15
FA 10:0	171.1	171.1	1.09	-80	-25	-16
FA 11:0	185.2	185.2	1.28	-80	-25	-16
FA 12:0	199.2	199.2	1.49	-80	-25	-16
FA 13:0	213.2	213.2	1.55	-80	-25	-16
FA 14:0	227.2	227.2	1.56	-80	-25	-16
FA 14:1	225.2	225.2	1.58	-80	-25	-16
FA 15:0	241.2	241.2	1.67	-80	-25	-16
FA 15:1	239.2	239.2	1.75	-80	-25	-16
FA 16:0	255.2	255.2	1.82	-80	-25	-16
FA 16:0_d3	258.3	258.3	1.84	-80	-25	-16
FA 16:1	253.2	253.2	1.97	-80	-25	-16
FA 17:0	269.2	269.2	1.95	-80	-25	-16
FA 17:1	267.2	267.2	2.1	-80	-25	-16
FA 17:2	265.2	265.2	2.11	-80	-25	-16
FA 18:0	283.3	283.3	2.21	-80	-25	-16
FA 18:0_d3	286.3	286.3	2.23	-80	-25	-16
FA 18:1	281.2	281.2	2.3	-80	-25	-16
FA 18:2	279.2	279.2	2.38	-80	-25	-16
FA 19:0	297.3	297.3	2.6	-80	-25	-16
FA 19:1	295.3	295.3	2.68	-80	-25	-16
FA 20:0	311.3	311.3	2.78	-80	-25	-16
FA 20:1	309.3	309.3	2.99	-80	-25	-16
FA 20:3	305.2	305.2	3.34	-80	-25	-16
FA 20:5	301.2	301.2	3.59	-80	-25	-16
FA 21:0	325.3	325.3	3.59	-80	-25	-16
FA 22:0	339.3	339.3	3.74	-80	-25	-16
FA 22:1	337.3	337.3	3.99	-80	-25	-16
FA 22:4	331.3	331.3	4.9	-80	-25	-16
FA 22:5	329.2	329.2	5.31	-80	-25	-16
FA 22:6	327.2	327.2	5.9	-80	-25	-16
FA 23:0	353.3	353.3	5.99	-80	-25	-16
FA 24:0	367.4	367.4	6.55	-80	-25	-16
PG(32:0)_PG(16:0/16:0)	721.503	255.233	5.72	-80	-45	-16
PG(32:0)_PG(18:0/14:0)	721.503	227.202	5.72	-80	-45	-16
PG(32:1)	719.5	153	5.08	-80	-45	-16
PG(32:1)_PG(14:0/18:1)	719.487	281.249	5.13	-80	-45	-16
PG(32:1)_PG(16:0/16:1)	719.487	253.217	5.13	-80	-45	-16
PG(34:0)_PG(16:0/18:0)	749.534	283.264	6.62	-80	-45	-16

## PŘÍLOHY

ID	Q1	Q3	RT [min]	DP [V]	CE [V]	CXP [V]
PG(34:1)	747.5	153	5.87	-80	-45	-16
PG(34:1)_PG(16:0/18:1)	747.518	281.249	5.92	-80	-45	-16
PG(34:1)_PG(18:0/16:1)	747.518	253.217	5.92	-80	-45	-16
PG(34:2)_PG(16:0/18:2)	745.503	279.233	5.33	-80	-45	-16
PG(34:2)_PG(18:1/16:1)	745.503	281.249	5.33	-80	-45	-16
PG(34:2-1)	745.5	153	5.28	-80	-45	-16
PG(35:1)	761.5	153	6.27	-80	-45	-16
PG(36:1)	775.5	153	6.72	-80	-45	-16
PG(36:1)_PG(16:0/20:1)	775.549	309.28	6.72	-80	-45	-16
PG(36:1)_PG(18:0/18:1)	775.549	281.249	6.72	-80	-45	-16
PG(36:1)_PG(20:0/16:1)	775.549	253.217	6.72	-80	-45	-16
PG(36:2)_PG(16:0/20:2)	773.534	307.264	6.02	-80	-45	-16
PG(36:2)_PG(18:0/18:2)	773.534	279.233	6.02	-80	-45	-16
PG(36:2)_PG(18:1/18:1)	773.534	281.249	6.02	-80	-45	-16
PG(36:2-1)	773.534	152.996	6.02	-80	-45	-16
PG(36:3)_PG(18:1/18:2)	771.518	279.233	5.13	-80	-45	-16
PG(36:4)	769.5	153	5.03	-80	-45	-16
PG(36:4)_PG(16:0/20:4)	769.503	303.233	5.03	-80	-45	-16
PG(36:4)_PG(18:2/18:2)	769.503	279.233	5.03	-80	-45	-16
PG(37:0)	791.6	153	7.72	-80	-45	-16
PG(37:1)	789.6	153	7.17	-80	-45	-16
PG(37:2)	787.5	153	6.62	-80	-45	-16
PG(37:3)	785.5	153	6.12	-80	-45	-16
PG(37:4)	783.5	153	5.62	-80	-45	-16
PG(38:1)_PG(20:0/18:1)	803.581	281.249	7.52	-80	-45	-16
PG(38:2)	801.6	153	6.92	-80	-45	-16
PG(38:2)_PG(18:1/20:1)	801.565	309.28	6.92	-80	-45	-16
PG(38:3)_PG(18:0/20:3)	799.549	305.249	6.32	-80	-45	-16
PG(38:4)_PG(16:0/22:4)	797.534	331.264	5.92	-80	-45	-16
PG(38:4)_PG(18:0/20:4)	797.534	303.233	5.92	-80	-45	-16
PG(38:4)_PG(18:1/20:3)	797.534	305.249	5.92	-80	-45	-16
PG(38:4-1)	797.5	153	5.92	-80	-45	-16
PG(38:5)_PG(18:1/20:4)	795.518	303.233	5.13	-80	-45	-16
PG(38:5-2)	795.5	153	5.08	-80	-45	-16
PG(38:6)_PG(16:0/22:6)	793.503	327.233	4.83	-80	-45	-16
PG(38:6)_PG(18:2/20:4)	793.503	303.233	4.83	-80	-45	-16
PG(38:6-2)	793.5	153	4.78	-80	-45	-16
PG(38:7)	791.5	153	4.43	-80	-45	-16
PG(39:1)	817.6	153	7.82	-80	-45	-16
PG(39:2)	815.6	153	7.22	-80	-45	-16
PG(39:3)	813.6	153	6.62	-80	-45	-16
PG(39:4)	811.5	153	6.07	-80	-45	-16
PG(39:5)	809.5	153	5.62	-80	-45	-16
PG(39:6)	807.5	153	5.13	-80	-45	-16
PG(40:1)_PG(20:0/20:1)	831.612	309.28	8.22	-80	-45	-16
PG(40:4)_PG(18:0/22:4)	825.565	331.264	6.42	-80	-45	-16
PG(40:5)_PG(18:0/22:5)	823.549	329.249	5.82	-80	-45	-16
PG(40:5)_PG(18:1/22:4)	823.549	331.264	5.82	-80	-45	-16
PG(40:6)_PG(18:1/22:5)	821.534	329.249	5.13	-80	-45	-16
PG(40:6)_PG(18:2/22:4)	821.534	331.264	5.13	-80	-45	-16
PG(40:7)_PG(18:1/22:6)	819.518	327.233	4.53	-80	-45	-16

PŘÍLOHY

ID	Q1	Q3	RT [min]	DP [V]	CE [V]	CXP [V]
PG(40:8)_PG(18:2/22:6)	817.503	327.233	4.23	-80	-45	-16
PG(41:4)	839.6	153	6.82	-80	-45	-16
PG(41:5)	837.6	153	6.22	-80	-45	-16
PG(41:6)	835.5	153	5.72	-80	-45	-16
PG(41:7)	833.5	153	5.33	-80	-45	-16
PG(43:6)	863.6	153	6.52	-80	-45	-16
PG(44:12)	865.5	153	3.73	-80	-45	-16
PI(30:0)	781.5	241	4.75	-70	-60	-16
PI(30:0)_PI(16:0/14:0)	781.487	227.202	4.8	-70	-60	-16
PI(32:0)	809.5	241	5.49	-70	-60	-16
PI(32:0)_PI(16:0/16:0)	809.518	255.233	5.49	-70	-60	-16
PI(32:1)_PI(16:0/16:1)	807.503	253.217	4.89	-70	-60	-16
PI(34:0)	837.5	241	6.29	-70	-60	-16
PI(34:0)_PI(16:0/18:0)	837.55	283.264	6.29	-70	-60	-16
PI(34:1)_PI(16:0/18:1)	835.534	281.249	5.69	-70	-60	-16
PI(34:1-1)	835.5	241	5.64	-70	-60	-16
PI(34:2)_PI(16:0/18:2)	833.518	279.233	5.09	-70	-60	-16
PI(34:2)_PI(18:1/16:1)	833.518	281.249	5.09	-70	-60	-16
PI(34:2-2)	833.5	241	5.09	-70	-60	-16
PI(35:1)	849.5	241	6.09	-70	-60	-16
PI(36:0)_PI(18:0/18:0)	865.581	283.264	6.88	-70	-60	-16
PI(36:1)_PI(16:0/20:1)	863.565	309.28	6.38	-70	-60	-16
PI(36:1)_PI(18:0/18:1)	863.565	281.249	6.38	-70	-60	-16
PI(36:1-2)	863.6	241	6.34	-70	-60	-16
PI(36:2)_PI(18:0/18:2)	861.55	279.233	5.79	-70	-60	-16
PI(36:2)_PI(18:1/18:1)	861.55	281.249	5.79	-70	-60	-16
PI(36:2-1)	861.5	241	5.79	-70	-60	-16
PI(36:3)_PI(16:0/20:3)	859.534	305.249	5.39	-70	-60	-16
PI(36:3-1)	859.5	241	5.34	-70	-60	-16
PI(36:4)_PI(16:0/20:4)	857.518	303.233	5.09	-70	-60	-16
PI(36:4-1)	857.5	241	5.09	-70	-60	-16
PI(37:4)	871.5	241	5.44	-70	-60	-16
PI(38:0)_PI(18:0/20:0)	893.612	283.264	7.88	-70	-60	-16
PI(38:1)_PI(20:0/18:1)	891.597	281.249	7.38	-70	-60	-16
PI(38:2)	889.6	241	6.78	-70	-60	-16
PI(38:2)_PI(18:1/20:1)	889.581	309.28	6.78	-70	-60	-16
PI(38:2)_PI(20:0/18:2)	889.581	279.233	6.78	-70	-60	-16
PI(38:3)	887.6	241	6.19	-70	-60	-16
PI(38:3)_PI(18:0/20:3)	887.565	305.249	6.19	-70	-60	-16
PI(38:4)_PI(16:0/22:4)	885.55	331.264	5.69	-70	-60	-16
PI(38:4)_PI(18:0/20:4)	885.55	283.3	5.69	-70	-60	-16
PI(38:4)_PI(18:1/20:3)	885.55	305.249	5.69	-70	-60	-16
PI(38:4-3)	885.5	241	5.64	-70	-60	-16
PI(38:5)_PI(16:0/22:5)	883.534	329.249	5.09	-70	-60	-16
PI(38:5)_PI(18:1/20:4)	883.534	303.233	5.09	-70	-60	-16
PI(38:5-1)	883.5	241	5.19	-70	-60	-16
PI(38:6)_PI(16:0/22:6)	881.518	327.233	4.6	-70	-60	-16
PI(38:6-2)	881.5	241	4.55	-70	-60	-16
PI(39:0)	907.6	241	8.27	-70	-60	-16
PI(39:1)	905.6	241	7.78	-70	-60	-16
PI(39:4)	899.6	241	6.19	-70	-60	-16

PŘÍLOHY

ID	Q1	Q3	RT [min]	DP [V]	CE [V]	CXP [V]
PI(39:6-2)	895.5	241	4.99	-70	-60	-16
PI(40:1)_PI(20:0/20:1)	919.628	309.28	7.88	-70	-60	-16
PI(40:4)_PI(18:0/22:4)	913.581	331.264	6.29	-70	-60	-16
PI(40:4)_PI(20:0/20:4)	913.581	303.233	6.29	-70	-60	-16
PI(40:4-2)	913.6	241	6.24	-70	-60	-16
PI(40:5)_PI(18:0/22:5)	911.565	329.249	5.99	-70	-60	-16
PI(40:5)_PI(18:1/22:4)	911.565	331.264	5.99	-70	-60	-16
PI(40:5-1)	911.6	241	5.84	-70	-60	-16
PI(40:6)_PI(18:0/22:6)	909.55	327.233	5.29	-70	-60	-16
PI(40:6-1)	909.5	241	5.59	-70	-60	-16
PI(40:7)_PI(18:1/22:6)	907.534	327.233	4.99	-70	-60	-16
PI(40:7-2)	907.5	241	4.99	-70	-60	-16
PI(40:8)	905.5	241	4.45	-70	-60	-16
PI(40:8)_PI(18:2/22:6)	905.518	327.233	4.5	-70	-60	-16
PI(42:10)	929.5	241	4.25	-70	-60	-16
PI(42:6)_PI(20:0/22:6)	937.581	327.233	6.09	-70	-60	-16
PI(44:5)	967.6	241	7.38	-70	-60	-16
PS(32:1)	732.5	645.5	5.12	-50	-35	-16
PS(33:0)	748.5	661.5	6.12	-50	-35	-16
PS(33:1)	746.5	659.5	5.64	-50	-35	-16
PS(34:0-1)	762.5	675.5	6.75	-50	-35	-16
PS(34:1)_PS(16:0/18:1)	760.513	281.249	5.85	-50	-35	-16
PS(34:1)_PS(18:0/16:1)	760.513	253.217	5.85	-50	-35	-16
PS(34:1-2)	760.5	673.5	5.8	-50	-35	-16
PS(34:2-1)	758.5	671.5	5.22	-50	-35	-16
PS(35:0)	776.5	689.5	7.12	-50	-35	-16
PS(35:1-1)	774.5	687.5	6.22	-50	-35	-16
PS(35:2)	772.5	685.5	5.8	-50	-35	-16
PS(36:0)_PS(18:0/18:0)	790.56	283.264	7.33	-50	-35	-16
PS(36:0-2)	790.6	703.6	7.33	-50	-35	-16
PS(36:1)_PS(18:0/18:1)	788.545	281.249	6.7	-50	-35	-16
PS(36:1-1)	788.5	701.5	6.64	-50	-35	-16
PS(36:2)_PS(18:0/18:2)	786.529	279.233	6.06	-50	-35	-16
PS(36:2)_PS(18:1/18:1)	786.529	281.249	6.06	-50	-35	-16
PS(36:2-1)	786.5	699.5	6.01	-50	-35	-16
PS(36:3-1)	784.5	697.5	5.38	-50	-35	-16
PS(36:4)_PS(16:0/20:4)	782.498	303.233	5.12	-50	-35	-16
PS(36:4-2)	782.5	695.5	5.12	-50	-35	-16
PS(37:2-2)	800.5	713.5	6.27	-50	-35	-16
PS(37:4)	796.5	709.5	5.59	-50	-35	-16
PS(38:0)	818.6	731.6	8.17	-50	-35	-16
PS(38:0)_PS(18:0/20:0)	818.592	283.264	8.17	-50	-35	-16
PS(38:1)	816.6	729.6	7.54	-50	-35	-16
PS(38:1)_PS(18:0/20:1)	816.576	309.28	7.54	-50	-35	-16
PS(38:1)_PS(20:0/18:1)	814.56	281.249	6.91	-50	-35	-16
PS(38:2)_PS(18:0/20:2)	814.56	307.264	6.91	-50	-35	-16
PS(38:2)_PS(18:1/20:1)	814.56	309.28	6.91	-50	-35	-16
PS(38:2)_PS(20:0/18:2)	814.561	279.234	6.91	-50	-35	-16
PS(38:2-1)	814.6	727.6	6.91	-50	-35	-16
PS(38:3)	812.5	725.5	6.38	-50	-35	-16
PS(38:3)_PS(18:0/20:3)	812.545	305.249	6.38	-50	-35	-16

PŘÍLOHY

ID	Q1	Q3	RT [min]	DP [V]	CE [V]	CXP [V]
PS(38:4)_PS(18:0/20:4)	810.529	303.233	5.96	-50	-35	-16
PS(38:4-1)	810.5	723.5	5.91	-50	-35	-16
PS(38:5)_PS(18:1/20:4)	808.513	303.233	5.33	-50	-35	-16
PS(38:5-1)	808.5	721.5	5.28	-50	-35	-16
PS(38:6-2)	806.5	719.5	4.59	-50	-35	-16
PS(38:7)	804.5	717.5	4.28	-50	-35	-16
PS(39:1)	830.6	743.6	7.96	-50	-35	-16
PS(39:2)	828.6	741.6	7.33	-50	-35	-16
PS(39:6)	820.5	733.5	5.34	-50	-35	-16
PS(40:1-1)	844.6	757.6	8.43	-50	-35	-16
PS(40:2-1)	842.6	755.6	7.75	-50	-35	-16
PS(40:3-1)	840.6	753.6	7.17	-50	-35	-16
PS(40:4)	838.6	751.6	6.64	-50	-35	-16
PS(40:4)_PS(18:0/22:4)	838.56	331.264	6.7	-50	-35	-16
PS(40:4)_PS(20:0/20:4)	838.56	303.233	6.7	-50	-35	-16
PS(40:5)	836.5	749.5	6.22	-50	-35	-16
PS(40:5)_PS(18:0/22:5)	836.545	329.249	6.27	-50	-35	-16
PS(40:5)_PS(18:1/22:4)	836.545	331.264	6.27	-50	-35	-16
PS(40:6)_PS(18:0/22:6)	834.529	327.233	5.75	-50	-35	-16
PS(40:6-2)	834.5	747.5	5.7	-50	-35	-16
PS(40:7)_PS(18:1/22:6)	832.513	327.233	5.22	-50	-35	-16
PS(40:7-1)	832.5	745.5	5.01	-50	-35	-16
PS(40:8-1)	830.5	743.5	4.49	-50	-35	-16
PS(41:2)	856.6	769.6	8.27	-50	-35	-16
PS(41:5)	850.6	763.6	6.7	-50	-35	-16
PS(41:6)	848.5	761.5	6.17	-50	-35	-16
PS(41:7)	846.5	759.5	5.64	-50	-35	-16
PS(42:10)	854.5	767.5	4.17	-50	-35	-16
PS(42:2)	870.6	783.6	8.59	-50	-35	-16
PS(42:4)	866.6	779.6	7.33	-50	-35	-16
PS(42:6)	862.6	775.6	6.17	-50	-35	-16
PS(42:6)_PS(20:0/22:6)	862.56	327.233	6.17	-50	-35	-16
PS(42:7)	860.5	773.5	5.64	-50	-35	-16
PS(42:8)	858.5	771.5	5.12	-50	-35	-16
PS(42:9)	856.5	769.5	4.59	-50	-35	-16
PS(43:5)	878.6	791.6	7.12	-50	-35	-16
PS(44:10)	882.5	795.5	4.85	-50	-35	-16
PS(44:11)	880.5	793.5	4.38	-50	-35	-16
PS(44:12)	878.5	791.5	4.01	-50	-35	-16
PS(44:6)	890.6	803.6	7.12	-50	-35	-16
PS(44:7)	888.6	801.6	6.54	-50	-35	-16
PS(44:8-2)	886.6	799.6	5.85	-50	-35	-16
PS(44:9)	884.5	797.5	5.38	-50	-35	-16



## PŘÍLOHY

Příloha 2. Parametry MRM přechodů pozitivního módu.

ID	Q1	Q3	RT [min]	DP [V]	CE [V]	CXP [V]
15:0-18:1(d7) DAG_SPLASH+NH4	605.5	346.3	8.9	60	26	15
15:0-18:1(d7)-15:0 TAG_SPLASH	829.37	570.5	12.75	60	38	15
18:1(d7) Chol Ester_SPLASH	675.68	369.4	13.14	60	43	15
18:1(d9) SM_SPLASH	738.663	184.2	6.98	60	43	15
CE(15:0)	628.6	369.4	12.77	100	20	6
CE(15:1)	626.6	369.4	12.28	100	20	6
CE(20:4)	690.6	369.4	12.46	100	20	6
CE(22:6)	714.6	369.4	12.16	100	20	6
Cer(33:2-3)_d18:1/15:1	522.5	264.3	6.84	100	40	6
Cer(34:0-2)_d18:0/16:0	540.5	266.3	8.09	100	40	6
Cer(34:0-3)_d20:0/14:0	540.5	312.3	8.09	100	40	6
Cer(34:1-4)_d18:1/16:0	538.5	264.3	7.85	100	40	6
Cer(34:2-1)_d16:0/18:2	536.5	238.3	7.14	100	40	6
Cer(34:2-7)_d18:2/16:0	536.5	262.2	7.14	100	40	6
Cer(35:0-3)_d20:0/15:0	554.6	312.3	8.5	100	40	6
Cer(35:1-4)_d16:1/19:0	552.5	236.2	8.25	100	40	6
Cer(35:2-1)_d18:0/17:2	550.5	266.3	7.64	100	40	6
Cer(35:2-3)_d18:1/17:1	550.5	264.3	7.64	100	40	6
Cer(35:3-1)_d18:1/17:2	548.5	264.3	7.04	100	40	6
Cer(35:3-2)_d18:2/17:1	548.5	262.2	7.04	100	40	6
Cer(35:4)_d18:2/17:2	546.5	262.2	6.44	100	40	6
Cer(36:0-2)_d18:0/18:0	568.6	266.3	8.95	100	40	6
Cer(36:0-3)_d20:0/16:0	568.6	312.3	8.95	100	40	6
Cer(36:1-2)_d16:0/20:1	566.6	238.3	8.7	100	40	6
Cer(36:1-3)_d18:1/18:0	566.6	264.3	8.7	100	40	6
Cer(36:2-5)_d18:1/18:1	564.5	264.3	8.05	100	40	6
Cer(36:2-6)_d18:2/18:0	564.5	262.2	8.05	100	40	6
Cer(36:3-1)_d18:2/18:1	562.5	262.2	7.44	100	40	6
Cer(36:4-1)_d16:0/20:4	560.5	238.3	6.84	100	40	6
Cer(36:4-2)_d18:0/18:4	560.5	266.3	6.84	100	40	6
Cer(36:4-4)_d18:1/18:3	560.5	264.3	6.84	100	40	6
Cer(36:4-5)_d18:2/18:2	560.5	262.2	6.84	100	40	6
Cer(36:5-3)_d18:1/18:4	558.5	264.3	6.24	100	40	6
Cer(36:6-2)_d18:2/18:4	556.5	262.2	5.73	100	40	6
Cer(37:0-2)_d18:0/19:0	582.6	266.3	9.2	100	40	6
Cer(37:2-1)_d20:0/17:2	578.6	312.3	8.35	100	40	6
Cer(37:2-3)_d20:1/17:1	578.6	264.3	8.35	100	40	6
Cer(38:0-2)_d18:0/20:0	596.6	266.3	9.7	100	40	6
Cer(38:0-3)_d20:0/18:0	596.6	312.3	9.7	100	40	6
Cer(38:1-3)_d18:1/20:0	594.6	264.3	9.45	100	40	6
Cer(38:2-3)_d20:0/18:2	592.6	312.3	8.85	100	40	6
Cer(38:2-4)_d16:1/22:1	592.6	236.2	8.85	100	40	6
Cer(38:2-5)_d18:1/20:1	592.6	264.3	8.85	100	40	6

PŘÍLOHY

ID	Q1	Q3	RT [min]	DP [V]	CE [V]	CXP [V]
Cer(38:2-6)_d18:2/20:0	592.6	262.2	8.85	100	40	6
Cer(38:2-7)_d20:1/18:1	592.6	310.3	8.85	100	40	6
Cer(38:3-3)_d20:0/18:3	590.6	312.3	8.35	100	40	6
Cer(38:3-6)_d20:1/18:2	590.6	310.3	8.35	100	40	6
Cer(38:3-7)_d18:2/20:1	590.6	262.2	8.35	100	40	6
Cer(38:4-1)_d16:0/22:4	588.5	238.3	7.85	100	40	6
Cer(38:4-2)_d18:0/20:4	588.5	266.3	7.85	100	40	6
Cer(38:4-3)_d20:0/18:4	588.5	312.3	7.85	100	40	6
Cer(38:4-4)_d16:1/22:3	588.5	236.2	7.85	100	40	6
Cer(38:4-5)_d18:1/20:3	588.5	264.3	7.85	100	40	6
Cer(38:4-6)_d20:1/18:3	588.5	310.3	7.85	100	40	6
Cer(38:4-7)_d18:2/20:2	588.5	262.2	7.85	100	40	6
Cer(38:5-2)_d18:0/20:5	586.5	266.3	7.34	100	40	6
Cer(38:5-3)_d16:1/22:4	586.5	236.2	7.34	100	40	6
Cer(38:5-4)_d18:1/20:4	586.5	264.3	7.34	100	40	6
Cer(38:6-1)_d18:1/20:5	584.5	264.3	6.79	100	40	6
Cer(38:6-3)_d16:1/22:5	584.5	236.2	6.79	100	40	6
Cer(38:6-4)_d18:2/20:4	584.5	262.2	6.79	100	40	6
Cer(38:7-1)_d18:2/20:5	582.5	262.2	6.24	100	40	6
Cer(39:2-2)_d18:2/21:0	606.6	262.2	9.15	100	40	6
Cer(40:0-2)_d18:0/22:0	624.6	266.3	10.41	100	40	6
Cer(40:1-2)_d16:0/24:1	622.6	238.3	10.16	100	40	6
Cer(40:2-4)_d18:1/22:1	620.6	264.3	9.55	100	40	6
Cer(40:3-1)_d18:0/22:3	618.6	266.3	8.95	100	40	6
Cer(40:3-4)_d18:1/22:2	618.6	264.3	8.95	100	40	6
Cer(40:3-5)_d18:2/22:1	618.6	262.2	8.95	100	40	6
Cer(40:4-1)_d18:0/22:4	616.6	266.3	8.45	100	40	6
Cer(40:4-3)_d18:1/22:3	616.6	264.3	8.45	100	40	6
Cer(40:4-4)_d20:1/20:3	616.6	310.3	8.45	100	40	6
Cer(40:4-5)_d18:2/22:2	616.6	262.2	8.45	100	40	6
Cer(40:5-1)_d18:0/22:5	614.6	266.3	7.95	100	40	6
Cer(40:5-2)_d20:0/20:5	614.6	312.3	7.95	100	40	6
Cer(40:5-3)_d18:1/22:4	614.6	264.3	7.95	100	40	6
Cer(40:5-5)_d18:2/22:3	614.6	262.2	7.95	100	40	6
Cer(40:6-1)_d18:0/22:6	612.5	266.3	7.44	100	40	6
Cer(40:6-2)_d18:1/22:5	612.5	264.3	7.44	100	40	6
Cer(40:6-3)_d20:1/20:5	612.5	310.3	7.44	100	40	6
Cer(40:6-4)_d18:2/22:4	612.5	262.2	7.44	100	40	6
Cer(40:7-1)_d18:1/22:6	610.5	264.3	6.94	100	40	6
Cer(40:7-2)_d18:2/22:5	610.5	262.2	6.94	100	40	6
Cer(41:0-2)_d18:0/23:0	638.6	266.3	10.81	100	40	6
Cer(41:1-2)_d18:1/23:0	636.6	264.3	10.56	100	40	6
Cer(42:0-2)_d18:0/24:0	652.7	266.3	11.21	100	40	6
Cer(42:1-3)_d18:1/24:0	650.6	264.3	10.96	100	40	6
Cer(42:2-3)_d18:1/24:1	648.6	264.3	10.26	100	40	6
Cer(42:3-3)_d18:2/24:1	646.6	262.2	9.7	100	40	6
Cer(42:5-1)_d20:0/22:5	642.6	312.3	8.75	100	40	6

## PŘÍLOHY

ID	Q1	Q3	RT [min]	DP [V]	CE [V]	CXP [V]
Cer(44:2-2)_d18:1/26:1	676.7	264.3	11.01	100	40	6
Cer(44:3)_d18:2/26:1	674.6	264.3	10.31	100	40	6
DG(30:0-3)_DG(12:0/18:0)	558.5	257.2	8.32	100	30	6
DG(30:0-5)_DG(14:0/16:0)	558.5	285.2	8.32	100	30	6
DG(31:0-2)_DG(11:0/20:0)	572.5	243.2	8.72	100	30	6
DG(31:0-4)_DG(13:0/18:0)	572.5	271.2	8.72	100	30	6
DG(31:1-6)_DG(15:0/16:1)	570.5	299.3	8.11	100	30	6
DG(32:0-1)_DG(10:0/22:0)	586.5	229.2	9.13	100	30	6
DG(32:0-3)_DG(12:0/20:0)	586.5	257.2	9.13	100	30	6
DG(32:0-5)_DG(14:0/18:0)	586.5	285.2	9.13	100	30	6
DG(32:0-7)_DG(16:0/16:0)	586.5	313.3	9.13	100	30	6
DG(32:1-8)_DG(16:0/16:1)	584.5	313.3	8.46	100	30	6
DG(32:2-8)_DG(16:0/16:2)	582.5	313.3	7.8	100	30	6
DG(32:3-6)_DG(16:1/16:2)	580.5	311.3	7.19	100	30	6
DG(32:5-2)_DG(12:0/20:5)	576.5	257.2	6.01	100	30	6
DG(33:0-4)_DG(13:0/20:0)	600.6	271.2	9.49	100	30	6
DG(33:0-6)_DG(15:0/18:0)	600.6	299.3	9.49	100	30	6
DG(33:1-5)_DG(15:0/18:1)	598.5	299.3	8.87	100	30	6
DG(33:1-7)_DG(16:0/17:1)	598.5	313.3	8.87	100	30	6
DG(33:2-6)_DG(16:0/17:2)	596.5	313.3	8.26	100	30	6
DG(34:0-7)_DG(16:0/18:0)	614.6	313.3	9.84	100	30	6
DG(34:1-3)_DG(14:0/20:1)	612.6	285.2	9.23	100	30	6
DG(34:1-7)_DG(16:0/18:1)	612.6	313.3	9.23	100	30	6
DG(34:1-9)_DG(17:0/17:1)	612.6	327.3	9.23	100	30	6
DG(34:2-2)_DG(14:0/20:2)	610.5	285.2	8.62	100	30	6
DG(34:2-5)_DG(16:0/18:2)	610.5	313.3	8.62	100	30	6
DG(34:3-3)_DG(16:1/18:2)	608.5	311.3	8	100	30	6
DG(34:4-6)_DG(17:2/17:2)	606.5	323.3	7.59	100	30	6
DG(34:4-7)_DG(18:2/16:2)	606.5	337.3	7.59	100	30	6
DG(34:5-5)_DG(18:3/16:2)	604.5	335.3	7.08	100	30	6
DG(35:0-1)_DG(10:0/25:0)	628.6	229.2	10.2	100	30	6
DG(35:1-8)_DG(17:0/18:1)	626.6	327.3	9.59	100	30	6
DG(35:2-1)_DG(13:0/22:2)	624.6	271.2	8.92	100	30	6
DG(35:2-4)_DG(16:1/19:1)	624.6	311.3	8.92	100	30	6
DG(35:2-5)_DG(17:0/18:2)	624.6	327.3	8.92	100	30	6
DG(35:2-7)_DG(17:2/18:0)	624.6	323.3	8.92	100	30	6
DG(35:4-2)_DG(15:0/20:4)	620.5	299.3	7.75	100	30	6
DG(36:0-6)_DG(15:0/21:0)	642.6	299.3	10.51	100	30	6
DG(36:0-7)_DG(16:0/20:0)	642.6	313.3	10.51	100	30	6
DG(36:0-9)_DG(18:0/18:0)	642.6	341.3	10.51	100	30	6
DG(36:1-2)_DG(14:0/22:1)	640.6	285.2	10	100	30	6
DG(36:1-5)_DG(16:0/20:1)	640.6	313.3	10	100	30	6
DG(36:1-9)_DG(18:0/18:1)	640.6	341.3	10	100	30	6
DG(36:2-7)_DG(18:0/18:2)	638.6	341.3	9.43	100	30	6
DG(36:2-8)_DG(18:1/18:1)	638.6	339.3	9.43	100	30	6
DG(36:3-2)_DG(16:0/20:3)	636.6	313.3	8.87	100	30	6
DG(36:3-3)_DG(16:1/20:2)	636.6	311.3	8.87	100	30	6

# PŘÍLOHY

ID	Q1	Q3	RT [min]	DP [V]	CE [V]	CXP [V]
DG(36:3-6)_DG(18:1/18:2)	636.6	339.3	8.87	100	30	6
DG(36:4-2)_DG(16:0/20:4)	634.5	313.3	8.31	100	30	6
DG(36:4-3)_DG(16:1/20:3)	634.5	311.3	8.31	100	30	6
DG(36:4-6)_DG(18:2/18:2)	634.5	337.3	8.31	100	30	6
DG(36:5-2)_DG(14:1/22:4)	632.5	283.2	7.75	100	30	6
DG(36:6-1)_DG(14:0/22:6)	630.5	285.2	7.29	100	30	6
DG(37:4-2)_DG(17:0/20:4)	648.6	327.3	8.82	100	30	6
DG(37:5-4)_DG(17:1/20:4)	646.5	325.3	8.31	100	30	6
DG(38:1-7)_DG(18:0/20:1)	668.6	341.3	10.66	100	30	6
DG(38:2-6)_DG(18:1/20:1)	666.6	339.3	10.15	100	30	6
DG(38:3-2)_DG(18:0/20:3)	664.6	341.3	9.64	100	30	6
DG(38:4-1)_DG(16:0/22:4)	662.6	313.3	9.13	100	30	6
DG(38:4-2)_DG(18:0/20:4)	662.6	341.3	9.13	100	30	6
DG(38:5-4)_DG(18:1/20:4)	660.6	339.3	8.62	100	30	6
DG(38:5-6)_DG(18:2/20:3)	660.6	337.3	8.62	100	30	6
DG(38:6-1)_DG(16:0/22:6)	658.5	313.3	8.05	100	30	6
DG(38:6-2)_DG(16:1/22:5)	658.5	311.3	8.05	100	30	6
DG(38:6-4)_DG(18:2/20:4)	658.5	337.3	8.05	100	30	6
DG(38:7-3)_DG(18:3/20:4)	656.5	335.3	7.49	100	30	6
DG(39:4-4)_DG(19:0/20:4)	676.6	355.3	9.33	100	30	6
DG(39:5-1)_DG(17:0/22:5)	674.6	327.3	8.77	100	30	6
DG(39:6-3)_DG(17:2/22:4)	672.6	323.3	8.21	100	30	6
DG(40:1-3)_DG(16:0/24:1)	696.7	313.3	11.33	100	30	6
DG(40:1-7)_DG(18:1/22:0)	696.7	339.3	11.33	100	30	6
DG(40:1-8)_DG(19:1/21:0)	696.7	353.3	11.33	100	30	6
DG(40:2-8)_DG(24:0/16:2)	694.6	425.4	10.76	100	30	6
DG(40:4-1)_DG(18:0/22:4)	690.6	341.3	9.64	100	30	6
DG(40:4-3)_DG(18:3/22:1)	690.6	335.3	9.64	100	30	6
DG(40:4-5)_DG(20:0/20:4)	690.6	369.3	9.64	100	30	6
DG(40:4-6)_DG(20:1/20:3)	690.6	367.3	9.64	100	30	6
DG(40:5-2)_DG(18:1/22:4)	688.6	339.3	9.13	100	30	6
DG(40:5-6)_DG(20:1/20:4)	688.6	367.3	9.13	100	30	6
DG(40:6-1)_DG(18:0/22:6)	686.6	341.3	8.62	100	30	6
DG(40:6-6)_DG(20:2/20:4)	686.6	365.3	8.62	100	30	6
DG(40:7-1)_DG(18:1/22:6)	684.6	339.3	8.16	100	30	6
DG(41:0-5)_DG(19:0/22:0)	712.7	355.3	12.3	100	30	6
DG(41:1-5)_DG(18:1/23:0)	710.7	339.3	11.73	100	30	6
DG(41:2-2)_DG(17:2/24:0)	708.7	323.3	11.17	100	30	6
DG(41:2-5)_DG(19:1/22:1)	708.7	353.3	11.17	100	30	6
DG(41:2-7)_DG(26:1/15:1)	708.7	451.4	11.17	100	30	6
DG(41:3-2)_DG(18:3/23:0)	706.6	335.3	10.56	100	30	6
DG(42:10-1)_DG(20:4/22:6)	706.5	361.3	7.39	100	30	6
DG(42:1-1)_DG(16:1/26:0)	724.7	311.3	12.14	100	30	6
DG(42:1-4)_DG(18:1/24:0)	724.7	339.3	12.14	100	30	6
DG(42:2-2)_DG(18:1/24:1)	722.7	339.3	11.58	100	30	6
DG(42:2-7)_DG(26:1/16:1)	722.7	451.4	11.58	100	30	6
DG(42:3-4)_DG(22:0/20:3)	720.7	397.4	11.07	100	30	6

PŘÍLOHY

ID	Q1	Q3	RT [min]	DP [V]	CE [V]	CXP [V]
DG(42:6-3)_DG(20:2/22:4)	714.6	365.3	9.54	100	30	6
DG(42:8-4)_DG(20:5/22:3)	710.6	359.3	8.41	100	30	6
DG(43:0-3)_DG(19:0/24:0)	740.7	355.3	13.06	100	30	6
DG(43:1-2)_DG(18:1/25:0)	738.7	339.3	12.5	100	30	6
DG(43:4-2)_DG(20:4/23:0)	732.7	361.3	10.81	100	30	6
DG(44:11)_DG(22:6/22:5)	732.6	385.3	7.7	100	30	6
DG(44:12)_DG(22:6/22:6)	730.5	385.3	7.19	100	30	6
DG(44:5-1)_DG(20:4/24:1)	744.7	361.3	10.76	100	30	6
DG(45:5-2)_DG(25:0/20:5)	758.7	439.4	11.07	100	30	6
DG(46:3-1)_DG(26:0/20:3)	776.7	453.4	12.5	100	30	6
DG(46:5-4)_DG(26:1/20:4)	772.7	451.4	11.43	100	30	6
DG(47:4)_DG(25:0/22:4)	788.7	439.4	12.35	100	30	6
DG(47:6)_DG(25:0/22:6)	784.7	439.4	11.27	100	30	6
Hex2Cer(32:1-4)_d18:1/14:0	834.6	264.3	5.88	100	45	6
Hex2Cer(34:1-4)_d18:1/16:0	862.6	264.3	6.9	100	45	6
Hex2Cer(40:1-3)_d18:1/22:0	946.7	264.3	9.4	100	45	6
Hex2Cer(42:2-2)_d18:1/24:1	972.7	264.3	9.4	100	45	6
Hex2Cer(42:2-3)_d20:1/22:1	972.7	310.3	9.45	100	45	6
HexCer(32:1-4)_d18:1/14:0	672.5	264.3	6.19	100	45	6
HexCer(34:1-1)_d20:0/14:1	700.6	312.3	7.21	100	45	6
HexCer(34:1-4)_d18:1/16:0	700.6	264.3	7.21	100	45	6
HexCer(34:1-5)_d18:0/16:1	700.6	266.3	7.21	100	45	6
HexCer(34:1-6)_d20:1/14:0	700.6	310.3	7.21	100	45	6
HexCer(35:1-2)_d20:0/15:1	714.6	266.3	7.67	100	45	6
HexCer(36:0-1)_d16:0/20:0	730.6	238.3	8.33	100	45	6
HexCer(36:0-2)_d18:0/18:0	730.6	266.3	8.33	100	45	6
HexCer(36:0-3)_d20:0/16:0	730.6	312.3	8.33	100	45	6
HexCer(36:1-1)_d16:1/20:0	728.6	236.2	8.02	100	45	6
HexCer(36:1-3)_d18:1/18:0	728.6	264.3	8.02	100	45	6
HexCer(36:1-4)_d18:0/18:1	728.6	266.3	8.02	100	45	6
HexCer(36:1-5)_d20:1/16:0	728.6	310.3	8.02	100	45	6
HexCer(36:2-2)_d18:0/18:2	726.6	266.3	7.31	100	45	6
HexCer(36:2-5)_d18:1/18:1	726.6	264.3	7.31	100	45	6
HexCer(36:2-7)_d18:2/18:0	726.6	262.2	7.31	100	45	6
HexCer(37:1-3)_d16:1/21:0	742.6	236.2	8.48	100	45	6
HexCer(37:1-4)_d18:1/19:0	742.6	264.3	8.48	100	45	6
HexCer(37:1-5)_d20:1/17:0	742.6	310.3	8.48	100	45	6
HexCer(38:1-3)_d18:1/20:0	756.6	264.3	8.89	100	45	6
HexCer(38:1-4)_d18:0/20:1	756.6	266.3	8.89	100	45	6
HexCer(38:1-5)_d20:1/18:0	756.6	310.3	8.89	100	45	6
HexCer(38:2-2)_d18:0/20:2	754.6	266.3	8.17	100	45	6
HexCer(38:2-4)_d16:1/22:1	754.6	236.2	8.17	100	45	6
HexCer(38:2-5)_d18:1/20:1	754.6	264.3	8.17	100	45	6
HexCer(38:2-6)_d20:1/18:1	754.6	310.3	8.17	100	45	6
HexCer(38:2-7)_d18:2/20:0	754.6	262.2	8.17	100	45	6
HexCer(39:1-3)_d18:1/21:0	770.7	264.3	9.29	100	45	6
HexCer(40:1-3)_d18:1/22:0	784.7	264.3	9.7	100	45	6

# PŘÍLOHY

ID	Q1	Q3	RT [min]	DP [V]	CE [V]	CXP [V]
HexCer(40:1-4)_d18:0/22:1	784.7	266.3	9.7	100	45	6
HexCer(40:2-1)_d18:0/22:2	782.7	266.3	9.09	100	45	6
HexCer(40:2-3)_d16:1/24:1	782.7	236.2	9.09	100	45	6
HexCer(40:2-4)_d18:1/22:1	782.7	264.3	9.09	100	45	6
HexCer(40:2-5)_d20:1/20:1	782.7	310.3	9.09	100	45	6
HexCer(40:2-6)_d18:2/22:0	782.7	262.2	9.09	100	45	6
HexCer(41:1-2)_d18:1/23:0	798.7	264.3	10.12	100	45	6
HexCer(42:1-3)_d18:1/24:0	812.7	264.3	10.41	100	45	6
HexCer(42:1-4)_d18:0/24:1	812.7	266.3	10.41	100	45	6
HexCer(42:2-2)_d18:1/24:1	810.7	264.3	9.9	100	45	6
HexCer(42:2-5)_d18:2/24:0	810.7	262.2	9.9	100	45	6
HexCer(42:3-1)_d20:0/22:3	808.7	312.3	9.42	100	45	6
HexCer(42:3-3)_d18:2/24:1	808.7	262.2	9.42	100	45	6
HexCer(42:4-1)_d20:0/22:4	806.7	312.3	8.84	100	45	6
HexCer(42:4-2)_d20:1/22:3	806.7	310.3	8.84	100	45	6
HexCer(44:2-2)_d20:1/24:1	838.7	310.3	10.72	100	45	6
HexCer(44:3)_d18:2/26:1	836.7	262.2	10.21	100	45	6
LPC(13:0)	454.3	184.1	1.14	110	40	6
LPC(14:0)	468.3	184.1	1.28	110	40	6
LPC(14:1)	466.3	184.1	1.13	110	40	6
LPC(15:0-1)	482.3	184.1	1.42	110	40	6
LPC(15:0-2)	482.3	184.1	2.04	110	40	6
LPC(15:1-1)	480.3	184.1	1.23	110	40	6
LPC(15:1-2)	480.3	184.11	1.65	110	40	6
LPC(16:0)	496.3	184.1	1.6	110	60	6
LPC(16:1)	494.3	184.1	1.37	110	40	6
LPC(16:2)	492.3	184.1	1.24	110	40	6
LPC(17:0)	510.4	184.1	1.74	110	40	6
LPC(17:1)	508.3	184.1	1.52	110	40	6
LPC(17:2)	506.3	184.1	1.33	110	40	6
LPC(18:0)	524.4	184.1	1.98	110	60	6
LPC(18:1)	522.4	184.1	1.71	110	60	6
LPC(18:1)(d7)_SPLASH	529.4	184.1	1.66	110	40	6
LPC(18:2)	520.3	184.1	1.46	110	40	6
LPC(18:3)	518.3	184.1	1.27	110	40	6
LPC(19:0)	538.4	184.1	2.22	110	40	6
LPC(20:0)	552.4	184.1	2.56	110	40	6
LPC(20:1)	550.4	184.1	2.13	110	40	6
LPC(20:2)	548.4	184.1	1.7	110	40	6
LPC(20:3)	546.4	184.1	1.56	110	40	6
LPC(20:4)	544.3	184.1	1.38	110	40	6
LPC(20:5)	542.3	184.1	1.26	110	40	6
LPC(21:0)	566.4	184.1	2.93	110	40	6
LPC(22:0)	580.4	184.1	3.41	110	40	6
LPC(22:1)	578.4	184.1	2.75	110	40	6
LPC(22:2)	576.4	184.1	2.5	110	40	6
LPC(22:4)	572.4	184.1	1.66	110	40	6

PŘÍLOHY

ID	Q1	Q3	RT [min]	DP [V]	CE [V]	CXP [V]
LPC(22:5-1)	570.4	184.1	1.42	110	40	6
LPC(22:5-2)	570.4	184.1	1.76	110	40	6
LPC(22:6)	568.3	184.1	1.37	110	40	6
LPC(24:0)	608.5	184.1	4.36	110	40	6
LPC(24:1)	606.5	184.1	3.45	110	40	6
LPC(25:0)	622.5	184.1	4.73	110	40	6
LPC(26:0)	636.5	184.1	5.3	110	40	6
LPC(26:1)	634.5	184.1	4.35	110	40	6
LPC(O-16:0)	482.4	184.1	1.7	100	40	6
LPC(O-16:1)	480.3	184.1	1.65	100	40	6
LPC(O-18:0)	510.4	184.11	2.21	100	40	6
LPC(O-18:1)	508.4	184.1	1.8	100	40	6
LPC(O-18:2-1)	506.4	184.1	1.49	100	40	6
LPC(O-18:2-2)	506.4	184.11	1.9	100	40	6
LPC(O-18:3-1)	504.3	184.1	1.29	100	40	6
LPC(O-18:3-2)	504.3	184.1	1.69	100	40	6
LPC(O-20:0)	538.4	184.1	2.94	100	40	6
LPC(O-20:1)	536.4	184.1	2.25	100	40	6
LPE(14:0)	426.3	285.2	1.31	100	25	6
LPE(15:0)	440.3	299.3	1.44	100	25	6
LPE(15:1)	438.3	297.2	1.26	100	25	6
LPE(16:0)	454.3	313.3	1.55	100	25	6
LPE(16:1)	452.3	311.3	1.35	100	25	6
LPE(17:0)	468.3	327.3	1.77	100	25	6
LPE(17:1)	466.3	325.3	1.58	100	25	6
LPE(17:2)	464.3	323.3	1.4	100	25	6
LPE(18:0)	482.3	341.3	1.99	100	25	6
LPE(18:1)	480.3	339.3	1.63	100	25	6
LPE(18:1)(d7)_SPLASH	487.3	346.3	1.67	100	25	6
LPE(18:2)	478.3	337.3	1.41	100	25	6
LPE(19:1)	494.3	353.3	1.95	100	25	6
LPE(20:1)	508.3	367.3	2.17	100	25	6
LPE(20:2)	506.3	365.3	1.86	100	25	6
LPE(20:3)	504.3	363.3	1.54	100	25	6
LPE(20:4)	502.3	361.3	1.4	100	25	6
LPE(22:0)	538.4	397.4	3.18	100	25	6
LPE(22:1)	536.4	395.4	2.72	100	25	6
LPE(22:2)	534.4	393.3	2.31	100	25	6
LPE(22:3)	532.3	391.3	1.95	100	25	6
LPE(22:4)	530.3	389.3	1.63	100	25	6
LPE(22:5)	528.3	387.3	1.49	100	25	6
LPE(22:6)	526.3	385.3	1.35	100	25	6
LPE(O-18:1)	488.3	347.3	2.23	100	30	6
LPE(O-18:2)	486.3	345.3	1.88	100	30	6
LPE(O-18:3)	484.3	343.3	1.6	100	30	6
PC(15:0-18:1)(d7)_SPLASH	753.6	184.1	7.39	100	60	6
PC(20:0)	566.4	184.11	2.73	100	40	6

## PŘÍLOHY

ID	Q1	Q3	RT [min]	DP [V]	CE [V]	CXP [V]
PC(21:0)	580.4	184.1	3.05	100	40	6
PC(23:0)	608.4	184.1	3.82	100	40	6
PC(24:1)	620.4	184.1	3.79	100	40	6
PC(25:1)	634.4	184.1	4.15	100	40	6
PC(26:0)	650.5	184.1	5.07	100	40	6
PC(27:0)	664.5	184.1	5.46	100	40	6
PC(27:2)	660.5	184.1	4.54	100	40	6
PC(28:0)	678.5	184.1	5.81	100	40	6
PC(28:1)	676.5	184.1	5.32	100	40	6
PC(28:2)	674.5	184.1	4.83	100	40	6
PC(29:0)	692.5	184.1	6.32	100	40	6
PC(29:1)	690.5	184.1	5.83	100	40	6
PC(30:0)	706.5	184.1	6.78	100	60	6
PC(30:1)	704.5	184.1	6.22	100	40	6
PC(30:2)	702.5	184.1	5.71	100	40	6
PC(30:3)	700.5	184.1	5.22	100	40	6
PC(30:5)	696.5	184.1	4.18	100	40	6
PC(31:0)	720.6	184.1	7.09	100	40	6
PC(31:1)	718.5	184.1	6.53	100	40	6
PC(31:2)	716.5	184.1	6.02	100	40	6
PC(32:0)	734.6	184.1	7.55	100	60	6
PC(32:1)	732.6	184.1	6.93	100	60	6
PC(32:2)	730.5	184.1	6.34	100	40	6
PC(32:3)	728.5	184.1	5.78	100	40	6
PC(33:0-1)	748.6	184.1	8.02	100	60	6
PC(33:1)	746.6	184.1	7.41	100	60	6
PC(33:2)	744.6	184.1	6.8	100	60	6
PC(33:3)	742.5	184.1	6.19	100	40	6
PC(33:6)	736.5	184.1	4.59	100	40	6
PC(34:0)	762.6	184.1	8.36	100	60	6
PC(34:1)	760.6	184.1	7.77	100	60	6
PC(34:2)	758.6	184.1	7.16	100	60	6
PC(34:3-1)	756.6	184.1	6.37	100	40	6
PC(34:3-2)	756.6	184.11	6.73	100	40	6
PC(34:4)	754.5	184.1	5.86	100	40	6
PC(34:6)	750.5	184.1	5.05	100	40	6
PC(35:0-1)	776.6	184.1	8.82	100	40	6
PC(35:1)	774.6	184.1	8.28	100	60	6
PC(35:2)	772.6	184.1	7.66	100	40	6
PC(35:3)	770.6	184.1	6.95	100	40	6
PC(35:4)	768.6	184.1	6.47	100	40	6
PC(35:5-1)	766.5	184.1	5.98	100	40	6
PC(35:6)	764.5	184.1	5.46	100	40	6
PC(36:0)	790.6	184.1	9.18	100	60	6
PC(36:1-1)	788.6	184.1	8.64	100	60	6
PC(36:2-1)	786.6	184.1	7.82	100	60	6
PC(36:2-2)	786.6	184.1	8	100	60	6



## PŘÍLOHY

ID	Q1	Q3	RT [min]	DP [V]	CE [V]	CXP [V]
PC(36:3-1)	784.6	184.1	7.46	100	60	6
PC(36:4-1)	782.6	184.1	7.06	100	60	6
PC(36:4-2)	782.6	184.11	6.6	100	40	6
PC(36:5)	780.6	184.1	6.49	100	40	6
PC(36:6)	778.5	184.1	5.91	100	40	6
PC(36:7)	776.5	184.1	5.35	100	40	6
PC(36:8)	774.5	184.1	4.86	100	40	6
PC(37:0)	804.6	184.1	9.61	100	40	6
PC(37:1-1)	802.6	184.1	8.93	100	40	6
PC(37:2-1)	800.6	184.1	8.44	100	60	6
PC(37:3-1)	798.6	184.1	7.9	100	40	6
PC(37:4)	796.6	184.1	7.39	100	40	6
PC(37:5)	794.6	184.1	6.9	100	40	6
PC(37:6)	792.6	184.1	6.27	100	40	6
PC(37:7)	790.5	184.1	5.76	100	40	6
PC(38:0)	818.7	184.1	10.01	100	40	6
PC(38:1-1)	816.6	184.1	9.3	100	60	6
PC(38:2-1)	814.6	184.1	8.67	100	60	6
PC(38:3)	812.6	184.1	8.24	100	60	6
PC(38:4-1)	810.6	184.1	7.65	100	60	6
PC(38:4-2)	810.6	184.1	8.02	100	60	6
PC(38:5-1)	808.6	184.1	7.41	100	60	6
PC(38:6-1)	806.6	184.1	6.55	100	60	6
PC(38:6-2)	806.6	184.11	6.85	100	60	6
PC(38:7-1)	804.6	184.11	5.9	100	40	6
PC(38:8)	802.5	184.1	5.42	100	40	6
PC(39:0)	832.7	184.1	10.35	100	40	6
PC(39:1-1)	830.7	184.1	9.74	100	40	6
PC(39:2)	828.6	184.1	9.15	100	40	6
PC(39:3)	826.6	184.1	8.62	100	40	6
PC(39:4-1)	824.6	184.1	8.43	100	40	6
PC(39:5-1)	822.6	184.1	7.49	100	40	6
PC(39:6)	820.6	184.1	7.29	100	40	6
PC(39:7)	818.6	184.1	6.78	100	40	6
PC(39:8)	816.6	184.1	6.07	100	40	6
PC(40:0)	846.7	184.1	10.76	100	40	6
PC(40:1-1)	844.7	184.1	10.2	100	40	6
PC(40:2-1)	842.7	184.1	9.53	100	60	6
PC(40:3)	840.6	184.1	9.04	100	40	6
PC(40:4-1)	838.6	184.1	8.82	100	60	6
PC(40:4-2)	838.6	184.1	8.47	100	60	6
PC(40:5-1)	836.6	184.1	7.95	100	60	6
PC(40:5-3)	836.6	184.11	8.28	100	60	6
PC(40:6-1)	834.6	184.1	7.71	100	60	6
PC(40:6-2)	834.6	184.1	7.33	100	60	6
PC(40:7)	832.6	184.1	7.05	100	60	6
PC(40:8-1)	830.6	184.1	6.29	100	40	6

# PŘÍLOHY

ID	Q1	Q3	RT [min]	DP [V]	CE [V]	CXP [V]
PC(41:0)	860.7	184.1	11.12	100	40	6
PC(41:1)	858.7	184.1	10.5	100	40	6
PC(41:2-1)	856.7	184.1	9.94	100	40	6
PC(41:3)	854.7	184.1	9.45	100	40	6
PC(41:4)	852.6	184.1	8.89	100	40	6
PC(41:5-1)	850.6	184.1	8.38	100	40	6
PC(41:6)	848.6	184.1	7.92	100	40	6
PC(41:7)	846.6	184.1	7.39	100	40	6
PC(42:0)	874.7	184.1	11.47	100	40	6
PC(42:1)	872.7	184.1	10.83	100	40	6
PC(42:10)	854.6	184.1	6.09	100	40	6
PC(42:2-1)	870.7	184.1	10.37	100	40	6
PC(42:3)	868.7	184.1	9.64	100	40	6
PC(42:4)	866.7	184.1	9.13	100	40	6
PC(42:5-1)	864.6	184.1	8.84	100	40	6
PC(42:5-2)	864.6	184.1	8.41	100	40	6
PC(42:6)	862.6	184.1	8.13	100	40	6
PC(42:7)	860.6	184.1	7.8	100	60	6
PC(42:8)	858.6	184.1	7.11	100	40	6
PC(42:9)	856.6	184.1	6.44	100	40	6
PC(43:0)	888.7	184.1	11.95	100	40	6
PC(43:1)	886.7	184.1	11.34	100	40	6
PC(43:2-1)	884.7	184.1	10.66	100	40	6
PC(43:3)	882.7	184.1	10.04	100	40	6
PC(43:4)	880.7	184.1	9.43	100	40	6
PC(43:5)	878.7	184.1	8.92	100	40	6
PC(43:6)	876.6	184.1	8.43	100	40	6
PC(44:1)	900.7	184.1	11.49	100	40	6
PC(44:10)	882.6	184.1	6.8	100	40	6
PC(44:11-1)	880.6	184.1	6.39	100	40	6
PC(44:12)	878.6	184.1	5.93	100	60	6
PC(44:2)	898.7	184.1	10.88	100	40	6
PC(44:3)	896.7	184.1	10.22	100	40	6
PC(44:4)	894.7	184.1	9.66	100	40	6
PC(44:5)	892.7	184.1	9.15	100	40	6
PC(44:6)	890.7	184.1	8.64	100	40	6
PC(44:7)	888.6	184.1	8.11	100	40	6
PC(44:8)	886.6	184.1	7.67	100	40	6
PC(44:9)	884.6	184.1	7.21	100	40	6
PC(45:1)	914.8	184.1	12.19	100	40	6
PC(45:2)	912.7	184.1	11.57	100	40	6
PC(45:3)	910.7	184.1	10.96	100	40	6
PC(45:4)	908.7	184.1	10.35	100	40	6
PC(45:5)	906.7	184.1	9.81	100	40	6
PC(45:6)	904.7	184.1	9.25	100	40	6
PC(46:4)	922.7	184.1	10.91	100	40	6
PC(46:5)	920.7	184.1	10.37	100	40	6

## PŘÍLOHY

ID	Q1	Q3	RT [min]	DP [V]	CE [V]	CXP [V]
PC(46:6)	918.7	184.1	9.79	100	40	6
PC(46:7)	916.7	184.1	9.23	100	40	6
PC(47:5)	934.7	184.1	10.78	100	40	6
PC(48:5)	948.7	184.1	11.14	100	40	6
PC(48:7)	944.7	184.1	9.99	100	40	6
PC(O-26:0)	636.5	184.111	5.65	100	40	6
PC(O-28:0)	664.5	184.11	6.45	100	40	6
PC(O-29:3)	672.5	184.1	5.75	100	40	6
PC(O-30:0)	692.6	184.1	7.29	100	40	6
PC(O-30:1-1)	690.5	184.11	6.85	100	40	6
PC(O-30:1-2)	690.5	184.1	7.19	100	40	6
PC(O-30:3)	686.5	184.1	6.25	100	40	6
PC(O-31:1-1)	704.6	184.1	7.34	100	40	6
PC(O-31:1-2)	704.6	184.11	7.64	100	40	6
PC(O-31:3)	700.5	184.11	6.65	100	40	6
PC(O-32:0)	720.6	184.1	8.14	100	40	6
PC(O-32:1-1)	718.6	184.1	7.54	100	60	6
PC(O-32:1-2)	718.6	184.1	8.09	100	60	6
PC(O-32:2)	716.6	184.1	7.54	100	40	6
PC(O-32:3)	714.5	184.1	7.04	100	40	6
PC(O-32:4)	712.5	184.11	6.55	100	40	6
PC(O-33:1-1)	732.6	184.1	7.89	100	40	6
PC(O-33:1-2)	732.6	184.11	8.34	100	60	6
PC(O-33:2-1)	730.6	184.1	7.24	100	40	6
PC(O-33:2-2)	730.6	184.11	7.74	100	40	6
PC(O-33:3)	728.6	184.1	7.04	100	40	6
PC(O-33:4)	726.5	184.11	6.55	100	40	6
PC(O-34:0)	748.6	184.1	8.99	100	60	6
PC(O-34:1-1)	746.6	184.11	8.39	100	60	6
PC(O-34:1-2)	746.6	184.1	8.89	100	60	6
PC(O-34:2-1)	744.6	184.1	7.64	100	60	6
PC(O-34:2-2)	744.6	184.11	8.24	100	60	6
PC(O-34:3-1)	742.6	184.1	7.34	100	40	6
PC(O-34:3-2)	742.6	184.1	7.79	100	40	6
PC(O-34:4-1)	740.6	184.1	6.85	100	40	6
PC(O-34:4-2)	740.6	184.1	7.29	100	40	6
PC(O-34:5-1)	738.5	184.1	6.3	100	40	6
PC(O-34:5-2)	738.5	184.11	6.75	100	40	6
PC(O-35:0)	762.6	184.1	9.33	100	60	6
PC(O-35:2-1)	758.6	184.11	8.29	100	40	6
PC(O-35:3)	756.6	184.111	7.89	100	40	6
PC(O-35:4)	754.6	184.1	7.44	100	40	6
PC(O-35:5)	752.6	184.1	6.95	100	40	6
PC(O-36:0)	776.7	184.1	9.63	100	40	6
PC(O-36:1-1)	774.6	184.11	9.09	100	60	6
PC(O-36:1-2)	774.6	184.1	9.48	100	60	6
PC(O-36:2-1)	772.6	184.1	8.54	100	60	6

PŘÍLOHY

ID	Q1	Q3	RT [min]	DP [V]	CE [V]	CXP [V]
PC(O-36:2-2)	772.6	184.11	8.99	100	60	6
PC(O-36:3-1)	770.6	184.1	7.99	100	60	6
PC(O-36:3-2)	770.6	184.11	8.44	100	60	6
PC(O-36:4-1)	768.6	184.1	7.54	100	60	6
PC(O-36:4-2)	768.6	184.11	7.99	100	60	6
PC(O-36:5-1)	766.6	184.1	7.09	100	40	6
PC(O-36:5-2)	766.6	184.1	7.54	100	40	6
PC(O-36:6-1)	764.6	184.1	6.55	100	40	6
PC(O-36:6-2)	764.6	184.11	6.99	100	40	6
PC(O-36:7)	762.5	184.1	6.55	100	40	6
PC(O-37:1-1)	788.7	184.1	9.58	100	60	6
PC(O-37:3)	784.6	184.11	8.64	100	40	6
PC(O-38:0)	804.7	184.1	10.38	100	40	6
PC(O-38:1-1)	802.7	184.1	9.88	100	40	6
PC(O-38:1-2)	802.7	184.1	10.33	100	40	6
PC(O-38:2-1)	800.7	184.1	9.33	100	60	6
PC(O-38:2-2)	800.7	184.11	9.78	100	60	6
PC(O-38:3-1)	798.6	184.1	8.74	100	60	6
PC(O-38:3-2)	798.6	184.11	9.24	100	60	6
PC(O-38:4-1)	796.6	184.1	8.14	100	40	6
PC(O-38:4-2)	796.6	184.11	8.64	100	40	6
PC(O-38:5-1)	794.6	184.11	7.74	100	40	6
PC(O-38:5-2)	794.6	184.1	8.19	100	40	6
PC(O-38:6-1)	792.6	184.11	7.29	100	40	6
PC(O-38:6-2)	792.6	184.1	7.64	100	40	6
PC(O-38:7)	790.6	184.11	7.14	100	40	6
PC(O-38:8)	788.6	184.1	6.65	100	40	6
PC(O-39:2)	814.7	184.1	10.13	100	40	6
PC(O-39:3)	812.7	184.1	9.63	100	40	6
PC(O-40:1-1)	830.7	184.11	10.63	100	40	6
PC(O-40:1-2)	830.7	184.111	10.93	100	40	6
PC(O-40:2-1)	828.7	184.1	10.08	100	40	6
PC(O-40:2-2)	828.7	184.1	10.53	100	40	6
PC(O-40:3-1)	826.7	184.1	9.53	100	40	6
PC(O-40:3-2)	826.7	184.1	10.03	100	40	6
PC(O-40:4-1)	824.7	184.1	9.19	100	40	6
PC(O-40:4-2)	824.7	184.1	9.73	100	40	6
PC(O-40:5-1)	822.6	184.11	8.74	100	40	6
PC(O-40:6-1)	820.6	184.1	8.19	100	40	6
PC(O-40:6-2)	820.6	184.11	8.74	100	40	6
PC(O-40:7)	818.6	184.11	8.14	100	40	6
PC(O-40:8)	816.6	184.11	7.64	100	40	6
PC(O-41:0)	846.7	184.1	11.53	100	40	6
PC(O-41:2)	842.7	184.1	10.93	100	40	6
PC(O-41:3)	840.7	184.1	10.43	100	40	6
PC(O-42:1-1)	858.7	184.1	11.23	100	40	6
PC(O-42:1-2)	858.7	184.11	11.62	100	40	6

## PŘÍLOHY

ID	Q1	Q3	RT [min]	DP [V]	CE [V]	CXP [V]
PC(O-42:2-1)	856.7	184.1	10.58	100	40	6
PC(O-42:2-2)	856.7	184.11	10.98	100	40	6
PC(O-42:3-1)	854.7	184.11	9.93	100	40	6
PC(O-42:3-2)	854.7	184.1	10.33	100	40	6
PC(O-42:4-1)	852.7	184.1	9.33	100	40	6
PC(O-42:4-2)	852.7	184.11	10.03	100	40	6
PC(O-42:5-1)	850.7	184.1	8.74	100	40	6
PC(O-42:5-2)	850.7	184.11	9.14	100	40	6
PC(O-42:6-1)	848.7	184.1	9.09	100	40	6
PC(O-42:6-2)	848.7	184.1	9.43	100	40	6
PC(O-42:7-1)	846.6	184.1	8.19	100	40	6
PC(O-42:8)	844.6	184.1	8.34	100	40	6
PC(O-43:3)	868.7	184.11	11.03	100	40	6
PC(O-44:2-2)	884.7	184.11	11.92	100	40	6
PC(O-44:3-1)	882.7	184.11	11.13	100	40	6
PC(O-44:3-2)	882.7	184.111	11.53	100	40	6
PC(O-44:4-1)	880.7	184.1	10.63	100	40	6
PC(O-44:4-2)	880.7	184.11	11.18	100	40	6
PE(15:0-18:1)(d7)_SPLASH	711.5	570.5	7.57	100	30	6
PE(32:0)	692.5	551.5	7.83	100	30	6
PE(32:1)	690.5	549.5	7.17	100	30	6
PE(33:0)	706.5	565.5	8.23	100	30	6
PE(33:1)	704.5	563.5	7.58	100	30	6
PE(34:0)	720.6	579.5	8.64	100	30	6
PE(34:1)	718.5	577.5	7.98	100	50	6
PE(34:2)	716.5	575.5	7.33	100	30	6
PE(34:3-1)	714.5	573.5	6.87	100	30	6
PE(34:3-2)	714.5	573.5	6.62	100	30	6
PE(34:4)	712.5	571.5	6.17	100	30	6
PE(35:0)	734.6	593.6	9.04	100	30	6
PE(35:1)	732.6	591.5	8.38	100	30	6
PE(35:2)	730.5	589.5	7.73	100	30	6
PE(35:4)	726.5	585.5	6.77	100	30	6
PE(35:5)	724.5	583.5	6.22	100	30	6
PE(35:6)	722.5	581.5	5.71	100	30	6
PE(36:0)	748.6	607.6	9.44	100	30	6
PE(36:1-1)	746.6	605.6	8.74	100	50	6
PE(36:2-1)	744.6	603.5	8.03	100	50	6
PE(36:3-1)	742.5	601.5	7.63	100	30	6
PE(36:4)	740.5	599.5	7.28	100	50	6
PE(36:5-1)	738.5	597.5	6.57	100	30	6
PE(36:6)	736.5	595.5	6.12	100	30	6
PE(36:7)	734.5	593.5	5.61	100	30	6
PE(37:0)	762.6	621.6	9.85	100	30	6
PE(37:1)	760.6	619.6	9.14	100	30	6
PE(37:2)	758.6	617.6	8.48	100	30	6
PE(37:3)	756.6	615.5	7.98	100	30	6

## PŘÍLOHY

ID	Q1	Q3	RT [min]	DP [V]	CE [V]	CXP [V]
PE(37:4)	754.5	613.5	7.78	100	30	6
PE(37:5)	752.5	611.5	7.02	100	30	6
PE(37:6)	750.5	609.5	6.57	100	30	6
PE(37:7)	748.5	607.5	6.07	100	30	6
PE(38:0)	776.6	635.6	10.25	100	30	6
PE(38:1)	774.6	633.6	9.49	100	30	6
PE(38:2)	772.6	631.6	8.87	100	30	6
PE(38:3-1)	770.6	629.6	8.43	100	30	6
PE(38:3-3)	770.6	629.6	8.74	100	30	6
PE(38:4-1)	768.6	627.5	7.75	100	50	6
PE(38:4-3)	768.6	627.51	8.18	100	50	6
PE(38:5-1)	766.5	625.5	7.38	100	50	6
PE(38:6)	764.5	623.5	7	100	50	6
PE(38:7-1)	762.5	621.5	6.27	100	30	6
PE(38:8)	760.5	619.5	5.71	100	30	6
PE(39:1)	788.6	647.6	10.1	100	30	6
PE(39:2)	786.6	645.6	9.54	100	30	6
PE(39:3)	784.6	643.6	9.09	100	30	6
PE(39:4-1)	782.6	641.6	8.59	100	30	6
PE(39:5-1)	780.6	639.5	8.09	100	30	6
PE(39:6)	778.5	637.5	7.48	100	30	6
PE(39:7)	776.5	635.5	6.87	100	30	6
PE(40:2)	800.6	659.6	9.74	100	30	6
PE(40:3)	798.6	657.6	9.24	100	30	6
PE(40:4-1)	796.6	655.6	8.94	100	30	6
PE(40:5)	794.6	653.6	8.13	100	50	6
PE(40:6-1)	792.6	651.5	7.63	100	50	6
PE(40:7)	790.5	649.5	7.22	100	50	6
PE(40:8)	788.5	647.5	6.42	100	30	6
PE(40:9-1)	786.5	645.5	5.81	100	30	6
PE(41:1)	816.6	675.6	10.85	100	30	6
PE(41:2)	814.6	673.6	10.3	100	30	6
PE(41:4)	810.6	669.6	9.24	100	30	6
PE(41:5)	808.6	667.6	8.74	100	30	6
PE(41:6)	806.6	665.6	8.18	100	30	6
PE(41:7)	804.6	663.5	7.53	100	30	6
PE(42:1)	830.7	689.6	10.95	100	30	6
PE(42:10)	812.5	671.5	6.22	100	30	6
PE(42:2)	828.6	687.6	10.65	100	30	6
PE(42:4)	824.6	683.6	9.24	100	30	6
PE(42:5)	822.6	681.6	8.94	100	30	6
PE(42:6)	820.6	679.6	8.64	100	30	6
PE(42:7)	818.6	677.6	7.98	100	30	6
PE(42:8)	816.6	675.5	7.27	100	30	6
PE(42:9)	814.5	673.5	6.72	100	30	6
PE(43:6)	834.6	693.6	8.43	100	30	6
PE(44:10)	840.6	699.5	6.97	100	50	6

# PŘÍLOHY

ID	Q1	Q3	RT [min]	DP [V]	CE [V]	CXP [V]
PE(44:11)	838.5	697.5	6.42	100	30	6
PE(44:12)	836.5	695.5	6.12	100	30	6
PE(44:5)	850.6	709.6	9.64	100	30	6
PE(44:7)	846.6	705.6	8.64	100	30	6
PE(44:8)	844.6	703.6	8.08	100	30	6
PE(44:9)	842.6	701.6	7.53	100	30	6
PE(O-30:1-1)_16:0p/14:0	648.5	364	7.47	100	30	6
PE(O-30:2-1)_16:0p/14:1	646.5	364	7	100	30	6
PE(O-32:0)	678.5	537.5	8.39	100	30	6
PE(O-32:1)	676.5	535.5	7.88	100	30	6
PE(O-32:1-1)_16:0p/16:0	676.5	364	8.34	100	30	6
PE(O-32:2)	674.5	533.5	7.39	100	30	6
PE(O-32:2-1)_16:0p/16:1	674.5	364	7.66	100	30	6
PE(O-32:2-3)_18:1p/14:0	674.5	390	7.69	100	30	6
PE(O-33:2-1)_16:0p/17:1	688.5	364	8.14	100	30	6
PE(O-33:2-4)_18:1p/15:0	688.5	390	8.59	100	30	6
PE(O-34:0)	706.6	565.6	9.11	100	30	6
PE(O-34:1)	704.6	563.5	8.58	100	30	6
PE(O-34:1-1)_16:0p/18:0	704.6	364	9.13	100	30	6
PE(O-34:1-2)_18:0p/16:0	704.6	392	9.13	100	30	6
PE(O-34:1-3)_20:0p/14:0	704.6	420	9.13	100	30	6
PE(O-34:2)	702.5	561.51	8.04	100	30	6
PE(O-34:2-1)_16:0p/18:1	702.5	364	8.47	100	50	6
PE(O-34:2-2)_18:0p/16:1	702.5	392	8.47	100	30	6
PE(O-34:2-3)_20:0p/14:1	702.5	420	8.47	100	30	6
PE(O-34:2-4)_18:1p/16:0	702.5	390	8.42	100	30	6
PE(O-34:3)	700.5	559.5	7.44	100	30	6
PE(O-34:3-1)_16:0p/18:2	700.5	364	7.84	100	30	6
PE(O-34:3-3)_18:1p/16:1	700.5	390	7.84	100	30	6
PE(O-34:3-5)_18:2p/16:0	700.5	388	7.79	100	30	6
PE(O-34:4)	698.5	557.5	6.94	100	30	6
PE(O-35:0)	720.6	579.6	9.49	100	30	6
PE(O-35:2)	716.6	575.5	8.42	100	30	6
PE(O-35:2-1)_16:0p/19:1	716.6	364	8.88	100	30	6
PE(O-35:2-2)_18:0p/17:1	716.6	392	8.98	100	30	6
PE(O-35:3-2)_18:1p/17:1	714.5	390	8.29	100	30	6
PE(O-35:4-1)_18:1p/17:2	712.5	390	7.69	100	30	6
PE(O-36:0)	734.6	593.61	9.9	100	30	6
PE(O-36:1)	732.6	591.6	9.36	100	30	6
PE(O-36:1-1)_16:0p/20:0	732.6	364	9.93	100	30	6
PE(O-36:1-2)_18:0p/18:0	732.6	392	9.93	100	30	6
PE(O-36:2)	730.6	589.6	8.81	100	30	6
PE(O-36:2-1)_16:0p/20:1	730.6	364	9.18	100	50	6
PE(O-36:2-2)_18:0p/18:1	730.6	392	9.38	100	50	6
PE(O-36:2-3)_20:0p/16:1	730.6	420	9.28	100	30	6
PE(O-36:2-4)_18:1p/18:0	730.6	390	9.18	100	30	6
PE(O-36:2-5)_20:1p/16:0	730.6	418	9.28	100	30	6

PŘÍLOHY

ID	Q1	Q3	RT [min]	DP [V]	CE [V]	CXP [V]
PE(O-36:3)	728.6	587.5	8.15	100	30	6
PE(O-36:3-1)_16:0p/20:2	728.6	364	8.78	100	30	6
PE(O-36:3-2)_18:0p/18:2	728.6	392	8.78	100	30	6
PE(O-36:3-4)_18:1p/18:1	728.6	390	8.58	100	50	6
PE(O-36:3-5)_20:1p/16:1	728.6	418	8.78	100	30	6
PE(O-36:4)	726.5	585.5	7.93	100	30	6
PE(O-36:4-1)_16:0p/20:3	726.5	364	8.09	100	30	6
PE(O-36:4-3)_18:1p/18:2	726.5	390	7.99	100	30	6
PE(O-36:4-5)_18:2p/18:1	726.5	388	7.99	100	30	6
PE(O-36:5)	724.5	583.51	7.34	100	30	6
PE(O-36:5-1)_16:0p/20:4	724.5	364	7.79	100	30	6
PE(O-36:6-1)_16:0p/20:5	722.5	364	7.19	100	30	6
PE(O-37:1)	746.6	605.61	9.65	100	50	6
PE(O-37:2-1)_18:0p/19:1	744.6	392	9.58	100	30	6
PE(O-37:3-2)_18:1p/19:1	742.6	390	8.98	100	30	6
PE(O-38:1)	760.6	619.6	10.08	100	30	6
PE(O-38:1-2)_18:0p/20:0	760.6	392	10.53	100	30	6
PE(O-38:2)	758.6	617.61	9.51	100	30	6
PE(O-38:2-2)_18:0p/20:1	758.6	392	9.93	100	30	6
PE(O-38:2-3)_20:0p/18:1	758.6	420	10.03	100	30	6
PE(O-38:2-4)_18:1p/20:0	758.6	390	10.08	100	30	6
PE(O-38:2-5)_20:1p/18:0	758.6	418	10.08	100	30	6
PE(O-38:3)	756.6	615.6	8.88	100	30	6
PE(O-38:3-1)_16:0p/22:2	756.6	364	9.48	100	30	6
PE(O-38:3-2)_18:0p/20:2	756.6	392	9.68	100	30	6
PE(O-38:3-4)_18:1p/20:1	756.6	390	9.43	100	50	6
PE(O-38:3-5)_20:1p/18:1	756.6	418	9.39	100	30	6
PE(O-38:3-6)_18:2p/20:0	756.6	388	9.43	100	30	6
PE(O-38:4)	754.6	613.6	8.46	100	30	6
PE(O-38:4-1)_16:0p/22:3	754.6	364	9.08	100	30	6
PE(O-38:4-2)_18:0p/20:3	754.6	392	9.08	100	30	6
PE(O-38:4-4)_18:1p/20:2	754.6	390	8.83	100	30	6
PE(O-38:4-5)_20:1p/18:4	754.6	418	8.76	100	30	6
PE(O-38:4-6)_18:2p/20:1	754.6	388	8.88	100	30	6
PE(O-38:5)	752.6	611.5	8.04	100	30	6
PE(O-38:5-1)_16:0p/22:4	752.6	364	8.48	100	30	6
PE(O-38:5-2)_18:0p/20:4	752.6	392	8.68	100	30	6
PE(O-38:5-3)_20:0p/18:4	752.6	420	8.34	100	30	6
PE(O-38:5-4)_18:1p/20:3	752.6	390	8.19	100	30	6
PE(O-38:5-6)_18:2p/20:2	752.6	388	8.19	100	30	6
PE(O-38:6)	750.5	609.5	7.39	100	30	6
PE(O-38:6-1)_16:0p/22:5	750.5	364	7.79	100	30	6
PE(O-38:6-2)_18:0p/20:5	750.5	392	8.09	100	30	6
PE(O-38:6-3)_18:1p/20:4	750.5	390	7.99	100	50	6
PE(O-38:7-1)_16:0p/22:6	748.5	364	7.59	100	50	6
PE(O-38:7-2)_18:1p/20:5	748.5	390	7.29	100	30	6
PE(O-38:7-3)_18:2p/20:4	748.5	388	7.29	100	30	6



PŘÍLOHY

ID	Q1	Q3	RT [min]	DP [V]	CE [V]	CXP [V]
PE(O-39:3-1)_20:1p/19:1	770.6	418	9.68	100	30	6
PE(O-40:2)	786.6	645.6	10.18	100	30	6
PE(O-40:2-2)_18:0p/22:1	786.6	392	10.58	100	30	6
PE(O-40:2-3)_20:0p/20:1	786.6	420	10.58	100	30	6
PE(O-40:3)	784.6	643.6	9.68	100	30	6
PE(O-40:3-3)_18:1p/22:1	784.6	390	10.08	100	30	6
PE(O-40:3-4)_20:1p/20:1	784.6	418	9.88	100	30	6
PE(O-40:4)	782.6	641.61	9.23	100	30	6
PE(O-40:4-1)_18:0p/22:3	782.6	392	9.73	100	30	6
PE(O-40:4-3)_18:1p/22:2	782.6	390	9.43	100	30	6
PE(O-40:4-4)_20:1p/20:2	782.6	418	9.43	100	30	6
PE(O-40:5)	780.6	639.6	8.68	100	30	6
PE(O-40:5-1)_18:0p/22:4	780.6	392	9.18	100	30	6
PE(O-40:5-2)_20:0p/20:4	780.6	420	9.43	100	30	6
PE(O-40:5-6)_18:1p/22:3	780.6	390	8.83	100	30	6
PE(O-40:5-7)_20:1p/18:3	780.6	418	9.03	100	30	6
PE(O-40:5-9)_18:2p/22:2	780.6	388	8.58	100	30	6
PE(O-40:6)	778.6	637.6	8.09	100	30	6
PE(O-40:6-2)_18:0p/22:5	778.6	392	8.58	100	30	6
PE(O-40:6-3)_20:0p/20:5	778.6	420	8.58	100	30	6
PE(O-40:6-6)_18:1p/22:4	778.6	390	8.48	100	50	6
PE(O-40:6-7)_20:1p/20:4	778.6	418	8.63	100	30	6
PE(O-40:6-9)_18:2p/22:3	778.6	388	8.58	100	30	6
PE(O-40:7-2)_18:0p/22:6	776.6	392	8.43	100	50	6
PE(O-40:7-6)_18:1p/22:5	776.6	390	7.99	100	30	6
PE(O-40:7-8)_18:2p/22:4	776.6	388	8.09	100	30	6
PE(O-40:8-1)_18:1p/22:6	774.5	390	7.69	100	30	6
PE(O-40:9)_18:2p/22:6	772.5	388	7.09	100	30	6
PE(O-42:0)	818.7	677.7	11.98	100	30	6
PE(O-42:3-2)_18:1p/24:1	812.7	390	10.68	100	30	6
PE(O-42:4)	810.6	669.61	9.78	100	30	6
PE(O-42:4-2)_20:1p/22:2	810.6	418	10.18	100	30	6
PE(O-42:5)	808.6	667.6	9.28	100	30	6
PE(O-42:5-1)_20:0p/22:4	808.6	420	9.68	100	30	6
PE(O-42:5-2)_20:1p/22:3	808.6	418	9.68	100	30	6
PE(O-42:6)	806.6	665.6	8.78	100	30	6
PE(O-42:6-1)_20:0p/22:5	806.6	420	9.18	100	30	6
PE(O-42:6-2)_20:1p/22:4	806.6	418	9.18	100	30	6
PE(O-42:7-1)_20:0p/22:6	804.6	420	9.18	100	30	6
PE(O-42:7-2)_20:1p/22:5	804.6	418	8.68	100	30	6
PE(O-42:8)_20:1p/22:6	802.6	418	8.19	100	30	6
SM(28:0)	621.5	184.1	4.48	110	40	6
SM(28:1)	619.5	184.1	3.97	110	40	6
SM(29:0)	635.5	184.1	5	110	40	6
SM(30:1)	647.5	184.1	4.84	110	40	6
SM(31:1)	661.5	184.1	5.25	110	40	6
SM(32:0)	677.6	184.1	6.02	110	40	6

## PŘÍLOHY

ID	Q1	Q3	RT [min]	DP [V]	CE [V]	CXP [V]
SM(32:1)	675.5	184.1	5.82	110	40	6
SM(32:2)	673.5	184.1	5	110	40	6
SM(33:0)	691.6	184.1	6.53	110	40	6
SM(33:1)	689.6	184.1	6.28	110	40	6
SM(33:3)	685.5	184.1	5	110	40	6
SM(34:0)	705.6	184.1	7.15	110	40	6
SM(34:1)	703.6	184.1	6.74	110	40	6
SM(34:2)	701.6	184.1	5.92	110	40	6
SM(34:3)	699.5	184.1	5.51	110	40	6
SM(34:5)	695.5	184.1	4.33	110	40	6
SM(35:0)	719.6	184.1	7.56	110	40	6
SM(35:1)	717.6	184.1	7.05	110	40	6
SM(35:2)	715.6	184.1	6.38	110	40	6
SM(36:0)	733.6	184.1	7.97	110	40	6
SM(36:1)	731.6	184.1	7.71	110	60	6
SM(36:2)	729.6	184.1	6.89	110	40	6
SM(37:0)	747.6	184.1	8.58	110	60	6
SM(37:1)	745.6	184.1	8.12	110	60	6
SM(37:2)	743.6	184.1	7.46	110	40	6
SM(37:3)	741.6	184.1	6.89	110	40	6
SM(38:0)	761.7	184.1	8.84	110	60	6
SM(38:1)	759.6	184.1	8.58	110	60	6
SM(38:2)	757.6	184.1	7.92	110	40	6
SM(38:3)	755.6	184.1	7.05	110	40	6
SM(38:4)	753.6	184.1	6.48	110	60	6
SM(38:6)	749.6	184.1	5.3	110	40	6
SM(39:0)	775.7	184.1	9.4	110	60	6
SM(39:1)	773.7	184.1	9.04	110	60	6
SM(39:2)	771.6	184.1	8.38	110	60	6
SM(40:0)	789.7	184.1	9.76	110	40	6
SM(40:1)	787.7	184.1	9.35	110	60	6
SM(40:2)	785.7	184.1	8.78	110	40	6
SM(40:3)	783.6	184.1	8.02	110	60	6
SM(40:4)	781.6	184.1	7.46	110	60	6
SM(40:5)	779.6	184.1	6.84	110	40	6
SM(40:6)	777.6	184.1	6.23	110	40	6
SM(40:7)	775.6	184.1	5.61	110	40	6
SM(40:8)	773.6	184.1	5	110	40	6
SM(41:0)	803.7	184.1	10.27	110	40	6
SM(41:1)	801.7	184.1	9.92	110	40	6
SM(41:2)	799.7	184.1	9.1	110	40	6
SM(42:0)	817.7	184.1	10.53	110	40	6
SM(42:1)	815.7	184.1	10.22	110	40	6
SM(42:2)	813.7	184.1	9.61	110	60	6
SM(42:3)	811.7	184.1	8.84	110	40	6
SM(42:4)	809.7	184.1	8.12	110	60	6
SM(42:5)	807.6	184.1	7.46	110	60	6

PŘÍLOHY

ID	Q1	Q3	RT [min]	DP [V]	CE [V]	CXP [V]
SM(42:6)	805.6	184.1	6.84	110	60	6
SM(42:7)	803.6	184.1	6.23	110	40	6
SM(43:0)	831.7	184.1	11.15	110	40	6
SM(43:1)	829.7	184.1	10.43	110	40	6
SM(43:2)	827.7	184.1	9.81	110	40	6
SM(44:1)	843.7	184.1	10.89	110	40	6
SM(44:2)	841.7	184.1	10.12	110	40	6
SM(44:3)	839.7	184.1	9.51	110	40	6
SM(45:1)	857.7	184.1	11.35	110	40	6
SM(46:1)	871.8	184.1	11.76	110	40	6
SM(46:2)	869.7	184.1	11.15	110	40	6
TG(40:0)_FA16:0	712.645	439.378	11.3	100	35	6
TG(42:0)_FA10:0	740.7	551.5	11.89	100	35	6
TG(42:1)_FA16:0	738.661	465.394	11.5	100	35	6
TG(42:1)_FA16:1	738.661	467.409	11.5	100	35	6
TG(42:1)_FA18:1	738.7	439.4	11.5	100	35	6
TG(43:0)_FA14:0	754.7	509.5	12.04	100	35	6
TG(43:0)_FA16:0	754.7	481.4	12.06	100	35	6
TG(43:1)_FA16:1	752.7	481.4	11.74	100	35	6
TG(44:0)_FA14:0	768.7	523.5	12.28	100	35	6
TG(44:0)_FA16:0	768.7	495.4	12.27	100	35	6
TG(44:0)_FA18:0	768.708	467.409	12.28	100	35	6
TG(44:1)_FA14:0	766.7	521.5	11.95	100	35	6
TG(44:1)_FA16:0	766.7	493.4	11.94	100	35	6
TG(44:1)_FA16:1	766.692	495.441	11.99	100	35	6
TG(44:1)_FA18:1	766.7	467.4	11.9	100	35	6
TG(44:2)_FA18:2	764.7	467.4	11.54	100	35	6
TG(45:0)_FA14:0	782.723	537.488	12.48	100	35	6
TG(45:0)_FA15:0	782.7	523.5	12.48	100	35	6
TG(45:0)_FA16:0	782.7	509.7	12.45	100	35	6
TG(45:1)_FA16:0	780.7	507.4	12.23	100	35	6
TG(45:1)_FA16:1	780.7	509.5	12.18	100	35	6
TG(45:2)_FA16:1	778.7	507.4	11.84	100	35	6
TG(46:0)_FA14:0	796.7	551.503	12.67	100	35	6
TG(46:0)_FA16:0	796.7	523.5	12.68	100	35	6
TG(46:0)_FA18:0	796.7	495.441	12.67	100	35	6
TG(46:1)_FA14:0	794.7	549.5	12.38	100	35	6
TG(46:1)_FA16:0	794.7	521.5	12.34	100	35	6
TG(46:1)_FA16:1	794.7	523.472	12.38	100	35	6
TG(46:1)_FA18:1	794.7	495.441	12.38	100	35	6
TG(46:2)_FA14:0	792.7	547.5	11.99	100	35	6
TG(46:2)_FA16:1	792.7	521.5	11.96	100	35	6
TG(46:3)_FA16:0	790.7	517.4	11.69	100	35	6
TG(46:3)_FA16:1	790.7	519.4	11.6	100	35	6
TG(47:0)_FA14:0	810.7	565.5	12.87	100	35	6
TG(47:0)_FA16:0	810.8	537.8	12.9	100	35	6
TG(47:0)_FA17:0	810.7	523.472	12.87	100	35	6

# PŘÍLOHY

ID	Q1	Q3	RT [min]	DP [V]	CE [V]	CXP [V]
TG(47:1)_FA14:0	808.7	563.5	12.58	100	35	6
TG(47:1)_FA16:0	808.7	535.5	12.62	100	35	6
TG(47:1)_FA16:1	808.7	537.4	12.58	100	35	6
TG(47:1)_FA17:0	808.7	521.4	12.58	100	35	6
TG(47:1)_FA18:1	808.7	509.5	12.58	100	35	6
TG(47:2)_FA14:0	806.7	561.5	12.33	100	35	6
TG(47:2)_FA15:0	806.7	547.5	12.23	100	35	6
TG(47:2)_FA16:0	806.7	533.5	12.43	100	35	6
TG(47:2)_FA18:1	806.7	507.4	12.38	100	35	6
TG(47:3)_FA16:1	804.7	533.5	11.99	100	35	6
TG(48:0)_FA14:0	824.7	579.5	13.07	100	35	6
TG(48:0)_FA15:0	824.8	565.4	13.07	100	35	6
TG(48:0)_FA16:0	824.8	551.5	13.06	100	35	6
TG(48:0)_FA18:0	824.8	523.5	13.3	100	35	6
TG(48:1)_FA14:0	822.7	577.5	12.77	100	35	6
TG(48:1)_FA16:0	822.8	549.5	12.73	100	35	6
TG(48:1)_FA16:1	822.7	551.4	12.77	100	35	6
TG(48:1)_FA18:0	822.7	521.4	12.77	100	35	6
TG(48:1)_FA18:1	822.8	523.5	12.73	100	35	6
TG(48:2)_FA14:0	820.7	575.5	12.38	100	35	6
TG(48:2)_FA16:0	820.7	547.4	12.38	100	35	6
TG(48:2)_FA16:1	820.7	549.5	12.37	100	35	6
TG(48:2)_FA18:1	820.7	521.5	12.39	100	35	6
TG(48:2)_FA18:2	820.7	523.5	12.38	100	35	6
TG(48:3)_FA16:0	818.7	545.5	12.23	100	35	6
TG(48:3)_FA16:1	818.7	547.5	12	100	35	6
TG(48:3)_FA18:2	818.7	521.5	12.03	100	35	6
TG(48:4)_FA14:0	816.7	571.5	11.89	100	35	6
TG(48:4)_FA18:2	816.7	519.4	11.62	100	35	6
TG(49:0)_FA14:0	838.8	593.6	13.31	100	35	6
TG(49:0)_FA16:0	838.8	565.5	13.22	100	35	6
TG(49:0)_FA17:0	838.8	551.503	13.26	100	35	6
TG(49:0)_FA18:0	838.8	537.5	13.26	100	35	6
TG(49:1)_FA16:0	836.8	563.5	12.97	100	35	6
TG(49:1)_FA16:1	836.8	565.5	12.97	100	35	6
TG(49:1)_FA17:0	836.8	549.5	12.97	100	35	6
TG(49:1)_FA18:1	836.8	537.5	12.97	100	35	6
TG(49:2)_FA14:0	834.8	589.6	12.58	100	35	6
TG(49:2)_FA16:0	834.8	561.5	12.58	100	35	6
TG(49:2)_FA16:1	834.8	563.5	12.6	100	35	6
TG(49:2)_FA17:0	834.8	547.5	12.67	100	35	6
TG(49:2)_FA17:1	834.8	549.5	12.6	100	35	6
TG(49:2)_FA18:1	834.8	535.5	12.77	100	35	6
TG(49:3)_FA16:1	832.7	561.5	12.28	100	35	6
TG(49:3)_FA18:1	832.7	533.5	12.23	100	35	6
TG(49:3)_FA18:2	832.7	535.5	12.33	100	35	6
TG(49:4)_FA18:2	830.7	533.5	11.94	100	35	6

# PŘÍLOHY

ID	Q1	Q3	RT [min]	DP [V]	CE [V]	CXP [V]
TG(50:0)_FA16:0	852.8	579.5	13.6	100	35	6
TG(50:0)_FA18:0	852.8	551.503	13.56	100	35	6
TG(50:1)_FA14:0	850.8	605.6	13.16	100	35	6
TG(50:1)_FA16:0	850.8	577.5	13.11	100	35	6
TG(50:1)_FA16:1	850.8	579.5	13.16	100	35	6
TG(50:1)_FA18:0	850.8	549.5	13.16	100	35	6
TG(50:1)_FA18:1	850.8	551.503	13.16	100	35	6
TG(50:1)_FA20:1	850.8	523.472	13.16	100	35	6
TG(50:2)_FA14:0	848.8	603.6	12.87	100	35	6
TG(50:2)_FA16:0	848.8	575.5	12.77	100	35	6
TG(50:2)_FA16:1	848.8	577.5	12.87	100	35	6
TG(50:2)_FA18:1	848.8	549.5	12.87	100	35	6
TG(50:2)_FA18:2	848.8	551.503	12.87	100	35	6
TG(50:3)_FA14:0	846.8	601.6	12.48	100	35	6
TG(50:3)_FA16:0	846.8	573.5	12.48	100	35	6
TG(50:3)_FA16:1	846.8	575.5	12.46	100	35	6
TG(50:3)_FA18:1	846.8	547.5	12.48	100	35	6
TG(50:5)_FA20:5	842.6	523.3	11.79	100	35	6
TG(51:0)_FA17:0	866.8	579.5	13.65	100	35	6
TG(51:0)_FA18:0	866.8	565.5	13.6	100	35	6
TG(51:1)_FA16:0	864.8	591.5	13.29	100	35	6
TG(51:1)_FA17:0	864.8	577.5	13.26	100	35	6
TG(51:1)_FA18:0	864.8	563.5	13.26	100	35	6
TG(51:1)_FA18:1	864.8	565.5	13.26	100	35	6
TG(51:2)_FA16:0	862.8	589.5	12.97	100	35	6
TG(51:2)_FA16:1	862.8	591.5	12.97	100	35	6
TG(51:2)_FA18:1	862.8	563.5	12.99	100	35	6
TG(51:2)_FA18:2	862.8	565.5	12.97	100	35	6
TG(51:3)_FA16:1	860.8	589.5	12.77	100	35	6
TG(52:0)_FA18:0	880.8	579.5	13.76	100	35	6
TG(52:1)_FA16:0	878.8	605.8	13.57	100	35	6
TG(52:1)_FA16:1	878.8	607.5	13.56	100	35	6
TG(52:1)_FA18:0	878.8	577.5	13.47	100	35	6
TG(52:1)_FA18:1	878.8	579.5	13.46	100	35	6
TG(52:1)_FA20:1	878.8	551.503	13.46	100	35	6
TG(52:2)_FA16:0	876.8	603.5	13.21	100	35	6
TG(52:2)_FA16:1	876.8	605.5	13.26	100	35	6
TG(52:2)_FA18:0	876.8	575.5	13.26	100	35	6
TG(52:2)_FA18:1	876.8	577.5	13.26	100	35	6
TG(52:2)_FA18:2	876.8	579.5	13.26	100	35	6
TG(52:3)_FA16:0	874.8	601.5	12.84	100	35	6
TG(52:3)_FA16:1	874.8	603.5	12.86	100	35	6
TG(52:3)_FA18:1	874.8	575.5	12.87	100	35	6
TG(52:3)_FA18:2	874.8	577.5	12.87	100	35	6
TG(52:4)_FA16:0	872.8	599.5	12.58	100	35	6
TG(52:4)_FA16:1	872.8	601.5	12.58	100	35	6
TG(52:4)_FA18:1	872.8	573.5	12.58	100	35	6

PŘÍLOHY

ID	Q1	Q3	RT [min]	DP [V]	CE [V]	CXP [V]
TG(52:4)_FA18:2	872.8	575.5	12.5	100	35	6
TG(52:4)_FA18:3	872.8	577.5	12.58	100	35	6
TG(52:4)_FA20:4	872.8	551.5	12.69	100	35	6
TG(52:5)_FA16:0	870.8	597.5	12.18	100	35	6
TG(52:5)_FA16:1	870.8	599.5	12.28	100	35	6
TG(52:5)_FA18:2	870.8	573.5	12.16	100	35	6
TG(52:5)_FA18:3	870.8	575.5	12.28	100	35	6
TG(52:6)_FA16:0	868.7	595.5	11.99	100	35	6
TG(52:6)_FA22:6	868.8	523.472	12.18	100	35	6
TG(53:1)_FA16:0	892.8	619.5	13.65	100	35	6
TG(53:1)_FA17:0	892.8	605.5	13.65	100	35	6
TG(53:1)_FA18:0	892.8	591.5	13.63	100	35	6
TG(53:2)_FA17:0	890.8	603.5	13.33	100	35	6
TG(53:2)_FA18:1	890.8	591.5	13.46	100	35	6
TG(53:3)_FA17:1	888.8	603.5	13.04	100	35	6
TG(53:3)_FA18:2	888.8	591.5	13.07	100	35	6
TG(53:8)_FA16:1	878.7	607.5	11.68	100	35	6
TG(54:0)_FA16:0	908.8	635.5	14.14	100	35	6
TG(54:0)_FA18:0	908.9	607.6	14.14	100	35	6
TG(54:1)_FA16:0	906.8	633.5	13.95	100	35	6
TG(54:1)_FA18:0	906.8	605.6	13.9	100	35	6
TG(54:1)_FA18:1	906.8	607.5	13.95	100	35	6
TG(54:2)_FA16:0	904.8	631.6	13.51	100	35	6
TG(54:2)_FA18:0	904.8	603.5	13.6	100	35	6
TG(54:2)_FA18:2	904.8	607.5	13.65	100	35	6
TG(54:2)_FA20:0	904.8	575.5	13.54	100	35	6
TG(54:2)_FA20:1	904.8	577.5	13.65	100	35	6
TG(54:2)_FA20:2	904.8	579.5	13.65	100	35	6
TG(54:3)_FA18:0	902.8	601.5	13.36	100	35	6
TG(54:3)_FA18:1	902.8	603.5	13.21	100	35	6
TG(54:3)_FA18:2	902.8	605.5	13.36	100	35	6
TG(54:4)_FA18:1	900.8	601.5	12.97	100	35	6
TG(54:4)_FA18:2	900.8	603.5	13.07	100	35	6
TG(54:4)_FA20:1	900.8	573.5	13.07	100	35	6
TG(54:4)_FA20:3	900.8	577.5	13.07	100	35	6
TG(54:5)_FA18:1	898.8	599.5	12.61	100	35	6
TG(54:5)_FA18:2	898.8	601.5	12.55	100	35	6
TG(54:5)_FA18:3	898.8	603.5	12.77	100	35	6
TG(54:5)_FA20:4	898.8	577.5	12.77	100	35	6
TG(54:5)_FA22:4	898.8	549.5	12.77	100	35	6
TG(54:6)_FA16:0	896.8	623.5	12.62	100	35	6
TG(54:6)_FA18:1	896.8	597.5	12.21	100	35	6
TG(54:6)_FA18:2	896.8	599.5	12.18	100	35	6
TG(54:6)_FA20:4	896.8	575.5	12.39	100	35	6
TG(54:6)_FA22:6	896.8	551.503	12.38	100	35	6
TG(54:7)_FA18:2	894.8	597.5	12.09	100	35	6
TG(54:7)_FA18:3	894.8	599.5	11.85	100	35	6

## PŘÍLOHY

ID	Q1	Q3	RT [min]	DP [V]	CE [V]	CXP [V]
TG(54:7)_FA20:4	894.8	573.5	12.09	100	35	6
TG(54:7)_FA22:6	894.8	549.5	12.09	100	35	6
TG(55:7)_FA15:0	908.8	649.5	12.36	100	35	6
TG(56:0)_FA16:0	936.9	663.6	14.53	100	35	6
TG(56:1)_FA16:0	934.9	661.6	14.24	100	35	6
TG(56:10)_FA16:0	916.7	643.5	11.66	100	35	6
TG(56:2)_FA20:1	932.9	605.6	13.95	100	35	6
TG(56:3)_FA18:1	930.8	631.5	13.75	100	35	6
TG(56:4)_FA18:2	928.8	631.5	13.36	100	35	6
TG(56:4)_FA20:4	928.8	607.6	13.29	100	35	6
TG(56:5)_FA18:1	926.8	627.5	12.97	100	35	6
TG(56:5)_FA20:4	926.8	605.5	13.14	100	35	6
TG(56:6)_FA16:0	924.8	651.5	12.58	100	35	6
TG(56:6)_FA18:0	924.8	623.5	12.82	100	35	6
TG(56:6)_FA20:4	924.8	603.5	12.87	100	35	6
TG(56:6)_FA22:6	924.8	579.5	13.1	100	35	6
TG(56:7)_FA16:0	922.8	649.5	12.59	100	35	6
TG(56:7)_FA18:1	922.8	623.5	12.57	100	35	6
TG(56:7)_FA18:2	922.8	625.5	12.38	100	35	6
TG(56:7)_FA20:4	922.8	601.5	12.38	100	35	6
TG(56:7)_FA22:6	922.8	577.5	12.38	100	35	6
TG(56:8)_FA18:2	920.8	623.5	12.18	100	35	6
TG(56:8)_FA20:4	920.8	599.5	12.18	100	35	6
TG(56:8)_FA22:6	920.8	575.5	12.38	100	35	6
TG(56:9)_FA18:1	918.8	619.5	11.84	100	35	6
TG(58:10)_FA20:4	944.8	623.5	12.04	100	35	6
TG(58:10)_FA22:6	944.8	599.5	12.09	100	35	6
TG(58:5)_FA20:0	954.8	625.5	13.6	100	35	6
TG(58:6)_FA18:0	952.8	651.5	13.26	100	35	6
TG(58:6)_FA22:5	952.8	605.5	13.26	100	35	6
TG(58:7)_FA16:0	950.8	677.6	13.08	100	35	6
TG(58:7)_FA18:0	950.8	649.5	12.97	100	35	6
TG(58:7)_FA18:1	950.8	651.5	12.77	100	35	6
TG(58:7)_FA20:1	950.8	623.5	12.9	100	35	6
TG(58:7)_FA22:6	950.8	605.5	12.67	100	35	6
TG(58:8)_FA20:4	948.8	627.5	12.67	100	35	6
TG(58:8)_FA22:5	948.8	601.5	12.43	100	35	6
TG(58:8)_FA22:6	948.8	603.5	12.67	100	35	6
TG(58:9)_FA20:4	946.8	625.5	12.38	100	35	6
TG(58:9)_FA22:6	946.8	601.5	12.38	100	35	6
TG(60:10)_FA22:6	972.8	627.5	12.48	100	35	6
TG(60:11)_FA22:6	970.8	625.5	12.09	100	35	6
TG(60:12)_FA22:6	968.8	623.5	11.94	100	35	6
TG(60:8)_FA18:1	976.8	677.5	12.91	100	35	6
TG(62:12)_FA18:0	996.8	695.5	12.33	100	35	6
TG(62:13)_FA22:6	994.8	649.5	11.94	100	35	6
TG(e)(48:0)_FA16:0	810.8	537.5	13.03	100	35	6

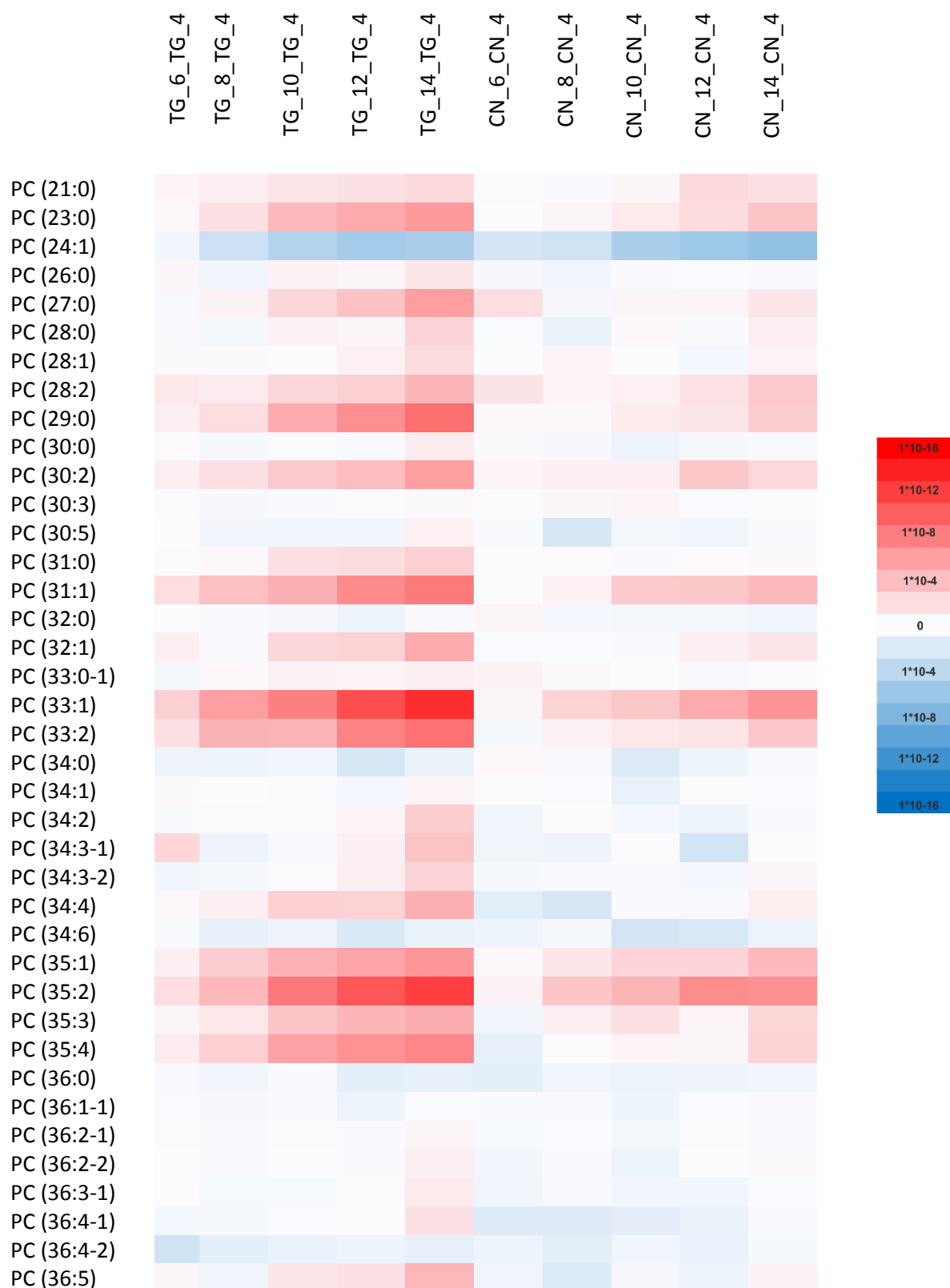
## PŘÍLOHY

ID	Q1	Q3	RT [min]	DP [V]	CE [V]	CXP [V]
TG(e)(50:0)_FA16:0	838.8	565.5	13.23	100	35	6
TG(e)(50:1)_FA16:0	836.8	563.5	12.93	100	35	6
TG(e)(52:1)_FA18:1	864.8	565.6	13.23	100	35	6
TG(e)(52:3)_FA18:1	860.8	561.5	12.68	100	35	6
TG(e)(54:2)_FA18:1	890.9	591.6	13.4	100	35	6
TG(e)(56:1)_FA22:1	920.9	565.6	13.91	100	35	6
TG(p)(48:1)_FA16:0	808.8	535.5	12.71	100	35	6
TG(P)(50:2)_FA16:0	834.8	561.5	12.58	100	35	6
TG(P)(52:2)_FA16:0	862.8	589.6	12.89	100	35	6
TG(p)(54:1)_FA18:0	892.9	591.6	13.67	100	35	6
TG(p)(54:2)_FA16:0	890.9	617.6	13.38	100	35	6



## PŘÍLOHY

Příloha 3. Teplotní mapa pro lipidovou třídu fosfatidylcholinu (PC). Změny konkrétních lipidů v průběhu stárnutí jsou znázorněny pomocí barevné škály na základě hodnot p-value (sytost barvy). Červená/modrá barva znázorňuje zvýšení/snížení na základě rozdílu mezi skupinami.





## PŘÍLOHY

