



Zdravotně  
sociální fakulta  
Faculty of Health  
and Social Sciences

Jihočeská univerzita  
v Českých Budějovicích  
University of South Bohemia  
in České Budějovice

**Kvalitativní analýza vybraných podtříd  
glykosfingolipidů izolovaných z lidské krevní  
plasmy pomocí HILIC-ESI-MS/MS**

## **BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Studijní program:

**SPECIALIZACE VE ZDRAVOTNICTVÍ**

**Autor:** Michaela Šiklová

**Vedoucí práce:** Mgr. Karel Hořejší

České Budějovice 2022

## Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci s názvem „*Kvalitativní analýza vybraných podtříd glykosfingolipidů izolovaných z lidské krevní plasmy pomocí HILIC-ESI-MS/MS*“ jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské/diplomové práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby bakalářské/diplomové práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé bakalářské/diplomové práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 3. května 2022

.....

Michaela Šiklová

## **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucímu mé bakalářské práce Mgr. Karlu Hořejšímu za odborné vedení mé práce a cenné rady, jež mi byly během zpracování této práce poskytnuty. Oceňuji také jeho velice přátelský přístup a ochotu kdykoliv pomoci. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Pavle Karšulinové za její ochotu provést odběr vzorků krve a všem dobrovolníkům, kteří byli ochotni poskytnout vzorky krve. V neposlední řadě bych poděkovala své rodině a přítelovi za podporu a pomoc.

# **Kvalitativní analýza vybraných podtříd glykosfingolipidů izolovaných z lidské krevní plasmy pomocí HILIC-ESI-MS/MS**

## **Abstrakt**

Tato bakalářská práce se zabývá kvalitativní analýzou vybraných podtříd glykosfingolipidů izolovaných z lidské krevní plasmy pomocí hydrofilní interakční kapalinové chromatografie s elektrosprejovou ionizací a tandemovou hmotnostní detekcí (HILIC-ESI-MS/MS). Glykosfingolipidy jsou všudypřítomné a strukturně velmi rozmanité složky buněčných membrán podílející se a ovlivňující mnoho buněčných funkcí. Bylo prokázáno, že změny ve strukturách glykosfingolipidů a v jejich rozdílné expresi mohou představovat klíčový faktor při vývoji mnoha onemocnění a různých typů rakoviny.

Teoretická část je věnována shrnutí základních poznatků o glykosfingolipidech, jejich biosyntéze, klasifikaci, biologických funkcí a jejich souvislosti s různými typy onemocnění a rakoviny. Dále jsou zde popsány metody izolace, přečištění a analytické možnosti stanovení glykosfingolipidů z biologických vzorků.

V rámci experimentální části práce byl proveden odběr a zpracování vzorků krve spolu s přípravou potřebných roztoků, vzorků plasmy a standardů. Dále byla provedena testovací analýza, optimalizace gradientu mobilní fáze, srovnání nejčastěji používaných extrakčních metod, a to metod podle Folcha, Bligh a Dyera, Matyashe a Alshehryho, a frakcionace lipidového extraktu. Nedílnou součástí praktické části byla rovněž identifikace a strukturní charakterizace glykosfingolipidů v rámci vybraných podtříd, včetně sestavení jejich profilu v lidské krevní plasmě.

V závěru práce jsou shrnuty výsledky práce a odpovědi na stanovené výzkumné otázky včetně zhodnocení možných zlepšení v dané oblasti.

## **Klíčová slova**

Glykosfingolipidy; Plasma; Extrakce; Kapalinová chromatografie; Hmotnostní spektrometrie; Frakcionace; Profil lipidů; Strukturní identifikace; Fragmentace

# **Qualitative analysis of selected glycosphingolipid subclasses isolated from human blood plasma using HILIC-ESI-MS/MS**

## **Abstract**

This bachelor thesis deals with the qualitative analysis of selected subclasses of glycosphingolipids isolated from human blood plasma using hydrophilic interaction liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry (HILIC-ESI-MS/MS). Glycosphingolipids are ubiquitous and structurally very diverse components of cell membranes involved in many cellular functions. It has been shown that changes in the structures of glycosphingolipids and their distinct expression can pose a key factor in the development of numerous diseases and different types of cancer.

The theoretical part of this thesis is dedicated to a summary of fundamental knowledge about glycosphingolipids, their biosynthesis, classification, biological functions and their association with various types of diseases and cancers. Furthermore, methods of isolation, purification and analytical possibilities for the determination of glycosphingolipids in biological samples are described here.

In the experimental part, blood samples were taken and processed together with the preparation of the necessary solutions, plasma samples, and standards. Moreover, a test analysis, optimization of mobile phase gradient and comparison of the most frequently used extraction methods according to Folch, Bligh and Dyer, Matyash, and Alshehry alongside fractionation of lipid extract is described in this part. An integral part of the experimental section was the identification and structural characterization of glycosphingolipids within selected subclasses, including the generation of GSL profiles in human blood plasma.

In conclusion, the results of the work and answers to the stated research questions are summarized, including the evaluation of possible improvements in this field.

## **Keywords**

Glycosphingolipids; Plasma; Extraction; Liquid chromatography; Mass spectrometry; Fractionation; Lipid profile; Structural identification; Fragmentation

## OBSAH

1	ÚVOD .....	8
2	TEORETICKÁ ČÁST .....	9
2.1	Glykosfingolipidy .....	9
2.1.1	Klasifikace a biosyntéza GSL .....	11
2.1.2	Biologické funkce GSL .....	13
2.1.3	GSL jako biomarkery pro různá onemocnění .....	14
2.1.4	GSL a rakovina.....	16
2.2	Metody izolace a přečištění GSL z biologických vzorků .....	17
2.2.1	Srážení proteinů (deproteinizace).....	17
2.2.2	Extrakce typu kapalina–kapalina (LLE).....	18
2.2.3	Extrakce tuhou fází (SPE) .....	20
2.3	Analytické možnosti stanovení GSL v biologických vzorcích .....	22
2.3.1	Kapalinová chromatografie .....	22
2.3.2	Hmotnostní spektrometrie .....	23
2.3.3	Přehled metod a přístupů používaných v lipidomice .....	24
3	CÍLE PRÁCE A VÝZKUMNÉ OTÁZKY .....	28
4	MATERIÁL A METODIKA.....	29
4.1	Použité chemikálie a rozpouštědla.....	29
4.2	Instrumentální vybavení, pomůcky a spotřební materiál .....	29
4.3	Příprava roztoků.....	32
4.3.1	Příprava mobilní fáze .....	32
4.3.2	Příprava směsného roztoku standardů .....	32
4.3.3	Příprava extrakčních rozpouštědel pro srovnání extrakcí .....	32
4.4	Odběr a zpracování vzorků krve.....	33
4.4.1	Odběr vzorků krve.....	33
4.4.2	Zpracování krve – separace plasmy .....	34
4.4.3	Příprava směsného vzorku plasmy .....	35
4.5	Izolace a extrakce GSL z lidské krevní plasmy .....	35
4.5.1	Příprava extraktu plasmy pro účely testování a optimalizaci .....	35
4.5.2	Extrakce GSL z plasmy – srovnání extrakcí .....	36
5	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	38
5.1	Testovací analýza.....	38

5.1.1	Výchozí podmínky chromatografické separace .....	42
5.1.2	Výchozí podmínky hmotnostní detekce .....	42
5.2	Optimalizace gradientu mobilní fáze .....	43
5.2.1	Reprodukovatelnost retenčního času .....	46
5.3	Srovnání extrakčních metod pro izolaci GSL z lidské plasmy .....	48
5.4	Frakcionace lipidového extraktu.....	50
5.5	Analýza vybraných podtříd GSL v lidské plasmě .....	52
5.5.1	<i>Strukturní charakterizace GSL</i> .....	52
5.5.2	Profil GSL v lidské plasmě.....	54
6	ZÁVĚR .....	57
7	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....	59
8	SEZNAM PŘÍLOH A OBRÁZKŮ .....	65
8.1	Příloha 1 .....	65
8.2	Příloha 2 .....	68
8.3	Příloha 3 .....	69
8.4	Příloha 4 .....	70
9	SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ .....	72

# 1 ÚVOD

Lipidomika je mladý vědní obor zabývající se studiem a analýzou lipidomu, tedy veškerých lipidů v buňce, tkáni nebo organismu. Hlavním cílem lipidomiky je identifikace a kvantifikace lipidových druhů, a to za účelem pochopení funkcí lipidů v živých systémech a změn, k nimž dochází během narušení jejich metabolismu.

Lipidy jsou přírodní látky jak rostlinného, tak živočišného původu, které jsou obvykle nerozpustné ve vodě, ale dobře rozpustné v organických rozpouštědlech. Lipidy tvoří základní stavební složku buněčných membrán, slouží jako zásoba energie a mají řadu dalších klíčových biologických funkcí. Z chemického hlediska představují lipidy heterogenní skupinu hydrofobních či amfipatických sloučenin o relativně nízké molekulové hmotnosti. Molekuly lipidů jsou typické přítomností různě dlouhých alkylových řetězců (obvykle se sudým počtem atomů uhlíku), anebo izoprenových jednotek v lineárním či cyklickém uspořádání. Molekuly lipidů bývají rovněž často modifikovány různými funkčními skupinami nebo jsou kovalentně spojeny s jinými malými polárními molekulami (např. glycerolem, sacharidy, zbytkem  $H_3PO_4$ , apod.), které zvýrazňují jejich amfipatický charakter.

Lipidy jsou nedílnou součástí našeho života a hrají velmi důležitou roli při vzniku a průběhu mnoha onemocnění včetně rakoviny. V případě rakovinného bujení, kdy dochází k nekontrolovanému množení buněk, je zapotřebí velké množství stavebního materiálu k tomu, aby mohl nádor růst a dále se rozvíjet. Tímto stavebním materiálem jsou z velké části právě lipidy, jež buňka získává ze svého okolního prostředí. Odlišení zdravé a nemocné buňky je tedy založeno na předpokladu, že se od sebe vzájemně liší skladbou lipidomu. Zároveň se předpokládá, že se tyto změny mohou projevit i ve složení tělních tekutin jako je např. krev, plasma, sérum nebo moč.

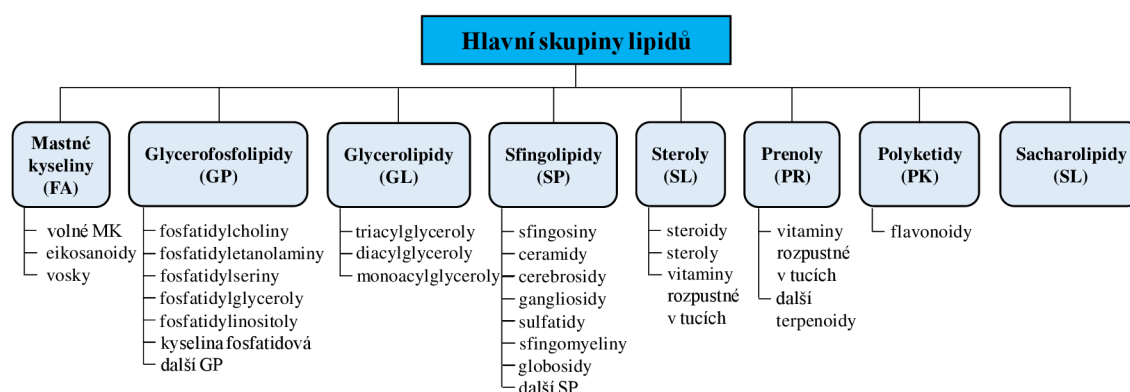
Přestože analýza lipidů je vzhledem k jejich velké strukturní rozmanitosti velice náročným úkolem, právě znalost složení a metabolismu lipidů je velmi důležitá, neboť poruchy v metabolismu lipidů mohou souviset s řadou závažných onemocnění včetně různých typů rakovin. Komplexní analýza lipidů tedy může vést k lepšímu porozumění průběhu těchto onemocnění či k objevení biomarkerů, které by umožnily odhalit dané onemocnění či rakovinu v raném stádiu a zvýšit tak šanci na záchranu mnoha lidských životů.



## 2 TEORETICKÁ ČÁST

Lipidy jsou dle klasifikace, kterou uvádí (Fahy *et al.* 2005; Fahy, Subramaniam, a Murphy 2009) a webový portál LIPID MAPS (Lipid Metabolites and Pathways Strategy, <https://www.lipidmaps.org/>), rozděleny do 8 kategorií, a to na mastné kyseliny, resp. acyly (FA), glycerolipidy (GL), glycerofosfolipidy (GP), sfingolipidy (SP), steroly (ST), prenoly (PR), sacharolipidy (SL) a polyketidy (PK). Každá kategorie lipidů má také svoji vlastní hierarchii subklasifikace. Lipidy, které se nejčastěji vyskytují v eukaryotickém systému, jsou znázorněny na obr. 1.

V rámci této bakalářské práce jsem se zaměřila výhradně na kvalitativní analýzu vybraných podtříd glykosfingolipidů, které patří mezi hlavní a zároveň nejružnorodější podtřídou sfingolipidů, neboť právě tato skupina lipidů má velký potenciál při hledání vhodných biomarkerů.

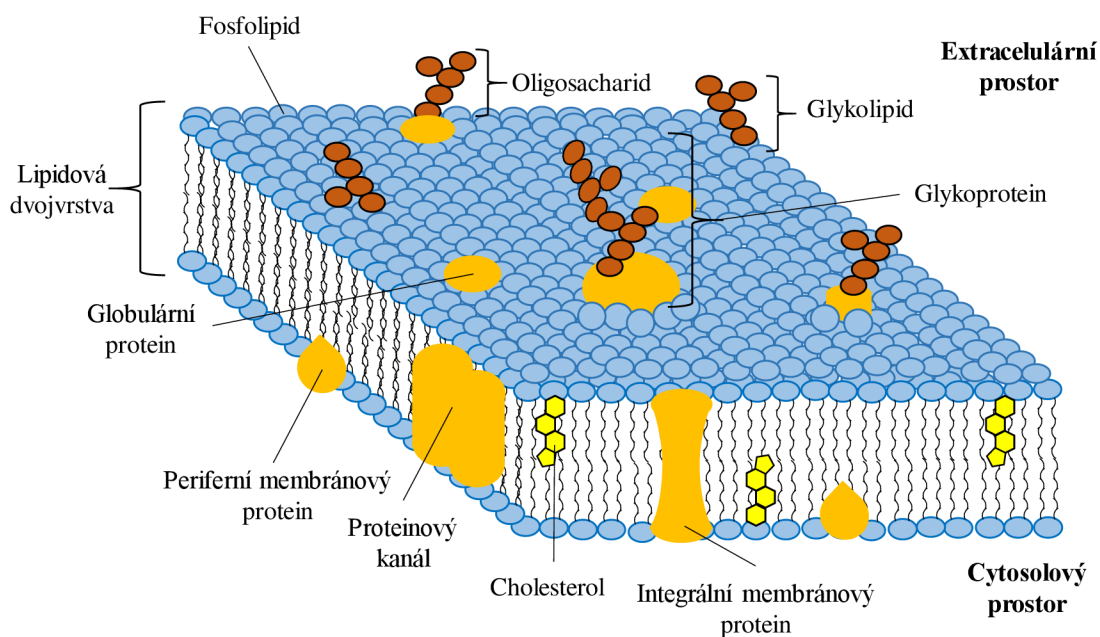


Obr. 1: Hlavní skupiny lipidů vyskytující se v eukaryotických buňkách – upraveno.

Klasifikace převzata z LIPID MAPS a od Fahy *et al.* (2005, 2009).

### 2.1 Glykosfingolipidy

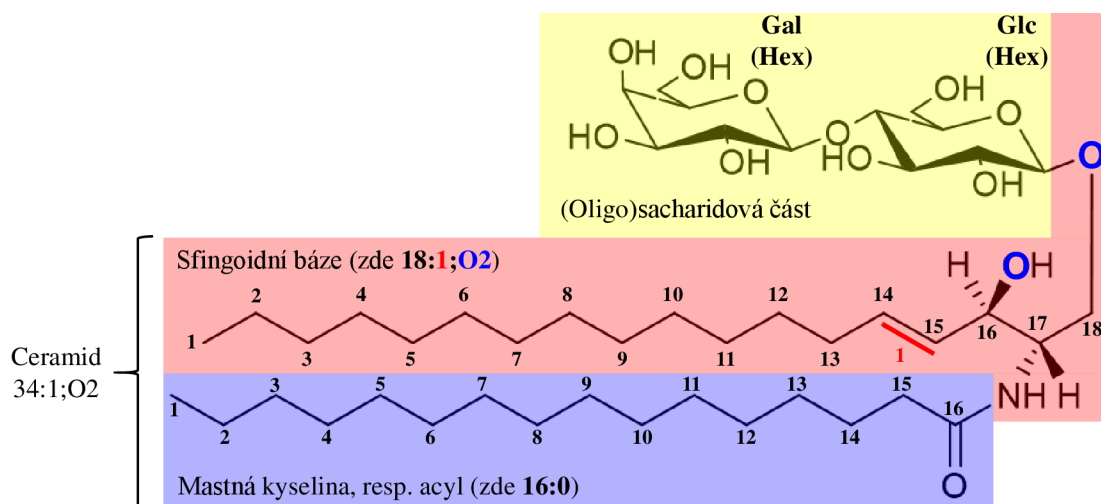
Glykosfingolipidy (GSL) byly poprvé objeveny a popsány roku 1942 Ernstem Klenkem po jejich izolaci z mozkové tkáně (X. Zhang a Kiechle 2004). GSL jsou všudypřítomné složky buněčných membrán (viz obr. 2) a membránově vázaných subcelulárních organel téměř všech eukaryotních organismů. GSL rovněž mohou cirkulovat v tělních tekutinách buď ve formě volné a/nebo vázané na proteiny. (Barrientos a Zhang 2020).



Obr. 2: Struktura buněčné membrány eukaryotické buňky – převzato a upraveno (Isaac 2005).

GSL jsou amfipatické sloučeniny a představují jednu z hlavních a strukturálně nejvíce heterogenních podtříd sfingolipidů. Molekula GSL (obr. 3) je složena z hydrofilní hlavní skupiny s alespoň jednou monosacharidovou jednotkou (obecně značeno jako Hex, hexóza) připojenou prostřednictvím glykosidové vazby k hydrofobní ceramidové části (Barrientos a Zhang 2020). První cukry, které se během biosyntézy připojují k ceramidovému řetězci, jsou nejčastěji glukóza (Glc) nebo galaktóza (Gal) (Schnaar a Kinoshita 2017). Celý sacharidový řetězec je pak připojen na primární hydroxylovou skupinu ceramidu. Ceramidová část GSL se skládá ze zbytku mastné kyseliny (acylu) připojené amidovou vazbou k základním dlouhému řetězci sfingoidní báze (Breimer *et al.* 2017). Mastné acyly v GSL jsou obecně dlouhé (nejčastější počet uhlíku je 16 až 26, C<sub>16</sub>–C<sub>26</sub>) a nasycené nebo mononasycené (Barrientos a Zhang 2020). Velikost sacharidové části se běžně pohybuje od jedné do dvanácti monosacharidových jednotek, ale byly také popsány GSL s více než třiceti monosacharidovými jednotkami (Breimer *et al.* 2017).

Prvním charakterizovaným glykosfingolipidem byl galaktosylceramid, který se řadí mezi nejjednodušší glykolipidy a je také jednou z nejhojnějších molekul v mozku obratlovců (Schnaar a Kinoshita 2017).

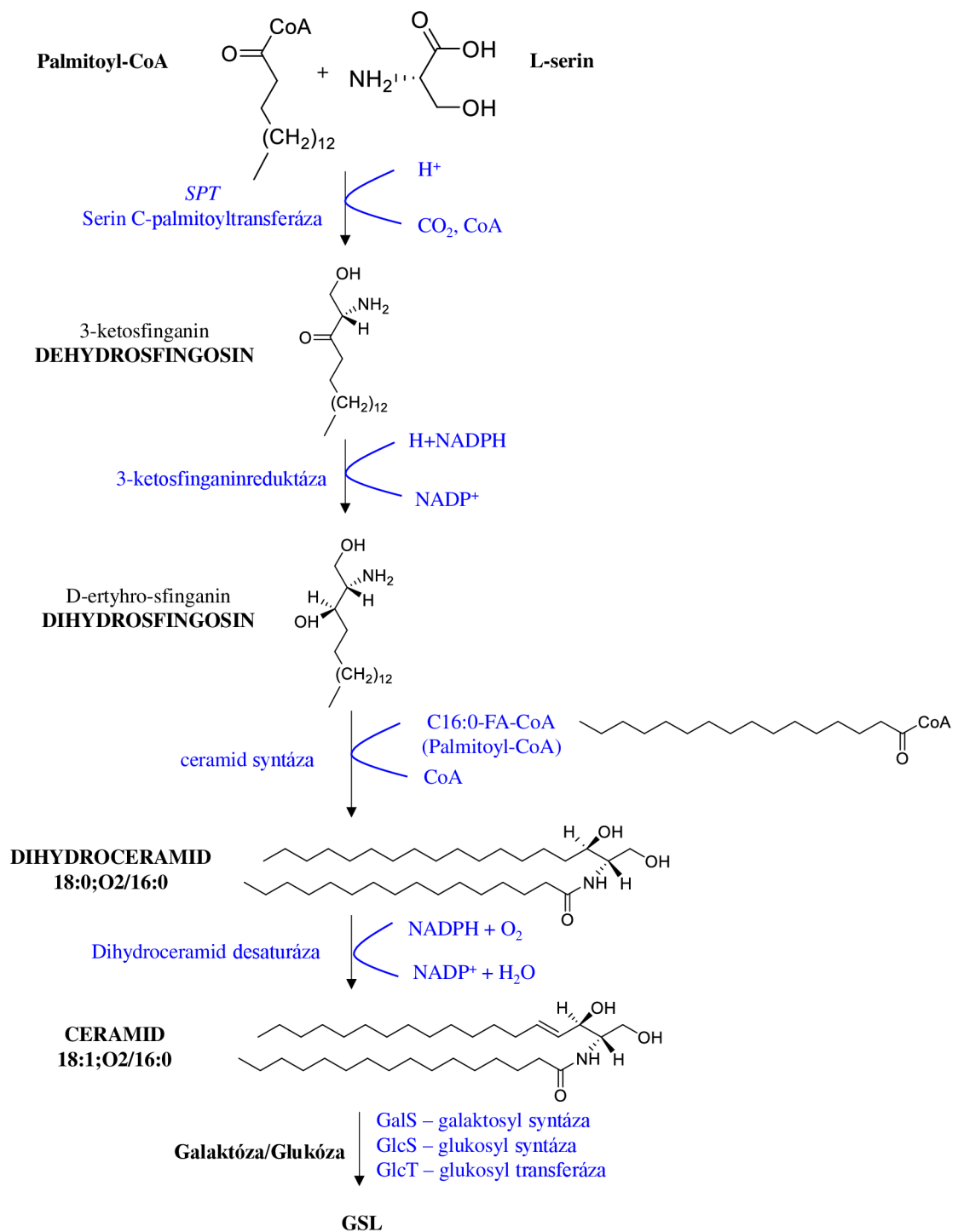


Obr. 3: Příklad struktury glykosfingolipidu (GSL) dihexosylceramidu 18:1;O<sub>2</sub>/16:0 (tj. Hex<sub>2</sub>Cer 34:1;O<sub>2</sub>) – vlastní tvorba.

### 2.1.1 Klasifikace a biosyntéza GSL

GSL jsou obecně klasifikovány na 2 základní skupiny, a to na neutrální a kyselé, tj. sialované a sulfátované GSL (Schnaar a Kinoshita 2017). Neutrální GSL se skládají ze dvou podskupin: monoglykosylceramidy (cerebrosidy) a oligoglykosylceramidy (globosidy), kyselé GSL se dále rozdělují na sialované glykosylceramidy (gangliosidy) a sulfoglykosylceramidy (sulfatidy) (Farwanah a Kolter 2012; Malhotra 2012; X. Zhang a Kiechle 2004). GSL mohou být dále klasifikovány na základě podobnosti struktury oligosacharidu do různých sérií, např. ganglio-série, globo-série, lakto-série apod. (T. Zhang *et al.* 2019).

Cesta pro biosyntézu desítek, stovek či tisíců GSL je poměrně složitá (obr. 4), a je jí překvapivě dosaženo za použití pouze několika glykosyltransferáz, které spojují prekurzory s meziprodukty za vzniku konkrétních produktů na základě specifčnosti enzymů. Enzymy přenášejí specifický cukr z příslušného cukerného nukleotidu na ceramidový základní řetězec nebo na neredukující konec rostoucího sacharidového řetězce připojeného k ceramidu. Glukosylceramidy (GlcCer) a galaktosylceramidy (GalCer) jsou syntetizovány pomocí enzymů UDP-Glc (uridin difosfát glukóza):glukosylceramid syntázy (ceramid glukosyltransferáza, CGlcT) a UDP-Gal (uridin difosfát galaktóza):galaktosyl syntázy (ceramid galaktosyltransferáza, CGalT). Syntéza GlcCer může být inhibována strukturními analogy ceramidu. Zatímco GlcCer je syntetizován na cytosolové straně Golgiho aparátu, GalCer je syntetizován v endoplazmatickém retikulu (ER) (A. H. Merrill 2008).



Obr. 4: Příklad „de novo“ biosyntézy ceramidu 34:1;O2, převzato a upraveno (A. H. Merrill 2008; Skotland *et al.* 2016).

“De novo“ biosyntéza ceramidu, např. 18:1;O2/16:0 (obr. 4), probíhá ve čtyřech krocích na cytosolové straně ER, zatímco syntéza GSL z ceramidového řetězce probíhá převážně v Golgiho aparátu (Skotland *et al.* 2016). Ceramidy (Cer) jsou základní

molekuly, ze kterých probíhá syntéza složitějších sfingolipidů, jako jsou sfingomyeliny a glykosfingolipidy. Prvním krokem je kondenzace aktivované C<sub>16</sub> mastné kyseliny palmitoyl-CoA a aminokyseliny L-serinu, který je katalyzován palmitoyltransferázou. Výsledným produktem je 3-ketosfinganin (3KS), který je dále redukován na sfinganin za pomoci 3-ketosfinganin reduktázy způsobem spojeným s přeměnou NADPH (nikotinamidadeninukleotidfosfátu). Sfinganin je dále N-acylován působením šesti izoform ceramid syntázy (CerS1-6). CerS5 a CerS6 používají jako substrát palmitoyl-CoA, čímž vzniká produkt dihydroceramid (Cer 18:0;O2/16:0). Poslední krok v "de novo" biosyntéze je katalyzován dihydroceramidem A4-desaturázou (DEGS), který se vyskytuje ve dvou izoformách: DEGS<sub>1</sub> a DEGS<sub>2</sub>. Pomocí DEGS dochází k zavedení hydroxylované skupiny do polohy C4 hlavního řetězce pomocí molekulárního kyslíku. Následuje dehydratační reakce, ve které DEGS prostřednictvím NADPH zavádí dvojnou vazbu mezi uhlíky C4 a C5 za vzniku charakteristické struktury jádra ceramidu (Cer 18:1;O2/16:0). Vytvořené Cer jsou následně přesunuty do Golgiho aparátu, kde jsou dále metabolizovány na GSL (Wigger *et al.* 2019).

### 2.1.2 Biologické funkce GSL

GSL plní mnoho důležitých funkcí v organismu. Hrají důležitou roli v molekulární signalizaci, buněčné komunikaci a buněčné adhezi (M. Wong *et al.* 2018). Vykazují řadu funkcí v buněčné diferenciaci a interakci. Je také známo, že hrají roli receptorů při invazi patogenů (T. Zhang *et al.* 2019).

GSL se primárně nachází na vnější straně plazmatické membrány buněk tak, aby jejich glykany směřovaly k vnějšímu prostředí a byla tak umožněna mezibuněčná komunikace zprostředkovaná vazbou na komplementární molekuly na druhé straně plazmatické membrány, což představuje jednu z jejich nejdůležitějších funkcí. Druhou nejdůležitější funkcí je modulace aktivit proteinů na téže straně plazmatické membrány. Na úrovni jedné buňky nejsou GSL pro život nezbytné, buňky bez GSL přežívají, množí se, a dokonce se diferencují. GSL jsou však vyžadovány pro vývoj na úrovni celého organismu (Schnaar a Kinoshita 2017). V plazmatické membráně hrají GSL roli v infekčních nemocích, kde působí jako buněčné receptory a koreceptory pro viry, bakterie a mikrobiální toxiny, mohou ale také působit jako antigeny v některých autoimunitních onemocněních (Barrientos a Zhang 2020; Hořejší *et al.* 2021). GlcCer hraje důležitou roli v kůži, kde slouží jako prekurzor, který je hydrolyzován na kožní

ceramidy za vzniku propustné bariéry. GlcCer je také nezbytný pro intracelulární membránový transport, buněčnou proliferaci a přežití. Rovněž má důležitou roli na rezistenci vůči léčivům a funkci buněk přirozených zabijáků. Mimo jiné jsou hladiny GlcCer změněny širokým spektrem nemocí, včetně kardiovaskulárních chorob, rakoviny, cukrovky a různých kožních poruch. GalCer a jeho sulfatované deriváty, nazývané sulfatidy, jsou hlavními složkami myelinu a bylo hlášeno, že vzájemně interagují prostřednictvím interakcí sacharid–sacharid (A. H. Merrill 2011).

Méně známou a prozkoumanou funkcí GSL je jejich role ve funkci imunitních buněk. Jak již bylo zmíněno, GSL se skládají z glykanů vázaných na ceramidové jádro. Rozmanitost glykanových struktur na GSL je řízena řadou proteinů zapojených do glykanové biosyntézy. Tyto proteiny jsou odlišně exprimovány v celém imunitním systému, což vede k velké variabilitě GSL, což naznačuje funkční roli GSL ve vývoji nebo aktivaci imunitních buněk. GSL jsou nezbytné pro nábor imunitních proteinů do specifických membránových mikrodomén a interakce přímo s molekulami na jiných typech buňky dále formují mnohostrannou funkci GSL v imunitě. GSL jsou tedy důležitými složkami funkčního imunitního systému a hrají všestranné role ve fyziologii a patofyziologii (T. Zhang *et al.* 2019).

### **2.1.3 *GSL jako biomarkery pro různá onemocnění***

GSL představují vysoce heterogenní třídu lipidů s mnoha buněčnými funkcemi zapojenými do širokého spektra nemocí, včetně různých typů rakoviny. GSL hrají klíčovou roli v mnoha fyziologických procesech (např. během buněčného vývoje, diferenciaci, rozhodování o osudu buňky apod.). Změněná exprese GSL může podporovat patofyziologické procesy jako je buněčná invaze, rezistence vůči mnoha léčivům a epiteliálně-mezenchymální přechod v maligní tkáň (Bien *et al.* 2020).

Lipidomika, jakožto rychle se rozvíjející vědní obor zaměřující se na identifikaci a kvantifikaci různých lipidových druhů v lipidomu, se nyní objevuje v popředí vědeckého výzkumu právě kvůli důležitosti lipidů v buněčném metabolismu, a to zejména s ohledem na prokázanou vazbu k různým nemocem včetně rakoviny. Schopnost analyzovat tyto malé molekuly vedla k lepšímu porozumění několika mechanismů řízených lipidy a k identifikaci biomarkerů na bázi lipidů u neurodegenerativních onemocnění, rakoviny, sepse, hojení ran a preeklampsie. Identifikace biomarkerů a porozumění specifickým lipidovým drahám spojených

s chorobnou patologií mohou tvořit základ ve vývoji nových terapeutik s nadějí vyléčení různých lidských nemocí (Stephenson, Hoferlin a Chalfant 2017). Lipidomika založená na hmotnostně-spektrometrických metodách má tedy veliký potenciál v medicíně, včetně diagnostiky a následné terapie a analýzy mechanismů, které jsou základem různých onemocnění, nebo jiných patofyziologických stavů a výživy (Uphoff *et al.* 2008).

Dědičné metabolické poruchy zahrnující enzymatické dráhy GSL způsobují glykosfingolipidózy. Glykosfingolipidózy jsou nejvíce převládající podskupinou lysozomálních poruch, jenž jsou charakterizovány akumulací jednoho nebo více GSL v buňkách nebo tkáních. K akumulaci GSL dochází v důsledku chybějícího či nedostačujícího množství enzymu blokující degradaci specifických GSL v lysozomech (Barrientos a Zhang 2020; X. Zhang a Kiechle 2004). K degradaci GSL dochází na povrchu intraendolysozomálních lumenálních váček a lze ji zablokovat vrozenou vadou lysozomální hydrolázy nebo příslušného aktivačního proteinu (Breiden a Sandhoff 2019). Jelikož jsou GSL hojně exprimovány v centrálním nervovém systému, glykosfingolipidózy jsou často charakteristické progresivním neurodegenerativním průběhem. Mezi tato onemocnění patří Fabryho choroba, Gaucherova choroba, Tay-Sachsova nemoc a Sandhoffova nemoc, které jsou způsobeny nedostatečnou funkcí enzymů (X. Zhang a Kiechle 2004).

Složení nebo množství glykanů může kolísat v průběhu progresu onemocnění a mohou tedy sloužit jako potenciální biomarkery pro dané onemocnění. Mnoho mozkových onemocnění má dysregulovaný metabolismus gangliosidů a sulfatidů. Dysregulace GSL se také podílí na autoimunitních, metabolických a dalších komplexních onemocnění. Jelikož GSL mohou indukovat terapeutické cytokiny, reakce zprostředkované buňkami jsou proto slibnými cíli pro imunoterapii. Jeden takový typ buněk, přirození zabíječi (buňky iNKT) rozpoznávají GSL a uvolňují cytokiny, které zabíjejí rakovinné nebo virem infikované buňky, což se jeví jako potenciální způsob léčby rakoviny a infekčních chorob. Znalost konkrétních molekulárních struktur GSL a zapojených metabolických cest by dále urychlila terapeutické aplikace cílené na GSL (Barrientos a Zhang 2020).

#### 2.1.4 GSL a rakovina

Různé buňky a tkáně vykazují rozdílnou expresi GSL a ke změnám ve strukturách glykanových skupin GSL dochází i během vývoje mnoha typů rakovin (Zhuo, Li, a Guan 2018). Ačkoliv je rakovina obecně popisována jako genetické onemocnění, nedávné studie ukázaly, že tumorogenní fenotypy jsou výsledkem řady mutačních událostí, které kombinují změny více signálních cest, vnitřních i vnějších, které mění základní buněčný metabolismus a poskytují podporu tří základních potřeb nezbytných pro dělení buněk: (1) rychlá tvorba ATP (adenosintrifosfát) k udržení energetického stavu, (2) zvýšená biosyntéza makromolekul a (3) zpřísněné udržování příslušného stavu buněčného redoxu. Lipidy hrají mnoho klíčových rolí ve všech těchto základních procesech nezbytných pro vývoj nádoru (Han 2016). Nádory často vykazují vysoké hladiny GSL, které interferují se zabíjecí schopností imunitního systému. Tyto vysoké hladiny GSL mají za následek vysoké koncentrace volných GSL v mikroprostředí nádoru. U některých nádorů, jako je například neuroblastom, byla plasmatická koncentrace nádorových derivátů GSL 50krát zvýšená ve srovnání se stejnými pacienty po léčbě nebo u zdravých kontrol (T. Zhang *et al.* 2019). Rakovinné buňky mohou být potenciálně odlišeny od zdravých buněk, a to na základě jejich různých glykosfingolipidových profilů (Barrientos a Zhang 2020). Imunoterapie rakoviny je velmi slibný přístup, který využívá imunitní systém k léčbě rakoviny (Zhuo, Li, a Guan 2018). V rakovinných buňkách je několik proteinů, které jsou buď zapnuty, nebo vypnuty, což dramaticky mění metabolismus a celkovou aktivitu buňky (Daniotti *et al.* 2013). GSL spojené s rakovinou mohou být použity nejen jako nádorové markery, ale také jako funkční molekuly regulující různé signály zavedené membránovými mikrodomény. Existuje řada zpráv o specifické expresi různých GSL u jednotlivých rakovin. Řadí se sem gangliosid GD<sub>3</sub> u melanomů a lymfoblastické leukémie, GD<sub>2</sub> u neuroblastomů, osteosarkomů, rakoviny plic a prsu, a také globotriaosylceramid (Gb<sub>3</sub>) u Burkittových lymfomů. Gangliosidy se dvěma vázanými kyselinami sialovými (tj. GD<sub>2</sub> a GD<sub>3</sub>) podporují maligní vlastnosti v různých rakovinných systémech. Zejména tandemově opakované struktury kyseliny sialové (jako jsou ty v GD<sub>3</sub> a GD<sub>2</sub>) zvýšily maligní vlastnosti rakovinných buněk, jako je buněčná proliferace, buněčná invaze a migrace, buněčná adheze a metastázy. Naproti tomu gangliosidy s pouze jednou vázanou kyselinou sialovou (tj. GM<sub>1</sub>, GM<sub>2</sub>, GM<sub>3</sub>) často potlačují maligní vlastnosti různých rakovinných buněk (Furukawa *et al.* 2019). Mnoho gangliosidů je



považováno za antigeny asociované s nádorem, jenž jsou nadměrně exprimovány při rakovině. V tomto důsledku bylo vyvinuto použití protinádorových gangliosidových monoklonálních protilátek pro diagnostiku, monitorování a léčbu pacientů s rakovinou (Groux-Degroote, Guérardel, a Delannoy 2017).

## **2.2 Metody izolace a přečištění GSL z biologických vzorků**

GSL se vyskytují ve všech tkáních, orgánech a biologických tekutinách. Značné množství GSL bylo nalezeno např. v plicích, srdci, střevech, ledvinách, sítnici a mozkomíšním moku. Zejména pak biologické tekutiny jako je krev a moč jsou vhodné pro studie biomarkerů, a to hned z několika důvodů. Tyto biologické vzorky lze jednak velmi snadno získat a jednak během patologických stavů může navíc docházet k odloučení GSL z povrchu poškozených tkání a jejich následnému přesunu do krevního oběhu (Barrientos a Zhang 2020). Krev, zejména plasma a sérum, patří mezi nejčastěji používané typy lidského biologického materiálu v současné lipidomické analýze (Wolrab *et al.* 2019). Krevní plasma je hlavním transportérem strukturálně odlišných molekul mezi orgány v lidském těle, přičemž metabolity krevní plasmy se běžně používají pro klinickou diagnostiku (Lee *et al.* 2014). Před samotnou chromatografickou analýzou je zapotřebí provést konvenční úpravu vzorků, která zahrnuje oddělení lipidů od ostatních molekul a iontů přítomných ve zkoumaném vzorku (Nováková a Douša 2013b; Uphoff 2008). Efektivní extrakce lipidů z biologických vzorků je důležitá pro úspěšnou kvalitativní a kvantitativní analýzu lipidů (Bang, Byeon, a Moon 2014). Mezi nejrozšířenější způsoby se řadí srážení proteinů (deproteinizace), extrakce z kapaliny do kapaliny (LLE) a extrakce na tuhou fázi (SPE), popřípadě kombinace výše zmíněných metod (Nováková a Douša 2013b).

### **2.2.1 Srážení proteinů (deproteinizace)**

Metodu deproteinizace lze použít jako alternativní způsob pro extrakci lipidů, kdy vysrážení proteinů probíhá nejčastěji ve vodě rozpustným organickým rozpouštědlem (Satomi, Hirayama, a Kobayashi 2017). Existuje několik způsobů, jak může být precipitace (srážení) proteinů provedeno, např. přidáním silných kyselin, organického rozpouštědla mísitelného s vodou, solí vícemocných iontů, kombinací deproteinizačních činidel nebo saturací materiálu síranem amonným (Nováková a Douša 2013b).

Vysrážení proteinů z tělních tekutin za pomoci organických rozpouštědel je nejjednodušší proces přípravy vzorku pro analýzu lipidů (Wolrab *et al.* 2019). Z organických rozpouštědel mísitelných s vodou lze pro srážení proteinů použít rozpouštědla jako je acetonitril (ACN), metanol (MeOH), etanol (EtOH), aceton (ACE) a izopropylalkohol (IPA). Bylo však zjištěno, že ACN není příliš vhodným činidlem pro extrakci lipidů, jelikož potenciálně aktivuje některé enzymy během procesu srážení proteinů (Satomi, Hirayama, a Kobayashi 2017). Mnoho studií také prokázalo, že pro profilování polárních sloučenin pomocí hmotnostní spektrometrie jsou nejvhodnější metody srážení proteinů za použití studených organických rozpouštědel, přičemž nejčastěji používaným rozpouštědlem je metanol (Lee *et al.* 2014).

Během procesu srážení proteinů by mělo dojít k odstranění proteinů i o malé molekulové hmotnosti. Supernatant získaný odstředěním je následně použit buď přímo k analýze, nebo je nejprve odpařen do sucha a vzniklý odparek je rozpuštěn v mobilní fázi a následně analyzován (Nováková a Douša 2013b)

Hořejší *et al.* (2021) uvádí, že deproteinizace pomocí ACN není efektivní metodou pro extrakci GSL kvůli významnému poklesu intenzity lipidových druhů a zároveň není pravděpodobně dostatečná k vysrážení všech proteinů ve vzorku. Dále uvádí, že použití ACE sice přináší lepší výsledky, ale stále ne dostačující, čímž dospívá k závěru, že precipitace na bázi alkoholu představuje jeden z nejlépe vyhovujících postupů přípravy vzorku pro analýzu GSL na bázi LC-MS.

### **2.2.2 Extrakce typu kapalina–kapalina (LLE)**

Jednou z nejvíce využívaných extrakčních metod v lipidomice je extrakce z kapaliny do kapaliny (LLE, liquid–liquid extraction). Tento způsob extrakce je hojně využíván především kvůli nenáročnosti provedení, pomocí něhož lze extrahovat látky ve vysokých výtěžcích, a to i z méně koncentrovaných vzorků. Tato metoda není rovněž náročná z hlediska přístrojového vybavení. Princip LLE spočívá v tom, že se analyt převede z vodné fáze do organického rozpouštědla, které je s vodou nemísitelné a tím dojde k vyextrahování požadovaného analytu ze vzorku (Nováková a Douša 2013b).

Mezi nejčastěji využívané extrakce typu LLE patří metoda dle Folche (1957) Bligha and Dyera (1959), Mathyase (2008) a Alshehryho (2015). Lipidy byly a stále jsou tradičně extrahovány směsí rozpouštědel zahrnující chloroform a metanol. Mezi tyto metody řadíme extrakce podle Folche a Bligha a Dyera, které byly původně

vyvinuty pro extrakci lipidů zejména z tkání a tekutin. Obě zmíněné metody jsou založené na vytvoření dvoufázového systému, ve kterém jsou lipidy rozděleny do organické fáze (Griffiths *et al.* 2020).

Bylo zjištěno, že Folchova metoda je neúčinnější LLE metodou pro extrakci široké škály lipidových tříd, tj. získání celkového lipidového extraktu. Používá se jako referenční proces extrakce v mnoha laboratořích pro širokou škálu biologických tekutin, včetně krve, moči, slin či mozkomíšního moku. Při použití této metody je vzorek homogenizován směsí rozpouštědel chloroform/metanol v objemovém poměru 2:1. (Folch, Lees, a Stanley 1957; M. W. K. Wong *et al.* 2019). Po vytvoření dvou fází je spodní organická fáze shromážděna a použita pro analýzu lipidů. Horní vodná fáze se používá k analýze primárních metabolitů (Lee *et al.* 2014).

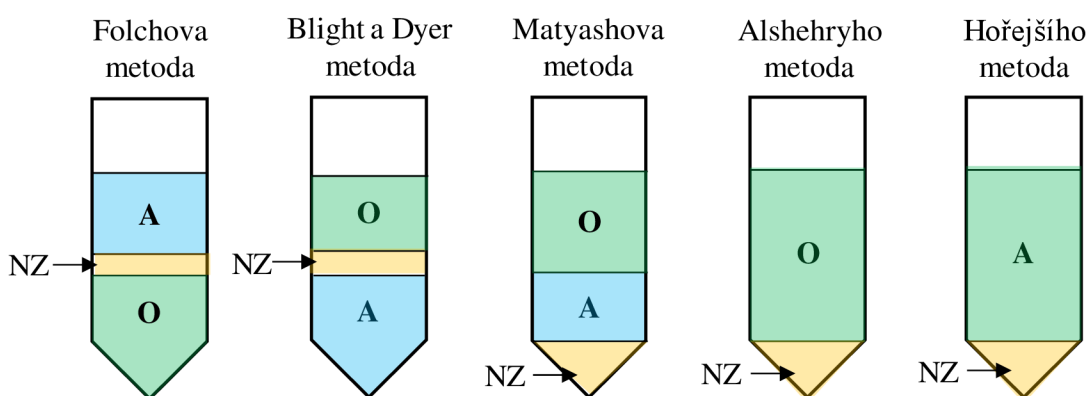
V návaznosti na Folche představili Bligh a Dyer metodu, při níž probíhá extrakce a rozdělení současně. Tato metoda je zvláště vhodná pro extrakci lipidů z inkubačního média, tkáňových homogenátů nebo buněčných suspenzí. Nevýhodou této metody je poskytování výrazně nižších odhadů obsahu lipidů ve vzorcích obsahujících více než 2 % lipidů v porovnání s Folchovou extrakční metodou (Folch, Lees, a Stanley 1957). Při použití této metody je vzorek smíchán se směsí chloroform/metanol jak je tomu u Folchovy metody, akorát v obráceném objemovém poměru 1:2. Horní vodná fáze je použita pro analýzu primárních metabolitů a spodní organická fáze slouží pro profilování lipidů po předchozím vysušení (Lee *et al.* 2014).

Další extrakce typu LLE je Matyashova metoda, která využívá pro extrakci lipidů methyl-terc-butylether (MTBE) (Matyash *et al.* 2008). Nahrazení chloroformu za MTBE prokázalo podobnou extrakci hlavních lipidových tříd. Tato metoda je významná zejména pro extrakci sfingolipidů a bylo prokázáno, že dosahuje podobné či dokonce lepší účinnosti při extrakci lipidů jak metoda Folchova (M. W. K. Wong *et al.* 2019). V rámci této metody se vzorek mísí se směsí MTBE/metanol v objemovém poměru 10:3 a následná fázová separace je dosažena pomocí přídavku vody. Kvůli nízké hustotě MTBE tvoří organická fáze obsahující lipidy horní vrstvu během separace (Matyash *et al.* 2008).

Jedním z nejnovějších typů LLE extrakce je Alshehryho metoda. Oproti předchozím zmíněným metodám se jedná o jednofázovou extrakci směsí rozpouštědel metanol/1-butanol v objemovém poměru 1:1. Tato novější metoda (společně s MTBE) eliminuje potřebu pipetovat lipidy ze spodní fáze, čímž do jisté míry omezuje možnou kontaminaci extraktu v důsledku narušení mezivrstvy složené z neextrahovatelných

zbytků (NZ), jak je tomu u metody podle Folche a Bligha a Dyera. MTBE metoda je zároveň bezpečnější a šetrnější k životnímu prostředí, jelikož není v této metodě použit chloroform. Alshehryho metoda naopak nezahrnuje dvoufázovou separaci rozpouštědel, a proto by mohla poskytovat lepší výtěžnost lipidů než metoda Matyasova (M. W. K. Wong *et al.* 2019).

Extrakce lipidů lze také provádět pomocí rozpouštědel na bázi alkoholu, jak je tomu u Alshehryho metody nebo nedávno publikované metody založené na kombinaci srážení proteinů pomocí směsi etanolu a vody s následným přečištěním pomocí extrakce na tuhé fázi (Hořejší *et al.* 2021). Rozdělení nerozpuštěných zbytků (NZ), vodné (A) a organické (O) fáze u výše zmíněných extrakčních metod je uvedeno na obr. 5.



Obr. 5: Znázornění separace jednotlivých fází u nejběžnějších typů LLE extrakcí používaných v lipidomické analýze – vlastní tvorba.

### 2.2.3 Extrakce tuhou fází (SPE)

Extrakce na tuhou fázi (SPE, solid-phase extraction) je typ extrakce, při níž dochází k rozdělení analytu mezi tuhou fází (sorbenť v extrakční kolonce) a kapalnou fází (kapalný vzorek obsahující analyty). Tato extrakční metoda zároveň přináší mnoho výhod. Mezi hlavní benefity SPE extrakce lze zahrnout možnost účinného zakoncentrování a přečištění analytu, vysokou výtěžnost či lepší možnost automatizace (Nováková a Douša 2013b).

Pro úspěšnou SPE extrakci je důležité dodržet několik zásad, které se týkají správného zacházení se vzorkem i sorbentem. Existuje velké množství sorbentů, např. nepolární fáze C18 nebo C8, dále polární fáze (např. aminopropyl, silikagel, oxid hlinitý), iontově výměnné materiály, různé polymerní materiály (např. PMMA, polymethylmethakrylát) a mnoho dalších. Po převedení vzorku do kapalné fáze je nutné

modifikovat kapalnou fázi tak, aby byla kompatibilní s tuhou fází v kolonce. Metoda SPE zahrnuje několik kroků jdoucích po sobě – kondicionování (aktivace sorbentu), ekvilibraci (příprava před nanesením vzorku), nanesení vzorku, promývání (odstranění nežádoucích látek) a eluci (vymytí požadovaných analytů) (Nováková a Douša 2013b).

V lipidomice se SPE extrakce často využívá pro extrakci polárnějších lipidů z biologických tekutin, a to zejména pokud je potřeba vyšší selektivita a citlivost. (Griffiths *et al.* 2020; Wolrab *et al.* 2019).

Mezi SPE metody můžeme zařadit také extrakční metodu Quechers (quick, easy, cheap, effective, rugged, safe), která byla původně vyvinuta pro multireziduální analýzu pesticidů obsažených v potravinách, dále byla vyvinuta pro extrakci polycyklických aromatických uhlovodíků v rybách, reziduí veterinárních léčiv ve zvířecí tkáni a léčiv z plné krve. Prvním krokem Quechers metody je extrakce acetonitrilem, který je následně oddělen od vodné matrice za použití bezvodého síranu hořečnatého absorbujícího vodu a octanu sodného ke zvýšení separace fází. Druhým krokem je disperzní extrakce v pevné fázi k vyčištění nečistot pomocí sorbentů. (Bang, Byeon, a Moon 2014).

Nově vyvinutá metoda využívající pro izolaci a čištění GSL z lidské krevní plazmy jednofázový systém rozpouštědel etanol/voda, jako bezpečnější alternativu k chloroformu, následovaná SPE extrakcí na bázi C18, se ukázala jako optimální metoda pro izolaci a purifikaci GSL z lidské krevní plazmy. Při přípravě vzorků pro analýzu GSL z krevní plasmy by měla být vyžadovaná SPE extrakce, protože eliminuje značné množství solí, které mohou způsobovat potlačení signálu v iontovém zdroji, a v konečném důsledku tak může výrazně zvýšit citlivost dané metody. Možnou nevýhodou však může být ztráta určité části analytu během procesu SPE extrakce (Hořejší *et al.* 2021).

SPE extrakce s sebou nese i další nevýhody mezi které lze zařadit relativně vysokou spotřebu vzorku i rozpouštědel a několika krokový způsob přečištění, popřípadě nutnost odpaření extraktu a jeho opětovné rozpuštění ve vhodném rozpouštědle či mobilní fázi. Méně závažným problémem je většinou jednorázové použití SPE kolonek, které vede ke zvýšení ekonomických nákladů, i přes to je ale extrakce na tuhou fázi jednou z nejrozšířenějších technik využívanou v laboratořích pro úpravy vzorků před samotnou analýzou (Nováková a Douša 2013b).

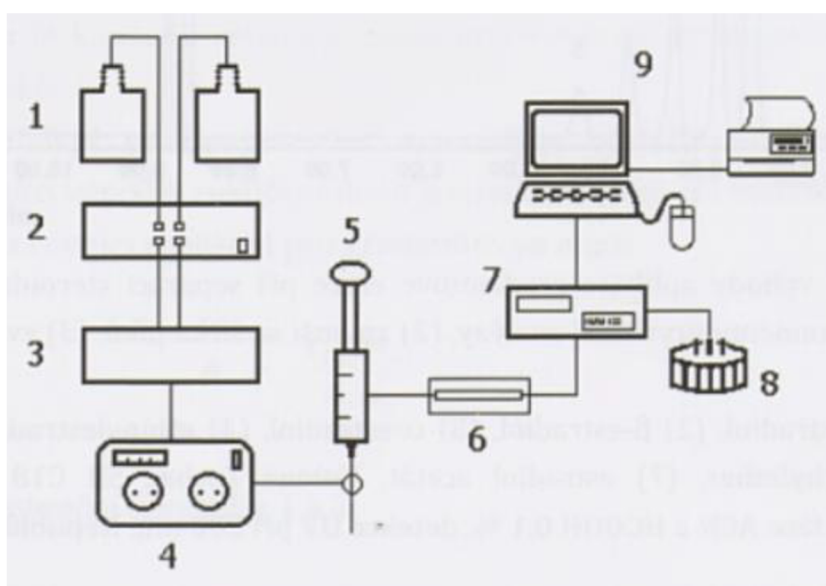
## 2.3 Analytické možnosti stanovení GSL v biologických vzorcích

### 2.3.1 Kapalinová chromatografie

Kapalinová chromatografie (LC, Liquid Chromatography) patří mezi nejčastěji používané analytické metody v lipidomické analýze. Kapalinová chromatografie se řadí mezi separační techniky založené na rozdílné distribuci dělených látek ve směsi mezi dvě různé nemísitelné fáze. Mobilní (pohyblivou) fází v kapalinové chromatografii je kapalina a stacionární (nepohyblivou) fází může být tuhá látka či kapalina ukotvená na tuhém nosiči, která je umístěna v chromatografické koloně ve formě sorbentu, jímž protéká mobilní fáze. Fázové rozhraní je zde důležité pro distribuci mezi stacionární a mobilní fází (Nováková a Douša 2013a).

Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC, High-Performance Liquid Chromatography) je nejčastějším druhem kapalinové chromatografie, při kterém je mobilní fáze přiváděna do systému pomocí čerpadla za vysokého tlaku (Nováková a Douša 2013a). HPLC má výhodu v tom, že je poměrně levná a velice uznávaná v oblasti lipidomiky pro rutinní analýzu komplexních lipidových směsí (Haynes *et al.* 2009; Pham *et al.* 2019).

Mezi základní části kapalinového chromatografu (viz obr. 6) patří zásobníky mobilní fáze (1), odplyňovač (2), směšovací zařízení (3), vysokotlaké čerpadlo (4), autosampler + dávkovací ventil (5), chromatografická kolona (6), detektor (7), sběrač frakcí nebo nádoba na odpad (8) a počítač (9).



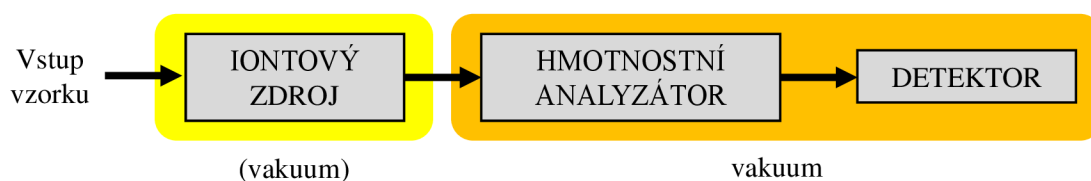
Obr. 6: Schéma kapalinového chromatografu (převzato z Nováková a Douša 2013a).

V HPLC je mobilní fáze přiváděna pomocí vysokotlakého čerpadla přes odplyňovač do směšovacího zařízení odkud je následně vedena do dávkovacího zařízení (tzv. autosampleru). V autosampleru dochází k nástřiku vzorku do proudu mobilní fáze a vzorek je dále unášen na chromatografickou kolonu, kde dochází k separaci jednotlivých složek vzorku na základě fyzikálně-chemických vlastností. Po průchodu chromatografickou kolonou jsou analyty v mobilní fázi detekovány detektorem. Výstupem detektoru je grafický záznam závislosti odezvy detektoru na čase, tzv. chromatogram (Klouda 2016; Křížek a Šíma 2015; Nováková a Douša 2013a).

Separace na chromatografické koloně může probíhat při stejném složení elučního činidla po celou dobu analýzy (tzv. izokratická eluce), nebo se může během analýzy složení elučního činidla měnit (tzv. gradientová eluce) (Nováková a Douša 2013b).

### 2.3.2 Hmotnostní spektrometrie

Jednou z nedílných součástí analýzy pomocí kapalinové chromatografie je spojení s hmotnostní spektrometrií (MS, Mass Spectrometry). Hmotnostní spektrometrie je analytická metoda založena na převedení molekul analytů na ionty a jejich následném rozdělení podle poměru jejich hmotnosti k náboji ( $m/z$ ). Výsledkem je záznam závislosti relativní intenzity iontů na poměru  $m/z$ , tzv. hmotnostní spektrum (Klouda 2016; Křížek a Šíma 2015). Mezi základní části hmotnostního spektrometru patří iontový zdroj, hmotnostní analyzátor, detektor, vakuový systém a vyhodnocovací zařízení (viz obr. 7).



Obr. 7: Obecné schéma hmotnostního spektrometru (Nováková a Douša 2013a).

Celý proces v hmotnostním spektrometru probíhá celkem ve třech fázích. Nejprve jsou neutrální molekuly analytu přivedeny do iontového zdroje, kde jsou převedeny na nabitě částice, tzv. ionty. Typ iontového zdroje se liší podle druhu použité ionizační techniky. V lipidomické analýze patří mezi nejčastěji používané ionizační techniky ve spojení kapalinové chromatografie s hmotností detekcí (LC-MS) ionizační techniky za

atmosférického tlaku (tzv. API techniky). Zejména elektrosprejová ionizace (ESI) se stala průlomovou technikou, neboť její oblast použití pokrývá široký rozsah polarit, a to od středně polárních až po iontové sloučeniny. V případě málo polárních či nepolárních sloučenin mohou nastat problémy. Kromě toho je i rozsah molekulové hmotnosti ESI výrazně širší než u jiných API technik jako je chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI) nebo fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI), a to i kvůli tvorbě vícenásobně nabitých iontů pro proteiny a jiné biopolymery. Typickými aplikacemi ESI jsou různé třídy bio(makro)molekul např. peptidy, proteiny, nukleotidy, polysacharidy nebo fosfolipidy (Holčapek, Jirásko a Lísa 2010). Princip ESI spočívá v tom, že analyt rozpuštěný ve vhodné mobilní fázi je přiváděn tenkou kapilární jehlou, na níž je vloženo vysoké napětí. Pomocí proudu zmlžujícího plynu (např. N<sub>2</sub>) dochází k postupnému odpařování rozpouštědla, zvyšování povrchového náboje a následné coulombické explozi, čímž vzniká velmi jemný aerosol nabitých částic. Takto vzniklé nabitě částice jsou následně urychleny a transportovány pomocí iontové optiky z části s atmosférickým tlakem do oblasti vysokého vakua hmotnostního analyzátoru. ESI může být prováděna v kladném nebo záporném režimu (Farwanah a Kolter 2012). V hmotnostním analyzátoru následně dochází k rozdělení iontů podle jejich poměru  $m/z$ , a to na základě rozdílných principů v závislosti na použitém typu hmotnostního analyzátoru. Mezi hmotnostní analyzátory řadíme např. iontové pasti, kvadrupólový analyzátor, analyzátor doby letu, orbitrap nebo iontovou cyklotronovou rezonanci (Klouda 2016; Křížek a Šíma 2015). V posledním kroku dochází k detekci proudu iontů, zesílení signálu detekovaných iontů pomocí elektronových násobičů nebo systému konverzních dynod a fotonásobiče, a následnému převodu signálu do podoby hmotnostního spektra (Nováková a Douša 2013b).

### ***2.3.3 Přehled metod a přístupů používaných v lipidomice***

Enormní růst v oblasti hmotnostní spektrometrie (MS) a její propojení se separačními technikami v posledních desetiletích stále pokračuje, což generuje zejména obrovské množství nových HPLC-MS systémů (vysokoučinná kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí) instalovaných po celém světě v akademických, průmyslových, farmaceutických a klinických laboratořích. Spojení separačních technik s MS je již dlouhou dobu předmětem velkého zájmu kvůli potenciálu při identifikaci chromatografických píků (Holčapek, Jirásko, a Lísa 2010).



Hmotnostní spektrometrie se ukázala jako vhodná metoda pro analýzu lipidů (Farwanah, Kolter, a Sandhoff 2011). Studie prokázaly, že hmotnostní spektrometrie je vhodná pro lipidomickou analýzu z několika důvodů. Poskytuje vysokou specifčnost s ohledem na identifikaci a strukturní charakterizaci komplexních sloučenin (možnost  $MS^2$ , popř.  $MS^n$  experimentů), lepší úroveň citlivosti, odezvu signálu lze korelovat s koncentrací analytu a také poskytuje široký dynamický rozsah (A. H. Merrill *et al.* 2005).

Lipidy se tradičně analyzují pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC), plynové chromatografie (GC) a chromatografie na tenké vrstvě (TLC) (Uphoff 2008). Poslední z výše zmíněných metod (tj. TLC), lze využít k izolaci specifických tříd GSL. Izolace se provádí na TLC destičce a za pomoci vhodného rozpouštědlového systému s následnou detekcí pomocí barviv (Barrientos a Zhang 2020). TLC na silikagelu je po desetiletí základním kamenem biochemické detekce gangliosidů a je dnes stále široce využívána, protože nabízí řadu výhod včetně nízké nákladnosti, jednoduchosti a možnosti kvantifikace pomocí kolorimetrických metod. TLC separace umožňuje nejen účinnou detekci molekulárních druhů, ale také jejich přípravu pro další strukturální analýzy (Groux-Degroote, Guérardel, a Delannoy 2017). Ačkoliv TLC je vysoce používanou technikou pro analýzu lipidů, profilování pomocí MS je zcela nepostradatelné pro získání strukturních informací o různých molekulárních druzích v rámci daných tříd lipidů (Kouzel *et al.* 2014).

V současné lipidomické analýze lze rozlišit tři hlavní přístupy: (1) analýza přímou infuzí do MS (tzv. shotgun analýza), (2) analýza pomocí kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní detekcí (LC-MS) a (3) hmotnostně-spektrometrické zobrazování (MSI, mass spectrometry imaging) využívající desorpční ionizační techniky (Holčapek, Liebisch, a Ekroos 2018).

### *1. Přímá infuze („shotgun“)*

U „shotgun“ přístupu jsou lipidy analyzovány pomocí MS ze surových lipidových extraktů bez předchozí chromatografické separace (Farwanah a Kolter 2012). Tento přístup je považován za jednoduchý a účinný zejména pro materiály bohaté lipidy. Mezi hlavní nevýhodu patří vysoké potlačení signálu, neboť veškeré lipidy včetně biologické matrice jsou analyzovány v jeden čas (Farwanah, Kolter, a Sandhoff 2011).

## 2. Kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní detekcí

Při analýze sfingolipidů se ukázaly velmi užitečné dva typy kapalinové chromatografie (LC). Jednak LC s reverzní fází (RP-LC), která se využívá pro separaci v závislosti na délce a stupni nasycení ceramidové části molekuly (tj. separace na jednotlivé molekulární druhy) a jednak LC s normálními fázemi (NP-LC), při níž dochází k separaci sloučenin primárně podle hydrofilní hlavní části molekuly (tj. separace na jednotlivé podtřídy) (A. H. Merrill *et al.* 2005; A. H. Merrill 2011).

Elektrosprejová ionizace (ESI) je nejčastěji používaná ionizační technika v lipidomické analýze (Farwanah a Kolter 2012), která ve spojení s kapalinovou chromatografií a tandemovou hmotnostní detekcí (LC-ESI/MS<sup>2</sup>) poskytuje zlepšenou citlivost, selektivitu, možnost separace izomerních sloučenin a možnost vysoce výkonných experimentů v porovnání s přímou infuzí do MS (shotgun) (Groux-Degroote, Guérardel, a Delannoy 2017). LC-ESI/MS<sup>2</sup> je tedy jedna z nejvhodnějších a preferovaných analytických metod, která je schopna poskytnout nezbytnou citlivost, a zároveň umožnit kompletní kvalitativní i kvantitativní lipidomickou analýzu i v malých množstvích vzorku (Haynes *et al.* 2009; A. H. Merrill *et al.* 2005).

V současné době je také patrný značný zájem o použití kapalinové chromatografie s hydrofilní interakcí (HILIC), která umožňuje separaci tříd lipidů na základě složení hlavních skupin (Pham *et al.* 2019). HILIC je zvláště vhodná pro analýzu polárních ionizovaných rozpuštěných látek, které je obtížné separovat pomocí technik s reverzní fází (RP-LC). Mimo jiné má oproti RP-LC i další výhody, jako jsou například kratší doba analýzy a společná eluce analytů a jejich vnitřních standardů (Farwanah a Kolter 2012). Nevýhodou této metody může být zejména delší doba ekvilibrace kolony a nemožnost separace isomerů (McCalley 2018).

## 3. Hmotnostně-spektrometrické zobrazování

Hmotnostně spektrometrické zobrazování (MSI) má v lipidomice velký potenciál. Většina studií analýzy lipidů založených na MSI používá jako ionizační metodu ionizaci laserem za účasti matrice (MALDI). MALDI lze možné provádět ve vakuu nebo při atmosférickém tlaku (Griffiths *et al.* 2020; Uphoff 2008). ESI a MALDI patří mezi nejrozšířenější ionizační techniky pro identifikaci polárních lipidů, zatímco pro nepolární lipidy je preferována chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI) (Lísa, Cífková, a Holčapek 2011). Vzorky pro MALDI se často připravují smícháním

roztoku obsahujícího analyt s roztokem obsahující matrici, která je obvykle ve větší koncentraci než analyt (Haynes *et al.* 2009). Rovněž vhodný výběr matrice je velice důležitý, jelikož může významně ovlivnit výsledky (Farwanah a Kolter 2012). Matrice pro MALDI jsou nejčastěji malé substituované organické kyseliny, které obsahují část schopnou absorbovat energii laseru, což způsobí přenos molekul matrice, iontů a molekul analytu do plynné fáze a následně dochází k ionizaci analytu. MALDI technika produkuje primárně jednonásobně nabitě ionty, což v kombinaci s MS přístroji s vysokým rozlišením (např. analyzátor doby letu, TOF) napomohlo při pozorování GSL s vyšší molekulovou hmotností (Haynes *et al.* 2009). Hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí a ionizací za účasti matrice a analyzátozem doby letu (MALDI-TOF-MS) může být aplikována na všechny známé třídy lipidů pro stanovení strukturních charakteristik lipidů z buněk, tkání, tělních tekutin a pro analýzu jejich lipidomů (Kouzel *et al.* 2014).

### 3 CÍLE PRÁCE A VÝZKUMNÉ OTÁZKY

Pro tuto bakalářskou práci byly stanoveny následující cíle:

- Vypracovat literární rešerši na dané téma
- Provést testovací analýzu glykosfingolipidů v lidské krevní plasmě pomocí metody HILIC-ESI-MS/MS
- Provést srovnání alespoň 3 různých postupů extrakce pro izolaci vybraných podtříd glykosfingolipidů z lidské krevní plasmy včetně následného hodnocení
- Provést identifikaci a strukturní charakterizaci glykosfingolipidů detekovaných v lidské krevní plasmě pomocí metody HILIC-ESI-MS/MS
- Vytvořit profil glykosfingolipidů v lidské krevní plasmě

Na základě stanovených cílů byly sestaveny výzkumné otázky:

- Jaký je současný stav poznání v analýze glykosfingolipidů v biologických vzorcích?
- Jaké podtřídy glykosfingolipidů se vyskytují v krevní plasmě?
- Jaké metody jsou vhodné pro izolaci glykosfingolipidů z krevní plasmy?
- Koreluje struktura glykosfingolipidů s již dříve publikovanými výsledky?
- Které konkrétní glykosfingolipidy se vyskytují v krevní plasmě?

## 4 MATERIÁL A METODIKA

### 4.1 Použité chemikálie a rozpouštědla

- Etanol – čistota pro LC:  $\geq 99,9$  % (Merck)
- Metanol – čistota pro LC-MS:  $\geq 99,9$  % (Honeywell, Riedel-de Haën)
- Chloroform stab. 1 % etanolu – čistota pro analýzu:  $\geq 99,8$  % (Penta Chemicals)
- Metyl terc-butyleter – čistota pro analýzu:  $\geq 99,5$  % (Merck)
- Butan-1-ol – čistota pro analýzu:  $\geq 98$  % (Chromservis)
- Dusík – čistota 4.0 (produkovaný generátorem dusíku, viz níže)
- Deionizovaná voda (Milli-Q)
- Dezinfekce Betadine kožní roztok (75 mg/ml)
- Kyselina octová – čistota pro LC-MS:  $\geq 99,9$  % (Sigma Aldrich)
- Octan amonný – čistota pro LC-MS:  $\geq 99,9$  % (Sigma Aldrich)
- Acetonitril – čistota pro LC-MS:  $\geq 99,9999$  % (Fisher Chemical)
- Zásobní roztok standardu GlcCer 30:1;O2 (18:1;O2/12:0) o molekulové hmotnosti 643,935 g/mol a koncentraci 2 mg/ml (Avanti Polar Lipids)
- Zásobní roztok standardu GalCer 30:1;O2 (18:1;O2/12:0) o molekulové hmotnosti 643,935 g/mol a koncentraci 2 mg/ml (Avanti Polar Lipids)
- Zásobní roztok standardu LacCer 30:1;O2 (18:1;O2/12:0) o molekulové hmotnosti 806,076 g/mol a koncentraci 2 mg/ml (Avanti Polar Lipids)
- Zásobní roztok standardu Gb<sub>3</sub> 35:1;O2 (18:1;O2/17:0) o molekulové hmotnosti 1038,360 g/mol a koncentraci 500 µg/ml (Matreya LLC)

### 4.2 Instrumentální vybavení, pomůcky a spotřební materiál

- Kapalinový chromatograf Ultimate 3000 (Thermo Fisher Scientific)
- Hmotnostní spektrometr Velos Pro (Thermo Fisher Scientific)
- Chromatografická kolona Ascentis Si (581502-U) 15 cm × 2,1 mm; 3 µm (Sigma Aldrich)
- Generátor dusíku Genius 1022 (Peak Scientific)
- Analytické váhy MS105DU (Metler Toledo)
- Centrifuga Sigma 3–30 K (Sigma Laborzentrifugen GmbH)
- Ultrazvuková lázeň Powersonic 603 (Hwashin Technology Company)
- Vakuový manifold na SPE kolonky s příslušenstvím (BDL)

- Koncentrátor vzorků s vyhříványými termobloky Stuart SBH130D/3 (Bibby Scientific Limited)
- Vortexová třepačka V3 S000 (IKA)
- Orbitální třepačka Orbit 1000 (Labnet)
- Výrobník deionizované vody Barnstead Smart2Pure Water Purification system 6 UV/UF (Thermo Fisher Scientific)
- Automatická dávkovací pipeta TransferPette<sup>®</sup> o objemu 0,5–5 ml, sériové číslo 06C0378 (Brand)
- Automatická dávkovací pipeta BioPette<sup>PLUS</sup> o objemu 100–1000  $\mu$ l, sériové číslo 440960561 (Labnet)
- Automatická dávkovací pipeta BioPette<sup>PLUS</sup> o objemu 20–200  $\mu$ l, sériové číslo 440950503 (Labnet)
- Automatická dávkovací pipeta BioPette<sup>PLUS</sup> o objemu 2–20  $\mu$ l, sériové číslo 440930369 (Labnet)
- Automatická dávkovací pipeta BioPette<sup>PLUS</sup> o objemu 0,5–10  $\mu$ l, sériové číslo 440920165 (Labnet)
- SPE kolonky Spe-ed C18/18, 500 mg sorbentu, velikost částic 40  $\mu$ m, porozita 60 Å (Applied Separations)
- Skleněné lahve s GL uzávěrem o objemu 250 ml a 500 ml
- Odměrné baňky o objemu 250 ml a 500 ml
- Stříčka s destilovanou vodou a stříčka s etanolem
- Kádinky o objemu 50, 100 a 250 ml
- Zkumavky na odběr krve Vacutest Kima o objemu 6 ml (K<sub>2</sub>EDTA)
- Skleněné vialky se šroubovacím uzávěrem o objemu 4, 8 a 40 ml
- Skleněné krimpovací vialky o objemu 2,0 ml
- Plastové stojánky na vialky a mikrozkušavky
- Plastové držáky jehel
- Hliníková krimpovací víčka ND11 se septem pryž/PTFE (Thermo Fisher Scientific)
- Špičky pro automatické pipety o objemu 10, 200, 1000 a 5000  $\mu$ l
- Inserty o objemu 200  $\mu$ l (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG)
- Plastové zkumavky s uzávěrem o objemu 15 ml (Fisherbrand)

- Plastové mikrozskumavky o objemu 1,5 ml – typ eppendorf (Thermo Fisher Scientific)
- Jehly na odběr krve Vacutest o průměru 0,8 a 0,9 mm
- Manuální krimpovací kleště (11 mm)
- Turniket (42–45 cm)
- Ochranné (nitrilové) rukavice
- Keramická navažovací lodička
- Kopist
- Ostatní pomůcky: lihové popisovače, buničitá vata

### 4.3 Příprava roztoků

#### 4.3.1 Příprava mobilní fáze

Mobilní fáze A (MF-A) byla připravena odměřením 250 ml acetonitrilu (ACN) pomocí odměrného válce (250 ml) do 500ml odměrné baňky, velmi slabě okyselena odpipetováním 2,5  $\mu$ l kyseliny octové ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) pomocí automatické dávkovací pipety (0,5–10  $\mu$ l) a následně doplněna acetonitrem po rysku.

Mobilní fáze B (MF-B) byla připravena navážením 0,19465 g octanu amonného ( $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ ). Navážka byla následně kvantitativně převedena do 250ml odměrné baňky pomocí 10% roztoku acetonitrilu v destilované vodě, velmi slabě okyselena odpipetováním 1,25  $\mu$ l kyseliny octové ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) pomocí automatické dávkovací pipety (0,5–10  $\mu$ l) a následně doplněna 10% roztokem acetonitrilu ve vodě po rysku.

#### 4.3.2 Příprava směšného roztoku standardů

Směsný roztok standardů o celkovém objemu 100  $\mu$ l byl připraven pipetováním jednotlivých zásobních roztoků standardů a metanolu do skleněné krimpovací vialky s insertem (200  $\mu$ l) a to dle postupu uvedeného v tab. 1.

Tab. 1: Příprava směšného roztoku standardů.

Standard	Objem zás. roztoku [ $\mu$ l]	Objem MeOH [ $\mu$ l]	Výsledná koncentrace [ $\mu$ g/ml]
GlcCer 30:1;O2	5		100
GalCer 30:1;O2	5		100
LacCer 30:1;O2	5	75	100
Gb <sub>3</sub> 35:1;O2	10		50

#### 4.3.3 Příprava extrakčních rozpouštědel pro srovnání extrakcí

Pro účely srovnání extrakcí pro izolaci GSL z lidské krevní plasmy bylo nejprve potřeba připravit příslušné směsi extrakčních činidel. Níže uvedená extrakční činidla byla připravena v dostatečném objemu odpipetováním příslušných rozpouštědel (tj. metanolu, MeOH; chloroformu,  $\text{CHCl}_3$ , metyl terc-butyleteru, MTBE a butanolu) v daném poměru pomocí automatické dávkovací pipety (0,5–5 ml), a to do skleněných



vialek se šroubovacím uzávěrem o celkovém objemu 40 ml. Složení příslušných směsí extrakčních činidel použitých pro srovnání LLE extrakcí je uvedeno v tab. 2.

Tab. 2: Složení příslušných extrakčních činidel pro srovnání LLE extrakcí.

LLE extrakce	Folchova metoda	Bligh a Dyer metoda	Mathyasova metoda	Alshehryho metoda
<b>Směs rozpouštědel</b>	CHCl <sub>3</sub> /MeOH	CHCl <sub>3</sub> /MeOH	MTBE/MeOH	Butanol/MeOH
<b>Poměr</b>	2/1 (v/v)	1/2 (v/v)	10/3 (v/v)	1/1 (v/v)
<b>Zdroj</b>	Folch <i>et al.</i> 1957	Blight a Dyer 1959	Matyash <i>et al.</i> 2008	Alshehry <i>et al.</i> 2015

#### 4.4 Odběr a zpracování vzorků krve

##### 4.4.1 Odběr vzorků krve

Odběry krve byly provedeny na Katedře chemie PřF JU v Českých Budějovicích poté, co byly obdrženy informované souhlasy od všech dárců (zdravých jedinců), kteří byli předem podrobně seznámeni s podmínkami, průběhem a účelem odběru krve. Odběr vzorků plné krve byl proveden všeobecnou sestrou Mgr. Pavlou Karšulínovou. Vzor informovaného souhlasu je uveden v Příloze 1.

Vzorky plné krve byly odebrány ráno na lačno z periferní žíly natažené paže (loketní jamka) pomocí uzavřeného odběrového systému, a to od 8 zdravých jedinců označených P01 až P08 (tj. 4 muži a 4 ženy), jejichž údaje jsou uvedeny v tab. 3. Před samotnou venepunkcí byla paže zatažena pomocí turniketu a následně bylo místo vpichu jehly vydezinfikováno. Po napíchnutí žíly byl turniket uvolněn a vzorek krve byl odebrán do zkumavek Vacutest Kima (objem 6 ml) s protisrážlivým roztokem K<sub>2</sub>EDTA (fialové víčko). Odebrané vzorky byly ihned po odběru 6–8krát mírně promíchány, aby došlo k dokonalému promísení krve s protisrážlivým roztokem (tzv. nesrážlivá krev).

Tab. 3: Údaje zdravých jedinců (dobrovolníků) zahrnutých v této práci.

Ev. číslo	Pohlaví	Ročník	Výška [cm]	Váha [kg]	BMI* [1]	Krev. sk.	Dotazník – otázka č.		
							1 <sup>a</sup>	2 <sup>b</sup>	3 <sup>c</sup>
P01	muž	1993	196	110	28,63	0	NE	NE	Alergie ATB ?
P02	žena	1999	168	52	18,42	B	NE	NE	Alergie PY,R
P03	muž	1992	192	90	24,41	AB	NE	NE	NE
P04	žena	1993	165	57	20,94	0	NE	ANO:HA	NE
P05	muž	1994	160	70	27,34	B	NE	NE	SKP
P06	žena	1994	170	55	19,03	A	NE	NE	Alergie PY,PL
P07	muž	1981	170	83	28,72	A	NE	NE	NE
P08	žena	1999	172	71	24,00	0	NE	NE	NE

\* Index tělesné hmotnosti (BMI) byl vypočten podle vzorce: BMI = hmotnost [kg] / (výška)<sup>2</sup> [m]

<sup>a</sup> Máte aktuálně nějaké zdravotní potíže?

<sup>b</sup> Užíváte poslední měsíc nějaké léky? Uveďte které; hormonální antikoncepce (HA)

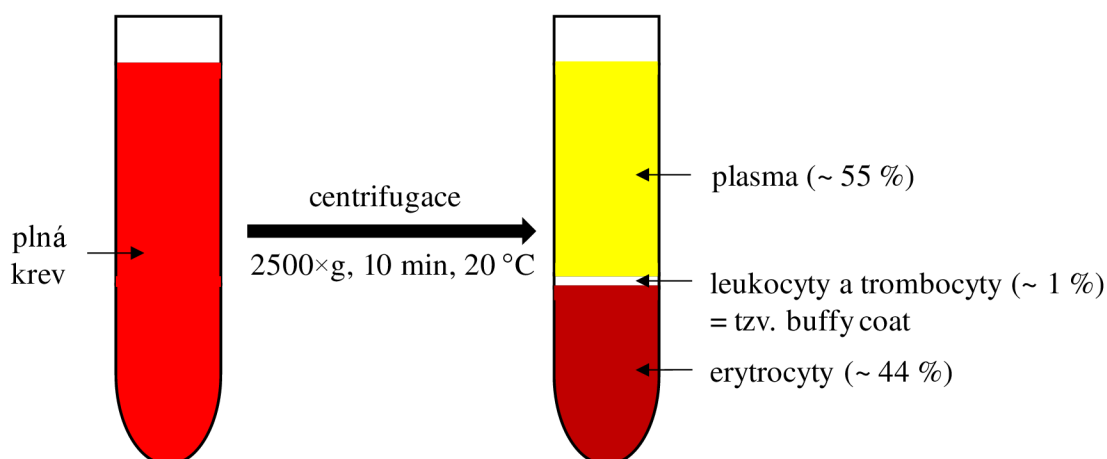
<sup>c</sup> Trpíte nějakým onemocněním? Jakým?

pyl (PY), plíseň (PL), roztoči (R), antibiotikum (ATB), typ není znám (?), srůst krční páteře (SKP)

#### 4.4.2 Zpracování krve – separace plasmy

Plasma byla oddělena od ostatních složek krve (tj. krevních destiček – trombocytů a krevních buněk – erytrocytů a leukocytů) centrifugací odebraných vzorků krve při  $2500 \times g$  (~ 4250 ot./min) v rotoru s fixním úhlem  $25^\circ$  po dobu 10 min při teplotě  $20^\circ C$  (viz obr. 8). Horní vrstva (plasma) byla rozdělena na stejné podíly (1,2 ml) pipetováním pomocí automatické pipety (100–1000  $\mu l$ ) do plastových mikrozkušavek o objemu 1,5 ml, které byly ihned zmrazeny a uskladněny v hlubokomrazicím boxu při teplotě  $-80^\circ C$ . Separace plasmy byla provedena vždy do 60 minut od odběru krve.

V odběrové zkumavce bylo v těsné blízkosti fázového rozhraní ponecháno malé množství plasmy, aby se zabránilo kontaminaci plasmy ostatními složkami krve.



Obr. 8: Separace krevních složek pomocí centrifugace.

#### 4.4.3 Příprava směsného vzorku plasmy

Za účelem pokrytí nehomogenního lipidového složení krevní plasmy byl připraven směsný vzorek plasmy umožňující identifikaci co možná největšího množství GSL. Pro přípravu byly použity vzorky plasmy 8 zdravých jedinců (P01 až P08) a to tak, že do plastové zkumavky (15 ml) bylo odpipetováno pomocí automatické pipety  $2 \times 0,75$  ml plasmy od každého zdravého jedince (tj. celkem bylo získáno 12 ml směsné plasmy). Vzniklý směsný vzorek plasmy byl dále homogenizován pomocí vortexové třepačky při 6000 ot./min po dobu 60 sekund. V konečné fázi byl homogenizovaný vzorek směsné plasmy rozpipetována na stejné podíly (1,2 ml) do nových plastových mikrozkušavek o objemu 1,5 ml, které byly následně také zmrazeny a uchovány v hlubokomrazicím boxu při teplotě  $-80$  °C do dalšího použití.

### 4.5 Izolace a extrakce GSL z lidské krevní plasmy

#### 4.5.1 Příprava extraktu plasmy pro účely testování a optimalizaci

Pro účely testování a následné optimalizace LC-MS metody byla provedena mírně upravená extrakce směsného vzorku plasmy postupem, který uvádí Hořejší *et al.* (2021) zahrnující odstranění proteinů (tzv. deproteinizaci) a přečištění pomocí SPE extrakce.

Pomocí automatické pipety bylo do 4ml skleněné vialky se šroubovacím uzávěrem odpipetováno 250  $\mu$ l směsného vzorku plasmy, poté byly přidány 3 ml etanolu a vzorek byl důkladně promíchán pomocí vortexové třepačky po dobu 1 minuty při 6000 ot./min. Vzorek byl následně umístěn do plastového stojanu a vložen do ultrazvukové lázně, kde

byl ponechán homogenizaci při teplotě 40 °C po dobu 10 minut. Homogenizovaný vzorek byl posléze vyndán z ultrazvukové lázně a vytemperován na okolní teplotu. Dále bylo ke vzorku přidáno 600 µl deionizované vody a vzorek byl opět promíchán pomocí vortexové třepačky po dobu 1 minuty při 6000 ot./min. Tímto způsobem připravený vzorek byl následně odstředěn pomocí centrifugy při 5000 × g a 20 °C po dobu 5 minut. Výsledný supernatant byl přenesen pomocí automatické pipety do nové skleněné vialky (4 ml) a odpařen ve vyhřívaném termobloku při 40 °C proudem dusíku do sucha. Pelet nebyl dále použit a byl vyhozen. Získaný odparek byl znovu rozpuštěn přidavkem 1 ml deionizované vody za pomoci vortexové třepačky při 6000 ot./min po dobu 1 minuty. Tímto postupem byl získán vzorek deproteinizované plasmy.

Deproteinizovaná plasma byla dále přečištěna pomocí SPE extrakce na kolonce Spe-ed C18/18 (500 mg sorbentu) a za pomoci vakuového manifoldu. SPE kolonka byla nejprve kondicionována 3 × 1 ml metanolu a ekvilibrována 3 × 1 ml deionizované vody. Následně byl na SPE kolonku nanesen 1 ml deproteinizované plasmy, kolonka byla promyta 3 × 1 ml deionizované vody (odstranění solí) a vysušena pomocí podtlaku po dobu 2 minut. Požadované analyty (tj. lipidy) zadržené na SPE kolonce byly následně vymyty 3 × 1 ml metanolu do 4ml skleněné vialky a odpařeny ve vyhřívaném bloku při 40 °C proudem dusíku. K získanému odparku bylo přidáno 50 µl metanolu a vzorek byl 60 sekund míchán pomocí vortexové třepačky při 6000 ot./min. V poslední fázi byl získaný extrakt plasmy přenesen do 2ml skleněné vialky s insertem (200 µl) a následně použit pro LC-MS analýzu, popř. zmražen a uchován při teplotě -80°C do další analýzy.

#### **4.5.2 Extrakce GSL z plasmy – srovnání extrakcí**

Extrakce GSL z lidské krevní plasmy pro účely srovnání extrakcí byla provedena pro celkem pět různých extrakčních metod (viz kapitola 2.2.2), jenž se v lipidomické analýze běžně používají. Postup extrakce byl následující: do čiré skleněné vialky se šroubovacím uzávěrem (4 ml) bylo odpipetováno pomocí automatické pipety 250 µl směsného vzorku plasmy a následně byly přidány 3 ml extrakčního rozpouštědla charakteristického pro danou extrakční metodu (viz tab. 2 v kapitole 4.3.3). Vzorek byl následně vortexován při 6000 ot./min (60 sekund) a poté vložen do ultrazvukového homogenizátoru, kde byl ponechán 10 min při 40 °C. Homogenizovaný vzorek byl poté vyjmut z ultrazvukové lázně a přendán na orbitální třepačku, kde byl ponechán třepání po dobu 1 hodiny při 300 ot./min. Rozdělení organické a anorganické (vodné) fáze

u dvoufázových metod (tj. metody podle Folche, Bligha a Dyera a Matyashe) bylo vyvoláno přidavkem 600  $\mu$ l deionizované vody a následným promícháním na vortexové třepačce. Pro dosažení důkladnější separace jednotlivých fází byl vzorek centrifugován při 1000 x g po dobu 5 minut. Oddělená organická fáze byla pomocí automatické pipety přenesena do nové skleněné vialky (4 ml) a odpařena ve vyhřívaném bloku při 40 °C pod proudem dusíku do sucha. Anorganická (vodná) fáze nebyla dále využívána. V případě jednofázových metod (tj. metody dle Alshehryho a Hořejšího) byl použit celý supernatant.

Získaný odparek byl znovu rozpuštěn přidavkem 50  $\mu$ l MeOH a následným mícháním pomocí vortexové třepačky (1 min). Výsledný extrakt byl přenesen do čiré skleněné krimpovací vialky (2 ml) s insertem (200  $\mu$ l). Takto připravené vzorky byly následně analyzovány pomocí LC-MS.

## 5 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 5.1 Testovací analýza

Za účelem zjištění, které konkrétní podtřídy GSL se vyskytují v lidské plasmě, byla nejprve provedena LC-MS testovací analýza. Pro tento účel byl použit extrakt směšného vzorku plasmy, který byl získán postupem uvedeným v kapitole 4.5.1 vycházející z nedávné práce Hořejšího *et al.* (2021). LC-MS testovací analýza byla provedena v rozmezí  $m/z$  600–2000, a to v obou módech polarizace ionizace, pozitivním i negativním, aby bylo zjištěno, při jakém módu ionizace poskytují nalezené podtřídy GSL vyšší odezvu.

Identifikace píků a jejich přiřazení ke konkrétní podtřídě GSL bylo provedeno na základě hodnot retenčního času, hmotnostních spekter a interní databáze hodnot  $m/z$  protonovaných  $[M+H]^+$  a deprotonovaných  $[M-H]^-$  molekul lipidů a jejich sodných  $[M+Na]^+$ , draselných  $[M+K]^+$  a/nebo amonných  $[M+NH_4]^+$  aduktů. Vzhledem ke skutečnosti, že v případě HILIC analýzy jednotlivé lipidové druhy v rámci dané podtřídy GSL koeluují, popř. eluují ve vzájemné těsné blízkosti, byl pro účely vyhodnocení testovací analýzy vybrán v rámci dané podtřídy GSL vždy jeden konkrétní endogenní lipid se složením ceramidu 34:1;O2 (resp. 18:1;O2/16:0). Ověření retenčního chování příslušných GSL bylo provedeno na základě analýzy směšného vzorku standardů (ST). Pro každou podtřídou GSL byl tedy vybrán jeden konkrétní endogenně zastoupený GSL a k němu jeden standard (viz podrobnější informace shrnuté v tab. 4).

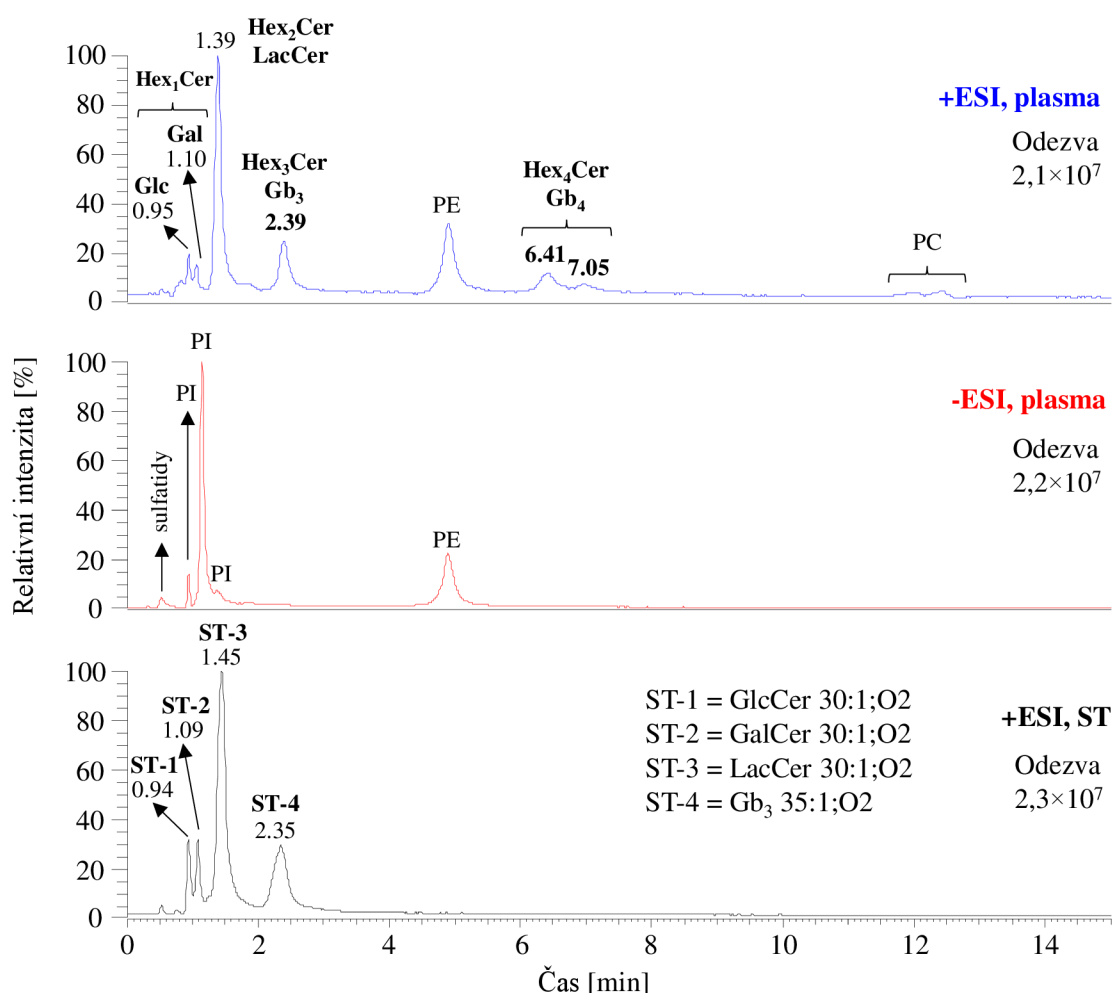
Tab. 4: Glykosfingolipidy a příslušné standardy použité v rámci testovací analýzy.

GSL podtřída	Složení lipidů Ceramid		Elementární složení	$m/z$ [M+H] <sup>+</sup>	$m/z$ [M-H] <sup>-</sup>
<b>Hex<sub>1</sub>Cer</b> (monohexosylceramidy)	Hex <sub>1</sub> Cer	34:1;O2	C <sub>40</sub> H <sub>77</sub> NO <sub>8</sub>	700.6	698.6
<b>GlcCer</b> (glukosylceramidy)	GlcCer*	30:1;O2	C <sub>36</sub> H <sub>69</sub> NO <sub>8</sub>	644.5	-----
<b>GalCer</b> (galaktosylceramidy)	GalCer*	30:1;O2	C <sub>36</sub> H <sub>69</sub> NO <sub>8</sub>	644.5	-----
<b>Hex<sub>2</sub>Cer</b> (dihexosylceramidy)	Hex <sub>2</sub> Cer	34:1;O2	C <sub>46</sub> H <sub>87</sub> NO <sub>13</sub>	862.6	860.6
<b>LacCer</b> (laktosylceramidy)	LacCer*	30:1;O2	C <sub>42</sub> H <sub>79</sub> NO <sub>13</sub>	806.6	-----
<b>Hex<sub>3</sub>Cer</b> (trihexosylceramidy)	Hex <sub>3</sub> Cer	34:1;O2	C <sub>52</sub> H <sub>97</sub> NO <sub>18</sub>	1024.7	1022.7
<b>Gb<sub>3</sub></b> (globotriaosylceramidy)	Gb <sub>3</sub> *	35:1;O2	C <sub>53</sub> H <sub>99</sub> NO <sub>18</sub>	1038.7	-----
<b>Hex<sub>4</sub>Cer</b> (tetrahexosylceramidy)	Hex <sub>4</sub> Cer	34:1;O2	C <sub>60</sub> H <sub>110</sub> N <sub>2</sub> O <sub>23</sub>	1227.8	1225.7
<b>Gb<sub>4</sub></b> (globotetraosylceramidy)	-----	-----	-----	-----	-----

\* značí použité standardy

Endogenně zastoupené (tj. přirozeně se vyskytující) GSL s ceramidovým složením 34:1;O2 byly vybrány na základě skutečnosti, že sfingosin 18:1;O2 je nejběžněji se vyskytující sfingoidní báze u GSL v živočišných buňkách a zároveň N-vázaná kyselina hexadekanová (tj. 16:0) patří mezi nejčastěji se vyskytující nasycené mastné kyseliny v lidském těle, tudíž ceramid 34:1;O2 patří mezi nejběžnější a nejvíce zastoupené.

Extrahované iontové chromatogramy vybraných GSL (viz tab. 4), které byly získány LC-MS analýzou extraktu směsného vzorku plasmy v pozitivním i negativním (+ESI a -ESI) módu ionizace a směsného vzorku standardů jsou uvedeny na obr. 9. Výchozí podmínky chromatografické separace a hmotnostní detekce byly převzaty z publikace Hořejšího (2021) a jsou uvedeny v následujících kapitolách 5.1.1 a 5.1.2.



Obr. 9: Extrahované iontové chromatogramy GSL získané v rámci testovací analýzy.

V rámci testovací analýzy (obr. 9) bylo detekováno a identifikováno celkem 5 piků odpovídající podtřídám GSL s 1–4 cukernými jednotkami. Mezi tyto GSL patřily zejm.

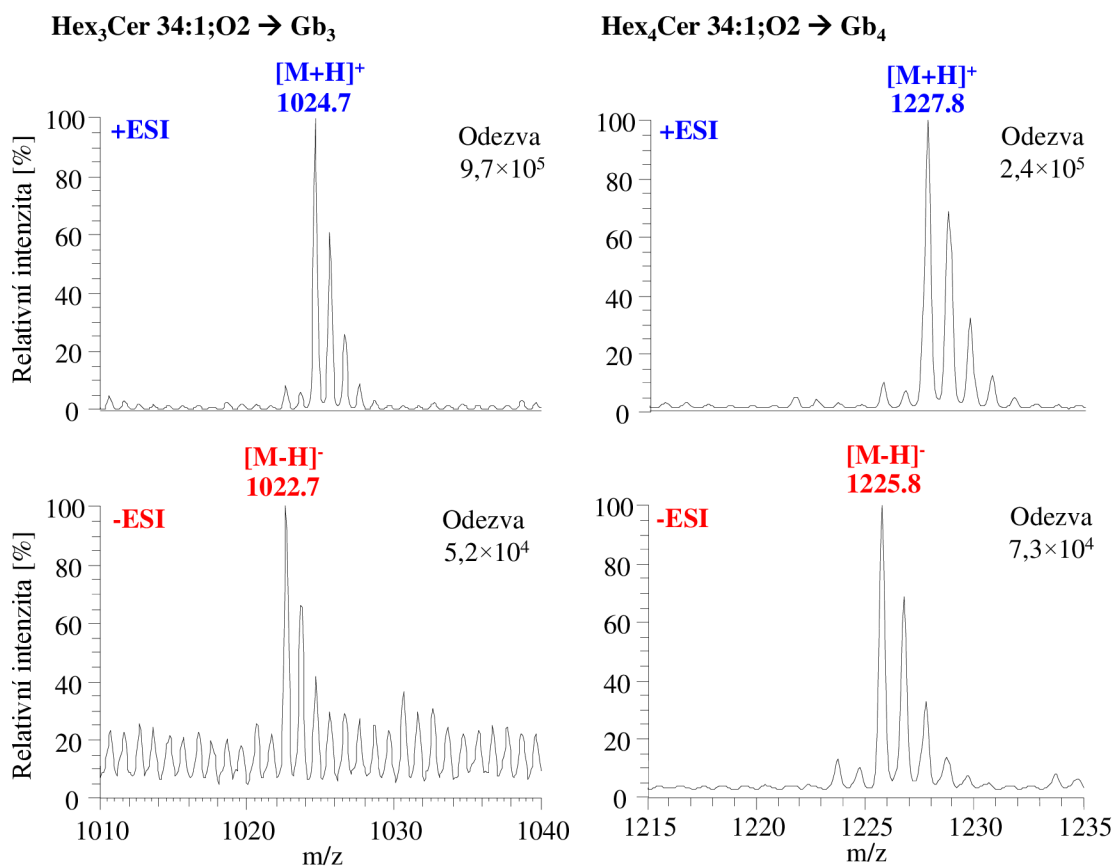
Hex<sub>1</sub>Cer s retenčním časem 0,95 min a 1,10 min, Hex<sub>2</sub>Cer s retenčním časem 1,39 min a dále Hex<sub>3</sub>Cer s retenčním časem 2,39 min a Hex<sub>4</sub>Cer s retenčním časem 6,41 min a 7,05 min. Po ověření retenčního chování s pomocí směsného vzorku standardů (ST-1 až ST-4) bylo zjištěno, že tyto podtřídy GSL koeluuji s uvedenými standardy a lze tedy říci, že se jedná konkrétně o GlcCer a GalCer v případě Hex<sub>1</sub>Cer, LacCer v případě Hex<sub>2</sub>Cer, Gb<sub>3</sub> v případě Hex<sub>3</sub>Cer a Gb<sub>4</sub> v případě Hex<sub>4</sub>Cer. Retenční chování Gb<sub>4</sub> však nebylo možné ověřit, neboť v současné době není standard pro Gb<sub>4</sub> komerčně dostupný. Identifikace tedy byla založena na příslušných hodnotách m/z, přítomnosti aduktů a s ohledem na výsledek uvedené v práci Hořejšího *et al.* (2021).

Bylo také zjištěno, že oba částečně rozdělené píky v retenčním čase 6,41 min a 7,05 min vykazují velmi podobná MS spektra. Toto částečné rozdělení může být způsobeno špatnou separací na chromatografické koloně nebo přítomností isomerních sloučenin, nicméně tato skutečnost nemohla být ověřena, neboť standard pro Gb<sub>4</sub> není dostupný a MS/MS spektra molekulárních iontů o stejné hodnotě m/z pro oba píky byla prakticky totožná. Hořejší *et al.* (2021) ve své práci také uvádí, že se může jednat o isoglobotetraosylceramidy (iGb<sub>4</sub>), tj. isomery Gb<sub>4</sub> lišící se typem vazby mezi sousedícími galaktózy (tj. Gal $\alpha$ 1,4Gal u Gb<sub>4</sub> a Gal $\alpha$ 1,3Gal u iGb<sub>4</sub>). Tato možnost je však málo pravděpodobná, neboť enzym produkující iGb<sub>4</sub> ( $\alpha$ 1,3-galaktosyltransferáza) není považována za aktivní v lidském těle (A. H. Merrill 2011).

V rámci testovací analýzy byla také na základě hodnot m/z získaných z veřejně přístupné databáze LIPID MAPS zjištěna pravděpodobná přítomnost některých fosfolipidů, a to fosfatidylinositolů (PI), fosfatidyletanolainů (PE) a fosfatidylcholinů (PC) a dále také sulfatovaných derivátů GSL (tj. sulfatidů). Tyto lipidy však nebyly dále zkoumány z důvodu zaměření práce pouze na neutrální GSL.

Z obr. 9 je také na první pohled patrné, že neutrální GSL (tj. GlcCer, GalCer, LacCer, Gb<sub>3</sub> a Gb<sub>4</sub>) poskytují vyšší odezvu v pozitivním módu ionizace, nicméně i v negativním módu ionizace dávají tyto podtřídy GSL určitou odezvu, která je však zastíněna vysokou intenzitou přítomných fosfolipidů. Jako příklad pro porovnání jsou na obr. 10 znázorněna hmotnostní spektra GSL, konkrétně Gb<sub>3</sub> 34:1;O2 a Gb<sub>4</sub> 34:1;O2 v pozitivním (+ESI) i negativním (-ESI) módu ionizace. Z obr. 10 lze tedy vyčíst, že hodnota odezvy detektoru pro Gb<sub>3</sub> a Gb<sub>4</sub> je výrazně lepší v pozitivní módu ionizace, a to přibližně 18 $\times$  vyšší (pro Gb<sub>3</sub>) a 3 $\times$  vyšší (pro Gb<sub>4</sub>). Z tohoto důvodu byly veškeré následující analýzy zaměřené na analýzu a identifikaci GSL prováděny pouze v pozitivním módu ionizace.





Obr. 10: Hmotnostní spektra Gb<sub>3</sub> a Gb<sub>4</sub> s ceramidem 34:1;O<sub>2</sub> získaná v rámci testovací analýzy extraktu směsného vzorku plasmy v obou módech polarity.

### 5.1.1 Výchozí podmínky chromatografické separace

Výchozí podmínky chromatografické separace v rámci testovací analýzy jsou uvedeny v následující tabulce (tab. 5).

Tab. 5: Výchozí podmínky chromatografické separace.

Parametr	Údaj/Hodnota														
Chromatografická kolona	Ascentis Si (150 × 2,1 mm; 3 µm), Supelco Sigma Aldrich														
Teplota kolony	40±1 °C														
Teplota autosampleru	5±0,5 °C														
Objem nástřiku	3 µl														
Průtok mobilní fáze	0,5 ml/min (konstantní po celou dobu analýzy)														
Složení mobilní fáze	MF-A: ACN MF-B: 10 mM CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub> v ACN/H <sub>2</sub> O (1/9, v/v) MF okyseleny přidavkem 0,5 µl CH <sub>3</sub> COOH na 100 ml MF														
Gradientový program	<table><tr><td>Čas [min]</td><td>0</td><td>7</td><td>16</td><td>18</td><td>19</td><td>25</td></tr><tr><td>MF-B [%]</td><td>10</td><td>11.4</td><td>20</td><td>20</td><td>10</td><td>10</td></tr></table>	Čas [min]	0	7	16	18	19	25	MF-B [%]	10	11.4	20	20	10	10
Čas [min]	0	7	16	18	19	25									
MF-B [%]	10	11.4	20	20	10	10									

### 5.1.2 Výchozí podmínky hmotnostní detekce

Výchozí podmínky hmotnostní detekce v rámci testovací analýzy jsou uvedeny v následující tabulce (tab. 6).

Tab. 6: Výchozí podmínky hmotnostní detekce.

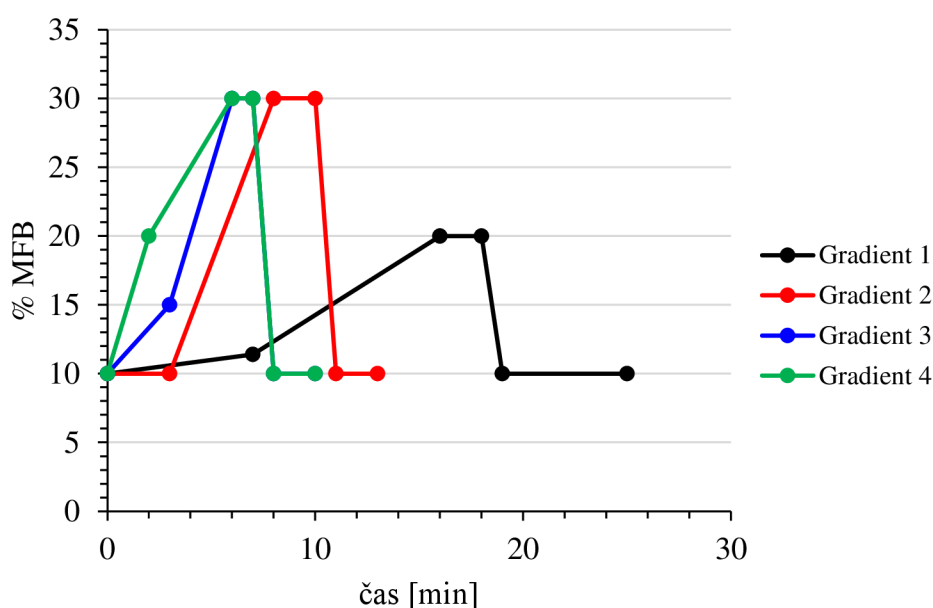
Parametr	Údaj/Hodnota
Teplota transferové trubice	300 °C
Teplota kapiláry	300 °C
Napětí na kapiláře	-3,0 kV (-ESI), +3,0 kV (+ESI)
Poměr průtoků plynu (S/A)	35/10 Arb. (celkový průtok 8 l/min)
Elektrické napětí na F-čočkách	-9,0 V
Elektrické napětí na S-čočkách	+60 V
Typ skenu	Full MS v rozmezí 600–2000 m/z
Doba plnění pasti	250 ms
Počet mikroskenů	1

S – hlavní zmlžující plyn, A – pomocný zmlžující plyn

## 5.2 Optimalizace gradientu mobilní fáze

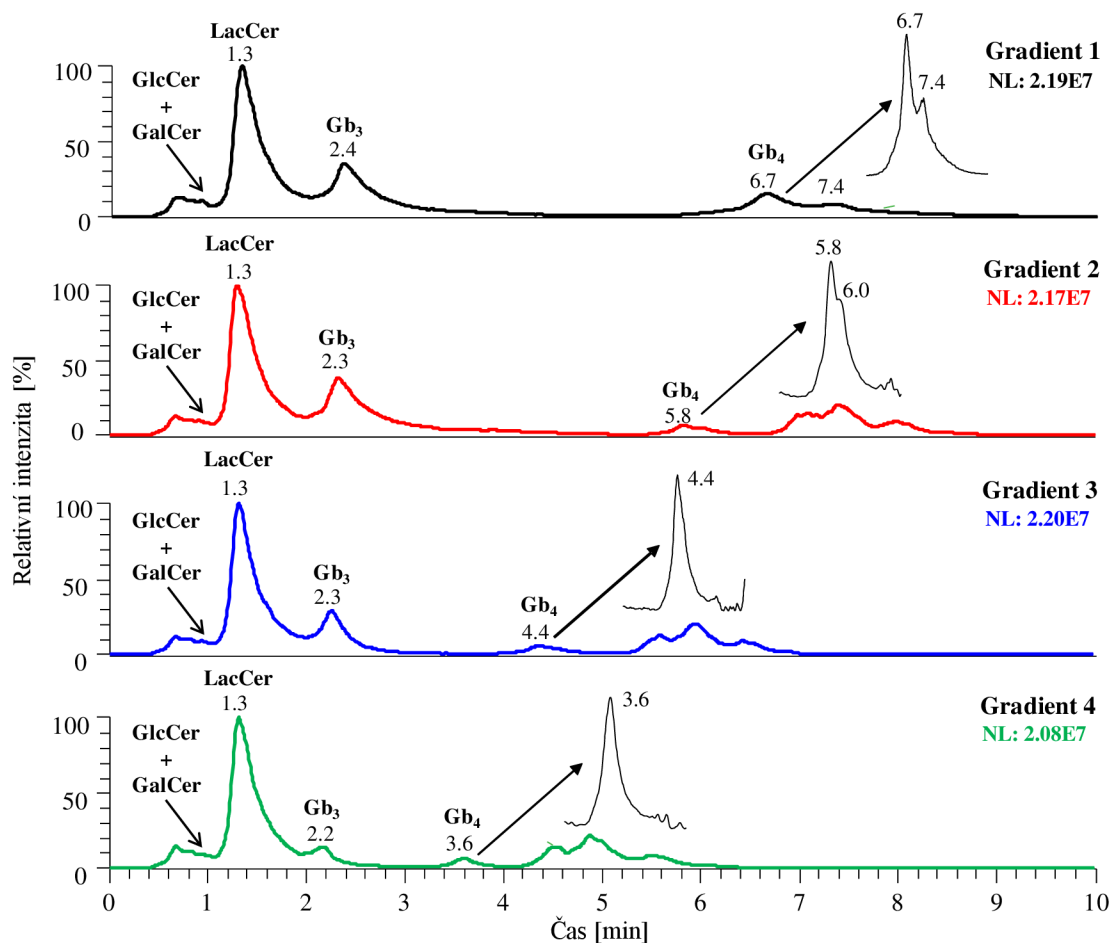
Za účelem dosažení lepší chromatografické separace GSL a zkrácení doby analýzy při současném dosažení co nejvyšší odezvy detektoru byla provedena optimalizace gradientu mobilní fáze. LC-MS analýza byla provedena v rozmezí  $m/z$  600–1500, a to pouze v pozitivním módu ionizace, kde poskytují GSL vyšší odezvu detektoru.

Za tímto účelem byl použit lipidový extrakt směšného vzorku plasmy, který byl získán způsobem uvedeným v kapitole 4.5.1. Celkem byly porovnány čtyři gradienty mobilní fáze (viz obr. 11). Jako výchozí (tj. gradient 1) byl použit gradient mobilní fáze, který uvádí Hořejší *et al.* (2021). Další tři různé gradienty (tj. gradient 2 až 4) byly následně vytvořeny, a to převážně zvyšováním procentuálního obsahu MF-B (tj. vodné složky), postupným zvyšováním a zkracováním strmosti první i druhé gradientové části a zkrácením doby ekvilibrace chromatografické kolony.



Obr. 11: Gradienty mobilní fáze použité v rámci optimalizace

Vyhodnocení optimalizace gradientu mobilní fáze bylo provedeno na základě srovnání hodnot retenčních časů nejběžněji se vyskytujícího lipidu v rámci dané podtřídy GSL (tj. lipid se složením ceramidu 34:1;O2), který zároveň ve většině případů představoval i nejvíce zastoupený lipid, a dále pak s ohledem na celkovou dobu analýzy a šířku píku v polovině výšky. Příslušné chromatogramy extrahovaných iontů získané LC-MS analýzou extraktu směšného vzorku plasmy pro jednotlivé gradienty mobilní fáze jsou uvedeny níže na obr. 12.



Obr. 12: Extrahované iontové chromatogramy směšného vzorku plasmy získané LC-MS analýzou pro čtyři různé gradienty mobilní fáze.

Z obr. 12 je zřejmé, že v případě výchozího gradientu mobilní fáze (tj. gradient 1) došlo oproti testovací analýze (obr. 9) k mírnému posunu retenčního času v případě Gb<sub>4</sub> (přibližně o 0,3 min). Zajímavé také je, že nebyl jednoznačně identifikován pik pro Hex<sub>1</sub>Cer (tj. GlcCer a GalCer) a zároveň nedošlo k rozdělení piků těchto dvou isomerů. Příčinou tohoto problému byla pravděpodobně přítomnost kontaminantů elujících v retenčním čase 0,6–1,0 min, které zřejmě pocházeli z pryžové části septa víčka vialky. Možnou příčinou může být také eluce těchto podtříd GSL v blízkosti mrtvého objemu kolony, kde se zároveň vymývají i velmi nepolární lipidy, což může působit určité problémy s ionizací těchto sloučenin. Obdobný problém byl pozorován i v případě analýzy směšného vzorku standardů (viz Příloha 2). Vzhledem k časové tísně v průběhu zpracování této práce však nebyla skutečná příčina tohoto problému dále zjišťována a pro vyhodnocení byly použity pouze podtřídy LacCer, Gb<sub>3</sub> a Gb<sub>4</sub>.

Hodnoty zjištěných retenčních časů (tab. 7) a šířky píků v polovině výšky (tab. 8) vybraných podtříd GSL pro všechny čtyři gradienty testované v rámci této kapitoly, které byly použity pro vyhodnocení optimalizace gradientu mobilní fáze, jsou uvedeny v následujících dvou tabulkách.

Tab. 7: Retenční časy pro vybrané podtřídy GSL a příslušné gradienty mobilní fáze.

Podtřída GSL		Retenční čas [min]			
		Gradient 1	Gradient 2	Gradient 3	Gradient 4
Hex <sub>2</sub> Cer	LacCer	1,33	1,29	1,31	1,31
Hex <sub>3</sub> Cer	Gb <sub>3</sub>	2,37	2,33	2,26	2,18
Hex <sub>4</sub> Cer	Gb <sub>4</sub>	6,66/7,36*	5,83/5,98*	4,36	3,60

Symbol \* značí dvojité píky pozorované pro podtřidu Gb<sub>4</sub>

Z tab. 7 a obr. 12 je patrné, že zvyšování procentuálního obsahu MF-B (tj. vodné složky mobilní fáze) nemá prakticky žádný nebo jen minimální vliv na změnu retence GSL patřících do podtříd LacCer a Gb<sub>3</sub>. Naopak u podtřídy Gb<sub>4</sub> je vliv změny retence již poměrně významný a při vzájemném porovnání všech čtyř gradientů dochází k téměř dvojnásobnému snížení retenčního času z 6–7 min na 3,6 min. Z tab. 7 a obr. 12 si lze také povšimnout, že v případě gradientů 1 a 2 byly pro podtřidu Gb<sub>4</sub> pozorovány dvojité píky, zatímco u gradientů 3 a 4 byl pozorován již pouze jeden pík. S ohledem na tyto skutečnosti se jeví jako optimální použití gradientu 3 nebo 4, kde došlo k významnému zkrácení časové prodlevy mezi Gb<sub>3</sub> a Gb<sub>4</sub>.

Tab. 8: Hodnoty šířky píků vybraných podtříd GSL v polovině výšky.

Podtřída GSL	Šířka píku v 50 % výšky [min]			
	Gradient 1	Gradient 2	Gradient 3	Gradient 4
LacCer	0,27	0,28	0,25	0,26
	P:1,51; L:1,24	P:1,50; L:1,22	R:1,48; L:1,23	R:1,49; L:1,23
Gb <sub>3</sub>	0,35	0,34	0,23	0,21
	P:2,60; L:2,25	R:2,56; L:2,22	R:2,39; L:2,16	R:2,27; L:2,06
Gb <sub>4</sub>	0,53	0,39	0,36	0,25
	P:6,98; L:6,45	R:6,11; L:5,72	R:4,60; L:4,24	R: 3,73; L:3,48
Doba analýzy	25 min	13 min	10 min	10 min

Písmena P a L značí hodnotu retenčního času pravé (P) a levé (L) části píku v ½ výšky

Další parametry, jež byly brány v potaz při vyhodnocování optimalizace gradientu mobilní fáze, byly šířka píku v polovině jeho výšky a celková doba analýzy (viz tab. 8). Hodnota šířky píku v polovině výšky byla vypočítána jako rozdíl retenčního času pravé a levé strany příslušného chromatografického píku. Z výsledků uvedených v tabulce je patrné, že hodnoty pro LacCer byly ve všech případech téměř totožné, což bylo vzhledem k téměř stejné retenci u všech čtyř zkoumaných gradientů očekáváno. Poměrně značné rozdíly však nastaly v případě podtříd Gb<sub>3</sub> a Gb<sub>4</sub>, kde se šířka píku v polovině výšky se změnou gradientu od 1 do 4 postupně a významně zmenšovala. V případě Gb<sub>3</sub> došlo ke snížení z hodnoty 0,35 min (výchozí gradient) postupně na hodnotu 0,34 min (gradient 2), 0,23 min (gradient 3) a 0,21 min (gradient 4). Obdobný a mnohem výraznější trend byl pozorován u Gb<sub>4</sub>, kde se hodnoty šířky píků v polovině výšky pohybovaly v rozmezí 0,25–0,53 min. Na základě těchto zjištění lze usoudit, že jako neoptimálnější se jeví gradienty 3 a 4, u nichž bylo dosaženo pro Gb<sub>3</sub> přibližně 1,5× nižší hodnoty šířky píku ve srovnání s výchozím gradientem. Pro Gb<sub>4</sub> byly tyto hodnoty v porovnání přibližně 1,5× (u gradientu 3) a 2× (u gradientu 4) nižší. V případě gradientů 3 a 4 bylo rovněž dosaženo výrazného snížení doby analýzy, a to o 15 minut. I přestože pro gradient 4 bylo dosaženo pro Gb<sub>3</sub> a Gb<sub>4</sub> lepších hodnot šířky píků (tj. užší píky) ve srovnání s gradientem 3, jako neoptimálnější byl zvolen gradient 3. Hlavním důvodem této volby byla skutečnost, že v případě gradientu 4 došlo v porovnání s gradientem 3 ke dvojnásobnému poklesu relativní intenzity Gb<sub>3</sub>, což je patrné i z obr. 12. Obecně lze říci, že oba gradienty (tj. gradient 3 a 4) poskytují velmi podobné výsledky a zároveň významně snižují celkovou dobu analýzy, a tím i spotřebu mobilní fáze (resp. snižují náklady na analýzu. Testování zvýšení průtoku mobilní fáze nebylo provedeno, neboť nemá tak výrazný vliv na retenci analytů jako složení mobilní fáze, resp. gradientu. Zároveň by tím došlo ke zvýšení spotřeby mobilní fáze.

### **5.2.1 Reprodukovatelnost retenčního času**

V rámci optimalizace gradientu mobilní fáze bylo také provedeno zkrácení doby ekvibrace chromatografické kolony z 5 minut na 2 minuty, a to za účelem zkrácení celkové doby analýzy. S ohledem na tuto skutečnost bylo nutné ověřit, zda je tato doba ekvibrace dostatečná a zda nedochází ke změně retenčního času zkoumaných analytů. Za tímto účelem bylo provedeno celkem 20 po sobě jdoucích nástřiků lipidového extraktu získaného ze směsného vzorku plasmy (viz postup extrakce v kapitole 4.5.1),

kteře byly analyzovány pomocí LC-MS za využití gradientu 3, který byl zvolen jako nejoptimálnější. Vyhodnocení bylo provedeno na základě srovnání hodnot RSD jednotlivých podtříd GSL vypočítaných pro 20 nástřiků téhož vzorku. Získané hodnoty retenčních časů (včetně průměru) a vypočítané hodnoty RSD jsou uvedeny v tab. 9.

Tab. 9: Hodnoty retenčních časů pro 20 nástřiků lipidového extraktu.

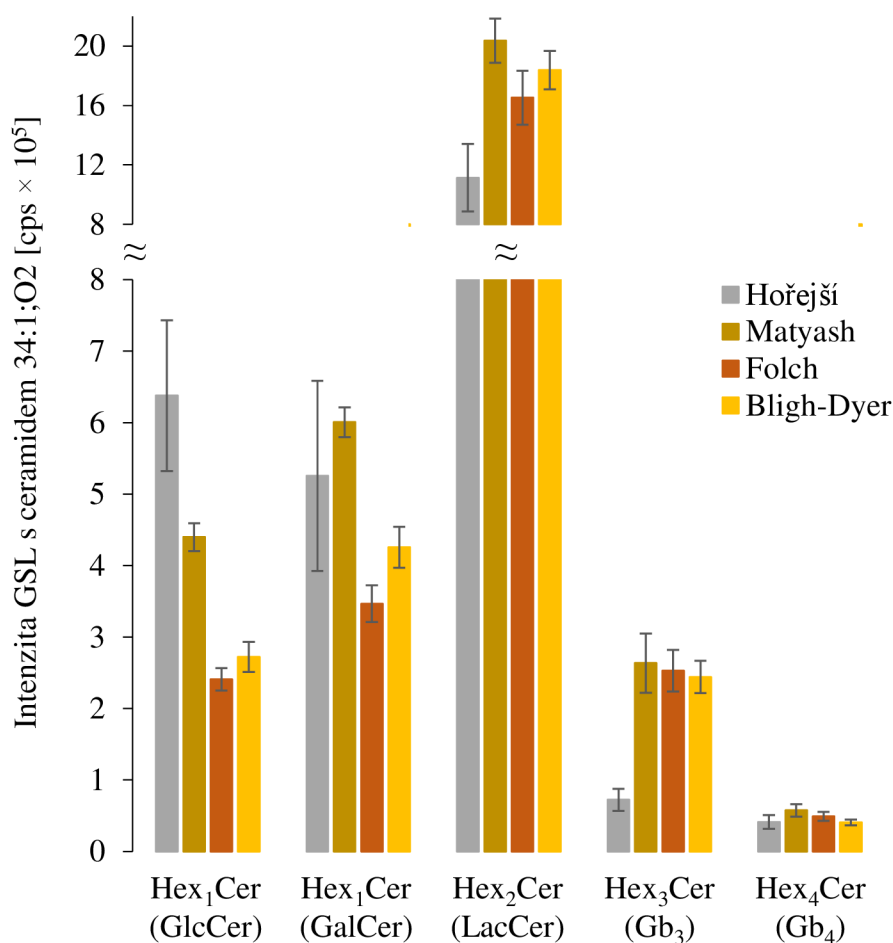
Nástřik č.	Podtřída GSL				
	GlcCer	GalCer	LacCer	Gb <sub>3</sub>	Gb <sub>4</sub>
<b>1</b>	0,93	1,06	1,40	2,38	4,57
<b>2</b>	0,94	1,07	1,40	2,35	4,49
<b>3</b>	0,94	1,09	1,43	2,36	4,50
<b>4</b>	0,94	1,08	1,42	2,43	4,49
<b>5</b>	0,94	1,07	1,43	2,44	4,48
<b>6</b>	0,94	1,06	1,42	2,37	4,49
<b>7</b>	0,94	1,06	1,43	2,39	4,45
<b>8</b>	0,94	1,05	1,42	2,41	4,46
<b>9</b>	0,94	1,06	1,43	2,44	4,45
<b>10</b>	0,94	1,07	1,41	2,41	4,46
<b>11</b>	0,94	1,05	1,42	2,39	4,49
<b>12</b>	0,94	1,05	1,41	2,43	4,44
<b>13</b>	0,94	1,06	1,42	2,39	4,47
<b>14</b>	0,93	1,06	1,42	2,40	4,45
<b>15</b>	0,93	1,06	1,40	2,40	4,48
<b>16</b>	0,95	1,04	1,43	2,43	4,47
<b>17</b>	0,95	1,04	1,42	2,42	4,48
<b>18</b>	0,95	1,04	1,43	2,42	4,47
<b>19</b>	0,95	1,04	1,43	2,42	4,47
<b>20</b>	0,95	1,04	1,44	2,42	4,47
<b>Retenční čas [min]</b>					
<b>Průměr</b>	0,94	1,06	1,42	2,41	4,48
<b>SD</b>	0,0064	0,0141	0,0115	0,0261	0,0274
<b>RSD [%]</b>	<b>0,68</b>	<b>1,33</b>	<b>0,81</b>	<b>1,08</b>	<b>0,61</b>

Z výsledků uvedených v tab. 9 je zřejmé, že i přes zkrácení doby ekvibrace chromatografické kolony z původních 5 minut na výsledné 2 minuty dochází v případě zkoumaných podtříd GSL pouze k minimální změně retenčního času. Hodnoty RSD pro jednotlivé podtřídy GSL se pohybovaly v rozmezí 0,61–1,33 %, což lze považovat za velmi dobré a zcela akceptovatelné hodnoty, tudíž zkrácení doby ekvibrace je možné. Důležité je zmínit, že zde došlo k rozdělení isomerů GlcCer a GalCer, čehož nebylo v předchozím kroku dosaženo z pravděpodobných příčin, jež byly uvedeny výše.

### 5.3 Srovnání extrakčních metod pro izolaci GSL z lidské plasmy

Srovnání extrakčních metod, jejichž detailní přehled je uveden v kapitole 2.2.2, bylo provedeno za účelem zjištění, která extrakční metoda je nejvhodnější pro extrakci GSL z lidské krevní plasmy. Za tímto účelem byly porovnány čtyři nejčastěji používané extrakce v lipidomické analýze, a to extrakční metody podle Folcha, Bligha a Dyera, Matyashe a Alshehryho spolu s nedávno vyvinutou metodou podle Hořejšího. Extrakce GSL ze směsného vzorku plasmy byla provedena podle postupu uvedeného v kapitole 4.5.2 s použitím příslušných směsí rozpouštědel (viz kapitola 4.3.3).

Pro každou extrakční metodu bylo provedeno celkem 5 nezávislých opakování, přičemž pro vyhodnocení byly použity GSL s ceramidy 34:1;O2. Extrakční metoda, při níž bylo dosaženo nejvyšší relativní intenzity a zároveň přijatelné směrodatné odchylky, byla vybrána jako optimální metoda vhodná pro analýzu GSL v lidské plasmě pomocí LC-MS. Výsledky srovnání extrakčních metod jsou znázorněny na obr. 13. Primární naměřená data pro srovnání extrakcí jsou uvedena v Příloze 3.



Obr. 13: Srovnání extrakčních metod pro izolaci GSL z lidské krevní plasmy.



Obrázek 13 znázorňuje výsledky porovnání extrakčních metod. Relativní intenzita je vyjádřena jako aritmetický průměr  $\pm$  relativní směrodatná odchylka (RSD,  $n = 5$ ). Na základě výsledků uvedených na obr. 13 a v Příloze 4 bylo zjištěno, že nejvyšší relativní intenzity a zároveň přijatelné hodnoty RSD (3,4–15,7 %) bylo dosaženo v případě použití Matyashovy metody. Velmi podobných výsledků bylo dosaženo i v případě metody podle Folcha a Bligh-Dyera, kde bylo dosaženo podobných hodnot relativních intenzit u podtříd LacCer, Gb<sub>3</sub> a Gb<sub>4</sub>, zatímco v případě podtříd GlcCer a GalCer byly hodnoty relativních intenzit pro obě uvedené podtřídy výrazně nižší. Současně hodnoty RSD byly v případě Folchovy (6,5–13,1 %) a Bligh-Dyerovy (6,7–9,8 %) metody srovnatelné či dokonce nižší v porovnání s Matyashovou metodou. Dále bylo zjištěno, že metoda podle Hořejšího poskytovala výrazně nižší hodnoty relativních intenzit pro podtřídy LacCer, Gb<sub>3</sub> a Gb<sub>4</sub> ve srovnání s metodami podle Folcha, Bligh-Dyera a Matyashy. V případě GSL podtřídy Hex<sub>1</sub>Cer (resp. GlcCer a GalCer) bylo u metody podle Hořejšího dosaženo srovnatelné nebo vyšší relativní intenzity, ale s výrazně vyšší hodnotou RSD (16,5 % pro GlcCer a 25,3 % pro GalCer). Vyšších hodnot RSD u Hořejšího metody bylo dosaženo i u LacCer (20,4 %), Gb<sub>3</sub> (21,5 %) a Gb<sub>4</sub> (23,2 %). Alshehryho metoda nebyla do srovnání zahrnuta, neboť z neznámého důvodu, který nebyl dále zkoumán, nebylo možné ve vzorcích identifikovat píky GSL, tudíž tato metoda byla vyhodnocena jako nevhodná pro analýzu GSL z lidské plasmy.

Je důležité také zmínit, že podtřídy GlcCer a GalCer jsou velmi slabě poutány stacionární fází chromatografické kolony a elují v poměrně těsné blízkosti mrtvého objemu ( $t_M = 0,36$  ml), kde se vymývají spolu se silně nepolárními lipidy a jinými nepolárními sloučeninami. Zároveň v této oblasti dochází ke koeluci uvedených podtříd GSL (tj. Hex<sub>1</sub>Cer) s hojně zastoupenými fosfolipidy (zejména fosfatidylinositoly), což může mít za následek ovlivnění (potlačení) účinnosti ionizace těchto podtříd GSL.

S ohledem na výše uvedené výsledky a popsání závěry byla jako optimální metoda extrakce pro analýzu GSL z lidské plasmy zvolena Matyashova metoda využívající směs MTBE a MeOH v objemovém poměru 10:3. Výhodou této metody je nahrazení chloroformu (CHCl<sub>3</sub>), který se používá u metody podle Folche a Bligh-Dyera, za méně škodlivou a bezpečnější alternativu MTBE, který nevykazuje takovou toxicitu jako chloroform. Další výhodou je odebírání horní (organické) vrstvy po rozdělení vrstev, čímž také dochází k minimalizaci možné kontaminace anorganickou (vodnou) fází či neextrahovatelnými zbytky jako v případě Folchovy či Bligh-Dyerovy metody.

## 5.4 Frakcionace lipidového extraktu

Lipidový extrakt získaný ze směsného vzorku plasmy pomocí Matyashovy metody byl následně frakcionován pomocí LC-MS metody s optimalizovaným gradientem mobilní fáze za účelem izolace, přečištění a následného zakoncentrování vybraných podtříd GSL od ostatních složek ve vzorku. Hlavním cílem frakcionace bylo zvýšení intenzity zejména méně zastoupených GSL a případné snížení pozadí (šumu), a to za účelem potenciální identifikace většího počtu GSL v rámci dané podtřídy.

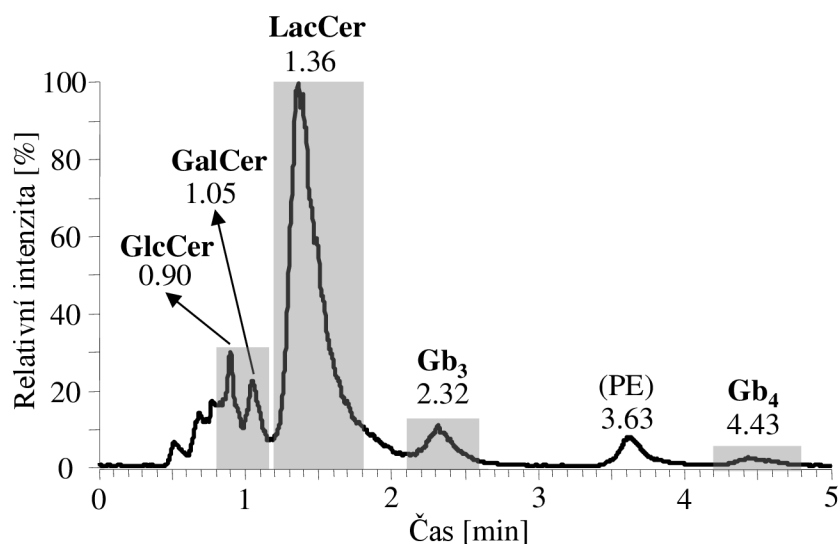
Frakcionace extraktu plasmy byla provedena pro celkem 20 nástřiků vzorku, kdy jednotlivé frakce byly sbírány kapilárou přímo na výstupu z chromatografické kolony a jímány do skleněné vialky (40 ml) v časových intervalech odpovídajících eluci dané podtřídy GSL (viz tab. 10).

Tab. 10: Časové intervaly (frakce) odpovídající eluci vybraných podtříd GSL.

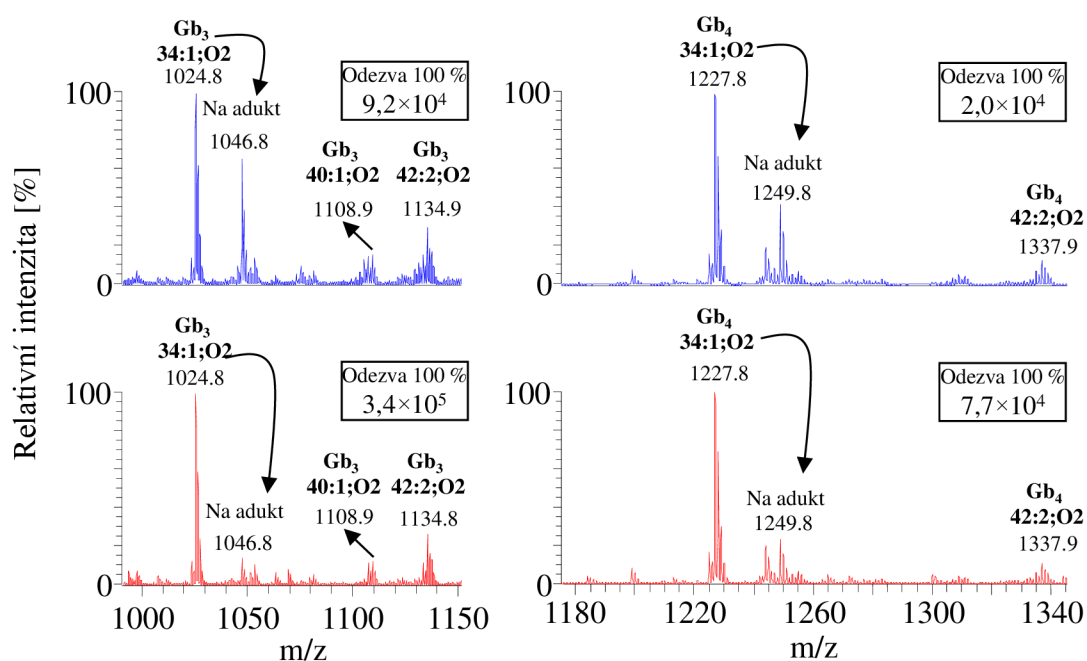
	FRAKCE			
	F1	F2	F3	F4
<b>Podtřída GSL</b>	GlcCer+GalCer	LacCer	Gb <sub>3</sub>	Gb <sub>4</sub>
<b>Úsek [min]</b>	0,8–1,15	1,2–1,8	2,1–2,6	4,2–4,8

Získaná frakce (tj. směs frakcí F1–F4) byla následně odpařena ve vyhřívaném termobloku při 40 °C pod proudem dusíku a vzniklý odparek byl rozpuštěn ve 20 µl MeOH a analyzován pomocí LC-MS. Vzhledem ke skutečnosti, že na kolonu bylo celkem nastříknuto 20 × 3 µl vzorku (tj. celkem 60 µl) a výsledný odparek byl rozpuštěn ve 20 µl MeOH, byl výsledný vzorek 3× zakoncentrován.

Na obr. 14 je uveden extrahovaný iontový chromatogram extraktu směsného vzorku plasmy získaného pomocí extrakční metody dle Matyashy (MTBE) a za využití LC-MS metody s optimalizovaným gradientem mobilní fáze. Na obrázku jsou také pro lepší představu znázorněny časové úseky sběru daných frakcí (viz šedé zóny). Srovnání MS spekter vybraných podtříd GSL (Gb<sub>3</sub> a Gb<sub>4</sub>) identifikovaných ve směsném vzorku plasmy před a po frakcionaci je uvedeno na obr. 15



Obr. 14: Extrahovaný iontový chromatogram směsného vzorku plasmy extrahovaného Matyashovou metodou a analyzovaný optimalizovanou LC-MS metodou.



Obr. 15: Srovnání MS spekter vybraných podtříd GSL, konkrétně Gb<sub>3</sub> a Gb<sub>4</sub> (modře: MS spektra bez frakcionace, červeně: MS spektra po frakcionaci)

Na základě MS spekter vybraných podtříd GSL (Gb<sub>3</sub> a Gb<sub>4</sub>) uvedených na obr. 15 lze říci, že pomocí frakcionace a následného zakoncentrování bylo pro uvedené podtřídy GSL dosaženo přibližně 4× vyšší odezvy detektoru než v případě analýzy vzorku bez předchozí frakcionace a zakoncentrování. Zároveň také došlo k potlačení

vzniku sodných aduktů (tj.  $[M+Na]^+$ ) nejvíce zastoupených GSL v rámci dané podtřídy, což je nejvíce patrné u podtřídy Gb<sub>3</sub>. I přesto, že pomocí frakcionace bylo dosaženo výrazně vyšší odezvy GSL v rámci dané podtřídy, což je důležité a výhodné při provádění MS/MS experimentů zejména minoritních sloučenin, jedná se o poměrně dosti časově náročný krok, který lze využít prakticky pouze pro kvalitativní analýzu. Možnou alternativou by mohla být příprava extraktu plasmy z většího množství biologického materiálu a jeho následné přečištění a frakcionace pomocí sloupcové chromatografie.

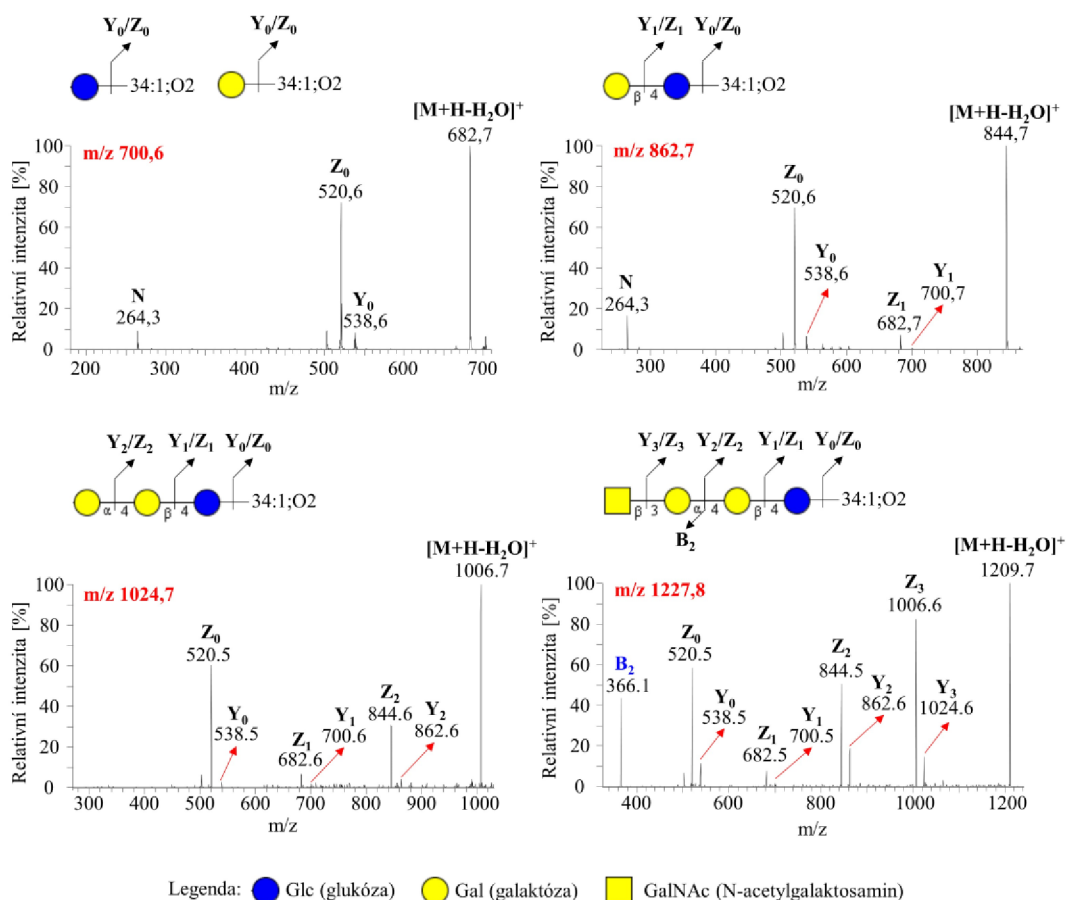
## 5.5 Analýza vybraných podtříd GSL v lidské plasmě

### 5.5.1 Strukturní charakterizace GSL

Struktura jednotlivých lipidových druhů GSL byla zjištěna pomocí typických fragmentačních vzorců, které jsou velmi dobře prostudovány (A. H. Merrill *et al.* 2005; Schweppe *et al.* 2010), a to na základě hodnot  $m/z$  prekurzorových a produktových iontů a s ohledem na hodnoty retenčních časů. Názvosloví fragmentů použité v této práci je v souladu se zavedeným značením (Ann a Adams 1992; Costello a Vath 1990; B. Domon, Vath, a Costello 1990; Bruno Domon a Costello 1988).

Hmotnostní spektra v rozsahu hmot  $m/z$  600–1500 byla získána v pozitivním módu ionizace pro všechny píky odpovídající zkoumaným podtřídám GSL (GlcCer, GalCer, LacCer, Gb<sub>3</sub> a Gb<sub>4</sub>). Jednotlivé lipidové druhy v rámci každé podtřídy byly pozorovány jako protonované molekuly  $[M+H]^+$ . MS/MS spektra jednotlivých lipidových druhů byla získána fragmentací  $[M+H]^+$  iontů pomocí kolizí indukované disociace (CID, Collision Induced Dissociation), a to za použití normalizované kolizní energie 40 %. Pro MS/MS analýzu bylo využito datově závislého sběru dat (DDA, Data-Dependent Acquisition) s nastaveným limitem pro MS/MS experimenty 1000 counts.

Interpretace MS/MS spekter reprezentativních lipidových druhů z každé zkoumané podtřídy GSL, spolu se znázorněním příslušného fragmentačního schéma, je uvedena na obr. 16. Konkrétně se jednalo o lipidy GlcCer a GalCer 18:1;O2/16:0 ( $m/z$  700,6), LacCer 18:1;O2/16:0 ( $m/z$  862,7), Gb<sub>3</sub> 18:1;O2/16:0 ( $m/z$  1024,7), Gb<sub>4</sub> 18:1;O2/16:0 ( $m/z$  1227,8). Pro zjednodušení je na obr. 16 uvedeno pouze jedno MS/MS spektrum lipidů Hex<sub>1</sub>Cer 18:1;O2/16:0, neboť MS/MS spektra pro GlcCer a GalCer jsou prakticky totožná vzhledem ke stejnému fragmentačnímu mechanismu.



Obr. 16: MS/MS spektra vybraných lipidových druhů GlcCer a GalCer ( $m/z$  700,6), LacCer ( $m/z$  862,7), Gb<sub>3</sub> ( $m/z$  1024,7) a Gb<sub>4</sub> ( $m/z$  1227,8) s ceramidem 18:1;O2/16:0.

Z obr. 16 je zřejmé, že sekvence monosacharidů v glykanové části molekuly GSL je velmi dobře demonstrována charakteristickou sérií málo intenzivních Y-iontů, které jsou doprovázeny intenzivnějšími Z-ionty pocházejícími z dodatečné ztráty vody z příslušného Y-iontu (tj.  $\Delta m/z = 18$ ). Pro určení počtu a sekvence monosacharidových jednotek ve struktuře GSL jsou tedy důležité zejména dvojice iontů značené jako Y a Z. Na obr. 16 lze pro uvedené GSL pozorovat dvojice iontů Y<sub>3</sub>/Z<sub>3</sub> při  $m/z$  1024,6 a 1006,6 odpovídající ztrátě N-acetylhexosaminu (HexNAc), Y<sub>2</sub>/Z<sub>2</sub>, ( $m/z$  862,6 a 844,5; ztráta Hex), Y<sub>1</sub>/Z<sub>1</sub> ( $m/z$  700,5 a 682,5; ztráta Hex) a Y<sub>0</sub>/Z<sub>0</sub> ( $m/z$  538,5 a 520,5; ztráta Hex) demonstrující postupnou ztrátu jednotlivých monosacharidových jednotek z řetězce. Schematické znázornění struktur GSL uvedených na obr. 16 bylo vytvořeno v programu GlycoWorkbench 2.1 (<https://glycoworkbench.software.informer.com/2.1/>). Konkrétní Y a Z ionty pozorované v rámci dané podtřídy GSL jsou uvedeny v tab. 11

Tab. 11: Ionty Y a Z pozorované v rámci dané podtřídy GSL.

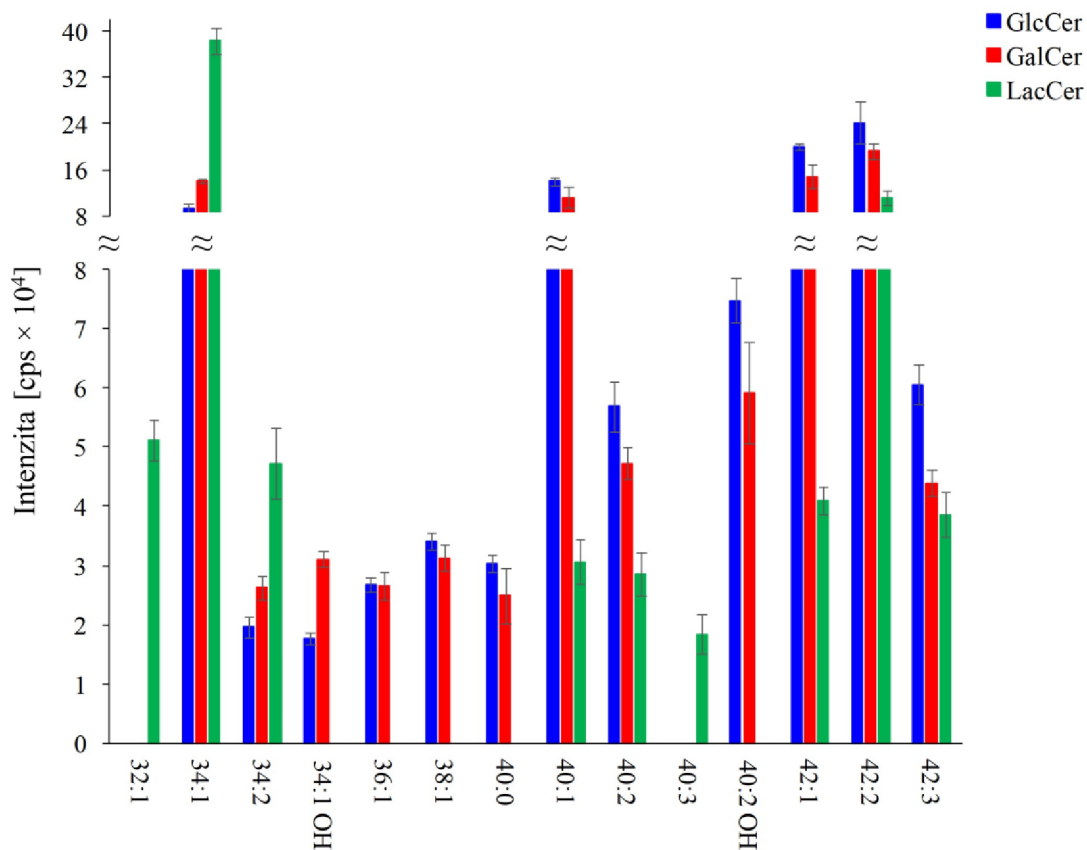
Typ iontu	Podtřída GSL				
	GlcCer	GalCer	LacCer	Gb <sub>3</sub>	Gb <sub>4</sub>
Z	Z <sub>0</sub>		Z <sub>0</sub> , Z <sub>1</sub>	Z <sub>0</sub> , Z <sub>1</sub> , Z <sub>2</sub>	Z <sub>0</sub> , Z <sub>1</sub> , Z <sub>2</sub> , Z <sub>3</sub>
Y	Y <sub>0</sub>		Y <sub>0</sub> , Y <sub>1</sub>	Y <sub>0</sub> , Y <sub>1</sub> , Y <sub>2</sub>	Y <sub>0</sub> , Y <sub>1</sub> , Y <sub>2</sub> , Y <sub>3</sub>

Důležité je zmínit, že ionty Z<sub>0</sub> při m/z 520,5 odpovídají odštěpení všech jednotek monosacharidů z uvedených GSL a demonstrují tak strukturu ceramidu (tj. 34:1;O2). MS/MS spektra také obsahují specifický fragmentový ion N při m/z 264,3 typický pro sfingoidní bázi 18:1;O2, jehož původ je velmi dobře znázorněn v této publikaci (A. H. Merrill *et al.* 2005). Lze si však povšimnout, že tento typ iontu není pozorován v MS/MS spektrech Gb<sub>3</sub> a Gb<sub>4</sub>, a to z důvodu omezení detekce fragmentů o nízké hodnotě m/z (tzv. mass cut-off). Přítomnost iontu N u Gb<sub>3</sub> a Gb<sub>4</sub> tedy byla prokázána MS<sup>3</sup> analýzou Z<sub>0</sub> iontu při m/z 520,5 (data nejsou ukázána). V případě fragmentace Gb<sub>4</sub> došlo také ke vzniku iontu B<sub>2</sub> (m/z 366,1), který odpovídá ztrátě terminální sekvence HexNAc-Hex u Gb<sub>4</sub>.

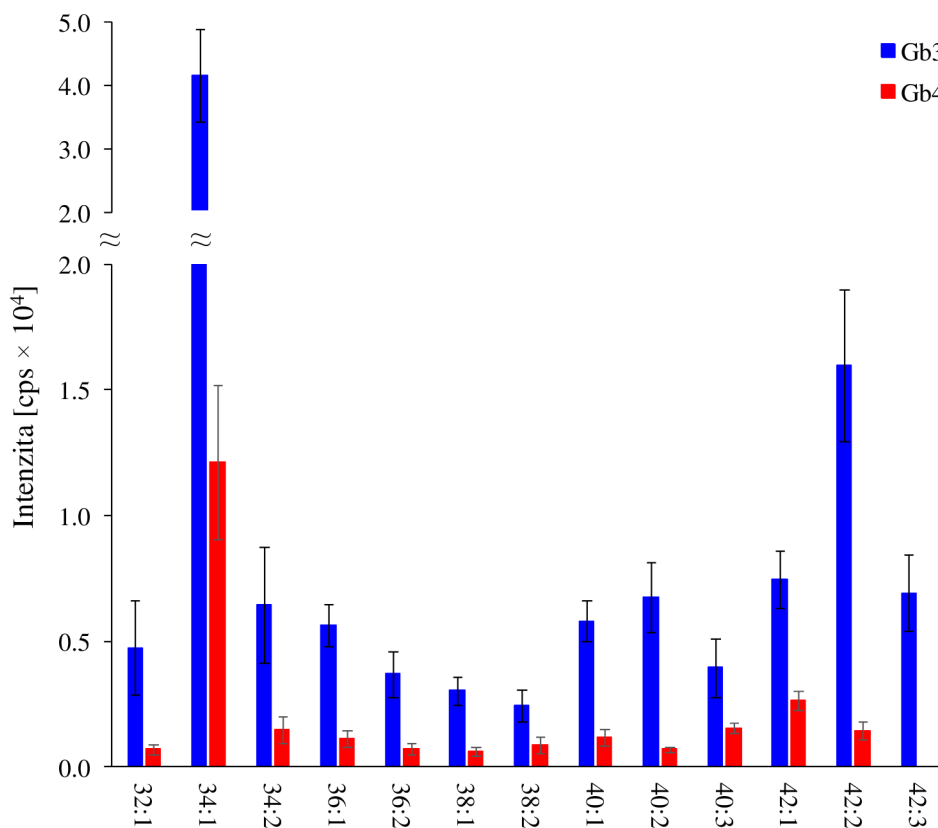
Závěrem lze říci, že fragmentační chování vybraných GSL v této práci uváděných je předvídatelné a v souladu s již dříve publikovanými výsledky (A. H. Merrill *et al.* 2005; Schweppe *et al.* 2010, Hořejší *et al.* 2021). Sekvenční štěpení GSL lze tedy využít k identifikaci počtu monosacharidových jednotek nacházejících se v glykanovém řetězci molekuly GSL a k určení složení ceramidové části řetězce.

### 5.5.2 Profil GSL v lidské plasmě

Po strukturální charakterizaci detekovaných lipidových druhů byly vytvořeny profily GSL v lidské krevní plasmě (viz obr. 17 a obr. 18). Výsledky na obrázcích jsou uvedeny jako aritmetický průměr intenzit konkrétního lipidového druhu, který byl získán ze tří nezávislých opakování ± RSD. V případě lipidů lišících se mezi sebou počty dvojných vazeb byla provedena izotopická korekce odečtením přepočítané intenzity M+2 iontu od intenzity M iontu lipidů, který má o jednu dvojnou vazbu méně (tj.  $\Delta m/z = 2$ ). Relativní intenzity M+2 iontů byly vypočítány na základě elementárního složení daného lipidů pomocí webového nástroje pro výpočet izotopových obálek sloučenin (Envipat, <https://www.envipat.eawag.ch/>).



Obr. 17: Profil GSL GlcCer, GalCer a LacCer v lidské krevní plasmě (n = 3).



Obr. 18: Profil GSL Gb<sub>3</sub> a Gb<sub>4</sub> v lidské krevní plasmě (n = 3).

Na základě výsledků uvedených na obr. 17 a 18 bylo zjištěno, že mezi nejvíce zastoupené GSL v rámci podtříd GlcCer a GalCer patří lipidy s ceramidem 34:1;O2, 40:1;O2, 42:1;O2 a 42:2;O2. V případě podtřídy LacCer byly nejvíce zastoupeny lipidy s ceramidem 34:1;O2 a 42:2;O2 a v případě podtříd Gb<sub>3</sub> a Gb<sub>4</sub> byly nejvíce zastoupeny GSL s ceramidem 34:1;O2. V rámci analýzy GSL v lidské krevní plasmě bylo také identifikováno i několika dalších převážně méně zastoupených GSL, jejichž identifikace byla uváděna dříve (Bowden *et al.* 2017; Hořejší *et al.* 2021; Quehenberger *et al.* 2010). Nelze však vyloučit přítomnost i dalších minoritních lipidových druhů GSL, které jsou velmi málo intenzivní, a/nebo nemusely být vzhledem k nastavenému cut-off limitu pro MS/MS experimenty fragmentovány. V souvislosti s tímto tedy nelze jednoznačně potvrdit ani vyloučit jejich přítomnost ve vzorku, přičemž nelze vyloučit ani možnou přítomnost pozičních izomerů a větvení.

V rámci této práce bylo na základě strukturní charakterizace identifikováno celkem 58 neutrálních GSL, konkrétně 12 GalCer, 12 GlcCer, 9 LacCer, 13 Gb<sub>3</sub> a 12 Gb<sub>4</sub>. Bylo také zjištěno, že ceramidová část GSL identifikovaných v lidské krevní plasmě obsahovala výhradně sfingoidní bázi 18:1;O2. Hořejší *et al.* (2021) a Quehenberger (2010) ve svých pracích uvádějí i přítomnost jiných typů sfingoidních bází (např. 18:2;O2 nebo 16:1;O2), nicméně v rámci této práce nebyla přítomnost těchto typů sfingoidní báze prokázána. Pro identifikaci většího počtu neutrálních GSL by bylo pravděpodobně nutné několikanásobné zakoncentrování vzorku zahrnující odstranění fosfolipidů, které ve vzorcích plasmy dominují a mohou tak způsobovat potlačení odezvy detektoru na úkor méně zastoupených neutrálních GSL.

V porovnání s prací Hořejšího *et al.* (2021) byly pozorovány velmi podobné lipidové profily GSL, nicméně v případě práce Hořejšího byl pro analýzu použit vzorek plasmy pouze od jednoho dobrovolníka, zatímco v rámci této práce byly získány vzorky plasmy od celkem 8 dobrovolníků. S touto skutečností může také souviset pozorovaná vyšší intenzita u GSL s delším ceramidovým řetězcem. Další možnou příčinou může být použití odlišné extrakční metody použité pro extrakci GSL z plasmy, která je vhodnější pro extrakci více nepolárních GSL (tj. GSL s delším ceramidovým řetězcem).



## 6 ZÁVĚR

V teoretické části bakalářské práce byly shrnuty podrobné informace o klasifikaci, biosyntéze a biologických funkcích GSL včetně jejich spojitosti s různými nemocemi a typy rakovin. Dále byly popsány metody izolace, přečištění a analytické možnosti stanovení GSL z biologických vzorků zahrnující popis kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie.

V experimentální části byla nejprve provedena LC-MS testovací analýza, která byla provedena v pozitivním (+ESI) i negativním (-ESI) módu ionizace. V rámci testovací analýzy bylo zjištěno, že mezi nejvíce zastoupené neutrální GSL patří GlcCer, GalCer, LacCer, Gb<sub>3</sub> a Gb<sub>4</sub>. Vyšší odezva detektoru pro neutrální GSL, zejména pro Gb<sub>3</sub> a Gb<sub>4</sub>, byla zaznamenána v pozitivním módu ionizace, proto byly veškeré následující analýzy prováděny pouze v pozitivním módu ionizace. V dalším kroku byla provedena optimalizace gradientu mobilní fáze, při které byly porovnány čtyři gradienty mobilní fáze. Vyhodnocení bylo provedeno na základě srovnání hodnot retenčních časů nejběžněji se vyskytujícího lipidu, celkové doby analýzy a šířky píku v polovině výšky. Optimálních výsledků bylo dosaženo za použití gradientu 3, u něhož byla významně snížena doba analýzy z původních 25 minut na 10 minut při současném zachování optimálních hodnot retenčního času a šířky píku v polovině výšky pro zkoumané podtřídy GSL. Zkrácení doby analýzy bylo dosaženo zvýšením procentuálního obsahu vodné složky mobilní fáze (tj. MF-B). Dále bylo provedeno srovnání 5 extrakčních metod pro izolaci GSL z lidské plasmy. Bylo zjištěno, že neoptimálnější výsledky z hlediska nejvyšší intenzity a vyhovujících hodnot RSD v porovnání s ostatními extrakčními metodami poskytuje metoda podle Matyashe využívající systém rozpouštědel metyl-terc-butyléter (MTBE) a metanol v poměru 10:3. Hlavními výhodami Matyashovy metody jsou mimo jiné nahrazení škodlivého chloroformu za podstatně méně škodlivý MTBE a odběr horní vrstvy po separaci vrstev. Na základě výše uvedených skutečností byla tato metoda zvolena jako neoptimálnější pro izolaci GSL z lidské krevní plasmy. Součástí praktické části byla rovněž frakcionace lipidového extraktu provedená za účelem dodatečného přečištění, snížení šumu, zakoncentrování a s tím související zvýšení intenzity jednotlivých lipidových druhů v rámci zkoumaných podtříd GSL. V rámci frakcionace bylo pro 3x koncentrované vzorky dosaženo až přibližně 4x vyšší odezvy detektoru a zároveň došlo k potlačení vzniku sodných aduktů. Vyšší odezva detektoru dosažená v rámci frakcionace by mohla

být výhodná zejména pro MS/MS experimenty, nicméně samotná frakcionace je poměrně časově náročná operace, tudíž by bylo vzhledem k efektivitě práce vhodnější použít k frakcionaci v budoucnu např. metodu sloupcové chromatografie. Posledním krokem byla strukturní charakterizace glykosfingolipidů a vytvoření profilu GSL v lidské krevní plasmě. V rámci této práce bylo identifikováno celkem 58 neutrálních GSL z 5 podtříd GSL se sfingoidní bází 18:1;O2, z nichž nejvíce zastoupené GSL byly GlcCer a GalCer s ceramidem 34:1;O2, 40:1;O2, 42:1;O2 a 42:2;O2, LacCer s ceramidem 34:1;O2 a 42:2;O2 a v případě GSL Gb<sub>3</sub> a Gb<sub>4</sub> byly nejvíce zastoupeny lipidy s ceramidem 34:1;O2. Na základě strukturní charakterizace lipidového profilu lze také konstatovat, že struktura GSL v této práci uvedená je v souladu s již dříve publikovanými výsledky.

Další práce by mohla být zaměřena na porovnání GSL profilů pro jednotlivé dobrovolníky za účelem zjištění heterogenity vzorků nebo na optimalizaci metody pro stanovení kyselých GSL v lidské plasmě či jiných biologických matricích a jejich strukturní charakterizaci, kvantifikaci GSL či vývoji nové extrakční metody pro izolaci a přečištění GSL z biologických materiálů zahrnující odstranění hojně zastoupených fosfolipidů pomocí alkalické hydrolýzy.

## 7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- ALSHEHRY, Z. H. et al. 2015. An Efficient Single Phase Method for the Extraction of Plasma Lipids. *Metabolites* 5(2): 389–403. doi: 10.3390/metabo5020389
- ANN, Q., ADAMS, J. 1992. Structure Determination of Ceramides and Neutral Glycosphingolipids by Collisional Activation of  $[M + Li]^+$  Ions. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 3(3): 260–63. doi: 10.1016/1044-0305(92)87010-V
- BANG, D. Y., BYEON, S. K., MOON, M. H. 2014. Rapid and Simple Extraction of Lipids from Blood Plasma and Urine for Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1331: 19–26. doi.org/10.1016/j.chroma.2014.01.024
- BARRIENTOS, R. C., ZHANG, Q. 2020. Recent Advances in the Mass Spectrometric Analysis of Glycosphingolipidome – A Review. *Analytica Chimica Acta* 1132: 134–55. doi.org/10.1016/j.aca.2020.05.051
- BIEN, T. et al. 2020. MALDI-2 Mass Spectrometry and Immunohistochemistry Imaging of Gb3Cer, Gb4Cer, and Further Glycosphingolipids in Human Colorectal Cancer Tissue. *Analytical Chemistry* 92(10): 7096–7105. doi: 10.1021/acs.analchem.0c00480
- BLIGH, E. G., DYER, W. J. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* 37(8): 911–17. doi: 10.1139/o59-099
- BOWDEN, J. A. et al. 2017. Harmonizing Lipidomics: NIST Interlaboratory Comparison Exercise for Lipidomics Using SRM 1950-Metabolites in Frozen Human Plasma. *Journal of Lipid Research* 58(12): 2275–88. doi: 10.1194/jlr.M079012
- BREIDEN, B., SANDHOFF K. 2019. Lysosomal Glycosphingolipid Storage Diseases. *Annual Review of Biochemistry* 88: 461–85. doi: 10.1146/annurev-biochem-013118-111518
- BREIMER, M. E. et al. 2017. Glycosphingolipids of Human Embryonic Stem Cells. *Glycoconjugate Journal* 34(6): 713–23. doi: 10.1007/s10719-016-9706-y
- COSTELLO, C. E., VATH, J. E. 1990. Tandem Mass Spectrometry of Glycolipids. *Methods in Enzymology* 193: 738–68. doi: 10.1016/0076-6879(90)93448-T

- DANIOTTI, J. L. et al. 2013. Glycosylation of Glycolipids in Cancer: Basis for Development of Novel Therapeutic Approaches. *Frontiers in Oncology*: 1–12. doi: 10.3389/fonc.2013.00306
- DOMON, B., VATH J. E., COSTELLO, C. E. 1990. Analysis of Derivatized Ceramides and Neutral Glycosphingolipids by High-Performance Tandem Mass Spectrometry. *Analytical Biochemistry* 184(1): 151–64. doi: 10.1016/0003-2697(90)90028-8
- DOMON, B., COSTELLO, C. E. 1988. A Systematic Nomenclature for Carbohydrate Fragmentations in FAB-MS/MS Spectra of Glycoconjugates. *Glycoconjugate Journal* 5(4): 397–409. doi: 10.1007/BF01049915
- FAHY, E. et al. 2005. A Comprehensive Classification System for Lipids. *Journal of Lipid Research* 46(5): 839–61. doi: 10.1194/jlr.E400004-JLR200
- FAHY, E. et al. 2009. Update of the LIPID MAPS Comprehensive Classification System for Lipids. *Journal of Lipid Research* 50: 9–14. doi: 10.1194/jlr.R800095-JLR200
- FARWANAH, H., KOLTER, T. 2012. Lipidomics of Glycosphingolipids. *Metabolites* 2(1): 134–64. doi: 10.3390/metabo2010134
- FARWANAH, H., KOLTER, T., SANDHOFF, K. 2011. Mass Spectrometric Analysis of Neutral Sphingolipids: Methods, Applications, and Limitations. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1811(11): 854–60. doi: 10.1016/j.bbalip.2011.05.011
- FOLCH, J., LEES, M., STANLEY, G. H. S. 1957. A Simple Method for the Isolation and Purification of Total Lipides from Animal Tissues. *The Journal of biological chemistry* 226(1): 497–509. doi: 10.1016/s0021-9258(18)64849-5
- FURUKAWA, K. et al. 2019. New Era of Research on Cancer-Associated Glycosphingolipids. *Cancer Science* 110(5): 1544–51. doi: 10.1111/cas.14005
- GRIFFITHS, W. J. et al. 2020. Lipidomics Basics. In: *Lipidomics: Current and Emerging Techniques*. London: Royal Society of Chemistry, p. 1–24. ISBN 978-1788011600
- GROUX-DEGROOTE, S., GUÉRARDEL, Y., DELANNOY, P. 2017. Gangliosides: Structures, Biosynthesis, Analysis, and Roles in Cancer.” *ChemBioChem* 18(13): 1146–54. doi: 10.1002/cbic.201600705
- HAN, X. 2016. *Lipidomics: Comprehensive Mass Spectrometry of Lipids*. 1st edition. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons. 496 p. ISBN 978-1-118-89312-8

- HAYNES, C. A. et al. 2009. Sphingolipidomics: Methods for the Comprehensive Analysis of Sphingolipids. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 877(26): 2696–2708. doi: 10.1016/j.jchromb.2008.12.057
- HOLČAPEK, M., JIRÁSKO, R., LÍSA, M. 2010. Basic Rules for the Interpretation of Atmospheric Pressure Ionization Mass Spectra of Small Molecules. *Journal of Chromatography A* 1217(25): 3908–21. doi: 10.1016/j.chroma.2010.02.049
- HOLČAPEK, M., LIEBISCH, G., EKROOS, K. 2018. Lipidomic Analysis. *Analytical Chemistry* 90(7): 4249–57. doi: 10.1021/acs.analchem.7b05395
- HOŘEJŠÍ, K. et al. 2021. Comprehensive Identification of Glycosphingolipids in Human Plasma Using Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography—Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Metabolites* 11(3): 1–24. doi: 10.3390/metabo11030140
- ISAAC, G. 2005. Development of Enhanced Analytical Methodology for Lipid Analysis from Sampling to Detection: A Targeted Lipidomics Approach. Uppsala. Dissertation thesis. Department of Chemistry, Uppsala University. ISBN: 978-80-86369-22-8
- KLOUDA, P. 2016. *Moderní Analytické Metody*. 3.vydání. Ostrava: Nakladatelství Pavel Klouda. 176 s. ISBN: 978-80-7394-486-5
- KOUZEL, I. U. et al. 2014. Progress in Detection and Structural Characterization of Glycosphingolipids in Crude Lipid Extracts by Enzymatic Phospholipid Disintegration Combined with Thin-Layer Chromatography Immunodetection and IR-MALDI Mass Spectrometry Ivan. *Analytical Chemistry*: 1215–22. doi: 10.1021/ac4035696
- KŘÍŽEK, M., Šíma, J. 2015. *Analytická Chemie*. České Budějovice: Jihočeská univerzita - Zemědělská fakulta. 213 s. ISBN 978-80-7394-486-5
- LEE, D. Y. et al. 2014. Comparative Evaluation of Extraction Methods for Simultaneous Mass-Spectrometric Analysis of Complex Lipids and Primary Metabolites from Human Blood Plasma. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 406(28): 7275–86. doi: 10.1007/s00216-014-8124-x
- LÍSA, M., CÍFKOVÁ, E., HOLČAPEK, M. 2011. Lipidomic Profiling of Biological Tissues Using Off-Line Two-Dimensional High-Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1218(31): 5146–56. doi: 10.1016/j.chroma.2011.05.081

- MALHOTRA, R. 2012. Membrane Glycolipids: Functional Heterogeneity: A Review. *Biochemistry & Analytical Biochemistry* 1(2): 1–5. doi: 10.4172/2161-1009.1000108
- MATYASH, V. et al. 2008. Lipid Extraction by Methyl-Terf-Butyl Ether for High-Throughput Lipidomics. *Journal of Lipid Research* 49(5): 1137–46. doi: 10.1194/jlr.D700041-JLR200
- MCCALLEY, D. V. 2018. A Study of Column Equilibration Time in Hydrophilic Interaction Chromatography. *Journal of Chromatography A* 1554: 61–70. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.04.016>
- MERRILL, H. A. et al. 2005. Sphingolipidomics: High-Throughput, Structure-Specific, and Quantitative Analysis of Sphingolipids by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. *Methods* 36(2): 207–24. doi: 10.1016/j.ymeth.2005.01.009
- MERRILL, H. A. 2008. Sphingolipids. *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*: 363–97. doi: 10.1016/B978-044453219-0.50015-5
- MERRILL, H. A. 2011. Sphingolipid and Glycosphingolipid Metabolic Pathways in the Era of Sphingolipidomics. *Chemical Reviews* 111(10): 6387–6422. doi: 10.1021/cr2002917
- NOVÁKOVÁ, L., DOUŠA, M. 2013a. *Moderní HPLC Separace v Teorii a Praxi I*. 1.vydání. eds. Lucie Nováková and Michal Douša. Praha: Europrint a.s. 299 s. ISBN: 978-80-260-4243-0
- NOVÁKOVÁ, L., DOUŠA, M. 2013b. *Moderní HPLC Separace v Teorii a Praxi II*. 1.vydání. eds. Lucie Nováková and Michal Douša. Praha: Europrint a.s. 229 s. ISBN: 978-80-260-4244-0
- PHAM, T. H. et al. 2019. Targeting Modified Lipids during Routine Lipidomics Analysis Using HILIC and C30 Reverse Phase Liquid Chromatography Coupled to Mass Spectrometry. *Scientific Reports* 9(1): 0–15. doi: 10.1038/s41598-019-41556-9
- UPHOFF, A. et al. 2007. *Analysis of Complex Lipidomes*. In: Medical Applications of Mass Spectrometry, Elsevier Scientific Publ. Co, p. 223–249. ISBN 978-0-444-51980-1
- QUEHENBERGER, O. et al. 2010. Lipidomics Reveals a Remarkable Diversity of Lipids in Human Plasma<sup>1</sup>. *Journal of Lipid Research* 51(11): 3299–3305. doi: 10.1194/jlr.M009449

- SATOMI, Y., HIRAYAMA, M., KOBAYASHI, H. 2017. One-Step Lipid Extraction for Plasma Lipidomics Analysis by Liquid Chromatography Mass Spectrometry. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 1063: 93–100. doi.org/10.1016/j.jchromb.2017.08.020
- SCHNAAR, R. L. T., KINOSHITA, T. 2017. Glycosphingolipids. In: *Essentials of Glycobiology 3rd Edition*, Cold Spring Harbor (New York): Cold Spring Harbor Laboratory Press, p. 1–11. ISBN 978-1621821328
- SCHWEPPE, C. H. et al. 2010. Neutral Glycosphingolipids in Human Blood: A Precise Mass Spectrometry Analysis with Special Reference to Lipoprotein-Associated Shiga Toxin Receptors. *Journal of Lipid Research* 51(8): 2282–94. doi: 10.1194/jlr.M006759
- SKOTLAND, T. et al. 2016. Determining the Turnover of Glycosphingolipid Species by Stable-Isotope Tracer Lipidomics. *Journal of Molecular Biology* 428(24): 4856–66. doi.org/10.1016/j.jmb.2016.06.013
- STEPHENSON, D. J., HOEFERLIN, L. A., CHALFANT, C. E. 2017. Lipidomics in Translational Research and the Clinical Significance of Lipid-Based Biomarkers. *Translational Research* 189: 13–29. doi: 10.1016/j.trsl.2017.06.006
- WIGGER, D. et al. 2019. Monitoring the Sphingolipid de Novo Synthesis by Stable-Isotope Labeling and Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 7: 1–16. doi: 10.3389/fcell.2019.00210
- WOLRAB, D. et al. 2019. Oncolipidomics: Mass Spectrometric Quantitation of Lipids in Cancer Research. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* 120. doi: 10.1016/j.trac.2019.04.012
- WONG, M. W. K. et al. 2019. Comparison of Single Phase and Biphasic Extraction Protocols for Lipidomic Studies Using Human Plasma. *Frontiers in Neurology* 10: 1–11. doi: 10.3389/fneur.2019.00879
- WONG, M. et al. 2018. Intact Glycosphingolipidomic Analysis of the Cell Membrane during Differentiation Yields Extensive Glycan and Lipid Changes. *Scientific Reports* 8(1): 1–10. doi.org/10.1038/s41598-018-29324-7
- ZHANG, T. et al. 2019. The Role of Glycosphingolipids in Immune Cell Functions. *Frontiers in Immunology* 10: 1–22. doi: 10.3389/fimmu.2019.00090
- ZHANG, X., KIECHLE, F. L. 2004. Glycosphingolipids in Health and Disease. *Annals of Clinical and Laboratory Science* 34(1): 3–13.

ZHUO, D., LI, X., GUAN, F. 2018. Biological Roles of Aberrantly Expressed Glycosphingolipids and Related Enzymes in Human Cancer Development and Progression. *Frontiers in Physiology* 9: 1–9. doi: 10.3389/fphys.2018.00466



## 8 SEZNAM PŘÍLOH A OBRÁZKŮ

### 8.1 Příloha 1

# INFORMOVANÝ SOUHLAS

## NÁZEV PROJEKTU

**Vývoj metodiky pro analýzu vybraných tříd lipidů v lidské krevní plasmě za účelem včasné diagnostiky nádorových a jiných onemocnění**

.....

**Jméno a příjmení**

Evidenční číslo dárce

**P**

Vážená paní, vážený pane,

předložený dokument je výzvou k účasti ve studii a poskytuje Vám informace, které Vám pomohou učinit informované rozhodnutí o účasti v této studii. K účasti v tomto projektu jste byl(a) vybrán(a) jako zdravý dobrovolník / zdravá dobrovolnice bez předchozí historie nádorového onemocnění. Cílem tohoto projektu je vypracovat postup pro včasnou diagnostiku vybraných nádorových a jiných onemocnění na základě nalezení vhodných lipidových biomarkerů. Posuzování změn u zdravých jedinců a nemocných se provádí na základě srovnání lipidomického profilu, který může být i u zdravých jedinců velmi různorodý. K pokrytí nehomogenity ve složení lipidů v krevní plasmě, která zároveň umožní identifikaci co možná největšího množství lipidů v rámci dané třídy, budeme potřebovat odebrat vzorek Vaší krve. Účast v této studii je dobrovolná na základě podepsání informovaného souhlasu a vyplnění základního dotazníku o Vašem zdravotním stavu (viz Příloha tohoto dokumentu). Souhlas s účastí můžete kdykoliv zrušit, a to písemnou formou vedoucímu studii.

### **Odběr krve**

Žádáme Vás o vzorek krve, který bude odebrán v domluveném termínu, kdy se dostavíte na Ústav chemie (UCH) Přírodovědecké fakulty Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích (adresa: Branišovská 1760, 370 05 České Budějovice).

Odběr provede Mgr. Pavla Karšulinová, všeobecná sestra, která Vám odebere asi 24 ml žilní krve pomocí uzavřeného odběrového systému.

### **Výdaje a kompenzace**

Získané biologické vzorky budou použity výhradně pro výzkumné účely a po skončení studie budou zlikvidovány. Nebudete mít žádné náklady s účastí ve studii a rovněž nedostanete žádné náhrady nebo odměnu za poskytnutí biologického materiálu.

### **Informace o utajení**

Informace týkající se Vaší účasti ve studii budou utajeny a budou použity pouze k vědeckým účelům v souladu s platnou legislativou České republiky o ochraně osobních údajů. Vaše biologické vzorky nebudou označeny Vaším jménem, ale výhradně s použitím evidenčního čísla. Nikdo nebude mít přístup k Vaším údajům, vyjma členů výzkumného týmu a veškerá práce s Vaším vzorkem bude probíhat pod evidenčním číslem. Přiřazení evidenčního čísla ke jménu bude uchováno v oddělené databázi dostupné pouze vedoucímu projektu. V případě ukončení Vaší účasti ve studii zůstávají údaje v dispozici u výzkumného týmu, aby nebyla narušena validita získaných dat, a to po dobu nezbytně nutno k dosažení cíle studie.

Vaší účasti na výzkumu si velice vážíme a děkujeme Vám, neboť bez Vaší účasti by realizace tohoto projektu nebyla zcela možná.

Vedoucí projektu: Mgr. Karel Hořejší (email: [khorejsi@prf.jcu.cz](mailto:khorejsi@prf.jcu.cz), adresa: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Přírodovědecká fakulta, Ústav chemie, Branišovská 1760, 370 05, České Budějovice

---

Já, níže podepsaný(á), souhlasím s účastí ve studii a s odběrem vzorku krve (4 zkumavky, 24 ml), který bude použit výhradně za účelem analýzy lipidů na Ústavu chemie PřF JU. Byl(a) jsem podrobně informován(a) o cíli studie, o jejích postupech, a o tom, co se ode mne očekává. Beru na vědomí, že prováděná studie je výzkumnou činností.

Byl(a) jsem informován(a), že moje osobní údaje budou uchovány v souladu s platnou legislativou České republiky o ochraně osobních údajů v platném znění a že mé jméno se nikdy nebude vyskytovat v referátech o této studii ani pro označení mého vzorku (označen pouze evidenčním číslem), a to bez mého výslovného souhlasu.

Beru na vědomí, že mé osobní údaje mohou být poskytnuty pouze bez identifikačních údajů (anonymní data) nebo s mým souhlasem.

Svou účast ve studii mohu kdykoliv přerušit či odstoupit. Moje účast ve studii je dobrovolná.

..... jméno a příjmení (dárce)	..... ročník	..... datum	..... podpis
..... výška (v cm) / váha (v kg)	..... krevní sk.	..... kontaktní e-mail	

## Příloha

Evidenční číslo dárce

**P**

1. Máte aktuálně nějaké zdravotní potíže? ano/ ne

2. Užíváte poslední měsíc nějaké léky? ano / ne

*(uveďte prosím zejména léky související s metabolismem lipidů jako např. hormonální léčba či hormonální antikoncepce, léky na snižování hladiny cholesterolu, apod.)*

Jaké: .....

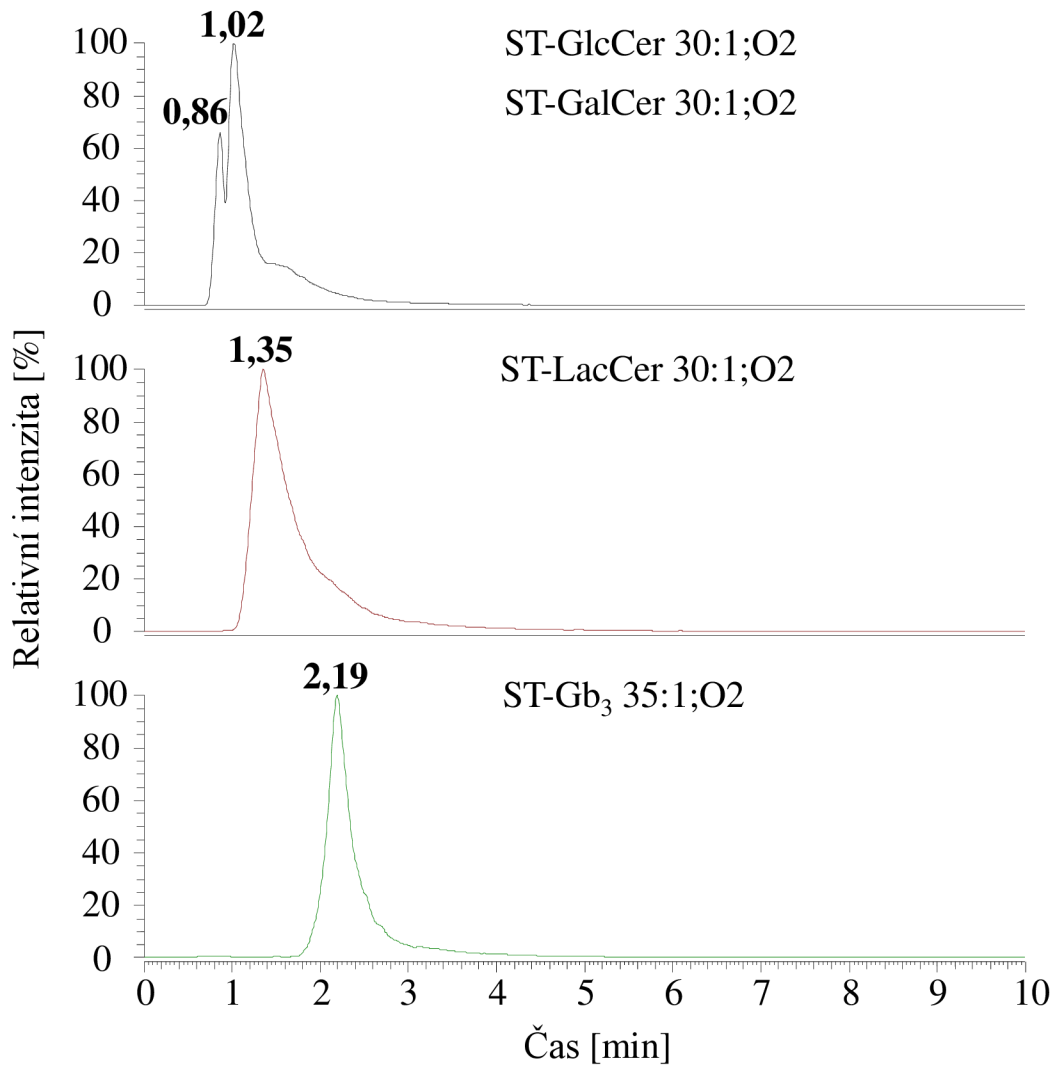
3. Trpíte onemocněním, které souvisí se žlázami s vnitřní sekrecí, ledvinami, dýchacími orgány, kosterní či svalovou soustavou, kůží, poruchou imunity či alergií? ano / ne

Uveďte: .....

Doplňující informace:

.....  
.....  
.....

## 8.2 Příloha 2



Obrázek: Extrahované iontové chromatogramy pro směsný vzorek standardů získané LC-MS analýzou a za použití gradientu 3.

(m/z 644,5 pro GlcCer a GalCer, m/z 806,6 pro LacCer a m/z 1038,7 pro Gb<sub>3</sub>)

### 8.3 Příloha 3

Tabulka: Primární data pro vyhodnocení srovnání extrakčních metod

METODA	GSL	Intenzita [cps × 10 <sup>5</sup> ]					Vyhodnocení		
		Opak.	Opak.	Opak.	Opak.	Opak.	Průměr	SD	RSD
		1	2	3	4	5			
<b>Hořejší</b>	<b>GlcCer</b>	6.48	7.19	4.55	6.77	6.9	<b>6.4</b>	<b>1.1</b>	<b>16.5</b>
	<b>GalCer</b>	4.73	5.71	3.48	5.24	7.11	<b>5.3</b>	<b>1.3</b>	<b>25.3</b>
	<b>LacCer</b>	10.80	8.86	13.90	9.09	13.00	<b>11.1</b>	<b>2.3</b>	<b>20.4</b>
	<b>Gb<sub>3</sub></b>	0.65	0.57	0.94	0.62	0.83	<b>0.7</b>	<b>0.2</b>	<b>21.5</b>
	<b>Gb<sub>4</sub></b>	0.41	0.34	0.58	0.35	0.39	<b>0.4</b>	<b>0.1</b>	<b>23.2</b>
<b>Matyash</b>	<b>GlcCer</b>	4.64	4.28	4.15	4.39	4.53	<b>4.4</b>	<b>0.2</b>	<b>4.4</b>
	<b>GalCer</b>	6.21	5.96	5.82	5.80	6.24	<b>6.0</b>	<b>0.2</b>	<b>3.5</b>
	<b>LacCer</b>	22.10	20.00	18.10	20.50	21.10	<b>20.4</b>	<b>1.5</b>	<b>7.3</b>
	<b>Gb<sub>3</sub></b>	2.93	2.91	2.05	2.34	2.94	<b>2.6</b>	<b>0.4</b>	<b>15.7</b>
	<b>Gb<sub>4</sub></b>	0.64	0.69	0.52	0.48	0.54	<b>0.6</b>	<b>0.1</b>	<b>15.3</b>
<b>Folch</b>	<b>GlcCer</b>	2.43	2.14	2.48	2.55	2.43	<b>2.4</b>	<b>0.2</b>	<b>6.5</b>
	<b>GalCer</b>	3.38	3.31	3.61	3.84	3.19	<b>3.5</b>	<b>0.3</b>	<b>7.5</b>
	<b>LacCer</b>	14.60	19.10	16.30	15.10	17.50	<b>16.5</b>	<b>1.8</b>	<b>11.1</b>
	<b>Gb<sub>3</sub></b>	2.28	2.33	2.91	2.77	2.35	<b>2.5</b>	<b>0.3</b>	<b>11.5</b>
	<b>Gb<sub>4</sub></b>	0.43	0.54	0.53	0.54	0.41	<b>0.5</b>	<b>0.1</b>	<b>13.1</b>
<b>Bligh-Dyer</b>	<b>GlcCer</b>	2.68	2.90	2.95	2.43	2.64	<b>2.7</b>	<b>0.2</b>	<b>7.7</b>
	<b>GalCer</b>	4.41	4.66	4.19	3.92	4.10	<b>4.3</b>	<b>0.3</b>	<b>6.7</b>
	<b>LacCer</b>	18.70	20.10	18.40	16.50	18.20	<b>18.4</b>	<b>1.3</b>	<b>7.0</b>
	<b>Gb<sub>3</sub></b>	2.59	2.69	2.51	2.17	2.24	<b>2.4</b>	<b>0.2</b>	<b>9.2</b>
	<b>Gb<sub>4</sub></b>	0.41	0.43	0.44	0.34	0.39	<b>0.4</b>	<b>0.0</b>	<b>9.8</b>

## 8.4 Příloha 4

Tabulka: Primární data pro vyhodnocení profilu GSL v lidské plasmě

Ceramid	Opakování														
	GlcCer			GalCer			LacCer			Gb <sub>3</sub>			Gb <sub>4</sub>		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
32:1							4.72	5.33	5.31	0.378	0.354	0.690	0.095	0.057	0.062
34:1	8.48	9.52	10.1	14.3	14.2	13.8	37.2	37	41	3.960	3.540	4.970	1.210	1.520	0.907
34:2	1.92	2.16	1.8	2.74	2.73	2.4	4.33	4.44	5.41	0.544	0.485	0.908	0.157	0.199	0.092
34:1 OH	1.75	1.89	1.69	3.16	3.22	2.95									
36:1	2.6	2.81	2.62	2.82	2.74	2.39				0.542	0.492	0.657	0.115	0.146	0.081
36:2										0.330	0.302	0.475			
38:1	3.28	3.38	3.56	3.38	3.08	2.93				0.299	0.251	0.363	0.074	0.092	0.051
38:2										0.234	0.190	0.314	0.069	0.076	0.043
40:0	3.04	3.18	2.9	2.89	2.62	1.97									
40:1	13.7	14.8	13.5	12.6	11.9	9.08	3	2.72	3.47	0.570	0.507	0.668	0.115	0.052	0.091
40:2	5.29	5.64	6.13	4.95	4.44	4.79	2.69	2.6	3.28	0.600	0.590	0.837	0.121	0.148	0.084
40:3							1.51	2.18	1.84	0.263	0.436	0.486	0.069	0.060	0.082
40:2 OH	7.25	7.92	7.26	6.58	6.23	4.95									
42:1	19.7	20.7	19.7	16.8	15	12.7	4.06	3.89	4.35	0.730	0.642	0.866	0.157	0.132	0.172
42:2	20.4	24.3	27.8	20.4	17.7	19.5	10.7	10	12.6	1.560	1.320	1.920	0.260	0.228	0.306
42:3	5.71	6.37	6.09	4.63	4.38	4.18	3.81	3.51	4.26	0.630	0.582	0.866	0.186	0.126	0.121

Tabulka: Vypočítané hodnoty průměru, směrodatné odchylky (SD) a relativní směrodatné odchylky (RSD) pro 3 opakování.

Ceramid	GlcCer			GalCer			LacCer			Gb <sub>3</sub>			Gb <sub>4</sub>		
	průměr	SD	RSD	průměr	SD	RSD	průměr	SD	RSD	průměr	SD	RSD	průměr	SD	RSD
32:1							5.12	0.347	6.8	0.47	0.187	39.5	0.07	0.021	29.2
34:1	9.37	0.821	8.8	14.10	0.265	1.9	38.40	2.254	5.9	4.16	0.735	17.7	1.21	0.307	25.3
34:2	1.96	0.183	9.4	2.62	0.193	7.4	4.73	0.594	12.6	0.65	0.229	35.5	0.15	0.054	36.0
34:1 OH	1.78	0.103	5.8	3.11	0.142	4.6									
36:1	2.68	0.116	4.3	2.65	0.229	8.6				0.56	0.085	15.0	0.11	0.033	28.5
36:2										0.37	0.093	25.2			
38:1	3.41	0.142	4.2	3.13	0.229	7.3				0.30	0.056	18.5	0.07	0.021	28.6
38:2										0.25	0.063	25.6	0.06	0.018	28.2
40:0	3.04	0.140	4.6	2.49	0.473	19.0									
40:1	14.00	0.700	5.0	11.19	1.863	16.6	3.06	0.379	12.4	0.58	0.081	13.9	0.09	0.032	37.3
40:2	5.69	0.422	7.4	4.73	0.261	5.5	2.86	0.369	12.9	0.68	0.140	20.7	0.12	0.032	27.4
40:3							1.84	0.335	18.2	0.40	0.117	29.6	0.07	0.011	15.5
40:2 OH	7.48	0.384	5.1	5.92	0.858	14.5									
42:1	20.03	0.577	2.9	14.83	2.055	13.9	4.10	0.233	5.7	0.75	0.113	15.1	0.15	0.020	13.2
42:2	24.17	3.702	15.3	19.20	1.375	7.2	11.10	1.345	12.1	1.60	0.302	18.9	0.26	0.039	14.8
42:3	6.06	0.331	5.5	4.40	0.225	5.1	3.86	0.377	9.8	0.69	0.152	21.9	0.14	0.036	25.1

## 9 SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ

<b>A</b>	anorganická (vodná) fáze
<b>ACE</b>	aceton
<b>ACN</b>	acetonitril
<b>APCI</b>	chemická ionizace za atmosférického tlaku
<b>API</b>	ionizační techniky za atmosférického tlaku
<b>APPI</b>	fotoionizace za atmosférického tlaku
<b>ATP</b>	adenosintrifosfát
<b>Cer</b>	ceramid
<b>CerS1-6</b>	ceramid syntáza 1 až 6
<b>CGalT</b>	ceramid galaktosyltransferáza
<b>CGlcT</b>	ceramid glukosyltransferáza
<b>CID</b>	kolizi indukovaná disociace
<b>DDA</b>	datově závislý sběr dat
<b>DEGS</b>	dihydroceramid A4-desaturáza
<b>DEGS1</b>	izoforma dihydroceramidu A4-desaturázy
<b>DEGS2</b>	izoforma dihydroceramidu A4-desaturázy
<b>ER</b>	endoplasmatické retikulum
<b>ESI</b>	elektrosprejová ionizace
<b>EtOH</b>	etanol
<b>FA</b>	mastné kyseliny, resp. mastné acyly
<b>Gal</b>	galaktóza
<b>GalCer</b>	galaktosylceramid
<b>Gb<sub>3</sub></b>	globotriaosylceramid
<b>Gb<sub>4</sub></b>	globotetraosylceramid
<b>GC</b>	plynová chromatografie
<b>GD<sub>2</sub></b>	disialotrihexosylgangliosid
<b>GD<sub>3</sub></b>	disialodihexosylgangliosid
<b>GL</b>	glycerolipidy
<b>Glc</b>	glukóza
<b>GlcCer</b>	glukosylceramid
<b>GM<sub>1</sub></b>	monosialotetrahexosylgangliosid



<b>GM<sub>2</sub></b>	monosialotrihexosylgangliosid
<b>GM<sub>3</sub></b>	monosialodihexosylgangliosid
<b>GP</b>	glycerofosfolipidy
<b>GSL</b>	glykosfingolipidy
<b>Hex</b>	hexóza
<b>Hex<sub>1</sub>cer</b>	monohexosylceramid
<b>Hex<sub>2</sub>cer</b>	dihexosylceramid
<b>Hex<sub>3</sub>cer</b>	trihexosylceramid
<b>Hex<sub>4</sub>Cer</b>	tetrahexosylceramid
<b>HexNAc</b>	N-acetylhexosamin
<b>HILIC-ESI-MS/MS</b>	hydrofilní interakční kapalinová chromatografie s elektrospřevodnou ionizací a tandemovou hmotnostní spektrometrií
<b>HPLC</b>	vysokoučinná kapalinová chromatografie
<b>HPLC-MS</b>	vysokoučinná kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí
<b>iGb<sub>4</sub></b>	isoglobotetraosylceramidy
<b>iNKT</b>	přirození zabíječi
<b>IPA</b>	isopropylalkohol
<b>LacCer</b>	laktosylceramid
<b>LC</b>	kapalinová chromatografie
<b>LC-MS</b>	kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí
<b>LIPID MAPS</b>	lipid metabolites and pathways strategy (webový portál)
<b>LLE</b>	extrakce kapalina–kapalina
<b>MALDI</b>	laserová desorpce a ionizace za účasti matrice
<b>MALDI-TOF-MS</b>	hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí a ionizací za účasti matrice a analyzátozem doby letu
<b>MeOH</b>	metanol
<b>MFA</b>	mobilní fáze A
<b>MFB</b>	mobilní fáze B
<b>MS</b>	hmotnostní spektrometrie
<b>MS/MS</b>	tandemová hmotnostní spektrometrie
<b>MSI</b>	hmotnostně spektrometrické zobrazování
<b>MTBE</b>	metyl-terc-butyléter

<b>NADPH</b>	nikotinamidadeninukleotidfosfát
<b>NP-LC</b>	kapalinová chromatografie s normální fází
<b>NZ</b>	neextrahovatelné zbytky
<b>O</b>	organická fáze
<b>PC</b>	fosfatidylcholin
<b>PE</b>	fosfatidyletanolamin
<b>PI</b>	fosfatidylinositol
<b>PK</b>	polyketidy
<b>PMMA</b>	polymethylmethakrylát
<b>PR</b>	prenoly
<b>RP-LC</b>	kapalinová chromatografie s reverzní fází
<b>RSD</b>	relativní směrodatná odchylka
<b>SL</b>	sacharolipidy
<b>SP</b>	sfingolipidy
<b>SPE</b>	extrakce na tuhou fázi
<b>ST</b>	standard
<b>ST</b>	steroly
<b>TLC</b>	chromatografie na tenké vrstvě
<b>t<sub>M</sub></b>	mrtvý retenční čas
<b>TOF</b>	analyzátor doby letu
<b>UDP-Gal</b>	uridin difosfát galaktóza
<b>UDP-Glc</b>	uridin difosfát glukóza
<b>+ESI</b>	elektrosprejová ionizace v pozitivním módu
<b>-ESI</b>	elektrosprejová ionizace v negativním módu
<b>3KS</b>	3-ketosfinganin



glukóza



galaktóza



N-acetylgalaktosamin