

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Multikomponentní analýza organických kyselin
v biologických vzorcích pro laboratorní diagnostiku
dědičných metabolických poruch**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

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

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval/a samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním diplomové práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byl/a jsem seznámen/a s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne 11.5.2020

.....

Ráda bych poděkovala vedoucímu mé práce doc. RNDr. Davidovi Friedeckému, Ph.D. a RNDr. Jaroslavě Friedecké, Ph.D. za veškerou pomoc, milý a vstřícný přístup a trpělivost při práci v laboratoři a při sepisování závěrečné práce. Tato diplomová práce vznikla za grantové podpory GAČR 18-12204S: Charakterizace lidského lipidomu a metabolomu pro personalizovanou zdravotní péči a hledání biomarkerů: studie rakoviny ledvin.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Barbora Pisklákova
Název práce	Multikomponentní analýza organických kyselin v biologických vzorcích pro laboratorní diagnostiku dědičných metabolických poruch
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Laboratoř dědičných metabolických poruch FNOL
Vedoucí práce	doc. RNDr. David Friedecký, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2020

Abstrakt

Organické acidémie jsou velkou skupinou dědičných metabolických poruch, které způsobují akumulaci organických kyselin v tělních tekutinách, narušují tak acidobazickou rovnováhu a vedou k progresivní encefalopatii. Současná analýza organických kyselin se provádí pomocí GC-MS, která ale trpí určitými nedostatky, mezi které patří především časová náročnost a potřeba většího množství vzorku. V teoretické části této práce jsou zpracovány dosavadní poznatky o organických acidémiích, možnostech jejich diagnostiky a současný stav analýzy organických kyselin.

V praktické části byla provedena optimalizace LC-MS metody, byla ověřena linearita odezvy a byly také vypočítány LOD a LOQ všech metabolitů. Byla stanovena stabilita vybraných oxokyselin za různých teplot skladování a byla provedena analýza vzorků moči pro laboratorní diagnostiku DMP.

Metoda bylo optimalizována pro 151 metabolitů pokrývající velmi širokou škálu organických acidémií, bylo možné také jednoznačně identifikovat veškeré izomery. Jako nejvhodnější teplota pro skladování vzorků moči z hlediska stability oxokyselin se obecně jeví teplota $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, naopak pro skladování vodných roztoků standardů $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Analýzou vzorků moči nově vyvinutou LC-MS metodou se podařilo diagnostikovat pacienty s methylmalonovou acidémií, leucinózou, glutarovou acidurií typu I a β -ketothiolasovou deficiencí.

Klíčová slova	Dědičné metabolické poruchy, organické acidémie, kapalinová chromatografie, hmotnostní spektrometrie
Počet stran	142
Počet příloh	3
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and Bc. Barbora Piskláková
surname

Title Multicomponent analysis of organic acids in
biological samples for laboratory diagnostics of
inherited metabolic disorders

Type of thesis Diploma

Department Laboratory for inherited metabolic disorders FNOL

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

The year of presentation 2020

Abstract

Organic acidemias are a big group of inborn errors of metabolism that cause an accumulation of organic acids in body fluids which disrupts acid-base balance leading to progressive encephalopathy. Current organic acids analysis is provided by GS-MS, which is however time-consuming and requires a larger amount of sample. In the theoretical part of this thesis is processed current knowledge of organic acidemias, their diagnostic options and current state of organic acids analysis.

In the experimental part the LC-MS method was optimized, the linearity of the response was verified and the LOD and LOQ of all metabolites were also calculated. The stability of selected oxoacids at different storage temperatures was determined and urine samples were analysed for laboratory diagnosis of IEM.

The method was optimized for 151 metabolites covering a very wide range of organic acidemias, it was also possible to unambiguously identify all isomers. The most suitable temperature for the storage of urine samples for oxoacid stability appears to be in general -80 °C, vice versa for the storage of aqueous solutions standards +4 °C. Analysis of urine samples by the newly developed LC-MS method managed to diagnose patients with methylmalonic acidemia, maple syrup urine disease, glutaric aciduria type I and β - ketothiolase deficiency.

Keywords Inherited metabolic disorders, organic acidemias,
liquid chromatography, mass spectrometry

Number of pages 142

Number of appendices 3

Language Czech

OBSAH

1	ÚVOD	8
2	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	9
2.1	Dědičné metabolické poruchy	9
2.1.1	Organické acidémie	10
2.1.2	Organické acidémie způsobené defekty v metabolismu aminokyselin	12
2.1.3	Klasické organické acidémie/acidurie	22
2.1.4	Organické acidémie způsobené defekty v metabolismu mastných kyselin	29
2.1.5	Organické acidémie způsobené mitochondriálními defekty	36
2.1.6	Organické acidémie způsobené defekty v močovinovém cyklu	41
2.1.7	Organické acidémie způsobené defekty v metabolismu sacharidů	44
2.1.8	Organické acidémie způsobené peroxisomálními defekty	51
2.1.9	Organické acidémie způsobené defekty v dalších metabolických drahách	54
2.2	Diagnostika dědičných metabolických poruch	62
2.3	Současná analýza organických kyselin	62
2.3.1	Vzorek pro metabolomickou analýzu	63
2.3.2	Plynová chromatografie ve spojení s hmotnostní detekcí	63
2.3.3	Kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní detekcí	65
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	67
3.1	Materiál	67
3.1.1	Chemikálie	67
3.1.2	Přístrojové vybavení	71
3.1.3	Biologický materiál	71
3.2	Metody	72
3.2.1	Příprava standardů	72
3.2.2	Příprava interních standardů	72
3.2.3	Optimalizace MRM přechodů pomocí standardů	72
3.2.4	Separace standardů pomocí kapalinové chromatografie	73
3.2.5	Stabilita oxokyselin	73
3.2.6	Příprava kalibračních směsí standardů	74
3.2.7	Příprava vzorků moči a jejich analýza	77
4	VÝSLEDKY	78
4.1	Vývoj LC-MS metody	78
4.1.1	Optimalizace podmínek separace	78
4.1.2	Kalibrační křivky metabolitů	81
4.1.3	Stabilita oxokyselin	85
4.2	Finální LC-MS metoda	88
4.3	Diagnostika pacientů	92
5	DISKUZE	100
6	ZÁVĚR	107
7	LITERATURA	108
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	120
9	PŘÍLOHY	122

CÍLE PRÁCE

Teoretická část:

- Zpracování literární rešerše shrnující dostupné poznatky o dědičných metabolických poruchách se zaměřením na organické acidémie a jejich laboratorní diagnostiku
- Shrnutí aktuálního stavu analýzy organických kyselin pro diagnostiku dědičných metabolických poruch a studium cíleného metabolického přístupu v klinické oblasti

Praktická část:

- Klinická cílená metabolická analýza biologických materiálů (např. moč, sérum, plasma, buněčné linie) zaměřená na komplexní skupinu organických kyselin metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií na principu trojitého kvadrupólu
- Příprava biologických vzorků pro diagnostiku dědičných metabolických poruch (organických acidémií), jejich analýza nově vyvinutou metodou viz výše, kvantitativní vyhodnocení naměřených dat a interpretace výsledků

1 ÚVOD

Dědičné metabolické poruchy jsou molekulárními chorobami způsobené mutací jednoho genu. Velkou skupinou těchto onemocnění jsou organické acidémie, které postihují intermediární metabolismus různých skupin látek a dochází ke hromadění organických kyselin v tělních tekutinách. Nabourávají tak acidobazickou rovnováhu organismu, což bývá pro pacienty fatální. Současná diagnostika těchto onemocnění spočívá v populačním screeningu (např. novorozenecký screening, v ČR pro 18 onemocnění), nebo se provádí selektivní screening pro osoby trpícími určitými příznaky, a to na úrovni metabolitů, proteinů nebo nukleových kyselin. Momentálně se rutinní laboratorní analýza organických kyselin provádí pomocí plynové chromatografie ve spojení s hmotnostní detekcí. Tato metoda trpí určitými nedostatky, mezi které patří především časová náročnost přípravy vzorku, neschopnost detekce mnoha neutrálních a pozitivně nabitých látek a také složitější vyhodnocení výsledků analýzy. V posledních letech se výzkum analýzy organických kyselin soustředí na zjednodušení, a především zrychlení jejich analýzy za pomoci jiných metod, přičemž největší potenciál má právě kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní detekcí, která vykazuje velmi dobrou citlivost a selektivitu.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Dědičné metabolické poruchy

Dědičné poruchy metabolismu jsou molekulárními, v naprosté většině případů autosomálně recesivními chorobami, které jsou způsobeny mutací jednoho genu (tzv. single-gen diseases). Tato mutace může představovat delecii jednoho nebo více párů nukleotidů, jejich inverzi, přemístění či opakování určité sekvence (Racek *et al.*, 2006). Následnou replikací, transkripcí a translací tak vzniká defektní protein (či různé typy RNA), který v závislosti na své funkci, způsobuje více či méně závažné poruchy metabolismu. Defekt tedy může postihnout enzymy, krevní bílkoviny neenzymové povahy, strukturní proteiny buněčné membrány, receptory, iontové kanály, regulační proteiny (Racek *et al.*, 2006).

Celkový výskyt těchto onemocnění je poměrně vysoký, uvádí se 1:1000 až 1:600. Toto číslo může být reálně i vyšší, jelikož mnoho pacientů může správné diagnóze unikat. V rámci různých zemí je incidence velmi rozmanitá, záleží to na několika faktorech: znalost lékařů, dostupnost diagnostických metod a skutečná genetická incidence. Některé oblasti se pak mohou vyznačovat zvláště vysokou incidencí jednoho typu onemocnění (např. v některých oblastech Slovenska se hojně vyskytuje alkaptonurie) (Šťastná, 2008).

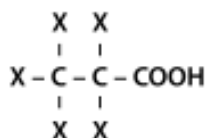
Klinické projevy jsou velmi rozmanité a zahrnují různou kombinaci u jednotlivých onemocnění (např. zvracení, koma, selhání jater, záchvaty, hypotonie, neprospívání, opožděný vývoj aj.) (Saudubray a Cazorla., 2016). Ačkoliv se naprostá většina příznaků objevuje v dětském věku, mohou se objevit i u adolescentů a dospělých. Tyto formy DMP s pozdním nástupem se často nerozpoznají, a tak jejich prevalence není známa (Sirrs *et al.*, 2016). Nejčastěji mají tito pacienti psychické nebo neurologické projevy, včetně atypické psychózy nebo deprese, demenci, poruchy pohybu a epilepsie (Saudubray *et al.*, 2016). Průběh těchto onemocnění může být chronický, někdy progresivní a pro některé DMP je charakteristické opakování akutní dekompenzace, způsobené zvýšenou hladinou toxických metabolitů (Šťastná, 2008).

Většina z těchto poruch je léčitelná a vyžaduje okamžité odstranění toxinu z těla speciálními dietami nebo „čisticími“ léky (karnitin, benzoát sodný, penicilamin atd.) (Saudubray, 2016). Dlouhodobá terapie spočívá v dietě, jako je omezení konzumace proteinů, vyhýbání se hladovění nebo podávání kofaktorů. V posledních letech se objevují i nové specifické způsoby léčby, jako je enzymová terapie, transplantace kostní dřeně pro některá lysosomální onemocnění ze strádání, transplantace orgánů u onemocnění

močovinového cyklu nebo organických acidurií (Saudubray a Cazorla., 2016). Žádná z těchto terapií však není kauzální léčbou. Tou je pouze oprava mutovaného genu nebo jeho náhrada genem intaktním (Racek *et al.*, 2006). Tato možnost léčby je stále ve fázi výzkumu.

2.1.1 Organické acidémie

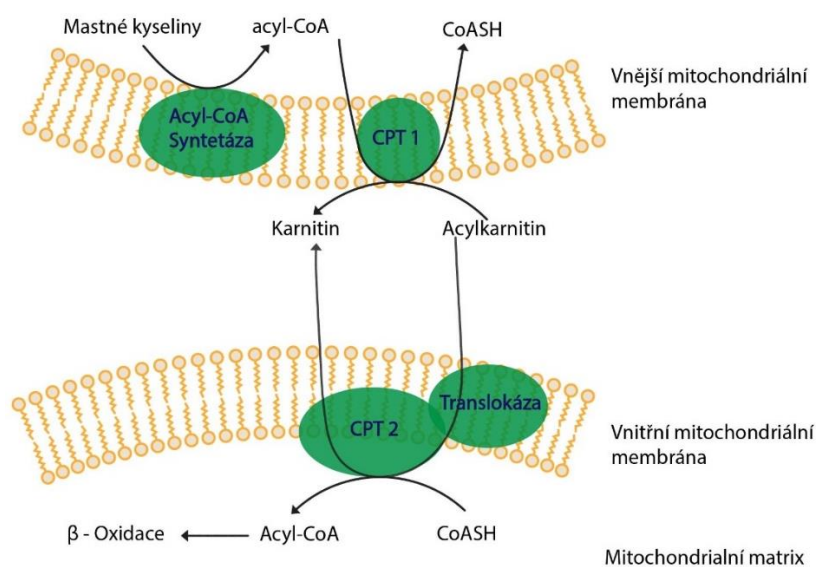
Organické acidémie jsou heterogenní, nejčastěji autozomálně recesivní onemocnění z třídy dědičných metabolických poruch, vznikající defektem v intermediárních metabolických drahách sacharidů, aminokyselin, nukleových kyselin, steroidů a oxidaci mastných kyselin. Dochází při nich k akumulaci organických kyselin v tkáních a tělních tekutinách a následně zvýšenému vylučování z těla močí, která se dobře vyšetřuje (Ozand, a Gascon, 1991; Blau *et al.*, 2008; Gallagher *et al.*, 2018). Jako organické acidémie označujeme onemocnění, při nichž dochází ke zvýšené koncentraci organických kyselin v plasmě, kdežto při organických aciduriích je zvýšená koncentrace v moči. Organické kyseliny jsou sloučeniny, které jsou ve vodě rozpustné, obsahují jednu nebo více karboxylových skupin, případně jiné další funkční skupiny (např. -keto, -hydroxyl, viz Obr. 1). Nacházejí se i u zdravých jedinců, jakožto meziprodukty metabolických drah, ovšem nedostatek enzymu/proteinu pro jejich další metabolizaci způsobuje u pacientů jejich akumulaci v těle v abnormálním množství, a tím narušení acidobazické rovnováhy a změnu intracelulárních biochemických pochodů, které vedou k progresivní encefalopatii (Villani *et al.*, 2017).



Obrázek 1 Obecná struktura organických kyselin. Symbol -X představuje jakoukoliv funkční skupinu (-hydroxy, -keto, -hydrogen, -karboxy) nebo boční řetězec (Převzato z Blau *et al.*, 2008).

Dalšími skupinami látek při analýze organických kyselin jsou acylglyciny a acylkarnitiny. Acylglyciny vznikají konjugací acyl-CoA s glycinem a jsou to normální minoritní metabolity mastných kyselin. Tato reakce je katalyzována mitochondriálním enzymem glycin N-acylasou (EC 2.3.1.13), která mimo jiné také katalyzuje vznik kyseliny hippurové a salicylmočové (Bartlett a Gompertz, 1974). V určitých případech DMP dochází k nadměrné vylučování specifického acylglycinu. Karnitin hraje důležitou roli při β -oxidaci mastných kyselin (Fritz, 1963) a při metabolismu aminokyselin s rozvětveným řetězcem. Je zodpovědný za přenos mastných kyselin (MK) s dlouhým

řetězcem přes vnitřní mitochondriální membránu, kde následně probíhá β -oxidace. Na Obr. 2 je schéma tohoto přenosu přes mitochondriální membrány. Většina klasických organických acidurií způsobena defekty v následných metabolických drahách je spojena se sekundární deficiencí karnitinu (Blau *et al.*, 2008). Za patologických podmínek, např. při poruchách oxidace MK nebo při organických acidemiích je z důvodu deficience acyl-CoA-dehydrogenasy funkce karnitinu, jakožto modulátoru intracelulární koncentrace CoA, regulátoru toku substrátu, rovnováhy energie přes membrány mitochondrií, stěžejní. Za takových podmínek se acyl-CoAs hromadí v matrix a karnitin je využíván pro přenos těchto látek z mitochondrií (Blau *et al.*, 2008).



Obrázek 2 Schéma přenosu mastných kyselin přes mitochondriální membrány za účasti karnitinového přenašeče (převzato z Funkce buněk a lidského těla, multimediální skripta; Fontana *et al.*, 2016).

Seznam rozdělených organických acidémií spolu s nejdůležitějšími biomarkery, názvy enzymu/proteinu, příslušného EC čísla a názvu mutovaného genu jsou uvedeny v následujících tabulkách 1 až 9 podle metabolismu, který postihují. Tabulky byly vytvořeny za účasti databází UniProt (<https://www.uniprot.org/>), Metagene (<http://www.metagene.de/>), Human Metabolome Database (<http://www.hmdb.ca/>) a Orphanet (<https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/index.php>), díky které byla vytvořena i klasifikace jednotlivých onemocnění to tříd podle postihovaného metabolismu. Ke každé tabulce náleží metabolické dráhy s vyznačenými defektními enzymy. Tyto mapy byly vytvořeny v on-line softwaru KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (<https://www.genome.jp/kegg>). K jednotlivým skupinám uvádím krátký popis vybraných onemocnění.

2.1.2 Organické acidémie způsobené defekty v metabolismu aminokyselin

Dědičné metabolické poruchy aminokyselin jsou výsledkem změny v katabolismu aminokyselin: absorpce ve střevech, exkrece ledvinami a reabsorpce, syntéza proteinů a metabolismus (Rinaldo *et al.*, 2006). Analýza organických kyselin v moči, aminokyselin v plasmě a acylkarnitinů jsou vhodné screeningové testy pro počáteční hodnocení těchto pacientů. Aminokyseliny v moči jsou zvláště užitečné při deficienci transportérů aminokyselin v ledvinách, jako např. cystinurie (DeArmond *et al.*, 2017).

Fenylketonurie (PKU) je nejběžnější nemocí metabolismu aminokyselin, jejíž incidence ve světě je přibližně 1:13000, v České republice 1:6500. Nedostatek fenylalaninhydroxylasy (PAH) vede k nahromadění fenylalaninu a současnému nedostatku tyrosinu. Tato aminokyselina hraje důležitou roli v enzymové katalýze a buněčné signalizaci, což způsobuje poruchy v syntéze neurotransmiterů a následnou mentální retardaci. Poruchami metabolismu tyrosinu trpí také jedinci s tyrosinemiemi (www.novorozeneckyscreening.cz; DeArmond *et al.*, 2017). Vzhledem k tomu, že tetrahydrobiopterin je kofaktor PAH, zodpovědný za přeměnu Phe na Tyr, tak podáváním tohoto kofaktoru jedincům s určitými mutacemi, se snižuje hladina Phe v plasmě (Zurflüh *et al.*, 2008). Momentálně ale jedinou spolehlivou léčbou této nemoci je dieta chudá na Phe (Burgard *et al.*, 2016).

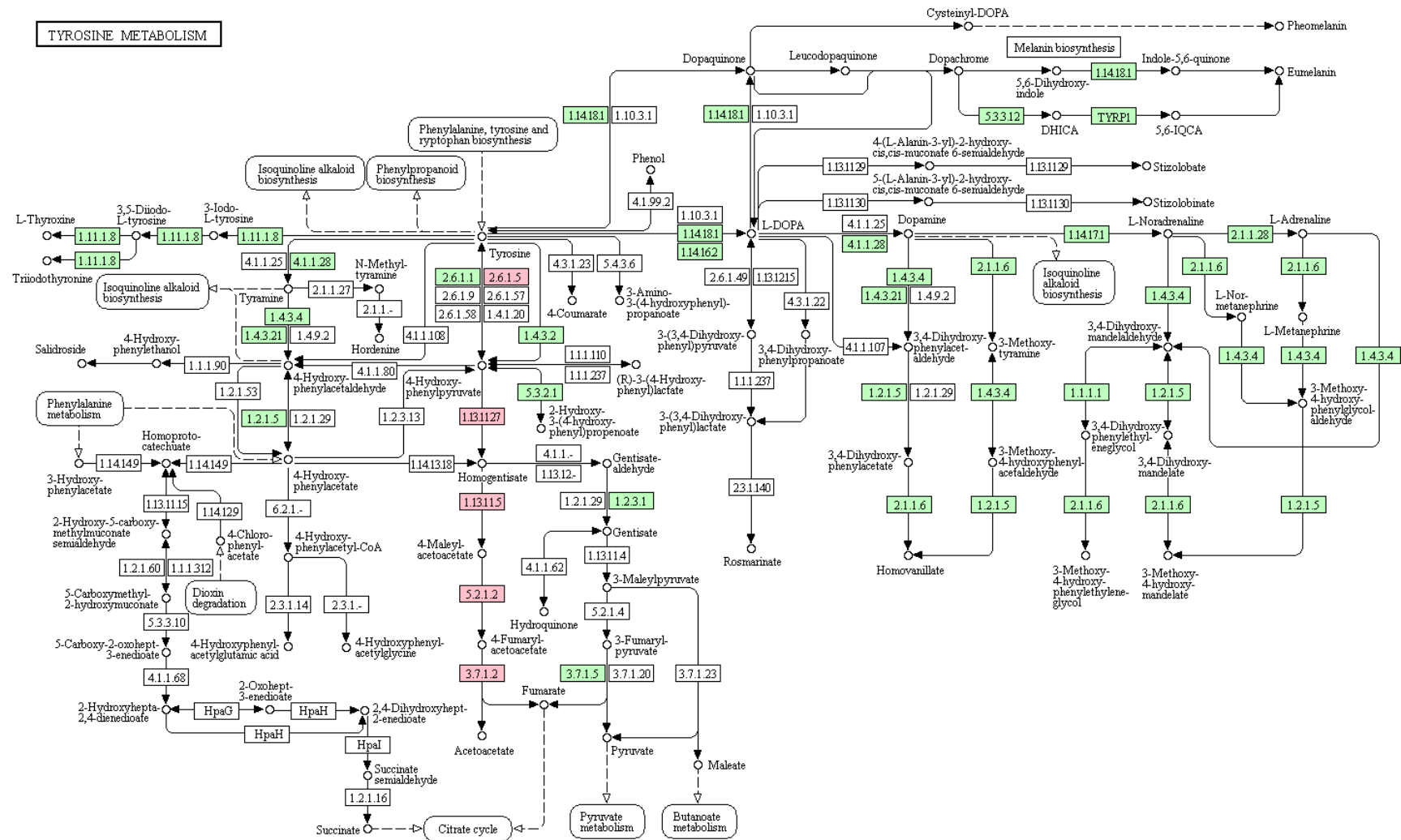
Leucinóza (MSUD), nebo také nemoc javorového sirupu, vzniká kvůli defektu v katabolismu aminokyselin s rozvětveným řetězcem (Val, Leu, Ile). Dochází tak k nahromadění 2-ketokyselin a 2-hydroxykyselin v těle, což vede k závažné toxicitě (DeArmond *et al.*, 2017). Ačkoliv je celosvětová incidence poměrně nízká, 1:185000, tak se toto onemocnění hojně vykytuje u některých etnik, například u aškenázských židů 1:113, nebo u starozákonných Mennonitů 1:176. Léčba spočívá v dietě chudé na aminokyseliny s rozvětveným řetězcem (www.novorozeneckyscreening.cz).

Tabulka 1 Seznam onemocnění způsobené defekty v metabolismu aminokyselin. Ke každému onemocnění náleží zkratka pod názvem onemocnění, název defektního enzymu/proteinu, EC číslo enzymu, mutovaný gen a nejdůležitější biomarkery pro dané onemocnění.

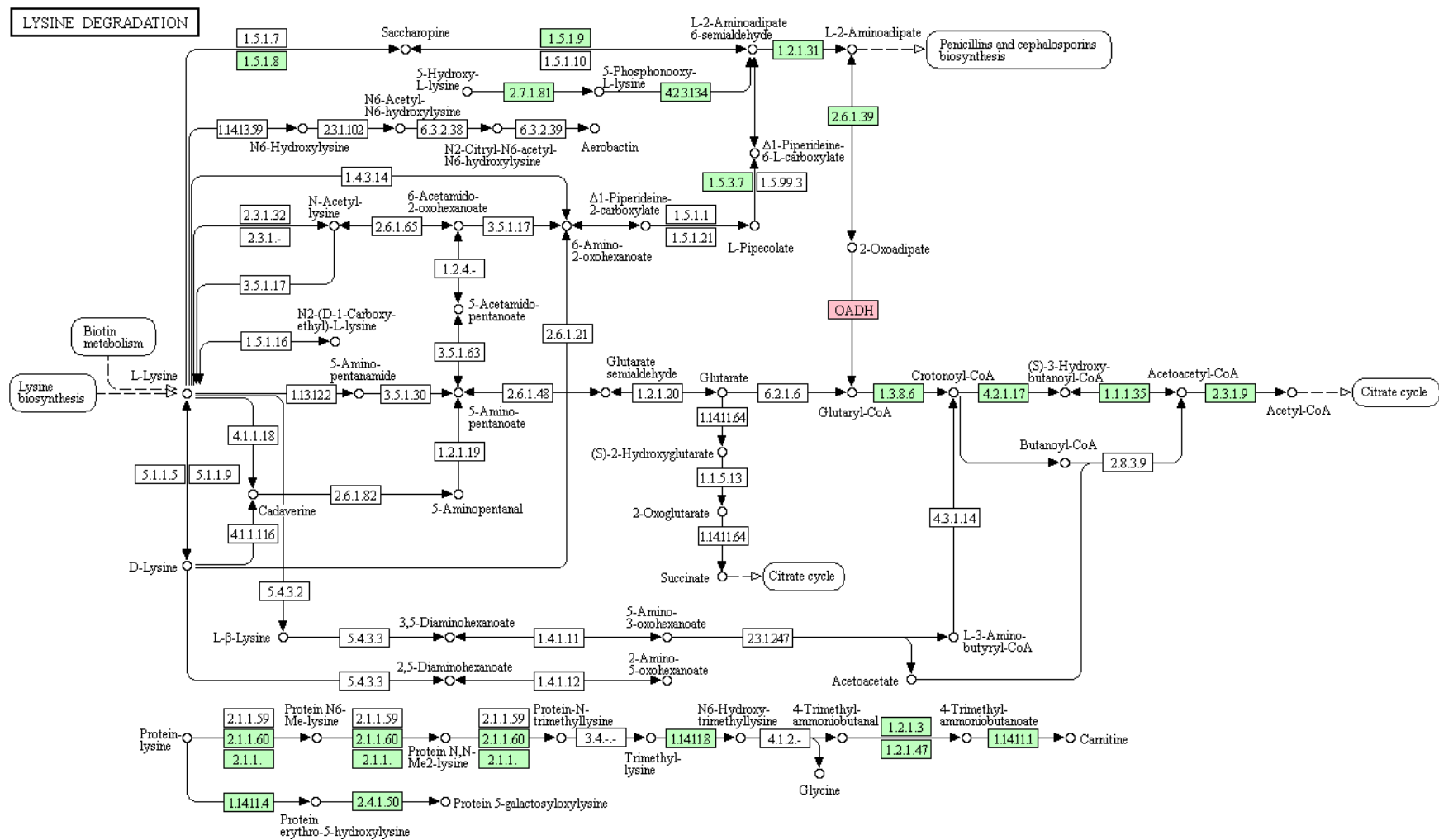
Leucinóza MSUD	2-oxoisovalerátdehydrogenasa 1.2.4.4 <i>BCKDHB, BCKDHA</i> 2-ketoisokaproová kyselina, 2-ketoisovalerová kyselina, 2-keto-3-methylvalerová kyselina, 2-hydroxyisokaproová kyselina, Citrát, 2-hydroxyisovalerová kyselina, 2-hydroxy-3-methylvalerová kyselina
Tyrosinemie typu I T1	Fumarylacetoacetasa 3.7.1.2 <i>FAH</i> 4-hydroxyfenyllaktát, N-acetyltyrosin, Sukcinylaceton, Vanillylmandlová kyselina, 3,4-dihydroxymandlová kyselina, 4-hydroxyfenylacetát, 4-hydroxyfenylpyruvát
Tyrosinemie typu II T2	Tyrosinaminotransferasa 2.6.1.5 <i>TAT</i> 4-hydroxyfenyllaktát, N-acetyltyrosin, 4-hydroxyfenylacetát, 4-hydroxyfenylpyruvát
Fenylketonurie PKU	Fenylalaninhydroxylasa 1.14.16.1 <i>PAH</i> Fenyllaktát, Fenylpyruvát, Mandlová kyselina, Fenylacetát, 2-hydroxyfenylacetát, 5-hydroxyindolacetát, Homovanilová kyselina, Vanillylmandlová kyselina, 3-hydroxyfenylacetát
2-aminoadipová acidurie AA	2-oxoglutarátdehydrogenasa, složka E1 1.2.4.2 <i>DHTKD1</i> 2-aminoadipová kyselina, 2-hydroxyadipová kyselina, 2-oxobutyryl
Deficience 3-hydroxisobutyryl-CoA- hydrolasy HIBCHD	3-hydroxyisobutyryl-CoA-hydrolasa 3.1.2.4 <i>HIBCH</i> 2-hydroxyisovalerová kyselina; 2,3-dihydroxy-2-methylbutanoát
5-oxoprolinová deficience OPLAHD	5-oxoprolinasa 3.5.2.9 <i>OPLAH</i> Pyroglutamová kyselina
Blue diaper syndrom BDS	Indol-3-acetát; 5-hydroxyindolacetát
Dimethylglycinurie DMGDHD	Dimethylglycindehydrogenasa 1.5.99.2 <i>DMGDH</i> Butyrylglycin; N,N-dimethylglycin
Hawkinsonurie HU	4-hydroxyphenylpyruvatedioxygenasa 1.13.11.27 <i>HPD</i> 4-hydroxyfenylacetát; 4-hydroxyfenylpropionát; 4-hydroxyfenyllaktát;
Deficience maleylacetoacetátisomerasy MAAID	Maleylacetoacetátisomerasa 5.2.1.2 <i>GSTZI</i> Sukcinylaceton

Tabulka 1 Seznam onemocnění způsobené defekty v metabolismu aminokyselin. Ke každému onemocnění náleží zkratka pod názvem onemocnění, název defektního enzymu/proteinu, EC číslo, mutovaný gen a nejdůležitější biomarkery pro dané onemocnění *pokračování*.

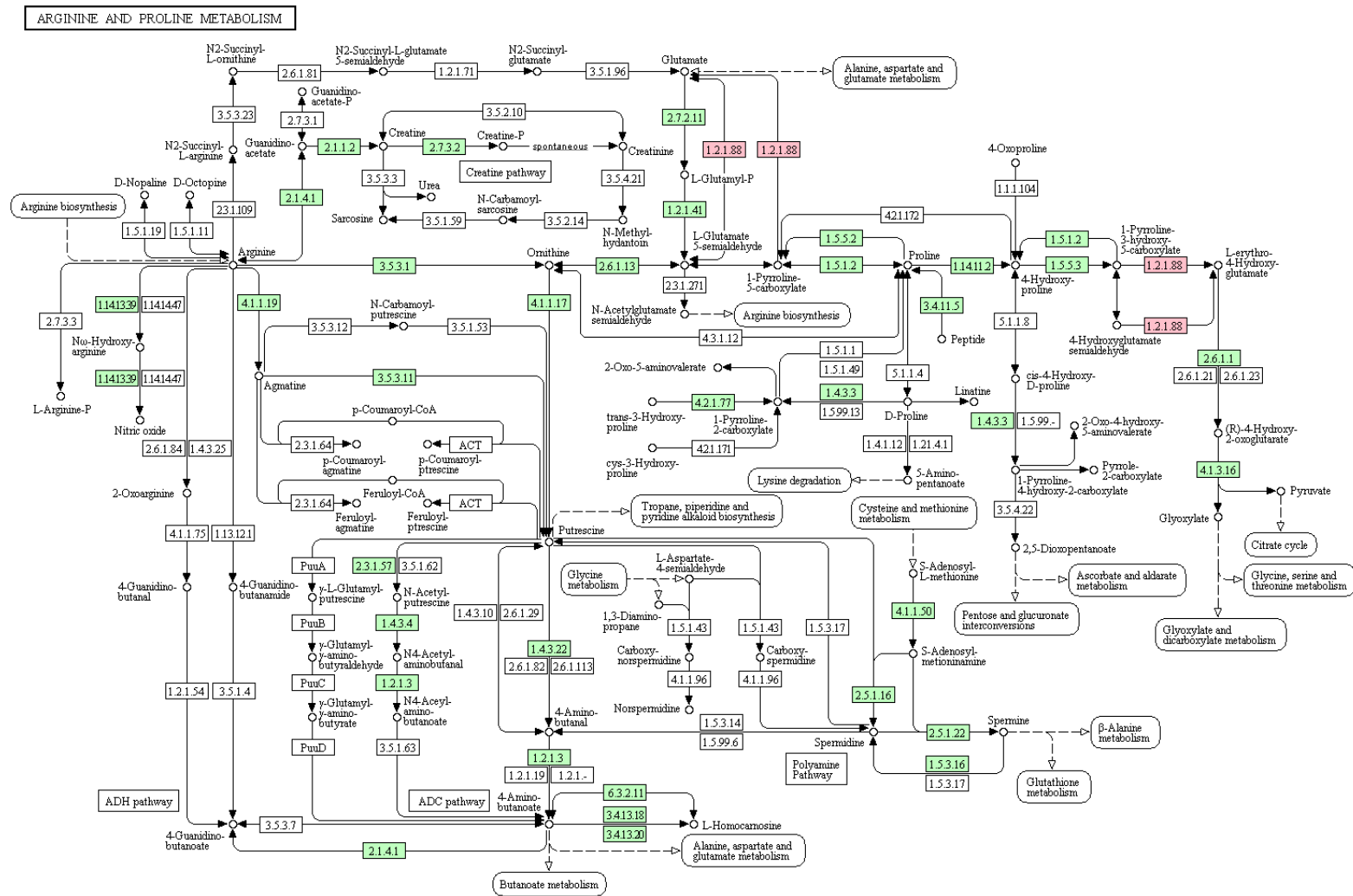
Deficience glutathionsynthetasy	Glutathionsynthetasa 6.3.2.3 <i>GSS</i>
GSD	Pyroglutamová kyselina
Alkaptonurie	Homogentisát-1,2-dioxygenasa 1.13.11.5 <i>HGD</i>
AKU	Homogentisová kyselin
Hyperprolinemie typu II	δ -1-pyrrolin-5-karboxylátdehydrogenasa 1.2.1.88 <i>ALDH4A1</i>
HPII	Prolin; N-pyrol-2-karboxylglycin
Prolidasová deficience	Peptidasa D 3.4.13.9 <i>PEPD</i>
PD	Glycylprolin



Obrázek 3 Metabolická mapa tyrosinového metabolismu. Červeně označené jsou defektní enzymy způsobující organické acidémie.

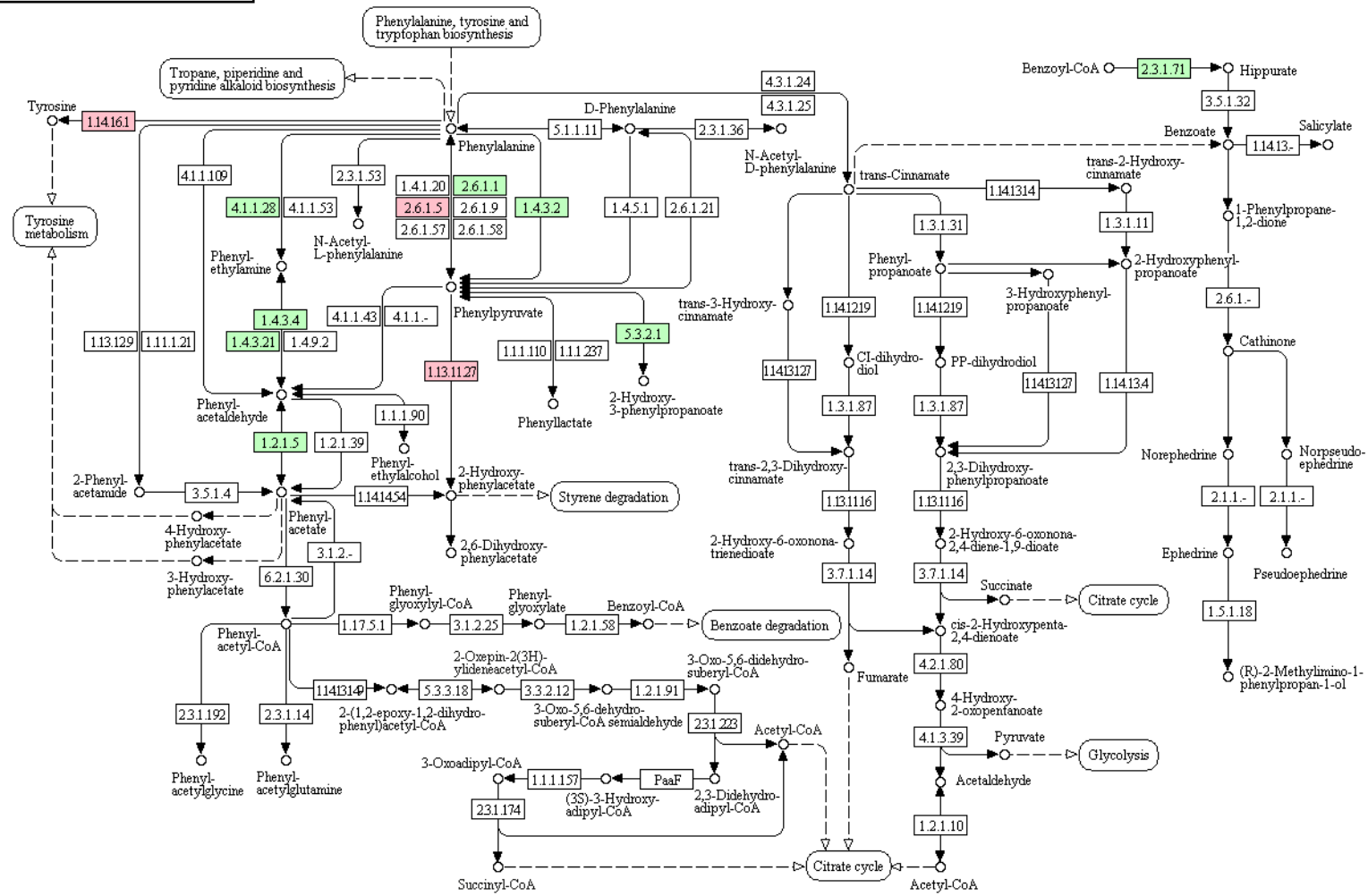


Obrázek 4 Metabolická mapa degradace lysinu. Červeně označené jsou defektní enzymy způsobující organické acidémie.

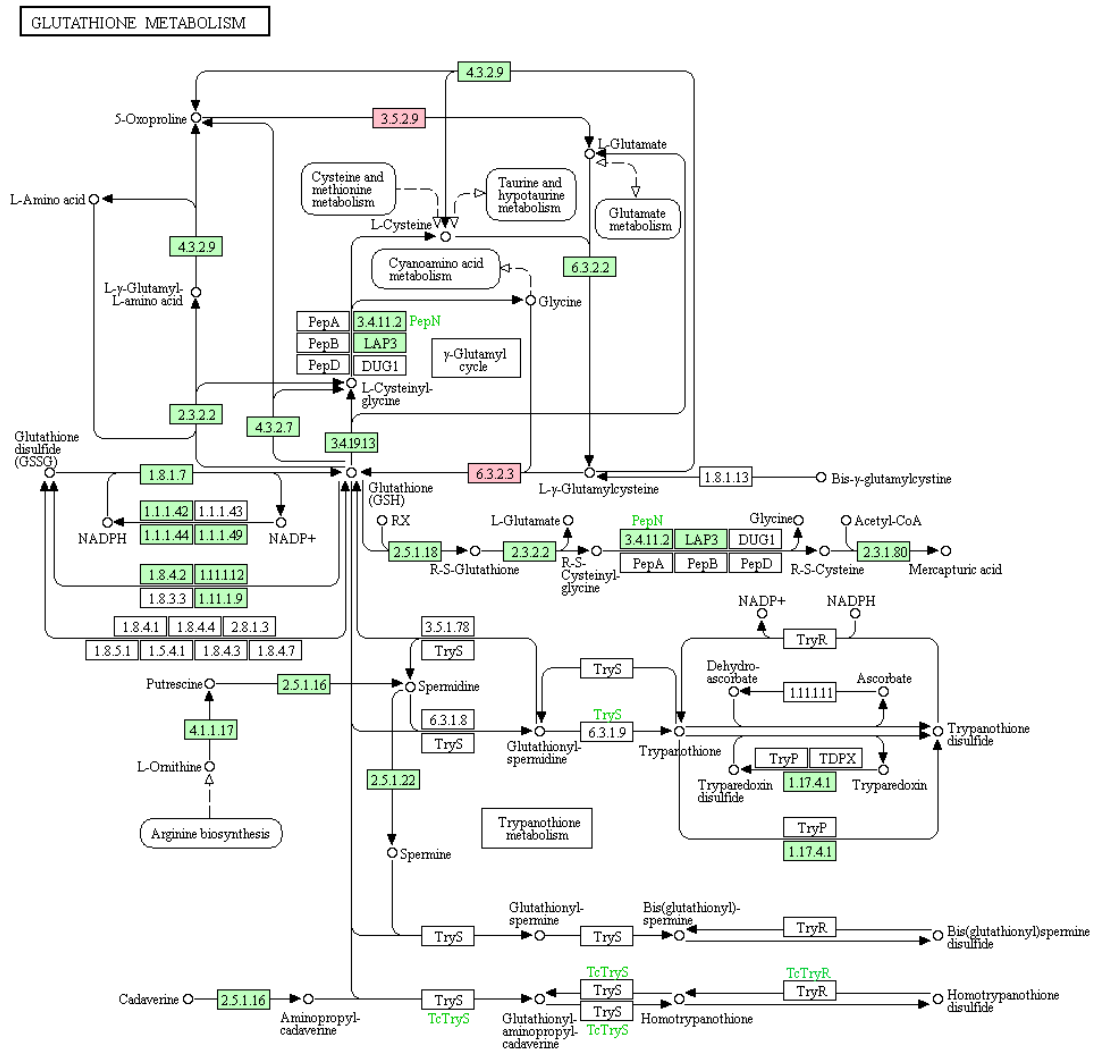


Obrázek 5 Metabolická mapa metabolismu argininu a prolinu. Červeně označené jsou defektní enzymy způsobující organické acidémie.

PHENYLALANINE METABOLISM

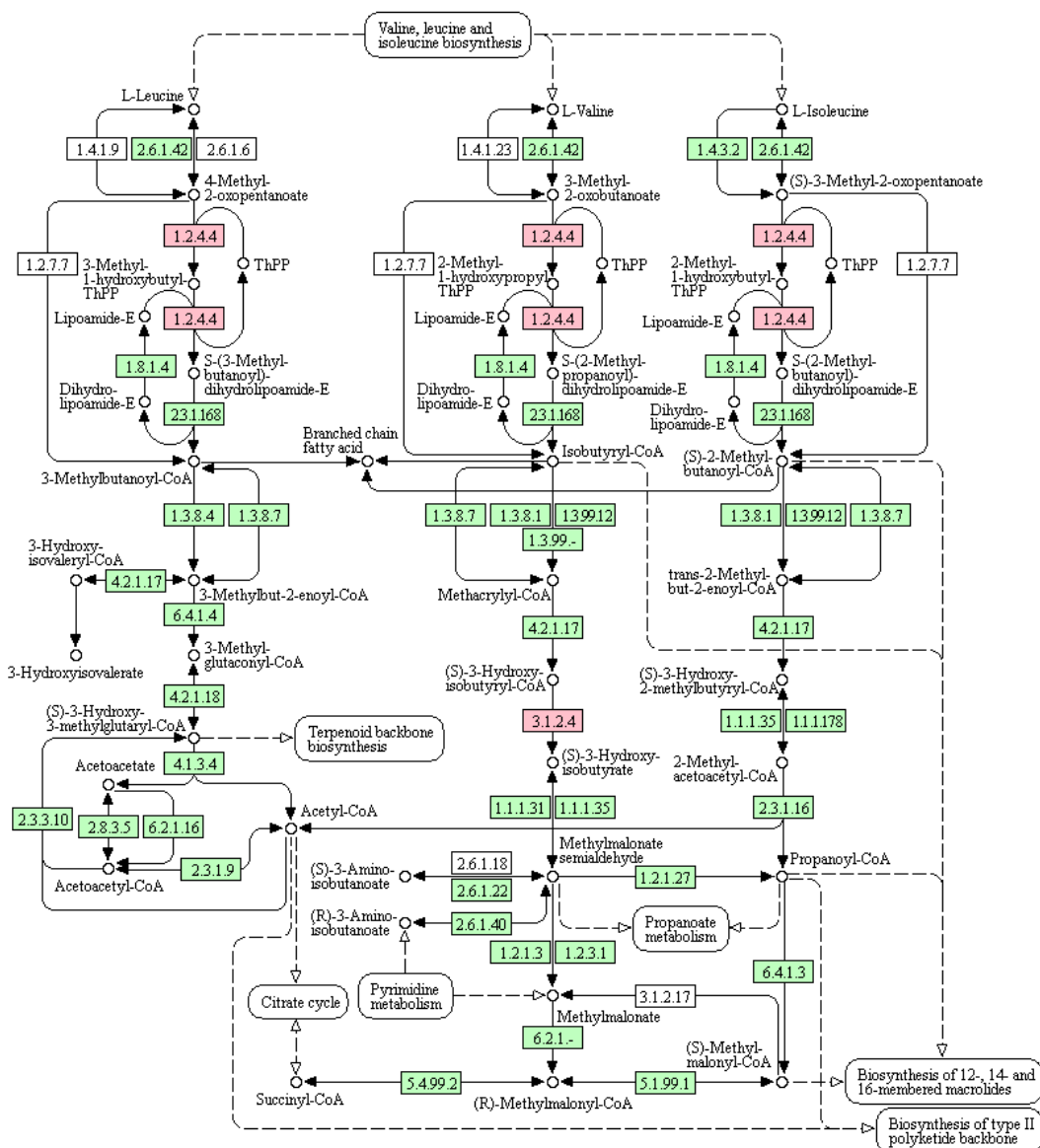


Obrázek 6 Metabolická mapa metabolismu fenylalaninu. Červeně označené jsou defektní enzymy způsobující organické acidémie.



Obrázek 7 Metabolická mapa metabolismu glutathionu. Červeně označené jsou defektní enzymy způsobující organické acidémie.

VALINE, LEUCINE AND ISOLEUCINE DEGRADATION



Obrázek 8 Metabolická mapa metabolismu aminokyselin s rozvětveným řetězcem. Červeně označené jsou defektní enzymy způsobující organické acidémie.

2.1.3 Klasické organické acidémie/acidurie

Jako klasické organické acidémie se nazývají onemocnění, které postihují metabolismus aminokyselin s rozvětveným řetězcem (BCAA), tedy leucin, isoleucin a valin (Villani *et al.*, 2017). Každá literatura nabízí různou klasifikaci, mohou se tedy mezi nimi vyskytnout i nemoci postihující jiný metabolismus, například metabolismus mastných kyselin. Nebo naopak mohou být přiřazeny k jinému metabolismu.

Isovalerová acidémie (IVA) patří mezi klasické organické acidémie postihující katabolismus leucinu, konkrétně isovaleryl-CoA-dehydrogenasu, a následkem toho dochází ke zvýšené koncentraci isovaleryl-CoA v těle (DeArmond *et al.*, 2017). Tento enzym je homotetramer, je syntetizován v cytoplasmě jako prekurzor a po následných posttranslačních modifikacích je zralý protein transportován do mitochondrií (DeArmond *et al.*, 2017). Světová incidence tohoto onemocnění je 1:230000 narozených dětí (www.novorozeneckyscreening.cz). Léčba spočívá v nízkém příjmu proteinů v kombinaci se suplementací karnitinem a glycinem, které dokáží navázat toxický isovaleryl-CoA. Při včasné diagnóze a léčbě se většina pacientů vyvíjí normálně (Schiff *et al.*, 2016).

Propionová acidémie (PA) je způsobena deficiencí mitochondriální propionyl-CoA-karboxylasy, která je složena ze dvou podjednotek a využívá biotin jako kofaktor (Schiff *et al.*, 2016). Důsledkem akumulace propionyl-CoA je inhibiční efekt jiných metabolických drah a zvýšená koncentrace acylkarnitiů, což vede k relativní karnitinové deficienci a zvýšené syntéze mastných kyselin s lichým počtem uhlíků (Schiff *et al.*, 2016). Methylmalonová acidurie (MMA) je onemocnění způsobené deficiencí methylmalonyl-CoA-mutasy, kofaktorem je adenosylkobalamin, a tak onemocnění tvorby adenosylkobalaminu způsobuje variantní formy MMA (Schiff *et al.*, 2016). Léčba obou onemocnění spočívá v proteinové dietě, suplementaci vitamínu B12, přičemž na tuto léčbu neodpovídá každý pacient. Většina pacientů, která odpovídá na suplementaci hydroxykobalaminu potřebují jen mírné proteinové omezení nebo vůbec žádné. Další možností je podávání karnitinu, metronidazolu, jelikož propionát je z části produkován i mikroorganismy a růstového hormonu pro jedince s chabým růstem (Schiff *et al.*, 2016).

Glutarová acidurie typu 1 je způsobena deficiencí glutaryl-CoA-dehydrogenasy, která se účastní katabolismu lysinu, hydroxylysínu a tryptofanu. Zvýšené koncentrace těchto aminokyselin a jejich produktů mohou způsobit poškození bazálních ganglií, což vede k dystonii a dyskinezi (Greenberg *et al.*, 1995; Lo, 2017). Incidence u bělošských

populací se uvádí 1:40000, vysoká incidence heterozygotů (1:10) je známa u Amišů v Pensylvánii (www.novorozeneckyscreening.cz). Novorozenci trpí obvykle makrocefalií, další symptomy jako metabolická acidóza nastupují později. Léčba spočívá v podávání karnitinu, riboflavinu, antipyretik, tekutin, insulinu a glukosy a také v dietě chudé na lysin (Lo, 2017; Hoffmann a Kölker, 2016). Pokud jsou pacienti léčeni správně, více než 80 % z nich se vyvíjí normálně (Tsai *et al.*, 1989)

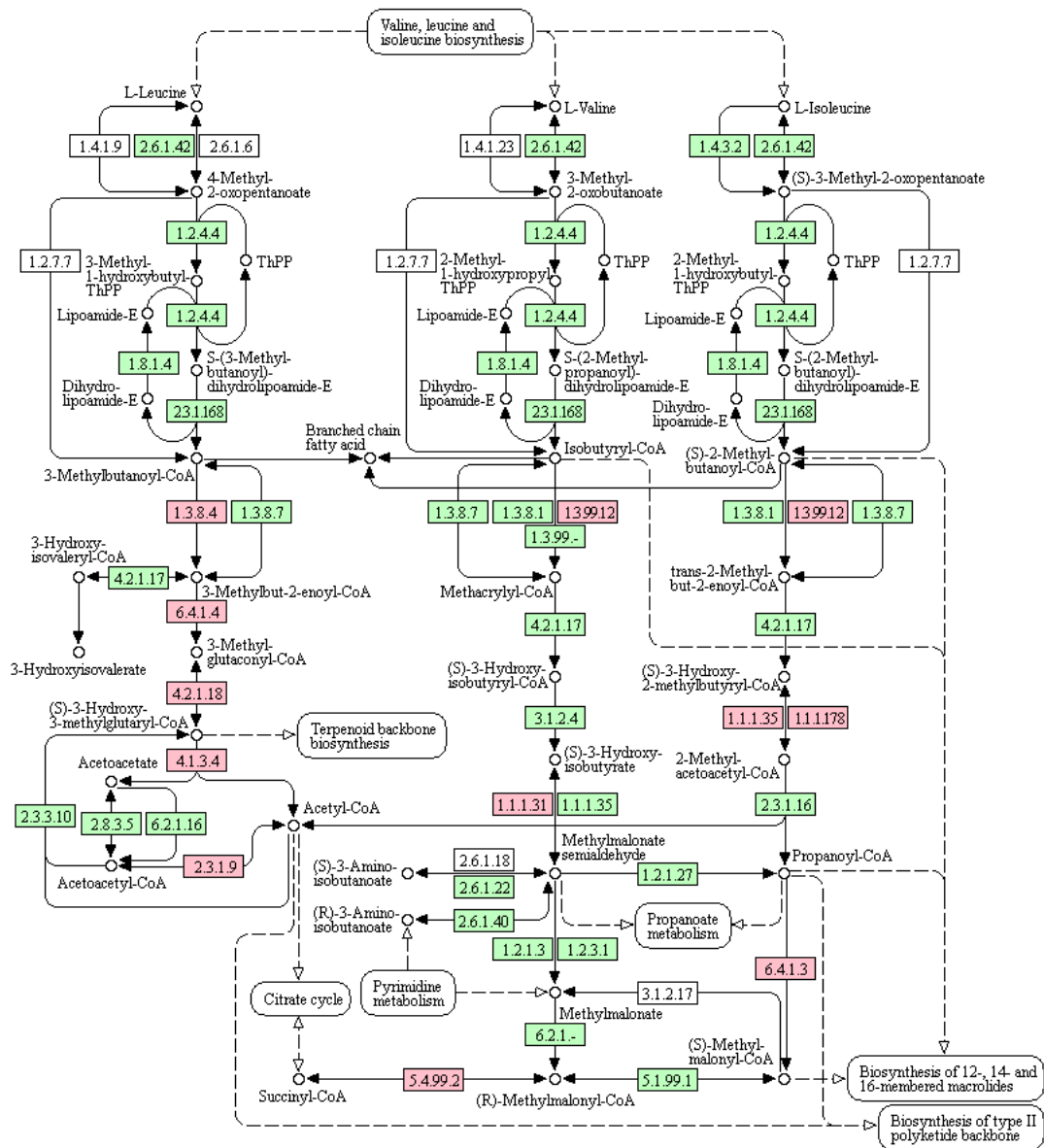
Tabulka 2 Seznam klasických organických acidurií. Ke každému onemocnění náleží zkratka pod názvem onemocnění, název defektního enzymu/proteinu, EC číslo enzymu, mutovaný gen a nejdůležitější biomarkery pro dané onemocnění.

Isovalerová acidémie IVA	Isovaleryl-CoA-dehydrogenasa, mitochondriální 1.3.8.4 <i>IVD</i> 3-hydroxyisovalerová kyselina; Isovalerylglycin; Isovalerylglytamát; Methylmalonová kyselina; Isovaleryl-L-karnitin
Deficience 3- methylkrotonyl-CoA- karboxylasy 3-MCCD	3-methylkrotonyl-CoA-karboxylasa, podjednotka alfa 6.4.1.4 <i>MCCCI</i> 3-hydroxy-isovalerová kyselina; 3-methylkrotonylglycin
Mnohonásobná karboxylasová deficience MCD	Biotin-protein ligasa 6.3.4.10 <i>HLCS</i> 3-hydroxyisovalerová kyselina; Laktát; Methylcitrát; Tiglylglycin; 3-hydroxypropionová kyselina; 3- hydroxyvalerová kyselina; 3-methylglutarová kyselina; 3- methylkrotonylglycin; Gltarová kyselina; Suberová kyselina; Sebaková kyselina;
3-hydroxy-3-methylglutarová acidurie HMGCLD	Hydroxymethylglutaryl-CoA-lyasa, mitochondriální 4.1.3.4 <i>HMGCL</i> 3-hydroxy-3-methylglutarová kyselina; 3-methylglutakonová kyselina; 3-methylglutaryl-L-karnitin; 3-methylglutarová kyselina; 3-hydroxy-isovalerová kyselina; 3- methylkrotonylglycin; Adipová kyselina;
3-methylglutakonová acidurie MGA1	3-methylglutakonyl-CoA-hydratasa 4.2.1.18 <i>AUH</i> 3-methylglutakonová kyselina; 3-methylglutarová kyselina; Laktát, Sukcinát; Pyruvát
3-ketothiolasová deficience KTLD	Acetyl-CoA-acetyltransferasa, mitochondriální 2.3.1.9 <i>ACATI</i> 2-methyl-3-hydroxybutyrát; 2-methyl-acetoacetát; 3- methylkrotonyl-L-karnitin; Tiglyl-L-karnitin; 3- hydroisovalerová kyselina; 3-hydroxypropionová kyselina; 3-methylkrotonylglycin; 3-hydroxybutyrát; Tiglylglycin
2-methylbutyryl-CoA- dehydrogenasová deficience SBCADD	Dehydrogenasa acyl-CoA s krátkým/rozvětveným řetězcem 1.3.99.12 <i>SBCAD</i> 2-methylbutyrylglycin; 2-ethylhydrakrylát; Isobutyrylglycin; 2-methylbutyryl-L-karnitin

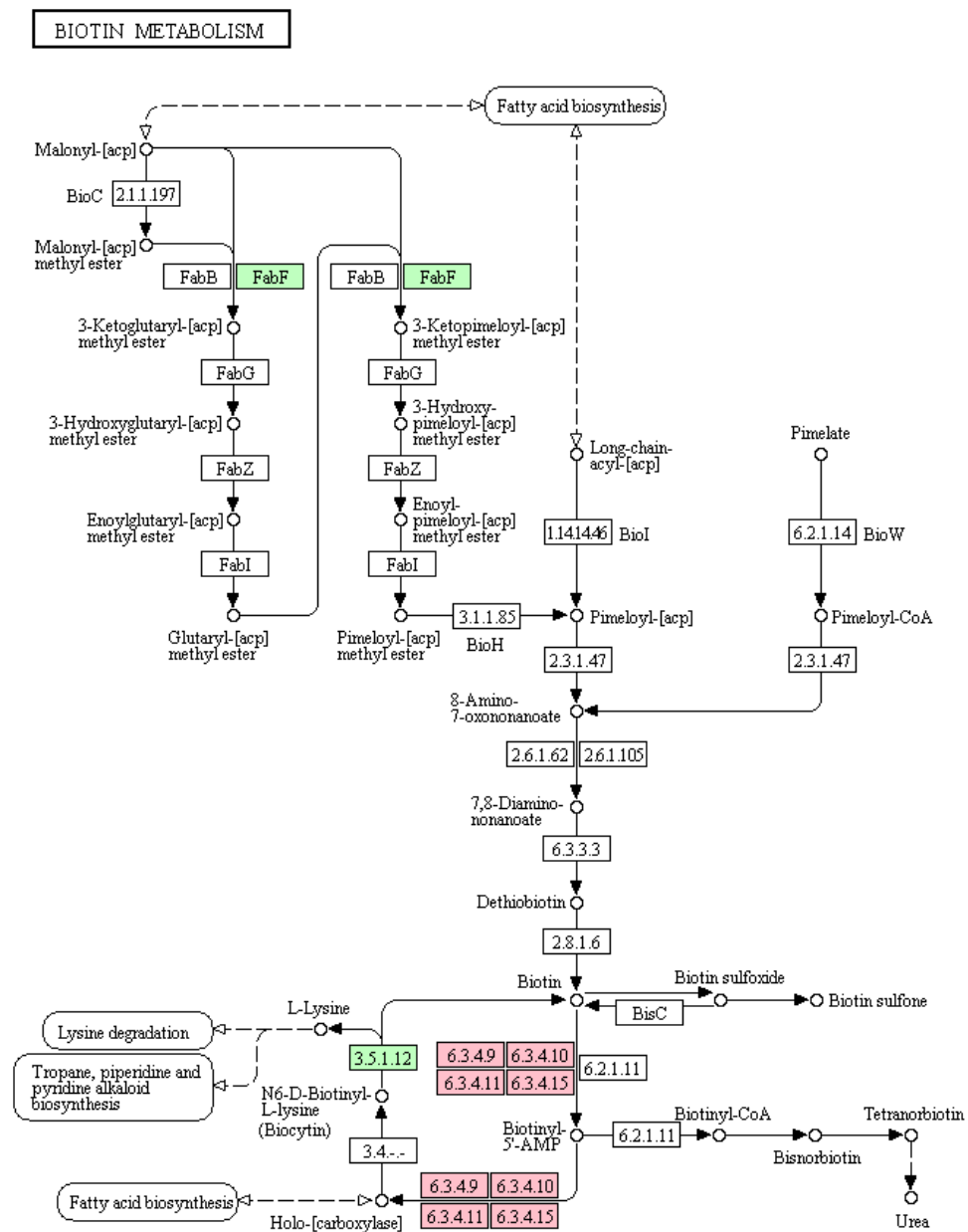
Tabulka 2 Seznam klasických organických acidurií. Ke každému onemocnění náleží zkratka pod názvem onemocnění, název defektního enzymu/proteinu, EC číslo, mutovaný gen a nejdůležitější biomarkery pro dané onemocnění *pokračování*.

2-methyl-3-hydroxybutyryl-CoA-dehydrogenasová deficiencie	3-hydroxyacyl-CoA-dehydrogenasa typu 2 1.1.1.178 <i>HSD17B10</i>
HSD10	2-methyl-3-hydroxybutyrát; 2-ethylhydracrylát; Laktát; Tiglylglycin
Propionová acidémie	Propionyl-CoA-karboxylasa, α a β řetězec 6.4.1.3 <i>PCCA, PCCB</i>
PA	3-hydroxypropionová kyselina; Methylcitrát; Propionylglycin; 3-hydroxyvalerová kyselina; Tiglylglycin; Propionyl-L-karnitin
Methylmalonová acidurie	Methylmalonyl-CoA-mutasa 5.4.99.2 <i>MMUT</i>
MMA	Methylmalonová kyselina; 3-hydroxyvalerová kyselina; 3- hydroxypropionová kyselina; Methylcitrát; Propionyl-L-karnitin
Glutarová acidurie typu I	Glutaryl-CoA-dehydrogenasa, mitochondriální 1.3.8.6 <i>GCDH</i>
GA 1	Glutarová kyselina; 3-hydroxyglutarová kyselina; Glutaryl-L-karnitin; Glutakonová kyselina
2-hydroxyglutarová acidurie typu I	D-2-hydroxyglutarátdehydrogenasa, mitochondriální 1.1.99.39 <i>D2HGDH</i>
MMA	2-hydroxyglutarová kyselina; 2-oxoglutarová kyselina; Sukcinát; GABA; 4-aminobutyrát
Kombinovaná MA a MMA	Malonyl-L-karnitin
Canavanova choroba	Aspartoacylasa 3.5.1.15 <i>ASPA</i>
ASPA	N-acetylaspartát
Deficiencie isobutyryl-CoA-dehydrogenasy	Isobutyryl-CoA-dehydrogenasa 1.3.8.- <i>ACAD8</i>
IBDD	Isobutyrylglycin; Isobutyryl-L-karnitin
Deficiencie aminoacylasy I	Aminoacylasa 1 3.5.1.14 <i>ACY1</i>
ACYD1D	N-acetylAKs; Acetylglycin
3-hydroxyisobutyrová acidurie	3-hydroxybutarátdehydrogenasa 1.1.1.31 <i>HIBADH</i>
HIBA	3-hydroxyisobutyrát

VALINE, LEUCINE AND ISOLEUCINE DEGRADATION

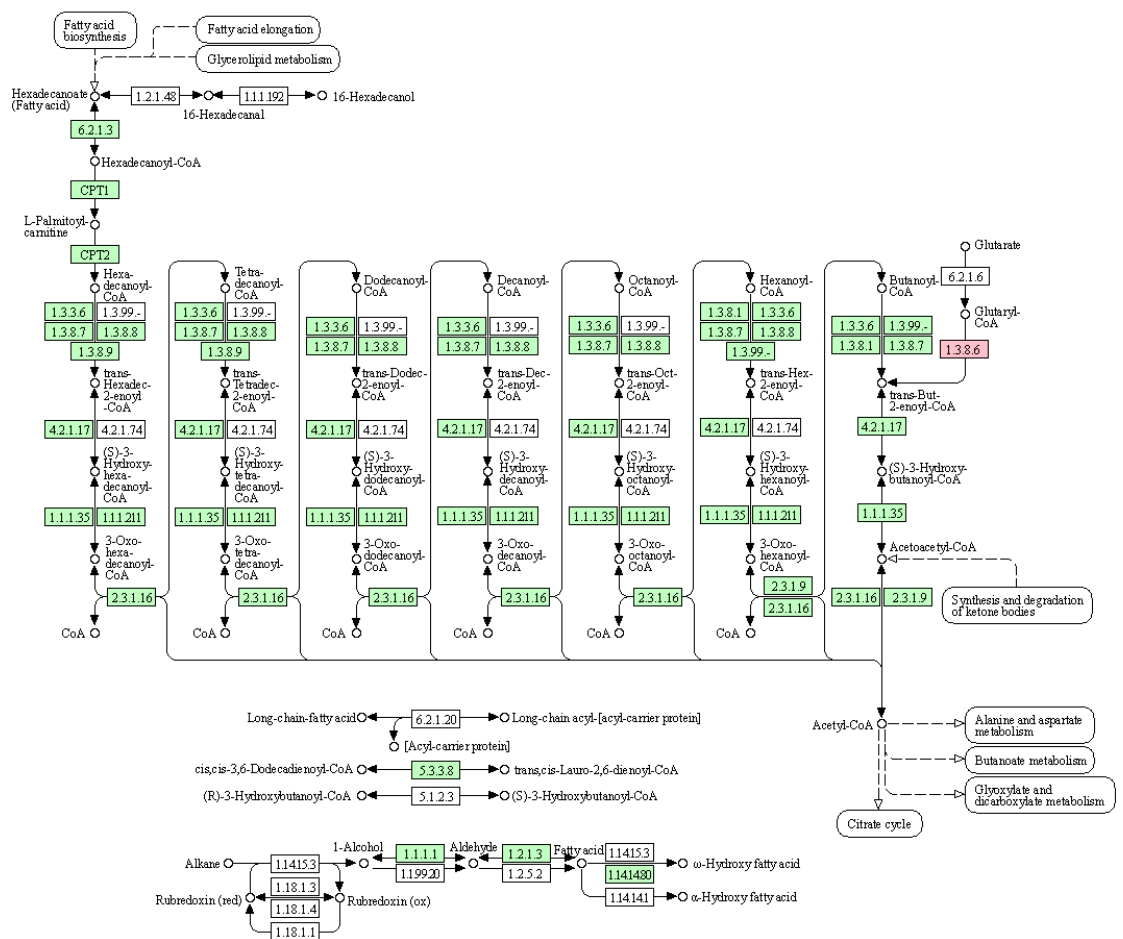


Obrázek 10 Metabolická mapa metabolismu aminokyselín s rozvětveným řetězcem patřících do skupiny klasických organických organických acidurií. Červeně označené jsou defektní enzymy způsobující organické acidémie.

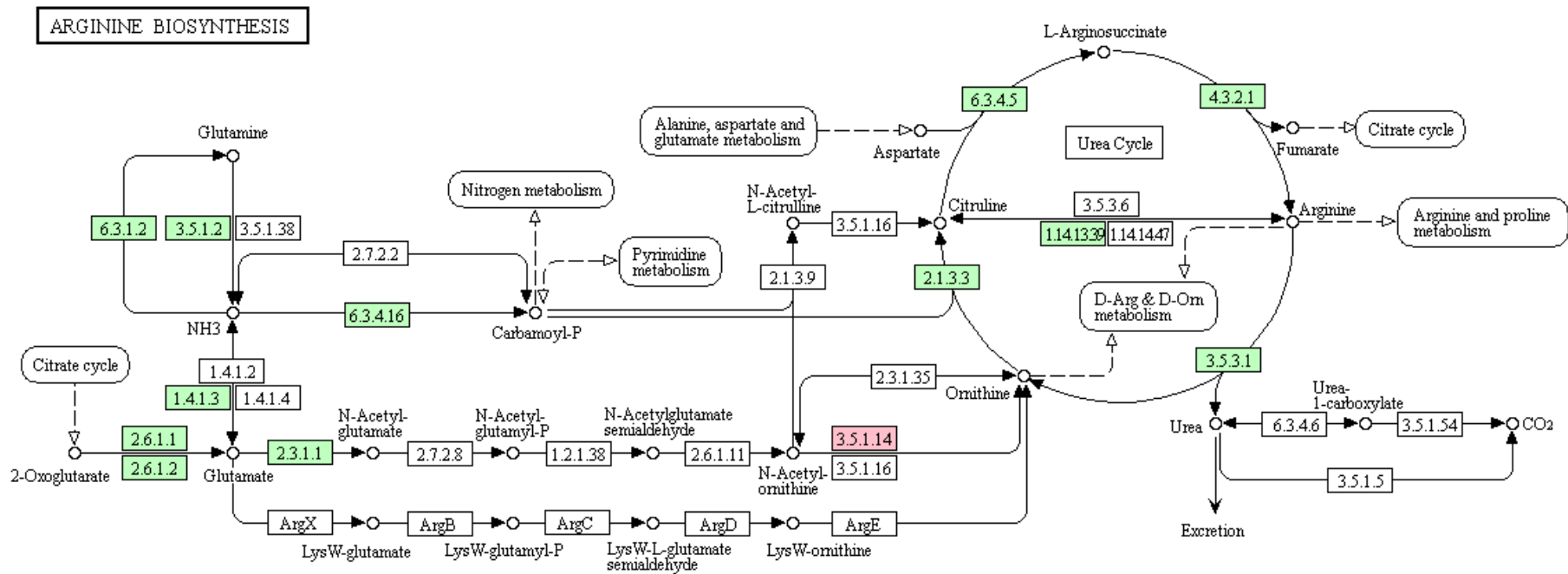


Obrázek 11 Metabolická mapa metabolismu biotinu. Červeně označené jsou defektní enzymy způsobující organické acidémie.

FATTY ACID DEGRADATION



Obrázek 12 Metabolická mapa β -oxidace mastných kyselin. Červeně označené jsou defektní enzymy způsobující organické acidémie.



Obrázek 13 Metabolická mapa biosyntézy argininu. Červeně označené jsou defektní enzymy způsobující organické acidémie.

2.1.4 Organické acidémie způsobené defekty v metabolismu mastných kyselin

Největší část těchto onemocnění tvoří poruchy β -oxidace mastných kyselin (BOX MK), což může narušit zdroj energie mnoha tkání, nejvíce kosterní a srdeční sval, a schopnost těla produkovat energii za nedostatku glukosy. Tato dráha je také spojena s produkcí ketolátů, jako jsou acetoacetát a 3-hydroxybutyrát, které jsou zdrojem energie pro tkáně, které nejsou schopny přímo oxidovat mastné kyseliny, jako například mozek (Jones a Bennett, 2017).

Translokasová deficiencie (CACTD) je způsobena defektem v translokasovém proteinu ve vnitřní mitochondriální membráně, který transportuje acylkarnitiny s dlouhým řetězcem do matrix a volný karnitin do cytosolu. Tím je znemožněna oxidace MK s dlouhým řetězcem (Jones a Bennett, 2017). Léčba spočívá v zábraně toku skrz karnitinový transport a BOX MK, zejména v období hladovění, horečky a ztráty živin gastrointestinálním traktem. Pacienti přijímají živiny ve formě sacharidů pro zabránění tělesnému stresu, prognóza bývá špatná a je také velmi obtížné kontrolovat vysoké koncentrace amoniaku u těchto pacientů (Jones a Bennett, 2017). Toto onemocnění je velmi vzácné, bylo potvrzeno méně než 30 případů (www.novorozeneckyscreening.cz).

Poruchy BOX MK (SCADD, MCADD, VLCADD, SCHADD, LCHADD, ECHS1D, MTPD) postihují různé kroky této dráhy a různě dlouhé acyl-CoA. Ačkoliv jsou tyto enzymy specifické na různě dlouhé řetězce, jejich enzymová specifita se může překrývat. Acyl-CoA se středně dlouhým a krátkým řetězcem (počet uhlíků 4-12) jsou oxidovány enzymy pro středně dlouhé a krátké řetězce, které se nachází v matrix. Acyl-CoA s dlouhým a velmi dlouhým řetězcem jsou oxidovány enzymy, které jsou navázány na vnitřní mitochondriální membránu. Poslední tři ze čtyř enzymů pro oxidaci acyl-CoA s dlouhým řetězcem jsou organizovány do oktamerního multienzymového komplexu, mitochondriálního trifunkčního proteinu (MTP) (Jones a Bennett, 2017). Poruchy BOX MK mají poměrně vysokou incidenci, zvláště v evropské populaci a u romského etnika (Morris a Spiekerkoetter, 2016; www.novorozeneckyscreening.cz). Většina pacientů s tímto onemocněním se musí vyhnout dlouhodobému hladovění, je třeba dodržovat dietu a je vyžadováno pečlivé vedení během akutní ataky, aby se předešlo metabolické dekompenzaci. Karnitin a riboflavin je indikován u specifických poruch, některé studie zkoumaly i léčbu benzaflavínem, který zvyšuje expresi enzymů BOX MK aktivací, přičemž u pacientů s deficiencí palmitoyltransferasy II došlo ke zvýšení enzymové

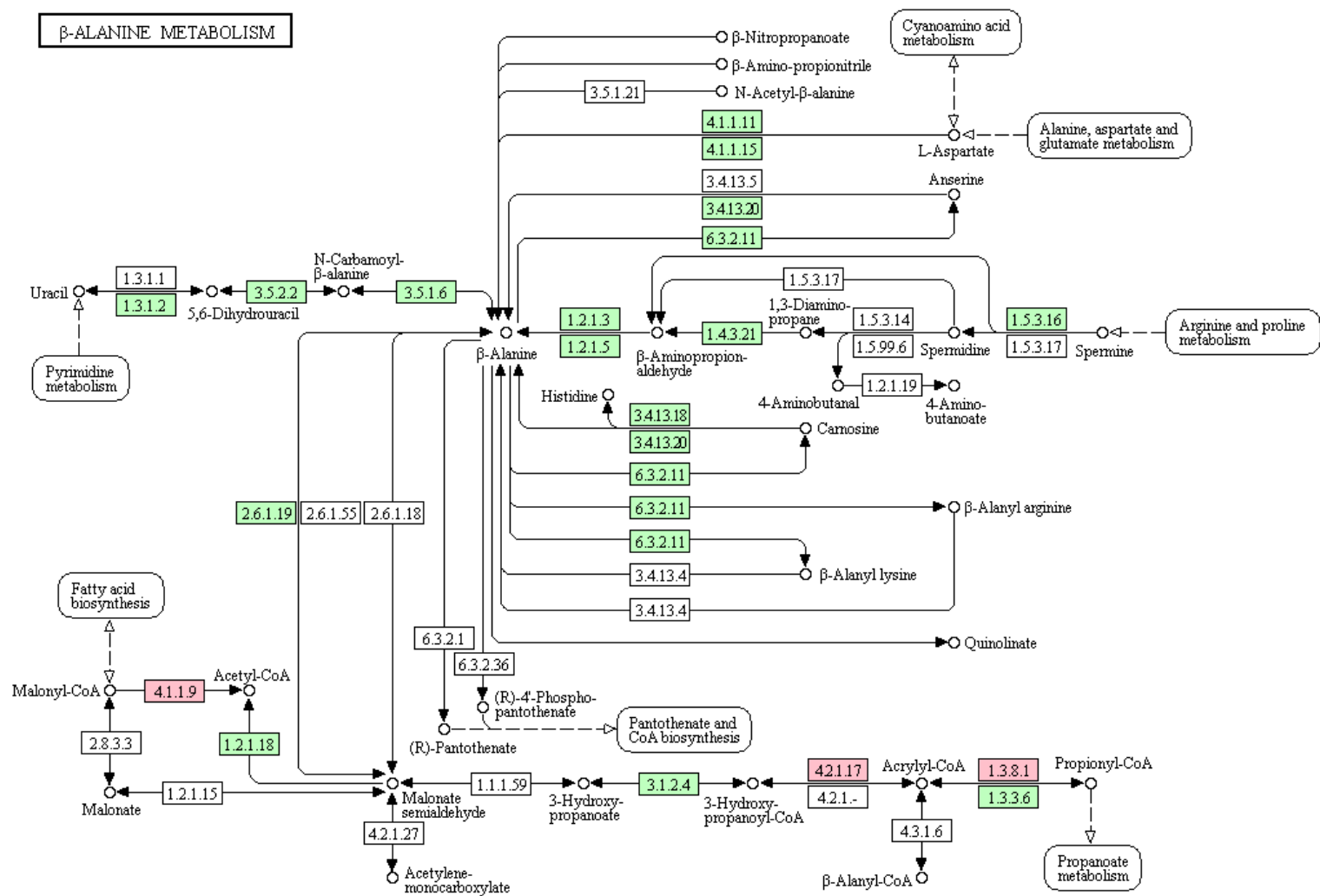
aktivity (Bonfont *et al.*, 2009), jiná studie ale zvýšení tolerance vůči zátěži nebo BOX MK nezjistila (Orngreen *et al.*, 2014).

Tabulka 3 Seznam onemocnění způsobených defekty v metabolismu mastných kyselin. Ke každému onemocnění náleží zkratka pod názvem onemocnění, název defektního enzymu/proteinu, EC číslo enzymu, mutovaný gen a nejdůležitější biomarkery pro dané onemocnění.

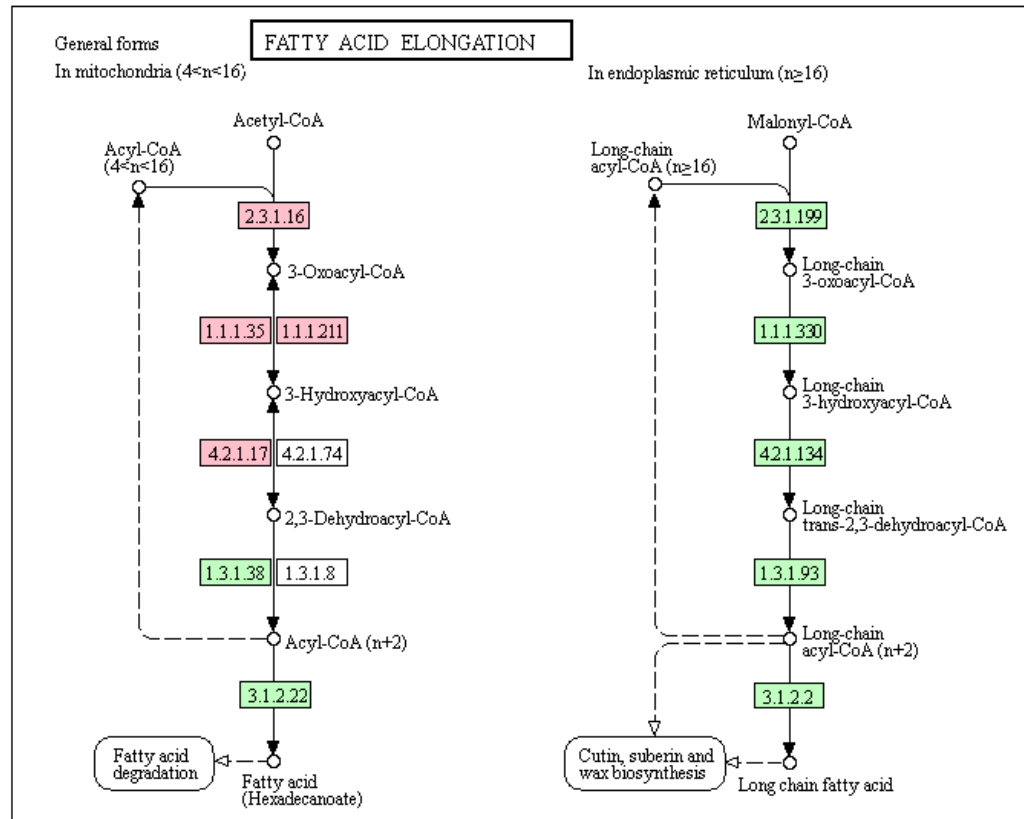
Glutarová acidurie typu II	Ubichinonoxidoreduktasa-flavoprotein přenášející elektron 1.5.5.1 <i>ETF A (IIA), ETF B (IIB), ETF DH (IIC)</i>
GA 2	Glutarová kyselina; Ethylmalonová kyselina; Adipová kyselina; Suberová kyselina; Sebaková kyselina; 2- hydroxyglutarová kyselina; Hexanoylglycin; Isovalerylglycin; Butyrylglycin; Suberylglycin; Isobutyrylglycin; 4-hydroxybutyrát; Glutaryl-L-karnitin; Glutaryl-glycin; 2-methylbutyrylglycin; Burytyl-L-karnitin; Isobutyryl-L-karnitin; Hexanoyl-L-karnitin; Oktanoyl-L-karnitin; Dekanoyl-L-karnitin; Dodekanoyl-L-karnitin; Tetradekanoyl-L-karnitin; Hexadekanoyl-L-karnitin
Deficience acyl-CoA-dehydrogenasy MK s krátkým řetězcem	Acyl-CoA-dehydrogenasa MK s krátkým řetězcem 1.3.8.1 <i>ACADS</i>
SCADD	Ethylmalonová kyselina; Butyrylglycin; Methylsukcinát; Adipová kyselina; Suberová kyselina; Sebaková kyselina; Laktát; Butyryl-L-karnitin
Deficience acyl-CoA dehydrogenasy MK se středně dlouhým řetězcem	Acyl-CoA-dehydrogenasa MK se středně dlouhým řetězcem 1.3.8.7 <i>ACADM</i>
MCADD	5-hydroxyhexanová kyselina; Suberová kyselina; Sebaková kyselina; Adipová kyselina; 7-hydroxyoktanová kyselina; Octanediová kyselina; Decanediová kyselina; Hexanoylglycin; Kaprolylglycin; trans-2-decenoyl-L-karnitin; (3-R)-3-hydroxyhexanoyl-L-karnitin; Malonyl-L-karnitin; Hexanoyl-L-karnitin; Oktanoyl-L-karnitin; Dekanoyl-L-karnitin
Deficience acyl-CoA dehydrogenasy MK s velmi dlouhým řetězcem	Acyl-CoA-dehydrogenasa MK s velmi dlouhým řetězcem 1.3.8.9 <i>ACADVL</i>
VLCADD	Suberová kyselina; Sebaková kyselina; Tetradekanoyl-L-karnitin; Hexadekanoyl-L-karnitin
Deficience 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenasy MK s dlouhým řetězcem	3-hydroxyacyl-CoA-dehydrogenasa MK s dlouhým řetězcem 1.1.1.211 <i>HADHA</i>
LCHADD	3-hydroxysuberová kyselina; 3-hydroxysebaková kyselina; Adipová kyselina

Tabulka 3 Seznam onemocnění způsobených defekty v metabolismu mastných kyselin. Ke každému onemocnění náleží zkratka, název defektního enzymu/proteinu, EC číslo, mutovaný gen a nejdůležitější biomarkery pro dané onemocnění *pokračování*.

Deficience mitochondriálního trifunkčního proteinu	Podjednotka β trifunkčního mitochondriálního proteinu 2.3.1.16 <i>HADHB</i>
MTPD	Suberová kyselina, Sebaková kyselina; 2-hydroxyadipová kyselina; 3-hydroxyadipová kyselina; 3-hydroxyoktenediová kyselina; 3-hydroxysuberová kyselina; 3-hydroxydekanediová kyselina; 3-hydroxysebaková kyselina; 3-hydroxydodecenediová kyselina; 3-hydroxydodekanediová kyselina; 3-hydroxytetradecenediová kyselina; 3-hydroxytetradekanediová kyselina;
Deficience 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenasy MK s krátkým řetězcem	3-hydroxyacyl-CoA-dehydrogenasa MK s krátkým řetězcem 1.1.1.35 <i>HSD17B10</i>
SCHADD	3,4-dihydroxybutyrát; 3-hydroxyglutarová kyselina; Hydroxybutyryl-L-karnitin; Hydroxyhexanoyl-L-karnitin
Translokasová deficience	Karnitin-acylkarnitintranslokasa <i>SLC25A20</i>
CACTD	Adipová kyselina; Suberová kyselina; Sebaková kyselina; Dodekanediová kyselina; Tetradekanediová kyselina; Suberoyl-L-karnitin; Arachidonyl-L-karnitin; 3-hydroxyhexanoyl-L-karnitin; Palmitoyl-L-karnitin; Stearoyl-L-karnitin
Deficience malonyl-CoA-dekarboxylasy; Malonová acidurie	Malonyl-CoA-dekarboxylasa 4.1.1.9 <i>MLYCD</i>
MCDD; MA	Malonyl-L-karnitin; Malonová kyselina; Methylmalonová kyselina; Sikcinát
Deficience monokarboxylátového transporteru I	Monokarboxylátový transporter 1 <i>SLC16A1</i>
MCT1D	3-hydroxybutyrát; Acetoacetát; Tiglylglycin; Methylacetoacetát
Deficience sukcinyl-CoA: 3-ketokyselina-CoA-transferasy	Sukcinyl-CoA: 3-ketokyselina-CoA-transferasa 2.8.3.5 <i>OXCT1</i>
SCOT	3-hydroxybutyrát; Acetoacetát
Deficience mitochondriální HMG-CoA-synthasy	3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA-synthasa 2.3.3.10 <i>HMGCS1</i>
HMGCS2D	Acetoacetát; nepřítomnost 3-hydroxybutyrátu; 3-methylkrotonylglycin
Deficience enoyl-CoA-hydratasy MK s krátkým řetězcem	Enoyl-CoA-hydratasa 4.2.1.17 <i>ECHS1</i>
ECHS1D	2-methyl-2,3-dihydroxybutyrát; Glyoxylát

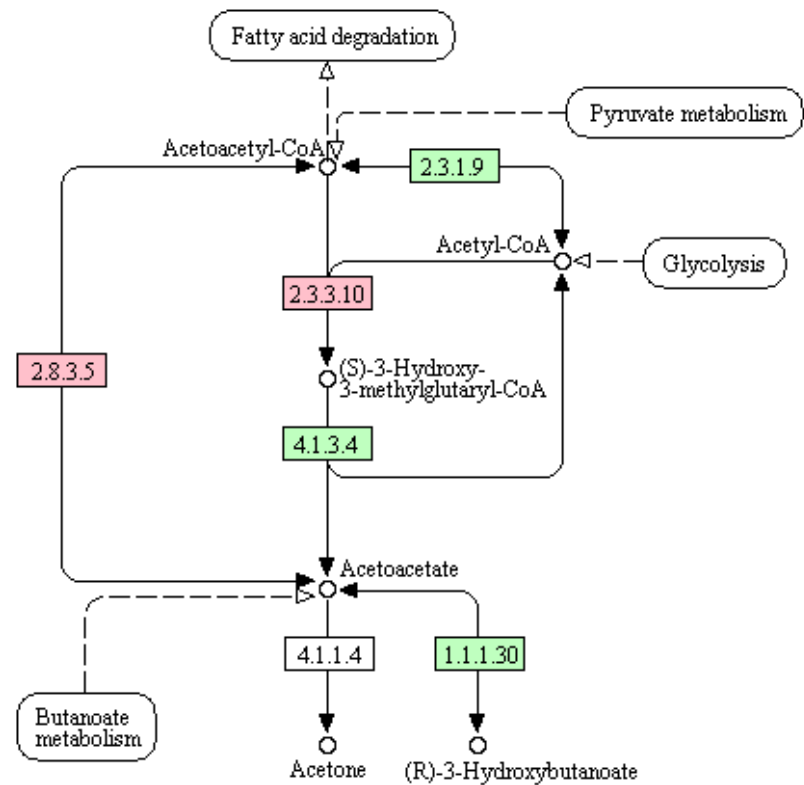


Obrázek 14 Metabolická mapa metabolismu β-alaninu. Červeně označené jsou defektní enzymy způsobující organické acidémie.



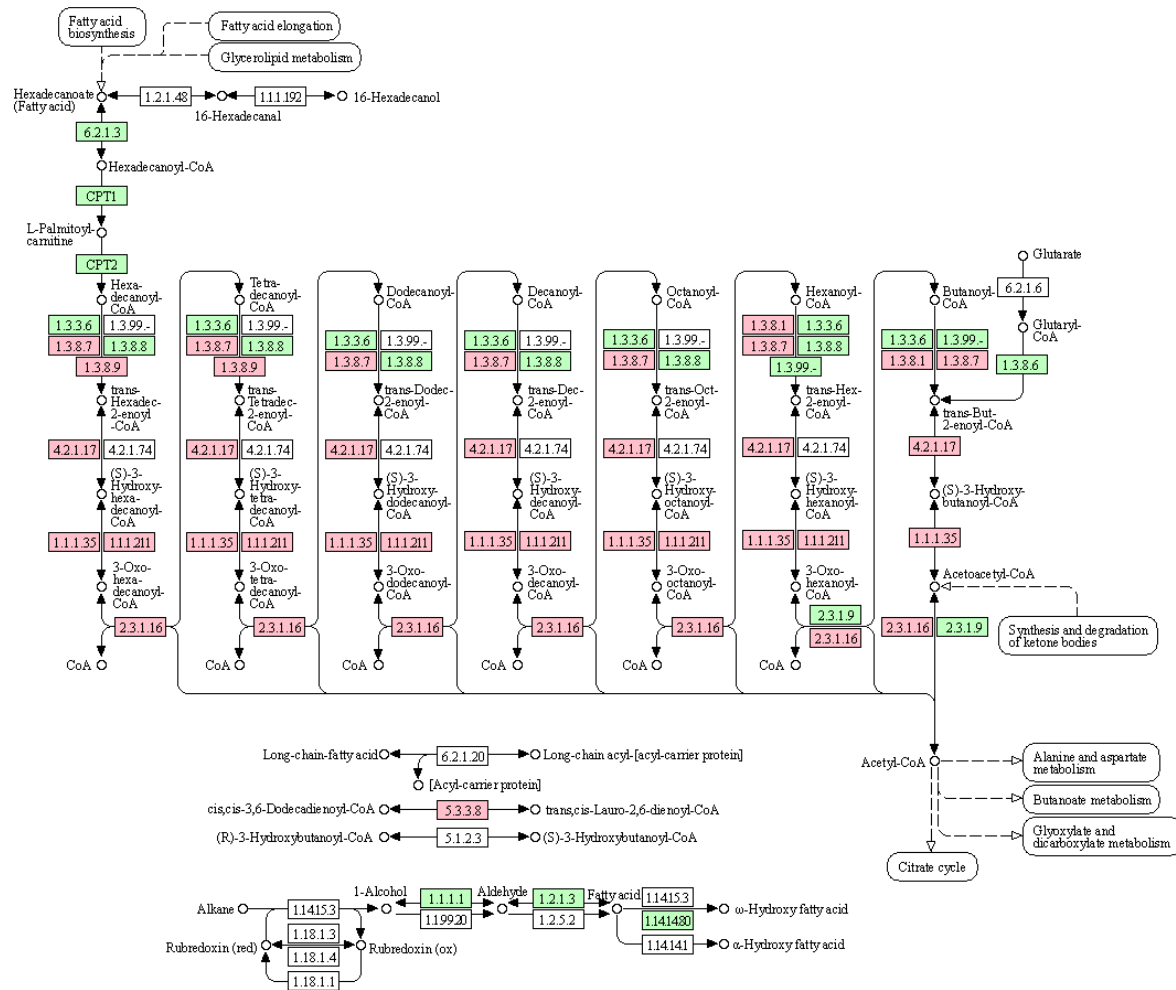
Obrázek 15 Metabolická mapa elongace mastných kyselin. Červeně označené jsou defektní enzymy způsobující organické acidémie.

SYNTHESIS AND DEGRADATION
OF KETONE BODIES



Obrázek 16 Metabolická mapa metabolismu ketolátok. Červeně označené jsou defektné enzýmy spôsobujúce organickú acidóziu.

FATTY ACID DEGRADATION



Obrázek 17 Metabolická mapa β-oxidace mastných kyselin. Červeně označené jsou defektní enzymy způsobující organické acidémie.

2.1.5 Organické acidémie způsobené mitochondriálními defekty

Mitochondrie, jejichž hlavním úkolem je produkce energie, jsou zapojeny v klíčových metabolických drahách, β -oxidaci MK, metabolismu aminokyselin a oxidativní fosforylace. Mitochondriální poruchy často výsledkem defektů v dýchacím řetězci a dalších drahách vyžadující mitochondriální funkci, jako je replikace, transkripce, translace, fúze nebo sestavení ribosomu (Couser a Gucsavas-Calikoglu, 2017). Nejvíce postiženými orgány jsou ty s velkými energetickými nároky, jako jsou játra, mozek, srdce, CNS apod. Průběh těchto onemocnění bývá progresivní, dokonce fatální (Couser a Gucsavas-Calikoglu, 2017).

Pearsonův syndrom je velmi vážné onemocnění, které způsobuje heteroplazmatickou delecí mitochondriální DNA v rozmezí 1000 až 10000 bp na délku, což způsobí ztrátu sekvence kódující proteiny oxidativní fosforylace. Toto onemocnění se objevuje už v dětském věku, pacienti trpí anémií, nedostatečností pankreatu a jsou závislí na transfuzi. Jedinci s tímto onemocněním často umírají v brzkém věku na selhání ledvin či jater (Couser a Gucsavas-Calikoglu, 2017).

Acyl-CoA-dehydrogenasa 9 je faktor komplexu I dýchacího řetězce. Pacienti s tímto onemocněním se potýkají s myopatiemi a laktátovou acidémií, někteří mohou mít neurologické problémy (Morris a Spiekerkoetter, 2016). Mnoho pacientů s ACAD9 vykazuje odpověď na perorální dodávání riboflavinu (Gerards *et al.*, 2011).

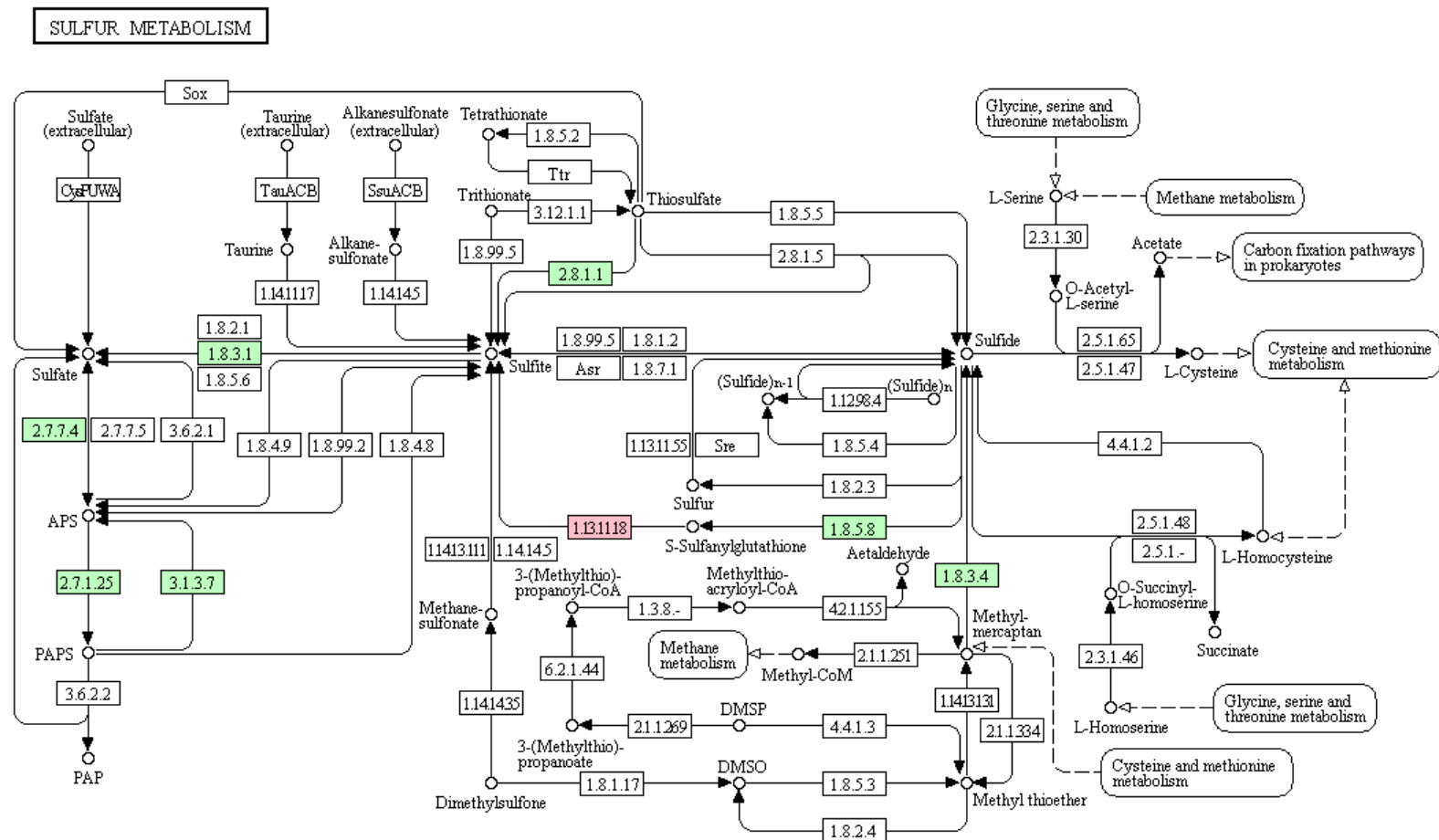
Mevalonová acidurie je zánětlivé autoimunitní onemocnění charakterizované opakovanými horečkami a zánětlivými stavy ve spojení s chronickým prozánětlivým stavem monocytů (Drenth *et al.*, 1995; van der Hilst *et al.*, 2008). Momentálně neexistuje žádná efektivní léčba, mnoho pacientů umírá na selhání dýchání (Prietsch *et al.*, 2003; Bader-Meunier *et al.*, 2011). Nejvíce slibná léčba spočívá v podávání antagonistů receptoru IL-1, jako je Anakinra, který blokuje biologickou aktivitu prozánětlivého cytokinu IL-1 β (Bodar *et al.*, 2005; van der Hilst *et al.*, 2008; ter Haar *et al.*, 2013).

Ethylmalonová encefalopatie (EPEMA) je progresivní multisystémové onemocnění s časnými záchvaty a neurologickými komplikacemi postihující persulfiddioxygenasu, která je důležitá pro detoxifikaci sulfidu (Tiranti *et al.*, 2009; Kožich *et al.*, 2016). Hromadící se H₂S inhibuje cytochrom c oxidasu (EC 1.9.3.1) a oxidaci MK s krátkým řetězcem, poškozují kapiláry a způsobuje krvácení do kůže (Kožich *et al.*, 2016). H₂S je produkován také střevními bakteriemi, což způsobuje těžké přetrvávající průjemy (Kožich *et al.*, 2016). Léčba spočívá v podávání metronidazolu, který redukuje bakteriální

produkci H₂S a N-acetylcysteinu, což je prekurzor glutathionu, který dokáže vychytávat síru z H₂S. I přesto je prognóza špatná (Viscomi *et al.*, 2010). Velký potenciál má transplantace jater, která ukázala u 7měsíční dívky výrazné zlepšení (Dionisi-Vici *et al.*, 2016).

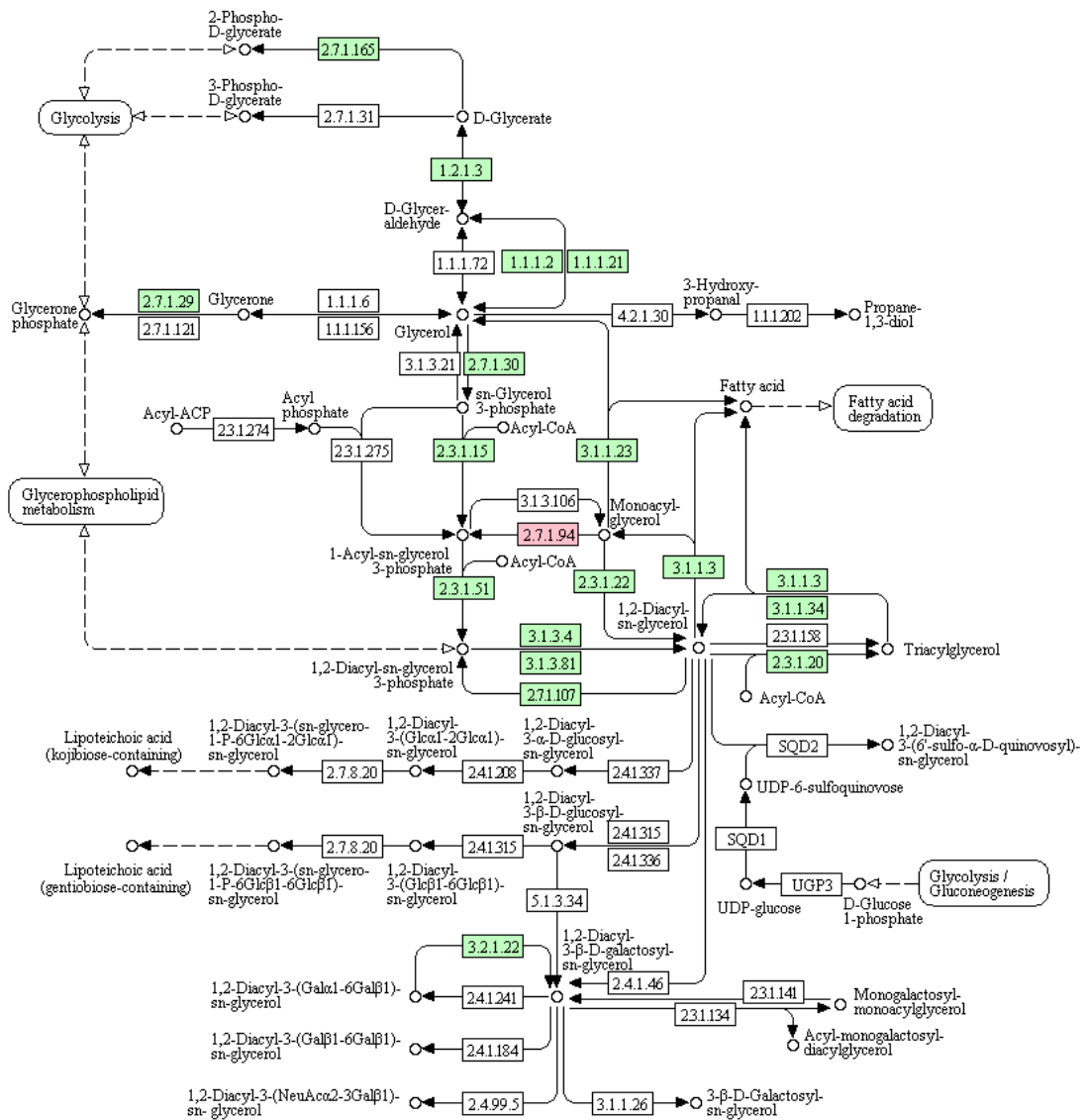
Tabulka 4 Seznam onemocnění způsobených defekty ve funkci mitochondrií. Ke každému onemocnění náleží zkratka pod názvem onemocnění, název defektního enzymu/proteinu, EC číslo enzymu nebo kód proteinu z UniProt databáze, mutovaný gen a nejdůležitější biomarkery pro dané onemocnění.

Deficience acyl-CoA-dehydrogenasy 9 ACADD9	Komplex I sestavující faktor ACAD9 Q9H845 <i>ACAD9</i> 2-hydroxybutarát;;
Ethylmalonová encefalopatie EPEMA	Persulfidodioxigenasa 1.13.11.18 <i>ETHE1</i> 2-methylbutyrylglycin; Ethylmalonová kyselina; Laktát; Butyry- /Isobutyrylglycin; Isovalerylglycin; Methylsukcinát; Butyryl-L-karnitin
Pearsonův syndrom PS	3-hydroxy-3-methylglutarová kyselina; 3-methylglutakonová kyselina
Sengersův syndrom SS	Acylglycerolkinasa 2.7.1.94 <i>AGK</i> 3-methylglutakonová kyselina
Mevalonová acidurie MKD	Mevalonátkinasa 2.7.1.36 <i>MVK</i> Mevalonová kyselina; Mevalonolakton



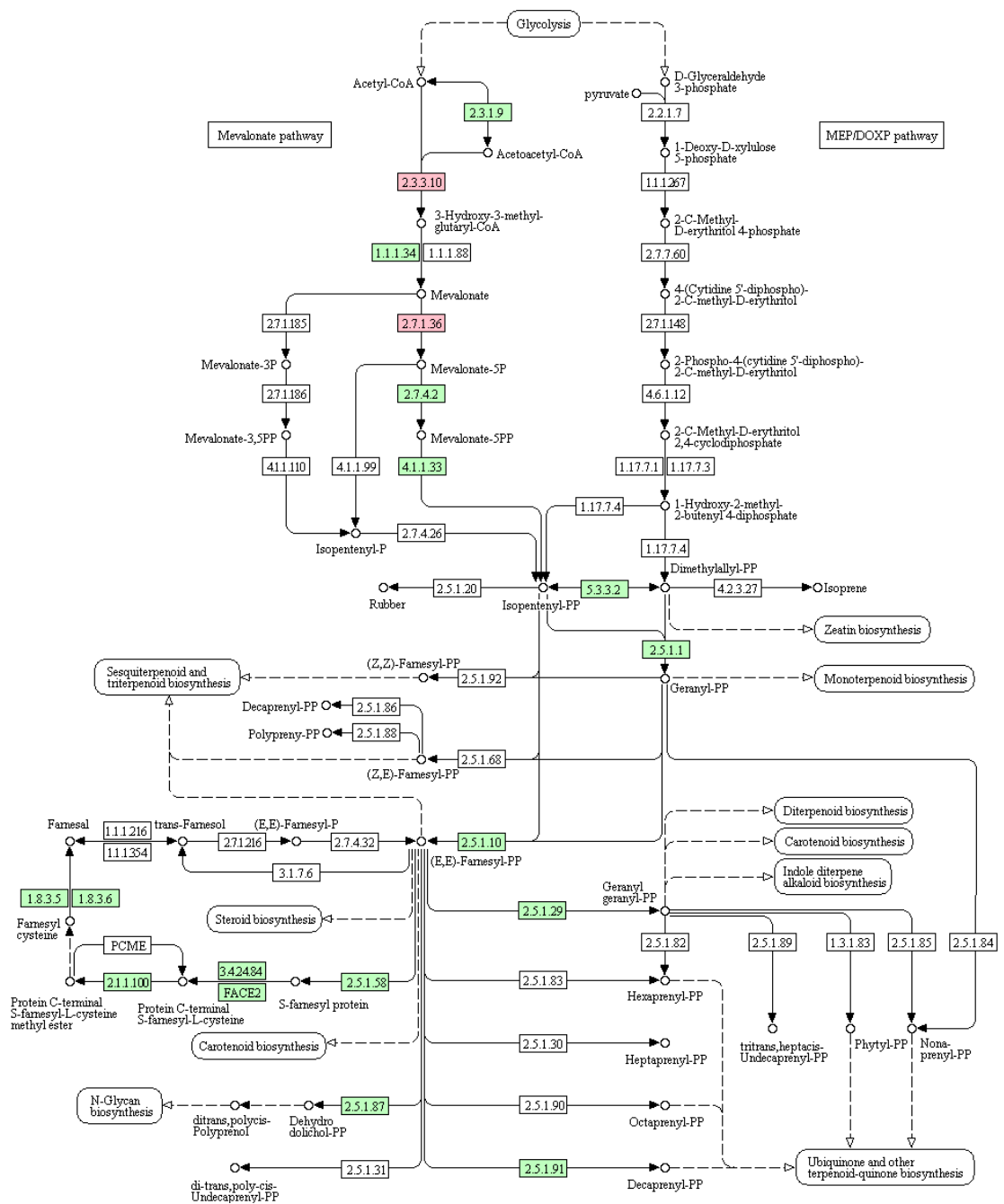
Obrázek 18 Metabolická mapa metabolismu síry. Červeně označené jsou defektní enzymy způsobující organické acidémie.

GLYCEROLIPID METABOLISM



Obrázek 19 Metabolická mapa metabolismu glycerollipidu kyselin. Červeně označené jsou defektní enzymy způsobující organické acidémie.

TERPENOID BACKBONE BIOSYNTHESIS



Obrázek 20 Metabolická mapa biosyntézy základní páteře terpenoidů. Červeně označené jsou defektní enzymy způsobující organické acidémie.

2.1.6 Organické acidémie způsobené defekty v močovinovém cyklu

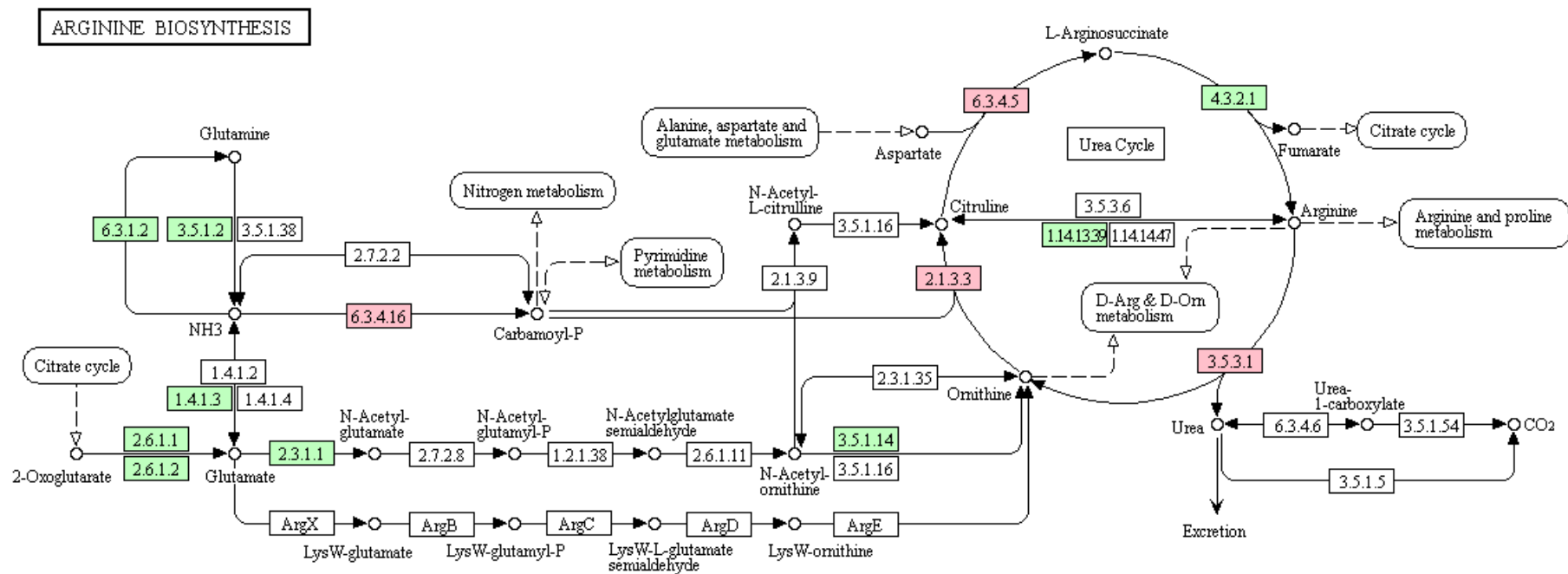
Jde o závažná onemocnění, jelikož se jedná o hlavní dráhu odbourávání dusíku a způsobují hyperammonemii. NH_3 se rychle dostává do mozku, kde je rychle převeden na nepropustný NH_4^+ . Zvýšená koncentrace amoniaku v mozku způsobuje nadměrnou syntézu gliového glutaminu a jeho akumulaci, což způsobuje otok astrocytů (Albrecht a Norenberg, 2006). Amoniak má také neurotoxickou roli při interferenci s K^+ pufrováním astrocytů vedoucí ke zvýšené koncentraci extracelulárního K^+ (Rangroo *et al.*, 2013). Do dráhy je zapojeno 5 enzymů a navíc, dva mitochondriální membránové transportéry, ornithinový a aspartátový-glutamátový člunek jsou také potřebné pro správné fungování této dráhy (Smith a Garg, 2017). Světová incidence těchto onemocnění je přibližně 1:35000 (Summar *et al.*, 2013). Léčba těchto onemocnění cílí na minimalizaci produkce amoniaku omezením přijímání proteinů, prevenci katabolismu a odstraňování dusíku alternativní dráhou pomocí benzoátu anebo fenylacetátu nebo fenylbutyrátu a pomocí dialyzačních zařízení. Řešením bývá také transplantace jater (Smith a Garg, 2017).

Deficience ornithintranskarbamoylasy je nejčastěji se vyskytující (1:15000) onemocnění močovinového cyklu. Jako jediný enzym této dráhy je exprimován genem lokalizovaným na chromosomu X. Muži bývají více postihnuti tímto onemocněním, zatímco ženy mohou zcela asymptomatické až typicky symptomatické v závislosti na náhodné X-inaktivaci (Smith a Garg, 2017).

Citrullinémie typu I je způsobena deficiencí argininosukcinátsynthetasy, která je mimo jiné zapojena v produkci oxidu dusnatého v cyklu argininu a citrulinu (Smith a Garg, 2017). Nepřiměřená syntéza NO a dalších toxických látek mohou být zapojeny v patogenezi citrullinémie a může to vysvětlovat mnoho důležitých neurokognitivních změn, která se nenachází u jiných poruch močovinového cyklu (Erez, 2013). Nedávné studie na zvířatech a předběžná data u lidí naznačují, že léky, které dodávají NO mohou být příznivé u tohoto onemocnění (Nagamani *et al.*, 2012).

Tabulka 5 Seznam onemocnění způsobených defekty v močovinovém cyklu. Ke každému onemocnění náleží zkratka pod názvem onemocnění, název defektního enzymu/proteinu, EC číslo enzymu nebo kód proteinu z UniProt databáze, mutovaný gen a nejdůležitější biomarkery pro dané onemocnění.

HHH syndrom ACADD9	mitochondriální ornithinový transportér 1 Q9Y619 <i>SLC25A15</i> Orotová kyselina; Hippurová kyselina
Deficience ornithintranskarbamoylasy OTCD	Ornithintranskarbamoylasa 2.1.3.3 <i>OTC</i> Orotová kyselina; Hippurová kyselina; Pyroglutamová kyselina
Argininemie AN	Arginasa -1 3.5.3.1 <i>ARG1</i> Orotová kyselina; Hippurová kyselina; 4-hydroxyglutamát
Deficience karbamoylfosfátsynthetasy CPSD	Karbamoylfosfátsynthetasa 6.3.4.16 <i>CPS1</i> 3-methylglutakonová kyselina; Orotová kyselina; Hippurová kyselina; Pyroglutamová kyselina; Suberová kyselina
Citrullinemie typu I ASSD	Argininosukcinátsynthetasa 6.3.4.5 <i>ASS1</i> N-acetylcitrulin; Orotová kyselina; Hippurová kyselina
Citrullinemie typu II NICCD	Mitochondriální protein Aralar2 vážící vápník Q9UJS0 <i>SLC25A13</i> 4-Hydroxyfenyllaktát; Propionyl-L-karnitin; Palmitoyl-L-karnitin; Stearoyl-L-karnitin



Obrázek 21 Metabolická mapa močovinného cyklu. Červeně označené jsou defektní enzymy způsobující organické acidémie.

2.1.7 Organické acidémie způsobené defekty v metabolismu sacharidů

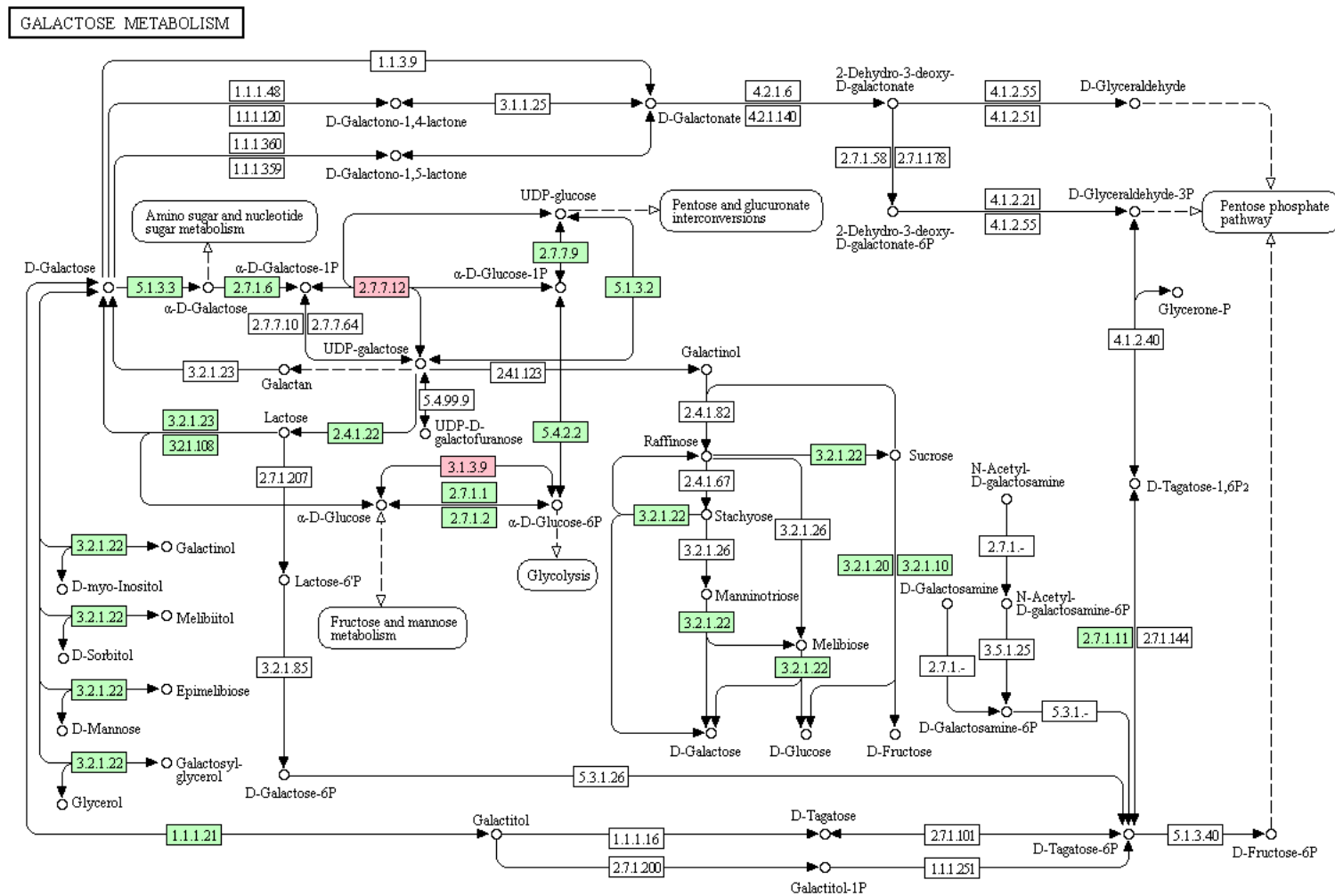
Sacharidy plní roli strukturní (nukleové kyseliny, glykoproteiny) a jsou také hlavním zdrojem energie. U pacientů s tímto typem onemocnění je často pozorována hypoglykémie, hepatomegalie a hypotonie (Ferguson, 2017).

Galaktosemie je způsobená mutací v genu pro galaktosa-1-fosfáturydyltransferasu, čímž je narušen metabolismus galaktosy. Novorozenci jsou asymptomaticí, problémy nastávají až po přijetí mateřského mléka, mezi něž patří zvracení, průjem, katarakt, hypoglykemie, renální tubulární dysfunkce, hepatomegalie apod. (Fridovich-Keil, 2006; Bosch, 2011). Léčba spočívá v omezení příjmu galaktosy, což je v pozdějším věku poměrně obtížné, vzhledem k tomu, že ji můžeme nalézt ve stopovém množství v zelenině, ovoci, luštěninách a pečivu (Bosch, 2011).

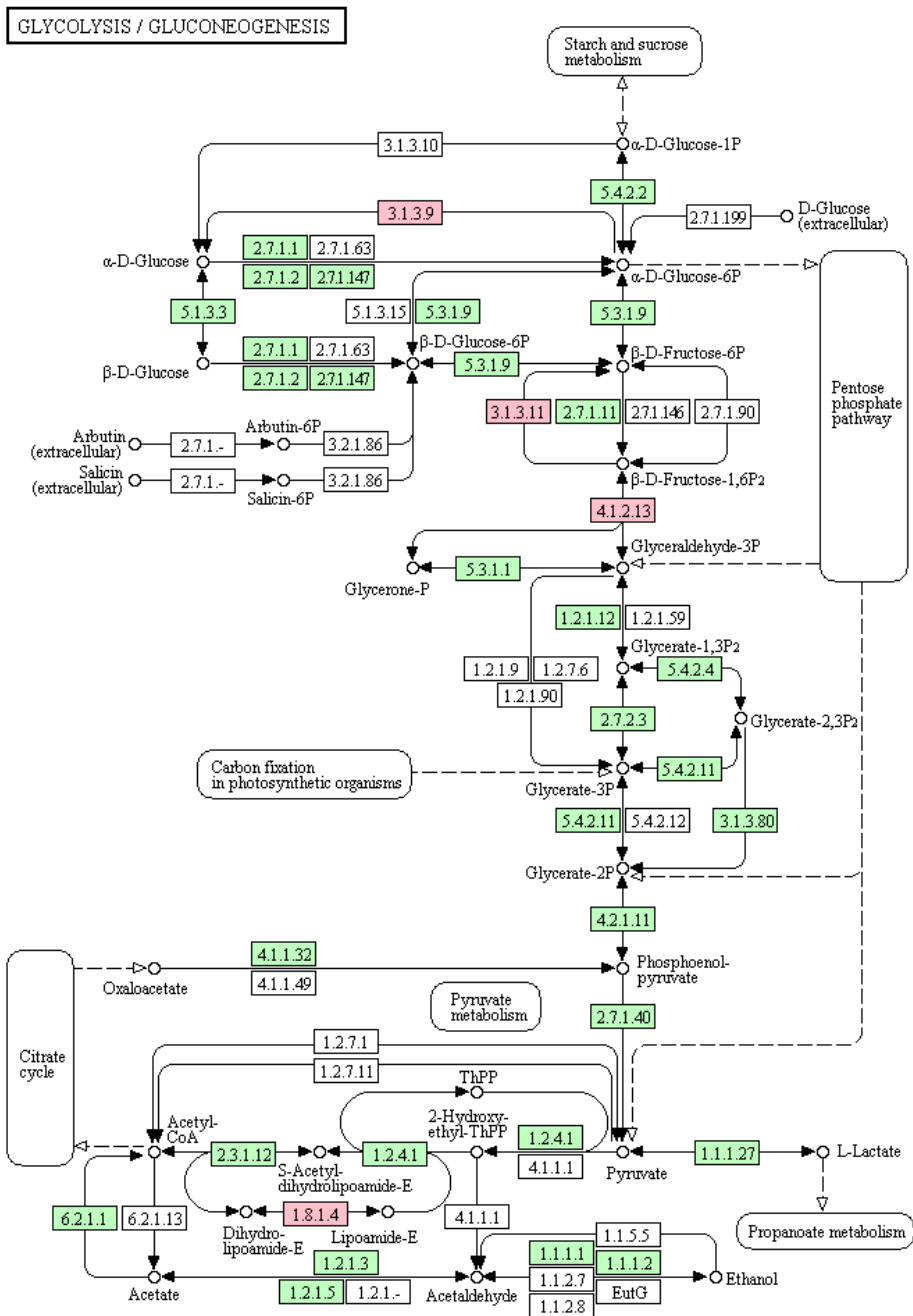
Poruchy metabolismu glykogenu (glykogenosy) primárně poškozují játra anebo svaly, ačkoliv s některými enzymatickými účinnostmi jsou spojeny vzácné neurologické fenotypy. Při glykogenose typu I nedochází k defosforylaci glukosa-6-fosfátu, ten je zadržován v játrech a tím dochází k hepatomegáliím (Walter *et al.*, 2016). U pacientů dochází také k hyperlaktatémii jako důsledek narušení glukoneogeneze a zvyšuje se při hladovění. Laktát může být využit jako alternativní zdroj energie pro mozek, a tak mohou být pacienti do určité míry chráněni od nepříznivých účinků hypoglykemie na CNS (Walter *et al.*, 2016). Vzhledem ke zvýšené koncentraci glukosa-6-fosfátu dochází ke zvýšené *de novo* lipogenezi a zvýšenému toku přes pentosafosfátovou dráhu za vzniku kyseliny močové z ribosa-5-fosfátu (Bandsma *et al.*, 2008). Tito pacienti se mohou dožít až dospělosti, kognitivní vývoj bývá normální za předpokladu, že nedošlo k epizodám těžké hypoglykemické encefalopatie. Zůstává však řada dlouhodobých komplikací, které výrazně ovlivňují jejich zdraví a kvalitu života (Walter *et al.*, 2016).

Tabulka 6 Seznam onemocnění způsobených defekty v metabolismu sacharidů. Ke každému onemocnění náleží zkratka pod názvem onemocnění, název defektního enzymu/proteinu, EC číslo enzymu nebo kód proteinu z UniProt databáze, mutovaný gen a nejdůležitější biomarkery pro dané onemocnění.

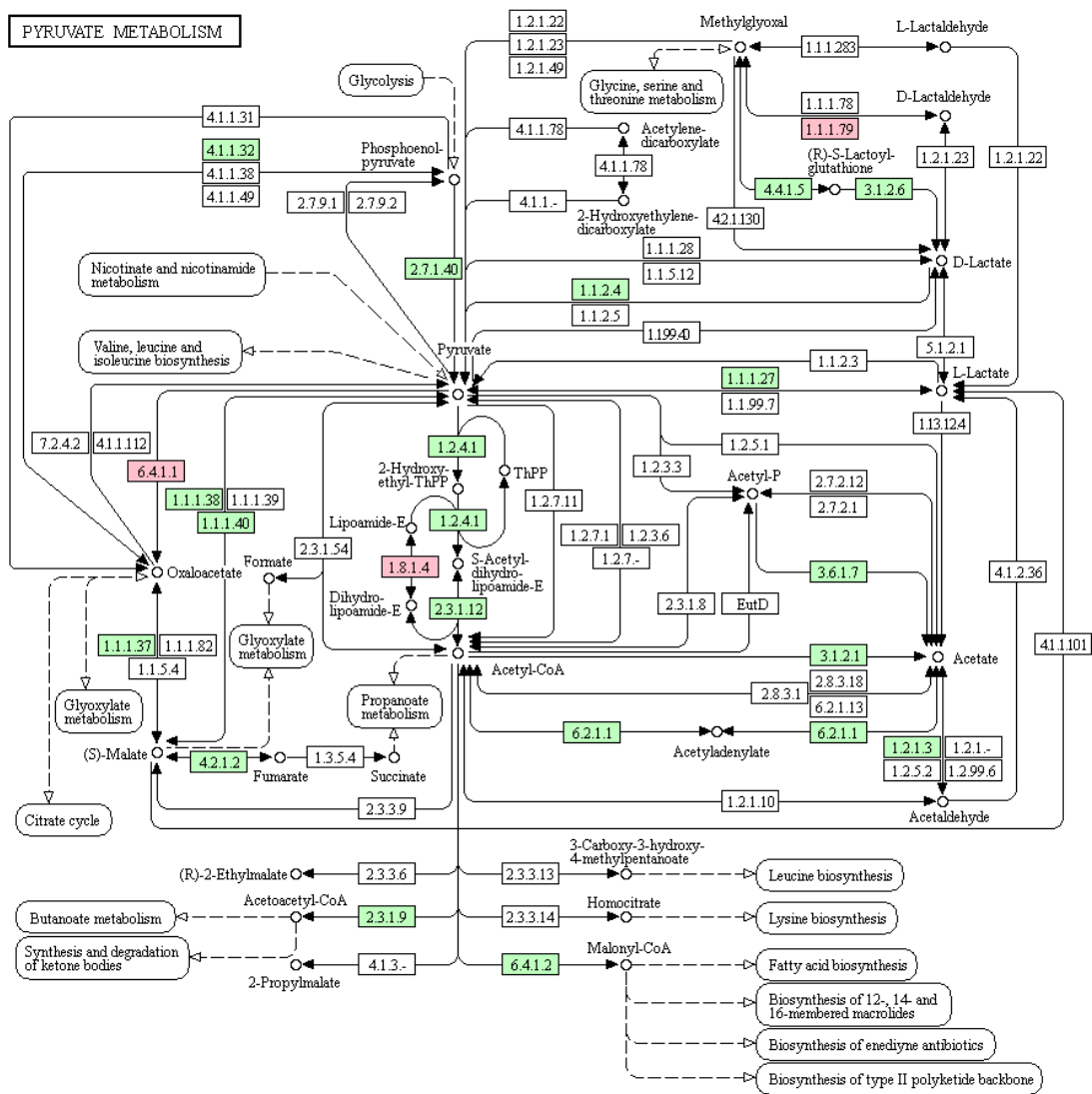
Deficience fruktosa-1,6-bisfosfatasy	Fruktosa-1,6-bisfosfatasa 1 3.1.3.11 <i>FBP1</i>
FBP1D	Laktát; Glycerol; Glycerol 3-fosfát
Glykogenosa typu I	Glukosa-6-fosfatáza 3.1.3.9 <i>G6PC</i>
GSD1	Laktát; 3-methylglutakonová kyselina; 3-metylglutarová kyselina
Galaktosemie	Galaktosa-1-fosfáturidyltransferasa 2.7.7.12 <i>GALT</i>
GALT	4-hydroxyfenyllaktát
Dědičná intolerance fruktosy	Fruktosa-1,6-bisfosfátaldolasa B 4.1.2.13 <i>ALDOB</i>
HFI	4-hydroxyfenyllaktát
Deficience pyruvátdehydrogenasy (podjednotka E3)	Složka proteinu pyruvátdehydrogenasy X O00330 <i>PDHX</i>
PDHD	Laktát; 2-ketoglutarová kyselina; Sukcinát; Malát; 2- ketoisokaproová kyselina; 2-ketoisovalerová kyselina; 2- keto-3-methylvalerová kyselina; 2-hydroxyisokaproová kyselina; 2-hydroxyisovalerová kyselina; 2-hydroxy-3-methylvalerová kyselina
Deficience pyruvátkarboxylasy	Pyruvátkarboxylasa 6.4.1.1 <i>PC</i>
PCD	Laktát; Pyruvát; Sukcinát; 3-hydroxybutyrát; Aceton; Malát; Fumarát
Hyperoxalurie typu II	Glyoxylátreduktasa/ hydroxypyruvátreduktasa 1.1.1.79 <i>GRHPR</i>
PH2	Oxalát, Glycerát
Hyperoxalurie typu III	4-hydroxy-2-oxoglutarátaldolasa 4.1.3.16 <i>DHDPSL</i>
PH3	Oxalát, 2,4-dihydroxyglutarová kyselina; 4-hydroxy-2-oxoglutarová kyselina
Deficience ribosa-5-fosfátisomerasy	Ribosa-5-fosfátisomerasa 5.3.1.6 <i>RPIA</i>
R5PID	Ribitol; Arabitol
Deficience transaldolasy	Transaldolasa 2.2.1.2 <i>TALDOI</i>
TALDO	Fumarát; Ribitol; Arabitol; Erythritol; Perseitol
Deficience dihydrolipoamiddehydrogenasy	Dihydrolipoamiddehydrogenasa 1.8.1.4 <i>DLD</i>
DLDD	2-hydroxyisokaproová kyselina; 2-hydroxyisovalerová kyselina; 2-oxoisokaproová kyselina; 2-oxoglutarová kyselina; 2-oxoisovalerová kyselina



Obrázek 22 Metabolická mapa metabolismu galaktosy. Červeně označené jsou defektní enzymy způsobující organické acidémie.



Obrázek 25 Metabolická mapa glykolysy a glukoneogenese. Červeně označené jsou defektní enzymy způsobující organické acidémie.



Obrázek 26 Metabolická mapa metabolismu pyruvátu. Červeně označené jsou defektní enzymy způsobující organické acidémie.

2.1.8 Organické acidémie způsobené peroxisomálními defekty

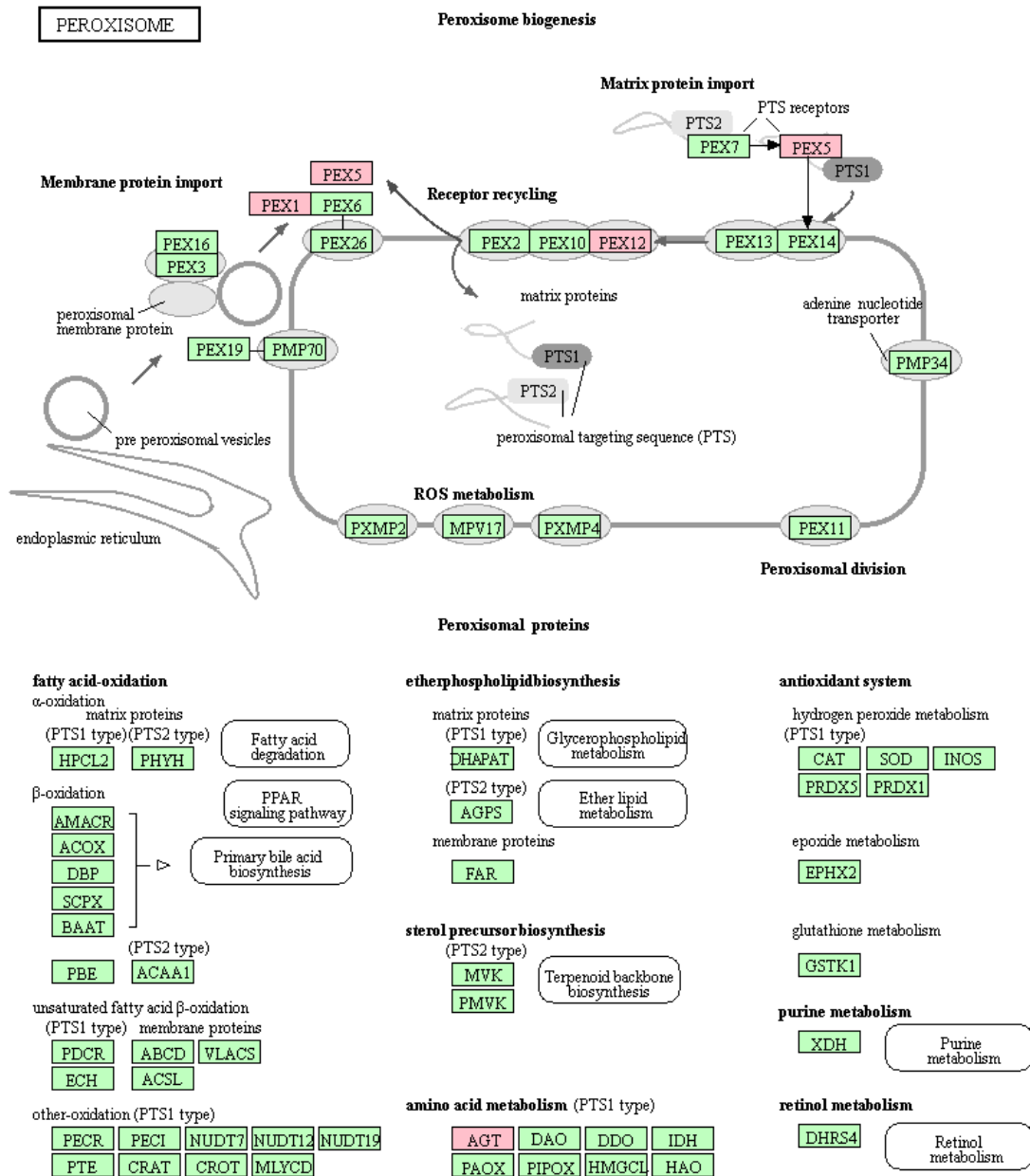
Peroxisomy jsou membránové útvary zodpovědné převážně za degradaci mastných kyselin s velmi dlouhým řetězcem a redoxní homeostázu. Biogeneze peroxisomu začíná v endoplazmatickém retikulu za uvolňování preperoxisomálních vezikul obsahujících peroxisomální membránové proteiny. Tyto preperoxizomové vezikuly se následně vyvinou na zralé peroxisomy, které jsou schopné importovat matricové proteiny (Dasouki, 2017).

První objevenou poruchou biogeneze peroxisomu byl v roce 1964 Zellwegerův syndrom (ZS) (Bowen *et al.*, 1964). Postižené děti mají vážné zdravotní problémy, které zahrnují neurologické a kosterní abnormality a dysfunkci jater. Mírnější formy ZS, souborně nazývané onemocnění ZS spektra, způsobují u pacientů narušení funkce peroxisomů kvůli mutaci v jednom z mnoha peroxinů (PEX), které jsou zodpovědné za správnou biogenezi. Tkáně pacientů s poruchou biogeneze peroxisomů obvykle vykazují morfologické odlišné peroxisomy, nazývané peroxisomální duchové (Dasouki, 2017). Navíc byly ve fibroblastech pacientů s peroxisomálními defekty β -oxidace MK prokázány velké peroxisomy a různé membránové struktury ve tvaru podkovy (Funato *et al.*, 2006).

Pacienti s hyperoxalurií typu 1 (PH1) disponují progresivním renální depozicí šťavelanu vápenatého jako urotiliáza anebo nefrokalcinóza, která v konečném důsledku vede k selhání ledvin. Kombinací zvýšené syntézy šťavelanu a nemožnosti ho vyloučit z těla vede k depozici šťavelanu vápenatého téměř po celém těle (Danpure, 2006). Toto onemocnění je způsobeno defektem enzymu alanin:glyoxylátaminotransferasa (AGT) (2.6.1.44), která se nachází v peroxisomech hepatocytů a katalyzuje transaminaci glyoxylátu na glycin. V případě PH1 dochází k vylučování glyoxylátu do cytosolu, kde je oxidován na oxalát laktátdehydrogenasou a redukován na glykolát glyoxylát/hydroxypyruvátreduktasou (Danpure a Jennings, 1986; Danpure, 2001). Transplantace jater nebo kombinovaná hepatorenální transplantace je považována za definitivní léčbu u pacientů s PH1. Kombinovaná hepatorenální transplantace je výhodnější, protože nahrazuje biochemicky defektní orgán, jakož i patofyziologicky poškozenou a ohroženou ledvinu, což může nakonec vést k vyřešení účinků systémové oxalosy (Tasic a Gucev, 2015; Bacchetta *et al.*, 2015).

Tabulka 7 Seznam onemocnění způsobených defekty v metabolismu peroxisomu. Ke každému onemocnění náleží zkratka pod názvem onemocnění, název defektního enzymu/proteinu, EC číslo enzymu nebo kód proteinu z UniProt databáze, mutovaný gen a nejdůležitější biomarkery pro dané onemocnění.

Zellwegerův syndrom ZS	Peroxisomální faktor biogeneze 1 O43933 <i>PEX1</i> 2-hydroxysebaková kyselina; 3-hydroxysebaková kyselina
Porucha v biogenezi peroxisomu 2B PBD2D	Peroxisomální receptor cílového signálu 1 P50542 <i>PEX5</i> Pimelová kyselina; Adipová kyselina; Azelaová kyselina; Suberová kyselina
Poruchy biogeneze peroxisomu	
PBDs	2-hydroxysebaková kyselina; 4-hydroxyfenyllaktát; Adipová kyselina; Suberová kyselina; Sebaková kyselina; Pipekolová kyselina; Azelaová kyselina; Pimelová kyselina; 3- hydroxysebaková kyselina
Porucha biogeneze peroxisomu 3A, 3B PBD3A; PBD3B	Peroxisomální sestavovací protein 12 O00623 <i>PEX12</i> Pipekolová kyselina
Hyperoxalurie typu I PH1	Alanin:glyoxylátaminotransferasa 2.6.1.44 <i>AGXT</i> Glykolát; Glyoxylát; Oxalát
Glutarová acidurie typu III GA3	Sukcinát-hydroxymethylglutarát-CoA-transferasa 2.8.3.13 <i>SUGCT</i> Glutarová kyselina; 3-hydroxyglutarová kyselina



Obrázek 27 Metabolická mapa biosyntézy peroxisomu a jeho metabolismu. Červeně označené jsou defektní enzymy způsobující organické acidémie.

2.1.9 Organické acidémie způsobené defekty v dalších metabolických drahách

Tato skupina onemocnění zahrnuje defekty v různých enzymech a jiných proteinech rozličných metabolických drah. Deficience 2-ketoglutarátového komplexu a fumarasová deficience jsou onemocněním citrátového cyklu. Jedna z primárních funkcí tohoto cyklu je tvorba redukovaného NAD a FAD, které jsou využívány při tvorbě ATP a poškození tohoto cyklu vede téměř vždy k poškození CNS (De Meirleir *et al.*, 2016). Vážnost a rozdílné klinické fenotypy pacientů se velmi liší a nejsou vždy specifické, projevy se pohybují od ohromné novorozenecké laktátová acidózy vedoucí k předčasné smrti až k relativně normálnímu vývoji až do dospělosti (De Meirleir *et al.*, 2016). Jedná se o velmi vzácná onemocnění, deficiencí 2-ketoglutarátového komplexu bylo popsáno 7 případů (metagene.de) a fumarasovou deficiencí trpí necelých 40 pacientů. V dnešní době neexistuje žádná efektivní léčba těchto onemocnění (De Meirleir *et al.*, 2016).

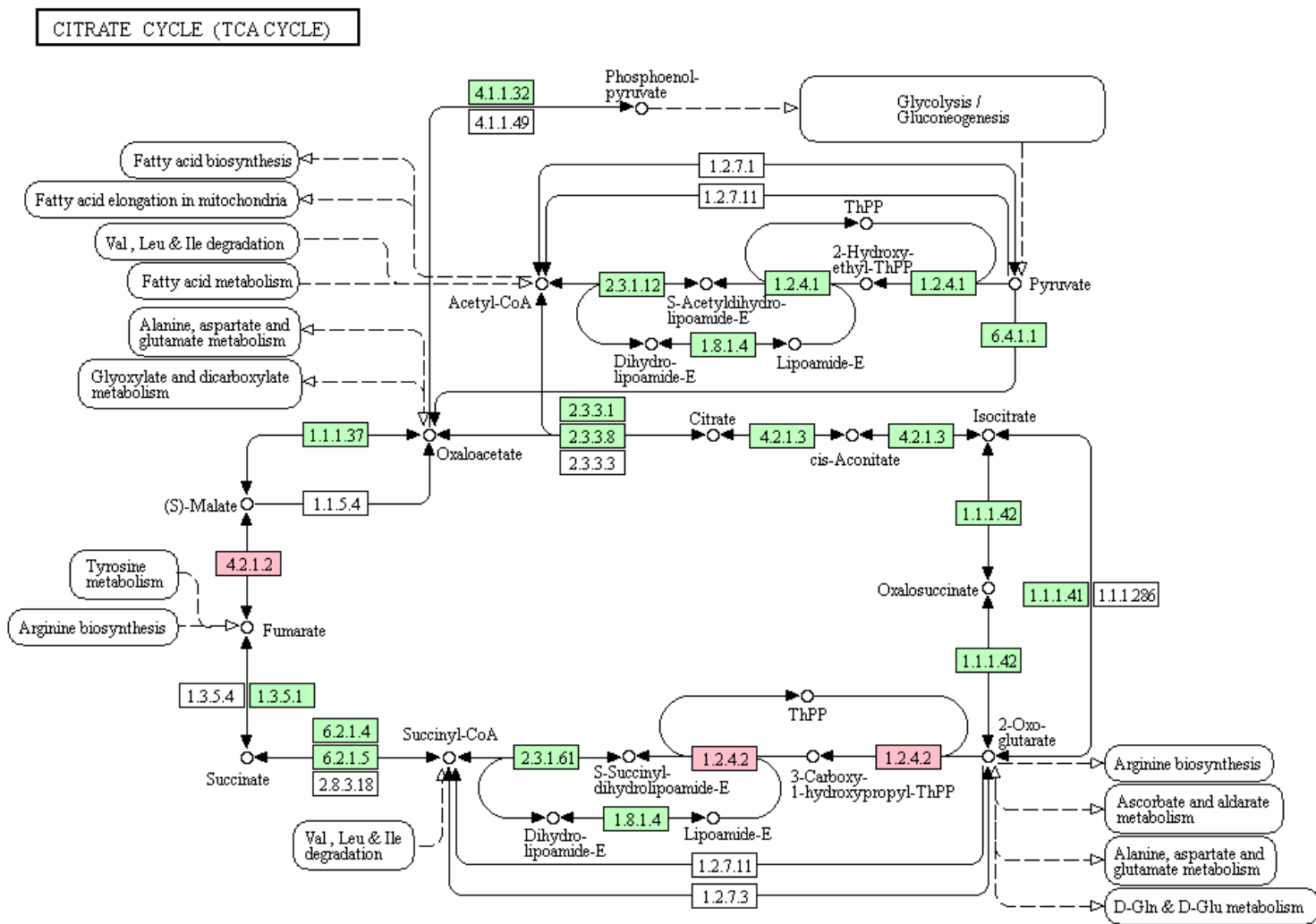
Orotová acidurie je onemocnění postihující metabolismus pyrimidinů, které se podílí na stavbě DNA a RNA, regulaci buněčného metabolismu, uchovávání a transportu energie, a transportu signálu (Cameron *et al.*, 1993; van Gennip a van Kuilenburg, 2002). Současná prevalence těchto onemocnění není známa, poslední epidemiologická studie popsala méně než 1000 pacientů v populaci téměř půl miliardy lidí z 18 evropských zemí (Simmonds *et al.*, 1997). Defektním enzymem je bifunkční uridin-5-monofosfátsynthasa, která katalyzuje přeměnu kyseliny orotové na uridin monofosfát. Prvními příznaky bývá makrocytická anémie, která je odolná vůči léčbě kyselinou listovou a vitamínem B12. Pokud není správně a rychle diagnostikována, dochází k opoždění růstu a vývoje (Bailey, 2009).

Tabulka 8 Seznam onemocnění způsobených defekty v metabolismu sacharidů. Ke každému onemocnění náleží zkratka, název defektního enzymu/proteinu, EC číslo nebo kód z UniProt databáze, mutovaný gen a nejdůležitější biomarkery pro dané onemocnění.

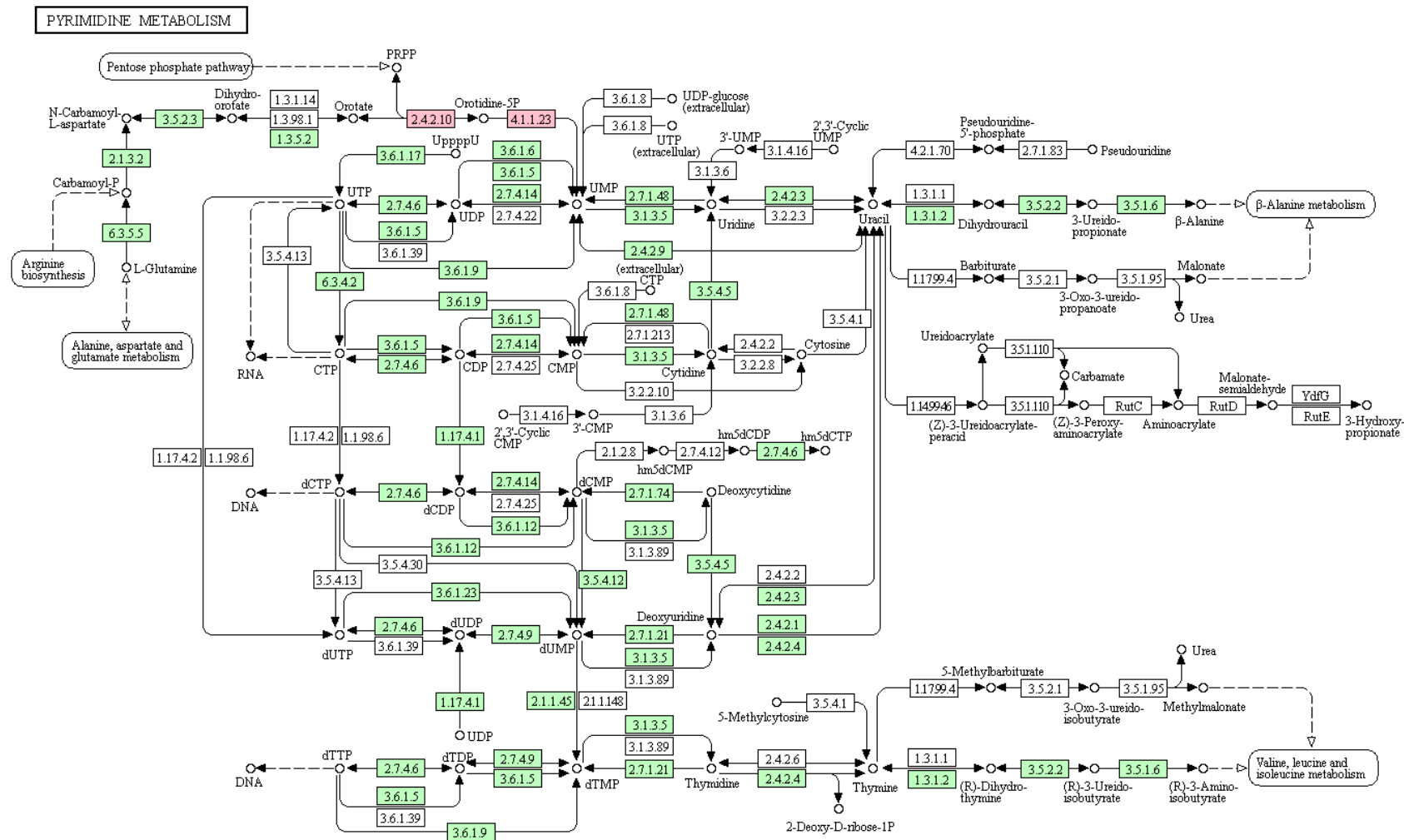
Laktátová acidóza	
LA	Laktát; Pyruvát; 2-hydroxybutyrát; 4-hydroxyfenylacetát; 2- hydroxyisobutyřát; 4-hydroxyfenyllaktát
Ketóza	
LA	3-hydroxybutyrát; Acetoacetát; L-karnitin
Pelizaeus-Merzbacherova choroba	Myelin proteolipid protein P60201 <i>PLP1</i>
PMD	N-Acetylaspartylglutamát

Tabulka 8 Seznam onemocnění způsobených defekty v metabolismu sacharidů. Ke každému onemocnění náleží zkratka, název defektního enzymu/proteinu, EC číslo nebo kód z UniProt databáze, mutovaný gen a nejdůležitější biomarkery pro dané onemocnění *pokračování*.

Deficience dekarboxylasy aromatických AK AADC	Dekarboxylasa aromatických L-aminokyselin 4.1.1.28 <i>AADC</i> Vanillaktát; N-acetyltyrosin
2-ketoadipová acidémie KAA	2-hydroxyadipová kyselina; 2-oxoglutarová kyselina; N- acetyl-2-aminoadipová kyselina; Fumarát; Malát; 2- aminoadipová kyselina; Sukcinát
Deficience 2-ketoglutarátdehydrogenasového komplexu KDCD	2-ketoglutarátdehydrogenasa 1.2.4.2 <i>OGDH</i> 2-oxoglutarová kyselina; Fumarát
Brown-Vialetto-van Laere syndrom 1 BVVLS1	Flavinový transportér rodiny solutních přenašečů, člen 3 <i>Q9NQ40</i> <i>C20ORF54</i> Ethylmalonová kyselina; Glutarová kyselina
DOOR syndrom DOORS	Člen 24 TBC1 doménové rodiny <i>Q9ULP9</i> <i>TBC1D24</i> 2-oxoglutarová kyselina; Sedoheptulosa-7-fosfát
Porfyrie s deficitem delta-aminolevulinátdehydratasy ALAD	δ -aminolevulinátdehydratasa 4.2.1.24 <i>ALAD</i> 5-aminolevulinová kyselina
Fumarasová deficience FD	Fumarátdehydratasa 4.2.1.2 <i>FH</i> Fumarát; Citrát
Deficience sukcinát-semialdehyddehydrogenasy SSADHD	Sukcinát-semialdehyddehydrogenasa 1.2.1.24 <i>ALDH5A1</i> 4-hydroxybutyrát; 3,4-dihydroxybutyrát; 2,4- dihydroxybutyrát; 4-aminobutyryl
Formiminoglutamová acidurie FIGLU	Formimidoyltransferasa-cyklodeaminasa 2.1.2.5 / 4.3.1.4 <i>FTCD</i> Hydantoin-5-propionová kyselina; Formiminoglutamová kyselina
Deficience glycerolkinasy GKD	Glycerolkinasa 2.7.1.30 <i>GK</i> Glycerol
Orotová acidurie OA	Uridin 5-monofosfátsynthasa 4.1.1.23 <i>UMPS</i> Orotová kyselina

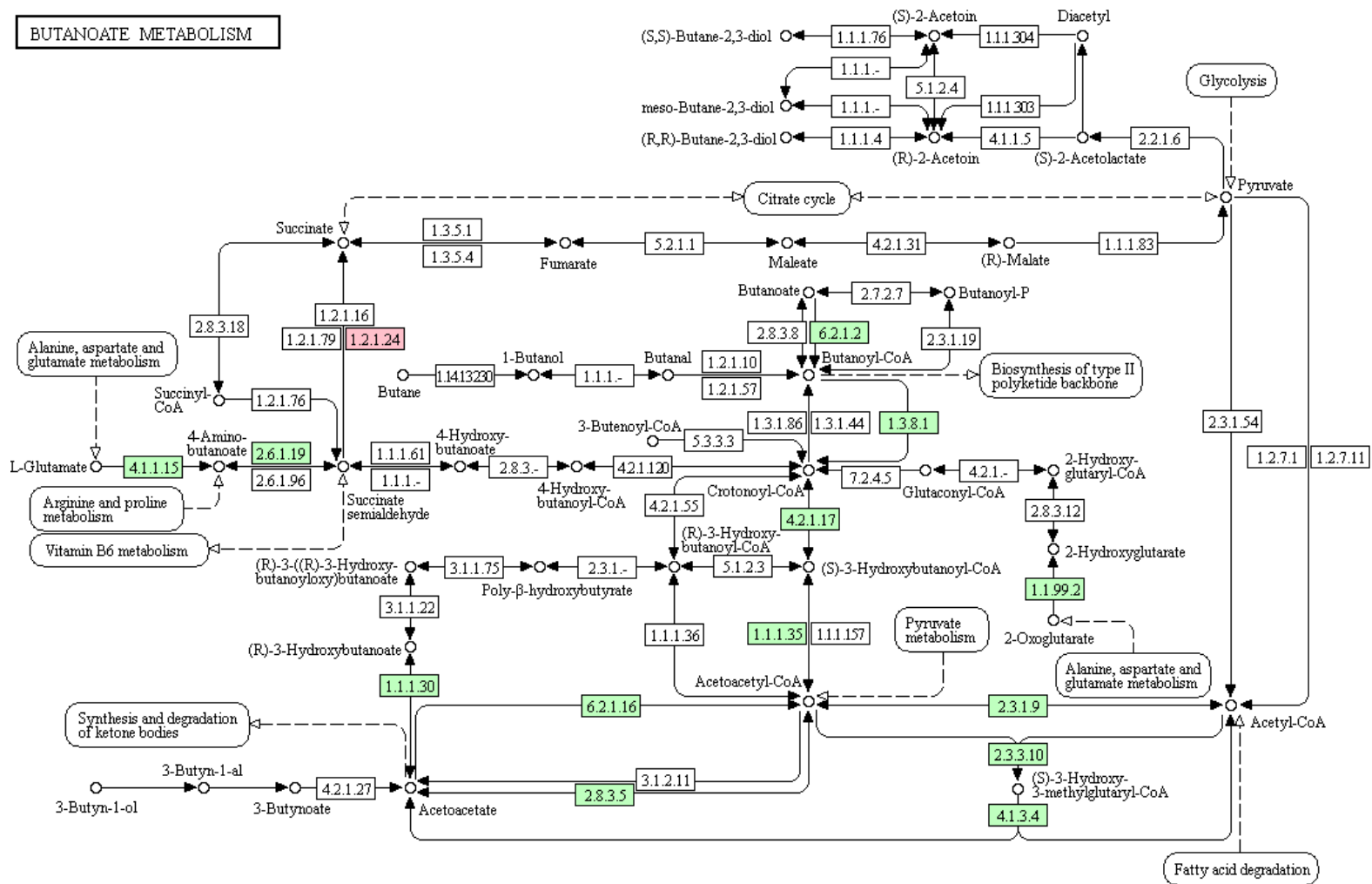


Obrázek 28 Metabolická mapa citrátového cyklu. Červeně označené jsou defektní enzymy způsobující organické acidémie.



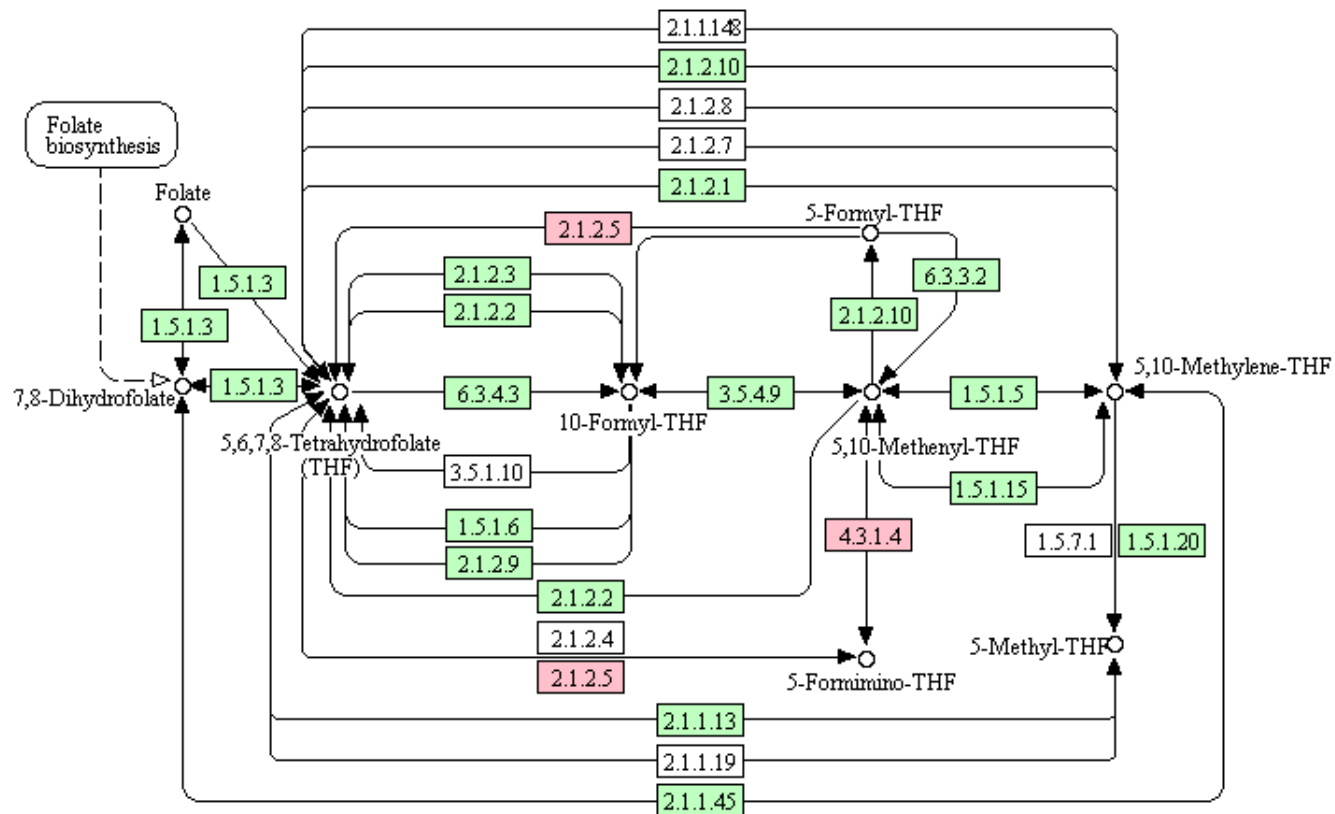
Obrázek 30 Metabolická mapa metabolismu pyrimidinů. Červeně označené jsou defektní enzymy způsobující organické acidémie.

BUTANOATE METABOLISM

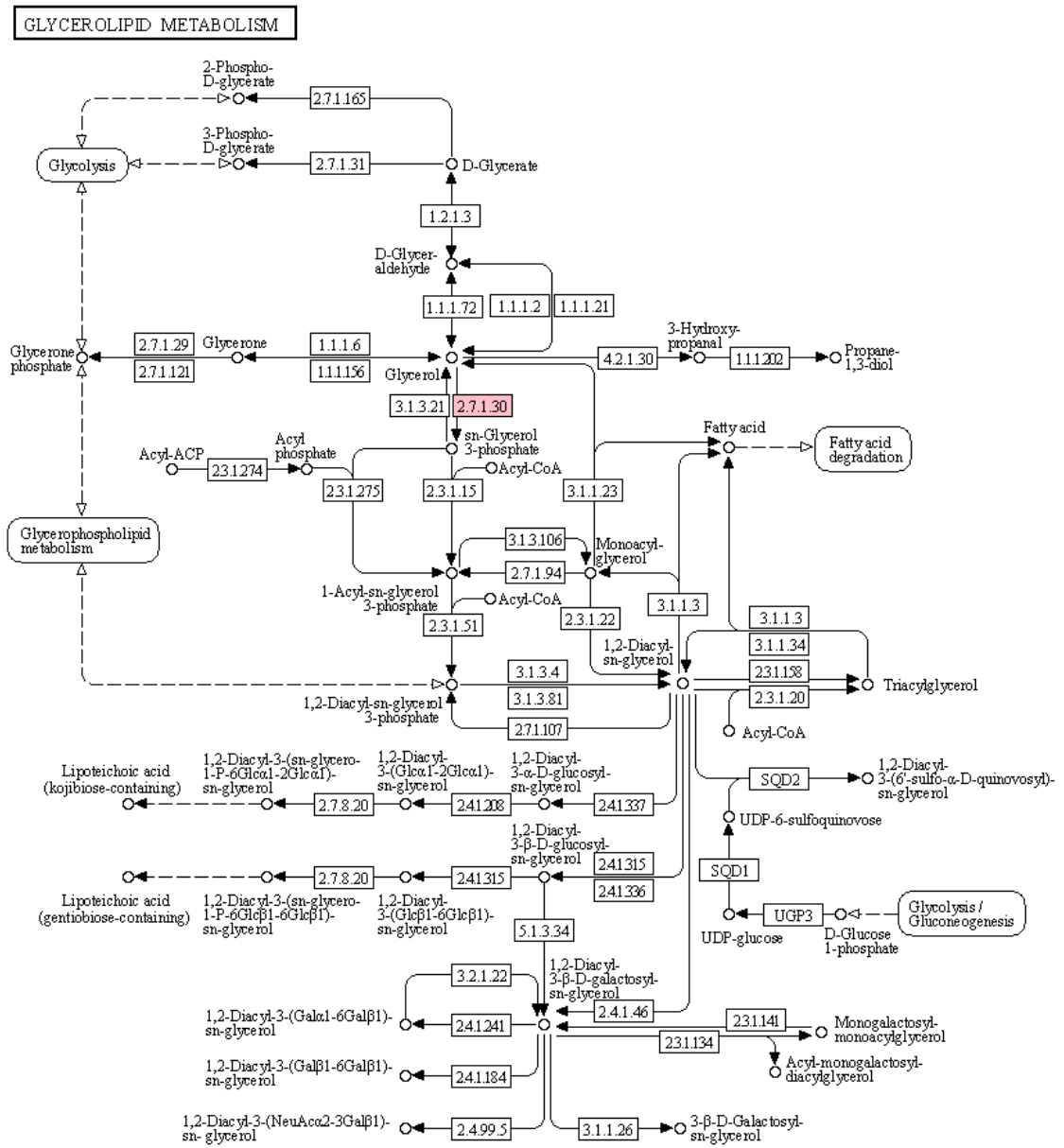


Obrázek 31 Metabolická mapa metabolismu butanoátu. Červeně označené jsou defektní enzymy způsobující organické acidémie.

ONE CARBON POOL BY FOLATE



Obrázek 32 Metabolická mapa metabolismu folátu. Červeně označené jsou defektní enzymy způsobující organické acidémie.



Obrázek 33 Metabolická mapa metabolismu glycerollipidu. Červeně označené jsou defektní enzymy způsobující organické acidémie.

2.2 Diagnostika dědičných metabolických poruch

Diagnostika DMP se provádí buď jako populační screening u všech osob určitého výběru populace (např. novorozenecký screening), nebo jako selektivní screening u určitých osob trpících určitými příznaky. Diagnóza by měla být provedena tak, aby mohlo být kdykoliv poskytnuto genetické poradenství v širší rodině (Šťastná, 2008). Vyšetření může probíhat na úrovni metabolitů, proteinu, tkáně nebo DNA. V ideálním případě je vhodné poruchu identifikovat na více úrovních, což dává největší jistotu ve správné diagnóze.

Nejvíce diagnostických možností je na úrovni metabolitů, které zahrnují intermediáty aminokyselin, sacharidů, oligosacharidů, glykosaminoglykanů, purinů, pyrimidinů, lipidů a dalších látek (Šťastná, 2008; Blau *et al.*, 2008). V případě DMP se v těle jedince hromadí substrát defektního enzymu, případě se tato nemoc může projevit nedostatkem produktu. Substrát je vylučován z organismu ve zvýšeném množství, ale může také aktivovat alternativní metabolické dráhy za vylučování atypických produktů, které u zdravého jedince nenacházíme (Racek *et al.*, 2006). Obtížností tohoto přístupu je odlišení heterozygotů, poněvadž koncentrace zdravých jedinců a heterozygotů se zčásti překrývají a také se tento přístup nemůže využít v případě, kdy defektní protein nevykazuje enzymovou aktivitu. Pokud defektní protein není enzym, využívají se pro detekci elektromigrační metody, jelikož změnou složení proteinu dochází ke změně náboje (Racek *et al.*, 2006).

Nejspecifičtější je detekce na úrovni nukleových kyselin, která je schopna rozpoznat i heterozygotní jedince. Většina poruch je heterogenní s mnoha mutacemi, z nichž jen malá část je pokryta komerčně dostupnými testovacími kity (Blau *et al.*, 2008). Předpokladem je úplná znalost sekvence v normálním i mutovaném genu, přičemž mutací může existovat, tudíž nepřítomnost jedné formy nemusí znamenat vyloučení daného onemocnění, navíc mohou vznikat nové, dosud neobjevené mutace. Metod diagnostiky na úrovni DNA je mnoho, ale mezi nejrozšířenější patří PCR (Racek *et al.*, 2006). Díky stále se snižujícím nákladům a rychlosti analýzy je v posledních letech čím dál atraktivnější využití sekvenování nové generace (Saudubray *et al.*, 2016).

2.3 Současná analýza organických kyselin

V současné době neexistuje analytická metoda, která by byla schopna zanalyzovat celý metabolom (Zhang *et al.*, 2012). Metabolomické studie se tedy musí zaměřovat jen na určitou skupinu látek, např. organické kyseliny. Vzhledem k tomu, že organické kyseliny mají relativně nízkou molekulovou hmotnost a jsou dobře rozpustné ve vodě, bývají

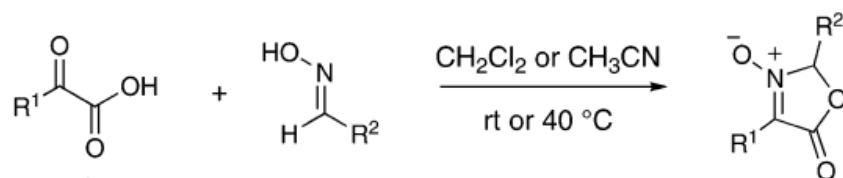
snadno vylučovány močí. V této matrici jsou téměř výhradně detekovány využitím plynové chromatografie ve spojení s hmotnostní detekcí (GC-MS) (Blau *et al.*, 2008). Organické kyseliny mohou být detekovány také v jiných matricích, (např. sérum, plasma, krev, mozkomíšni mok), ale vzhledem k funkci ledvin jsou tyto kyseliny v moči zkoncentrovány a tato matrice také obsahuje velmi malé koncentrace proteinů, což snižuje potenciální nevýhody při analýze vzorku (la Marca a Rizzo, 2011). Dalšími metodami používanými pro profilování organických kyselin jsou kapilární elektroforéza (Baena *et al.*, 2005; García a Barbas, 2003), nukleární magnetická rezonance (Sims *et al.*, 1993) a ionizace elektrosprejem ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií (Bonafé *et al.*, 2000; Pitt *et al.*, 2002; Nagaraja *et al.*, 2010).

2.3.1 Vzorek pro metabolomickou analýzu

Pokud je u pacienta podezření na DMP, je potřeba provést odběr moči, krve, mozkomíšního moku pro příslušné vyšetření (Saudubray *et al.*, 2016). Preferovaným vzorkem je moč bez přídavku konzervačních látek a uchovávaný na ledu. Případně může být vzorek ve formě kapky vysušené moči na filtračním papíru, pokud je transport na ledu problematický či finančně náročný (Blau *et al.*, 2008). Analýza organických kyselin může být provedena i v jiných vzorcích, např. plasma, sérum, amniotická tekutina (Kumps *et al.*, 2004), hemofiltrát (Guth *et al.*, 1999).

2.3.2 Plynová chromatografie ve spojení s hmotnostní detekcí

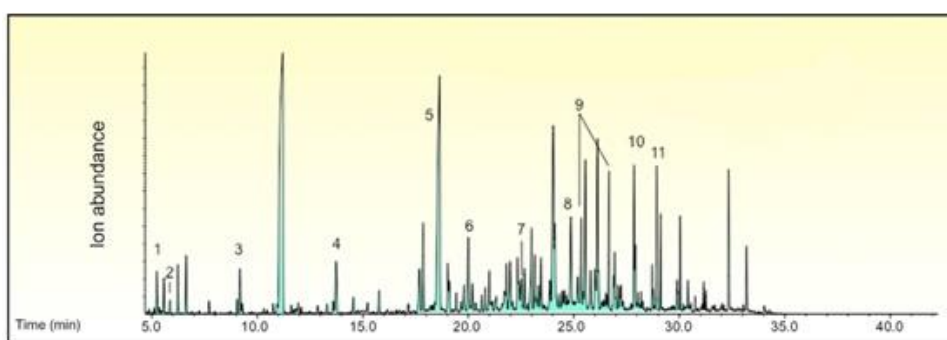
Pro tento typ analýzy je nutné převést analyty ve vzorku do plynného stavu, čehož je dosaženo derivatizací analytů. Vzorek je smíchán s roztokem interních standardů a následně je přidána minerální kyselina (např. HCl) pro snížení pH pod 2, dojde tak k protonizaci organických kyselin. Dalším krokem bývá oximace 2-ketokyselin pomocí hydrochloridu hydroxylaminu, není to ovšem rutinně prováděný krok a využívá se při opakování analýzy, pokud první analýzy odhalí zvýšenou exkreci 2-ketokyselin a přítomnost dalších látek (např. sukcinylaceton, glyoxylová kyselina) (la Marca a Rizzo, 2011; Blau *et al.*, 2008). 2-ketokyseliny jsou velmi reaktivní skupinou látek, jako nechráněné jsou labilní vůči dekarboxylaci, což ztěžuje jejich manipulaci (Cooper *et al.*, 1983). Chemoselektivní ochrana 2-ketokyselin anulací oximy vytváří chemicky stabilní 2,5-dihydrooxazol-3-oxidy (obr. 3) (Flores a Bode, 2010).



Obrázek 34 Rovnice vzniku oximu 2-ketokyseliny (převzato z Flores a Bode, 2010).

Poté jsou několikrát extrahovány kapalinou (ethylacetátem, etherem). Spojené organické vrstvy jsou vysušeny síranem sodným a odpařeny na vodní lázni v proudu dusíku. Pro převedení kyseliny do plynného stavu je nutná jejich derivatizace, nejčastěji trimethylsilylace (Blau *et al.*, 2008). Trimethylsilyl ether (TMS) vznikají reakcí s N,O,- bis-(trimethylsilyl)trifluoroacetamidem (BSTFA), obsahující 1% trimethylchlorosilan (TMCS). TMS ethery organických kyseliny jsou poté separovány na kapilární koloně obsahující nepolární stacionární fázi v proudu inertního plynu, nejčastěji helia (Blau *et al.*, 2008).

Po separaci jsou organické kyseliny detekovány hmotnostním spektrometrem ve skenujícím módu v hmotnostním rozsahu m/z 50 až 500 (Blau *et al.*, 2008). Každý analyt je poté identifikován podle svého retenčního času a charakteristické fragmentace v TIC (total ion current) chromatogramu. Konvenční přístup spočívá v extrakci z TIC profilu hmotnostní spektra všech píků nad předem definovanou intenzitou a manuálně, nebo pomocí počítače identifikaci každého hmotnostního spektra (Blau *et al.*, 2008). Kvantifikace je dosaženo porovnáním kalibrací čistého standardu dané látky v poměru k internímu standardu (Blau *et al.*, 2008). Bohužel mnoho neutrálních a pozitivně nabitých sloučenin není touto technikou detekováno (Lo, 2017).



Obrázek 35 Příklad GC-MS TIC chromatogramu normálního pacienta. Interní standardy v elučním pořadí: 1- L-laktát-d3, 2- Pyruvát- $^{13}\text{C}_3$, 3-Methyl-d3-malonová kyselina, 4-D-L-serin-d3, 5-Kreatin-d3, 6- L-fenyl-d5-alanin, 7- Orotová- $^{15}\text{N}_2$ kyselina, 8- Sebaková-d4 kyselina, 9- D-glukosa- $^{13}\text{C}_6$ (2 píky), 10- Myoinositol-d6, 11- L-tryptofan-d5. (Převzato a upraveno z Smith a Garg, 2017).

Další metoda identifikace organických kyselin využívá enzym ureasu, která rozkládá močovinu, nejhojněji zastoupenou sloučeninu v moči (Shoemaker a Elliot, 1991; Lo *et al.*, 2010; Lo, 2017). Ta působí v koloně jako separační interference, způsobuje přetížení kolony a maskuje řadu analytů, a tím znesnadňuje jejich identifikaci (Jáčová, 2019). Ošetření vzorků ureasou umožňuje TMS derivatizaci téměř všech organických molekul v moči a dalších tělních tekutinách (Lo, 2017).

Ačkoliv má GC-MS řadu výhod (separační účinnost metabolitů, vysokou senzitivitu a specifitu, málo efektů matrice a široce pokryté knihovny hmotnostních spekter) (Pasikanti *et al.*, 2008), má i řadu nevýhod. Především, organické kyseliny nejsou těkavé a musí být před analýzou extrahovány organickým rozpouštědlem a derivatizovány. To dělá tuto metodu pracnou a zdlouhavou, a je také zapotřebí relativně velké množství vzorku (minimálně 2 ml (Blau *et al.*, 2008)).

2.3.3 Kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní detekcí

V posledních letech byla vyvinuta alternativní metoda analýzy organických kyselin, kapalinová chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií (LC-MS/MS) (Want *et al.*, 2010; Bouatra *et al.*, 2013; Körver-Keularts *et al.*, 2018). LC-MS/MS má vynikající citlivost (v nanomolárním rozsahu) a specifitu. LC-MS/MS je rychlejší a do jisté míry méně pracná metoda, ale je omezena na detekci analytů v předem definovaném seznamu analytů a má slabou odezvu několika sloučenin, které jsou důležité pro diagnostiku některých specifických onemocnění. Na druhou stranu se MS/MS ukazuje být metodou pro přesné a rychlé stanovení jednotlivých organických kyselin a příbuzných látek (Blau *et al.*, 2008).

Körver-Keularts *et al.* (2018) vyvinuli LC-QTOF/MS metodu pro kvantitativní analýzu organických kyselin v moči, která zahrnuje biomarkery metabolických onemocnění i intermediátů léčiv. Pro separaci použili C18 kolonu a jako detektor QTOF hmotnostní analyzátor vybavený zdrojem ionizace elektrosprejem. Byli schopni touto metodou separovat a identifikovat 74 analytů. Lineární kalibrační křivky ($R^2 > 0,98$) byly získány pro 68 analytů ve vodě i v moči. Limit kvantifikace u většiny analytů byl stanoven na 3 $\mu\text{mol/l}$. Další látky měly LOQ vyšší (např. malonová kyselina 21 $\mu\text{mol/l}$). Variační koeficient (CV) v rámci jednoho runu byl u většiny látek do 10 %, mezi runy pak pro nízké koncentrace do 20 % a pro vysoké koncentrace do 10 %. Porovnávali také rutinní GC-MS metodu s nově vyvinou LC-MS metodou 24 organických kyselin v 28 vzorcích, přičemž přijatelná výtěžnost metody (recovery) se pohybuje mezi 80 a 120 %.

20 z 24 analytů u LC-QTOF/MS metody vykazovaly tuto výtěžnost, dokonce pro tiglylglycin, 3- hydroxyisobutyrovou kyselinu a pyroglutamovou kyselinu byla výtěžnost vylepšena oproti GC-MS metodě. Obě tyto metody vykazovaly výbornou linearitu pro všech 24 analytů. Passion-Bablok regresní analýza ukázala, že obě tyto metody jsou vysoce korelační a srovnatelné. Podařilo se jim tak vyvinout rychlou LC-QTOF/MS metodu pro kvantifikaci 71 metabolitů v moči, které pokrývají metabolické onemocnění běžně identifikované GC-MS.

Jacob *et al.* (2018) vyvinuli LC-MS/MS metodu, která zahrnuje širokou škálu metabolických onemocnění a je použitelná pro různé biologické matrice (krev, sérum, krevní skvrny, tkáně). Separace byla provedena na C18 koloně, hmotnostní analyzátor byl pak trojitý kvadrupól. Složení mobilní fáze bylo rozdílné v závislosti na polaritě módu. Metabolity byly ze vzorků extrahovány extrakčním činidlem, jehož složení záviselo na matrici, po přidání interního standardu. Z hlediska studia rolí různých biologických matric na metabolický profil vykazovaly krevní skvrny maximální metabolickou hladinu analytů v porovnání se vzorky krve a séra, což je podpořeno i dalšími studii (Zukunft *et al.*, 2013; Drolet *et al.*, 2017).

Analýza organických kyselin je také důležitá pro zjištění kvality potravin. Coelho *et al.* (2018) zavedli metodu pro simultánní analýzu organických kyselin a sacharidů ve víně a hroznových džusech pomocí HPLC na iontoměničové koloně (Hi-Plex H) s detekcí diodového pole (DAD) a indexu lomu (RID). Metoda poskytuje hodnoty pro linearitu ($R > 0.9982$), preciznost ($CV \% < 1.4$), výtěžnost (76–106 %) and limit detekce (0.003– 0.044 g/l) a kvantifikace (0.008–0.199 g/l), které jsou považovány za přijatelné pro použití při charakterizaci těchto typů matric. Analýza hlavních komponent byla použita pro ověření aplikace této metody pro kontrolu kvality těchto produktů a vedla ke správné separaci vzorků podle typu zpracování.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiál

3.1.1 Chemikálie

(2R, 3S)-2,3-dihydroxybutanoát (Sigma-Aldrich, Švýcarsko)
(2R,3R)-2,3-dihydroxy-2-methylbutanoát (TRC, Kanada)
(3-R)-3-hydroxyhexadekanoyl-L-karnitin (Sigma-Aldrich, Švýcarsko)
(3-R)-3-hydroxyhexanoyl-L-karnitin (Sigma-Aldrich, Švýcarsko)
(3-R)-3-hydroxyoktadekanoyl-L-karnitin (Sigma-Aldrich, Švýcarsko)
(3-R)-3-hydroxytetradekanoyl-L-karnitin (Sigma-Aldrich, Švýcarsko)
(4R)-4-hydroxyglutamát (Sigma-Aldrich, Švýcarsko)
13C₂15N-hexanoylglycin (Sigma-Aldrich, USA)
2,4-dihydroxybutyrát (Sigma-Aldrich, Švýcarsko)
2-hydroxybutyrát (Sigma-Aldrich, Japonsko)
2-hydroxyglutarát (Sigma-Aldrich, USA)
2-hydroxyisobutyrate (Aldrich, Německo)
2-methylbutyrylglycin (VU Medical Center, Nizozemsko)
2-methylbutyryl-L-karnitin (Sigma-Aldrich, Švýcarsko)
2-methylcitrát (Sigma-Aldrich, Švýcarsko)
2-methyl-d3-citrát (Sigma-Aldrich, USA)
2-oxobutyrate (Sigma-Aldrich, Švýcarsko)
3,4-dihydroxybutyrát (Sigma-Aldrich, Švýcarsko)
3-hydroxybutyrát (Sigma-Aldrich, USA)
3-hydroxyisobutyrate (Sigma-Aldrich, Švýcarsko)
3-methylkrotonylglycin (VU Medical Center, Nizozemsko)
3-methylkrotonyl-L-karnitin (Sigma-Aldrich, Švýcarsko)
3-methylglutaryl-L-karnitin (Avanti, USA)
4-aminobutyrate (Acros Organics, Čína)
4-hydroxy-2-oxoglutarát (Sigma-Aldrich, Švýcarsko)
4-hydroxybutyrát (Sigma-Aldrich, Čína)
4-hydroxyfenyllaktát (Sigma-Aldrich, USA)
4-hydroxyfenylpyruvát (Sigma-Aldrich, USA)
Acetoacetát (Sigma-Aldrich, Německo)
Acetylglycin (VU Medical Center, Nizozemsko)

Adipoyl-L-karnitin (Sigma-Aldrich, Švýcarsko)
Akonitát (Aldrich, Německo)
Arachidonyl-L-karnitin (Sigma-Aldrich, Švýcarsko)
Butyrylglycin (VU Medical Center, Nizozemsko)
Butyryl-L-karnitin (Sigma-Aldrich, Švýcarsko)
Citramalát (Fluka, USA)
D,L-indol-3-laktát (Sigma-Aldrich, Švýcarsko)
D2-fumarát (Sigma-Aldrich, USA)
D4-sukcinát (Sigma-Aldrich, USA)
Dekanoyl-L-karnitin (Sigma-Aldrich, USA)
Ethylacetoacetát (Sigma-Aldrich, Čína)
Fenyllaktát (Sigma-Aldrich, Švýcarsko)
Fenylpropinoylglycin (VU Medical Center, Nizozemsko)
Fenylpyruvát (Sigma-Aldrich, Švýcarsko)
Fumarát (Fluka, Švýcarsko)
Glutaryl-L-karnitin (Sigma-Aldrich, Švýcarsko)
Glycerát (Sigma-Aldrich, Německo)
Glycylprolin (Sigma-Aldrich, USA)
Heptanoylglycin (VU Medical Center, Nizozemsko)
Hexanoylglycin (VU Medical Center, Nizozemsko)
Hexanoyl-L-karnitin (Sigma-Aldrich, Švýcarsko)
Isobutyrylglycin (VU Medical Center, Nizozemsko)
Isobutyryl-L-karnitin (Sigma-Aldrich, Švýcarsko)
Isocitrát (Sigma-Aldrich, USA)
Isovalerylglycin (VU Medical Center, Nizozemsko)
Isovalerylkarnitin D9 (CIL, Velká Británie)
Isovaleryl-L-karnitin (Sigma-Aldrich, Švýcarsko)
Kyselina 13C homovanilová (Sigma-Aldrich, USA)
Kyselina 13C pipekolová (Sigma-Aldrich, USA)
Kyselina 2,5-dihydroxybenzoová (Sigma-Aldrich, Čína)
Kyselina 2,5-dihydroxyfenyloctová (Sigma-Aldrich, UK)
Kyselina 2-aminoadipová (Sigma-Aldrich, Švýcarsko)
Kyselina 2-hydroxyfenyloctová (Sigma-Aldrich, USA)
Kyselina 2-hydroxyisokaproová (Sigma-Aldrich, Japonsko)

Kyselina 2-hydroxyisovalerová (Sigma-Aldrich, Indie)
Kyselina 2-methylglutakonová (Sigma-Aldrich, Švýcarsko)
Kyselina 2-oxoadipová (Sigma-Aldrich, Švýcarsko)
Kyselina 2-oxoglutarová (Fluka, Švýcarsko)
Kyselina 2-oxoisokaproová (Sigma-Aldrich)
Kyselina 2-pikolinová (Sigma-Aldrich, Velká Británie)
Kyselina 3,4-dihydroxyfenyloctová (Sigma-Aldrich, Švýcarsko)
Kyselina 3-hydroxy-3-methylglutarová (Sigma-Aldrich, Německo)
Kyselina 3-hydroxydekanová (Sigma-Aldrich, Švédsko)
Kyselina 3-hydroxyfenyloctová (Sigma-Aldrich, Německo)
Kyselina 3-hydroxyglutarová (Sigma-Aldrich, Čína)
Kyselina 3-hydroxyisovalerová (Sigma-Aldrich, Čína)
Kyselina 3-hydroxymandlová (Sigma-Aldrich, Kanada)
Kyselina 3-hydroxyoktanová (Sigma-Aldrich, Japonsko)
Kyselina 3-hydroxypropionová (Sigma-Aldrich, Japonsko)
Kyselina 3-hydroxysebaková (ChemCruz)
Kyselina 3-hydroxyvalerová (TRC Canada, Kanada)
Kyselina 3-methyladipová (Sigma-Aldrich, Slovensko)
Kyselina 3-methylglutakonová (Sigma-Aldrich, Švýcarsko)
Kyselina 3-methylglutarová (Sigma-Aldrich, Indie)
Kyselina 4-hydroxybenzoová (Sigma-Aldrich, Čína)
Kyselina 4-hydroxyfenyloctová (Sigma-Aldrich, UK)
Kyselina 5-hydroxyindolactová (Fluka, Čína)
Kyselina adipová (Fluka, Německo)
Kyselina azelaová (Sigma-Aldrich, Čína)
Kyselina citronová (Sigma-Aldrich, USA)
Kyselina D,L-3,4-dihydroxymandlová (Sigma-Aldrich, Kanada)
Kyselina ethylmalonová (Sigma-Aldrich)
Kyselina fenoxyoctová (Sigma-Aldrich, Čína)
Kyselina fenyloctová (Sigma-Aldrich, Francie)
Kyselina glutakonová (Sigma-Aldrich, Německo)
Kyselina glutarová (Sigma-Aldrich, Německo)
Kyselina glykolová (Sigma-Aldrich, Německo)
Kyselina glyoxylová (Sigma-Aldrich, Čína)

Kyselina hipurová (Lachema, Česká republika)
Kyselina homovanilová (Sigma-Aldrich, Německo)
Kyselina hydantoin-5-propionová (Matrix Scientific)
Kyselina kynurenová (Sigma-Aldrich, UK)
Kyselina malonová (Lachema, Česká republika)
Kyselina mandlová (Sigma-Aldrich, Čína)
Kyselina methyl-d3-malonová (Sigma-Aldrich, USA)
Kyselina orotová (INC Biochemicals)
Kyselina pimelová (Sigma-Aldrich, Čína)
Kyselina pipekolová (Calbiochem)
Kyselina pyroglutamová (Sigma-Aldrich, Německo)
Kyselina sebaková (Sigma-Aldrich)
Kyselina suberová (Fluka, Německo)
Kyselina tartarová (Sigma-Aldrich, Itálie)
Kyselina vanilylmandlová (Merck)
Laktát (Sigma-Aldrich, USA)
Laktát $^{13}\text{C}_3$ (CIL, Velká Británie)
Lauroyl-L-karnitin (Sigma-Aldrich, Švýcarsko)
LC-MS acetonitril (Honeywell, Německo)
LC-MS kyselina mravenčí (Honeywell, Německo)
LC-MS methanol (Honeywell, Německo)
LC-MS voda (Honeywell, Německo)
L-karnitin hydrochlorid (Sigma-Aldrich, Španělsko)
Malát (Fluka, USA)
Maleát acid (Sigma-Aldrich, USA)
Malonyl-L-karnitin (Sigma-Aldrich, Austrálie)
Methylmalonát (Sigma-Aldrich)
Methylsukcinát (Sigma-Aldrich, USA)
Mevalonolakton (Sigma-Aldrich, Švýcarsko)
Myristoyl-L-karnitin (Sigma-Aldrich, Švýcarsko)
N-acetylaspartát (Fluka, Itálie)
N-acetyltyrosin (Sigma-Aldrich)
O-acetyl-L-karnitin hydrochlorid (Sigma-Aldrich, USA)
Oktanoyl-L-karnitin (Sigma-Aldrich, Austrálie)

Oxaloacetát (Sigma-Aldrich, USA)
Palmitoyl-L-karnitin (Sigma-Aldrich, Švýcarsko)
Pivaloylglycin (VU Medical Center, Nizozemsko)
Propionylglycin (VU Medical Center, Nizozemsko)
Propionyl-L-karnitin (Sigma-Aldrich, Švýcarsko)
Pyruvát (Sigma-Aldrich, Čína)
Sebakoyl-L-karnitin (Sigma-Aldrich, Austrálie)
Sigmatrix urine diluent (Sigma-Aldrich, USA)
Stearoyl-L-karnitin (Sigma-Aldrich, Austrálie)
Suberoyl-L-karnitin (Sigma-Aldrich, Austrálie)
Suberylglycin (VU Medical Center, Nizozemsko)
Sukcinát (Fluka, Švýcarsko)
Sukcinylaceton (Sigma-Aldrich, Izrael)
Tigloyl-L-karnitin (Sigma-Aldrich, Švýcarsko)
Tiglylglycin (VU Medical Center, Nizozemsko)
Trans-2-decenoyl-L-karnitin (Sigma-Aldrich, Austrálie)
Trans-2-oktenoyl-L-karnitin (Sigma-Aldrich, Austrálie)
Valerylglycin (VU Medical Center, Nizozemsko)
Valeryl-L-karnitin (Sigma-Aldrich, Austrálie)
Valproát sodný (Sigma-Aldrich, Německo)
Vanillaktát (Santa Cruz biotechnology)

3.1.2 Přístrojové vybavení

Kapalinový chromatograf Exion LC (Sciex), hmotnostní spektrometr QTRAP 6500 (Sciex); ESI (gas 1/2: 50 psi, -4500/+5500, 450 °C), kolona Acquity UPLC HSS T3 C18 (Waters), 1.8 µm, 2.1 × 100 mm, kapalinový chromatograf UltiMate 3000 (Dionex), hmotnostní spektrometr Triple Quad 6500 (SCIEX); ESI (gas 1/2: 50 psi, -4500/+5500 V, 450 °C), váhy HR120 (AND), třepačka MS3 basic (IKA), automatické pipety (Eppendorf), automatická elektronická pipeta eVol (SGE Analytical Science), ultrazvuková lázeň Elmasonic (Elma), mikrozkuřavky.

3.1.3 Biologický materiál

Veškeré vzorky močí mi byly k dispozici na pracovišti v laboratoři dědičných metabolických poruch FNOL pro účel diagnostiky DMP.

3.2 Metody

3.2.1 Příprava standardů

Veškeré standardy (celkem 150) byly připraveny jako 10 mM roztoky v LC-MS vodě, kromě acylglycinů, které byly připraveny o koncentraci 30 mM. Roztoky byly uchovávány v mrazáku při -20°C.

3.2.2 Příprava interních standardů

Byly smíchány připravené pracovní roztoky IS o celkovém objemu 5 ml a složení hexanoylglycin-13C2, 15N (23 μM) a kyselina methyl-d3-malonová (413 μM) do 10 ml odměrné baňky. K tomu bylo přidáno 50 μl kyseliny methyl-d3-citronové (6.83 mM), 200 μL kyseliny homovanilové-13C6, 18O (10 mM), 10 μl isovaleryl-L-karnitinu-D9 (10 mM), 200 μl kyseliny pipekolové-13C (10 mM), 22,3 μL laktátu-13C3 (10x zředěný 20% roztok o výchozí koncentraci 2,24 mol/l). Takto připravená směs IS byla alikvotována do mikrozkušavek po 1 ml a skladována při -20 °C.

3.2.3 Optimalizace MRM přechodů pomocí standardů

Pro optimalizaci MRM přechodů byly použity 1μM roztoky standardů, které byly připraveny ředěním zásobních standardů v mobilní fázi A a B v poměru 1:1. Mobilní fáze A obsahuje 0,5% kyselinu mravenčí v LC-MS vodě a mobilní fáze B obsahuje 0,5% kyselinu mravenčí v LC-MS acetonitrilu. Bylo tedy pipetováno 1 μl 10mM zásobního standardu, 499 μl MF A a 500 μl MF B. Stříkačka byla nejprve 3x promyta 500 μl LC-MS methanolu a poté byla 3x promyta stejným množstvím i kapilára. 1μM roztoky standardů byly vpraveny do stříkačky, která tyto standardy dávkovala přímo do hmotnostního spektrometru po 7 μl/min. Ladění MRM přechodů bylo provedeno v softwaru Analyst 1.3.6 2015 (SCIEX), který pro každý standard vybírá automaticky 10 nejintenzivnějších píků přechodu molekulového a produktového iontu v +MRM i -MRM módu. Jako molekulové ionty byly voleny jednak hmoty samotných standardů, tak i jejich adukty s kyselinou mravenčí, která je obsažena v mobilní fázi.

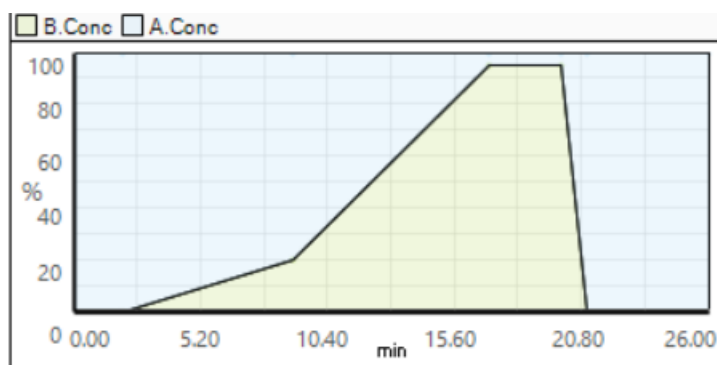
Výsledkem optimalizace pak byla tabulka s 10 přechody v +MRM a 10 v -MRM módu s údaji o deklasteračních potenciálech (DP), vstupních potenciálech (EP), kolizních energiích (CE) a potenciálech na konci kolizní cely (CXP) pro každý ze všech 151 standardů. Tyto údaje byly posléze využity pro detekci těchto látek po separaci pomocí kapalinové chromatografie.

3.2.4 Separace standardů pomocí kapalinové chromatografie

Byly připraveny roztoky standardů organických kyselin o objemu 100 μl a koncentraci 100 μM (byl pipetován 1 μl 10 mM standardu a 99 μl LC-MS vody), acylkarnitinů o koncentraci 1 μM (byl pipetován 1 μl 100 μM standardu a 99 μl LC-MS vody) a acylglycinů o koncentraci 3 μM (bylo pipetováno 10 μl 30 μM standardu a 90 μl LC-MS vody) do vialek s insertem. Případné izomery byly analyzovány jednak samostatně a jednak ve směsi všech společných izomerů pro optimalizaci jejich separace.

Separace byla provedena pomocí kapalinového chromatografu Exion LC (Sciex) na koloně Acquity UPLC HSS T3 (C18) (Waters), 1.8 μm , 2.1 x 100 mm, při 30 °C gradientovou elucí za zvyšování podílu organické mobilní fáze B (viz obr. 36) při průtoku 0,35 $\mu\text{l}/\text{min}$ po dobu 26 minut. Detekce byla provedena pomocí hmotnostního spektrometru na základě předchozího ladění, který dokáže přepínat polaritu během analýzy („polarity switching”).

Po provedení separace byla analýza vyhodnocena v softwaru Analyst 1.3.6 2015 (SCIEX), kde byly vybírány píky s největší hodnotou S/N pro každý standard. U izomerů byl vybírán společný přechod, kvantifikační, a pokud to bylo možné, tak i specifický přechod pro každý izomer. Finální metoda pro všechny metabolity byla poté zpracována do tabulky s údaji o retenčním čase, molekulovém a produktovém iontu, DP, EP, CE a CXP.



Obrázek 36 Schéma binárního gradientu nastavený při separaci organických kyselin a příbuzných látek.

3.2.5 Stabilita oxokyselin

Oxokyseliny jsou pro analýzu poměrně problematické sloučeniny, vzhledem k jejich velké nestabilitě ve vodném roztoku, kde mají tendenci odštěpovat karboxy- skupinu a polymerizovat (Cooper *et al.*, 1983). Taktéž při rutinní GC-MS analýze organických kyselin je zapotřebí, aby 2-oxokyseliny chráněny oximací.

Byly připraveny čerstvé zásobní 10 mM roztoky oxokyselin: 2-oxoglutarová, 2-oxoadipová, 2-oxoisokaproová, glyoxylová, fenylpyruvát, 4-hydroxyfenylpyruvát, 4-hydroxy-2-oxoglutarová, 2-oxobutyrát, sukcinylaceton, acetoacetát, pyroglutamát a ethylacetoacetát. Z těchto zásobních roztoků byl připraven 1 ml směsi 12 oxokyselin o koncentraci 100 $\mu\text{mol/l}$, tak, že bylo pipetováno 10 μl zásobního 10mM standardu do mikrozkušavky a doplněno LC-MS vodou na objem 1 ml. Dále byla připravena směsná moč a směsná moč s přídavkem směsi oxokyselin, každá do 3 vialek. Tato směsná moč obsahovala koncentraci kreatininu 4,96 mM, kterou bylo nutné naředit na koncentraci 1 mM. Do 6 vialek bylo tedy pipetováno 20,2 μl moče a do tří z nich bylo přidáno 79,8 μl LC-MS vody. Následně bylo smícháno 5 μl každého 10mM zásobního roztoku oxokyselin do mikrozkušavky a doplněno 15 μl na objem 75 μl . Z této směsi bylo odebráno 7,5 μl do každé ze zbylých 3 vialek a doplněno 72,3 μl LC-MS vody na objem 100 μl . Výsledná koncentrace oxokyselin ve směsné moči byla tedy 50 μM .

Následně bylo pipetováno 100 μl směsi do vialky s insertem a spolu se směsnou močí a směsnou močí se směsí oxokyselin zanalyzováno. Čerstvě připravená směs oxokyselin byla poté rozpipetována do 3 alikvotů, a spolu s močí a močí se směsí oxokyselin byly 1 měsíc uchovávány při 3 různých teplotách, a to při +4 °C v lednici, -20 °C a -80 °C v mrazáku. Po 1 měsíci skladování byly tyto vzorky opět zanalyzovány pro sledování jejich stability za různých podmínek. Analýzy byly vyhodnoceny v softwaru Multiquant 3.0.3 (SCIEX).

3.2.6 Příprava kalibračních směsí standardů

Pro kalibraci byly vytvořeny 4 směsi standardů, a to acylglyciny (1), acylkarnitiny (2) a 2 skupiny organických kyselin rozdělené podle jejich obsahu v moči u zdravých jedinců na ty s nižší (3) a vyšší koncentrací (4) (rozdělení a horní kalibrační body jsou uvedeny v příloze 3).

Kalibrační rozmezí standardů bylo voleno podle fyziologických koncentrací jednotlivých látek z veřejně dostupných databází hmdb.ca a metagene.de s doplňujícími informacemi o intenzitách odezvy standardů a vzorků. Desetibodová kalibrační řada byla

připravena dvojkovou ředící řadou v matrici, přičemž byla použita syntetická moč Sigmatrix urine diluent (Sigma-Aldrich).

Byla připravena směs 15 acylglycinů o koncentraci 55 μM tak, že bylo pipetováno 1,1 μl každého 30mM standardu do společné mikrozkušavky a doplněno 584,6 μl Sigmatrix na finální objem 600 μl . Z této směsi bylo odpipetováno 200 μl do další mikrozkušavky a k ní bylo přidáno 200 μl Sigmatrix. Tímto způsobem byla dále vytvořena kalibrační řada o 10 bodech. Z každé této mikrozkušavky bylo pipetováno 100 μl do vialky s insertem. Byl také připraven blank, který obsahoval pouze Sigmatrix a nulový kalibrátor, který obsahoval 100 μl Sigmatrix a k němu a všem kalibračním bodům bylo ještě přidáno 10 μl směsi IS. Kalibrační body měly tedy výsledné koncentrace: $5,00 \cdot 10^1$; $2,50 \cdot 10^1$; $1,25 \cdot 10^1$; 6,25; 3,13; 1,56; $7,81 \cdot 10^{-1}$; $3,91 \cdot 10^{-1}$; $1,95 \cdot 10^{-1}$; $9,77 \cdot 10^{-2} \mu\text{mol/l}$.

Dále byl připraven 1 ml směsi 30 acylkarnitinů o různých koncentracích podle jejich fyziologických koncentrací v moči. Nejvyšší kalibrační body jsou spolu s jednotlivými karnitiny uvedeny v příloze 3. Koncentrace acylkarnitinů ve směsi byla tedy 0,11; 1,1; 11 a 22 μM a bylo do mikrozkušavky pipetováno 1,1 μl nebo 11 μl naředěného 100 μM roztoku příslušných acylkarnitinů (AK) s nejvyšší kalibračním bodem 0,1 a 1 μM . K této směsi bylo ještě pipetováno 11 a 22 μl dalších AK. Směs byla doplněna na 1 ml syntetickou močí Sigmatrix urine diluent. Z této směsi bylo odpipetováno 200 μl do další mikrozkušavky a k ní bylo přidáno 200 μl Sigmatrix. Tímto způsobem byla dále vytvořena kalibrační řada o 10 bodech. Z každé této mikrozkušavky bylo pipetováno 100 μl do vialky s insertem. Byl také připraven blank, který obsahoval pouze Sigmatrix a nulový kalibrátor, který obsahoval 100 μl Sigmatrix a k němu a všem kalibračním bodům bylo ještě přidáno 10 μl směsi IS. Výsledné koncentrace AK byly:

- $1,00 \cdot 10^{-1}$; $5,00 \cdot 10^{-2}$; $2,50 \cdot 10^{-2}$; $1,25 \cdot 10^{-2}$; $6,25 \cdot 10^{-3}$; $3,13 \cdot 10^{-3}$; $1,56 \cdot 10^{-3}$; $7,81 \cdot 10^{-4}$; $3,91 \cdot 10^{-4}$; $1,95 \cdot 10^{-4}$.
- 1,00; $5,00 \cdot 10^{-1}$; $2,50 \cdot 10^{-1}$; $1,25 \cdot 10^{-1}$; $6,25 \cdot 10^{-2}$; $3,13 \cdot 10^{-2}$; $1,56 \cdot 10^{-2}$; $7,81 \cdot 10^{-3}$; $3,91 \cdot 10^{-3}$; $1,95 \cdot 10^{-3}$.
- $1,00 \cdot 10^1$; 5,00; 2,50; 1,25; $6,25 \cdot 10^{-1}$; $3,13 \cdot 10^{-1}$; $1,56 \cdot 10^{-1}$; $7,81 \cdot 10^{-2}$; $3,91 \cdot 10^{-2}$; $1,95 \cdot 10^{-2}$.
- $2,00 \cdot 10^1$; $1,00 \cdot 10^1$; 5,00; 2,50; 1,25; $6,25 \cdot 10^{-1}$; $3,13 \cdot 10^{-1}$; $1,56 \cdot 10^{-1}$; $7,81 \cdot 10^{-2}$; $3,91 \cdot 10^{-2} \mu\text{mol/l}$.

Další směs byla směs organických kyselin s různým nejvyšším výchozím kalibračním bodem, a to 1, 10 a 100 μM tak, že bylo pipetováno 1,1 μl 1mM roztoku STD, 1,1 μl 10mM roztoku STD a 11 μl 10 mM roztoku STD. Tato směs byla poté doplněna na objem 1 ml Sigmatrix Z této směsi bylo odebráno 200 μl do další mikrozkuhavky a bylo k ní přidáno 200 μl Sigmatrix. Tímto způsobem byla dále vytvořena kalibrační řada o 10 bodech. Z každé této mikrozkuhavky bylo pipetováno 100 μl do vialky s insertem. Byl také připraven blank, který obsahoval pouze Sigmatrix a nulový kalibrátor, který obsahoval 100 μl Sigmatrix a k němu a všem kalibračním bodům bylo ještě přidáno 10 μl směsi IS. Výsledné koncentrace kalibračních bodů byly následující:

- 1,00; $5,00 \cdot 10^{-1}$; $2,50 \cdot 10^{-1}$; $1,25 \cdot 10^{-1}$; $6,25 \cdot 10^{-2}$; $3,13 \cdot 10^{-2}$; $1,56 \cdot 10^{-2}$; $7,81 \cdot 10^{-3}$; $3,91 \cdot 10^{-3}$; $1,95 \cdot 10^{-3}$.
- $1,00 \cdot 10^1$; 5,00; 2,50; 1,25; $6,25 \cdot 10^{-1}$; $3,13 \cdot 10^{-1}$; $1,56 \cdot 10^{-1}$; $7,81 \cdot 10^{-2}$; $3,91 \cdot 10^{-2}$; $1,95 \cdot 10^{-2}$.
- $1,00 \cdot 10^2$; $5,00 \cdot 10^1$; $2,50 \cdot 10^1$; $1,25 \cdot 10^1$; 6,25; 3,13; 1,56; 7,81; $3,91 \cdot 10^{-1}$; $1,95 \cdot 10^{-1}$ $\mu\text{mol/l}$.

Poslední směs byla taktéž směs organických kyselin s vyšším obsahem v moči. Směs obsahovala 220, 110 a 11 μM organických kyselin tak, že bylo pipetováno 22 μl , 11 μl a 1,1 μl 10 mM STD organických kyselin a tato směs byla doplněna na objem 1 ml Sigmatrix. Z této směsi bylo odebráno 200 μl do další mikrozkuhavky a bylo k ní přidáno 200 μl Sigmatrix. Tímto způsobem byla dále vytvořena kalibrační řada o 10 bodech. Z každé této mikrozkuhavky bylo pipetováno 100 μl do vialky s insertem. Byl také připraven blank, který obsahoval pouze Sigmatrix a nulový kalibrátor, který obsahoval 100 μl Sigmatrix a k němu a všem kalibračním bodům bylo ještě přidáno 10 μl směsi IS. Výsledné koncentrace byly následující:

- $1,00 \cdot 10^1$; 5,00; 2,50; 1,25; $6,25 \cdot 10^{-1}$; $3,13 \cdot 10^{-1}$; $1,56 \cdot 10^{-1}$; $7,81 \cdot 10^{-2}$; $3,91 \cdot 10^{-2}$; $1,95 \cdot 10^{-2}$.
- $1,00 \cdot 10^2$; $5,00 \cdot 10^1$; $2,50 \cdot 10^1$; $1,25 \cdot 10^1$; 6,25; 3,13; 1,56; 7,81; $3,91 \cdot 10^{-1}$; $1,95 \cdot 10^{-1}$.
- $2,00 \cdot 10^2$; $1,00 \cdot 10^2$; $5,00 \cdot 10^1$; $2,50 \cdot 10^1$; $1,25 \cdot 10^1$; 6,25; 3,13; 1,56; $7,81 \cdot 10^{-1}$; $3,91 \cdot 10^{-1}$ $\mu\text{mol/l}$.

Kalibrační směsi byly analyzovány finální LC-MS metodou popsanou viz výše a vyhodnoceny v softwaru MultiQuant 3.0.3 (SCIEX).

3.2.7 Příprava vzorků moči a jejich analýza

Vzorky moči byly připraveny ředěním na koncentraci kreatininu 1 mmol/l a objemu 100 μ l do vilaky s insertem. Vzorky, které obsahovaly kreatinin pod 1 mmol/l byly analyzovány neředěné a byl u nich zvýšen nástřik úměrně koncentraci kreatininu. Ke každému vzorku bylo následně přidáno 10 μ l směsi interních standardů. Koncentrace IS ve vzorcích je pak následující: kyselina methyl-d3-malonová (18,8 μ mol/l), hexanoylglycin-13C2, 15N (1,0 μ mol/l), kyselina methyl-d3-citronová (3,1 μ mol/l), kyselina homovanilová-13C6, 18O (18,2 μ mol/l), isovaleryl-L-karnitin-D9 (0,9 μ mol/l), kyselina pipekolová-13C (18.2 μ mol/l), laktát-13C3 (44,8 μ mol/l).

U takto připravených vzorků byla provedena cílená metabolomická LC-MS analýza touto nově vytvořenou metodou s nástřikem 1 μ l, v případě vzorků s obsahem kreatininu pod 1 mmol/l byl nástřik zvýšen úměrně obsahu kreatininu.

4 VÝSLEDKY

4.1 Vývoj LC-MS metody

4.1.1 Optimalizace podmínek separace

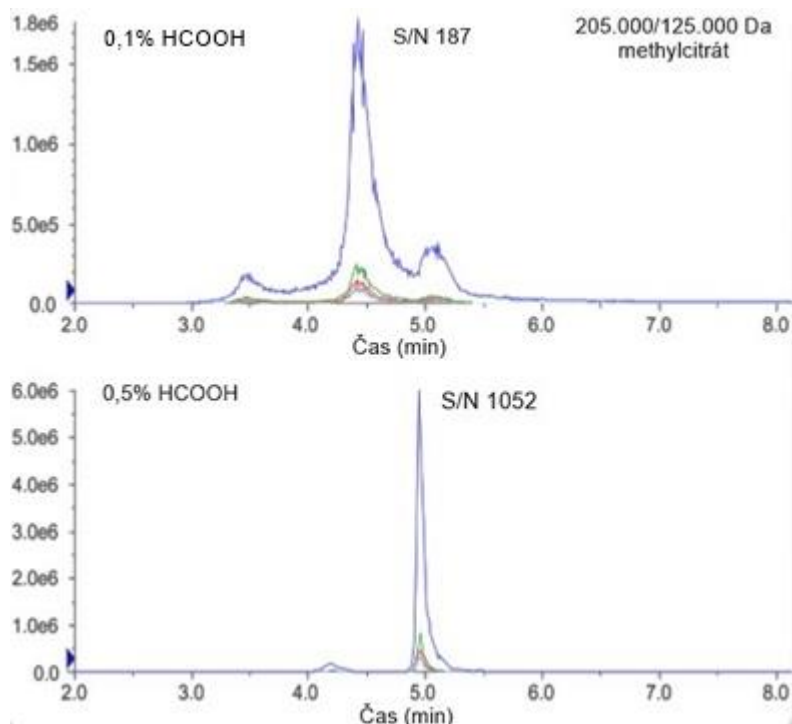
Vyvíjená metoda byla nejprve optimalizována pomocí kapalinového chromatografu UltiMate 3000 (Dionex) a hmotnostního spektrometru Triple Quad 6500 (SCIEX) za různých podmínek. Byla testována separace na těchto 3 kolonách:

- Luna Omega Polar C18 (Phenomenex)
- Kinetex EVO C18 (Phenomenex)
- Acquity UPLC HSS T3 (Waters)

Za různého průtoku: 0,45; 0,40; 0,35 ml/min, při 2 různých gradientech, teploty 40 °C; 30 °C; 22 °C, složení mobilní fáze:

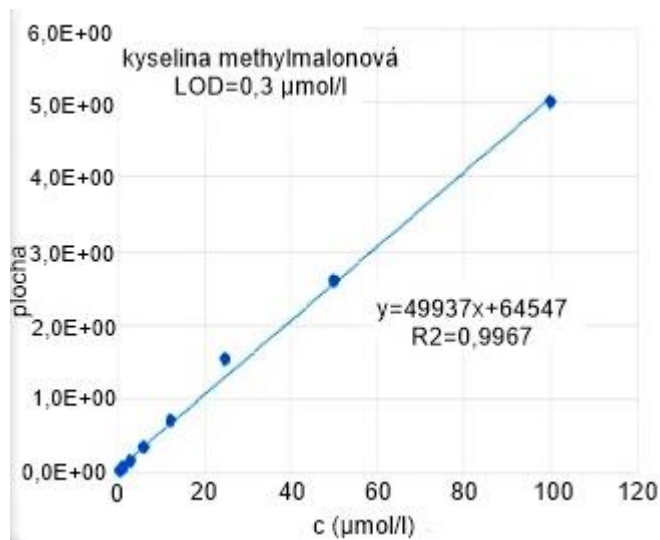
- Mobilní fáze A:
 - 0,1; 0,25; 0,5% HCOOH v H₂O (pH 2.34)
- Mobilní fáze B:
 - 0,1; 0,25; 0,5% HCOOH v methanolu
 - 0,5% HCOOH v acetonitrilu

Byl sledován tvar píků, citlivost odezvy standardů (S/N), linearita odezvy a reprodukovatelnost. Nejlepší parametry vykazovala kombinace kolony Acquity UPLC HSS T3 (Waters), za průtoku 0,35 ml/min, teploty 30 °C při složení MF A 0,5% HCOOH v H₂O a MF B 0,5% HCOOH v acetonitrilu za postupného přidavku organické MF B (viz Obr. 36, kap. 3.2.4). Na Obr. 37 je uveden příklad optimalizace separace methylcitrátu za použití 0,1% a 0,5% HCOOH v mobilních fázích, kde je zřejmé, že při vyšší koncentraci HCOOH dochází k lepší detekci a zlepšuje se i tvar píku. Za těchto podmínek bylo možné identifikovat 124 organických kyselin, acylglycinů a acylkarnitinů. V -MRM módu se podařilo optimalizovat přechody pro 140 organických kyselin, +MRM módu pak 74 látek, převážně acylglycinů a acylkarnitinů a organických kyselin obsahující π - elektrony. Molekuly s nízkou molekulovou hmotností, jako například glykolát ($M_r=76,05$) byly měřeny v SIM módu.

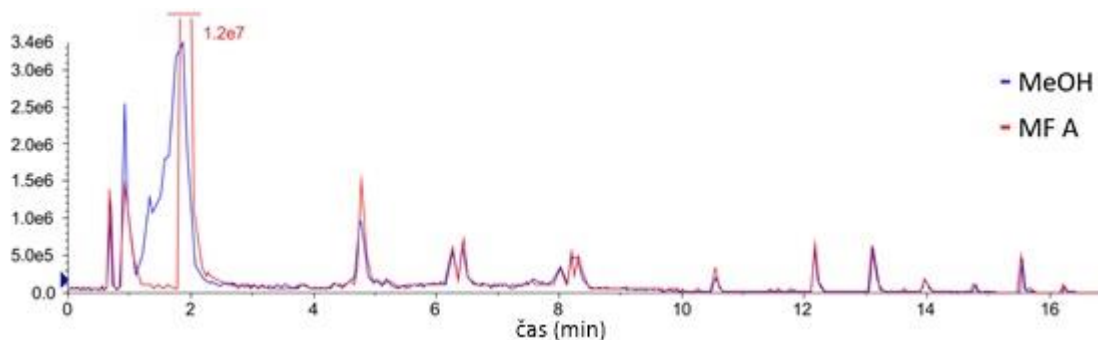


Obrázek 37 Příklad separace methylcitrátu za použití dvou různých koncentrací kyseliny mravenčí v mobilních fázích. Na horním obrázku je separace za použití 1% kyseliny mravenčí, na dolním obrázku je separace za použití 0,5 % kyseliny mravenčí.

Analyty měřené na původní instrumentaci poskytovaly dobrou lineární odezvu, na Obr. 38 je příklad kalibrační závislosti kyseliny methylmalonové bez normalizace na interní standard.



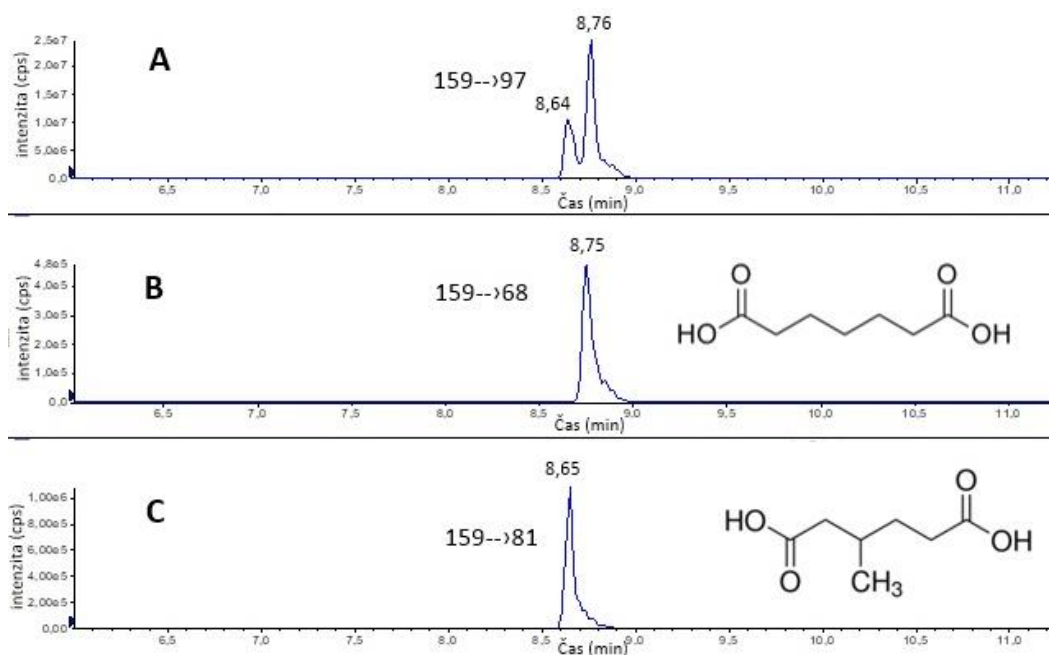
Obrázek 38 Kalibrační křivka kyseliny methylmalonové bez normalizace na interní standard, která byla sestavena pomocí analýzy kalibračních bodů nově vyvinutou LC-MS metodou na kapalinovém chromatografu UltiMate 3000 (Dionex) a hmotnostním spektrometru Triple Quad 6500 (SCIEX).



Obrázek 39 Srovnání analýzy vzorku plasmy pomocí kapalinového chromatografu UltiMate 3000 (Dionex) a hmotnostního spektrometru Triple Quad 6500 (SCIEX) za přítomnosti methanolu (modře) a po lyofilizaci rekonstituci mobilní fázi A (červeně).

Problémy způsobovala také inkompatibilita některých biologických materiálů se separačním systémem. V případě moči se vzorek pouze ředil vodou na koncentraci kreatininu 1 mmol/l. U plasmy, kterou bylo nezbytné deproteinovat methanolem, docházelo ke změně citlivosti a selektivity a také k posunutí retenčních časů analytů z důvodu méně polárního charakteru vzorku. Tento problém se podařilo vyřešit lyofilizací a následně rekonstitucí v mobilní fázi A. Srovnání analýz vzorků plasem za přítomnosti methanolu a MF A je uveden na Obr. 39.

Vzhledem k pořízení nové instrumentace poskytující vyšší citlivost pro nízkomolekulární analyty v negativním módu byla metoda převedena na nový LC-MS systém, konkrétně tedy na kapalinový chromatograf Exion LC (Sciex) ve spojení s hmotnostním spektrometrem QTRAP 6500 (Sciex). Pro vybrané organické kyseliny a acylglyciny bylo provedeno nové ladění optimálních MRM přechodů. Na Obr. 40 je uveden příklad separace izomerů kyseliny pimelové a 3-methyladipové, které nebylo možné původní instrumentací od sebe odlišit. Na novém systému byly nalezeny specifické přechody těchto izomerů a došlo tedy k úspěšné separaci a identifikaci těchto látek. Také byla zlepšena lineární odezva a citlivost (LOD a LOQ) analytů. Při porovnání analýzy kyseliny methylmalonové, která na původní instrumentaci vykazovala lineární odezvu s koeficientem determinace $R^2=0,9967$ a limitem detekce 0,30 $\mu\text{mol/l}$, tak na novém LC-MS systému byly naměřeny $R^2=0,9983$ s LOD 0,06 $\mu\text{mol/l}$.



Obrázek 40 Separace izomerů kyseliny pimelové a 3-methyladipové, pro které bylo možné nalézt díky hmotnostnímu spektrometru QTRAP 6500 specifické přechody. Na obrázku A je analýza za společného MRM přechodu 159→97, na obrázku B je analýza těchto izomerů za nalezení specifického přechodu 159→68 pro kyselinu pimelovou a strukturní vzorec této kyseliny, na obrázku C je analýza těchto izomerů za nalezení specifického přechodu 159→81 pro kyselinu 3-methyladipovou a strukturní vzorec této kyseliny.

4.1.2 Kalibrační křivky metabolitů

Před samotnou analýzou musely být upraveny hodnoty kolizních energií pro vybrané metabolity, které vykazovaly příliš vysokou abundanci. Konkrétně byly zvýšeny o 15 eV. Údaje jsou uvedeny v Tab. 9.

Tabulka 9 Údaje o upravených hodnotách kolizních energií pro vybrané metabolity.

Metabolit	MRM	Původní hodnota CE (eV)	Upravená hodnota CE (eV)
Kyselina sebaková_1	-	-22	-37
Kyselina sebaková_2	-	-26	-41
Isocitrát	-	-20	-35
Kyselina 2-hydroxyglutarová	-	-14	-29
Malát_1	-	-14	-29
Malát_2	-	-22	-37
Citrát	-	-24	-39
Kyselina fenoxyoctová	-	-20	-35
2-oxoglutarát_1	-	-12	-27
2-oxoglutarát_2	-	-14	-29
C5 Isovaleryl-L-karnitin	+	25	40

Tabulka 9 Údaje o upravených hodnotách kolizních energií pro vybrané metabolity *pokračování*.

Metabolit	MRM	Původní hodnota CE (eV)	Upravená hodnota CE (eV)
C4 isobutyryl-L-karnitin	+	25	40
C8:1 2-oktenoyl-L-karnitin	+	27	42
C0 L-karnitin	+	29	44
N-acetylaspartát_1	+	13	28
N-acetylaspartát_2	+	21	36
4-aminobutyrát_1	+	29	44
4-aminobutyrát_2	+	13	28
Pyroglutamát	+	17	32
Kyselina hippurová_1	+	43	58
Kyselina hippurová_2	+	15	30

Po analýze všech kalibračních směsí byly vyhodnoceny kalibrační křivky za použití vybraného interního standardu integrací ploch píků za použití vážení 1/y. Dále byly vypočítány hodnoty limitu detekce (LOD) a kvantifikace (LOQ). LOD byl vypočítán podle vzorce: $LOD = \frac{3 \cdot N}{S} * c$.

N – intenzita odezvy blanku;

S – intenzita odezvy standardu;

c – koncentrace, při níž byl pozorován odpovídající signál S

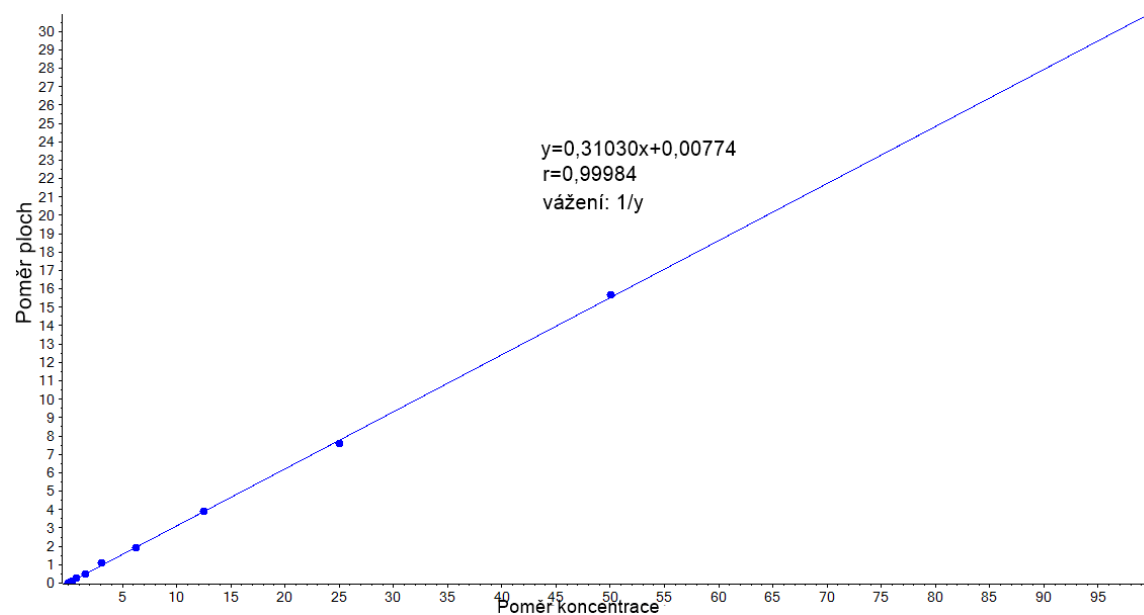
LOQ byl vypočítán jako: $LOQ = LOD * 3,33$. Podle funkčních skupin a substituentů ve struktuře jednotlivých metabolitů byly voleny odpovídající interní standardy. Pro karnitiny byl zvolen isovaleryl-L-karnitin-D9 (Iva-CarZ), pro glycinu hexanoylglycin- $^{13}C_2$, ^{15}N (HGZ), pro monokarboxylové alifatické kyseliny byl vybrán laktát- $^{13}C_3$ (LacZ), pro heterocyklické sloučeniny kyselina pipekolová- ^{13}C (PZ), pro fenolické kyseliny kyselina homovanilová- $^{13}C_6$, ^{18}O (HVAZ), pro dikarboxylové kyseliny kyselina methyl-d 3 -malonová (MMAD) a pro trikarboxylové methyl-d 3 -citronová kyselina (MeCitZ).

Pro většinu metabolitů byly hodnoty korelačních koeficientů lepší než 0,98. V 11 případech metabolitů ale hodnoty této korelace nedosáhlo, tyto hodnoty jsou zvýrazněny v příloze č. 3 červeně, v případě karnitinu C18 a 4-hydroxyglutamátu nebyla dosažena lineární odezva. V případě N-acetylaspartátu se po úpravě CE nedařilo vůbec detekovat píky, a tudíž ani sestavit kalibrační přímku a vypočítat hodnoty LOD a LOQ. Tyto

problémy budu dále rozebírat v diskuzi. Pro ukázkou je níže přiložena kalibrační křivka glycerátu a tabulka č. 10 s hodnotami LOD a LOQ glycerátu. Hodnoty korelačních koeficientů, LOD a LOQ všech metabolitů jsou uvedeny v příloze 3.

Tabulka 10 Údaje o intenzitách píků standardu příslušné koncentrace, vypočítané LOD a LOQ a korelační koeficienty glycerátu spolu s údaji o příslušné směsi, horním kalibračním bodu a interním standardu.

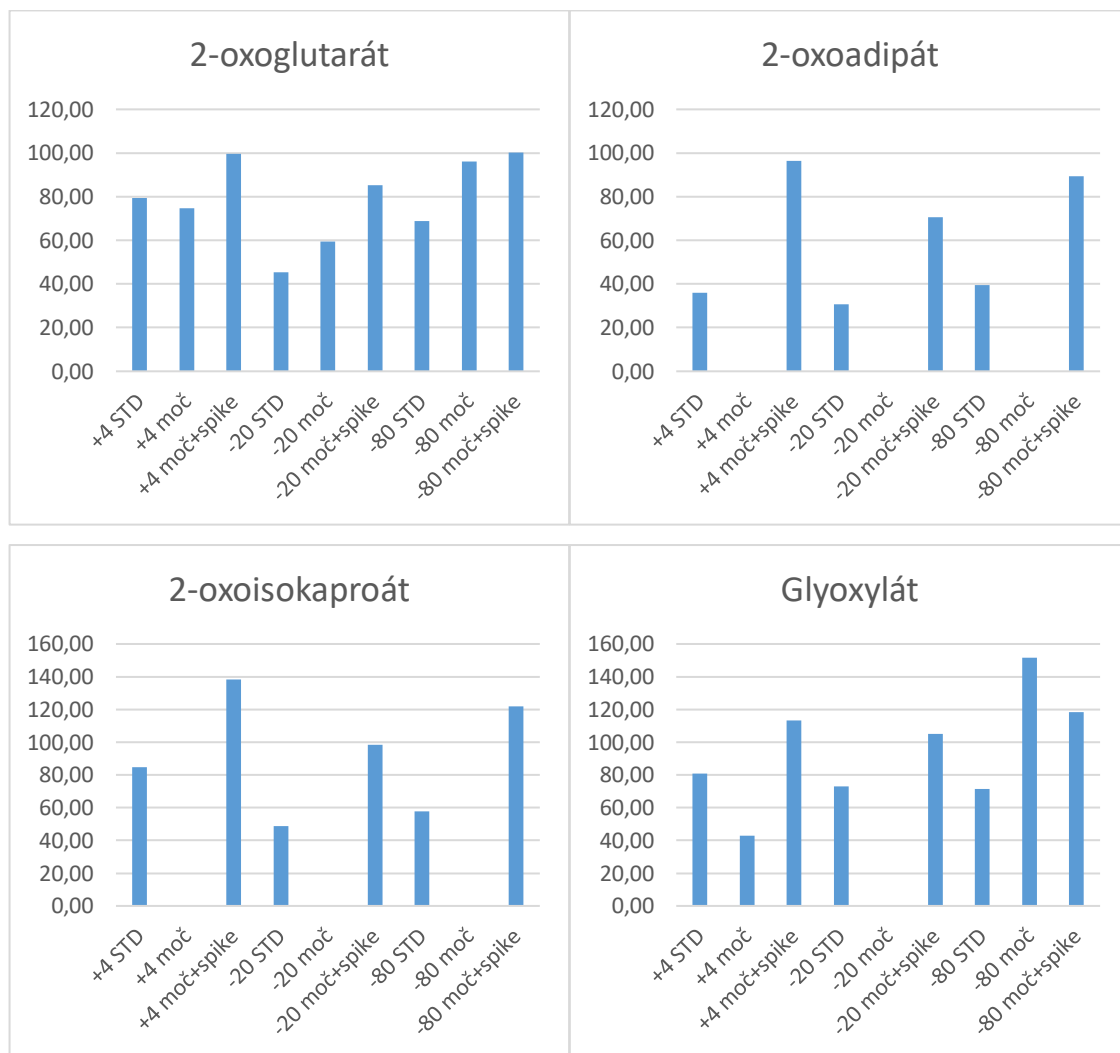
Název metabolitu	směs	horní kalibrační bod (μM)	Interní standard	S	N	c (μM)	LOD (μM)	LOQ (μM)	Korelační koeficient r
Glycerát	4	1,00E+2	LacZ	3,15E+03	3,15E+02	0,1953	5,86E-02	1,95E-01	0,9998



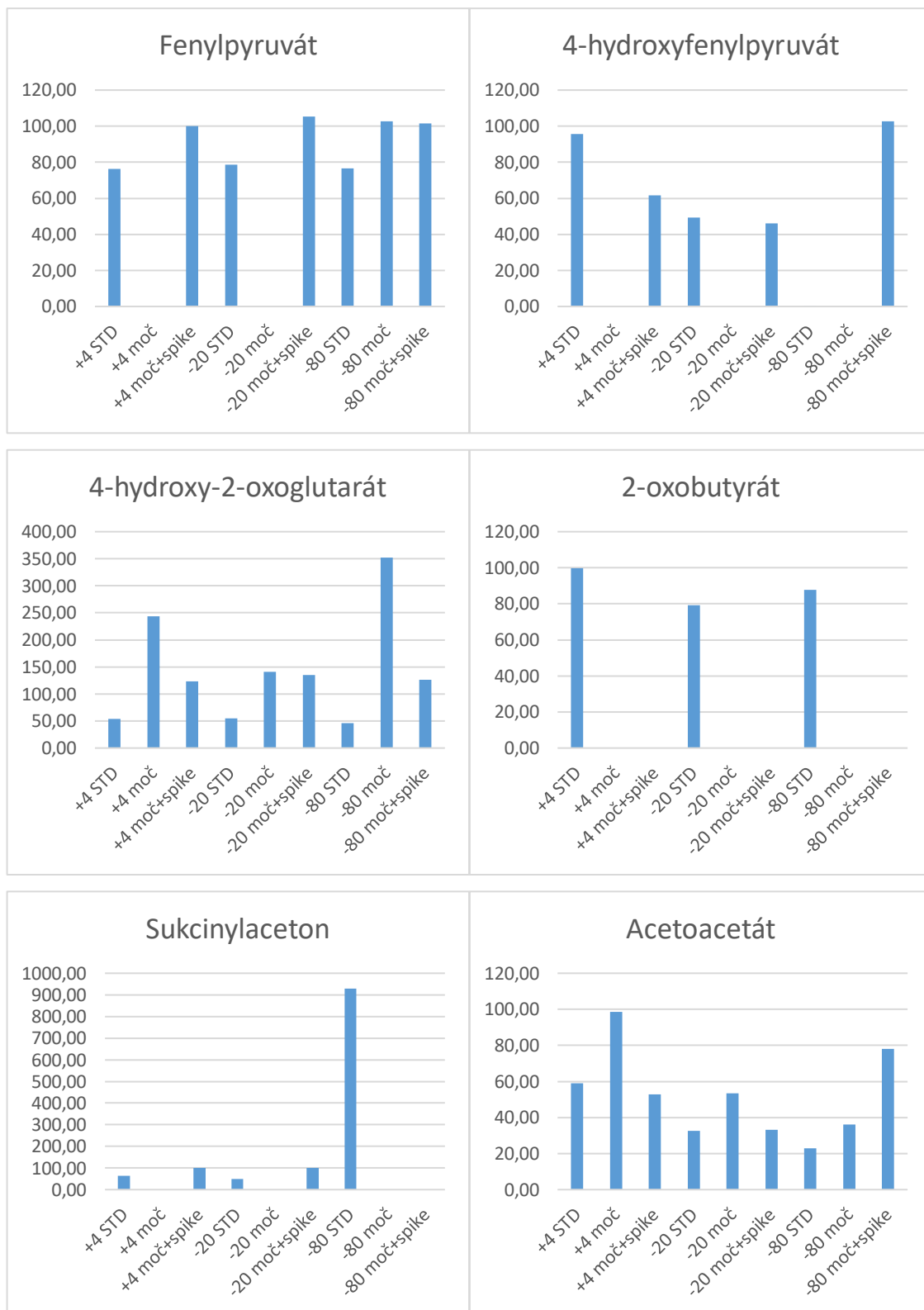
Obrázek 41 Graf kalibrační závislosti glycerátu. Na ose y se nachází poměr ploch pod píkem mezi glycerátem a interním standardem laktátem $^{13}C_3$, na ose x je potom poměr koncentrací. Graf byl vygenerován v softwaru Multiquant 3.0.3. (SCIEX) a upraven do českého jazyka.

4.1.3 Stabilita oxokyselin

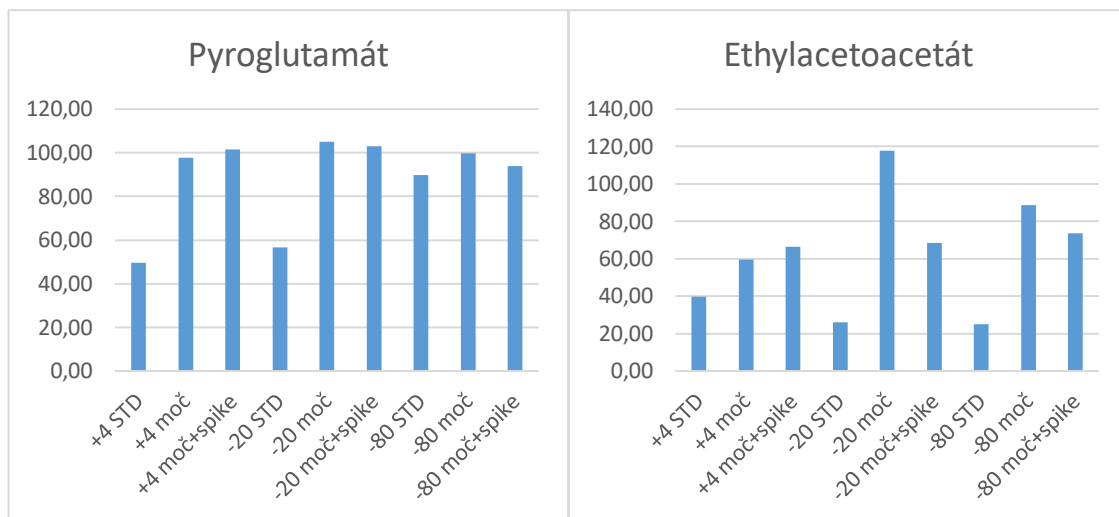
Stabilita 12 oxokyselin ve vodných vzorcích, moči a moči se směsí těchto oxokyselin byla měřena po 1 měsíci skladování za různé teploty (+4 °C, -20 °C a -80 °C). Posléze bylo vypočítáno procentuální zastoupení těchto oxokyselin ve vzorcích oproti čerstvým standardům.



Obrázek 42 Grafy relativní změny (%) oxokyselin při skladování za různých podmínek ve srovnání s čerstvě připravenými vzorky.



Obrázek 43 Grafy relativní změny (%) oxokyselin při skladování za různých podmínek ve srovnání s čerstvě připravenými vzorky.



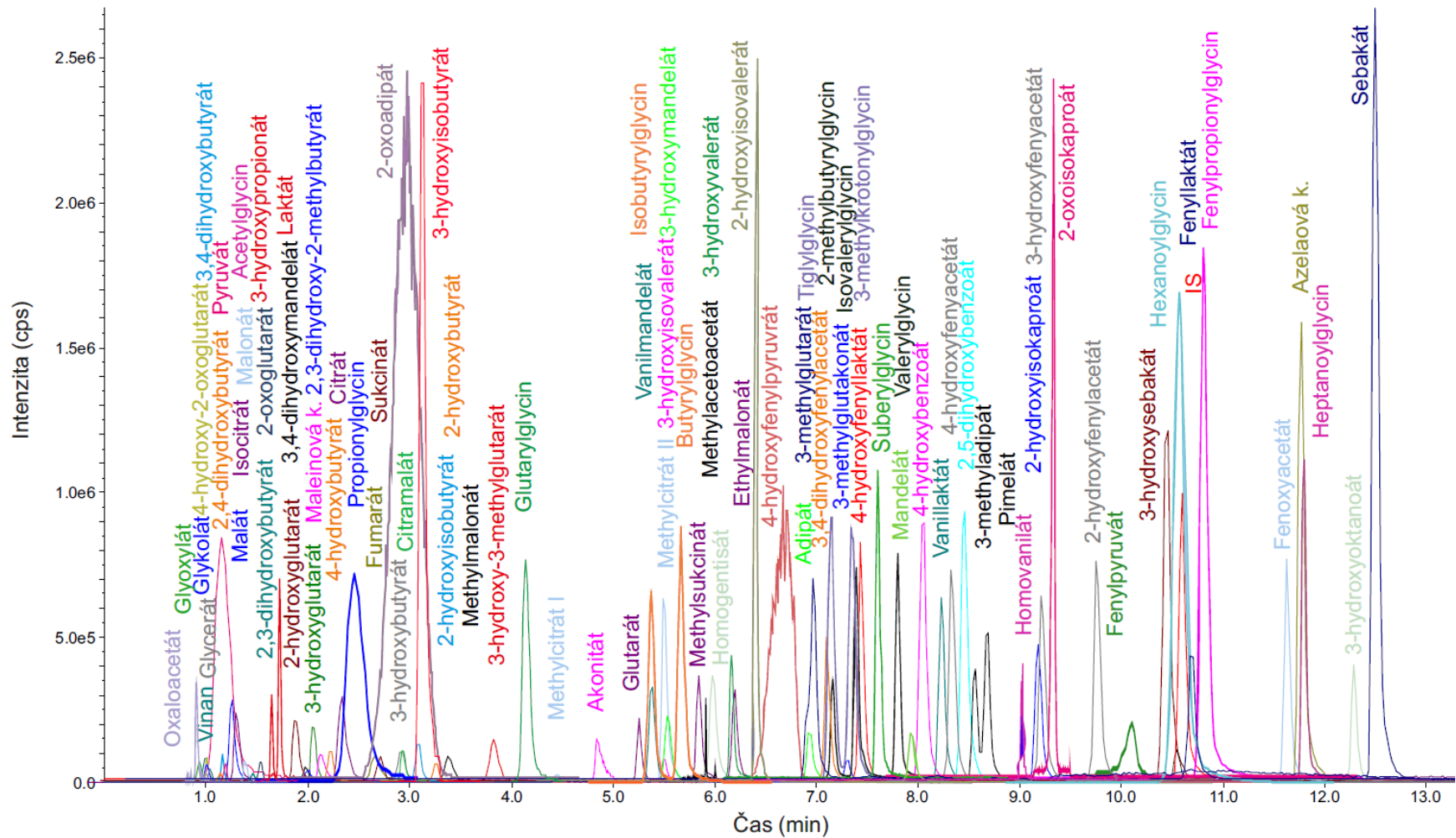
Obrázek 44 G Grafy relativní změny (%) oxokyselin při skladování za různých podmínek ve srovnání s čerstvě připravenými vzorky.

Jako nejlepší teplota pro skladování roztoků standardů se průměrně jeví +4 °C, až na 2-oxoadipát, který je mírně stabilnější při -80 °C, dále také 4-hydroxy-2-oxoglutarát, který vykazuje lepší stabilitu při -20 °C a pyroglutamat, jehož stabilita klesá od -80 °C po +4 °C. Nejstabilnější teplotou pro skladování moči z hlediska oxokyselin je -80 °C, při níž většina oxokyselin vykazuje koncentraci nad 80 % původní koncentrace. Výjimkou je acetoacetát, jehož stabilita klesá od +4 °C po -80 °C. Dále pak také pyroglutamat a ethylacetoacetát, které vykazují mírně vyšší stabilitu v moči při -20 °C. Některé oxokyseliny nebyly v moči fyziologicky přítomny, nebo je jejich koncentrace mimo limit detekce. Pro zjištění jejich stability v močích bylo nutné přidat jejich směs do této matrice. Při všech teplotách je většina těchto oxokyselin v matrici velmi stabilní, výjimku tvoří acetoacetát a 4-hydroxyfenylpyruvát, u kterých koncentrace při -20 °C klesá pod 50 % původní koncentrace. 2-oxoglutarát, glyoxylát a 4-hydroxy-2-oxoglutarát vykazovaly stejný trend, a tedy, že v matrici jsou nejstabilnější při -80 °C, stejně tak pyroglutamat, který byl v matrici nejstabilnější při -20 °C. Naopak acetoacetát ethylacetoacetát byly po přidání do moči nejstabilnější při -80 °C. 2-oxoadipát, 2-oxoisokaproát a sukcinylaceton pak vykazují nejvyšší stabilitu při +4 °C po jejich přidání do moči, přičemž v čisté nebyly detekovány. Fenylpyruvát je pak nejvíce stabilní při -20 °C, i když je jeho stabilita v matrici při všech třech teplotách velmi vyrovnaná. 2-oxobutyryát bylo možné detekovat pouze jako čistý standard, ani po jeho přidání do moči jej nebylo možné detekovat.

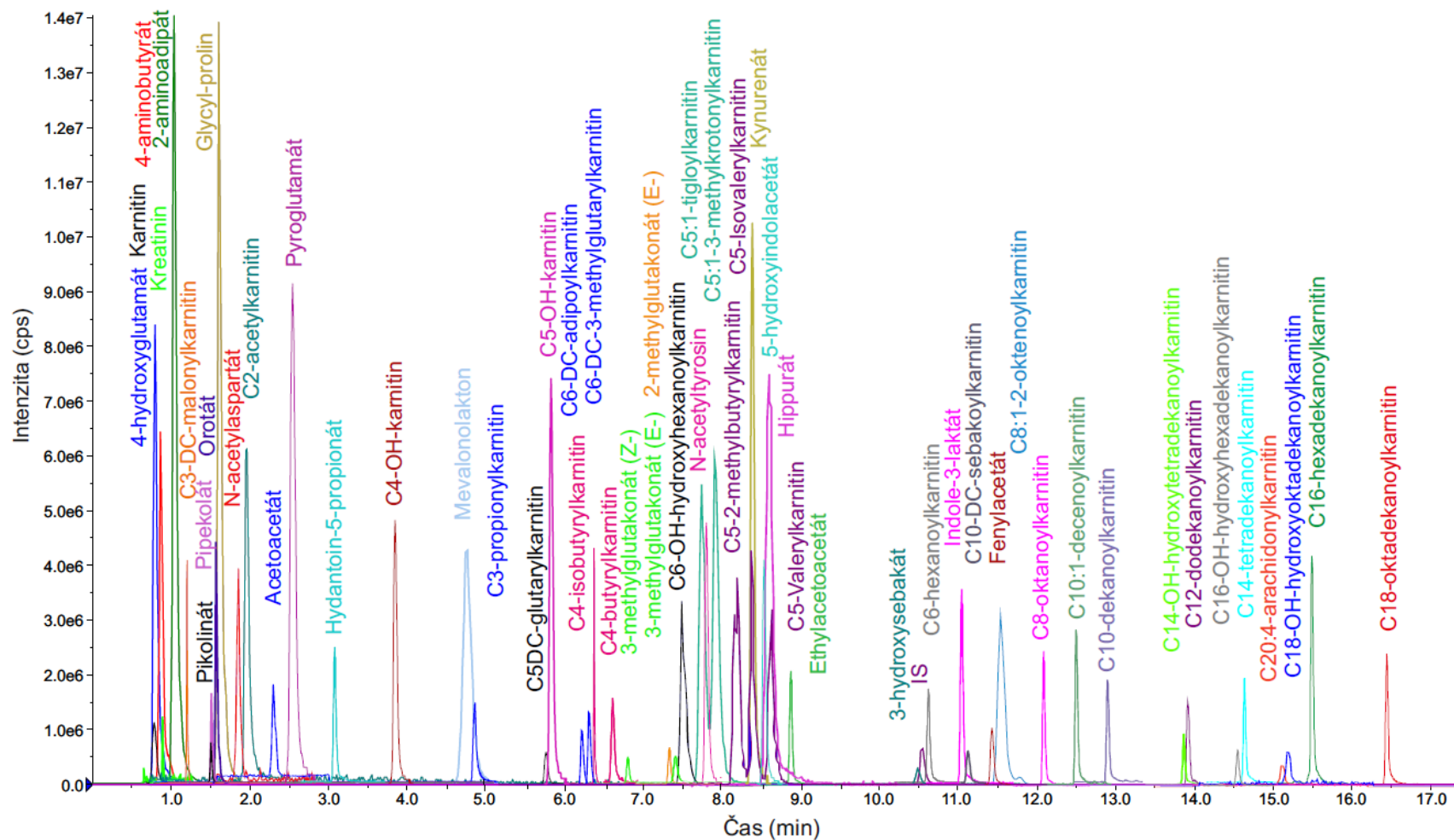
4.2 Finální LC-MS metoda

Po optimalizaci MRM přechodů a separaci standardů organických kyselin a dalších látek byly vybrány ty, které vykazovaly nejvyšší hodnotu S/N a byla tak vytvořena finální metoda pro detekci těchto metabolitů s údaji o prekurzorovém a produktovém iontu, retenčním čase, DP, CE, CP a CXP. V +MRM módu bylo naladěno celkem 97 přechodů a v -MRM 150 přechodů. Tyto údaje jsou uvedeny v tabulce v přílohách 1 a 2. Jelikož některé metabolity nebyly k dispozici ve formě čistého standardu, optimalizace jejich MRM přechodů proběhla za pomoci vzorku pacientů, konkrétně se jednalo o karnitiny C4-OH a C5-OH, methylacetoacetát a glutarylglycin. Glutarylglycin byl později obdržen i jako čistý standard, a byl použit na přípravu kalibrační směsi acylglycinů.

Na Obr. 45 a 46 jsou uvedeny obrázky s chromatografickými profily jednotlivých metabolitů v +MRM a -MRM módu. Dále byly vytvořeny fragmentační tabulky na základě separace standardů o koncentraci 3 μ M acylglycinů, 1 μ M acylkarnitinů a 100 μ M organických kyselin. Jsou rozděleny podle skupin na acylglyciny, acylkarnitiny a organické kyseliny dle počtu karboxylových skupin. Tyto tabulky obsahují údaje o všech produktových iontech, jejich možné struktuře a intenzitách jejich odezvy pro každý metabolit. Tyto tabulky jsou s ohledem na jejich velikost na vyžádání u autora.

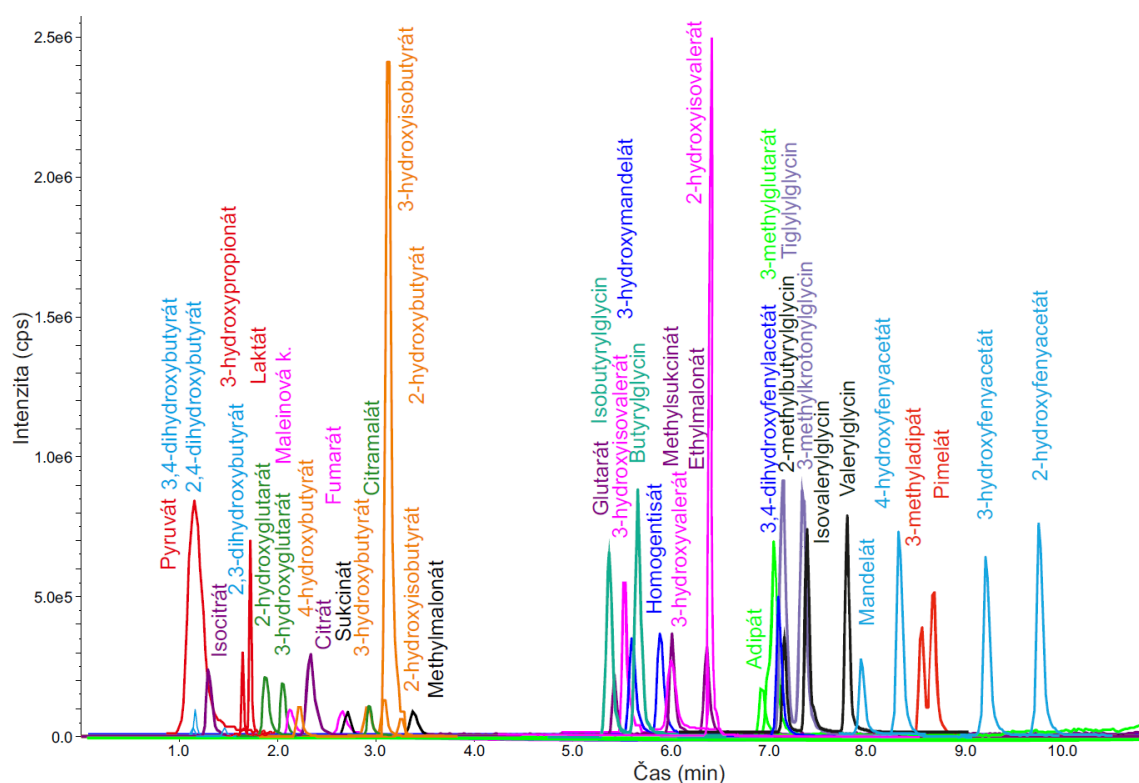


Obrázek 45 Chromatografický profil standardů organických kyselin a acylglycinů detekovaných v -MRM módu.

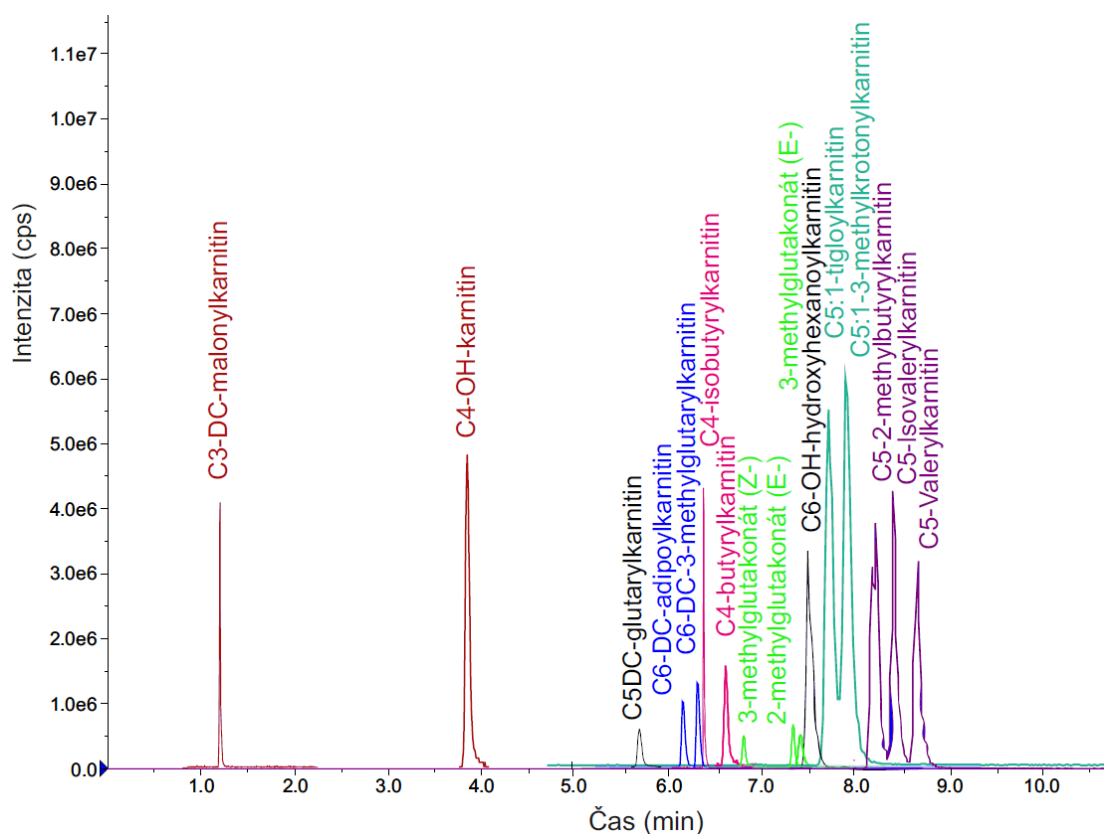


Obrázek 46 Chromatografický profil standardů organických kyselin a acylkarnitinů v +MRM módu.

Metodou bylo také možno separovat veškeré izomery metabolitů. Podařilo se nalézt specifické přechody pro většinu izomerů kromě vybraných látek: C4, C5 a C5:1; burytyl- a isobutyrylglycin; 2- methylbutyryl-, isovaleryl- a valerylglycin; 3-methylkrotonyl- a tiglylglycin; 2- hydroxybutyrát a 2-hydroxyisobutyrát; 3-hydroxyvalerát a 3-hydroxyisovalerát. Tyto metabolity se ovšem podařilo od sebe chromatograficky separovat, dle rozdílných retenčních časů, což je nezbytné pro rozlišení vybraných DMP. Separace izomerů detekovaných v -MRM a +MRM módu jsou uvedeny na Obr. 47 a 48.



Obrázek 47 Chromatografický profil separovaných izomerů, které jsou detekovány v -MRM módu. Jednotlivé izomery jsou vyobrazeny stejnou barvou.



Obrázek 48 Chromatografický profil separovaných izomerů, které jsou detekovány v +MRM módu. Jednotlivé izomery jsou vyobrazeny stejnou barvou.

4.3 Diagnostika pacientů

Byla provedena analýza 32 vzorků moči zdravých kontrol a vybraných pacientů s DMP. Ve třech případech se jednalo o jeden subjekt, kterému byly provedeny 3 odběry (P10) v různých dnech. Dle kalibračních závislostí byly u vzorků spočítány koncentrace jednotlivých metabolitů, ty nejvíce diskriminující dané onemocnění uvedeny v Tab. 11. Z těchto údajů byla posléze provedena diagnostika pacientů, která byla ověřena rutinně používanou GC-MS metodou.

Tabulka 11 Vyhodnocení diagnosticky významných metabolitů pro vybraná onemocnění a jejich srovnání s fyziologickými hodnotami, které byly naměřeny touto metodou, případně jsou doplněny o hodnoty z databází a literatury. Koncentrace jsou uvedeny v jednotkách $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ kreatininu.

Metabolit	Fyziologická koncentrace ($\mu\text{mol}/\text{mmol}$ cr)	Patologická koncentrace ($\mu\text{mol}/\text{mmol}$ cr)	Pacient
Acetylglycin	0,07-8,87	18,15	P15
Propionylglycin	0,00-0,51	27,92	P10_1
		232,83	P10_2
		47,36	P10_3
Tiglylglycin	0,11-5,21* v lit. až 7,60	9,47	P10_1
		20,76	P10_2
		14,48	P10_3
		43,09	P30
Glutarylglýcin	0.03-0.78	10,01	P27
		4,02	P28
C0 L-karnitin	0.74-20.96	936,2	P10_1
		55,65	P27
		55,98	P28
C2 acetylkarnitin	0,07-6,64	30,22	P7
		11,61	P10_2
		9,16	P13
		11,12	P20
		8,2	P25
		9,49	P27
		11,67	P28
C3 propionylkarnitin	0,004-1,14	38,27	P10_1
		40,81	P10_2
		45,31	P10_3
C5DC glutaryl-karnitin	0,06-1,69* v lit až 5,10	22,35	P27
		31,85	P28
C5:1 3-methylkrotonylkarnitin	0.0002-0.25	0,79	P10_1
		1,61	P10_2
		1,45	P10_3
		2,68	P30
Methylmalonát	0,55-33,17	1169,04	P10_1
		1908,16	P10_2
		1105,38	P10_3
2-hydroxyisokaproát	0,00-2,05	7,33	P10_2
		231,15	P15
2-oxoisokaproát	0,04-1,49* v lit. až 37,00	176,87	P10_2
		1429,65	P15
2-hydroxyisovalerát	0,00-5,27* v lit. až 12,00	247,02	P10_2
		4553,88	P15
3-hydroxyvalerát	0,00-8,09	347,03	P10_2

Tabulka 11 Vyhodnocení diagnosticky významných metabolitů pro vybraná onemocnění a jejich srovnání s fyziologickými hodnotami, které byly naměřeny touto metodou, případně jsou doplněny o hodnoty z databázi a literatury. Koncentrace jsou uvedeny v jednotkách $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ kreatininu *pokračování*.

Metabolit	Fyziologická koncentrace ($\mu\text{mol}/\text{mmol}$ cr)	Patologická koncentrace ($\mu\text{mol}/\text{mmol}$ cr)	Pacient
		12,58	P10_3
3-hydroxyisovalerát	0,00-35,79* v lit. až 66,00	70,02	P10_1
		1045,29	P10_2
		92,54	P10_3
		76,47	P15
Laktát	2,07-185,93	268,87	P10_1
		15887,04	P10_2
		270,91	P10_3
		1827,73	P15
3-hydroxyprípionát (laktát_b)	0,00-64,75* v lit až 93,00	552,69	P10_1
		5255,65	P10_2
		659,61	P10_3
2-oxobutyát	6,09-76,07	229,86	P10_1
		1307,02	P10_2
		242,19	P10_3
		284,43	P15
Pyruvát	0,08-41,87* v lit až 59,00	602,74	P10_2
Kyselina vinná	4,20-47,44* v lit. až 64,40	121,88	P7
		76,58	P10_1
		126,68	P10_2
		134,51	P10_3
		161,52	P17
		345,55	P27
		306,73	P28
2-methylglutakonát	0,00-2,85	14,72	P10_1
		9,16	P10_2
		28,54	P10_3
3-methylglutakonát	2,36-29,91	33,29	P7
		40,75	P10_1
		111,18	P10_2
		82,6	P10_3
		31,82	P17
		35,93	P19
3-methyladipát	0,18-4,20* v lit. až 7,20	34,68	P10_1
		50,25	P10_2
		31,98	P10_3
Glutarát	0,13-13,41	48,34	P10_1
		131,82	P10_2
		39,89	P10_3

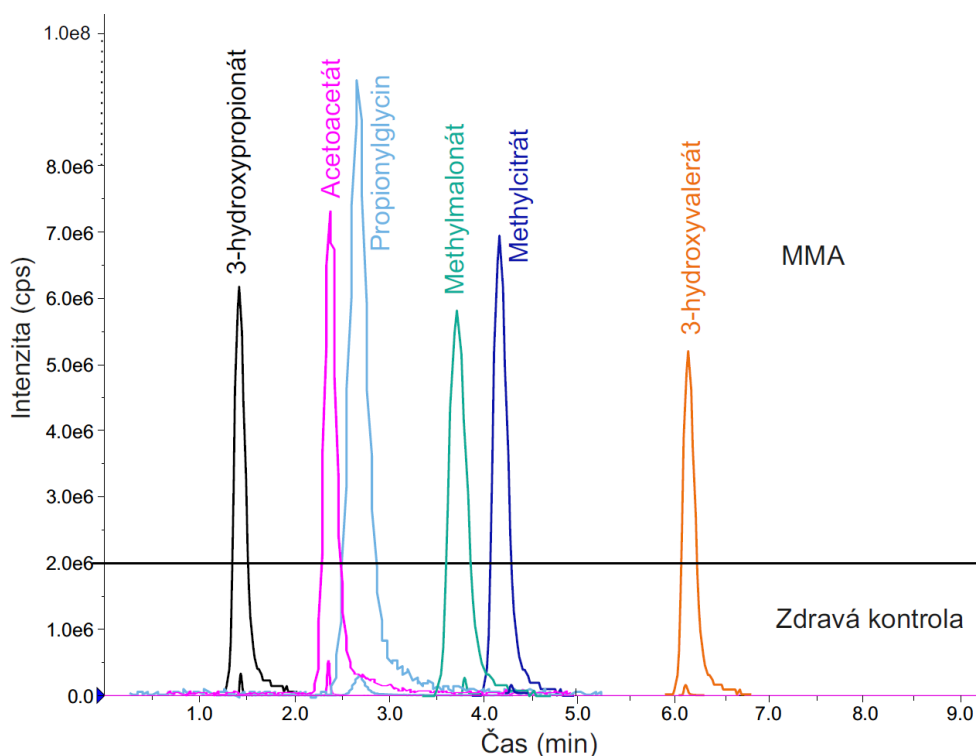
Tabulka 11 Vyhodnocení diagnosticky významných metabolitů pro vybraná onemocnění a jejich srovnání s fyziologickými hodnotami, které byly naměřeny touto metodou, případně jsou doplněny o hodnoty z databázi a literatury. Koncentrace jsou uvedeny v jednotkách $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ kreatininu *pokračování*.

Metabolit	Fyziologická koncentrace ($\mu\text{mol}/\text{mmol}$ cr)	Patologická koncentrace ($\mu\text{mol}/\text{mmol}$ cr)	Pacient
		70,17	P27
		191,91	P28
Acetoacetát	0,00-29,72	2399,18	P7
		537,64	P10_1
		40171,89	P10_2
		985,36	P10_3
		2240,43	P15
		295,26	P13
		507,3	P20
		606,73	P25
		58,84	P26
		48,74	P29
Fumarát	0,31-26,89* v lit. až 34,00	130,94	P10_1
		558,78	P10_2
		266,93	P10_3
2-hydroxybutyrát	0,24-8,32	32,39	P7
		147,63	P10_2
		14,38	P13
		89,88	P15
		11,37	P17
		11,83	P20
2-hydroxyisobutyřát	0,20-16,27	195,8	P7
		1650	P10_2
		34,27	P10_3
		35,84	P13
		259,5	P15
		49,55	P20
3-hydroxybutyrát	0,08-52,58* v lit až 100,00	635,1	P7
		5126	P10_2
		113,4	P10_3
		115,4	P13
		833,9	P15
		152,4	P20
3-hydroxyisobutyřát	2,43-33,03* v lit. až 48,00	250,1	P10_2
		53,62	P15
2-methylcitrát	1,70-20,81	1932,7	P10_1
		2447,6	P10_2

Tabulka 11 Vyhodnocení diagnosticky významných metabolitů pro vybraná onemocnění a jejich srovnání s fyziologickými hodnotami, které byly naměřeny touto metodou, případně jsou doplněny o hodnoty z databázi a literatury. Koncentrace jsou uvedeny v jednotkách $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ kreatininu *pokračování*.

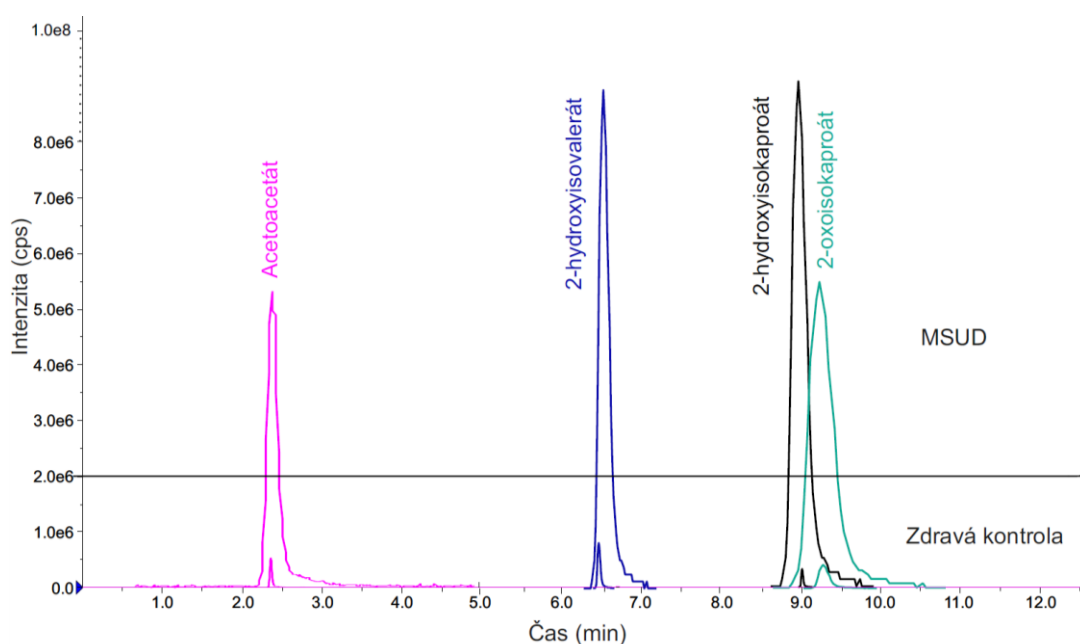
Metabolit	Fyziologická koncentrace ($\mu\text{mol}/\text{mmol}$ cr)	Patologická koncentrace ($\mu\text{mol}/\text{mmol}$ cr)	Pacient
3-hydroxyglutarát	0,70-14,63* v lit. až 44,00	1789,6	P10_3
		84,7	P27
		155,51	P28

Pacient P10 je děvče, ročník 2017, kterému byly provedeny 3 kontrolní odběry v průběhu 3 týdnů v období srpen-září 2019. Zvýšená koncentrace některých metabolitů, především kyseliny methylmalonové, 3-hydroxypropionové, propionylglycinu a 3-hydroxyvalerové kyseliny, ukazují methylmalonovou acidurii. Je zřejmé, že tato pacientka také trpí častou ketózou, a to především kvůli vysokým koncentracím acetoacetátu a 3-hydroxybutyrátu a také laktátovou acidózou vzhledem k vysokým koncentracím laktátu, pyruvátu, 2-hydroxybutyrátu, 2-hydroxyisobutyrate a 3-hydroxyisobutyrate. Rozdíl v metabolickém profilu nejvíce signifikantních metabolitů mezi zdravou kontrolou a pacientem s MMA je uveden na Obr. 49.



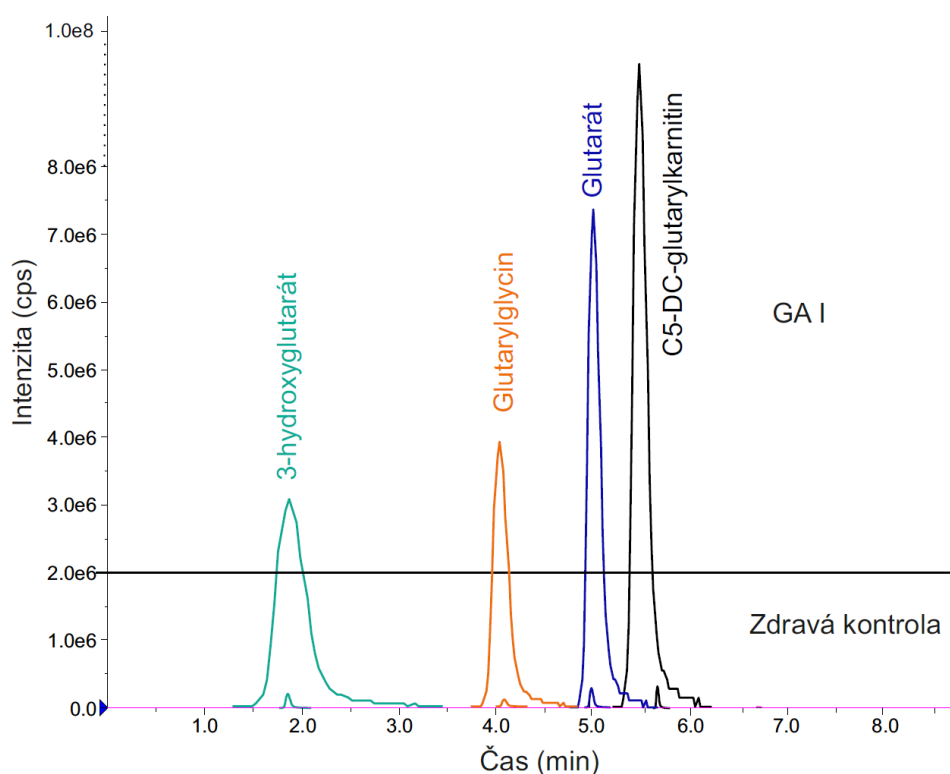
Obrázek 49 Porovnání metabolického profilu nejvíce signifikantních biomarkerů u vzorku pacienta s methylmalonovou acidémií ve srovnání se kontrolním vzorkem zdravého jedince.

P15 je chlapec, ročník 2019, který má v moči přítomnou velmi vysokou koncentraci kyselin 2-hydroxy a 2-oxoisokaproové a 2-hydroxyisovalerové a dalších 2-oxo- a 2-hydroxykyselin, což je charakteristickým znakem pro leucinózu (MSUD). Stejně jako v předchozím případě i tento pacient trpí častou ketózou a laktátovou acidózou vzhledem ke zvýšeným koncentracím ketolátek, laktátu, 2-hydroxybutyrátu, 2-hydroxyisobutyátu a 3-hydroxyisobutyátu. Rozdíl v metabolickém profilu nejvíce signifikantních metabolitů mezi zdravou kontrolou a pacientem s MSUD je uveden na Obr. 50.



Obrázek 50 Porovnání metabolického profilu nejvíce signifikantních biomarkerů u vzorku pacienta s leucinózou (MSUD) ve srovnání se kontrolním vzorkem zdravého jedince.

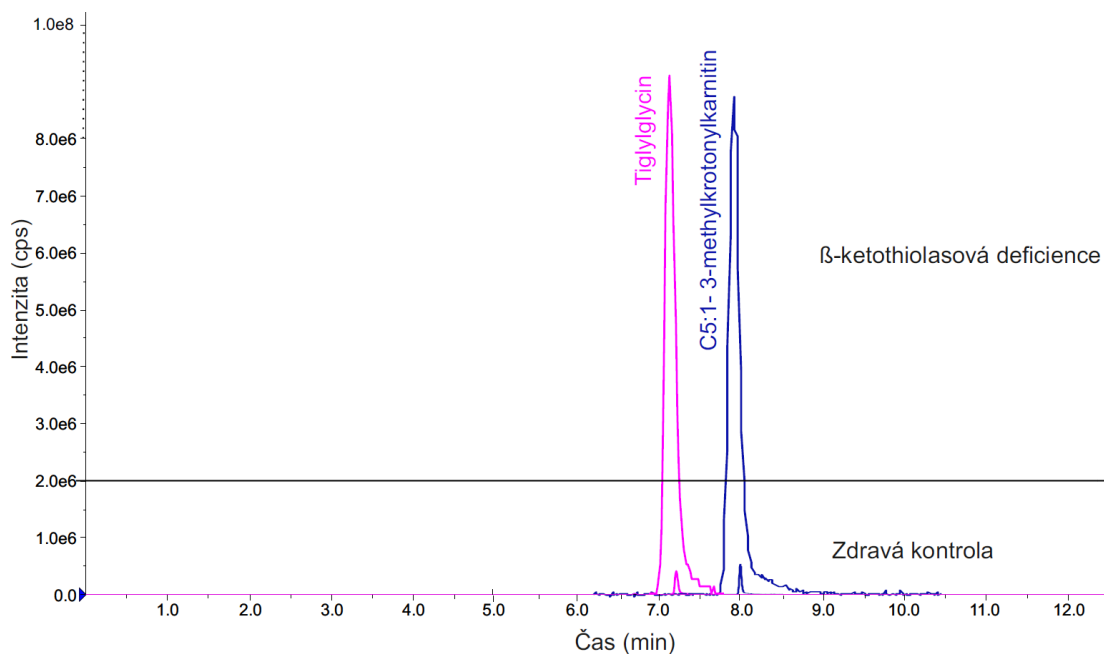
V případě pacientů P27 a P28 se jedná o sourozence ve věku 17 a 10 let s glutarovou acidurií typu 1, což dokazuje vysoká koncentrace 3-hydroxyglutarátu, glutarátu a glutarylkarnitinu v jejich moči, jakožto typických biomarkerů tohoto onemocnění. Jejich moč obsahuje také vysokou koncentraci acetylkarnitinu a karnitinu, které odkazují na možnou ketózu nebo suplementaci karnitinem. Rozdíl v metabolickém profilu nejvíce signifikantních metabolitů mezi zdravou kontrolou a pacientem s GA I je uveden na Obr. 51.



Obrázek 51 Porovnání metabolického profilu nejvíce signifikantních biomarkerů u vzorku pacienta s glutarovou acidurií typu I (GA I) ve srovnání se kontrolním vzorkem zdravého jedince.

Pacient P30 je dívka, ročník 2016, která má v moči vysoký obsah tiglylglycinu, jehož vysoká koncentrace se vyskytuje u více druhů DMP, konkrétně β -ketothiolasová deficiencie, 2-methyl-3-hydroxybutyryl-CoA-dehydrogenasová deficiencie, deficiencie monokarboxylátového transporteru I, mnohonásobná karboxylasová deficiencie a propionová acidémie. Dalším zvýšeným metabolitem vyskytující se u této pacientky byl 3-methylkrotonylkarnitin, jehož vysoká koncentrace potvrzuje, že pacientka trpí β -ketothiolasovou deficiencí. Rozdíl v metabolickém profilu nejvíce signifikantních metabolitů mezi zdravou kontrolou a pacientem s MMA je uveden na Obr. 52.

Moče dalších pacientů obsahovaly zvýšené koncentrace některých metabolity, ačkoliv u nich nebyla prokázána žádná dědičná metabolická porucha. Pacienti P7, P13, P20 a P25 mají zvýšenou koncentraci acetylkarnitinu, což může být následek suplementace karnitinem nebo ketózy. Ketózu by potvrzovala také přítomnost zvýšené koncentrace ketolátek, acetoacetátu a 3-hydroxybutyrátu. Vzorky P7, P13 a P20 obsahují vyšší koncentraci 2-hydroxyisobutyryátu a spolu s P17 i 2-hydroxybutyrátu, což může značit laktátovou acidózu. Není ovšem potvrzené, že by tyto pacienty trpěli nějakou formou DMP. V některých vzorcích byla přítomna zvýšenou koncentraci také kyseliny vinné, která ale není spojována s žádnou dědičnou metabolickou poruchou a v největší míře se do těla dostává potravou.



Obrázek 52 Porovnání metabolického profilu nejvíce signifikantních biomarkerů u vzorku pacienta s β -ketothiolasovou deficiencí ve srovnání se kontrolním vzorkem zdravého jedince.

5 DISKUZE

Touto nově vyvinutou LC-MS metodou je možné analyzovat 151 metabolitů. Na koloně Acquity UPLC HSS T3 C18 dochází k jejich separaci dle snižující se polaridy zvyšováním podílu acetonitrilu (viz. Obr. 45 a 46). Tento typ kolony obsahuje „velmi silné částice silikagelu“ (high strength silica), které odolávají kyselé hydrolyze a zajišťují dlouhou životnost kolony. Dále zajišťuje tzv. T3 vazbu využívající trifunkční C18 alkylovou fázi, která podporuje retenci polárních látek a je kompatibilní s vodnou mobilní fází. Navíc T3 „end-capping“ je více efektivní než tradiční trimethylsilanový (TMS). Tato kombinace T3 vazby a end-cappingu zvyšuje životnost, selektivitu a stabilitu kolony a zlepšuje tvar píku. Chuang *et al.* (2009) provedli analýzu acetoacetátu, pyruvátu a dalších příbuzných látek a kvůli vysoké polaritě, hydrofilite a slabé retenci těchto látek na reverzní fázi bylo nutné je derivatizovat a extrahovat pro zlepšení podmínek pro MS analýzu, nebo byly separovány na HILIC koloně (Inoue *et al.*, 2016).

Většina metabolitů analyzovaných touto metodou vykazuje nejvyšší odezvu v negativním módu, což je očekávatelné vzhledem k povaze organických kyselin. V pozitivním módu mají pak nejvyšší odezvu látky obsahující dusík (výjimkou tvoří acylglyciny, které mají lepší odezvu v negativním módu), nebo některé látky obsahující systém π -elektronů (např. fenylactová kyselina). Kalibrační křivky byly vyhodnoceny celkem pro 140 metabolitů, jejichž korelační koeficienty nabývaly hodnot $r > 0,98$. Metabolity C16 hexadekanoyl-L-karnitin, C16-OH 3-hydroxyhexadekanoyl-L-karnitin, C18 oktadekanoyl-L-karnitin, C18-OH 3-hydroxyoktadekanoyl-L-karnitin, 3,4-dihydroxymandlová k., 2,5-dihydroxybenzoát (gentisát), 2,5-dihydroxyfenylacetát (homogentisát), sukcinylaceton, acetoacetát, 2-oxoisokaproát a 4-hydroxyglutamát vykazovaly tyto hodnoty nižší. Karnitiny C16, C16-OH, C18 a C18-OH jsou tvořeny dlouhým nepolárním řetězcem a eluují se z kolony jako jedny z posledních, což by mohlo mít vliv na jejich kvantifikaci.

V porovnání s LC-QTOF metodou Körver-Keularts *et al.* (2018) tato metoda vykazuje lepší citlivost, kdy u 105 metabolitů je LOQ $< 1 \mu\text{mol/l}$. Dokonce pro acylkarnitiny není ojedinělé, že je tento limit řádově 10^{-2} - $10^{-5} \mu\text{mol/l}$. Pro dalších 26 metabolitů se LOQ pohybuje mezi 1-10 $\mu\text{mol/l}$ a u 5 metabolitů se tento limit pohybuje od 10-50 $\mu\text{mol/l}$. Autoři tohoto článku uvádí, že pro 3 metabolity byla hodnota LOQ poměrně vysoká, konkrétně 4-hydroxybutarát (18 $\mu\text{mol/l}$), malonát (21 $\mu\text{mol/l}$) a acetoacetát (69 $\mu\text{mol/l}$). Námi vyvinutá LC-MS metoda posouvá tyto LOQ podstatně níž, konkrétně pro malonát

(0,72 $\mu\text{mol/l}$), 4-hydroxybutyrát (1,63 $\mu\text{mol/l}$) a acetoacetát (33,40 $\mu\text{mol/l}$), který má tento limit poměrně vysoký kvůli vysoké intenzitě šumu, ale tato hodnota LOQ se nachází na rozmezí mezi fyziologickou a patologickou hodnotou, a tak je možné rozpoznat již mírné zvýšení acetoacetátu od fyziologických hodnot. Pro 3 metabolity, konkrétně sukcinylaceton, N-acetylasparát a 2-oxoglutarát se tyto hodnoty nepodařilo vypočítat. Sukcinylaceton má vysokou hodnotu šumu, a tak je obtížně detekovatelný. Pro analýzu N-acetylasparátu a 2-oxoglutarátu bylo kvůli vysoké intenzitě standardů nutné upravit hodnoty kolizní energie, konkrétně byly zvýšeny o 15 eV pro snížení citlivosti. Tato úprava byla pro tyto dva metabolity nejspíše příliš vysoká a citlivost odezvy tak byla velmi malá. U těchto dvou metabolitů bude potřeba CE optimalizovat, což bude otázkou dalšího bádání. Veškeré hodnoty LOD a LOQ pro všechny metabolity jsou uvedeny v příloze 3.

Vzhledem ke komplexnosti vyvinuté metody se nepodařila dokončit úplná validace zahrnující mimo provedeního nepřesnost, správnost, opakovatelnost, dlouhodobá stabilita a další.

Obecně většina oxokyselin vykazovala slabou odezvu standardu ($S/N < 189$), výjimkou byl pyroglutamát, fenylpyruvát a 4-hydroxy-2-oxoglutarát. Nízkou odezvu, a tedy i vyšší hodnoty LOD a LOQ vykazovaly oxokyseliny: glyoxylát, acetoacetát, 2-oxobutyryát a oxaloacetát. Pro analýzu oxokyselin je nejčastěji využívána derivatizace kvůli nízké stabilitě těchto kyselin a také pro zlepšení podmínek pro MS analýzu (Peng *et al.*, 2016; Noguchi *et al.*, 2014; Olson *et al.*, 2013). Případně byly tyto kyseliny separovány pomocí HILIC kolony (Inoue *et al.*, 2016; Sriboonvorakul *et al.*, 2013). Peng *et al.*, 2016 navíc stanovovali stabilitu pyruvátu a acetoacetátu ve vzorcích krevních skvrn a také samotných standardů. Jako nejstabilnější teplota pro skladování standardu pyruvátu se jevila teplota +4 °C, -80 °C a pokojová teplota, pro standard acetoacetátu pak +4 °C a -80 °C. Tento fakt úplně nekoresponduje s našimi výsledky, jelikož při -80 °C byla stabilita acetoacetátu nejnižší. Stabilita těchto dvou oxokyselin byla stanovena také v matrici za různých podmínek, po přidavku antikoagulantů, s precipitací a bez precipitace krevních proteinů. Po přidavku antikoagulantů NaF, heparinu a citrátu sodného docházelo postupně k poklesu koncentrace pyruvátu za všech teplot, naopak acetoacetát byl relativně stabilní za všech podmínek. Autoři to vysvětlují tím, že krevní hladiny acetoacetátu se enzymaticky neměnily, jelikož metabolismus ketolátek probíhá v mitochondriích (Laffel, 1999), které v krvi nejsou přítomny. Stručně řečeno, precipitace proteinu v krvi v kombinaci s nízkou skladovací teplotou (-20 °C) by mohla účinně

zachovat integritu pyruvátu před měřením, ale vysrážený protein urychlil degradaci acetoacetátu. Izolací supernatantu došlo ke zpomalení degradace acetoacetátu, což umožnilo skladování vzorků supernatantů při - 20 °C po dobu 10 dnů.

U pacientky s methylmalonovou acidémií (P10) byla pozorována zvýšená koncentrace mnoha metabolitů, nejdůležitějším je ovšem methylmalonová kyselina. MMA znemožňuje přeměnu propionyl-CoA na sukcinyl-CoA, a tak dochází k jeho akumulaci, která je navíc podpořena sekundární inhibicí propionyl-CoA karboxylasy (EC 7.2.4.3) propionyl-CoA a jeho metabolity. Za těchto podmínek jsou aktivovány minoritní metabolické dráhy propionyl-CoA, jeho β -nebo ω -oxidací vzniká 3-hydroxypropionát. Dále kondenzací oxaloacetátu a propionyl-CoA vzniká 2-methylcitrát, jehož akumulace v mitochondriích způsobuje inhibici citrátového cyklu a vede k hypoglykémii a produkci ketolátek (Cheema-Dhadli *et al.*, 1975; Villani *et al.*, 2017). Jeden z efektů v patogenezi MMA je ztráta důležité anaplerotické dráhy citrátového cyklu kvůli zablokování jednoho z konečných kroků propionátového metabolismu, prostřednictvím propionyl-CoA a jeho metabolitu methylmalonyl-CoA je sukcinyl-CoA poháněn do citrátového cyklu, což představuje značné množství celkové produkce ATP (Brunengraber a Roe, 2006). Navíc, deficience syntézy sukcinyl-CoA společně s inhibicí mitochondriálního dikarboxylátového přenašeče vyvolanou methylmalonyl-CoA způsobuje pokles glukoneogeneze a syntézy hemu za zvyšování koncentrace glycinu může přispívat k růstové retardaci a neurologickým abnormalitám (Mirandola *et al.*, 2008; Bicakci, 2015). MMA je také spojená s deficiencí dýchacího řetězce a tvorbou megamitochondrií (De Keyzer *et al.*, 2009; Zsengellér *et al.*, 2014) a také změnou v energetickém metabolismu mitochondrií (Melo *et al.*, 2011; Wajner a Goodman, 2011). Studie na lidech a myších také ukázaly buněčně specifickou mitochondriální patologii, primárně v proximálních tubulech ledvin, která je spojená s deficiencí cytochrom c oxidasy (EC 1.9.3.1) a zvýšené koncentrace markerů oxidačního stresu v moči a plasmě (Zsengellér *et al.*, 2014; Manoli *et al.*, 2013).

Zajímavým nálezem u pacientky s MMA byla vyšší přítomnost kyseliny 3-methyladipové. 3-methyladipová kyselina vzniká rozkladem kyseliny fytanové. Je odvozená od fytolu, tedy postranního řetězce chlorofylu (Willstätter *et al.*, 1911), který je v těle přežvýkavců uvolňován pomocí mikroorganismů žijících v jejich gastrointestinálním traktu (Patton a Benson, 1966). Do lidského těla se dostává potravou z mléčných výrobků a tuků přežvýkavců. Vzhledem k methylovým skupinám na uhlíkovém řetězci je znemožněna její degradace β -oxidací, a tak je v těle odbourávána

α -oxidací (Avigan *et al.*, 1966), v menší míře také ω -oxidací, při které je finálním produktem právě 3-methyladipová kyselina, která je vylučována močí (Wanders *et al.*, 2001; Wierzbicki *et al.*, 2002). Porucha α -oxidace fytanové kyseliny je způsobena peroxisomální poruchou nazývanou Refsumova choroba, při které je kyselina fytanová degradována pouze ω -oxidací a aktivita této dráhy je přibližně dvojnásobná oproti normálu (Wierzbicki *et al.*, 2002). Přítomnost 3-methyladipátu u pacientů s methylmalonovou acidémií nebyl prozatím blíže zkoumán. Jakobs *et al.* (1984) provedli analýzu moči a plodové vody pacientů s PA a MMA, přičemž identifikovali několik methylovaných dikarboxylových kyselin. Jendou z nich byla i 3-methyladipová kyselina. Methylované mastné kyseliny s lichým počtem uhlíků byly také identifikovány v lipidech pacientů s MMA (Kishimoto *et al.*, 1973). Předpokládalo se, že vznikly nahrazením methylmalonyl-CoA za malonyl-CoA v reakcích syntetizovanými synthasou mastných kyselin. Následná ω -oxidace methylovaných mastných kyselin by vedla k methylovaným dikarboxylovým mastným kyselinám, které byly v této studii více zastoupeny v plodové vodě a moči pacientů s propionovou acidémií než s MMA. To vylučuje, že by tyto methylované kyseliny byly odvozeny od methylmalonyl-CoA jako prekurzoru methylovaných dikarboxylových kyselin, protože pacienti s propionovou acidémií nejsou schopni karboxylovat propionyl-CoA na methylmalonyl-CoA. Pacientka s MMA obecně vykazovala zvýšené koncentrace mnoha metabolitů, přičemž bylo možné pozorovat vývoj vzhledem k 3 po sobě jdoucích odběrů. V její moči byly nalezeny vysoké koncentrace 2-hydroxy a 2-oxokyselin, které jsou typické pro MSUD. Tato dvě onemocnění postihují degradaci valinu, leucinu a isoleucinu a je možné, že se pacientka s MMA nacházela ve stavu metabolické dekompenzace. To je stav, kdy selhávají kompenzační mechanismy, které udržují onemocnění v přijatelných mezích a zvyšuje se katabolismus. Tyto dekompenzace jsou život ohrožující ataky, bývá nutná hospitalizace pacienta, při které je mu orálně či intravenózně podávána glukosa, pozastaven příjem proteinů a je nutná detoxikace naakumulovaných metabolitů pomocí léčiv (L-karnitin, benzoát sodný) či pomocí dialýzy (Zwickler *et al.*, 2012).

Pacient postižený leucinózou (MSUD) (P15) měl vysoký obsah 2-oxoisokaproátu, 2-hydroxyisokaproátu a 2-hydroxyisovalerátu, což je typickým znakem MSUD, vzhledem k tomu, že je narušen druhý krok degradace aminokyselin s rozvětveným řetězcem, a to dehydrogenasový komplex aminokyselin s rozvětveným řetězcem (EC 1.2.4.4). Vniká tak velké množství 2-oxokyselin, které jsou redukovány na odpovídající 2-hydroxykyseliny pravděpodobně lákttádehydrogenasou (EC 1.1.1.27)

(Mamer, 2017). Při tomto onemocnění dochází k poškození mozku, které může být způsobeno jeho zánětem, který je pravděpodobně vyvolán změnou koncentrace BCAA a permeability hematoencefalické bariéry (Villani *et al.*, 2017). Leucin a příbuzné metabolity také mohou hrát roli v propustnosti jiných aminokyselin přes tuto bariéru, což má za následek sníženou koncentraci důležitých aminokyselin pro mozek s nepříznivými účinky na růst mozku a syntézu a funkci neurotransmiterů (Killian a Chinkale, 2001). Také se ukázalo, že MSUD narušuje energetický metabolismus neuronů, 2-oxoisokaproát se ukazuje jako zhášec oxidativní fosforylace a spolu s leucinem je inhibitorem Křebsova cyklu (Amaral *et al.*, 2010). BCAA se také ukázaly jako signifikantní inhibitory kreatinkinasy (EC 2.7.3.2) v kůře krysích mozku (Pilla *et al.*, 2003) a také fibroblasty pacientů s MSUD vykazovaly značné poškození mitochondriální a jaderné DNA, což vedlo k dysfunkci mitochondrií (Strand *et al.*, 2014).

U pacientů s glutarovou acidúí typu 1 (P27 a P28) byly nalezeny vysoké koncentrace glutarylglycinu, glutarylkarnitinu, glutarátu a 3-hydroxyglutarátu. Při tomto onemocnění se v těle hromadí glutaryl-CoA, který je za účasti karnitinacyltransferasy (EC 2.3.1.137) esterifikován na glutarylkarnitin, který je z těla vyloučen, což ovšem vede k sekundární karnitinové deficienci (Hoffmann a Kölker, 2016). Předpokládá se, že tvorba 3-hydroxyglutarátu probíhá z glutaryl-CoA ve dvou krocích přes glutakonyl-CoA pomocí enzymů β -oxidace MK. Glutaryl-CoA může být převeden na glutakonyl-CoA pomocí acyl-CoA dehydrogenasy mastných kyselin se středně dlouhým řetězcem (EC 1.3.8.7), s menší aktivitou pak i pomocí acyl-CoA dehydrogenasy mastných kyselin s krátkým (EC 1.3.8.1) a dlouhým (EC 1.3.8.8) řetězcem (Peters *et al.*, 2019). Následná konverze na 3-hydroxyglutaryl-CoA probíhá přes 3-methylglutakonyl-CoA hydratasu (EC 4.2.1.18) (Mack *et al.*, 2006). Mechanismy, kterými dochází k poškození specifických mozkových struktur jsou předmětem mnoha hypotéz. Nejvíce opodstatněné důkazy ukazují na narušení metabolismu v mozkové tkáni vyvolané akumulací kyselin glutarové a 3-hydroxyglutarové a glutaryl-CoA. Glutaryl-CoA inhibuje 2-oxoglutarátdehydrogenasový komplex (EC 1.2.4.2), glutarová kyselina narušuje člunek dikarboxylových kyselin mezi astrocyty a neurony a u 3-hydroxyglutarové kyseliny se předpokládá, že slabě aktivuje glutamátovou neurotransmisi (Sauer *et al.*, 2005; Sauer *et al.*, 2006). Akumulace těchto údajných neurotoxinů v mozku je usnadněna slabou permeabilitou hematoencefalické bariéry pro dikarboxylové kyseliny, což způsobuje zachycení těchto metabolitů v mozku (Sauer *et al.*, 2006). Předpokládá se, že

narušená mozková hemodynamika přispívá k metabolické toxicitě tohoto onemocnění (Strauss *et al.*, 2010).

β -ketothiolasová deficiencie je způsobena deficiencí tohoto enzymu, jinak nazývaného acetoacetyl-CoA thiolasa (EC 2.3.1.9) postihující metabolismus ketolátek a degradaci isoleucinu. Jsou důležitým zdrojem energie pro mnoho tkání za nedostatku glukosy, především mozek. Při degradaci isoleucinu je tento enzym zodpovědný za thiolysu 2- methylacetoacetyl-CoA na acetyl-CoA a propionyl-CoA. Tomuto kroku předchází 2 reverzibilní reakce, a tedy konverze tiglyl-CoA na 2-methyl-3-hydroxybutyryl-CoA-enoyl-CoA-hydratasou (EC 4.2.1.17) a dále na 2- methylacetoacetyl-CoA 3-hydroxyacyl-CoA-dehydrogenasou (EC 1.1.1.35). U pacientky s touto chorobou (P30) byly nalezeny vysoké koncentrace tiglylglycinu, který vzniká konjugací glycinu a tiglyl-CoA za účasti mitochondriální glycin N-acylasy. V její moči byla nalezena také vysoká koncentrace 3-methylkrotonylkarnitinu, který je metabolitem degradace leucinu, bohužel jsem nedohledala publikaci, která by jeho zvýšenou přítomnost vysvětlovala. Tato moč také vykazovala absenci 2- methylacetoacetátu, který je typickým biomarkerem tohoto onemocnění. Jedním z možných vysvětlení může být špatná optimalizace MRM přechodu tohoto analytu, vzhledem k tomu, že nebyl k dispozici čistý standard této látky, ale tento MRM přechod byl optimalizován ze vzorku pacienta anebo nízká citlivost systému, což bude předmětem dalšího výzkumu.

Přítomnost vysoké koncentrace kyseliny vinné u pacientů je s největší pravděpodobností zapříčiněna její konzumací v potravě. Vyskytuje se především v hroznech a jejich zpracováním poté ve víně. Používá se jako aditivum v potravinách pro svou kyselou chuť a také jako antioxidant (Regueiro *et al.*, 2014). Je analogem malátu a inhibitorem fumarasy (E.C. 4.2.1.2), která katalyzuje přeměnu malátu na fumarát (Mahler a Cordes, 1966). Její obsah v moči je v největší míře zapříčiněn požitím takových potravin. Dalším možným zdrojem kyseliny vinné mohou být kvasinky rodu *Saccharomyces* přítomné ve střevech nebo močovém měchýři, její vysoké koncentrace byly také nalezeny u dětí s autismem (Shaw *et al.*, 1995) a není známo, že by tato látka byla spojována s dědičným metabolickým onemocněním.

Moč mnoha pacientů obsahovala zvýšené koncentrace ketolátek, především 3-hydroxybutyrátu a acetoacetátu. Ketóza je velmi běžná u dětí a je spojena s hladověním, diabetem, zvracením a poruchami s nakládáním glykogenu. Vznikají v játrech oxidací mastných kyselin z acetyl-CoA za vzniku acetoacetátu, z něj potom vzniká

3-hydroxybutyrát a aceton. Ketóza je velmi běžný nález v dětství, defekty kelolýzy jsou velmi vzácné a ketonurie u nemocného novorozence nemusí vždy znamenat primární metabolickou poruchu (metagene.de). Laktátová acidóza bývá primárně způsobena defekty v metabolismu pyruvátu nebo dýchacího řetězce, ale není neobvyklá ani u dalších metabolických poruch, jako jsou organické acidémie, poruchy močovinového cyklu a poruchy oxidace mastných kyselin (Shah, 2017). 2-hydroxybutarát je častý nález u pacientů s ketoacidózou a laktátovou acidózou. Vzniká za katalýzy laktátdehydrogenasou (EC 1.1.1.27) nebo 2-hydroxybutyrátdehydrogenasou (EC 1.1.99.6) z 2-oxobutyrátu, který je produkován katabolismem methioninu a threoninu a anabolismem glutathionu (Gall *et al.*, 2010). Při oxidačním stresu nebo při podávání xenobiotik se výrazně zvyšuje produkce glutathionu, a tím i exkrece 2-hydroxybutyrátu do moči. Je to také marker insulinové rezistence a zhoršené regulace glukosy, která se objevuje v důsledku zvýšené oxidace lipidů a oxidačního stresu (Gall *et al.*, 2010). Zvýšené koncentrace 2-hydroxybutyrátu byly také nalezeny v plasmě pacientů s diabetem 2. typu (Li *et al.*, 2009).

U dalších pacientů byly nalezeny také zvýšené koncentrace určitých metabolitů, které ale jednoznačně neukazují na onemocnění DMP, což potvrdila i rutinní GC-MS metoda. Je tedy pravděpodobné, že zvýšené hladiny těchto metabolitů byly způsobeny jinými vlivy, než jsou DMP.

6 ZÁVĚR

V teoretické části této práce byla vypracována literární rešerše shrnující dosavadní poznatky o dědičných poruchách metabolismu se zaměřením na organické acidémie, možnosti diagnostiky těchto onemocnění a současný stav analýzy organických kyselin v biologických vzorcích.

V praktické části byla optimalizována metoda na základě kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní detekcí pro 151 metabolitů pokrývajících velmi širokou škálu organických acidémií. Tato metoda vykazuje velmi dobrou citlivost a selektivitu spolu s velkým lineárním rozsahem, bylo možné také separovat, případně nalézt specifické přechody, a tak jednoznačně identifikovat veškeré izomery. Byla také stanovena stabilita vybraných oxokyselin za různých podmínek skladování, přičemž obecně se jako nejvhodnější teplota pro skladování vzorků močí jeví teplota $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, naopak pro skladování vodných roztoků standardů $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Byla také provedena analýza vzorků močí nově vyvinutou LC-MS metodou pro účel diagnostiky DMP, přičemž se podařilo na základě zvýšených koncentrací specifických metabolitů jednoznačně odhalit pacienty s methylmalonovou acidémií, leucinózou, glutarovou acidurií typu I a β -ketothiolasovou deficiencí.

Dále by měla být provedena celková validace této LC-MS metody, analýza dalších typů biologických vzorků a ověření optimalizace přechodu pro methylacetoacetát.

7 LITERATURA

- ALBRECHT, Jan a Michael D. NORENBURG, 2006. Glutamine: A Trojan horse in ammonia neurotoxicity. *Hepatology* [online]. **44**(4), 788-794 [cit. 2020-03-02]. DOI: 10.1002/hep.21357. ISSN 0270-9139. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/hep.21357>
- AMARAL, Alexandre Umpierrez, Guilhian LEIPNITZ, Carolina Gonçalves FERNANDES, Bianca SEMINOTTI, Patrícia Fernanda SCHUCK a Moacir WAJNER, 2010. A-Ketoisocaproic acid and leucine provoke mitochondrial bioenergetic dysfunction in rat brain. *Brain Research* [online]. **1324**, 75-84 [cit. 2020-05-10]. DOI: 10.1016/j.brainres.2010.02.018. ISSN 00068993. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006899310003641>
- AVIGAN, Joel, Daniel STEINBERG, Alisa GUTMAN, Charles E. MIZE a George W.A. MILNE, 1966. Alpha-decarboxylation, an important pathway for degradation of phytanic acid in animals. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [online]. **24**(6), 838-844 [cit. 2020-05-08]. DOI: 10.1016/0006-291X(66)90324-X. ISSN 0006291X. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0006291X6690324X>
- BACCHETTA, Justine, Djalila MEKAHLI, Christine RIVET, Delphine DEMÈDE a Anne-Laure LECLERC, 2015. Pediatric combined liver–kidney transplantation. *Current Opinion in Organ Transplantation* [online]. **20**(5), 543-549 [cit. 2020-03-04]. DOI: 10.1097/MOT.0000000000000225. ISSN 1087-2418. Dostupné z: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00075200-201510000-00010>
- BADER-MEUNIER, B., B. FLORKIN, J. SIBILIA, et al., 2011. Mevalonate Kinase Deficiency: A Survey of 50 Patients. *PEDIATRICS* [online]. **128**(1), e152-e159 [cit. 2020-03-02]. DOI: 10.1542/peds.2010-3639. ISSN 0031-4005. Dostupné z: <http://pediatrics.aappublications.org/cgi/doi/10.1542/peds.2010-3639>
- BAENA, Beatriz, Alejandro CIFUENTES a Coral BARBAS, 2005. Analysis of carboxylic acids in biological fluids by capillary electrophoresis. *ELECTROPHORESIS* [online]. **26**(13), 2622-2636 [cit. 2020-03-05]. DOI: 10.1002/elps.200410329. ISSN 0173-0835. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/elps.200410329>
- BAILEY, C. J., 2009. Orotic aciduria and uridine monophosphate synthase: A reappraisal. *Journal of Inherited Metabolic Disease* [online]. **32**(S1), 227-233 [cit. 2020-03-05]. DOI: 10.1007/s10545-009-1176-y. ISSN 0141-8955. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1007/s10545-009-1176-y>
- BANDSMA, Robert H J, Berthil H PRINSEN, Monique DE SAIN-VAN DER VELDEN, Jan-Peter RAKE, Theo BOER, G Peter A SMIT, Dirk-Jan REIJNGOUD a Folkert KUIPERS, 2008. Increased de novo Lipogenesis and Delayed Conversion of Large VLDL into Intermediate Density Lipoprotein Particles Contribute to Hyperlipidemia in Glycogen Storage Disease Type 1a. *Pediatric Research* [online]. **63**(6), 702-707 [cit. 2020-03-04]. DOI: 10.1203/PDR.0b013e31816c9013. ISSN 0031-3998. Dostupné z: <http://www.nature.com/doi/10.1203/PDR.0b013e31816c9013>
- BARTLETT, K. a D. GOMPERTZ, 1974. The specificity of glycine-N-acylase and acylglycine excretion in the organicacidaemias. *Biochemical Medicine* [online]. **10**(1), 15-23 [cit. 2020-03-01]. DOI: 10.1016/0006-2944(74)90004-0. ISSN 00062944. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0006294474900040>
- BICAKCI, Zafer, 2015. Growth Retardation, General Hypotonia, and Loss of Acquired Neuromotor Skills in the Infants of Mothers With Cobalamin Deficiency and the Possible Role of Succinyl-CoA and Glycine in the Pathogenesis. *Medicine* [online]. **94**(9) [cit. 2020-05-09]. DOI: 10.1097/MD.0000000000000584. ISSN 0025-7974. Dostupné z: <http://journals.lww.com/00005792-201503010-00010>
- BLAU, N., Marinus DURAN a Kenneth Michael GIBSON, c2008. *Laboratory guide to the methods in biochemical genetics*. Berlin: Springer. ISBN 978-3-540-76697-1.

- BODAR, E.J., HILST, J.C., DRENTH, J.P., Meer, J.W., & Simon, A.J. (2005). Effect of etanercept and anakinra on inflammatory attacks in the hyper-IgD syndrome: introducing a vaccination provocation model. *The Netherlands journal of medicine*, **63** 7, 260-4
- BONAFÉ, Luisa, Heinz TROXLER, Thomas KUSTER, Claus W. HEIZMANN, Néstor A. CHAMOLES, Alberto B. BURLINA a Nenad BLAU, 2000. Evaluation of Urinary Acylglycines by Electrospray Tandem Mass Spectrometry in Mitochondrial Energy Metabolism Defects and Organic Acidurias. *Molecular Genetics and Metabolism* [online]. **69**(4), 302-311 [cit. 2020-03-05]. DOI: 10.1006/mgme.2000.2982. ISSN 10967192. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1096719200929822>
- BONNEFONT, Jean-Paul, Jean BASTIN, Anthony BEHIN a Fatima DJOUADI, 2009. Bezafibrate for an Inborn Mitochondrial Beta-Oxidation Defect. *New England Journal of Medicine* [online]. **360**(8), 838-840 [cit. 2020-03-02]. DOI: 10.1056/NEJMc0806334. ISSN 0028-4793. Dostupné z: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMc0806334>
- BOSCH, Annet M., 2011. Classic galactosemia: dietary dilemmas. *Journal of Inherited Metabolic Disease* [online]. **34**(2), 257-260 [cit. 2020-03-04]. DOI: 10.1007/s10545-010-9157-8. ISSN 0141-8955. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1007/s10545-010-9157-8>
- BOUATRA, Souhaila, Farid AZIAT, Rupasri MANDAL, et al., 2013. The Human Urine Metabolome. *PLoS ONE* [online]. **8**(9), e73076 [cit. 2020-03-08]. DOI: 10.1371/journal.pone.0073076. ISSN 1932-6203. Dostupné z: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0073076>
- BOWEN, Peter, Choon S. LEE, Hans ZELLWEGER a Robert LINDENBERG, 1964. A familial syndrome of multiple congenital defects. *Bulletin of the Johns Hopkins Hospital*. **114**, 402-414.
- BRUNENGRABER, Henri a Charles R. ROE, 2006. Anaplerotic molecules: Current and future. *Journal of Inherited Metabolic Disease* [online]. **29**(2-3), 327-331 [cit. 2020-05-09]. DOI: 10.1007/s10545-006-0320-1. ISSN 0141-8955. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1007/s10545-006-0320-1>
- BURGARD, Peter, Robin H. LACHMANN a John WALTER, 2016. Hyperphenylalaninaemia. SAUDUBRAY, Jean-Marie, Matthias R. BAUMGARTNER a John WALTER, ed. *Inborn Metabolic Diseases* [online]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2016 [cit. 2020-03-01]. DOI: 10.1007/978-3-662-49771-5_16. ISBN 978-3-662-49769-2. Dostupné z: http://link.springer.com/10.1007/978-3-662-49771-5_16
- CAMERON, J. S., F. MORO a H. A. SIMMONDS, 1993. Gout, uric acid and purine metabolism in paediatric nephrology. *Pediatric Nephrology* [online]. **7**(1), 105-118 [cit. 2020-03-05]. DOI: 10.1007/BF00861588. ISSN 0931-041X. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/BF00861588>
- CHEEMA-DHADLI, Surinder, Clifford C LEZNOFF a Mitchell L HALPERIN, 1975. Effect of 2-Methylcitrate on Citrate Metabolism: Implications for the Management of Patients with Propionic acidemia and Methylmalonic aciduria. *Pediatric Research* [online]. **9**(12), 905-908 [cit. 2020-05-08]. DOI: 10.1203/00006450-197512000-00008. ISSN 0031-3998. Dostupné z: <http://www.nature.com/doi/10.1203/00006450-197512000-00008>
- CHUANG, Chih-Kuang, Tuen-Jen WANG, Chun-Yan YEUNG, et al., 2009. A method for lactate and pyruvate determination in filter-paper dried blood spots. *Journal of Chromatography A* [online]. **1216**(51), 8947-8952 [cit. 2020-05-08]. DOI: 10.1016/j.chroma.2009.10.074. ISSN 00219673. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967309016045>
- COELHO, Emanuela Monteiro, Carla Valéria DA SILVA PADILHA, Gabriela Aquino MISKINIS, Antônio Gomes Barroso DE SÁ, Giuliano Elias PEREIRA, Luciana Cavalcanti DE AZEVÊDO a Marcos DOS SANTOS LIMA, 2018. Simultaneous analysis of sugars and organic acids in wine and grape juices by HPLC: Method validation and characterization of products from northeast Brazil. *Journal of Food Composition and Analysis* [online]. **66**, 160-167 [cit. 2020-03-16]. DOI: 10.1016/j.jfca.2017.12.017. ISSN 08891575. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0889157517302958>

- COOPER, Arthur J. L., James Z. GINOS a Alton MEISTER, 1983. Synthesis and properties of the alpha-keto acids. *Chemical Reviews* [online]. **83**(3), 321-358 [cit. 2020-03-08]. DOI: 10.1021/cr00055a004. ISSN 0009-2665. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/cr00055a004>
- COUSER, N. a M. GUCAVAS-CALIKOGLU, 2017. Mitochondrial disorders. *Biomarkers in Inborn Errors of Metabolism* [online]. Elsevier, 2017 [cit. 2020-03-02]. DOI: 10.1016/B978-0-12-802896-4.00008-0. ISBN 9780128028964. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128028964000080>
- DANPURE, C.J. a P.R. JENNINGS, 1986. Peroxisomal alanine: glyoxylate aminotransferase deficiency in primary hyperoxaluria type I. *FEBS Letters* [online]. **201**(1), 20-34 [cit. 2020-03-04]. DOI: 10.1016/0014-5793(86)80563-4. ISSN 00145793. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1016/0014-5793%2886%2980563-4>
- DANPURE, Christopher J., 2001. Primary hyperoxaluria. *The Online Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease* [online]. McGraw-Hill Professional [cit. 2020-03-04]. DOI: 10.1036/ommbid.162. ISBN 9780071459969. Dostupné z: <https://ommbid.mhmedical.com/content.aspx?bookid=2709§ionid=225543281>
- DANPURE, Christopher J., 2006. Primary hyperoxaluria type 1: AGT mistargeting highlights the fundamental differences between the peroxisomal and mitochondrial protein import pathways. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* [online]. **1763**(12), 1776-1784 [cit. 2020-03-04]. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2006.08.021. ISSN 01674889. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167488906002291>
- DASOUKI, M., 2017. Peroxisomal disorders. *Biomarkers in Inborn Errors of Metabolism* [online]. Elsevier, 2017 [cit. 2020-03-04]. DOI: 10.1016/B978-0-12-802896-4.00007-9. ISBN 9780128028964. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128028964000079>
- DE KEYZER, Yves, Vassili VALAYANNOPOULOS, Jean-François BENOIST, et al., 2009. Multiple OXPHOS Deficiency in the Liver, Kidney, Heart, and Skeletal Muscle of Patients With Methylmalonic Aciduria and Propionic Aciduria. *Pediatric Research* [online]. **66**(1), 91-95 [cit. 2020-05-09]. DOI: 10.1203/PDR.0b013e3181a7c270. ISSN 0031-3998. Dostupné z: <http://www.nature.com/doi/finder/10.1203/PDR.0b013e3181a7c270>
- DE MEIRLEIR, Linda, Angels GARCIA-CAZORLA a Michèle BRIVET, 2016. Disorders of Pyruvate Metabolism and the Tricarboxylic Acid Cycle. SAUDUBRAY, Jean-Marie, Matthias R. BAUMGARTNER a John WALTER, ed. *Inborn Metabolic Diseases* [online]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2016 [cit. 2020-03-05]. DOI: 10.1007/978-3-662-49771-5_11. ISBN 978-3-662-49769-2. Dostupné z: http://link.springer.com/10.1007/978-3-662-49771-5_11
- DEARMOND, P.D., D.J. DIETZEN a A.L. PYLE-EILOLA, 2017. Amino acids disorders. *Biomarkers in Inborn Errors of Metabolism* [online]. Elsevier, 2017 [cit. 2020-03-01]. DOI: 10.1016/B978-0-12-802896-4.00003-1. ISBN 9780128028964. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128028964000031>
- DIONISI-VICI, Carlo, Daria DIODATO, Giuliano TORRE, et al., 2016. Liver transplant in ethylmalonic encephalopathy: a new treatment for an otherwise fatal disease. *Brain* [online]. **139**(4), 1045-1051 [cit. 2020-03-02]. DOI: 10.1093/brain/aww013. ISSN 0006-8950. Dostupné z: <https://academic.oup.com/brain/article-lookup/doi/10.1093/brain/aww013>
- DRENTH, JP, M VAN DEUREN, J VAN DER VEN-JONGEKRIJG, CG SCHALKWIJK a JW VAN DER MEER, 1995. Cytokine activation during attacks of the hyperimmunoglobulinemia D and periodic fever syndrome. *Blood* [online]. **85**(12), 3586-3593 [cit. 2020-03-02]. DOI: 10.1182/blood.V85.12.3586.bloodjournal85123586. ISSN 0006-4971. Dostupné z: <https://ashpublications.org/blood/article/85/12/3586/123509/Cytokine-activation-during-attacks-of-the>
- DROLET, Jeremy, Vladimir TOLSTIKOV, Brian A. WILLIAMS, et al., 2017. Integrated Metabolomics Assessment of Human Dried Blood Spots and Urine

- Strips. *Metabolites* [online]. **7**(3) [cit. 2020-03-16]. DOI: 10.3390/metabo7030035. ISSN 2218-1989. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/2218-1989/7/3/35>
- EREZ, Ayelet, 2013. Argininosuccinic aciduria: from a monogenic to a complex disorder. *Genetics in Medicine* [online]. **15**(4), 251-257 [cit. 2020-03-02]. DOI: 10.1038/gim.2012.166. ISSN 1098-3600. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/gim2012166>
- EUROPEAN BIOINFORMATICS INSTITUTE, SWISS INSTITUTE OF BIOINFORMATICS, PROTEIN INFORMATION RESOURCE, 2002. *UniProt: The Universal Protein Resource* [online]. UniProt Consortium [cit. 2020-05-10]. Dostupné z: <https://www.uniprot.org/>
- FERGUSON, A.M., 2017. Carbohydrate disorders. *Biomarkers in Inborn Errors of Metabolism* [online]. Elsevier, 2017 [cit. 2020-03-04]. DOI: 10.1016/B978-0-12-802896-4.00013-4. ISBN 9780128028964. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128028964000134>
- FLORES, Melissa A. a Jeffrey W. BODE, 2010. Chemoselective Protection of α -Ketoacids by Direct Annulations with Oximes. *Organic Letters* [online]. **12**(9), 1924-1927 [cit. 2020-03-08]. DOI: 10.1021/ol100467t. ISSN 1523-7060. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ol100467t>
- FONTANA, Josef, Jan TRNKA, Patrik MAĎA, Peter IVÁK, Petra LAVRÍKOVÁ a Lucie NOVÁKOVÁ, 2013. Odbourávání lipidů a metabolismus ketolátek. In: *Funkce buněk a lidského těla: Multimediální učebnice* [online]. [cit. 2020-05-10]. Dostupné z: <http://fbt.cz/skripta/ii-premena-latek-a-energie-v-bunce/11-odbouravani-lipidu-a-metabolismus-ketolatek/>
- FRIDOVICH-KEIL, Judith L., 2006. Galactosemia: The good, the bad, and the unknown. *Journal of Cellular Physiology* [online]. **209**(3), 701-705 [cit. 2020-03-04]. DOI: 10.1002/jcp.20820. ISSN 0021-9541. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jcp.20820>
- FRITZ, IRVING B., 1963. *Carnitine and Its Role in Fatty Acid Metabolism** *Work reviewed from this laboratory was supported by grants A-1465 and A-1682 from the National Institutes of Health [online]. Elsevier, 1963 [cit. 2020-03-01]. Advances in Lipid Research. DOI: 10.1016/B978-1-4831-9937-5.50014-4. ISBN 9781483199375. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9781483199375500144>
- FUNATO, Michinori, Nobuyuki SHIMOZAWA, Tomoko NAGASE, et al., 2006. Aberrant peroxisome morphology in peroxisomal beta-oxidation enzyme deficiencies. *Brain and Development* [online]. **28**(5), 287-292 [cit. 2020-03-04]. DOI: 10.1016/j.braindev.2005.10.010. ISSN 03877604. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0387760405002044>
- GALL, Walter E., Kirk BEEBE, Kay A. LAWTON, et al., 2010. A-Hydroxybutyrate Is an Early Biomarker of Insulin Resistance and Glucose Intolerance in a Nondiabetic Population. *PLoS ONE* [online]. **5**(5) [cit. 2020-05-08]. DOI: 10.1371/journal.pone.0010883. ISSN 1932-6203. Dostupné z: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0010883>
- GALLAGHER, Renata C, Laura POLLARD, Anna I SCOTT, Suzette HUGUENIN, Stephen GOODMAN a Qin SUN, 2018. Laboratory analysis of organic acids, 2018 update: a technical standard of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG). *Genetics in Medicine* [online]. **20**(7), 683-691 [cit. 2020-03-01]. DOI: 10.1038/gim.2018.45. ISSN 1098-3600. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/gim201845>
- GARCÍA, Antonia a Coral BARBAS, 2003. Capillary Electrophoresis for the Determination of Organic Acidurias in Body Fluids: A Review. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* [online]. **41**(6) [cit. 2020-03-05]. DOI: 10.1515/CCLM.2003.115. ISSN 1434-6621. Dostupné z: <https://www.degruyter.com/view/j/cclm.2003.41.issue-6/cclm.2003.115/cclm.2003.115.xml>
- GERARDS, Mike, Bianca J. C. VAN DEN BOSCH, Katharina DANHAUSER, et al., 2011. Riboflavin-responsive oxidative phosphorylation complex I deficiency caused by defective ACAD9: new function for an old gene. *Brain* [online]. **134**(1), 210-219 [cit. 2020-03-02].

- DOI: 10.1093/brain/awq273. ISSN 1460-2156. Dostupné z: <https://academic.oup.com/brain/article-lookup/doi/10.1093/brain/awq273>
- GREENBERG, Cheryl R., David REIMER, Rupinder SINGAL, et al., 1995. A G-to-T transversion at the +5 position of intron 1 in the glutaryl CoA dehydrogenase gene is associated with the island Lake variant of glutaric acidemia type I. *Human Molecular Genetics* [online]. **4**(3), 493-495 [cit. 2020-03-01]. DOI: 10.1093/hmg/4.3.493. ISSN 0964-6906. Dostupné z: <https://academic.oup.com/hmg/article-lookup/doi/10.1093/hmg/4.3.493>
- GUTH, H.-J., M. ZSCHIESCHE, E. PANZIG, P. E. RUDOLPH, B. JÄGER a G. KRAATZ, 1999. Which Organic Acids does Hemofiltrate Contain in the Presence of Acute Renal Failure? *The International Journal of Artificial Organs* [online]. **22**(12), 805-810 [cit. 2020-03-08]. DOI: 10.1177/039139889902201205. ISSN 0391-3988. Dostupné z: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/039139889902201205>
- HMDB: *The Human Metabolome Database* [online], 2018. Kanada: Wishart [cit. 2020-03-01]. Dostupné z: <https://hmdb.ca/>
- HOFFMANN, Georg F. a Stefan KÖLKER, 2016. Cerebral Organic Acid Disorders and Other Disorders of Lysine Catabolism. SAUDUBRAY, Jean-Marie, Matthias R. BAUMGARTNER a John WALTER, ed. *Inborn Metabolic Diseases* [online]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2016 [cit. 2020-03-01]. DOI: 10.1007/978-3-662-49771-5_22. ISBN 978-3-662-49769-2. Dostupné z: http://link.springer.com/10.1007/978-3-662-49771-5_22
- INOUE, Koichi, Yasuto MIYAZAKI, Keiko UNNO, Jun Zhe MIN, Kenichiro TODOROKI a Toshimasa TOYO'OKA, 2016. Stable isotope dilution HILIC-MS/MS method for accurate quantification of glutamic acid, glutamine, pyroglutamic acid, GABA and theanine in mouse brain tissues. *Biomedical Chromatography* [online]. **30**(1), 55-61 [cit. 2020-05-08]. DOI: 10.1002/bmc.3502. ISSN 02693879. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/bmc.3502>
- JACOB, Minnie, Abeer MALKAWI, Nour ALBAST, Salam AL BOUGHHA, Andreas LOPATA, Majed DASOUKI a Anas M. ABDEL RAHMAN, 2018. A targeted metabolomics approach for clinical diagnosis of inborn errors of metabolism. *Analytica Chimica Acta* [online]. **1025**, 141-153 [cit. 2020-03-16]. DOI: 10.1016/j.aca.2018.03.058. ISSN 00032670. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003267018304975>
- JÁČOVÁ, Jaroslava. *Vícerozměrné separační techniky pro analýzu metabolomu lidské moči*. Olomouc, 2019. Disertační práce. Univerzita Palackého v Olomouci. Vedoucí práce Tomáš ADAM.
- JAKOBS, Cornelis, Lambertus DORLAND, Lawrence SWEETMAN, Marinus DURAN, William L NYHAN a Sybe K WADMAN, 1984. Identification of Methyl-branched Chain Dicarboxylic Acids in Amniotic Fluid and Urine in Propionic and Methylmalonic Acidemia. *Pediatric Research* [online]. **18**(11), 1185-1191 [cit. 2020-05-08]. DOI: 10.1203/00006450-198411000-00027. ISSN 0031-3998. Dostupné z: <http://www.nature.com/doi/10.1203/00006450-198411000-00027>
- JONES, P.M. a M.J. BENNETT, 2017. Disorders of mitochondrial fatty acid β -oxidation. *Biomarkers in Inborn Errors of Metabolism* [online]. Elsevier, 2017 [cit. 2020-03-02]. DOI: 10.1016/B978-0-12-802896-4.00005-5. ISBN 9780128028964. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128028964000055>
- KEGG: *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* [online], 1995. Japonsko: Kanehisa Laboratories [cit. 2020-05-10]. Dostupné z: <https://www.kegg.jp/>
- KILLIAN, Dennis M. a Prashant J. CHIKHALE, 2001. Predominant functional activity of the large, neutral amino acid transporter (LAT1) isoform at the cerebrovasculature. *Neuroscience Letters* [online]. **306**(1-2), 1-4 [cit. 2020-05-09]. DOI: 10.1016/S0304-3940(01)01810-9. ISSN 03043940. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304394001018109>
- KISHIMOTO, Yasuo, Marcia WILLIAMS, Hugo W. MOSER, Charles HIGNITE a Klaus BIEMANN, 1973. Branched-chain and odd-numbered fatty acids and aldehydes in the nervous system of a patient with deranged vitamin B12 metabolism. *Journal of Lipid*

- Research* [online]. **14**(1), 69-77 [cit. 2020-05-08]. Dostupné z: <https://www.jlr.org/content/14/1/69.long>
- KÖRVER-KEULARTS, Irene M. L. W., Ping WANG, Huub W. A. H. WATERVAL, et al., 2018. Fast and accurate quantitative organic acid analysis with LC-QTOF/MS facilitates screening of patients for inborn errors of metabolism. *Journal of Inherited Metabolic Disease* [online]. **41**(3), 415-424 [cit. 2020-03-08]. DOI: 10.1007/s10545-017-0129-0. ISSN 0141-8955. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1007/s10545-017-0129-0>
- KOŽICH, Viktor, Andrew A. M. MORRIS a Henk J. BLOM, 2016. Disorders of Sulfur Amino Acid Metabolism. SAUDUBRAY, Jean-Marie, Matthias R. BAUMGARTNER a John WALTER, ed. *Inborn Metabolic Diseases* [online]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2016 [cit. 2020-03-02]. DOI: 10.1007/978-3-662-49771-5_20. ISBN 978-3-662-49769-2. Dostupné z: http://link.springer.com/10.1007/978-3-662-49771-5_20
- KUMPS, A., E. VAMOS, Y. MARDENS, M. ABRAMOWICZ, J. GENIN a P. DUEZ, 2004. Assessment of an electron-impact GC-MS method for organic acids and glycine conjugates in amniotic fluid. *Journal of Inherited Metabolic Disease* [online]. **27**(5), 567-579 [cit. 2020-03-08]. DOI: 10.1023/B:BOLI.0000042981.52186.a9. ISSN 0141-8955. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1023/B:BOLI.0000042981.52186.a9>
- LA MARCA, Giancarlo a Cristiano RIZZO, 2011. Analysis of Organic Acids and Acylglycines for the Diagnosis of Related Inborn Errors of Metabolism by GC- and HPLC-MS. METZ, Thomas O., ed. *Metabolic Profiling* [online]. Totowa, NJ: Humana Press, 2011-12-17 [cit. 2020-03-05]. Methods in Molecular Biology. DOI: 10.1007/978-1-61737-985-7_4. ISBN 978-1-61737-984-0. Dostupné z: http://link.springer.com/10.1007/978-1-61737-985-7_4
- LAFFEL, Lori, 1999. Ketone Bodies: a Review of Physiology, Pathophysiology and Application of Monitoring to Diabetes. *Diabetes Metabolism Research and Reviews* [online]. **15**(6), 412-426 [cit. 2020-05-10]. DOI: 10.1002/(sici)1520-7560(199911/12)15:6<412::aid-dmrr72>3.0.co;2-8. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/%28SICI%291520-7560%28199911/12%2915%3A6%3C412%3A%3AAID-DMRR72%3E3.0.CO%3B2-8>
- LI, Xiang, Zhiliang XU, Xin LU, Xuehui YANG, Peiyuan YIN, Hongwei KONG, Ying YU a Guowang XU, 2009. Comprehensive two-dimensional gas chromatography/time-of-flight mass spectrometry for metabolomics: Biomarker discovery for diabetes mellitus. *Analytica Chimica Acta* [online]. **633**(2), 257-262 [cit. 2020-05-08]. DOI: 10.1016/j.aca.2008.11.058. ISSN 00032670. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003267008019909>
- LO, S.F., 2017. Organic acid disorders. *Biomarkers in Inborn Errors of Metabolism* [online]. Elsevier, 2017 [cit. 2020-03-01]. DOI: 10.1016/B978-0-12-802896-4.00002-X. ISBN 9780128028964. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B978012802896400002X>
- LO, Stanley F., Velta YOUNG a William J. RHEAD, 2010. Identification of Urine Organic Acids for the Detection of Inborn Errors of Metabolism Using Urease and Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS). GARG, Uttam a Catherine A. HAMMETT-STABLER, ed. *Clinical Applications of Mass Spectrometry* [online]. Totowa, NJ: Humana Press, 2010-10-30 [cit. 2020-03-08]. Methods in Molecular Biology. DOI: 10.1007/978-1-60761-459-3_42. ISBN 978-1-60761-458-6. Dostupné z: http://link.springer.com/10.1007/978-1-60761-459-3_42
- MACK, Matthias, Ute SCHNIEGLER-MATTOX, Verena PETERS, Georg F. HOFFMANN, Michael LIESERT, Wolfgang BUCKEL a Johannes ZSCHOCKE, 2006. Biochemical characterization of human 3-methylglutaconyl-CoA hydratase and its role in leucine metabolism. *FEBS Journal* [online]. **273**(9), 2012-2022 [cit. 2020-05-08]. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2006.05218.x. ISSN 1742464X. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1742-4658.2006.05218.x>
- MAMER, Orval A., 2017. Medical Applications of Mass Spectrometry. LINDON, John, George E. TRANTER a David KOPPENAAL. *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry* [online]. 3rd edition. Elsevier, 2017 [cit. 2020-05-09]. DOI: 10.1016/B978-0-

- 12-803224-4.00199-0. ISBN 9780128032251. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128032244001990>
- MANOLI, I., J. R. SYSOL, L. LI, et al., 2013. Targeting proximal tubule mitochondrial dysfunction attenuates the renal disease of methylmalonic acidemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. **110**(33), 13552-13557 [cit. 2020-05-09]. DOI: 10.1073/pnas.1302764110. ISSN 0027-8424. Dostupné z: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1302764110>
- MELO, Daniela R., Alicia J. KOWALTOWSKI, Moacir WAJNER a Roger F. CASTILHO, 2011. Mitochondrial energy metabolism in neurodegeneration associated with methylmalonic acidemia. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* [online]. **43**(1), 39-46 [cit. 2020-05-09]. DOI: 10.1007/s10863-011-9330-2. ISSN 0145-479X. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10863-011-9330-2>
- Metagene: Metabolic and Genetic Information Center* [online], 2017. Německo: Frauendienst-Egger [cit. 2020-03-01]. Dostupné z: <http://www.metagene.de/>
- MIRANDOLA, S. R., D. R. MELO, P. F. SCHUCK, G. C. FERREIRA, M. WAJNER a R. F. CASTILHO, 2008. Methylmalonate inhibits succinate-supported oxygen consumption by interfering with mitochondrial succinate uptake. *Journal of Inherited Metabolic Disease* [online]. **31**(1), 44-54 [cit. 2020-05-09]. DOI: 10.1007/s10545-007-0798-1. ISSN 0141-8955. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1007/s10545-007-0798-1>
- MORRIS, Andrew A. M. a Ute SPIEKERKOETTER, 2016. Disorders of Mitochondrial Fatty Acid Oxidation & Riboflavin Metabolism. SAUDUBRAY, Jean-Marie, Matthias R. BAUMGARTNER a John WALTER, ed. *Inborn Metabolic Diseases* [online]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2016 [cit. 2020-03-02]. DOI: 10.1007/978-3-662-49771-5_12. ISBN 978-3-662-49769-2. Dostupné z: http://link.springer.com/10.1007/978-3-662-49771-5_12
- NAGAMANI, Sandesh C.S., Philippe M. CAMPEAU, Oleg A. SHCHELOCHKOV, et al., 2012. Nitric-Oxide Supplementation for Treatment of Long-Term Complications in Argininosuccinic Aciduria. *The American Journal of Human Genetics* [online]. **90**(5), 836-846 [cit. 2020-03-02]. DOI: 10.1016/j.ajhg.2012.03.018. ISSN 00029297. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002929712001620>
- NAGARAJA, Dindagur, Sopanahalli Narasimhamurthy MAMATHA, Tanima DE a Rita CHRISTOPHER, 2010. Screening for inborn errors of metabolism using automated electrospray tandem mass spectrometry: Study in high-risk Indian population. *Clinical Biochemistry* [online]. **43**(6), 581-588 [cit. 2020-03-05]. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2009.12.009. ISSN 00099120. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0009912009005578>
- NOGUCHI, Kazuyoshi, Toshimi MIZUKOSHI, Hiroshi MIYANO a Naoyuki YAMADA, 2014. Development of a New LC-MS/MS Method for the Quantification of Keto Acids. *CHROMATOGRAPHY* [online]. **35**(3), 117-123 [cit. 2020-05-10]. DOI: 10.15583/jpchrom.2014.017. ISSN 1342-8284. Dostupné z: https://www.jstage.jst.go.jp/article/jpchrom/35/3/35_2014.017/_article
- Novorozenecký screening* [online], 2013. Česká republika: Votava [cit. 2020-03-01]. Dostupné z: <https://www.novorozeneckyscreening.cz/>
- OLSON, Kristine C., Gang CHEN a Christopher J. LYNCH, 2013. Quantification of branched-chain keto acids in tissue by ultra fast liquid chromatography–mass spectrometry. *Analytical Biochemistry* [online]. **439**(2), 116-122 [cit. 2020-05-10]. DOI: 10.1016/j.ab.2013.05.002. ISSN 00032697. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003269713002224>
- ORNGREEN, M. C., K. L. MADSEN, N. PREISLER, G. ANDERSEN, J. VISSING a P. LAFORET, 2014. Bezafibrate in skeletal muscle fatty acid oxidation disorders: A randomized clinical trial. *Neurology* [online]. **82**(7), 607-613 [cit. 2020-03-02]. DOI: 10.1212/WNL.000000000000118. ISSN 0028-3878. Dostupné z: <http://www.neurology.org/cgi/doi/10.1212/WNL.000000000000118>

- Orphanet: The portal for rare diseases and orphan drugs* [online], 2014. Francie: Institut national de la santé et de la recherche médicale [cit. 2020-05-10]. Dostupné z: <https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/index.php?lng=EN>
- OZAND, Pinar T. a Generoso G. GASCON, 2016. Topical Review Article: Organic Acidurias. *Journal of Child Neurology* [online]. **6**(3), 196-219 [cit. 2020-03-01]. DOI: 10.1177/088307389100600302. ISSN 0883-0738. Dostupné z: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/088307389100600302>
- PASIKANTI, Kishore K., Paul C. HO a Eric C. Y. CHAN, 2008. Development and validation of a gas chromatography/mass spectrometry metabonomic platform for the global profiling of urinary metabolites. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* [online]. **22**(19), 2984-2992 [cit. 2020-03-08]. DOI: 10.1002/rcm.3699. ISSN 09514198. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/rcm.3699>
- PATTON, Stuart a A.A. BENSON, 1966. Phytol metabolism in the bovine. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism* [online]. **125**(1), 22-32 [cit. 2020-05-08]. DOI: 10.1016/0005-2760(66)90140-8. ISSN 00052760. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0005276066901408>
- PENG, Minzhi, Yanna CAI, Xiefan FANG a Li LIU, 2016. Rapid quantification of metabolic intermediates in blood by liquid chromatography-tandem mass spectrometry to investigate congenital lactic acidosis. *Analytica Chimica Acta* [online]. **942**, 50-57 [cit. 2020-05-10]. DOI: 10.1016/j.aca.2016.08.025. ISSN 00032670. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003267016309680>
- PETERS, Verena, Marina MORATH, Matthias MACK, et al., 2019. Formation of 3-hydroxyglutaric acid in glutaric aciduria type I: in vitro participation of medium chain acyl-CoA dehydrogenase. *JIMD Reports* [online]. **47**(1), 30-34 [cit. 2020-05-08]. DOI: 10.1002/jmd2.12026. ISSN 21928312. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jmd2.12026>
- PILLA, Carmen, Rui Felipe DE OLIVEIRA CARDOZO, Carlos SEVERO DUTRA-FILHO, Angela TEREZINHA SOUZA WYSE, Moacir WAJNER a Clóvis MILTON DUVAL WANNMACHER, 2003. *Neurochemical Research* [online]. **28**(5), 675-679 [cit. 2020-05-09]. DOI: 10.1023/A:1022876130038. ISSN 03643190. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1023/A:1022876130038>
- PITT, James J, Mary EGGINGTON a Stephen G KAHLER, 2002. Comprehensive Screening of Urine Samples for Inborn Errors of Metabolism by Electrospray Tandem Mass Spectrometry. *Clinical Chemistry* [online]. **48**(11), 1970-1980 [cit. 2020-03-05]. DOI: 10.1093/clinchem/48.11.1970. ISSN 0009-9147. Dostupné z: <https://academic.oup.com/clinchem/article/48/11/1970/5642290>
- PRIETSCH, V., E. MAYATEPEK, H. KRASTEL, et al., 2003. Mevalonate Kinase Deficiency: Enlarging the Clinical and Biochemical Spectrum. *PEDIATRICS* [online]. **111**(2), 258-261 [cit. 2020-03-02]. DOI: 10.1542/peds.111.2.258. ISSN 0031-4005. Dostupné z: <http://pediatrics.aappublications.org/cgi/doi/10.1542/peds.111.2.258>
- RACEK, Jaroslav, c2006. *Klinická biochemie. 2.,* preprac. vyd. Praha: Galén. ISBN 8072623249.
- RANGROO THRANE, Vinita, Alexander S THRANE, Fushun WANG, et al., 2013. Ammonia triggers neuronal disinhibition and seizures by impairing astrocyte potassium buffering. *Nature Medicine* [online]. **19**(12), 1643-1648 [cit. 2020-03-02]. DOI: 10.1038/nm.3400. ISSN 1078-8956. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/nm.3400>
- REGUEIRO, Jorge, Anna VALLVERDÚ-QUERALT, Jesús SIMAL-GÁNDARA, Ramón ESTRUCH a Rosa María LAMUELA-RAVENTÓS, 2014. Urinary tartaric acid as a potential biomarker for the dietary assessment of moderate wine consumption: a randomised controlled trial. *British Journal of Nutrition* [online]. **111**(9), 1680-1685 [cit. 2020-05-08]. DOI: 10.1017/S0007114513004108. ISSN 0007-1145. Dostupné z: https://www.cambridge.org/core/product/identifider/S0007114513004108/type/journal_article
- RINALDO, Piero, S. HAHN a D. MATERN, 2006. Inborn Errors of Amino Acid, Organic Acid and fatty Acid Metabolism. BURTIS, Carl A., Edward R. ASHWOOD a David E.

- BRUNS. *Tietz textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*. 4th edition. Velká Británie: Elsevier Saunders.
- SAUDUBRAY, Jean-Marie a Angels GARCIA-CAZORLA. Clinical Approach to Inborn Errors of Metabolism in Pediatrics. SAUDUBRAY, Jean-Marie, Matthias R. BAUMGARTNER a John WALTER, ed. *Inborn Metabolic Diseases* [online]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2016, 2016, s. 3-70 [cit. 2020-03-01]. DOI: 10.1007/978-3-662-49771-5_1. ISBN 978-3-662-49769-2. Dostupné z: http://link.springer.com/10.1007/978-3-662-49771-5_1
- SAUDUBRAY, Jean-Marie, Matthias R. BAUMGARTNER a John WALTER, ed., 2016. *Inborn Metabolic Diseases* [online]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg [cit. 2020-03-01]. DOI: 10.1007/978-3-662-49771-5. ISBN 978-3-662-49769-2.
- SAUER, Sven W., Jürgen G. OKUN, Gert FRICKER, et al., 2006. Intracerebral accumulation of glutaric and 3-hydroxyglutaric acids secondary to limited flux across the blood-brain barrier constitute a biochemical risk factor for neurodegeneration in glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. *Journal of Neurochemistry* [online]. **97**(3), 899-910 [cit. 2020-05-08]. DOI: 10.1111/j.1471-4159.2006.03813.x. ISSN 00223042. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1471-4159.2006.03813.x>
- SAUER, Sven W., Jürgen G. OKUN, Marina A. SCHWAB, Linda R. CRNIC, Georg F. HOFFMANN, Stephen I. GOODMAN, David M. KOELLER a Stefan KÖLKER, 2005. Bioenergetics in Glutaryl-Coenzyme A Dehydrogenase Deficiency. *Journal of Biological Chemistry* [online]. **280**(23), 21830-21836 [cit. 2020-05-08]. DOI: 10.1074/jbc.M502845200. ISSN 0021-9258. Dostupné z: <http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M502845200>
- SCHIFF, Manuel, Hélène Ogier DE BAULNY a Carlo DIONISI-VICI, 2016. Branched-chain Organic Acidurias/Acidaemias. SAUDUBRAY, Jean-Marie, Matthias R. BAUMGARTNER a John WALTER, ed. *Inborn Metabolic Diseases* [online]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2016 [cit. 2020-03-01]. DOI: 10.1007/978-3-662-49771-5_18. ISBN 978-3-662-49769-2. Dostupné z: http://link.springer.com/10.1007/978-3-662-49771-5_18
- SHAH, Ira, 2017. Lactic Acidosis in Children – A Varied Presentation. *Journal of Pediatric Intensive Care* [online]. **06**(03), 206-208 [cit. 2020-05-08]. DOI: 10.1055/s-0036-1596065. ISSN 2146-4618. Dostupné z: <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-0036-1596065>
- SHAW, William, Ellen KASSEN a Enrique CHAVES, 1995. Increased Urinary Excretion of Analogs of Krebs Cycle Metabolites and Arabinose in Two Brothers with Autistic Features. *Clinical chemistry* [online]. **41**(8), 1094-1104 [cit. 2020-05-08]. Dostupné z: <https://pdfs.semanticscholar.org/31fb/060fb53e5d5191d026ff0e0783c136e35ae2.pdf>
- SHOEMAKER, James D. a William H. ELLIOTT, 1991. Automated screening of urine samples for carbohydrates, organic and amino acids after treatment with urease. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* [online]. **562**(1-2), 125-138 [cit. 2020-03-08]. DOI: 10.1016/0378-4347(91)80571-S. ISSN 03784347. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/037843479180571S>
- SIMMONDS, H. A., J. A. DULEY, L. D. FAIRBANKS a M. B. MCBRIDE, 1997. *Journal of Inherited Metabolic Disease* [online]. **20**(2), 214-226 [cit. 2020-03-05]. DOI: 10.1023/A:1005308923168. ISSN 01418955. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1023/A:1005308923168>
- SIMS, Cynthia J., Don T. FUJITO, Dennis R. BURHOLT, Josef DADOK, Harlan R. GILES a D. Allan WILKINSON, 1993. Quantification of human amniotic fluid constituents by high resolution proton nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy. *Prenatal Diagnosis* [online]. **13**(6), 473-480 [cit. 2020-03-05]. DOI: 10.1002/pd.1970130609. ISSN 01973851. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/pd.1970130609>
- SIRRS, S., C. HOLLAK, M. MERKEL, et al., 2016. The Frequencies of Different Inborn Errors of Metabolism in Adult Metabolic Centres: Report from the SSIEM Adult Metabolic Physicians Group. MORAVA, Eva, Matthias BAUMGARTNER, Marc PATTERSON, Shamima RAHMAN, Johannes ZSCHOCKE a Verena PETERS, ed. *JIMD Reports, Volume 27* [online]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2015-10-9 [cit. 2020-03-01].

- JIMD Reports. DOI: 10.1007/8904_2015_435. ISBN 978-3-662-50408-6. Dostupné z: http://link.springer.com/10.1007/8904_2015_435
- SMITH, L.D. a U. GARG, 2017. Urea cycle and other disorders of hyperammonemia. *Biomarkers in Inborn Errors of Metabolism* [online]. Elsevier, 2017 [cit. 2020-03-02]. DOI: 10.1016/B978-0-12-802896-4.00004-3. ISBN 9780128028964. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128028964000043>
- SRIBOONVORAKUL, Natthida, Natchanun LEEPIPATPIBOON, Arjen M. DONDORP, Thomas POUPLIN, Nicholas J. WHITE, Joel TARNING a Niklas LINDEGARDH, 2013. Liquid chromatographic–mass spectrometric method for simultaneous determination of small organic acids potentially contributing to acidosis in severe malaria. *Journal of Chromatography B* [online]. **941**, 116-122 [cit. 2020-05-10]. DOI: 10.1016/j.jchromb.2013.10.005. ISSN 15700232. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1570023213005369>
- ŠŤASTNÁ, S. Laboratorní diagnostika dědičných metabolických poruch. *Medicina pro praxi*, 2008, **5** (6), 274-276.
- STRAND, Janne M., Ragnhild SKINNES, Katja SCHEFFLER, Terje ROOTVELT, Berit WOLDSETH, Magnar BJØRÅS a Lars EIDE, 2014. Genome instability in Maple Syrup Urine Disease correlates with impaired mitochondrial biogenesis. *Metabolism* [online]. **63**(8), 1063-1070 [cit. 2020-05-09]. DOI: 10.1016/j.metabol.2014.05.003. ISSN 00260495. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0026049514001437>
- STRAUSS, Kevin A., Patrick DONNELLY a Max WINTERMARK, 2010. Cerebral haemodynamics in patients with glutaryl-coenzyme A dehydrogenase deficiency. *Brain* [online]. **133**(1), 76-92 [cit. 2020-05-08]. DOI: 10.1093/brain/awp297. ISSN 1460-2156. Dostupné z: <https://academic.oup.com/brain/article-lookup/doi/10.1093/brain/awp297>
- SUMMAR, Marshall L., Stefan KOELKER, Debra FREEDENBERG, Cynthia LE MONS, Johannes HABERLE, Hye-Seung LEE a Brian KIRMSE, 2013. The incidence of urea cycle disorders. *Molecular Genetics and Metabolism* [online]. **110**(1-2), 179-180 [cit. 2020-03-02]. DOI: 10.1016/j.ymgme.2013.07.008. ISSN 10967192. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1096719213002333>
- TASIC, Velibor, Zoran GUCEV, 2015. Nephrolithiasis and Nephrocalcinosis in Children - Metabolic and Genetic Factors. *Pediatric Endocrinology Reviews*. **13**(1):468-476.
- TER HAAR, Nienke, Helen LACHMANN, Seza ÖZEN, et al., 2013. Treatment of autoinflammatory diseases: results from the Eurofever Registry and a literature review. *Annals of the Rheumatic Diseases* [online]. **72**(5), 678-685 [cit. 2020-03-02]. DOI: 10.1136/annrheumdis-2011-201268. ISSN 0003-4967. Dostupné z: <http://ard.bmj.com/lookup/doi/10.1136/annrheumdis-2011-201268>
- TIRANTI, Valeria, Carlo VISCOMI, Tatjana HILDEBRANDT, et al., 2009. Loss of ETHE1, a mitochondrial dioxygenase, causes fatal sulfide toxicity in ethylmalonic encephalopathy. *Nature Medicine* [online]. **15**(2), 200-205 [cit. 2020-03-02]. DOI: 10.1038/nm.1907. ISSN 1078-8956. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/nm.1907>
- TSAI, Michael Y., Debra D. JOHNSON, Lawrence SWEETMAN a Susan A. BERRY, 1989. Two siblings with biotin-resistant 3-methylcrotonyl-coenzyme A carboxylase deficiency. *The Journal of Pediatrics* [online]. **115**(1), 110-113 [cit. 2020-03-01]. DOI: 10.1016/S0022-3476(89)80343-9. ISSN 00223476. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022347689803439>
- VAN DER HILST, Jeroen C. H., Evelien J. BODAR, Karyl S. BARRON, Joost FRENKEL, Joost P. H. DRENTH, Jos W. M. VAN DER MEER a Anna SIMON, 2008. Long-Term Follow-Up, Clinical Features, and Quality of Life in a Series of 103 Patients With Hyperimmunoglobulinemia D Syndrome. *Medicine* [online]. **87**(6), 301-310 [cit. 2020-03-02]. DOI: 10.1097/MD.0b013e318190cfb7. ISSN 0025-7974. Dostupné z: <http://journals.lww.com/00005792-200811000-00001>

- VAN GENNIP, Albert H. a Andre B. P. VAN KUILENBURG, 2002. Defects of Pyrimidine Degradation: Clinical, Molecular and Diagnostic Aspects. ZOREF-SHANI, Esther a Oded SPERLING, ed. *Purine and Pyrimidine Metabolism in Man X* [online]. Boston, MA: Springer US, 2002 [cit. 2020-03-05]. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. DOI: 10.1007/0-306-46843-3_46. ISBN 978-0-306-46515-4. Dostupné z: http://link.springer.com/10.1007/0-306-46843-3_46
- VILLANI, Guglielmo RD, Giovanna GALLO, Emanuela SCOLAMIERO, Francesco SALVATORE a Margherita RUOPPOLO, 2017. "Classical organic acidurias": diagnosis and pathogenesis. *Clinical and Experimental Medicine* [online]. **17**(3), 305-323 [cit. 2020-03-01]. DOI: 10.1007/s10238-016-0435-0. ISSN 1591-8890. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10238-016-0435-0>
- VISCOMI, Carlo, Alberto B BURLINA, Imad DWEIKAT, Mario SAVOJARDO, Costanza LAMPERTI, Tatjana HILDEBRANDT, Valeria TIRANTI a Massimo ZEVIANI, 2010. Combined treatment with oral metronidazole and N-acetylcysteine is effective in ethylmalonic encephalopathy. *Nature Medicine* [online]. **16**(8), 869-871 [cit. 2020-03-02]. DOI: 10.1038/nm.2188. ISSN 1078-8956. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/nm.2188>
- WAJNER, Moacir a Stephen I. GOODMAN, 2011. Disruption of mitochondrial homeostasis in organic acidurias: insights from human and animal studies. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* [online]. **43**(1), 31-38 [cit. 2020-05-09]. DOI: 10.1007/s10863-011-9324-0. ISSN 0145-479X. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10863-011-9324-0>
- WALLENFELS, K., 1968. *Biological Chemistry*. Von H. R. Mahler und E. J. Cordes. Harper & Row (Publishers), New York-London 1966. 1. Aufl., XV, 872 S., zahlr. Abb. u. Tab., gen. 63 s. *Angewandte Chemie* [online]. **80**(1), 51-51 [cit. 2020-05-08]. DOI: 10.1002/ange.19680800124. ISSN 00448249. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/ange.19680800124>
- WALTER, John, Philippe A. LABRUNE a Pascal LAFORET, 2016. The Glycogen Storage Diseases and Related Disorders. SAUDUBRAY, Jean-Marie, Matthias R. BAUMGARTNER a John WALTER, ed. *Inborn Metabolic Diseases* [online]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2016 [cit. 2020-03-04]. DOI: 10.1007/978-3-662-49771-5_5. ISBN 978-3-662-49769-2. Dostupné z: http://link.springer.com/10.1007/978-3-662-49771-5_5
- WANDERS, Ronald J. A., Cornelis JAKOBS a Ola H. SKJELDAL, 2001. SCRIVER, Charles R., William S. SLY, Barton CHILDS, Arthur L. BEAUDET, David VALLE, Kenneth W. KINZLER a Bert VOGELSTEIN. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease* [online]. 8th edition. New York: McGraw-Hill [cit. 2020-05-08]. ISBN 978-0079130358.
- WANT, Elizabeth J, Ian D WILSON, Helen GIKA, Georgios THEODORIDIS, Robert S PLUMB, John SHOCKCOR, Elaine HOLMES a Jeremy K NICHOLSON, 2010. Global metabolic profiling procedures for urine using UPLC-MS. *Nature Protocols* [online]. **5**(6), 1005-1018 [cit. 2020-03-08]. DOI: 10.1038/nprot.2010.50. ISSN 1754-2189. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/nprot.2010.50>
- WIERZBICKI, Anthony S., Matthew D. LLOYD, Christopher J. SCHOFIELD, Michael D. FEHER a F. Brian GIBBERD, 2002. Refsum's disease: a peroxisomal disorder affecting phytanic acid alpha-oxidation. *Journal of Neurochemistry* [online]. **80**(5), 727-735 [cit. 2020-05-08]. DOI: 10.1046/j.0022-3042.2002.00766.x. ISSN 0022-3042. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.0022-3042.2002.00766.x>
- WILLSTÄTTER, Richard, Erwin W. MAYER a Ernst HÜNI, 1911. Untersuchungen über Chlorophyll. XII. Über Phytol I. *Justus Liebig's Annalen der Chemie* [online]. **378**(1), 73-152 [cit. 2020-05-08]. DOI: 10.1002/jlac.19113780104. ISSN 00754617. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jlac.19113780104>
- ZHANG, Aihua, Hui SUN, Ping WANG, Ying HAN a Xijun WANG, 2012. Recent and potential developments of biofluid analyses in metabolomics. *Journal of Proteomics* [online]. **75**(4), 1079-1088 [cit. 2020-03-05]. DOI: 10.1016/j.jprot.2011.10.027. ISSN 18743919. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1874391911005367>

- ZSENGELLÉR, Zsuzsanna K., Nika ALJINOVIC, Lisa A. TEOT, et al., 2014. Methylmalonic acidemia: A megamitochondrial disorder affecting the kidney. *Pediatric Nephrology* [online]. **29**(11), 2139-2146 [cit. 2020-05-09]. DOI: 10.1007/s00467-014-2847-y. ISSN 0931-041X. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00467-014-2847-y>
- ZUKUNFT, Sven, Martina SORGENFREI, Cornelia PREHN, Gabriele MÖLLER a Jerzy ADAMSKI, 2013. Targeted Metabolomics of Dried Blood Spot Extracts. *Chromatographia* [online]. **76**(19-20), 1295-1305 [cit. 2020-03-16]. DOI: 10.1007/s10337-013-2429-3. ISSN 0009-5893. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10337-013-2429-3>
- ZURFLÜH, Marcel R., Johannes ZSCHOCKE, Martin LINDNER, et al., 2008. Molecular genetics of tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency. *Human Mutation* [online]. **29**(1), 167-175 [cit. 2020-03-01]. DOI: 10.1002/humu.20637. ISSN 10597794. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/humu.20637>
- ZWICKLER, Tamaris, Gisela HAEGE, Alina RIDERER, Friederike HÖRSTER, Georg F. HOFFMANN, Peter BURGARD a Stefan KÖLKER, 2012. Metabolic decompensation in methylmalonic aciduria: which biochemical parameters are discriminative? *Journal of Inherited Metabolic Disease* [online]. **35**(5), 797-806 [cit. 2020-05-08]. DOI: 10.1007/s10545-011-9426-1. ISSN 0141-8955. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1007/s10545-011-9426-1>

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ACAD9	acyl-CoA-dehydrogenasa 9
AGT	alanin:glyoxylátaminotransferasa
ATP	adenosintrifosfát
BCAA	aminokyseliny s rozvětveným řetězcem (angl. brached chain amino acids)
BOX MK	β -oxidace mastných kyselin
BSTFA	N,O,-bis-(trimethylsilyl)trifluoroacetamid
CACTD	karnitin-acylkarnitintranslokasová deficiencie
CNS	centrální nervová soustava
CV	variační koeficient
DAD	detekce diodového pole
DMP	dědičné metabolické poruchy
DP	deklasterační potenciál
ECHS1D	deficiencie enoyl-CoAhydratasy mastných kyselin s krátkým řetězcem
EPEMA	ethylmalonová encefalopatie
HGZ	izotopově značený hexanoylglycin
HVAZ	izotopově značená kyselina homovanilová
GA1	glutarová acidurie typu I
GC-MS	plynová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií
IEM	dědičné metabolické poruchy (angl. inherited errors of metabolism)
IVA	isovalerová acidémie/acidurie
Iva-CarZ	izotopově značený isovalerylkarnitin
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
LacZ	izotopově značený laktát
LCHADD	deficiencie 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenasy mastných kyselin s dlouhým řetězcem
LC-MS	kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií
LOD	spodní limit detekce
LOQ	spodní limit kvantifikace
MCADD	deficiencie acyl-CoA-dehydrogenasy mastných kyselin se středně dlouhým řetězcem
MeCitZ	izotopově značený methylcitrát
MF	mobilní fáze

MMA	methylnalonová acidémie/acidurie
MMAD	deuterovaná methylnalonová kyselina
MRM	angl. multiple reaction monitoring
MSUD	nemoc javorového sirupu; leucinóza
MTP	mitochondriální trifunkční protein
MTPD	deficience mitochondriálního trifunkčního proteinu
PA	propionová acidémie/acidurie
PAH	fenylalaninhydroxylasa
PEX	peroxin
PH1	primární hyperoxalurie 1
PKU	fenylketonurie
PZ	izotopově značená kyselina pipekolová
RID	detekce indexu lomu
SCADD	deficience acyl-CoA-dehydrogenasy mastných kyselin s krátkým řetězcem
SCHADD	Deficience 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenasy mastných kyselin s krátkým řetězcem
SIM	angl. selected ion monitoring
TIC	chromatogram celkového souboru iontů (angl. total ion current)
TMCS	trimethylchlorosilan
TMS	trimethylsilyl
VLCADD	deficience acyl-CoA-dehydrogenasy mastných kyselin s velmi dlouhým řetězcem
ZS	Zellwegerův syndrom
EP	vstupní potenciál
CE	kolizná energie
CXP	potenciál na konci kolizní cely

9 PŘÍLOHY

Příloha 1 Tabulka s finální LC-MS metodou s údaji o prekurzorovém (Q1), produktovém (Q3) iontu, deklasteračních potenciálech (DP), vstupních potenciálech (EP), kolizních energiích (CE) a potenciálech na konci kolizní cely (CXP) pro metabolity detekované v -MRM módu.

Q1	Q3	RT	ID	MRM Window	Primary	Treshold	Dwell Weight	DP	EP	CE	CXP
144.917	59	7.19	3MG_1	120	1	10000	1	-70	-10	-30	-7
144.917	85	7.19	3MG_2	120	1	10000	1	-70	-10	-24	-9
144.914	83	7.15	Adip+3MG	120	1	10000	1	-35	-10	-18	-9
144.914	80.9	7.1	Adip_specif	120	1	10000	1	-35	-10	-26	-9
142.893	98.9	7.4	3-MGC_1	120	1	10000	1	-5	-10	-10	-11
142.893	55.1	7.4	3-MGC_2	120	1	10000	1	-5	-10	-20	-7
160.888	98.9	4.05	3-OH-3-MG_1	120	1	10000	1	-25	-10	-16	-11
160.888	57	4.05	3-OH-3-MG_2	120	1	10000	1	-25	-10	-22	-7
116.921	58.9	5.66	3-OHIV+3-OHV(6.12)	120	1	10000	1	-25	-10	-14	-7
116.899	58.9	6.12	3-OHV (2.pik)	120	1	10000	1	-25	-10	-14	-7
116.921	71	6.49	2-OHIV	120	1	10000	1	-15	-10	-16	-9
116.921	45	6.49	2-OHIV	120	1	10000	1	-15	-10	-16	-20
104.878	74.9	1.08	Glyceric_1	120	1	10000	1	-25	-10	-16	-9
104.878	57	1.08	Glyceric_2	120	1	10000	1	-25	-10	-18	-11
88.919	43	1.72	Lactic_a	120	1	10000	1	-5	-10	-14	-19
88.919	41	1.67	Lactic_a+b	120	1	10000	1	-5	-10	-32	-17
88.898	59.1	1.62	Lactic_b	120	1	10000	1	-5	-10	-14	-5
190.854	86.9	2.71	Citric	120	1	10000	1	-20	-10	-24	-9
190.854	110.9	2.05	Isocitric+Citric	300	1	10000	1	-20	-10	-16	-13
190.874	117	1.42	Isocitric	120	1	10000	1	-5	-10	-20	-13
172.877	85	3.36	Aconitic_A1	120	1	10000	1	-10	-10	-16	-9

Příloha 1 Tabulka s finální LC-MS metodou s údaji o prekurzorovém (Q1), produktovém (Q3) iontu, deklasteračních potenciálech (DP), vstupních potenciálech (EP), kolizních energiích (CE) a potenciálech na konci kolizní cely (CXP) pro metabolity detekované v -MRM módu *pokračování*.

Q1	Q3	RT	ID	MRM Window	Primary	Treshold	Dwell Weight	DP	EP	CE	CXP
172.877	85	4.79	Aconitic_B1	120	1	10000	1	-10	-10	-16	-9
172.877	128.9	3.36	Aconitic_A2	120	1	10000	1	-10	-10	-12	-15
172.877	128.9	4.79	Aconitic_B2	120	1	10000	1	-10	-10	-12	-15
116.894	98.9	3.03	Succinic	120	1	10000	1	-50	-10	-16	-11
116.879	55	3.77	Methylmalonic	120	1	10000	1	-5	-10	-32	-20
116.879	72.9	3.4	Succ+MMA	300	1	10000	1	-5	-10	-12	-9
74.888	45	1.07	Glycolic	120	1	10000	1	-25	-10	-14	-20
74.888	74.888	1.07	Glycolic_SIM	120	1	10000	1	-25	-10	-5	-10
114.853	70.9	1.82	Maleic	120	1	10000	1	-5	-10	-14	-11
114.854	71	2.37	Fumaric	120	1	10000	1	-5	-10	-14	-11
160.844	115	2.38	Fum-FA	120	1	10000	1	-5	-10	-10	-13
132.852	114.9	1.11	Malic_1	120	1	10000	1	-5	-10	-14	-13
132.852	73	1.11	Malic_2	120	1	10000	1	-5	-10	-22	-9
130.905	86.9	5.7	Glu+MeSucc+EMA	300	1	10000	1	-5	-10	-12	-11
130.905	54	6.25	EMA	120	1	10000	1	-5	-10	-42	-20
130.909	113	5.96	MeSucc	120	1	10000	1	-15	-10	-14	-13
130.91	69	5.1	Glutar	120	1	10000	1	-20	-10	-20	-7
102.842	41.1	1.24	Malonic_1	120	1	10000	1	-5	-10	-34	-19
102.842	59	1.24	Malonic_2	120	1	10000	1	-5	-10	-14	-7
146.887	84.9	2.13	2-OHG+3-OHG+citramal	300	1	10000	1	-20	-10	-18	-11
146.875	128.9	1.68	2-OHG	120	1	10000	1	-25	-10	-14	-15
146.88	43	1.87	3-OHG	120	1	10000	1	-5	-10	-32	-19
146.887	86.9	2.57	Citramalic	120	1	10000	1	-20	-10	-18	-11

Příloha 1 Tabulka s finální LC-MS metodou s údaji o prekurzorovém (Q1), produktovém (Q3) iontu, deklasteračních potenciálech (DP), vstupních potenciálech (EP), kolizních energiích (CE) a potenciálech na konci kolizní cely (CXP) pro metabolity detekované v -MRM módu *pokračování*.

Q1	Q3	RT	ID	MRM Window	Primary	Treshold	Dwell Weight	DP	EP	CE	CXP
172.947	111	10.47	Suberic_1	120	1	10000	1	-40	-10	-20	-13
172.947	83	10.47	Suberic_2	120	1	10000	1	-40	-10	-26	-9
200.953	139	12.17	Sebacic_1	120	1	10000	1	-50	-10	-22	-15
200.953	111	12.17	Sebacic_2	120	1	10000	1	-50	-10	-26	-13
130.935	85	9.09	2-OHIC_1	120	1	10000	1	-30	-10	-18	-9
130.935	68.9	9.09	2-OHIC_2	120	1	10000	1	-30	-10	-28	-9
180.866	121.9	9.2	HVA	120	1	10000	1	-25	-10	-18	-13
226.882	121.9	9.2	HVA-FA	120	1	10000	1	-5	-10	-28	-13
196.88	136.9	5.22	VMA_1	120	1	10000	1	-25	-10	-28	-15
196.88	137.9	5.22	VMA_2	120	1	10000	1	-25	-10	-16	-15
204.878	124.9	4.1	MeCit_A1	120	1	10000	1	-15	-10	-18	-13
204.878	124.9	5.71	MeCit_B1	120	1	10000	1	-15	-10	-18	-13
204.878	71	4.1	MeCit-A2	120	1	10000	1	-15	-10	-24	-9
204.878	71	5.71	MeCit-B2	120	1	10000	1	-15	-10	-24	-9
210.907	149.9	8.25	Vanillic_1	120	1	10000	1	-85	-10	-28	-17
210.907	133.9	8.25	Vanillic_2	120	1	10000	1	-85	-10	-26	-15
102.873	84.9	2.13	4-OH-but	120	1	10000	1	-25	-10	-14	-9
102.88	41	2.67	3-OH-but	120	1	10000	1	-70	-10	-32	-19
102.882	72.9	2.96	3-OH-isobut	120	1	10000	1	-20	-10	-14	-11
102.881	41	2.92	2-OHIB	120	1	10000	1	-40	-10	-32	-9
102.877	57	3.07	2-OH-but (2.pik za 2-OH- ibut 2.92)	120	1	10000	1	-25	-10	-16	-7
132.907	70.9	1.86	2,3-diOH-2Mbut	120	1	10000	1	-30	-10	-20	-9
132.907	89	1.86	2,3-diOH-2Mbut	120	1	10000	1	-30	-10	-16	-11

Příloha 1 Tabulka s finální LC-MS metodou s údaji o prekurzorovém (Q1), produktovém (Q3) iontu, deklasteračních potenciálech (DP), vstupních potenciálech (EP), kolizních energiích (CE) a potenciálech na konci kolizní cely (CXP) pro metabolity detekované v -MRM módu *pokračování*.

Q1	Q3	RT	ID	MRM Window	Primary	Treshold	Dwell Weight	DP	EP	CE	CXP
118.89	59	1.1	3,4-diOHbut	120	1	10000	1	-15	-10	-14	-7
118.883	47.1	1.36	2,3-diOHbut	120	1	10000	1	-30	-10	-18	-7
118.886	99	15	2,4-diOHbut	120	1	10000	1	-20	-10	-18	-11
115.887	74	1.43	AcGly	120	1	10000	1	-15	-10	-14	-9
129.913	74	2.66	ProGly	120	1	10000	1	-25	-10	-14	-9
143.935	74	5.87	BuGly	120	1	10000	1	-20	-10	-16	-9
143.924	73.9	5.66	IBuGly	120	1	10000	1	-50	-10	-16	-9
157.932	74	7.94	ValGly	120	1	10000	1	-30	-10	-16	-9
157.936	74	7.38	IvaGly	120	1	10000	1	-35	-10	-16	-9
157.933	73.9	7.13	2-MeBuGly	120	1	10000	1	-40	-10	-16	-9
171.952	74	10.41	HexGly	120	1	10000	1	-30	-10	-18	-9
174.929	76.9	10.41	C13N15 HexGly	120	1	10000	1	-40	-10	-18	-9
185.945	74	11.81	HepGly	120	1	10000	1	-30	-10	-18	-9
155.926	74	7.4	3-MCGly	120	1	10000	1	-25	-10	-16	-9
155.921	73.9	7.23	TiGly	120	1	10000	1	-35	-10	-14	-9
205.919	73.9	10.98	PheProGly	120	1	10000	1	-40	-10	-18	-9
229.956	73.9	8.7	SuberylGly	120	1	10000	1	-55	-10	-22	-9
180.885	162.9	7.44	4-HPL	120	1	10000	1	-35	-10	-18	-17
180.885	133.9	7.43	4-HPL	120	1	10000	1	-35	-10	-34	-15
287.972	81	6.42	Adipoyl-Car	120	1	1000	1	-45	-10	-54	-9
287.983	85	6.47	3MG-Car_A	120	1	1000	1	-50	-10	-40	-9
287.983	85	6.59	3MG-Car_B	120	1	1000	1	-50	-10	-40	-9
158.906	81	8.65	3-methyladipic	120	1	10000	1	-30	-10	-28	-9

Příloha 1 Tabulka s finální LC-MS metodou s údaji o prekurzorovém (Q1), produktovém (Q3) iontu, deklasteračních potenciálech (DP), vstupních potenciálech (EP), kolizních energiích (CE) a potenciálech na konci kolizní cely (CXP) pro metabolity detekované v -MRM módu *pokračování*.

Q1	Q3	RT	ID	MRM Window	Primary	Treshold	Dwell Weight	DP	EP	CE	CXP
158.91	68.9	8.75	pimelic	120	1	10000	1	-30	-10	-30	-9
158.906	97.1	8.7	3-methyladip+pimelic	300	1	10000	1	-30	-10	-18	-11
186.933	124.9	11.5	Azelaic_1	120	1	10000	1	-50	-10	-20	-13
186.933	97	11.5	Azelaic_2	120	1	10000	1	-50	-10	-26	-11
158.962	41	11.98	3-OH-octanoic_1	120	1	10000	1	-30	-10	-48	-19
204.926	159	11.98	3-OH-octanoic_FA	120	1	10000	1	-10	-10	-10	-15
174.862	85	5.72	Glutaconic_A1	120	1	1000	1	-5	-10	-12	-11
174.862	85	6.77	Glutaconic_B1	120	1	1000	1	-5	-10	-12	-11
174.862	41.2	5.72	Glutaconic_A2	120	1	1000	1	-5	-10	-26	-19
174.862	41.2	6.77	Glutaconic_B2	120	1	1000	1	-5	-10	-26	-19
148.873	43	0.9	tartaric_1	120	1	10000	1	-10	-10	-34	-9
148.873	86.9	0.9	tartaric_2	120	1	10000	1	-10	-10	-18	-11
216.946	157	10.34	3-OH-sebacic_1	120	1	10000	1	-5	-10	-20	-18
216.946	199	10.34	3-OH-sebacic_2	120	1	10000	1	-5	-10	-16	-18
120.902	101.9	2.6	D4-succinic_1	120	1	10000	1	-25	-10	-16	-16
120.902	76.9	2.6	D4-succinic_2	120	1	10000	1	-25	-10	-16	-10
119.904	75.9	3.28	D3-methylmalonic_1	120	1	10000	1	-5	-10	-14	-10
119.904	57.9	3.27	D3-methylmalonic_2	120	1	10000	1	-5	-10	-34	-14
186.962	58.9	13.49	3-OH decanoic_1	120	1	10000	1	-45	-10	-16	-8
186.962	41	13.49	3-OH decanoic_2	120	1	10000	1	-45	-10	-54	-18
162.833	117	2.58	D2-Fumaric-FA	120	1	10000	1	-15	-10	-10	-12
116.868	29.2	2.58	D2-Fumaric	120	1	10000	1	-50	-10	-20	-14
164.911	146.9	10.44	phenyllactic_1	120	1	10000	1	-15	-10	-16	-17

Příloha 1 Tabulka s finální LC-MS metodou s údaji o prekurzorovém (Q1), produktovém (Q3) iontu, deklasteračních potenciálech (DP), vstupních potenciálech (EP), kolizních energiích (CE) a potenciálech na konci kolizní cely (CXP) pro metabolity detekované v -MRM módu *pokračování*.

Q1	Q3	RT	ID	MRM Window	Primary	Treshold	Dwell Weight	DP	EP	CE	CXP
164.911	103	10.44	phenyllactic_2	120	1	10000	1	-15	-10	-22	-11
166.896	120.9	5.71	3-OH-mandelic	120	1	10000	1	-10	-10	-22	-13
166.896	123	6.12	2,5-diOH-PheAc (homogentisic)	120	1	10000	1	-20	-10	-16	-15
166.897	122.9	7.29	3,4-diOH-PheAc	120	1	10000	1	-5	-10	-12	-13
152.877	107.9	8.57	2,5-diOH-benzoic (gentisic)	120	1	10000	1	-20	-10	-28	-11
136.88	93	8.18	4-OH-benzoic	120	1	10000	1	-5	-10	-20	-11
150.908	106.9	7.95	mandelic_1	120	1	10000	1	-10	-10	-12	-13
196.871	151	7.95	mandelic_2	120	1	10000	1	-10	-10	-10	-9
150.903	107	9.79	2-HPA	120	1	10000	1	-10	-10	-18	-11
196.885	106.9	9.21	3-HPA	120	1	10000	1	-5	-10	-18	-11
150.907	78.9	8.66	4-HPA	120	1	10000	1	-25	-10	-24	-9
182.859	136.9	1.91	3,4-diOH-mandelic_1	120	1	10000	1	-15	-10	-20	-15
182.859	80.9	1.91	3,4-diOH-mandelic_2	120	1	10000	1	-15	-10	-38	-9
91.855	43.1	1.44	lactic C13_FA	120	1	10000	1	-5	-10	-34	-20
188.887	129.9	9.46	homovanillic C13	120	1	10000	1	-20	-10	-18	-16
234.905	129.9	9.46	homovanillic C13_FA	120	1	10000	1	-10	-10	-28	-14
207.857	127.9	4.54	2-methyl-d3-citric_1	120	1	10000	1	-30	-10	-18	-16
207.857	86.9	5.83	2-methyl-d3-citric_2	120	1	10000	1	-30	-10	-22	-10
144.744	100.9	1.57	2-oxoglutaric_1	120	1	10000	1	-50	-10	-12	-16
144.744	57	1.66	2-oxoglutaric_2	120	1	10000	1	-50	-10	-14	-8
158.855	59	3.17	2-oxoadipate	120	1	10000	1	-10	-10	-16	-8
174.885	128.9	9.28	2-oxoisocaproic	120	1	10000	1	-10	-10	-10	-14
72.874	45	0.78	glyoxylic	120	1	10000	1	-25	-10	-12	-20

Příloha 1 Tabulka s finální LC-MS metodou s údaji o prekurzorovém (Q1), produktovém (Q3) iontu, deklasteračních potenciálech (DP), vstupních potenciálech (EP), kolizních energiích (CE) a potenciálech na konci kolizní cely (CXP) pro metabolity detekované v -MRM módu *pokračování*.

Q1	Q3	RT	ID	MRM Window	Primary	Treshold	Dwell Weight	DP	EP	CE	CXP
150.904	92.9	11.53	phenoxyAc	120	1	10000	1	-25	-10	-20	-14
162.895	91	10.05	Phepyruvic_A	120	1	10000	1	-5	-10	-14	-10
162.895	91	10.8	Phepyruvic_B	120	1	10000	1	-5	-10	-14	-10
178.885	107	6.8	4-OH-PhePyr_A	120	1	10000	1	-20	-10	-12	-12
178.885	107	10.44	4-OH-PhePyr_B	120	1	10000	1	-20	-10	-12	-12
160.822	55	0.9	4-OH-2-oxoglut	120	1	10000	1	-5	-10	-18	-6
146.844	100.9	2.4	2-oxobutyric_FA	120	1	10000	1	-15	-10	-10	-10
132.826	86.9	1.15	pyruvic acid_1	120	1	10000	1	-15	-10	-10	-16
86.87	32	1.15	pyruvic acid_2	120	1	10000	1	-5	-10	-12	-14
176.749	130.7	0.9	oxaloacetate	120	1	10000	1	-85	-10	-26	-14
156.9	98.9	6.51	4,6-dioxohept	120	1	10000	1	-5	-10	-14	-14
115.1	71	5.6	MetAcAc	120	1	10000	1	-50	-10	-15	-10
188	74	4.11	GluGly	120	1	10000	1	-50	-10	-25	-10
59	42	2.6	Urea-neg	300	1	100000	1	-50	-10	-20	-7

Příloha 2 Tabulka s finální LC-MS metodou s údaji o prekurzorovém (Q1), produktovém (Q3) iontu, deklasteračních potenciálech (DP), vstupních potenciálech (EP), kolizních energiích (CE) a potenciálech na konci kolizní cely (CXP) pro metabolity detekované v +MRM módu.

Q1	Q3	RT	ID	MRM Window	Primary	Treshold	Dwell Weight	DP	EP	CE	CXP
144.919	126.9	7.3	2-MGC_1	120	1	10000	1	1	10	9	20
144.919	99	7.3	2-MGC_2	120	1	10000	1	1	10	15	10
144.92	127	6.83	3-MGC_A1	120	1	10000	1	1	10	9	12
144.92	127	7.4	3-MGC_B1	120	1	10000	1	1	10	9	12
144.921	99	6.83	3-MGC_A2	120	1	10000	1	1	10	17	12
144.921	99	7.4	3-MGC_B2	120	1	10000	1	1	10	17	12
131.031	69.1	5	MVL_1	120	1	10000	1	1	10	13	8
131.031	43.1	5	MVL_2	120	1	10000	1	1	10	33	20
162.074	85	0.84	C0	120	1	10000	1	51	10	29	16
171.108	85.1	0.84	Car-D9	120	1	10000	1	51	10	29	16
204.174	84.9	1.93	C2	120	1	10000	1	51	10	27	16
207.117	85.1	1.93	C2-D3	120	1	10000	1	51	10	27	16
218.111	85	5.43	C3	120	1	10000	1	51	10	27	16
221.088	85.1	5.43	C3-D3	120	1	10000	1	51	10	27	16
248.004	85.1	1.3	C3DC malonyl	120	1	10000	1	51	10	27	10
248.004	59.6	1.3	C3DC malonyl_1	120	1	10000	1	51	10	47	8
232.121	85.1	6.78	C4 butyryl	120	1	10000	1	56	10	29	16
235.124	85	6.78	C4-D3-butyryl	120	1	10000	1	56	10	29	16
232.04	85	6.6	C4 isobut	120	1	10000	1	46	10	25	10
255.197	85	8.45	C5-D9-isovaleryl	120	1	10000	1	66	10	29	16
246.104	85.1	8.3	C5 2-M-but	120	1	10000	1	61	10	25	10
246.081	85	8.47	C5 Isovaleryl	120	1	10000	1	36	10	25	10
246.129	85	8.68	C5 Valeryl	120	1	10000	1	41	10	25	10

Příloha 2 Tabulka s finální LC-MS metodou s údaji o prekurzorovém (Q1), produktovém (Q3) iontu, deklasteračních potenciálech (DP), vstupních potenciálech (EP), kolizních energiích (CE) a potenciálech na konci kolizní cely (CXP) pro metabolity detekované v +MRM módu *pokračování*.

Q1	Q3	RT	ID	MRM Window	Primary	Treshold	Dwell Weight	DP	EP	CE	CXP
276.141	85.1	5.74	C5DC glutaryl	120	1	10000	1	70	10	35	16
282.304	84.9	5.74	C5DC-D6-glutaryl	120	1	10000	1	70	10	35	16
244.046	85	7.89	C5:1 tigloyl	120	1	10000	1	36	10	25	10
244.059	85	8.01	C5:1 3-M-crot	120	1	10000	1	46	10	27	10
263.114	85.2	10.61	C6-D3	120	1	10000	1	51	10	31	16
260.102	85.1	10.61	C6	120	1	10000	1	51	10	31	16
276.031	85	7.47	C6-OH	120	1	10000	1	66	10	27	10
276.031	60	7.47	C6-OH_2	120	1	10000	1	66	10	21	8
290.101	111	6.38	C6DC adipoyl	120	1	10000	1	41	10	29	12
290.014	213	6.44	C6DC 3-M-glut-pik1	120	1	10000	1	51	10	23	12
290.015	213	6.55	C6DC 3-M-glut-pik2	120	1	10000	1	51	10	23	12
291.147	85.1	12.09	C8-D3	120	1	10000	1	72	10	34	16
288.188	85	12.09	C8	120	1	10000	1	72	10	34	16
286.094	85.1	11.87	C8:1 2-octenoyl	120	1	10000	1	51	10	27	10
318.058	139.1	8.94	C8DC suberoyl	120	1	10000	1	56	10	29	16
319.221	85	12.99	C10-D3	120	1	10000	1	79	10	38	16
316.221	85	12.99	C10	120	1	10000	1	79	10	38	16
314.124	85	12.8	C10:1 decenoyl	120	1	10000	1	101	10	27	10
346.072	85	11.05	C10DC sebacoyl	120	1	10000	1	66	10	33	10
344.219	85	13.81	C12	120	1	10000	1	81	10	41	16
347.219	85	13.81	C12-D3	120	1	10000	1	81	10	41	16
372.262	85	14.62	C14	120	1	10000	1	81	10	47	16
375.262	85	14.62	C14-D3	120	1	10000	1	81	10	47	16

Příloha 2 Tabulka s finální LC-MS metodou s údaji o prekurzorovém (Q1), produktovém (Q3) iontu, deklasteračních potenciálech (DP), vstupních potenciálech (EP), kolizních energiích (CE) a potenciálech na konci kolizní cely (CXP) pro metabolity detekované v +MRM módu *pokračování*.

Q1	Q3	RT	ID	MRM Window	Primary	Treshold	Dwell Weight	DP	EP	CE	CXP
388.192	85	13.77	C14-OH	120	1	10000	1	86	10	31	10
400.272	84.9	15.41	C16	120	1	10000	1	90	10	47	16
403.272	84.9	15.41	C16-D3	120	1	10000	1	90	10	47	16
416.204	85	14.55	C16-OH	120	1	10000	1	96	10	31	10
428.287	85.2	16.16	C18	120	1	10000	1	105	10	51	16
431.287	85.2	16.16	C18-D3	120	1	10000	1	105	10	51	16
444.187	85.2	15.35	C18-OH	120	1	10000	1	91	10	33	10
448.191	85	15.09	C20:4 Arachidonyl	120	1	10000	1	71	10	63	10
137.01	91	11.47	Phe-acetic	120	1	1000	1	6	10	15	8
189.98	62	8.42	Kynurenic_1	120	1	10000	1	1	10	70	20
189.98	90	8.42	Kynurenic_2	120	1	10000	1	1	10	59	10
192.016	119	8.51	5-HIAA_1	120	1	10000	1	26	10	35	14
192.016	91	8.51	5-HIAA_2	120	1	10000	1	26	10	45	10
173.029	70.1	1.6	Glycyl-Proline_1	120	1	10000	1	1	10	31	8
173.029	116	1.6	Glycyl-Proline_2	120	1	10000	1	1	10	19	12
163.975	100	0.71	4-OH-glutamic	120	1	10000	1	16	10	21	12
163.975	73.9	0.71	4-OH-glutamic	120	1	10000	1	16	10	23	10
175.953	133.8	1.75	N-acetylaspartate_1	120	1	10000	1	11	10	13	16
175.953	87.8	1.75	N-acetylaspartate_2	120	1	10000	1	11	10	21	12
223.861	136	7.85	N-acetyltyrosine_1	120	1	10000	1	1	10	25	16
223.981	90.9	7.85	N-acetyltyrosine_2	120	1	10000	1	31	10	55	10
206.004	118.1	11.06	indollactic_1	120	1	10000	1	1	10	29	14
206.004	130	11.05	indollactic_2	120	1	10000	1	1	10	39	14

Příloha 2 Tabulka s finální LC-MS metodou s údaji o prekurzorovém (Q1), produktovém (Q3) iontu, deklasteračních potenciálech (DP), vstupních potenciálech (EP), kolizních energiích (CE) a potenciálech na konci kolizní cely (CXP) pro metabolity detekované v +MRM módu *pokračování*.

Q1	Q3	RT	ID	MRM Window	Primary	Treshold	Dwell Weight	DP	EP	CE	CXP
162.015	98	1	Aminoadipic_1	120	1	10000	1	1	10	21	12
162.015	55	1	Aminoadipic_2	120	1	10000	1	1	10	37	20
103.881	45	0.8	4-aminobutyric_1	120	1	10000	1	50	10	29	12
103.881	86.6	0.8	4-aminobutyric_2	120	1	10000	1	50	10	13	10
130.072	84.1	1.52	Pipecolic_1	120	1	10000	1	1	10	21	10
130.072	56.1	1.52	Pipecolic_2	120	1	10000	1	1	10	37	8
123.973	51.1	1.55	Picolinic_1	120	1	10000	1	86	10	47	20
123.973	78	1.55	Picolinic_2	120	1	10000	1	86	10	25	10
179.977	77.1	8.59	Hippuric_1	120	1	10000	1	41	10	43	12
179.977	105.1	8.59	Hippuric_2	120	1	10000	1	41	10	15	12
157.045	68	1.59	Orotic_1	120	1	10000	1	1	10	29	18
157.045	111	1.59	Orotic_2	120	1	10000	1	1	10	19	14
131.04	84.1	1.54	pipecolic C13_1	120	1	10000	1	1	10	21	10
131.04	56.1	1.54	pipecolic C13_2	120	1	10000	1	1	10	39	8
144.974	71	13.83	valproic	120	1	10000	1	1	10	15	8
113.9	86	3	creatinine	360	1	100000	1	46	10	15	10
102.801	43.1	2.3	acetoacetic	120	1	10000	1	1	10	15	20
129.992	84	2.48	pyroglutamic	120	1	10000	1	16	10	17	10
130.99	85	8.79	ethylacetoac_1	120	1	10000	1	61	10	13	10
130.99	43	8.77	ethylacetoac_2	120	1	10000	1	61	10	21	10
255.11	85	8.5	IsovalerylCar D9	120	1	10000	1	46	10	25	10
262.2	85	5.9	C5-OH	120	1	10000	1	60	10	30	16
248.2	85	3	C4-OH	180	1	10000	1	30	10	30	16

Příloha 2 Tabulka s finální LC-MS metodou s údaji o prekurzorovém (Q1), produktovém (Q3) iontu, deklasteračních potenciálech (DP), vstupních potenciálech (EP), kolizních energiích (CE) a potenciálech na konci kolizní cely (CXP) pro metabolity detekované v +MRM módu *pokračování*.

Q1	Q3	RT	ID	MRM Window	Primary	Treshold	Dwell Weight	DP	EP	CE	CXP
172.933	155	2.51	hydantoin-5-PA_1	120	1	10000	1	1	10	11	18
172.933	84.1	2.51	hydantoin-5-PA_2	120	1	10000	1	1	10	19	10
61	44	2.6	Urea I	300	1	100000	1	100	10	26	13

Příloha 3 Tabulka s údaji o intenzitách signálu standardu (S) příslušné koncentrace (c) a šumu (N), vypočítané LOD a LOQ a korelační koeficienty kalibrační křivky pro každý metabolit spolu s údaji o příslušné směsi, horním kalibračním bodu a interním standardu.

Název metabolitu	směs	horní kalibrační bod (uM)	Interní standard	S	N	c (μM)	LOD (μM)	LOQ (μM)	Korelační koeficient r
Acetylglycin	1	5.00E+01	HGZ	6.71E+03	3.21E+02	9.77E-02	1.40E-02	4.66E-02	0.9949
Propinoylglycin	1	5.00E+01	HGZ	1.05E+04	1.32E+02	9.77E-02	3.70E-03	1.23E-02	0.9956
Butyrylglycin	1	5.00E+01	HGZ	1.45E+04	1.03E+02	9.77E-02	2.10E-03	6.90E-03	0.9995
Isobutyrylglycin	1	5.00E+01	HGZ	7.09E+03	2.23E+02	9.77E-02	9.20E-03	3.07E-02	0.9929
Valerylglycin	1	5.00E+01	HGZ	2.78E+04	4.16E+02	9.77E-02	4.40E-03	1.46E-02	0.9904
Isovalerylglycin	1	5.00E+01	HGZ	2.95E+04	1.77E+02	9.77E-02	1.80E-03	5.80E-03	0.9957
2-methylbutyrylglycin	1	5.00E+01	HGZ	1.20E+04	4.10E+02	9.77E-02	1.00E-02	3.32E-02	0.9950
Hexanoylglycin	1	5.00E+01	HGZ	5.15E+04	2.90E+02	9.77E-02	1.60E-03	5.50E-03	0.9992
Heptanoylglycin	1	5.00E+01	HGZ	1.82E+05	6.57E+02	9.77E-02	1.10E-03	3.50E-03	0.9962
3-methylcrotonylglycin	1	5.00E+01	HGZ	2.64E+04	3.76E+02	9.77E-02	4.20E-03	1.39E-02	0.9945
Tiglylglycin	1	5.00E+01	HGZ	2.55E+03	2.40E+02	9.77E-02	2.76E-02	9.18E-02	0.9925
Phenylpropinoylglycin	1	5.00E+01	HGZ	7.22E+04	1.25E+02	9.77E-02	5.00E-04	1.70E-03	0.9990
Suberylglycin	1	5.00E+01	HGZ	2.64E+04	3.18E+02	9.77E-02	3.50E-03	1.17E-02	0.9955
Glutarylglycin	1	5.00E+01	HGZ	2.88E+03	7.98E+01	9.77E-02	8.10E-03	2.71E-02	0.9889
C0 L-karnitin	2	2.00E+01	Iva-CarZ	3.95E+03	2.14E+03	7.81E-02	1.27E-01	4.24E-01	0.9972
C10 dekanoyl-L-karnitin	2	1.00E+00	Iva-CarZ	6.21E+04	4.20E+02	2.00E-03	0.00E+00	1.00E-04	0.9999

Příloha 3 Tabulka s údaji o intenzitách signálu standardu (S) příslušné koncentrace (c) a šumu (N), vypočítané LOD a LOQ a korelační koeficienty kalibrační křivky pro každý metabolit spolu s údaji o příslušné směsi, horním kalibračním bodu a interním standardu *pokračování*.

Název metabolitu	směs	horní kalibrační bod (uM)	Interní standard	S	N	c (μM)	LOD (μM)	LOQ (μM)	Korelační koeficient r
C10:1 decenoyl-L-karnitin	2	1.00E+00	Iva-CarZ	5.71E+04	2.56E+03	2.00E-03	3.00E-04	9.00E-04	0.9996
C10DC sebacoyl-L-karnitin	2	1.00E+00	Iva-CarZ	1.40E+04	3.60E+03	2.00E-03	1.50E-03	5.00E-03	0.9998
C12 dodekanoyl-L-karnitin	2	1.00E-01	Iva-CarZ	6.23E+03	8.39E+02	2.00E-04	1.00E-04	3.00E-04	0.9968
C14 tetradekanoyl-L-karnitin	2	1.00E-01	Iva-CarZ	2.52E+04	7.73E+03	2.00E-04	2.00E-04	6.00E-04	0.9946
C14-OH 3-hydroxytetradekanoyl-L-karnitin	2	1.00E-01	Iva-CarZ	1.60E+04	7.69E+02	2.00E-04	0.00E+00	1.00E-04	0.9970
C16 hexadekanoyl-L-karnitin	2	1.00E-01	Iva-CarZ	4.19E+04	1.78E+03	2.00E-04	0.00E+00	1.00E-04	0.9404
C16-OH 3-hydroxyhexydeknoyl-L-karnitin	2	1.00E-01	Iva-CarZ	2.29E+04	2.88E+02	2.00E-04	0.00E+00	0.00E+00	0.9700
C18 oktadekanoyl-L-karnitin	2	1.00E-01	Iva-CarZ	1.69E+03	1.43E+03	2.00E-04	5.00E-04	1.70E-03	0.0063
C18-OH 3-hydroxyoktadekanoyl-L-karnitin	2	1.00E-01	Iva-CarZ	5.51E+04	4.25E+02	2.00E-04	0.00E+00	0.00E+00	0.9289
C2 acetylkarnitin	2	1.00E+01	Iva-CarZ	1.92E+05	4.89E+03	1.95E-02	1.50E-03	5.00E-03	0.9974
C20:4 arachidonyl-L-karnitin	2	1.00E+00	Iva-CarZ	1.15E+05	6.33E+02	2.00E-03	0.00E+00	1.00E-04	0.9880
C3 propionyl-L-karnitin	2	1.00E+00	Iva-CarZ	1.52E+04	5.11E+03	3.90E-03	3.90E-03	1.31E-02	0.9993
C3DC malonyl-L-karnitin	2	1.00E+00	Iva-CarZ	3.37E+04	4.67E+03	7.80E-03	3.20E-03	1.08E-02	0.9977

Příloha 3 Tabulka s údaji o intenzitách signálu standardu (S) příslušné koncentrace (c) a šumu (N), vypočítané LOD a LOQ a korelační koeficienty kalibrační křivky pro každý metabolit spolu s údaji o příslušné směsi, horním kalibračním bodu a interním standardu *pokračování*.

Název metabolitu	směs	horní kalibrační bod (uM)	Interní standard	S	N	c (μM)	LOD (μM)	LOQ (μM)	Korelační koeficient r
C4 butyryl-L-karnitin	2	1.00E+00	Iva-CarZ	3.10E+04	4.68E+03	2.00E-03	9.00E-04	3.00E-03	0.9958
C4 isobutyryl-L-karnitin	2	1.00E+01	Iva-CarZ	1.19E+05	2.93E+03	1.95E-02	1.40E-03	4.80E-03	0.9994
C5 2-methylbutyryl-L-karnitin	2	1.00E+00	Iva-CarZ	2.08E+04	1.91E+03	2.00E-03	6.00E-04	1.80E-03	0.9992
C5 Isovaleryl-L-karnitin	2	1.00E+00	Iva-CarZ	1.45E+04	1.60E+03	2.00E-03	7.00E-04	2.20E-03	0.9996
C5 Valeryl-L-karnitin	2	1.00E+00	Iva-CarZ	1.98E+04	2.69E+03	2.00E-03	8.00E-04	2.70E-03	0.9996
C5:1 3-methylkrotonyl-L-karnitin	2	1.00E+00	Iva-CarZ	1.70E+04	2.19E+03	2.00E-03	8.00E-04	2.60E-03	0.9994
C5:1 tigloyl-L-karnitin	2	1.00E+00	Iva-CarZ	2.50E+04	2.14E+03	2.00E-03	5.00E-04	1.70E-03	0.9960
C5DC glutaryl-L-karnitin	2	1.00E+01	Iva-CarZ	5.98E+04	4.90E+03	1.95E-02	4.80E-03	1.60E-02	0.9999
C6 hexanoyl-L-karnitin	2	1.00E+00	Iva-CarZ	2.91E+04	1.25E+03	2.00E-03	3.00E-04	9.00E-04	0.9991
C6DC 3-methylglutaryl-L-karnitin	2	1.00E+01	Iva-CarZ	5.67E+04	1.81E+03	1.95E-02	1.90E-03	6.20E-03	0.9993
C6DC adipoyl-L-karnitin	2	1.00E+01	Iva-CarZ	2.40E+04	1.29E+03	1.95E-02	3.20E-03	1.05E-02	0.9997
C6-OH 3-hydroxyhexanoyl-L-karnitin	2	1.00E+00	Iva-CarZ	2.45E+04	4.94E+03	2.00E-03	1.20E-03	4.00E-03	0.9993
C8 oktanoyl-L-karnitin	2	1.00E+00	Iva-CarZ	4.13E+04	5.51E+02	2.00E-03	1.00E-04	3.00E-04	0.9998
C8:1 2-octenoyl-L-karnitin	2	1.00E+01	Iva-CarZ	3.70E+05	2.89E+03	1.95E-02	5.00E-04	1.50E-03	0.9994
C8DC suberoyl-L-karnitin	2	1.00E+00	Iva-CarZ	4.07E+03	8.15E+02	2.00E-03	1.20E-03	4.00E-03	0.9990
Valproát	3	1.00E+02	LacZ	5.19E+03	9.96E+02	7.81E-01	4.50E-01	1.50E+00	0.9978

Příloha 3 Tabulka s údaji o intenzitách signálu standardu (S) příslušné koncentrace (c) a šumu (N), vypočítané LOD a LOQ a korelační koeficienty kalibrační křivky pro každý metabolit spolu s údaji o příslušné směsi, horním kalibračním bodu a interním standardu *pokračování*.

Název metabolitu	směs	horní kalibrační bod (uM)	Interní standard	S	N	c (μM)	LOD (μM)	LOQ (μM)	Korelační koeficient r
Hydantoin-5-propionát_2	3	1.00E+02	PZ	2.65E+04	2.02E+03	1.95E-01	4.48E-02	1.49E-01	0.9984
3-hydroxymandlová kyselina	3	1.00E+00	HVA	1.54E+03	3.31E+02	1.56E-02	1.01E-02	3.37E-02	0.9974
DL-3.4-dihydroxymandlová k.	3	1.00E+00	HVA	9.87E+03	4.31E+03	2.50E-01	3.27E-01	1.09E+00	0.9734
Vanillaktát_1	3	1.00E+01	HVA	1.16E+03	1.79E+02	1.95E-02	9.00E-03	3.01E-02	0.9988
DL-indol-3-laktát_1	3	1.00E+02	PZ	9.36E+04	4.33E+03	1.95E-01	2.71E-02	9.02E-02	0.9985
Mandlová k._1 (2-hydroxy-2-fenylacetát)	3	1.00E+02	HVA	2.70E+04	1.04E+04	1.56E+00	1.80E+00	5.99E+00	0.9966
2-hydroxyisocaproát_1	3	1.00E+01	LacZ	7.10E+03	2.64E+03	1.95E-02	2.18E-02	7.26E-02	0.9940
Mevalonolaktón_1	3	1.00E+01	LacZ	1.12E+04	1.23E+03	1.95E-02	6.50E-03	2.16E-02	0.9997
2-methylglutakonát_1	3	1.00E+02	MMAD	9.98E+04	3.25E+04	1.25E+01	1.22E+01	4.06E+01	0.9837
2.5-dihydroxybenzoát (gentisát)	3	1.00E+01	HVAZ	2.78E+03	4.40E+02	1.95E-02	9.30E-03	3.09E-02	0.9871
2.5-dihydroxyfenylacetát (homogentisát)	3	1.00E+01	HVAZ	1.08E+04	3.37E+03	3.13E-01	2.94E-01	9.78E-01	0.9636
3.4-dihydroxyfenylacetát	3	1.00E+01	HVAZ	5.91E+03	1.42E+03	3.13E-01	2.25E-01	7.50E-01	0.9779
4-hydroxybenzoát	3	1.00E+01	HVAZ	3.84E+04	1.26E+04	7.81E-02	7.72E-02	2.57E-01	0.9901
Malonát_1	3	1.00E+01	MMAD	1.16E+03	2.77E+02	1.56E-01	1.12E-01	3.72E-01	0.9949
Kynurenát_1	3	1.00E+01	PZ	2.34E+03	7.60E+02	1.56E-01	1.52E-01	5.07E-01	0.9937
4.6-dioxoheptanoát (sukcinylaceton)	3	1.00E+01	LacZ	3.74E+03	2.75E+02	6.25E-01	1.38E-01	4.59E-01	0.8826

Příloha 3 Tabulka s údaji o intenzitách signálu standardu (S) příslušné koncentrace (c) a šumu (N), vypočítané LOD a LOQ a korelační koeficienty kalibrační křivky pro každý metabolit spolu s údaji o příslušné směsi, horním kalibračním bodu a interním standardu *pokračování*.

Název metabolitu	směs	horní kalibrační bod (uM)	Interní standard	S	N	c (μM)	LOD (μM)	LOQ (μM)	Korelační koeficient r
Fenylacetát	3	1.00E+01	HVAZ	9.71E+03	3.32E+03	6.25E-01	6.41E-01	2.13E+00	0.9973
Oxaloacetát	3	1.00E+02	MMAD	2.10E+03	2.39E+03	7.81E-01	2.67E+00	8.87E+00	0.9878
2-hydroxybutyrát	3	1.00E+02	LacZ	2.53E+04	1.34E+04	3.91E-01	6.22E-01	2.07E+00	0.9907
3-methyladipát	3	1.00E+02	MMAD	2.10E+03	2.03E+02	1.95E-01	5.67E-02	1.89E-01	0.9968
3-hydroxyvalerát	3	1.00E+01	LacZ	3.02E+03	7.79E+02	3.91E-02	3.02E-02	1.01E-01	0.9957
Glutarát	3	1.00E+02	MMAD	1.44E+03	3.74E+02	1.95E-01	1.52E-01	5.06E-01	0.9931
3-methylglutarát_1	3	1.00E+02	MMAD	1.48E+03	7.20E+02	1.56E+00	2.28E+00	7.59E+00	0.9840
Methylsukcinát	3	1.00E+01	MMAD	1.89E+03	4.26E+02	1.56E-01	1.06E-01	3.52E-01	0.9938
2-hydroxyfenylacetát	3	1.00E+01	HVAZ	2.47E+04	5.42E+03	3.91E-02	2.58E-02	8.58E-02	0.9970
Maleát	3	1.00E+02	MMAD	3.29E+04	6.99E+03	1.95E-01	1.25E-01	4.15E-01	0.9990
Orotát_1	3	1.00E+01	PZ	3.33E+03	5.30E+02	1.95E-02	9.30E-03	3.10E-02	0.9993
5-hydroxyindolacetát_1	3	1.00E+02	PZ	2.68E+04	1.07E+03	1.95E-01	2.33E-02	7.76E-02	0.9996
2-hydroxyisovalerát_1	3	1.00E+02	LacZ	5.41E+03	5.92E+02	1.95E-01	6.41E-02	2.14E-01	0.9975
Suberát_1	3	1.00E+02	MMAD	2.67E+05	1.99E+05	1.95E-01	4.36E-01	1.45E+00	0.9854
Glycylprolin_2	3	1.00E+02	PZ	1.66E+05	1.02E+03	1.95E-01	3.60E-03	1.19E-02	0.9990
Ethylmalonát	3	1.00E+02	MMAD	1.39E+03	6.45E+01	1.56E+00	2.18E-01	7.26E-01	0.9923

Příloha 3 Tabulka s údaji o intenzitách signálu standardu (S) příslušné koncentrace (c) a šumu (N), vypočítané LOD a LOQ a korelační koeficienty kalibrační křivky pro každý metabolit spolu s údaji o příslušné směsi, horním kalibračním bodu a interním standardu *pokračování*.

Název metabolitu	směs	horní kalibrační bod (uM)	Interní standard	S	N	c (μM)	LOD (μM)	LOQ (μM)	Korelační koeficient r
2-hydroxyisobutyřát	3	1.00E+02	LacZ	1.17E+03	2.41E+02	3.91E-01	2.41E-01	8.03E-01	0.9995
2-oxoadipát	3	1.00E+01	MMAD	2.99E+03	2.95E+02	3.13E-01	9.25E-02	3.08E-01	0.9957
Glyoxylát	3	1.00E+02	LacZ	2.18E+03	2.15E+03	1.56E+00	4.61E+00	1.53E+01	0.9968
4-hydroxybutyřát	3	1.00E+01	LacZ	2.09E+03	1.09E+03	3.13E-01	4.90E-01	1.63E+00	0.9942
2,3-dihydroxybutanoát	3	1.00E+02	LacZ	1.69E+03	5.66E+02	3.91E-01	3.92E-01	1.31E+00	0.9980
3-hydroxysebakát_1	3	1.00E+02	MMAD	4.17E+04	1.68E+03	1.95E-01	2.36E-02	7.85E-02	0.9981
Citramalát	3	1.00E+02	MMAD	1.44E+04	2.90E+03	1.95E-01	1.18E-01	3.94E-01	0.9959
Acetoacetát	3	1.00E+02	LacZ	3.01E+04	1.61E+04	6.25E+00	1.00E+01	3.34E+01	0.9386
2-methylcitrát_1	3	1.00E+02	MeCitZ	2.71E+04	2.30E+02	1.95E-01	5.00E-03	1.66E-02	0.9962
Vanilmandlová kyselina	3	1.00E+02	HVAZ	9.83E+03	2.13E+02	1.95E-01	1.27E-02	4.24E-02	0.9979
3-methylglutakonát_1	3	1.00E+02	MMAD	2.22E+05	2.59E+04	2.50E+01	8.74E+00	2.91E+01	0.9806
2-aminoadipát_2	3	1.00E+02	MMAD	1.63E+04	8.50E+02	1.95E-01	3.05E-02	1.02E-01	0.9960
Fumarát	3	1.00E+02	MMAD	2.25E+04	7.75E+02	1.95E-01	2.02E-02	6.73E-02	0.9881
2-oxoisokaproát	3	1.00E+01	LacZ	2.52E+04	2.57E+03	2.50E+00	7.65E-01	2.55E+00	0.9707
2-pikolinát_1	3	1.00E+01	PZ	2.57E+03	9.19E+02	7.81E-02	8.38E-02	2.79E-01	0.9990
3-hydroxyfenylacetát	3	1.00E+02	HVAZ	8.19E+03	5.40E+03	7.81E-01	1.55E+00	5.15E+00	0.9971

Příloha 3 Tabulka s údaji o intenzitách signálu standardu (S) příslušné koncentrace (c) a šumu (N), vypočítané LOD a LOQ a korelační koeficienty kalibrační křivky pro každý metabolit spolu s údaji o příslušné směsi, horním kalibračním bodu a interním standardu *pokračování*.

Název metabolitu	směs	horní kalibrační bod (uM)	Interní standard	S	N	c (μM)	LOD (μM)	LOQ (μM)	Korelační koeficient r
Homovanilát	3	1.00E+02	HVAZ	3.55E+03	2.88E+02	1.56E+00	3.80E-01	1.27E+00	0.9994
3-hydroxyglutarát	3	1.00E+01	MMAD	1.65E+03	2.08E+02	1.56E-01	5.89E-02	1.96E-01	0.9851
Pipekolát_1	3	1.00E+02	PZ	7.50E+05	8.20E+03	1.95E-01	6.40E-03	2.13E-02	0.9990
4-hydroxyfenylpyruvát	3	1.00E+02	HVAZ	9.43E+03	8.31E+02	7.81E-01	2.07E-01	6.88E-01	0.9964
Azelaová kyselina_1	3	1.00E+02	MMAD	1.09E+06	8.69E+05	1.95E-01	4.67E-01	1.56E+00	0.9962
3-hydroxyisobutyřát	3	1.00E+02	LacZ	1.14E+04	1.16E+03	3.91E-01	1.19E-01	3.95E-01	0.9991
2-oxoglutarát_2	4	1.00E+02	MMAD	5.97E+03	4.45E+03	2.50E+01	5.59E+01	1.86E+02	0.9863
2-oxobutyřát	4	1.00E+02	LacZ	5.49E+03	1.86E+03	6.25E+00	6.36E+00	2.12E+01	0.9905
Sebakát_1	4	1.00E+02	MMAD	8.96E+03	4.55E+03	1.95E-01	2.98E-01	9.91E-01	0.9986
Pyruvát_1	4	1.00E+02	LacZ	2.73E+03	1.00E+03	1.95E-01	2.16E-01	7.18E-01	0.9979
Tartarát_1	4	1.00E+02	MMAD	1.04E+04	2.65E+02	1.95E-01	1.50E-02	4.98E-02	0.9914
3-hydroxyisovalerát	4	1.00E+02	LacZ	1.40E+04	1.79E+03	1.95E-01	7.49E-02	2.50E-01	0.9957
Pimelát	4	1.00E+02	MMAD	2.33E+03	4.80E+02	3.91E-01	2.42E-01	8.05E-01	0.9931
4-hydroxy-2-oxoglutarát	4	1.00E+02	MMAD	1.07E+03	1.39E+02	1.95E-01	7.60E-02	2.53E-01	0.9920
Methylmalonát	4	1.00E+02	MMAD	1.49E+03	1.54E+02	1.95E-01	6.04E-02	2.01E-01	0.9986
Fenyllaktát	4	1.00E+01	HVAZ	5.43E+03	9.73E+02	1.95E-02	1.05E-02	3.49E-02	0.9973

Příloha 3 Tabulka s údaji o intenzitách signálu standardu (S) příslušné koncentrace (c) a šumu (N), vypočítané LOD a LOQ a korelační koeficienty kalibrační křivky pro každý metabolit spolu s údaji o příslušné směsi, horním kalibračním bodu a interním standardu *pokračování*.

Název metabolitu	směs	horní kalibrační bod (uM)	Interní standard	S	N	c (μM)	LOD (μM)	LOQ (μM)	Korelační koeficient r
Fenylpyruvát	4	1.00E+01	HVAZ	3.25E+03	4.31E+02	1.56E-01	6.23E-02	2.07E-01	0.9965
Isocitrát	4	1.00E+02	MeCitZ	2.10E+03	1.28E+03	7.81E-01	1.42E+00	4.74E+00	0.9929
N-acetylaspartát	4	1.00E+02	MMAD	-	-	-	-	-	-
3-hydroxypropionát (b-laktát)	4	1.00E+02	LacZ	1.71E+03	8.24E+02	3.91E-01	5.64E-01	1.88E+00	0.9968
Akonitát	4	1.00E+02	MMAD	1.50E+04	1.40E+03	1.95E-01	5.45E-02	1.81E-01	0.9975
2-hydroxyglutarát	4	1.00E+02	MMAD	1.23E+03	2.12E+02	7.81E-01	4.06E-01	1.35E+00	0.9925
3-hydroxybutyrát	4	1.00E+02	LacZ	7.81E+02	1.80E+02	7.81E-01	5.39E-01	1.80E+00	0.9988
4-aminobutyřát_1	4	1.00E+02	LacZ	3.76E+03	1.94E+03	3.91E-01	6.06E-01	2.02E+00	0.9937
3-hydroxy-3-methylglutarát_2	4	1.00E+02	MMAD	3.50E+03	1.81E+02	1.95E-01	3.03E-02	1.01E-01	0.9981
Glutakonát_1	4	1.00E+02	MMAD	5.51E+03	1.36E+03	3.13E+00	2.32E+00	7.73E+00	0.9894
Pyroglutamát	4	1.00E+02	PZ	4.26E+04	6.36E+03	1.95E-01	8.74E-02	2.91E-01	0.9932
Glycerát	4	1.00E+02	LacZ	3.15E+03	3.15E+02	1.95E-01	5.86E-02	1.95E-01	0.9998
3-hydroxydekanóat	4	1.00E+01	LacZ	7.51E+04	5.72E+04	1.95E-02	4.46E-02	1.48E-01	0.9963
2.4-dihydroxybutyrát	4	1.00E+02	LacZ	3.84E+02	1.60E+02	1.95E-01	2.44E-01	8.11E-01	0.9946
Laktát	4	1.00E+02	LacZ	2.38E+04	1.66E+04	1.95E-01	4.08E-01	1.36E+00	0.9908
4-hydroxyfenylacetát	4	1.00E+02	HVAZ	2.72E+03	8.35E+02	3.13E+00	2.88E+00	9.58E+00	0.9861

Příloha 3 Tabulka s údaji o intenzitách signálu standardu (S) příslušné koncentrace (c) a šumu (N), vypočítané LOD a LOQ a korelační koeficienty kalibrační křivky pro každý metabolit spolu s údaji o příslušné směsi, horním kalibračním bodu a interním standardu *pokračování*.

Název metabolitu	směs	horní kalibrační bod (uM)	Interní standard	S	N	c (μM)	LOD (μM)	LOQ (μM)	Korelační koeficient r
Malát_1	4	1.00E+02	MMAD	7.19E+02	3.45E+02	1.95E-01	2.81E-01	9.36E-01	0.9950
Sukcinát	4	1.00E+02	MMAD	5.17E+03	3.22E+03	1.95E-01	3.65E-01	1.22E+00	0.9985
3.4-dihydroxybutyrát	4	1.00E+02	LacZ	5.42E+03	1.89E+02	1.95E-01	2.04E-02	6.80E-02	0.9977
4-hydroxyfenyllaktát_1	4	1.00E+02	HVAZ	3.29E+04	6.89E+02	1.95E-01	1.23E-02	4.09E-02	0.9942
Glykolát_SIM	4	1.00E+02	LacZ	3.89E+04	1.50E+04	1.95E-01	2.26E-01	7.52E-01	0.9863
Adipát	4	1.00E+02	MMAD	4.90E+03	3.17E+03	1.95E-01	3.79E-01	1.26E+00	0.9972
N-acetyltyrosin_1	4	1.00E+02	HVAZ	9.58E+03	5.82E+03	1.56E+00	2.85E+00	9.47E+00	0.9926
Hippurát_1	4	1.00E+02	HVAZ	4.44E+04	2.25E+02	1.95E-01	3.00E-03	9.90E-03	0.9984
Citrát	4	2.00E+02	MeCitZ	4.59E+03	3.42E+02	3.91E-01	8.71E-02	2.90E-01	0.9977
Fenoxyacetát	4	1.00E+02	HVAZ	9.11E+04	3.76E+04	1.95E-01	2.42E-01	8.05E-01	0.9970
Ethylacetoacetát_2	4	1.00E+02	LacZ	1.12E+04	2.19E+03	1.56E+00	9.14E-01	3.04E+00	0.9968
2.3-dihydroxy-2-methylbutanoát_1	4	1.00E+02	LacZ	1.37E+04	5.26E+02	1.95E-01	2.25E-02	7.50E-02	0.9989
4-hydroxyglutamát	4	1.00E+01	MMAD	3.75E+03	9.43E+02	1.56E-01	1.18E-01	3.93E-01	0.2628
3-hydroxyoktanoát_1	4	1.00E+01	LacZ	1.12E+03	6.93E+02	1.95E-02	3.64E-02	1.21E-01	0.9979