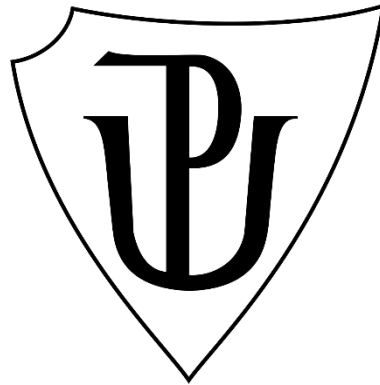


UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Prírodovedecká fakulta

Katedra biochémie



Lipidomická analýza apokrinného potu

DIPLOMOVÁ PRÁCA

Autor:	Bc. Kristína Jamrichová
Študijný program:	N0512A130009 Biochémia
Študijný odbor:	Biochémia
Forma štúdia:	Prezenčná
Vedúci práce:	Mgr. Aleš Kvasnička
Konzultant:	prof. RNDr. David Friedecký, Ph.D.
Rok:	2023

Prehlasujem, že som diplomovú prácu vypracoval/a samostatne s vyznačením všetkých použitých zdrojov a spoluautorstva. Súhlasím so zverejnením diplomovej práce podľa zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, v znení neskorších predpisov. Bol/a som oboznámený/á s tým, že sa na moju prácu vzťahujú práva a povinnosti vyplývajúce zo zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, v znení neskorších predpisov.

V Olomouci dne

.....

Podpis študenta

Pod'akovanie

Chcela by som vyjadriť veľkú vďaku vedúcemu práce pánu Mgr. Alešovi Kvasničkovi, z Laboratória dedičných metabolických porúch, kde som mala možnosť vypracovať túto prácu, za jeho sústavnú, obetavú a trpezlivú pomoc pri vypracovaní tejto práce, ako aj cenné rady poskytnuté počas celého magisterského štúdia. Ďalej by som sa rada poďakovala svojej rodine za ich podporu a trpezlivosť počas celého vysokoškolského štúdia.

Bibliografická identifikácia

Meno a priezvisko autora	Bc. Kristína Jamrichová
Názov práce	Lipidomická analýza apokrinného potu
Typ práce	Diplomová
Pracovisko	Katedra biochémie
Vedúci práce	Mgr. Aleš Kvasnička
Konzultant	Prof. RNDr. David Friedecký, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2023

Abstrakt

Táto diplomová práca bola zameraná na výskum zmeny v kompozícií lipidov v apokrinnom pote medzi pacientkami s histologicky potvrdeným karcinómom prsníka a vzorkami potu zdravých subjektov, ktoré slúžili ako vzorky kontrolné. Podľa aktuálnych poznatkov o využívaní potu ako vzorky pri klinickej analýze z hľadiska lipidomiky, je zmena koncentrácie alebo zastúpenia určitých druhov lipidov často signálom patologických stavov súvisiacich s poruchou ich metabolizmu alebo rakovinového ochorenia. Vzorky boli analyzované cieľenou lipidomickou metódou pomocou LC-MS/MS, ktorá bola zavedená a publikovaná pracoviskom kde bola táto práca realizovaná. Pomocou jednorozmernej a mnohorozmernej štatistickej analýzy, kombinovanej s pokročilejšími vizualizačnými metódami bolo medzi pacientkami a kontrolami pozorované zvýšenie množstva lipidov patriacich do lipidových tried – TG, DG, FA, CE, LPC, Cer a HexCer. K najvýznamnejšiemu zvýšeniu medzi pacientkami a kontrolami, došlo najmä pri nasýtených a nenasýtených TG s dlhými reťazcami, FA s dlhými až veľmi dlhými reťazcami a nenasýtených DG s dĺžkou acylového reťazca 32 uhlíkov. Medzi znížené skupiny lipidov v porovnávaných vzorkách pacientiek a kontrol patrili triedy – DG, FA, PE, PEO, LPE, PS, PI, SM, a Cer. K najvýznamnejšiemu zníženiu došlo pri skupinách DG, PE, PS, PI a LPE. Následne boli porovnávané pacientky s jednotlivými veľkosťami histologicky diagnostikovaných karcinómov T1, T2 až T3 a T.4 a kontrolné vzorky. Pri porovnaní medzi T1 a kontrolami boli zvýšené lipidy v skupinách – TG, DG, FA, CE, Cer a zníženými skupinami boli – DG, PE, PEO, LPE, PI, Cer a HexCer. Pri porovnávaní medzi T2 a kontrolami boli zvýšené lipidy v skupinách – TG, DG a znížené v skupinách – DG, FA, PE, LPE, PS, PI a SM. Pri porovnávaní medzi T3.4 boli zvýšené lipidy v triedach – FA, HexCer, SM, PC, PS, PI, PE, Cholesterol

a miernejšie aj TG. Zmena v metabolizme TAG a FA, ktoré sú dôležitým zdrojom energie ako aj súčasť stavebných blokov ostatných lipidov, bola už popísaná v literatúre v súvislosti s re-programovaním ich metabolizmu v rakovinových bunkách. Zmeny v množstve SM a Cer, ktoré sú súčasťou membrán, súvisí s ich úlohou v raste a diferenciácií bunky, ako aj ich zapojení pri regulácií apoptózy. Zmeny v množstve FA, ktoré sú súčasťou PC, PE a SM, v konečnom dôsledku ovplyvňujú štruktúru bunkových membrán a majú vplyv na onkogénne signálne dráhy. Rakovinové bunky s nadmernou *de novo* lipogenezou syntetizujú nadmerné množstvo FA, ktoré ukladajú vo forme TG, čím poskytujú energeticky bohaté látky poháňajúce kancerogézu, a zároveň poskytujú stavebné látky pre syntézu membránových lipidov ovplyvňujúcich fluiditu membrány, a tým vplývajú na účinok liečiv ako aj vznik metastáz.

Kľúčová slova	Apokrinný pot, rakovina prsníka, lipidomika, cieleňá analýza
Počet strán	108
Počet príloh	3
Jazyk	<i>Slovenský</i>

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Kristína Jamrichová
Title	Bc.
Type of thesis	Diploma
Department	Department of biochemistry
Supervisor	Mgr. Aleš Kvasnička
Consultant	Prof. RNDr. David Friedecký, Ph.D.
The year of presentation	2023

Abstract

This thesis aimed to investigate the change in lipid composition in apocrine sweat between patients with histologically confirmed breast cancer and sweat samples from healthy subjects who served as controls. According to the current knowledge on the use of sweat as a sample in clinical analysis from a lipidomics point of view, a change in the concentration or abundance of certain lipid species is often a signal of pathological conditions related to a disturbance in their metabolism or cancer. Samples were analyzed by a targeted lipidomics method using LC-MS/MS, which was established and published by the department where this work was conducted. Using univariate and multivariate statistical analysis, combined with more advanced visualization methods, an increase in the amount of lipids belonging to the lipid classes - TG, DG, FA, CE, LPC, Cer, and HexCer - was observed between patients and controls. The most significant increase between patients and controls, occurred mainly in saturated and unsaturated TG with very long chains, FA with long to very long chains, and unsaturated DG with an acyl chain length of 32 carbons. The reduced lipid groups in the matched patient and control samples included DG, FA, PE, PEO, LPE, PS, PI, SM, and Cer. The most significant reductions occurred in the DG, PE, PS, PI, and LPE groups. Subsequently, patients with each size of histologically diagnosed T1, T2 to T3, and T.4 cancers and controls were compared. In the comparison between T1 and controls, the elevated lipid groups were - TG, DG, FA, CE, Cer and the decreased groups were - DG, PE, PEO, LPE, PI,, Cer and HexCer. When comparing T2 and controls, the elevated lipids in the groups were - TG, DG and the decreased groups were - DG, FA, PE, LPE, PS, PI and SM. When comparing between T3.4, lipids were elevated in - FA, HexCer, SM, PC, PS, PI, PE, Cholesterol ,and to a lesser extent TG. Alteration in the metabolism of TAG and FA, which are

important sources of energy as well as part of the building blocks of other lipids, has been previously described in the literature in relation to the re-programming of their metabolism in cancer cells. Changes in the amount of SM and Cer, which are membrane components, have been related to their role in cell growth and differentiation and their involvement in the regulation of apoptosis. Changes in the amount of FAs, which are components of PC, PE, and SM, ultimately affect the structure of cell membranes and have implications for oncogenic signaling pathways. Cancer cells with excessive de novo lipogenesis synthesize excessive amounts of FAs, which they store as TGs, thus providing energy-rich substances that drive carcinogenesis, and provide building blocks for the synthesis of membrane lipids that influence membrane fluidity, thereby affecting the effect of drugs as well as the emergence of metastasis.

Keywords	Apocrine sweat, breast cancer, lipidomics, targeted analysis
Number of pages	108
Number of appendices	3
Language	<i>Slovak</i>

Obsah

1.	ÚVOD	11
2.	SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY	12
2.1.	Potné žľazy	12
2.1.1.	Rozdelenie a fyziológia potných žliaz.....	12
2.1.2.	Apokrinné potné žľazy	14
2.1.3.	Zloženie apokrinného potu	19
2.2.	Patofyziológia potu	21
2.2.1.	Zmeny zloženia potu v dôsledku patologických stavov	21
2.3.	Lipidy	24
2.3.1.	Lipidomika	24
2.3.2.	Lipidová nomenklatúra.....	25
2.3.3.	Extrakcia lipidov z biologických materiálov	29
2.3.4.	Analýza lipidov pomocou LC-MS	31
2.3.4.1.	Cielená a necielená analýza	31
2.3.4.2.	Kvapalinová chromatografia	32
2.3.4.3.	Hmotnostná spektrometria.....	33
2.3.5.	Vyhodnocovanie dát v lipidomike	35
2.3.5.1.	Príprava, normalizácia a transformácia dát.....	36
2.3.5.2.	Jednorozmerná štatistická analýza	37
2.3.5.3.	Viacrozmerná štatistická analýza.....	38
3.	EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	39
3.1.	Materiál	39
3.1.1.	Chemikálie.....	39
3.1.2.	Biologický materiál.....	39
3.1.3.	Prístrojové vybavenie.....	41
3.1.4.	Použitý softvér	41
3.2.	Metódy	41
3.2.1.	Príprava vzoriek	43
3.2.2.	Cielená lipidomická analýza apokrinného potu	44
3.2.3.	Štatistická analýza dát	46
3.2.3.1.	Korekcia a normalizácia surových dát	46
3.2.3.2.	Štatistické vyhodnotenie dát	47
4.	VÝSLEDKY	49
4.1.	Identifikácia lipidov a ich retenčné správanie na kolóne s reverznou fázou	49
4.2.	Transformácia LOESS	51

4.3.	Výsledky nesupervizovanej analýzy hlavných komponentov (PCA)	52
4.4.	Výsledky supervizovanej diskriminačnej analýzy (PLS-DA)	54
4.5.	Výsledky ortogonálnej diskriminačnej analýzy	57
4.6.	Vizualizácia výsledkov pomocou vulkánových grafov	63
4.7.	Vizualizácia výsledkov pomocou lipidových máp	65
4.8.	Vizualizácia výsledkov pomocou ROC-kriviek	70
5.	DISKUSIA	74
6.	ZÁVER	83
6.1.	Cielená lipidomická analýza apokrinného potu	83
6.2.	Perspektíva lipidomickej analýzy neinvazívne odobraného apokrinného potu pri skríningu rakoviny prsníka	83
7.	LITERATÚRA	84
8.	ZOZNAM POUŽITÝCH SYMBOLOV A SKRATIEK	96
9.	PRÍLOHY	99

CIELE PRÁCE

- Vypracovanie literárnej rešerše o aktuálnych možnostiach využitia potu v klinickej analýze (so zameraním na ekrinný a apokrinný pot) a ich chemická charakterizácia.
- Vypracovanie literárnej rešerše aktuálneho stavu lipidomických metód s ohľadom na extrakciu lipidov a ich následnú analýzu pomocou hmotnostnej spektrometrie v spojení s kvapalinovou chromatografiou (cieľený a necieľený prístup).
- Extrakcia lipidov zo vzoriek apokrinného potu pacientiek s karcinómom prsníka a kontrolných vzoriek a ich následná lipidomická analýza cieľeným prístupom.
- Spracovanie dát nameraných cieľeným prístupom.
- Štatistická analýza pomocou viacrozmerných a jednorozmerných metód.
- Vyhodnotenie výsledkov a biochemická interpretácia zmien v lipidovom profile apokrinného potu u pacientiek s karcinómom prsníka.
- Zhodnotenie potenciálneho použitia lipidov v apokrinnom pote ako markerov rakoviny prsníka.

1. ÚVOD

Rastúci záujem o výskum lipidov vzniká v dôsledku stále častejšej asociácií zmien koncentrácie lipidov, a dysreguláciou ich biochemických dráh, s vplyvom patologických stavov. Táto skutočnosť prináša potenciál využiť tieto zmeny k stanoveniu nových diagnostických biomarkerov. Taktiež sa zdôrazňuje význam lipidomických štúdií zameraných na pochopenie, diagnostiku a liečenie rôznych patologických stavov, akým je napr. rakovina. Využitie poznatkov z lipidomiky je príležitosťou tvoriť efektívnejšie ciele liečby, presnejšie stanovovať prognózy a najmä včasne diagnostikovať ochorenia vďaka skríningu lipidových biomarkerov (Stephenson et al., 2017). Využitím komplexnejších spektrometrických a chromatografických metód pri analýze vzoriek, by klinická prax bola obohatená o informácie týkajúce sa detailnej štruktúry a funkcie špecifických lipidových tried (Pakiet et. al., 2019).

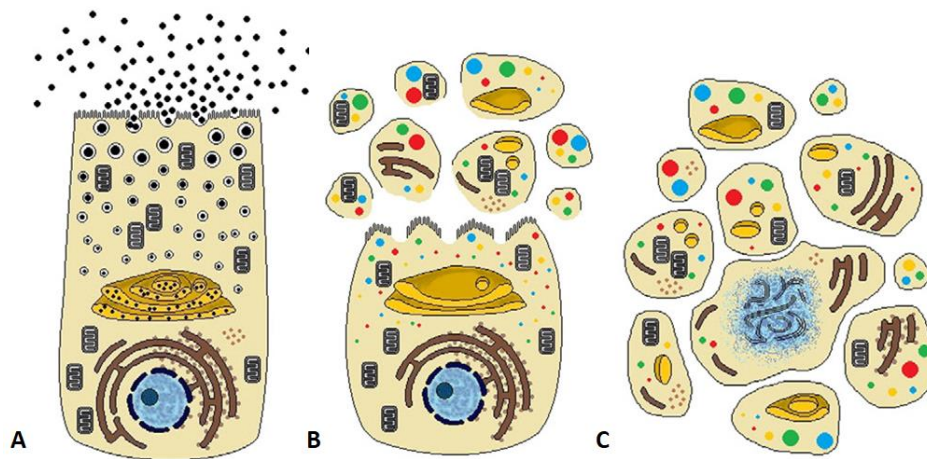
V súčasnosti sa čím ďalej, tým viac uplatňujú mikrovzorkovacie a neinvazívne postupy pri odbere klinických vzoriek. Týmito metódami je možný neinvazívny a hlavne bezbolestný odber rôzneho biologického materiálu – krv, moč, sliny alebo pot. Práve obmedzenie bolestivosti, odber minimálneho množstva spojený s rýchlosťou a presnosťou analýzy má obrovský potenciál v diagnostike a terapiách. Tieto mikrovzorkovacie postupy by mali uplatnenie v oblastiach ako je onkológia, neurológia alebo imunológia. Jedným z týchto postupov je analýza apokrinného potu. Apokrinný pot sa od ekrinného líši v spôsobe sekrécie, ktorá nie je závislá na teplote alebo fyzickej aktivite čím sa jeho koncentrácia a zloženie v čase, stávajú stabilnejšími (Kvasnička et al., 2021). Využitie apokrinného potu v klinickej analýze má veľký potenciál pri zlepšení diagnostiky a liečby širokého spektra ochorení. Ak by bola táto metóda ďalej rozvíjaná existuje potenciál pri detekcii rôznych typov rakoviny. Táto metóda je navyše spojená s neinvazívnym odberom vzorky a v budúcnosti by sa tak mohla stať veľmi dostupnou a jednoduchou diagnostickou metódou. V tejto práci sme testovali aplikovateľnosť lipidomickej analýzy apokrinného potu pomocou odberového systému SLIDE pre skrínung rakoviny prsníka v spolupráci s Univerzitou v Hradci Králové a Mamologickou klinikou Fakultnej Nemocnice v Hradci Králové.

2. SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY

2.1. Potné žľazy

2.1.1. Rozdelenie a fyziológia potných žliaz

Homeostáza je súhrn procesov, vďaka ktorým si živé organizmy aktívne snažia zachovať svoje vnútorné podmienky (telesná teplota, pH krvi, krvný tlak, hladinu cukru v krvi a i.) pre svoj život v rovnováhe, nezávisle od meniacich sa vonkajších podmienok prostredia. U ľudí je jedným z najdôležitejších homeostatických procesov udržiavanie fyziologickej telesnej teploty. Pri zvýšení vonkajšej teploty alebo pri fyzickej aktivite dochádza aj k zvýšeniu telesnej teploty. Jedným zo spôsobov akým si ľudia dokážu túto teplotu opätovne znížiť je regulácia krvného obehu a potenie (Casa et al., 2019; Baker, 2019). Potením sa z potných žliaz vylučuje viskózna tekutina zvaná pot. Potenie je esenciálnou fyziologickou funkciou dôležitou pre reguláciu vylučovania vody a homeostázy kľúčových elektrolytov Na^+ , Cl^- (Chen et al., 2020). Potné žľazy majú v malej miere exkretčnú funkciu podobnú akú má renálny systém, ktorý je zodpovedný za odstraňovanie nadbytočných mikronutrientov, odpadových produktov metabolizmu a toxikantov z tela (Baker, 2019). Okrem už vyššie spomenutých sa jedná o ióny (Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ , PO_4^{3-} , NH_4^+) a organické zlúčeniny (aminokyseliny, hydroxy/ keto kyseliny, voľné mastné kyseliny (FA), sacharidy, močovina, vitamíny, farmaceutiká a i.) (Stefaniak & Harvey, 2006; Kvasnička et al., 2021). Toto naznačuje, že niektoré komponenty potu sú fyziologické alebo patologické indikátory (Chen et al., 2020). Okrem toho sú relatívne koncentrácie nemetabolizovaných drog občas vyššie v pote ako v krvi, moči alebo slinách (Cone, 1997; Dutkiewicz et al., 2014; Chen et al., 2020). Potné žľazy sú rozmiestnené na celom povrchu tela a rozlišujeme tri druhy potných žliaz: ekrinné, apokrinné a apoekrinné. V roku 1917 a 1921 Schiefferdecker navrhol, aby sa potné žľazy členili podľa spôsobu sekrécie potu, a teda na ekrinné/merokrinné, apokrinné a holokrinné (Obr. 1) (Montagna & Parrakal, 1974). Týmto sa podarilo jednoznačne funkčne definovať tri veľmi odlišné kategórie sekrécie bunkového materiálu týchto žliaz (Montagna & Parrakal, 1974).

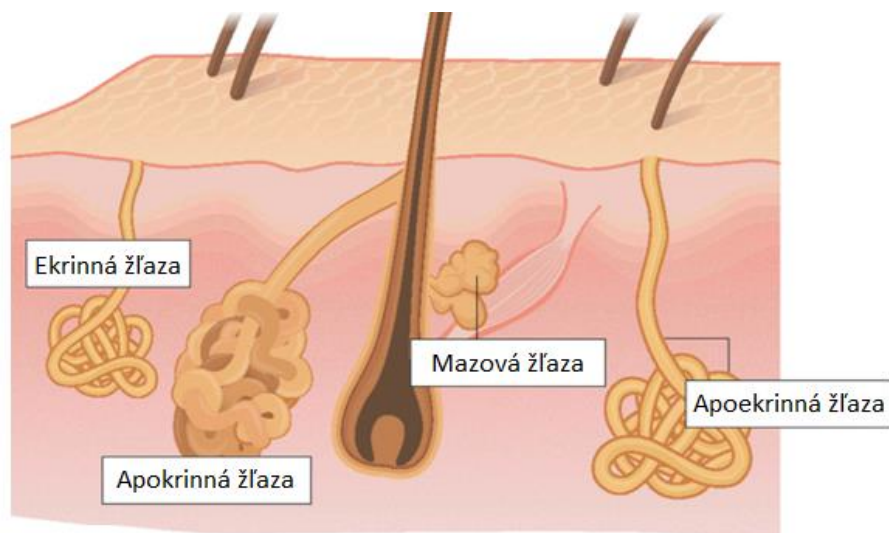


Obr. 1: Schéma všetkých spôsobov sekrécie potu. A) Merokrinná/ekrinná sekrécia, B) Apokrinná sekrécia, C) Holokrinná sekrécia (prevzaté a upravené z Farkaš, 2015).

Pri merokrinnej/ekrinnej sekrécií dochádza k uvoľňovaniu iba nízkomolekulárnych, vo vode rozpustných, látok. Tento proces je podobný exocytóze, pri ktorej sú vylučované látky z bunky fúzané s vezikulami golgiho aparátu (GA), a následne sú tieto vezikuli fúzané s cytoplazmatickou membránou (CM), až sú nakoniec vylučované do extracelulárneho priestoru (Obr. 1, A) (Cui & Schlessinger, 2015). Počas apokrinnej sekrécie je bunkový materiál, obsahujúci fragmenty cytoplazmy, obalený CM vylúčený do lúmenu žľazy alebo intersticiálneho priestoru (Charles, 1959; Schaumburg-Lever & Lever, 1975). Časti tohto bunkového materiálu obsahujú celé bunkové organely a proteíny v *in situ* pozícii, ktoré zostávajú naďalej funkčné (Obr. 1, B) (Farkaš, 2015). Pri tejto sekrécií sa bunky, z ktorých sa oddeľujú tieto kusy cytoplazmy aj s organelami v mieste odštiepenia opätovne zacelia a nemusia byť nahradzované novými bunkami (Farkaš, 2015). Tretím typom sekrécie je holokrinná sekrécia. Na rozdiel od apokrinnej sekrécie dochádza k dezintegrácii celých buniek, pričom aj jadro môže slúžiť ako sekrečný produkt a sekret je veľmi bohatý na lipidy (Obr. 1, C) (Montagna & Parrakal, 1974). Po holokrinnej sekrécií musia byť bunky nahradené novou vrstvou buniek, a jedná sa skôr o tradičnú sekréciu mazových žliaz ako potných žliaz (Schaumburg-Lever & Lever, 1975). Inervácia apokrinnych žliaz je zatiaľ neobjasnená, ale ukázalo sa, že izolované žľazy reagujú silnejšie na cholinergické stimuly ako adrenergické (Sato et al., 1987; Sato & Sato, 1987). Emocionálne stimuly, akými sú napr. úzkosť a strach, môžu vyvolať potenie na dlaniach, chodidlách alebo aj na čele (chladenie mozgu počas mentálneho stresu) a axilách (Asahina et al., 2003; Asahina et al., 2015).

2.1.2. Apokrinné potné žľazy

Apokrinné žľazy ako prvý identifikoval Krause v roku 1844, a neskôr boli pomenované Schiefferdeckerom v roku 1922 (Hibbs, 1962; Montagna & Parakkal, 1974). Apokrinné potné žľazy sú lokalizované najmä v axille, prsiach, tvári, pokožke hlavy a v perineu (Montagna & Parakkal, 1974; Robertshaw, 1983). Hustota apokrinných žliaz je rôznorodá a štúdie zatiaľ uvádzajú 8–43/cm² plochy tela (Sato et al., 1987; Hussain et al., 2017). Apokrinné žľazy sú na rozdiel od ekrinných väčšie, a ich sekrét je vylučovaný najskôr do vlasového folikulu, nie na povrch pokožky ako pri ekrinných žľazách (Obr. 2) (Weiner & Hellmann, 1960; Baker, 2019). Napriek tomu, že sú apokrinné potné žľazy v pokožke prítomné už od narodenia ich aktivita sa začne prejavovať až v puberte (Sato et al., 1987).

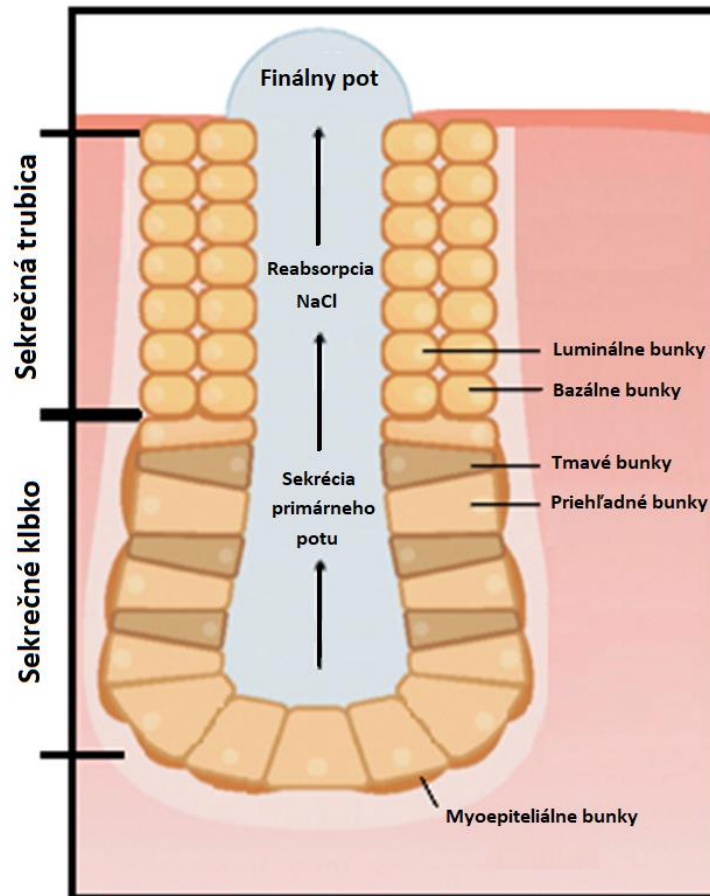


Obr. 2: Rozdelenie potných žliaz (prevzaté a upravené z Baker, 2019).

Ekrinné potné žľazy sú rovnomerne rozmiestnené po celom povrchu tela a najviac ovplyvňujú termoreguláciu. Ich najväčšia koncentrácia je lokalizovaná na dlaniach, chodidlách a vlasovej pokožke hlavy. O existencii apoekrinných žliaz zatiaľ existujú protichodné názory, nakoľko ich prítomnosť bola zatiaľ potvrdená pri imunohistochemickej analýze s použitím protilátok odlišujúcich jednotlivé potné žľazy, ale nebola potvrdená pri izolačnej ani histologickej analýze vzoriek axilárnej kože (Bovell et al., 2007). Medzi protilátky použité pri analýze patrili: myelomonocytný marker (CD15; zo sekrečných buniek) a globulín-1 (HMFG-1; z tuku materského mlieka) apokrinných žliaz, membránový glykoproteín (CD44; zo sekrečného kľbka)

a Ca^{2+} viažuci proteín (S-100; bazálne bunky) ekrinných žliaz (Bovell et al., 2007). Výsledky tejto analýzy však priniesli konfliktné výsledky nakoľko s ich použitím sa nedali jednoznačne rozlíšiť ani ekrinné a apokrinné žľazy, pretože dané protilátky neboli dostatočne selektívne pre jednotlivé typy (Bovell et al., 2007). Predpokladá sa, že sa apokrinné žľazy vyvíjajú z ekrinných počas puberty, a ich počet sa zvýši až na 45% celkového množstva axilárnych žliaz do dovŕšenia šestnásteho až osemnásteho roku (Sato et al., 1987). Predpokladá sa, že sú lokalizované, podobne ako apokrinné, hlavne do oblasti axíl (Sato & Sato 1987, Beer et al., 2006). Veľkostne sa nachádzajú medzi apokrinnými a ekrinnými žľazami avšak zdieľajú vlastnosti s oboma typmi žliaz (Obr.2) (Sato & Sato, 1987). Apokrinné žľazy pravdepodobne vylučujú sekrét priamo na povrch pokožky (Obr. 2) (Sato & Sato., 1987; Baker, 2019) a produkujú väčšie množstvo potu než ekrinné (Bovell et al., 2007). Funkcia tejto sekrécie je zatiaľ neznáma, ale nie je veľmi pravdepodobné, že by hrala dôležitú úlohu pri termoregulácii nakoľko vyparovanie v oblasti axíl je veľmi neefektívne (Baker, 2019). Apokrinné potné žľazy produkujú len malé množstvo potu, a preto nemajú významný účinok na termoreguláciu (Bovell et al., 2007). Tento typ žľazy je zložený zo sekrečného kľbka a sekrečnej trubice (Obr.2) (Bovell et al., 2007). V apokrinných žľazách sa nachádzajú dva typy buniek: stĺpcovité sekrečné bunky a myoepiteliálne bunky (Hussain et al., 2017). Sekrečné bunky sú zvyčajne plné mitochondrií (Mi) a rôznorodých granúl s nejasnými bunkovými membránami a mikrovilami smerujúcich do lúmenu žľazy (Wilke et al., 2007; Hussain et al., 2017). V sekrečnom kľbku sa nachádza vrstva stĺpcovitých sekrečných buniek (Bell, 1974; Ito, 1988; Inaba & Inaba, 1992). Z vnútornej strany je táto vrstva obklopená fenestrovanou vrstvou myoepiteliálnych buniek (Inaba & Inaba, 1992; Bovell et al., 2007). Funkciou myoepiteliálnych buniek je poskytovanie štruktúrnej pomoci žľaze proti hydrostatickému tlaku, ktorý sa vytvára počas produkcie potu (Sato & Sato, 1983; Baker, 2019). Lúmen je v priemere väčší než u ekrinných potných žliaz (Ito, 1988). Sekrečná trubica u apokrinných potných žliaz nemá žiadne známe reabsorpčné funkcie a je tvorená z dvojitej vrstvy kuboidálnych buniek, ktoré sa spájajú s epitelom vlasového folikulu, výsledkom čoho je vyprázdňovanie sekréту žľazy do vlasového folikulu (Obr.2) (Inaba & Inaba, 1992; Bovell et al., 2007). Histologické vyšetrenie sekcií vzorky kože z axily ukázali, že napriek tomu, že sú oba typy žliaz (apokrinné a ekrinné) od seba úplne oddelené zostávajú stále v tesnej blízkosti (Bovell et al., 2007). Anatomická štruktúra ekrinnej potnej žľazy pozostáva taktiež zo sekrečného kľbka a trubice tvorenej z jednoduchého

tubulárneho epitelu (Obr.3) (Baker, 2019). Sekrečné kĺbko však obsahuje tri typy buniek: priehľadné, tmavé a myoepiteliálne (Obr. 3) (Baker, 2019). Priehľadné bunky sú zodpovedné za sekréciu primárneho potu, ktorý je takmer izotonický s krvnou plazmou (Sato, 1977; Costill, 1977; Sato & Sato, 1990). Priehľadné bunky obsahujú systém intercelulárnych kanálikov, glykogén, veľké množstvo Mi a majú Na^+ K^+ ATP-ázovú aktivitu (Sato & Sato, 1983; Baker, 2019). Tmavé bunky sú odlišiteľné najmä vďaka nadmernému množstvu tmavých granúl v cytoplazme (Baker, 2019). Ich funkcia zatiaľ nie je objasnená, ale predpokladá sa, že by potencióálne mohli pôsobiť ako úložisko rôznych bioaktívnych materiálov zapájajúcich sa do regulácie priehľadných buniek a buniek trubice (Sato et al.,1991; Baker, 2019). Trubica je tvorená z dvoch bunkových vrstiev: bazálnej a luminálnej (Obr. 3) (Baker, 2019). Primárnou funkciou je resorpcia Na^+ a Cl^- iónov počas toho ako pot prúdi cez trubicu najmä v proximálnej časti trubice, ktorá má vyššiu Na^+ K^+ ATP-ázovú aktivitu a obsahuje väčšie množstvo Mi (Sato & Sato, 1983; Baker, 2019). Výsledkom tejto resorpcie je hypotonický finálny pot, ktorý je sekretovaný na povrch kože (Obr. 3) (Sato, 1977; Sato, 1993, Baker, 2019). Medzi bunky tvoriace apoekrinné žľazy patria ekrinné a apokrinné sekrečné bunky a myoepiteliálne bunky (Sato et al., 1987; Hussain et al., 2017). Morfológia a fyziológia týchto žliaz ešte nebola presne objasnená a vyžaduje si ďalší výskum.



Obr. 3: Štruktúra ekrinnej žľazy (upravené a prevzaté z Baker, 2019).

Apokrinná sekrécia bolo pozorovaná okrem potných žliaz napríklad aj v mliečnych žľazách, slzných kanálikoch, mazových žľazách v ušnom kanáli (Kawabata & Kurosumi, 1976), nadsemeníkoch (Morales & Cavicchia, 1991), choroidnom plexe (Agnew et al., 1980; Gudeman et al., 1989), prištítnych telieskach (Ream & Principato, 1981), v prednom laloku hypofýzy (Schwarz et al., 1988) alebo sliznici maternice (Bartosch et al., 2011). Niektoré z menovaných žliaz, hlavne prištítne telieska a hypofýza, sú endokrinné žľazy s vnútorným vylučovaním ale ostatné sú exokrinné, z ktorých mnohé slúžia ako bariérový epitel (Farkaš, 2015). Teda z hľadiska smeru sekrécie sú apokrinné žľazy zvyčajne exokrinné a slúžia na komunikáciu s vonkajším prostredím (Farkaš, 2015). Týmto sa odlišujú od exocytózy, ktorá slúži hlavne na komunikáciu medzi bunkami vo vnútri organizmu a dokonca v rámci rovnakého tkaniva (Farkaš, 2015). Anatomicky najkomplikovanejšou apokrinnou žľazou je mliečna žľaza (Farkaš, 2015). Vďaka objaveniu slinnej apokrinnnej žľazy u *Drosophily*, ktorá je skvelým modelovým organizmom, bolo možné bližšie skúmať tento typ sekrécie, a popísať ako sa počas najintenzívnejšej fázy sekrécie z buniek uvoľňujú veľké

fragmenty bunkových štruktúr, vrátane celých organel ako napr. Mi, GA a oblasti endoplazmatického retikula (EPR) (Farkaš et al., 2014). Sekrét obsahuje membránové, cytoskeletárne, Mi, ribozomálne a nukleárne ako aj nukleolárne proteíny (Farkaš, 2015). Navyše tkanivo je, aj napriek masívnej apokrinnej sekrécii, stále vitálne, a produkty DNA sú stále tvorené, čo sa potvrdilo inkorporáciou rádioaktívnych prekurzorov do novo syntetizovanej RNA (Farkaš, 2015). Exocytóza sa využíva na intracelulárnu komunikáciu pomocou molekúl, ktoré sú koncentrované do sekrečných vezikúl (Farkaš, 2015). Po rozpade vezikúl je ich obsah prijatý populáciou cieľových buniek, kde tieto molekuly slúžia ako signál alebo sa využijú na obnovu transmembránových komponentov (Farkaš, 2015). Navyše exocytózou sa môžu uvoľňovať len rozpustné proteíny, ktoré sa viažu na vnútorný receptor (Machado et al., 2010). Naopak apokrinnou sekréciou sa dokáže uvoľniť akýkoľvek proteín napr. aj nerozpustný polypeptid (Nelson a Cox, 2017). Z energetického sa týmto spôsobom šetrí energia, ktorá by bola nevyhnutná na zbalenie proteínov do vezikuli (Farkaš, 2015). Pri apokrinnej sekrécii zostávajú všetky proteíny sekrétu v ich pôvodnej *in situ* polohe s ich pôvodným subcelulárnym umiestneným v kompartmentoch v rozpustnom a funkčnom stave (Farkaš, 2015). Apokrinná sekrécia bola pozorovaná len u organizmov s vyššími tkanivovými štruktúrami, na rozdiel od exocytózy, ktorá je pozorovaná aj u jednobunkových organizmov, a nie je zatiaľ jasné prečo sú len organizované tkanivá schopné apokrinnej sekrécie (Alberts et al., 2007; Farkaš, 2015).

2.1.3. Zloženie apokrinného potu

Pot je za normálnych okolností priehľadná telová tekutina s mierne kyslým pH, ktoré sa pri apokrinnom pote pohybuje okolo pH 0,5 – 5,6 a pri ekrinnom okolo hodnoty pH 4,0 – 6,0 (Sato et al., 1989). Apokrinné žľazy produkujú viskózný na lipidy bohatý pot, ktorého hlavnou zložkou je voda 99%, zvyšné 1% tvoria rôzne látky ako napr. dusíkaté látky hlavne aminokyseliny a urea (Raiszadeh et al., 2012; Jadoon et al., 2015), kovové a nekovové ióny (K^+ , Na^+ , Cl^- , Ca^{2+} , NH_4^+) (Caplan & Goldberger, 2001; Jadoon et al., 2015), metabolity laktát, urea, sacharidy, lipidy ako aj rôzne farmaceutiká alebo drogy (Sato et al., 1989; Jadoon et al., 2015; Kvasnička et al., 2021). Nakoľko má pot mierne kyslé pH, preferenčne sa v ňom akumulujú bázické drogy viac než v krvi (Caplan & Goldberger, 2001).

Zvyčajne sú u mnohých druhov apokrinné žľazy považované za pachové žľazy zapájajúce sa do produkcie feromónov (pach tela), avšak táto sociálno-sexuálna funkcia je u ľudí len minimálna (Baker, 2019). Zloženie potu závisí od mnohých faktorov napr. rýchlosť potenia, dĺžka trvania prechodu potu cez sekrečnú trubicu, aldosterónová aktivita, fyzický tréning, psychologické stavy a aklimatizácia na podmienky prostredia (Noël et al., 2012; Hussain et al., 2017). Toto naznačuje existenciu funkcií, ktoré ešte musia byť objasnené (Hussain et al., 2017). Existujú dohady, že pot by mohol byť len ultrafiltrátom plazmy nakoľko obsahujú veľmi podobné komponenty len v rôznych koncentráciách (Harker, 2006; Hussain et al., 2017). Avšak, na základe proteomických analýz potu od schizofrenických pacientov a kontrolných vzoriek, len 6 zo 185 unikátnych proteínov bolo identifikovaných v sére čo naznačuje, že pot zrejme nie je len ultrafiltrát plazmy (Hussain et al., 2017). Apokrinný pot obsahuje nosné proteíny pre prchavé molekuly pachu ako napr. prchavé organické molekuly (VOC) a feromóny s aminokyselinovými konjugátmi produkovanými bakteriálnymi enzýmami (Wilke et al., 2007; Hussain et al., 2017). Apokrinná bromhidróza, pach tela je spojený s veľkým množstvom baktérií (viac ako 10^6 baktérií/cm²) mikroflóry kože ako sú napr. aeróbne *cocci* a druhy *diphtheroida*, *corynobacterium* a *stafylococcus epidermidis* (Barazantny et al., 2012; Noël et al., 2012). Na získanie vhodného množstva potu, a pre následnú analýzu, je potrebných viacero spôsobov odberu, pre rôzne typy potu. Na vyvolania sekrécie ekrinného potu vplyvajú environmentálne faktory (teplota a vlhkosť), regulačné systémy (hormonálne a sympatetický nervový systém), diéta a niektoré chemikálie schopné vyvolať potenie ako sú napr. pilokarpín (Jadoon et al., 2015).

Pri apokrinnom pote bol pozorovaný vplyv emócií ako napr. bolesti alebo strachu, sympatetických stimulantov (epinefrín) (Shelley & Hurley, 1953). Lipidomická analýza slz, ktoré sú tvorené v žľazách produkujúcu olej na viečkach, identifikovala viac ako 150 lipidov zo šiestich rôznych lipidových tried (Rantamäki et al., 2011). Všetky tieto lipidové triedy sú zhodné s druhmi, ktoré sa zvyčajne nachádzajú v subcelulárnych kompartmentoch ako EPR, GA alebo CM (Alberts et al., 2007; Hullin-Matsuda et al., 2014). Dôležitou vlastnosťou apokrinného sekrétu je prítomnosť komplexného bunkového lipidómu v sekretovanom materiály (Farkaš, 2015). Vďaka tomu, že pri apokrinnej sekrécii dochádza k dezintegrácii bunky nedochádza k zriedeniu vylučovaného sekrétu (Chen et al., 2020). Kvasnička et al., pri lipidomickej analýze apokrinného potu identifikovali vo vzorkách 240 lipidov z 15-tich lipidových tried a podtried. Jednalo sa o cholesteryl estery (CE), ceramidy (Cer), hexosylceramidy (HexCer), lysofosfatidylcholíny (LPC), fosfatidylcholíny (PC), plazmalogén fosfatidylcholíny (PCO), lysofosfatidyletanolamíny (LPE), fosfatidyletanolamíny (PE), plazmalogén fosfatidyletanolamíny (PEO), fosfatidylinizitoly (PI), fosfatidylseríny (PS), sfingomyelíny (SM), diacylglyceroly (DG), triacylglyceroly (TG) a FA (Kvasnička et al., 2021). Až 83,8% celkového množstva lipidov tvorili FA. V menšom množstve už boli zastúpené DG (7,9%), CE (4,4%), TG (2,1%), a sfingolipidy spolu s glycerofosfolidmi tvorili 1,9% potu (Kvasnička et al., 2021). Ceramidy (1,3%) a sfingomyelíny (0,2%) zastupovali väčšinu lipidových podtried (Kvasnička et al., 2021).

2.2. Patofyziológia potu

2.2.1. Zmeny zloženia potu v dôsledku patologických stavov

Pri ochoreniach môže pot meniť svoje zloženie a niektoré z týchto komponentov môžu slúžiť ako biomarkery pre danú chorobu (Sato et al., 1989; Caplan & Goldberger, 2001; Raiszadeh et al., 2012; Jadoon et al., 2015). Ku zmenám zloženia potu však dochádza aj pri rozdielnych technikách odberu (Takemura et al., 1989), alebo podmienkach, pri ktorých je pod odoberaný (Chen et al., 2020). Pri zvýšenej rýchlosti metabolizmu vyvolanej cvičením, môže dôjsť k zvýšeniu rýchlosti dezintegrácie buniek, čo vedie pri porovnaní zloženia potu odobraného v skupine ľudí, ktorým bol odobraný po fyzickej aktivite, a skupine ľudí, ktorým bol odobraný po pasívnom prehrievaní (Chen et al., 2020). Vo vzorke jedincov, ktorým bol pot odobraný po fyzickej aktivite, bola zvýšená koncentrácia močoviny, Na^+ a K^+ (Chen et al., 2020). Podobné výsledky boli pozorované aj pri porovnávaní apokrinných a ekrinných žliaz, pričom zmeny v spôsobe exkrécie potu z buniek medzi týmito žľazami mohli mať za následok zmeny v koncentrácií urey a iónov, ktoré boli vyššie práve v apokrinnom pote (Chen et al., 2020). Koncentráciu Cl^- v pote výrazne neovplyvnili rôzne spôsoby potenia ani typ potnej žľazy. (Chen et al., 2020). Zmeny v rýchlosti metabolizmu, vyvolanej cvičením, mohli spôsobiť zvýšenie exkrécie počas behu (Chen et al., 2020). Obzvlášť dôležitým aspektom odberu vzoriek apokrinného potu je vyhnúť sa kontaminácii sekrétu z ekrinných žliaz. Tejto kontaminácií sa dá vyhnúť pomocou vonkajšej kompresie, vákua alebo využitím kapilárnych síl, pričom by subjekt nemal byť vystavený nadmernému teplu alebo fyzickej aktivite pred odberom vzorky (Shelley & Hurley, 1953; Sato & Sato, 1987; Kvasnička et al., 2021). Správnemu odberu vzorky môžu brániť aj špecifické odchýlky medzi subjektami, ktorým je pot odoberaný akými sú napr. používanie antiperspirantov (môžu zablokovať alebo poškodiť potnú žľazu), a variabilita rýchlosti a množstva sekrécie medzi subjektami (McGrath, 2009). Jedným z ochorení, pri ktorom boli pozorované zmeny zloženia potu je atopická dermatitída (AD) (Boothe et al., 2017). AD je chronické dedičné ochorenie, ktoré spôsobuje dysregulácia lipidov v medzibunkových spojeniach kože, čím sa porušuje kožná bariéra (Boothe et al., 2017). Na miestach s porušenou kožnou bariérou následne vzniká zápal a dochádza k strate vody (Boothe et al., 2017). V danom mieste, a v okolí rany, sa tým vysušuje pokožka, ktorá sa následne olupuje čo spôsobuje svrbenie (Boothe et al., 2017). Cer sú triedou lipidov skladajúcou sa z 12-tich známych druhov nachádzajúcich

sa v rôznom pomere v pokožke (van Smeden et al., 2014). Z týchto dvanástich druhov 8 tvorí a udržuje epidermálnu bariéru, a tvorí z 80% všetkých kožných ceramidov (van Smeden et al., 2014; Agrawal et al., 2017). Koncentrácia všetkých týchto 8 druhov je znížená u pacientov trpiacich AD, ktorí majú poškodenú epidermálnu bariéru (Ishikawa et al., 2010; Janssens et al., 2012). Zvyšné 4 druhy Cer, NS (4-hydroxysfingeníny a nehydroxylované mastné kyseliny) a NdS (sfinganíny a nehydroxylované mastné kyseliny), tvoria 15% kožných ceramidov a zohrávajú úlohu pri signalizačných dráhach v keratinocytoch, zodpovedajúcich za proliferáciu nových keratinocytov a hojenie rán (Geilen et al., 1997; van Smeden et al., 2014). NS a NdS ceramidy s krátkym reťazcom majú zvýšené hladiny u pacientov s AD avšak NS a NdS ceramidy s dlhým reťazcom (>50 C) majú zníženú hladinu (Ishikawa et al., 2010; Agrawal et al., 2017). Bioaktívne lipidy majú rôzne formy a regulujú širokú škálu procesov ako napr. zápal, bunkový rast a diferenciácia buniek (Murakami, 2011; Agrawal et al., 2017). Medzi tieto mediátory zahrňame oxidované lipidy (oxylipíny), endokanabinoidy a Cer (Murakami, 2011; Agrawal et al., 2017). Vo vzorkách potu pacientov trpiacich AD a zdravých kontrolných subjektov bolo identifikovaných 58 lipidových mediátorov, z ktorých 38 patrilo medzi oxylipíny, 3 nitrolipidy, 13 endokanabinoidov, 7 NS alebo NdS ceramidov a 2 sfingolipidové kostry (C18:1 sfingozín) (Agrawal et al., 2017). Pri porovnaní množstva Cer a C18:1 sfingozínu, hlavne u mužov, medzi pacientami trpiacimi AD a zdravými subjektami, bolo pozorované 2 – 6 násobné zvýšenie množstva Cer a C18:1 sfingozínu (Agrawal et al., 2017). A u žien len 1 až 1,5-násobné zvýšenie (Agrawal et al., 2017). Tieto rozdiely v množstve Cer korelovali dysreguláciou lipidov epidermálnej bariéry u pacientov trpiacich AD, ktorých koža nebola v čase odberov vzoriek potu poškodená a ani sa neolupovala (Agrawal et al., 2017). Toto zistenie naznačuje, že analýza potu by mohla byť využívaná na skorú diagnostiku AD u pacientov, ktorí zatiaľ nemajú jednoznačné symptómy AD (Agrawal et al., 2017). Jedným z najznámejších prípadov kedy sa pot používa na diagnostiku je potný test na cystickú fibrózu (CF), ktorý bol po prvý raz popísaný v roku 1959 (Wallis, 1997). Podstatou tohto testu je sledovanie hladiny Cl⁻ iónov (Wallis, 1997). Koncentrácia Cl⁻ iónov ako aj Na⁺ iónov je ovplyvnená prístupnosťou CFTR (transmembránový regulátor vodivosti pri cystickej fibróze) chloridových kanálov v sekrécnej trubici ekrinných potných žliaz (Baker, 2019). Znížené množstvo CFTR kanálov spôsobuje nízku reabsorpciu Cl⁻ iónov a ich zvýšenú koncentráciu vo finálnom pote (Baker, 2019). Pri pacientoch trpiacich CF dosahujú tieto ióny koncentráciu nad 60 mmol/l (>70 mmol/l u adolescentov

a dospelých) (Wallis, 1997). Potný test si vyžaduje vzorku potu s hmotnosťou >100 mg (Wallis, 1997). Tento test sa typicky prevádza v triplikátoch pre zaistenie správnosti diagnózy (Wallis, 1997). U detí sa tento test vykonáva až potom, ako je možné získať dostatočné množstvo potu na jeho prevedenie (Wallis, 1997). Pri starších deťoch a adolescentoch je občas koncentrácia Cl⁻ iónov vyššia ako 60 mmol/l (Fitzpatrick et al., 1986; Wallis, 1997). V týchto prípadoch sa využíva 9- α - fludrokortizón, ktorý zvýši reabsorpciu Na⁺ iónov, čím sa u zdravých jedincov zníži koncentrácia týchto iónov v pote avšak u pacientov s CF nie (Hodsen et al., 1983; Wallis, 1997).

2.3. Lipidy

Lipidy sú chemicky veľmi rozmanitá skupina zlúčenín, ktorých spoločnou a definujúcou vlastnosťou je nerozpustnosť vo vode. Rovnako aj z hľadiska ich štruktúry a biologických funkcií sa jedná o veľmi rôznorodú skupinu chemických látok. Pre mnohé organizmy slúžia ako základná zásobná forma energie v podobe tukov a olejov (Nelson & Cox, 2017). Fosfolipidy, steroly alebo sfingolipidy (sfingomyelíny) sú zase hlavnými štruktúrnymi elementami biologických membrán (Nelson & Cox, 2017). Iné lipidy, ktoré sú síce prítomné len v malých množstvách, hrajú kľúčovú úlohu ako kofaktory enzýmov, elektrónové prenášače, pigmenty absorbujúce svetlo, hydrofóbne kotvy pre proteíny, chaperóny pomáhajúce pri skladaní membránových proteínov, emulgačné činidlá v tráviacom trakte, hormóny a intracelulárne signálne molekuly (van Meer, 2005).

2.3.1. Lipidomika

Lipidomika je pomerne novým odvetvím metabolomiky pričom oboje patria medzi tzv. *-ómické* disciplíny, akými sú aj genomika, transkriptomika, proteomika alebo metabolomika (Vailati-Riboni et al., 2017). Ich cieľom je identifikovať, charakterizovať a kvantifikovať biologické molekuly zapojené do štruktúry, funkcie a dynamiky bunky, tkaniva alebo organizmu. Koncovka *-óm* sa používa pri popise objektu na ktorý sa daná vedná disciplína zameriava teda genóm, proteóm, transkriptóm, metabolóm alebo lipidóm (Vailati-Riboni et al., 2017). Metabolomika študuje všetky chemické procesy, v ktorých vystupujú malé molekuly – metabolity, a metabolóm popisuje súbor všetkých metabolitov v bunke, tkanive, orgáne alebo organizme, ktoré sú produktami týchto procesov. Lipidomika je rýchlo rozvíjajúca sa oblasť *-ómických* metód, ktorá sa zameriava na identifikáciu a kvantifikáciu málo polárnych a nepolárnych molekúl – lipidov (Vailati-Riboni et al., 2017). Ako ohraničenia organel a buniek sú lipidy neustále vystavované biochemickým zmenám v intra- aj extracelulárnom prostredí v dôsledku čoho podstupujú mnohé chemické a štrukturálne modifikácie (Nelson & Cox, 2017). Lipidóm teda reflektuje tieto biochemické zmeny v rámci systému vďaka čomu jeho výskum poskytuje lepšie pochopenie biochémie daného skúmaného systému, a má potenciál identifikovať biochemické anomálie vznikajúce v dôsledku vplyvov narúšajúcich homeostázu lipidov (Stephenson et al., 2017). Zároveň poskytuje informácie o dysregulácii lipidov pri rôznych patologických stavoch akými sú napr.

obezita (Mika & Śledzinski, 2017), diabetes (Markgraf et al., 2016), kardiovaskulárne ochorenia (Stegemann et al., 2014) alebo rôzne typy rakoviny - prostaty (Skotland et al. 2017), pankreasu (Swierczynski et al., 2014), pľúc (Xia et al., 2005), močového mechúra (Piyarathna et al., 2017). Práve kvôli týmto skutočnostiam je lipidomika momentálne v popredí vedeckého záujmu, a vďaka implementáciám moderných analytických detekčných metód, ako napr. hmotnostná spektrometria, nastal v tejto oblasti rapídny pokrok za posledných dvadsať rokov (Pakiet et al., 2019; Waseem et al., 2022).

2.3.2. Lipidová nomenklatúra

Lipidomické analýzy poskytujú ohromné množstvá dát, a počty prirodzene vyskytujúcich lipidov sa pohybujú približne v desaťtisícoch. Z tohto dôvodu bolo kľúčové vytvorenie jednotného klasifikačného systému lipidov, ako aj ich nomenklatúry a databáz, ktoré by dané lipidy evidovali. Momentálne existuje takýchto databáz niekoľko a ponúkajú rôzne funkcie (Tab. 1).

Tab. 1: Zoznam lipidomických databáz a ich funkcií (prevzaté a upravené podľa Abinaya et al., 2022)

Názov databázy	Funkcie
Lipid MAPS – Structure Database	Databáza štruktúr a rôznych poznámok k biologicky relevantným lipidom
LIPIDAT	Databáza biofyzikálnych vlastností rôznych lipidov
Lipid Bank Database	Databáza obsahuje spektrálne dáta, biologické vlastnosti rôznych lipidov
Cyber lipids	Databáza zbiera a rozširuje informácie týkajúce sa lipidov
Lipid Library	Umožňuje prehliadať a identifikovať ligandy pre receptory
Chemical Entities of Biological Interest	Slovník názvov malých zlúčenín prepojený na LMSD
Swiss Lipids	Pomáha s integráciou lipidomických dát na základe biologických poznatkov o lipidoch a ich modeloch

Tab. 2: Kategórie lipidov a príklady (prevzaté a upravené podľa Fahy et al., 2005)

Kategória	Kód kategórie	Príklady
Mastné kyseliny	FA	Oleát, stearoyl-CoA
Glycerolipidy	GL	Di- a triacylaglyceroly
Glycerofosfolipidy	GP	Fosfatidylcholín, fosfatidylserín
Sfingolipidy	SP	Sfingomyelín, gangliozyd GM2
Sterolové lipidy	ST	Cholesterol, žľčové kyseliny
Prenolové lipidy	PR	Retinol, ubichinón
Sacharolipidy	SL	Lipopolysacharid
Polyketidy	PK	Tetracyklín, erytromycín

Lipidy majú širokú škálu štruktúr, od ktorých sa odvíjajú systematické názvy jednotlivých lipidov. Podľa LIPID MAPS Structure database, (LMSD), jednej z najväčších databáz, ktorá má vlastný klasifikačný systém, rozdelujeme lipidy do ôsmich kategórií podľa štruktúry a funkcie (Tab. 2) (Fahy et al., 2005). V rámci každej kategórie sú lipidy ďalej rozdeľované do tried a podtried, ktoré sa uvádzajú na začiatku systematického názvu lipidu spolu s počtom uhlíkov a násobných väzieb (Tab. 3) (Fahy et al., 2005). Pre presnejšiu charakterizáciu sa ďalej uvádza počet uhlíkov jednotlivých FA (Tab. 3), z ktorých sa lipid skladá (Fahy et al., 2005). Pri určovaní násobnej väzby sa používa viacero symbolov podľa toho či je jej poloha známa pomocou lomítka (Tab. 3) alebo neznáma pomocou separátora (Tab. 3). Ak je známa poloha len jednej väzby, uvádza sa v zátvorkách s popisom jej pozície sn-1/sn-2/sn-3 (Fahy et al., 2005). Ak je známa uvádza sa aj rovnako aj jej geometria pomocou písmen „E“ a „Z“ nahrádzajúcich *cis*- a *trans*- (Tab. 3) (Fahy et al., 2005). Pri určovaní stereochemie naviazaných substituentov a funkčných skupín sa používa značenie písmenami „R“ alebo „S“ namiesto α - a β - (Tab. 3) (Fahy et al., 2005).

Tab. 3: Hierarchia tvorby systematického názvu oksyličeného fosfatidyletanolamínu (prevzaté a upravené podľa Kopcynski et al., 2022)

Úroveň charakterizovanej štruktúry	Názov lipidu
Kategória	GP
Trieda	PE
Druh	PE 32:2; O3
Molekulárna	PE 16: 1_16: 1; O3
Pozícia nenasýtenej väzby	PE 16: 1/16: 1; O3
Definovaná štruktúra	PE 16: 1(6)/16:0; (OH)2; oxo
Úplná štruktúra (geometria)	PE 16: 1(6Z)/16:0; 5 OH, 8 OH; 3oxo
Kompletná štruktúra (stereochemia)	PE 16: 1(6Z)/16:0; 5 OH [R], 8 OH [S]; 3oxo

Pri sfingolipidoch sa sfingoidová kostra (1,3-dihydroxy a 1,3,4-trihydroxy) označuje písmenami „d“ a „t“ (Fahy et al., 2005). Ak je známe, že sa alkyl viaže na štruktúru cez atóm kyslíka alebo dusíka, v názve sa toto viazanie označuje pomocou *O*- alebo *N*-hned' za názov podskupiny (Wakelem & Spener, 2020). Trojitá väzba (Y) a cyklické štruktúry (cyA (počet C) : B (počet nenasýtených väzieb)) sa uvádzajú pred funkčnými skupinami, ktoré sú na konci názvu (Wakelem & Spener, 2020).

V LMSD je každému lipidu priradený identifikačný kód, LM_ID, skladajúci sa zo 14 znakov (Tab. 4) (Liebisch et al., 2020). Znaky označujúce príslušnosť k databáze (LM) môžu byť upravené podľa databázy, z ktorej lipid pôvodne pochádza aby sa umožnila vzájomná referencia medzi databázami (napr. LB pre Lipid Bank) a každý lipid obsahuje identifikačný kód aj pôvodnej databázy (Liebisch et al., 2020). Tieto identifikačné kódy LMDS umožňuje taktiež vyhľadávanie lipidov podľa ich štruktúry ako aj vyhľadávanie podľa substituentov alebo pomocou názvov funkčných skupín pre uľahčenie vyhľadávania v texte (Liebisch et al., 2020).

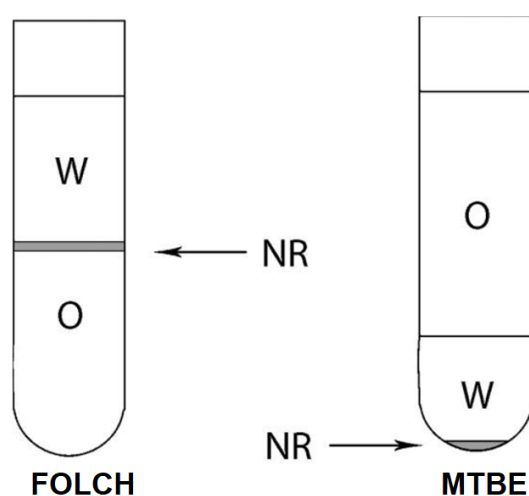
Tab.4: Formát identifikačného kódu podľa LIPID MAPS (prevzaté a upravené podľa Fahy et al. 2009)

Znaky	Popis znaku	Príklad znaku	Komentár
1 – 2	LM	LM	Fixný znak, označuje LIPID MAPS databázu
3 – 4	Kategória	PR	Jedna z ôsmich kategórií lipidov
5 – 6	Trieda	01	-
7 – 8	Podtrieda	03	00 v prípade ak nie je podtrieda pre daný lipid
9 – 10	Kód štvrtého identifikačného levelu	06	Len pre špeciálne lipidy, ktoré to vyžadujú inak sa môže vynechať
11 – 14	Identifikátor v rámci podtriedy alebo štvrtého identifikačného levelu	0002	Glykosfingolipidové podtriedy

2.3.3. Extrakcia lipidov z biologických materiálov

Proces prípravy vzoriek na analýzu začína po ich odobratí. Pre kvalitné výsledky analýzy je nesmierne dôležité aby bola predanalytická fáza vykonaná správne (Züllig et al., 2020). Do predanalytickej fázy patria všetky procesy, ktorými vzorka musí prejsť než sa dostane do laboratória a sú to – odber, transport a uskladnenie (Züllig et al., 2020). Obzvlášť veľká pozornosť je kladená na oxidačné a degradačné procesy účinkom enzýmov alebo teploty (Züllig et al., 2020). Niektoré biologické vzorky však aj po transporte do laboratória nie sú hneď vhodné na analýzu, pretože sú príliš komplexné, a obsahujú veľké množstvo látok nepotrebných pre analýzu (Züllig et al., 2020). Príprava vzorky na analýzu je jednou z časovo náročnejších krokov manipulácie so vzorkou a do veľkej miery ovplyvňuje kvalitu výslednej analýzy (Addepalli & Mullangi, 2020). Obzvlášť pri *-ómických* štúdiách sa vyžaduje aby pred samotnou analýzou podstúpili biologické vzorky extrakciu len vybranej časti skúmaných látok, pri lipidomike sa jedná o lipidy. Proces homogenizácie je dôležitým krokom predprípravy vzorky na analýzu, najmä ak sa jedná o vzorky tkaniva alebo buniek. Pri telových tekutinách ako krv, pot, slzy alebo moč nehrá príliš veľkú úlohu (Nováková et al., 2013; Züllig et al., 2020). Zabezpečuje aby všetky lipidy zo vzorky boli prístupné pre extrakciu rozpúšťadlami. V lipidomike má tento krok dva hlavné účely, a tými sú odstránenie nezvyčajných molekúl nelipidovej povahy a obohatenie vzorky – zvýšenie koncentrácie lipidov (Nováková et al., 2013; Addepalli & Mullangi, 2020). Homogenizáciu sprostredkujú rôzne homogenizátory, ktoré zvyčajne využívajú silu, tlak, sonikáciu alebo detergenty na rozbitie buniek (Nelson & Cox, 2017). Homogenizované vzorky sú potom pripravené na extrakciu cieľovej skupiny látok. Jednou z najtradičnejších metód extrakcie lipidov z biologických matric je extrakcia z kvapaliny do kvapaliny. Jej princípom je prevedenie analytu z vodnej fázy do organickej fázy, ktorú tvorí organické rozpúšťadlo nemiešateľné s vodou na základe rozdeľovacieho koeficientu voda/oktanol (Nováková et al., 2013). Takáto jednoduchá technika sa ľahko optimalizuje a nie je náročná na prevedenie ani prístrojové vybavenie. Používa sa na extrakciu látok v nízkej aj vysokej koncentracií. Touto technikou sa dajú odizolovať látky na základe ich polarít a pH. Neutrálne lipidy (TG, vosky, pigmenty a i.) sa jednoducho extrahujú z tkanív pomocou etyléteru, chloroformu alebo benzénu, jedná sa o rozpúšťadlá zabraňujúce zhukovaniu lipidov spôsobeného hydrofóbnym efektom (Nelson & Cox., 2017). Membránové lipidy sú amfipatické a jednoduchšie sa

extrahujú polárnejšími rozpúšťadlami akými sú etanol alebo metanol, ktoré znižujú hydrofóbne interakcie medzi molekulami lipidov a oslabujú vodíkové väzby a elektrostatické interakcie, ktoré viažu membránové proteíny k týmto lipidom (Nelson & Cox., 2017). Typickými rozpúšťadlami používaných pri extrakciách je systém podľa Folch, et al., 1957 tvorený chloroformom, metanolom a vodou (v pomere 2:1:0,6) (Obr.4).



Obr. 4: Fázové schéma MTBE a FOLCH metód. MTBE – metyl-terc-butyl éter; W – voda; O – Organická fáza, NR – nerozpustný zostatok proteínu (Upravené a prevzaté z Matyash et al., 2008).

Zmes sa oddelí do dvoch fáz – horná vodná fáza tvorená metanolom a vodou obsahuje rozpustené proteíny a cukry a dolná organická tvorená chloroformom obsahuje lipidy (Bligh & Dyer, 1959; Nelson & Cox., 2017) (Obr. 4). Ďalšou veľmi používanou technikou je zmes metanol a terc-butyléter a voda (1,5:5:1,25) (Obr. 4). Výhodou tejto techniky je odstránenie toxického metanolu za netoxický terc-butyléter (Obr. 4) (Addepalli & Mullangi, 2020). Avšak jednoduchá izopropanolová extrakcia je porovnateľne dobrou extrakčnou technikou, a v niektorých prípadoch dokonca lepšie ako vyššie zmienené prístupy (Sarafian et al., 2014). Extrakcia na pevnej fáze je tiež veľmi používanou technikou extrakcie lipidov z biologických matríc. Jednou z jej výhod je vysoký výt'azok v dôsledku účinného za koncentrovania analytu a zároveň nižšia spotreba rozpúšťadiel (Novalchai et al., 2015). Princíp rozdeľovania je postavený na interakciách analytu s pevnou fázou (napr. v extrakčnej kolóne) počas prechodu

kvapalnej fázy obsahujúcej vzorku (Novalchai et al., 2015). Analyt musí mať vyššiu afinitu k stacionárnej fáze než k matrici vzorky a po vymytí nežiadúcich látok je kolóna vysušená. Polárne lipidy sa zachytávajú na kólóne a neutrálne sú prepúšťané a sú v prvej vzorke z kolóny (Nováková et al., 2013). Polárne lipidy sú potom vymyté z kolóny rozpúšťadlami s rastúcou polaritou. Nenabité ale polárne lipidy sa vymývajú acetónom a veľmi polárne, nabité lipidy, sa vymývajú metanolom (cerebrozidy a glycerofosfolipidy) (Nelson & Cox., 2017). Výhodou tejto formy extrakcie je rovnako jej jednoduchosť a finančná nenáročnosť avšak táto metóda je stále pomerne zdĺhavá (Nováková et al., 2013).

2.3.4. Analýza lipidov pomocou LC-MS

Po extrakcii lipidov z biologických matric sú vzorky extraktov pripravené na analýzu. Prístup k analýze lipidov môže byť cieľový alebo necieľový (Jurowski et al., 2017). Cieľová analýza sa zameriava na detekciu malého množstva vybraných druhov lipidov, ktorých chemické vlastnosti sú známe už pred analýzou vzorky, a necieľová, sa zameriava na detekciu čo najväčšieho množstva všetkých prítomných lipidov (Jurowski et al., 2017).

2.3.4.1. Cieľová a necieľová analýza

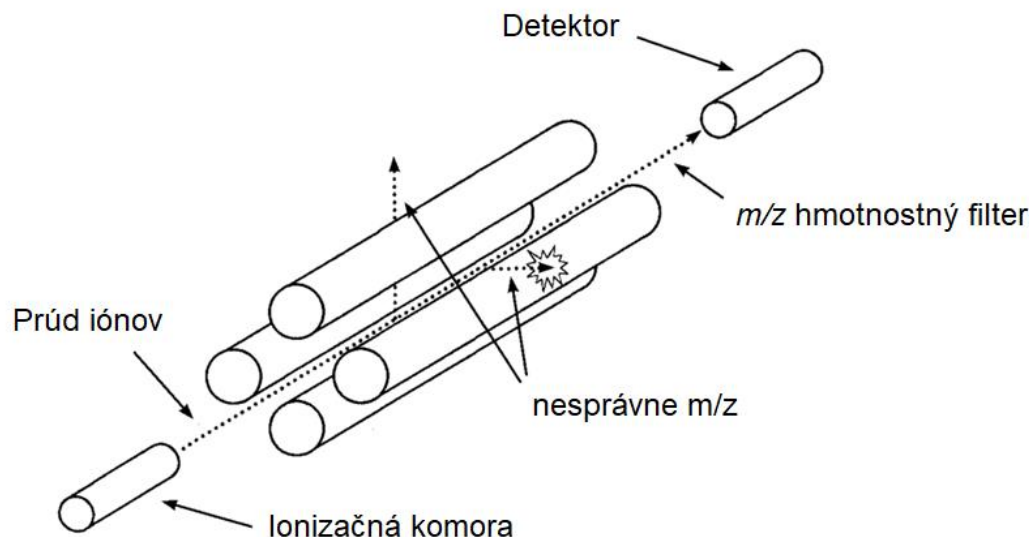
Cieľová analýza sa zameriava na detekciu menšieho množstva vybraných druhov lipidov, ktorých chemické vlastnosti sú známe už pred analýzou vzorky a je obvykle kvantitatívna (Jurowski et al., 2017). Necieľová analýza analyzuje vzorky „naslepo“, bez vedomosti o presných chemických vlastnostiach analytov, a jej cieľom je zachytiť prítomnosť čo najväčšieho počtu druhov lipidov vo vzorke (Cajka & Fiehn, 2014). Výsledkom necieľenej analýzy sú obvykle len semikvantitatívne alebo relatívne informácie o koncentráciách zaznamenaných druhov lipidov (Broadhurst et al., 2018).

2.3.4.2. Kvapalinová chromatografia

Analýza vzoriek oboma spôsobmi je v dnešnej dobe najčastejšie vykonávaná kvapalinovou chromatografiou (LC) spojenou s hmotnostnou spektrometriou (LC-MS) (Cajka & Fiehn, 2014), pretože kombinuje separačnú schopnosť chromatografie s detekčnými vlastnosťami MS. Analýza lipidómu týmto spôsobom je citlivá, rýchla a jej pomocou je možné identifikovať a/alebo kvantifikovať niekoľko stoviek molekúl naraz (Lin et al., 2014). Pri cielej analýze sa získavajú už informácie aj o presnej koncentrácii vybraných analytov v prípade použitia vnútorného štandardu alebo koncentračnej rady kalibračných roztokov (Urban, 2016). Metóda vnútorného štandardu slúži ako korekčný faktor metódy a kompenzuje rozdiely v MS, a straty vzorky počas úpravy (Urban, 2016). Najvyužívanejšími sú izotopovo značené štandardy, pretože sa s analytom zhodujú vo všetkých fyzikálno-chemických vlastnostiach okrem molekulovej hmotnosti (Urban, 2016). Pri LC sa prispôbujú parametre chromatografickej kolóny (priemer, dĺžka, tlak, typ stacionárnej a mobilnej fázy) podľa fyzikálnych a chemických vlastností rozdeľovaných látok (Morley & Minceva, 2021). Pri separácii lipidov sa používa LC s reverznou fázou (RF), v ktorej sú na molekuly stacionárnej fázy kovalentne pripojené hydrofóbne alkylové reťazce z rôznou dĺžkou (C8, C18), na ktoré sa pomocou hydrofóbných interakcií zachytávajú hydrofóbne reťazce lipidov, zatiaľ čo hydrofilné molekuly prechádzajú kolónou bez zachytenia spolu s elučným činidlom (Morley & Minceva, 2021). Zachytené hydrofóbne molekuly sú potom postupne eluované z kolóny znížením polaroty mobilnej fázy, využitím nepolárneho rozpúšťadla (Morley & Minceva, 2021). Ďalším často používaným typom LC je chromatografia založená na hydrofilnej interakcii (HILIC) (Addepalli & Mullangi, 2020). Jedná sa o LC s normálnou fázou (NF), kedy je stacionárna fáza polárna (zachytávajú sa na ňu polárne hlavičky lipidov) a elučné činidlo je nepolárne (Addepalli & Mullangi, 2020).

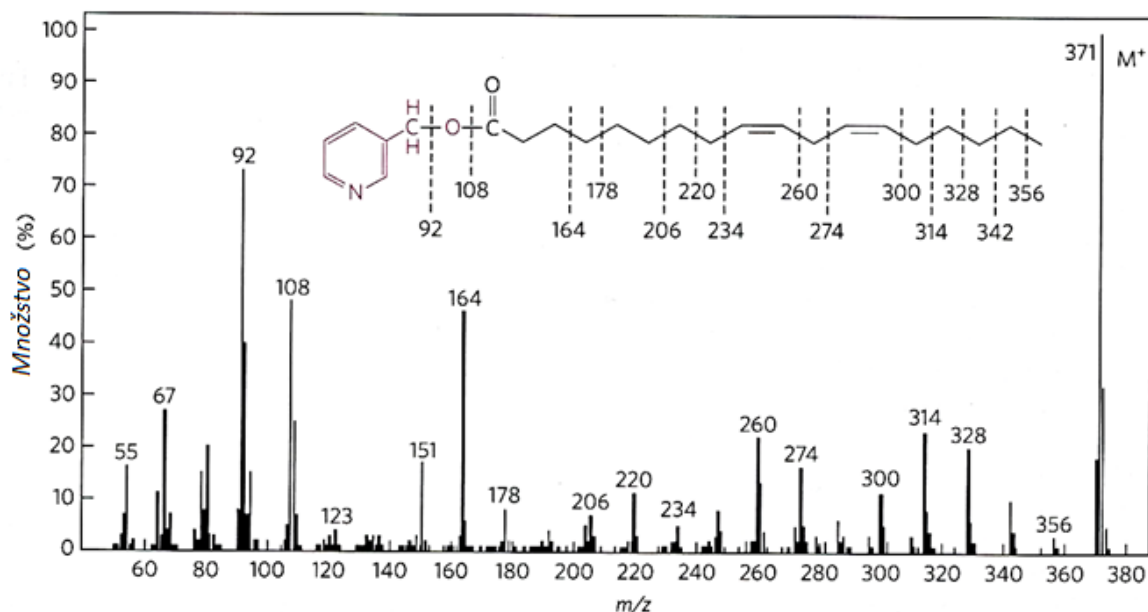
2.3.4.3. Hmotnostná spektrometria

Po chromatografickej separácii sú jednotlivé lipidy nastreknuté do MS. Princípom MS je splynenie, ionizácia a následná frakcionácia kvapalných alebo tuhých, ktoré tiež musia byť rozpustené v kvapaline, vzoriek analytov, a ich prevedenie do plynnej fázy, ionizácia a prípadne následná fragmentácia (Hu & Zhang, 2018). Analyty sú následne identifikované a kvantifikované, buď podľa prekursorového iónu alebo zvyčajne podľa špecifickej fragmentácie ich molekúl, ktoré sú zaznamenané ako signály pomeru hmotnosti fragmentov a ich náboja (m/z) (Obr. 5; Obr. 6) (Friedecký & Lemr, 2012). Detekciou týchto fragmentov vznikajú fragmentačné spektrá, pomocou ktorých je možné určiť chemickú štruktúru analytov (Obr. 6) (Friedecký & Lemr, 2012). MS je inštrumentálna technika zložená z iónového zdroja, hmotnostného analyzátoru a detektora. V iónovom zdroji sú produkované ióny a existujú rôzne druhy iónových zdrojov pričom využívanéjšie sú tzv. mäkké ionizačné techniky, ktoré sú najviac používané (Lin et al., 2014). Jedná sa o ionizáciu elektrosprejom pri atmosférickom tlaku (ESI) (Ho et al., 2003; Lin et al., 2014), ktorá je zložená z tenkej kovovej kapiláry, ktorá je pod vysokým napätím a pri vystreknutí vzorky je matrica (napr. elučné činidlo) odparená prúdom inertného plynu (napr. dusík) a dochádza k ionizácii a čiastočne fragmentácii molekúl analytu (Ho et al., 2003). Molekuly môžu byť ionizované, buď kladne alebo záporne, na základe kladného alebo záporného napätia, kedy reakciou s rozpúšťadlom a aditívami v mobilnej fáze vznikajú adukty (Lin et al., 2014). Pri pozitívnom móde ionizáciou vznikajú kladne nabité aduktové ióny – $[M+H]^+$, $[M+Na]^+$, $[M+K]^+$, $[M+NH_4]^+$ (Varghese et al., 2012). Pri negatívnom móde pri ionizácii vznikajú záporne nabité aduktové ióny – $[M-H]^-$, $[M+HCOO]^-$, $[M+CH_3COO]^-$ (Varghese et al., 2012). Do mobilnej fázy sa ešte pre LC pridávajú kyseliny aby sa tieto adukty tvorili ľahšie - kyselina octová, kyselina mravčia alebo ich soli (Nováková et al., 2013). Ďalšou mäkkou ionizačnou technikou je MALDI (Matrix assisted laser desorption/ionization), ktorá ionizuje vzorky nanosené na platničku pomocou laserovej desorpcie (Spengler, 2015). Molekuly lipidov sú schopné ionizácie rôznymi spôsobmi než v prírode vďaka svojim unikátnym komplexným štruktúram (Hu & Zhang, 2018). Pri analyzátoroch sa sú najpoužívanejšie trojitý kvadrupól (QqQ) alebo tzv. analyzátor doby letu (TOF) (Lin et al., 2014; Loos et al., 2016; Hu & Zhang, 2018). Jedná sa o dva tandemovo spojené hmotnostné spektrometre medzi ktorých analyzátorami sa nachádza kolízna cela (Obr. 5) (Honour, 2003; Hu & Zhang, 2018).



Obr. 5: Schéma trojitého kvadrupólu (Prevzaté a upravené podľa Honour, 2003).

Každý trojitý kvadrupól je tvorený zo 4 paralelných tyčí obklopujúcich centrálnu dutinu (Obr. 5) (Honour, 2003; Loos et al., 2016). Každá tyč je nabitá buď záporne alebo kladne párovo a antiparalelne, čím sa vytvorí v dutine elektrické pole, ktorého napätie môžeme ovplyvňovať a podľa sily tohto poľa potom usmerniť prúd iónov prekursora alebo fragmentu (Obr. 5) (Honour, 2003; Loos et al., 2016). Len určité prekursorové ióny alebo fragmenty, ktorých m/z je príliš veľké alebo malé (podľa nastavených parametrov), sú schopné prejsť cez analyzátor na detektor (Obr. 5). Kolízna cela (obvykle označená ako Q2) je naplnená kolíznym plynom, ktorý kolízne fragmentuje vybrané ióny z prvého kvadrupólu a vzniknuté kolízne fragmenty sú potom analyzované tretím kvadrupólom (Lin et al., 2014). Toto usporiadanie umožňuje potom rôzne skenovací módy –produktový (Q1 prepúšťa len jednu m/z a Q3 všetky), prekursorový (Q1 prepúšťa všetky m/z a Q3 len jednu), neutrálnej straty (Q1 a Q3 skenujú zároveň a ich rozdiel je neutrálna strata) a monitoring viacnásobných reakcií (MRM) (Q1 a Q3 skenujú len jednu m/z) (Sherwood et al., 2009). Pri TOF analyzátore je meraná doba letu iónových fragmentov molekúl rýchlosťou, ktorá je závislá od ich m/z (malé ióny letia rýchlejšie) (Sherwood et al., 2009).



Obr. 6: Ilustrácia LC-MS spektra picolinol esteru kyseliny linolénovej. Picolinol ester kyseliny linolénovej má $M_r = 371$. Po ionizácii sa molekula fragmentuje na prekursorový ión, v ktorom N picolinolu nesie pozitívny náboj a sériu menších fragmentov produkovaných prerušením C-C väzieb v MK. MS oddelí nabité fragmenty podľa ich pomeru m/z . Prominentnými fragmentami sú $m/z = 92, 108, 151$ a 164 obsahujúce pyridínový kruh picolinolu a rôzne fragmenty karboxylovej skupiny. Materský ión poskytuje dôkaz o prítomnosti uhl'ovodíkového reťazca C18 s 2 nenasýtenými väzbami – zistené vďaka fragmentom z pravého konca molekuly do fragmentu 300, po ktorom nasleduje medzera 26 pre uhlíky koncovej nenasýtenej väzby na 274. Rovnaká medzera 14 na C11 metylénovej skupine na 260. (prevzaté a upravené podľa Nelson & Cox, 2017).

2.3.5. Vyhodnocovanie dát v lipidomike

Lipidomické analýzy poskytujú ohromné množstvá dát, ktoré je nutné pred samotnou štatistickou analýzou nutné spracovať. Tomu predchádza predpríprava vzoriek tzv. pre-processing, kedy sa surové dáta najskôr musia upraviť (Katajama et al., 2005). Medzi prvými úpravami je zoradenie („alignment“) retenčných časov a píkov chromatogramov (Smith et al., 2006). Korekcia retenčných časov sa zvyčajne vykonáva pomocou vnútorných štandardov, ktoré musia byť správne vybrané tak aby pokryli rozpätie retenčných časov analytov (Dettmer et al., 2007). Pri nadmernom počte vnútorných štandardov, alebo pri veľkých maticových efektoch môže dochádzať k supresii iónu analytu, a následnej nesprávnej kvantifikácii (Sysi-Aho et al., 2007).

2.3.5.1. Príprava, normalizácia a transformácia dát

Ďalším krokom je transformácia a normalizácia dát pomocou matematických operácií ako logaritmizácia alebo normalizácia pomocou pravdepodobnostného kvocientu (PQN) (Dieterle et al., 2006). Táto metóda porovnáva distribúciu kvocientov medzi vzorkami a referenčným spektrom, a následne upravuje chyby pri riedení zistením dilučného faktoru každej vzorky (Dieterle et al., 2006). Transformácia dát je niekedy nevyhnutná pre úpravu distribúcie dát, aby dosiahli normálne rozdelenie pre nasledujúcu štatistickú analýzu (Warrack et al., 2009). Posledným krokom pred prípravou dát je vyriešiť problém nulových hodnôt, ktoré sa po analýze vyskytujú v dátach (Checa et al., 2015). Po úprave píkov sa môže byť až okolo 10–25% nulových a to predovšetkým v prípade necielennej analýzy (Enot et al., 2006). Mnohé vyhodnocovacie softvéry však nevedia operovať s nulovými hodnotami, a je potrebná náhrada inými hodnotami. Táto náhrada dokáže ovplyvniť dáta, a často sa používa nahradenie hodnotou priemeru alebo inými metódami (Enot et al., 2006). Po pred prípravou dát sú LC-MS dáta zosumarizované do zoznamu píkov, ktorých integráciou získavame plochu píku, kde je množstvo analytu stanovené vzťahnutím a prepočítaním na vnútorné štandardy, alebo pomocou kalibračnej rady (Checa et al., 2015). Pri vyhodnocovaní dát v lipidomike sa zvyčajne najskôr využívajú štatistické metódy na vyhodnotenie rozdielov množstva lipidov pri rôznych podmienkach, a až následne analyzovať dáta za účelom ich kategorizácie do skupín, alebo hľadania vlastností, vďaka ktorým boli zaradené do daných skupín (Lepš, 2016). Takisto testovanie nulových hypotéz na základe porovnávania priemerov dvoch skupín, distribúciu populácie alebo korelácie premenných (Lepš, 2016). Pri určovaní štatistickej významnosti je najviac používaná metóda t-test, ktorý patrí medzi parametrické metódy (Lepš, 2016). Princíp spočíva v tom, že ak poznáme strednú hodnotu základného súboru dát „ μ “ (súbor všetkých jedincov, u ktorých sa daný znak môže vyskytovať) a porovnáme ju s vybranou hodnotou výberového súboru z populácie, o ktorej predpokladáme, že má hodnotu μ rovnakú ako základný súbor (Lepš, 2016). Teda poznáme nejaký parameter daného súboru. Analýza je cieleňá na detekciu rozdielov v množstve určitých lipidových tried medzi porovnávanými skupinami.

2.3.5.2. Jednorozmerná štatistická analýza

Štatistické analýzy sa dajú rozdeliť na jednorozmerné a viacrozmerné. Pri jednorozmerných sa štatistický význam hľadá separátne pre každú jednotlivú premennú zvlášť – t-test (Hotelling, 1931; Lepš, 2016) alebo analýza variácií (ANOVA) (Zhou et al., 2012). Hlavným krokom týchto štatistických analýz je testovanie hladiny významnosti – pravdepodobnosť zamietnutia nulovej hypotézy napriek tomu, že platí (Zhou et al., 2012). Nulová hypotéza sa vždy prijíma alebo zamietna na základe náhodného výberu, a preto zvyčajne môžu nastať chyby dvoch typov – falošne pozitívny „ α “ (nulová hypotéza sa zamietne, ale platí) alebo falošne negatívny „ β “ (nulovú hypotézu prijímeme aj keď je chybná) (Zhou et al., 2012). Žiadny test nedokáže úplne eliminovať oba typy chýb, a teda sa dopredu stanovuje α reprezentujúca hladinu významnosti testu, ktorá je dostatočne nízka, zvyčajne $\alpha = 0,05 = p\text{-value}$, čím teda dostaneme 95% istotu správneho výberu (Lepš, 2016). *P-value* je hodnota využívaná pri štatistických analýzach pri testovaní nulových hypotéz, a je to najnižšia hodnota, pri ktorej zamietame nulovú hypotézu (Lepš, 2016). Pravdepodobnosť $1-\beta$ naopak reprezentuje silu testu a jej významom je správne zamietnutie nesprávnej nulovej hypotézy. Táto hodnota závisí na významnosti testu a klesá spolu s ňou. Využitie jednosmernej ANOVA štatistiky je potrebné pri porovnávaní medzi viac ako 2 skupinami a ich priemermi zároveň a získanie jedného výsledku, ktorý buď prijíma alebo odmieta nulovú hypotézu ktorá hovorí, že priemery skupín sú rovnaké (Zhou et al., 2012). Hľadajú sa štatisticky významné zmeny lipidov, podľa *p-value* získanej týmito jednorozmernými technikami či už pri parametrickom alebo neparametrickom prístupe (Checa et al., 2015).

2.3.5.3. Viacrozmerná štatistická analýza

Viacrozmerná analýza slúži k celkovému posúdeniu variability dát (podobnosť alebo rozdielnosť vzoriek alebo experimentálnych skupín) na základe väčšieho množstva (desiatok až stoviek) premenných (Worley & Powers, 2013). Patrí sem analýza hlavných komponentov (PCA), nesupervizovaná metóda, ktorá využíva informácie o všetkých premenných, ktoré následne lineárne kombinuje na nové premenné – hlavné komponenty do 2D formátu (Worley & Powers, 2013). Supervizovanou multivariačnou metódou je napr. PLS-DA ktorá sa využíva na zistenie vzťahov a diskriminujúcich premenných v rámci a medzi predem definovanými experimentálnymi skupinami (Trygg & Wold, 2002; Zhou et al., 2012). Po štatistickom spracovaní lipidomických dát nasleduje interpretácia dát, hľadanie skrytých trendov alebo dizajnovanie štúdií. Posledným krokom býva vhodná vizualizácia dát napr. pomocou lipidových máp v programe Cytoscape. Jedná sa o pokročilú vizualizačnú techniku, ktorá umožňuje sledovanie zmien a vzťahov medzi sieťou premenných čo je obzvlášť užitočné pri práci s veľkým objemom dát (Shannon, 2003).

3. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

3.1. Materiál

3.1.1. Chemikálie

Izopropanol (IPA, LC-MS grade, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Acetonitril (MeCN, LC-MS grade, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Octan amónny (s, 99% p.a., Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA)

Deionizovaná voda (LC-MS grade, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Zmes štandardov SPLASH® LIPIDOMIX® Mass Spec Standard (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL, USA)

Deuterovaný štandard C15 ceramidu (Cer (d18:1(d7)/15:0)) (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL, USA).

Deuterovaný štandard kyseliny olejovej (FA 18:1(d9)) (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA)

Štandardný referenčný materiál NIST® SRM® 1950 Metabolites in Human Plasma (NIST®, Gaithersburg, Maryland, USA)

Mobilné fázy pri cieľenú lipidomickú analýzu:

A: Acetonitril:H₂O (6:4 v/v)

B: IPA:Acetonitril (9: 1 v/v)

Do oboch mobilných fáz bol pridaný octan amónny (10 mmol/l)

3.1.2. Biologický materiál

Vzorky apokrinného potu pacientiek s rakovinou prsníka boli zbierané v rámci pilotnej štúdie Mamologickou klinikou Fakultnej nemocnice Hradec Králové. Do štúdie boli zaradené pacientky s histologicky potvrdeným karcinómom prsnej žľazy, s veľkosťou T1 až T4, nezávisle na histologickom type nádoru a na prítomnosti postihnutia axilárnych lymfatických uzlín (Tab.5). S priemerným vekom 56 rokov ako aj 23 vzoriek zdravých subjektov, ktorých priemerný vek bol 64 rokov.

Tab.5: Klinické informácie o pacientkách v experimentálnej kohorte. Uvedené sú parametre sú T – Veľkosť primárneho nádoru, N – Regionálne lymfatické uzliny (N0-v blízkych lymfatických uzlinách nie je rakovina, N1-3 – množstvo a lokalizácia lymfatických uzlín s rakovinou), M - Vzdialené metastázy (Mx-metastázy nemôžu byť namerané, M0 – bez metastáz). Typy histologicky potvrdených nádorov boli – invazívny duktálny, medulárny, lobulárny, DCIS (duktálny karcinóm in situ = prekancerózný stav) a phyllodes. Tieto typy neboli pre štúdiu podstatné, a preto ich nešpecifikujeme bližšie. Rodinná anamnéza – v rodine sa vyskytla rakovina aspoň u 1 člena (+), vyskytla sa u 2 členov (++), nevyskytla sa (-)

Vek	Primárny nádor (T)	Regionálne lymfatické uzliny (N)	Vzdialené metastázy (M)	Typ nádoru	Rodinná anamnéza
54	T1	N0	M0	invaz.duktál+medul	+
75	T1	N1	M0	invaz.duktálny	-
32	T1	N0	M0	invaz.duktálny	++
48	T1	N0	Mx	invaz.duktálny,DCIS	-
69	T1	N0	M0	invaz.duktálny	-
54	T1	N0	M0	phyllodes	-
70	T1	N0	Mx	invaz.duktálny	-
70	T1	N0	M0	invaz.duktálny	++
54	T1	N0	M0	invaz.duktálny	+
60	T1	N0	M0	invaz.duktálny	+
42	T2	N1	M0	invaz.duktálny	+
40	T2	N0	M0	invaz.duktálny+DCIS	+
50	T2	N0	Mx	invaz.duktálny+lobul	-
33	T2	N0	M0	invaz.duktálny	-
48	T2	N1	M0	invaz.duktálny+DCIS	+
58	T2	N0	M0	lobulár	-
82	T4	N1	Mx	invaz.duktálny	-
67	T3/T1	N1	M0	duktálny+lobulár/lobul	-
52	T3	N3	Mx	lobulár	-

3.1.3. Prístrojové vybavenie

Odberový systém SLIDE

1. 3-D adaptér vytlačný tlačiarňou Trilab DeltiX 3D
 - vonkajšie rozmery - 41 mm – dĺžka, 14 mm – polomer
 - materiál - PLA filament (sfarbenie – zafír, priemer – 1,75 mm, Smart Materials 3D, Alcalá la Real, Spain)
 - program 3 D Builder (version 18.0.1931.0, Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA)
 - nastavené parametre – teplota extrúdera a vyhrievacej podložky: 210/55°C; extrúzna šírka: 0.4 mm; hrúbka vrstvy: 0.2 mm; rýchlostný stupeň: fast)
2. Filtračný disk z porózneho skla (S1 – porozita, priemer – 10 mm; Winzer Laborglastechnik; Wertheim, Germany)

3. Uzatvárateľná plastová tuba

Vysokoúčinný kvapalinový chromatograf ExionLC™ System (AB Sciex LLC, Framingham, MA, USA)

Kolóna s reverznou fázou C8 BEH (2.1 mm × 100 mm, 1.7 µm, Waters, Milford, MA, U.S.A.)

Hmotnostný spektrometer s trojitým kvadrupólom, lineárnou iónovou pascou a elektrosprejom (QTRAP 6500; SCIEX, Framingham, MA, USA)

3.1.4. Použitý softvér

Analyst software (verzia 1.6.2, AB Sciex LLC, Framingham, MA, USA)

SCIEX OS software (verzia 1.6.1, AB Sciex LLC, Framingham, MA, USA)

R studio (Metabol package; verzia 3.6.3, The R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria)

CytoScape (verzia 3.8.2, <https://www.cytoscape.org/>)

3.2. Metódy

Metóda odberu vzoriek, prípravy vzoriek pred analýzou ako aj lipidomická analýza pomocou LC-MS/MS, pôvodne prevzatá z článku Xuan et al., 2018, a neskôr upravená podľa Kvasnička et al., 2021. Parametre tejto metódy sú zhrnuté v Tab. 6, ktorej úplná verzia sa nachádza v kapitole 9. Prílohy.

Tab.6: Parametre použitej metódy na analýzu vzoriek v pozitívnom a negatívnom móde pre použité štandardy a zástupcov všetkých skúmaných lipidových tried. Uvedené sú hodnoty m/z prekurzorového iónu (Q1) a m/z fragmentového iónu (Q3). Hodnota retenčného času (rt) je predpokladaná hodnota rt

Štandard	Aduktový ión	m/z (Q1)	m/z (Q3)	Retenčný čas (rt)
PS 15:0-18:1 (d7)	[M-H] ⁻	755,56	570,547	5,49
PI 15:0-18:1 (d7)	[M-H] ⁻	847,6	570,547	5,37
PG 15:0-18:1 (d7)	[M-H] ⁻	759,59	570,547	5,57
CE 18:1 (d7)	[M+NH ₄] ⁺	675,7	369,4	12,78
PC 15:0-18:1 (d7)	[M+H] ⁺	753,6	184,1	6,9
Cholesterol (d7)	[M+H-H ₂ O] ⁺	376,4	376,4	4,8
TG 15:0-18:1 (d7)-15:0	[M+NH ₄] ⁺	829,8	570,5	12,38
SM 18:1 (d9)	[M+H] ⁺	738,6	184,1	6,52
LPC 18:1 (d7)	[M+H] ⁺	529,4	184,1	1,5
DG 15:0-18:1 (d7)	[M+NH ₄] ⁺	605,6	346,3	8,48
PE 15:0-18:1 (d7)	[M+H] ⁺	711,6	570,5	7,1
LPE 18:1 (d7)	[M+H] ⁺	487,4	346,3	1,5
Cer 18:1 (d7)-15:0	[M+H] ⁺	531,5	271,3	6,8
FA 18:1 (d9)	[M-H] ⁻	290,2	290,2	2
Cholesterol	[M-H] ⁻	369,4	369,4	369,4
CE 16:1	[M+NH ₄] ⁺	640,6	640,6	369,4
Cer 32:0-2_18:0-14:0	[M+H] ⁺	512,5	512,5	266,3
DG 30:0-6_15:0-15:0	[M+NH ₄] ⁺	558,5	558,5	299,3
HexCer 32:2-4_18:1-14:1	[M+H] ⁺	670,5	670,5	264,3
LPC 16:0	[M+H] ⁺	496,3	496,3	184,1
LPE 14:1	[M+H] ⁺	424,2	424,2	283,2
PC 32:0	[M+H] ⁺	734,6	734,6	184,1
PCO 32:1-2	[M+H]	718,6	718,6	184,1
PE 4:1	[M+H] ⁺	718,5	718,5	577,5
PEO 34:2-1_16:0-18:1	[M+H]	702,5	702,5	364
SM 28:0	[M+H] ⁺	621,5	621,5	184,1
TG 42:0-FA14:0	[M+NH ₄] ⁺	740,7	740,7	495,4
FA 16:0	[M-H] ⁻	255,2	255,2	1,8
PI 34:1-1	[M-H] ⁻	835,5	241	5,8
PS 34:1-2	[M-H] ⁻	760,5	673,5	5,9
PC 32:1_PC 14:0-18:1_FA 18:1 (+O)	[M+H] ⁺	790,5604	281,249	6,6
PE 34:1_PE 16:0-18:1_FA 18:1 (+O)	[M+H] ⁺	716,5236	281,249	7,6

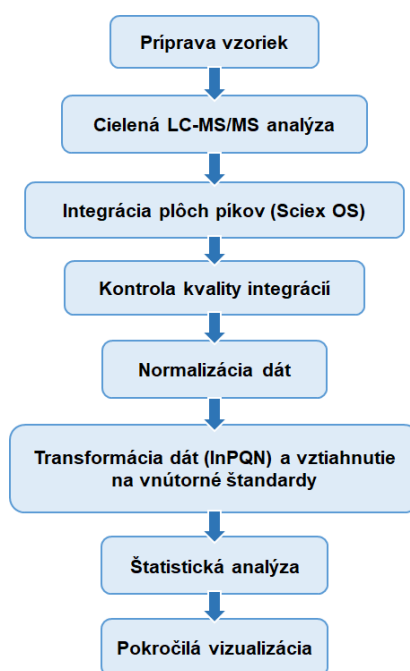
3.2.1. Príprava vzoriek

Medzi vzorky použité v našej analýze patrili – vzorky pacientiek s potvrdeným karcinómom prsníka s veľkosťou T1 až T4, vzorky kontrol odobrané zdravým subjektom, vzorky štandardného referenčného materiálu (SRM) - metabolitov ľudskej plazmy, vzorky kontroly kvality (QC), vzorky BLANK a vzorky extrakčného roztoku (ES). Vzorky pacientiek a kontrol boli po odbere uskladnené pri - 80°C. Cieľom ich nasledujúcej úpravy bola extrakcia lipidov zo vzoriek potu. Prvým krokom bolo rozmrazenie všetkých vzoriek potu a následná príprava ES. ES obsahovalo ako extrakčné činidlo 80% IPA a zmes štandardov SPLASH® LIPIDOMIX® Mass Spec Standard, ku ktorým boli pridané ďalšie deuterované štandardy ceramidu (d7) a mastnej kyseliny (d9) špecifikované v podkapitole 4.1.1 Chemikálie. Vzorky potu a ES sme nechali 15 minút temperovať na ľade. Vzorky potu boli v tomto kroku ešte stále adsorbované na sklenených poróznych diskoch, pomocou ktorých boli odobrané. K týmto poróznym diskom sme pridali 400 µl ES a túto zmes sme najskôr 10 minút sonikovali, a následne 1 hodinu inkubovali pri izbovej teplote na miešačke pri 600 rpm. Po inkubácii sme do skúmavky (1,5 mL), od firmy Eppendorf, alikvotovali 200 µl supernatantu extraktu potu a extrakt sme následne centrifugovali 10 minút (10 000 x g, 4 °C). Po centrifugácii sme preniesli 150 µl supernatantu do sklenených LC vialiek. Pri extrakcii lipidov zo vzoriek SRM metabolitov ľudskej plazmy sme použili 50 µl vzorky SRM a 150 µl ES. Vzorky QC sme vytvorili zmiešaním alikvótnych objemov 15 µl extraktov z každej vzorky potu pred LC-MS/MS analýzou do mikroskúmavky, ktorá bola následne zvortexovaná a centrifugovaná. Táto vzorka bola rozpipetovaná do 5 sklenených LC-MS vialiek. Posledným typom vzoriek boli Blank vzorky, ktoré obsahovali 50 µl vody a 150 µl izopropanolu. Zmes sme 20s premiešali na vortexe a 10 minút centrifugovali 10 minút (>13 000 x g (max. ot./min.), 4 °C). Po centrifugácii sme preniesli 150 µl supernatantu do samostatnej skúmavky, a roztok sme preniesli do sklenených LC vialiek. Takto upravené vzorky boli následne umiestnené do držiaku automatického vzorkovača kvapalinového chromatografu, ktorý bol temperovaný na 4°C.

3.2.2. Cielená lipidomická analýza apokrinného potu

Cielenou lipidomickou analýzou sme sa zamerali na určité množstvo lipidov, na základe publikovanej práce (Kvasnička et al., 2021), boli lipidy v apokrinnom potu vopred vyselektované ešte pred analýzou. Pre ich identifikáciu a relatívne stanovenie množstva, ako plôch píkov lipidov k plochám píkov IS vo vzorkách, sme postupovali nasledovne. Poradie vzoriek sme pred analýzou randomizovali a v danom poradí sme s nimi následne manipulovali. Ostatné vzorky – BLANK, QC, ES a SRM sme potom priebežne rozmiestnili nasledujúcim spôsobom. Ako prvá bola testovaná vzorka BLANK, ktorou sme testovali vhodnosť systému pre našu analýzu. Vzorky BLANK obsahovali len rozpúšťadlá a ich význam pri testovaní spočíval v indikovaní nečistôt kolóny alebo prítomnosti nečistôt v rozpúšťadlách. Ako ďalšia nasledovala vzorka ES s obsahom chemických štandardov uvedených v podkapitole Chemikálie 4.1.1., ktorými sme sledovali signály pozadia rozpúšťadiel a vnútorných štandardov, pretože tieto analyty pokrývali širokú škálu hodnôt m/z a aj retenčných časov. Cieľom bolo získať istotu, že výsledky budú kvalitné a vhodné na analýzu. Po vzorke ES nasledovala séria vzoriek BLANK, ktorých úloha rovnako spočívala v kontrole správneho premývania injekčného systému kvapalinového chromatografu, a pre zabezpečenie, že nedochádzalo k prenášaniam analytov medzi vzorkami tzv. *carry-over* (Broadhurst et al., 2018). Vzorky QC boli merané po každých piatich meraných vzorkách potov. Vzorky QC slúžili ako referenčné vzorky ktoré boli použité na určenie variability a robustnosti lipidomickej analýzy. Pomocou týchto vzoriek možno identifikovať a odstrániť odchýlky v procese vzorkovania, spracovania a analýzy, ktoré by inak mohli ovplyvniť výsledky testovacích vzoriek. A najmä umožní odhaliť systematické zmeny a odchýlky v odozve hmotnostného spektrometra. To pomáha zabezpečiť kvalitu a spoľahlivosť dát a zvyšuje reprodukovateľnosť a robustnosť lipidomickej analýzy. Štandardný referenčný materiál SRM bol v analýze použitý v piatich biologických replikátoch. Pri kvapalinovej chromatografii sme použili kvapalinový chromatograf ExionLC™ System (AB Sciex LLC, Framingham, MA, USA) a zvolili sme techniku na reverznej fáze s kolónou C8 BEH (2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm, Waters, Milford, MA, U.S.A.) (Obr. 7). Kolóna bola premývaná mobilnými fázami A a B, ktorých zloženie je definované v podkapitole Chemikálie 4.1.1.. Elučný gradient bol v do 1,5 min separácie nastavený na 68% A a 32% B, do 18 min došlo k zmene pomeru mobilných fáz na 3% A a 97% B, až sa nakoniec ich pomer ustálil na pôvodný pomer 68% A a 32% B pre ekvilibračiu kolóny.

Prietoková rýchlosť kolóny bola 0,35 ml/min a celkový počet analyzovaných vzoriek bol 120 podkapitola Príprava vzoriek 4.2.1.. Kvapalinový chromatograf bol napojený s hmotnostným spektrometer s trojitým kvadrupólom, lineárnou iónovou pascou a elektrosprejom (QTRAP 6500; SCIEX, Framingham, MA, USA) (Obr. 7). Tandemovým spojením kvapalinovej chromatografie s hmotnostným spektrometrom sme postupne analyzovali všetky eluované lipidy. Meranie bolo vykonané v pozitívnom aj negatívnom móde s programovaným sledovaním viacnásobných reakcií– Multiple reaction monitoring (MRM). Celková analýza každého nástreku trvala 20 minút.



Obr. 7: Schéma pracovného postupu analýzy.

Výsledné surové dáta analýzy boli v podobe chromatogramov, ktorých plochy sme poloautomaticky integrovali v programe SCIEX OS (Obr. 7). Už počas tohto prvotného spracovania dát sme na základe faktorov ako – príliš veľké odchýlky od teoretického retenčného času, nízke intenzity pík (<500 cps (counts per second)), abnormálny tvar pík (viac vrcholov na jeden pík) alebo úplná neprítomnosť pík, vyselekovali lipidy, ktoré boli ovplyvnené týmito faktormi a nepokračovali sme v ich ďalšom vyhodnocovaní. Po ukončení integrácií sme overili ich kvalitu vynesím závislosti pomeru ich hmotnosti k náboju (m/z) od retenčných časov (min) všetkých adekvátnych lipidov, podľa lipidových tried, do grafu (Obr. 7). Tieto grafy nám ilustrovali správanie sa jednotlivých lipidov v závislosti od počtu uhlíkov a násobných väzieb v štruktúre reťazcov acylových zvyškov tzv. lipidové vzory (lipid patterns).

3.2.3. Štatistická analýza dát

Pri štatistickej analýze a grafickej vizualizácii získaných dát sme využili software RStudio (verzia 3.6.3, The R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria), integrované vývojové prostredie, pre programovací jazyk R. K automatickému procesovaniu dát bol využitý balíček Metabol (Garlido, 2019), ktorý umožňuje korekciu dát na základe vzoriek kontroly kvality, transformáciu, normalizáciu, centrovanie a škálovanie dát, ako aj jednorozmerné a monohorozmerné štatistické vyhodnotenie dát.

3.2.3.1. Korekcia a normalizácia surových dát

Prvým krokom štatistickej analýzy bola korekcia dát metódou LOESS (Locally estimated scatterplot smoothing). Korekcia dát bola nevyhnutná pred štatistickou analýzou z viacerých dôvodov. Jednalo sa najmä o minimalizáciu vplyvu rozdielov v jednotkách, v ktorých sme dáta merali, na štatistickú analýzu. Dáta vyjadrené v rôznych škálovacích jednotkách merania by mohli nepriaznivo ovplyvniť interpretáciu výsledkov, a preto bolo potrebné dáta transformovať na rovnakú mierku. Ďalším dôležitým dôvodom pre korekciu dát bolo zabezpečenie rovnomerného rozdelenia dát, ktoré je kritické pre niektoré štatistické analýzy, pretože dáta môžu mať rôzne asymetrické rozdelenie. Korekcia nám taktiež umožnila zmierniť vplyv extrémnych hodnôt, ktoré môžu skresľovať výsledky štatistických analýz, a preto je potrebné ich zahrnúť do procesu normalizácie dát. V konečnom dôsledku bola korekcia dát nevyhnutná pre dosiahnutie presných a spoľahlivých výsledkov v rámci tejto štatistickej analýzy. LOESS korekcia je metóda vyhladzovania dát, ktorá sa používa na odstránenie trendov v dátach. Táto metóda vyhladzuje dáta tak, že nájde pre každý dátový bod jeho okolie, a potom vypočíta vážený priemer hodnôt v tomto okolí. LOESS korekcia je neparametrická metóda, využívaná na odstránenie trendov v dátach a na dosiahnutie rovnomerného rozdelenia dát tak aby boli rovnomerné a aby sa minimalizoval vplyv trendov. Trendy sú opakujúce sa javy v dátach, ktoré môžu byť spôsobené rôznymi faktormi, ako sú experimentálne podmienky, technické problémy alebo biologická variabilita. LOESS korekcia teda pomáha identifikovať základný trend v dátach a odstrániť lokálne fluktuácie, ktoré môžu byť spôsobené náhodnými chybami alebo odľahlými hodnotami. Použitie tejto metódy umožňuje zvýšiť reprodukovateľnosť a spoľahlivosť analýz a zabezpečiť rovnomerné rozdelenie dát. Po korekciách boli dáta normalizované, a zároveň transformované pomocou funkcie \lnPQN (probabilistic

quotient normalisation s využitím prirodzeného logaritmu), ktorá zohľadňuje rôzne zriedenia vzoriek škálovaním spektier na rovnakú virtuálnu celkovú koncentráciu. Normalizácia sa zameriava na zabezpečenie, aby všetky hodnoty mali rovnakú váhu, zatiaľ čo transformácia sa používa na zlepšenie predikčného modelu tým, že zmení tvar dát tak, aby boli vhodnejšie pre daný model.

3.2.3.2. Štatistické vyhodnotenie dát

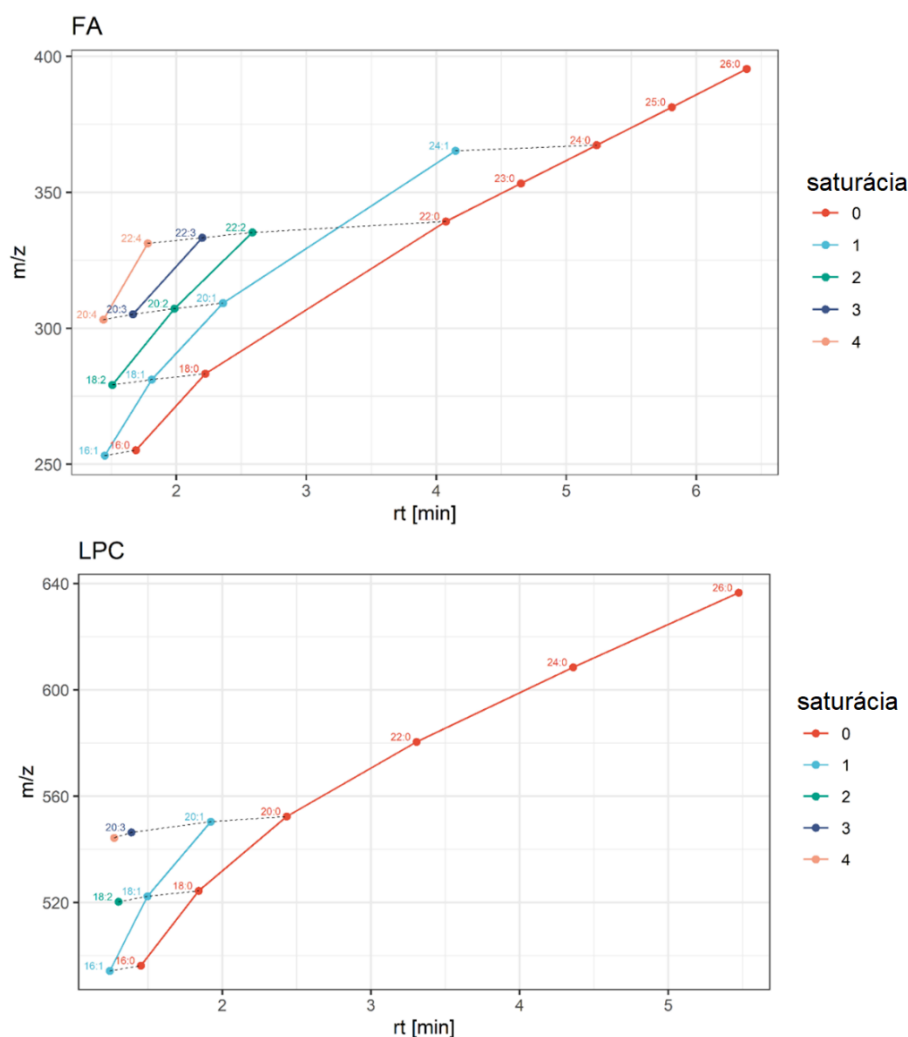
Pri štatistickej analýze sme okrem porovnávania rozdielov medzi vzorkami potu pacientov a kontrolných vzoriek od zdravých subjektov, porovnávali aj rozdiely v zložení potu pacientiek na základe veľkosti histologického nálezu (veľkosť nádoru - VN). Na overenie štatistickej hypotézy, sme použili štatistické testy z jednorozmernej aj viacrozmernej štatistickej analýzy. Jedným z prvých štatistických testov použitých na naše dáta bola nesupervizovaná analýza hlavných komponentov (Principal Component Analysis - PCA). Vďaka tomu, že daný test nemal informácie o skupinách, do ktorých dané vzorky patria bol schopný objektívne rozdeliť všetky dáta len na základe podobnosti poskytnutých hodnôt. Výstupy tohto testu slúžili neskôr pri identifikácii vzoriek s odľahlými hodnotami – outliers. Následne sme pri štatistickom vyhodnocovaní pristúpili k supervizovaným diskriminačným analýzám – PLS-DA (Partial Least Squared Discriminant Analysis) a OPLS-DA (Orthogonal Projections to Latent Structures Discriminant Analysis). Jedná sa o štatistické metódy, ktorých úlohou bola klasifikácia dát na základe vopred definovaných skupín. Hlavným cieľom týchto metód bolo identifikovať a následne oddeliť skupiny vzoriek na základe rozdielov v poskytnutých dátach. PLS-DA je metóda, ktorá využíva lineárnu regresiu na identifikáciu lineárnej kombinácie premenných, ktorá najlepšie rozdeľuje dáta do tried. Táto metóda sa často používa v prípadoch, keď existuje veľké množstvo korelovaných premenných. PLS-DA kombinuje princípy PCA a lineárnej diskriminačnej analýzy (LDA) a vytvára model na základe projektovania pôvodných dát do nového priestoru, ktorý najlepšie rozlišuje jednotlivé triedy. OPLS-DA je vylepšenou verziou PLS-DA, ktorá využíva korekciu ortogonalnosti na rozdelenie informácií o triedach od nezmyselných faktorov, ktoré neprinášajú žiadne užitočné informácie pre klasifikáciu. Táto metóda sa často používa v prípadoch, keď existuje veľa šumu alebo vysoký stupeň variabilit v dátach. OPLS-DA zvyčajne poskytuje presnejšie a spoľahlivejšie výsledky ako PLS-DA, pretože umožňuje odstrániť vplyv faktorov, ktoré nie sú relevantné pre

triedy. Pre sledovanie významnosti jednotlivých lipidov dátach boli zvolené Vulkáno grafy, v ktorých sme pozorovali zmenu obsahu jednotlivých lipidov vo vzorkách. Ako nezávislá premenná na ose x bol rozdiel mediánov v daných porovnávaných skupín, a ako závislá premenná bola záporný dekadický logaritmus p -value. Na týchto grafoch sme teda s rastúcou hodnotou $-\log_{10} p\text{-value}$ pozorovali významnú zmenu v skupinách celkových pacientiek alebo skupinám pacientiek rozdelených podľa veľkosti nádoru oproti kontrolnej skupine. A podľa rastúce rozdielu mediánov bolo pozorované zvýšenie množstva daných lipidov oproti kontrolným skupinám. Na záver bola vykonaná hierarchická klastrová analýza pomocou programu Cytoscape (verzia 3.8.2, <https://www.cytoscape.org/>). Táto technika zoskupuje podobné pozorovania do zhlukov na základe podobnosti vzájomnej podobnosti dát a umožňuje pozorovanie zmien v obsahu jednotlivých lipidových tried.

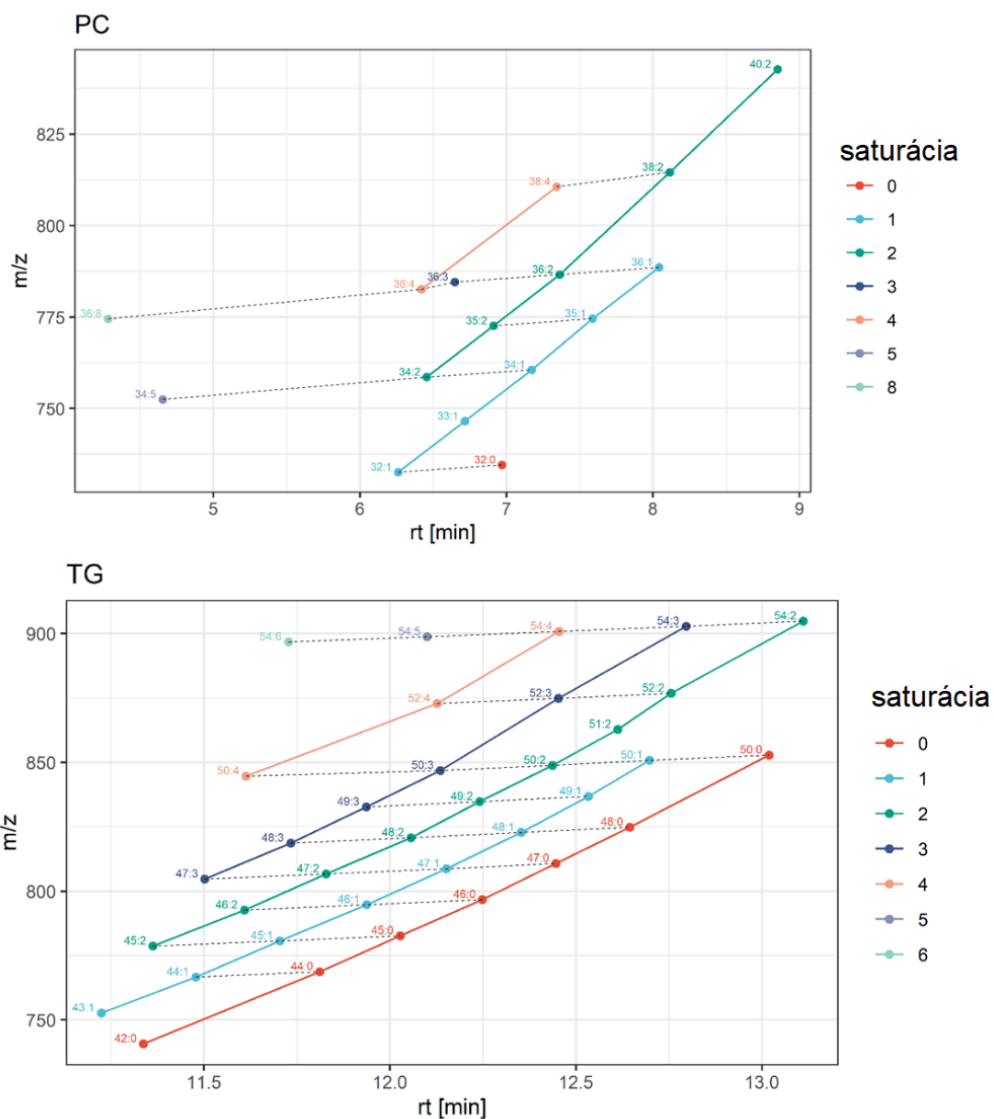
4. VÝSLEDKY

4.1. Identifikácia lipidov a ich retenčné správanie na kolóne s reverznou fázou

Pre zobrazenie chromatografického správania jednotlivých lipidových tried sme zostrojili grafy závislosti pomeru m/z od retenčných časov. Tieto grafy nám umožnili pozorovať elučné trendy spôsobené – počtom násobných väzieb, počtom uhlíkov ako aj vplyv polarita lipidových tried a ich funkčnú závislosť m/z od retenčného času. Medzi polárnejšie lipidové triedy, ktoré sme pozorovali patrili napr. LPC (12), LPE (5), FA (18). Stredne polárnejšie skupiny – PC (17), PCFA (17), PCO (5), PE (6), PEO (6), SM (36), PI (11), PS (26), Cer (61), HexCer (9) a nepolárne skupiny – TG (35), DG (16), CE (5). Nižšie sú uvedené lipidové vzory pre lipidy z každej z týchto tried.



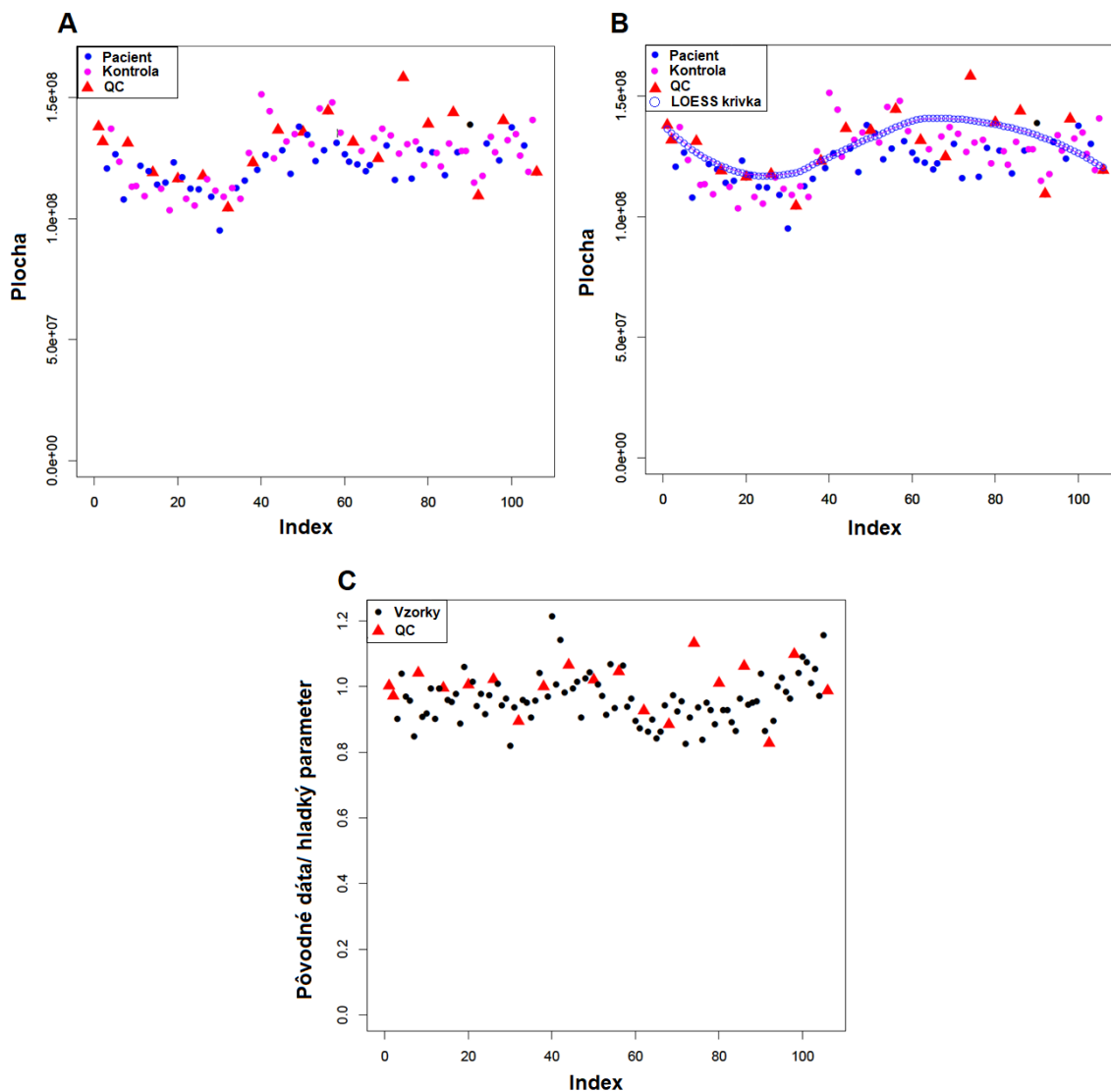
Obr. 8: Retenčné závislosti lipidov. Polárnejšie lipidové triedy – FA a LPC. Graf zobrazuje závislosť m/z od retenčného času (rt) v minútach počas non-scheduled MRM analýzy. Saturácia vyjadruje počet dvojitých väzieb na acylových reťazcoch daných lipidov



Obr. 9: Retenčné závislosti lipidov. Pre menej polárne (PC) a nepolárne lipidové triedy (TG). Graf zobrazuje závislosť m/z od retenčného času (rt) v minútach počas non-scheduled MRM analýzy. Saturácia vyjadruje počet dvojitého väzby na acylových reťazcoch daných lipidov.

4.2. Transformácia LOESS

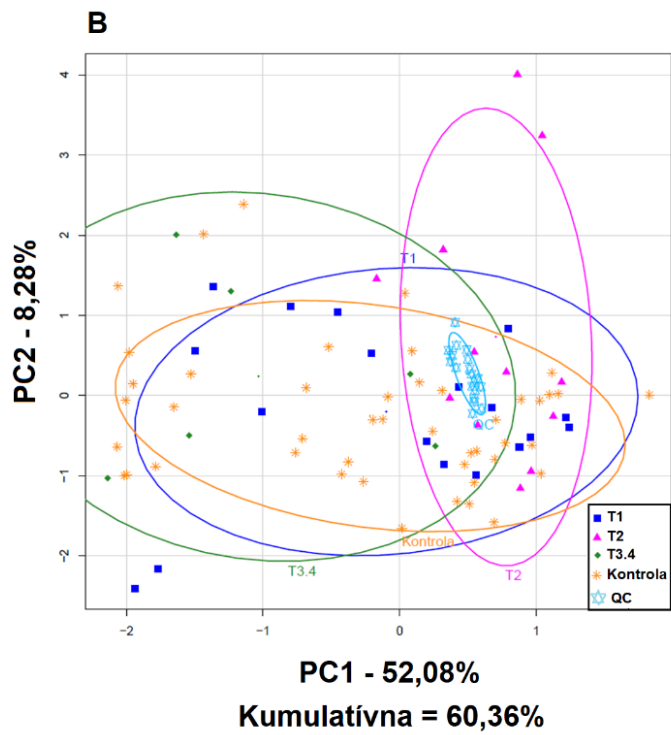
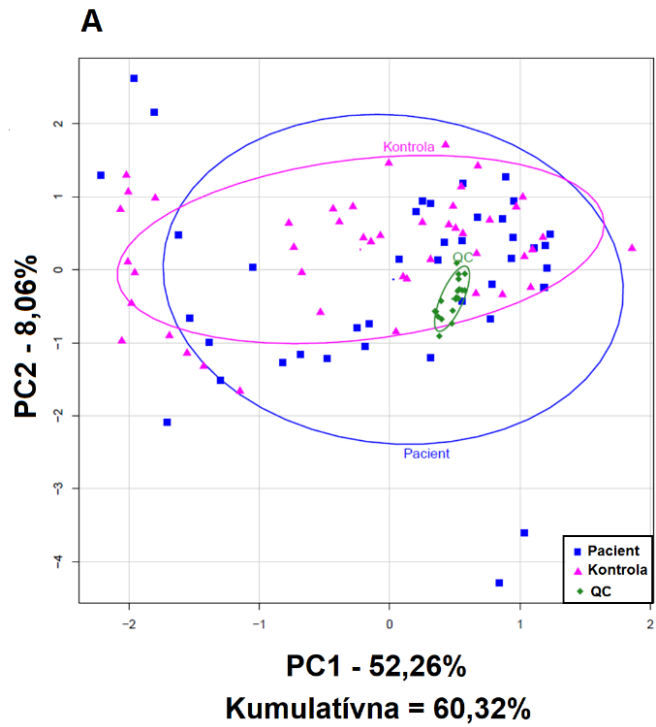
Na nasledujúcich grafoch je grafické znázornenie úpravy dát pomocou transformácie LOESS. Na ose x je označenie poradia vzorky a na ose y sa nachádza plocha. Na Obr. 10 A sú zobrazené pôvodné dáta pred úpravou. Na Obr. 10 B je cez pôvodné dáta preložená krivka LOESS. Na Obr. 10 C sú zobrazené dáta po transformácii.



Obr. 10: Vplyv transformácie LOESS (locally estimated scatterplot smoothing) na získané dáta o ploche štandardu PC (15:0/18:1-d7) v jednotlivých analyzovaných vzorkách. A – pôvodné dáta bez transformácie, B – preloženie dát krivkou LOESS, C – dáta po korekcii.

4.3. Výsledky nesupervizovanej analýzy hlavných komponentov (PCA)

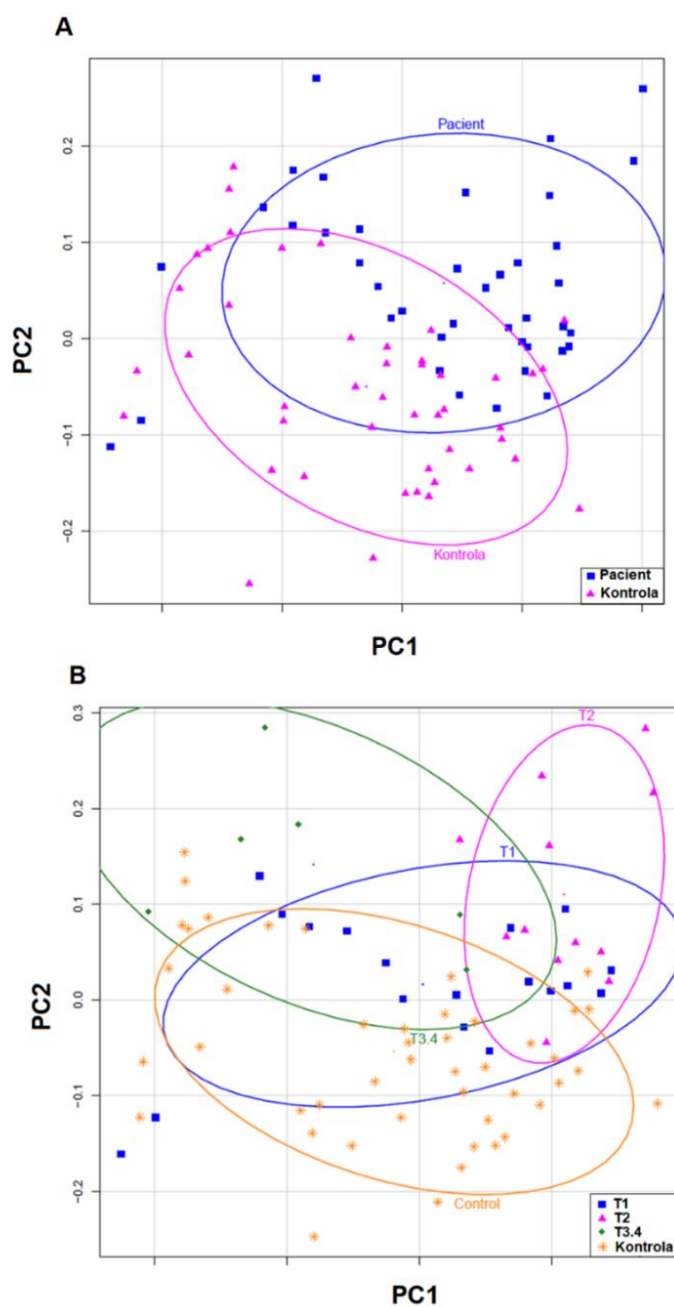
Pre objektívne posúdenie variability medzi porovnávanými skupinami bola použitá analýza hlavných komponentov. Na Obr. 11 A sú vzorky pacientov označené modrými štvorcami a kontrol ružovými trojuholníkmi. Rozdiel medzi skupinami je v prípade PCA len málo evidentný a nie je pozorované oddelenie skupín pacientov od kontrol. Na Obr. 11 B sú vzorky pacientiek s VN T1 označené modrým štvorcom, VN T2 ružovým trojuholníkom, VN T3 zeleným kosoštvorcom. Na tomto PCA grafe sú rozdiely medzi skupinami výraznejšie ako pri porovnaní medzi pacientami a kontrolami. Variabila je, podľa tejto metódy, teda väčšia v rámci skupín VN, pričom najnižší prekryv má porovnanie medzi skupinou VN T3.4 a kontrola. V oboch grafoch sú zobrazené aj hodnoty vzoriek QC, ktoré vizuálne slúžia na overenie kvality dát. Všetky QC boli tvorené z alikvótnych množstiev odobraných zo všetkých klinických vzoriek (pacient aj kontrola) a ich zloženie by teda malo byť totožné a nemalo by dochádzať k disperzii. Odchýlky sú zvyčajne spôsobené nevyhnutnými chybami pri pipetovaní, rozdielmi v hmotnosti vzoriek alebo ak sa združená kontrola kvality nevytvára z čiastkových vzoriek všetkých biologických testovaných vzoriek. Pokiaľ sú QC tesne zoskupené vzhľadom na pozorovaný rozptyl biologických vzoriek, potom sa tieto údaje môžu považovať za vysoko kvalitné.



Obr. 11: Výsledky PCA analýzy. Porovnávanými skupinami boli – A - Pacient a Kontrola, B – Veľkosť nádoru (VN) T1, T2, T3.4 a Kontrola.

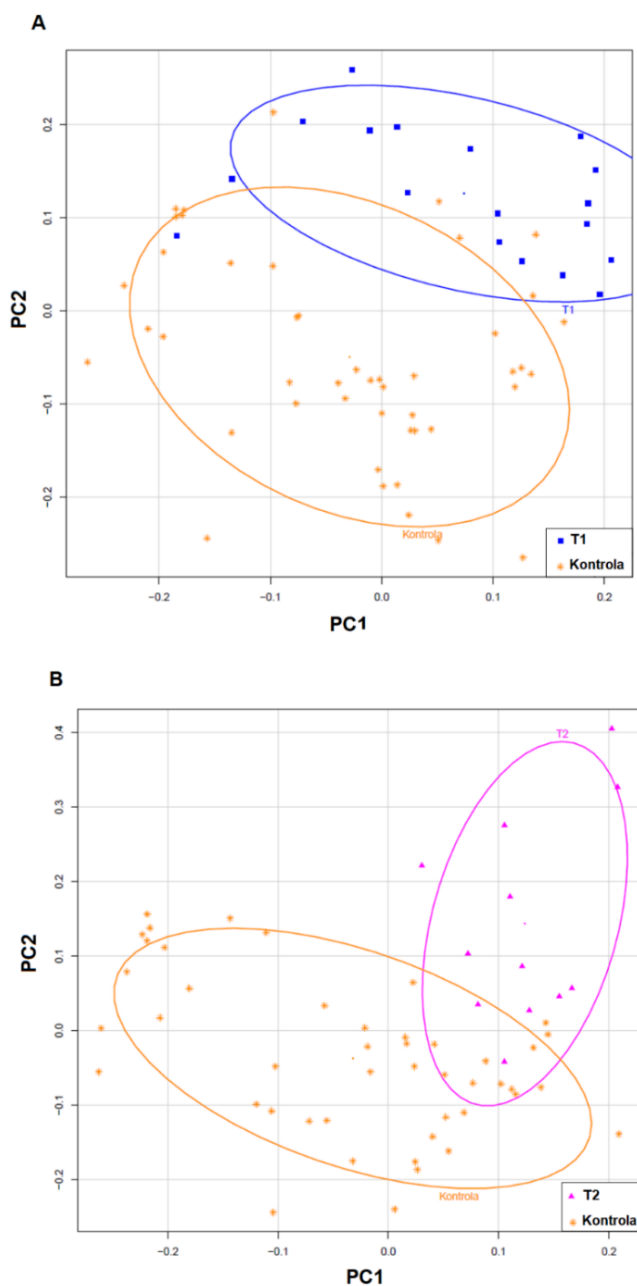
4.4. Výsledky supervizovanej diskriminačnej analýzy (PLS-DA)

Pre identifikáciu diskriminujúcich lipidov rozlišujúce experimentálne skupiny bola využitá supervizovaná technika diskriminačnej analýzy. Vzorky pacientov sú na Obr.12 A označené modrými štvorcami a kontrol ružovými trojuholníkmi. Na Obr.12 B sú VN T1 modrými štvorcami, VN T2 ružovými trojuholníkmi, VN T3.4 zelenými kosoštvorcami a kontroly sú značené žltými hviezdčkami. Rozdiel medzi skupinami je väčší ako pri výsledkoch rovnakého porovnania pomocou PCA.

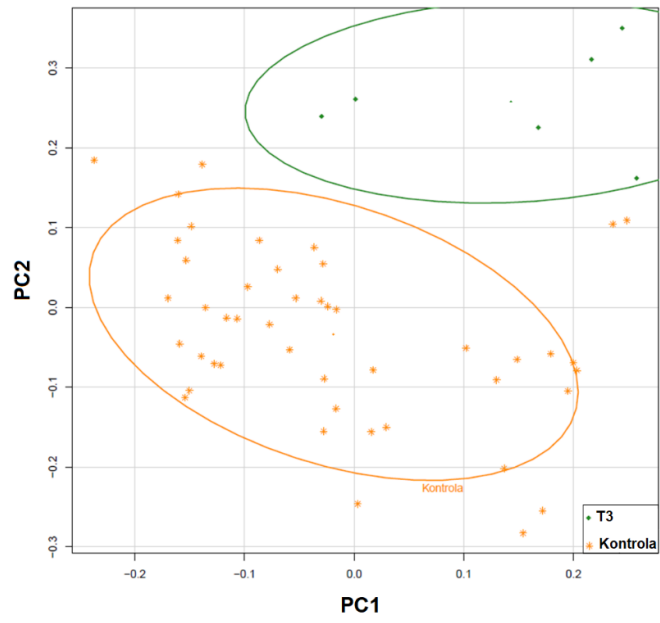


Obr. 12: Výsledky PLS-DA analýzy. Porovnávanými skupinami boli – A-Pacient a Kontrola, B-VN T1, T2, T3.4 a Kontrola.

Pokračovanie výsledkov diskriminačnej analýzy PLS-DA. Na Obr.13 A sú VN T1 značený modrými štvorcami a kontrola žltými hviezdčkami. T1 a kontroly boli odseba takmer úplne oddlené, až na 2 vzorky T1 a 4 vzorky kontrol. Na Obr.13 B sú VN T2 značený ružovými trojuholníkmi a kontroly žltými hviezdčkami. Skupiny boli viac rozdelené ako na Obr. 13 A, ale prekryv nastal kvôli 2 vzorkám T2 a 2 kontrolám. Na Obr.14 sú VN T3 značené zelenými kosoštvorcami a kontroly žltými hviezdčkami. Vzorky T3.4 sú úplne oddelené a nepodobajú sa kontrolám.



Obr. 13: Výsledky PLS-DA analýzy. Porovnávanými skupinami boli – A – VN T1 A Kontrola a B - VN T2 a Kontrola. Pri týchto skupinách ešte dochádza k prekryvu vzoriek Pacientov s Kontrolami.



Obr. 14: Výsledky PLS-DA analýzy. Porovnávanými skupinami boli – VN T3.4 A Kontrola. Pri týchto skupinách už nedochádza k prekryvu skupín.

Tab. 7: Tabuľka 30 štatisticky najvýznamnejších lipidov podľa testu OPLS-DA s uvedeným absolútnym p-skóre (p1) a hodnotami P-value podľa Wilcoxonovho testu a t-testu. Uvedená je taktiež miera zmeny uvedených lipidov (Fold change) medzi skupinou pacientiek a kontrol (P/K)

Názov lipidu	p1 (S-plot)	P-value (Wilcox test)	P-value (t-test)	Miera zmeny (Fold change, P/K)
<i>FA 24:0</i>	-4,95	0,091	0,255	1,48
<i>FA 26:0</i>	-5,14	0,038	0,176	1,47
<i>PC(38:2-1)</i>	6,40	0,440	0,399	0,97
<i>PE(36:2)_PE 18:1-18:1_FA 18:1(+O)</i>	6,65	0,148	0,161	0,63
<i>PE(36:2-1)</i>	6,32	0,179	0,138	0,70
<i>PE(36:3)_PE 18:1-18:2_FA 18:2(+O)</i>	6,95	0,209	0,227	0,86
<i>PE(36:3-1)</i>	7,05	0,203	0,228	0,79
<i>PE(38:2)</i>	6,64	0,188	0,120	0,95
<i>PI(36:1)_PI(18:0/18:1)</i>	5,70	0,072	0,315	0,81
<i>PI(36:2)_PI(18:1/18:1)</i>	5,65	0,081	0,331	0,82
<i>PS(34:1)_PS(16:0/18:1)</i>	6,91	0,549	0,643	0,83
<i>PS(34:1-2)</i>	7,88	0,298	0,223	0,47
<i>PS(34:2)_PS(16:0/18:2)</i>	7,13	0,645	0,485	1,00
<i>PS(34:2-1)</i>	7,95	0,358	0,126	0,99
<i>PS(36:2)_PS(18:0/18:2)</i>	6,56	0,332	0,248	0,98
<i>PS(36:2)_PS(18:1/18:1)</i>	7,77	0,087	0,075	0,83
<i>PS(36:2-1)</i>	7,58	0,219	0,201	-0,82
<i>PS(36:3)_PS(18:1/18:2)</i>	6,64	0,200	0,196	0,93
<i>PS(36:3-1)</i>	7,73	0,242	0,085	0,76
<i>PS(38:2-1)</i>	7,10	0,222	0,309	0,85
<i>PS(38:4-1)</i>	7,25	0,110	0,095	0,83
<i>PS(38:6-2)</i>	8,14	0,219	0,360	0,76
<i>PS(40:6-2)</i>	6,86	0,138	0,203	0,82
<i>PS(40:7-1)</i>	7,46	0,264	0,346	0,82
<i>SM(30:0)</i>	6,42	0,833	0,831	0,97
<i>SM(34:0)</i>	6,65	0,538	0,708	0,73
<i>SM(34:1)</i>	5,54	0,461	0,546	0,87
<i>SM(36:0)</i>	6,79	0,813	0,889	0,74
<i>SM(36:1)</i>	6,18	0,894	0,945	0,96
<i>SM(36:2)</i>	6,19	0,578	0,892	0,95

Tab. 8: Tabuľka 30 štatisticky najvýznamnejších lipidov podľa testu OPLS-DA s uvedeným absolútnym p-skóre (p1) a hodnotami P-value podľa Wilcoxonovho testu a t-testu. Uvedená je taktiež miera zmeny uvedených lipidov (Fold change) medzi skupinou pacientiek s VN T1 a kontrol (T1/K)

Názov lipidu	p1 (S-plot)	P-value (Wilcox test)	P-value (t-test)	Miera zmeny (Fold change, T1/K)
<i>Cer(36:2-7)_d20:1/16:1</i>	-3,44	0,232	0,229	1,04
<i>Cer(40:2-3)_d16:1/24:1</i>	-3,44	0,354	0,275	1,11
<i>Cer(42:0-2)_d18:0/24:0</i>	-3,10	0,454	0,409	1,07
<i>Cer(42:2-3)_d18:1/24:1</i>	-3,16	0,853	0,630	0,96
<i>Cer(43:0-1)_d18:0/25:0</i>	-3,21	0,256	0,295	1,09
<i>Cer(44:0-1)_d18:0/26:0</i>	-3,34	0,250	0,384	1,12
<i>Cer(44:2-1)_d20:1/24:1</i>	-3,42	0,188	0,239	1,05
<i>Cer(44:2-2)_d18:1/26:1</i>	-3,30	0,339	0,427	1,07
<i>Cer(46:1-1)_d20:1/26:0</i>	-3,27	0,183	0,404	1,08
<i>FA 22:0</i>	-3,22	0,472	0,478	1,20
<i>FA 23:0</i>	-3,18	0,354	0,369	1,18
<i>FA 24:0</i>	-3,34	0,232	0,452	1,50
<i>FA 25:0</i>	-3,33	0,232	0,353	1,27
<i>FA 26:0</i>	-3,37	0,183	0,413	1,42
<i>PC(35:1)</i>	4,25	0,610	0,502	0,95
<i>PC(36:2)_PC 18:1-18:1_FA 18:1(+O)</i>	4,15	0,386	0,261	1,00
<i>PC(38:2-1)</i>	4,37	0,445	0,306	0,95
<i>PC(40:2-1)</i>	4,37	0,169	0,101	0,94
<i>PE(36:2)_PE 18:0-18:2_FA 18:2(+O)</i>	3,25	0,147	0,309	0,91
<i>PE(36:2)_PE 18:1-18:1_FA 18:1(+O)</i>	4,39	0,362	0,323	0,86
<i>PE(36:2-1)</i>	4,31	0,419	0,278	0,66
<i>PE(36:3)_PE 18:1-18:2_FA 18:2(+O)</i>	4,58	0,386	0,358	0,95
<i>PE(36:3-1)</i>	4,67	0,411	0,415	0,80
<i>PE(38:2)</i>	4,53	0,269	0,266	0,93
<i>PE(38.2)_PE 18:1-20:1_FA 20:1(+O)</i>	3,98	0,226	0,204	0,84
<i>PS(34:1-2)</i>	4,85	0,784	0,888	1,29
<i>PS(36:2)_PS(18:1/18:1)</i>	4,76	0,900	0,597	1,06
<i>PS(36:2-1)</i>	4,58	0,947	0,693	0,94
<i>PS(36:3-1)</i>	4,97	0,865	0,588	1,08
<i>PS(38:6-2)</i>	5,06	0,739	0,764	0,86

Tab. 9: Tabuľka 30 štatisticky najvýznamnejších lipidov podľa testu OPLS-DA s uvedeným absolútnym p-skóre (p1) a hodnotami P-value podľa Wilcoxonovho testu a t-testu. Uvedená je taktiež miera zmeny uvedených lipidov (Fold change) medzi skupinou pacientiek s VN T2 a kontrol (T2/K)

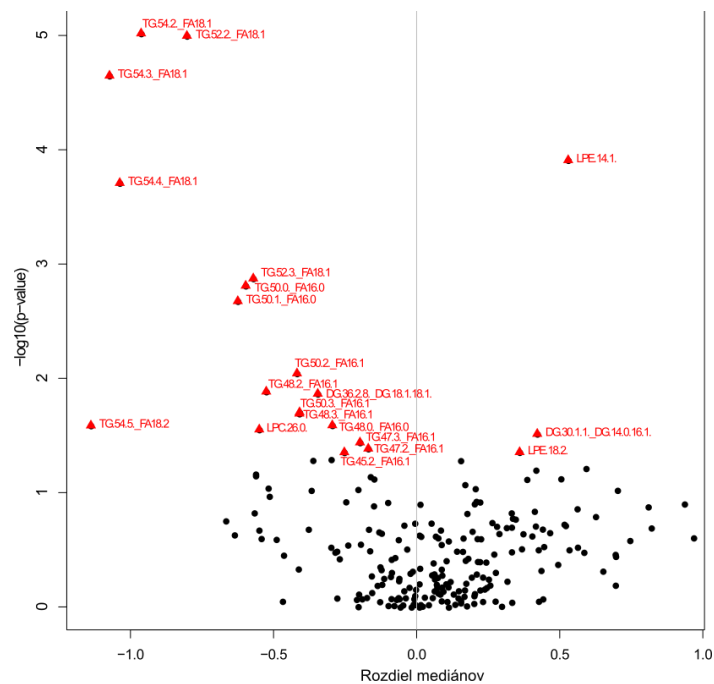
Názov lipidu	p1 (S-plot)	P-value (Wilcox test)	P-value (t-test)	Miera zmeny (Fold change, T2/K)
<i>FA 24:0</i>	-6,84	0	0	0,92
<i>FA 26:0</i>	-6,84	0	0	0,46
<i>PC(38:2-1)</i>	9,24	0,076	0,042	0,42
<i>PE(36:2)_PE 18:1-18:1_FA 18:1(+O)</i>	9,60	0,003	0,001	0,94
<i>PE(36:2-1)</i>	9,27	0,014	0,003	0,91
<i>PE(36:3)_PE 18:1-18:2_FA 18:2(+O)</i>	10,11	0,011	0,005	0,11
<i>PE(36:3-1)</i>	10,25	0,020	0,005	0,67
<i>PS(34:1)_PS(16:0/18:1)</i>	9,96	0,001	0	0,85
<i>PS(34:1-2)</i>	11,54	0,001	0	1,90
<i>PS(34:2)_PS(16:0/18:2)</i>	10,70	0,017	0	1,70
<i>PS(34:2-1)</i>	12,14	0,005	0	-0,07
<i>PS(36:1-1)</i>	8,18	0,002	0	0,69
<i>PS(36:2)_PS(18:0/18:2)</i>	9,62	0,003	0	0,43
<i>PS(36:2)_PS(18:1/18:1)</i>	11,55	0	0	0,86
<i>PS(36:2-1)</i>	11,10	0,001	0	0,52
<i>PS(36:3)_PS(18:1/18:2)</i>	9,69	0,002	0	-5,04
<i>PS(36:3-1)</i>	11,84	0,002	0	0,77
<i>PS(38:2-1)</i>	10,03	0	0	0,56
<i>PS(38:4-1)</i>	10,50	0,001	0	-0,22
<i>PS(38:6)_PS(16:0/22:6)</i>	9,51	0,002	0	0,73
<i>PS(38:6-2)</i>	11,60	0,001	0	0,58
<i>PS(40:6-2)</i>	9,78	0,002	0	0,70
<i>PS(40:7-1)</i>	10,94	0,003	0	0,54
<i>SM(28:0)</i>	9,68	0,205	0,024	0,78
<i>SM(33:0)</i>	8,66	0,069	0,002	0,67
<i>SM(34:0)</i>	9,40	0,003	0	0,67
<i>SM(34:1)</i>	8,01	0,016	0,001	0,93
<i>SM(36:0)</i>	9,64	0,082	0,006	0,93
<i>SM(36:1)</i>	8,93	0,042	0,006	0,62
<i>SM(36:2)</i>	8,94	0,063	0,043	0,79

Tab. 10: Tabuľka 30 štatisticky najvýznamnejších lipidov podľa testu OPLS-DA s uvedeným absolútnym p-skóre (p1) a hodnotami P-value podľa Wilcoxonovho testu a t-testu. Uvedená je taktiež miera zmeny uvedených lipidov (Fold change) medzi skupinou pacientiek s VN T3.4 a kontrol (T3.4/K)

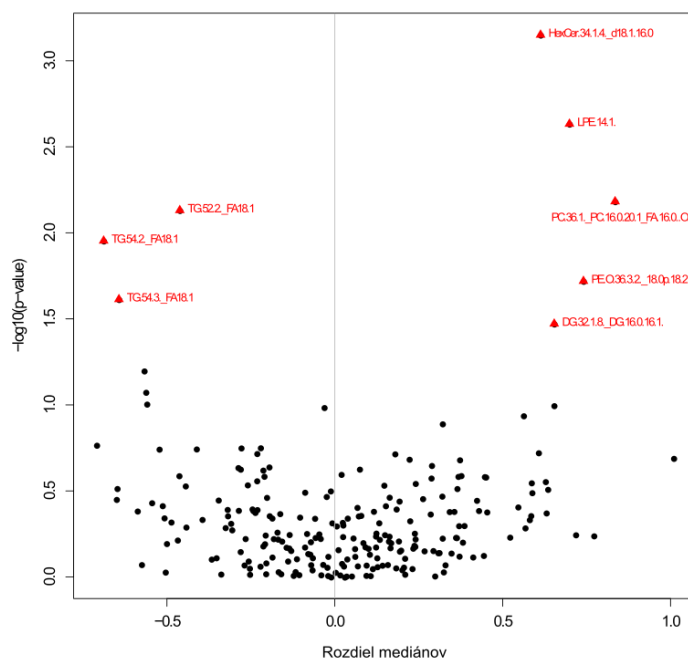
Názov lipidu	p1 (S-plot)	P-value (Wilcox test)	P-value (t-test)	Miera zmeny (Fold change, T3.4/K)
<i>Cer(32:2-3)_d16:1/16:1</i>	7,83	0,052	0,106	0,60
<i>Cer(33:2-1)_d16:0/17:2</i>	7,48	0,008	0,018	0,67
<i>Cer(33:2-2)_d16:1/17:1</i>	7,96	0,089	0,158	0,74
<i>Cer(34:2-5)_d16:1/18:1</i>	7,95	0,114	0,186	0,67
<i>Cer(35:2-3)_d18:1/17:1</i>	7,43	0,009	0,040	0,67
<i>Cer(36:2-7)_d20:1/16:1</i>	7,96	0,055	0,112	0,78
<i>Cer(40:2-3)_d16:1/24:1</i>	7,92	0,083	0,157	0,58
<i>Cer(42:0-2)_d18:0/24:0</i>	7,37	0,038	0,071	0,77
<i>Cer(42:2-3)_d18:1/24:1</i>	7,35	0,068	0,085	0,62
<i>Cer(43:0-1)_d18:0/25:0</i>	7,61	0,045	0,110	0,76
<i>Cer(44:0-2)_d20:0/24:0</i>	7,37	0,024	0,020	0,65
<i>Cer(44:2-1)_d20:1/24:1</i>	7,32	0,101	0,133	0,84
<i>Cer(45:0)_d20:0/25:0</i>	7,39	0,024	0,027	0,75
<i>Cer(46:1-1)_d20:1/26:0</i>	7,57	0,035	0,070	0,65
<i>FA 22:0</i>	7,63	0,005	0,008	0,63
<i>FA 24:0</i>	7,58	0,014	0,025	-0,08
<i>FA 25:0</i>	7,54	0,012	0,020	0,52
<i>FA 26:0</i>	7,42	0,026	0,054	0,14
<i>PC(35:1)</i>	-9,95	0,135	0,186	1,19
<i>PC(38:2-1)</i>	-10,58	0,083	0,150	1,26
<i>PE(36:2)_PE 18:1-18:1_FA 18:1(+O)</i>	-9,97	0,143	0,152	1,47
<i>PE(36:3)_PE 18:1-18:2_FA 18:2(+O)</i>	-10,52	0,128	0,136	2,02
<i>PE(36:3-1)</i>	-10,78	0,094	0,117	1,52
<i>PS(34:1-2)</i>	-11,77	0,160	0,234	3,30
<i>PS(36:2-1)</i>	-11,40	0,114	0,173	11,77
<i>PS(38:6-2)</i>	-12,53	0,078	0,112	2,14
<i>SM(32:0)</i>	-9,97	0,048	0,119	1,69
<i>SM(32:1)</i>	-8,66	0,020	0,080	1,39
<i>SM(34:0)</i>	-9,97	0,033	0,118	3,05
<i>SM(34:1)</i>	-8,42	0,059	0,105	1,57

4.6. Vizualizácia výsledkov pomocou vulkánových grafov

Vulkánové grafy boli využité na prehľadnú vizualizáciu výsledkov jednorozmernej štatistiky. Na ose y je vynesená hodnota $-\log p\text{-value}$ čím je označená významnosť zmeny, ktorá zdola na hor rastie. Na ose x sú nanesené hodnoty rozdielu mediánov medzi porovnávanými skupinami a zobrazujú zníženie alebo zvýšenie množstva, ktoré z ľavej do pravej strany klesá.



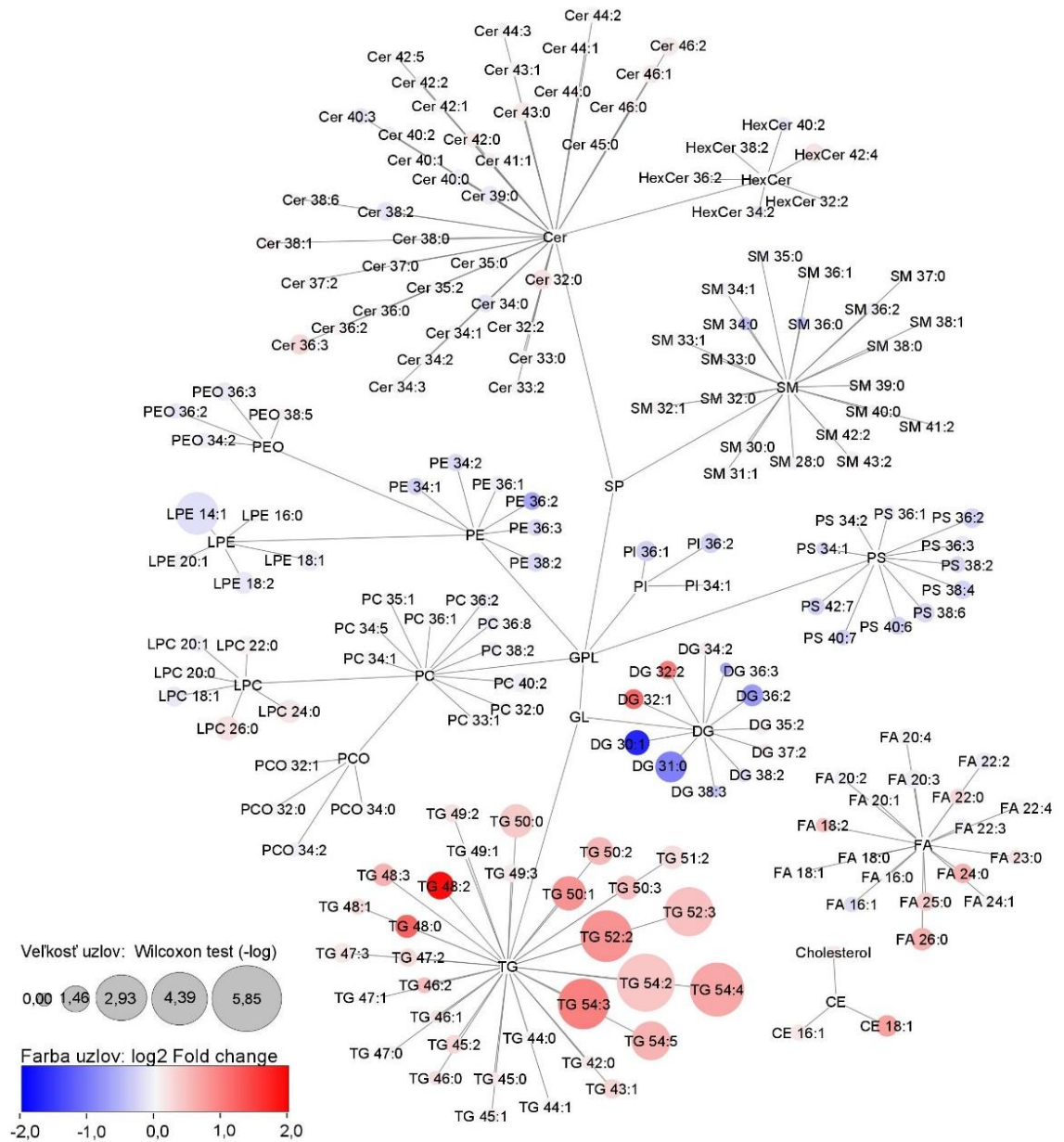
Obr. 19: Výsledky Volcano plot pri porovnávaní skupín – Pacient a Kontrola.



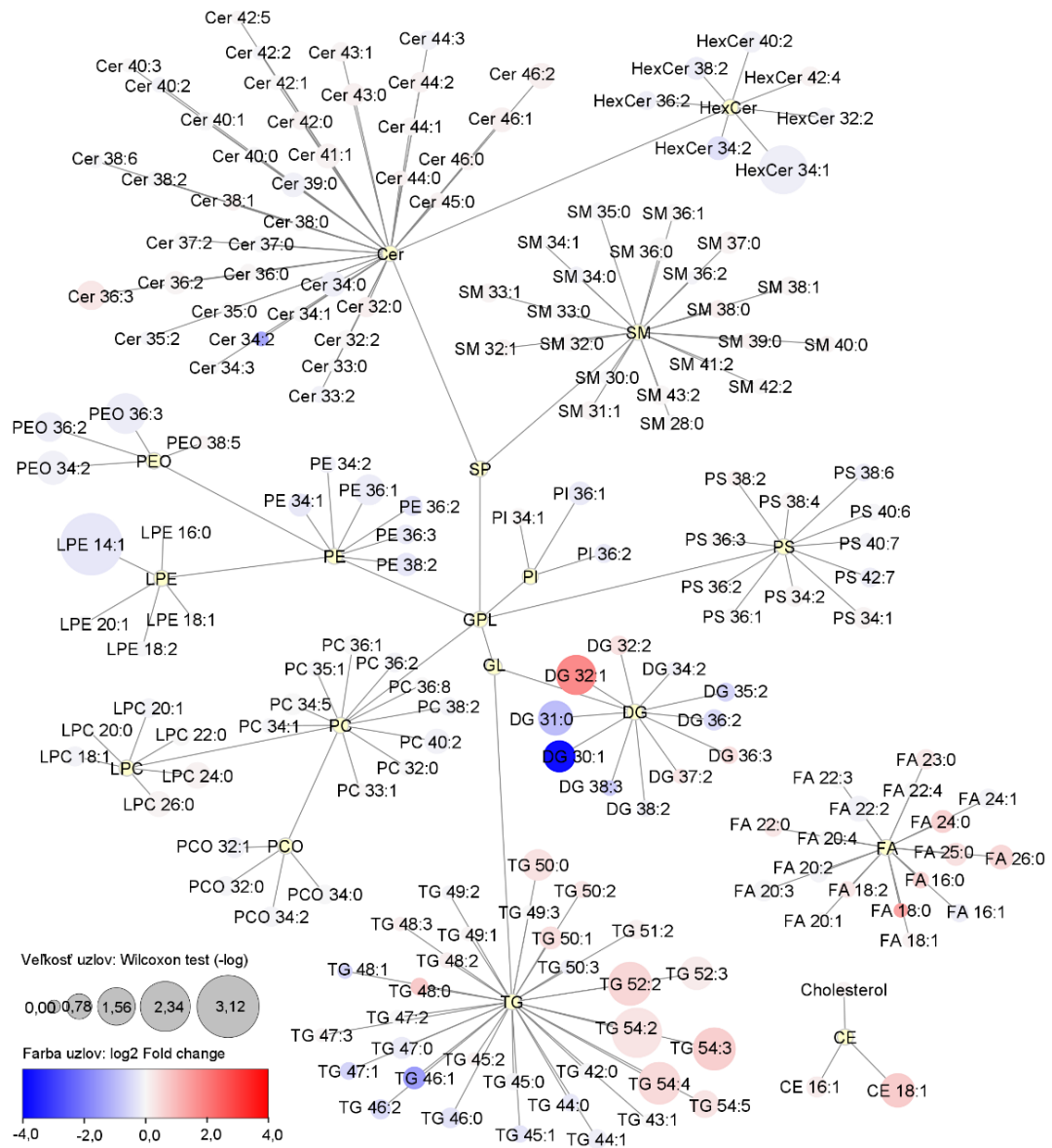
Obr. 20: Výsledky Volcano plot pri porovnávaní skupín – VN T1 a Kontrola.

4.7. Vizualizácia výsledkov pomocou lipidových máp

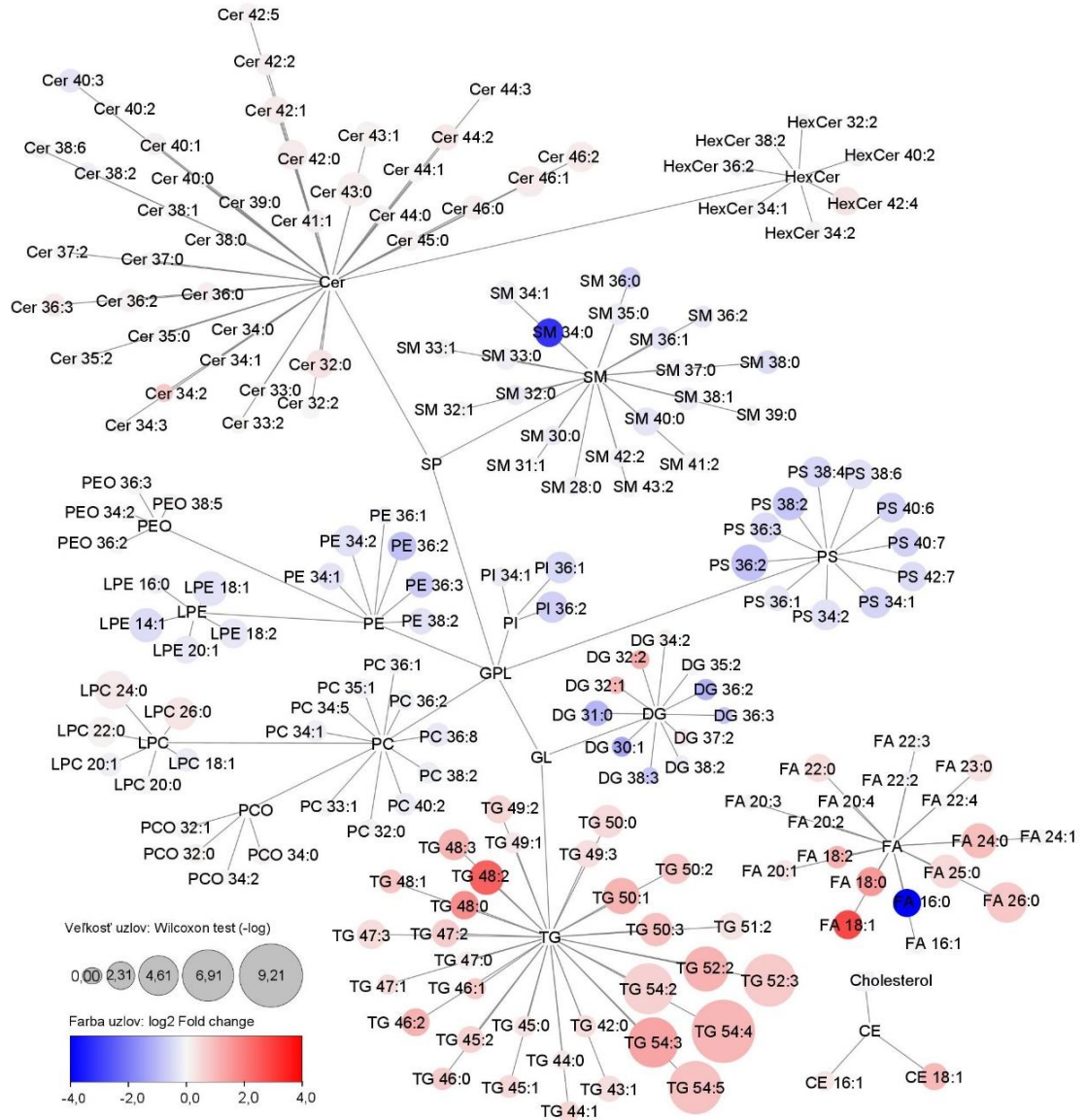
Vizualizácia výsledkov pomocou lipidových máp programom CytoScape, bola využitá na sledovanie globálnych lipidových trendov. Významnosť zmeny je označená veľkosťou uzlov a farba uzlov, označuje zníženie alebo zvýšenie oproti porovnáwanej kontrolnej skupine. Na Obr. 23 pri porovnaní skupiny pacientov a kontrol bolo možné pozorovať systematické významné zvýšenie TG a miernejšie aj niektorých FA, DG, CE, LPC a Cer, ktorých zmena množstva oproti kontrolám nebola až natoľko veľká ako pri TG. Významné zníženie množstva bolo pozorované hlavne pri DG a LPE a v menšom množstve sa významnejšie menili aj PS, PE a PI. Na Obr. 24 bolo vizualizované porovnanie medzi skupinou VN T1 a kontrolami. Bola významné zvýšenie bolo pozorované pri DG, TG, CE a FA a významné znížené množstvá DG, PE, PEO, LPE, HexCer, TG, PE a Cer oproti kontrolnej skupine. Na Obr. 25 je zobrazená lipidová mapa vytvorená porovnaním skupiny VN T2 s kontrolami. Na tejto mape pozorujeme výrazné zvýšenie TG, DG, FA, CE, LPC, Cer a HexCer. Medzi významnejšie znížené skupiny patria LPE, PE, PI, PS, DG a aj jedna FA. Na poslednej lipidovej mape, Obr. 26, vidíme porovnanie medzi skupinou VN T3.4 a kontrolami. Významne zvýšené sú skupiny FA, TG, DG, SM, HexCer, PS, PE, PC, DG a cholesterolu. Významne zníženými skupinami hlavne Cer, CE a niektoré DG, PS a PE.



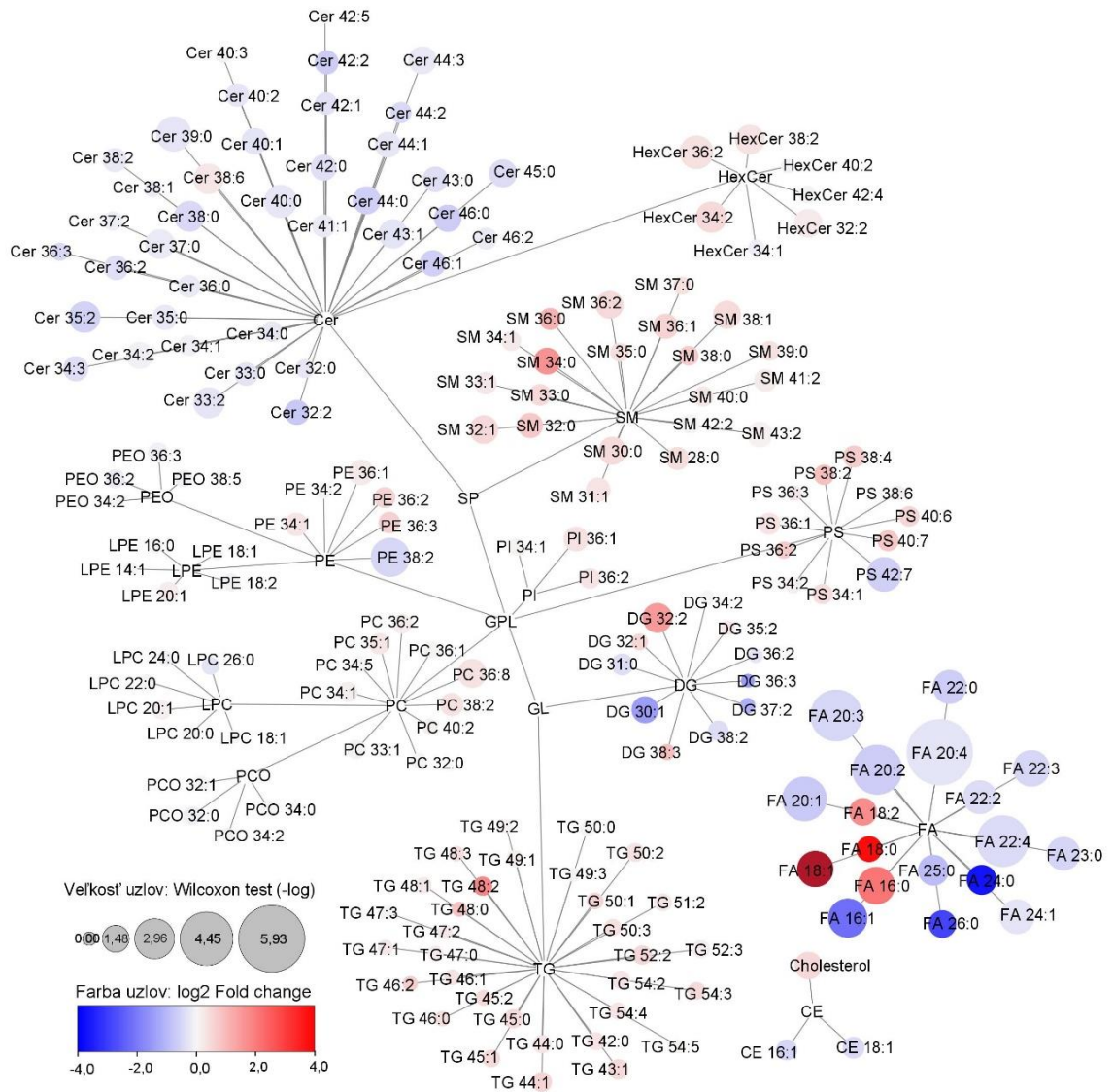
Obr. 23: Lipidová mapa, porovnávanými skupinami boli–Pacient a Kontrola. Významné zvýšenie množstva – TG, FA, DG, CE, LPC, Cer oproti kontrolám. Významné zníženie množstva – DG a LPE, PS, PE a PI oproti kontrolám.



Obr. 24: Lipidová mapa, porovnanými skupinami boli– VN T1 a Kontrola. Významné zvýšenie množstva – DG, TG, CE a FA oproti kontrolnej skupine. Významné zníženie množstva – DG, PE, PEO, LPE, HexCer, TG, PE a Cer oproti kontrolnej skupine.



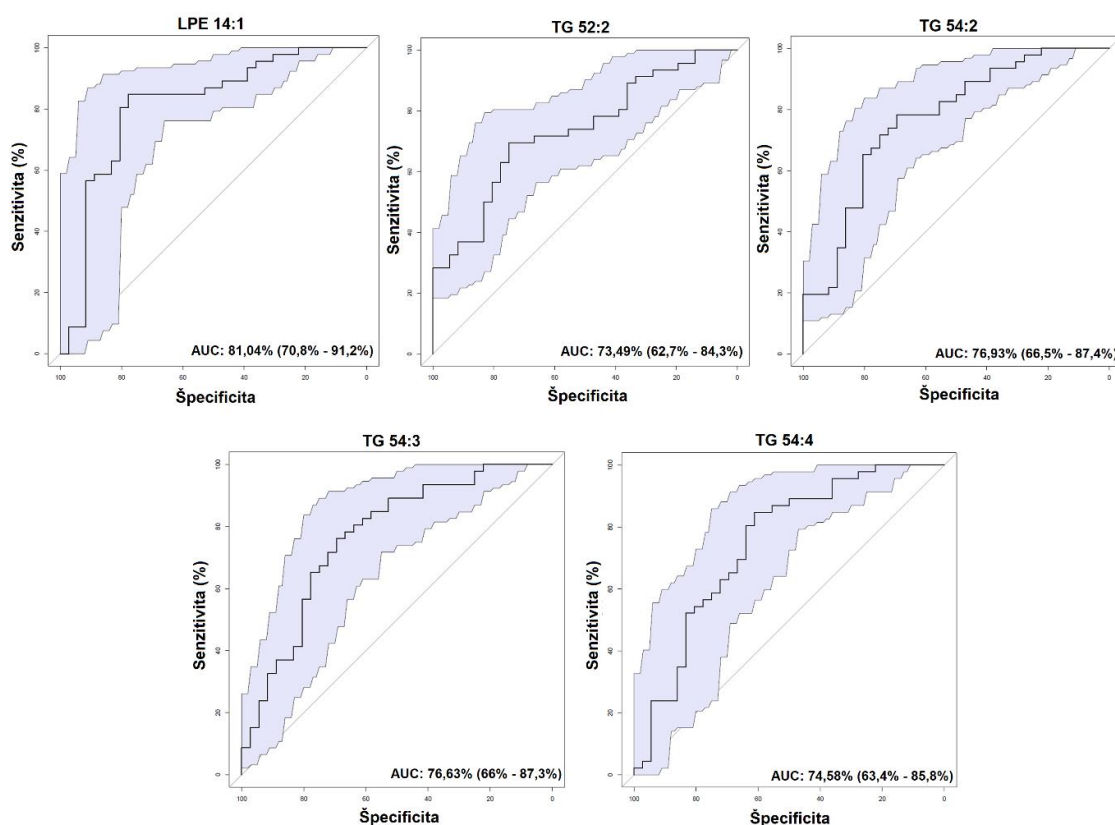
Obr. 25: Lipidová mapa, porovnanými skupinami boli– VN T2 a Kontrola. Na Výrazné zvýšenie množstva – TG, DG, FA, CE, LPC, Cer, HexCer. Významne zníženie množstva – LPE, PE, PI, PS, DG, FA.



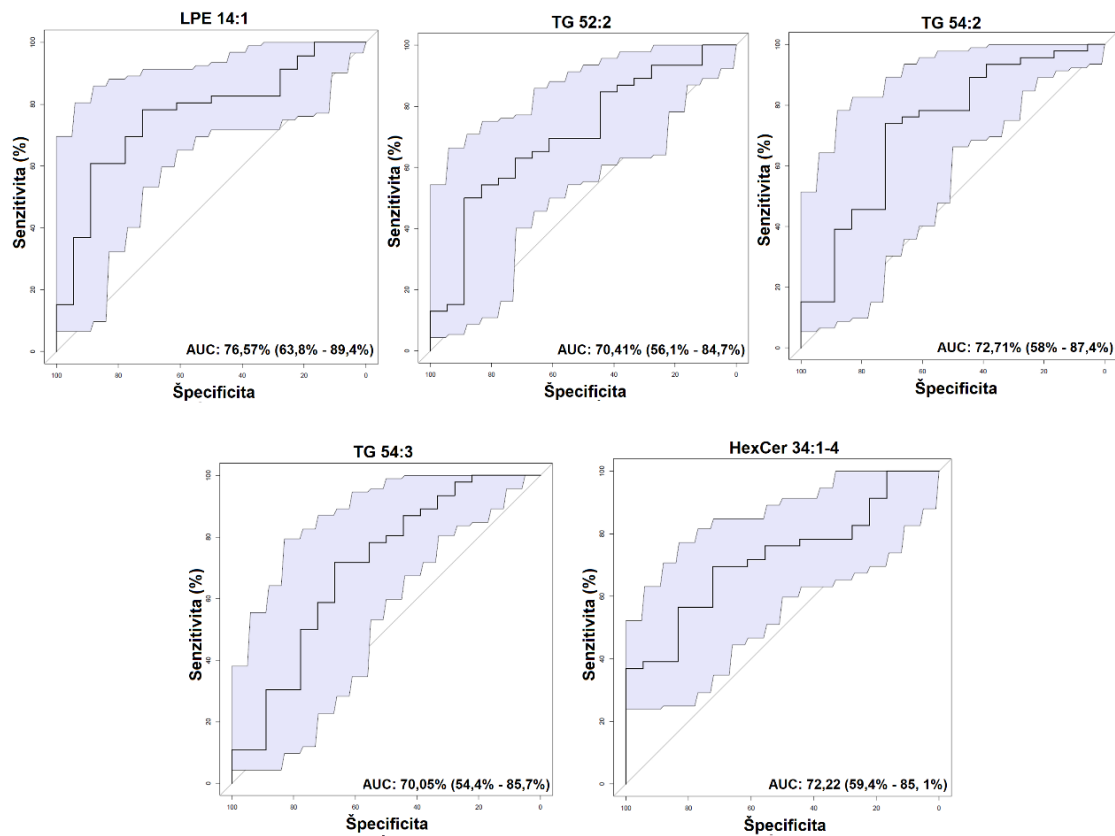
Obr. 26: Lipidová mapa, porovnanými skupinami boli – VN T3.4 a Kontrola. Významne zvýšenie množstva – FA, TG, DG, SM, HexCer, PS, PE, PC, DG , Cholesterol. Významne zníženie množstva – Cer, CE, DG, PS, PE.

4.8. Vizualizácia výsledkov pomocou ROC-kriviek

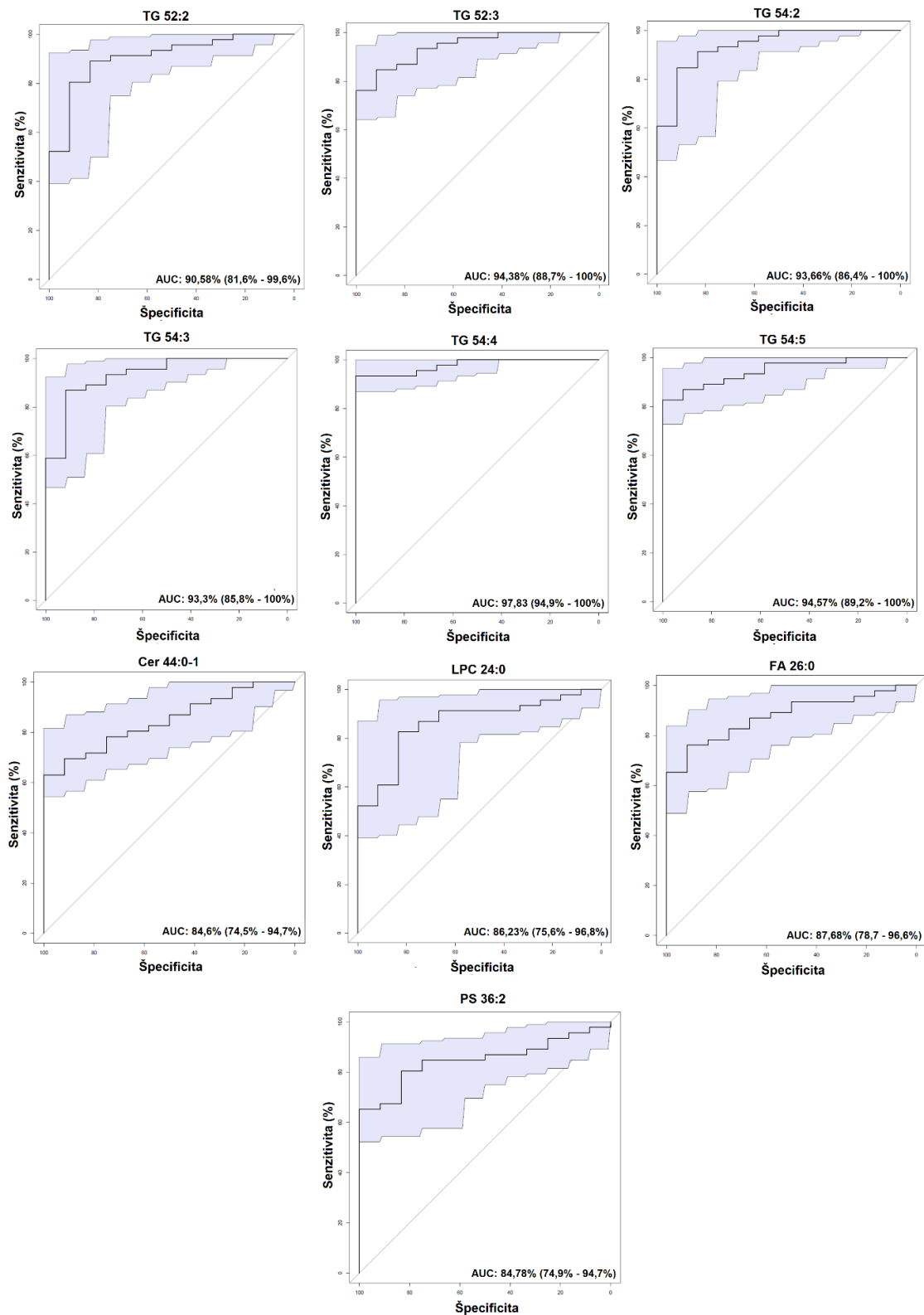
Výsledkom vizualizácie pomocou ROC-kriviek (Receiver operating characteristic) sú grafy, kde je na osi y vynesená citlivosť testu, ktorá hovorí o množstve skutočne pozitívnych, ktorý sa týmto testom dajú identifikovať. Na osi x je vynesená špecificita a táto hodnota vyjadruje množstvo falošne pozitívnych, ktorý sa týmto testom dajú identifikovať. V grafoch sú zaznamenané hodnoty plochy pod krivkou (AUC), ktorá percentuálne popisuje pravdepodobnosť s akou by tento test dokázal určiť skutočne pozitívne a falošne pozitívne vzorky. Tieto hodnoty umožňujú navzájom porovnávať rôzne ROC-krivky. ROC krivky najlepšie diskriminujúcich lipidov, ktorých AUC bola minimálne 70%, sme vyseletovali najskôr podľa najlepšieho skóre AUC spomedzi všetkých ROC kriviek v danej porovnáwanej skupine, následne sme zohľadnili výsledky testov OPLS-DA, Vulkáno grafov a Lipidových máp. Cieľom bolo vybrať také lipidy, ktoré patrili do tried, ktoré sa v týchto testoch ukázali ako štatisticky významne zmenené oproti kontrolným vzorkám.



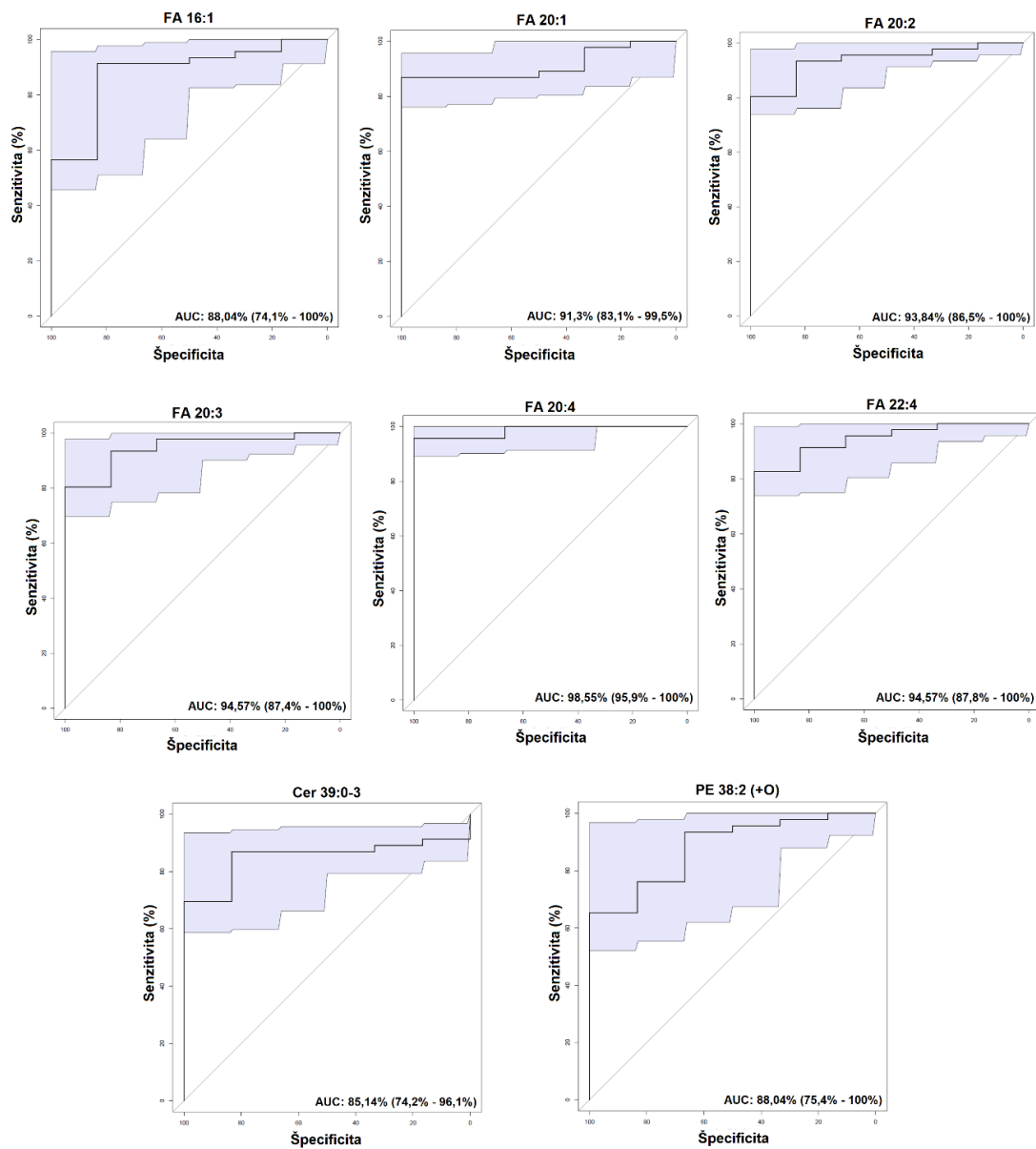
Obr. 27: ROC-krivky (Receiver operating characteristic vybraných lipidov pri porovnaní skupín Pacient a Kontrola.



Obr. 28: ROC-krivky (Receiver operating characteristic vybraných lipidov pri porovnaní skupín VN T1 a Kontrola.



Obr. 29: ROC-krivky (Receiver operating characteristic vybraných lipidov pri porovnaní skupín VN T2 a Kontrola.



Obr. 30: ROC-krivky (Receiver operating characteristic vybraných lipidov pri porovnaní skupín VN T3.4 a Kontrola.

5. DISKUSIA

Lipidomická analýza prináša nové možnosti výskumu ochorení spojených s dysreguláciou lipidov ako aj možnosti včasnej diagnostiky. Pri analýze vzoriek existuje predpoklad, že množstvo lipidov sa bude líšiť medzi vzorkami od pacientov s patologickým stavom a zdravými jedincami (Wolrab et al., 2019). Avšak koncentrácie lipidov závisia aj od rôznych exogénnych faktorov (príjem potravy, cirkadiánný rytmus), ako aj od endogénnych faktorov (napr, hormonálny rytmus) (Chua et al., 2013). Ďalšími faktormi ovplyvňujúcimi kvalitu vzorky sú hlavne správny odber vzorky a vhodná odberová technika, podmienky a dĺžka skladovania vzorky po odbere alebo transporte klinických vzoriek (Wolrab et al., 2019). A neskôr pri samotnej analýze napr. čistotou použitých chemikálií počas úpravy vzorky pred analýzou alebo v extrakčnom postupe izolácie lipidov od matrice. Všetky tieto faktory ilustrujú, aká dôležitá je kvalita vzorky a harmonizácia protokolov izolácie vzoriek, aby bolo možné získať šancu dospieť k diagnostickým záverom. Výskumné laboratória sú závislé od vzoriek, ktorých odber je vykonávaný na externých pracoviskách, a majú len obmedzený vplyv na odberu vzoriek. Pre klinické vzorky vhodné na lipidomickú analýzu sú rovnako dôležité pravidlá o výbere a nezaradení do štúdie na základe určitých kritérií – zhoda pohlavia, veku, indexu telesnej hmotnosti, neprítomnosť komorbidít alebo po-operačný stavov (Wolrab et al., 2019). Všetky tieto faktory mali vplyv aj na výsledky tejto lipidomickej štúdie, kde bol ako klinický materiál použitý apokrinný pot odobraný pacientkam s rakovinou prsníka, ktoré sa od seba odlišovali aj veľkosťou nádoru alebo prítomnosťou metastáz. Z dôvodu nedokonalého odberu vzoriek potu (vzorky obsahovali rôzne farebné vlákna z oblečenia, chlpy a iné nečistoty) a vysokej heterogenity potu (v niektorých vzorkách pri analýze jedného analytu boli jednoznačne viditeľné píky (intenzity až 10^5 cps) a v iných vzorkách pík nebol vôbec) (Obr. 31) nebol obsah lipidov vo vzorkách kvantifikovaný a pracovali sme len s relatívnym porovnaním plôch integrovaných pík chromatogramov (Obr. 31).

Cieľom tejto pilotnej lipidomickej analýzy bolo zistiť, či sa kompozícia lipidov významne mení pri porovnaní tohto patologického stavu oproti vzorkám, odobraným subjektom, ktoré toto ochorenie nemajú. Na zistenie rozdielu lipidového profilu vo vzorkách boli relatívne plochy píkov chromatogramov porovnávané medzi skupinami Pacient a Kontrola; Pacient VN (T1, T2, T3.4) a Kontrola, sériou štatistických testov jednorozmernej a mnohorozmernej štatistickej analýzy, ktoré umožnili porovnanie týchto skupín. Prvou bola analýza hlavných komponentov. Táto nesupervizovaná metóda však poukázala len na veľmi malé rozdiely medzi všetkými skupinami.



Obr. 31: Zobrazenie variability výsledkov chromatogramov v softvéri Sciex-OS. Výsledky LC-MS/MS analýzy lipidu PS (34:1) _PS(18:0/16:1) v podobe chromatogramov.

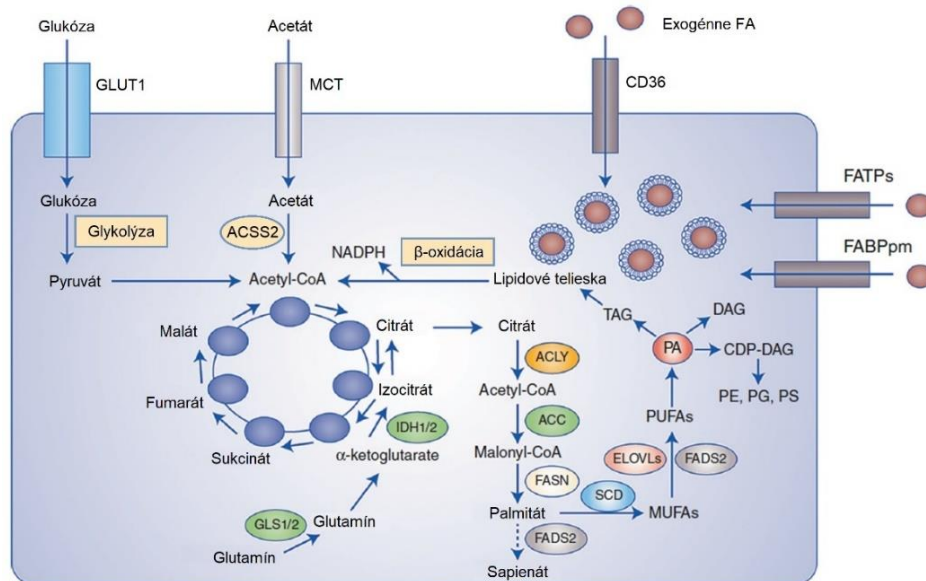
Jednoznačnejšie rozdiely poskytla až supervizovaná diskriminačná analýza, PLS-DA, kde rozdiely medzi skupinami, Pacient a Kontrola, boli významnejšie a grafické zobrazenie porovnania medzi skupinami, Pacient VN (T1, T2, T3.4) a Kontrola, jednoznačne poukázala na zväčšujúce sa rozdiely medzi VN a kontrolnou vzorkou, s narastajúcou veľkosťou nádoru. Z analýzy ortogónalnej diskriminačnej analýzy, OPLS-DA, boli výsledky zobrazené pomocou grafov S-plot. Grafy S-plot zobrazujú závislosť súvislosti medzi premennými – korelácie, od vzájomnej zmeny týchto premenných – kovariancie. Touto analýzou sme získali štyri sety tridsiatich najvýznamnejších lipidov podľa tohto testu. Pri porovnaní všetkých setov hodnôt získaných medzi skupinami, Pacient VN (T1, T2, T3.4) a Kontrola, bola hodnota

kovariancie významne znížená pri triedach FA (22:0, 23:0, 24:0, 25:0, 26:0), Cer, SM, PS, PE, PC a zvýšená pri skupinách PC, PE, PS, SM, Cer a FA (22:0, 24:0, 25:0, 26:0). Pri porovnaní medzi skupinami, Pacient a Kontrola, bola znížená kovariancia len v skupine FA (24:0, 26:0) a zvýšená v skupinách PC, PE, PI, PS, SM. Konkrétne sa jednalo o PC 38:2-1, nenasýtené PE s počtom uhlíkov (C36 – C38), PI 36:1 a 36:2, polynenasýtené PS s počtom uhlíkov (C34 – C40) a SM s počtom uhlíkov (C30 – C36). Pre ďalšiu analýzu významnosti zmeny lipidových profilov boli vynesené závislosti rozdielu mediánov medzi porovnávanými skupinami a $-\log_{10} p\text{-value}$ na Vulkáno grafoch. Pri porovnaní významne zvýšených hodnôt rozdielu mediánov medzi skupinami, Pacient a Kontrola; Pacient VN (T1, T2, T3.4) a Kontrola, vyselektované lipidy z tried TG obzvlášť 52:2, 52:3, 54:2, 54:3, 54:4, 54:5, FA 24:0 A 26:0, PC 36:8 a HexCer 38:2-5. Významne znížené boli lipidy z tried LPE 14:1, HexCer 34:1-4, PC 36:1, PEO 36:3-2, DG 32:1-8, nenasýtené PS (C36 – C42), nenasýtené FA (C20 – C22) a Cer 39:0-3. Finálnou vizualizáciou výsledkov pomocou programu Cytoscape, sme získali väčší prehľad o zmene, a významnosti zmeny, lipidov medzi skupinami Pacient a Kontrola; Pacient VN (T1, T2, T3.4) a Kontrola. Na lipidových mapách bolo možné pozorovať najvýznamnejšie zvýšenie v skupine TG, ktoré boli zvýšené u skupín, Pacient VN T1(T2) a Kontrola, ktoré výrazne poklesli u skupín Pacient VN T3 a Kontrola. Významné zvýšené hodnoty boli pozorované aj v skupine FA, ktoré boli presne naopak zvýšené práve v skupinách, Pacient VN T3 a Kontrola, a znížené v skupinách Pacient VN T1(T2) a Kontrola. Pri triede LPE bolo pozorované významné zníženie pri všetkých porovnaníach. Na záver štatistickej analýzy sme pre všetky porovnávané skupiny vytvorili ROC krivky, podľa ktorých sme nakoniec vyseletovali 19 lipidov, ktorých hodnoty AUC dosahovali najlepšieho skóre pre dané skupiny. Jednalo sa o lipidy z triedy TG (C52 – C54), LPE 14:1, FA (C16 – C22), Cer 39:0-3, LPC 24:0, PS, HexCer 34:1-4.

Zmeny v lipidovom profile medzi porovnávanými skupinami sa dajú pripísať abnormálnemu metabolickému správaniu rakovinových buniek. Rôzne podtypy rakoviny prsníka sa navzájom odlišujú v spôsobe akým pozmeňujú svoj metabolizmus. V tejto štúdií boli použité vzorky pacientiek, ktoré mali zvyčajne pozitívny test na marker – estrogénový receptor (ER), progesterónový receptor (PR), jadrový nehistónový proteín (KI-67) a ľudský receptor epidermálneho rastového faktora 2 (HER2+). Avšak niektoré pacientky mali pozitívne testy aj na nádorový supresor p53 (p53). Tieto rozdiely mohli taktiež výrazne ovplyvniť zmeny v lipidovom profile, ako aj našich výsledkov. Vyššie uvedené markery ER, HER2+ a p53 sú úzko spojené z metabolizmom FA, ktorého metabolizmus bol podľa výsledkov ovplyvnený najviac.

Metabolizmus FA v rakovinových bunkách je ovplyvnený metabolizmom glukózy cez tzv. Warburgov efekt (Liberti & Locasale, 2016). Warburgov efekt popisuje preferenciu rakovinových buniek ku glykolýze, ako metabolickej dráhe produkujúcej chemickú energiu aj v prostredí bohatom na kyslík za tvorby laktátu (Zhang et al., 2021). Glukóza spolu s glutamínom poskytujú rakovinovým bunkám uhlíkové skelety a zdroj dusíka, pre syntézu širokej škály ďalších metabolitov. Hneď ako sa v rakovinovej bunke z glukózy syntetizuje pyruvát, a následne acetyl CoA, môže začať syntéza FA (Obr. 32) (Nelson a Cox., 2017). Enzýmom acetyl-CoA karboxyláza je acetyl-CoA premieňaný na malonyl-CoA, ktorý je vstupnou látkou *de novo* lipogenézy (Obr. 32) (Nelson & Cox, 2017). V normálnom tkanive je *de novo* lipogenéza obmedzená len na hepatocyty a adipocyty, avšak rakovinové bunky sú schopné túto anabolickú dráhu reaktivovať (Obr.32) (Monaco, 2017). Zároveň sú FA komponentami mnohých ďalších lipidových druhov, nakoľko po vytvorení kyseliny palmitovej (FA 16:0), môže byť táto FA ďalej predĺžovaná alebo desaturovaná (Chen & Wang, 2021) (Obr.32). V dôsledku toho FA prispievajú k obrovskej štruktúrálnej rozmanitosti lipidového profilu (Chen & Wang, 2021).

Rakovinové bunky sú schopné prijímať FA aj exogénne čo spôsobuje ich metabolickú flexibilitu (Obr.32) (Koundouros et al., 2020). Exogénny príjem FA je sprostredkovaný špecializovanými transportérmi (Su & Abumrad, 2009), z ktorých najlepšie popísaným je CD36 (Obr.32), známy aj ako translokáza mastných kyselín (FAT) (Koundouros et al., 2020). Táto rodina transportných proteínov mastných kyselín (FATP) a proteíny viažuce mastné kyseliny na plazmatickú membránu (FABPpm) vykazujú zvýšenú expresiu v nádoroch (Obr. 32) (Koundouros et al., 2020).



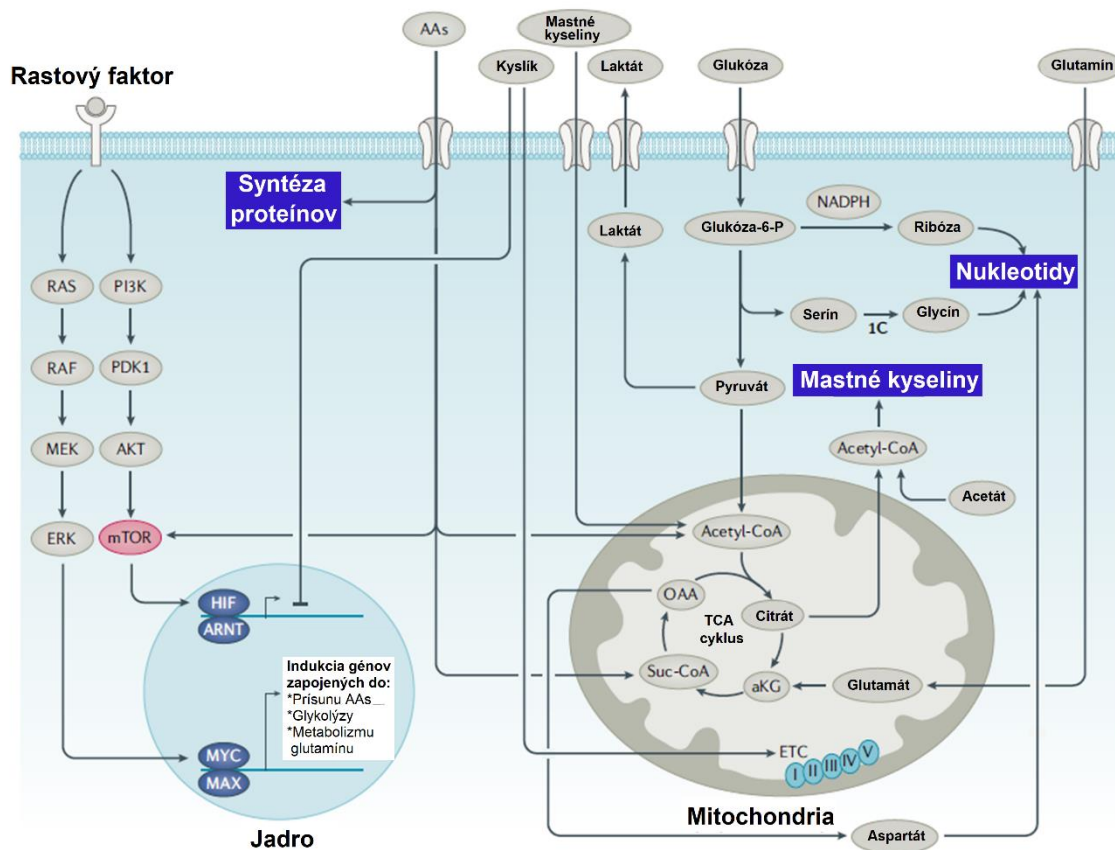
Obr. 32: Exogénny príjem a *de novo* syntéza FA rakovinovými bunkami. Exogénny príjem je sprostredkovaný špecializovanými prenášačmi – CD36, FATPs a FABPpm. FA sú následne uskladnené v lipidových telieskach, z ktorých sú využívané pre produkciu NADPH a acetyl-CoA β-oxidáciou. Zdrojom C, pre *de novo* lipogenézu je v rakovinových bunkách glukóza, glutamín a acetát na syntézu citrátu. Palmitát je syntetizovaný postupne z citrátu enzymatickou aktivitou ACLY, ACC a FASN. Následne môže byť desaturovaný, predĺžený a tvoriť iné lipidové druhy. Alternatívnou cestou desaturácie palmitátu je cez FADS2 a tvorbu sapienátu namiesto palmitooleátu. GLUT1-glukózový prenášač 1; MCT-monocarboxylátový prenášač; CD36-diferenciačný klastor 36; FATPs-proteínové prenášače FA; FABPpm-proteín viažuci FA; GLS, glutamináza; IDH1/2- izocitrátdehydrogenáza; ACLY-ATP-citrátlyáza; ACSS2-acyl-CoA syntetáza; ACC-acetyl-CoA karboxyláza; FASN-syntetáza FA, MUFA-mononenasýtená FA; PUFAs-polynenasýtená FA; SCD-stearoyl-CoA desaturáza; FADS2- FA desaturáza 2; ELOVLs-elongázy veľmi dlhých FA; PA-kys. fosfatidová; TAG, DAG, PE, PG-phosphatidylglycerol; PS (prevzaté a upravené podľa Koundouros et al., 2020).

Metabolizmus lipidov je v rakovinových bunkách značne ovplyvnený v dôsledku zvýšenej hladiny estrogénu (Kulkoyluoglu-Cotul et al., 2019). Zvýšené množstvo estrogénu, za vzniku komplexu, estrogén-ER, spôsobuje nepriamo aktivovanú génovú transkripciu, pomocou proteín-proteínových interakcií s inými transkripčnými faktormi ako napr. p53 (Shang, 2006; Jerry et al., 2010). Transkripčný faktor p53, je nádorový supresor, ktorý, ovplyvňuje *de novo* lipogenézu v nádorových bunkách prsníka, a jedná sa o najčastejšie mutovaný gén pri rakovine prsníka (Liu et al., 2014; Kruiswijk et al., 2015; Yue et al., 2017). Ako transkripčný faktor, p53, reguluje gény podieľajúce sa na procesoch proliferácie, opravy DNA, senescencie a bunkovej smrti (Yue et al., 2017; Lacroix et al., 2020). Väčšina mutácií, p53 nájdených u pacientov je miss-sense, a vedie k stabilnej forme proteínu, ktorá získava novú funkciu s pro-nádorovým účinkom (Liu et al., 2014; Yue et al., 2017).

Estrogénom je taktiež ovplyvnená indukcia onkogénu c-Myc transkripčného faktoru, ktorý spúšťa proliferáciu a bunkový cyklus (Obr. 33) (Butt et al., 2005). Estrogén a c-Myc majú navzájom synergický účinok pri spustení proliferácie (Cheng et al., 2006; Wang et al., 2011). Myc reguluje expresiu génov asociovaných s príjmom glukózy – transportéry GLUT1 (Osthus et al., 2000; Ying et al., 2012; Cox et al., 2018), glutamínu a metabolizmom lipidov (Park et al., 2020). Spôsobuje up-reguláciu glykolýzy a glutaminolýzy, napr. aktiváciou enzýmov glykolýzy – glutamináza, hexokináza 2 a fosfofruktokináza (Osthus et al., 2000; Kim et al., 2004). Myc taktiež up-reguluje, glykolytický enzým, laktátdehydrogenázu (LDH) v nádorových bunkách, a poskytuje tak molekulárny základ Warburgovho efektu (Obr. 33) (Shim et al., 1997; Martínez-Reyes et al., 202, Lewis et al., 2000; Doherty et al., 2013). C-Myc je taktiež regulovaný pomocou HER2+ cez signálnu kaskádu RAS/RAF/MEK/ERK (Wang et al., 2011). Aktivácia dráhy RAS/RAF/MEK/ERK môže viesť k progresii bunkového cyklu, prežívaniu buniek, diferenciácií a migrácií (Sears, 1999; Roberts & Der, 2007; Samatar & Poulikaios, 2014).

Hypoxiou indukovateľné faktory (HIF), ktoré vplývajú na prežitie a rast nádorov (Malik et al., 2012; Cheng et al., 2013; Zhang et al., 2021) sú centrálnym regulátorom homeostázy kyslíka v rakovinových bunkách, a sú taktiež regulované estrogénom (Zhang et al., 2021). Ich transkripcia je aktivovaná cez PI3K/Akt/mTOR signálnu dráhu (Semenza, 2003; Semenza, 2013; Yang et al., 2015). HIF zvyšujú glykolýzu prostredníctvom transkripčnej up-regulácie a fosforylácie glukózových transportérov, čím vplývajú na rast, progresiu a metastázovanie (Zhang et al., 2021).

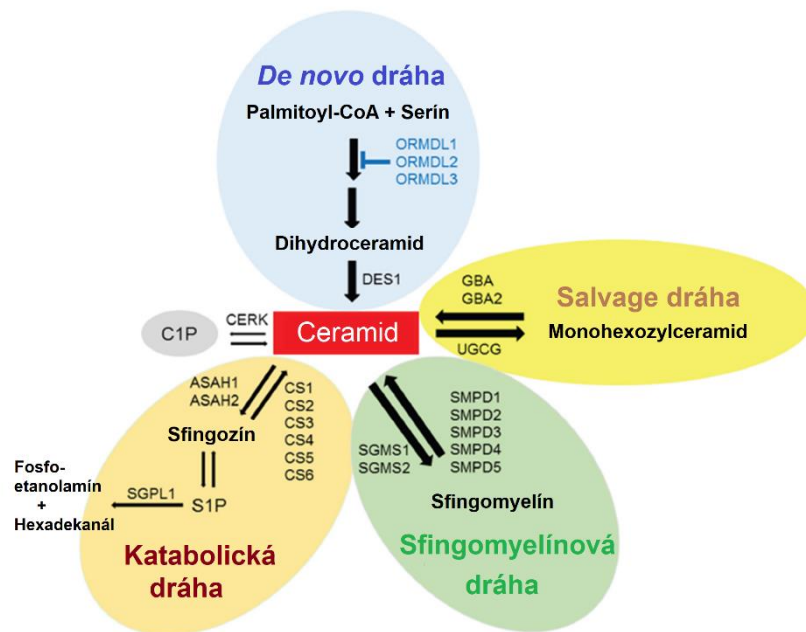
V prípade karcinómov prsníka obohatených o HER2+, vedie vysoko aktivovaná signalizácia HER2-PI3K-AKT-mTOR (Obr. 33) k aktivácii transkripčného faktora viažuceho faktora 1 (SREBF1), ktorý aktivuje expresiu kľúčových lipogénnych génov, vrátane syntázy mastných kyselín, citrátlyázy a acetyl-CoA karboxylázy (Zhao et al., 2021). Táto aktivácia prispieva k agresivite HER2+ karcinómov prsníka (Mendez et al., 2004; Portsmann et al., 2008; Ricoult et al., 2016; Zhao et al., 2021).



Obr. 33: Onkogénne faktory regulujú metabolismus rakovinových buniek. Dysregulované tyrozínkinázové receptory aktivujú RAS alebo PI3K, MYC a/alebo mTOR, zvyšuje syntézu proteínov z mRNA indukovaných MYC, aby sa zvýšil prílev aminokyselín (AA vrátane glutamínu), glukózy a mastných kyselín, ktoré poháňajú syntézu mastných kyselín, nukleotidov a proteínov. Hypoxiou indukované faktory HIF1 α a HIF2 α sú indukované mTOR alebo hypoxiou, čo vedie k aktivácii glykolytickej dráhy s premenou glukózy na laktát, ktorý sa exportuje extracelulárne. MYC aktivuje gény zapojené do glykolyzy a presunu 3-fosfoglycerátu na produkciu serínu, ktorý sa mení na glycín a prispieva k metabolizmu jedného uhlíka (1C). MYC tiež indukuje metabolizmus glutamínu, zvyšuje príjem glutamínu a glukózy a ich katabolizmus v cykle trikarboxylových kyselín (TCA), čím poskytuje základ pre syntézu mastných kyselín a nukleotidov. Ukazuje sa, že kyslík pomáha mitochondriálnemu elektrónovému transportnému reťazcu (ETC, so zobrazenými komplexmi I-V) alebo inhibuje HIF1 α a HIF2 α tým, že sprostredkúva jeho proteazomálnu degradáciu. aKG – α -ketoglutarát; ARNT – jadrový translokátor aryl uhl'ovodíkového receptora; MAX – faktor X asociovaný s MYC; OAA – oxalacetát; Suc-CoA – sukcinyl-koenzým A (prevzaté a upravené podľa Stine et al., 2022).

Medzi najdôležitejšie funkcie lipidov odvodených od FA patrí tvorba biologických membrán, modulácia ich tekutosti a uchovávanie zásob energie v podobe TG uskladnených v lipidových telieskach (Nelson & Cox, 2017). Pomocou *de novo* lipogenézy si rakovinové bunky syntetizujú väčšie množstvo nasýtených a mononenasýtených FA, ktoré sú veľmi stabilné pri ich inkorporácii do cytoplazmatickej membrány dochádza k zníženiu jej fluidity (Chen & Wang, 2021). Tento mechanizmus je v rakovinových bunkách využívaný na ochranu pred oxidačným poškodením (peroxidáciou) reaktívnymi formami kyslíka (ROS) alebo chemoterapeutikami (napr. doxorubicin), ktoré by mohli vyvolať apoptózu (bunkovú smrť) (Rysman et al., 2010).

Zmena lipidového profilu Cer bola pravdepodobne tiež spôsobená ovplyvneným metabolizmom Cer v rakovinových bunkách. Syntéza Cer sa skladá z troch separátnych metabolických dráh – salvage, sfingomyelínová a *de novo* (Obr. 34) (Moro et al., 2018). *De novo* dráha je ovplyvnená množstvom cytoplazmatického palmitoyl-CoA, ktorý vzniká lipogenezou, a s rastúcou koncentráciou palmitoyl-CoA dochádza k zvyšovaniu syntézy Cer *de novo* (Obr. 34) (Pinton et al., 2001; Chung et al., 2017). Mnohé štúdie poukazujú na rolu Cer ako dôležitej signálnej molekuly pri apoptotickej odpovedi rakovinovej bunky na spúšťače apoptózy, akými sú tumor necrosis faktor (TNF α), hypoxia, poškodenie DNA alebo chemoterapeutiká (García-González et al., 2018). Deacyláciou ceramidu za vzniku sfingozínu, ktorého fosforyláciou vzniká sfingozín-1-fosfátu (S1P) (Obr.34), o ktorom sa predpokladá, že dokáže regulovať bunkový rast, prežitie a migráciu rakovinovej bunky cez intracelulárne ako aj receptorom sprostredkované mechanizmy (Ponnusamy et al., 2010).



Obr. 34: Metabolické dráhy ceramidov v tkanive rakoviny prsníka. Cer sú tvorené hlavnými dráhami, ako sú cesta *de novo*, salvage a sfingomyelínová. Cer môže byť fosforylovaný na ceramid-1-fosfát (C1P), rozkladaný na sfingozín a fosforylovaný na sfingozín-1-fosfát (S1P) (prevzaté a upravené podľa Moro et al., 2017).

Nedávno objaveným regulátorom lipogenézy bola serylaminoacyl tRNA syntetáza (SerRS), s klasickou funkciou viazania serínu na jeho príbuznú tRNA, pre biosyntézu proteínov (Zhao et al., 2021). Počas evolúcie SerRS u stavovcov získala unikátnu karboxylovú doménu, ktorá obsahuje jadrový lokalizačný signál (Elstrom et al., 2004). V jadre SerRS pôsobí ako transkripčný represor génov podieľajúcich sa na biosyntéze lipidov *de novo* (Xu et al., 2010). Biologický význam jadrového SerRS, pri rakovine prsníka spočíva v korelácii zvýšenej SerRS, s lepším klinickým výsledkom pacientok s rakovinou prsníka (Wise et al., 2008). Jadrová translokácia SerRS je ovplyvnená hladinou glukózy a je vplyvom na acetyláciu SerRS na zvyšku lyzínu 323 (K323) (Zhao et al., 2021). Pri experimentoch s *knock-in* myšami nesúce mutáciu SerRS, ktorého lyzín nebol acetylovaný v jednej alele génu SerRS, vykazovali – zníženú jadrovú lokalizáciu SerRS, vyššiu telesnú hmotnosť ako aj zvýšenú hmotnosť tukového tkaniva, čo potvrdzuje vplyv SerRS na reguláciu metabolizmu lipidov v rakovinových bunkách (Zhao et al., 2021).

6. ZÁVER

Táto diplomová práca bola zameraná na lipidomickú analýzu s využitím odberového systému apokrinného potu SLIDE podľa Kvasnička et al., 2021 na vzorkách pacientiek s histologicky potvrdením karcinómom prsníka. Teoretická časť sa zameriaval na charakterizáciu potných žliaz, popis zloženia a patofyziológie potu. Ďalej boli zhrnuté poznatky o lipidomike a lipidovej nomenklatúre, ako aj popis aktuálne používaných metód extrakcie a analýzy vzoriek v lipidomike a štatistické vyhodnotenie lipidomických dát. Výsledky tejto práce priniesli nižšie uvedené závery.

6.1. Cielená lipidomická analýza apokrinného potu

Úspešne bola otestovaná lipidomická analýza podľa Kvasnička et al., (2021) na klinických vzorkách apokrinného potu. Pomocou cielenej lipidomickej analýzy boli pri porovnaní lipidových profilov nájdené rozdiely medzi skupinou vzoriek pacientiek a kontrolných vzoriek zdravých subjektov. Pomocou techník štatistickej analýzy bolo vyselektovaných 19 lipidov, ktoré majú potenciál slúžiť ako biomarkery pri diagnostike rakoviny prsníka z apokrinného potu. Celkovo najväčšie zmeny boli pozorované pri triedach lipidov – TG a FA. Významné zmeny boli pozorované pri triedach lipidov SM, PC, PE, LPE. LPC, DG a Cer. Zmeny v lipidovom profile boli pravdepodobne spôsobené zmenou metabolizmu v rakovinových bunkách.

6.2. Perspektíva lipidomickej analýzy neinvazívne odobraného apokrinného potu pri skríningu rakoviny prsníka

Budúcnosť analýzy klinických vzoriek tkvie v jednoduchom, rýchlom a hlavne neinvazívom odbere vzoriek v kombinácii s rýchlymi, presnými a robustnými metódami analýzy. Cieľom tejto práce bolo aplikovať presne takúto analýzu. Jej výsledky potvrdili, že má schopnosť rozlišovať pacientov od vzoriek zdravých kontrol, ktoré reálne odrážajú zmeny v metabolizme rakovinových buniek popísaných v literatúre. Výsledný súbor 19 lipidov patriacich do skupín TG, FA, Cer, HexCer, PS, LPE a LPC, ktorých schopnosť rozlišovať skutočne pozitívnych a falošne pozitívnych sa pohybovala v rozmedzí 70% – 90%, majú potenciál stať sa biomarkermi pre rakovinu prsníka a slúžiť na skorú diagnostiku. Avšak pre zavedenie tejto metódy do skríningu rakoviny prsníka bude v budúcnosti nutná validačná štúdia s väčším počtom vzoriek a medzi väčším množstvom odberových miest.

7. LITERATÚRA

- Addepalli, R. V., & Mullangi, R. (2020). A concise review on lipidomics analysis in biological samples. *ADMET & DMPK*, 9(1), 1–22. <https://doi.org/10.5599/admet.913>
- Agnew, W. F., Yuen, T. G., & Achtyl, T. R. (1980). Ultrastructural observations suggesting apocrine secretion in the choroid plexus: a comparative study. *Neurological research*, 1(4), 313–332. <https://doi.org/10.1080/01616412.1980.11739563>
- Agrawal, K., Hassoun, L. A., Foolad, N., Pedersen, T. L., Sivamani, R. K., & Newman, J. W. (2017). Sweat lipid mediator profiling: a noninvasive approach for cutaneous research. *Journal of lipid research*, 58(1), 188–195. <https://doi.org/10.1194/jlr.M071738>
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M. (2007). *Molecular Biology of the Cell*, 5th edition Garland Science, New York.
- Asahina, M., Poudel, A., & Hirano, S. (2015). Sweating on the palm and sole: physiological and clinical relevance. *Clinical autonomic research : official journal of the Clinical Autonomic Research Society*, 25(3), 153–159. <https://doi.org/10.1007/s10286-015-0282-1>
- Asahina, M., Suzuki, A., Mori, M., Kanesaka, T., & Hattori, T. (2003). Emotional sweating response in a patient with bilateral amygdala damage. *International journal of psychophysiology : official journal of the International Organization of Psychophysiology*, 47(1), 87–93. [https://doi.org/10.1016/s0167-8760\(02\)00123-x](https://doi.org/10.1016/s0167-8760(02)00123-x)
- Aumüller, G., Wilhelm, B., & Seitz, J. (1999). Apocrine secretion--fact or artifact?. *Annals of anatomy = Anatomischer Anzeiger : official organ of the Anatomische Gesellschaft*, 181(5), 437–446. [https://doi.org/10.1016/S0940-9602\(99\)80020-X](https://doi.org/10.1016/S0940-9602(99)80020-X)
- Avela, H. F., & Sirén, H. (2020). Advances in lipidomics. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 510, 123–141. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2020.06.049>
- Baker L. B. (2019). Physiology of sweat gland function: The roles of sweating and sweat composition in human health. *Temperature (Austin, Tex.)*, 6(3), 211–259. <https://doi.org/10.1080/23328940.2019.1632145>
- Bartosch, C., Lopes, J. M., Beires, J., & Sousa, M. (2011). Human endometrium ultrastructure during the implantation window: a new perspective of the epithelium cell types. *Reproductive sciences (Thousand Oaks, Calif.)*, 18(6), 525–539. <https://doi.org/10.1177/19337191110392055>
- Barzantny, H., Brune, I., & Tauch, A. (2012). Molecular basis of human body odour formation: insights deduced from corynebacterial genome sequences. *International journal of cosmetic science*, 34(1), 2–11. <https://doi.org/10.1111/j.1468-2494.2011.00669.x>
- Beer, G. M., Baumüller, S., Zech, N., Wyss, P., Strasser, D., Varga, Z., Seifert, B., Hafner, J., & Mihic-Probst, D. (2006). Immunohistochemical differentiation and localization analysis of sweat glands in the adult human axilla. *Plastic and reconstructive surgery*, 117(6), 2043–2049. <https://doi.org/10.1097/01.prs.0000210681.90799.b1>
- Bell M. (1974). Proceedings: The ultrastructure of human axillary apocrine glands after epinephrine injection. *The Journal of investigative dermatology*, 63(1), 147–159. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12678349>
- Bian, X., Liu, R., Meng, Y., Xing, D., Xu, D., & Lu, Z. (2021). Lipid metabolism and cancer. *The Journal of experimental medicine*, 218(1), e20201606. <https://doi.org/10.1084/jem.20201606>
- Bligh, E. G., & Dyer, W. J. (1959). A RAPID METHOD OF TOTAL LIPID EXTRACTION AND PURIFICATION. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37(1), 911–917. doi:10.1139/y59-099
- Boothe, D. W., Tarbox, J. A., & Tarbox, M. B. (2017). Atopic Dermatitis: Pathophysiology. *Advances in experimental medicine and biology*, 1027, 21–37. https://doi.org/10.1007/978-3-319-64804-0_3
- Bovell, D. L., Corbett, A. D., Holmes, S., Macdonald, A., & Harker, M. (2007). The absence of apoeccrine glands in the human axilla has disease pathogenetic implications, including axillary hyperhidrosis. *The British journal of dermatology*, 156(6), 1278–1286. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2007.07917.x>

- Butt, A. J., McNeil, C. M., Musgrove, E. A., & Sutherland, R. L. (2005). Downstream targets of growth factor and oestrogen signalling and endocrine resistance: the potential roles of c-Myc, cyclin D1 and cyclin E. *Endocrine-related cancer*, 12 Suppl 1, S47–S59. <https://doi.org/10.1677/erc.1.00993>
- Cajka, T., & Fiehn, O. (2014). Comprehensive analysis of lipids in biological systems by liquid chromatography-mass spectrometry. *Trends in analytical chemistry : TRAC*, 61, 192–206. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2014.04.017>
- Caplan, Y. H., & Goldberger, B. A. (2001). Alternative specimens for workplace drug testing. *Journal of analytical toxicology*, 25(5), 396–399. <https://doi.org/10.1093/jat/25.5.396>
- Casa, D. J., Chevront, S. N., Galloway, S. D., & Shirreffs, S. M. (2019). Fluid Needs for Training, Competition, and Recovery in Track-and-Field Athletes. *International journal of sport nutrition and exercise metabolism*, 29(2), 175–180. <https://doi.org/10.1123/ijsnem.2018-0374>
- Cone E. J. (1997). New developments in biological measures of drug prevalence. *NIDA research monograph*, 167, 108–129. PMID: 9243559
- Costill D. L. (1977). Sweating: its composition and effects on body fluids. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 301, 160–174. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1977.tb38195.x>
- Cox, A. G., Tsomides, A., Yimlamai, D., Hwang, K. L., Miesfeld, J., Galli, G. G., Fowl, B. H., Fort, M., Ma, K. Y., Sullivan, M. R., Hosios, A. M., Snay, E., Yuan, M., Brown, K. K., Lien, E. C., Chhangawala, S., Steinhauser, M. L., Asara, J. M., Houvras, Y., Link, B., ... Goessling, W. (2018). Yap regulates glucose utilization and sustains nucleotide synthesis to enable organ growth. *The EMBO journal*, 37(22), e100294. <https://doi.org/10.15252/embj.2018100294>
- Cui, C. Y., & Schlessinger, D. (2015). Eccrine sweat gland development and sweat secretion. *Experimental dermatology*, 24(9), 644–650. <https://doi.org/10.1111/exd.12773>
- de la Torre, R., Farré, M., Navarro, M., Pacifici, R., Zuccaro, P., & Pichini, S. (2004). Clinical pharmacokinetics of amphetamine and related substances: monitoring in conventional and non-conventional matrices. *Clinical pharmacokinetics*, 43(3), 157–185. <https://doi.org/10.2165/00003088-200443030-00002>
- Dettmer, K., Aronov, P. A., & Hammock, B. D. (2007). Mass spectrometry-based metabolomics. *Mass spectrometry reviews*, 26(1), 51–78. <https://doi.org/10.1002/mas.20108>
- Dieterle, F., Ross, A., Schlotterbeck, G., & Senn, H. (2006). Probabilistic quotient normalization as robust method to account for dilution of complex biological mixtures. Application in ¹H NMR metabolomics. *Analytical chemistry*, 78(13), 4281–4290. <https://doi.org/10.1021/ac051632c>
- Dobson, R. L., Formisano, V., Lobitz, W. C., Jr, & Brophy, D. (1958). Some histochemical observations on the human eccrine sweat glands. III. The effect of profuse sweating. *The Journal of investigative dermatology*, 31(3), 147–159
- Doherty, J. R., Yang, C., Scott, K. E., Cameron, M. D., Fallahi, M., Li, W., Hall, M. A., Amelio, A. L., Mishra, J. K., Li, F., Tortosa, M., Genau, H. M., Rounbehler, R. J., Lu, Y., Dang, C. V., Kumar, K. G., Butler, A. A., Bannister, T. D., Hooper, A. T., Unsal-Kacmaz, K., ... Cleveland, J. L. (2014). Blocking lactate export by inhibiting the Myc target MCT1 Disables glycolysis and glutathione synthesis. *Cancer research*, 74(3), 908–920. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-2034>
- Dowhan, W., Vitrac, H., & Bogdanov, M. (2019). Lipid-Assisted Membrane Protein Folding and Topogenesis. *The protein journal*, 38(3), 274–288. <https://doi.org/10.1007/s10930-019-09826-7>
- Dutkiewicz, E. P., Lin, J. D., Tseng, T. W., Wang, Y. S., & Urban, P. L. (2014). Hydrogel micropatches for sampling and profiling skin metabolites. *Analytical chemistry*, 86(5), 2337–2344. <https://doi.org/10.1021/ac4039338>
- Elstrom, R. L., Bauer, D. E., Buzzai, M., Karnauskas, R., Harris, M. H., Plas, D. R., Zhuang, H., Cinalli, R. M., Alavi, A., Rudin, C. M., & Thompson, C. B. (2004). Akt stimulates aerobic glycolysis in cancer cells. *Cancer research*, 64(11), 3892–3899. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-03-2904>

- Engin A. (2017). Obesity-associated Breast Cancer: Analysis of risk factors. *Advances in experimental medicine and biology*, 960, 571–606. https://doi.org/10.1007/978-3-319-48382-5_25
- Engin A. B. (2017). What Is Lipotoxicity?. *Advances in experimental medicine and biology*, 960, 197–220. https://doi.org/10.1007/978-3-319-48382-5_8
- Enot, D. P., Beckmann, M., & Draper, J. (2006). On the Interpretation of High Throughput MS Based Metabolomics Fingerprints with Random Forest. *Lecture Notes in Computer Science*, 226–235. doi:10.1007/11875741_22
- Fahy, E., Cotter, D., Sud, M., & Subramaniam, S. (2011). Lipid classification, structures and tools. *Biochimica et biophysica acta*, 1811(11), 637–647. <https://doi.org/10.1016/j.bbaliip.2011.06.009>
- Fahy, E., Subramaniam, S., Brown, H. A., Glass, C. K., Merrill, A. H., Jr, Murphy, R. C., Raetz, C. R., Russell, D. W., Seyama, Y., Shaw, W., Shimizu, T., Spener, F., van Meer, G., VanNieuwenhze, M. S., White, S. H., Witztum, J. L., & Dennis, E. A. (2005). A comprehensive classification system for lipids. *Journal of lipid research*, 46(5), 839–861. <https://doi.org/10.1194/jlr.E400004-JLR200>
- Fahy, E., Subramaniam, S., Murphy, R. C., Nishijima, M., Raetz, C. R., Shimizu, T., Spener, F., van Meer, G., Wakelam, M. J., & Dennis, E. A. (2009). Update of the LIPID MAPS comprehensive classification system for lipids. *Journal of lipid research*, 50 Suppl(Suppl), S9–S14. <https://doi.org/10.1194/jlr.R800095-JLR200>
- Farkaš R. (2015). Apocrine secretion: New insights into an old phenomenon. *Biochimica et biophysica acta*, 1850(9), 1740–1750. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2015.05.003>
- Farkaš, R., Ďatková, Z., Mentelová, L., Löw, P., Beňová-Liszeková, D., Beňo, M., Sass, M., Řehulka, P., Řehulková, H., Raška, O., Kováčik, L., Šmigová, J., Raška, I., & Mechler, B. M. (2014). Apocrine secretion in *Drosophila* salivary glands: subcellular origin, dynamics, and identification of secretory proteins. *PloS one*, 9(4), e94383. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094383>
- Fellmann, N., Labbe, A., Gachon, A. M., & Coudert, J. (1985). Thermal sweat lactate in cystic fibrosis and in normal children. *European journal of applied physiology and occupational physiology*, 54(5), 511–516. <https://doi.org/10.1007/BF00422962>
- Fitzpatrick, S. B., Rosenstein, B. J., & Langbaum, T. S. (1986). Diagnosis of cystic fibrosis during adolescence. *Journal of adolescent health care : official publication of the Society for Adolescent Medicine*, 7(1), 38–43. [https://doi.org/10.1016/s0197-0070\(86\)80093-6](https://doi.org/10.1016/s0197-0070(86)80093-6)
- García-González, V., Díaz-Villanueva, J. F., Galindo-Hernández, O., Martínez-Navarro, I., Hurtado-Ureta, G., & Pérez-Arias, A. A. (2018). Ceramide Metabolism Balance, a Multifaceted Factor in Critical Steps of Breast Cancer Development. *International journal of molecular sciences*, 19(9), 2527. <https://doi.org/10.3390/ijms19092527>
- Garden J. W. (1966). Plasma and sweat histamine concentrations after heat exposure and physical exercise. *Journal of applied physiology*, 21(2), 631–635. <https://doi.org/10.1152/jappl.1966.21.2.631>
- Geilen, C. C., Wieder, T., & Orfanos, C. E. (1997). Ceramide signalling: regulatory role in cell proliferation, differentiation and apoptosis in human epidermis. *Archives of dermatological research*, 289(10), 559–566. <https://doi.org/10.1007/s004030050240>
- Gesase, A. P., & Satoh, Y. (2003). Apocrine secretory mechanism: recent findings and unresolved problems. *Histology and histopathology*, 18(2), 597–608. <https://doi.org/10.14670/HH-18.597>
- Gesase, A. P., Satoh, Y., & Ono, K. (1996). Secretagogue-induced apocrine secretion in the Harderian gland of the rat. *Cell and tissue research*, 285(3), 501–507. <https://doi.org/10.1007/s004410050666>
- Gudeman, D. M., Brightman, M. W., Merisko, E. M., & Merrill, C. R. (1989). Release from live choroid plexus of apical fragments and electrophoretic characterization of their synthetic products. *Journal of neuroscience research*, 24(2), 184–191. <https://doi.org/10.1002/jnr.490240209>

- Harker, M., Coulson, H., Fairweather, I., Taylor, D., & Daykin, C. A. (2006). Study of metabolite composition of eccrine sweat from healthy male and female human subjects by ¹H NMR spectroscopy. *Metabolomics*, 2(3), 105–112. doi:10.1007/s11306-006-0024-4
- Hashimoto, K., Gross, B. G., & Lever, W. F. (1966). Electron microscopic study of apocrine secretion. *The Journal of investigative dermatology*, 46(4), 378–390. <https://doi.org/10.1038/jid.1966.58>
- Hibbs R. G. (1962). Electron microscopy of human apocrine sweat glands. *The Journal of investigative dermatology*, 38, 77–84. <https://doi.org/10.1038/jid.1962.17>
- Hodson, M. E., Beldon, I., Power, R., Duncan, F. R., Bamber, M., & Batten, J. C. (1983). Sweat tests to diagnose cystic fibrosis in adults. *British medical journal (Clinical research ed.)*, 286(6375), 1381–1383. <https://doi.org/10.1136/bmj.286.6375.1381>
- Honour J. W. (2003). Benchtop mass spectrometry in clinical biochemistry. *Annals of clinical biochemistry*, 40(Pt 6), 628–638. <https://doi.org/10.1258/000456303770367216>
- Horner, W.E. (1846) *Special Anatomy and Histology* vol. 1. (7th edition), Lea and Blanchard Press.
- Hotelling, H. (1992). The Generalization of Student's Ratio. *Breakthroughs in Statistics*, 54–65. doi:10.1007/978-1-4612-0919-5_4
- Hu, T., & Zhang, J. L. (2018). Mass-spectrometry-based lipidomics. *Journal of separation science*, 41(1), 351–372. <https://doi.org/10.1002/jssc.201700709>
- Huang, C. T., Chen, M. L., Huang, L. L., & Mao, I. F. (2002). Uric acid and urea in human sweat. *The Chinese journal of physiology*, 45(3), 109–115. PMID: 12817713
- Hullin-Matsuda, F., Taguchi, T., Greimel, P., & Kobayashi, T. (2014). Lipid compartmentalization in the endosome system. *Seminars in cell & developmental biology*, 31, 48–56. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2014.04.010>
- Hussain, J. N., Mantri, N., & Cohen, M. M. (2017). Working Up a Good Sweat - The Challenges of Standardising Sweat Collection for Metabolomics Analysis. *The Clinical biochemist. Reviews*, 38(1), 13–34. PMID: 28798503
- Charles A. (1959). An electron microscopic study of the human axillary apocrine gland. *Journal of anatomy*, 93(2), 226–232.
- Checa, A., Bedía, C., & Jaumot, J. (2015). Lipidomic data analysis: tutorial, practical guidelines and applications. *Analytica chimica acta*, 885, 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.02.068>
- Chen, L. L., & Wang, W. J. (2021). p53 regulates lipid metabolism in cancer. *International journal of biological macromolecules*, 192, 45–54. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.09.188>
- Chen, Y. L., Kuan, W. H., & Liu, C. L. (2020). Comparative Study of the Composition of Sweat from Eccrine and Apocrine Sweat Glands during Exercise and in Heat. *International journal of environmental research and public health*, 17(10), 3377. <https://doi.org/10.3390/ijerph17103377>
- Cheng, A. S., Jin, V. X., Fan, M., Smith, L. T., Liyanarachchi, S., Yan, P. S., Leu, Y. W., Chan, M. W., Plass, C., Nephew, K. P., Davuluri, R. V., & Huang, T. H. (2006). Combinatorial analysis of transcription factor partners reveals recruitment of c-MYC to estrogen receptor-alpha responsive promoters. *Molecular cell*, 21(3), 393–404. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.12.016>
- Cheng, Y. C., Rondón, G., Anderlini, P., Khouri, I. F., Champlin, R. E., & Ueno, N. T. (2013). Paclitaxel and Trastuzumab as Maintenance Therapy in Patients with HER2-Positive Metastatic Breast Cancer Who Underwent High-Dose Chemotherapy and Autologous Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Journal of Cancer*, 4(8), 679–685. <https://doi.org/10.7150/jca.6775>
- Chua, E. C., Shui, G., Lee, I. T., Lau, P., Tan, L. C., Yeo, S. C., Lam, B. D., Bulchand, S., Summers, S. A., Puvanendran, K., Rozen, S. G., Wenk, M. R., & Gooley, J. J. (2013). Extensive diversity in circadian regulation of plasma lipids and evidence for different circadian metabolic phenotypes in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(35), 14468–14473. <https://doi.org/10.1073/pnas.1222647110>

- Chung, J. O., Koutsari, C., Blachnio-Zabielska, A. U., Hames, K. C., & Jensen, M. D. (2018). Effects of meal ingestion on intramyocellular ceramide concentrations and fractional de novo synthesis in humans. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 314(2), E105–E114. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00153.2017>
- Inaba M, Inaba, Y. (1992) *Human Body Odor*. Tokyo: Springer-Verlag.
- Ishikawa, J., Narita, H., Kondo, N., Hotta, M., Takagi, Y., Masukawa, Y., Kitahara, T., Takema, Y., Koyano, S., Yamazaki, S., & Hatamochi, A. (2010). Changes in the ceramide profile of atopic dermatitis patients. *The Journal of investigative dermatology*, 130(10), 2511–2514. <https://doi.org/10.1038/jid.2010.161>
- Ito T. (1988). Morphological connections of the human apocrine and eccrine sweat gland--occurrence of the so-called "mixed sweat glands"--a review. *Okajimas folia anatomica Japonica*, 65(5), 315–335. https://doi.org/10.2535/ofaj1936.65.5_315
- Jadoon, S., Karim, S., Akram, M. R., Kalsoom Khan, A., Zia, M. A., Siddiqi, A. R., & Murtaza, G. (2015). Recent developments in sweat analysis and its applications. *International journal of analytical chemistry*, 2015, 164974. <https://doi.org/10.1155/2015/164974>
- Janssens, M., van Smeden, J., Gooris, G. S., Bras, W., Portale, G., Caspers, P. J., Vreeken, R. J., Hankemeier, T., Kezic, S., Wolterbeek, R., Lavrijsen, A. P., & Bouwstra, J. A. (2012). Increase in short-chain ceramides correlates with an altered lipid organization and decreased barrier function in atopic eczema patients. *Journal of lipid research*, 53(12), 2755–2766. <https://doi.org/10.1194/jlr.P030338>
- Jerry, D. J., Dunphy, K. A., & Hagen, M. J. (2010). Estrogens, regulation of p53 and breast cancer risk: a balancing act. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 67(7), 1017–1023. <https://doi.org/10.1007/s00018-009-0244-7>
- Joensuu, K., Leidenius, M., Kero, M., Andersson, L. C., Horwitz, K. B., & Heikkilä, P. (2013). ER, PR, HER2, Ki-67 and CK5 in Early and Late Relapsing Breast Cancer-Reduced CK5 Expression in Metastases. *Breast cancer : basic and clinical research*, 7, 23–34. <https://doi.org/10.4137/BCBCR.S10701>
- Jurowski, K., Kochan, K., Walczak, J., Barańska, M., Piekoszewski, W., & Buszewski, B. (2017). Analytical Techniques in Lipidomics: State of the Art. *Critical reviews in analytical chemistry*, 47(5), 418–437. <https://doi.org/10.1080/10408347.2017.1310613>
- Katajamaa, M., & Oresic, M. (2005). Processing methods for differential analysis of LC/MS profile data. *BMC bioinformatics*, 6, 179. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-6-179>
- Kawabata, I., & Kurosumi, K. (1976). Transmission and scanning electron microscopy of the human ceruminous apocrine gland. II. Myoepithelial cells. *Archivum histologicum Japonicum = Nihon soshikigaku kiroku*, 39(4), 231–255. <https://doi.org/10.1679/aohc1950.39.231>
- Kim, J. W., Zeller, K. I., Wang, Y., Jegga, A. G., Aronow, B. J., O'Donnell, K. A., & Dang, C. V. (2004). Evaluation of myc E-box phylogenetic footprints in glycolytic genes by chromatin immunoprecipitation assays. *Molecular and cellular biology*, 24(13), 5923–5936. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.13.5923-5936.2004>
- Kopczynski, D., Hoffmann, N., Peng, B., Liebisch, G., Spener, F., & Ahrends, R. (2022). Goslin 2.0 Implements the Recent Lipid Shorthand Nomenclature for MS-Derived Lipid Structures. *Analytical chemistry*, 94(16), 6097–6101. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.1c05430>
- Koundouros, N., & Poulogiannis, G. (2020). Reprogramming of fatty acid metabolism in cancer. *British journal of cancer*, 122(1), 4–22. <https://doi.org/10.1038/s41416-019-0650-z>
- Kruiswijk, F., Labuschagne, C. F., & Vousden, K. H. (2015). p53 in survival, death and metabolic health: a lifeguard with a licence to kill. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 16(7), 393–405. <https://doi.org/10.1038/nrm4007>
- Kulkoyluoglu-Cotul, E., Arca, A., & Madak-Erdogan, Z. (2019). Crosstalk between Estrogen Signaling and Breast Cancer Metabolism. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, 30(1), 25–38. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2018.10.006>
- Kurosumi, K., & Kawabata, I. (1976). Transmission and scanning electron microscopy of the human ceruminous apocrine gland. I. Secretory glandular cells. *Archivum histologicum*

- Japonicum = Nihon soshikigaku kiroku, 39(4), 207–229. <https://doi.org/10.1679/aohc1950.39.207>
- Kurosumi, K., Shibasaki, S., & Ito, T. (1984). Cytology of the secretion in mammalian sweat glands. *International review of cytology*, 87, 253–329. [https://doi.org/10.1016/s0074-7696\(08\)62445-6](https://doi.org/10.1016/s0074-7696(08)62445-6)
- Kvasnička, A., Friedecký, D., Tichá, A., Hyšpler, R., Janečková, H., Brumarová, R., Najdekr, L., & Zadák, Z. (2021). SLIDE-Novel Approach to Apocrine Sweat Sampling for Lipid Profiling in Healthy Individuals. *International journal of molecular sciences*, 22(15), 8054. <https://doi.org/10.3390/ijms22158054>
- Lacroix, M., Riscal, R., Arena, G., Linares, L. K., & Le Cam, L. (2020). Metabolic functions of the tumor suppressor p53: Implications in normal physiology, metabolic disorders, and cancer. *Molecular metabolism*, 33, 2–22. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2019.10.002>
- Lawrence, C. M., & Lonsdale Eccles, A. A. (2006). Selective sweat gland removal with minimal skin excision in the treatment of axillary hyperhidrosis: a retrospective clinical and histological review of 15 patients. *The British journal of dermatology*, 155(1), 115–118. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2006.07320.x>
- Lepš, J. (2016) *Biostatistika* (1. vydanie). Jan Lepš, Petr Šmilauer - Episteme.
- Lewis, B. C., Prescott, J. E., Campbell, S. E., Shim, H., Orlowski, R. Z., & Dang, C. V. (2000). Tumor induction by the c-Myc target genes *rcl* and *lactate dehydrogenase A*. *Cancer research*, 60(21), 6178–6183. PMID: 11085542
- Liberti, M. V., & Locasale, J. W. (2016). The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells?. *Trends in biochemical sciences*, 41(3), 211–218. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2015.12.001>
- Liebesch, G., Fahy, E., Aoki, J., Dennis, E. A., Durand, T., Ejsing, C. S., Fedorova, M., Feussner, I., Griffiths, W. J., Köfeler, H., Merrill, A. H., Jr, Murphy, R. C., O'Donnell, V. B., Oskolkova, O., Subramaniam, S., Wakelam, M. J. O., & Spener, F. (2020). Update on LIPID MAPS classification, nomenclature, and shorthand notation for MS-derived lipid structures. *Journal of lipid research*, 61(12), 1539–1555. <https://doi.org/10.1194/jlr.S120001025>
- Lin, S. Y., Hsu, W. H., Lin, C. C., & Chen, C. J. (2014). Mass spectrometry-based proteomics in Chest Medicine, Gerontology, and Nephrology: subgroups omics for personalized medicine. *BioMedicine*, 4(4), 25. <https://doi.org/10.7603/s40681-014-0025-y>
- Liu, J., Zhang, C., & Feng, Z. (2014). Tumor suppressor p53 and its gain-of-function mutants in cancer. *Acta biochimica et biophysica Sinica*, 46(3), 170–179. <https://doi.org/10.1093/abbs/gmt144>
- Liu, J., Zhang, C., Hu, W., & Feng, Z. (2015). Tumor suppressor p53 and its mutants in cancer metabolism. *Cancer letters*, 356(2 Pt A), 197–203. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2013.12.025>
- Lonsdale-Eccles, A., Leonard, N., & Lawrence, C. (2003). Axillary hyperhidrosis: eccrine or apocrine?. *Clinical and experimental dermatology*, 28(1), 2–7. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2230.2003.01162.x>
- Loos, G., Van Schepdael, A., & Cabooter, D. (2016). Quantitative mass spectrometry methods for pharmaceutical analysis. *Philosophical transactions. Series A, Mathematical, physical, and engineering sciences*, 374(2079), 20150366. <https://doi.org/10.1098/rsta.2015.0366>
- Machado, J. D., Díaz-Vera, J., Domínguez, N., Alvarez, C. M., Pardo, M. R., & Borges, R. (2010). Chromogranins A and B as regulators of vesicle cargo and exocytosis. *Cellular and molecular neurobiology*, 30(8), 1181–1187. <https://doi.org/10.1007/s10571-010-9584-y>
- Malik, F., Korkaya, H., Clouthier, S. G., & Wicha, M. S. (2012). Lin28 and HER2: two stem cell regulators conspire to drive aggressive breast cancer. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 11(15), 2780–2781. <https://doi.org/10.4161/cc.21395>
- Markgraf, D. F., Al-Hasani, H., & Lehr, S. (2016). Lipidomics-Reshaping the Analysis and Perception of Type 2 Diabetes. *International journal of molecular sciences*, 17(11), 1841. <https://doi.org/10.3390/ijms17111841>
- Martínez-Reyes, I., & Chandel, N. S. (2021). Cancer metabolism: looking forward. *Nature reviews. Cancer*, 21(10), 669–680. <https://doi.org/10.1038/s41568-021-00378-6>

- Matyash, V., Liebisch, G., Kurzchalia, T. V., Shevchenko, A., & Schwudke, D. (2008). Lipid extraction by methyl-tert-butyl ether for high-throughput lipidomics. *Journal of lipid research*, 49(5), 1137–1146. <https://doi.org/10.1194/jlr.D700041-JLR200>
- McGrath K. G. (2009). Apocrine sweat gland obstruction by antiperspirants allowing transdermal absorption of cutaneous generated hormones and pheromones as a link to the observed incidence rates of breast and prostate cancer in the 20th century. *Medical hypotheses*, 72(6), 665–674. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2009.01.025>
- McLellan, T. M., Daanen, H. A., & Cheung, S. S. (2013). Encapsulated environment. *Comprehensive Physiology*, 3(3), 1363–1391. <https://doi.org/10.1002/cphy.c130002>
- Menendez, J. A., Vellon, L., Mehmi, I., Oza, B. P., Ropero, S., Colomer, R., & Lupu, R. (2004). Inhibition of fatty acid synthase (FAS) suppresses HER2/neu (erbB-2) oncogene overexpression in cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(29), 10715–10720. <https://doi.org/10.1073/pnas.0403390101>
- Meyer, F., Laitano, O., Bar-Or, O., McDougall, D., & Heigenhauser, G. J. (2007). Effect of age and gender on sweat lactate and ammonia concentrations during exercise in the heat. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas*, 40(1), 135–143. <https://doi.org/10.1590/s0100-879x2007000100017>
- Mika, A., & Sledzinski, T. (2017). Alterations of specific lipid groups in serum of obese humans: a review. *Obesity reviews : an official journal of the International Association for the Study of Obesity*, 18(2), 247–272. <https://doi.org/10.1111/obr.12475>
- Monaco M. E. (2017). Fatty acid metabolism in breast cancer subtypes. *Oncotarget*, 8(17), 29487–29500. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15494>
- Montagna, & Parakkal, P. F. (1974). *The structure and function of skin* (Third edition). Academic Press.
- Montgomery, I., Jenkinson, D. M., Elder, H. Y., Czarnecki, D., & MacKie, R. M. (1984). The effects of thermal stimulation on the ultrastructure of the human atrichial sweat gland. I. The fundus. *The British journal of dermatology*, 110(4), 385–397. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.1984.tb04652.x>
- Morales, A., & Cavicchia, J. C. (1991). Release of cytoplasmic apical protrusions from principal cells of the cat epididymis, an electron microscopic study. *Tissue & cell*, 23(4), 505–513. [https://doi.org/10.1016/0040-8166\(91\)90008-h](https://doi.org/10.1016/0040-8166(91)90008-h)
- Morley, R., & Minceva, M. (2021). Liquid-Liquid Chromatography: Current Design Approaches and Future Pathways. *Annual review of chemical and biomolecular engineering*, 12, 495–518. <https://doi.org/10.1146/annurev-chembioeng-101420-033548>
- Moro, K., Kawaguchi, T., Tsuchida, J., Gabriel, E., Qi, Q., Yan, L., Wakai, T., Takabe, K., & Nagahashi, M. (2018). Ceramide species are elevated in human breast cancer and are associated with less aggressiveness. *Oncotarget*, 9(28), 19874–19890. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.24903>
- Munger, B. L., Brusilow, S. W., & Cooke, R. E. (1961). An electron microscopic study of eccrine sweat glands in patients with cystic fibrosis of the pancreas. *The Journal of pediatrics*, 59, 497–511. [https://doi.org/10.1016/s0022-3476\(61\)80233-3](https://doi.org/10.1016/s0022-3476(61)80233-3)
- Murakami M. (2011). Lipid mediators in life science. *Experimental animals*, 60(1), 7–20. <https://doi.org/10.1538/expanim.60.7>
- Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2017). *Lehninger principles of biochemistry* (Seventh edition). W.H. Freeman.
- Noël, F., Piérard-Franchimont, C., Piérard, G. E., & Quatresooz, P. (2012). Sweaty skin, background and assessments. *International journal of dermatology*, 51(6), 647–655. <https://doi.org/10.1111/j.1365-4632.2011.05307.x>
- Nolvachai, Y., Kulsing, C., Boysen, R. I., Matyska, M. T., Pesek, J. J., Marriott, P. J., & Hearn, M. T. (2015). Comparison of the performance of different silica hydride particles for the solid-phase extraction of non-volatile analytes from dark chocolate with analysis by gas chromatography-quadrupole mass spectrometry. *Food chemistry*, 174, 434–439. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.10.083>

- Nováková, L., Douška, M. et al. (2013) *Moderní HPLC separace v teorii a praxi II* (1. vydanie). Lucie Nováková a Michal Douška – Europrint a.s..
- Osthus, R. C., Shim, H., Kim, S., Li, Q., Reddy, R., Mukherjee, M., Xu, Y., Wonsey, D., Lee, L. A., & Dang, C. V. (2000). Deregulation of glucose transporter 1 and glycolytic gene expression by c-Myc. *The Journal of biological chemistry*, 275(29), 21797–21800. <https://doi.org/10.1074/jbc.C000023200>
- Pakiet, A., Kobiela, J., Stepnowski, P., Sledzinski, T., & Mika, A. (2019). Changes in lipids composition and metabolism in colorectal cancer: a review. *Lipids in health and disease*, 18(1), 29. <https://doi.org/10.1186/s12944-019-0977-8>
- Park, J. H., Pyun, W. Y., & Park, H. W. (2020). Cancer Metabolism: Phenotype, Signaling and Therapeutic Targets. *Cells*, 9(10), 2308. <https://doi.org/10.3390/cells9102308>
- Pichini, S., Altieri, I., Zuccaro, P., & Pacifici, R. (1996). Drug monitoring in nonconventional biological fluids and matrices. *Clinical pharmacokinetics*, 30(3), 211–228. <https://doi.org/10.2165/00003088-199630030-00003>
- Pinton, P., Ferrari, D., Rapizzi, E., Di Virgilio, F., Pozzan, T., & Rizzuto, R. (2001). The Ca²⁺ concentration of the endoplasmic reticulum is a key determinant of ceramide-induced apoptosis: significance for the molecular mechanism of Bcl-2 action. *The EMBO journal*, 20(11), 2690–2701. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.11.2690>
- Piyarathna, D. W. B., Rajendiran, T. M., Putluri, V., Vantaku, V., Soni, T., von Rundstedt, F. C., Donepudi, S. R., Jin, F., Maity, S., Ambati, C. R., Dong, J., Gödde, D., Roth, S., Störkel, S., Degener, S., Michailidis, G., Lerner, S. P., Pennathur, S., Lotan, Y., Coarfa, C., ... Putluri, N. (2018). Distinct Lipidomic Landscapes Associated with Clinical Stages of Urothelial Cancer of the Bladder. *European urology focus*, 4(6), 907–915. <https://doi.org/10.1016/j.euf.2017.04.005>
- Ponnusamy, S., Meyers-Needham, M., Senkal, C. E., Saddoughi, S. A., Sentelle, D., Selvam, S. P., Salas, A., & Ogretmen, B. (2010). Sphingolipids and cancer: ceramide and sphingosine-1-phosphate in the regulation of cell death and drug resistance. *Future oncology (London, England)*, 6(10), 1603–1624. <https://doi.org/10.2217/fon.10.116>
- Porstmann, T., Santos, C. R., Griffiths, B., Cully, M., Wu, M., Leever, S., Griffiths, J. R., Chung, Y. L., & Schulze, A. (2008). SREBP activity is regulated by mTORC1 and contributes to Akt-dependent cell growth. *Cell metabolism*, 8(3), 224–236. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2008.07.007>
- Raiszadeh, M. M., Ross, M. M., Russo, P. S., Schaepper, M. A., Zhou, W., Deng, J., Ng, D., Dickson, A., Dickson, C., Strom, M., Osorio, C., Soeprono, T., Wulfkühle, J. D., Petricoin, E. F., Liotta, L. A., & Kirsch, W. M. (2012). Proteomic analysis of eccrine sweat: implications for the discovery of schizophrenia biomarker proteins. *Journal of proteome research*, 11(4), 2127–2139. <https://doi.org/10.1021/pr2007957>
- Rantamäki, A. H., Seppänen-Laakso, T., Oresic, M., Jauhiainen, M., & Holopainen, J. M. (2011). Human tear fluid lipidome: from composition to function. *PloS one*, 6(5), e19553. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019553>
- Ream, L. J., & Principato, R. (1981). Ultrastructural observations on the mechanism of secretion in the rat parathyroid after fluoride ingestion. *Cell and tissue research*, 214(3), 569–573. <https://doi.org/10.1007/BF00233496>
- Ricoult, S. J., Yecies, J. L., Ben-Sahra, I., & Manning, B. D. (2016). Oncogenic PI3K and K-Ras stimulate de novo lipid synthesis through mTORC1 and SREBP. *Oncogene*, 35(10), 1250–1260. <https://doi.org/10.1038/onc.2015.179>
- Roberts, P. J., & Der, C. J. (2007). Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene*, 26(22), 3291–3310. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210422>
- Robertshaw, D. (1983) *Apocrine sweat glands. Biochemistry and physiology of the skin.* Oxford University Press, Inc., 642–653.
- Rysman, E., Brusselmans, K., Scheys, K., Timmermans, L., Derua, R., Munck, S., Van Veldhoven, P. P., Waltregny, D., Daniëls, V. W., Machiels, J., Vanderhoydonc, F., Smans, K., Waelkens, E., Verhoeven, G., & Swinnen, J. V. (2010). De novo lipogenesis protects cancer cells from free radicals and chemotherapeutics by promoting membrane lipid

- saturation. *Cancer research*, 70(20), 8117–8126. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-3871>
- Samatar, A. A., & Poulikakos, P. I. (2014). Targeting RAS-ERK signalling in cancer: promises and challenges. *Nature reviews. Drug discovery*, 13(12), 928–942. <https://doi.org/10.1038/nrd4281>
- Sarafian, M. H., Gaudin, M., Lewis, M. R., Martin, F. P., Holmes, E., Nicholson, J. K., & Dumas, M. E. (2014). Objective set of criteria for optimization of sample preparation procedures for ultra-high throughput untargeted blood plasma lipid profiling by ultra performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Analytical chemistry*, 86(12), 5766–5774. <https://doi.org/10.1021/ac500317c>
- Sato K. (1977). The physiology, pharmacology, and biochemistry of the eccrine sweat gland. *Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology*, 79, 51–131. <https://doi.org/10.1007/BFb0037089>
- Sato, K., & Sato, F. (1983). Individual variations in structure and function of human eccrine sweat gland. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 245(2), R203–R208. doi:10.1152/ajpregu.1983.245.2.r203
- Sato, K., & Sato, F. (1987). Sweat secretion by human axillary apoeccrine sweat gland in vitro. *The American journal of physiology*, 252(1 Pt 2), R181–R187. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1987.252.1.R181>
- Sato, K., & Sato, F. (1990). Na⁺, K⁺, H⁺, Cl⁻, and Ca²⁺ concentrations in cystic fibrosis eccrine sweat in vivo and in vitro. *The Journal of laboratory and clinical medicine*, 115(4), 504–511.
- Sato, K., Kang, W. H., Saga, K., & Sato, K. T. (1989). Biology of sweat glands and their disorders. I. Normal sweat gland function. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 20(4), 537–563. [https://doi.org/10.1016/s0190-9622\(89\)70063-3](https://doi.org/10.1016/s0190-9622(89)70063-3)
- Sato, K., Kang, W. H., Saga, K., & Sato, K. T. (1989). Biology of sweat glands and their disorders. II. Disorders of sweat gland function. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 20(5 Pt 1), 713–726. [https://doi.org/10.1016/s0190-9622\(89\)70081-5](https://doi.org/10.1016/s0190-9622(89)70081-5)
- Sato, K., Leidal, R., & Sato, F. (1987). Morphology and development of an apoeccrine sweat gland in human axillae. *The American journal of physiology*, 252(1 Pt 2), R166–R180. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1987.252.1.R166>
- Sato, K., Ohtsuyama, M., & Samman, G. (1991). Eccrine sweat gland disorders. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 24(6 Pt 1), 1010–1014. [https://doi.org/10.1016/s0190-9622\(08\)80117-x](https://doi.org/10.1016/s0190-9622(08)80117-x)
- Sears, R., Leone, G., DeGregori, J., & Nevins, J. R. (1999). Ras enhances Myc protein stability. *Molecular cell*, 3(2), 169–179. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(00\)80308-1](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(00)80308-1)
- Segawa, A., Loffredo, F., Puxeddu, R., Yamashina, S., Testa Riva, F., & Riva, A. (1998). Exocytosis in human salivary glands visualized by high-resolution scanning electron microscopy. *Cell and tissue research*, 291(2), 325–336. <https://doi.org/10.1007/s004410051002>
- Semenza G. L. (2003). Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nature reviews. Cancer*, 3(10), 721–732. <https://doi.org/10.1038/nrc1187>
- Semenza G. L. (2013). HIF-1 mediates metabolic responses to intratumoral hypoxia and oncogenic mutations. *The Journal of clinical investigation*, 123(9), 3664–3671. <https://doi.org/10.1172/JCI67230>
- Shang Y. (2006). Molecular mechanisms of oestrogen and SERMs in endometrial carcinogenesis. *Nature reviews. Cancer*, 6(5), 360–368. <https://doi.org/10.1038/nrc1879>
- Shelley, W. B., & Hurley, H. J., Jr (1953). The physiology of the human axillary apocrine sweat gland. *The Journal of investigative dermatology*, 20(4), 285–297. <https://doi.org/10.1038/jid.1953.35>
- Sherwood, C. A., Eastham, A., Lee, L. W., Risler, J., Mirzaei, H., Falkner, J. A., & Martin, D. B. (2009). Rapid optimization of MRM-MS instrument parameters by subtle alteration of precursor and product m/z targets. *Journal of proteome research*, 8(7), 3746–3751. <https://doi.org/10.1021/pr801122b>

- Shetage, S. S., Traynor, M. J., Brown, M. B., Raji, M., Graham-Kalio, D., & Chilcott, R. P. (2014). Effect of ethnicity, gender and age on the amount and composition of residual skin surface components derived from sebum, sweat and epidermal lipids. *Skin research and technology : official journal of International Society for Bioengineering and the Skin (ISBS) [and] International Society for Digital Imaging of Skin (ISDIS) [and] International Society for Skin Imaging (ISSI)*, 20(1), 97–107. <https://doi.org/10.1111/srt.12091>
- Shibasaki, M., Davis, S.L. (2016) Human perspiration and cutaneous circulation. Meyer, Szygula, Z., & Wilk, B. Fluid balance, hydration, and athletic performance (First edition, 33–58). Meyer, Z. Szygula, & B. Wilk, Eds - CRC Press. <https://doi.org/10.1201/b19037>
- Shim, H., Dolde, C., Lewis, B. C., Wu, C. S., Dang, G., Jungmann, R. A., Dalla-Favera, R., & Dang, C. V. (1997). c-Myc transactivation of LDH-A: implications for tumor metabolism and growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(13), 6658–6663. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.13.6658>
- Schaumburg-Lever, G., & Lever, W. F. (1975). Secretion from human apocrine glands: an electron microscopic study. *The Journal of investigative dermatology*, 64(1), 38–41. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12540893>
- Schwarz, R., Fath el-Bab, M. R., & Peukert-Adam, I. (1988). The mode of secretion in the anterior pituitary gland of the cow and the ewe. *Anatomischer Anzeiger*, 167(3), 183–189. PMID: 3202321
- Skotland, T., Ekroos, K., Kauhanen, D., Simolin, H., Seierstad, T., Berge, V., Sandvig, K., & Llorente, A. (2017). Molecular lipid species in urinary exosomes as potential prostate cancer biomarkers. *European journal of cancer (Oxford, England: 1990)*, 70, 122–132. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2016.10.011>
- Smith, C. A., Want, E. J., O'Maille, G., Abagyan, R., & Siuzdak, G. (2006). XCMS: processing mass spectrometry data for metabolite profiling using nonlinear peak alignment, matching, and identification. *Analytical chemistry*, 78(3), 779–787. <https://doi.org/10.1021/ac051437y>
- Spengler B. (2015). Mass spectrometry imaging of biomolecular information. *Analytical chemistry*, 87(1), 64–82. <https://doi.org/10.1021/ac504543v>
- Stefaniak, A. B., & Harvey, C. J. (2006). Dissolution of materials in artificial skin surface film liquids. *Toxicology in vitro: an international journal published in association with BIBRA*, 20(8), 1265–1283. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2006.05.011>
- Stegemann, C., Pechlaner, R., Willeit, P., Langley, S. R., Mangino, M., Mayr, U., Menni, C., Moayyeri, A., Santer, P., Rungger, G., Spector, T. D., Willeit, J., Kiechl, S., & Mayr, M. (2014). Lipidomics profiling and risk of cardiovascular disease in the prospective population-based Bruneck study. *Circulation*, 129(18), 1821–1831. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.113.002500>
- Stephenson, D. J., Hoeflerlin, L. A., & Chalfant, C. E. (2017). Lipidomics in translational research and the clinical significance of lipid-based biomarkers. *Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine*, 189, 13–29. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2017.06.006>
- Stine, Z. E., Schug, Z. T., Salvino, J. M., & Dang, C. V. (2022). Targeting cancer metabolism in the era of precision oncology. *Nature reviews. Drug discovery*, 21(2), 141–162. <https://doi.org/10.1038/s41573-021-00339-6>
- Su, X., & Abumrad, N. A. (2009). Cellular fatty acid uptake: a pathway under construction. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, 20(2), 72–77. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2008.11.001>
- Swierczynski, J., Hebanowska, A., & Sledzinski, T. (2014). Role of abnormal lipid metabolism in development, progression, diagnosis and therapy of pancreatic cancer. *World journal of gastroenterology*, 20(9), 2279–2303. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i9.2279>
- Sysi-Aho, M., Katajamaa, M., Yetukuri, L., & Oresic, M. (2007). Normalization method for metabolomics data using optimal selection of multiple internal standards. *BMC bioinformatics*, 8, 93. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-8-93>
- Takemura, T., Wertz, P. W., & Sato, K. (1989). Free fatty acids and sterols in human eccrine sweat. *The British journal of dermatology*, 120(1), 43–47. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.1989.tb07764.x>

- Trygg, J., & Wold, S. (2002). Orthogonal projections to latent structures (O-PLS). *Journal of Chemometrics*, 16(3), 119–128. doi:10.1002/cem.695
- Uphoff, A., Hermansson, M., Haimi, P., & Somerharju, P. (2007). Analysis of complex lipidomes. In K. Vékey, A. Telekes, & A. Vertes (Eds.), *Medical Applications of Mass Spectrometry* (pp. 223-249). Elsevier Scientific Publ. Co.
- Urban P. L. (2016). Quantitative mass spectrometry: an overview. *Philosophical transactions. Series A, Mathematical, physical, and engineering sciences*, 374(2079), 20150382. <https://doi.org/10.1098/rsta.2015.0382>
- Vailati-Riboni, M., Palombo, V., & Loor, J. J. (2017). What Are Omics Sciences? *Periparturient Diseases of Dairy Cows, Ametaj* (First edition, 1-7), N. B. – Springer Cham 1–7. doi:10.1007/978-3-319-43033-1_1
- van Smeden, J., Janssens, M., Gooris, G. S., & Bouwstra, J. A. (2014). The important role of stratum corneum lipids for the cutaneous barrier function. *Biochimica et biophysica acta*, 1841(3), 295–313. <https://doi.org/10.1016/j.bbali.2013.11.006>
- Varghese, R. S., Zhou, B., Nezami Ranjbar, M. R., Zhao, Y., & Ransom, H. W. (2012). Ion annotation-assisted analysis of LC-MS based metabolomic experiment. *Proteome science*, 10 Suppl 1(Suppl 1), S8. <https://doi.org/10.1186/1477-5956-10-S1-S8>
- Wallis C. (1997). Diagnosing cystic fibrosis: blood, sweat, and tears. *Archives of disease in childhood*, 76(2), 85–88. <https://doi.org/10.1136/adc.76.2.85>
- Wang, C., Mayer, J. A., Mazumdar, A., Fertuck, K., Kim, H., Brown, M., & Brown, P. H. (2011). Estrogen induces c-myc gene expression via an upstream enhancer activated by the estrogen receptor and the AP-1 transcription factor. *Molecular endocrinology* (Baltimore, Md.), 25(9), 1527–1538. <https://doi.org/10.1210/me.2011-1037>
- Warrack, B. M., Hnatyshyn, S., Ott, K. H., Reily, M. D., Sanders, M., Zhang, H., & Drexler, D. M. (2009). Normalization strategies for metabolomic analysis of urine samples. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, 877(5-6), 547–552. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2009.01.007>
- Waseem, B. A., Kashif, M., & Srinivasan, H. (2022). Lipidomics: An excellent tool for chronic disease detection. *Current research in translational medicine*, 70(4), 103346. <https://doi.org/10.1016/j.retram.2022.103346>
- Weiner, J.S, Hellmann, K. (1960) The sweat glands. *Biological Reviews*, 35 (2):141–186. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.1960.tb01413.x>
- Wilke, K., Martin, A., Terstegen, L., & Biel, S. S. (2007). A short history of sweat gland biology. *International journal of cosmetic science*, 29(3), 169–179. <https://doi.org/10.1111/j.1467-2494.2007.00387.x>
- Wilke, K., Wepf, R., Keil, F. J., Wittern, K. P., Wenck, H., & Biel, S. S. (2006). Are sweat glands an alternate penetration pathway? Understanding the morphological complexity of the axillary sweat gland apparatus. *Skin pharmacology and physiology*, 19(1), 38–49. <https://doi.org/10.1159/000089142>
- Wise, D. R., DeBerardinis, R. J., Mancuso, A., Sayed, N., Zhang, X. Y., Pfeiffer, H. K., Nissim, I., Daikhin, E., Yudkoff, M., McMahon, S. B., & Thompson, C. B. (2008). Myc regulates a transcriptional program that stimulates mitochondrial glutaminolysis and leads to glutamine addiction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(48), 18782–18787. <https://doi.org/10.1073/pnas.0810199105>
- Wolrab, D., Jirásko, R., Chocholoušková, M., Peterka, O., & Holčápek, M. (2019). Oncolipidomics: Mass Spectrometric Quantitation of Lipids in Cancer Research. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. doi: 10.1016/j.trac.2019.04.012
- Worley, B., & Powers, R. (2013). Multivariate Analysis in Metabolomics. *Current Metabolomics*, 1(1), 92–107. <https://doi.org/10.2174/2213235X11301010092>
- Xia, S. H., Wang, J., & Kang, J. X. (2005). Decreased n-6/n-3 fatty acid ratio reduces the invasive potential of human lung cancer cells by downregulation of cell adhesion/invasion-related genes. *Carcinogenesis*, 26(4), 779–784. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgi019>
- Xu, J., Chen, Y., & Olopade, O. I. (2010). MYC and Breast Cancer. *Genes & cancer*, 1(6), 629–640. <https://doi.org/10.1177/1947601910378691>

- Yang, J., Altahan, A., Jones, D. T., Buffa, F. M., Bridges, E., Interiano, R. B., Qu, C., Vogt, N., Li, J. L., Baban, D., Ragoussis, J., Nicholson, R., Davidoff, A. M., & Harris, A. L. (2015). Estrogen receptor- α directly regulates the hypoxia-inducible factor 1 pathway associated with antiestrogen response in breast cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(49), 15172–15177. <https://doi.org/10.1073/pnas.1422015112>
- Ying, H., Kimmelman, A. C., Lyssiotis, C. A., Hua, S., Chu, G. C., Fletcher-Sananikone, E., Locasale, J. W., Son, J., Zhang, H., Coloff, J. L., Yan, H., Wang, W., Chen, S., Viale, A., Zheng, H., Paik, J. H., Lim, C., Guimaraes, A. R., Martin, E. S., Chang, J., ... DePinho, R. A. (2012). Oncogenic Kras maintains pancreatic tumors through regulation of anabolic glucose metabolism. *Cell*, 149(3), 656–670. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.01.058>
- Yue, X., Zhao, Y., Xu, Y., Zheng, M., Feng, Z., & Hu, W. (2017). Mutant p53 in Cancer: Accumulation, Gain-of-Function, and Therapy. *Journal of molecular biology*, 429(11), 1595–1606. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2017.03.030>
- Zhang, A., Sun, H., Wang, P., Han, Y., & Wang, X. (2012). Modern analytical techniques in metabolomics analysis. *The Analyst*, 137(2), 293–300. <https://doi.org/10.1039/c1an15605e>
- Zhang, D., Xu, X., & Ye, Q. (2021). Metabolism and immunity in breast cancer. *Frontiers of medicine*, 15(2), 178–207. <https://doi.org/10.1007/s11684-020-0793-6>
- Zhao J, Bai H, Li X, Yan J, Zou G, Wang L, Li X, Liu Z, Xiang R, Yang XL, Shi Y. Glucose-sensitive acetylation of Seryl tRNA synthetase regulates lipid synthesis in breast cancer. *Signal Transduct Target Ther*. 2021 Aug 16;6(1):303. doi: 10.1038/s41392-021-00714-0.
- Zhou, B., Xiao, J. F., Tuli, L., & Ressom, H. W. (2012). LC-MS-based metabolomics. *Molecular bioSystems*, 8(2), 470–481. <https://doi.org/10.1039/c1mb05350g>
- Züllig, T., Trötz Müller, M., & Köfeler, H. C. (2020). Lipidomics from sample preparation to data analysis: a primer. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 412(10), 2191–2209. <https://doi.org/10.1007/s00216-019-02241-y>

8. ZOZNAM POUŽITÝCH SYMBOLOV A SKRATIEK

ACC	acetylkoenzým A karboxyláza (EC 6.4.1.2)
ACCS2	acylkoenzým A syntetáza (EC 6.2.1.3)
ACLY	citrátlyáza (EC 2.3.3.8)
AD	atopická dermatitída
Akt	proteínkináza Akt (EC 2.7.11.1)
ANOVA	analýza variácií
ARNT	jadrový prenášač aryl uhlovodíkového reťazca
AUC	plocha pod krivkou
C1P	ceramid-1-fosfát
CD15	myelomonocytný marker
CD36	prenášač extracelulárnych mastných kyselín
CD44	membránový glykoproteín CD44
CE	cholesteryl ester
Cer	ceramid
CF	cystická fibróza
CFTR	transmembránový regulátor vodivosti pri cystickej fibróze
CM	cytoplazmatická membrána
c-Myc	transkripčný faktor c-Myc
DG	diacylglycerol
ELOVL	elongáza veľmi dlhých mastných kyselín (EC 2.3.1.199)
ER	endoplazmatické retikulum
ER	estrogénový receptor
ERK	proteínkináza regulovaná extracelulárnym signálom (EC 2.7.11.24)
ES	extrakčný roztok
ESI	ionizácia elektrosprejom
ETC	elektrónový transportný reťazec
FA	voľná mastná kyselina
FADS2	acyl koenzým A-6-desaturáza (EC 1.14.19.3)
FASN	syntáza mastných kyselín (EC 2.3.1.85)
FATP	transportný proteín mastných kyselín
GA	Golgiho aparát
GL	glycerolipid
GLS	glutamínsyntáza (EC 6.3.1.2)
GLUT1	glukózový transportér 1
GP	glycerofosfolipidy
Her2+	ľudský receptor epidermálneho rastového faktora
HexCer	hexosylceramid
HIF	faktory vyvolané hypoxiou
IDH	izocitrátdehydrogenáza (EC 1.1.1.42)
IPA	izopropanol
IS	vnútorný štandard
KI67	jadrový nehistónový proteín KI67
LB	Lipid Bank
LC	kvapalinová chromatografia
LC-MS	kvapalinová chromatografia spojená s hmotnostnou spektrometriou

LDA	lineárna diskriminačná analýza
LDH	laktátdehydrogenáza (EC 1.1.1.27)
LM	LIPID MAPS
LMSD	LIPID MAPS štruktúrna databáza
lnPQN	probabilistic quotient normalisation
LOESS	locally estimated scatterplot smoothing
LPC	lyzofosfatidylcholín
LPE	lyzofostatidyletanolamín
Mi	mitochondrie
M	vzdialené metastázy
<i>m/z</i>	pomer hmotnosti a veľkosti náboja
MALDI	Matrix assisted laser desorption/ionization
MAX	faktor X asociovaný s transkripčným faktorom c-Myc
MCT	monokarboxylátový prenášač
MeCN	acetonitril
MEK	mitogénom aktivovaná proteínkináza kináza (EC 2.7.12.2)
MRM	monitoring viacnásobných reakcií
MS	hmotnostná spektrometria
mTOR	cicavčia cieľová kináza rapamycínu (EC 2.7.11.1)
MUFA	mononenасыtená mastná kyselina
N	regionálne lymfatické uzliny
NdS	sfinganíny a nehydroxylované mastné kyseliny
NF	normálna fáza
NR	nerozpustný zostatok proteínu
NS	4-hydroxysfingeníny a nehydroxylované mastné kyseliny
O	oktanol
OAA	oxalacetát
OPLS-DA	ortogonálna diskriminačná analýza
p1	hodnota kovariancie
P13K	fosfatidylinozitl-3-kináza (EC 2.7.1.154)
p53	nádorový supresor
PA	kyselina fosfatidová
PC	fosfatidylcholín
PCA	analýza hlavných komponentov
PCO	plasmalogén fosfatidylcholín
PE	fosfatidyletanolamíny
PEO	plasmalogén fosfatidyletanolamín
PG	fosfatidylglycerol
PI	fosfatidylinozitol
PK	polyketid
PLS-DA	diskriminačná analýza
PQN	pravdepodobnostný kvocient
PR	prenolový lipid
PR	receptor progesterónu
PS	fosfatidylserín
PUFA	polynenasýtená mastná kyselina
Q1	prvý kvadрупól
Q3	tretí kvadрупól
QC	kontrola kvality
QqQ	trojitý kvadрупól

RAF	proteínkináza RAF (EC:2.7.11.1)
RAS	Ras proteín s GTP-ázovou aktivitou (EC 3.6.5.2)
RF	reverzná fáza
ROC	receiver operating characteristic
rt	retenčný čas
S1P	sfingozín-1-fosfát
SCD	stearoylkoenzým A desaturáza (EC 1.14.19.1)
SerRS	serylaminoacyl-tRNA syntetáza (EC 6.1.1.11)
SL	sacharolipid
SM	sfingomyelín
SP	sfingolipid
SREBF1	transkripčný faktor 1 viažuci sterolové regulačné prvky
SRM	štandardný referenčný materiál
ST	sterolové lipidy
Suc-CoA	sukcinylkoenzým A
T	veľkosť primárneho nádora
TCA	cyklus trikarboxylových kyselín
TG	triacylglycerol
TNF- α	tumor necrosis faktor α
TOF	analyzátor doby letu
VN	veľkosť nádoru
VOC	prchavé organické molekuly
W	voda

9. PRÍLOHY

Príloha 1: Zloženie zmesi štandardov SPLASH® LIPIDOMIX® Mass Spec Standard (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL, USA).

Štandard	Koncentrácia (µg/ml)	Sumárny vzorec	Presná hmotnosť	Molekulová hmotnosť
15:0-18:1(d7) PC	160	C ₄₁ H ₇₃ D ₇ NO ₈ P	752.606	753.093
15:0-18:1(d7) PE	5	C ₃₈ H ₆₇ D ₇ NO ₈ P	710.559	711.013
15:0-18:1(d7) PS	5	C ₃₉ H ₆₆ D ₇ NNaO ₁₀ P	776.531	777.004
15:0-18:1(d7) PG	30	C ₃₉ H ₆₇ D ₇ NaO ₁₀ P	763.536	764.006
15:0-18:1(d7) PI	10	C ₄₂ H ₇₅ D ₇ NO ₁₃ P	846.596	847.116
15:0-18:1-d7-PA	7	C ₃₆ H ₆₁ D ₇ NaO ₈ P	689.499	689.927
18:1(d7) LPC	25	C ₂₆ H ₄₅ D ₇ NO ₇ P	528.392	528.71
18:1(d7) LPE	5	C ₂₃ H ₃₉ D ₇ NO ₇ P	486.345	486.631
18:1-d7-cholesterol	350	C ₄₅ H ₇₁ D ₇ O ₂	657.644	658.143
18:1(d7) MG	2	C ₂₁ H ₃₃ D ₇ O ₄	363.337	363.583
15:0-18:1(d7) DG	10	C ₃₆ H ₆₁ D ₇ O ₅	587.551	587.965
15:0-18:1(d7)-15:0 TG	55	C ₅₁ H ₈₉ D ₇ O ₆	811.765	812.347
18:1(d9) SM	30	C ₄₁ H ₇₂ D ₉ N ₂ O ₆ P	737.64	738.121
Cholesterol (d7)	100	C ₂₇ H ₃₉ OD ₇	393.399	393.697

Príloha 2: Pozitívny mód merania LC-MS/MS

Lipid	Q1 (m/z)	Q3 (m/z)	rt (min)
<i>PS(15:0-18:1-d7)</i> _(HG,185)	755,556	570,547	5,49
<i>PI(15:0-18:1-d7)</i> _(HG,260)	847,604	570,547	5,37
<i>PG(15:0-18:1-d7)</i> _(HG,172)	759,588	570,547	5,57
<i>CE(18:1-d7)</i>	675,7	369,4	12,78
<i>PC(15:0/18:1-d7)</i>	753,6	184,1	6,9
<i>Cholesterol(d7)</i>	376,4	376,4	4,8
<i>TG(15:0/18:1-d7/15:0)</i>	829,8	570,5	12,38
<i>SM(d18:1/18:1-d9)</i>	738,6	184,1	6,52
<i>SM(d18:1/18:1-d9)_LCB</i>	738,6	264,3	6,52
<i>LPC(18:1-d7)</i>	529,4	184,1	1,5
<i>DG(15:0/18:1-d7)</i>	605,6	346,3	8,48
<i>PE(15:0/18:1-d7)</i>	711,6	570,5	7,1
<i>LPE(18:1-d7)</i>	487,4	346,3	1,5
<i>Cer(d18:1(d7)/15:0)</i>	531,5	271,3	6,8
<i>Cholesterol</i>	369,4	369,4	4,8
<i>CE(16:1)</i>	640,6	369,4	12,4
<i>CE(18:0)</i>	670,6	369,4	13,3
<i>CE(18:1)</i>	668,6	369,4	12,9
<i>CE(20:0)</i>	698,7	369,4	13,7
<i>CE(20:1)</i>	696,7	369,4	13,3
<i>CE(24:0)</i>	754,7	369,4	14,4
<i>CE(24:1)</i>	752,7	369,4	14
<i>Cer(32:0-2)_d18:0/14:0</i>	512,5	266,3	6,8
<i>Cer(32:2-3)_d16:1/16:1</i>	508,5	236,2	6
<i>Cer(33:0-2)_d18:0/15:0</i>	526,5	266,3	7,2
<i>Cer(33:2-1)_d16:0/17:2</i>	522,5	238,3	6,5
<i>Cer(33:2-2)_d16:1/17:1</i>	522,5	236,2	6,5
<i>Cer(33:2-3)_d18:1/15:1</i>	522,5	264,3	6,5
<i>Cer(34:0-2)_d18:0/16:0</i>	540,5	266,3	7,7
<i>Cer(34:0-3)_d20:0/14:0</i>	540,5	312,3	7,8
<i>Cer(34:1-4)_d18:1/16:0</i>	538,5	264,3	7,4
<i>Cer(34:1-5)_d18:0/16:1</i>	538,5	266,3	7,3
<i>Cer(34:2-1)_d16:0/18:2</i>	536,5	238,3	7
<i>Cer(34:2-5)_d16:1/18:1</i>	536,5	236,2	7
<i>Cer(34:2-6)_d18:1/16:1</i>	536,5	264,3	7
<i>Cer(34:3-4)_d18:2/16:1</i>	534,5	262,2	6,2
<i>Cer(35:0-2)_d18:0/17:0</i>	554,6	266,3	8,2
<i>Cer(35:2-3)_d18:1/17:1</i>	550,5	264,3	7,4
<i>Cer(36:0-2)_d18:0/18:0</i>	568,6	266,3	8,6
<i>Cer(36:0-3)_d20:0/16:0</i>	568,6	312,3	8,6
<i>Cer(36:2-4)_d16:1/20:1</i>	564,5	236,2	8
<i>Cer(36:2-5)_d18:1/18:1</i>	564,5	264,3	7,9
<i>Cer(36:2-7)_d20:1/16:1</i>	564,5	310,3	7,9
<i>Cer(36:3-1)_d18:2/18:1</i>	562,5	262,2	7,2
<i>Cer(37:0-2)_d18:0/19:0</i>	582,6	266,3	9

<i>Cer(37:0-3)_d20:0/17:0</i>	582,6	312,3	9
<i>Cer(37:2-3)_d20:1/17:1</i>	578,6	264,3	8,4
<i>Cer(38:0-2)_d18:0/20:0</i>	596,6	266,3	9,4
<i>Cer(38:0-3)_d20:0/18:0</i>	596,6	312,3	9,4
<i>Cer(38:1-1)_d16:1/22:0</i>	594,6	236,2	9,3
<i>Cer(38:1-3)_d18:1/20:0</i>	594,6	264,3	9,2
<i>Cer(38:1-4)_d18:0/20:1</i>	594,6	266,3	9
<i>Cer(38:2-4)_d16:1/22:1</i>	592,6	236,2	8,9
<i>Cer(38:2-5)_d18:1/20:1</i>	592,6	264,3	8,8
<i>Cer(38:2-7)_d20:1/18:1</i>	592,6	310,3	8,8
<i>Cer(38:6-1)_d18:1/20:5</i>	584,5	264,3	6,9
<i>Cer(39:0-3)_d20:0/19:0</i>	610,6	312,3	9,7
<i>Cer(40:0-2)_d18:0/22:0</i>	624,6	266,3	10,1
<i>Cer(40:1-1)_d16:1/24:0</i>	622,6	236,2	10,1
<i>Cer(40:2-3)_d16:1/24:1</i>	620,6	236,2	9,7
<i>Cer(40:2-4)_d18:1/22:1</i>	620,6	264,3	9,6
<i>Cer(40:3-4)_d18:1/22:2</i>	618,6	264,3	8,8
<i>Cer(41:1-1)_d16:1/25:0</i>	636,6	236,2	10,4
<i>Cer(41:1-2)_d18:1/23:0</i>	636,6	264,3	10,3
<i>Cer(42:0-2)_d18:0/24:0</i>	652,7	266,3	10,8
<i>Cer(42:1-1)_d16:1/26:0</i>	650,6	236,2	10,7
<i>Cer(42:1-2)_d16:0/26:1</i>	650,6	238,3	10,4
<i>Cer(42:1-3)_d18:1/24:0</i>	650,6	264,3	10,6
<i>Cer(42:2-3)_d18:1/24:1</i>	648,6	264,3	10,3
<i>Cer(42:5-1)_d20:0/22:5</i>	642,6	312,3	8,3
<i>Cer(43:0-1)_d18:0/25:0</i>	666,7	266,3	11,1
<i>Cer(43:1-1)_d18:1/25:0</i>	664,7	264,3	11
<i>Cer(44:0-1)_d18:0/26:0</i>	680,7	266,3	11,4
<i>Cer(44:0-2)_d20:0/24:0</i>	680,7	312,3	11,3
<i>Cer(44:1-1)_d18:1/26:0</i>	678,7	264,3	11,3
<i>Cer(44:1-4)_d20:0/24:1</i>	678,7	312,3	11,1
<i>Cer(44:2-1)_d20:1/24:1</i>	676,7	310,3	10,9
<i>Cer(44:2-2)_d18:1/26:1</i>	676,7	264,3	11
<i>Cer(44:3)_d18:2/26:1</i>	674,6	264,3	10,2
<i>Cer(45:0)_d20:0/25:0</i>	694,7	312,3	11,6
<i>Cer(46:0)_d20:0/26:0</i>	708,7	312,3	11,9
<i>Cer(46:1-1)_d20:1/26:0</i>	706,7	310,3	11,4
<i>Cer(46:2)_d20:1/26:1</i>	704,7	310,3	11,2
<i>DG(30:0-6)_DG(15:0/15:0)</i>	558,5	299,3	8
<i>DG(30:1-1)_DG(14:0/16:1)</i>	556,5	285,2	7,4
<i>DG(31:0-6)_DG(15:0/16:0)</i>	572,5	299,3	8,4
<i>DG(31:1-6)_DG(15:0/16:1)</i>	570,5	299,3	7,8
<i>DG(32:1-8)_DG(16:0/16:1)</i>	584,5	313,3	8,3
<i>DG(32:2-7)_DG(16:1/16:1)</i>	582,5	311,3	7,7
<i>DG(33:2-5)_DG(15:1/18:1)</i>	596,5	297,2	8
<i>DG(34:2-3)_DG(14:1/20:1)</i>	610,5	283,2	8,2
<i>DG(35:2-3)_DG(15:1/20:1)</i>	624,6	297,2	8,7
<i>DG(36:2-2)_DG(14:1/22:1)</i>	638,6	283,2	9,1

<i>DG(36:2-4)_DG(16:1/20:1)</i>	638,6	311,3	9,1
<i>DG(36:2-8)_DG(18:1/18:1)</i>	638,6	339,3	9,1
<i>DG(36:3-1)_DG(14:1/22:2)</i>	636,6	283,2	8,5
<i>DG(37:2-2)_DG(15:1/22:1)</i>	652,6	297,2	9,5
<i>DG(38:2-3)_DG(16:1/22:1)</i>	666,6	311,3	9,9
<i>DG(38:2-6)_DG(18:1/20:1)</i>	666,6	339,3	9,9
<i>DG(38:3-1)_DG(16:1/22:2)</i>	664,6	311,3	9,3
<i>HexCer(32:2-4)_d18:1/14:1</i>	670,5	264,3	5,4
<i>HexCer(34:1-4)_d18:1/16:0</i>	700,6	264,3	6,7
<i>HexCer(34:2-2)_d18:0/16:2</i>	698,6	266,3	6,4
<i>HexCer(34:2-5)_d18:1/16:1</i>	698,6	264,3	6,4
<i>HexCer(36:2-4)_d16:1/20:1</i>	726,6	236,2	7,5
<i>HexCer(36:2-5)_d18:1/18:1</i>	726,6	264,3	7,4
<i>HexCer(38:1-3)_d18:1/20:0</i>	756,6	264,3	8,6
<i>HexCer(38:2-5)_d18:1/20:1</i>	754,6	264,3	8,3
<i>HexCer(40:2-4)_d18:1/22:1</i>	782,7	264,3	9,1
<i>HexCer(42:4-2)_d20:1/22:3</i>	806,7	310,3	8,4
<i>LPC(16:0)</i>	496,3	184,1	1,5
<i>LPC(16:1)</i>	494,3	184,1	1,3
<i>LPC(18:0)</i>	524,4	184,1	1,9
<i>LPC(18:1)</i>	522,4	184,1	1,5
<i>LPC(18:2)</i>	520,3	184,1	1,3
<i>LPC(20:0)</i>	552,4	184,1	2,6
<i>LPC(20:1)</i>	550,4	184,1	2
<i>LPC(20:3)</i>	546,4	184,1	1,4
<i>LPC(20:4)</i>	544,3	184,1	1,3
<i>LPC(22:0)</i>	580,4	184,1	3,5
<i>LPC(24:0)</i>	608,5	184,1	4,6
<i>LPC(26:0)</i>	636,5	184,1	5,8
<i>LPE(14:1)</i>	424,2	283,2	1,3
<i>LPE(16:0)</i>	454,3	313,3	1,5
<i>LPE(18:1)</i>	480,3	339,3	1,6
<i>LPE(18:2)</i>	478,3	337,3	1,3
<i>LPE(20:1)</i>	508,3	367,3	2,1
<i>PC(32:0)</i>	734,6	184,1	7,3
<i>PC(32:1)</i>	732,6	184,1	6,6
<i>PC(33:1)</i>	746,6	184,1	7
<i>PC(34:1)</i>	760,6	184,1	7,5
<i>PC(34:2)</i>	758,6	184,1	6,7
<i>PC(34:5)</i>	752,5	184,1	4,9
<i>PC(35:1)</i>	774,6	184,1	7,9
<i>PC(35:2)</i>	772,6	184,1	7,2
<i>PC(36:1-1)</i>	788,6	184,1	8,3
<i>PC(36:2-1)</i>	786,6	184,1	7,7
<i>PC(36:3-1)</i>	784,6	184,1	6,9
<i>PC(36:4-1)</i>	782,6	184,1	6,7
<i>PC(36:4-2)</i>	782,6	184,1	6,2
<i>PC(36:8)</i>	774,5	184,1	4,5

<i>PC(38:2-1)</i>	814,6	184,1	8,4
<i>PC(38:4-1)</i>	810,6	184,1	7,2
<i>PC(40:2-1)</i>	842,7	184,1	9,1
<i>PC(40:3)</i>	840,6	184,1	8,7
<i>PC(42:2-1)</i>	870,7	184,1	9,8
<i>PC(42:3)</i>	868,7	184,1	9,3
<i>PC(O-32:0)</i>	720,6	184,1	7,8
<i>PC(O-32:1-2)</i>	718,6	184,1	7,8
<i>PC(O-34:0)</i>	748,6	184,1	8,7
<i>PC(O-34:2-2)</i>	744,6	184,1	8
<i>PC(O-38:1-1)</i>	802,7	184,1	9,5
<i>PE(34:1)</i>	718,5	577,5	7,6
<i>PE(34:2)</i>	716,5	575,5	6,9
<i>PE(35:1)</i>	732,6	591,5	8
<i>PE(36:1-1)</i>	746,6	605,6	8,5
<i>PE(36:2-1)</i>	744,6	603,5	7,8
<i>PE(36:3-1)</i>	742,5	601,5	7,1
<i>PE(38:2)</i>	772,6	631,6	8,6
<i>PE(40:7)</i>	790,5	649,5	6,7
<i>PE(O-34:2-1)_16:0p/18:1</i>	702,5	364	8,1
<i>PE(O-36:2-2)_18:0p/18:1</i>	730,6	392	9
<i>PE(O-36:3-2)_18:0p/18:2</i>	728,6	392	8,4
<i>PE(O-36:3-4)_18:1p/18:1</i>	728,6	390	8,3
<i>PE(O-36:5-1)_16:0p/20:4</i>	724,5	364	7,4
<i>PE(O-38:5-2)_18:0p/20:4</i>	752,6	392	8,3
<i>SM(28:0)</i>	621,5	184,1	3,7
<i>SM(30:0)</i>	649,5	184,1	4,7
<i>SM 30:0_SM 18:0;2/12:0</i>	649,528	266,284	4,1
<i>SM(31:1)</i>	661,5	184,1	4,8
<i>SM(32:0)</i>	677,6	184,1	5,6
<i>SM(32:1)</i>	675,5	184,1	5,3
<i>SM 32:1_SM 16:1;2/16:0</i>	675,544	236,237	5,3
<i>SM 32:1_SM 18:1;2/14:0</i>	675,544	264,269	5,3
<i>SM 33:1_SM 17:1;2/16:0</i>	689,559	250,253	5,3
<i>SM(33:0)</i>	691,6	184,1	6,1
<i>SM(33:1)</i>	689,6	184,1	5,8
<i>SM(34:0)</i>	705,6	184,1	6,6
<i>SM 34:0_SM 16:0;2/18:0</i>	705,591	238,237	6,6
<i>SM 34:0_SM 18:0;2/16:0</i>	705,591	266,284	6,6
<i>SM(34:1)</i>	703,6	184,1	6,3
<i>SM 34:1_SM 16:1;2/18:0</i>	703,575	236,237	6,3
<i>SM 34:1_SM 18:1;2/16:0</i>	703,575	264,269	6,3
<i>SM 34:1_SM 19:0;2/15:1</i>	703,575	280,3	6,3
<i>SM 34:1_SM 19:1;2/15:0</i>	703,575	278,284	6,3
<i>SM(35:0)</i>	719,6	184,1	7,2
<i>SM(36:0)</i>	733,6	184,1	7,6
<i>SM 36:0_SM 16:0;2/20:0</i>	733,6	238,237	7,6
<i>SM 36:0_SM 18:0;2/18:0</i>	733,6	266,284	7,6

<i>SM(36:1)</i>	731,6	184,1	7,3
<i>SM 36:1_SM 16:1;2/20:0</i>	731,606	236,237	7,3
<i>SM 36:1_SM 18:1;2/18:0</i>	731,606	264,269	7,3
<i>SM(36:2)</i>	729,6	184,1	6,5
<i>SM 36:2_SM 18:1;2/18:1</i>	729,591	264,269	6,5
<i>SM 36:2_SM 18:2;2/18:0</i>	729,591	262,253	6,5
<i>SM(37:0)</i>	747,6	184,1	8,1
<i>SM(38:0)</i>	761,7	184,1	8,5
<i>SM(38:1)</i>	759,6	184,1	8,3
<i>SM 38:1_SM 16:1;2/22:0</i>	759,638	236,237	8,3
<i>SM 38:1_SM 18:1;2/20:0</i>	759,638	264,269	8,3
<i>SM(39:0)</i>	775,7	184,1	8,9
<i>SM(40:0)</i>	789,7	184,1	9,4
<i>SM(41:0)</i>	789,7	184,1	10
<i>SM(41:1)</i>	801,684	184,1	9,7
<i>SM 41:1_SM 17:1;2/24:0</i>	801,684	250,253	9,7
<i>SM 41:1_SM 18:1;2/23:0</i>	801,684	264,269	9,7
<i>SM(41:2)</i>	799,7	184,1	8,7
<i>SM 41:2_SM 17:2;2/24:0</i>	799,669	248,237	8,7
<i>SM 41:2_SM 18:1;2/23:1</i>	799,669	262,253	8,7
<i>SM 41:2_SM 18:2;2/23:0</i>	799,669	262,253	8,7
<i>SM(42:1)</i>	815,7	184,1	9,9
<i>SM(42:2)</i>	813,7	184,1	9,1
<i>SM 42:2_SM 18:1;2/24:1</i>	813,684	264,269	8,27
<i>SM 42:2_SM 18:2;2/24:0</i>	813,684	262,253	8,5
<i>SM(43:2)</i>	827,7	184,1	9,5
<i>TG(42:0)_FA14:0</i>	740,7	495,4	11,6
<i>TG(43:1)_FA16:1</i>	752,7	481,4	11,5
<i>TG(44:0)_FA14:0</i>	768,7	523,5	12
<i>TG(44:1)_FA16:1</i>	766,692	495,441	11,7
<i>TG(45:0)_FA16:0</i>	782,7	509,7	12,3
<i>TG(45:1)_FA16:1</i>	780,7	509,5	11,9
<i>TG(45:2)_FA16:1</i>	778,7	507,4	11,6
<i>TG(46:0)_FA16:0</i>	796,7	523,5	12,5
<i>TG(46:1)_FA16:1</i>	794,7	523,472	12,2
<i>TG(46:2)_FA16:1</i>	792,7	521,5	11,8
<i>TG(47:0)_FA16:0</i>	810,8	537,8	12,7
<i>TG(47:1)_FA16:1</i>	808,7	537,4	12,4
<i>TG(47:2)_FA16:1</i>	806,7	535,7	12,1
<i>TG(47:3)_FA16:1</i>	804,7	533,5	11,7
<i>TG(48:0)_FA16:0</i>	824,8	551,5	12,9
<i>TG(48:1)_FA16:0</i>	822,8	549,5	12,6
<i>TG(48:2)_FA16:1</i>	820,7	549,5	12,3
<i>TG(48:3)_FA16:1</i>	818,7	547,5	12
<i>TG(49:1)_FA16:0</i>	836,8	563,5	12,8
<i>TG(49:2)_FA16:1</i>	834,8	563,5	12,5
<i>TG(49:3)_FA16:1</i>	832,7	561,5	12,2
<i>TG(50:0)_FA16:0</i>	852,8	579,5	13,2

<i>TG(50:1)_FA16:0</i>	850,8	577,5	12,9
<i>TG(50:2)_FA16:1</i>	848,8	577,5	12,7
<i>TG(50:3)_FA16:1</i>	846,8	575,5	12,4
<i>TG(50:4)_FA18:2</i>	844,7	547,5	12,1
<i>TG(51:2)_FA18:1</i>	862,8	563,5	12,8
<i>TG(52:2)_FA18:1</i>	876,8	577,5	13
<i>TG(52:3)_FA18:1</i>	874,8	575,5	12,7
<i>TG(52:4)_FA16:1</i>	872,8	601,5	12,4
<i>TG(54:2)_FA18:1</i>	904,8	605,5	13,3
<i>TG(54:3)_FA18:1</i>	902,8	603,5	13
<i>TG(54:4)_FA18:1</i>	900,8	601,5	12,7
<i>TG(54:5)_FA18:2</i>	898,8	601,5	12,3
<i>TG(54:6)_FA18:2</i>	896,8	599,5	11,9

Príloha 3: Negatívny mód merania LC-MS/MS

Názov lipidu	Q1 (m/z)	Q3 (m/z)	rt (min)
<i>15:0-18:1(d7)</i> <i>PG_SPLASH_2</i>	740,552	153	5,56
<i>15:0-18:1(d7)</i> <i>PI_SPLASH_2</i>	828,56	241	5,37
<i>15:0-18:1(d7)</i> <i>PG_SPLASH_1</i>	740,552	288,298	5,56
<i>15:0-18:1(d7)</i> <i>PI_SPLASH_1</i>	828,56	288,298	5,37
<i>15:0-18:1(d7)</i> <i>PS_SPLASH_1</i>	753,547	288,298	5,49
<i>15:0-18:1(d7)</i> <i>PS_SPLASH_2</i>	753,547	666,547	5,49
<i>15:0-18:1(d7)</i> <i>PC_SPLASH_18:1d7</i>	811,625	288,298	7
<i>15:0-18:1(d7)</i> <i>PE_SPLASH_18:1d7</i>	709,557	288,298	7
<i>FA_20:4_d8</i>	311,2	311,2	1,7
<i>FA_18:1_d9</i>	290,2	290,2	2
<i>FA 16:0</i>	255,2	255,2	1,8
<i>FA 16:1</i>	253,2	253,2	1,5
<i>FA 18:0</i>	283,3	283,3	2,3
<i>FA 18:1</i>	281,2	281,2	1,9
<i>FA 18:2</i>	279,2	279,2	1,6
<i>FA 20:1</i>	309,3	309,3	2,5
<i>FA 20:2</i>	307,3	307,3	2,1
<i>FA 20:3</i>	305,2	305,2	1,7
<i>FA 20:4</i>	303,2	303,2	1,5
<i>FA 22:0</i>	339,3	339,3	4,3
<i>FA 22:2</i>	335,3	335,3	2,7
<i>FA 22:3</i>	333,3	333,3	2,3
<i>FA 22:4</i>	331,3	331,3	1,9
<i>FA 23:0</i>	353,3	353,3	4,9
<i>FA 24:0</i>	367,4	367,4	5,5
<i>FA 24:1</i>	365,3	365,3	4,4
<i>FA 25:0</i>	381,4	381,4	6,1
<i>FA 26:0</i>	395,4	395,4	6,7
<i>PI(34:1-1)</i>	835,5	241	5,8
<i>PI(34:1)_PI(14:0/20:1)</i>	835,534	309,28	5,8
<i>PI(34:1)_PI(16:0/18:1)</i>	835,534	281,249	5,8
<i>PI(34:1)_PI(18:0/16:1)</i>	835,534	253,217	5,8
<i>PI(36:1-2)</i>	863,6	241	6,7
<i>PI(36:1)_PI(16:0/20:1)</i>	863,565	309,28	6,7
<i>PI(36:1)_PI(18:0/18:1)</i>	863,565	281,249	6,7
<i>PI(36:1)_PI(20:0/16:1)</i>	863,565	253,217	6,7
<i>PI(36:2-1)</i>	861,5	241	6
<i>PI(36:2)_PI(16:0/20:2)</i>	861,55	307,264	6
<i>PI(36:2)_PI(18:0/18:2)</i>	861,55	279,233	6
<i>PI(36:2)_PI(18:1/18:1)</i>	861,55	281,249	6
<i>PS(34:1-2)</i>	760,5	673,5	5,9

<i>PS(34:1)_PS(14:0/20:1)</i>	760,513	309,28	5,9
<i>PS(34:1)_PS(16:0/18:1)</i>	760,513	281,249	5,9
<i>PS(34:1)_PS(18:0/16:1)</i>	760,513	253,217	5,9
<i>PS(34:2-1)</i>	758,5	671,5	5,1
<i>PS(34:2)_PS(14:0/20:2)</i>	758,498	307,264	5,1
<i>PS(34:2)_PS(16:0/18:2)</i>	758,498	279,233	5,1
<i>PS(34:2)_PS(18:1/16:1)</i>	758,498	281,249	5,1
<i>PS(36:1-1)</i>	788,5	701,5	6,8
<i>PS(36:1)_PS(16:0/20:1)</i>	788,545	309,28	6,8
<i>PS(36:1)_PS(18:0/18:1)</i>	788,545	281,249	6,8
<i>PS(36:1)_PS(20:0/16:1)</i>	788,545	253,217	6,8
<i>PS(36:2-1)</i>	786,5	699,5	6,1
<i>PS(36:2)_PS(16:0/20:2)</i>	786,529	307,264	6,1
<i>PS(36:2)_PS(18:0/18:2)</i>	786,529	279,233	6,1
<i>PS(36:2)_PS(18:1/18:1)</i>	786,529	281,249	6,1
<i>PS(36:3-1)</i>	784,5	697,5	5,3
<i>PS(36:3)_PS(16:0/20:3)</i>	784,513	305,249	5,3
<i>PS(36:3)_PS(18:0/18:3)</i>	784,513	277,217	5,3
<i>PS(36:3)_PS(18:1/18:2)</i>	784,513	279,233	5,3
<i>PS(38:2-1)</i>	814,6	727,6	6,9
<i>PS(38:2)_PS(18:0/20:2)</i>	814,56	307,264	6,9
<i>PS(38:2)_PS(18:1/20:1)</i>	814,56	309,28	6,9
<i>PS(38:2)_PS(20:0/18:2)</i>	814,561	279,234	6,9
<i>PS(38:4-1)</i>	810,5	723,5	5,6
<i>PS(38:4)_PS(16:0/22:4)</i>	810,529	331,264	5,6
<i>PS(38:4)_PS(18:0/20:4)</i>	810,529	303,233	5,6
<i>PS(38:4)_PS(18:1/20:3)</i>	810,529	305,249	5,6
<i>PS(38:4)_PS(18:2/20:2)</i>	810,529	307,264	5,6
<i>PS(38:6-2)</i>	806,5	719,5	4,8
<i>PS(38:6)_PS(16:0/22:6)</i>	806,498	327,233	4,8
<i>PS(38:6)_PS(18:1/20:5)</i>	806,498	301,217	4,8
<i>PS(38:6)_PS(18:2/20:4)</i>	806,498	303,233	4,8
<i>PS(40:6-2)</i>	834,5	747,5	5,8
<i>PS(40:6)_PS(18:0/22:6)</i>	834,529	327,233	5,8
<i>PS(40:6)_PS(18:1/22:5)</i>	834,529	329,249	5,8
<i>PS(40:6)_PS(18:2/22:4)</i>	834,529	331,264	5,8
<i>PS(40:7-1)</i>	832,5	745,5	5
<i>PS(40:7)_PS(18:1/22:6)</i>	832,513	327,233	5
<i>PS(40:7)_PS(18:2/22:5)</i>	832,513	329,249	5
<i>PS(42:7)</i>	860,5	773,5	5,9
<i>PC(32:1)_PC 14:0-18:1_FA 18:1(+O)</i>	790,56	281,249	6,6
<i>PC(32:1)_PC 16:0-16:1_FA 16:1(+O)</i>	790,56	253,217	6,6
<i>PC(33:1)_PC 15:0-18:1_FA 15:0(+O)</i>	804,576	241,217	7
<i>PC(33:1)_PC 16:0-17:1_FA 17:1(+O)</i>	804,576	267,233	7
<i>PC(34:1)_PC 16:0-18:1_FA 18:1(+O)</i>	818,592	281,249	7,5
<i>PC(34:1)_PC 16:1-</i>	818,592	283,264	7,5

<i>18:0_FA 18:0(+O)</i>			
<i>PC(34:2)_PC 16:0-18:2_FA 18:2(+O)</i>	816,576	279,233	6,7
<i>PC(34:2)_PC 16:1-18:1_FA 16:1(+O)</i>	816,576	253,217	6,7
<i>PC(35:1)_PC 17:0-18:1_FA 17:0(+O)</i>	832,607	269,249	7,9
<i>PC(35:2)_PC 17:0-18:2_FA 18:2(+O)</i>	830,592	279,233	7,2
<i>PC(36:1)_PC 16:0-20:1_FA 16:0(+O)</i>	846,623	255,233	8,3
<i>PC(36:1)_PC 18:0-18:1_FA 18:1(+O)</i>	846,623	281,249	8,3
<i>PC(36:2)_PC 16:0-20:2_FA 20:2(+O)</i>	844,607	307,264	7,7
<i>PC(36:2)_PC 18:0-18:2_FA 18:2(+O)</i>	844,607	279,233	7,7
<i>PC(36:2)_PC 18:1-18:1_FA 18:1(+O)</i>	844,607	281,249	7,7
<i>PC(36:3)_PC 16:0-20:3_FA 20:3(+O)</i>	842,592	305,249	6,9
<i>PC(36:3)_PC 18:1-18:2_FA 18:2(+O)</i>	842,592	279,233	6,9
<i>PC(36:4)_PC 16:0-20:4_FA 20:4(+O)</i>	840,576	303,233	6,7
<i>PC(36:4)_PC 18:1-18:3_FA 18:3(+O)</i>	840,576	277,217	6,2
<i>PC(36:4)_PC 18:2-18:2_FA 18:2(+O)</i>	840,576	279,233	6,2
<i>PE(34:1)_PE 16:0-18:1_FA 18:1(+O)</i>	716,524	281,249	7,6
<i>PE(34:1)_PE 16:1-18:0_FA 18:0(+O)</i>	716,524	283,264	7,6
<i>PE(34:2)_PE 16:0-18:2_FA 18:2(+O)</i>	714,508	279,233	6,9
<i>PE(34:2)_PE 16:1-18:1_FA 16:1(+O)</i>	714,508	253,217	6,9
<i>PE(36:2)_PE 16:0-20:2_FA 20:2(+O)</i>	742,539	307,264	7,8
<i>PE(36:2)_PE 18:0-18:2_FA 18:2(+O)</i>	742,539	279,233	7,8
<i>PE(36:2)_PE 18:1-18:1_FA 18:1(+O)</i>	742,539	281,249	7,8
<i>PE(36:3)_PE 16:0-20:3_FA 20:3(+O)</i>	740,524	305,249	7,1
<i>PE(36:3)_PE 18:1-18:2_FA 18:2(+O)</i>	740,524	279,233	7,1
<i>PE 38:2_PE 18:1-20:1_FA 20:1(+O)</i>	770,57	309,28	8,6
<i>PE(38:2)_PE 18:0-20:2_FA 20:2(+O)</i>	770,57	307,264	8,6
<i>PE(38:2)_PE 18:2-20:0_FA 18:2(+O)</i>	770,57	279,233	8,6
