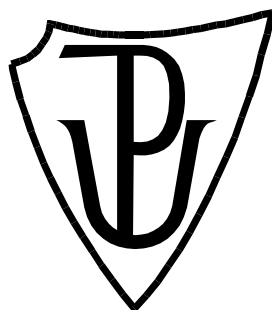


UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Metabolomická analýza krevních skvrn koní
s atypickou myopatií**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Kateřina Zuzanáková
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Radana Brumarová, Ph.D.
Rok:	2020

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

V Olomouci dne

Poděkování

Největší poděkování patří mé vedoucí Mgr. Radaně Brumarové, Ph.D. za její obrovskou trpělivost a vstřícnost, odborné vedení a za množství poskytnutých konzultací. Také bych ráda poděkovala kolektivu Laboratoře metabolomiky Ústavu molekulární a translační medicíny a Ústavu dědičných metabolických poruch v Olomouci, jmenovitě doc. RNDr. Davidu Friedeckému, Ph.D. za množství rad a cenných informací. Další poděkování patří MVDr. Petrovi Jahnovi, CSc. za poskytnutí vzorků a spolupráci na projektu.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Kateřina Zuzaňáková
Název práce	Metabolomická analýza krevních skvrn koní s atypickou myopatií
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Ústav molekulární a translační medicíny Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci, Laboratoř metabolomiky
Vedoucí práce	Mgr. Radana Brumarová, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2020

Abstrakt

Atypická myopatie (AM) je získané onemocnění pozorované u volně se pasoucích koní. Je způsobena otravou po požití nažek a semenáčků některých druhů javorů. Ty obsahují hypoglycin A (HGA) a také methylenecyklopropylglycin (MCPG), jejichž metabolity mají inhibiční vliv na jednotlivé kroky β -oxidace.

Diplomová práce se zabývá analýzou vzorků krevních skvrn koní s podezřením na AM a kontrol. Do vyhodnocení byly zahrnuty také vzorky koní se zátěžovou myopatií. Metodou FIA-MS byly změřeny koncentrace acylkarnitinů a aminokyselin. Nejvíce diskriminujícími metabolity oddělující skupiny AM a kontrol byly C6, C8 a C8:1, v případě zátěžové myopatie byly tyto acylkarnitiny jen mírně zvýšeny. Analýza HGA, MCPG a jejich metabolitů byla provedena pomocí LC-MS/MS. U vzorků koní s AM se podařilo detekovat tři ze čtyř známých metabolitů. Od některých koní s AM byly k dispozici vícenásobné odběry vzorků krevních skvrn dokládající změny v metabolickém profilu v závislosti na průběhu onemocnění.

Klíčová slova	atypická myopatie, β -oxidace mastných kyselin, FIA-MS, HPLC, hmotnostní spektrometrie, statistická analýza, acylkarnitiny, hypoglycin A, MCPG
Počet stran	80
Počet příloh	0

Jazyk

Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Bc. Kateřina Zuzaňáková
Title	Metabolomic analysis of blood spots taken from horses suffering from atypical myopathy
Type of thesis	Diploma
Department	Institute of Molecular and Translational Medicine Faculty of Medicine and Dentistry Palacky University Olomouc, Laboratory of metabolomic
Supervisor	Mgr. Radana Brumarová, Ph.D.
The year of presentation	2020

Abstract

Equine atypical myopathy (AM) is an acquired disease observed in free-grazing horses. It's caused by poisoning after digestion of seeds and seedlings of some maple species. They contain hypoglycine A (HGA) and methylencyclopropylglycine (MCPG), whose metabolites have an inhibitory effect on individual steps in β -oxidation.

In the diploma thesis, the practical part is focused on analysis of blood spots samples of horses with suspected atypical myopathy and control groups. Samples of horses with exertional myopathy were also included in evaluation. Concentrations of acylcarnitines and amino acids were measured by FIA-MS. Most discriminatory metabolites dividing groups of AM and controls were C6, C8 a C8:1, in case of exertional myopathy these metabolites were slightly increased. Analysis of HGA, MCPG and their metabolites was performed by LC-MS/MS. Three of four known metabolites were detected in samples of horses with AM. There were multiple blood samples available from horses with AM, demonstrating changes in metabolic profile depending on the course of disease.

Keywords	atypical myopathy, β -oxidation of fatty acids, FIA-MS, HPLC-MS/MS, mass spectrometry, statistical analysis, acylcarnitines, hypoglycin A, MCPG
Number of pages	80
Number of appendices	0

Language

Czech

OBSAH

1 Úvod	11
2 Současný stav řešené problematiky	12
2.1 Atypická myopatie	12
2.1.1 Příčiny onemocnění	12
2.1.1.1 Hypoglycin A.....	12
2.1.1.2 Methylencyklopropylglycin.....	14
2.1.1.3 Metabolizace HGA a MCPG	15
2.1.2 Výskyt atypické myopatie	17
2.1.3 Klinické symptomy	18
2.1.3.1 Rabdomyolýza	19
2.1.4 Biochemický profil.....	19
2.1.4.1 Podobná onemocnění.....	20
2.1.5 Posmrtné a histopatologické nálezy	21
2.1.6 Léčba	22
2.2 Patobiochemie onemocnění	24
2.2.1 Aktivace mastných kyselin a transport přes mitochondriální membránu 24	
2.2.2 Průběh β -oxidace	26
2.2.2.1 Acyl-CoA dehydrogenasa.....	27
2.2.2.2 Enoyl-CoA hydratasa.....	28
2.3 Metody	30
2.3.1 Průtoková injekční analýza	30
2.3.2 Kapalinová chromatografie	32
2.3.3 Tandemová hmotnostní spektrometrie	32
2.4 Zpracování dat	34
3 Experimentální část	36
3.1 Materiál a příprava vzorků.....	36

3.1.1	Chemikálie.....	36
3.1.2	Biologický materiál	36
3.1.3	Přístrojové vybavení.....	36
3.1.4	Příprava vzorků pro FIA-MS	36
3.1.5	Příprava vzorků pro HPLC-MS/MS.....	37
3.2	Metody	38
3.2.1	FIA-MS analýza	38
3.2.2	Analýza HPLC-MS/MS	38
3.2.3	Statistická analýza	39
4	Výsledky	40
4.1	Tvorba databáze	40
4.2	FIA-MS analýza.....	40
4.3	Analýza HPLC-MS/MS.....	57
4.4	Analýza vícenásobných odběrů	59
5	Diskuze	68
6	Závěr.....	73
7	Literatura.....	74
8	Seznam použitých symbolů a zkratk	79

Cíle práce

- Vypracování rešerše odborné literatury na dané téma (atypická myopatie, hmotnostní spektrometrie, statistická analýza).
- Tvorba interní databáze vzorků koní s podezřením na atypickou myopatii a kontrol. Příprava vzorků krevních skvrn s následnou analýzou metodami FIA-MS a HPLS-MS/MS.
- Vyhodnocení získaných dat a jejich interpretace.

1 Úvod

Předložená diplomová práce se zabývá onemocněním zvaným atypická myopatie. Jedná se o získaný syndrom koní propukající po požití nažek a semenáčku některých druhů javorů obsahujících látky hypoglycin A a methylencyklopropylglycin (Votion *et al.*, 2014; Bochnia *et al.*, 2019). Atypická myopatie je doprovázena svalovou rabdomyolýzou, třesem, ztuhlostí, chvěním, pocením a dalšími klinickými příznaky.

Hlavní toxické metabolity zmíněných látek jsou zodpovědné za inhibici FAD dependentních acyl-CoA dehydrogenas a enoyl-CoA hydratase, čímž dochází k ovlivnění metabolismu lipidů a aminokyselin s následnou akumulací meziproductů těchto drah (zejména acylkarnitinů a acylglycinů v krvi a moči).

Technika FIA-MS bývá využívána v rámci novorozeneckého screeningu pro rychlou a spolehlivou analýzu chemických látek ve vzorcích a má široké využití v klinické diagnostice, metabolomice, environmentálních vědách a toxikologii. Hlavní výhodou je možnost přímého nástřiku do proudu mobilní fáze s následným zpracováním hmotnostním spektrometrem, čímž je urychlena analýza vzorků. Naopak HPLC-MS/MS je založena na účinné separaci látek v chromatografické koloně, které jsou poté detekovány pomocí hmotnostního spektrometru.

V této práci byly zmíněné techniky využity pro analýzu vzorků krevních skvrn koní s podezřením na atypickou myopatii a kontrolních skupin. Stanoven byl celkový metabolický profil acylkarnitinů a aminokyselin, látek hypoglycinu A a methylencyklopropylglycinu a jejich metabolitů.

2 Současný stav řešené problematiky

2.1 Atypická myopatie

Atypická myopatie (AM), známá také jako sezónní pastevní myopatie, je potenciálně fatální onemocnění pozorované u volně se pasoucích koní převážně na podzim a na jaře. Jedná se o získané svalové onemocnění, jehož příčinou je otrava hypoglycinem A (HGA) a také methylenecyklopropylglycinem (MCPG; Bochnia *et al.*, 2019), ke které dochází po požití nažek a semenáčků některých druhů javorů (Votion *et al.*, 2014). AM je doprovázena rozsáhlou rbdomyolýzou vedoucí ke svalové slabosti, ztuhlosti, třesu a myoglobinurii. Uvádí se, že nejméně 75 % případů vede ke smrti koně do 72 hodin po nástupu prvních příznaků (Votion *et al.*, 2008; Sponseller *et al.*, 2012).

2.1.1 Příčiny onemocnění

AM lze charakterizovat jako získanou mnohočetnou deficienci flavinadenin dinukleotid (FAD) – dependentních acyl-CoA dehydrogenas, které se účastní metabolismu lipidů a aminokyselin (AMK) (Westermann *et al.*, 2008). Příčina AM však nebyla dlouhou dobu známá. Za možný toxický zdroj byla považována houba *Rhytisma acerinum*, způsobující černou skvrnitost listů javorů (van der Kolk *et al.*, 2010), a bakterie *Clostridium sordelii*. Tato bakterie se řadí mezi gram-pozitivní sporulující bakterie a působí jako letální toxin u lidí i zvířat (Unger-Torroledo *et al.*, 2010). V roce 2013 byla objasněna příčina AM díky identifikaci metabolitů HGA v biologickém materiálu postižených koní (Valberg *et al.*, 2013).

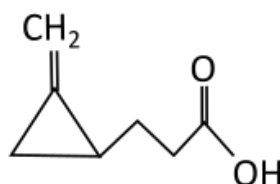
2.1.1.1 Hypoglycin A

HGA (α -amino- β -[2-methylenecyklopropyl] propionová kyselina) (Obr. 1) je přirozeně se vyskytující neproteinogenní aminokyselina, která je přítomna u některých druhů javorů (*Acer pseudoplatanus*, *Acer negundo*) (Valberg *et al.*, 2013). Nachází se převážně v nažkách, jež dozrávají a opadávají na podzim, v semenáčcích klíčících na jaře a v malém množství také v listech, přičemž u semenáčků byl zjištěn dvakrát vyšší obsah HGA ve srovnání s nažkami. Listy obsahují velmi malé množství HGA (do 0,01 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$; Baise *et al.*, 2015; Unger *et al.*, 2014). Koncentrace HGA v nažkách je vysoce variabilní jak mezi stromy na stejné pastvině, tak mezi pastvinami (Unger *et al.*, 2014). Hodnoty se nejčastěji pohybují v rozmezí 3–160 $\mu\text{g}/\text{semeno}$ (Valberg *et al.*, 2013). Byly

však zjištěny koncentrace dosahující až 820 $\mu\text{g}/\text{semeno}$ (Unger *et al.*, 2014). HGA se vyskytuje také v nezralém ovoci rostlin rodu *Sapindaceae* (Isenberg *et al.*, 2016).

HGA byl detekován v krvi a moči koní s klinickými příznaky AM i u koní bez příznaků, kteří se však pásli na stejných pastvinách. Hodnoty jsou v séru velmi proměnlivé. Ve článku Baise *et al.* (2015) je uvedena průměrná koncentrace HGA u koní, kteří přežili, $4,5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. U koní, kteří uhynuli nebo u nich byla provedena eutanázie zjistili průměrné hodnoty $6 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a u koní vyskytujících se na stejné pastvině, avšak bez příznaků AM, se naměřily hodnoty v průměru $0,43 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Také Bochnia *et al.* (2015) uvádí vysokou variabilitu v koncentracích HGA v tělesných tekutinách koní s AM. V séru byla zjištěna nejvyšší hodnota $58,72 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, tato koncentrace však následující dny rychle klesala. U koní ze stejných pastvin bez projevů AM se hodnoty pohybovaly v rozmezí $0,326\text{--}11,12 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Dále byly v séru a moči detekovány metabolity HGA methylencyklopropylacetyl-karnitin (MCPA-karnitin) a MCPA-glycin (Valberg *et al.*, 2013). Hodnoty koncentrací MCPA-karnitinu v séru se pohybovaly v rozmezí $166\text{--}652 \text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ a koncentrace MCPA-glycinu v moči byly $0,28\text{--}1,97 \mu\text{mol}\cdot\text{mmol}^{-1}$ kreatininu (Bochnia *et al.*, 2015).

Metabolit HGA ireverzibilně inhibuje acyl-CoA dehydrogenasy pro krátký (EC 1.3.8.1.) a střední (EC 1.3.8.7.) řetězec potřebné pro odbourávání (β -oxidaci) mastných kyselin (MK). Dále dochází k inhibici karnitin-acyl-CoA transferasy (EC 2.3.1.21.), která se účastní transportu MK s dlouhým řetězcem do mitochondrií (Valberg *et al.*, 2013), k narušení metabolismu AMK (inhibice isovaleryl-, methylbutyryl-, glutaryl-CoA dehydrogenas) a k inhibici glukoneogeneze (Westermann *et al.*, 2008).



Obr. 1 Strukturní vzorec hypoglycinu A.

2.1.1.2 Methylenklopropylglycin

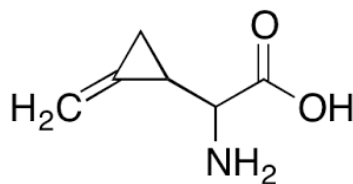
Ve studii Bochnia *et al.* (2019) byla kromě HGA popsána další látka, která se může účastnit rozvoje AM. Jedná se o MCPG (Obr. 2), který je strukturním analogem HGA, a stejně jako HGA byla jeho přítomnost potvrzena u rostlin rodu *Sapindaceae*, mezi které se řadí také javor (*Acer*). V séru koní postižených AM byly nalezeny velmi variabilní koncentrace MCPG (3,4–1623 nmol·l⁻¹), které však byly nižší než hodnoty HGA (1184–16 294 nmol·l⁻¹). Současně byla v séru zjištěna vysoká koncentrace metabolitů MCPG methylenklopropylformyl-glycinu (MCPF-glycinu) a MCPF-karnitinu. Hodnoty jednotlivých měřených parametrů se od sebe vzájemně lišily o jeden až dva řády. Nebyla však pozorována žádná korelace mezi MCPG a konjugáty MCPF-glycinu a MCPF-karnitinu (Bochnia *et al.*, 2019).

Pro člověka může být HGA a MCPG také nebezpečné. Tyto látky se vyskytují u ovoce rodu *Sapindaceae* (Barceloux, 2009) a po požití nezralých plodů, případně jejich velkého množství, dochází k otravě (Sander *et al.*, 2017). Mezi ovoce *Sapindaceae* se řadí mimo jiné ackee, liči, mamoncillo a longan (Bochnia *et al.*, 2019).

U lidí byly v moči a také v séru po otravě po požití některých plodů detekovány metabolity HGA a MCPG (Sander *et al.*, 2017). V minulosti byly popsány otravy po požití nezralého ovoce ackee, které může mít za následek metabolický syndrom známý jako „Jamaican vomiting sickness“, který byl poprvé zaznamenán a zkoumán v roce 1976 (Tanaka *et al.*, 1976). Ackee je tropické ovoce, které roste na vysokých stálezelených jamajských stromech *Blighia sapida*. Plody jsou oranžové až červené barvy a pod slupkou obsahují narůžovělou až žlutou rosolovitou jedlou část obklopující velká černá semena. Ve slupce, semenech a nedozrálé dužině je obsažen jedovatý HGA a MCPG. Dozríváním ackee hladiny toxinů klesají na hladinu umožňující bezpečnou konzumaci (Barceloux, 2009; Grunes *et al.*, 2012). Nezralé ackee je vysoce toxické, ke konzumaci velmi nebezpečné a u člověka způsobuje těžké nevolnosti, závratě, pocení a hypoglykémii. Byly zaznamenány případy vedoucí až ke smrti (Katibi *et al.*, 2015; Sanford *et al.*, 2018).

Jsou také známy případy otravy po nadměrné konzumaci liči (plod *Litchi chinensis*). Především v Indii jsou popsány případy akutních neurologických problémů, převážně u dětí, žijících v oblastech s rozsáhlým pěstováním stromů s plody liči (Shrivastava *et al.*, 2015). Podvyživené děti často konzumují na lačno velké množství liči, čímž dochází

k hypoglykémii pod kritickou mez, vedoucí k následnému poškození mozku, akutní encefalitidě (zánětu mozku) popřípadě ke smrti (Shrivastava *et al.*, 2017).



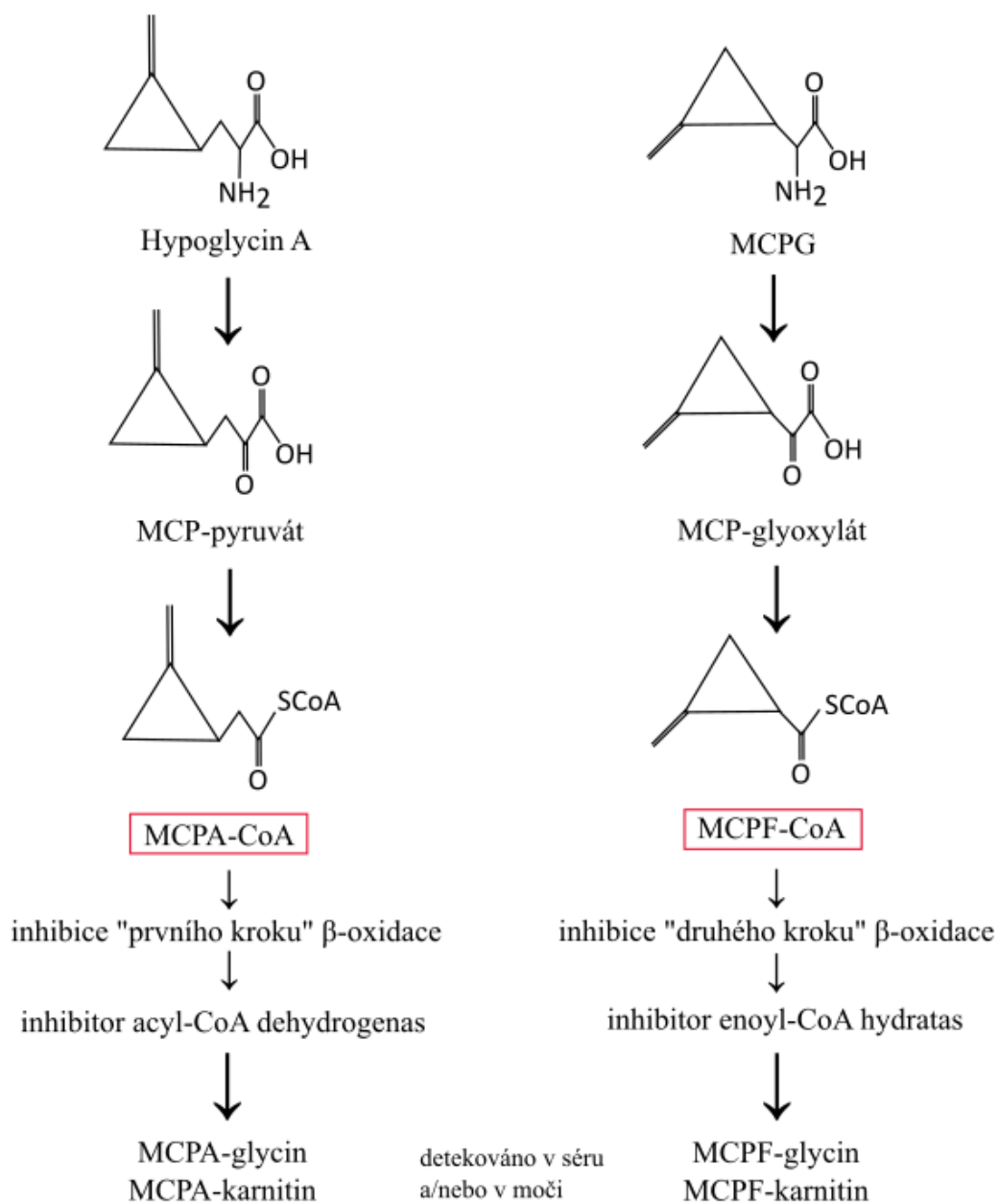
Obr. 2 Strukturální vzorec methylenicyklopropylglycinu.

2.1.1.3 Metabolizace HGA a MCPG

HGA není sám o sobě toxický. Jedná se o protoxin, který je v játrech metabolizován na toxické produkty (Von *et al.*, 1964). Nejprve je aminotransferasou v cytosolu přeměněn na MCP-pyruvát. Ten vstupuje do mitochondrie a je dále dekarboxylován a konjugován s koenzymem A (CoA) za vzniku metabolitu MCPA-CoA (Obr. 3) zodpovědného za inhibici FAD dependentních acyl-CoA dehydrogenas. FAD kofaktor se spojuje s alfa uhlíkem MCPA-CoA a vytváří nevratný komplex deaktivující acyl-CoA dehydrogenasy (Wenz *et al.*, 1981; Hine *et al.*, 1984; Lai *et al.* 1993, Westermann *et al.*, 2016).

Inhibicí mitochondriálních enzymů využívajících kofaktor FAD dochází k ovlivnění metabolismu lipidů, AMK a cholinu s následnou intracelulární akumulací specifických metabolitů (Westermann *et al.*, 2008). MCPA-CoA dále ovlivňuje aktivitu isovaleryl-CoA dehydrogenasy a 2-methyl-acyl-CoA dehydrogenasy pro větvené řetězce (Bochnia *et al.*, 2019). Nahromaděné acyl-CoA jsou poté navázány na karnitin a ve formě acylkarnitinů se akumulují v krvi a moči (Sander *et al.*, 2016).

MCPG je v prvním kroku metabolizován v cytosolu za účasti aminotransferasy na MCP-glyoxylát, který se dostává do mitochondrie, kde se dále dekarboxyluje a konjuguje s CoA (analogicky s HGA) za vzniku hlavní toxické formy MCPF-CoA (Obr. 3). MCPF-CoA inhibuje druhý krok β -oxidace, blokuje enoyl-CoA hydratasy zodpovědnou za reverzibilní hydrataci 2-*trans*-enoyl-CoA thioesterů na odpovídající hydroxyacylové sloučeniny (Bochnia *et al.*, 2019).



Obr. 3 Metabolizace HGA a MCPG (upraveno podle Melde *et al.*, 1991; Bochnia *et al.*, 2019).

2.1.2 Výskyt atypické myopatie

Onemocnění s klinickými symptomy AM bylo poprvé pozorováno u volně se pasoucích koní v roce 1939 v severním Walesu ve Velké Británii (Bowen *et al.*, 1942). V roce 1995 došlo k jednomu z hlavních propuknutí v Německu, což vedlo ke zvýšení povědomí o onemocnění na celém světě, a to z důvodu úhynu 111 koní, kteří vykazovali klinické příznaky rabdomyolýzy (Brandt *et al.*, 1997). Existuje řada publikací popisujících výskyt AM v různých evropských zemích. V současnosti byla nemoc prokázána v Belgii, Dánsku, Francii, Německu, Irsku, Velké Británii, Lotyšsku, Lucembursku, Španělsku, Švýcarsku, Nizozemí, Rakousku, Itálii, Norsku a Švédsku (Palencia *et al.*, 2007; Votion *et al.*, 2007b; van Galen *et al.*, 2012; McKenzie *et al.*, 2016). Dále došlo k propuknutí AM v Austrálii, Kanadě, USA (Cassart *et al.*, 2007; Finno *et al.*, 2006) a nejnověji také v České republice (Karlíková *et al.*, 2016).

AM může ovlivnit jednotlivce nebo více koní ve stejné skupině. Všichni koně jsou potenciálně citliví na AM, přesto u mladých koní a koní nad 20 let bylo pozorováno, že jsou vystaveni většímu riziku. Prevalence u mladých koní nebyla dosud zcela vysvětlena, ale pravděpodobně je způsobena tím, že koně do tří let tráví více času na pastvinách a potřebují vyšší energetický příjem (Bochnia *et al.*, 2015). Propuknutí AM je vysoce variabilní a sezónní, často nastává po období vlhkého a větrného nebo chladného počasí. Většina případů se vyskytuje na podzim, kdy jsou nažky přítomny na pastvině, nebo na jaře, kdy dochází ke klíčení semen a růstu semenáčků (van Galen *et al.*, 2010, 2012). Propuknutí onemocnění na jaře je méně časté než na podzim, ale přesto představuje 4–12 % ze všech pozorovaných případů ročně (van Galen *et al.*, 2012; Gonzalez *et al.*, 2017).

Onemocnění nejčastěji propuká u koní, kteří se pasou na pastvinách se stromy javoru klen, s nahromaděným opadaným listím, mrtvým dřevem a často v mokřích oblastech (Witkowska-Piłaszewicz *et al.*, 2019). Důležitou roli při otravě koní má pravděpodobně také stupeň zralosti a množství požitých semen. K vážné otravě může postačit jen několik semen obsahujících vyšší koncentrace HGA (Valberg *et al.*, 2013; Bochnia *et al.*, 2015). Rozdílný výskyt AM může být tedy způsoben individuální citlivostí daného koně a náhodnými rozdíly v příjmu HGA, MCPG a doprovodných látek (Bochnia *et al.*, 2019). V České republice byl zaznamenán také případ výskytu klinických příznaků AM u novorozeného hříběte. Hříbě se narodilo klisně, která prodělala atak AM v šestém měsíci gravidity. V době narození hříběte však byla bez příznaků onemocnění. Hříbě po

šesti hodinách od narození začalo projevovat první pohybové potíže. Krevní rozbor ukázal velmi vysoké hodnoty svalových enzymů CK a aspartátaminotransferasy. Ve vzorku odebraném 16 hodin před eutanázií hříběte byly nalezeny zvýšené koncentrace acylkarnitinů, a také byla detekována přítomnost MCPA-karnitinu $0,01 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ potvrzující diagnosu AM (Karlíková *et al.*, 2017).

2.1.3 Klinické symptomy

AM bývá zaměňována za koliku. Je charakterizována subakutními nebo akutními obecnými příznaky, které se objevují během prvních 12 až 24 hodin po otravě (Votion *et al.*, 2007b). Z počátku je pozorována zrychlená dechová i tepová frekvence, apatie, letargie, kolika, svalová ztuhlost a třes. Objevuje se také zvýšené pocení a svalová slabost. Během několika hodin se postižení koně nemohou postavit na více než pár minut, chuť k jídlu zůstává nezměněná nebo je narozdíl od koliky zvýšená. V terminální fázi je pozorována celková ztráta chuti k jídlu (Palencia *et al.*, 2007; Votion *et al.*, 2007b). U zvířat se často vyvinou respirační potíže, dochází k zúžení dýchacích cest a většina poté umírá nebo je uspána do 72 hodin po nástupu příznaků (Palencia *et al.*, 2007).

Během klinického vyšetření jsou zaznamenány překrvené sliznice (stávají se tmavě červené) a podchlazení (pod $36,5 \text{ }^\circ\text{C}$) (Brandt *et al.*, 1997; Palencia *et al.*, 2007), existují však zprávy o normálních nebo dokonce hypertermických koních s AM (van Galen *et al.*, 2012). Zpočátku onemocnění se nemění srdeční frekvence, ale s rozvojem poškození svalů se stává nepravidelná a akcelerovaná z důvodu kardiomyocytového poškození. Jsou pozorovány srdeční šelesty a zvýšená rychlost dýchání (Witkowska-Piłaszewicz *et al.*, 2019).

Důležitým projevem je přítomnost myoglobinu v moči jako následku těžké rabdomyolýzy, způsobující tmavou barvu moči (myoglobinurie). Nepřítomnost myoglobinurie však nevylučuje AM. Záleží na okamžiku vyšetření koně podle nástupu klinických příznaků a závažnosti rabdomyolýzy.

Mezi méně časté příznaky patří ikterus, hemoragická diatéza, otoky hlavy, bezvědomí, mírný průjem, dislokace tlustého střeva, výhřez penisu, perirenální bolest, ptóza (pokles horního víčka) a trismus (křeč žvýkacích svalů) (Brandt *et al.*, 1997; Votion *et al.*, 2007a).

2.1.3.1 Rabdomyolýza

Rabdomyolýza je způsobena narušením mitochondriálního metabolismu, zejména v buňkách kosterní a srdeční svaloviny. Jedná se o syndrom zahrnující rozpad kosterního svalstva, svalových buněk (myocytů), který způsobuje únik myoglobinu a dalších intracelulárních proteinů a elektrolytů do krevního oběhu (Criddle, 2003; Khan, 2009).

Rabdomyolýza se u koní rozlišuje na rabdomyolýzu vyvolanou zátěží, a naopak bez zátěžovou. Zátěží způsobená rabdomyolýza je obvykle vyvolána nadměrným pohybem a fyzickou námahou koní a postihuje nejčastěji svaly zadních končetin. Bez zátěžová bývá spojována nejen s AM, ale také s dalšími typy myopatií (toxickou, infekční apod.) (Keen, 2011). Pravděpodobná příčina rabdomyolýzy spojovaná s AM spočívá v narušení homeostázy sodíku a vápníku ve svalové buňce (Huerta-Alardin *et al.*, 2005). Vlivem inhibice odbourávání MK může docházet k omezení funkce sodno-draselné pumpy, Ca^{2+} ATPasy a sodno-vápenatého výměníku (Warren *et al.*, 2002; Huerta-Alardin *et al.*, 2005). Akumulace meziproductů β -oxidace potenciálně vede ke zvýšenému úniku iontů a konečná efektorová cesta způsobuje nárůst volného cytosolického Ca^{2+} , který následně zahajuje kaskádu účinků vedoucích ke zvýšení permeability buněk a ke kapilárnímu úniku (Houten *et al.*, 2010).

Nejcitlivějším indikátorem poškození myocytů jsou extrémně vysoké hodnoty kreatinkinasy (CK, EC 2.7.3.2) v krvi. CK nemá toxické účinky a tato změna hodnot je pouhým ukazatelem zvýšené propustnosti svalových membrán (Gronert, 2001). Dále jsou přítomny výrazně vysoké hodnoty myoglobinu (Criddle, 2003). Myoglobin je molekula přenášející kyslík a dodávající kyslík myocytům. Rozpad svalových vláken vede k myoglobinurii (Cheney, 1994), projevující se tmavě červeným zbarvením moči (Dayer-Berenson, 1994). Myoglobin je nefrotoxický a u koní s AM tedy může dojít k akutnímu renálnímu selhání (Haskins, 1998).

2.1.4 Biochemický profil

Při hematologickém vyšetření je pozorován zvýšený hematokrit (poměr mezi objemem červených krvinek a plné krve – PCV). U koní, kteří uhynuli, byla hodnota PCV výrazně vyšší než u koní, kteří přežili (Votion *et al.*, 2007b; van Galen *et al.*, 2012). Také může být přítomen nárůst celkového počtu bílých krvinek obvykle způsobený neutrofilii (zmnožení počtu neutrofilních granulocytů) (Žuraw *et al.*, 2016).

V souvislosti s narušením β -oxidace MK a metabolismu AMK s rozvětveným řetězcem dochází k akumulaci odpovídajících metabolitů před enzymatickým blokem. Tato akumulace vede k charakteristickým abnormálním biochemickým profilům krve a moči postižených koní. Profil organických kyselin v moči mívá neobvykle zvýšené hladiny kyseliny ethylmalonové, 2-methylsukcinové, adipové a laktátu. Dále je v moči pozorován nárůst acylovaných karnitinů (C2–C8; C8:1, C10:1, C10:2) a konjugátů s glycinem, zejména butyrylglycinu, isovalerylglycinu a hexanoylglycinu. V krvi jsou nalezeny zvýšené hodnoty acylkarnitinů s krátkým a středním řetězcem (C2–C5, C6–C12, C8:1, C10:1, C10:2, C5DC, C14) a také volného karnitinu (Westermann *et al.*, 2008; Valberg *et al.*, 2013).

V biochemických analýzách koní s AM je běžně identifikována zvýšená aktivita enzymů aspartátaminotransferasy (AST, EC 2.6.1.1.), laktátdehydrogenasy (1.1.1.27.) a CK (Westermann *et al.*, 2008). Hladina CK stoupá v souvislosti s nástupem klinických příznaků na hodnoty $> 10\,000\text{ IU}\cdot\text{l}^{-1}$ ($166,67\ \mu\text{kat}\cdot\text{l}^{-1}$) a často dosahuje až $> 100\,000\text{ IU}\cdot\text{l}^{-1}$ ($1666,67\ \mu\text{kat}\cdot\text{l}^{-1}$; Votion *et al.*, 2007b). Nicméně vyšší aktivita CK nemůže být prognostickým faktorem, protože při měření krátce po nástupu prvních klinických příznaků může být pouze mírně zvýšena a hodnoty narůstají s rozvojem onemocnění (van Galen *et al.*, 2012).

2.1.4.1 Podobná onemocnění

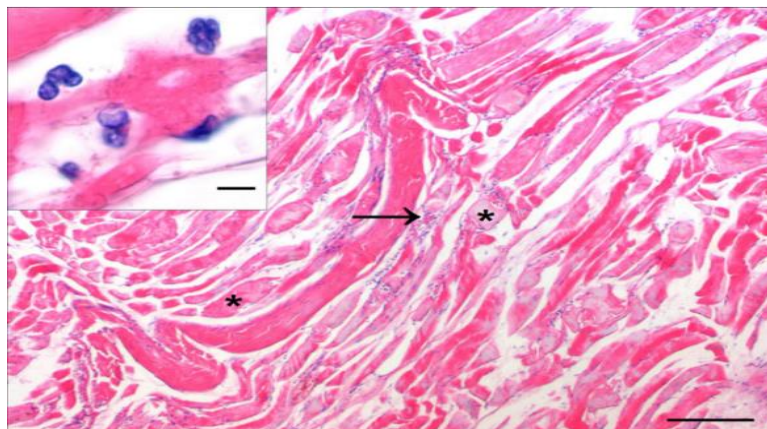
Podobný metabolický profil (akumulace acylkarnitinů v krvi a organických kyselin v moči) je pozorován také u lidí s mnohočetným deficitem acyl-CoA dehydrogenas pro středně dlouhé řetězce (MADD – „Medium chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency“), známým jako glutarová acidémie/acidurie typu II (OMIM: 231680) (Westermann *et al.*, 2008). Jedná se o dědičnou autosomálně recesivní metabolickou poruchu způsobenou mutacemi s následným deficitem v elektronovém transportním flavoproteinovém (ETF) systému, který hraje důležitou roli v mitochondriálním respiračním řetězci (Amendt a Rhead, 1986, Westermann *et al.*, 2008). Systém ETF slouží jako akceptor elektronů pro několik mitochondriálních FAD dependentních dehydrogenas, které jsou nezbytné pro β -oxidaci MK a metabolismus rozvětvených AMK, glutarátu a cholinu (Watmough a Frerman, 2010). U koní s AM však bylo zjištěno, že aktivita systému ETF je uvnitř referenčního rozmezí, avšak aktivita primárních enzymů, tj. FAD dehydrogenas je snížena (Westermann *et al.*, 2007, 2008).

2.1.5 Posmrtné a histopatologické nálezy

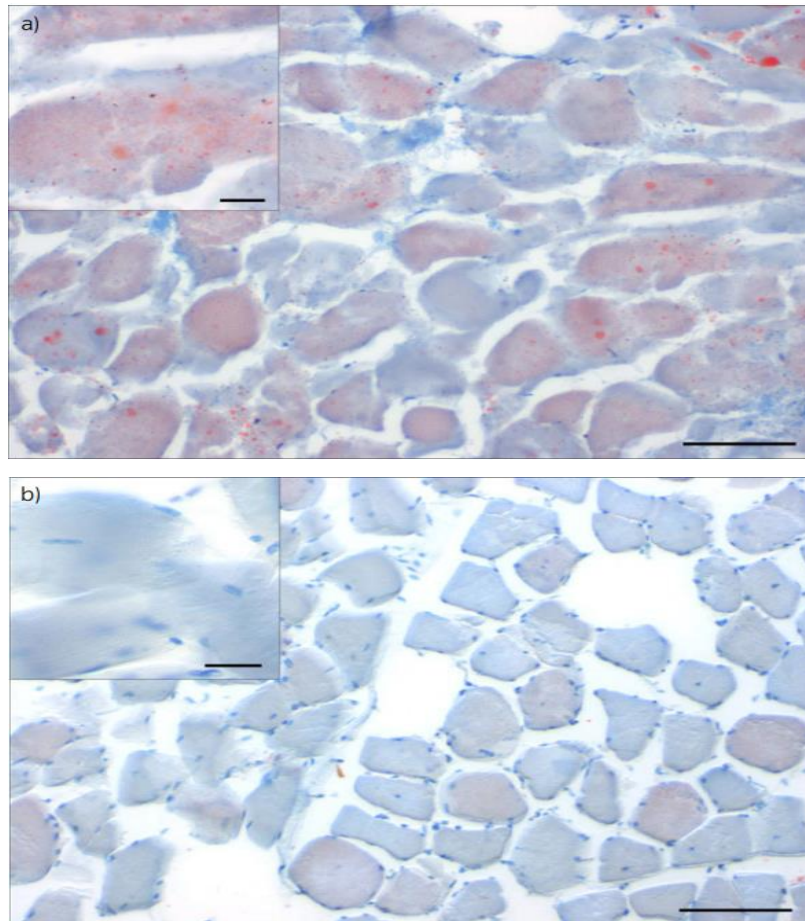
Míra úmrtnosti v důsledku AM se pohybuje mezi 75–85 % (Puyalto-Moussu *et al.*, 2004; Votion *et al.*, 2014). Přežití závisí především na rychlé diagnóze onemocnění a okamžitém zahájení léčby (viz. kapitola Léčba).

Při postmortálním vyšetření je močový měchýř naplněn tmavě hnědou močí (Cassart *et al.*, 2007). V žaludku lze pozorovat fragmenty javorových semen. Plíce, slezina a játra bývají silně překrvené (Žuraw *et al.*, 2016). Makroskopicky jsou viditelná nekrotická ložiska jako bledé oblasti zejména v posturálním a respiračním svalstvu, případně v myokardu. Na druhé straně existují zprávy o tom, že v kosterním ani srdečním svalstvu nebyly pozorovány žádné makroskopické změny (Puyalto-Moussu *et al.*, 2004, Votion *et al.*, 2004). Morfologická vyšetření koní s AM prokázala také akutní a degenerativní proces v důsledku intracelulární akumulace lipidů ve svalových vláknech.

Při histopatologickém vyšetření je pozorován myodegenerativní proces svalových vláken typu I. Tato tzv. „pomalá“ červená vlákna jsou charakteristická aerobním metabolismem (obsahují vysoký podíl mitochondrií a myoglobinu) doprovázeným β -oxidací. Svalová vlákna vykazují fragmentaci, otoky, ztrátu příčných pruhů a objevuje se hyalín (Cassart *et al.*, 2007; Palencia *et al.*, 2007). Další vyšetření mezižeberních, trapézových a deltových svalů prokázalo závažnou rabdomyolýzu spojenou s minimální neutrofilní infiltrací (Obr. 4) a byly odhaleny rozsáhlé jemné rozptýlené mezibuněčné lipidové kapénky v postižených kosterních svalech, čímž byla prokázána akumulace lipidů (Obr. 5) (Žuraw *et al.*, 2016).



Obr. 4 Deltový sval: těžká, akutní, multifokální rabdomyolýza (hvězdička) a minimální neutrofilní infiltrace (šipka). Při větším zvětšení několik neutrofilních granulocytů kolem poškozených svalových vláken (převzato ze Žuraw *et al.*, 2016).



Obr. 5 a) Trapézové svaly: multifokální lipidové kapénky v pruhovaných svalových vláknech b) Trapézové svaly: kontrolní vzorek svalstva od zdravého koně (převzato ze Żuraw *et al.*, 2016).

2.1.6 Léčba

Koně s AM vyžadují podpůrnou a ošetrovatelskou péči. Je nutné co nejdříve odvést koně z pastvin a umístit je do stáje s hlubokou podestýlkou, aby se zabránilo podchlazení a dalšímu volnému pohybu (Witkowska-Piłaszewicz *et al.*, 2019).

V současnosti neexistuje specifická léčba pro AM a terapie je pouze symptomatická. První a nejdůležitější fází terapie je podávání infuzí pro obnovení acidobazické a elektrolytické rovnováhy. Podání glukosy v dávce $1\text{--}4\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ intravenózně zvyšuje šance zvířete na uzdravení (Votion *et al.*, 2007b). V závislosti na stavu se doporučuje zavést protizánětlivé léky, v případě nutnosti také analgetika. Nejčastěji jsou používána nesteroidní protizánětlivá léčiva, ale musí být používána s ohledem na možnost současného poškození ledvin. Výskyt svalových křečí je spíše vzácný, ale byla

pozorována svalová ztuhlost a fascikulace (samovolné svalové záškuby). Podání svalových relaxantů může koním přinést úlevu, ale zároveň je třeba myslet na přítomnost svalové slabosti (Witkowska-Piłaszewicz *et al.*, 2019). Dále podpůrná léčba zahrnuje podávání vitamínů a antioxidantů (vitamin B, C, E a selen). Koně, kteří dostávali podpůrnou léčbu, vykazovali vyšší míru přežití než skupina koní bez jakýchkoliv doplňků stravy (van Galen *et al.*, 2012).

2.2 Patobiochemie onemocnění

V těle slouží lipidy mimo jiné jako zdroj energie. Odbourávání MK v podobě β -oxidace probíhá v mitochondriích, které jsou důležité také pro další metabolické děje. Mitochondrie obsahují zejména enzymy citrátového cyklu, respiračního řetězce a ATP synthasy a v rámci metabolismu lipidů zde probíhá také produkce ketolátek (Murray *et al.*, 2000).

Proces β -oxidace MK je klíčovou metabolickou cestou pro energetickou homeostázu v játrech, srdci a kosterním svalstvu. Během hladovění, kdy je omezeno zásobování glukosou, může většina tkání, kromě mozku, využít k výrobě energie přímo MK z krevního řečiště. Játra dále přeměňují MK na ketolátky, které jsou dalším zdrojem energie využívaným všemi tkáněmi, včetně mozku.

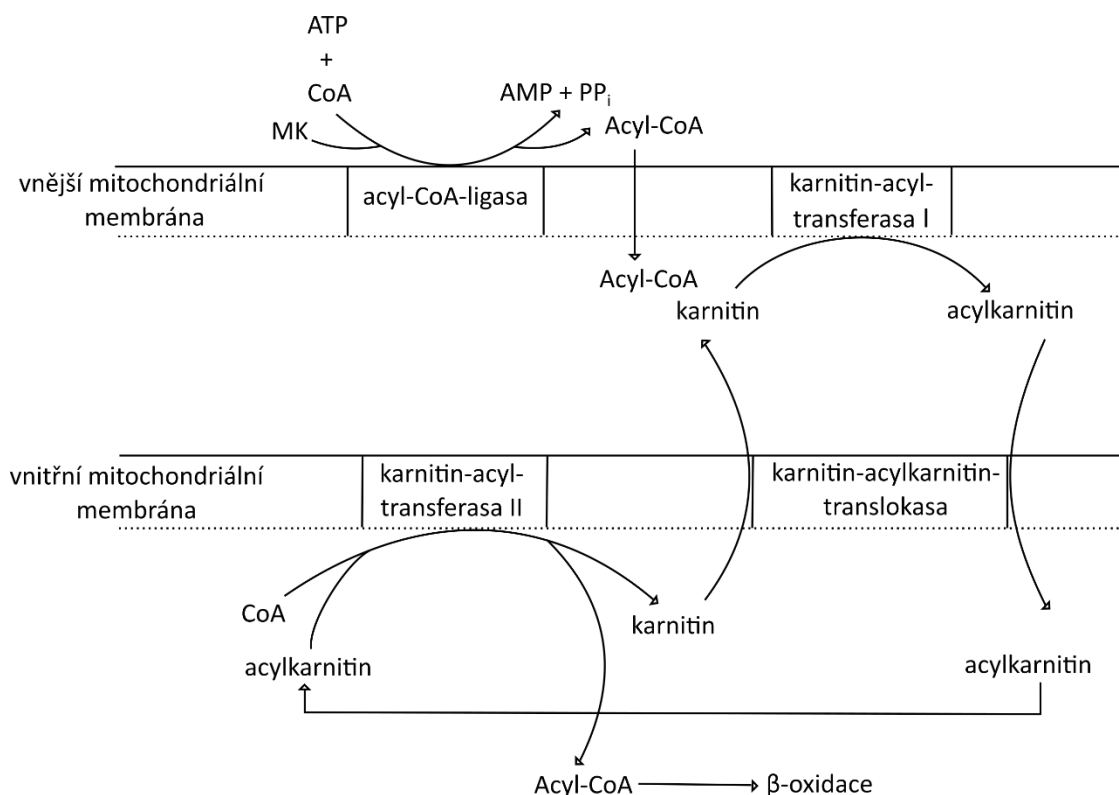
Kromě mitochondrií probíhá oxidace MK také v peroxisomech. V nich jsou nejprve MK s dlouhým a velmi dlouhým řetězcem zkráceny a následně přeneseny do mitochondrií. Existují také specializované minoritní dráhy oxidace MK. Jedná se o α -oxidaci, tj. odštěpování jednouhlíkatých fragmentů z karboxylového konce molekuly a ω -oxidaci, při které je methylová skupina převedena na $-\text{CH}_2\text{OH}$ a následně oxidována na karboxylovou skupinu (Murray *et al.*, 2000).

2.2.1 Aktivace mastných kyselin a transport přes mitochondriální membránu

Reaktivita volných mastných kyselin je nízká, a proto vstupují do metabolických dějů až po aktivaci navázáním na CoA (Kodíček *et al.*, 2018). MK s krátkým a středně dlouhým řetězcem vstupují do matrix volně a následně jsou aktivovány acyl-CoA ligasou (EC 6.2.1.2) na acyl-CoA (Matouš *et al.*, 2010). Aktivace MK s délkou řetězce C12–C18 probíhá již v cytosolu na vnější mitochondriální membráně pomocí ATP dependentních acyl-CoA ligas (EC 6.2.1.3.). Na karboxylovou skupinu MK se naváže ATP a vzniká meziprodukt acyladenylát, který je poté přenesen na SH skupinu CoA za vzniku acyl-CoA. Acyl-CoA je substrátem pro β -oxidaci nebo triglyceridovou biosyntézu (Gerhard *et al.*, 2012).

Vnitřní mitochondriální membrána není propustná pro acyl-CoA s délkou řetězce C12–C18, a k importu je proto využíván acyl-CoA karnitinový transportní systém. Prvního kroku tohoto systému se účastní enzym karnitinacyltransferasa I (CPT I, EC 2.3.1.21.), který katalyzuje proces konjugace acyl-CoA s karnitinem za vzniku acylkarnitinu a uvolnění CoA. Následně karnitin-acylkarnitintranslokasa (CACT, EC

2.3.1.26.) přenáší acylkarnitin dovnitř mitochondrie přes tzv. karnitinový cyklus za současného transportu volné molekuly karnitinu ven. Jakmile acylkarnitin vstoupí do mitochondrie, účastní se dalšího kroku karnitinacyltansferasa II (CPT2, EC 2.3.1.21.) lokalizovaná na vnitřní straně vnitřní mitochondriální membrány, která přenáší acylovou skupinu z acylkarnitinu na CoA. Vzniklý acyl-CoA je dále zpracován v β -oxidaci. Proces vstupu MK do mitochondrie je popsán na obr. 6 (van der Leij *et al.*, 2000; Ramsay *et al.*, 2001; Matouš *et al.*, 2010).



Obr. 6 Úloha karnitinu při transportu mastných kyselin do mitochondrie (upraveno podle Matouš *et al.*, 2010).

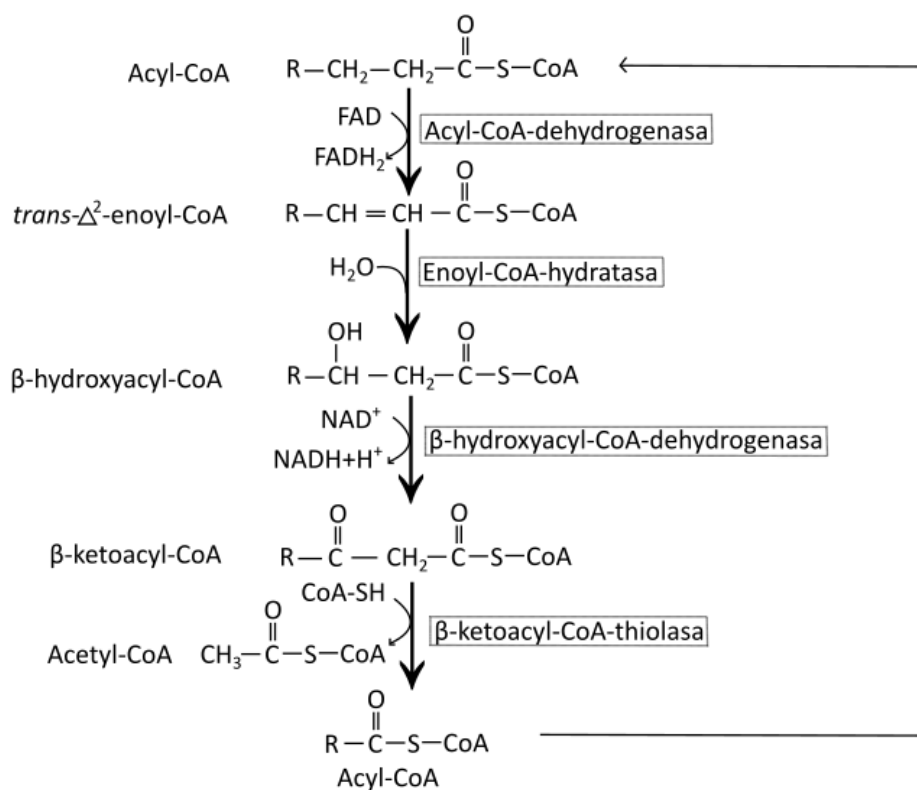
2.2.2 Průběh β -oxidace

β -oxidace je cyklický proces (Obr. 7) probíhající uvnitř mitochondrií, ve kterém jsou acyl-CoA prostřednictvím čtyř enzymových reakcí zkráceny. Po ukončení každého cyklu jsou dva uhlíkové atomy na karboxylovém konci uvolňovány ve formě acetyl-CoA (Kodíček *et al.*, 2018).

V prvním kroku se acyl-CoA dehydrogenuje acyl-CoA dehydrogenasou (EC 1.3.1.8.) za vzniku *trans*-2-enoyl-CoA s dvojnou vazbou mezi 2. (α) a 3. (β) uhlíkem v pozici *trans*. Kofaktorem acyl-CoA dehydrogenasy je flavoprotein obsahující prostetickou skupinu FAD, která přenáší vodíkové atomy za vzniku FADH₂. Ve druhém kroku dochází k hydrataci katalyzované *trans*-2-enoyl-CoA hydratase (EC 4.2.1.17). Nastává adice molekuly vody na dvojnou vazbu enoyl-CoA za vzniku L-3-hydroxyacyl-CoA. Ve třetím kroku je výsledný L-3-hydroxyacyl-CoA přeměněn na 3-keto-acyl-CoA. Za účasti koenzymu NAD⁺ se -OH skupina na 3. (β) uhlíku dehydrogenuje na karbonylovou pomocí β -hydroxyacyl-CoA dehydrogenasy (EC 1.1.1.35). Konečné thiolitické štěpení 3-keto-acyl-CoA produkuje acyl-CoA zkrácený o dva uhlíkové řetězce a acetyl-CoA.

Každý cyklus poskytuje acyl-CoA zkrácený o dva atomy uhlíku, acetyl-CoA, jeden nikotinamidadenindinukleotid (NADH) a jeden FADH₂ jako nosiče elektronů (nebo redukující ekvivalenty). Výsledný acyl-CoA vstupuje do dalšího cyklu β -oxidace. Acetyl-CoA může vstoupit do citrátového cyklu, kde je zoxidován a elektrony jsou dodány do elektronového transportního řetězce (Matouš *et al.*, 2010; Gerhard *et al.*, 2012).

Dále bude tato diplomová práce zaměřena na enzymy, u kterých dochází k ovlivnění funkce v průběhu onemocnění AM.

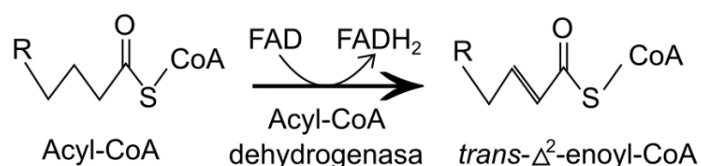


Obr. 7 Průběh β-oxidace (upraveno podle Matouš *et al.*, 2010; Murray *et al.*, 2000).

2.2.2.1 Acyl-CoA dehydrogenasa

Enzymy acyl-CoA dehydrogenasy (ACAD) katalyzují α , β -dehydrogenaci esterů acyl-CoA v katabolismu MK a AMK. Jedná se o mitochondriální flavoenzymy využívající FAD jako kofaktor a účastníci se vždy prvního kroku cyklu β-oxidace za vzniku *trans*-enoyl-CoA (Obr. 8).

První a rychlost určující krok desaturace acyl-CoA esterů je katalyzován enzymy ze dvou proteinových rodin, ACAD a acyl-CoA oxidas (ACOX) (Swigoňová, *et al.*, 2009). V mitochondriích dochází nejprve k pevné vazbě ACAD na prostetickou skupinu FAD a k přenosu elektronů z odpovídajících CoA esterových substrátů na ETF (Sander *et al.*, 2010). ETF přenáší elektrony na ETF dehydrogenasu, která je propojena s elektronovým transportním řetězcem přes komplex III (Swigoňová *et al.*, 2009).



Obr. 8 Reakce katalyzovaná acyl-CoA dehydrogenasou (upraveno podle en.wikipedia.org).

Lidský genom kóduje jedenáct skupin enzymů ACAD s různou substrátovou specifitou a s různými profily tkáňové exprese. Pět z těchto enzymů se účastní β -oxidace MK (Swigoňová *et al.*, 2009). Podle specifity k rozdílné délce řetězce je rozlišována acyl-CoA dehydrogenasa pro krátký (SCAD), střední (MCAD), dlouhý (LCAD, EC 1.3.8.8.) a velmi dlouhý (VLCAD, EC 1.3.8.9.) řetězec. SCAD pro délku řetězce C2–C4 a MCAD pro C4–C12 se vyskytují v matrix mitochondrií (Matouš *et al.*, 2010). LCAD je také přítomna v mitochondriální matrix a má širokou substrátovou specifitu (C8–C22). Bylo prokázáno, že LCAD katalyzuje také degradaci acyl-CoA s rozvětveným řetězcem a určitých mononasycených a polynasycených acyl-CoA. VLCAD je specifický pro řetězce C22–C24 a bývá spojován s membránou mitochondrií (Wanders *et al.*, 1999; Le *et al.*, 2000; Chegary *et al.*, 2009).

Na katabolismu AMK se podílejí čtyři další členové ACAD: isovaleryl-CoA dehydrogenasa (IVD, EC 1.3.8.4.) pro leucin, acyl-CoA dehydrogenasa s krátkým/rozvětveným řetězcem (SBCAD, EC 1.3.8.5.) pro isoleucin, isobutyryl-CoA dehydrogenasa (IBD, EC 1.3.8.-) pro valin a glutaryl-CoA dehydrogenasa (GCD, EC 1.3.8.6.) pro lysin a tryptofan (Swigoňová *et al.*, 2009).

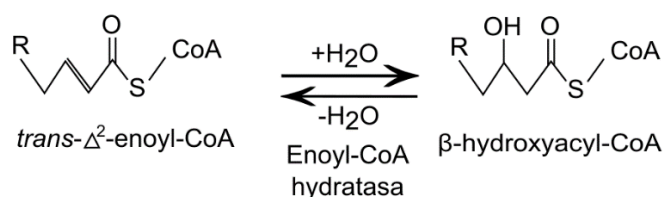
2.2.2.2 Enoyl-CoA hydratasa

Enzym enoyl-CoA hydratasa (ECH) známá také jako krotonasa katalyzuje druhý krok β -oxidace MK. Usnadňuje adici molekuly vody přes dvojnou vazbu mezi druhým a třetím atomem uhlíku thioesteru *trans*-enoyl-CoA, což vede k tvorbě thioesteru β -hydroxyacyl-CoA (Obr. 9) (Allenbach *et al.*, 2000).

Jedná se o hexamerický protein s 6 - ti aktivními místy. V průběhu reakce dochází k přidání hydroxylové skupiny a protonu na nenasycený *trans*-enoyl-CoA. Enzym poskytuje dva glutamové zbytky jako katalytickou kyselinu a bázi. Tyto dvě AMK udržují vodu na místě, což umožňuje *syn* adici vody na α , β -nenasycený acyl-CoA na β -

uhlíku, a α -uhlík poté zachytí další proton, který dokončí tvorbu β -hydroxyacyl-CoA (Bahnson *et al.*, 2002).

V rámci specifity se rozlišuje enoyl-CoA hydratasa pro krátké řetězce (ECH1, EC 4.2.1.17) katalyzující přeměnu MK s krátkým a středním řetězcem. Je lokalizována v mitochondriích a aktivní jako monofunkční mitochondriální enzym (Wu *et al.*, 2008). ECH1 má vysokou substrátovou afinitu také pro krotonyl-CoA (Fong *et al.*, 1977) a vykazuje mírnou aktivitu při degradaci methakrylyl-CoA (valinová dráha), 3-methylcrotonylyl-CoA (leucinová dráha) a tiglyl-CoA (isoleucinová dráha) (Ferdinandusse *et al.*, 2015; Yamada *et al.*, 2015). Dále se rozlišuje enoyl-CoA hydratasa pro dlouhé řetězce (LCEH, EC 4.2.1.74), která je součástí tzv. mitochondriálního trifunkčního proteinu a katalyzuje oxidaci MK s dlouhým řetězcem (Wu *et al.*, 2008). Na peroxisomální β -oxidaci se podílí enoyl-CoA hydratasa ECH2 (EC 4.2.1.119) vázána na peroxisomy a integrována do multifunkčního komplexu peroxisomálních enzymů (Wu *et al.*, 2008).



Obr. 9 Reakce katalyzovaná enoyl-CoA hydratasa (upraveno podle Bahnson *et al.*, 2002).

2.3 Metody

Metabolomika je interdisciplinární obor zahrnující komplexní kvantitativní a kvalitativní profilování metabolitů pomocí různých analytických přístupů. Metabolity mají rozdílné fyzikálně-chemické vlastnosti a koncentrační rozsah, a mohou být analyzovány pomocí hmotnostní spektrometrie (MS), která bývá často ve spojení s kapalinovou chromatografií (LC-MS) nebo plynovou chromatografií (GC-MS). Další možností je spojení MS s kapilární elektroforézou, nebo s dávkováním vzorku přímo do MS v režimu průtokové injekční analýzy (FIA-MS – „Flow Injection Analysis Mass Spectrometry“) (Putri *et al.*, 2015).

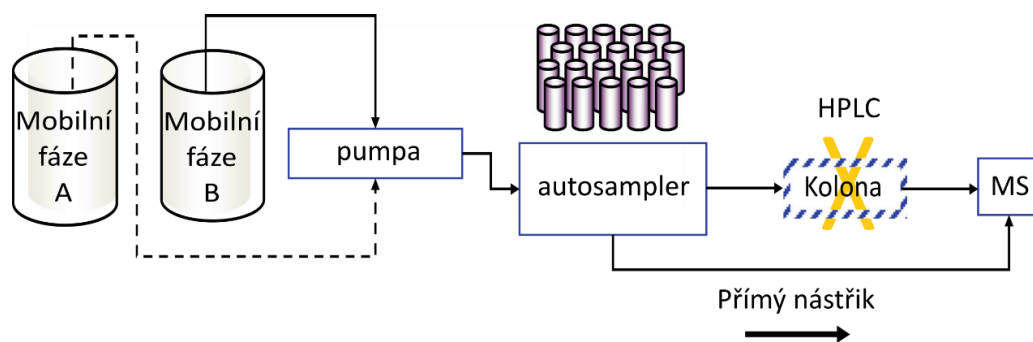
2.3.1 Průtoková injekční analýza

FIA je analytická technika založena na dávkování vzorku do kontinuálního proudu mobilní fáze. Jedná se o automatickou analýzu poprvé popsanou prof. Růžičkou v roce 1974 (Růžička a Hansen, 1988). Spojením FIA a MS došlo k rozšíření a vylepšení možností MS (Schug, 2013).

Technika FIA-MS je nejvhodnější pro provedení rychlého a spolehlivého kvantitativního screeningu chemických látek analýzou matric jako je krev, moč a další. Využívá se pro kvantifikaci různých analytů, léčiv, pesticidů, kontaminantů životního prostředí, dále také v klinické diagnostice, metabolomice, enviromentálních vědách, toxikologii apod. (Nanita a Kaldon, 2016).

Metody FIA-MS lze rozdělit na metody využívající přímého nástřiku vzorku na nosnou kapalinu pro zavedení do hmotnostního analyzátoru a metody využívající FIA pro míchání roztoků v reakční cívce k provedení chemické reakce, případně k vytvoření koncentračního gradientu s následnou detekcí v MS (Shug *et al.*, 2010).

Nejčastěji se při analýzách využívá moderních autosamplerů, které jsou obvykle přítomny u kapalinových chromatografů. Chromatografická kolona je v tomto zapojení vynechána, a dochází tedy k přímému nástřiku vzorku do iontového zdroje (Obr. 10; Schug, 2010). Hlavními výhodami použití FIA-MS oproti chromatografickým technikám LC-MS, případně GC-MS jsou rychlost analýzy (obvyklý čas jedné analýzy < 60 s), reprodukovatelnost a jednoduchost metody, a oproti samotné MS také vyšší přesnost a citlivost (Nanita a Kaldon, 2016). Naopak nevýhodami může být nedostatečná separace vzorků, použití pro úzký okruh analytů a nemožnost sledování izomerů.



Obr. 10 Schéma zapojení FIA-MS (upraveno podle Nanita a Kaldon, 2016).

2.3.2 Kapalinová chromatografie

Kapalinová chromatografie (LC – „Liquid Chromatography“) je fyzikálně-chemická metoda, při níž jsou látky ve vzorku děleny na základě interakce kapalně mobilní fáze a fáze stacionární. V LC jsou využívány různé mechanismy separace – adsorpce, rozdělování na základě rozpustnosti, iontová výměna, molekulově síťový efekt nebo specifické interakce afinitní chromatografie (is.mendelu.cz, 4. 2. 2020). Na základě uspořádání stacionární fáze je rozlišována kapalinová chromatografie kolonová, tenkovrstvá nebo papírová.

V metabolomice bývá vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC – „High Performance Liquid Chromatography“) společně s plynovou chromatografií často využívanou separační technikou. Spojení s hmotnostní spektrometrií umožňuje účinnou separaci a následně charakterizaci mnoha metabolitů. HPLC vyniká vysokou účinností a opakovatelností. Metoda je vhodná pro dělení netěkavých a polárních látek (web.natur.cuni.cz, 6. 2. 2020).

Mezi hlavní části kapalinového chromatografu patří vysokotlaká pumpa, kolona a detektor. Vysokotlaká pumpa zajišťuje vysoký tlak (až 40 MPa) potřebný pro dosažení konstantní rychlosti proudění mobilní fáze, které je kladen značný odpor při průchodu stacionární fází. Kolonou bývá obvykle nerezová trubice s délkou 5–25 cm a průměrem okolo 2–4 mm tvořenou stacionární fází s mikročásticemi silikagelu, na kterých jsou navázány např. nepolární uhlovodíky nebo polárnější uhlovodíky s funkční skupinou (Snyder *et al.*, 2012).

2.3.3 Tandemová hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie je analytická metoda založena na interakci nabitých částic s elektrickým nebo magnetickým polem ve vakuu (Friedecký *et al.*, 2012). Základem hmotnostních spektrometrů je iontový zdroj, hmotnostní analyzátor a detektor částic. Existují různé typy hmotnostních analyzátorů, pomocí kterých dochází k separaci iontů na základě poměru m/z (de Hoffmann *et al.*, 2007).

Tandemová hmotnostní spektrometrie je založena na kombinaci hmotnostních analyzátorů. Nejčastěji jsou využívány kombinace kvadrupólů (QqQ), kvadrupólu s průletovým analyzátozem (QqTOF), kvadrupólu s orbitrapem, iontové pasti s iontovou cyklotronovou rezonancí (IT-ICR) a další (Friedecký *et al.*, 2012).

Jedním z nejčastěji využívaných uspořádání je tzv. trojitý kvadrupól, který je založen na kombinaci dvou kvadrupólů, mezi nimiž se nachází kolizní cely. Při tomto uspořádání se analyzované ionty nejprve selektují v prvním kvadrupólu (Q1) podle hodnot m/z . Poté vstupují do kolizní cely (q2), kde dochází ke srážce s kolizním plynem a k jejich fragmentaci. Fragmentované ionty vstupují do druhého kvadrupólu (Q3), kde se opět selektují podle poměru m/z a dopadají na detektor (Obr. 11; Ho *et al.*, 2003).



Obr. 11 Schéma trojitého kvadrupólu (upraveno podle www.en.wikipedia.org, 19. 4. 2018).

2.4 Zpracování dat

Velké množství dat získaných metabolomickou analýzou je třeba před samotnou statistickou analýzou vhodně zpracovat a interpretovat. Data z metabolomického experimentu mají nejčastěji formu chromatografických záznamu, který je nutné vhodně upravit pro redukci systematického a náhodného analytického šumu (Wojtowicz *et al.*, 2012).

Hlavními výstupy jsou plochy nebo koncentrace nalezených metabolitů, které jsou dále statisticky zpracovány pomocí specializovaných softwarů (např. R, Statistica). Pro celkové statistické vyhodnocení jsou využívány jednorozměrné metody analyzující soubor dat v rámci jedné dimenze a mnohorozměrné metody nahlížející na data ve vícedimenzionálním prostoru (Kirwan, 2013). Při zpracování původních dat z analyzátoru je třeba zahrnout korekci na vzorky kontroly kvality (QC) pomocí interpolace, imputaci nulových hodnot, transformaci atp. Tyto kroky zahrnují eliminaci systematických vlivů měření, nahrazení hodnot pod limitem detekce přístroje a transformaci, při které se data obvykle vycentrují na střední hodnotu a seškálují na jednotkový rozptyl.

Jednorozměrnou analýzu lze mimo jiné využít pro potvrzení výsledků z vícerozměrné analýzy a pro testování hypotéz o významnosti jednotlivých metabolitů mezi skupinami vzorků. Grafickými výstupy jednorozměrných metod jsou např. krabicové a vulkánové grafy či korelační mapy (Kirwan, 2013).

Hlavními úlohami pro vícerozměrnou statistickou analýzu (MVDA – „MultiVariate Data Analysis“) jsou redukce dimenze, nalezení trendů v datech a vztahů mezi metabolity. Mnohorozměrné metody lze rozdělit na dvě skupiny – nesupervizované („unsupervised“) a supervizované („supervised“).

Typickou nesupervizovanou metodou je analýza hlavních komponent (PCA – „Principal Component Analysis“). Jedná se o transformaci původních dat do nižší dimenze o menším počtu proměnných zvaných hlavní komponenty (PCs – „principal components“), přičemž první dvě až tři PCs zpravidla stačí k zachycení dostatečného množství variability v původních datech. Proměnné navzájem nekorelují, a poskytují tak nezávislé informace o systému (Wojtowicz *et al.*, 2012). U PCA nejsou předem zadány informace který vzorek patří do které skupiny, a je tedy vhodná k vizualizaci celkového metabolického chování vzorků a jejich shlukování. Grafickými výstupy pro PCA jsou skórový („score plot“, zobrazuje průmět pozorování do roviny zvolených komponent)

a zátěžový graf („loading plot“, zobrazuje původní proměnné, tj. metabolity nejčastěji ve formě šipek, kde jejich délky odpovídají velikostem příspěvku u PCs nacházejících se ve směru šipek). Další možností je tzv. biplot kombinující oba předchozí způsoby zobrazení (Wojtowicz *et al.*, 2012).

U supervizovaných statistických nástrojů je již zadána informace o příslušnosti vzorku ke skupině, a jsou proto nejčastěji používány k hledání nejvíce diskriminujících metabolitů mezi skupinami. Pracují s maticí naměřených dat a s vektorem zařazení pozorování do skupin. Principem těchto metod je spojení regresní analýzy (numerický výstup) a klasifikace (kategoriální výstup) s cílem identifikace skupin pomocí menšího počtu proměnných/malého počtu metabolitů. Patří sem diskriminační analýza metodou dílčích nejmenších čtverců PLS-DA (Partial Least Squares Discriminant Analysis) a její ortogonální alternativa OPLS-DA (Orthogonal Partial Least Squares Discriminant Analysis), jejímž výstupem je tzv. S-plot nebo graf VIP (Wojtowicz *et al.*, 2012).

↓

3 Experimentální část

3.1 Materiál a příprava vzorků

3.1.1 Chemikálie

Voda, acetonitril, methanol a HCl v 1-butanolu byly v LC-MS kvalitě zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich, USA, interní standard o-oktanoyl-karnitin byl zakoupen od firmy Cambridge Isotop Laboratories (Boston, USA) a standardy MCPA-L-karnitin a HGA u firmy Toronto Research Chemicals Inc (Toronto, ON, Kanada).

3.1.2 Biologický materiál

V rámci praktické části byly měřeny koncentrace acylkarnitinů, HGA, MCPG a jejich konjugátů. Pro analýzy byly k dispozici vzorky suchých krevních skvrn koní s klinickými příznaky AM, kontrolní vzorky od koní ze stejných pastvin bez příznaků AM a ustájených koní, kteří nebyli na těchto pastvinách přítomni. Do studie byly také zařazeni koně s diagnózou zátěžové myopatie. Pro zjištění koncentrací jednotlivých metabolitů byla využita FIA-MS analýza a HPLC-MS/MS. Vzorky suchých krevních skvrn byly získány ve spolupráci s Klinikou chorob koní a Veterinární a farmaceutické Univerzity v Brně. Byly odebrány v letech 2013–2019.

3.1.3 Přístrojové vybavení

Centrifuga (Sigma 3 - 16KL, Osterode am Harz, Německo), třepačka (Biosan, typ PST-60HL plus Thermo Shaker, Riga, Latvia), lyofilizátor (Freezone, Labconco, USA), hmotnostní spektrometr s trojitým kvadrupólem API 4000 (SCIEX, Framingham, Massachusetts, USA), hmotnostní spektrometr s trojitým kvadrupólem Triple Quad 6500 (SCIEX, Framingham, MA, USA), kapalinový chromatograf UltiMate 3000RS (Dionex, Sunnyvale, CA, USA).

3.1.4 Příprava vzorků pro FIA-MS

Koncentrace acylkarnitinů byly měřeny pomocí FIA-MS analýzy. Z každé odběrové kartičky s krevní skvrnou byl vyražen terčik o průměru 3 mm do 96 - ti jamkové titrační desky. Vzorky byly extrahovány v methanolu (20 min, 600 rpm) s interními isotopicky značenými standardy (acylované karnitiny a AMK). Následovala centrifugace (10 min, 570 x g, 4 °C), přepipetování do vialek a FIA-MS analýza.

3.1.5 Příprava vzorků pro HPLC-MS/MS

Pro detekci HGA, MCPA-karnitinu, MCPA-glycinu, MCPG, MCPF-karnitinu a MCPF-glycinu byla využita analýza pomocí HPLC-MS/MS. Z krevních skvrn byly vyraženy terčíky o průměru 3,2 mm a byly extrahovány ve 100 μ l MeOH s interním standardem (1 μ M, o-oktanoyl-L-karnitin HCl (N methyl-D3)). Inkubace probíhala při pokojové teplotě po dobu 30 minut. Následovala centrifugace všech vzorků (14000 g/10 min/4 °C), přepipetování do nových eppendorfek a lyofilizace. Ke vzorkům bylo přidáno 50 μ l 1-butanolu v HCl a byly zvortexovány. Inkubace probíhala 30 minut při 65 °C. Poté byly vzorky odfoukávány v proudu dusíku při 65 °C. Bylo přidáno 100 μ l směsi methanol:MF-A (4:1), vzorky byly zvortexovány a přepipetovány do vialek. Pro sledování reprodukovatelnosti měření byl připraven QC vzorek (odebráním 5 μ l ze vzorků koní s podezřením na AM) a tento vzorek byl nastříkovan v průběhu analýzy. Látky byly kvantifikovány na komerčně dostupné standardy MCPA-karnitin a HGA.

3.2 Metody

3.2.1 FIA-MS analýza

Analýza byla provedena pomocí hmotnostní spektrometrie s trojitým kvadrupólem API 4000 (SCIEX, Framingham, Massachusetts, USA) za použití MassChrom® kitu určeného pro analýzu AMK a acylkarnitinů v krevních skvrnách (Chromsystems, Německo). Systém byl po dobu analýzy kontrolován programem Analyst 1.6.2 software (SCIEX). Vzorky byly měřeny v pozitivním módu za použití MRM („Multiple Reaction Monitoring“) přechodů.

Nastavení parametrů iontového zdroje a pomocných plynů bylo: napětí na kapiláře 5500 V, tlak kolizního plynu 2 psi, „curtain gas“ 20 psi, tlak sušícího a zamlžujícího plynu byl 40 psi a teplota v iontovém zdroji byla nastavena na 450 °C.

Objem nástřiku vzorku byl 3 µl. Rychlost průtoku mobilní fáze byla snížena z 0,3 ml·min⁻¹ na 0,03 ml·min⁻¹ v časovém rozmezí 0,15–0,4 min během každé analýzy. Naměřená data byla kvantifikována na hodnoty interních standardů v programu ChemoView verze 2.0.2 (SCIEX) porovnáním intenzit signálu analytu a jeho odpovídajícího interního standardu.

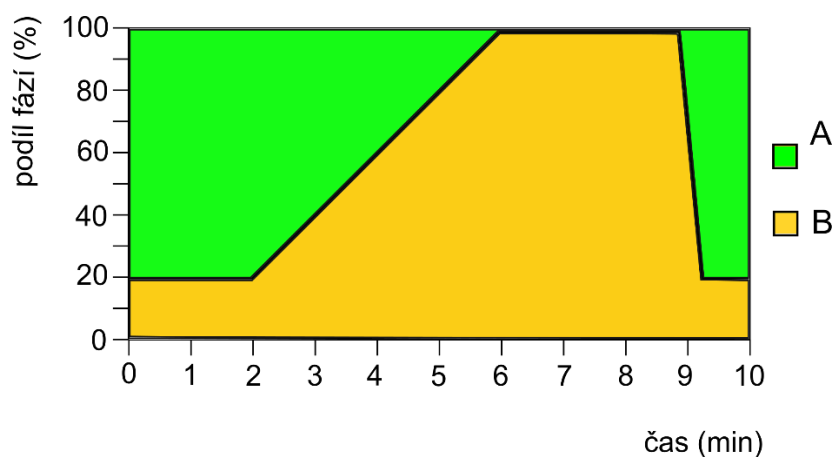
3.2.2 Analýza HPLC-MS/MS

Analýza vzorků pomocí HPLC-MS/MS probíhala za použití UltiMate 3000 RS ve spojení s hmotnostním spektrometrem (Triple Quad 6500; SCIEX, Framingham, MA, USA). Pro měření byla použita kolona BEH C18 firmy Waters (50 mm; 1,7 µm; 2,1 mm).

Parametry MS/MS: napětí na kapiláře v iontovém zdroji 5500 V, tlak kolizního plynu 6 psi, „curtain gas“: 35 psi, tlak plynů v iontovém zdroji 40 psi a teplota v iontovém zdroji byla nastavena na 400 °C.

Mobilní fáze A byla tvořena 28 mM roztokem NH₄COOH o pH 2,8; mobilní fázi B byl methanol. Průtok mobilní fáze byl 0,4 ml·min⁻¹. Gradient začínal na 20 % mobilní fázi B po dobu 2 minut, poté v rozmezí 2–5,9 minut lineárně stoupal na hodnotu 99 % B, která byla konstantní do 9 minut. Poté se v rozmezí 9–9,2 minut vrátil k iniciačním podmínkám 20 % B, které byly udržovány až do 10 minuty (Obr. 12). Butyrylované metabolity byly detekovány v MRM módu (přechod pro HGA: 198/74; MCPG: 184/110,7; MCPA-karnitin: 312/85; MCPA-glycin: 226/74; MCPF-karnitin: 298,15/85;

MCPF-glycin: 212/81). Měření probíhalo v pozitivním módu a data byla zpracována v programu Sciex OS Software 1.6.1. MCPA-karnitin a HGA byl kvantifikován na komerčně dostupné standardy. Relativní koncentrace MCPF-karnitinu byla určena vztahem na standard MCPA-karnitin, MCPF-glycin pak na standard hypoglycin A.



Obr. 12 Průběh gradientové eluce v chromatografickém systému u analýzy HGA a MCPG.

3.2.3 Statistická analýza

Získaná data byla zpracována a statisticky vyhodnocena v „R“ programu (verze 3.1.2) s využitím metabolického statistického balíčku Metabol (Gardlo *et al.*, 2019). Graficky byla data vizualizována mnohorozměrnou nesupervizovanou analýzou PCA a jednorozměrnými statistickými metodami, konkrétně krabicovými a vulkánovými grafy.

4 Výsledky

4.1 Tvorba databáze

V rámci této práce byla vytvořena databáze ze získaných vzorků k projektu Atypická myopatie odebraných v letech 2013–2020. Celkově byly k dispozici vzorky suchých krevních skvrn, plné krve, krevního séra, plasmy a moči od koní s AM (suspAM), a také od kontrolních koní bez přístupu na zasažené pastviny (CS), klinicky zdravých koní na pastvině s AM (CO) a koní s diagnózou zátěžové myopatie (zat). V rámci tvorby databáze došlo k rozdělení vzorků na základě biologického materiálu (suché krevní skvrny – D, plná krev – B, sérum – S, plasma – P a moč – U) a dále k přiřazení unikátního čísla pro každého koně. Vzorky byly označeny pomocí štítků a suché krevní skvrny byly dále rozděleny do složek. Vzorky s vícenásobnými odběry byly odlišeny písmeny (a,b,c...).

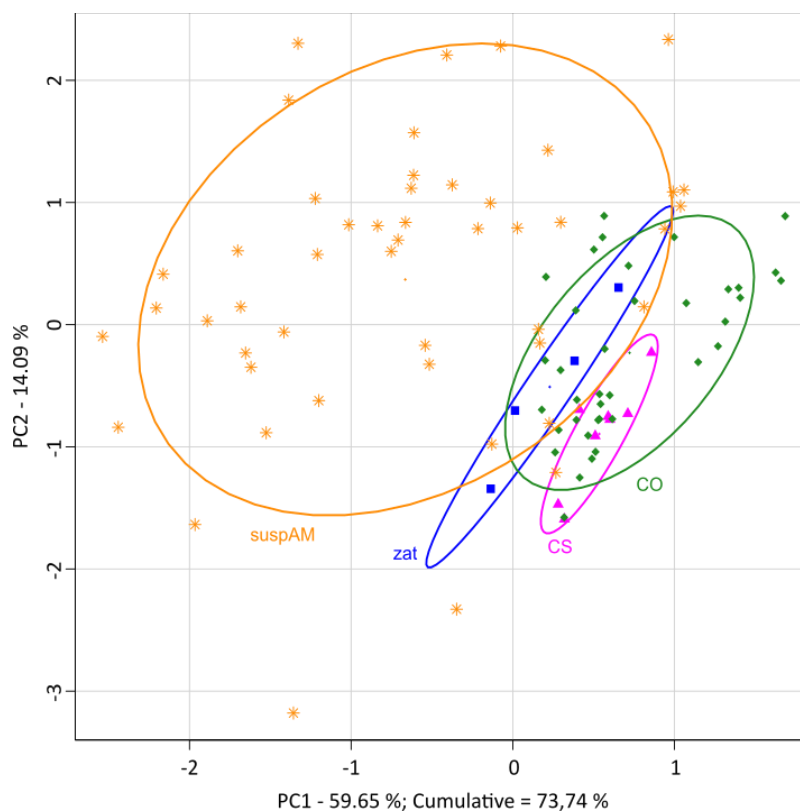
4.2 FIA-MS analýza

FIA-MS analýzou byly sledovány koncentrace acylovaných karnitinů a AMK ve vzorcích krevních skvrn. Hladiny acylkarnitinů byly pozorovány ve 4 skupinách (Tab.1): suspAM, CS, CO a zat. U některých koní byly k dispozici vícenásobné odběry krevních skvrn v různém časovém rozmezí od zpozorování prvních příznaků AM. V rámci statistického vyhodnocení byl od koní s vícenásobným odběrem ponechán vždy první vzorek odebraný po propuknutí příznaků AM.

Tab. 1 Počty vzorků pro jednotlivé skupiny koní.

Celkový počet koní	98
Počet vzorků pro jednotlivé skupiny	
Koně s podezřením na AM	100
Kontrolní koně	8
Koně bez klinických příznaků AM	37
Koně s diagnózou zátěžové myopatie	7

V analýze PCA došlo k částečnému oddělení vzorků suspAM od ostatních skupin (Obr. 13). Vzorky koní se zátěžovou myopatií se klastrovaly v blízkosti skupin CS a CO. Vysvětlená variabilita pro první dvě dimenze byla 73,74 %.



Obr. 13 PCA vzorků krevních skvrn jednotlivých skupin koní: suspAM, zat, CO a CS.

U koní suspAM byly pozorovány zvýšené hladiny acylkarnitinů s krátkým a středně dlouhým řetězcem oproti vzorkům CS a CO. Koncentrace acylkarnitinů u jednotlivých skupin jsou uvedeny v tab. 2. Na obr. 14 je zobrazen vulkánový graf porovnávající skupiny CS a suspAM se zvýrazněním nejvíce diskriminujících acylkarnitinů. Hladina významnosti byla u tohoto grafu korigována na počet metabolitů (Bonferroniho korekce). Ukázky krabicových grafů nejvíce diskriminujících acylkarnitinů jsou uvedeny na obr. 15 a 16.

Tab. 2 Koncentrace acylkarnitinů ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) pro jednotlivé skupiny koní.

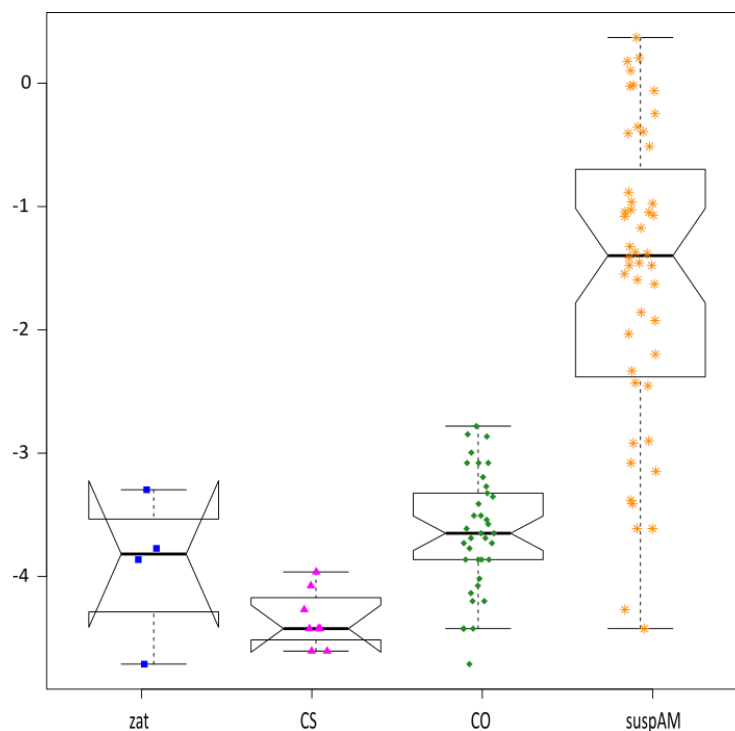
metabolit	CS			CO			suspAM			zat		
	min	max	medián	min	max	medián	min	max	medián	min	max	medián
C0	3,324	7,785	5,610	1,704	15,663	5,091	3,636	76,932	15,475	7,251	28,818	16,094
C2	0,940	2,615	1,873	0,113	2,331	1,091	0,236	23,213	4,643	2,051	7,711	2,392
C3	0,188	0,427	0,276	0,040	0,464	0,236	0,09	2,937	0,411	0,209	0,484	0,372
C3DC_C4OH	0,016	0,041	0,022	0,011	0,147	0,030	0,025	0,826	0,121	0,027	0,101	0,069
C4	0,107	0,323	0,187	0,077	0,819	0,281	0,035	42,73	2,728	0,150	0,573	0,293
C4DC_C5OH	0,047	0,151	0,076	0,037	0,179	0,071	0,017	0,592	0,123	0,080	0,439	0,123
C5	0,150	0,797	0,347	0,178	3,652	0,581	0,075	30,072	3,956	0,165	0,531	0,386
C5DC	0,093	0,150	0,132	0,052	0,648	0,167	0,13	3,195	0,66	0,138	0,369	0,184
C5:1	0,011	0,017	0,016	0,010	0,083	0,017	0,011	0,104	0,038	0,022	0,072	0,039
C6	0,019	0,033	0,023	0,010	0,130	0,032	0,024	7,376	0,608	0,031	0,094	0,041
C6DC_C7OH	0,017	0,025	0,019	0,007	0,100	0,027	0,013	0,142	0,058	0,021	0,074	0,035
C8	0,010	0,019	0,012	0,009	0,062	0,026	0,012	1,448	0,251	0,009	0,037	0,021
C8:1	0,008	0,011	0,009	0,006	0,035	0,012	0,011	1,611	0,132	0,013	0,032	0,019
C10	0,021	0,031	0,024	0,002	0,038	0,014	0,007	0,756	0,088	0,005	0,029	0,010
C10:1	0,019	0,024	0,021	0,003	0,052	0,020	0,01	0,464	0,086	0,010	0,022	0,014
C10:2	0,016	0,025	0,020	0,001	0,042	0,021	0,01	0,811	0,103	0,015	0,185	0,018
C12	0,004	0,010	0,008	0,000	0,020	0,007	0,000	0,276	0,039	0,008	0,029	0,011
C12:1	0,009	0,016	0,011	0,001	0,031	0,008	0,004	0,182	0,035	0,008	0,026	0,015
C14	0,012	0,041	0,028	0,000	0,037	0,016	0,007	0,726	0,051	0,015	0,045	0,021
C14:1	0,008	0,015	0,009	0,002	0,014	0,008	0,006	0,339	0,045	0,009	0,022	0,014
C14:2	0,007	0,015	0,010	0,001	0,012	0,007	0,003	0,050	0,015	0,006	0,011	0,009
C14OH	0,003	0,006	0,003	0,000	0,006	0,002	0,000	0,100	0,010	0,002	0,006	0,004

Tab. 2 Koncentrace acylkarnitinů ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) pro jednotlivé skupiny koní (*pokračování*).

metabolit	CS			CO			suspAM			zat		
	min	max	medián	min	max	medián	min	max	medián	min	max	medián
C16	0,201	0,772	0,500	0,083	1,261	0,378	0,017	5,237	0,574	0,121	0,830	0,651
C16:1	0,011	0,027	0,024	0,002	0,034	0,015	0,003	0,475	0,051	0,007	0,041	0,021
C16OH	0,008	0,012	0,011	0,001	0,013	0,006	0,003	0,161	0,016	0,008	0,013	0,010
C16:1OH	0,014	0,047	0,030	0,007	0,048	0,019	0,001	0,417	0,031	0,004	0,035	0,027
C18	0,213	0,697	0,397	0,082	0,675	0,292	0,014	3,841	0,339	0,129	0,760	0,472
C18:1	0,095	0,404	0,275	0,040	0,406	0,180	0,014	3,076	0,335	0,041	0,657	0,305
C18:2	0,020	0,056	0,042	0,004	0,056	0,024	0,003	0,346	0,037	0,008	0,063	0,019
C18:1OH	0,006	0,009	0,008	0,000	0,018	0,007	0,000	0,121	0,015	0,003	0,020	0,011
C18:2OH	0,015	0,024	0,020	0,001	0,027	0,010	0,000	0,059	0,014	0,005	0,014	0,009
C18OH	0,002	0,005	0,004	0,000	0,007	0,003	0,000	0,036	0,005	0,002	0,004	0,003

*C0 – karnitin, C2 – acetylkarnitin, C3 – propionylkarnitin, C3DC_C4OH – malonyl/karnitin/hydroxybutyrylkarnitin, C4 – butyrylkarnitin, C4DC_C5OH – methylmalonylkarnitin/3-hydroxyisovalerylkarnitin, C5 – valerylkarnitin, C5DC – glutarylkarnitin, C5:1 – tiglylkarnitin, C6 – hexanoylkarnitin, C6DC_C7OH – C8 – oktanoylkarnitin, C8:1 – oktenoylkarnitin, C10 – dekanoylkarnitin, C10:1 – decenoylkarnitin, C10:2 – dekadienoylkarnitin, C12 – dodekanoylkarnitin, C12:1 – dodecenoylkarnitin, C14 – tetradekanoylkarnitin, C14:1 – tetradecenoylkarnitin, C14:OH – hydroxytetradekanoylkarnitin, C16 – hexadekanoylkarnitin, C16:1 – hexadecenoylkarnitin, C16OH – hydroxyhexadekanoylkarnitin, C18 – oktadekanoylkarnitin, C18:1 – oktadecenoylkarnitin, C18:2 – oktadekadienoylkarnitin, C18:2OH – hydroxyoktadekadienoylkarnitin, C18OH – hydroxyoktadekanoylkarnitin.

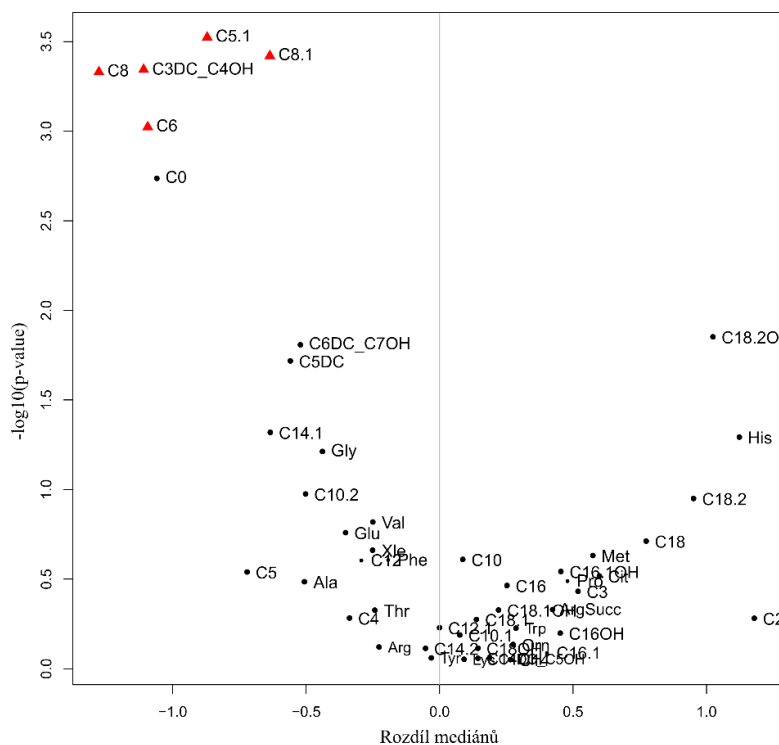
*z vícenásobných odběrů zahrnut vždy pouze první odběr



Obr. 16 Porovnání hladin acylkarnitinu C8 mezi skupinami zat, CS, CO a suspAM.

Po analýze metabolitů hypoglycinu A a MCPG byla skupina suspAM dále rozlišena na základě přítomnosti (pos) nebo nepřítomnosti (neg) MCPA-karnitinu. Opět je v případě vícenásobných odběrů koní zahrnut pouze první odběr.

Tímto podrobnějším rozdělením došlo v rámci PCA téměř ke splynutí profilu negativních vzorků se skupinami CS, CO a zat. Pozitivní vzorky se klastrovaly dál od ostatních skupin (Obr. 17). Na obr. 18 a 19 jsou pomocí vulkánových grafů porovnány skupiny CS vs pos a neg a zvýrazněny nejvíce diskriminující metabolity. U krabicových grafů byla hladina většiny acylkarnitinů vzorků neg na úrovni skupin CO, popř. byla mírně zvýšená. Zřetelnější zvýšení však bylo patrné při porovnání se skupinou CS. V případě pos vzorků byly koncentrace některých acylkarnitinů s krátkým a středním řetězcem vyšší až o několik řádů (Tab. 3). Nejvýznamnější metabolity jsou uvedeny na obr. 20–23.

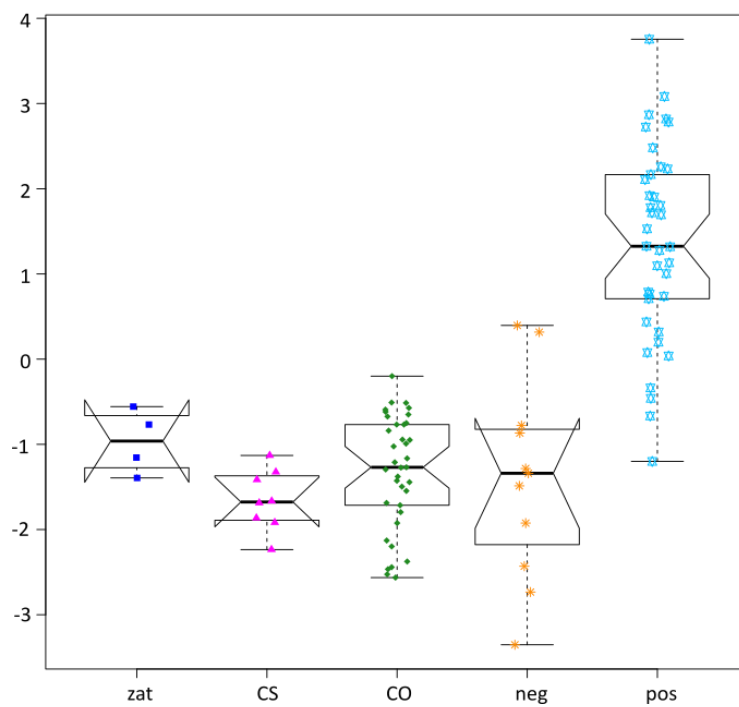


Obr. 19 Vulkánový graf se znázorněním diskriminujících metabolitů mezi skupinami CS a neg.

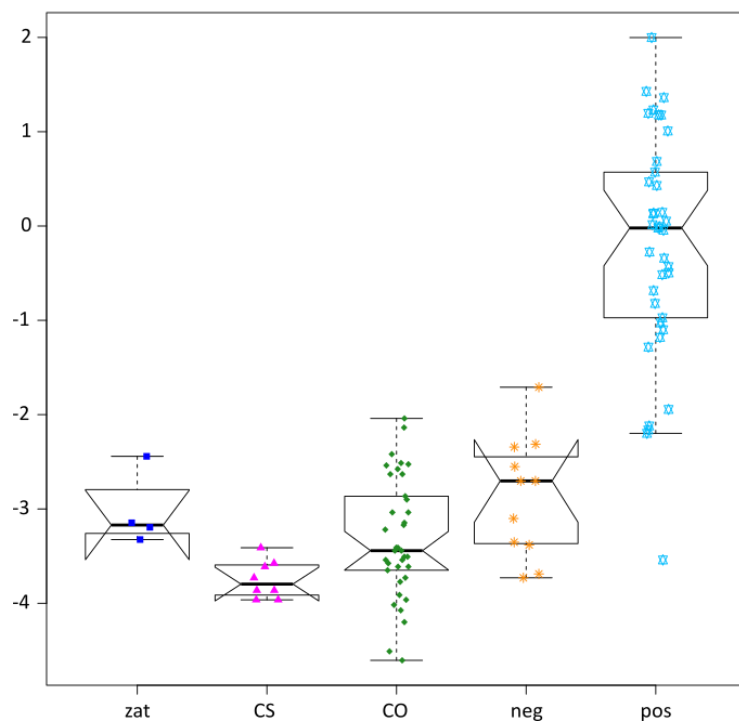
Tab. 3 Koncentrace acylkarnitinů s krátkým a středním řetězcem pro vzorky koní s podezřením na AM, u kterých byl detekován (pos) a nebyl detekován (neg) MCPA-karnitin ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$).

metabolit	pos			neg		
	min	max	medián	min	max	medián
C0	4,549	76,932	15,104	3,636	47,663	16,178
C2	0,236	23,213	5,164	0,281	11,939	0,576
C3	0,117	2,937	0,507	0,090	1,096	0,164
C3DC_C4OH	0,025	0,826	0,145	0,034	0,305	0,065
C4	0,301	42,730	4,614	0,035	1,485	0,262
C4DC_C5OH	0,048	0,592	0,148	0,017	0,490	0,063
C5	0,280	30,072	4,556	0,075	10,225	0,704
C5DC	0,159	3,195	0,828	0,130	2,883	0,230
C5:1	0,011	0,104	0,039	0,017	0,067	0,037
C6	0,029	7,376	0,994	0,024	0,181	0,067
C6DC_C7OH	0,017	0,142	0,068	0,013	0,091	0,032
C8	0,012	1,448	0,351	0,014	0,266	0,043
C8:1	0,015	1,611	0,181	0,011	0,049	0,017
C10	0,015	0,756	0,124	0,007	0,071	0,022
C10:1	0,014	0,464	0,125	0,010	0,039	0,019
C10:2	0,011	0,811	0,195	0,010	0,096	0,033
C12	0,007	0,276	0,052	0,000	0,070	0,010

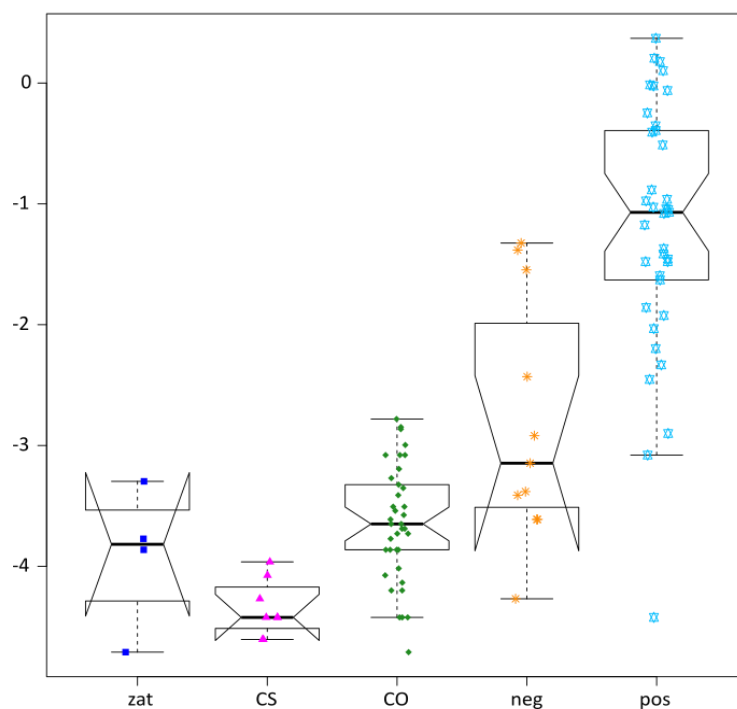
*z vícenásobných odběrů zahrnut pouze první odběr.



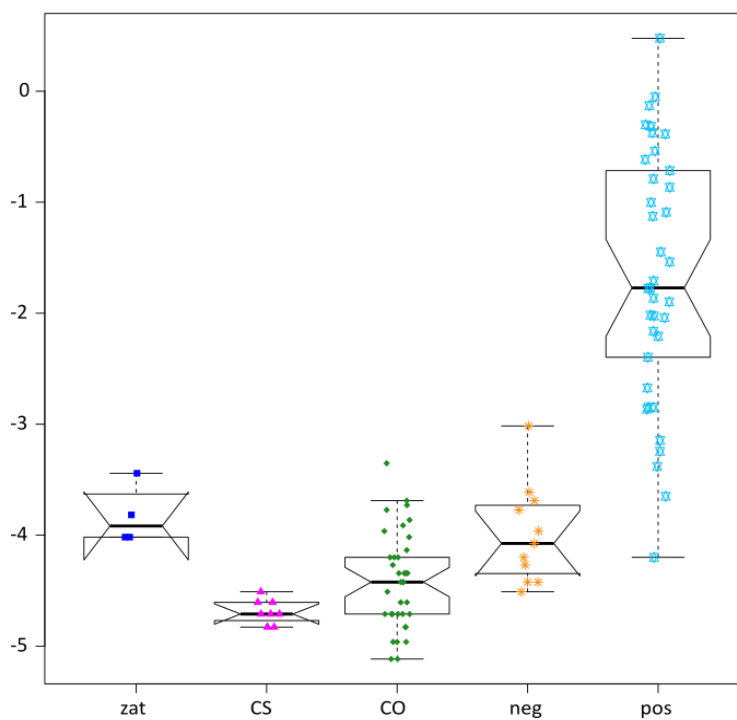
Obr. 20 Porovnání hladiny acylkarnitinu C4 u pos vzorků od ostatních skupin.



Obr. 21 Porovnání hladiny acylkarnitinu C6 u pos vzorků od ostatních skupin.

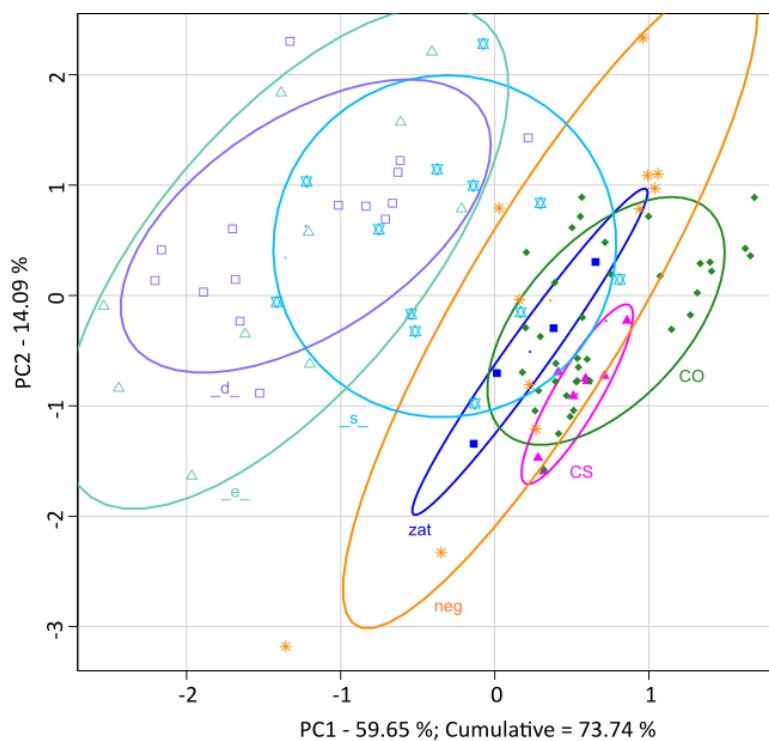


Obr. 22 Porovnání hladiny acylkarnitinu C8 u pos vzorků od ostatních skupin.

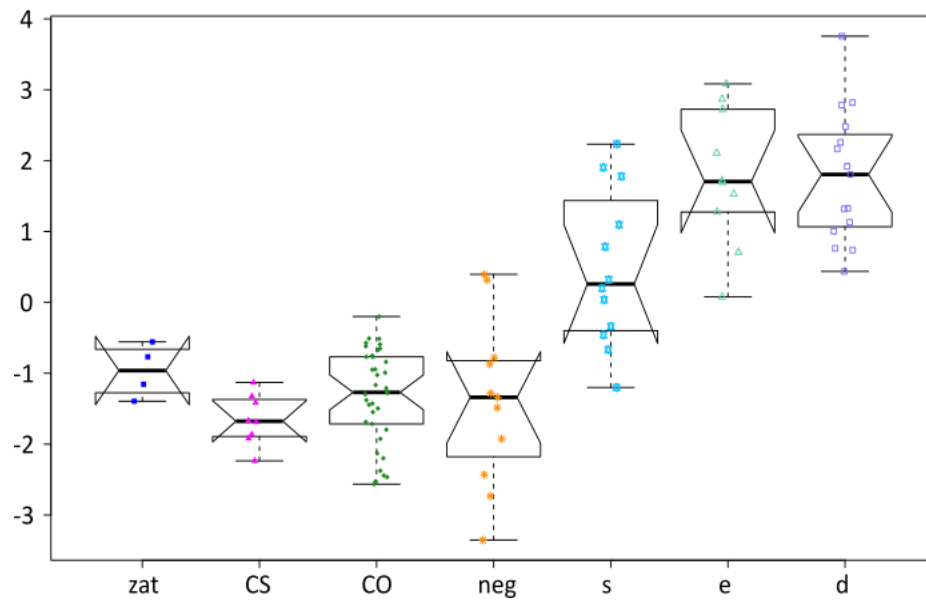


Obr. 23 Porovnání hladiny acylkarnitinu C8.1 u pos vzorků od ostatních skupin.

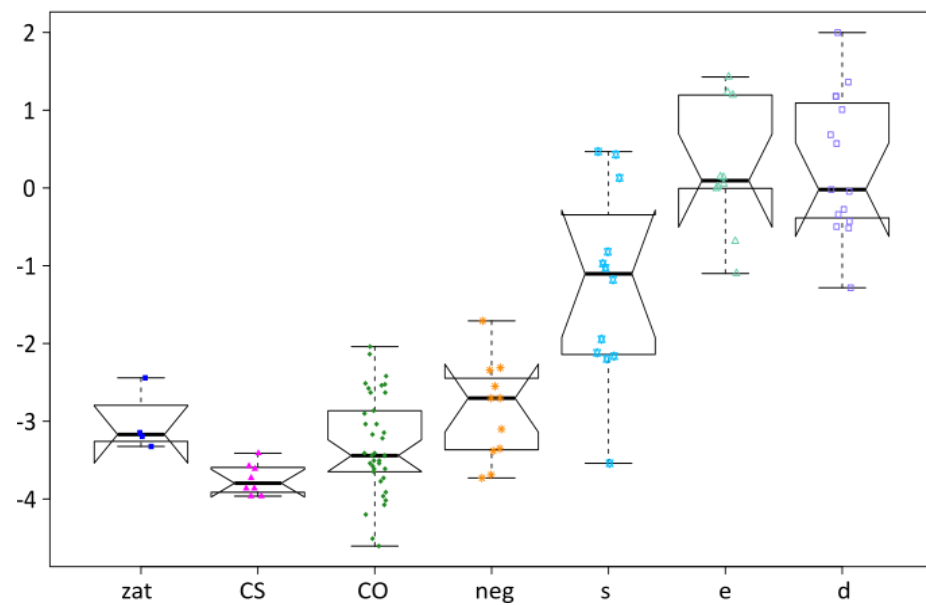
Vzorky koní s pozitivním nálezem MCPA-karnitinu byly dále rozlišeny na základě přežití (s), úhynu (d) a eutanázie (e) zvířete. V rámci PCA se částečně oddělily vzorky koní, u kterých došlo k úhynu nebo k eutanázii. Vzorky koní, kteří přežili, se z části překrývají s ostatními skupinami (Obr. 24). Hladina acylkarnitinů koní, kteří přežili, je oproti kontrolním vzorkům zvýšená, avšak nižší než u koní, u kterých došlo k úhynu případně k eutanázii (Obr. 25–28).



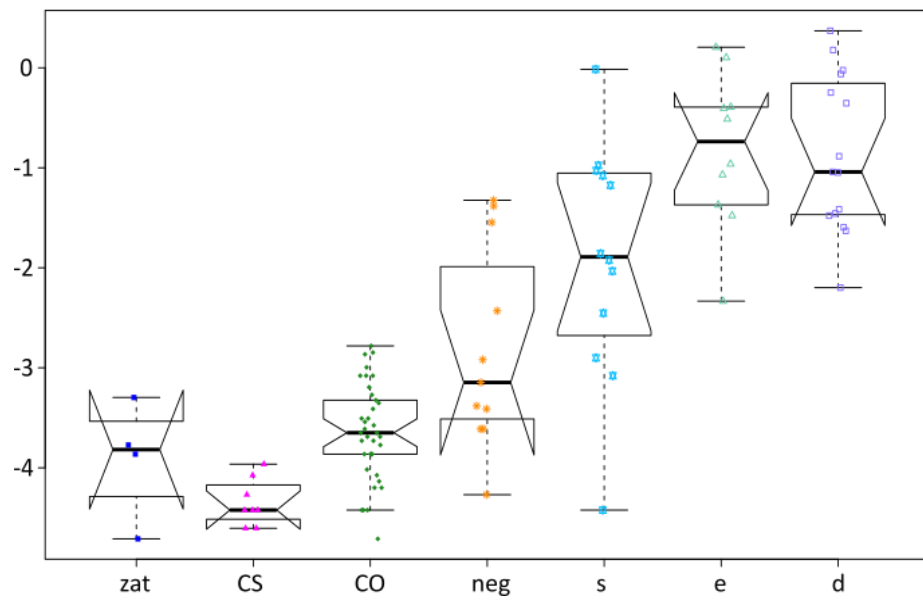
Obr. 24 PCA vzorků porovnávající vzorky koní, kteří přežili (s), uhynuli (d) anebo došlo k eutanázii (e) od skupin CS, CO a zat.



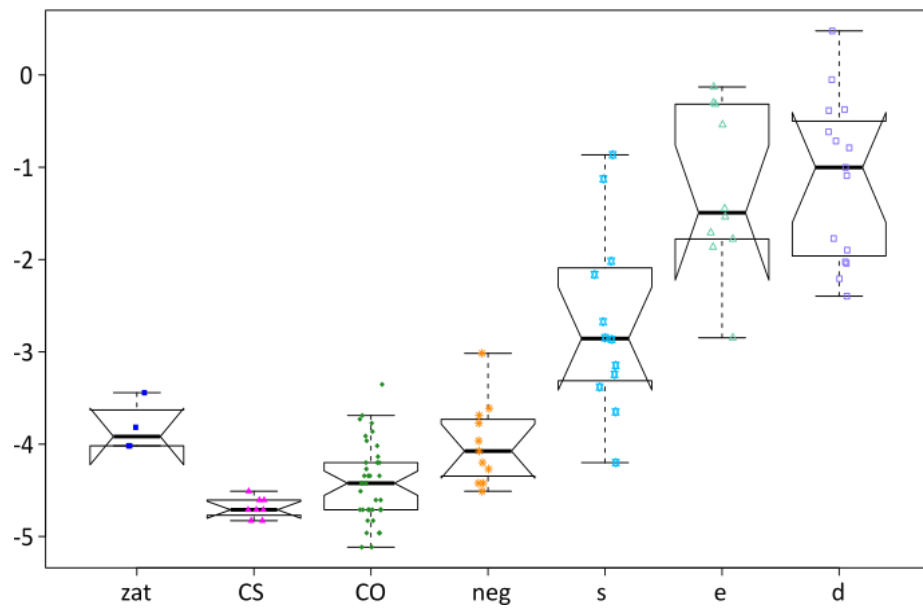
Obr. 25 Porovnání hladin acylkarnitinu C4 mezi jednotlivými skupinami.



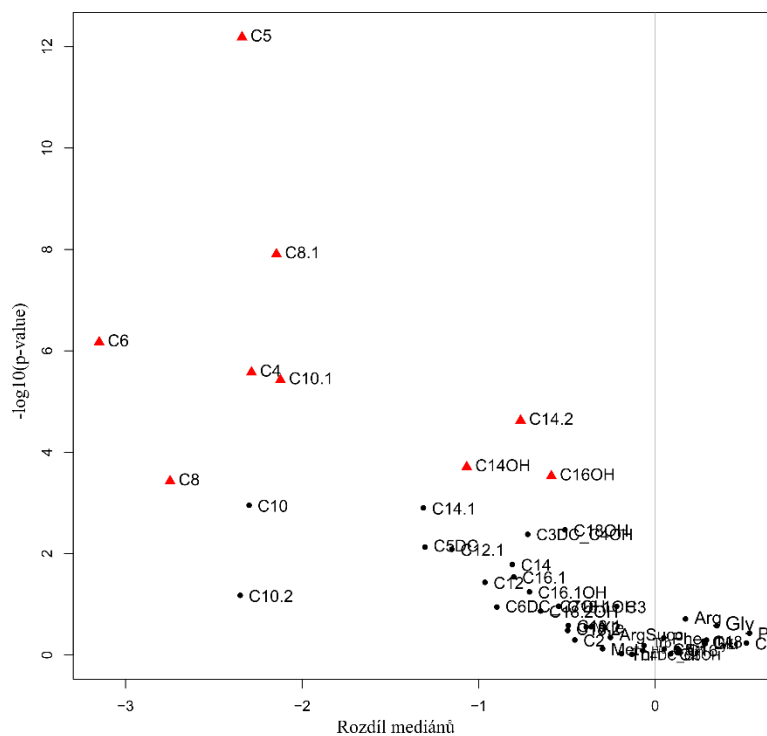
Obr. 26 Porovnání hladin acylkarnitinu C6 mezi jednotlivými skupinami.



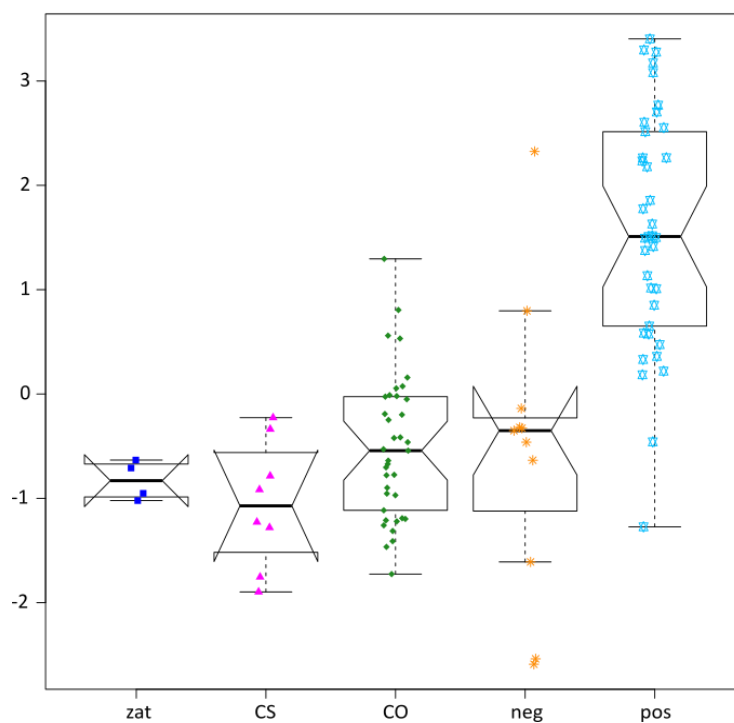
Obr. 27 Porovnání hladin acylkarnitinu C8 mezi jednotlivými skupinami.



Obr. 28 Porovnání hladin acylkarnitinu C8.1 mezi jednotlivými skupinami.



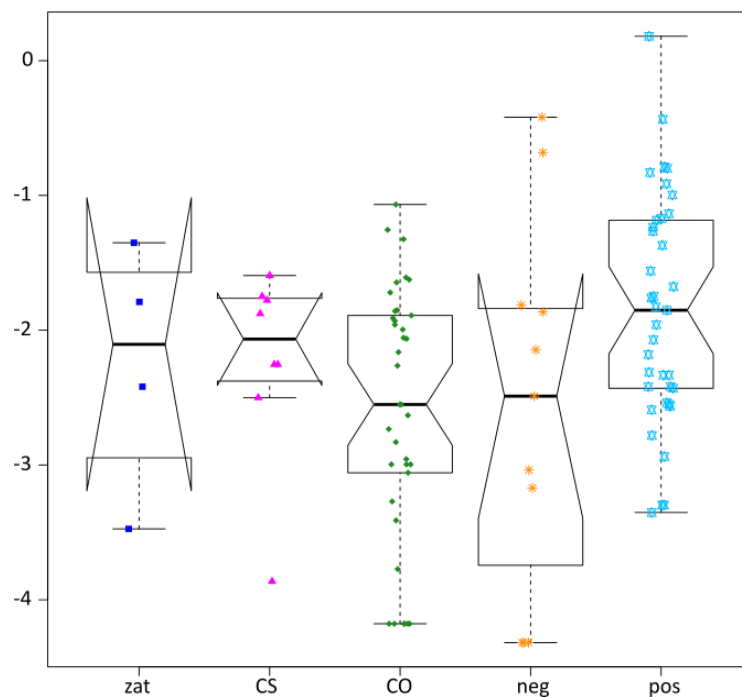
Obr. 30 Vulkánový graf se znázorněním diskriminujících metabolitů mezi skupinami zat a pos.



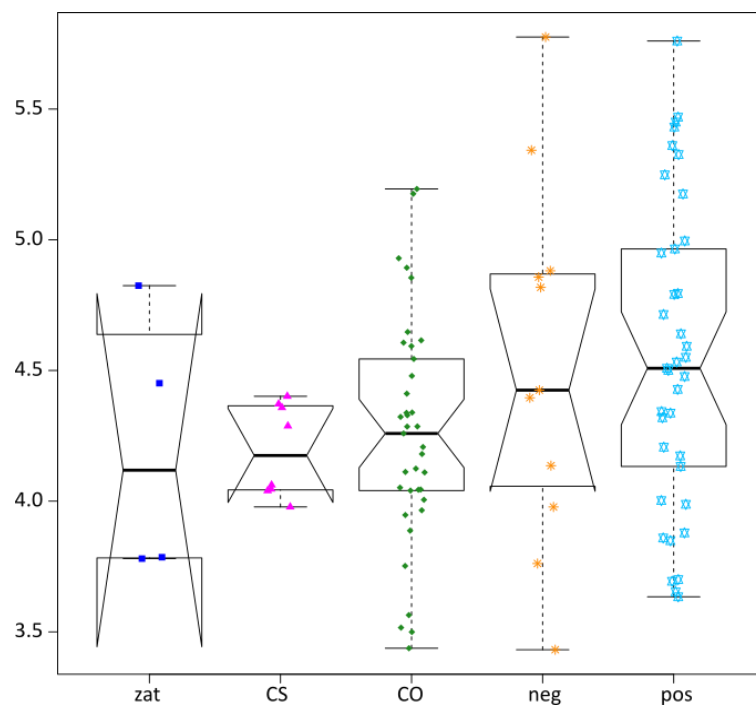
Obr. 31 Porovnání hladin acylkarnitinu C5 mezi jednotlivými skupinami.

Vyhodnocení aminokyselin

V rámci vyhodnocení AMK nebyly nalezeny významné rozdíly mezi jednotlivými skupinami. Příklady krabicových grafů jsou uvedeny na obr. 32 a 33.



Obr. 32 Porovnání hladin argininsukcinátu mezi jednotlivými skupinami.

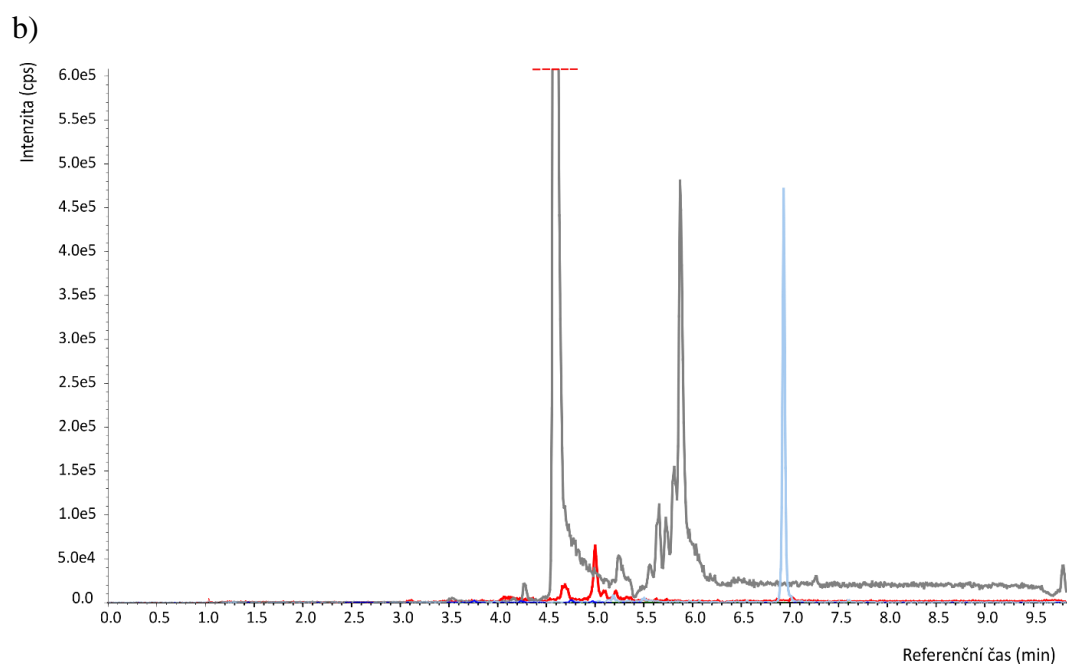
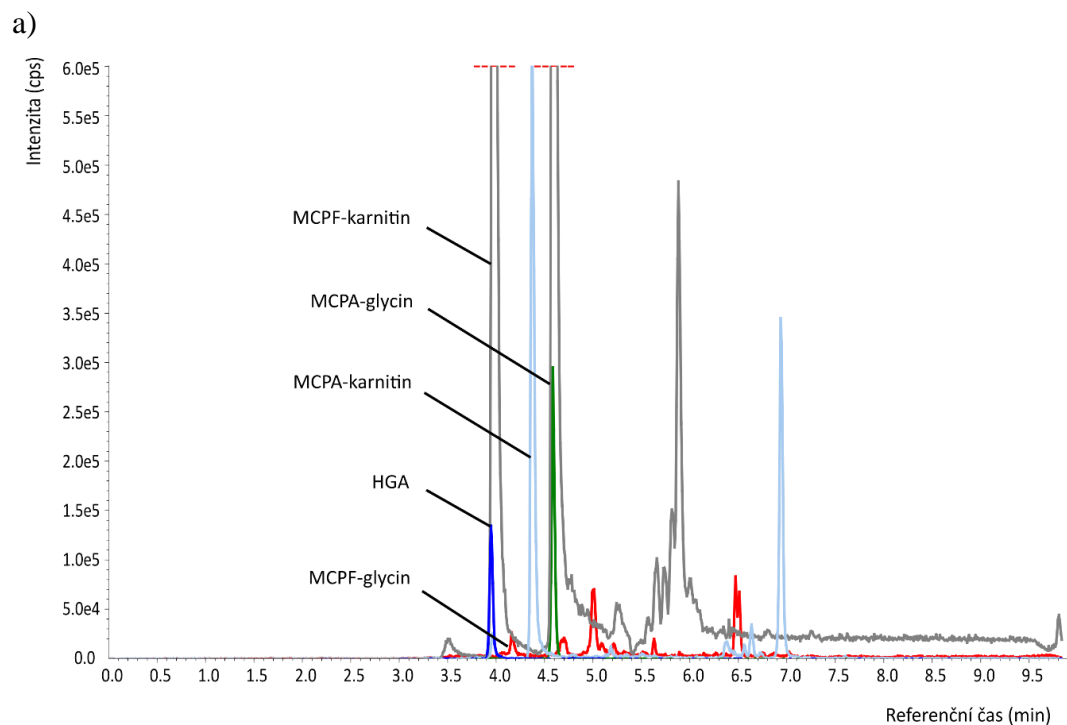


Obr. 33 Porovnání hladin valinu mezi jednotlivými skupinami.

4.3 Analýza HPLC-MS/MS

Analýzou HPLC-MS/MS byly měřeny koncentrace HGA, MCPG a jejich konjugátů (MCPA-karnitin, MCPA-glycin, MCPF-karnitin a MCPA-glycin). Na obr. 34 jsou uvedeny ukázky chromatogramů kontrolního vzorku ustájeného koně bez přístupu na pastvinu, kde se vyskytovala AM, a vzorku koně s diagnózou AM.

V tab. 4 jsou uvedeny rozmezí koncentrací nalezených metabolitů pro jednotlivé skupiny koní. MCPG a jeho metabolit MCPF-glycin nebyly detekovány. U skupin CS a zat nebyly tyto látky pozorovány.



*pozadí chromatogramů bylo zapříčiněno derivatizací; u skupiny CS byly stanovované analyty pod limitem detekce.

Obr. 34 Ukázky chromatogramů koní ze skupin a) AM, b) CS.

Tab. 4 Rozmezí koncentrací jednotlivých metabolitů ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$).

skupina koní	HGA			MCPA-karnitin			MCPA-glycin			MCPF-karnitin		
	min	max	medián	min	max	medián	min	max	medián	min	max	medián
CS	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
CO	0,074	2,027	0,313	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	0,006	0,011	0,007
suspAM	0,083	28,729	2,474	0,001	0,266	0,029	0,117	3,021	0,521	0,009	1,209	0,083
pos	0,184	28,729	3,621	0,003	0,266	0,029	0,117	3,021	0,521	0,014	1,209	0,083
neg	0,083	0,757	0,308	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	0,01	0,016	0,01
zat	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

*z vícenásobných odběrů zahrnut pouze první odběr, N/A – analyty pod limitem detekce

4.4 Analýza vícenásobných odběrů

U vícenásobných odběrů krevních skvrn koní s podezřením na AM byly vzorky odebrány v různém časovém rozmezí od zpozorování prvních příznaků AM. Informace o odběrech a hodnoty naměřených metabolitů jsou uvedeny v tab.5.

Změny v koncentracích diskriminujících acylkarnitinů C6, C8 a C8.1, HGA, MCPG a jejich metabolitů a CK v závislosti na průběhu onemocnění od vybraných koní jsou uvedeny na grafech 1-8. Koně D12, D44 a D118 uhynuli, u koní D14, D74 a D92 byla provedena eutanázie a koně D95, D111, D114, D116 se uzdravili. Referenční rozmezí CK pro zdravé koně je 0,67–15,15 $\mu\text{kat}\cdot\text{l}^{-1}$.

Tab. 5 Informace o koních s vícenásobným odběrem krevních skvrn a koncentrace jednotlivých látek ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$), hodnoty kreatinkinasy v $\mu\text{kat}\cdot\text{l}^{-1}$.

Označení koně	diagnosa	Δt hod (od prvních příznaků)	diagnosa dle MCPA	HGA	MCPA-karnitin	MCPA-glycin	MCPF-karnitin	C6	C8	C8:1	hodnoty CK	eutanázie uzdravení existus
D12	suspAM	5	AM	1,857	0,024	0,207	0,150	1,982	0,781	0,454	1412	exitus
		24		0,371	0,011	N/A	0,083	0,833	0,257	0,225	8561	
		36		0,263	0,013	N/A	0,111	1,234	0,281	0,281	16330	
D13	suspAM	0	zdravý	0,315	N/A	N/A	0,016	0,181	0,088	0,049	93	uzdravení
		96		0,158	N/A	N/A	N/A	0,046	0,047	0,022	7	
D14	suspAM	5	AM	6,683	0,025	0,521	0,090	0,333	0,097	0,058	274	eutanázie
		24		4,791	0,022	0,334	0,091	0,542	0,176	0,089	3033	
		30		2,012	0,015	0,136	0,046	0,375	0,138	0,081	3422	
		48		0,871	0,005	NA	0,025	0,265	0,092	0,053	2377	
D15	suspAM	90	AM	0,416	0,005	NA	0,083	0,608	0,228	0,110	308	exitus
		96		0,409	N/A	N/A	0,059	0,283	0,133	0,074	421	
D18	suspAM	24	zdravý	N/A	N/A	N/A	N/A	0,035	0,014	0,011	748	uzdravení
		48		N/A	N/A	N/A	N/A	0,058	0,017	0,012	255	
D24	suspAM	0	AM	3,621	0,007	0,328	0,030	0,115	0,34	0,043	916,01	uzdravení
		24		1,489	0,005	0,248	0,016	0,285	0,447	0,086	348,35	
		48		0,619	0,002	NA	0,008	0,064	0,304	0,03	143,44	
		250		0,281	N/A	N/A	N/A	0,045	0,273	0,021	7,3	

*N/A – pod limitem detekce

Tab. 5 Informace o koních s vícenásobným odběrem krevních skvrn a koncentrace jednotlivých látek ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$), hodnoty kreatinkinasy v $\mu\text{kat}\cdot\text{l}^{-1}$. (pokračování).

Označení koně	diagnosa	Δt hod (od prvních příznaků)	diagnosa dle MCPA	HGA	MCPA-karnitin	MCPA-glycin	MCPF-karnitin	C6	C8	C8:1	hodnoty CK	eutanázie uzdravení existus
D28	suspAM	48	zdravý	0,699	NA	N/A	0,010	0,096	0,043	0,023	1717	uzdravení
		120		0,226	N/A	N/A	N/A	0,048	0,037	0,019	83,5	
D39	suspAM	0	AM	1,721	0,027	N/A	0,048	1,138	0,309	0,115	2000	uzdravení
		72		0,312	N/A	N/A	0,005	0,157	0,077	0,026	3 666	
D44	suspAM	24	AM	4,680	0,053	0,396	0,235	3,249	0,940	0,95	1830	exitus
		40		6,187	0,049	0,554	0,216	2,558	0,875	0,600	-	
		72		2,050	0,014	0,247	0,039	0,778	0,529	0,225	-	
D54	suspAM	0	AM	0,877	N/A	0,157	0,032	0,055	0,042	0,037	12	uzdravení
		10		0,313	0,004	N/A	0,025	0,248	0,087	0,074	-	
		36		0,124	N/A	N/A	0,025	0,143	0,045	0,045	3 546	
		48		0,083	N/A	N/A	0,005	0,053	0,019	0,022	2662	
D74	suspAM	5	AM	6,880	0,096	0,220	0,161	4,168	1,108	0,739	545,5	eutanázie
		24		9,522	0,311	NA	0,894	4,576	1,146	0,841	8 000	
D82	suspAM	15	zdravý	0,757	N/A	NA	N/A	0,034	0,266	0,015	419	uzdravení
		24		0,569	N/A	N/A	N/A	0,035	0,299	0,016	296	
		36		0,485	N/A	N/A	N/A	0,05	0,273	0,016	218	
		60		0,541	N/A	NA	N/A	0,041	0,254	0,016	312	
		84		0,415	N/A	N/A	N/A	0,223	0,375	0,043	206	

*N/A – pod limitem detekce

Tab. 5 Informace o koních s vícenásobným odběrem krevních skvrn a koncentrace jednotlivých látek ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$), hodnoty kreatinkinasy v $\mu\text{kat}\cdot\text{l}^{-1}$. (pokračování).

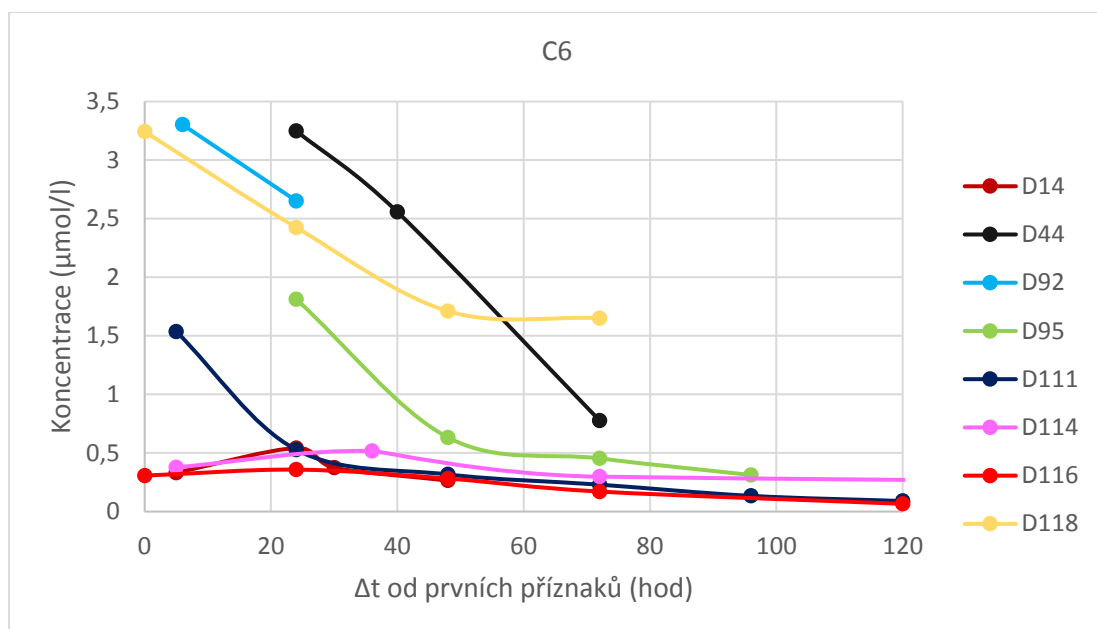
Označení koně	diagnosa	Δt hod (od prvních příznaků)	diagnosa dle MCPA	HGA	MCPA-karnitin	MCPA-glycin	MCPF-karnitin	C6	C8	C8:1	hodnoty CK	eutanázie uzdravení existus
D92	suspAM	6	AM	25,249	0,157	1,951	0,182	3,303	1,228	0,878	3218,8	eutanázie
		24		12,269	0,086	1,117	0,139	2,652	0,86	0,623	-	
D95	suspAM	24	AM	3,736	0,021	0,650	0,083	1,813	1,149	0,341	2704	uzdravení
		48		3,883	0,011	0,323	0,056	0,633	0,457	0,147	3126	
		72		2,744	0,007	NA	0,064	0,454	0,317	0,099	2018	
		96		1,245	0,004	0,077	0,025	0,312	0,295	0,078	809	
D109	suspAM	48	AM	0,184	N/A	N/A	0,016	0,358	0,156	0,058	1006,2	uzdravení
		96		NA	N/A	N/A	NA	0,071	0,094	0,030	106	
D111	suspAM	5	AM	6,574	0,083	0,565	0,208	1,537	0,377	0,421	8615	uzdravení
		24		2,335	0,022	0,287	0,074	0,528	0,142	0,133	12 868	
		48		1,173	0,008	0,153	0,035	0,317	0,095	0,073	12293	
		72		0,557	0,006	NA	0,032	0,23	0,08	0,051	6605	
		96		0,224	N/A	N/A	0,005	0,134	0,061	0,039	2427	
		120		0,230	N/A	N/A	N/A	0,09	0,051	0,03	459	
		144		0,220	N/A	N/A	N/A	0,082	0,064	0,033	179	
		168		0,219	N/A	N/A	N/A	0,056	0,027	0,02	97	
		192		0,150	N/A	N/A	N/A	0,062	0,035	0,024	57	
		216		0,131	N/A	N/A	N/A	0,064	0,035	0,017	37	
		264		0,076	N/A	N/A	N/A	0,049	0,026	0,017	20	
		336		0,091	N/A	N/A	N/A	0,043	0,024	0,018	10	

*N/A – pod limitem detekce

Tab. 5 Informace o koních s vícenásobným odběrem krevních skvrn a koncentrace jednotlivých látek ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$), hodnoty kreatinkinasy v $\mu\text{kat}\cdot\text{l}^{-1}$. (pokračování).

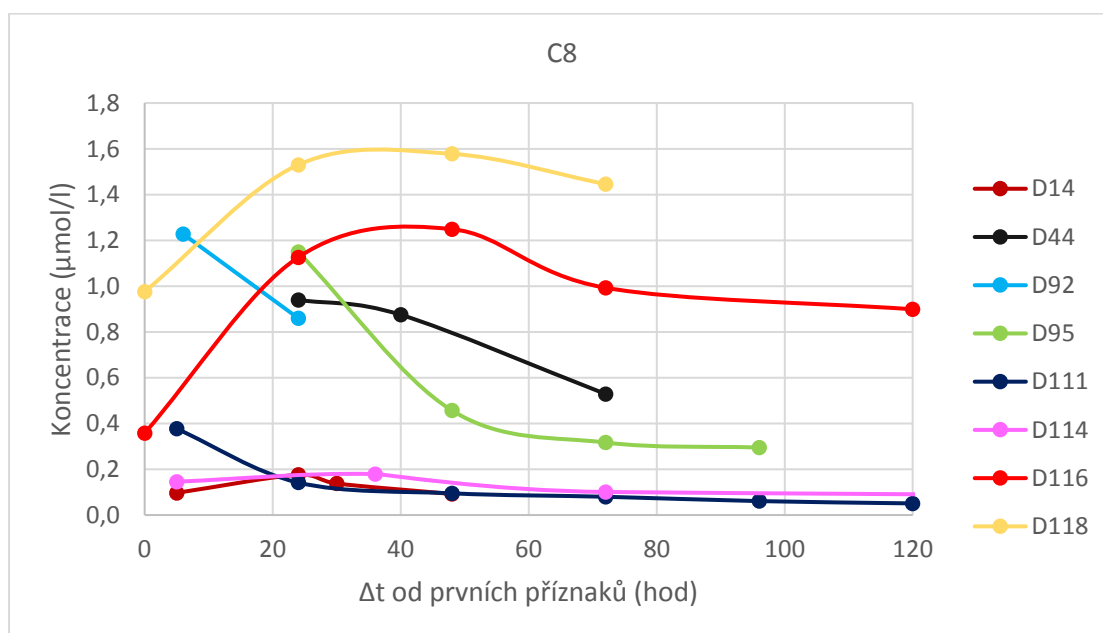
Označení koně	diagnosa	Δt hod (od prvních příznaků)	diagnosa dle MCPA	HGA	MCPA-karnitin	MCPA-glycin	MCPF-karnitin	C6	C8	C8:1	hodnoty CK	eutanázie uzdravení existus
D114	suspAM	5	AM	7,814	0,024	0,194	0,031	0,378	0,146	0,133	700	uzdravení
		36		3,170	0,022	0,115	0,053	0,517	0,179	0,139	1814	
		72		0,958	0,010	0,147	0,029	0,298	0,101	0,071	143	
		648		0,111	N/A	N/A	N/A	0,083	0,021	0,023	4	
		1368		0,098	N/A	N/A	N/A	0,07	0,018	0,028	-	
D116	suspAM	0	AM	11,249	N/A	0,572	N/A	0,307	0,358	0,069	3745	uzdravení
		24		10,387	0,008	0,317	0,015	0,358	1,126	0,162	2619	
		48		2,755	0,003	0,164	0,028	0,282	1,249	0,156	3940	
		72		1,323	N/A	0,145	0,008	0,171	0,993	0,08	1846	
		120		0,711	N/A	NA	N/A	0,066	0,899	0,051	220	
D118	suspAM	0	AM	13,176	0,049	2,207	0,078	3,243	0,976	0,68	2950	exitus
		24		5,080	0,042	1,425	0,068	2,425	1,53	0,818	5146	
		48		2,037	0,032	0,236	0,093	1,711	1,578	0,851	10906	
		72		1,622	0,019	0,172	0,083	1,651	1,446	0,624	7065	

*N/A – analyty pod limitem detekce



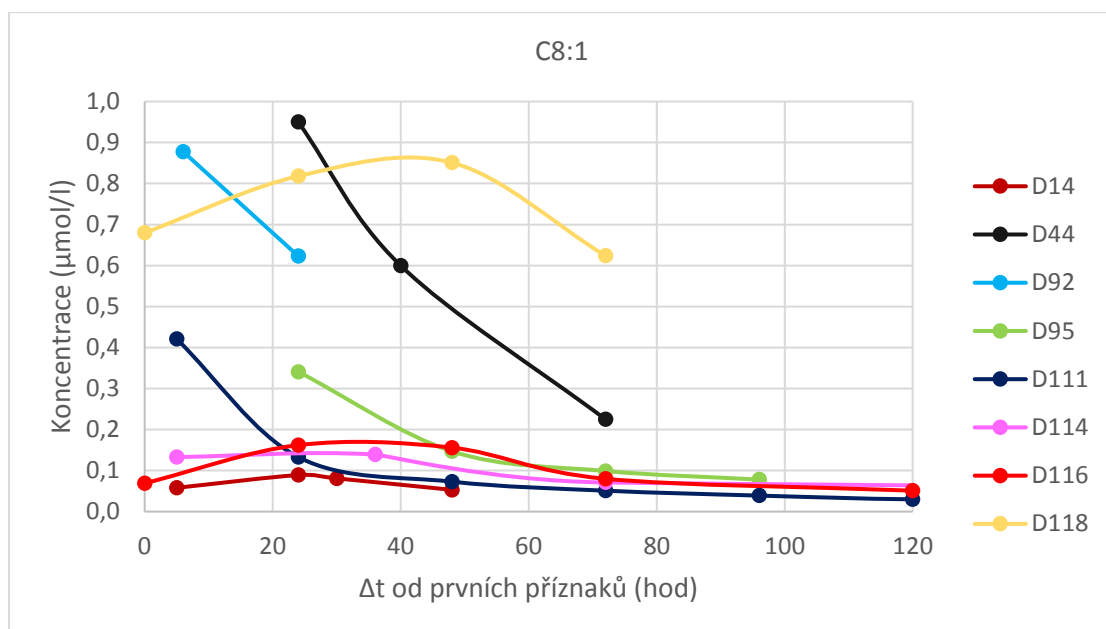
*D14, D92 – eutanázie; D44, D118 – exitus; D95, D111, D114, D116 – uzdravení

Graf 1 Změny koncentrací hexanoylkarnitinu u vzorků koní s vícenásobným odběrem.



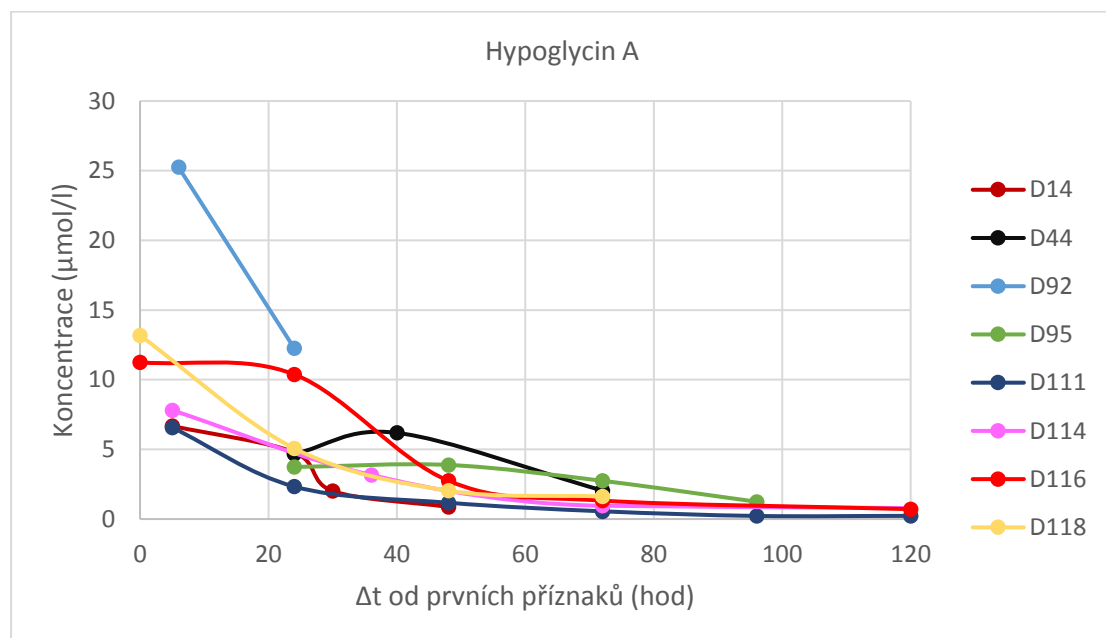
*D14, D92 – eutanázie; D44, D118 – exitus; D95, D111, D114, D116 – uzdravení

Graf 2 Znárodnění změn koncentrací oktanoylkarnitinu u vzorků koní s vícenásobným odběrem.



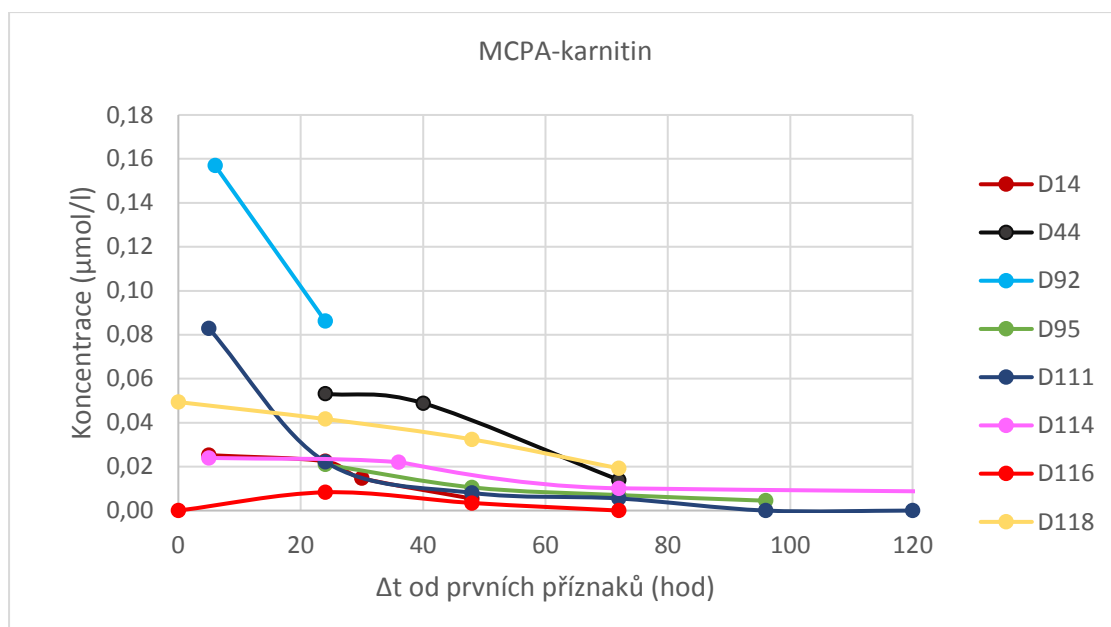
*D14, D92 – eutanázie; D44, D118 – exitus; D95, D111, D114, D116 – uzdravení

Graf 3 Znárodnění změn koncentrací oktenoylkarnitinu u vzorků koní s vícenásobným odběrem.



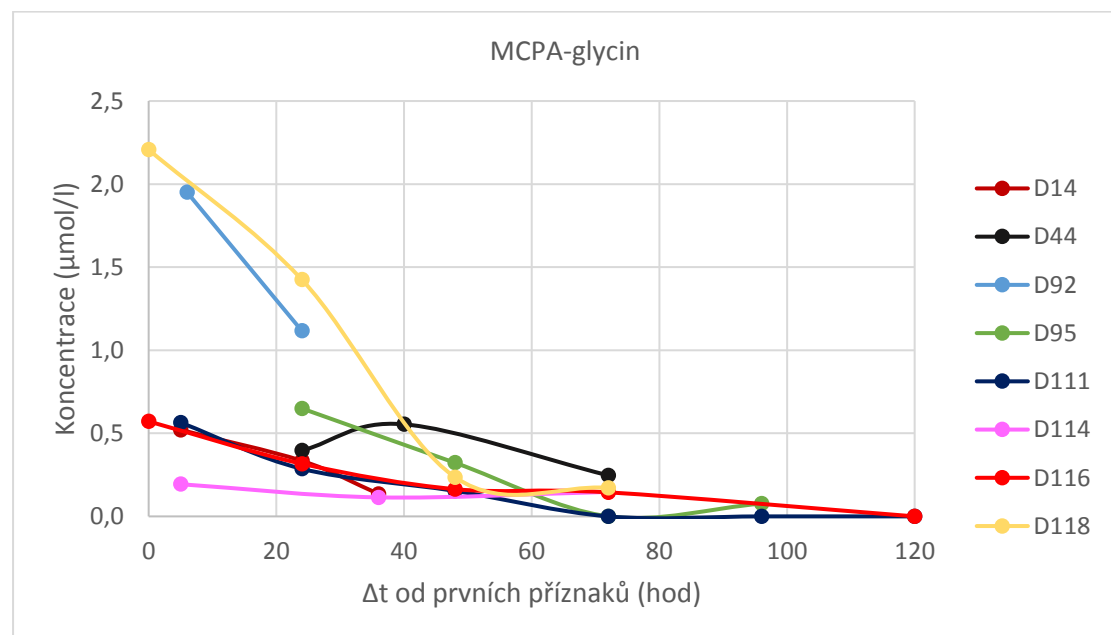
*D14, D92 – eutanázie; D44, D118 – exitus; D95, D111, D114, D116 – uzdravení

Graf 4 Znárodnění změn koncentrací hypoglycinu A u vzorků koní s vícenásobným odběrem.



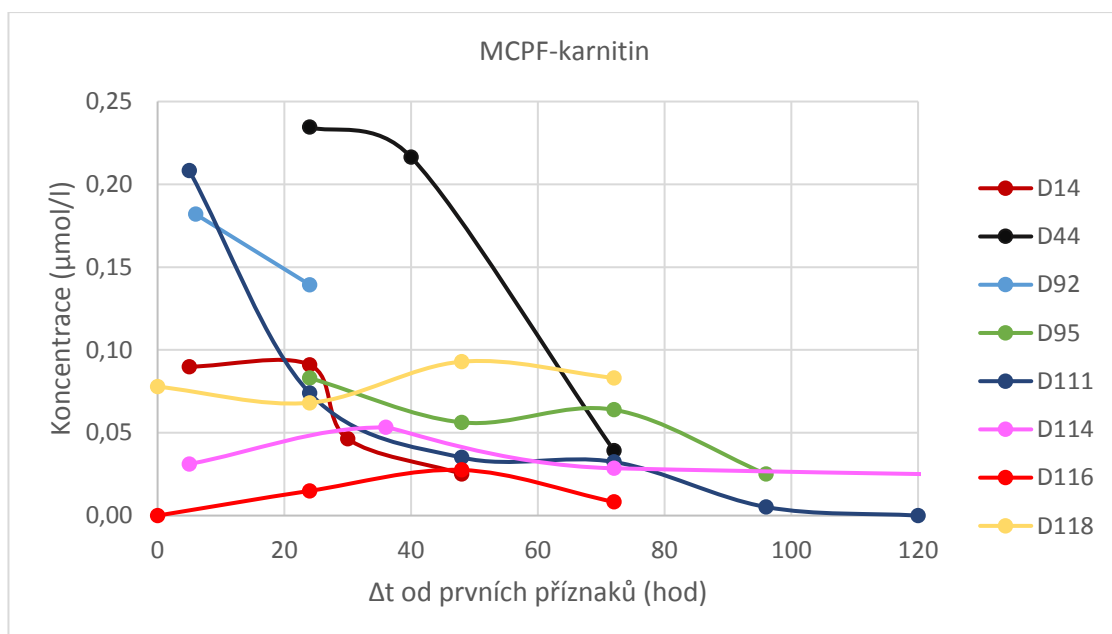
*D14, D92 – eutanázie; D44, D118 – exitus; D95, D111, D114, D116 – uzdravení

Graf 5 Znáornění změn koncentrací MCPA-karnitinu u vzorků koní s vícenásobným odběrem.



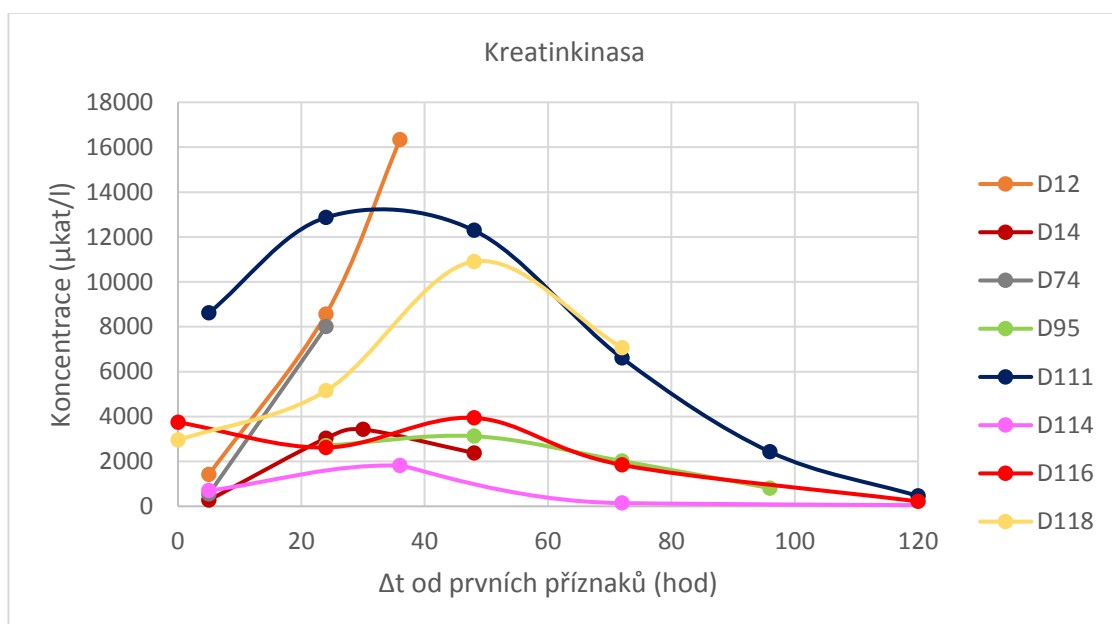
*D14, D92 – eutanázie; D44, D118 – exitus; D95, D111, D114, D116 – uzdravení

Graf 6 Znáornění změn koncentrací MCPA-glycinu u vzorků koní s vícenásobným odběrem.



*D14, D92 – eutanázie; D44, D118 – exitus; D95, D111, D114, D116 – uzdravení

Graf 7 Znárodnění změn koncentrací MCPF-karnitinu u vzorků koní s vícenásobným odběrem.



*D74, D92 – eutanázie; D12, D118 – exitus; D95, D111, D114, D116 – uzdravení

Graf 8 Znárodnění změn koncentrací kreatinkinasy u vzorků koní s vícenásobným odběrem.

5 Diskuze

Předložená diplomová práce byla zaměřena na problematiku atypické myopatie, která bývá pozorována u volně se pasoucích koní. Byly sledovány změny v metabolických profilech u koní s příznaky AM a porovnávány se skupinami koní bez příznaků AM, avšak pasoucích se na stejných pastvinách, s kontrolními koňmi bez přístupu na tyto pastviny a s koňmi s diagnózou zátěžové myopatie. Sledovanými parametry byly hladiny acylkarnitinů, aminokyselin, HGA, MCPG a jejich metabolitů (MCPA-karnitin, MCPA-glycin, MCPF-karnitin, MCPF glycin) a hodnoty CK.

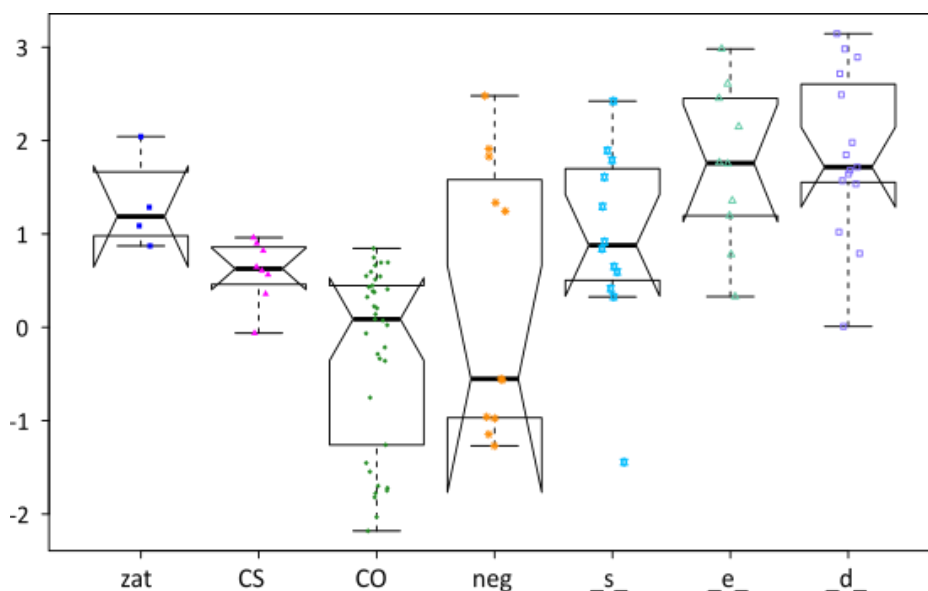
Inhibicí β -oxidace, způsobené metabolity MCPA-CoA a MCPF-CoA, dochází v mitochondriích k akumulaci acyl-CoA za snížení volné frakce CoA. Pro její obnovení jsou z přebytečných acyl-CoA pomocí karnitinacyltransferasy přeneseny acylové skupiny na karnitin za vzniku acylovaných karnitinů, které jsou poté vyloučeny ven z buňky (Cibulka, 2005). V krvi a moči koní s AM jsou tak pozorovány zvýšené koncentrace acylkarnitinů převážně s krátkým a středně dlouhým řetězcem (Westermann *et al.*, 2008; Sponseller *et al.*, 2012).

Pomocí statistických nástrojů byly nejprve vizualizovány a srovnány koncentrace acylkarnitinů pro všechny vzorky suchých krevních skvrn koní s podezřením na AM. Po analýze HGA a jeho metabolitů byl acylkarnitinový profil vzorků s pozitivním nálezem MCPA-karnitinu dále vyhodnocován samostatně. Nejvíce diskriminujícími acylkarnitiny oddělujícími tuto skupinu (pos) a kontrolní koně byly C6, C8, C8:1 a C4. I v případě koní, u kterých nebyl MCPA-karnitin detekován, bylo pozorováno zvýšení zmíněných acylkarnitinů vůči kontrolním ustájeným koním a s výjimkou C4 byl mírný nárůst pozorován i u klinicky zdravých koní ze stejné pastviny. Koncentrace acylkarnitinů klinických zdravých koní ze stejných pastvin byly zjišťovány také ve studii Bochnia *et al.*, (2015). Podobně byl mírný nárůst pozorován pro C4, C6, C8 a C10:1, ale také pro acylkarnitiny C5 a C10.

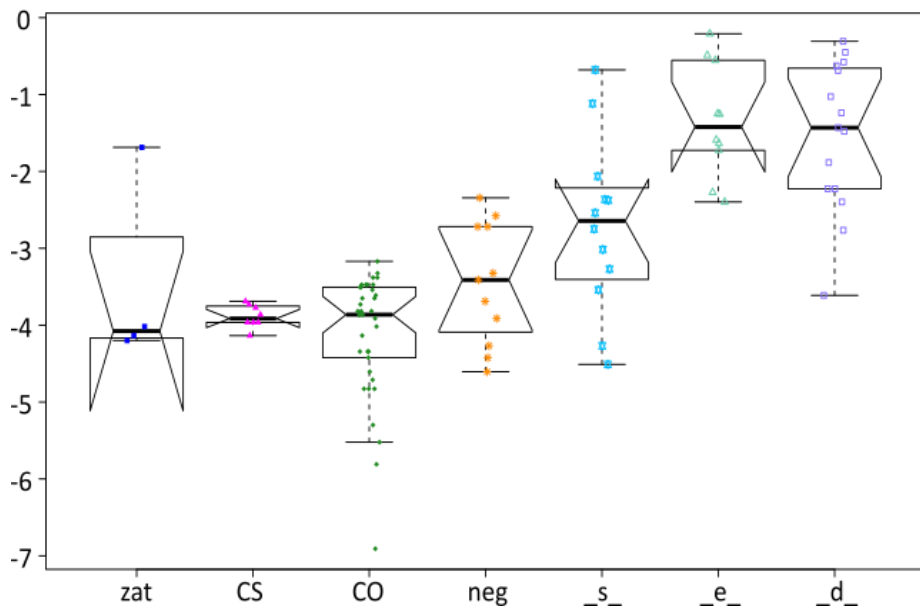
V rámci vyhodnocení získaných dat od vzorků koní s diagnózou zátěžové myopatie byl pozorován jen mírný nárůst hladin acylkarnitinů s krátkým a středním řetězcem oproti klinicky zdravým koním. Zátěžová myopatie, zvaná také jako zátěžová rabdomyolýza (ER – „Exertional Rhabdomyolysis“), je jednou z nejčastějších onemocnění svalů koní a bývá způsobena nadměrnou fyzickou zátěží (Hunt *et al.*, 2008). Během závodní sezóny se vyvíjí u 5–10 % koní. Hlavními příznaky jsou křeče, ztuhlost, kulhání, nadměrné pocení, neochota k pohybu atp. (MacLeay *et al.*, 1999)

a podobně jako u AM jsou v krvi zvýšené hladiny svalových enzymů CK a AST (Van Galen *et al.*, 2013). Vzhledem ke zvýšené aktivitě zmíněných enzymů mohou být z klinického pohledu tyto diagnózy zaměněny. V předchozí studii metabolický screening odhalil, že u sledovaných koní s akutní myopatií vyvolanou velkou fyzickou zátěží a jednoho koně s post-anestetickou myopatií došlo v plazmě ke zvýšení volného karnitinu, C2, C3 a C4 (Westermann *et al.*, 2008). Díky lišícímu se profilu acylkarnitinů by mohla být jejich analýza vhodná pro prvotní upřesnění, zda se může jednat o rbdomyolýzu vyvolanou nadměrnou zátěží koně nebo o AM, u které bývají zvýšené acylkarnitiny C6-C10.

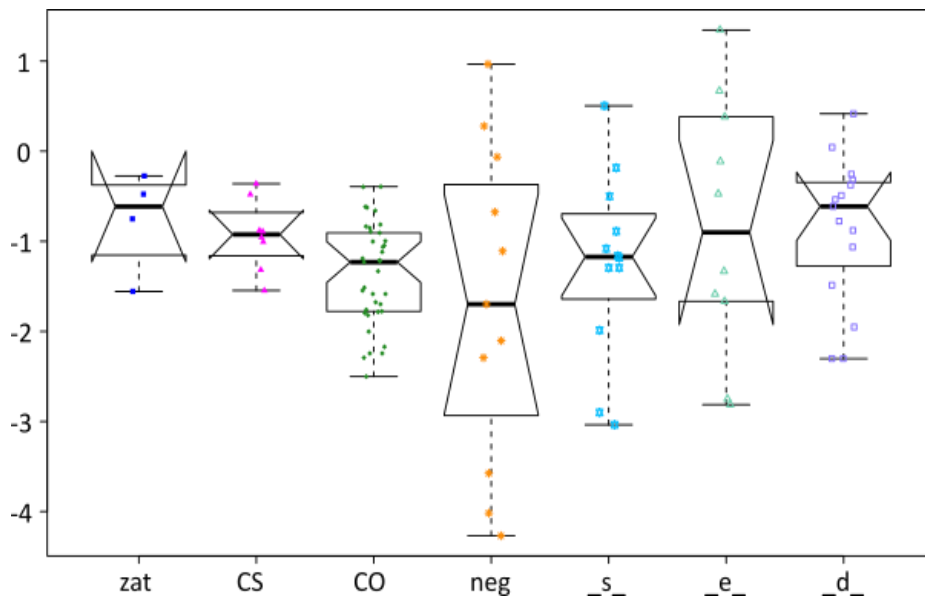
U krabicových grafů koní, kteří uhynuli nebo byli utraceni, lze pozorovat nárůst koncentrací acylkarnitinů vůči koním s AM, kteří přežili. Ve studii Boemer *et al.*, (2017) byla pro prognózu úmrtí zvířete zvolena kombinace C2, C10:2 a C18 acylkarnitinů. U těchto acylkarnitinů byly u uhynulých koní nalezeny signifikantně vyšší koncentrace než u koní, kteří přežili. Zajímavý byl také rozdíl ve věku koní. Polovina koní, kteří přežili atak AM, byla starší 7 let, naopak 64 % koní, u kterých došlo k úhynu, bylo mladších než 4 roky (Boemer *et al.*, 2017). Na obr. 35–37 jsou uvedeny krabicové grafy výše uvedených acylkarnitinů porovnávající skupiny koní, kteří přežili, uhynuli, nebo u nich byla provedena eutanázie. V rámci našich dat byl pozorován jen mírný nárůst C2, změna v hladinách C18 nebyla u těchto skupin signifikantní.



Obr. 35 Porovnání hladin acylkarnitinu C2 mezi jednotlivými skupinami.

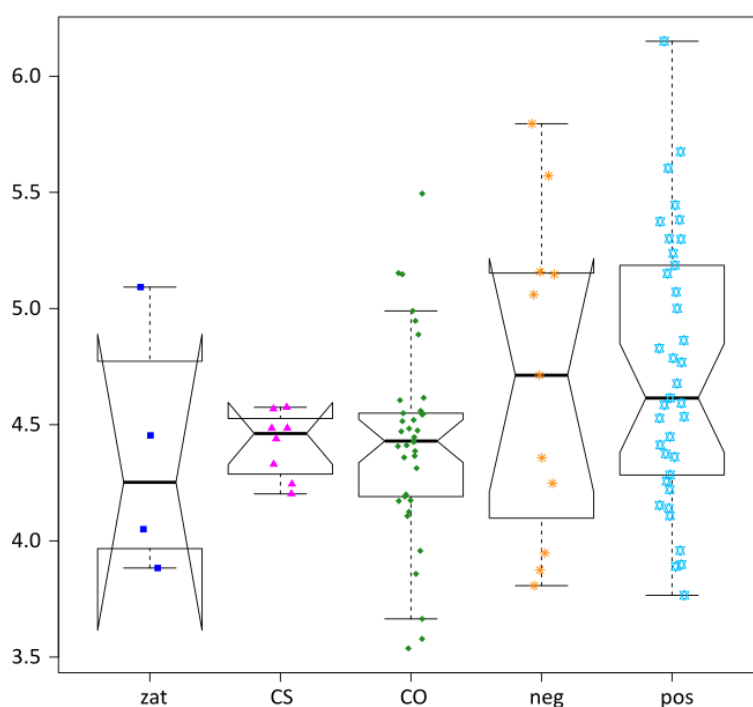


Obr. 36 Porovnání hladin acylkarnitinu C10:2 mezi jednotlivými skupinami.



Obr. 37 Porovnání hladin acylkarnitinu C18 mezi jednotlivými skupinami.

Vyhodnocením aminokyselin nebyly v krevních skvrnách koní s AM pozorovány výrazné rozdíly. V publikaci Karlíková *et al.*, (2016) byly u koní s AM nalezeny zvýšené hladiny aspartátu a leucinu, avšak aspartát nebyl součástí FIA-MS analýzy. Nález vyšší koncentrace leucinu mohl souviset s inhibicí isovaleryl-CoA dehydrogenasy hypoglycinem A (Tanaka *et al.*, 1971). Snížená aktivita tohoto enzymu byla také popsána ve svalové tkáni koní s AM v publikaci Westermann *et al.*, (2007). V rámci dat v této práci byl u skupiny AM vůči kontrolním koním pozorován jen mírný nárůst koncentrací větvených aminokyselin (včetně valinu obr. 33 a leucinu obr. 38). Toto zvýšení bylo nicméně patrné i u koní s negativním výsledkem na MCPA-karnitin.



Obr. 38 Porovnání hladiny leucinu/isoleucinu/alloisoleucinu mezi jednotlivými skupinami.

Analýza HGA, MCPG a jejich metabolitů byla provedena ze suchých krevních skvrn pomocí HPLC-MS/MS. U žádné skupiny se nepodařilo detekovat MCPG a MCPF-glycin. Koncentrace metabolitů HGA a MCPF-karnitinu byly u vzorků kontrolních koní CS pod limitem detekce. U koní s diagnózou AM, u kterých byl nalezen MCPA-karnitinu ($0,003\text{--}0,266 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$), byla prokázána také přítomnost MCPF-karnitinu ($0,014\text{--}1,209 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) jako jednoho z metabolitů MCPG. Ve velmi nízkých koncentracích byl MCPF-karnitin také potvrzen u pěti vzorků klinicky zdravých koní

ze stejných pastvin ($0,006\text{--}0,011 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$). Stejně tak byl u těchto koní nalezen i HGA ($0,074\text{--}2,027 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$). Ve studii Bochnia *et al.*, 2015 byla v séru klinicky zdravých koní ze stejných pastvin prokázána také přítomnost HGA, a to v koncentracích $0,33\text{--}11,12 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (AM: $17,2\text{--}58,7 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$), hladina MCPA-karnitinu byla těsně nad limitem detekce ($0,002\pm 0,001 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$). V moči těchto koní pak byla potvrzena přítomnost MCPA-glycinu ($0,015\pm 0,012 \mu\text{mol}/\text{mmoL}$ kreatininu), nicméně v séru nebyl detekován. V této práci nebyl ve skupině CO MCPA-glycin v krevních skvrnách nalezen.

Dále byla v práci zkoumána data z opakovaných odběrů získaných od koní s AM. Průběh onemocnění AM je doprovázen zvýšením koncentrací svalových enzymů v krvi. Hodnoty CK mohou být však v prvních hodinách po propuknutí AM v referenčním rozmezí a stoupat až následně v průběhu onemocnění (Van Galen *et al.*, 2013), což bylo pozorováno i v případě opakovaných odběrů v této práci. U těchto koní došlo v prvních hodinách po propuknutí onemocnění k nárůstu hodnot CK (maximální zjištěná konc. byla $16\,330 \mu\text{kat}\cdot\text{l}^{-1}$). Nicméně koncentrace CK u koní, kteří přežili, v následujících hodinách postupně klesala. U koní, kteří se uzdravili a zároveň byly k dispozici vzorky odebrané s velkým časovým odstupem od prvních projevů onemocnění, došlo po 336, resp. po 648 hodinách od prvních projevů onemocnění ke snížení koncentrace až k referenčním hodnotám (ref. hodnoty: $0,67\text{--}15,15 \mu\text{kat}/\text{l}$).

Hypoglycin A byl v případě vícenásobných odběrů detekován u většiny vzorků krevních skvrn i několik dnů po propuknutí onemocnění. Naopak u metabolitů MCPA-karnitinu, MCPA-glycinu a MCPF-karnitinu došlo u většiny uzdravených koní postupně ke snížení koncentrací pod mez detekce. Konjugáty s karnitinem byly detekovatelné po delší dobu než MCPA-glycin. V krevních skvrnách koně D111, od něž bylo k dispozici 12 odběrů, byly v prvních 48 hodinách detekovány všechny metabolity. Díky vzorkům s velkým časovým odstupem od prvních příznaků onemocnění můžeme u tohoto koně pozorovat snížení koncentrací jednotlivých metabolitů pod limitní hodnoty. Pouze HGA byl v případě tohoto koně nalezen i 336 hodin po zpozorování prvních příznaků. U koně s označením D118 došlo v rámci 48 h k postupnému poklesu koncentrací HGA, MCPA-karnitinu a C6 v porovnání s prvním odběrem. Na rozdíl od koncentrací CK, MCPF-karnitinu, C8 a C8:1, které byly v tomto bodě (48 h) nejvyšší.

6 Závěr

V teoretické části této diplomové práce byla vypracována literární rešerše na téma atypická myopatie. Součástí práce bylo shrnutí dosavadních poznatků o onemocnění včetně příznaků, histopatologických a laboratorních nálezů a možnostech léčby. Dále byl popsán inhibiční vliv metabolitů HGA a MCPG na jednotlivé kroky β -oxidace, ke kterým dochází při atypické myopatii.

V praktické části byla vytvořena interní databáze vzorků koní. Následně byly analyzovány vzorky krevních skvrn koní s podezřením na AM, koní bez klinických příznaků AM pasoucích se na stejných pastvinách, kontrolních koní a koní s diagnózou zátěžové myopatie. Pomocí metody FIA-MS a následné statistické analýzy byly zkoumány změny v metabolickém profilu acylkarnitinů a aminokyselin. U koní s diagnózou AM byly nalezeny zvýšené koncentrace acylkarnitinů s krátkým a středním řetězcem vůči vzorkům kontrolním. Nejvíce diskriminující byly C6, C8 a C8:1. Následně pomocí HPLC-MS/MS byly ve vzorcích krevních skvrn hledány HGA, MCPG a jejich metabolity MCPA-karnitin, MCPA-glycin, MCPF-karnitin a MCPF-glycin. U některých koní s podezřením na atypickou myopatii byly k dispozici vícenásobné odběry vzorků krevních skvrn dokládající průběh onemocnění, díky čemuž byly pozorovány změny v koncentracích jednotlivých metabolitů v čase.

7 Literatura

- Allenbach L., Poirier Y. (2000): Analysis of the Alternative Pathways for the β -oxidation of Unsaturated Fatty Acids using Transgenic Plants Synthesizing Polyhydroxyalkanoates in Peroxisomes. *Plant Physiology* **124**(3), 1159-1168.
- Amendt, B. A., & Rhead, W. J. (1986): The multiple acyl-coenzyme A dehydrogenation disorders, glutaric aciduria type II and ethylmalonic-adipic aciduria. Mitochondrial fatty acid oxidation, acyl-coenzyme A dehydrogenase, and electron transfer flavoprotein activities in fibroblasts. *The Journal of clinical investigation* **78**(1), 205-213.
- Bahnson B. J., Anderson V. E., Petsko G. A. (2002): Structural mechanism of enoyl-CoA hydratase: three atoms from a single water are added in either an E1cb stepwise or concerted fashion. *Biochemistry* **41**(8), 2621-2629.
- Baise E., Habyarimana J. A., Amory H., Boemer F., Douny C., Gustin P., Marcillaud-Pittel C., Patarin F., Weber M., Votion D. M. (2015): Samaras and seedlings of *Acer pseudoplatanus* are potential sources of hypoglycin A intoxication in atypical myopathy without necessarily inducing clinical signs. *Equine Veterinary Journal* **48**, 414-417.
- Barceloux, D. G. (2009): Akee fruit and Jamaican vomiting sickness (*Blighia sapida* König). *Disease-a-month: DM* **55**(6), 318.
- Boemer, F., Dettleux, J., Cello, C., Amory, H., Marcillaud-Pitel, C., Richard, E., ... & Votion, D. M. (2017): Acylcarnitines profile best predicts survival in horses with atypical myopathy. *PloS one* **12**(8).
- Bochnia M., Ziegler J., Sander J., Uhlig A., Schaefer S., Vollstedt S., Zeyner A. (2015): Hypoglycin A content in blood and urine discriminates horses with atypical myopathy from clinically normal horses grazing on the same pasture. *Plos One* **10**, 9-11.
- Bochnia M., Sander J., Ziegler J., Terhardt M., Sander S., Janzen N., Cavalleri J. V., Zuraw A., Wensch-Dorendorf M., Zeyner A. (2019): Detection of MCPG metabolites in horses with atypical myopathy. *PloS one* **14**(2).
- Bowen J. N., Craig J. F. (1942): Myoglobinuria in horses. *The Veterinary Records* **35**, 354.
- Brandt K., Hinrichs U., Glitz F., Landes E., Schulze C., Deegen E., Pohlenz J., Coenen M. (1997): Atypische myoglobinurie der weidepferde. *Pferdeheilkunde* **13**, 27-34.
- Cassart D., Baise E., Cherel Y. (2007): Morphological alterations in oxidative muscles and mitochondrial structure associated with equine atypical myopathy. *Equine veterinary journal* **39**, 26-32.
- Cibulka R. (2005): Metabolické účinky karnitinu a jeho význam v medicíně. *Klinická biochemie a metabolismus* **13**(34), 24-28.
- Criddle L. M. (2003): Rhabdomyolysis. Pathophysiology, recognition, and management. *Critical Care Nurse* **23**(6), 14-30.
- Dayer-Berenson, L. (1994): Rhabdomyolysis: a comprehensive guide. *ANNA journal* **21**(1), 15-8.
- de Hoffmann E., Stroobant V. (2007): Mass spectrometry, principles and application. 3rd ed. John Wiley & Sons Ltd, England, 489 stran.
- Ferdinandusse, S., Friederich, M.W., Burlina, A., Ruiten, J.P.N., Coughlin, C.R., Dishop, M.K., Gallagher, R.C., Bedoyan, J.K., Vaz, F.M., Waterham, H.R., *et al.* (2015): Clinical and biochemical characterization of four patients with mutations in ECHS1. *Orphanet J. Rare Dis.*, **10**, 79.
- Finno C. J., Valberg S. J., Wunschmann A., Murphy J. M. (2006): Seasonal pasture myopathy in horses in the midwestern United States: 14 cases (1998-2005). *Journal of American Veterinary Medical Association* **229**, 1134-1141.
- Fong, J.C., Schulz, H. (1977): Purification and properties of pig heart crotonase and the presence of short chain and long chain enoyl coenzyme A hydratases in pig and guinea pig tissues. *J. Biol. Chem.*, **252**, 542-547.
- Friedecky D., Lemr K. (2012): Úvod do hmotnostní spektrometrie. *Klin. Biochem. Metab* **20** (41), 154-159.

- Gardlo A., Friedecký D., Najdekr L., Karlíková R., Adam T., (2019): Metabol: The statistical analysis of metabolomic data.
- Gerhard M., Schomburg D. (2012): *Biochemical pathways: an atlas of biochemistry and molecular biology*. 2nd ed., John Wiley a Sons, New Jersey.
- Gonzalez-Medina S., Ireland J. L., Piercy R. J., Newton J. R., Votion D. M. (2017): Equine atypical myopathy in the UK: epidemiological characteristics of cases reported from 2011 to 2015 and factor associated with survival. *Equine Veterinary Journal* **49**, 746-752.
- Gronert, G. A. (2001): Cardiac arrest after succinylcholinemortality greater with rhabdomyolysis than receptor upregulation. *Anesthesiology: The Journal of the American Society of Anesthesiologists* **94**(3), 523-529.
- Grunes D. E., Scordi-Bello I., Suh M., Florman S., Yao J., Fiel M. I., Thung S. N. (2012): Fulminant hepatic failure attributed to ackee fruit ingestion in a patient with sickle cell trait. *Case report in transplantation*, 2012.
- Haskins, N. (1998): Rhabdomyolysis and acute renal failure in intensive care. *Nursing in critical care* **3**(6), 283-288.
- Hine D.G., Tanaka K. (1984): Capillary gas chromatographic/mass spectrometric analysis of abnormal metabolites in hypoglycin-treated rat urine. *Biomedical Mass Spectrometry* **11**, 332-339.
- Ho C. S., Lam C. W. K., Chan M. H. M., Cheung R. C. L., Law L. K., Lit L. C. W., Ng K. F., Suen M. W. M., Tai H. L. (2003): Electrospray ionization mass spectrometry: principles and clinical applications. *Clin Biochem Rev* **24**, 3-12.
- Houten S. M., & Wanders R. J. (2010): A general introduction to the biochemistry of mitochondrial fatty acid β -oxidation. *Journal of inherited metabolic disease* **33**(5), 469-477.
- Huerta-Alardin A. L., Varon J., Marik P. E. (2005): Bench-to-bedside review: Rhabdomyolysis—an overview for clinicians. *Critical Care* **9**, 158–169.
- Hunt L. M., Valberg S. J., Steffenhagen K., McCue M. E. (2008): An epidemiologic study of myopathies in warm blood horses. *Equine Veterinary Journal* **40**, 171–177.
- Chegary M., Brinke H., Ruiter J.P., et al. (2009): Mitochondrial long chain fatty acid beta-oxidation in man and mouse. *Biochim Biophys Acta* **1791**, 806–815.
- Cheney P. (1994): Early management and physiologic changes in crush syndrome. *Critical care nursing quarterly* **17**(2), 62-73.
- Isenberg, S. L., Carter, M. D., Hayes, S. R., Graham, L. A., Johnson, D., Mathews, T. P., ... & Johnson, R. C. (2016): Quantification of toxins in soapberry (Sapindaceae) arils: hypoglycin A and methylenecyclopropylglycine. *Journal of agricultural and food chemistry* **64**(27), 5607-5613.
- Karlíková, R., Šíroká, J., Jahn, P., Friedecký, D., Gardlo, A., Janečková, H., Hrdinová F., Drábková Z., Adam, T. (2016): Equine atypical myopathy: A metabolic study. *The Veterinary Journal* **216**, 125-132.
- Karlíková R., Šíroká J., Mech M., Friedecký D., Janečková H., Mádrová L., Hrdinová F., Drábková Z., Dobešová O., Adam T., Jahn P. (2017): Newborn foal with atypical myopathy. *Journal of Veterinary Internal Medicine* **32**(5), 1768-1772.
- Katibi O. S., Olaosebikan R., Abdulkadir M. B., Ogunkunle T. O., Ibraheem R. M., Murtala R. (2015): Ackee Fruit Poisoning in Eight Siblings: Implications for Public Health Awareness. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **93**(5), 1122-1123.
- Keen J. (2011): Diagnosis and management of equine rhabdomyolysis. *In Practice* **33**(2), 68–77.
- Khan F. Y. (2009): Rhabdomyolysis: A review of the literature. *The Netherlands Journal of Medicine* **67**, 272-283.
- Kirwan J. (2013): Metabolomics for the practising vet. *In Practice* **35**, 438-445.
- Kodíček M., Valentová O., Hynek R. (2018): *Biochemie chemický pohled na biologický svět*. 2re ed., Vysoká škola chemicko-technologická, Praha, 408 stran.
- Lai M.T., Li D., Oh E., Liu H.W. (1993): Inactivation of medium-chain acyl-CoA dehydrogenase by a metabolite of hypoglycin: Characterization of the major turnover

- product and evidence suggesting an alternatice flavin modification pathway. *Journal of the American Chemical Society* **115**, 1619-1628.
- Le W, Abbas AS, Sprecher H, Vockley J, Schulz H. (2000): Long-chain acyl-CoA dehydrogenase is a key enzyme in the mitochondrial beta-oxidation of unsaturated fatty acids. *Biochim Biophys Acta*, **1485**,121–128.
- McKenzie R. K., Hill F. I., Habyarimana J. A., Boemer F., Votion D. M. (2016): Detection of hypoglycin A in the seeds of sycamore (*Acer pseudoplatanus*) and box elder (*A. negundo*) in New Zealand: the toxin associated with cases of equine atypical myopathy. *New Zealand Veterinary Journal* **64**, 182-187.
- MacLeay J. M., Sorum S. A., Valberg S. J., Marsh W. E., Sorum M. D. (1999): Epidemiologic analysis of factors influencing exertional rhabdomyolysis in Thoroughbreds. *American Journal of Veterinary Research* **60**, 1562-1566.
- Matouš B. et al. (2010): Lipidy. In: *Základy lékařské chemie a biochemie*. První vydání. (Houdek L.), Galén, Praha, 59.
- Matouš B. et al. (2010): Metabolismus lipidů. In: *Základy lékařské chemie a biochemie*. První vydání. (Houdek L.), Galén, Praha, 151-175.
- Melde K., Jackson S., Bartlett K., Sherratt H.S.A., Ghisla S. (1991): Metabolic consequences of methylencyclopropylglycine poisoning in rats. *Biochemical Journal* **274**, 395-400.
- Murray R.K, Granner D.K, Mayes P.A, et al. (2000): In: *Harper's biochemistry*. 25th ed. New York: McGraw-Hill; 2000.
- Nanita S. C., Kaldon L. G. (2016): Emerging flow injection mass spektrometry methods for high-throughput quantitative analysis. *Anal Bioanal Chem* **408**, 23-33.
- Palencia P., Rivero J. L. L. (2007): Atypical myopathy in two grazing horses in northern Spain. *Veterinary records* **161**, 346-348.
- Putri S. P., Matsuda F., Bamba T. (2015): Mass spectrometry-based metabolomics. *Boca Raton: CRC Press, Taylor & Francis Group*, 2015.
- Puyalto-Moussu C., Saison A., Leconte D. (2004): Myoglobinurie atyique: epidemiologie de cas Frans caise de myopathie aigue. *Pratique vétérinaire equine* **36**, 29-35.
- Ramsay R. R., Gandour R. D., van der Leij F. R. (2001): Molecular enzymology of carnitine transfer and transport. *Biochimica et Biophysica Acta* **1546**, 21–43.
- Růžička J., Hansen E. H. (1988): *Flow Injection Analysis*. 2nd ed. John Wiley & Sons, Chichester, UK, 524 stran.
- Sander, J., Cavalleri, J. M., Terhardt, M., Bochnia, M., Zeyner, A., Zuraw, A., ... & Janzen, N. (2016): Rapid diagnosis of hypoglycin A intoxication in atypical myopathy of horses. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* **28(2)**, 98-104.
- Sander J, Terhardt M, Sander S, Janzen N (2017): Quantification of Methylencyclopropyl Compounds and Acyl Conjugates by UPLC-MS/MS in the study of the biochemical effects of the Ingestion of canned. Ackee (*Blighia sapida*) and Lychee (*Litchi chinensis*). *Journal of Agri. Food Chem* **65**, 2603–2608.
- Sanford, A. A., Isenberg, S. L., Carter, M. D., Mojica, M. A., Mathews, T. P., Laughlin, S., ... & Johnson, R. C. (2018): Quantification of hypoglycin A and methylenecyclopropylglycine in human plasma by HPLC-MS/MS. *Journal of Chromatography B* **1095**, 112-118.
- Shrivastava, A., Srikantiah, P., Kumar, A., Bhushan, G., Goel, K., Kumar, S., ... & Tulsian, Y. (2015): Outbreaks of unexplained neurologic illness—Muzaffarpur, India, 2013–2014. *MMWR. Morbidity and mortality weekly report* **64(3)**, 49.
- Shrivastava, A., Kumar, A., Thomas, J. D., Laserson, K. F., Bhushan, G., Carter, M. D., ... & Dwivedi, M. (2017): Association of acute toxic encephalopathy with litchi consumption in an outbreak in Muzaffarpur, India, 2014: a case-control study. *The Lancet Global Health* **5(4)**, 458-466.
- Schug K. A., Serrano C., Fryčák P. (2010): Controlled band dispersion for quantitative binding determination and analysis with electrospray ionization-mass spektrometry. *Mass Spectrom Rev* **29**, 806-829.
- Snyder L.R., Kirkland J.J., Glajch J.L. (2012): *Practical HPLC method development*. 2nd ed. John Wiley & Sons, Chichester, UK, 800 stran.

- Sponseller, B. T., Valberg, S. J., Schultz, N. E., Bedford, H., Wong, D. M., Kersh, K. and Shelton, G. D. (2012): Equine multiple acyl-CoA dehydrogenase deficiency (MADD) associated with seasonal pasture myopathy in the midwestern United States. *Journal of Veterinary Internal Medicine* **26**, 1012-1018.
- Swigoňová Z., Mohsen Al-W., Vockley J. (2009): Acyl-CoA Dehydrogenases: Dynamic History of Protein Family Evolution. *Journal of molecular evolution* **69**(2), 176-193.
- Tanaka, K., Miller, E. M., Isselbacher, K. J. (1971): Hypoglycin A: A specific inhibitor of isovaleryl CoA dehydrogenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **68**, 20–24.
- Tanaka K., Kean E. A., Johnson B. (1976): Jamaican Vomiting Sickness: Biochemical Investigation of two cases. *The New England Journal of Medicine* **295**, 461–467
- Unger-Torroledo L., Straub R., Lehmann A.D., Graber F., Stahl C., Frey J., Gerber V., Hoppeler H. and Baum O. (2010): Lethal toxin of *Clostridium sordellii* is associated with fatal equine atypical myopathy. *Vet. Microbiol* **144**, 487-492.
- Unger L., Nicholson A., Jewitt E. M. Gerber V., Hegeman A., Sweetman L., Valberg S. (2014): Hypoglycin A concentration in seeds of acer pseudoplatanus trees growing on atypical myopathy-Affected and control pastures. *Journal of veterinary internal medicine* **28**, 1289-1293.
- Valberg S. J., Sponseller B. T., Hegeman A. D., Earing J., Bender J. B., Martinson K. L., Patterson S. E., Sweetman L. (2013): Seasonal pasture myopathy/atypical myopathy in North America associated with ingestion of hypoglycin A within seeds of the box elder tree. *Equine Veterinary Journal* **45**, 419-426.
- van der Kolk, J. H., Wijnberg, I. D., Westermann, C. M., Dorland, L., de Sainvan der Velden, M. G., Kranenburg, L. C., Duran, M., Dijkstra, J. A., van der Lugt, J. J., Wanders, R. J. and Gruys, E. (2010): Equine acquired multiple acyl-CoA dehydrogenase deficiency (MADD) in 14 horses associated with ingestion of Maple leaves (*Acer pseudoplatanus*) covered with European tar spot (*Rhytisma acerinum*). *Molecular Genetics and Metabolism* **101**, 289-291.
- van der Leij F. R., Huijkman N. C., Boomsma C., Kuipers J. R., Bartelds B. (2000): Genomics of the human carnitine acyltransferase genes. *Molecular Genetics and Metabolism* **71**, 139–153.
- van Galen G., Amory H., Busschers E., Cassart D., De Bruijn M., Gerber V., Keen J., Lefere L., Pitel C. M., Marr C., Muller J. M., Pineau X., Saegerman C., Sandersen C., Serteyn D., Torfs S., Unger L., Verwilghen D., Votion D. M. (2010): European outbreak of atypical myopathy in the autumn 2009. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care* **20**, 528-532.
- van Galen G., Marcillaud Pitel C., Saegerman C., Patarin F., Amory H., Baily J. D., Cassart D., Gerber V., Hahn C., Harris P., Keen J. A., Kirschvink N., Lefere L., McGorum B., Muller J. M., Picavet M. T., Piercy R. J., Roscher K., Serteyn D., Unger L., van der Kolk J. H., van Loon G., Verwilghen D., Westermann C.M., Votion D.M. (2012): European outbreaks of atypical myopathy in grazing equids (2006–2009): spatiotemporal distribution, history and clinical features. *Equine veterinary journal* **44**(5), 614-620.
- Von H., Chang J., Boehm H. (1964): Metabolism and metabolic effects of hypoglycin. *Biochim. Biophys. Acta* **90**, 611-613.
- Votion D. M., Hahn C. N., Milne E. M. (2007a): Concurrent conditions in single cases: the need to differentiate equine dysautonomia (grass sickness) and atypical myopathy. *Equine Veterinary Journal* **39**, 390-392.
- Votion D. M., Linden A., Saegerman C., Engels P., Ericum M., Thiry E., Delguste C., Rouxhet S., Demoulin V., Navet R., Sluse F., Serteyn D., van Galen G., Amory H. (2007b): History and clinical features of atypical myopathy in horses in Belgium (2000-2005). *Journal of Veterinary Internal Medicine* **21**, 1380-1391.
- Votion D. M., Serteyn D. (2008): Equine atypical myopathy: A review. *The veterinary journal* **178**, 185-190.
- Votion D. M., van Galen G., Sweetman L., Boemer F., De Tullio P., Dopagne C., Lefere L. (2014): Identification of methylcyclopropyl acetic acid in serum of European horses with atypical myopathy. *Equine Veterinary Journal* **46**, 146-149.

- Wanders R.J., Vreken P., Boer M.E., Wijburg F.A., Gennip A.H., IJlst L. (1999): Disorders of mitochondrial fatty acyl-CoA beta-oxidation. *Journal of Inherited Metabolic Disease* **22**,442–487.
- Warren J. D., Blumbergs P.C., Thompson P.D. (2002): Rhabdomyolysis: a review. *Muscle Nerve* **25**, 332–347.
- Watmough N. J., Frerman F. E. (2010): The electron transfer flavoprotein: Ubiquinone oxidoreductases. *Biochimica et Biophysica Acta* **1797**, 1910-1916.
- Wenz A., Thorpe C., Ghisla S. (1981): Inactivation of general acyl-CoA dehydrogenase from pig kidney by a metabolite of hypoglycin A. *Journal of Biological Chemistry* **256**, 9809-9812.
- Westermann C. M., de Sain-van der Velden M. G. M., van der Kolk J.H., Berger R., Wijnberg I.D., Koeman J.P., Wanders R.J.A., Lenstra J.A., Testerink N., Vaandrager A.B. (2007): Equine biochemical multiple acyl-CoA dehydrogenase deficiency (MADD) as a cause of rhabdomyolysis. *Molecular Genetics and Metabolism* **91**, 362-369.
- Westermann C. M., Dorland L., Votion D. M., de Sain-van der Velde M. G., Wijnberg I. D., Wanders R. J., Spliet W. G., Testerink N., Berger R., Ruiter J. P., van der Kolk J. H. (2008): Acquired multiple Acyl-CoA dehydrogenase deficiency in 10 horses with atypical myopathy. *Neoromuscular Disorder* **18**, 355-364.
- Westermann C. M., van Leeuwen R., van Raamsdonk L.W., Mol H. G. (2016): Hypoglycin A concentrations in maple tree species in the Netherlands and the occurrence of atypical myopathy in horses. *Journal of Veterinary Internal Medicine* **30**, 880-884.
- Witkowska-Piłaszewicz O., Kaszak I., Żmigrodzka M., Winnicka A., Sacharczuk M., Szczepaniak J., Cywinska A. (2019): Equine atypical myopathy – a review. *Animal Science Papers and Reports* **37**, 23-242.
- Wojtowicz P., Zrostlíková J., Šťastná V., Dostálová E., Žídková L., Bruheim P., Adam T. (2012): Comprehensive two-dimensional gas chromatography coupled to time-of-flight mass spectrometry in human metabolomics. In: *Gas Chromatography – Biochemicals, Narcotics and Essential Oils*, (Salih B., çelikbiçak Ö. eds.), InTech, Rijeka, Croatia, 29-50.
- Wu L, Lin S, Li D (2008): Comparative inhibition studies of enoyl-CoA hydratase 1 and enoyl-CoA hydratase 2 in long-chain fatty acid oxidation. *Org Lett* **10**, 3355–3358.
- Yamada, K., Aiba, K., Kitaura, Y., Kondo, Y., Nomura, N., Nakamura, Y., Fukushi, D., Murayama, K., Shimomura, Y., Pitt, J., *et al.* (2015): Clinical, biochemical and metabolic characterisation of a mild form of human short-chain enoyl-CoA hydratase deficiency: Significance of increased N-acetyl-S-(2-carboxypropyl)cysteine excretion. *J. Med. Genet.*, **52**, 691–698.
- Žuraw A., Dietert K., Kühnel S., Sander J., Klopfleisch R. (2016): Equine atypical myopathy caused by hypoglycin A intoxication associated with ingestion of sycamore male tree seeds. *Equine veterinary journal* **48** (4), 418-421.

Internetové zdroje

Mendelova univerzita v Brně: https://is.mendelu.cz/eknihovna/opory/zobraz_cast.pl?cast=52970 (4. 2. 2020).

Přírodovědecká fakulta Univerzita Karlova: <http://web.natur.cuni.cz/~tesarove/hplc.pdf> (6.2.2020).

Wikipedia: https://en.wikipedia.org/wiki/Acyl-CoA_dehydrogenase.

Wikipedia: https://en.wikipedia.org/wiki/File:Triple_quadrupole_schematic.jpeg (19. 4. 2018).

8 Seznam použitých symbolů a zkratek

ACAD	acyl-CoA dehydrogenasa
ACOX	acyl-CoA oxidasa
AM	atypická myopatie
AMK	aminokyselina
ATP	adenosintrifosfát
CK	kreatinkinasa
CACT	karnitinacylkarnitintransferasa
CoA	koenzym A
CPT I	karnitinpalmotoyltransferasa I
CPT II	karnitinpalmitoyltransferasa II
ECH1	enoyl-CoA hydratasa pro krátký řetězec
ECH2	peroxisomální enoyl-CoA hydratasa
ETF	elektronový transportní flavoproteinový systém
FAD	flavinadenindinukleotid (ox)
FADH ₂	flavinadenindinukleotid (red)
FIA	průtoková injekční analýza
GC	plynová chromatografie
GCD	glutaryl-CoA dehydrogenasa
HGA	hypoglycin A
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IBD	isobutyryl-CoA dehydrogenasa
IT-ICR	iontová past s cyklotronovou rezonancí
IVD	isovaleryl-CoA dehydrogenasa
LC	kapalinová chromatografie
LCAD	acyl-CoA dehydrogenasa pro dlouhý řetězec
LCEH	enoyl-CoA hydratasa pro dlouhý řetězec
MADD	deficit acyl-CoA dehydrogenasy se středně dlouhým řetězcem
MCAD	acyl-CoA dehydrogenasa pro středně dlouhý řetězec
MCP	methylencyklopropyl
MCPA	methylencyklopropylacetyl
MCPF	methylencyklopropylformyl
MCPG	methylencyklopropylglycin

MK	mastné kyseliny
MRM	sledování produktu rozpadu molekulárního iontu
MS	hmotnostní spektrometrie
MCDV	vícerozměrná statistická analýza
NAD ⁺	nikotinamidadenindinukleotid (ox)
NADH	nikotinamidadenindinukleotid (red)
OPLS-DA	ortogonální diskriminační analýza částečných nejmenších čtverců
PCA	analýza hlavních komponent
PCs	hlavní komponenty
PCV	hematokrit
PLS-DA	diskriminační analýza nejmenších čtverců
QC	kontrola kvality
QqQ	trojitý kvadrupól
QqTOF	kvadrupól s průletovým analyzátozem
SBCAD	acyl-CoA dehydrogenasa s krátkým/rozvětveným řetězcem
SCAD	acyl-CoA dehydrogenasa pro krátký řetězec
VLCAD	acyl-CoA dehydrogenasa pro velmi dlouhý řetězec