

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
LÉKAŘSKÁ FAKULTA



Mgr. Štěpán Kouřil

METABOLOMICKÁ A LIPIDOMICKÁ ANALÝZA
BIOLOGICKÝCH MATERIÁLŮ

DISERTAČNÍ PRÁCE

Školitel: doc. RNDr. David Friedecký, Ph.D.

Obor: Lékařská chemie a klinická biochemie

Disertační práce byla vypracována během prezenční formy doktorského studia na Ústavu lékařské chemie a biochemie Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci v období září 2017 – listopad 2021.

Prohlašuji, že jsem disertační práci vypracoval samostatně s použitím uvedené literatury, kterou cituji. Spoluautoři souhlasí s použitím publikovaných výsledků.

V Olomouci dne 15. 11. 2021

.....

Štěpán Kouřil

PODĚKOVÁNÍ

Děkuji svému školiteli doc. RNDr. Davidu Friedeckému, Ph.D. za odborné vedení a pozitivní přístup po celou dobu postgraduálního studia. Dále děkuji prof. RNDr. Tomáši Adamovi, Ph.D., kolegům z Laboratoře metabolomiky, spolupracovníkům z Oddělení klinické biochemie FNOL a všem zahraničním kolegům, kteří se se mnou podíleli na odborných publikacích. V neposlední řadě děkuji všem, kteří mne v průběhu studia podporovali.

BIBLIOGRAFICKÁ IDENTIFIKACE

Jméno a příjmení autora: Mgr. Štěpán Kouřil

Název disertační práce: Metabolomická a lipidomická analýza biologických materiálů.

Název disertační práce anglicky: Metabolomic and lipidomic analysis of biological materials.

Studijní program: Lékařská chemie a klinická biochemie

Školitel: doc. RNDr. David Friedecký, Ph.D.

Rok obhajoby: 2022

Klíčová slova v češtině: metabolomika, lipidomika, hmotnostní spektrometrie, procesování dat, Alzheimerova choroba

Klíčová slova v angličtině: metabolomics, lipidomics, mass spectrometry, data processing, Alzheimer's disease

SOUHRN

Metabolomika se zabývá studiem endogenních a exogenních nízkomolekulárních látek (metabolitů) v biologickém systému. Necílený metabolomický přístup s využitím kapalinové chromatografie v kombinaci s vysokorozlišující hmotnostní spektrometrií umožňuje identifikaci nových biomarkerů onemocnění, případně může být vhodným nástrojem pro sledování odpovědi na léčbu na individuální úrovni či samotné studium patobiochemických procesů.

V případě necíleného experimentu je nutné extrahovat ze zdrojových dat potenciální metabolity pomocí tzv. preprocessingu, v průběhu kterého dochází mimo jiné ke sloučení signálů patřící jednomu analytu. Současné nástroje využívají složité algoritmy pro detekci izotopů, aduktů či fragmentů pocházející z iontového zdroje hmotnostního spektrometru za účelem zabránění výskytu multiplicit v datech a případné chybné identifikaci potenciálních metabolitů. V této práci je popsán skript CROP založený na Pearsonově párové korelaci a retenční charakteristice společně s grafickým znázorněním pomocí korelační sítě, který je schopen tyto falešně pozitivní výsledky účinně odstranit.

Alzheimerova choroba (AD) je progresivní neurodegenerativní onemocnění, které je nejčastější příčinou demence vůbec a představuje tak vzhledem ke svému stále se zvyšujícímu výskytu globální problém. Periferní infekce následované systémovým zánětem mohou přispívat ke vzniku AD a urychlovat její progresi v pozdějším věku. Za pomoci cílené metabolomické analýzy a necíleného lipidomického přístupu byla provedena analýza krevní plazmy, mozkové kůry a hippocampu kontrolní skupiny myši (WT) a transgenních myši APdE9, kterým byl podáván lipopolysacharid (LPS) indukující neurozánět. U myši APdE9 + LPS byly pozorovány změny v hladinách lysinu, myo-inositolu, sperminu, fosfokreatinu, acylkarnitinů a diacylglycerolů, oproti myším APdE9 bez LPS. U kontrolních myši byl vliv LPS na metabolom a lipidom zanedbatelný. Tato zjištění jsou v souladu s teorií, že infekcí vyvolaný systémový zánět urychluje změny biochemických drah u myši s AD, ale nikoli u kontrolních zvířat. Výsledky studie přispívají k hlubšímu pochopení úlohy systémového zánětu v patogenezi AD.

Klíčová slova: metabolomika, lipidomika, hmotnostní spektrometrie, procesování dat, Alzheimerova choroba

SUMMARY

Metabolomics deals with the study of endogenous and exogenous low molecular weight substances (metabolites) in a biological system. A non-targeted metabolomics approach using liquid chromatography in combination with high-resolution mass spectrometry allows the identification of new biomarkers of disease, or may be a suitable tool for monitoring response to the treatment at the individual level or for the study of pathobiochemical processes themselves.

In the case of a non-targeted experiment, it is necessary to extract potential metabolites from the source data by so-called preprocessing, during which, among other things, signals belonging to one analyte are merged. Current software tools use sophisticated algorithms to detect isotopes, adducts, or in-source fragments in order to avoid the occurrence of multiplicities in the data and possible misidentification of potential metabolites. In this work, a CROP script based on Pearson pairwise correlation and retention characteristics along with a graphical representation using a correlation network that is able to effectively remove these false positive features is described.

Alzheimer's disease (AD) is a progressive neurodegenerative disorder that is the most common cause of dementia in general and thus represents a global problem due to its increasing prevalence. Peripheral infections followed by systemic inflammation may contribute to the development of AD and accelerate its progression in later life. Using a targeted metabolomic analysis and a non-targeted lipidomic approach, blood plasma, cortex, and hippocampus from wild-type (WT) and APdE9 transgenic mice treated with neuroinflammation-inducing lipopolysaccharide (LPS) were analyzed. Changes in the levels of lysine, myo-inositol, spermine, phosphocreatine, acylcarnitines, and diacylglycerols were observed in APdE9 + LPS mice, compared to APdE9 mice without LPS. In WT mice, the effect of LPS administration on the metabolome and lipidome was negligible. These findings are consistent with the theory that infection-induced systemic inflammation accelerates changes in biochemical pathways in AD mice but not in WT animals. The results of the study contribute to a deeper understanding of the role of systemic inflammation in the pathogenesis of AD.

Keywords: metabolomics, lipidomics, mass spectrometry, data processing, Alzheimer's disease

OBSAH

1	ÚVOD	1
2	TEORETICKÁ ČÁST	3
2.1	Metabolomika a lipidomika	3
2.2	Postup necílené metabolomické analýzy pomocí hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením	5
2.2.1	Definice biologické otázky a design experimentu	6
2.2.2	Příprava vzorku, preanalytická fáze	7
2.2.3	LC-HRMS analýza dat	8
2.2.3.1	Uspořádání analytické série a využití QC vzorků	8
2.2.3.2	Kapalinová chromatografie – LC	14
2.2.3.3	Hmotnostní spektrometrie – MS	15
2.2.4	Procesování dat	18
2.2.4.1	Peak picking	18
2.2.4.2	Filtrování, korekce driftu, normalizace, odečet blanku	20
2.2.4.3	Anotace neznámých látek	22
2.2.5	Statistická analýza	23
2.2.5.1	Jednorozměrné metody	23
2.2.5.2	Vícerozměrné metody	24
2.3	Alzheimerova choroba	26
2.3.1	Význam metabolomiky ve studiu Alzheimerovy choroby	27
3	CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE	32
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	33
4.1	Redukce multiplicit v metabolomických datech na základě korelačních vztahů	33
4.1.1	Materiál a metody	33
4.1.1.1	Chemikálie	33
4.1.1.2	Přístrojové vybavení	33
4.1.1.3	Biologický materiál a příprava vzorků	34
4.1.1.4	Necílená LC-HRMS analýza pacientů s HMGA	34
4.1.1.5	Necílená LC-HRMS analýza kontrolních vzorků	35
4.1.1.6	R-skript CROP	36
4.1.2	Výsledky	39
4.1.2.1	Analýza pacientů s HMGA	39

4.1.2.2	Analýza kontrolních vzorků	43
4.1.3	Diskuse	43
4.2	Metabolomická a lipidomická analýza změn způsobených zánětem vyvolaným pomocí LPS u transgenních APdE9 myši	44
4.2.1	Materiál a metody	44
4.2.1.1	Chemikálie	44
4.2.1.2	Přístrojové vybavení	44
4.2.1.3	Biologický materiál	45
4.2.1.4	Příprava vzorků	46
4.2.1.5	Cílená metabolomická/necílená lipidomická analýza	48
4.2.1.6	Statistická analýza	49
4.2.2	Výsledky	50
4.2.2.1	Cílená metabolomická analýza mozkové tkáně	52
4.2.2.2	Necílená lipidomická analýza mozkové tkáně	55
4.2.2.3	Cílená metabolomická a necílená lipidomická analýza krevní plazmy	58
4.2.3	Diskuse	58
4.2.3.1	Změny v metabolických drahách	58
4.2.3.2	Změny v lipidomu	60
4.2.3.3	Regionálně specifické změny metabolomu a lipidomu mozku.	61
5	ZÁVĚR	63
5.1	Redukce multiplicit v metabolomických datech na základě korelačních vztahů	63
5.2	Metabolomická a lipidomická analýza změn způsobených zánětem vyvolaným pomocí LPS u transgenních APdE9 myši	63
6	VÝHLEDY	64
6.1	Redukce multiplicit v metabolomických datech na základě korelačních vztahů	64
6.2	Metabolomická a lipidomická analýza změn způsobených zánětem vyvolaným pomocí LPS u transgenních APdE9 myši	64
7	SEZNAM ZKRATEK	66
8	LITERATURA	68
9	SEZNAM PRACÍ	79
9.1	Publikace s IF vztahující se k disertaci	79
9.2	Publikace v recenzovaných časopisech vztahující se k disertaci	79
9.3	Ostatní publikace s IF	79

9.4	Příspěvky na konferencích vztahující se k disertaci	80
9.5	Ostatní příspěvky na konferencích	81
10	PŘÍLOHY	84
10.1	Příloha č. 1 - Nastavení parametrů procesování v softwaru Compound Discoverer 3.0 - projekt HMGA	84
10.2	Příloha č. 2 - Nastavení parametrů procesování v softwaru Compound Discoverer 3.0 - kontrolní skupina pacientů	89
10.3	Příloha č. 3 - Nastavení parametrů procesování v softwaru Compound Discoverer 3.0 - projekt AD	94

1 ÚVOD

Rychle se rozvíjející oblast metabolomiky kombinuje strategie pro identifikaci a kvantifikaci metabolitů pomocí sofistikovaných analytických technologií, společně s aplikací pokročilých nástrojů a statistických metod pro extrakci informací z naměřených dat a jejich interpretaci. V posledních letech došlo k obrovskému pokroku ve vývoji analytických přístupů k analýze různých buněčných produktů, jako jsou produkty genové exprese, proteiny či metabolity. Všechny tyto takzvané „omické vědy“, včetně genomiky, transkriptomiky, proteomiky a metabolomiky, jsou považovány za důležité nástroje sloužící k hlubšímu porozumění patobiochemii onemocnění.

Pokroky v oblasti metabolomiky ukázaly složitost dynamických změn spojených se vznikem a progresí Alzheimerovy choroby (AD), což podtrhuje problémy s vývojem účinných terapeutických intervencí. Definování změn na systémové úrovni by u AD mohlo poskytnout vhled do mechanismů onemocnění, pokročit ve vývoji panelů biomarkerů a pomoci při sledování účinnosti terapie. Vzhledem k tomu, že metabolické dráhy jsou u různých druhů do značné míry podobné, mohla by metabolomika zlepšit převod preklinického výzkumu prováděného na zvířecích modelech AD na lidi.

Zpracování necílených metabolomických dat (tzv. „preprocessing“) je jedním ze základních kroků v průběhu necíleného metabolomického experimentu založeného na kapalinové chromatografii s hmotnostní detekcí. Cílem preprocessingu je kvantifikace a přiřazení jednotlivých signálů naměřených ve vzorku do matice tzv. „features“ (potenciálních metabolitů) a sloučení těchto entit napříč mezi vzorky v rámci celého experimentu. Tato data jsou dále zpracována, např. pomocí regrese, normalizace, dochází k odstranění šumu či signálů pozadí vzorku. Dalším důležitým krokem v necílené metabolomické analýze je anotace neznámých látek např. s využitím online dostupných databází či knihoven fragmentačních spekter.

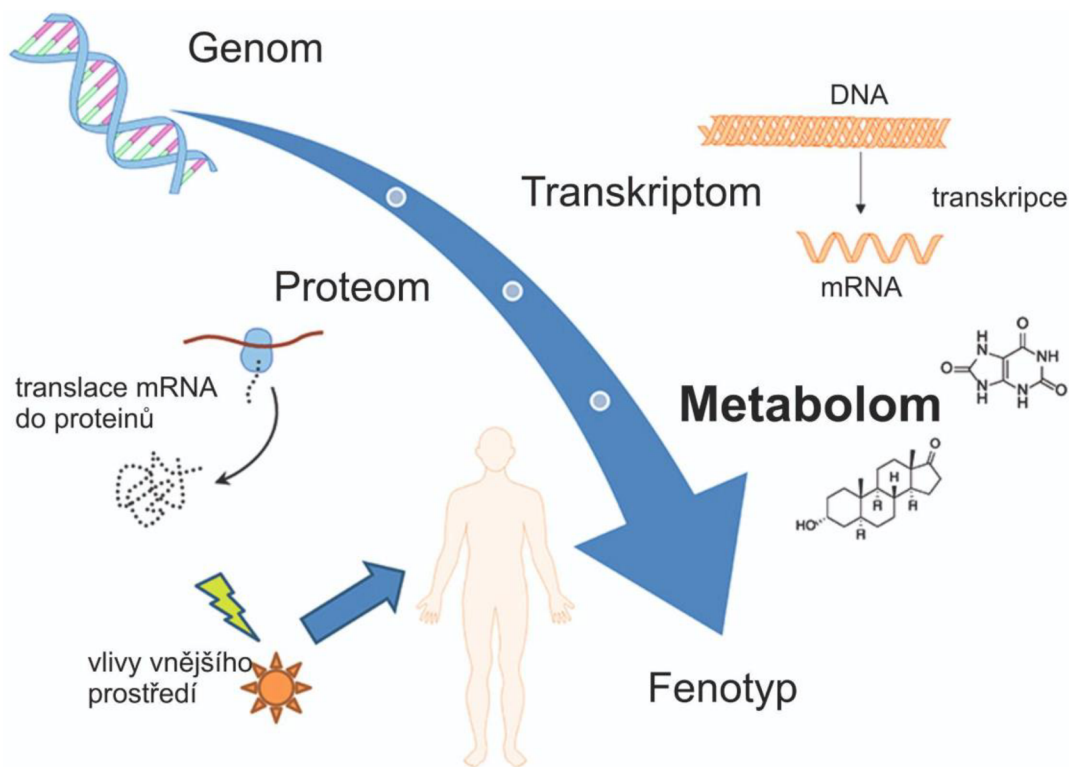
Jedním z problémů preprocessingu, který je dále řešen v rámci této disertační práce je obsah multiplicit v datech po jejich zpracování pomocí preprocesovacích softwarů. Odstranění těchto features vede ke zvýšení kvality zpracovaných dat a snížení počtu falešně pozitivních výsledků.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Metabolomika a lipidomika

Metabolomika je vědní obor zabývající se studiem metabolismu a metabolitů přítomných v organismu a patří mezi jednu z mnoha „omických“ disciplín, podobně jako například proteomika (studium proteinů), genomika (studium genomu - DNA), transkriptomika (studium transkriptomu - RNA), či méně známé vědy jako exposomika (studium kompletního souboru environmentálních vlivů), mikrobiomika (studium mikrobiomu), a jiné. Přesněji lze metabolom definovat jako soubor nízkomolekulárních látek přítomných ve studovaném systému (buňka, tkáň, organismus) v daném čase. Metabolom je dynamický, odráží aktuální stav daného systému a přímo souvisí s fenotypem. Vzhledem k tomu, že představuje nejen výstup genomu, potažmo transkriptomu a proteomu, ale je také přímo ovlivněn vlivy vnějšího prostředí, je umístěn na konci „omické“ kaskády (obr. 1) [1].

Vzhledem ke stále se zdokonalujícím analytickým technikám a tudíž i zvyšujícímu se počtu analyzovatelných metabolitů postupně dochází k diverzifikaci metabolomiky na další podobory zabývající se studiem pouze určité skupiny látek, např. sacharidů (glykomika) či lipidů (lipidomika). Naproti tomu je ale tendence kombinovat výsledky více „omických“ věd do tzv. multi-omiky, díky čemuž lze získat komplexní obraz studované problematiky [2].



Obrázek 1. Přehled postavení základních „omických“ věd v rámci tzv. omické kaskády: genomika-transkriptomika-proteomika-metabolomika. Převzato a upraveno podle Steuer a kol. [3].

Metabolomiku lze dle použitého analytického přístupu rozdělit na cílenou a necílenou analýzu. Zatímco cílená analýza se soustředí na předem známý počet definovaných metabolitů, necílená metabolomika se snaží zachytit informace pokud možno o všech metabolitech ve sledovaném vzorku. V druhém případě se po analýze vzorků data dále zpracovávají a pomocí různých jedno- a vícerozměrných statistických metod se filtrují tzv. „features“ (potenciální detekované látky), které jsou předmětem zájmu. Poté následuje jejich identifikace. V literatuře již byla popsána celá řada cílených i necílených metod pro separaci a kvantifikaci složek spadajících do metabolomu. Bylo však zjištěno, že žádná analytická platforma není schopna zachytit všechny metabolomické informace v rámci jedné analýzy [4].

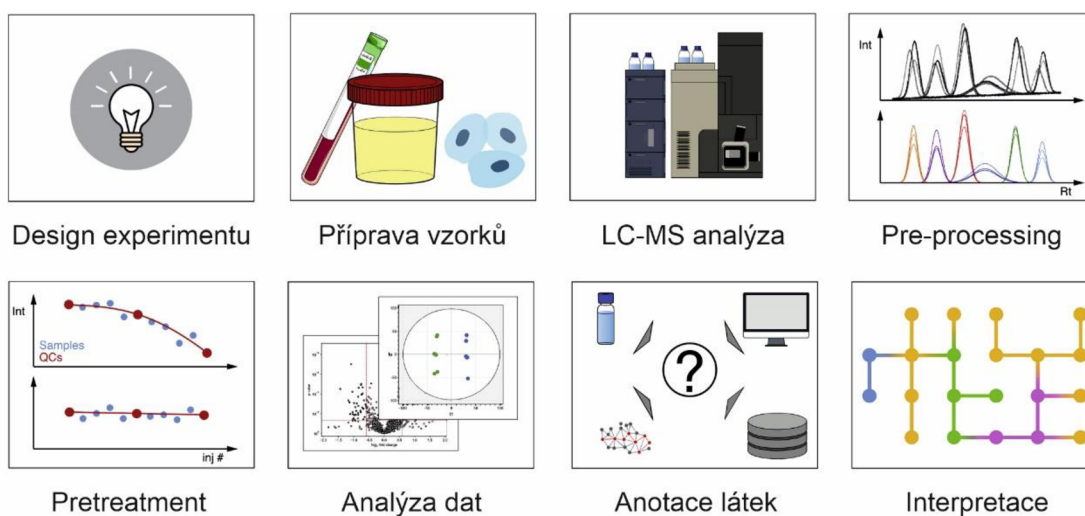
Mezi nejčastější analytické techniky využívané v metabolomice patří kapalinová, případně plynová chromatografie v kombinaci s hmotnostní spektrometrií či spektroskopie nukleární magnetické rezonance (NMR). Vzhledem

k vysoké citlivosti, rozlišení, jednoduché přípravě vzorků, vysokému prostupu vzorků a obrovské univerzálnosti je však LC-MS v poslední době jasnou možností první volby [5]. Pro cílenou analýzu lze obecně použít všechny druhy MS zařízení, včetně přístrojů s trojitým kvadrupólem. Pro necílené přístupy se upřednostňují MS přístroje s vysokým rozlišením, jako jsou hmotnostní spektrometry s analyzátozem doby letu (TOF), kvadrupól-TOF analyzátoři (Q-TOF) nebo přístroje využívající Fourierovu transformaci (FT), např. hmotnostní spektrometry Orbitrap, případně iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací (FT-ICR). Znalost přesného poměru hmotnosti k náboji (m/z) poskytuje základ pro identifikaci analytů napříč vzorky, jelikož umožňuje výpočet sumárních vzorců neznámých sloučenin a usnadňuje identifikaci features pomocí online dostupných databází, jako je např. METLIN [6], Human Metabolome Database (HMDB) [7], či LipidMaps [8].

Vzhledem ke značně rozdílné povaze molekul lipidů oproti polárním metabolitům došlo postupně k oddělení lipidomiky jako samostatného podoboru metabolomiky. Přes značnou podobnost v rámci celého analytického postupu se lipidomika vyznačuje zejména obrovskou paletou analyzovaných látek, ať už jde o rozdílné třídy lipidů (od čistě nepolárních jednoduchých mastných kyselina až po složité glycerofosfolipidy či lipoproteinové částice), tak o rozdílné izomery téhož lipidu lišící se např. pouze polohou dvojně vazby, případně stereoizomery. Jako příklad lze uvést fakt, že kombinací běžných eukaryotických lipidových motivů může vzniknout více než 180 000 teoretických fosfolipidových struktur, které mohou být přítomny v dané buňce či tkáňovém extraktu [9].

2.2 Postup necílené metabolomické analýzy pomocí hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením

Následující kapitola shrne obecný postup necílené metabolomické analýzy pomocí kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostním spektrometrem s vysokým rozlišením (LC-HRMS). Celý proces je schematicky znázorněn na obr. 2. Jednotlivé postupy konkrétních laboratoří se mohou lišit v závislosti na studované problematice a cílech dané studie.



Obrázek 2. Schematický postup LC-HRMS metabolické analýzy biologických vzorků. Převzato a upraveno podle Pezzatti a kol. [10].

2.2.1 Definice biologické otázky a design experimentu

Jasná definice cílů a designu experimentu je základním prvkem kvalitních výsledků jakékoliv studie, i když tento krok bývá mnohdy opomíjen. Hypotéza musí být předem jasně formulována a experiment musí být navržen tak, aby bylo možné rozlišit zkoumané experimentální skupiny. Je třeba jasně stanovit, prodiskutovat a vyhodnotit silné stránky a omezení navrhovaného metabolického přístupu, například pokud jde o volbu cílené či necílené analýzy, případně o omezení z hlediska citlivosti zvolené analytické techniky, degradace metabolitů v průběhu přípravy a měření vzorků, vnitřní variability vzorků nebo jejich dostupného množství. Samotný výběr typu analyzovaného vzorku hraje důležitou roli vzhledem k nerovnoměrnému rozložení metabolitů v organismu. V neposlední řadě je třeba vzít v úvahu etické požadavky, pokud to vyžaduje typ studie a místní předpisy.

Vhodný experimentální design je nezbytný k tomu, aby bylo možné z naměřených dat vyvodit přesvědčivé závěry a aby se zabránilo vzniku souborů dat, které nejsou schopny splnit stanovené cíle [11,12]. Je třeba mít na paměti, že biologické vzorky jsou obvykle spojeny s metadaty, jako jsou věk, pohlaví, etnický původ, zdravotní stav, strava, případně s podmínkami pěstování u buněčných kultur, tj. typ média,

teplota, prostředí nebo např. zavedené genetické modifikace [13,14]. Rozsáhlá charakterizace vzorků je proto nezbytná pro vyloučení, minimalizaci nebo zahrnutí vlivu těchto dalších, potencionálně zavádějících, faktorů na složení metabolomu [15], zejména u studií na lidech, kde demografické parametry, komorbidity a léky mohou vést k nesprávné interpretaci výsledků [16].

Zásadním aspektem každého experimentu je určení vhodného počtu vzorků potřebného k tomu, aby se zvýraznily relevantní metabolické změny spojené s jevem, který je předmětem zájmu, případně byla nalezena omezená podmnožina vysoce spolehlivých změn sloužících k objevu nových biomarkerů. Vzhledem k tomu, že u necílené analýzy většinou nelze dopředu stanovit očekávaný rozdíl mezi studovanými skupinami ani variabilitu budoucího měření, představuje odhad dostatečného počtu pozorování značnou výzvu. V této souvislosti byly vyvinuty různé přístupy k odhadu přiměřeného počtu pozorování pro danou studii. V praxi se odhad provádí buď na základě analytických údajů získaných z menší pilotní studie, případně je možné využít apriorních informací o experimentálním uspořádání a následné analýze dat a vhodný počet vzorků nasimulovat [17]. Je třeba poznamenat, že pro dosažení vhodné velikosti vzorku mohou být rozhodující další omezení, jako jsou cenové náklady, kapacitní možnosti laboratoře či dostupnost vhodných vzorků (např. u raritních onemocnění).

2.2.2 Příprava vzorku, preanalytická fáze

Preanalytická fáze zahrnuje všechny faktory před odběrem vzorku, způsob odběru, skladování a samotnou přípravu vzorků. V průběhu tohoto procesu je třeba minimalizovat variabilitu vyskytující se ve všech fázích preanalytického zpracování, aby bylo zajištěno, že získané údaje odrážejí především biologickou variabilitu vzorků, a nikoli variabilitu dalších faktorů nebo náhodných či systematických chyb [11,12]. Jednotlivé preanalytické postupy se liší v závislosti na použité matrici (krevní plazma, moč, tkáň, buněčné kultury aj.).

V klinických studiích se velmi často využívá vzorků krevní plazmy (získává se centrifugací plné nesrážlivé krve), případně krevního séra (centrifugace po vysrážení), vzhledem k relativně jednoduchému způsobu odběru, který nijak

nepoškodí pacienta. Vzorky jsou po stočení extrahovány pomocí vhodného rozpouštědla (např. MeOH), případně je využívána řada postupů zahrnující homogenizaci a složitější vícestupňové extrakce, vše v závislosti na extrahovaných analytech a použitém typu vzorku. Zásadním krokem celé přípravy vzorku je tzv. „quenching“ neboli zastavení metabolismu, které se provádí nejčastěji rychlou změnou vnějších podmínek jako je teplota (prudké zmrazení např. pomocí kapalného dusíku), případně pH [18,19]. Je nutné brát v potaz také stabilitu analyzovaných látek a uzpůsobit tomu rychlost celé přípravy a podmínky v průběhu preanalytické fáze.

2.2.3 LC-HRMS analýza dat

2.2.3.1 Uspořádání analytické série a využití QC vzorků

Vzhledem ke složitosti celé LC-HRMS analýzy bylo ustanoveno obecné uspořádání analytické série (tzv. „batch“), které by mělo být dodržováno, aby byla minimalizována možnost výskytu systematických chyb či zvýšení variability dané samotným měřením (obr. 3). Na začátku série by měl být měřen slepý vzorek (např. čisté rozpouštědlo) pro ověření čistoty použitých chemikálií (mobilních fází) či vyloučení kontaminace celého separačního systému. Dále by měla být analyzována směs obsahující malý počet autentických chemických standardů (obvykle 5-10 analytů) zastupujících jednotlivé analyzované skupiny látek a pokrývajících ideálně celý rozsah m/z a retenčních časů. Výsledky pro tento vzorek jsou poté posouzeny z hlediska přesnosti m/z a chromatografických charakteristik, včetně retenčního času, plochy a tvaru píku, a porovnány s předem definovanými kritérii přijatelnosti. V případech, kdy kritéria nejsou splněna, je třeba provést nápravnou údržbu analytické platformy a znovu analyzovat roztok pro kontrolu systému [20].

Slepý vzorek pro kontrolu systému
Směs standardů pro kontrolu systému
10 kondicionálních QC vzorků
Extrakční blank
Směsný QC vzorek
Standardní referenční materiál
5-10 randomizovaných biologických vzorků
Směsný QC vzorek
5-10 randomizovaných biologických vzorků
Směsný QC vzorek
5-10 randomizovaných biologických vzorků
Směsný QC vzorek
5-10 randomizovaných biologických vzorků
Standardní referenční materiál
Směsný QC vzorek
Extrakční blank
5x Směsný QC vzorek - MS/MS analýza
Slepý vzorek pro kontrolu systému

Obrázek 3. Schematické znázornění obecně doporučeného uspořádání analytické série necílené metabolické analýzy.

Necílená metabolomika se z definice snaží být univerzálním nástrojem, je třeba si ale uvědomit, že použitá metoda extrakce metabolitů a zvolená analytická platforma ovlivní typy obohacených a detekovaných látek, a to na základě jejich fyzikálně-chemických vlastností. Cílem analytických metodik je proto maximalizovat počet a fyzikálně-chemickou rozmanitost metabolitů detekovaných v biologickém vzorku. Nežádoucím, ale nevyhnutelným vedlejším produktem tohoto komplexního přístupu je fakt, že výsledná data mohou zahrnovat signály z chemických látek přítomných v mobilních fázích spolu s kontaminanty pocházejícími z odběru vzorku, manipulace se vzorkem a spotřebního materiálu využitého při zpracování vzorku. Aby bylo zajištěno, že datová matice použitá pro statistickou analýzu a biologickou interpretaci přesně odráží studovaný biologický systém, je třeba signály pocházející z těchto zdrojů identifikovat a následně odstranit, případně označit. Za tímto účelem lze provést proces přípravy tzv. slepého vzorku neboli „blanku“, za použití stejných rozpouštědel, chemikálií, spotřebního materiálu a standardního operačního postupu jako u ostatních vzorků, ale bez použití skutečného biologického vzorku. Tyto slepé vzorky se běžně nazývají procesní slepé vzorky nebo extrakční slepé vzorky a měly by být analyzovány na začátku analytické série. Veškeré nalezené signály v těchto slepých zpracovaných vzorcích lze s jistotou identifikovat jako kontaminanty, a tudíž je následně z analýzy vyloučit.

Při každé analytické sérii je třeba testovat další nežádoucí artefakt, známý jako „carryover“. Jedná se o přenos signálu z jednoho biologického vzorku do dalšího vzorku, například vlivem nedostatečného promytí injekčního systému mezi jednotlivými nástřiky vzorků. Tento zdroj kontaminace lze prozkoumat tak, že se po sérii biologických vzorků analyzuje slepý vzorek, ve kterém se poté hledá výskyt signálů souvisejících s předchozími vzorky. Analyty jsou poté většinou vyloučeny, stejně jako u extrakčních slepých vzorků na základě předem daných kritérií.

U necílené metabolomiky, kde se detekují stovky nebo tisíce metabolitů a chemická identita všech metabolitů není před získáním dat známa, není možné komplexně používat vnitřní standardy a není ani možné generovat kalibrační

křivky specifické pro jednotlivé metabolity, jako je tomu v případě cílené analýzy. Pro každý analyt neexistují předem stanovená kritéria přijatelnosti kontroly kvality ani meze kvantifikace. U necílených testů je možné poskytnout pouze relativní míru přesnosti – náhodnou chybu kvantifikace při opakovaném měření biologicky identického vzorku (v tomto případě se využívá vzorku kontroly kvality – QC vzorku). Složení QC vzorku by mělo odrážet souhrnné složení metabolitů všech biologických vzorků v dané studii a obsahovat stejnou matici jako samotné vzorky. Je důležité si uvědomit, že pokud metabolit není přítomen v QC vzorku, nelze vypočítat a vykázat kvalitu jeho měření. Nejvhodnějším způsobem, jak vytvořit více kopií takového komplexního QC vzorku, je použít samotné biologické vzorky. Smícháním všech, nebo reprezentativní podmnožiny biologických vzorků v dané studii, vznikne jediný směsný QC vzorek obsahující informaci ze všech vzorků v dané studii. Toho lze dosáhnout odebráním malého objemu každého vzorku a jejich důkladným promícháním za vzniku homogenního směsného vzorku, ze kterého se poté připraví několik alikvotů k samotné analýze, jak je zobrazeno na obrázku 4.



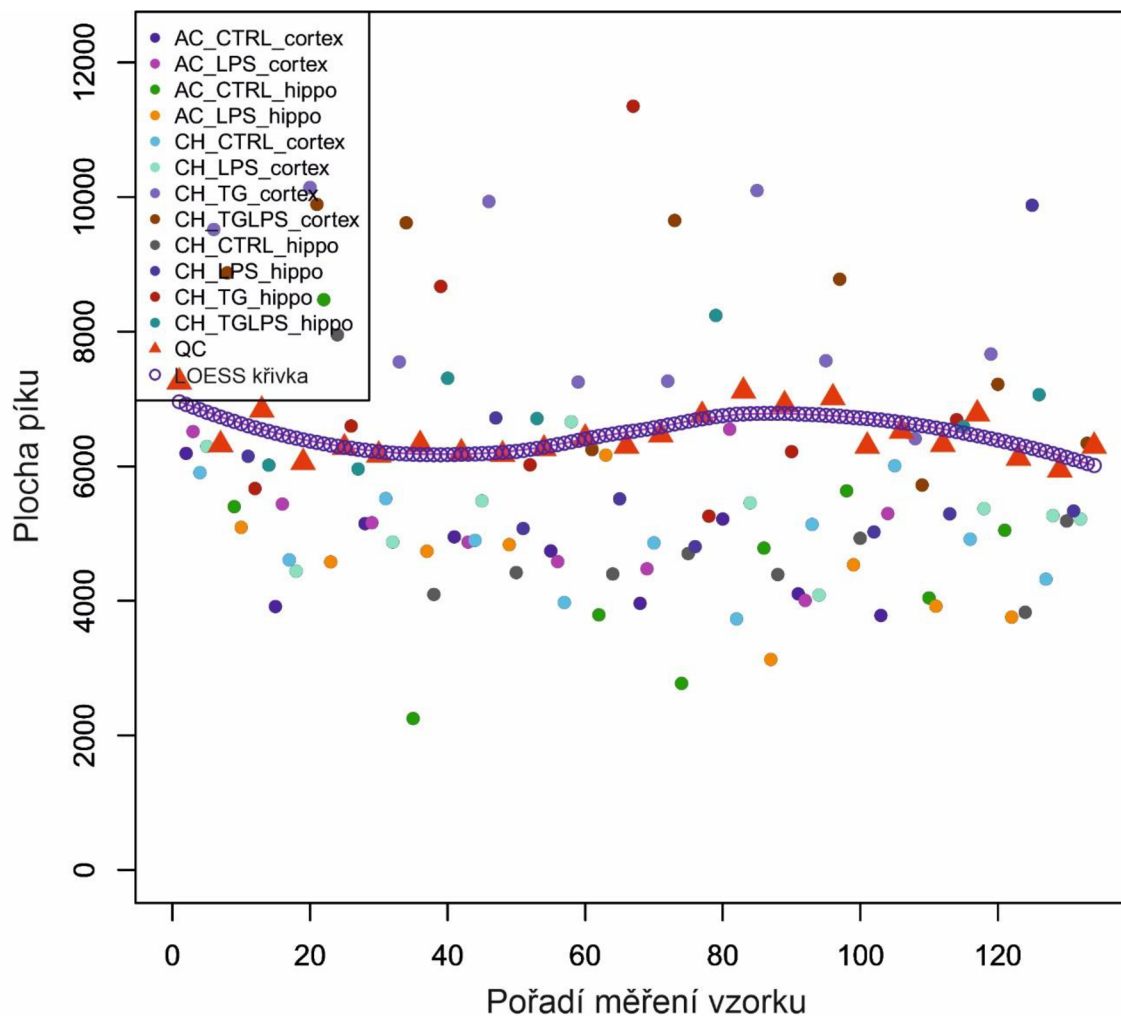
Obrázek 4. Schematické znázornění přípravy směsného vzorku kontroly kvality. Z každého biologického vzorku je odebráno malé množství za vzniku jednoho směsného vzorku, který je poté rozaliquotován pro samotnou analýzu v rámci analytické série. Převzato a upraveno podle Broadhurst a kol. [20].

Je důležité poznamenat, že směsné QC vzorky musí být zpracovány stejným způsobem jako vzorky biologické, aby se zajistilo, že výsledná míra přesnosti odpovídá biologickým vzorkům a poskytuje kontrolu kvality pro celý

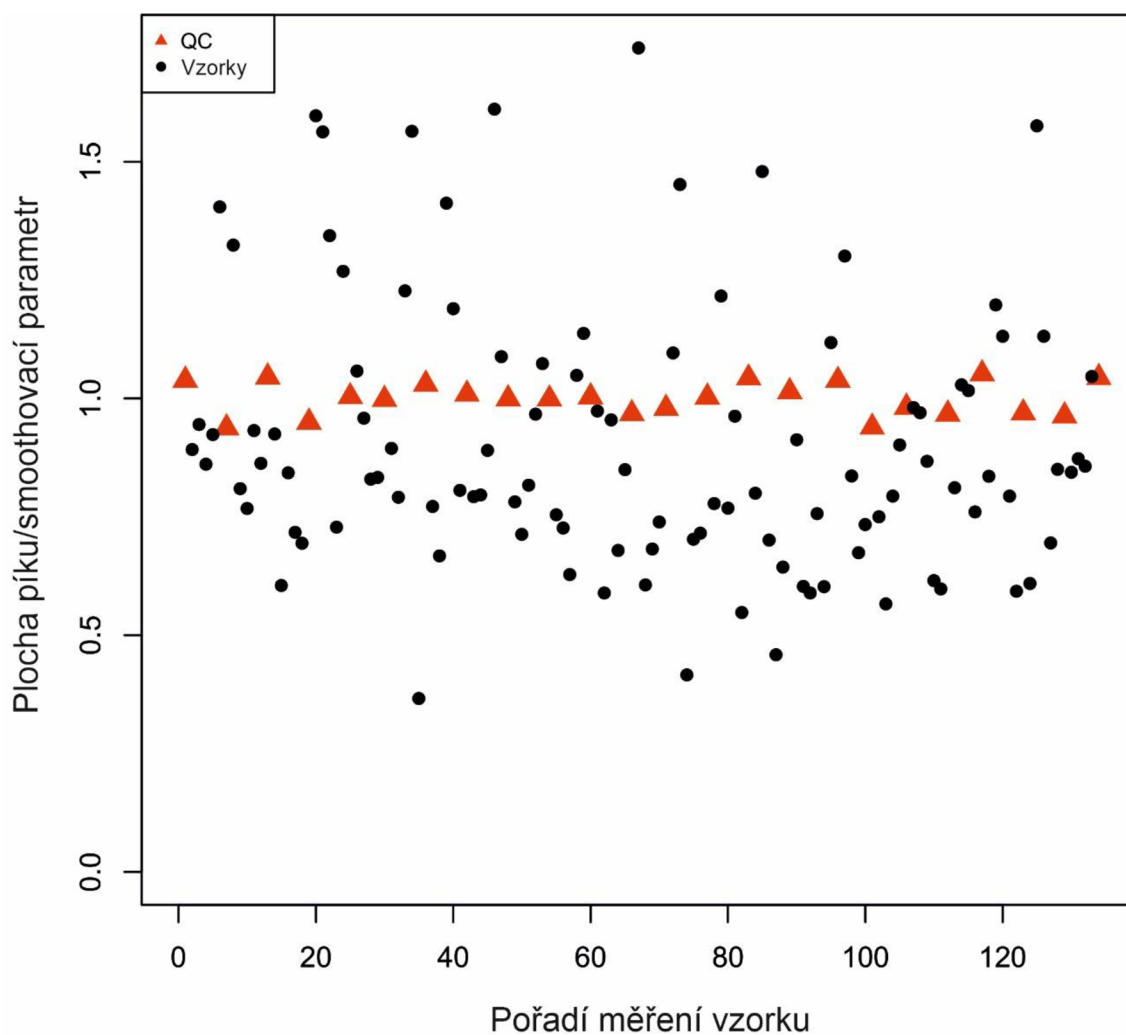
postup metabolomické analýzy. Pro zajištění stálosti analytů a zabránění odparu organických rozpouštědel z HPLC vialek v průběhu měření celé analytické série se doporučuje využívat pro QC vzorky jednotlivé alikvoty a vzorky analyzovat odděleně [20].

QC vzorky jsou analyzovány na začátku analytické série pro ustálení (kondicionaci) celého systému [21] a dále jako každý cca pátý až šestý vzorek pro korekci nestability měření pro jednotlivé analyty. Tato korekce se provádí pomocí různých výpočetních metod, od jednoduché lineární regrese [22] až po složitější algoritmy jako je LOESS regrese [23] (obr. 5 a 6). V případě měření více analytických sérií a za předpokladu, že jsou QC vzorky odebrány homogenně pro všechny tyto série, lze QC vzorky využít pro korekci signálu mezi těmito sériemi [24]. Vzorky kontroly kvality je možné využít také při následném zpracování dat pro filtrování jednotlivých features [25].

Výše uvedený systém kontroly kvality sice umožňuje posoudit kvalitu v rámci jedné studie, neumožňuje však porovnat kvalitu v různých studiích v rámci jedné laboratoře, případně mezi různými laboratořemi. K řešení tohoto problému lze použít komerční standardní referenční materiál (SRM). SRM materiály jsou vytvářeny a prodávány certifikovanými skupinami, jako je např. Národní institut standardů a technologií NIST. V metabolomice se hojně využívá směsná krevní plazma SRM 1950 [26]. Nicméně obecně lze pro tento účel využít jakýkoliv typ směsného vzorku kontroly kvality připraveného ve větším množství. Tento vzorek se rozaliquotuje a skladuje při teplotě $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ nebo v tekutém dusíku. Pro každou analytickou sérii nebo studii lze poté rozmrazit pouze jeden alikvot, a ten následně analyzovat v rámci série. Získané výsledky umožňují dlouhodobé vyhodnocování dat v rámci laboratoře, případně mezi laboratořemi [25,27,28].



Obrázek 5. Příklad aplikace LOESS regrese v rámci necílené metabolické analýzy vzorků mozkové tkáně jednotlivých myších modelů studie AD. Analyt LPE a C16:0 před aplikací regresní analýzy. Biologické vzorky jsou zobrazeny barevnými puntíky, QC vzorky pak červenými trojúhelníky. Na základě proložené LOESS křivky, která je zobrazena modrými kruhy, dojde k narovnání dat mezi jednotlivými analýzami.



Obrázek 6. Příklad aplikace LOESS regrese v rámci necílené metabolické analýzy vzorků mozkové tkáně jednotlivých myších modelů studie AD. Analyt LPE a C16:0 po aplikaci regresní analýzy. Biologické vzorky jsou zobrazeny černými puntíky, QC vzorky pak červenými trojúhelníky. Na základě proložené LOESS křivky došlo k narovnání dat mezi jednotlivými analýzami.

2.2.3.2 Kapalinová chromatografie – LC

Zavedení ultraúčinné kapalinové chromatografie (UHPLC) podstatně zvýšilo dostupné chromatografické rozlišení a počet detekovaných metabolitů ve srovnání s tradiční kapalinovou chromatografií [29]. Spojení UHPLC s hmotnostními spektrometry s vysokým hmotnostním rozlišením tak slouží jako ideální nástroj pro analýzu a následnou identifikaci předpokládaných metabolitů v biologickém systému. Kapalinová chromatografie s použitím reverzní fáze

(RPLC) je zřejmě nejčastější volbou v necílené metabolomické analýze díky své univerzálnosti, robustnosti, stabilitě a dobré retenci nepolárních až středně polárních metabolitů [30]. Pro ideální separaci jednotlivých analytů se často využívá gradientové eluce, kdy vlivem přechodu z mobilní fáze s vysokým obsahem vody do organické mobilní fáze dochází ke zvyšování poměru organického rozpouštědla, a tudíž k postupnému uvolňování nepolárních metabolitů z kolony. K zajištění lepší ionizace v hmotnostním spektrometru se využívají různá aditiva mobilních fází, jako např. kyselina mravenčí nebo octová. Použitým organickým rozpouštědlem je obvykle methanol, případně acetonitril. Reverzní fáze umožňuje účinnou retenci a separaci relativně nepolárních metabolitů ve velkém rozsahu molekulových hmotností (50 až > 1 500 Da) a zahrnuje například vysokomolekulární lipidy (např. fosfolipidy a triacylglyceroly) či nepolární aminokyseliny (např. tryptofan, fenylalanin). Polární metabolity eluují v mrtvém objemu kolony nebo na počátku chromatografického cyklu, kde není dosaženo účinné retence, tudíž ani separace těchto látek.

K zadržení velmi polárních metabolitů jsou lépe uzpůsobeny další alternativní separační režimy, jako je např. hydrofilní interakční chromatografie (HILIC) [31]. Vzhledem k tomu, že v HILIC se pro mobilní fáze používá větší podíl organických rozpouštědel, lze při použití ionizace elektrosprejem (ESI) očekávat lepší ionizaci a citlivost [32]. Obecně ale platí, že reprodukovatelnost retenčních časů v podmínkách HILIC bývá horší a tento přístup je také citlivější na matricové vlivy než RPLC. Krom toho v průběhu gradientu dochází ke změnám interakcí mezi analyty a kolonou, tudíž je náročnější předpovědět pořadí eluce jednotlivých sloučenin.

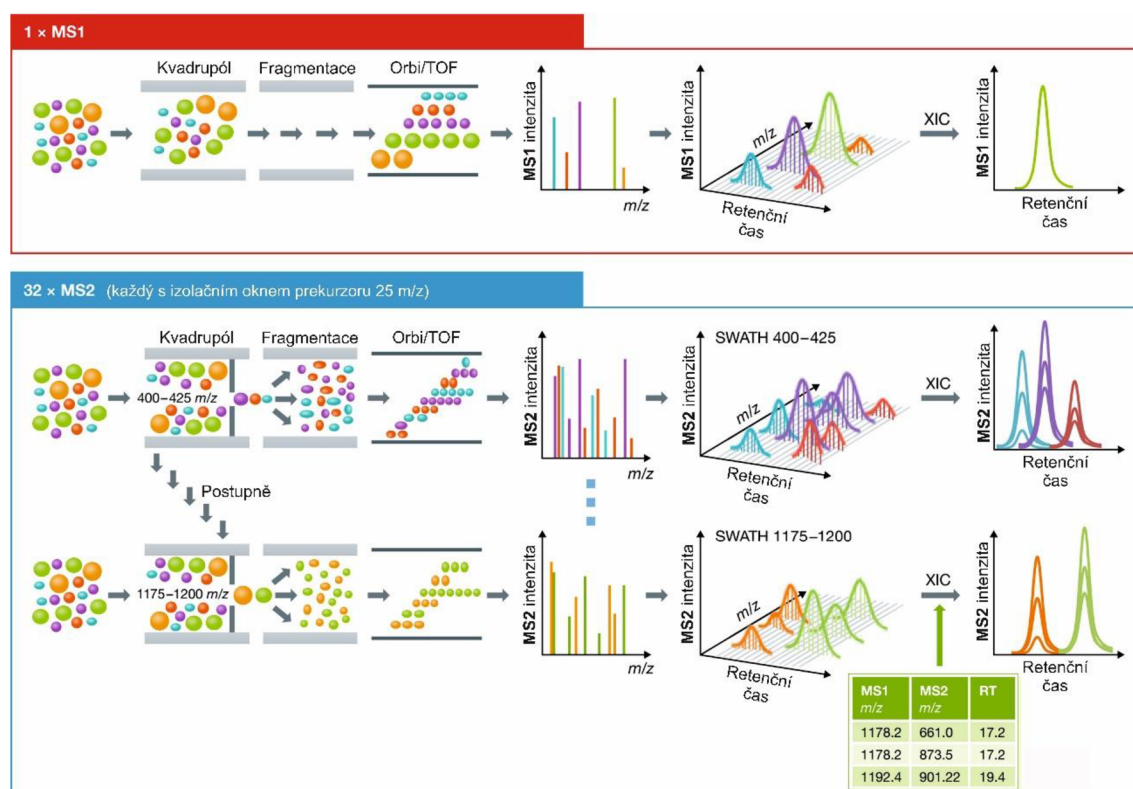
2.2.3.3 Hmotnostní spektrometrie – MS

V necílené metabolomice se často používají dva typy hmotnostních spektrometrů s vysokým rozlišením – orbitální iontová past (Orbitrap) a kvadrupólový hmotnostní analyzátor ve spojení s analyzátozem doby letu (Q-TOF), které mohou dosáhnout přesnosti pod 1 ppm. FT-ICR není tolik využívána zejména vzhledem k finanční náročnosti, přestože vyniká extrémní rozlišovací

schopností, dobrou citlivostí a přesností měření. Analyzátoři typu Orbitrap mají potenciál překonat Q-TOF, pokud jde o hmotnostní rozlišovací schopnost s hodnotami od 200 000 do 1 000 000 šířky píku v polovině jeho výšky (FWHM), zatímco Q-TOF běžně dosahují 30 000 až 60 000 FWHM, což je ale často pro nízkomolekulární analyty dostačující. Lepší rozlišovací schopnost Orbitrapů je dosažena na úkor delších pracovních cyklů v důsledku principu fungování orbitální iontové pasti, zatímco detektory Q-TOF mohou získat až 100 MS/MS spekter za sekundu nezávisle na rozlišovací schopnosti [33].

Donedávna necílené metabolomické protokoly založené na MS spoléhaly na analýzu vybraného hmotnostního rozsahu, tzv. „full scan“, ze kterého se teprve poté odvozovaly metabolity, které byly předmětem zájmu (např. potenciální biomarkery). Ty byly následně identifikovány tandemovou hmotnostní spektrometrií po vícenásobném vstříku do LC-MS/MS systému. Takový postup je ale velmi zdlouhavý a v podstatě spoléhá na ruční analýzu dat. Díky neustálému zdokonalování HRMS analyzátorů se zvýšeným dynamickým rozsahem, rychlostí akvizice a zvýšenou citlivostí se však tato situace vyvíjí a objevují se integrované protokoly sběru dat, které jsou schopny provádět „více-eventové“ analýzy umožňující souběžnou detekci, kvantifikaci a strukturní charakterizaci biomolekul prostřednictvím MS/MS experimentů v rámci jedné analýzy. Jedním z takových přístupů je tzv. akvizice závislá na datech („data dependent acquisition“, DDA), při níž jsou po prvním skenu v celém vybraném rozsahu skenování (tzv. „survey scan“) v každém cyklu vybrány k fragmentaci pouze nejhojnější ionty. Akvizice DDA poskytuje čistá fragmentační spektra a produktové ionty lze snadno spojit s jejich prekurzory. Omezením přístupu DDA je skutečnost, že fragmentační spektra nemusí být získána pro všechny analyty zájmu. Druhým přístupem je tzv. akvizice nezávislá na datech („data independent acquisition“, DIA), při které nedochází k výběru iontů na základě kritérií aplikovaných na survey scan. Pokud jsou během DIA fragmentovány všechny dostupné ionty, jedná se o tzv. „all-ion fragmentation“ (AIF). Výsledná MS/MS spektra jsou poté tvořena směsí fragmentů generovaných ze všech prekurzorových iontů, proto může být někdy obtížné stanovit jednoznačnou hmotnost prekurzoru k danému fragmentačnímu

vzoru [34]. V posledních několika letech se jako alternativa k AIF v DIA prosazuje přístup tzv. sekvenční akvizice všech teoretických fragmentačních spekter (SWATH-MS), při které se pro fragmentaci postupně vybírají široká izolační okna prekurzorů (obr. 7). Velikost izolačních oken snižuje počet prekurzorových iontů vybraných pro fragmentaci MS/MS, a tím snižuje složitost získaných fragmentačních spekter. Fragmenty se spojí se svými domnělými prekurzory pomocí výpočetní dekonvoluce [35].



Obrázek 7. Schematické znázornění SWATH-MS analýzy s využitím hybridních hmotnostních spektrometrů, které obvykle využívají kvadrupól jako první hmotnostní analyzátor a analyzátor doby letu (TOF), případně Orbitrap jako druhý hmotnostní analyzátor. V režimu SWATH-MS se obvykle zaznamenává jedno spektrum prekurzorového iontu (MS1), po němž následuje série spekter fragmentových iontů (MS2) s širokými izolačními okny prekurzorů (např. 25 m/z). Opakovaným cyklováním po sobě jdoucích oken v definovaném hmotnostním rozsahu se zaznamená komplexní soubor dat, který obsahuje informace o všech detekovatelných fragmentových a prekurzorových iontech. Díky tomu lze generovat extrahované iontové chromatogramy na úrovni MS1 i MS2. Fragmenty

jsou poté spojeny se svými domnělými prekurzory pomocí výpočetní dekonvoluce. Převzato a upraveno podle Ludwig a kol. [36].

Generování fragmentačních spekter je vysoce závislé na zvolené disociační energii, a to bez ohledu na použitý přístup, tj. na DDA, DIA nebo AIF [34]. Příliš nízké nebo příliš vysoké energie mohou vést k absenci fragmentace nebo naopak k velké fragmentaci metabolitů, a tudíž k zániku informace o struktuře dané látky. Mnohdy se k získání bohatších fragmentačních dat používá více různých disociačních energií [37,38].

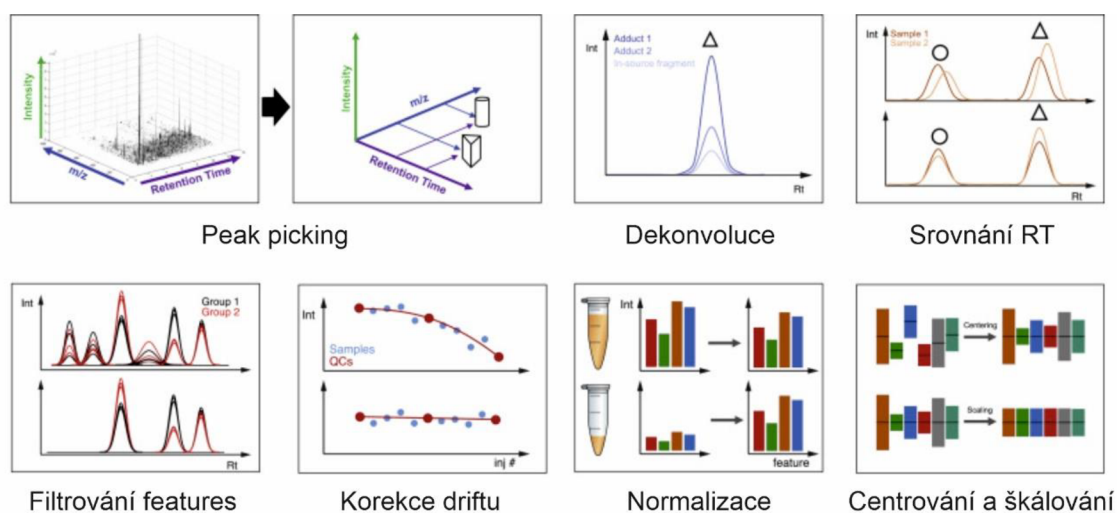
Častým problémem, který se vyskytuje u MS využívající ionizaci elektrosprejem je, že každá molekula přítomná ve vzorku může vést k tvorbě několika m/z iontů (izotopů, aduktů, případně fragmentů vzniklých ve zdroji, tzv. „in-source fragments“). Složení mobilních fází, experimentální podmínky během ionizace a přenos iontů přes iontovou optiku hmotnostního spektrometru určuje povahu a množství každého z těchto iontů [39,40]. Jejich vznik je třeba minimalizovat a dále se s nimi vypořádat v průběhu procesování dat.

2.2.4 Procesování dat

2.2.4.1 Peak picking

Základem kvalitního preprocessingu surových dat z LC-MS analýzy je extrakce intenzit signálů jednotlivých m/z v průběhu retenčního času za vzniku datové matice potenciálních detekovaných látek, tzv. „features“ (obr. 8). Tento proces se nazývá „Peak picking“. Úspěšný peak picking by měl poskytnout ideální kompromis mezi zachováním většiny relevantních informací o přítomných analytech a vyřazením maxima irelevantních dat. Nastavením vhodných parametrů, mezi které patří např. určení linie šumu, minimální intenzita píku nebo počet bodů na pík, lze dosáhnout výsledků obsahujících pouze minimální podíl šumových píků. Jednotlivá softwarová řešení využívají rozličné algoritmy pro správné určení tvaru píku a samotný peak picking, a proto se nastavované parametry mezi sebou liší a nelze je vzájemně jednoduše srovnat. Mezi přední software sloužící k procesování dat patří open-source platformy XCMS [41] a

MZmine [42], případně programy Compound Discoverer firmy Thermo Fisher Scientific či Progenesis QI od společnosti Waters.



Obrázek 8. Schematický postup procesování metabolomických dat. Převzato a upraveno podle Pezzatti a kol. [10].

Jelikož se retenční časy mohou během celé analytické série vzájemně mírně odchylovat (v závislosti na robustnosti použité LC metody), je třeba v rámci peak pickingu provést srovnání retenčních časů mezi jednotlivými analýzami, tzv. „retention time alignment“. Použité algoritmy slouží k tomu, aby píky odpovídající stejnému iontu měly ve všech analyzovaných vzorcích totožné retenční časy. Tato úprava je nutná před generováním samotných features, jež jsou definovány jako chromatografické píky o určitém poměru m/z a RT, které lze konzistentně měřit napříč vzorky.

Datová tabulka po úspěšném peak pickingu a srovnání retenčních časů může u některých vzorků obsahovat chybějící hodnoty (tzv. „gaps“). Důvodem přítomnosti chybějících hodnot je obvykle existence píků s nízkou intenzitou či píků nevyhovujících nastaveným parametrům (tvar píku, počet bodů na píku), které tudíž nejsou v průběhu peak pickingu detekovány. Některé programy obsahují algoritmy pro vyplňování mezer (tzv. „gap filling“), které v surových datech hledají píky o definovaném m/z a RT nalezených v jiných vzorcích nezávisle na nastavených parametrech peak pickingu, a výsledná data tudíž chybějící hodnoty

vůbec neobsahují. V opačném případě se využívají metody odhadu chybějících hodnot, jako je např. metoda imputace k-nejbližších sousedů [43].

V tomto bodě jsou získaná data stále vysoce redundantní díky přítomnosti píků odpovídajících různým izotopům, aduktům a fragmentům téže molekuly [44]. Seskupení píků (dekonvoluci) lze provést na základě shody retenčních časů a rozdílu hmotností mezi píky s ohledem na očekávané adukty a neutrální ztráty. Pro dekonvoluci se využívá také tvaru profilů píků, které musí být pro jednotlivé features patřící k téže molekule totožné. Pro seskupování píků byla navržena řada algoritmů a řešení, mezi které patří např. CAMERA [45], případně CliqueMS [46]. Jelikož adukty a izotopy lze jednoduše definovat na základě rozdílu m/z , nebývá s přiřazení těchto features k dané molekule problém. Ten ale nastává v případě in-source fragmentů, které vznikají v závislosti na podmínkách konkrétní analýzy a nelze je většinou předem definovat. V tomto ohledu může pomoci např. využití vzájemné korelace intenzit těchto fragmentů, mateřské molekuly a jednotlivých aduktů/izotopů napříč všemi analyzovanými vzorky využívané např. softwarem RAMClust [47], případně skriptem CROP [48], jak je popsáno níže v praktické části.

2.2.4.2 Filtrování, korekce driftu, normalizace, odečet blanku

Po spojení jednotlivých features patřícím jedné molekule získáváme tabulku metabolitů přítomných v analyzovaných vzorcích. Tato tabulka je výchozím prvkem pro další procesovací mechanismy sloužící ke korekci a zkvalitnění výstupu pro statistickou analýzu.

Odezva signálu na stejnou koncentraci látky se může v průběhu času v důsledku mnoha neovlivnitelných faktorů měnit, případně může docházet ke změnám způsobeným stárnutím vzorku v autosampleru v průběhu analytické série (např. degradace některých méně stabilních látek, jejich biotransformace či odpar rozpouštědla). Jelikož by koncentrace ve vzorcích QC měla být v ideálním případě konstantní a zároveň by QC vzorky měly obsahovat všechny analyty, slouží interpolace jejich signálů, například pomocí LOESS regrese [23], k narovnání výsledných dat (obr. 6 a 7).

Dalším potřebným krokem processingu je normalizace dat. V průběhu přípravy může docházet k rozdílným výtěžnostem extrakce či jiným chybám vedoucím ve výsledku k analýze rozdílného množství výchozího materiálu. Při analýze moči lze jednoduše využít normalizaci na hladinu kreatininu [49,50], existuje však celá řada dalších přístupů (např. PQN normalizace [51]), jejichž porovnání shrnuje např. Cook a kol. [52]. Často se k metabolomickým datům přistupuje jako ke kompozičním [53,54]. V takovém případě jsou jednotlivé metabolity brány jako část celku (celého metabolomu), a tudíž žádnou složku kompozice nelze interpretovat izolovaně od ostatních a je třeba použít jiné typy normalizací, jako je např. centrovaná logratio transformace (CLR) [53].

Zatímco cílem normalizace je srovnat hladiny metabolitů vzájemně mezi jednotlivými vzorky, metody škálování usilují o srovnání hladin jednotlivých metabolitů v rámci jednoho vzorku, jelikož každý z metabolitů může mít při analýze jiný odezvový faktor. Opět existuje celá řada metod škálování, mezi které patří např. autoškálování či Pareto škálování [55].

Jedním z dalších kroků zpracování dat je odečtení pozadí pomocí naměřeného slepého vzorku. I v tomto případě je využívána řada postupů, v ideálním případě by ale vždy měly být informace o odstraněných features či sloučeninách dohledatelná a tyto látky by mělo být možné do analýzy v případě potřeby zpětně dodat. Jako příklad lze uvést software Compound Discoverer, který všechny features dle nastavených parametrů označí jako „background” a je na uživateli, jak s nimi dále pracuje.

V neposlední řadě se často využívá různého filtrování finálních dat za účelem odstranění látek, které nevyhovují předem daným kritériím přijatelnosti a jsou přítomny pouze v určitém procentu QC vzorků, nebo mají v QC vzorcích vysokou variabilitu [56]. Výslednou tabulku lze také samozřejmě dále filtrovat v závislosti na účelu dané studie, kdy lze využít např. filtry retenčního času, molekulové hmotnosti či specifické filtry elementárního složení jednotlivých features.

2.2.4.3 Anotace neznámých látek

Anotace a identifikace metabolitů umožňuje nejen začlenit získaná data do biologického kontextu, ale také použít redukované soubory dat pro následnou statistickou analýzu. Pro anotaci lze využít různé fyzikálně-chemické vlastnosti analytů, jako je přesný poměr m/z , fragmentační vzor či retenční čas. Provádění anotace metabolitů pouze na základě přesné m/z a retenčního chování může vést k vysokému počtu chybných anotací. Proto je doporučováno využít co nejvíce dostupných ortogonálních informací, které vzájemně potvrdí identitu dané látky. Například odvozením teoretického fragmentačního spektra, které odpovídá fragmentačnímu spektru dané molekuly, případně jeho srovnáním se spektrem obsaženým v knihovně fragmentačních spekter, či přímo se spektrem čistého chemického standardu, zvýšíme zásadně úroveň identifikace dané látky. Dnes je již samozřejmostí výpočet sumárního vzorce dle přesné hodnoty m/z , izotopového složení, případně i s použitím sumárního složení jednotlivých fragmentů dané molekuly za předpokladu přítomnosti fragmentačních dat.

Vzhledem k tomu, že potvrzení identity jednotlivých metabolitů je poměrně časově náročný úkol, často se provádí úplná anotace pouze u těch metabolitů, které jsou označeny jako diskriminující po statistické analýze dat [57]. Tímto způsobem jsou prostředky investovány pouze do potvrzení relevantních metabolitů odlišujících studovanou experimentální skupinu či jiných metabolitů, které jsou předmětem zájmu.

Pro anotaci neznámých látek je zcela zásadní využití databází chemických sloučenin, případně knihoven fragmentačních spekter. Přestože je obecně doporučováno vzhledem ke shodným podmínkám analýzy využívat své vlastní „in-house“ databáze a knihovny, v praxi je mnohem více preferované využití různých online nástrojů. Vlastní databáze jsou omezené pouze na dostupné chemické látky a vybudování kvalitní databáze je časově i finančně náročné. Mezi nejvyužívanější online metabolomické databáze patří HMDB [7], METLIN [58], NIST [59], či lipidomická databáze LipidMaps [8]. S výhodou lze také využít knihovny fragmentačních spekter výrobců hmotnostních spektrometrů, jako je např. mzCloud firmy Thermo Fisher Scientific, ve které jsou obsaženy

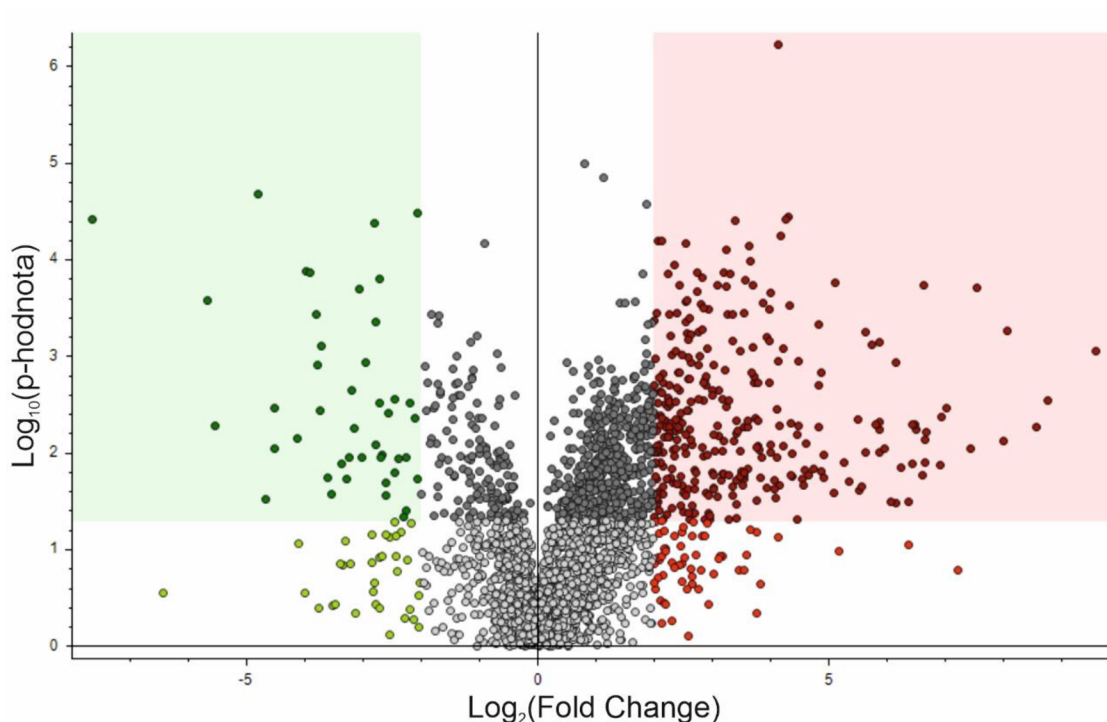
fragmentační stromy změřené pomocí analyzátorů typu Orbitrap [60]. Dalším přiblížením mohou být databáze biochemických drah zaměřené na biochemické vztahy mezi jednotlivými metabolity, z nichž nejznámější je KEGG [61], případně MetaCyc [62].

2.2.5 Statistická analýza

Statistická analýza naměřených a správně zprocesovaných dat poskytuje klíč ke správné interpretaci výsledků. Obecně lze využít dvou přístupů. Jednorozměrné analýza je založena na klasické analýze jedné proměnné a je aplikována na jednotlivé metabolity nezávisle. Naproti tomu vícerozměrné statistické metody posuzují všechny metabolity jako celek [63].

2.2.5.1 Jednorozměrné metody

Jednorozměrné metody umožňují hodnocení jednotlivých metabolitů porovnáním jejich hladin mezi experimentálními skupinami a posouzením statistické významnosti pozorovaných rozdílů. V případě splnění podmínky normality jsou využívány parametrické testy (např. Studentův t-test), v opačném případě se jedná o jejich neparametrické varianty (např. Wilcoxonův test). Hojně využívanou vizualizací jednorozměrných dat jsou krabicové grafy zobrazující současně medián, jednotlivé kvartily, vousy pro znázornění variability dat i odlehlé hodnoty. Vulkánový graf nabízí další účinný způsob, jak současně vizualizovat významnost změn mezi experimentálními skupinami, zejména pokud se analyzuje velký počet metabolitů (obr. 9). Při paralelním porovnávání velkého počtu proměnných se provádí vícenásobné testování hypotéz a je pravděpodobnější, že dojde k chybným falešně pozitivním výsledkům. V této souvislosti je doporučeno používat korekční metody, které upravují hladinu významnosti pozorovaného rozdílu mezi testovanými skupinami. Hojně využívanou metodou je Bonferroniho korekce, při které je požadovaná hladina významnosti vydělena počtem testovaných hypotéz, tj. výsledným počtem metabolitů [64,65].



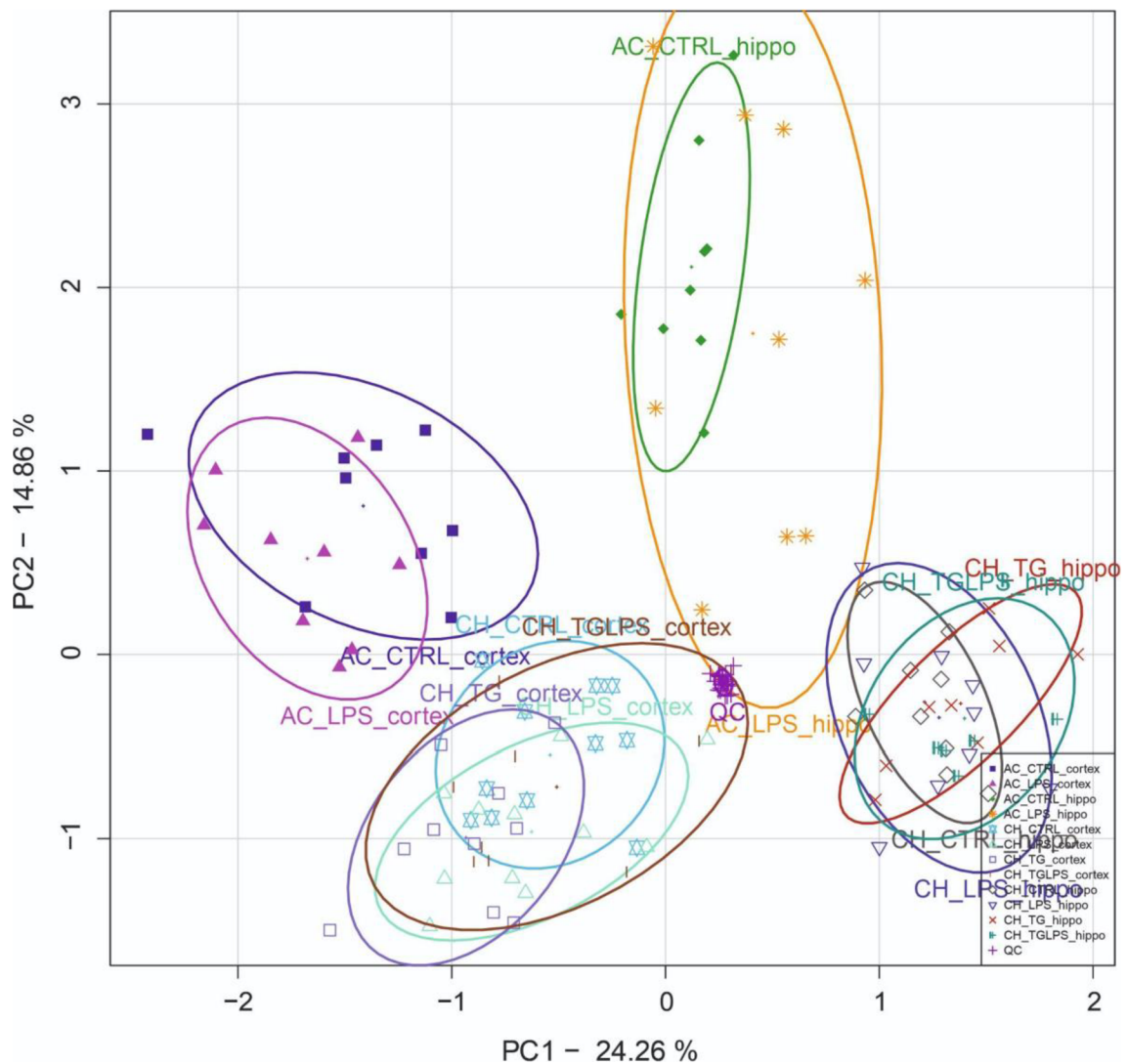
Obrázek 9. Vulkánový graf. Puntíky reprezentují jednotlivé features dané studie. Zeleně je zobrazena oblast snížených metabolitů ($\text{Log}_2(\text{Fold Change}) < -2$; $p\text{-hodnota} < 0,05$), červeně oblast zvýšených metabolitů ($\text{Log}_2(\text{Fold Change}) > 2$; $p\text{-hodnota} < 0,05$). Exportováno a upraveno ze softwaru Compound Discoverer 3.0.

2.2.5.2 Vícerozměrné metody

Cílem vícerozměrných přístupů je zachytit celkovou strukturu naměřených dat a pomoci tak k jejich správné interpretaci. Pro ověření konzistentnosti dat, přítomnosti odlehlých hodnot, případně jiných systematických vlivů se využívají nesupervizované statistické metody, které nepracují s informací o zařazení vzorků do experimentálních skupin. Nejvýznamnější z nich je analýza hlavních komponent (PCA), která často slouží jako výchozí bod statistické analýzy v metabolomice. Při PCA dochází k redukci počtu lineárně závislých proměnných za vzniku nekorelovaných proměnných, tzv. hlavních komponent. Tyto hlavní proměnné jsou poté seřazeny dle klesající míry variability a vyobrazeny ve formě tzv. grafu komponentního skóre (obr. 10). V něm dochází ke shlukování jednotlivých pozorování (vzorků) do skupin dle jejich metabolického profilu. Dalším výstupem PCA je graf komponentních zátěží, ze kterého lze vyčíst, které

z původních proměnných (metabolitů) přispívají k separaci jednotlivých skupin nejvyšší mírou. Kombinací obou těchto grafů je poté dvojný graf, tzv. „biplot“.

Naproti tomu supervizované přístupy slouží k cílené identifikaci diskriminujících metabolitů mezi předem známými skupinami. V metabolomice se nejčastěji setkáváme s metodou zvanou diskriminační analýza částečných nejmenších čtverců (PLS-DA) a její ortogonální variantou OPLS-DA. Výstupem z těchto metod může být S-plot, případně VIP plot, ze kterých lze diskriminující metabolity pro jednotlivé dvojice experimentálních skupin jednoduše vyčíst [66].



Obrázek 10. Graf komponentního skóre analýzy hlavních komponent. Analýza byla provedena na lipidomických datech komplexní studie Alzheimerovy choroby. Jednotlivé studované skupiny jsou dobře separovány, jak potvrzují 75%

konfidenční elipsy. QC vzorky jsou seskupeny uprostřed mezi všemi ostatními vzorky, což ukazuje na správně provedený preprocessing dat.

2.3 Alzheimerova choroba

Alzheimerova choroba (AD) je neurodegenerativní onemocnění, klinicky definované postupnou ztrátou paměti a dalších kognitivních funkcí. Představuje až 70 % všech případů demence a je tedy nejrozšířenější formou demence u starších lidí vůbec [67]. Prodlužující se střední délka života je spojena se zvýšenou prevalencí a incidencí AD a dělá z AD globální problém nejen pro systém veřejného zdravotnictví. Poklesu kognitivních a funkčních schopností předchází preklinická fáze známá jako mírná kognitivní porucha (Mild cognitive impairment, MCI), komplexní syndrom charakterizovaný poruchami paměti, který lze považovat za mezistupeň ve vývoji AD z normálního procesu stárnutí [68]. Přesná etiologie AD je stále velkou hádankou. Během AD dochází k četným biochemickým změnám, mezi které patří ukládání plaků amyloidu β ($A\beta$), hyperfosforylace tau proteinu, oxidační stres, neurozánět, abnormální homeostáza kovů nebo také narušení energetických a neurotransmiterových drah [69–72]. Extracelulární amyloidní plaky jsou tvořeny peptidy amyloidu beta, které vznikají postupným zpracováním amyloidového prekurzorového proteinu (APP) za účasti β - a γ -sekretáz [73], zatímco intracelulární neurofibrilární klubka jsou tvořeny hyperfosforylovaným tau proteinem, běžně asociovaným s mikrotubuly [74,75]. Předpokládá se, že oba tyto hlavní patologické znaky způsobují dysfunkci neuronů a synapsí. Proteolytické zpracování APP vedoucí ke vzniku peptidů $A\beta$ je obecný buněčný proces, který je ovlivňován genetickými a vnějšími faktory, stejně jako faktory spojenými se samotným stárnutím. Nejrozšířenější genetické faktory pro AD souvisejí s genem pro apolipoprotein E (*APOE*) a s mutacemi v genech pro presenilin (PS), který kóduje proteolyticky aktivní část komplexu γ -sekretázy [76–78]. Kromě mutací v genech pro PS je známo několik mutací v samotném genu APP, které rovněž způsobují familiární Alzheimerovu chorobu (FAD) [79].

V současné době lze diagnózu AD provést pouze na základě vyloučení jiných patologií pomocí kombinace různých neuropsychologických a

laboratorních testů [8]. Tento diagnostický protokol je navíc účinný pouze u pacientů s výrazným poklesem kognitivních funkcí, což znemožňuje včasné odhalení AD a snižuje účinnost následné farmakologické léčby. Definitivní diagnóza vyžaduje postmortální vyšetření mozku za účelem potvrzení přítomnosti plaků A β a neurofibrilárních klubek. Ze všech těchto důvodů má hlubší porozumění molekulárním mechanismům spojených s patogenezí a progresí onemocnění zásadní význam zejména pro objevení časných a přesných diagnostických testů a také pro pomoc při vývoji nových léků. Za tímto účelem se v posledních letech objevuje použití technologií systémové biologie, zejména metabolomiky, protože mají potenciál komplexně zkoumat biochemické změny, které jsou základem patologických procesů.

2.3.1 Význam metabolomiky ve studiu Alzheimerovy choroby

Výzkumu Alzheimerovy choroby tradičně brání dlouhé pre-symptomatické období tohoto neurodegenerativního onemocnění, nemožnost studovat mikroskopické změny v průběhu progresu AD, stejně jako složitost etiologie a variabilita klinických příznaků. Nedostatečná přesnost současných diagnostických testů, zejména v časných stádiích onemocnění, může navíc vést k zahrnutí preklinických pacientů s AD do kontrolních skupin v klinických studiích, což omezuje spolehlivost objevených biomarkerů [80]. Proto je v posledních letech snaha o využití metabolomiky pro zkoumání patologických mechanismů tohoto onemocnění a také pro identifikaci nových biomarkerů. V této souvislosti byla použita celá řada metabolomických technik, a to jak na lidských kohortách, tak na různých myších modelech. Nejčastěji používané myší modely jsou založeny na nadměrné expresi mutovaných forem lidského APP [81,82], případně koexpresi mutovaného lidského presenilinu 1, za účelem urychlení ukládání A β [83]. Hojně jsou také využívány myší modely bez genetické modifikace, u kterých jsou symptomy AD vyvolány podáváním lipopolysacharidu (LPS) způsobujícího neurozáněť [84]. Mimo to jsou samozřejmě zkoumány různé typy lidských biologických vzorků s cílem získat celkový přehled o patologických změnách, které jsou základem AD. Analýza mozkové tkáně vykazuje velký potenciál,

protože umožňuje *in situ* charakterizovat neuropatologické procesy spojené s AD. Mozkomíšni mok je také vhodnou biologickou tekutinou vzhledem k tomu, že jeho složení přímo odráží metabolickou produkci mozku. V neposlední řadě bylo popsáno také použití méně invazivních vzorků, jako je krevní sérum nebo plazma, moč a sliny, s cílem identifikovat jednodušší a levnější biomarkery, které by se daly použít v klinické praxi [85].

Panuje shoda, že z metabolického hlediska je klíčovým znakem Alzheimerovy choroby narušený metabolismus lipidů [86]. Metabolické studie již dříve zaznamenaly významné změny v obsahu fosfolipidů, sfingolipidů a souvisejících katabolických metabolitů, jakožto produktů procesů destabilizujících buněčné membrány (Tab. 1). Stejně tak důležitou roli hraje homeostáza cholesterolu, pravděpodobně v důsledku vlivu této sloučeniny na tvorbu neuronálních lipidových raftů [87]. Hyperlipidemie byla navíc popsána jako velmi důležitý rizikový faktor pro rozvoj AD, což se nakonec projevuje zvýšenou cirkulující hladinou triglyceridů a dalších neutrálních lipidů. Další výzkumy odhalily významné poruchy biosyntézy metabolitů souvisejících s neurotransmiterovými systémy. Kromě toho se prokázalo také narušení mnoha drah souvisejících s energetickým metabolismem, mimo jiné glykolýzy, citrátového cyklu, β -oxidace lipidů, glukoneogeneze a ketogeneze. Tyto změny metabolismu jsou obvykle doprovázeny zvýšeným oxidačním stresem, který má za následek snížení hladin antioxidantů a zvýšení markerů oxidace proteinů, lipidů a nukleových kyselin. Kromě těchto nejčastějších metabolických změn existují také důkazy o zapojení dalších centrálních drah, jako je např. močovinový cyklus, případně metabolismus purinů, polyaminů a žlučových kyselin, což dokazuje multifaktoriální charakter této neurodegenerativní poruchy (Tab.1) [88].

Tabulka 1. Přehled metabolomických studií u pacientů s Alzheimerovou chorobou, případně pacientů s mírnou kognitivní poruchou. AD - Alzheimerova choroba, MCI - mírná kognitivní porucha

Studovaná populace	Použitý biologický materiál	Ovlivněné analyty	Citace
AD (N=50), kontroly (N=50)	Mozkomíšni mok	Sfingomyeliny, fosfatidylcholin	[89]
AD (N = 43), MCI (N = 33), kontroly (N = 35)	Krevní plazma	Fosfatidylcholin, Lysofosfatidylcholin	[90]
AD (N = 47), MCI (N = 143), kontroly (N = 46)	Sérum	Fosfatidylcholin, plasmalogeny, sfingomyeliny steroly, histamin, 2,4-dihydroxybutanoát	[91]
AD (N = 90), MCI (N = 77), kontroly (N = 51)	Sérum	Plasmalogeny, diacylglyceroly	[92]
AD (N = 36), MCI (N = 48), kontroly (N = 40)	Krevní plazma	Cholesteryl estery s dlouhým řetězcem	[93]
AD (N = 20), kontroly (N = 20)	Krevní plazma	Lysofosfatidylcholin, tryptofan, fytosfingosin, dihydrosfingosin	[94]
AD (N = 30), MCI (N = 30), kontroly (N = 30)	Krevní plazma	Sfingomyeliny	[95]
AD (N= 268), kontroly (N = 696) + AD (N= 178), kontroly (N = 210)	Krevní plazma + sérum	Sfingolipidy, fosfolipidy	[96]
AD (N = 10), kontroly (N = 10)	Erythrocyty	Sfingolipidy, metabolismus aminokyselin	[97]
AD (N = 10), kontroly (N = 10)	Krevní plazma	Desmosterol	[98]
AD (N = 17), kontroly (N = 5)	Části mozkové tkáně	Sulfatidy, ceramidy	[99]
AD (N = 30), kontroly (N = 30)	Sérum	Ceramidy, diacylglyceroly, amidy mastných kyselin a volné mastné kyseliny, urea, kreatinin, malát, taurin, dopamin, serotonin, alanin, pikolinát	[100]

AD (N = 6), kontroly (N = 8)	Horní frontální gyrus	Sulfatidy	[101]
AD (N = 26), kontroly (N = 26)	Krevní plazma	Sfingomyeliny s dlouhým řetězcem, ceramidy	[102]
AD (N = 75), MCI (N = 17), kontroly (N = 45)	Sérum	Ceramidy, fosfolipidy, sfingomyeliny, sulfatidy, monoacylglyceroly, acylkarnitiny oleamid, fenylacetylglutamin	[103]
AD (N = 660), MCI (N = 583)	Sérum	Sfinganin-1-fosfát, 7-ketocholesterol, 3-methoxytyrosin, deoxyribose-5-fosfát, fenyllaktát, lysofosfatidylcholin, fenylalanin, ornithin, glutamát	[104]
AD (N = 256), kontroly (N = 218)	Sliny	Sfinganin-1-fosfát, ornitin, fenyllaktát, inosin, 3-dehydrokarnitin, hypoxantin	[105]
AD (N = 660), MCI (N = 583)	Sliny	Cytidin, sfinganin-1-fosfát, ornitin, fenyllaktát, pyroglutamát, glutamát, tryptofan, inosin, 3-dehydrokarnitin, hypoxantin	[106]
AD (N = 57), MCI (N = 58), kontroly (N = 57)	Krevní plazma	Mastné kyseliny, dimethylglycin, glutamát, uridin, glyceraldehyd, sukcinát, fumarát, 5-oxoprolin, taurin, hypotaurin, malát, glutamin, 2-aminoadipát, prolin, cystein, cytidin, thymin, hypoxantin, citrát	[107]
AD (N = 79), kontroly (N = 51)	Mozkomíšní mok	Cystein, tyrosin, fenylalanin, methionin, serin, pyruvát, taurin, kreatinin, kortizol, dopamin, uridin	[108]
AD (N = 42), MCI (N = 14), kontroly (N = 37)	Sérum	Cholin, kreatinin, dimethylarginin, homocysteinyl-cystein, acylkarnitiny, peptidy, kreatin, asparagin, methionin, histidin, karnitin, N-acetyl-spermidin, valeryl-karnitin	[109]
AD (N = 21), MCI (N = 33), kontroly (N = 21)	Mozkomíšní mok	Uracil, xanthin, uridin, tyrosyl-serin, methylsalsolinol, nonanoylglycin, dopaminchinon, kaproát, vanylglykol, histidin, pipekolát, kreatinin, taurin, C16-sfingosin-1-fosfát, tryptofan, 5-methylthioadenosine	[110]
AD (N = 15), MCI (N = 15), kontroly (N = 15)	Krevní plazma, mozkomíšní mok	Metabolismus cholesterolu, lysinu, argininu, aspartátu a asparaginu, močovinový cyklus, polyaminy, ...	[111]
AD (N = 21), kontroly (N = 19)	Čelní mozková kůra	Metabolismus fosfolipidů, met. alaninu, aspartátu a glutamátu, met. argininu a prolinu, met. cysteinu a methioninu, met. glycinu, serinu a threoninu, met. purinu,	[112]

		biosyntéza pantothenátu a CoA	
AD (N = 9), kontroly (N = 9)	Části mozkové tkáně	Metabolismus aminokyselin, met. glukózy, močovinový cyklus, citrátový cyklus, met. nukleotidů	[113]
AD (N = 23), kontroly (N = 21)	Sérum	Valin, močovina, aspartát, pyroglutamát, glutamin, fenylalanin, asparagin, ornitin, pipekolát, histidin, tyrosin, palmitát, kys. močová, tryptofan, stearát, cystein, laktát, ketoglutarát, isocitrát, glukóza, oleát, adenosin, cholesterol	[114]
AD (N = 112), MCI (N = 33), kontroly (N = 45)	Mozkomišní mok	Fenylalanin, glutamát, laktát, acetát, hydroxyisovalerát, hydroxybutyrát	[115]
AD (N = 10), kontroly (N = 10)	Části mozkové tkáně	Spermin, spermidin, N-acetylspermin, N-acetylspermidin, putrescin	[116]
AD (N = 40), MCI (N = 36), kontroly (N = 38)	Mozkomišní mok	Methionin, 5-hydroxyindoleacetát, vanillylmandelát, xanthosin, glutathion, hypoxantin	[117]
AD (N = 15), kontroly (N = 15)	Mozkomišní mok	Noradrenalin, tokoferoly, 3-methoxytyramin, 5-hydroxytryptofan, methoxy-hydroxyfenylglykol, askorbát	[118]
AD (N = 22), kontroly (N = 18)	Sérum	Valin, glutamin, N-acetylglutamin, glutamát, histidin, arginin, dopamin, karnitin, kreatin, mastné kyseliny, eikosanoidy, triacylglyceroly, cholin, glycerofosfocholin, fosfolipidy	[119]
AD (N = 22), kontroly (N = 18)	Sérum	Histidin, arginin, imidazol, taurin, guanidin, putrescin, oleamid, fosfolipidy, eikosanoidy, diacylglyceroly, kynurenin	[120]
111 vzorků (AD, MCI, kontroly)	Mozková kůra	Metabolismus žlučových kyselin	[121]
AD (N = 305), MCI (N = 789), kontroly (N = 370)	Sérum	Metabolismus žlučových kyselin	[122]

3 CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE

Cílem disertační práce bylo vyvinout a aplikovat metabolomické workflow zahrnující procesy od designu experimentu, přes přípravu vzorků a měření necílených metabolomických dat až po jejich zpracování pomocí preprocesovacího software a statistické analýzy. Vzhledem k tomu, že metabolomická data i po zpracování pomocí běžného preprocesovacího programu obsahují nadbytečné features, bylo cílem této práce vyvinout nástroj pro účinné odstranění těchto potenciálně falešně pozitivních analytů.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Redukce multiplicit v metabolomických datech na základě korelačních vztahů

Tato práce vznikla během zpracovávání metabolomických dat kvůli potřebě očistit tato data od velkého množství nadbytečných signálů, které by zkreslovaly výsledky samotné analýzy, jelikož nebyly odstraněny běžným procesovacím softwarem. Odborná publikace s názvem „CROP: correlation-based reduction of feature multiplicities in untargeted metabolomic data“ byla publikována v roce 2020 v časopise Bioinformatics [48].

4.1.1 Materiál a metody

4.1.1.1 Chemikálie

Acetonitril, methanol, ethanol a voda (LC-MS kvalita), kyselina mravenčí, 3-hydroxy-3-methylglutarová kyselina; vše Sigma-Aldrich, St. Louis, USA.

4.1.1.2 Přístrojové vybavení

- Analytické váhy Kern ABT 120-5DM (Kern, Německo)
- Centrifuga chlazená Rotina 420R (Hettich, Německo)
- Centrifuga Mikro 120 (Hettich, Německo)
- Vortex V-1 (BioSan, Lotyšsko)
- pH metr CyberScan PC 150 (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Lyofilizátor FreeZone (Labconco, USA)
- LC-HRMS: UltiMate 3000 RS kapalinový chromatograf (Dionex, USA) ve spojení s hmotnostním spektrometrem Orbitrap Elite (Thermo Fischer Scientific, USA)

4.1.1.3 Biologický materiál a příprava vzorků

Funkčnost R-skriptu CROP byla testována na dvou souborech dat z klinických metabolomických experimentů. Veškeré vzorky byly anonymizovány a odebrány v souladu s Helsinskou deklarácí Světové zdravotnické organizace.

Prvním projektem byl zaměřen na identifikaci nových biomarkerů dědičné metabolické poruchy 3-hydroxy-3-methyl-glutarové acidurie (HMGA) [123]. V rámci této studie bylo analyzováno 5 vzorků krevní plazmy od pacientů s diagnostikovanou HMGA a dále 20 vzorků od zdravých kontrolních jedinců, poskytnutých ve spolupráci s Translační metabolickou laboratoří Radboud University Nijmegen v Holandsku a Laboratoří dědičných metabolických poruch Fakultní nemocnice Olomouc. K 50 μ l krevní plazmy byl přidán ledově vychlazený methanol/ethanol (1:1, 200 μ l). Vzorky byly promíchány (vortex, 30 s), inkubovány při -80 °C přes noc a poté centrifugovány (21 300 x g, 15 min, 4 °C). Supernatant (220 μ l) byl lyofilizován, rekonstituován roztokem kyseliny mravenčí ve vodě (0,1 %, 100 μ l), promíchán (vortex, 15 s) a centrifugován (21 300 x g, 15 min, 4 °C). Vzorky kontroly kvality (QC) byly připraveny smícháním souboru všech patientských vzorků a souboru všech kontrolních vzorků v poměru 1:1, aby se zabránilo ředicímu efektu výrazně většího počtu kontrolních vzorků oproti patientským. Data byla nahrána do veřejně přístupné online databáze MetaboLights (MTBLS1332; [124]), kde aktuálně probíhá jejich recenzní řízení.

Druhým projektem, na kterém byl demonstrován problém odstranění lipidových klastrů, byla analýza krevní plazmy od 20 zdravých jedinců, získaných z Laboratoře dědičných metabolických poruch Fakultní nemocnice Olomouc. Vzorky byly deproteinovány pomocí 80% ledově vychlazeného MeOH (30 μ l vzorku + 120 μ l MeOH, přes noc, -80 °C) a centrifugovány (21 300 x g, 15 min, 4 °C). Supernatant byl následně přepipetován do HPLC vialek k samotné analýze.

4.1.1.4 Necílená LC-HRMS analýza pacientů s HMGA

Všechny vzorky byly analyzovány v rámci jedné analytické série obsahující kondiční QC vzorky, slepé vzorky (blank), QC vzorky pro měření

fragmentačních spekter, směsi standardů a vzorky kontroly kvality celého systému (každý šestý nástřík). Vzorky krevní plazmy od pacientů s HMGA a kontrolních zdravých jedinců byly analyzovány v náhodném pořadí.

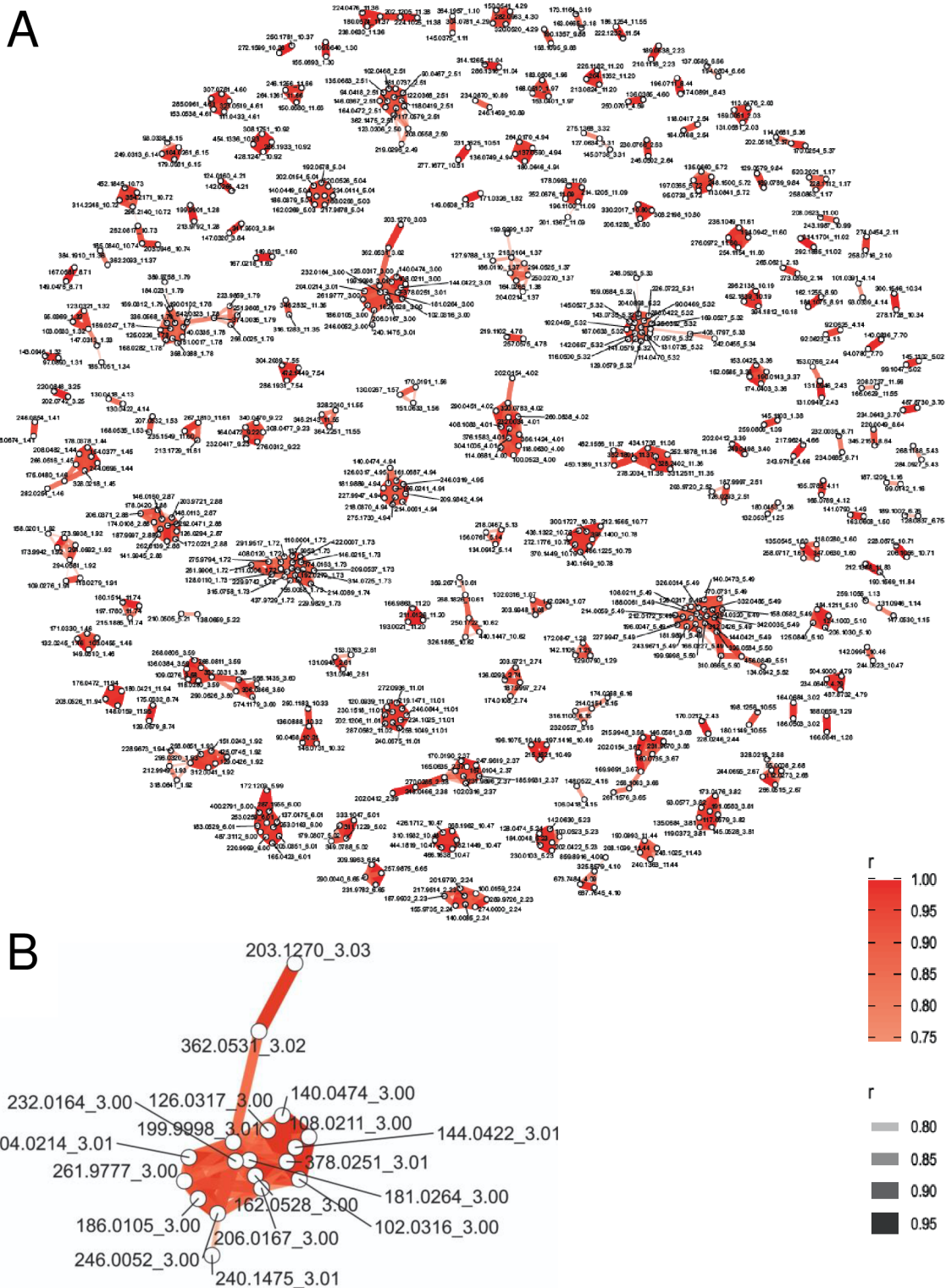
Analýza byla provedena pomocí ultraúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií (UHPLC-MS) užitím LC systému Dionex UltiMate 3000 Rapid Separation (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) a hmotnostního spektrometru Orbitrap Elite (Thermo Fisher Scientific, MA, USA). Pro separaci jednotlivých analytů za pomoci gradientové eluce byla použita kolona Acquity HSS T3 s reverzní fází (100 × 2,1 mm; 100Å, 1,8 µm, Waters, Milford, MA, USA) (mobilní fáze A 0,1 % kyseliny mravenčí ve vodě, pH 2,66, mobilní fáze B 0,1% kyselina mravenčí v roztoku methanolu a vody (99:1), t = 0,0 - 1,0 min, 1 % B; t = 16,0 - 20,0 min, 100 % B; t = 21,0 - 25,0 min, 1 % B; 0,4 ml/min; 40 °C). Objem nástříku byl 5 µl. Data byla měřena v pozitivním módu (full-scan, ESI+, 120 000 FWHM, *m/z* 90-1000) a následně zpracována pomocí softwaru Compound Discoverer 3.0 (Thermo Fisher Scientific) podle parametrů uvedených v příloze č. 1.

4.1.1.5 Necílená LC-HRMS analýza kontrolních vzorků

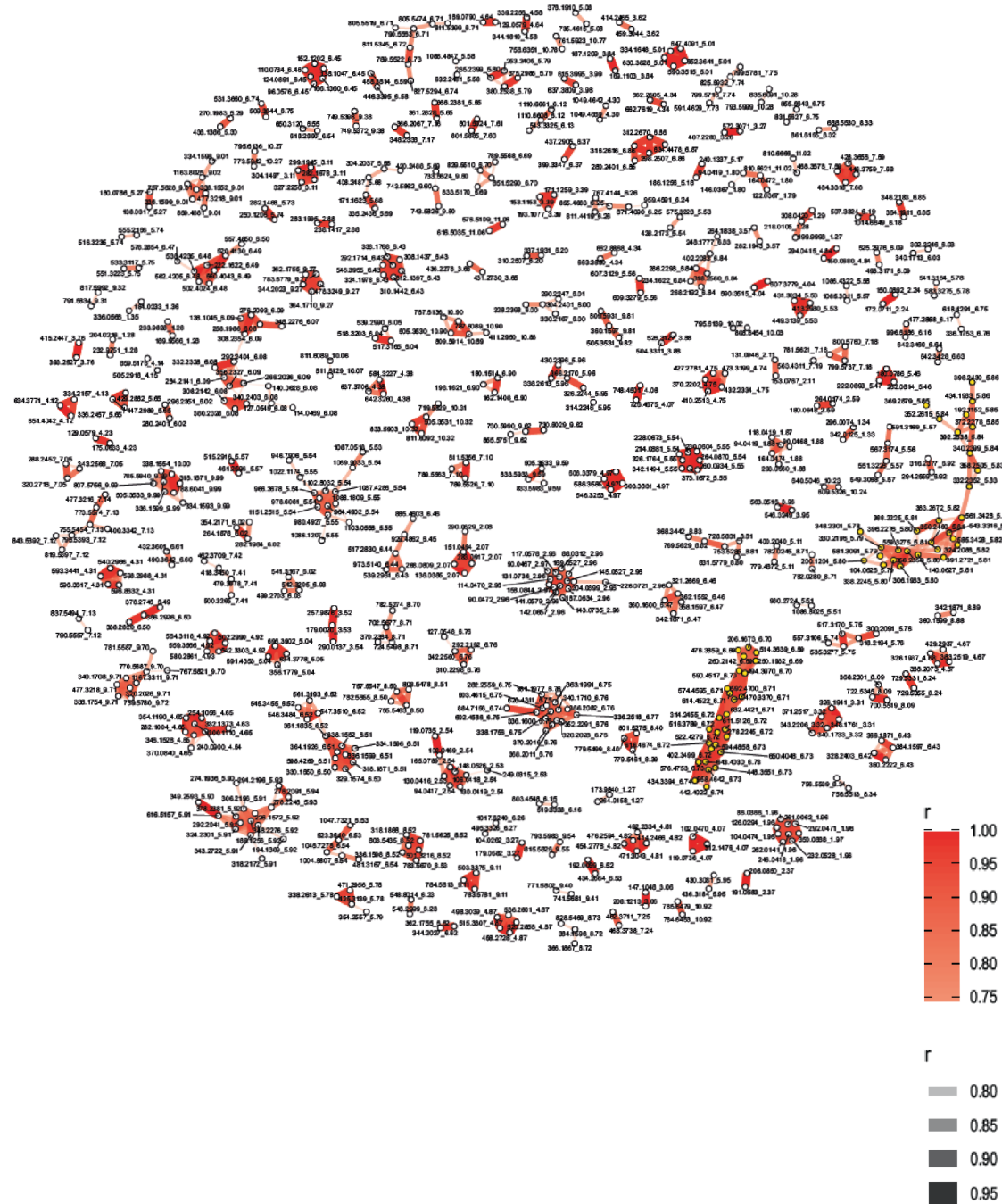
Vzorky krevní plazmy od zdravých jedinců (N = 20) byly deproteinovány pomocí 80% MeOH a analyzovány metodou UHPLC-MS pomocí LC systému Dionex UltiMate 3000 Rapid Separation (Thermo Fisher Scientific, USA) spojeného s hmotnostním spektrometrem Orbitrap Elite (Thermo Fisher Scientific, USA). Pro separaci byla použita kolona Acquity UPLC BEH C18 s reverzní fází (2,1 × 100 mm, 1,7 µm, Waters, USA) (mobilní fáze A 0,1 % kyselina mravenčí ve vodě, B 0,1 % kyselina mravenčí v MeOH, t = 0,0, 0,5 % B; t = 4,0, 70 % B; t = 4,5-10,4, 98 % B; t = 10,6-15,0, 0,5 % B; 0,35 ml/min; 40 °C). Objem nástříku byl 5 µl. Data byla měřena v pozitivním módu (full-scan, ESI+, 60 000 FWHM, *m/z* 60-1300) a zpracována pomocí softwaru Compound Discoverer 3.0 (Thermo Fisher Scientific, USA) s parametry uvedenými v příloze č. 2.

4.1.1.6 R-skript CROP

Skript CROP byl vytvořen v open source programovacím jazyce R (v. 3.6.1), díky čemuž jej lze snadno začlenit do standardního metabolického procesovacího postupu (workflow). Algoritmus kombinuje Pearsonův párový korelační koeficient s nastaveným rozsahem retenčních časů (RT) za účelem seskupení všech features patřící jednomu analytu do jednoho klastru. Každý takový shluk je pak zastoupen v konečné datové tabulce jedním feature (m/z) s nejvyšší průměrnou plochou píku. Shlukování je znázorněno korelační sítí [125], což umožňuje vizuální kontrolu nastavených parametrů (obr. 11). Barva a tloušťka okrajů jednotlivých propojení v síti odrážejí sílu asociace daného páru (tj. hodnotu korelačního koeficientu). Kromě hraničních parametrů pro korelační koeficient $ccth$ a retenčního času rtw , je potřeba nastavit maximální povolené retenční okno $maxrtw$, které určuje největší povolený rozdíl retenčních časů dvou features v rámci celého klastru. Nastavení těchto parametrů je závislé na účinnosti chromatografické separace. Nepřiměřeně vysoká hodnota rtw by mohla způsobit seskupení korelovaných features s podobným RT patřícím k rozdílným sloučeninám. Správným nastavením parametru $maxrtw$ (obvykle se začíná s hodnotou $maxrtw = 2 \cdot rtw$, za předpokladu dostatečně účinné separace jednotlivých analytů a následného správného zpracování dat) se tento jev tzv. „dlouhých klastrů“ zvýrazní probarvením jednotlivých uzlů žlutou barvou jako varování (obr. 12). Navrhuje se začít s $ccth = 0,75$ (vysoká korelace) a rtw menší nebo rovné polovině mediánu šířky píku. Podrobná kontrola dat je nicméně zásadním krokem při ověřování platnosti zvolených parametrů, jelikož rtw souvisí s účinností srovnání retenčních časů („RT alignmentu“) v rámci procesovacího workflow a $ccth$ závisí např. na počtu vzorků. Proto je třeba, aby oba parametry byly posuzovány v závislosti na naměřených datech.



Obrázek 11. *A* – Korelační síť pro soubor dat HMGa s následujícím nastavením parametrů: $ccth = 0,75$; $rtw = 0,01$; $maxrtw = 0,04$. Barva a tloušťka jednotlivých propojení odráží sílu korelace. *B* – Přibližení klastru 3-hydroxy-3-methyl glutarátu.



Obrázek 12. Korelační síť pro soubor dat zdravých kontrolních jedinců s následujícím nastavením parametrů: $c_{th} = 0,75$; $rtw = 0,01$; $maxrtw = 0,04$. Barva a tloušťka propojení odráží sílu korelace. V obrázku jsou přítomny protáhlé klustry, které jsou označeny žlutým probarvením jednotlivých uzlů.

4.1.2 Výsledky

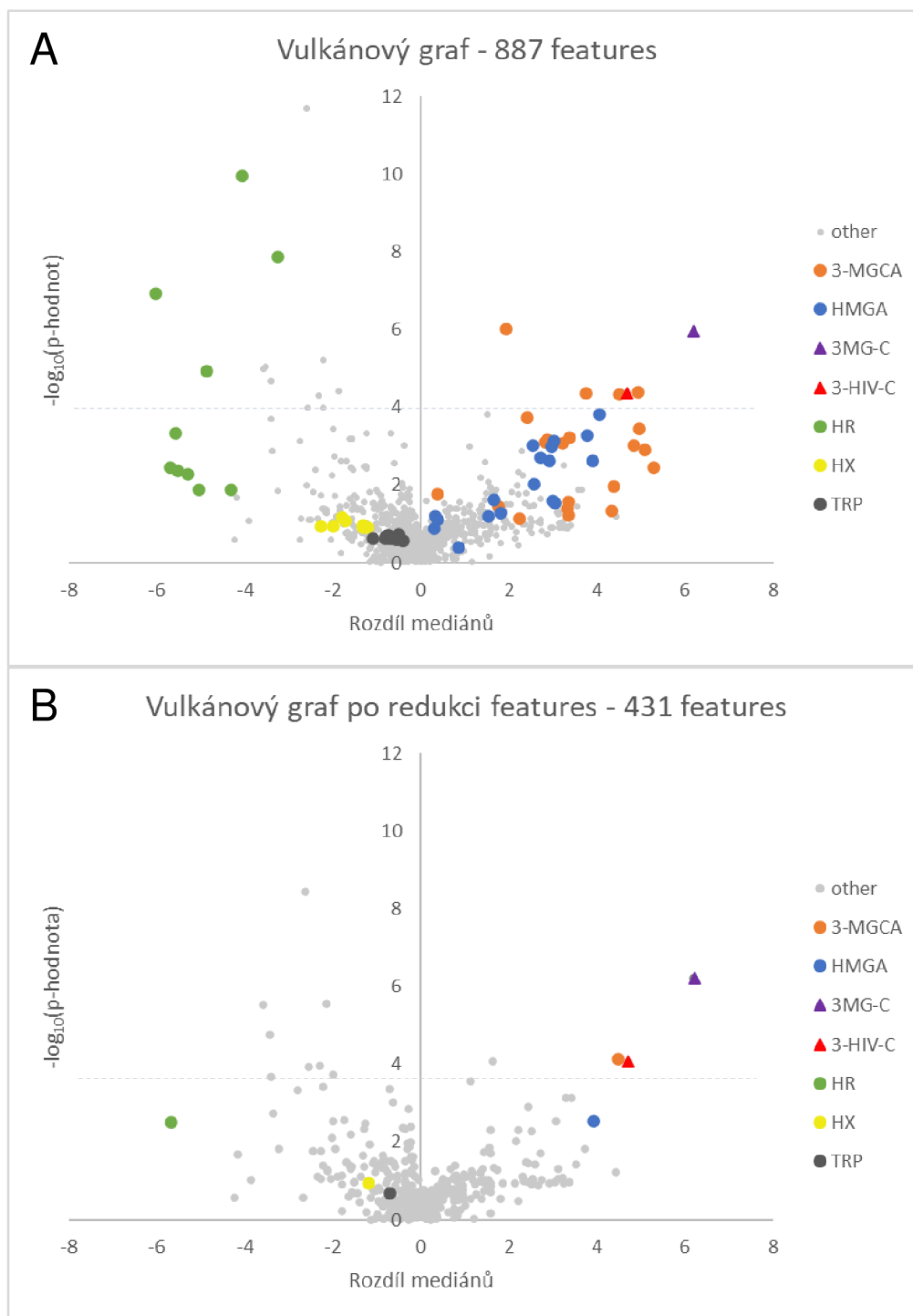
4.1.2.1 Analýza pacientů s HMGA

Finální tabulka píků exportovaná ze softwaru Compound Discoverer 3.0 (již po automatickém seskupení aduktů) obsahovala 887 látek. V tomto datovém souboru CROP identifikoval 138 klastrů (obr. 11). Všechny klastry byly podrobně manuálně zkontrolovány za účelem zjištění jejich složení (vyhledávání v online databázích Metlin, HMDB a Lipid Maps, vizuální porovnání tvaru píku). Složení vybraných klastrů bylo potvrzeno měřením čistých chemických standardů (tab. 2). Takto bylo přiřazeno 98 % znaků jako metabolity, adukty, fragmenty, izotopy a další features s podobným RT a tvarem píku. (doplňující informace publikace Kouřil a kol. [48]). Celkový počet features byl redukován na 431.

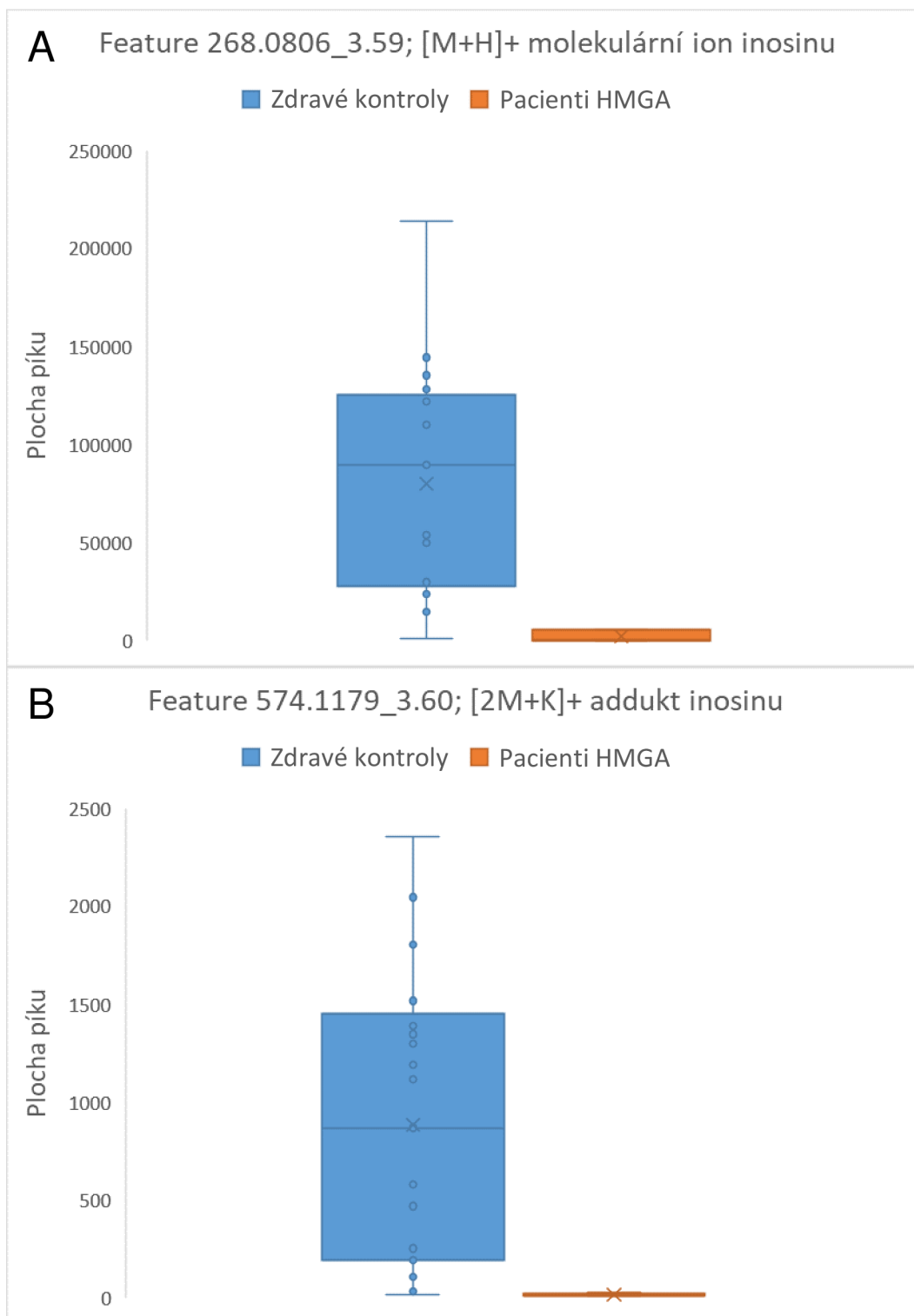
Pro ilustraci vlivu na následnou statistickou analýzu byly porovnány vulkánové grafy před a po aplikaci skriptu CROP (obr. 13). Výsledky jsou čistší a obsahují méně falešně pozitivních kandidátů na biomarkery. Vulkánový graf zkonstruovaný ze všech 887 features (obr. 13A) ukázal významný pokles inosinu a s ním souvisejících features. Inosin je známým biomarkerem methylmalonové acidurie a defektu purinnukleosidfosforylázy. Z metabolického hlediska však není známa souvislost mezi snížením inosinu a HMGA. Ručním procházením dat bylo zjištěno, že většina features klastru inosinu tvoří falešně pozitivní multiplicity způsobené píky s intenzitami blízkými detekčnímu limitu (tudíž náchylnějšími k ovlivnění šumem) málo hojných aduktů a in-source fragmentů ve skupině pacientů (viz obr. 14). Po aplikaci skriptu CROP (obr. 13B) jsou multiplicity zastoupeny pouze samotným inosinem (feature s největší plochou píku), který není statisticky signifikantní. Falešně pozitivní features související s inosinem byly tudíž účinně odstraněny.

Tabulka 2. Rozbor klastru 3-hydroxy-3-methyl glutarátu a jeho srovnání s měřením čistého chemického standardu.

Feature <i>m/z</i>	Extrahovaný chromatogram - pacientský vzorek	Plocha píku poměr	Extrahovaný chromatogram - standard	Plocha píku poměr
162.0528_3.00 163.0597		4.11·10 ⁶ 100%		7.96·10 ⁶ 100%
102.0316_3.00 103.0387		3.1·10 ⁶ 75%		4.49·10 ⁶ 56%
108.0211_3.00 109.0282		3.95·10 ⁵ 10%		5.73·10 ⁵ 7%
126.0317_3.00 127.0388		9.02·10 ⁶ 219%		1.41·10 ⁷ 177%
140.0474_3.00 141.0544		5.92·10 ⁵ 14%		8.01·10 ⁵ 10%
144.0422_3.01 145.0496		3.63·10 ⁶ 88%		3.56·10 ⁶ 45%
181.0264_3.00 182.0339		8.27·10 ⁵ 20%		6.64·10 ⁵ 8%
186.0105_3.00 187.0176		3.51·10 ⁵ 9%		3.61·10 ⁴ 0.5%
199.9998_3.01 201.0070		2.17·10 ⁵ 5%		1.46·10 ⁵ 2%
203.1270_3.03 204.1338		1.15·10 ⁶ 28%		0 0%
204.0214_3.01 205.0287		1.37·10 ⁵ 3%		1.42·10 ⁴ 0%
206.0167_3.00 207.0238		1.73·10 ⁵ 4%		3.26·10 ⁵ 4%
232.0164_3.00 233.0235		2.81·10 ⁵ 7%		9.46·10 ³ 0.1%
240.1474_3.01 233.0235		1.38·10 ⁶ 34%		0 0%
246.0052_3.00 247.0123		6.79·10 ⁵ 17%		5.07·10 ⁴ 1%
261.9777_3.00 262.9850		2.96·10 ⁵ 7%		4.76·10 ⁵ 6%
362.0531_3.02 363.0595		9.12·10 ⁵ 22%		8.75·10 ⁵ 11%
378.0251_3.01 379.0318		3.67·10 ⁵ 9%		7.06·10 ⁵ 9%



Obrázek 13. Vulkánové grafy před (A) a po (B) odstranění nadbytečných features pomocí skriptu CROP. Celkový počet features byl snížen z 887 na 431. Vybrané metabolity jsou označeny následovně: 3-methylglutakonát (3-MGCA) oranžově, 3-hydroxy-3-methylglutarát (HMGA) modře, 3-methylglutaryl karnitin (3-MG-C) fialově, 3-hydroxyisovalerylkarnitin (3-HIV-C) červeně, inosin (HR) zeleně, hypoxantin (HX), tryptofan (TRP) tmavě šedě, ostatní features světle šedě. Přerušovaná čára představuje hladinu významnosti 0,05 po Bonferroniho korekci.



Obrázek 14. Krabicové grafy vybraných features z klastru inosinu. Před aplikací skriptu CROP (A) byl jako významný shledán feature 574.1179_3.60 ([2M+K]⁺ addukt inosinu, $-\log_{10}(p\text{-hodnoty}) = 9,96$; viz obr. 13A). Po aplikaci skriptu CROP (B) jako zástupce klastru vybrán feature 268.0806_3.59, statisticky nevýznamný ([M+H]⁺ molekulový ion inosinu, $-\log_{10}(p\text{-hodnoty}) = 2,29$; viz obr. 13B).

4.1.2.2 Analýza kontrolních vzorků

Předpokládá se, že v průběhu zpracování dat může dojít k náhodnému sloučení některých biologicky korelovaných látek v případě nedostatečné chromatografické separace. Tento jev byl pozorován na druhém souboru dat při analýze vzorků séra od zdravých kontrolních jedinců necílenou metodou zaměřenou jak na analýzu polárních metabolitů, tak na analýzu lipidů. Suboptimální separace lipidů se v korelační síti projevila protáhlými klastry (obr. 13). V případě výskytu takovýchto klastrů je třeba zpřísnit nastavené parametry. Lze ovšem předpokládat, že ne všechny multiplicity musí být účinně odstraněny.

4.1.3 Diskuse

CROP je nový nástroj pro efektivní identifikaci a redukci multiplicit v datech. Není určen jako hlavní algoritmus pro detekci aduktů, která je běžně prováděna pomocí preprocesovacího softwaru, nicméně by měl být začleněn jako doplňková součást stávajícího systému před statistickou analýzou. Grafická korelační síť generovaná programem CROP nabízí uživatelsky přívětivou vizuální kontrolu nastavení parametrů a jejich vlivu na shlukování. Skript navíc dále umožňuje zpětné rozluštění obsahu jednotlivých klastrů identifikovaných jako kandidáty na biomarkery pomocí statistické analýzy.

4.2 Metabolomická a lipidomická analýza změn způsobených zánětem vyvolaným pomocí LPS u transgenních APdE9 myší

Ve spolupráci s kolegy z University of Eastern Finland v Kuopiu byla řešena problematika vzniku a progresu Alzheimerovy choroby. Konkrétně se tato studie zabývala změnami v metabolomu a lipidomu transgenních myší po podání lipopolysacharidu indukujícího neurozánět, jako jednoho z faktorů ovlivňujícího rozvoj AD. V této studii bylo použito kompletní procesovací workflow, jehož součástí byl také výše popsáný R-skript CROP. Odborná publikace s názvem „Metabolomic and lipidomic changes triggered by lipopolysaccharide-induced systemic inflammation in transgenic APdE9 mice“ byla publikována v roce 2021 v časopise Scientific Reports [126].

4.2.1 Materiál a metody

4.2.1.1 Chemikálie

Acetonitril, methanol, ethanol, propan-2-ol a voda (LC-MS kvalita), kyselina mravenčí, kyselina octová, terc-butylmethylether, dichlormethan, LPS (#L2880), tribromoethanol (#75-80-9, Avertin); (vše Sigma-Aldrich, St. Louis, USA).

4.2.1.2 Přístrojové vybavení

- Analytické váhy Kern ABT 120-5DM (Kern, Německo)
- Centrifuga chlazená Rotina 420R (Hettich, Německo)
- Centrifuga Mikro 120 (Hettich, Německo)
- Vortex V-1 (BioSan, Lotyšsko)
- pH metr CyberScan PC 150 (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Lyofilizátor FreeZone (Labconco, USA)
- LC-MS/MS: Sciex Exion AD kapalinový chromatograf ve spojení s hmotnostním spektrometrem QTRAP 6500+ (Sciex, USA)
- LC-HRMS: UltiMate 3000 RS kapalinový chromatograf (Dionex, USA) ve spojení s hmotnostním spektrometrem Orbitrap Elite (Thermo Fischer Scientific, USA)

4.2.1.3 Biologický materiál

Pokusy na zvířatech byly v souladu s pokyny ARRIVE a byly prováděny podle směrnice EU 2010/63/EU pro pokusy na zvířatech. Postupy byly schváleny finskou Národní radou pro pokusy na zvířatech (ESA VI-2015-000744). Kritéria pro zařazení/vyřazení jednotlivých zvířat do studie byla založena na zdravotním stavu zvířat. V analýze byla použita zvířata, která byla zdravá a dle tělesné hmotnosti a vizuálního pozorování nevykazovala známky onemocnění. Žádné ze zvířat během studie neuhynulo. Vzhledem k vyššímu výskytu AD a riziku u žen ve srovnání s muži byly použity myši samice. S ohledem na požadovanou sílu studie stanovenou na 0,8 a alfa na 0,05 byla při počtu 9 vzorků na skupinu vypočtena velikost účinku (effect size) 1,1 a vyšší jako statisticky významná. Velikost skupin byla stanovena jako kompromis mezi složitostí experimentu, použitím zvířecích modelů ve studii a obecným doporučením pro metabolomické studie.

Zvířata patřila do jedné ze čtyř studijních skupin: kontrolní skupina myši s podáváním LPS (skupina WT+LPS), transgenní myši APdE9 (skupina APdE9, RRID: MGI:5701399, [127]) a myši APdE9 s podáváním LPS (skupina APdE9+LPS), přičemž všechny byly srovnávány s věkově odpovídajícími WT myšmi (kontrolní WT skupina). Použité transgenní myši APdE9 byly vytvořeny společnou injektáží chimérického myšího/lidského APP695 nesoucího švédskou mutaci a lidského vektoru PS1-dE9, oba řízené vlastním promotorem myšího prionového proteinu [127]. Dvojitě transgenní myši byly zpětně zkríženy s kmenem C57BL/6 J, čímž vznikly transgenní myši APdE9 (APP/PS1) na pozadí C57BL/6 J. Myši byly 16-17 měsíců staré, jelikož se v tomto věku u myši APdE9 vyskytuje zvýšená tvorba A β plaků a deficit učení a paměti [128–130]. LPS byl podáván podle dříve publikovaného protokolu [131,132]. Dlouhodobé podávání LPS již dříve vyvolalo zánět a zhoršení prostorové paměti u myši 3xTg-AD [131].

Myším ve skupinách WT+LPS (n = 11) a APdE9+LPS (n = 9) bylo podáváno intraperitoneálně 500 μ g/kg LPS dvakrát týdně po dobu čtyř týdnů, po nichž následovalo dvoutýdenní období vymývání. Poté bylo zvířatům opět intraperitoneálně podáváno 500 μ g/kg LPS dvakrát týdně po dobu čtyř týdnů, po

kterém následovalo pětitydenní vymývání s následnou dekapitací. Doba vymývání byla aplikována z důvodu pozorování dlouhodobých změn, které přetrvávají i po ukončení podávání LPS. Myšim v kontrolních skupinách WT (n = 11) a APdE9 (n = 10) byl místo LPS aplikován intraperitoneálně 0,9% fyziologický roztok podle stejného schématu jako ve skupinách WT+LPS a APdE9+LPS.

Všechna zvířata byla umístěna ve standardních laboratorních podmínkách: čtyři až šest zvířat v kleci, denní cyklus světlo-tma 12-12 h, krmivo (Lactamin R36; Lactamin AB, Švédsko) a konzumace vody ad libitum, relativní vlhkost 60 %. V den dekapitace byly myši anestetizovány tribromoethanolem, terminálním anestetikem poskytujícím rychlou a hlubokou chirurgickou analgezií. Použití tribromoethanolu schválila finská Národní rada pro pokusy na zvířatech (ESAVI-2015-000,744). Po anestezii byla krev odebrána srdeční punkcí do zkumavek obsahujících citrát jako antikoagulant. Všechny procedury byly prováděny během dne. Krevní plazma byla oddělena centrifugací (1500 × g, 6 min, 4 °C), poté byla plazmatická vrstva znovu centrifugována (12 000 × g, 6 min, 4 °C), aby se odstranily krevní destičky. Vzorky krevní plazmy byly až do analýzy skladovány při teplotě -80 °C. Myší mozky byly perfundovány pomocí tříminutové transkardiální perfuze heparinizovaným fyziologickým roztokem (2500 IU/l). Po odstranění mening byly mozková kůra a hipokampus odděleny, zmrazeny v tekutém dusíku a až do analýzy uchovávány při - 80 °C.

4.2.1.4 Příprava vzorků

Extrakce metabolitů ze vzorků plazmy pro cílenou metabolomiku:

Příprava vzorků plazmy pro cílenou metabolomiku byla provedena podle dříve popsaného protokolu [133]. Vzorek krevní plazmy (30 µl) byl centrifugován (14 000 × g, 10 min, 4 °C). Odebraných 20 µl supernatantu bylo smícháno s 80 µl předem vychlazeného methanolu za vzniku 80% (v/v) roztoku methanolu. Vzorky byly jemně protřepány a inkubovány po dobu 6 h při teplotě -80 °C, poté následovala centrifugace (14 000 × g, 10 min, 4 °C). Supernatant (80 µl) byl následně lyofilizován. Slepé extrakty byly připraveny stejnou metodou s použitím vody místo plazmy. Vzorky byly až do analýzy skladovány při teplotě -80 °C.

Extrakce ze vzorků krevní plazmy pro necílenou lipidomiku:

Lipidy (nepolární fáze) ze vzorků plazmy byly extrahovány pomocí dvoufázového extrakčního protokolu upraveného podle Sarafiana a spol. [133,134]. Vzorky plazmy (25 μ l) byly smíchány se směsí methanol/terc-butylmethylether/voda (187,5 μ l; 1:5:1,5; V:V:V) a vortexovány po dobu 60 s. Vzorky byly ponechány 10 min při pokojové teplotě a inkubovány při -20 °C přes noc. Následně byly vzorky centrifugovány (14 000 \times g, 20 min 4 °C), organická fáze (120 μ l) byla odebrána a lyofilizována a následně uložena při -80 °C až do doby analýzy. Slepé extrakty byly připraveny stejnou metodou s použitím vody místo plazmy.

Příprava vzorků tkání pro cílenou metabolomiku (vodná extrakce):

Pro vodnou extrakci byly zmražené vzorky kůry a hipokampu (26,2 \pm 4,26 mg) přeneseny do zkumavek (Sample Tubes RB, QIAGEN) předem naplněných jednou 5mm ocelovou kuličkou (QIAGEN). Následně byl přidán 50% (V/V) vodný roztok předem vychlazeného methanolu, jehož objem byl upraven podle hmotnosti tkáně (100 μ l rozpouštědla na 28 mg tkáně). Po zmrazení vzorků na suchém ledu byla provedena lýza tkáně a extrakce metabolitů pomocí kulového mlýnku (30 Hz, 40 s, 2 cykly; TissueLyser II, QIAGEN). Vzorky byly centrifugovány (13 000 \times g, 20 min, 4 °C) a alikvoty 100 μ l supernatantu (28 mg vzorku/100 μ l alikvoty) byly lyofilizovány. Vzorky byly až do analýzy skladovány při teplotě -80 °C.

Příprava vzorků tkání pro necílenou lipidomiku (organická extrakce):

Pro organickou extrakci byl ke zbytkovému peletu získanému po vodné extrakci přidán roztok předem vychlazeného dichlormethanu/methanolu (3:1). Objem roztoku byl přizpůsoben hmotnosti vzorku (28 mg tkáně/100 μ l rozpouštědla). Po zmrazení na suchém ledu byly vzorky přeneseny do kulového mlýnku (rychlostí 30 Hz, 40 s/cyklus, 2 cykly) a následně centrifugovány (13 000 \times g, 20 min, 4 °C). Alikvoty supernatantu organické fáze (28 mg tkáně/100 μ l alikvoty) byly převedeny do skleněných lahviček. Následně byly

vzorky ponechány v digestoři přes noc k odpaření při pokojové teplotě. Vzorky byly až do analýzy skladovány při teplotě -80 °C.

Resuspenze vzorků pro cílenou metabolomiku a necílenou lipidomiku:

Pro cílenou metabolomickou analýzu byly vzorky resuspendovány ve 100 μ l methanolu/vody (4:1; V/V). Po resuspenzi byly vzorky vortexovány (30 s). Kombinací 10 μ l alikvotů resuspendovaných extraktů a důkladným vortexováním (5 min) byl připraven společný vzorek kontroly kvality (QC). Všechny vzorky byly centrifugovány (při 20 000 \times g po dobu 10 min při 4 °C) a přepipetovány do HPLC vialek k samotné analýze.

Pro necílenou lipidomickou analýzu byly vzorky připraveny přesně stejným postupem jako vzorky pro cílenou analýzu s použitím 120 μ l směsi propan-2-ol/acetonitril/voda (2:1:1; V/V/V) místo 100 μ l směsi methanol/voda.

4.2.1.5 Cílená metabolomická/necílená lipidomická analýza

Analytická metoda pro cílenou metabolomiku byla převzata od Yuana a kol. [133]. Experimenty byly provedeny pomocí UHPLC-MS/MS s použitím LC systému Dionex UltiMate 3000 Rapid Separation (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) ve spojení s hmotnostním spektrometrem Triple Quad 6500 (SCIEX, Framingham, MA, USA). Metabolity byly separovány na koloně Phenomenex Luna NH₂, 2,1 \times 150 mm, 3 μ m, (Phenomenex, UK) pomocí gradientové eluce (mobilní fáze A: 20 mM octan amonný, pH 9,75; mobilní fáze B: acetonitril). Průtoková rychlost byla nastavena na 0,3 ml/min s následujícím gradientem: t = 0,0, 95 % B; t = 15,0, 30 % B; t = 17,0, 5 % B; t = 23,0, 5 % B; t = 23,1, 95 % B; t = 28,0 min 95 % B. Teplota kolony byla nastavena na 35 °C a objem nástřiku byl 2 μ l. Parametry MS byly následující: napětí na kapiláře + 5500 V a - 4500 V; tlak pomocných plynů 40 psi; teplota iontového zdroje 400 °C. K řízení LC/MS přístroje byl použit software Analyst (SCIEX, USA).

Necílená lipidomická analýza byla provedena metodou UHPLC-MS s použitím LC systému Dionex UltiMate 3000 Rapid Separation (Thermo Fisher Scientific, USA) ve spojení s hmotnostním spektrometrem Orbitrap Elite (Thermo

Fisher Scientific, USA). Analyty byly separovány na koloně Acquity UPLC BEH C18 2,1 × 100 mm, 1,7 μm (Waters, USA) s využitím gradientové eluce (mobilní fáze A: 10 mM mravenčan amonný a 0,1% kyselina mravenčí v 60% acetonitrilu; mobilní fáze B: 10 mM mravenčan amonný a 0,1 % kyseliny mravenčí v 90% propan-2-olu) dle dříve publikované metody [135]. Průtoková rychlost byla nastavena na 0,4 ml/min s následujícím gradientem: t = 0,0, 40 % B; t = 2, 43 % B, t = 2,1, 50 % B; t = 12,0, 54 % B; t = 12,1, 70 % B; t = 18,0, 99 % B; t = 18,1, 40 % B; t = 20,0, 40 % B. Teplota kolony byla nastavena na 55 °C a objem nástřiku byl 2 μl. Data byla měřena v pozitivním módu ESI+ v hmotnostním rozsahu 100-1600 *m/z* při rozlišení 60 000 FWHM v centroidním režimu. Parametry iontového zdroje byly nastaveny následovně: krycí plyn 40 arbitrárních jednotek; pomocný plyn 15 arbitrárních jednotek; napětí elektrospreje 3 kV; teplota kapiláry 300 °C; teplota zdroje 350 °C. Vybrané analyty byly podrobeny MS/MS analýze s použitím různých kolizních energií. Jako řídicí software přístroje Orbitrap Elite byl použit software Thermo Tune Plus 2.7.0.1103 SP1 (Thermo Fisher Scientific, MA, USA).

QC vzorky byly analyzovány jako prvních deset nástřiků a poté každý šestý nástřik. Dále byly analyzovány dva slepé vzorky na začátku a na konci analytické série.

4.2.1.6 Statistická analýza

Integrace píků z cílené metabolické analýzy byla provedena pomocí programu MultiQuant 3.0 (SCIEX, Framingham, MA, USA). Soubory surových dat z necílené lipidické analýzy byly zpracovány pomocí preprocesovacího softwaru Compound Discoverer 3.0 (Thermo Fisher Scientific, USA) dle parametrů v příloze č. 3. Odstranění redundantních features (fragmentů ze zdroje, nerozpoznaných aduktů atd.) bylo provedeno pomocí R-skriptu CROP [48]. Zpracování dat a statistické vyhodnocení bylo provedeno pomocí balíčku Metabol [136] s využitím softwaru R [137]. Pro korekci signálu byla použita LOESS regrese [23]. Na základě variačních koeficientů (CV) vypočtených z QC vzorků byly metabolity/features s CV vyšším než 30 % vyloučeny z dalšího zpracování

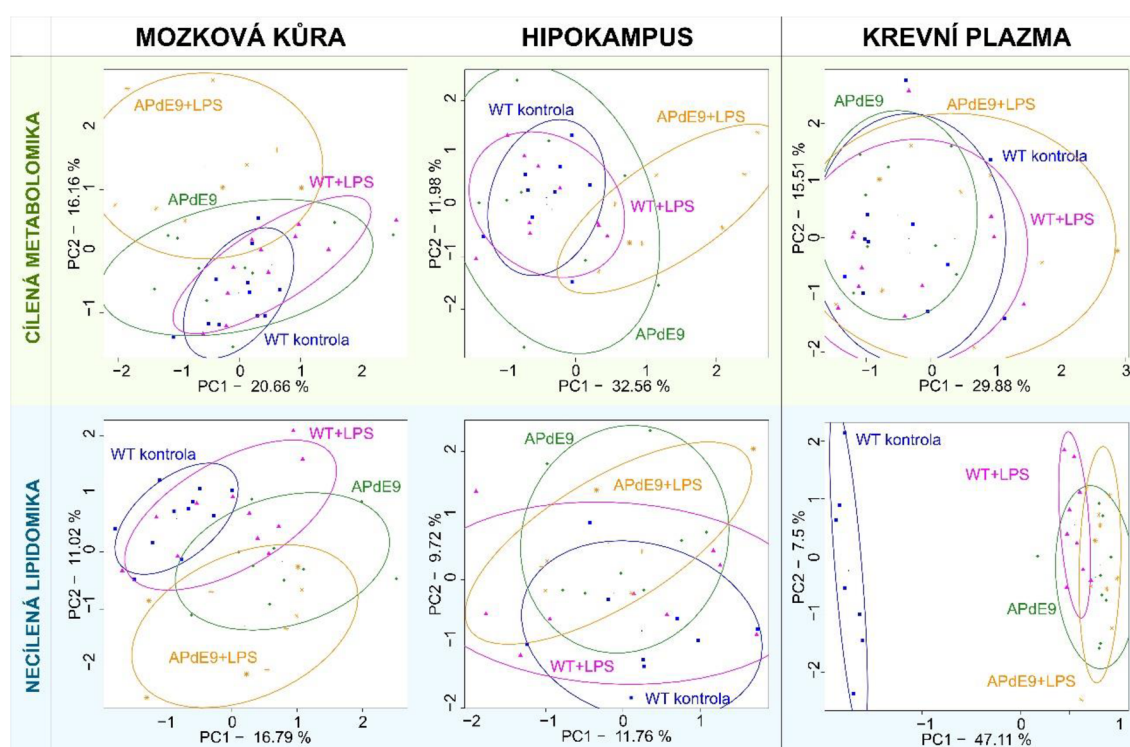
dat. Data byla analyzována jako kompoziční s použitím CLR transformace [53]. Byly použity jak nesupervizovaná analýza hlavních komponent (PCA), tak supervizované vícerozměrné statistické přístupy (diskriminační analýza metodou parciálních nejmenších čtverců, PLS-DA), tak jednorozměrné statistické metody (heatmappy založené na p-hodnotách, krabicové grafy). P-hodnota byla vypočtena pomocí t-testu a dále byla aplikována Bonferroniho korekce ($\alpha = 0,05/\text{počet metabolitů}$). Přítomnost odlehlých hodnot byla vyhodnocena metodou detekce odlehlých hodnot pomocí interkvartilového rozpětí a vizuální kontrolou výsledků z vícerozměrné statistické analýzy. Nejvíce ovlivněné biochemické dráhy byly určeny pomocí modulu MetaboAnalyst 4.0 Pathway Analysis, který je založen na databázi metabolických drah KEGG (v rámci této studie bylo použito 140 metabolitů z knihovny *Mus musculus*). Aby bylo možné identifikovat a přímo porovnat nejvýznamnější dráhy, byl práh $-\log(p\text{-hodnoty})$ nastaven na 3,0 a práh hodnoty tzv. „pathway impact” na 0,3 (v grafech zvýrazněno červeným obdélníkem). Pro výpočet byly použity algoritmy Global Test a Relativebetweenness Centrality. Pro účely článku byly anotovány pouze statisticky významné features založené na shodě s databází Metlin (hmotnostní tolerance < 1 ppm) a odpovídajícím retenčním chováním. Některé z diskriminujících lipidů, LPC/LPE a PC/PE, nebyly rozlišeny z důvodu stejné molekulové hmotnosti a podobnému retenčnímu chování.

4.2.2 Výsledky

Cílem studie bylo porovnat metabolom a lipidom u myší APdE9, APdE9+LPS a myší WT+LPS s věkově odpovídajícími WT kontrolami za účelem prozkoumání vlivu systémového zánětu u AD. Již dříve byl charakterizován šestnáctiměsíční model myší APdE9 z hlediska zvýšené tvorby A β plaků a poruchy prostorového učení a paměti [129,138].

Analýzy mozkové kůry a hipokampu vedly k detekci 153 metabolitů pomocí cílené metabolomické analýzy a 1435 features necíleným lipidomickým přístupem. V krevní plazmě tří myších modelů a WT kontrol bylo detekováno 144 metabolitů a 482 lipidů (doplňující informace publikace Puris a kol. [126]).

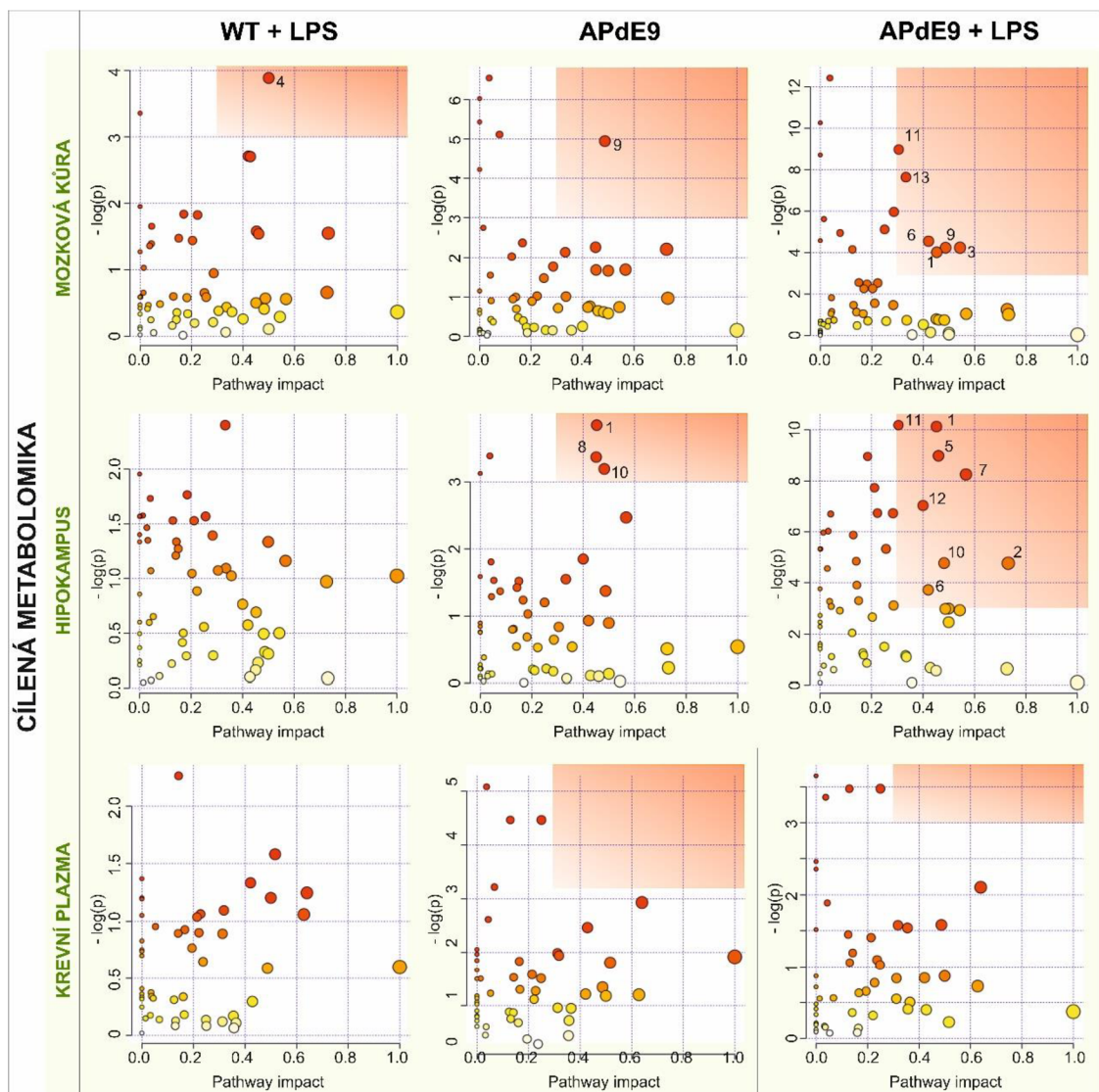
Celkové rozdíly a podobnosti v hipokampálních a kortikálních lipidech a metabolitech mezi všemi skupinami byly hodnoceny pomocí nesupervizované vícerozměrné statistické metody PCA (obr. 15). Byl pozorován překryv hipokampálního a kortikálního metabolomu myši WT+LPS s kontrolní skupinou WT, zatímco myši APdE9 a myši APdE9+LPS vykazovaly o něco lepší separaci od kontrolní skupiny WT v kortikálním a hipokampálním metabolomu (obr. 15 a,b) a lipidomu (obr. 15 d,e). Při srovnání plazmatických profilů kontrolní skupiny WT a ostatních skupin myši mělo podávání LPS a/nebo mutace APdE9 malý vliv na polární metabolity (obr. 15 c), ale významný vliv na komplexní lipidom (obr. 15 f).



Obrázek 15. Graf komponentního skóre analýzy hlavních komponent (PCA) pro každý model a analytický přístup zkoumaný za účelem porovnání obecných rozdílů v metabolickém (a-c) a lipidovém složení (d-f) hipokampu, kůry mozkové a krevní plazmy u všech studovaných skupin. Zobrazeny 75% konfidenční elipsy.

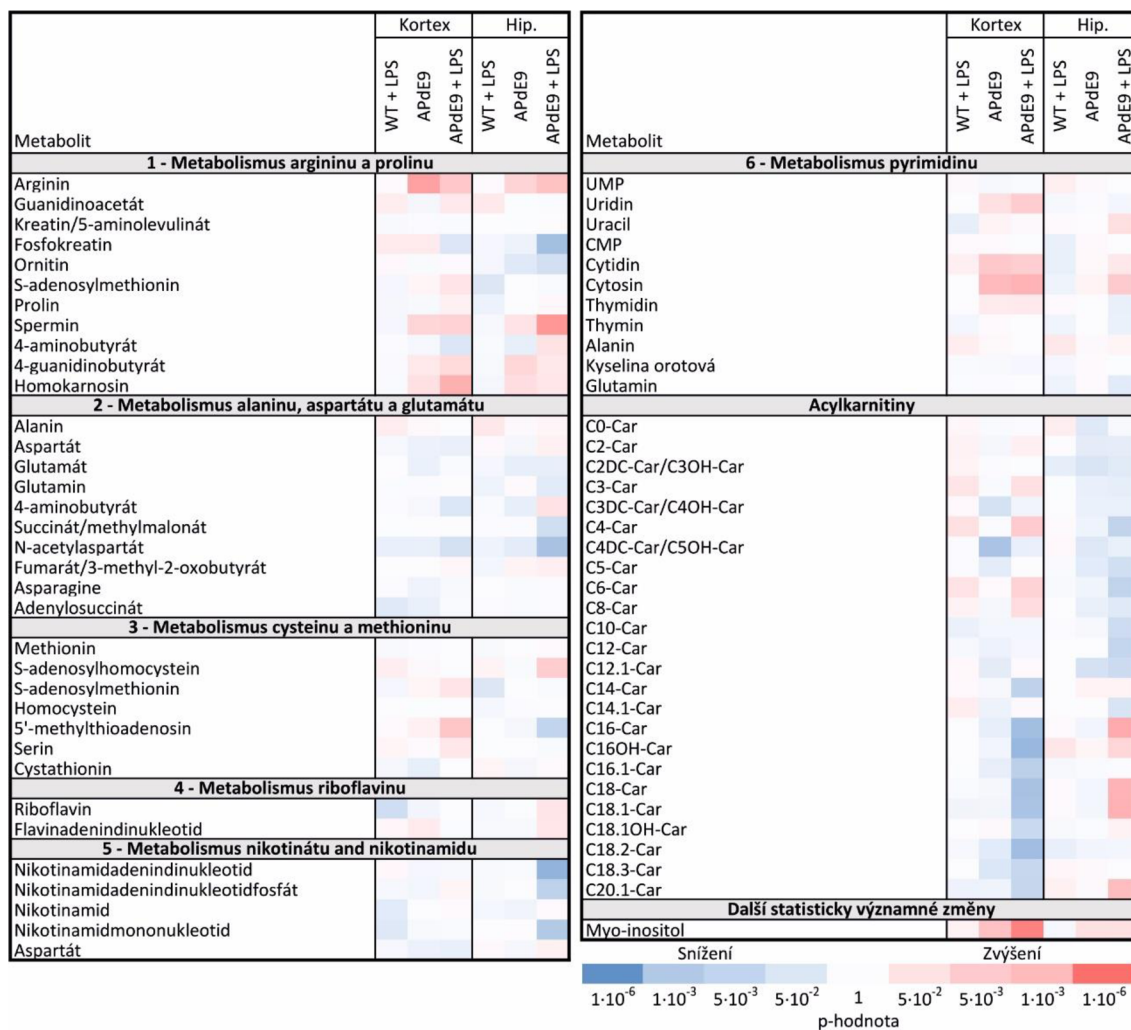
4.2.2.1 Cílená metabolomická analýza mozkové tkáně

Výsledky analýzy biochemických drah (obr. 16) byly v souladu se zjištěními z výše popsané nesupervizované PCA. Vlivem podání LPS nedošlo k téměř žádným změnám v metabolismu mozkové kůry a hipokampu myší WT, zatímco po podání LPS bylo pozorováno prohloubení změn u myší APdE9. U obou transgenních modelů, myší APdE9 a APdE9+LPS, byl ve srovnání s kontrolními zvířaty WT ovlivněn metabolismus argininu a prolinu a biosyntéza argininu v mozkové kůře, a dále metabolismus sacharidů v hipokampu. Podávání LPS u myší APdE9 způsobilo změny v následujících biochemických drahách: metabolismus cysteinu a methioninu, metabolismus sacharidů a metabolismus kyseliny arachidonové v mozkové kůře; metabolismus nikotínátu a nikotinamidu, metabolismus β -alaninu, metabolismus glutathionu a metabolismus alaninu, aspartátu a glutamátu v hipokampu; metabolismus argininu a prolinu a odbourávání mastných kyselin v mozkové kůře i hipokampu (obr. 16).



Obrázek 16. Analýza metabolických drah (MetaboAnalyst 4.0, <https://www.metaboanalyst.ca/>) provedená na cílených metabolických datech v hipokampu, mozkové kůře a krevní plazmě všech studovaných skupin oproti příslušným kontrolám. Červený obdélník zvýrazňuje nejvíce ovlivněné dráhy s $-\log(p)$ hodnotou větší než 3 a Pathway impact větším než 0,3. Jednotlivé dráhy jsou očíslovány následovně: 1- metabolismus argininu a prolinu, 2- metabolismus alaninu, aspartátu a glutamátu, 3- metabolismus cysteinu a methioninu, 4- metabolismus riboflavinu, 5- metabolismus nikotinátu a nikotinamidu, 6- metabolismus pyrimidinu, 7- metabolismus β -alaninu, 8- metabolismus histidinu, 9- metabolismus sacharidů, 10- biosyntéza argininu, 11- odbourávání mastných kyselin, 12- metabolismus glutathionu, 13- metabolismus kyseliny arachidonové.

Pro získání hlubšího přehledu o jednotlivých ovlivněných metabolitech, byla sestrojena teplotní mapa založená na p-hodnotě (obr. 17, doplňující informace publikace Puris a kol. [126]). Postupný nárůst statistické významnosti (pokles p-hodnoty) byl pozorován u řady metabolitů u myší APdE9 a APdE9+LPS, zatímco podávání LPS nezpůsobilo žádné významné změny hladin metabolitů v mozkové kůře ani hipokampu WT myší. V kůře myší APdE9 bylo pozorováno statisticky významné zvýšení argininu a N-formylglycinamid ribonukleotidu. Podávání LPS u myší APdE9 významně zvýšilo kortikální hladiny lysinu, myo-inositolu a hipokampální hladiny sperminu. U myší APdE9+LPS bylo navíc pozorováno snížení hipokampálních hladin fosfokreatinu a několika metabolitů zapojených do metabolismu nikotinamidu. Zajímavé je, že v hipokampu myší APdE9 a myší APdE9+LPS byl ve srovnání s kontrolními zvířaty WT pozorován klesající trend hladin různých acylkarnitinů s krátkým a středním řetězcem. Podobně i acylkarnitiny s dlouhým řetězcem vykazovaly v mozkové kůře těchto dvou modelů klesající trend ve srovnání s kontrolní skupinou WT. Statisticky významné změny byly pozorovány u acylkarnitinů (C16, C18:2, C16OH) u myší APdE9+LPS ve srovnání s kontrolní skupinou WT (obr. 17).



Obrázek 17. Teplotní mapa zobrazující změny v hladinách metabolitů v mozkové kůře a hipokampu u myši WT+LPS ($n = 11$), APdE9 ($n = 11$) a APdE9+LPS ($n = 9$) oproti kontrolní skupině WT ($n = 11$). Teplotní mapa p-hodnot bez korekce, v měřítku \log_{10} : červeně, zvýšení metabolitů (Fold Change > 0), modře - snížení metabolitů (Fold Change < 0). Statistická významnost na hladině 0,05 po Bonferroniho korekci byla vypočtena jako hodnota $p < 3,23 \times 10^{-4}$.

4.2.2.2 Necílená lipidomická analýza mozkové tkáně

Na základě p-hodnot byla sestavena teplotní mapa nejvíce postižených lipidů v mozkové tkáni (obr. 18). Pro zobrazení obecných změn u studovaných myších modelů ve srovnání s WT kontrolami byly vybrány následující třídy lipidů: fosfatidylcholinu (PC), fosfatidylethanolaminy (PE), lysofosfatidylcholinu (LPC), lysofosfatidylethanolaminy (LPE), diacylglyceroly (DG) a triacylglyceroly (TG).

Podávání LPS skupině WT+LPS nemělo významný vliv na kortikální a hipokampální hladiny lipidů. U myši APdE9+LPS byla významně zvýšena řada DG (DG36:1, DG36:3, DG38:3, DG40:5, DG38:1, DG40:1, DG40:4, DG40:2, DG42:2, DG42:4, DG42:1), některé z nich byly významně zvýšeny také u myši APdE9 (DG40:1, DG42:1). Naproti tomu TG mozkové tkáně nebyly žádného z modelů statisticky významně změněny. Ovšem hipokampální TG vykazovaly klesající trend ve skupinách APdE9 a APdE9+LPS ve srovnání s WT kontrolami. LPC/LPE vykazovaly rostoucí trendy u myši APdE9 a APdE9+LPS, přičemž došlo k významnému zvýšení hladiny některých z nich v mozkové kůře obou modelů (LPC e C15:1/LPE e C18:1, LPC a C15:0/LPE a C18:0, LPC a C15:0/LPE a C18:0, LPC a C16:0/LPE a C19:0, LPC a C18:1, LPC a C18:0/LPE a C21:0, LPC a C20:0, LPC a C20:1, LPC a C20:3, LPE a C20:0, LPE e C16:1, LPE a C16:0). V mozkové kůře a hipokampu myši APdE9 a APdE9+LPS byly zjištěny různé významné změny PC/PE ve srovnání s kontrolami WT: snížení kortikálních PC aa C33:3/PE aa C36:3 (obě skupiny), zvýšení hipokampálních PE ae C38:6 a PC aa C40:1 (APdE9+LPS), snížený PE ae C40:7 (mozková kůra APdE9+LPS i hipokampus), snížený PC aa C35:3/PE aa C38:3 a PE ae C42:7 (mozková kůra APdE9+LPS), zvýšený kortikální PC ae C36:6 a PC ae C36:5 (obě skupiny), zvýšený kortikální PC ae C38:5 (myši APdE9) (obr. 18, doplňující informace publikace Puris a kol. [126]).

4.2.2.3 Cílená metabolomická a necílená lipidomická analýza krevní plazmy

Cílený metabolomický přístup s využitím nesupervizované PCA (obr. 15c) a analýzy metabolických drah (obr. 16) neodhalil žádné statisticky významné změny v krevní plazmě zkoumaných myší. Změny v metabolismu pozorované v mozkové tkáni se tedy plně neodrazilily v hladinách metabolitů v krevní plazmě, což naznačuje rozdílnou regulaci hladin metabolitů v plazmě a mozkové tkáni. Necílená lipidomická analýza odhalila systematické statisticky významně snížení hladin monoacylglycerolů (MG16:0, MG18:0), DG (DG34:0, DG36:0, DG38:0, DG38:1) a ceramidů (Cer d18:0/13:0, Cer d18:0/15:0, Cer d18:0/17:0) u všech pozorovaných skupin.

4.2.3 Diskuse

Systémový neurozánět je spojován zvýšeným rizikem AD a progresí tohoto onemocnění. Změny v metabolických a lipidových profilech v důsledku systémového zánětu vyvolaného infekcí u AD však dosud nebyly hlouběji studovány. Pro studium vlivu neurozánětu byl v této studii využit transgenní model myši s AD (myši APdE9), kterým byl chronicky podáván LPS. Analýza krevní plazmy, mozkové kůry a hippocamu odhalila výraznější změny kortikálního a hipokampálního metabolomu a lipidomu u APdE9+LPS myši, zatímco vliv LPS na metabolom a lipidom WT myši byl zanedbatelný. Výsledky potvrzují teorii, že neurozánět vyvolaný infekcí urychluje biochemické změny pouze u myši s AD, nikoliv u zdravých WT zvířat.

4.2.3.1 Změny v metabolických drahách

Systémové podávání LPS zvýšilo počet významně ovlivněných metabolických drah v mozkové tkáni myši APdE9. Biochemické dráhy ovlivněné podáváním LPS u myši APdE9 byly shodně dříve zaznamenány také v mozku pacientů s AD. Konkrétně se jedná o metabolismus cysteinu a methioninu [139], argininu a prolinu [139], metabolismus nikotinátu a nikotinamidu [140], metabolismus alaninu, aspartátu a glutamátu [141], metabolismus glutathionu [142] a metabolismus sacharidů [143], metabolismus kyseliny arachidonové [144],

odbourávání mastných kyselin [145] a metabolismus β -alaninu [111]. Uvedené dráhy nebyly v mozkové tkáni myši APdE9 bez podání LPS změněny. Tato zjištění ukazují, že změny ve zmíněných metabolických drahách pozorované u pacientů s AD mohou být vyvolány systémovým zánětem.

Podrobnější pohled na metabolický a lipidový profil mozkové tkáně myši APdE9 po podání LPS navíc odhalil významné změny v hladinách několika metabolitů a lipidů. U myši APdE9, kterým byl podáván fyziologický roztok, nebyly tyto změny významné, ale vykazovaly podobný trend, což poskytuje důkaz o urychlujícím účinku systémového zánětlivého inzultu na metabolom a lipidom mozku. Například podobně jako u pacientů s AD byly u myši APdE9 po podání LPS ve srovnání s kontrolami WT pozorovány významně zvýšené hladiny polyaminu sperminu v hipokampu [116] a kortikálního myo-inositolu, klíčové molekuly v přenosu buněčných signálů a osmoregulaci [146], nikoliv však u myši APdE9, kterým byl podáván pouze fyziologický roztok. Kromě toho byly významně sníženy hladiny hipokampálního NAD⁺ u myši APdE9+LPS ve srovnání s WT kontrolami. NAD⁺ je nezbytný metabolit pro mitochondriální biogenezi a odolnost neuronů vůči stresu, kde působí jako kofaktor DNA reparačního proteinu PARP1, sirtuinů (SIRT1 až SIRT7) a cyklických ADP ribózových hydroláz CD38 a CD157. Hou et al. [147] prokázali, že u myšního modelu AD se zavedeným deficitem DNA reparace (3xTgAD/Pol β + / -) byly sníženy kortikální hladiny NAD⁺ a suplementace nikotinamidribosidem významně normalizovala neurozáněť, synaptický přenos, poškození DNA, fosforylovaný tau, zlepšila učení a paměťové funkce. Naše výsledky podporují zásadní roli NAD⁺ v patogenezi AD a poskytují další informace o možné roli systémového zánětu v poruchách spojených s NAD⁺.

Hladiny fosfokreatinu, metabolitu zapojeného do argininového cyklu, v hipokampu byly po podání LPS u myši APdE9 významně sníženy, přičemž se uvádí, že u pacientů s AD jsou zvýšené ve srovnání s nedementními jedinci [148]. Zajímavé je, že podávání LPS významně zvýšilo kortikální hladiny lysinu u myši APdE9, zatímco v mozku pacientů s AD byly zjištěny snížené hladiny této aminokyseliny [113]. Pro objasnění tohoto jevu bude nutné provést další studie.

Podávání LPS u myši APdE9 mělo statisticky významný vliv na hladiny několika acylkarnitinů (C16, C18:2, C16OH), zatímco v mozkové tkáni myši APdE9 byly ve srovnání s WT kontrolami pozorovány pouze statisticky nevýznamné trendy. Přestože informace o změnách hladin acylkarnitinů v mozkové tkáni u AD jsou omezené, tyto údaje naznačují význam dalšího zkoumání změn acylkarnitinů u AD. Žádné z výše uvedených metabolických změn v mozkové tkáni nebyly zjištěny v plazmě myši APdE9+LPS.

4.2.3.2 Změny v lipidomu

Podávání LPS u myši APdE9 vedlo ke zvýšení počtu diskriminujících lipidů ve srovnání se změnami pozorovanými u myši APdE9, kterým byl podáván fyziologický roztok. V mozku hrají lipidy zásadní roli ve strukturální integritě neuronálních membrán a regulaci neuronální aktivity a slouží jako prekurzory bioaktivních lipidových mediátorů [149]. Abnormální metabolismus lipidů u pacientů s AD byl již dříve popsán [150]. V této studii podávání LPS významně zvýšilo hladiny DG mozkové kůry u myši APdE9 (DG 36:1, DG36:3, DG38:3, DG40:5, DG38:1, DG40:1, DG40:4, DG40:2, DG42:2, DG42:4, DG42:1), zatímco v mozkové kůře myši APdE9 bez podání LPS byly ve srovnání s kontrolními zvířaty WT významně zvýšeny pouze DG 40:1 a DG42:1. Podobně byly zaznamenány zvýšené hladiny DG ve frontální kůře pacientů s AD [151–153]. DG obecně působí jako strukturní lipidy, mediátory přenosu signálu a prekurzory glycerofosfolipidů. Obsah DG ve tkáních je přísně regulován, aby se zachovaly jejich rozmanité funkce [154]. Wood a kol. navrhli, že zvýšený obsah DG u AD může být způsoben degradací glycerofosfolipidů, která zahrnuje přímou degradaci PE na DG řízenou fosfolipázou C (PLC) a deacylací PE na LPE zprostředkovanou fosfolipázou A2 (PLA2) s následným metabolismem LPE na DG [152]. Zapojení těchto metabolických drah bylo podpořeno snížením hladin PE pozorovaným v mozku [151,153] a v plazmě [155]. V této studii byly u myši APdE9+LPS zjištěny změny v hladinách PE v mozku. Kortikální LPE (LPE a C20:0, LPE e C16:1, LPE a C16:0) byly významně zvýšeny jak u myši APdE9+LPS, tak u myši APdE9 bez podání LPS ve srovnání s WT kontrolami,

což naznačuje, že systémový zánět vyvolaný podáváním LPS nemá u myši APdE9 vliv na LPE v mozku. Další informace o změnách hladin LPE v mozku pacientů s AD nicméně chybí. Na základě výsledků této studie nelze poskytnout přesvědčivý důkaz, že zvýšení DG pozorované po podání LPS u myši APdE9 bylo způsobeno degradací PE. Zajímavé je, že v plazmě myši APdE9+LPS a fyziologickým roztokem byly pozorovány zvýšené hladiny LPE, což je v souladu s dříve popsáním zvýšeným plazmatickým LPE 16:0 a 18:1 u pacientů s AD [156]. Pokud se tedy potvrdí změna hladin LPE v mozku pacientů s AD, mohou tato zjištění otevřít nové možnosti ověření zvýšených hladin LPE v plazmě jako biomarkeru AD.

LPE vznikají z PC pomocí enzymu PLA2 a rychle se acylují acetyl-CoA, aby se udrželo normální složení nervové membrány. V této studii byly kortikální hladiny LPC a PC významně změněny jak u myši APdE9+LPS, tak u myši APdE9 bez LPS. Z těchto výsledků lze vyvodit předběžný závěr, že LPS neovlivňuje tvorbu LPC z PC. Zajímavé je, že kortikální hladiny LPC u myši APdE9 byly ve srovnání s kontrolami WT významně zvýšené, což podporuje dříve navrhovanou souvislost LPC s AD [157]. Podobně jako v této studii byly reportovány zvýšené hladiny LPC (LPC a C18:1 a LPC a C18:2) ve frontální kůře postmortálních mozků s AD [158].

4.2.3.3 Regionálně specifické změny metabolomu a lipidomu mozku.

Z globálního hlediska odhalila tato studie určité rozdíly ve změnách metabolitů a lipidů mezi hipokampem a kůrou jak u myši APdE9+LPS, tak u myši APdE9 bez podání LPS ve srovnání s kontrolními WT myšmi. Cílená metabolická analýza odhalila, že hipokampus byl ovlivněn nepatrně více než mozková kůra myši APdE9 ve srovnání s kontrolními WT zvířaty. Podobně podávání LPS u myši APdE9 vedlo k mírně většímu ovlivnění metabolických drah v hipokampu než v mozkové kůře. Podáváním LPS byl ovlivněn například metabolismus cysteinu a methioninu pouze v mozkové kůře myši APdE9, zatímco biosyntéza argininu, syntéza glutathionu a metabolismus alaninu, aspartátu a glutamátu byly ovlivněny pouze v hipokampu. Tato zjištění jsou v souladu

s nedávnými studii regionálně specifických proteomických a metabolických poruch v lidském mozku s AD, které ukázaly, že hipokampus byl postižen více než motorická a senzorická kůra [113,159].

Naproti tomu v této studii byla mozková kůra náchylnější ke změnám lipidového metabolismu než hipokampus, a to jak u myši APdE9+LPS, tak u myši APdE9 bez podání LPS. Lipidy, jejichž obsah v mozku je velmi hojný a vyznačuje se specifickým složením v různých oblastech mozku, se podílejí na patogenezi AD prostřednictvím regulace transportu a proteolytické aktivity několika proteinů vázaných na plazmatickou membránu, tj. APP, β -sekretázy 1 a presenilinů [149,160,161]. Tato zjištění zdůrazňují význam zkoumání biochemických poruch specifických pro jednotlivé oblasti mozku u AD, o nichž v současné době chybí systémové znalosti.

5 ZÁVĚR

Předložená disertační práce se zabývá procesováním metabolomických dat s využitím nového nástroje CROP pro odstraňování redundantních features přítomných v naměřených datech. Celý postup metabolomické analýzy byl aplikován také ve studii zabývající se Alzheimerovou chorobou. Na základě výše uvedených informací byly formulovány následující dílčí závěry:

5.1 Redukce multiplicit v metabolomických datech na základě korelačních vztahů

Cílem této práce bylo poukázat na problém zastoupení multiplicit v metabolomických datech a nutnost jejich redukce. Tento jev se v datech vyskytuje i přes to, že jsou data zpracována pomocí běžného preprocesovacího softwaru. Pomocí R-skriptu CROP byly redundantní features účinně odstraněny.

5.2 Metabolomická a lipidomická analýza změn způsobených zánětem vyvolaným pomocí LPS u transgenních APdE9 myší

Tato studie je prvním rozsáhlým výzkumem, který charakterizuje změny v plazmatickém a mozkovém metabolomu a lipidomu vyvolané systémovým zánětem vyvolaným LPS u transgenních myší APdE9. Výsledky ukázaly, že podávání LPS mělo vliv na metabolismus u transgenních myší AD, nikoli však u kontrolní skupiny zvířat. Podobné změny byly již dříve zaznamenány u pacientů s AD. Tyto výsledky naznačují, že infekcí vyvolaný systémový zánět může urychlovat změny biochemických drah u pacientů s AD, nikoli však u zdravých jedinců. Tyto informace jsou přínosem pro pochopení vlivu infekcí vyvolaného systémového zánětu na progresi AD.

6 VÝHLEDY

6.1 Redukce multiplicit v metabolomických datech na základě korelačních vztahů

Za účelem zlepšení preprocesovacího postupu v metabolomické analýze byl vyvinut R-skript CROP. Cílem tohoto skriptu a vzniklé odborné publikace není pouze návrh řešení odstranění nadbytečných features, ale také upozornění na tento jev, který je přítomen při rutinním zpracování metabolických dat, a může tak negativně ovlivňovat výstupy metabolomických studií. Předpokládá se, že tato otázka bude v budoucnu řešena také pomocí rutinních preprocesovacích nástrojů. V takovém případě může CROP sloužit minimálně jako účinný nástroj pro jednoduché odhalení kvality odstranění redundantních features.

Celý proces zpracování metabolomických dat je nadále využíván v řadě studií aktuálně řešených v Laboratoři metabolomiky, UMTM, LF UP. Jedná se např. o projekty týkající se purinové de novo biosyntézy, případně dalších studií zaměřených na AD či dědičné metabolické poruchy.

Pro zvýšení komplexnosti měřených dat a zpřehlednění výstupů bude při analýze také využíván přístup cílené lipidomické analýzy pomocí LC-MS/MS [162], nebo např. software Cytoscape, který dokáže jednoduše zobrazit vztahy mezi jednotlivými metabolity a současně je propojit s metadaty pomocí metabolických sítí [163].

6.2 Metabolomická a lipidomická analýza změn způsobených zánětem vyvolaným pomocí LPS u transgenních APdE9 myší

Cílem této studie bylo sledovat obecné změny metabolomu a lipidomu u myších modelů po podání LPS. Byly zaznamenány statisticky významné rozdíly v hladinách určitých metabolitů a tříd lipidů ve tkáni mozkové kůry a hipokampu, které byly dále porovnány se změnami pozorovanými u pacientů s AD. Budoucí studie by měly objasnit buněčně specifické změny pro důkladnější prozkoumání molekulárních mechanismů, které jsou základem změn v metabolomu a lipidomu

pozorovaných v této studii. Aktuálně se připravuje publikace popisující vliv krátkodobého podávání LPS na kontrolní WT myši a transgenní myši APdE9, která by měla objasnit vhodnost použití těchto myších modelů ve studiu AD.

7 SEZNAM ZKRATEK

AD	Alzheimerova choroba
AIF	fragmentace všech dostupných iontů
<i>APOE</i>	gen pro apolipoprotein E
APP	amyloidový prekurzorový protein
A β	amyloidu β
Cer	ceramid
CSF	mozkomíšní mok
CV	variační koeficient
DDA	akvizice závislá na datech
DG	diacylglycerol
DIA	akvizice nezávislá na datech
ESI	ionizace elektrosprejem
FAD	familiární Alzheimerova choroba
FT	Fourierova transformace
FT-ICR	iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací
FWHM	šířka píku v polovině jeho výšky
HILIC	hydrofilní interakční chromatografie
HMDB	the Human Metabolome Database
HMGA	3-hydroxy-3-methyl-glutarová acidurie
HR	inosin
HX	hypoxantin
HRMS	hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením
LC-MS	kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí
LPC	lysofosfatidylcholin
LPE	lysofosfatidylethanolamin
LPS	lipopolysacharid
MCI	mírná kognitivní porucha
MG	monoacylglycerol
MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie

<i>m/z</i>	poměr hmotnosti ku náboji
NMR	nukleární magnetická rezonance
OPLS-DA	ortogonální diskriminační analýza metodou dílčích nejmenších čtverců
PC	fosfatidylcholin
PCA	analýza hlavních komponent
PE	fosfatidylethanolamin
PLA2	fosfolipáza A2
PLC	fosfolipáza C
PS	presenilin
RPLC	kapalinová chromatografie s použitím reverzní fáze
RT	retenční čas
QC	vzorek kontroly kvality
Q-TOF	kvadrupólový analyzátor ve spojení s analyzátozem doby letu
SRM	standardní referenční materiál
SWATH-MS	sekvenční akvizice všech teoretických fragmentačních spekter
TG	triacylglycerol
TOF	průletový hmotnostní analyzátor
TRP	tryptofan
UHPLC	ultraúčinná kapalinová chromatografie
WT	kontrolní skupina myši
3-HIV-C	3-hydroxyisovalerylkarnitin
3-MGCA	3-methylglutakonát
3-MG-C	3-methylglutarylkarnitin

8 LITERATURA

1. Goodacre R, Vaidyanathan S, Dunn WB, Harrigan GG, Kell DB. Metabolomics by numbers: acquiring and understanding global metabolite data. *Trends Biotechnol.* 2004;22: 245–252.
2. Yan J, Risacher SL, Shen L, Saykin AJ. Network approaches to systems biology analysis of complex disease: integrative methods for multi-omics data. *Brief Bioinform.* 2018;19: 1370–1381.
3. Steuer AE, Brockbals L, Kraemer T. Metabolomic Strategies in Biomarker Research—New Approach for Indirect Identification of Drug Consumption and Sample Manipulation in Clinical and Forensic Toxicology? *Frontiers in Chemistry.* 2019. doi:10.3389/fchem.2019.00319
4. Dinis-Oliveira RJ. Metabolomics of drugs of abuse: a more realistic view of the toxicological complexity. *Bioanalysis.* 2014;6: 3155–3159.
5. Pan Z, Raftery D. Comparing and combining NMR spectroscopy and mass spectrometry in metabolomics. *Anal Bioanal Chem.* 2007;387: 525–527.
6. Guijas C, Rafael Montenegro-Burke J, Domingo-Almenara X, Palermo A, Warth B, Hermann G, et al. METLIN: A Technology Platform for Identifying Knowns and Unknowns. *Analytical Chemistry.* 2018. pp. 3156–3164. doi:10.1021/acs.analchem.7b04424
7. Wishart DS, Tzur D, Knox C, Eisner R, Guo AC, Young N, et al. HMDB: the Human Metabolome Database. *Nucleic Acids Research.* 2007. pp. D521–D526. doi:10.1093/nar/gkl923
8. Sud M, Fahy E, Cotter D, Brown A, Dennis EA, Glass CK, et al. LMSD: LIPID MAPS structure database. *Nucleic Acids Res.* 2007;35: D527–32.
9. Yetukuri L, Ekroos K, Vidal-Puig A, Orešič M. Informatics and computational strategies for the study of lipids. *Mol. Biosyst.* 2008. pp. 121–127. doi:10.1039/b715468b
10. Pezzatti J, Boccard J, Codesido S, Gagnebin Y, Joshi A, Picard D, et al. Implementation of liquid chromatography-high resolution mass spectrometry methods for untargeted metabolomic analyses of biological samples: A tutorial. *Anal Chim Acta.* 2020;1105: 28–44.
11. Gagnebin Y, Julien B, Belén P, Serge R. Metabolomics in chronic kidney disease: Strategies for extended metabolome coverage. *J Pharm Biomed Anal.* 2018;161: 313–325.
12. Dunn WB, Wilson ID, Nicholls AW, Broadhurst D. The importance of experimental design and QC samples in large-scale and MS-driven untargeted metabolomic studies of humans. *Bioanalysis.* 2012;4: 2249–2264.
13. Kirwan JA, Brennan L, Broadhurst D, Fiehn O, Cascante M, Dunn WB, et al. Preanalytical Processing and Biobanking Procedures of Biological Samples for Metabolomics Research: A White Paper, Community Perspective (for “Precision Medicine and Pharmacometabolomics Task Group”-The Metabolomics Society Initiative). *Clin Chem.* 2018;64: 1158–1182.
14. Tang J. Microbial metabolomics. *Curr Genomics.* 2011;12: 391–403.
15. Kohler I, Hankemeier T, van der Graaf PH, Knibbe CAJ, van Hasselt JGC. Integrating clinical metabolomics-based biomarker discovery and clinical pharmacology to enable precision medicine. *Eur J Pharm Sci.* 2017;109S: S15–S21.
16. Thévenot EA, Roux A, Xu Y, Ezan E, Junot C. Analysis of the Human Adult Urinary Metabolome Variations with Age, Body Mass Index, and Gender by Implementing

- a Comprehensive Workflow for Univariate and OPLS Statistical Analyses. *J Proteome Res.* 2015;14: 3322–3335.
17. Blaise BJ, Correia G, Tin A, Young JH, Vergnaud A-C, Lewis M, et al. Power Analysis and Sample Size Determination in Metabolic Phenotyping. *Anal Chem.* 2016;88: 5179–5188.
 18. Sussulini A. *Metabolomics: From Fundamentals to Clinical Applications.* Springer; 2017.
 19. León Z, García-Cañaveras JC, Donato MT, Lahoz A. Mammalian cell metabolomics: experimental design and sample preparation. *Electrophoresis.* 2013;34: 2762–2775.
 20. Broadhurst D, Goodacre R, Reinke SN, Kuligowski J, Wilson ID, Lewis MR, et al. Guidelines and considerations for the use of system suitability and quality control samples in mass spectrometry assays applied in untargeted clinical metabolomic studies. *Metabolomics.* 2018;14: 72.
 21. Zelena E, Dunn WB, Broadhurst D, Francis-McIntyre S, Carroll KM, Begley P, et al. Development of a robust and repeatable UPLC-MS method for the long-term metabolomic study of human serum. *Anal Chem.* 2009;81: 1357–1364.
 22. van der Kloet FM, Bobeldijk I, Verheij ER, Jellema RH. Analytical error reduction using single point calibration for accurate and precise metabolomic phenotyping. *J Proteome Res.* 2009;8: 5132–5141.
 23. Dunn WB, Broadhurst D, Begley P, Zelena E, Francis-McIntyre S, Anderson N, et al. Procedures for large-scale metabolic profiling of serum and plasma using gas chromatography and liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Nat Protoc.* 2011;6: 1060–1083.
 24. Kirwan JA, Broadhurst DI, Davidson RL, Viant MR. Erratum to: Characterising and correcting batch variation in an automated direct infusion mass spectrometry (DIMS) metabolomics workflow. *Analytical and Bioanalytical Chemistry.* 2014. pp. 6075–6076. doi:10.1007/s00216-014-8047-6
 25. Lewis MR, Pearce JTM, Spagou K, Green M, Dona AC, Yuen AHY, et al. Development and Application of Ultra-Performance Liquid Chromatography-TOF MS for Precision Large Scale Urinary Metabolic Phenotyping. *Anal Chem.* 2016;88: 9004–9013.
 26. Simón-Manso Y, Lowenthal MS, Kilpatrick LE, Sampson ML, Telu KH, Rudnick PA, et al. Metabolite Profiling of a NIST Standard Reference Material for Human Plasma (SRM 1950): GC-MS, LC-MS, NMR, and Clinical Laboratory Analyses, Libraries, and Web-Based Resources. *Analytical Chemistry.* 2013. pp. 11725–11731. doi:10.1021/ac402503m
 27. Dunn WB, Broadhurst DI, Atherton HJ, Goodacre R, Griffin JL. Systems level studies of mammalian metabolomes: the roles of mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Chem Soc Rev.* 2011;40: 387–426.
 28. Begley P, Francis-McIntyre S, Dunn WB, Broadhurst DI, Halsall A, Tseng A, et al. Development and performance of a gas chromatography-time-of-flight mass spectrometry analysis for large-scale nontargeted metabolomic studies of human serum. *Anal Chem.* 2009;81: 7038–7046.
 29. Wilson ID, Nicholson JK, Castro-Perez J, Granger JH, Johnson KA, Smith BW, et al. High resolution “ultra performance” liquid chromatography coupled to oa-TOF mass spectrometry as a tool for differential metabolic pathway profiling in functional genomic studies. *J Proteome Res.* 2005;4: 591–598.
 30. Pezzatti J, González-Ruiz V, Codesido S, Gagnebin Y, Joshi A, Guillarme D, et al. A scoring approach for multi-platform acquisition in metabolomics. *J Chromatogr A.* 2019;1592: 47–54.

31. Periat A, Krull IS, Guillaume D. Applications of hydrophilic interaction chromatography to amino acids, peptides, and proteins. *J Sep Sci.* 2015;38: 357–367.
32. Periat A, Boccard J, Veuthey J-L, Rudaz S, Guillaume D. Systematic comparison of sensitivity between hydrophilic interaction liquid chromatography and reversed phase liquid chromatography coupled with mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 2013;1312: 49–57.
33. Fenaille F, Barbier Saint-Hilaire P, Rousseau K, Junot C. Data acquisition workflows in liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry-based metabolomics: Where do we stand? *J Chromatogr A.* 2017;1526: 1–12.
34. Nash WJ, Dunn WB. From mass to metabolite in human untargeted metabolomics: Recent advances in annotation of metabolites applying liquid chromatography-mass spectrometry data. *TrAC Trends in Analytical Chemistry.* 2019. p. 115324. doi:10.1016/j.trac.2018.11.022
35. Gillet LC, Navarro P, Tate S, Röst H, Selevsek N, Reiter L, et al. Targeted data extraction of the MS/MS spectra generated by data-independent acquisition: a new concept for consistent and accurate proteome analysis. *Mol Cell Proteomics.* 2012;11: O111.016717.
36. Ludwig C, Gillet L, Rosenberger G, Amon S, Collins BC, Aebersold R. Data-independent acquisition-based SWATH-MS for quantitative proteomics: a tutorial. *Mol Syst Biol.* 2018;14: e8126.
37. Naz S, Gallart-Ayala H, Reinke SN, Mathon C, Blankley R, Chaleckis R, et al. Development of a Liquid Chromatography-High Resolution Mass Spectrometry Metabolomics Method with High Specificity for Metabolite Identification Using All Ion Fragmentation Acquisition. *Anal Chem.* 2017;89: 7933–7942.
38. Blaženović I, Kind T, Sa MR, Ji J, Vaniya A, Wancewicz B, et al. Structure Annotation of All Mass Spectra in Untargeted Metabolomics. *Anal Chem.* 2019;91: 2155–2162.
39. Xu Y-F, Lu W, Rabinowitz JD. Avoiding misannotation of in-source fragmentation products as cellular metabolites in liquid chromatography-mass spectrometry-based metabolomics. *Anal Chem.* 2015;87: 2273–2281.
40. Domingo-Almenara X, Montenegro-Burke JR, Benton HP, Siuzdak G. Annotation: A Computational Solution for Streamlining Metabolomics Analysis. *Anal Chem.* 2018;90: 480–489.
41. Smith CA, Want EJ, O’Maille G, Abagyan R, Siuzdak G. XCMS: processing mass spectrometry data for metabolite profiling using nonlinear peak alignment, matching, and identification. *Anal Chem.* 2006;78: 779–787.
42. Pluskal T, Castillo S, Villar-Briones A, Orešič M. MZmine 2: Modular framework for processing, visualizing, and analyzing mass spectrometry-based molecular profile data. *BMC Bioinformatics.* 2010. doi:10.1186/1471-2105-11-395
43. Hrydziuszko O, Viant MR. Missing values in mass spectrometry based metabolomics: an undervalued step in the data processing pipeline. *Metabolomics.* 2012;8: 161–174.
44. Mahieu NG, Patti GJ. Systems-Level Annotation of a Metabolomics Data Set Reduces 25 000 Features to Fewer than 1000 Unique Metabolites. *Analytical Chemistry.* 2017. pp. 10397–10406. doi:10.1021/acs.analchem.7b02380
45. Kuhl C, Tautenhahn R, Böttcher C, Larson TR, Neumann S. CAMERA: an integrated strategy for compound spectra extraction and annotation of liquid chromatography/mass spectrometry data sets. *Anal Chem.* 2012;84: 283–289.
46. Senan O, Aguilar-Mogas A, Navarro M, Capellades J, Noon L, Burks D, et al. CliqueMS: a computational tool for annotating in-source metabolite ions from LC-

- MS untargeted metabolomics data based on a coelution similarity network. *Bioinformatics*. 2019;35: 4089–4097.
47. Broeckling CD, Afsar FA, Neumann S, Ben-Hur A, Prenni JE. RAMClust: a novel feature clustering method enables spectral-matching-based annotation for metabolomics data. *Anal Chem*. 2014;86: 6812–6817.
 48. Kouřil Š, de Sousa J, Václavík J, Friedecký D, Adam T. CROP: correlation-based reduction of feature multiplicities in untargeted metabolomic data. *Bioinformatics*. 2020;36: 2941–2942.
 49. Chadha V, Garg U, Alon US. Measurement of urinary concentration: a critical appraisal of methodologies. *Pediatr Nephrol*. 2001;16: 374–382.
 50. Warrack BM, Hnatyshyn S, Ott K-H, Reily MD, Sanders M, Zhang H, et al. Normalization strategies for metabolomic analysis of urine samples. *Journal of Chromatography B*. 2009. pp. 547–552. doi:10.1016/j.jchromb.2009.01.007
 51. Dieterle F, Ross A, Schlotterbeck G, Senn H. Probabilistic quotient normalization as robust method to account for dilution of complex biological mixtures. Application in ¹H NMR metabolomics. *Anal Chem*. 2006;78: 4281–4290.
 52. Cook T, Ma Y, Gamagedara S. Evaluation of statistical techniques to normalize mass spectrometry-based urinary metabolomics data. *J Pharm Biomed Anal*. 2020;177: 112854.
 53. Pawlowsky-Glahn V, Buccianti A. *Compositional Data Analysis: Theory and Applications*. John Wiley & Sons; 2011.
 54. Gardlo A, Smilde AK, Hron K, Hrdá M, Karlíková R, Friedecký D, et al. Normalization techniques for PARAFAC modeling of urine metabolomic data. *Metabolomics*. 2016. doi:10.1007/s11306-016-1059-9
 55. van den Berg RA, Hoefsloot HCJ, Westerhuis JA, Smilde AK, van der Werf MJ. Centering, scaling, and transformations: improving the biological information content of metabolomics data. *BMC Genomics*. 2006;7: 142.
 56. Schiffman C, Petrick L, Perttula K, Yano Y, Carlsson H, Whitehead T, et al. Filtering procedures for untargeted LC-MS metabolomics data. *BMC Bioinformatics*. 2019;20: 334.
 57. Huan T, Palermo A, Ivanisevic J, Rinehart D, Edler D, Phommavongsay T, et al. Autonomous Multimodal Metabolomics Data Integration for Comprehensive Pathway Analysis and Systems Biology. *Anal Chem*. 2018;90: 8396–8403.
 58. Smith CA, O'Maille G, Want EJ, Qin C, Trauger SA, Brandon TR, et al. METLIN: a metabolite mass spectral database. *Ther Drug Monit*. 2005;27: 747–751.
 59. Linstrom PJ, Mallard WG. The NIST Chemistry WebBook: A Chemical Data Resource on the Internet†. *Journal of Chemical & Engineering Data*. 2001. pp. 1059–1063. doi:10.1021/je000236i
 60. Vaniya A, Fiehn O. Using fragmentation trees and mass spectral trees for identifying unknown compounds in metabolomics. *Trends Analyt Chem*. 2015;69: 52–61.
 61. Kanehisa M, Goto S. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res*. 2000;28: 27–30.
 62. Caspi R, Billington R, Keseler IM, Kothari A, Krummenacker M, Midford PE, et al. The MetaCyc database of metabolic pathways and enzymes - a 2019 update. *Nucleic Acids Res*. 2020;48: D445–D453.
 63. Saccenti E, Hoefsloot HCJ, Smilde AK, Westerhuis JA, Hendriks MMW. Reflections on univariate and multivariate analysis of metabolomics data. *Metabolomics*. 2014. pp. 361–374. doi:10.1007/s11306-013-0598-6
 64. Vinaixa M, Samino S, Saez I, Duran J, Guinovart JJ, Yanes O. A Guideline to Univariate Statistical Analysis for LC/MS-Based Untargeted Metabolomics-Derived

- Data. *Metabolites*. 2012;2: 775–795.
65. Broadhurst DI, Kell DB. Statistical strategies for avoiding false discoveries in metabolomics and related experiments. *Metabolomics*. 2007. pp. 171–196. doi:10.1007/s11306-006-0037-z
 66. Ren S, Hinzman AA, Kang EL, Szczesniak RD, Lu LJ. Computational and statistical analysis of metabolomics data. *Metabolomics*. 2015. pp. 1492–1513. doi:10.1007/s11306-015-0823-6
 67. Reitz C, Brayne C, Mayeux R. Epidemiology of Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol*. 2011;7: 137–152.
 68. Petersen RC. Mild cognitive impairment as a diagnostic entity. *J Intern Med*. 2004;256: 183–194.
 69. Blennow K, de Leon MJ, Zetterberg H. Alzheimer's disease. *The Lancet*. 2006. pp. 387–403. doi:10.1016/s0140-6736(06)69113-7
 70. Smith MA, Rottkamp CA, Nunomura A, Raina AK, Perry G. Oxidative stress in Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. 2000. pp. 139–144. doi:10.1016/s0925-4439(00)00040-5
 71. Tuppo EE, Arias HR. The role of inflammation in Alzheimer's disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2005. pp. 289–305. doi:10.1016/j.biocel.2004.07.009
 72. González-Domínguez R, García-Barrera T, Gómez-Ariza JL. Characterization of metal profiles in serum during the progression of Alzheimer's disease. *Metallomics*. 2014. pp. 292–300. doi:10.1039/c3mt00301a
 73. Selkoe DJ. Alzheimer's Disease: Genes, Proteins, and Therapy. *Physiological Reviews*. 2001. pp. 741–766. doi:10.1152/physrev.2001.81.2.741
 74. Kosik KS, Joachim CL, Selkoe DJ. Microtubule-associated protein tau (tau) is a major antigenic component of paired helical filaments in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986;83: 4044–4048.
 75. Goedert M, Wischik CM, Crowther RA, Walker JE, Klug A. Cloning and sequencing of the cDNA encoding a core protein of the paired helical filament of Alzheimer disease: identification as the microtubule-associated protein tau. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988;85: 4051–4055.
 76. St George-Hyslop PH, Petit A. Molecular biology and genetics of Alzheimer's disease. *C R Biol*. 2005;328: 119–130.
 77. Tandon A, Fraser P. The presenilins. *Genome Biol*. 2002;3: reviews3014.
 78. van Duijn CM, de Knijff P, Cruts M, Wehnert A, Havekes LM, Hofman A, et al. Apolipoprotein E4 allele in a population-based study of early-onset Alzheimer's disease. *Nat Genet*. 1994;7: 74–78.
 79. Bertram L, Tanzi RE. Thirty years of Alzheimer's disease genetics: the implications of systematic meta-analyses. *Nat Rev Neurosci*. 2008;9: 768–778.
 80. Craig-Schapiro R, Fagan AM, Holtzman DM. Biomarkers of Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis*. 2009;35: 128–140.
 81. Hsiao K, Chapman P, Nilsen S, Eckman C, Harigaya Y, Younkin S, et al. Correlative memory deficits, A β elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science*. 1996;274: 99–102.
 82. Frautschy SA, Yang F, Irrizarry M, Hyman B, Saido TC, Hsiao K, et al. Microglial response to amyloid plaques in APPsw transgenic mice. *Am J Pathol*. 1998;152: 307–317.
 83. Duff K, Eckman C, Zehr C, Yu X, Prada CM, Perez-tur J, et al. Increased amyloid- β 42(43) in brains of mice expressing mutant presenilin 1. *Nature*. 1996;383: 710–713.

84. Zakaria R, Wan Yaacob WM, Othman Z, Long I, Ahmad AH, Al-Rahbi B. Lipopolysaccharide-induced memory impairment in rats: a model of Alzheimer's disease. *Physiol Res.* 2017;66: 553–565.
85. O'Bryant SE, Mielke MM, Rissman RA, Lista S, Vanderstichele H, Zetterberg H, et al. Blood-based biomarkers in Alzheimer disease: Current state of the science and a novel collaborative paradigm for advancing from discovery to clinic. *Alzheimers Dement.* 2017;13: 45–58.
86. Chew H, Solomon VA, Fonteh AN. Involvement of Lipids in Alzheimer's Disease Pathology and Potential Therapies. *Frontiers in Physiology.* 2020. doi:10.3389/fphys.2020.00598
87. Feringa FM, van der Kant R. Cholesterol and Alzheimer's Disease; From Risk Genes to Pathological Effects. *Frontiers in Aging Neuroscience.* 2021. doi:10.3389/fnagi.2021.690372
88. González-Domínguez R, Sayago A, Fernández-Recamales Á. Metabolomics in Alzheimer's disease: The need of complementary analytical platforms for the identification of biomarkers to unravel the underlying pathology. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2017;1071: 75–92.
89. Koal T, Klavins K, Seppi D, Kemmler G, Humpel C. Sphingomyelin SM(d18:1/18:0) is significantly enhanced in cerebrospinal fluid samples dichotomized by pathological amyloid- β 42, tau, and phospho-tau-181 levels. *J Alzheimers Dis.* 2015;44: 1193–1201.
90. Klavins K, Koal T, Dallmann G, Marksteiner J, Kemmler G, Humpel C. The ratio of phosphatidylcholines to lysophosphatidylcholines in plasma differentiates healthy controls from patients with Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Alzheimers Dement.* 2015;1: 295–302.
91. Orešič M, Hyötyläinen T, Herukka S-K, Sysi-Aho M, Mattila I, Seppänen-Laakso T, et al. Metabolome in progression to Alzheimer's disease. *Transl Psychiatry.* 2011;1: e57.
92. Wood PL, Locke VA, Herling P, Passaro A, Vigna GB, Volpato S, et al. Targeted lipidomics distinguishes patient subgroups in mild cognitive impairment (MCI) and late onset Alzheimer's disease (LOAD). *BBA Clin.* 2016;5: 25–28.
93. Proitsi P, Kim M, Whitley L, Pritchard M, Leung R, Soininen H, et al. Plasma lipidomics analysis finds long chain cholesteryl esters to be associated with Alzheimer's disease. *Transl Psychiatry.* 2015;5: e494.
94. Li N-J, Liu W-T, Li W, Li S-Q, Chen X-H, Bi K-S, et al. Plasma metabolic profiling of Alzheimer's disease by liquid chromatography/mass spectrometry. *Clin Biochem.* 2010;43: 992–997.
95. Armirotti A, Basit A, Realini N, Caltagirone C, Bossù P, Spalletta G, et al. Sample preparation and orthogonal chromatography for broad polarity range plasma metabolomics: application to human subjects with neurodegenerative dementia. *Anal Biochem.* 2014;455: 48–54.
96. Huynh K, Lim WLF, Giles C, Jayawardana KS, Salim A, Mellett NA, et al. Concordant peripheral lipidome signatures in two large clinical studies of Alzheimer's disease. *Nat Commun.* 2020;11: 5698.
97. Mill J, Patel V, Okonkwo O, Li L, Raife T. Erythrocyte sphingolipid species as biomarkers of Alzheimer's disease. *J Pharm Anal.* 2021. doi:10.1016/j.jpha.2021.07.005
98. Sato Y, Suzuki I, Nakamura T, Bernier F, Aoshima K, Oda Y. Identification of a new plasma biomarker of Alzheimer's disease using metabolomics technology. *J Lipid Res.* 2012;53: 567–576.

99. Han X, M Holtzman D, McKeel DW Jr, Kelley J, Morris JC. Substantial sulfatide deficiency and ceramide elevation in very early Alzheimer's disease: potential role in disease pathogenesis. *J Neurochem.* 2002;82: 809–818.
100. González-Domínguez R, García-Barrera T, Gómez-Ariza JL. Application of a novel metabolomic approach based on atmospheric pressure photoionization mass spectrometry using flow injection analysis for the study of Alzheimer's disease. *Talanta.* 2015;131: 480–489.
101. Cheng H, Wang M, Li J-L, Cairns NJ, Han X. Specific changes of sulfatide levels in individuals with pre-clinical Alzheimer's disease: an early event in disease pathogenesis. *J Neurochem.* 2013;127: 733–738.
102. Han X, Rozen S, Boyle SH, Hellegers C, Cheng H, Burke JR, et al. Metabolomics in early Alzheimer's disease: identification of altered plasma sphingolipidome using shotgun lipidomics. *PLoS One.* 2011;6: e21643.
103. González-Domínguez R, Rupérez FJ, García-Barrera T, Barbas C, Gómez-Ariza JL. Metabolomic-Driven Elucidation of Serum Disturbances Associated with Alzheimer's Disease and Mild Cognitive Impairment. *Curr Alzheimer Res.* 2016;13: 641–653.
104. Liang Q, Liu H, Zhang T, Jiang Y, Xing H, Zhang A-H. Discovery of serum metabolites for diagnosis of progression of mild cognitive impairment to Alzheimer's disease using an optimized metabolomics method. *RSC Adv.* 2016;6: 3586–3591.
105. Liang Q, Liu H, Zhang T, Jiang Y, Xing H, Zhang A-H. Metabolomics-based screening of salivary biomarkers for early diagnosis of Alzheimer's disease. *RSC Adv.* 2015;5: 96074–96079.
106. Liang Q, Liu H, Li X, Zhang A-H. High-throughput metabolomics analysis discovers salivary biomarkers for predicting mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *RSC Adv.* 2016;6: 75499–75504.
107. Wang G, Zhou Y, Huang F-J, Tang H-D, Xu X-H, Liu J-J, et al. Plasma metabolite profiles of Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *J Proteome Res.* 2014;13: 2649–2658.
108. Czech C, Berndt P, Busch K, Schmitz O, Wiemer J, Most V, et al. Metabolite profiling of Alzheimer's disease cerebrospinal fluid. *PLoS One.* 2012;7: e31501.
109. González-Domínguez R, García A, García-Barrera T, Barbas C, Gómez-Ariza JL. Metabolomic profiling of serum in the progression of Alzheimer's disease by capillary electrophoresis-mass spectrometry. *Electrophoresis.* 2014;35: 3321–3330.
110. Ibáñez C, Simó C, Barupal DK, Fiehn O, Kivipelto M, Cedazo-Mínguez A, et al. A new metabolomic workflow for early detection of Alzheimer's disease. *J Chromatogr A.* 2013;1302: 65–71.
111. Trushina E, Dutta T, Persson X-MT, Mielke MM, Petersen RC. Identification of Altered Metabolic Pathways in Plasma and CSF in Mild Cognitive Impairment and Alzheimer's Disease Using Metabolomics. *PLoS ONE.* 2013. p. e63644. doi:10.1371/journal.pone.0063644
112. Paglia G, Stocchero M, Cacciatore S, Lai S, Angel P, Alam MT, et al. Unbiased Metabolomic Investigation of Alzheimer's Disease Brain Points to Dysregulation of Mitochondrial Aspartate Metabolism. *J Proteome Res.* 2016;15: 608–618.
113. Xu J, Begley P, Church SJ, Patassini S, Hollywood KA, Jüllig M, et al. Graded perturbations of metabolism in multiple regions of human brain in Alzheimer's disease: Snapshot of a pervasive metabolic disorder. *Biochim Biophys Acta.* 2016;1862: 1084–1092.
114. González-Domínguez R, García-Barrera T, Gómez-Ariza JL. Metabolite profiling

- for the identification of altered metabolic pathways in Alzheimer's disease. *J Pharm Biomed Anal.* 2015;107: 75–81.
115. Laakso MP, Jukarainen NM, Vepsäläinen J. Diagnosis of dementias by high-field 1H MRS of cerebrospinal fluid. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2015;86: 1286–1290.
 116. Inoue K, Tsutsui H, Akatsu H, Hashizume Y, Matsukawa N, Yamamoto T, et al. Metabolic profiling of Alzheimer's disease brains. *Scientific Reports.* 2013. doi:10.1038/srep02364
 117. Kaddurah-Daouk R, Zhu H, Sharma S, Bogdanov M, Rozen SG, Matson W, et al. Alterations in metabolic pathways and networks in Alzheimer's disease. *Transl Psychiatry.* 2013;3: e244.
 118. Kaddurah-Daouk R, Rozen S, Matson W, Han X, Hulette CM, Burke JR, et al. Metabolomic changes in autopsy-confirmed Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement.* 2011;7: 309–317.
 119. González-Domínguez R, García-Barrera T, Gómez-Ariza JL. Using direct infusion mass spectrometry for serum metabolomics in Alzheimer's disease. *Anal Bioanal Chem.* 2014;406: 7137–7148.
 120. González-Domínguez R, García-Barrera T, Gómez-Ariza JL. Metabolomic study of lipids in serum for biomarker discovery in Alzheimer's disease using direct infusion mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal.* 2014;98: 321–326.
 121. Baloni P, Funk CC, Yan J, Yurkovich JT, Kueider-Paisley A, Nho K, et al. Metabolic Network Analysis Reveals Altered Bile Acid Synthesis and Metabolism in Alzheimer's Disease. *Cell Rep Med.* 2020;1: 100138.
 122. MahmoudianDehkordi S, Arnold M, Nho K, Ahmad S, Jia W, Xie G, et al. Altered bile acid profile associates with cognitive impairment in Alzheimer's disease-An emerging role for gut microbiome. *Alzheimers Dement.* 2019;15: 76–92.
 123. Václavík J, Mádrová L, Kouřil Š, de Sousa J, Brumarová R, Janečková H, et al. A newborn screening approach to diagnose 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase deficiency. *JIMD Rep.* 2020;54: 79–86.
 124. Haug K, Salek RM, Conesa P, Hastings J, de Matos P, Rijnbeek M, et al. MetaboLights--an open-access general-purpose repository for metabolomics studies and associated meta-data. *Nucleic Acids Res.* 2013;41: D781–6.
 125. Pedersen TL (2018) ggraph: An Implementation of Grammar of Graphics for Graphs and Networks. R package version 1.0.2. <https://github.com/thomasp85/ggraph> (14 January 2020, date last accessed).
 126. Puris E, Kouřil Š, Najdekr L, Loppi S, Korhonen P, Kanninen KM, et al. Metabolomic and lipidomic changes triggered by lipopolysaccharide-induced systemic inflammation in transgenic APdE9 mice. *Scientific Reports.* 2021. doi:10.1038/s41598-021-92602-4
 127. Jankowsky JL, Fadale DJ, Anderson J, Xu GM, Gonzales V, Jenkins NA, et al. Mutant presenilins specifically elevate the levels of the 42 residue beta-amyloid peptide in vivo: evidence for augmentation of a 42-specific gamma secretase. *Hum Mol Genet.* 2004;13: 159–170.
 128. Little CS, Hammond CJ, MacIntyre A, Balin BJ, Appelt DM. Chlamydia pneumoniae induces Alzheimer-like amyloid plaques in brains of BALB/c mice. *Neurobiol Aging.* 2004;25: 419–429.
 129. Malm TM, Iivonen H, Goldsteins G, Keksa-Goldsteine V, Ahtoniemi T, Kanninen K, et al. Pyrrolidine dithiocarbamate activates Akt and improves spatial learning in APP/PS1 mice without affecting beta-amyloid burden. *J Neurosci.* 2007;27: 3712–3721.

130. Kaya I, Jennische E, Lange S, Tarik Baykal A, Malmberg P, Fletcher JS. Brain region-specific amyloid plaque-associated myelin lipid loss, APOE deposition and disruption of the myelin sheath in familial Alzheimer's disease mice. *J Neurochem*. 2020;154: 84–98.
131. Sy M, Kitazawa M, Medeiros R, Whitman L, Cheng D, Lane TE, et al. Inflammation induced by infection potentiates tau pathological features in transgenic mice. *Am J Pathol*. 2011;178: 2811–2822.
132. Kitazawa M. Lipopolysaccharide-Induced Inflammation Exacerbates Tau Pathology by a Cyclin-Dependent Kinase 5-Mediated Pathway in a Transgenic Model of Alzheimer's Disease. *Journal of Neuroscience*. 2005. pp. 8843–8853. doi:10.1523/jneurosci.2868-05.2005
133. Yuan M, Breitkopf SB, Yang X, Asara JM. A positive/negative ion-switching, targeted mass spectrometry-based metabolomics platform for bodily fluids, cells, and fresh and fixed tissue. *Nat Protoc*. 2012;7: 872–881.
134. Sarafian MH, Gaudin M, Lewis MR, Martin F-P, Holmes E, Nicholson JK, et al. Objective set of criteria for optimization of sample preparation procedures for ultra-high throughput untargeted blood plasma lipid profiling by ultra performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Anal Chem*. 2014;86: 5766–5774.
135. Vorkas PA, Isaac G, Anwar MA, Davies AH, Want EJ, Nicholson JK, et al. Untargeted UPLC-MS profiling pipeline to expand tissue metabolome coverage: application to cardiovascular disease. *Anal Chem*. 2015;87: 4184–4193.
136. Gardlo A, Friedecky D, Hron K, Najdekr L, Karlikova R, Adam T. AlzbetaG/Metabol: The statistical analysis of metabolomic data (Version v 1.0.0). Zenodo (2019).
137. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. [http:// www.R- project. org/](http://www.R-project.org/) (2013).
138. Minkeviciene R, Ihalainen J, Malm T, Matilainen O, Keksa-Goldsteine V, Goldsteins G, et al. Age-related decrease in stimulated glutamate release and vesicular glutamate transporters in APP/PS1 transgenic and wild-type mice. *J Neurochem*. 2008;105: 584–594.
139. Wilkins JM, Trushina E. Application of Metabolomics in Alzheimer's Disease. *Frontiers in Neurology*. 2018. doi:10.3389/fneur.2017.00719
140. Sonntag K-C, Ryu W-I, Amirault KM, Healy RA, Siegel AJ, McPhie DL, et al. Late-onset Alzheimer's disease is associated with inherent changes in bioenergetics profiles. *Scientific Reports*. 2017. doi:10.1038/s41598-017-14420-x
141. Griffin JWD, Bradshaw PC. Amino Acid Catabolism in Alzheimer's Disease Brain: Friend or Foe? *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2017. pp. 1–15. doi:10.1155/2017/5472792
142. Mandal PK, Saharan S, Tripathi M, Murari G. Brain Glutathione Levels – A Novel Biomarker for Mild Cognitive Impairment and Alzheimer's Disease. *Biological Psychiatry*. 2015. pp. 702–710. doi:10.1016/j.biopsych.2015.04.005
143. Butterfield DA, Halliwell B. Oxidative stress, dysfunctional glucose metabolism and Alzheimer disease. *Nat Rev Neurosci*. 2019;20: 148–160.
144. Sanchez-Mejia RO, Mucke L. Phospholipase A2 and arachidonic acid in Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta*. 2010;1801: 784–790.
145. Snowden SG, Ebshiana AA, Hye A, An Y, Pletnikova O, O'Brien R, et al. Association between fatty acid metabolism in the brain and Alzheimer disease neuropathology and cognitive performance: A nontargeted metabolomic study. *PLoS Med*. 2017;14: e1002266.

146. Voevodskaya O, Poulakis K, Sundgren P, van Westen D, Palmqvist S, Wahlund L-O, et al. Brain myoinositol as a potential marker of amyloid-related pathology: A longitudinal study. *Neurology*. 2019;92: e395–e405.
147. Hou Y, Lautrup S, Cordonnier S, Wang Y, Croteau DL, Zavala E, et al. NAD supplementation normalizes key Alzheimer's features and DNA damage responses in a new AD mouse model with introduced DNA repair deficiency. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2018. pp. E1876–E1885. doi:10.1073/pnas.1718819115
148. Rijpma A, van der Graaf M, Meulenbroek O, Olde Rikkert MGM, Heerschap A. Altered brain high-energy phosphate metabolism in mild Alzheimer's disease: A 3-dimensional P MR spectroscopic imaging study. *Neuroimage Clin*. 2018;18: 254–261.
149. Frisardi V, Panza F, Seripa D, Farooqui T, Farooqui AA. Glycerophospholipids and glycerophospholipid-derived lipid mediators: A complex meshwork in Alzheimer's disease pathology. *Progress in Lipid Research*. 2011. pp. 313–330. doi:10.1016/j.plipres.2011.06.001
150. Wong MW, Braidy N, Poljak A, Pickford R, Thambisetty M, Sachdev PS. Dysregulation of lipids in Alzheimer's disease and their role as potential biomarkers. *Alzheimers Dement*. 2017;13: 810–827.
151. Wood PL, Barnette BL, Kaye JA, Quinn JF, Woltjer RL. Non-targeted lipidomics of CSF and frontal cortex grey and white matter in control, mild cognitive impairment, and Alzheimer's disease subjects. *Acta Neuropsychiatrica*. 2015. pp. 270–278. doi:10.1017/neu.2015.18
152. Wood PL, Medicherla S, Sheikh N, Terry B, Phillipps A, Kaye JA, et al. Targeted Lipidomics of Frontal Cortex and Plasma Diacylglycerols (DAG) in Mild Cognitive Impairment and Alzheimer's Disease: Validation of DAG Accumulation Early in the Pathophysiology of Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2015. pp. 537–546. doi:10.3233/jad-150336
153. Chan RB, Oliveira TG, Cortes EP, Honig LS, Duff KE, Small SA, et al. Comparative lipidomic analysis of mouse and human brain with Alzheimer disease. *J Biol Chem*. 2012;287: 2678–2688.
154. Carrasco S, Mérida I. Diacylglycerol, when simplicity becomes complex. *Trends Biochem Sci*. 2007;32: 27–36.
155. Conquer JA, Tierney MC, Zecevic J, Bettger WJ, Fisher RH. Fatty acid analysis of blood plasma of patients with Alzheimer's disease, other types of dementia, and cognitive impairment. *Lipids*. 2000;35: 1305–1312.
156. Wood PL, Phillipps A, Woltjer RL, Kaye JA, Quinn JF. Increased lysophosphatidylethanolamine and diacylglycerol levels in Alzheimer's disease plasma. *JSM Alzheimer's Dis. Relat. Dement*. 2014; 1: 1001.
157. Law S-H, Chan M-L, Marathe GK, Parveen F, Chen C-H, Ke L-Y. An Updated Review of Lysophosphatidylcholine Metabolism in Human Diseases. *Int J Mol Sci*. 2019;20. doi:10.3390/ijms20051149
158. Grimm MOW, Grösgen S, Riemenschneider M, Tanila H, Grimm HS, Hartmann T. From brain to food: analysis of phosphatidylcholins, lyso-phosphatidylcholins and phosphatidylcholin-plasmalogens derivatives in Alzheimer's disease human post mortem brains and mice model via mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2011;1218: 7713–7722.
159. Xu J, Patassini S, Rustogi N, Riba-Garcia I, Hale BD, Phillips AM, et al. Regional protein expression in human Alzheimer's brain correlates with disease severity. *Commun Biol*. 2019;2: 43.

160. Penke B, Paragi G, Gera J, Berkecz R, Kovács Z, Crul T, et al. The Role of Lipids and Membranes in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease: A Comprehensive View. *Curr Alzheimer Res.* 2018;15: 1191–1212.
161. Reitz C. Dyslipidemia and the risk of Alzheimer's disease. *Curr Atheroscler Rep.* 2013;15: 307.
162. Xuan Q, Hu C, Yu D, Wang L, Zhou Y, Zhao X, et al. Development of a High Coverage Pseudotargeted Lipidomics Method Based on Ultra-High Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. *Anal Chem.* 2018;90: 7608–7616.
163. Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, et al. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res.* 2003;13: 2498–2504.

9 SEZNAM PRACÍ

9.1 Publikace s IF vztahující se k disertaci

- Puris, E., Kouřil, Š., Najdekr, L., Loppi, S., Korhonen, P., Kanninen, K. M., Malm, T., Koistinaho, J., Friedecký, D., & Gynther, M. (2021). Metabolomic and lipidomic changes triggered by lipopolysaccharide-induced systemic inflammation in transgenic APdE9 mice. *Scientific reports*, 11(1), 13076. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-92602-4> (IF = 4,379)
- Kouřil, Š., de Sousa, J., Václavík, J., Friedecký, D., & Adam, T. (2020). CROP: correlation-based reduction of feature multiplicities in untargeted metabolomic data. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 36(9), 2941–2942. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btaa012> (IF = 5,610)
- Walach, J., Filzmoser, P., Kouřil, Š., Friedecký, D., & Adam, T. (2020). Cellwise outlier detection and biomarker identification in metabolomics based on pairwise log ratios. *Journal of chemometrics*, 34(1), e3182. <https://doi.org/10.1002/cem.3182> (IF = 1,500)

9.2 Publikace v recenzovaných časopisech vztahující se k disertaci

- Václavík, J., Mádrová, L., Kouřil, Š., de Sousa, J., Brumarová, R., Janečková, H., Jáčová, J., Friedecký, D., Knapková, M., Kluijtmans, L., Grünert, S. C., Vaz, F. M., Janzen, N., Wanders, R., Wevers, R. A., & Adam, T. (2020). A newborn screening approach to diagnose 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase deficiency. *JIMD reports*, 54(1), 79–86. <https://doi.org/10.1002/jmd2.12118>

9.3 Ostatní publikace s IF

- Jaworek, P., Tarkowski, P., Hluska, T., Kouřil, Š., Vrobel, O., Nisler, J., & Kopečný, D. (2019). Characterization of five CHASE-containing histidine kinase receptors from *Populus × canadensis* cv. Robusta sensing isoprenoid

and aromatic cytokinins. *Planta*, 251(1), 1. <https://doi.org/10.1007/s00425-019-03297-x> (IF = 4.116)

- Jaworek, P., Kopečný, D., Zalabák, D., Šebela, M., Kouřil, Š., Hluska, T., Končítíková, R., Podlešáková, K., & Tarkowski, P. (2019). Occurrence and biosynthesis of cytokinins in poplar. *Planta*, 250(1), 229–244. <https://doi.org/10.1007/s00425-019-03152-z> (IF = 4.116)
- Markovich, O., Steiner, E., Kouřil, Š., Tarkowski, P., Aharoni, A., & Elbaum, R. (2017). Silicon promotes cytokinin biosynthesis and delays senescence in Arabidopsis and Sorghum. *Plant, cell & environment*, 40(7), 1189–1196. <https://doi.org/10.1111/pce.12913> (IF = 6.362)
- Bar, M., Israeli, A., Levy, M., Ben Gera, H., Jiménez-Gómez, J. M., Kouřil, Š., Tarkowski, P., & Ori, N. (2016). CLAUSA Is a MYB Transcription Factor That Promotes Leaf Differentiation by Attenuating Cytokinin Signaling. *The Plant cell*, 28(7), 1602–1615. <https://doi.org/10.1105/tpc.16.00211> (IF = 9.618)

9.4 Příspěvky na konferencích vztahující se k disertaci

- Kouřil Š., Rendlová J., Friedecký D., Adam T. Removing false features in metabolomics data using correlations. Metabolomic Bio & Data 2018 (MOVISS), 9.-12.9. 2018, Vorau, Austria, Book of Abstracts, p. 26.
- Šíroková J., Mádrová L., Karlíková R., Kouřil Š., Jorda R., Kryštof V., Friedecký D., Adam T. Effect of cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitors on cellular metabolome regarding selectivity. Metabolomic Bio & Data 2018 (MOVISS), 9.-12.9. 2018, Vorau, Austria, Book of Abstracts, p. 49.
- Kouřil Š. Standardizace omických metod pro analýzu malých molekul. FONS – Symposium klinické biochemie, Pardubice, Česká Republika 16.9.-18.9.2018, Sborník a program symposia, p. 63, ISBN 978-80-87436-13-4.
- Kouřil Š., Rendlová J., Friedecký D., Adam T. Removing false features in metabolomics data using correlations. Metabomeeting, 17.-19. 12. 2017 University of Nottingham, UK. Book of abstracts, p. 83.

- Kouřil Š., Rendlová J., Friedecký D., Adam T. Removing false features in metabolomics data using correlations. Eighth Annual Conference of the Czech Society for Mass Spectrometry. Olomouc, Czech Republic, 27.-29.3.2019. Book of abstracts, p.38, ISBN ISBN 978-80-905045-9-2.

9.5 Ostatní příspěvky na konferencích

- Karlíková R., Friedecký D., Kouřil Š., Mičová K., Najdekr L., Adam T., Majerová P., Kováč A. Metabolomická studie tauopatie – má smysl opakovat experiment? 6. Česká lipidomická konference, Praha, Česká Republika, 14.-15. 6. 2018, s. 14, ISBN 978-80-86241-59-3.
- Friedecký D., Gardlo A., Rendlová J., Karlíková R., Kouřil Š., Mičová K., Adam T. Analýza jednorozměrných a vícerozměrných dat. 6. Česká lipidomická konference, Praha, Česká Republika, 14.-15. 6. 2018, s. 21, ISBN 978-80-86241-59-3.
- Karlíková R., Friedecký D., Majerová P., Kováč A., Kouřil Š., Mičová K., Najdekr L., Adam T. Metabolomická analýza vzorků transgenních potkanů s tauopatií. Meeting mladých vědců, Olomouc, Česká republika, 21. – 22 - 6. 2018.
- Friedecký D., Karlíkova R., Knapkova M., Micova K., Zuzanakova K., Machkova M., Kouril S., Jacova J., Dluholucky S., Adam T. Targeted metabolomic analysis of dry blood spots from patients suffering from SCADD. Annual Symposium of the Society for the Study of Inborn Errors of Metabolism (SSIEM), Athens, Greece, 4.-7.9.2018. J Inherit Metab Dis (2018) 41 (Suppl 1):S80. DOI: 10.1007/s10545-018-0233-9.
- Friedecký D., Karlíková R., Mičová K., Gardlo A., Janečková H., Vrobel I., Najdekr L., Kouřil Š., Rendlová J., Mádrová L., Jáčová J., Adam T. Jak kriticky hodnotit výsledky v metabolomice . 19. Škola hmotnostní spektrometrie 2015, Špindlerův Mlýn, Česká republika, 9.-14.9.2018, Sborník 19. ročník Školy hmotnostní spektrometrie, s. 198-203. ISBN 978-80-88195-07-8.

- Karlíková R., Friedecký D., Kouřil Š., Mičová K., Janečková H., Adam T. Metabolomika a její význam pro studium patobiochemie onemocnění. FONS – Sympozium klinické biochemie, Pardubice, Česká Republika 16.9.-18.9.2018, Sborník a program sympozia, p. 41, ISBN 978-80-87436-13-4.
- Friedecký D., Karlíková R., Mičová K., Gardlo A., Janečková H., Vrobel I., Najdekr L., Kouřil Š., Rendlová J., Mádrová L., Václavík J., Jáčová J., Adam T. Advanced mass spectrometry for discovering new biomarkers of inborn errors of metabolism. 18th International Nutrition & Diagnostics Conference, Prague, Czech Republic, 22.-25.9.2018. Book of proceedings, s. 38, ISBN 978-80-7560-016-5.
- Karlíková R., Janečková H., Friedecký D., Knapková M., Mičová K., Machková M., Zuzanáková K., Kouřil Š., Jáčová J., Dluholucký S., Adam T. Targeted metabolomic analysis of dried blood spots from patients with short-chain acyl-coenzymeA dehydrogenase deficiency (SCADD). Metabomeeting, 17.-19. 12. 2017 University of Nottingham, UK. Book of abstracts, p. 81.
- Václavík J., Mádrová L., Karlíková R., Friedecký D., Kouřil Š., Kluijtmans L.A.J., Wevers R.A., Adam T. New biomarkers of 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA lyase deficiency. Eighth Annual Conference of the Czech Society for Mass Spectrometry. Olomouc, Czech Republic, 27.-29.3.2019. Book of abstracts, p.37, ISBN ISBN 978-80-905045-9-2.
- Václavík J., Mádrová L., Kouřil Š., Rendlová J., Karlíková R., Friedecký D., Vaz F.M., Wanders R.J.A., Kluijtmans L.A.J., Wevers R.A., Adam T. Nové potenciální biomarkery 3-hydroxy-3-methylglutarové acidurie. 34. Pracovní dny Dědičné metabolické poruchy, Olomouc, Česká republika, 29.–31. 5. 2019. Program a sborník abstrakt a posterů.
- Friedecký D., Karlíková R., Mádrová L., Kouřil Š., Janečková H., Václavík J., Rendlová J., Mičová K., Gardlo A., Jáčová J., Dobešová D., Kvasnička A., Zuzanáková K., Adam T. Význam metabolomiky v diagnostice dědičných metabolických poruch. 34. Pracovní dny Dědičné metabolické

poruchy, Olomouc, Česká republika, 29.–31. 5. 2019. Program a sborník abstrakt a posterů.

- Friedecky D., Karlikova R., Knapkova M., Machkova M., Kouril S., Jacova J., Kvasnicka A., Dluholucky S., Adam T. New insights into short chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency by targeted metabolomics and lipidomics. Annual Symposium of the Society for the Study of Inborn Errors of Metabolism (SSIEM 2019), Rotterdam, The Netherlands, 3.-6. 9.2019. *J Inher Metab Dis* (2019) 42 (Suppl 1):S58. DOI: 10.1002/jimd.12153

10 PŘÍLOHY

10.1 Příloha č. 1 - Nastavení parametrů procesování v softwaru Compound Discoverer 3.0 - projekt HMGA

Search name: 2019_03_08_hmgcld
Created with Discoverer version: 3.0.0.294

```
[Input Files (0)]
  -->Select Spectra (1)
  [Select Spectra (1)]
    -->Align Retention Times (2)
    [Align Retention Times (2)]
      -->Detect Compounds (3)
      [Detect Compounds (3)]
        -->Group Compounds (4)
        [Group Compounds (4)]
          -->Fill Gaps (16)
          -->Search ChemSpider (8)
          -->Assign Compound Annotations (9)
          -->Predict Compositions (12)
          -->Map to KEGG Pathways (23)
          -->Map to Metabolika Pathways (25)
          -->Search mzCloud (21)
          -->Compound Class Scoring (26)
          [Fill Gaps (16)]
            -->Normalize Areas (19)
            [Normalize Areas (19)]
              -->Mark Background Compounds
(15)
                [Search ChemSpider (8)]
                -->Apply mzLogic (22)
                [Map to Metabolika Pathways (25)]
                -->Apply mzLogic (22)
                [Mark Background Compounds
(15)]
                [Apply mzLogic (22)]
                [Assign Compound Annotations
(9)]
                [Predict Compositions (12)]
                [Map to KEGG Pathways (23)]
                [Search mzCloud (21)]
                [Compound Class Scoring (26)]
                [Differential Analysis (10)]
                [Descriptive Statistics (18)]
```

Processing node 0: Input Files

Input Data

Processing node 1: Select Spectra

1. General Settings:

- Precursor Selection: Use MS(n - 1) Precursor
- Use Isotope Pattern in Precursor Reevaluation: True

- Provide Profile Spectra: Automatic
- Store Chromatograms: False

2. Spectrum Properties Filter:

- Lower RT Limit: 1
- Upper RT Limit: 24
- First Scan: 0
- Last Scan: 0
- Ignore Specified Scans: (not specified)
- Lowest Charge State: 0
- Highest Charge State: 0
- Min. Precursor Mass: 70 Da
- Max. Precursor Mass: 5000 Da
- Total Intensity Threshold: 0
- Minimum Peak Count: 1

3. Scan Event Filters:

- Mass Analyzer: (not specified)
- MS Order: Any
- Activation Type: (not specified)
- Min. Collision Energy: 0
- Max. Collision Energy: 1000
- Scan Type: Any
- Polarity Mode: (not specified)

4. Peak Filters:

- S/N Threshold (FT-only): 0

5. Replacements for Unrecognized Properties:

- Unrecognized Charge Replacements: 1
- Unrecognized Mass Analyzer Replacements: ITMS
- Unrecognized MS Order Replacements: MS2
- Unrecognized Activation Type Replacements: CID
- Unrecognized Polarity Replacements: +
- Unrecognized MS Resolution@200 Replacements: 60000
- Unrecognized MSn Resolution@200 Replacements: 30000

Processing node 2: Align Retention Times

1. General Settings:

- Alignment Model: Adaptive curve
- Alignment Fallback: Use Linear Model
- Maximum Shift [min]: 0.7
- Shift Reference File: True
- Mass Tolerance: 5 ppm
- Remove Outlier: True

Processing node 3: Detect Compounds

1. General Settings:

- Mass Tolerance [ppm]: 5 ppm
- Intensity Tolerance [%]: 30
- S/N Threshold: 1.5
- Min. Peak Intensity: 10000
- Ions:
 - [2M+ACN+H]+1
 - [2M+ACN+Na]+1
 - [2M+H]+1
 - [2M+K]+1

[2M+Na]+1
[2M+NH4]+1
[M+ACN+H]+1
[M+ACN+Na]+1
[M+H]+1
[M+K]+1
[M+Na]+1
[M+NH4]+1
- Base Ions: [M+H]+1
- Min. Element Counts: C H
- Max. Element Counts: C150 H250 Br3 Cl4 K2 N10 Na2 O18 P5 S5

2. Peak Detection:
- Filter Peaks: True
- Max. Peak Width [min]: 0.5
- Remove Singlets: True
- Min. # Scans per Peak: 8
- Min. # Isotopes: 2

Processing node 4: Group Compounds

1. Compound Consolidation:
- Mass Tolerance: 5 ppm
- RT Tolerance [min]: 0.3

2. Fragment Data Selection:
- Preferred Ions: [M+H]+1

Processing node 16: Fill Gaps

1. General Settings:
- Mass Tolerance: 5 ppm
- S/N Threshold: 1.5
- Use Real Peak Detection: True

Processing node 19: Normalize Areas

1. QC-based Area Correction:
- Regression Model: Linear
- Min. QC Coverage [%]: 25
- Max. QC Area RSD [%]: 50
- Max. # Files Between QC Files: 20

2. Area Normalization:
- Normalization Type: None
- Exclude Blanks: True

Processing node 15: Mark Background Compounds

1. General Settings:
- Max. Sample/Blank: 5
- Max. Blank/Sample: 0
- Hide Background: True

Processing node 8: Search ChemSpider

1. Search Settings:
- Database(s): Human Metabolome Database; KEGG; LipidMAPS; PubMed
- Search Mode: By Formula or Mass
- Mass Tolerance: 5 ppm
- Max. # of results per compound: 100
- Max. # of Predicted Compositions to be searched per Compound: 3
- Result Order (for Max. # of results per compound): Order By Reference Count (DESC)

2. Predicted Composition Annotation:
- Check All Predicted Compositions: False

Processing node 22: Apply mzLogic

1. Search Settings:
- FT Fragment Mass Tolerance: 10 ppm
- IT Fragment Mass Tolerance: 0.4 Da
- Max. # Compounds: 0
- Max. # mzCloud Similarity Results to consider per Compound: 10
- Match Factor Threshold: 30

Processing node 9: Assign Compound Annotations

1. General Settings:
- Mass Tolerance: 5 ppm

2. Data Sources:
- Data Source #1: Predicted Compositions
- Data Source #2: ChemSpider Search
- Data Source #3: mzCloud Search
- Data Source #4: Metabolika Search
- Data Source #5: (not specified)

Processing node 12: Predict Compositions

1. Prediction Settings:
- Mass Tolerance: 5 ppm
- Min. Element Counts: C H
- Max. Element Counts: C250 H190 N10 O18 P5 S5
- Min. RDBE: 0
- Max. RDBE: 40
- Min. H/C: 0.1
- Max. H/C: 3.5
- Max. # Candidates: 10
- Max. # Internal Candidates: 200

2. Pattern Matching:
- Intensity Tolerance [%]: 30
- Intensity Threshold [%]: 0.1
- S/N Threshold: 3
- Min. Spectral Fit [%]: 30
- Min. Pattern Cov. [%]: 90
- Use Dynamic Recalibration: True

3. Fragments Matching:
- Use Fragments Matching: True
- Mass Tolerance: 10 ppm
- S/N Threshold: 3

Processing node 23: Map to KEGG Pathways

1. Search Settings:
 - Search Mode: By Formula or Mass
2. By Mass Search Settings:
 - Mass Tolerance: 5 ppm
3. By Formula Search Settings:
 - Max. # of Predicted Compositions to be searched per Compound: 3
4. Display Settings:
 - Max. # Pathways in 'Pathways' column: 20

Processing node 25: Map to Metabolika Pathways

1. Search Settings:
 - Metabolika Pathways:
 - Search Mode: By Formula or Mass
2. By Mass Search Settings:
 - Mass Tolerance: 5 ppm
3. By Formula Search Settings:
 - Max. # of Predicted Compositions to be searched per Compound: 3
4. Display Settings:
 - Max. # Pathways in 'Pathways' column: 20

Processing node 21: Search mzCloud

1. Search Settings:
 - Compound Classes: All
 - Match Ion Activation Type: True
 - Match Ion Activation Energy: Match with Tolerance
 - Ion Activation Energy Tolerance: 20
 - Apply Intensity Threshold: True
 - Precursor Mass Tolerance: 10 ppm
 - FT Fragment Mass Tolerance: 10 ppm
 - IT Fragment Mass Tolerance: 0.4 Da
 - Identity Search: HighChem HighRes
 - Similarity Search: Similarity Reverse
 - Library: Reference
 - Post Processing: Recalibrated
 - Match Factor Threshold: 60
 - Max. # Results: 10

Processing node 26: Compound Class Scoring

1. General Settings:
 - Compound Classes: \Carnitines
 - S/N Threshold: 50
 - High Acc. Mass Tolerance: 2.5 mmu
 - Low Acc. Mass Tolerance: 0.5 Da
 - Allow AIF Scoring: True

Processing node 10: Differential Analysis

1. General Settings:
- Log10 Transform Values: True

Processing node 18: Descriptive Statistics

No parameters

FILTERS USED:

- Background is false
- Area (Max.) is greater than 1000
- Formula is not blank
- # Usable QC is greater than 15
- Group CV [%] is less than 200 in every sample group
- RT [min] is less than 12

10.2 Příloha č. 2 - Nastavení parametrů procesování v softwaru Compound Discoverer 3.0 - kontrolní skupina pacientů

Search name: Control dataset
Created with Discoverer version: 3.0.0.294

```
[Input Files (0)]
  -->Select Spectra (1)
    [Select Spectra (1)]
      -->Align Retention Times (2)
        [Align Retention Times (2)]
          -->Detect Compounds (3)
            [Detect Compounds (3)]
              -->Group Compounds (4)
                [Group Compounds (4)]
                  -->Fill Gaps (16)
                    -->Search ChemSpider (8)
                      -->Assign Compound Annotations (9)
                        -->Predict Compositions (12)
                          -->Map to Metabolika Pathways (25)
                            -->Search mzCloud (21)
                              [Fill Gaps (16)]
                                -->Normalize Areas (19)
                                  [Normalize Areas (19)]
                                    -->Mark Background Compounds
(15)
[Search ChemSpider (8)]
  -->Apply mzLogic (22)
[Map to Metabolika Pathways (25)]
  -->Apply mzLogic (22)
    [Mark Background Compounds
(15)]
      [Apply mzLogic (22)]
        [Assign Compound
Annotations (9)]
          [Predict Compositions (12)]
            [Search mzCloud (21)]
```

Processing node 0: Input Files

Input Data

Processing node 1: Select Spectra

1. General Settings:

- Precursor Selection: Use MS(n - 1) Precursor
- Use Isotope Pattern in Precursor Reevaluation: True
- Provide Profile Spectra: Automatic
- Store Chromatograms: False

2. Spectrum Properties Filter:

- Lower RT Limit: 1
- Upper RT Limit: 15
- First Scan: 0
- Last Scan: 0
- Ignore Specified Scans: (not specified)
- Lowest Charge State: 0
- Highest Charge State: 0
- Min. Precursor Mass: 70 Da
- Max. Precursor Mass: 5000 Da
- Total Intensity Threshold: 0
- Minimum Peak Count: 1

3. Scan Event Filters:

- Mass Analyzer: (not specified)
- MS Order: Any
- Activation Type: (not specified)
- Min. Collision Energy: 0
- Max. Collision Energy: 1000
- Scan Type: Any
- Polarity Mode: (not specified)

4. Peak Filters:

- S/N Threshold (FT-only): 0

5. Replacements for Unrecognized Properties:

- Unrecognized Charge Replacements: 1
- Unrecognized Mass Analyzer Replacements: ITMS
- Unrecognized MS Order Replacements: MS2
- Unrecognized Activation Type Replacements: CID
- Unrecognized Polarity Replacements: +
- Unrecognized MS Resolution@200 Replacements: 60000
- Unrecognized MSn Resolution@200 Replacements: 30000

Processing node 2: Align Retention Times

1. General Settings:

- Alignment Model: Adaptive curve
- Alignment Fallback: Use Linear Model
- Maximum Shift [min]: 0.2
- Shift Reference File: True
- Mass Tolerance: 5 ppm
- Remove Outlier: True

Processing node 3: Detect Compounds

1. General Settings:

- Mass Tolerance [ppm]: 5 ppm
- Intensity Tolerance [%]: 30
- S/N Threshold: 1.5
- Min. Peak Intensity: 10000
- Ions:
 - [2M+ACN+H]+1
 - [2M+ACN+Na]+1
 - [2M+H]+1
 - [2M+K]+1
 - [2M+Na]+1
 - [2M+NH4]+1
 - [M+ACN+H]+1
 - [M+ACN+Na]+1
 - [M+H]+1
 - [M+K]+1
 - [M+Na]+1
 - [M+NH4]+1
- Base Ions: [M+H]+1
- Min. Element Counts: C H
- Max. Element Counts: C150 H250 Br3 Cl4 K2 N10 Na2 O18 P5 S5

2. Peak Detection:

- Filter Peaks: True
- Max. Peak Width [min]: 0.5
- Remove Singlets: True
- Min. # Scans per Peak: 6
- Min. # Isotopes: 2

Processing node 4: Group Compounds

1. Compound Consolidation:

- Mass Tolerance: 5 ppm
- RT Tolerance [min]: 0.2

2. Fragment Data Selection:

- Preferred Ions: [M+H]+1

Processing node 16: Fill Gaps

1. General Settings:

- Mass Tolerance: 5 ppm
- S/N Threshold: 1.5
- Use Real Peak Detection: True

Processing node 19: Normalize Areas

1. QC-based Area Correction:

- Regression Model: Linear
- Min. QC Coverage [%]: 25
- Max. QC Area RSD [%]: 50
- Max. # Files Between QC Files: 20

2. Area Normalization:

- Normalization Type: None
- Exclude Blanks: True

Processing node 15: Mark Background Compounds

1. General Settings:
- Max. Sample/Blank: 5
 - Max. Blank/Sample: 0
 - Hide Background: True

Processing node 8: Search ChemSpider

1. Search Settings:
- Database(s): Human Metabolome Database; KEGG; LipidMAPS; PubMed
 - Search Mode: By Formula or Mass
 - Mass Tolerance: 5 ppm
 - Max. # of results per compound: 100
 - Max. # of Predicted Compositions to be searched per Compound: 3
 - Result Order (for Max. # of results per compound): Order By Reference Count (DESC)
2. Predicted Composition Annotation:
- Check All Predicted Compositions: False

Processing node 22: Apply mzLogic

1. Search Settings:
- FT Fragment Mass Tolerance: 10 ppm
 - IT Fragment Mass Tolerance: 0.4 Da
 - Max. # Compounds: 0
 - Max. # mzCloud Similarity Results to consider per Compound: 10
 - Match Factor Threshold: 30

Processing node 9: Assign Compound Annotations

1. General Settings:
- Mass Tolerance: 5 ppm
2. Data Sources:
- Data Source #1: Predicted Compositions
 - Data Source #2: ChemSpider Search
 - Data Source #3: mzCloud Search
 - Data Source #4: Metabolika Search
 - Data Source #5: (not specified)

Processing node 12: Predict Compositions

1. Prediction Settings:
- Mass Tolerance: 5 ppm
 - Min. Element Counts: C H
 - Max. Element Counts: C250 H190 N10 O18 P5 S5
 - Min. RDBE: 0
 - Max. RDBE: 40
 - Min. H/C: 0.1
 - Max. H/C: 3.5
 - Max. # Candidates: 10

- Max. # Internal Candidates: 200

2. Pattern Matching:

- Intensity Tolerance [%]: 30
- Intensity Threshold [%]: 0.1
- S/N Threshold: 3
- Min. Spectral Fit [%]: 30
- Min. Pattern Cov. [%]: 90
- Use Dynamic Recalibration: True

3. Fragments Matching:

- Use Fragments Matching: True
- Mass Tolerance: 10 ppm
- S/N Threshold: 3

Processing node 25: Map to Metabolika Pathways

1. Search Settings:

- Metabolika Pathways
- Search Mode: By Formula or Mass

2. By Mass Search Settings:

- Mass Tolerance: 5 ppm

3. By Formula Search Settings:

- Max. # of Predicted Compositions to be searched per Compound: 3

4. Display Settings:

- Max. # Pathways in 'Pathways' column: 20

Processing node 21: Search mzCloud

1. Search Settings:

- Compound Classes: All
- Match Ion Activation Type: True
- Match Ion Activation Energy: Match with Tolerance
- Ion Activation Energy Tolerance: 20
- Apply Intensity Threshold: True
- Precursor Mass Tolerance: 10 ppm
- FT Fragment Mass Tolerance: 10 ppm
- IT Fragment Mass Tolerance: 0.4 Da
- Identity Search: HighChem HighRes
- Similarity Search: Similarity Reverse
- Library: Reference
- Post Processing: Recalibrated
- Match Factor Threshold: 60
- Max. # Results: 10

Processing node 10: Differential Analysis

1. General Settings:

- Log10 Transform Values: True

Processing node 18: Descriptive Statistics

No parameters

FILTERS USED:

- Background is false
- Area (Max.) is greater than 1000
- Formula is not blank
- Group CV [%] is less than 200 in every sample group

10.3 Příloha č. 3 - Nastavení parametrů procesování v softwaru Compound Discoverer 3.0 - projekt AD

Search name: AD chronic plasma/AD chronic brain
Created with Discoverer version: 3.0.0.294

```
[Input Files (0)]
  -->Select Spectra (1)
    [Select Spectra (1)]
      -->Align Retention Times (2)
        [Align Retention Times (2)]
          -->Detect Compounds (3)
            [Detect Compounds (3)]
              -->Group Compounds (4)
                [Group Compounds (4)]
                  -->Fill Gaps (16)
                  -->Predict Compositions (12)
                  -->Search ChemSpider (8)
                  -->Assign Compound Annotations (9)
                    [Fill Gaps (16)]
                      -->Normalize Areas (19)
                        [Normalize Areas (19)]
                          -->Mark Background Compounds
(15)                                     [Mark Background Compounds
(15)]                                     [Predict Compositions (12)]
                                           [Search ChemSpider (8)]
                                           [Assign Compound Annotations
(9)]                                       [Differential Analysis (10)]
                                           [Descriptive Statistics
(18)]
```

Processing node 0: Input Files

Input Data

Processing node 1: Select Spectra

1. General Settings:

- Precursor Selection: Use MS(n - 1) Precursor
- Use Isotope Pattern in Precursor Reevaluation: True
- Provide Profile Spectra: Automatic
- Store Chromatograms: False

2. Spectrum Properties Filter:

- Lower RT Limit: 1

- Upper RT Limit: 19
- First Scan: 0
- Last Scan: 0
- Ignore Specified Scans: (not specified)
- Lowest Charge State: 0
- Highest Charge State: 0
- Min. Precursor Mass: 100 Da
- Max. Precursor Mass: 5000 Da
- Total Intensity Threshold: 0
- Minimum Peak Count: 1

3. Scan Event Filters:

- Mass Analyzer: (not specified)
- MS Order: Any
- Activation Type: (not specified)
- Min. Collision Energy: 0
- Max. Collision Energy: 1000
- Scan Type: Any
- Polarity Mode: (not specified)

4. Peak Filters:

- S/N Threshold (FT-only): 1.5

5. Replacements for Unrecognized Properties:

- Unrecognized Charge Replacements: 1
- Unrecognized Mass Analyzer Replacements: ITMS
- Unrecognized MS Order Replacements: MS2
- Unrecognized Activation Type Replacements: CID
- Unrecognized Polarity Replacements: +
- Unrecognized MS Resolution@200 Replacements: 60000
- Unrecognized MSn Resolution@200 Replacements: 30000

Processing node 2: Align Retention Times

1. General Settings:

- Alignment Model: Adaptive curve
- Alignment Fallback: Use Linear Model
- Maximum Shift [min]: 4
- Shift Reference File: True
- Mass Tolerance: 5 ppm
- Remove Outlier: True

Processing node 3: Detect Compounds

1. General Settings:

- Mass Tolerance [ppm]: 5 ppm
- Intensity Tolerance [%]: 30
- S/N Threshold: 1.5
- Min. Peak Intensity: 3000
- Ions:

```

[2M+ACN+H]+1
[2M+ACN+Na]+1
[2M+H]+1
[2M+K]+1
[2M+Na]+1
[2M+NH4]+1
[M+ACN+H]+1
[M+ACN+Na]+1
[M+H]+1

```

[M+K]+1
[M+Na]+1
[M+NH4]+1
- Base Ions: [M+H]+1
- Min. Element Counts: C H
- Max. Element Counts: C150 H250 Br3 Cl4 K2 N10 Na2 O18 P5 S5

2. Peak Detection:
- Filter Peaks: True
- Max. Peak Width [min]: 0.5
- Remove Singlets: True
- Min. # Scans per Peak: 10
- Min. # Isotopes: 2

Processing node 4: Group Compounds

1. Compound Consolidation:
- Mass Tolerance: 5 ppm
- RT Tolerance [min]: 1

2. Fragment Data Selection:
- Preferred Ions: [M+H]+1

Processing node 16: Fill Gaps

1. General Settings:
- Mass Tolerance: 10 ppm
- S/N Threshold: 1.5
- Use Real Peak Detection: True

Processing node 19: Normalize Areas

1. QC-based Area Correction:
- Regression Model: Linear
- Min. QC Coverage [%]: 30
- Max. QC Area RSD [%]: 50
- Max. # Files Between QC Files: 15

2. Area Normalization:
- Normalization Type: None
- Exclude Blanks: True

Processing node 15: Mark Background Compounds

1. General Settings:
- Max. Sample/Blank: 5
- Max. Blank/Sample: 0
- Hide Background: True

Processing node 12: Predict Compositions

1. Prediction Settings:
- Mass Tolerance: 5 ppm
- Min. Element Counts: C H
- Max. Element Counts: C250 H190 Br5 Cl5 I3 N10 O18 P5 S5
- Min. RDBE: 0

- Max. RDBE: 40
- Min. H/C: 0.1
- Max. H/C: 3.5
- Max. # Candidates: 10
- Max. # Internal Candidates: 200

2. Pattern Matching:

- Intensity Tolerance [%]: 30
- Intensity Threshold [%]: 0.1
- S/N Threshold: 3
- Min. Spectral Fit [%]: 30
- Min. Pattern Cov. [%]: 90
- Use Dynamic Recalibration: True

3. Fragments Matching:

- Use Fragments Matching: True
- Mass Tolerance: 5 ppm
- S/N Threshold: 3

Processing node 8: Search ChemSpider

1. Search Settings:

- Database(s): Human Metabolome Database; KEGG; LipidMAPS; PubMed
- Search Mode: By Formula or Mass
- Mass Tolerance: 5 ppm
- Max. # of results per compound: 100
- Max. # of Predicted Compositions to be searched per Compound: 3
- Result Order (for Max. # of results per compound): Order By Reference Count (DESC)

2. Predicted Composition Annotation:

- Check All Predicted Compositions: False

Processing node 9: Assign Compound Annotations

1. General Settings:

- Mass Tolerance: 5 ppm

2. Data Sources:

- Data Source #1: Predicted Compositions
- Data Source #2: ChemSpider Search
- Data Source #3: (not specified)
- Data Source #4: (not specified)
- Data Source #5: (not specified)

Processing node 10: Differential Analysis

1. General Settings:

- Log10 Transform Values: True

Processing node 18: Descriptive Statistics

No parameters

FILTERS USED:

- Background is false
- Area (Max.) is greater than 3000

- Formula is not blank
- # Usable QC is greater than 5
- Group CV [%] is less than 200 in every sample group