

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI**  
**LÉKAŘSKÁ FAKULTA**

---



**METABOLOMICKÉ NÁSTROJE PRO**  
**IDENTIFIKACI NOVÝCH BIOMARKERŮ**  
**DĚDIČNÝCH METABOLICKÝCH PORUCH**

DISERTAČNÍ PRÁCE

Olomouc 2020

Ing. Jan Václavík

---



**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**  
**LÉKAŘSKÁ FAKULTA**

---



Ing. Jan Václavík

**METABOLOMICKÉ NÁSTROJE PRO**  
**IDENTIFIKACI NOVÝCH BIOMARKERŮ**  
**DĚDIČNÝCH METABOLICKÝCH PORUCH**

DISERTAČNÍ PRÁCE

Školitel: prof. RNDr. Tomáš Adam, Ph.D.

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

Obor: Lékařská chemie a klinická biochemie

Disertační práce byla vypracována během presenční formy doktorského studia na Ústavu lékařské chemie a biochemie Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci v období září 2013–březen 2020.



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

V Olomouci dne 31. 3. 2020

.....

Jan Václavík



## **PODĚKOVÁNÍ**

Mé poděkování patří především prof. RNDr. Tomáši Adamovi, Ph.D. a doc. RNDr. Davidu Friedeckému, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a nemalou dávku trpělivosti. Velké díky patří i celému kolektivu Laboratoře metabolomiky a Laboratoře dědičných metabolických poruch FNOL za odbornou spolupráci, přátelský přístup, vloženu důvěru a psychickou podporu. Poděkování patří i pracovníkům Oddělení klinické biochemie, Transfúzního oddělení a Hemato-onkologické kliniky FNOL za jejich ochotnou spolupráci. Dále bych chtěl poděkovat všem zahraničním kolegům, kteří se semnou podíleli na odborných publikacích.

V neposlední řadě bych rád poděkoval své rodině, partnerce a přátelům za podporu a lásku, kterou mi věnovali.





## BIBLIOGRAFICKÁ IDENTIFIKACE

Jméno a příjmení autora:	Ing. Jan Václavík
Název disertační práce:	Metabolomické nástroje pro identifikaci nových biomarkerů dědičných metabolických poruch.
Název disertační práce anglicky:	Metabolomic tools for identification of new biomarkers of inborn errors of metabolism.
Studijní program:	Lékařská chemie a klinická biochemie
Školitel:	prof. RNDr. Tomáš Adam, Ph.D.
Rok obhajoby:	2020
Klíčová slova v češtině:	metabolomika, strukturní identifikace, biomarkery, novorozenecký screening, dědičné metabolické poruchy, 3-hydroxy-3-methylglutarová acidurie, fenylketonurie, hmotnostní spektrometrie
Klíčová slova v angličtině:	metabolomics, structural elucidation, biomarkers, newborn screening, inherited metabolic disorders, 3-hydroxy-3-methylglutaric aciduria, phenylketonuria, mass spectrometry



## SOUHRN

Navzdory značnému pokroku v diagnostice a přístrojových technologiích jsou dědičné metabolické poruchy (DMP) stále významnou příčinou úmrtí novorozeneých dětí. Pro jejich efektivní diagnostiku a následné monitorování pacientů je za potřebí znát specifické biomarkery těchto chorob. U DMP mohou být nové či specifičtější biomarkery odhaleny analýzou vzorků tělních tekutin, popř. tkání získaných od pacientů a kontrol, pomocí necílené metabolické analýzy. K tomuto účelu lze využít kapalinovou chromatografii ve spojení s vysokorozlišovací hmotnostní spektrometrií (LC-HRMS). Výsledkem takové analýzy je po statistickém zpracování dat seznam nejvýznamnějších charakteristických signálů poměrů hmotnosti ku náboji ( $m/z$ ), které mohou zastupovat diagnosticky informativní biomarkery. Nevýhodou tohoto přístupu je nutnost zpětné identifikace molekulové struktury.

V této práci byly identifikovány a charakterizovány molekulové struktury neznámých  $m/z$  signálů, které byly významně zvýšené ve vzorcích plazmy pacientů s fenylketonurií (PKU) a 3-hydroxy-3-methylglutarovou acidurií (HMGGA). Přesná molekulová hmotnost a víceúrovňová fragmentační spektra  $m/z$  signálů byla naměřena pomocí hybridního hmotnostního spektrometru s lineární iontovou pastí a orbitální iontovou pastí poskytující vysoké rozlišení. Získaná data byla porovnána se spektrálními databázemi a analyzována softwarem predikujícím fragmentační chování molekul. Uvedený postup vedl ke strukturní charakterizaci nových látek, které mohou být využity v diagnostice a následném sledování pacientů s DMP.

V plazmě pacientů s PKU byly charakterizovány dva konjugáty glutamyl-glutamyl-fenylalanin a fenylalanin-glukóza. Oproti hladinám fenylalaninu (Phe), konvenčnímu biomarkeru PKU, vykazovaly tyto látky vyšší variabilitu naměřených hodnot a nižší korelaci s hladinami Phe, což demonstruje jejich potenciální nezávislou informační hodnotu během případného sledování diagnostikovaných pacientů s PKU.

V případě HMGA pacientů byly v plazmě charakterizovány neznámé biomarkery jako tři poziční izomery 3-methylglutakonylkarnitinu, které byly shledány selektivnějšími markery než dosud známý 3-hydroxyizovalerylkarnitin.

V další studii byla provedena necílená metabolická analýza plazmy pacientů s HMGA a kontrol. Mezi nejvíce diskriminujícími metabolity mezi skupinami byly kromě 3-hydroxyizovalerylkarnitinu nalezeny také 3-methylglutakonát a 3-hydroxy-3-methylglutarát. Tyto metabolity byly následně kvantifikovány ve 23 vzorcích krevních skvrn HMGA pacientů a 55 kontrol, aby se ověřil jejich diagnostický potenciál pro novorozenecký screening (NBS). Vzorky byly analyzovány kapalinovou chromatografií ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií a výsledky přesvědčivě poukazují na možnost rozšířit novorozenecký screening o sledování HMGA pomocí zde prezentovaných specifických biomarkerů.

Klíčová slova: metabolomika, strukturní identifikace, biomarkery, novorozenecký screening, dědičné metabolické poruchy, 3-hydroxy-3-methylglutarová acidurie, fenyketonurie, hmotnostní spektrometrie.

## SUMMARY

Despite considerable advancement in diagnostics and technology, inherited metabolic disorders are still a significant cause of newborn deaths. Effective diagnostics and follow-up monitoring require specific biomarkers of these disorders. Novel biomarkers of inherited metabolic disorders can be found by analyzing body fluids of patients and a reference control group of healthy individuals during untargeted metabolomic studies. Liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry can be used for this purpose. After statistical evaluation of the data, a result of such analysis is a list of the most significant and characteristic  $m/z$  signals that might represent diagnostically informative biomarkers whose structural identities must yet be characterized.

The thesis describes the identification and the structural characterization of unknown  $m/z$  signals that were significantly increased in samples of patients suffering from phenylketonuria and 3-hydroxy-3-methylglutaric aciduria. Accurate masses and multistage fragmentation spectra of unknown  $m/z$  signals were acquired using a hybrid mass spectrometer with linear and orbital ion traps which provides a high-resolution mass spectra. The obtained data were queried against spectral databases and analyzed by software predicting fragmentation behavior of molecules. This methodology led to structural elucidation of novel compounds that might be utilized in diagnostics and follow-up monitoring of patients. Two conjugates of glutamyl-glutamyl-phenylalanine and phenylalanine-glucose were characterized in plasma samples of phenylketonuria patients. These novel markers showed high interpatient variation and did not correlate to levels of a convention biomarker of phenylketonuria, phenylalanine, illustrating their potential added value for follow-up monitoring of these patients.

In the case of novel markers for 3-hydroxy-3-methylglutaric aciduria, three positional isomers of 3-methylglutaconylcarnitine, which are more selective biomarkers than currently used 3-hydroxyisovalerylcarnitine, were characterized in plasma samples of patients.

The last study described in the thesis is an untargeted metabolomic analysis of plasma samples of 3-hydroxy-3-methylglutaric aciduria patients and age-

matched controls. Besides 3-hydroxyisovalerylcarnitine, also 3-methylglutaconate and 3-hydroxy-3-methylglutarate were found among the most discriminating metabolites between patients and controls. These metabolites were then quantified in 23 dried blood spots of patients suffering from 3-hydroxy-3-methylglutaric aciduria and 55 controls in order to evaluate their diagnostic potential for newborn screening programs. Samples were analyzed by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry and the results clearly demonstrate applicability of these novel markers in newborn screening to diagnose 3-hydroxy-3-methylglutaric aciduria.

Keywords: metabolomics, structural elucidation, biomarkers, newborn screening, inherited metabolic disorders, 3-hydroxy-3-methylglutaric aciduria, phenylketonuria, mass spectrometry.

# OBSAH

1	ÚVOD .....	- 1 -
2	TEORETICKÁ ČÁST .....	- 3 -
2.1	Dědičné metabolické poruchy .....	- 3 -
2.1.1	Klasifikace dědičných metabolických poruch.....	- 4 -
2.1.2	Fenylketonurie (hyperfenylalaninémie) .....	- 6 -
2.1.3	3-Hydroxy-3-methylglutarová acidurie.....	- 9 -
2.2	Laboratorní novorozenecký screening .....	- 13 -
2.2.1	Historie novorozeneckého screeningu.....	- 14 -
2.2.2	Kritéria choroby pro zařazení do novorozeneckého screeningu .	- 14 -
2.2.3	Novorozenecký screening v ČR .....	- 15 -
2.3	Metabolomika.....	- 16 -
2.3.1	Přístrojové vybavení pro metabolomickou analýzu .....	- 18 -
2.3.2	Cílená metabolomika.....	- 20 -
2.3.3	Necílená metabolomika .....	- 21 -
2.3.4	Statistické zpracování metabolomických LC-MS dat .....	- 22 -
2.3.5	Statistická analýza a vizualizace metabolomických LC-MS dat.	- 23 -
2.3.6	Strukturní identifikace neznámých látek .....	- 27 -
3	CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE .....	- 30 -
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	- 31 -
4.1	Chemikálie.....	- 31 -
4.2	Přístrojové vybavení.....	- 31 -
4.3	Strukturní identifikace nových biomarkerů známých dědičných metabolických poruch na základě vícestupňových fragmentačních spekter-	- 32 -
4.3.1	Materiál a metody .....	- 32 -



4.3.1.1	Vzorky.....	32 -
4.3.1.2	Výběr biomarkerů necílenou metabolickou analýzou .....	33 -
4.3.1.3	Strukturní identifikace biomarkerů .....	34 -
4.3.2	Výsledky .....	35 -
4.3.2.1	Výběr biomarkerů .....	35 -
4.3.2.2	Vícestupňová fragmentační analýza pomocí Orbitrapu Elite-	38 -
4.3.2.2.1	Fenylketonurie .....	38 -
4.3.2.2.2	Deficit 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyázy.....	46 -
4.3.3	Diskuze .....	48 -
4.4	Diagnostika 3-hydroxy-3-methylglutarové acidurie v rámci novorozeneckého screeningu .....	50 -
4.4.1	Materiál a metody .....	50 -
4.4.1.1	Vzorky.....	50 -
4.4.1.2	Metody .....	51 -
4.4.1.2.1	Necílená metabolická analýza .....	53 -
4.4.1.2.2	Cílená LC-MS analýza krevních skvrn .....	55 -
4.4.2	Výsledky .....	58 -
4.4.2.1.1	Necílená metabolická analýza .....	58 -
4.4.2.1.2	Cílená LC-MS analýza krevních skvrn .....	62 -
4.4.3	Diskuze .....	64 -
5	ZÁVĚR .....	66 -
5.1	Strukturní identifikace nových biomarkerů známých dědičných metabolických poruch na základě vícestupňových fragmentačních spekter-	66 -
5.2	Diagnostika deficitu 3-hydroxy-3-methylglutarové acidurie v rámci novorozeneckého screeningu .....	67 -
6	VÝHLEDY .....	68 -

6.1	Strukturní identifikace nových biomarkerů známých dědičných metabolických poruch na základě vícestupňových fragmentačních spekter-	68 -
6.2	Diagnostika deficitu 3-hydroxy-3-methylglutarové acidurie v rámci novorozeneckého screeningu .....	68 -
7	SEZNAM ZKRATEK .....	69 -
8	LITERATURA .....	71 -
9	SEZNAM PRACÍ .....	80 -
9.1	Publikace vztahující se k disertaci .....	80 -
9.2	Ostatní publikace .....	80 -
9.3	Příspěvky na konferencích vztahující se k disertaci .....	81 -
9.4	Ostatní příspěvky na konferencích .....	84 -
10	PŘÍLOHY .....	88 -
10.1	Kompletní seznam nastavených parametrů Compound Discovereru 3.0 během peak-pickingu .....	88 -

# 1 ÚVOD

Dědičné metabolické poruchy (DMP) jsou heterogenní skupinou chorob, jejichž počet vlivem pokroku v diagnostice a technologiích neustále roste. Programy novorozeneckého screeningu v mnoha zemích světa mají za úkol odhalit nejfrekvenčnější poruchy, u nichž včasná diagnóza může zabránit nevratnému poškození zdraví pacienta. Přesto všechno jsou DMP významnou příčinou úmrtí novorozeneckých dětí. Klíčem k efektivní diagnostice a léčbě těchto chorob jsou specifické biomarkery tělních tekutin, které dokážou tyto onemocnění odhalit v preklinickém stádiu. V ideálním případě by měli rovněž predikovat a monitorovat odpověď na léčbu. Specifické biomarkery DMP mohou být odhaleny necílenou metabolickou analýzou tělních tekutin, která kombinuje současné separační techniky s hmotnostní spektrometrií s vysokým rozlišením (HRMS). Správné provedení necílené metabolické analýzy se skládá z mnoha dílčích kroků, kde chyba v jediném z nich může vést k milným závěrům studie. Počínaje jednotným a reprodukovatelným odběrem vzorku přes samotné provedení analýzy kapalinovou chromatografií ve spojení s vysokorozlišovací hmotnostní spektrometrií až po korektní úpravu naměřených dat, jejich správné statistické zpracování a vizualizaci. Výsledkem dobře provedené metabolické analýzy je seznam statisticky nejvíce diskriminujících  $m/z$  signálů, které mohou reprezentovat diagnosticky významné biomarkery studované DMP. Kritickou součástí metabolických analýz je strukturní identifikace  $m/z$  signálů, které oddělují skupinu pacientů s konkrétní DMP a kontrolní skupinu (zdravé jedince).

Tato práce popisuje metabolické nástroje k odhalení a následnou strukturní identifikaci nových biomarkerů dvou DMP s využitím LC-HRMS přístroje, který umožňuje měření vícestupňových fragmentačních spekter s vysokým rozlišením. Tento přístup je demonstrován na fenylketonurii, chorobě, která byla jako první zařazena do programů novorozeneckého screeningu řady zemí už v 60. letech 19. století a je zřejmě nejlépe prostudovanou DMP. Nicméně diagnostika i následné klinické sledování PKU pacientů je stále založené na měření

zvýšené hladiny Phe ve spojení s poměrem Phe a tyrozinu (Tyr). Podle nedávných studií z roku 2017 [1], [2], které se zabývali dlouhodobým klinickým stavem časně diagnostikovaných PKU pacientů, se vždy nedaří docílit požadovaného dobrého zdravotního stavu pacientů jen pomocí udržování hladiny Phe pod 360  $\mu\text{mol/l}$  v krvi. Z pohledu klinické praxe je proto stále poptávka po biomarkerech PKU, které by lépe reflektovali odpověď na léčbu a predikovali budoucí zdravotní stav.

Druhou chorobou, pro kterou byly hledány nové specifické biomarkery metabolickou analýzou, byla HMGA. Tuto velice vzácnou poruchu lze v současnosti diagnostikovat pomocí selektivního metabolického screeningu. Její primární plazmatický biomarker 3-hydroxyizovalerylkarnitin je ale nespecifický, a proto je zapotřebí provést potvrzovací analýzu organických kyselin v moči nebo analýzu enzymových aktivit v leukocytech. V obou případech musí pacient poskytnout dodatečný vzorek moče nebo plné krve. Motivací této práce bylo nalézt selektivní biomarker, který by umožňoval diagnostiku HMGA přímo ze vzorku krevní skvrny v rámci novorozeneckého screeningu.

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Dědičné metabolické poruchy

Vrozené vady metabolismu jsou heterogenní skupinou chorob, které mohou být dědičné nebo vzniknout indukovanou či spontánní mutací. Důsledkem těchto mutací jsou během proteosyntézy tvořeny enzymy či transportní proteiny s pozměněnou primární strukturou, která může ovlivnit jejich funkci, lokalizaci nebo zcela zastavit jejich syntézu. Podle funkce defektního proteinu/enzymu v metabolismu se odvíjí klinické projevy onemocnění. V případě snížené či zcela chybějící enzymové aktivity dochází k hromadění substrátů metabolické dráhy před tímto blokem. Tyto látky také mohou vstupovat do alternativních biochemických procesů. Zvýšená koncentrace substrátů či jejich vedlejších produktů může být pro buňku toxická a závažně tak ovlivňovat její funkci. Zásadní vliv na organismus může mít i nedostatek produktu ovlivněné enzymové reakce. Další příčinou DMP mohou být patologické změny ve strukturních proteinech buněčných membrán, krevních bílkovinách neenzymové povahy, transportních proteinech nebo receptorech [3].

Přestože mají jednotlivé DMP velice nízký výskyt, jako celek jsou významnou příčinou úmrtí novorozenců dětí [4]. Starší studie uvádějí kumulativní výskyt DMP 1/800 [5] nebo dokonce 1/500 [6]. Nejnovější studie však popisují méně jak 1/2000 nově narozených dětí [7]. Pro metabolické poruchy jsou typické nejednoznačné klinické příznaky, které komplikují jejich rozpoznávání. Díky technologickému pokroku počet popsanych chorob a diagnostika pacientů neustále roste. Proto se dá předpokládat, že jejich skutečný kumulativní výskyt bude ještě vyšší.

Až dvě třetiny DMP vykazují autosomálně recesivní dědičnost. Příkladem může být fenylketonurie (PKU) nebo HMGGA. Vzácněji (21 %) se vyskytují poruchy s autosomálně dominantní dědičností, u kterých stačí, aby jedinec nesl jednu defektní alelu a onemocnění se projeví. Příkladem může být Huntingtonova choroba, která se většinou rozvíjí po dosažení věku 30-40 let. Pokud takto postižený jedinec má potomky se zdravým partnerem, šance na přenos poruchy je

50 % [8]. Ještě vzácnější je X-vázaná dědičnost (6 %), příkladem je Fabryho choroba, a dále nemoci spojené s mitochondriální dědičností (6 %) [4].

### **2.1.1 Klasifikace dědičných metabolických poruch**

Z pohledu patofyziologie lze DMP rozdělit do tří skupin [9]. Choroby vedoucí k intoxikaci organismu, poruchy energetického metabolismu a poruchy biosyntézy nebo degradace komplexních molekul.

Do první skupiny zahrnujeme poruchy metabolismu, u kterých dochází k hromadění často toxických substrátů před metabolickým blokem, což vede k postupné nebo akutní intoxikaci. Patří sem poruchy metabolismu aminokyselin (například PKU, alkaptonurie, argininémie a jiné), organické acidurie (HMGA, izovalerová acidurie, methylmalonová acidurie a další), vrozené vady metabolismu močovinového cyklu (deficit ornithintranskarbamoylázy), sacharidové intolerance (galaktosémie), choroby způsobené intoxikací kovů (Wilsonova choroba) a poruchy syntézy hemu (porfýrie). Společným znakem těchto chorob je fyziologický embryonální a fetální vývoj. Manifestace symptomů intoxikace nastává nepravidelně, až po určité době, a to buď akutně (selhání jater, zvracení, kóma atd.) nebo chronicky (opožděný psychomotorický vývoj, neprospívání, kardiomyopatie a jiné). Spouštěčem akutní metabolické krize může být horečka, katabolismus, přidružené onemocnění nebo příjem potravy [9].

Diagnóza se určuje pomocí analýzy krve, moči, popřípadě cerebrospinální tekutiny, ve kterých se stanovují nefyziologické koncentrace aminokyselin, organických kyselin, acylkarnitinů a sacharidů. Diagnóza musí být potvrzena na základě genetického testování fibroblastů nebo leukocytů pacienta, neboť zvýšenou hladinu výše uvedených metabolitů může krátkodobě způsobit i strava. Většina těchto chorob je léčitelná prostřednictvím rychlého odstranění nahromaděných toxických látek pomocí speciálně upravené stravy, dialýzy a/nebo podáním “detoxikačních“ léčiv (L-karnitinu, benzoátu sodného, penicilaminu aj.). I přes některé odlišnosti v patofyziologii se do této skupiny řadí i vrozené vady biosyntézy a katabolismu neurotransmiterů (kyselina gama-aminomáselná,

monoaminy a glycin) a vrozené vady biosyntézy aminokyselin serinu, glutaminu, prolinu a ornitinu) [9].

Do druhé skupiny DMP patří choroby vyznačující se symptomy způsobené nedostatečnou produkcí či využitím energie jaterní tkání, svalstvem, mozkem, myokardem a dalšími. Dělíme je dále na závažné, často neléčitelné mitochondriální energetické defekty a méně závažné cytoplazmatické energetické defekty. Mitochondriální choroby zahrnují vrozené laktátové acidémie (poruchy přenosu pyruvátu, poruchy pyruvátkarboxylázy, pyruvátdehydrogenázy a enzymů Krebsova cyklu), poruchy dýchacího řetězce,  $\beta$ -oxidace a tvorby ketolátek. Pouze poruchy týkající se tvorby ketolátek a biosyntézy ubichinonu jsou částečně léčitelné [9]. Cytoplazmatické energetické defekty jsou obecně méně závažné. Patří sem neléčitelné vrozené poruchy pentózofosfátové dráhy. Dále defekty kreatinového metabolismu, z nichž některé jsou léčitelné, a v neposlední řadě léčitelné poruchy v metabolických drahách glykolýzy, glukoneogeneze a glykogenu. Symptomy druhé skupiny DMP jsou nejčastěji hypoglykémie, hepatomegalie, hyperlaktátémie, hypotonie, kardiomyopatie, selhání oběhového systému, poškození mozku, neprospívání a syndrom náhlého úmrtí novorozence. Některé mitochondriální choroby a poruchy pentózofosfátové dráhy mohou ovlivňovat embryofetální vývoj a způsobovat tak dysmorfismus, dysplazii či malformace [10]. Diagnóza těchto chorob je obtížná, neboť je založena na funkčních testech, enzymové analýze vyžadující biopsii.

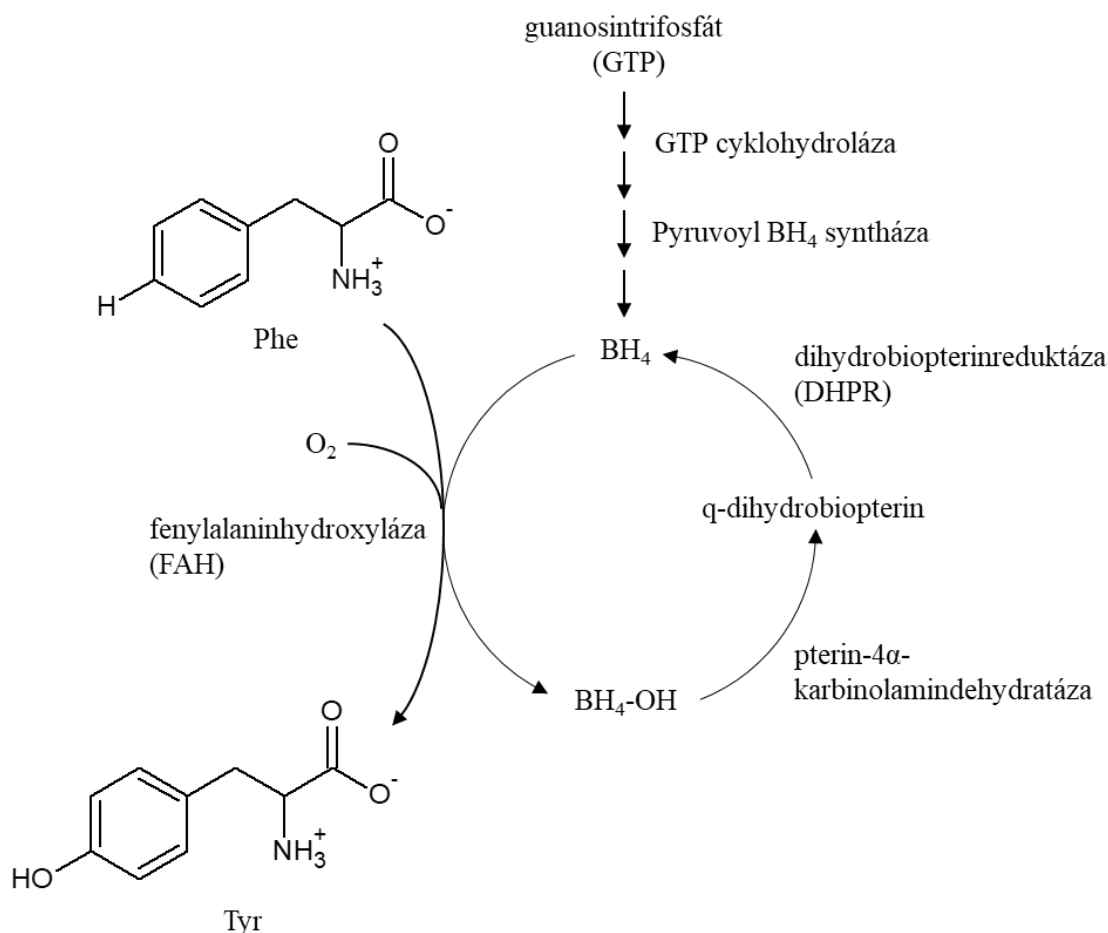
Třetí skupina DMP zahrnuje choroby narušující biosyntézu nebo degradaci komplexních molekul. Symptomy se postupně vyvíjí, jsou trvalé a nejsou ovlivněny stravou. Patří sem především lyzozomální a peroxizomální poruchy, choroby nitrobuněčného transportu a poruchy biosyntézy cholesterolu. Většina těchto onemocnění je zatím neléčitelná, avšak pacienti s některými lyzozomálními poruchami mohou být léčeni pomocí enzymové terapie [11].

Vzhledem k zaměření této disertační práce byly podrobněji zpracovány dvě DMP, a to PKU a HMGA.

### 2.1.2 Fenyلكetonurie (hyperfenylalaninémie)

Zvýšená hladina Phe (hyperfenylalaninémie – HFA) u novorozených dětí může být důsledkem řady příčin. Nejznámější onemocnění vedoucí k abnormální koncentraci fenylalaninu v krvi je klasická fenyلكetonurie (PKU, OMIM 261600). Tato autozomálně recesivní porucha je způsobená mutacemi v genu kódující fenylalaninhydroxylázu (FAH, EC 1.14.16.1), přeměňující Phe na Tyr. Jeho kofaktorem je tetrahydrobiopterin (BH<sub>4</sub>) jehož anomálie v biosyntéze či regeneraci vedou také k HFA [12], viz obrázek 1. Déle trvající HFA s koncentrací Phe nad 360–600 μmol/l a nízkou hladinou Tyr negativně ovlivňuje vývoj mozku novorozených dětí a způsobuje postupující mentální retardaci, spasticitu, epilepsii, bledou pleť, světlé vlasy, modré oči, kožní vyrážky a psychiatrické problémy [12]. Těmto zdravotním komplikacím se lze vyhnout díky včasné diagnóze a zavedení speciální stravy ochuzené o Phe a pravidelné dávkování chybějícího Tyr. V ideálním případě má být léčba zahájena co nejdříve, nejpozději dva týdny po porodu [13].

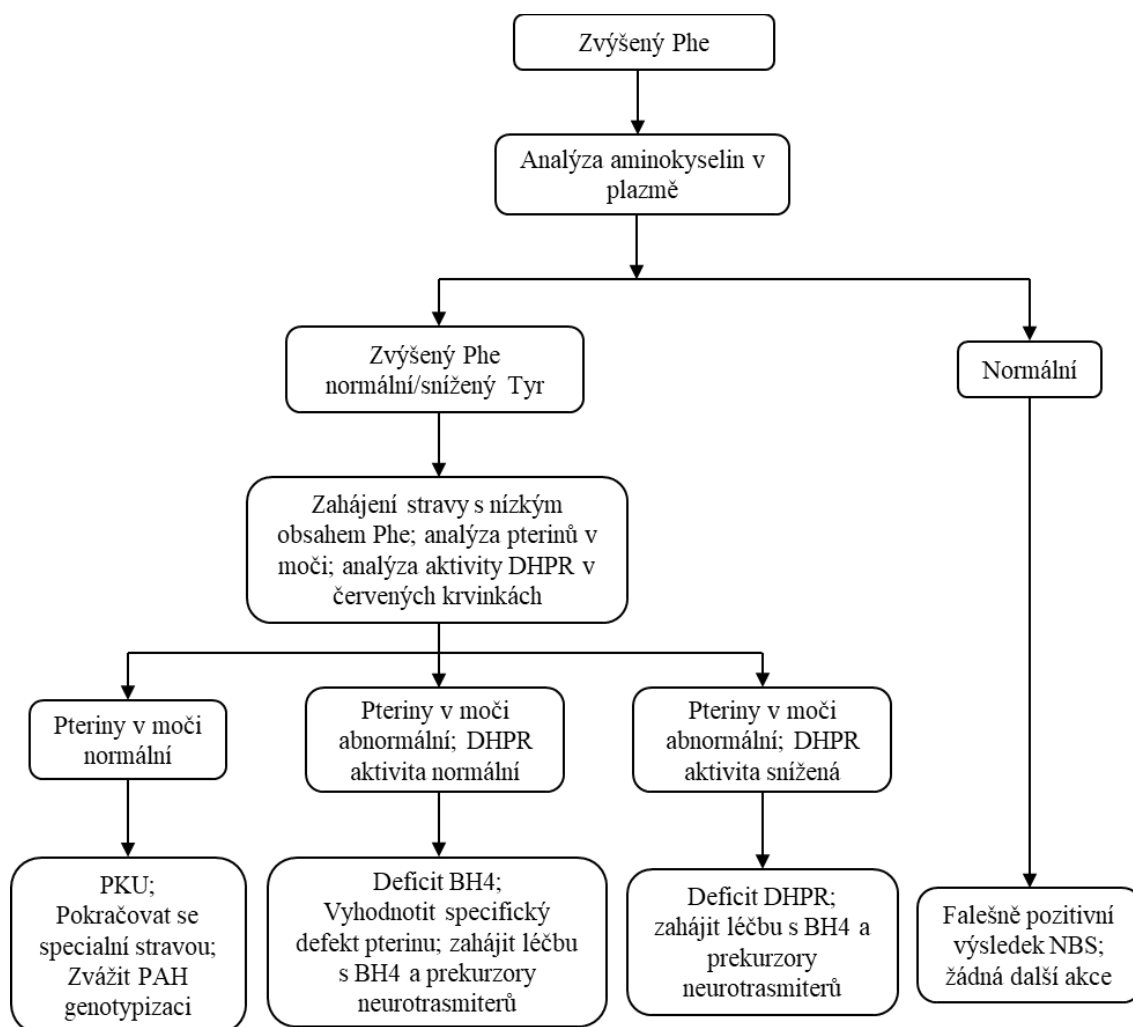




**Obrázek 1.** Metabolická dráha přeměny Phe a Tyr a s ní spojená cyklická dráha prekursoru tetrahydrobiopterinu.

Kromě klasické PKU může být příčinou zvýšené hladiny Phe podání parenterální výživy, léčiv (trimethoprim, chemoterapeutik) a jaterní onemocnění [14].

Většina novorozenců s významnou HFA trpí deficitem FAH. Četnost této poruchy se liší mezi etnickými skupinami a geografickými oblastmi světa. V České republice je výskyt uváděn v rozmezí 1/8000-1/10000 [15], zatímco celosvětový výskyt ve screenovaných populacích je přibližně 1/12000 [9]. Z praktických důvodů se deficit FAH dělí na dvě skupiny: PKU vyžadující léčbu a mírná HFA, u které není většinou léčba potřebná (Phe <360  $\mu$ mol/l). Obrázek 2 zobrazuje pracovní postup v případě detekce HFA odhalené pomocí novorozeneckého screeningu podle ACT listu vypracovaného American College of Medical Genetics and Genomics [16].



**Obrázek 2.** Diagram zobrazující doporučený postup v případě detekce HFA odhaleného pomocí novorozeneckého screeningu (upraveno podle [16]).

Vysoká hladina Phe v krevních skvrnách by měla být ověřena kvantitativní analýzou aminokyselin v krvi (plazmě), aby se potvrdila jak hladina Phe, tak i snížená koncentrace Tyr. Pro diagnózu PKU je limitní hodnota koncentračního poměru Phe/Tyr < 3 [14]. Neléčení pacienti s klasickou PKU mívají koncentraci Phe obvykle vyšší než 1000  $\mu\text{mol/l}$  [17]. Pro vyloučení zvýšené hladiny Phe z důvodu deficitu kofaktoru BH<sub>4</sub> se provádí analýza pterinů v moči nebo krevní skvrně a stanovuje se aktivita dihydropteridinreduktázy (DHPR) v krvi. Přídavná léčba pomocí komerčně dostupného syntetického BH<sub>4</sub> může mít terapeutický význam a předepisuje se pacientům, u kterých došlo k alespoň 30 % snížení hladiny Phe v krvi po jednorázovém podání 10 mg BH<sub>4</sub>/kg váhy pacienta [18].

Odhaduje se, že pozitivně na tuto doplňkovou léčbu reaguje 25-50 % pacientů trpících HFA [14]. Doporučená terapeutická hladina Phe se v různých zemích liší, avšak v prvních 6-10 letech PKU pacienta by se měla udržovat mezi 120-360  $\mu\text{mol/l}$  [19]. Po dosažení adolescence se mohou stravovací omezení zmírnit. Mezi odborníky však nepanuje shoda, jestli je pro PKU pacienty po dosažení dospělosti léčba nutná [14].

Před početím a během těhotenství matky s fenylketonurií se striktně musí dodržovat hladina Phe pod 360  $\mu\text{mol/l}$  aby se minimalizovalo riziko teratogenních efektů na vyvíjející se plod [17], [18].

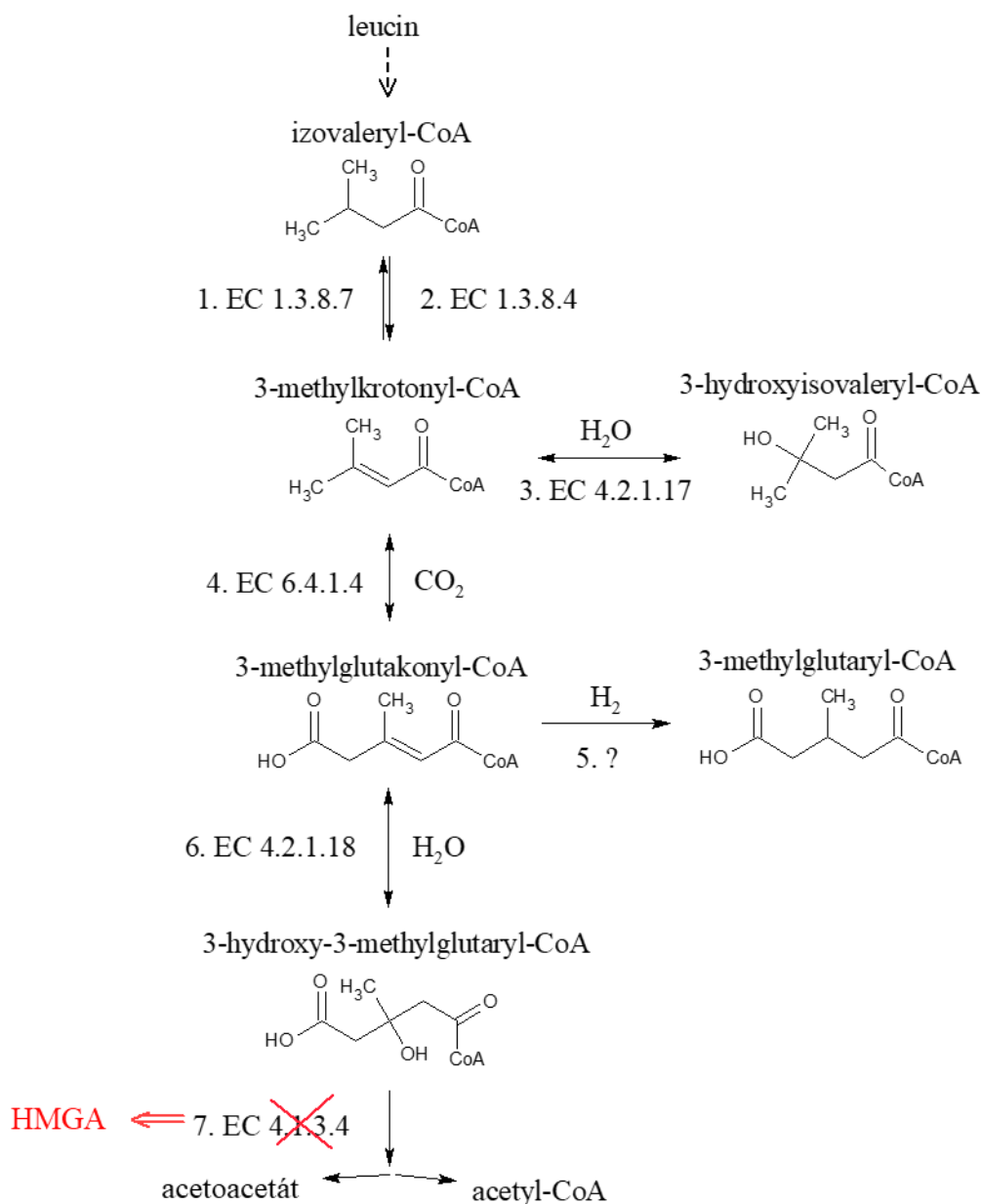
Mezi známé laboratorní nálezy PKU pacientů patří kromě vysoké hladiny Phe a snížené koncentrace Tyr v krvi i zvýšené koncentrace fenylpyruvátu (fenylketon), fenyllaktátu, fenylacetátu, 2-hydroxyfenylacetátu a N-fenylacetylglutamátu v moči pacientů [21]. Fenylacetát je vylučován i potem a způsobuje typický zatuchlý až myší zápach kůže a moči pacientů. Celková bledost, světlá kůže a vlasy jsou způsobené nedostatkem pigmentu melaninu, jehož prekurzorem je deprivovaný Tyr.

Diagnóza i následné kontrolní analýzy v průběhu života PKU pacientů závisí převážně na sledování koncentrace Phe (poměru Phe/Tyr) v plazmě pacientů. Nicméně i přes precizní pravidelnou kontrolu hladiny Phe v plazmě PKU pacientů se ne vždy dosahuje kýženého dobrého zdravotního stavu [1], [2]. Z toho pohledu je v klinické praxi stálá poptávka po biomarkerech PKU, které dokážou lépe reflektovat odpověď na léčbu a lépe predikovali budoucí zdravotní stav.

### **2.1.3 3-Hydroxy-3-methylglutarová acidurie**

3-Hydroxy-3-methylglutarová acidurie, neboli deficit 3-hydroxy-3-methylglutaryl koenzym A lyázy (HMG-CoA lyáza, OMIM 246450), je vzácná, autosomálně recesivní DMP způsobená mutacemi genu kódující HMG-CoA lyázu (EC 4.1.3.4). Tento mitochondriální enzym katalyzuje štěpení HMG-CoA na acetyl-CoA a acetoacetát. Přeměna je součástí posledního kroku leucinové degradační dráhy (Obrázek 3) a je využívána během biosyntézy ketolátek. Moč

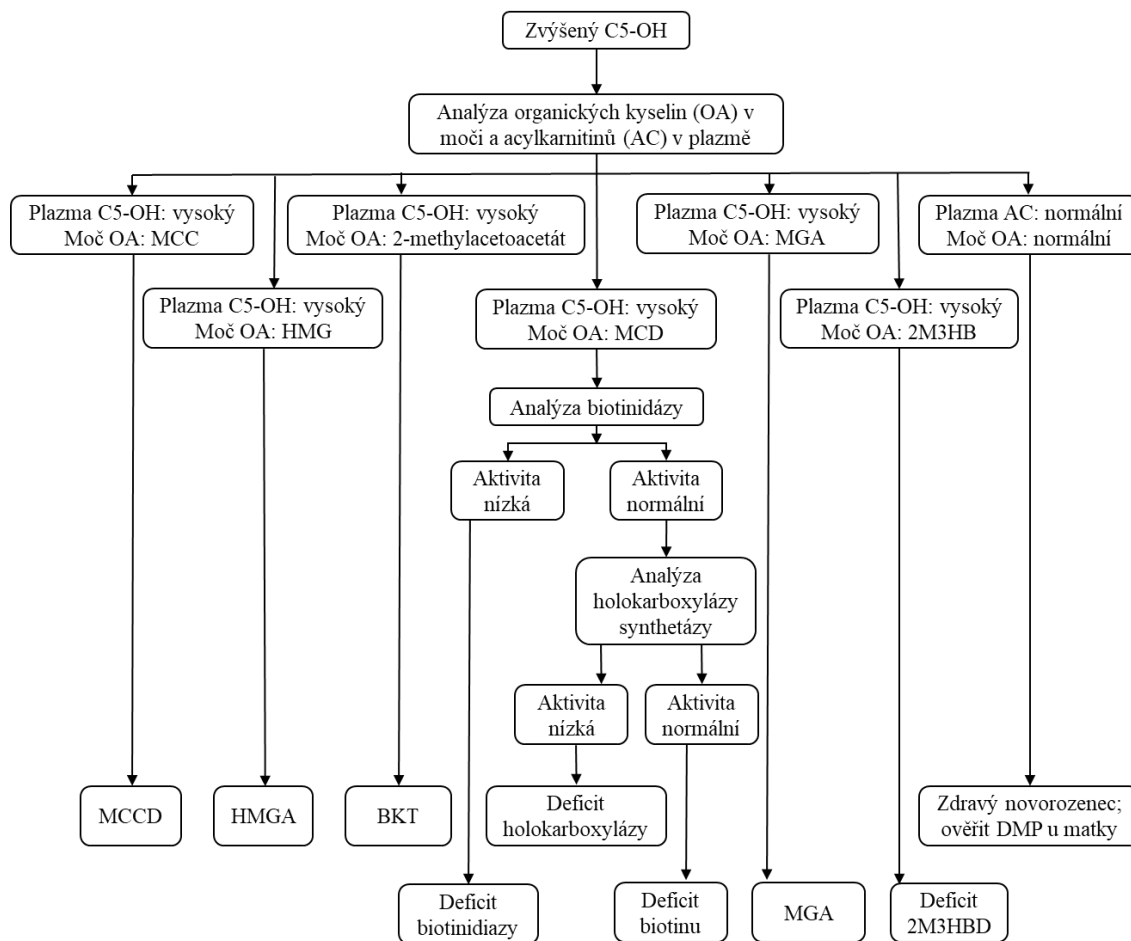
pacientů vykazuje zvýšenou exkreci 3-hydroxyisovalerátu (3HIV), 3-methylglutakonátu (3MGC), 3-hydroxy-3-methylglutarátu (HMG), 3-methylglutarátu (3MG) a v některých případech 3-methylkrotonylglycinu. V plazmě pacientů bývá zvýšená koncentrace 3-hydroxyizovalerylkarnitinu (3HIV-K) [22], 3-methylglutaryl karnitinu (3MG-K) [23] a tří izomerů 3-methylglutakonyl karnitinu (3MGC-K) [24]. Pacienti mohou trpět závažnou metabolickou krizí, která může být doprovázená záchvaty, letargií, hypotonií, zvracením a acidózou s hypoketotickou hypoglykemií, která může vyústit v nevratná neurologická poškození, kóma i smrt [25]. U většiny pacientů se choroba projeví v prvním roce života a u přibližně poloviny z nich během novorozeneckého období. Nejčastějšími spouštěči metabolické krize jsou déle trvající hladovění, onemocnění, katabolický stres a nadměrná fyzická aktivita.



**Obrázek 3:** Metabolická dráha leucinové degradace s vyznačenými DMP. Enzymy této dráhy jsou: EC 1.3.8.7, acyl-CoA dehydrogenáza mastných kyselin se středně dlouhým řetězcem; 2, EC 1.3.8.4, izovaleryl-CoA dehydrogenáza; 3, EC 4.2.1.17, 3-methylkrotonyl-CoA hydratáza; 4, EC 6.4.1.4, 3-methylkrotonyl-CoA karboxyláza; 5, neznámý; 6, EC 4.2.1.18, 3-methylglutakonyl-CoA hydratáza; 7, EC 4.1.3.4, 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyáza.

Diagnóza HMGA bývá stanovena po nástupu první metabolické krize. Vzhledem k symptomům je indikován selektivní metabolický screening, který je založen na analýze krevní skvrny pomocí tandemové hmotnostní spektrometrie

(MS/MS) v módu “selected-reaction monitoring“ (SRM – sledování produktů rozpadu molekulového iontu). Pro HMGA je diagnosticky významný přechod 262/85, který zastupuje nederivatizované C4-DC a C5-OH acylkarnitiny. Avšak tento SRM přechod poskytují celkově čtyři isobarické acylkarnitiny (3HIV-K, 2-methyl-3-hydroxybutyrylkarnitin, methylmalonylkarnitin a sukcinylkarnitin), které společně poukazují na celou řadu DMP (deficit 3-methylkrotonyl-CoA karboxylázy (MCCD), HMGA, deficit  $\beta$ -ketothiolázy (BKT), 3-methylglutakonovou acidurii (MGCA), deficit 2-methyl-3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenázy (2M3HBD), methylmalonovou acidémii, mnohočetný deficit karboxyláz (MCD), deficit sukcinyl-CoA ligázy a choroby způsobené mutacemi v genech kódujících  $\alpha$  a  $\beta$  podjednotku ADP-dependentní sukcinyl-CoA syntetázy, známé jako deficit SUCLA2 [26]). Některé laboratoře používají derivatizační krok (butylaci) před analýzou acylkarnitinů, aby odlišili jejich dikarboxylové formy. Avšak sledování butylovaného C5-OH acylkarnitinu pomocí SRM přechodu 318/85 také poukazuje na více chorob (MCCD, HMGA, MCD a MGCA) [27]. Aby se rozhodlo mezi těmito chorobami a potvrdila finální diagnóza, musí pacient poskytnout vzorek plné krve pro analýzu enzymových aktivit v leukocytech nebo vzorek moči pro analýzu organických kyselin. Obrázek 4 zobrazuje doporučený postup v případě detekce zvýšené koncentrace C5-OH acylkarnitinu odhaleného pomocí selektivního metabolického screeningu podle ACT listu vypracovaného American College of Medical Genetics and Genomics [16]. Z výše uvedených chorob má nejvyšší výskyt MCCD (1:40000). Avšak je odhadováno, že až 95 % případů je benigních a nevyžadují žádnou lékařskou intervenci [28]. Tato skutečnost odráží fakt, že míra falešně pozitivních případů (odhalených prostřednictvím SRM rozpadu 262/85) je příliš vysoká na to, aby se tento SRM přechod zařadil do primárního novorozeneckého screeningu.



**Obrázek 4.** Diagram zobrazující doporučený postup v případě detekce zvýšeného C5-OH odhaleného pomocí selektivního metabolického screeningu (upraveno podle [16]).

## 2.2 Laboratorní novorozenecký screening

Úkolem laboratorního NBS je aktivní celoplošné vyhledávání vrozených a dědičných chorob v preklinickém stádiu. Smyslem je diagnostikovat a zahájit léčbu choroby dříve, než dojde k nástupu symptomů a zabránit tak případnému nevratnému poškození zdraví dítěte. Principem je analýza definovaného výřezu suché kapky krve na filtračním papíru, během kterého se stanovují koncentrace specifických látek (biomarkery jednotlivých DMP [14]). Odběr kapky krve novorozence se provádí v rozmezí mezi 48. – 72. hodinou po narození.

### **2.2.1 Historie novorozeneckého screeningu**

První metodu NBS pro celoplošné vyhledávání PKU pacientů společně s metodikou odběru suché kapky krve představil Robert Guthrie a Ada Susi v roce 1963 [29]. Jejich metoda bakteriálního inhibičního testu byla brzy modifikována a následně aplikována pro detekci jiných DMP (např. galaktozémie, leucinózy, homocystinurie a jiných). První enzymové analýzy pro účely novorozeneckého screeningu byly vyvinuty pro galaktozémii v roce 1964 [30] a pro deficit biotinidázy v roce 1984 [31]. V roce 1975 byla publikována imunoanalýza pro detekci novorozenecké hypotyreózy [32] a během následujících let pro kongenitální adrenální hyperplazii, cystickou fibrózu, deficit glukóza-6-fosfát dehydrogenázy a mnoho dalších. Bakteriální inhibiční testy byly postupně nahrazovány fluorimetrickými metodami v 80. a 90. letech. Využití metod molekulární genetiky pro účely NBS bylo poprvé představeno v roce 1988 [33]. Aplikace MS/MS pro NBS byla poprvé publikována v roce 1990 [34] a významně tak ovlivnila tento obor. Díky jednoduché přípravě vzorků, vysoké míry automatizace a možnosti detekovat mnoho analytů (biomarkerů) v jediné analýze, umožnila tato technologie zařazení řady DMP do NBS programů mnoha zemí. Důležitou vlastností je i jednoduchost v přidávání dalších vyšetřovaných chorob/biomarkerů při zachování časové a finanční náročnosti stávající analytické metody.

### **2.2.2 Kritéria choroby pro zařazení do novorozeneckého screeningu**

Už v roce 1968 Wilson a Jungner [35] definovali kritéria, které musí daná choroba splňovat, aby byla zařazena do NBS. Od té doby byla několikrát přepracována až do současné podoby, kterou vyhotovil Watson a kolektiv v roce 2006 [36] pro American College of Medical Genetics and Genomics. Pravidla se dají shrnout do dvou hlavních kritérií, při jejichž splnění by se daná choroba měla screenovat: detekce choroby v novorozeneckém období je přínosná pro pacienta a celkový benefit včasné detekce by měl být rozumně vyvážen rizikem spojeným s falešně pozitivním nebo falešně negativním výsledkem testu. Je důležité si



uvědomit, že NBS zaštiťuje celý proces od odběru vzorku až po adekvátní doporučení o zahájení léčby včetně zhodnocení celkového dopadu NBS programu na pacienta.

### 2.2.3 Novorozenecký screening v ČR

V České republice se od 1. 6. 2016 vyšetřuje v rámci NBS 18 chorob (převzato z [37]):

1. cystická fibróza
- endokrinní onemocnění
  2. kongenitální hypotyreóza
  3. kongenitální adrenální hyperplazie
- dědičné poruchy metabolismu
  4. argininémie
  5. citrulinémie I. typu
  6. deficit acyl-CoA dehydrogenázy mastných kyselin se středně dlouhým řetězcem
  7. deficit acyl-CoA dehydrogenázy mastných kyselin s velmi dlouhým řetězcem
  8. deficit biotinidázy
  9. deficit 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenázy mastných kyselin s dlouhým řetězcem
  10. deficit karnitinpalmitoyltransferázy I
  11. deficit karnitinpalmitoyltransferázy II
  12. deficit karnitinacylkarnitintranslokázy
  13. fenylketonurie a hyperfenylalaninémie
  14. glutarová acidurie typ I
  15. homocystinurie z deficitu cystathionin  $\beta$ -syntházy, pyridoxin neresponzivní forma
  16. homocystinurie z deficitu methylenetetrahydrofolátreduktázy
  17. izovalerová acidurie

## 18. leucinóza (nemoc javorového sirupu)

Na stránkách <https://www.novorozeneckyscreening.cz/> (online přístup 22. 12. 2019) se uvádí, že kumulativní výskyt výše uvedených onemocnění v České republice je přibližně 1/1150.

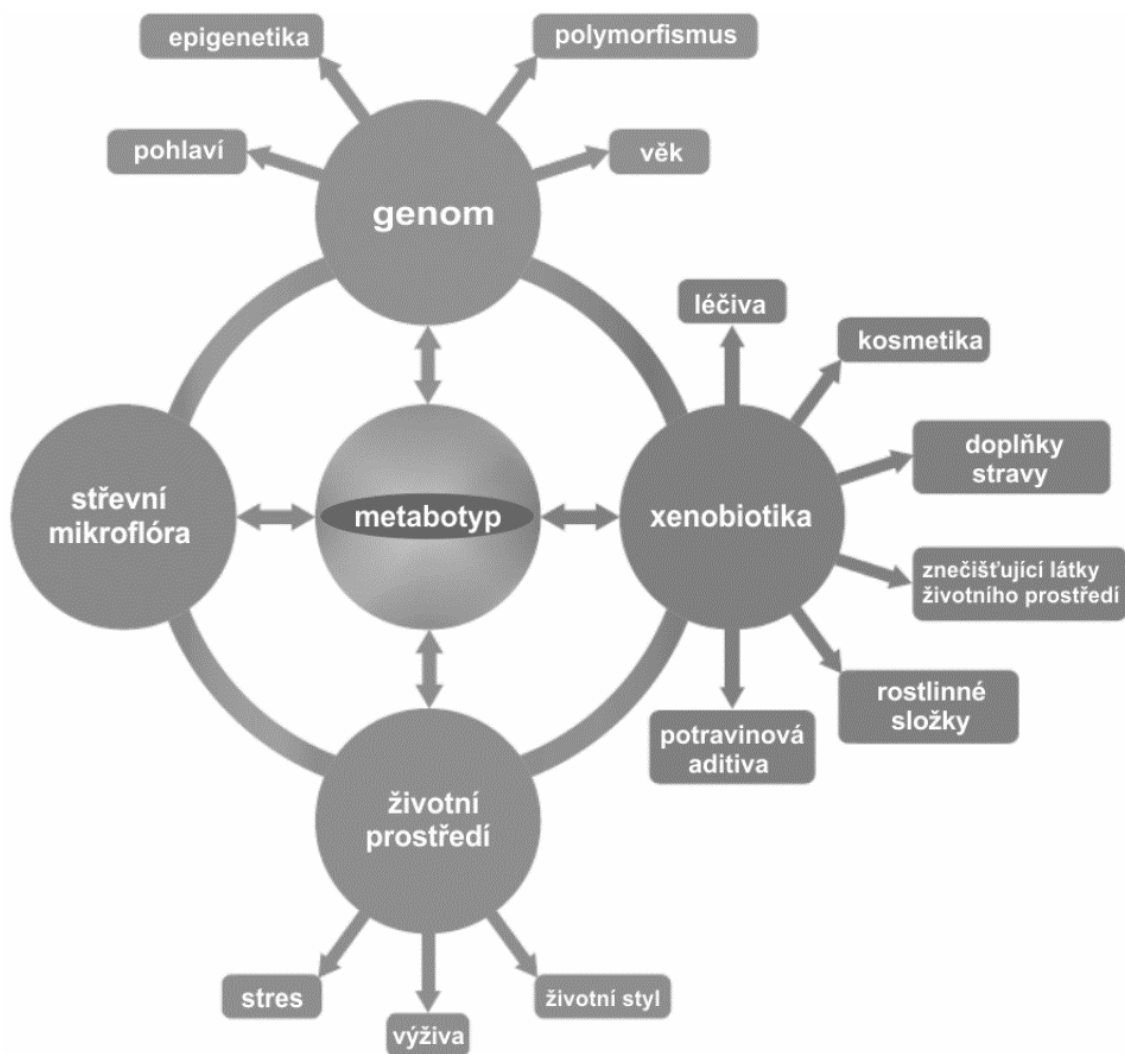
Velká část těchto chorob je odhalena pomocí screenování hlavních biomarkerů metodou MS/MS primárního NBS (tzv. first-tier screening). Při abnormálním výsledku jednoho či více biomarkerů se na původním vzorku krevní skvrny provádí test druhé úrovně – tzv. second-tier (pokud existuje pro danou chorobu), který je selektivnější pro konkrétní onemocnění [18] a nebo se rovnou přistupuje k potvrzující analýze, která ale většinou vyžaduje dodatečný odběr vzorku plné krve nebo moči. Příkladem může být leucinóza, která bývá odhalena v primárním NBS zvýšením SRM rozpadu 132/86, který zastupuje leucin, izoleucin, alloizoleucin, norleucin a 4-hydroxyprolin. Analýzou druhé úrovně specifické pro alloizoleucin se může potvrdit leucinóza [38] a u pacienta se může zahájit léčba dříve, než dojde k nevratnému poškození jeho zdraví. K definitivnímu potvrzení diagnózy je zapotřebí provést analýzu aminokyselin v krvi a analýzu acylkarnitinů v moči. Popřípadě enzymovou analýzou či genetické testy.

### 2.3 Metabolomika

Metabolomika je vědní obor zabývající se identifikací a kvantifikací nízkomolekulárních látek, tj. molekul menších než 1500 Da, ve vzorcích tělních tekutin, buněk nebo tkání [39]. Společně s lipidomikou, proteomikou a genomikou patří do skupiny tzv. omických věd. Soubor těchto nízkomolekulárních látek se nazývá metabolom a jednotlivé látky metabolity. Vzhledem k tématu této práce budou následující odstavce pojednávat pouze o lidském metabolomu. Přestože nejznámější databáze lidského organismu Human Metabolome Database (HMDB) [40] obsahuje přes 40 000 sloučenin, které se teoreticky mohou v lidském

organismu vyskytnout, podle studie z roku 2011 [41] obsahuje lidské sérum při nejmenším 4200 endogenních metabolitů a moč přes 3000 [42]. Mezi nejčastěji detekované metabolity patří aminokyseliny, organické kyseliny, acylkarnitiny, lipidy, sacharidy, puriny a pyrimidiny. Z tohoto výčtu se jako samostatný vědní obor vydělila lipidomika, neboť analytický přístup k lipidům, jako hydrofobních látek, se liší od zbytku metabolitů [43].

Aktuální koncentrace jednotlivých metabolitů v organismu je ovlivňována řadou vzájemně působících faktorů (viz. Obrázek 5), z nichž ty nejvýznamnější jsou následující: okolní prostředí, genetická výbava, strava, přijímané léky, střevní mikroflóra a onemocnění. Probíhající onemocnění je zřejmě nejvíce studovaný faktor ovlivňující lidský metabolom a v případě metabolomických studií chorob je snaha ostatní vlivy eliminovat. Toho se docílí správnou volbou kontrolních vzorků od zdravých jedinců, kteří variabilitou věku, pohlavím a maximem ostatních parametrů odpovídají skupině pacientů. Jinými slovy, skupina pacientů a kontrol by měla být co nejvíce fenotypově podobná (až na probíhající chorobu pacientů). Způsob odběru a zpracování vzorků i použitá analytická metoda musí být pro obě skupiny identické. Pořadí, ve kterém se vzorky analyzují, by mělo být náhodné [44]. Pro statistické vyhodnocení metabolických rozdílů mezi skupinami je vhodné volit podobný počet jedinců ve skupinách, čehož se většinou nedaří docílit při studiu vzácných chorob, neboť nashromáždit dostatečný počet patientských vzorků je pro jejich nízký výskyt obtížné.



**Obrázek 5.** Faktory ovlivňující individuální metabolom jedince – metabotyp (upraveno podle [45]).

Metabolomika se dále dělí na cílenou a necílenou podle toho, zda sledujeme menší skupinu konkrétních metabolitů nebo sledujeme kromě známých i široké spektrum neznámých látek, jak bude popsáno v dalších kapitolách.

### 2.3.1 Přístrojové vybavení pro metabolomickou analýzu

Z instrumentálních technik metabolomickým analýzám aktuálně dominuje kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí (LC-MS) díky své velké separační účinnosti, citlivosti a s ní spojený maximální počet detekovaných metabolitů [46]. Před nástupem ultraúčinné kapalinové chromatografie (UHPLC)

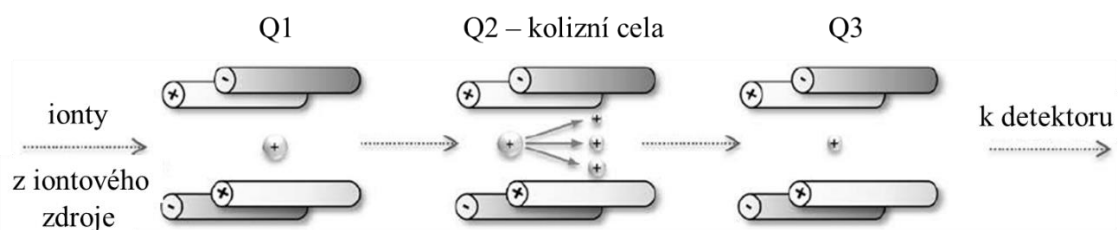
(kolem roku 2004) dosahovala plynová chromatografie (GC) lepšího chromatografického rozlišení a proto se častěji používala právě GC ve spojení s MS detekcí [47]. Další frekventovaně používanou technikou je nukleární magnetická rezonance (NMR), která má výhody jakými jsou velká reprodukovatelnost měření a lepší schopnost identifikace neznámých molekul [48]. Své místo v metabolomických studiích má i kapilární elektroforéza ve spojení s MS detekcí [49]. V současné době právě kombinace těchto technologií poskytuje nejkompletnější pohled do světa změn malých molekul v biologických systémech [41][42].

Obecným principem LC-MS je kontinuální analýza pozitivně a/nebo negativně nabitých molekul obsažených ve vzorku, které byly předtím rozděleny stacionární fází LC. K ionizaci se nejčastěji využívá elektrosprej, jehož základní princip byl představen v roce 1989 [50] a na poli ionizačních technik ve spojení s LC dominuje dodnes. Ionty jsou poté separovány hmotnostním analyzátozem podle jejich poměru  $m/z$  a postupně dopadají na detektor (fotonásobič) nebo jsou krátkodobě zachyceny v cyklickém pohybu uvnitř hmotnostního analyzátoru (např. orbitrap), kde indukují „proudový obraz“, který je Fourierovou transformací přepočítán na klasické hmotnostní spektrum [51]. Na rozdíl od peptidů a proteinů, většina malých molekul studovaných metabolomickým přístupem se nabíjí jedenkrát, takže jejich poměr  $m/z$  odpovídá molekulové hmotnosti. Aby se zabránilo vzájemným interakcím částic uvnitř MS, jsou tyto přístroje vybaveny rotačními a turbomolekulárními pumpami, které udržují vysoký stupeň vakua. Současné hmotnostní spektrometry skenují požadovaný rozsah  $m/z$  50–1500 v jednotkách (orbitrap) až desítkách (TOF) Hz s rozlišením 40 000 (TOF) – 1 000 000 (orbitrap). Rozlišení je vypočítané podle šířky hmotnostního píku v polovině jeho výšky. Podle nedávné studie je honba za stále vyšším rozlišením MS přístrojů ve snaze detekovat více metabolitů v jediném nástřiku vzorku zbytečná a rozlišení 120 000 je dostatečné pro pozitivní i negativní mód [52].

### 2.3.2 Cílená metabolomika

Cílená metabolomika se dá charakterizovat jako semi-kvantitativní analýza menší skupiny známých molekul v biologických systémech. Například se stanovují substráty, produkty a meziproducty metabolických drah nebo metabolity určité chemické skupiny (acylkarnitiny, organické kyseliny atp.). Znalost sledovaných metabolitů se využívá při výběru a vývoji analytické metody a při přípravě vzorků tak, aby se dosáhlo co nejlepší selektivity, citlivosti, přesnosti i správnosti použité metody.

Tyto vlastnosti poskytují metody LC-MS/MS s využitím interních standardů, kterými jsou izotopově značené analogy stanovovaných metabolitů. Analýzy probíhají s využitím trojných kvadrupólů v módu „multiple-reaction monitoring“ (MRM), během kterého se sledují produkty rozpadů molekulových iontů jednotlivých metabolitů. V průběhu analýzy se na prvním kvadrupólu vybírá mateřský molekulový ion (daného metabolitu). Na dalším kvadrupólu dojde působením kolizní energie k jeho štěpení a třetí kvadrupól propouští k detektoru jen nejintenzivnější fragment (SRM), viz obrázek 6. Pro každý metabolit se mění nastavení parametrů kvadrupólů, čímž se postupně proměří všechny metabolity v LC-MS/MS metodě. Konkrétní nastavení parametrů kvadrupólů pro jednotlivé metabolity se získá analýzou certifikovaných standardů, na základě kterých se parametry optimalizují. Analýza každého metabolitu zabírá určitý čas (dwell time) a součet těchto intervalů odpovídá době trvání jednoho MRM cyklu (z pravidla do 2 vteřin). Tímto principem lze rozlišit i metabolity, které mají sice stejnou molekulovou hmotnost (resp. poměr  $m/z$ ) a retenční čas ( $t_R$ ), ale odlišnou hmotnost vznikajících fragmentů [51]. Podle „Metabolomics Standards Initiative“ (MSI) [53], která definovala minimální požadavky k identifikaci a kvantifikaci metabolitů, je výsledek takové analýzy absolutní kvantifikace analyzovaných metabolitů.



**Obrázek 6.** Znáznornění principu tandemové hmotnostní spektrometrie (upraveno podle [51]).

### 2.3.3 Necílená metabolomika

Snahou necílené metabolomiky je detekovat maximální možný počet metabolitů obsažený v biologickém vzorku (stovky až jednotky tisíc), a to včetně těch neznámých a neočekávaných. Z této formulace vyplívá, že necílená metabolomika je mimo jiné vhodná pro odhalení nových potenciálních biomarkerů chorob [54][55]. Pro tyto účely se využívají převážně LC-MS přístroje s hmotnostním analyzátozem poskytující vysoké rozlišení (HRMS), přesnost a správnost spekter [56]. Příkladem jsou TOF analyzátozy, orbitrapy a iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací.

Největší slabinou necílené metabolomické analýzy založené na LC-HRMS je stále identifikace jednotlivých metabolitů [57], která je nezbytná pro jejich biologickou interpretaci. Pro tyto účely se často kombinuje několik režimů sběru dat u MS přístroje, a to na opakovaných nástřicích stejného vzorku. Celkový sken poskytuje informaci o všech iontech (v přednastaveném  $m/z$  rozsahu) vstupujících v daném  $t_R$  do MS přístroje. Na datech závislé a nezávislé skenovací režimy poté poskytují informaci o fragmentačních spektrech vybraných sloučenin, která napomáhají strukturní identifikaci [58][59].

Druhou nejčastěji používanou technologií pro necílenou metabolomiku je NMR, která umožňuje relativně jednoduchou identifikaci neznámých molekul, ale počet detekovaných metabolitů je oproti LC-HRMS metodám nižší [60].

### 2.3.4 Statistické zpracování metabolomických LC-MS dat

Zpracování LC-MS dat z metabolomické analýzy se skládá z řady dílčích kroků, které nesou mnoho úskalí. Pouze hluboké porozumění a správné provedení jednotlivých úkonů, umožňuje získat vhodně upravená data, na jejichž základě lze definovat hodnotné závěry studie [61].

Prvním krokem je tzv. „peak-picking“, během kterého dochází podle definovaných parametrů algoritmu k integraci píků, nahrazení nulových hodnot, zarovnání  $t_R$  a odstranění píků na úrovni šumu. K tomuto úkolu se využívají nejrůznější softwary, z nichž některé jsou open-source (MZmine2 [62], XCMS [63], MetAlign [64]) a jiné komerční (Compound Discoverer od Thermo Fisher Scientific).

Během ionizace metabolitů v iontovém zdroji dochází k tvorbě molekulových iontů, ale i mnoha aduktů, izotopů a ve zdroji vznikajících fragmentů, které uměle zvyšují počet detekovaných signálů metabolitů. Ty „falešné příspěvky“ je za potřebí algoritmicky odstranit nebo všechny sjednotit do jediného „signálu“ [65].

Další důležitou úpravou dat jsou korekce odstraňující systematické chyby měření. K tomu účelu se do sekvence metabolomické analýzy vkládají vzorky kontroly kvality (QC), které jsou analyzovány opakovaně po určitém počtu analýz (typicky každý 4. - 6. vzorek). Důležitost QC vzorků v metabolomické analýze shrnul D. Broadhurst a kolektiv v roce 2018 [66], kde rovněž zmiňuje nejčastěji používané algoritmy korigující systematickou chybu měření. V této práci byl použit tzv. „Locally Estimated Scatterplot Smoothing“ (LOESS) [67], který koriguje lokální odezvu metabolitu na základě jeho rozptylu při měření QC vzorků. Podle vypočítaného rozptylu signálů jednotlivých metabolitů uvnitř QC vzorků je vhodné odstranit všechny metabolity jejichž variační koeficient je vyšší než 30 %. Nemělo by se zapomínat na detekci odlehlých hodnot a jejich odstranění z datové tabulky.

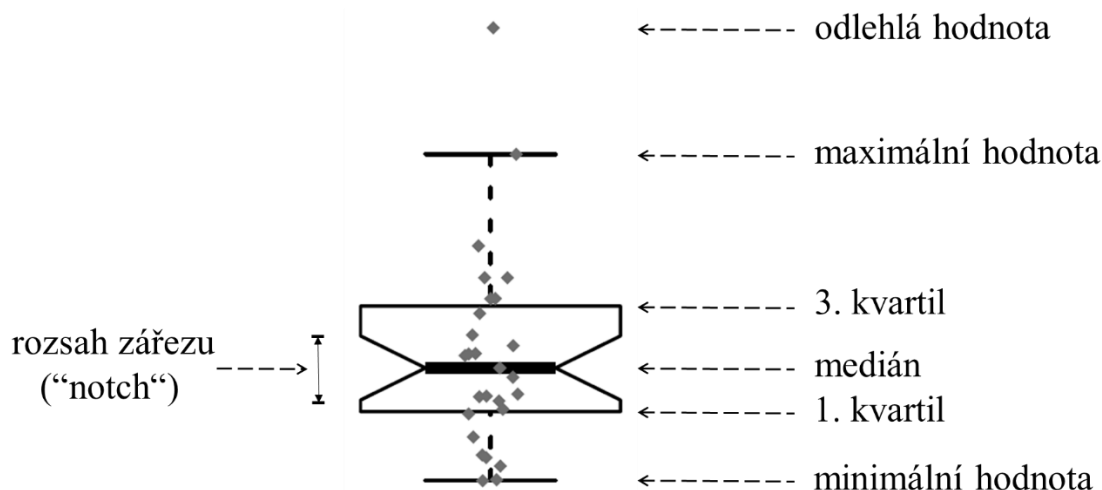
Před samotnou vizualizací by se ještě data měla normalizovat (vycentrovat na střední hodnotu) a škálovat, aby se eliminoval vliv řádových rozdílů v koncentracích jednotlivých metabolitů. Statistických přístupů k odstraňování



odlehých hodnot, normalizací a škálování existuje celá řada a komplexnost těchto přístupů přesahuje problematiku této práce.

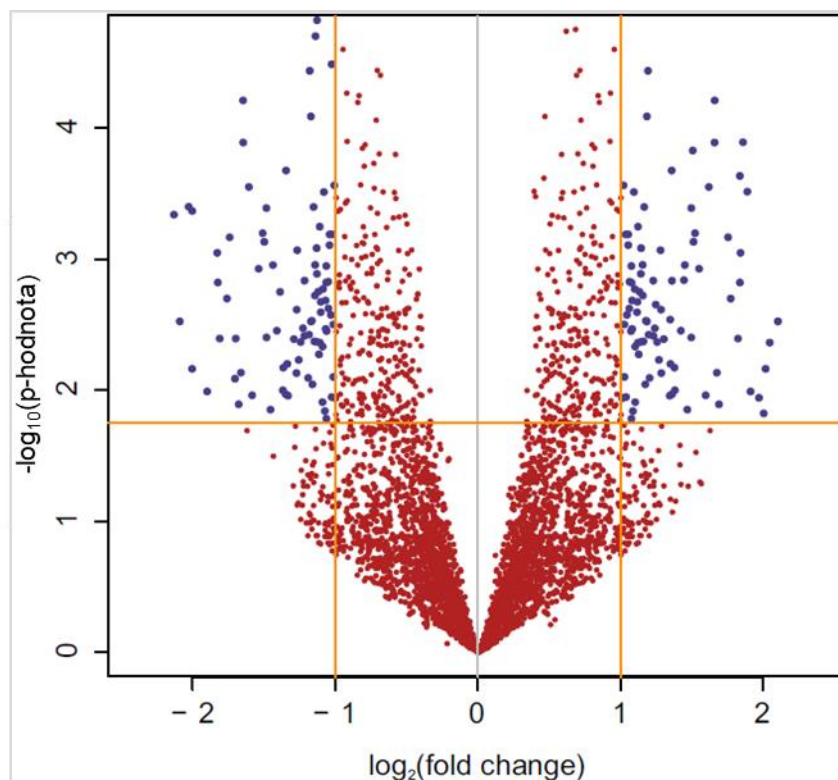
### **2.3.5 Statistická analýza a vizualizace metabolomických LC-MS dat**

Pro grafické zobrazení rozdílných hodnot konkrétního metabolitu mezi skupinou pacientů a kontrol se často používají krabicové grafy (boxplot), viz obrázek 7. Tento zobrazovací nástroj jednorozměrné statistiky se skládá z „krabice“ jejíž okraje jsou tvořeny 1. a 3. kvantilem a vnitřní linie představuje medián naměřených hodnot. Na krabici navazují tzv. vousy, podobající se chybovým úsečkám, které jsou dlouhé maximálně 1,5násobku mezikvartilového rozpětí. Pokud se v datech vyskytují ještě nižší/vyšší hodnoty, jsou označeny jako odlehlé. V opačném případě vousy reprezentují minimální a maximální naměřené hodnoty. Oblíbenou modifikací krabicového grafu jsou zářezy (v anglické literatuře tzv. notch) v okolí mediánu, jejichž šířka se zvyšuje s rostoucím rozptylem dat a se snižujícím se počtem vzorků ve skupině. Statistická teorie říká (předpoklad symetrického rozdělení s dostatečným počtem hodnot), že pokud se zářezy dvou krabicových grafů nepřekrývají, existuje na 95% hladině významnosti rozdíl mezi mediány [68]. Pokud ovšem metabolomik pátrá po diagnosticky významném biomarkeru DMP, hledá ideálně takový metabolit, jehož krabicový graf se pro skupinu pacientů nepřekrývá s krabicovým grafem kontrolní skupiny nejen rozsahem zářezů, ale i minimálních a maximálních hodnot. Tím je možné do určité míry minimalizovat riziko falešně pozitivních a falešně negativních výsledků diagnostického testu, které mají zásadní psychický dopad na rodiče pacienta.



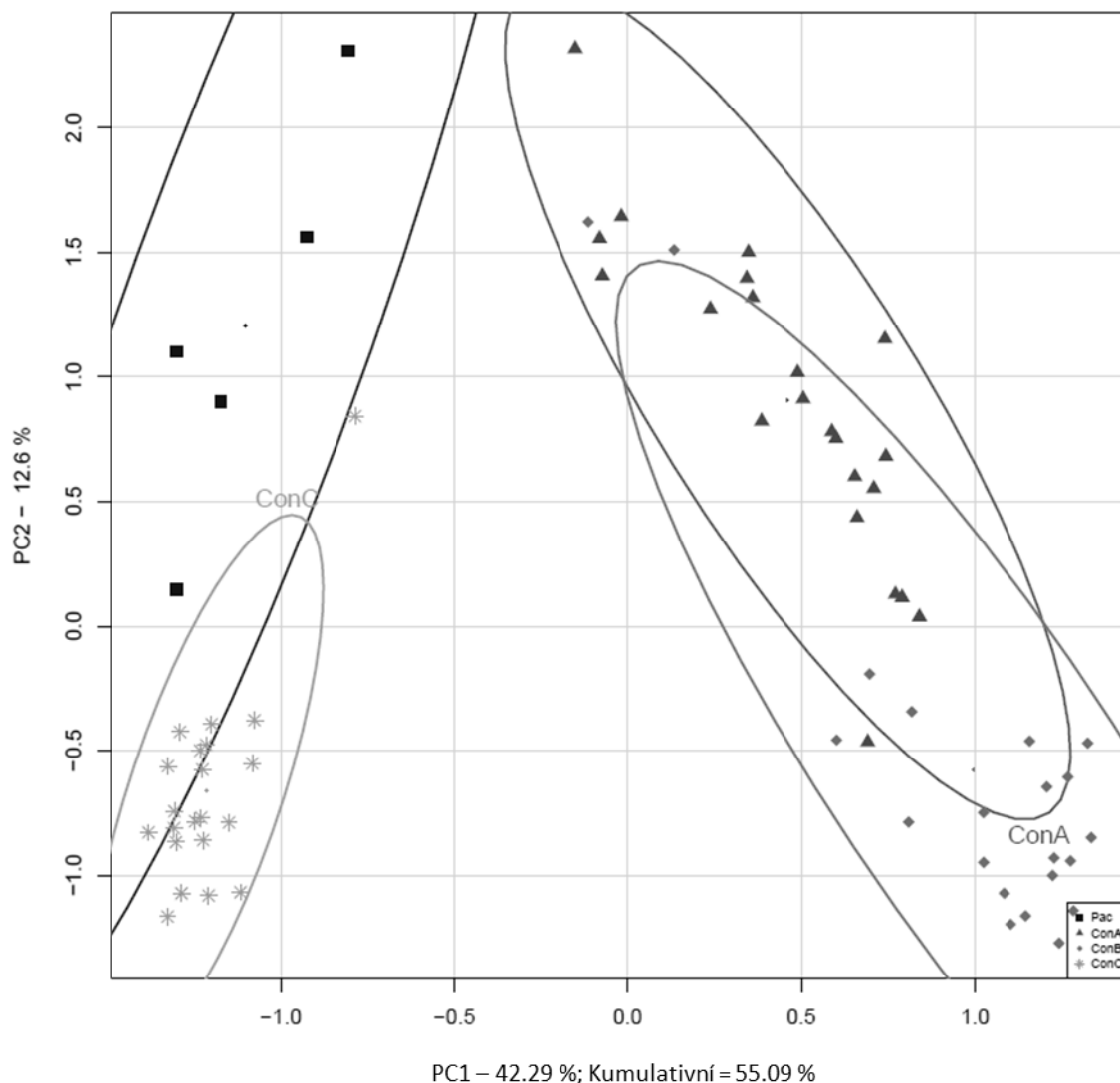
**Obrázek 7.** Varianta krabicového grafu se zářezy a zobrazenými hodnotami jedné skupiny.

Další důležitou zobrazovací metodou je tzv. vulkánový graf [69], který získal svůj název podle typického tvaru zobrazení metabolomických dat připomínajícího chrlící sopku, viz obrázek 8. Jde o druh bodového grafu (korelační diagram), který vykresluje metabolity v prostoru v závislosti na jejich statistické významnosti rozdílu mezi centrálními tendencemi porovnávaných skupin vyjádřené pomocí záporného dekadického logaritmu z příslušných p-hodnot ( $-\log_{10}$  p-hodnoty) a velikosti rozdílu střední hodnoty metabolitu u pacientů a kontrol ( $\log_2$  fold-change). Fold-change (F-Ch) se vypočítá jako průměr hodnot u pacientů vydělený průměrem u kontrol a výsledek se zlogaritmuje logaritmem o základu 2. Z této formulace vyplývá, že metabolity nacházející se v obou horních rozích vulkánového grafu představují potenciální biomarkery choroby. Kvantifikace statistické významnosti na základě p-hodnoty je stále používaná, avšak do značné míry nesprávná, obzvláště při mnohonásobném testování [70]. Alternativou může být vulkánový graf založený na bayesovské statistice, který s p-hodnotami npracuje a lépe zohledňuje kompoziční charakter metabolomických dat [71].



**Obrázek 8.** Příklad vulkánového grafu zobrazující významné metabolity v obou horních rozích grafu. Každý bod představuje jeden metabolit.

Pro sledování celkových metabolických rozdílů mezi skupinami pacientů a kontrol se často využívá nástroj mnohorozměrné statistiky tzv. analýza hlavních komponent (PCA - Principal Component Analysis) [72], viz obrázek 9. Každý vzorek pacienta nebo kontroly je vykreslený do nejčastěji dvourozměrného grafu na základě největších rozdílů v hodnotách všech metabolitů. Vzorky s podobným metabolickým profilem se shlukují blíže k sobě. Kolem shluků je možné vykreslit elipsy představující 75 % konfidenční interval. Všechny osy (hlavní komponenty) tohoto prostoru jsou na sebe kolmé (ortogonální) a ve dvourozměrné PCA projekci jsou zobrazeny jen první dvě komponenty (v trojrozměrném prostoru první tři), které procentuálně odpovídají nejvyšší možné kumulativně vysvětlené variabilitě. PCA nepracuje s informací o zařazení jednotlivých vzorků do skupin, a proto je považována za objektivní metodu (tzv. nesupervizovaná metoda).



**Obrázek 9.** Příklad dvourozměrné PCA zobrazující čtyři různé skupiny vzorků. Elipsy představují 75% konfidenční interval.

Další významnou vícerozměrnou statistickou metodou je diskriminační analýza metodou dílčích nejmenších čtverců (PLS-DA – Partial Least Squares Discriminant Analysis) [73] a její ortogonální varianta (OPLS-DA – Orthogonal Partial Least Squares Discriminant Analysis) [72]. Na rozdíl od PCA tyto metody pracují s informací o zařazení jednotlivých vzorků do skupin (supervizované metody). Jedním z výstupů OPLS-DA metody je graf významnosti proměnných v projekci (VIP – Variable Importance in Projection), který se používá pro

identifikaci nejvíce diskriminujících metabolitů mezi skupinou pacientů a kontrol. Jinými slovy, může se použít k určení nejvýznamnějších biomarkerů chorob.

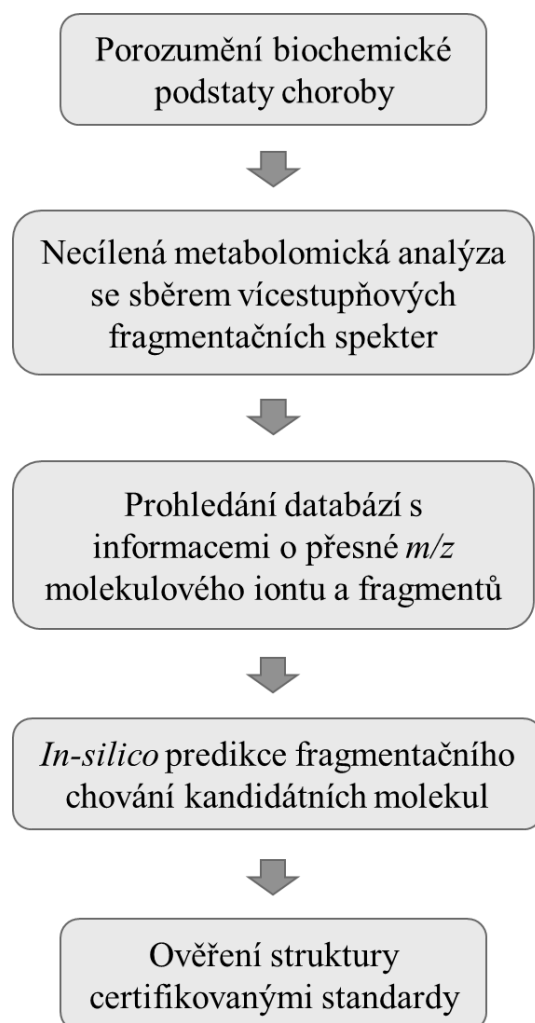
### 2.3.6 Strukturní identifikace neznámých látek

V současnosti existuje několik instrumentálních technik, které umožňují identifikaci molekulové struktury neznámých látek. Každá má svá instrumentální omezení, které zabraňují jednoznačnému určení molekulové identity. Příkladem může být rentgenová krystalografie, pro jejíž úspěšnou aplikaci je zapotřebí získat monokrystalickou formu studované neznámé látky, což není vždy možné. Infračervená a Ramanova spektroskopie poskytují informace o přítomnosti funkčních skupin, avšak málokdy se podaří na základě těchto informací určit kompletní molekulovou strukturu. Spektrální knihovny plynové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií (GC-MS) jsou sice obsáhlé, ale podobně jako u infračervené a Ramanově spektroskopii, identifikace struktury na základě spekter těchto technik je obtížná, pokud naměřené spektrum v knihovně není. NMR je obecně nejvhodnější technika pro určení molekulové struktury neznámých látek. Ovšem ta nedokáže charakterizovat neznámé látky v submikromolárních koncentracích v komplikované biologické matrici (např. plazma nebo moč) [60].

Pro tento typ úkolu je vhodná UHPLC ve spojení s HRMS, která umožňuje měření vícestupňových fragmentačních spekter (HRMS<sup>n</sup>) s přesností  $m/z$  1 ppm [74]. S touto přesností naměřená  $m/z$  odpovídá při užití jen nejfrekventovanějších atomů tvořící lidský organismus (C, H, N, S, O, P) jednotkám až desítkám sumárních vzorců. Tento počet může být dále snížen aplikací „sedmi zlatých pravidel“ identifikace metabolitů, které publikovali Tobias Kind a Oliver Fiehn v roce 2007 [75]. Obzvláště u  $m/z$  do 400 Da může být v některých případech aplikací těchto pravidel přiřazen právě jeden sumární vzorec. Pokud se k sumárnímu vzorci přidá informace o víceúrovňových fragmentačních spektrech a prohledají se experimentální databáze jako je například Metlin [76], HMDB [40], mzCloud (<https://www.mzcloud.org/>), ChemSpider

(<http://www.chemspider.com/>), MyCompoundID [77], šance na určení chemické struktury je vyšší [24] [56] [57]. Při luštění konkrétní molekulové struktury neznámé látky mohou být nápomocny programy, které umožňují predikovat fragmentační chování molekul jako je například MassFrontier (Highchem, Slovakia).

Důležitým aspektem strukturní identifikace neznámého metabolitu je důkladná rešerše studovaného biochemického procesu, neboť znalost enzymových přeměn metabolických drah může navést k hledání jen nejpravděpodobnějších chemických vzorců, které vycházejí ze známých zisků a ztrát atomů/funkčních skupin mezi substrátem a produktem. Schéma pracovního postupu strukturní identifikace neznámé látky, která byla nalezena jako statisticky významná v metabolomických studiích DMP, je znázorněno na obrázku 10.



**Obrázek 10.** Pracovní postup strukturní identifikace neznámé látky z necílené metabolomické studie.

Definitivní identifikace neznámé látky není vždy možná. V roce 2007 Sumner a kolektiv [53] v rámci MSI shrnuli čtyři základní úrovně spolehlivosti identifikace neznámých látek.

Pro absolutní identifikaci (MSI úroveň 1) určované látky je zapotřebí experimentálně naměřit minimálně dvě ortogonální fyzikálně-chemické vlastnosti jako jsou  $t_R$ , přesná  $m/z$ , poměr izotopů, produktová MS spektra,  $^1\text{H}$  a/nebo  $^{13}\text{C}$  NMR spektra, dvourozměrná NMR spektra atd. Tato naměřená data musí být ve shodě s naměřenými daty certifikovaného referenčního materiálu (standard) za identických analytických podmínek.

Pro úroveň domněle identifikované látky (MSI úroveň 2) je opět zapotřebí naměřit dvě ortogonální fyzikálně-chemické vlastnosti. Identifikace je založena na porovnání dat s dostupnými daty naměřenými v jiných laboratořích nebo porovnáním s dostupnými spektrálními knihovnami.

MSI úroveň 3 odpovídá domněle identifikované látce, o které můžeme pouze konstatovat, že patří do určité skupiny chemických látek (acylkarnitiny, fosfatidilcholinu, acylglyciny atp.) podle charakteristického spektrálního prvku, který odpovídá právě dané chemické skupině látek.

Látky, u kterých se nepodaří nalézt shodná spektrální data v databázích ani literatuře, se klasifikují jako neznámé (MSI úroveň 4), avšak pro budoucí výzkum je přínosné naměřená data sdílet.

### 3 CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE

Diagnóza i následné kontrolní analýzy v průběhu života PKU pacientů závisí převážně na sledování hladiny fenylalaninu v krvi. Jeho koncentrace se ale vlivem stravy může v čase měnit, a proto i přes precizní pravidelnou kontrolu hladiny fenylalaninu mohou mít pacienti zdravotní komplikace [1], [2]. V klinické praxi je stálá poptávka po biomarkerech PKU, které by lépe reflektovaly odpověď na léčbu a predikovaly budoucí zdravotní stav.

HMGA se jeví jako vhodný kandidát pro novorozenecký screening. Současná metodologie neumožňuje stanovit diagnózu HMGA na základě analýzy krevních skvrn a vyžaduje dodatečný odběr moče nebo plné krve pacientů [16]. Nalezení nových specifických biomarkerů HMGA by umožnilo stanovit diagnózu během novorozeneckého screeningu bez nutnosti opakovaného vzorkování.

Cílem této disertační práce bylo metabolomickými nástroji nalézt a strukturně identifikovat nové biomarkery dvou známých dědičných metabolických poruch, PKU a HMGA.



## 4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1 Chemikálie

Acetonitril, methanol, ethanol a voda LC-MS kvality byly zakoupeny u Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) stejně jako kyselina mravenčí a octová, a chemické standardy Phe, glukózy (Glc), manózy a galaktózy.

Následující chemické standardy byly použity pro identifikaci/kvantifikaci: izovalerylkarnitin (IV-K), 3-methylkrotonylkarnitin (3MC-K) a 2-methylbutyrylkarnitin byly zakoupeny u Sigma-Aldrich (Švýcarsko). Adipoylkarnitin a tiglylkarnitin u Sigma-Aldrich (Rakousko). 3MG-K byl z Avanti (MA, USA). 3MGC and 3H3MG byl zakoupen u Sigma-Aldrich (Německo). Adipát u společnosti Fluka (Německo) a 3MG-A u Sigma-Aldrich (Indie).

### 4.2 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)
- Ultrazvuk (JeKen, Čína)
- LC-MS/MS přístroj: Sciex Exion AD kapalinový chromatograf ve spojení s hmotnostním spektrometrem QTRAP 6500+ (Sciex, Framingham, MA, USA) s elektrosprejovou ionizací
- LC-HRMS<sup>n</sup> přístroj: UltiMate 3000 RS kapalinový chromatograf (Dionex, USA) ve spojení s hmotnostním spektrometrem Orbitrap Elite (Thermo Fischer Scientific, USA) s elektrosprejovou ionizací

Přístrojové vybavení v Nijmegenu:

- LC-HRMS přístroj: Agilent 6540 UHD Accurate-Mass Q-TOF (Santa Clara, CA, USA) s elektrosprejovou ionizací

### **4.3 Strukturní identifikace nových biomarkerů známých dědičných metabolických poruch na základě vícestupňových fragmentačních spekter**

Tato studie se zabývá určením molekulových struktur neznámých  $m/z$  signálů, které byly významně zvýšené ve vzorcích plazem pacientů s PKU a HMGA v porovnání s kontrolami. Odborná publikace s názvem „Structural elucidation of novel biomarkers of known metabolic disorders based on multistage fragmentation mass spectra“ byla publikována v roce 2018 v časopise Journal of Inherited Metabolic Disorders [24].

#### **4.3.1 Materiál a metody**

##### **4.3.1.1 Vzorky**

Vzorky plazem sedmi pacientů s diagnostikovanou PKU byly získány v rámci rutinního sledování hladiny Phe během jejich léčby (strava ochuzená o Phe). Dále byly získány vzorky dvou pacientů s HMGA, jejichž diagnóza byla potvrzena enzymovými a genetickými testy. Pro tuto studii se také podařilo získat vzorek plazmy pacienta s MCCD, jehož diagnóza byla rovněž potvrzena genetickými testy. Všechny vzorky pacientů byly získány z Translační metabolické laboratoře Radboud univerzity Nijmegen, Holandsko.

Kontrolní vzorky plazem byly získány z Laboratoře dědičných metabolických poruch Fakultní nemocnice Olomouc. Odběr veškerého biologického materiálu byl proveden v souladu s Helsinskou deklarací Světové zdravotnické organizace. Všechny vzorky byly anonymizovány.

Před analýzou byly všechny vzorky skladovány při  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  a následně rozmrazeny při  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Ke  $100\text{ }\mu\text{l}$  alikvotu heparinované plazmy byla přidána ledová směs methanol/ethanol (1:1,  $400\text{ }\mu\text{l}$ ). Směs byla vortexována 30 s a inkubována v lednici při  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  po dobu 20 min. Vysrážené proteiny byly centrifugovány při  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  a  $22\text{ }600\text{ g}$  během 15 min. Supernatant o objemu  $350\text{ }\mu\text{l}$  byl lyofilizován a rozpuštěn ve  $100\text{ }\mu\text{l}$  vody obsahující 0,1% kyselinu mravenčí. Vzorky byly vortexovány 15 s a centrifugovány při laboratorní teplotě a  $22\text{ }600\text{ g}$  po dobu 15 min. Druhý supernatant o objemu  $90\text{ }\mu\text{l}$  byl převeden do LC vialek.

#### **4.3.1.2 Výběr biomarkerů necílenou metabolickou analýzou**

Výběr potenciálních biomarkerů pomocí necílené LC-HRMS metabolické analýzy byl proveden podle postupu publikovaném již dříve v roce 2016 [78]. Pro separaci látek byla zvolena C18 kolona Acquity HSS T3 (Waters, Milford, MA, USA,  $100 \times 2,1\text{ mm}$ ,  $100\text{ }\text{Å}$ ,  $1,8\text{ }\mu\text{m}$ ) a pro jejich detekci byl použit přístroj QTOF-MS Agilent 6540 UHD (Santa Clara, CA, USA) v pozitivním módu. Mobilní fáze A obsahovala vodu s 0,1% kyseliny mravenčí,  $\text{pH} = 2,66$ ) a mobilní fáze B obsahovala směs methanolu a vody v poměru 99:1 s přídavkem 0,1% kyseliny mravenčí. Při průtoku  $400\text{ }\mu\text{l}/\text{min}$  trvala analýza jednoho vzorku 25 min. Gradientová eluce měla následující profil:  $t = 0,0\text{--}1,0\text{ min}$ , 1 % B;  $t = 16,0\text{--}20,0\text{ min}$ , 100 % B;  $t = 21,0\text{--}25,0\text{ min}$ , 1 % B. Tato separační metoda byla rovněž použita pro rozdělení konjugátů Phe a hexóz. Detekce píků byla provedena pomocí softwaru XCMS [63] a výsledná data byla zpracována pomocí bioinformatického procesu vyvinutého spolupracovníky v Nijmegenu (Holandsko). Výsledný soubor tohoto zpracování dat byl seznam  $m/z$  signálů (viz kapitola 2.3.4), jejichž intenzity se u pacientů významně lišily od kontrolní skupiny, která se skladbou pohlaví a věku shodovala se skupinou pacientů. U statisticky významných  $m/z$  signálů, u kterých byla nalezena shodná data o přesné  $m/z$  a  $t_R$  v HMDB 3.0 databázi [40], byla provedena identifikace metabolitů (MSI úroveň 2). Tento postup zpracování metabolických dat byl klinicky validován v Nijmegenu pomocí tělních tekutin

pacientů se 48 známými DMP a nazván jako “Metabolický screening další generace“ [79].

#### 4.3.1.3 Strukturní identifikace biomarkerů

Na statisticky významných  $m/z$  signálech, které se nepodařilo strukturně identifikovat v Nijmegenu, se dále pracovalo v Olomouci s využitím LC-HRMS<sup>n</sup>. Pro analýzu statisticky významných  $m/z$  signálů nalezených v Nijmegenu byla použita stejná separační metoda LC, jako je uvedeno v kapitole 4.3.1.2. Hmotnostní spektra byla naměřena na Orbitrapu Elite, hybridním spektrometru s orbitální i lineární iontovou pastí. Díky této kombinaci lze měřit vícestupňová fragmentační spektra. Přesnost měření hmot do 1 ppm byla zajištěna interní hmotnostní kalibrací na základě diizooktylfthalátu o teoretické hodnotě  $m/z$  391,2843. Vzorky byly analyzovány v pozitivním módu (2,8 kV) s elektrosprejovou ionizací. Teplota iontového zdroje a přenosové trubice byla nastavena u obou na 350 °C. Nastavení pomocných plynů (krycí, pomocný a čistící) iontového zdroje bylo 50, 16 a 0 arbitrárních jednotek. Celkový sken byl nastaven v rozsahu  $m/z$  90–500 při rozlišení 120 000. MS<sup>n</sup> spektra byla naměřena při rozlišení 60 000 s využitím kolizí indukované disociace (CID) s izolační šířkou 1 Da. Nastavení energie pro CID fragmentace byla vždy 35 jednotek normalizované kolizní energie. Získané informace o sumárních vzorcích, přesné  $m/z$  molekulových iontů a jejich fragmentů jednotlivých statisticky významných  $m/z$  signálů, byly vloženy do vyhledávacích algoritmů spektrálních databází jako je Metlin, ChemSpider, mzCloud, HMDB a MyCompoundID. Software predikující fragmentace molekul MassFrontier (Highchem, Slovensko) byl využit při identifikaci jednotlivých  $m/z$  signálů.

Jeden statisticky významný  $m/z$  signál byl identifikován jako konjugát Phe a hexózy. Vzhledem k relativně vysoké koncentraci obou látek v organismu pacientů s PKU byl ověřován teoretický neenzymatický vznik tohoto konjugátu inkubací 1 mmol/l Phe s 5 mmol/l Glc, manózou, galaktózou, glukózou-1-<sup>13</sup>C a glukózou-6-<sup>13</sup>C po dobu 24 h. Každá hexóza vytvořila konjugát s Phe. Tyto

konjugáty byly dále analyzovány dalšími dvěma LC metodami (amido-kolona Acquity UPLC BEH a amino-kolona Supelco apHera) s cílem získat odlišné  $t_R$  konjugátů.

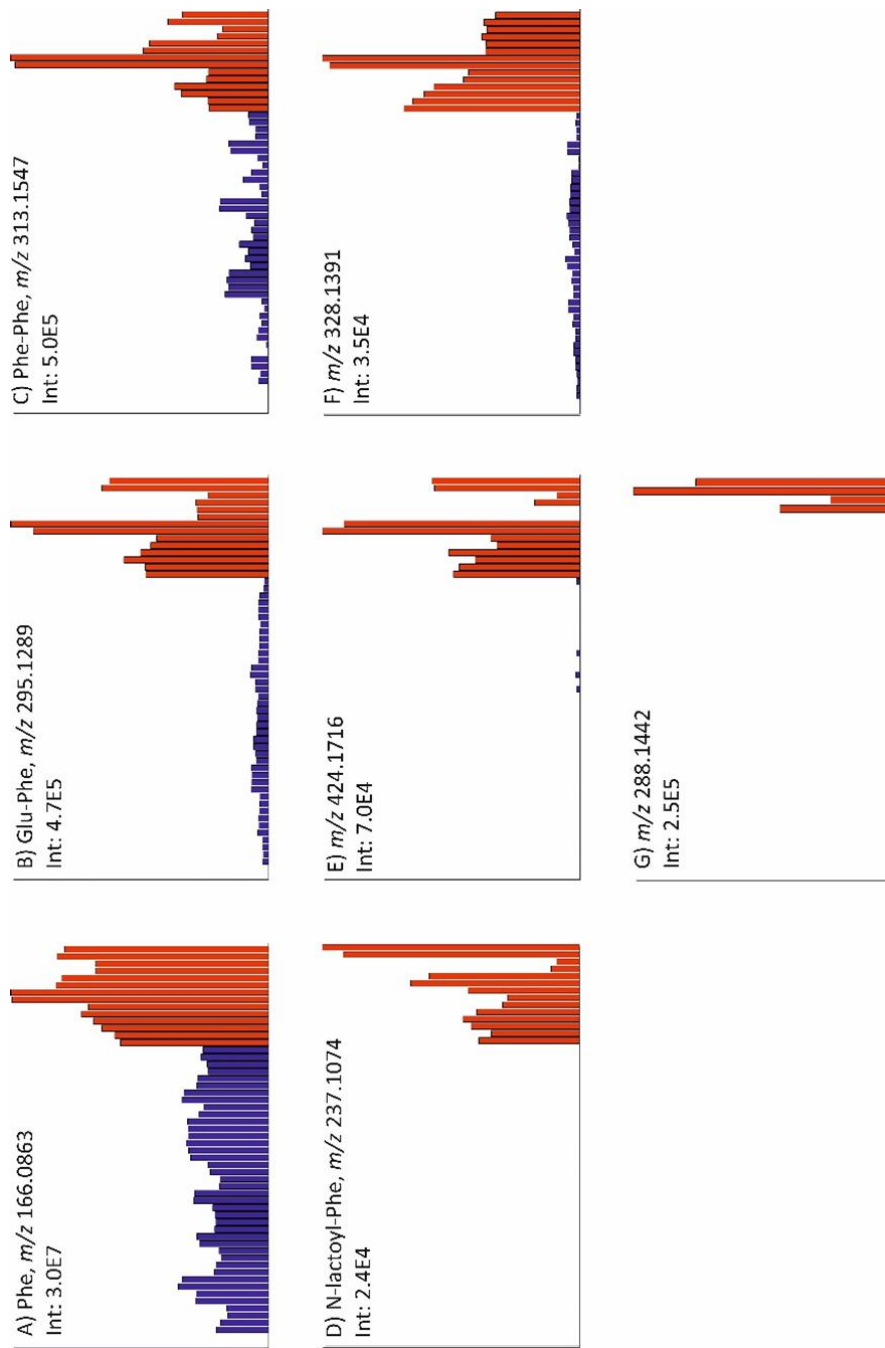
## 4.3.2 Výsledky

### 4.3.2.1 Výběr biomarkerů

Pomocí LC-QTOF-MS byly analyzovány všechny významně zvýšené  $m/z$  signály u pacientů trpících PKU a HMGA (viz. obrázek 11). Obrázek 11A ukazuje intenzity iontu Phe u sedmi PKU pacientů tak, jak byly naměřeny pomocí LC-QTOF-MS analýzy. 11B ukazuje signál o hodnotě  $m/z$  295,1289, který byl domněle identifikován pomocí HMDB databáze jako glutamylfenylalanin. Tento konjugát byl už dříve popsán jako  $\gamma$ -glutamylfenylalanin a označen jako biomarker PKU v moči [80] i v plazmě [81]. Studie tvorby  $\gamma$ -glutamyl-konjugátu katalyzované pomocí  $\gamma$ -glutamyltranspeptidáz publikované v roce 1975 [82] podporuje teorii o konjugaci glutamylu prostřednictvím  $\gamma$ -uhlíku. Tato anotace byla potvrzena prostřednictvím komerčně dostupného standardu  $\gamma$ -glutamylfenylalaninu. Metabolomická analýza vedla k identifikaci dalších dvou již dříve popsaných biomarkerů PKU (viz. obrázek 11C a 11D), fenylalanylphenylalanin (Phe-Phe) [81] a N-laktoyl-Phe [83]. Další dva významné  $m/z$  signály byly zvýšené ve vzorcích PKU pacientů:  $m/z$  328,1391 a 424,1716 (viz obrázek 11E a 11F) v porovnání s kontrolami. HMDB databáze neposkytla žádné návrhy molekulových struktur pro tyto  $m/z$  signály, kdy byly vyhledávány  $[M+H]^+$  a  $[M+Na]^+$  ionty s odchylkou molekulové hmotnosti do 5 ppm. Je zajímavé, že v rámci skupiny PKU pacientů měly tyto neznámé látky větší rozptyl hodnot než běžně využívaný PKU biomarker Phe. Rovněž korelace těchto látek k hladinám Phe měla omezenou hodnotu, tj.  $R^2 < 0,7$ .

Známé diagnostické metabolity HMGA jako 3H3MG, 3HIV, 3HIV-K, 3MG-K and 3MGC (*cis*- a *trans*-forma), byly u pacientů významně zvýšené ve srovnání se skupinou kontrol. Jeden signál o hodnotě  $m/z$  288,1442, pro který nebyla

nalezena žádná struktura v databázích, byl významně zvýšený ve vzorcích pacientů trpících HMGA (stejná  $m/z$  byla nalezena ve třech  $t_R$  viz. obrázek 11G) vůči kontrolám.



**Obrázek 11.** Intenzity PKU biomarkerů (a) Phe,  $m/z$  166,0863; (b) Glu-Phe,  $m/z$  295,1289; (c) Phe-Phe,  $m/z$  313,1547; (d) N-laktoyl-Phe,  $m/z$  238,1074; (e)  $m/z$  424,1714; (f)  $m/z$  328,1391 ve vzorcích sedmi léčených PKU pacientů (červeně) a intenzita HMGa biomarkeru (g);  $m/z$  288,1442 ve vzorcích dvou HMGa pacientů. Každý metabolit je porovnán s 20ti kontrolami (modře) a každý vzorek je analyzován dvakrát (technický replikát). Pořadí analyzovaných PKU pacientů je v panelech A-F stejné.

Neznámé signály o hodnotách  $m/z$  328,1391 a 424,1716 nalezené ve vzorcích PKU pacientů a  $m/z$  288,1442 nalezený u HMGA plazem byly vybrány pro další charakterizaci a strukturní identifikaci pomocí LC-HRMS<sup>n</sup> analýzy.

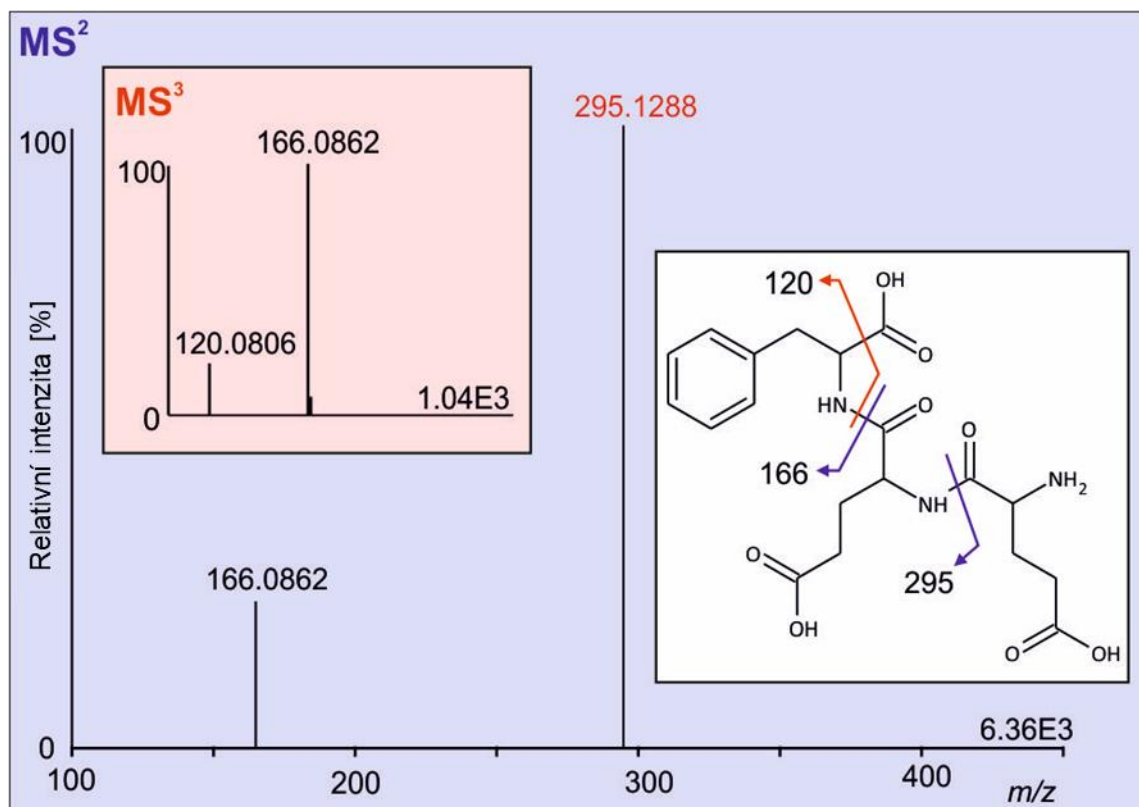
#### 4.3.2.2 Vícestupňová fragmentační analýza pomocí Orbitrapu Elite

##### 4.3.2.2.1 Fenyketonurie

Významný signál  $m/z$  424,1716 nalezený v Nijmegenu pomocí LC-QTOF-MS analýzy jako biomarker PKU byl detekovaný v celkovém skenu LC-HRMS analýzy jako  $m/z$  424,1714. Tato hodnota odpovídá sumárnímu vzorci  $C_{19}H_{26}O_8N_3$  při hmotnostní odchylce 0,6 ppm a stupni nenasycenosti 9. Molekulový ion byl detekován v  $t_R$  5,5 min. Méně frekventované izotopy od molekulového ionty se nepodařilo detekovat, neboť intenzita molekulového iontu byla příliš nízká. Pro tento  $m/z$  signál byl nalezeno v Metlin databázi (s hmotnostní odchylkou do 5 ppm) 56 návrhů struktur, z čehož jen 4 byly  $[M+H]^+$  ionty odpovídající tripeptidům Phe se dvěma molekulami glutamové kyseliny (Glu): Phe-Glu-Glu, Glu-Glu-Phe, Glu-Phe-Glu a lék carbidopum/levodopum. HMDB neposkytla žádný návrh struktury (hledány jen  $[M+H]^+$  a  $[M+Na]^+$  ionty).

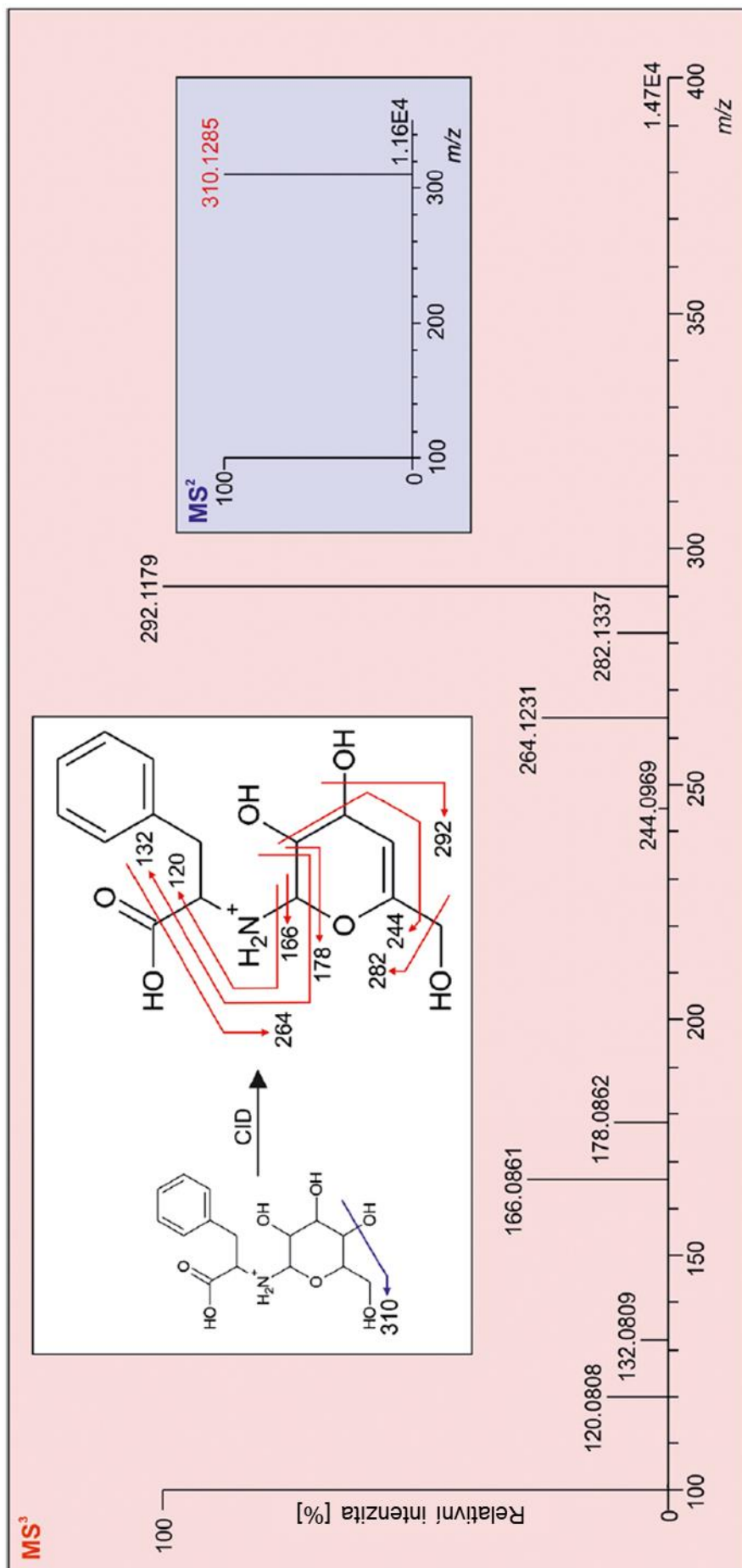
CID fragmentační analýza molekulového iontu poskytla dva dominantní fragmenty o  $m/z$  295,1288 a 166,0862 a jeden minoritní ion 120,0806. Fragmentační ion o  $m/z$  166,0862 odpovídá molekule Phe a z jeho přítomnosti v MS spektru vyplývají dvě zásadní informace. Jednak poukazuje na vazbu Glu a Phe prostřednictvím amino-skupiny patřící Phe a také zabraňuje molekule Phe nacházet se mezi dvěma molekulami Glu. Produktový ion o  $m/z$  120,0806 je známý charakteristický fragment Phe. Fragmentační mechanismus je znázorněn na obrázku 12. Na základě výsledků fragmentační analýzy a *in-silico* výpočtů pomocí softwaru MassFrontier byla neznámá látka o  $m/z$  424,1714 identifikována jako Glu-Glu-Phe.





**Obrázek 12.** CID MS<sup>2</sup> a MS<sup>3</sup> fragmentační spektra Glu-Glu-Phe.

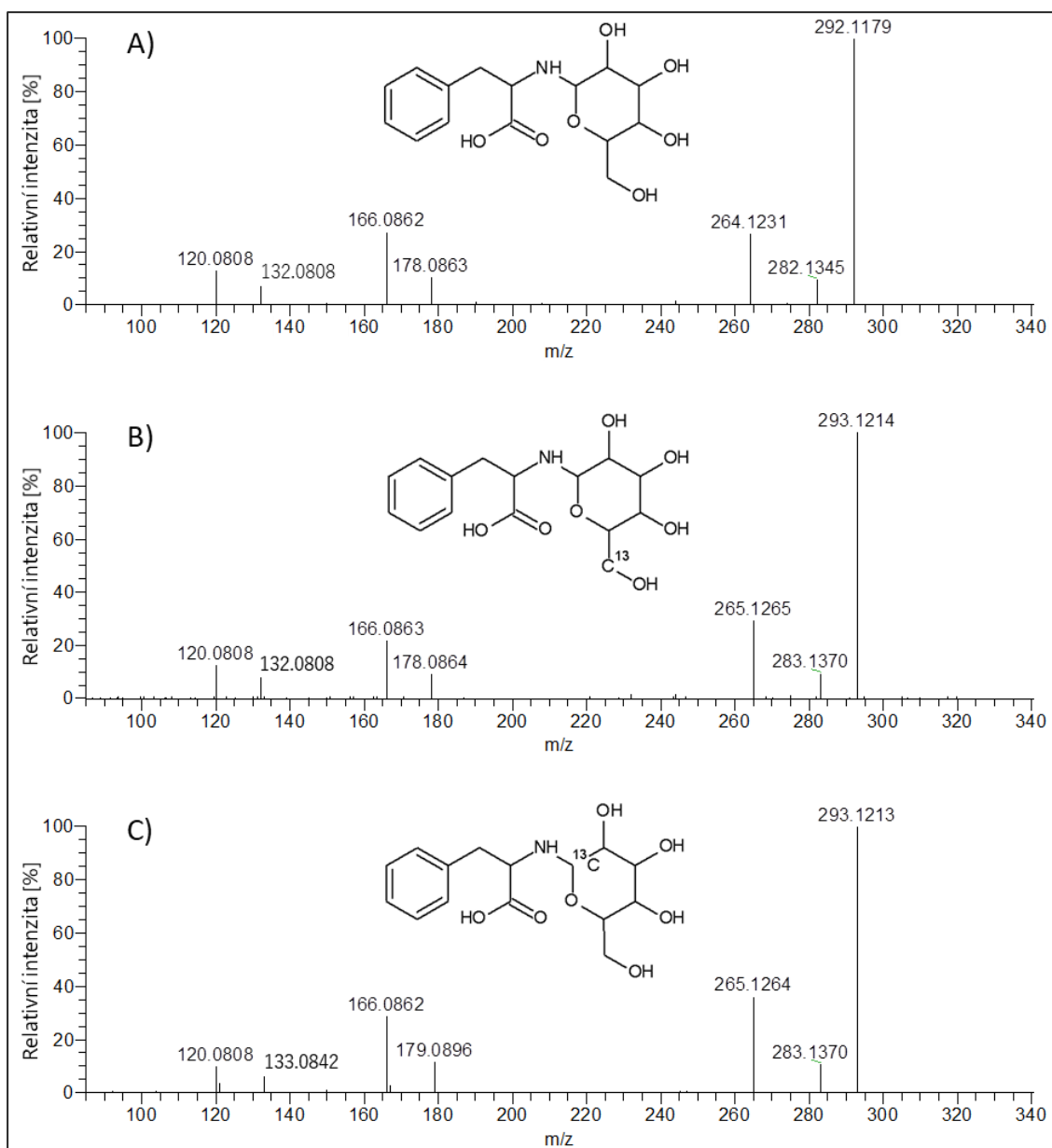
Další významně zvýšený signál u PKU pacientů byl detekován s  $m/z$  328,1391, čemuž odpovídá sumární vzorec C<sub>15</sub>H<sub>22</sub>O<sub>7</sub>N při hmotnostní odchylce 0,5 ppm a stupni nenasycenosti 6. Molekulový ion byl nalazen v t<sub>R</sub> 4,4 min a relativní intezity jeho <sup>13</sup>C<sub>1</sub>, <sup>13</sup>C<sub>2</sub> a <sup>13</sup>C<sub>3</sub> izotopů byly 15,1 % 1,9 % a 0,3 %. Tento sumární vzorec odpovídá podle ChemSpider a databáze MyCompoundID kojugátu Phe a hexózy. Výsledkem MS<sup>2</sup> CID fragmentační analýzy byl jediný dominantní ion ( $m/z$  310,1285 odpovídající ztrátě molekuly vody), který v MS<sup>3</sup> CID fragmentační analýze poskytl bohaté produktové spektrum, jenž bylo užitečné pro strukturní identifikaci, viz obrázek 13. Ionty o  $m/z$  166,0863 a 120,0808 odpovídají Phe a jeho hlavnímu fragmentu s neutrální ztrátou 46,0051 (HCOOH).



**Obrázek 13.** CID MS<sup>2</sup> a MS<sup>3</sup> fragmentační spektra konjugátu Phe a hexózy nalezené v plazmě PKU pacientů.

Inkubační experimenty Phe s hexózy vedly k neenzymatickému vzniku konjugátů Phe a hexózy. Syntetizované konjugáty Phe-Glc, Phe-manóza a Phe-galaktóza koeluovaly v LC nezávisle na použité stacionární fázi (C18, amino i amido fázi). Pravděpodobně z důvodu shodné orientace molekul konjugátů ke stacionární fázi koncem tvořeným molekulou Phe. Fragmentační hmotnostní spektra ( $MS^2$  a  $MS^3$ ) syntetizovaných konjugátů Phe-Glc a Phe-manózy byla shodná s fragmentačními spektry naměřenými ve vzorcích plazem PKU pacientů a zároveň byla ve shodě s *in-silico* predikovanými produktovými spektry.

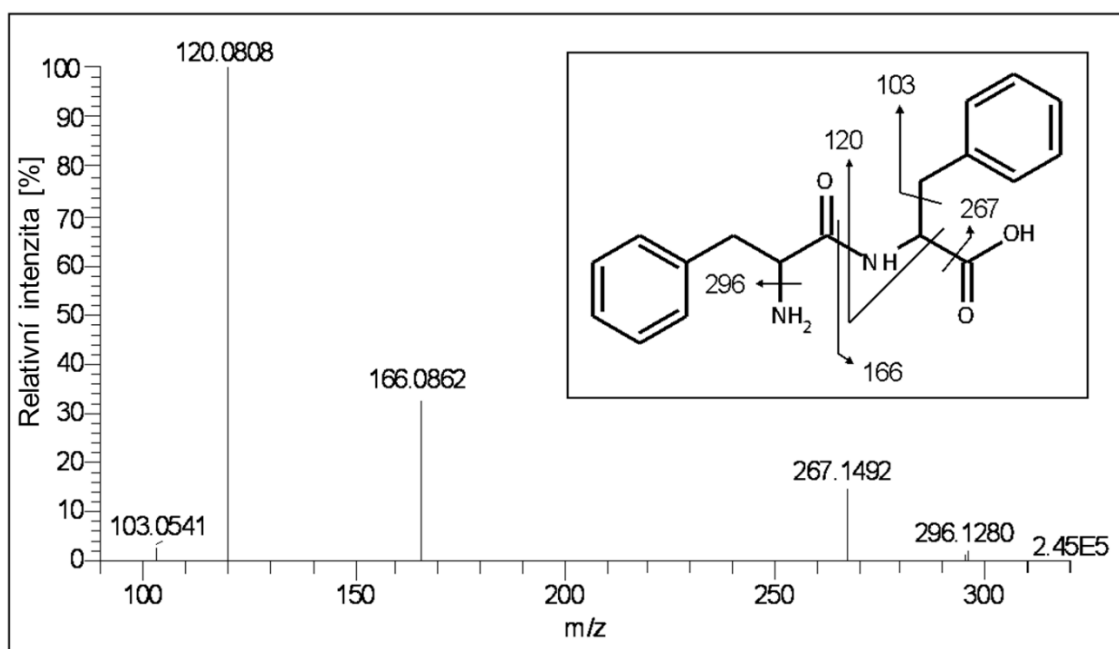
Fragmentační analýza syntetizovaného konjugátu Phe s izotopově značným standardem glukóza-1- $^{13}C$  potvrdila vazbu mezi Phe a atomem uhlíku C1 patřící Glc. Vysvětlením je přítomnost produktového iontu o  $m/z$  179,0896 v  $MS^3$  spektru, zatímco ion o  $m/z$  178,0863, který by odpovídal druhé nejpravděpodobnější konjugaci prostřednictvím atomu uhlíku C6 patřící Glc, v  $MS^3$  spektru přítomný nebyl, viz. obrázek 14. Přítomnost fragmentu v  $MS^3$  spektru o  $m/z$  133,0842 potvrdila konjugaci Phe ke Glc prostřednictvím amino skupiny (pro porovnání - obrázky 13 a 14).



**Obrázek 14.** MS<sup>3</sup> fragmentační spektra A) Phe-hexózy nalezené ve vzorcích plasmy PKU pacientů, B) syntetizovaného konjugátu Phe-glukózy-6-<sup>13</sup>C, C) syntetizovaného konjugátu Phe-glukózy-1-<sup>13</sup>C.

Kromě výše uvedených biomarkerů byly u pacientů s PKU nalezeny také konjugáty nedávno popsané literatuře a to Phe-Phe [81] a N-laktoyl-Phe [83]. Jejich molekulové struktury byly charakterizovány stejným postupem jako bylo popsáno výše. Dipeptid Phe byl detekován v plazmě PKU pacientů pomocí LC-HRMS orbitrap analýzy jako  $m/z$  313,1547, což odpovídá sumárnímu vzorci C<sub>18</sub>H<sub>21</sub>O<sub>3</sub>N<sub>2</sub> při přesnosti určení molekulové hmotnosti 0,1 ppm a ekvivalentu

nenasycenosti o hodnotě 10. Molekulový iont byl detekován v  $t_R$  8,9 min s relativní intenzitou izotopů  $^{13}C_1$  16,0 % a  $^{13}C_2$  1,0 %. Relativní intenzita teoretického izotopového vzoru pro sumární vzorec  $C_{18}H_{21}O_3N_2$  je  $^{13}C_1$  19,5 % a  $^{13}C_2$  a 1,8 %. CID fragmentační analýza molekulového iontu poskytla ionty o  $m/z$  103,0541, 120,0808, 166,0862, 267,1491 a 296,1279. Podle Metlin databáze odpovídá  $m/z$  313,1547 s přesností molekulové hmotnosti do 1 ppm buď N-[4-[(hydroxyamino)karbonyl]fenyl]- $\alpha$ S-(1-methylethyl)-benzenacetamidu nebo Phe-Phe. Na základě experimentálních fragmentačních dat (viz obrázek 15) a *in-silico* výpočtů byla  $m/z$  313,1547 charakterizována jako konjugát Phe-Phe.



**Obrázek 15.** CID MS2 fragmentační spektrum Phe-Phe nalezeného v plazmě PKU pacientů.

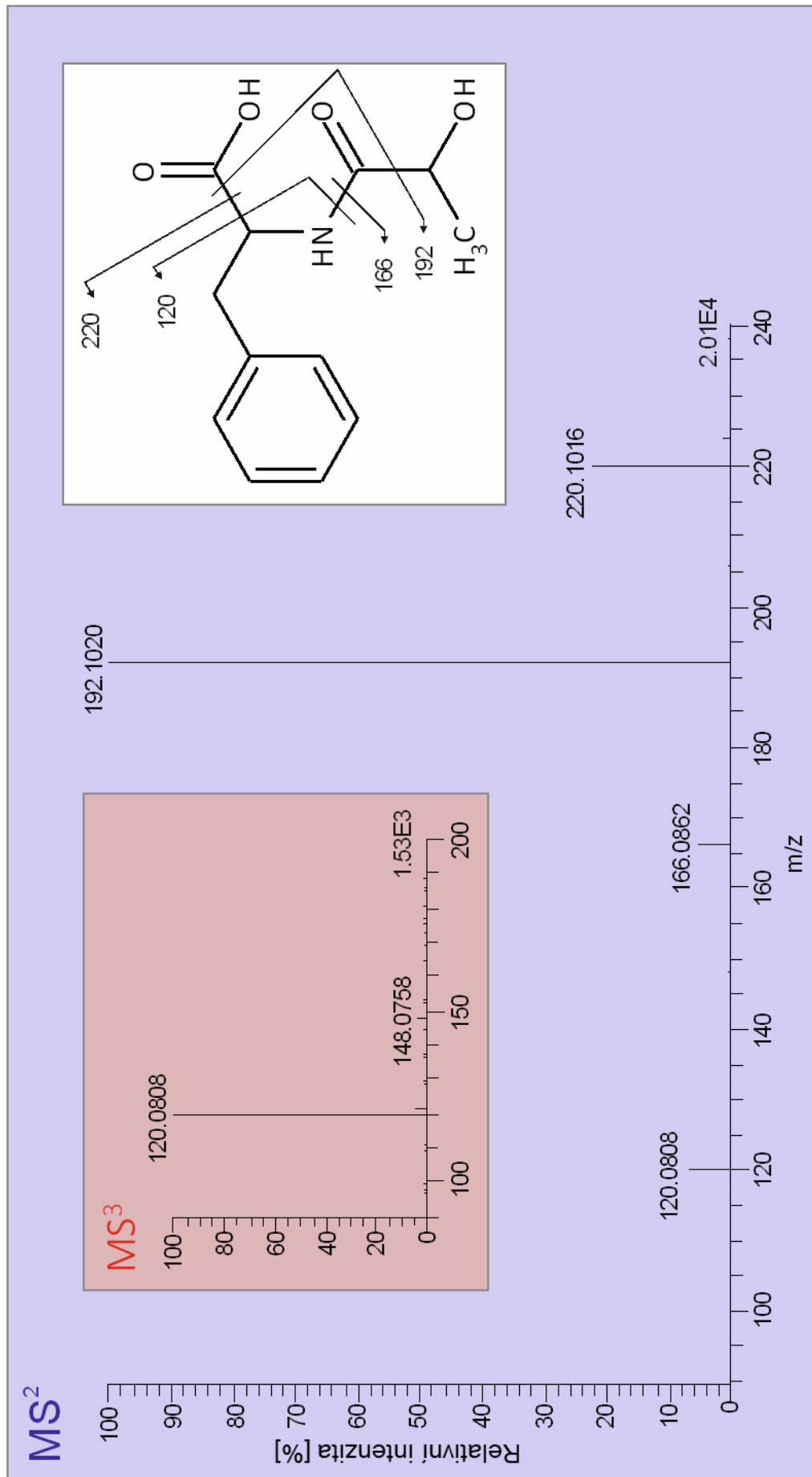
Další známý biomarker PKU, který byl charakterizován již dříve jako N-laktoyl-Phe byl rovněž detekován pomocí LC-HRMS orbitrap analýzy. Jeho  $m/z$  238,1074 odpovídá sumárnímu vzorci  $C_{12}H_{16}O_4N$  při přesnosti určení molekulové hmotnosti 0,1 ppm a ekvivalentu nenasycenosti o hodnotě 6.  $t_R$  molekulového iontu byl 9,5 min s relativní intenzitou izotopu  $^{13}C_1$  11,5 %. Relativní intenzita teoretického izotopového vzoru pro sumární vzorec  $C_{12}H_{16}O_4N$  je 13,0 % pro  $^{13}C_1$  izotop. Naměřené CID MS<sup>2</sup> spektrum obsahuje fragmentační ionty o  $m/z$

120,0808, 166,0862, 192,1019 a 220,0969. Dominantní ion v MS<sup>2</sup> spektru o *m/z* 192,1019 byl fragmentován dále a jeho MS<sup>3</sup> spektrum obsahuje ionty o *m/z* 120,0808 a 148,0757. Fragmentační dráha 238,1074/192,1019/148,0757 představuje neutrální ztrátu mravenčí kyseliny v prvním kroku a poté neutrální ztrátu acetaldehydu v následujícím kroku, což potvrzuje konjugaci Phe a laktátu prostřednictvím NH skupiny, viz obrázek 16. Tabulka 1 shrnuje biomarkery PKU, které byly pozorovány v této studii.

**Tabulka 1.** Biomarkery PKU pozorované v této studii.

metabolit	<i>m/z</i> (M+H <sup>+</sup> )	<i>t<sub>R</sub></i> (min)	průměr F-Ch (pac/kon)	průměr intenzit	
				pac	kon
Phe	166,0863	4,6	3	2,27e7	7,67e6
Glu-Phe	295,1289	7,1	12	2,45e5	2,00e4
Phe-hexóza	328,1391	5,2	19	1,94e5	1,00e4
Glu-Glu-Phe	424,1714	7,6	320	3,01e3	9,47e0
Phe-Phe	313,1547	8,9	4	1,60e4	3,68e3
N-laktoyl-Phe	238,1074	9,5	N/A	1,07e3	N/A

Pozn. pac – pacienti, kon – kontroly, N/A: V kontrolních vzorcích byla odezva pod limitem detekce, což znemožňuje výpočet fold-change (F-Ch).



**Obrázek 16.** CID MS<sup>2</sup> a MS<sup>3</sup> fragmentační spektra N-laktoyl-Phe nalezeného v plazmě PKU pacientů.

#### 4.3.2.2.2 Deficit 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyázy

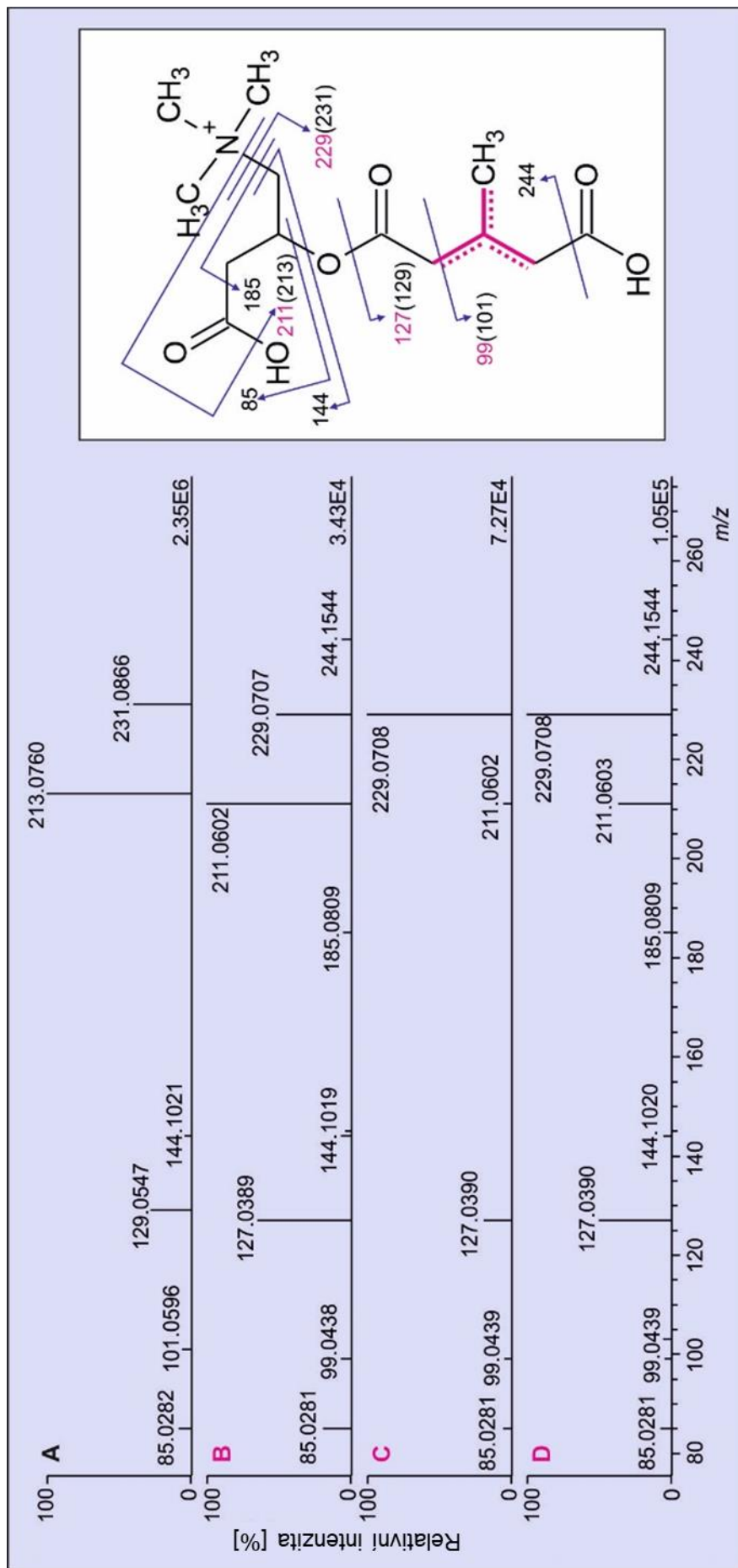
Tři chromatografické píky s  $t_R$  4,6 min, 5,0 min a 5,2 min byly nalezeny se shodným  $m/z$  288,1440, což odpovídá sumárnímu vzorci  $C_{13}H_{22}O_6N$  (hmotnostní odchylka 0,6 ppm a stupeň nenasycenosti 4). Všechny chromatografické píky poskytly stejné CID MS<sup>2</sup> fragmentační ionty, které se pouze lišily svou relativní intenzitou, viz obrázek 17B-D. Srovnáme-li tyto spektra s fragmentačním spektrem 3-methylglutarylkarnitinu (viz obrázek 17A), nalezneme hmotnostní rozdíl 2,0085 Da u třech nejdominantnějších fragmentů, který odpovídá dvěma vodíkovým atomům, které má 3-methylglutarylkarnitin ve své struktuře navíc. Produktové ionty o  $m/z$  85,0281 a 144,1019 odpovídají známým fragmentům acylkarnitinů. Přítomnost karnitinu ve struktuře byla potvrzena i charakteristickou neutrální ztrátou 161,1050 (288,1440 → 127,0390). Tyto informace společně s biochemickou logikou naznačují, že statisticky významný signál u pacientů s HMGA odpovídá 3-methylglutakonylkarnitinu a jeho izomerům. Tabulka 2 shrnuje pozorované acylkarnitinové biomarkery v plazmě pacientů s HMGA. Vzhledem k tomu, že byly dostupné jen dva vzorky pacientů, nebyly vypočítány F-Ch jednotlivých biomarkerů mezi skupinou pacientů a kontrol, ale je uveden pouze průměr intenzi.

**Tabulka 2.** Biomarkery HMGA pozorované v té studii.

acylkarnitin	m/z (M+H <sup>+</sup> )	$t_R$ (min)	sumární vzorec	průměr intenzit	
				pac	kon
3-hydroxyizovaleryl	262,1649	4,1	$C_{12}H_{24}NO_5$	6,59e6	5,86e4
3-methylglutakonyl izomer A	288,1442	4,6	$C_{13}H_{22}NO_6$	3,46e5	N/A
3-methylglutakonyl izomer B	288,1442	5,0	$C_{13}H_{22}NO_6$	1,23e5	N/A
3-methylglutakonyl izomer C	288,1442	5,2	$C_{13}H_{22}NO_6$	5,40e5	N/A
3-methylglutaryl	290,1598	5,1	$C_{13}H_{24}NO_6$	7,41e6	3,12e4

Pozn. pac – pacienti, kon – kontroly; N/A: V kontrolních vzorcích byla odezva pod limitem detekce.





**Obrázek 17.** CID MS<sup>2</sup> fragmentační spektra (A) 3-methylglutaryl-L-carnitinu, (B) píku s  $t_R$  4,6 min, (C) píku s  $t_R$  5,0 min, (D) píku s  $t_R$  5,2 min.

### 4.3.3 Diskuze

Současné hybridní HRMS přístroje obsahující lineární i orbitální iontovou past mohou dosahovat přesnosti určení molekulové hmotnosti pod 1 ppm a to díky externí kalibraci a hlavně online hmotnostní korekci prostřednictvím “lock mass“ funkce [84]. Úroveň této hmotnostní přesnosti významně snižuje počet teoretických sumárních vzorců, které odpovídají dané  $m/z$ . Vysoké rozlišení (1 000 000) současných orbitrapů umožňuje odlišit i sloučeniny, které jsou při nižším rozlišení (např. 30 000) u starších TOF-MS přístrojů maskovány překryvem širokých hmotnostních píků [52]. MS data naměřená při vysokém rozlišení poskytují informace i o izotopové četnosti a poměrech atomů ve struktuře, které jsou pro některé prvky typické a mohou tak odhalit jejich přítomnost v určované molekule [85], [86]. Tyto schopnosti HRMS<sup>n</sup> přístrojů umožňují překonat obtíže s identifikací neznámých látek v metabolomických studiích.

Tato studie ukazuje výhody kombinace necílené metabolomické analýzy s LC-HRMS<sup>n</sup> a demonstruje schopnost spolehlivě identifikovat struktury nových potenciálních biomarkerů známých DMP. S využitím vícestupňových fragmentačních analýz se podařilo určit molekulovou strukturu neznámých látek, které byly nalezeny metabolomickým přístupem u vzorků plazem pacientů trpících PKU a HMGA. Tyto neznámé látky charakterizované jako potenciální biomarkery byly nalezeny pomocí “metabolického screeningu další generace“ [79] založené na LC-QTOF-MS systému v Nijmegenu, zatímco strukturní identifikace pomocí LC-HRMS<sup>n</sup> analýz proběhla v Olomouci. Identita těchto látek se podařila určit ve vzorcích plazmy bez jakéhokoli zakoncentrování a přečišťování.

Kromě strukturního potvrzení známých biomarkerů PKU Phe-Phe a N-laktoyl-Phe byly pozorovány i nové biomarkery s  $m/z$  424,1714 a 328,1391. LC-HRMS<sup>n</sup> fragmentační analýza signálu  $m/z$  424,1714 odhalila informace, na jejichž základě byla identifikována jediná odpovídající struktura, a to tripeptid Glu-Glu-Phe. Z pohledu MSI (viz kapitola 2.3.6) [53] spolehlivost identifikace Glu-Glu-Phe odpovídá úrovni 2. Za zmínku stojí fakt, že pro Glu-Glu-Phe byl vypočítán největší F-Ch mezi pacienty a kontrolní skupinou. Intenzita této látky však u jednoho pacienta byla pod limitem detekce, přestože hladina Phe naměřená v jeho

vzorku byla srovnatelná s ostatními PKU pacienty. Druhý nový biomarker PKU s  $m/z$  328,1391 byl identifikován jako konjugát Phe-hexózy (MSI úroveň 3). Inkubací Phe s Glc, manózou a galaktózou se podařilo napodobit ne-enzymatickou konjugaci *in vitro*. Výsledky LC-HRMS<sup>n</sup> analýz těchto *in vitro* syntetizovaných konjugátů společně se skutečností, že nejdostupnější hexóza *in vivo* je Glc, vedly k závěru, že konjugát Phe-Glc je nejpravděpodobnějším kandidátem identifikace. Rozdíly naměřených hodnot mezi pacienty a kontrolní skupinou byly větší u nově identifikovaných biomarkerů ve srovnání s klasickým biomarkerem PKU (Phe), viz tabulka 1. Vzhledem k teoreticky ne-enzymatickému mechanismu vzniku konjugátu Phe-Glc je možné formulovat hypotézu, že jeho měřením by se dala sledovat dlouhodobější hladina Phe *in vivo* než měřením samotného Phe (analogie měření glykovaného hemoglobinu k měření Glc). Tripeptid Glu-Glu-Phe by teoreticky mohl také vznikat ne-enzymatickou konjugací a podobné inkubační experimenty jako u Phe-hexózy je třeba provést, aby se tato hypotéza otestovala. Nižší korelace mezi hladinami Phe a hladinami nově nalezených PKU biomarkerů naznačuje, že tyto látky by mohly poskytnout dodatečnou informaci o klinickém stavu PKU pacientů. Budoucí studie složená z většího počtu klinicky dobře definovaných PKU pacientů by měla ověřit, jestli sledování hladin Glu-Glu-Phe a Phe-Glc může pozitivně ovlivnit jejich dlouhodobý zdravotní stav.

Ve vzorcích plazem pacientů s HMGA byly nalezeny tři neobvyklé píky s identickou přesnou hmotností 288,1440 Da. Tyto tři signály poskytovaly i shodné fragmentační ionty na jejichž základě byly následně identifikovány jako tři poziční izomery 3MGC-K (MSI úroveň 2). 3MGC-K byl už pozorován v silně přečišťované moči pacientů s MGCA pomocí MS se starším typem ionizace (bombardování těžkými atomy) [87]. Autoři však identifikovali pouze jeden izomer 3MGC-K a jeho přítomnost v moči připisovali léčbě pacienta L-karnitinem. Během naší studie byl k dispozici i vzorek plazmy pacienta s MCCD. Defektní enzym této choroby katalyzuje reakci v degradační metabolické dráze leucinu před krokem, který katalyzuje HMG-CoA lyáza. Proto u MCCD nebylo očekáváno hromadění 3MGC-K. Přesně podle předpokladu, žádný signál o  $m/z$  288,1440 nebyl v plazmě pacienta s MCCD nalezen. Primární plazmatický

biomarker HMGA, 3HIV-K, je běžně pozorován i v plazmě pacientů s MCCD a mnohočetným deficitem karboxyláz. Sledování 3MGC-K by mohlo zvýšit specificitu diagnostického testování, které by mělo význam například v NBS. Podobně jako v případě nově nalezených potenciálních biomarkeru PKU, skutečná přidaná hodnota sledování 3MGC-K u HMGA je třeba ověřit další studií, která se bude skládat z většího počtu klinicky dobře definovaných pacientů.

#### **4.4 Diagnostika 3-hydroxy-3-methylglutarové acidurie v rámci novorozeneckého screeningu**

Tato studie si dala za cíl nalézt nové potenciální plazmatické biomarkery HMGA. Pomocí necílené metabolické analýzy byly v plazmě pacientů nalezeny zvýšené hladiny (vůči kontrolám) acylkarnitinů a organických kyselin, které jsou biochemicky odvozeny od meziproductů leucinové degradační dráhy. Následující experiment se týkal cílené analýzy diskriminujících metabolitů z předchozího experimentu a kladl si za cíl demonstrovat jejich diagnostický potenciál ve vzorcích krevních skvrn pacientů s HMGA pro možnost využití v NBS. Měření těchto metabolitů v rámci NBS umožní specificky diagnostikovat HMGA bez nutnosti ověřovací analýzy organických kyselin v moči pacienta. Publikace na toto téma s názvem „A newborn screening approach to diagnose 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase deficiency“ byla publikována v roce 2020 v časopise JIMD Reports [88].

##### **4.4.1 Materiál a metody**

###### **4.4.1.1 Vzorky**

Vzorky plazem pro necílenou metabolickou analýzu byly získány od 5 pacientů s HMGA – 3 dívky (stářím 4, 17 dnů a 8 let) a 2 chlapci (stářím 1 a 5 let). Diagnóza těchto pacientů byla potvrzena enzymovými a genetickými testy. Kontrolní vzorky plazem byly získány od 19 dětí (9 chlapců a 10 dívek ve věku mezi 2 a 17 let) odběrem krve do 5 ml vakuových zkumavek K<sub>3</sub>EDTA Vacuette

Greiner (Německo) při laboratorní teplotě a centrifugaci na 3000 x g trvající 10 min. Odebraná plazma byla skladována v mrazícím boxu při -80 °C. Vzorky pocházející od spolupracujících laboratoří byly doručeny na suchém ledu do 48 hodin.

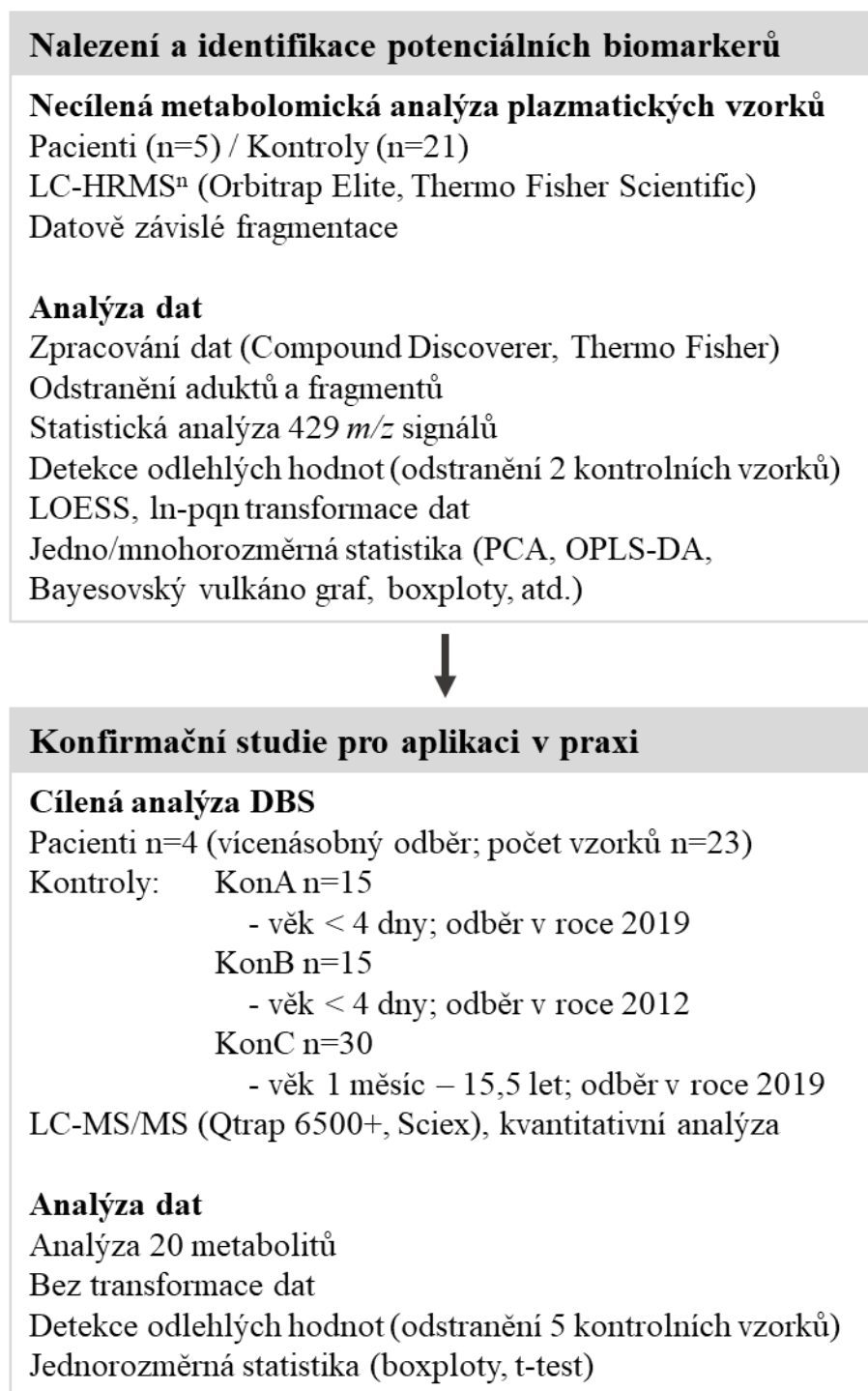
V cílené LC-MS/MS analýze byly použity tři typy kontrolních vzorků krevních skvrn: vzorky zdravých novorozenců (KonA, n = 14) odebraných maximálně tři týdny před analýzou (reprezentující kontroly vůči potencionálně nově diagnostikovaným novorozencům s HMGA), vzorky zdravých novorozenců (KonB, n = 14) odebraných přibližně 6 let před analýzou (reprezentující kontroly vůči starým vzorkům krevních skvrn pacientů, které se podařilo získat pro tuto studii) a vzorky zdravých jedinců ve věku 1 měsíc až 15 let (KonC, n = 27), jejichž vzorky krevních skvrn byly odebrány maximálně dva měsíce před analýzou (reprezentující kontrolní vzorky odpovídající stáří pacientů s HMGA, které se podařilo získat pro tuto studii). Všechny kontrolní vzorky byly odebrány v Laboratoři dědičných metabolických poruch Fakultní nemocnice Olomouc.

Vzorky krevních skvrn geneticky potvrzeného pacienta s HMGA (Pac1 – dívka, léčená speciální stravou s nízkým obsahem proteinů a pravidelnou dávkou L-karnitinu, poskytla 20 vzorků v rozsahu věku 4,4 až 15,2 roků) byly získány od spolupracující laboratoře ve Freiburgu (Německo). Další vzorek geneticky potvrzeného pacienta (Pac4 – novorozený chlapec diagnostikovaný 10 dní po porodu poskytl vzorek před zahájením léčby) byl získán z Dětské univerzitní nemocnice v Banské Bystrici (Slovensko). Do studie byli zahrnuti i další dva pacienti z německého Hannoveru, jejichž diagnóza HMGA nebyla zatím potvrzena genetickými testy (Pac2 a Pac3 – dvě dívky ve věku 5,6 a 10,0 let).

#### **4.4.1.2 Metody**

Vzorky plazem pacientů s HMGA a kontrol byly analyzovány pomocí necílené metabolomiky s využitím LC-HRMS<sup>n</sup> s cílem odhalit metabolity odlišující tyto dvě skupiny. Po statistickém vyhodnocení a zpracování dat byly určeny fyziologické koncentrace nejvíce diskriminujících látek pomocí LC-

MS/MS analýzy 55 kontrolních vzorků krevních skvrn. Stejně tak byly vypočítány patologické koncentrace diskriminujících metabolitů v krevních skvrnách pacientů. Přehled provedených experimentů i s metodami zpracování dat je k nahlédnutí na obrázku 18. Forma všech publikovaných dat je v souladu s minimálními publikačními požadavky iniciativy MSI [53].



**Obrázek 18.** Přehled provedených experimentů.

#### 4.4.1.2.1 Necílená metabolická analýza

Vzorky plazem byly rozmrazeny v lednici při 4 °C a 50 µl alikvot heparinovaných plazem byl převeden do polypropylenových zkumavek. Do každé byla přidána vymražená směs methanolu/ethanolu (1:1, 200 µl) pro vysrážení proteinů. Vzorky byly vortexovány po dobu 30 s a inkubovány při -80 °C přes noc. Poté byly vzorky centrifugovány při 21 300 x g po dobu 15 min při 4 °C. Supernatant (220 µl) byl lyofilizován a rozpuštěn ve vodě (100 µl) s přidavkem 0,1% mravenčí kyseliny. Po homogenizaci byly vzorky centrifugovány při 21 300 x g po dobu 15 min při 4 °C. Systémové QC vzorky byly připraveny ze směsi alikvotů všech patientských vzorků a směsi alikvotů všech kontrolních vzorků v poměru 1:1, aby bylo zabráněno zředovacímu efektu významně vyššího počtu kontrolních vzorků nad počtem patientských vzorků. Všechny vzorky byly analyzovány v jediné sérii analýz skládající se z QC vzorků (7), blanků (jeden na začátku a jeden na konci série), QC vzorků (8), během jejichž analýz byly měřeny datově závislá fragmentační spektra, směsi standardů pro odlišení izobarických látek (4) a systémových QC vzorků (každá 6. analýza v pořadí). Vzorky kontrol a pacientů byly analyzovány v náhodném pořadí.

Všechny vzorky byly aplikovány na kolonu Acquity HSS T3 s reverzní C18 fází, která byla vyhřívána na 40 °C uvnitř LC systému Ultimate 3000 (Dionex, Sunnyvale, CA, USA). Byl použit 5 µl nástřik s využitím 40 µl vzorkovací smyčky a oplachem jehly mobilní fází B mezi jednotlivými nástřiky vzorků. Chromatografická metoda (složení mobilních fází, gradient, průtok, teplota kolonového prostoru) byla stejná, jako v kapitole 4.3.1.2. LC systém byl propojen s hybridním Orbitrapem Elite, který byl nastaven stejně jako v kapitole 4.3.1.3. Byla využita elektrosprejová ionizace v pozitivním módu (2,8 kV). Celkový sken sbíral data v rozsahu  $m/z$  90–1000 při rozlišení 120 000. Přesnost měření  $m/z$  byla nižší než 1 ppm díky externí kalibraci (kalibrační mix pro pozitiv, Thermo Scientific, San Jose, USA) a online hmotnostní korekci pomocí diizooktylfthalátu o teoretické hodnotě  $m/z$  391,2843.

Pro datově závislé fragmentační analýzy byl vytvořen seznam  $m/z$  signálů, které měli ve vzorku blanku odezvu alespoň 30 000. Tyto hodnoty  $m/z$  nebyly

analyzovány během fragmentačních analýz QC vzorků. Datově závislé fragmentační analýzy byly měřeny při rozlišení 15 000 a to prostřednictvím dvou typů fragmentačních technik, tj kolizemi indukovanou disociací (CID) a disociací velkou kolizní energií (HCD). Pět nejintenzivnějších iontů bylo fragmentováno v každém skenovacím cyklu, a to ve čtyřech  $m/z$  rozsazích 90–200, 200–400, 400–600 and 600–1000 (jeden nástřik QC vzorku na každý  $m/z$  rozsah a typ fragmentace). U CID fragmentací byla použita energie 35 jednotek normalizované kolizní energie a u HCD fragmentací to bylo 50 jednotek.

#### 4.4.1.2.1.1 Zpracování dat

K detekci a integraci chromatografických píků byl využit program Compound Discoverer 3.0, kterým byly doplněny chybějící hodnoty (hodnotou šumu), srovnány retenční časy a odstraněny píky mající intenzitu pod 10 000. Kompletní seznam nastavených parametrů v programu Compound Discoverer je vypsán v kapitole 10. Přílohy. Spojení aduktů, izotopů a fragmentů vznikajících ve zdroji od každého jednotlivého metabolitu proběhlo ve statistickém software R (v3.5.0) tak, jak je popsáno v publikaci Kouřil, de Sousa a kolektiv [65]. Korekce signálu pomocí lokální regrese (LOESS, viz kapitola 2.3.4) [67] byla provedena pomocí softwarového balíčku Metabol [89] v R programu. Metabolity/signály, které měly pro QC vzorky vyšší variační koeficient než 30 % byly z finální datové tabulky odstraněny. Data byla normalizována podle pravděpodobnostního kvocientu [90] a pro jejich škálování byl použit přirozený logaritmus [91]. Detekce odlehlých hodnot byla provedena v rámci skupin pomocí ROBPCA metody, která kombinuje robustní kovarianční odhad s technikami sledování projekce [92], které jsou součástí balíčku Metabol [89]. [88]. Na základě výsledků metody byly dva kontrolní vzorky určeny jako odlehlé a jejich celkový počet se snížil na 19.

Po těchto úpravách dat z necílené metabolické analýzy se přistoupilo k jejich vizualizaci pomocí mnohorozměrných statistických metod jako je PCA a OPLS-DA (viz kapitola 2.3.5). Kromě bayesovského vulkánového grafu byly všechny výpočty a grafické výstupy provedeny v softwarovém balíčku Metabol [89]. K určení nejvíce diskriminujících metabolitů mezi skupinami pacientů a



kontrol (tj. potenciálních biomarkerů) byly vybrány výstupy z bayesovského vulkánového grafu [71] a VIP grafu z OPLS-DA. Pouze metabolity se vzdáleností intervalu s nejvyšší hustotou posteriorního rozdělení (HDI) od nuly alespoň 2 a metabolity s VIP skóre větším než 2 byly považovány za dostatečně významné, aby se u nich provedla strukturní identifikace.

#### 4.4.1.2.1.2 Strukturní identifikace diskriminujících metabolitů

Identifikace diskriminujících metabolitů byla provedena v souladu s principy MSI [53]. Identita acylkarnitinů a organických kyselin odvozených od degradační metabolické dráhy leucinu byla potvrzena srovnáním přesné molekulové hmotnosti, fragmentačních spekter a retenčních časů s certifikovaným referenčním materiálem (MSI úroveň 1). Všechny diskriminující metabolity, pro které nebyly odpovídající standardy komerčně dostupné, byly identifikovány na základě přesné molekulové hmotnosti, porovnáním fragmentačních spekter a oblastí eluce z chromatografické kolony s podobným typem metabolitu, od něhož byl komerční standard dostupný (MSI úroveň 2). Diskriminující metabolity, které se nepodařilo strukturně identifikovat, byly označeny jako neznámé (MSI úroveň 4).

#### 4.4.1.2.2 Cílená LC-MS analýza krevních skvrn

K ověření diagnostického potenciálu diskriminujících metabolitů z necílené metabolické analýzy pro účely NBS byla provedena analýza 23 krevních skvrn od 4 pacientů s HMGA (jeden pacient poskytl v průběhu života 20 vzorků) a 60 kontrolních vzorků. Analyzovalo se pomocí LC systému Sciex Exion AD, který byl propojený s MS přístrojem Qtrap 6500+ nastaveným na časově závislý MRM mód. LC-MS/MS metoda obsahovala MRM přechody, které odpovídaly metabolitům nalezeným necílenou metabolickou analýzou vzorků plazem pacientů s HMGA. Metoda navíc obsahovala i MRM přechody metabolitů, které by se na základě biochemické podstaty onemocnění daly teoreticky očekávat, tj. acylglyciny, acylkarnitiny a organické kyseliny vztahující se k defektní

metabolické dráze. Kompletní seznam MRM přechodů LC-MS/MS metody v pozitivním módu je uveden v Tabulce 3 a v negativním módu v Tabulce 4.

Tabulka 3. Seznam sledovaných metabolitů v cílené LC-MS/MS analýze - pozitivní mód

MRM pozitiv	Q1	Q3	DP	CE
L-karnitin	162,1	85,0	51	29
L-karnitin-D9	171,1	85,1	51	29
C5-karnitin	246,2	85,1	56	29
C5-karnitin-D9	255,2	85,0	66	20
3MC-K	244,1	84,9	41	29
3MC-Gly	262,2	85,0	60	30
3HIV-K	288,2	85,0	41	29
3MGC-K	290,1	212,9	51	23
3MG-K	282,3	84,9	70	35
C5-DC-D9	306,2	85,0	51	23
3H3MG-K	160,0	75,8	1	13
Leu	158,0	82,8	6	15
LeuLeu	132,0	85,9	43	17
izovaleryl-Gly	245,2	132,1	10	19
inosin	268,9	136,9	81	21
mevalonolakton	131,0	69,1	1	13

Tabulka 4. Seznam sledovaných metabolitů v cílené LC-MS/MS analýze - negativní mód

MRM negativ	Q1	Q3	DP	CE
3HIV	116,9	58,9	-25	-14
3MGC	142,9	98,9	-5	-10
3MG	144,9	59,0	-70	-30
3H3MG	160,9	98,9	-25	-16
2-OH izokaproát	131,0	85,0	-50	-17
adipát	144,9	80,9	-35	-26
acetoacetát	101,0	57,2	-50	-15
methymalonát-D3	120,0	76,0	-25	-14
hexanoyl-Gly <sup>13</sup> C2 <sup>15</sup> N	175,0	77,0	-10	-16

Příprava vzorků zahrnovala odebrání jednoho výřezu s průměrem 3,0 mm z každého vzorku krevní skvrny, který se následně extrahoval ve 100 µl methanolu obsahující izotopově značené standardy izovalerylkarnitin-D9 a methylmalonyl-D3. Extrakty byly po 20 min na třepačce (405 rpm) lyofilizovány a rozpuštěny ve 100 µl 0,1% kyselině mravenčí. Vzorky se po homogenizaci centrifugovaly na 21 300 x g při 4 °C po dobu 10 min a 90 µl supernatantu bylo převedeno do UHPLC vialek. Šesti bodová kalibrační směs tří standardů 3HIV, 3MGC a 3H3MG byla použita pro výpočet jejich koncentrace v krvi. Pro tento výpočet byl aplikován ředící faktor 62,5 (výřez byl extrahován 100 µl rozpouštědla) neboť podle nedávné studie [93] bylo zjištěno, že jeden výřez o průměru 3,0 mm z krevní skvrny obsahuje 1,6 µl krve.

Všechny vzorky byly aplikovány na stejnou kolonu, jako v případě necílené metabolické analýzy. Kolona byla vyhřívána na 30 °C v kolonovém prostoru LC systému zmíněném výše. Mobilní fáze se skládala z A – 0,5% mravenčí kyseliny a B – ACN s přídavkem 0,5% mravenčí kyseliny. Při průtoku mobilní fáze 350 µl/min byla délka analýzy 26 min. Gradientová eluce měla následující profil: t = 0,0–2,0 min, 0 % B; t = 9,0 min, 20 % B; t = 17,0–20,0 min, 95 % B; 21,0–26,0 min, 0 % B. Teplota autosampleru byla 4 °C. Vzorky byly analyzovány

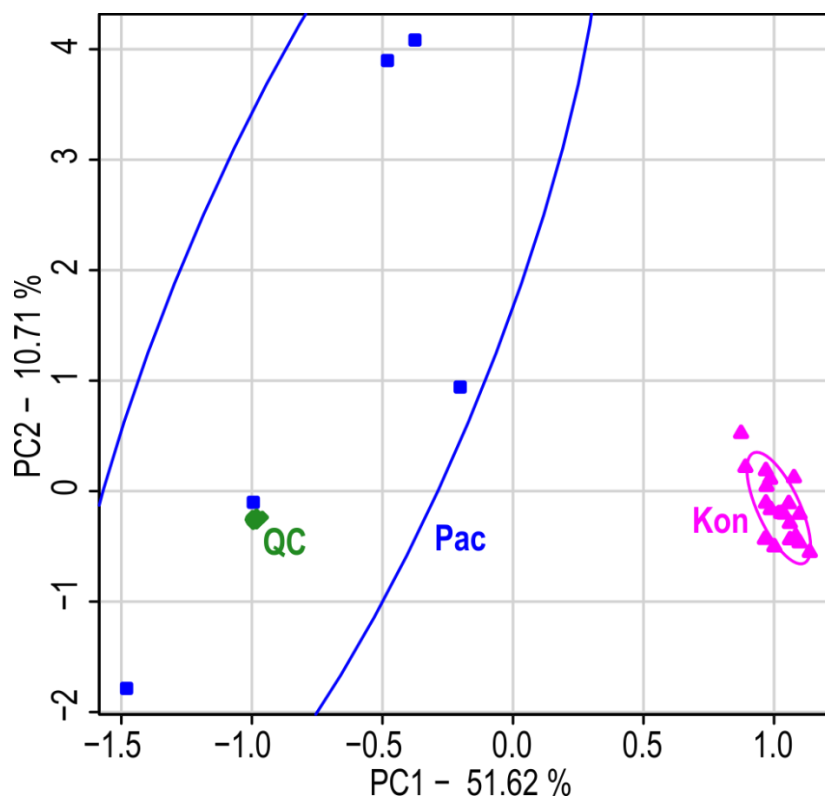
v pozitivním (4,5 kV) a negativním módu s elektrosprejovou ionizací. Teplota iontového zdroje byla 450 °C. Tlak clonícího plynu („curtain gas“) byl nastaven na 35 psi a oba pomocné plyny iontového zdroje byly nastaveny na 50 psi.

Integrace píků byla provedena v programu MultiQuant 3.0 (SCIEX) a vyhodnocení pak v programu Microsoft Excel (MS Office 2016). Plochy zintegrovaných píků organických kyselin byly vyděleny plochou píku methylmalonátu-D3, všechny ostatní metabolity byly vyděleny plochou píku izovalerylkarnitinu-D9. Koncentrace významných metabolitů byly vypočítány na základě kalibrační křivky. Podle ROBPCA metody pro detekci odlehých hodnot (součástí balíčku Metabol) bylo odstraněno pět kontrolních vzorků (po jednom ze skupiny KonA a KonB a tři ze skupiny KonC).

## **4.4.2 Výsledky**

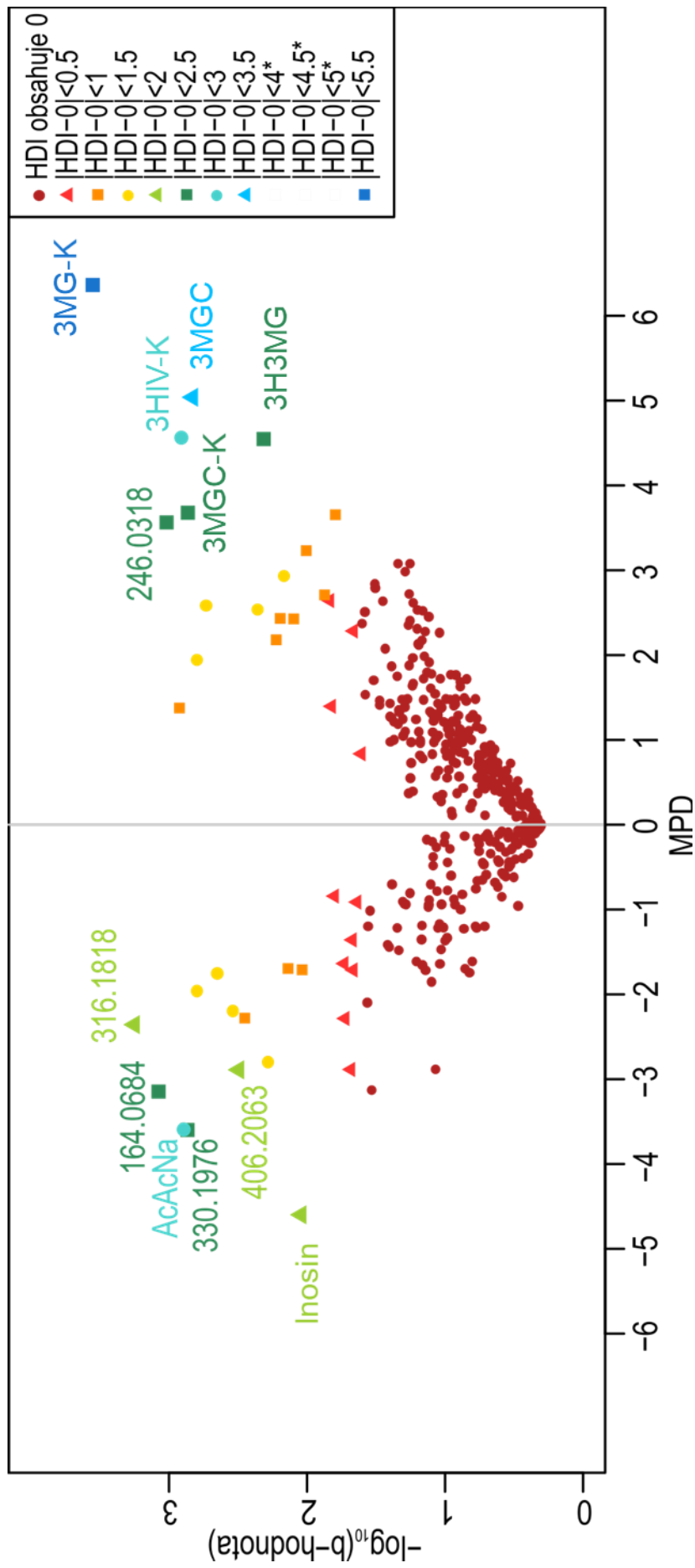
### **4.4.2.1.1 Necílená metabolická analýza**

Vzorky plazem pacientů s HMGA byly analyzovány společně s kontrolními vzorky pomocí necílené metabolické analýzy. Po zpracování a filtrování dat bylo identifikováno celkem 429  $m/z$  signálů. Nesupervizovaná statistická metoda PCA zřetelně oddělila patientské a kontrolní vzorky, což svědčí o zásadních rozdílech v metabolických profilech skupin, viz obrázek 19. Skupiny byly rozděleny ve dvou dimenzích o nejvyšší možné kumulativní vysvětlené variabilitě 62,3 %. Těsné klastrování QC vzorků vyjadřuje dobrou stabilitu analytického systému.



**Obrázek 19.** Dvourozměrná nesuservizovaná PCA analýza vzorků plazem pacientů (Pac, modrá) s HMGA a kontrolních vzorků (Kon, růžová). Zelený klastr reprezentuje QC vzorky. Oblasti uvnitř zobrazených elips představují 75% konfidenční interval.

Supervizované statistické metody jako je bayesovský vulkánový graf (obrázek 20) s vizualizací HDI hladin vzdáleností od nuly a VIP graf z OPLS-DA analýzy byly využity pro určení metabolitů, jejichž hladiny byly nejvíce zvýšeny u skupiny pacientů, viz tabulka 5. V seznamu nejvíce diskriminujících metabolitů byly nalezeny všechny známé plazmatické biomarkery HMGA (3HIV-K, 3MG-K, 3MGC-K). Seznam dále obsahuje volné organické kyseliny (3MGC a 3H3MG), které jsou odvozeny od acyl-CoA, které se kumulují vlivem metabolického bloku. Tyto organické kyseliny jsou známými biomarkery HMGA ve vzorcích moče pacientů, které ale nikdy nebyly reportovány jako zvýšené v plazmě pacientů. Kromě těchto organických kyselin obsahuje tabulka 6 i 3HIV. Jedná se o organickou kyselinu odvozenou od známého plazmatického biomarkeru HMGA (3HIV-K).



**Obrázek 20.** Bayesovský vulkanový graf s barevnou vizualizací HDI hladin vzdálenosti pro dataz necílené metabolické analýzy. Tmavě červené body vyznačují nevýznamné metabolity. Potenciální biomarkery jsou vyobrazeny v modro-zelených barvách v pravém horním rohu. \* V těchto HDI hladinách vzdálenosti nebyly žádné metabolity nalezeny.

**Tabulka 5.** Nejvíce zvýšené metabolity u pacientů s HMGA na základě VIP skóre z OPLS-DA.

metabolit	[M+H] <sup>+</sup>	RT (min)	VIP skóre	HDI vzdálenost	F-Ch **	MSI identifikace
3MG-K	290,1598	4,38	3,04	5,1	63,2	úroveň 1
3MGC	127,0383*	5,49	2,68	3,4	151,4	úroveň 1
3HIV-K	262,1649	3,65	2,47	2,9	137,1	úroveň 2
3H3MG	163,0601	3,00	2,47	2,0	359,3	úroveň 1
3MGC-K	288,1441	4,42	2,24	2,4	50,5	úroveň 2
neznámý	247,0391	5,48	2,18	2,2	55,2	úroveň 4
neznámý	321,0854	3,97	2,03	0,6	135,8	úroveň 4

\* Fragmentový iont ze zdroje s větší plochou píku než molekulový ion.

\*\* Vypočítaný podíl průměru ploch píků pacientů a průměru ploch píků kontrolní skupiny KonC.

**Tabulka 6.** Organické kyseliny, které byly nalezeny zvýšené ve vzorcích plazmy pacientů s HMGA vůči kontrolám.

organická kyselina	[M+H] <sup>+</sup>	průměr ploch píků kontrol	2SD	průměr ploch píků pacientů	2SD	F-Ch
3HIV	119,0703	2141	2068	148054	530638	69,2
3MGC	145,0495	419	286	63345	87226	151,4
3H3MG	163,0601	413	398	148429	529361	359,3

Kromě známých plazmatických biomarkerů HMGA (3HIV-K, 3MG-K, 3MGC-K) byly u pacientů nalezeny ve zvýšené koncentraci i další acylkarnitiny, které jsou odvozené od meziproductů leucinové degradační dráhy, viz Tabulka 7. Za zmínku stojí především identifikace 3H3MG-K, neboť jeho CoA analog je meziproductem leucinové degradační dráhy. Do současnosti je považován za jediný substrát pro enzym HMGCL a práce z roku 2017 uvádí tento metabolit u HMGA pacientů jako nedetekovatelný [94].

**Tabulka 7.** Acylkarnitiny, které byly nalezeny zvýšené ve vzorcích plazmy pacientů s HMGA.

acylkarnitin	[M+H] <sup>+</sup>	průměr ploch píků kontrol	2SD	průměr ploch píků pacientů	2SD	F-Ch
IV-K	246,1700	2712	3143	6761	12550	2,5
3MC-K	244,1543	35	18	716	1742	20,4
3HIV-K	262,1649	619	899	84847	198406	137,1
3MGC-K	288,1441	19	243	952	1411	50,5
3MG-K	290,1598	108	199	6797	44782	63,2
3H3MG-K	306,1547	14	10	121	275	8,4

#### 4.4.2.1.2 Cílená LC-MS analýza krevních skvrn

Tabulka 8 zobrazuje vypočítané koncentrace metabolitů v krvi pacientů s HMGA a zdravých jedinců po přepočtu dat pro vzorky krevních skvrn podle postupu v kapitole 4.4.1.2.2. Krabicové grafy 3MGC, 3H3MG, 3HIV a 3HIV-K ukazují zcela oddělenou distribuci koncentrací v patientských vzorcích oproti zdravé populaci bez jakéhokoliv překryvu dat nezávisle na tom, zda jsou pacienti na léčbě či nikoliv, viz obrázek 21.

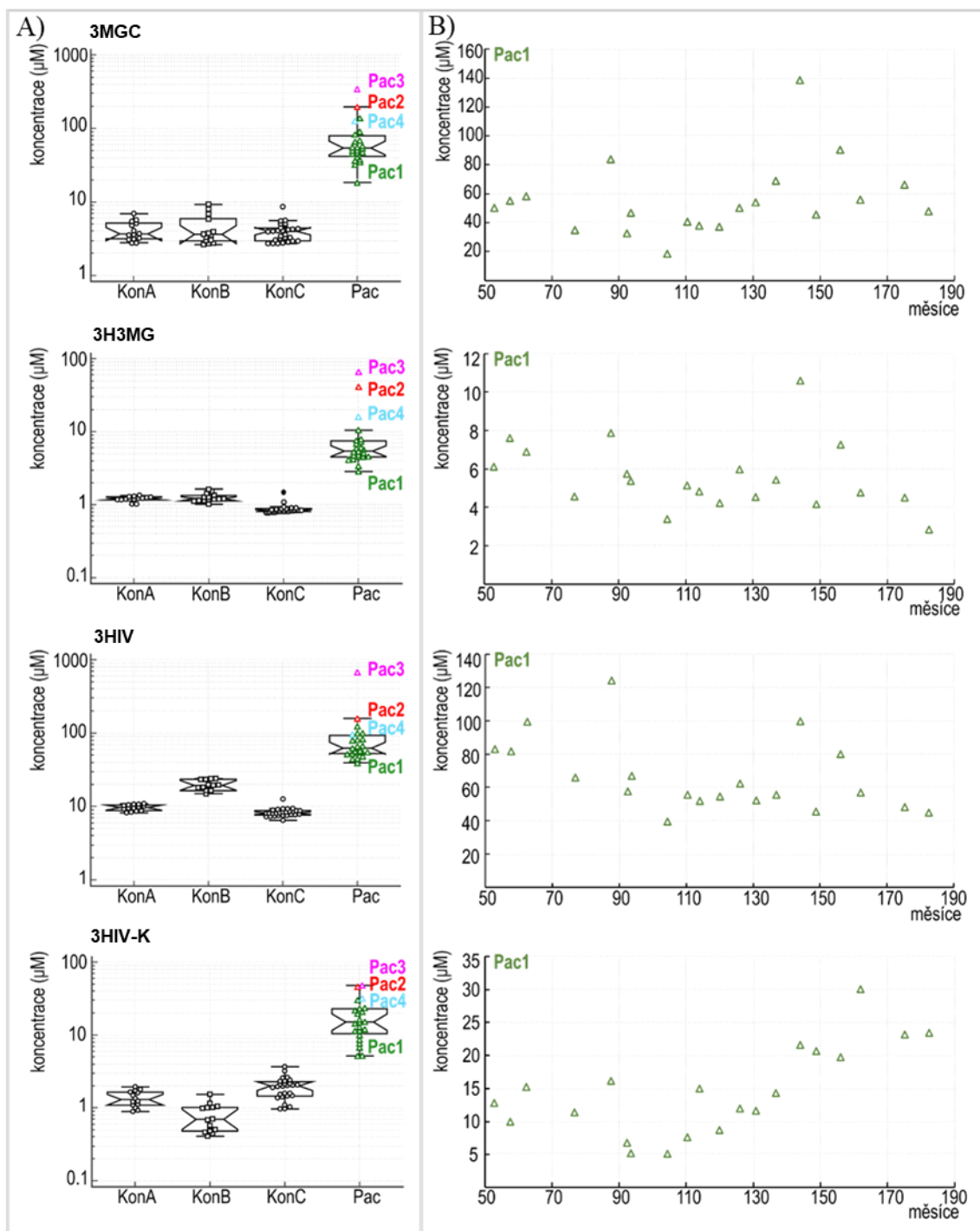
**Table 8.** Koncentrace metabolitů v krvi pacientů HMGCLD a kontrol s vypočítanými F-Ch na základě cílené analýzy krevních skvrn.

metabolit (μM)	KonA	KonB	KonC	průměr Pac1	Pac2	Pac3	Pac4	F-Ch1 *	F-Ch2 **
3MGC	4,1 ± 2,5	4,6 ± 4,2	4,2 ± 3,7	55,5 ± 51,7	195,9	343,2	126,9	13,3	53,2
3H3MG	1,2 ± 0,2	1,3 ± 0,3	0,9 ± 0,4	5,6 ± 3,6	40,0	64,9	16,1	6,3	45,2
3HIV	9,5 ± 2,1	19,3 ± 6,2	8,6 ± 3,6	66,2 ± 43,9	158,5	659,8	95,8	7,7	35,4
3HIV-K	1,3 ± 1,0	0,8 ± 0,7	1,9 ± 1,5	14,6 ± 13,6	45,7	47,5	31,7	7,6	21,8

\*Vypočítaný jako průměr koncentrací pacienta 1 (léčený pacient) vydělený průměrem koncentrací kontrolní skupiny KonC.

\*\*Vypočítaný jako průměr koncentrací pacienta 2, 3 a 4 (neléčení pacienti v době odebrání vzorků) vydělený průměrem koncentrací kontrolní skupiny KonC.





**Obrázek 21.** A) Krabicové grafy koncentrací 3MGC, 3H3MG, 3HIV a 3HIV-K u pacientů (Pac) a kontrolních skupin (KonA, KonB and KonC). Na ose y je použita logaritmická škála pro lepší vizualizaci rozdílů mezi jednotlivými kontrolními skupinami. B) Koncentrace metabolitů byla sledována v krvi pacienta 1 z období jeho věku 4,4 – 15,2 roků.

### 4.4.3 Diskuze

Plazmy pacientů s HMGA mohou vykazovat patologické koncentrace amoniaku, laktátu, 3MG-K [23], 3HIV-K [22] a třech izomerů 3MGC-K [24]. Žádný z těchto metabolitů není selektivní biomarker pro tuto chorobu, což zabraňuje diagnostikovat HMGA přímo ze vzorku krevní skvrny pacienta. Současná diagnostika HMGA je závislá na profilu organických kyselin v moči, který je charakteristický zvýšenou hladinou 3HIV, 3H3MG, 3MGC, 3MG, adipátu a v některých případech 3-methylkrotonylglycinu [95]. Odběr vzorků moči těchto pacientů obvykle nastane během (první) metabolické krize, která je spojená s projevem symptomů, jako je opakované zvracení, záchvaty a zhoršená bdělost. V metabolické krizi pacientů je častým laboratorním nálezem hypoglykémie, acidóza, hyperamonémie, zvětšené aniontové okno a zvýšené aktivity transamináz. U většiny pacientů (92 %) se symptomy objeví v průběhu prvního roku života a přibližně u poloviny už v novorozeneckém období. Magnetická rezonance pacientů u více než 70 % pacientů vykazuje abnormální nálezy na mozku [25] a to pravděpodobně vlivem metabolických krizí, které nastávají v brzkém období jejich života. Toto onemocnění se většinou potvrzuje pomocí enzymových a/nebo genetických testů. Stanovení diagnózy HMGA ve velmi nízkém věku může vést k rychlému zahájení léčby a snížení počtu budoucích metabolických krizí. Velká část pacientů na léčbě vykazuje normální psychomotorický vývoj, což demonstruje potřebu tuto chorobu rychle rozpoznat a diagnostikovat. Stejně jako u jiných organických acidurií, včasná diagnóza je kriticky důležitá pro celkovou kvalitu života HMGA pacientů. Na základě těchto skutečností se HMGA jeví jako perfektní kandidát pro zařazení do programu NBS.

Dle mého nejlepšího vědomí neexistuje spolehlivý zdroj informací, který uvádí údaj o celosvětovém výskytu HMGA. Tato choroba se jeví jako velice vzácná, avšak vyšší míru poddiagnostiky nelze vyloučit. Existuje pár studií, které zmiňují vyšší míru výskytu v některých populacích (Saudská Arábie, Brazílie, Portugalsko a Španělsko), nicméně i tak reportují výskyt menší jak 1/100 000 živě narozených dětí [95]–[97]. Podle Uniform Screening Panel [36] získalo onemocnění HMGA 16. příčku z 84 DMP pro zařazení do programů NBS v USA.

Nicméně, nízký výskyt této choroby brzdí vědecký pokrok ve vývoji specifických analytických metod, které by umožňovaly včasnou diagnózu HMGA bez nutnosti potvrzovací analýzy vzorků moče pacientů.

Pomocí necílené metabolomické analýzy plazem pacientů s HMGA byly nalezeny 3MGC a 3H3MG mezi nejvíce diskriminujícími metabolity rozlišující skupinu pacientů a kontrol. Následná LC-MS/MS analýza vzorků krevních skvrn pacientů s HMGA a kontrol byla použita pro určení rozsahu fyziologických koncentrací 3MGC ( $4,1 \pm 2,5 \mu\text{mol/l}$ ), 3H3MG ( $1,2 \pm 0,2 \mu\text{mol/l}$ ), 3HIV ( $9,5 \pm 2,1 \mu\text{mol/l}$ ) a 3HIV-K ( $1,3 \pm 1,0 \mu\text{mol/l}$ ) v krvi zdravých novorozenců a ukázala významně zvýšené patologické koncentrace těchto metabolitů v krvi pacientů s HMGA. Stojí za povšimnutí, že nově navrhované diagnostické metabolity byly u novorozeneckého pacienta 4 zvýšené přibližně o jeden řád oproti zdravým novorozencům.

## 5 ZÁVĚR

Předložená disertační práce se zabývá odhalením nových biomarkerů známých dědičných metabolických poruch pomocí metabolomických nástrojů a jejich následnou strukturní identifikací. Na základě výše uvedených informací byly formulovány následující závěry:

### 5.1 Strukturní identifikace nových biomarkerů známých dědičných metabolických poruch na základě vícestupňových fragmentačních spekter

Tato práce ukazuje, že i v případě nejintenzivněji studovaných metabolických poruch jako je PKU, je možné nalézt nové biomarkery a strukturně je charakterizovat pomocí kombinace necílené metabolické analýzy s vícestupňovou fragmentační analýzou. Tato metodologie umožňuje překonat obtíže spojené s identifikací neznámých látek v metabolomických studiích, a to u látek o relativně nízkých koncentracích v komplikovaných biologických matricích bez nutnosti vzorky derivatizovat či zakoncentrovávat. Skutečnost, že nově identifikované markery PKU, které tato práce popisuje, vykazují větší variabilitu naměřených hodnot než konvenční biomarkery PKU a že jejich korelace ke konvenčnímu biomarkeru je omezená, je pozoruhodná a mohla by naznačovat, že monitorování těchto markerů může poskytovat nezávislou informaci o klinickém stavu pacientů.

Ve vzorcích plazem pacientů s HMGA byly nalezeny tři neobvyklé píky s identickou  $m/z$  288,1440, které byly charakterizovány jako izomery 3MGC-K. Sledování 3MGC-K by mohlo zvýšit specifitu diagnostického testování, které by mělo význam pro NBS.

## **5.2 Diagnostika deficitu 3-hydroxy-3-methylglutarové acidurie v rámci novorozeneckého screeningu**

Výsledky této studie poukazují na možnost rozšířit NBS o sledování pacientů s HMGA pomocí tandemové hmotnostní spektrometrie. SRM přechod 262/85 může být monitorován při analýze první úrovně NBS, čímž by se odhalil zvýšený 3HIV-K. V případě jeho zvýšené odezvy lze provést analýzu druhé úrovně, která by monitorovala odezvu pro 3H3MG a 3MGC pomocí LC-MS/MS, čímž by se potvrdila/vyvrátila diagnóza HMGA.

## **6 VÝHLEDY**

### **6.1 Strukturní identifikace nových biomarkerů známých dědičných metabolických poruch na základě vícestupňových fragmentačních spekter**

Současné diagnostické metody pro DMP jsou založeny převážně na tandemových hmotnostně spektrometrických technikách. Vzhledem k jejich vyšší citlivosti oproti orbitrapové technologii by měl být vývoj specifických MS/MS metod pro nově popsané biomarkery snadný. Existuje však řada otázek, které by měly být ověřeny v budoucích studiích před tím, než se zde popsané nové látky stanou významnými a klinicky informativními biomarkery těchto chorob. Zejména je třeba prostudovat specifičnost těchto látek pro danou chorobu, korelace s klinickým stavem a ovlivnění hodnot před a po zahájení léčby.

### **6.2 Diagnostika deficitu 3-hydroxy-3-methylglutarové acidurie v rámci novorozeneckého screeningu**

Vzhledem k omezenému počtu pacientů v této studii vlivem velké vzácnosti tohoto onemocnění je zapotřebí ověřit praktičnost toho diagnostického přístupu v rozsáhlejší studii zahrnující více klinicky dobře definovaných pacientů. Na jejím základě by měl být vyvinut optimální screeningový algoritmus pro detekci onemocnění u HMGA pacientů.

Prezentovaná metodologie odhalující nové biomarkery může být aplikována u ostatních chorob, pro které jsou charakteristické zvýšené hladiny C5-OH, což by vedlo k novým diagnosticky přesnějším analýzám druhého stupně NBS, jenž by umožnily včasnou diagnózu ze vzorků krevních skvrn.

## 7 SEZNAM ZKRATEK

2M3HBD	deficit 2-methyl-3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenázy
3HIV	3-hydroxyizovalerát
3HIV-K	3-hydroxyizovalerylkarnitin
3H3MG-K	3-hydroxy-3-methylglutaryl-karnitin
3H3MG	3-hydroxy-3-methylglutarát
3MC-K	3-methylkrotonylkarnitin
3MG	3-methylglutarát
3MG-K	3-methylglutaryl-karnitin
3MGC	3-methylglutakonát
3MGC-K	3-methylglutakonyl-karnitin
AcAcNa	sodný adukt acetoacetát
BH <sub>4</sub>	tetrahydrobiopterin
BKT	deficit $\beta$ -ketothiolázy
CID	kolizně indukovaná disociace
DHPR	dihydropteridinreduktáza
DMP	dědičné metabolické poruchy
FAH	fenylalaninhydroxyláza
F-Ch	fold-change
GC	plynová chromatografie
GC-MS	plynová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií
Glc	glukóza
Glu	glutamová kyselina
HCD	disociace velkou kolizní energií
HDI	nejvyšší hustota aposteriorního rozdělení
HFA	hyperfenylalaninémie
HMDB	Human Metabolome Database
HMGA	3-hydroxy-3-methylglutarová acidurie
HMG-CoA	3-hydroxy-3-methylglutaryl koenzym A

HRMS	hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením
HRMS <sup>n</sup>	HRMS, která umožňuje měření víceúrovňových fragmentačních spekter
IV-K	izovalerylkarnitin
LC-MS	kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí
<i>m/z</i>	poměr hmotnosti ku náboji
MCCD	deficit 3-methylkrotonylkarboxylázy
MCD	mnohočetný deficit karboxyláz
MGCA	3-methylglutakonová acidurie
MRM	sledování produktů rozpadu molekulových iontů
MS/MS	tandemová hmotností spektrometrie
MSI	Metabolomics Standards Initiative
NBS	novorozenecký screening
NMR	nukleární magnetická rezonance
OPLS-DA	ortogonální diskriminační analýza metodou dílčích nejmenších čtverců
PCA	analýza hlavních komponent
Phe-Phe	fenylalanylphenylalanin
PKU	fenylketonurie
PLS-DA	diskriminační analýza metodou dílčích nejmenších čtverců
SRM	sledování produktu rozpadu molekulového iontu
TOF	průletový hmotnostní analyzátor
<i>t<sub>R</sub></i>	retenční čas
UHPLC	ultraúčinná kapalinová chromatografie
VIP	graf významnosti proměnných v projekci



## 8 LITERATURA

- [1] R. Jahja *et al.*, “Cognitive Profile and Mental Health in Adult Phenylketonuria: A PKU-COBESO Study,” *Neuropsychology*, vol. 31, no. 4, pp. 437–447, 2017.
- [2] C. Romani, L. Palermo, A. MacDonald, E. Limback, S. K. Hall, and T. Geberhiwot, “The impact of phenylalanine levels on cognitive outcomes in adults with phenylketonuria: Effects across tasks and developmental stages,” *Neuropsychology*, vol. 31, no. 3, pp. 242–254, 2017.
- [3] J. Racek, *Klinická biochemie*. Praha: Galén, 2006.
- [4] T. Pampols, “Inherited Metabolic Rare Disease,” in *Rare Diseases Epidemiology*, Springer Science+Business Media B.V., 2010, pp. 397–431.
- [5] S. Sanderson, A. Green, M. A. Preece, and H. Burton, “The incidence of inherited metabolic disorders in the West Midlands, UK,” *Arch. Dis. Child.*, vol. 91, no. 11, pp. 896–899, 2006.
- [6] V. Kožich and J. Zeman, “Dědičné metabolické poruchy v pediatrii,” *Postgraduální medicína*, vol. 12, no. 7, pp. 793–799, 2010.
- [7] D. Waters, D. Adeloye, D. Woolham, E. Wastnedge, S. Patel, and I. Rudan, “Global birth prevalence and mortality from inborn errors of metabolism: A systematic analysis of the evidence,” *J. Glob. Health*, vol. 8, no. 2, 2018.
- [8] E. Kočárek, *Genetika*, 2. vydání. Praha: Scientia, 2008.
- [9] J.-M. Saudubray, G. van den Berghe, and J. H. Walter, *Inborn Metabolic Diseases*, 5th Editio. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, 2012.
- [10] F. J. Spronsen, G. P. A. Smit, and J. J. H. M. Erwich, “Inherited metabolic diseases and pregnancy,” *BJOG An Int. J. Obstet. Gynaecol.*, vol. 112, no. 1, pp. 2–11, 2005.
- [11] R. J. Desnick and E. H. Schuchman, *Enzyme Replacement Therapy for Lysosomal Diseases: Lessons from 20 Years of Experience and Remaining Challenges*, vol. 13, no. 1. 2012.
- [12] M. R. Zurflüh *et al.*, “Molecular genetics of tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency,” *Hum. Mutat.*, vol. 29, no. 8, p. 1079,

- 2008.
- [13] C. R. Scriver, “The PAH Gene, Phenylketonuria, and a Paradim Shift,” *Hum. Mutat.*, vol. 28, no. 9, pp. 831–845, 2007.
- [14] U. Garg and L. D. Smith, *Biomarkers in Inborn Errors of Metabolism*. Cambridge: Elsevier Inc., 2017.
- [15] Národní sdružení PKU a jiných DMP, “Fenylketonurie.” [Online]. Available: <https://www.nspku.cz/nemoci/fenylketonurie.html>. [Accessed: 15-Dec-2019].
- [16] American College of Medical Genetics and Genomics, “Newborn Screening ACT Sheets and Confirmatory Algorithms.” [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK55827/>. [Accessed: 15-Dec-2019].
- [17] J. J. Mitchell, Y. J. Trakadis, and C. R. Scriver, “Phenylalanine hydroxylase deficiency,” *Genet. Med.*, vol. 13, no. 8, pp. 697–707, 2011.
- [18] G. F. Hoffmann, J. Zschocke, and W. L. Nyhan, *Inherited Metabolic Diseases*, 2nd editio. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag GmbH, 2017.
- [19] J. Vockley *et al.*, “Phenylalanine hydroxylase deficiency: Diagnosis and management guideline,” *Genet. Med.*, vol. 16, no. 2, pp. 188–200, 2014.
- [20] B. Rouse *et al.*, “Maternal phenylketonuria collaborative study (MPKUCS) offspring: Facial anomalies, malformations, and early neurological sequelae,” *Am. J. Med. Genet.*, vol. 69, no. 1, pp. 89–95, 1997.
- [21] X. Xiong, X. Sheng, D. Liu, T. Zeng, Y. Peng, and Y. Wang, “A GC/MS-based metabolomic approach for reliable diagnosis of phenylketonuria,” *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 407, no. 29, pp. 8825–8833, 2015.
- [22] T. H. Zytковicz *et al.*, “Tandem Mass Spectrometric Analysis for Amino , Organic , and Fatty Acid Disorders in Newborn Dried Blood Spots : A Two-Year Summary from the New England Newborn Screening Program,” *Clin. Chem.*, vol. 47, no. 11, pp. 1945–1955, 2001.
- [23] C. R. Roe, D. S. Millington, and D. A. Maltby, “Identification of 3-methylglutaryl-carnitine. A new diagnostic metabolite of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A lyase deficiency,” *J. Clin. Invest.*, vol. 77, no.

- 4, pp. 1391–1394, 1986.
- [24] J. Václavík *et al.*, “Structural elucidation of novel biomarkers of known metabolic disorders based on multistage fragmentation mass spectra,” *J. Inherit. Metab. Dis.*, vol. 41, no. 3, pp. 407–414, 2018.
- [25] S. C. Grünert *et al.*, “3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A lyase deficiency: Clinical presentation and outcome in a series of 37 patients,” *Mol. Genet. Metab.*, vol. 121, no. 3, pp. 206–215, 2017.
- [26] C. Rizzo *et al.*, “Measurement of succinyl-carnitine and methylmalonyl-carnitine on dried blood spot by liquid chromatography-tandem mass spectrometry,” *Clin. Chim. Acta*, vol. 429, pp. 30–33, 2014.
- [27] F. Santarelli *et al.*, “A neonatal case of 3-hydroxy-3-methylglutaric-coenzyme A lyase deficiency,” *Ital. J. Pediatr.*, vol. 39, no. 1, p. 33, 2013.
- [28] B. Wilcken, “3-Methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency: to screen or not to screen?,” *J. Inherit. Metab. Dis.*, vol. 39, no. 2, pp. 171–172, 2016.
- [29] R. Guthrie and A. Susi, “A simple phenylalanine method for detecting phenylketonuria in large populations of newborn infants,” *Pediatrics*, vol. 32, no. 3, pp. 338–343, 1963.
- [30] E. Beutler, M. Baluda, and G. N. Donnell, “A new method for the detection of galactosemia and its carrier state,” *J. Lab. Clin. Med.*, vol. 64, no. 4, pp. 694–705, 1964.
- [31] G. S. Heard, J. R. Secor McVoy, and B. Wolf, “A screening method for biotinidase deficiency in newborns,” *Clin. Chem.*, vol. 30, no. 1, pp. 125–127, 1984.
- [32] J. H. Dussault, P. Coulombe, C. Laberge, J. Letarte, H. Guyda, and K. Khoury, “Preliminary report on a mass screening program for neonatal hypothyroidism,” *J. Pediatr.*, vol. 86, no. 5, pp. 670–674, 1975.
- [33] J. A. Dodge, “Implications of the new genetics for screening for cystic fibrosis,” *Lancet*, vol. 332, no. 8612, pp. 672–674, 1988.
- [34] D. S. Millington, N. Kodo, D. L. Norwood, and C. R. Roe, “Tandem mass spectrometry: A new method for acylcarnitine profiling with potential for neonatal screening for inborn errors of metabolism,” *J. Inherit. Metab. Dis.*,

- vol. 13, no. 3, pp. 321–324, 1990.
- [35] J. M. G. Wilson and G. Jungner, “The principles and practice of screening for disease,” *Public Heal. Pap.*, vol. Number 34, 1968.
- [36] M. S. Watson, M. Y. Mann, M. A. Lloyd-Puryear, P. Rinaldo, and R. R. Howell, “Newborn Screening: Toward a Uniform Screening Panel and System - Executive Summary,” *Pediatrics*, vol. 117, no. 5, pp. 296–307, 2006.
- [37] “Metodický návod k zajištění celoplošného novorozeneckého laboratorního screeningu a následné péče,” *Věstník Minist. Zdr. České republiky*, vol. 6, p. 16, 2016.
- [38] D. Oglesbee *et al.*, “Second-tier test for quantification of alloseleucine and branched-chain amino acids in dried blood spots to improve newborn screening for maple syrup urine disease (MSUD),” *Clin. Chem.*, vol. 54, no. 3, pp. 542–549, 2008.
- [39] V. S. Gomase, S. S. Changbhale, S. A. Patil, and K. V. Kale, “Metabolomics,” *Curr. Drug Metab.*, vol. 9, no. 1, pp. 89–98, 2008.
- [40] D. S. Wishart *et al.*, “HMDB 3.0-The Human Metabolome Database in 2013,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 41, no. D1, pp. 801–807, 2013.
- [41] N. Psychogios *et al.*, “The human serum metabolome,” *PLoS One*, vol. 6, no. 2, 2011.
- [42] S. Bouatra *et al.*, “The Human Urine Metabolome,” *PLoS One*, vol. 8, no. 9, 2013.
- [43] M. Holčápek, G. Liebisch, and K. Ekroos, “Lipidomic Analysis,” *Anal. Chem.*, vol. 90, no. 7, pp. 4249–4257, 2018.
- [44] M. Lämmerhofer and W. Weckwerth, *Metabolomics in Practice*. Weinheim: Wiley-VCH Verlag & Co. KGaA, 2013.
- [45] C. H. Johnson, A. D. Patterson, J. R. Idle, and F. J. Gonzalez, “Xenobiotic Metabolomics: Major Impact on the Metabolome,” *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, vol. 52, no. 1, pp. 37–56, 2012.
- [46] A. Roux, D. Lison, C. Junot, and J. F. Heilier, “Applications of liquid chromatography coupled to mass spectrometry-based metabolomics in

- clinical chemistry and toxicology: A review,” *Clin. Biochem.*, vol. 44, no. 1, pp. 119–135, 2011.
- [47] A. Garcia and C. Barbas, “Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) Based Metabolomics,” in *Methods in Molecular Biology*, Springer Science+Business Media, 2011, pp. 191–204.
- [48] J. L. Markley *et al.*, “The future of NMR-based metabolomics,” *Curr. Opin. Biotechnol.*, vol. 43, pp. 34–40, 2017.
- [49] T. V. Maier and P. Schmitt-Kopplin, “Capillary Electrophoresis in Metabolomics,” in *Capillary Electrophoresis*, Vol 1483., New York, NY: Humana Press, 2016.
- [50] J. B. Fenn, M. Mann, C. K. A. I. Meng, S. F. Wong, and C. M. Whitehouse, “Electrospray Ionization for Mass Spectrometry of Large Biomolecules,” *Science (80-. )*, vol. 246, pp. 64–71, 1989.
- [51] D. Friedecký and K. Lemr, “Úvod do hmotnostní spektrometrie,” *Klin. Biochem. a Metab.*, vol. 20, no. 3, pp. 152–157, 2012.
- [52] L. Najdekr, D. Friedecky, R. Tautenhahn, J. Wang, and T. Adam, “Influence of Mass Resolving Power in Orbital Ion-Trap Mass Spectrometry-Based Metabolomics,” 2016.
- [53] L. W. Sumner *et al.*, “Proposed minimum reporting standards for chemical analysis Chemical Analysis Working Group (CAWG) Metabolomics Standards Initiative (MSI),” *Metabolomics*, vol. 3, no. 3, pp. 211–221, 2007.
- [54] R. Bujak *et al.*, “Metabolomics reveals metabolite changes in acute pulmonary embolism,” *J. Proteome Res.*, vol. 13, no. 2, pp. 805–816, 2014.
- [55] G. Nagana Gowda and D. Raftery, “Biomarker Discovery and Translation in Metabolomics,” *Curr. Metabolomics*, vol. 1, no. 3, pp. 227–240, 2013.
- [56] S. Naz *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.*, vol. 89, no. 15, pp. 7933–7942, 2017.
- [57] W. B. Dunn *et al.*, “Mass appeal: Metabolite identification in mass spectrometry-focused untargeted metabolomics,” *Metabolomics*, vol. 9, no.

- SUPPL.1, pp. 44–66, 2013.
- [58] H. Tsugawa *et al.*, “MS-DIAL: Data-independent MS/MS deconvolution for comprehensive metabolome analysis,” *Nat. Methods*, vol. 12, no. 6, pp. 523–526, 2015.
- [59] K. B. Scheidweiler, M. J. Y. Jarvis, and M. A. Huestis, “Nontargeted SWATH acquisition for identifying 47 synthetic cannabinoid metabolites in human urine by liquid chromatography-high-resolution tandem mass spectrometry,” *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 407, no. 3, pp. 883–897, 2015.
- [60] W. B. Dunn, D. I. Broadhurst, H. J. Atherton, R. Goodacre, and J. L. Griffin, “Systems level studies of mammalian metabolomes: the roles of mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectroscopy,” *Chem. Soc. Rev.*, vol. 40, no. 1, pp. 387–426, 2011.
- [61] I. Gertsman and B. A. Barshop, “Promises and pitfalls of untargeted metabolomics,” *J. Inherit. Metab. Dis.*, vol. 41, no. 3, pp. 355–366, 2018.
- [62] T. Pluskal, S. Castillo, A. Villar-Briones, and M. Orešič, “MZmine 2: Modular framework for processing, visualizing, and analyzing mass spectrometry-based molecular profile data,” *BMC Bioinformatics*, vol. 11, 2010.
- [63] C. a Smith, E. J. Want, G. O’Maille, R. Abagyan, and G. Siuzdak, “XCMS: Processing Mass Spectrometry Data for Metabolite Profiling Using Nonlinear Peak Alignment, Matching, and Identification,” *Anal. Chem.*, vol. 78, no. 3, pp. 779–787, 2006.
- [64] A. Lommen, “MetAlign: Interface-Driven, Versatile Metabolomics Tool for Hyphenated Full-Scan Mass Spectrometry Data Preprocessing,” *Anal. Chem.*, vol. 81, no. 8, pp. 3079–3086, 2009.
- [65] Š. Kouřil, J. de Sousa, J. Václavík, D. Friedecký, and T. Adam, “CROP: Correlation-based reduction of feature multiplicities in untargeted metabolomic data,” *Bioinformatics*, p. ahead of print, 2020.
- [66] D. Broadhurst *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*, vol. 14, no. 6,

- pp. 1–17, 2018.
- [67] W. B. Dunn *et al.*, “Procedures for large-scale metabolic profiling of serum and plasma using gas chromatography and liquid chromatography coupled to mass spectrometry,” *Nat. Protoc.*, vol. 6, no. 7, pp. 1060–1083, 2011.
- [68] R. McGill, J. W. Tukey, and W. A. Larsen, “Variations of box plots,” *Am. Stat.*, vol. 32, no. 1, pp. 12–16, 1978.
- [69] W. Li, “Volcano plots in analyzing differential expressions with mRNA microarrays,” *J. Bioinform. Comput. Biol.*, vol. 10, no. 6, pp. 1–24, 2012.
- [70] R. L. Wasserstein and N. A. Lazar, “The ASA’s Statement on p-Values: Context, Process, and Purpose,” *Am. Stat.*, vol. 70, no. 2, pp. 129–133, 2016.
- [71] J. de Sousa, O. Vencálek, K. Hron, J. Václavík, D. Friedecký, and T. Adam, “Bayesian Multiple Hypotheses Testing in Compositional Analysis of Untargeted Metabolomic Data,” *Anal. Chim. Acta*, vol. 1097, pp. 49–61, 2020.
- [72] B. Worley and R. Powers, “PCA as a predictor of OPLS-DA model reliability,” *Curr. Metabolomics*, vol. 4, no. 2, pp. 97–103, 2016.
- [73] M. Barker and W. Rayens, “Partial least squares for discrimination,” *J. Chemom.*, vol. 17, no. 3, pp. 166–173, 2003.
- [74] A. Vaniya and O. Fiehn, “Using fragmentation trees and mass spectral trees for identifying unknown compounds in metabolomics,” *Trends Anal. Chem.*, vol. 69, pp. 52–61, 2015.
- [75] T. Kind and O. Fiehn, “Seven Golden Rules for heuristic filtering of molecular formulas obtained by accurate mass spectrometry,” *BMC Bioinformatics*, vol. 8, p. 105, 2007.
- [76] T. R. Sana, J. C. Roark, X. Li, K. Waddell, and S. M. Fischer, “Molecular formula and METLIN personal metabolite database matching applied to the identification of compounds generated by LC/TOF-MS,” *J. Biomol. Tech.*, vol. 19, no. 4, pp. 258–266, 2008.
- [77] L. Li *et al.*, “MyCompoundID: Using an evidence-based metabolome library for metabolite identification,” *Anal. Chem.*, vol. 85, no. 6, pp. 3401–3408, 2013.

- [78] C. D. M. van Karnebeek *et al.*, “NANS-mediated synthesis of sialic acid is required for brain and skeletal development,” *Nat. Genet.*, vol. 48, no. 7, pp. 777–784, 2016.
- [79] K. L. M. Coene *et al.*, “Next-generation metabolic screening: targeted and untargeted metabolomics for the diagnosis of inborn errors of metabolism in individual patients,” *J. Inherit. Metab. Dis.*, vol. 41, no. 3, pp. 337–353, 2018.
- [80] H. Peck and R. J. Pollitt, “The occurrence of gamma-glutamylphenylalanine in the urine of newborn phenylketonurics.,” *Clin. Chim. Acta.*, vol. 94, no. 3, pp. 237–240, Jun. 1979.
- [81] M. J. Miller *et al.*, “Untargeted metabolomic analysis for the clinical screening of inborn errors of metabolism,” *J. Inherit. Metab. Dis.*, vol. 38, no. 6, pp. 1029–1039, 2015.
- [82] M. Orłowski and S. Wilk, “Intermediates of the gamma-glutamyl cycle in mouse tissues. Influence of administration of amino acids on pyrrolidone carboxylate and gamma-glutamyl amino acids,” *Eur. J. Biochem.*, vol. 53, pp. 581–590, 1975.
- [83] R. S. Jansen *et al.*, “*N*-lactoyl-amino acids are ubiquitous metabolites that originate from CNDP2-mediated reverse proteolysis of lactate and amino acids,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 112, no. 21, pp. 6601–6606, 2015.
- [84] J. V. Olsen, “Parts per Million Mass Accuracy on an Orbitrap Mass Spectrometer via Lock Mass Injection into a C-trap,” *Mol. Cell. Proteomics*, vol. 4, no. 12, pp. 2010–2021, Dec. 2005.
- [85] T. Kind and O. Fiehn, “Advances in structure elucidation of small molecules using mass spectrometry.,” *Bioanal. Rev.*, vol. 2, no. 1–4, pp. 23–60, Dec. 2010.
- [86] I. Vrobel *et al.*, “Novel sulphur-containing imatinib metabolites found by untargeted LC-HRMS analysis,” *Eur. J. Pharm. Sci.*, vol. 104, no. February, pp. 335–343, 2017.
- [87] S. Jooste, E. Erasmus, L. J. Mienie, W. J. de Wet, and K. M. Gibson, “The detection of 3-methylglutaryl carnitine and a new dicarboxylic conjugate, 3-



- methylglutaconylcarnitine, in 3-methylglutaconic aciduria,” *Clin. Chim. Acta*, vol. 230, no. 1, pp. 1–8, 1994.
- [88] J. Václavík *et al.*, “A newborn screening approach to diagnose 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase deficiency,” *JIMD Rep.*, p. přijato, 2020.
- [89] A. Gardlo, D. Friedecký, L. Najdekr, R. Karlíková, and T. Adam, “Metabol: The statistical analysis of metabolomic data.” 2019.
- [90] F. Dieterle, A. Ross, G. Schlotterbeck, and H. Senn, “Probabilistic quotient normalization as robust method to account for dilution of complex biological mixtures. Application in 1H NMR Metabonomics,” *Anal. chem.*, vol. 78, no. 13, pp. 4281–4290, 2006.
- [91] R. Di Guida *et al.*, “Non-targeted UHPLC-MS metabolomic data processing methods: a comparative investigation of normalisation, missing value imputation, transformation and scaling,” *Metabolomics*, vol. 12, no. 5, 2016.
- [92] M. Hubert, P. J. Rousseeuw, and K. Vanden Branden, “ROBPCA: a new approach to robust principal component analysis,” *Technometrics*, vol. 47, no. 1, pp. 64–79, 2005.
- [93] E. Hewawasam, G. Liu, D. W. Jeffery, R. A. Gibson, and B. S. Muhlhausler, “Estimation of the Volume of Blood in a Small Disc Punched From a Dried Blood Spot Card,” *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, vol. 120, no. 3, 2018.
- [94] M. M. Adeva-Andany, L. López-Maside, C. Donapetry-García, C. Fernández-Fernández, and C. Sixto-Leal, “Enzymes involved in branched-chain amino acid metabolism in humans,” *Amino Acids*, vol. 49, no. 6, pp. 1005–1028, 2017.
- [95] J. Pié *et al.*, “Molecular genetics of HMG-CoA lyase deficiency,” *Mol. Genet. Metab.*, vol. 92, no. 3, pp. 198–209, 2007.
- [96] C. R. Vargas *et al.*, “Incidence of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A lyase (HL) deficiency in Brazil, South America,” *JIMD Short Rep. #093*, 2007.
- [97] S. Menao *et al.*, “Ten novel HMGCL mutations in 24 patients of different origin with 3-hydroxy-3-methyl-glutaric aciduria,” *Hum. Mutat.*, vol. 30, no. 3, 2009.

## 9 SEZNAM PRACÍ

### 9.1 Publikace vztahující se k disertaci

- J. Václavík, K.L.M. Coene, I. Vrobel, L. Najdekr, D. Friedecký, R. Karlíková, L. Mádrová, A. Petsalo, U.F.H. Engelke, A. van Wegberg, L. A. J. Kluijtmans, T. Adam a R. A. Wevers, “Structural elucidation of novel biomarkers of known metabolic disorders based on multistage fragmentation mass spectra”, *J. Inherit. Metab. Dis.*, vol. 41, no. 3, pp. 407–414, 2018 (IF = 3,970).
- J. Václavík, L. Mádrová, Š. Kouřil, J. de Sousa, R. Brumarová, H. Janečková, J. Jáčová, D. Friedecký, M. Knapková, L.A.J. Kluijtmans, S.C. Grünert, F.M. Vaz, N. Janzen, R.J.A. Wanders, R. A. Wevers a T. Adam, „A newborn screening approach to diagnose 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase deficiency“ *JIMD Reports*, přijato 2020.
- Š. Kouřil, J. de Sousa, J. Václavík, D. Friedecký, T. Adam, “CROP: Correlation-based reduction of feature multiplicities in untargeted metabolomic data,” *Bioinformatics*, vol. 1, no. 2, 2020 (IF = 4,531).
- J. de Sousa, O. Vencálek, K. Hron, J. Václavík, D. Friedecký a T. Adam, “Bayesian Multiple Hypotheses Testing in Compositional Analysis of Untargeted Metabolomic Data,” *Anal. Chim. Acta*, vol. 1097, pp. 49–61, 2020, (IF = 5,256).

### 9.2 Ostatní publikace

- L. Mádrová, M. Krijt, V. Barešová, J. Václavík, D. Friedecký, D. Dobešová, V. Škopová, T. Adam a M. Zikánová “Mass spectrometric analysis of purine de novo biosynthesis intermediates,” *PLoS One*, vol. 13, no. 12, pp. 1–19, 2018 (IF = 2.776).

### 9.3 Příspěvky na konferencích vztahující se k disertaci

- J. Václavík, D. Friedecký, L.A.J. Kluijtmans, T. Adam, R.A. Wevers, „Určování struktur biomarkerů dědičných metabolických poruch na základě fragmentačních hmotnostních spekter s použitím přesné hmoty,“ 31. Pracovní dny Dědičné metabolické poruchy, Bratislava, Slovensko, 25.–27.5.2016 Abstrakta – přednášky, s. 35, MET16PHAPAT59CZ
- J. Václavík, D. Friedecký, T. Adam, L.A.J. Kluijtmans, R. Wever, „Exact mass multi-stage fragmentation for structural elucidation of biomarkers of inherited metabolic disorders,“ Advances in Chromatography and Electrophoresis & Chiral 2016, Olomouc, Česká republika, 6.-9.6.2016. Book of abstracts, s. 41, ISBN 978-80-244-4961-6.
- J. Václavík, D. Friedecký, T. Adam, L.A.J. Kluijtmans, R. Wever, „Exact mass multi-stage fragmentation for structural elucidation of biomarkers of inherited metabolic disorders,“ Annual Symposium of the Society for the Study of Inborn Errors of Metabolism, Rome, Italy, 6.-9.9.2016. J Inher Metab Dis (2016) 39 (Suppl 1):S73-S74. DOI: 10.1007/s10545-016-9969-2
- J. Václavík, I. Vrobel, K. Mičová, L. Najdekr, L.A.J. Kluijtmans, R.A.Wevers, D. Friedecký, T. Adam, „Orbitrap-based HRMS for new biomarker and drug metabolites study,“ 6. Konference České Společnosti pro Hmotnostní Spektrometrii, 29.-31.3.2017, ISBN 978-80-905045-7-8, s.37, Olomouc, Česká republika.
- J. Václavík, L. Najdekr, D. Friedecký, T. Adam; „New biomarkers of inherited metabolic diseases by metabolomics,“ 32. Pracovní dny Dědičné metabolické poruchy, Nesuchyně, Česká republika, 17.–19.5.2017. Sborník posterů, p. 31.
- J. Václavík, D. Friedecký, T. Adam, L.J.A. Kluijtmans, R.A. Wevers, „Structural elucidation of novel biomarkers of known metabolic disorders based on multistage fragmentation mass spectra,“ IMTM Reactor, PhD Conference, 14.-16.6.2017, Abstract book, p.24.

- J. Václavík, D. Friedecký, A. Petsalo, U. Engelke, K.L.M. Coene, A. van Wegberg, L.A.J. Kluijtmans, T. Adam, R.A. Wevers, „Určování molekulárních struktur nových biomarkerů známých dědičných metabolických poruch na základě víceúrovňových fragmentačních spekter,“ České společnosti klinické biochemie ČLS JEP s mezinárodní účastí; České Budějovice, 17.-19.9.2017. *Klinická biochemie a metabolismus* (2017), 3 (25), 149.
- D. Friedecký, R. Karlíková, K. Mičová, A. Gardlo, H. Janečková, I. Vrobel, L. Mádrová, J. Václavík, L. Najdekr, J. Jáčová, E. Faber, K. Hron, T. Adam, “Význam hmotnostní spektrometrie v hledání nových biomarkerů onemocnění,“ České společnosti klinické biochemie ČLS JEP s mezinárodní účastí; České Budějovice, Česká republika, 17.-19.9.2017. *Klinická biochemie a metabolismus* (2017), 3 (25), 140.
- J. Václavík, L. Mádrová, R. Karlíková, D. Friedecký, L.A.J. Kluijtmans, R.A. Wevers, T. Adam, „Acylcarnitine profile of 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA lyase deficiency patients,“ *Metabomeeting*, 17.-19.12.2017 University of Nottingham, UK. *Book of abstracts*, p. 111.
- J. Václavík, H. Janečková, L. Mádrová, R. Karlíková, D. Friedecký, L.A.J. Kluijtmans, T. Adam, R.A. Wevers, „Acylcarnitine profile of 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA lyase deficiency patients,“ 33. Pracovní dny dědičné metabolické poruchy, Košice, Slovensko, 23.-25.5.2018. *Program*, s. 25-26.
- J. Václavík, H. Janečková, L. Mádrová, R. Karlíková, D. Friedecký, L.A.J. Kluijtmans, R.A. Wevers, T. Adam, „Acylcarnitine profile of 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA lyase deficiency patients,“ *Annual Symposium of the Society for the Study of Inborn Errors of Metabolism (SSIEM)*, Athens, Greece, 4.-7.9.2018. *J Inher Metab Dis* (2018) 41 (Suppl 1):S37–S127. DOI: 10.1007/s10545-018-0233-9.
- L.A.J. Kluijtmans, U.F.H. Engelke, K.L.M. Coene, E. van der Heeft, S. De Boer, H. Kwast, C.D.G. Huigen, J. Vaclavik, D. Friedecky, A. van Wegberg, B. Hoegen, M.C. De Vries, C. Gilissen, J. Engel, C.D.M. van

Karnebeek, T. Adam, R.A. Wevers. Biomarker discovery using Next Generation Metabolic Screening (NGMS) and multistage fragmentation analysis. Annual Symposium of the Society for the Study of Inborn Errors of Metabolism (SSIEM), Athens, Greece, 4.-7.9.2018. J Inher Metab Dis (2018) 41 (Suppl 1):S71. DOI: 10.1007/s10545-018-0233-9.

- J. Václavík, L. Mádrová, R. Karlíková, D. Friedecký, L.A.J. Kluijtmans, R.A. Wevers, T. Adam, „Acylcarnitine profile of 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA lyase deficiency patients,“ Metabolomic Bio & Data 2018 (MOVISS), 9.-12.9.2018, Vorau, Austria, Book of Abstracts, p. 52.
- D. Friedecký, R. Karlíková R, K. Mičová, A. Gardlo, H. Janečková, I. Vrobel, L. Najdekr, Š. Kouřil, J. Rendlová, M. Mádrová, J. Václavík, J. Jáčová, T. 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.
- D. Friedecký, J. Václavík, K.L.M Coene, L. Najdekr, R. Karlíková, L. Mádrová, A. van Wegberg, L.A.J. Kluijtmans, R.A. Wevers, „Metabolomics in inherited metabolic diseases,“ Eighth Annual Conference of the Czech Society for Mass Spectrometry. Olomouc, Czech Republic, 27.-29.3.2019. Book of abstracts, p.29, ISBN 978-80-905045-9-2.
- J. Václavík, L. Mádrová, R. Karlíková, D. Friedecký, Š. Kouřil, L.A.J. Kluijtmans, R.A. Wevers, T. Adam, „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 978-80-905045-9-2.
- J. Rendlová, K. Hron, O. Vencálek, J. Václavík, D. Friedecký, T. Adam, „Compositional analysis of untargeted metabolomic data using multiple Bayesian hypotheses testing,“ Eighth Annual Conference of the Czech Society for Mass Spectrometry. Olomouc, Czech Republic, 27.-29.3.2019. Book of abstracts, p.36, ISBN 978-80-905045-9-2.

- J. Václavík, L. Mádrová, Š. Kouřil, J. Rendlová, R. Karlíková, D. Friedecký, F.M. Vaz, R.J.A. Wanders, L.A.J. Kluijtmans, R.A. Wevers, T. Adam, „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.
- D. Friedecký, R. Karlíková, L. Mádrová, Š. Kouřil, H. Janečková, J. Václavík, J. Rendlová, K. Mičová, A. Gardlo, J. Jáčová, D. Dobešová, A. Kvasnička, K. Zuzáňáková, T. Adam., „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.
- D. Friedecký, J. Václavík, K.L.M. Coene, L. Najdekr, R. Karlíková, J. Jáčová, L. Mádrová, A. an Wegberg, L.A.J. Kluijtmans, R.A. Wevers, T. Adam, „New LC-MS tools in diagnosing inherited metabolic diseases,“ 48th International symposium on high performance liquid phase separations and related techniques (HPLC 2019), Milan, Italy, 16.-20.6.2019, Final program, s. 56.

#### 9.4 Ostatní příspěvky na konferencích

- D. Friedecký, R. Karlíková, J. Šíroká, L. Najdekr, A. Kalivodová, K. Mičová, M. Hrdá, J. Jáčová, J. Václavík, I. Vrobel, H. Janečková, K. Hron, T. Adam, “Specifika preanalytické fáze vyšetřovacích metod založených na principu kapalinové chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií“ FONS 2014, 21.-23.9.2014, Pardubice, Česká republika.
- D. Friedecký, R. Karlíková, J. Šíroká, L. Najdekr, A. Kalivodová, K. Mičová, M. Hrdá, J. Jáčová, J. Václavík, I. Vrobel, H. Janečková, K. Hron, T. Adam, “Metody přímého nástřiku v kombinaci s hmotnostní spektrometrií pro analýzu malých molekul. Automatizace v přípravě vzorků,“ Pragolab, 2.10.2014, Praha, Česká republika.

- D. Friedecký, E. Hlídková, H. Janečková, V. Bekárek, J. Jáčová, A. Kalivodová, R. Karlíková, K. Mičová, L. Najdekr, J. Václavík, I. Vrobel, M. Hrdá, J. Ševčíková, L. Kittlová, V. Růžičková, M. Kapustová, T. Semeniuk, A. Zábranská, S. Petrželová, H. Rezková, M. Machálková, M. Galoczová, M. Ludvová, S. Pavlíková, J. Široká, K. Hron, T. Adam, “Moderní separační metody ve spojení s pokročilými technikami hmotnostní spektrometrie v klinické laboratoři,“ XI. kongres Slovenskej spoločnosti klinickej biochémie s medzinárodnou účasťou, 5.-7.10.2014 Hotel TURIEC, Martin, Slovensko.
- J. Václavík, D. Friedecký, T. Adam, „Comparison of diagnostic performance of high resolution mass spectrometry and tandem mass spectrometry – a case of purine and pyrimidine metabolic disorders,“ CECE, 20.–22.10.2014 Brno, Česká republika, Programme and Abstracts, p. 431-432, ISBN 978-80-904959-2-0.
- D. Friedecký, E. Hlídková, H. Janečková, V. Bekárek, J. Jáčová, A. Kalivodová, R. Karlíková, K. Mičová, L. Najdekr, J. Václavík, I. Vrobel, M. Hrdá, J. Ševčíková, L. Kittlová, V. Růžičková, M. Kapustová, T. Semeniuk, A. Zábranská, S. Petrželová, H. Rezková, M. Machálková, M. Galoczová, M. Ludvová, S. Pavlíková, J. Široká, K. Hron, T. Adam, “Separační techniky v rutinní diagnostické laboratoři – současnost a budoucnost,“ 8. Středomoravské dny laboratorní medicíny, Kouty nad Desnou, Česká republika, 22.-23.1.2015.
- D. Friedecký, E. Hlídková, H. Janečková, V. Bekárek, J. Jáčová, A. Kalivodová, R. Karlíková, K. Mičová, L. Najdekr, J. Václavík, I. Vrobel, M. Hrdá, J. Ševčíková, L. Kittlová, V. Růžičková, M. Kapustová, T. Semeniuk, A. Zábranská, S. Petrželová, H. Rezková, M. Machálková, M. Galoczová, M. Ludvová, S. Pavlíková, J. Široká, K. Hron, T. Adam, “Současné trendy v diagnostice dědičných metabolických poruch,“ Lékařský seminář Šumperské nemocnice a.s. – Vybraná témata z laboratorní medicíny, Šumperk, Česká republika, 25.3.2015.

- R. Karlíková, J. Šíroková, J. Václavík, F. Hrdinová, D. Friedecký, Z. Drábková, A. Gardlo, H. Janečková, P. Jahn, T. Adam, „Atypical myopathy - metabolite profiling of equine serum and urine,“ 4. konference České společnosti pro hmotnostní spektrometrii, Hradec Králové, Česká republika, 15.-17.4.2015. Sborník příspěvků, s. 66. ISBN 978-80-905045-4-7.
- L. Mádrová, E. Hlídková, M. Krijt, V. Barešová, J. Václavík, D. Friedecký, D. Dobešová, O. Součková, V. Škopová, T. Adam, M. Zikánová, „Mass spectrometric analysis of purine de novo biosynthesis,“ 33. Pracovní dni dedičné metabolické poruchy, Košice, Slovensko, 23.-25.5.2018. Program, s. 25.
- L. Mádrová, M. Krijt, V. Barešová, J. Václavík, D. Friedecký, D. Dobešová, O. Součková, V. Škopová, M. Zikánová, T. Adam, „Mass spectrometric analysis of purine de novo biosynthesis,“ Metabolomics 2018, 14th Annual Conference of the Metabolomics Society, Seattle, Washington, USA, 24.-28.6.2015, Abstract book, P210.
- L. Mádrová, M. Krijt, V. Barešová, J. Václavík, D. Friedecký, D. Dobešová, O. Součková, V. Škopová, T. Adam, M. Zikánová, „Mass spectrometric analysis of purine de novo biosynthesis,“ Metabomeeting, 17.-19.12.2017 University of Nottingham, UK. Book of abstracts, p. 88
- L. Mádrová, M. Krijt, V. Barešová, J. Václavík, D. Friedecký, D. Dobešová, O. Součková, V. Škopová, M. Zikánová, T. Adam, „Mass spectrometric analysis of purine de novo biosynthesis,“ Metabolomic Bio & Data 2018 (MOVISS), 9.-12.9.2018, Vorau, Austria, Book of Abstracts, p. 23.
- L. Mádrová, M. Krijt, V. Barešová, J. Václavík, D. Friedecký, D. Dobešová, O. Součková, V. Škopová, M. Zikánová, T. Adam, „Mass spectrometric analysis of purine de novo biosynthesis,“ 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): S162. DOI: 10.1007/s10545-018-0233-9.



- L. Mádrová, R. Karlíková, D. Dobešová, J. Václavík, D. Friedecký, V. Barešová, M. Zikánová, T. Adam, „Metabolomická analýza HeLa buněčných linií defektních v jednotlivých krocích purinové de novo syntézy,“ 34. Pracovní dny Dědičné metabolické poruchy, Olomouc, Česká republika, 29.–31. 5. 2019. Program a sborník abstrakt a posterů.

# 10 PŘÍLOHY

## 10.1 Kompletní seznam nastavených parametrů Compound Discovereru 3.0 během peak-pickingu

Search name: 2019\_03\_08\_hmgld

Search description: -

Search date: 3/8/2019 9:43:01 AM

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:

- File Name(s) (Hidden):

X:\HMGCLD\_project\6\_Blank1.raw  
X:\HMGCLD\_project\7\_QC6\_CID1.raw  
X:\HMGCLD\_project\8\_QC7\_CID2.raw  
X:\HMGCLD\_project\9\_QC8\_CID3.raw  
X:\HMGCLD\_project\10\_QC9\_CID4.raw  
X:\HMGCLD\_project\11\_QC10\_HCD1.raw  
X:\HMGCLD\_project\12\_QC11\_HCD2.raw  
X:\HMGCLD\_project\22\_QC14.raw  
X:\HMGCLD\_project\23\_QC15.raw  
X:\HMGCLD\_project\26\_ConC19\_boy\_13year.raw  
X:\HMGCLD\_project\28\_ConC9\_girl\_19year.raw  
X:\HMGCLD\_project\30\_QC16.raw

X:\HMGCLD\_project\33\_Pac4\_boy\_1year.raw  
X:\HMGCLD\_project\35\_ConC4\_boy\_14year.raw  
X:\HMGCLD\_project\37\_QC17.raw  
X:\HMGCLD\_project\39\_ConC14\_girl\_16year.raw  
X:\HMGCLD\_project\43\_ConC2\_boy\_17year.raw  
X:\HMGCLD\_project\44\_QC18.raw  
X:\HMGCLD\_project\45\_ConC16\_girl\_5year.raw  
X:\HMGCLD\_project\51\_QC19.raw  
X:\HMGCLD\_project\53\_Pac1\_girl\_8year.raw  
X:\HMGCLD\_project\54\_ConC10\_boy\_8year.raw  
X:\HMGCLD\_project\58\_QC20.raw  
X:\HMGCLD\_project\59\_ConC5\_girl\_11year.raw  
X:\HMGCLD\_project\62\_ConC13\_girl\_15year.raw  
X:\HMGCLD\_project\63\_Pac2\_girl\_4day.raw  
X:\HMGCLD\_project\65\_QC21.raw  
X:\HMGCLD\_project\71\_ConC22\_boy\_13year.raw  
X:\HMGCLD\_project\72\_QC22.raw  
X:\HMGCLD\_project\74\_ConC8\_boy\_7year.raw  
X:\HMGCLD\_project\76\_Pac5\_girl\_17day.raw  
X:\HMGCLD\_project\77\_ConC6\_boy\_1year.raw  
X:\HMGCLD\_project\79\_QC23.raw  
X:\HMGCLD\_project\81\_ConC15\_boy\_11year.raw  
X:\HMGCLD\_project\84\_ConC1\_girl\_2year.raw  
X:\HMGCLD\_project\86\_QC24.raw  
X:\HMGCLD\_project\88\_ConC12\_boy\_15year.raw  
X:\HMGCLD\_project\91\_Pac3\_boy\_5year.raw  
X:\HMGCLD\_project\92\_ConC3\_girl\_15year.raw  
X:\HMGCLD\_project\93\_QC25.raw  
X:\HMGCLD\_project\96\_ConC17\_girl\_4year.raw  
X:\HMGCLD\_project\99\_ConC20\_girl\_4year.raw  
X:\HMGCLD\_project\100\_QC26.raw

X:\HMGCLD\_project\113\_Blank4.raw  
X:\HMGCLD\_project\102\_ConC18\_boy\_12year.raw  
X:\HMGCLD\_project\104\_ConC21\_girl\_16year.raw  
X:\HMGCLD\_project\106\_ConC7\_boy\_12year.raw  
X:\HMGCLD\_project\107\_QC27.raw  
X:\HMGCLD\_project\110\_QC28.raw  
X:\HMGCLD\_project\111\_QC29.raw  
X:\HMGCLD\_project\112\_Blank2.raw  
X:\HMGCLD\_project\113\_Blank3.raw

-----  
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+NH<sub>4</sub>]+1

[M+ACN+H]+1

[M+ACN+Na]+1

[M+H]+1

[M+K]+1

[M+Na]+1

[M+NH<sub>4</sub>]+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]<sup>+</sup>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