



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

**ANALÝZA TĚKAVÝCH ORGANICKÝCH LÁTEK
PRODUKOVANÝCH MONOCYTY BĚHEM SEPSE**

ANALYSIS OF VOLATILE ORGANIC COMPOUNDS PRODUCED BY MONOCYTES DURING SEPSIS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Adéla Bártová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Ludmila Mravcová, Ph.D.

BRNO 2019

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1258/2018
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Bc. Adéla Bártová**
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **Ing. Ludmila Mravcová, Ph.D.**
Akademický rok: 2018/19

Název diplomové práce:

Analýza těkavých organických látek produkovaných monocyty během sepse

Zadání diplomové práce:

1. Vypracovat rešerši na téma stanovení malých těkavých molekul v biologických vzorcích.
2. Optimalizovat metodu stanovení pomocí komprehenzivní dvojdimenzionální plynové chromatografie.
3. Analýza sady vzorků optimalizovanou metodou.
4. Zpracování a vyhodnocení získaných výsledků.

Termín odevzdání diplomové práce: 10.5.2019

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

Bc. Adéla Bártová
student(ka)

Ing. Ludmila Mravcová, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2019

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Tato práce se zabývá možností analýzy těkavých látek produkovaných monocyty v průběhu sepse. K tomuto účelu byla jako metoda zvolena komprehenzivní dvojdimenzionální plynová chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí. V první části práce byla optimalizována metoda dvojdimenzionální plynové chromatografie pro stanovení těkavých organických látek. V této části práce byly postupně upravovány parametry metody plynové chromatografie tak, aby bylo dosaženo co nejvyšší účinnosti. Dále byly optimalizovány podmínky přípravy vzorků. V druhé části práce byla optimalizovaná metoda využita k měření sady vzorků monocytů. Tyto vzorky byly podrobeny působení různých inhibitorů imunitního systému a stimulátorů simulujících bakteriální nebo kvasinkovou infekci. Na základě tohoto měření bylo identifikováno několik sloučenin, které jsou produkovány monocyty za podmínek simulujících infekci.

ABSTRACT

This thesis is focused on the possibility of analysis of volatile organic compounds produced by monocytes during sepsis. Method of comprehensive two-dimensional gas chromatography with mass spectrometric detection was chosen for this purpose. Content of the first part was the optimization of the method of two-dimensional gas chromatography for the determination of volatile organic compounds. In this part were gradually adjusted parameters of the gas chromatography method to achieve the maximum efficiency. Further were adjusted conditions of samples preparation. Content of the second part was the usage of already optimized method for the analysis of the samples set of monocytes. Samples were subjected to the action of different inhibitors of the immune system and stimulators simulating bacterial or yeast infection. Based on this analysis were identified some compounds, which are produced by monocytes under condition simulating the infection.

KLÍČOVÁ SLOVA

Monocyty, sepse, těkavé organické látky, dvojdimenzionální plynová chromatografie, metabolomika.

KEY WORDS

Monocytes, sepsis, volatile organic compounds, two-dimensional gas chromatography, metabolomics.

BÁRTOVÁ, Adéla. Analýza těkavých organických látek produkovaných monocyty během sepse [online]. Brno, 2019 [cit. 2019-05-09]. Dostupné z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/117724>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Ludmila Mravcová.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

Poděkování

Na tomto místě bych chtěla poděkovat Ing. Ludmile Mravcové, Ph.D. za skvělé vedení a trpělivost při řešení práce. Dále bych také ráda poděkovala Ing. Lucii Pompeiano Vaničkové, Ph.D. a prof. Ing. Josefu Čáslavskému, CSc. za cenné rady.

V neposlední řadě bych chtěla poděkovat kamarádce Dominice Tučkové za neustálý optimismus, podporu a pomoc v laboratoři.

OBSAH

1.	ÚVOD	7
2.	TEORETICKÁ ČÁST	8
2.1.	Imunologie	8
2.1.1.	Specifická imunita	8
2.1.2.	Nespecifická imunita	9
2.1.3.	Monocyty	9
2.2.	Sepse	10
2.2.1.	Základní pojmy týkající se sepse	11
2.2.2.	Projevy sepse	11
2.2.3.	Průběh sepse	12
2.2.4.	Diagnostika sepse	13
2.2.5.	Terapie sepse	14
2.3.	Metabolomika	14
2.3.1.	Analytické metody využívané v metabolomice.....	14
2.3.2.	Využití	15
2.4.	Těkavé organické látky	16
2.4.1.	Analýza těkavých organických látek v metabolomice	16
2.5.	SPME	18
2.5.1.	Využití SPME pro analýzu biologických vzorků	19
2.6.	Plynová chromatografie	20
2.6.1.	Účinnost separačního systému.....	21
2.6.2.	Instrumentace.....	22
2.7.	Komprehenzivní plynová chromatografie (GCxGC)	25
2.7.1.	Instrumentace.....	26
2.7.2.	Využití GCxGC v analýze biologických vzorků	27
2.8.	Hmotnostní spektrometrie	27
2.8.1.	Instrumentace.....	27
3.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	31
3.1.	Přístrojové vybavení a parametry měření	31
3.2.	Vzorky	32
3.2.1.	Použité inhibitory	33
3.2.2.	Použité stimulanty	33

3.3.	Optimalizace SMPE metody.....	34
3.3.1.	Vliv přídavku NaCl	34
3.3.2.	Výběr SPME vlákna	35
3.3.3.	Optimalizace doby inkubace a doby jímání těkavých látek	37
3.4.	Optimalizace GC metody	38
3.4.1.	Změna teploty sekundární kolony	38
3.4.2.	Změna teploty modulátoru.....	38
3.4.3.	Změna modulační periody	38
3.4.4.	Optimalizace teplotního programu	39
3.5.	Shrnutí výsledných optimalizovaných parametrů	39
4.	VÝSLEDKY A DISKUZE	40
4.1.	Potencionální metabolity	40
4.2.	Vliv přístroje.....	43
4.3.	Vliv SPME vlákna	44
4.4.	Porovnání jednotlivých dárců.....	45
4.5.	Další pozorování	46
5.	ZÁVĚR	47
6.	ZDROJE	48
7.	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	53
8.	PŘÍLOHY.....	54
8.1.	2D chromatogramy SPME vláken.....	54
8.2.	2D chromatogramy vzorků	56
8.3.	Tabulky identifikovaných sloučenin.....	74

1. ÚVOD

Sepse, laicky označovaná také jako otrava krve, je život ohrožující stav. Tento stav je ročně diagnostikován u statisíců osob, přičemž mortalita se pohybuje v rozmezí 30-50%. Klíčovým aspektem úspěšné terapie sepse je její včasné rozpoznání a sledování průběhu. Ke sledování průběhu je zásadním krokem nalezení rychlé analytické metody pro sledování vybraných biomarkerů. V současné době se pro diagnostiku využívají mikrobiologické kultivace nebo imunologické metody jako ELISA, případně PCR. Tyto metody však vyžadují dostatek času k získání výsledků, což je pro sledování průběhu sepse velkým problémem.

Cílem této práce bylo určit několik metabolitů produkovaných monocyty, jejichž přítomnost by signalizovala bakteriální nebo kvasinkovou infekci. Přítomnost, případně koncentrace, těchto těkavých látek ve vzorku krve pacienta by mohla být využita ke stanovení fáze sepse, ve které se konkrétní pacient nachází. Toto by mohlo vést k lepšímu nastavení terapeutických postupů, a tím ke snížení mortality sepse.

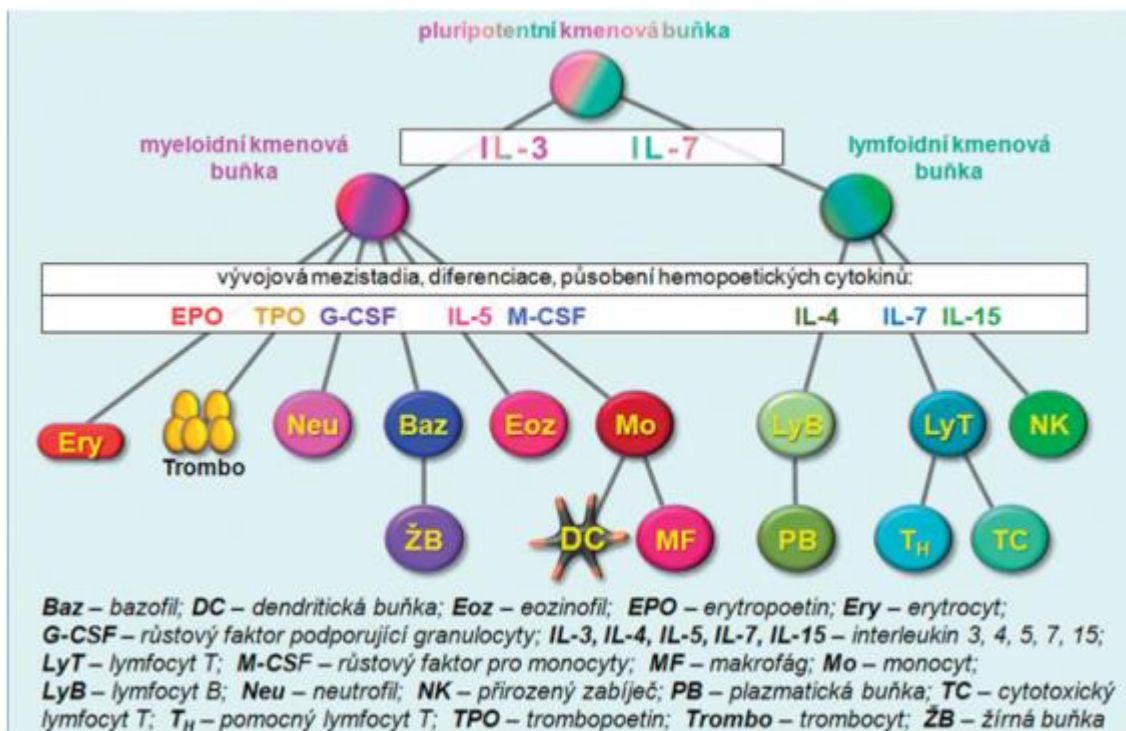
Využití metabolomických analýz je moderním trendem při diagnostice celé řady onemocnění. Studium metabolomických profilů se využívá například ke stanovení diagnózy metabolických poruch nebo různých typů rakoviny. Díky tomu, že metabolismus reaguje na změny celkového stavu organismu, je sledování jeho změn možným přístupem také v diagnostice sepse.

V této práci byla pro studium těkavých organických látek uvolňovaných z monocytů zvolena metoda komprehenzivní dvojdimenzionální plynové chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí s analyzátozem doby letu. Tato metoda je optimální právě pro necílený metabolický screening.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. Imunologie

Imunitní systém patří k jednomu z regulačních mechanismů organismu. Napomáhá také k udržování jeho vnitřního prostředí. Jeho úkolem je rozpoznat cizí buňky a molekuly od vlastních a likvidovat to, co považuje za škodlivé. Imunitní systém má schopnost učení a paměti. Imunitu dělíme na přirozenou - nespecifickou a získanou (adaptivní) - specifickou. Imunokompetentní buňky jsou produkovány v centrálních lymfatických orgánech, jakými jsou kostní dřeň nebo brzlík. Poté jsou diferenciovány a aktivovány v periferních lymfatických orgánech, tedy ve slezině nebo lymfatických uzlinách. Z kmenových buněk vznikají v kostní dřeni diferenciací všechny imunitní buňky. Z myeloidní linie buněk dále vznikají červené krvinky, krevní destičky a některé bílé krvinky, konkrétně granulocyty a monocyty. Z druhé linie, lymfoidní, vznikají lymfocyty, další typ bílých krvinek [1,2]



Obrázek 1: Vývojové linie krevních buněk [2]

2.1.1. Specifická imunita

Specifická imunita se utváří při každém setkání organismu s antigenem. Využívá specifické mechanismy a má imunologickou paměť. Je tvořena humorální a buněčnou složkou. Humorální složku imunity tvoří protilátky, které jsou produkovány B-lymfocyty, a cytokiny. Buněčnou složku tvoří B-lymfocyty a T-lymfocyty. Ty se vytváří v kostní dřeni a dozrávají v periferních lymfatických orgánech. T-lymfocyty jsou diferenciovány tak, aby rozeznaly specifické antigeny. Po odeznění zánětu zůstávají v krvi jako paměťové buňky. B-lymfocyty produkují po setkání s antigenem příslušné protilátky [3].

2.1.2. Nespecifická imunita

Nespecifická imunita je tvořena komplementem, fagocytujícími buňkami a NK (natural killer) buňkami. Přírozená imunita je vývojově starší složkou imunitního systému. Buňky nespecifické imunity nemají paměť. Na přítomnost antigenu v organismu reagují vždy stejně a poměrně rychle. Na svém povrchu nemají žádné receptory k rozlišování jednotlivých antigenů, ale disponují molekulami schopnými vázat struktury vyskytující se na povrchu organismů nebo poškozených buněk. Fagocytující buňky se vyznačují schopností fagocytózy, což je proces pohlcování pevných částic z okolního prostředí. Tento proces se skládá z chemotaxe, tedy pohybu za škodlivou látkou, jejího rozpoznání, pohlcení, usmrcení a následné sekrece látek, které jsou rozpoznatelné dalšími složkami imunitního systému. Součástí imunitního systému jsou také přírozené bariéry, jako kůže a sliznice. Dále také některé fyziologické funkce, například: peristaltika, činnost řasinkového epitelu, který se nachází v dýchacích cestách, nebo kašel [1,2]

2.1.3. Monocyty

Součástí nespecifické imunity je také monocytomakrofágový systém. Ten, jak již z názvu vyplývá, tvoří monocyty a makrofágy. Monocyty se nachází v krevním řečišti a po vstupu do tkání se mění na makrofágy. Ty nesou v různých tkáních různé názvy, v játrech je nazýváme Kupfferovy buňky, v plicích alveolární makrofágy, v dutině břišní peritoneální makrofágy, v kůži jsou to Langerhansovy buňky a v nervovém systému mluvíme o mikroglíích. V kostní tkáni dochází k jejich fúzi a tím ke vzniku osteoklastů v chrupavce pak chondroklastů. Makrofágy se také účastní remodelace tkání, destrukce starých a poškozených erytrocytů a metabolismu železa. Monocyty mají také schopnost diferenciaci v dendritické buňky. Ty jsou propojovacím článkem mezi specifickou a nespecifickou imunitou. Po fagocytóze vystavují na svém povrchu cílové antigeny pro T-lymfocyty, které jsou tímto aktivovány. Aktivací monocytů dochází k produkci cytokinů. Tyto látky aktivují specifickou imunitu a vedou k celkové reakci organismu na přítomnost patogenu [1,4,5].

Monocyty jsou se svým průměrem dosahujícím až 20 μm největšími bílými krvinkami. Jejich průměrný počet v krvi dospělého člověka činí $0,4 \cdot 10^9$ v jednom litru. V těle tvoří až 8 % procent z celkového množství leukocytů. Doba jejich života se pohybuje mezi 60 a 100 dny. V krvi se pohybují asi tři dny a poté prostupují do tkání, kde dochází k diferenciaci. Výrazné zvýšení jejich počtu v krvi je označováno jako monocytóza. Dochází k jejich zvýšení nad hodnotu $0,8 \cdot 10^9$ na litr krve. Naopak pokles pod $0,2 \cdot 10^9$ v litru se nazývá monocytopenie. Jejich zvýšení bývá průvodním jevem zánětlivých onemocnění [2,4,6].



Obrázek 2: Monocyt [7]

Monocyty patří mezi agranulocyty, což znamená, že jejich cytoplasma neobsahuje žádná specifická granula. Vyvíjí se z pluripotentních kmenových buněk nejprve přes monoblasty a následně přes promonocyty. Jejich dozrávání je stejně jako u ostatních krevních elementů řízeno růstovými faktory. V případě monocytů je tím hlavním růstovým faktorem M-CSF (Macrophage colony stimulating factor) Růstové faktory jsou peptidické látky, které se využívají také v terapii pro urychlení diferenciaci a proliferaci buněk transplantované kostní dřeně [2 4,5,8].

2.2. Sepsa

Za přirozených podmínek je součástí lidského organismu i velké množství bakterií. Průměrný počet těchto mikroorganismů u dospělého člověka činí asi 10^{15} . Jsou trvale přítomné na kůži, na sliznicích horních cest dýchacích nebo v urogenitálním systému. Pokud nedojde k jejich výraznému přemnožení, nezpůsobují tyto bakterie žádné onemocnění. V opačném případě dochází k vyvolání imunitní odpovědi což, pokud jsou porušeny imunitní bariéry, může vést k rozvoji infekce. Akutní infekce se může rozšířit krevním řečištěm dále do organismu a vyvolat tak celkovou reakci. Tato reakce se označuje jako sepsa a mezi její typické projevy patří například horečka, zchvácenost nebo zrychlený pulz [1].

Sepsa je klinický stav charakterizovaný systémovým zánětem. V roce 2005 byla nejčastější příčinou smrti pacientů na jednotkách intenzivní péče. Podle definice uvedené na konferenci Sepsis-3 z roku 2016 je sepsa život ohrožující orgánová dysfunkce v důsledku reakce organismu na infekci. Sepsa je progredujícím stavem při infekci a může vést až k totálnímu selhání orgánů. Nejčastěji bývá vyvolána bakteriemi, méně často pak viry, houbami nebo parazity. Nemusí být způsobena jen přítomností živých mikroorganismů, ale i uvolněnými endogenními proteiny nebo fosfolipidy, které se uvolňují při poškození nebo rozpadu tkání v organismu [9,10,11].

2.2.1. Základní pojmy týkající se sepse

2.2.1.1. SIRS (Syndrom systémové zánětlivé odpovědi)

SIRS je součástí příznaků sepse, ale i dalších stavů jako jsou trauma nebo popáleniny. Cílem SIRS je eliminace škodlivých mikroorganismů, omezení rozsahu poškození tkání, odstranění poškozených buněk a tkání, podpora hojení ran a znovu obnovení orgánových funkcí. Mezi mechanismy působení tohoto syndromu patří horečka, změna metabolismu vitamínů a stopových prvků, syntéza proteinů akutní fáze a aktivace komplementu. SIRS se projevuje zvýšením nebo snížením teploty nad 38 °C respektive pod 36 °C, tachykardií více než 90 tepů za minutu a zvýšením dechové frekvence nad 20 dechů za minutu. Dále také leukocytózou případně leukocytopenií. Sepse je definována jako SIRS v přítomnosti nebo jako důsledek prokázané infekce [9,12].

2.2.1.2. Těžká sepse

Jako těžká sepse je označován stav sepse spojený s orgánovou dysfunkcí, sníženým prokrvením tkání (hypoperfuzí), sníženým krevním tlakem (hypotenzí) a akutními změnami stavu vědomí. Tento termín byl však v roce 2016 v důsledku nové definice sepse označen jako nadbytečný a následně zrušen [9,10].

2.2.1.3. Septický šok

Septický šok vzniká v důsledku sepse. Mezi jeho projevy patří kritické snížení perfuze tkání a následně i mnohočetné orgánové selhání. Je to stav nereagující na objemovou terapii. Podle nové definice je septický šok definován jako sepse s buněčnými nebo metabolickými abnormalitami nebo oběhovou nestabilitou, které jsou natolik závažné, že zvyšují její úmrtnost. Mortalita se v tomto případě pohybuje mezi 40 a 60 % [9,10].

2.2.1.4. MODS (Syndrom multiorgánové disfunkce)

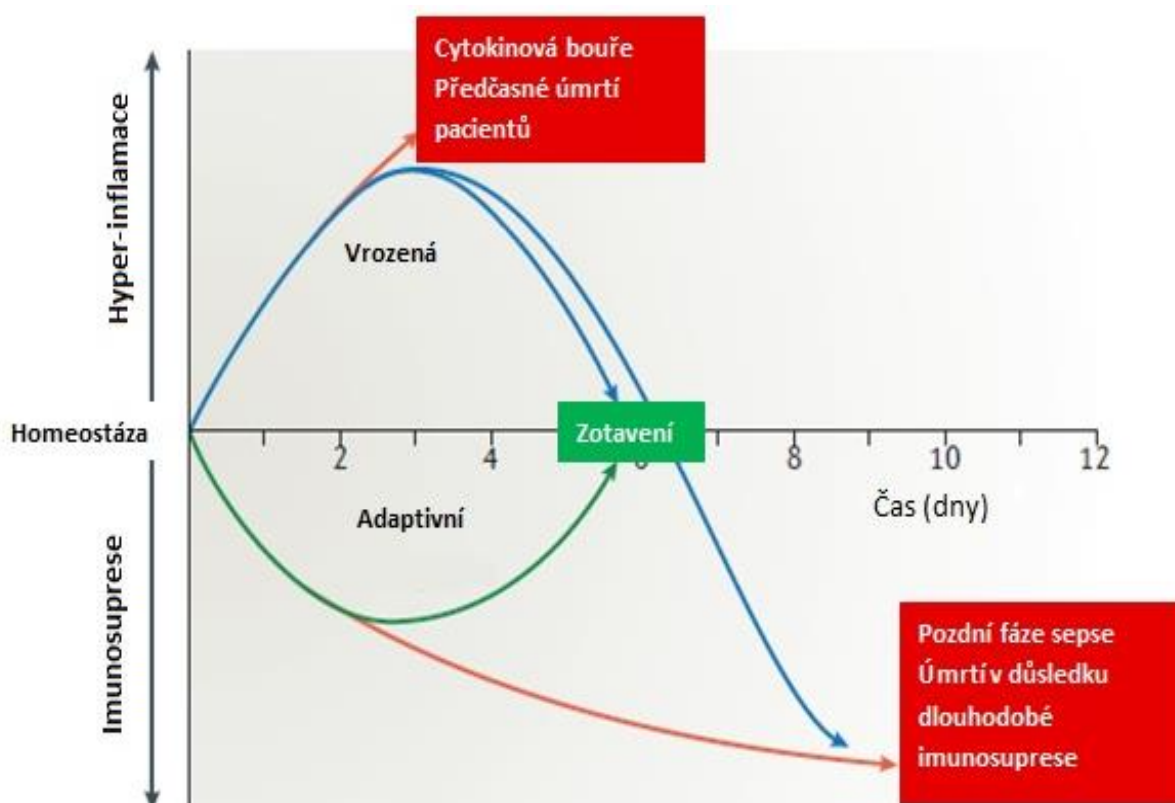
Touto zkratkou je označováno postupné nebo paralelní selhávání dvou a více orgánů. Syndrom zahrnuje proces selhávání od lehké orgánové dysfunkce po totální a nevratné selhání. Tento proces může být důsledkem různých akutních zranění nebo sepse [9,13].

2.2.2. Projevy sepse

Mezi projevy sepse patří zejména nepravidelná horečka střídaná třesavkami, zchvácenost, zrychlený pulz, zrychlená frekvence dýchání a snížený krevní tlak. V krvi je pozorována zvýšená koncentrace CRP, prokalcitoninu a cytokinů. Dochází také k výraznému snížení kapilárního návratu a zvýšení srdečního výdeje. Dále jsou pozorovány abnormality v jaterních a ledvinových funkcích [12].

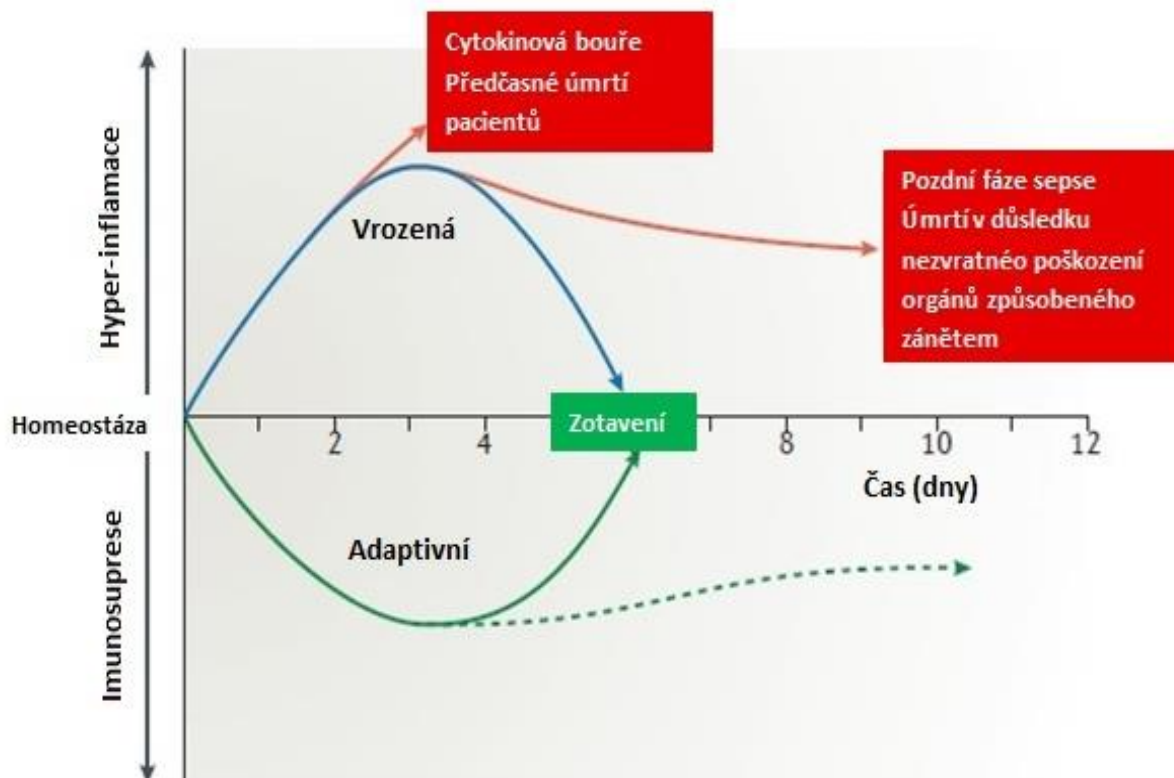
2.2.3. Průběh sepse

Průběh sepse není stále stoprocentně objasněn. Jedna teorie hovoří o tom, že v prvních dnech po nástupu sepse, dochází k aktivaci pro i proti zánětlivých mechanismů imunitního systému. Monocyty a další imunokompetentní buňky uvolňují velké množství cytokinů, které navozují zánětlivou reakci. Intenzita této reakce je závislá na typu patogenu, současném stavu pacienta a na dalších faktorech. Na obrázku (Obrázek 3) vidíme tuto teorii v grafickém znázornění. Prodloužená modrá a červená čára znázorňuje dlouho trvající infekci vedoucí k imunosupresi, rozvoji sekundárních infekcí a následně i ke smrti. Podle této teorie většina pacientů umírajících na následky sepse, umírá v důsledku potlačení funkce imunitního systému. K imunosupresi dochází vlivem apoptózy imunokompetentních buněk nebo oslabení jejich funkce [14].



Obrázek 3: Časový průběh sepse podle teorie konečné imunosuprese [14]

Druhá teorie popisuje příčinu úmrtní jako reakci na trvalou aktivaci buněk imunitního systému, což vede k dlouhodobému zánětu. Ten způsobuje nevratné poškození orgánů [14].



Obrázek 4: Časový průběh sepse podle teorie dlouhodobě působícího zánětu [14]

2.2.4. Diagnostika sepse

Včasná diagnostika sepse je klíčová pro přežití pacienta. Rychlost určení diagnózy může ovlivnit celkový výsledek léčby. Aktuálně používaným diagnostickým testem je stanovení hladiny prokalcitoninu (PCT). PCT je prohormonem kalcitoninu. Je produkován buňkami štítné žlázy a v průběhu první fáze sepse dochází k mnohonásobnému zvýšení jeho hladiny. Dalším použitelným markerem je C-reaktivní protein (CRP). Hladina CRP je běžně měřena lékaři pro diagnostiku bakteriální infekce. Mezi nejčastější původce infekcí vedoucích k septickému stavu patří: *Streptococcus pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* a *Klebsiella pneumoniae* [12].

Sepse bývá diagnostikována také pomocí mikrobiálních kultivací nebo přímé mikroskopie. Výhodou mikroskopického pozorování je jeho rychlost. Příprava a prohlédnutí preparátu vyžadují přibližně půl hodiny. Takto získané informace jsou však pouze orientační. Kultivační metodě může být podrobena celá řada biologických materiálů, jako krev, hnis, mozkomíšní mok nebo moč. Tento materiál je naočkován na živné půdy a následně kultivován. Po několika dnech vyrostou na půdách kolonie přítomných bakterií. Tímto způsobem mohou být bakterie identifikovány, což může napomoci ke správnému nasazení antibiotik. Hlavní nevýhodou kultivačních technik je doba potřebná k vývoji kultury, která se obvykle pohybuje mezi 24 a 48 hodinami [1,11].

Dalšími využívanými technikami jsou například ELISA testy nebo detekce bakteriální DNA pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR). Tyto techniky jsou výrazně rychlejší než mikrobiální kultivace avšak stále je zapotřebí několika hodin k získání výsledků. V důsledku

toho nejsou ani tyto techniky schopny monitorovat dramatické změny v průběhu sepse. Tato skutečnost otvírá široké pole pro využití dalších technik a analytických přístupů v diagnostice a monitorování průběhu sepse [11].

2.2.5. Terapie sepse

Léčba septického stavu je náročným procesem. Základem je podání antibiotik a dalších léků k odstranění projevů infekce. Včasné podání správných antibiotik je spojeno s výrazně nižší mortalitou. Podávají se také například antipyretika ke snížení horečky a analgetika proti bolesti. Dalším důležitým terapeutickým postupem je doplňování ztrát vody a minerálů, ke kterým dochází vlivem narušení permeability kapilár. Odstranění zdrojů sepse je nezbytnou součástí terapie. Je nutné odstranit cizí tělesa nebo katetry, vyjmout nebo vyřadit z funkce orgány postižené infekcí, odstranit nekrotické tkáně a abscesy [1,10].

2.3. Metabolomika

Metabolomika je studium metabolomu, což je soubor všech metabolitů v biologickém systému. Tato věda se věnuje studiu metabolitů, jejich interakcí a reakcí na změny prostředí, jakými jsou například změny teploty, pH nebo stres. Rozšíření metabolomiky v posledních letech umožnilo široký rozmach ve zkoumání genotypovo - fenotypových vztahů u mikroorganismů. Metabolické inženýrství umožňuje optimalizaci růstu mikroorganismů pro jejich využití v biotechnologii. Metabolomika také výrazně přispívá k lepšímu pochopení regulačních mechanismů a biochemických pochodů u in vivo pěstovaných buněk. Toto vede k optimalizaci fermentačních procesů v biotechnologické produkci enzymů, vitamínů a dalších látek. Metabolom bakterie obsahuje 500-1200 látek. Změna intracelulární koncentrace těchto metabolitů může vést k charakterizaci enzymové kinetiky, což může pomoci objasnit mechanismus inhibice nebo omezení některých biosyntetických kroků. Celková hmotnost metabolomu se odhaduje na 3-5 % hmotnosti buňky. Asi 85 % metabolitů má molekulovou hmotnost pod 500 g/mol. A právě nízká molekulová hmotnost metabolitů znemožňuje prekoncentrační techniky jakými je například ultrafiltrace, což je dalším problémem při jejich analýze [15].

2.3.1. Analytické metody využívané v metabolomice

Analýza metabolomu je velmi náročným oborem, vzhledem ke složitosti zkoumaných vzorků. Nejvíce využívanými metodami v tomto oboru jsou plynová chromatografie, vysokoúčinná kapalinová chromatografie nebo kapilární elektroforéza. Tyto techniky však nejsou schopny dokonale rozlišit tak velké množství látek, které se nachází, obvykle v nízkých koncentracích, v buňkách, natož pak postihnout změnu jejich koncentrace se změnami okolí. Řešením tohoto problému jsou multidimenzionální analýzy. Jejich výhodou je rozlišení velkého množství látek v jedné analýze. Dvojdimenzionální plynová chromatografie spojená s hmotnostní spektrometrií přináší mnohem větší poměr signálu a šumu a vyšší separační kapacitu. Proto je ideální volbou pro metabolomickou analýzu. Zapojením hmotnostního spektrometru jako detektoru se otevírá možnost rozlišování izotopů. Toho se

využívá například v izotopovém značení aminokyselin při proteomických studiích. Dalšími široce využívanými analytickými metodami jsou enzymatické testy, chromatografie na tenké vrstvě nebo nukleární magnetická rezonance [15,16].

2.3.2. Využití

Metabolomika má své místo v oblasti lékařské biologie, při screenigu dědičných defektů, vývoji léků a studiu metabolických poruch. Další využití nachází také ve studiu funkční genomiky rostlin. Metabolomické přístupy jsou využívány také k identifikaci mikrobiálních kmenů nebo při kontrole nemocí. Znalost metabolomu umožňuje lepší a účinnější biotechnologickou výrobu. Metabolomika buněčných kultur také umožňuje identifikaci nových biomarkerů patologických stavů pro diagnostiku [15,17].

Metabolomický přístup byl také navržen při diagnostice rakoviny. Rakovina prsu je nejrozšířenější onkologickou diagnózou u žen, a také hlavní příčinou jejich úmrtí. Výzkumná skupina z Portugalska se věnovala stanovení těkavých organických látek uvolňovaných z buněčné kultury buněk rakoviny prsu. Tyto výsledky byly porovnány s těkavými látkami uvolňovanými z buněčné kultury buněk zdravé prsní tkáně. Předpokladem studie byla změna v metabolismu u nádorových buněk, což by mělo vést k produkci specifickým sloučenin. Pro analýzu byla použita metoda SPME-GC/MS. Výsledkem studie byla identifikace několika látek produkovaných pouze nádorovými buňkami. Ty by v budoucnu mohly být využity k diagnostice karcinomu prsu [17].

Metabolomický přístup je také využíván pro analýzu vzorků plasmy nebo krve ve výzkumech týkajících se diagnostiky sepse. Sepsa totiž indukuje metabolické poruchy. Vzorky krve byly analyzovány u pacientů s podezřením na sepsi na urgentním příjmu. Tento přístup by zvolen, aby se předešlo zbytečnému podávání antibiotik a tím riziku vzniku antibiotické rezistence u bakterií [18].

Metabolomické profily, naměřené v různých časových intervalech od navození septického stavu u krys, byly porovnávány, aby byla zjištěna minimální doba v které je již možné detekovat změny v metabolismu. Po dvanácti hodinách byla identifikována zvýšená koncentrace kyseliny linolové, stearové, olejové a dokosaheptaenové. Již v krátkém čase tedy dochází ke zrychlení metabolismu lipidů, a to nejspíše z důvodu zvýšené potřeby energie. Tyto vzorky byly analyzovány pomocí HPLC/MS [19].

2.4. Těkavé organické látky

Těkavé organické látky jsou studovány v mnoha oborech jako potravinářská chemie, environmentální chemie, medicína nebo forenzní analýza. Jejich obecnější definice jsou založeny na fyzikálních a chemických vlastnostech sloučenin, jako jsou jejich struktura, bod varu, a tenze par. Podle agentury pro ochranu životního prostředí v USA jsou těkavé organické látky definovány jako organické sloučeniny, jejichž tenze nasycených par je při teplotě 20 °C větší než 130 Pa [20]

2.4.1. Analýza těkavých organických látek v metabolomice

2.4.1.1. Těkavé látky produkované bakteriemi

Množství výzkumných skupin se v současné době věnuje identifikaci patogenních bakterií na základě jejich produkce malých organických těkavých látek. Patogen lze rychle a snadno identifikovat analýzou těkavých látek nacházejících se přímo nad agarem. K takovéto analýze se nejčastěji využívá mikroextrakce na pevné fázi spojená s plynovou chromatografií s hmotnostně spektrometrickou detekcí. Dalším možným přístupem je využití spektrometrie iontové mobility. Tato technika je založená na dělení analytů podle jejich náboje, hmotnosti a průřezu plochy. Specifitu metody analýzy, lze zvýšit přidáním specifického substrátu do růstového media. V průběhu růstu na takto upraveném médiu jsou bakteriemi produkovány unikátní organické těkavé látky. Toho se dá využít, pokud známe enzymatický aparát daného patogenu. Tato technika může najít využití i při analýze vlivu antibiotik na růst kultury. Vlivem antibiotik totiž dochází k omezení produkce některých těkavých látek [21].

Tato metoda byla využita při stanovení biomarkerů infekce způsobené několika základními druhy patogenních bakterií. Krevní vzorky zdravých pacientů byly smíchány s bujonem a inkubovány v přítomnosti bakterií. Produkované VOCs byly analyzovány. Tímto postupem byl například identifikován kyanovodík, jako biomarker přítomnosti *Pseudomonas aeruginosa*, což je bakterie způsobující například zápal plic [21].

Diagnostika bakterémie je podle několika dalších výzkumů možná, díky tomu, že existují metabolity, produkované pouze bakteriemi a ne člověkem. Byly analyzovány těkavé metabolity bakterií nejčastěji způsobujících sepsi a tak identifikováno několik sloučenin, které nejsou produkovány lidským organismem. Mezi tyto sloučeniny patří například isopentanol, methylmerkaptan nebo trimethylamin. Tyto sloučeniny by tedy mohly sloužit jako biomarkery přítomnosti bakterií [22].

Bakterie jsou také častým původcem infekcí u popálenin, chronických kožních vředů nebo dalších těžko se hojících ran. Odběr vzorků pro identifikaci mikroorganismu způsobujícího infekci bývá často invazivní a bolestivý. Využití detekce těkavých látek z obvažového materiálu pomocí SPME-GC/MS by mohlo být rychlým a snadným řešením tohoto problému [23].

2.4.1.2. *Těkavé látky ve vydechovaném vzduchu*

Další oblastí výzkumu týkající se malých organických molekul je analýza látek ve vydechovaném vzduchu. Tímto přístupem se dá teoreticky odlišit například sepse od zánětu, a to zejména množstvím a typem vydechovaných těkavých organických látek. S každým výdechem jsou vyloučeny tisíce těkavých látek. Jejich množství a složení se výrazně mění se zdravotním stavem. V rámci výzkumu byly analyzovány těkavé látky ve vydechovaném vzduchu u kryš v průběhu sepse, hemoragického šoku, endotoxemie, což je stav přítomnosti endotoxinů v krvi, a u kryš z kontrolní skupiny. Výsledky všech čtyř skupin byly porovnány. V průběhu experimentu byly pozorovány změny koncentrace u několika vybraných metabolitů. Koncentrace těchto metabolitů se měnila v průběhu několika hodin. Na základě těchto výsledků by mohla být vytvořena metoda pro určení stavu, v jakém se organismus nachází [24].

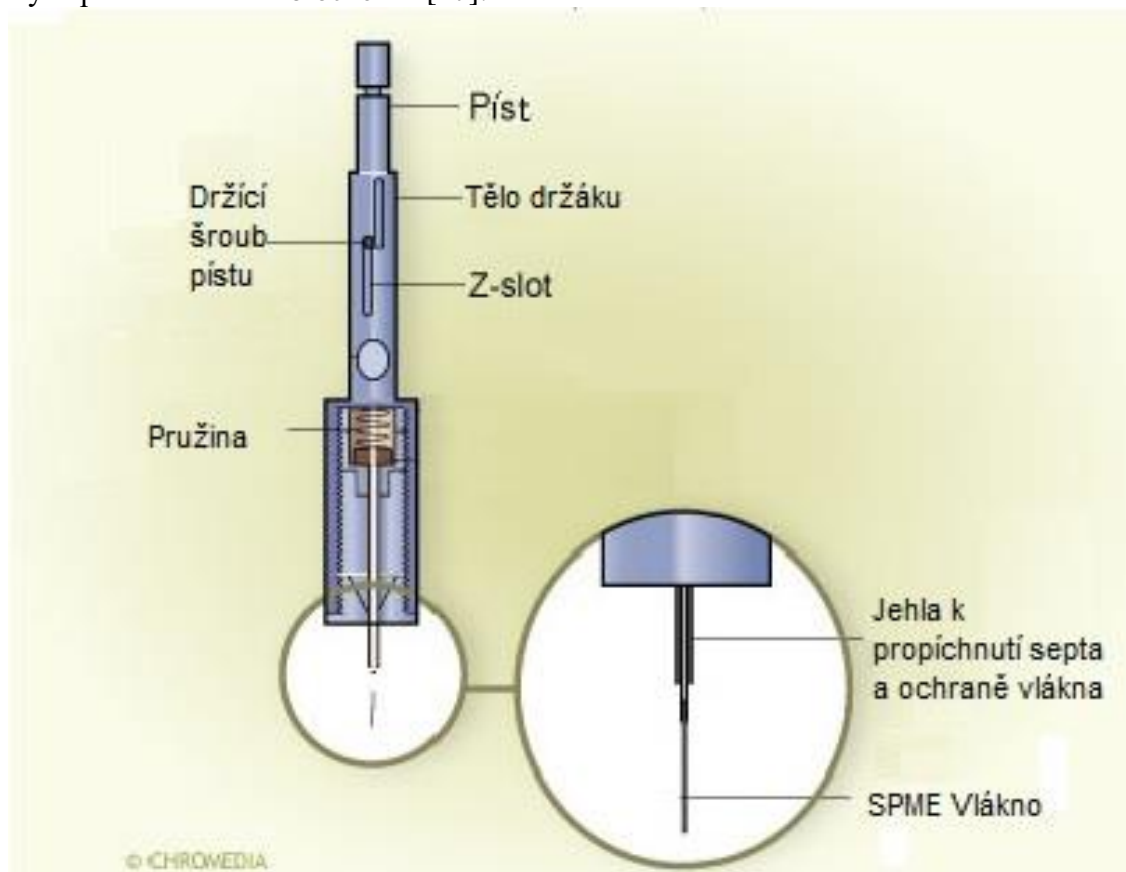
V dalších studiích byl analyzován vydechovaný vzduch například u kryš infikovaných lipopolysacharidem z bakterie *E. Coli*. Použití lipopolysacharidu k navození podmínek bakteriální infekce, je široce používaným modelem. Vydechovaný vzduch byl analyzován pomocí IMS (spektrometrie iontové mobility) a poté také pomocí SPME GC/MS. Tyto dvě metody byly porovnány. Výhodami IMS jsou zejména rychlost analýzy, minimální manipulace se vzorkem a možnost použití přenosného přístroje. Poslední ze jmenovaných by v případě tohoto experimentu mohlo umožnit analýzu vydechovaného vzduchu přímo u lůžka pacienta a tím rychlou možnost určení diagnózy [11].

2.5. SPME

SPME nebo-li mikroextrakce na pevné fázi byla původně vyvinuta pro použití v analýze životního prostředí. Jedná se o techniku pro přípravu vzorků pro plynovou chromatografii. Výhodou této techniky je, že nevyžaduje žádná organická rozpouštědla ani přístrojové vybavení a k analýze nám postačí minimální množství vzorku [25].

SPME spojuje všechny procesy složité přípravy vzorku, jeho zakoncentrování a extrakce do jediného kroku. Což snižuje riziko vzniku chyb a zároveň šetří čas [26].

Tato technika založená na adsorpci a následné desorpci byla vyvinuta v první polovině devadesátých let. Vzorek se v tomto případě sorbuje na jeden až dva centimetry dlouhé křemenné vlákno pokryté polymerem. Toto vlákno je umístěno v ocelové jehle s pístem, která slouží k propíchnutí septa a zároveň funguje jako ochrana vlákna před poškozením. K adsorpci analytu na vlákno, přesněji do vrstvy polymeru, dochází po dobu několika minut, obvykle 2-30. Tato doba je nutná k dosažení sorpční rovnováhy. Čas nutný k dosažení rovnováhy je závislý na koncentraci analytu ve vzorku a na typu polymeru pokrývajícím vlákno. Typ polymeru má také vliv na selektivitu extrakce. Mezi další možnosti ovlivnění extrakčního procesu patří změna pH vzorku, jeho míchání, vysolovací efekt nebo zahřívání vzorku. K desorpci poté dochází vlivem vysoké teploty v injektoru plynového chromatografu. Tato metoda našla využití v analýze těžkých sloučenin při monitorování životního prostředí, v analýze potravin nebo v biochemii [27].



Obrázek 5: Zařízení pro SPME [28].

Rozlišujeme 3 typy mikroextrakce tuhou fází. První z nich je přímá metoda, při té je vlákno ponořeno přímo do vzorku a analyty jsou tak adsorbovány přímo na stacionární fázi. Při Head space metodě je vlákno umístěno do prostoru nad vzorkem a dochází k extrakci ze vzduchu. Tato metoda je šetrnější k používanému vláknu, zabraňuje se navázání vysokomolekulárních látek a dalších netěkavých sloučenin. Posledním typem je membránově chráněná extrakce. V tomto uspořádání je přidána membrána, která chrání vlákno před poškozením. Používá se pro vysoce kontaminované vzorky, které by vlákno mohly poškodit [26].

Největší výhodou této techniky je snadné použití a minimalizace znečištění rozpouštědlem. S použitím správného vlákna je tato metoda velice selektivní. Nevýhodami může být malá absorpční kapacita vlákna, které tak může být snadno nasyceno, relativně špatná reprodukovatelnost a jeho poměrně nízká životnost [25]

Tabulka 1: Stacionární fáze využívané pro SPME [25, 29].

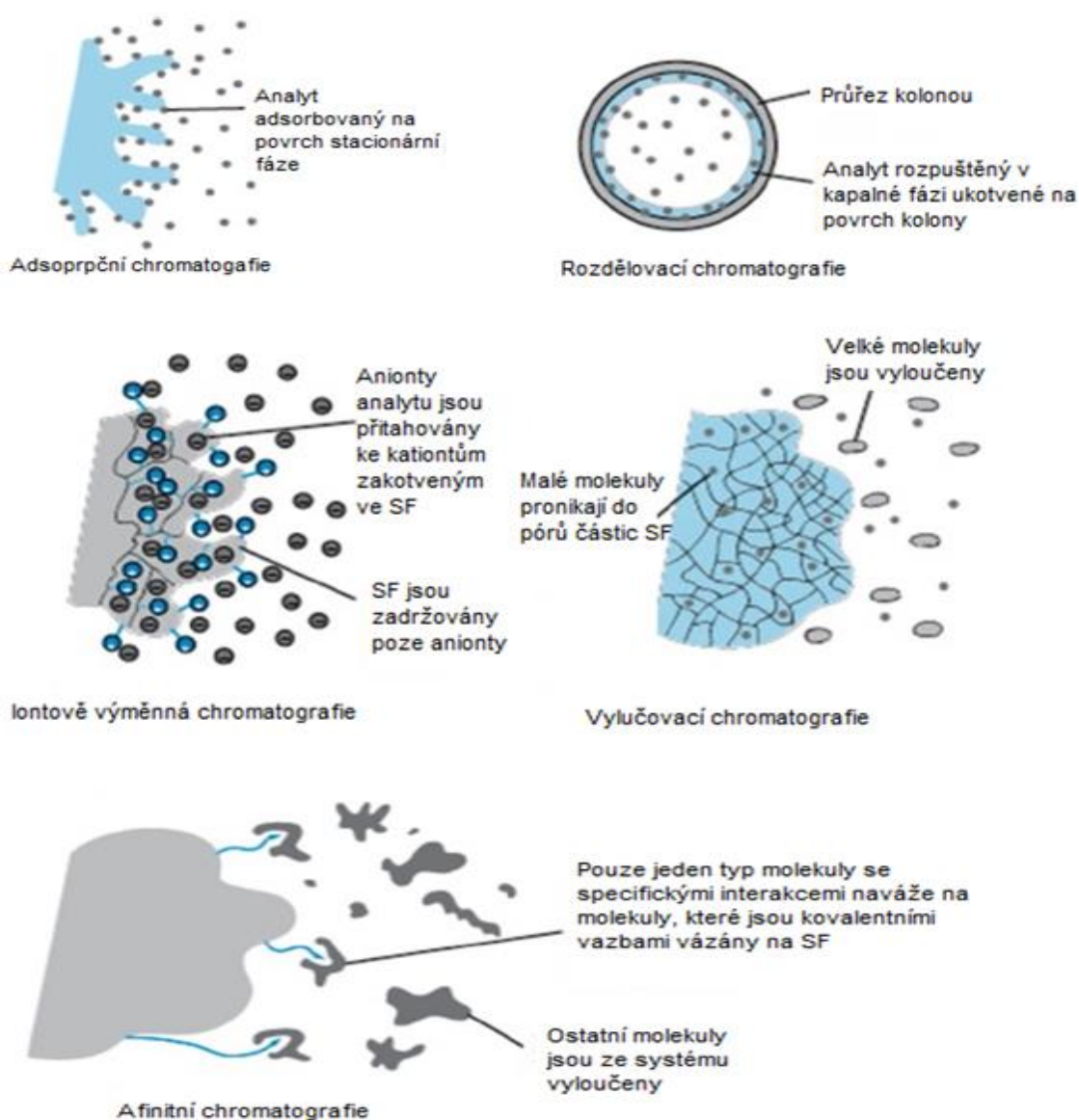
Typ polymeru	Označení	Tloušťka fáze (μm)	Analyty
Polydimethylsiloxan	PDMS	7, 30, 100	Nepolární látky
Polyakrylát	PA	85	Polární, středně těkavé látky (zvláště fenoly)
Polydimethylsiloxan/Divinylbenzen	PDMS/DVB	60, 65	Polární látky (zvláště fenoly)
Carboxen/Polydimethylsiloxan	CAR/PDMS	78, 85	Těkavé, nízkomolekulární látky
Carbowax/Divinylbenzen	CW/DVB	65, 70	Polární látky (zvláště alkoholy)
Divinylbenzen/Carbonex/ Polydimethylsiloxan	DVB/CAR/ PDMS	30	Široké využití

2.5.1. Využití SPME pro analýzu biologických vzorků

Biologické vzorky jsou velmi komplexní a jednotlivé analyty jsou v nich zastoupeny ve velmi nízkých koncentracích. Tato metoda našla díky svojí rychlosti a jednoduchosti využití například ve forenzní a klinické analýze. Mikrobiologická analýza aromatických látek produkovaných některými druhy patogenních bakterií se využívá i při zpracování drůbeže. Těkavé látky uvolňované bakteriemi způsobují nepříjemný zápach. Jejich analýza se využívá při studiu bakteriální kontaminace při kontrole bezpečnosti potravin. Některé látky produkované bakteriemi nebo houbami mohou být izolovány a dále využity. Pro určení správné fáze růstu, ve které má dojít k izolaci můžeme odebírat vzorky pomocí SPME v časovém horizontu, aniž by musel být jejich růst narušen. V analýze životního prostředí jsou touto metodou analyzovány aldehydy produkované řasami, které způsobují nepříjemný zápach znečištěných povrchových vod [29].

2.6. Plynová chromatografie

Chromatografie je termín používaný pro širokou škálu separačních technik založených na distribuci vzorku mezi pohyblivou a nepohyblivou fází. Složky vzorku, které výrazně interagují se stacionární fází, jsou v chromatografickém systému zadržovány po delší dobu. Míra jejich interakce se stacionární fází je úměrná době, po kterou je analyt zadržován v systému. Stacionární fází může být kapalina nebo pevná látka. Podle skupenství mobilní fáze dělíme chromatografii na plynovou, kapalinovou a supekritickou fluidní. Vzhledem k povaze interakcí mezi analytem a stacionární fází dělíme chromatografii na rozdělovací, adsorpční, vylučovací, chromatografii hydrofobních interakcí, iontově výměnnou chromatografii a afinitní chromatografii. Tyto fyzikálně chemické principy jsou zobrazeny na obrázku. (Obrázek 6). Tyto mechanismy jsou využívány především v kapalinové chromatografii a mohou být používány i v kombinaci. Plynová chromatografie využívá zejména rozdělovací nebo adsorpční mechanismus [30,31,32].



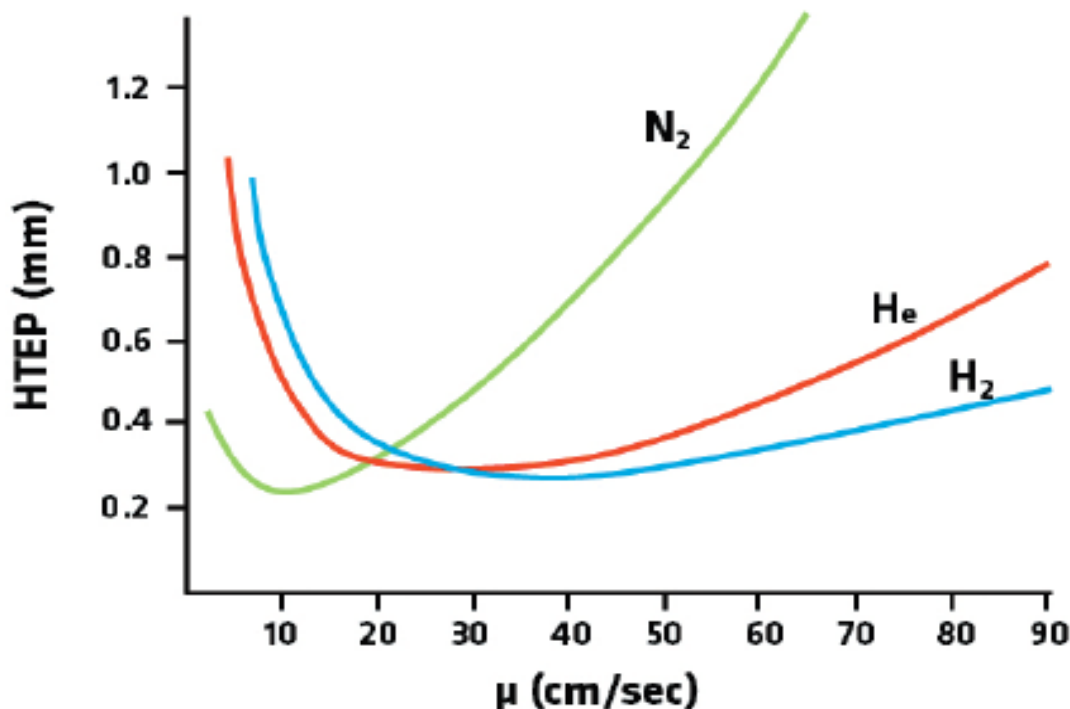
Obrázek 6: Separační mechanismy v chromatografii [30].

2.6.1. Účinnost separačního systému

Lineární rychlost mobilní fáze významně ovlivňuje účinnost separačního systému. Důležitým krokem je tedy zvolit optimální nastavení mezi rychlostí a účinností kolony. Tento problém je vyjádřen van Deemterovou teorií. Účinnost kolony je v tomto případě kvantifikována pomocí výškového ekvivalentu teoretického patra. Ten je vypočítán jako podíl délky kolony a počtu teoretických pater. Počet teoretických pater je parametr zjistitelný z chromatogramu a je závislý na šířce výsledného píku. Závislost výškového ekvivalentu teoretického patra na lineární rychlosti průtoku mobilní fáze je vyjádřen van Deemterovou rovnicí,

$$H = A + \frac{B}{u} + C_S u + C_M u \quad (1)$$

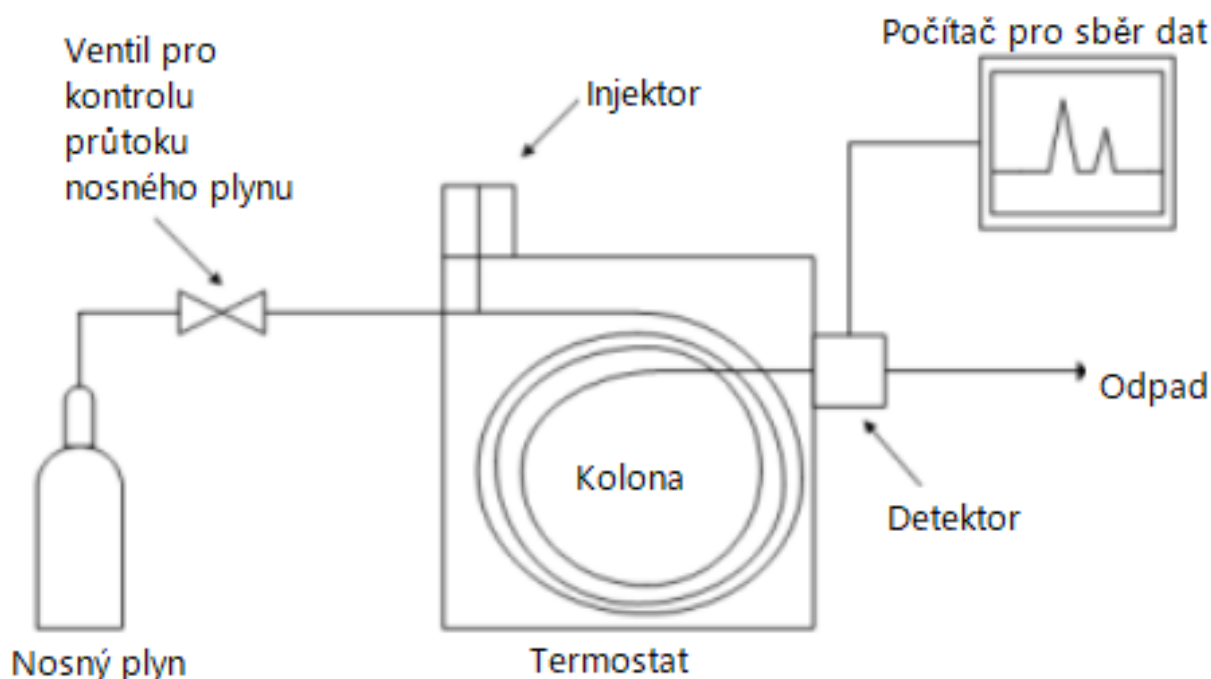
kde u je lineární rychlost mobilní fáze, A je vyjádřením turbulentní difuze, B molekulární difuze, C_S je vyjádření odporu proti přenosu hmoty ve stacionární fázi a C_M vyjadřuje odpor proti přenosu hmoty v mobilní fázi. Turbulentní difuze vyjadřuje nepravidelnost v náplni kolony. V důsledku toho proudí mobilní fáze některými částmi rychleji a jinými pomaleji. Tento člen je tedy nezávislý na rychlosti pohybu mobilní fáze. Molekulární difuze probíhá v plynné fázi a je úměrná době, kterou analyt stráví v mobilní fázi. Je tedy nepřímo úměrná průtokové rychlosti nosného plynu. Tyto křivky se však zásadně mění s průměrem kolony. Čím menší je její průměr, tím plošší jsou křivky. Pro rychlou chromatografii se proto využívají kolony o menším průměru. Při nastavení optimální rychlosti průtoku nosného plynu lze dosáhnout podobné účinnosti separace při použití všech třech typů nosných plynů [32,33,34].



Obrázek 7: Grafické znázornění van Deemterovy rovnice pro nejpoužívanější plyny [35].

2.6.2. Instrumentace

Plynový chromatograf je tvořen injektorem určeným pro vstup vzorku. Vzorek je skrz septum dávkován na kolonu, která je uložena v termostatu. Udržování teploty a její programovatelná změna je důležitou součástí metody. Nutnou součástí je také zásobní láhev plynu, který působí jako mobilní fáze a případně plynu, který je nutný ke správnému fungování detektoru. Nedílnou součástí je také počítač pro sběr a zpracování dat [25,33].



Obrázek 8: Schéma plynového chromatografu [36].

2.6.2.1. Mobilní fáze

Mobilní fází je v tomto případě nosný plyn. Tento plyn je inertní a neúčastní se žádných interakcí s analytem nebo stacionární fází jako je tomu v případě mobilní fáze u kapalinové chromatografie. Mezi nejvíce využívané plyny patří dusík, vodík, argon nebo helium. Používané plyny musí mít vysokou čistotu. Součástí přístroje musí být také kvalitní regulátory tlaku pro zajištění stabilního průtoku nosného plynu kolonou [25, 33].

Výběr použitého nosného plynu závisí například na požadované rychlosti analýzy nebo na zvoleném detektoru. Dusík je se svojí vyšší molekulovou hmotností viskóznější, než ostatní plyny. Dochází v něm tedy k nižší difuzi analytu. Pro analýzy s nižší požadovanou průtokovou rychlostí dosahuje nejvyšší účinnosti separace. Na grafickém znázornění van Deemterovy rovnice je však patrné, že se zvyšující se lineární rychlostí mobilní fáze se účinnost separace u dusíku prudce snižuje. Pro rychlejší analýzy je proto vhodné zvolit jako nosný plyn helium nebo vodík. Vodík vykazuje při zvyšování rychlosti průtoku nejmenší ztrátu účinnosti. Největším rizikem jeho využití je však jeho reaktivita a výbušnost ve směsi se vzduchem. Výhodami využití helia jsou jeho inertnost a kompatibilita s téměř všemi druhy detektorů. Nevýhodou je však zejména jeho vysoká cena [25,32,34].

2.6.2.2. Injektor

V injektoru dochází k odpařování kapalného vzorku, který je poté mobilní fází přenes na kolonu. Součástí injektoru je liner, což je skleněná trubička, která zajišťuje homogenizaci vzorku, brání jeho degradaci a zlepšuje jeho odpařování. Při nástřiku vzorku je také důležitá volba teploty injektoru. Ta musí být nastavena tak, aby nedocházelo ke kondenzaci analytu.[25,33].

Existuje několik typů injektorů pro kapilární kolony. Základním rozlišením je dávkování s děličem toku nebo bezděličové dávkování. Dávkování s děličem toku nosného plynu se využívá pro koncentrované vzorky, aby nedocházelo k přetížení kolony a tak ke snížení účinnosti separace. Vzorek vstupuje do injektoru, kde se míchá s nosným plynem v předem daném poměru. Jen velmi malá část této směsi postupuje na kolonu a zbytek je odváděn pryč ze systému [25,37].

Bezděličové dávkování se využívá pro stopové analýzy. Používá se stejný injektor, ale dochází k uzavření vzduchového ventilu pro odvod plynu.

Dalším typem dávkování vzorku je využití injektoru s programovatelnou teplotou. Vzorek se v tomto případě zavádí při nízké teplotě a poté dochází k postupnému ohřevu. Tato technika se využívá pro teplo citlivé látky [25].

Posledním typem je dávkování vzorku přímo na kolonu. V tomto případě je jehla zavedena přímo na kolonu. Tato technika se využívá při stopových analýzách [25,37].

Vzorky pro analýzu jsou z velké části dávkovány v kapalném stavu a to buď ručně pomocí mikrodávkačů nebo s využitím automatického dávkače. Množství dávkovaného vzorku se pohybuje v rozmezí 1-3 μl [25,33].

2.6.2.3. Kolona

Kolona je nejdůležitější součástí plynového chromatografu. Klíčovou úlohu při separaci hraje volba stacionární fáze. Míra polaritativy stacionární fáze má zásadní vliv na účinnost separace. Kolony pro plynovou chromatografii mohou být buď náplňové, nebo kapilární

Náplňové kolony bývají nejčastěji skleněné, jejich vnitřní průměr se pohybuje v rozmezí 2-5 mm a jejich délka dosahuje 1-5 m. Více používanými jsou kapilární kolony. Jejich délka se pohybuje v rozmezí 5-150 m a jejich vnitřní průměr je 0,1-0,75 mm. Bývají nejčastěji vyrobeny z křemene potaženého vrstvou polyimidu. Tato vrstva brání oxidaci, tepelné degradaci a zvyšuje pružnost kolony. Stacionární fáze bývají nejčastěji polysiloxany substituované methyly nebo fenyle.

Kolona je umístěna v termostátovaném prostoru. Teplota kolony ovlivňuje míru interakcí. Obecně platné pravidlo zní, že s rostoucí teplotou roste množství polárních interakcí a klesá podíl těch disperzních. Zvýšení teploty kolony vede také k rychlejší eluci, bohužel však na úkor rozlišení. Při analýze směsí je volena programovatelná teplota na termostatu. Teplota se během analýzy v pravidelných intervalech zvyšuje, což umožňuje lepší rozlišení některých látek [25,33,37].

2.6.2.4. *Detektor*

Plynová chromatografie využívá velké množství různých detektorů pracujících na různých principech. Tyto detektory se liší citlivostí, selektivitou a mezemi detekce pro různé látky. Nejběžnějším a nejuniversálnějším detektorem je plamenový ionizační detektor (FID). Dalšími detektory jsou tepelně vodivostní detektor (TCD), který je nedestruktivní vůči vzorku, fotoionizační detektor, mikrokatatometr, termoionizační detektor (TID) detektor elektronového záchytu (ECD), fotometrický plamenový detektor (FPD), S plynovou chromatografií se dá spojit i olfaktometr.

Tato technika je také kombinovatelná s řadou dalších technik jakými jsou nejen hmotnostní spektrometrie ale také infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací a atomová emisní spektrometrie [25,37].

2.6.2.5. *Využití*

Plynová chromatografie je široce využívanou technikou například v monitorování průmyslových pracovních procesů. Ve farmaceutickém průmyslu se využívá v kontrole kvality léčiv, analýze nových produktů nebo k monitorování metabolitů produkovaných v biologických systémech. Má své místo i v environmentální analýze při detekci pesticidů nebo jejich reziduí a při hodnocení kvality ovzduší. Polutanty v ovzduší mohou způsobovat vážná onemocnění, jakými jsou například astma, bronchitida nebo rakovina plic. Analýza ropných produktů je dalším polem působnosti plynové chromatografie. Další využití nachází také v klinické biochemii v analýze vzorků, jakými jsou krev nebo moč. Látky jako proteiny, aminokyseliny, mastné kyseliny, steroly, triacylglyceridy nebo vitamíny mohou být také analyzovány po předchozí derivatizaci. V potravinářské chemii je plynová chromatografie využívána k analýze antioxidantů a konzervantů [38].

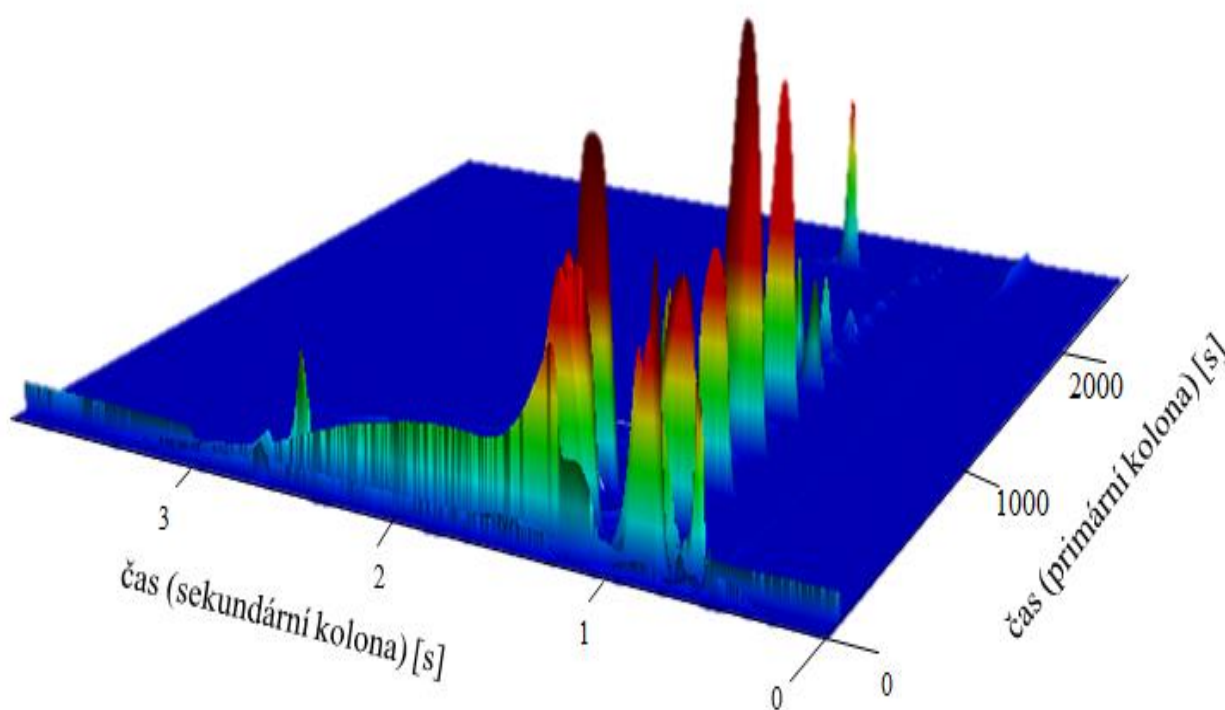
2.6.2.6. *Multidimenzionální plynová chromatografie (GC-GC)*

Jednoduché spojení dvou chromatografických kolon o různých polaritách vede k výraznému zlepšení separace. Vzorek je nejprve separován na první koloně a poté jsou některé, nedokonale oddělené frakce nastříkovány na druhou kolonu s jinou stacionární fází, kde jsou dále separovány. Výkonnější a přesnější verzí multidimenzionální plynové chromatografie je komprehenzivní plynová chromatografie (GCxGC). O té bude pojednáno v samostatné kapitole [25].

2.7. Komprehenzivní plynová chromatografie (GCxGC)

Na rozdíl od GC-GC nedochází v tomto případě k převedení pouze některých frakcí do sekundární kolony, ale je převeden celý eluát z primární kolony. K převodu mezi kolonami slouží modulátor. Modulátor zajišťuje vznik úzkých pásem na vstupu do sekundární kolony. Na druhé koloně proto musí docházet k rychlé separaci tak, aby retenční čas všech analytů byl kratší než modulační perioda. Čas strávený v sekundární koloně se pohybuje mezi 3 a 5 sekundami. Počítačový software kombinuje data z obou kolon a vytvoří sadu souřadnic pro každý pík a vzniká tak dvojrozměrný chromatogram. Nutnou součástí přístroje musí být také dostatečně rychlý detektor. Takovým může být například hmotnostní spektrometr s analyzátozem doby letu [25].

Dvojdímenzionální plynová chromatografie je ideální volbou při analýze složitých vzorků. Využívá se v případech, kdy klasická plynová chromatografie nedokáže jednotlivé látky rozlišit a dochází k jejich koelucii. Ve spojení s hmotnostní spektrometrií s analyzátozem doby letu nachází široké uplatnění v analýze potravin, životního prostředí, biologických a petrochemických vzorků. Velkou výhodou oproti použití běžné plynové chromatografie je výrazné zvýšení píkové kapacity. Výsledná píková kapacita je dána součinem píkové kapacity jednotlivých kolon. Dozvídáme se tak výrazně více informací o vzorku. Dochází ke zvýšení poměru signálu a šumu a tím k zlepšení mezi detekce [39,40].



Obrázek 9: Výsledné zpracování časových souřadnic do 3D grafu

2.7.1. Instrumentace

2.7.1.1. Kolona

Instrumentace dvojdimenzionálního plynového chromatografu je prakticky totožná s klasickým plynovým chromatografem. Je zde navíc pouze za první klasickou kolonu přidána druhá menší kolona a mezi ně je umístěn modulátor. Obě kolony mohou být umístěny v jednom termostatovaném prostoru, pro lepší ovládání teploty je však výhodnější umístit sekundární kolonu do zvláštního prostoru.

Obě kolony se liší v polaritě stacionární fáze. Primární kolona má obvykle délku 30 m a vnitřní průměr 0,25-0,32 mm. Sekundární kolona musí být krátká, obvykle 0,5-2 metry, aby došlo k separaci všech složek frakce z první kolony, než dojde k převedení další frakce.

Ve většině případů je primární kolona nepolární. Dochází tedy nejprve k separaci na základě rozdílného bodu varu jednotlivých složek [39,40].

2.7.1.2. Modulátor

Modulátor slouží k záchytu a akumulaci, refokusaci a opětovnému rychlému uvolnění jednotlivých frakcí.

Jedním z možných typů modulátorů je teplotní modulátor, který používá kapalný oxid uhličitý pro zachycení a zaostření analytů v prvních centimetrech sekundární kolony. Na část kolony je přiváděn kapalný oxid uhličitý a po předem určeném časovém úseku dojde k posunutí modulátoru. Zaostřená zóna analytu je znovu vystavena teplotě v termostatu. Není tedy nutný žádný další zdroj tepla a analyt je uvolňován na sekundární kolonu.

Nejpoužívanějšími termálními modulátory jsou kryogenní proudové modulátory. Ty využívají buď kapalný oxid uhličitý, nebo kapalný dusík. V nejčastějším uspořádání je tvoří čtyři trysky. Do dvou je přiváděn horký vzduch a do dvou plynný dusík chlazený kapalným dusíkem respektive oxid uhličitý. Dusík se využívá v případě analýzy velmi těžkých sloučenin. Jejich výhodou je také v tom, že neobsahují žádné pohyblivé části, které by mohli podléhat opotřebení. V jednodušším uspořádání tohoto modulátoru byla využita pouze jedna tryska k chlazení. K ohřevu vzorku a tím k jeho převedení na sekundární kolonu docházelo vystavením části kolony teplotě v termostatu [39,41,42].



Obrázek 10: Kryogenní modulátor ve dvou tryskovém uspořádání [42]

2.7.1.3. Detektor

Jako detektor může být využit hmotnostní spektrometr nebo prakticky jakýkoliv detektor použitelný v plynové chromatografii s dostatečně vysokou skenovací rychlostí. Dříve byl velmi používaným FID detektor. ECD a atomový emisní detektor poskytují také uspokojivé výsledky i přes vysokou požadovanou rychlost analýzy. V poslední době je však stále používanější spojení s hmotnostní spektrometrií s využitím TOF analyzátoru nebo kvadrupólu [39].

2.7.2. Využití GCxGC v analýze biologických vzorků

V posledních letech byl zaznamenán prudký nárůst článků vydaných na téma analýzy biologických vzorků pomocí GCxGC. Tato metoda byla využita k analýze léčiv v krvi, ke stanovení organických metabolitů v moči nebo tkáních myši, ke stanovení těkavých organických látek v lidském dechu nebo produkovaných rostlinami. Analýzou lidského dechu bylo stanoveno množství látek provázejících různá onemocnění. Například sloučeniny síry jsou spojeny s onemocněním jater, zvýšená koncentrace uhlovodíků s onemocněním plic, střev nebo s neurologickými onemocněními. V metabolomice byla tato metoda využita pro analýzu metabolomu bakterií, kvasinkových buněk nebo extraktu myších tkání [39].

2.8. Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie je analytická metoda využívaná pro identifikaci, charakterizaci a kvantifikaci širokého spektra různých látek. Touto metodou lze analyzovat malé molekuly i velké biomolekuly, jakými jsou například proteiny. Nespornou výhodou této techniky je, že k analýze postačí naprosto minimální množství vzorku. Historicky první možnost využití našla tato metoda při analýze nově objevených prvků již na počátku 20. století. Dále byla využívána pro analýzy v ropném průmyslu. Až poté byl objeven její potenciál pro analýzu biomolekul. Výrazným posunem v rozvoji této techniky bylo objevení možnosti propojení s chromatografickými metodami. Tato kombinace vedla se snížením detekčního limitu a současně ke zvýšení specifity [43,44,45].

2.8.1. Instrumentace

Hmotnostní spektrometr se skládá z iontového zdroje, kde dochází k ionizaci analytu. Ionty jsou poté separovány v hmotnostním analyzátoru. Následně dochází v detektoru k vytvoření signálu, který je zpracováván počítačovým softwarem za vzniku hmotnostního spektra. Nezbytnou součástí přístroje je také vakuová pumpa k vytvoření hlubokého vakua [43]

2.8.1.1. Ionizační techniky

Iontové zdroje slouží k ionizaci sloučenin, které jsou dále analyzovány v analyzátorech. Ačkoliv do hmotnostního analyzátoru vstupuje vzorek vždy v plynném stavu, do iontového zdroje může vstupovat analyt ve všech třech skupenstvích [43].

Ionizace v plynné fázi

Pro plynné vzorky se nejčastěji využívá elektronová ionizace. Tato technika je nejvíce využívána při propojení hmotnostního spektrometru a plynového chromatografu. K ionizaci vzorků dochází pomocí proudu elektronů emitovaných ze žhaveného, nejčastěji wolframového, vlákna. Emitované elektrony se šíří prostorem ke kladně nabitým elektrodám, anodám a při průletu kolem molekul analytu dochází k vyražení valenčních elektronů a tak ke vzniku radikál kationtů. Takto vzniklé ionty jsou pomocí další elektrody vypuzovány do hmotnostního analyzátoru. Při dosažení ionizačního potenciálu molekul analytu dochází k jejich fragmentaci [43,45].

Další technikou využívanou pro fragmentaci plynů je chemická ionizace. V případě chemické ionizace je v iontovém zdroji navíc přítomen reakční plyn, nejčastěji methan. Tento plyn je ve výrazném nadbytku oproti analytu. V první fázi dochází k ionizaci reakčního plynu, který následně interaguje s molekulami analytu a tím dochází k přenosu protonu [43].

2.8.1.2. Hmotnostní analyzáto

Hmotnostní analyzáto jsou srdcem hmotnostního spektrometru. Jejich úkolem je separace iontů na základě poměru jejich hmotnosti a náboje. Ionty se dělí v prostředí hlubokého vakua a to na základě jejich pohybu v elektrickém nebo magnetickém poli [43].

Nejčastěji používanými hmotnostními analyzáto jsou kvadrupól, iontová past a analyzáto doby letu (TOF).

Kvadrupól

Kvadrupól je tvořen čtyřmi tyčemi, na něž je střídavě vkládáno stejnosměrné napětí. Na dvě protilehlé tyče je vždy vkládáno stejné napětí, navíc je na všechny tyče vkládáno vysokofrekvenční střídavé napětí. Toto střídání vede k navození oscilace iontů v prostoru mezi tyčemi. Při daném nastavení napětí projdou prostorem jen ionty o daném poměru hmotnosti a náboje. Z tohoto důvodu bývá kvadrupól někdy nazýván laditelným filtrem. Změnami v nastavení mohou být postupně na detektor propuštěny všechny ionty [43].

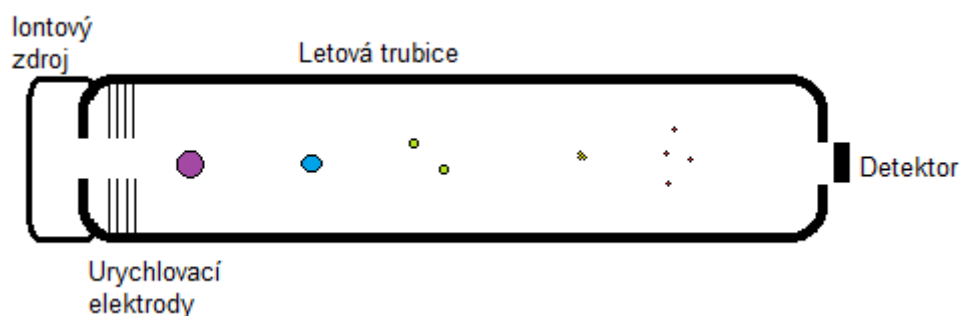
Sférická Iontová past

Iontová past je tvořena třemi elektrodami, na které je vkládáno střídavé napětí. V pasti jsou ukládány ionty, které jsou následně postupně vypuzovány na základě jejich poměru hmotností a náboje. Iontová past nachází využití také při MS/MS analýze [43].

TOF

Analyzáto doby letu vyhodnocuje vlastnosti iontů na základě jejich doby letu v evakuované letové trubici o známé délce. Ionty jsou na vstupu do této trubice urychlovány v elektrickém poli tak, aby měli stejnou kinetickou energii. Vlivem jejich rozdílné velikosti dosahují na základě tohoto urychlení různé rychlosti letu. Lehké ionty se díky tomu pohybují rychleji než ty těžší. Výsledný rozdíl v době letu je zaznamenáván na detektoru, kde se generuje signál, na jehož základě se vytváří hmotnostní spektrum. TOF má téměř neomezený

hmotností rozsah, a proto je ideálním řešením pro analýzu jak malých látek, tak velkých biomolekul nebo polymerů. Díky tomu, že je TOF pulzní technikou, je optimální pro spojení s ionizační technikou MALDI. Ke zvýšení rozlišovací schopnosti je nutné prodloužit dráhu letu. K tomu se využívá iontových zrcadel nebo-li reflektronů. Ionty při použití zrcadel vykonávají dráhu ve tvaru V nebo W [43].



Obrázek 11: Analyzátor doby letu.

Mezi další hmotnostní analyzátoři patří magnetický nebo elektrostatický sektorový analyzátor, Orbitrap, Iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací nebo lineární iontová past [43,45].

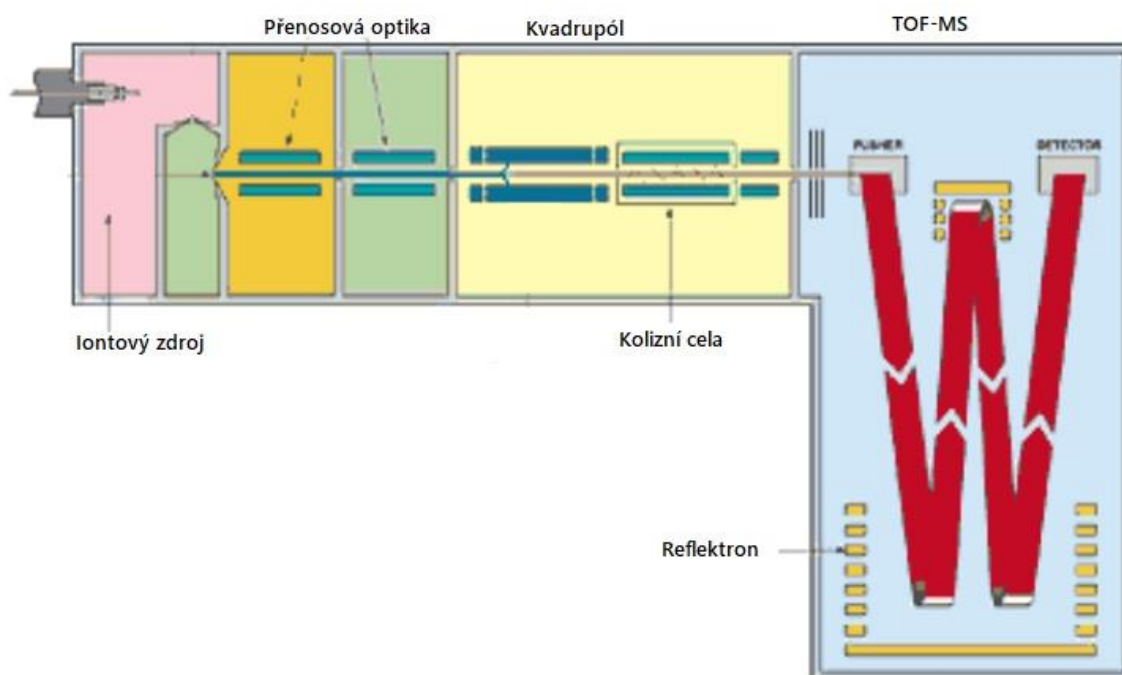
2.8.1.3. *Spojení s chromatografickými technikami*

Spojení chromatografie s hmotnostní spektrometrií umožňuje analýzu směsí látek, což samotná hmotnostní spektrometrie nedovoluje. Analýza komplexnějších směsí vzorků vyžaduje přechod separaci pomocí chromatografie. Toto spojení umožňuje identifikaci píků v případě obsahu neznámých látek ve vzorku. Takové látky mohou být identifikovány pomocí porovnání výsledného spektra s knihovny MS spektrem. Další výhodou je možnost rozlišit látky, které jsou z kolony eluovány současně [43].

2.8.1.4. *Tandemové techniky (MS/MS)*

Termínem tandemová technika bývá označováno spojení více hmotnostních analyzátorů při jedné analýze. Některá literatura označuje tímto termínem i spojení s chromatografickými metodami. V případě spojení více analyzátorů dochází nejprve k fragmentaci a ionizaci, poté k separaci iontů a následně dochází k další fragmentaci a separaci výsledných fragmentů. Toto spojení zvyšuje poměr signálu a šumu [43].

Rozlišujeme tandemové techniky v prostoru a v čase. Příkladem využití tandemových technik v čase je iontová past, kde dochází nejprve k separaci vybraného iontu, následně je přiváděn kolizní plyn a dochází k fragmentaci. Vzniklé fragmenty jsou poté postupně vypuzovány na detektor. Tandemovou technikou pro MS/MS v prostoru je například trojitý kvadrupól. V tomto případě funguje první kvadrupól jako separátor, druhý jako kolizní cela a ve třetím dochází opět k separaci. Dalšími analyzátoři využívanými pro MS/MS v prostoru jsou kombinace sektorových analyzátorů, dvojice průletových analyzátorů nebo hybridní analyzátoři spojující více možností. Mezi hybridními analyzátoři je nejvíce preferován QTOF, tedy spojení kvadrupólu s analyzátořem doby letu [43,46].



Obrázek 12: Schéma hybridního analyzátoru využívaného pro MS/MS- Q TOF [47].

2.8.1.5. *Využití hmotnostní spektrometrie*

Hmotnostní spektrometrie nejčastěji ve spojení s chromatografickými technikami nachází uplatnění ve velkém množství průmyslových odvětví. A to například při analýze průmyslových polymerů, meziproductů petrochemického průmyslu nebo v potravinářském průmyslu. Při analýze potravin se využívá například pro detekci antibiotik v medu nebo v mléce, dále také k identifikaci bakterií v mikrobiologické kontrole potravin. Dále se také využívá pro detekci pesticidů nebo jejich reziduí, detekci drog, toxických chemických látek bojových látek nebo výbušnin [43,48].

2.8.1.6. *Využití hmotnostní spektrometrie při analýze biologických vzorků*

Hmotnostní spektrometrie nachází využití také v proteomice. Analýza proteinů a peptidů umožňuje lepší pochopení fungování buněčného metabolismu. Díky tomu je široce využívána také v klinické diagnostice například ke stanovení diagnózy vrozených metabolických poruch. Využívá se také při analýze sacharidů a oligonukleotidů. V metabolomice se tato technika používá pro stanovování těkavých organických látek uvolňovaných u buněčných kultur a při metabolických analýzách bakterií i rostlin, kde se sleduje například jejich produkce alkaloidů. Nachází využití také při forenzní analýze, analýze biologických tekutin, krve, krevní plazmy, krevního séra nebo moči, ale také v diagnostice například k analýze vydechané vzduchu. Dále také ve farmakologii při stanovování farmakokinetických profilů léčiv [17,19,48].

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1. Přístrojové vybavení a parametry měření

Celé měření proběhlo na dvojdimenzionálním plynovém chromatografu s hmotnostně spektrometrickou detekcí a analyzátozem doby letu Pegasus 4D (GCxGC/MS-TOF) (Obrázek 13). V první fázi experimentální části byla optimalizována technika mikroextrakce tuhou fází jímání vzorků na SPME vlákno a poté metoda plynové chromatografie. V druhé části byla optimalizovanou metodou analyzována sada vzorků monocytů.

- **Přístroj:** hmotnostní spektrometr Pegasus 4D (Leco, USA),
plynový chromatograf Agilent 6890 (Agilent USA)
- **Plynový chromatograf**
 - **Primární kolona** Rtx-5SilMS
délka: 29,8 m
vnitřní průměr: 250 μm
tloušťka filmu: 0,25 μm
 - **Sekundární kolona** BPX-50
délka: 1,1 m
vnitřní průměr: 100 μm
tloušťka filmu: 0,1 μm
 - **Nástřik vzorku** ručně, SPME vlákno
bezděličové dávkování
 - **Nosný plyn** He
průtok: 1 ml \cdot min⁻¹
 - **Doba analýzy** 3080 s
 - **Offset sekundární kolony** +5 °C
 - **Teplotní program** počáteční teplota: 40 °C, po dobu 1 min
nárůst: 5 °C za min do 250 °C
15 °C za min do 300 °C, po dobu 5 min
 - **Modulátor** offset +15 °C
modulační perioda: 4 s
horký pulz: 0,6 s
studený pulz: 1,4 s
- **Hmotnostní spektrometr**
 - **Iontový zdroj** EI, 70eV
teplota: 250 °C
 - **Analyzátor** TOF
sběr dat: 200 spekter za sekundu
rozsah m/z: 29-500
- **Software** ChromaTOF (LECO)



Obrázek 13: Pegasus 4D Leco [49]

3.2. Vzorčky

Analyzované vzorky byly dodány z Mezinárodního centra klinického výzkumu Fakultní nemocnice u svaté Anny. Vzorky monocytů dvou zdravých dárců byly pěstovány na mediu X-VIVO 15 (Lonza). Každý vzorek obsahoval dva až tři miliony buněk. Vzorky byly inkubovány po dobu 12 hodin při teplotě 37 °C. K buňkám byly přidány inhibitory imunitního systému 60 minut před přidáním stimulantů simulujících bakteriální nebo kvasinkovou infekci. Vzorky byly následně odstředěny. Buňky i medium byly zvláště zmrazeny. Buňky byly označeny číslem a jim příslušná media číslem a písmenem S (viz Tabulka 2). Pro jímání na vlákno bylo ze vzorků odebráno 20 µl do skleněné vialky. Tato vialka byla poté zahřívána ve vodní lázni při teplotě 37 °C. Po inkubaci bylo do vialky vloženo SPME vlákno a těkavé látky ze vzorku byly za současného udržování teploty 37 °C jímány po dobu 30 minut. Takto připravená vlákna byla poté analyzována pomocí GCxGC/MS-TOF.

Tabulka 2: Připravené vzorky s inhibitory a stimulatory

<i>DÁRCE 1</i>	Bez inhibitoru	CsA	FK506	TPCA
Nestimulované	1 / S1	2 / S2	3 / S3	4 / S4
LPS	5 / S5	6 / S6	7 / S7	8 / S8
ZYM	9 / S9	10 / S10	11 / S11	12 / S12
<i>DÁRCE 2</i>				
Nestimulované	13 / S13	14 / S14	15 / S15	16 / S16
LPS	17 / S17	18 / S18	19 / S19	20 / S20
ZYM	21 / S21	22 / S22	23 / S23	24 / S24

Tabulka 3: Zkušební sada vzorků

ZKUŠEBNÍ SADA	Nestimulované	LPS	ZYM	CsA/ZYM
–	77 / S77	78 / S78	79 / S79	80 / S80
–	81 / S81	82 / S82	83 / S83	84 / S84

3.2.1. Použité inhibitory

Cyklosporin A (CsA) je cyklický polypeptid. Působí jako inhibitor produkce interleukinu 2 a cytokinů u T-lymfocytů. Inhibuje také aktivaci B-lymfocytů a ovlivňuje funkci dendritických buněk. Využívá se jako imunosupresivum při transplantacích orgánů a kostní dřeně nebo jako léčivo autoimunitních onemocnění [50].

Takrolimus (FK506) patří do skupiny makrolidů. Podobně jako CsA je inhibitorem kalcineurinu a tím blokuje produkci cytokinů a interleukinu 2. Ve srovnání s cyklosporinem je však mnohem účinnější. Využívá se jako léčivo u pacientů po transplantaci orgánů a při léčbě autoimunitních onemocnění [51].

TPCA je inhibitorem NFκB dráhy. NFκB je transkripční faktor regulující transkripci genů odpovědných za apoptózu buněk a imunitní odpověď.

3.2.2. Použité stimulanty

Lipopolysacharid (LPS) je součást stěny gramnegativních bakterií. Váže se na neutrofilů a tím dochází k aktivaci prozánětlivých mechanismů. Aktivují se monocyty a makrofágy a dochází k produkci cytokinů a tím aktivaci T-lymfocytů a NK buněk [52].

Tento stimulant byl použit k simulaci bakteriální infekce.

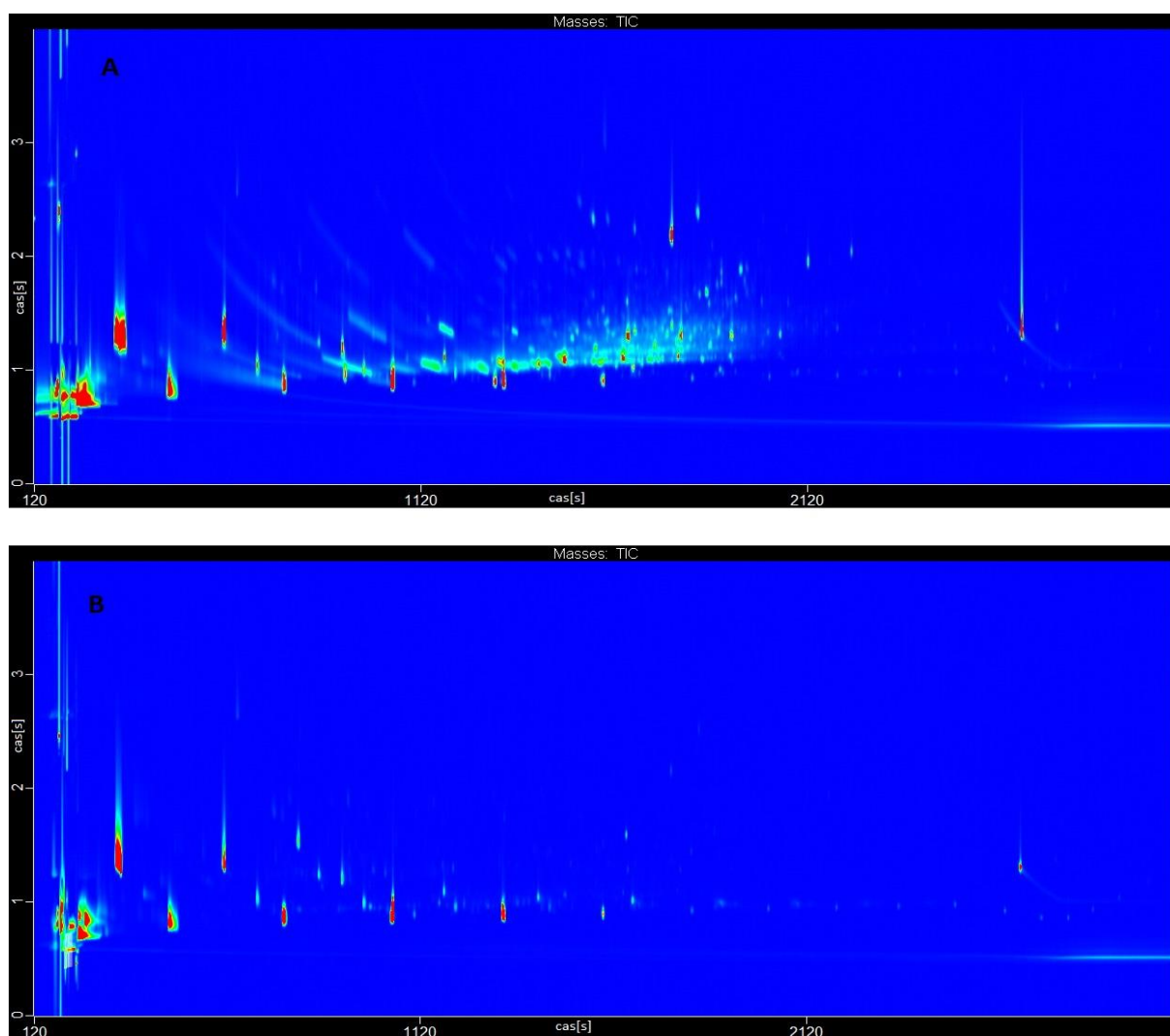
Zymosan (ZYM) byl zvolen jako stimulant simulující kvasinkovou infekci. Jedná se o kvasinkový polysacharid. Ten podobně jako LPS aktivuje buňky imunitního systému a způsobuje tak produkci prozánětlivých molekul. Účinek kvasinkových stimulantů na imunitní systém je slabší, než je tomu u těch bakteriálních.

3.3. Optimalizace SMPE metody

3.3.1. Vliv přídavku NaCl

Prvním optimalizačním krokem bylo sledování vlivu přídavku NaCl do vzorku před jímáním. Vysolování má vliv na účinnost extrakce některých sloučenin. V roztoku dochází ke zvýšení iontové síly a tím ke snížení rozpustnosti některých látek. Tento efekt je nejvýraznější u těkavých a polárních látek.

Do vialky s 20 μl vzorku bylo před zahájením inkubace přidáno 20 μl roztoku NaCl ve vodě o koncentraci $200 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$. Výsledné chromatogramy vzorku S78, najímaném na šedém vlákne, byly porovnány (Obrázek 14). Na základě tohoto porovnání, bylo rozhodnuto, že pro další analýzy bude přidáván roztok NaCl. Po přídavku NaCl docházelo k menšímu rozmývání píků, ke snížení šumu a tím ke snazší interpretaci dat.



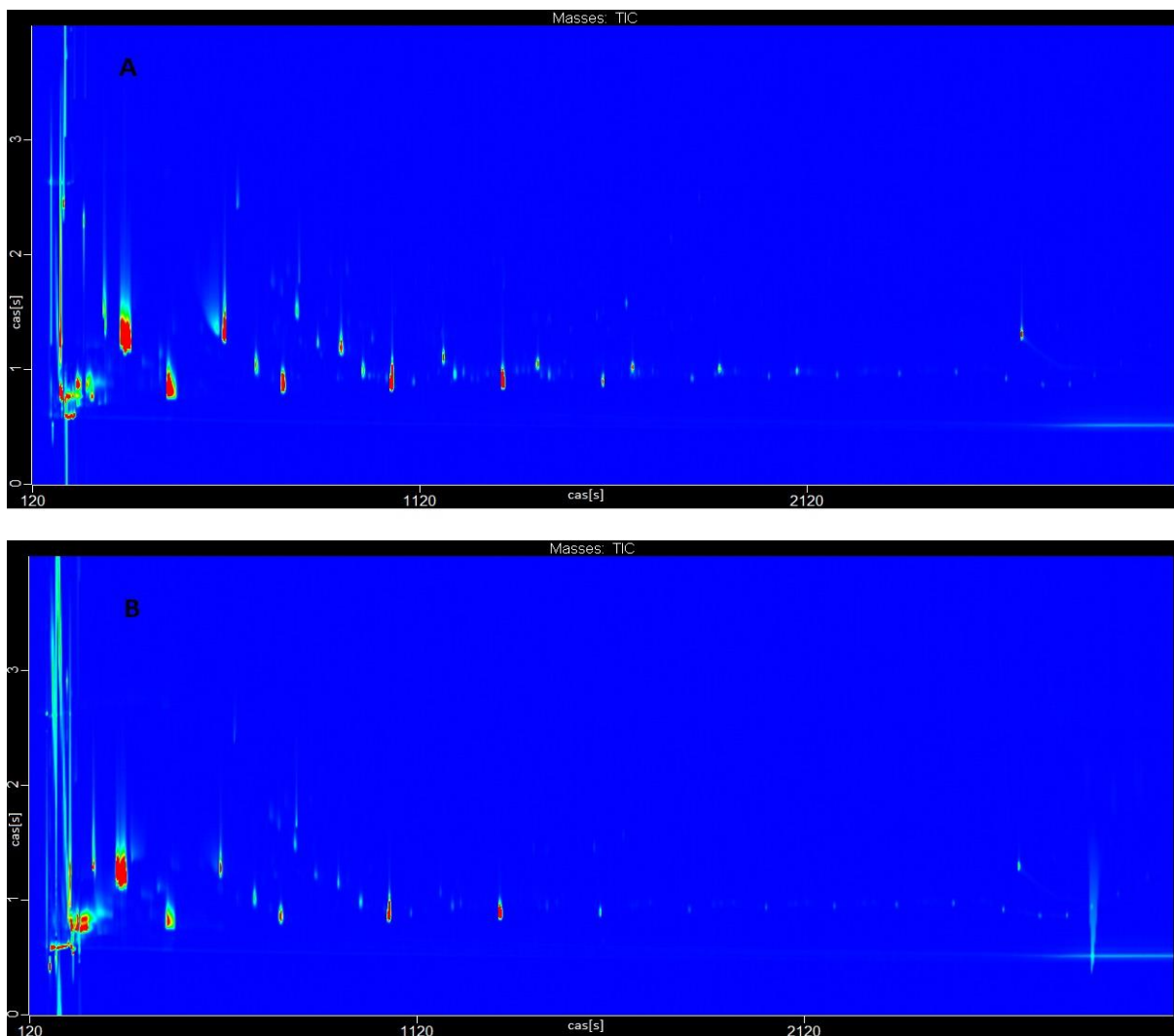
Obrázek 14: Vliv přídavku NaCl. A vzorek S78 bez NaCl, B vzorek S78 s přídavkem NaCl

3.3.2. Výběr SPME vlákna

Dalším zásadním krokem byl výběr nejvhodnějšího SPME vlákna pro extrakci těkavých sloučenin. Z tabulky (Tabulka 1) vyplývá, že pro nízkomolekulární těkavé látky by mělo být nejvhodnější volbou vlákno s povrchem CAR/PDMS (Light blue, black). Toto vlákno bylo porovnáváno zejména s vláknem DVB/CAR/PDMS (Grey), které má nejuniversálnější využití. Pro získání úplných informací byla tato vlákna porovnána i s dalšími dostupnými typy (viz Tabulka 4). Všechna vlákna byla nejprve aktivována podle pokynů výrobce. Na všech vláknech byl změřen vzorek S78 ze zkušební sady. Z grafického porovnání vláken je patrné, že na vlákně Grey je intenzita signálu analytů nejvyšší a kvantitativně bylo na toto vlákno najímáno nejvíce těkavých látek. Z tohoto důvodu bylo pro další měření zvoleno vlákno Grey. Na ostatních vláknech je také najímáno menší množství látek v oblasti našeho zájmu. Výsledné chromatogramy z měření ostatních vláken jsou součástí příloh (8.1).

Tabulka 4: Použitá SMPE vlákna

Označení	Stacionární fáze	Tloušťka (μm)	Jádro	Princip extrakce	Aktivace
Grey	DVB/CAR/PDMS	50/30	Stableflex	adsorpce	30 min 270 °C
Blue	PDMS/DVB	65	Křemenné vlákno	adsorpce	30 min 250 °C
Light blue	CAR/PDMS	85	Stableflex	absorpce	30 min 300 °C
Red	PDMS	100	Křemenné vlákno	absorpce	30 min 300°C
Black	CAR/PDMS	75	Křemenné vlákno	absorpce	30 min 300 °C
White	PA	85	Křemenné vlákno	absorpce	30 min 280 °C



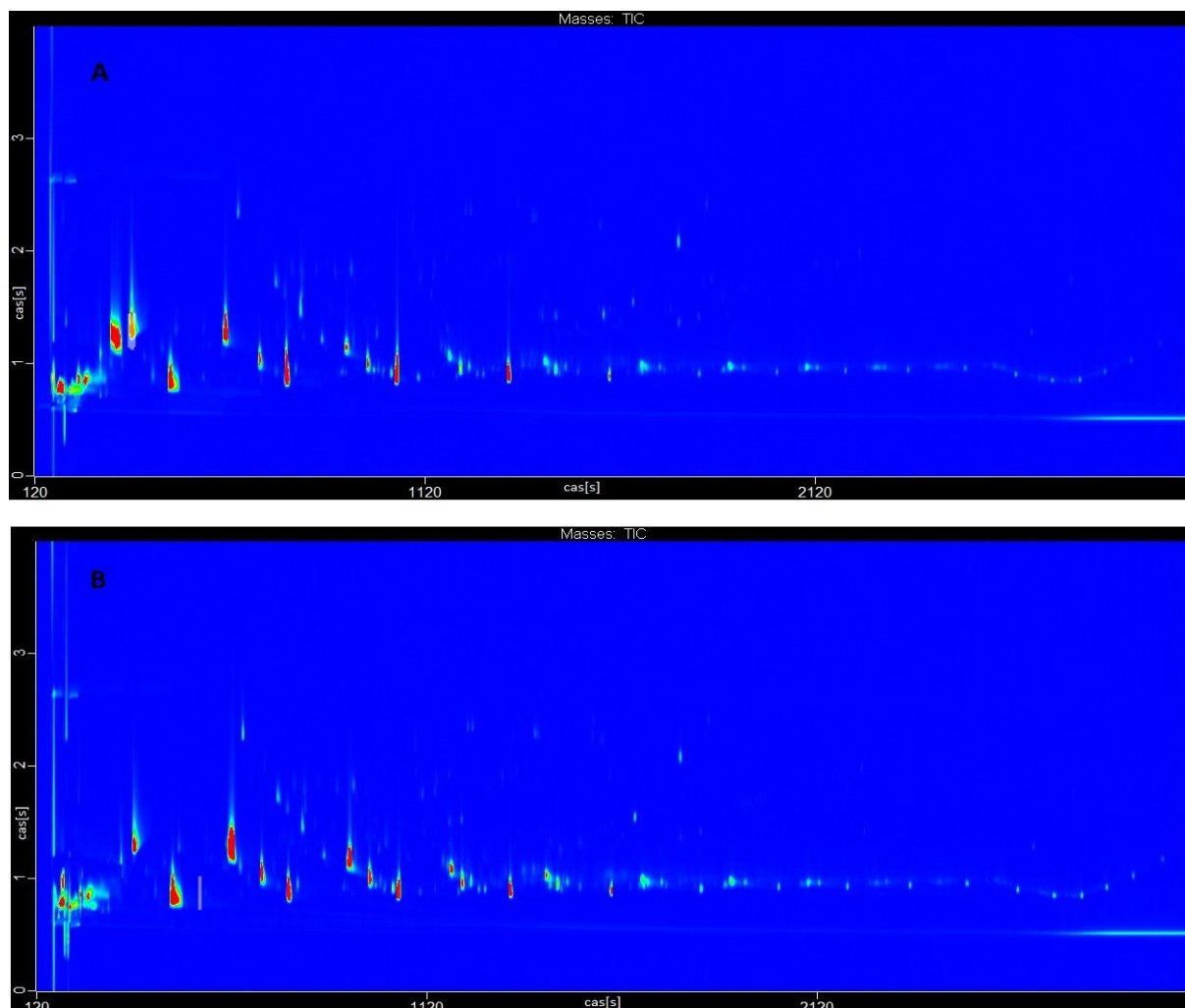
Obrázek 15: Porovnání vláken. A Grey, B Light Blue s najímaným vzorkem S78

3.3.3. Optimalizace doby inkubace a doby jímání těkavých látek

Určení optimální doby inkubace a jímání těkavých látek metodou SPME bylo další částí optimalizace. Byly porovnány vzorky najímané a inkubované v různém časovém rozmezí. Výsledné chromatogramy byly porovnány. Z výsledků vyplývá, že doba jímání má v tomto časovém rozpětí minimální vliv na množství sorbovaných látek. Látky se na vlákno jímají poměrně rychle, a proto se jejich množství ani koncentrace po 15 minutách již nemění. V případě inkubace jsou lepší výsledky dosaženy delší inkubací. Delší zahřívání vzorků vede k uvolnění většího množství těkavých látek. Z toho důvodu byla pro další měření zvolena delší doba inkubace. Doba jímání byla ponechána na 30 minutách hlavně z praktických důvodů a pro lepší organizaci měření.

Tabulka 5: Vyzkoušené kombinace doby jímání a doby inkubace

Vz.	Doba inkubace (min)	Doba jímání (min)
1	30	30
2	30	15
3	15	30
4	15	15



Obrázek 16: Porovnání vlivu doby jímání a doby inkubace A vz. 3, B vz. 2

3.4. Optimalizace GC metody

3.4.1. Změna teploty sekundární kolony

Po zjištění optimální metody přípravy vzorku byla upravována metoda plynové chromatografie. Důležitou roli při GCxGC separaci hraje teplota. Prvním krokem byla změna nastavení offsetu teploty sekundární kolony. Tato hodnota označuje rozdíl teploty mezi primární a sekundární kolonou. Tato hodnota byla nejprve nastavena na +5 °C a poté zvýšena na +15 °C. Toto nastavení má vliv na účinnost separace sekundární kolony. Pro další měření byla tato teplota nastavena na +5 °C. Při tomto nastavení docházelo k lepšímu rozlišení píků.

3.4.2. Změna teploty modulátoru

Dalším optimalizovaným parametrem bylo nastavení offsetu teploty modulátoru. Stejně jako u sekundární kolony je tato teplota nastavována vzhledem k primární koloně. Počáteční hodnota byla nastavena na +15 °C a poté snížena na +5 °C. Snížení této teploty vedlo k nedostatečnému rozlišení některých píků. Proto byla pro všechna další měření zvolena optimální teplota +15 °C.

3.4.3. Změna modulační periody

Teplotní modulátor u přístroje Pegasus 4D tvoří čtyři trysky. Do dvou je přiváděn plynný dusík chlazený kapalným dusíkem a do dvou horký vzduch. Doba působení pulzů má zásadní vliv na rozlišení látek v druhé dimenzi. Změna celkové doby teplotní modulace ovlivňuje účinnost separace sekundární kolony. Pokud je modulační perioda příliš krátká nemají látky ve druhé koloně možnost se dostatečně rozdělit. Modulační perioda byla v rámci optimalizace zkrácena ze 4 s na 3 s. A dále byly také upravovány poměry trvání jednotlivých pulzů v rámci periody. Klíčovou roli hraje doba působení studeného pulzu. Dochází při něm k zafoksování a zakoncentrování látek eluovaných z primární kolony. Čím je tento puls delší, tím větší množství eluátu je zmraženo a poté znovu uvolněno. Jako optimální byla zvolena modulační perioda trvající 4 s s horkým pulzem 0,6 s a studeným pulzem 1,4 s.

Tabulka 6: Změny v modulační periodě a nastavení pulzů

Modulační perioda	4 s		3 s	
	Horký pulz	0,30 s	0,60 s	0,30 s
Studený pulz	1,70 s	1,40 s	1,20 s	0,90 s

3.4.4. Optimalizace teplotního programu

Původní teplotní program byl změněn tak, aby nárůst teploty byl pomalejší. Tím by mělo dojít k lepší separaci těkavých látek.

- **Původní teplotní program** počáteční teplota: 40 °C, po dobu 1 min
nárůst: 5 °C za min do 250 °C
15 °C za min do 300 °C, po dobu 5 min
- **Nový teplotní program** počáteční teplota: 40 °C, po dobu 5 min
nárůst: 2 °C za min do 100 °C
15 °C za min do 280 °C, po dobu 5 min

Tato změna vedla také k prodloužení doby analýzy na 57 minut. Vzhledem k tomu, že ve vzorku byly očekávány zejména malé těkavé molekuly, bylo nastavení pomalejšího nárůstu teploty vhodnou volbou.

3.5. Shrnutí výsledných optimalizovaných parametrů

Příprava vzorku

Do vialky bylo odebráno 20 µl vzorku a k těm bylo přidáno 20 µl vodného roztoku NaCl o koncentraci 200 mg·ml⁻¹. Takto připravený vzorek byl inkubován po dobu 30 minut při teplotě 37 °C. Poté bylo do vialky vloženo SPME vlákno a vzorek byl jímán po dobu 30 minut.

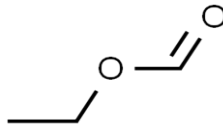
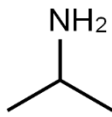
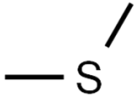
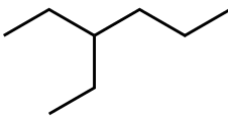
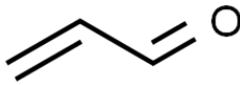
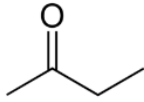
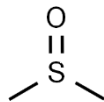
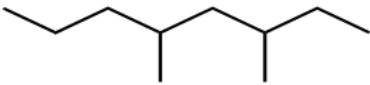
- **SPME Vlákno** Grey, Supelco (Merck-Sigma Aldrich, USA)
DVB/CAR/PDMS
50/30 µm
- **Metoda plynové chromatografie**
 - **Doba analýzy** 3420 s
 - **Offset sekundární kolony** +5 °C
 - **Teplotní program** počáteční teplota: 40 °C, po dobu 1 min
nárůst: 2 °C za min do 100 °C
15 °C za min do 280 °C, po dobu 5 min
 - **Modulátor** offset +15 °C
modulační perioda: 4 s
horký pulz: 0,6 s
studený pulz: 1,4 s

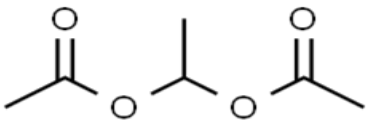
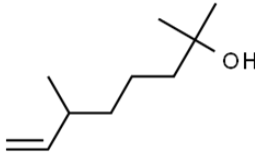
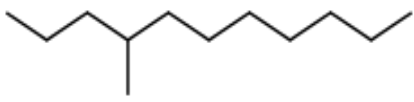
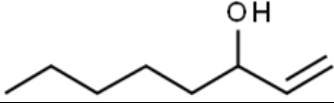
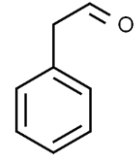
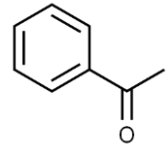
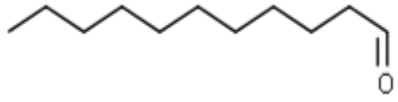
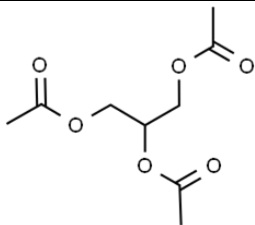
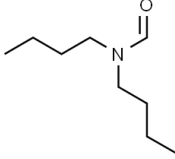

4. VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1. Potencionální metabolity

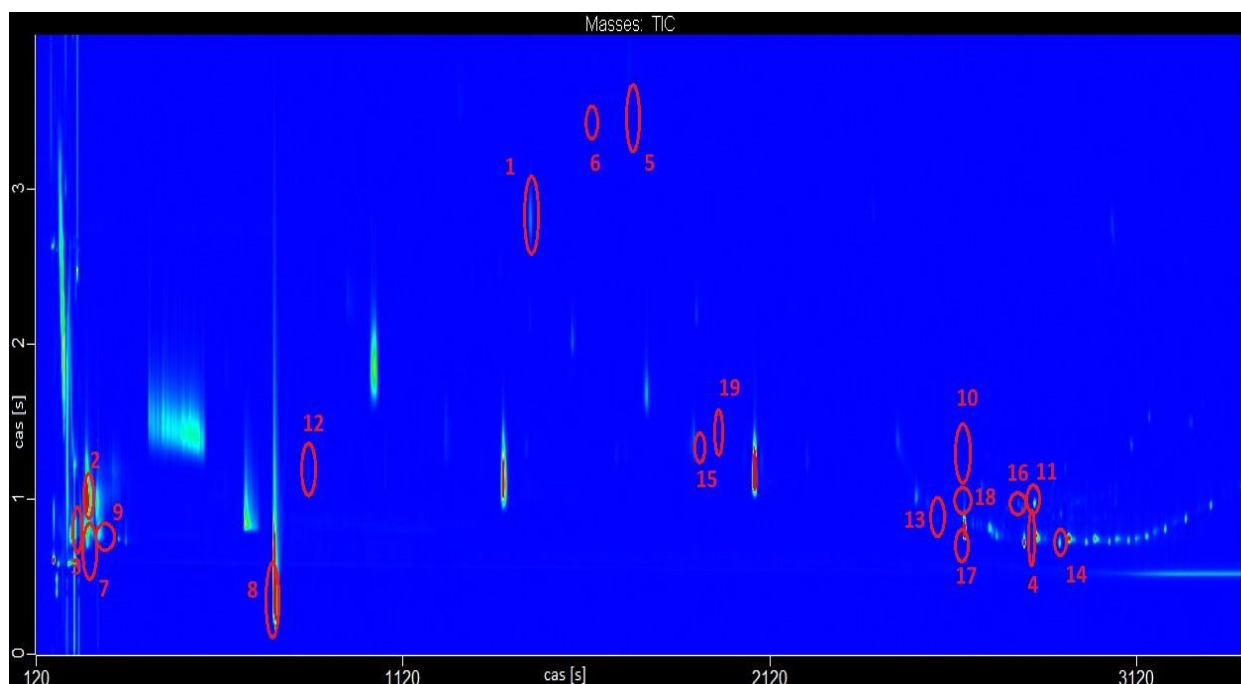
Za optimalizovaných podmínek byly analyzovány sady vzorků od obou dárců. Na základě této analýzy bylo detekováno 25 sloučenin uvolňovaných z monocytů vlivem působení inhibitorů nebo stimulantů. Tyto látky jsou shrnuty v tabulce (Tabulka 7). Od analytů detekovaných v jednotlivých vzorcích byly odečteny těkavé látky identifikované v analýzách čistých SPME vláken a blanků. Poté byla výsledná data porovnána mezi sebou, aby mohly být určeny sloučeniny vyskytující se větším množstvím vzorků. Na základě těchto dat, lze usuzovat na sloučeniny, které by mohly být biomarkery sepse. Vzhledem k tomu, že vzorky byly poskytnuty v množství pouze několika mikrolitrů nebylo možné analýzy opakovat a výsledky tak nejsou zcela vypovídající. Výsledné chromatogramy všech vzorků včetně zkušební sady jsou součástí příloh (8.2).

Tabulka 7: Přehled identifikovaných sloučenin

	Název	Retenční čas Primární kolona, sekundární kolona [s]	Strukturní vzorec
1	Ethyl formiát	174 , 0.620	
2	2-Propanamin	176 , 0.620	
3	Dimethyl sulfid	216 , 0.770	
4	3-Ethylhexan	856, 1.175	
5	Prop-2-enal	216 , 0.865	
6	Butan-2-on	256 , 0.995	
7	Dimethyl sulfoxid	768 , 0.655	
8	3,5-Dimethyloktan	1905 , 1.125	

	Název	Retenční čas Primární kolona, sekundární kolona [s]	Strukturní vzorec
9	1,1 -Ethandiol diacetát	1468 , 2.805	
10	2,6-Dimethylokt-7-en-2-ol	1779 , 1.515	
11	4-Methylundekan	1960 , 1.350	
12	Okt-1-en-3-ol	1360 , 1.990	
13	Fenylacetaldehyd	1640 , 3.715	
14	Acetofenon	1736 , 3.730	
15	Undekanal	2652 , 1.095	
16	Triacetin	2692 , 1.240	
17	N,N-Dibutylformamid	2640 , 1.400	
18	3-Dodecen	2631 , 0.865	

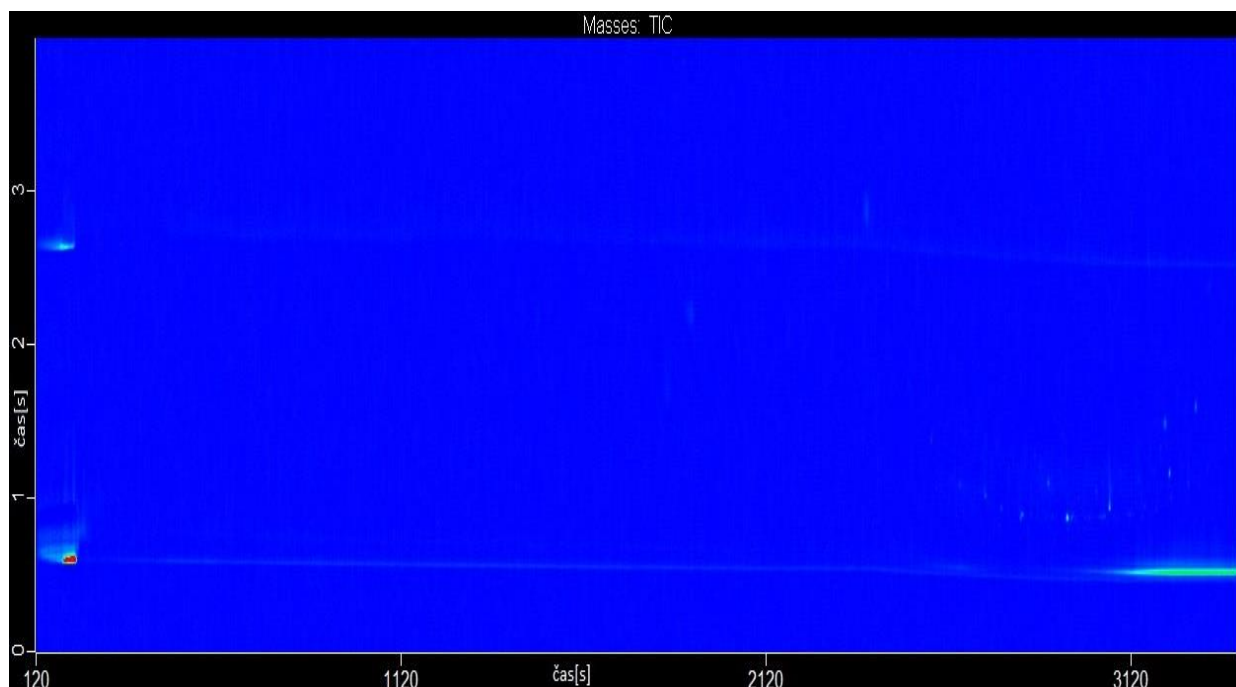
	Název	Retenční čas Primární kolona, sekundární kolona [s]	Strukturní vzorec
19	Nonadekan	2636 , 0.860	
20	Tridekan	2640 , 0.910	
21	Dodekanal	2764 , 0.945	
22	1-Oktoxyoktan	2931 , 0.785	
23	Diisobutyl glutarát	2880 , 0.935	
24	dl-Alanyl-l-alanin	3304 , 2.525	
25	Hexadekanová kyselina	3060 , 0.956	



Obrázek 17: Chromatogram vzorku S7 s vyznačením identifikovaných látek. **1** 1,1-Ethandiol diacetát, **2** Butan-2-on, **3** Prop-2-enal, **4** 3-Dodecen, **5** Acetofenon, **6** Fenylacetaldehyd, **7** Dimethyl sulfide, **8** Dimethyl sulfoxide, **9** Ethyl formiát, **10** N,N-dibutylformamid, **11** Diisobutyl glutarát, **12** 3-Ethylhexan, **13** Nonadekan, **14** 1-Oktoxyoktan, **15** 3,5-Dimethyloktan, **16** Dodekanal, **17** Tridekan, **18** Undekanal, **19** 4-Methylundekan

4.2. Vliv přístroje

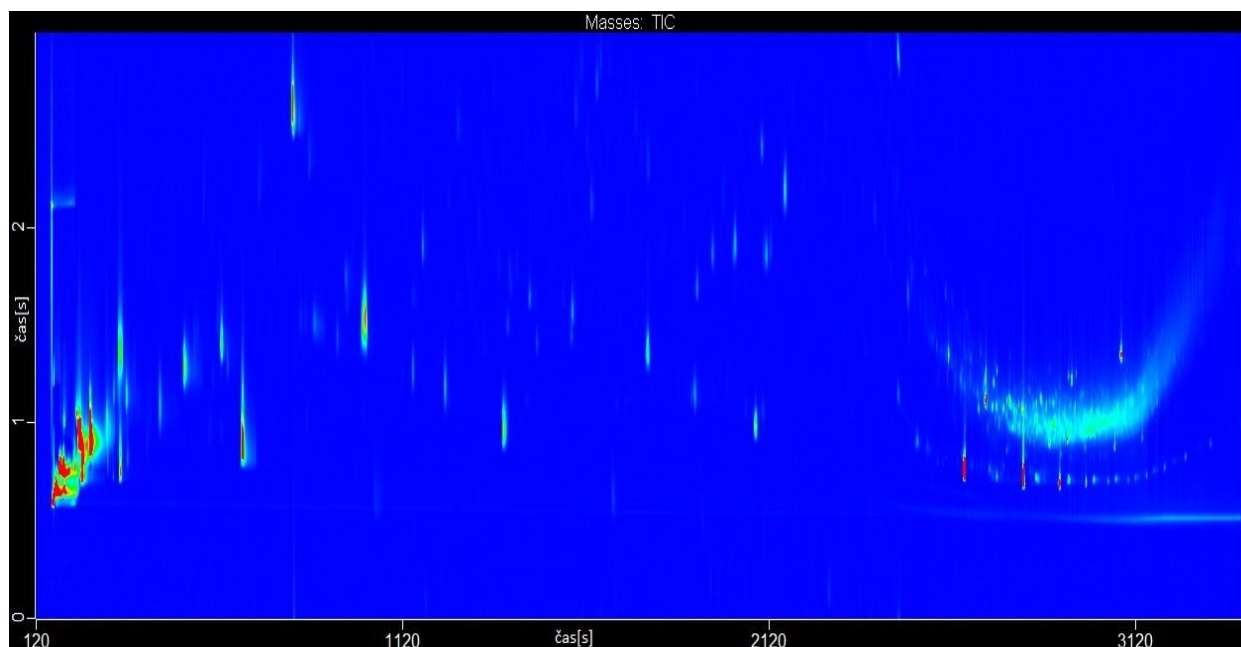
Na přístroji, byly v průběhu času, po který bylo měření prováděno, měřeny i další typy látek. I tato skutečnost má vliv na vzhled výsledných chromatogramů. Na obrázku (Obrázek 18) můžeme vidět chromatogram blanku (tedy samotného přístroje bez vložení vlákna) poté, co přechází dny probíhala jiná měření. Z obrázku je patrné, že i samotný přístroj vykazuje nějakou odezvu. V jednom blanku může být identifikováno i přes 1000 látek. Velkou část těchto píků tvoří siloxany uvolňované z kolony nebo kontaminace z prostředí laboratoře. Další část je tvořena zbytkovými látky z předchozích měření.



Obrázek 18: Blank přístroje (bez vlákna).

4.3. Vliv SPME vlákna

SPME vlákna jsou velice citlivá na okolní látky. I při minimálním kontaktu se vzduchem dochází k sorpci, a tím ke znečištění SPME vlákna. Z tohoto důvodu, bylo na začátku každého měřicího dne, změřeno samotné SPME vlákno a vzorky byly poté porovnávány v rámci jednotlivých dní. Na obrázku (Obrázek 19) můžeme vidět chromatogram samotného nového vlákna bezprostředně po jeho aktivaci. Na tomto chromatogramu identifikoval přístroj přes 4000 sloučenin. Stejně jako v případě blanku je velká část tvořena siloxany pocházejícími z kolony a z použitého vlákna.



Obrázek 19: Vlákno Grey bez sorpce vzorku

4.4. Porovnání jednotlivých dárců

I přesto, že byly očekávány stejné reakce imunitního systému u obou dárců, výsledky se zásadně rozcházejí. Tato skutečnost mohla být způsobena například rozdílným věkem nebo zdravotním stavem konkrétní osoby. Vzhledem k tomu, že tyto informace o dárcích nám nejsou známy, nemůžeme příčinu odlišností určit. Z tabulky (Tabulka 8) zobrazující plochu píků triacetinu v měřených vzorcích obou dárců je patrné, že monocyty dárce 1 produkují velké množství této látky, zatímco v případě druhého dárce se vyskytuje jen v několika málo vzorcích. Tato skutečnost byla pozorována u většího množství látek. Z celkového pohledu byla produkce látek buňkami monocytů u prvního dárce vyšší než u druhého.

Tabulka 8: Triacetin

DÁRCE 1	Bez inhibitoru		CsA		FK506		TPCA	
	Plocha píku							
	Buňky	Médium	Buňky	Médium	Buňky	Médium	Buňky	Médium
Nestimulované	1	S1	325 206	–	32 381	–	119 101	60 860
LPS	89 194	17 722	6	162 294	–	–	39 169	35 126
ZYM	–	–	79 470	23 450	99 673	352 077	407 000	245 929
DÁRCE 2								
Nestimulované	13	–	–	26 903	9 540	58 413	–	–
LPS	–	–	–	–	19	–	–	–
ZYM	–	–	–	–	–	–	–	–



Vzorky, které nebyly dodány, nebo se jen nepodařilo změřit.

– Vzorky ve kterých nebyla daná sloučenina nalezena

4.5. Další pozorování

Dále byly také patrné rozdíly mezi vzorky monocytů a jím příslušných supernatantů. Některé látky byly nalezeny pouze ve vzorcích supernatantů a jiné naopak pouze u odstředěných monocytů. Toto mohlo být způsobeno například tím, že některé látky jsou od počátku produkovány extracelulárně a tím jejich koncentrace v médiu stoupá. Tato skutečnost je patrná například u fenylacetaldehydu, který byl identifikován téměř výhradně ve vzorcích supernatantů. Opačným případem je okt-1-en-3-ol, který se nachází pouze ve vzorcích monocytů.

Tabulka 9: Fenylacetaldehyd

DÁRCE 1	Bez inhibitoru		CsA		FK506		TPCA	
	Plocha píku							
	Buňky	Médium	Buňky	Médium	Buňky	Médium	Buňky	Médium
Nestimulované	1	S1	–	137 022	–	100 993	–	66 967
LPS	–	12 098	6	–	–	31 142	–	90 462
ZYM	–	–	–	–	–	21 731	–	–
DÁRCE 2								
Nestimulované	13	43 261	–	19 604	–	–	1 144 209	378 453
LPS	55 543	–	137 400	12 963	19	–	–	–
ZYM	–	81 622	–	31 705	–	–	–	29 346



Vzorky, které nebyly dodány, nebo se jen nepodařilo změřit.

– Vzorky ve kterých nebyla daná sloučenina nalezena

U některých látek byla pozorována přítomnost pouze při použití některých inhibitorů. Příkladem takové sloučeniny je **prop-2-enal**, jehož největší množství bylo nalezeno u vzorků podrobených působení TPCA. Dalším příkladem je **nonadekan**, ten je identifikován nejčastěji v přítomnosti FK506 a to i v nepřítomnosti stimulatoru

Kyselina hexadekanová je produkována pouze u monocytů, které byly vystaveny působení nějakého stimulatoru. Větší množství je pozorováno u vzorků se zymosanem. Naopak **dimethyl sulfid** a **dimethyl sulfoxid** jsou produkovány pouze u inhibovaných vzorků.

4-methylundekan patří ke sloučeninám, které se vyskytují ve větší míře u prvního dárce. A to v přítomnosti FK506 a TPCA, zatímco při použití CsA se téměř neobjevuje. Stejně je tomu také u **dodekanalu**, který se naopak vyskytuje ve vyšších koncentracích v přítomnosti CsA a u prvního dárce i TPCA. **2,6-dimethylokt-7-en-2-ol** je stejně jako dodekanal více u prvního dárce a v přítomnosti CsA i u druhého dárce.

Stejně jako fenylacetaldehyd je **acetofenon** přítomný spíše ve vzorcích supernatantů.

Tato srovnání byla provedena u všech potenciálních metabolitů a jeho výsledky jsou shrnuty v tabulkách, které jsou součástí příloh. (8.3)

5. ZÁVĚR

Cílem této práce bylo sestavit a optimalizovat analytickou metodu, která bude použita pro stanovení a charakterizaci potencionálních metabolických biomarkerů sepse. GC-MS analýza těkavých látek uvolňovaných z monocytů by měla vést k rychlému stanovení diagnózy u pacientů se sepsí. V lepším případě by výsledná koncentrace metabolitů mohla pomoci určit, v jaké fázi průběhu sepse se daný pacient nachází. Tento poznatek by pomohl lékařům při správném určení terapeutických postupů, a tím snad i ke snížení mortality v případech sepse.

Tato diplomová práce je součástí projektu Ministerstva Zdravotnictví České Republiky, který má za cíl charakterizaci a osvětlení role signalizace monocytárních buněk, jejich metabolických změn a transkripčních faktorů u pacientů se závažnou sepsí. Práce je pilotní studií tohoto projektu, proto jsou její výsledky pouze prvním krokem k vytvoření schopné a správně fungující metody pro diagnostiku.

Necílený screening patří v analytické praxi k nejtěžším úkolům. Cílem je identifikovat všechny sloučeniny nacházející se ve vzorku a ty poté porovnat z hlediska relevance a důležitosti. Tato část práce byla náročná a to zejména časově. I přesto jsou výsledky pouze předběžné a bude třeba ještě velkého množství dalších analýz k potvrzení nebo vyvrácení toho, zda látky uvedené v této práci jsou pro tento účel využitelné.

Jako velká překážka při přesnějším stanovení látek byla shledána malá množství dodaných vzorků, díky čemuž nemohly být analýzy opakovány. Vzhledem k tomu, že se jedná o biologické vzorky, je jejich chování prakticky nepředvídatelné. Vzorky jsou citlivé na jakékoli změny prostředí včetně minimálních změn v teplotě.

Výsledkem práce je sestavení tabulky potencionálních metabolitů. S největší nadějí je pohlíženo například na dodekanal, 3-dodecen, dimethyl sulfid, dimethyl sulfoxid, fenylacetaldehyd, 4-methylundekan nebo 3,5-dimethyloktan. Určení těchto metabolitů je důležitým krokem v pochopení metabolismu monocytů a jeho reakcí na probíhající zánětlivou reakci organismu. Metabolomika je v dnešní době široce využívána pro stanovení biomarkerů různých typů rakoviny. Proto věřím, že najde své uplatnění i v tomto případě.

6. ZDROJE

1. NAVRÁTIL, Leoš. Vnitřní lékařství: pro nelékařské zdravotnické obory. Praha: Grada, 2008. ISBN 978-80-247-2319-8.
2. JÍLEK, Petr. Imunologie: stručně, jasně, přehledně. Praha: Grada, 2014. ISBN 978-80-247-4822-1.
3. BERNÁŠKOVÁ, Klára. Fyziologie a patofyziologie imunity. ROKYTA, Richard a kolektiv. Fyziologie a patologická fyziologie: pro klinickou praxi [online]. Praha: Grada Publishing, 2015, s. 45-70 [cit. 2019-04-1]. ISBN 978-80-247-9902-5.
4. VAJNER, Luděk, Jiří UHLÍK a Václava KONRÁDOVÁ. Lékařská histologie I. Cytologie a obecná histologie. Druhé vydání. Univerzita Karlova: Karolinum, 2018. ISBN 978-80-246-4106-5
5. PENKA, Miroslav, Eva TESAŘOVÁ a kolektiv. Hematologie a transfúzní lékařství I.: Hematologie. Praha: Grada Publishing, 2011. ISBN 978-80-247-7192-2.
6. LUKÁŠ, Karel, Aleš ŽÁK a kolektiv. Chorobné znaky a příznaky: Diferenciální diagnostika. Praha: Grada Publishing, 2014. ISBN 978-80-247-9012-1.
7. RAYMAAKERS, Karen. How Monocytes Function in the Body. In: Verywell Health [online]. New York: Dotdash, c2019, March 20, 2019 [cit. 2019-04-09]. Dostupné z: <https://www.verywellhealth.com/what-are-monocytes-2252110#monocytes-in-lymphoma-and-other-cancers>
8. KITTNAR, Otomar. Lékařská fyziologie. Praha: Grada, 2011. ISBN 978-80-247-3068-4.
9. ZADÁK, Zdeněk. Výživa v intenzivní péči. 2., rozš. a aktualiz. vyd. Praha: Grada, 2008. ISBN 978-80-247-2844-5.
10. ZADÁK, Zdeněk a Eduard HAVEL. Intenzivní medicína na principech vnitřního lékařství. 2., doplněné a přepracované vydání. Praha: Grada Publishing, 2017. ISBN 978-80-271-0282-2.
11. GUAMÁN, Ana V., Alba CARRERAS, Daniel CALVO, Idoya AGUDO, Daniel NAVAJAS, Antonio PARDO, Santiago MARCO a Ramon FARRÉ. Rapid detection of sepsis in rats through volatile organic compounds in breath. Journal of Chromatography B [online]. 2012, 881-882, 76-82 [cit. 2019-04-03]. DOI: 10.1016/j.jchromb.2011.12.001. ISSN 15700232. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1570023211007884>
12. STREITOVÁ, Dana a Renáta ZOUBKOVÁ. Septické stavy v intenzivní péči: ošetrovatelská péče. Praha: Grada Publishing, 2015. Sestra (Grada). ISBN 978-80-247-5215-0.
13. AL-KHAJAFI, Ali H. Multiple Organ Dysfunction Syndrome in Sepsis. In: Medscape [online]. Atlanta: Web MD, c1994-2019, Feb 05, 2019 [cit. 2019-04-1]. Dostupné z: <https://emedicine.medscape.com/article/169640-overview#a3>

14. HOTCHKISS, Richard S., Guillaume MONNERET a Didier PAYEN. Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. *Nature Reviews Immunology* [online]. 2013, 13(12), 862-874 [cit. 2019-04-11]. DOI: 10.1038/nri3552. ISSN 1474-1733. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/nri3552>
15. OLDIGES, Marco, Stephan LÜTZ, Simon PFLUG, Kirsten SCHROER, Nadine STEIN a Christiane WIENDAHL. Metabolomics: current state and evolving methodologies and tools. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2007, 76(3), 495-511 [cit. 2019-04-02]. DOI: 10.1007/s00253-007-1029-2. ISSN 0175-7598. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-007-1029-2>
16. WANG, Bing, Aiqin FANG, John HEIM, Bogdan BOGDANOV, Scott PUGH, Mark LIBARDONI a Xiang ZHANG. DISCO: Distance and Spectrum Correlation Optimization Alignment for Two-Dimensional Gas Chromatography Time-of-Flight Mass Spectrometry-Based Metabolomics. *Analytical Chemistry* [online]. 2010, 82(12), 5069-5081 [cit. 2019-04-02]. DOI: 10.1021/ac100064b. ISSN 0003-2700. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ac100064b>
17. SILVA, Catarina L., Rosa PERESTRELO, Pedro SILVA, Helena TOMÁS a José S. CÂMARA. Volatile metabolomic signature of human breast cancer cell lines. *Scientific Reports* [online]. 2017, 7(1) [cit. 2019-04-08]. DOI: 10.1038/srep43969. ISSN 2045-2322. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/srep43969>
18. KAUPPI, Anna M., Alicia EDIN, Ingrid ZIEGLER, et al. Metabolites in Blood for Prediction of Bacteremic Sepsis in the Emergency Room. *PLOS ONE* [online]. 2016, 11(1) [cit. 2019-04-11]. DOI: 10.1371/journal.pone.0147670. ISSN 1932-6203. Dostupné z: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0147670>
19. XU, Ping-bo, Zhong-ying LIN, Hai-bing MENG, et al. A metabonomic approach to early prognostic evaluation of experimental sepsis. *Journal of Infection* [online]. 2008, 56(6), 474-481 [cit. 2019-04-11]. DOI: 10.1016/j.jinf.2008.03.011. ISSN 01634453. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0163445308001321>
20. DEWULF, Jo, Herman VAN LANGENHOVE a Gyula WITTMANN. Analysis of volatile organic compounds using gas chromatography. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* [online]. 2002, 21(9-10), 637-646 [cit. 2019-04-02]. DOI: 10.1016/S0165-9936(02)00804-X. ISSN 01659936. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S016599360200804X>
21. LOUGH, Fraser, John D. PERRY, Stephen P. STANFORTH a John R. DEAN. Detection of exogenous VOCs as a novel in vitro diagnostic technique for the detection of pathogenic bacteria. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* [online]. 2017, 87, 71-81 [cit. 2019-04-03]. DOI: 10.1016/j.trac.2016.12.004. ISSN 01659936. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165993616303302>

22. BOS, Lieuwe D. J., Peter J. STERK, Marcus J. SCHULTZ a Chetan E. CHITNIS. Volatile Metabolites of Pathogens: A Systematic Review. PLoS Pathogens [online]. 2013, 9(5) [cit. 2019-04-03]. DOI: 10.1371/journal.ppat.1003311. ISSN 1553-7374. Dostupné z: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.1003311>
23. PERSAUD, K. C., A. M. PISANELLI, A. BAILEY, et al. Identification of wound infection by limited set of volatile products. In: 2008 IEEE Sensors [online]. IEEE, 2008, 2008, s. 1375-1377 [cit. 2019-04-08]. DOI: 10.1109/ICSENS.2008.4716702. ISBN 978-1-4244-2580-8. Dostupné z: <http://ieeexplore.ieee.org/document/4716702/>
24. FINK, Tobias, Alexander WOLF, Felix MAURER, et al. Volatile Organic Compounds during Inflammation and Sepsis in Rats. Anesthesiology [online]. 2015, 122(1), 117-126 [cit. 2019-04-03]. DOI: 10.1097/ALN.0000000000000420. ISSN 0003-3022. Dostupné z: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00000542-201501000-00025>
25. QIAN, Michael C., Devin G. PETERSON a Gary A. REINECCIUS. Gas Chromatography. NIELSEN, S. Suzanne, ed. Food Analysis [online]. Cham: Springer International Publishing, 2017, 2017-06-07, s. 227-253 [cit. 2019-04-04]. Food Science Text Series. DOI: 10.1007/978-3-319-45776-5_14. ISBN 978-3-319-45774-1. Dostupné z: http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-45776-5_14
26. HOOK, Gary L., Gregory L. KIMM, Tara HALL a Philip A. SMITH. Solid-phase microextraction (SPME) for rapid field sampling and analysis by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). TrAC Trends in Analytical Chemistry [online]. 2002, 21(8), 534-543 [cit. 2019-04-02]. DOI: 10.1016/S0165-9936(02)00708-2. ISSN 01659936. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165993602007082>
27. HORÁK, Tomáš, Jiří ČULÍK, Marie JURKOVÁ, Pavel ČEJKA, Vladimír KELLNER, Josef DVOŘÁK a Danuša HAŠKOVÁ. Possibilities of Utilization of Modern Sample Preparation Methods for Gas Chromatographic Analysis of Beverages and Especially beer. Kvasny Prumysl [online]. 2010, 56(9), 358-366 [cit. 2019-04-02]. DOI: 10.18832/kp2010038. ISSN 00235830. Dostupné z: <http://kvasnyprumysl.cz/doi/10.18832/kp2010038.html>
28. PINO, Veronica, Jared L ANDERSON, Alain BERTHOD a Apryll M STALCUP, ed. Analytical Separation Science [online]. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., 2015 [cit. 2019-04-07]. ISBN 9783527678129.
29. AUGUSTO, Fabio a Antonio LUIZ PIRES VALENTE. Applications of solid-phase microextraction to chemical analysis of live biological samples. TrAC Trends in Analytical Chemistry [online]. 2002, 21(6-7), 428-438 [cit. 2019-04-02]. DOI: 10.1016/S0165-9936(02)00602-7. ISSN 01659936. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165993602006027>

30. ISMAIL, Baraem P. Basic Principles of Chromatography. NIELSEN, S. Suzanne, ed. Food Analysis [online]. Cham: Springer International Publishing, 2017, 2017-06-07, s. 185-211 [cit. 2019-04-04]. Food Science Text Series. DOI: 10.1007/978-3-319-45776-5_12. ISBN 978-3-319-45774-1. Dostupné z: http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-45776-5_12
31. SOMMER, L., et al. Základy analytické chemie II. Brno: VUTIUM, 2000. 347 s. ISBN 80-214-1742-0.
32. ČÁSLAVSKÝ, Josef. Chromatografie I. [Přednáška]. Brno: Instrumentální a strukturní analýza FCH VUT, 10. 11. 2017.
33. PĚKNICOVÁ, Markéta a Dagmar KRUCINOVÁ. Analýza organických látek: sborník přednášek z kurzu. Český Těšín: 2 THETA, 1999. ISBN 80-902432-9-0.
34. HORÁK, Tomáš, Jiří ČULÍK, Marie JURKOVÁ, Pavel ČEJKA, Vladimír KELLNER, Josef DVORÁK a Danuša HAŠKOVÁ. Faster gas chromatography and its utilization in brewing. Part 1. - Theoretical and practical aspects. Kvasny Prumysl [online]. 2009, 55(9), 250-254 [cit. 2019-04-03]. DOI: 10.18832/kp2009020. ISSN 00235830. Dostupné z: <http://kvasnyprumysl.cz/doi/10.18832/kp2009020.html>
35. CONNOR, Ed a Carlos FIDELIS. The Effect of Draw-out Lens Diameter on Sensitivity of GC–MS Analysis. In: Peak Scientific [online]. United Kingdom, c2019, July 2017 [cit. 2019-04-10]. Dostupné z: <https://www.peakscientific.com/articles/the-effect-of-draw-out-lens-diameter-on-sensitivity-of-gc/>
36. URBAN, Jiří. Gas chromatography. Chromatographer: Resolution matters [online]. Pardubice: One press, c2019, Aug 9,2009 [cit. 2019-04-07]. Dostupné z: <http://www.chromatographer.com/gas-chromatography/>
37. ČÁSLAVSKÝ, Josef. Plynová chromatografie. [Přednáška]. Brno: Instrumentální a strukturní analýza FCH VUT, 10. 11. 2017.
38. GROB, Robert Lee a Eugene F. BARRY. Modern practice of gas chromatography. 4th ed. Hoboken, N.J.: Wiley-Interscience, c2004. ISBN 9780471229834
39. ADAHCHOUR, M., J. BEENS a U.A.Th. BRINKMAN. Recent developments in the application of comprehensive two-dimensional gas chromatography. Journal of Chromatography A [online]. 2008, 1186(1-2), 67-108 [cit. 2019-04-02]. DOI: 10.1016/j.chroma.2008.01.002. ISSN 00219673. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967308000216>
40. ČÁSLAVSKÝ, Josef. Tandemové techniky. [Přednáška]. Brno: Instrumentální a strukturní analýza FCH VUT, 2017.
41. HARYNUK, James a Tadeusz GÓRECKI. New liquid nitrogen cryogenic modulator for comprehensive two-dimensional gas chromatography. Journal of Chromatography A [online]. 2003, 1019(1-2), 53-63 [cit. 2019-04-10]. DOI: 10.1016/j.chroma.2003.08.097. ISSN 00219673. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967303016479>

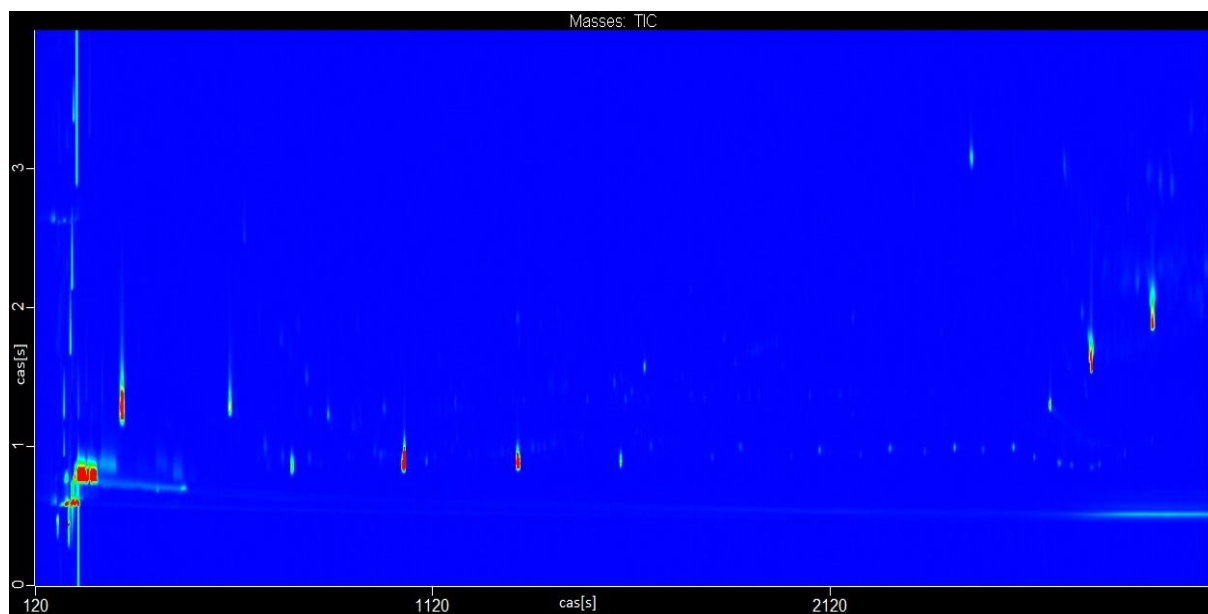
42. BAHAGHIGHAT, H. Daniel, Chris E. FREYE a Robert E. SYNOVEC. Recent advances in modulator technology for comprehensive two dimensional gas chromatography. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* [online]. 2019, 113, 379-391 [cit. 2019-04-12]. DOI: 10.1016/j.trac.2018.04.016. ISSN 01659936. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S016599361830120>
43. SMITH, J. Scott a Rohan A. THAKUR. Mass Spectrometry. NIELSEN, S. Suzanne, ed. *Food Analysis* [online]. Cham: Springer International Publishing, 2017, 2017-06-07, s. 165-181 [cit. 2019-04-04]. Food Science Text Series. DOI: 10.1007/978-3-319-45776-5_11. ISBN 978-3-319-45774-1. Dostupné z: http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-45776-5_11
44. GRIFFITHS, Jennifer. A Brief History of Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* [online]. 2008, 80(15), 5678-5683 [cit. 2019-04-09]. DOI: 10.1021/ac8013065. ISSN 0003-2700. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ac8013065>
45. ČÁSLAVSKÝ, Josef. Hmotnostní spektrometrie I.: Princip, vývoj, instrumentace. [Přednáška]. Brno: Instrumentální a strukturní analýza FCH VUT, 13. 10. 2017.
46. ČÁSLAVSKÝ, Josef. Hmotnostní spektrometrie II.: Vakuum, přímá analýza, tandemová MS, interpretace MS spekter. [Přednáška]. Brno: Instrumentální a strukturní analýza FCH VUT, 20. 10. 2017.
47. PERKEL, Jeffrey. Mass Spectrometry Applications for Proteomics. *The Scientist* [online]. Ontario: LABX MEDIA GROUP, c1986-2019, Aug 20,2001 [cit. 2019-04-07]. Dostupné z: <https://www.the-scientist.com/technology-profile/mass-spectrometry-applications-for-proteomics-54359>
48. TAKÁTS, Zoltán, Justin M. WISEMAN a R. Graham COOKS. Ambient mass spectrometry using desorption electrospray ionization (DESI): instrumentation, mechanisms and applications in forensics, chemistry, and biology. *Journal of Mass Spectrometry* [online]. 2005, 40(10), 1261-1275 [cit. 2019-05-05]. DOI: 10.1002/jms.922. ISSN 1076-5174. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jms.922>
49. Pegasus 4D-C: Komprehenzivní dvoudimenzionální plynový chromatograf s hmotnostním detektorem (TOF). LECO [online]. Plzeň: Leco instrumente, c2018 [cit. 2019-04-19]. Dostupné z: <https://cz.leco-europe.com/product/pegasus-4d/>
50. SUCHÝ, David a Milan GRUNDMANN. Cyklosporin A: farmakokinetika, monitorování a jeho použití v revmatologii. *Klinická farmakologie a farmacie* [online]. 2009, 2009, 23(4), 187-193 [cit. 2019-04-20]. ISSN 1803-5353. Dostupné z: <https://www.klinickafarmakologie.cz/pdfs/far/2009/04/09.pdf>
51. SAUDEK, František. Tacrolimus. *Remedia* [online]. 2006, leden 2006, 2006(1), 61-79 [cit. 2019-04-20]. ISSN 2336-354. Dostupné z: <http://www.remédia.cz/Clanky/Lekove-profilu/Tacrolimusum/6-I-ei.magarticle.aspx4>
52. BARTŮŇKOVÁ, Jiřina a kolektiv. Imunodeficiencie navozené infekčními činiteli. *Imunodeficiencie* [online]. 2., přeprac. a dopl. vyd. Praha: Grada, 2007, s. 205-219 [cit. 2019-04-18]. ISBN 978-80-247-1980-1.

7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

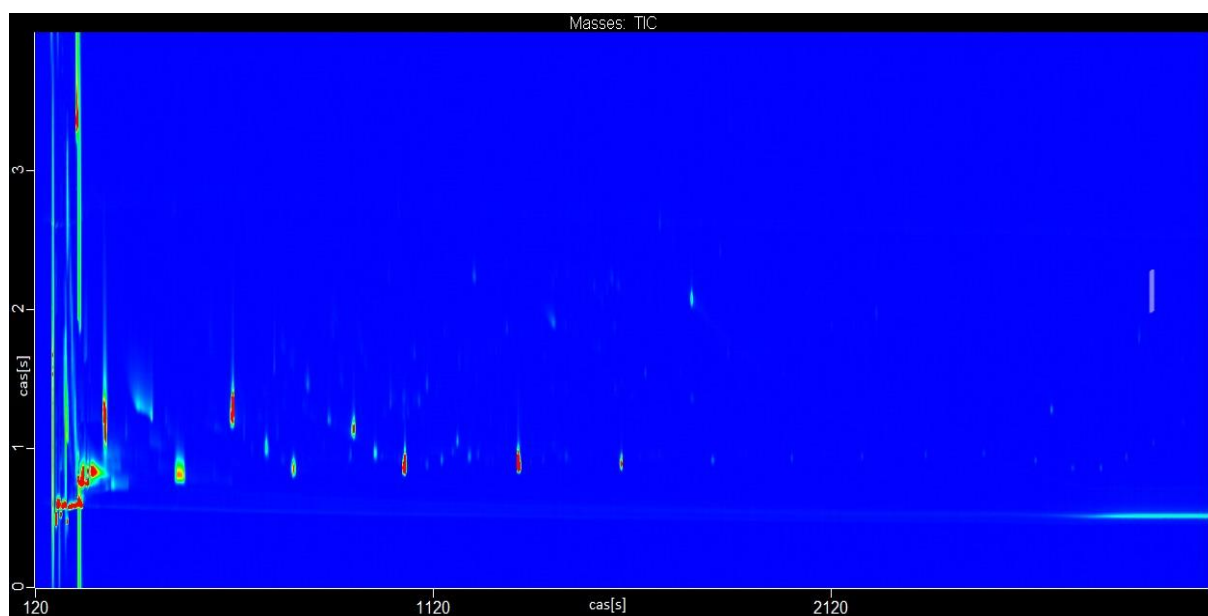
CRP	C-reaktivní protein
CsA	Cyklosporin A
ECD	Detektor elektronového záchytu
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
FID	Plamenový ionizační detektor
FK506	Takrolimus
FPD	Fotometrický plamenový detektor
GC	Plynová chromatografie
GCxGC	Dvojdímenzionální plynová chromatografie
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IMS	Spektrometrie iontové mobility
LPS	Lipopolysacharid
MALDI	Laserová desorpce a ionizace za účasti matrice
M-CSF	Růstový hormon pro makrofágy
MODS	Syndrom multiorgánové dysfunkce
MS	Hmotnostní spektrometrie
NK buňky	Natural killer buňky
PCR	Polymerázová řetězová reakce
PCT	Prokalcitonin
Q	Kvadrupól
SF	Stacionární fáze
SIRS	Systémová zánětlivá odpověď organismu
SPME	Mikroextrakce tuhou fází
TCD	Tepelně vodivostní detektor
TID	Termoionizační detektor
TOF	Analyzátor doby letu
TPCA	2-(Karbamoylamino)-5-(4-fluorofenyl)-3-thiofenkarboxamid
UV	Ultrafialové záření
VOC	Těkavá organická látka
ZYM	Zymosan

8. PŘÍLOHY

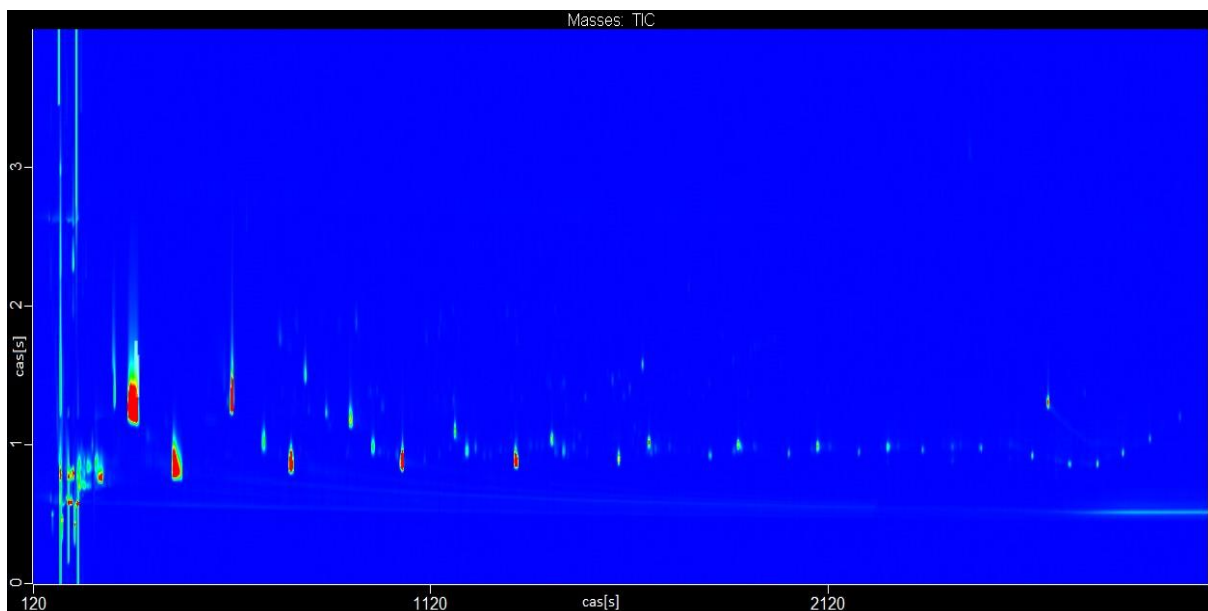
8.1. 2D chromatogramy SPME vláken



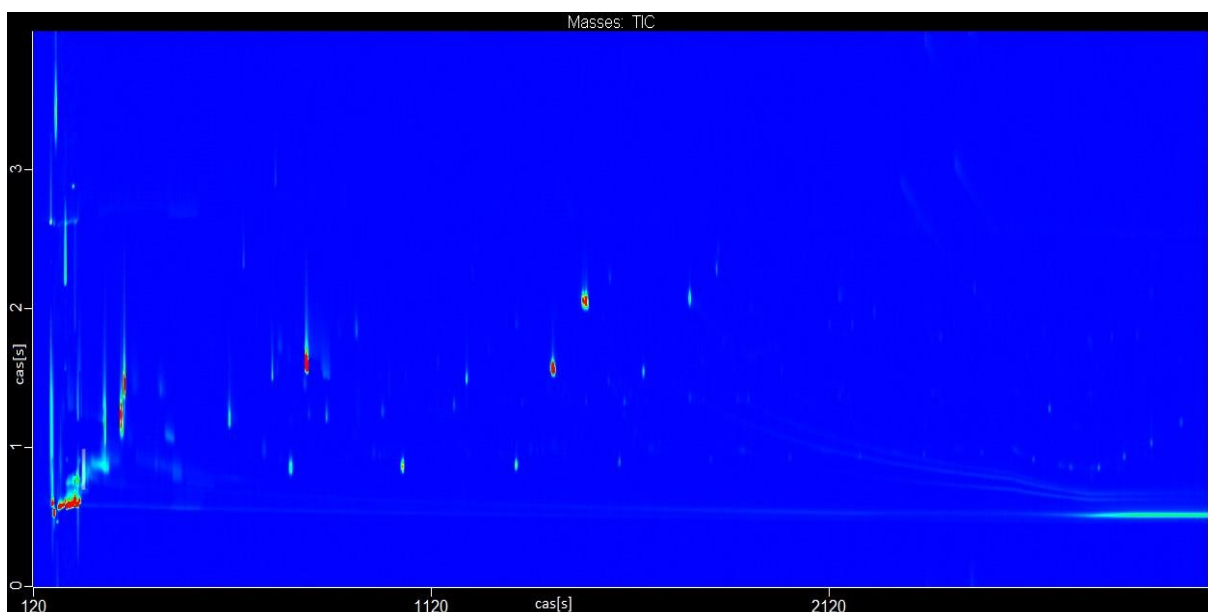
Obrázek 20: Vlákno Red vzorek S78



Obrázek 21: Vlákno Black vzorek S78

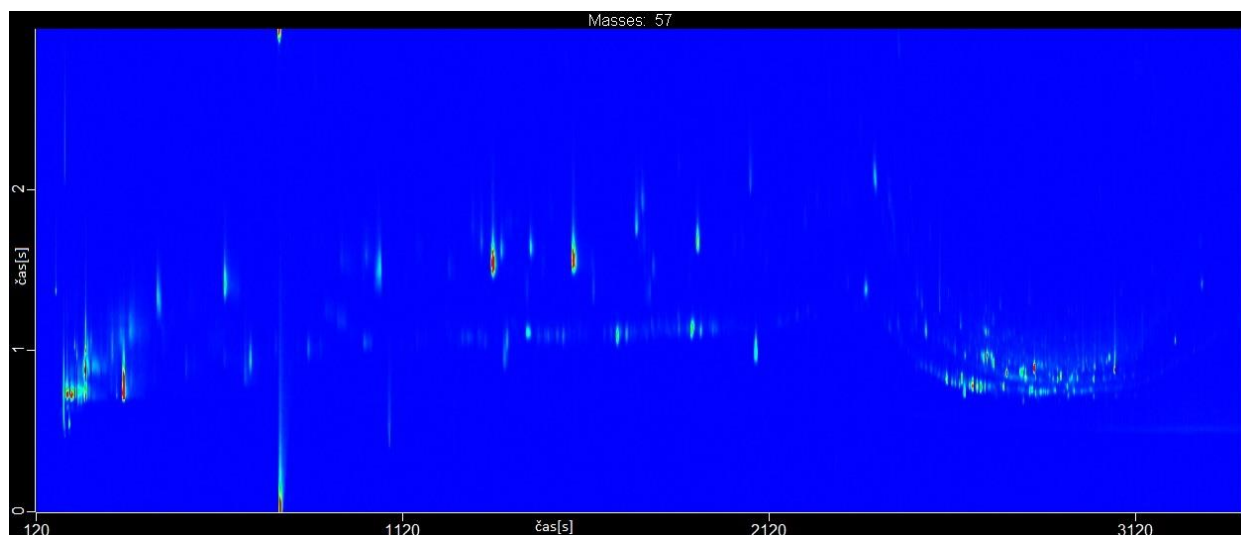


Obrázek 22: Vlákno Blue vzorek S78

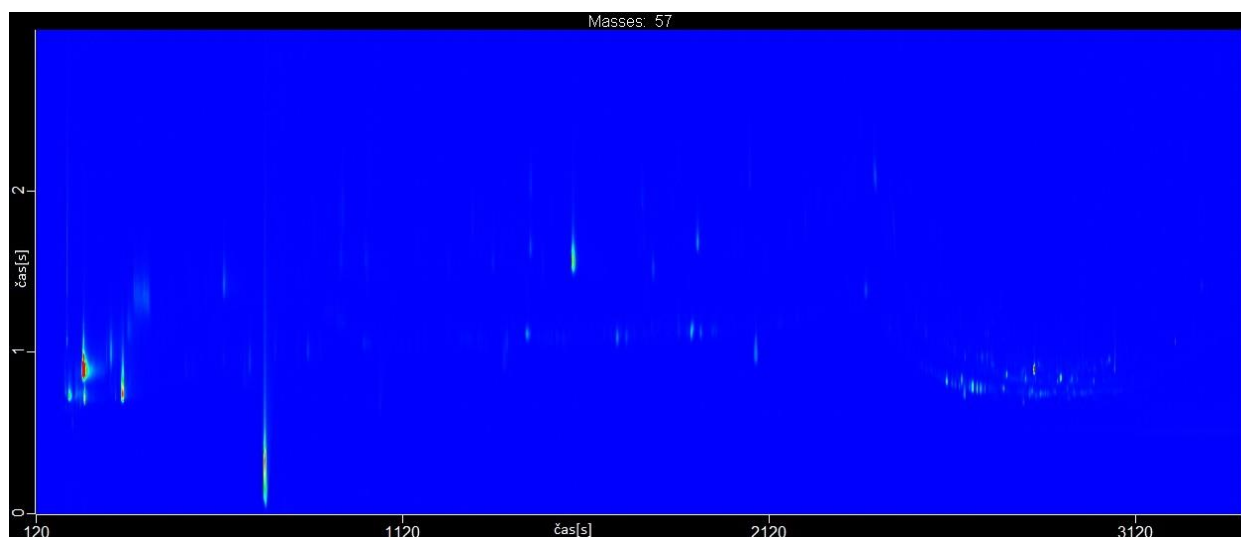


Obrázek 23: Vlákno White vzorek S78

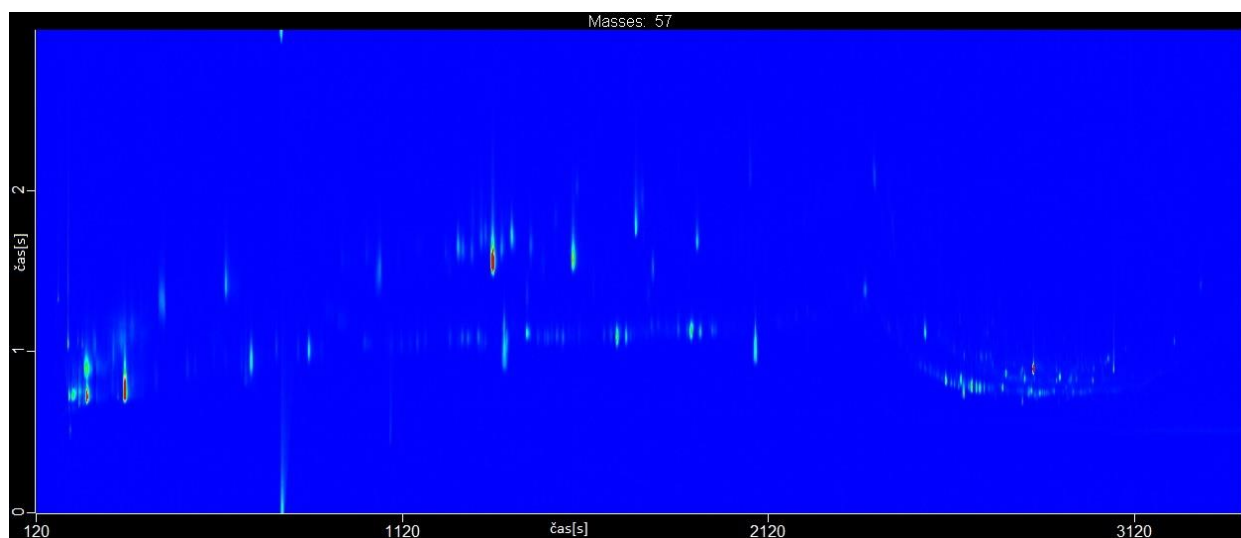
8.2. 2D chromatogramy vzorků



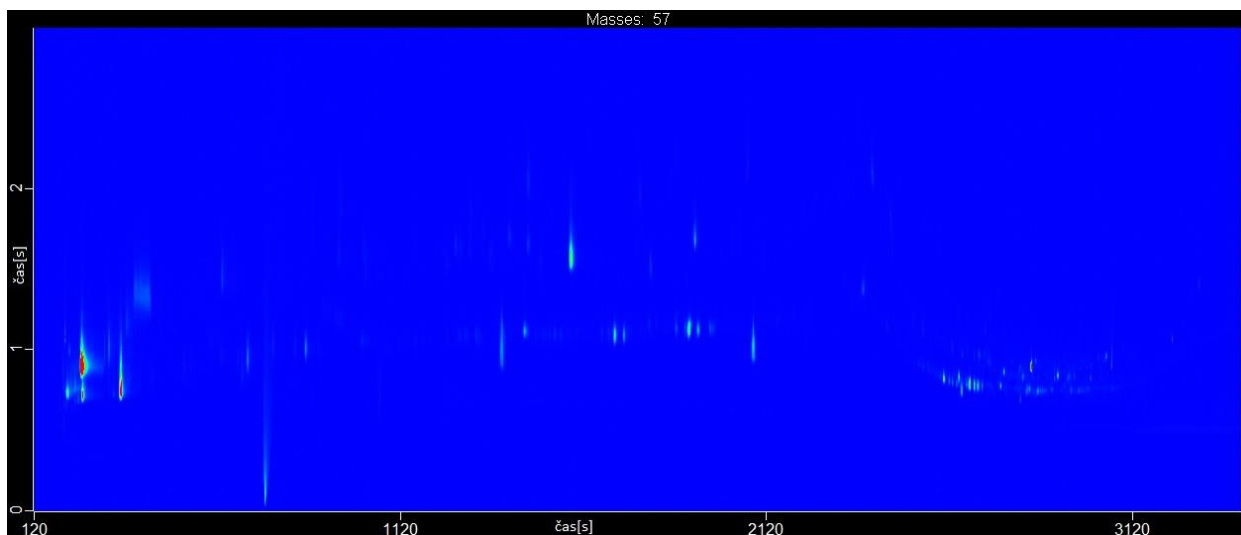
Obrázek 24: Vzorek 2



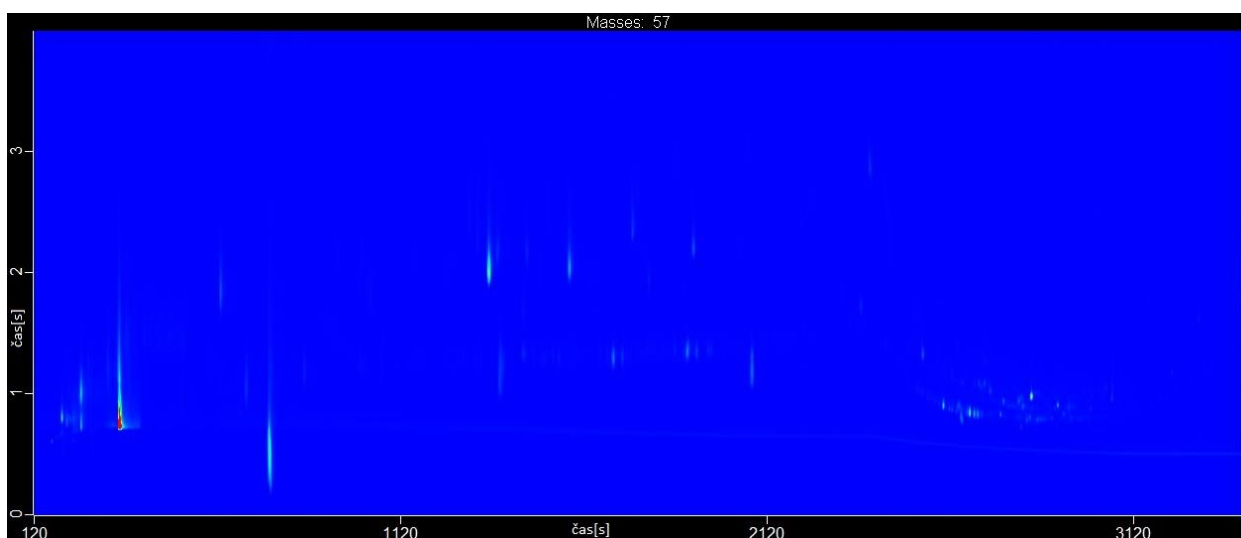
Obrázek 25: Vzorek S2



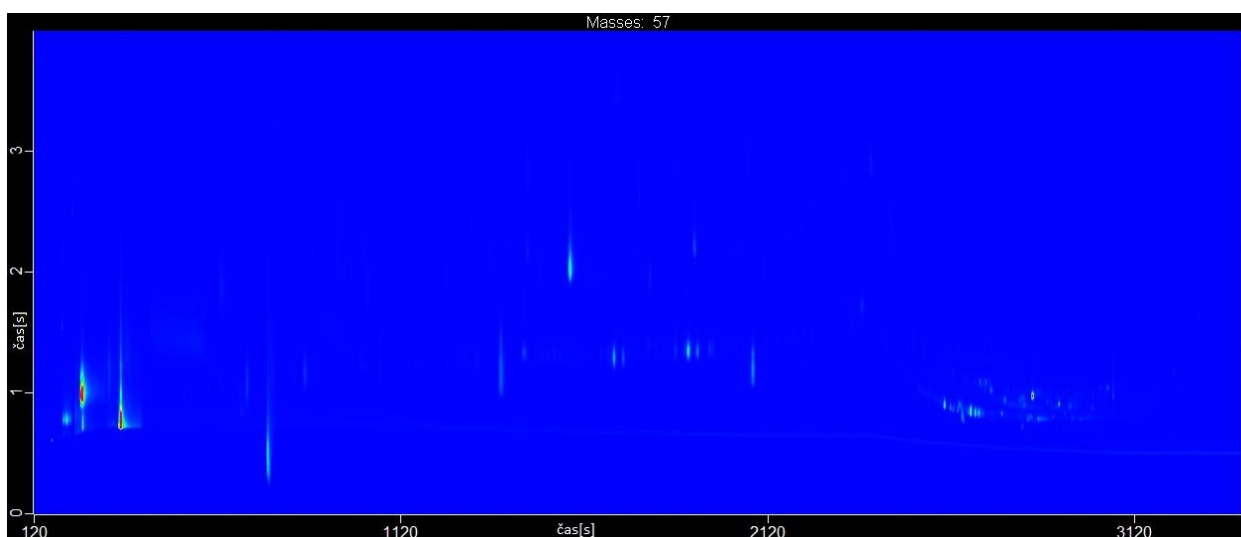
Obrázek 26: Vzorek 3



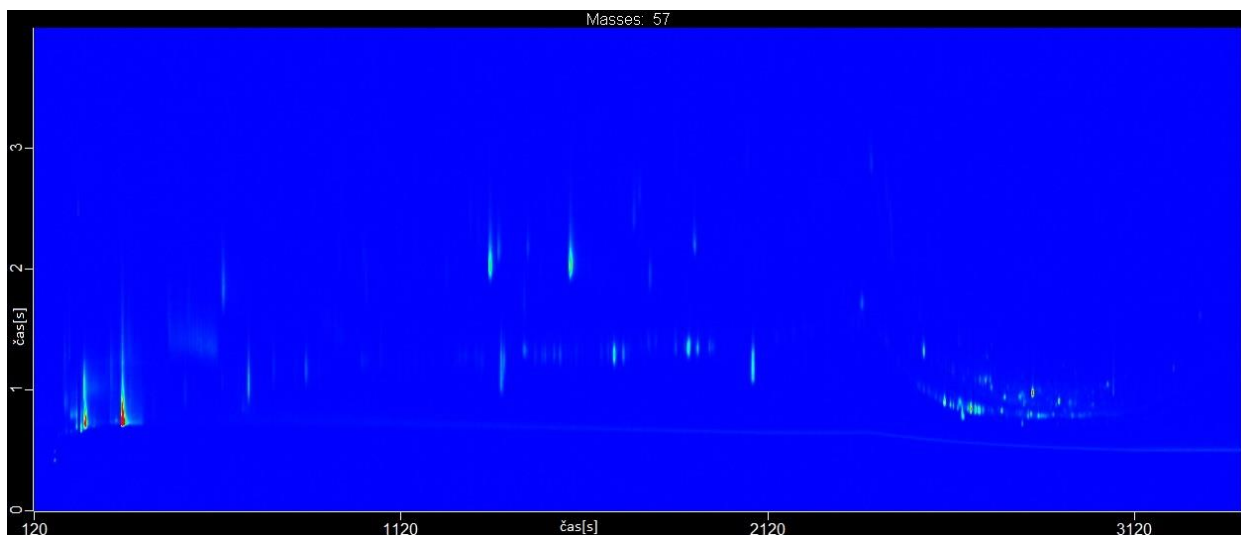
Obrázek 27: Vzorek S3



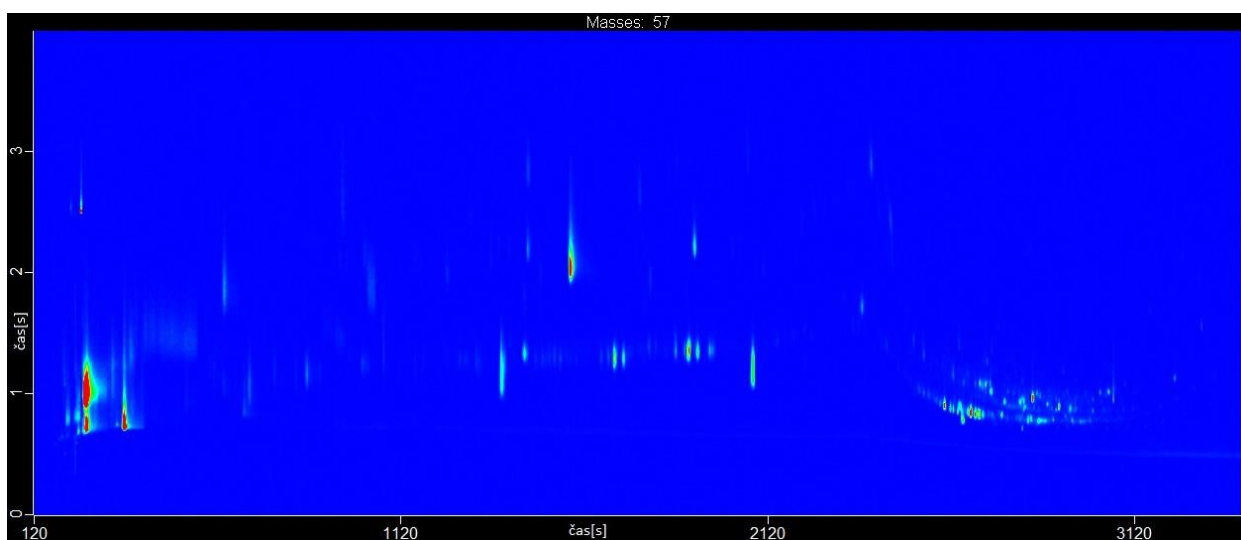
Obrázek 28: Vzorek 4



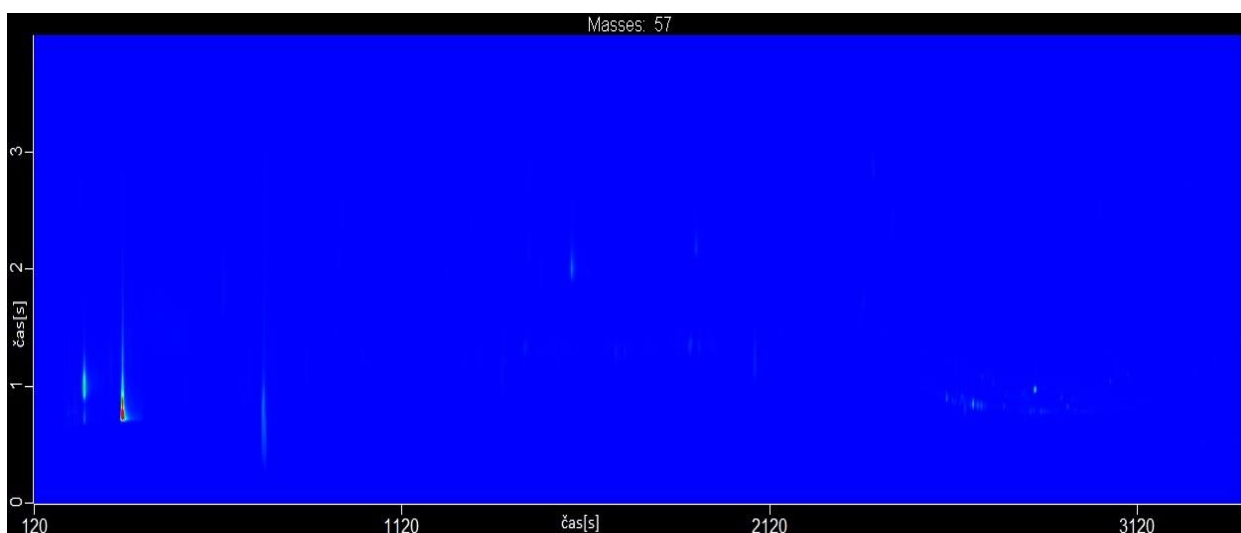
Obrázek 29: Vzorek S4



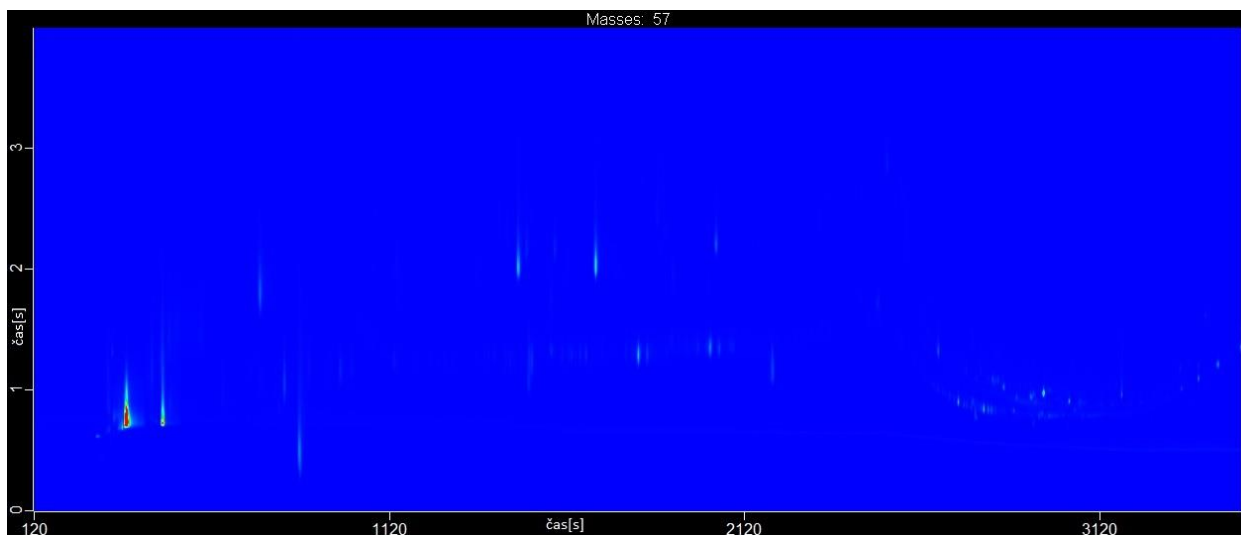
Obrázek 30: Vzorek 5



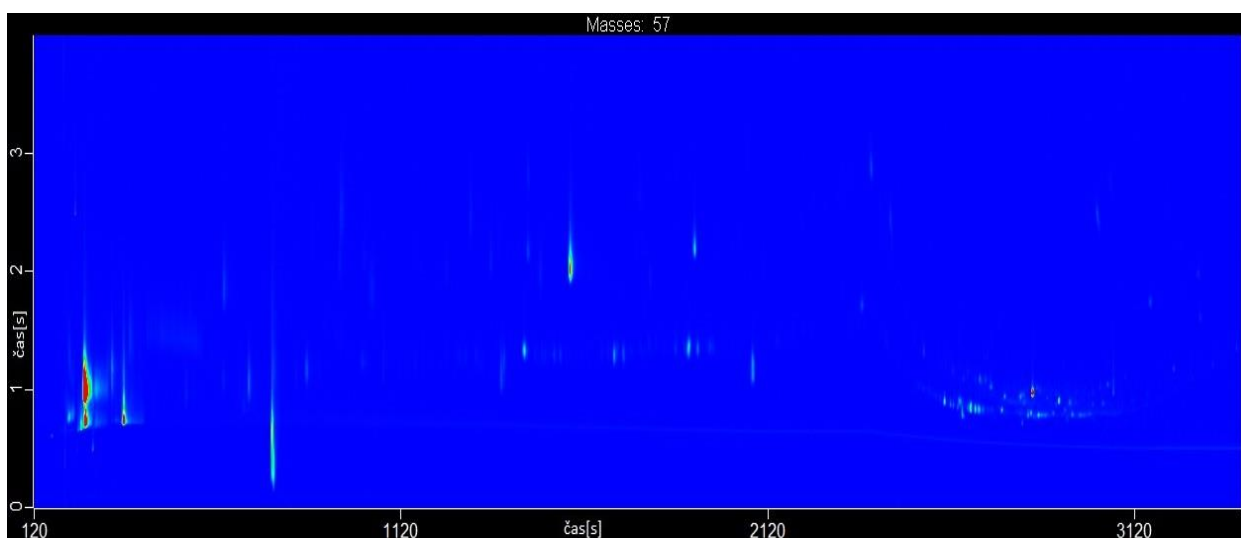
Obrázek 31: Vzorek S5



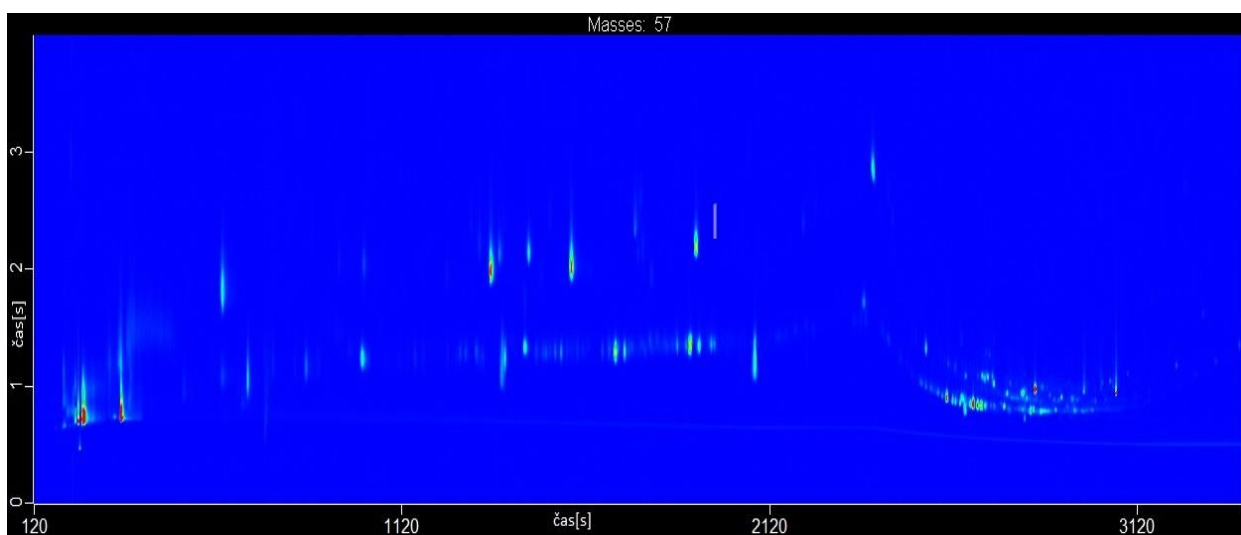
Obrázek 32: Vzorek S6



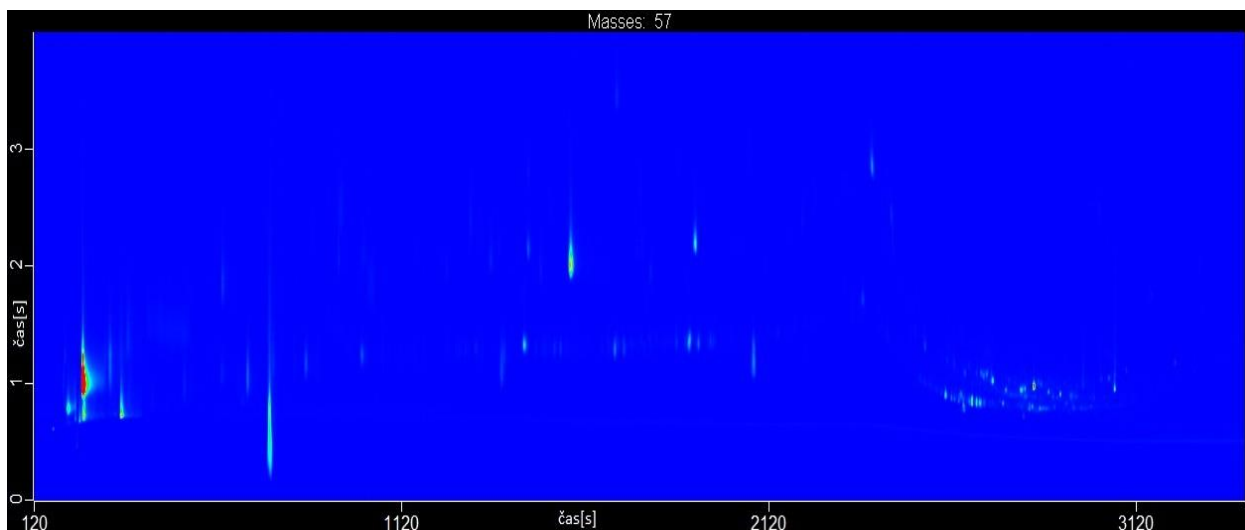
Obrázek 33: Vzorek 7



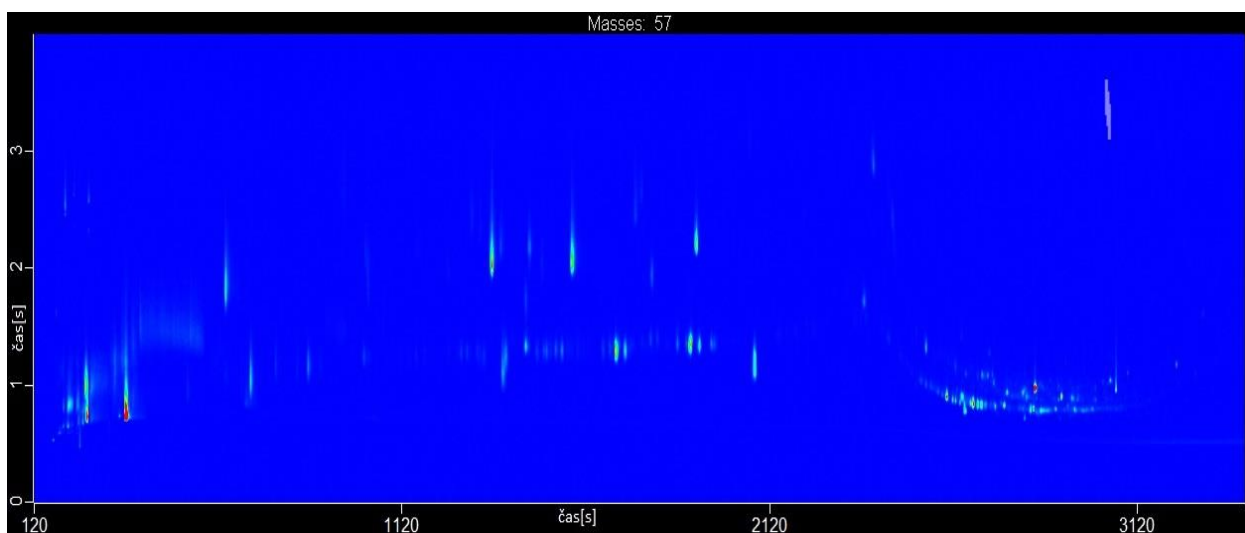
Obrázek 34: Vzorek S7



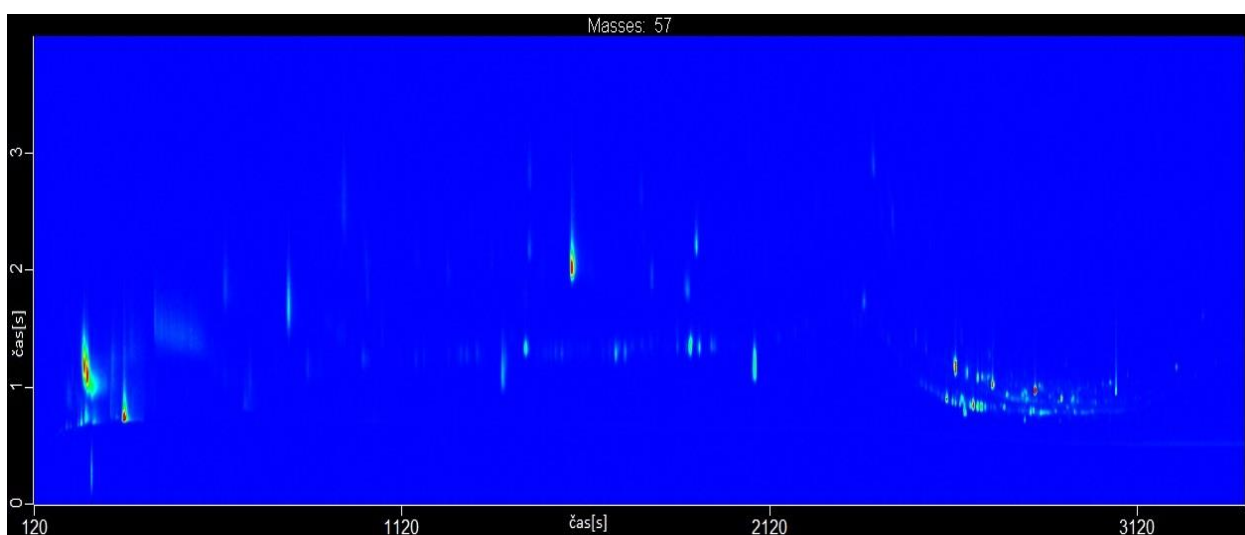
Obrázek 35: Vzorek 8



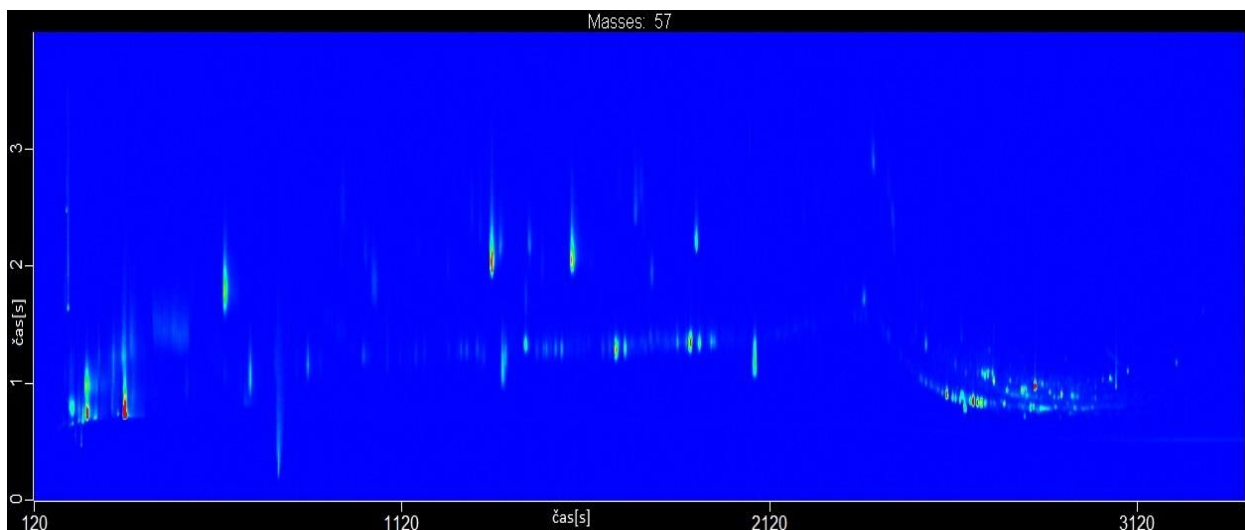
Obrázek 36: Vzorek S8



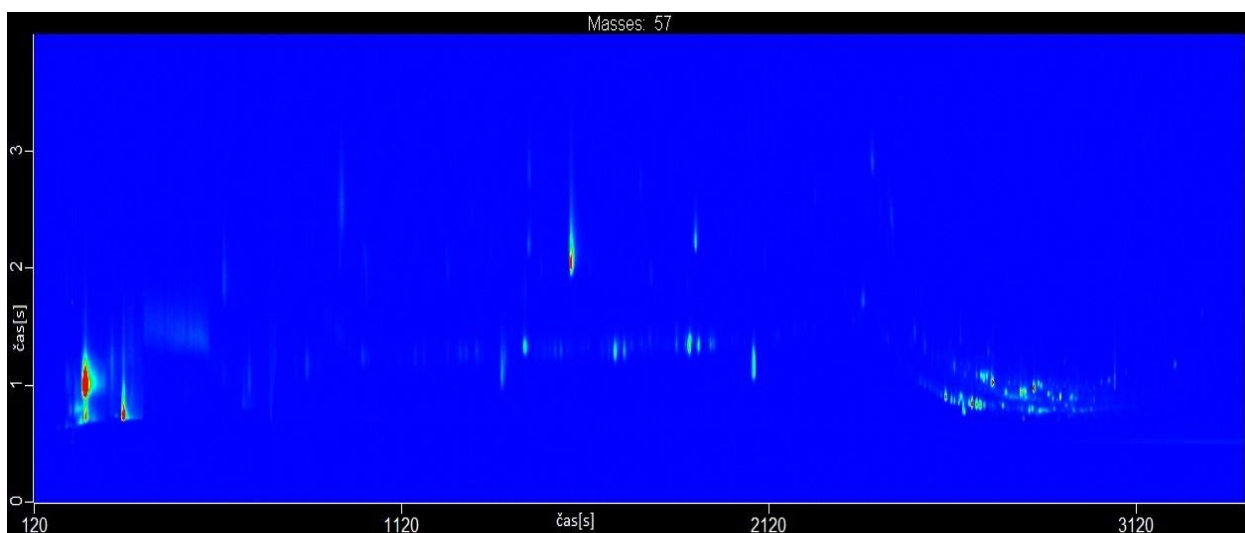
Obrázek 37: Vzorek 9



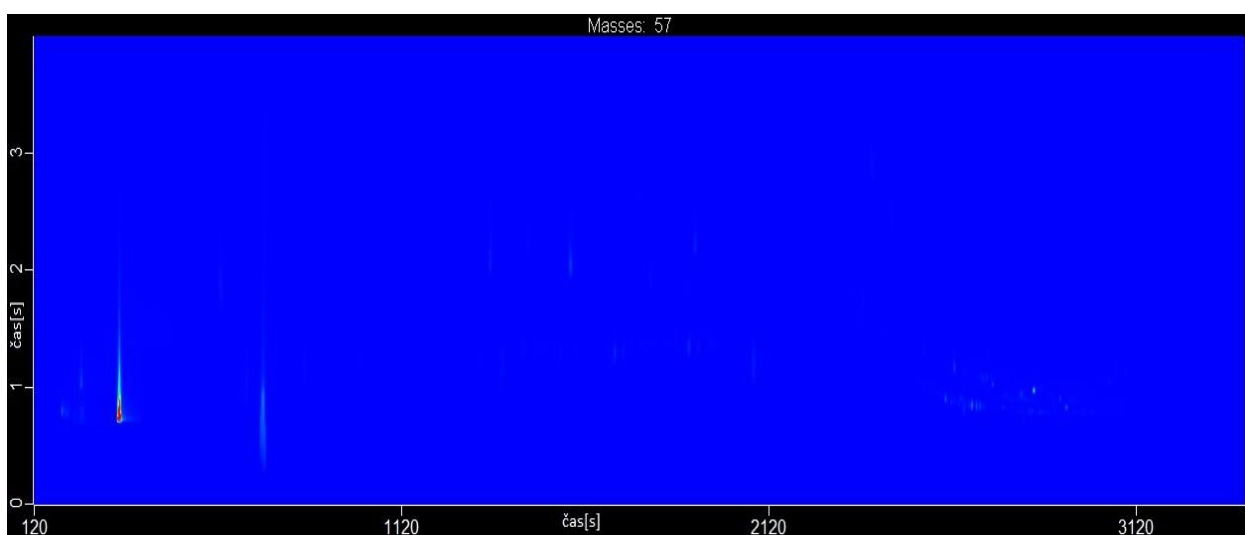
Obrázek 38: Vzorek S9



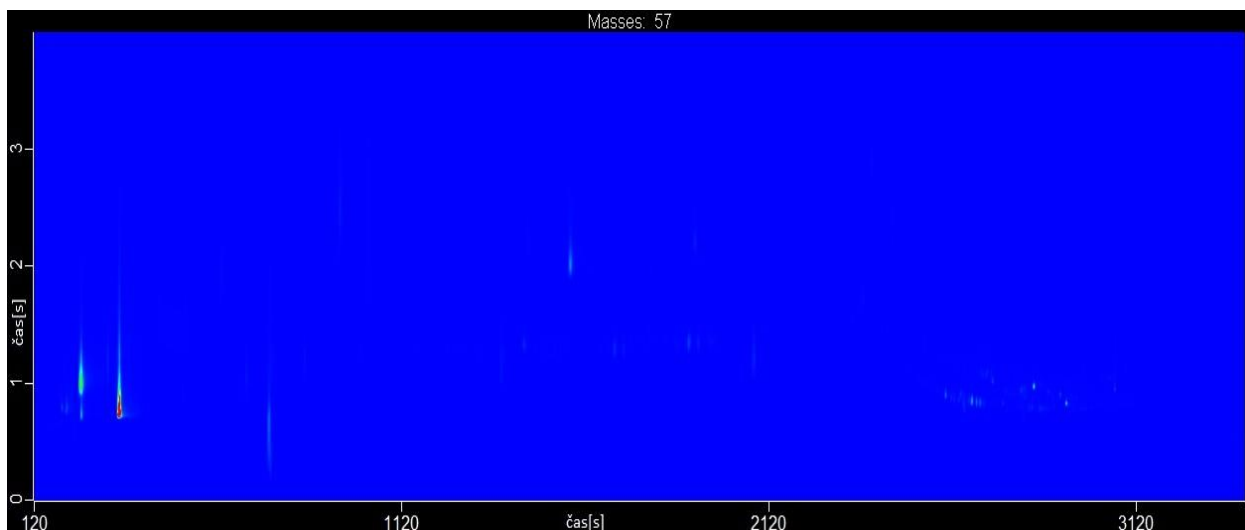
Obrázek 39: Vzorek 10



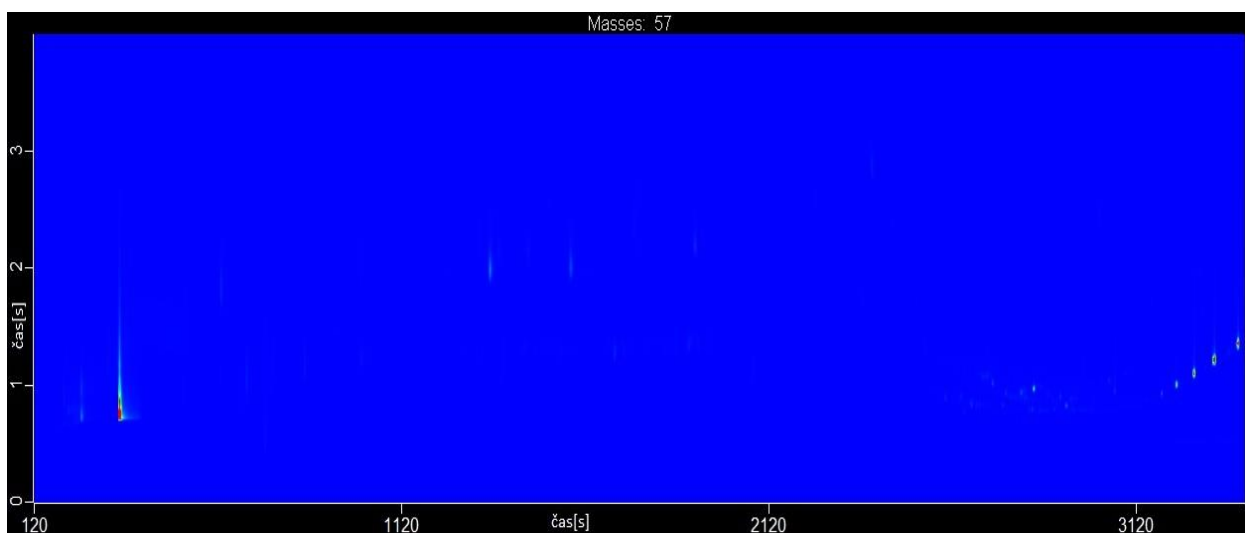
Obrázek 40: Vzorek S10



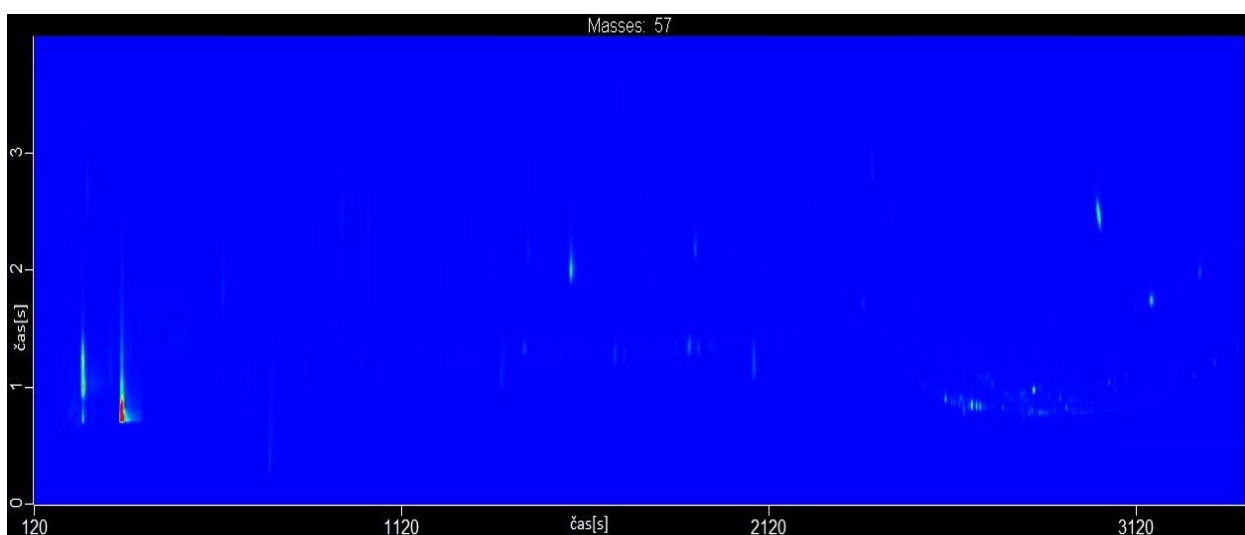
Obrázek 41: Vzorek 11



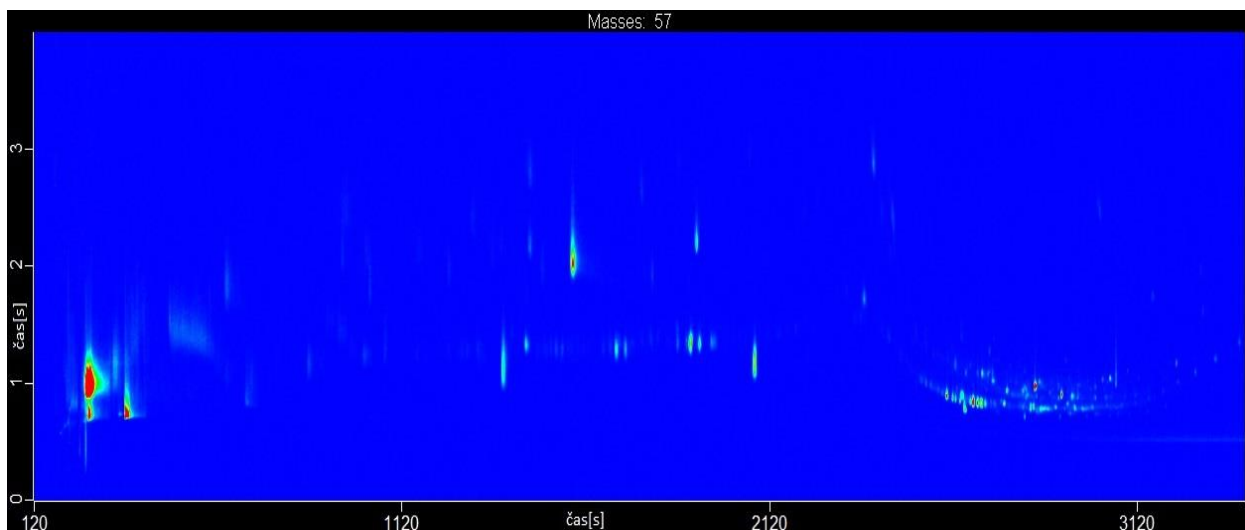
Obrázek 42: Vzorek S11



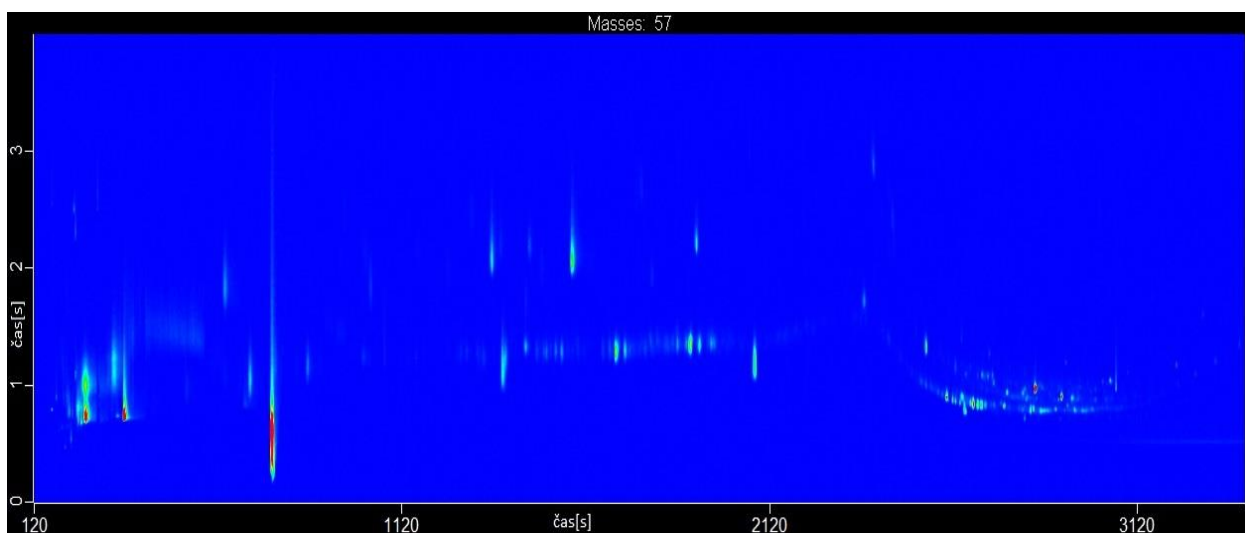
Obrázek 43: Obrázek 12



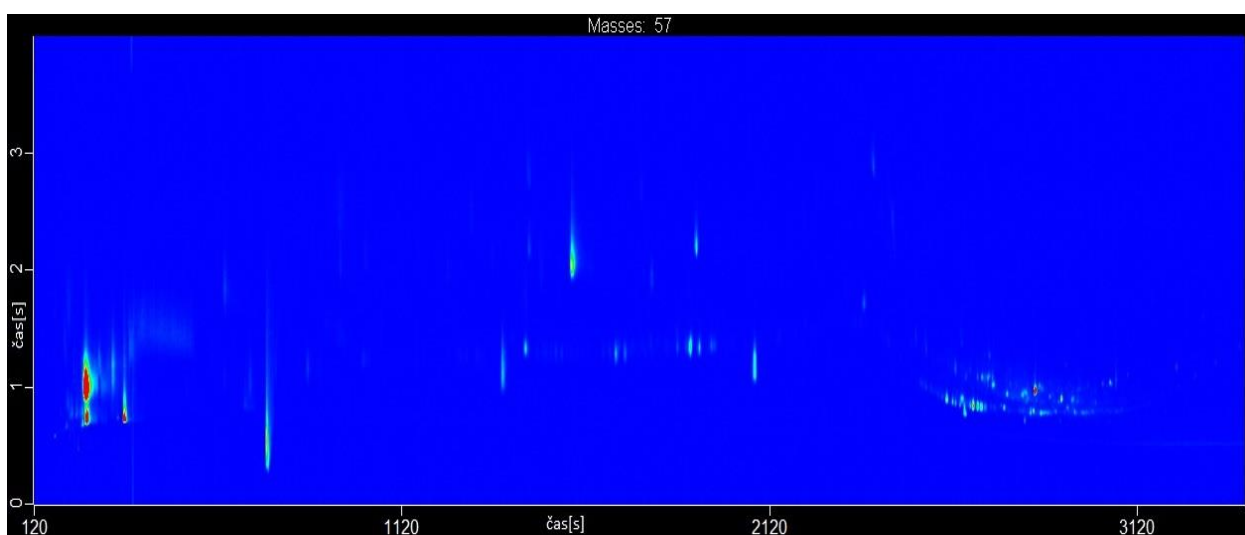
Obrázek 44: Vzorek S12



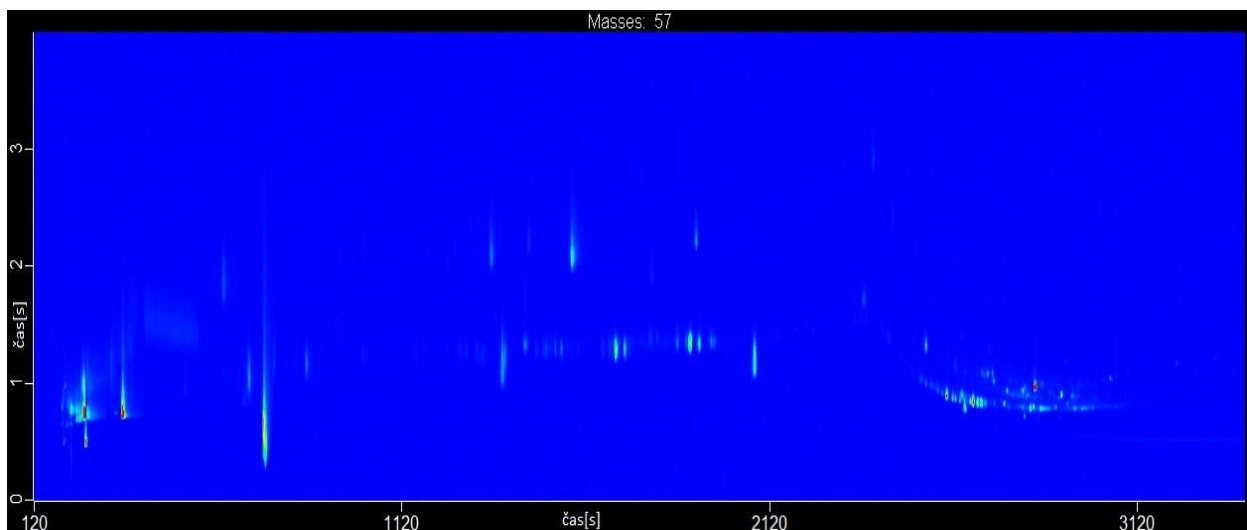
Obrázek 45: Vzorek S13



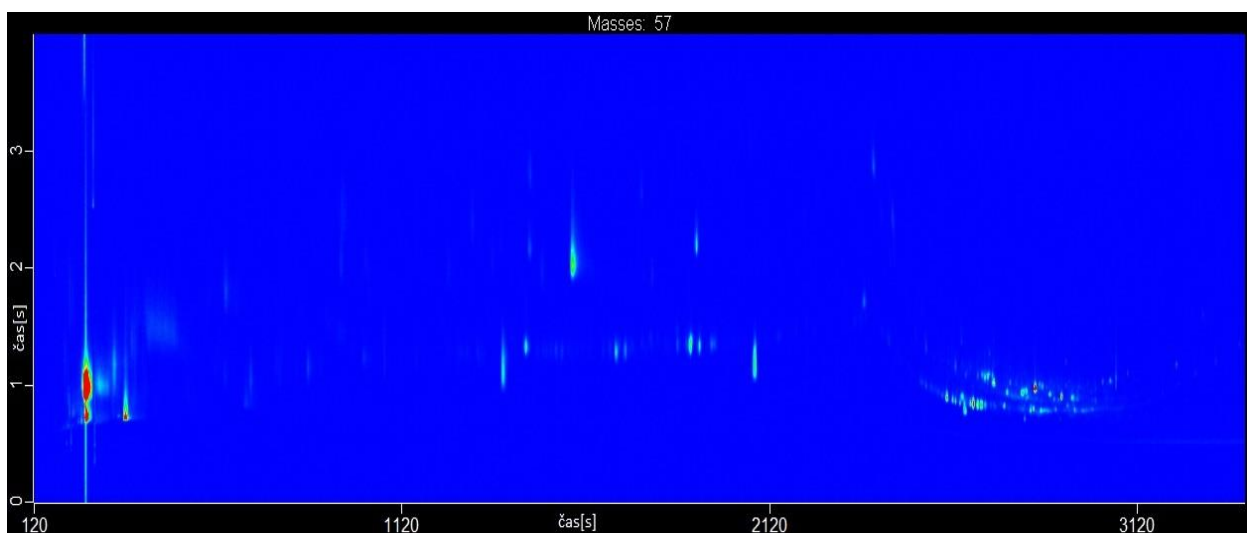
Obrázek 46: Vzorek 14



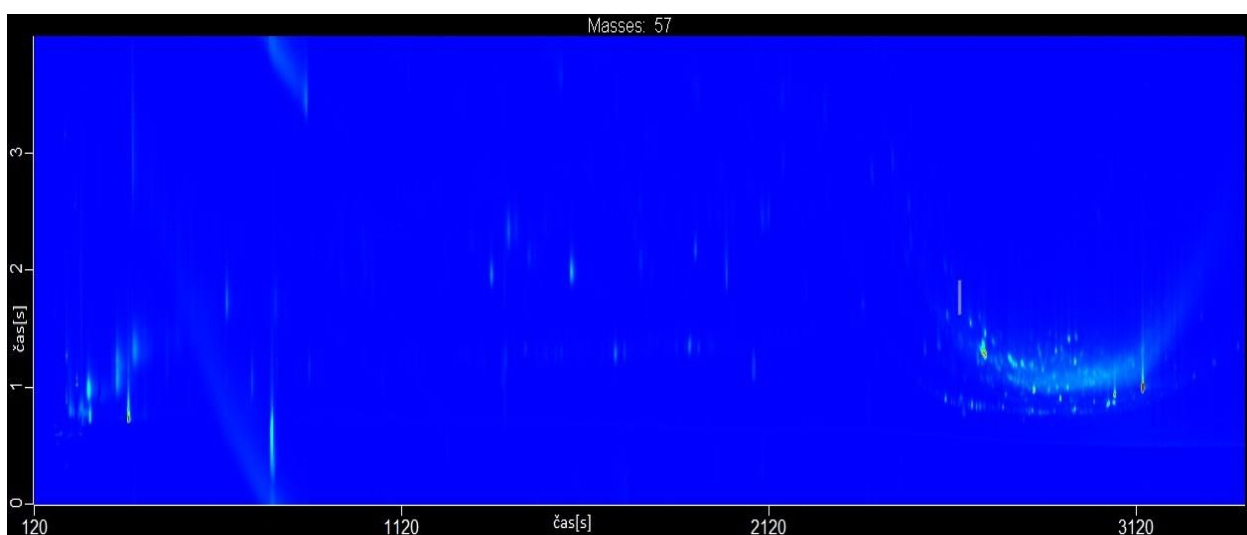
Obrázek 47: Vzorek S14



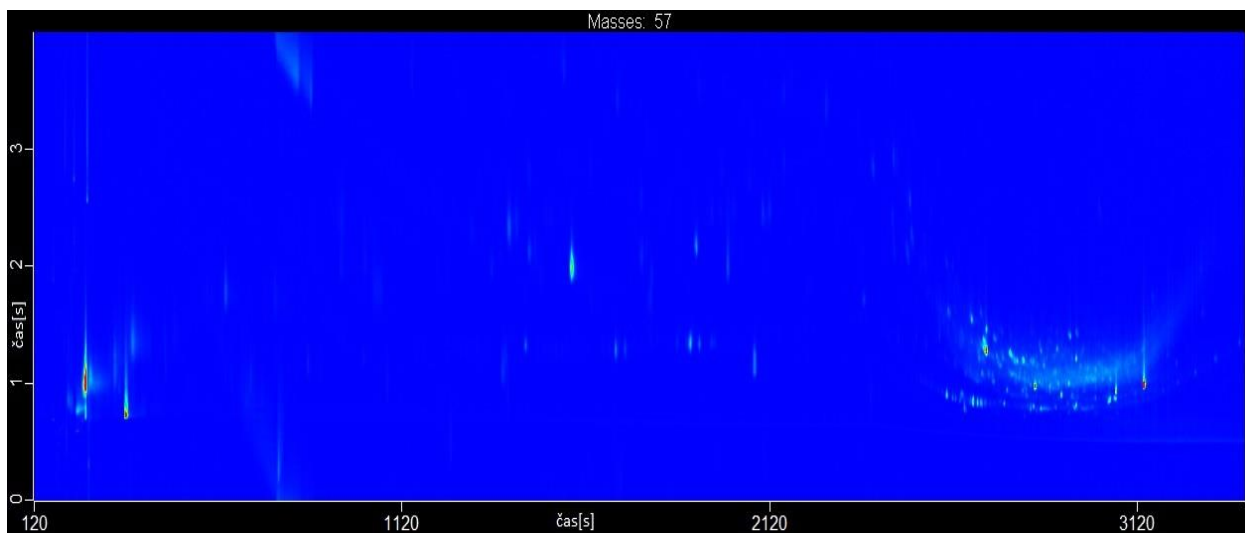
Obrázek 48: Vzorek 15



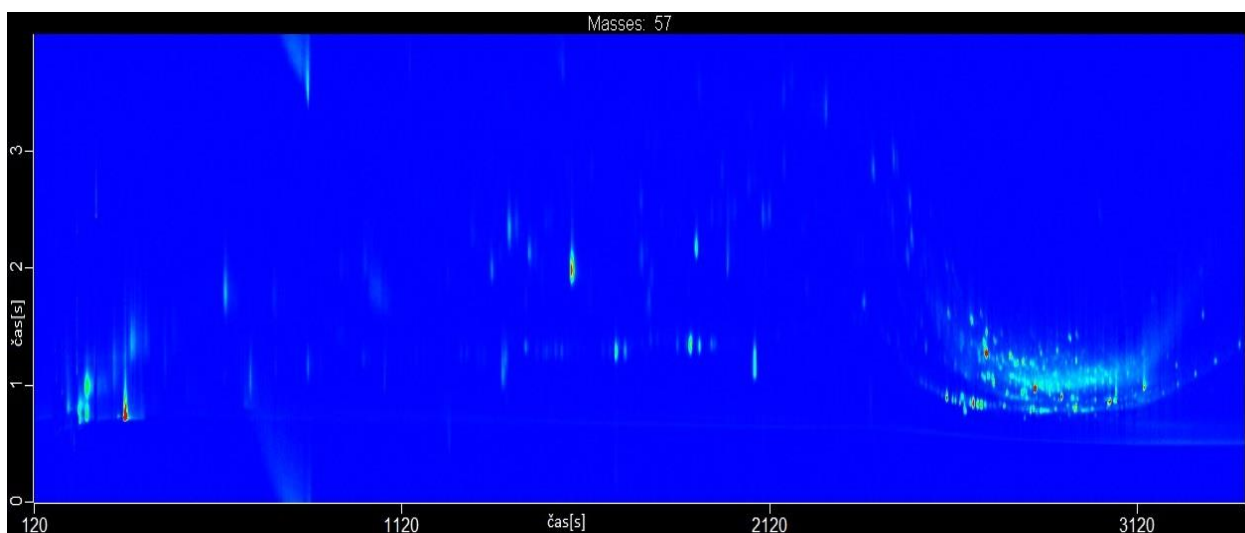
Obrázek 49: Vzorek S15



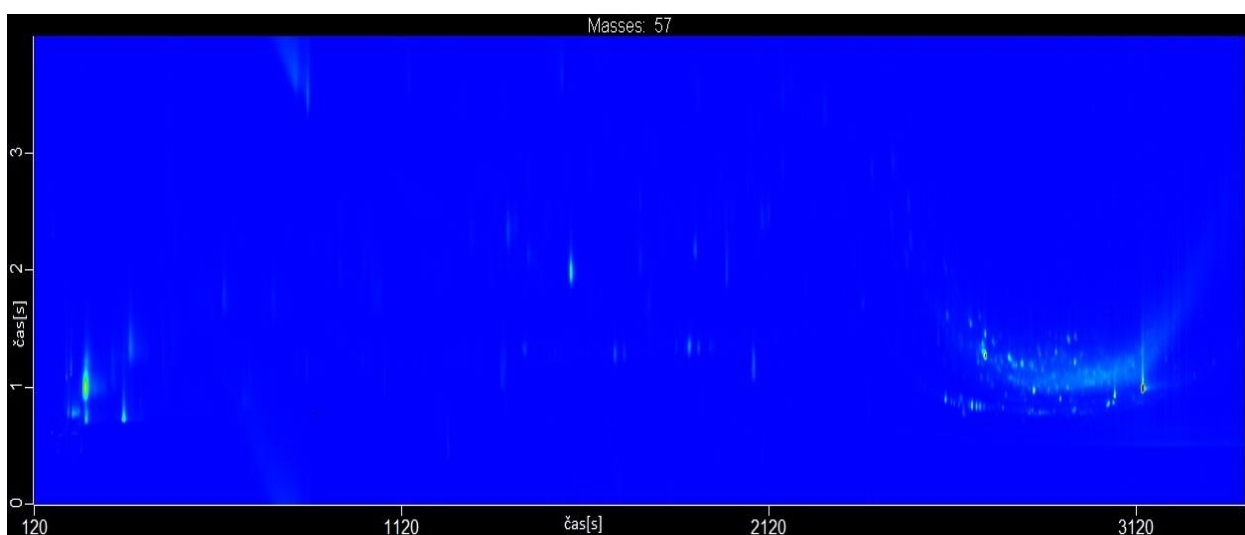
Obrázek 50: Vzorek 16



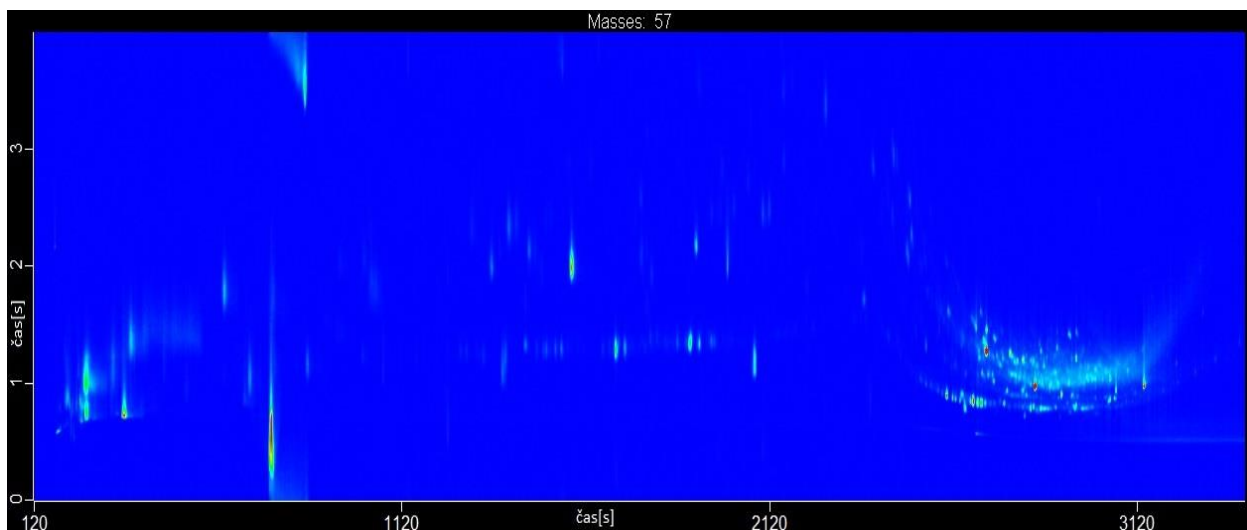
Obrázek 51: Vzorek S16



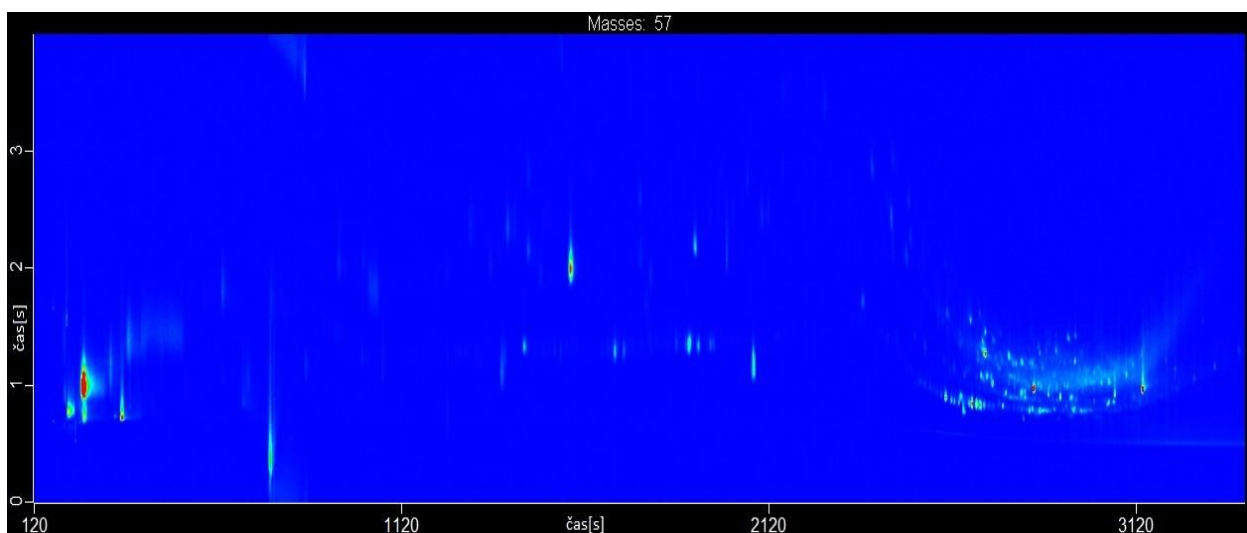
Obrázek 52: Vzorek 17



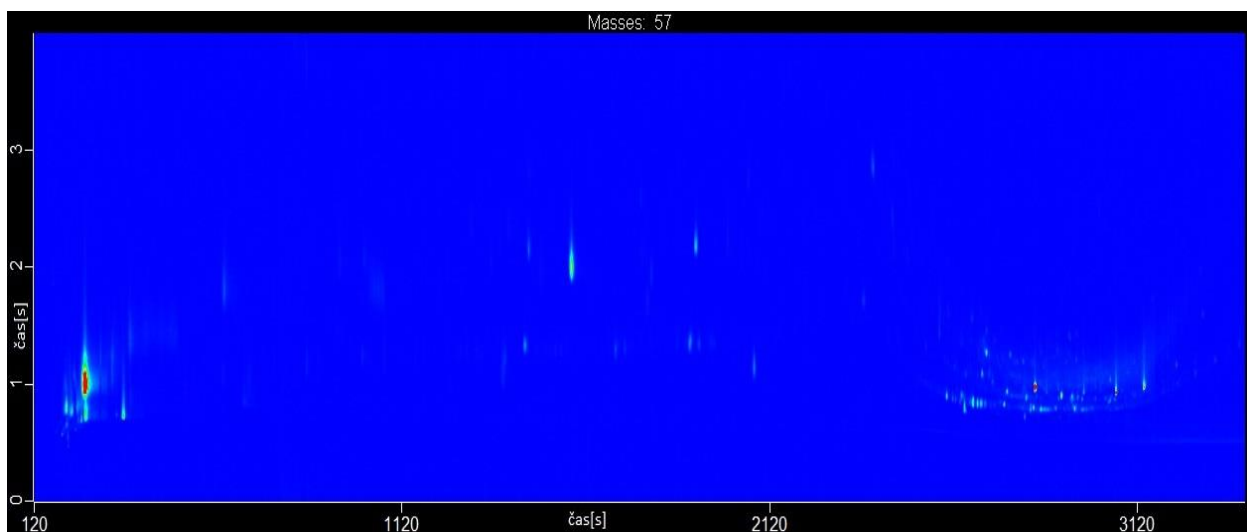
Obrázek 53: Vzorek S17



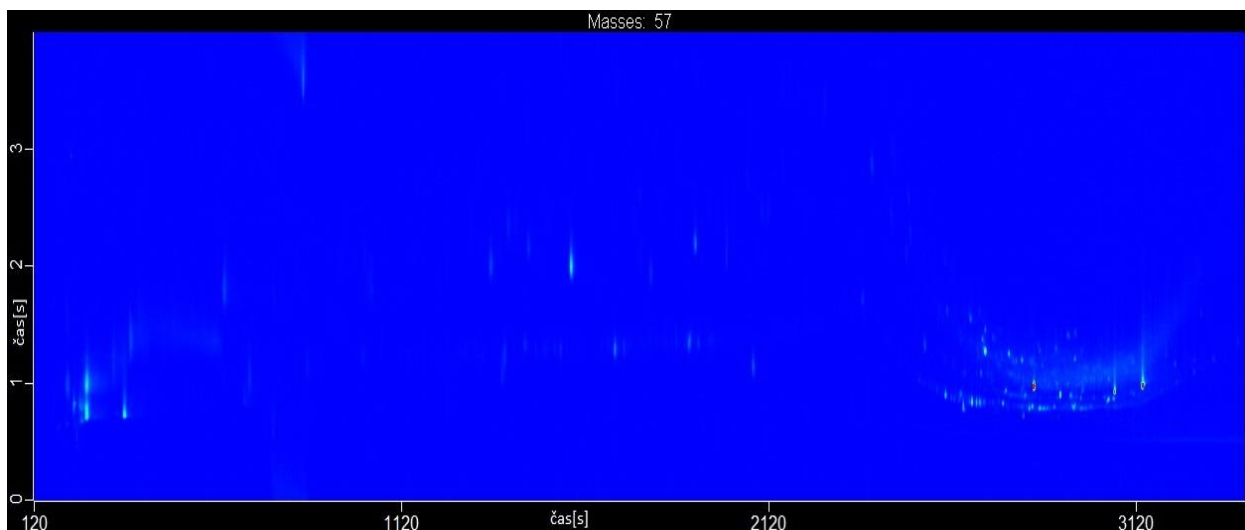
Obrázek 54: Vzorek 18



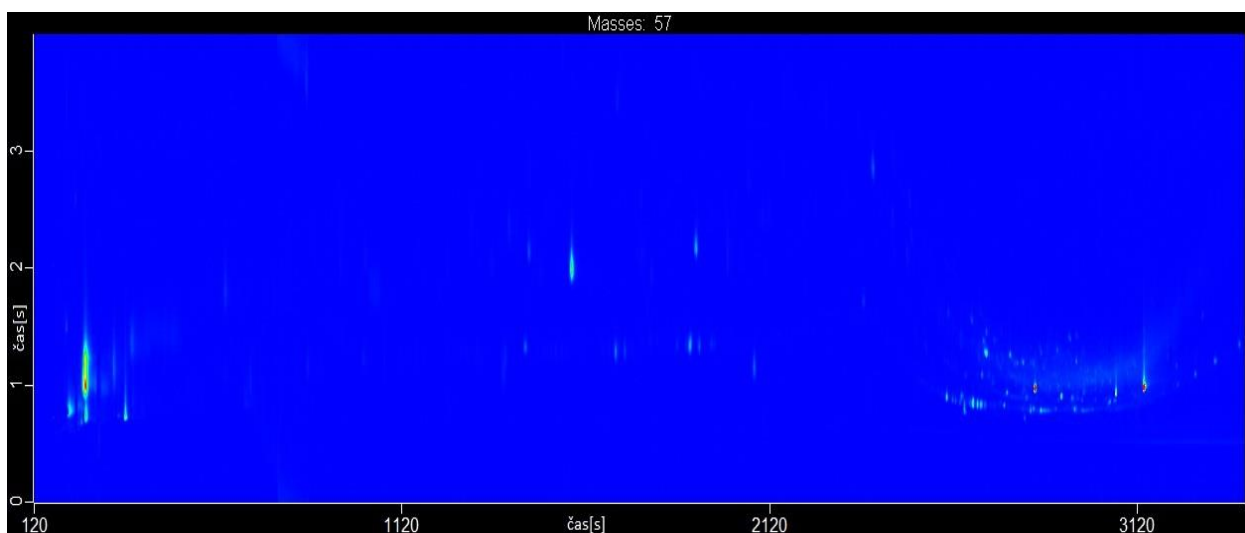
Obrázek 55: Vzorek S18



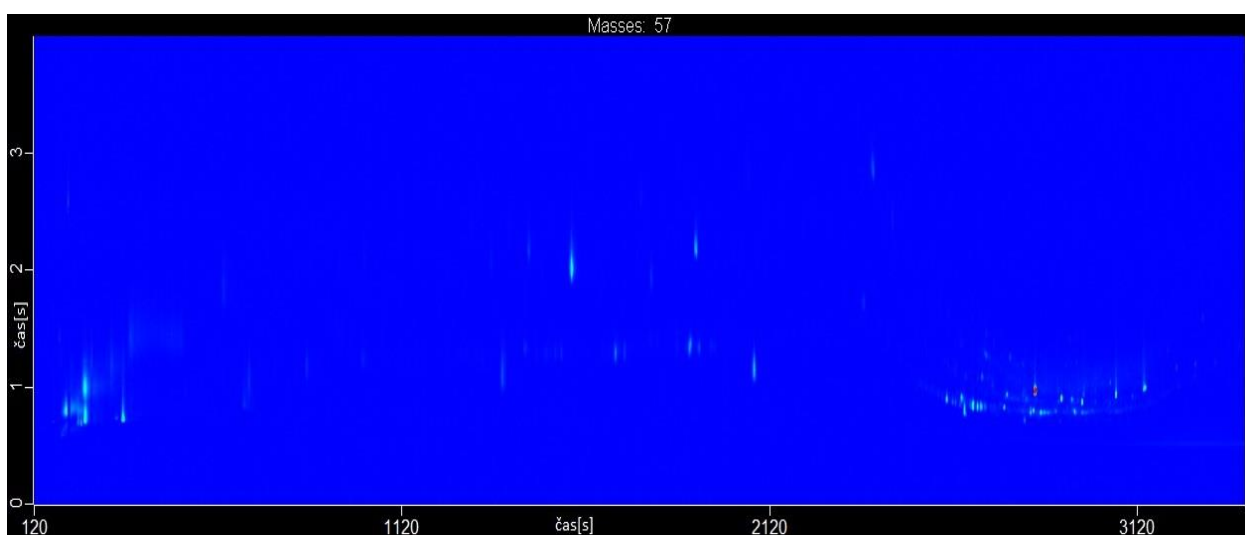
Obrázek 56: Vzorek S19



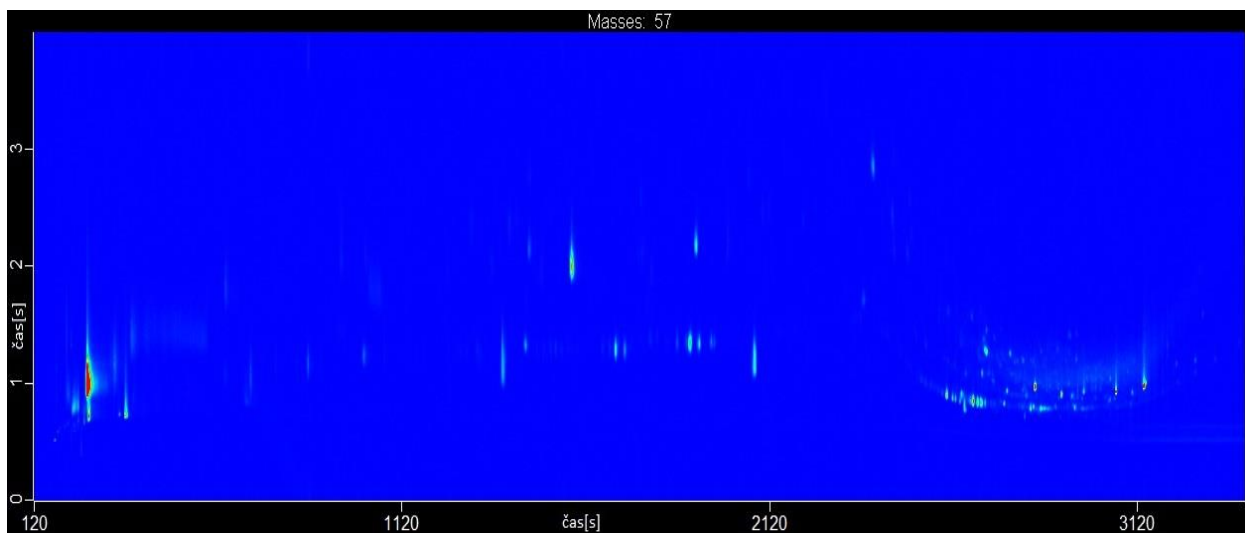
Obrázek 57: Vzorek 20



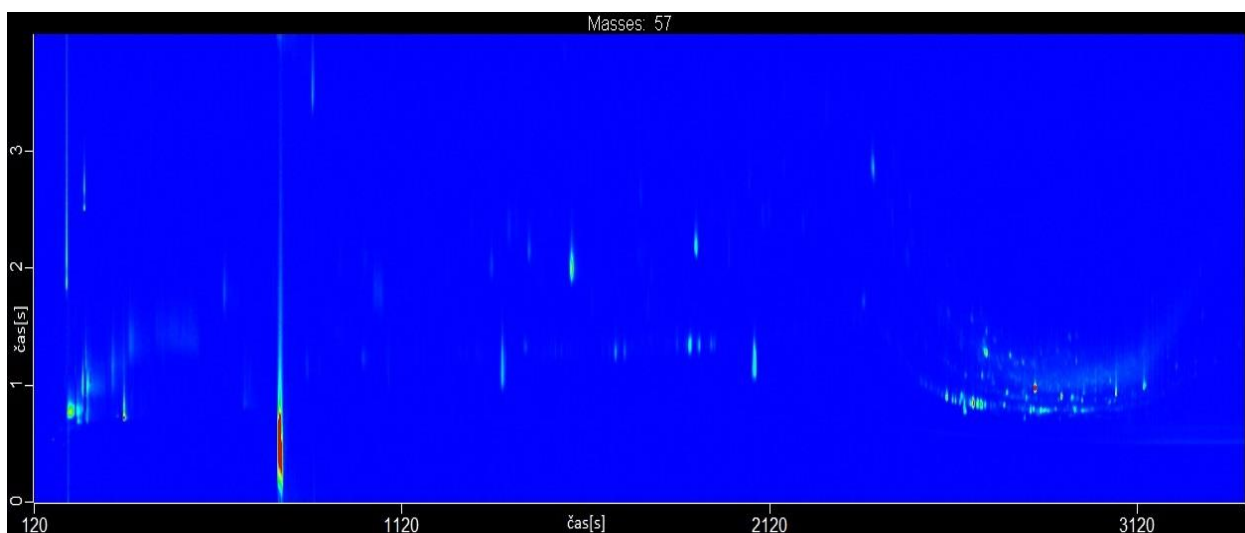
Obrázek 58: Vzorek S20



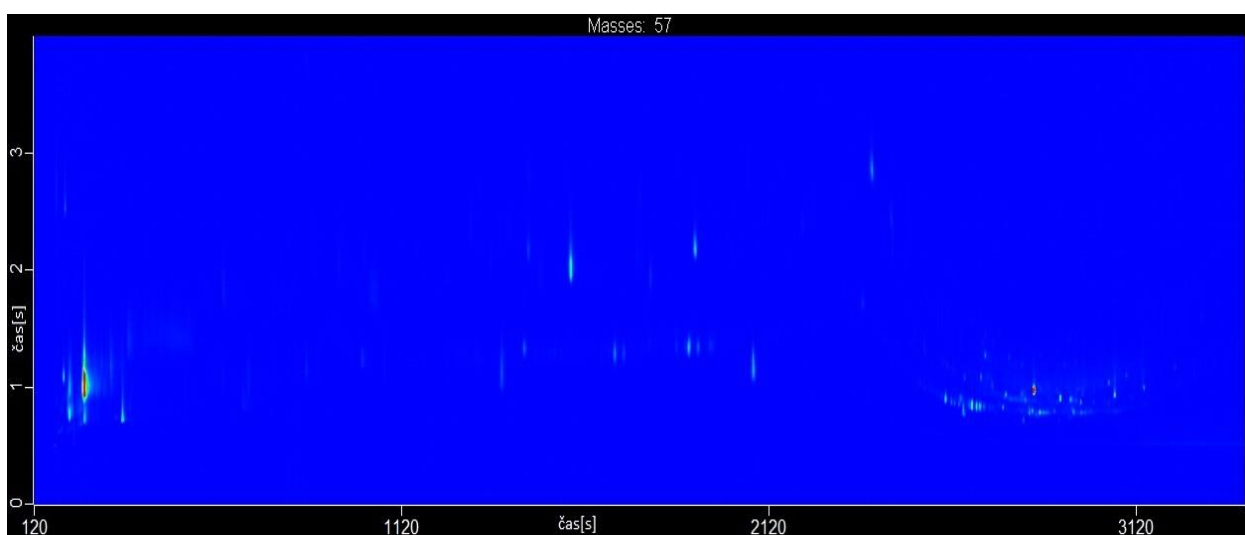
Obrázek 59: Vzorek 21



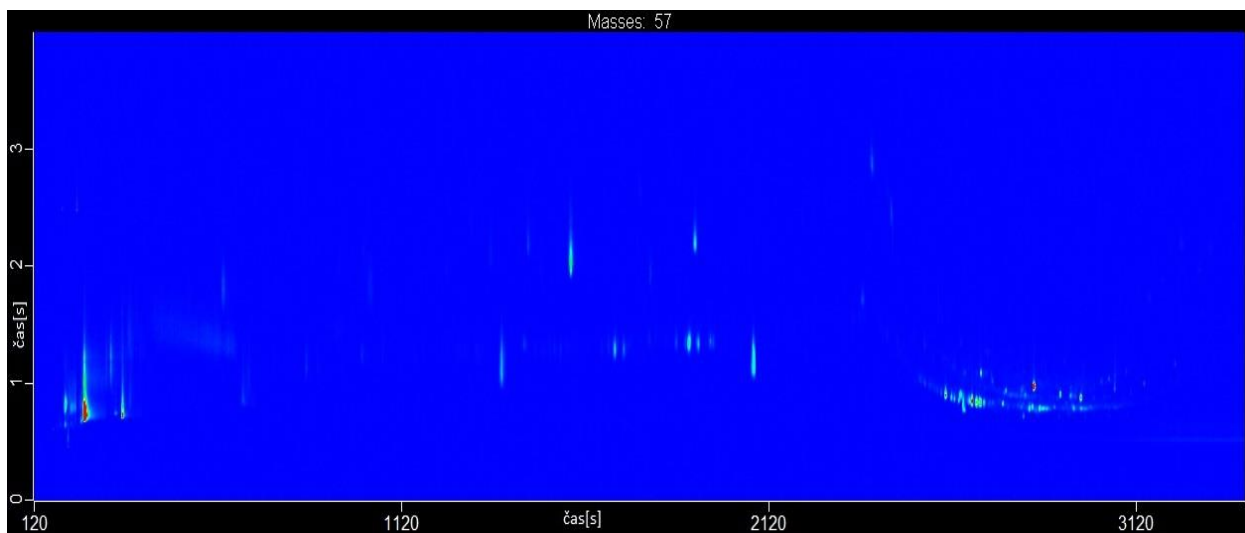
Obrázek 60: Vzorek S21



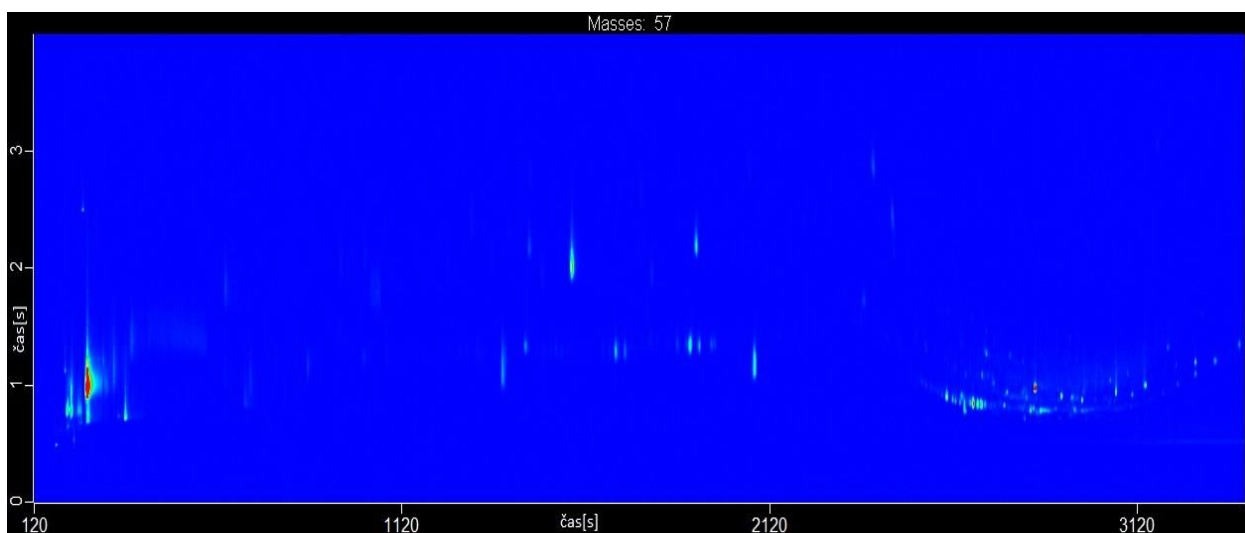
Obrázek 61: Vzorek 22



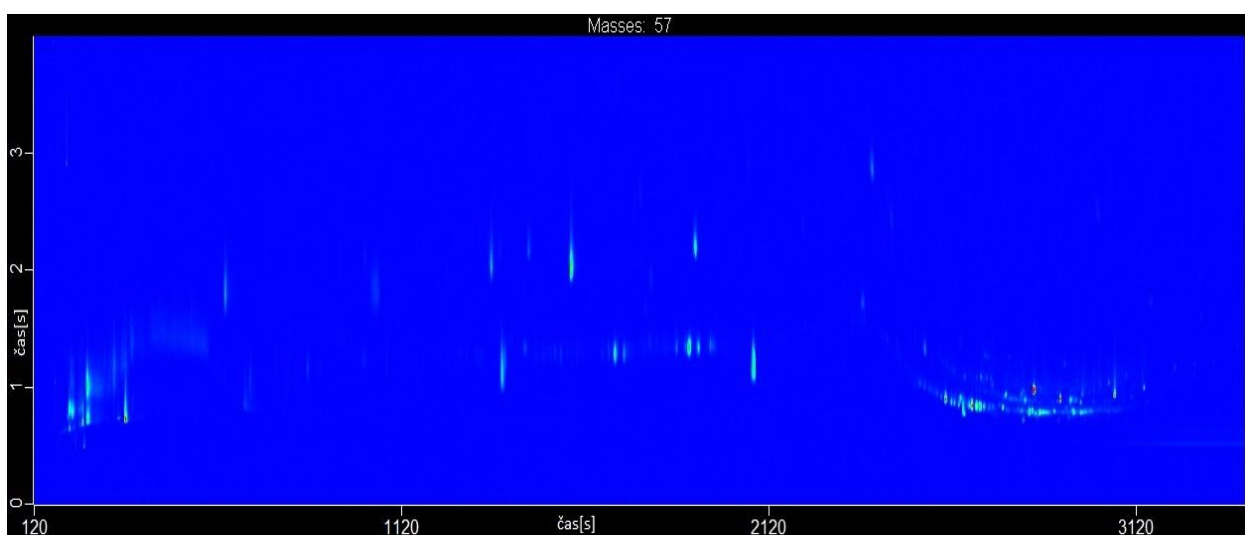
Obrázek 62: Vzorek S22



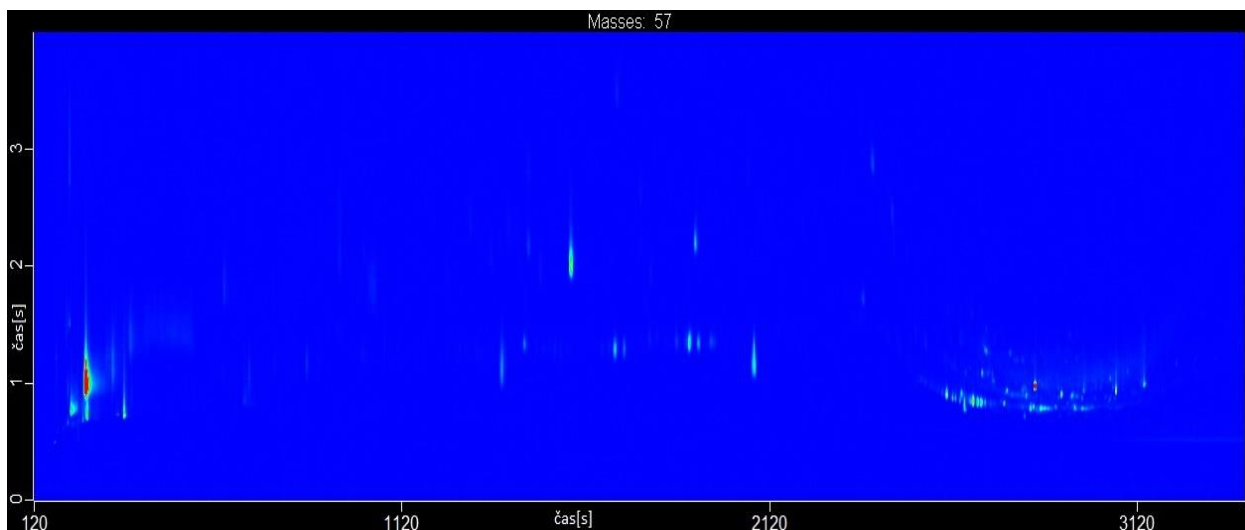
Obrázek 63: Vzorek 23



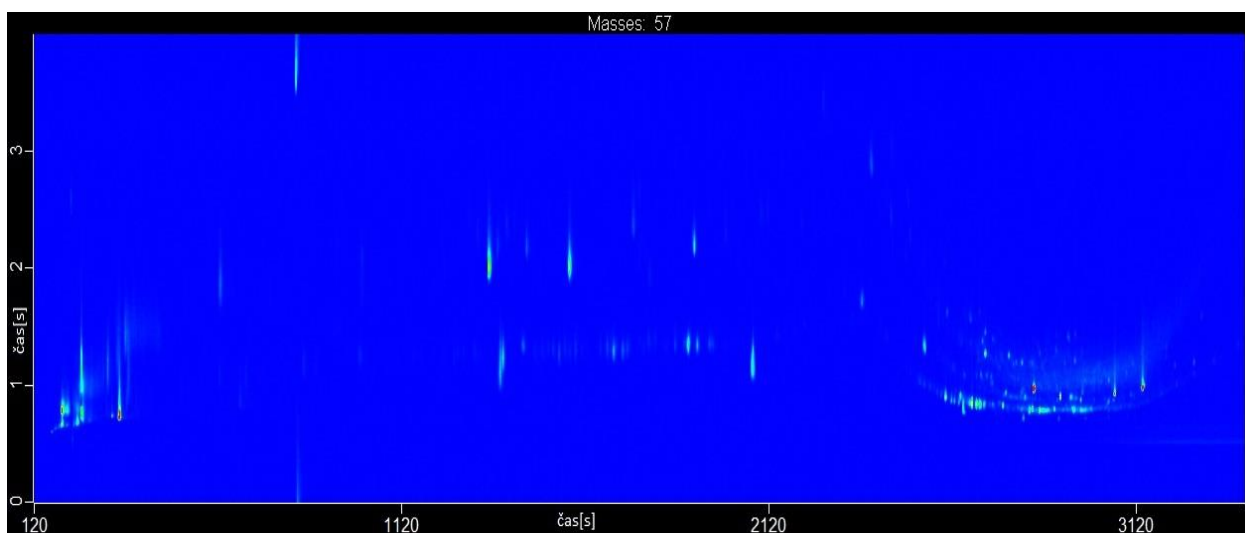
Obrázek 64: Vzorek S23



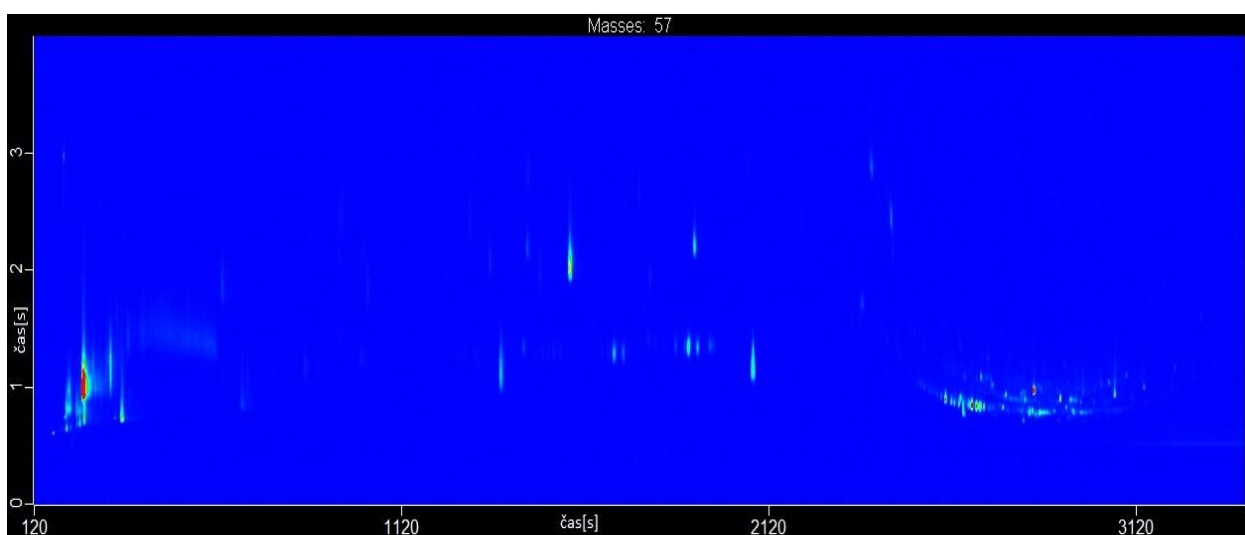
Obrázek 65: Vzorek 24



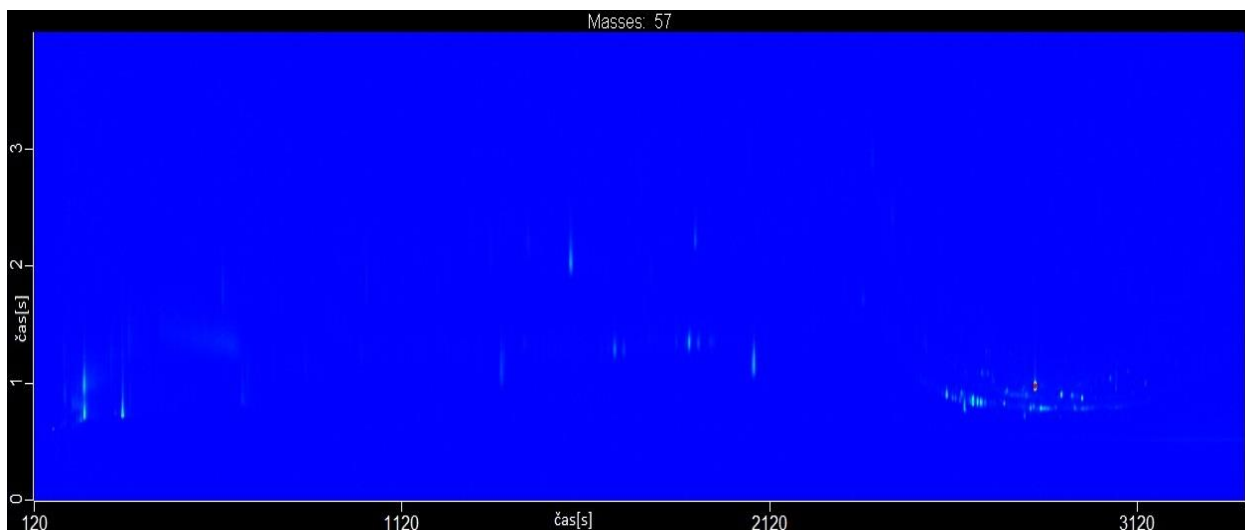
Obrázek 66: Vzorek S24



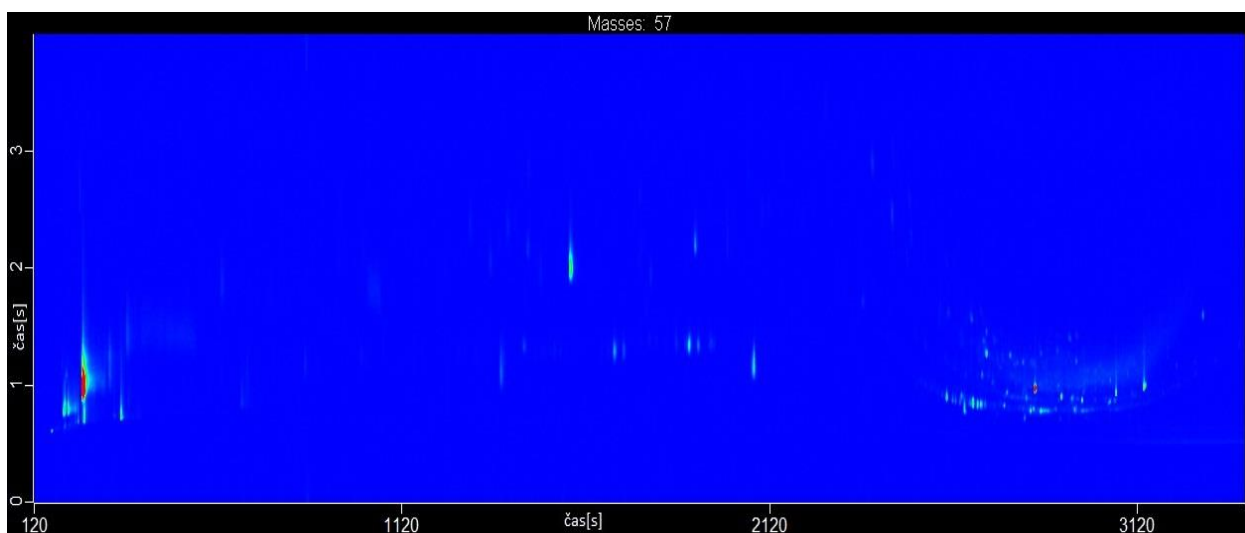
Obrázek 67: Vzorek 78



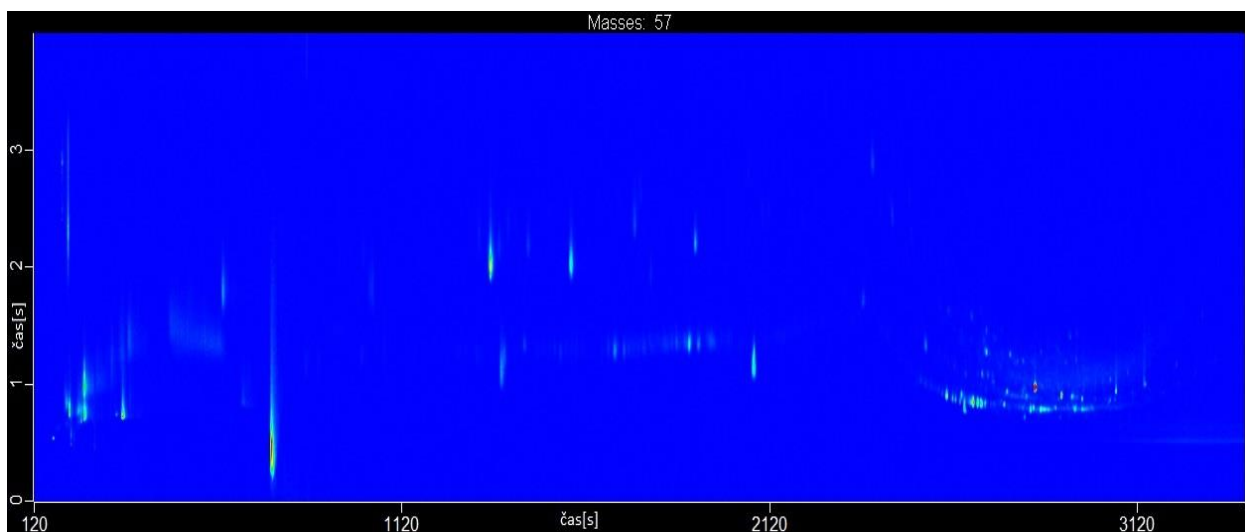
Obrázek 68: Vzorek S78



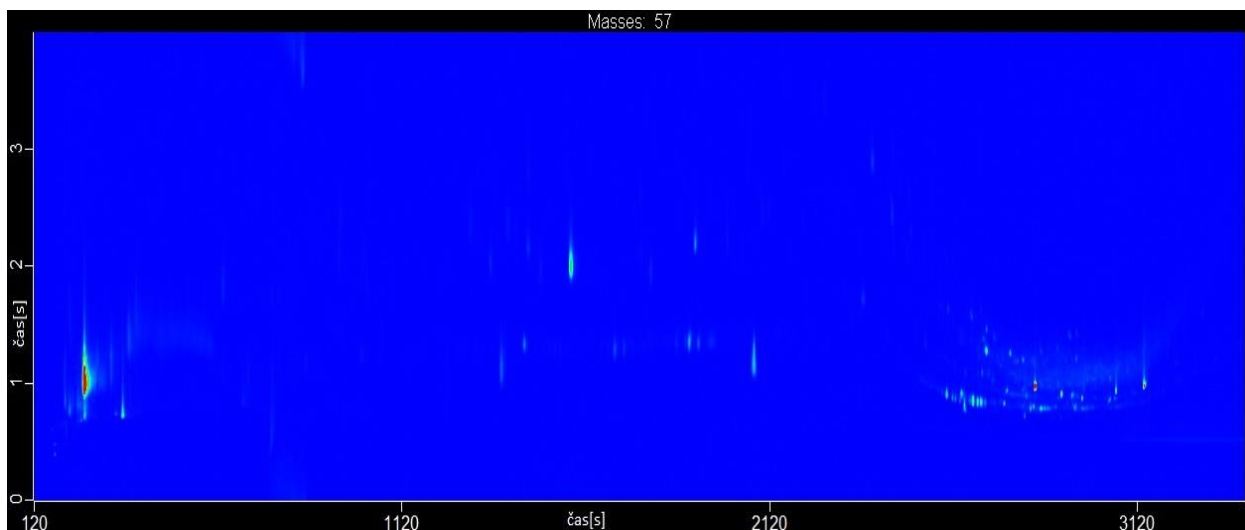
Obrázek 69: Vzorek 79



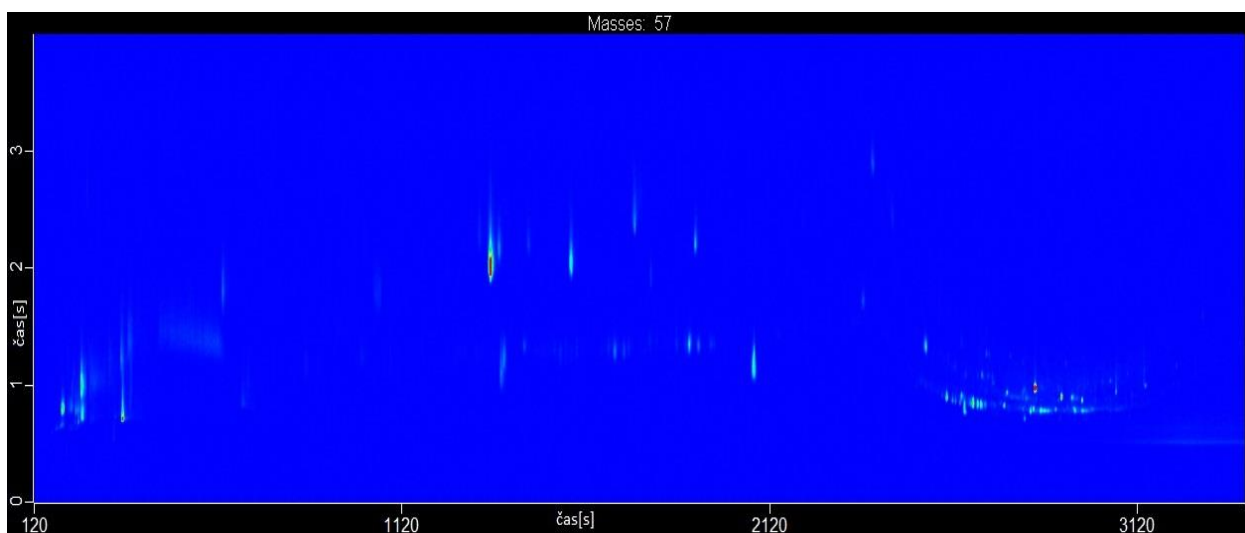
Obrázek 70: Vzorek S79



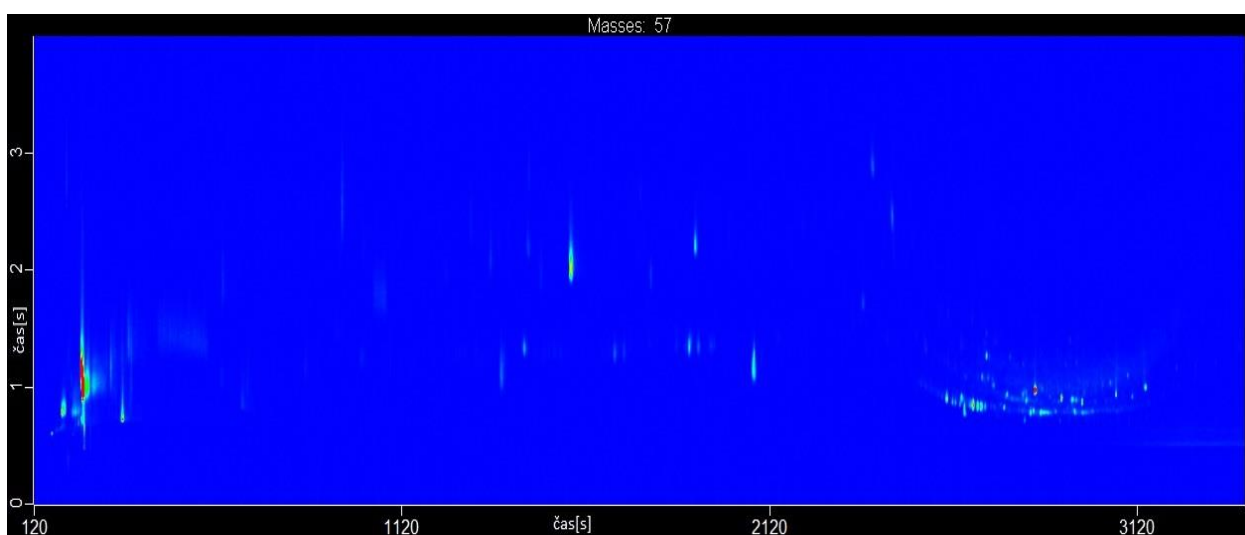
Obrázek 71: Vzorek 80



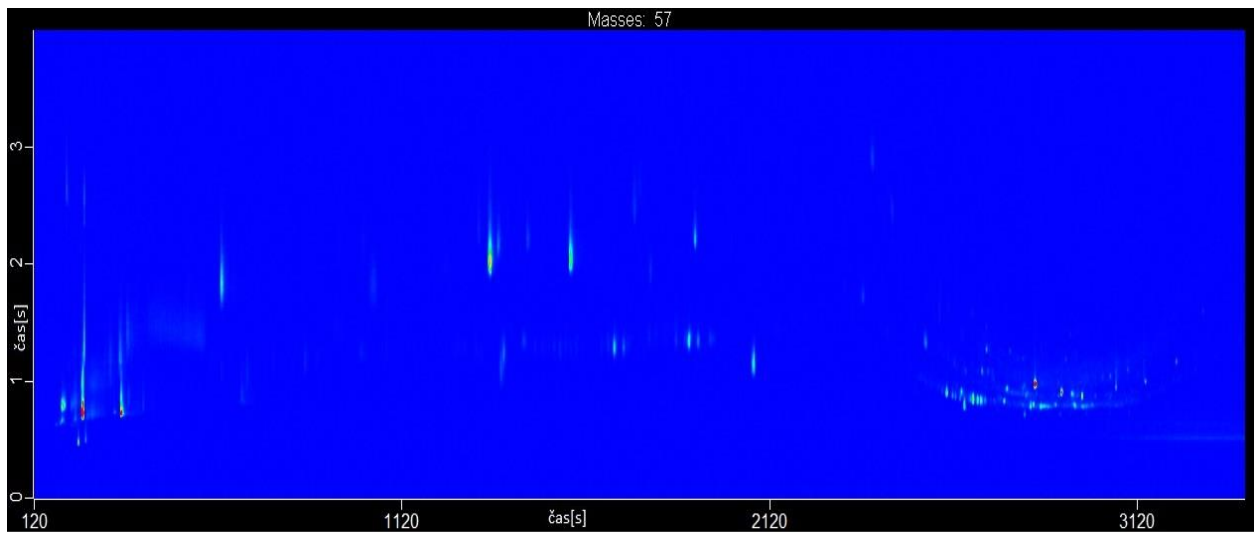
Obrázek 72: Vzorek S80



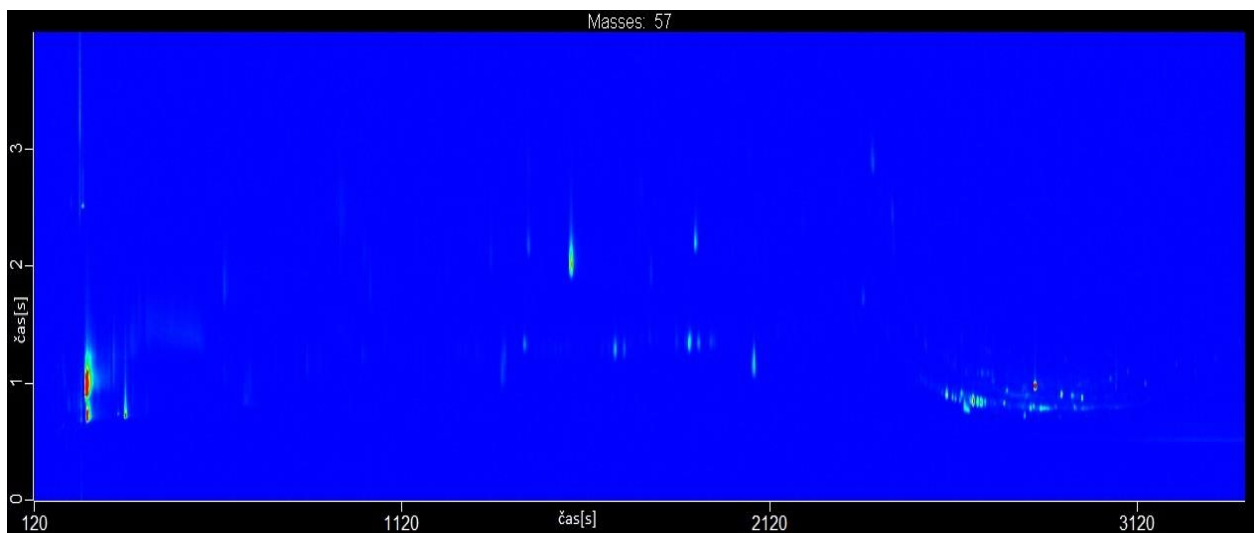
Obrázek 73: Vzorek 82



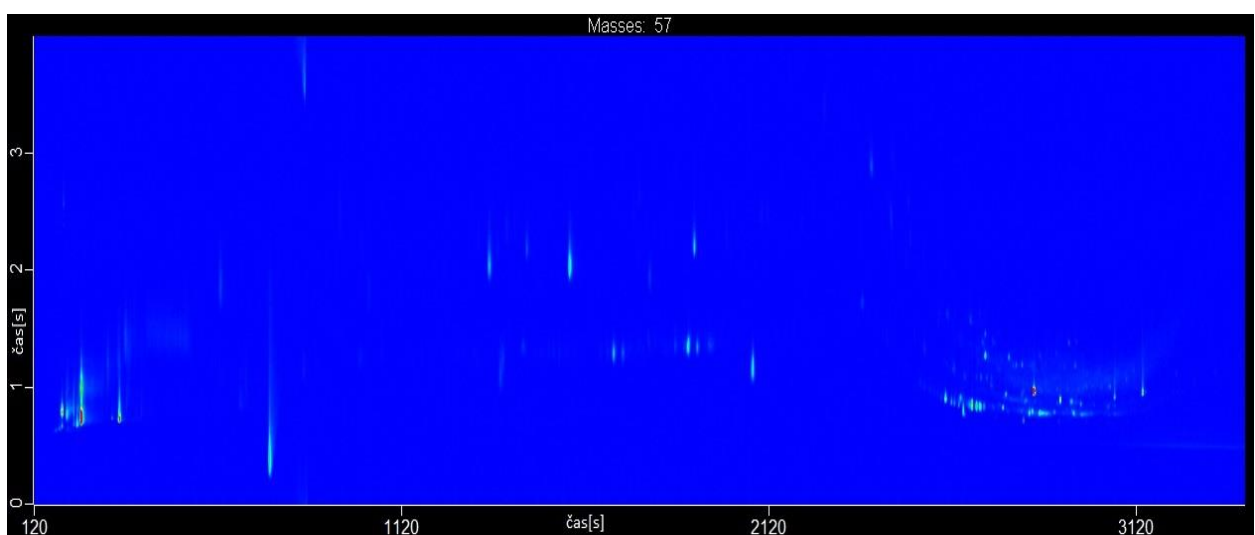
Obrázek 74: Vzorek S82



Obrázek 75: Vzorek 83




Obrázek 76: Vzorek S83



Obrázek 77: Vzorek 84

8.3. Tabulky identifikovaných sloučenin

Legenda k tabulkám:

	Vzorky, které nebyly dodány, nebo se jen nepodařilo změřit.
–	Vzorky ve kterých nebyla daná sloučenina nalezena
CsA	Inhibitor, Cyklosporin A
FK506	Inhibitor, Takrolimus
TPCA	Inhibitor, 2-(Karbamoylamino)-5-(4-fluorofenyl)-3-thiofenkarboxamid
LPS	Stimulant, bakteriální lipopolysacharid
ZYM	Stimulant, kvasinkový zymosan

Tabulka 10: 1,1-Ethandiol, diacetát

DÁRCE 1	Bez inhibitoru		CsA		FK506		TPCA	
	Plocha píku							
	Buňky	Médium	Buňky	Médium	Buňky	Médium	Buňky	Médium
Nestimulované	1	S1	12 216	8 760 827	60 588	–	43 647	6 959 792
LPS	–	–	6	–	–	7 665 484	106 961	–
ZYM	–	6 662 128	–	5 650 767	–	6 910 971	–	5 282 750
DÁRCE 2								
Nestimulované	13	100 607	–	–	–	–	–	1 960 725
LPS	15 533	131 459	–	6 929 973	19	–	–	2 938 896
ZYM	–	547 385	–	2 375 715	–	86 251	–	9 474,3
ZKUŠEBNÍ SADA								
–	77	S77	–	–	–	2 659 221	–	2 292 826
–	81	S81	–	–	–	385 657	–	S84

Tabulka 11: Okt-1-en-3-ol

DÁRCE 1	Bez inhibitoru		CsA		FK506		TPCA	
	Plocha píku							
	Buňky	Médium	Buňky	Médium	Buňky	Médium	Buňky	Médium
Nestimulované	1	S1	929 979	–	1 789 239	–	1 126 194	–
LPS	–	–	6	–	794 220	–	929 217	–
ZYM	412 993	–	654 542	–	237 691	–	905 075	–
DÁRCE 2								
Nestimulované	13	–	–	–	96 008	–	470 654	–
LPS	–	–	–	–	19	–	49 420	–
ZYM	–	–	–	–	–	–	54 933	–
ZKUŠEBNÍ SADA								
–	77	S77	354 825	–	–	–	–	–
–	81	S81	786 511	–	–	–	60 412	S84

Tabulka 12: Butan-2-on

DÁRCE 1	Bez inhibitoru		CsA		FK506		TPCA	
	Plocha píku							
	Buňky	Médium	Buňky	Médium	Buňky	Médium	Buňky	Médium
Nestimulované	1	S1	–	51 427 456	1 186 079	45 776 414	6 510 559	7 821 693
LPS	2 461 935	42 537 127	6	63 641 790	–	115 376 110	–	147 742 538
ZYM	515 827	9 460 995	944 264	7 271 648	171 697	21 292 597	656 438	2 958 662
DÁRCE 2								
Nestimulované	13	7 168 414	1 020 702	48 818 013	2 811 097	25 001 218	973 928	4 393 976
LPS	–	8 870 472	11 984 040	8 250 308	19	3 661 079	–	–
ZYM	190 900	6 564 072	–	2 467 767	114 276	7 286 825	2 409 360	6 606 115
ZKUŠEBNÍ SADA								
–	77	S77	–	30 709 185	–	6 056 012	–	1 246 818
–	81	S81	–	26 700 406	–	5 754 810	5 542 139	S84

Tabulka 13: 2-Propanamin

DÁRCE 1	Bez inhibitoru		CsA		FK506		TPCA	
	Plocha píku							
	Buňky	Médium	Buňky	Médium	Buňky	Médium	Buňky	Médium
Nestimulované	1	S1	186 236	–	184 714	–	635 743	–
LPS	–	139 799	6	136 146	–	–	112 805	55 474
ZYM	–	–	–	44 299	–	73 855	166 906	30 949
DÁRCE 2								
Nestimulované	13	–	–	–	–	–	–	–
LPS	56 220	–	–	102 682	19	324 263	37 739	–
ZYM	37 454	–	14 643	–	–	–	–	–
ZKUŠEBNÍ SADA								
–	77	S77	15 214	–	119 080	–	–	–
–	81	S81	–	–	–	–	8 834	S84

Tabulka 14: Prop-2-enal

DÁRCE 1	Bez inhibitoru		CsA		FK506		TPCA	
	Plocha píku							
	Buňky	Médium	Buňky	Médium	Buňky	Médium	Buňky	Médium
Nestimulované	1	S1	–	30 470	–	–	–	–
LPS	14 187	–	6	69 283	116 177	21 759	73 783	84 149
ZYM	–	–	–	–	–	–	36 920	21 622
DÁRCE 2								
Nestimulované	13	–	–	–	–	–	832 739	178 068
LPS	127 213	105 784	162 004	38 789	19	75 743	37 200	–
ZYM	–	–	10 067	–	–	–	–	–
ZKUŠEBNÍ SADA								
–	77	S77	25 573	–	–	–	39 521	39 932
–	81	S81	–	–	–	–	–	S84

Tabulka 15: 3-Dodecen

DÁRCE 1	Bez inhibitoru		CsA		FK506		TPCA	
	Plocha píku							
	Buňky	Médium	Buňky	Médium	Buňky	Médium	Buňky	Médium
Nestimulované	1	S1	14539	–	19053	39617	–	–
LPS	7391,3	12404	6	24798	–	7930,4	18299	–
ZYM	12024	28224	14386	8778,7	10114	15957	14908	–
DÁRCE 2								
Nestimulované	13	–	–	–	–	9 333,3	–	–
LPS	–	7 564,6	–	–	19	–	–	6 125
ZYM	–	24 587	11 710	4 304,1	–	–	10 930	8 924,6
ZKUŠEBNÍ SADA								
–	77	S77	5 440	5 135,1	–	4 259,6	–	–
–	81	S81	7 824,9	3 109,2	5 832,1	4 526	10 075	S84

Tabulka 16: 2,6-Dimethylokt-7-en-2-ol

DÁRCE 1	Bez inhibitoru		CsA		FK506		TPCA	
	Plocha píku							
	Buňky	Médium	Buňky	Médium	Buňky	Médium	Buňky	Médium
Nestimulované	1	S1	101 350	101 287	–	70 473	136 688	–
LPS	89 835	3 634,1	6	66 625	54 402	–	–	122 050
ZYM	75 886	90 512	108 289	–	317 637	79 921	152 693	11 566
DÁRCE 2								
Nestimulované	13	–	–	127 547	–	–	111 108	71 394
LPS	–	–	84 297	9 471,6	19	–	–	–
ZYM	–	–	28 433	–	–	–	–	–
ZKUŠEBNÍ SADA								
–	77	S77	–	–	–	–	–	–
–	81	S81	–	8 772,5	–	–	–	S84

Tabulka 17: Acetofenon

DÁRCE 1	Bez inhibitoru		CsA		FK506		TPCA	
	Plocha píku							
	Buňky	Médium	Buňky	Médium	Buňky	Médium	Buňky	Médium
Nestimulované	1	S1	56522	180814	37227	–	14667	55442
LPS	–	119408	6	176424	–	128060	–	333269
ZYM	28479	94044	–	8191,2	–	38858	–	165454
DÁRCE 2								
Nestimulované	13	–	–	31 668	–	74 659	234 289	350 263
LPS	–	293 695	104 713	140 527	19	82 979	–	81 490
ZYM	–	154 904	37 885	119 231	–	25 514	–	97 019
ZKUŠEBNÍ SADA								
–	77	S77	–	18 147	–	–	–	29 135
–	81	S81	–	77 161	–	39 721	–	S84

Tabulka 18: Fenylacetaldehyd

DÁRCE 1	Bez inhibitoru		CsA		FK506		TPCA	
	Plocha píku							
	Buňky	Médium	Buňky	Médium	Buňky	Médium	Buňky	Médium
Nestimulované	1	S1	–	137 022	–	100 993	–	66 967
LPS	–	12 098	6	–	–	31 142	–	90 462
ZYM	–	–	–	–	–	21 731	–	–
DÁRCE 2								
Nestimulované	13	43 261	–	19 604	–	–	1 144 209	378 453
LPS	55 543	–	137 400	12 963	19	–	–	–
ZYM	–	81 622	–	31 705	–	–	–	29 346
ZKUŠEBNÍ SADA								
–	77	S77	–	–	–	29 978	–	–
–	81	S81	–	–	–	–	–	S84

Tabulka 19: Dimethyl sulfid

DÁRCE 1	Bez inhibitoru		CsA		FK506		TPCA	
	Plocha píku							
	Buňky	Médium	Buňky	Médium	Buňky	Médium	Buňky	Médium
Nestimulované	1	S1	4 289 093	1 704 730	4 487 618	1 042 425	2 120 432	4 782 229
LPS	–	–	6	188 733	665 994	5 290 456	1 086 861	577 103
ZYM	–	–	2 102 319	797 386	3 336 466	5 166 729	1 157 587	2 090 487
DÁRCE 2								
Nestimulované	13	–	674 694	813 652	2 168 415	167 044	831 508	650 125
LPS	–	25 953	188 858	2 962 133	19	–	91 586	58 653
ZYM	–	27 195	2 895 051	2 728 048	152 419	2 419 966	45 750	1 305 132
ZKUŠEBNÍ SADA								
–	77	S77	–	–	–	–	1 605 893	66 093
–	81	S81	–	–	–	27 247	1 795 228	S84

Tabulka 20: Dimethyl sulfoxid

DÁRCE 1	Bez inhibitoru		CsA		FK506		TPCA	
	Plocha píku							
	Buňky	Médium	Buňky	Médium	Buňky	Médium	Buňky	Médium
Nestimulované	1	S1	54 759 602	2 365 504	20 573 037	4 386 419	99 855 353	42 412 313
LPS	–	–	6	65 421 896	53 857 469	63 243 914	157 244	7 959 226
ZYM	–	–	9 758 639	–	180 193 852	41 423 070	1 903 876	7 661 657
DÁRCE 2								
Nestimulované	13	–	106 597 187	36 323 704	632 495	–	63 472 589	10 847 986
LPS	–	–	82 783 274	26 192 054	19	–	124 778	–
ZYM	–	–	48 859 645	–	–	662 915	46 373	–
ZKUŠEBNÍ SADA								
–	77	S77	–	–	–	–	2 601 733	20 141
–	81	S81	–	–	–	–	15 927 868	S84

Tabulka 21: N,N -Dibutylformamid

DÁRCE 1	Bez inhibitoru		CsA		FK506		TPCA	
	Plocha píku							
	Buňky	Médium	Buňky	Médium	Buňky	Médium	Buňky	Médium
Nestimulované	1	S1	178 660	94 669	87 067	67 728	153 900	99 523
LPS	109 549	118 591	6	91 912	184 060	100 407	205 436	82 148
ZYM	102 421	99 281	155 653	141 328	206 811	128 480	190 465	79 233
DÁRCE 2								
Nestimulované	13	66 197	81 057	117 094	103 722	112 994	111 465	180 074
LPS	221 064	175 173	–	152 762	19	54 216	37 483	82 206
ZYM	40 538	68 457	83 391	59 609	57 940	52 982	41 395	74 758
ZKUŠEBNÍ SADA								
–	77	S77	40 334	70 510	20 775	53 594	40 222	56 107
–	81	S81	43 136	54 010	–	48 692	35 601	S84

Tabulka 22: Diisobutyl glutarát

DÁRCE 1	Bez inhibitoru		CsA		FK506		TPCA	
	Plocha píku							
	Buňky	Médium	Buňky	Médium	Buňky	Médium	Buňky	Médium
Nestimulované	1	S1	52 039	23 893	8 426	–	–	–
LPS	–	72 591	6	–	64 390	–	105 243	232 592
ZYM	–	–	–	134 269	–	254 024	187 112	125 431
DÁRCE 2								
Nestimulované	13	22 753	–	56 168	41 128	130 214	–	89 214
LPS	103 055	34 076	39 217	5 209	19	–	–	–
ZYM	–	–	–	–	–	–	–	–
ZKUŠEBNÍ SADA								
–	77	S77	–	–	–	–	–	–
–	81	S81	–	–	–	–	–	S84

Tabulka 23: Ethyl formiát

DÁRCE 1	Bez inhibitoru		CsA		FK506		TPCA	
	Plocha píku							
	Buňky	Médium	Buňky	Médium	Buňky	Médium	Buňky	Médium
Nestimulované	1	S1	–	56 458	7 997 921	15 601	–	–
LPS	18 171 536	–	6	90 229	–	7 998 722	–	50 153 022
ZYM	27 555	–	–	–	–	–	–	805 968
DÁRCE 2								
Nestimulované	13	55 429	21 112	–	–	6 368 116	–	–
LPS	–	–	–	8 799	19	5 330 754	–	–
ZYM	–	–	–	18 753	151 032	–	1 279 284	152 309
ZKUŠEBNÍ SADA								
–	77	S77	242 272	4 386 473	8 193 131	7 599 960	–	772 585
–	81	S81	1 170 333	1 095 960	696 711	–	–	S84

Tabulka 24: 3,5-Dimethylóktan

DÁRCE 1	Bez inhibitoru		CsA		FK506		TPCA	
	Plocha píku							
	Buňky	Médium	Buňky	Médium	Buňky	Médium	Buňky	Médium
Nestimulované	1	S1	133 614	145 385	282 851	–	184 129	228 871
LPS	194 007	81 354	6	207 218	314 136	220 874	176 924	35 970
ZYM	201 101	175 144	–	–	70 120	370 537	151 665	132 989
DÁRCE 2								
Nestimulované	13	141 855	147 484	–	286 563	167 903	–	184 439
LPS	–	85 712	258 026	–	19	59 247	–	–
ZYM	46 780	183 071	87 136	97 301	133 768	119 705	108 156	137 607
ZKUŠEBNÍ SADA								
–	77	S77	110 178	42 761	–	102 951	65 180	108 607
–	81	S81	94 890	73 433	–	114 056	120 388	S84

Tabulka 25: 1-Oktoxyktan

DÁRCE 1	Bez inhibitoru		CsA		FK506		TPCA	
	Plocha píku							
	Buňky	Médium	Buňky	Médium	Buňky	Médium	Buňky	Médium
Nestimulované	1	S1	39 170	16 252	10 750	–	23 751	12 268
LPS	8 882	8 861,4	6	90 307	23 370	16 813	27 018	19 871
ZYM	11 621	21 738	6 711	14 147	154 133	339 403	113 386,0	73 571
DÁRCE 2								
Nestimulované	13	10 517	7 681	17 776	12 414	13 552	21 368	13 413
LPS	18 303	7 132,8	9 451,2	9 510,9	19	3 777,8	–	–
ZYM	–	–	10 608	–	3 893,5	–	3 745,1	–
ZKUŠEBNÍ SADA								
–	77	S77	–	13 040	–	–	–	3 253,3
–	81	S81	–	3 554,2	–	–	–	S84

Tabulka 26: 3-Ethylhexan

DÁRCE 1	Bez inhibitoru		CsA		FK506		TPCA	
	Plocha píku							
	Buňky	Médium	Buňky	Médium	Buňky	Médium	Buňky	Médium
Nestimulované	1	S1	–	–	979 887	–	146 996	380 950
LPS	105 233	155 243	6	48 576	–	148 664	–	–
ZYM	–	54 657	233 947	115 326	270 575	–	–	47 866
DÁRCE 2								
Nestimulované	13	–	180 242	–	–	43 351	–	156 469
LPS	–	49 172	266 391	–	19	23 359	–	–
ZYM	–	161 882	–	13 766	–	69 529	–	–
ZKUŠEBNÍ SADA								
–	77	S77	–	17 449	–	44 020	–	–
–	81	S81	–	–	–	–	–	S84

Tabulka 27: Dl-Alanyl-l-Alanin

DÁRCE 1	Bez inhibitoru		CsA		FK506		TPCA	
	Plocha píku							
	Buňky	Médium	Buňky	Médium	Buňky	Médium	Buňky	Médium
Nestimulované	1	S1	–	–	–	–	121 913	–
LPS	19700	–	6	–	–	55 225	–	102 811
ZYM	171 765	–	101 958	11 601	–	9 831	–	163 484
DÁRCE 2								
Nestimulované	13	13 479	182 100	78 355	59 196	68 265	36 420	162 591
LPS	64 076	–	–	9 475	19	102 621	27 442	–
ZYM	96 105	–	53 094	–	15 023	22 819	–	27 455
ZKUŠEBNÍ SADA								
–	77	S77	56 678	69 672	78 132	–	23 239	–
–	81	S81	–	145 770	45 775	33 030	–	S84

Tabulka 28: Dodekanal

DÁRCE 1	Bez inhibitoru		CsA		FK506		TPCA	
	Plocha píku							
	Buňky	Médium	Buňky	Médium	Buňky	Médium	Buňky	Médium
Nestimulované	1	S1	68 512	7 449	–	–	98 378	92 632
LPS	16 060	81 461	6	112 020	134 915	68 605	151 453	104 332
ZYM	57 754	94 604	94 764	112 506	105 828	176 639	229 158	114 676
DÁRCE 2								
Nestimulované	13	34 081	19 730	27 260	–	89 790	–	–
LPS	11 960	30 960	40 962	129 490,0	19	–	–	–
ZYM	–	–	–	96 739	–	53 145	195 627	45 617
ZKUŠEBNÍ SADA								
–	77	S77	75 104	66 544	37 753	48 344	–	–
–	81	S81	80 753	–	–	–	–	S84

Tabulka 29: Hexadekanová kyselina

DÁRCE 1	Bez inhibitoru		CsA		FK506		TPCA	
	Plocha píku							
	Buňky	Médium	Buňky	Médium	Buňky	Médium	Buňky	Médium
Nestimulované	1	S1	–	–	–	–	–	–
LPS	–	40 829	6	18 299	144 826	34 435	302 089	231 132
ZYM	6 800	63 207	–	–	–	300 560	179 234	65 804
DÁRCE 2								
Nestimulované	13	44 160	63 526	–	–	–	498 723	–
LPS	–	850 397	163 835	169 069	19	172 140	90 316	179 240
ZYM	157 062	364 997	321 682	142 802	6 794	112 991	127 769	200 555
ZKUŠEBNÍ SADA								
–	77	S77	180 343	76 599	5 414	154 549	49 634	150 891
–	81	S81	22 821	54 349	–	–	–	S84

Tabulka 30: Nonadekan

DÁRCE 1	Bez inhibitoru		CsA		FK506		TPCA	
	Plocha píku							
	Buňky	Médium	Buňky	Médium	Buňky	Médium	Buňky	Médium
Nestimulované	1	S1	17 216	17 996	19 130	27 075	–	26 153
LPS	16 434	–	6	9 164,5	19 766	24 395	48 069	–
ZYM	18 730	24 872	–	–	28 913	–	7 300,8	42 214
DÁRCE 2								
Nestimulované	13	32 190	15 550	22 932	23 918	–	–	–
LPS	31 226	–	34 838	–	19	31 815	39 831	–
ZYM	11 689	–	–	15 332	40 148	–	–	44 811
ZKUŠEBNÍ SADA								
–	77	S77	56 320	–	–	–	45 925	30 193
–	81	S81	–	31 840	16 597	24 945	15 216	S84

Tabulka 31: Triacetin

DÁRCE 1	Bez inhibitoru		CsA		FK506		TPCA	
	Plocha píku							
	Buňky	Médium	Buňky	Médium	Buňky	Médium	Buňky	Médium
Nestimulované	1	S1	325 206	–	32 381	–	119 101	60 860
LPS	89 194	17 722	6	162 294	–	–	39 169	35 126
ZYM	–	–	79 470	23 450	99 673	352 077	407 000	245 929
DÁRCE 2								
Nestimulované	13	–	–	26 903	9 540	58 413	–	–
LPS	–	–	–	–	19	–	–	–
ZYM	–	–	–	–	–	–	–	–
ZKUŠEBNÍ SADA								
–	77	S77	–	–	–	–	–	–
–	81	S81	–	–	–	–	–	S84

Tabulka 32: Tridekan

DÁRCE 1	Bez inhibitoru		CsA		FK506		TPCA	
	Plocha píku							
	Buňky	Médium	Buňky	Médium	Buňky	Médium	Buňky	Médium
Nestimulované	1	S1	–	–	–	–	54 250	62 313
LPS	55 639	–	6	–	56 267	69 563	119 737	–
ZYM	58 143	–	66 590	46 254	–	99 061	–	97 126
DÁRCE 2								
Nestimulované	13	–	1 876	26 629	–	1 796	–	64 438
LPS	–	66 659	64 680	61 972	19	–	–	–
ZYM	–	–	39 424	30 157	–	33 119	–	39 226
ZKUŠEBNÍ SADA								
–	77	S77	38 100	–	29 496	–	–	50 908
–	81	S81	12 812	37 981	–	37 749	–	S84

Tabulka 33: 4-Methylundekan

DÁRCE 1	Bez inhibitoru		CsA		FK506		TPCA	
	Plocha píku							
	Buňky	Médium	Buňky	Médium	Buňky	Médium	Buňky	Médium
Nestimulované	1	S1	–	–	48 050	33 582	43 472	30 062
LPS	–	47 140	6	59 434	64 893	38 738	105 744	55 275
ZYM	32 305	49 204	94 288	–	71 656	85 909	29 509	44 071
DÁRCE 2								
Nestimulované	13	–	71 769	–	–	52 390	49 289	48 838
LPS	50 608	48 169	–	–	19	–	–	–
ZYM	–	43 683	–	28 095	32 156	29 164	–	–
ZKUŠEBNÍ SADA								
–	77	S77	–	–	21 696	–	12 894	–
–	81	S81	–	12 765	–	–	–	S84

Tabulka 34: Undekanal

DÁRCE 1	Bez inhibitoru		CsA		FK506		TPCA	
	Plocha píku							
	Buňky	Médium	Buňky	Médium	Buňky	Médium	Buňky	Médium
Nestimulované	1	S1	–	–	–	–	–	–
LPS	–	–	6	26 849	11 332	15 750	29 579	28 981
ZYM	12 953	–	14 587	13 324	21 800	19 653	16 748	19 475
DÁRCE 2								
Nestimulované	13	6 320,4	10 517	12 912	6 079,4	6 919,9	15 724	5 953
LPS	11 739	–	–	–	19	–	–	–
ZYM	10 069	16 379	8 195,6	21 361	–	1 956	–	5 748
ZKUŠEBNÍ SADA								
–	77	S77	3 358	–	–	–	–	–
–	81	S81	–	–	–	–	–	S84