

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická

Stanovení vybraných tříd sfingolipidů v lidské plazmě pomocí hmotnostní  
spektrometrie

Bc. Denisa Kolářová

Diplomová práce  
2021

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2020/2021

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Denisa Kolářová**  
Osobní číslo: **C19568**  
Studijní program: **N1407 Chemie**  
Studijní obor: **Analytická chemie**  
Téma práce: **Stanovení vybraných tříd sfingolipidů v lidské plazmě pomocí hmotnostní spektrometrie**  
Zadávací katedra: **Katedra analytické chemie**

### Zásady pro vypracování

1. Vypracujte literární rešerši zaměřenou na lipidy zejména z kategorie sfingolipidů, diskutujte jejich biologickou důležitost a možnosti jejich analýzy s využitím hmotnostní spektrometrie včetně správné přípravy vzorku a parametrů validace metody.
2. Zoptimalizujte metodu pro kvantitativní analýzu sfingomyelinů společně s koncentračně méně zastoupenými sfingolipidy jako jsou např. ceramidy, hexosylceramidy a dihexosylceramidy v extraktu lidské plasmy s využitím „shotgun“ přístupu na trojitém kvadrupólu a zavedením vzorku pomocí průtokové injekční analýzy.
3. Zoptimalizovanou metodu validujte a aplikujte pro stanovení koncentrací vybraných sfingolipidů ve standardním referenčním materiálu NIST SRM 1950 (metabolity ve zmrazené lidské plazmě) a srovnajte výsledky s dostupnými daty z literatury.

Rozsah pracovní zprávy:  
Rozsah grafických prací:  
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Podle pokynů vedoucího práce.

Vedoucí diplomové práce: **Ing. Robert Jirásko, Ph.D.**  
Katedra analytické chemie

Konzultanti diplomové práce: **prof. Ing. Michal Holčapek, Ph.D.**  
Katedra analytické chemie  
**Mgr. Jakub Idkowiak**  
Katedra analytické chemie

Datum zadání diplomové práce: **5. února 2021**  
Termín odevzdání diplomové práce: **7. května 2021**

L.S.

---

**prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.**  
děkan

---

**prof. Ing. Karel Ventura, CSc.**  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2021

Prohlašuji:

Práci s názvem Stanovení vybraných tříd sfingolipidů v lidské plazmě pomocí hmotnostní spektrometrie jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 14. 7. 2021

Bc. Denisa Kolářová

## **PODĚKOVÁNÍ**

Ráda bych poděkovala vedoucímu mé diplomové práce Ing. Robertu Jiráskovi, Ph.D. za odborné vedení, ochotu a cenné rady při zpracování této práce. Rovněž bych chtěla poděkovat Mgr. Ing. Jakubu Idkowiakovi za jeho trpělivost a věnovaný čas zejména při práci v laboratoři. Dále bych chtěla poděkovat celé skupině hmotnostní spektrometrie vedené prof. Ing. Michalem Holčapkem, Ph.D. za veškeré rady, které mi poskytli. Zvláštní poděkování patří mé rodině za podporu po celou dobu studia.

## **ANOTACE**

Diplomová práce se zabývá vývojem shotgun metody, kde je vzorek do hmotnostního spektrometru zaváděn pomocí průtokové injekční analýzy, pro kvantitativní analýzu sfingomyelinů, ceramidů, hexosylceramidů a dihexosylceramidů v lidské plazmě. V teoretické části jsou nejprve shrnuty základní informace o lipidech, zejména sfingolipidech, hmotnostní spektrometrii, lipidomice a validaci analytické metody. Cílem práce bylo optimalizovat a validovat metodu, aplikovat ji pro stanovení koncentrací vybraných sfingolipidů ve standardním referenčním materiálu NIST SRM 1950 a výsledky porovnat s dostupnými údaji v literatuře. Optimalizovaná metoda byla finálně použita pro měření malé kohorty klinických vzorků zahrnující plazmu pacientů s kolorektálním karcinomem a zdravých kontrol.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

hmotnostní spektrometrie, lipidomika, rakovina, sfingolipidy, shotgun, validace

## **TITLE**

Determination of selected classes of sphingolipids in human plasma by mass spectrometry

## **ANNOTATION**

The diploma thesis focuses on the development of a shotgun method, where the sample is introduced to a mass spectrometer by flow injection analysis, for quantitative analysis of sphingomyelins, ceramides, hexosylceramides and dihexosylceramides in human plasma. The theoretical part summarises the basic information about lipids, particularly sphingolipids, mass spectrometry, lipidomics, and validation of the analytical method. The aim of the work was to optimize and validate the method, apply it to determine the concentrations of selected sphingolipids in the NIST SRM 1950 standard reference material, and compare the obtained results with available data in the literature. The optimized method was finally used for a small clinical cohort including plasma samples of healthy controls and patients with colorectal carcinoma.

## **KEYWORDS**

mass spectrometry, lipidomics, cancer, sphingolipids, shotgun, validation

# OBSAH

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK.....	10
SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK .....	13
ÚVOD.....	17
1. TEORETICKÁ ČÁST .....	19
1.1. Lipidy.....	19
1.1.1 Klasifikace lipidů.....	20
1.1.1.1. Mastné acyly .....	20
1.1.1.2. Glycerolipidy .....	21
1.1.1.3. Glycerofosfolipidy .....	22
1.1.1.4. Sfingolipidy .....	24
1.1.1.4.1. Sfingoidní báze .....	25
1.1.1.4.2. Ceramidy.....	25
1.1.1.4.3. Fosfosfingolipidy .....	26
1.1.1.4.4. Glykosfingolipidy .....	27
1.1.1.5. Ostatní kategorie lipidů.....	29
1.2. Hmotnostní spektrometrie.....	30
1.2.1. Princip hmotnostní spektrometrie .....	30
1.2.2. Ionizační techniky.....	31
1.2.2.1. Ionizace za atmosférického tlaku.....	31
1.2.2.1.1. Ionizace elektrosprejem .....	31
1.2.2.1.2. Chemická ionizace za atmosférického tlaku.....	33
1.2.2.1.3. Fotoionizace za atmosférického tlaku.....	33
1.2.2.2. Ionizace laserem za účasti matrice.....	34
1.2.3. Hmotnostní analyzátory .....	34
1.2.3.1. Kvadrupólový analyzátor.....	35
1.2.3.1.1. Trojitý kvadrupólový analyzátor .....	35
1.2.3.1.1.1. Sken produktových iontů .....	36
1.2.3.1.1.2. Sken iontů prekurzoru.....	36
1.2.3.1.1.3. Sken neutrálních ztrát .....	37
1.2.3.1.1.4. Sken vybraných iontových reakcí.....	37
1.2.3.2. Iontová past.....	38

1.2.3.2.1.	3D Iontová past .....	38
1.2.3.2.2.	Lineární iontová past .....	39
1.2.3.3.	Elektrostatická orbitální past .....	40
1.2.3.4.	Iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací .....	41
1.2.3.5.	Analyzátor doby letu.....	41
1.2.3.6.	Hybridní hmotnostní spektrometry .....	42
1.2.3.6.1.	QqTOF .....	43
1.3.	Lipidomika.....	44
1.3.1.	Příprava vzorků.....	44
1.3.2.	Metody analýzy vzorků .....	46
1.3.2.1.	Separční techniky v lipidomice.....	47
1.3.2.2.	Desorpční ionizační techniky a hmotnostně spektrometrické zobrazování .. .....	48
1.3.2.3.	Shotgun lipidomika.....	48
1.4.	Validace analytických metod v hmotnostní spektrometrii .....	52
1.4.1.	Kalibrační křivka .....	52
1.4.2.	Správnost .....	53
1.4.3.	Přesnost.....	53
1.4.4.	Extrakční výtěžnost.....	53
1.4.5.	Matriční efekt.....	53
1.4.6.	Selektivita .....	54
1.4.7.	Paměťový efekt.....	54
1.4.8.	Další parametry validace .....	54
2.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	55
2.1.	Seznam použitých chemikálií a standardů.....	55
2.2.	Přístroje a zařízení .....	55
2.3.	Anotace a nomenklatura lipidů .....	56
2.4.	Příprava směsi vnitřních standardů.....	56
2.5.	Biologické vzorky.....	57
2.6.	Kontrola kvality .....	58
2.7.	Příprava vzorku.....	58



2.7.1. Extrakce podle Folche .....	58
2.7.2. MTBE extrakce.....	58
2.7.3. Proteinové srážení s BuOH/MeOH.....	59
2.7.4. Extrakce s EtOAc.....	59
2.8. HPLC podmínky .....	60
2.9. MS podmínky – XEVO TQD .....	60
2.10. MS podmínky – QTRAP 6500 .....	60
2.11. Zpracování naměřených dat.....	61
2.12. Validace metody .....	62
2.12.1. Kalibrační křivka .....	62
2.12.2. Přesnost a správnost.....	62
2.12.3. Extrakční výtěžnost.....	63
2.12.4. Matriční efekt.....	63
2.12.5. Selektivita .....	63
2.12.6. Paměťový efekt.....	63
2.12.7. Opakovatelnost .....	64
2.13. Měření klinických vzorků plazmy .....	64
3. VÝSLEDKY A DISKUZE.....	65
3.1. Porovnání extrakčních protokolů.....	65
3.2. Optimalizace shotgun metody .....	66
3.2.1. Optimalizace HPLC podmínek.....	66
3.2.2. Optimalizace MS podmínek – XEVO TQD .....	69
3.2.3. Optimalizace MS podmínek – QTRAP 6500 .....	71
3.3. Validace metody pro biologické vzorky .....	76
3.4. Aplikace validované metody pro stanovení vybraných sfingolipidů ve standardním referenčním materiálu NIST SRM 1950 .....	86
3.5. Klinická studie kolorektálního karcinomu.....	93
ZÁVĚR .....	102
POUŽITÁ LITERATURA .....	104

## SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

<b>Obrázek 1</b> Lipidová dvojvrstva .....	19
<b>Obrázek 2</b> Strukturální vzorec mastného acylu: kyselina hexadekanová .....	20
<b>Obrázek 3</b> Příklady struktur glycerolipidů .....	22
<b>Obrázek 4</b> Struktura a hlavní třídy fosfolipidů.....	23
<b>Obrázek 5</b> Struktury sfingolipidů .....	24
<b>Obrázek 6</b> Sfingoidní báze: sfingosin (základní struktura sfingolipidů).....	25
<b>Obrázek 7</b> Obecný strukturální vzorec ceramidu .....	25
<b>Obrázek 8</b> Obecný strukturální vzorec sfingomyelinu.....	26
<b>Obrázek 9</b> Přehled chemických struktur neutrálních a kyselých GLS podtříd .....	27
<b>Obrázek 10</b> Strukturální vzorec hexosylceramidu: N-(dodekanoyl)-1-β-glukosyl-sfing-4-enin (GlcCer(d18:1/12:0)) .....	28
<b>Obrázek 11</b> Strukturální vzorec gangliosidu: GM4(d18:1/16:0) .....	29
<b>Obrázek 12</b> Strukturální vzorec sulfatidu.....	29
<b>Obrázek 13</b> Schéma hmotnostního spektrometru.....	30
<b>Obrázek 14</b> Schéma ionizace elektrosprejem.....	32
<b>Obrázek 15 a</b> Schéma chemické ionizace za atmosférického tlaku, <b>b</b> Schéma fotoionizace za atmosférického tlaku.....	33
<b>Obrázek 16</b> Schéma ionizace laserem za účasti matrice .....	34
<b>Obrázek 17</b> Schéma kvadrupólového analyzátoru .....	35
<b>Obrázek 18</b> Schématické znázornění skenu produktových iontů.....	36
<b>Obrázek 19</b> Schématické znázornění skenu iontů prekursoru .....	37
<b>Obrázek 20</b> Schématické znázornění skenu neutrálních ztrát .....	37
<b>Obrázek 21</b> Schématické znázornění skenu iontových reakcí .....	37
<b>Obrázek 22</b> Schéma 3D iontové pasti .....	38
<b>Obrázek 23</b> Schéma lineární iontové pasti .....	39
<b>Obrázek 24</b> Schéma orbitální pasti.....	40
<b>Obrázek 25</b> Schéma FT – ICR cely.....	41
<b>Obrázek 26</b> Schéma analyzátoru doby letu s reflektorem .....	42
<b>Obrázek 27</b> Schéma hybridního hmotnostního spektrometru QqTOF.....	43
<b>Obrázek 28</b> Srovnání <i>top-down</i> a <i>bottom-up</i> lipidomických přístupů.....	49
<b>Obrázek 29</b> Izotopická korekce .....	51

<b>Obrázek 30</b> ESI-MS/MS spektrum PIS $m/z$ 264,3 pro Cer při záznamu kladných iontů na XEVO TQD při finálních zoptimalizovaných podmínkách .....	70
<b>Obrázek 31</b> ESI-MS/MS spektrum PIS $m/z$ 184,1 pro SM a PC při záznamu kladných iontů na XEVO TQD při finálních zoptimalizovaných podmínkách .....	71
<b>Obrázek 32</b> Závislost intenzity na kolizní energii při měření PIS $m/z$ 264,3 (každá barva značí jedno měření).....	73
<b>Obrázek 33</b> Závislost intenzity na deklasteračním potenciálu při měření PIS $m/z$ 264,3 (každá barva značí jedno měření).....	73
<b>Obrázek 34</b> ESI-MS/MS spektrum PIS $m/z$ 264,3 pro Cer, HexCer, Hex2Cer při záznamu kladných iontů na QTRAP 6500 při finálních zoptimalizovaných podmínkách.....	74
<b>Obrázek 35</b> ESI-MS/MS spektrum PIS $m/z$ 184,1 pro SM a PC při záznamu kladných iontů na QTRAP 6500 při finálních zoptimalizovaných podmínkách.....	75
<b>Obrázek 36</b> Kalibrační křivky interních standardů <b>a</b> Cer 30:1;O <sub>2</sub> , <b>b</b> Cer 35:1;O <sub>2</sub> , <b>c</b> LacCer 30:1;O <sub>2</sub> , <b>d</b> GlcCer 30:1;O <sub>2</sub> , <b>e</b> SM 30:1;O <sub>2</sub> a <b>f</b> SM 36:2;O <sub>2</sub> d <sub>9</sub> .....	77
<b>Obrázek 37</b> Extrakční výtěžnost jednotlivých IS v IS mixu na nízké, střední a vysoké koncentrační hladině .....	83
<b>Obrázek 38</b> Matriční faktory pro jednotlivé vzorky na nízké, střední a vysoké koncentrační hladině pro interní standard Cer 30:1;O <sub>2</sub> .....	84
<b>Obrázek 39</b> Identifikované ionty [M+H] <sup>+</sup> pro Cer, HexCer a Hex2Cer v NIST plazmě, IS jsou znázorněny tučně.....	90
<b>Obrázek 40</b> Identifikované ionty [M+H] <sup>+</sup> pro SM v NIST plazmě, IS jsou znázorněny tučně .....	91
<b>Obrázek 41</b> Porovnání dat z literatury a nalezených koncentrací, přičemž koncentrace 1 byly počítány s využitím IS SM 36:2;O <sub>2</sub> d <sub>9</sub> , Cer 35:1;O <sub>2</sub> , GlcCer 30:1;O <sub>2</sub> , LacCer 30:1;O <sub>2</sub> a koncentrace 2 s využitím IS SM 30:1;O <sub>2</sub> , Cer 30:1;O <sub>2</sub> pro <b>a</b> SM a <b>b</b> Cer, HexCer, Hex2Cer .....	92
<b>Obrázek 42</b> Koncentrace vybraných sfingolipidů <b>a</b> SM 34:1;O <sub>2</sub> , <b>b</b> Cer 18:1;O <sub>2</sub> /24:0, <b>c</b> HexCer 18:1;O <sub>2</sub> /24:1, <b>d</b> Hex2Cer 18:1;O <sub>2</sub> /16:0 v QC vzorcích.....	95
<b>Obrázek 43</b> MDA pro 25 pacientů s kolorektálním karcinomem (červené tečky) a 25 zdravých kontrol (modré tečky): skóre grafy <b>a</b> nesupervizované PCA a <b>b</b> supervizované OPLS-DA.....	97
<b>Obrázek 44 a</b> Krabicové grafy a <b>b</b> cirkulární dendrogram s teplotní mapou nejvíce regulovaných sfingolipidů v lidské plazmě pacientů s kolorektálním karcinomem .....	101

<b>Tabulka 1</b> Příklady extrakčních protokolů kapalina – kapalina používaných v lipidomice....	46
<b>Tabulka 2</b> Hmotnostní a molární koncentrace vnitřních standardů včetně koncentrace jednotlivých zásobních roztoků a příslušných objemů pipetovaných do finální směsi .....	57
<b>Tabulka 3</b> Finální HPLC podmínky .....	68
<b>Tabulka 4</b> Finální podmínky optimalizace na XEVO TQD .....	69
<b>Tabulka 5</b> Finální podmínky optimalizace na QTRAP 6500 .....	72
<b>Tabulka 6</b> LOD a LOQ pro jednotlivé standardy .....	78
<b>Tabulka 7</b> Vyhodnocená přesnost jako RSD pro jednotlivé IS na nízké, střední a vysoké koncentrační hladině během dne, mezi dny a mezi operátory .....	79
<b>Tabulka 8</b> Vyhodnocená správnost pro jednotlivé IS na nízké, střední a vysoké koncentrační hladině během dne, mezi dny a mezi operátory.....	81
<b>Tabulka 9</b> Matriční efekty jednotlivých interních standardů vyjádřené jako RSD .....	84
<b>Tabulka 10</b> Selektivity jednotlivých interních standardů v 6 individuálních vzorcích .....	85
<b>Tabulka 11</b> Identifikované lipidy v NIST plazmě, jejich koncentrace a RSD mezi jednotlivými měřeními (z koncentrací a intenzit) a porovnání nalezených hodnot s literaturou .....	88
<b>Tabulka 12</b> Základní klinické údaje pacientů trpících kolorektálním karcinomem a zdravých dobrovolníků (kontrol).....	93
<b>Tabulka 13</b> Neparametrické testování získaných dat – medián, mezikvartilové napětí, míra velikosti účinku, p-hodnota a významnost .....	99

## SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

Acetyl CoA	Acetylkoenzym A (Acetylcoenzym A)
ACP	Proteinový nosič acylu (Acyl Carrier Protein)
ALEX	Analýza lipidových experimentů (Analysis of Lipid Experiments)
APCI	Chemická ionizace za atmosférického tlaku (Atmospheric Pressure Chemical Ionization)
APPI	Fotoionizace za atmosférického tlaku (Atmospheric Pressure Photoionization)
BUME	Butanol-methanol (Butanol-Methanol)
BuOH	1-Butanol (1-Butanol)
CE	Kolizní energie (Collision Energy)
Cer	Ceramidy (Ceramides)
CN:DB	Počet atomů uhlíku a dvojných vazeb (Carbon Number:Double Bonds)
DC	Stejnoseměrný proud (Direct Current)
DP	Deklasterační potenciál (Declustering Potential)
EMA	Evropská léková agentura (European Medicines Agency)
ESI	Ionizace elektroprejem (Electrospray Ionization)
ESI-MS	Ionizace elektrospřejem ve spojení s hmotnostní spektrometrií (Electrospray Ionization – Mass Spectrometry)
ESI-MS/MS	Ionizace elektrospřejem ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií (Electrospray Ionization – Tandem Mass Spectrometry)
EtOAc	Ethyl-acetát (Ethyl Acetate)
EtOH	Ethanol (Ethanol)
FA	Mastné acyly (Fatty Acyls)
FC	Míra velikosti účinku (Fold Change)
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (Federal and Drug Administration)

FIA	Průtoková injekční analýza (Flow Injection Analysis)
FT	Fourierova transformace (Fourier Transformation)
FT-ICR	Iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací (Fourier-Transform Ion Cyclotron Resonance)
Gal	Galaktóza (Galactose)
GalCer	Galaktosylceramid (Galactosylceramide)
Gal-Gal-GlcCer, Gb3	Globotriaosylceramid (Globotriaosylceramide)
GalNAc	N-acetylgalaktosamin (N-Acetylgalactosamine)
GalNAc-Gal-Gal-GlcCer, Gb4	Globotetraosylceramid (Globotetraosylceramide)
GclCer	Glukosylceramid (Glucosylceramide)
Glc	Glukóza (Glucose)
GM3	Monosialodihexosylgangliosid (Monosialodihexosyl Ganglioside)
GSL	Glykosfingolipidy (Glycosphingolipids)
Hex	Hexan (Hexane)
Hex2Cer	Dihexosylceramid (Dihexosylceramide)
HexCer	Hexosylceramid (Hexosylceramide)
HILIC	Hydrofilní kapalinová chromatografie (Hydrophilic Liquid Chromatography)
HL	Vysoká koncentrační úroveň (High Level)
HPLC-MS	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií (High-Performance Liquid Chromatography- Mass Spectrometry)
IPA	2-Propanol (2-Propanol)
IS	Vnitřní standard (Internal Standard)
IS mix	Směs vnitřních standardů (Mixture of Internal Standards)
IQR	Mezikvartilové rozpětí (Interquartile Range)
IT	Iontová past (Ion Trap)
LacCer	Laktosylceramid (Lactosylceramide)

LC-MS	Kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií (Liquid Chromatography-Mass Spectrometry)
LIT	Lineární iontová past (Linear Ion Trap)
LL	Nízká koncentrační úroveň (Low Level)
LLOQ	Dolní mez kvantifikace (Lowest Limit of Quantification)
LOD	Mez detekce (Limit of Detection)
LOQ	Mez stanovitelnosti (Limit of Quantification)
LPC	Lysofosfatidylcholin (Lysophosphatidylcholine)
MALDI	Ionizace laserem za účasti matrice (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization)
Malonyl CoA	Malonylkoenzym A (Malonylcoenzym A)
MCA	Multikanálová analýza (Multi Channel Analysis)
MDA	Vícerozměrná statistická analýza (Multivariate Data Analysis)
MeOH	Methanol (Methanol)
ML	Střední koncentrační úroveň (Medium Level)
MRM	Sledování vícenásobných reakcí (Multiple Reaction Monitoring)
MS	Hmotnostní spektrometrie (Mass Spectrometry)
MSI	Hmotnostně spektrometrické zobrazování (Mass Spectrometry Imaging)
MTBE	Methyl- <i>terc</i> -butyl ether (Methyl- <i>Tert</i> -Butyl Ether)
MW	Molekulární hmotnost (Molecular Weight)
nanoESI	Nanoelektrosprej (Nanoelectrospray)
NIST plazma	Standardní referenční materiál NIST SRM 1950 (Standard Reference Material NIST SRM 1950)
NP-LC	Kapalinová chromatografie s normální fází (Normal – Phase Liquid Chromatography)

OPLS-DA	Ortogonalní diskriminační analýza částečných nejmenších čtverců (Orthogonal Partial Least Squares – Discriminant Analysis)
PC	Fosfatidylcholin (Phosphatidylcholine)
PCA	Analýza hlavních komponent (Principal Component Analysis)
PIS	Sken iontů prekursoru (Precursor Ion Scan)
Q	Kvadrupólový analyzátor (Quadrupole mass analyzer)
q, q2	Druhý kvadrupól (Second quadrupole)
Q1	První kvadrupól (First quadrupole)
Q3	Třetí kvadrupól (Third quadrupole)
QC	Kontrola kvality (Quality control)
QqQ	Trojité kvadrupól (Triple Quadrupole)
R	Korelační koeficient (Correlation coefficient)
RF	Vysokofrekvenční (Radio Frequency)
RP-LC	Kapalinová chromatografie s reverzní fází (Reversed – Phase Liquid Chromatography)
RSD	Relativní směrodatná odchylka (Relative Standard Deviation)
SFC	Superkritická fluidní chromatografie (Supercritical Fluid Chromatography)
SHex2Cer	Dihexosylsulfatid (Dihexosyl Sulfatide)
SHexCer	Monohexosylsulfatid (Monohexosyl Sulfatide)
SM	Sfingomyeliny (Sphingomyelins)
SP	Sfingolipidy (Sphingolipids)
SPE	Extrakce tuhou fází (Solid – Phase Extraction)
TG	Triacylglyceroly (Triacylglycerols)
TIC	Celkový iontový proud (Total Ion Current)
TOF	Analyzátor doby letu (Time-of-Flight mass analyzer)
UHPLC	Ultravysokoúčinná kapalinová chromatografie (Ultra-High-Pressure Liquid Chromatography)



## ÚVOD

Lipidomika je samostatnou oblastí metabolomiky a specializuje se na analýzu lipidů izolovaných z buněk, tělních tekutin, tkání a dalších biologických vzorků. Lipidy jsou důležité biologicky účinné látky, jsou rostlinného nebo živočišného původu, účastní se buněčné signalizace a slouží k porozumění mechanismů některých onemocnění. Sfingolipidy jsou kategorie lipidů a řadí se mezi ně sfingoidní báze, ceramidy, fosfosfingolipidy a glykosfingolipidy. Jsou to amfipatické lipidy, které se obvykle nacházejí v buněčných membránách a vytváří mechanicky stabilní a chemicky odolnou vnější vrstvu lipidové dvojvrstvy plazmatické membrány. Sfingomyeliny, ceramidy, hexosylceramidy a dihexosylceramidy se údajně podílejí na metabolismu v průběhu různých nádorových onemocnění, jejich analýza je náročná a moderní analytické přístupy umožňující spolehlivou automatizovanou analýzu velkých množství vzorků by mohly přispět k výzkumu jejich biologické role v rakovině. [1, 2]

Pro lipidomickou analýzu biologických vzorků se klíčovou technikou stala hmotnostní spektrometrie. Využívají se především dva přístupy, přičemž v jednom je využito spojení hmotnostní spektrometrie se separačními technikami a v druhém se k měření využívá výhradně hmotnostní spektrometr. V tomto druhém případě, tzv. shotgun lipidomice, je lipidový extrakt do iontového zdroje hmotnostního spektrometru zaveden bez předřazené separační techniky. V iontovém zdroji jsou všechny lipidy ionizovány společně a jsou stanoveny na základě velmi vysokého hmotnostního rozlišení anebo pomocí specifických MS/MS skenů. K záznamu těchto specifických selektivních skenů se používají hmotnostní spektrometry s trojitým kvadrupólovým analyzátozem nebo hybridním analyzátozem kombinujícím kvadrupól a lineární iontovou past, přičemž nejvíce využívanou ionizační technikou je ionizace elektrosprejem. [2]

Důležitým požadavkem na lipidomické analýzy je harmonizace a správnost reportovaných výsledků. Výsledky nesmí být zavádějící a musí být věrohodné, aby nevedly k falešně pozitivním nebo negativním závěrům, které mohou být zdrojem nesprávné biologické interpretace. Z těchto důvodů je v lipidomické komunitě kladen vysoký důraz na jednotnou anotaci lipidů a adekvátní validaci metody. Při experimentech zahrnujících měření většího počtu vzorků je také důležité provést jejich randomizaci pro extrakci i měření a do sekvence zahrnout i kontrolní vzorky, které slouží k průběžné kontrole celého analytického experimentu.

V této práci je optimalizována a validována shotgun metoda pro stanovení sfingomyelinů společně s méně koncentračně zastoupenými ceramidy, hexosylceramidy a dihexosylceramidy. Tato metoda je využita pro jejich kvantifikaci ve standardním referenčním materiálu NIST SRM 1950 a pro měření malé kohorty klinických vzorků plazmy pacientů s kolorektálním karcinomem a zdravých dobrovolníků.

# 1. TEORETICKÁ ČÁST

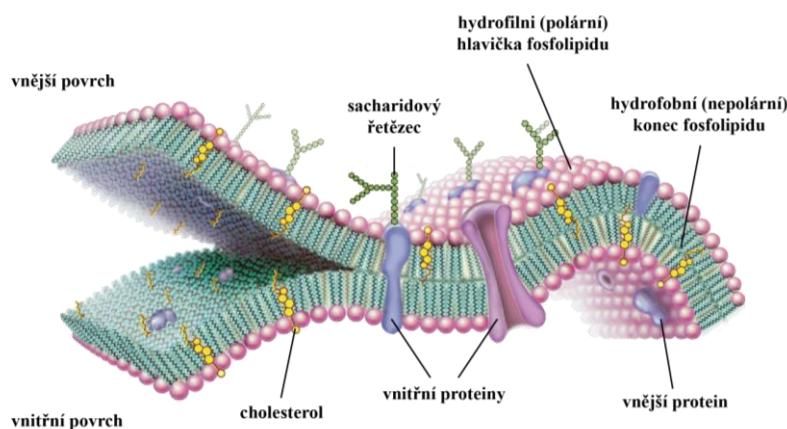
## 1.1. Lipidy

Studium lipidů je výzkumnou oblastí, která má stále větší význam. Lipidy jsou rozmanitá skupina přirozeně se vyskytujících sloučenin a neexistuje pro ně žádná mezinárodní definice. Pod pojmem lipidy se běžně rozumějí tuky nebo oleje, konkrétně molekuly, které jsou rozpustné v nepolárních rozpouštědlech, jako je chloroform, hexan, benzen nebo některé alkoholy. Jednoduchá definice však zahrnuje širokou škálu sloučenin a může být nepřesná vzhledem k novým klasifikačním metodám, které zahrnují deriváty žlučových kyselin rozpustných ve vodě nebo mastné kyseliny s krátkým řetězcem. [3–6]

Dále lze lipidy definovat jako malé hydrofobní nebo amfipatické molekuly, které mohou zcela nebo zčásti vzniknout kondenzací thioesterů na bázi karbanionu<sup>I</sup> (mastné kyseliny, polyketidy a další) nebo kondenzacemi izoprenových jednotek na bázi karbokationu<sup>II</sup> (prenoly, steroly a další). [7]

Lipidy fungují jako základní strukturální složky membrán, jako signální molekuly, jako chemické identifikátory specifických membrán, a hlavně jako molekuly pro ukládání energie. Syntéza lipidů je nerovnoměrně rozložena mezi několik buněčných membrán, což vyžaduje, aby většina organel závisela na transportních procesech lipidů. [8, 9]

Biologické membrány se skládají z lipidových dvojvrstev. V membránách se vyskytují glycerofosfolipidy, které obsahují hydrofilní a hydrofobní část, kromě glycerofosfolipidů se v membránách mohou vyskytovat i sfingolipidy (např. sfingomyelin), steroly (cholesterol) nebo proteiny (obr. 1). [10]



**Obrázek 1** Lipidová dvojvrstva [9]

<sup>I</sup> Karbanion – iont, který obsahuje záporně nabitý atom uhlíku

<sup>II</sup> Karbokation – iont, který obsahuje kladně nabitý atom uhlíku

### 1.1.1 Klasifikace lipidů

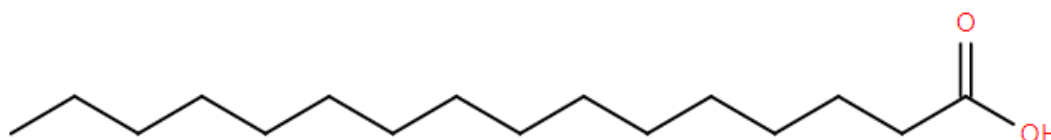
Rozdělení lipidů je možné na základě fyzikálních vlastností při pokojové teplotě (oleje jsou kapalné a tuky pevné), jejich polaritě (polární a neutrální (nepolární) lipidy), jejich esencialitě pro člověka (esenciální a neesenciální mastné kyseliny). [11]

Pro usnadnění mezinárodní komunikace o lipidech byla vyvinuta komplexní klasifikace lipidů se společnou platformou. V roce 2005 Mezinárodní výbor pro klasifikaci a nomenklaturu lipidů pod záštitou konsorcia LIPID MAPS vyvinul a zřídil „Komplexní klasifikační systém pro lipidy“ založený na přesně definovaných chemických a biochemických principech a využívající ontologii, která je rozšiřitelná, flexibilní a škálovatelná. Tento klasifikační systém je slučitelný s požadavky informatiky, aby bylo možné se vypořádat s obrovským množstvím údajů, které lipidomická komunita generuje. [12, 13]

Komplexní klasifikační systém organizuje lipidy do osmi přesně definovaných kategorií: mastné acyly, glycerolipidy, glycerofosfolipidy, sfingolipidy, steroly, prenoly, sacharolipidy a polyketidy. Tyto kategorie zahrnují prokaryotické a eukaryotické zdroje lipidů. Systém je k dispozici také on-line na internetových stránkách LIPID MAPS (<https://www.lipidmaps.org>) a je v něm zaznamenáno více jak 45 000 biologicky významných lipidů. [7, 13]

#### 1.1.1.1. Mastné acyly

Mastné acyly (FA) jsou velkou kategorií lipidů s téměř 9985 strukturami obsaženými v databázi struktur LIPID MAPS. Zahrnují více podskupin, kterými jsou například mastné kyseliny, oktadekanoidy, eikosanoidy, dokosanoidy, mastné alkoholy, mastné aldehydy, mastné ethery, uhlovodíky a deriváty mastných kyselin jako estery, amidy, nitrily a glykosidy. Příklad struktury mastné kyseliny je uveden na obr. 2. Mastné kyseliny ve volné formě a jako variabilní mastné acyly v lipidech jsou převládajícími lipidovými strukturami. [7, 14]



**Obrázek 2** Strukturní vzorec mastného acylu: kyselina hexadekanová [7]

Nejčastější podskupinou mastných acylů jsou mastné kyseliny a jejich konjugáty. Běžná mastná kyselina se skládá z dlouhého uhlovodíkového řetězce, který je ukončen karboxylovou skupinou. Klasifikace mastných kyselin se provádí s ohledem na přítomnost větvení nebo funkčních skupin v uhlovodíkovém řetězci nebo stupeň nasycení. [12]

Biosyntéza mastných kyselin je u rostlin a živočichů do značné míry podobná. Oba organismy jsou schopné produkovat mastné kyseliny z acetylkoenzymu A (acetyl CoA) prostřednictvím společného působení acetyl CoA karboxylázy a syntázy<sup>III</sup> mastných kyselin. Prvním krokem syntézy mastných kyselin je tvorba malonylkoenzymu A (malonyl CoA) z acetyl CoA. Druhým krokem při výrobě mastných kyselin je aktivace jak malonyl CoA, tak acetyl CoA, přenosem acylových skupin na proteinový nosič acylu (ACP). Tyto reakce jsou katalyzovány malonyl CoA-ACP transacylázou a acetyl CoA-ACP transacylázou. Syntáza mastných kyselin prodlužuje acylový řetězec o dva uhlíky za cyklus činnosti, přičemž jako kondenzační jednotka se používá acetyl CoA. Tato série reakcí vrcholí tvorbou kyseliny palmitové a stearové, které jsou dále prodlužovány a desaturovány na další mastné kyseliny. U živočichů a rostlin probíhá první desaturace<sup>IV</sup> na devátém uhlíku. [11]

Mastná acylová skupina ve třídách mastných kyselin a konjugátů je charakterizována opakující se řadou methylenových skupin, které této kategorii lipidů udávají hydrofobní charakter. [12]

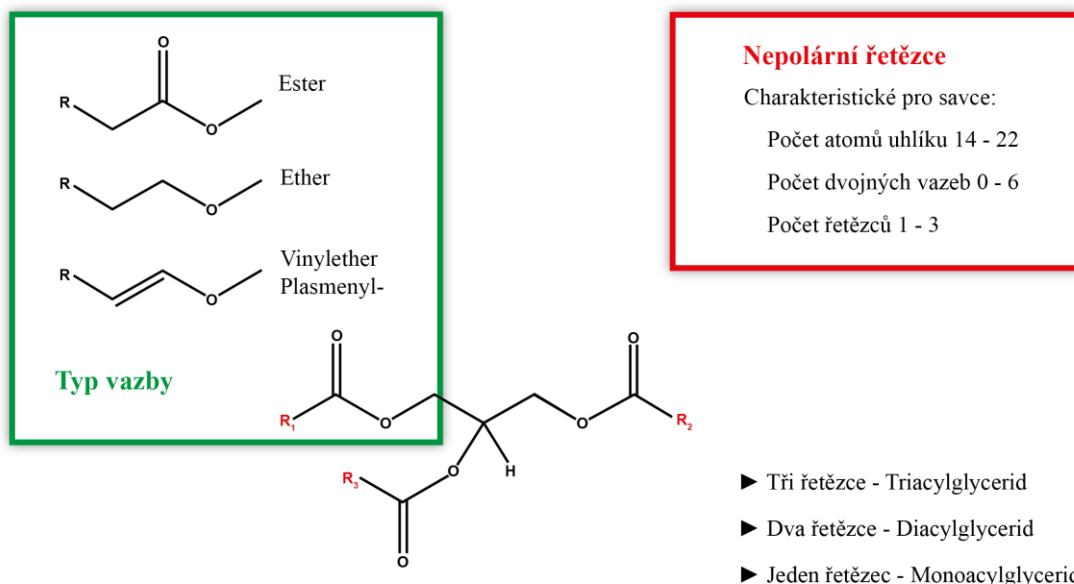
### 1.1.1.2. Glycerolipidy

Strukturní databáze LIPID MAPS obsahuje informace o 7656 strukturách glycerolipidů. Základní stavební jednotkou glycerolipidů je glycerol, na němž jsou navázány jedna, dvě nebo tři mastné kyseliny esterovou vazbou (mono-, di-, trisubstituované glyceroly) (obr. 3). Pokud jde o počet připojených mastných acylů, podkategorie glycerolipidů se označují jako monoradylglyceroly (monoacylglyceroly, monoalkylglyceroly, atd.), diradylglyceroly (diacylglyceroly, dialkylglyceroly, atd.) a triradylglyceroly (triacylglyceroly, alkyldiacylglyceroly, atd.), z nichž největší význam mají triacylglyceroly (TG), které jsou obsaženy v mnoha lidských tkáních a buňkách. [7, 10, 12, 15]

---

<sup>III</sup> Syntázy – jedná se o triviální název pro lyázy, enzymy schopné spojit dvě sloučeniny kovalentní vazbou

<sup>IV</sup> Desaturace – proces vedoucí ke vzniku dvojných, popř. trojných vazeb v organických sloučeninách, tj. jejich dehydrogenace, resp. oxidace



**Obrázek 3** Příklady struktur glycerolipidů [16]

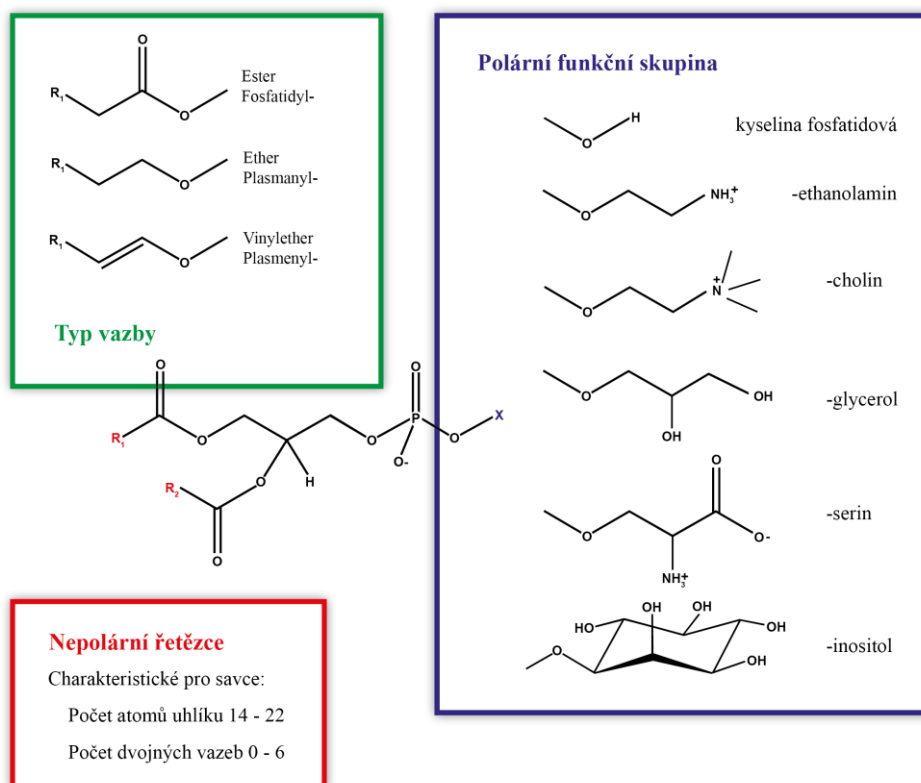
Glycerolipidy jsou velká skupina biologických molekul nezbytných pro tvorbu membrán, ukládání kalorií a rozhodujících nitrobuněčných procesů. Syntéza a skladování glycerolipidů hraje ústřední roli při udržování energetické homeostázy. TG jsou nejkaličtější formou ukládání energie a jejich akumulace v tukové tkáni umožňuje zvířatům vydržet půst během spánku nebo delší období nedostatku potravy. [17, 18]

Denní spotřeba tuků u lidí je asi 90-120 g/den s rychlostí absorpce 95 %. Tuky a oleje pocházející ze zvířat nebo rostlin se většinou skládají z různých druhů TG. K vychytávání lipidů v potravě dochází hlavně v tenkém střevě. [15, 19, 20]

### 1.1.1.3. Glycerofosfolipidy

Glycerofosfolipidy, také nazývané fosfolipidy, jsou obrovskou kategorií lipidů a v databázi struktur LIPID MAPS lze nalézt celkem 9957 registrovaných struktur. Jsou téměř všude přítomné a zahrnují velké množství podskupin, například glycerofosfocholin, glycerofosfoethanolamin, glycerofosfoserin, glycerofosfoglycerol, glycerofosfát a další. [7, 21]

Fosfolipidy se skládají ze dvou molekul mastných acylů esterifikovaných na pozicích sn-1 a sn-2 glycerolu, v pozici sn-3 je přes vazbu fosfátového esteru připojena specifická funkční skupina (obr. 4). V případě, že je glycerol esterifikován pouze na jedné pozici (sn-1 nebo sn-2) jedná se o lysofosfolipidy. [12, 21]



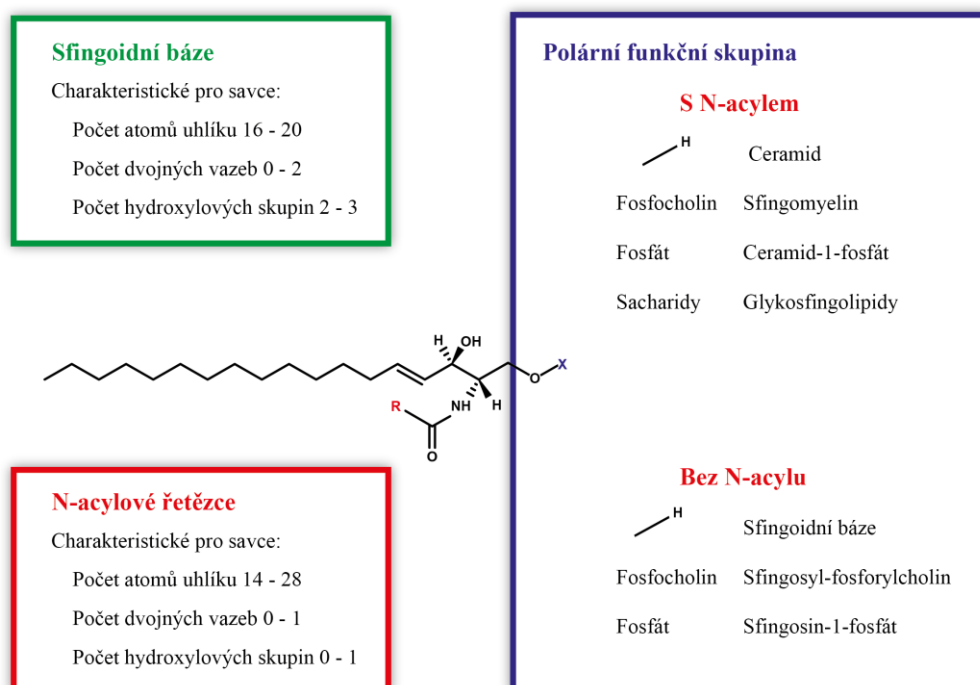
**Obrázek 4** Struktura a hlavní třídy fosfolipidů [16]

Funkční skupina tvoří hydrofilní část a určuje typ fosfolipidu, postranní mastné acylové řetězce jsou hydrofobní. Tato amfipatická vlastnost fosfolipidů poskytuje základ pro rozčlenění buněk. Fosfolipidy jsou hlavní složkou biologických membrán. Velikost, tvar, náboj a chemické složení různých fosfolipidových tříd hrají roli při tvorbě a udržování plazmatické membránové dvojvrstvy buněk, stejně jako membrán obklopujících subcelulární orgány. Fosfolipidy se podílejí na stabilizaci proteinů v membráně a působí jako kofaktory v enzymatických reakcích. Jsou nezbytné pro absorpci, transport a skladování lipidů. Fosfolipidy jsou vylučovány do žluče, aby pomohly při trávení a vstřebávání tuků v potravě. Tvoří monovrstvu na povrchu lipoproteinů, které slouží k transportu neutrálních lipidů do celého těla. Fosfolipidy také slouží jako rezervoár signálních molekul, jako je kyselina arachidonová nebo diacylglycerol. [21]

Změny profilu fosfolipidů v krevní plazmě byly pozorovány v průběhu progresu kardiovaskulárních onemocnění, hypertenze, diabetu, selhání jater nebo různých typů rakoviny. [22–26]

#### 1.1.1.4. Sfingolipidy

V databázi struktur LIPID MAPS je k dispozici 4858 struktur sfingolipidů (SP). Mezi sfingolipidy se řadí sfingoidní báze, ceramidy, fosfosfingolipidy, neutrální glykosfingolipidy, kyselá glykosfingolipidy a jiné (obr. 5). Do této kategorie patří sfingomyeliny (SM), které jsou hlavními sfingolipidy v krevní plazmě a mají strukturální a signální funkce. [7]



Obrázek 5 Struktury sfingolipidů [16]

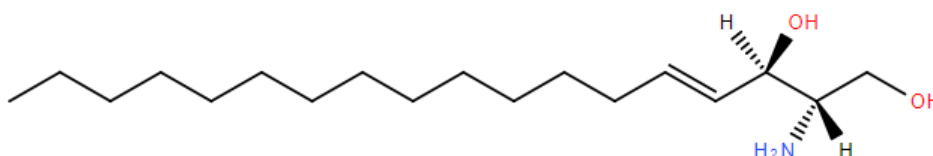
Sfingolipidy jsou spolu se steroly a glycerofosfolipidy využívány pro tvorbu membrán v eukaryotických buňkách. Kromě toho některé lipidy z těchto lipidových tříd slouží jako signální molekuly k regulaci biologických procesů. [21]

Sfingolipidy jsou komplexní skupina sloučenin a mají společný strukturální rys, sfingoidní jádro, které je syntetizováno *de novo* ze serinu a dlouhého řetězce mastného acyl-CoA. Sfingoidní báze se dále přeměňuje na ceramidy, fosfosfingolipidy, glykosfingolipidy a další podtřídy, včetně proteinových aduktů. [12]



#### 1.1.1.4.1. Sfingoidní báze

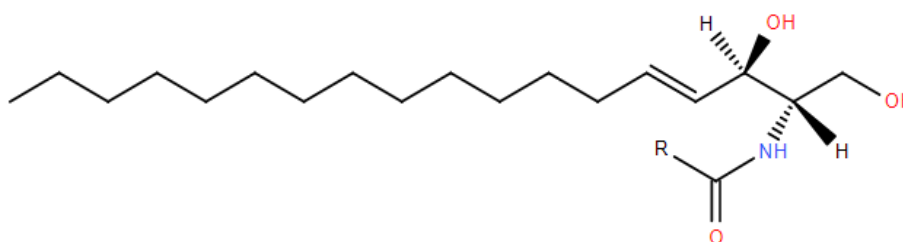
Hlavní sfingoidní báze savců se běžně označuje jako „sfingosin“. Sfingosin je (2S,3R,4E)-2-aminooktadec-4-en-1,3-diol (také se nazývá d-erythro-sfingosin a sfing-4-enin), struktura je ukázána na obr. 6. Jedná se pouze o jednu z mnoha sfingoidních bází vyskytujících se v přírodě, které se liší délkou a větvením alkylového řetězce, počtem a pozicemi dvojných vazeb, přítomností dalších hydroxylových skupin a dalšími vlastnostmi. [12]



**Obrázek 6** Sfingoidní báze: sfingosin (základní struktura sfingolipidů) [7]

#### 1.1.1.4.2. Ceramidy

Nejjednodušší třídou sfingolipidů jsou ceramidy (Cer), které obsahují sfingosin nebo příbuzné báze navázané na mastnou kyselinu prostřednictvím amidové vazby (obr. 7). Ceramidy se používají jako prekurzory pro tvorbu buď fosfo- nebo glykosfingolipidů připojením různých funkčních skupin, které poskytují řadu jedinečných fyzikálních vlastností. [27]



**Obrázek 7** Obecný strukturní vzorec ceramidu [7]

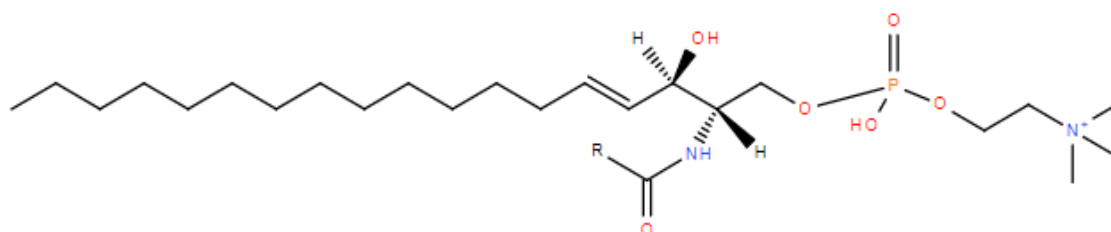
Mastné kyseliny, které jsou navázané na sfingoidní bázi, jsou obvykle nasycené nebo mononenasycené a ve svém řetězci většinou obsahují 14 až 26 atomů uhlíku. Přítomnost hydroxylové skupiny na uhlíku 2 je poměrně běžná. Ceramidy mají někdy

specializované mastné kyseliny, například kožní ceramid, který obsahuje 30 atomů uhlíku dlouhý řetězec s hydroxylovou skupinou na koncovém ( $\omega$ ) atomu uhlíku. [12]

Množství SP v membránách je přísně regulováno. Ceramidy jsou extrémně hydrofobní a zvyšují molekulární řád (rigiditu) fosfolipidů obsažených v membránách. Ceramidy jsou sice méně významné složky v membráně, ale jejich fyzikální a chemické vlastnosti mohou indukovat mikrodomény. Navíc při stresu nebo apoptóze<sup>V</sup> se koncentrace ceramidů mohou zdesetinásobit. [28, 29]

#### 1.1.1.4.3. Fosfosfingolipidy

Hlavními fosfosfingolipidy savců jsou sfingomyeliny (ceramidfosfocholiny). SM se skládají ze sfingosinového jádra, fosfocholinové funkční skupiny a mastné kyseliny navázané amidovou vazbou na jádro (obr. 8). SM je dominantní sfingolipid v membránách savčích buněk, tato lipidová třída je specificky obohacena v plazmové membráně a Golgiho síti. Charakteristickým strukturálním rysem SM je nízká úroveň nenasycení. Sfingolipidy mají rozsáhlé schopnosti vázat vodík, což spolu s jejich nasycenou povahou usnadňuje tvorbu sfingolipidových a sfingomyelinem obohacených laterálních domén v membránách. Sfingomyeliny jsou také prekurzory ceramidů. [12, 30]



**Obrázek 8** Obecný strukturální vzorec sfingomyelinu [7]

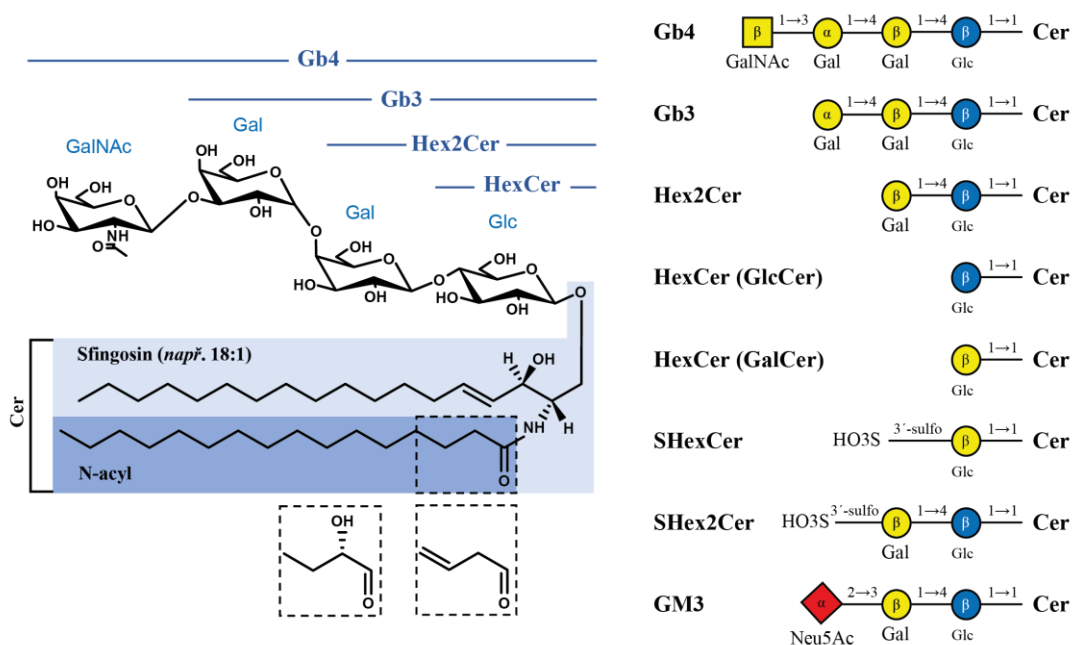
Velká fosfocholinová funkční skupina SM dává SM důležité membránové vlastnosti, funkční skupina se jeví jako optimální pro interakce SM a cholesterolu a tato interakce má mnoho důležitých funkčních důsledků. Změny hladin SM v plazmě jsou považovány za nezávislý rizikový faktor pro rozvoj kardiovaskulárních onemocnění u lidí a nové studie

<sup>V</sup> Apoptóza – zánik buňky, který je odlišný od její nekrózy a není provázen zánětlivou reakcí

osvětlily možný mechanismus jeho úlohy v aterogenezi<sup>VI</sup>. Velmi zajímavý je i fakt, že s přítomností některých neobvyklých druhů SM je spojována i lidská dlouhověkost. [30]

#### 1.1.1.4.4. Glykosfingolipidy

Glykosfingolipidy (GLS) se klasifikují na základě struktury zbytku sacharidu, který je navázán na jádro sfingosinu. Mezi glykosfingolipidy patří neutrální a kyselé glykosfingolipidy. Strukturální klasifikace GLS je založena na sacharidové sekvenci připojené k ceramidové části (obr. 9). První monosacharidová jednotka navázaná na ceramid je galaktóza (Gal) nebo glukóza (Glc), což vede ke vzniku galaktosylceramidu (GalCer, tj. HexCer) nebo glukosylceramidu (GlcCer, tj. HexCer). Sacharidové jádro může být rozšířeno o další sacharidové jednotky, které vytvoří komplexnější GLS, jako je laktosylceramid (LacCer, tj. Hex2Cer), globotriaosylceramid (Gal-Gal-GlcCer, tj. Gb3) a globotetraosylceramid (GalNAc-Gal-Gal-GlcCer, tj. Gb4). Analogy GalCer a Gal-GlcCer se sulfátovou skupinou navázanou na C3-hydroxyl galaktózy se nazývají sulfatidy (tj. SHexCer a SHex2Cer). Sialylované GLS, jako např. GM3, se nazývají gangliosidy. [7, 12, 31]

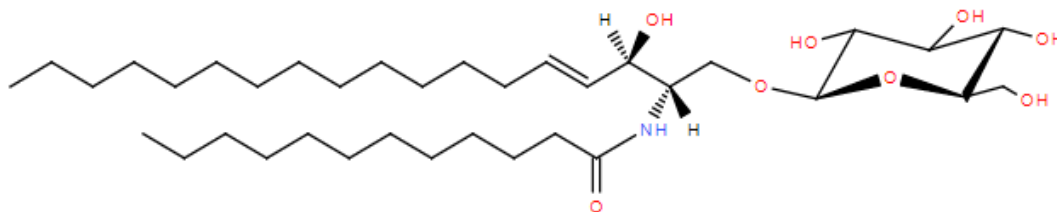


**Obrázek 9** Přehled chemických struktur neutrálních a kyselých GLS podtříd [31]

<sup>VI</sup> Aterogeneze – vznik aterosklerózy, ateroskleróza je onemocnění tepen, tzv. „kornatění“, při němž se v jejich stěnách ukládají tukové látky ve formě tzv. ateromu a druhotně vápník

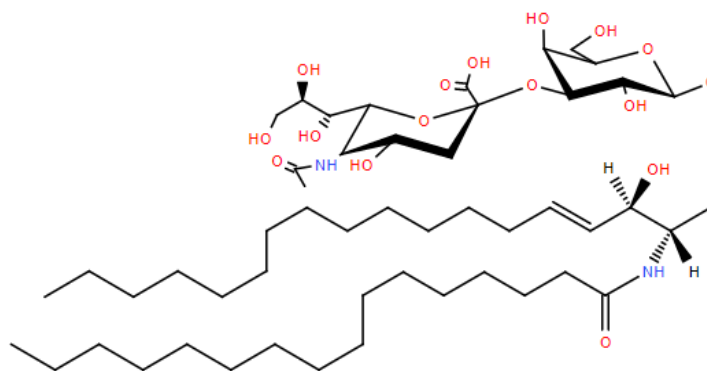
GLS jsou všude přítomné složky membrán, které se nacházejí převážně ve vnější vrstvě buněčné plazmatické membrány prakticky všech eukaryotických druhů a některých bakterií. GLS jsou nejen složky buněčných membrán, ale slouží také jako důležité bioaktivní sloučeniny s celou řadou buněčných funkcí, včetně interakcí mezi buňkami, adheze buněk, migrace buněk, růstu, proliferace, diferenciací, intracelulární a extracelulární signalizace a apoptózy. Jejich izolace, detekce a komplexní strukturní analýza je náročným úkolem vzhledem ke strukturní rozmanitosti molekul GLS. Tyto amfipatické sloučeniny představují jednu z hlavních a strukturálně nejvíce heterogenních podtříd sfingolipidů složenou z hydrofilní funkční skupiny s nejméně jedním monosacharidovým reziduem navázaným glykosidickou vazbou na hydrofobní ceramidovou složku. [31]

Neutrální glykosfingolipidy obsahují jeden nebo více nenabitých monosacharidových jednotek, jako je glukóza, galaktóza, N-acetylglukosamin, N-acetylgalaktosamin (GalNAc) a fukosa, které jsou seskupeny do skupin podle povahy glykosubstituentů. Neutrální GLS se skládají ze dvou podskupin: monoglykosylceramidy (cerebrosidy) a oligoglykosylceramidy (globosidy). Hlavní podtřídou neutrálních glykosfingolipidů jsou hexosylceramidy (HexCer), jejichž struktura je ukázána na obr. 10. [12, 31]

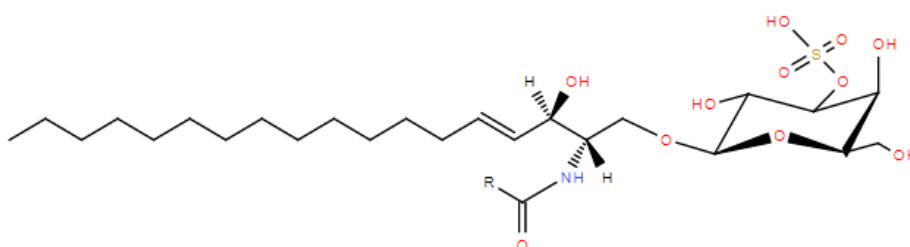


**Obrázek 10** Strukturní vzorec hexosylceramidu: N-(dodekanoyl)-1-β-glukosyl-sfing-4-enin (GlcCer(d18:1/12:0)) [7]

Kyselé glykosfingolipidy obsahují ionizované funkční skupiny (např. karboxyl nebo sulfát). Důležité podtřídy kyselých glykosfingolipidů jsou gangliosidy (sialosylglykosylceramidy) (obr. 11) a sulfatidy (také sulfoglykosfingolipidy) (obr. 12). [7, 12, 31]



**Obrázek 11** Strukturální vzorec gangliosidu: GM4(d18:1/16:0) [7]



**Obrázek 12** Strukturální vzorec sulfatidu [7]

Neutrální glykosfingolipidy (hexosylceramidy) a kyselé glykosfingolipidy (gangliosidy a sulfatidy) jsou v současné době zkoumány u pacientů s nádorovým onemocněním, a i u jiných lidských onemocnění. Změny hladin hexosylceramidu, gangliosidu a sulfatidu byly zjištěny v různých typech tkání v progresi rakoviny. [32–34]

### 1.1.1.5. Ostatní kategorie lipidů

Steroly jsou polycyklické sloučeniny nenasycených alkoholů s hydroxylovou skupinou v poloze 3 a s alifatickým postranním řetězcem v poloze 17. V databázi struktur LIPID MAPS je obsaženo celkem 3023 struktur sterolů. Prenoly jsou malá skupina lipidů s 1521 strukturami obsaženými v databázi struktur LIPID MAPS, tvoří je jedna nebo více izoprenových jednotek a jsou prekursorem pro isoprenoidy a polyprenoly. Sacharolipidy mají mastné kyseliny navázány přímo na páteř cukru a vytvářejí struktury, které jsou kompatibilní s membránovými dvojvrstvami. V databázi struktur LIPID MAPS je celkem 1326 struktur sacharolipidů. Polyketidy jsou syntetizovány klasickými enzymy a počet polyketidů v databázi struktur LIPID MAPS je 6970. [7, 12, 13]

## 1.2. Hmotnostní spektrometrie

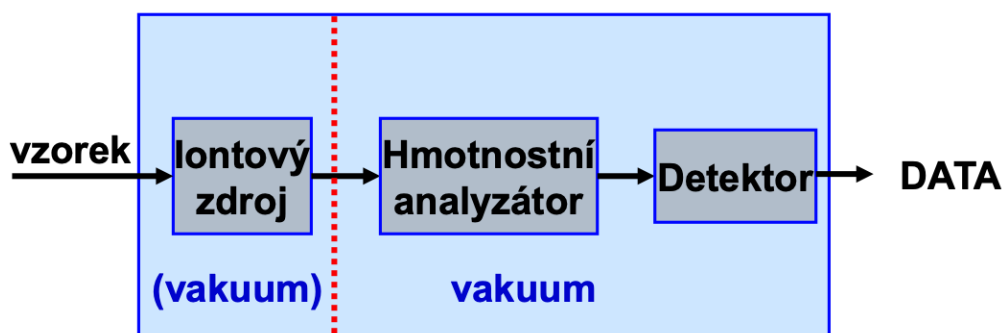
Hmotnostní spektrometrie (MS) je nepostradatelným analytickým nástrojem v chemii, biochemii, farmacii, medicíně a mnoha souvisejících vědních oborech. Strukturní objasnění neznámých látek, environmentální a forenzní analýzy, kontrola kvality drog, potravin a polymerů – to vše do značné míry závisí na hmotnostní spektrometrii. [35]

MS je standardní technika pro analytické zkoumání molekul a složitých směsí. Je důležitá při určování elementárního složení molekuly a při získávání částečných strukturálních informací pomocí hmotnostních spektrálních fragmentací. [36]

Vysoká citlivost a selektivita, univerzálnost, minimální spotřeba vzorku, možnost kvalitativní (určení  $M_R$  – elementární složení) a kvantitativní (odezva je závislá na koncentraci) analýzy jsou hlavními výhodami této metody. Nevýhodou je, že MS je destruktivní metoda a její pořizovací a provozní náklady jsou velmi vysoké. [37]

### 1.2.1. Princip hmotnostní spektrometrie

Základní princip hmotnostní spektrometrie je založen na interakci nabitých částic s elektrickým nebo magnetickým polem ve vakuu. Dochází k produkci iontů, oddělení na základě jejich poměru hmotnosti a náboje ( $m/z$ ) a následnému záznamu relativních intenzit jednotlivých iontů. Hmotnostní spektrometry se skládají ze tří hlavních částí a těmi jsou iontový zdroj, hmotnostní analyzátor a detekční systém (detektor) (obr. 13). [37, 38]



Obrázek 13 Schéma hmotnostního spektrometru [37]

První proces, který probíhá v hmotnostním spektrometru, slouží k tvorbě iontů iontovým zdrojem. Iontový zdroj je část hmotnostního spektrometru, která ionizuje molekuly ve vzorku. [39, 40]

V druhém kroku jsou generované ionty odděleny podle jejich specifického  $m/z$  v hmotnostním analyzátoru. Bylo vyvinuto několik typů hmotnostních analyzátorů a všechny mají společné to, že používají elektrické a/nebo magnetické pole k rozlišování iontů. [6, 40]

Posledním krokem hmotnostní spektrometrické analýzy je proces detekce iontů. Ionty po oddělení hmotnostním analyzátozem pokračují do detekčního systému. Jako detektory se po desetiletí používají tradiční analogové a elektronové multiplikátorové detektory. V dnešní době jsou běžně používány vylepšené varianty těchto detektorů. [40]

### **1.2.2. Ionizační techniky**

Univerzální ionizační technika pro všechny látky neexistuje, takže je vždy potřeba vybrat optimální způsob ionizace pro danou látku. Ionizační techniky je možné dělit podle množství vnitřní energie po ionizaci na „tvrdé“ a „měkké“ a mohou pracovat za atmosférického nebo sníženého tlaku. [41]

Ionizační proces, jehož výsledkem je významná fragmentace nabitých molekul, je znám jako „tvrdá ionizace“. Příkladem tvrdé ionizační techniky je elektronová ionizace. Pokud jsou ve spektru pozorovány neporušené ionty, tak se jedná o „měkkou ionizaci“. Mezi měkké ionizační techniky patří ionizace elektrosprejem (ESI), chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI), ionizace laserem za účasti matrice (MALDI) a další. V dnešní době jsou nejběžnějšími aplikovanými ionizačními technikami ESI, APCI a MALDI. [36, 39]

#### **1.2.2.1. Ionizace za atmosférického tlaku**

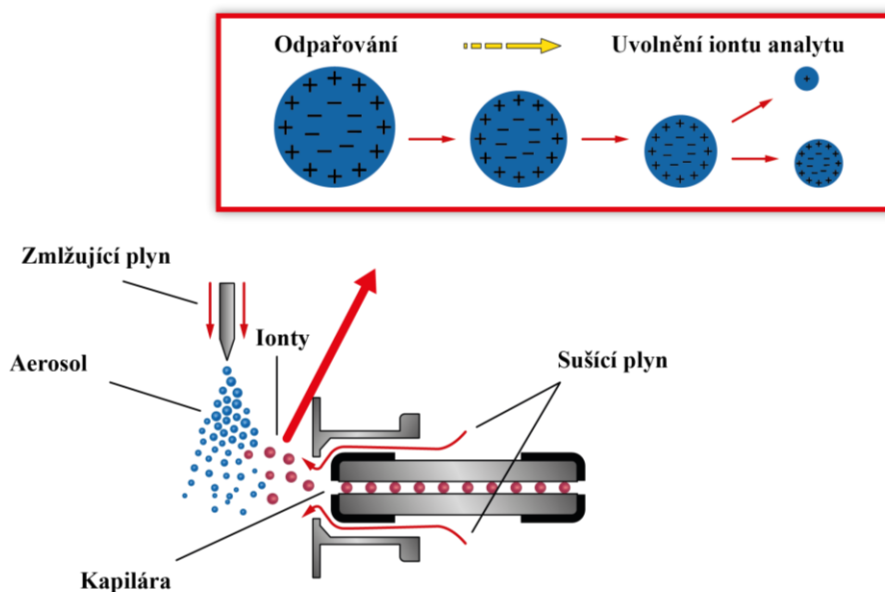
Mezi techniky, kde probíhá ionizace za atmosférického tlaku, se řadí ionizace elektrosprejem, chemická ionizace za atmosférického tlaku a fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI). Tyto ionizační techniky znamenaly průlom v řešení spojení vysokoúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (HPLC-MS). [41]

##### **1.2.2.1.1. Ionizace elektrosprejem**

Ionizace elektrosprejem je „měkká“ ionizační technika a dochází při ní ke generování jednou až vícenásobně nabitých iontů v závislosti na typu ionizovaných sloučenin. Zavedení ESI vedlo k významnému pokroku a umožnilo analýzu velkých biomolekul (bílkoviny, lipidy), aniž by došlo k jejich fragmentaci. ESI je nyní hlavní ionizační metodou pro spojení kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie (LC-MS). [36, 42, 43]

ESI může být aplikována v širokém rozsahu polarit, je vhodná pro ionizaci vysoce polárních až iontových sloučenin, ale i pro středně polární nebo dokonce nepolární molekuly, které tvoří adukty s ionty přítomnými v mobilní fázi. Ve spektrech ESI-MS proto mohou být pozorovány následující ionty:  $[M+H]^+$ ,  $[M+Na]^+$ ,  $[M+K]^+$ ,  $[M+NH_4]^+$ ,  $[M-H]^-$ ,  $[M+HCOO]^-$  atd. [6, 36, 41, 42]

Roztok vzorku je přiveden ESI kapilárou, na kterou je vloženo vysoké napětí (2-5 kV). Následně dochází za pomoci zmlžujícího plynu k rozprášení aerosolu a vznikající kapičky nesou na povrchu velké množství nábojů. Rozpouštědlo je pomalu odpařováno a zvyšuje hustotu elektrického náboje v kapičkách až do Rayleighova stabilizačního limitu. Další odpařování rozpouštědla vede k nestabilitě („Coulombické explozi“), která disociuje kapičky na ještě menší. Nově vytvořené kapičky procházejí opět odpařováním a Coulombickým štěpením. Nakonec všechny generované ionty vstoupí do hmotnostního spektrometru (obr. 14). [42]



**Obrázek 14** Schéma ionizace elektrosprejem [41]

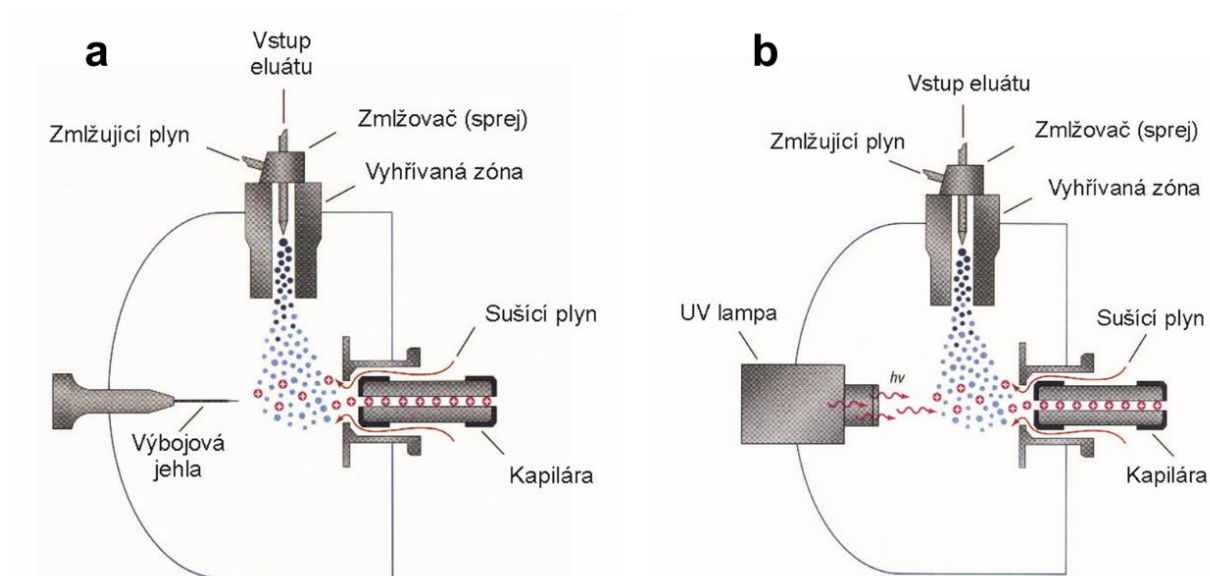
V posledních letech nachází stále více uplatnění technika nanoelektrosprej (nanoESI), která dovoluje velmi nízké průtoky a je součástí čipů využívaných pro automatizaci analytických měření založených na hmotnostní spektrometrii. Dávkování nanolitřů rozpouštědel pomocí nanoESI umožňuje stabilní analýzu po dlouhou dobu, nízkou spotřebu vzorků a rozpouštědel a současné zvýšení citlivosti ve srovnání s konvenčními ESI zdroji. [36]



### 1.2.2.1.2. Chemická ionizace za atmosférického tlaku

Chemická ionizace za atmosférického tlaku je technika „měkké“ ionizace, v některých zdrojích je však zdůrazněna možnost vyššího výskytu fragmentací ve srovnání s ESI. APCI sdílí určité podobnosti s ESI zdroji, v APCI jsou molekuly analytu ionizovány v plynné fázi, a kromě přívodní kapiláry je zde přítomen i vyhřívací blok a výbojová (koronová) jehla, na kterou je aplikováno vysoké napětí. Roztok obsahující analyty je rozprašován pomocí suchého dusíku a k ionizaci dochází ve stavu páry. V důsledku koronového výboje jsou molekuly rozpouštědla v plynném stavu ionizovány a vzniklé ionty slouží jako hlavní zdroj protonů pro analyty. Ionty jsou dále usměrněny na vstupní elektrodu a pomocí iontové optiky fokusovány dále směrem k analyzátoru (obr. 15a). [35, 36, 44]

APCI lze využít ke studiu polárních sloučenin, stejně jako pro studium molekul střední nebo nízké polariry. Dají se ionizovat například steroidy a steroly, organické kyseliny, léky nebo nepolární mastné kyseliny. [36]



**Obrázek 15** a Schéma chemické ionizace za atmosférického tlaku,  
b Schéma fotoionizace za atmosférického tlaku [41]

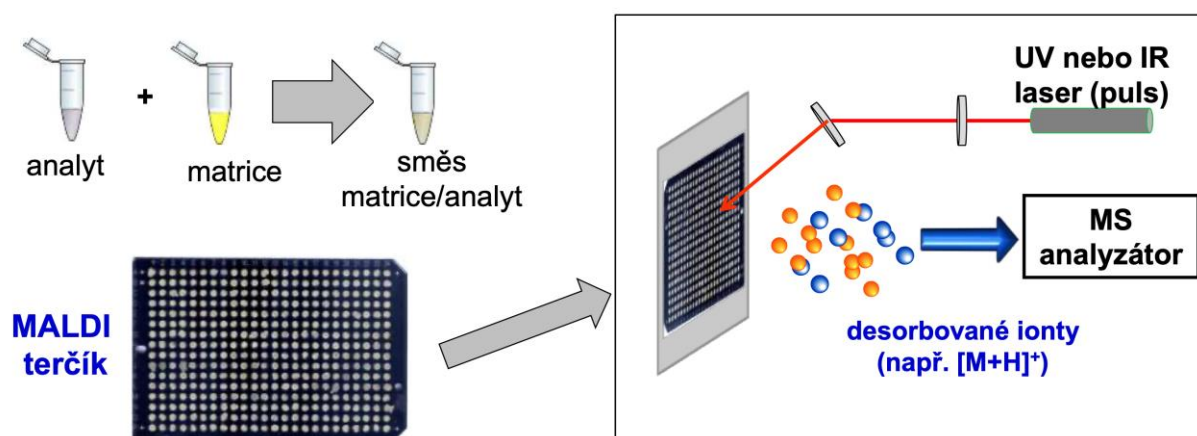
### 1.2.2.1.3. Fotoionizace za atmosférického tlaku

Fotoionizace za atmosférického tlaku patří mezi „měkké“ ionizační techniky. APPI má obdobné uspořádání jako APCI s tím rozdílem, že pro ionizaci molekul není použita výbojová jehla, ale je využit zdroj UV záření (obr. 15b). [36, 41]

APPI se využívá ve spojení s LC-MS a usnadňuje analytickou detekci slabě polárních a nepolárních sloučenin pomocí hmotnostní spektrometrie. Je široce využívána v analytických testech v potravinářském, environmentálním, lékařském a chemickém průmyslu. [45]

### 1.2.2.2. Ionizace laserem za účasti matrice

Ionizace laserem za účasti matrice je „měkká“ ionizační technika. Před ionizací je vzorek smíchán s matricí (obvykle s organickou kyselinou) a poté je nanesen na MALDI terčik. Proces ionizace vyžaduje krátký laserový puls, který desorbuje matrici a přítomné analyty. Matricové molekuly absorbují laserovou energii, jsou ionizovány a přenášejí náboj na molekuly analytu v plynné fázi. Molekuly analytu jsou obvykle ionizovány tím, že jsou protonovány nebo deprotonovány blízkými matricovými molekulami. Ionizace probíhá ve vakuu, ale je možné ji realizovat i za atmosférického tlaku (obr. 16). [38, 46, 47]



Obrázek 16 Schéma ionizace laserem za účasti matrice [41]

Technika MALDI je vhodná k analýze biomolekul, jako jsou peptidy, lipidy, sacharidy nebo jiné organické makromolekuly. Nejčastěji je MALDI kombinována s analyzátořem doby letu (TOF). [46, 47]

### 1.2.3. Hmotnostní analyzátořy

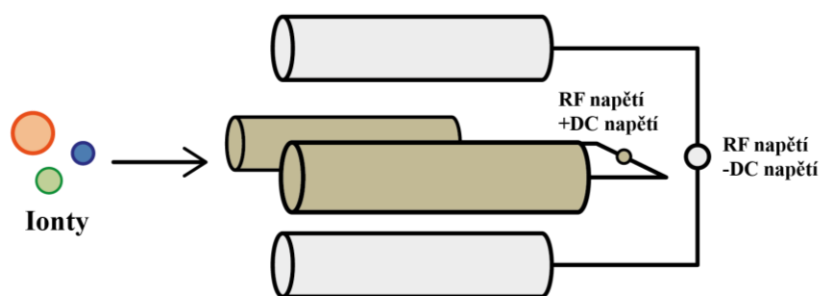
Hmotnostní analyzátořy oddělují přenášené ionty na základě jejich poměru  $m/z$ . Celý proces probíhá za vakua a všechny analyzátořy využívají statické nebo dynamické elektrické a magnetické pole, případně jejich kombinace. Mezi důležité parametry hmotnostních analyzátořů patří rozlišovací schopnost, přesnost měření správné hmotnosti, dynamický rozsah, hmotnostní rozsah a rychlost analýzy (skenování za jednotku času). [6, 38]

Příkladem typicky používaných analyzátorů hmotnosti v lipidomice jsou analyzátoři doby letu, kvadrupólové analyzátoři (Q), iontové pasti (IT) (např. lineární iontová past – LIT nebo kvadrupólová iontová past), iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací (FT-ICR) a Orbitrap. [6, 35]

### 1.2.3.1. Kvadrupólový analyzátor

Kvadrupólový hmotnostní analyzátor byl vynalezen na počátku 50. let 20. století Wolfgangem Paulem, který byl za svůj objev oceněn Nobelovou cenou až v roce 1989. [48]

Q je konstruován ze čtyř paralelních hyperbolických/kruhových tyčí. Principem je, že na dvě protilehlé kovové tyče je vloženo kladné stejnosměrné napětí, na zbývající dvě tyče záporné stejnosměrné napětí a na všechny čtyři je superponováno vysokofrekvenční střídavé napětí. Potenciál se tedy skládá ze dvou složek a těmi jsou napětí stejnosměrného proudu (DC) a radiofrekvenční (RF) napětí (obr. 17). Ionty jsou přivedeny do kvadrupólu a začnou oscilovat. Použitý poměr napětí umožňuje, aby se k detektoru dostaly pouze ionty v určitém rozsahu  $m/z$ , protože budou mít stabilní trajektorie pro definovaný poměr radiofrekvenčního napětí a napětí stejnosměrného proudu. Zbývající ionty různých  $m/z$  mají nestabilní trajektorie a budou neutralizovány srážkou s tyčemi. Proto Q fungují jako hmotnostně selektivní filtry. [6, 35]



Obrázek 17 Schéma kvadrupólového analyzátoru [6]

#### 1.2.3.1.1. Trojitý kvadrupólový analyzátor

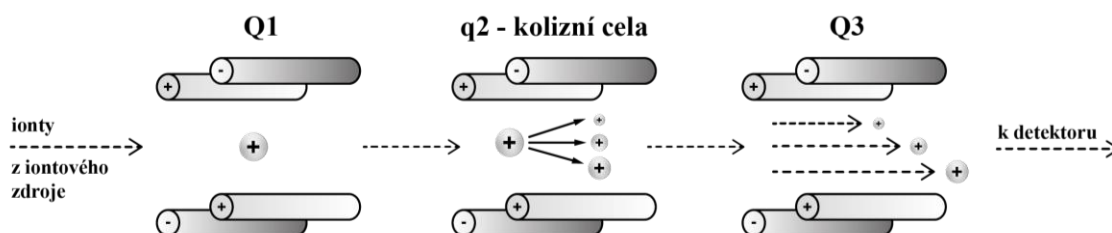
Běžně používaným hmotnostním analyzátořem v lipidomice je trojitý kvadrupól (QqQ), který se skládá ze tří po sobě jdoucích kvadrupólů. První kvadrupól (Q1) je hmotnostní filtr, který umožňuje přenos pouze vybraných iontů (vybírání iontů při

definovaném  $m/z$ ) na druhý kvadrupól, a je řízen DC a RF napětími. Druhý kvadrupól (q, q2 nebo CID) je kolizní cela, která je naplněna inertním plynem, jako je argon, hélium nebo dusík. Srážka s molekulami plynu vyvolává tvorbu fragmentových iontů a tyto fragmenty jsou analyzovány pomocí třetího kvadrupólu. Na q2 je aplikováno pouze RF napětí. Třetí kvadrupól (Q3) je další hmotnostní filtr, který přenáší vybrané fragmentové ionty do detekčního systému hmotnostního spektrometru, a také je řízen DC a RF napětími. [6]

QqQ umožňuje pracovat v různých skenovacích módech např. sken produktových iontů, sken iontů prekurzoru (PIS), sken neutrálních ztrát a sken selektivních iontových reakcí. [38]

### 1.2.3.1.1.1. Sken produktových iontů

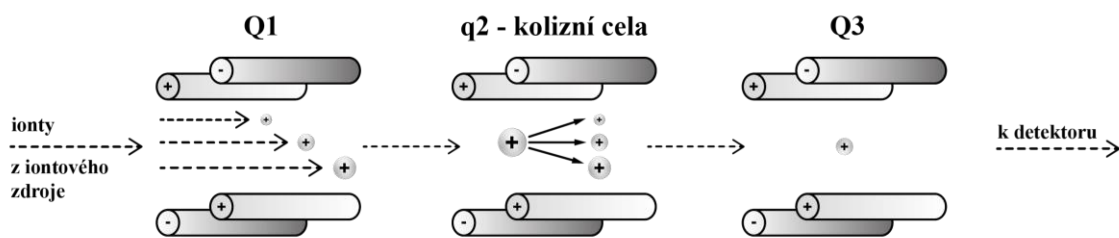
Sken produktových iontů je mód, kde Q1 propouští vybraný iont s definovanou hodnotou  $m/z$ , v q2 dochází k jeho fragmentaci a Q3 skenuje všechny produktové ionty daného prekurzoru v definovaném rozsahu  $m/z$  (obr. 18). [38]



**Obrázek 18** Schématické znázornění skenu produktových iontů [38]

### 1.2.3.1.1.2. Sken iontů prekurzoru

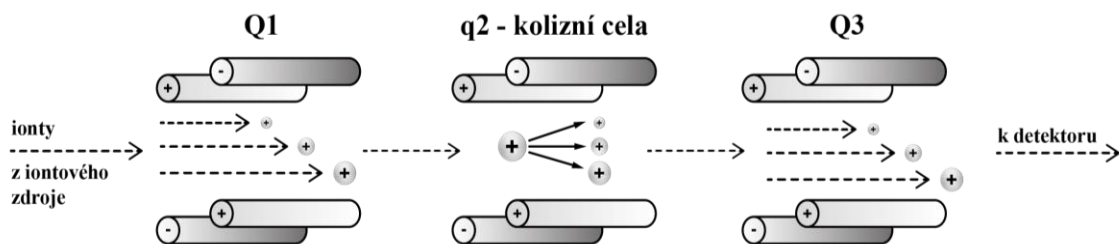
Sken iontů prekurzoru pracuje v opačném režimu než sken produktových iontů. Q1 skenuje vybraný rozsah  $m/z$ , v kolizní cele dochází k fragmentaci iontů, které jsou přenášeny na Q3. Q3 je nastaven tak, že monitoruje pouze vybraný fragmentový iont (obr. 19). [38]



**Obrázek 19** Schématické znázornění skenu iontů prekurzoru [38]

### 1.2.3.1.1.3. Sken neutrálních ztrát

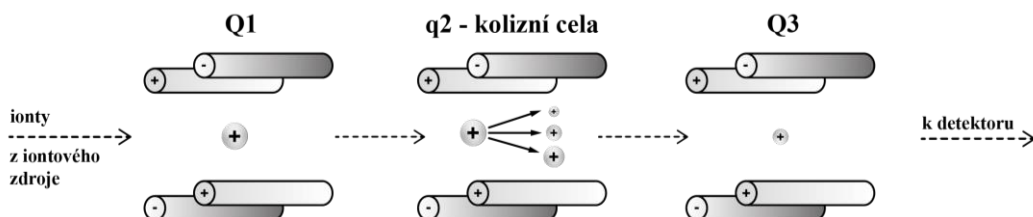
V tomto režimu Q1 a Q3 skenují současně ionty se stejnou diferencí  $m/z$ . Tato diference ukazuje neutrální fragment vzniklý v q2 (obr. 20). [38]



**Obrázek 20** Schématické znázornění skenu neutrálních ztrát [38]

### 1.2.3.1.1.4. Sken vybraných iontových reakcí

Ve skenu iontových reakcí se na Q1 vybírá selektivní prekurzorový iont, který je v q2 fragmentován a poté dochází k selektivní detekci fragmentového iontu na Q3 (obr. 21). Pokud je na Q3 detekováno dva a více fragmentových iontů prekurzoru, pak je tento mód označován jako sledování vícenásobných reakcí (MRM). [38]



**Obrázek 21** Schématické znázornění skenu iontových reakcí [38]

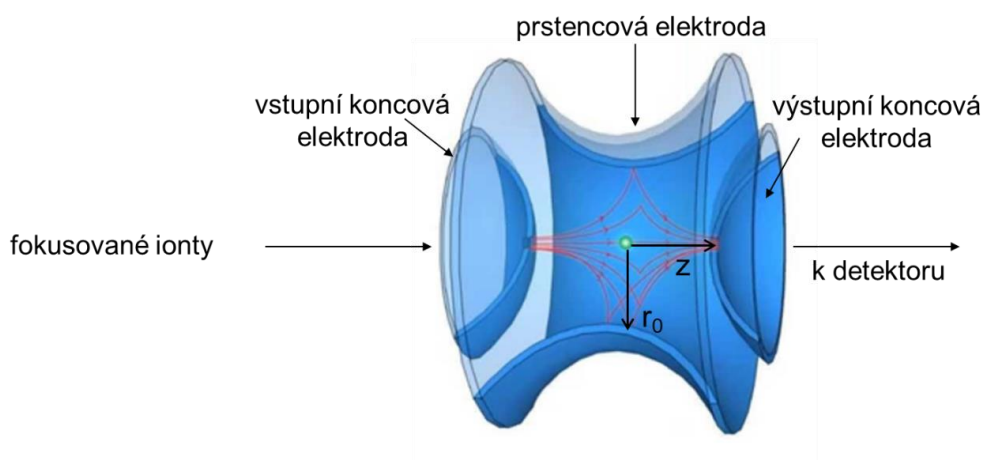
### 1.2.3.2. Iontová past

Iontová past je založena na záchytu iontů a jejich následné analýze. Existuje několik variant iontové pasti, například 2D lineární kvadrupólová iontová past a 3D (sférická) iontová past. Tyto IT používají stejný princip jako kvadrupólové analyzátory, s tím rozdílem, že kvadrupólové systémy oddělují a detekují hmoty tím, že nechávají oscilující ionty procházet kvadrupólem, aby se dostaly k detektoru, zatímco systémy iontové pasti oddělují a detekují hmoty vypouštěním iontů s nestabilními oscilacemi ze systému. [49]

Jak již napovídá název, systémy iontové pasti zachycují vytvořené ionty předtím, než je oddělí hmotnostně. Navíc pracují v pulzním režimu a pouze omezené množství iontů může být zachyceno, což má za následek užší dynamický rozsah než u kvadrupólových analyzátorů. [49]

#### 1.2.3.2.1. 3D Iontová past

3D iontová past je zařízení, které využívá trojrozměrné kvadrupólové pole k zachycení a analýze hmotnosti iontů. Vynalezl ji Wolfgang Paul a podle něj je také známá jako Paulova past. Tvoří ji kruhová elektroda, která je umístěna mezi dvěma hyperbolickými elektrodami, které tvoří celu (obr. 22). Ionty jsou krátkým napěťovým DC pulzem přivedeny do pasti vstupním otvorem koncové elektrody. Na prstencovou elektrodu je poté vloženo vhodné RF napětí, koncové elektrody jsou uzemněny, čímž se okolo centrální osy zformují příslušná elektrická pole, která se mění dynamicky v čase. Ionty jsou tak zadrženy uvnitř pasti a pohybují se po stabilních trajektoriích. [50]



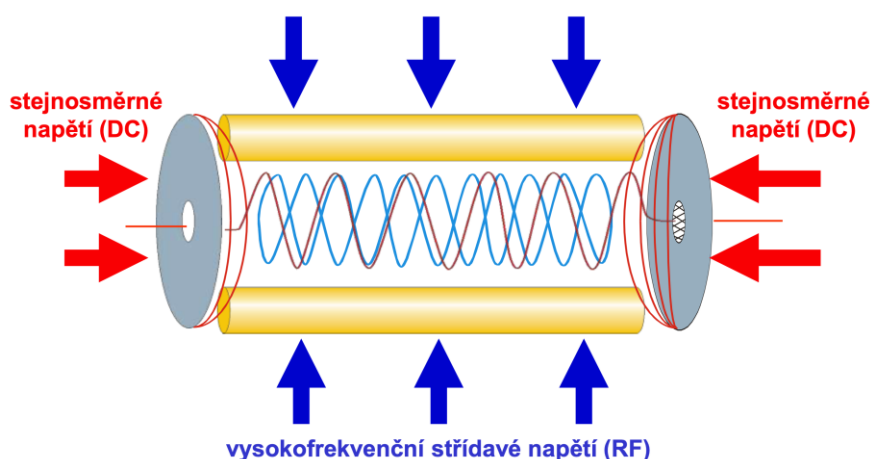
Obrázek 22 Schéma 3D iontové pasti [51]

V pasti hraje důležitou roli hélium, které kromě fragmentace iontů slouží k usměrnění iontů do středu pasti. Se vzrůstajícím RF napětím dochází k destabilizaci trajektorií „lehčích“ iontů. Pro excitaci iontů je mezi koncové elektrody aplikováno pomocné střídavé napětí. [50]

Tento analyzátor má nízkou rozlišovací schopnost, ale umožňuje tzv.  $MS^n$  experimenty. V pasti můžeme zachytit specifický prekursorový ion (ostatní jsou z pasti vypuzeny), který můžeme následně kolizemi s molekulami kolizního plynu fragmentovat za vzniku produktových iontů ( $MS^2$ ). Následně může být v pasti izolován další specifický ion vzniklý z předchozí fragmentace a tento cyklus můžeme postupně opakovat (pokud máme dostatečné množství příslušných produktových iontů) až do vzniku tzv.  $MS^n$  spektra. Proto je IT považována za hmotnostní spektrometrii specializovanou na objasnění cesty fragmentace pro strukturální stanovení cílové molekuly. [49]

### 1.2.3.2.2. Lineární iontová past

Jedná se v podstatě o kvadrupól, na jehož koncích jsou dodatečné elektrody. Ionty jsou zachyceny radiálně dvourozměrným radiofrekvenčním polem a axiálně zastavovacími potenciály aplikovanými na koncové elektrody (obr. 23). Vyznačuje se vysokou kapacitou plnění iontů (až 50x vyšší ve srovnání s 3D iontovou pastí), oproti 3D pasti má vyšší lineární dynamický rozsah a může pracovat v módu klasického kvadrupólu. Díky této možnosti může nahrazovat třetí kvadrupól v QqQ analyzátoru. Toto uspořádání je označováno jako QTrap a kromě selektivních skenovacích režimů umožňuje i  $MS^n$  experimenty podobně jako 3D past. [52]



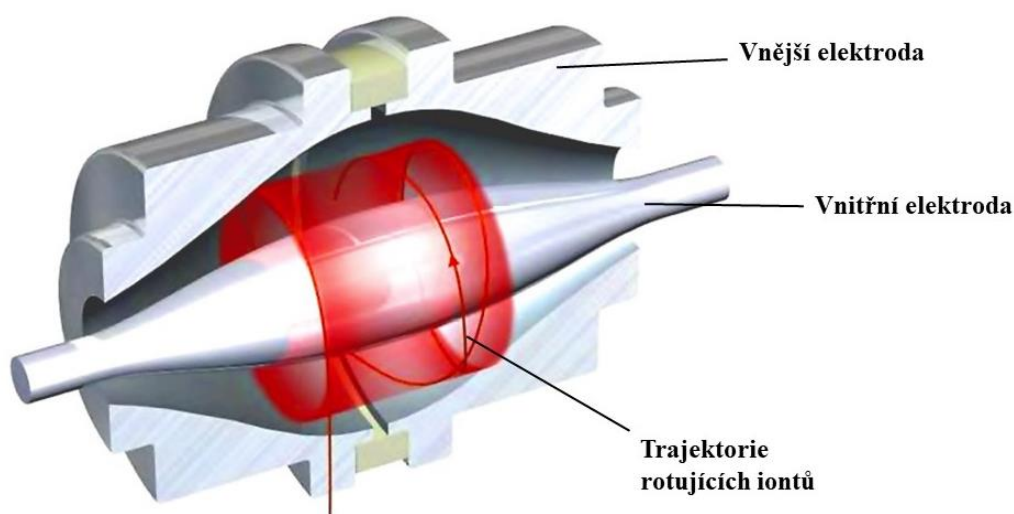
Obrázek 23 Schéma lineární iontové pasti [51]



### 1.2.3.3. Elektrostatická orbitální past

Orbitální past neboli Orbitrap je nejnovějším analyzátozem hmotnostní spektrometrie a oproti předchozím iontovým pastím s nízkou rozlišovací schopností umožňuje měření hmotnostních spekter s vysokým rozlišením, což umožňuje ověření elementárního složení pozorovaných iontů. [50, 53]

Orbitrap je jednoduchá iontová past a není v ní potřeba aplikovat žádné RF napětí a magnetické pole. Skládá se z vnější a středové vřetenové elektrody, na které je vloženo napětí (obr. 24). V orbitální pasti ionty rotují v orbitálních pohybech kolem centrální elektrody a současně se pohybují podél její osy. Ionty různých hodnot  $m/z$  jsou separovány, protože oscilují na různých frekvencích. Vnější elektroda má roli přijímacích desek pro detekci indukovaného proudu těchto oscilací. Shromážděná data v časové doméně jsou pak Fourierovou transformací (FT) transformována do frekvenční domény a následně převedena do hmotnostních spekter. [50, 53]



Obrázek 24 Schéma orbitální pasti [54]

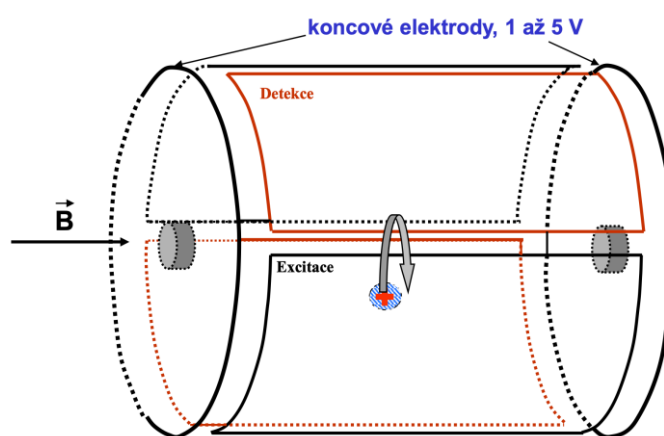
Hybridní tandemové hmotnostní spektrometry kombinující lineární iontovou past nebo kvadrupól a Orbitrap mění paradigma lipidomické analýzy. Hmotnostní rozlišení vyšší než 100 000 spolu s hmotnostní přesností stanovení správné hodnoty  $m/z < 1$  ppm se stalo běžně dosažitelným v režimech MS i MS/MS. Kombinace Orbitrapu a LIT v hybridních tandemovém přístroji umožnila efektivní MS/MS experimenty a zvýšila dynamický rozsah iontové detekce na více než tisíci násobek. Systémy MS s orbitální pastí jsou široce



používány v shotgun lipidomice, která se provádí pomocí přímé infuze vzorku do iontové zdroje bez předchozí chromatografické separace. [55]

#### 1.2.3.4. Iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací

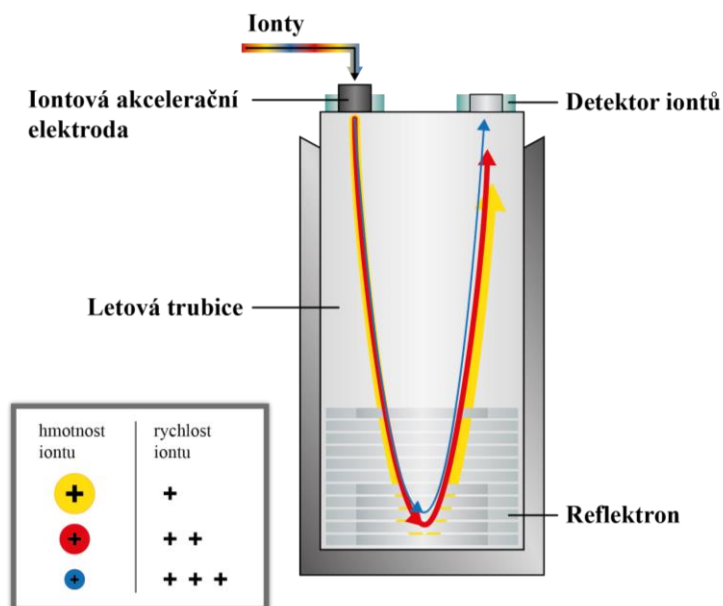
Poslední analyzátor na principu iontové pasti je analyzátor iontové cyklotronové rezonance s Fourierovou transformací, který pro separaci iontů využívá jejich cyklotronové frekvence v silném magnetickém poli. Jedná se o nejpokročilejší hmotnostní analyzátor, pokud jde o vysokou přesnost měření správné  $m/z$  a rozlišovací schopnost, která může přesahovat 10 000 000. Ionty jsou zde zachyceny v silném magnetickém poli ( $B$ ) v cele, která se skládá ze dvou koncových elektrod a dále dvou protilehlých excitačních a dvou protilehlých detekčních elektrod (obr. 25). Aplikací napětí na koncové elektrody jsou ionty zadrženy uvnitř cely, na excitační elektrody je následně vložen širokopásmový RF puls, čímž dojde k rezonanční excitaci iontů na vyšší orbit blíže k detekčním elektrodám, které detekují indukovaný proud specifických cyklotronových frekvencí jednotlivých iontů. FT se přepočtou tyto frekvence do stupnice  $m/z$  – získáme hmotnostní spektrum. [35, 50, 56]



Obrázek 25 Schéma FT – ICR cely [57]

#### 1.2.3.5. Analyzátor doby letu

Analyzátor doby letu je pulsní a neskenovací hmotnostní analyzátor. Má jednoduchou konstrukci, která se skládá z urychlovače, oblasti bez pole, (reflektronu) a detektoru uvnitř vakuové komory zvané letová trubice (obr. 26). [49]



**Obrázek 26** Schéma analyzátoru doby letu s reflektorem [49]

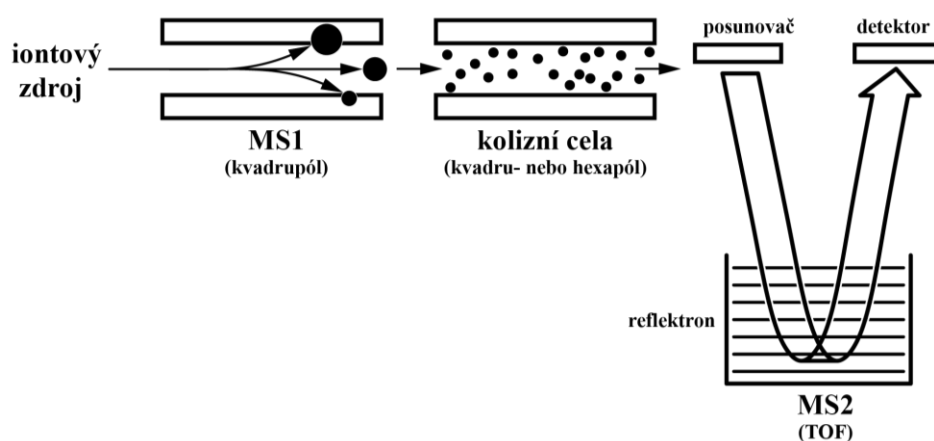
TOF odděluje a detekuje ionty různých  $m/z$  měřením doby, po kterou ionty putují oblastí bez pole. Nejprve jsou ionty vytvořené v ionizační jednotce nashromážděny a zavedeny v pulzech do letové trubice. Tyto ionty jsou urychleny působením vysokého akceleračního napětí mezi elektrodami. Vzhledem ke konstantnímu akceleračnímu napětí a kinetické energii letí uvnitř letové trubice každý iont svou jedinečnou rychlostí, aby dosáhl iontového detektoru. Rychlosti iontů se mění nepřímou s jejich hmotností, takže vyšší rychlostí letí ionty s menší hodnotou  $m/z$  a nižší rychlostí letí ionty s vyšší hodnotou  $m/z$ . [49, 50]

### 1.2.3.6. Hybridní hmotnostní spektrometry

Hybridní hmotnostní spektrometry jsou přístroje konstruované ze dvou a více různých typů hmotnostních analyzátorů a většinou se používají za účelem MS/MS a  $MS^n$  experimentů. Mezi hybridní hmotnostní spektrometry patří kombinace sektorového analyzátoru a kvadrupólu, kombinace LIT a FT analyzátorů (ICR, Orbitrap), IT-TOF a QqTOF. [57]

### 1.2.3.6.1. QqTOF

QqTOF je nejběžnější hybridní analyzátor. Ionty vstupují do letové trubice v kolmém směru (ortogonální uspořádání) a následně jsou napěťovým pulsem urychleny směrem k iontovému zrcadlu (reflektronu) a dále na detektor. V reflektoru dochází k vyrovnání kinetických energií, díky čemuž tento analyzátor poskytuje vysokou rozlišovací schopnost a umožňuje měření přesných hmotností s nízkou chybou určení správné hodnoty  $m/z$ . Pro MS/MS experimenty je možné v kvadrupólu izolovat prekurzorový ion, který dále transportujeme do kolizní cely (druhý kvadrupól nebo hexapól), kde jsou pomocí kolizního plynu a vhodně zvoleného napětí generovány jeho produktové ionty. Schéma QqTOF je ukázáno na obr. 27. [57]



**Obrázek 27** Schéma hybridního hmotnostního spektrometru QqTOF [57]

### 1.3. Lipidomika

Lipidomika je rozsáhlý vědecký obor zabývající se studiem biochemických drah lipidů v biologických systémech. Pojem lipidom lze definovat jako kompletní lipidový profil v buňce, tkáni, nebo obecně celého organismu či studovaného systému. Rozvoj této poměrně nové vědecké disciplíny byl urychlen převážně díky vývoji nových analytických technologií, z čehož nejvýznamnější je právě hmotnostní spektrometrie. Lipidomika poskytuje kvalitativní i kvantitativní informace o jednotlivých buněčných lipidech, jejich vzájemných interakcích a souvislostech s ostatními přítomnými sloučeninami (proteiny, další malé molekuly) a v posledních letech bylo v mnoha pracích dokázáno, že změny lipidomu představují důležitou roli pro studium stavů různých onemocnění, např. obezita, ateroskleróza, rakovina, atd. [58–61]

Vzhledem ke složitosti struktury a rozmanitosti molekul lipidů však stále existuje prostor pro vývoj a zlepšení lipidomických přístupů – od přípravy vzorku po analýzu MS a zpracování dat. [61]

#### 1.3.1. Příprava vzorků

Robustní, reprodukovatelné a rychlé protokoly přípravy vzorků pro širokou škálu lipidových tříd jsou nezbytné pro komplexní, spolehlivou a kvantitativní analýzu lipidů v biologických vzorcích. Při odběru vzorků, jejich konzervaci a extrakci je třeba dbát zvýšené opatrnosti. Tyto procesy by se měly vždy opakovat identicky mezi vzorky a studii, aby se získala nejvyšší reprodukovatelnost a hodnota údajů. Je třeba pečlivě zvážit vhodný výběr rozpouštědel, činidel, množství vzorků a dalších parametrů. Správná lipidomická analýza zahrnuje použití vnitřních standardů (IS), které se ke vzorku přidávají před extrakcí, aby se usnadnilo sledování výtěžků a absolutní kvantifikace. [26, 60]

Nejlepší je použití čerstvě odebraných vzorků, což je však vzhledem k praktickým okolnostem obvykle velmi obtížné, např. odběr vzorků krve v nemocnici a provádění lipidomických analýz v jiném místě. Proto jsou velmi často vzorky po odběru zmrazeny a skladovány před analýzou při teplotě  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , aby se zabránilo jejich rozkladu a zastavily se další biochemické reakce. [60, 62]

Extrakce kapalina – kapalina je nejčastěji využívanou technikou pro separaci lipidů z homogenizovaných biologických materiálů. K převedení lipidů ze vzorku do roztoku se obvykle používají nepolární organická rozpouštědla jako chloroform, methyl-*tert*-butyl ether (MTBE) a heptan. Nejčastěji používané jsou extrakční systémy na bázi chloroformu podle

Folche a Bligh – Dyera. Nedávno byly vyvinuty modifikované protokoly využívající MTBE a butanol-methanol (BUME). Dalším možným populárním přístupem je aplikovat jednoduché proteinové srážení, které může být prováděno různými rozpouštědly, např. BuOH:MeOH, MeOH, EtOH nebo acetonitril (viz Tabulka 1). [26, 60, 62]

Extrakce tuhou fází (SPE) je v lipidomice velmi specifická technika přípravy vzorku, která poskytuje vysoce obohacené vzorky s malou kontaminací. Použití SPE pro obecný screening mnoha lipidových tříd se spíše nevyužívá, protože je časově náročná. Na druhou stranu, SPE může být využita k obohacení určitých lipidových tříd, čímž se navíc sníží kontaminace. Při SPE jsou velmi často využívány C18 kolonky, které pracují na podobném principu jako chromatografie s reverzními fázemi (RP-LC). C18 kolonky lze například použít k přečištění a obohacení glykosfingolipidů po deproteinizaci. Obecně platí, že SPE je spíše používána pro cílenou lipidomiku, ačkoli je příležitostně používána i pro necílené přístupy. [31, 62–64]

**Tabulka 1** Příklady extrakčních protokolů kapalina – kapalina používaných v lipidomice

Extrakční metoda	Extrakční rozpouštědla	Poznámky
Folch [65]	2:1 (v/v) CHCl <sub>3</sub> :MeOH (I. krok) H <sub>2</sub> O nebo roztok soli (II. krok) CHCl <sub>3</sub> (III. krok)	Necílená lipidomika, široká obnova lipidových tříd, organická fáze – dolní
Bligh – Dyer [66]	2:1 (v/v) CHCl <sub>3</sub> :MeOH (I. krok) 1 část: CHCl <sub>3</sub> + 1 část: H <sub>2</sub> O (II. krok)	Necílená lipidomika, široká obnova lipidových tříd, organická fáze – dolní
MTBE [67]	3.3:1 (v/v) MTBE:MeOH (I. krok) H <sub>2</sub> O (oddělení fází) (II. krok) 10:3:2.5 (v/v/v) MTBE:MeOH:H <sub>2</sub> O (III. krok)	Necílená lipidomika, široká obnova lipidových tříd, organická fáze – horní
BUME [68]	3:1 (v/v) BuOH:MeOH (I. krok) 3:1 (v/v) heptan:ethyl acetát + 1% CH <sub>3</sub> COOH (II. krok) 3:1 (v/v) heptan:ethyl acetát (III. krok)	Široká obnova lipidových tříd, obnova lipidů z horní fáze, původně věnovaná extrakci lipidů ze vzorků tkání
Proteinové srážení (MeOH) [69]	např. MeOH	Obnova polárních lipidových tříd, např. lysofosfolipidů, fosfolipidů; preferovaný typ materiálu: lidská plazma nebo sérum

### 1.3.2. Metody analýzy vzorků

Lipidy lze analyzovat řadou metod založených na MS. Tři hlavní přístupy v lipidomickém výzkumu jsou MS analýza s přímou infuzí (známá také jako shotgun lipidomika), chromatografická separace spojená s MS (typicky kapalinová chromatografie (LC-MS)) a metody MS s desorpční ionizací (často používané pro hmotnostně spektrometrické zobrazování, MSI). Tyto přístupy přinášejí různá data z hlediska specifičnosti a citlivosti a v rámci každého přístupu dochází k podstatným rozdílům v metodách a softwaru z důvodu vlastností hmotnostních spektrometrů a typu chromatografie. [60, 70]

### 1.3.2.1. Separáční techniky v lipidomice

V minulosti se pro analýzu lipidů často používala tenkovrstv chromatografie, ale dnes se používá pedevm pro preparativní izolaci vybraných lipidů nebo lipidových trid. Plynov chromatografie spojen s hmotnostn spektrometrií je osvden technika analýzy methylesterů mastných kyselin po transesterifikaci všech lipidů, kter poskytuje informace o složení FA, ale informace o intaktních lipidech se ztrácí. Ultravysokouinn kapalinov chromatografie (UHPLC) je jednoznan nejosvědčenější a nejpouzvanj technika pouzvan pro separaci lipidů a společn se shotgun MS patří spojen kapalinov chromatografie a hmotnostn spektrometrie mezi klčov analytick přístupy v lipidomick analýze. [26, 60]

V moderní lipidomice se využívá několika typických reimů kapalinov chromatografie, kter mohou být přizpůsobeny téměř všem potebnm požadavkům včetně separace různých typů lipidových isobarů a izomerů. Dodaten informace o retenčním čase v různých režimech LC-MS zvyšuje spolehlivost a důvěryhodnost identifikace, čehož se využívá pro detekci a identifikaci nových lipidů. [60, 61]

Nejrozsrenjm a nejbenjm chromatografickm režimem v lipidomice je kapalinov chromatografie pracující v reverzních fázích vyznačující se univerzln použitelnost, vysokou selektivitou airokou skálou komern dostupných kolon od mnoha vyrobc s různými délkami kovalentn vázaných alkylových řetzců (od C4 do C30, nejtypičtější je C18). Obvykle se obsah organických rozpouštědel (např. acetonitrilu, methanolu nebo isopropanolu) během gradientu zvyšuje, zatímco obsah vody nebo vodnch pufrů klesá. Retenční mechanismus je založen na interakci hydrofobních tukových acylových řetzců se stacionární fází, kter může být ovlivněna sloenm mobilní fáze. Polární analyty jsou dobře rozpustn v polární mobilní fází, a proto mn reagují s hydrofobní stacionární fází. Oproti tomu nepolární lipidy preferují interakci s nepolární stacionární fází a pro usnadnění jejich eluce je nutn zvyit eluční slu mobilní fáze a navýšit tak podl organick složky vhodnm gradientem. Ačkoliv RP-LC umožňuje v porovnání s ostatními technikami identifikaci mnohem vtho počtu lipidů, tak tento přístup vyžaduje mnohem vt usl pr kvantitativních mřench, protože pro tak velké množství sloučenin prakticky nelze dosáhnout, aby vnitrn standardy koeluovaly s jednotlivými analyty. Matriční efekt, kter se může mezi různými vzorky lišit, tak nemusí být pln kompenzován. [60, 62, 71]

Hydrofilní kapalinov chromatografie (HILIC) separuje lipidy pedevm na základě polárních funkčních skupin, take IS koeluuje s lipidy dan tridy v rámci jednoho pku velmi blízko sebe. Pro kompenzaci matričního efektu tedy stačí přidat pouze jeden nebo dva IS,

čímž se výrazně sníží finanční náklady na analýzu, ale na druhou stranu nejde pomocí této metody rozlišit izomery, takže počet kvantifikovaných lipidů je v porovnání s RP-LC výrazně nižší. [60, 62, 71]

Kapalinová chromatografie pracující v systému s normálními fázemi (NP-LC) se využívá převážně pro analýzu nepolárních lipidů podle jejich polariry a nejčastěji využívá polární stacionární fáze na bázi silikagelu. [60, 62]

Nejnovějším přístupem pro separaci lipidů je použití superkritické fluidní chromatografie (SFC), která odděluje lipidy podle polariry podobně jako u HILIC, ale navíc umožňuje oddělení nepolárních a polárních lipidů v jedné analýze během kratší doby analýzy s vyšším chromatografickým rozlišením. [72, 73]

Další chromatografické módy, např. chirální separace, argentační chromatografie jsou používány spíše pro speciální aplikace jako je právě separace různých typů izomerů. [74–76]

### **1.3.2.2. Desorpční ionizační techniky a hmotnostně spektrometrické zobrazování**

Pro charakterizaci lipidů bylo vyvinuto a použito mnoho desorpčních ionizačních technik pracujících buď za atmosférického tlaku, nebo ve vakuu. Nejběžnější ionizační technikou v této skupině je MALDI následovaná desorpční ionizací elektrosprejem. Lipidy jsou jedny z nejhojnějších sloučenin v biologických tkáních a desorpční MS je často používána pro charakterizaci tkáně v jedné nebo dvou dimenzích (MSI). [26]

### **1.3.2.3. Shotgun lipidomika**

Shotgun lipidomika je pro analýzu lipidů spolehlivá metoda, při které lipidy nejsou oddělovány chromatografií a do hmotnostního spektrometru se zavádějí pomocí přímé infuze vzorku. Nepřetržitě vstříkovaná směs lipidového extraktu je elektrosprejem ionizována přímo v hmotnostním spektrometru. Tato technika je rychlá, vysoce citlivá a dokáže identifikovat stovky lipidů. [61, 77, 78]

Shotgun lipidomika s přímou infuzí pomocí injekční pumpy se obvykle provádí jedním skenem lipidů pomocí ESI-MS. Tento přístup je z provozního hlediska nejjednodušší, ale není vhodný pro vysoce propustné analýzy, protože nejde automatizovat (pro zavedení každého vzorku musí být přítomna obsluha). Výzkum se proto zaměřil na vývoj automatizace zavádění vzorků. Slibnou a rozšiřující se strategií pro automatizaci je implementace robotického zařízení NanoMate, které zavádí vzorky do čipu obsahujícího nanoESI trysky.

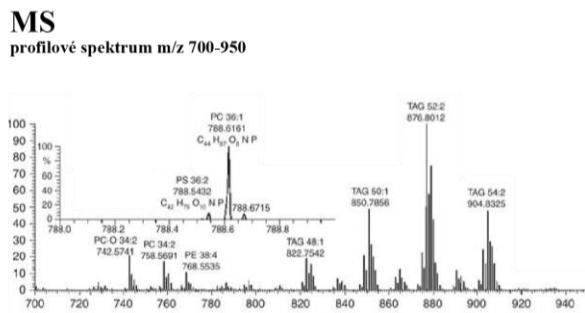


Alternativně lze využít zavedení vzorku z LC autosampleru pomocí průtokové injekční analýzy (FIA), kde je nejprve využito vyšších průtoků pro zavedení vzorku do iontového zdroje a následně je při získávání dat průtok redukován, aby se udržel konstantní celkový iontový proud (TIC) po celou dobu lipidomické analýzy. [79, 80]

Shotgun lipidomika lze využít k analýze lipidů dvěma hlavními způsoby. První koncept se nazývá *top-down* a zaměřuje se na kvantifikaci neporušených lipidů. Je založen na přesném stanovení hmotnosti v základním skenu změřeném pomocí analyzátorů s velmi vysokou rozlišovací schopností a umožňuje tak určit elementární složení pozorovaných iontů. Alternativně je využíván druhý způsob, který se nazývá *bottom-up*. Přístup *bottom-up* identifikuje lipidy na základě charakteristických iontů nebo neutrálních ztrát, které jsou odvozeny od specifických fragmentů pro lipidové třídy, např. funkčních skupin nebo mastných kyselin v MS<sup>2</sup>. Srovnání obou způsobů je ukázáno na obr. 28. [77]

### Top-down lipidomika

- Pouze přístroje s vysokým rozlišením
- Identifikace a kvantifikace na základě MS<sup>1</sup> spektra

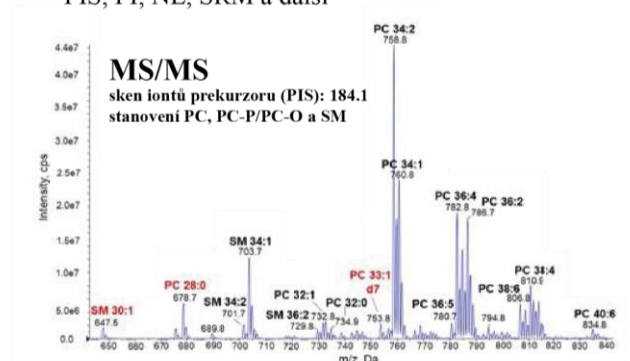


**Identifikace:**

m/z 788.6161 → PC 36:1, 788.6169

### Bottom-up lipidomika

- Přístroje s nízkým nebo vysokým rozlišením
- Identifikace a kvantifikace na základě MS<sup>2</sup> spektra - PIS, PI, NL, SRM a další



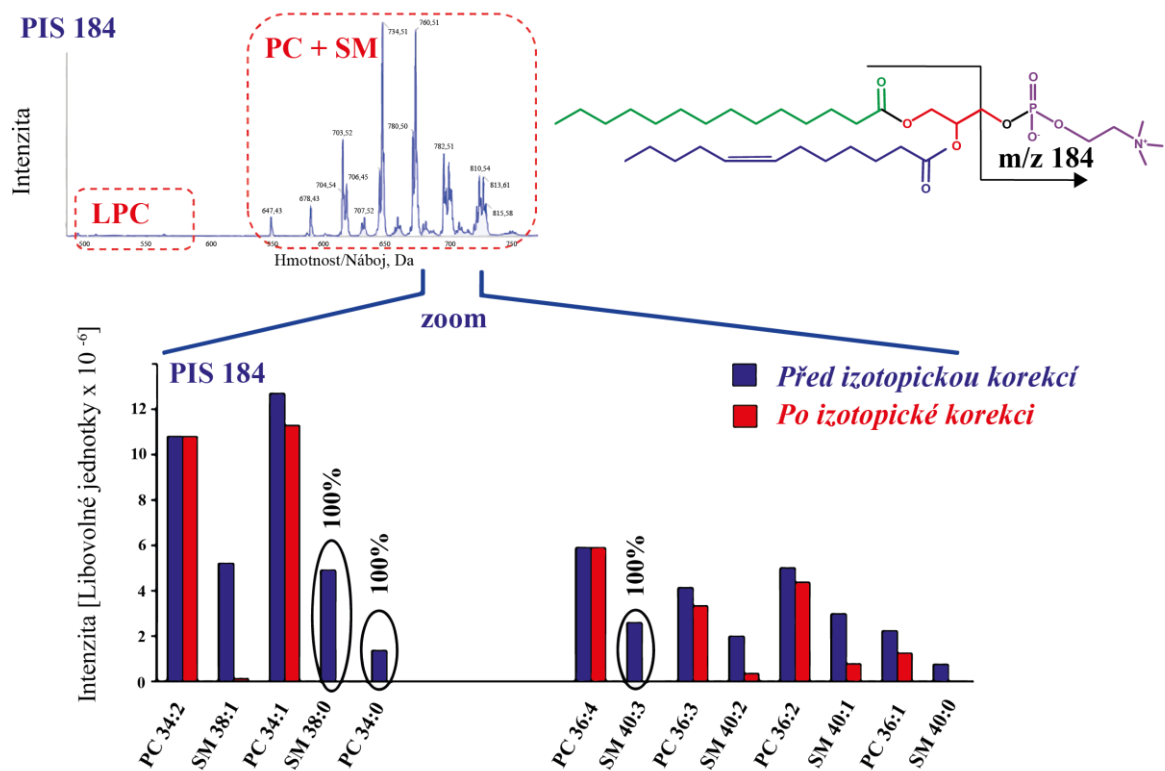
**Identifikace:**

Registrace prekurzorů, které produkují m/z 184.1 ionty v důsledku fragmentace, pouze LPC, PC a SM

**Obrázek 28** Srovnání *top-down* a *bottom-up* lipidomických přístupů

Průkopnické shotgun metody byly založeny na MS/MS s nízkým rozlišením, pro tyto metody jsou typické trojitě kvadrupólové přístroje. [60]

Globální lipidomická analýza má za následek existenci široko rozsáhlých databází lipidů, které vyžadují speciální softwarové nástroje podporující identifikaci a kvantifikaci lipidů a jejich vizualizaci z naměřených dat. Pro identifikaci lipidů pomocí shotgun lipidomiky bylo vyvinuto mnoho softwarových nástrojů, například LipidXplorer, ALEX (Analysis of Lipid Experiments/Analýza lipidových experimentů), LipidQuant, LipidView a další. Většina těchto softwarů disponuje automatickou izotopickou korekcí, která je provedena v rámci všech kvantifikovaných lipidů. Jde o to, že v případě záznamu lipidů v rámci jednoho spektra dochází k překryvu hlavního izotopického píku jednoho lipidu s M+2 izotopem jiného lipidu, který má o jednu dvojnou vazbu méně. Kromě toho může dojít i k překryvu lipidů využívajících stejný typ skenu. Jako příklad lze uvést fosfatidylcholin (PC) a SM, které obsahují cholinovou funkční skupinu a jsou hlavními složkami eukaryotických lipidů. Obě kategorie lipidů lze monitorovat pomocí pozitivního iontového režimu elektrosprejové tandemové MS za použití skenu iontů prekurzoru  $m/z$  184. Přestože se PC objevují v sudých  $m/z$  a SM v lichých  $m/z$ , může docházet k významnému překrývání jejich izotopů. Za účelem odstranění těchto zkreslení v důsledku překryvů izotopů byl vytvořen izotopový korekční algoritmus. Příklad izotopické korekce je ukázán na obr. 29. [81–86]



**Obrázek 29** Izotopická korekce [87]

Podle publikovaných článků je shotgun lipidomika vhodná pro rychlé a účinné stanovení a kvantifikaci fosfolipidů, sfingolipidů a neutrálních lipidů v různých koncentracích. Navíc se již využívá v klinickém výzkumu. Hlavní nevýhoda tohoto přístupu souvisí s obtížemi při udržování konstantní koncentrace lipidů v průběhu sběru dat, protože se vzorky ředí čistou mobilní fází. Pozornost by měla být věnována také optimalizaci a úpravě metodiky, aby se zabránilo kontaminaci systému při měření klinických vzorků. [80, 88–90]

## 1.4. Validace analytických metod v hmotnostní spektrometrii

Validace je ověření, že je daná metoda vhodná k danému účelu a poskytuje výsledky s definovanou jistotou. Pokyny pro validaci bioanalytických metod jsou vypracovány různými organizacemi jako např. Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) a Evropskou agenturou pro léčivé přípravky (EMA) a je třeba, aby byly dodržovány. Při validaci se obvykle stanovují parametry, kterými jsou kalibrační křivka, linearita, limit detekce, limit kvantifikace, správnost, přesnost, extrakční výtěžnost, matricové efekty, selektivita, paměťový efekt a další. Hlavním cílem validace metody je prokázat spolehlivost konkrétní metody pro stanovení koncentrace analytu ve specifické biologické matrici, jako je krev, sérum, plazma, moč nebo sliny. Kompletní validace metody by měla být provedena pro každou analytickou metodu, ať už novou nebo založenou na literatuře. [85, 91–94]

### 1.4.1. Kalibrační křivka

Kalibrační křivka ukazuje vztah mezi odezvou detektoru a koncentrací analytu. Linearita je nejčastěji hodnocena korelačním koeficientem ( $R$ ) =  $\pm 1$ . Kalibrační standardy se známým množstvím analytu se vztahují na rozsah kalibrace, zahrnují kalibrační křivku a měly by být připraveny ve stejné biologické matrici jako vzorky ze studie. V ideálním případě by před provedením validace analytické metody mělo být známo, jaký rozsah koncentrací je očekáván. Rozsah kalibrace je definován LLOQ, což je nejnižší kalibrační standard, a ULOQ, což je horní mez kvantifikace. Mělo by být použito minimálně šest úrovní kalibračních koncentrací. Pro každý zkoumaný standard během validace metody by měla existovat jedna kalibrační křivka. Zpětně vypočítané koncentrace kalibračních standardů by se měly pohybovat v rozmezí  $\pm 15$  % relativní směrodatné odchylky (RSD), s výjimkou LLOQ, pro který by to mělo být v rozmezí  $\pm 20$  %. [91, 93, 94]

Mez detekce (LOD) je nejnižší detekovatelné množství ve vzorku, odpovídá koncentraci, pro kterou je analytický signál statisticky významně odlišný od šumu. Mez stanovitelnosti (LOQ) je nejnižší stanovitelné množství ve vzorku, je stanovitelné s dostatečnou přesností a správností. [91]

### **1.4.2. Správnost**

Správnost analytické metody popisuje těsnost shody mezi výsledkem měření a přijatou referenční hodnotou (vyjádřeno v procentech), přičemž tedy 100 % znamená úplnou shodu. Správnost by měla být posuzována na směsných vzorcích obohacených známým množstvím standardu. Správnost by měla být stanovena analýzou na minimálně 3 koncentračních hladinách (nízká, střední, vysoká hladina = LL, ML, HL), které pokrývají rozsah kalibračních křivek, a pro každou hladinu by mělo být nejméně 5 vzorků. Validace správnosti je hodnocena během jednoho dne a mezi jednotlivými dny (minimálně 2 dny). Průměrná koncentrace by měla být v rozmezí 15 % nominálních hodnot, s výjimkou LLOQ, který by měl být v rozmezí 20 % nominální hodnoty. [91, 93]

### **1.4.3. Přesnost**

Přesnost analytické metody popisuje blízkost jednotlivých opakovaných měření a je vyjadřována jako variační koeficient, což je v podstatě RSD. Přesnost by měla být prokázána u směsných vzorků s nízkou, střední a vysokou koncentrační hladinou IS v rámci jednoho dne a mezi různými dny. Pro každou koncentrační hladinu by mělo být minimálně 5 vzorků. Přesnost (% RSD) koncentrací stanovených na každé úrovni by neměla překročit 15 %, s výjimkou LLOQ, kde by neměla překročit 20 %. [91, 93]

### **1.4.4. Extrakční výtěžnost**

Extrakční výtěžnost by měla být optimalizována, aby bylo zjištěno, že je extrakce účinná a reprodukovatelná. Výtěžnost nemusí být 100 %, ale rozsah výtěžnosti analytu a IS by měl být neměnný a reprodukovatelný. Výtěžnost extrakce je stanovována porovnáním intenzity signálu směsných vzorků s IS před extrakcí a s IS po extrakci na 3 koncentračních hladinách (LL, ML, HL). [85, 92]

### **1.4.5. Matriční efekt**

Matriční efekt je definován jako změna odezvy analytu v důsledku rušivých a často neidentifikovaných složek v matici vzorku a měl by být zkoumán minimálně na 2 koncentračních hladinách. Během validace je nutné vyhodnotit tzv. matriční faktor pro alespoň 6 různých nezávislých vzorků (nesmí být používán směsný vzorek), který je určen poměrem odezev IS přidávaných do jednotlivých vzorků obsahujících studovanou matici k odezvám IS v rozpouštědle bez matrice. Následně je vypočítán matriční efekt, který je

vyjádřen standardní relativní odchylkou mezi maticními faktory vypočítanými pro jednotlivé zkoumané vzorky. RSD by měla být  $\pm 15\%$ . [85, 93, 94]

#### **1.4.6. Selektivita**

Vyvinutá analytická metoda by měla být schopna odlišit sledované analyty a IS od endogenních složek v matici nebo jiných složek ve vzorku. Směs IS musí být testována z hlediska její vhodnosti k vyloučení jakýchkoliv maticových nebo systémových interferencí, které by mohly vést ke kvantifikačním chybám. Selektivita by měla být prokázána pomocí nejméně 6 individuálních vzorků a je počítána na základě poměru odezvy slepých maticových vzorků (vzorky bez IS) a odezvy vzorků obohacených IS na nízké hladině koncentrace po extrakci. Nepřítomnost rušivých složek je obvykle akceptována, pokud je odezva menší než 20 % LLOQ pro analyt a 5 % pro vnitřní standard. [85, 93]

#### **1.4.7. Paměťový efekt**

Paměťový efekt je změna koncentrace způsobená zbytkovým analytem z předchozího vzorku, který zůstává v analytickém přístroji. Paměťový efekt by měl být řešen a minimalizován během vývoje metody. Během validace by se paměťový efekt měl posuzovat vstřikováním slepých vzorků (vzorky bez matrice a IS). Ve slepých vzorcích by neměl být paměťový efekt větší než 20 % LLOQ pro analyt a 5 % pro vnitřní standard. [93, 94]

#### **1.4.8. Další parametry validace**

Mezi další parametry validace patří opakovatelnost, robustnost, integrita ředění nebo stabilita. Opakovatelnost metody se stanovuje na více koncentračních hladinách pomocí RSD. Robustnost metody je její schopnost nebýt ovlivněna malými změnami v podmínkách analýzy a je vyjádřena pomocí RSD. Integrita ředění je posouzení postupu ředění vzorku, ředění by nemělo ovlivnit přesnost a správnost. Mělo by být provedeno i hodnocení stability, aby se zjistilo, že každý krok učiněný během přípravy, zpracování a analýzy vzorků, jakož i použité podmínky skladování nemají vliv na koncentraci analytu. [91, 94]

## 2. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 2.1. Seznam použitých chemikálií a standardů

- 1-Butanol (BuOH) – HPLC čistota,  $\geq 99,7$  %, Honeywell (Seelze, Německo)
- Deionizovaná voda
- Ethyl-acetát (EtOAc) – LC-MS čistota, Honeywell (Seelze, Německo)
- Hexan (Hex) – LC-MS čistota, Fluka (Buchs, Švýcarsko)
- Chloroform (CHCl<sub>3</sub>) – LC čistota, Merck (Darmstadt, Německo)
- Methanol (MeOH) – LC-MS čistota,  $\geq 99,9$  %, Honeywell (Seelze, Německo)
- Methyl-*tert*-butyl ether (MTBE) – LC čistota, Merck (Darmstadt, Německo)
- Octan amonný –  $\geq 99,9$  % stopových kovů, Honeywell (Seelze, Německo)
- Uhličitan amonný –  $\geq 30,0$  % NH<sub>3</sub>, Honeywell (Seelze, Německo)
- 2-Propanol (IPA) – LC-MS čistota,  $\geq 99,9$  %, Honeywell (Seelze, Německo)
- Směs vnitřních standardů (IS mix) – Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA), Nu-Chek (Elysian, MN, USA) nebo Merck (Darmstadt, Německo)

### 2.2. Přístroje a zařízení

- Analytická váha ABT 120-5DM – Kern & Sohn GmbH (Balingen, Německo)
- Dávkočep Multipette M4 – Eppendorf (Hamburg, Německo)
- Hmotnostní spektrometr QTRAP 6500 – Sciex (Concord, Ontario, Kanada)
- Hmotnostní spektrometr XEVO TQD s trojitým kvadrupólem – Waters (Milford, MA, USA)
- Kapalinový chromatograf s kapilární pumpou 1260 Infinity Series, binární pumpou 1290 Infinity Series a autosamplerem 1260 Infinity Series – Agilent Technologies (Waldbronn, Německo)
- Koncentrátor vzorku NDK200-2N – MIULAB (Hangzhou, Zhejiang, Čína)
- Mechanické pipety s nastavitelným objemem – Sartorius (Goettingen, Německo)
- Laminární box MSC-Advantage II. třídy – Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
- Minitřepačka IKA MS1 – IKA (Staufen, Německo)
- Odstředivka Hettich EBA 20 – Hettich (Tuttlingen, Německo)
- Pasteurovy pipety skleněné – Thermo Fisher Scientific (Bremen, Německo)
- Referenční systém čištění vody Milli-Q – Millipore (Molsheim, Francie)
- Ultrazvuková lázeň FB Fisherbrand 15061H – Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)

### 2.3. Anotace a nomenklatura lipidů

Anotace a nomenklatura lipidů byla řízena aktualizovanými pokyny stanovenými Mezinárodním výborem pro klasifikaci a nomenklaturu lipidů. Pro ceramidy Cer, pro hexosylceramidy HexCer, pro dihexosylceramidy Hex2Cer, pro glukosylceramidy GlcCer, pro laktosylceramidy LacCer a pro sfingomyeliny SM. Jednotlivé lipidy byly anotovány na dvou úrovních. První byla úroveň celkového složení, je to nejnižší anotační úroveň, a představuje celkové složení lipidu, tj. součet atomů uhlíků, dvojných vazeb a počet dalších atomů kyslíku (CN:DB), např. SM 36:2;O2. Druhou byla úroveň rozpoznání mastného alkylu/acylu, která je postavena na identifikaci fragmentů v MS nebo MS/MS spektru, a kde lomítkem je charakterizována známá *sn*-pozice, např. Cer 18:1;O2/16:0. Nomenklatura sfingolipidů je založena na přítomnosti sfingosinu v molekule, číslo za zkratkou třídy udává počet uhlíků a dvojně vazby sfingosinu následované počtem kyslíků a N-vázaným mastným acylem (např. HexCer 18:1;O2/22:0). [95, 96]

### 2.4. Příprava směsi vnitřních standardů

IS mix (Tabulka 2) pro kvantifikovanou třídu sfingolipidů byl připraven smícháním vybraných IS ve vhodných koncentracích. Zásobní roztoky od standardů byly připraveny ve směsi chloroform/methanol (1:1, v/v). Přidaný objem pro vzorky plazmy byl ve většině případů 20  $\mu$ l kromě experimentů týkajících se validace, kde byla použita i jiná množství. Koncentrace vztažená na ml směsi IS je označena jako  $c_{IS-mix}$ . Směs standardů byla před extrakcemi přidávána k 25  $\mu$ l plazmy, proto je zde uvedena i koncentrace vztažená na ml plazmy ( $C_{plazma}$ ).



**Tabulka 2** Hmotnostní a molární koncentrace vnitřních standardů včetně koncentrace jednotlivých zásobních roztoků a příslušných objemů pipetovaných do finální směsi

	<b>Czásobní [<math>\mu\text{g}/\mu\text{l}</math>]</b>	<b>V [<math>\mu\text{l}</math>]</b>	<b>CIS-mix [<math>\mu\text{g}/\text{ml}</math>]</b>	<b>Cplazma [<math>\mu\text{g}/\text{ml}</math>]</b>	<b>Cplazma [<math>\text{nmol}/\text{ml}</math>]</b>	<b>MW</b>
Cer 30:1;O2	2,00	4,00	1,60	1,28	2,66	481,45
Cer 35:1;O2	2,00	4,00	1,60	1,28	2,32	551,53
LacCer 30:1;O2	2,00	3,00	1,20	0,96	1,19	805,56
GlcCer 30:1;O2	2,00	1,30	0,52	0,42	0,65	643,50
SM 30:1;O2	2,00	70,00	28,00	22,40	34,65	646,51
SM 36:2;O2 d9	1,00	160,00	32,00	25,60	34,71	737,64
Rozpouštědlo	CHCl <sub>3</sub> /MeOH 1:1 (v/v)	4757,70				
V <sub>celkový</sub>		5000,00				

## 2.5. Biologické vzorky

Plazma dobrovolníků byla získána na Onkologické klinice Lékařské fakulty, Univerzity Palackého a Fakultní nemocnice Olomouc (Česká republika). Dobrovolníci byli nalačno a dostali doporučení, aby se večer před odběrem vyhnuli těžkým jídlům a konzumaci alkoholu. Všichni dárči podepsali informovaný souhlas se zařazením do této studie.

Lidská krev byla odebrána do zkumavek určených pro odběr krve a zkumavky byly uchovány 30 minut při pokojové teplotě. Poté byly vzorky krve odstředěny při 2500 otáčkách/min při 20 °C po dobu 10 minut a byla získána plazma. 2 ml supernatantu byly přeneseny do Eppendorfových zkumavek, které byly následně skladovány při teplotě – 80 °C až do dalšího zpracování pro lipidomickou analýzu.

## 2.6. Kontrola kvality

Pro kontrolu kvality (QC) byl připraven směsný vzorek, který obsahoval stejný podíl plazmy 25 zdravých mužů a 25 mužů s kolorektálním karcinomem. Jako standardní referenční materiál byl použit NIST SRM 1950 (metabolity ve zmrazené lidské plazmě) (NIST plazma).

## 2.7. Příprava vzorku

### 2.7.1. Extrakce podle Folche

Plazma byla extrahována podle modifikovaného Folchova postupu. Do 4 ml skleněných vialek bylo pipetováno 20  $\mu$ l IS mixu (pro experimenty týkající se validace byla přidána i jiná množství), 25  $\mu$ l plazmy, 2 ml chloroformu a 1 ml methanolu a vzniklá směs byla homogenizována v ultrazvukové lázni po dobu 15 minut při 40 °C. Když vzorky dosáhly okolní teploty, bylo přidáno 600  $\mu$ l 250 mM uhličitanu amonného ve vodě (500 ml vody + 12.01125 g uhličitanu amonného), vzorky byly 15 minut homogenizovány v ultrazvukové lázni při 40 °C, 5 minut odstředovány při 3000 otáčkách/min a poté byla organická vrstva (spodní vrstva) převedena pomocí Pasteurových pipet do 8 ml skleněných vialek. Extrakce byla opakována přidáním 2 ml chloroformu do vodné fáze původních 4 ml vialek. Následovala 15minutová homogenizace vzorků v ultrazvukové lázni při 40 °C, odstředování po dobu 5 minut při 3000 otáčkách/min a nakonec byla spodní organická vrstva odpipetována a zkombinována s vrstvou první. Organická fáze byla odpařována pod proudem N<sub>2</sub> do sucha a po odpaření byly extrakty skladovány při teplotě – 80 °C. V den měření byly vzorky samovolně rozmrazeny na okolní teplotu. Extrakční zbytky byly rozpuštěny v 500  $\mu$ l směsi CHCl<sub>3</sub>:MeOH (1:1, v/v), po dobu 10 s promíchány na minitřepačce a převedeny do HPLC vialek. Vzorky byly pro analýzu 15x zředěny pomocí rozpouštědla vzorku, kterým byla směs CHCl<sub>3</sub>:MeOH:IPA (1:2:4, v/v/v) s 5 mM octanem amonným. [65, 85]

### 2.7.2. MTBE extrakce

Do 4 ml skleněných vialek bylo pipetováno 20  $\mu$ l IS mixu, 25  $\mu$ l plazmy, 2,4 ml MTBE a 720  $\mu$ l methanolu a vzniklá směs byla promíchávána na minitřepačce po dobu 5 minut. Poté byla směs homogenizována v ultrazvukové lázni po dobu 15 minut při 40 °C. Když vzorky dosáhly okolní teploty, bylo přidáno 600  $\mu$ l vody. Následně byly vzorky promíchávány na minitřepačce po dobu 3 minut, 5 minut odstředovány při 3000 otáčkách/min

a poté byla organická vrstva (horní vrstva) převedena pomocí Pasteurových pipet do 8 ml skleněných vialek. Extrakce byla opakována přidáním 1,3 ml MTBE, 390  $\mu$ l methanolu a 310  $\mu$ l vody do vodné fáze původních 4 ml vialek. Následovalo 5minutové promíchávání vzorků na minitřepačce, 15minutová homogenizace vzorků v ultrazvukové lázni při 40 °C, odstředování po dobu 5 minut při 3000 otáčkách/min a nakonec byla horní organická vrstva odpipetována a zkombinována s vrstvou první. Organická fáze byla odpařována pod proudem N<sub>2</sub> do sucha a po odpaření byly extrakty skladovány při teplotě – 80 °C. V den měření byly vzorky samovolně rozmrazeny na okolní teplotu. Extrakční zbytky byly rozpuštěny v 500  $\mu$ l směsi CHCl<sub>3</sub>:MeOH (1:1, v/v), po dobu 10 s promíchány na minitřepačce a převedeny do HPLC vialek. Vzorky byly pro analýzu 15x zředěny pomocí rozpouštědla vzorku, kterým byla směs CHCl<sub>3</sub>:MeOH:IPA (1:2:4, v/v/v) s 5 mM octanem amonným. [67]

### **2.7.3. Proteinové srážení s BuOH/MeOH**

Do 4 ml skleněných vialek bylo pipetováno 20  $\mu$ l IS mixu, 25  $\mu$ l plazmy a 250  $\mu$ l BuOH:MeOH (1:1, v/v). Vzniklá směs byla 1 minutu promíchávána na minitřepačce. Následovala 15minutová homogenizace vzorků v ultrazvukové lázni při 40 °C a odstředování po dobu 10 minut při 3000 otáčkách/min. Nakonec byly vzorky filtrovány přes 0,2  $\mu$ m filtr a převedeny do HPLC vialek. Extrakty byly skladovány při teplotě – 80 °C. V den měření byly vzorky samovolně rozmrazeny na okolní teplotu a byly pro analýzu 15x zředěny pomocí rozpouštědla vzorku, kterým byla směs CHCl<sub>3</sub>:MeOH:IPA (1:2:4, v/v/v) s 5 mM octanem amonným. [97, 98]

### **2.7.4. Extrakce s EtOAc**

Do 4 ml skleněných vialek bylo pipetováno 20  $\mu$ l IS mixu, 10  $\mu$ l plazmy a 570  $\mu$ l EtOAc:IPA (1:4, v/v). Vzniklá směs byla 3 minuty promíchávána na minitřepačce. Následovala 10minutová homogenizace vzorků v ultrazvukové lázni při 40 °C a odstředování po dobu 10 minut při 3000 otáčkách/min. Nakonec byly vzorky filtrovány přes 0,2  $\mu$ m filtr a převedeny do HPLC vialek. Extrakty byly skladovány při teplotě – 80 °C. V den měření byly vzorky samovolně rozmrazeny na okolní teplotu a byly pro analýzu 15x zředěny pomocí rozpouštědla vzorku, kterým byla směs CHCl<sub>3</sub>:MeOH:IPA (1:2:4, v/v/v) s 5 mM octanem amonným. [99]

## 2.8. HPLC podmínky

Kapalinový chromatograf Agilent s kapilární pumpou 1260, binární pumpou 1290 a autosamplerem 1260 byl použit pro experimenty přímé injekční analýzy. Pro kapilární pumpu byl nastaven konstantní průtok 3,5 µl/min po dobu 7,5 min a použitá mobilní fáze byla směs CHCl<sub>3</sub>:MeOH:IPA (1:2:4, v/v/v). U binární pumpy s mobilní fází CHCl<sub>3</sub>:MeOH:IPA (1:2:4, v/v/v) s 0,5 % vody byl proveden následující gradient průtoku: 0-0,45 min 50 µl/min; 0,45-0,47 min přechod z 50 µl/min na 5 µl/min, 0,47-6,70 min 5 µl/min; 6,70-6,80 min přechod z 5 µl/min na 200 µl/min; a 6,80-7,50 min 200 µl/min. Kapilární pumpa byla využívána pro stabilní TIC a binární pumpa pro zavedení vzorku do MS a čištění systému. Dávkovaný objem byl 50 µl. Teplota autosampleru byla nastavena na 4 °C. Po každém nástřiku byla injekční jehla promyta pomocí injekčního programu směsí MeOH:H<sub>2</sub>O (1:1, v/v), Hex:IPA:CHCl<sub>3</sub> (7:1,5:1,5; v/v/v) a CHCl<sub>3</sub>:MeOH (1:1, v/v) a pravidelně po pěti nástřicích byla použita promývací metoda celého systému, která trvala 4,5 min, po celou dobu byl pro binární pumpu nastaven vysoký průtok 200 µl/min, kapilární pumpa měla konstantní průtok 3,5 µl/min a pomocí injekčního programu byla postupně jehla promyta směsí MeOH:H<sub>2</sub>O (1:1, v/v), Hex:IPA:CHCl<sub>3</sub> (7:1,5:1,5; v/v/v) a CHCl<sub>3</sub>:MeOH (1:1, v/v) a nakonec bylo do systému nastříknuto 80 µl slepého vzorku. [86, 88]

## 2.9. MS podmínky – XEVO TQD

Hmotnostní spektrometr XEVO TQD s trojitým kvadrupólem byl vybaven elektrosprejovým iontovým zdrojem a nastaven na měření kladně nabitých iontů. Pro vlastní měření byly nastaveny následující podmínky: napětí na kapiláře 3,75 kV, napětí na kuželové elektrodě 30 V, desolvatační teplota 200 °C, průtok desolvatačního plynu 300 l/hod, průtok plynu na kuželové elektrodě 20 l/hod, a kolizní energie 40 V. Hmotnostní spektrum bylo získáno kombinací skenu iontů prekursoru (PIS)  $m/z$  264,3 v pozitivním iontovém režimu specifickém pro Cer v rozmezí  $m/z$  450-660 při skenovací rychlosti 1000 Da/s pomocí kontinuálního režimu a PIS  $m/z$  184,1 v pozitivním iontovém režimu specifickém pro lipidy obsahující fosfocholin (SM, PC, LPC) v rozmezí  $m/z$  640-850 při skenovací rychlosti 100 Da/s pomocí kontinuálního režimu.

## 2.10. MS podmínky – QTRAP 6500

Hybridní hmotnostní spektrometr QTRAP 6500 s elektrosprejovou ionizací byl použit s následujícími podmínkami: snímání kladně nabitých iontů, tlak sušícího plynu 20 psi, napětí

v iontovém zdroji 5500 V, teplota zdroje 50 °C, tlak plynu 1 v iontovém zdroji 35 psi, tlak plynu 2 v iontovém zdroji 20 psi, deklasterační potenciál 100 V pro Cer, HexCer, Hex2Cer a 80 V pro SM, počáteční potenciál 10 V, kolizní energie 40 V pro Cer, HexCer, Hex2Cer a 30 V pro SM, a kolizní výstupní potenciál 15 V. Hmotnostní spektrum bylo získáno kombinací PIS  $m/z$  264,3 v pozitivním iontovém režimu specifickém pro Cer, HexCer a Hex2Cer v rozmezí  $m/z$  450-980 při skenovací rychlosti 200 Da/s pomocí MCA režimu (Multi Channel Analysis – skeny jsou postupně sčítány a výsledkem je suma všech skenů) a PIS  $m/z$  184,1 v pozitivním iontovém režimu specifickém pro lipidy obsahující fosfocholin (SM, PC, LPC) v rozmezí  $m/z$  640-850 při skenovací rychlosti 200 Da/s pomocí MCA režimu.

## 2.11. Zpracování naměřených dat

Data ze shotgun experimentů na XEVO TQD byla získána a předběžně zpracována pomocí softwaru MassLynx (Waters). Data získaná z měření na QTRAP 6500 byla nejprve zpracována pomocí softwaru Analyst (Sciex), dále byla data extrahována pomocí softwaru LipidView (Sciex) a exportována do .txt souboru. Výsledná binární data obsahující  $m/z$  vs. intenzita pro každý vzorek byla nakopírována do macro skriptu v Excelu (LipidQuant) pro automatizované zpracování dat. V tomto macro skriptu byly jednotlivé  $m/z$  s konkrétní hodnotou intenzity párovány s teoretickými hodnotami  $m/z$  (databáze všech teoreticky možných lipidů v rámci daného PIS skenu) s předdefinovanou tolerancí hmotnostního okna (0,3 Da). Následně byla v LipidQuantu automaticky provedena izotopická korekce, jednotlivé hodnoty odečtených intenzit byly poděleny intenzitou příslušného IS a vynásobeny jeho koncentrací, čímž byly získány molární koncentrace pro všechny nalezené lipidy (v případě validace byly odečteny pouze intenzity interních standardů). Výsledné tabulky, kde byly zahrnuty pouze endogenně zastoupené lipidy a IS, byly exportovány do jiného Excel souboru a byly použity pro výpočet validačních parametrů či statistické vyhodnocení v případě NIST plazmy a klinické studie. Multivariační analýza dat (MDA) zjištěných koncentrací ve vzorcích plazmy zahrnujících 25 zdravých kontrol a 25 pacientů s kolorektálním karcinomem byla provedena pomocí softwaru SIMCA, verze 13.0 (Umetrics, Umeå, Švédsko) a pomocí volně přístupného softwarového jazyka a prostředí R (<https://cran.r-project.org/>). Před vlastní statistickou analýzou byla provedena logaritmická transformace dat a Pareto škálování. [80]

## 2.12. Validace metody

Validace shotgun metody na QTRAP 6500 byla provedena v souladu s FDA a EMA a přispůsobena pro konkrétní potřeby lipidomické analýzy na základě publikovaných článků v oboru. Validace byla provedena pro jednotlivé IS z IS mixu jako zástupce pro odpovídající lipidové třídy. Předpokladem je, že každý IS je pro danou lipidovou třídu reprezentativní a při analytickém experimentu se chová velmi podobně jako ostatní přirozeně se vyskytující lipidy. Pro validaci byl použit modifikovaný extrakční protokol podle Folche. Vzorek 25  $\mu$ l biologického materiálu (směsné plazmy nebo plazmy) byl obohacen IS mixem buď před extrakcí, nebo po ní. Všechny validované parametry byly vypočteny pomocí Microsoft Excel. [85, 92–94]

### 2.12.1. Kalibrační křivka

Kalibrační křivky byly připraveny tak, že směsný vzorek plazmy byl před extrakcí obohacen IS mixem v různých úrovních koncentrace. Pro sestavení kalibrační křivky bylo připraveno celkem 7 kalibračních bodů, postupně bylo do jednotlivých vialek pipetováno 5, 10, 15, 20, 25, 30 a 35  $\mu$ l IS mixu a každý kalibrační bod byl připraven třikrát. Jednotlivé body kalibrace byly zprůměrovány a pro každý standard byla sestavena příslušná kalibrační křivka skládající se s průměrných hodnot a chybových úseček. Koncentrace jednotlivých kalibračních bodů byly zpětně vypočteny z regresní rovnice a následně porovnány s teoretickými hodnotami, přičemž rozdíl mezi teoretickou a vypočtenou koncentrací by měl být <15 %. LOQ byl stanoven jako nejnižší kalibrační bod a LOD byl stanoven jako 1/3 LOQ. [85]

### 2.12.2. Přesnost a správnost

Pro stanovení přesnosti a správnosti byly vzorky před extrakcí obohaceny IS mixem na nízké, střední a vysoké koncentrační úrovni a pro každou hladinu koncentrace byly vždy připraveny 3 vzorky. Již sestavené kalibrační křivky byly použity pro stanovení správnosti, přičemž regresní rovnice kalibračních křivek byly použity pro výpočet experimentálně zjištěných koncentrací jednotlivých vzorků. Pro stanovení správnosti byly experimentálně zjištěné koncentrace poděleny teoretickými hodnotami a vynásobeny stem, přičemž odchylka od teoretické hodnoty by měla být v intervalu  $\pm 20$  % u vzorků s nízkou koncentrační hladinou IS mixu a  $\pm 15$  % u vzorků se střední a vysokou hladinou koncentrace IS mixu. Přesnost byla počítána z intenzit jednotlivých IS, byla určena jako standardní relativní

odchylka v rámci příslušných opakovaných experimentů a neměla by překročit 15 %, s výjimkou LLOQ, kde by neměla překročit 20 %. [85]

Vzorky pro přesnost a správnost byly zpracovány dvěma operátory. Parametry byly hodnoceny během jednoho (pátek) a druhého (pondělí) dne a mezi jednotlivými dny pro každého operátora a následně byla hodnocena přesnost a správnost mezi operátory během jednoho a druhého dne a mezi jednotlivými dny.

### **2.12.3. Extrakční výtěžnost**

Výtěžnost extrakce byla stanovena porovnáním intenzit signálů vzorků obohacených IS před a po extrakci na LL/ML/HL. Pro každou koncentrační úroveň bylo k výpočtu použito 6 vzorků (3 vzorky s IS před extrakcí + 3 vzorky s IS po extrakci).

### **2.12.4. Matriční efekt**

Stanovení matričních efektů a faktorů bylo provedeno u 6 náhodně vybraných vzorků (3 zdraví a 3 nemocní jedinci) na LL, ML, HL. Dále bylo analogicky připraveno 6 vzorků samotného IS mixu na LL, ML, HL. Matriční faktor byl určen poměrem odezev vzorků obohacených IS mixem po extrakci k odezvám zředěných čistých standardů. Matriční efekt byl určen jako RSD v jednotlivých koncentračních úrovních, která by měla být  $\pm 15\%$ . [85]

### **2.12.5. Selektivita**

Selektivita byla určena pro 3 náhodně vybrané vzorky zdravých dobrovolníků a 3 vzorky pacientů s kolorektálním karcinomem. Kritérium přijatelnosti analytické metody je splněno, jestliže odezva signálu odpovídající IS je ve vzorku bez přídavku IS  $<5\%$  LLOQ. [85]

### **2.12.6. Paměťový efekt**

Paměťový efekt byl stanoven vyhodnocením slepého vzorku rozpouštědla vstříknutého po nástřiku nejvyššího kalibračního bodu. Dále byl paměťový efekt hodnocen po každém pátém nástřiku. Odezva jednotlivých  $m/z$  u slepých vzorků rozpouštědla by měla být  $<20\%$  odezvy LLOQ pro analyt a  $<5\%$  pro IS. [85]

### **2.12.7. Opakovatelnost**

Opakovatelnost měření byla posouzena opakovanými měřeními NIST plazmy. Jeden vzorek byl 5x za sebou nastříknut a výsledek byl vyjádřen pomocí RSD.

### **2.13. Měření klinických vzorků plazmy**

Plazma 50 mužů (25 pacientů s kolorektálním karcinomem a 25 zdravých dobrovolníků) byla získána na Onkologické klinice Lékařské fakulty, Univerzity Palackého a Fakultní nemocnice Olomouc (Česká republika). Studie byla schválena Etickým výborem nemocnice a všichni pacienti a dobrovolníci podepsali informovaný souhlas. Plazma byla skladována při teplotě – 80 °C až do zpracování a analýzy vzorků. Extrakty lidské plazmy byly připraveny modifikovanou metodou podle Folche se směsí chloroform-methanol-voda (viz kapitola 2.7.1. Extrakce podle Folche). Pro měření byly všechny vzorky v sekvenci plně randomizovány a na začátku a po každých 10 analýzách byly nastříkovány QC vzorky a NIST plazma.



### 3. VÝSLEDKY A DISKUZE

V rámci experimentální části této práce byl nejprve vybrán vhodný extrakční protokol a následně byla zoptimalizována shotgun metoda pro stanovení sfingomyelinů, ceramidů, hexosylceramidů a dihexosylceramidů v extraktu lidské plazmy v rámci jedné analýzy. Zoptimalizovaná metoda byla validována a aplikována pro identifikaci a stanovení koncentrací vybraných sfingolipidů ve standardním referenčním materiálu NIST SRM 1950. Metoda byla rovněž aplikována v krátké klinické studii zahrnující kvantitativní analýzu lipidů v extraktu plazmy 25 zdravých dobrovolníků (kontrol) a 25 pacientů s kolorektálním karcinomem.

#### 3.1. Porovnání extrakčních protokolů

S ohledem na stanovení SM, Cer, HexCer a Hex2Cer byly vybrány čtyři v lipidomice zavedené extrakční protokoly, které byly navzájem porovnány pro extrakci lipidů ze směsného vzorku plazmy. Zkoumány byly dva přístupy proteinového srážení, první s využitím směsi BuOH:MeOH (1:1, v/v) a druhý pomocí směsi EtOAc:IPA (1:4, v/v). Dále byly porovnávány dva přístupy dvoufázové extrakce – podle Folche a MTBE. Směsný vzorek plazmy byl vždy obohacen IS mixem před extrakcí. Pro každý extrakční protokol byly připraveny tři vzorky a každý byl třikrát nadávkován. Měření byla provedena na hmotnostním spektrometru QTRAP 6500.

Při porovnání TIC všech extrakčních protokolů bylo zjištěno, že citlivost extrakčního protokolu proteinového srážení s BuOH:MeOH a extrakčního protokolu s EtOAc je nižší než u extrakčního protokolu s MTBE a podle Folche, důvodem je, že u MTBE extrakce a extrakce podle Folche je analyzována pouze čistá organická fáze na rozdíl od protokolů proteinového srážení. V případě extrakcí podle Folche byl získán lepší signál pro polárnější lipidy HexCer a Hex2Cer než u MTBE extrakce, což je pravděpodobně důsledek vyššího indexu polarity chloroformu v porovnání s MTBE. Jako nejlepší extrakční protokol byla tedy vybrána extrakce podle Folche.

## 3.2. Optimalizace shotgun metody

Cílem této práce bylo zoptimalizovat metodu pro kvantitativní analýzu hojně zastoupených SM společně s koncentračně méně zastoupenými Cer, HexCer a Hex2Cer v extraktu lidské plazmy s využitím shotgun přístupu na trojitým kvadrupólu a zavedením vzorku pomocí FIA.

Optimalizace byla provedena na dvou přístrojích. Prvním byl hmotnostní spektrometr XEVO TQD s trojitým kvadrupólem a druhým byl hmotnostní spektrometr QTRAP 6500. HPLC podmínky pro oba přístroje byly stejné, vzorky byly dávkovány pomocí autosampleru kapalinového chromatografu Agilent a následně při nízkém průtoku zaváděny do hmotnostního spektrometru s ESI sondou.

### 3.2.1. Optimalizace HPLC podmínek

Optimální průtoky mobilní fáze pro jednotlivé kroky byly nastaveny tak, aby bylo dosaženo rychlého zavedení vzorku, dostatečně dlouhé doby pro provedení všech kvantitativních skenů a minimalizace paměťového efektu. Kapilární pumpa měla konstantní průtok 3,5  $\mu\text{l}/\text{min}$  po celou dobu analýzy, tento průtok byl vyhodnocen jako nejlepší s ohledem na stabilní TIC signál po dostatečně dlouhou dobu, při vyšším průtoku docházelo k rychlému poklesu TIC. U binární pumpy byl počáteční průtok 50  $\mu\text{l}/\text{min}$ . Tento průtok byl optimální pro dostatečně rychlé přivedení nadávkovaného vzorku do hmotnostního spektrometru, aby nedocházelo k zbytečnému prodloužení analýzy. Ačkoliv byl původně průtok binární pumpy během vlastní analýzy pozastaven, nakonec byl z důvodu problému se stabilitou TIC nastaven na 5  $\mu\text{l}/\text{min}$ . Teoreticky by šlo tedy využít pouze binární pumpu, což bude předmětem dalších experimentů. Pro promývání po analýze byl nastaven průtok binární pumpy na 200  $\mu\text{l}/\text{min}$ . Při tomto průtoku bylo zajištěno dostatečné promytí systému a eliminace paměťového efektu.

Při shotgun analýze je používáno podstatně vyšší množství vzorku než při analýzách, které využívají separaci, např. UHPLC a UHPSFC metody, je to dáno skutečností, že je vzorek vsřikován během celé analýzy, ale jednotlivé lipidy jsou měřeny pouze po krátkou dobu odpovídající MS/MS skenům. [80]

Dávkovat bylo potřeba takové množství vzorku, aby byl TIC konstantní po dobu nezbytnou pro udělání veškerých MS/MS skenů všech sledovaných lipidů. Postupně byly prováděny experimenty s dávkovaným objemem 20, 30, 40 a 50  $\mu\text{l}$  vzorku, nejlepších výsledků bylo dosaženo při nadávkování 50  $\mu\text{l}$ , TIC byl konstantní po dostatečně dlouhou

dobu, a i citlivost metody byla vyšší oproti menším dávkovaným objemům. Dávkovací smyčka měla maximální objem 100  $\mu\text{l}$ , tudíž bylo možné dávkovat i větší objemy, ale to už by zbytečně vedlo k zvýšení času analýzy. Při dávkování vyšších objemů by do hmotnostního spektrometru bylo vpravováno větší množství materiálu, a tudíž by docházelo k větší kontaminaci systému a zvýšila by se spotřeba vzorku.

S dávkovaným objemem vzorku velice úzce souviselo ředění vzorku. Ředění rozpuštěného extraktu muselo být zvoleno tak, aby byla vykazována dostatečná citlivost, a zároveň nebyly vzorky příliš koncentrované a nedocházelo ke kontaminaci systému. Jako optimální byl určen 15x zředěný vzorek ve směsi  $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{IPA}$  (1:2:4,  $v/v/v$ ) s 5 mM octanem amonným. Celkem se tedy jednalo o 300x zředěnou plazmu, protože extrahováno bylo 25  $\mu\text{l}$  plazmy, jejíž extrakt byl rozpuštěn v 500  $\mu\text{l}$  a následně ještě 15x zředěn. Byly proměřovány i 25x ředěné vzorky (celkem 500x ředěné extrakty plazmy), ale při tomto ředění nebylo dosaženo dostatečné citlivosti pro kvantitativní analýzu HexCer a Hex2Cer. Naopak nižší ředění sice poskytlo lepší citlivost, ale přístroj byl velmi rychle znečištěn, což není kompatibilní s vysokopropustnými analýzami, které v praxi vyžadují měření velkého množství vzorků.

Na základě literatury a předchozích experimentů v naší laboratoři byla pro rozpuštění vzorku použita směs  $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{IPA}$  (1:2:4,  $v/v/v$ ) s 5 mM octanem amonným, mobilní fáze byla v případě kapilární pumpy směs  $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{IPA}$  (1:2:4,  $v/v/v$ ) a pro binární pumpu pak směs  $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{IPA}$  (1:2:4,  $v/v/v$ ) s 0,5 % vody. Jde o to, že tato rozpouštědla musí velmi dobře rozpustit všechny studované lipidy, umožnit reprodukovatelnou ionizaci, zajistit uspokojivou citlivost a v případě binární pumpy i dostatečné vymytí zbývajících lipidů ze systému. [77, 80, 86]

V uvedené literatuře byl použit 7,5 mM nebo 10 mM octan amonný, tato množství octanu amonného sice velmi dobře fungovala, ale problémem je, že čím vyšší koncentrace jsou použity, tím více solí se v hmotnostním spektrometru vysráží, a to způsobuje kontaminaci (přenos vzorku), ucpání ESI jehly atd. Použití 5 mM octanu amonného poskytnulo stejné výsledky jako vyšší koncentrace a zbytečně nevedlo k větší kontaminaci systému. Nutno podotknout, že voda přítomná v mobilní fázi binární pumpy pomáhala odstranit soli ze systému při promývacím kroku a navíc v kombinaci s bezvodou mobilní fází vedenou z kapilární pumpy zlepšila citlivost pro polárnější analyty. Při nesprávném poměru rozpouštědel nebo špatném složení rozpouštědla pro vzorek by mohlo dojít k výraznému snížení citlivosti, a proto bylo potřeba dbát na správnou přípravu těchto rozpouštědel. [80, 86]

Po každém nástřiku byla injekční jehla navíc promyta polární směsí rozpouštědel (MeOH:H<sub>2</sub>O (1:1, v/v)), semipolární směsí rozpouštědel (Hex:IPA:CHCl<sub>3</sub> (7:1,5:1,5; v/v/v)) a nepolární směsí rozpouštědel (CHCl<sub>3</sub>:MeOH (1:1, v/v)), aby byly odstraněny všechny zachycené látky a nedocházelo k paměťovému efektu.

Jelikož byla používána těkavá rozpouštědla, která se odpařují již při velmi nízké teplotě, tak byla teplota autosampleru nastavena na 4 °C. Celkový čas metody byl 7,5 minuty a vlastní analýza trvala 6,23 minuty. Finální HPLC podmínky jsou uvedeny v Tabulce 3.

**Tabulka 3** Finální HPLC podmínky

<b>Parametry</b>	<b>Hodnoty/chemikálie</b>
Průtok mobilní fáze – přiváděcí krok před vlastní analýzou	50 µl/min
Průtok mobilní fáze – vlastní analýza (kapilární pumpa)	3,5 µl/min
Průtok mobilní fáze – vlastní analýza (binární pumpa)	5 µl/min
Průtok mobilní fáze – promývání po analýze	200 µl/min
Dávkované množství	50 µl
Ředění vzorku	15x
Složení mobilní fáze – kapilární pumpa	CHCl <sub>3</sub> :MeOH:IPA (1:2:4, v/v/v)
Složení mobilní fáze – binární pumpa	CHCl <sub>3</sub> :MeOH:IPA (1:2:4, v/v/v) + 0,5 % H <sub>2</sub> O
Složení rozpouštědla pro vzorek	CHCl <sub>3</sub> :MeOH:IPA (1:2:4, v/v/v) + 5 mM octan amonný
Směsi rozpouštědel pro oplach jehly	MeOH:H <sub>2</sub> O (1:1, v/v) Hex:IPA:CHCl <sub>3</sub> (7:1,5:1,5; v/v/v) CHCl <sub>3</sub> :MeOH (1:1, v/v)
Teplota autosampleru	4 °C
Doba analýzy	6,23 min
Doba metody	7,5 min

### 3.2.2. Optimalizace MS podmínek – XEVO TQD

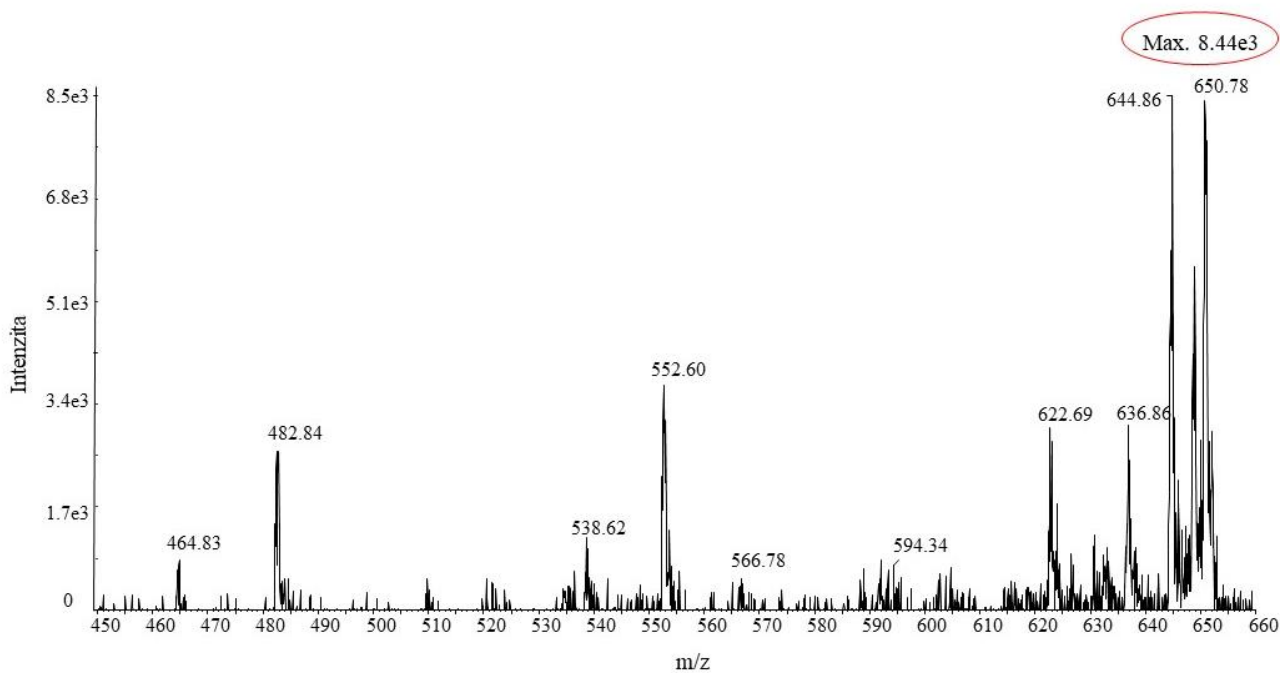
Nejprve byla provedena optimalizace na hmotnostním spektrometru XEVO TQD s trojitým kvadrupólem. Jednotlivé parametry byly optimalizovány v následujícím pořadí: napětí na kapiláře (2,5; 2,75; 3,0; 3,25; 3,5; 3,75 kV), desolvatační teplota (50, 100, 150, 200 °C), průtok desolvatačního plynu (200, 250, 300, 350, 400 l/hod), průtok plynu na kuželové elektrodě (0, 10, 20, 30 l/hod), napětí na kuželové elektrodě (10, 20, 30 V) a kolizní energie (35, 40, 45 V). Finální zoptimalizované parametry jsou uvedeny v Tabulce 4. Jednotlivé grafy optimalizovaných parametrů zde nejsou prezentovány, jelikož tento hmotnostní spektrometr nakonec nebyl použit pro další experimenty, a detailní optimalizace je ukázána pouze pro hmotnostní spektrometr QTRAP 6500.

**Tabulka 4** Finální podmínky optimalizace na XEVO TQD

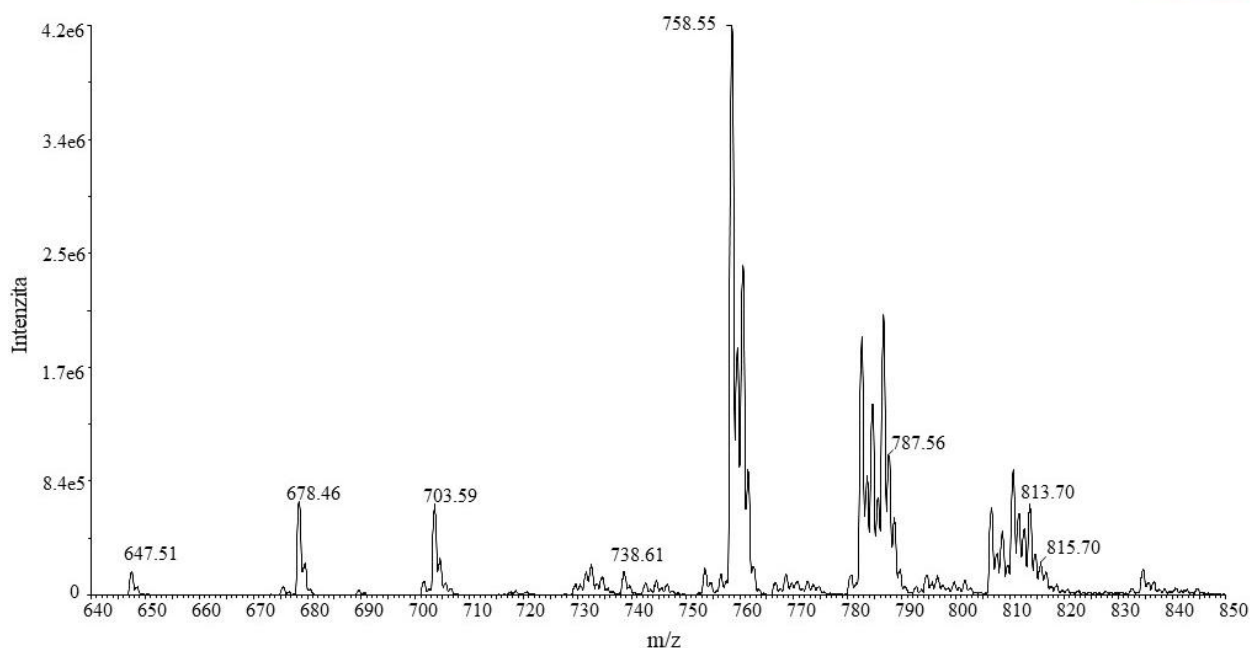
<b>Parametry</b>	<b>Hodnoty</b>
Napětí na kapiláře	3,75 kV
Napětí na kuželové elektrodě	30 V
Desolvatační teplota	200 °C
Průtok desolvatačního plynu	300 l/hod
Průtok plynu na kuželové elektrodě	20 l/hod
Kolizní energie	40 V

Pro stanovení studovaných lipidů byly kombinovány dva skeny, oba pracující při snímání kladně nabitých iontů. Prvně byl v čase od 0,5 min do 6 min kontinuálně zaznamenáván PIS  $m/z$  264,3, specifický pro Cer, při skenovací rychlosti 1000 Da/s a v rozsahu  $m/z$  450-660. Následně byl od 5 do 6 minuty nastaven PIS  $m/z$  184,1 (specifický pro SM) při skenovací rychlosti 100 Da/s a v rozmezí  $m/z$  640-850. Rozmezí  $m/z$ , ve kterém byly dané třídy lipidů měřeny, bylo zjištěno z literatury a pomocí databáze LIPID MAPS. Skenovací rychlost byla optimalizována s ohledem na dosažení co nejvyšší citlivosti a hmotnostního rozlišení. Obecně platí, že pokud strávíme více času jedním přechodem, citlivost by měla být vyšší. U PIS skenu (např.  $m/z$  264,3) však skenujeme v širším rozsahu hodnot  $m/z$ , a pokud se v těchto intervalech vyskytují i místa bez signálu tak při nižší skenovací rychlosti zbytečně travíme čas skenováním těchto oblastí, což vede k poklesu

signálu. Pro Cer byla zvolena skenovací rychlost 1000 Da/s, protože se jedná o stopově zastoupené lipidy a bylo potřeba nashromáždit více spekter, zároveň však došlo ke ztrátě rozlišení. V případě koncentračně více zastoupených SM postačovala skenovací rychlost 100 Da/s. Získaná spektra jsou ukázána na obr. 30 a 31. [7]



**Obrázek 30** ESI-MS/MS spektrum PIS  $m/z$  264,3 pro Cer při záznamu kladných iontů na XEVO TQD při finálních zoptimalizovaných podmínkách



**Obrázek 31** ESI-MS/MS spektrum PIS  $m/z$  184,1 pro SM a PC při záznamu kladných iontů na XEVO TQD při finálních zoptimalizovaných podmínkách

Z literatury mi bylo známo, že bych měla být schopna pomocí PIS  $m/z$  264,3 stanovit i HexCer a Hex2Cer, ale při experimentech na tomto hmotnostním spektrometru toho nebylo při rozumném ředění vzorku dosaženo z důvodu nízké citlivosti. Z tohoto důvodu bylo učiněno rozhodnutí metodu optimalizovat na jiném přístroji s vyšší citlivostí.

### 3.2.3. Optimalizace MS podmínek – QTRAP 6500

Hmotnostní spektrometr QTRAP 6500 sice disponuje oproti hmotnostnímu spektrometru XEVO TQD s trojitým kvadrupólem vyšší citlivostí a byl schopný registrovat více lipidů, ale na druhou stranu je více náchylný ke kontaminaci, a proto byl během optimalizace i dalších měření průběžně kontrolován stav případného znečištění s využitím nástříků slepých vzorků rozpouštědla. Výše popsané zoptimalizované ředění vzorku i promývací kroky se ukázaly být dostatečné.

V tomto případě byla optimalizována kolizní energie v intervalu 5-80 V (obr. 32) a deklasterační potenciál v intervalu 50-200 V (obr. 33) pro PIS  $m/z$  264,3. Ostatní parametry, kterými jsou kolizní výstupní potenciál, napětí v iontovém zdroji, tlaky plynů v iontovém zdroji a další, byly převzaty z předchozích lipidomických experimentů, přičemž není

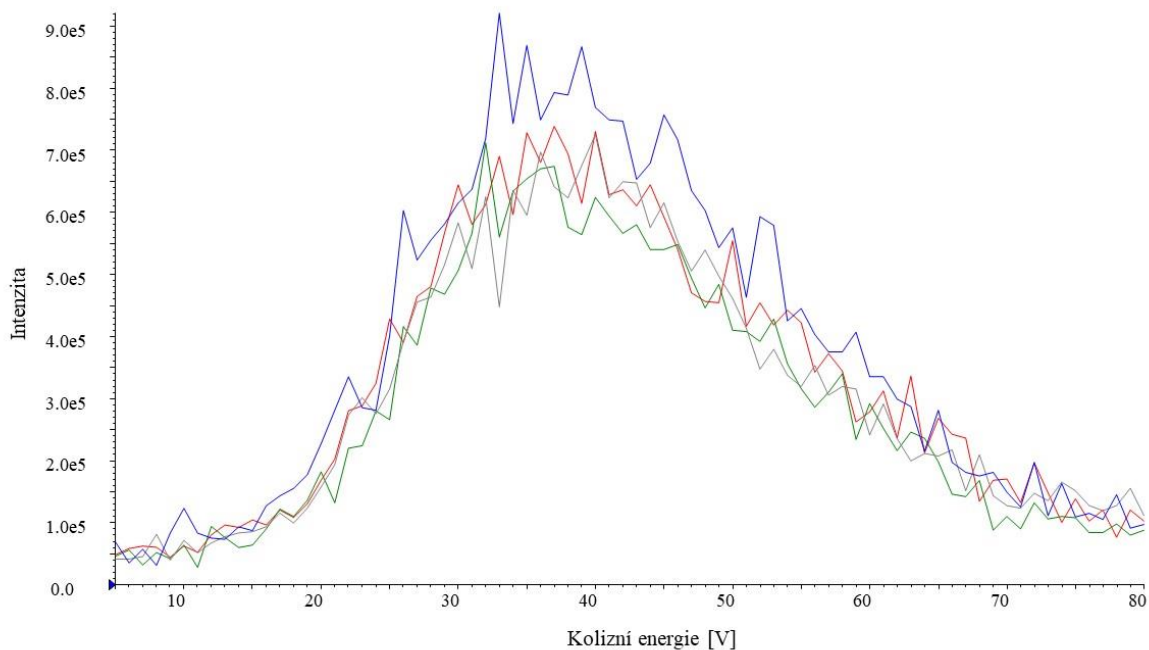
doporučeno společností Sciex tyto parametry měnit. Finální parametry jsou uvedeny v Tabulce 5.

**Tabulka 5** Finální podmínky optimalizace na QTRAP 6500

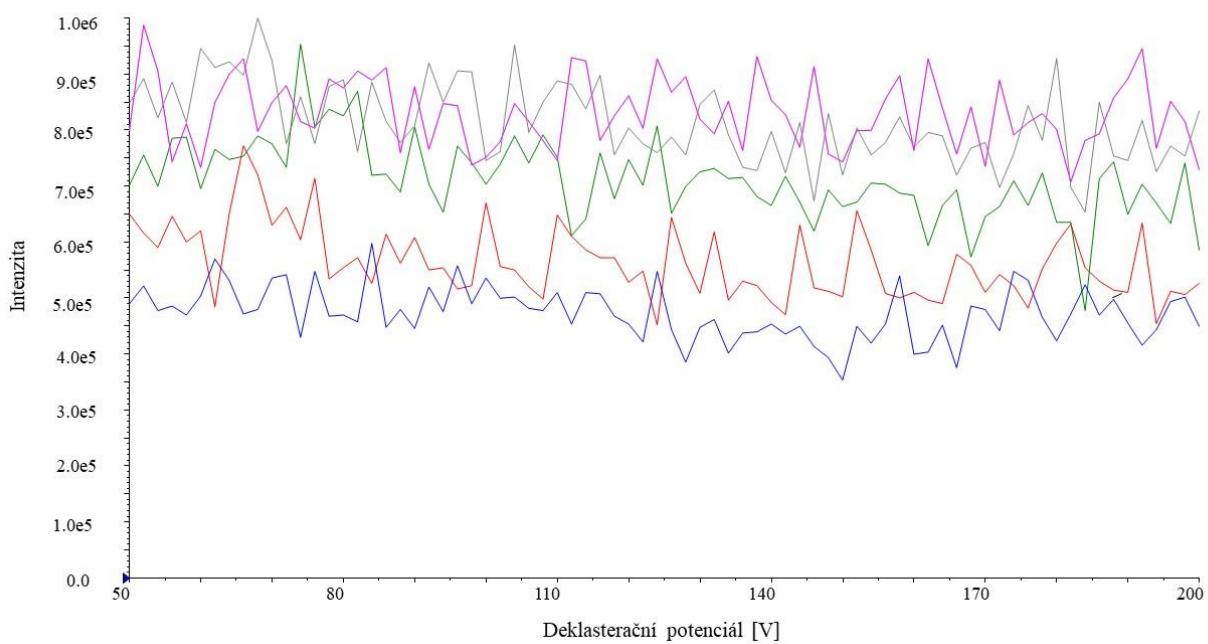
Parametry	Hodnoty	
	PIS <i>m/z</i> 264,3	PIS <i>m/z</i> 184,1
Tlak sušícího plynu	20 psi	20 psi
Napětí v iontovém zdroji	5500 V	5500 V
Teplota zdroje	50 °C	50 °C
Tlak plynu 1 v iontovém zdroji	35 psi	35 psi
Tlak plynu 2 v iontovém zdroji	20 psi	20 psi
Deklasterační potenciál	100 V	80 V
Počáteční potenciál	10 V	10 V
Kolizní energie	40 V	30 V
Kolizní výstupní potenciál	15 V	15 V

Z TIC (obr. 32) byla odečtena jako optimální hodnota kolizní energie (CE) 40 V pro PIS *m/z* 264,3; měření bylo několikrát opakováno, aby bylo potvrzeno, že je tato hodnota opravdu optimální, pro PIS *m/z* 184,1 byla použita nižší kolizní energie, protože fragmentace SM je ochotnější a není potřeba tak vysoké kolizní energie. Vliv deklasteračního potenciálu (DP) byl zanedbatelný, jak je demonstrováno na obr. 33, z tohoto důvodu byla vybrána hodnota 100 V. Vzhledem k tomu, že byla u SM snížena CE, tak byl analogicky snížen i DP.



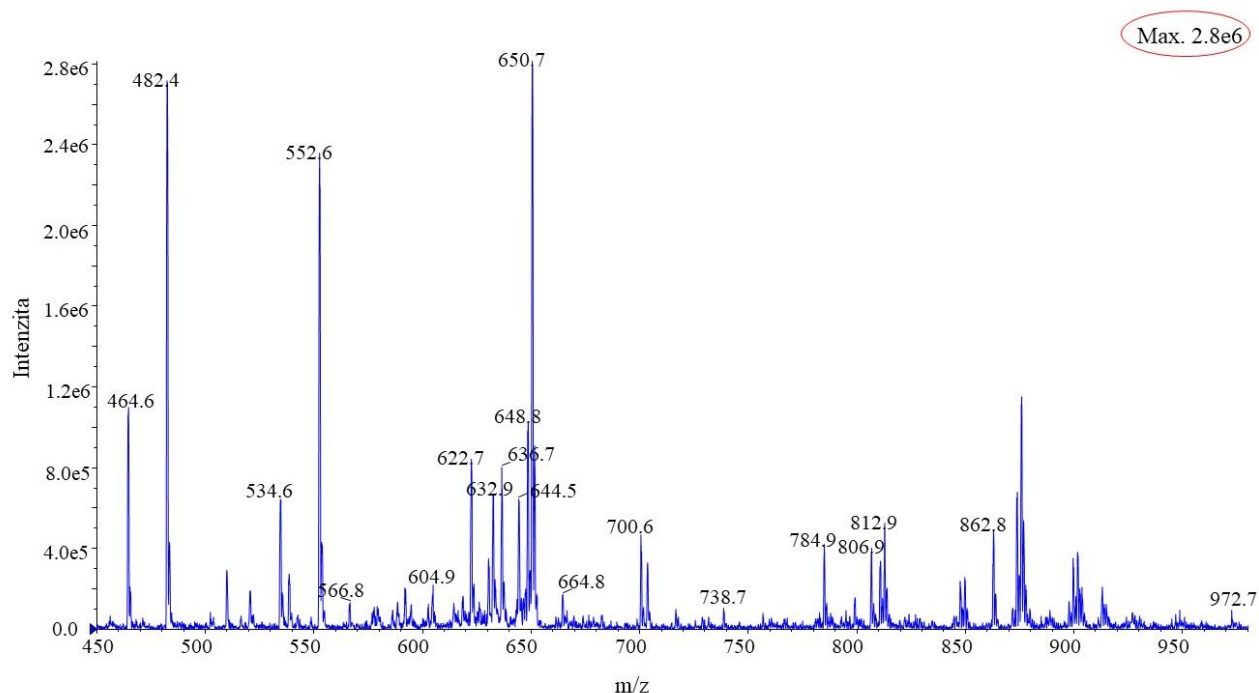


**Obrázek 32** Závislost intenzity na kolizní energii při měření PIS  $m/z$  264,3 (každá barva značí jedno měření)

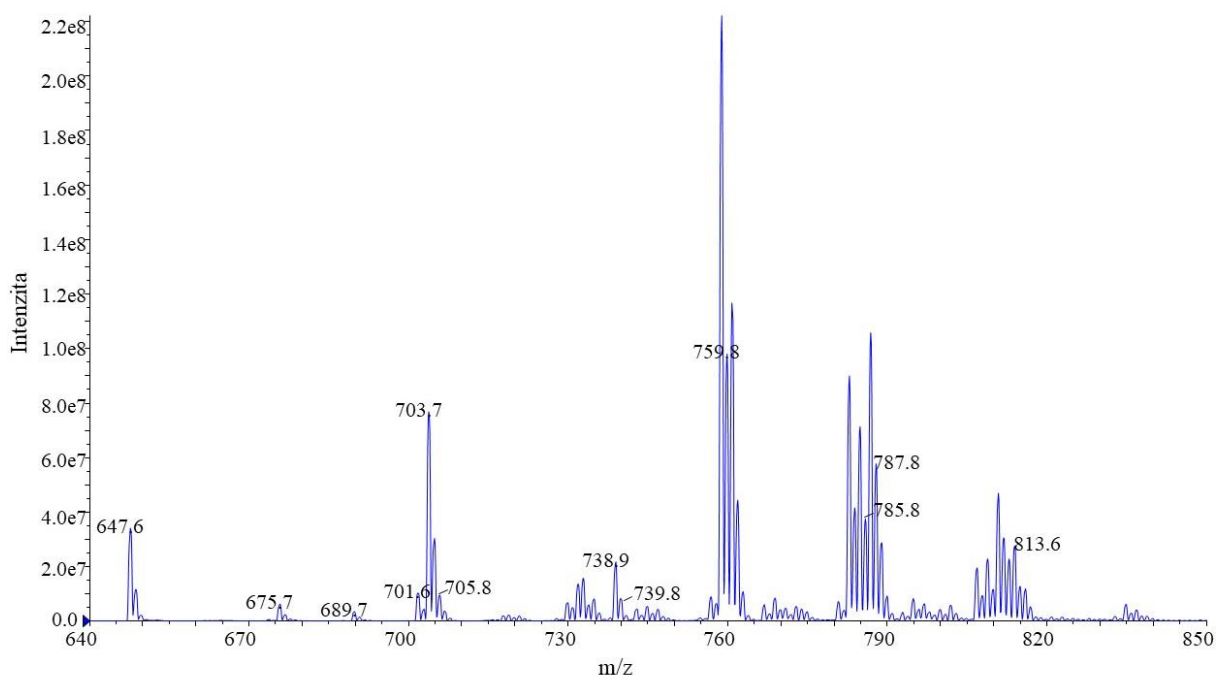


**Obrázek 33** Závislost intenzity na deklasteračním potenciálu při měření PIS  $m/z$  264,3 (každá barva značí jedno měření)

Po zoptimalizování parametrů byla vytvořena metoda, pomocí které bylo možné stanovit nejen SM a Cer, ale i HexCer a Hex2Cer. Metoda měla dvě periody, v první periodě byl nastaven PIS  $m/z$  264,3 a po dobu 5,001 min byla získávána data málo zastoupených Cer, HexCer a Hex2Cer. Ve druhé periodě byl nastaven PIS  $m/z$  184,1 a během 1,495 min byla získána data příslušející SM. Nastavené rozmezí  $m/z$  pro Cer, HexCer a Hex2Cer bylo 450-980 a pro SM 640-850. Jako optimální byla zvolena skenovací rychlost 200 Da/s u obou skenů, při této skenovací rychlosti byla získána spektra dobré kvality a s dostatečnou citlivostí (obr. 34 a 35).



**Obrázek 34** ESI-MS/MS spektrum PIS  $m/z$  264,3 pro Cer, HexCer, Hex2Cer při záznamu kladných iontů na QTRAP 6500 při finálních zoptimalizovaných podmínkách



**Obrázek 35** ESI-MS/MS spektrum PIS  $m/z$  184,1 pro SM a PC při záznamu kladných iontů na QTRAP 6500 při finálních zoptimalizovaných podmínkách

Při porovnání spekter z přístroje XEVO TQD (obr. 30 a 31) a přístroje QTRAP 6500 (obr. 34 a 35) je zřejmé, že s využitím přístroje QTRAP 6500 je dosaženo výrazně vyšší citlivosti, spektra vykazují mnohem lepší rozlišení a tím pádem je možné identifikovat a kvantifikovat větší počet sfingolipidů. Z těchto důvodů bylo logicky rozhodnuto, že veškeré další experimenty budou prováděny na tomto přístroji.

### 3.3. Validace metody pro biologické vzorky

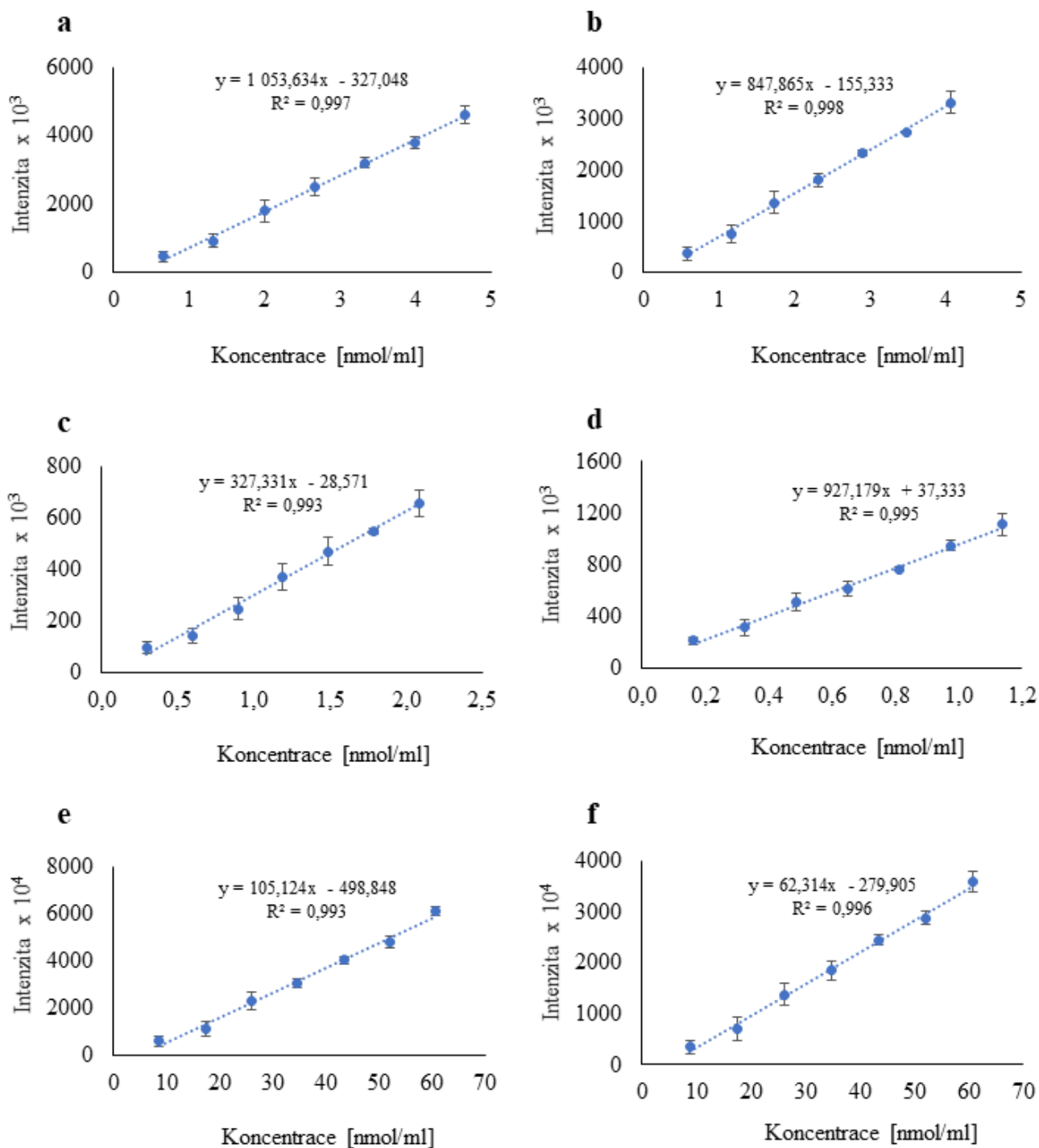
Po optimalizaci metody byla provedena validace metody pro ověření její aplikovatelnosti pro kvantitativní stanovení studovaných lipidů ve vzorcích lidské plazmy.

Pro jednotlivé studované třídy lipidů byly vybrány reprezentativní IS. Pro Cer byly používány standardy Cer 30:1;O2 a Cer 35:1;O2, pro HexCer byl jako standard používán GlcCer 30:1;O2, pro Hex2Cer to byl standard LacCer 30:1;O2 a pro SM to byly standardy SM 30:1;O2 a SM 36:2;O2 d9.

Nejdříve byla provedena prevalidace na menším setu vzorků, aby bylo zjištěno, jaký lineární rozsah očekávat a jaké množství IS mixu je možné použít pro LL, ML, HL.

Celý validační set byl pro měření kompletně randomizován a celkem bylo pro validaci provedeno 218 nástřiků. Po každém nástřiku byla injekční jehla promyta MeOH:H<sub>2</sub>O (1:1, v/v), Hex:IPA:CHCl<sub>3</sub> (7:1,5:1,5; v/v/v) a CHCl<sub>3</sub>:MeOH (1:1, v/v). Po každém pátém nástřiku byla použita promývací metoda, která trvala 4,5 min a kde za vysokého průtoku binární pumpy byla jehla postupně promyta MeOH:H<sub>2</sub>O (1:1, v/v), Hex:IPA:CHCl<sub>3</sub> (7:1,5:1,5; v/v/v) a CHCl<sub>3</sub>:MeOH (1:1, v/v) a na závěr bylo do celého systému nadávkováno 80 µl slepého vzorku, po každém dvacátém nástřiku byla tato metoda použita dvakrát za sebou, aby se zamezilo přenosu vzorku. Pravidelně byly nástřikovány slepé vzorky, vzorky pro kontrolu kvality a standardní referenční materiál NIST SRM 1950. Jako nízká koncentrační úroveň IS mixu bylo zvoleno množství 10 µl, jako střední koncentrační úroveň 20 µl a jako vysoká koncentrační úroveň 30 µl.

Prvním validovaným parametrem bylo ověření linearity. Kalibrační křivky byly konstruovány pro jednotlivé IS (obr. 36) a pro všechny bylo splněno kritérium přijatelnosti  $R \geq 0,99$ . Chybové úsečky ukazují směrodatnou odchylku mezi jednotlivými měřeními. Z důvodu zpětného zjištění, že pro SM je možné reprodukovatelně změřit i nižší koncentrace, byl dodatečně měřen 1 µl přídavek IS mixu. Vzhledem k tomu, že měření proběhlo po čištění hmotnostního spektrometru, tak tento bod nebyl dáván do kalibrační přímky, ale intenzita SM 30:1;O2 a SM 36:2;O2 d9 byla při tomto přídávku více než 30 krát větší než šum a RSD signálu pro tři opakované experimenty nepřesáhlo 20 %. Z tohoto důvodu bylo LOQ pro SM stanoveno na tuto koncentraci. [100]



**Obrázek 36** Kalibrační křivky interních standardů **a** Cer 30:1;O<sub>2</sub>, **b** Cer 35:1;O<sub>2</sub>, **c** LacCer 30:1;O<sub>2</sub>, **d** GlcCer 30:1;O<sub>2</sub>, **e** SM 30:1;O<sub>2</sub> a **f** SM 36:2;O<sub>2</sub> d9

Z regresních rovnic byly zpětně vypočteny koncentrace jednotlivých kalibračních bodů a pro všechny bylo splněno kritérium, že byla chyba <15 % (pro LLOQ <20 %), s výjimkou nejnižšího kalibračního bodu IS LacCer 30:1 (chyba 26 %) a SM 30:1;O<sub>2</sub>

(chyba 21 %). Tyto chyby byly pravděpodobně způsobeny nepřesným pipetováním, ale byly stále přijatelné. LOD a LOQ jsou uvedeny v Tabulce 6.

**Tabulka 6** LOD a LOQ pro jednotlivé standardy

<b>IS</b>	<b>LOD [nmol/ml]</b>	<b>LOQ [nmol/ml]</b>
Cer 30:1;O2	0,22	0,67
Cer 35:1;O2	0,19	0,58
LacCer 30:1;O2	0,10	0,30
GlcCer 30:1;O2	0,05	0,16
SM 30:1;O2	0,58	1,73
SM 36:2;O2 d9	0,58	1,74

Dalšími validačními parametry, které byly hodnoceny, byly přesnost a správnost. Byly hodnoceny na 3 koncentračních hladinách (LL/ML/HL) dvěma operátory a cílem bylo ověřit, že analytická metoda poskytuje správné a přesné výsledky, jak během jednoho dne, tak i v průběhu dní. RSD přesnosti během dne, mezi dny a mezi operátory nepřesáhla 24 % pro všech 6 interních standardů (Tabulka 7). Správnost analytické metody se pohybovala v rozmezí 92 – 115 % v rámci prvního dne, 94 – 144 % v rámci druhého dne a 94 – 125 % v rámci dvou dnů, přičemž největších odchylek bylo dosaženo na nejnižší koncentrační hladině (Tabulka 8). Větší chyby (zejména druhý den) operátora 1 (extrakce provedené mnou) v porovnání se zkušenějším druhým operátorem jasně demonstrují, že lipidomické extakce vyžadují zkušenost a soustředěnost. S výjimkou chyb, kterých se dopustil první operátor během druhého dne, byla odchylka od správných hodnot menší než 25 % a v případě tohoto typu lipidomické analýzy bez separace byla považována za dostatečnou. Je nutné si uvědomit, že vzorky byly plně randomizovány a jednotlivé chyby se týkají zaznamenaných absolutních intenzit bez jakékoliv normalizace. Intenzita jednotlivých lipidů se může v průběhu sekvence měnit a právě proto je potřeba, aby IS vykazoval podobné chování jako ostatní lipidy v rámci lipidové třídy, pro kterou byl použit. V případě záznamu molárních koncentrací, kde už se jedná o normalizaci na daný IS je tento problém eliminován.

**Tabulka 7** Vyhodnocená přesnost jako RSD pro jednotlivé IS na nízké, střední a vysoké koncentrační hladině během dne, mezi dny a mezi operátory

IS	Operátor	Den	Přesnost (RSD)		
			LL	ML	HL
Cer 30:1;O2	1. operátor	1. den	17 %	15 %	6 %
		2. den	19 %	15 %	10 %
		Mezi dny	20 %	17 %	8 %
	2. operátor	1. den	18 %	5 %	9 %
		2. den	2 %	18 %	3 %
		Mezi dny	12 %	12 %	6 %
	Mezi operátory	1. den	17 %	10 %	7 %
		2. den	13 %	17 %	7 %
		Mezi dny	16 %	15 %	7 %
Cer 35:1;O2	1. operátor	1. den	24 %	11 %	7 %
		2. den	10 %	13 %	14 %
		Mezi dny	17 %	15 %	13 %
	2. operátor	1. den	4 %	4 %	14 %
		2. den	11 %	22 %	7 %
		Mezi dny	8 %	15 %	10 %
	Mezi operátory	1. den	15 %	8 %	10 %
		2. den	10 %	19 %	11 %
		Mezi dny	13 %	16 %	11 %
LacCer 30:1;O2	1. operátor	1. den	8 %	9 %	4 %
		2. den	22 %	5 %	18 %
		Mezi dny	18 %	19 %	15 %
	2. operátor	1. den	6 %	11 %	10 %
		2. den	5 %	4 %	10 %
		Mezi dny	7 %	8 %	10 %
Mezi	1. den	6 %	9 %	7 %	

GlcCer 30:1;O2	operátory	2. den	14 %	15 %	14 %	
		Mezi dny	13 %	17 %	12 %	
	<hr/>					
	1. operátor	1. den	10 %	11 %	4 %	
		2. den	16 %	15 %	8 %	
		Mezi dny	15 %	18 %	6 %	
	2. operátor	1. den	3 %	9 %	10 %	
		2. den	18 %	9 %	14 %	
		Mezi dny	13 %	9 %	11 %	
	Mezi operátory	1. den	7 %	9 %	8 %	
		2. den	16 %	15 %	12 %	
		Mezi dny	14 %	15 %	10 %	
<hr/>						
SM 30:1;O2	1. operátor	1. den	9 %	6 %	2 %	
		2. den	20 %	9 %	17 %	
		Mezi dny	22 %	14 %	13 %	
	2. operátor	1. den	9 %	14 %	17 %	
		2. den	10 %	12 %	8 %	
		Mezi dny	10 %	12 %	13 %	
	Mezi operátory	1. den	9 %	10 %	11 %	
		2. den	16 %	13 %	14 %	
		Mezi dny	16 %	13 %	13 %	
	<hr/>					
	SM 36:2;O2 d9	1. operátor	1. den	7 %	7 %	3 %
			2. den	21 %	6 %	19 %
Mezi dny			23 %	14 %	15 %	
2. operátor		1. den	10 %	10 %	19 %	
		2. den	12 %	12 %	7 %	
		Mezi dny	12 %	10 %	14 %	
Mezi operátory		1. den	10 %	8 %	13 %	
		2. den	16 %	13 %	15 %	
		Mezi dny	17 %	13 %	15 %	



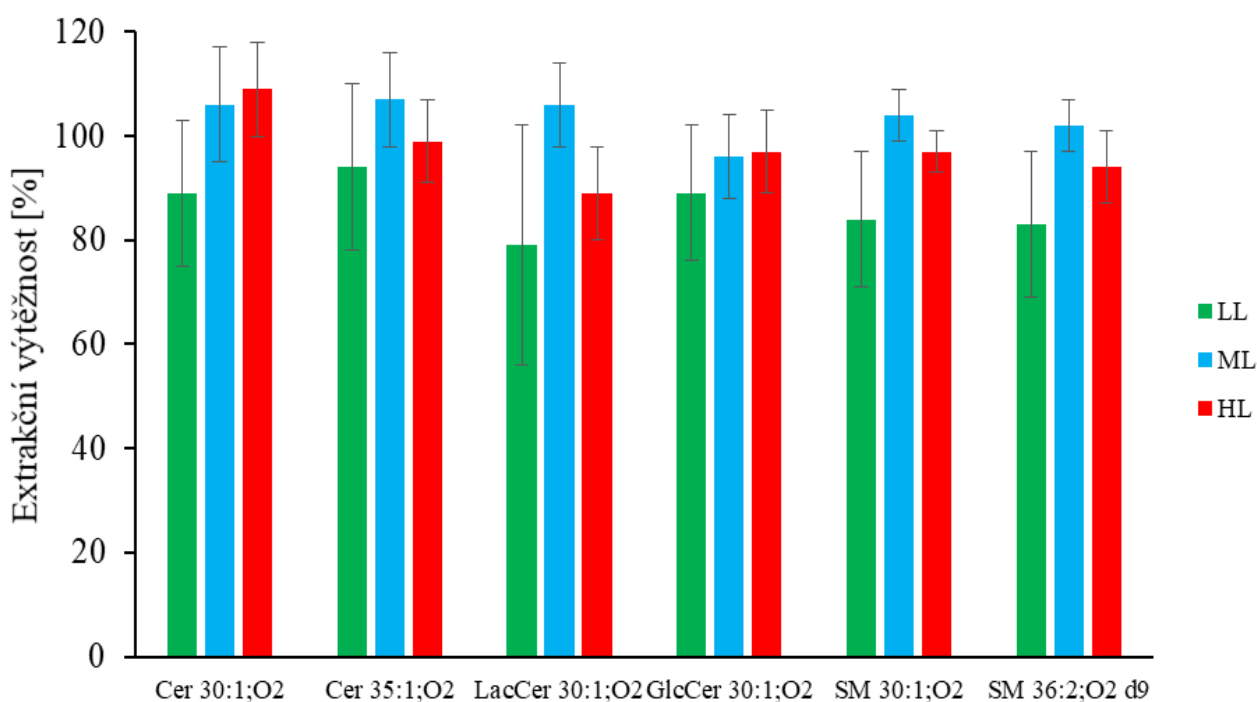
**Tabulka 8** Vyhodnocená správnost pro jednotlivé IS na nízké, střední a vysoké koncentrační hladině během dne, mezi dny a mezi operátory

IS	Operátor	Den	Správnost			
			LL	ML	HL	
Cer 30:1;O2	1. operátor	1. den	96 %	97 %	97 %	
		2. den	113 %	114 %	101 %	
		Mezi dny	104 %	105 %	99 %	
	2. operátor	1. den	104 %	93 %	95 %	
		2. den	106 %	97 %	96 %	
		Mezi dny	105 %	95 %	96 %	
	Mezi operátory	1. den	100 %	95 %	96 %	
		2. den	110 %	94 %	99 %	
		Mezi dny	105 %	100 %	97 %	
	Cer 35:1;O2	1. operátor	1. den	95 %	98 %	94 %
			2. den	106 %	117 %	106 %
			Mezi dny	101 %	107 %	100 %
2. operátor		1. den	98 %	92 %	97 %	
		2. den	102 %	96 %	99 %	
		Mezi dny	100 %	94 %	98 %	
Mezi operátory		1. den	96 %	95 %	96 %	
		2. den	104 %	107 %	103 %	
		Mezi dny	100 %	101 %	99 %	
LacCer 30:1;O2		1. operátor	1. den	112 %	105 %	103 %
			2. den	129 %	144 %	118 %
			Mezi dny	120 %	125 %	111 %
	2. operátor	1. den	115 %	105 %	103 %	
		2. den	125 %	112 %	110 %	
		Mezi dny	120 %	108 %	106 %	
	Mezi	1. den	113 %	105 %	103 %	

GlcCer 30:1;O2	operátory	2. den	127 %	128 %	114 %	
		Mezi dny	120 %	117 %	108 %	
			1. den	100 %	100 %	104 %
	1. operátor	2. den	120 %	130 %	110 %	
		Mezi dny	110 %	115 %	107 %	
	2. operátor	1. den	103 %	101 %	95 %	
		2. den	114 %	107 %	96 %	
			Mezi dny	109 %	104 %	96 %
	Mezi operátory	1. den	102 %	100 %	100 %	
		2. den	117 %	119 %	103 %	
		Mezi dny	109 %	109 %	101 %	
			1. den	104 %	104 %	104 %
SM 30:1;O2	1. operátor	2. den	128 %	126 %	115 %	
		Mezi dny	116 %	115 %	109 %	
	2. operátor	1. den	110 %	107 %	96 %	
		2. den	118 %	110 %	104 %	
			Mezi dny	114 %	108 %	100 %
	Mezi operátory	1. den	107 %	105 %	100 %	
		2. den	123 %	118 %	109 %	
		Mezi dny	115 %	112 %	105 %	
			1. den	102 %	107 %	106 %
	SM 36:2;O2 d9	1. operátor	2. den	129 %	131 %	119 %
			Mezi dny	115 %	119 %	112 %
		2. operátor	1. den	111 %	109 %	98 %
2. den			121 %	112 %	106 %	
		Mezi dny	116 %	110 %	102 %	
Mezi operátory		1. den	106 %	108 %	102 %	
		2. den	125 %	122 %	113 %	
		Mezi dny	116 %	115 %	107 %	

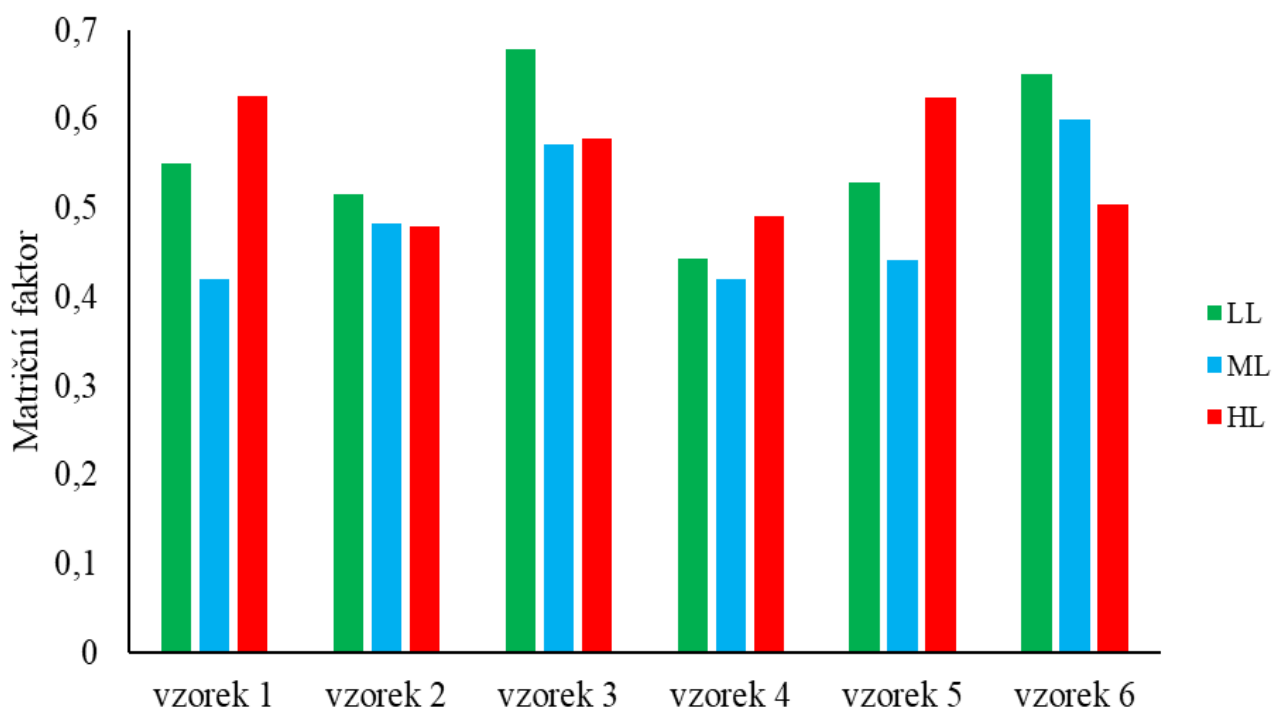
S ohledem na výše uvedené výsledky přesnosti a správnosti bylo dokázáno, že analytická metoda poskytuje výsledky s dostatečnou přesností a správností.

Extrakční výtěžnost analytické metody byla validována na 3 koncentračních hladinách (LL, ML, HL) a pohybovala se v rozmezí 79 – 94 % pro LL, 96 – 107 % pro ML a 89 – 109 % pro HL (obr. 37). Jelikož pro každou koncentrační úroveň bylo provedeno 6 extrakcí, tak byly v grafu sestrojeny chybové úsečky, které znázorňují RSD mezi jednotlivými experimenty.



**Obrázek 37** Extrakční výtěžnost jednotlivých IS v IS mixtu na nízké, střední a vysoké koncentrační hladině

Matriční faktor byl porovnáván na 6 nezávislých vzorcích na 3 koncentračních hladinách a pohyboval se v rozmezí 0,35 – 1,3. Velký matriční faktor byl v podstatě očekáván, protože při shotgun analýze ionizujeme veškeré analyty najednou ve stejném čase. U různých vzorků (s maticí a bez matrice) pak tedy dochází buď k většímu, nebo menšímu potlačení signálu v závislosti na analytickém složení vzorku. Příklad matričních faktorů jednotlivých dobrovolníků pro Cer 30:1;O2 je ukázán na obr. 38. Z matričních faktorů byly vypočteny matriční efekty, které jsou zřejmé z Tabulky 9. Ve většině případů se RSD pohybovala okolo  $\pm 15$  %, pouze v případě interního standardu LacCer 30:1;O2 na nejnížší koncentrační hladině byla RSD 37 %. Kritérium přijatelnosti bylo splněno.



**Obrázek 38** Matriční faktory pro jednotlivé vzorky na nízké, střední a vysoké koncentrační hladině pro interní standard Cer 30:1;O2

**Tabulka 9** Matriční efekty jednotlivých interních standardů vyjádřené jako RSD

IS	RSD		
	LL	ML	HL
Cer 30:1;O2	16 %	16 %	12 %
Cer 35:1;O2	17 %	15 %	12 %
LacCer 30:1;O2	37 %	11 %	13 %
GlcCer 30:1;O2	9 %	15 %	15 %
SM 30:1;O2	17 %	16 %	11 %
SM 36:2;O2 d9	14 %	15 %	12 %

Zkouška selektivity pro pět standardů prokázala, že nejsou přítomny žádné interference v blízké oblasti  $m/z$ , a že je odlišení IS od sloučenin matrice a systémových interferencí dostačující a ve většině případů je <5 % signálu LLOQ a IS tedy splňují kritérium přijatelnosti analytické metody. Toto kritérium nebylo splněno pouze pro interní standard

GlcCer 30:1;O2, protože byly přítomny interference a jejich hodnoty jsou uvedeny v Tabulce 10. Tyto interference mohly být způsobeny tím, že GlcCer 30:1;O2 není deuterovaný, a tudíž se v plazmě mohl tento lipid o nízké koncentraci vyskytovat. I přes tuto skutečnost bylo tohoto IS využito pro následný výpočet koncentrací HexCer ve vzorku NIST plazmy a výsledky byly porovnány s literaturou, kde byl mimo jiné tento IS použit také.

**Tabulka 10** Selektivity jednotlivých interních standardů v 6 individuálních vzorcích

IS	Selektivita					
	Vzorek 1	Vzorek 2	Vzorek 3	Vzorek 4	Vzorek 5	Vzorek 6
Cer 30:1;O2	2 %	3 %	1 %	1 %	1 %	1 %
Cer 35:1;O2	4 %	4 %	1 %	2 %	1 %	3 %
LacCer 30:1;O2	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %
GlcCer 30:1;O2	47 %	47 %	32 %	36 %	30 %	48 %
SM 30:1;O2	7 %	8 %	5 %	4 %	4 %	3 %
SM 36:2;O2 d9	4 %	4 %	0 %	0 %	0 %	0 %

Posledními hodnocenými validačními parametry byly paměťový efekt a opakovatelnost. Paměťový efekt nebyl pozorován a RSD opakovatelnosti měření nepřesáhla 8 %, tudíž bylo prokazatelné, že přístroj měřil s dostatečnou přesností. Monitorování koncentrací/intenzit QC vzorků během validace metody potvrzovalo stabilitu signálu, přičemž jednotlivé RSD koncentrací/intenzit v QC nepřesáhly 15 %.

Validační parametry ukázaly, že je metoda použitelná pro kvantitativní analýzu vybraných sfingolipidů (Cer, HexCer, Hex2Cer a SM).

### 3.4. Aplikace validované metody pro stanovení vybraných sfingolipidů ve standardním referenčním materiálu NIST SRM 1950

Zoptimalizovaná a validovaná metoda byla aplikována pro identifikaci a stanovení SM, Cer, HexCer a Hex2Cer v NIST plazmě a získaná data byla srovnána s literaturou (Tabulka 11).

Celkem bylo připraveno 5 vzorků NIST plazmy obohacených IS mixem na střední koncentrační úrovni před extrakcí a každý vzorek byl jednou změřen. Jednotlivé sfingolipidy byly identifikovány pomocí ESI-MS/MS v režimu záznamu kladných iontů pomocí PIS  $m/z$  264,3 pro Cer, HexCer a Hex2Cer a PIS  $m/z$  184,1 pro SM (obr. 39, 40). Ve spektrech byly pozorovány ionty  $[M+H]^+$ , které byly párovány s databází, a navíc byly pozorovány i ionty  $[M+H-H_2O]^+$  pro Cer.

Stanovení koncentrací jednotlivých sfingolipidů bylo prováděno pomocí softwaru LipidQuant, který provedl automatickou izotopickou korekci. Zjištěné koncentrace jednotlivých sfingolipidů v rámci pěti opakování byly zprůměrovány. Při kvantifikaci byla nalezená molární koncentrace počítána vztažením intenzity nalezeného lipidu na intenzitu konkrétního interního standardu a následně vynásobena jeho koncentrací. V případě stanovení HexCer a Hex2Cer byl pro každou třídu použit pouze jeden IS, konkrétně GlcCer 30:1;O2 a LacCer 30:1;O2. U zbývajících lipidových tříd, SM a Cer, bylo v obou případech využito dvou dostupných IS, konkrétně Cer 35:1;O2, SM 36:2;O2 d9 (v Tabulce 11 použity pro výpočet koncentrace 1) a Cer 30:1;O2, SM 30:1;O2 (v Tabulce 11 použity pro výpočet koncentrace 2). Použití dvou IS v rámci jedné třídy umožnilo výpočet dvou paralelních hodnot nalezených koncentrací. Ačkoliv lipidy v rámci jednotlivé lipidové třídy vykazují během ionizace relativně podobné chování, tak se jejich odezva liší v závislosti na délce přítomných acylů a počtu dvojných vazeb, jak již bylo dříve popsáno v literatuře [101]. Nejlepší by tedy bylo mít pro každý lipid jeho deuterovaný analog, což je prakticky nemožné. V našem případě, kdy jsou všechny lipidy ionizovány ve stejném čase, je alespoň kompenzován matriční efekt, protože nedochází ke změně složení mobilní fáze během analýzy. Daleko horší situace však nastává v případě použití separace v reverzních fázích, kde jsou IS a příslušné endogenně přítomné lipidy ionizovány zcela v jiném čase.

Celkem bylo zoptimalizovanou shotgun metodou identifikováno a následně kvantifikováno 39 sfingolipidů – 20 sfingomyelinů, 7 ceramidů, 8 hexosylceramidů a 4 dihexosylceramidy, z čehož koncentrace 10 lipidů byla pod limitem kvantifikace z výsledků validace. Nicméně v tabulce jsou přesto uvedeny (označeny hvězdičkou) a porovnány

s literaturou. Ačkoliv byly tyto koncentrace pod limitem kvantifikace, tak většina z nich byla spolehlivě stanovena, což dokládá fakt, že RSD mezi jednotlivými pěti opakování je pro většinu z nich < 18 %. Z toho plyne, že jednotlivé parametry validace byly nastaveny velmi striktně a limit kvantifikace je ve skutečnosti nižší.

V Tabulce 11 je pro lipidy uváděna základní anotační úroveň CN:DB, v tomto experimentu byla pro SM rozlišena pouze tato úroveň, ale pro Cer, HexCer a Hex2Cer byla pomocí PIS  $m/z$  264,3 měřena konkrétní sfingoidní báze 18:1;O2 (jiné sfingoidní báze byly pod úrovní stanovení 18:1). V literatuře [102] bylo uvedeno pouze CN:DB rozlišení pro všechny zkoumané sfingolipidy na rozdíl od literatur [103] a [104], kde bylo rozlišení na vyšší úrovni. V případě literatury [103] jsou v tabulce uvedeny koncentrace pro Cer a HexCer se sfingoidní bází 18:1;O2 a pro SM je uváděn součet koncentrací pro více rozlišených bází. A v literatuře [104] je pro SM, Cer i HexCer uváděn součet koncentrací jednotlivých rozlišených bází.

V literatuře [102] byly prezentovány výsledky z mezilaboratorního srovnávání, které probíhalo ve 30 různých laboratořích, a výsledky byly uváděny jako konsenzuální koncentrace. V publikaci [103] byla data získána pomocí NP-LC ESI-MS/MS s využitím MRM skenů a byly použity IS SM 18:1;O2/12:0, Cer 18:1;O2/12:0, GlcCer 18:1;O2/12:0 a LacCer 18:1;O2/12:0. RP-LC ESI-MS/MS technika byla využita v literatuře [104], SM byly fragmentovány pomocí PIS  $m/z$  184,1 a Cer, HexCer a Hex2Cer pomocí různých PIS, např. PIS  $m/z$  264,3; PIS  $m/z$  236,2; PIS  $m/z$  278,3 atd., a použitými standardy byly SM 18:1;O2/12:0, Cer 18:1;O2/17:0, HexCer 18:1;O2/16:0 d3 a Hex2Cer 18:1;O2/16:0 d3. Při srovnávání nalezených dat s literaturou je důležité si uvědomit, že velice záleží na tom, jaké IS byly použity a jaká technika byla pro kvantitativní měření použita. Optimalizovanou shotgun metodou v této práci byly nalezeny výsledky, které se blížily datům z literatury, zejména nalezené koncentrace 1 pro SM a Cer byly velmi blízké vypočteným konsenzuálním koncentracím v literatuře [102], např. u SM 39:1;O2 byla uváděna koncentrace 3,6 nmol/ml (ve 14 různých laboratořích) se standardní nejistotou 1,0; zatímco má nalezená koncentrace 1 stejného vzorku NIST plazmy byla 3,17 nmol/ml nebo u Cer 38:1;O2 byla v literatuře hlášena konsenzuální koncentrace 0,11 nmol/ml (v 16 laboratořích, nejistota 0,021) oproti mé hodnotě 0,12 nmol/ml. Grafické znázornění porovnání nalezených koncentrací a dat z literatury je ukázáno na obr. 41.

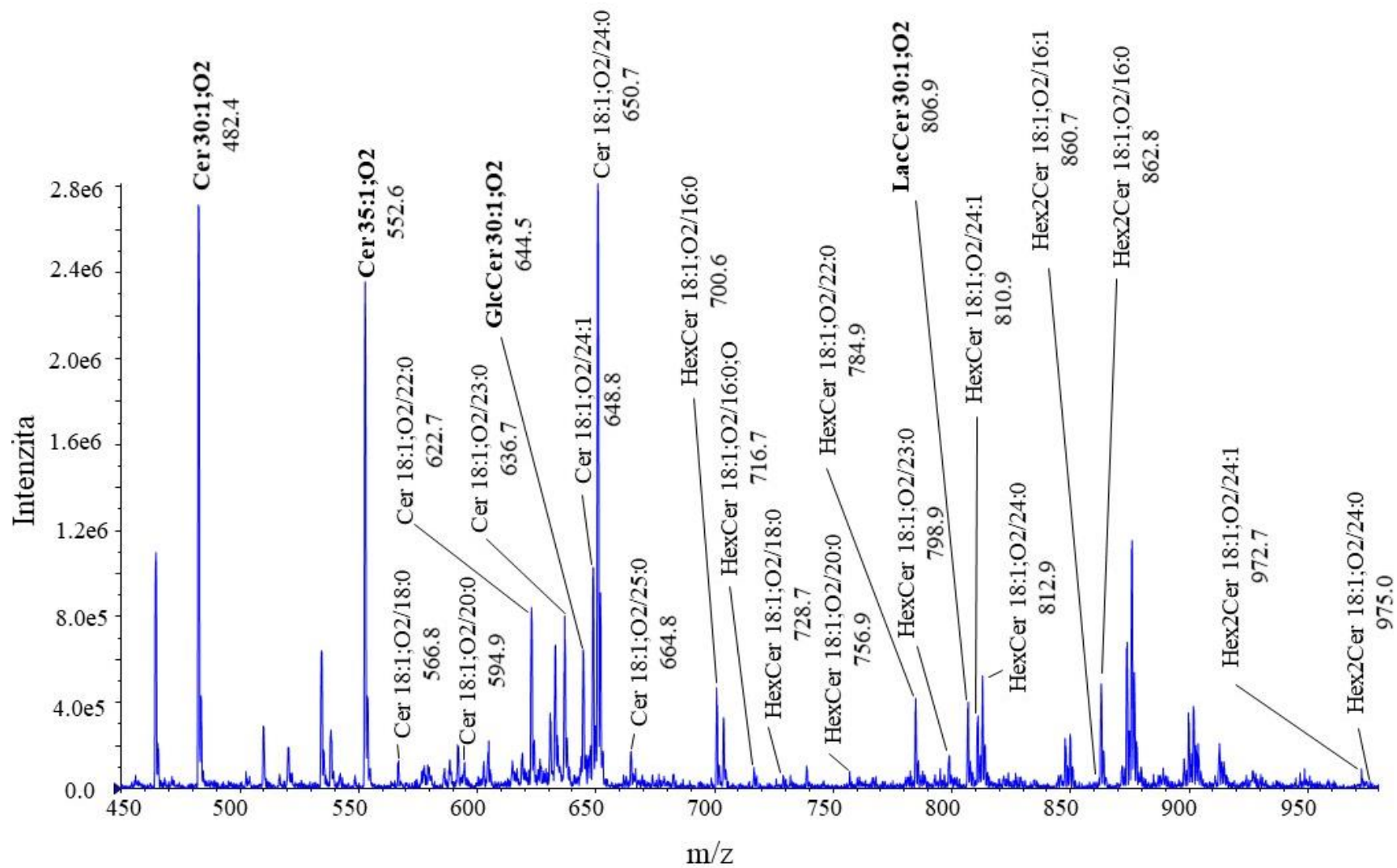
**Tabulka 11** Identifikované lipidy v NIST plazmě, jejich koncentrace a RSD mezi jednotlivými měřeními (z koncentrací a intenzit) a porovnání nalezených hodnot s literaturou

Lipid	Data z literatury [nmol/ml]			Nalezené koncentrace [nmol/ml]		RSD [%]		
	[102]	[103]	[104]	1	2	1	2	z intenzit
SM 32:1;O2	8,4	9,17	6,00	9,42	6,40	3	4	11
SM 33:1;O2	4,7	6,22	3,16	5,19	3,53	4	3	11
SM 34:0;O2	5,8	16,7	3,92	4,56	3,12	10	15	13
SM 34:1;O2	100	81,0	103,97	117,27	79,78	2	5	11
SM 34:2;O2	16	0,702	11,28	17,34	11,80	3	5	11
SM 35:0;O2	–	1,24	–	0,49 *	–	12	–	11
SM 35:1;O2	2,5	3,75	2,40	2,89	1,96	3	5	12
SM 36:1;O2	20	16,2	20,77	19,13	13,01	4	5	11
SM 36:2;O2	9,6	10,8	7,63	11,42	7,77	2	5	11
SM 37:1;O2	1,0	0,902	0,94	0,66 *	0,45 *	14	13	15
SM 38:2;O2	5,2	6,60	4,19	3,08	2,10	7	10	15
SM 39:1;O2	3,6	4,34	2,81	3,17	2,16	1	6	14
SM 40:1;O2	20	15,0	22,45	13,72	9,33	14	13	15
SM 40:2;O2	12	15,7	14,74	10,98	7,48	7	10	15
SM 41:0;O2	–	–	–	0,56 *	0,38 *	18	15	11
SM 41:1;O2	7,7	7,00	7,64	8,08	5,51	4	10	13
SM 42:1;O2	20	12,5	14,57	14,48	9,86	4	7	12
SM 42:2;O2	44	33,0	35,22	33,89	23,09	3	8	12
SM 43:1;O2	–	1,30	–	0,97 *	0,66 *	9	11	10
SM 43:2;O2	1,0	1,73	1,10	1,30 *	0,88 *	8	9	11
Cer 36:1;O2	0,12	0,128	0,07	0,10 *	0,07 *	13	16	17
Cer 38:1;O2	0,11	0,145	0,34	0,12 *	0,09 *	31	12	14
Cer 40:1;O2	0,65	1,22	2,04	1,04	0,74	7	9	4
Cer 41:1;O2	0,67	0,281	1,24	0,97	0,68	6	5	8
Cer 42:1;O2	1,9	3,00	3,82	3,82	2,70	7	7	6
Cer 42:2;O2	0,82	1,00	2,31	1,43	1,01	6	4	6
Cer 43:1;O2	–	0,271	–	0,23 *	0,16 *	18	16	16
HexCer 34:1;O2	0,86	0,336	1,30		1,68		10	11
HexCer 34:1;O3	–	–	–		0,33		6	3
HexCer 36:1;O2	0,13	0,0275	0,02		0,24		7	5
HexCer 38:1;O2	–	0,079	–		0,17		25	24

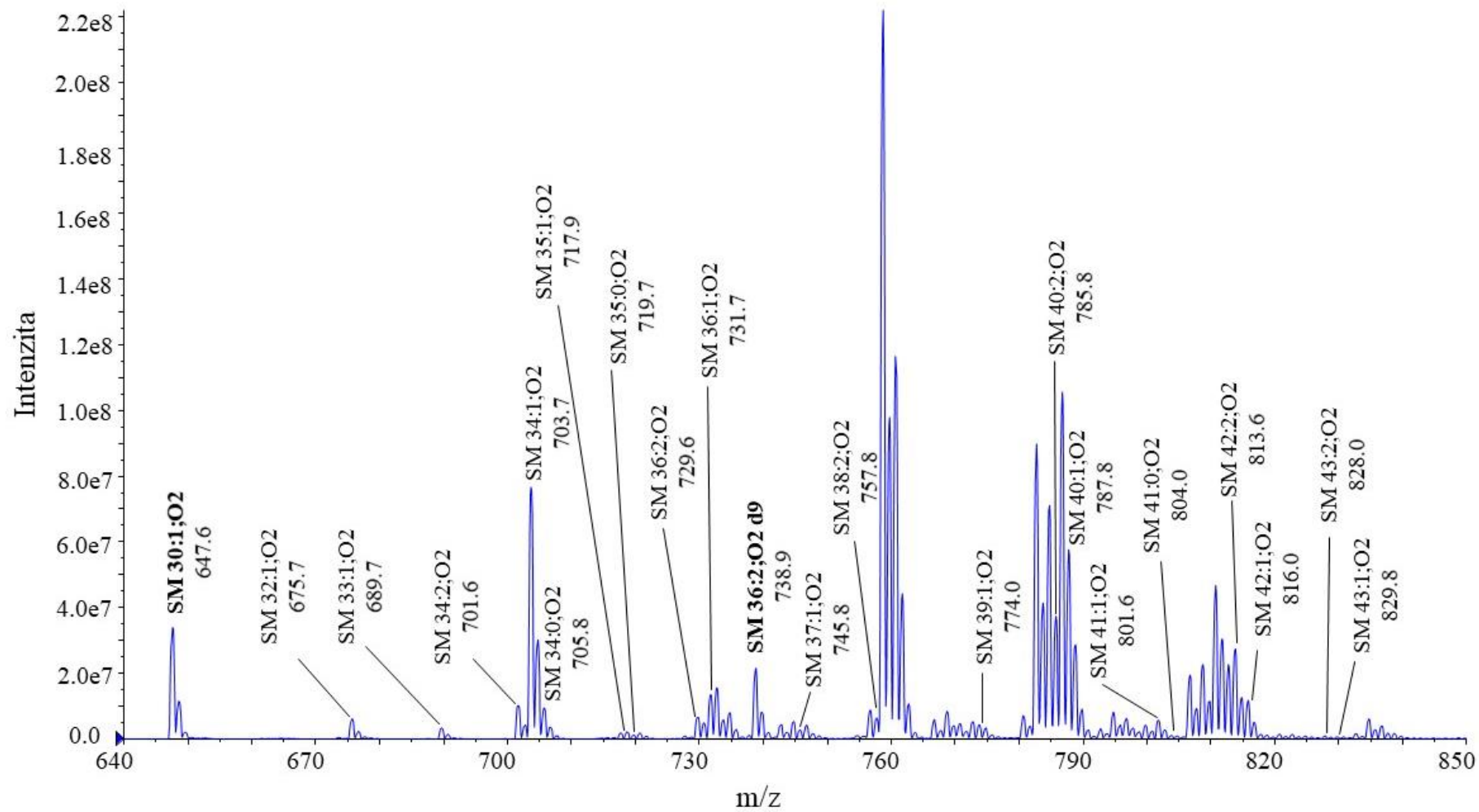


HexCer 40:1;O2	2,4	0,522	0,37	1,55	10	9
HexCer 41:1;O2	–	0,187	–	0,73	11	7
HexCer 42:1;O2	2,7	0,409	0,56	1,87	5	3
HexCer 42:2;O2	–	0,332	–	1,37	11	8
Hex2Cer 34:1;O2	–	–	–	3,78	13	3
Hex2Cer 34:2;O2	–	–	–	0,16 *	39	38
Hex2Cer 42:1;O2	–	–	–	0,12 *	38	19
Hex2Cer 42:2;O2	–	–	–	0,41	31	20

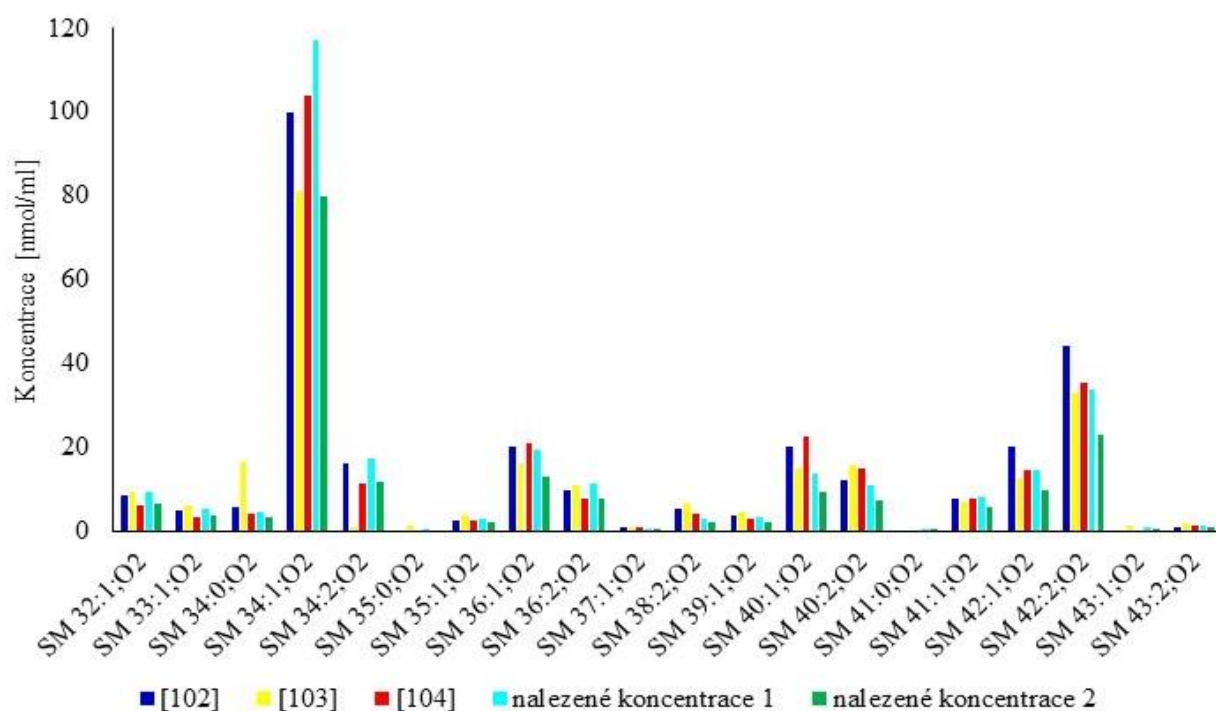
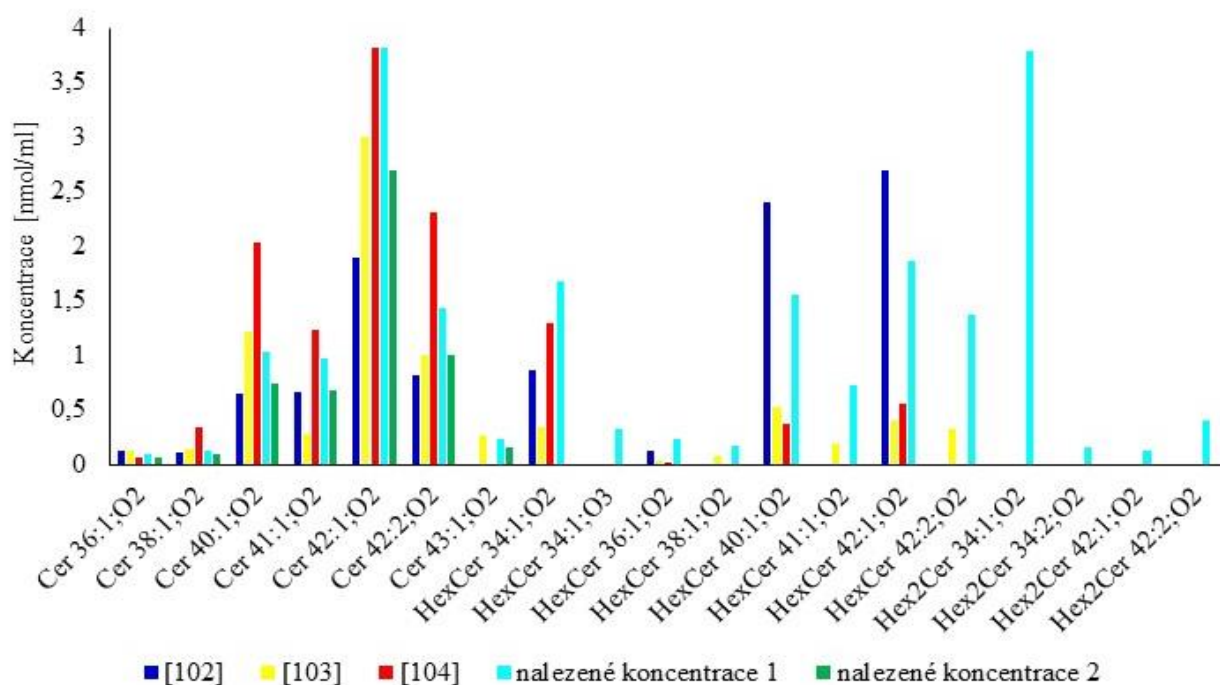
\* hodnoty pod LOQ



**Obrázek 39** Identifikované ionty  $[M+H]^+$  pro Cer, HexCer a Hex2Cer v NIST plazmě, IS jsou znázorněny tučně



**Obrázek 40** Identifikované ionty  $[M+H]^+$  pro SM v NIST plazmě, IS jsou znázorněny tučně

**a****b**

**Obrázek 41** Porovnání dat z literatury a nalezených koncentrací, přičemž koncentrace 1 byly počítány s využitím IS SM 36:2;O2 d9, Cer 35:1;O2, GlcCer 30:1;O2, LacCer 30:1;O2 a koncentrace 2 s využitím IS SM 30:1;O2, Cer 30:1;O2 pro **a** SM a **b** Cer, HexCer, Hex2Cer

### 3.5. Klinická studie kolorektálního karcinomu

Vyvinutá metoda byla finálně aplikována pro měření malé kohorty klinických vzorků plazmy 25 pacientů s kolorektálním karcinomem (KK) a 25 zdravých kontrol (ZK) s cílem porovnat, zdali budou v jednotlivých skupinách nalezeny významné rozdíly v koncentracích studovaných sfingolipidů. Studie zahrnovala vzorky mužů ve věku 53 až 67 let a základní klinické údaje jsou uvedeny v Tabulce 12. Vzorky plazmy byly extrahovány a poté i měřeny v randomizovaném pořadí.

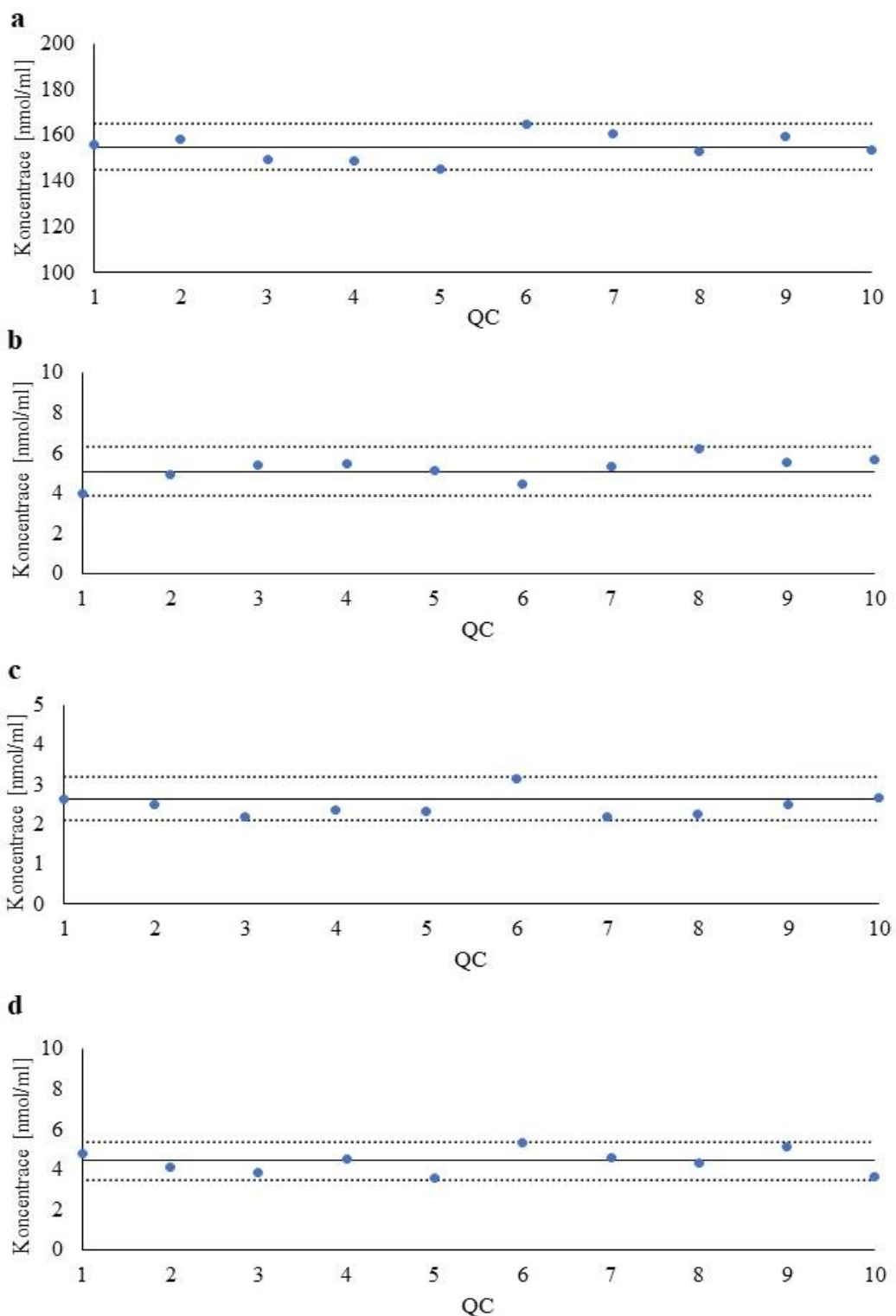
**Tabulka 12** Základní klinické údaje pacientů trpících kolorektálním karcinomem a zdravých dobrovolníků (kontrol)

Číslo vzorku	Věk	Klinický stav	Stádium rakoviny
KK1	67	pacient	1
KK2	60	pacient	3
KK3	53	pacient	3
KK4	57	pacient	3
KK5	63	pacient	2
KK6	62	pacient	3
KK7	57	pacient	3
KK8	56	pacient	1
KK9	61	pacient	4
KK10	64	pacient	1
KK11	58	pacient	1
KK12	60	pacient	3
KK13	63	pacient	2
KK14	57	pacient	4
KK15	64	pacient	3
KK16	65	pacient	3
KK17	57	pacient	3
KK18	53	pacient	3
KK19	61	pacient	2
KK20	59	pacient	3
KK21	61	pacient	2
KK22	64	pacient	2

KK23	62	pacient	2
KK24	67	pacient	1
KK25	63	pacient	3
ZK1	61	kontrola	–
ZK2	61	kontrola	–
ZK3	57	kontrola	–
ZK4	63	kontrola	–
ZK5	55	kontrola	–
ZK6	64	kontrola	–
ZK7	66	kontrola	–
ZK8	59	kontrola	–
ZK9	57	kontrola	–
ZK10	53	kontrola	–
ZK11	54	kontrola	–
ZK12	66	kontrola	–
ZK13	65	kontrola	–
ZK14	61	kontrola	–
ZK15	62	kontrola	–
ZK16	55	kontrola	–
ZK17	65	kontrola	–
ZK18	66	kontrola	–
ZK19	56	kontrola	–
ZK20	54	kontrola	–
ZK21	66	kontrola	–
ZK22	65	kontrola	–
ZK23	58	kontrola	–
ZK24	57	kontrola	–
ZK25	59	kontrola	–

V rámci měření této studie byly proměřovány QC vzorky, aby bylo ověřeno, že podmínky v přístroji byly stabilní a neměnily se. Celkem bylo změřeno 10 QC vzorků, 5 vzorků bylo od jednoho operátora (QC<sub>1</sub> až QC<sub>5</sub>) a 5 vzorků bylo od druhého operátora (QC<sub>6</sub> až QC<sub>10</sub>). V grafech na obr. 42 jsou zobrazeny závislosti vypočtených koncentrací v jednotlivých QC vzorcích pro nejvíce zastoupené sfingolipidy reprezentující jednotlivé lipidové třídy. Pro každou koncentraci je v grafu zobrazen průměr této koncentrace v rámci

jednotlivých QC vzorků (plná černá čára) a vedle toho tečkované čáry, které značí RSD od průměru. Ze záznamů je patrné, že podmínky byly stabilní, protože RSD mezi jednotlivými QC vzorky nepřesáhla 13 %.



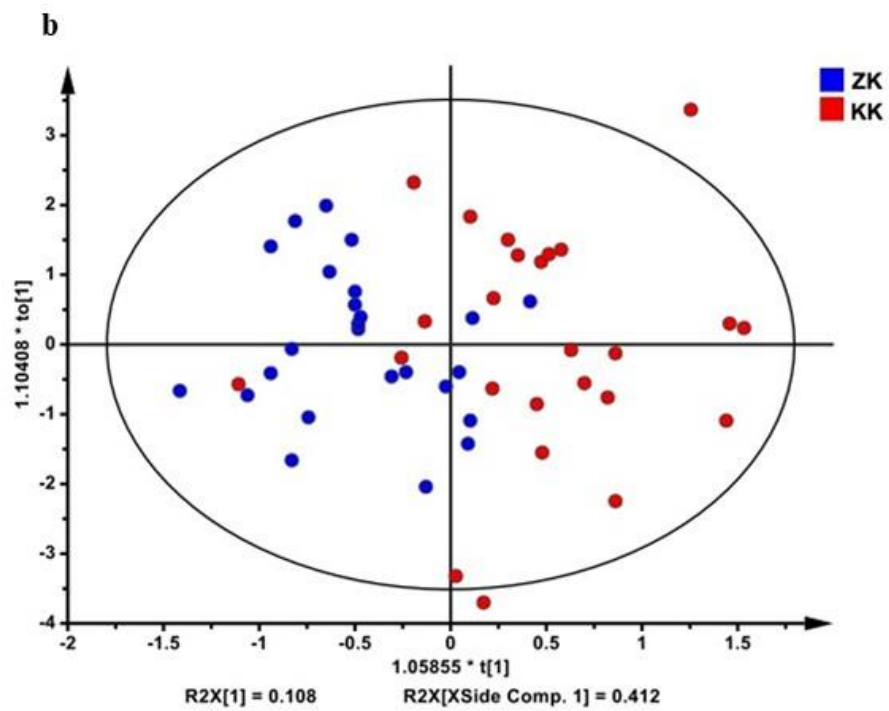
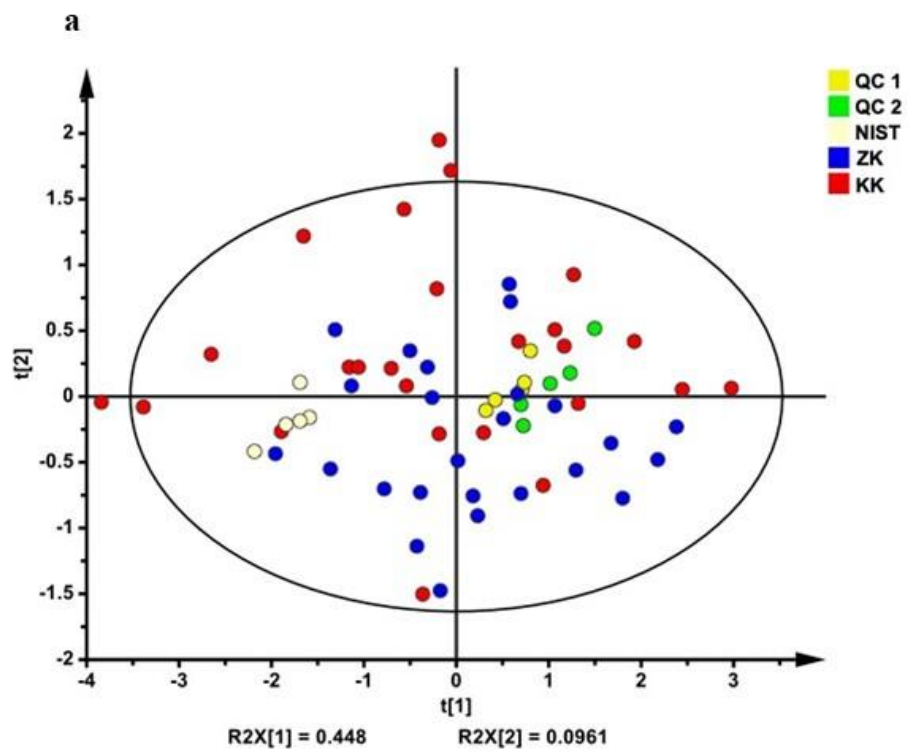
**Obrázek 42** Koncentrace vybraných sfingolipidů **a** SM 34:1;O2, **b** Cer 18:1;O2/24:0, **c** HexCer 18:1;O2/24:1, **d** Hex2Cer 18:1;O2/16:0 v QC vzorcích

Soubor naměřených dat, který zahrnoval intenzity všech studovaných sfingolipidů pro všechny proměřené vzorky plazmy, byl následně statisticky zpracován modely MDA. S využitím softwaru SIMCA, byla nejdříve použita nesupervizovaná metoda – analýza hlavních komponent (PCA) a následně ortogonální diskriminační analýza částečných nejmenších čtverců neboli ortogonální projekce do latentních struktur (OPLS-DA).

Z rozptylového grafu komponentních skóre pro PCA na obr. 43a je patrné částečné rozdělení do dvou skupin s malým překryvem shluků pro pacienty s kolorektálním karcinomem (KK – červeně) a zdravé kontroly (ZK – modře). Rovněž je vidět shlukování vzorků NIST plazmy (NIST – světle žlutě), QC vzorků prvního operátora (QC 1 – žlutě) a QC vzorků druhého operátora (QC 2 – zeleně), což ukazuje, že během měření nedošlo k žádným potížím. Rozptyl mezi jednotlivými body (různými vzorky) v rámci obou studovaných skupin značí biologickou variabilitu, která reflektuje genotyp daného člověka a rovněž i vnější faktory jako např. další onemocnění, stres, dietu či životní styl.

V případě supervizované OPLS-DA jsou před tvorbou modelu předdefinovány dvě konkrétní skupiny, v našem případě KK (červeně) a ZK (modře). OPLS-DA vyjadřuje lineární vztah mezi těmito skupinami a proměnnými (intenzity jednotlivých lipidů v rámci skupin). Obr. 43b ukazuje OPLS-DA skóre graf vytvořený na základě porovnání molárních koncentrací (nmol/ml) lipidů KK a ZK. Obě skupiny jsou v tomto případě od sebe odděleny lépe. S využitím tohoto modelu byly stanoveny hodnoty správnosti 82 %, specificity 80 % a senzitivity 84 %. Správnost popisuje celkovou úspěšnost predikce. Senzitivita neboli citlivost vyjadřuje úspěšnost správného přiřazení vzorků získaných od pacientů s nádorovým onemocněním, 21 vzorků bylo správně pozitivních a 4 vzorky byly falešně negativní. Specificita vyjadřuje schopnost správného přiřazení zdravých kontrol (tedy vzorků, které nejsou spojeny s rakovinou), 20 vzorků bylo správně negativních a 5 vzorků bylo falešně pozitivních.





**Obrázek 43** MDA pro 25 pacientů s kolorektálním karcinomem (červené tečky) a 25 zdravých kontrol (modré tečky): skóre grafy **a** nesupervizované PCA a **b** supervizované OPLS-DA

Pro vyhodnocení nejvíce dysregulovaných sfingolipidů ovlivňujících rozdělení vzorků do dvou skupin byla pomocí R softwaru – balíčku rstatix generována tabulka (Tabulka 13) zahrnující výsledky neparametrického testování získaných dat. Na základě těchto statistických výpočtů byly zjištěny nejvíce statisticky významné sfingolipidy, pro které byly následně sestrojeny krabicové grafy (obr. 44a), a které byly využity pro sestrojení cirkulárního dendrogramu s teplotní mapou (obr. 44b), opět s využitím R softwaru.

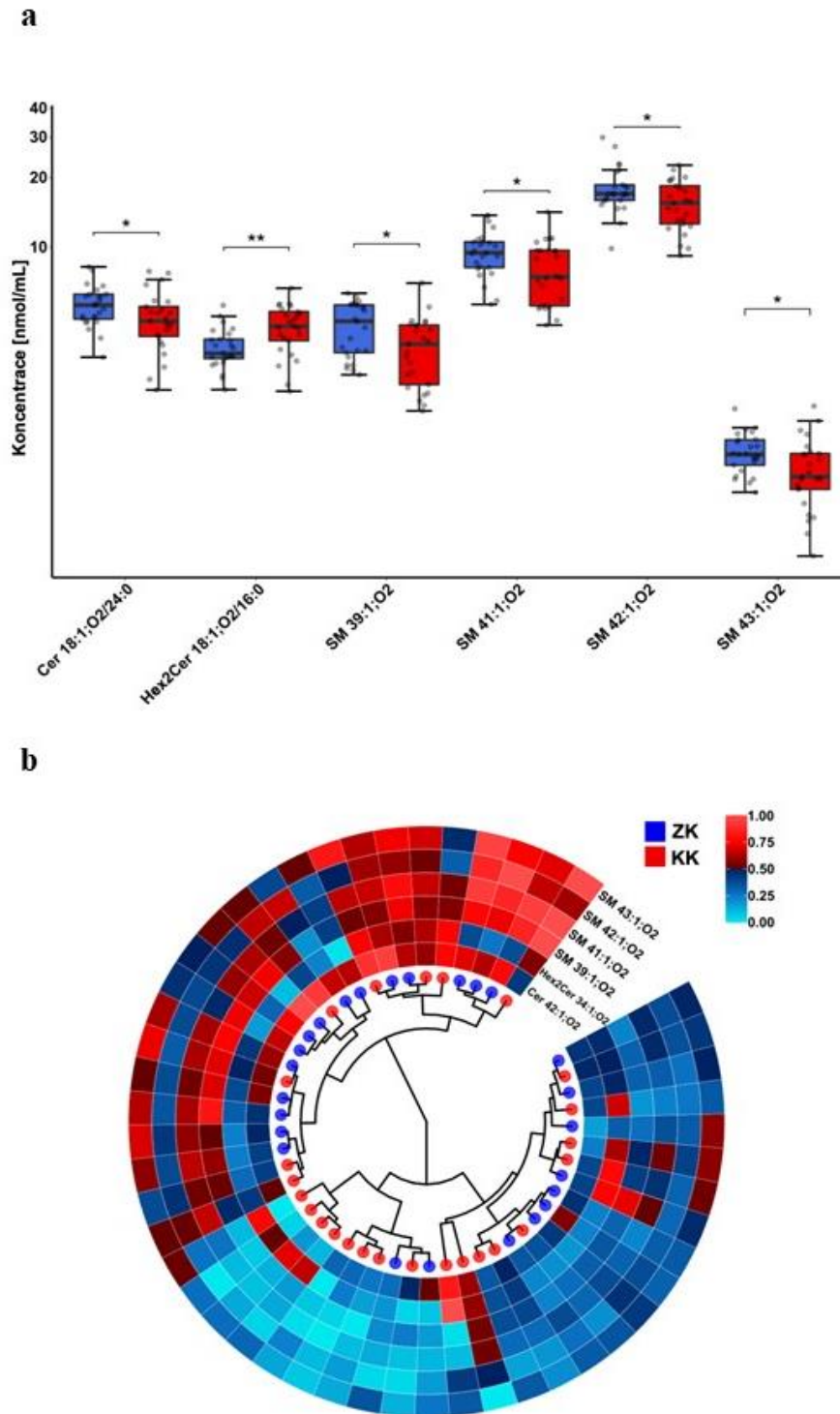
V Tabulce 13 je uveden medián koncentrací pro obě studované skupiny (ZK a KK), který dělí řadu na dvě stejně početné poloviny a čím více se tyto mediány liší, tím jsou ZK a KK rozdílnější. Dále je zde uvedeno mezikvartilové rozpětí (IQR), které představuje rozdíl mezi třetím a prvním kvantilem příslušné koncentrační distribuce v rámci jednotlivých skupin a je důležitým prvkem pro konstrukci krabicového grafu. Míra velikosti účinku (FC) představuje podíl mediánu KK a ZK, a čím více je hodnota větší nebo menší než 1, tím je lipid více dysregulován. Poslední parametr je p-hodnota testu, kde platí, jestliže je p-hodnota menší než hladina významnosti ( $\alpha = 0,05$ ), tak je daný lipid statisticky významný. p-hodnoty byly nižší než 0,05 pouze u 6 z 36 identifikovaných sfingolipidů. Pro Cer, HexCer a Hex2Cer byla měřena konkrétní sfingoidní báze 18:1;O2, v tabulce je uvedena pouze základní anotační úroveň CN:DB.

**Tabulka 13** Neparametrické testování získaných dat – medián, mezikvartilové napětí, míra velikosti účinku, p-hodnota a významnost

Lipid	Skupina		Počet		Medián [nmol/ml]		IQR [nmol/ml]		FC	P-hodnota	Významnost
	1	2	1	2	ZK	KK	ZK	KK			
Cer 36:1;O2	KK	ZK	25	25	0,154	0,171	0,088	0,057	1,110	0,209	
Cer 40:1;O2	KK	ZK	25	25	1,385	1,293	0,401	0,344	0,934	0,158	
Cer 41:1;O2	KK	ZK	25	25	1,330	1,196	0,234	0,403	0,899	0,126	
Cer 42:1;O2	KK	ZK	25	25	5,607	4,784	1,370	1,420	0,853	0,037	*
Cer 42:2;O2	KK	ZK	25	25	2,547	2,862	1,000	0,810	1,124	0,289	
Cer 43:1;O2	KK	ZK	25	25	0,343	0,300	0,092	0,127	0,875	0,418	
Hex2Cer 34:1;O2	KK	ZK	25	25	3,461	4,540	0,699	1,325	1,312	0,003	**
Hex2Cer 42:2;O2	KK	ZK	25	25	0,653	0,719	0,160	0,197	1,101	0,325	
HexCer 34:1;O2	KK	ZK	25	25	2,017	2,316	0,539	0,916	1,148	0,202	
HexCer 34:1;O3	KK	ZK	25	25	0,390	0,332	0,122	0,102	0,851	0,117	
HexCer 36:1;O2	KK	ZK	25	25	0,293	0,260	0,107	0,120	0,887	0,985	
HexCer 38:1;O2	KK	ZK	25	25	0,276	0,263	0,083	0,129	0,953	0,316	
HexCer 40:1;O2	KK	ZK	25	25	1,991	1,834	0,523	0,367	0,921	0,071	
HexCer 41:1;O2	KK	ZK	25	25	0,878	0,837	0,358	0,221	0,953	0,247	
HexCer 42:1;O2	KK	ZK	25	25	2,495	2,208	0,635	0,646	0,885	0,092	
HexCer 42:2;O2	KK	ZK	25	25	1,903	2,329	0,436	0,985	1,224	0,052	
SM 32:1;O2	KK	ZK	25	25	14,468	12,155	4,676	2,963	0,840	0,164	
SM 33:1;O2	KK	ZK	25	25	7,829	6,932	2,502	1,716	0,885	0,407	
SM 34:0;O2	KK	ZK	25	25	5,582	5,142	0,659	1,589	0,921	0,263	
SM 34:1;O2	KK	ZK	25	25	142,263	151,639	17,254	38,712	1,066	0,551	
SM 34:2;O2	KK	ZK	25	25	20,737	20,882	3,887	5,944	1,007	0,590	
SM 35:0;O2	KK	ZK	25	25	0,535	0,664	0,197	0,287	1,241	0,316	
SM 35:1;O2	KK	ZK	25	25	3,653	3,660	1,199	1,382	1,002	0,954	
SM 36:1;O2	KK	ZK	25	25	25,113	26,335	7,186	7,384	1,049	0,603	
SM 36:2;O2	KK	ZK	25	25	11,813	12,316	2,265	4,518	1,043	0,672	
SM 37:1;O2	KK	ZK	25	25	0,749	0,996	0,505	0,745	1,330	0,325	
SM 38:2;O2	KK	ZK	25	25	4,223	3,940	1,826	2,168	0,933	0,464	
SM 39:1;O2	KK	ZK	25	25	4,773	3,797	2,128	2,058	0,796	0,014	*
SM 40:1;O2	KK	ZK	25	25	17,255	14,825	6,377	9,725	0,859	0,112	
SM 40:2;O2	KK	ZK	25	25	15,876	15,177	4,748	6,379	0,956	0,316	
SM 41:0;O2	KK	ZK	25	25	0,638	0,589	0,101	0,172	0,923	0,112	
SM 41:1;O2	KK	ZK	25	25	9,463	7,453	2,389	4,123	0,788	0,035	*
SM 42:1;O2	KK	ZK	25	25	17,081	15,559	2,679	5,859	0,911	0,043	*
SM 42:2;O2	KK	ZK	25	25	49,849	52,418	8,243	21,448	1,052	0,441	
SM 43:1;O2	KK	ZK	25	25	1,261	1,009	0,326	0,381	0,800	0,029	*
SM 43:2;O2	KK	ZK	25	25	2,255	2,058	0,678	1,096	0,913	0,564	

Největší rozdíly v koncentracích byly nalezeny u Cer 18:1;O2/24:0, Hex2Cer 18:1;O2/16:0, SM 39:1;O2, SM 41:1;O2, SM 42:1;O2 a SM 43:1;O2.

Krabicové grafy těchto nejvíce dysregulovaných sfingolipidů jsou ukázány na obr. 44a. Každá tečka v tomto grafu reprezentuje jednotlivý vzorek, z čehož je patrné, jak jsou jednotlivá data distribuována. Koncentrace lipidů pro skupinu KK jsou značeny červeně a koncentrace kontrolní skupiny ZK modře, přičemž je osa y v logaritmickém měřítku. Z těchto grafů je patrné, že většina lipidů je ve vzorcích rakoviny down-regulována, kromě lipidu Hex2Cer 18:1;O2/16:0. Tento lipid vykazuje opačný trend, jeho koncentrace je ve vzorcích rakoviny zvýšena a tato změna je statisticky nejvýznamnější. Cirkulární dendrogram s teplotní mapou (obr. 44b) je typem shlukové analýzy, barvy zde vyjadřují koncentrace studovaných lipidů, červená barva demonstruje vyšší koncentrace a modrá naopak koncentrace nižší, a červené tečky označují vzorky KK a modré pak ZK. Dendrogram opět ukazuje poměrně pěkné rozdělení obou studovaných skupin a dokazuje významnost těchto 6 dysregulovaných lipidů, jejichž koncentrace se vlivem rakoviny mění, a tudíž by mohly být potenciálně využity pro detekci rakoviny z krve. Změny v koncentracích těchto lipidů mohou být spojeny buď s progresí rakoviny a jejím metabolismem nebo mohou být způsobeny odezvou imunitního systému. Pro potvrzení konkrétní hypotézy by bylo potřeba provést další biologické a analytické experimenty (měřit aktivitu příslušných enzymů zodpovědných za tvorbu těchto specifických lipidů, připravit adekvátní experiment na buněčných a zvířecích modelech, apod.).



**Obrázek 44 a** Krabicové grafy a **b** cirkulární dendrogram s teplotní mapou nejvíce regulovaných sfingolipidů v lidské plazmě pacientů s kolorektálním karcinomem

## ZÁVĚR

V této práci byla optimalizována a validována shotgun metoda na hybridním analyzátoru QTRAP se zaváděním vzorku pomocí FIA pro analýzu vybraných sfingolipidů, konkrétně SM a koncentračně méně zastoupených Cer, HexCer a Hex2Cer, ve vzorcích lidské plazmy.

V rámci diplomové práce byly porovnávány čtyři extrakční protokoly a nejlepších výsledků bylo dosaženo při použití extrakce podle Folche. Pro FIA zavedení vzorku byl použit kapalinový chromatograf, přičemž nadávkované množství činilo 50  $\mu$ l 300x ředěné plazmy a optimální průtok mobilní fáze pro vlastní analýzu byl < 10  $\mu$ l/min. Dále byly optimalizovány MS podmínky na dvou hmotnostních spektrometrech. Prvním byl hmotnostní spektrometr XEVO TQD s trojitým kvadrupólem a druhým hmotnostní spektrometr QTRAP 6500. Hmotnostní spektrometr QTRAP 6500 poskytl mnohem vyšší citlivost a kvalitu záznamu spekter, tudíž bylo rozhodnuto, že veškeré další analýzy budou prováděny na něm, včetně validace analytické metody a změření menší kohorty klinických vzorků.

V případě validace byly hodnoceny parametry kalibrační křivka a její linearita, přesnost, správnost, extrakční výtěžnost, matriční efekt, selektivita, paměťový efekt a opakovatelnost. Na základě výsledků z validace bylo ověřeno, že vyvinutá metoda je aplikovatelná pro spolehlivou a komplexní lipidomickou kvantifikaci SM, Cer, HexCer a Hex2Cer. Ve standardním referenčním materiálu NIST SRM 1950 bylo metodou identifikováno a následně kvantifikováno 39 sfingolipidů, z čehož 10 bylo pod limitem kvantifikace. Při porovnání nalezených koncentrací a dat z literatury bylo zjištěno, že jsou výsledky velmi dobře srovnatelné. Rovněž byla demonstrována důležitost použití vhodného interního standardu, který má společně s typem kvantitativního lipidomického přístupu významný vliv na získané hodnoty zjištěných molárních koncentrací jednotlivých lipidů v měřených vzorcích.

Po optimalizaci, validaci a ověření všech potřebných parametrů byla metoda využita pro lipidomickou analýzu klinických vzorků lidské plazmy 25 pacientů s kolorektálním karcinomem a u 25 zdravých kontrol. V rámci těchto měření bylo v plazmě identifikováno a následně kvantifikováno 36 sfingolipidů. Následně byly na získaná data aplikovány PCA a OPLS-DA modely, jenž prokázaly, že kontrolní vzorky jsou částečně separovány od vzorků pacientů s rakovinou, přičemž supervizovaná OPLS-DA metoda dokázala jednotlivé skupiny rozlišit se správností 82%. Neparametrickým testováním bylo následně určeno 6 statisticky významných lipidů, z nichž Cer 18:1;O2/24:0, SM 39:1;O2, SM 41:1;O2, SM 42:1;O2 a

SM 43:1;O2 byly u vzorků získaných od pacientů s rakovinou v porovnání se zdravými kontrolami sníženy. Naopak koncentrace Hex2Cer 18:1;O2/16:0 byla u pacientů s kolorektálním karcinomem vyšší. Pro lepší vizualizaci koncentračních změn těchto lipidů byly finálně sestrojeny krabicové grafy a jejich důležitost byla potvrzena tvorbou charakteristických shluků v cirkulárním dendrogramu s teplotní mapou.

Je důležité poukázat na to, že v této práci bylo zahrnuto pouze malé množství klinických vzorků a zjištěné dysregulace, jejich potenciál pro detekci rakoviny nebo monitorování terapie, by měly být v budoucnosti pečlivě vyhodnoceny na větší prospektivní kohortě.

## POUŽITÁ LITERATURA

- [1] A. D. Watson. Thematic review series: Systems Biology Approaches to Metabolic and Cardiovascular Disorders. Lipidomics: a global approach to lipid analysis in biological samples. *Journal of Lipid Research*, **2006**, 47 (10), s. 2101-2111.
- [2] I. Brabcová, E. Cífková, R. Jirásko, M. Chocholoušková, M. Holčapek. Lipidomická analýza biologických vzorků přímou infúzí spojenou s hmotnostní spektrometrií. In: J. Fischer, J. Kellner, K. Vytras, editoři. *Monitorování cizorodých látek v životním prostředí XIX.: Sborník příspěvků ze semináře*. Pardubice: Univerzita Pardubice, 2017. ISBN 978-80-7560-086-8.
- [3] E. Fahy, D. Cotter, M. Sud, S. Subramaniam. Lipid classification, structures and tools. *Biochimica et Biophysica Acta*, **2011**, 1811 (11), s. 637-647.
- [4] P. Schönfeld, L. Wojtczak. Short- and medium-chain fatty acids in energy metabolism: the cellular perspective. *Journal of Lipid Research*, **2016**, 57, s. 943-954.
- [5] L. I. Gidez. The lore of lipids. *Journal of Lipid Research*, **1984**, 25, s. 1430-1436.
- [6] M. Höring. Development of a Flow Injection Analysis Fourier Transform Mass Spektrometry (FIA-FTMS) Method to Quantify Lipid Species Profiles of Biological Samples. Regensburg, 2019, 110 s. Disertační práce. Univerzita v Regensburgu, Lékařská fakulta. Vedoucí práce PD Dr. Gerhard Liebisch.
- [7] LIPID MAPS® Structure Database (LMSD). *LIPID MAPS®* [online]. © 2003-2020 [cit. 1. 12. 2020]. Dostupné z: <https://www.lipidmaps.org>
- [8] G. Van Meer, D. R. Voelker, G. W. Feigenson. Membrane lipids: where they are and they behave. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **2008**, 9, s. 112-124.
- [9] Molecular view of the cell membrane. *Encyclopædia Britannica* [online]. © 2007 Encyclopædia Britannica. [cit. 2. 12. 2020]. Dostupné z: <https://www.britannica.com/science/tympanic-membrane#/media/1/463558/45550>
- [10] R. K. Murray, D. K. Granner, P. A. Mayes, W. V. Rodwell. *Harper's illustrated biochemistry*. 27th edition. New York: McGraw-Hill, 2006. ISBN: 9780071461979
- [11] C. C. Akoh, D. B. Min. *Food Lipids: Chemistry, Nutrition and Biotechnology*. 3rd edition. New York: CRC Press, 2008. ISBN 978-1-4200-4663-2.



- [12] E. Fahy, S. Subramaniam, H. A. Brown, Ch. K. Glass, A. H. Merrill, R. C. Murphy, Ch. R. H. Raetz, D. W. Russell, Y. Seyama, W. Shaw, T. Shimizu, F. Spener, G. Van Meer, M. S. Vannieuwenhze, S. H. White, J. L. Witztum, E. A. Dennis. A comprehensive classification system for lipids. *Journal of Lipid Research*, **2005**, *46*, s. 839-862.
- [13] E. Fahy, S. Subramaniam, R. C. Murphy, M. Nishijima, Ch. R. H. Raetz, T. Shimizu, F. Spener, G. Van Meer, M. J. O. Wakelam, E. A. Dennis. Update of the LIPID MAPS comprehensive classification system for lipids. *The Journal of Lipid Research*, **2009**, *50*, S9-S14.
- [14] G. Liebisch, J. A. Vizcaíno, H. Köfeler, M. Trötz Müller, W. J. Griffi, G. Schmitz, F. Spener, M. J. O. Wakelam. Shorthand notation for lipid structures derived from mass spectrometry. *Journal of Lipid Research*, **2013**, *54*, s. 1523-1530.
- [15] H. Mu, C.-E. Høy. The digestion of dietary triacylglycerols. *Progress in Lipid Research*, **2004**, *43* (2), s. 105-133.
- [16] G. Liebisch. *21. ročník Školy hmotnostní spektrometrie: Krátký kurz IV – Lipidomics analysis*. 1. vydání. Praha: Spektroskopická společnost Jana Marka Marci, 2020. ISBN 978-80-88195-22-1.
- [17] K. Reue, D. N. Brindley. Thematic Review Series: Glycerolipids. Multiple roles for lipins/phosphatidate phosphatase enzymes in lipid metabolism. *Journal of Lipid Research*, **2008**, *49* (12), s. 2493-2503.
- [18] D. R. Voelker. Glycerolipid Structure, Function, and Synthesis in Eukaryotes. *Encyclopedia of Biological Chemistry*, **2013**, s. 412-418.
- [19] M. M. Hussain. Intestinal lipid absorption and lipoprotein formation. *Current Opinion in Lipidology*, **2014**, *25* (3), s. 200-206.
- [20] X. Pan, M. M. Hussain. Gut triglyceride production. *Biochimica et Biophysica Acta*, **2012**, *1821* (5), s. 727-735.
- [21] AOCS Lipid Library®. *The American Oil Chemists' Society* [online]. © 2020 [cit. 9. 12. 2020]. Dostupné z: <https://lipidlibrary.aocs.org/>
- [22] P. A. Munda, Ch. K. Barlow, P. J. Nestel, E. H. Barnes, A. Kirby, P. Thompson, D. R. Sullivan, Z. H. Alshehry, N. A. Mellett, K. Huynh, K. S. Jayawardana, C. Giles, M. J. McConville, S. Zoungas, G. S. Hillis, J. Chalmers, M. Woodward, G. Wong, B. A. Kingwell, J. Simes, A. M. Tonkin, P. J. Meikle, et al. Large-scale plasma lipidomic profiling identifies lipids that predict cardiovascular events in secondary prevention. *JCI Insight*, **2018**, *3* (17), s. 1-15.

- [23] J. Graessler, D. Schwudke, P. E. H. Schwarz, R. Herzog, A. Shevchenko, S. R. Bornstein. Top-Down Lipidomics Reveals Ether Lipid Deficiency in Blood Plasma of Hypertensive Patients. *PLoS One*, **2009**, 4 (7), s. 1-13.
- [24] M. N. Barber, S. Risis, Ch. Yang, P. J. Meikle, M. Staples, M. A. Febbraio, C. R. Bruce. Plasma Lysophosphatidylcholine Levels Are Reduced in Obesity and Type 2 Diabetes. *PLoS One*, **2012**, 7 (7), s. 1-12.
- [25] J. N. Van der Veen, J. P. Kennelly, S. Wan, J. E. Vance, D. E. Vance, R. L. Jacobs. The critical role of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine metabolism in health and disease. *Biochimica et Biophysica Acta*, **2017**, 1859 (9), s. 1558-1572.
- [26] D. Wolrab, R. Jirásko, M. Chocholoušková, O. Peterka, M. Holčápek. Oncolipidomics: Mass spectrometric quantitation of lipids in cancer research. *Trends in Analytical Chemistry*, **2019**, 120, s. 1-15.
- [27] A. H. Merrill. Sphingolipid and glycosphingolipid metabolic pathways in the era of sphingolipidomics. *Chemical Reviews*, **2011**, 111 (10), s. 6387-6422.
- [28] A. Alonso, F. Goni. M. The Physical Properties of Ceramides in Membranes. *Annual Review of Biophysics*, **2018**, 47, s. 633-654.
- [29] G. Staneva, A. Momchilova, C. Wolf, P. J. Quinn, K. Koumanov. Membrane microdomains: role of ceramides in the maintenance of their structure and functions. *Biochimica et Biophysica Acta*, **2009**, 1788 (3), s. 666-675.
- [30] J. P. Slotte. Biological functions of sphingomyelins. *Progress in Lipid Research*, **2013**, 52 (4), s. 424-437.
- [31] K. Hořejší, R. Jirásko, M. Chocholoušková, D. Wolrab, D. Kahoun, M. Holčápek. Comprehensive Identification of Glycosphingolipids in Human Plasma Using Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography – Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Metabolites*, **2021**, 11 (3), s. 140.
- [32] L. K. Ryland, T. E. Fox, X. Liu, T. P. Loughran, M. Kester. Dysregulation of sphingolipid metabolism in cancer. *Cancer Biology & Therapy*, **2011**, 11 (2), s. 138-149.
- [33] R. Jirásko, M. Holčápek, M. Khalikova, D. Vrána, V. Študent, Z. Prouzová, B. Melichar. MALDI Orbitrap Mass Spectrometry Profiling of Dysregulated Sulfoglycosphingolipids in Renal Cell Carcinoma Tissues. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, **2017**, 28 (8), s. 1562-1574.

- [34] R. Hájek, M. Lísa, M. Khalikova, R. Jirásko, E. Cífková, V. Študent, D. Vrána, L. Opálka, K. Vávrová, M. Matzenauer, B. Melichar, M. Holčapek. HILIC/ESI-MS determination of gangliosides and other polar lipid classes in renal cell carcinoma and surrounding normal tissues. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2018**, *410*, s. 6585-6594.
- [35] J. H. Gross. *Mass spektrometry. A textbook*. 2nd edition. Heidelberg: Springer-Verlag, 2011. ISBN 978-3-642-10709-2.
- [36] T. Kind, O. Fiehn. Advances in structure elucidation of small molecules using mass spectrometry. *Bioanalytical Reviews* **2**, **2010**, s. 23-60.
- [37] R. Jirásko. Úvod do hmotnostní spektrometrie [přednáška]. Pardubice: Fakulta chemicko-technologická Univerzity Pardubice, 18. 2. 2020. Dostupné z: <https://holcapek.upce.cz>
- [38] D. Friedecký, K. Lemr. Úvod do hmotnostní spektrometrie. *Klinická biochemie a metabolismus*, **2012**, *20* (41), s. 152-157.
- [39] Ch. Dass. *Fundamentals of Contemporary Mass Spectrometry*. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2006. ISBN 978-0-471-68229-5.
- [40] D. W. Koppenaal, Ch. J. Barinaga, M. B. Denton, R. P. Sperline, G. M. Hieftje, G. D. Schilling, F. J. Andrade, J. H. Barnes. MS Detectors. *Analytical Chemistry*, **2005**, *77* (21), s. 418 A-427 A.
- [41] R. Jirásko. Ionizační techniky [přednáška]. Pardubice: Fakulta chemicko-technologická Univerzity Pardubice, 25. 2. 2020. Dostupné z: <https://holcapek.upce.cz>
- [42] J. B. Fenn, M. Mann, C. K. Meng, S. F. Wong, C. M. Whitehouse. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science*, **1989**, *246* (4926), s. 64-71.
- [43] S. J. Gaskell. Electrospray: Principles and Practice. *Journal of Mass Spectrometry*, **1998**, *32* (7).
- [44] K. B. Louie, S. M. Kosina, Y. Hu, H. Otani, M. de Raad, A. N. Kufin, N. J. Mouncey, B. P. Bowen, T. R. Northen. Mass Spectrometry for Natural Product Discovery. *Comprehensive Natural Products III: Chemistry and Biology*, **2020**, *6*, s. 263-306.
- [45] Atmospheric Pressure Photoionization Ionization. *Creative Proteomics* [online]. © 2008-2021 Creative Proteomics. [cit. 20. 1. 2021]. Dostupné z: <https://www.creative-proteomics.com/support/atmospheric-pressure-photoionization-ionization.htm>

- [46] MALDI-TOF Mass Spectrometry. *Creative Proteomics* [online]. © 2008-2021 Creative Proteomics. [cit. 20. 1. 2021]. Dostupné z: <https://www.creative-proteomics.com/technology/maldi-tof-mass-spectrometry.htm>
- [47] J. Leopold, Y. Popkova, K. M. Engel, J. Schiller. Recent Developments of Useful MALDI Matrices for the Mass Spectrometric Characterization of Lipids. *Biomolecules*, **2018**, 8 (173), s. 1-25.
- [48] R. E. Finnigan. Quadrupole mass spectrometers. *Analytical Chemistry*, **1994**, 66 (19), s. 969 A-975 A.
- [49] SHIMADZU Excellence in Science. *Shimadzu Corporation* [online]. © 2021 [cit. 30. 1. 2021]. Dostupné z: <https://www.shimadzu.com>
- [50] S. Medhe. Mass Spectrometry: Analysers an Important Tool. *International Journal of Chemical Sciences*, **2018**, 16 (3), s. 1-8.
- [51] R. Jirásko. Hmotnostní analyzátory – 1. část [přednáška]. Pardubice: Fakulta chemicko-technologická Univerzity Pardubice, 10. 3. 2020. Dostupné z: <https://holcapek.upce.cz>
- [52] D. J. Douglas, A. J. Frank, D. Mao. Linear ion traps in mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews*, **2004**, 24 (1).
- [53] R. A. Zubarev, A. Makarov. Orbitrap Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*, **2013**, 85 (11), s. 5288-5296.
- [54] ThermoFisher Scientific. *Thermo Fisher Scientific Inc.* [online]. © 2021 [cit. 3. 2. 2021]. Dostupné z: <https://analyteguru.com/resources/intact-monoclonal-antibody-characterization-using-a-bench-top-orbitrap-mass-spectrometer/>
- [55] D. Schwudke, K. Schuhmann, R. Herzog, S. R. Bornstein, A. Shevchenko. Shotgun lipidomics on high resolution mass spectrometers. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, **2011**, 3 (9).
- [56] M. Ghaste, R. Mistrik, V. Shulaev. Applications of Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance (FT-ICR) and Orbitrap Based High Resolution Mass Spectrometry in Metabolomics and Lipidomics. *International Journal of Molecular Sciences*, **2016**, 17 (6), s. 816.
- [57] R. Jirásko. Hmotnostní analyzátory – 2. část [přednáška]. Pardubice: Fakulta chemicko-technologická Univerzity Pardubice, 17. 3. 2020. Dostupné z: <https://holcapek.upce.cz>
- [58] X. Han. Lipidomics for studying metabolism. *Nature Reviews Endocrinology*, **2016**, 12, s. 668-679.

- [59] X. Han, K. Yang, R. W. Gross. Multi – dimensional mass spectrometry – based shotgun lipidomics and novel strategies for lipidomic analyses. *Mass Spectrometry Reviews*, **2012**, *31* (1), s. 134-178.
- [60] M. Holčapek, G. Liebisch, K. Ekroos. Lipidomic Analysis. *Analytical Chemistry*, **2018**, *90*, s. 4249-4257
- [61] J. Wang, Ch. Wang, X. Han. Tutorial on lipidomics. *Analytica Chimica Acta*, **2019**, *1061*, s. 28-41.
- [62] T. Züllig, M. Trötz Müller, H. C. Köfeler. Lipidomics from sample preparation to data analysis: a primer. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2020**, *412*, s. 2191-2209.
- [63] K. Jurowski, K. Kochan, J. Walczak, M. Barańska, W. Piekoszewski, B. Buszewski. Comprehensive review of trends and analytical strategies applied for biological samples preparation and storage in modern medical lipidomics: State of the art. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, **2017**, *86*, s. 276-289.
- [64] J. Aldana, A. Romero-Otero, M. P. Cala. Exploring the Lipidome: Current Lipid Extraction Techniques for Mass Spectrometry Analysis. *Metabolites*, **2020**, *10* (6), s. 231.
- [65] J. Folch, M. Lees, G. H. Sloane Stanley. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *The Journal of Biological Chemistry*, 1957, *226* (1), s. 497-509.
- [66] E. G. Bligh, W. J. Dyer. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, **1959**, *37* (8), s. 911-917.
- [67] V. Matyash, G. Liebisch, T. V. Kurzchalia, A. Shevchenko, D. Schwudke. Lipid extraction by methyl-tert-butyl ether for high-throughput lipidomics. *Journal of Lipid Research*, **2008**, *49*, s. 1137-1146.
- [68] L. Löfgren, G.-B. Forsberg, M. Ståhlman. The BUMÉ method: a new rapid and simple chloroform-free method for total lipid extraction of animal tissue. *Scientific Reports*, **2016**, *6*, s. 27688.
- [69] Z. Zhao, Y. Xu. An extremely simple method for extraction of lysophospholipids and phospholipids from blood samples. *Journal of Lipid Research*, **2010**, *51* (3), s. 652-659.

- [70] B. Burla, M. Arita, M. Arita, A. K. Bendt, A. Cazenave-Gassiot, E. A. Dennis, K. Ekroos, X. Han, K. Ikeda, G. Liebisch, M. K. Lin, T. P. Loh, P. J. Meikle, M. Orešič, O. Quehenberger, A. Shevchenko, F. Torta, M. J. O. Wakelam, C. E. Wheelock, M. R. Wenk. MS-based lipidomics of human blood plasma: a community-initiated position paper to develop accepted guidelines. *Journal of Lipid Research*, **2018**, *59*, s. 2001-2017.
- [71] M. Lange, Z. Ni, A. Criscuolo, M. Fedorova. Liquid Chromatography Techniques in Lipidomics Research. *Chromatographia*, **2019**, *82*, s. 77-100.
- [72] M. Lída, M. Holčapek. High-Throughput and Comprehensive Lipidomic Analysis Using Ultrahigh-Performance Supercritical Fluid Chromatography – Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*, **2015**, *87*, s. 7187-7195.
- [73] D. Wolrab, M. Chocholoušková, R. Jirásko, O. Peterka, V. Mužáková, H. Študentová, B. Melichar, M. Holčapek. Determination of one year stability of lipid plasma profile and comparison of blood collection tubes using UHPSFC/MS and HILIC-UHPLC/MS. *Analytica Chimica Acta*, **2020**, *1137*, s. 74-84.
- [74] G. Gübitz, M. G. Schmid. Chiral Separation by Chromatographic and Electromigration Techniques. A Review. *Biopharmaceutics & Drug Disposition*, **2001**, *22*, s. 291-336.
- [75] M. Nocun, J. T. Andersson. Argentation chromatography for the separation of polycyclic aromatic compounds according to ring number. *Journal of Chromatography A*, **2012**, *1219*, s. 47-53.
- [76] S. Momchilova, B. Nikolova-Damyanova. Silver Ion Chromatography of Fatty Acids. In: M. Wenk. *Encyclopedia of Lipidomics*. Dordrecht: Springer, 2016. ISBN 978-94-007-7864-1.
- [77] L. F. Eggers, D. Schwudke. Shotgun Lipidomics Approach for Clinical Samples. In: M. Giera. *Clinical Metabolomics: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*, **2018**, *1730*, s. 163-174.
- [78] F.-F. Hsu. Mass spectrometry-based shotgun lipidomics – a critical review from the technical point of view. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2018**, *410*, s. 6387-6409.
- [79] J. A. Bowden, J. T. Bangma, J. R. Kucklick. Development of an Automated Multi-Injection Shotgun Lipidomics Approach Using a Triple Quadrupole Mass Spectrometer. *Lipids*, **2014**, *49*, s. 609-619.

- [80] M. Lída, E. Cífková, M. Khalikova, M. Ovčáčíková, M. Holčápek. Lipidomic analysis of biological samples: Comparison of liquid chromatography, supercritical fluid chromatography and direct infusion mass spectrometry methods. *Journal of Chromatography A*. **2017**, 1525, s. 96-108.
- [81] R. Herzog, K. Schuhmann, D. Schwudke, J. L. Sampaio, S. R. Bornstein, M. Schroeder, A. Shevchenko. LipidXplorer: A Software for Consensual Cross-Platform Lipidomics. *PLoS ONE*, **2012**, 7 (1), s. e29851.
- [82] R. Herzog, D. Schwudke, A. Shevchenko. LipidXplorer: Software for Quantitative Shotgun Lipidomics Compatible with Multiple Mass Spectrometry Platforms. *Current Protocols in Bioinformatics*, **2013**, 43, s. 14.12.1-14.12.30.
- [83] P. Husen, K. Tarasov, M. Katafiasz, E. Sokol, J. Vogt, J. Baumgart, R. Nitsch, K. Ekroos, Ch. S. Ejsing. Analysis of Lipid Experiments (ALEX): A Software Framework for Analysis of High-Resolution Shotgun Lipidomics Data. *PLoS ONE*, **2013**, 8 (11), s. e79736.
- [84] Ch. S. Ejsing, E. Duchoslav, J. Sampaio, K. Simons, R. Bonner, Ch. Thiele, K. Ekroos, A. Shevchenko. Automated Identification and Quantification of Glycerophospholipid Molecular Species by Multiple Precursor Ion Scanning. *Analytical Chemistry*, **2006**, 78, s. 6202-6214.
- [85] D. Wolrab, M. Chocholoušková, R. Jirásko, O. Peterka, M. Holčápek. Validation of lipidomic analysis of human plasma and serum by supercritical fluid chromatography-mass spectrometry and hydrophilic interaction liquid chromatography-mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2020**, 412, s. 2375-2388.
- [86] G. Liebisch, B. Lieser, J. Rathenberg, W. Drobnik, G. Schmitz. High-throughput quantification of phosphatidylcholine and sphingomyelin by electrospray ionization tandem mass spectrometry coupled with isotope correction algorithm. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular and Cell Biology of Lipids*, **2004**, 1686 (1-2), s. 108-117.
- [87] M. Holčápek, M. Lída, E. Cífková. Hmotnostní spektrometrie v lipidomické kvantitativní analýze [přednáška]. Luhačovice: 17. Škola hmotnostní spektrometrie, 4. – 9. 9. 2016. Dostupné z: <https://holcapek.upce.cz>
- [88] G. Liebisch, M. Binder, R. Schifferer, T. Langmann, B. Schulz, G. Schmitz. High throughput quantification of cholesterol and cholesteryl ester by electrospray ionization tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular and Cell Biology of Lipids*, **2006**, 1761 (1), s. 121-128.

- [89] P. Wiesner, K. Leidl, A. Boettcher, G. Schmitz, G. Liebisch. Lipid profiling of FPLC-separated lipoprotein fractions by electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Lipid Research*, **2009**, 50 (3), s. 574-585.
- [90] M. Wang, Ch. Wang, R. H. Han, X. Han. Novel advances in shotgun lipidomics for biology and medicine. *Progress in Lipid Research*, **2016**, 61, s. 83-108.
- [91] M. Chocholoušková. Validace analytických metod v hmotnostní spektrometrii. In: M. Holčápek, R. Jirásko, M. Chocholoušková, O. Peterka, editoři. *Sborník: 21. ročník Školy hmotnostní spektrometrie*. 1. vydání. Praha: Spektroskopická společnost Jana Marka Marci, 2020. ISBN 978-80-88195-18-4.
- [92] Bioanalytical Method Validation: Guidance for Industry. *U. S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration* [online]. © 2020 FDA. [cit. 11. 6. 2021]. Dostupné z: <https://www.fda.gov/files/drugs/published/Bioanalytical-Method-Validation-Guidance-for-Industry.pdf>
- [93] Guideline on bioanalytical method validation. *European Medicines Agency: Science Medicines Health* [online]. © 2015 European Medicines Agency. [cit. 11. 6. 2021]. Dostupné z: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-bioanalytical-method-validation\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-bioanalytical-method-validation_en.pdf)
- [94] ICH guideline M10 on bioanalytical method validation. *European Medicines Agency: Science Medicines Health* [online]. © 2019 European Medicines Agency. [cit. 11. 6. 2021]. Dostupné z: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/draft-ich-guideline-m10-bioanalytical-method-validation-step-2b\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/draft-ich-guideline-m10-bioanalytical-method-validation-step-2b_en.pdf)
- [95] G. Liebisch, E. Fahy, J. Aoki, E. A. Dennis, T. Durand, Ch. S. Ejsing, M. Fedorova, I. Feussner, W. J. Griffiths, H. Köfeler, A. H. Merrill, R. C. Murphy, V. B. O'Donnell, O. Oskolkova, S. Subramaniam, M. J. O. Wakelam, F. Spener. Update on LIPID MAPS classification, nomenclature, and shorthand notation for MS-derived lipid structures. *Journal of Lipid Research*, **2020**, 61 (12), s. 1539-1555.
- [96] Z. Vaňková, O. Peterka, M. Chocholoušková, D. Wolrab, R. Jirásko, M. Holčápek. Retention dependences support highly confident identification of lipid species in human plasma by reversed-phase UHPLC/MS. *bioRxiv*, **2021**.
- [97] Z. H. Alshehry, Ch. K. Barlow, J. M. Weir, Y. Zhou, M. J. McConville, P. J. Meikle. An Efficient Single Phase Method for the Extraction of Plasma Lipids. *Metabolites*, **2015**, 5 (2), s. 389-403.



- [98] K. Huynh, W. L. F. Lim, C. Giles, K. S. Jayawardana, A. Salim, N. A. Mellett, A. A. T. Smith, G. Olshansky, B. G. Drew, P. Chatterjee, I. Martins, S. M. Laws, A. I. Bush, Ch. C. Rowe, V. L. Villemange, D. Ames, C. L. Masters, M. Arnold, K. Nho, A. J. Saykin, R. Baillie, X. Han, R. Kaddurah-Daouk, R. N. Martins, P. J. Meikle. Concordant peripheral lipidome signatures in two large clinical studies of Alzheimer's disease. *Nature Communications*, **2020**, *11*, s. 5698.
- [99] J.-H. Lin, L.-Y. Liu, M.-H. Yang, M.-H. Lee. Ethyl Acetate/Ethyl Alcohol Mixtures as an Alternative to Folch Reagent for Extracting Animal Lipids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2004**, *52* (16), s. 4984-4986.
- [100] J. V. Loco, M. Elskens. Ch. Croux, H. Beernaert. Linearity of calibration curves: use and misuse of the correlation coefficient. *Accreditation and Quality Assurance*, **2002**, *7*, s. 281-285.
- [101] M. Holčapek, M. Lísa, P. Jandera, N. Kabátová. Quantitation of triacylglycerols in plant oils using HPLC with APCI-MS, evaporative light-scattering, and UV detection. *Journal of Separation Science*, **2005**, *28*, s. 1315-1333.
- [102] J. A. Bowden, A. Heckert, C. Z. Ulmer, Ch. M. Jones, J. P. Koelmel, L. Abdullah, L. Ahonen, Y. Alnouti, A. Armando, J. M. Asara, T. Bamba, J. R. Barr, J. Bergquist, Ch. H. Borchers, J. Brandsma, S. B. Breitkopf, T. Cajka, A. Cazenave-Gassiot, A. Checa, M. A. Cinel, R. A. Colas, S. Cremers, E. A. Dennis, J. E. Evans, A. Fauland, O. Fiehn, M. S. Gardner, T. J. Garrett, K. H. Gotlinger, J. Han, Y. Huang, A. H. Neo, T. Hyötyläinen, Y. Izumi, H. Jiang, H. Jiang, J. Jiang, M. Kachman, R. Kiyonami, K. Klavins, Ch. Klose, H. C. Köfeler, J. Kolmert, T. Koal, G. Koster, Z. Kuklenyik, I. J. Kurland, M. Leadley, K. Lin, K. R. Maddipati, D. McDougall, P. J. Meikle, N. A. Mellett, C. Monnin, M. A. Moseley, R. Nandakumar, M. Oresic, R. Patterson, D. Peake, J. S. Pierce, M. Post, A. D. Postle, R. Pugh, Y. Qiu, O. Quehenberger, P. Ramrup, J. Rees, B. Rembiesa, D. Reynaud, M. R. Roth, S. Sales, K. Schuhmann, M. L. Schwartzman, Ch. N. Serhan, A. Shevchenko, S. E. Somerville, L. St. John-Williams, M. A. Surma, H. Takeda, R. Thakare, J. W. Thompson, F. Torta, A. Triebel, M. Trötzmüller, S. J. K. Ubhayasekera, D. Vuckovic, J. M. Weir, R. Welti, M. R. Wenk, C. E. Wheelock, L. Yao, M. Yuan, X. H. Zhao, S. Zhou. Harmonizing Lipidomics: NIST Interlaboratory Comparison Exercise for Lipidomics using Standard Reference Material 1950 – Metabolites in Frozen Human Plasma. *Journal of Lipid Research*, **2017**, *58* (12), s. 2275-2288.

- [103] O. Quehenberger, A. M. Armando, A. H. Brown, S. B. Milne, D. S. Myers, A. H. Merrill, S. Bandyopadhyay, K. N. Jones, S. Kelly, R. L. Shaner, C. M. Sullards, E. Wang, R. C. Murphy, R. M. Barkley, T. J. Leiker, Ch. R. H. Raetz, Z. Guan, G. M. Laird, D. A. Six, D. W. Russell, J. G. McDonald, S. Subramaniam, E. Fahy, E. A. Dennis. Lipidomics reveals a remarkable diversity of lipids in human plasma. *Journal of Lipid Research*, **2010**, *51*, s. 3299-3305.
- [104] K. Huynh, Ch. K. Barlow, K. S. Jayawardana, J. M. Weir, N. A. Mellett, M. Cinel, D. J. Magliano, J. E. Shaw, B. G. Drew, P. J. Meikle. High-Throughput Plasma Lipidomics: Detailed Mapping of the Associations with Cardiometabolic Risk Factors. *Cell Chemical Biology*, 2019, *26* (1), s. 71-84.