

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Analýza lipidů v krevních skvrnách pro
diagnostiku dědičných metabolických poruch**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Lucie Mádrová
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Lukáš Najdekr
Termín odevzdání práce:	6. 5. 2013

Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracovala samostatně za použití citované literatury.“

V Olomouci dne 3. 5. 2013

.....

Lucie Mádrová

Ráda bych poděkovala svému vedoucímu bakalářské práce Mgr. Lukáši Najdekrovi za odborné vedení, ochotu při konzultacích a především trpělivost. Dále bych chtěla poděkovat všem pracovníkům a studentům Laboratoře metabolomiky Ústavu molekulární a translační medicíny Lékařské fakulty Univerzity Palackého a Laboratoře dědičných metabolických poruch Oddělení klinické biochemie Fakultní nemocnice Olomouc.

Tato práce vznikla za podpory projektu, jehož infrastrukturální část (Ústav molekulární a translační medicíny) byla podpořena Operačním programem Výzkum a vývoj pro inovace (projekt CZ.1.05/2.1.00/01.0030).

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora	Lucie Mádrová
Název práce	Analýza lipidů v krevních skvrnách pro diagnostiku dědičných metabolických poruch
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Ústav molekulární a translační medicíny Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci, Laboratoř metabolomiky
Vedoucí práce	Mgr. Lukáš Najdekr
Rok obhajoby práce	2013
Abstrakt	Deficit acyl-CoA dehydrogenasy mastných kyselin se středně dlouhým řetězcem („Medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency“ - MCADD) se řadí k nejběžnějším poruchám mitochondriální β-oxidace mastných kyselin. Tato práce se zabývá použitím necíleného přístupu metabolomiky v diagnostice tohoto onemocnění. Analýza byla provedena metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostním spektrometrem na principu orbitální iontové pasti. Bylo identifikováno 378 metabolitů, mezi nimiž se vyskytovaly známé MCADD biomarkery, ale i další potenciálně významné látky. Pomocí statistických metod byly vyhodnoceny změny v metabolomu a jejich vliv na zařazení vzorku ke kontrolní či patientské skupině.
Klíčová slova	Hmotnostní spektrometrie, Orbitrap, metabolomika, MCADD, statistická analýza
Počet stran	55
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification:

Author's first name and surname	Lucie Mádrová
Title	Analysis of lipids in the dry blood spots for diagnosis of inherited metabolic disorders
Type of thesis	Bachelor
Department	Institute of Molecular and Translational Medicine Faculty of Medicine and Dentistry Palacky University Olomouc, Laboratory of metabolomics
Supervisor	Mgr. Lukáš Najdekr
The year of presentation	2013
Abstract	Medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency (MCADD) is the most common defect of mitochondrial fatty acid β -oxidation. This work deals with the use of an untargeted metabolomic approach to diagnosing the disease. The analysis was performed by high-performance liquid chromatography coupled with mass spectrometer working on a principle of an orbital ion-trap. Among 378 detected metabolites were identified the known MCADD biomarkers as well as other potentially significant substances. Changes in a metabolome and their impact on classifying a sample either to control or patient group were evaluated by using various statistical methods .
Keywords	Mass spectrometry, Orbitrap, metabolomics, MCADD, statistical analysis
Number of pages	55
Number of appendices	0
Language	Czech

Obsah:

CÍLE PRÁCE	8
TEORETICKÁ ČÁST	9
1. Hmotnostní spektrometrie	10
1.1. Základní prvky hmotnostního spektrometru	10
1.2. Historický vývoj hmotnostní spektrometrie	11
1.3. Orbitrap	13
1.1.1. Základní charakteristika	13
1.1.2. Mechanismus spirálního pohybu iontů	13
1.1.3. Využití Orbitrapu v MS/MS systémech - Orbitrap Elite	14
2. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie	17
2.1. HPLC instrumentace	17
2.2. Kolony	18
3. Metabolomika	20
4. Dědičné metabolické poruchy	22
4.1. Podstata metabolických chorob	22
4.2. Typy dědičnosti	22
4.3. Klasifikace dědičných metabolických poruch	23
4.4. Novorozenecký screening	24
5. Deficit acyl-CoA dehydrogenasy mastných kyselin se středně dlouhým řetězcem	25
5.1. Charakteristika enzymu	25
5.2. Molekulární podstata deficitu	26
5.3. Vstup mastných kyselin do mitochondrie	27
5.4. Vliv na energetický metabolismus buňky	28
5.5. Symptomy	29
5.6. Mortalita	30
5.7. Léčba	30
5.8. Dědičnost a incidence	31
5.9. Diagnostika	31
EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	33
6. Materiál a metody	34
6.1. Metody	34
6.2. Biologický materiál	35
6.3. Použité chemikálie	35

6.4. Příprava mobilní fáze.....	35
6.5. Příprava vzorku.....	36
6.6. Statistické zpracování dat	36
7. Výsledky	39
7.1. Chromatografická separace.....	39
7.2. Identifikace metabolitů	41
7.3. Statistické vyhodnocení dat	44
7.4. Diskuze	47
ZÁVĚR	49
LITERATURA.....	50
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	55

CÍLE PRÁCE

- Vypracování literární rešerše na téma: hmotnostní spektrometrie (Orbitrap), HPLC, metabolomika, dědičné metabolické poruchy, MCADD
- Necílená analýza suchých krevních skvrn LC/MS
- Zpracování dat základními statistickými metodami a identifikace nejvíce signifikantních analytů

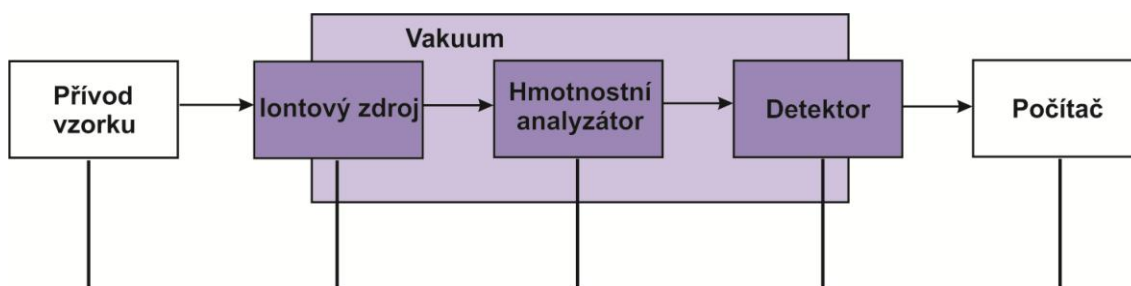
TEORETICKÁ ČÁST

1. Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie je analytická technika, která našla široké využití při studiu chemických látek od základní identifikace a kvantifikace, přes určení struktury molekul až po izotopové zastoupení atomů v molekulách a mnohé další. Pracuje na principu tvorby iontů látky a následnému rozdělení podle poměru hmoty k náboji m/z (de Hoffmann & Stroobant, 2007, a).

1.1. Základní prvky hmotnostního spektrometru

Hmotnostní spektrometr se skládá ze tří základních částí (Obr. 1). První je iontový zdroj, ve kterém převedeme zkoumané analyty na nabitě částice - ionty. Ionizace se dělí na dvě skupiny - „tvrdou“ a „měkkou“ techniku - podle množství energie, kterou na molekulu působíme. Mezi zástupce „tvrdé“ ionizační techniky řadíme např. elektronovou ionizaci (EI - „Electron ionization“). Molekuly analytu jsou vystavovány srážkám s energeticky bohatými elektrony. Výsledkem je vznik kladně nabitěho radikálu dané molekuly, který se navíc může dále rozpadat na fragmenty z důvodu přebytku energie (Bleakney, 1929). Naopak u „měkkých“ ionizačních technik je přebytek energie vzniklého iontu malý, tudíž je omezena i možnost jeho fragmentace. K tomuto druhu ionizace řadíme chemickou ionizaci (CI - „Chemical ionization“) (Munson & Field, 1966) a mnoho desorpčních technik, např. ionizaci elektrosprejem (ESI - „Electrospray ionization“) (Fenn et al., 1989), nebo matricí asistovaná laserová desorpce (MALDI - „Matrix-assisted laser desorption/ionization“) (Tanaka et al., 1988).



Obr. 1: Základní schéma hmotnostního spektrometru

Ionty putují dále do hmotnostního analyzátoru, kde jsou rozděleny podle poměru hmoty k náboji (m/z). Obecně lze říci, že všechny hmotnostní analyzátoary využívají statické/dynamické elektrické a magnetické pole nebo jejich kombinaci. Na základě rozdílu v principu separace iontů můžeme hmotnostní analyzátoary rozdělit

do dvou skupin. První skupinou jsou skenující analyzátory, které kontinuálně vysílají ionty se specifickou hodnotou m/z směrem k detektoru (de Hoffmann & Stroobant, 2007, b). Zástupcem této skupiny je např. kvadrupólový hmotnostní analyzátor (Paul, 1990). Ve druhé skupině se nachází hmotnostní analyzátory, které kontinuálně vysílají ionty k detektoru, ale na rozdíl od skenujících analyzátorů nerozlišují specifickou hodnotu m/z . K detektoru jsou tedy vysílány všechny ionty a princip jejich separace se liší v závislosti na použitém hmotnostním analyzátoru (de Hoffmann & Stroobant, 2007, b). Například v průletovém hmotnostním analyzátoru (TOF-MS - „Time-of-flight mass spectrometer“) jsou ionty separovány podle doby doletu iontů k detektoru (Stephens, 1946). Za hmotnostní analyzátor lze považovat i iontovou past, ve které jsou všechny ionty přítomné dohromady, poté jsou postupně vypuzovány ven podle poměru m/z . Na jejím principu pracuje např. Orbitrap, ve kterém je separace (a zároveň i detekce) iontů umožněna měnícím se elektrostatickým polem (Makarov, 2000).

Třetím základním prvkem hmotnostního spektrometru je detektor. Po průchodu iontů hmotnostním analyzátozem dopadají ionty na detektor, který je zaznamená jako elektrický proud úměrný počtu iontů a specifické hodnotě m/z . Signál je poté převeden na hmotnostní spektrum. Detektory lze rozdělit do dvou obdobných skupin, jako tomu bylo u hmotnostních analyzátorů. Některé zaznamenávají signál v sekvencích, tzn. vždy jen jednu skupinu iontů o určité hodnotě m/z , jiné simultánně detekují příchod všech iontů z hmotnostního analyzátoru (de Hoffmann & Stroobant, 2007, c).

1.2. Historický vývoj hmotnostní spektrometrie

Základy pro vývoj hmotnostní spektrometrie položil již v 19. Století J. J. Thomson, který pozoroval elektrický výboj v plynech při nízkém tlaku, kdy byly vzniklé katodové paprsky vychýleny ze své dráhy působením magnetického a elektrostatického pole na základě jejich hmotnosti a po dopadu na fotografickou desku vytvořily sérii křivek (Thomson, 1913). Následovaly pokusy W. Astona a A. J. Dempstera a sestavení prvního hmotnostního spektrometru (Aston, 1919). V roce 1946 byl sestaven první průletový hmotnostní analyzátor (TOF-MS), ve kterém jsou ionty separovány podle rychlosti, s jakou dopadají na detektor v závislosti na rostoucím m/z (Stephens, 1946).

S rozvojem chromatografických metod a potřebou látky nejen oddělit, ale také identifikovat, docházelo také k postupnému spojování separačních technik s hmotnostní spektrometrií. V padesátých letech se podařilo spojit plynovou

chromatografii s hmotnostní spektrometrií (GC-MS - „gas chromatography - mass spectrometry“) (Gohlke, 1959). Tento systém identifikace těkavých látek našel v začátcích uplatnění zejména v petrochemickém průmyslu, např. pro simulaci destilace ropných frakcí (Green, 1964).

Od začátku sedmdesátých let byly zaznamenávány první pokusy o propojení hmotnostní spektrometrie s kapalinovou chromatografií (LC-MS - „Liquid chromatography - mass spectrometry“) (Niessen, 2003). Najednou bylo možné identifikovat i netěkavé látky jako peptidy (Yu, 2012), fosfolipidy (Uhl et al., 2011), oligosacharidy (Thanawiroon et al., 2004) a mnohé další. Koncem osmdesátých let byly vynalezeny techniky elektrosprejové ionizace (ESI) a matricí asistované laserové desorpce (MALDI), které znamenaly průlom v analýze látek s molekulovou hmotností v řádech několika tisíců daltonů, jako jsou proteiny (Karas & Hillenkamp, 1988) nebo oligonukleotidy (Pieles et al., 1993). Za objev těchto technik obdržel John B. Fenn i Koichi Tanaka v roce 2002 Nobelovu cenu za chemii (www.nobelprize.org, citováno 3. 2. 2013).

Za posledních 15 let došlo k rapidnímu vývoji technik hmotnostní spektrometrie. Hmotnostní analyzátory jsou neustále zdokonalovány, běžnou praxí je jejich spojování do hybridních systémů např. QQQ („Triple quadrupole mass spectrometer“) (Yost & Enke, 1978), Q-TOF („Quadrupole-time of flight“) (Glish & Goeringer, 1984). Byly vynalezeny také nové ionizační techniky - DESI („Desorption electrospray ionization“) (Takáts et al., 2004) a DART („Direct analysis in real time“) (Cody et al., 2005). V roce 2000 byl představen hmotnostní analyzátor pracující na novém principu - Orbitrap (Makarov, 2000).

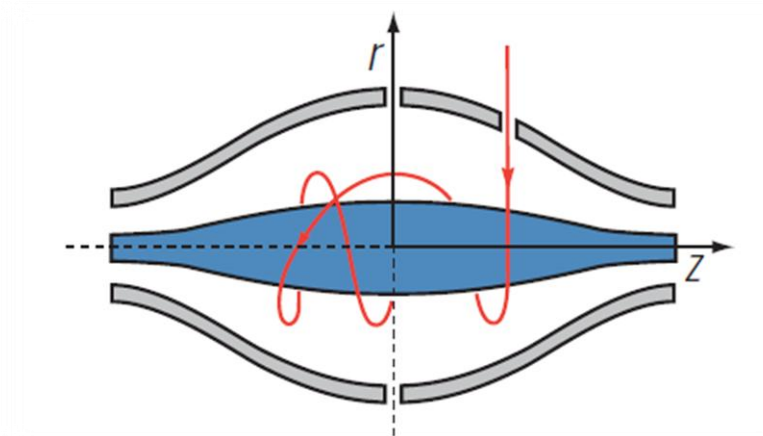
Hmotnostní spektrometrie je v dnešní době velice rozšířenou technikou, jelikož se jedná o rychlou, přesnou a specifickou techniku s relativně jednoduchou interpretací dat. Hmotnostní spektrometry různého stupně rozlišení jsou komerčně dostupné a díky jejich kompaktnosti se dají použít v běžných podmínkách analytických laboratoří. Vývoj uživatelsky přijatelného programového vybavení snižuje nároky na obsluhu a umožňuje rutinní provoz.

1.3. Orbitrap

Orbitrap patří k nejnovějším typům hmotnostních spektrometrů pracujících na principu elektrostatické iontové pasti. Byl vynalezen ruským fyzikem Alexanderem Makarovem (Makarov, 2000), na trh vstoupil v roce 2005 (Makarov et al., 2006).

1.1.1. Základní charakteristika

Přestože se jedná o novou koncepci hmotnostního analyzátoru, Orbitrap lze považovat za modifikaci Kingdonovy iontové pasti (Kingdon, 1923) s rozdílným tvarem vnitřní a vnější elektrody. Na Obr. 2 je schematicky znázorněn průřez Orbitrapem. Vnější elektroda „soudkového“ tvaru je rozdělena na dvě části, které jsou od sebe izolovány keramickým kruhem. Na vnitřní vřetenovitou elektrodu je přiváděno stejnosměrné napětí, zatímco vnější elektroda je uzemněná (Makarov, 2000).



Obr. 2: Průřez Orbitrapem se znázorněnou stabilní trajektorií iontu (Orbitrap Elite Hardware Manual (Thermo Scientific), 2011)

1.1.2. Mechanismus spirálního pohybu iontů

Ionty jsou přiváděny do pasti, prostoru mezi dvěma elektrodami, tečně k siločarám elektrostatického pole, které je souměrné kolem osy z (Obr. 2). Spirální pohyb iontů okolo vnitřní elektrody je způsoben jejím elektrostatickým polem s kvadraticko-logaritmickým potenciálem (Obr. 3), který je dán jak přivedeným stejnosměrným napětím na elektrodě, tak jejím tvarem (Makarov, 2000).

$$U(r, z) = \frac{k}{2} \left(z^2 - \frac{r^2}{2} \right) + \frac{k}{2} (R_m)^2 \ln \left[\frac{r}{R_m} \right] + C$$

Obr. 3: Rovnice kvadraticko-logaritmického potenciálu elektrostatického pole (Makarov, 2000)

Tím, že ionty přivedeme v nenulové vzdálenosti od osy z , jim udělíme potenciální energii vůči této ose. Ionty v pasti obíhají po kruhových trajektoriích okolo středové elektrody, pokud jsou splněny podmínky na kinetickou energii přiváděných iontů a potenciální energii elektrostatického pole v pasti. Tedy přitažlivá síla mezi iontem a elektrodou musí být v rovnováze s odstředivou silou působící na obíhající iont okolo osy z . Za těchto podmínek iont vykonává orbitální pohyb kolem vnitřní elektrody (Hu et al., 2005). Pro detekci kationtů vkládáme záporné napětí několika kilo-elektronvoltů na vnitřní elektrodu, kladné napětí použijeme pro detekci aniontů (de Hoffmann & Stroobant, 2007, d).

Pokud je gradient napětí v ose z nenulový, je i zrychlení iontů v ose z nenulové. Tím pádem se pohyb iontů chová podobně jako harmonický oscilátor. Frekvence pohybu iontů v ose z (axiální frekvence) je přímo úměrná poměru hmotnosti iontu a jeho náboje a není závislá na počáteční kinetické energii, úhlu a pozici vstupujícího iontu (Obr. 4) (Hu et al., 2005).

$$\omega = \sqrt{\left(\frac{z}{m}\right) k}$$

Obr. 4: Rovnice odvození m/z z frekvence harmonických oscilací iontů podél osy pole (Hu et al., 2005)

Výsledná trajektorie pohybu iontů okolo vnitřní elektrody (osy z) je tedy dána orbitálním pohybem okolo osy z i pohybem v jejím směru a má spirální charakter. Tento pohyb iontů o určitém m/z indukuje proud, který je zesilován oběma polovinami vnější elektrody a následně je Fourierovou transformací převeden z frekvenčního spektra na hmotnostní spektrum.

1.1.3. Využití Orbitrapu v MS/MS systémech - Orbitrap Elite

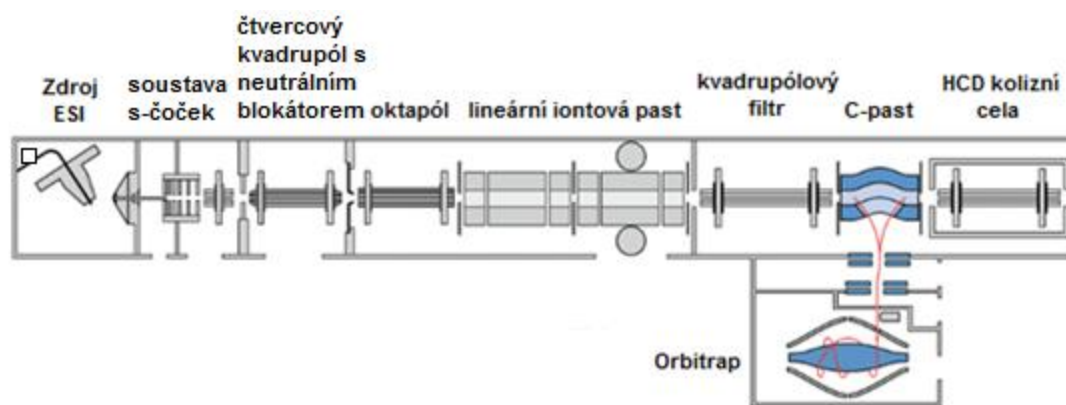
Orbitrap je komerčně dostupný v několika hybridních MS/MS systémech. Nejnovějším je Orbitrap Elite, v němž Orbitrap plní funkci hmotnostního detektoru. I když je možné fragmentovat ionty přímo v Orbitrapu, je daleko efektivnější připravit

ionty v jiném hmotnostním analyzátoru a teprve poté je detekovat v Orbitrapu (Makarov et al., 2006).

Orbitrap Elite se skládá ze čtyř hlavních částí: iontového zdroje, lineární iontové pasti (nízko - a vysokotlaké pasti), C-pasti a Orbitrapu (Obr. 5). Zkoumaný vzorek je nejprve převeden na ionty technikou umožňující jejich kontinuální produkci, např. elektrosprejem (ESI), ionizací za atmosférického tlaku (APCI) či fotoionizací za atmosférického tlaku (APPI). Ionty jsou následně vedeny do prostoru lineární iontové pasti, kde mohou být analyzovány jejich MS a MSⁿ spektra s vysokou senzitivitou, ale relativně nízkým rozlišením a přesností. Tato past se skládá ze dvou identických lineárních kvadrupólů, které jsou od sebe odděleny středovou čočkou. Mají přívod radiofrekvenčního a excitačního střídavého napětí, a zároveň nezávislý zdroj stejnosměrného napětí, které slouží k transferu iontů z jedné pasti do druhé. První past pracuje při vyšším tlaku a slouží především k usměrňování toku iontů. Dochází zde také k chlazení - zpomalení iontů héliem. V nízkotlaké pasti jsou usměrněné a ochlazené ionty vypuzovány k oběma stranám směrem k detektoru, nebo mohou pokračovat dále, pokud chceme detekci provést až v Orbitrapu. Lineární iontová past tedy může pracovat nezávisle na Orbitrapu (Olsen et al., 2009). Ionty postupují dále do C-pasti, které byl dán název podle konstrukce ve tvaru písmene c.

V C-pasti ionty ztrácí kinetickou energii reakcí s dusíkem, který přichází z HCD cely („Higher Energy Collision-Induced Dissociation Cell“). Tímto je zajištěno ochlazení iontů před vstupem do Orbitrapu. HCD cela je multipól naplněný kolizním plynem, který zde vytváří vyšší tlak. Nachází se v přímé linii s C-pastí a využívá se jako druhý možný zdroj fragmentace iontů v tomto hybridním systému. Spektra fragmentů získaná z HCD cely, následně detekovaná Orbitrapem, jsou srovnatelná se spektry z trojitého kvadrupólu. Na vstupní a výstupní štěrbině C-pasti je vloženo radiofrekvenční napětí, které vytváří potenciál podél osy zakřivení C-pasti. Ionty shodného m/z se akumulují ve svazcích podél této osy. Poté jsou na elektrody vkládány pulzy stejnosměrného napětí, které způsobí extrakci iontového svazku. Velká populace iontů se shodným m/z je tedy pulzním mechanismem přivedena kolmo do prostoru Orbitrapu. Zde je provedena jejich konečná detekce a převedení na hmotnostní spektra pomocí Fourierovy transformace (Orbitrap Elite Hardware Manual (Thermo Scientific), 2011).

Vzhledem ke schopnosti kumulovat ionty stejných hmotností ještě před detekcí je tento systém vhodný pro analýzu metabolitů, které mají extrémně nízké koncentrace.



Obr. 5: Schéma Orbitrap Elite (upraveno podle www.planetorbitrap.com, citováno 3. 11. 2012)

Systém Orbitrap Elite má díky zmenšené geometrii elektrod Orbitrapu („High-field Orbitrap Analyzer“) a pokročilému zpracování signálu (eFT - „enhanced Fourier Transformation“) rozlišovací schopnost až 240 000 (FWHM - „Full Width at Half Maximum“) pro m/z 400, kterou zatím překonává pouze iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací (FT-ICR), ale Orbitrap Elite má v tomto směru jednoznačnou výhodu v nižší pořizovací ceně, snadné obsluze a možnosti spojení s kapalinovou chromatografií (Michalski et al., 2012).

S neustálým vývojem nových modifikací výše popsaného hybridního MS/MS systému lze dosáhnout rozlišení přesahující 1 000 000 FWHM (pro $m/z < 300-400$, detekční čas 3 s) (Denisov et al., 2012). Přesnost určení jednotlivých frekvencí iontů Fourierovou transformací přináší zároveň i přesné určení jejich hmotnosti (< 1 ppm při použití interního standardu, < 3 ppm po 2 h s externí kalibrací za definovaných podmínek) a vyšší dynamický rozsah ($> 10\,000$ mezi jednotlivými spektry, $> 5\,000$ mezi nejvyšším a nejnižším detekovatelným signálem iontu v rámci jednoho spektra) (Orbitrap Elite Hardware Manual (Thermo Scientific), 2011).

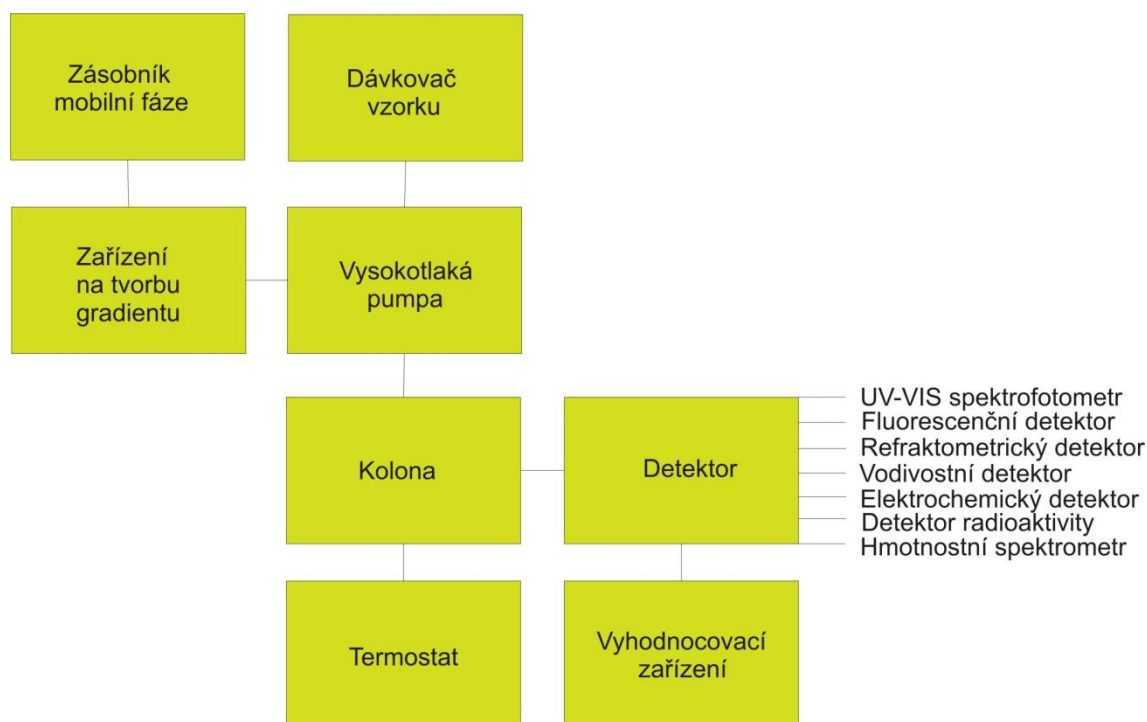
Vysoká rozlišovací schopnost zajišťuje velmi přesné určení molekulových hmotností, což je výhodou hlavně při analýze komplexních vzorků a cílených analytů s nízkou koncentrací v proteomice, metabolomice, lipidomice a dalších (www.planetorbitrap.com, citováno 3. 11. 2012).

2. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie („High-performance liquid chromatography“, HPLC) je analytická separační technika, která se vyvinula z plynové chromatografie v počátcích 70. let. Je založena na stejných principech jako nízkotlaká kapalinová chromatografie, ale má vyšší účinnost, kratší časy separace a potřebu menšího objemu vzorku. HPLC je v dnešní době velmi využívaná zejména díky širokému spektru vzorků, které lze díky ní analyzovat (ionty, polární i nepolární látky, málo těkavé látky, tepelně nestabilní i vysokomolekulární) (Štulík et al., 2004).

2.1. HPLC instrumentace

Na Obr. 6 jsou znázorněny základní části HPLC. Tento systém se skládá ze zásobníku mobilní fáze (oddělené fáze A a B), které lze libovolně kombinovat pomocí zařízení na tvorbu gradientu. Tak můžeme dosáhnout různého způsobu eluce - isokratické či gradientové. Mobilní fáze musí na kolonu přicházet odplyněná, jinak by se v detektoru tvořily bubliny v důsledku tlakového spádu (detektor pracuje za atmosferického tlaku). K odplynění se používá ultrazvuk, podtlak nebo probublávání héliem. Systém dále obsahuje dávkovač vzorku a vysokotlaké pumpy, zajišťující kontinuální průtok řádově mililitrů za minutu (ale i např. nl za minutu pro kapilární kolony - nano-LC). HPLC kolony musí odolat vysokým tlakům, obvykle jsou vyrobeny z nerezové oceli, jejich vnitřní průměr se pohybuje řádově v mikrometrech pro analytické kolony, ale u preparativních kolon se setkáváme s několikacentimetrovými průměry. Z kolony eluát putuje do detektoru. Detektorů je velké množství, lze je rozdělit podle vlastností systému, kterou detekují. Jedná se buď o univerzální detektory, měřící vlastnost systému jako celku (index lomu, tepelnou vodivost,...), nebo selektivní detektory, které jsou citlivější pro analýzu vzorků v komplexních maticích (např. měření absorpance při určité vlnové délce, měření MS-spekter hmotnostním spektrometrem). Signál z detektoru je poté vysílán do počítače nebo jiného vyhodnocovacího zařízení (Štulík et al., 2004, Pingoud et al., 2002).



Obr. 6: Schéma HPLC zařízení (upraveno podle Pingoud et al., 2002)

2.2. Kolony

Pro analytické účely se používají kolony o délce 5-25 cm s průměrem několika milimetrů. U preparativních kolon se vnitřní průměr značně zvětšuje z důvodu zkrácení doby separace.

Výplň kolony musí být přizpůsobena vysokým tlakům, které na kolonu působí. Používají se tedy odolné částice s definovaným průměrem, většinou kulatého tvaru. Pro dosažení co největšího povrchu jsou navíc tyto částice porézní nejen na povrchu, ale i uvnitř. V systému normálních fází se jedná o částice SiO_2 (méně často Al_2O_3). Po jejich derivatizaci alkylovými a arylovými skupinami mohou tvořit obrácenou fázi. Dle aplikace může být obrácená fáze například chirální - separace enantiomerů (Guo et al., 2012) nebo s nabitými částicemi - iontově výměnná chromatografie (Kozaki et al., 2013).

V systému normálních fází je mobilní fáze méně polární, než fáze stacionární. Polární molekuly více interagují se stacionární fází. Mají větší retenci ve srovnání s nepochárnými molekulami, které tím pádem budou eluovat jako první. K typickým elučním roztokům řadíme hexan, metylenchlorid a ethylacetát. V HPLC systému na obrácených fázích je situace opačná. Mobilní fáze je více polární, než fáze stacionární. Nepochární molekuly se tedy na koloně budou držet delší dobu, takže jejich

eluze bude probíhat až po polárních molekulách. Mobilní fáze je nejčastěji složena z acetonitrilu, metanolu, vody nebo jejich kombinace (Pingoud et al., 2002).

3. Metabolomika

Metabolomika je v dnešní době dynamicky se vyvíjejícím odvětvím analytické biochemie zabývající se studiem metabolomu. Metabolom je definován jako soubor nízkomolekulárních látek (metabolitů) přítomných v buňce, které se účastní všech metabolických procesů nutných pro růst a normální fungování buňky a celého organismu (Fiehn, 2002). Metabolomika vhodně doplňuje starší obory jako je transkriptomika, proteomika a genomika. Fyziologické změny, projevující se jako důsledek odchylky v expresi genů, jsou charakterizovány změnou metabolomu. Metabolom je daleko citlivější, než transkriptom či proteom. Již malá změna v expresi proteinu má velký efekt na aktivitu metabolické dráhy a koncentrace jejích metabolitů (Goodacre, 2007).

Existuje hned několik metod studia metabolomu, přičemž se žádnou z nich nedá analyzovat celý metabolom najednou. Má to více příčin. Metabolitů je mnoho, vykazují značnou variabilitu v chemické a fyzikální povaze látky (např. polární-nepolární, těkavé-netěkavé, nízko/vysokomolekulární) a jejich koncentrace ve vzorku se může lišit v rozmezí několika řádů (od pikomolární až po milimolární koncentrace). Problém také často nastává v účinné extrakci metabolitů z biologických matric (krev, moč, tkáň). Na základě parametrů, které chceme ve vzorku sledovat, se analytické přístupy v metabolomice dělí na cílenou analýzu metabolitů, metabolické profilování, metabolický fingerprinting a metabolický footprinting.

Cílená analýza metabolitů je zaměřená na identifikaci a kvantifikaci vybraného metabolitu či skupiny metabolitů (např. enzymový substrát, meziprodukt určité metabolické dráhy atd.). V tomto případě je chemická podstata zkoumaných látek známá, takže je kladen důraz na přípravu vzorku tak, aby byl co nejmenší vliv matrice a ostatních látek, které v analýze nejsou podstatné. Existuje i necílený přístup metabolické analýzy. V ideálním případě sleduje všechny metabolity v daném vzorku. Může být tedy zdrojem nových hypotéz, které lze potom potvrdit či vyvrátit cílenou analýzou.

Metabolické profilování slouží k detekci a kvantifikaci skupiny podobných metabolitů (předem známých, většinou vázaných ke specifické metabolické dráze). Analýza se obvykle provádí kombinací plynové/kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (GC-MS, LC-MS) nebo nukleární magnetickou rezonancí (NMR).

Metabolický fingerprinting se odlišuje od předchozích dvou metod. Cílem je klasifikace analyzovaného vzorku na základě porovnání s “otisky prstů” metabolitů (nejčastěji MS spektra, NMR spektra, chromatogramy) pomocí statistických metod. Je to obecná, velmi rychlá metoda, obvykle bez kvantitativního a kvalitativního stanovení. Změny v “otiscích prstů” korespondují se změnami metabolomických profilů, které jsou spojené s aktuálním fyziologickým stavem organismu. Tato metoda spadá do odvětví metabonomiky - studia hladin metabolitů organismu v závislosti na odpověď na určitý stimulus nebo léčbu.

Poslední metodou je metabolomický footprinting, který se zabývá analýzou metabolitů v extracelulárních tekutinách (tzv. exometabolomem) (Goodacre, 2007, Dettmer & Hammock, 2004, Álvarez-Sánchez et al., 2010).

4. Dědičné metabolické poruchy

Dědičné metabolické poruchy (DMP) jsou velká skupina genetických poruch ovlivňujících metabolismus. Vyznačují se vysokým počtem, různorodostí, ale zároveň raritním výskytem. Mohou se vyskytnout v jakémkoliv věku. Až na výjimky jsou pro ně typické nejednoznačné klinické příznaky.

4.1. Podstata metabolických chorob

Dědičné metabolické poruchy jsou způsobené mutací v jaderné či mitochondriální DNA. Nejčastěji se jedná o mutace jednoho či více párů nukleotidů DNA - delecii, inverzi, přemístění, opakování určité sekvence (repetice) atd. V důsledku toho vznikají chyby v přepisu do mRNA (transkripce) a defektní je i tvořící se protein (translace). Postižený gen, kódující syntézu proteinu, způsobí změnu jeho struktury nebo se jeho tvorba úplně zastaví. Podle funkce tohoto proteinu v metabolismu nebo stavbě organismu se odvíjí klinické projevy onemocnění. Většinou je defektním proteinem enzym zúčastněný v některé z metabolických drah. Pak mohou nastat různé situace. Nefunkční enzym není schopný přeměnit substrát na produkt, který tím pádem chybí. Zároveň dochází k akumulaci substrátu, jeho hromadění v buňce nebo přeměna na vedlejší metabolity, často toxického charakteru. Mimo enzymy mohou být defektní také jiné skupiny proteinů: krevní bílkoviny neenzymové povahy, strukturní proteiny buněčných membrán, receptory, proteiny tvořící iontové kanály a regulační proteiny. Z tohoto výčtu jasně vyplývá variabilita klinických projevů (Racek et al., 2006, a).

4.2. Typy dědičnosti

Většina DMP se řadí k autozomálně recesivnímu typu dědičnosti. Postižený tedy bývá homozygot, který zdědil obě defektní alely po rodičích - heterozygotech (případně homozygotech nebo kombinace např. matka heterozygot, otec homozygot). Rodiče - heterozygoti fungují jako přenašeči, jelikož mají zachovanou alespoň částečnou syntézu normálního proteinu, takže se u nich onemocnění klinicky nemusí tak výrazně projevit. Příkladem je fenylketonurie či galaktosemie.

Ostatní typy dědičnosti jsou méně časté, jedná se o: autozomálně dominantní poruchy (např. familiární hypercholesterolemie), gonozomálně recesivní poruchy (např. Lesch-Nyhamův syndrom), gonozomálně dominantní poruchy (např. Conradi-Hünnerman-Happlův syndrom). Existují i defekty mitochondriálních genů. U těchto poruch se genetická informace přenáší pouze vajíčkem (ze strany matky) a pokud

nejdou postiženy geny všech mitochondrií, je jejich přenos vždy různý z důvodu náhodné distribuce mitochondrií do dceřinných buněk (Racek et al., 2006, b, Štern et al., 2011).

4.3. Klasifikace dědičných metabolických poruch

U DMP je několik možností, jak je blíže rozdělit do menších skupin. Dají se charakterizovat například podle postižené metabolické dráhy, velikosti molekul, typu molekul či organelové lokalizace. Z patofyziologického hlediska lze DMP rozdělit do následujících tří velkých skupin.

V první skupině se setkáváme s DMP vedoucími k intoxikaci organismu. Vznikají hromaděním toxických meziproduktů proximálně od metabolického bloku, které způsobí akutní intoxikaci, nebo se mohou kumulovat po delší dobu. Do této skupiny patří poruchy metabolismu aminokyselin (fenylketonurie, homocystinurie, choroba javorového sirupu atd.), většina organických acidurií (isovalerová, methylmalonová, propionová atd.), dědičné poruchy močovinového cyklu, intolerance sacharidů (galaktosémie), intoxikace kovy (Wilsonova choroba, hemochromatóza) a porfyrie. U těchto chorob nedochází k ovlivnění embryofetálního vývoje a symptomy se obvykle objevují až po určité době. Jedná se buď o akutní stavy (charakteristické zvracením, kómami, selháním jater) nebo se choroba manifestuje chronickými projevy, jako je neprospívání, opožděný psychomotorický vývoj, kardiomyopatie atd. Léčba spočívá v dietním opatření nebo podávání léků usnadňujících vylučování toxického metabolitu. Diagnóza se určuje analýzou aminokyselin v plasmě a moči, organických kyselin a acylkarnitinů. Z důvodu náhodné elevace daných metabolitů (např. v důsledku stravy), které způsobují falešnou pozitivitu výsledku, je u všech poruch diagnóza finálně potvrzena až genetickými testy. I přes některé odlišnosti zde můžeme zařadit i poruchy syntézy a degradace neurotransmiterů (monoaminů, GABA) a poruchy syntézy aminokyselin (serinu, glutaminu).

Druhou skupinu tvoří poruchy energetického metabolismu, kam patří mitochondriální a cytoplasmatické defekty. Společným jmenovatelem je neschopnost vytvářet nebo zpracovávat energii v játrech, srdci, svaletch, mozku a ostatních tkáních. Klinicky se tedy tyto choroby nejčastěji projevují hypoglykemií, hepatomegalií, hypotonií, kardiomyopatií, zvýšenou hladinou laktátu, oběhovým selháním, postižením mozku, syndromem náhlého úmrtí novorozence a dalšími. Mitochondriální poruchy jsou závažné, patří k nim vrozené laktátové acidémie (poruchy pyruvátkarboxylasy, pyruvátdehydrogenasy a enzymů Krebsova cyklu), poruchy respiračního řetězce, poruchy oxidace mastných kyselin (např. MCADD) a poruchy metabolismu ketolátů.

Cytoplasmatické energetické poruchy zahrnují defekty glykolýzy, glukoneogeneze, kreatinového a glykogenového metabolismu, pentosafosfátové dráhy a hyperinsulinismus. Stanovení diagnózy je náročnější, jedná se o funkční zkoušky, enzymatickou analýzu buněčných kultur a molekulární analýzy.

Poslední skupinou jsou poruchy syntézy či katabolismu komplexních molekul. Příznaky jsou trvalé, vyvíjí se, a jsou nezávislé na přijímané stravě. Patří sem lysozomální a peroxizomální onemocnění, dědičné poruchy glykosylace, vrozené poruchy syntézy cholesterolu a poruchy intracelulárního transportu a zpracování. Diagnóza se kromě klasických biochemických metod v některých případech určuje na základě analýzy DNA. Až na výjimky jsou akutní stavy těchto onemocnění neléčitelné (Saudubray et al., 2011). Současným trendem je léčba pomocí enzymové terapie, využívaná u některých lysozomálních poruch (Sillence et al., 2012, Stirnemann et al., 2010).

4.4. Novorozenecký screening

Novorozenecký screening je metoda aktivního a celoplošného vyhledávání chorob v preklinickém stádiu. Snahou tedy je stanovit diagnózu a zahájit léčbu dříve, než se choroba začne projevovat. Ke stanovení koncentrace vybraných látek se používá suchá kapka krve, odebíraná všem novorozencům z patičky na filtrační papír (tzv. novorozenecká screeningová kartička). Odběr se provádí 48-72 hodin po porodu a vzorky se poté zasílají do laboratoří specializovaných na novorozenecký screening. Z analytických metod je nejčastěji využívána tandemová hmotnostní spektrometrie a plynová chromatografie (pro analýzu moči), některá onemocnění se stanovují pomocí imunoanalytických metod nebo molekulárně genetické analýzy. V České republice byl celoplošný novorozenecký screening zaveden v roce 2009, v základním screeningu je vyšetřováno celkem 13 onemocnění (www.novorozeneckyscreening.cz, citováno 17. 3. 2013).

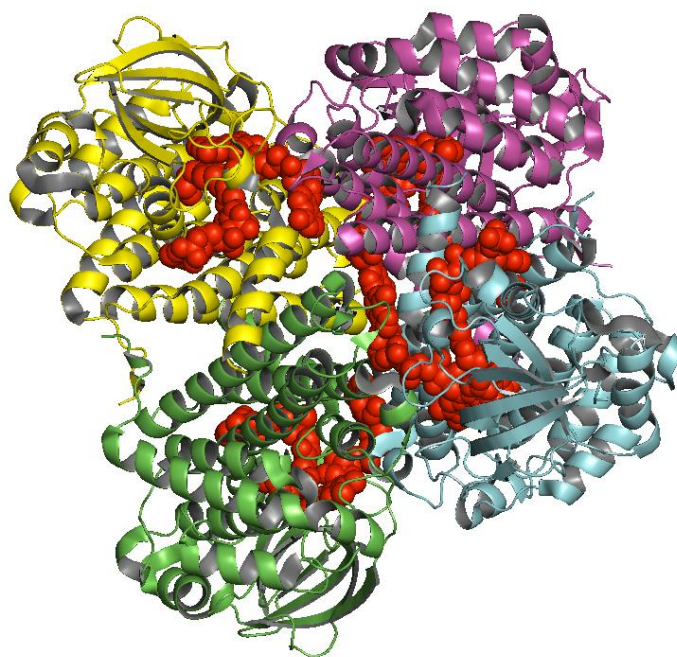
5. Deficit acyl-CoA dehydrogenasy mastných kyselin se středně dlouhým řetězcem

Deficit acyl-CoA dehydrogenasy mastných kyselin se středně dlouhým řetězcem („Medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency“ - MCADD) se řadí k nejběžnějším dědičným metabolickým poruchám v rámci podskupiny poruch mitochondriální β -oxidace mastných kyselin (Iafolla et al., 1994).

5.1. Charakteristika enzymu

Acyl-CoA dehydrogenasa mastných kyselin se středně dlouhým řetězcem (MCAD, EC 1.3.99.3, OMIM 201450) patří do rodiny acyl-CoA dehydrogenas (ACAD), kterých bylo do dnešní doby identifikováno celkem devět. Pět z těchto enzymů se účastní β -oxidace mastných kyselin s různou délkou řetězce: acyl-CoA dehydrogenasa mastných kyselin s krátkým/ středně dlouhým/ dlouhým/ velmi dlouhým řetězcem (SCAD, MCAD, LCAD, VLCAD1, VLCAD2). Zbývající čtyři enzymy katalyzují oxidaci aminokyselin. Strukturně se s výjimkou VLCAD1 vždy jedná o homotetramery s flavinadenindinukletidovým kofaktorem (FAD), který je přirozeným akceptorem elektronu a jeho transferu do dýchacího řetězce (Kim & Miura, 2004).

Každá podjednotka MCAD tetrameru se skládá ze tří přibližně stejně velkých domén: N-koncové α -domény (zbytky 1 - 129), C-koncové α -domény (zbytky 240 - 396) a β -domény (zbytky 130 - 239) (Obr. 10). Jak už sám název napovídá, α -domény jsou složeny z nahuštěných α -helixů, které tvoří jádro tetrameru. Na povrchu se nachází dva k sobě kolmé β -skládané listy β -domény. 3D struktura enzymu je tetraedrální uspořádání dimeru z dimerů s celkovým průměrem asi 90Å. Vzájemné interakce mezi monomery tvořící dimer, zahrnující vazebné místo pro FAD, jsou rozsáhlé. Mezi dvěma dimery se nachází pouze helix-helix interakce. Katalytické místo sestávající z vazebného místa pro substrát (acyl-CoA se středně dlouhým řetězcem) a kofaktor FAD tvoří z velké části rozhraní mezi β -doménou a C-koncovou doménou (Kim & Miura, 2004).



Obr. 10: 3D struktura tetrameru MCAD s navázaným substrátem - acyl-CoA (červeně)
(vytvořeno v PyMOL podle Satoh et al., 2003)

5.2. Molekulární podstata deficitu

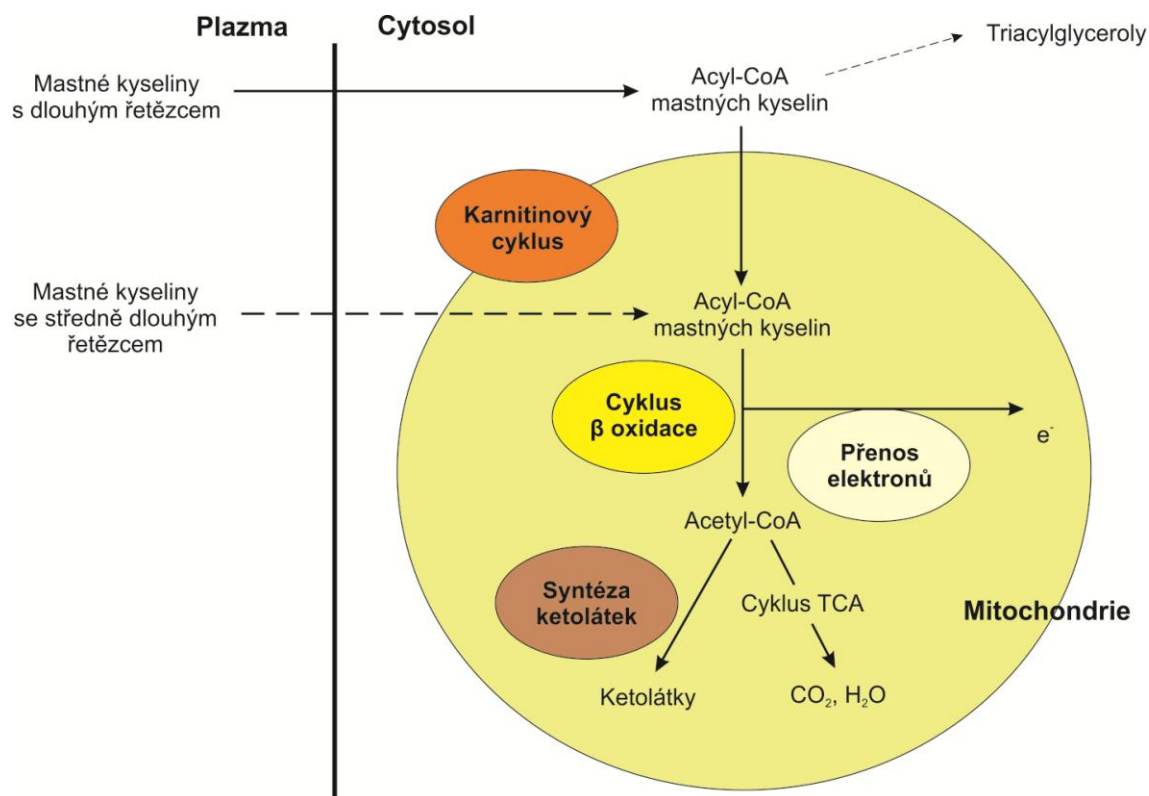
Za deficit acyl-CoA dehydrogenasy mastných kyselin se středně dlouhým řetězcem jsou zodpovědné mutace v genu *ACADM*. Jedná se o tzv. missense mutace - tedy bodové mutace, při nichž dochází ke změně příslušného kodonu, která způsobí záměnu aminokyseliny, jež je tímto kodonem určená. Za nejběžnější mutaci u pacientů diagnostikovaných po metabolické dekompenzaci je považována K304E (c.985A>G), které je přisuzováno velké riziko klinických projevů. U pacientů diagnostikovaných novorozeneckým screeningem je tato mutace méně častá, pozorujeme naopak širší genotypickou heterogenitu (Maier et al., 2009).

Obecně lze konstatovat, že hlavní molekulární podstatou MCADD je nedostatečné sbalení proteinu s následnou ztrátou funkce (Maier et al., 2009). Tato hypotéza byla navrhována již v dřívější studii mutace K304E, ve které autoři poukázali na fakt, že náhradou bazického lysinu kyselinou glutamovou dojde k destabilizaci podjednotky. Pozice 304 se nachází v C-koncové α -doméně a přímo se účastní formování tetrameru, takže pokud dojde k záměně, je skládání proteinu do konečné tetramerní formy inhibováno a to vede k destabilizaci enzymu (Yokota et al., 1990). Detailně byla zkoumána podstata také dalších mutací, které byly identifikovány novorozeneckým screeningem. Bylo například sledováno, že existuje snaha do určité

míry kompenzovat ztrátu aktivity nedostatečně sbaleného proteinu overexpresí chaperonů, napomáhajících agregaci proteinu. Zajímavé výsledky poskytla také analýza tepelné stability zmutovaných enzymů. U většiny mutantů došlo k 50% ztrátě funkce při teplotách nižších jak 40°C, což může být v přímé korelaci s faktem, že u značné části pacientů s MCADD dojde k metabolické dekompenzaci právě během onemocnění doprovázených horečkou (Maier et al., 2009).

5.3. Vstup mastných kyselin do mitochondrie

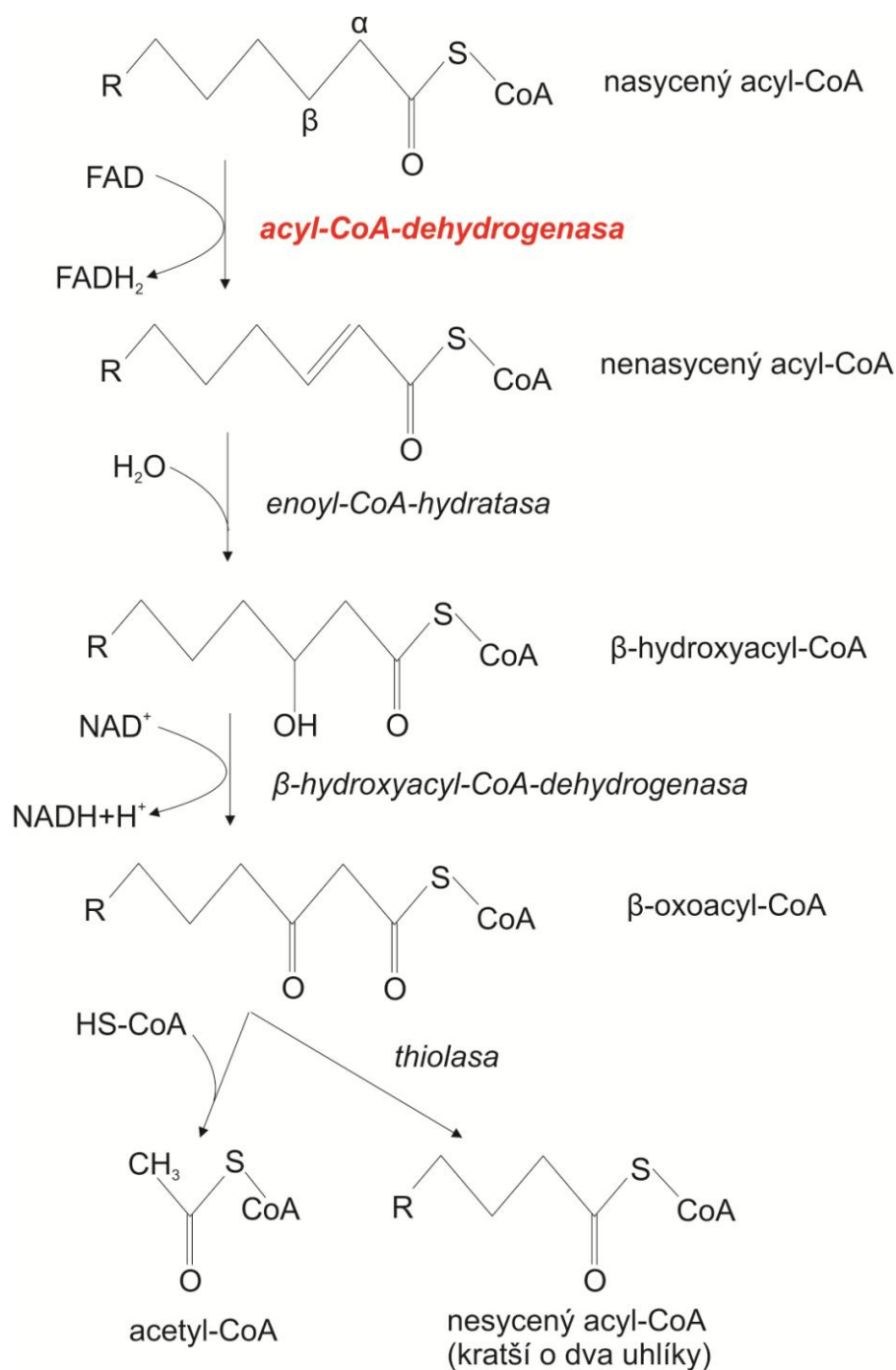
Oxidaci mastných kyselin lze rozdělit do čtyř hlavních oddílů: karnitinového cyklu, β -oxidace, přenosu elektronů a syntézy ketolátů (Obr. 11). Toto schéma je společné pro všechny mastné kyseliny, ale v závislosti na délce řetězce pozorujeme odlišnosti. Mastné kyseliny se středně dlouhým řetězcem jsou schopné (na rozdíl od mastných kyselin s dlouhým řetězcem) vstoupit do mitochondriální matrix volně, nevyužívají tedy karnitinový cyklus. Jejich aktivace na acyl-CoA deriváty probíhá až v matrix mitochondrie (Stanley et al., 2008, Berg et al., 2002).



Obr. 11: Hlavní kroky mitochondriální oxidace mastných kyselin: karnitinový cyklus, cyklus β -oxidace, přenos elektronů a syntéza ketolátů. Přerušovanou čarou je znázorněn volný vstup mastných kyselin se středně dlouhým řetězcem do mitochondrie (upraveno podle Stanley et al., 2008)

5.4. Vliv na energetický metabolismus buňky

Vlastní β -oxidace mastných kyselin zahrnuje čtyři kroky (Obr. 12). Acyl-CoA dehydrogenasa katalyzuje přeměnu acyl-CoA na trans- Δ^2 -enoyl-CoA (nenasycený acyl-CoA) za účasti koenzymu flavinadenindinukleotidu (FAD). Jedná se tedy o zablokování již prvního kroku β -oxidace. Mastné kyseliny s řetězcí dlouhými 4 - 12 uhlíků nemohou být odbourány na acetyl-CoA. Tímto nastává problém hned z několika důvodů. Acetyl-CoA běžně vstupuje do citrátového cyklu a dále do respiračního řetězce, kde je tímto zajištěna tvorba energie ve formě adenosintrifosfátu (ATP). Pokud tedy acetyl-CoA není tvořen, je zastavena také tvorba energie. Další významnou roli má acetyl-CoA v syntéze ketolátek (acetoacetát, 3-hydroxybutyrát). Funguje zde jako jejich prekurzor. Na ketolátky, jako hlavního zdroje energie, se adaptují životně důležité orgány (mozek, srdce, ledviny) při metabolickém stresu, aby byla zachována jejich správná funkce. Většina acyl-CoA, získaných β -oxidací, vstupuje do jater a je přeměňována právě na ketolátky. Játra dále využívají energii z mastných kyselin pro syntézu močoviny a glukoneogenezi. Díky produkci ketolátek s jejich přímou oxidací v ostatních tkáních pokrývají mastné kyseliny značné množství energetických potřeb organismu při delším hladovění (Stanley et al, 2008, Berg et al., 2002).



Obr. 12: Celkový průběh β -oxidace mastných kyselin se zvýrazněnou acyl-CoA dehydrogenasou - enzymem zodpovědným za první krok přeměny mastné kyseliny na produkty β -oxidace (upraveno podle Ledvína et al., 2009).

5.5. Symptomy

Příznaky nemoci se projeví při nástupu metabolického stresu, např. během dlouhodobého hladovění nebo při horečce. Jedná se nejčastěji o hypoketonickou hypoglykémii, která se rozvíjí zhruba po 16 hodinách hladovění, kdy je aktivována

lipolýza a oxidace mastných kyselin. V tomto období pozorujeme rapidní zvyšování hladiny volných mastných kyselin v plazmě. Hypoglykémie vzniká jako odpověď na excesivní využití glukózy jako zdroje energie, která nemůže být získána odbouráním tuků. Doprovodnými symptomy jsou zvracení, hepatomegalie, zmatenost, poruchy vědomí vyúsťující až v kóma.

Encefalopatie a s ní spojené neurologické problémy (poruchy paměti, řeči, reflexů atd.) bývá vysvětlována dysfunkcí hematoencefalické bariéry, která je poškozena v důsledku akumulace toxických metabolitů zúčastněných v peroxidaci lipidů a syntéze volných radikálů (Schuck et al., 2007).

V novorozeneckém věku se první ataky objevují mezi 3-24 měsíci. Jsou vyvolány buď infekčním onemocněním, nebo hladověním. Metabolický stres se například může vyskytnout při neúspěšném kojení (Stanley et al., 2008).

U dospělých se příznaky vyskytují často po nadměrném požití alkoholu, které většinou vede ke zvracení a způsobí tak stav hladovění (Wilhelm, 2006). V dalších případech byl metabolický stres pozorován například po operačním zákroku, při infekci horních cest dýchacích nebo v těhotenství (Lang, 2009).

Řada pacientů se také potýká s chronickými projevy MCADD. Mezi nejčastěji uváděné patří únava, bolest svalů a snížená tolerance na fyzickou aktivitu. Děti mívají větší riziko obezity. Možný důvod lze nalézt v dietním opatření, které zahrnuje zvýšený příjem sacharidů i večer (Derks et al., 2006).

5.6. Mortalita

U nediagnostikovaných pacientů je mortalita vysoká. Při prvním ataku umírá přibližně 25% dětí (Derks et al., 2006), u dospělých je to v akutních stavech až 50% (Lang, 2009). Včasné zachycení pacientů novorozeneckým screeningem snižuje riziko úmrtí či vážnějších záchvatů na minimum. I přes tento fakt stále existuje asi 5% riziko úmrtí během prvních dnů života, ještě než jsou dostupné výsledky screeningu (Wilcken et al., 2007).

5.7. Léčba

Léčba MCADD je ve své podstatě velmi jednoduchá. Spočívá v prevenci metabolického stresu, zejména hypoglykémie. Ta bývá vyvolána dlouhodobým hladověním nebo nadměrnou fyzickou aktivitou. Pacienti by tedy měli dodržovat pravidelný dietní režim se zvýšeným obsahem škrobů a omezeným přísunem tuků

(vyhýbat se stravě s vysokým obsahem mastných kyselin se středně dlouhým řetězcem). Sacharidy slouží jako alternativní zdroj energie a brání tak mobilizaci oxidace mastných kyselin, která by vedla k hromadění jejich toxických metabolitů v organismu. Možné je i podávání karnitinu. V akutních stavech je nutný parenterální přívod glukózy (www.novorozeneckyscreening.cz, citováno 15. 3. 2013).

5.8. Dědičnost a incidence

MCADD má autozomálně recesivní typ dědičnosti. Onemocnění tedy dítě získá vždy, když zdědí defektní alelu po otci i matce, což ve výsledku představuje pravděpodobnost 25% u každého dítěte (Snustad & Simmons, 2009).

Obecně předpokládaná incidence je 1:6 000-1:50 000 s vyšším výskytem u severních Evropanů, bělochů v USA a v romské populaci. Výskyt přenašečů je cca 1:70. V České republice je incidence tohoto onemocnění 1:14 114 (kumulativní incidence vycházející z celkem 16 screeningem zachycených případů v letech 2010-2011) (www.novorozeneckyscreening.cz, citováno 15. 3. 2013). Před zavedením celoplošných novorozeneckých screeningů v mnoha zemích byl výskyt MCADD daleko nižší, než je tomu nyní. To prokazuje například rozsáhlá studie pacientů s tímto deficitem v Dánsku. V období deseti let předtím, než byl zaveden screening, byla incidence klinicky se projevujících pacientů 1:39 691. Naproti tomu screeningová data ukazují incidenci 1:8 954. Jedním z mnoha důvodů takto významného rozdílu je detekce pacientů i s mírnější formou enzymového defektu, která se nemusí klinicky projevit (Andersen et al., 2012).

5.9. Diagnostika

Detekci MCADD lze provést, stejně jako u dalších poruch oxidace mastných kyselin, vyšetřením profilu acylkarnitinů v plazmě, suchých krevních skvrnách na filtračním papíru nebo v moči hmotnostní spektrometrií. Acylkarnitiny totiž vznikají transesterifikací intermediárních metabolitů acyl-CoA proximálně od bloků v oxidaci mastných kyselin. Charakteristická je zvýšená koncentrace hexanoylkarnitinu (C6), oktanoylkarnitinu (C8), decenoylkarnitinu (C10:1), dále se používají poměry C8/C2 a C8/C10 (Pasquali et al., 2006)

Koncentrace celkového karnitinu v plazmě a tkáních je snížena, protože hromadící se acylkarnitiny inhibují renální a tkáňový transport volného karnitinu. Během hladovění v plazmě patologicky stoupá koncentrace mastných kyselin se

středně dlouhým řetězcem, oktanoátu a kyseliny cis-4-decenové. V moči nacházíme zvýšené množství dikarboxylových kyselin, které vznikají parciální oxidací mastných kyselin v mikrosomech a peroxisomech jako odpověď na zvýšenou hladinu volných mastných kyselin v plazmě (Stanley et al., 2008). V moči lze také zaznamenat zvýšené vylučování glycinových konjugátů hexanoátu, suberátu a fenypropionátu, derivovaných z jejich esterů-CoA (Gregersen et al., 1994).

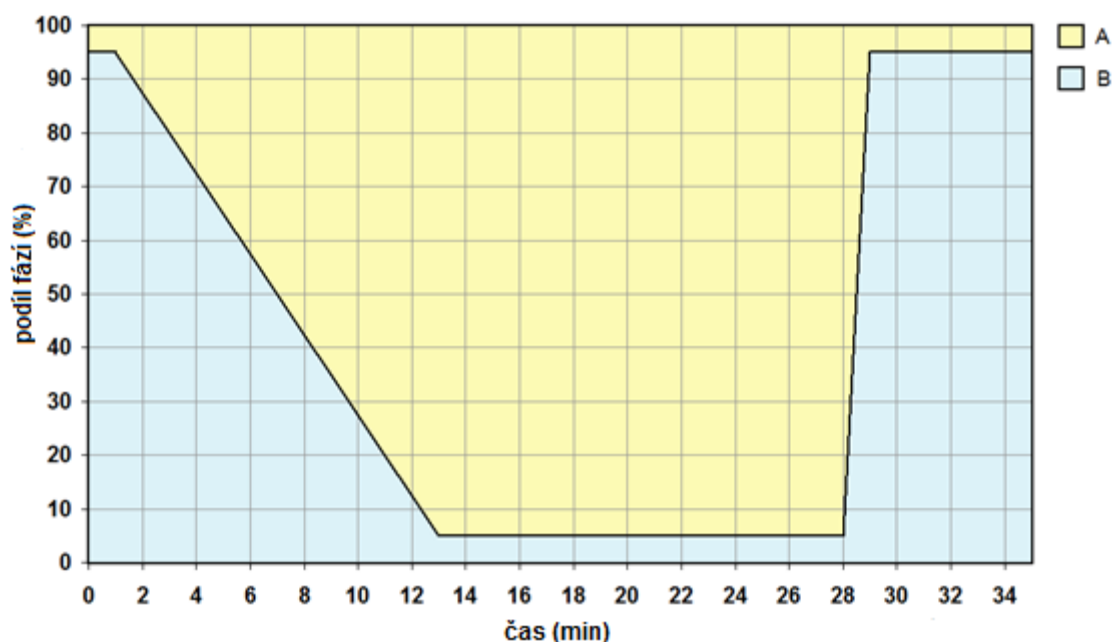
Při stanovování diagnózy je vždy nutné brát ohled na dobu odběru vzorku. Některé látky mohou být zvýšené například pouze v období metabolické dekompenzace, jinak se pacient může jevit jako zdravý. Pokud jsou například pacienti stabilizovaní, je koncentrace organických kyselin a acylglycinů v moči značně snižena, až na hexanoylglycin a suberylglycin, které lze detekovat. Naproti tomu, abnormální profil acylkarnitinů v plazmě nalezneme vždy. Testování by tedy mělo zahrnovat analýzu organických kyselin a acylglycinů v moči a plazmových acylkarnitinů. Diagnózu lze potvrdit analýzou DNA (Pasquali et al., 2006).

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

6. Materiál a metody

6.1. Metody

Separace byla provedena s použitím HPLC (UHPLC Dionex Ultimate 3000 RS, Thermo Scientific, USA, (CA)) v systému normálních fází za podmínek HILIC separace (hydrofilní interakční chromatografie): kolona Luna 3 μm NH_2 100 Å, 150 x 2 mm (Phenomenex, Torrance, USA); mobilní fáze A: 20 mM acetát amonný (pH 9,45), mobilní fáze B: acetonitril. Gradientová eluce probíhala následovně: 95% B po dobu 1 minuty, poté lineární pokles obsahu B do 13. minuty na celkových 5%, udržení gradientu 5% B 15 minut (do 28. minuty eluce), zvýšení obsahu B na 95% během 28. minuty a udržení tohoto stavu až do konce separace (Obr. 13). Po celou dobu separace byla udržována teplota 25°C a průtok 300 $\mu\text{l}/\text{min}$. Separace probíhala 37 minut s nástřikem 10 μl .



Obr. 13: Záznam průběhu gradientové eluce

Detekce byla provedena pomocí hmotnostního spektrometru Orbitrap Elite (Thermo Scientific, USA, (MA)) v pozitivním módu ESI (teplota iontového zdroje 300°C, teplota kapiláry 350°C, napětí spreje 3 kV). Analýza probíhala ve full scanu. Detekce látek byla nastavena pro rozmezí 70 - 1200 m/z s rozlišením 120 000 FWHM. Přesnost určení hmoty byla do 10 ppm.

Pro ovládání systému a sběr dat byl použit program XCalibur (2.2-SP1). Data byla statisticky zpracována v programu R-software (<http://r-project.org>, citováno

10. 4. 2013), pomocí metabolické softwarové nástavby XCMS (Smith et al., 2006, Tautenhahn et al., 2008, Benton et al., 2010) a CAMERA (Kuhl et al., 2012). Datová matice byla upravena následujícím postupem. Nejdříve se provedla interpolace metodou LOESS (Cleveland & Delvin, 1988) pro odstranění systémové chyby. Byl spočítán variační koeficient. Všechny analyty, u nichž byl variační koeficient větší jak 30%, byly vyloučeny z dalšího statistického zpracování. U nulových hodnot (např. z důvodu koncentrace látek, které byly pod detekčním limitem) byly doplněny chybějící hodnoty tak, že se vždy k chybějící hodnotě doplnily 2/3 nejmenší hodnoty v rámci dané skupiny (MCADD, kontrolní vzorky). Jelikož na data pohlížíme jako na kompoziční, můžeme použít clr (centered log ratio) transformaci (Hron, 2010). Data byla dále vycentrována k nule. Grafickým výstupem je PCA, DFA a dendrogram (shluková analýza).

Finální identifikace analytů proběhla v databázi METLIN (Smith et al., 2005), HMDB (Wishart et al., 2007) a LipidMAPS (Sud et al., 2007).

6.2. Biologický materiál

Pro analýzu byly použity suché krevní skvrny (dried blood spot - DBS), odebrané pacientům z České republiky v rámci novorozeneckého screeningu - 24 suchých krevních skvrn pacientů s deficitem acyl-CoA dehydrogenasy mastných kyselin se středně dlouhým řetězcem (MCADD) a 24 kontrolních vzorků od zdravých pacientů získaných z novorozeneckého screeningu.

6.3. Použité chemikálie

Kyselina octová, hydroxid amonný, acetonitril (LC-MS), metanol (LC-MS) a voda (LC-MS) byly zakoupeny u firmy Sigma-Aldrich (St. Louis, USA).

6.4. Příprava mobilní fáze

Mobilní fáze A (20 mM acetát amonný, pH 9,45) byla připravena smícháním 0,5 l LC-MS vody s 0,572 ml kyseliny octové a vytitrováním hydroxidem amonným (25% vodný roztok) na pH 9,45 (pH metr Cyberscan (Eutech Instruments) - kalibrace na pH 7 a 10). Mobilní fáze B obsahovala pouze acetonitril. Připravené mobilní fáze byly před použitím vloženy na 5 minut do ultrazvukové lázně.

6.5. Příprava vzorku

Z každé screeningové odběrové karty byly kleštěmi odebrány dva terčíky o průměru 3,2 mm (ekvivalent 8 μ l krve), ke kterým bylo přidáno 100 μ l methanolu. Extrakce probíhala po dobu 30 minut na vortexu. Následně byl vzorek centrifugován 10 minut při 20 000 g, poté bylo 50 μ l supernatantu přeneseno do HPLC vialky a bylo přidáno 50 μ l LC-MS vody (upraveno dle Dénes et al., 2012). Dále byly připraveny vzorky kontroly kvality (QC) tak, že bylo smícháno vždy 10 μ l supernatantu z každého vzorku s následným naředěním LC-MS vodou v poměru 1:1. Slepý vzorek („blank“) byl připraven stejným postupem jako ostatní vzorky, ale bez použití krevních skvrn.

6.6. Statistické zpracování dat

Výběr statistické metody závisí na typu získaných dat. Analýzou vícerozměrných dat zkoumáme vztahy mezi složkami náhodného vektoru. Vybrané metody analýzy vícerozměrných dat, použité v této práci, lze dále rozdělit na metody supervizované (diskriminační analýza) a metody nesupervizované (analýza hlavních komponent, shluková analýza).

Metoda hlavních komponent (PCA - „Principle component analysis“) patří mezi široce využívané metody statistické analýzy. Jejím cílem je transformace vícerozměrných dat tak, aby se stala jednoduššími. Původní proměnné jsou zredukovány na menší počet skrytých (latentních) proměnných (tzv. hlavních komponent) se současnou snahou o co nejmenší ztrátu informace o původních datech (variabilitě souboru). Hlavní komponenty jsou lineární kombinace původních proměnných, které vysvětlují jejich variabilitu a závislost. První hlavní komponenta Z_1 popisuje největší rozptyl původních dat, druhá hlavní komponenta Z_2 vyjadřuje největší rozptyl, který není obsažený v Z_1 atd. (Obr. 7) V grafickém zobrazení (biplot - dvojný graf) je možné sledovat shluky jednotlivých pozorování (objektů), přičemž informace o tom, zda konkrétní objekt náleží k dané skupině, není předem dána.

$$Z_1 = a_{11}X_1 + a_{12}X_2 + a_{13}X_3 + \dots a_{1n}X_n$$

$$Z_2 = a_{21}X_1 + a_{22}X_2 + a_{23}X_3 + \dots a_{2n}X_n$$

Obr. 7: Rovnice výpočtu první a druhé hlavní komponenty (převzato z Miller & Miller, 2005)

Hierarchické shlukování patří k metodám analýzy shluků (CLU - „Cluster analysis“), které se zabývají vyšetřováním podobnosti vícerozměrných objektů. Cílem je rozřídění objektů do shluků (tříd) na základě vyhledávání objektů, které jsou si blízké v n-rozměrném prostoru proměnných. Vzdálenost d mezi dvěma objekty v tomto prostoru, vyjádřená souřadnicemi $(x_1, x_2, \dots, x_n; y_1, y_2, \dots, y_n)$ je Eukleidovským typem vzdálenosti (Obr. 8). Objekty náležící stejné třídě jsou si více podobné, než objekty z různých tříd. Grafické zobrazení se nazývá dendrogram. Informace o náležitosti k dané třídě není, podobně jako u analýzy hlavních komponent, předem dána.

$$d = \sqrt{(x_1 - y_1)^2 + (x_2 - y_2)^2 + \dots + (x_n - y_n)^2}$$

Obr. 8: Výpočet Eukleidovské vzdálenosti v n-rozměrném prostoru (převzato z Miller & Miller, 2005)

Diskriminační analýza (DFA - „Discriminant function analysis“) se liší od předchozích dvou metod. V tomto případě je příslušnost objektu k dané skupině předem zadána. Cílem je tedy opět zařazení objektů do různých skupin nebo zařazení nového objektu do stávajících skupin na základě klasifikačního pravidla. Nejdříve je nutné najít lineární diskriminační funkci Y (LDF - „Linear discriminat function“), která představuje lineární kombinaci původních proměnných $X_1, X_2, \dots$ (Obr. 9). Dimenze dat je zredukována. Funkce Y tedy vyjadřuje rozdíly mezi jednotlivými skupinami (rozdíl hodnoty funkce Y objektů patřících do stejné skupiny je menší, než rozdíl hodnoty funkce Y objektů z různých skupin) (Meloun & Miličák, 2002, Miller & Miller, 2005).

$$Y = a_1X_1 + a_2X_2 + \dots a_nX_n$$

Obr. 9: Rovnice výpočtu lineární diskriminační funkce Y (převzato z Miller & Miller, 2005)

Existuje obecný předpoklad, že diskriminační analýza vždy předčí analýzu hlavních komponent, jelikož pracuje přímo s diskriminací mezi jednotlivými skupinami. Ovšem v případech, kdy je například počet objektů ve skupině malý nebo je jejich

distribuce v základním rozdělení nestejněměrná, se použitím analýzy hlavních komponent zdá být přínosnější (Martínez & Kak, 2001).

Výsledky, diskuze a závěr budou zveřejněny 14. 4. 2014.

7. Výsledky

7.1. Chromatografická separace

7.2. Identifikace metabolitů

7.3. Statistické vyhodnocení dat

7.4. Diskuze

ZÁVĚR

LITERATURA

- Álvarez-Sánchez B., Priego-Capote F., Luque de Castro M. D. (2010) Metabolomics analysis I. Selection of biological samples and practical aspects preceding sample preparation, *Trend. Anal. Chem.* **29**, 111-119.
- Andersen B. S. et al. (2012) MCAD deficiency in Denmark, *Mol. Genet. Metab.* **106**, 175-188.
- Aston, F. W. (1919) *Philos. Mag.* **38**, 707.
- Benton P. H., Want E. J., Ebbels T. M. D. (2010) Correction of mass calibration gaps in liquid chromatography-mass spectrometry metabolomics data, *Bioinformatics* **26**, 2488.
- Berg J. M., Tymoczko J. L., Stryer L. (2002) Biochemistry, pp. 615-616, W. H. Freeman and Company, New York.
- Bleakney, W. (1929) *Phys. Rev.*, **34**, 157.
- Cleveland W. S., Devlin S. J. (1988) Locally weighted regression: an approach to regression analysis by local fitting. *J. Am. Stat. Assoc.* **83**, 596-610.
- Cody R. B., Laramée J. A., Durst H. D. (2005) Versatile new ion source for the analysis of materials in open air under ambient conditions, *Anal. Chem.* **77**, 2297.
- de Hoffmann, E., Stroobant, V. (2007) Mass Spectrometry: Principles and Applications, pp. a: 1-4, b: 85, c: 175, d: 122-124, Third Edition, John Wiley & Sons, New York, USA.
- Denisov, E., Damoc, E., Lange, O., Makarov, A. (2012) Orbitrap mass spectrometry with resolving powers above 1,000,000, *Int. J. Mass. Spectrom.* **325-327**, 80-85.
- Derks et al. (2006) The natural history of medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency in the Netherlands: clinical presentation and outcome, *J. Pediatr. US* **148**, 665-670.
- Dettmer K., Hammock B. D. (2004) Metabolomics - A new exciting field within the "omics" sciences, *Environ. Health Persp.* **112**, 396-397.
- Fenn, J. B., Mann, M., Meng, C. K. et al. (1989) *Science* **246**, 64.
- Glish G. L., Goeringer D. E. (1984), Tandem quadrupole/time-of-flight instrument for mass spectrometry/mass spectrometry, *Anal. Chem.* **56**, 2291.
- Gohlke, R. S. (1959) Time-of-flight mass spectrometry and gas-liquid partition chromatography, *Anal. Chem.* **31**, 535-541.
- Goodacre R. (2007) Metabolomics of a superorganism, *J. Nutr.* **137**, 259-266.
- Green L. E., Schmauch L. J., Worman J. C. (1964), Simulated distillation by gas chromatography, *Anal. Chem.* **36**, 1512-1516.

- Gregersen N., Winter V., Lyonnet S., Saudubray J. M., Wendel U., Jensen T. G., Andersen B. S., Kolvraa S., Lehnert W., Bolund L, et al. (1994) Molecular genetic characterization and urinary excretion pattern of metabolites in two families with MCAD deficiency due to compound heterozygosity with a 13 base pair insertion in one allele, *J. Inherit. Metab. Dis.* **17**, 169-184.
- Guo X., Li Ch., Duan L., Zhao L., Lou H., Ren D. (2012) Separation of the enantiomers of naringenin and eriodictyol by amylose-based chiral reversed-phase high-performance liquid chromatography, *Drug Discoveries & Therapeutics* **6**, 321-326.
- Hron K. (2010) Elementy statistické analýzy kompozičních dat, Informační bulletin České statistické společnosti, 3. ročník, pp. 41-49.
- Hu, Q., Noll, R. J., Li, H., Makarov, A., et al. (2005), The Orbitrap: a new mass spectrometer, *J. Mass. Spectrom.* **40**, 430-443.
- lafolla A. K., Thompson R. J. Jr., Roe C. R. (1994) Medium-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency: Clinical course in 120 affected children, *J. Pediatr. US* **124**, 409-415.
- Karas, M. & Hillenkamp, F. (1988), Laser desorption ionization of proteins with molecular mass exceeding 10,000 daltons, *Anal. Chem.* **60**, 2299-2301.
- Kim J-J. P., Miura R. (2004) Acyl-CoA dehydrogenases and acyl-CoA oxidases, *Eur. J. Biochem.* **271**, 483-493.
- Kingdon, K. H. (1923) *Phys. Rev.* **21**, 408-418.
- Kozaki D., Mori M., Nakatani N., Arai K., Masuno T., Koseki M., Itabashi H., Tanaka K. (2013) Indirect UV detection-ion-exclusion/cation-exchange chromatography of common inorganic ions with sulfosalicylic acid eluent, *Anal. Sci.* **29**, 121-126.
- Kuhl C., Tautenhahn R., Boettcher C., Larson T. R., Neumann S. (2012) CAMERA: an integrated strategy for compound spectra extraction and annotation of liquid chromatography/mass spectrometry data sets, *Anal. Chem.* **84**, 283-289.
- Ledvina M., Stoklasová A., Cerman J. (2009) *Biochemie pro studující medicíny*, pp. 155, Karolinum, Praha.
- Maier E., Gersting S. W., Kemter K. F., Jank J. M., Reindl M., Messing D. D., Truger M. S., Sommerhoff C. P., Muntau A. (2009) Protein misfolding is the molecular mechanism underlying MCADD identified in newborn screening, *Hum. Mol. Genet.* **18**, 1612-1623.
- Makarov A. (2000), Electrostatic axially harmonic orbital trapping: a high-performance technique of mass analysis, *Anal. Chem.* **72**, 1156-1162.

- Makarov, A., Denisov, E., Kholomeev, A., Balschun, W., Lange, O., Strupat, K., Horning, S. (2006), Performance evaluation of a hybrid linear ion trap/orbitrap mass spectrometer, *Anal. Chem.* **78**, 2113-2120.
- Martínez A. M., Kak A. C. (2001) PCA versus LDA, *IEEE Trans. Pattern Anal. Mach. Intell.* **32**, 228-233.
- Meloun M., Militký J. (2002) Kompendium statistického zpracování dat, pp. 213-279, Nakladatelství Academia, Praha.
- Michalski A., Damoc E., Lange O., Denisov E., Nolting D., Mueller M., Viner R., Schwartz J., Remes P., Belford M., Dunyach J. J., Cox J., Horning S., Mann M., Makarov A. (2011) Ultra high resolution linear ion trap Orbitrap mass spectrometer (Orbitrap Elite) facilitates top down LC MS/MS and versatile peptide fragmentation modes, *Mol. Cell. Proteomics*, doi: 10.1074/mcp.O111.013698.
- Miller J. N., Miller J. C. (2005) Statistics and chemometrics for analytical chemistry, pp. 213-227, Pearson Education Limited, Edinburgh, England.
- Munson M. S. B., Field F. H. (1966), Chemical ionization mass spectrometry. I. general introduction, *J. Am. Chem. Soc.* **88**, 2621-2630.
- Niessen W. M. A. (2003) Progress in liquid chromatography-mass spectrometry instrumentation and its impact on high-throughput screening, *J. Chromatogr. A* **1000**, 413–436.
- Olsen J. V., Schwartz J. C., Nielsen M. L., Damoc E., Denisov E., Lange O., Remes P., Taylor D., Splendore M., Wouters E. R., Senko M., Makarov A., Mann M., Horning S. (2009) A dual pressure linear ion trap orbitrap instrument with very high sequencing speed, *Mol. Cell. Proteomics* **8**, 2759-2769.
- Orbitrap Elite Hardware Manual (2011), Thermo Scientific, Bremen, Německo
- Pasquali M., Monsen G., Richardson L., Alston M., Longo N. (2006) Biochemical findings in common inborn errors of metabolism, *Am. J. Med. Genet. C* **142**, 64-76.
- Paul W. (1990), Electromagnetic traps for charged and neutral particles, *Rev. Mod. Phys.* **62**, 531-540.
- Pieleles U., Zürcher W., Schär M., Moser H. E. (1993), Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: a powerful tool for the mass and sequence analysis of natural and modified oligonucleotides, *Nucleic Acids Res.* **21**, 3191.
- Pingoud A., Urbanke C., Hoggett J., Jeltsch A. (2002) Biochemical methods, pp. 97-101, Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, Německo.
- Racek J. et al. (2006) Klinická biochemie, pp. a: 259, b: 266-267, Galén, Praha

- Satoh A., Nakajima Y., Miyahara I., Hirotsu K., Tanaka T. et al. (2003) Structure of the transitive state analog of medium-chain acyl-CoA dehydrogenase. Crystallographic and molecular orbital studies on the charge-transfer complex of medium-chain acyl-CoA dehydrogenase with 3-thiooctanoyl-CoA, *J. Biochem.* **134**, 297-304.
- Saudubray J-M. (2011) Clinical approach to inborn errors of metabolism in paediatrics in *Inborn metabolic diseases*, (Saudubray J-M., Van den Berghe G., Walter J. H., ed.), pp. 4-5, Springer, Nemecko.
- Schuck P. F., Ceolato P. C., Ferreira G. C. et al. (2007) Oxidative stress induction by cis-4-decenoic acid: relevance for MCAD deficiency, *Free Radical Res.* **41**, 1261-1272.
- Sillence D., Waters K., Donaldson S., Shaw P. J., Ellaway C. (2012) Combined enzyme replacement therapy and hematopoietic stem cell transplantation in mucopolysaccharidosis type VI., *JIMD Rep.* **2**, 103-106.
- Smith C. A., O'Maille G., Want E. J., Qin C., Trauger S. A., Brandon T. R., Custodio D. E., Abagyan R., Siuzdak G. (2005) METLIN: a metabolite mass spectral database, *Ther. Drug Monit.* **27**, 747-751.
- Smith C. A., Want E. J., O'Maille G., Abagyan R., Siuzdak G. (2006) XCMS: Processing mass spectrometry data for metabolite profiling using nonlinear peak alignment, matching and identification, *Anal. Chem.* **78**, 779-787.
- Snustad D. P., Simmons M. J. (2009) *Genetika*, pp. 50-53, Nakladatelství K-public, Brno.
- Stanley C. A., Bennett M. J., Mayatepek E. (2008) Poruchy mitochondriální oxidace mastných kyselin a příbuzných metabolických cest v Diagnostika a léčba dědičných metabolických poruch (Fernandes J., Saudubray J-M., Van den Berghe G., Walter J. H., ed.), pp. 214-220, Nakladatelství Triton, Praha.
- Stephens, W. (1946) *Phys. Rev.* **69**, 691.
- Stirnemann J., Belmatoug N., Vincent C., Fain O., Fantin B., Mentré F. (2010) Bone events and evolution of biologic markers in Gaucher disease before and during treatment, *Arthritis Res. Ther.* **12**, R156.
- Sud M., Fahy E., Cotter D., Brown A., Dennis E. A., Glass C. K., Merrill A. H. Jr., Murphy R. C., Raetz C. R., Russel D. W., Subramaniam S. (2007) LMSD: Lipid maps structure database, *Nucleic Acids Res.* **35**, 527-532.
- Štern P. et al. (2011) *Obecná a klinická biochemie*, pp. 129-145, Nakladatelství Karolinum, Praha.
- Štulík et al. (2011) *Kolonová chromatografie v Analytické separační metody*, pp. 80-116, Nakladatelství Karolinum, Praha.

- Takáts Z., Wiseman J. M., Gologan B., Cooks R. G. (2004) Mass spectrometry sampling under ambient conditions with desorption electrospray ionization, *Science* **15**, 471-473.
- Tanaka, T., Waki, H., Ido, Y. et al. (1988) Protein and polymer analysis up to m/z 100,000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2**, 151.
- Tautenhahn R., Boettcher C., Neumann S. (2008) Highly sensitive feature detection for high resolution LC/MS BMC, *Bioinformatics* **9**, 504.
- Thanawiroon C., Rice K. G., Toida T., Linhardt R. J. (2004), Liquid chromatography/mass spectrometry sequencing approach for highly sulfated heparin-derived oligosaccharides, *J. Biol. Chem.* **279**, 2608-15.
- Thomson, J. J. (1913) Rays of Positive Electricity and Their Application to Chemical Analysis, Longmans Green, London, Velká Británie.
- Uhl O., Glaser C., Demmelair H., Koletzko B. (2011), Reversed phase LC/MS/MS method for targeted quantification of glycerophospholipid molecular species in plasma, *J. Chromatogr. B* **879**, 3556– 3564.
- Wilcken et al. (2007) Outcome of neonatal screening for medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency in Australia: a cohort study, *Lancet* **369**, 37-42.
- Wilhelm W. D. (2006) Sudden death in a young woman from medium chain acyl-coenzyme A dehydrogenase (MCAD) deficiency, *J. Emerg. Med.* **30**, 291-294.
- Wishart D. S., Tzur D., Eisner R., Guo A. C., Young N. et al. (2007), HMDB: the human metabolome database, *Nucleic Acids Res.* **35**, 521-526.
- Yokota I., Indo Y., Coates P. M., Tanaka K. (1990) Molecular basis of medium chain acyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency, *J. Clin. Invest.* **86**, 1000-1003.
- Yost R. A. and Enke C. G. (1978), Selected ion fragmentation with a tandem quadrupole mass spectrometer, *J. Am. Chem. Soc.* **100**, 2274.
- Yu Y., Xu J., Liu Y., Chen Y. (2012) Quantification of human serum transferrin using liquid chromatography-tandem mass spectrometry based targeted proteomics, *J. Chromatogr. B* **902**, 10-5.

Elektronické zdroje:

www.nobelprize.org (3. 2. 2013)

www.novorozeneckyscreening.cz (17. 3. 2013)

www.planetorbitrap.com (3. 11. 2012)

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ACAD	acyl-CoA dehydrogenasa
clr	transformace logaritmem podílu složek
CLU	shluková analýza
CoA	koenzym A
DBS	suché krevní skvrny
DFA	diskriminační analýza
DMP	dědičné metabolické poruchy
ESI	ionizace elektrosprejem
FT	Fourierova transformace
FTMS	hmotnostní spektrometrie s Fourierovou transformací
FWHM	maximální šířka v polovině výšky píku
HCD	vysokoenergetická kolizní cela
HILIC	hydrofilní interakční chromatografie
HMDB	Human Metabolome Database
LDF	lineární diskriminační funkce
MCADD	deficit acyl-CoA dehydrogenasy mastných kyselin se středně dlouhým řetězcem
MS ²	tandemová hmotnostní spektrometrie
PAz-PC	1-palmitoyl-2-azelaoyl-sn-glycero-3-fosfocholin
PCA	analýza hlavních komponent
TCA	Krebsův cyklus