

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Metabolomická analýza myší plasmy za použití aminopropylové kolony a TripleQ-MS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Veronika Šťastná
Studijní program:	M1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Lukáš Najdekr
Termín odevzdání práce:	2. 5. 2013

Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou práci vypracoval(a) samostatně za použití citované literatury.“

V Olomouci dne

/vlastnoruční podpis/

Poděkování

Největší poděkování patří vedoucímu mé diplomové práce Mgr. Lukáši Najdekrovi za jeho trpělivost a cenné rady při studiu daného tématu a provádění praktické části. Velké poděkování rovněž věnuji všem pracovníkům laboratoře dědičných metabolických poruch, zejména Doc. RNDr. Tomáši Adamovi, Ph.D. za velkou pomoc a užitečné připomínky při plnění zadaného úkolu. 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	Bc. Veronika Šťastná
Název práce	Metabolomická analýza myší plasmy za použití aminopropylové kolony a TripleQ-MS
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Ústav molekulární a translační medicíny, Laboratoř metabolomiky
Vedoucí práce	Mgr. Lukáš Najdekr
Rok obhajoby práce	2013
Abstrakt	Metabolomika je vědní obor zabývající se analýzou metabolomu. Metabolom je kompletní soubor látek přítomných v buňce nebo biologickém systému v daném čase. Cílená metabolomika se zabývá kvalitativní a kvantitativní analýzou vybraných metabolitů souvisejících s konkrétní metabolickou drahou. Pro separaci látek byla použita vysoce účinná kapalinová chromatografie s modifikovanou fází HILIC a gradientovou elucí, která umožňuje separaci látek podle polarit v závislosti na zvyšující se polaritě mobilní fáze během analýzy. Pro detekci a identifikaci metabolitů byl použit trojitý kvadrupólový analyzátor s ionizací elektrosprejem v pozitivním a negativním módu v režimu "multiple reaction monitoring". Cílem této práce je aplikace modifikované metody na myší plasmy přístupem cílené metabolomiky a následná optimalizace a evaluace metody pomocí HPLC spojené s trojitým kvadrupólovým analyzátozem. Celkem bylo v metodě nalazelo 425 metabolitů. Ve vzorcích bylo identifikováno 124 látek. Ostatní látky byly ze seznamu odstraněny, jelikož se plasmě nevyskytovaly nebo byly málo abundantní. Látky byly rozděleny do skupin a bylo popsáno jejich chování na koloně. Byla provedena statistická analýza, jejím výstupem byla analýza hlavních komponent a diskriminační analýza. Modifikovaná metoda byla aplikována na vzorky plasmy <i>CFTR-KO</i> a wild type myší na léčbě fenretinidem a je vhodná pro měření plasmatických vzorků přístupem cílené metabolomiky.
Klíčová slova	Hmotnostní spektrometrie, kapalinová chromatografie, metabolomika, cystická fibróza, fenretinid
Počet stran	89
Počet příloh	-
Jazyk	Český

Bibliographical identification:

Autor's first name and surname	Bc. Veronika Šťastná
Title	Metabolomic analysis of mouse plasma using an aminopropyl column and TripleQ-MS
Type of thesis	Master
Department	Institute of molecular and translational medicine, Laboratory of metabolomics
Supervisor	Mgr. Lukáš Najdekr
The year of presentation	2013
Abstrakt	Metabolomics is the science dealing with the analysis of the metabolome. Metabolome is the complete set of substances present in a cell or a biological system at a given time. Targeted metabolomics is interested in qualitative and quantitative analysis of selected metabolites associated with a specific metabolic pathway. For separation of substances high performance liquid chromatography with a modified phase HILIC was used. Gradient elution was chosen which allows separation of substances according to the polarity depending on the increasing polarity of the mobile phase during analysis. For the detection and identification of metabolites triple quadrupole analyzer was used with electrospray ionization in positive or negative mode in the "multiple reaction monitoring". The aim of this work is to apply the modified method to mouse plasma by targeted metabolomic approach and subsequent optimization and evaluation of the method using HPLC associated with triple quadrupole analyzer. The method was tuned to measure 425 metabolites. In the samples 124 analytes were identified. Rest of a analytes have been removed from the list because they were not present in plasma or were not very abundant. Analytes were divided into the groups and their behavior on the column was described. The outcome from statistical analysis was principal component analysis and discriminant analysis. The modified method was applied to plasma samples <i>CFTR-KO</i> mice and wild type mice with fenretinide treatment. It was demonstrated that this method is suitable for measurement of plasma samples with targeted metabolomics approach.
Keywords	Mass spectrometry, liquid chromatography, metabolomics, cystic fibrosis, fenretinide
Number of pages	89
Number of appendices	-
Language	Czech

OBSAH

CÍLE PRÁCE	- 7 -
TEORETICKÁ ČÁST	- 8 -
2 Hmotnostní spektrometrie	- 9 -
2.1 Úvod	- 9 -
2.2 Instrumentace	- 10 -
2.3 Ionizační techniky	- 11 -
2.3.1 Ionizace elektrosprejem (Electrospray ionization, ESI)	- 11 -
2.4 Hmotnostní analyzátoři	- 14 -
2.4.1 Průletový analyzátor (Time of flight, TOF)	- 16 -
2.4.2 Kvadrupólový analyzátor	- 17 -
2.4.3 Iontová past	- 18 -
2.4.4 Iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací	- 19 -
2.4.5 Orbitrap	- 19 -
2.5 Detektor	- 21 -
2.6 Tandemová hmotnostní spektrometrie	- 21 -
2.6.1 Trojitý kvadrupól (QqQ)	- 22 -
3 Kapalinová chromatografie	- 23 -
3.1 Úvod	- 23 -
3.2 Separace na základě polarity	- 23 -
3.3 HPLC s normální fází	- 25 -
3.3.1 Hydrophilic-Interaction Chromatography (HILIC)	- 25 -
3.4 HPLC s reverzní fází	- 26 -
3.5 ELUCE	- 27 -
3.5.1 Izokratická eluce	- 27 -
3.5.2 Gradientová eluce	- 27 -
4 Metabolomika	- 28 -
4.1 Úvod	- 28 -
4.2 Metabolom	- 28 -
4.3 Metody studia metabolomu	- 29 -
5 Cystická fibróza	- 31 -
5.1 Úvod	- 31 -
5.2 Incidence	- 31 -
5.3 CFTR gen	- 32 -
5.3.1 Mutace genu CFTR	- 32 -
5.4 CFTR protein	- 34 -

5.4.1	Struktura	- 34 -
5.4.2	Funkce CFTR proteinu	- 35 -
5.5	Příznaky cystické fibrózy	- 37 -
5.6	Diagnóza.....	- 39 -
5.7	Terapie.....	- 39 -
5.7.1	Léčba respiračních příznaků	- 40 -
5.7.2	Léčba zažívacích obtíží	- 40 -
5.7.3	Transplantace plic	- 41 -
5.7.4	Genová terapie	- 41 -
6	Retinoidy	- 43 -
6.1	Úvod.....	- 43 -
6.2	Fenretinid.....	- 43 -
PRAKTICKÁ ČÁST.....		- 45 -
7	Materiál.....	- 46 -
7.1	Biologický materiál.....	- 46 -
7.2	Přístrojové vybavení	- 46 -
7.3	Použité chemikálie.....	- 46 -
7.4	Příprava mobilní fáze.....	- 46 -
8	Příprava vzorků plasmy, vzorků kontroly kvality a „blanku“	- 47 -
8.1	Plasma <i>CFTR-KO</i> myší	- 47 -
9	Metoda	- 48 -
9.1	Statistická analýza	- 61 -
9.1.1	Analýza hlavních komponent	- 61 -
9.1.2	Diskriminační analýza.....	- 61 -
10	Výsledky	- 62 -
11	Diskuse.....	- 75 -
12	Závěr	- 77 -
13	Literatura	- 78 -
14	Seznam použitých zkratk	- 88 -

CÍLE PRÁCE

- Vypracování rešerše na téma: Metabolomika, HPLC, hmotnostní spektrometrie, cystická fibróza a fenretinid
- Adaptace metody přístupu cílené metabolomiky na vzorky plasmy *CFTR-KO* myší na terapii fenretinidem
- Statistické vyhodnocení metabolomických dat

TEORETICKÁ ČÁST

2 Hmotnostní spektrometrie

2.1 Úvod

Hmotnostní spektrometrie (Mass Spectrometry - MS) je fyzikálně - chemická metoda založená na převedení molekul analytu na ionty, separace těchto iontů podle jejich poměru hmotnosti a náboje (m/z) a následné zpracování signálu jednotlivých iontů. Mezi výhody hmotnostní spektrometrie v porovnání s jinými analytickými technikami patří mimořádná citlivost, nízké detekční limity, rychlost a řadí se mezi destruktivní metody s minimální spotřebou vzorku. MS je vhodná pro určování relativní molekulové hmotnosti a dalších strukturních informací.

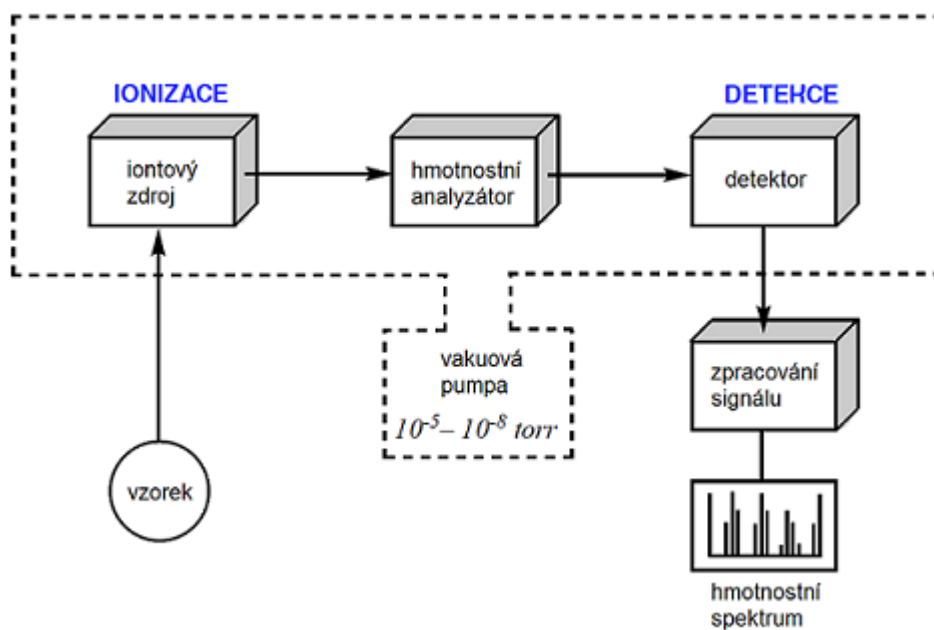
V analytické chemii jsou nejnovější aplikace většinou orientovány na biochemické analýzy např. proteomu, metabolomu nebo metabolismu léčiv, a tak dále. Mezi další analytické aplikace MS patří kontrola znečištění ovzduší, potravinářské kontroly, forenzní vědy, identifikaci a kvantifikaci pesticidů ve vzorcích vody nebo kontrola dopingu u sportovců (Hofman & Stroobant, 2007, Bramer, 1997).

Spojení hmotnostní spektrometrie a plynové chromatografie (Gas Chromatography/Mass Spectrometry - GC/MS) značnou mírou přispělo k rozvoji MS a vznikla tak efektivní technika pro analýzu složitých směsí organických látek (Zoro & Halley, 1976). GC/MS technika je vhodná pro analýzu těkavých a termostabilních sloučenin. V případě analytu, který je termolabilní, polární nebo málo těkavý se provádí derivatizace, která zabrání tepelnému rozkladu, zlepší chromatografickou separaci a citlivost analýzy. Hmotnostní spektrometrie je také často spojována s kapalinovou chromatografií (Liquid Chromatography/Mass Spectrometry – LC/MS) a to v případech, kdy se do MS zavádí např. tepelně labilní sloučeniny, které nelze snadno separovat pomocí plynové chromatografie. LC/MS se používá pro analýzu látek v komplexních směsích a tyto látky musí být rozpustné v použité mobilní fázi. Spojení GC a LC s hmotnostní spektrometrií je možno využít také pro identifikaci neznámých analytů. Techniky jsou si v mnoha ohledech podobné. Obě metody jsou založené na interakci analytu se stacionární a mobilní fází, s tím rozdílem, že u plynové chromatografie je mobilní fází plyn (Abian, 1999, Díaz-Cruz et al., 2003).

2.2 Instrumentace

Hmotnostní spektrometr se zpravidla skládá ze 4 základních částí (obr.1): iontový zdroj, hmotnostní analyzátor, detektor a vyhodnocovací zařízení.

Vzorek je přiveden do iontového zdroje, kde jsou molekuly analytu ionizovány a jsou vtahovány do hmotnostního analyzátoru. V této části jsou ionty separovány jedním nebo více analyzátorů, dále jsou přivedeny do detektoru, detekovány a výsledný signál se převádí do datového záznamu. Hmotnostní spektrometr pracuje za hlubokého vakua, což minimalizuje ion-molekulové reakce, rozptyl, neutralizace iontů a fragmentace, které negativně ovlivňují analýzu (Hofman & Stroobant, 2007, Bramer, 1997).



Obr. 1: Obecné schéma hmotnostního spektrometru.

2.3 Ionizační techniky

Iontový zdroj generuje nabitě molekuly analytu v plynné fázi. Molekuly jsou ionizovány buď současně (např. ionizace elektrosprejem), (Hilton & Benesch, 2012) nebo prostřednictvím samostatných procesů (doutnavý výboj), (Harrison & Magee 1974). Ionizační techniky můžeme rozdělit na měkké a tvrdé. Měkké ionizační techniky poskytují intaktní ionty velkých molekul jako proteiny, nukleové kyseliny nebo dokonce nekovalentně vázané komplexy a energie dodaná molekule stačí pouze na vytvoření iontu z neutrální molekuly (chemická ionizace za atmosférického tlaku, ionizace elektrosprejem (electrospray ionization, ESI), ionizace rychlými ionty (fast atom bombardment, FAB), ionizace za atmosférického tlaku). Dodaná energie u tvrdých ionizačních technik je dostatečně velká, aby se z neutrální molekuly vytvořil ion a aby se vzniklé ionty dále štěpily (ionizace elektronem). Výběr iontového zdroje závisí převážně na aplikaci - některé zdroje jsou velmi specializované, jiné jsou téměř univerzální (ESI) (Hofman & Stroobant, 2007, Ekman et al. 2009, Banerjee & Mazumdar, 2012).

2.3.1 Ionizace elektrosprejem (Electrospray ionization, ESI)

Ionizace elektrosprejem je měkká ionizační technika, při které se tvoří ionty v plynné fázi (Fenn et al., 1989). V dnešní době je tato metoda často využívána v chemické a biochemické analýze. Spolu s hmotnostním spektrometrem dovoluje zkoumání molekulárního složení kapalných vzorků.

Před rozvojem spojení ESI-MS existovala řada ionizačních technik (chemická ionizace, ionizace elektronem), ale žádná z nich nebyla schopna překonat náchylnost analytu k fragmentaci, docházelo tedy k intenzivnímu rozpadu kovalentních vazeb (Banerjee & Mazumdar, 2012, Hilton & Benesch, 2012). V 80. letech se vědci snažili změřit přesnou molekulovou hmotnost biologicky významných velkých molekul např. proteinů. Ačkoli byla v této době pro ionizaci biologického materiálu dostupná ionizační metoda FAB (Barber et al., 1981), dosáhlo se díky ní převážně jednou nabitých molekul analytu a byla spíše vhodnější pro menší částice s molekulovou hmotností do 1000 Da. Nicméně hmotnostní spektrometry v té době nebyly schopné analyzovat vysoké hodnoty m/z nabitých vysokomolekulárních proteinů. Proto jedinou možností jak v této době analyzovat proteiny, bylo jejich rozštěpení na menší peptidy a vzniklou směs analyzovat pomocí FAB-MS. Tyto problémy byly překonány v roce 1989, kdy John Fenn představil ionizaci

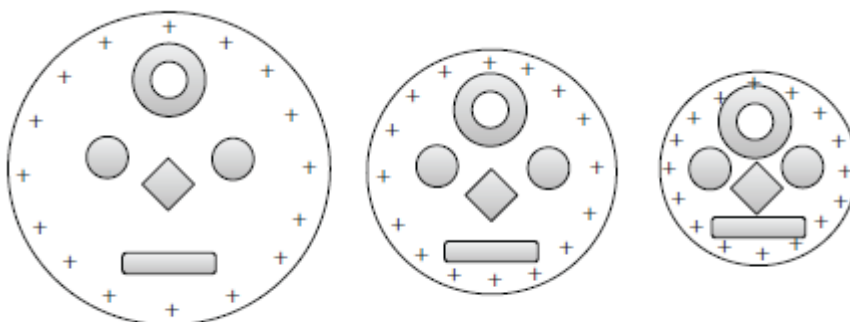
elektrosprejem (Fenn et al., 1989). Techniku, u které nedochází k fragmentaci a velké molekuly (např. proteiny) jsou ionizovány za pomoci mnohonásobného nabití. Toto mnohonásobné nabití snižuje hodnotu m/z výsledného iontu a je možné je analyzovat pomocí běžných hmotnostních analyzátorů (Banerjee & Mazumdar, 2012, Hilton & Benesch, 2012).

V případě ESI je vzorek rozpuštěn v rozpouštědle a roztok analytu projde přes kapiláru, na kterou je vloženo vysoké napětí. Na konci kapiláry dochází k akumulaci nábojů, čím se povrch stává nestabilním a deformuje se. Pod vlivem vysokého elektrického pole se tak vytvoří tzv. Taylorův kužel (obr. 2). Ten je poté rozprášen díky zmlžovacímu plynu a vznikají nabité kapičky. Kapičky s nahromaděným nábojem na povrchu (pozitivní nebo negativní) jsou následně odpuzovány vysokonapěťovou tryskou (má stejnou polaritu) a pohybují se ve směru elektrického pole (směrem k vyhřáté kapiláře) (Ekman et al. 2009).



Obr. 2: Vliv vysokého napětí na kapku na konci kapiláry, vznik Taylorova kuželu (převzato z Hofman & Stroobant, 2007).

Existují dvě síly působící v opačných směrech na nabité kapičky. Jednou z nich je povrchové napětí, které se snaží zachovat kulovitý tvar kapky, a druhá je Coulombická síla odpuzování mezi náboji na povrchu, která se snaží rozbít kulový tvar nabité kapičky.

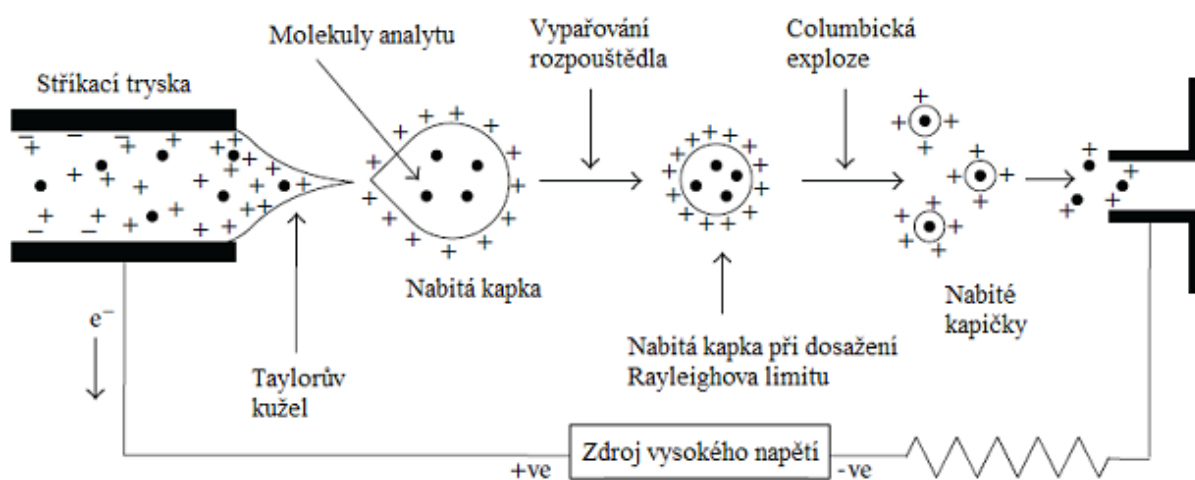


Obr. 3: Vypařování rozpouštědla ze vzniklé kapičky (převzato z Banerjee & Mazumdar, 2012).

Jakmile se vytvoří kapičky, ihned se z nich začne vypařovat rozpouštědlo (obr. 3). Molekuly rozpouštědla opouští kapky jako neutrální částice, což vede

ke zvýšení hustoty povrchového náboje. Odpařování rozpouštědla nastává v okamžiku, kdy se kapičky dostanou do prostoru mezi sprejovací tryskou a vyhřívanou kapilárou. V důsledku toho se objem kapek snižuje až k bodu (Rayleighův limit), (Rayleigh, 1882), kdy povrchové napětí nemůže déle udržet Coulombickou sílu odpuzování. V tomto bodě nastává Columbická exploze, při které se velké kapky rozpadnou na mnoho malých kapiček za současného rozdělení původních nábojů. Vzniklé kapičky nejsou jen menší než původní kapky, ale mají také větší poměr náboje k hmotě a dále putují do hmotnostního analyzátoru (obr. 4) (Hofman & Stroobant, 2007, Ekman et al. 2009, Banerjee & Mazumdar, 2012, Hilton & Benesch, 2012, Wilm, 2011).

Při přípravě vzorku je vyžadováno rozpuštění látky na vhodnou koncentraci do roztoku vody a organického rozpouštědla (methanol, isopropanol nebo acetonitril). Také se přidává malé množství kyseliny octové nebo mravenčí pro podporu pozitivní ionizace molekul analytu. V případě negativního módu se pro deprotonaci přidává např. roztok amoniaku (Ekman et al. 2009, Banerjee & Mazumdar, 2012).



Obr. 4: Schématické znázornění procesu ionizace elektrosprejem (převzato z Banerjee & Mazumdar, 2012).

ESI je velmi jemná ionizační metoda (dochází k velmi malé fragmentaci a slabé vazby jsou často zachovány), proto se může spojení ESI-MS využívat pro analýzu trojrozměrné struktury proteinů, intaktních posttranslačně modifikovaných proteinů (Carr et al., 1991) nebo nekovalentně vázaných komplexů jako protein-ligand komplex (Hofstadler & Sannes-Lowery, 2006).

ESI-MS se využívá i ve spojení s vysoce účinnou kapalinovou chromatografií (HPLC) (Banerjee & Mazumdar, 2012). Toto spojení umožňuje analýzu jak malých tak i velkých molekul o různých polaritách v komplexních biologických vzorcích. Nevýhodou ESI může být potlačení signálu analytu způsobené soutěžením o náboj mezi elektrolyty. Tento nedostatek brání např. důkladné analýze komplexních směsí, pokud není použita chromatografická prefrakcionace. Soutěžení o náboj stejně jako intenzita signálu analytu závisí na podmínkách experimentu jako je pH, složení rozpouštědla, koncentrační zastoupení jednotlivých analytů atd. (Ekman et al. 2009, Hilton & Benesch, 2012, Wilm, 2011).

2.4 Hmotnostní analyzátory

Jakmile se vytvoří ionty v plynné fázi, dochází k jejich separaci na základě poměru hmoty a náboje (m/z). Existuje několik typů hmotnostních analyzátorů (tab. 1)

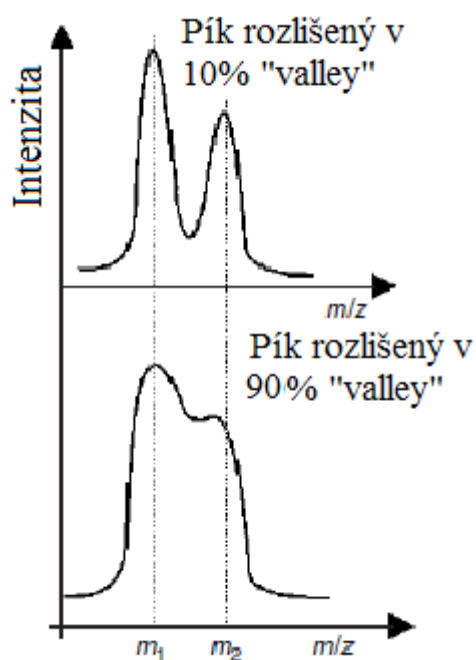
Tab. 1: Typy analyzátorů používaných v hmotnostní spektrometrii (upraveno podle Hofman & Stroobant, 2007).

Typ analyzátoru	Symbol	Princip separace
Elektrický sektor	E nebo ESA	Kinetická energie
Magnetický sektor	B	Hybnost
Kvadrupól	Q	m/z (stabilita trajektorie)
Iontová past	IT	m/z (rezonanční frekvence)
Analyzátor doby letu	TOF	Rychlost (čas letu)
Iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací	FTICR	m/z (rezonanční frekvence)
Orbitrap	OT	m/z (rezonanční frekvence)

Všechny hmotnostní analyzátory využívají statické nebo dynamické elektrické pole a magnetické pole, které může fungovat samostatně nebo v kombinaci. Hlavní rozdíl mezi analyzátory je ve způsobu použití pole, kterým je dosažena separace. Mezi pět hlavních charakteristik pro měření výkonu hmotnostního analyzátoru patří:

rozsah naměřených hodnot, rychlost analýzy, transmise, měření přesné hmoty a rozlišení.

- *Rozsah naměřených hodnot* jsou hodnoty m/z , ve kterých je hmotnostní analyzátor schopen měřit.
- *Rychlost analýzy* udává s jakou rychlostí analyzátor měří na určitém rozsahu m/z . Je vyjádřena v hmotnostních jednotkách za sekundu ($s^{-1} = \text{Hz}$).
- *Transmise* je poměr množství iontů, které dosáhlo detektoru a počet iontů vstupujících do hmotnostního analyzátoru. Přenos obecně zahrnuje iontové ztráty v jiných částech hmotnostního analyzátoru, jako jsou elektrické čočky před a za analyzátozem.
- *Měření přesné hmoty* udává rozdíl mezi teoretickou m/z a naměřenou hodnotou m/z .
- *Rozlišovací schopnost* je schopnost analyzátoru odlišit signály dvou iontů, jejichž rozdíl v hodnotě m/z je malý (obr. 5) (Hofman & Stroobant, 2007, Ekman et al. 2009, Gross, 2011).



Obr. 5: Rozlišovací schopnost (upraveno podle Hofman & Stroobant, 2007).

2.4.1 Průletový analyzátor (Time of flight, TOF)

Průletový analyzátor separuje ionty na základě rozdílné doby letu stanovené časovým intervalem mezi startovním signálem a pulsem generovaným nárazem iontu na detektor. Princip TOF byl poprvé popsán Stephensenem v roce 1946 (Stephenson, 1946).

Lineární TOF – nejprve se v iontovém zdroji vytvářejí skupiny iontů a tyto ionty se po počátečním zrychlení v elektrickém poli dostanou do oblasti bez jakéhokoliv pole, tzv. letové trubice, kde jsou rozděleny na základě jejich rychlosti. Předtím než opustí zdroj, má ion hmotnost m a náboj q a je urychlován potenciálem V_s . Elektrická energie E_{el} je přeměněna na kinetickou energii E_k (rovnice 1).

$$E_k = \frac{mv^2}{2} = qV_s = zeV_s = E_{el}$$

Rychlost iontu vycházejícího ze zdroje je dána upravením rovnice 1:

$$v = (2zeV_s/m)^{1/2}$$

Po počátečním zrychlení se ionty pohybují konstantní rychlostí k detektoru a čas t , který potřebují k překonání vzdálenosti L než dosáhnou detektoru je dán rovnicí 3.

$$t = \frac{L}{v}$$

Mezi výhody TOF patří teoreticky neomezený rozsah měřených m/z , vysoká rychlost přenosu, spektra lze získat z velmi malého množství vzorku a díky pulsnímu módu je tento analyzátor vhodný pro kombinaci s MALDI (ionizace laserem za účasti matrice). Jedním z hlavních nedostatků prvních TOF analyzátorů bylo velmi malé rozlišení (1000 – 2000 FWHM) ve srovnání s ostatními analyzátory (Hofman & Stroobant, 2007, Ekman et al. 2009, Wolff & Stehen, 1953).

- TOF s refletronem

Pro zlepšení rozlišovací schopnosti přístroje může být použito iontové zrcadlo neboli refletron, který vyrovnává rozdílné kinetické energie iontů se stejnou hodnotou m/z . Refletron vytváří tzv. brzdící pole, ve kterém ionty s větší kinetickou

energií a tedy s větší rychlostí proniknou hlouběji než ionty s nižší kinetickou energií. V důsledku toho rychlejší ionty stráví více času v reflektoru, a proto dosáhnou detektoru současně jako pomalejší ionty se stejnou m/z . Nicméně reflektor zvyšuje hmotnostní rozlišení na úkor citlivosti a dochází zde k omezení hmotnostního rozsahu (Mamyrin et al., 1973).

- „Delayed extraction“

V případě „delayed extraction“ se ionty na začátku od sebe oddělí podle svých kinetických energií (ionty s vyšší E_k dosáhnou detektoru dříve). Pulsní extrakce aplikována po určité době předává více energie na ionty o nízké E_k (není zapnuto el. pole, které by ionty urychlovalo). Proto méně energetické ionty obdrží více kinetické energie a dojde k vyrovnání těchto hodnot u iontů se stejným m/z (Hofman & Stroobant, 2007, Ekman et al. 2009).

2.4.2 Kvadrupólový analyzátor

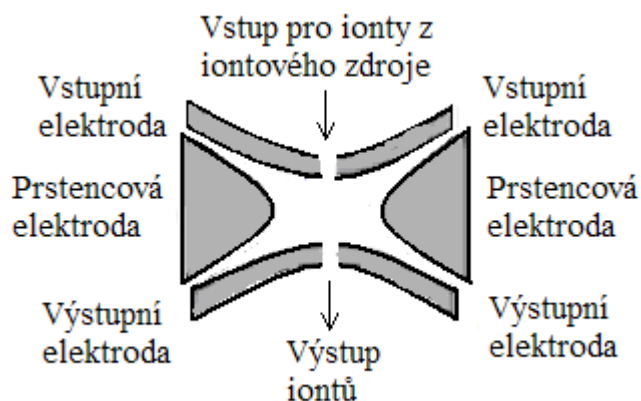
Kvadrupólový analyzátor je zařízení, které využívá stabilitu trajektorie v oscilujícím elektrickém poli k separaci iontů podle jejich m/z . První popis tohoto analyzátoru byl publikován v roce 1953 Paulem a Steinwedem (Paul & Steinwedel, 1953).

Kvadrupólový analyzátor je tvořen ze čtyř tyčí kruhového nebo hyperbolického tvaru rozmístěných paralelně po kružnici. Na tyče je vkládáno stejnosměrné a zároveň vysokofrekvenční střídavé napětí. Protilehlé tyče mají stejnou polaritu a sousedící tyče mají polaritu opačnou. K separaci dochází při průchodu iontů mezi tyčemi, kdy ionty začnou oscilovat. Kvadrupól slouží jako filtr a propustí k detektoru pouze ionty se stabilní oscilací o daném m/z , ionty s nestabilní oscilací se k detektoru nedostanou a jsou zachyceny na tyčích kvadrupólu (Ekman et al. 2009).

U kvadrupólového analyzátoru nezáleží na E_k iontu v momentě, kdy opouští iontový zdroj, ale pouze na poměru hmoty a náboje. Výhodou tohoto analyzátoru je možnost spojení s chromatografickými technikami a s kontinuálními iontovými zdroji jako ESI, ale nehodí se pro pulzní ionizační metody (Hofman & Stroobant, 2007, Ekman et al. 2009).

2.4.3 Iontová past

Iontová past je analyzátor, který funguje na stejném principu jako kvadrupólový analyzátor, ale její geometrie je odlišná. Jako první popsali původní iontovou past Paul a Steinwedel v roce 1960 (Paul & Steinwedel, 1960).



Obr. 6: Schématické znázornění iontové pasti (upraveno podle Hofman & Stroobant, 2007).

Iontová past je tvořena celkem třemi elektrodami o hyperbolickém průřezu (obr. 6). Na větší prstencovou střední elektrodu se při konstantní frekvenci přivádí vysokofrekvenční napětí s měnící se amplitudou. Vstupní a výstupní elektroda uzavírají prstencovou elektrodu a jsou uzemněny. Ionty vyprodukované v iontovém zdroji jsou přeneseny do iontové pasti skrz otvor ve vstupní elektrodě. Díky elektromagnetickému poli jsou ionty v analyzátoru zadržovány až do doby, kdy se pole začne měnit a dojde k jejich vypuzení v závislosti na hodnotě m/z přes otvor ve výstupní elektrodě směrem k detektoru. V případě iontové pasti se používá inertní plyn (např. helium), který pomáhá zadržovat ionty ve středu pasti a tím zvyšuje citlivost a hmotnostní rozlišení. Rovněž plní funkci kolizního plynu a snižuje kinetickou energii iontů. Iontová past je použitelná jak pro kontinuální tak pro pulzní iontové zdroje. Výhodou je také možnost fragmentace molekul (Hofman & Stroobant, 2007, Ekman et al. 2009).

2.4.4 Iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací

Princip iontové cyklotronové rezonance (ICR) byl vyvinut Lawrenceem kolem roku 1930. V roce 1950 představil Sommer využití ICR v hmotnostní spektrometrii a kombinace s Furierovou transformací (FT) byla vyvinuta Comisarowem a Marshallem v roce 1974 (Comisarow & Marshall, 1974).

Nejdříve ionty opustí iontový zdroj, kde vznikaly za atmosférického tlaku. S postupným snižováním tlaku se dostanou až do cyklotronové cely (ICR cely), která funguje jako elektromagnetická iontová past, ve které je vakuum v řádu až 10^{-11} mbar a teplota blíží se absolutní nule. Analyzátor s cyklotronovou rezonancí obsahuje supravodivý magnet a využívá silného homogenního magnetického pole k zachycení iontů. Toto pole způsobí, že ionty vykonávají kruhový pohyb s frekvencí, která je závislá na jejich m/z . V ICR cele jsou přítomny zachycovací elektrody, které ionty stabilizují. Na elektrody je vkládáno elektrostatické pole a dochází k axiální stabilizaci iontů, jelikož jim zabrání opustit celu podél osy magnetického pole. Ionty určené k detekci jsou excitovány, jejich poloměr kruhového pohybu se zvětší a tím se dostanou blíže k detekční elektrodě, která indukuje malý proud pokaždé, když se ion k elektrodě přiblíží. Detekovaný proud se pomocí Furierovy transformace převede na hodnotu m/z .

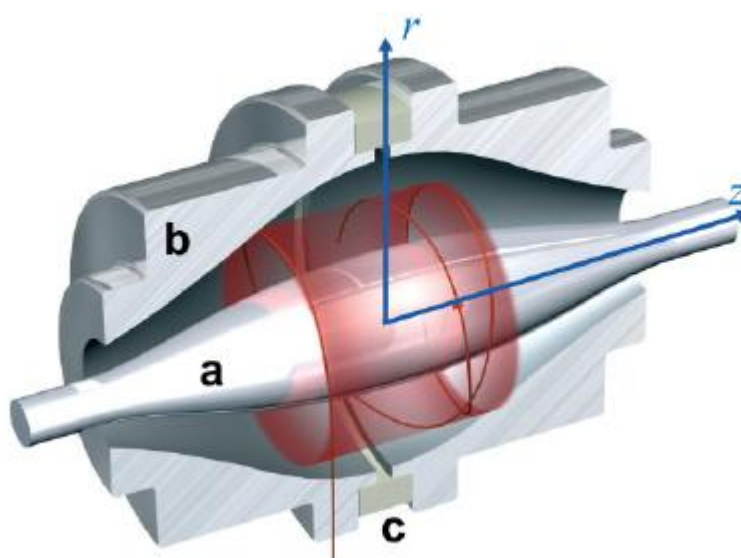
Kvůli dlouhé době detekce nutné pro maximální rozlišení je nezbytné, aby ionty vydržely v cele delší dobu. Hlavním důvodem destrukce iontů je jejich srážka se zbytkem plynu v cele, proto je velice důležité udržovat tlak co nejnižší. Do cely by se také nemělo dostat více než 10^6 iontů, protože by columbická repulse mohla způsobit posun nebo rozšíření píků ve spektru. U této metody může být také dosaženo zvýšení signálu opětovným změřením iontů, které již byly detekovány. Rozsah hodnot m/z je limitován silou magnetického pole a kinetickou energií iontů v cele (Hofman & Stroobant, 2007, Ekman et al., 2009).

2.4.5 Orbitrap

Orbitrap funguje jako elektrostatická iontová past využívající Furierovy transformace k získání hmotnostního spektra. Nový koncept hmotnostního analyzátoru byl poprvé navrhnout a popsán v roce 1996 A. Makarovem (Makarov, 2000) a první stroj byl na trh uveden v roce 2005.

Orbitrap je zařízení, které využívá pouze elektrostatické pole vložené mezi vnitřní a vnější elektrody k udržení iontů uvnitř (Scigelova & Makarov 2006). Analyzátor (obr. 7) se skládá z centrální elektrody, kolem které se pohybují ionty a

vnější elektrody rozdělené na poloviny keramickým izolačním kroužkem. Na ionty působí elektrostatická přitažlivá síla, která je kompenzována odstředivou silou. K udržení stabilní trajektorie iontů po průniku do orbitrapu musí mít ionty dostatečnou tangenciální rychlost, jinak dojde ke kolizi s vnitřní elektrodou. Jakmile se ionty dostanou do orbitrapu musí mít kinetickou energii kolem 1600 eV, aby se mohly pohybovat ve spirálách kolem středové elektrody. Ionty se tedy otáčejí kolem vnitřní elektrody, společně oscilují podél osy z a jejich frekvence je úměrná hodnotě m/z . Následně je detekován proud pohybu iontů a signál je zpracován převodem dat z frekvencí do hmotnostního spektra pomocí Fourierovi transformace (Makarov, 2000). V případě orbitrapu je udržováno vysoké vakuum (10^{-10} torr) potřebné k získání vysokého rozlišení, neboť srážky vedou k rozptylu, fragmentaci a přechodnému rozpadu (Scigelova & Makarov 2006).



Obr. 7: Orbitrap s centrální elektrodou (a), vnější elektrodou (b) a keramickým izolačním kroužkem (c), (převzato z Scigelova & Makarov 2006).

Orbitrap poskytuje měření přesné hmoty nad intenzity v rozmezí 5000 v rámci jednoho spektra. Díky této vysoké rozlišovací schopnosti orbitrapu mohou být přesné hmoty iontů stanoveny vždy, když je signál spolehlivě odlišen od šumu (signál/šumu = 2 - 3). Přesná hmota je s externí kalibrací 5 ppm a 2 ppm s interní kalibrací. Dynamický rozsah je přes 3000 v rámci spektra a přes 500 000 mezi spektry (Hofman & Stroobant, 2007, Ekman et al. 2009, Makarov, 2000).

2.5 Detektor

Volba detektoru závisí na konstrukci hmotnostního spektrometru a analytické aplikaci. K detekci iontů se využívají různé přístupy založené na hmotě, náboji nebo rychlosti iontů.

Jakmile ionty proletí skrze hmotnostní analyzátor, dopadnou na detektor s fotonásobičem, kde je přeměněna energie příchozích částic na využitelný signál. Jakmile částice narazí na detektor, energie z dopadu způsobí uvolnění sekundárních částic, např. elektrony nebo fotony. Počet sekundárních částic uvolněných z dopadu závisí převážně na energii a rychlosti příchozích iontů. Fotonásobiče v detektorech jsou schopny generovat z dopadajících iontů elektrický proud, který je úměrný jejich množství (Hofman & Stroobant, 2007, Ekman et al., 2009).

2.6 Tandemová hmotnostní spektrometrie

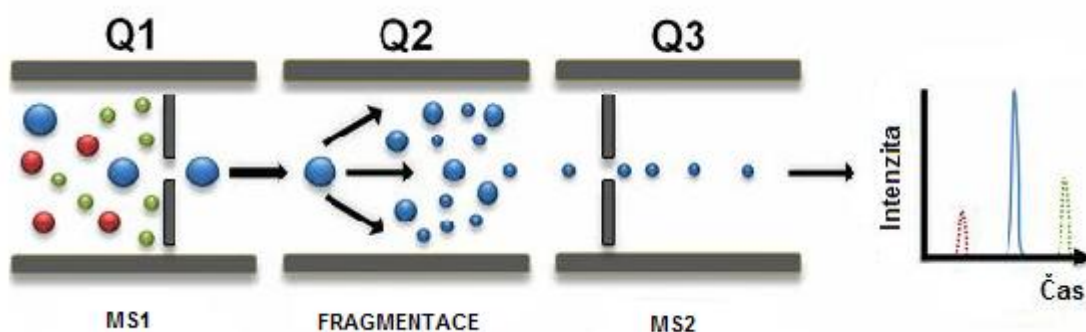
Tandemový hmotnostní spektrometr je přístroj skládající se z více než jednoho analyzátoru, a proto může být použit pro strukturní a sekvenční analýzy. Měření fragmentárních spekter (MS_n) můžeme rozdělit na dvě fáze. Ionty selektovány prvním analyzátozem jsou fragmentovány a v dalším analyzátozu dochází k selekci a identifikaci těchto fragmentů.

Tandemová hmotnostní spektrometrie je rozdělena na dvě hlavní skupiny: „tandem-in-space“ a „tandem-in-time“. „Tandem-in-space“ hmotnostní spektrometr se skládá z iontového zdroje, zařízení pro aktivaci prekurzorového iontu a alespoň ze dvou hmotnostních analyzátozu. V prvním analyzátozu se vyberou prekurzorové ionty v úzkém rozmezí hodnot m/z . Izolované ionty vstoupí do aktivačního zařízení (kolizní cela naplněná plynem) a dochází k jejich fragmentaci. Vytvořené fragmenty vstupují do druhého hmotnostního analyzátozu, kde jsou analyzovány (MS²). „Tandem-in-time“ vytvořené ionty jsou v iontovém zdroji zachyceny, fragmentovány a separovány podle m/z v jednom analyzátozu. V tomto případě se využívá analyzátozu na bázi pasti, kde ionty přetrvávají delší dobu, a proto je možné provádět analýzu iontů několikrát za sebou (Hofman & Stroobant, 2007, Ekman et al. 2009).

2.6.1 Trojitý kvadrupól (QqQ)

Trojitý kvadrupól je typem tandemového hmotnostního spektrometru, který obsahuje tři paralelně uspořádané kvadrupólové analyzátoři (obr. 8). V režimu MRM („multiple reaction monitoring“, sledování produktu rozpadu molekulárního iontu), který byl použit pro analýzu v praktické části práce, slouží první kvadrupól Q1 jako filtr a vybírá specifický prekurzorový ion podle zadané hodnoty m/z . Vybraný prekurzorový ion postupuje dále do druhého „hybridního“ kvadrupólu Q2 označovaného jako kolizní cela, ve které se tvoří fragmenty z vybraného iontu po srážce s kolizním plynem a velikost fragmentů je dána kolizní energií. Třetí kvadrupól Q3 funguje stejně jako Q1, tedy jako filtr a izoluje vybraný ion vytvořený v kolizní cele, který dále putuje do detektoru. Výhodou MRM módu je vysoká citlivost a specifita pro měření látek (např. metabolitů).

Trojitý kvadrupól se často využívá v kombinaci s kapalinovou chromatografií (LC), pro kvantitativní analýzu látek s nízkou koncentrací v komplexních směsích (Hofman & Stroobant, 2007, Ekman et al. 2009).



Obr. 8: Schéma trojitého kvadrupólu (upraveno podle Boja & Rodriguez, 2011).

3 Kapalinová chromatografie

3.1 Úvod

Vysoce účinná kapalinová chromatografie (HPLC) se používá jako analytický nástroj k separaci složitých směsí. HPLC se skládá ze zásobníku mobilní fáze, z pumpy, která pohybuje mobilní fází a vzorkem v celém systému, autosampleru nebo vstřikovače pro zavádění vzorků, analytické kolony, na které se separují sloučeniny a detektoru. Uspořádání fází u HPLC může být buď normální nebo reverzní (tab. 2) (Snyder et al., 2010).

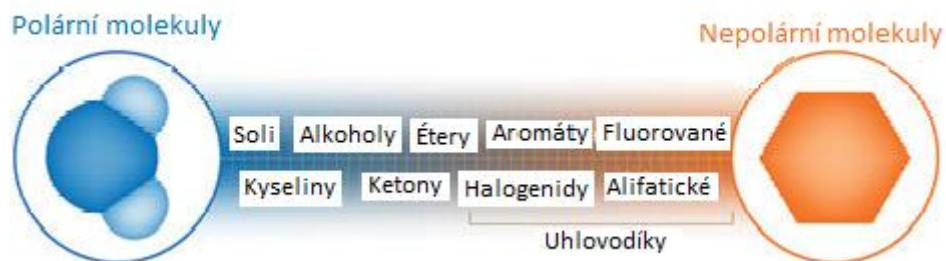
Důležitým bodem ve vývoji kapalinové chromatografie je vznik ultra vysoce účinné kapalinové chromatografie (Ultra-High Performance Liquid Chromatography, UHPLC). UHPLC využívá chromatografické kolony, jejichž částice jsou menší než 2 μm . Tyto kolony jsou schopné pracovat pod vysokým tlakem, což umožňuje rychlou separaci s vysokou účinností za současného zkrácení doby analýzy (Varma et al., 2011).

Tab 2.: Charakteristiky fází pro separaci na základě polarity.

Mód separace	Stacionární fáze	Mobilní fáze
Normální fáze	Polární	Nepolární
Reverzní fáze	Nepolární	Polární

3.2 Separace na základě polarity

V molekulách jsou specificky uspořádány určité skupiny atomů tzv. funkční skupiny, které jsou zodpovědné za jejich specifické vlastnosti, předvídatelné chemické reakce a určují, zda je molekula polární nebo nepolární (obr. 9). Organické molekuly jsou seřazeny do tříd podle převažujících funkčních skupin, které každá molekula obsahuje. Při použití separačního režimu na základě polarity je relativní chromatografická retence různých druhů molekul určena převážně povahou a umístěním těchto funkčních skupin (Braithwaite & Smith, 1999).



Obr 9.: Rozdělení molekul podle jejich relativní retence do řady chromatografické polaroty od vysoce polární až po vysoce nepolární (upraveno podle http://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=10049076&locale=en_CZ, 3. 4. 2013)

Tyto vlastnosti jsou proto základem pro chromatografickou separaci založenou na polaritě.

Molekuly mobilní fáze, které soutěží s molekulami analytu o místa na stacionární fázi, vytěsňují analyt, který poté projde rychleji kolonou. Neustále přitom dochází k porušování a zároveň ustanovení rovnováhy interakcí analytu mezi mobilní a stacionární fází, tato rovnováha je charakterizována rozdělovacím koeficientem. Voda je na polární straně stupnice mobilních fází a rozpouštědel (obr. 10), přičemž hexan je u nepolárního konce (Snyder et al., 2009, Alpert, 1990).



Obr. 10.: Rozdělení mobilních fází podle polaroty od vysoce polární až po vysoce nepolární (upraveno podle http://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=10049076&locale=en_CZ, 3. 4. 2013).

3.3 HPLC s normální fází

Normální fáze HPLC znamená, že stacionární fáze je tvořena polárními funkčními skupinami, zatímco mobilní fáze je nepolární nebo málo polární rozpouštědlo. Běžně se používá polární stacionární fáze nebo kolona z kuliček silikagelu. Silikagel je relativně nejvíce polární sloučenina ve srovnání se všemi ostatními výplňovými materiály (např. octadecylsilylová). Mezi příklady mobilních fází v normálním uspořádání patří např. hexan, dichlormethan, chloroform, diethylether, a isopropylalkohol. Většina rozpouštědel používaných jako mobilní fáze je nemísitelných s vodou a je málo polární. Ve většině případů se používá směsných mobilních fází, aby se dosáhlo lepší separace sloučenin. V uspořádání normálních fází se budou nepolární sloučeniny eluovat z kolony rychleji než polární sloučeniny (obr. 11) (Martin et al., 2003).



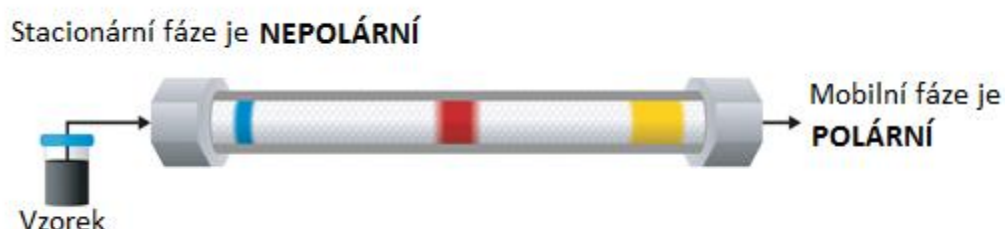
Obr. 11: Obrázek představuje normální fázi při chromatografické separaci směsi se třemi analyty. Polární stacionární fáze nejsilněji zadržuje polární žlutý analyt. Nepolární modrý analyt se eluuje jako první díky nepolárnímu rozpouštědлу (upraveno podle http://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=10049076&locale=en_CZ, 3. 4. 2013).

3.3.1 Hydrophilic-Interaction Chromatography (HILIC)

HILIC lze považovat za variantu normální fáze, u které dochází k hydrofilní interakci mezi mobilní fází a polární stacionární fází. Mobilní fáze při normálním uspořádání je 100% organická a jsou přítomny pouze stopy vody. Přidáním vody do organické mobilní fáze (např. acetonitril) umožňuje separaci a eluci polárních sloučenin, které jsou zachycené na polární stacionární fázi. Voda tedy jako silné polární rozpouštědlo soutěží s polárními analyty na koloně. Polární sloučeniny, které jsou nejprve přitahovány k polární stacionární fázi, jsou eluovány se zvyšující se polaritou mobilní fáze (Boersema et al., 2008).

3.4 HPLC s reverzní fází

Princip reverzní fáze je opačný k normálnímu systému fází, tedy stacionární fáze je tvořena nepolárním materiálem a mobilní fáze je polární. Běžně používaným materiálem v rámci kolon reverzních fází je silikagel spojený např. s uhlíkovým řetězcem o délce 18 atomů (C18). Existují i jiné kolony se střední polaritou, jako C8 a s kyano skupinami. Kolony obsahující kyano skupiny mohou být použity v normální i reverzní fázi. Mobilní fáze pro reverzní systém se obvykle skládá z pufr, methanolu, acetonitrilu a isopropanolu. U reverzní fáze HPLC jsou nepolární sloučeniny zadržovány na koloně déle než polární sloučeniny (obr. 12) (Coward et al, 1996).



Obr. 12: Nejvíce zadržovanou sloučeninou je více nepolární modrý analyt a jeho interakce s nepolární kolonou je největší. Polární žlutý analyt je zadržován slabě, prochází přes kolonu nejrychleji a je eluováno vodným roztokem rozpouštědla jako první (upraveno podle http://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=10049076&locale=en_CZ, 3. 4. 2013).

V dnešní době se používá uspořádání reverzních fází přibližně v 75% HPLC metod, především díky reprodukovatelnosti a širokému požití. Většina z protokolů s reverzní fází používá jako rozpouštědlo vodu v kombinaci s polárním organickým rozpouštědlem, např. acetonitril nebo methanol. Kolona obsahující modifikovaný silikagel oktadekanovými residui je jedním z nejpoužívanějších typů reverzní fáze u HPLC (Martin et al., 2003).

3.5 ELUCE

Eluční chromatografie se provádí buď v izokratickém nebo gradientovém režimu.

3.5.1 Izokratická eluce

Složení mobilní fáze se nemění po celou dobu potřebnou k tomu, aby se vzorek vyeluoval z kolony. Ve většině případů je izokratická separace dobře přizpůsobitelná individuálním aplikacím nebo vzorkům.

3.5.2 Gradientová eluce

Při gradientové eluci dochází ke změně ve složení mobilní fáze během separace. Gradientová eluce je vhodnější pro separaci složitých směsí a často s kratší dobou analýzy. Množství analytů, které mohou být separovány je větší a rozlišení píků je také lepší oproti izokratické eluci (MacNair et al., 1999).

4 Metabolomika

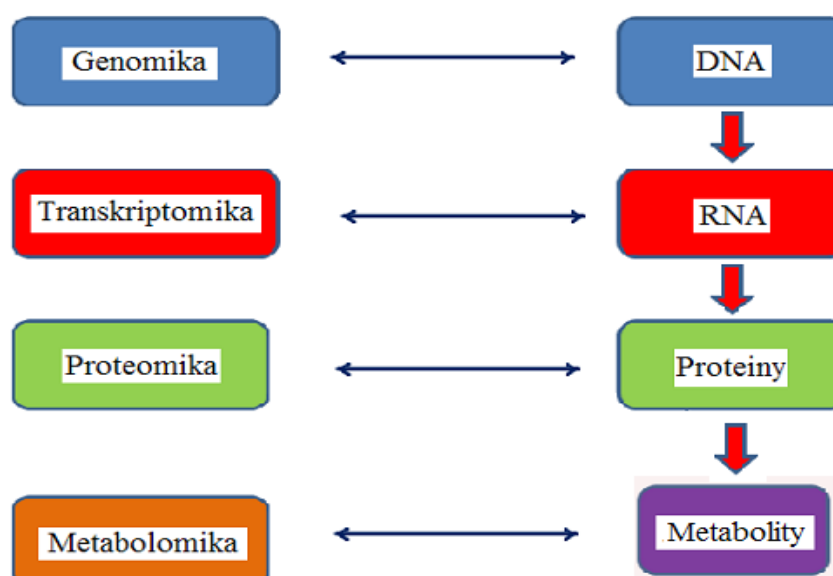
4.1 Úvod

Metabolomika je vědní obor, který zahrnuje identifikaci a kvantifikaci metabolitů v cílovém organismu s využitím sofistikovaných analytických technologií. Tento přístup umožňuje zkoumat rozdíly v celkových metabolických profilech, a je možné tímto přístupem detekovat komplexní biologické změny (Roessner & Bowne, 2009).

4.2 Metabolom

Metabolom je soubor organických molekul o malé molekulové hmotnosti (metabolitů) v daném biologickém vzorku. Molekuly, které tvoří metabolom se nazývají metabolity (Roux et al., 2011).

Komplexní analýza metabolomu je důležitá rozsáhlých studií DNA sekvencí (genomu), RNA (transkriptomu) a proteinů (proteomu), (obr. 13) (Tomita & Nishioka, 2005).



Obr. 13: Přehled „omických“ věd (upraveno 8. 3. 2013 podle <http://www.sciencebasedmedicine.org/index.php/woo-omics/>).

Metabolity mohou být definovány jako všechny organické molekuly přirozeně se vyskytující v metabolismu organismu, ale nejsou přímými produkty genetické exprese. Metabolity můžeme rozlišit na dvě skupiny podle jejich původu: endogenní a exogenní metabolity.

Mezi endogenní metabolity patří primární a sekundární metabolity. Primární metabolity se účastní velkého množství reakcí, jsou zapojeny do základních životních procesů jako jsou růst, vývoj a reprodukce. Příkladem mohou být aminokyseliny nebo meziprodukty glykolýzy. Naopak sekundární metabolity jsou druhově specifické, mají omezenou distribuci a jsou syntetizovány pro konkrétní biologickou funkci jako jsou alkaloidy u rostlin nebo hormony u savců.

Exogenní metabolity představují produkty metabolismu exogenních sloučenin, které vznikají modifikací původní molekuly nebo při enzymatické konverzi. Tyto látky jsou vylučovány do okolí např. extracelulární tekutinou nebo do růstového média (Roux et al., 2011).

4.3 Metody studia metabolomu

- **Cílená metabolomika**

Kvalitativní a kvantitativní analýza vybraných metabolitů souvisejících s konkrétní metabolickou reakcí. Výhodou této metody je vysoká citlivost. Jednou z metod cílené analýzy je metabolické profilování (Fiehn, 2002, Ellis et al., 2007, Dunn & Ellis, 2005).

- **Necílená metabolomika**

Necílená metabolomika se zaměřuje na detekci všech skupin metabolitů. Obecně platí, že necílená metabolomika má za úkol určit znaky, které se mění mezi dvěma a více vzorky ve skupině (Tautenhahn et al., 2012).

- **Metabolický footprinting**

Analýza extracelulárních metabolitů, které jsou vylučovány organismy např. do růstového média (Fiehn, 2002, Ellis et al., 2007).

- **Metabolický fingerprinting**

Rychlá, komplexní analýza vzorku bez identifikace a kvantifikace jednotlivých metabolitů. Metoda porovnává a klasifikuje vzorky metabolitů nebo „fingerprinty“, které se mění v reakci na nemoc nebo vystavení toxinu. Nejčastěji se používá hmotnostní spektrometrie nebo nukleární magnetická rezonance (Dettmer & Hammock, 2004, Dunn & Ellis, 2005).

5 Cystická fibróza

5.1 Úvod

Cystická fibróza (CF) dříve zvaná jako mukoviscidóza je genetické onemocnění, které postihuje především dýchací a trávicí soustavu a vyskytuje se převážně u kavkazské poluce (u černochoů a asiátů se vyskytuje minimálně). Toto smrtelné autosomálně recesivní onemocnění je způsobeno mutací obou *CFTR* alel, tudíž pacient s CF je homozygot (Drumm et al., 2005). Proteinový produkt *CFTR* genu - chloridový kanál, je při mutaci defektní a způsobuje abnormální obsah elektrolytů v potu, nedostatečnou funkci slinivky, produkci hustého hlenu, paličkovité prsty, u mužů azoospermii (nepřítomnost spermií v ejakulátu) a u žen sníženou plodnost. U pacientů s cystickou fibrózou dochází často k zánětům dýchacího ústrojí, tyto záněty mohou být i trvalé a nejčastěji jsou způsobeny bakterií *Pseudomonas aeruginosa* (Davies, 2002).

Po druhé světové válce umírala většina dětí na CF v kojeneckém věku, dnes se 50% nemocných dožívá věku přes 30 let. I přes očividné zvýšení věku pacientů patří cystická fibróza mezi smrtelná onemocnění a terminální stadium je řešitelné pouze plicní transplantací (O'Sullivan & Freedman, 2009).

V dnešní době je popsáno více než 1500 mutací genu *CFTR* (O'Sullivan & Freedman, 2009), ale jednou z nejzávažnějších mutací je delece 3 párů bazí, která vede ke ztátě phenylalaninu na pozici 508 proteinu – mutace F508. Mutace jsou často populačně specifické a/nebo se vyskytují ve vyšší míře v populačních či náboženských skupinách (Maurya et al., 2011, Muntau, 2009, Vávrová, 2006).

5.2 Incidence

Cystická fibróza postihuje stejně muži i ženy a vyskytuje se u jednoho z 2700 - 3800 narozených dětí. Při současné porodnosti v České republice z dat vyplývá, že každý rok se narodí 33 dětí s CF. V ČR je přibližně 500 pacientů s CF a každý 26. – 33. jedinec v kavkazské populaci je zdravým nosičem mutace genu *CFTR* (přibližně 4%). Nemoc se vyskytuje nejčastěji v Evropě a v USA, u mimo evropských populací

je incidence výrazně nižší: hispánská populace 1 : 9000, asijská 1 : 32000 a africko-americká populace 1 : 15000 (Muntau, 2009, Vávrová, 2006, Griesenbach et al., 1999, Ratjen & Döring, 2003).

5.3 *CFTR* gen

Cystická fibróza je způsobena mutací genu *CFTR* (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator), jež byl poprvé identifikován v roce 1989. Gen *CFTR* (obr. 14) je lokalizován na dlouhém raménku 7. chromozomu na pozici q31.2, skládá se z 27 exonů, jeho velikost je 230 000 párů bazí. Tento gen kóduje polypeptid CFTR o délce 1480 aminokyselin, který funguje jako chloridový kanál v epiteliální membráně dýchacích cest, potních žlázách a slinivky (Maurya et al., 2011, Noone & Knowles, 2001, Balaščaková et al., 2008, Sheppard & Welsh, 1999).



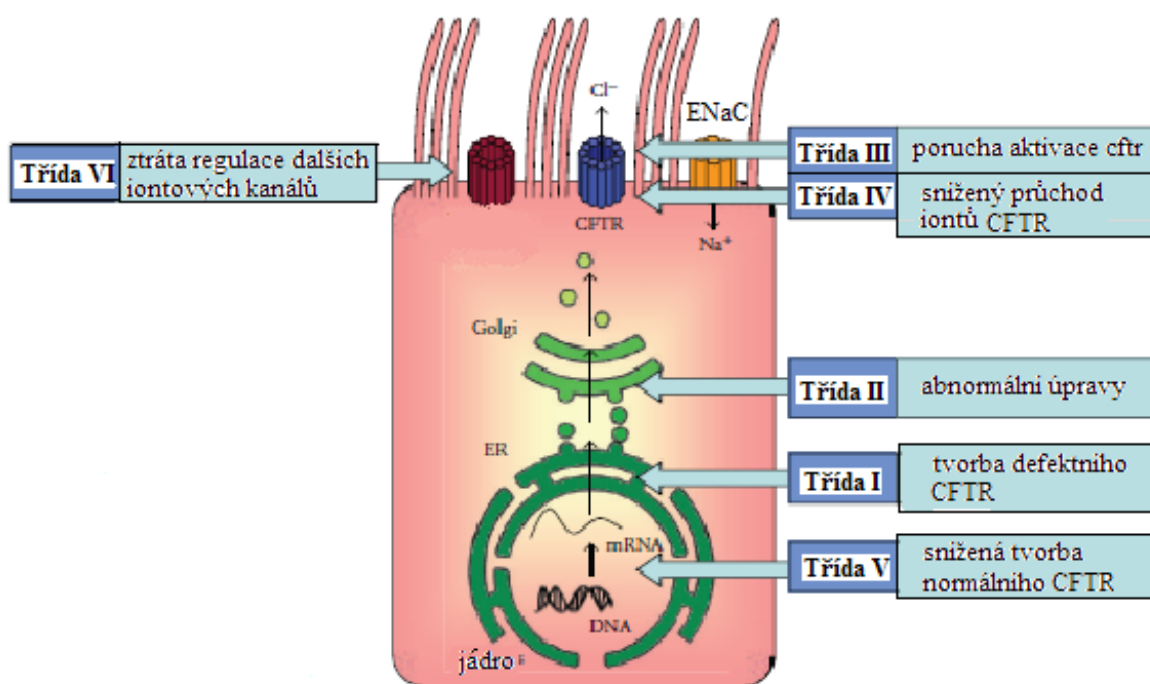
Obr. 14: Lokalizace *CFTR* genu (upraveno podle Maurya et al., 2011)

5.3.1 Mutace genu *CFTR*

Mutace *CFTR* genu mají za následek abnormality v epiteliálním transportu iontů a molekul. V závislosti na stupni závažnosti se může defekt *CFTR* rozdělit na „mírný“ a „těžký“. Mezi nejčastější mutace „těžkého typu“ patří nesmyslné mutace (nonsense), posuny čtecího rámce (frameshift) nebo sestřihové mutace (splicing). Tyto mutace vedou k tvorbě nefunkčního proteinu CFTR, což má souvislost s pankreatickou nedostatečností a se závažností plicního onemocnění. „Mírné“ mutace produkují částečně funkční CFTR proteiny v apikální membráně a jsou obvykle spojeny s pankreatickou soběstačností a mírnější formou onemocnění plic (Noone & Knowles, 2001, Balaščaková et al., 2008, Griesenbach et al., 1999, Reeves et al., 2012, Vávrová, 2006).

Mutace genu *CFTR* se obecně dělí na ty, které mění strukturu CFTR proteinu během jeho tvorby (Třídy I, II, V) a na ty, které ovlivňují funkci proteinu (Třídy III, IV, VI) (obr. 15).

Do třídy I patří mutace s poškozením nebo úplnou ztrátou syntézy proteinu. Mutace II zahrnuje chyby v posttranslačních úpravách (do této skupiny patří i mutace F508). Třída III je charakteristická sníženou odpovědí chloridového kanálu na aktivaci cAMP. U skupiny IV dochází ke změně iontové selektivity nebo vodivosti iontového kanálu. U třídy V se vytváří CFTR se sníženým stupněm funkčnosti. Poslední skupina mutací je spojena se ztrátou regulační funkce dalších iontových kanálů jako sodíkový kanál ENaC (epithelial sodium channels) a tato ztráta regulační aktivity může výrazně ovlivnit průběh cystické fibrózy (Noone & Knowles, 2001, Balaščaková et al., 2008, Griesenbach et al., 1999, Reeves et al., 2012, Vávrová, 2006).

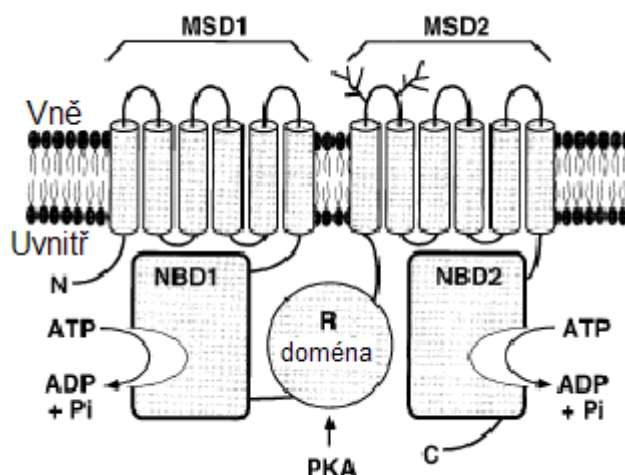


Obr. 15: Třídy mutací genu *CFTR* (upraveno podle Reeves et al., 2012).

5.4 CFTR protein

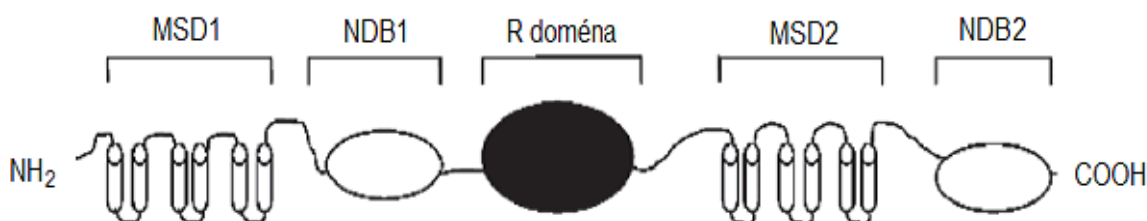
5.4.1 Struktura

CFTR je integrální membránový protein (obr. 16) o velikosti 1480 aminokyselin, patřící do velké skupiny ATP-vazebných transportérů (ABC transportéry), které vyžadují energii z hydrolýzy ATP k aktivnímu transportu malých molekul přes buněčnou membránu. CFTR jako jediný člen z této třídy funguje jako iontový kanál.



Obr. 16: Protein CFTR integrovaný v membráně (upraveno podle Sheppard & Welsh, 1999)

Zatímco se většina ABC transportérů skládá ze čtyř domén, CFTR jako jediný obsahuje celkem 5 domén (navíc má regulační doménu), (obr. 17): dvě transmembránové domény (MSD), dvě nukleotid-vazebné domény (NBD) a jedna regulační doména, která reguluje pohyb chloridových iontů přes membránu díky navázání nebo odtržení fosfátové skupiny (Hanrahan et al., 2013, Rogan et al., 2011, Hunt et al., 2013, Riordan, 1993, Sheppard & Welsh, 1999, Rowe et al., 2005).



Obr. 17: Rozvinutá struktura proteinu CFTR (upraveno podle Maurya et al., 2011).

CFTR protein se v dýchacích cestách nachází na apikální membráně submukózních žlázek, ovšem v potních žlázách se nachází na apikální i na bazální části sekreторických buněk (Vávrová, 2006, Maurya et al., 2011, Muntau, 2009).

5.4.2 Funkce CFTR proteinu

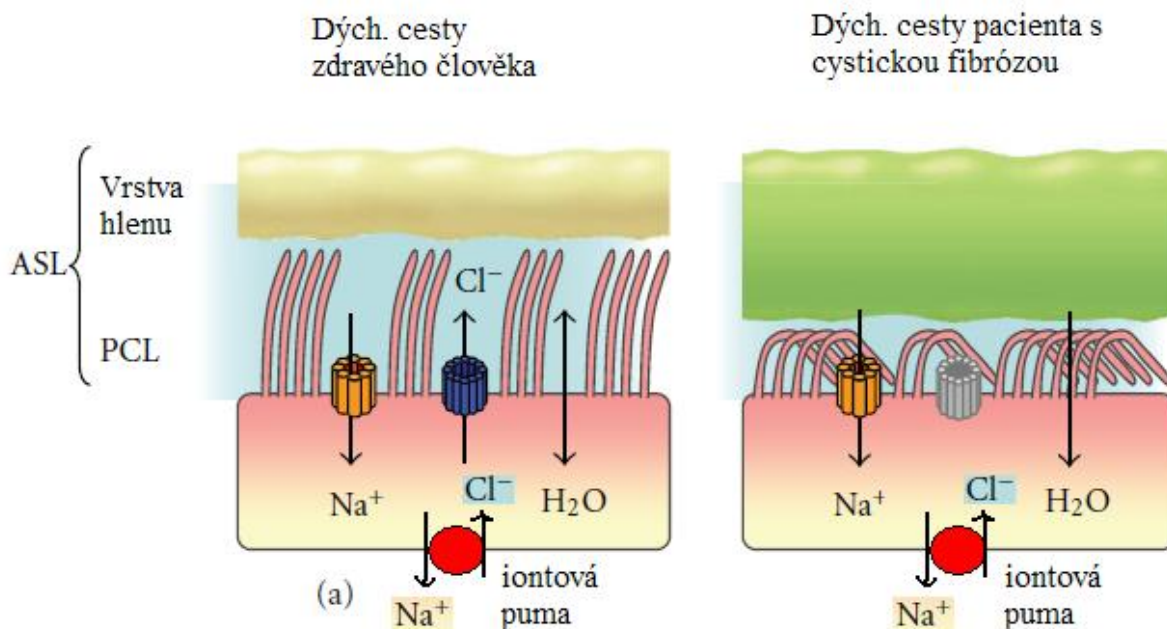
Chloridový transportní kanál CFTR se nachází v apikální plazmatické membráně a pro fungování vyžaduje interakci mezi více doménami. K otevření kanálu je třeba fosforylace serinových reziduí na mnoha místech R domény cAMP-dependentní fosfokinázou A (PKA). Jakmile je R doména fosforylována, je průchodnost kanálu regulována cykly ATP hydrolýzy na doménách NBD, které jsou konformačně aktivní a umožňují otevírání a zavírání kanálu vertikálním posunem R domény. Nakonec proteinové fosfatázy defosforylují doménu R a vrátí kanál do jeho klidového stavu (Vávrová, 2006, Maurya et al., 2011, Muntau, 2009, Hanrahan et al., 2013, Rogan et al., 2011, Hunt et al., 2013, Riordan, 1993, Sheppard & Welsh, 1999, Rowe et al., 2005).

▪ Plíce

Dýchací cesty jsou pokryty tenkou vrstvou (~ 3 mm) roztoku (airway surface liquid – ASL) skládající se z periciliární tekutiny (tekutina, ve které kmitají řasinky) a tenké vrstvy hlenu (Reeves et al., 2012). ASL zachycuje bakterie a cizí částice, zatímco řasinky svým pohybem odstraňují částice ven z plic směrem k ústům = mukociliární clearance (MCC) podporovaný kašlem, čistí dýchací cesty mechanicky. Proces MCC je velmi důležitý obranný mechanismus, který brání plíce před infekcí. Plíce u zdravého člověka jsou sterilní a tato sterilita je udržována komplikovaným obranným mechanismem, navzdory neustálé přítomnosti virů a bakterií ve vzduchu, který dýcháme (Wine, 1999, Reeves et al., 2012).

U cystické fibrózy plíce ztrácejí schopnost udržet sterilní povrch a jsou postupně zničeny bakteriální infekcí (Wine, 1999, Donaldson et al., 2006). Buňky plic obsahují ve své membráně (na straně dýchacích cest) kanály pro transport iontů. (obr. 18). Jeden z kanálů transportuje sodné ionty do buňky, zatímco protein CFTR transportuje Cl^- ven z buňky do hlenu pokrývajícího povrch dýchacích cest. Společně s iontovou pumpou, která se vyskytuje na protější straně membrány, vede chod obou kanálů ke zvýšení chloridových iontů v hlenu a vytváří se tak iontový gradient (vyšší koncentrace směrem ven z buňky). Aby se koncentrace vyrovnaly, dochází k transportu vody, která udržuje hlen zvlhčený. U pacientů s cystickou fibrózou je chloridový kanál nefunkční, což znamená, že chloridové ionty nemohou být

přenášeny do hlenu, tím pádem nevzniká žádný koncentrační gradient, nedochází k transportu vody na povrch a pokrývající hlen je vysušený a hustší (Vávrová, 2006, Wine, 1999, Reeves et al., 2012, Donaldson et al., 2006).



Obr. 18: Dýchací cesty zdravého jedince a pacienta s CF (upraveno podle Reeves et al., 2012).

▪ Potní žlázy

Potní žlázy vylučují především slanou vodu pomocí dvou paralelních mechanismů. Hlavní sekreční dráha není závislá na fungování CFTR kanálu, takže množství potu u CF je normální. Nicméně, reabsorpce soli z potu je výrazně abnormální u pacientů s cystickou fibrózou. Za normálních podmínek se primární pot pohybuje podél potního kanálku a dochází ke vstřebání většiny Na^+ a Cl^- . Epitel potních kanálků má neobvykle vysokou vodivost pro ionty a předpokládá se, že má malou propustnost pro vodu, což umožňuje vstřebávání přebytečné soli z vody. To má za následek produkci zředěné potu, takže se člověk může ochlazovat odpařováním vody z povrchu kůže bez ztráty nepřiměřené množství soli.

U potních kanálků pacientů s CF téměř nedochází k přenosu Cl^- zpět do buňky, jelikož CFTR kanál je jedinou cestou pro transport Cl^- . Dochází také

ke zpomalení transportu sodných iontů, protože CFTR kanál ovlivňuje aktivitu ENaC kanálu v potních kanálcích.

Výsledkem je, že velmi málo NaCl se vstřebává, a proto pot u CF pacientů obsahuje vysoké množství soli. Koncentrace soli je tak vysoká (> 100 mM vs. typické hodnoty 20 nebo 30 mM u zdravých jedinců), že koncentrace chloridů v potu je jedním z nejspolehlivějších fyziologických ukazatelů CF (Vávrová, 2006, Wine, 2003, Mickle et al., 1998, Quinton, 2007).

▪ Slinivka břišní (Pancreas)

CFTR kanály fungují ve slinivce břišní jako transportéry chloridových a hydrogenuhličitanových iontů do lumen pankreatických kanálků. Regulovaný tok iontů udržuje odpovídající objem a pH sekretu, aby bylo umožněno běžné fungování slinivky. Při dysfunkci CFTR se zhoršuje sekrece chloridových a hydrogenuhličitanových iontů a to vede ke snížení objemu více kyselého sekretu. Tento jev způsobuje neprůchodnost pankreatických kanálků, následné poškození a odumírání slinivky. Navíc, akumulace hlenu zabraňuje pohybu trávicích enzymů do dvanáctníku, což vede k poruše vstřebávání tuků, vitaminů rozpustných v tucích a podvýživě (Rosenstein & Zeitlin, 1998, Walkowiak et al., 2008, Taylor & Aswani, 2002).

5.5 Příznaky cystické fibrózy

- Obecně (v jakémkoliv věku)
 - Cystická fibróza v rodinné anamnéze
 - Slaný pot na kůži
 - Paličkovité prsty
 - Při vykašlávání přítomnost sekretu
 - *Pseudomonas aeruginosa* izolovaná ze sekretu dýchacích cest
- Novorozenci
 - Neprůchodnost střeva
 - Vleklá žloutenka
 - Kalcifikace (zvápenatění) břišního svalu
- Rané dětství

- Trvalé infiltráty na rentgenu hrudníku
 - Neprospívání
 - Otok celého těla nebo snížená hladina krevních bílkovin (hypoproteinémie)
 - Chronický průjem
 - Roztažení stěny břišní
 - Porucha tvorby a sekrece žluči (cholestáza)
 - Infekce způsobená patogenem *Staphylococcus aureus*
 - Zvýšení nitrolebního tlaku (nedostatek vitamínu A)
 - Rozpad červených krvinek (hemolytická anemie, nedostatek vitamínu E způsobuje anemii zvýšením křehkosti a snížením životaschopnost červených krvinek)
- Dětství
 - Zánět všech vedlejších nosních dutin
 - Nadměrné množství tuku ve stolici (steatorea)
 - Výhřez konečníku (rektální prolaps)
 - Ucpání střeva zahuštěným obsahem nebo vchlípení střeva
 - Záněty slinivky
 - Nemoci jater
- Puberta a dospělost
 - Alergie na houbu z rodu *Aspergillus* (aspergilóza)
 - Zánět všech vedlejších nosních dutin nebo vychlípení sliznice vedlejších nosních dutin do nosní dutiny (nosní polypóza)
 - Abnormálně rozšířené průdušky
 - Vykašlávání krve
 - Záněty slinivky
 - Opožděná puberta
 - Azoospermie

(O'Sullivan & Freedman, 2009)

5.6 Diagnóza

Obecně se diagnóza CF provádí u pacientů s klinickými příznaky nemoci. Klinické podezření se potvrdí potním testem a následným molekulárně-genetickým vyšetřením. Potní test je považován za nejspolehlivější metodu pro rozpoznání CF. U cystické fibrózy je obsah chloridů vyšší než 60 mmol/l, za hraniční hodnoty se považují hodnoty mezi 30 – 60 mmol/l. Při pozitivním výsledku se test opakuje apokud stále zůstává klinické podezření na CF, test se opakuje i při negativním výsledku. Mezi další diagnostické metody patří vyšetření funkce slinivky, bakteriologické vyšetření a novorozenecký screening. V České republice je v základním novorozeneckém screeningu zahrnuto celkem 13 onemocnění. Vyšetření se provádí ze suché kapky krve a tento test musí podstoupit každý novorozenec narozený v České republice (Holubová et al., 2007). Cystická fibróza byla do seznamu chorob přidána v říjnu roku 2009 a její stanovení se provádí měřením imunoreaktivního trypsinogenu (IRT) z krevních skvrn novorozenců. Velmi vysoké koncentrace IRT naznačují poškození slinivky spojené s CF ale v malém procentu případů zvýšená koncentrace IRT nemusí souviset s cystickou fibrózou (test pro ni není specifický). Pro pacienty se zvýšenou hladinou IRT se v druhém kole vyšetřuje gen pro CF (O'Sullivan & Freedman, 2009, Muntau, 2009, Rosenstein & Zeitlin, 1998, <http://www.cfklub.cz/Novorozenecky-screening>).

5.7 Terapie

V současné době je cystická fibróza léčená, avšak zatím patří mezi nevyléčitelná onemocnění. Včasná diagnóza CF spolu s komplexním léčebným plánem může výrazně zlepšit kvalitu života pacientů. Podstata léčby spočívá zejména ve zmírnění obtíží, které cystická fibróza vyvolává. Hlavní cíle symptomatické léčby CF jsou:

- Prevence a kontrola plicních infekcí
- Uvolnění a odstranění silného, lepkavého hlenu z plic
- Léčba nebo prevence ucpaní střev
- Poskytování dostatečné výživy
- Prevence dehydratace (nedostatek tekutin v těle)

(Muntau, 2009, O'Sullivan & Freedman, 2009)

5.7.1 Léčba respiračních příznaků

Hlavními prvky léčby plicních problémů u lidí s CF je pohybová fyzioterapie, dechové cvičení a léky. Cvičení slouží k uvolnění a odstranění hlenu, zbavení se nečistot a bakterií v plicích a tím zlepšení dechového objemu.

K inhalační léčbě se využívá roztoku kuchyňské soli o (0,9-3%, v některých případech až 7%), který napomáhá rozpuštění sekretu. Někdy se přidávají i látky rozšiřující průdušky (bronchodilatancia) uvolňující neprůchodnost, což napomáhá lepšímu odstraňování hlenu. Mezi další inhalované látky patří antibiotika (tobramycin, amikacin), které potlačují infekci v plicích nebo inhalace DNásy, jelikož v hleny je vysoká koncentrace DNA z rozpadlých leukocytů. DNása se využívá k odstranění vysoce viskózního a elastického hlenu z plic (Muntau, 2009).

Při protizánětlivé terapii se podávají kortikosteroidy a v některých případech i ibuprofen ve vysokých dávkách (O'Sullivan & Freedman, 2009). Antibiotická terapie se využívá především k prevenci a léčbě plicních infekcí. Antibiotika mohou být perorální a léčí se s nimi hlavně mírnější formy infekce. Inhalační antibiotika se podávají pro prevenci a kontrolu infekcí způsobených bakteriemi rodu *Pseudomonas* a u častých nebo těžce léčitelných infekcí se využívají antibiotika intravenózní podávaná především v nemocnici. Antibiotická terapie je často kombinována s protizánětlivou terapií (Muntau, 2009, O'Sullivan & Freedman, 2009, <http://www.cfklub.cz/admin/files/File/01-Prirucka-o-vyzive-u-nemocnych-CF.pdf>).

5.7.2 Léčba zažívacích obtíží

Cystická fibróza způsobuje mnoho problémů se zažíváním jako objemné stolice, otok břicha, těžké zácpy nebo plynatost. Zažívací problémy mohou vést ke špatnému růstu a špatnému vývoje u dětí, a proto je cílem léčby dostatečné prospívání, dobrý růst a včasný pubertální vývoj.

Strava u pacientů s CF by měla být vysokokalorická – 130-150 % normální potřeby zdravého jedince. Dále se zvyšuje přísun tuků a vitaminovými doplňky se nahrazují v tucích rozpustné vitamíny (A, D, E, K), jelikož u CF je pozorován nedostatek těchto vitamínů v těle.

Cystická fibróza způsobuje pankreatickou nedostatečnost = enzymy ze slinivky se nedostanou do tenkého střeva, aby mohly trávit potravu, proto je potrava z těla vyloučena objemnou stolicí, která ovšem obsahuje velké množství tuku. Proto je nutné před každým jídlem užívat enzymatické přípravky (Muntau, 2009, O'Sullivan &

Freedman, 2009, <http://www.cfklub.cz/admin/files/File/01-Prirucka-o-vyzive-u-nemocnych-CF.pdf>).

5.7.3 Transplantace plic

Transplantace plic je konečná terapeutická alternativa pro pacienty s terminálním onemocněním plic. Transplantace potenciálně prodlouží a výrazně zlepší kvalitu života u řádně vybraných pacientů. Opatrný přístup výběru vhodných pacientů pro transplantaci zlepšuje poměr rizika a benefitů z tohoto náročného chirurgického zákroku. V Evropě není obvyklé, aby transplantaci plic podstupovaly děti s cystickou fibrosou, pokud ovšem nemají prognózu života kratší než 2 roky i přes maximální zdravotní léčbu. Transplantace plic u dětí do 5 let přežívá méně než polovina pacientů, o něco málo lepších výsledků se dosahuje u dospělých pacientů, kdy 50 % příjemců zůstává naživu průměrně 6 let po transplantaci (Muntau, 2009, O'Sullivan & Freedman, 2009, Sanders et al., 2006).

5.7.4 Genová terapie

I přes naklonování *CFTR* genu v roce 1989 (Riordan et al., 1989) tento objev i po 20 letech nepřinesl praktické výsledky pro pacienty s CF v oblasti genové terapie. Pro léčbu autosomálně recesivních onemocnění jako cystická fibróza by mělo být možné, nezávisle na třídě mutace, vložit jednu kopii normálně fungující molekuly DNA do postižené buňky a podle ní by se v buňce měl vytvořit zcela funkční protein. Ačkoliv se tento proces jeví jednoduše, v praxi se tento postup ukazuje být velmi náročný (O'Sullivan & Freedman, 2009, Anson et al., 2006).

Počáteční pokusy s adenovirovými vektory se ukázaly být nepraktické kvůli imunogenicitě (schopnost antigenů navodit imunitní odpověď) a nízké výnosnosti virových vektorů při vkládání DNA do epiteliálních buněk. Jako dalšími potenciálními vektory byly označeny AAV (adeno-associated viruses), které měly napravit pohyb chloridových iontů v nosních epiteliálních buňkách, ovšem výsledky z klinických pokusů nevedly k výraznému zlepšení spirometrických hodnot. Existuje ale řada nedostatků, které brání rozvoji genové terapie: vhodné techniky pro doručení genu, složitost interakcí mezi hostitelem a vektorem a různá povaha nemoci u cystických fibrotiků (O'Sullivan & Freedman, 2009, Anson et al., 2006).

Mezi nejnovější vědecké přístupy jak provádět genovou terapii patří metoda SMaRT (spliceosome-mediated RNA trans-splicing), která nabízí nový přístup k cílovým buňkám, které přirozeně exprimují gen cystické fibrózy. Jedna z výhod této

metody je redukována velikost přenášeného genu, což umožňuje použití většího množství technologií pro doručení genu. Oprava genu touto metodou probíhá pouze v buňkách, které mají vadnou mRNA a protein, může tak obnovit částečnou funkci v buněčné kultuře a in vivo modelech s tímto onemocněním. Jako první o této technice publikoval Xiaoming Liu se spolupracovníky (Liu et al., 2002).

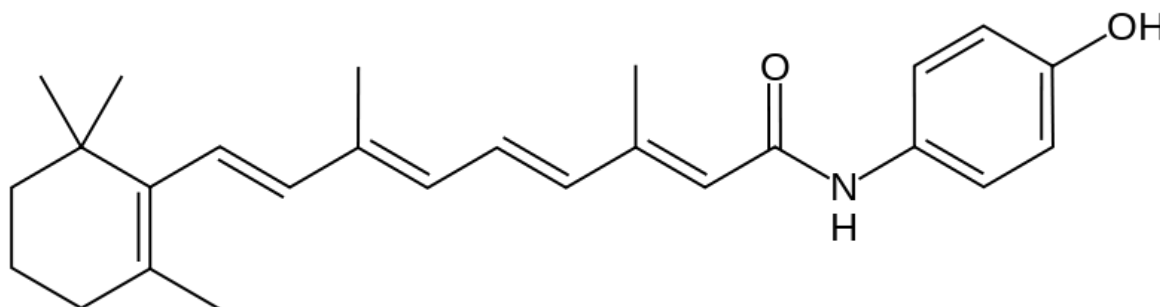
6 Retinoidy

6.1 Úvod

Retinoidy jsou přírodní a syntetické látky odvozené od vitamínu A (retinol), které se účastní mnoha buněčných procesů. Přírodní retinoidy jsou zapojeny do fyziologie zraku a morfogeneze (formování tkání) během embryonálního vývoje. Retinoidy hrají také důležitou roli při regulaci růstu a diferenciaci různých typů normálních a zhoubných buněk a mohou tedy různými způsoby inhibovat proliferaci buněk, indukovat diferenciaci a vyvolat buněčnou smrt (apoptóza). Díky svým aktivitám jsou hojně studovány jako léčiva pro proliferativní onemocnění, zejména rakoviny a onemocnění kůže (Brun et al., 2012, Simoni & Tolomeo, 2001).

6.2 Fenretinid

Jedním ze syntetických retinoidů je fenretinid (N-(4-hydroxyphenyl) retinamid, 4-HPR), konkrétně se jedná o analog *all-trans* kyseliny retinové, který vznikl modifikací karboxylové skupiny retinové kyseliny N-4 hydroxyfenylovou skupinou (obr. 19). Tím vznikla látka s vyšší efektivitou jako chemopreventivní činidlo za současného snížení toxicity v porovnání s ostatními retinoidy. Fenretinid byl a v současnosti je zkoumán jako potenciální léčivo pro léčbu rakoviny (Cazzaniga et al., 2012), cystické fibrózy (Guilbault et al., 2009) nebo revmatoidní artritidy (Haraoui et al., 1985). Svou cytotoxickou aktivitou projevuje také vůči různým lidským rakovinným buňkám jako rakovinné buňky plic, neuroblastom (nervové buňky) nebo gliom (mozkové buňky). Jak se ukázalo v několika studiích, účinky fenretinidu závisí koncentraci léku (Cooper et al., 2011, Formelli et al., 2008, Wu et al., 2001).



Obr. 19: Struktura fenretinidu

Fenretinid byl poprvé syntetizován ve Spojených státech na konci 60. let Ganderem (Gander & Gurney, 1980) a jeho biologickou aktivitu testovaly Sporn a Newton (Sporn & Newton, 1979), kteří mimo jiné ukázali, že se tento lék přednostně kumuluje v prsou a ne v játrech. Během dalších studií se ukázalo, že 4-HPR je méně toxický než mnoho jiných retinoidů. Jeho chemopreventivní účinky byly dokázány ve studii z roku 1979 Moonem (Moon et al., 1979), kdy inhiboval chemicky indukovaný prsní karcinom u krys. Poté byly prokázány jeho chemopreventivní účinky proti recidivě rakoviny prsu u premenopauzálních žen (Costa et al., 1994, Cazzaniga et al., 2012).

Mezi hlavní identifikované metabolity fenretinidu patří N-(4-methoxyphenyl) retinamide (4-MPR) a aktivní 4-oxo-N-(4hydroxyphenyl)retinamide (4-oxo-4-HPR), nedávno identifikovaný metabolit s modifikací na pozici 4 cyklohexenového kruhu. 4-MPR se hojně vyskytuje v plasmě a in vitro je neefektivní jako inhibitor růstu téměř všech testovaných buněčných linií. Naproti tomu 4-oxo-4-HPR se vyznačuje antiproliferačním a proapoptotickým efektem a zdá se být účinnější než 4-HPR (Illingworth et al., 2011). Inhibiční koncentrace IC₅₀ 4-oxo-4-HPR byla 2-4x nižší než koncentrace 4-HPR u všech testovaných buněčných linií. Tento test prováděl Villani v roce 2006 (Villani et al., 2006).

Fenretinid vyvolává apoptózu primárně prostřednictvím mechanismu nezávislého na receptoru (receptor-independent mechanism), který je doprovázen zvýšením signálních molekul, např. ceramidy (blokuje buněčný cyklus a podporují apoptózu) nebo kaspásy (spouští apoptózu). Fenretinid také indukuje apoptózu uvolněním reaktivních forem kyslíku (proces nezávislý na receptor-independent mechanism) (Wu et al., 2001).

U pacientů s cystickou fibrózou dochází k nerovnováze polynenasycených mastných kyselin, a to snížením hladiny kyseliny dokosaheptaenové (DHA) a zvýšení hladiny kyseliny arachidonové (AA). DHA je omega-3 mastná kyselina a její metabolity jsou protizánětlivé resolviny a protektiny. Na druhou stranu AA je omega-6 mastná kyselina a tvoří prozánětlivé eikosanoidy: prostaglandiny a leukotrieny. Fenretinid dokáže tyto abnormality normalizovat, snižuje prozánětlivé metabolity AA a zvyšuje protizánětlivé resolviny a protektiny (Wu et al., 2001, Illingworth et al., 2011, Formelli et al., 2008, Guilbault et al., 2009).

PRAKTICKÁ ČÁST

7 Materiál

7.1 Biologický materiál

Plasmy *CFTR*-knockoutovaných a WT myší byly získány z McGill University Health Centre v Montrealu.

7.2 Přístrojové vybavení

Vortex (V-1 Plus, Biosan, Riga, Latvia), centrifuga (Rotina 420R, Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Německo), pH metr Intelli-stirrer MSH-300i (Biosan, Riga, Latvia), kapalinový chromatograf UltiMate 3000 RS (Dionex, Sunnyvale, CA) tandemový hmotnostní spektrometr QTRAP 5500 (AB Sciex, Foster City, CA, USA).

7.3 Použité chemikálie

Voda LC-MS (Sigma Aldrich Chemie, USA), acetonitril (LC-MS Chromasolv, Fluka, dodala Sigma-Aldrich Chemie, Německo), methanol (LC-MS Chromasolv, Fluka, dodala Sigma-Aldrich Chemie, Německo), kyselina octová (eluent additive for LC-MS, (Chromasolv, Fluka, dodala Sigma-Aldrich Chemie, Německo), hydroxid amonný ($\geq 25\%$ in H₂O, eluent additive for LC-MS, (Chromasolv, Fluka, dodala Sigma-Aldrich Chemie, Německo).

7.4 Příprava mobilní fáze

Mobilní fáze A je roztok 20 mM-acetátu amonného o pH 9,45. K 0,5 l vody se přidalo 0,573 ml kyseliny octové a poté se roztok titroval hydroxidem amonným na pH 9,45. Jako mobilní fáze B byl použit acetonitril.

8 Příprava vzorků plasmy, vzorků kontroly kvality a „blanku“

Zamražená plasma se nechala rozmrazit na ledu a poté byla zvortexována. Do ependorfek se odebraly 2 µl plasmy, přidalo se 8 µl vody a 30 µl methanolu. Vzniklá směs se 15 s vortexovala a poté byla vložena do centrifugy (15800 g; 15 min) při 20°C. Ze vzniklého supernatantu bylo odebráno 40 µl do vialek s insertem.

Pro kontrolu kvality bylo ze supernatantu každého vzorku odebráno 7 µl, které byly následně smíchány dohromady do jedné vialky s insertem.

Příprava blanku probíhala stejným způsobem jako příprava vzorků plasmy, ovšem místo 2 µl plasmy se odebraly 2 µl vody.

8.1 Plasma *CFTR*-KO myši

Myši plasmy byly rozděleny do 4 skupin podle genotypu a typu léčby (tab. 3). Léčba fenretinidem probíhala 28 dní (inhalačně) a plasma byla odebrána 4 hodiny po poslední dávce léku. V případě neošetřených myši se podával 28 dní ethanol (inhalačně).

- Wild Type (WT)
- WT léčený fenretinidem, odebrání plasmy
- *CFTR*-KO
- *CFTR*-KO myši léčené fenretinidem, odebrání plasmy

Tab 3. Rozdělení myši podle genotypu a typu léčby.

Genotyp		Léčba	Genotyp		Léčba
GROUP 1	WT	EtOH	GROUP 2	WT	FEN
	WT	EtOH		WT	FEN
	WT	EtOH		WT	FEN
	WT	EtOH		WT	FEN
	WT	EtOH		WT	FEN
	WT	EtOH		WT	FEN
	WT	EtOH		WT	FEN
	WT	EtOH		WT	FEN

GROUP 3	KO-Cftr	EtOH	GROUP 4	KO-Cftr	FEN
	KO-Cftr	EtOH		KO-Cftr	FEN
	KO-Cftr	EtOH		KO-Cftr	FEN
	KO-Cftr	EtOH		KO-Cftr	FEN
	KO-Cftr	EtOH		KO-Cftr	FEN
	KO-Cftr	EtOH		KO-Cftr	FEN
	KO-Cftr	EtOH		KO-Cftr	FEN
	KO-Cftr	EtOH		KO-Cftr	FEN

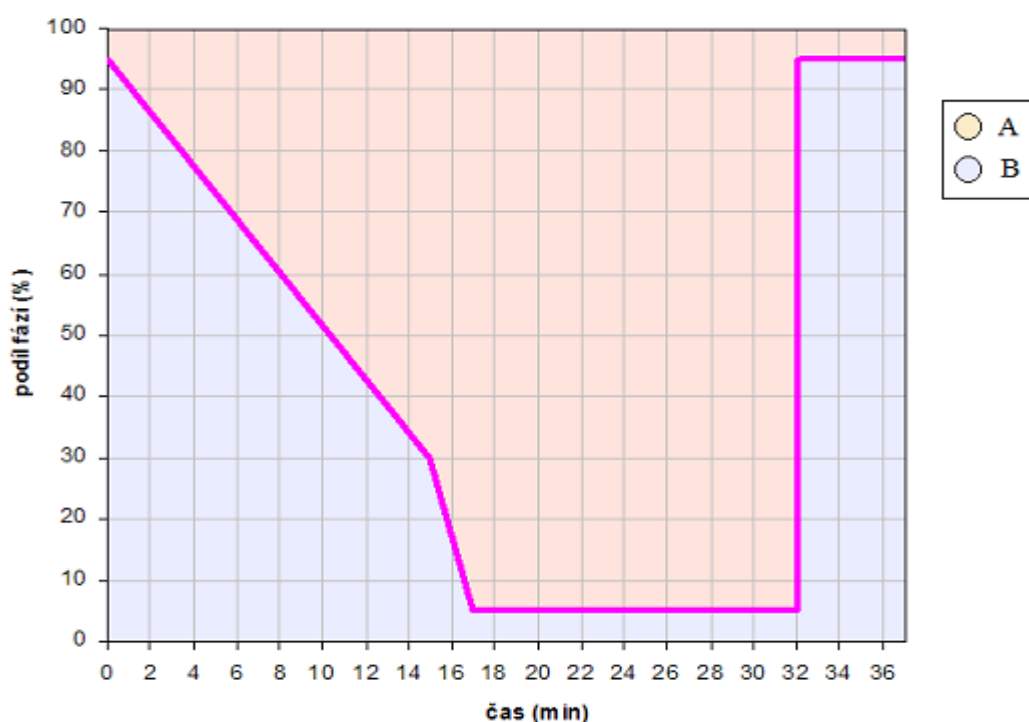
9 Metoda

Metabolity obsažené v plasmě *CFTR-KO* myši byly analyzovány vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií (HPLC-MS-MS).

Chromatografická separace probíhala na přístroji UltiMate 3000 RS za použití aminopropylkové kolony Luna (Phenomenex, CA, USA) termostatované na teplotu 25 °C (velikost částic stacionární fáze byly 3 µm a délka kolony byla 150 mm). Nástřik vzorku byl 10 µl.

Pro tuto metodu byla použita gradientová eluce o rychlosti průtoku mobilní fáze 0,3 ml/min (obr. 20). Mobilní fází A byl octan amonný (20 mmol/l; pH 9,45), mobilní fáze B byl acetonitril. Na začátku analýzy byl poměr fází A a B 95% a 5%. Během 15 minut se procento mobilní fáze B postupně snížilo na 30% a za další 2 minuty klesl obsah mobilní fáze B na 5% a obsah mobilní fáze A tedy na 95%. V 32. minutě se obsah mobilních fází vrátil do původního stavu za 0,1 minut (95% B, 5% A) a tento stav trval až do konce analýzy v 37. minutě.

Pro detekci a kvantifikaci byl použit tandemový hmotnostní spektrometr (QTRAP 5500 (AB Sciex, Foster City, CA, USA) s ionizací elektrosprejem. Hmotnostní spektrometr pracoval v režimu MRM (multiple reaction monitoring) a jeho nastavení je uvedeno v tabulce 4.



Obr 20: Průběh gradientové eluce v chromatografickém systému. Mobilní fáze A: 20 mmol/l octan amonný (pH 9,45), mobilní fáze B: acetonitril.

Tab. 4: Parametry MS/MS použité při cílené metabolické analýze.

Parametr	Hodnota	Jednotka
tlak „curtain gas“	30	psi
tlak kolizního plynu	medium	psi
tlak zmlžujícího plynu	40	psi
tlak sušícího plynu	40	psi
napětí na kapiláře v iontovém zdroji	+/-4500	V
teplota zmlžujícího plynu	400	°C
rozlišení kvadrupólů	unit	
pause time	3	ms

Metoda byla naladěna na 425 látek, konkrétně 234 v pozitivním módu (tab. 5) a 191 v negativním (tab. 6).

Tab. 5: Látky v pozitivním módu seřazené podle RT (RT - retenční čas, Q1 - rodičovský ion, Q3 - dceřiný ion, DP[V] - deklasterační potenciál, EP[V] - vstupní potenciál, CE[V] - kolizní energie, CXP[V] - výstupní potenciál kolizní cely).

Látka s ST	RT	Q1	Q3	DP	EP	CE	CXP
ST359 - ubiquinone	1,6	250,9	218,9	76	10	19	22
ST227 - vitamin K	1,7	172,6	105	191	10	27	10
ST074 - vitamin D2	1,7	397,2	91,1	66	10	85	12
ST169 - 11-deoxycorticosterone	1,8	331,1	109	111	10	25	6
ST066 - topiramate	1,8	340,1	263,9	136	10	13	20
ST181 - cholesterol	1,9	387,1	105	146	10	21	10
ST399 - N-acetyltyrosine	1,9	224	135,9	26	10	25	14
ST229 - 2-aminophenol	2,1	109,9	65,1	71	10	29	6
ST172 - 6-hydroxymelatonin	2,1	248,9	189,9	51	10	23	16
TKI - Nilotinib	2,2	530,1	289,1	111	10	43	24
ST144 - Gly-Gly-ethylester	2,2	161	104	26	10	15	10
ST085 - benzylamine	2,2	108	65,1	36	10	37	8
ST183 - dihydrouracil	2,3	114,9	72,9	91	10	17	10
ST224 - nicotinamide	2,4	122,9	79,9	1	10	27	8
ST049 - N-acetylserotonin	2,5	218,9	159,9	101	10	21	14
ST216 - thymine	2,8	126,9	109,9	96	10	23	10
ST164 - thymidine	3,7	242,9	126,8	61	10	17	12
ST249 - deoxyuridine	4,4	228,9	113	91	10	23	12
ST304 - 5'-methylthioadenosine	4,5	297,9	135,9	51	10	27	14
TKI - Dasatinib	4,6	488	232,1	111	10	55	18
ST205 - deoxyadenosine	5	251,9	118,9	36	10	59	10
ST368 - 3-methoxytyramine	5,1	167,9	119	41	10	25	12
C18-4	5,1	420,6	85	98	10	57	15
C18-3	5,1	422,6	85	98	10	57	15
C18-2	5,1	424,3	85,1	89	10	54	15
C18-1	5,1	426,4	85,1	89	10	55	15
C18	5,1	428,4	85,1	96	10	63	15
C18-1OH	5,1	442,4	85,1	92	10	57	15
C20-2	5,1	452,7	85	102	10	60	15
C20-1	5,1	454,7	85	102	10	60	15
C20	5,1	456,7	85	100	10	60	15
C20-D3	5,1	459,7	85	102	10	60	15
C22-5	5,1	474,7	85	106	10	65	15
C22-2	5,1	480,7	85	106	10	65	15
C22-1	5,1	482,7	85	106	10	65	15
C22	5,1	484,7	85	106	10	65	15
C20-DC	5,1	486,7	85	103	10	62	15
C22-D3	5,1	487,7	85	106	10	65	15
C22-DC	5,1	514,7	85	106	10	65	15
C26-2	5,1	536,9	85	112	10	69	15

Látka s ST	RT	Q1	Q3	DP	EP	CE	CXP
C26-1	5,1	538,9	85	112	10	69	15
C26	5,1	540,9	85	112	10	69	15
C26-D3	5,1	543,9	85	112	10	69	15
C26-DC	5,1	570,9	85	112	10	69	15
C14-2	5,2	368,3	85,1	78	10	47	15
C14-1	5,2	370,3	85,1	78	10	47	15
C14	5,2	372,3	85,1	86	10	45	15
C12-DC	5,2	374,3	85,1	86	10	45	15
C14-2OH	5,2	384,3	85,1	81	10	49	15
C14-1OH	5,2	386,3	85,1	81	10	50	15
C16:2	5,2	396,3	85,1	83	10	51	15
C16-1	5,2	398,3	85,1	84	10	51	15
C16	5,2	400,3	85,1	84	10	51	15
C16:2-OH	5,2	412,3	85,1	86	10	53	15
C16-1OH	5,2	414,3	85,1	87	10	53	15
C16OH	5,2	416,3	85,1	87	10	53	15
ST219 - creatinine	5,2	113,9	86	46	10	15	10
C12:1	5,3	342,3	85,1	73	10	44	15
C12	5,3	344,3	85,1	73	10	44	15
C10-2	5,4	312,2	85,1	67	10	40	15
C10-1	5,4	314,2	85,1	68	10	40	15
C10	5,4	316,2	85,1	56	10	37	15
TKI - Imatinib	5,5	494,1	394,2	111	10	39	32
C6DC, C7OH	5,5	290,2	85,1	63	10	37	15
C9	5,5	302,2	85,1	66	10	39	15
C7-DC	5,5	304,2	85,1	66	10	39	15
C8-1	5,6	286,2	85,1	63	10	37	15
C8	5,6	288,2	85,1	66	10	33	15
ST035 - normetanephine	5,8	183,9	134	51	10	27	10
ST189 - riboflavin	5,8	376,9	243	11	10	33	20
ST210 - adenosine	5,9	267,9	118,9	41	10	67	10
C6:1	5,9	258,2	85,1	57	10	33	15
C6	5,9	260,2	85,1	56	10	27	15
C4DC, C5OH	5,9	262,2	85,1	58	10	33	15
C5:1-DC	5,9	274,1	85,1	60	10	35	15
C5DC	5,9	276,2	85,1	61	10	35	15
C5-1	6,1	244,2	85,1	55	10	31	15
C5	6,1	246,2	85,1	46	10	29	15
C3DC, C4OH	6,1	248,1	85,1	55	10	32	15
STx06 - Alr	6,1	216,2	84	46	10	19	10
ST153 - cytosine	6,2	111,9	94,8	96	10	27	10
ST440 - 4-Pyridoxate	6,3	184	148,2	56	10	29	12
C4:1	6,4	230,1	85,1	52	10	29	15
C4	6,4	232,2	85,1	46	10	29	15

Látka s ST	RT	Q1	Q3	DP	EP	CE	CXP
ST403 - 2-picolinic acid	6,5	123,9	106	16	10	15	10
ST309 - g-GluCys	6,5	251	149	61	10	29	14
ST206 - adenine	6,5	135,9	118,9	171	10	31	14
ST156 - pyridoxine	6,7	169,9	133,9	121	10	29	12
ST041 - spermine	6,7	203,9	138	66	10	17	12
STx04 - AICAr	6,7	259,1	110	61	10	31	10
ST028 - N-acetylgalactosamine; ST380 - N-acetylglucosamin; ST341 - N-acetylmannosamine	6,7	221,9	144	51	10	21	14
ST341 - N-acetylmannosamine; ST028 - N-acetylgalactosamine; ST380 - N-acetylglucosamine	6,7	221,9	125,9	46	10	17	14
ST089 - metanephine	6,7	197,9	165	36	10	25	14
C3:1	6,8	216,1	85,1	49	10	27	15
C3	6,8	218,1	85,1	46	10	29	15
C3-OH	6,8	234,1	85,1	53	10	30	15
ST380 - N-acetylglucosamine; ST028 - N-acetylgalactosamin; ST341 - N-acetylmannosamine	6,9	221,9	138,1	41	10	23	16
ST013 - serotonin	6,9	176,9	114,9	36	10	39	12
ST286 - cytidine	7	244	111,9	31	10	27	10
ST101 - betaine	7	118	58,1	161	10	39	8
ST230 - thiamin	7,1	265,9	123	36	10	25	12
STx05 - FAICAr	7,1	287,1	138	56	10	31	12
C2	7,4	204,1	85,1	41	10	27	15
ST328 - pyridoxal	7,6	167,9	93,9	31	10	31	10
ST435 - Trigonelline	7,6	138	92,1	1	10	29	10
ST243 - Leu/ST242 - Ile/ST241 - Alloile/ST009 - NorLeu	7,6	132	85,9	46	10	15	10
ST260 - guanine	7,7	152	81,9	76	10	37	10
ST179 - glucosamine	7,8	179,9	84	51	10	19	10
ST046 - galactosamine	7,8	180	72	21	10	21	8
ST031 - pipercolic a.	7,8	129,9	84,1	51	10	23	10
ST176 - kynurenine	7,9	208,9	93,9	56	10	21	10
ST245 - phenylalanine	8	165,9	119,9	36	10	19	12
ST042 - homocysteine	8	135,9	91	136	10	33	10
ST139 - N.N-dimethylglycine/ST062 - 2-aminoisobutyric acid	8	103,9	58	63	10	18	8
ST001 - valine	8,1	117,9	72,1	56	10	17	8
ST203 - deoxyinosine	8,1	252,9	136,9	51	10	19	12
ST382 - selenomethionine	8,1	197,9	108,8	56	10	31	12
ST393 - hexanoylglycine	8,2	173,9	75,9	51	10	13	10
ST010 - methionine	8,2	149,9	104	41	10	15	10
ST003 - tryptophan	8,2	204,9	145,8	41	10	25	14
ST019 - cysteate	8,3	169,9	105,8	96	10	27	12
ST324 - taurocholate	8,3	516	337,1	186	10	33	28

Látka s ST	RT	Q1	Q3	DP	EP	CE	CXP
ST240 - 5-aminolevulinate; ST170 - creatine	8,3	131,9	89,9	61	10	19	8
ST057 - N-acetylputrescine	8,4	131	71,9	76	10	21	8
ST208 - hypoxanthine	8,4	136,9	109,9	136	10	29	10
ST007 - proline	8,5	115,9	69,9	31	10	21	8
ST211 - guanosine	8,5	284	151,9	51	10	27	14
ST315 - carnitine	8,6	161,9	102,9	56	10	23	10
ST109 - phenylserine	8,6	181,9	118	36	10	21	10
ST117 - benzoyl-Ala	8,6	193,9	105	46	10	23	8
ST122 - AlaPhe	8,7	236,9	166	46	10	17	14
ST065 - protoporphyrin	8,7	563	445,2	231	10	67	34
ST251 - guanidinoacetate	8,7	117,9	75,9	51	10	17	8
ST064 - N-methylhistamine	8,8	125,9	109	56	10	19	10
ST029 - 3-aminoisobutyrate	8,8	104	86,1	56	10	11	8
ST395 - tiglylGly/ST390 - 3-methylcrotonylGly	8,8	157,9	83	40	10	13	8
ST053 - hippurate	8,9	179,8	104,9	36	10	19	10
ST118 - LeuTyr	8,9	295	182	56	10	17	20
ST022 - alanine/ST237 - sarcosine; ST005 - beta-Alanine	8,9	89,9	44,1	51	10	23	6
ST236 - 4-hydroxyproline	8,9	131,9	85,8	41	10	19	10
ST063 - 4-guanidinobutanoate	9	145,9	86,9	51	10	21	10
ST125 - GlyPhe	9	222,9	119,9	61	10	29	12
ST127 - AlaMet	9	220,9	149,8	61	10	17	14
ST209 - inosine	9,1	268,9	136,9	81	10	21	12
ST134 - 3-methylhistidine; ST060 - N-methylhistidine	9,1	169,9	123,9	46	10	21	14
ST002 - tyrosine	9,1	181,9	136	46	10	19	12
ST362 - 7,8-dihydroneopterin	9,1	256	164,9	21	10	31	16
ST124 - AlaVal/ST114 - AlaNorval	9,2	188,9	117,9	41	10	15	10
ST086 - canavanine	9,3	177,1	76	31	10	21	10
ST103 - GlyLeu/ST128 - GlyNorleu	9,3	188,9	132	45	10	17	12
ST021 - asparagine	9,3	132,943	74,1	36	10	21	8
ST161 - 5-oxoproline I	9,3	129,9	84	51	10	19	10
ST267 - 5-hydroxytryptophane	9,4	220,9	161,9	46	10	25	16
ST121 - LeuGlyGly	9,4	245,9	86	51	10	21	10
ST005 - beta-Alanine; ST022 - alanine/ST237 - sarcosine	9,4	89,9	71,9	26	10	13	8
ST004 - threonine/ST160 - homoserine	9,4	119,9	73,9	41	10	15	8
ST342 - N-acetyloronithine	9,6	174,9	114,9	51	10	17	12
ST025 - 4-aminobutanoate	9,6	104	68,9	56	10	21	8
ST238 - glutamine	9,6	146,9	83,9	66	10	25	10
ST239 - glycine	9,7	75,9	29,9	41	10	27	8
ST115 - GlyNorval	9,7	174,9	72	56	10	23	8
ST095 - 6-aminohexanoate	9,7	132	79	36	10	23	10

Látka s ST	RT	Q1	Q3	DP	EP	CE	CXP
ST130 - GlyVal	9,8	174,9	118	51	10	17	12
ST006 - serine	9,8	105,8	60	16	10	15	8
ST083 - 1-aminocyclopropane-1-carboxylate	10	101,9	56	31	10	17	8
ST308 - choline	10	104,3	60	36	10	23	8
ST015 - histidine	10	155,9	110	46	10	19	10
ST112 - GlyTrp	10,1	261,9	188	56	10	25	16
ST044 - homoarginine	10,1	188,9	84	76	10	31	8
ST060 - N-methylhistidine; ST134 - 3-methylhistidine	10,1	169,9	96	41	10	27	10
ST254 - dihydrothymine	10,1	128,8	62	111	10	37	8
ST322 - beta-Alanyl-N-methylhistidine	10,3	240,8	108,8	46	10	33	12
ST111 - AlaAla	10,3	160,9	89,9	66	10	15	10
ST253 - S-adenosylhomocysteine	10,3	384,9	135,9	56	10	29	12
ST120 - AlaPro	10,3	186,8	104,8	66	10	23	10
ST132 - GlySer	10,7	162,9	84,1	41	10	25	8
ST248 - homocarnosine	10,8	240,8	155,9	41	10	15	14
ST052 - carnosine	10,9	226,9	109,9	86	10	33	10
ST161 - 5-oxoproline II	11	129,9	83,9	51	10	19	10
ST038 - biotin	11,1	244,7	227	61	10	21	18
ST123 - GlyAla	11,1	146,9	89,9	56	10	15	10
ST034 - ornithine	11,2	132,9	115,6	51	10	13	12
ST119 - GlyTyr	11,2	238,9	136	1	10	27	12
ST246 - lysine	11,2	146,9	84	66	10	23	10
ST107 - AlaAsn	11,3	203,9	133,1	46	10	17	12
ST129 - AlaGlyGly	11,5	203,9	129	36	10	13	12
ST104 - GlyGly	11,7	132,9	75,9	51	10	15	10
ST131 - GlyAsp	11,9	189,9	132,9	31	10	19	16
ST014 - homocystine	12	268,9	135,9	56	10	15	12
ST108 - GlyGlyGly	12,1	189,6	114,8	46	10	13	10
ST110 - GlyGlyGlyGly	12,2	246,9	115,1	56	10	25	14
ST040 - cystathionine	12,7	222,9	88,1	51	10	41	10
ST178 - 3-ureidopropionate	12,8	132,9	72	41	10	17	8
ST116 - HisHis	13,2	293	110,1	61	10	37	12
ST398 - 4-hydroxycyclohexylacetic acid	14,1	158,9	98,8	81	10	17	12
ST228 - p-benzenediol/ST102 - pyrocatechol	14,3	110,9	83	126	10	14	10
ST018 - glutamate	14,4	147,8	83,9	41	10	23	8
ST026 - 2-aminoadipate	14,5	161,8	98	56	10	21	8
ST364 - saccharopine	14,7	276,9	129,9	76	10	23	12
ST198 - xanthosine	14,7	284,9	152,9	96	10	15	14
ST305 - nicotinamide mononucleotide	14,8	334,9	123	36	10	23	12
ST056 - adrenaline	14,8	183,9	100,8	61	10	23	10

Látka s ST	RT	Q1	Q3	DP	EP	CE	CXP
ST012 - cystine	14,8	240,9	151,8	36	10	19	20
ST332 - S-lactoylglutathione	14,9	380,3	233	56	10	23	18
ST024 - cysteine	15,2	121,9	58,9	156	10	31	10
ST317 - glutathione	15,9	307,9	178,9	41	10	17	16
STx02 - CAIr	16,7	260,2	128,1	36	10	17	12
ST269 - phosphocreatine	17	211,7	90,1	26	10	21	10
ST443 - Biliverdin	17,1	583,1	297,1	116	10	45	28
ST301 - CMP-N-acetylneuraminate	17,2	615,1	323,9	56	10	19	28
ST199 - N-acetylaspartate	17,2	175,8	134	36	10	15	12
ST434 - Bilirubin	17,2	585,1	299,2	26	10	39	22
ST292 - FAD	17,9	785,8	347,9	1	10	31	30
ST293 - dCMP	18	307,9	112	56	10	19	10
ST288 - CMP	18	323,8	111,9	46	10	21	10
ST233 - O-phospho-L-serine	18,2	186	87,8	31	10	17	12
ST400 - AICAR	18,3	339	109,9	131	10	45	12
ST279 - dAMP	18,4	331,9	135,9	41	10	23	14
ST135 - AMP	18,4	348	135,9	116	10	27	14
ST353 - 5-methyltetrahydrofolate	18,8	460	313	56	10	27	24
ST316 - glutathione disulfide	18,8	612,9	484	56	10	27	42
ST152 - 5-formyltetrahydrofolate	19	473,9	299	61	10	45	24
ST252 - S-adenosyl-L-methionine	19,1	399,014	250,1	26	10	23	22
ST082 - dGMP	19,5	348,1	80,9	1	10	31	12
ST262 - GMP	19,7	363,8	151,9	36	10	25	14
ST265 - IMP	20,2	349	136,9	31	10	19	12
ST277 - xanthurenate	20,7	205,9	159,9	26	10	27	14
ST363 - dihydrofolate	21,3	444	177,9	61	10	19	16
ST387 - SAMP	21,7	464,1	251,9	71	10	31	20
ST374 - acetyl-CoA	22,1	809,7	303	36	10	41	26
ST360 - CoA	22,2	767,6	261	56	10	39	24
STx08 - SAICAR	22,3	455	243	86	10	25	22

Tab. 6: Látky v negativním módu seřazené podle RT (RT - retenční čas, Q1 - rodičovský ion, Q3 - dceřiný ion, DP[V] - deklasterační potenciál, EP[V] - vstupní potenciál, CE[V] - kolizní energie, CXP[V] - výstupní potenciál kolizní cely).

Látka s ST	RT	Q1	Q3	DP	EP	CE	CXP
ST432 - Erythritol	2,1	121	59,1	-15	-10	-14	-7
ST215 - uracil	3,4	110,952	42,1	-35	-10	-22	-11
ST421 - 1,6-Anhydro-β-D-glucose	3,8	161	101,1	-25	-10	-10	-9
ST036 - xylulose	4,7	148,9	71	-5	-10	-24	-7
ST087 - 4-hydroxybenzaldehyde	4,9	120,8	92	-15	-10	-32	-9
ST138 - ribose	5,3	148,8	88,9	-30	-10	-14	-17

Látka s ST	RT	Q1	Q3	DP	EP	CE	CXP
ST180 - glucono-1,5-lactone I	5,4	176,9	129	-10	-10	-12	-11
ST250 - 5-hydroxymethyluracil	5,5	140,9	80	-80	-10	-24	-7
ST439 - 7-Methylguanine	5,8	164	106,1	-5	-10	-32	-13
ST218 - uridine	5,8	242,8	110	-95	-10	-22	-11
ST427 - Indoxyl sulfate	5,8	212	81	-25	-10	-20	-7
ST150 - xylose	5,9	149,9	89,9	-15	-10	-8	-15
ST210 - adenosine	5,9	265,9	133,7	-60	-10	-10	-17
ST146 - fucose	5,9	162,8	59,1	-28	-10	-20	-5
STx07 - FGAr	6	233	143,1	-30	-10	-14	-13
ST437 - Allantoin	6,3	156,9	114,1	-30	-10	-16	-11
ST011 - vitamin D3	6,4	383,2	83,1	-55	-10	-28	-9
ST158 - ribitol;ST423 - Arabitol	6,5	150,9	71	-38	-10	-24	-9
ST190 - palmitic acid	6,5	255,1	45,1	-145	-10	-54	-7
ST444 - 3-Methyl-2-oxobutanoate	6,5	114,9	71,1	-20	-10	-12	-11
ST415 - Hydrocinnamate	6,8	149	105,1	-50	-10	-14	-11
ST442 - Leu-Leu	6,9	243,1	130,2	-60	-10	-24	-15
ST414 - Phenyllactate	6,9	165	101,1	-30	-10	-38	-11
ST096/ST097/ST195/ST197 - hexose - Glu Fru Gal Man	7,1	178,9	88,9	-40	-10	-12	-9
ST428 - Phenylacetate	7,3	135	91,1	-35	-10	-12	-9
ST302 - galactitol	7,3	180,8	100,8	-35	-10	-16	-17
ST378 - leucinic acid	7,4	130,8	84,7	-5	-10	-16	-17
ST420 - Mannitol	7,4	180,9	89,1	-35	-10	-18	-9
ST187 - salicylate/ST223 - 4-hydroxybenzoate	7,4	136,9	92,9	-35	-10	-22	-7
ST401 - 2-hydroxyphenylacetate	7,5	150,8	106,9	-5	-10	-18	-7
ST157 - tetrahydrobiopterin	7,6	239,8	179,9	-20	-10	-10	-7
ST217 - pseudouridine	7,7	242,8	153	-35	-10	-20	-11
ST425 - 3-Indolepropionate	7,7	187,8	116,2	-65	-10	-18	-7
ST204 - deoxyguanosine	7,7	265,8	150	-20	-10	-28	-13
ST404 - Prostaglandin E2	7,8	350,9	270,9	-60	-10	-22	-7
ST426 - Indolelactate	7,8	203,6	128,1	-40	-10	-30	-11
ST168 - ascorbate	7,8	174,9	114,9	-15	-10	-16	-7
ST059 - 1-methylxanthine	7,9	164,9	108	-60	-10	-26	-13
ST054 - ofloxacin	7,9	360,1	275,2	-140	-10	-26	-21
ST436 - Cholate	7,9	407,2	289,3	-170	-10	-54	-25
ST413 - 2-Furoylglycine	8,1	168	124,2	-45	-10	-14	-11
ST391 - phenylpropionylglycine	8,2	205,9	73,9	-50	-10	-20	-7
ST429 - 3-(3-OHphenyl)propanoate	8,3	165	106,1	-15	-10	-30	-7
ST419 - Levulinate	8,4	115	71,1	-40	-10	-14	-9
ST171 - myo-inositol	8,4	178,9	124,9	-85	-10	-20	-11
ST201 - 2-hydroxyisovalerate	8,4	116,9	71,1	-55	-10	-16	-5
ST397 - 2-methyl-buterylGly/ST396 - isovalerylGly	8,6	157,9	73,9	-35	-10	-18	-7

Látka s ST	RT	Q1	Q3	DP	EP	CE	CXP
ST416 - Indole-3-acetate	8,6	173,9	130,1	-10	-10	-16	-11
ST084 - benzoate	8,7	120,9	76,9	-15	-10	-16	-7
ST231 - lactose/ST162 - maltose; ST151 - melibiose/ST177 - sucrose	8,8	340,9	161	-55	-10	-12	-11
ST173 - N-acetylmethionine	9	189,9	141,9	-20	-10	-16	-7
ST055 - anthranilate	9	135,9	92	-25	-10	-20	-9
ST362 - 7.8-dihydroneopterin	9	253,9	194	-40	-10	-14	-17
ST151 - melibiose/ST177 - sucrose; ST231 - lactose/ST162 - maltose	9	340,9	179	-100	-10	-18	-11
ST389 - isobutyrylglycine/ST388 - butyrylGly	9	143,9	74	-15	-10	-16	-7
ST143 - 2-hydroxyisobutyric acid/ST325 - 2-hydroxybutanoate	9	102,9	57	-35	-10	-16	-7
ST159 - taurine	9,1	123,8	79,9	-45	-10	-28	-7
ST346 - triiodothyronine	9,1	649,4	126,8	-110	-10	-76	-11
ST194 - glyoxylate	9,1	72,9	55,2	-45	-10	-22	-7
ST303 - succinylacetone	9,1	156,9	99	-25	-10	-14	-9
ST412 - N-Acetyl-L-alanine	9,1	130	88,1	-5	-10	-16	-11
ST166 - 2.3- dihydroxybenzoate/ST202 - 2.5- dihydroxybenzoate	9,2	152,9	108	-37	-10	-32	-7
ST161 - 5-oxoproline	9,3	127,961	82	-60	-10	-18	-7
ST186 - melezitose; ST225 - raffinose; ST185 - maltotriose	9,3	502,9	323	-160	-10	-30	-9
ST050 - citrulline	9,4	174,016	131,2	-40	-10	-16	-9
ST225 - raffinose; ST185 - maltotriose; ST186 - melezitose	9,5	502,8	179	-160	-10	-30	-13
ST185 - maltotriose; ST225 - raffinose; ST186 - melezitose	9,9	502,9	341	-100	-10	-12	-27
ST394 - propionylglycine	10	129,9	74	-30	-10	-16	-7
ST212 - uric a.	10	166,9	59,9	-30	-10	-46	-7
ST027 - tropate	10	164,9	102,9	-20	-10	-14	-9
ST424 - N,N-Dimethylarginine	10	200,9	156,2	-10	-10	-16	-13
ST067 - 2-oxobutanoate/ST311 - acetoacetate/ST043 - succinate semialdehyde	10,2	100,8	57	-30	-10	-12	-7
ST405 - Sphingosine 1-phosphate I a II	10,2	377,9	78,6	-90	-10	-90	-9
ST163 - stachyose	10,3	664,8	383	-185	-10	-44	-31
ST137 - lactate	10,4	88,9	43	-30	-10	-16	-7
ST148 - kynurenate	10,4	187,8	144	-45	-10	-20	-11
ST033 - oxalate	10,5	88,9	70,9	-45	-10	-14	-9
ST090 - nicotinate	10,5	121,9	77,9	-30	-10	-18	-7
ST310 - 2-oxoglutarate	10,5	144,9	101	-30	-10	-10	-7
ST351 - porphobilinogen	10,6	224,8	98,9	-30	-10	-20	-7
ST142 - Gly-aminobutyric acid	10,9	158,9	101,9	-45	-10	-18	-9
ST008 - pantothenate	10,9	217,9	88	-75	-10	-20	-7

Látka s ST	RT	Q1	Q3	DP	EP	CE	CXP
ST323 - glycerate	11,2	104,9	58,8	-5	-10	-18	-7
ST247 - arginine	11,3	173,044	131,1	-55	-10	-22	-17
ST433 - Threonate	11,3	135	75,1	-40	-10	-18	-9
ST220 - homovanillate	11,5	180,8	122,1	-40	-10	-20	-11
ST214 - orotic a.	11,6	154,9	110,9	-15	-10	-16	-5
ST221 - vanilmandelate	11,6	196,8	138	-45	-10	-18	-9
ST017 - 2-oxoadipate	11,7	158,9	58,9	-40	-10	-18	-5
ST207 - xanthine	11,7	150,9	108	-55	-10	-24	-9
ST235 - aspartate	11,7	131,953	88,1	-35	-10	-16	-7
ST078 - 4-hydroxybutyric acid	11,8	102,9	56,9	-30	-10	-18	-7
ST113 - GlyMet	12,2	204,8	101,9	-35	-10	-26	-9
ST182 - quinate	12,4	191	93,1	-105	-10	-30	-9
ST232 - sialic a.	13,2	309	87	-125	-10	-20	-7
ST155 - shikimate	13,3	173	93	-45	-10	-22	-9
ST165 - gluconate	13,4	194,8	129	-40	-10	-18	-11
ST180 - glucono-1,5-lactone II	13,5	176,9	129,1	-10	-10	-12	-11
ST339 - 2'.3'-cyclic CMP	13,6	303,8	109,9	-50	-10	-22	-7
ST271 - NAD+	14,3	662,7	540,9	-55	-10	-20	-3
ST296 - CDP-choline	14,3	486,8	427,9	-155	-10	-20	-11
ST092 - glucuronate	14,3	192,8	113	-50	-10	-16	-9
ST175 - pyruvate	14,8	86,925	43,1	-45	-10	-12	-7
ST244 - N-argininosuccinate	15,3	288,9	132	-70	-10	-28	-9
ST445 - Cys-Gly	15,5	177	143	-150	-10	-12	-15
ST438 - Asp-Phe	15,8	279,1	164	-45	-10	-20	-15
ST234 - ethanolamine phosphate	16,5	139,8	78,9	-20	-10	-16	-7
ST441 - Acetyl phosphate	16,6	138,9	79,1	-20	-10	-22	-7
ST192 - sebacic acid	17	200,9	139	-65	-10	-26	-13
ST392 - suberylglycine	17	229,9	74	-50	-10	-24	-7
ST068 - N-acetylglutamate	17,1	187,9	102	-45	-10	-24	-9
ST343 - 5-hydroxyindoleacetate	17,1	189,8	144	-45	-10	-30	-13
ST188 - suberate	17,2	172,9	111	-35	-10	-20	-9
ST375 - 2-hydroxyglutarate	17,3	146,9	128,9	-25	-10	-16	-13
ST321 - oxaloacetate/ST047 - glutarate/ST080 - ethylmalonate	17,3	130,8	86,8	-37	-10	-16	-9
ST191 - glutaconate/ST077 - ketoleucine/ST222 - mevalonolactone;ST417 - 3-Methyl-2-oxopentanoate	17,3	128,9	85	-36	-10	-12	-7
ST259 - ribose 5-phosphate/ST344 - xylulose 5-phosphate	17,4	228,8	96,8	-45	-10	-20	-13
ST335 - erythrose 4-phosphate	17,5	198,9	96,8	-20	-10	-14	-9
ST039 - malate	17,5	132,9	71,1	-35	-10	-20	-7
ST348 - sorbitol 6-phosphate	17,5	260,8	78,8	-40	-10	-66	-9
ST020 - hydroxypyruvate	17,5	102,8	59	-35	-10	-12	-5
ST300 - UDP-N-acetyl-D-glu.amin	17,5	605,7	384,9	-85	-10	-38	-29

Látka s ST	RT	Q1	Q3	DP	EP	CE	CXP
ST334 - G-1-P/ST402 - Gal-1-P; ST333 - G-6-P/ST369 - F-6-P	17,6	258,8	78,9	-40	-10	-58	-9
ST361 - N-Acetylglucosamine 6-phosphate	17,6	299,8	78,8	-55	-10	-74	-9
ST023 - succinate/ST193 - methylmalonate	17,6	116,8	73	-35	-10	-14	-9
ST048 - fumarate;ST283 - caproic acid	17,6	114,9	71	-38	-10	-13	-7
ST069 - glycerol 3-phosphate	17,7	170,9	78,9	-35	-10	-34	-9
ST355 - glucosamine 6-phosphate	17,7	257,8	78,9	-40	-10	-72	-9
ST149 - NADH	17,7	663,7	397	-35	-10	-44	-17
ST037 - malonate/ST079 - 3-hydroxybutanoate	17,7	102,9	59	-30	-10	-14	-7
ST073 - phenylacetaldehyde/ST075 - mercaptopyruvate	17,7	118,9	95,8	-80	-10	-29	-9
ST133 - LeuGly	17,8	186,8	124,9	-30	-10	-20	-11
ST295 - UDP-D-galactose/ST275 - UDP-glucose	17,8	564,7	322,9	-75	-10	-34	-21
ST340 - thiamin diphosphate	17,8	423,8	302,9	-65	-10	-20	-19
ST076 - 3-sulfinioalanine	17,9	150,8	89	-35	-10	-16	-7
ST099 - dTMP	17,9	320,8	194,9	-35	-10	-24	-15
STx01 - succinyladenosine	17,9	381,8	134	-65	-10	-46	-7
ST293 - dCMP	18	305,8	194,9	-55	-10	-24	-17
ST288 - CMP	18	321,8	96,8	-55	-10	-28	-9
ST356 - FMN	18,1	454,9	139	-75	-10	-26	-9
ST147 - pyridoxamine phosphate	18,2	246,8	229,9	-35	-10	-14	-11
ST281 - dUMP	18,2	306,8	195	-50	-10	-22	-5
ST357 - glycerone phosphate	18,3	168,9	79	-5	-10	-34	-11
ST313 - 3-mercaptolactate	18,3	120,9	77	-10	-10	-16	-5
ST140 - UMP	18,4	322,8	210,9	-65	-10	-22	-21
ST279 - dAMP	18,4	329,8	134	-65	-10	-32	-11
ST135 - AMP	18,4	345,8	133,9	-90	-10	-46	-13
ST367 - pyridoxal phosphate	18,4	245,8	96,8	-40	-10	-20	-11
STx03 - SAICAr	18,6	373,2	241,1	-45	-10	-24	-17
ST373 - adenylyl sulfate	18,6	425,8	346	-50	-10	-26	-25
ST333 - G-6-P/ST369 - F-6-P; ST334 - G-1-P/ST402 - Gal-1-P	18,7	258,9	96,8	-30	-10	-22	-9
ST030 - tartarate	18,7	148,9	87	-40	-10	-18	-9
ST297 - GDP-L-fucose	18,9	587,7	441,9	-95	-10	-34	-35
ST291 - GDP-mannose	19	603,7	423,9	-35	-10	-42	-29
ST082 - dGMP	19,6	345,8	150	-35	-10	-34	-11
ST294 - ADP-ribose	19,6	557,7	346	-45	-10	-36	-27
ST262 - GMP	19,7	361,8	211	-45	-10	-26	-11
ST265 - IMP	20,2	346,8	96,9	-60	-10	-28	-5
ST329 - 3-phosphoglycerate	20,5	184,8	78,9	-20	-10	-50	-7
ST272 - NADP+	20,6	742,7	620,9	-70	-10	-24	-17

Látka s ST	RT	Q1	Q3	DP	EP	CE	CXP
ST312 - aconitate	20,6	172,9	84,9	-35	-10	-18	-7
ST051 - citrate/ST184 - isocitrate	20,7	190,8	110,9	-40	-10	-18	-11
ST289 - UDP-glucuronate	20,8	578,7	402,9	-70	-10	-34	-31
ST287 - CDP	20,8	401,8	158,9	-60	-10	-32	-13
ST298 - dCDP	20,8	385,8	158,9	-30	-10	-30	-13
ST270 - phosphoenolpyruvate	20,8	166,8	78,9	-35	-10	-24	-7
ST098 - dTDP	21	400,8	158,8	-60	-10	-34	-13
ST274 - UDP	21,2	402,9	158,8	-70	-10	-34	-9
ST338 - deoxyribose 5-phosphate	21,3	212,8	97	-35	-10	-20	-7
ST284 - ADP	21,4	425,8	133,9	-95	-10	-32	-11
ST278 - dADP	21,4	409,8	158,8	-30	-10	-32	-13
ST387 - SAMP	21,6	461,8	96,8	-55	-10	-30	-9
ST290 - NADPH	22,4	743,7	425,9	-30	-10	-42	-35
ST280 - dGDP	22,4	425,8	158,9	-70	-10	-32	-15
ST261 - GDP	22,6	441,8	158,8	-95	-10	-36	-13
ST264 - IDP	22,8	426,8	134,9	-75	-10	-32	-11
ST081 - dCTP	23,2	465,7	158,9	-65	-10	-36	-15
ST257 - CTP	23,3	481,7	158,9	-70	-10	-44	-13
ST276 - UTP	23	482,7	158,7	-80	-10	-48	-13
ST100 - dTTP	23,5	480,7	158,8	-70	-10	-46	-9
ST106 - ATP	24	505,7	158,8	-75	-10	-40	-13
ST282 - dUTP	24	466,7	158,9	-55	-10	-36	-11
ST071 - dATP	25	489,7	158,7	-60	-10	-36	-13
ST263 - GTP	27	521,6	158,8	-90	-10	-50	-9
ST299 - dITP	27	490,7	158,8	-65	-10	-40	-13
ST266 - ITP	28	506,7	158,7	-60	-10	-48	-13
ST072 - dGTP	28	505,7	158,9	-70	-10	-38	-13

9.1 Statistická analýza

9.1.1 Analýza hlavních komponent

Analýza hlavních komponent je statistická metoda pro snížení velkého množství dat za současného zachování informačního obsahu. Tato metoda je ovšem neúčinná pokud jsou proměnné nekorelované (Miller & Miller, 2005).

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

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

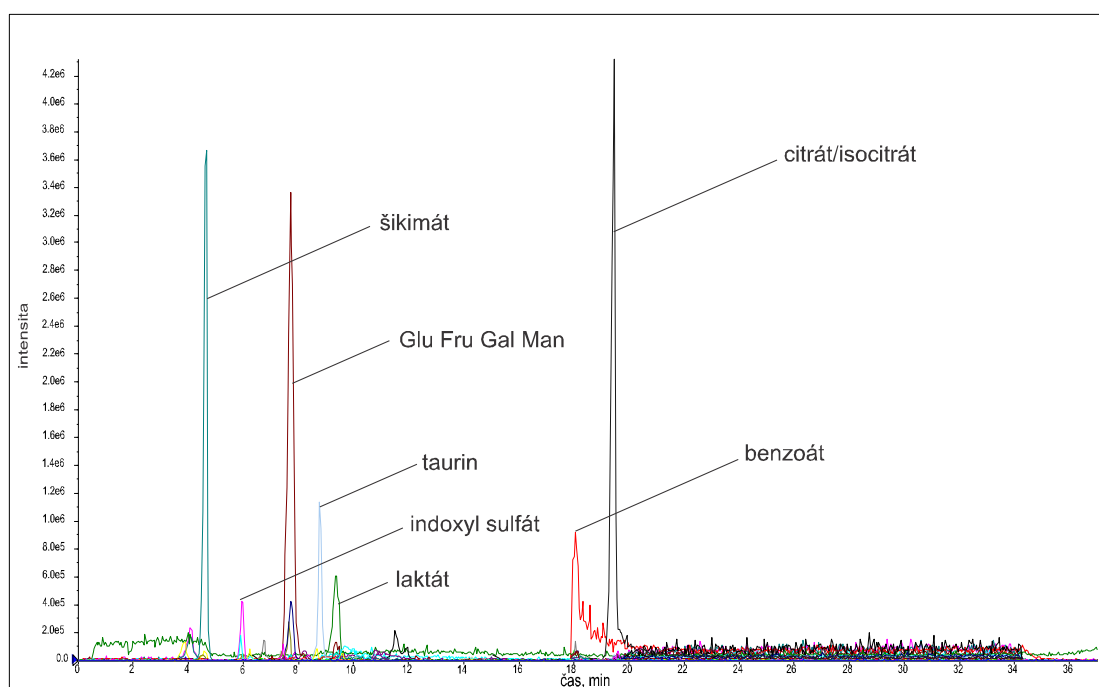
9.1.2 Diskriminační analýza

Cílem diskriminační analýzy je rozlišení a klasifikace objektů do skupin na základě jejich vlastností nebo zařazení nového objektu do známé skupiny pomocí klasifikačního pravidla, přičemž je předem zadána příslušnost k dané skupině (Miller & Miller, 2005).

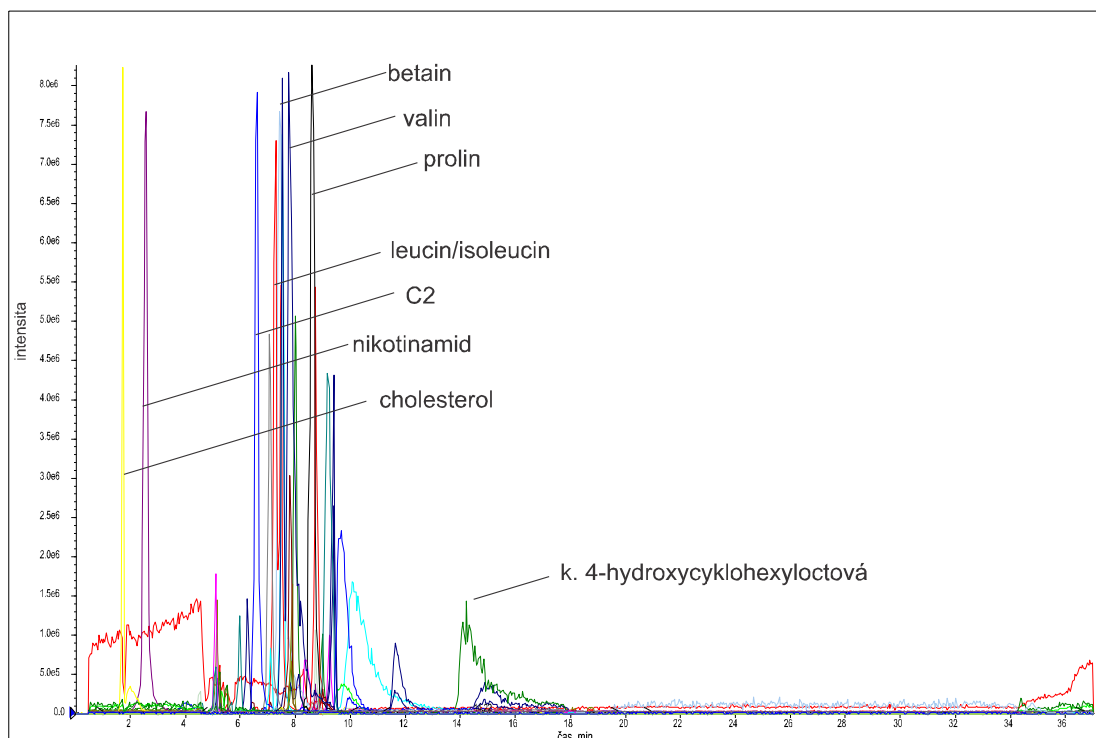
Naměřená data byla zpracována v softwaru „R“ (www.r-project.org). Byla provedena interpolace dat metodou LOESS (Miller & Miller, 2005) pro odstranění systematické chyby a byl vypočítán variační koeficient. Veškeré analyty s variačním koeficientem větším než 30% byly z analýzy odstraněny. Nulové hodnoty v datovém souboru byly nahrazeny 2/3 nejnižší hodnoty v rámci skupiny. Na data bylo pohlíženo jako na kompoziční data, kdy pro nás nebyly důležité absolutní koncentrace jednotlivých analytů, ale pouze jejich poměr. Na datovou matici byla aplikována clr transformace (Hron et al., 2012). Jako poslední krok bylo provedeno centrování dat. Grafickým výstupem statistické analýzy byla analýza hlavních komponent a diskriminační analýza.

10 Výsledky

Jednotlivé látky byly analyzovány jak v negativním módu tak v módu pozitivním. Ukázky chromatogramů z negativního a pozitivního módu všech látek jsou na obrázcích 21 a 22.



Obr.21: Analýza látek v negativním MRM módu (191 látek)



Obr. 22: Analýza látek v pozitivním MRM módu (234 látek)

Z celkového počtu 425 látek v akviziční metodě zůstalo po vyhodnocení celkem 124 metabolitů (tab. 7). Počet metabolitů v jednotlivých skupinách a jejich rozdělení do negativního a pozitivního módu je shrnut v tabulce 8.

Tab. 7: Identifikované metabolity ve vzorcích plasmy.

Název metabolitu	Průměrné RT	Název metabolitu	Průměrné RT
C22	4,81	ST176 - kynurenine	7,33
C22-1	4,84	ST420 - Mannitol	7,36
C20	4,87	ST201 - 2-hydroxyisovalerate	7,37
C20-1	4,89	ST208 - hypoxanthine	7,45
C18-1OH	4,89	C2	7,45
C20-2	4,91	ST096/ST097/ST195/ST197 . hexose-Glu Fru Gal Man	7,46
C18	4,93	ST157 - tetrahydrobiopterin	7,46
C18-1	4,94	ST031 - pipercolate	7,54
C16-1OH	4,96	ST003 - tryptophan	7,54
C16:2-OH	4,97	ST397 - 2.methyl.butrylGly/ST396- isovalerylGly	7,57
C18-2	4,97	ST231 . lactose/ST162 . maltose; ST151 . melibiose/ST177-sucrose	7,59
C18-3	4,99	ST010 - methionine	7,61

Název metabolitu	Průměrné RT	Název metabolitu	Průměrné RT
C16	4,99	ST001 - valine	7,73
C16-1	5,01	ST173 - N-acetylmethionine	7,75
C16:2	5,03	ST053 - hippurate	7,77
C14-1OH	5,04	ST425 - 3-Indolepropionate	7,82
C14-1	5,07	ST389 - isobutyrylglycine/ST388- butyrylGly	8,06
C12-DC	5,08	ST139 - N.N-dimethylglycine	8,10
C14	5,08	ST062 - 2-aminoisobutyric acid	8,10
C14-2	5,11	ST170 - creatine	8,32
C12	5,17	ST412 - N-Acetyl-L-alanine	8,34
C12:1	5,19	ST002 - tyrosine	8,44
C10	5,30	ST109 - phenylserine	8,44
C10-1	5,33	ST042 - homocysteine	8,44
ST219 - creatinine	5,33	ST007 - proline	8,44
C10-2	5,39	ST064 - N-methylhistamine	8,47
C16OH	5,43	ST159 - taurine	8,47
C8	5,47	ST236 - 4-hydroxyproline	8,60
C8-1	5,60	ST251 - guanidinoacetate	8,62
C5:1-DC	5,63	ST022 - alanine/ST237 - sarcosine; ST005 - beta-Alanine	8,68
ST447 - DHA	5,69	ST134 - 3-methylhistidine; ST060 - N-methylhistidine	8,69
ST206 - adenine	5,74	ST084 - benzoate	8,79
ST427 - Indoxyl sulfate	5,74	ST315 - carnitine	8,86
ST446 - AA	5,75	ST004 - threonine/ST160 - homoserine	8,92
C6	5,78	ST063 - 4-guanidinobutanoate	8,94
ST190 - palmitic acid	5,87	ST137 - lactate	9,03
C6:1	5,89	ST033 - oxalate	9,03
ST431 - 1,5-Anhydro-D-glucitol	6,03	ST238 - glutamine	9,06
ST146 - fucose	6,03	ST239 - glycine	9,13
C5	6,05	ST050 - citrulline	9,24
C7-DC	6,15	ST021 - asparagine	9,34
C5-1	6,23	ST351 - porphobilinogen	9,40
ST153 - cytosine	6,25	ST006 - serine	9,45
C4	6,37	ST015 - histidine	9,61
C3-OH	6,37	ST060 - N-methylhistidine; ST134 - 3-methylhistidine	9,68
STx07 - FGAr	6,43	ST308 - choline	9,85
C4:1	6,52	ST161 - 5-oxoproline II	10,37
ST423 - Arabitol	6,53	ST247 - arginine	10,43
ST158 - ribitol	6,53	ST246 - lysine	11,25
ST440 - 4-Pyridoxate	6,56	ST034 - ornithine	11,43
C5DC	6,67	ST040 - cystathionine	11,64
ST028 - N- acetylgalactosamine	6,75	ST165 - gluconate	12,25

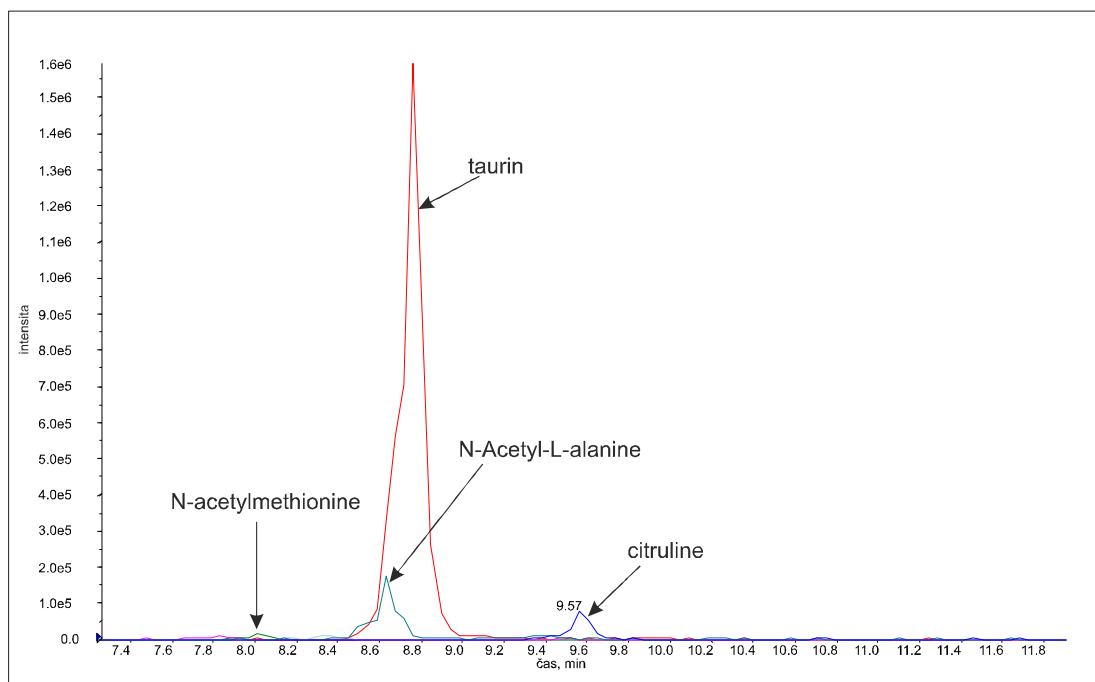
Název metabolitu	Průměrné RT	Název metabolitu	Průměrné RT
ST041 - spermine	6,76	ST012 - cystine	12,96
C3	6,83	ST018 - glutamate	13,00
ST324 - taurocholate	7,04	ST026 - 2-aminoadipate	13,20
ST243 - Leu/ST242 - Ile/ST241 - Alloile/ST009 - NorLeu	7,06	ST316 - glutathione disulfide	17,38
ST013 - serotonin	7,08	ST039 - malate	17,39
ST217 - pseudouridine	7,13	ST069 - glycerol 3-phosphate	17,39
ST393 - hexanoylglycine	7,19	ST292 - FAD	17,40
ST101 - betaine	7,19	ST023 - succinate/ST193-methylmalonate	17,41
ST302 - galactitol	7,25	ST434 - Bilirubin	17,62
ST245 - phenylalanine	7,28	ST051 - citrate/ST184-isocitrate	18,73

Tab. 8: Rozdělení metabolitů do skupin.

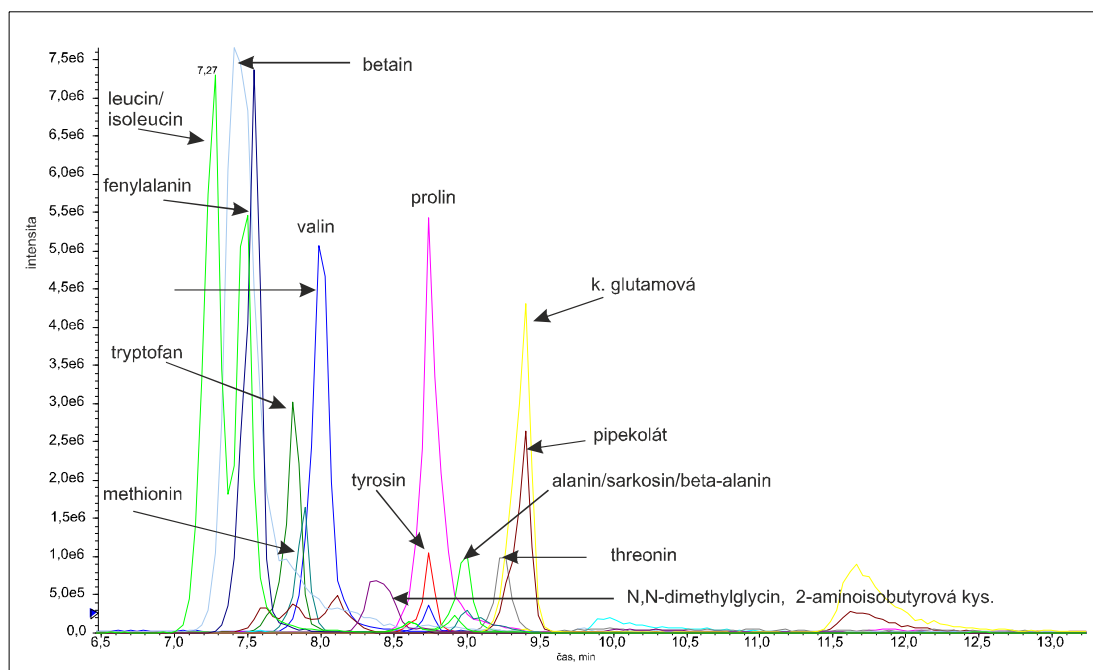
Skupina látek	Negativní mód	Pozitivní mód
Aminokyseliny	7	34
Organické kyseliny	13	-
Sacharidy	10	1
Peptidy	-	1
Acylované karnitiny	-	41
Puriny a pyrimidiny	2	4
Ostatní látky	2	9

Chromatogramy všech látek v rámci jednotlivých skupin jsou zobrazeny na obrázcích 23-31.

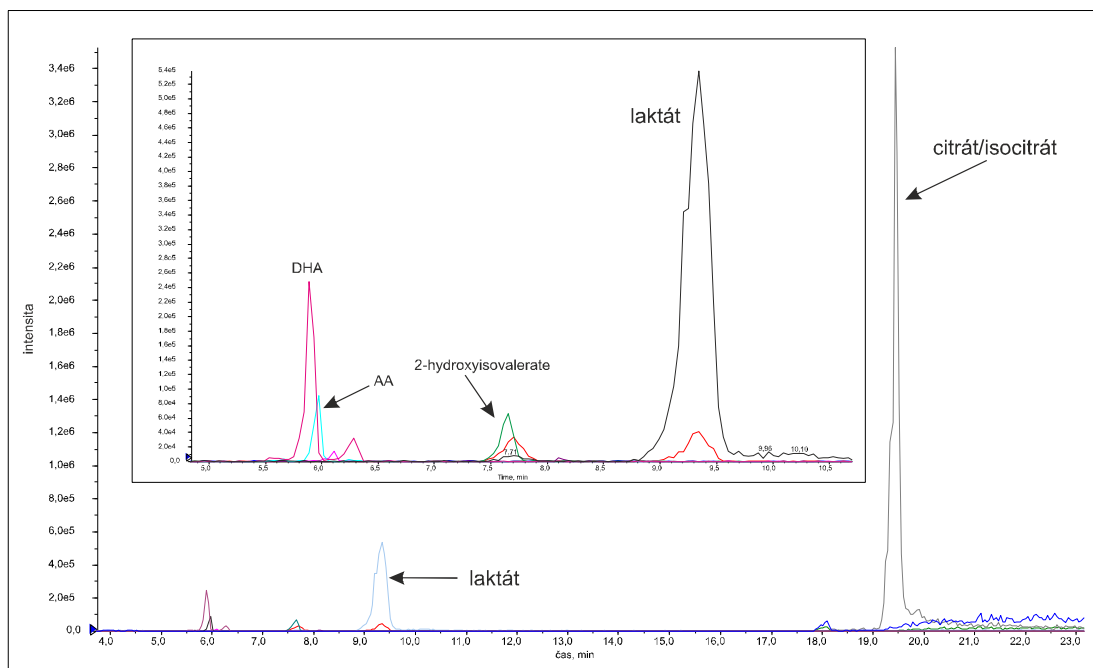
Eluce aminokyselin (obr. 22, 23) probíhala přibližně od 6. do 10. minuty. Separace organických kyselin (obr. 24) probíhala téměř po celou dobu analýzy a všechny organické kyseliny byly analyzovány v negativním MRM módu. Puriny a pyrimidiny (obr. 25, 26) se eluovaly z kolony od 5. do 9. Minuty. Většina cukerných metabolitů (obr. 27) se separovala od 5. do 12. minuty v negativním módu. Separace acylkarnitinů (obr. 28) probíhala v pozitivním módu v rozmezí od 5. do 10. minuty v závislosti na délce acylu navázaného na karnitin. Glutathion disulfid byl jediným zástupcem peptidů (obr. 29) s retenčním časem 18,07 min. Eluce ostatních látek (obr. 30, 31), probíhala v obou módech až do 25. minuty.



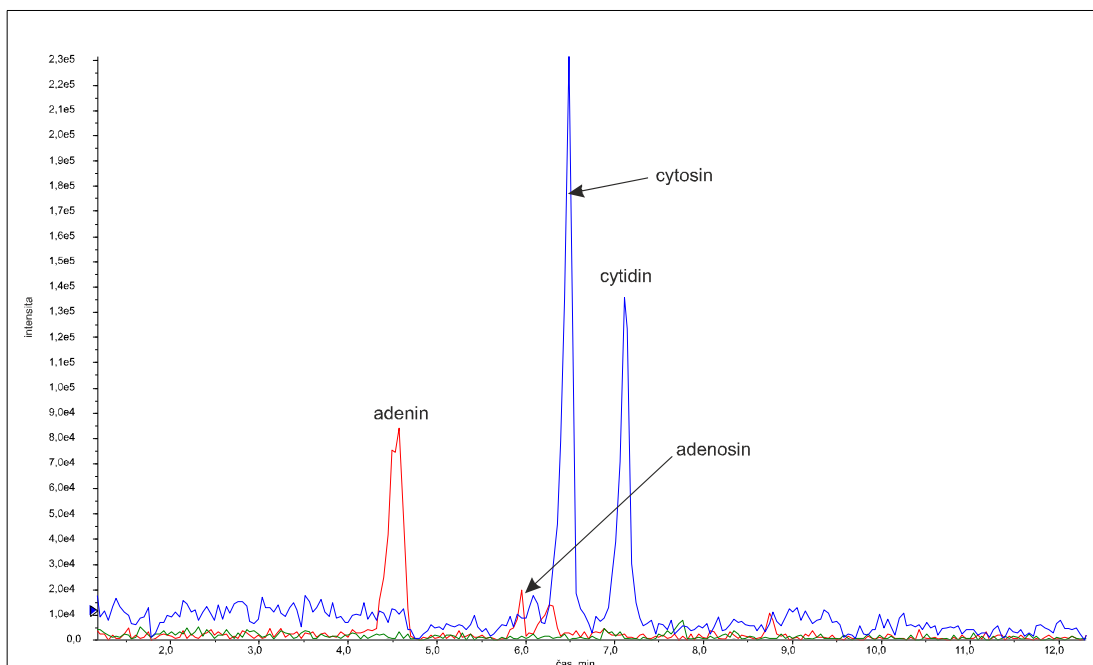
Obr. 22: Separace aminokyselin v negativním módu (celkem 7 aminokyselin)



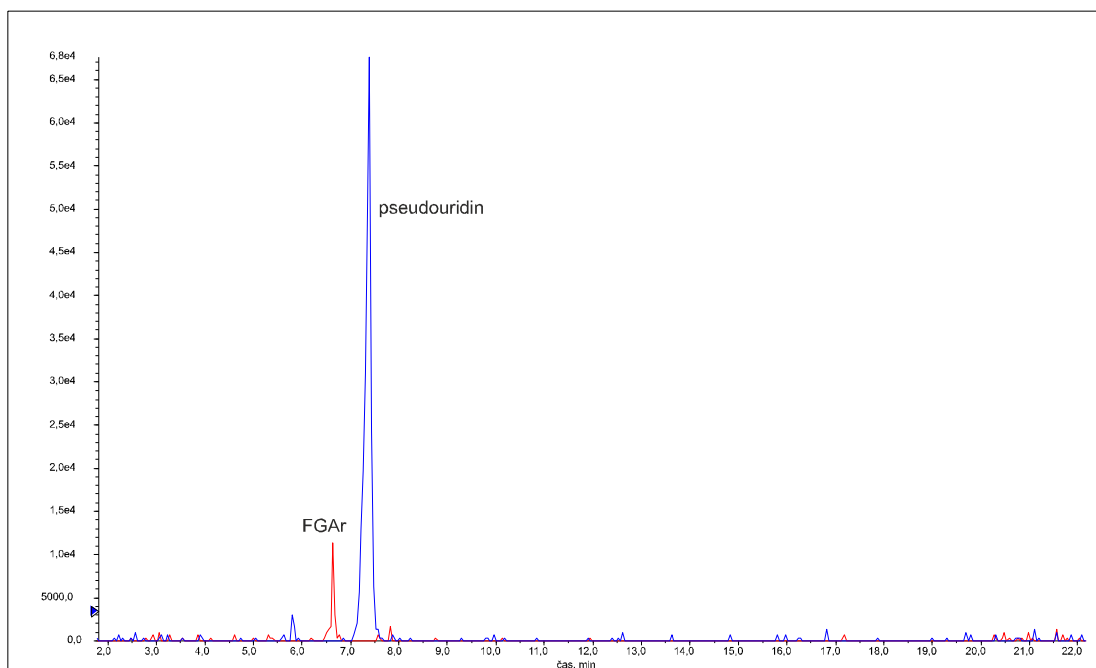
Obr. 23: Separace aminokyselin v pozitivním módu (celkem 34 aminokyselin)



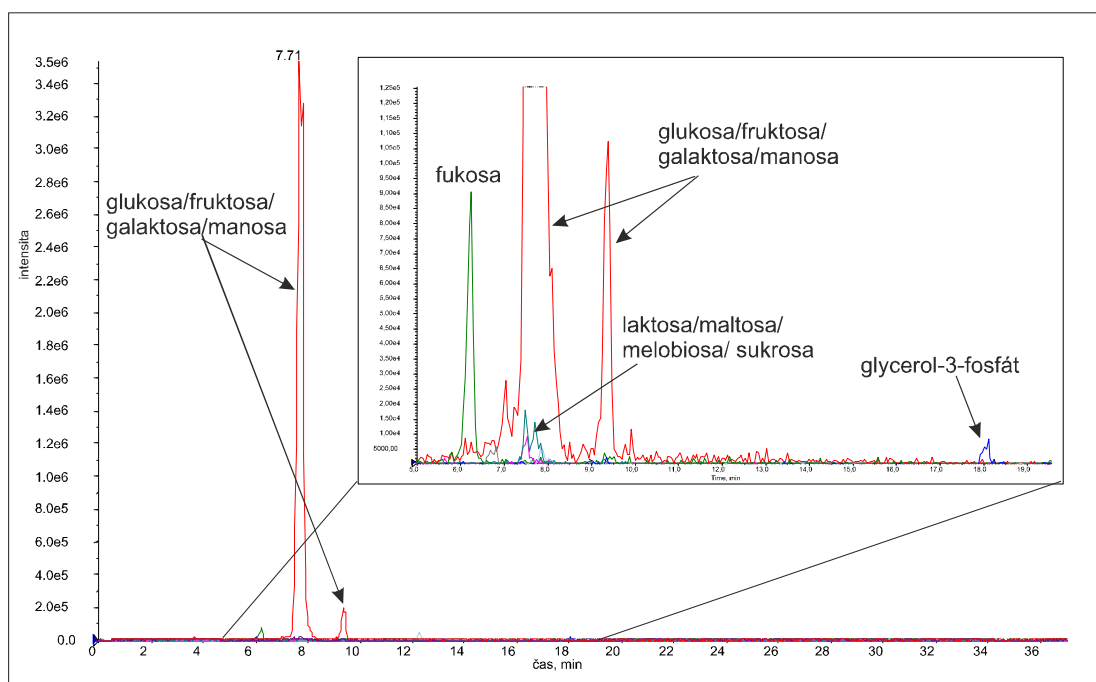
Obr. 24: Separace organických kyselin v negativním módu (celkem 13 metabolitů)



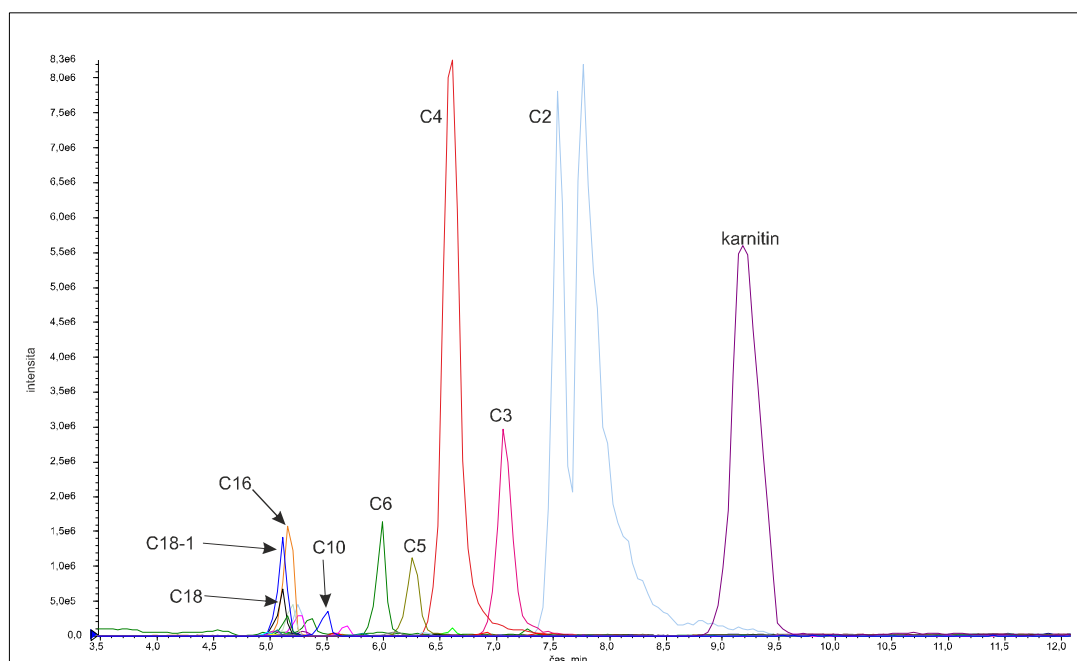
Obr. 25: Separace purinů a pyrimidinů v negativním módu (adenin a cytosin)



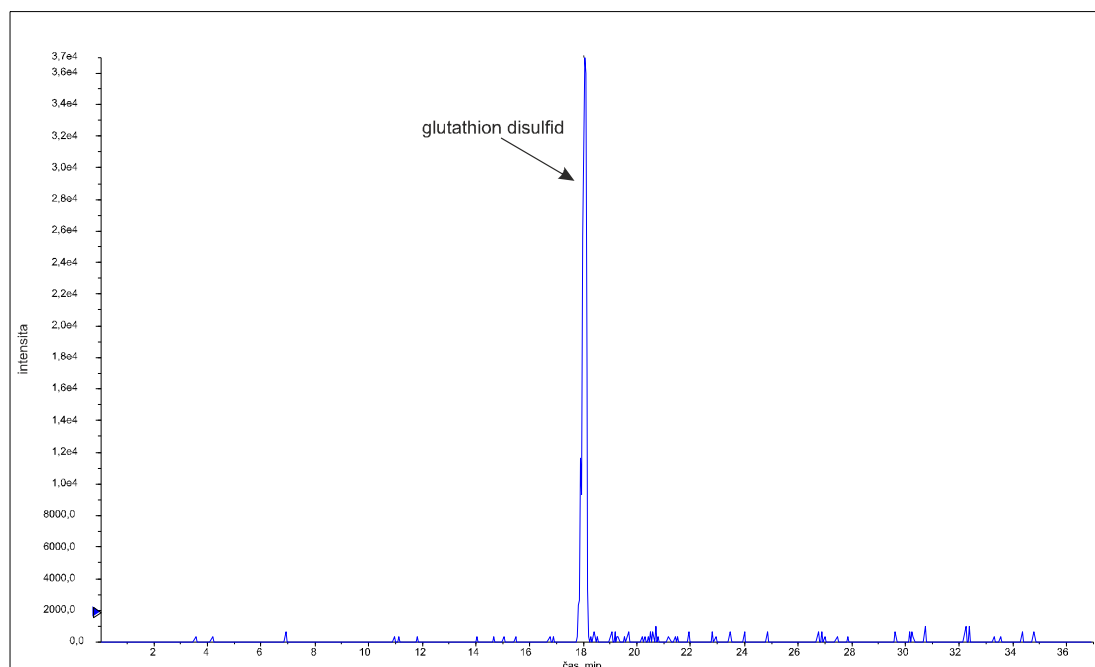
Obr. 26: Separace purinů a pyrimidinů v pozitivním módu (celkem 4 látky)



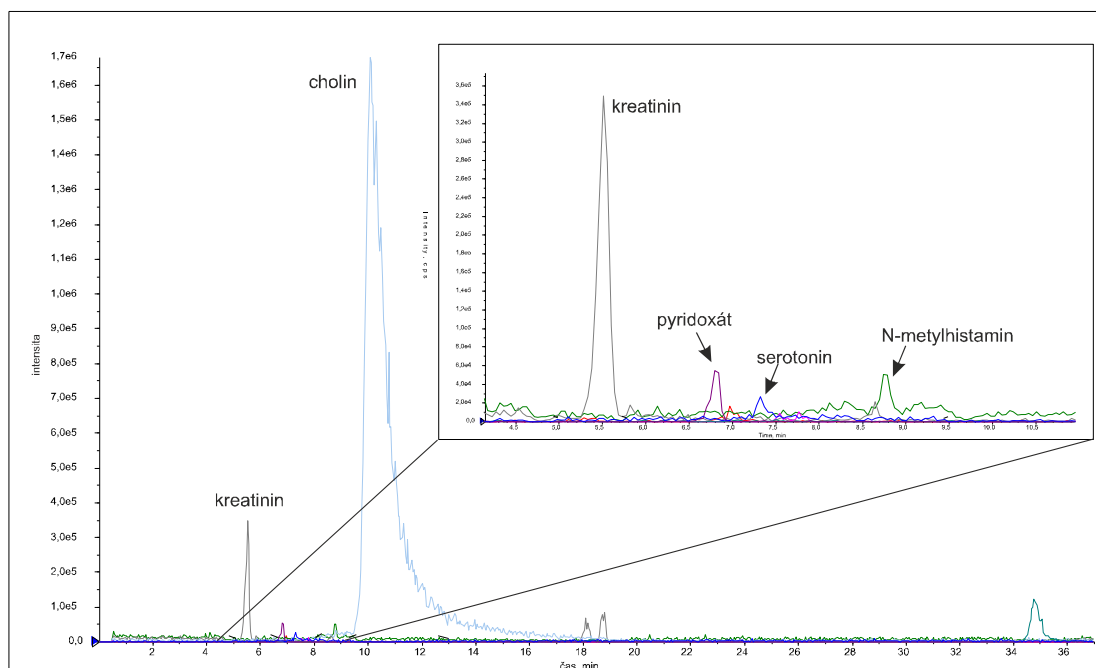
Obr. 27: Separace cukerných složek v negativním módu (celkem 10 látek)



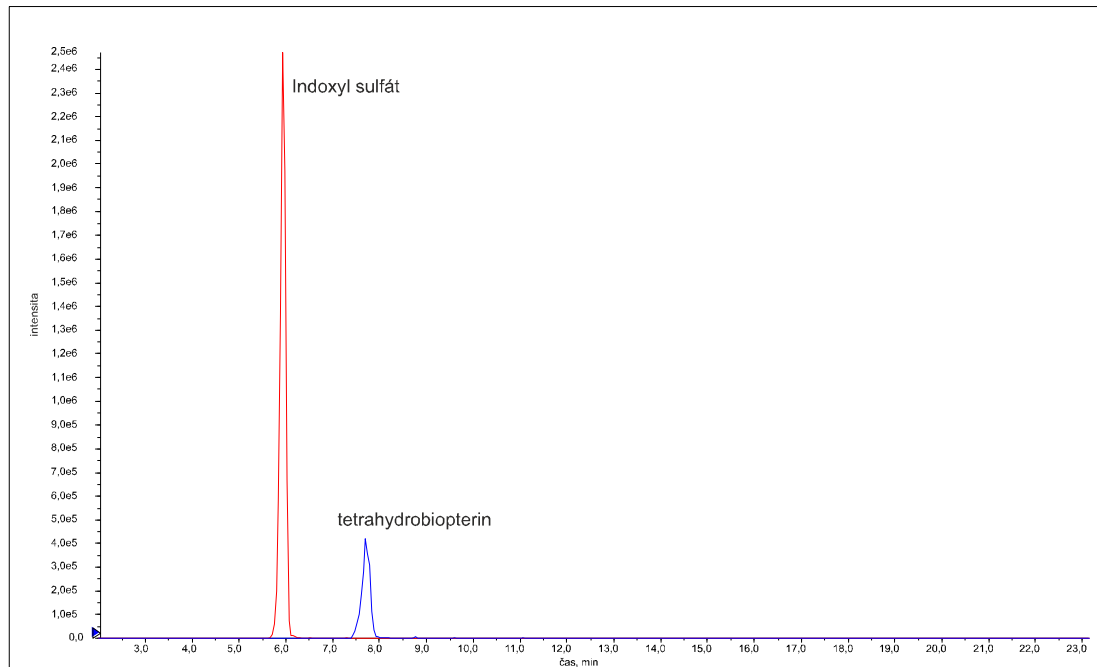
Obr. 28: Separace acylkarnitinů v pozitivním módu (celkem 41 metabolitů)



Obr. 29: Separace peptidů v pozitivním módu

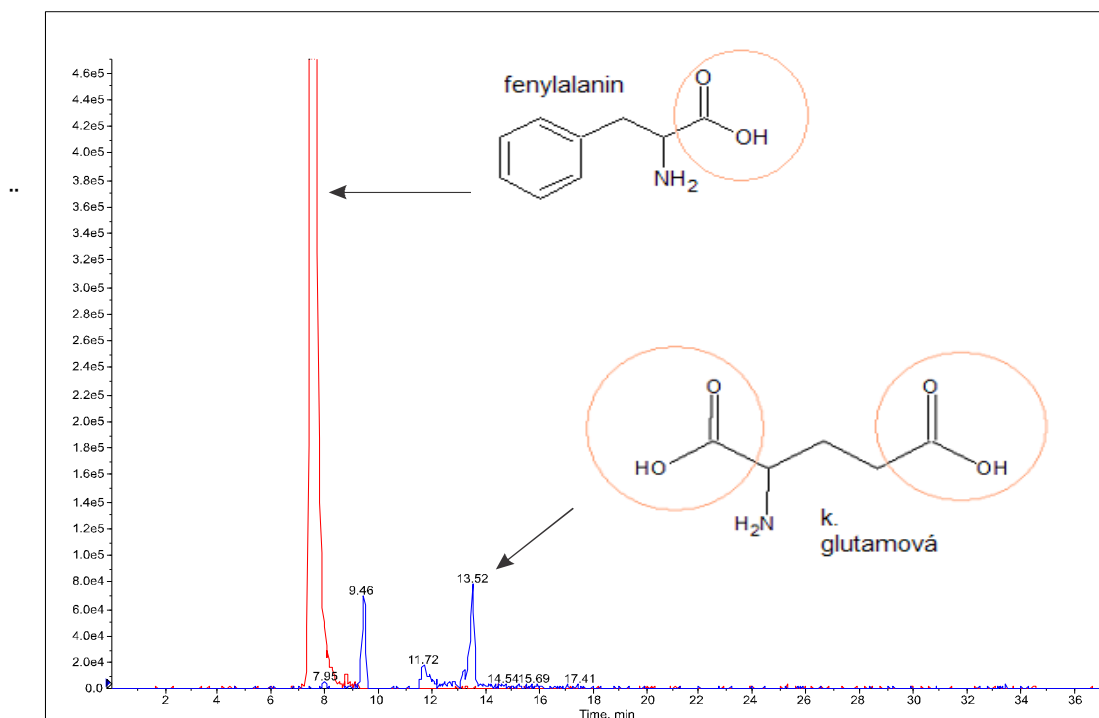


Obr. 30: Separace ostatních látek v pozitivním módu (celkem 9 metabolitů)

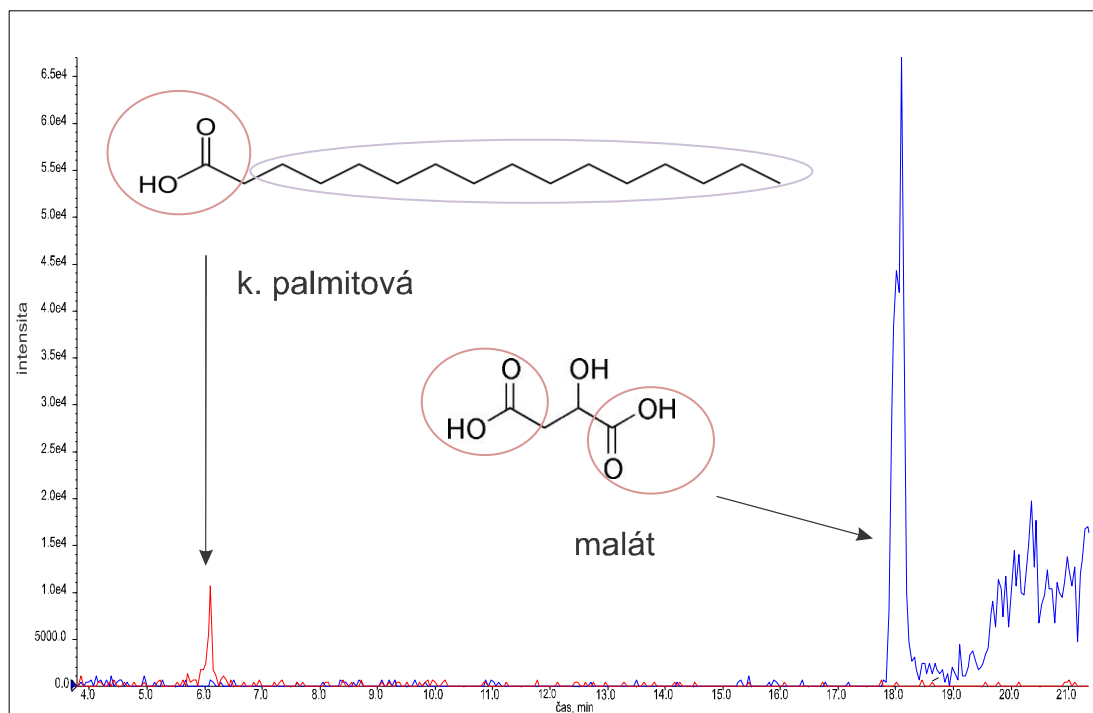


Obr. 31: Separace ostatních látek v negativním módu (celkem 2 metabolity)

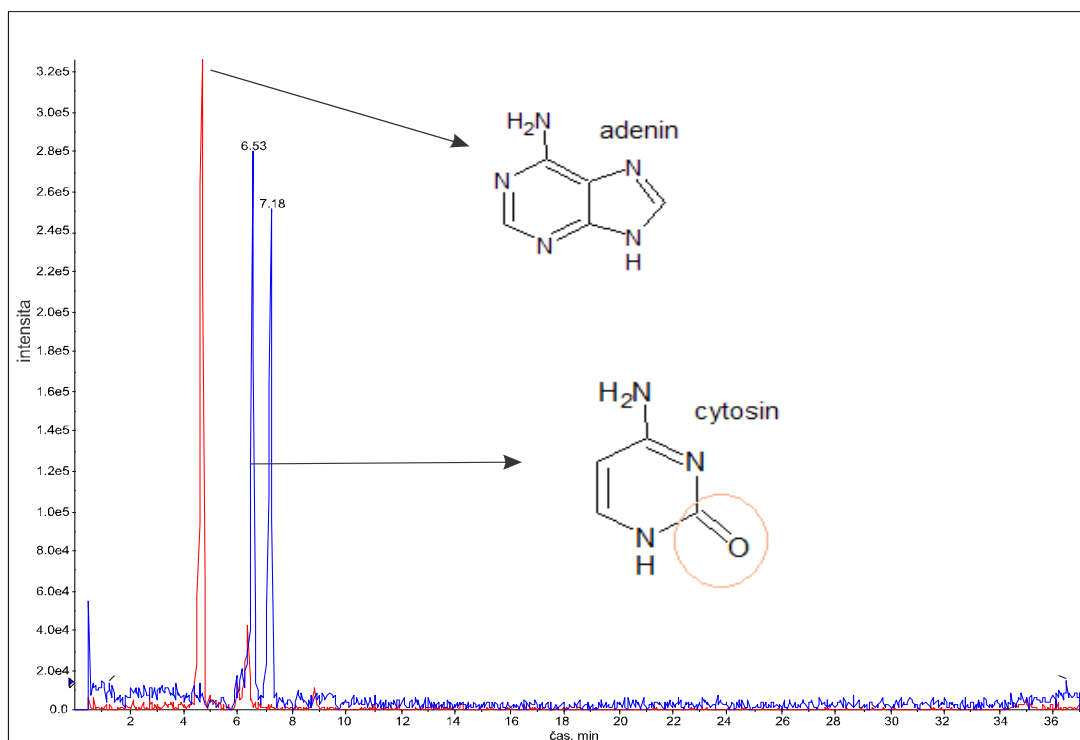
Na koloně došlo k separaci látek převážně na základě polariry. Látky, které obsahovaly nepolární struktury nebo byly slabě polární se separovaly na začátku analýzy. Látky obsahující polární skupiny se eluovaly v průběhu analýzy v závislosti na počtu kyselých skupin. Příklady skupin látek s rozdílnou strukturou a retenčním časem jsou uvedeny na obrázcích 32, 33, 34.



Obr. 32: Příklad separace látek ze skupiny aminokyselin (fenylalanin a k. glutamová)



Obr. 33: Příklad separace látek ze skupiny organických kyselin (k. palmitová a malát)



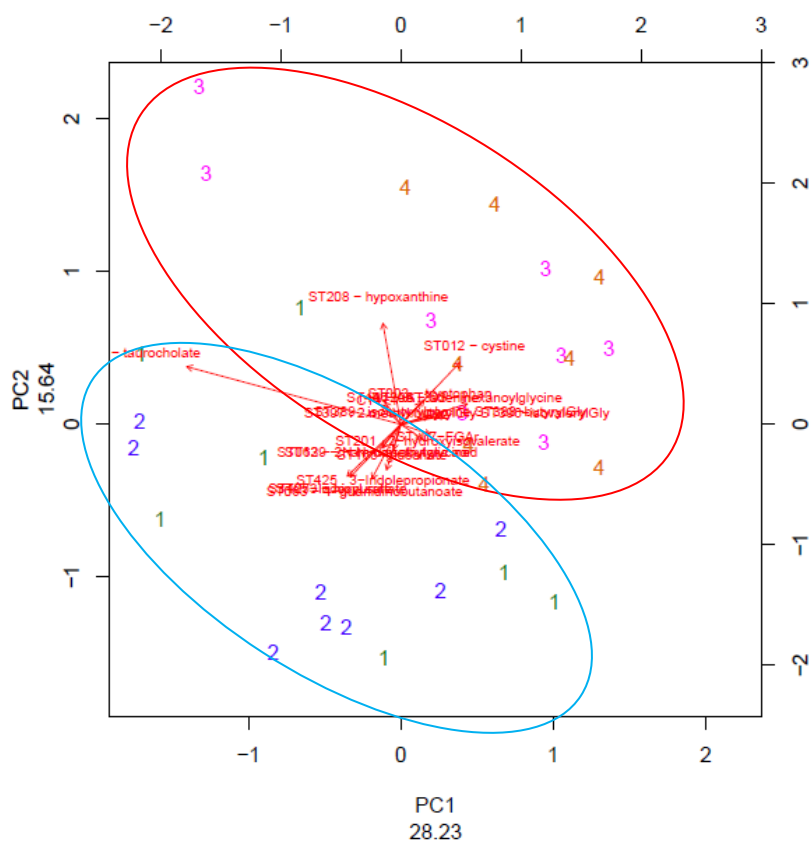
Obr. 34: Příklad separace látek ze skupiny nukleotidů (adenin a cytosin)

V tabulce 9 je uvedeno 20 nejvíce diskriminujících analytů oddělujících od sebe jednotlivé skupiny vzorků.

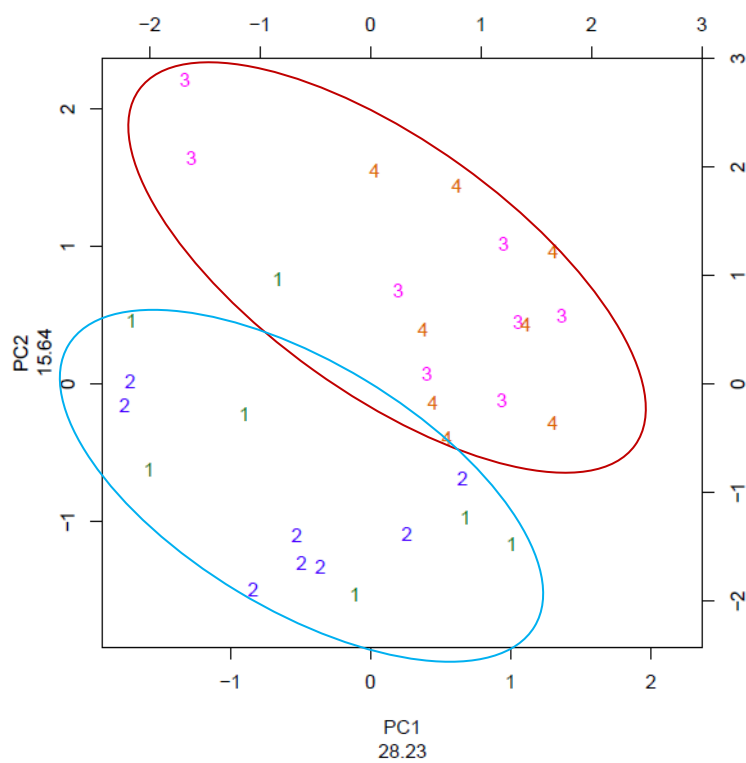
V případě PCA (obr. 35, 36) došlo k rozlišení CF (3,4) a WT (1,2), u DFA (obr. 37) analýzy se podařilo rozlišit u WT skupiny s lékem a bez léku.

Tab. 9: Seznam 20 nejvíce diskriminujících látek s délkou vektoru (PCA biplot).

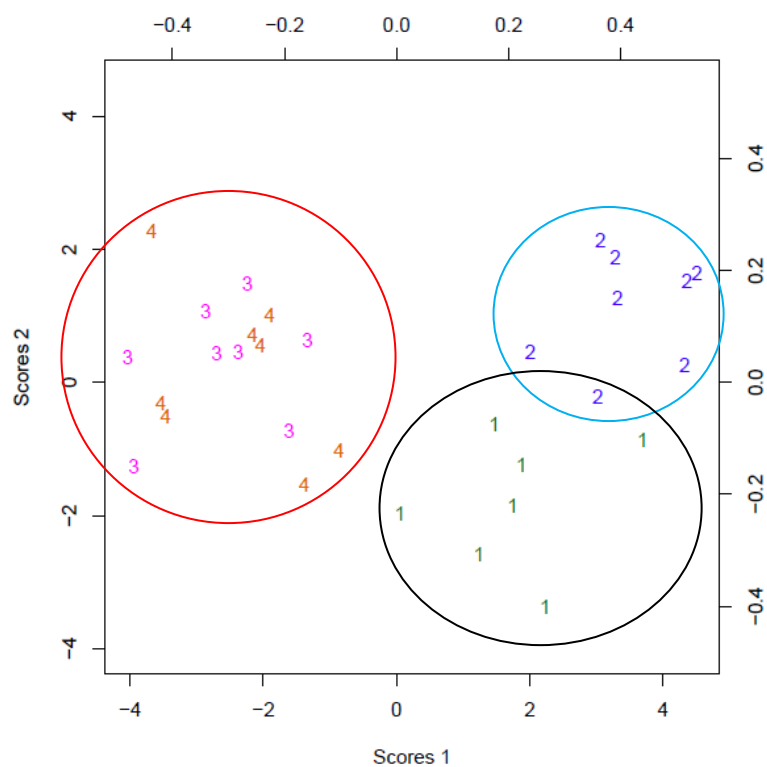
Látky s ST	Délka vektoru	Látky s ST	Délka vektoru
ST324 - taurocholate	2,3062	ST003 - tryptophan	0,3474
ST208 - hypoxanthine	1,0635	STx07 - FGAr	0,3237
ST012 - cystine	0,8868	ST062 - aminoisobutyric acid	0,3097
ST053 - hippurate	0,7748	ST139 - N,N-dimethylglycine	0,3081
ST427 - Indoxyl sulfate	0,7568	C22	0,3044
ST393 - hexanoylglycine	0,7236	ST206 - adenine	0,3035
ST063 - 4-guanidinobutanoate	0,6402	ST446 - AA	0,2831
ST425 - 3-Indolepropionate	0,4952	C14 - 1	0,2820
ST397 - 2-methyl-buterylGly,	0,4744	ST165 - gluconate	0,2702
ST396-isovalerylGly	0,4744	ST201 - 2-hydroxyisovalerate	0,2682
ST389 - isobutyrylglycine, ST388-buterylGly	0,4265		



Obr. 35: Biplot PCA s 20 nejvíce diskriminujícími metabolity



Obr. 36: Biplot PCA s odlišenými skupinami CF (3,4) a WT (1,2)



Obr. 37: Graf DFA s odlišenými skupinami CF (3,4) a WT, u WT odlišení skupiny na terapii fenretinidem (2) a bez terapie (1).

11 Diskuse

Cílem této práce je adaptace metody cílené metabolomiky na plasmatické vzorky a následné změření a statistické vyhodnocení.

U této metody byla použita chromatografická separace na aminopropylové koloně s modifikovanou fází HILIC – stacionární fáze je polární stejně jako fáze mobilní. Na začátku separace obsahovala mobilní fáze z 95% acetonitril. Cholesterol a další nepolární látky eluovaly z kolony v mrtvém čase (do 2 min). Tento fakt byl způsoben absencí karboxylových skupin v molekule a tak nedocházelo k interakci analytu s aminoskupinami stacionární fáze. Na začátku analýzy se eluovaly nepolární látky, které slabě interagují se stacionární fází (adenin, RT = 5,74 min). Např. cytosin (RT = 6,25 min) je také nepolární látka ale separuje se až za adeninem, protože obsahuje jednu polární funkční skupinu. Na obrázku 34 jsou patrné na stejném MRM přechodu dva píky pro jednu látku, ale v jiných retenčních časech. Tento jev je způsoben fragmentací v iontovém zdroji molekul adenosinu a cytidinu na adenin a cytosin a jednotlivé molekuly ribózy. V průběhu analýzy docházelo ke kontinuální změně složení mobilní fáze (vzrůstal podíl vodné fáze, která je více polární) a tudíž se látky separovaly postupně podle vzrůstající polarity. V tomto případě bylo využito efektu gradientové eluce, kdy látky obsahující několik karboxylových skupin opouští kolonu dříve než u eluce isokratické. Doba analýzy se takto zkrátí. Např. fenylalanin jako nepolární aminokyselina se separoval z kolony v 7,28 min, naproti tomu polární kyselina glutamová, která obsahuje 2 karboxylové skupiny se eluovala z kolony mnohem později (RT (k. glutamová) = 13,00 min) (obr. 32). Stejně tak tomu bylo i v případě organických kyselin: např. k. palmitová, která sice obsahuje polární –COOH skupinu, ale také nepolární řetězec, proto docházelo k její separaci v 5,87 minutě. Naproti tomu např. malát obsahující 2 karboxylové skupiny a jednu hydroxylovou je polárnější a je uvolňován z kolony až v 17,39 minutě (obr. 33). Jedny z nejvíce zadržovaných analytů na koloně jsou látky, které obsahují jeden a více fosfátových zbytků, např. glycerol-3-fosfát s retenčním časem 17,39 min (tab. 7). Během analýzy se nepodařilo separovat některé látky se stejným MRM přechodem, u kterých docházelo k interferenci, např. laktosa/maltosa s retenčním časem 7,59 min (tab. 7).

Eluce aminokyselin (obr. 22, 23) probíhala přibližně od 6. do 10. minuty. Rozdíl retenčních časů jednotlivých aminokyselin je převážně způsoben počtem –COOH a NH₂ funkčních skupin. Separace organických kyselin (obr. 24) probíhala téměř po celou dobu analýzy a všechny organické kyseliny byly analyzovány

v negativním MRM módu. Retenční časy se lišily od 9,03 minut u laktátu až po citrát/isocitrát ($3 \times -\text{COOH}$) s $\text{RT} = 18,73$. Puriny a pirimidiny (obr. 25, 26) se vzhledem ke svým podobným strukturám eluovaly z kolony od 5. do 8. minuty. Většina cukerných metabolitů (obr. 27) se separovala od 5. do 12. minuty v negativním módu. Blíže ke 12. minutě se eluovaly cukerné látky s vyšším počtem $-\text{OH}$ skupin (glukonát, tab. 7). Skupina acylkarnitinů (obr. 28) obsahovala metabolity měřené v pozitivním módu a eluce probíhala do 9. minuty, kdy se z kolony eluoval samotný karnitin (C0). Byla tudíž pozorovatelná závislost retenčního času na délce acylu navázaného na karnitinu. V případě acylkarnitinu C2 a několika dalších analytů se vytvořil dvojpík a to díky vysoké koncentraci této látky a došlo k přehlcení detektoru. Skupina peptidů (obr. 29) měla pouze jediného zástupce (glutathion disulfid), jehož retenční čas v pozitivním módu byl 18,07 min především díky rozvětvené struktuře obsahující celkem 4 karboxylové skupiny. Ostatní látky se separovaly na koloně s různými retenčními časy v závislosti na jejich struktuře a počtu karboxylových skupin (obr. 30, 31).

Naměřená data byla zpracována v softwaru MultiQuant 2.1.1 (AB Sciex, Framingham, USA). Po vyhodnocení výsledků v MultiQuantu se počet původních 425 látek zdedukoval na 124 látek identifikovaných v plasmě (tab. 7). Zbylé metabolity byly ze seznamu odstraněny, protože byly málo abundantní nebo se ve vzorcích plasmy nevyskytovaly. Snížení počtu metabolitů vedlo k lepšímu a rychlejšímu vyhodnocování dat.

Ve statistickém vyhodnocení PCA (obr. 35, 36) se skupiny WT (1,2) a CF (3,4) od sebe oddělily. Žádné signifikantní rozdíly nebyly pozorovány před a po podání fenretinidu jak u WT tak i u CF. V případě DFA analýzy (obr. 37) se stejně jako v případě PCA se od sebe odlišily skupiny WT a CF. Navíc u skupiny WT došlo k rozdělení skupin WT s fenretinidem (2) a WT bez fenretinidu (1). U CF nebylo pozorováno žádné rozdělení v závislosti na podání léku.

12 Závěr

Z výsledků vyplývá, že uvedená metoda cílené metabolomiky je vhodná pro metabolické profilování vzorků myší plasmy. S použitím grafických výstupů statistické analýzy jsou výsledky snadno interpretovatelné a vyhodnocování je velmi efektivní.

V teoretické části byla vypracována rešerše na téma: hmotnostní spektrometrie a vysoce účinná kapalinová chromatografie, metabolomika, cystická fibróza a fenretinid.

Další výzkum bude směřován na omezení počtu analytů akviziční metody a tvorby metody na základě „Schedule MRM“, která by měla být citlivější a lépe kvantifikovatelná.

13 Literatura

Abian J. (1999) The Coupling of Gas and Liquid Chromatography with Mass Spektrometry. *J Mass Spectrom* **34**, 157-168.

Alpert A. J. (1990) Hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds. *J Chromatogr* **499**, 177-196.

Anson D. S., Smith G. J., Parsons D. W. (2006) Gene therapy for cystic fibrosis airway disease- is clinical success imminent. *Curr Gene Ther* **6**, 161-179.

Balaščaková M., Piskáčková T., Holubová A., Raušová E., Kazárová V., Krebsová A., Koudová M., Štambergová A., Čamajová J., Norambuena P., Křenková P., Votava F., Vávrová V., Macek M. st., Macek M. ml. (2008) Současné metodické postupy a přehled preimplantační, prenatalní a postnatální DNA diagnostiky cystické fibrózy v České republice. *Čes.-slov. Pediatr* **63**, 62–75.

Banerjee S., Mazumdar S. (2012) Electrospray ionization mass spectrometry: a technique to access the information beyond the molecular weight of the analyte. *Int J Anal Chem* **2012**.

Barber M., Bordoli R. S., Sedgwick R. D. Tyler A. N. (1981) Fast atombombardment of solids (F.A.B.): a new ion source for mass spektrometry. *J Chem Soc, Chem. Commun* **1981**, 325-327.

Boersema P.J., Mohammed S., Heck A.J. (2008) Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) in proteomics. *Anal Bioanal Chem* **391**, 151-159.

Boja E. S., Rodriguez H. (2011) The path to clinical proteomics research: integration of proteomics, genomics, clinical laboratory and regulatory science. *Korean J Lab Med* **31**, 61-71.

Braithwaite A., Smith F. J. (1999) Chromatographic methods, pp. 10-280, Kulwer academic publishers, Netherlands.

Bramer S. C. Van (1997) An Introduction to Mass spectrometry, pp. 1-38, Chester, Pennsylvania, USA.

Brun P. J., Yang K. J., Lee S. A., Yuen J. J., Blaner W. S. (2012) Retinoids: Potent regulators of metabolism. *Biofactors* **2012**.

Carr S. A., Hemling M. E., Bean M. F., Roberts G. D. (1991) Integration of mass spectrometry in analytical biotechnology. *Anal Chem* **63**, 2802-2824.

Cazzaniga M., Varricchio C., Montefrancesco C., Feroce I., Guerrieri-Gonzaga A. (2012) Fenretinide (4-HPR): a preventive chance for women at genetic and familial risk? *J Biomed Biotechnik* **2012**.

Comisarow, M. B., Marshall, A. G. (1974) Fourier transform ion cyclotron resonance spectroscopy. *Chem Phys Lett* **25**, 282–283.

Cooper J. P., Hwang K., Singh H., Wang D., Reynolds C. P., Curley R. W. Jr, Williams S. C., Maurer B. J., Kang M. H. (2011) Fenretinide metabolism in humans and mice: utilizing pharmacological modulation of its metabolic pathway to increase systemic exposure. *Br J Pharmacol* **163**, 1263-1275.

Costa A., Formelli F., Chiesa F., Decensi A., De Palo G., Veronesi U. (1994) Prospects of chemoprevention of human cancers with the synthetic retinoid fenretinide. *Cancer Res* **54**, 2032-2037.

Coward L, Kirk M, Albin N, Barnes S. (1996) Analysis of plasma isoflavones by reversed-phase HPLC-multiple reaction ion monitoring-mass spectrometry. *Clin Chim Acta* **247**, 121-142.

Davies J. C. (2002) *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: pathogenesis and persistence. *Paediatr Respir Rev* **3**, 128-134.

Dettmer K., Hammock B. D.(2004) Metabolomics-A new exciting field within the "omics" sciences. *Environ Health Perspect* **112**, 396-397.

Díaz-Cruz M. S., López de Alda M. J., López R., Barceló D. (2003) Determination of estrogens and progestogens by mass spectrometric techniques (GC/MS, LC/MS and LC/MS/MS). *J Mass Spectrom* **38**, 917-923.

Donaldson S. H., Bennett W. D., Zeman K. L., Knowles M. R., Tarran R., Boucher R. C. (2006) Mucus clearance and lung function in cystic fibrosis with hypertonic saline. *N Engl J Med* **354**, 241-250.

Drumm M. L., Konstan M. W., Schluchter M. D., Handler A., Pace R., Zou F., Zariwala M., Fargo D., Xu A., Dunn J.M., Darrah R.J., Dorfman R., Sandford A.J., Corey M., Zielenski J., Durie P., Goddard K., Yankaskas J.R., Wright F.A., Knowles M.R (2005) Genetic modifiers of lung disease in cystic fibrosis. *N Engl J Med* **353**, 1443-1453.

Dunn W. B., Ellis D. I. (2005) Metabolomics: Current analytical platforms and methodologies. *Trends Analyt Chem* **24**, 285–294.

Ekman R., Silberring J., Westman-Brinkmalm A., Kraj A. (2009) Mass spectrometry. Instrumentation, interpretation and applications, pp. 27 – 102, Wiley J. & sons, Hoboken, New Jersey, USA.

Ellis D. I., Dunn W. B., Griffin J. L., Allwood J. W., Goodacre R. (2007) Metabolic fingerprinting as a diagnostic tool. *Pharmacogenomics* **8**, 1243-1266.

Fenn J. B., Mann M., Meng C. K., Wong S. F., Whitehouse C. M. (1989) Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* **246**, 64-71.

Fiehn O. (2002) Metabolomics--the link between genotypes and phenotypes. *Plant Mol Biol* **48**, 155-171.

Formelli F., Cavadini E., Luksch R., Garaventa A., Villani M. G., Appierto V., Persiani S. (2008) Pharmacokinetics of oral fenretinide in neuroblastoma patients: indications for optimal dose and dosing schedule also with respect to the active metabolite 4-oxo-fenretinide. *Cancer Chemother Pharmacol* **62**, 655-665.

- Gander R. J., Gurney J. A. (1980) Retinoic acid derivatives. US 4190594.
- Guilbault C., Wojewodka G., Saeed Z., Hajdich M., Matouk E., De Sanctis J. B., Radzioch D. (2009) Cystic fibrosis fatty acid imbalance is linked to ceramide deficiency and corrected by fenretinide. *Am J Respir Cell Mol Biol* **41**, 100-106.
- Griesenbach U., Geddes D. M., Alton E. W. (1999) The pathogenic consequences of a single mutated CFTR gene. *Thorax* **54**, 19-23.
- Gross J. H. (2011) Mass spektrometry, pp 24-680, Springer, New York, USA.
- Hanrahan J. W., Sampson H. M., Thomas D. Y. (2013) Novel pharmacological strategies to treat cystic fibrosis. *Trends Pharmacol Sci.* **34**, 119-125.
- Haraoui B., Wilder R. L., Allen J. B., Sporn M. B., Helfgott R. K., Brinckerhoff C. E. (1985) Dose-dependent suppression by the synthetic retinoid, 4-hydroxyphenyl retinamide, of streptococcal cell wall-induced arthritis in rats. *Int J Immunopharmacol* **7**, 903-916.
- Harrison W. W., Magee C. W. (1974) Hollow cathode ion source for solids mass spectrometry. *Anal chem* **46**, 461-464.
- Hilton G. R., Benesch J. L. (2012) Two decades of studying non-covalent biomolecular assemblies by means of electrospray ionization mass spectrometry. *J R Soc Interface* **9**, 801-816.
- Hoffmann E. de, Stroobant V. (2007) Mass spectrometry. Principles and Applications, pp. 15 – 211, Wiley J. & sons, Chichester, West Sussex, England.
- Hofstadler S. A., Sannes-Lowery K. A. (2006) Applications of ESI-MS in drug discovery: interrogation of noncovalent complexes. *Nat Rev Drug Discov* **5**, 585-595.
- Holubová A., Balašćáková M., Skalická V., Kračmar P., Piskáčková T., Vávrová V., Zemková D., Gonsorčíková L., Lebl J., Macek M. ml., Votava F. (2007) Newborn Screening for Cystic Fibrosis in the Czech Republic: Results of a Pilot Study. *Čes-slov Pediat* **62**, 187-195.

Hron K., Filzmoser P., Thompson K. (2012) Linear regression with compositional explanatory variables. *J Appl Stat* **39**, 1115-1128.

Hunt J. F., Wang C., Ford R. C. (2013) Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (ABCC7) Structure. *Cold Spring Harb Perspect Med* **3**.

Illingworth N. A., Boddy A. V., Daly A. K., Veal G. J. (2011) Characterization of the metabolism of fenretinide by human liver microsomes, cytochrome P450 enzymes and UDP-glucuronosyltransferases. *Br J Pharmacol* **162**, 989-999.

Liu X., Jiang Q., Mansfield S. G., Puttaraju M., Zhang Y., Zhou W., Cohn J. A., Garcia-Blanco M. A., Mitchell L.G., Engelhardt J.F. (2002) Partial correction of endogenous DeltaF508 CFTR in human cystic fibrosis airway epithelia by spliceosome-mediated RNA trans-splicing. *Nat Biotechnol* **20**, 47-52.

MacNair J. E., Patel K. D., Jorgenson J. W. (1999) Ultrahigh-pressure reversed-phase capillary liquid chromatography: isocratic and gradient elution using columns packed with 1.0-micron particles. *Anal Chem* **71**, 700-708.

Makarov, A. (2000) Electrostatic axially harmonic orbital trapping: high-performance technique of mass analysis. *Anal Chem* **72**, 1156–1162.

Mamyrin, B. A., Karataev, V. I., Schmikk, D. V., Zagulin, V. A. (1973) *Sov. Phys. – JETP* **37**.

Martin P. D., Jones G. R., Stringer F., Wilson I. D. (2003) Comparison of normal and reversed-phase solid phase extraction methods for extraction of beta-blockers from plasma using molecularly imprinted polymers *Analyst* **128**, 345-350.

Maurya N., Awasthi S., Dixit P. (2011) Association of CFTR gene mutation with bronchial asthma. *Indian J Med Res* **135**, 469 – 478.

Mickle J. E., Macek M. Jr, Fulmer-Smentek S. B., Egan M. M., Schwiebert E., Guggino W., Moss R., Cutting G. R. (1998) A mutation in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene associated with elevated sweat chloride concentrations in the absence of cystic fibrosis. *Hum Mol Genet* **7**, 729-735.

Miller J. N., Miller J. C. (2005) Statistics and chemometrics for analytical chemistry. pp. 205-280, Ashfour colour press, Great Britain.

Moon R. C., Thompson H. J., Becci P. J., Grubbs C. J., Gander R. J., Newton D. L., Smith J. M., Phillips S. L., Henderson W. R., Mullen L. T., Brown C. C., Sporn M. B. (1979) N-(4-Hydroxyphenyl)retinamide, a new retinoid for prevention of breast cancer in the rat. *Cancer Res* **39**, 1339-1346.

Muntau A. C. (2009) *Pediatric*, pp. 336 – 348, Grada Publishing, Praha.

Noone P. G., Knowles M. R. (2001) 'CFTR-opathies': disease phenotypes associated with cystic fibrosis transmembrane regulator gene mutations. *Respir Res.* **2**, 328-332.

O'Sullivan B. P., Freedman S. D. (2009) Cystic fibrosis. *Lancet* **373**, 1891–1904.

Paul, W., Steinwedel, H. S. (1960) Apparatus for separating charged particles of different specific charged. US Patent, 2939952.

Paul, W., Steinwedel, H. S. (1953) *Z. Naturforsch.*, **8a**, 448-450.

Quinton P. M. (2007) Cystic fibrosis: lessons from the sweat gland. *Physiology* **22**, 212-225.

Ratjen F., Döring G. (2003) Cystic fibrosis. *Lancet* **361**, 681-689.

Rayleigh J. W. S. (1882) On the equilibrium of liquid conducting masses charged with electricity. *Philos Mag* **14**, 184.

Reeves E. P., Molloy K., Pohl K., McElvaney N. G. (2012) Hypertonic saline in treatment of pulmonary disease in cystic fibrosis. *ScientificWorldJournal* **2012**.

Riordan J. R. (1993) The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Annu Rev Physiol* **55**, 609-630.

Riordan J. R., Rommens J. M., Kerem B., Alon N., Rozmahel R., Grzelczak Z., Zielenski J., Lok S., Plavsic N., Chou J. L. (1989) Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* **245**, 1066-1073.

Roessner U., Bowne J. (2009) What is metabolomics all about? *Biotechniques* **46**, 363-365.

Rogan M. P., Stoltz D. A., Hornick D. B. (2011) Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator intracellular processing, trafficking, and opportunities for mutation-specific treatment. *Chest* **139**, 1480-1490.

Rosenstein B. J., Zeitlin P. L. (1998) Cystic fibrosis. *Lancet* **351**, 277–282.

Roux A., Lison D., Junot C., Heilier J. F. (2011) Applications of liquid chromatography coupled to mass spectrometry-based metabolomics in clinical chemistry and toxicology: A review. *Clin Biochem* **44**, 119-135.

Rowe S. M., Miller S., Sorscher E. J. (2005) Cystic fibrosis. *N Engl J Med* **352**, 1992-2001.

Sanders N. N., Franckx H., De Boeck K., Hastraete J., De Smedt S. C., Demeester J. (2006) Role of magnesium in the failure of rhDNase therapy in patients with cystic fibrosis. *Thorax* **61**, 962-968.

Scigelova M., Makarov A. (2006) Orbitrap mass analyzer--overview and applications in proteomics. *Proteomics* **6**, 16-21.

Sheppard D. N., Welsh M. J. (1999) Structure and function of the CFTR chloride channel. *Physiol Rev* **9**, 23-45.

Simoni D., Tolomeo M. (2001) Retinoids, apoptosis and cancer. *Curr Pharm Des* **7**, 1823-1837.

Snyder L. R., Kirkland J. J., Dolan J. W. (2010) Introduction to modern liquid chromatography, pp. 15-420, Wiley Publication, USA.

Sporn M. B., Newton D. L. (1979) Chemoprevention of cancer with retinoids. *Fed Proc* **38**, 2528-2534.

Stephens W. (1946) A Method for Measuring Effective Contact e.m.f. between a Metal and a Semi-Conductor. *Phys Rev* **69**, 42-43.

Tautenhahn R., Patti G. J., Rinehart D., Siuzdak G. (2012) XCMS Online: a web-based platform to process untargeted metabolomic data. *Anal Chem* **84**, 5035-5039.

Taylor C. J., Aswani N. (2002) The pancreas in cystic fibrosis. *Paediatr Respir Rev* **3**, 77-81.

Tomita M., Nishioka T. (2005) Metabolomics: The Frontier of Systems Biology, pp. 5-144.

Varma D., Ganti S., Gilles T., Diaz M., Thompson T., Stull J., Jansen S. A. (2011) Comparison of UHPLC and HPLC methods for the assay of prostanoids: "are the methods equivalent in terms of accuracy and precision?". *Bioanalysis* **3**, 853-862.

Vávrová V. (2006) Cystická fibróza, pp. 10-504, Grada Publishing , a.s., Praha.

Villani M. G., Appierto V., Cavadini E., Bettiga A., Prinetti A., Clagett-Dame M. (2006) 4-Oxo-fenretinide, a recently identified fenretinide metabolite, induces marked G2-M cell cycle arrest and apoptosis in fenretinide-sensitive and fenretinide-resistant cell lines. *Cancer Res* **66**, 3238–3247.

Walkowiak J., Lisowska A., Blaszczyński M. (2008) The changing face of the exocrine pancreas in cystic fibrosis: pancreatic sufficiency, pancreatitis and genotype. *Eur J Gastroenterol Hepatol* **20**, 157-160.

Wilm M. (2011) Principles of electrospray ionization. *Mol Cell Proteomics* **10**, 1-8.

Wine J. J. (2003) Rules of conduct for the cystic fibrosis anion channel. *Nat Med* **9**, 827-828.

Wine J. J. (1999) The genesis of cystic fibrosis lung disease. *J Clin Invest* **103**, 309-312.

Wolff M. M., Stephen W. E. (1953) A pulsed mass spectrometer with time dispersion. *Rev Sci Instrum* **24**, 616-617.

Wu J. M., DiPietrantonio A.M., Hsieh T.C. (2001) Mechanism of fenretinide (4-HPR)-induced cell death. *Apoptosis* **6**, 377-388.

Zoro J. A., Hadley K. (1976) Organic Mass Spectrometry in Forensic Science. *J Forensic Sci Soc* **16**, 103–114.

Internetové zdroje:

<http://www.sciencebasedmedicine.org/index.php/woo-omics/>

8. 3. 2013

<http://www.cfklub.cz/Novorozenecky-screening>

27. 2. 2013

<http://www.cfklub.cz/admin/files/File/01-Prirucka-o-vyzive-u-nemocnych-CF.pdf>

27. 2. 2013

http://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=10049076&locale=en_CZ

3. 4. 2013

14 Seznam použitých zkratk

4-HPR	N-(4-hydroxyphenyl)retinamide
4-MPR	N-(4-methoxyphenyl)retinamide
4-oxo-4-HPR	4-oxo-N-(4hydroxyphenyl)retinamide
AA	Kyselina arachidonová
ASL	Airway surface liquid
ATP	Adenosintrifosfát
AAV	Adeno-associated viruses
cAMP	Cyclic adenosine monophosphate
CE	Kapilární elektroforéza
CF	Cystická fibróza
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator
DHA	Kyselina dokosahexaenová
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
ENaC	Epithelial Na ⁺ channel
ESI	Electrospray ionization
FAB	Ionizace rychlými ionty
FT ICR	Iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací
GC	Gas Chromatography
GC/MS	Gas Chromatography/Mass Spectrometry
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IRT	Imunoreaktivního trypsinogenu
LC	Liquid Chromatography
LC/MS	Liquid Chromatography/Mass spectrometry
MALDI	Desorpce/ionizace laserem za účasti matrice („matrix assisted laser desorption/ionization“)
MCC	Mukociliární clearance
MRM	Multiple reaction monitoring
MS	Mass Spektrometry
MSD	Transmembránová doména
MSn	Tandemová hmotnostní spektrometrie
NBD	Nukleotid-vazebná doména
PKA	Fosfokináza A

QqQ	Trojité kvadupól
RNA	Ribonukleová kyselina
SMaRT	Spliceosome-mediated RNA trans-splicing
TOF	Time of flight
WT	Wild Type