

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Stanovení kyselých glykosfingolipidů v lidské plazmě  
pomocí hmotnostní spektrometrie

Bc. Jan Vlach

Diplomová práce

2022

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2021/2022

# ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Jan Vlach**  
Osobní číslo: **C20533**  
Studijní program: **N0531A130028 Analytická chemie**  
Téma práce: **Analýza kyselých glykosfingolipidů v lidské plazmě pomocí hmotnostní spektrometrie**  
Zadávající katedra: **Katedra analytické chemie**

## Zásady pro vypracování

1. Vypracujte literární rešerši zaměřenou na lipidy zahrnující třídy kyselých glykosfingolipidů (gangliosidy a sulfatidy), diskutujte jejich biologickou důležitost a možnosti jejich analýzy s využitím hmotnostní spektrometrie včetně správné přípravy vzorku.
2. Zoptimalizujte extrakci pro izolaci sulfatidů a gangliosidů z lidské plazmy a proveďte jejich strukturní identifikaci s využitím MALDI/Orbitrap-MS/MS a případně LC/MS/MS.
3. Ověřte funkčnost metody pro kvantitativní analýzu pomocí základních validačních parametrů, zejména ověření extrakční účinnosti, linearity, přesnosti metody a selektivity, a metodu aplikujte pro stanovení koncentrací sulfatidů a gangliosidů v lidské plazmě.

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

Seznam doporučené literatury:

Podle pokynů vedoucího práce.

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

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

Datum zadání diplomové práce: **7. února 2022**  
Termín odevzdání diplomové práce: **6. května 2022**

L.S.

---

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

---

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

V Pardubicích dne 21. února 2022

Prohlašuji:

Práci s názvem Stanovení kyselých glykosfingolipidů v lidské plazmě pomocí hmotnostní spektrometrie jsem vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

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

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

V Pardubicích dne 6. 5. 2022

Bc. Jan Vlach

# PODĚKOVÁNÍ

Tímto bych rád poděkoval panu Ing. Robertu Jiráskovi, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, ochotu a připomínky při vypracování mé diplomové práce. Dále bych chtěl poděkovat celé skupině hmotnostní spektrometrie pod vedením prof. Ing. Michala Holčapka, Ph.D. za veškeré rady a vytvoření příjemného prostředí pro práci. Děkuji celé rodině a blízkým za podporu během studia.

## **ANOTACE**

Tato práce je zaměřena na analýzu kyselých glykosfingolipidů z plazmy s využitím MALDI hmotnostní spektrometrie. V teoretické části jsou stručně popsány biologické funkce studovaných lipidů v lidském organismu a obecný přehled metod k jejich analýze založených zejména na hmotnostní spektrometrii. V praktické části jsou diskutovány jednotlivé kroky optimalizace zahrnující porovnání vhodných extrakčních protokolů a přípravy vzorku před MALDI analýzou. Důležitou částí je validace optimalizované metody a ověření její funkčnosti pro kvantitativní analýzu. Optimalizovaná a validovaná metoda je finálně použita pro měření standardního referenčního materiálu NIST lidské plazmy SRM 1950. Výsledky jsou srovnány s dostupnými údaji v literatuře.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

glykosfingolipidy, plazma, extrakce, hmotnostní spektrometrie, MALDI,

## **ANOTATION**

This thesis is focused on the analysis of acid glycosphingolipids from plasma using MALDI mass spectrometry. The theoretical part briefly describes the biological functions of the studied lipids in human organism and a general overview of methods for their analysis, mainly mass spectrometry. In the practical part, the individual steps of optimization are discussed, including the comparison of suitable extraction protocols and sample preparation before MALDI analysis. An important part is the validation of the optimized method and the verification of its functionality for quantitative analysis. The optimized and validated method is finally used to measure the standard reference material NIST human plasma SRM 1950. The results are compared with available data in the literature.

## **KEY WORDS**

Lipids, plasma, extractions, mass spectrometry, MALDI

# OBSAH

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK .....	9
ÚVOD.....	16
<b>1 TEORETICKÁ ČÁST .....</b>	<b>17</b>
1.1 LIPIDY .....	17
1.2 VÝZNAM LIPIDŮ V PATOLOGICKÉM SCREENINGU .....	17
1.3 KYSELÉ GLYKOSFINGOLIPIDY .....	19
1.3.1 Metabolismus sulfatidů a gangliosidů v organismu .....	21
1.3.1.1 Metabolismus sulfatidů .....	22
1.3.1.2 Metabolismus gangliosidů.....	23
1.3.2 Biologické funkce sulfatidů .....	24
1.3.3 Biologické funkce gangliosidů.....	26
1.4 METODY LIPIDOMICKÉ ANALÝZY .....	27
1.4.1 Kapalinová chromatografie spojená s hmotnostní spektrometrií .....	27
1.4.1.1 Kapalinová chromatografie .....	27
1.4.1.2 Hmotnostní spektrometrie .....	29
1.4.1.2.1 Ionizační techniky.....	29
1.4.1.2.1.1 Elektrosprejová ionizace .....	30
1.4.1.2.1.2 Chemická ionizace za atmosférického tlaku a fotoionizace za atmosférického tlaku .....	30
1.4.1.2.1.3 Ionizace/desorpce laserem za účasti matrice.....	31
1.4.1.2.2 Hmotnostní analyzátoři.....	31
1.4.1.2.2.1 Kvadrupólový analyzátor a iontová past .....	32
1.4.1.2.2.1.1 Kvadrupólový analyzátor.....	32
1.4.1.2.2.1.2 Analyzátoři na principu Paulovy iontové pasti .....	32
1.4.1.2.2.2 Analyzátor doby lety.....	33
1.4.1.2.2.3 QqTOF.....	33
1.4.1.2.2.4 Elektrostatická orbitální past.....	33
1.5 LIPIDOMICKÁ ANALÝZA .....	34
1.5.1 Příprava vzorků.....	35
<b>2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....</b>	<b>38</b>
2.1 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE.....	38
2.2 POUŽITÝ MATERIÁL A INSTRUMENTACE.....	38
2.3 PŘÍSTROJOVÉ PODMÍNKY .....	40
2.3.1 Hmotnostní spektrometr MALDI LTQ Orbitrap XL .....	40
2.3.2 Kapalinový chromatograf s kapilární pumpou 1260 Infinity Series .....	40
2.3.3 Hmotnostní spektrometr MicrOTOF-Q .....	40
2.4 PŘÍPRAVA INTERNÍCH STANDARDŮ .....	41
2.5 OPTIMALIZACE METODY .....	42

2.5.1	Příprava vzorků plazmy .....	42
2.5.2	Dvojitá Folch extrakce plazmy .....	42
2.5.3	Extrakce plazmy reverzní fází.....	43
2.5.4	Extrakce plazmy iontově výměnnou tuhou fází WAX a odsolení s C18 .....	44
2.6	VALIDACE METODY.....	46
2.6.1	Kalibrační řada.....	46
2.6.2	Přesnost a správnost.....	46
2.6.3	Extrakční výtěžnost.....	47
2.6.4	Příprava a měření NIST plazmy.....	47
<b>3</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUZE .....</b>	<b>48</b>
3.1	POROVNÁNÍ EXTRAČNÍCH PROTOKOLŮ .....	48
3.2	VÝBĚR ROZPOUŠTĚCÍHO KROKU EXTRAKTU.....	50
3.3	ZAKONCENTROVÁNÍ EXTRAKTU A VÝBĚR KONCENTRACE MALDI MATRICE.....	51
3.4	VALIDACE METODY.....	55
3.5	APLIKACE VALIDOVANÉ METODY PRO STANOVENÍ GANGLIOSIDŮ A SULFATIDŮ V REFERENČNÍM MATERIÁLU NIST SRM 1950 .....	63
<b>ZÁVĚR</b>	<b>.....</b>	<b>66</b>
<b>PŘÍLOHY</b>	<b>.....</b>	<b>77</b>



## SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

Obrázek 1 — Princip metaboliky [12] .....	18
Obrázek 2 — Struktura sulfatidu: Mono-Sulfo Galactosyl( $\beta$ ) Ceramid (18:1;O2/24:0).....	19
Obrázek 3 — Struktura gangliosidu GM3: monosialodihexosylgangliosid (18:1;O2/24:0).....	19
Obrázek 4 — Dělení gangliosidů [17] .....	20
Obrázek 5 — Schéma metabolických cest glykosfingolipidů, sfingolipidů a fosfosfingolipidů [18, 20, 21] .....	21
Obrázek 6 — Syntéza sulfatidů [22].....	22
Obrázek 7 — Struktura axonové membrány [22] .....	25
Obrázek 8 — Schéma orbitální pasti [65].....	34
Obrázek 9 — Schématický postup dvojité Folch extrakce a další přípravy vzorku před vlastní analýzou .....	43
Obrázek 10 — Schématický postup SPE-C18 .....	44
Obrázek 11 — Schématický postup SPE-WAX .....	45
Obrázek 12 — Porovnání intenzit vybraných endogenních lipidů s rozdílnou koncentrací uhličitanu amonného přidaného v rámci Folch extrakce .....	49
Obrázek 13 — Stabilita intenzit endogenních lipidů v extraktu rozpuštěném v iPr-OH/CHCl <sub>3</sub> a MeOH/CHCl <sub>3</sub> po čtyřech hodinách analýzy.....	51
Obrázek 14 — Stabilita intenzit endogenních lipidů v extraktu rozpuštěném v iPr-OH/CHCl <sub>3</sub> a MeOH/CHCl <sub>3</sub> po čtyřech hodinách analýzy.....	51
Obrázek 15 — Záznam spektra SPE extraktu ve FTMS režimu se zvýrazněnými nejintenzivnějšími zástupci GM3 v plazmě.....	52
Obrázek 16 — Záznam spektra SPE extraktu ve FTMS režimu se zvýrazněnými nejintenzivnějšími zástupci SHexCer ve zkušební plazmě .....	53
Obrázek 17 — Záznam spektra SPE extraktu ve FTMS režimu se zvýrazněnými nejintenzivnějšími zástupci SHex <sub>2</sub> Cer ve zkušební plazmě .....	53
Obrázek 18 — TIC chromatogram .....	54
Obrázek 19 — MS/MS spektrum SHexCer 34:1;O2 (18:1/16:0) .....	54
Obrázek 20 — Folch validační extrakty na MALDI destičce před analýzou.....	55
Obrázek 21 — Folch validační extrakty na MALDI destičce po dvanácti hodinách analýzy .....	55
Obrázek 22 — SPE-C18 validační extrakty na MALDI destičce před analýzou .....	56
Obrázek 23 — SPE-C18 validační extrakty na MALDI destičce po třech hodinách analýzy .....	56
Obrázek 24 — Grafické porovnání intenzit a koncentrací endogenních lipidů v rámci kalibračních bodů a) před	

normalizací b) po normalizaci .....	58
Obrázek 25 — Kalibrační řady s přídavkem IS před a po extrakci podle typu extrakční techniky a) Folch b) SPE-C18.....	59
Obrázek 26 — Extrakční účinnosti IS standardů SHexCer 18:1;O2/12:0 a GM3 18:1;O2/18:0-d5.....	62
Příloha 1 — Finální identifikační tabulka endogenních kyselých glykosfingolipidů ve zkušební plazmě A (Folch), B (SPE-C18).....	80
Příloha 2 — Identifikování zástupci GM3 ve směsné plazmě a porovnání intenzit s ohledem na optimalizovanou extrakční techniku.....	81
Příloha 3 — Identifikování zástupci SHex <sub>2</sub> Cer ve směsné plazmě a porovnání intenzit s ohledem na optimalizovanou extrakční techniku.....	81
Příloha 4 — Identifikování zástupci SHexCer ve směsné plazmě a porovnání intenzit s ohledem na optimalizovanou extrakční techniku.....	82
Příloha 5 - MS/MS spektrum GM3 34:1 .....	83
Tabulka 1 — Enzymy v metabolismu sulfatidů a gangliosidů – funkce a onemocnění.....	23
Tabulka 2 — Koncentrace Interních standardů v IS mixu.....	41
Tabulka 3 — Limity detekce a kvantifikace použitých IS.....	60
Tabulka 4 — Přesnost Folch a SPE-C18 na třech koncentračních hladinách.....	60
Tabulka 5 — Správnost Folch a SPE-C18 na třech koncentračních hladinách.....	61
Tabulka 8 — Koncentrace endogenních lipidů v NIST SRM 1950 plazmě .....	64

## SEZNAM ZNAČEK A ZKRATEK

2-PrOH	2-Propanol (2-propanol)
9-AA	9-Aminoakridin (9-Aminoacridine)
ACN	Acetonitril (Acetonitrile)
aGSL	Kyselé glykosfingolipidy (acidic glycosphingolipids)
APCI	Chemická ionizace za atmosférického tlaku (Atmospheric Pressure Chemical Ionization)
APPI	Fotoionizace za atmosférického tlaku (Atmospheric Pressure Photoionization)
ARSA	Arylsulfatáza (Arylsulfatase)
ATP	Adenosintrifosfát (adenosine triphosphate)
BEH	Hybrid s ethylenovým můstkem (ethylene bridged hybrid)
Cer	Ceramid (Ceramide)
CGT	Ceramidgalaktosyl transferáza (Ceramide galactosyl transferase)
CMP-Neu5Ac	Cytidinmonofosfát (Cytidine monophosphate)
CNS	Centrální nervová soustava (Central nervous system)
CST	Cerebrosid sulfotransferáza (Cerebroside sulfotransferase)
CV	Variační koeficient (coefficient of variation)

DC	Stejnsměrný proud (Direct Current)
DHA	Kyselina dokosahexaenová (Docosahexaenoic acid)
EI	Elektronová ionizace (Electron ionization)
ESI	Ionizace elektropřejem (Electrospray Ionization)
FT-ICR	Iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací (Fourier-Transform Ion Cyclotron Resonance)
Gal	Galaktóza (Galactose)
GALC	Galaktocerebrozidáza (Galactocerebrosidase)
GalCer	Galaktosylceramid (Galactosylceramide)
GalNAC	N-acetylgalaktosamin (N-Acetylgalactosamine)
Glu	Glukóza (Glucose)
GluNAC	N-acetylglukosoamin (N-acetylglucosamine)
GM1	Monosialotetrahexosylgangliosid (Monosialotetrahexosylganglioside)
GM3	Monosialodihexosylgangliosid (Monosialodihexosyl Ganglioside)
HDL	Vysokodenzitní lipoprotein (high density lipoprotein)
HFBA	Kyselina heptafluoromáselná (Heptafluorobutyric acid)
LC-HILIC	Chromatografie hydrofilních interakcí (Chromatography of hydrophilic interactions)

HL	Vysoká koncentrační úroveň (High Level)
IS	Interní standard (Internal standard)
IS mix	Směs vnitřních standardů (Mixture of Internal Standards)
LC-MS	Kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií (Liquid Chromatography-Mass Spectrometry)
LC-NP	Kapalinová chromatografie s normální fází (Normal – Phase Liquid Chromatography)
LC-RP	Kapalinová chromatografie reverzní fáze (Revers – Phase Liquid Chromatography)
LDL	Nízkodenzitní lipoprotein (Low density lipoprotein)
LL	Nízká koncentrační úroveň (Low Level concentration)
l-l	Extrakce kapalina-kapalina (liquid-liquid extraction)
LOD	Limit detekce (Limit of detection)
LOQ	Limit kvantifikace (Limit of quantification)
MALDI	Desorpce za účasti matrice (Matrix assisted laser desorption/ionization)
MeOH	Methanol (Methanol)
ML	Střední koncentrační hladina (Middle level concentration)

MS/MS	Tandemová hmotnostní spektrometrie (Tandem mass spectrometry)
MTBE	Methyl terc-buthyl ether ((Methyl-Tert-Butyl Ether)
MW	Molekulární hmotnost (Molecular weight)
NADH <sup>+</sup>	Nikotinamidadenindinukleotid (Nicotinamide adenine dinucleotide)
NIST plazma	Standardní referenční materiál lidské plazmy NIST SRM 1950 (Standard Reference Material human plasma NIST SRM 1950)
PAPS	3'-fosfoadenosin-5'-fosfosulfátu (3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate)
PI	Fosfatidylinositol (Phosphatidylinositol)
Q	Kvadrupólový analyzátor (Quadrupole analyzer)
QqQ	Trojité kvadrupól (Triple Quadrupole)
QqTOF	Hybridní analyzátor kvadrupól / analyzátor doby letu (Hybrid analyzer quadrupole / Time Of Flight analyzer)
R <sup>2</sup>	Koeficient determinace (Coefficient of determination)
RF	Vysokofrekvenční napětí (Radio Frequency)
RSD	Relativní směrodatná odchylka (Relative Standard Deviation)
SA	Kyselina sialová (Sialic acid)
SFC	Superkritická fluidní chromatografie (Supercritical Fluid Chromatography)
SHex <sub>2</sub> Cer	Dihexosylsulfatid (Dihexosyl Sulfatide)

SHexCer	Monohexosylsulfatid (Monohexosyl Sulfatide)
SPE	Extrakce tuhou fází (Solid phase extraction)
TOF	Analyzátor doby letu (Time Of Flight analyzator)
UDP	Uridin fosfát (Uridine phosphate)
WAX	Slabá aniontová výměna (Weak anion exchange)

## ÚVOD

Kyselý (glyko)sfingolipidy jsou velmi úzce orientovaná skupina lipidů, které jsou v současnosti čím dál více předmětem zájmu, jelikož se účastní důležitých biologických funkcí v lidském organismu. Změna jejich koncentrační hladiny je spojována se změnou patologického stavu organismu, takže není divu, že jsou tyto sloučeniny zvažovány jako potenciální biomarkery různých onemocnění.

Hlavní podskupinou, na kterou se práce orientuje jsou sulfatidy (monohexosylsulfatidy; SHexCer a dihexosylsulfatidy; SHex<sub>2</sub>Cer) a gangliosidy (monosialodihexosylceramidy; GM3). Většina analytických metod pro jejich analýzu je založená na hmotnostní spektrometrii, zejména v kombinaci s kapalinovou chromatografií. Nicméně lze pro tento účel využít i metody bez separace. Vzhledem k iontovému charakteru studovaných sloučenin je nejvhodnější ionizace elektrosprejem (ESI) nebo ionizace/desorpce laserem za účasti matrice (MALDI) v režimu záznamu záporných iontů. Přístupy bez chromatografie vedou sice k rychlejším analýzám, ale obvykle se zde vyskytuje silný matriční efekt, vzhledem k tomu, že jsou všechny ionty ionizovány ve stejný čas. Dále je nezbytné využít hmotnostní analyzátor s vysokou rozlišovací schopností, aby byly v hmotnostních spektrech jednotlivé ionty rozlišeny. Počet ionizovaných molekul lze snížit selektivní extrakcí nebo využitím vhodné selektivní MALDI matrice. Rozhodující úlohu potom hraje validace, která prokáže, zdali jsou metody vhodné pro kvantitativní, semi-kvantitativní nebo pouze kvalitativní analýzy.

V diplomové práci jsou využívány a podle potřeby upraveny již publikované extrakční postupy, které se v práci modifikují pro zvýšení počtu identifikovaných a kvantifikovaných sulfatidů a gangliosidů v plazmě [1] [2] [3]. Celá práce je postavena na optimalizaci Folch extrakce a extrakcí tuhou fází s oktadecylem jako sorbentem. Klíčovým parametrem je výchozí objem extrahované plazmy a finální rozpouštění extraktu.



# 1 Teoretická část

## 1.1 Lipidy

Lipidy lze charakterizovat jako rozmanitou skupinu molekul s řadou biologických funkcí. V současnosti je známo osm základních kategorií lipidů, přičemž kategorie jsou definovány na základě totožného skeletu molekuly (například molekula lipidu obsahuje sfingoidní bázi = sfingolipidy). Jmenovitě jde o mastné acyly, glycerolipidy, glycerofosfolipidy, sfingolipidy, steroly, prenoly, sacharolipidy a polyketidy [4]. Práce se zaměřuje na skupinu kyselých glykosfingolipidů (aGSL, acidic glycosfingolipids), konkrétně na sulfatidy a gangliosidy, které patří mezi hlavní zástupce aGSL v lidském organismu. Tyto lipidy jsou definovány přítomností kyselé polární skupiny, konkrétně sulfátové (sulfatidy) nebo karboxylové skupiny v sacharidové části molekuly lipidu [4] [5]. Bližší vysvětlení struktury a dalších parametrů je uvedeno na dalších stranách.

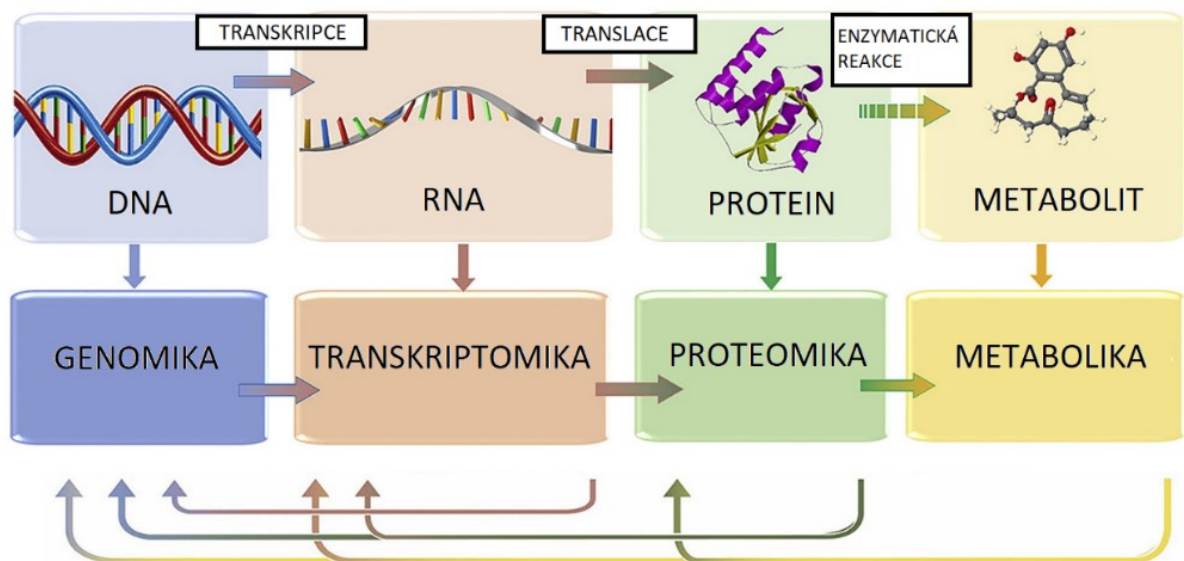
Lipidy v organismu zastupují rozmanité funkce. Jsou součástí biologických membrán, slouží k transportu informací a jako zdroj energie. Jsou brány jako různé ukazatele patologických stavů v organismu. Příkladem může být stanovení triacylglycerolu a celkového cholesterolu, LDL-cholesterolu a HDL-cholesterolu v případě metabolické poruchy tvorby transportních lipoproteinů, které slouží k transportu lipidů do buňky a do jater, kde dochází k jejich metabolizaci. Případně stanovení koncentrace konkrétních skupin lipidů slouží jako ukazatel samotného defektu přeměny lipidu v játrech [6] [7]. Současné trendy umožňují sledování koncentrace lipidů v plazmě, tkáních a dalších biologických materiálech za účelem diagnostiky rakovinných onemocnění a dalších patologických stavů [8, 9].

## 1.2 Význam lipidů v patologickém screeningu

Před samotnou specifikací struktury, biologického významu, metabolismu gangliosidů a sulfatidů je nutné poskytnout základní informace, proč může lipidomická analýza sloužit k indikaci různých patologických stavů organismu, např. k včasné diagnostice nádorových onemocnění [1] [11]

Lipidomika, která je v podstatě součástí metabolomiky, je posledním krokem v kaskádě metabolických přístupů (*Obrázek 1*). Lipidy společně se sacharidy a proteiny patří mezi základní stavební složky buněk v lidském organismu. Veškeré lipidy podléhají přesně určeným

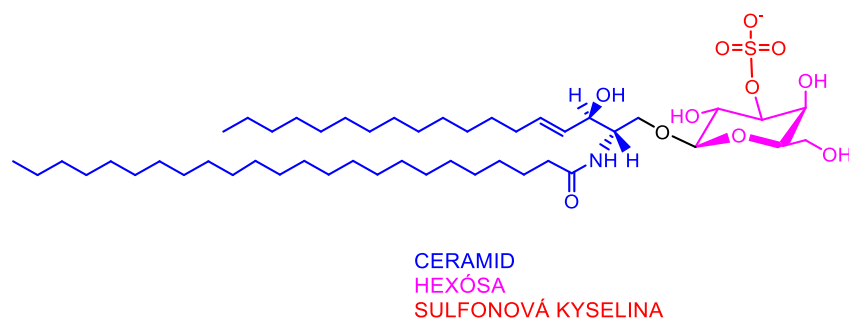
metabolickým procesům, které určují co se s daným lipidem stane, jak je degradován, syntetizován, přeměněn atd. Lipidové metabolické procesy jsou řízeny enzymatickými cestami [10]. Je známo, že enzymy jsou tvořeny buď pouze bílkovinou, nebo bílkovinou složkou a kofaktorem (nebílkovinná složka; například NADH<sup>+</sup> -donor protonů do enzymatické reakce). Přesná informace o funkci enzymu, jak má být syntetizován (přesné pořadí aminokyselin) je uložena v genomu buňky. V případě fyziologického průběhu probíhá proteosyntéza a opravné procesy syntézy enzymu v pořádku a enzym plní svoji funkci [11]. V případě rakovinného bujení dochází ke změně genetické informace buňky a s tím i syntézy enzymu. Může se změnit genetický kód enzymu (enzym nedělá co má), může dojít k jeho nadměrné proteosyntéze, nebo obojí dohromady. Pokud je změněna funkce enzymu, dochází ke vzniku nových metabolitů (lipidů), které lze využít k identifikaci nádorových onemocnění. Případně dochází ke zvýšení nebo snížení exprese dané molekuly lipidů, což může opět indikovat změnu patologického stavu. Všechny tyto kauzality lze při pochopení biochemických procesů na úrovni metabolických drah vci nádorových onemocnění [11] [12].



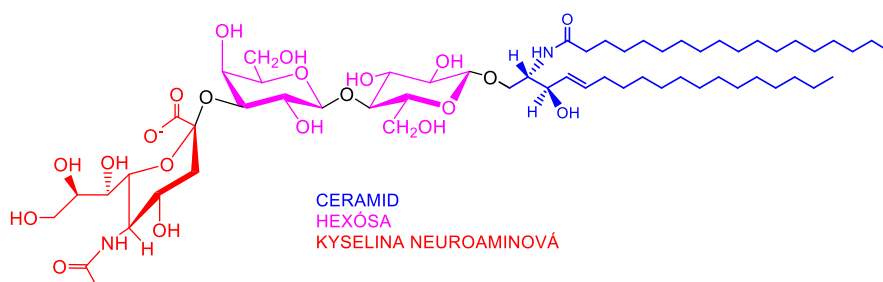
**Obrázek 1** — Princip metaboliky [10]

### 1.3 Kyselé glykosfingolipidy

Mezi nejzastoupenější aGSL v lidské plazmě patří sulfatidy a gangliosidy GM3. Obecně obě skupiny disponují základním skeletem hydrofóbního ceramidu. Rozdíl v sulfatidech a gangliosidech je na základě přítomnosti počtu polárních monosacharidových složek vázaných na ceramid a zejména pak přítomností specifických kyselých funkčních skupin. U sulfatidů je to přítomnost sulfátové skupiny vázané na sacharidovou složku. U gangliosidů je to přítomnost kyseliny neuroaminové (sialové). Pro lepší představu jsou na *Obrázcích 2 a 3* uvedeny struktury pro dva vybrané lipidy, mono-Sulfo Galactosyl( $\beta$ ) Ceramid (18:1;O2/24:0) a mono-sialodihexosylgangliosid (GM3) (18:1;O2/24:0) [1] [3]. V případě sulfatidů se v lidském organismu nejčastěji studují galactosylsulfatidy, které obsahují jednu monosacharidovou jednotku s jednou sulfátovou skupinou. Druhou nejčastější skupinou jsou lactosylsulfatidy, které obsahují dvě monosacharidové jednotky. U gangliosidů jsou struktury rozmanitější a v literatuře nalezneme články, které se zabývají gangliosidy s různými počty základních monosacharidových jednotek i sialových kyselin [14, 15] [16].

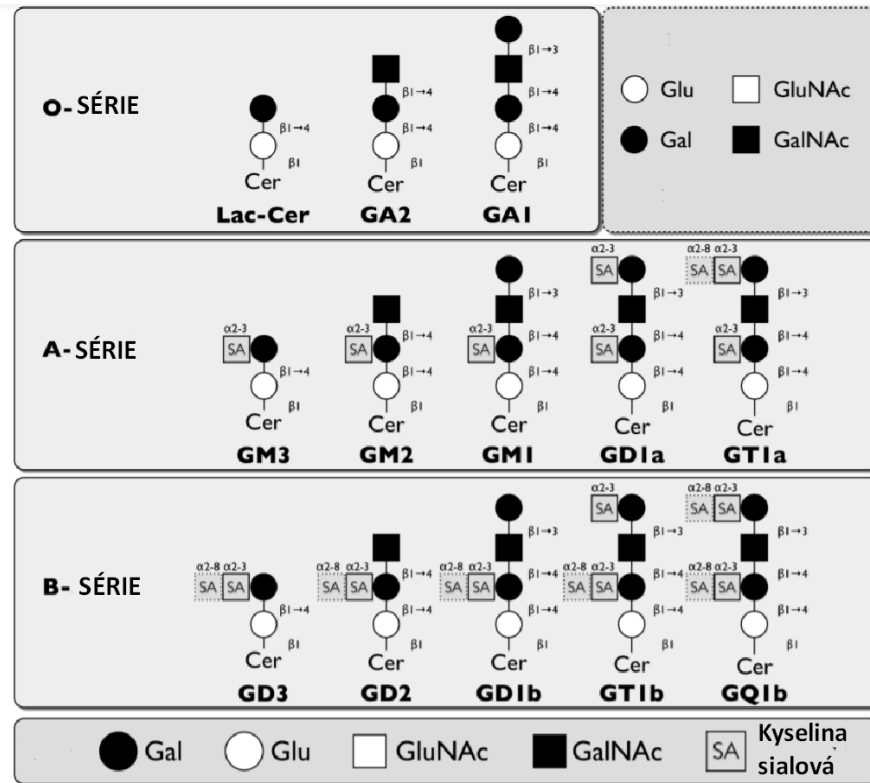


**Obrázek 2** — Struktura sulfatidu: Mono-Sulfo Galactosyl( $\beta$ ) Ceramid (18:1;O2/24:0)



**Obrázek 3** — Struktura gangliosidu GM3: monosialodihexosylgangliosid (18:1;O2/24:0)

Skupina gangliosidů je rozdělena do skupin (sérií) na základě množství a typu monosacharidových jednotek vázaných na ceramid, zároveň značnou roli hraje i poloha kyseliny neuroaminové (Obrázek 4) [14] [20]. V ceramidové části se pak jednotlivé sulfatidy a gangliosidy liší typem ceramidové báze, délkou N-acylu, počtem násobných vazeb a hydroxylů [14].

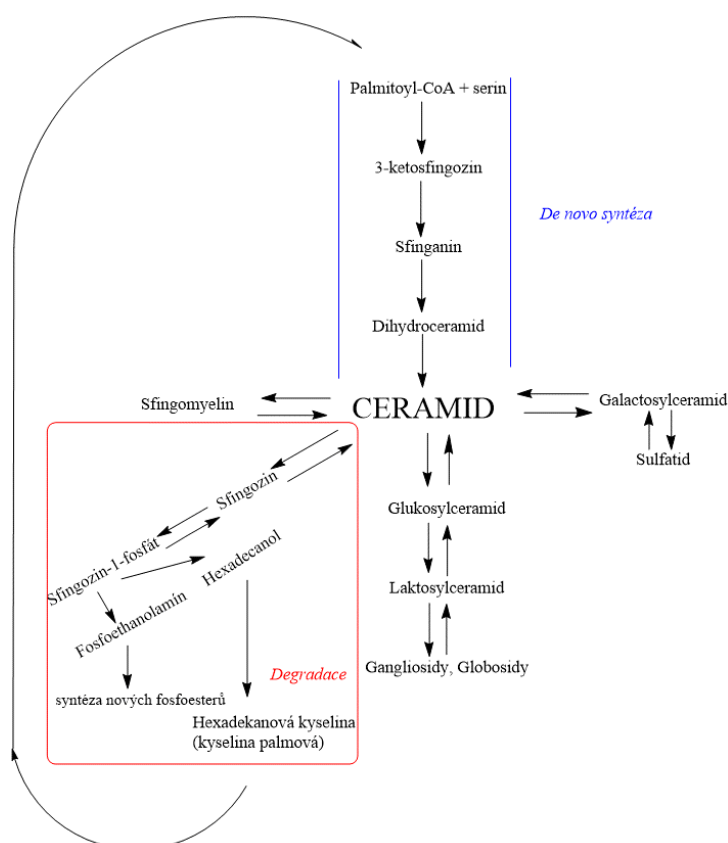


Obrázek 4 — Dělení gangliosidů [17]

### 1.3.1 Metabolismus sulfatidů a gangliosidů v organismu

Při syntéze sulfatidů a gangliosidů je počáteční složkou ceramid, na dalších stranách jsou popsány jednotlivé kroky jejich syntézy. Metabolismus lipidů je velmi komplexní, jak je patrné z *Obrázku 5*, který demonstruje, že i syntéza glykosfingolipidů zahrnuje spoustu enzymů. Porucha byť jediného enzymu může vést ke změně patologického stavu, který vede k nežádoucím dějům v organismu [18].

Díky reverzibilním reakcím, jak je uvedeno na *Obrázku 5*, lze sulfatidy a gangliosidy převést na odlišně lipidové třídy a podtřídy. Hlavní reakční mezi složkou je opět ceramid. Z ceramidu jsou poté syntetizovány odlišné glykolipidy s odlišnými monosacharidovými jednotkami, dále pak i sfingomyeliny aj [18] [19]. Degradáční procesy probíhají přes ceramid, kdy ceramid přechází na sfingozin, sfingozinfosfáty, fosfoethanolaminy, hexadecanal. Následně jsou tyto látky podle potřeby zpracovány v organismu, znovu použity k syntéze výchozích látek, případně dále degradovány a vyloučeny [18].

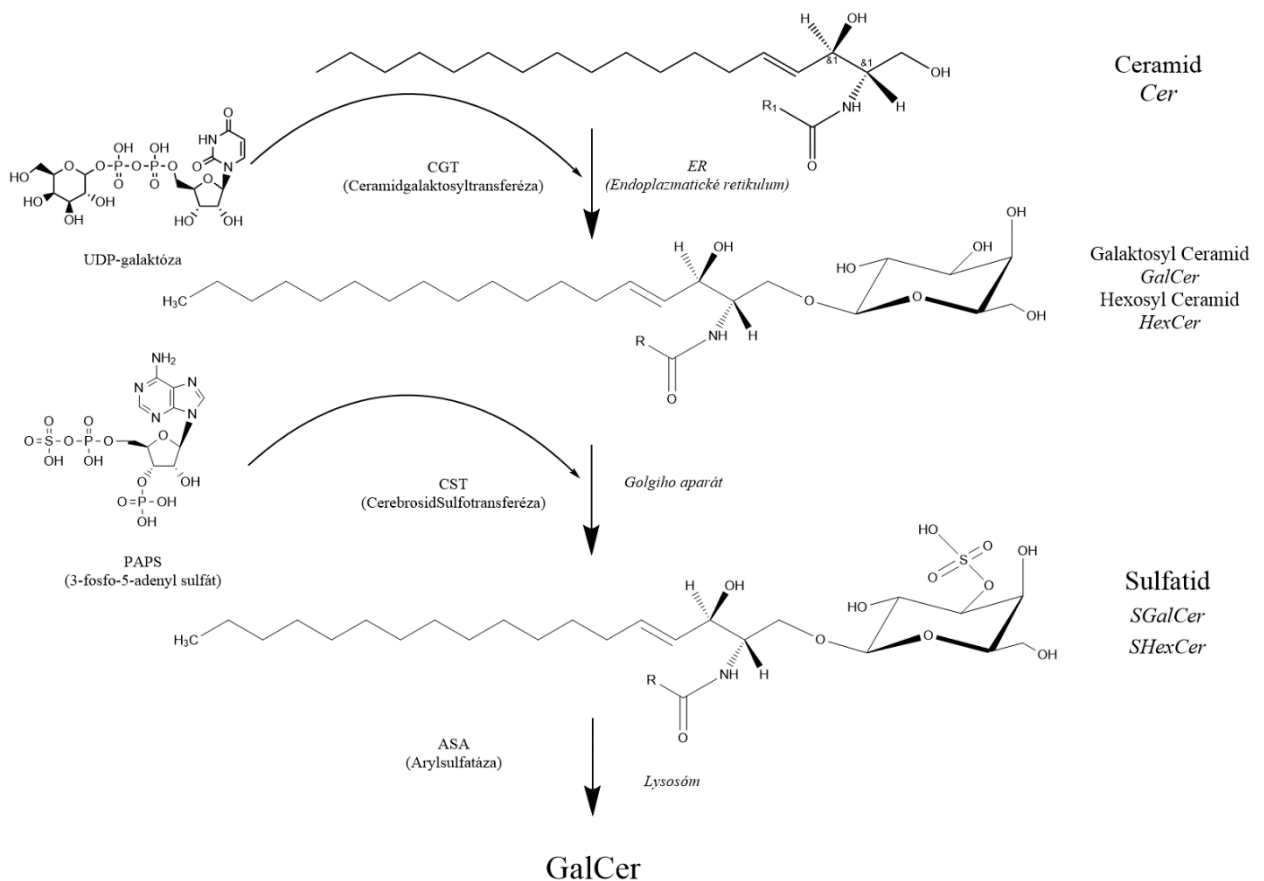


**Obrázek 5** — Schéma metabolických cest glykosfingolipidů, sfingolipidů a fosfosfingolipidů [18, 20, 21]

### 1.3.1.1 Metabolismus sulfatidů

Obecná syntéza sulfatidů začíná u ceramidu (Obrázek 6). Z ceramidu za účasti enzymu ceramidgalaktosyl transferázy (CGT) a UDP-galaktózy dojde k připojení galaktózy na ceramid a vzniká galaktosyl-ceramid. Tato reakce je reverzibilní za použití Galaktocerebrozidázy (GALC). Po odštěpení monosacharidu z UDP se připojí další monosacharid a syntéza se opakuje podle potřeby. (Endoplazmatické retikulum) [22][23][20].

Z GalCer a 3'-fosfoadenosin-5'-fosfosulfátu (PAPS) s použitím enzymu cerebrosid sulfotransferáza (CST) dojde k připojení sulfonové kyseliny a dojde tak ke vzniku sulfatidu, zpětně lze sulfatid převést na GalCer pomocí enzymu arylsulfatázy (ARSA) (Golgiho aparát) [22] [20].



Obrázek 6 — Syntéza sulfatidů [22]

### 1.3.1.2 Metabolismus gangliosidů

Pro připojení sacharidových složek k ceramidu slouží enzym glukosyltransferáza a galactosyltransferáza s účastí UDP (uridinfosfát) (Endoplazmatické retikulum) [12] [13] [25] [27].

Připojení kyseliny neuroaminové (sialové kyseliny;SA) probíhá za účasti gangliosid syntház (pro GM3:GM3 syntháza), kdy donorem kyseliny neuroaminové je sodná sůl kyseliny sialové připojené na cytidinmonofosfátu (CMP-Neu5Ac). (Golghiho aparát) [12] [13] [25] [27]. Pro ilustraci jsou v *Tabulce 1* uvedeny vybrané enzymy a příslušná onemocnění, které jsou v literatuře spojeny s poruchou těchto enzymů.

**Tabulka 1** — Enzymy v metabolismu sulfátidů a gangliosidů – funkce a onemocnění

Enzym	Onemocnění	Zdroj
CGT	Nieman-Pick onemocnění typu A Metachromatická leukodystrofie	[27]
CST	Rakovina ledvin, ovarii Snížená inzulinová rezistance	[28]
GALC	Krabbeho choroba	[29]
ARSA	Metachromatická leukodystrofie Nervová onemocnění: neuropatie aj	[30]
GM3 syntháza	Amish infantilní epilepsie	[31]
Sialidáza	Různé druhy rakovin	[32]
GM1 $\beta$ -galktosidáza	Morquio B syndrome	[33]

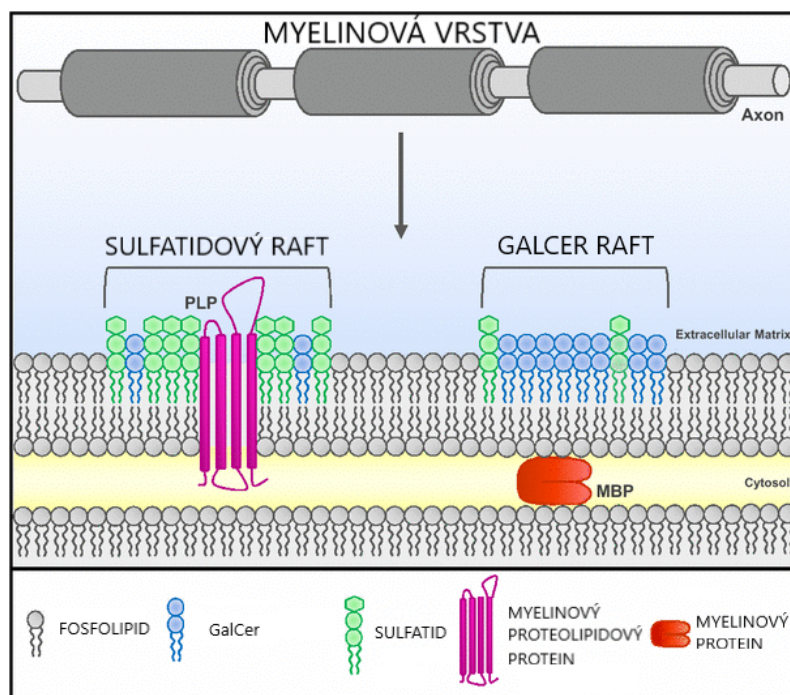
### 1.3.2 Biologické funkce sulfatidů

Základní funkce sulfatidů jsou následující:

- Adheze na imunoprotektivní buňky v rámci rozpadu buněčných membrán (imunoprotektivní) [35] [36].
- Rozpoznávání cizorodých struktur – bakterie, viry (imunoprotektivní) [22] [34].
- Jsou součástí transportních membránových proteinů -vázaní iontů, kladně nabitých částí molekul a ovlivňování jejich transportu (homeostáza a transport) [36].
- Udržování integrity membrán (strukturní) [10] [11] [38].

Nejvyšší zastoupení sulfatidů je v CNS, slezině a ledvinách [22]. V CNS jsou sulfatidy uloženy v myelinové vrstvě, která pokrývá axon nervu (*Obrázek 7*). Zastoupeny jsou zde zejména sulfatidy s dlouhými nenasycenými hydroxylovanými mastnými kyselinami (C22/24). Změna kompozice alkylového řetězce může mít odlišné funkce. Bylo prokázáno, že v případě zkrácení řetězce na isoformu C18 dochází k degenerativním onemocněním [22]. Přibližně 30 % myelinové vrstvy tvoří jenom sulfatidy a cerebrosidy (neutrální glykosfingolipidy). Důležitou funkci zastupují jako strukturní složka v myelinové vrstvě, udržují společně s ostatními lipidy integritu axonové membrány, slouží k předávání informací a také hrají velkou roli v případě rozpadu myelinové vrstvy (zánět) [37, 38]. Sulfatid je v takovémto případě navázán na imunoprotektivní buňky (glia) pomocí specifického proteinu (L-selektinu), kdy následně dojde ke spuštění obraných mechanismů imunitního systému (*obrázek 8*). Opakovaný a dlouhodobý rozpad a změna kompozice alkylového řetězce může naznačovat i chronické neurodegenerativní onemocnění, jako Parkinsonovu chorobu a sklerózu [22] [36] [38].





**Obrázek 7** — Struktura axonové membrány [22]

V ledvinách jsou sulfatidy součástí membrán ledvinových buněk, nejvyšší koncentrace dosahují v distálních částech nefronu, nejzastoupenější je C18:0 isoforma [39]. Díky svému zápornému náboji je sulfatid schopen vázat některé kationty, které jsou vylučovány do močových cest a zpětně umožnit jejich reabsorpci. Zmiňovaný je zejména amonný kation. Přebytečné protony vlivem metabolické acidózy jsou v organismu pufovány a během renální filtrace jsou vázány ve formě amonných kationtů, tyto amonné kationty jsou během ledvinové filtrace několikrát reabsorbovány a vyloučeny [40]. V současné době je potvrzeno, že amonné kationty jsou zpětně reabsorbovány membránovými transportními proteiny (iontové kanály), které obsahují ve svém okolí sulfatidy a umožňují transport amonných iontů, další výzkum na toto téma stále probíhá [41]. Stejně jako v CNS slouží sulfatidy jako indikátory rozpadu buněk, kdy odtržený sulfatid je vázán na specifický protein (L-selektin) imunoprotektivních buněk a udává tak náznak imunitnímu systému zánět, patogenezi atd. [22] [41].

Ve slinivce nalezneme sulfatidy v beta buňkách Langerhansových ostrůvků. V beta buňkách jsou přítomny zejména sulfatidy s hydroxylovanými nenasycenými mastnými kyselinami [22]. Tyto beta buňky organizují sekreci insulinu a řadu dalších peptidů. Mezi hlavní funkce sulfatidů patří ovlivňování sekrece insulinu, účastní se syntézy proinsulinu a tím tedy syntézy insulinu obecně [36]. Sulfatid je potřebný k aktivaci ATP-senzitivních kanálů pro draselné ionty a iontových kanálů pro vápenaté ionty, kdy následně proběhne řada

biochemických procesů finálně vedoucí k sekreci inzulínu. Inzulín je glukózově dependtní, to znamená že jeho sekrece je zejména ovlivňována koncentrací glukózy v krvi, nicméně celá sekrece je ovlivňována řadou faktorů (i přítomností sulfatidů) a v případě nadměrné nebo nedokonalé exprese sulfatidů přispívají k patologickým stavům [22] [36].

### **1.3.3 Biologické funkce gangliosidů**

Gangliosidy jsou přítomny ve všech tkáních [33]. Jsou nejčastěji lokalizovány na vnější plazmatické membráně v uskupeních zvané mikrodomény (lipidové rafty), což je struktura glykosfingolipidů a proteinových receptorů. Tato uskupení ovlivňují membránovou fluiditu, čili transport látek přes plazmatickou membránu (zejména iontů) a určitou roli zastávají i v neurotransmisi [25] [42]. Nedostatečná produkce gangliosidů má určitou spojitost s Alzheimerovou chorobou, Parkinsonovou chorobou, sklerózou, mrtvicí a epilepsií [25].

Další funkcí je vliv na růstový cyklus buněk, toto ovlivnění koordinuje zejména GM3 (ovlivňováním růstových faktorů). V současných studiích je potvrzeno, že vysoká exprese gangliosidů souvisí s nádorovým onemocněním. V případě rakovinového bujení se rakovinná buňka snaží zvýšenou expesí gangliosidů (zejména GM3) indukovat růstové faktory a podpořit tak svůj růst [42] [43] [44] [45]. V současnosti se vysoká exprese GM3 potvrdila v případě rakoviny prsu a močového měchýře [46] [47].

## 1.4 Metody lipidomické analýzy

### 1.4.1 Kapalinová chromatografie spojená s hmotnostní spektrometrií

Kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí patří mezi nejpoužívanější techniky současnosti k analýze biologických vzorků, jak ve vědecké sféře, tak klinické. V současnosti se k této kombinaci přistupuje díky své robustnosti, citlivosti, schopnosti analyzovat velký počet biomolekul v jediném vzorku a získání retenčních parametrů, které jsou velmi užitečnou doplňující informací k hmotnostním spektrům. Největší rozmach v této kombinaci přineslo objevení elektrosprejové ionizace (ESI) a chemické ionizace za atmosférického tlaku (APCI). Následně budou popsány základní principy obou technik, jak separačních tak hmotnostních [48].

#### 1.4.1.1 Kapalinová chromatografie

Jedná se o separační techniku, kde dochází k ustanovení rovnováhy mezi mobilní a stacionární fází. Tuto rovnováhu lze využít k rozdělení látek v závislosti na čase. Stacionární fáze má funkci zadržování analytu a mobilní fáze unášení analytu k detektoru. [49–52].

Kategorizace kapalinových separačních technik je rozsáhlá a lze ji brát z určitých úhlů pohledu. Pro lipidy jsou používány čtyři základní módy separačních technik. Mezi tyto základní módy patří: kapalinová chromatografie s reverzními fázemi (RP-LC), kapalinová chromatografie s normálními fázemi (NP-LC), chromatografie hydrofilních interakcí (HILIC) a superkritická fluidní chromatografie (SFC) [49–52].

RP-LC je nejběžnější technikou používanou v lipidomice a je založena na interakci nepolární stacionární fáze (C18, C8) s nepolárním řetězcem mastných kyselin lipidů. Důležitou roli hraje i volba mobilní fáze. Jako mobilní fáze se používají taková rozpouštědla, aby byla polárnější než stacionární fáze. Příkladem je ACN, voda, metanol, isopropanol nejčastěji s příměsí vhodného pufru nebo slabé kyseliny, jako je kyselina mravenčí, octová aj. Převážně dominuje gradientová eluce, jelikož se analyzuje velké množství molekul. Separace s využitím RP se používá k rozdělování lipidu na základě délky nepolárního řetězce, počtu násobných vazeb, ale i podle typu polární hlavy lipidu. Je možno sledovat i isomerii, čili odlišit dvě molekuly se stejným sumárním vzorcem, ale odlišným uspořádáním alkylového řetězce lipidu [49, 52].

NP-LC využívá silně polární stacionární fázi tvořenou nejčastěji silikagelem. U normálních fází je definice taková, že sorbent musí být polárnější než mobilní fáze. Jako mobilní fáze se používá methanol, hexan, isopropanol. Touto technikou lze odlišit lipidy podle počtu násobných vazeb, polohou, cis/trans izomerii a regioizomerie [53, 54].

HILIC dělí látky podle polární části lipidu. U lipidů je výsledný chromatogram rozdělen podle jednotlivých lipidových skupin podle přítomnosti totožné polární části. Jako lože se používá nejčastěji kolony s křemíkem (Si). Mobilní fáze jsou různorodé, nicméně opět dominuje gradientová eluce, jako složky mobilní fáze se nejčastěji volí voda, ACN s příměsí kyseliny octové, acetát amonný aj [16, 50, 51, 53]

SFC umožňuje dělit lipidy jak polární, tak nepolární ve velmi krátkém čase. Stacionární fáze obsahuje jak nepolární skupiny, tak polární skupiny. Mobilní fáze je nadkritická tekutina, nejčastěji CO<sub>2</sub>. Pro zlepšení retenčních a dělicích vlastností se přidávají modifikátory jako je methanol nebo voda s příměsí solí (octan amonný) a poměr celkového složení modifikátorů se během separace mění [50].

### 1.4.1.2 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie je fyzikálně-chemická metoda, která poskytuje rozlišení iontů podle hmotnosti ku náboji ( $m/z$ ). Hmotnostní spektrometry, tedy zařízení k tomuto určené, má tři základních částí: ionizační zdroj, hmotnostní analyzátor a detektor. Nedílnou součástí je i vakuová technika pro vytvoření vakua, pro lipidomiku se využívají techniky ionizace za atmosférického tlaku, v samotných analyzátoch je pak aplikováno vakuum. Tyto části jsou dále děleny na jednotlivé zástupce dle principu fyzikálně-chemických procesů ionizace, separace iontů a konstrukce analyzátoru. [53][55].

#### 1.4.1.2.1 Ionizační techniky

V současnosti se využívá několik ionizačních technik v závislosti na charakteru ionizovaných molekul a aplikaci. Základní rozdělení je na tvrdé a měkké ionizační techniky, při čemž dělení do těchto dvou skupin je na základě použité energie při ionizaci. V případě tvrdé ionizace dochází kromě vzniku molekulárních iontů i k výrazné fragmentaci v důsledku získaného přebytku energie. Do této skupiny patří elektronová ionizace (EI), která je nejvíce spojována s plynovou chromatografií. V případě nižší ionizační energie hovoříme o měkkých ionizačních technikách. V tomto případě často fragmentové ionty v základních hmotnostních spektrech nepozorujeme. Nicméně záleží na typu molekuly a vazebných silách mezi jejími atomy. Mezi tyto techniky patří ionizace pracující za atmosférického tlaku: elektrospřejová ionizace (ESI), chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI) a fotoionizace pracující z atmosférického tlaku (APPI). Dále sem spadá ionizace/desorpce laserem účasti matrice (MALDI), která může pracovat za atmosférického tlaku i za vakua. [56] [57] [58].

Pro spojení se separačními technikami v on-line uspořádání se využívají zejména ESI a APCI, případně APPI. MALDI je kategorizovaná jako technika bez on-line separace. Nejčastěji v lipidomice nachází uplatnění ESI a APCI, avšak pro některé specifické aplikace, např. zobrazování tkání, je vhodnější použít MALDI [58].

#### 1.4.1.2.1.1 Elektrosprejová ionizace

ESI patří mezi „měkké“ ionizační metody, které poskytují většinou základní hmotnostní spektra bez fragmentace, a tedy i dodatečných informací o struktuře iontů (molekul). Tento nedostatek lze eliminovat spojením ESI a tandemové hmotnostní spektrometrie (ESI-MS/MS) [58] [59] [60].

Princip je založen na průchodu kapaliny (rozpouštědla) s analytem kapilárou, na které je aplikované vysoké napětí (2-5 kV), a kterou je tato směs za pomoci dusíku rozprašována, ve vzniklých kapičkách rozpouštědla s analytem dochází k odpařování rozpouštědla, kapičky kapaliny se zmenšují a zvětšuje se povrchový náboj. Růst náboje dojde do meze (Rayleighův limit), kdy se uvolní iont analytu. Molekuly můžeme ionizovat ve dvou základních režimech, v režimu generování kladně nabitých iontů (pozitivní mód) a záporně nabitých iontů (negativní mód). Podle volby módu vznikají tyto základní ionty nesoucí informaci o molekulové hmotnosti molekuly  $[M+H]^+$ ,  $[M+Na]^+$ ,  $[M+K]^+$ ,  $[M+NH_4]^+$ ,  $[M-H]^-$ ,  $[M+HCOO]^-$  atd. V případě přítomnosti více polárních skupin mohou vznikat i vícenásobné ionty. [58] [59] [60].

#### 1.4.1.2.1.2 Chemická ionizace za atmosférického tlaku a fotoionizace za atmosférického tlaku

Princip je obdobný jako u ESI, nicméně ionizace probíhá v plynné fázi. Je zde přítomná kapilára, na kterou není vkládáno žádné napětí a slouží pouze k vytvoření aerosolu eluátu za pomoci zamlžujícího plynu (ve většině případech dusíku). V momentě tvorby aerosolu je aplikován výboj z výbojové kapiláry (koronové jehly), při čemž dochází nejprve k ionizaci mobilní fáze. Následně dochází v plynné fázi k reakcím mezi analytem, mobilní fází a zmlžujícím plynem. Výsledkem je vznik iontů analytu, které jsou poté usměrněny do hmotnostního analyzátoru. U fotoionizace (APPI) je energie k ionizaci dodávána formou UV-záření [56, 60].

APCI a APPI se oproti ESI využívají pro analýzu středně polárních až nepolárních lipidů, takže pro analýzu kyselých glykosfingolipidů vhodné nejsou [56, 60].

#### 1.4.1.2.1.3 Ionizace/desorpce laserem za účasti matrice

Jedná se o techniku, která není konstruována pro on-line spojení se separačníma technikami. Velkou využitelnost hraje v biochemické, mikrobiologické a histologické aplikaci pro studium biomolekul, zejména lipidů a proteinů. Tuto techniku lze využít jak pro polární, tak nepolární látky v závislosti na zvolené matrici. Vzorek je společně s matricí (látka schopná absorbovat energii laseru) nanesen na MALDI terčík. Následně na zaschlou skvrnu vysíláme, s vysokou frekvencí, laserové pulsy, přičemž dochází nejprve k odpaření vzorku. V odpařeném oblaku dochází k reakcím mezi matricí a analytem za vzniku iontů, které jsou poté usměrněny do hmotnostního analyzátoru [59] [60].

#### 1.4.1.2.2 Hmotnostní analyzátory

Jednotlivé analyzátory jsou děleny dle fyzikálních procesů dělení iontů a konstrukce. Mezi tyto fyzikální procesy patří různá stabilita oscilací iontů v magnetickém a elektrickém poli, odlišná doba letu pro větší a malé molekuly, různá frekvence harmonických oscilací v orbitální pasti [63, 64].

Analyzátory lze dělit i podle hmotnostní rozlišovací schopnosti (RP), což je veličina, která nám udává, jak je analyzátor schopný od sebe odlišit ionty s podobnou hmotou. Analyzátory s vysokou rozlišovací schopností dosahují hodnot hmotnostního rozlišení od 10 000 do 20 000 000, s nízkým hmotnostním rozlišením pak do 3000. Mezi nízko-rozlišující se řadí kvadrupólový analyzátor (Q) a iontové pasti. Mezi vysoko-rozlišující pak (TOF) cyklotronová rezonance (FT-ICR), Orbitrap a průletový analyzátor (TOF), zejména v kombinaci s kvadrupólem (QTOF) [63, 64].

Důležité je taky uvést pojem “mass accuracy“, neboli správnost určení hodnoty  $m/z$ . Jedná se o veličinu, která říká, jak se naměřená hodnota hmotnosti iontu liší od teoretické hodnoty hmotnosti iontu v jednotkách ppm. Dalšími parametry jsou hmotnostní rozsah a dynamický rozsah. Hmotnostní rozsah udává rozsah  $m/z$  hodnot, přes který analyzátor může zaznamenat spektra. Dynamický rozsah pak v jakém rozmezí koncentrací je odezva lineární [63, 64].

#### **1.4.1.2.2.1 Kvadrupólový analyzátor a iontová past**

Jedná se o nejrozšířenější hmotnostní analyzátor v současnosti, velkou předností je robustnost, snadná údržba, menší nároky na vakuum [63] [64].

##### **1.4.1.2.2.1.1 Kvadrupólový analyzátor**

Konstrukčně se skládá ze čtyřech kruhových tyčí. Na dvě protilehlé tyče je vloženo záporné stejnosměrné napětí a na zbylé dvě protilehlé tyče kladné stejnosměrné napětí. Zároveň na všechny tyče působí vysokofrekvenční střídavé napětí. Potenciál tyčí se pak skládá z vysokofrekvenčního napětí (RF) a napětí stejnosměrného proudu (DC) [64].

Ionty z ionizačního zdroje zamíří na kvadrupól a začnou oscilovat. Při určitém poměru napětí dojde ke stabilizaci pouze určitých iontů s danou  $m/z$  a ty jsou pak vedeny k detektoru. Ostatní ionty jsou přitahovány k tyčím a jsou deaktivovány [64].

Dominantně se kvadrupól používá jako filtr vybraných iontů. Díky tomuto se osvědčilo použití několikerého kvadrupólu za sebou, nejběžnější je trojitý kvadrupól (QqQ): kdy první kvadrupól slouží jako filtr iontů pro určité  $m/z$ , druhý kvadrupól slouží k tvorbě fragmentů iontů (výsledkem srážkou iontu s plyny) a třetí kvadrupól (případně iontová past) jako analyzátor takto vzniklých produktových iontů. S využitím QqQ a vhodné počítačové instrumentace lze sledovat konkrétní hodnoty  $m/z$  fragmentových iontů a objasnit strukturní informace o molekule [64].

##### **1.4.1.2.2.1.2 Analyzátor na principu Paulovy iontové pasti**

Paulova iontová past, je pojmenována podle jejího vynálezce Wolfganga Paula. Funguje na jednoduchém principu: zachycení iontů statickými a oscilujícími radiofrekvenčními el. poli a následné vypuzení iontů o určité  $m/z$ . Podle konstrukčního uspořádání existuje lineární iontová past a sférická (3D) iontová past [64].

Lineární iontová past je defacto podobná kvadrupólovému analyzátoru, tvoří ji opět čtyři hyperbolické tyče, odlišností je přítomnost koncových elektrod. Na rozdíl od Q analyzátoru funguje na principu propouštění iontů s nestabilní oscilací (Q propouští se stabilní oscilací). Detektor je umístěn kolmo na dráhy iontů [64].

Sférická iontová past je tvořena dvěma prstenovými elektrodami a propojenými koncovými elektrodami na které je vkládáno napětí. Ionty oscilují uvnitř pasti a opět při určitém napětí



jsou vypuzeny pouze ty ionty, které jsou nestabilní. Uvnitř této pasti je přítomné helium, které umožní fragmentaci a zároveň stabilizují dráhy iontů ve středu pasti [64].

#### **1.4.1.2.2.2 Analyzátor doby lety**

Tento analyzátor se řadí do kategorie pulzních a neskenovacích analyzátorů. To znamená že veškeré vzniklé ionty jsou nashromážděny, následně pulsním polem vypuzeny. Dělení iontů pak probíhá na základě jejich odlišné rychlosti, a tedy rozdílného času doletu na detektor (nedochází tedy ke skenování). Základním principem rozdělení iontů je, že těžší ionty letí pomaleji a lehčí rychleji. Konstrukce tohoto analyzátoru je prostá, tvoří ji urychlovač (místo kde je vkládaný puls), oblast bez pole (letová trubice), reflektron a detektor [63] [64].

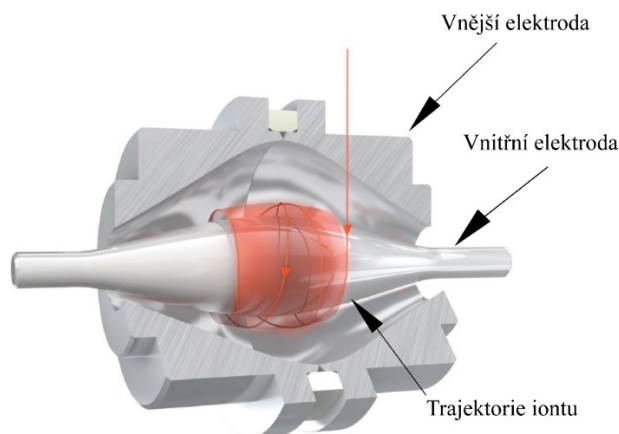
#### **1.4.1.2.2.3 QqTOF**

Jedná se o kombinaci kvadrupólu (Q) kolizní cely (q) a TOF analyzátoru. Výhodou této kombinace je zvýšení rozlišení a vzhledem k ortogonálnímu uspořádání i kompatibilita s API technikami. Avšak toto uspořádání hlavně umožňuje měření tandemových hmotnostních spekter. Kvadrupól slouží k vybrání určitého iontu, takový ion je pak přesunut do kolizní cely, kde je s využitím vhodného napětí podroben srážkám s kolizním plynem. Vzniklé fragmenty jsou následně analyzovány v TOF analyzátoru a jsou zdrojem strukturní informace [63] [64].

#### **1.4.1.2.2.4 Elektrostatická orbitální past**

Elektrostatická orbitální past neboli Orbitrap (*Obrázek 8*) se řadí mezi iontové pasti s vysokou rozlišovací schopností. V případě Orbitrapu se nepoužívá vysokofrekvenční záření (jako v případě lineární iontové pasti, kvadrupólu) a ani magnetické pole (jako v případě magnetického analyzátoru, cyklotronové rezonance), ale na elektrody je vloženo pouze stejnosměrné napětí. Konstrukčně se skládá z centrální elektrody a vnější elektrody (*Obrázek 9*). Princip dělení iontů je založen na odlišných axiálních oscilacích iontů o určité hmotnosti kolem centrální elektrody. Frekvence axiálních oscilací je nepřímo úměrná hodnotě  $m/z$  a pro každý ion indukuje proud na vnějších elektrodách. Tento proud je pak pro všechny ionty zaznamenáván a pomocí Fourierova transformace převeden na hmotnostní spektra. Tyto analyzátoři umožňují dosáhnout rozlišení až 1 000 000 a záznam  $m/z$  hmotnostní s přesností 1 ppm. Orbitrap je nejčastěji součástí hybridních analyzátorů, kde je kombinován s lineární iontovou pastí či kvadrupólem. V současnosti jsou tato hybridní uspořádání velice populární i v lipidomice, a to zejména kvůli možnosti vysokého rozlišení a správnosti určení hodnoty  $m/z$  pro prekurzorové i produk-

tové ionty. V rámci diplomové práce byla pro tento účel použita zejména CID, kolizně indukovaná disociace (Collision-induced dissociation). V tomto případě vznikají produktové ionty při disociaci po srážkách iontu prekursoru a přítomnými molekulami kolizního plynu za použití vhodného napětí. [63] [64].



**Obrázek 8** — Schéma orbitální pasti [65]

## 1.5 Lipidomická analýza

Lipidomika je věda, která se zabývá kvalitativní a kvantitativní analýzou lipidů izolovaných z buněk, tkání nebo tělních tekutin s využitím hmotnostní spektrometrie. V praxi se lze setkat se třemi přístupy analýzy, a to s přímou infuzí vzorku do hmotnostního analyzátoru, dále pak přístupy založené na spojení hmotnostní spektrometrie s chromatografií nebo s použitím MALDI techniky, která patří taktéž k technikám bez on-line separace [39] [48] [62].

Výhodné je aGSL (jak se separačníma technikami či bez) měřit v negativním módu, kdy se sulfatidy a gangliosidy lépe ionizují. Z chemické podstaty molekul SHexCer a GM3, je pro molekulu výhodnější přecházet na záporné ionty než na kladné, právě díky kyselým skupinám, kde se snadněji odštěpí proton a vzniká pak záporný ion [66] [67] [68].

Pro kapalinovou chromatografii s hmotnostní detekcí je nesčetné množství publikací a aplikací, jak pro analýzu lipidů z plazmy, moče tak i tkáně [69]. V lipidomice existují dva základní přístupy chromatografické separace lipidů. V prvním případě, chromatografie v reverzních fázích (RP), při které dochází k separaci jednotlivých lipidů, a to zejména na základě interakcí nepolárních řetězců s nepolární stacionární fází (např. oktadecylsilikagel). Jako mobilní fáze se nejčastěji volí polární rozpouštědla (MeOH;ACN;H<sub>2</sub>O s přidávkem pufrů, kyselin

aj) [49] [69] [70] [71]. Dalším frekventovaným módem je separace s použitím hydrofilních interakcí, která rozlišuje a separuje lipidy podle polární části lipidu, nepolární se eluují jako první, poté se zvyšujícím podílem vody v mobilní fázi dochází k eluci polárnějších analytů. Největší výhodou tohoto přístupu je, že interní standard (IS) a příslušné analyty koeluují, čímž se eliminuje matriční efekt. Nejčastěji se využívají Si kolony, jako mobilní fáze se volí voda, ACN s příměsí pufrů o určitém pH [16, 51]. K separaci tříd dochází v případě SFC například s BEH (hybrid s ethylenovým můstkem (ethylene bridged hybrid) kolonou a oxidem uhličitým jako mobilní fázi, kde přítomná aditiva jako je methanol a voda během separace tvoří gradient [67] [66].

V případě použití MALDI hmotnostní spektrometrie přicházíme o informaci o retenčním chování. Na druhou stranu oproti LC/MS je u této techniky velmi nízká spotřeba rozpouštědel a úspora času. Zároveň s vhodnou maticí lze lépe ionizovat jiné analyty než druhé. [66] [68]. Velmi dobrých výsledků semikvantitativní analýzy sulfatidů bylo dosaženo s použitím 9-aminoacridinu (9-AA). Metody využívající tuto MALDI maticí poskytnuly reprodukovatelné výsledky jak v případě analýzy vybraných lipidů v extraktech plazmy, moče i tkání [3] [72].

### 1.5.1 Příprava vzorků

V biologických vzorcích tekutin, buněk, tkání se nachází nesčetné množství sloučenin, látek, molekul. Představa analýzy takto komplexního vzorku bez úpravy by mohla mít za následek nežádoucí kontaminaci instrumentace a nečitelnost dat. Proto se přistupuje k postupům, které umožní nežádoucí sloučeniny odstranit a selektivně izolovat jenom potřebné analyty. Mezi tyto postupy patří zejména extrakce [48] [73] [50].

V případě plazmy, která je velmi často maticí pro lipidomickou analýzu s využitím hmotnostní spektrometrie je důležité učinit vícero postupů, které lze shrnout do těchto základních úkonů: vysrážení a odstranění bílkovin precipitací, centrifugace, odsolení a extrahování lipidomů [49] [48] [73] [50] [74].

K deproteinaci plazmy se nejčastěji používají organická rozpouštědla: methanol, butanol, ethanol či jejich směsi v určitém poměru. Po precipitaci se velmi často vzorek plazmy sonifikuje v ultrazvuku po dobu 10-15 min, poté je centrifugován při 3000 ot/min [49] [48] [73] [50] [53].

Takto připravený vzorek stále obsahuje interferenty. Proto se přistupuje k extrakčním technikám, které umožní specificky extrahovat lipidy z plazmy. Hlavním problémem jsou soli, které se v případě hmotnostní detekce mohou usazovat ve spektrometru a potlačovat signál, proto je potřeba je odstranit. Díky svému hydrofobnímu charakteru je možné lipidy extrahovat nepolárními rozpouštědly v případě extrakce kapalina-kapalina a nepolárními sorbenty v případě extrakce tuhou fází (SPE), kdy u obou technik nedojde k záchytu molekul čistě iontové povahy (soli) a jsou takto odstraněny [75] [74] [51].

V současné době se osvědčila l-l extrakce dle Folche, kde se používá chloroform jako rozpouštědlo vhodné pro přestup lipidů z plazmy. Nabízí se i rozpouštědla jako heptan, směs butanolu/methanolu aj [75] [74] [51].

Pro extrakci lipidů tuhou fází jsou nejčastěji používané sorbenty využívající stejný princip sorpce jako v chromatografických kolonách pro reverzní fází, nabízí se oktadecyl (C18), oktyl (C8) pro zadržování nepolárních molekul. Pro eluci lipidů se užívá nejčastěji methanol [75] [74] [51] [76].

Pro skupiny lipidů, které obsahují silně polární skupiny (COOH, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) se nabízí doposud neodzkoušené specifické extrakce tuhou fází, a to s použitím iontového sorbentu, kde fungují interakce mezi iontovým analytem (iontovou částí analytu) a sorbentem na bázi iontové výměny. Tyto extrakce se nabízí pro specifickou extrakci právě kyselých glykosfigolipidů, které nesou záporný náboj v širokém rozsahu pH. Funkční skupinou sorbentu jsou nejčastěji amíny, zejména sekundární [76] [77] [78].

Moderní trendy umožňují použití sorbentu, který obsahuje jak polární skupinu, tak reverzní fází. U lipidů si to lze představit tak, že polární hlava lipidů přistane k polární části sorbentu a hydrofobní konec k nepolární části sorbentu. Takto na analyt působí dvě síly a retence je silnější [79].

V případě extrakce kyselých lipidů nesoucí kyselé polární skupiny s použitím bazických polárních sorbentů je nutné u obou pochopit chování v závislosti na pH, které poskytnou informace pro postup extrakce. Je třeba zvolit takové pH vzorku, aby analyt nesl náboj, následně použít takové pH k protonaci sorbentu, aby došlo k zachycení analytu. Dále se musí zvolit vhodné pH promývacích roztoků k vymytí slabých kyselin a v poslední řadě je potřeba použít vhodné pH elučního roztoku, aby buď ztratil náboj analyt, nebo aby ztratil náboj sorbent a došlo k eluci analytu [80].

Konkrétně pro sulfatidy a gangliosidy se hodí sekundární amíny vázané na alifatických uhlovodících či aromatických jádrech. Sulfatidy, respektive sulfonová kyselina nese záporný náboj již při nízkých pH ( $pK_a = <1$ ), takže pro eluci sulfatidu se používá zejména takové pH elučního roztoku, aby došlo ke ztrátě náboje na sorbentu (nad  $pH=11$ ). U gangliosidů činí  $pK_a=2,6$ , jedná se tedy o středně silnou kyselinu, proto se musí dbát obezřetnosti při promývání interferencí, aby nedošlo k nechtěné eluci, postup je potom stejný jako u sulfatidů [79] [80] .

## 2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 2.1 Použité chemikálie

- Methanol (MeOH) čistota,  $\geq 99.9\%$ , Honeywell (Charlotte, NC, USA)
- Chloroform (CHCl<sub>3</sub>) – LC čistota, Merck (Darmstadt, Německo)
- Octan amonný –  $\geq 99.9\%$  stopových kovů, Honeywell
- Uhličitan amonný –  $\geq 30.0\%$  NH<sub>3</sub>, Honeywell
- 2-Propanol (2-PrOH) – LC-MS čistota,  $\geq 99.9\%$ , Honeywell
- Směs vnitřních standardů (IS mix) – Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA),
- Deionizovaná voda – byla připravena systémem Barnstead Smart2Pure Water Purification System (Waltham, MA, USA)
- 98-100% kyselina mravenčí – Suprapur (Darmstadt, Germany)
- 7N amoniak v methanolu – Sigma Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)
- 25-28% vodný roztok amoniaku – PENTA (Chrudim, CZ)
- Ethylalkohol – PENTA (Chrudim, CZ)
- IS SHexCer (18:1/12:0) amonná sůl – Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA),
- IS GM3 (18:1/18:0-d5) amonná sůl – Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA)
- 9-Aminoacridin – Sigma Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)

### 2.2 Použitý materiál a instrumentace

- Analytická váha ABT 120-5DM – Kern & Sohn GmbH (Balingen, Německo)
- Dávkovač Multipette M4 – Eppendorf (Hamburg, Německo)
- Extrakční kolonka Spe-ed C18/18; 500mg; 3 ml s velikostí částic 40  $\mu\text{m}$  – (Applied Separations, Allentown, PA, USA)
- Extrakční kolonka Oasis WAX 6 cc; 150 mg; 1 ml s velikostí částic 30  $\mu\text{m}$  – Waters (Milford, MA, USA)
- Mechanické pipety s nastavitelným objemem – Sartorius (Goettingen, Německo)
- Mechanické pipety s nastavitelným objemem – Thermo Scientific (Waltham, MA USA)
- Merck Millipore Chemical Duty vakuové/tlakové čerpadlo – Merck (Darmstadt, Německo)
- Laminární box MSC-Advantage II. třídy – Thermo Fisher Scientific
- Odstředivka Hettich EBA 20 – Hettich (Tuttlingen, Německo)

- Hmotnostní spektrometr LTQ Orbitrap XL – Thermo Fisher Scientific
- Hmotnostní spektrometr MicrOTOF-Q – Bruker Daltonics (Billerica, MA USA)
- Kapalinový chromatograf s kapilární pumpou 1260 Infinity Series, binární pumpou 1290 Infinity Series a autosamplérem 1260 Infinity Series – Agilent Technologies (Waldbronn, Německo)
- Pasteurovy pipety skleněné – Thermo Fisher Scientific
- Referenční systém čištění vody Milli-Q – Millipore (Molsheim, Francie)
- Chromabond vakuový manifold se 12 pozicemi – Macherey Nagel (Allentown, PA USA)
- Ultrazvuková lázeň FB Fisherbrand 15061H – Thermo Fisher Scientific

## 2.3 Přístrojové podmínky

### 2.3.1 Hmotnostní spektrometr MALDI LTQ Orbitrap XL

Hmotnostní spektra byla měřena s využitím MALDI ionizace v režimu FTMS (celkový časový hmotnostní scan; Full Time Mass Scan) při záznamu záporně nabitých iontů v hmotnostním rozsahu  $m/z$  400 – 2000 a rozlišovací schopnost byla nastavena na hodnotu 100 000 (pro  $m/z$  400). Energie  $N_2$  UV laseru (337 nm, 60 Hz) činila 2,9  $\mu$ J a velikost paprsku byla přibližně 80 m x 100  $\mu$ m. Destička se pohybovala spirálně od středu ke konci spotu a velikost kroku byla nastavena na 250 mm. Počet mikroskenů byl nastaven na 2 mikroskeny/sken a do každého bodu byly aplikovány dvě laserové střely, při čemž byly měřeny  $\frac{3}{4}$  spotu. Celkově bylo při tomto nastavení měřeno 36 bodů během 2,2 minut pro každý spot [2].

Podmínky fragmentace pro určení struktur nejintenzivnějších sulfatidů a gangliosidů v plazmě byly následující: identifikace probíhala v režimu pro záznam záporně nabitých iontů. Hmotnostní rozsah se automaticky měnil podle zadané hmoty daného lipidu. Energie a podmínky laseru byly stejné jako v případě FTMS. Kolizní energie byla nastavena na 80 eV a byla použita metoda CID (fragmentace v lineární iontové pasti). Destička se pohybovala taktéž od středu ke konci spotu a velikost kroku byla nastavena na 50 mm. Doba měření MS/MS záznamu byla celkově pro každý lipid 2,2 minuty [2].

### 2.3.2 Kapalinový chromatograf s kapilární pumpou 1260 Infinity Series

Byla použita Ascentis Si kolona, (150 × 2.1 mm, 3  $\mu$ m velikost částic; Sigma-Aldrich). Separace probíhala při gradientové eluci, kdy první mobilní fázi (A) tvořil acetonitril (ACN) s 0,5  $\mu$ l kyseliny octové na 100 ml. Druhá mobilní fáze (B) měla složení ACN/voda (10/90, v/v) s 10mM octanem amonným a 0,5  $\mu$ l kyseliny octové na 100 ml. Gradient byl následující: 0 min—10 % B, 7 min —11,4 % B, 10 min—10 % B, 12 min—10 % B. Průtok byl nastaven na 0,5 ml/min. Kolona byla vyhřívána na 40°C. Analýza byla snížena na 12 min oproti literatuře, neboť kyselé glykosfingolipidy jsou eluovány při těchto podmínkách do 10 min [1].

### 2.3.3 Hmotnostní spektrometr MicrOTOF-Q

Analýza probíhala v negativním módu. Napětí kapiláry činilo 3 kV, tlak zmlžujícího plynu 1,2 bar a průtok a teplota sušícího plynu byly 8 l/min a 300 °C. Hmotnostní rozsah činil  $m/z$  100-2000 [16]



## 2.4 Příprava interních standardů

Pro gangliosidy a sulfatidy byl připraven IS (interní standard) mix sulfatidů, gangliosidů v chloroform/methanol (1:1, v/v) na koncentrace uvedené v *Tabulce 2*. Pro validaci byly pro tvorbu kalibrační řady pipetovány rozdílné objemy z této IS směsi, nicméně pro většinu analýz byl volen objem 25  $\mu\text{l}$  jako střední hladina (ML).

**Tabulka 2** — Koncentrace Interních standardů v IS mixu

<b>IS</b>	<b>Kompozice acylů</b>	<b>c v IS mixu (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b>Pipetovaný objem (<math>\mu\text{l}</math>)</b>	<b>c IS ve 100 <math>\mu\text{l}</math> plazmy (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b>c IS ve 100 <math>\mu\text{l}</math> plazmy (<math>\text{nmol/mL}</math>)</b>	<b>MW (<math>\text{g/mol}</math>)</b>
SHexCer (30:1)	18:1/12:0	2,4	25	0,6	0,031	723
GM3 (36:1-d5)	18:1/18:0-d5	0,09		0,0255	0,505	1185

## 2.5 Optimalizace metody

Veškeré pokusy probíhaly nejprve bez přidavku interních standardů, kdy se jednotlivé experimenty při validaci porovnávaly na základě chování vybraných endogenních zástupců sulfatidů a gangliosidů. Následně byla optimalizovaná metoda analýzy aGSL z plazmy validována pomocí IS.

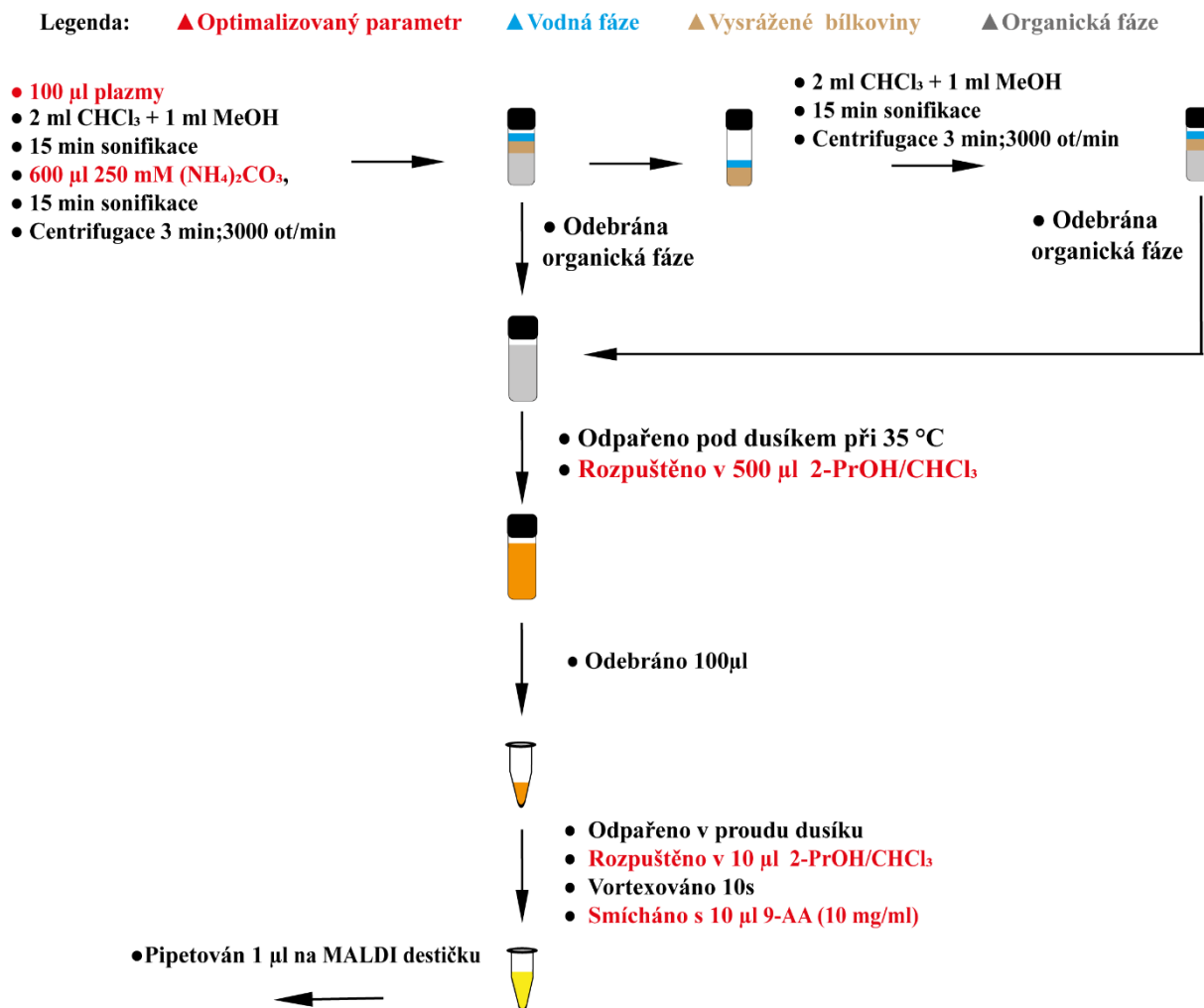
### 2.5.1 Příprava vzorků plazmy

Pro následné experimenty bylo připraveno 10 ml plazmy smícháním adekvátních podílů plazmy (100 ml) od 100 dobrovolníků.

### 2.5.2 Dvojitá Folch extrakce plazmy

Pro lepší pochopení celého procesu extrakce a poextrakčních úprav je přiloženo schéma na *Obrázku 9*. Bylo odebráno 25, 100 a 200  $\mu\text{l}$  plazmy do 4 ml vialek, pro každý objem byly provedeny tři extrakty. Do vialek bylo připipetováno 2 ml  $\text{CHCl}_3$  a 1 ml MeOH. Takto připravené vzorky byly sonifikovány 15 min. Po ukončení sonifikace se ke vzorku přidalo 600  $\mu\text{l}$  250 mM uhličitanu amonného (simultánně proběhla extrakce s 500 mM uhličitanem amonným). Obsah ve vialce se vložil do ultrazvuku po dobu 15 min. Následně proběhla centrifugace 3 min při 3000ot/min. Z vialky byla následně pasterovou pipetou odebrána spodní fáze obsahující lipidy a převedena do nové čisté vialky. K původnímu vzorku bylo dodatečně přidáno 2 ml  $\text{CHCl}_3$ , opět se sonifikovalo 15 min a centrifugovalo 3 min při 3000 ot/min. Finálně byla opět odebrána spodní fáze a převedena do vialky s prvním odběrem organické fáze. Extrakt byl odpařen pod proudem dusíku při 35°C.

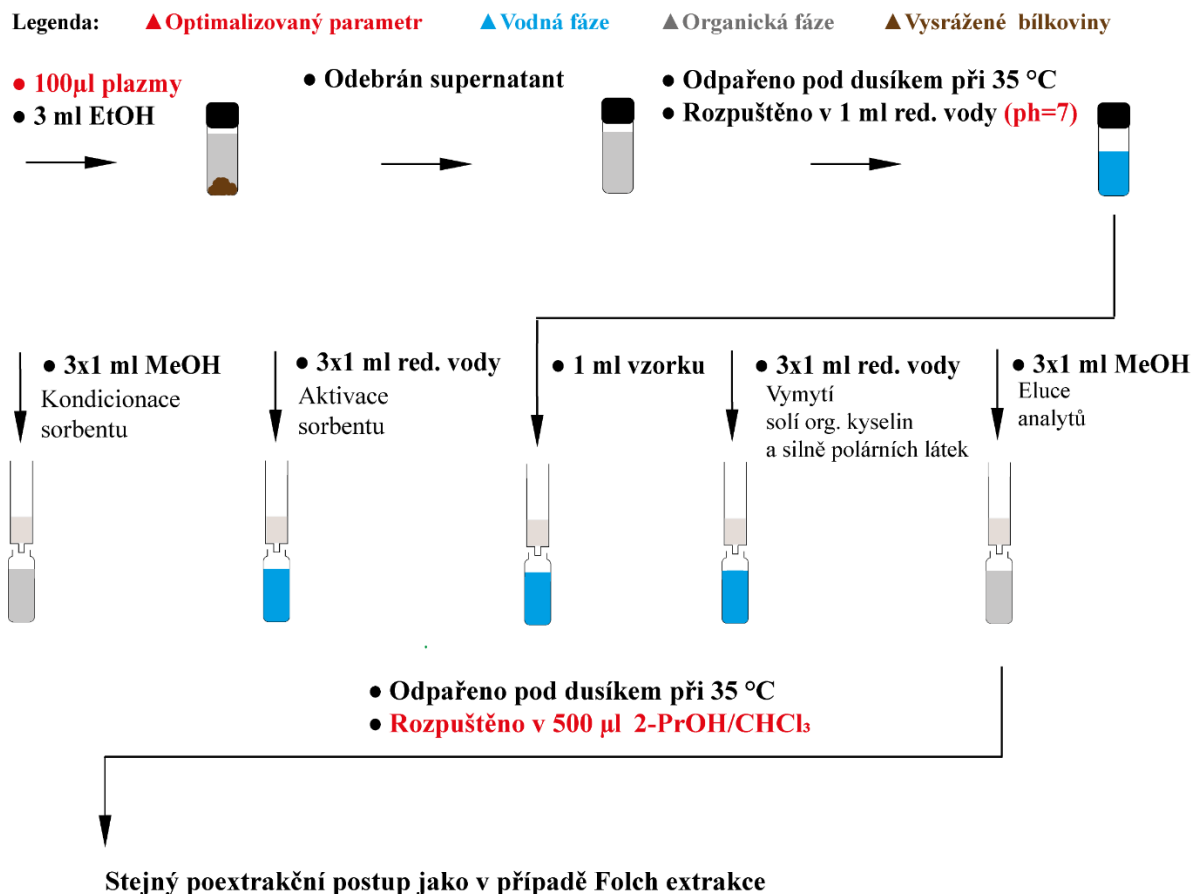
Před vlastní analýzou byl finální extrakt rozpuštěn ve 500  $\mu\text{l}$  2-PrOH / $\text{CHCl}_3$ , z těchto extraktů bylo odpipetováno 10  $\mu\text{l}$  a smícháno s 10  $\mu\text{l}$  5 mg/ml 9-AA, zamícháno a proměřeno. Zbylých 400  $\mu\text{l}$  extraktu bylo použito na testování zakoncentrování a jeho vliv na stabilitu signálu. Z každé vialky bylo odebráno zvlášť 100  $\mu\text{l}$  do ependorfky. Tento objem byl odpařen a pak každý zvlášť byl 2x, 5x a 10x zakoncentrován, jako rozpouštědlo se zvolila směs 2-PrOH / $\text{CHCl}_3$ . Pro 25  $\mu\text{l}$  a 50  $\mu\text{l}$  se zakoncentrováním 2x, 5x, 10x bylo použito 5 mg/ml 9-AA, pro 100  $\mu\text{l}$  plazmy při zakoncentrování 2x a 5x bylo použito 5 mg/ml, pro 10x již 10 mg/ml. Pro 200  $\mu\text{l}$  bylo použito ve všech krocích 10 mg/ml, větší hodnota koncentrace 9-AA není umožněna, neboť se jedná o hraniční hodnotu rozpustnosti 9-AA.



**Obrázek 9** — Schématický postup dvojité Folch extrakce a další přípravy vzorku před vlastní analýzou

### 2.5.3 Extrakce plazmy reverzní fází

Před samotnou aplikací extrakčních kolonek, se musí daná plazma deproteinizovat. Bylo odebráno 100 µl a 200 µl plazmy do zvlášť oddělených 4 ml vialek. Do těchto vialek byly napipetovány 3 ml ethanolu. Vzorek byl sonifikován 15 min. Poté bylo přidáno 600 µl redestilované vody. Následně se vortexovalo 1 min a poté se centrifugovalo 5 min při 6000 ot/min. Ze vzorku byl poté supernatant odebrán a odpařen pod proudem dusíku při 35 °C. Následně bylo reziduum rozpuštěno v 1 ml destilované vody. Extrakční kolonka byla promytá 3x1 ml MeOH poté 3x1ml redestilované vody. Na kolonkou byl napipetován 1 ml vzorku. Následně byly napipetovány 3x1 ml vody. Jako eluční činidlo byl zvolen methanol. Extrakt byl odpařen pod proudem dusíku při 35 °C a rozpuštěn v 500 µl 2-PrOH /CHCl<sub>3</sub>. Následně byl aplikován stejný postup jako v případě Folch extrakce. *Obrázek 10* reprezentuje postup.



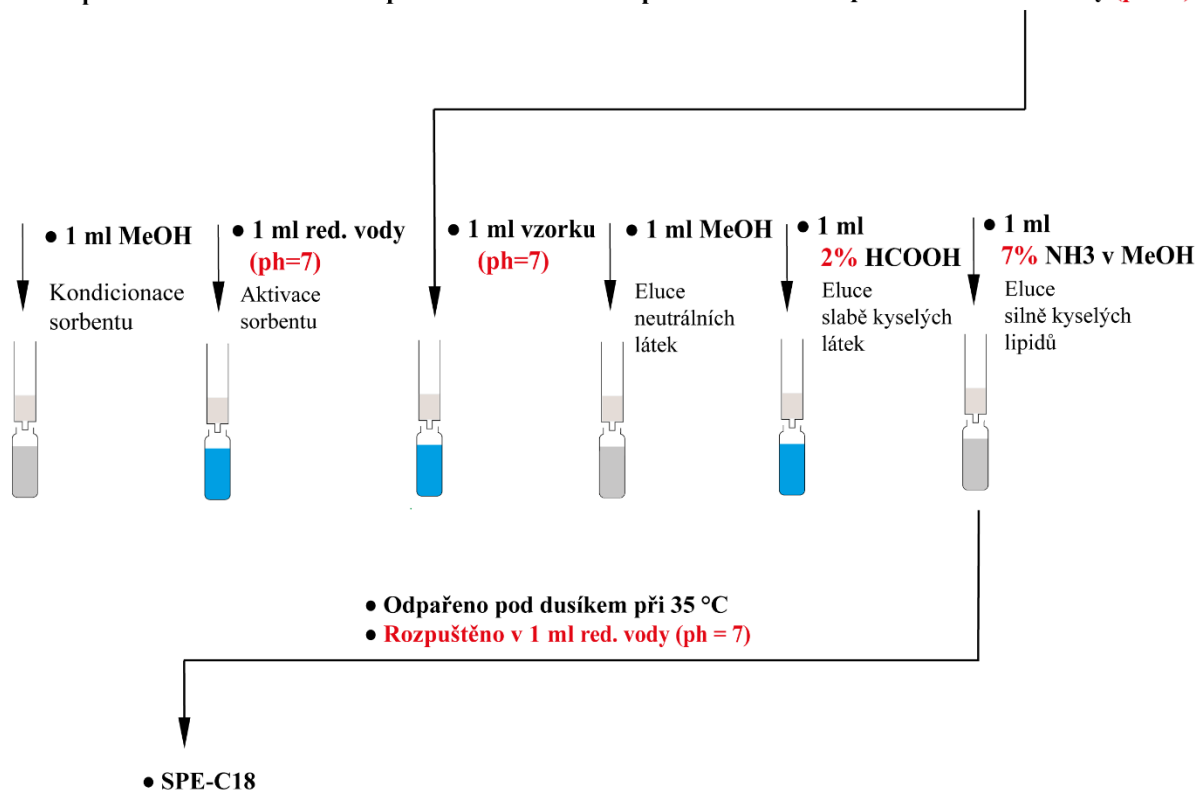
**Obrázek 10** — Schématický postup SPE-C18

## 2.5.4 Extrakce plazmy iontově výměnnou tuhou fází WAX a odsolení s C18

Před extrakcí byl použit stejný postup precipitace jako v kapitole 2.5.3. Kolonka byla aktivována 1 ml methanolu a následně 1 ml vody. Na kolonku byl napipetován 1 ml vzorku (pH = 7). Vymytí neutrálních látek proběhlo 1 ml MeOH. K eluci slabě kyselých interferencí byl použit 1 ml 5 % HCOOH. Finální eluce proběhla 5 % NH<sub>3</sub> v MeOH. Extrakt byl odpařen pod proudem dusíku při 35 °C a rozpuštěn v 1 ml vody (pH=7). Následně byl použit stejný postup jako s C-18 sorbentem pro odsolení. Níže na *Obrázku 11* je schématický postup pro lepší pochopení procesu.

Legenda: ▲ **Optimalizovaný parametr**    ▲ **Vodná fáze**    ▲ **Organická fáze**

● **Precipitace** → ● **Odebrání supernatantu** → ● **Odpaření** → ● **Rozpuštění v 1 ml red. vody (pH=7)**



Obrázek 11 — Schématický postup SPE-WAX

## 2.6 Validace metody

Validace lipidomické metody s využitím 9-AA a MALDI LTQ Orbitrap XL byla provedena pro jednotlivé IS gangliosidů a sulfatidů, konkrétně se jednalo o SHex-Cer 30:1;O2/12:0 a GM3 18:1/18:0-d5). Metoda byla validována zejména pro modifikovanou Folch extrakci, nicméně z důvodu následně zjištěné rozdílné extrakční výtěžností pro GM3 s krátkým a dlouhým acylovými řetězci byla provedena zjednodušená validace pro SPE-C18 extrakci (tvorba kalibrační řady a analýza NIST plazmy) a následně byly obě extrakce porovnány. Pro následné experimenty byl vzorek 100  $\mu$ l plazmy obohacen před a po extrakci.

### 2.6.1 Kalibrační řada

Kalibrační řada byla sestavena s přidavkem IS směsi (*Tabulka 2*) do 100  $\mu$ l plazmy před extrakcí na různých hladinách koncentrací. Takto byly pipetovány tyto objemy: 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30 a 35  $\mu$ l IS směsi, pro každý kalibrační bod byly provedeny tři extrakce. Následně bylo simultánně provedeno 10 extrakcí bez přidavků IS před extrakcí, kde finální extrakty byly rozpuštěny v 500  $\mu$ l 2-PrOH/CHCl<sub>3</sub> a smíchány. Z tohoto extraktu pak bylo odebráno příslušných 100  $\mu$ l extraktu a do něj pak přidány IS o těchto objemech: 0, 20, 1, 2, 3, 4, 5, 6 a 7  $\mu$ l, aby byla zachována stejná koncentrace IS ve 100  $\mu$ l extraktu jako v případě přidavků IS před extrakcí. Pro každý kalibrační bod byly takto obohaceny tři objemy extrakce s přidavkem po extrakci (3x 100  $\mu$ l). Z každého extraktu pak byly pipetovány 3 kvalitní spoty na MALDI destičku. Výsledné intenzity pro každý extrakt byly zprůměrovány. S využitím kalibrační řady byla stanovena experimentální koncentrace IS dosazením naměřených intenzit IS, tato koncentrace se pak využila k výpočtu dalších validačních parametrů.

### 2.6.2 Přesnost a správnost

Tyto validační parametry byly aplikovány na oba typy extrakcí. Pro určení těchto parametrů byly vytvořeny tři přidavky před extrakcí na třech hladinách: na nižší hladině (LL; 10  $\mu$ l IS směsi), střední (ML; 25  $\mu$ l IS směsi) a nejvyšší (HL; 35  $\mu$ l IS směsi). Pro správnost byly dosazeny do kalibračních křivek experimentální intenzity IS v těchto kalibračních bodech a takto byly zjištěny experimentální koncentrace interních standardů, ty pak byly zpětně poděleny teoretickou hodnotou v daných kalibračních bodech a vynásobeny 100, kdy výsledkem byla správnost metody, chyba by se měla pohybovat v intervalu  $\pm 15\%$  (85 % - 115 %). Přesnost byla provedena s využitím stejných vzorků na těchto třech hladinách v rámci jednoho dne i následující den, kdy výsledkem byla přesnost v rámci prvního dne a pak přesnost v rámci

dvou dní. V případě přesné kvantitativní metody by neměla překročit 15 % (případně 20 % pro LOQ). U každého pokusu byly opět pipetovány 3 kvalitní spoty na MALDI destičku. Pro SPE byly tyto dva parametry sledovány pouze v rámci jednoho dne.

### **2.6.3 Extrakční výtěžnost**

Extrakční výtěžnost byla stanovena porovnáním směrníc kalibračních přímk IS před a po extrakci, následně pak také porovnáním intenzit IS ve vzorcích na střední hladině (ML) s přidavkem IS před a po extrakci.

### **2.6.4 Příprava a měření NIST plazmy**

Jak pro Folch tak pro SPE extrakci byla provedena extrakce a analýza 100  $\mu$ l NIST plazmy s přidavkem 25  $\mu$ l IS před extrakcí. Byly provedeny celkem 3 extrakce. Jednotlivé koncentrace kvantifikovaných endogenních zástupců byly vypočteny pomocí jednoduchého výpočtu: intenzita endogenního zástupce byla podělena intenzitou IS a podíl byl vynásoben koncentrací IS. Výsledky pro obě extrakční techniky byly finálně porovnány.

### 3 Výsledky a diskuze

Optimalizace byla provedena pro následující kroky: množství plazmy, extrakční protokol, rozpouštěcí krok po extrakci a koncentrace MALDI matrice. Výsledky byly hodnoceny podle počtu identifikovaných zástupců GM3, SHexCer a SHex<sub>2</sub>Cer v plazmě. Přehled identifikovaných aGSL je uveden v přílohách (*Příloha 1*). Podmínkou pro identifikaci lipidu bylo, že odchylka experimentálně změřené m/z od teoretické hodnoty byla v rámci  $\pm 3$  ppm, a že jeho intenzita byla alespoň pětinasobek hodnoty šumu (šum SPE:  $2,5 \times 10^3$ ; šum Folch:  $2 \times 10^3$ ).

#### 3.1 Porovnání extrakčních protokolů

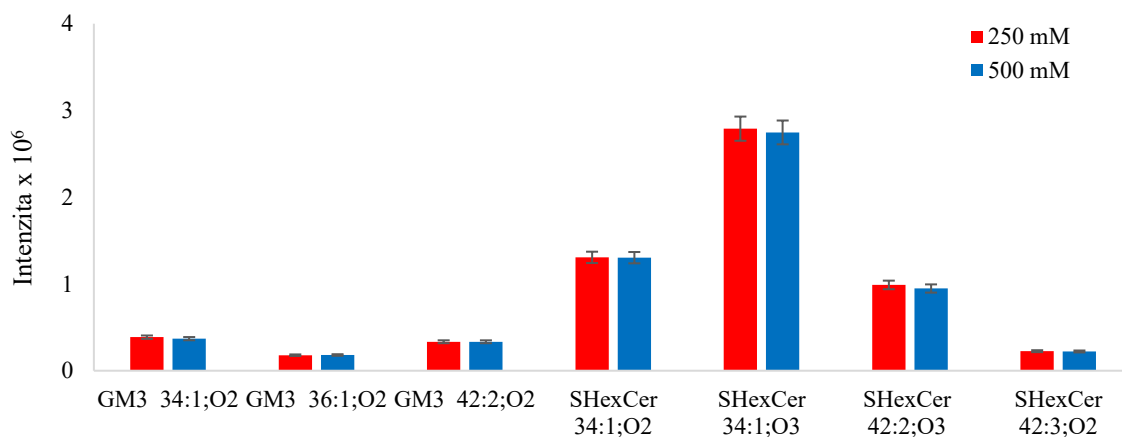
Pro analýzu aGSL byly porovnány dva extrakční protokoly, extrakce dle Folche a SPE-C18. S ohledem na počet endogenních zástupců gangliosidů a sulfatidů nejlépe dopadla Folch extrakce (51 zástupců) a SPE-C18 (54 zástupců) pro 100  $\mu$ l plazmy s následným zakoncentrováním vzorku (10x), vše shrnuto v přílohách (*Příloha 1*). Původně byla po optimalizaci k finální validaci vybrána Folch extrakce z důvodu menší časové a finanční náročnosti. Během validace bylo zjištěno, že Folch extrakce má velmi nízkou extrakční účinnost pro gangliosidy, a proto byly následně validovány obě techniky, jak postup s využitím Folch tak SPE-C18 extrakce. Na sloupcových grafech v přílohách (*Příloha 2, 3 a 4*) je porovnání všech nalezených endogenních zástupců pro finálně optimalizované parametry ve směsné plazmě s ohledem na optimalizovanou extrakční techniku (100  $\mu$ l plazmy; 10x zakoncentrování; 10 mg/ml 9-AA). Celkem byly provedeny v rámci optimalizace 3 extrakce pro každou metodu, a pro každý nalezený endogenní lipid byla následně vypočtena i reprodukovatelnost vyjádřená formou RSD, která doplnila určení, jestli je lipid přítomný. Pokud se pohybovala hodnota RSD v rámci 20 %, lipid byl vybrán. Jak je patrné, tak ve většině případech si SPE-C18 vede lépe a vykazuje vyšší hodnoty intenzit sulfatidů. Zároveň tato extrakční technika byla schopna vyselektovat některé zástupce, pro které byl Folch nevhodný. Příkladem jsou některé SHex<sub>2</sub>Cer. Bohužel pro tyto zástupce dosud nejsou dostupné IS, takže v rámci budoucí komentované validace jsou vztaženy na IS SHexCer. U intenzit GM3 se zdá, že jsou intenzity srovnatelné, ale v některých případech jsou v případě Folch extrakce dokonce i vyšší hodnoty, ačkoliv extrakční účinnost je pro některé zástupce GM3 v porovnání s SPE-C18 nižší, jak bude demonstrováno následně během popisu validace a analýzy NIST plazmy.

Bez ohledu na výsledky je nutno podotknout, že Folch extrakce je finančně a časově méně náročná. Názornou ukázkou je to, že v případě validace Folch extrakce bylo bez větších



problému provedeno 40 extrakcí během 5 hodin. U SPE, z důvodu celkem dvou odpařování (po precipitaci a pak odpaření finálního extraktu), se extrakce značně prodlužovala. Komplikace při SPE extrakci nastaly rovněž v SPE aparatuře, kde byl v některých pozicích (kolonkách) pozorován nekonstantní průtok. Tento jev nastával zejména při optimalizacích, kdy na různých polohách extrakční aparatury eluční rozpouštědla protýkala odlišnou rychlostí i přesto, že tlak na vakuové pumpě byl konstantní. Vysvětlení je pravděpodobně takové, že se sorbent v kolonce v některých případech ucpal i bez přítomnosti bílkovin. Na závěr je potřeba zmínit, že jednotlivé kroky SPE jsou hůře automatizovatelné.

U Folch extrakce je distribuce extrahovaných látek mezi vodnou a organickou fází ovlivněna přítomností dalších sloučenin. Z toto důvodu bylo testováno, zdali by zvýšení koncentrace uhličitánu amonného ve vodné fázi nepomohlo k lepšímu přechodu polárních lipidů do organické fáze. Pro tento účel byl uskutečněn pokus, kdy se místo 250 mM uhličitánu amonného použila při extrakci dvojnásobná koncentrace (500 mM). Porovnáním získaných dat se zjistilo, že nedošlo k výrazné změně výsledků a intenzity pro vybrané endogenní aGSL jsou srovnatelné (Obrázek 12). Pro následné experimenty byl proto použit 250 mM uhličitánu amonný.



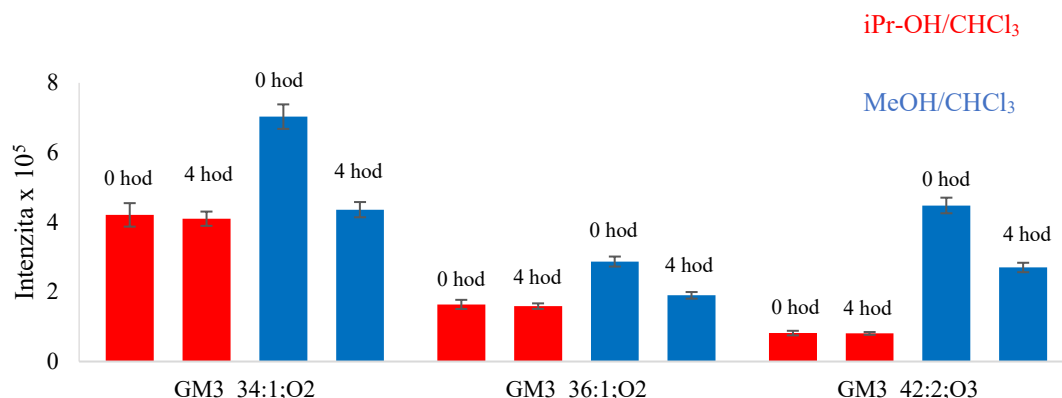
**Obrázek 12** — Porovnání intenzit vybraných endogenních lipidů s rozdílnou koncentrací uhličitánu amonného přidaného v rámci Folch extrakce

Po optimalizaci Folch a SPE-C18 extrakcí, byl uskutečněn pokus s SPE-WAX se stejným množstvím plazmy (100  $\mu$ l), bohužel v případě této extrakce nebyla získaná data reprodukovatelná. Extrakty byly simultánně proměřeny LC-HILIC metodou, která byla v rámci celé diplomové práce použita pro měření, pokud metoda MALDI nasvědčovala nějaký problém, jako je třeba krystalizace na spotu a nebo nevhodnost postupu extrakce. Postupovalo se dle doporučené literatury, kdy se oproti doporučenému nástřiku 1  $\mu$ l, zvýšilo na 5  $\mu$ l a 10  $\mu$ l, ve všech případech nebyla data reprodukovatelná.

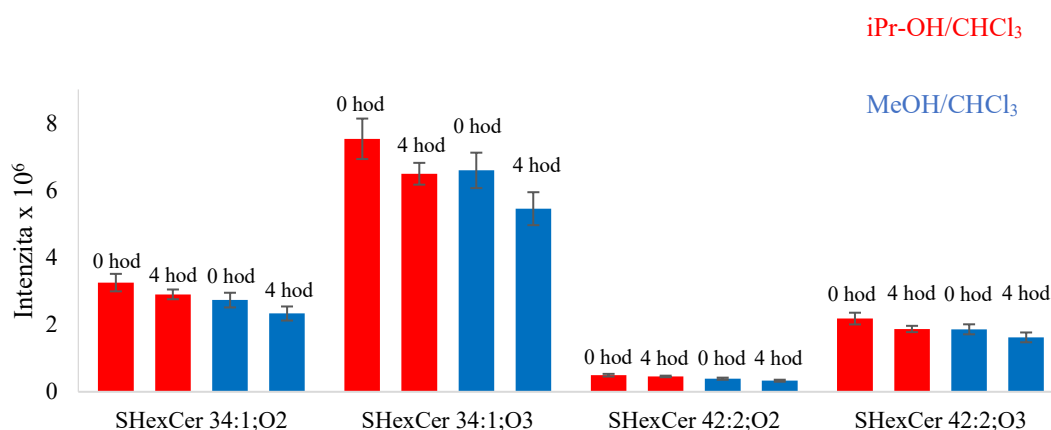
Důvod nereprodukovatelných výsledků může být například, že retence aGSL je příliš silná a 7% a 10%  $\text{NH}_3$  v MeOH je nevhodný na eluci. Do budoucna se tedy nabízí použití odlišné báze/zásady s vyšším pH. Momentálně není pro extrakci aGSL s využitím SPE-WAX dostupná literatura, a proto veškeré postupy byly zkoušeny dle doporučených postupů uvedených v katalogích dodavatelů zabývajících se výrobou SPE-WAX (Waters, Agilent). Dalším parametrem volby těchto postupů byly fyzikálně-chemické vlastnosti kyselých lipidů a vlastnosti funkčních skupin sorbentů (sekundárních aminů). Retence a eluce analytů s použitím SPE-WAX funguje na principu přechodu analytů mezi disociovanou/neutrální formou analytu a neutrální/protonovanou funkční skupinou sorbentu, a proto je nutné lipidy při extrakci nejprve převést na vhodnou formu nesoucí náboj.

### 3.2 Výběr rozpouštěcího kroku extraktu

Pro optimalizaci rozpouštěcího kroku byly využity zbylé extrakty z optimalizace SPE. Testovaly se dvě směsi rozpouštědel, 2-PrOH /  $\text{CHCl}_3$  (1:1, v/v) a MeOH /  $\text{CHCl}_3$  (1:1, v/v), kdy se sledovala intenzita signálu vybraných endogenních lipidů (EL). Směs MeOH /  $\text{CHCl}_3$  obecně poskytnula vyšší intenzity pro GM3, díky jejich lepší rozpustnosti oproti 2-PrOH /  $\text{CHCl}_3$ . Nicméně byl proveden další pokus, a to jaká je stabilita signálu po 4 hodinách měření, kdy je destička s naspotovanými vzorky umístěna ve vakuu v prostoru MALDI sondy (pro Folch extrakci byla stabilita sledována v rámci validace). Pro MeOH /  $\text{CHCl}_3$  došlo po 4 hodinách u vybraných GM3 ke snížení intenzit v rozsahu 35 – 40 %, pro sulfatidy do 20 %. Pro 2-PrOH /  $\text{CHCl}_3$  u všech zástupců bylo snížení maximálně do 20 %, proto byla následně použita pro rozpuštění extraktu. Na *Obrázcích 13 a 14* jsou schematicky znázorněny poklesy intenzit během analýzy. V případě Folch extrakce jsou počáteční hodnoty intenzit v těchto rozpouštědlech podobné a snižování také.



**Obrázek 13** — Stabilita intenzit endogenních lipidů v extraktu rozpuštěném v iPr-OH/CHCl<sub>3</sub> a MeOH/CHCl<sub>3</sub> po čtyřech hodinách analýzy



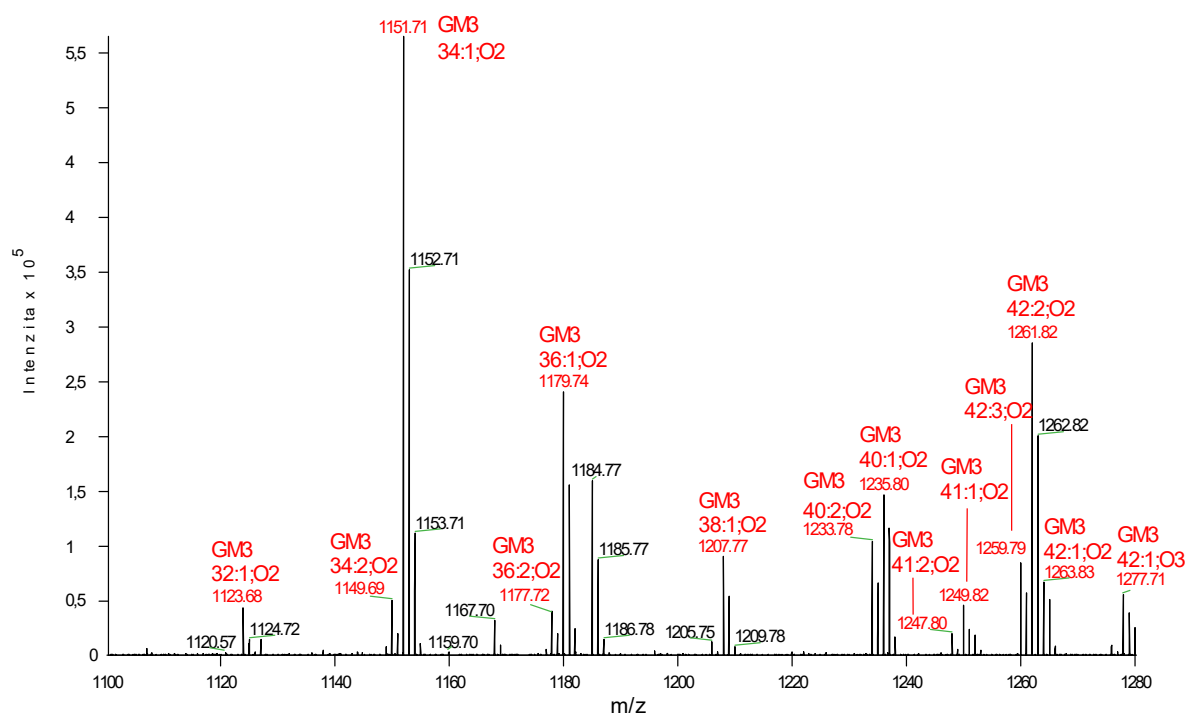
**Obrázek 14** — Stabilita intenzit endogenních lipidů v extraktu rozpuštěném v iPr-OH/CHCl<sub>3</sub> a MeOH/CHCl<sub>3</sub> po čtyřech hodinách analýzy

### 3.3 Zakoncentrování extraktu a výběr koncentrace MALDI matrice

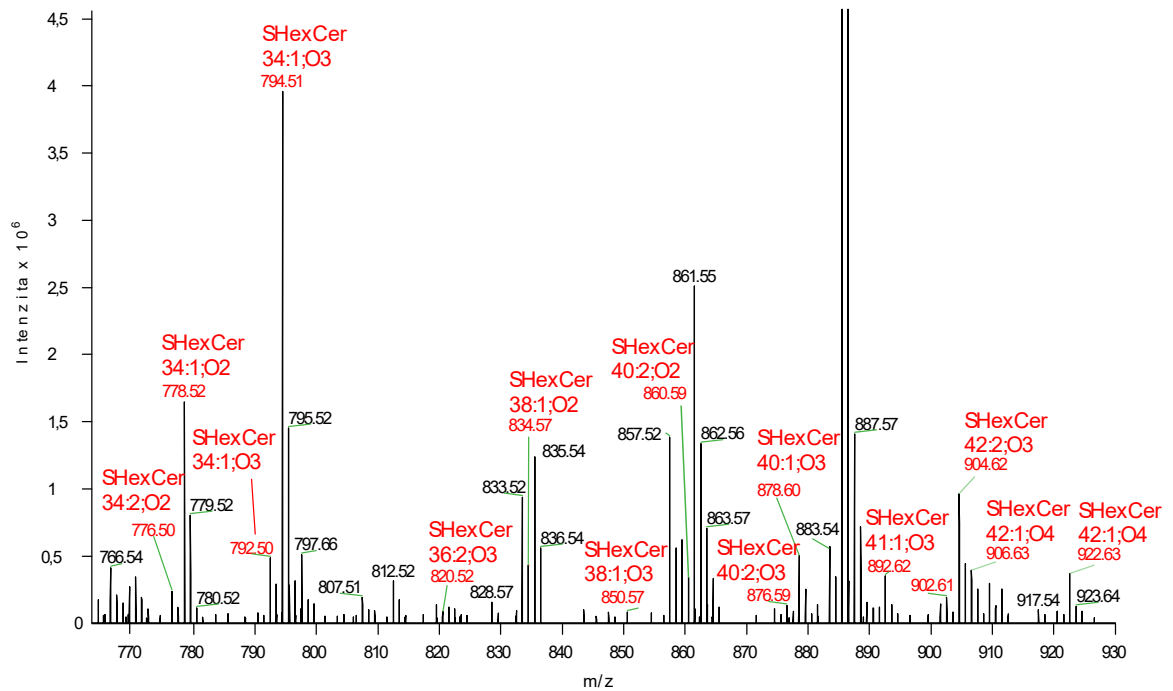
V případě optimalizace tohoto kroku se opět porovnávala intenzita endogenních zástupců gangliosidů a sulfatidů a rovněž se sledovalo, zdali dochází v případě různého zakoncentrování vzorku k lineárnímu vzrůstu signálu přirozeně se vyskytujících lipidů v plazmě. Jako počáteční koncentrace 9-AA byla zvolena koncentrace 5 mg/ml a Folch extrakce byla testována pro výchozí objem 25  $\mu$ l plazmy bez zakoncentrování (již publikovaná metoda [2]). Následně se objem plazmy pro extrakci zvyšoval (*Příloha 1*) a testovalo se i zakoncentrování finálního extraktu (2x, 5x a 10x). Lineární nárůst signálu byl maximálně pozorován pro použitý objem 100  $\mu$ l plazmy s následným 5x zakoncentrováním. V případě 10x zakoncentrovaného

extraktu už signál nenarůstal. Z tohoto důvodu se koncentrace 9-AA zvýšila na 10 mg/ml, přičemž bylo dosaženo pro 10x zakoncentrovaný extrakt 100 ml plazmy opětovného zvýšení signálu. Tato hodnota je zároveň hraniční rozpustností 9-AA, takže tento postup byl zvolen jako finální.

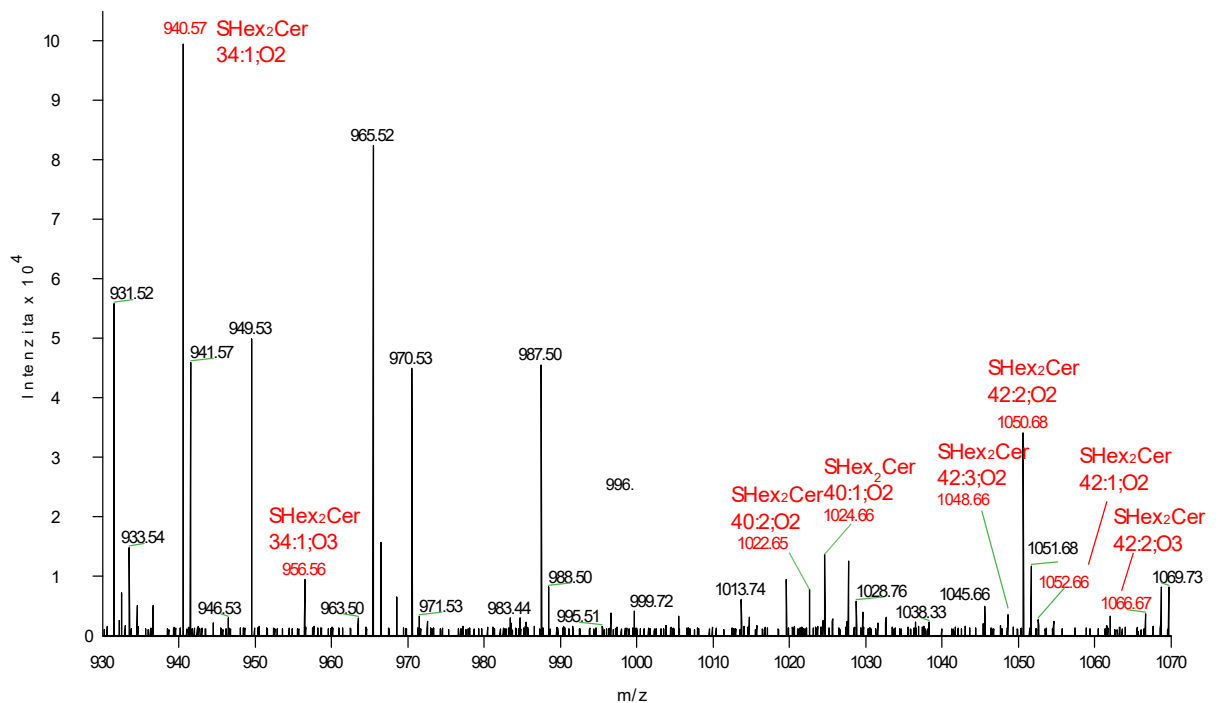
Obrázek 15, 16 a 17 reprezentuje zprůměrované spektrum získané proměřením jednoho spotu extraktu optimalizované metody s využitím SPE-C18 v režimu FTMS, kde jsou zvýrazněné nejintenzivnější zástupci GM3 a SHexCer a SHex<sub>2</sub>Cer ve zkušební plazmě. Pro velké množství identifikovaných zástupců SHexCer a pro přehlednost spektra jsou zvýrazněni jen vybraní zástupci. Na Obrázku 18 je znázorněn záznam celkového iontového proudu v rámci měření jednoho spotu. Záznam ukazuje relativně stabilní signál, a tedy i homogenní krystalizaci analytu a MALDI matrice. Pokud by totiž v takovém záznamu došlo k propadu intenzity, znamenalo by to, že vzorek na spotu zkrystalizoval nerovnoměrně, což by vedlo k nereprodukovatelným výsledkům.



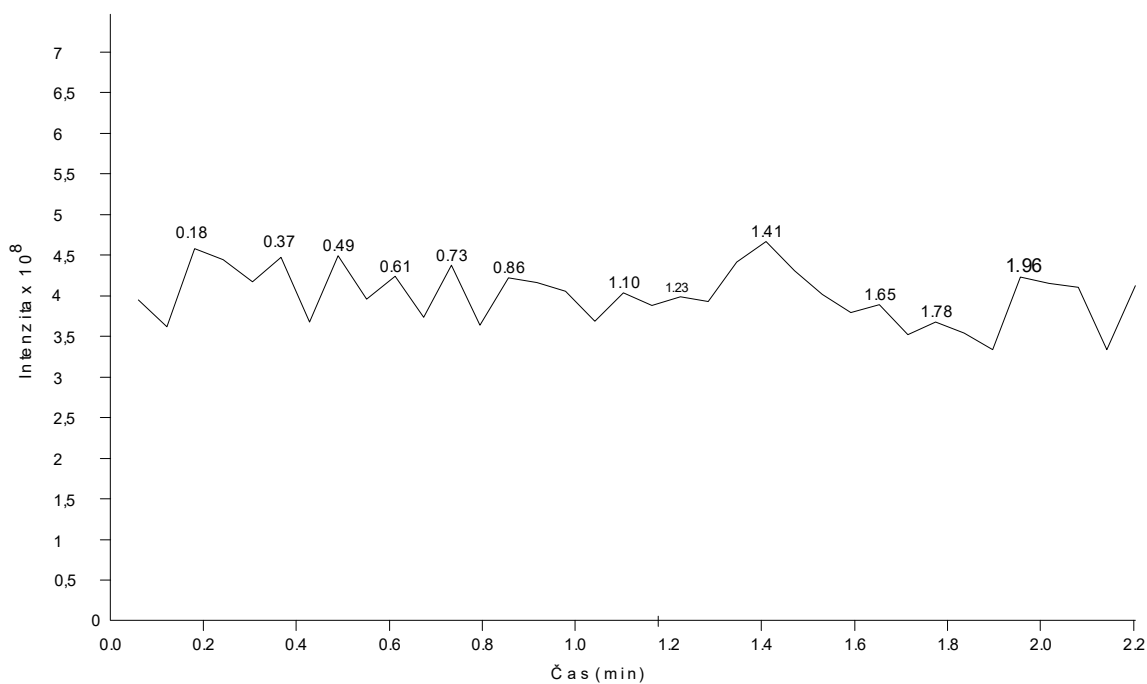
**Obrázek 15** — Záznam spektra SPE extraktu ve FTMS režimu se zvýrazněnými nejintenzivnějšími zástupci GM3 v plazmě



**Obrázek 16** — Záznam spektra SPE extraktu ve FTMS režimu se zvýrazněnými nejintenzivnějšími zástupci SHexCer ve zkušební plazmě

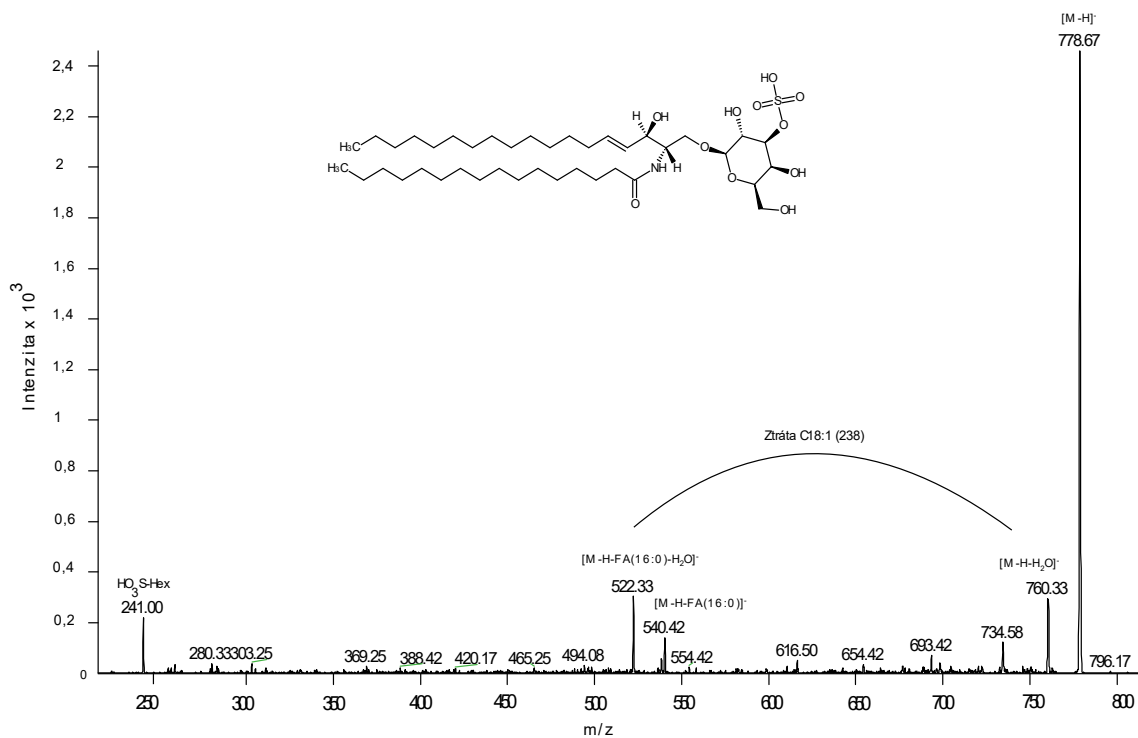


**Obrázek 17** — Záznam spektra SPE extraktu ve FTMS režimu se zvýrazněnými nejintenzivnějšími zástupci SHex<sub>2</sub>Cer ve zkušební plazmě



**Obrázek 18** — TIC chromatogram

Zde na *Obrázku 19* je na ukázkou záznam MS/MS spektra molekuly SHexCer 34:1;O2 (18:1/16:0) s  $m/z$  778.5 s charakteristickými fragmenty

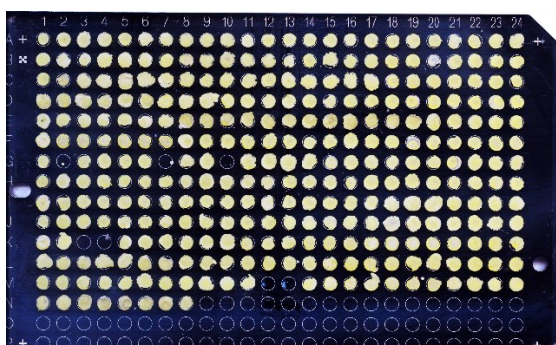


**Obrázek 19** — MS/MS spektrum SHexCer 34:1;O2 (18:1/16:0)

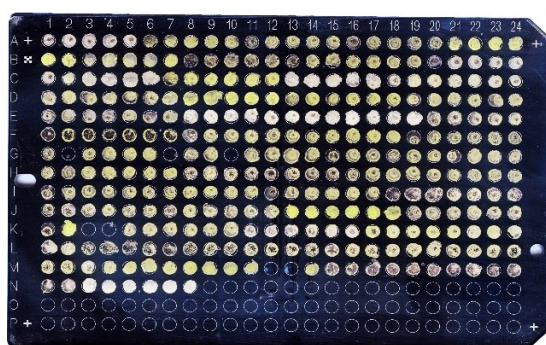
### 3.4 Validace metody

Pro validaci metody byla použita směs IS. Tyto interní standardy nesmí být endogenně přítomny ve studované matrici (plazmě) a měly by reprezentativně reflektovat chování endogenních lipidů. Po sulfatidy byl použit standard SHexCer 18:1;O2/12:0 pro gangliosidy GM3 18:1;O2/18:0-d5. Před validací se uskutečnilo testování optimální koncentrace zásobní IS směsi pro přidavek na střední hladině (přidával se objem 25  $\mu\text{l}$  ke 100  $\mu\text{l}$  plazmy), aby koncentrace, a s tím související naměřená intenzita, byla v rámci intenzit (nejlépe ve středu) pozorovaných endogenních lipidů v plazmě.

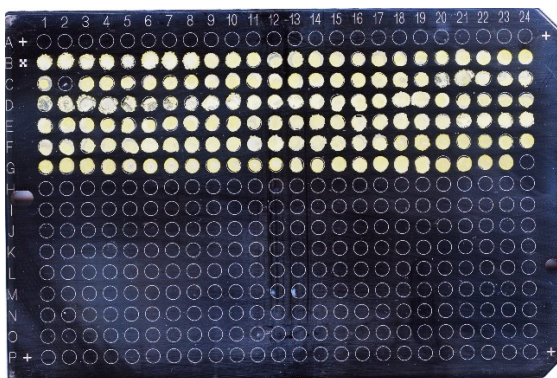
Validace s využitím Folch extrakce zahrnovala měření celkově 308 spotů. Před každým spotováním byl vždy na adekvátní pozici pipetován 1  $\mu\text{l}$   $\text{CHCl}_3$ , který zlepšuje rozložení a přínavost vzorku k destičce (dávkovaný vzorek se pak nerozpíjí). Sekvenční analýza Folch extraktů probíhala 11,3 hodin (každý spot se analyzoval 2,2 minuty). Na *Obrázku 20 a 21* jsou vidět spoty vzorků na MALDI destičce před a po 12 hodinách analýzy, a je patrné, že kvalita spotů během takto dlouhé analýzy rapidně klesla (vlivem odpařování). Tento závěr potvrzují i spoty u SPE validace, které vzhledově působí lépe (*Obrázek 22 a 23*), neboť analýza byla značně kratší (134 měřených spotů/5 hodin). V kapitole rozpouštěcí kroky sekvenční analýza dokonce probíhala do 4 hodin a pokles intenzit během měření sekvence (potvrzující odpařování naspotovaného vzorku), nebyl tak znatelný.



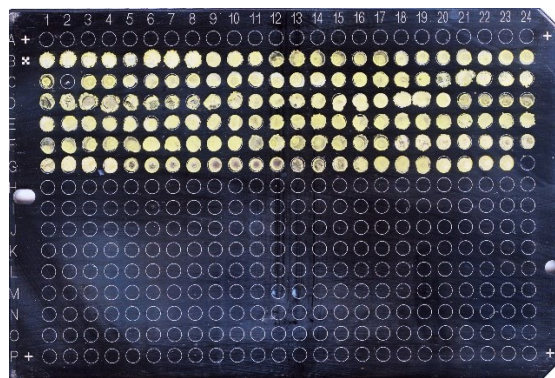
**Obrázek 20** — Folch validační extrakty na MALDI destičce před analýzou



**Obrázek 21** — Folch validační extrakty na MALDI destičce po dvanácti hodinách analýzy



**Obrázek 22** — SPE-C18 validační extrakty na MALDI destičce před analýzou

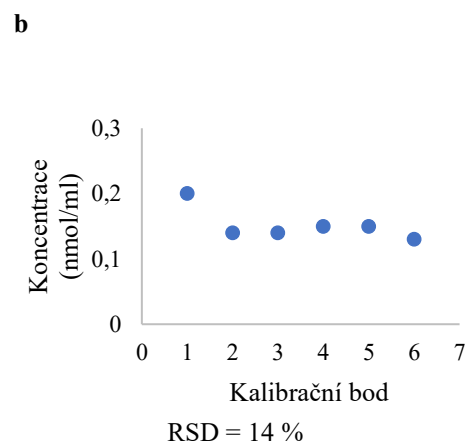
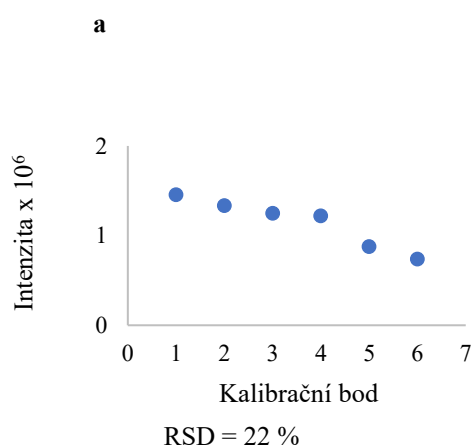


**Obrázek 23** — SPE-C18 validační extrakty na MALDI destičce po třech hodinách analýzy

Pro vybrané endogenní lipidy jsou na *Obrázku 24 (a)* vyneseny intenzity v závislosti na kalibračních bodech. Z obrázku je patrné, že dochází ke snižování intenzit endogenních lipidů během postupného měření kalibračních bodů. Tento trend by nasvědčoval, že koncentrace v každém bodě je odlišná, přitom musí být totožná, jedná se o tentýž vzorek plazmy. Proto byly intenzity endogenních lipidů s využitím intenzit IS přepočteny na koncentraci (*Obrázek 24 (b)*) a vyneseny do grafu v závislosti na kalibračním bodě. Tyto kroky pak potvrdily: 1) důležitost přidavků IS 2) koncentrace endogenních lipidů je přibližně stejná v každém bodě.

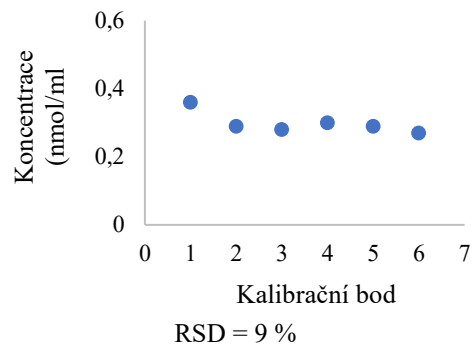
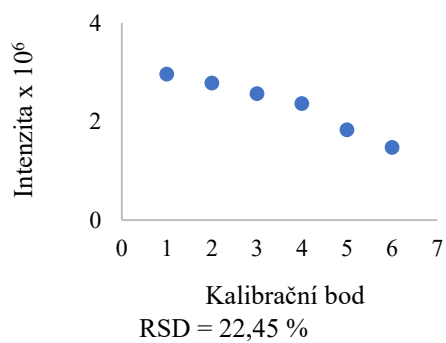
**Zástupce**

SHexCer  
34:1;O2

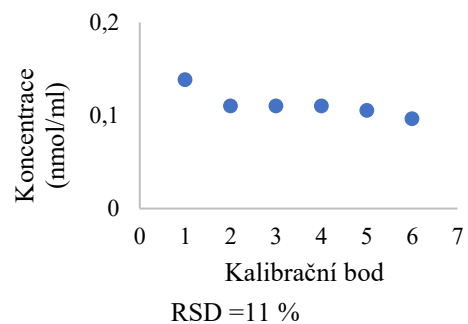
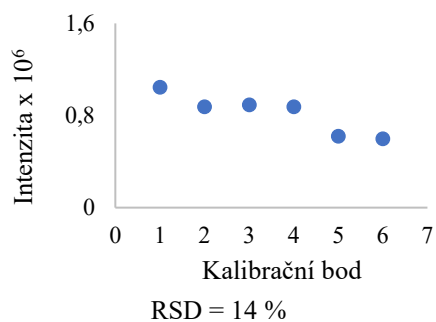




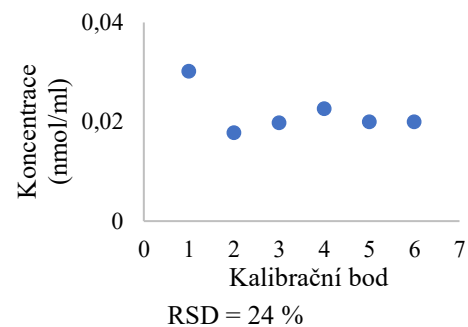
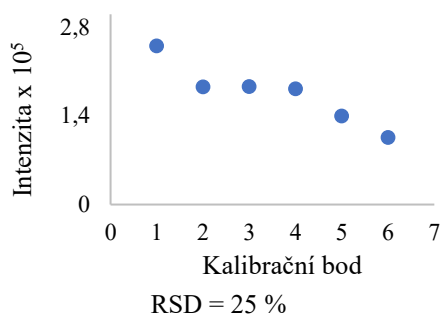
SHexCer  
34:1;O3



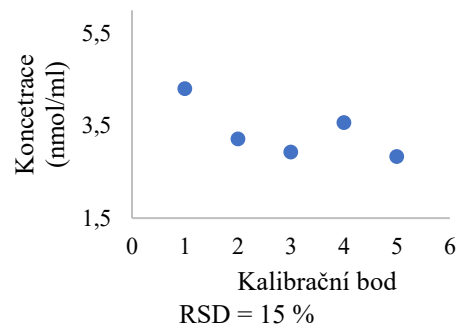
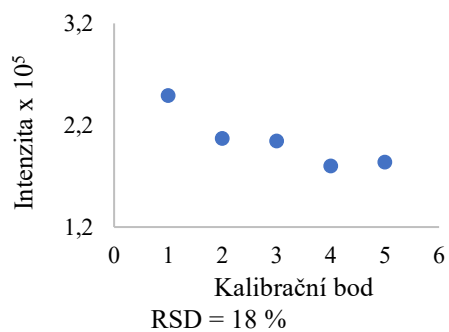
SHexCer  
42:2;O3

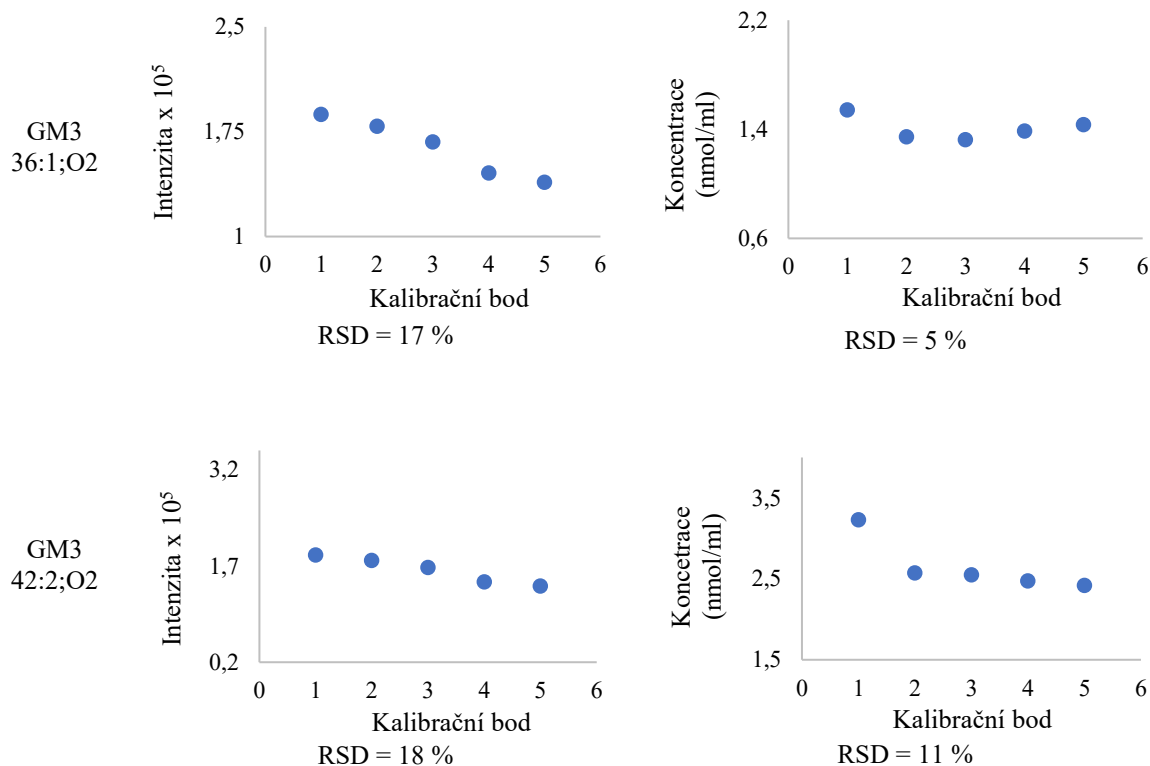


SHexCer  
42:3;O2



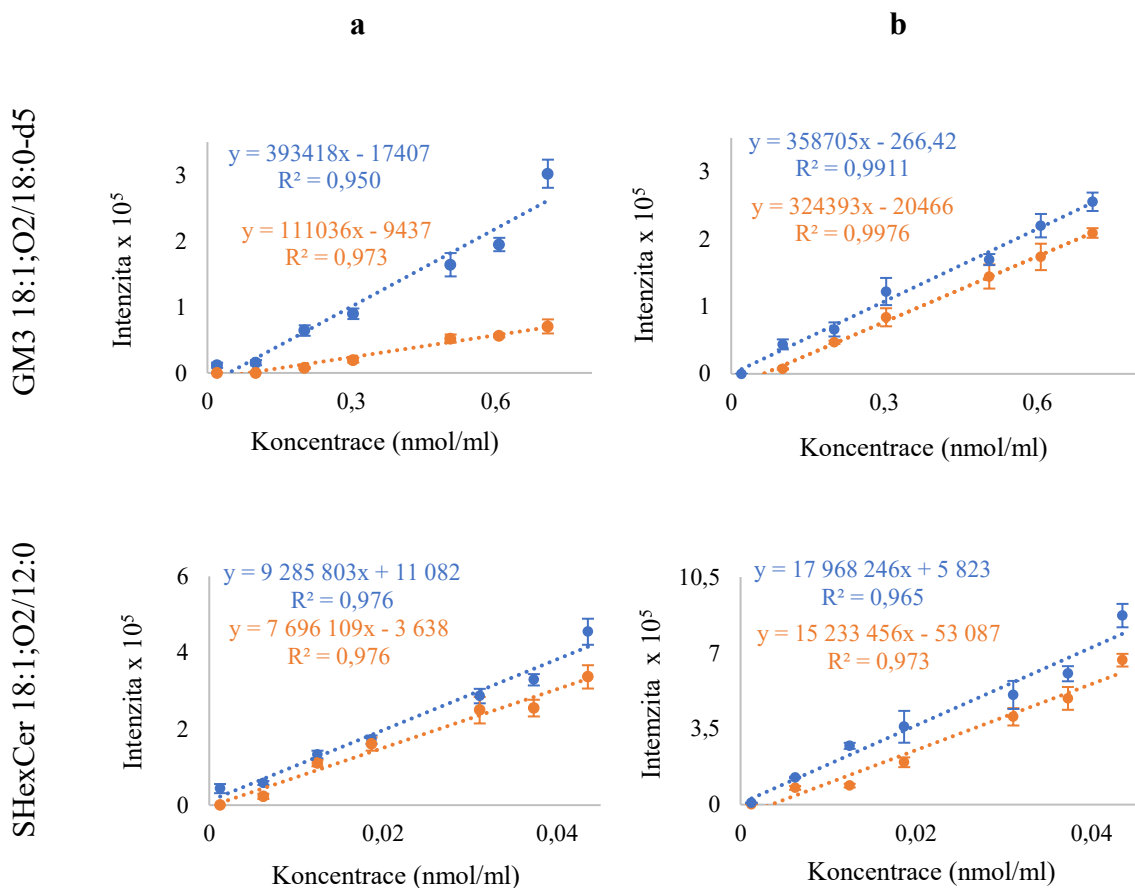
GM3  
34:1;O2





**Obrázek 24** — Grafické porovnání intenzit a koncentrací endogenních lipidů v rámci kalibračních bodů **a)** před normalizací **b)** po normalizaci

Kalibrační řady (*Obrázek 25*) byly úplně prvním validačním parametrem. Kalibrace Folch i SPE extrakce splňovala linearitu. Nicméně vzhledem k hodnotě koeficientu determinace ( $R^2$ ), který sice přesahoval hodnotu 0,9, ale nedosahoval 0,99, z čehož je patrné, že tato metoda je vhodná spíše pro semikvantitativní měření. Nutno podotknout, že koeficient je nižší i z důvodu odpařování. Součástí kalibračních křivek jsou chybové úsečky každého měřeného bodu, které v žádném bodě nepřesahovali  $RSD = 20 \%$ , což dokazuje reprodukovatelnost metody. Modrá přímková značka naznačuje kalibrační body s přidávkou IS po extrakci, oranžová před extrakcí.



**Obrázek 25** — Kalibrační řady s přidavkem IS před a po extrakci podle typu extrakční techniky **a)** Folch **b)** SPE-C18

Zpětným dosazením intenzit IS do rovnice regrese před extrakcí pro obě extrakční techniky byly zjištěny experimentální hodnoty koncentrací IS, kdy chyba pro LOQ byla do 15 %, tato chyba je přijatelná. V *Tabulce 3* jsou uvedeny limity pro obě techniky. Je nutné uvést, že limity kvantifikace a detekce pro SPE a Folch extrakci jsou odlišné u IS gangliosidů, neboť při extrahování gangliosidů Folch extrakcí je velmi nízká extrakční výtěžnost (30 % - 40 %), tímto se posune i limit detekce a kvantifikace pro tuto konkrétní metodu, proto jsou uvedeny v *Tabulce 3* limity pro obě techniky zvlášť.

**Tabulka 3** — Limity detekce a kvantifikace použitých IS

IS	SPE-C18		Folch	
	LOD	LOQ	LOD	LOQ
	(pmol/ml)	(pmol/ml)	(pmol/ml)	(pmol/ml)
SHexCer 18:1;O2/12:0	6	2,4	6	2,4
GM3 18:1;O2/18:0-d5	100	300	240	680

Dalšími parametry bylo určení přesnosti a správnosti. Tyto parametry byly určovány na třech koncentračních hladinách LL / ML / HL. Pro Folch extrakci byly zjištěny procentuální hodnoty přesnosti mezi dvěma dny, pro SPE pouze jednodenní. Pro IS sulfatidů nepřesahovala odchylka přesnosti u obou metod 20 %, s ohledem na problematiku kvalitního spotování a odpařování se výsledky zdají zdařilé a jsou tedy přesné. Pro gangliosidy došlo ke komplikacím na LH u Folch extrakce, kdy přesnost přesahovala 20 % u prvního dne a i v rámci obou dnů. SPE se v tomto ohledu jeví přesnější s ohledem na všechny hladiny (*Tabulka 4*).

**Tabulka 4** — Přesnost Folch a SPE-C18 na třech koncentračních hladinách

IS	Den	Přesnost Folch (RSD)		
		LL	ML	HL
SHexCer 18:1;O2/12:0	1. den	7	14	15
	2. den	9	11	8
	Mezi dny	8	12,5	11,5
GM3 18:1;O2/18:0-d5	1. den	21	4	16
	2. den	34	7	11
	Mezi dny	27,5	5,5	13,5

Přesnost SPE (RSD)

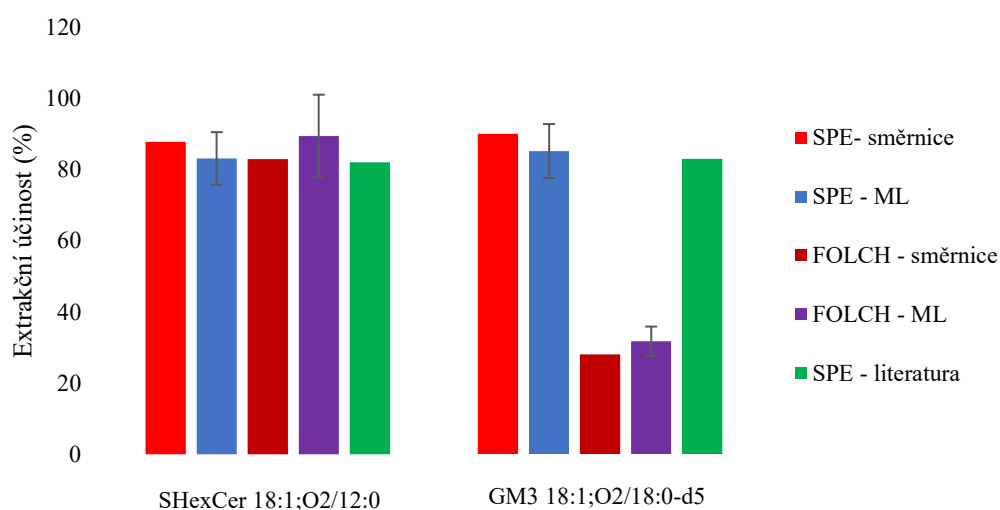
SHexCer 18:1;O2/12:0	1. den	12	9	5
GM3 18:1;O2/18:0-d5	1. den	19	11	3

Správnost odráží i funkčnost extrakce, kdy z důvodu nižších extrakčních účinností Folch extrakce dosahují některé koncentrační hladiny IS gangliosidů odlišnost  $\pm 30\%$  od teoretických hodnot koncentrace, zejména LH. SPE u obou zástupců standardů dosahují správnosti  $\pm 20\%$  až na výjimku, kdy v případě LH u IS sulfatidů chyba přesáhla  $20\%$ . Výsledky správnosti jsou uvedeny v *Tabulce 5*. Tento trend opět ukazuje, že se metoda hodí pro semikvantitativní měření.

**Tabulka 5** — Správnost Folch a SPE-C18 na třech koncentračních hladinách

IS	Den	Správnost Folch (%)		
		LL	ML	HL
SHexCer 18:1;O2/12:0	1. den	119	105	102
	2. den	80	74	97
	Mezi dny	99,5	89,5	99,5
GM3 18:1;O2/18:0-d5	1. den	68	105	83
	2. den	136	126	89
	Mezi dny	102	115	86
Správnost SPE (%)				
SHexCer 18:1;O2/12:0	1. den	73	96	108
GM3 18:1;O2/18:0-d5	1. den	104	100	99

Extrakční účinnost byla určena dle směrnice kalibračních křivek před a po extrakci pro obě techniky. Následně byla uvedena (*Obrázek 26*) extrakční účinnost pro optimalizovaných 25  $\mu$ l IS. Je patrné, že extrakční účinnost Folch pro gangliosidy dosahuje výtěžnosti maximálně 40 %. Pro extrakční účinnosti ze směrnice a literatury nejsou uvedeny chybové úsečky, pro tento parametr by se každá kalibrační křivka musela vytvořit 3x. Extrakční účinnost SPE-C18 u obou IS dosahuje rozmezí 80 – 90 %, pro GM3 dokonce při výpočtu extrakční účinnosti z neprůměrovaných hodnot na ML dosahuje výtěžnost nad 90 %, po zprůměrování je to přesných 90 %.



**Obrázek 26** — Extrakční účinnosti IS standardů SHexCer 18:1;O2/12:0 a GM3 18:1;O2/18:0-d5

### 3.5 Aplikace validované metody pro stanovení gangliosidů a sulfatidů v referenčním materiálu NIST SRM 1950

Obě extrakční techniky byly aplikovány na stanovení vybraných kyselých lipidů v NIST plazmě (*Tabulka 6*) Pro kvantifikaci byly použity stejné interní standardy, jako v případě validace. Příklad IS byl na střední hladině ML (25  $\mu$ l). Výsledky jsou porovnány s literaturou. Mezi Folch extrakcí a SPE nejsou příliš velké rozdíly v koncentracích pro gangliosidy s krátkými řetězci, avšak se zvyšující se délkou acylového zbytku dochází u Folch extrakce k nárůstům koncentrací. Lipidy v tabulce 8 jsou seřazeny právě podle složení acylových zbytků. Tento nárůst koncentrací je způsoben rozdílným přestupem GM3 s různou délkou acylu do organické fáze během Folch extrakce. Pro GM3, které mají podobnou délku acylu jako IS a rovněž i jednu dvojnou vazbu, jsou koncentrace srovnatelné s SPE extrakcí. Nicméně pro více odlišné GM3 jsou koncentrace mezi jednotlivými extrakcemi rozdílné, nejmarkantnější rozdíl se nachází u GM3 42:2;O2, GM3 40:1;O2. Z tohoto důvodu by bylo vhodnější použít více IS s rozdílnými délkami acylových zbytků a počtem přítomných násobných vazeb. U sulfatidů je situace různorodá a pro některé případy jsou koncentrace rozdílné, což může být způsobeno do jisté míry i rozdílným matričním efektem. Závěrem lze konstatovat, že porovnání s publikovanou metodou RP-LC/MS, ve které bylo kvantifikováno podstatně méně aGSL, ukazuje velmi dobrou shodu výsledků. Tento fakt dokazuje, že metoda vyvinutá v rámci diplomové práce poskytuje srovnatelné výsledky a je tedy aplikovatelná pro semikvantitativní měření aGSL v plazmě. Stejně tak i porovnání s předchozí prací provedené na stejné instrumentaci ukazuje poměrně relativně dobrou shodu výsledků [2]. Pozorované odchylky jsou pravděpodobně opět způsobené matričním efektem, který může být pro extrakci 25 ml plazmy bez zakoncentrování výrazně odlišný než 10 x zakoncentrovaný extrakt 100 ml plazmy. V případě SHex<sub>2</sub>Cer bohužel nebylo možné výsledky porovnat s literaturou, neboť tyto koncentrace v NIST plazmě doposud nikdo nebyl schopen stanovit a v literatuře nejsou tedy uvedeny.

**Tabulka 6** — Koncentrace endogenních lipidů v NIST SRM 1950 plazmě

<b>Interní standard</b>		<b>Koncentrace (pmol/ml)</b>				
GM3 (18:1/10-d5)		506,9				
SHexCer 18:1;O2/12:0		31,1				
<b>Zástupce</b>	<b>Folch</b>		<b>SPE-C18</b>		<b>Folch literatura</b>	
	c (pmol/ml)	RSD (%)	c (pmol/ml)	RSD (%)	c (pmol/ml) [81]	c (pmol/ml) [2]
GM3 34:1;O2			1181,20	23	875,06	
GM3 34:2;O2	77,81	17	78,40	5		
GM3 36:1;O2	541,10	9	443,07	4	345,59	
GM3 36:2;O2	92,24	4	80,76	15		
GM3 38:1;O2	163,92	17	139,71	7	378,34	
GM3 40:1;O2	609,47	5	353,76	5	565,58	
GM3 40:1;O3	75,71	11	55,41	15		
GM3 40:2;O2	270,05	10	240,92	26		
GM3 41:1;O2	177,44	15	84,98	22		
GM3 41:2;O2	28,96	7	20,14	17		
GM3 42:1;O2	510,60	15	220,33	4	313,60	
GM3 42:1;O3	123,70	14	61,93	26		
GM3 42:2;O2	842,57	4	647,41	26	492,18	
GM3 42:2;O3	162,47	13	91,94	25	283,04	
GM3 42:3;O2	258,56	16	187,20	20		
SHex <sub>2</sub> Cer 34:1;O2	2,65	25	3,70	4		
SHex <sub>2</sub> Cer 34:1;O3			0,37	18		
SHex <sub>2</sub> Cer 40:1;O2			0,60	27		
SHex <sub>2</sub> Cer 42:1;O2			0,44	15		
SHex <sub>2</sub> Cer 42:2;O2	1,61	17	1,39	31		
SHex <sub>2</sub> Cer 42:3;O2			0,48	15		
SHexCer 34:0;O3	20,00	11	15,70	3		18,32
SHexCer 34:1;O2	122,65	11	96,85	4	151,08	126,23
SHexCer 34:1;O3	265,89	9	220,61	3	254,96	250,70
SHexCer 34:2;O2	16,62	14	13,55	3		15,59
SHexCer 34:2;O3	31,01	17	28,07	4		23,63
SHexCer 36:1;O2	13,26	27	2,40	16		2,68
SHexCer 36:1;O3	6,16	19	5,26	9		3,24
SHexCer 36:2;O2	4,68	15	2,19	9		
SHexCer 36:2;O3	3,87	18	4,14	4		
SHexCer 38:1;O2	1,87	5	0,88	22		
SHexCer 38:1;O3	6,23	9	4,53	7		
SHexCer 38:2;O2	3,63	15	1,47	15		
SHexCer 40:0;O3	5,24	15	3,01	4		
SHexCer 40:0;O4	7,44	13	4,36	9		
SHexCer 40:1;O2	23,02	13	12,76	8		



SHexCer 40:1;O3	53,51	9	30,30	8		52,43
SHexCer 40:2;O2	14,81	12	9,41	14		8,44
SHexCer 40:2;O3	19,60	12	11,23	25		12,76
SHexCer 41:0;O4	3,26	20	2,11	18		
SHexCer 41:1;O2	10,05	17	5,22	13		4,90
SHexCer 41:1;O3	36,25	9	19,45	9		33,62
SHexCer 41:2;O2	4,72	17	3,46	18		
SHexCer 41:2;O3	12,29	10	8,23	14		5,48
SHexCer 42:0;O4	7,42	12	4,50	6		
SHexCer 42:1;O2	17,99	9	9,10	12		12,59
SHexCer 42:1;O3	58,47	8	31,96	11	32,74	55,69
SHexCer 42:1;O4	24,14	12	14,22	12		15,02
SHexCer 42:2;O2	37,26	15	21,87	17	30,46	31,98
SHexCer 42:2;O3	72,18	12	39,15	25		68,10
SHexCer 42:3;O2	20,05	11	11,52	15		10,10
SHexCer 42:3;O3	17,93	10	10,78	12		10,21

## ZÁVĚR

V rámci optimalizace bylo zjištěno, že během analýzy dochází k odpařování vzorku na MALDI destičce. Kvůli této situaci byla pro rozpouštěcí krok před smícháním s MALDI maticí testována směs rozpouštědel  $iPr-OH/CHCl_3$  a  $MeOH/CHCl_3$  a následně byla porovnána stabilita vzorku extraktu v nich rozpuštěných během analýzy, přičemž  $iPr-OH/CHCl_3$  vykazoval lepší stabilitu. Nicméně při tomto postupu docházelo k výraznému odpaření, na základě čehož bylo vyhodnoceno, že pro dosažení optimálních výsledků je nutné měřit sekvence v rámci 5 hodin, kdy je ztráta intenzit studovaných aGSL do 20 % původních hodnot.

Validační parametry pro Folch extrakci, jako je linearita, přesnost a správnost prokázaly, že metoda je vhodná pro semikvantitativní lipidomickou analýzu. Jediný parametr, který nedosáhl spolehlivých výsledků je extrakční účinnost pro GM3, která dosahuje 28 % z poměru směrnice kalibrační křivky IS přidaných před a po extrakci a 31 % určených z ML. Dále bylo na základě proměření koncentrací NIST plazmy a srovnání s SPE potvrzeno, že se extrakční účinnost pro GM3 liší v závislosti na délce acylu v ceramidové části. Pro sulfatidy jsou všechny parametry přijatelné a použití Folch extrakce pouze pro sulfatidy je bezproblémové. Extrakční účinnost v jejich případě dosahuje 89 % při určení z ML a 82 % ze směrnice.

Validace SPE C-18 prokazuje, že tento typ extrakce pro GM3 je jednoznačně spolehlivější a dosahuje přijatelných výsledků, což platí i pro sulfatidy.

Volbu protokolu tedy rozhoduje typ analytu. V případě, že středem zájmu jsou GM3, doporučení je použít spíše SPE-C18, jelikož technika není tolik odlišná pro různé délky acylových zbytků. V případě sulfatidů je možné použít oba dva extrakční protokoly, avšak je nutné brát v potaz, že pro řádnou extrakci SHex<sub>2</sub>Cer je výhodnější SPE-C18.

Obě validované techniky byly použity na analýzu aGSL v referenčním materiálu NIST plazmě, kdy bylo kvantifikováno 52 zástupců aGSL (31 zástupců SHexCer, 6 zástupců SHex<sub>2</sub>Cer a 15 zástupců GM3). Porovnání SPE a Folch extrakce ukázalo, že polárnější analyty, např. GM3 s krátkými acyly, vykazují horší extrakční účinnost, což bylo pozorováno i v případě SHex<sub>2</sub>Cer. Finální porovnání s literaturou ukázalo relativně dobrou shodu. Navíc metoda vyvinutá v rámci této diplomové práce dokáže stanovit v porovnání s literaturou více než dvojnásobek aGSL, což naznačuje její potenciál pro jejich stanovení v plazmě v rámci klinických měření, což bude předmětem další studie.

## SEZNAM LITERATURY

- [1] HOŘEJŠÍ Karel, Robert JIRÁSKO, Michaela CHOCHOLOUŠKOVÁ, Denise WOLRAB, David KAHOUN a Michal HOLČAPEK. Comprehensive Identification of Glycosphingolipids in Human Plasma Using Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography—Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Metabolites* [online]. 2021, **11**(3), 140.
- [2] JIRÁSKO, Robert, Jakub IDKOWIAK, Denise WOLRAB, Aleš KVASNIČKA, David FRIEDECKÝ, Krzysztof POLAŃSKI, Hana ŠTUDENTOVÁ, Vladimír ŠTUDENT, Bohuslav MELICHAR a Michal HOLČAPEK. Altered plasma, urine, and tissue profiles of sulfatides and sphingomyelins in patients with renal cell carcinoma. B.m.: medRxiv. [online] 2022.
- [3] JIRÁSKO, Robert, Michal HOLČAPEK, Maria KHALIKOVA, David VRÁNA, Vladimír ŠTUDENT, Zuzana PROUZOVÁ a Bohuslav MELICHAR. MALDI Orbitrap Mass Spectrometry Profiling of Dysregulated Sulfoglycosphingolipids in Renal Cell Carcinoma Tissues. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* [online]. 2017, **28**(8), 1562–1574.
- [4] FAHY, Eoin, Dawn COTTER, Manish SUD a Shankar SUBRAMANIAM. Lipid classification, structures and tools. *Biochimica et biophysica acta* [online]. 2011, **1811**(11), 637–647.
- [6] FEINGOLD, Kenneth R. Introduction to Lipids and Lipoproteins. In: Kenneth R. FEINGOLD, Bradley ANAWALT, Alison BOYCE, George CHROUSOS, Wouter W. DE HERDER, Ketan DHATARIYA, Kathleen DUNGAN, Jerome M. HERSHMAN, Johannes HOFLAND, Sanjay KALRA, Gregory KALTSAS, Christian KOCH, Peter KOPP, Márta KORBONITS, Christopher S. KOVACS, Wendy KUOHUNG, Blandine LAFERRÈRE, Miles LEVY, Elizabeth A. MCGEE, Robert MCLACHLAN, John E. MORLEY, Maria NEW, Jonathan PURNELL, Rakesh SAHAY, Frederick SINGER, Mark A. SPERLING, Constantine A. STRATAKIS, Dace L. TRENCE a Don P. WILSON, ed. Endotext [online]. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc., 2000

- [7] Holmes MV, Millwood IY, Kartsonaki C, Hill MR, Bennett DA, Boxall R, Guo Y, Xu X, Bian Z, Hu R, Walters RG, Chen J, Ala-Korpela M, Parish S, Clarke RJ, Peto R, Collins R, Li L, Chen Z; China Kadoorie Biobank Collaborative Group. Lipids, Lipoproteins, and Metabolites and Risk of Myocardial Infarction and Stroke. *J* 2018 [online] 13;71(6).620-632
- [8] MATSUSHITA, Yuki, Hayato NAKAGAWA a Kazuhiko KOIKE. Lipid Metabolism in Oncology: Why It Matters, How to Research, and How to Treat. *Cancers* [online]. 2021, **13**(3), 474.
- [9] MURO, Eleonora, G. Ekin ATILLA-GOKCUMEN a Ulrike S. EGGERT. Lipids in cell biology: how can we understand them better? *Molecular Biology of the Cell* [online]. 2014, **25**(12), 1819–1823.
- [10] LUQUE DE CASTRO, M. D. a R. QUILES-ZAFRA. Lipidomics: An omics discipline with a key role in nutrition. *Talanta* [online]. 2020
- [11] Harperova ilustrovaná biochemie, Autor: Robert K. Murray, ISBN: 978-80-7262-907-7, EAN: 9788072629077, Nakladatel: Galén [vid. 2021-12-07].
- [12] WANG, Wenjun, Ling BAI, Wei LI a Jiuwei CUI. The Lipid Metabolic Landscape of Cancers and New Therapeutic Perspectives. *Frontiers in Oncology* [online]. 2020, **10**, 2686.
- [14] MERTEN, M., S. MOTAMEDY, S. RAMAMURTHY, F.c. ARNETT a P. THIAGARAJAN. Sulfatides. *Circulation* [online]. 2003, **108**(17), 2082–2087.
- [15] YU, Robert K., Yi-Tzang TSAI, Toshio ARIGA a Makoto YANAGISAWA. Structures, biosynthesis, and functions of gangliosides--an overview. *Journal of Oleo Science* [online]. 2011, **60**(10), 537–544. ISSN 1347-3352.
- [16] Comprehensive Identification of Glycosphingolipids in Human Plasma Using Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Mass Spectrometry - PubMed [online] 2019.
- [17] TAUBE, Stefan, Mengxi JIANG a Christiane E. WOBUS. Glycosphingolipids as Receptors for Non-Enveloped Viruses. *Viruses* [online]. 2010, **2**(4), 1011–1049.

- [18] LEWIS, Alexander C., Craig T. WALLINGTON-BEDDOE, Jason A. POWELL a Stuart M. PITSON. Targeting sphingolipid metabolism as an approach for combination therapies in haematological malignancies. *Cell Death Discovery* [online]. 2018, **4**(1), 1–11.
- [19] JIAO, Wen-Juan, Fei-Qiang LI, Yue-Liang BAI, Xiao-Xiao SHI, Mu-Fei ZHU, Min-Jing ZHANG, Cun-Gui MAO a Zeng-Rong ZHU. Rice Stripe Virus Infection Alters mRNA Levels of Sphingolipid-Metabolizing Enzymes and Sphingolipids Content in *Laodelphax striatellus*. *Journal of Insect Science* [online]. 2017, **17**.
- [20] CASTILLO, Rolando, Leonel ROJO, Marcela HENRÍQUEZ HENRÍQUEZ, Hernan SILVA, Maturana HURTADO, Maria VILLAR, Manuel FUENTES a Pablo GASPAR. From Molecules to the Clinic: Linking Schizophrenia and Metabolic Syndrome through Sphingolipids Metabolism. *Frontiers in Neuroscience* [online]. 2016, **10**.
- [21] NAKAHARA, Kanae, Aya OHKUNI, Takuya KITAMURA, Kensuke ABE, Tatsuro NAGANUMA, Yusuke OHNO, Raphael A. ZOELLER a Akio KIHARA. The Sjögren-Larsson Syndrome Gene Encodes a Hexadecenal Dehydrogenase of the Sphingosine 1-Phosphate Degradation Pathway. *Molecular Cell* [online]. 2012, **46**(4), 461–471.
- [22] TAKAHASHI, Tadanobu a Takashi SUZUKI. Role of sulfatide in normal and pathological cells and tissues. *Journal of Lipid Research* [online]. 2012, **53**(8), 1437–1450.
- [23] MERSCHER, Sandra a Alessia FORNONI. Podocyte Pathology and Nephropathy – Sphingolipids in Glomerular Diseases. *Frontiers in endocrinology* [online]. 2014, **5**, 127.
- [24] KOLTER, Thomas. Ganglioside Biochemistry. *ISRN Biochemistry* [online]. **2012**,
- [25] SIPIONE, Simonetta, John MONYROR, Danny GALLEGUILLOS, Noam STEINBERG a Vaibhavi KADAM. Gangliosides in the Brain: Physiology, Pathophysiology and Therapeutic Applications. *Frontiers in Neuroscience* [online]. 2020, **14**, 1004.

- [26] SANDHOFF, Roger a Konrad SANDHOFF. Emerging concepts of ganglioside metabolism. *FEBS Letters* [online]. 2018, **592**(23), 3835–3864.
- [27] GeneCards; The human gene database; Cerebroside Synthase. In: GeneCards [online]. 16. prosinec 2021. Dostupné z: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=UGT8>
- [28] GeneCards; The human gene database; Cerebroside Sulfotransferase. In: [online]. 16. prosinec 2021. Dostupné z: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=GAL3ST1>
- [29] GeneCards; The human gene database; Galactosylceraminidase. In: [online]. 16. prosinec 2021. Dostupné z: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=GALC>
- [30] GeneCards; The human gene database; Cerebroside-Sulfatase. In: [online]. 16. prosinec 2021. Dostupné z: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ARSA>
- [31] GeneCards; The human gene database; Sialyltransferase. In: [online]. 16. prosinec 2021. Dostupné z: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ST3GAL5>
- [32] GeneCards; The human gene database; Sialidase. In: [online]. 16. prosinec 2021. Dostupné z: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=NEU1>
- [33] GeneCards; The human gene database; GM1 beta - galktosidá-za. In: [online]. 15. prosinec 2021. Dostupné z: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=GLB1>
- [34] ARREBERG, Philomena, Ramesh HALDER a Vipin KUMAR. Cross-Regulation Between Distinct Natural Killer T Cell Subsets Influences Immune Response to Self and Foreign Antigens. *Journal of Cellular Physiology* [online]. 2009, **218**(2), 246–250.
- [35] HALMER, Ramona, Silke WALTER a Klaus FASSBENDER. Sphingolipids: Important Players in Multiple Sclerosis. *Cellular Physiology and Biochemistry* [online]. 2014, **34**(1), 111–118.
- [36] BLOMQUIST, Maria, Thomas OSTERBYE, Jan-Eric MÅNSSON, Karsten BUSCHARD a Pam FREDMAN. Uptake of the glycosphingolipid sulfatide in the gastrointestinal tract and pancreas in vivo and in isolated islets of Langerhans. *Lipids in Health and Disease* [online]. 2006, **5**(1), 26.

- [37] JEON, Sae-Bom, Hee Jung YOON, Se-Ho PARK, In-Hoo KIM a Eun Jung PARK. Sulfatide, A Major Lipid Component of Myelin Sheath, Activates Inflammatory Responses As an Endogenous Stimulator in Brain-Resident Immune Cells. *The Journal of Immunology* [online]. 2008, **181**(11), 8077–8087.
- [38] GRASSI, Sara, Simona PRIONI, Livia CABITTA, Massimo AURELI, Sandro SONNINO a Alessandro PRINETTI. The Role of 3-O-Sulfogalactosylceramide, Sulfatide, in the Lateral Organization of Myelin Membrane. *Neurochemical Research* [online]. 2016, **41**(1), 130–143.
- [39] KUCHARŤ, Ladislav, Befekadu ASFAW, Helena POUPĚTOVÁ, Jitka HONZÍKOVÁ, František TUREČEK a Jana LEDVINOVÁ. Direct Tandem Mass Spectrometric Profiling of Sulfatides in Dry Urinary Samples for Screening of Metachromatic Leukodystrophy. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* [online]. 2013, **425**, 153–159.
- [40] WEINER, I. David a Jill W. VERLANDER. Ammonia Transporters and Their Role in Acid-Base Balance. *Physiological Reviews* [online]. 2017, **97**(2), 465–494.
- [41] STETTNER, Paula, Soline BOURGEOIS, Christian MARSCHING, Milena TRAYKOVA-BRAUCH, Stefan PORUBSKY, Viola NORDSTRÖM, Carsten HOPF, Robert KOESTERS, Roger SANDHOFF, Herbert WIEGANDT, Carsten A. WAGNER, Hermann-Josef GRÖNE a Richard JENNEMANN. Sulfatides are required for renal adaptation to chronic metabolic acidosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2013, **110**(24), 9998–10003.
- [42] PROKAZOVA, Nina, N SAMOVILOVA, E GRACHEVA a Natalia GOLOVANOVA. Ganglioside GM3 and its biological functions. *Biochemistry. Biokhimiia* [online]. 2009, **74**, 235–49.
- [43] SAFAIE-QAMSARI, Elmira, Alireza NOURAZARIAN, Salman BAGHERI a Morteza MOTALLEBNEZHAD. Ganglioside as a Therapy Target in Various Types of Cancer. *Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP* [online]. 2016, **17**, 1643–7.
- [44] Chemoenzymatically synthesized ganglioside GM3 analogues with inhibitory effects on tumor cell growth and migration - ScienceDirect [online]. [vid. 2021-12-09].

- [45] LI, Ruixiang, Jessica MANELA, Yu KONG a Stephan LADISCH. Cellular Gangliosides Promote Growth Factor-induced Proliferation of Fibroblasts. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 2000, **275**(44), 34213–34223.
- [46] GU, Yuchao, Junhua ZHANG, Wenyi MI, Jing YANG, Feng HAN, Xinzhi LU a Wengong YU. Silencing of GM3 synthase suppresses lung metastasis of murine breast cancer cells. *Breast cancer research: BCR* [online]. 2008, **10**(1), R1.
- [47] SATOH, M., A. ITO, H. NOJIRI, K. HANDA, K. NUMAHATA, C. OHYAMA, S. SAITO, S. HOSHI a S. I. HAKOMORI. Enhanced GM3 expression, associated with decreased invasiveness, is induced by brefeldin A in bladder cancer cells. *International Journal of Oncology*. 2001, **19**(4), 723–731.
- [48] HOLČAPEK, Michal, Gerhard LIEBISCH a Kim EKROOS. Lipidomic Analysis. *Analytical Chemistry* [online]. 2018, **90**(7), 4249–4257.
- [49] VAŇKOVÁ, Zuzana, Ondřej PETERKA, Michaela CHOCHOLOUŠKOVÁ, Denise WOLRAB, Robert JIRÁSKO a Michal HOLČAPEK. Retention dependences support highly confident identification of lipid species in human plasma by reversed-phase UHPLC/MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2021.
- [50] WOLRAB, Denise, Michaela CHOCHOLOUŠKOVÁ, Robert JIRÁSKO, Ondřej PETERKA a Michal HOLČAPEK. Validation of lipidomic analysis of human plasma and serum by supercritical fluid chromatography–mass spectrometry and hydrophilic interaction liquid chromatography–mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2020, **412**(10), 2375–2388.
- [51] HÁJEK, Roman, Robert JIRÁSKO, Miroslav LÍSA, Eva CÍFKOVÁ a Michal HOLČAPEK. Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography–Mass Spectrometry Characterization of Gangliosides in Biological Samples. *Analytical Chemistry* [online]. 2017, **89**(22), 12425–12432.
- [52] DORSEY, John G., William T. COOPER, Barbara A. SILES, Joe P. FOLEY a Howard G. BARTH. *Liquid Chromatography: Theory and Methodology*. *Analytical Chemistry* [online]. 1996, **68**(12), 515–568.



- [53] ZÜLLIG, Thomas, Martin TRÖTZMÜLLER a Harald C. KÖFELER. Lipidomics from sample preparation to data analysis: a primer. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2020, **412**(10), 2191–2209.
- [54] KOTAPATI, Hari Kiran a Philip D. BATES. Normal phase HPLC method for combined separation of both polar and neutral lipid classes with application to lipid metabolic flux. *Journal of Chromatography B* [online]. 2020, **1145**, 122099.
- [55] WU, Zhexue, Jong Cheol SHON a Kwang-Hyeon LIU. Mass Spectrometry-based Lipidomics and Its Application to Biomedical Research. *Journal of Lifestyle Medicine* [online]. 2014, **4**(1), 17–33.
- [56] NORKOVÁ, Renáta a Jana JAKLOVÁ. Ionizační techniky a rozhraní pro spojení kapilárních-elektro migračních metod s hmotnostně spektrometrickou detekcí. *Chem. Listy*. 2013, 7.
- [57] CLENCH, M. R. a L. W. TETLER. CHROMATOGRAPHY: LIQUID | Detectors: Mass Spectrometry. In: Ian D. WILSON, ed. *Encyclopedia of Separation Science* [online]. Oxford: Academic Press, 2000 [vid. 2021-12-15], s. 616–622. ISBN 978-0-12-226770-3.
- [58] MEDHE, Sharad. Ionization Techniques in Mass Spectrometry: A Review. *Mass Spectrometry & Purification Techniques* [online]. 2018, **04**(01) [vid. 2021-12-15]. ISSN 24699861.
- [59] HO, CS, CWK LAM, MHM CHAN, RCK CHEUNG, LK LAW, LCW LIT, KF NG, MWM SUEN a HL TAI. *Electrospray Ionisation Mass Spectrometry: Principles and Clinical Applications*. *The Clinical Biochemist Reviews*. 2003, **24**(1), 3–12.
- [60] R. Jirásko. Ionizační Techniky – 1. část [přednáška]. Pardubice: Fakulta chemicko\_technologická Univerzity Pardubice, 10. 3. 2021. Dostupné z: <https://holcapek.upce.cz>
- [61] R. Jirásko. Ionizační techniky – 2. část [přednáška]. Pardubice: Fakulta chemicko\_technologická Univerzity Pardubice, 17. 3. 2020. Dostupné z: <https://holcapek.upce.cz>

- [62] CHO, Yi-Tzu, Hung SU, Wen-Jeng WU, Deng-Chyang WU, Ming-Feng HOU, Chao-Hung KUO a Jentaie SHIEA. Chapter Six - Biomarker Characterization by MALDI-TOF/MS. In: Gregory S. MAKOWSKI, ed. *Advances in Clinical Chemistry* [online]. B.m.: Elsevier, 2015, s. 209–254.
- [63] R. Jirásko. *Hmotnostní analyzátořy – 2. část [přednáška]*. Pardubice: Fakulta chemicko\_technologická Univerzity Pardubice, 17. 3. 2020. Dostupné z: <https://holcapek.upce.cz>
- [64] R. Jirásko. *Hmotnostní analyzátořy – 1. část [přednáška]*. Pardubice: Fakulta chemicko\_technologická Univerzity Pardubice, 17. 3. 2020. Dostupné z: <https://holcapek.upce.cz>
- [65] *Mass spectrometry advances* [online]. 2022 Dostupné z: <https://healthcare-in-europe.com/en/news/mass-spectrometry-advances.html>
- [66] PETERKA, Ondřej, Robert JIRÁSKO, Michaela CHOCHOLOUŠKOVÁ, Ladislav KUCHAR, Denise WOLRAB, Roman HÁJEK, David VRÁNA, Ondřej STROUHAL, Bohuslav MELICHAR a Michal HOLČAPEK. Lipidomic characterization of exosomes isolated from human plasma using various mass spectrometry techniques. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* [online]. 2020, **1865**(5), 158634. ISSN 1388-1981.
- [67] LÍSA, Miroslav a Michal HOLČAPEK. High-Throughput and Comprehensive Lipidomic Analysis Using Ultrahigh-Performance Supercritical Fluid Chromatography–Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* [online]. 2015, **87**(14), 7187–7195. ISSN 0003-2700, 1520-6882.
- [68] CHENG, Hua, Gang SUN, Kui YANG, Richard W. GROSS a Xianlin HAN. Selective desorption/ionization of sulfatides by MALDI-MS facilitated using 9-aminoacridine as matrix. *Journal of Lipid Research* [online]. 2010, **51**(6), 1599–1609.
- [69] SPACIL, Zdenek, Arun BABU KUMAR, Hsuan-Chieh LIAO, Christiane AURAY-BLAIS, Samantha STARK, Teryn R SUHR, C Ronald SCOTT, Frantisek TURECEK a Michael H GELB. Sulfatide Analysis by Mass Spectrometry for Screening of Metachromatic Leukodystrophy in Dried Blood and Urine Samples. *Clinical Chemistry* [online]. 2016, **62**(1), 279–286.

- [70] CALVANO, Cosima Damiana, Giovanni VENTURA, Anna Maria SARDANELLI, Ilario LOSITO, Francesco PALMISANO a Tommaso R.I. CATALDI. Identification of neutral and acidic glycosphingolipids in the human dermal fibroblasts. *Analytical Biochemistry* [online]. 2019, **581**,
- [71] A ianyang Huang, Xiang Zhou, Danting Liu, Baozhong Xin, Karen Cechner, Heng Wang, Aimin Zhou. A new liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for quantification of gangliosides in human plasma. 2014, 455, 26-34
- [72] JACKSON, Shelley N., Benoit COLSCH, Thomas EGAN, Ernest K. LEWIS, J. Albert SCHULTZ a Amina S. WOODS. Gangliosides' analysis by MALDI-ion mobility MS. *The Analyst* [online]. 2011, **136**(3), 463–466.
- [73] LIAKH, Ivan, Tomasz SLEDZINSKI, Lukasz KASKA, Paulina MOZOLEWSKA a Adriana MIKA. Sample Preparation Methods for Lipidomics Approaches Used in Studies of Obesity. *Molecules* [online]. 2020, **25**(22), 5307.
- [74] RACH, Oliver, Xenophon HADEEN a Dirk SACHSE. An automated solid phase extraction procedure for lipid biomarker purification and stable isotope analysis. *Organic Geochemistry* [online]. 2020, **142**, 103995.
- [75] ALDANA, Julian, Adriana ROMERO-OTERO a Mónica P. CALA. Exploring the Lipidome: Current Lipid Extraction Techniques for Mass Spectrometry Analysis. *Metabolites* [online]. 2020, **10**(6), 231.
- [76] RUIZ-GUTIERREZ, Valentina a M. CAMINO. Update on solid-phase extraction for the analysis of lipid classes and related compounds. *Journal of chromatography. A* [online]. 2000, **885**, 321–41.
- [77] Agilent's New Weak Anion Exchange (WAX) Solid Phase Extraction Cartridges: SampliQ WAX [online]. B.m.: Agilent Technologies. 6. duben 2021. Dostupné z: <https://www.agilent.com/cs/library/technicaloverviews/Public/5990-5394EN.pdf>
- [78] Oasis WAX SPE Products for Strongly Acidic Compounds. 2019. Dostupné z: <https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720001062en.pdf>

- [79] Simplifying Solid-Phase Extraction - Oasis Solid-Phase Extraction Products [online]. B.m.: Waters. 2017. Dostupné z: <https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720001692en.pdf>
- [80] Marvin was used for drawing, displaying and characterizing chemical structures, substructures and reactions, Marvin n.n.n (version number), 201n (insert year of version release), ChemAxon (<http://www.chemaxon.com>) [online]. 2021. Marvin was used for drawing, displaying and characterizing chemical structures, substructures and reactions, Marvin n.n.n (version number), 201n (insert year of version release), ChemAxon (<http://www.chemaxon.com>). Dostupné z: <https://chemaxon.com/>
- [81] HUYNH, Kevin, Christopher K. BARLOW, Kaushala S. JAYAWARDANA, Jacquelyn M. WEIR, Natalie A. MELLETT, Michelle CINEL, Dianna J. MAGLIANO, Jonathan E. SHAW, Brian G. DREW a Peter J. MEIKLE. High-Throughput Plasma Lipidomics: Detailed Mapping of the Associations with Cardiometabolic Risk Factors. *Cell Chemical Biology* [online]. 2019, **26**(1), 71-84.e4.

# PŘÍLOHY

Prametr			A										B		
Množství plazmy (µl)			25	50	100	100	200	100	100	100	100	200	25	100	200
Matrice			9-AA												
Koncentrace matrice (mg/ml)			5	5	5	10	10	5	5	5	10	10	10	10	10
Zakoncentrování (x)			-	-	-	-	-	2	5	10	10	10	10	10	10
Zástupce	[M-H] <sup>-</sup>	Sumární vzorec	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	✓	✓
GM3 32:1;O2	1123,6746	C55H100N2O21	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	✓	✓
GM3 34:1;O2	1151,7059	C57H104N2O21	×	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
GM3 34:2;O2	1149,6902	C57H102N2O21	×	×	×	×	✓	×	×	×	✓	✓	×	✓	✓
GM3 36:1;O2	1179,7372	C59H108N2O21	×	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
GM3 36:2;O2	1177,7215	C59H106N2O21	×	×	×	×	×	✓	✓	✓	✓	✓	×	✓	✓
GM3 38:1;O2	1207,7685	C61H112N2O21	×	×	×	×	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
GM3 40:1;O2	1235,7998	C63H116N2O21	×	×	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
GM3 40:1;O3	1251,7947	C63H116N2O22	×	×	×	×	×	✓	✓	✓	✓	✓	×	✓	✓
GM3 40:2;O2	1233,7841	C63H114N2O21	×	×	×	×	×	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
GM3 41:1;O2	1249,8154	C64H118N2O21	×	×	×	×	×	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
GM3 41:2;O2	1247,7998	C64H116N2O21	×	×	×	×	×	✓	✓	✓	✓	✓	×	✓	✓

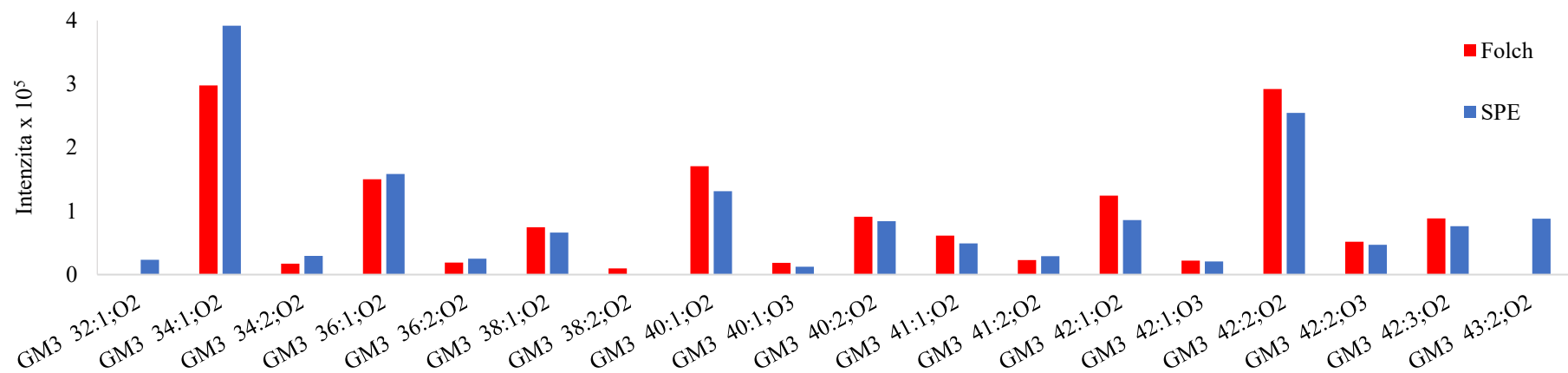
GM3 42:1;O2	1263,8311	C65H120N2O21	×	×	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
GM3 42:1;O3	1279,826	C65H120N2O22	×	×	×	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
GM3 42:2;O2	1261,8154	C65H118N2O21	×	×	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
GM3 42:2;O3	1277,8103	C65H118N2O22	×	×	×	×	✓	✓	✓	×	✓	✓	✓	✓	✓
GM3 42:3;O2	1259,7998	C65H116N2O21	×	×	×	×	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
SHex <sub>2</sub> Cer 34:1;O2	940,5673	C46H87NO16S	×	×	×	×	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
SHex <sub>2</sub> Cer 34:1;O3	956,5622	C46H87NO17S	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	✓	✓
SHex <sub>2</sub> Cer 40:2;O2	1022,6455	C52H97NO16S	×	×	×	×	×	×	×	×	×	✓	✓	×	✓
SHex <sub>2</sub> Cer 40:1;O2	1024,6612	C52H99NO16S	×	×	×	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	×	✓
SHex <sub>2</sub> Cer 42:1;O2	1052,6925	C54H103NO16S	×	×	×	×	×	×	×	×	×	✓	✓	×	✓
SHex <sub>2</sub> Cer 42:2;O2	1050,6768	C54H101NO16S	×	×	×	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
SHex <sub>2</sub> Cer 42:2;O3	1066,6717	C54H101NO17S	×	×	×	×	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	×	✓
SHex <sub>2</sub> Cer 42:3;O2	1048,6612	C54H99NO16S	×	×	×	×	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	×	✓
SHexCer 34:0;O3	796,525	C40H79NO12S	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
SHexCer 34:1;O2	778,5145	C40H77NO11S	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
SHexCer 34:1;O3	794,5094	C40H77NO12S	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
SHexCer 34:2;O2	776,4988	C40H75NO11S	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
SHexCer 34:2;O3	792,4937	C40H75NO12S	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓

SHexCer 36:1;O2	806,5458	C42H81NO11S	×	×	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
SHexCer 36:1;O3	822,5407	C42H81NO12S	×	×	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
SHexCer 36:2;O2	804,5301	C42H79NO11S	×	×	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
SHexCer 36:2;O3	820,525	C42H79NO12S	×	×	×	×	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
SHexCer 38:1;O2	834,5771	C44H85NO11S	×	×	×	×	✓	✓	✓	✓	✓	✓	×	✓	✓
SHexCer 38:1;O3	850,572	C44H85NO12S	×	×	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	×	✓	✓
SHexCer 38:2;O2	832,5614	C44H83NO11S	×	×	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
SHexCer 40:0;O3	880,6189	C46H91NO12S	×	×	×	×	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
SHexCer 40:0;O4	896,6138	C46H91NO13S	×	×	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
SHexCer 40:1;O2	862,6084	C46H89NO11S	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
SHexCer 40:1;O3	878,6033	C46H89NO12S	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
SHexCer 40:2;O2	860,5927	C46H87NO11S	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
SHexCer 40:2;O3	876,5876	C46H87NO12S	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
SHexCer 41:0;O4	910,6295	C47H93NO13S	×	×	×	×	×	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
SHexCer 41:1;O2	876,624	C47H91NO11S	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
SHexCer 41:1;O3	892,6189	C47H91NO12S	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
SHexCer 41:2;O2	874,6084	C47H89NO11S	×	×	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
SHexCer 41:2;O3	890,6033	C47H89NO12S	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓

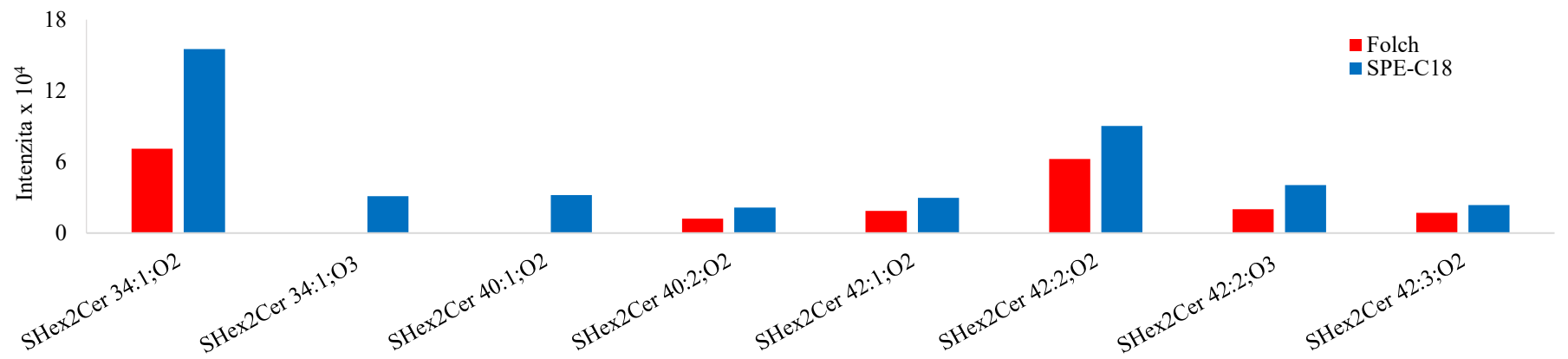
SHexCer 42:0;O3	908,6502	C48H95NO12S	×	×	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	×	✓	✓
SHexCer 42:0;O4	924,6451	C48H95NO13S	×	×	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
SHexCer 42:1;O2	890,6397	C48H93NO11S	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
SHexCer 42:1;O3	906,6346	C48H93NO12S	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
SHexCer 42:1;O4	922,6295	C48H93NO13S	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
SHexCer 42:2;O2	888,624	C48H91NO11S	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
SHexCer 42:2;O3	904,62	C48H91NO12S	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
SHexCer 42:3;O3	902,6033	C48H89NO12S	×	×	×	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
SHexCer 42:4;O2	884,5927	C48H87NO11S	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	✓	✓

**Příloha 1** — Finální identifikační tabulka endogenních kyselých glykosfingolipidů ve směsné plazmě **A** (Folch), **B** (SPE-C18)

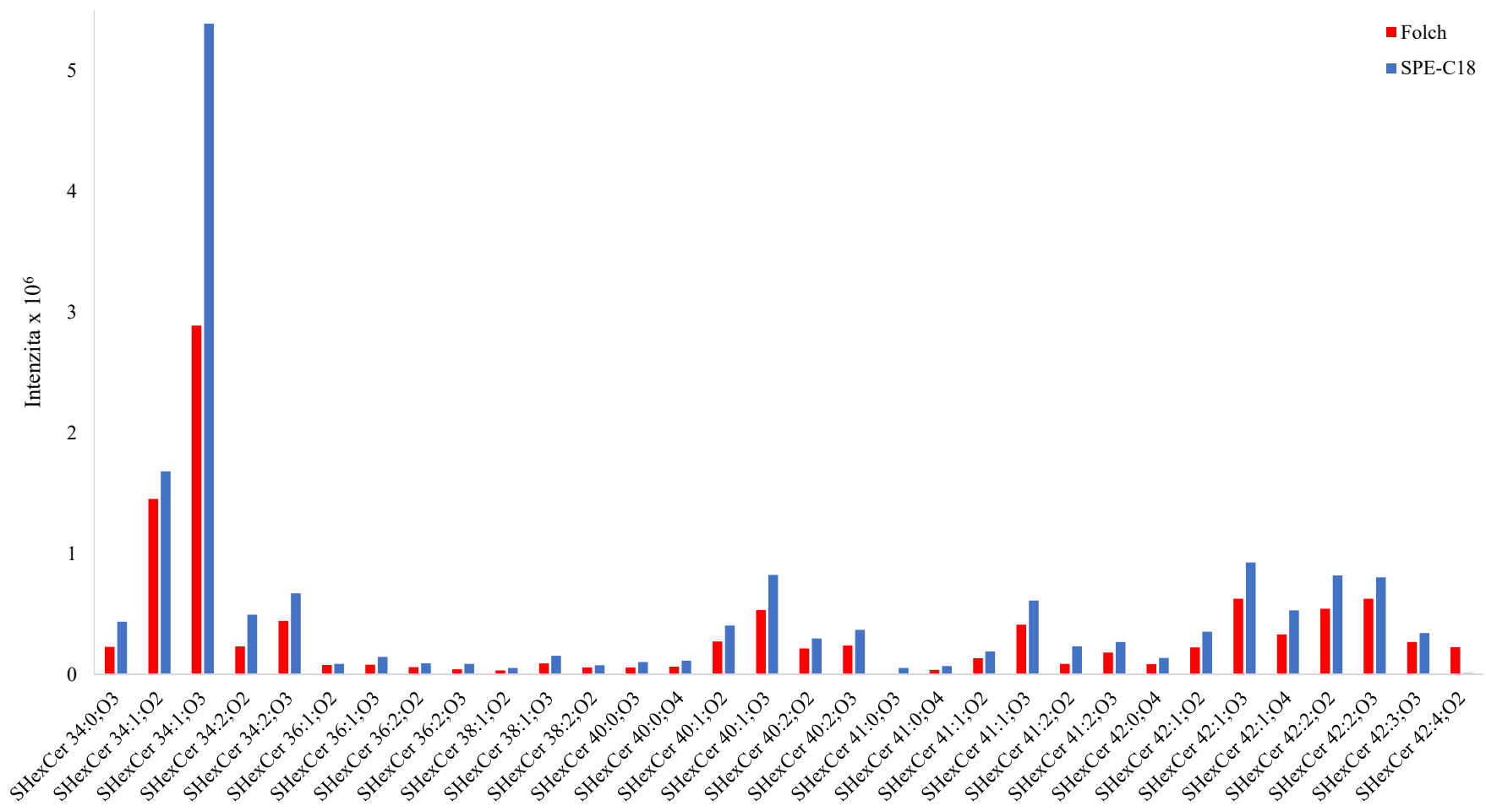




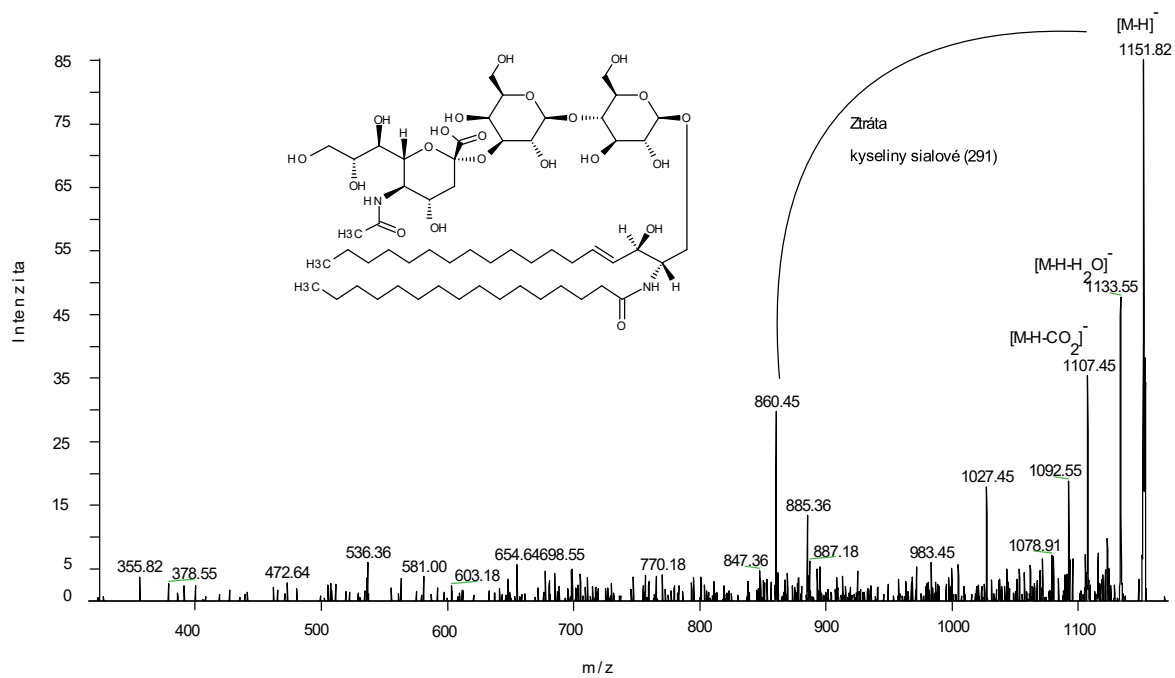
**Příloha 2** — Identifikování zástupci GM3 ve směsné plazmě a porovnání intenzit s ohledem na optimalizovanou extrakční techniku



**Příloha 3** — Identifikování zástupci SHex<sub>2</sub>Cer ve směsné plazmě a porovnání intenzit s ohledem na optimalizovanou extrakční techniku



**Příloha 4** — Identifikování zástupci SHexCer ve směsné plazmě a porovnání intenzit s ohledem na optimalizovanou extrakční techniku



Příloha 5 - MS/MS spektrum GM3 34:1