Univerzita Karlova

1. lékařská fakulta

Autoreferát disertační práce

UNIVERZITA KARLOVA
1. lékařská fakulta

Lipidomická analýza tukové tkáně pacientů s ischemickou chorobou srdeční

Mgr. Petra Tomášová

Praha, 2022

Doktorské studijní programy v biomedicíně

Univerzita Karlova a Akademie věd České republiky

Obor: biochemie a patobiochemie

Předseda oborové rady: Prof. MUDr. Zdeněk Kleibl, Ph.D.

Školicí pracoviště: IV. interní klinika – klinika gastroenterologie a hepatologie 1. LF UK a VFN

Školitel: RNDr. Marek Vecka, Ph.D.

Obsah

Abstrakt 4

Abstract 5

Úvod 6

Hypotézy a cíle práce 8

Materiál a metodika studie 8

Vzorky pacientů 9

Extrakce 9

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie a hmotnostní spektrometrie 10

Výsledky 11

Ověření metody HPLC-MS 11

Porovnání složení lipidů v subkutánní a epikardiální tukové tkáni 12

Diskuze 18

Vliv umístění tukové tkáně na profil lipidů 18

Vliv onemocnění ICHS a DM2T na profil lipidů 20

Závěr 21

Literatura 22

Seznam zkratek 26

Seznam publikací 29

Publikace, které jsou podkladem dizertace s impakt faktorem (IF) 29

Publikace bez vztahu k tématu dizertace 29

Abstrakt

Stále stoupající incidence ischemické choroby srdeční (ICHS) je jedním z nejvýznamnějších zdravotních problémů současné doby v České republice i celosvětově. Rizikovým faktorem rozvoje ICHS je obezita a diabetes mellitus 2. typu (DM2T). Metabolismus lipidů je vlivem těchto onemocnění velmi ovlivněn, přičemž významnou roli v těchto změnách hraje i tuková tkáň, dříve považovaná za pouhé úložiště energie. Dnes je diskutována i jako endokrinní orgán a její vliv na celotělový metabolismus je významný. Pro sledování metabolismu lipidů je účinným nástrojem lipidomická analýza, která spojuje výhody stanovení velkého množství analytů, malého množství vzorku a jeho rychlé přípravy.

V první fázi práce jsem optimalizovala HPLC-MS metodu necílené lipidomické analýzy v tukové tkáni. V další fázi jsem metodu využila pro porovnání subkutánní a epikardiální tukové tkáně. Na závěr své práce jsem zhodnotila vliv ICHS a DM2T na lipidový profil subkutánní a epikardiální tukové tkáně.

Optimalizace preanalytické fáze umožnila analýzu celkem 206 lipidových molekul v obou typech tukové tkáně. Epikardiální tuková tkáň oproti subkutánní obsahovala vyšší zastoupení fosfatidylcholinů (např. PC(32:0), PC(32:1), PC(36:4)) a nižší množství triacylglycerolů (např. TAG(18:1,18:2,18:1)).

Výsledky naznačují, že velikost lipidových kapének je v epikardiální tukové tkáni menší, což může být způsobeno ochranou funkcí tkáně proti lipotoxicitě v myokardu. ICHS se projevuje mitochondriální dysfunkcí v tukové tkáni. Změny pozorované v lipidových molekulách jsou pravděpodobně důsledkem jak mitochondriální dysfunkce, tak inzulínové rezistence. HPLC-MS metoda je vhodná pro analýzu lipidových molekul v tukové tkáni. Lipidové profily se lišily v závislosti na umístění tkáně v organizmu i na rozvoji onemocnění u pacienta.

Abstract

The ever-increasing incidence of coronary artery disease (CAD) in Czech Republic and worldwide is one of the most important health problem today. Obesity and type 2 diabetes mellitus (DM2T) are risk factors for the development of CAD. Lipid metabolism is greatly affected by these diseases and adipose tissue, previously considered a mere energy store, also plays an important role in these changes. Today adipose tissue is discussed also as an endocrine organ, which effect whole body metabolism significantly. Lipidomic analysis is an effective tool for monitoring lipid metabolism. Lipidomics combines the advantages of determining a large number of analytes and a small amount of sample and its rapid preparation.

In the first part of study, I optimized the HPLC-MS method of untargeted lipidomic analysis in adipose tissue. Then, this method was used to compare subcutaneous and epicardial adipose tissue. Finally, I evaluated the effect of CAD and DM2T on the lipid profiles of subcutaneous and epicardial adipose tissues.

Optimization of the pre-analytical phase enabled the analysis of 206 lipid molecules (in total) in both types of adipose tissue. Compared to subcutaneous adipose tissue, epicardial adipose tissue contained a higher proportion of phosphatidylcholines (e.g. PC(32:0), PC(32:1), PC(36:4)) and lower amounts of triacylglycerols (e.g. TAG(18:1,18:2,18:1)).

The results suggest that the size of lipid droplets is smaller in epicardial adipose tissue, which may be due to the protection of tissue against lipotoxicity in myocardium. CAD is manifested by mitochondrial dysfunction in adipose tissue. During the DM2T development, insulin resistance arises in insulin-sensitive tissues, including adipose tissue. Changes observed in lipid molecules are probably consequences of mitochondrial dysfunction and insulin resistance.

The HPLC-MS method is suitable for the analysis of lipid molecules in adipose tissue. Lipid profiles varied depending on tissue location and the disease development in the patient.

Úvod

Ischemická choroba srdeční (ICHS) je v současné době jednou z nejčastějších příčin úmrtí v České republice. Je způsobená ucpáním tepen a následným nedostatečným zásobením srdeční tkáně živinami a kyslíkem [1]. Vznik aterogenních plátů je podporován přítomností subklinického zánětu, který doprovází metabolický syndrom včetně diabetes mellitus 2. typu (DM2T) [2]. Mechanismus vzniku ateroskleróza souvisí s rozvojem endoteliální dysfunkce.

Metabolismus lipidů je vlivem rozvoje metabolického syndromu a s tím související ICHS a DM2T deregulován. Změny byly pozorovány především v plazmě, a to v hladině volných mastných kyselin [3], triacylglycerolů [4] či v hladinách fosfolipidů [5]. Regulace lipidového metabolismu probíhá také prostřednictvím lipoproteinových částic především LDL.

Dnes už není tuková tkáň považována za pouhé úložiště přebytečné energie, tepelný izolátor či ochranu proti nárazům, ale je diskutována i jako významný endokrinní orgán. Hlavními složkami tukové tkáně jsou adipocyty, stromavaskulární buňky, makrofágy, preadipocyty a další elementy [6,7]. Tukovou tkáň dělíme na bílou a hnědou (případně béžovou). Bílé adipocyty obsahují ve své cytoplazmě jednu velkou lipidovou kapénku a málo mitochondrií [8]. V disertační práci se zabývám pouze bílou tukovou tkání. Lipidová kapénka je na svém povrchu tvořena vrstvou fosfolipidů a periferními proteiny, ve svém jádru uchovává TAG, DAG, steroly a estery sterolů [9].

Tukovou tkáň můžeme dělit i podle jejího umístění na podkožní a viscerální. Podkožní, neboli subkutánní tuková tkáň (SAT), plní především ochranou a tepelně izolační funkci. Viscerální tuková tkáň obklopuje v dutině břišní orgány např. játra nebo srdce. Speciálním druhem viscerální tukové tkáně je epikardiální (ETT), která je uložena kolem vrcholu levé komory, na stěně pravé komory, na síních a na obou přívěscích, dále mezi viscerální vrstvou perikardu a myokardem. ETT plní funkci ochranou proti průchodu pulzu arterií, endokrinní, imunitní a metabolickou. Tkáně uložené v rozdílných oblastech organizmu mají rozdílnou endokrinní a biochemickou funkci [10,11].

Necílený přístup analýzy lipidů je vhodným nástrojem pro sledování změn v hladinách několika stovek lipidových molekul. Nejčastěji se používá pro objasnění patogeneze některých onemocnění, sledování progrese onemocnění a vlivu léčby [12]. V současné době je uvedený postup používán pro analýzu různých biologických vzorků např. plazmy, séra a různých typů tkáně [13,14].

Nejhojnější lipidovou třídou v tukové tkání jsou acylglyceroly (99 %). Jejich zastoupení se snižuje u obézních jedinců na 97 %. Ze skupiny acylglycerolů se jedná především o triacylglyceroly (TAG), dále diacylglyceroly (DAG) a nejméně zastoupené jsou monoacylglyceroly (MAG). Zbylé 1-3 % lipidů tukové tkáně tvoří ostatní lipidové třídy. Profil lipidů v tukové tkáni je odlišný v závislosti na umístění tkáně v organizmu [10] a může být ovlivněn přítomností některých onemocnění.

V necílené lipidomice se jako nejčastější způsob detekce používá hmotnostní spektrometr (MS). Limitem tohoto přístupu je dynamický rozsah měření a může docházet k potlačení signálu minoritních lipidových molekul, tzn. molekul o velmi nízkých koncentracích. Používané metody necílené lipidomiky jsou proto schopné analyzovat především TAG a DAG. Analýza dalších lipidových tříd se často potýká s nízkým limitem detekce měření, avšak právě tyto lipidy by potenciálně mohly hrát důležitou roli v rozvoji mnohých onemocnění např. ischemické choroby srdeční [10]. Separační metody nejčastěji používané v lipidomice jsou vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC, liquid chromatography), plynová chromatografie (GC, gas chromatography), superkritická fluidní chromatografie (SFC, supercritical fluid chromatography) a kapilární elektroforéza.

Hypotézy a cíle práce

Hypotéza:

1. Lipidomický profil tukové tkáně se liší v závislosti na jejím umístění

2. Zastoupení lipidů v tukové tkáni je ovlivněno přítomností ischemické choroby srdeční (ICHS) a diabetes mellitus 2. typu (DM2T).

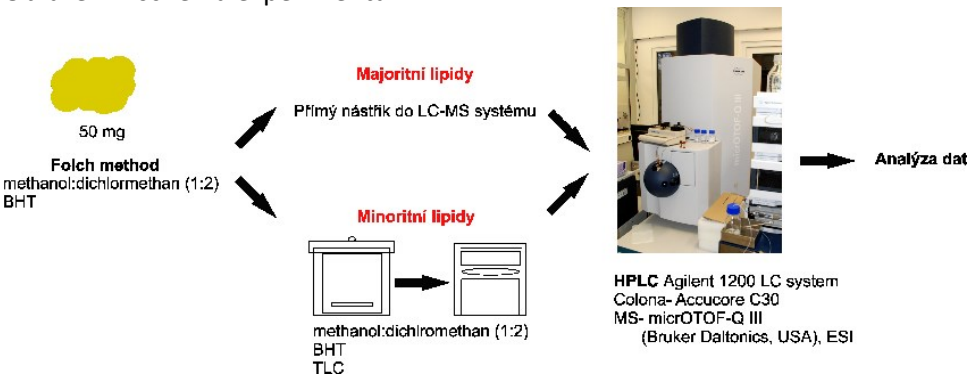
Cíl práce

1. Optimalizovat stanovení lipidů v tukové tkáni necílenou lipidomickou analýzou včetně stanovení minoritních lipidů
2. Zjistit rozdíly ve složení lipidového spektra v podkožní a epikardiální tukové tkáni
3. Porovnat vliv ICHS a DM2T na složení lipidů v podkožní a epikardiální tukové tkáně v rámci klinické studie

Materiál a metodika studie

Předkládaná práce je tvořena třemi částmi, které se zabývají optimalizací HPLC-MS metody pro stanovení lipidového spektra v tukové tkáni a jejím možným využití v klinické praxi. Schéma přípravy vzorků a HPLC-MS analýza postupu jsou shrnuty na obrázku 1.

Obrázek 1: schéma experimentu



Vzorky pacientů

Biologické vzorky byly získány od 44 pacientů, kteří podstoupili kardiochirurgickou operaci na pracovišti 1. LF UK a Všeobecné fakultní nemocnice v Praze. Pro optimalizaci metody HPLC-MS bylo použito 10 vzorků tukové tkáně a pro porovnání STT a ETT bylo využito 10 vzorků od pacientů s ICHS bez DM2T. Pro porovnání vlivu ICHS a DM2T byli pacienti rozděleni následovně do tří skupin: 1. skupina 11 pacientů bez ICHS a bez DM2T (ICHS-, T2DM-), 2. skupina 13 pacientů s ICHS a bez DM2T (ICHS+, T2DM-) a 3. skupina 10 pacientů s ICHS a DM2T (ICHS+, T2DM+).

Vzorky krve pro základní biochemickou analýzu byly odebrány před kardiologickou operací před zahájením anestezie. Vzorky STT a ETT (1 - 2 g) pro lipidomickou analýzu byly odebrány pacientům na začátku kardiologické operace po střední sternotomii z přibližně stejného místa. Vzorky tukové tkáně byly uloženy do fosfátového pufru (1 ml, 0,01 M PBS, pH 7,4) nebo RNAlateru (Qiagen GmbH, Hilden, Německo) a skladovány při -80 °C do doby analýzy.

Extrakce

Tuková tkáň byla nejprve homogenizována. Lipidy byly extrahovány z homogenizátu pomocí Folchovi metodou. Po centrifugaci byla spodní vrstva

odebrána a rozdělena do dvou podílů, které byly odpařeny pod proudem dusíku.

První podíl extraktu byl použit pro necílenou lipidomiku. Vysušený extrakt byl rozpuštěn ve směsi propan-2-ol : acetonitril : voda (1:2:1, v/v/v) a 1 µl rozpuštěného vzorku byl aplikován do přístroje HPLC-MS. Druhý podíl extraktu byl použit k stanovení minoritních lipidů. K oddělení majoritních TAG od ostatních lipidů z tukové tkáně byla použita chromatografie na tenké vrstvě (TLC).

Vysušený druhý podíl extraktu byl rozpuštěn ve směsi metanol : hexan (2:1, v/v). TLC deska byla pokryta silikagelem 60 $PF_{254+366}$. Chromatografická vana byla naplněna směsí heptan : dietyléter : kyselina octová (80:20:1, v/v/v) s 100 µg/ml BHT a 1 hodinu sycena párami mobilní fáze.

200 µl rozpuštěného extraktu bylo naneseno na desku. Deska byla vložena do chromatografické vany. Po chromatografické separaci byla poloha TAG na chromatografické desce vizualizována pomocí UV světla. Migrace lipidových tříd byla určena pomocí směsi lipidových standardů (SPLASH® Lipidomix® Mass Spec Standard). Oblasti silikagelu mimo TAG s dalšími lipidovými třídami (minoritní lipidy v tukové tkáni) byly seškrábnuty a dvakrát extrahovány směsí metanol : hexan (2:1, v/v).

Extrakt byl vysušen proudem dusíku, rozpuštěn v 300 µl směsi propanol-2-ol : acetonitril : voda (1:2:1, v/v/v) a byl opakovaně centrifugován 5 min při 15000 rpm. Extrakt byl napipetován do chromatografické vialky a 15 µl bylo nastříknuto do přístroje HPLC-MS. Paralelně byly připraveny slepé vzorky.

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie a hmotnostní spektrometrie

HPLC přístroj Agilent 1200 LC, (Agilent Technologies, Kalifornie, USA) byl vybaven kolonou Accucore C30 (150 x 2,1 mm, 2,6 µm, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) a temperován při 40 °C. Složení mobilní fáze A bylo

následující: 60 % acetonitril s 10 mM mravenčanem amonným a 0,1% kyselinou mravenčí. Mobilní fáze B byla směs acetonitril : propan-2-ol (1:9, v/v) s 10 mM mravenčanem amonným a 0,1% kyselinou mravenčí.

Mobilní fáze protékala rychlostí 0,24 ml/min. Gradient mobilní fáze B byl 5 min 30 %, 2 min 30 % - 43 %, 1,3 min 43 % - 50 %, 11,3 min 50 % - 70 %, 7 min 100 % a 10 min 30 %. Detekce byla pomocí MS micrOTOF-Q III (Bruker Daltonics, USA) v pozitivním i negativním ionizačním módu. Rozmezí měřených hmot bylo 100 - 2000 m/z. Extrakce i měření vzorků bylo prováděno v náhodném pořadí. V měřící sekvenci byly zařazené slepé vzorky. Získaná data byla zpracována pomocí programu DataAnalysis 4.2 (Bruker Daltonics, USA), MZmine 2.23.

Data byla statisticky vyhodnocena vícerozměrnými a jednorozměrnými metodami. Signifikantně změněné píky podle Wilcoxonova rank sum testu (neparametrický test) byly identifikovány na základě přesné hmoty, specifických fragmentů, hodnoty mSigma a porovnáním retenčních časů se standardy. Data byla dále korelována s biochemickými parametry.

Opakovatelnost nástřiku byla ověřena pomocí směsi standardů (SPLASH® Lipidomix® Mass Spec Standard), opakovatelnost extrakce, správnost TLC pomocí analýzy TAG bez a se separací, dále byl testován vliv skladovacího média na složení lipidů v tukové tkáni.

Výsledky

Ověření metody HPLC-MS

Vzhledem k tomu, že triacylglyceroly jsou v tukové tkáni v koncentracích řádově vyšších než zbývající lipidy, bylo měření minoritních lipidových tříd necílenou lipidomikou možné až po odstranění TAG od ostatních lipidů pomocí TLC a analýzu HPLC – MS minoritních a majoritních sloučenin lipidů provádět odděleně. Zařazení tohoto kroku do postupu analýzy umožnilo stanovit navíc 37 lipidových molekul k 169 již identifikovaným pomocí necílené lipidomiky. 115 z 206 identifikovaných lipidů byly TAG. Ostatní lipidy byly z tříd

diacylglycerolů (DAG), monoacylglycerolů (MAG), fosfatidyletanolaminů (PE), fosfatidylcholinů (PC), sfingomyelinů (SM), ceramidů (Cer), fosfatidylinositolů (PI) a fosfatidylserinů (PS).

V první fázi řešení projektu jsem hodnotila vliv skladovacího média na hladiny minoritních lipidů. Vzorky tukové tkáně byly po odběru paralelně uloženy do média RNAlater nebo fosfátového pufru pH 7,4. Bylo prokázáno, že hladiny identifikovaných lipidů nejsou ovlivněny skladovacím mediem.

Opakovatelnost HPLC-MS měření vyjádřená variačním koeficientem byla ověřena pomocí směsi standardů a byla 0 až 3 %. U necílené lipidomiky byl medián opakovatelnosti vyjádřený jako variační koeficient 4,5 % a pro analýzu po odstranění TAG 12,8 %. Dále byla porovnána hladina TAG naměřená necílenou lipidomikou a lipidomikou se zařazením TLC. Hladiny TAG se nelišily v závislosti na použité metodě. Průměr stupňů shody byl 19 % a 0 % byla absolutní shoda.

Porovnání složení lipidů v subkutánní a epikardiální tukové tkáni

Pacienti, jejichž vzorky byly zařazeny do této části studie, trpěli nadváhou, také jejich koncentrace glykémie na lačno byla zvýšená. Naopak, hladiny TAG, HDL a celkového cholesterolu byly v rozmezí referenčních hodnot.

S cílem porovnání složení lipidů v STT a ETT byla provedena jednorozměrná a vícerozměrná [PCA a PLS-DA (Partial least squares-discriminant analysis)] analýza dat. Z výsledků jednorozměrné analýzy vyplývá, že ETT je bohatší na PC a obsahuje méně TAG než STT. Výsledky jsou znázorněny v Tabulce 1.

Tabulka 1: Lipidy signifikantně lišící se mezi ETT a STT

Lipidy	m/z	Retenční čas (min)	Poměr intenzity (ETT/STT)	p hodnota	Adjustovaná p-hodnota
SM(d34:1)	703,5730	21,2	1,50	**0,021**	0,058
PI(20:4,18:1)	883,5386	20,9	0,36	**0,010**	**0,037**
PE(20:4,18:0)	766,5366	24,4	0,55	**0,014**	**0,042**
PC(32:0)	734,5693	23,5	13,30	**0,001**	**0,019**
PC(32:1)	732,5529	21,3	6,40	**0,045**	0,112
PC(34:1)	760,5821	24,1	1,55	**0,014**	**0,046**
PC(34:2)	758,5664	21,2	1,86	**0,006**	**0,032**
PC(36:1)	788,6130	26,4	1,56	**0,009**	**0,037**
PC(36:2)	786,6001	24,7	1,83	**0,002**	**0,015**
PC(36:4)	782,5657	21,4	8,55	**0,001**	**0,019**
PC(36:5)	780,5495	19,8	7,12	**0,009**	**0,038**
PC(38:4)	810,5982	23,8	7,80	**0,002**	**0,021**
DAG(18:1,18:0)	640,5840	28,3	1,90	**0,004**	**0,024**
TAG(16:0,18:1,18:2)	874,7848	33,7	0,67	**0,006**	**0,003**
TAG(18:1,18:2,18:1)	900,8008	33,8	0,64	**0,026**	0,074
TAG(16:0,18:1,18:1)	876,8012	34,3	0,65	**0,021**	0,072
TAG(18:3,18:1,20:0)	928,8256	33,0	0,77	**0,026**	0,074

Data jsou uvedena jako poměr intenzity lipidu v ETT/ STT. Statistická signifikance p hodnota < 0,05 odpovídá neparametrickému testu (Wilcoxon rank sum test) a je vyznačena červeně, Benjaminiho & Yekutieliho test byl použit ke korekci falešně pozitivních, resp. negativních výsledků (FDR - false discovery rate).
Zkratky: PC - glycerofosfatidylcholin, TAG - triacylglycerol, DAG -diacylglycerol, SM - sfingomyelin, Cer - ceramid, PI - glycerofosfatidylinositol, PE - glycerofosfatidyletanolamin.

Profil lipidů v tukové tkáni pacientů s ischemickou chorobou srdeční a diabetes mellitus druhého typu

V klinické části práce jsem hodnotila vliv ICHS a DM2T na profil lipidů v ETT a STT. Pacientům rozděleným do 3 skupin podle diagnózy ICHS a DM2T byly změřeny biochemické a antropometrické parametry. Koncentrace celkových TAG, celkového a HDL cholesterolu, BMI a poměru obvodu pas/boky se mezi skupinami nelišily. U pacientů s ICHS v kombinaci s DM2T byla zjištěna zvýšená hladina glukózy nalačno.

K zjištění rozdílů v lipidovém spektru tukové tkáně u skupin výše uvedených byly použity oba způsoby analýzy HPLC – MS s/bez TLC v pozitivním i negativním módu. Výsledky jednorozměrné analýzy jsou uvedeny v Tabulce 2.

Zjednodušeně lze říci, že lipidomická analýza STT i ETT odhalila změny lipidového spektra způsobené přítomností ICHS a DM2T. Změny byly v lipidových třídách monoacylglycerolů (MAG), diacylglycerolů (DAG), triacylglycerolů (TAG), glycerofosfatidylcholinů (PC), glycerofosfatidylserinů (PS), glycerofosfatidyletanolaminů (PE), sfingomyelinů (SM) a ceramidů (Cer). Změny byly častěji pozorovány v ETT v porovnání s STT. Výsledky jsou uvedeny v Tabulce 2.

Významně změněné hladiny lipidů v ETT a STT byly korelovány s výše zmíněnými biochemickými a antropometrickými parametry. TAG(18:1,17:1) a Cer(d18:1,22:0) významně korelovaly s poměrem pas/boky v STT. V ETT signifikantně korelovaly LysoPE(18:1) s HDL cholesterolem. Vybrané signifikantní korelace jsou uvedeny na obrázcích 2 a 3.

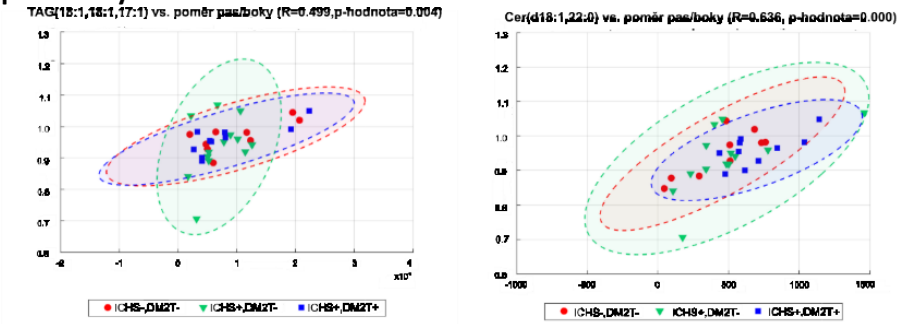
Tabulka 2. Lipidy signifikantně změněné v ETT nebo STT pacientů bez/s ICHS a DM2T

Lipidy	Epikardiální tuková tkáň			Subkutánní tuková tkáň		
	ICHS+, DM2T- vs. ICHS-, DM2T-	ICHS+, DM2T+ vs. ICHS-, DM2T-	ICHS+, DM2T+ vs. ICHS+, DM2T-	ICHS+, DM2T- vs. ICHS-, DM2T-	ICHS+, DM2T+ vs. ICHS-, DM2T-	ICHS+, DM2T+ vs. ICHS+, DM2T-
Glycerolipidy						
MAG(16:0)	0,39	1,06	2,73	0,37	3,20	**8,64***
DAG(16:0,18:1)	1,39	1,13	0,82	**2,48***	2,40	0,97
DAG(18:2,18:2)	0,49	2,01	**4,10*****	**0,29***	1,29	**4,52***
TAG(18:1,16:0,14:0)	**1,52***	1,02	**0,67***	1,03	0,77	0,75
TAG(10:0,14:0,16:0)	1,00	**0,56***	0,56	0,77	0,57	0,74
TAG(18:1,16:0,12:0)	1,09	0,57	**0,52***	0,70	0,55	0,79
TAG(18:1,16:1,12:0)	1,37	0,78	**0,57***	0,84	0,61	0,73
TAG(20:1,18:1,18:2)	**1,28***	1,22	0,96	**2,22***	**2,53***	1,14
TAG(16:1,16:0,15:1)	1,35	0,89	**0,66***	0,83	0,89	1,07
TAG(18:1,16:0,15:0)	1,20	0,77	**0,65***	0,89	0,88	0,99
TAG(16:1,18:1,15:1)	1,19	0,81	**0,68****	1,18	0,98	0,83
TAG(16:0,14:0,18:0)	0,93	**0,59***	0,63	0,70	**0,47***	0,68
TAG(16:0,18:1,17:0)	**1,30****	0,95	**0,73***	1,18	0,84	0,71
TAG(17:0,18:0,16:0)	**1,31***	0,79	**0,61*****	1,11	0,95	0,86
TAG(18:1,18:1,17:1)	**1,25***	1,01	0,81	0,96	1,00	1,05

Lipidy	Epikardiální tuková tkáň			Subkutánní tuková tkáň		
	ICHS+, DM2T- vs. ICHS-, DM2T-	ICHS+, DM2T+ vs. ICHS-, DM2T-	ICHS+, DM2T+ vs. ICHS+, DM2T-	ICHS+, DM2T- vs. ICHS-, DM2T-	ICHS+, DM2T+ vs. ICHS-, DM2T-	ICHS+, DM2T+ vs. ICHS+, DM2T-
Fosfolipidy						
PS(18:0,18:1)	1,04	**1,59***	1,53	**4,80***	3,23	0,67
LysoPE(20:4)	0,93	**2,18***	**2,34***	0,75	1,12	**1,48***
LysoPE(18:1)	1,23	**3,01***	**2,44****	0,78	1,54	1,98
LysoPE(18:2)	0,91	2,23	**2,46***	0,63	1,14	1,80
LysoPC(16:0)	0,56	1,13	**2,03***	1,17	1,98	1,70
LysoPC(18:1)	1,32	2,07	**1,58***	1,46	**3,40***	**2,32***
LysoPC(18:2)	0,52	1,68	3,22	1,24	**2,72***	**2,20***
PC(34:0)	0,42	1,39	**3,36***	1,10	1,95	1,77
PC(32:0)	0,52	1,94	**3,75****	2,40	3,84	1,60
PC(32:1)	0,34	1,77	**5,14***	1,83	**3,88***	2,12
Sfingolipidy						
Cer(d18:1,22:0)	1,01	1,35	1,33	1,49	**2,39***	1,60
SM(d36:1)	0,53	1,74	**3,28***	2,62	**4,09***	1,56
SM(d40:1)	0,95	2,38	**2,50***	1,50	1,91	1,28
SM(d42:2)	0,65	1,78	**2,75***	1,97	4,06	2,07

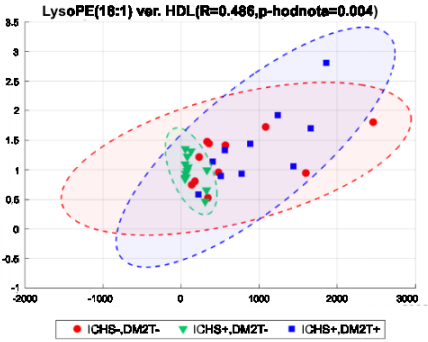
*Data jsou vyjádřena jako poměr relativní intenzity píků pro skupiny pacientů; K statistickému zpracování dat byl použit neparametrický Wilcoxonův rank-sum test, * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001, ICHS-, DM2T-: skupina bez ICHS a bez DM2T, ICHS+, DM2T-: skupina s ICHS a bez DM2T, ICHS+, DM2T+ -skupina s ICHS a s DM2T. Zkratky: MAG – monoacylglycerol, DAG - diacylglycerol, TAG - triacylglycerol, PS – glycerofosfatidylserin, PE – glycerofosfatidyletanolamin, PC – glycerofosfatidylcholin, Cer – ceramid, SM - sfingomyelin.*

Obrázek 2. Korelace signifikantně změněných lipidů v STT s biochemickými parametry



K statistickému vyhodnocení byl použit Spearmanův korelační test a parciální korelace napříč všemi skupinami
Zkratky: ICHS-, DM2T-: skupina bez ICHS a bez DM2T, ICHS+, DM2T-: skupina s ICHS a bez DM2T, ICHS+, DM2T+ -skupina s ICHS a s DM2T

Obrázek 3: Korelace signifikantně změněných lipidů v ETT s biochemickými parametry



K statistickému vyhodnocení byl použit Spearmanův korelační test a parciální korelace napříč všemi skupinami
Zkratky: ICHS-, DM2T-: skupina bez ICHS a bez DM2T, ICHS+, DM2T-: skupina s ICHS a bez DM2T, ICHS+, DM2T+ -skupina s ICHS a s DM2T

Diskuze

V této práci byla optimalizována lipidomická analýza HPLC – MS pro stanovení majoritních a minoritních lipidů v tukové tkáni. Preanalytická fáze nově zahrnuje TLC separaci vysoce zastoupených TAG od lipidových tříd přítomných v tukové tkáni v koncentracích řádově nižších.

Pomocí necílené lipidomiky lze v plazmě identifikovat mnoho lipidových molekul z rozličných tříd [13]. Bohužel současné lipidomické analýzy HPLC–MS se potýkají s nízkou citlivostí metody pro stanovení některých skupin lipidů a mohou být použity jen pro analýzu hojně zastoupených lipidů v biologickém materiálu. Ve své disertační práci jsem necílenou lipidomickou analýzou dentifikovala 169 lipidů v tukové tkáni. Modifikace preanalytické fáze s využitím TLC mi umožnilo identifikovat navíc 37 lipidových molekul.

Před použitím metody HPLC-MS včetně TLC pro analýzu reálných vzorků tukové tkáně bylo nutné postup optimalizovat. Přestože analýza minoritních i majoritních lipidových molekul byla dostatečně reprodukovatelná, TLC zvýšila variabilitu naměřených hodnot (CV = 4,5 % bez TLC, CV = 12,8 % s TLC). Domnívám se, že rozdíl může být způsoben hlavně oxidací lipidů vzdušným kyslíkem během TLC, přestože bylo preventivně do chromatografické vany přidáno BHT jako antioxidační činidlo a TLC probíhala ve tmě, ve vakuu a v prostředí nasycených par mobilní fáze.

V klinické části studie byly použity biologické vzorky skladované v RNAlateru. Z tohoto důvodu byly porovnány relativní koncentrace lipidových molekul ve vzorcích tukové tkáně skladovaných v RNAlateru a fosfátovém pufru. Nebyl nalezen žádný vliv na hladiny zkoumaných lipidových molekul.

Vliv umístění tukové tkáně na profil lipidů

U pacientů s ICHS má uložení tukové tkáně v organismu vliv na složení lipidů. Jednorozměrnou analýzou byly zjištěny rozdíly v relativním zastoupení lipidů z tříd TAG a PC. Signifikantně změněné lipidy v STT byly především z třídy TAG.

Domnívám se, že vyšší obsah TAG v STT je zapříčiněn rozdílnou expresí genů v homeostáze TAG a genů účastnících se tvorby lipidových kapének (ACSL1, PPARγ, FSP27 and DGAT1) [15].

Fosfolipidy jsou především součástí buněčných membrán a z celkového množství fosfolipidů v buňce tvoří PC 40 – 50 % a PE 40 % [16]. Lipidové kapénky (lipid droplets, LD) jsou na povrchu pokryty jednou vrstvou fosfolipidů a uvnitř uskladňují TAG. Kardiomyocyty jsou velmi citlivé na lipotoxicitu způsobenou FA [17,18], z toho důvodu je nutné, aby byly TAG pevně uloženy v LD [19]. Pro velikost LD je zásadní poměr PC vůči PE. Nižší obsah PC nebo vyšší zastoupení PE vede ke spojování malých LD do větších [20]. V mé studii bylo zastoupení PC vyšší v ETT než v STT. Vyšší obsah PC a nížší obsah PE(20:4,18:0) v ETT ve srování s STT může signalizovat tvorbu menších lipidových částic v ETT [10].

Syme a spol. korelovali hladiny PC v séru dospívajících s rizikovými faktory ICHS. Pozorovali negativní korelace PC(16:0/2:0) s objemem viscerální tukové tkáně, s hladinou TAG v krvi na lačno a krevním tlakem. Dále popsali pozitivní korelaci lysoPC(14:1) s obsahem viscerálního tuku a hladinou TAG [21]. Guasch-Ferré a spol. studovali meziprodukty syntézy PC v plazmě a popsali jejich důležitou roli při rozvoji ICHS [22]. Adipocyty v ETT pravděpodobně neslouží primárně jako úložiště energie jako v STT, ale mohou sloužit i k ochraně proti lipotoxicitě [23].

Ve své práci jsem dále zjistila zvýšené množství PI(20:4,18:1) v STT ve srovnání s ETT, což je v souladu se zjištěním, že PI jsou součástí fosforylačních kaskád a jsou součástí mnoha buněčných procesů [24,25].

Dalšími fosfolipidy v tukové tkáni jsou PS a z literatury je známo, že sfingolipidy jsou významné signální molekuly v regulaci růstu, migraci, stárnutí či angiogenezi [26]. Jak již bylo dříve popsáno, obezita a ICHS jsou asociovány s dysregulací sfingolipidů [27]. Vícerozměrná analýza PCA a PLS-DA odhalila velmi mírné rozdíly v ETT a STT v profilu lipidů.

Vliv onemocnění ICHS a DM2T na profil lipidů

Vícerozměrná analýza PCA a PLS-DA neprokázala významné rozdíly v zastoupení lipidových molekul mezi skupinami. Jednorozměrná analýza odhalila změny v lipidových třídách především glycerolipidů, fosfolipidů a sfingolipidů. Efekt ICHS a DM2T na lipidový profil byl často opačný (Tabulka 2).

Lipidový profil u pacientů s ICHS a DM2T se lišil především v relativním zastoupení glycerolipidů. Výraznější změny byly pozorovány v ETT. Vlivem ICHS byly zvýšené molekuly acylglycerolů, které obsahovaly ve své struktuře nasycené nebo mononenasycené FA (14:0, 16:0, 17:0, 17:1, 18:0, 18:1, 18:2 a 20:1) [28]. Hlavní třídou lipidů v tukové tkáni jsou glycerolipidy a změny v této třídě lipidů odpovídají publikacím, ve kterých byly měřeny pouze FA [10]. Zvýšené zastoupení TAG, které obsahují ve své molekule FA 18:1 a 16:0, může být důsledkem porušení regulace proliferace hladké svaloviny u ICHS [29]. Některé tyto FA jsou také diskutovány pro svůj vyšší aterogenní potenciál [30].

Dále ve své práci uvádím, že zastoupení TAG s FA 18:1 a 16:0 ve své molekule bylo naopak snížené u pacientů s DM2T. Pezeshkian a spol. popsali snížené relativní zastoupení FA 16:0 vlivem DM2T v ETT.

Obsah DAG(18:2,18:2) byl snížen v STT u pacientů s ICHS a je o nich známo, že hrají v buňce roli druhých poslů [31]. Snížená hladina FA 18:2 v plazmě u pacientů s ICHS byla již dříve popsána [30]. FA 18:2 je důležitá při snižování hladiny LDL cholesterolu.

Difosfatidylglyceroly v tkáni srdce obsahují ve své molekule často FA 18:2. V této studii bylo pozorováno snížené zastoupení DAG(18:2,18:2) v STT. U pacientů s ICHS se vyskytuje mitochondriální dysfunkce a jedna z příčin jejího vzniku může být i nedostatek FA 18:2 [32].

U pacientů s DM2T byl DAG(18:2,18:2) zvýšen v ETT i STT. DAG jsou známy jako mediátory inzulínové rezistence především v játrech a svalech [33]. Tato skutečnost byla i experimentálně prokázána. Snížení hladiny FA 18:2

v plazmatických fosfolipidech může způsobovat u pacientů vznik DM2T a ICHS [34].

Další změna zjištěná ve spektrech lipidů bylo zvýšené zastoupení molekul TAG obsahujících FA s lichým počtem uhlíků u pacientů s ICHS. Prekurzorem pro syntézu FA s lichým počtem uhlíků je propionyl-CoA, který v organismu vzniká degradací aminokyselin s rozvětveným řetězcem (leucin, valin) [35]. Hladiny FA s lichým počtem uhlíků mohou být také ovlivněny aktivitou metylmalonyl-CoA mutázy u pacientů s ICHS nebo DM2T [36]. Aktivita tohoto enzymu může přispět k zvýšenému zastoupení FA s lichým počtem uhlíků v ETT u pacientů s ICHS [37].

Opačný trend jsem pozorovala u pacientů s DM2T. V tukové tkáni dochází ke snížení oxidace větvených aminokyselin. Tento efekt byl popsán jako důsledek inzulínové rezistence v tkáni [38].

Vlivem onemocnění DM2T byly v tukové tkáni, především v ETT, pozorovány změny v lipidové třídě fosfolipidů. Změny lysofosfolipidů korespondují se studií na myším modelu C57Bl/6J v tukové tkáni [39]. Snížené množství LysoPC v plazmě může být způsobeno jejich akumulací v tkáních, ve kterých dochází k rozvoji inzulínové rezistence [40]. Další efekt rozvoje inzulinové rezistence v tukové tkáni byl pozorován v hladinách sfingolipidů. Porušení dráhy *de novo* syntézy sfingolipidů v tukové tkáni vede k dysfunkci adipocytů a rozvoji inzulínové rezistence [41].

Závěr

Metoda HPLC-MS optimalizovaná v této práci umožnila současně analyzovat 206 lipidových molekul. Lipidový profil STT a ETT se liší, především v lipidové třídě acylglycerolů a fosfolipidů. Výsledky naznačují menší velikost lipidových částic v ETT, což nejspíš brání lipotoxicitě lipidů v myokardu. Vliv ICHS i DM2T se více projevoval do profilu lipidů v ETT. Změny korespondovaly s dostupnou literaturou diskutující rozvoj mitochondriální dysfunkce u ICHS a inzulínové rezistence u DM2T.

Literatura

1. Hradec, J. & Býma, S. *Ischemická choroba srdeční*. *Centrum doporučených postupů pro praktické lékaře* (2007).

2. Patel, T. P. *et al.* Insulin resistance : an additional risk factor in the pathogenesis of cardiovascular disease in type 2 diabetes. *Heart Fail. Rev.* **21**, 11–23 (2016).

3. Ghosh, A., Gao, L., Thakur, A., Siu, P. M. & Lai, C. W. K. Role of free fatty acids in endothelial dysfunction. *J. Biomediacal Sci.* **24:50**, 1–15 (2017).

4. Budoff, M. Triglycerides and Triglyceride-Rich Lipoproteins in the Causal Pathway of Cardiovascular Disease. *Am. J. Cardiol.* **118**, 138–145 (2016).

5. Rauschert, S. *et al.* Lipidomics Reveals Associations of Phospholipids With Obesity and Insulin Resistance in Young Adults. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **101**, 871–879 (2016).

6. Appari, M. & Channon, K. M. Metabolic Regulation of Adipose Tissue Macrophage. **29**, 297–312 (2018).

7. Rezaee, F. & Dashty, M. Role of Adipose Tissue in Metabolic System Disorders Adipose Tissue is the Initiator of Metabolic Diseases. *J. Diabetes Metab. Disord.* **S13**, 1–9 (2013).

8. Czech, M. P. Mechanisms of insulin resistance related to white , beige , and brown adipocytes. *Mol. Metab.* **34**, 27–42 (2020).

9. Guo, Y., Cordes, K. R., Farese, R. V. & Walther, T. C. Lipid droplets at a glance. *J. Cell Sci.* **122**, 749–752 (2009).

10. Jové, M. *et al.* Human omental and subcutaneous adipose tissue exhibit specific lipidomic signatures. *FASEB J.* **28**, 1071–1081 (2014).

11. Dolinková, M. *et al.* The endocrine profile of subcutaneous and visceral adipose tissue of obese patients. *Mol. Cell. Endocrinol.* **291**, 63–70 (2008).

12. Watson, A. D. Lipidomics : a global approach to lipid analysis in biological systems. *J. Lipid Res.* **47**, 2101–2111 (2006).

13. Narváez-Rivas, M. & Zhang, Q. Comprehensive untargeted lipidomic analysis using core-shell C30 particle column and high field orbitrap mass spectrometer. *J. Chromatogr. A* **1440**, 123–134 (2016).

14. Holčapek, M., Liebisch, G. & Ekroos, K. Lipidomic analysis. *Anal. Bioanal. Chem.* **412**, 2187–2189 (2020).

15. Meex, R. C. R., Schrauwen, P. & Hesselink, M. K. C. Modulation of myocellular fat stores: lipid droplet dynamics in health and disease. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **297**, R913-24 (2009).

16. Veen, J. N. *et al.* The critical role of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine metabolism in health and disease ☆ *BBA - Biomembr.* **1859**, 1558–1572 (2017).

17. Nakanishi, T. & Kato, S. Impact of diabetes mellitus on myocardial lipid deposition: An autopsy study. *Pathol. Res. Pract.* **210**, 1018–1025 (2014).

18. Engin, A. B. What Is Lipotoxicity? *Adv. Exp. Med. Biol.* **960**, 197–220 (2017).

19. Matloch, Z., Kotulák, T. & Haluzik, M. The Role of Epicardial Adipose Tissue in Heart Disease. *Physiol. Res* **65**, 23–32 (2016).

20. van der Veen, J. N. *et al.* The critical role of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine metabolism in health and disease. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1859**, 1558–1572 (2017).

21. Syme, C. *et al.* Glycerophosphocholine Metabolites and Cardiovascular Disease Risk Factors in Adolescents: A Cohort Study. *Circulation* **134**, 1629–1636 (2016).

22. Guasch-Ferré, M. *et al.* Plasma metabolites from choline pathway and risk of cardiovascular disease in the PREDIMED (Prevention with Mediterranean Diet) study. *J. Am. Heart Assoc.* **6**, (2017).

23. Tomášová, P. *et al.* Lipid Profiling in Epicardial and Subcutaneous Adipose Tissue of Patients with Coronary Artery Disease. *J. Proteome Res.* **19**, 3993–4003 (2020).

24. Suh, P.-G. *et al.* Multiple roles of phosphoinositide-specific phospholipase C isozymes. *BMB Rep.* **41**, 415–434 (2008).

25. Beretta, M., Bauer, M. & Hirsch, E. PI3K signaling in the pathogenesis of obesity: The cause and the cure. *Adv. Biol. Regul.* **58**, 1–15 (2015).

26. Hannun, Y. A. & Obeid, L. M. Principles of bioactive lipid signalling: Lessons from sphingolipids. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 139–150 (2008).

27. Samad, F., Badeanlou, L., Shah, C. & Yang, G. Adipose tissue and ceramide

biosynthesis in the pathogenesis of obesity. *Adv. Exp. Med. Biol.* **721**, 67–86 (2011).

28. Almeida, C. D. G. De *et al.* The fatty acid profile of adipose tissue as a predictor of the ponderal and inflammatory response in adult women six years after bariatric surgery. *Lipids Health Dis.* **19**, 1–11 (2020).

29. Zhang, Y. *et al.* PGC-1 a Inhibits Oleic Acid Induced Proliferation and Migration of Rat Vascular Smooth Muscle Cells. *PLoS One* **2**, e1137 (2007).

30. Chei, C. *et al.* Serum Fatty Acid and Risk of Coronary Artery Disease. *Circulation* **82**, 3013–3020 (2018).

31. Perreault, L. *et al.* Intracellular localization of diacylglycerols and sphingolipids influences insulin sensitivity and mitochondrial function in human skeletal muscle. 1–21 (2018).

32. Dudek, J., Hartmann, M. & Rehling, P. The role of mitochondrial cardiolipin in heart function and its implication in cardiac disease. *BBA - Mol. Basis Dis.* **1865**, 810–821 (2019).

33. Erion, D. M. & Shulman, G. I. Diacylglycerol-mediated insulin resistance. *Nat. Med.* **16**, 400–402 (2013).

34. Pezeshkian, M. & Mahtabipour, M. R. Epicardial and subcutaneous adipose tissue Fatty acids profiles in diabetic and non-diabetic patients candidate for coronary artery bypass graft. *Bioimpacts* **3**, 83–89 (2013).

35. Crown, S. B., Marze, N. & Antoniewicz, M. R. Catabolism of Branched Chain Amino Acids Contributes Significantly to Synthesis of Odd- Chain and Even-Chain Fatty Acids in 3T3-L1 Adipocytes. *PLoS One* **10**, 1–22 (2015).

36. Connelly, M. A., Wolak-Dinsmore, J. & Dullaart, R. P. F. Branched Chain Amino Acids Are Associated with Insulin Resistance Independent of Leptin and Adiponectin in Subjects with Varying Degrees of Glucose Tolerance. *Metab. Syndr. Relat. Disord.* **15**, 183–186 (2017).

37. Green, C. R. *et al.* Branched chain amino acid catabolism fuels adipocyte differentiation and lipogenesis. *Physiol. Behav.* **176**, 139–148 (2016).

38. Lackey, D. E. *et al.* Regulation of adipose branched-chain amino acid catabolism enzyme expression and cross-adipose amino acid flux in human obesity. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **304**, E1175-87 (2013).

39. Barber, M. N. *et al.* Plasma Lysophosphatidylcholine Levels Are Reduced in Obesity and Type 2 Diabetes. *PLoS One* **7**, 1–12 (2012).

40. Kurano, M. *et al.* Regulation of plasma glycero-lysophospholipid levels by lipoprotein metabolism. *Biochem. J.* **476**, 3565–3581 (2019).

41. Xu, F. *et al.* Metabolic signature shift in type 2 diabetes mellitus revealed by mass spectrometry-based metabolomics. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **98**, 1060–1065 (2013).

Seznam zkratek

BHT – 2,6-Di-tert-butyl-4-methylphenol, 2,6-Di-tert-butyl-p-cresol

BMI - index tělesné hmotnosti (body mass index)

CAD - coronary artery disease

Cer - ceramidy

CV - variační koeficient (coefficient of variation)

DAG - diacylglyceroly

DM - diabetes mellitus

DM2T - diabetes mellitus 2. typu

ETT - epikardiální tuková tkáň

FA - mastné kyseliny (fatty acids)

FDR - míra falešné pozitivity (false discovery rate)

GC - plynová chromatografie (gas chromatography)

HDL - lipoproteiny s vysokou hustotou (high density lipoproteins)

HPLC - vysokoúčinná kapalinová chromatografie (high pressure liquid chromatography)

ICHS - ischemická choroba srdeční

ICHS-, T2DM- - pacienti bez ischemické choroby srdeční a bez diabetes mellitus 2. typu

ICHS+, T2DM- - pacienti s ischemickou chorobou srdeční a bez diabetes mellitus 2. typu

ICHS+, T2DM+ - pacienti s ischemickou chorobou srdeční a s diabetes mellitus 2. typu

LC - kapalinová chromatografie (liquid chromatography)

LD - lipidová kapénka (lipid droplet)

LDL - lipoproteiny s nízkou hustotou (low density lipoproteins)

lysoPC- lysofosfatidylcholiny (lysophosphatidylcholines)

MAG - monoacylglyceroly

MS - hmotnostní spektrometr (mass spectrometry)

m/z – poměr hmota/náboj

PBS – fosfátový pufr (phosphate buffered saline)

PC - fosfatidylcholiny (phosphatidylcholines)

PCA - analýza hlavních komponent (principal component analysis)

PE – fosfatidyletanolaminy (phosphatidylethanolamines)

PG – fosfatidylglyceroly (phosphatidylglycerols)

PI – fosfatidylinositoly (phosphatidylinositols)

PLS-DA - metoda nejmenších čtverců- diskriminační analýza (partial least squares regression)

PPAR - receptory aktivované peroxisomálními proliferátory (peroxisome proliferator-activated receptors)

PS – fosfatidylseriny (phosphatidylserines)

SFC - superkritická fluidní chromatografie (supercritical fluid chromatography)

SM – sfingomyeliny (sphingomyelins)

STT - subkutánní tuková tkáň

TAG - triacylglyceroly

TLC - tenkovrstvá chromatografie (thin layer chromatography)

Seznam publikací

Publikace, které jsou podkladem dizertace s impakt faktorem (IF)

Tomášová P, Čermáková M, Pelantová H, Vecka M, Kratochvílová H, Lipš M, Lindner J, Ivák P, Netuka I, Šedivá B, Haluzík M, Kuzma M. Lipid Profiling in Epicardial and Subcutaneous Adipose Tissue of Patients with Coronary Artery Disease. J Proteome Res. 2020 Oct 2;19(10):3993-4003. doi: 10.1021/acs.jproteome.0c00269. Epub 2020 Sep 8. PMID: 32830500. **(IF: 4,074)**

Tomášová P, Čermáková M, Pelantová H, Vecka M, Kratochvílová H, Lipš M, Lindner J, Šedivá B, Haluzík M, Kuzma M. Minor lipids profiling in subcutaneous and epicardial fat tissue using LC/MS with an optimized preanalytical phase. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2019 Apr 15;1113:50-59. doi: 10.1016/j.jchromb.2019.03.006. Epub 2019 Mar 12. PMID: 30897405. **(IF: 3,004)**

Publikace bez vztahu k tématu dizertace

a) s IF

Tomášová P, Bugáňová M, Pelantová H, Holubová M, Šedivá B, Železná B, Haluzík M, Maletínská L, Kuneš J, Kuzma M. Metabolomics Based on MS in Mice with Diet-Induced Obesity and Type 2 Diabetes Mellitus: the Effect of Vildagliptin, Metformin, and Their Combination. Appl Biochem Biotechnol. 2019 May;188(1):165-184. doi: 10.1007/s12010-018-2899-8. Epub 2018 Nov 5. PMID: 30393821. **(IF: 1,638)**

Tomášová P, Procházková P, Roubalová R, Dvořák J, Tlaskalová-Hogenová H, Čermáková M, Pelantová H, Šedivá B, Vecka M, Papežová H, Kuzma M. NMR- and MS-Based Untargeted Metabolomic Study of Stool and Serum Samples from Patients with Anorexia Nervosa. J Proteome Res. 2021 Oct 4. doi: 10.1021/acs.jproteome.1c00537. Epub ahead of print. PMID: 34606283. **(IF: 4,074)**

Prochazkova P, Roubalova R, Dvorak J, Tlaskalova-Hogenova H, Cermakova M, **Tomasova P**, Sediva B, Kuzma M, Bulant J, Bilej M, Hrabak P, Meisnerova E, Lambertova A, Papezova H. Microbiota, Microbial Metabolites, and Barrier

Function in A Patient with Anorexia Nervosa after Fecal Microbiota Transplantation. Microorganisms. 2019 Sep 10;7(9):338. doi: 10.3390/microorganisms7090338. PMID: 31510101; PMCID: PMC6780752. **(IF: 4,167)**

Čermáková M, Pelantová H, Neprašová B, Šedivá B, Maletínská L, Kuneš J, **Tomášová P**, Železná B, Kuzma M. Metabolomic Study of Obesity and Its Treatment with Palmitoylated Prolactin-Releasing Peptide Analog in Spontaneously Hypertensive and Normotensive Rats. J Proteome Res. 2019 Apr 5;18(4):1735-1750. doi: 10.1021/acs.jproteome.8b00964. Epub 2019 Mar 11. PMID: 30810318. **(IF: 4,074)**

Vecka M, Žák A, Staňková B, Fojtíková Š, **Tomášová P**, Kutová S. Žlučové kyseliny – malé molekuly velkých možností. Chemické Listy. 2019;113:82-89. **(IF: 0,390)**

Koncošová M, Vrzáčková N, Křížová I, **Tomášová P**, Rimpelová S, Dvořák A, Vítek L, Rumlová M, Ruml T, Zelenka J. Inhibition of Mitochondrial Metabolism Leads to Selective Eradication of Cells Adapted to Acidic Microenvironment. Int J Mol Sci. 2021 Oct 6;22(19):10790. doi: 10.3390/ijms221910790. PMID: 34639130. **(IF: 5,923)**

Procházková P, Roubalová R, Dvořák J, Kreisinger J, Hill M, Tláskalová-Hogenová H, **Tomášová P**, Pelantová H, Čermáková M, Kuzma M, Bulant J, Bilej M, Smitka K, Lambertová A, Holanová P, Papezová H. The intestinal microbiota and metabolites in patients with anorexia nervosa. Gut Microbes. 2021 Jan-Dec;13(1):1-25. doi: 10.1080/19490976.2021.1902771. PMID: 33779487; PMCID: PMC8018350. **(IF: 8,99)**

b) bez IF

Vecka M, Staňková B, Kutová S, **Tomášová P**, Tvrzická E, Žák A. Comprehensive sterol and fatty acid analysis in nineteen nuts, seeds, and kernel. *SN Appl. Sci.* 1, 1531 (2019).

Poděkování:

Děkuji svému školiteli RNDr. Marku Veckovi, Ph.D. a Ing. Marku Kuzmovi, Ph.D. za účinnou pomoc, cenné rady a připomínky, trpělivost a velkou podporu.

Dále chci poděkovat všem spoluautorům přikládaných publikací, především prof. MUDr. Martinu Haluzíkovi, DrSc., RNDr. Zdeňce Lacinové, Mgr. Martině Čermákové, Ph.D, RNDr. Blance Šedivé, Ph.D. a RNDr. Heleně Pelantové, Ph.D.

Studie, které jsou součástí této disertační práce, byly podpořeny výzkumnými projekty: Agentura pro zdravotnický výzkum ČR 15-26854A, RVO-VFN64165 Všeobecná fakultní nemocnice, PROGRES Q25/LF1/2 Univerzita Karlova, Národní program udržitelnosti NPU I Lo1509, Specifický vysokoškolský výzkum 260370-2017.