

**Univerzita Karlova  
1. lékařská fakulta**

Studijní program: kombinovaný  
Studijní obor: biochemie a patobiochemie



**UNIVERZITA KARLOVA  
1. lékařská fakulta**

**Mgr. Petra Tomášová**

**Lipidomická analýza tukové tkáně pacientů s ischemickou  
chorobou srdeční**

Lipidomic analysis of adipose tissue in patients with ischemic heart disease

Disertační práce

Školitel: RNDr. Marek Vecka, Ph.D.

Praha, 2022

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 2.3. 2022

Petra Tomášová

**Proclamation:**

I hereby state that I have prepared my thesis independently and that I have cited all the used references and other sources. I also state, that this work was not used to obtain any other academic degree.

I agree with archiving of my thesis in electronic form in the archive of the system Theses.cz, because of the possibility to search for instances of plagiarism.

Prague, the 2.3. 2022

Petra Tomášová

**Identifikační záznam/Identification:**

TOMÁŠOVÁ, Petra: **Lipidomická analýza tukové tkáně pacientů s ischemickou chorobou srdeční.**  
*[Lipidomic analysis of adipose tissue in patients with ischemic heart disease.]* Praha, 2022. 125 stran,  
2 přílohy. Disertační práce. Univerzita Karlova, 1. lékařská fakulta, IV. interní klinika. Vedoucí závěrečné  
práce/Školitel: RNDr. Marek Vecka, Ph.D.

**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

## Seznam zkratek

ATP - adenosintrifosfát

BCAA – aminokyseliny s rozvětveným řetězcem (branched chain amino acids)

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

BMI - index tělesné hmotnosti (body mass index)

CAD - coronary artery disease

CD36 – diferenciační skupina 36 (cluster of differentiation)

Cer - ceramidy

CV - variační koeficient (coefficient of variation)

DAG - diacylglyceroly

DM - diabetes mellitus

DM1T - diabetes mellitus 1. typu

DM2T - diabetes mellitus 2. typu

EKG – elektrokardiogram

ESI- ionizace pomocí elektrospreje (electrospray ionization)

ETT - epikardiální tuková tkáň

FA - mastné kyseliny (fatty acids)

FFA - volné mastné kyseliny (free fatty acids)

FDR - míra falešných objevů (false discovery rate)

FID - plamenoionizační detektor (flame ionization detector)

GC - plynová chromatografie (gas chromatography)

GLUT4 - glukózový transportér 4

HDL - lipoproteiny s vysokou hustotou (high density lipoproteins)

HDL-C – HDL - cholesterol

HILIC - hydrofilní chromatografie (hydrophilic interaction chromatography)

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

ICH<sup>+</sup>, T2DM<sup>+</sup> - pacienti s ischemickou chorobou srdeční a s diabetes mellitus 2. typu

IL - interleukin

IR – inzulínová rezistence

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)

MTBE - metyl-terc-butyl éter

MUFA - mononenasycené mastné kyseliny (monounsaturated fatty acids)

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 (phosphatidylinositol)

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

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

PS – fosfatidylseriny (phosphatidylserines)

PUFA – polynenasycené mastné kyseliny (polyunsaturated fatty acids)

Q-TOF – kvadrupólový detektor v kombinaci s detektorem doby letu (quadrupole-time-of-flight)

QC - vzorek kontroly kvality (quality control sample)

SD - směrodatná odchylka (standard deviation)

SFA - nasycené mastné kyseliny (saturated fatty acids)

SFC - superkritická fluidní chromatografie (supercritical fluid chromatography)

SM – sfingomyeliny (sphingomyelins)

SPE - extrakce na pevné fázi (solid phase extraction)

SREBP - protein vázající se na sterolový regulační prvek (sterol regulatory element-binding protein)

STT - subkutánní tuková tkáň

TAG - triacylglyceroly

TIC - celkový iontový chromatogram (total ion chromatogram)

TNF - tumor nekrotizující faktor (tumor necrosis factor)

TLC - tenkovrstvá chromatografie (thin layer chromatography)

TLR - Toll-like receptor

VLDL - lipoproteiny o velmi nízké hustotě (very low-density lipoproteins)

# Obsah

1	Úvod .....	10
2	Teoretická část .....	12
2.1	Ischemická choroba srdeční .....	12
2.2	Diabetes mellitus druhého typu .....	14
2.3	Tuková tkáň .....	15
2.3.1	Složení tukové tkáně .....	15
2.3.2	Biochemické pochody v tukové tkáni .....	17
2.3.3	Dělení tukové tkáně .....	18
2.4	Dělení tukové tkáně podle lokalizace .....	19
2.4.1	Podkožní tuková tkáň .....	19
2.4.2	Viscerální tuková tkáň .....	19
2.4.3	Epikardiální tuková tkáň .....	20
2.4.4	Inzulinová rezistence .....	22
2.5	Lipidy .....	25
2.5.1	Lipidy v tukové tkáni .....	25
2.5.2	Uložení lipidů v adipocytech .....	30
2.5.3	Složení mastných kyselin v epikardiální tukové tkáni .....	31
2.6	Lipidomika .....	31
2.6.2	Metody používané v lipidomice .....	34
2.6.3	Lipidomika při studiu poruch metabolismu .....	46
3	Hypotéza a cíle práce .....	48
4	Metodika studie .....	49
4.1	Chemikálie a přístroje .....	49
4.2	Soubor pacientů .....	50
4.3	Antropometrická měření, základní biochemická vyšetření a odběr biologického materiálu .....	51
4.4	Preanalytická fáze lipidomické analýzy .....	52
4.4.1	Homogenizace, extrakce a separace pomocí tenkovrstvé chromatografie .....	53
4.5	Vysokoučinná kapalinová chromatografie s detekcí pomocí hmotnostního spektrometru .....	54
4.5.1	Vysokoučinná kapalinová chromatografie .....	54
4.5.2	Detekce pomocí hmotnostního spektrometru .....	55
4.6	Analýza dat .....	55
4.7	Identifikace lipidů .....	56
4.8	Ověření metody .....	56
4.9	Statistika .....	57
5	Výsledky .....	58



5.1	Optimalizace metody .....	58
5.1.1	Identifikace lipidů .....	58
5.1.2	Optimalizace metody .....	60
5.2	HPLC-MS analýza vzorků tukové tkáně pacientů s ICHS a T2DM .....	63
5.2.1	Porovnání spektra lipidů v subkutánní a epikardiální tukové tkáni .....	63
5.2.2	Vliv ischemické choroby srdeční a diabetes mellitus druhého typu na složení lipidů v tukové tkáni .....	68
6	Diskuze.....	78
6.1	Optimalizace metody .....	79
6.2	Porovnání epikardiální a subkutánní tukové tkáně.....	80
6.3	Vliv onemocnění ICHS a DM2T .....	81
7	Závěr .....	86
8	Souhrn .....	87
9	Summary.....	89
10	Literatura.....	91
11	Publikační činnost.....	101
11.1	Publikační činnost vztahující se k tématu práce.....	101
11.1.1	Publikace v časopisech s IF .....	101
11.2	Aktivní účast na konferenci přednášek/posterů: .....	101
11.2.1	Poster.....	101
11.2.2	Přednášky .....	101
11.3	Publikační činnost bez vztahu k tématu práce .....	102
11.3.1	Publikace v časopisech s IF: .....	102
12	Seznam příloh.....	104

# 1 Úvod

Ischemická choroba srdeční (ICHS) je celosvětově jednou z nejčastějších příčin předčasného úmrtí. Světová zdravotnická organizace (World Health Organisation) uvádí, že každoročně zemře v jejím důsledku 17,9 milionu lidí (údaj z roku 2019). Nedostatečné zásobení srdeční tkáně způsobené nejčastěji ucpáním cév aterogenními pláty vede k sníženému přísunu živin a kyslíku do tkáně a odvodu odpadních produktů z tkáně (Hradec a Býma 2007). V mechanismu vzniku aterogenních plátů hraje důležitou roli endoteliální dysfunkce, která souvisí s chronickým zánětem v organismu (Ghosh et al. 2017). K rozvoji aterosklerózy z důvodu chronického zánětu může zásadním způsobem přispívat i diabetes mellitus 2. typu (DM2T) nebo obecně tzv. metabolický syndrom, jehož doprovodným projevem je chronický zánět bez klinických projevů (Akash, Rehman a Chen 2013; Herder, Carstensen a Ouwens 2013; Patel et al. 2016; World Health Organization 2019).

Klíčovým faktorem ovlivňujícím rozvoj ICHS a DM2T včetně subklinického zánětu je metabolismus lipidů (Itani et al. 2002; Kohno et al. 2018; Pezeshkian a Mahtabipour 2013). Poruchy metabolismu lipidů jsou spojovány s deregulací jedné nebo více metabolických drah. Mezi vlivy přispívající k endoteliální dysfunkci pacientů s ICHS patří hladina, resp. složení volných mastných kyselin v cirkulaci (Ghosh et al. 2017) a stejnou mírou zvýšená koncentrace triacylglycerolů případně vysoký počet lipoproteinových částic obsahujících triacylglyceroly (Budoff 2016). Na základě posledních výzkumů jsou triacylglyceroly považovány za prediktivní markery rozvoje DM2T (Zhao et al. 2019) a dále byla popsána souvislost mezi obsahem fosfolipidů v plazmě a rozvojem DM2T (Rauschert et al. 2016).

Ke sledování změn v metabolismu lipidů v organismu je možné použít necílenou lipidomiku, která umožňuje sledování hladin i několika stovek lipidů současně. Analýza dovoluje paralelní stanovení lipidů z různých tříd, které obsahují mastné kyseliny s různým stupněm nasycení a délkou řetězce. Současné metody se zaměřují především na analýzu biologických vzorků plazmy a séra. Do popředí vědeckého zájmu se dostávají i lipidomické analýzy různých typů tkání, jako jsou játra, mozek nebo tuková tkáň (Holčapek, Liebisch a Ekroos 2020; Narváez-Rivas a Zhang 2016; Wu, Shon a Liu 2014). Analytické přístupy používané v lipidomice zahrnují především plynovou (GC, gas chromatography) a kapalinovou chromatografii (LC, liquid

chromatography) v kombinaci s detekcí pomocí hmotnostního spektrometru (MS, mass spectrometry) (Holčápek, Liebisch a Ekroos 2020).

V posledních dekádách je tuková tkáň diskutována nejen jako zásobárna energie, ale také jako významný endokrinní orgán s dopadem na celotělový metabolismus. Tvorba některých produktů tukové tkáně, tzv. adipokinů, se liší v závislosti na umístění tukové tkáně v těle a jejich spektrum může záviset na stadiu onemocnění (Fasshauer a Blüher 2015; Pezeshkian a Mahtabipour 2013; Pezeshkian et al. 2009). Složení lipidů v tukové tkáni také závisí na jejich lokalizaci v organismu a může mít zásadní vliv na funkci tukové tkáně a patogenezi různých onemocnění (Barchuk et al. 2020; Pakiet, Stepnowski a Sledzinski 2019; Smith a Kahn 2016). Lipidy obsažené v tukové tkáni jsou z 99 % reprezentovány acylglyceroly. U obézních jedinců se obsah acylglycerolů v tukové tkáni mění, snižuje se a dosahuje 97 %. Z acylglycerolů přítomných v tukové tkáni se jedná především o triacylglyceroly (TAG) (Jové et al. 2014). Dosud zavedené metody necílené lipidomiky zachycovaly v analýzách především triacylglyceroly a diacylglyceroly, avšak změny poměrů jednotlivých lipidů naznačují, že v patogenezi onemocnění mohou hrát klíčovou roli i minoritně zastoupené lipidy, jako jsou sfingolipidy, ceramidy, a fosfolipidy (Jové et al. 2014).

## 2 Teoretická část

### 2.1 Ischemická choroba srdeční

Ischemická choroba srdeční (ICHS) je jednou z nejčastějších příčin úmrtí v České republice. Je definována jako nedostatečné prokrvení srdečního svalu (myokardu) způsobená patologickými změnami na věnčitých tepnách. ICHS dělíme na akutní a chronickou formu. Mezi akutní formy řadíme nestabilní anginu pectoris a akutní infarkt myokardu. Mezi chronické formy řadíme stav po infarktu myokardu, asymptomatickou ICHS zjištěnou při jiném vyšetření, stabilní anginu pectoris, chronické srdeční selhání a dysrytmické formy ICHS (Hradec a Býma 2007).

Ucpání cév aterogenními pláty a vznik aterosklerózy věnčitých tepen má za následek nedostatečné zásobení myokardu kyslíkem, živinami a hromaděním odpadních produktů metabolismu v tkáni. Riziko vzniku aterosklerózy lze do určité míry ovlivnit změnou životního stylu např. redukcí hmotnosti u obézních pacientů, zanecháním kouření, kompenzací vysokého tlaku (hypertenze), léčbou dyslipidémie a kompenzací DM2T. Počet obézních lidí celosvětově stoupá a předpokládá se, že v roce 2025 bude celosvětově obézních 18 % mužů a 21 % žen (Longo et al. 2019). Další rizikové faktory jsou neovlivnitelné a patří mezi ně pohlaví, věk u mužů nad 45 let a u žen věk po menopauze, genetická dispozice, resp. přítomnost ICHS u příbuzných (Hradec a Býma 2007). Vedle uvedených rizikových faktorů ICHS byla popsána řada laboratorních ukazatelů pro diagnózu ICHS, tzv. kardiomarkerů. Jedná se např. o trombogenní faktory (Hradec a Býma 2007), kreatinkinázu a její izoformy s podjednotkou M (muscle) a B (brain), myoglobin, troponin I a troponin T. Jako nezávislý faktor predikce kardiovaskulárních onemocnění se nově využívá Index poměru koncentrace triacylglycerolů a glykémie na lačno, a to zejména u pacientů, u kterých nejsou přítomny tradiční rizikové faktory (Alizargar et al. 2020; Budoff 2016; Park et al. 2020). U zdravých jedinců se index používá pro kontrolu přítomnosti inzulínové rezistence. Mezi další používané indexy řadíme například aterogenní index plazmy, vyjádřený poměrem koncentrací triacylglycerolů a HDL-cholesterolu (Dobiášová a Frohlich 2001).

Klíčovým faktorem ovlivňujícím tvorbu aterogenních plátů je metabolismus lipidů (např. cholesterolu, fosfolipidů, triacylglycerolů) prostřednictvím lipoproteinových částic.

Lipoproteinové částice s nízkou hustotou (LDL, low density lipoprotein) jsou hlavním zdrojem lipidů, tvořících aterogenní pláty (Sukhorukov, Karagodin a Orekhov 2016). Během cirkulace LDL částice podléhají enzymatické a neenzymatické modifikaci, např. oxidaci, zmenšování velikosti a desializaci, které předurčí, zda budou mít LDL částice aterogenní potenciál. Navíc takto modifikované LDL částice spouštějí imunitní odpověď organismu a vedou k produkci proaterogenních autoimunitních protilátek IgG (Summerhill et al. 2019).

Vznik aterogenních plátů může být dále způsoben dysfunkcí cévního endotelu. Dysfunkce cévního endotelu vzniká v důsledku chronického zánětu v organismu spojeného se stavy, jako je hypertenze, inzulínová rezistence, stres, obezita a DM2T. Endotel je tvořen z jedné vrstvy endoteliálních buněk, pokrývající vnitřní stěny cév mezi krevním řečištěm a buňkami hladké svaloviny (Ghosh et al. 2017). Zdravý endotel má antioxidační, antikoagulační a antiaterogenní vlastnosti. Profibrinolytický protizánětlivý efekt zdravého endotelu inhibuje přilnavost leukocytů a krevních destiček k cévní stěně, dále pak zabraňuje migraci a proliferaci buněk hladké svaloviny. Do místa poškozeného endotelu jsou přitahovány monocyty/makrofágy a T-lymfocyty, dochází k proliferaci buněk hladké svaloviny, zvyšuje se propustnost endoteliální výstelky a ukládají se zde oxidované LDL částice. Oxidované LDL částice zvyšují tvorbu adhezních molekul, což vede k přesunu monocytů a T-lymfocytů do intimy. Monocyty se následně diferencují na makrofágy, které pohlcují oxidované LDL částice za vzniku pěnových buněk. Zvyšuje se produkce prozánětlivých cytokinů a reaktivních forem kyslíku (Feng et al. 2018; Konukoglu a Uzun 2017). Vznik aterogenních plátů v cévách není způsoben jen patologickým metabolismem, ale i zvýšeným příjmem tuků potravou, tzn. západním způsobem stravování a životním stylem (Sfyri a Matsakas 2017).

Diagnostika ICHS probíhá na základě symptomů, nepravidelného elektrokardiogramu (EKG) a zvýšených hodnot biochemických markerů v séru, které jsou zmíněné výše (kreatinkináza, izoenzym MB kreatinkinázy, myoglobin, troponin I a troponin T) (Feng et al. 2018). EKG je základní vyšetřovací metoda ICHS, avšak její abnormality jsou nad rámec této disertační práce (Karen a Svačina 2018).

V současné době je pozornost široké vědecké veřejnosti zaměřena na hledání nových, hlavně prediktivních faktorů podílejících se na onemocnění srdce. (Kohno et al. 2018). K těmto účelům lze využít různé laboratorní techniky včetně lipidomické analýzy prostřednictvím vysokoúčinné kapalinové chromatografie s detekcí pomocí hmotnostní spektrometrie (HPLC-

MS, high pressure liquid chromatography - mass spectrometry) (Holčapek, Liebisch a Ekroos 2020).

## 2.2 Diabetes mellitus druhého typu

Diabetes mellitus (DM) je onemocnění, které vzniká v důsledku nedostatečné sekrece inzulínu slinivkou břišní anebo jeho patologickým působením v organismu, což má za následek špatné hospodaření s glukózou v tkáních. Buňky, které nejsou dostatečně zásobené glukózou, energeticky strádají a glukóza se hromadí v krvi a vzniká tzv. hyperglykémie. DM se dělí nejčastěji na diabetes mellitus 1. typu (DM1T) a 2. typu (DM2T). Kromě tohoto základního členění existují další typy diabetu jako např. gestační DM nebo geneticky podmíněný diabetes MODY. Celosvětově bylo v roce 2017 léčeno 425 milionů pacientů s DM (zahrnuje DM 1. i 2. typu) (World Health Organization 2019). Při DM2T jsou buňky tkání běžně citlivé k inzulínu (tuková tkáň, kosterní svalstvo a játra) na inzulín rezistentní a vzniká tzv. inzulínová rezistence (Longo et al. 2019). V tomto případě je hladina inzulínu v krvi buď nezměněná, nebo zvýšená v porovnání proti zdravým kontrolám. Následným krokem patogeneze DM2T je porucha v tvorbě a skladování inzulínu  $\beta$ -buňkami pankreatu. V tomto případě je již pankreas vyčerpán, netvoří inzulín a hladiny inzulínu v krvi prudce klesají (Karen a Svačina 2018; Sobczak, Blindauer a Stewart 2019).

Inzulín je jeden z hlavních hormonů regulujících energetický a lipidový metabolismus, který působí přes inzulínový receptor. Zvyšuje přijímání glukózy prostřednictvím translokace intracelulárního glukózového transportéru 4 (GLUT4) z cytosolu na plazmatickou membránu. Dále zvyšuje jak přijímání mastných kyselin (FA) buňkou, tak jejich syntézu a inhibuje lipolýzu. V tukové tkáni navíc stimuluje diferenciaci a růst adipocytů přes zvýšení genové exprese genových transkripčních faktorů, jako je receptor aktivovaný proliferátorem peroxisomů (PPAR, peroxisome proliferator-activated receptor), v tomto případě PPAR- $\gamma$ , protein vázající se na sterolový regulační prvek (SREBP, sterol regulatory element-binding protein), konkrétně SREBP-1 (obě izoformy SREBP-1a a SREBP-1c) a mnoho dalších (Sá et al. 2017).

Screeningové vyšetření zaměřující se na záchyt diabetu a prediabetu je založeno na stanovení hladiny glykémie nalačno v žilní krvi. Referenční mez pro podezření z diabetes mellitus je  $\geq 5,6$

mmol/l. Na možnost porušení glukózové tolerance u pacienta upozorňují i hladiny glykemií kdykoli během dne v plné kapilární krvi s hodnotou větší než 7,0 mmol/l nebo v žilní plazmě s hodnotou větší než 7,8 mmol/l, dále pak hladina glykovaného hemoglobinu HbA1c  $\geq$  39 mmol/mol. Koncentrace HbA1c v krvi odpovídá dlouhodobé kompenzaci hladiny glykémie v krvi pacienta.

Léčbu DM2T dělíme na nefarmakologickou a farmakologickou. Mezi nefarmakologickou léčbu řadíme především úpravu životního stylu zahrnující dietní opatření a fyzickou aktivitu. Cílem těchto opatření je redukce hmotnosti nebo případně stabilizace jejího dlouhodobého nárůstu. Lékem první volby u DM2T je metformin. Pokud hodnota glykovaného hemoglobinu HbA1c i nadále překračuje hodnotu 53 mmol/mol, přistupuje se ke kombinované antidiabetické léčbě (Haluzík 2018).

Pacienti s DM2T obvykle trpí i dalšími nemocemi. Patří k nim dyslipidémie, obezita v oblasti pasu (viscerální tuk), arteriální hypertenze nebo protrombotické stavy. U pacientů s DM2T je vyšší riziko kardiovaskulárních onemocnění včetně ischemické choroby srdeční, mozkových příhod, demence a jiných. Kombinaci výše uvedených onemocnění lze souhrnně nazvat jako metabolický syndrom. Mezinárodní diabetologická federace definuje metabolický syndrom jako přítomnost centrální obezity (obvod pasu  $\geq$  94 cm u mužů a  $\geq$  80 cm u žen u evropského etnika; u asijského etnika je obvod pasu pro muže  $\geq$  90 cm (Zimmet, George a Alberti 2006)) a dalších 2 z následujících faktorů: triacylglycerolémie (TAG)  $>$  1,70 mmol/l, HDL-C  $<$  1,0 mmol/l u mužů resp. 1,30 mmol/l u žen, krevní tlak  $>$  130/85 mm Hg (nebo antihypertenzivní léčba), porucha glykémie nalačno (glykémie  $>$  5,6 mmol/l, nebo přítomnost DM) (Huang 2009)

## 2.3 Tuková tkáň

### 2.3.1 Složení tukové tkáně

Tuková tkáň se skládá z adipocytů, kolagenu, nervů, cév a stromavaskulárních buněk, ke kterým patří endoteliální buňky a makrofágy (M1 a M2 fenotypu), preadipocyty, fibroblasty, dendritické buňky a leukocyty (Appari a Channon 2018; Rezaee a Dashty 2013). Kolagenní vlákna tvoří síť, která drží celou strukturu tukové tkáně pohromadě. Vlastní buňky tukové

tkáně jsou adipocyty. Krevní zásobením tkáně probíhá pomocí cév, které jsou obklopeny stromavaskulárními buňkami. Makrofágy v tukové tkáni dělíme podle druhu fenotypu na M1 a M2. Makrofágy M1, tzv. prozánětlivé, produkují prozánětlivé cytokiny, chemokiny a další faktory, které přispívají k rozvoji inzulínové rezistence (IR) v tukové tkáni. Naopak M2 makrofágy (tzv. protizánětlivé) se vyskytují především v tukové tkáni štíhlých jedinců. M2 makrofágy produkují protizánětlivé působky, zejména cytokiny a další látky, a tím udržují homeostázu tkáně (Chylikova et al. 2018; Haluzík, Haluzíková a Trachta 2010). Nedílnou částí tukové tkáně jsou endoteliální buňky, které zajišťují spojení mezi adipocyty a krevním řečištěm.

#### 2.3.1.1 *Funkce tukové tkáně*

Po mnoho let byla tuková tkáň považována pouze za úložiště energie ve formě TAG, dále jako tepelný izolátor a ochrana proti nárazům. V roce 1994 byl objeven hormon leptin jako významný produkt tukové tkáně (Zhang et al. 1994) a od té doby je tuková tkáň považována za endokrinní orgán produkující signální molekuly, které nazýváme obecně adipokiny. Adipokiny lze rozdělit podle místa jejich tvorby, a to na adipokiny tvořené pouze adipocyty (leptin, adiponektin, chemerin, atd.) a na působky tvořené jak v adipocytech, tak v dalších buňkách tukové tkáně (interleukin 6, tumor necrosis faktor  $\alpha$ , atd.). Působení adipokinů v organismu je autokrinní, parakrinní i endokrinní. Hladiny adipokinů ovlivňují metabolismus v mnoha dalších orgánech, jako jsou játra, mozek, slinivka břišní, imunitní systém, cévy a svaly. Adipokiny regulují citlivost tkání na inzulín (leptin, adiponektin, chemerin) a jeho produkci (apelin). Zvýšená sekrece některých cytokinů může být příčinou subklinického zánětu v organismu (interleukin (IL)- 1b, -6, -8, a tumor nekrotizující faktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ). Apelin působí na krevní tlak, chuť k jídlu řídí leptin a visfatin. Další adipokiny mohou působit v metabolismu lipidů (apelin, rozpustný CD36), hromadění lipidů v játrech a angiogenezi (Fasshauer a Blüher 2015; Haluzík, Haluzíková a Trachta 2010). Adipokiny jsou označovány jako potenciální terapeutické cíle obezity a s obezitou spojených onemocnění. Funkce a molekulární účinky mnoha adipokinů jsou dosud neznámé a jsou předmětem mnoha výzkumů (Fasshauer a Blüher 2015; Haluzík, Haluzíková a Trachta 2010).



## 2.3.2 Biochemické pochody v tukové tkáni

### 2.3.2.1 Adipogeneze

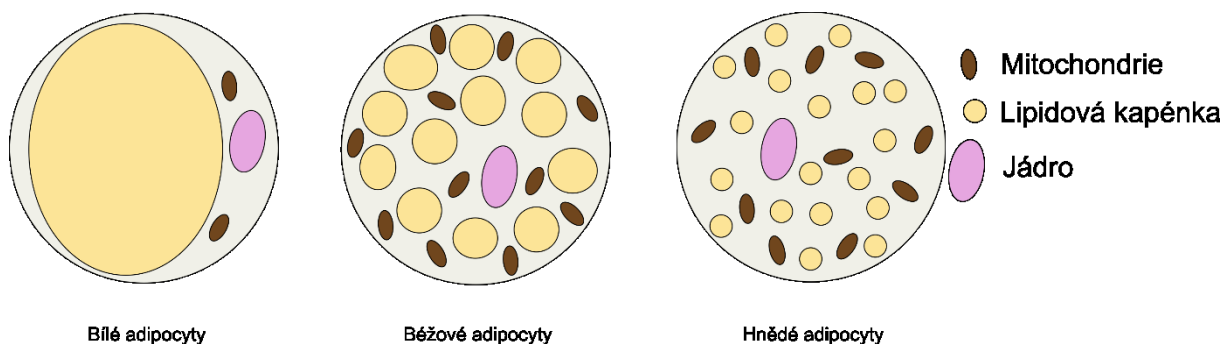
Adipogeneze je fyziologický proces v tukové tkáni a je komplexem řady kroků včetně zvýšeného energetického příjmu. Vyvinutí zralého adipocytu z prekurzorové buňky je řízeno sekvencí transkripčních faktorů. V bílé tukové tkáni je adipogeneze zahájena aktivací aktivačního proteinu 1 a následnou zvýšenou expresí PPAR- $\gamma$ . Další důležité transkripční faktory účastnící se adipogeneze jsou SREBP-1c a proteiny rodiny STAT, které mají funkci jak přenašečů signálu, tak transkripčních faktorů, dále pak transkripční proteiny typu Krüppel a rodina proteinů vázající CCAAT zesilovač (Moseti, Regassa a Kim 2016). Důležitou roli v pozdní fázi diferenciací adipocytů hraje inzulín. Inzulín podporuje genovou expresi transkripčních faktorů SREBP-1c, PPAR- $\gamma$  a FOXO 1 (Cignarelli et al. 2019; Sarjeant a Stephens 2012). Kromě uvedených transkripčních faktorů se podílí na vzniku zralých adipocytů adiponektin, FABP4 (fatty acid binding protein 4) a FAS (fatty acid synthase). Kromě výše uvedených procesů je adipogeneze závislá na příjmu energie získané při syntéze FA a TAG.

Hromadění tuků v tukové tkáni může probíhat ze dvou zdrojů, a to vstřebáním z cirkulace nebo po *de novo* syntéze FA v adipocytech. TAG cirkulují v organismu především ve formě chylomikronů nebo jako lipoproteinové částice o velmi nízké hustotě (VLDL, very low-density lipoproteins). Tyto lipoproteinové částice mohou vznikat ve střevě nebo v játrech po vstřebání tuků z potravy. V tukové tkáni jsou TAG z lipoproteinových částic hydrolyzovány na neesterifikované FA za katalýzy inzulín senzitivní lipoproteinové lipázy. Uvolněné FA z TAG jsou transportovány do adipocytů pomocí glykoproteinového transportéru CD36 a transportního proteinu 1 pro FA. Volné FA jsou v adipocytech reesterifikovány na TAG a uloženy v lipidových kapénkách v adipocytech (Cignarelli et al. 2019; Mehrotra et al. 2015). Tvorba kapének je přísně regulována neuroendokrinním systémem a dostupností substrátů z cirkulace pro jejich syntézu. Signální dráha metabolismu TAG je závislá na druhých poslech, jako je cyklický adenosinmonofosfát (cAMP) a cyklický guanosinmonofosfát (cGMP), které regulují aktivaci enzymů hormon-senzitivní lipázy, adipocytární triacylglycerolové a monoacylglycerolové lipázy (Fang, Pyne a Pyne 2019).

Složení tukové tkáně se mění v závislosti na kalorickém příjmu. Při dlouhodobém zvýšeném energetickém příjmu potravou dochází ke zvětšení neboli hypertrofii adipocytů, čímž je zásadně ovlivněna jejich metabolická funkce. V důsledku hypertrofie dochází v tkáni ke zvýšené infiltraci makrofágů a následnému zvýšení sekrece prozánětlivých faktorů, snížení citlivosti na inzulin v tkáni a k zvýšení lipolýzy (Haluzík, Haluzíková a Trachta 2010; H. Xu et al. 2003). Nedávné studie popisují korelaci mezi velikostí lipidových kapének a sérovou hladinou  $\text{Na}^+$  iontů (Gao et al. 2018).

### 2.3.3 Dělení tukové tkáně

Tukovou tkáň můžeme dělit na bílou, hnědou a béžovou. Bílá tuková tkáň obsahuje tzv. bílé adipocyty, pro které je charakteristická přítomnost jedné lipidové kapénky a malého množství mitochondrií. V tukové kapénce jsou uloženy TAG (Haluzík, Haluzíková a Trachta 2010). Naopak buňky hnědé tukové tkáně obsahují několik malých lipidových kapének a velké množství mitochondrií. Hnědá tuková tkáň slouží k termogenezi (Appari a Channon 2018). Hnědé adipocyty jsou schopny metabolizovat lipidy v reakci na chlad a adrenergický stimul, mohou produkovat teplo zvýšením exprese a sekrece rozvolňujícího proteinu 1. Bílé adipocyty se mohou diferencovat na béžové adipocyty s podobnými vlastnostmi, jako mají hnědé adipocyty. Béžové adipocyty vznikají v bílé tukové tkáni po vystavení chladu a po přerušovaném půstu (Czech 2020; Fang, Pyne a Pyne 2019). Na obrázku 1 jsou uvedeny adipocyty z různých druhů tukové tkáně.



**Obrázek 1. Adipocyty v bílé, béžové a hnědé tukové tkáni.**

*Převzato a upraveno: Paul a spol. (Paul 2018)*

## 2.4 Dělení tukové tkáně podle lokalizace

Podle umístění v organismu dělíme tukovou tkáň na podkožní a viscerální. Toto rozdělení má velký význam především při zohledňování jejich metabolické funkce.

### 2.4.1 Podkožní tuková tkáň

Jedním z důležitých faktorů metabolického zdraví je přednostní ukládání přebytečného tuku do podkoží. V tomto případě pak mluvíme o podkožní neboli subkutánní tukové tkáni (STT), která plní funkci hlavně mechanickou, podpůrnou, tepelnou a působí i jako ochrana proti nárazům. Přestože je STT zdrojem celé řady bioaktivních látek, z klinického hlediska je STT méně významná, tzn. méně metabolicky aktivní v porovnání s jinými depoty tuku. Toczyłowski a spol. porovnávali mRNA expresi a proteinovou sekreci adipokinů v STT a epikardiální tukové tkáni (ETT). Většina testovaných adipokinů kromě prozánětlivého cytokinu IL-6 měla zvýšenou expresi v ETT v porovnání s STT. Proteinové exprese leptinu, IL-6 a visfatinu byly v obou tkáních stejné (Toczyłowski et al. 2019). Naopak Blambace a spol. popisují sníženou mRNA expresi adiponektinu v ETT, což může být dáno do souvislosti s patofyziologií onemocnění srdce. Z hlediska citlivosti na podnět inzulínu k přijímání glukózy je viscerální tuková tkáň citlivější než STT (Cignarelli et al. 2019).

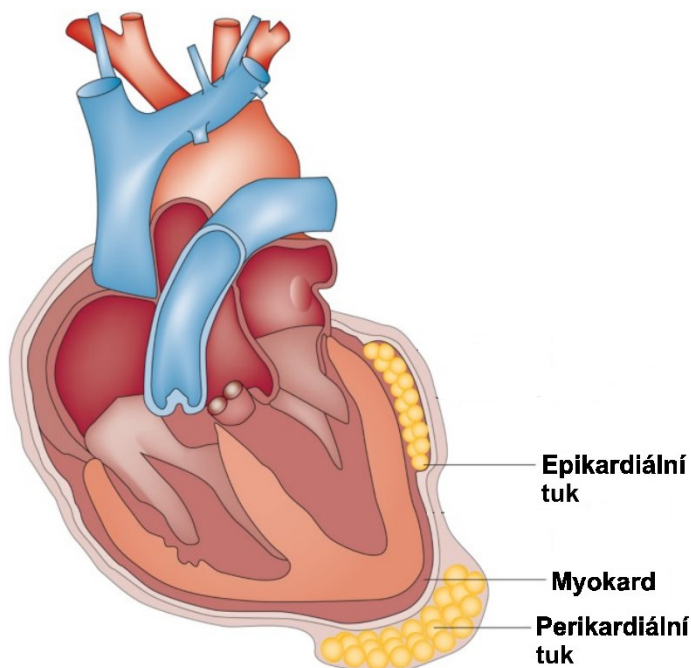
### 2.4.2 Viscerální tuková tkáň

Naopak viscerální tuková tkáň se nachází v dutině břišní a obklopuje vnitřní orgány, jako jsou střeva, játra, srdce a ledviny, a její zvětšený objem je spojován s vyšším rizikem vzniku ICHS a DM2T. Viscerální tuková tkáň obsahuje větší množství M1 makrofágů, které produkují více prozánětlivých faktorů a adipokinů, které se portální žílou dostávají do jater, kde ovlivňují mnoho metabolických procesů (Curat et al. 2006; Haluzík, Haluzíková a Trachta 2010). Speciálním typem viscerální tukové tkáně je ETT.

### 2.4.3 Epikardiální tuková tkáň

#### 2.4.3.1 Funkce a fyziologie epikardiální tukové tkáně

Epikardiální tuková tkáň (ETT) se nachází na stěně pravé komory, kolem vrcholu levé komory, na síních a na obou přívěscích, dále mezi myokardem a viscerální vrstvou perikardu. Také všechny koronární tepny jsou pokryty ETT. ETT leží v těsné blízkosti myokardu a z toho důvodu jsou obě tkáně zásobeny stejnými koronárními cévami (Souček a Novák 2018). Na obrázku 2 je znázorněno uložení ETT v blízkosti myokardu. Z ETT se uvolňují FA jako zdroj energie pro myokard. Naopak v případě přebytku FA slouží ETT k jejich ukládání, a tím brání lipotoxicitě FA. U obézních diabetiků s vysokými hladinami volných FA, kde další ukládání tuku nestačí vyrovnávat jejich hladiny, dochází ke zvýšení  $\beta$ -oxidace a následně k produkci reaktivních forem kyslíku (Song et al. 2020). ETT má s myokardem společný embryonální původ ve splanchopleurickém mezodermu na rozdíl od perikardiálního tuku, který pochází z hrudního mezenchymu (Souček a Novák 2018). Velikost adipocytu v ETT byla významně větší u diabetiků ve srovnání s pacienty bez diabetu (Bambace et al. 2014; Tomášová et al. 2019).



**Obrázek 2: Schéma uložení epikardiální tukové tkáně v blízkosti srdce.**

*Převzato a upraveno: Iacobellis a spol. (Iacobellis 2015)*

Objem ETT je spjat s rozvojem inzulínové rezistence a metabolického syndromu. ETT zprostředkovává patofyziologické procesy srdečního selhání. Vyšší objem ETT koreluje s rozšířením síní a narušeným diastolickým plněním pravé a levé komory. ETT má funkci nejen mechanickou, která spočívá v ochraně srdce proti průchodu pulzu arterií (Song et al. 2020), ale i endokrinní, imunitní a metabolickou. Také má termogenní efekt, obsahuje větší množství mitochondrií se zvýšenou expresí genů pro syntézu enzymů, a je součástí srdečního nervového systému (nervová zakončení se nacházejí přímo v ETT) (Matloch et al. 2016; Saburkina et al. 2011; Souček a Novák 2018). Díky sdílené mikrocirkulaci s myokardem ovlivňuje ETT angiogenezi a imunitu, a tím chrání myokard. Z důvodu nižší aktivity hexokinázy a fruktokinázy v ETT není glukóza hlavním zdrojem energie (Song et al. 2020).

Stejně jako jiné typy tukové tkáně i ETT produkuje adipokiny, které v případě ETT působí především na regulaci endoteliální funkce, ovlivňují koagulaci a zánětlivou odpověď. V ETT byla pozorována zvýšená produkce leptinu, IL-6, TNF $\alpha$ , adiponektinu, visfatinu, rezistinu, omentinu oproti STT (Curat et al. 2006). Snížená exprese adiponektinu v ETT souvisí s vznikem ICHS i v případě porovnání s kontrolní skupinou zdravých jedinců se stejným BMI. Adiponektin má významné protektivní účinky pro organismus. Zvyšuje citlivost tkání na inzulín, což vede ke zvýšené  $\beta$ -oxidaci FA v tukové tkáni v blízkosti srdce. Na rozdíl od většiny známých adipokinů má adiponektin protizánětlivé, antiapoptotické, antioxidantní a antiaterogenní účinky. Adiponektin lze také považovat za kardioprotektivní faktor. Jeho sérové koncentrace negativně korelují s BMI a objemem ETT, viscerálního či perikardiálního tuku (Baker et al. 2006; Iacobellis et al. 2005; Samaras et al. 2010).

Jak již bylo popsáno, tuková tkáň má vliv na některé imunitní procesy. Monocyty infiltrované do ETT se polarizují na prozánětlivé makrofágy a produkují adrenomedullin, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  a MCP-1 (Song et al. 2020). Adrenomedullin je vazoaktivní peptid s natriuretickými a angiogenními účinky.

V ETT pacientů s ICHS byla popsána zvýšená exprese receptorů TLR (Vianello et al. 2016), která může mít souvislost s hypertrofií adipocytů. Hypertrofie adipocytů v ETT vede k jejich degeneraci, zvýšené infiltraci M1 polarizovaných makrofágů do tkáně a zvýšené expresi TLR-2 a TLR-4 (Souček a Novák 2018).

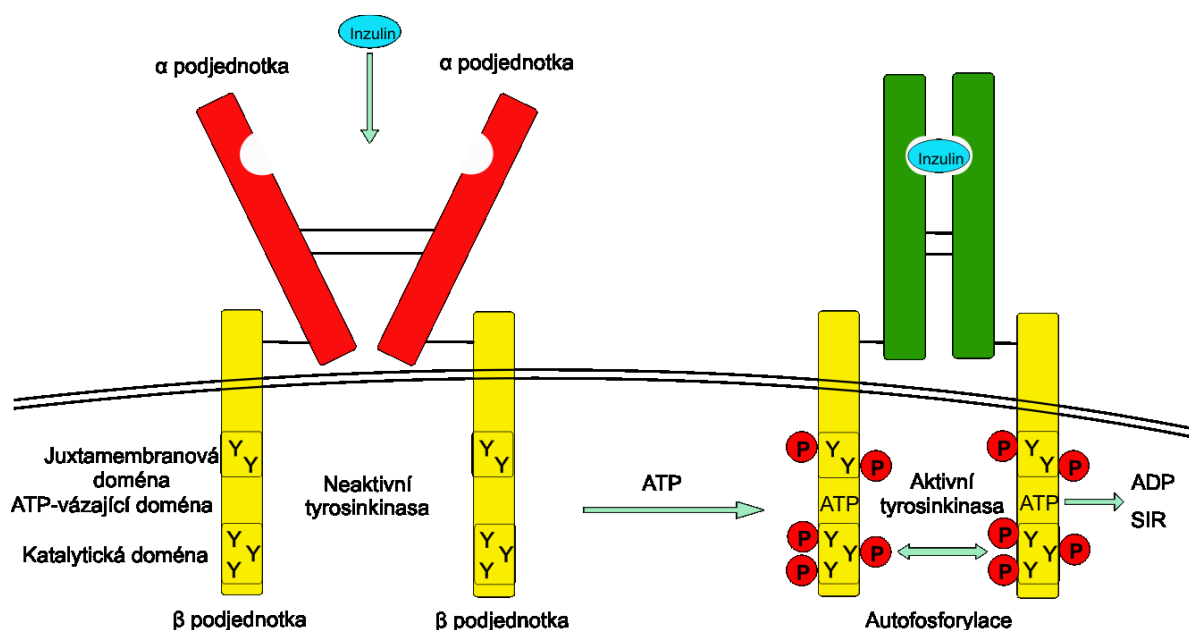
#### 2.4.3.2 Energetické zásobení srdeční tkáně

Srdeční tkáň vyžaduje nepřetržitý přísun energie ve formě ATP. Z tohoto důvodu je nutná rychlá regulace energetického metabolismu a jeho přepínání v závislosti na zdroji substrátu pro produkci ATP. Srdce zdravého člověka získává energii z 60-80 % z  $\beta$ -oxidace FA, z 20-30 % z glukózy a zbytek zajišťují ketolátky, laktát a aminokyseliny (Lopaschuk et al. 2010; Zlobine, Gopal a Ussher 2016). Volné FA se mohou vstřebat do buněk srdečního svalu po uvolnění z vazby na albumin. Vázané FA jsou uvolňovány enzymaticky pomocí lipoproteinové lipázy z TAG přítomných v chylomikrech nebo v lipoproteinových částicích o velmi nízké hustotě. V ETT se FA dostávají do myokardu buď přes koronární arterii, nebo přes intersticiální tekutinu. ETT se vyznačuje zvýšeným podílem volných FA v porovnání s jinými tukovými depoty a vysokou rychlostí jejich inkorporace do buněk a také vyšší syntézou a katabolismem.

#### 2.4.4 Inzulinová rezistence

Inzulínová rezistence (IR) je definována jako porucha odpovědi tkáně na podnět inzulínu. Mezi tkáně citlivé na inzulín, tedy tkáně, kde může vznikat IR, řadíme játra, kosterní svalstvo a tukovou tkáň (Czech 2020). Inzulín reguluje lipogenezi (prostřednictvím např. SREBP-1c) a lipolýzu, ovlivňuje glukózový transportér GLUT4 a glukoneogenezi prostřednictvím regulace transkripce genů pro enzymy fosfoenolpyruvátcarboxykinázu 1 a glukóza-6-fosfatázu (Cignarelli et al. 2019; Hatting et al. 2019). Glukózové transportéry můžeme rozdělit do tříd 1-7. GLUT-4 je jediný transportér závislý na hladině inzulínu a nachází se v tkáních citlivých na inzulín (Cignarelli et al. 2019).

Obrázek 3 znázorňuje schéma receptoru pro inzulín na povrchu buňky. Inzulín nasedne na  $\alpha$  podjednotku tyrozin kinázového receptoru. Kináza katalyzuje fosforylaci tyrozinových zbytků na  $\beta$  podjednotce, což umožní aktivaci fosfoinositid 3-kinázy a zvýšení fosfatidylinositol (3,4,5)-trisfosfátu. Fosfatidylinositol (3,4,5)- trisfosfát aktivuje kinázu závislou na fosfoinositidu, který dohromady s mTOR komplexem 2 katalyzuje fosforylaci proteinkinázy B (PKB/AKT) na Thr308 a Ser473. Tato kaskáda vede k výše zmíněným biochemickým změnám. Inzulín také reguluje růst a diferenciaci buněk. Tato dráha probíhá prostřednictvím aktivace Ras/mitogen aktivované protein kinázy (Fang, Pyne a Pyne 2019).



**Obrázek 3. : Schéma receptoru pro inzulin na povrchu buněk.**

Zkratky: ATP- adenosintrifosfát, ADP- adenosindifosfát, Y- tyrosin, P – fosfát, SIR – (soluble insulin receptor)

Převzato a upraveno: Barthel a spol. (Barthel a Joost 2008)

Existují dvě izoformy inzulinového receptoru. Jedná se o formu A a B, které se mezi sebou liší délkou řetězce aminokyselin, A je dlouhá izoforma a B krátká izoforma. Na povrchu buňky se mohou izoformy skládat do heterodimerů (kombinace formy A a B) a homodimerů (vždy A a A nebo B a B) (Cignarelli et al. 2019).

#### 2.4.4.1 Inzulinová rezistence v tukové tkáni

Tuková tkáň má klíčovou roli v rozvoji IR. IR se projevuje v tukové tkáni dříve než v játrech a ve svalech (Smith 2002). Přestože tuková tkáň zpracuje pouze 3-10 % orálně přijaté glukózy, zásadně ovlivňuje homeostázu glukózy několika způsoby: ukládáním lipidů v lipidových kapénkách, syntézou lipidů nebo omezením lipolýzy, vysokou oxidací glukózy a přítomností FA v hnědých a béžových adipocytech, které zvyšují energetický výdej a sekreci bioaktivních faktorů. Bioaktivní molekuly působí na mozek, játra, kosterní sval, pankreatické ostrůvky a další tkáně (Czech 2020; Guilherme et al. 2020; Kelley et al. 1988).

V tukové tkáni se nacházejí dva druhy inzulínových receptorů. Inzulínový receptor A je na povrchu méně diferencovaných buněk a inzulínový receptor B je na povrchu zralých buněk. Inzulínový receptor B je zodpovědný za systémový metabolický efekt inzulínu. Cignarelli a spol. ve své studii naznačují, že změna poměru inzulínového receptoru A a B může ovlivňovat vznik inzulínové rezistence a rozvoj DM2T (Cignarelli et al. 2019).

V tukové tkáni může vznikat z glukózy během glykolýzy glycerol-3-fosfát, který je esterifikován FA, a je meziproduktem syntézy TAG. Ukládání tuku v tukové tkáni zabraňuje ektopickému ukládání tuku v játrech a svalech (Abel et al. 2001). Jak již bylo popsáno, inzulín v tukové tkáni inhibuje lipolýzu a z tohoto důvodu vzniká při IR v tukové tkáni vysoká koncentrace neesterifikovaných FA, které se touto cestou uvolňují do plazmy (Petersen et al. 2018).

#### *2.4.4.2 Souvislost inzulínové rezistence s metabolismem lipidů v tukové tkáni*

Příčina vzniku IR v tukové tkáni není dosud přesně objasněna. Jedna z teorií jejího vzniku jí dává do souvislosti s dlouho trvajícím subklinickým zánětem. Tato teorie je podpořena korelací zánětlivých markerů s výskytem DM2T (Blüher 2016; Herder, Carstensen a Ouwens 2013). Další diskutovanou příčinou IR je mitochondriální dysfunkce adipocytů bílé tukové tkáně, která může být způsobena nadprodukcí metabolitů lipidů a laktátu, jež byly korelovány s IR v periferních tkáních. Navíc ektopické ukládání tuků způsobuje vysokou koncentraci lipidových metabolitů v tukové tkáni. Následkem těchto dějů se zvýší hladina DAG a ceramidů, které aktivují fosfokinázu Cε a fosfokinázu Cζ, které katalyzují inhibici fosforylace serinu a threoninu inzulínového receptoru (Fang, Pyne a Pyne 2019; Rauschert et al. 2016).

Dalším potenciálním principem vzniku IR se zabývali Rauschert a spol., kteří pozorovali souvislost mezi zvýšeným množstvím PC(32:2) a LysoPC(14:0), resp. sníženým množstvím PC(43:6) a PC(44:12) v lidské plazmě a IR. Jejich studie dále poukazuje na korelaci mezi LysoPC(14:0) a IR, nikoli však s obezitou (Rauschert et al. 2016). Autoři dále poukazují na souvislost mezi zvýšenou hladinou FA 14:0 a uvolňováním inzulínu z β pankreatických buněk.

Souvislost mezi lipidy a IR byla popsána také ve svalu. Změny byly pozorovány v signální dráze diacylglyceroly/proteinkinázy C (Itani et al. 2002), hladinách neesterifikovaných FA, triacylglycerolů a ceramidů (Pickersgill et al. 2007).



## 2.5 Lipidy

Lipidy jsou základní složkou lidského těla. V organismu zastávají důležité funkce, jsou strukturální součástí buněčných membrán, účastní se buněčného růstu a dělení, buněčné smrti a pomocí kovalentní vazby modifikují funkce některých proteinů. Jsou důležitým zdrojem i zásobárnou energie a také působí v signálních kaskádách (Li et al. 2014; Watson 2006).

Lipidy můžeme rozdělit na hydrofobní a amfipatické molekuly. Dále je lze rozdělit na lipidy jednoduché (např. mono-, di-, triacylglyceroly), složené (fosfoglycerolipidy, sfingoglycerolipidy) a lipidy odvozené (mastné alkoholy, steroly). Nejčastější dělení je do následujících lipidových tříd podle molekulární struktury (Quehenberger et al. 2010):

- mastné kyseliny,
- glycerolipidy,
- glycerofosfolipidy,
- sfingolipidy
- sterolové lipidy,
- prenolové lipidy,
- sacharolipidy,
- polyketidy

### 2.5.1 Lipidy v tukové tkáni

V tukové tkáni jsou nejvíce zastoupenou skupinou glycerolipidy. U jedinců s normálními hodnotami BMI tvoří glycerolipidy až 99 % z celkového množství identifikovaných lipidů. U obézních jedinců se tento podíl snižuje až na 97 %. Většinou se jedná o TAG. Dále následují fosfolipidy, sfingolipidy a malé množství volných mastných kyselin a sterolů (Jové et al. 2014).

#### 2.5.1.1 Mastné kyseliny

Mastné kyseliny (FA, fatty acids) jsou karboxylové kyseliny s dlouhým alifatickým řetězcem. Na jednom konci molekuly většinou obsahují metylovou skupinu (nepolární část) a na druhé

straně řetězce karboxylovou skupinu (polární část). Podle přítomnosti/nepřítomnosti dvojně vazby v molekule dělíme FA na saturevané (nasyčené), tj. bez přítomnosti dvojně vazby v molekule (SFA, saturated fatty acids) a nesaturevané, tj. mononenasyčené FA s jednou dvojnou vazbou (MUFA, monounsaturated fatty acids) a polynenasycené FA s dvěma nebo více dvojnými vazbami (PUFA, polyunsaturated fatty acids). Délka řetězce, počet i konformace dvojných vazeb silně ovlivňuje fyzikálně-chemické vlastnosti FA. Rozpustnost ve vodě klesá s délkou řetězce. Délka řetězce také zvyšuje bod tuhnutí FA, naopak přítomnost dvojně vazby, a především její konformace *cis*- snižuje bod tuhnutí.

V krvi jsou nejvíce zastoupeny SFA, na druhém místě jsou MUFA, které následují PUFA n-6 a PUFA n-3. V cirkulaci jsou nejvíce zastoupeny FA, jako je 18:1 n-9 (olejová kyselina), kterou následuje 16:0 (palmitová kyselina). Některé FA jsou v tukové tkáni uvolněny z esterové vazby TAG. Mezi volnými FA jsou nejvíce zastoupeny MUFA, druhé jsou SFA, třetí PUFA n-6 a poté PUFA n-3. Hodson a spol. měřili FA v tukové tkáni a v krvi a zjistili, že kyselina olejová v tukové tkáni tvořila 43,5 mol % všech FA. Druhá je kyselina palmitová s 21,5 mol % (Hodson, Skeaff a Fielding 2008).

FA se dostávají do organismu hlavně potravou (esenciální a neesenciální FA). Dalším zdrojem je endogenní syntéza z potravy přijatých sacharidů (neesenciální FA). Tento proces probíhá především v játrech, tukové tkáni a mléčné žláze. *De novo* syntézy FA se účastní soubor elongáz a desaturáz (Guillou et al. 2010).

Sprecher popsal metabolismus polynenasycených n-3 a n-6 FA probíhající v mikrozomech a peroxisomech. Dochází zde k syntéze 22 uhlíkového řetězce s dvojnou vazbou na pozici 4 (Sprecher 2000).

Mastné kyseliny se vyskytují buď jako volné nebo vázané esterovou vazbou hlavně ve formě TAG nebo fosfoglycerolipidů. Volné FA jsou v séru navázané na albumin. Dále slouží jako prekurzory pro tvorbu hormonálních a nehormonálních signálních molekul (Sobczak, Blindauer a Stewart 2019).

Zvýšená hladina volných FA v krvi je známým rizikovým faktorem metabolického syndromu včetně ICHS a DM2T. Zvýšené hladiny volných FA jsou spojovány s rozvojem inzulínové rezistence, subklinického zánětu a endoteliální dysfunkce. Přesný princip vzniku inzulínové rezistence prostřednictvím volných FA je dosud nejasný. Jedna z teorií říká, že volné FA

inaktivují fosfatidylinositol-3-kinázu (Ghosh et al. 2017; Sobczak, Blindauer a Stewart 2019). Dalšími popsánymi důsledky zvýšené hladiny volných FA v plazmě je inhibice inzulínem indukovaného vstřebávání glukózy do svalu a aktivace glykogensyntázy. Volné mastné kyseliny také zvyšují glukoneogenezi a sekreci inzulínu (Boden 1999).

#### 2.5.1.2 *Glycerolipidy*

Glycerolipidy jsou odvozené od trojsytného alkoholu glycerolu. Esterifikací glycerolu jednou FA vznikají monoacylglyceroly (MAG), dvěma diacylglyceroly (DAG) a třemi triacylglyceroly (TAG). V plazmě se nejčastěji vyskytují molekuly TAG obsahující ve své molekule SFA a MUFA. Konkrétně je nejvíce zastoupena olejová kyselina (cca 38 mol%), kterou následuje palmitová kyselina (okolo 30 mol%) (Hodson, Skeaff a Fielding 2008). Méně jsou zastoupeny PUFA n-6. PUFA n-6 jsou v TAG obsaženy zhruba v 5-6x vyšší koncentraci než PUFA n-3 (Otoki et al. 2017). V tukové tkáni se FA vyskytují v molekulách TAG především jako MUFA, následované poloviční koncentrací SFA a čtvrtinovou hladinou PUFA n-6. Přibližně 13 krát méně než PUFA n-6 se vyskytují PUFA n-3 v tukové tkáni (Fang, Pyne a Pyne 2019). TAG jsou známé jako zásobní tuky, jsou nepolární, hydrofobní a nevyskytují se v membránách.

Zvýšená hladina TAG v plazmě je nezávislým rizikovým faktorem a prediktorem výskytu DM2T. Pacienti se zvýšenou hladinou TAG v plazmě mají téměř o 54 % vyšší pravděpodobnost rozvoje DM2T (Zhao et al. 2019). Mechanismus této korelace není přesně znám, ale Zhao a spol. se domnívají, že tuková tkáň jako endokrinní orgán hraje důležitou roli při rozvoji DM2T a jak již bylo popsáno, TAG jsou nejvíce zastoupenou lipidovou třídou v tukové tkáni (Zhao et al. 2019). Již dlouhou dobu je známá souvislost také mezi hladinou TAG a kardiovaskulárními onemocněními. Aterogenní účinek je popsán především u lipoproteinových částic bohatých na TAG (Miller et al. 2011).

#### 2.5.1.3 *Sfingolipidy*

Základem struktury sfingolipidů je sfingosin, nenasycený uhlovodík s 18 uhlíky s aminoalkoholovou skupinou. Sfingolipidy jsou součástí buněčných membrán, účastní se

aktivace imunitních buněk a jsou důležité signální molekuly. Sfgingolipidy dělíme do tří skupin, a to na ceramidy (Cer), sfgingomyeliny (SM) a glykosfgingolipidy podle substituentu, který nahradí vodík na kyslíku, respektive dusíku na uhlíku C1 a C2. Ceramidy vznikají po navázání FA amidovou vazbou na uhlíku C2. Sfgingomyeliny vznikají po esterifikaci OH skupiny na uhlíku C1 FA a navázáním FA na amidovou vazbu na C2 uhlíku. Glykosfgingolipidy jsou sloučeniny ceramidů, ve kterých je na prvním uhlíku nahrazen vodík z OH skupiny molekulou sacharidu.

Některé sfgingolipidy, konkrétně sfgingosin 1-fosfát a od něho odvozené ceramidy, jsou spojovány s dysfunkcí adipocytů. V adipocytech dochází ke změně úrovně syntézy ceramidů, která vede k blokaci inzulínové signalizační dráhy a k aktivaci zánětu v adipocytech. Sfgingosin 1-fosfát podporuje chronický zánět v tukové tkáni a inhibuje adipogenezi. Dále může být tuková tkáň zdrojem cirkulujících ceramidů. Zvýšená syntéza ceramidů v tukové tkáni byla popsána především u pacientů s DM2T. Inhibice enzymatické kaskády se jeví jako potenciální terapeutický cíl, který může vést ke zlepšení stavu adipocytů (Fang, Pyne a Pyne 2019). Ceramidy byly také označeny jako markery kardiovaskulárních onemocnění, protože byla prokázána souvislost mezi zvýšenou hladinou některých sfgingolipidů v séru a přítomností ICHS (Poss et al. 2020) .

#### 2.5.1.4 Cholesterolestery

Cholesterol se vyskytuje v plazmě buď samostatně, nebo je esterifikován FA na 3. uhlíku nejčastěji acyly pocházejícími z PUFA n-6, hlavně z FA 18:2 n-6 (linolová kyselina) a méně často jsou na cholesterolu esterově vázány MUFA a SFA. Minoritně se vyskytují PUFA n-3. Složení FA v esterech cholesterolu v plazmě odráží příjem FA z potravy a aktivitu enzymů související s estery cholesterolu (Hodson, Skeaff a Fielding 2008; Otoki et al. 2017).

V buňce jsou cholesterolestery (CE) uloženy v cytoplazmě v lipidových kapénkách a jsou v dynamické rovnováze s volným cholesterolem. CE mohou být pohlceny makrofágy, což je jeden z možných způsobů vzniku pěnové buňky na vnitřní stěně cév, tento mechanismus se významnou mírou podílí na vzniku aterosklerózy. V regulaci pohlcování esterifikovaného cholesterolu makrofágem hraje významnou roli PPAR $\alpha$ . Jeho aktivací se pohlcování CE sníží (Ghosh et al. 2012).

### 2.5.1.5 Glycerofosfolipidy

Glycerofosfolipidy jsou deriváty kyseliny fosfatidové. Kyselina fosfatidová vzniká z meziproductů glykolýzy glycerinaldehyd-3-fosfátu nebo dihydroxyacetonfosfátu přes izomerační reakci, dále pomocí fosfolipázy D z PC nebo diacylglycerolkinázy z DAG. Z kyseliny fosfatidové vznikají DAG nebo cytidindifosfát-DAG, které mohou být prekurzory glycerofosfolipidů.

Rozlišujeme následující podtřídy glycerofosfolipidů:

- fosfatidylcholin (PC),
- lysofosfatidylcholin (LysoPC),
- fosfatidyletanolaminy (PE),
- lysofosfatidyletanolaminy (LysoPE),
- fosfatidylseriny (PS),
- fosfatidylinositoly (PI),
- fosfatidylglyceroly (PG)
- difosfatidylglyceroly.

LysoPC a lysoPE mají ve své molekule navázanou pouze jednu FA, naopak PC a PE mají navázané 2 molekuly FA. V plazmě se vyskytují molekuly fosfolipidů především se SFA. Konkrétně se jedná především o palmitovou kyselinu. Druhou nejvíce zastoupenou skupinou jsou PUFA n-6. Z nich je nejvíce zastoupená kyselina linolová (18:2 n-6). Následující skupinou jsou MUFA. Minoritně se zde vyskytují PUFA n-3 (Hodson, Skeaff a Fielding 2008; Otoki et al. 2017). Glycerofosfolipidy jsou hlavní lipidovou třídou obsaženou v membránách. Tvoří vnitřní vrstvu fosfolipidové dvojvrstvy plazmatické membrány. Na struktuře vnější vrstvy se velkou měrou podílí kromě glycerofosfolipidů také SM. Lipidové membrány se však liší ve svém složení i v rámci organel, např. mitochondriální membrána obsahuje větší množství difosfatidylglycerolů (Dudek, Hartmann a Rehling 2019). Dále jsou PC a SM obsaženy v lipoproteinových částicích (Rauschert et al. 2019). V tukové tkáni se vyskytují především PC a PE. Byla popsána indukce lipolýzy a apoptózy některými zástupci PC (Otoki et al. 2017). Lysofosfolipidy interagují s receptory spojenými s G proteiny (Abdel-latif et al. 2016).

## 2.5.2 Uložení lipidů v adipocytech

V tukové tkáni jsou lipidy uloženy v adipocytech. Většinu cytoplazmy, především u bílých adipocytů, zabírají lipidové kapénky (lipid droplets, LD), proto je umístění ostatních organel v těchto buňkách stísněné. Jádro je v adipocytech natlačeno na plazmatickou membránu. Golgiho aparát, hladké a hrubé endoplazmatické retikulum jsou zastoupeny v nižším množství, než je běžné u ostatních buněk. Obsah mitochondrií se liší podle druhu tukové tkáně (Sarjeant a Stephens 2012).

V současné době jsou stále častěji diskutovány i další funkce triacylglycerolů v metabolismu lipidů a v signálních drahách adipocytů (Meex, Schrauwen a Hesselink 2009). Tvorba LD probíhá ve všech buňkách v těle, avšak nejvýraznější je v adipocytech. Kromě již zmíněných TAG obsahují LD diacylglyceroly, estery cholesterolu a volný cholesterol. Na povrchu LD je vrstva fosfolipidů, cholesterolu a proteiny specifické pro povrch LD. Počet a velikost LD v adipocytech se liší velmi dynamicky v řádech hodin v závislosti na přebytku energie nebo naopak její potřebě. Syntéza neutrálních lipidů nutných pro jádro LD je katalyzována diacylglycerol *O*-acyltransferázou a sterol *O*-acyltransferázou a navíc je regulována dostupností substrátu. Fosfolipidy vyskytující se na povrchu LD jsou z 90 % PC a PE (Krahmer et al. 2011; Meex, Schrauwen a Hesselink 2009).

Stejně jako hormonální funkce tukové tkáně se liší jejího umístění, tak i složení lipidů je v jednotlivých depotech rozdílné. Dosud bylo publikováno pouze malé množství studií zabývajících se těmito rozdíly. Jové a spol. porovnávali složení viscerálního a subkutánního tuku s využitím necílené a cílené lipidomiky. K analýze využili kapalinovou chromatografii s detekcí MS (Q-TOF/MS). V tukové tkáni identifikovali 159 lipidových struktur, z nichž 97 % patřilo do třídy glycerolipidů. Zbylé lipidy byly z třídy SM, glycerofosfolipidů, acylů FA a sterolových lipidů. Nejvýznamnější změny byly pozorovány v TAG a DAG, lišící se typem FA, tzn. délkou jejich řetězce a nenasyceností. Ve viscerální tukové tkáni byly přítomny ve zvýšené koncentraci TAG s FA s vyšším počtem uhlíků. (Jové et al. 2014).

### 2.5.3 Složení mastných kyselin v epikardiální tukové tkáni

Složení FA v ETT se liší od jiných tkání. Hladiny nasycených FA, jako jsou 16:0, 14:0, jsou v ETT nižší než v STT a naopak, hladiny nenasycených, jako jsou 16:1n-7, 18:1n-9, 18:2n-6, 18:3n-3, byly vyšší v ETT než u STT (Pezeshkian et al. 2009; Rabkin 2007; Souček a Novák 2018). ETT se dále liší od ostatních tukových depot lipogenezí indukovanou inzulínem a vyznačuje se malým využitím glukózy jako zdroje energie, nízkou expresí genů pro tvorbu lipoproteinové lipázy, steraoyl-CoA desaturázy a acetyl-CoA karboxylázy  $\alpha$  (Rabkin 2007).

Stejně jako v hnědé tukové tkáni jsou v ETT přítomny mitochondrie s vyšší expresí uncoupling proteinu 1, jehož prostřednictvím se přebytečná energie přeměňuje v teplo místo ATP (Sacks et al. 2009).

#### 2.5.3.1 Lipolýza a lipogeneze

Při zvýšené potřebě energie organismem adipocyty uvolňují FA do krevního řečiště prostřednictvím lipolýzy TAG za katalýzy triacylglycerolové lipázy, hormon senzitivní lipázy a monoacylglycerolové lipázy (Ha a Bauer 2019). První dva jmenované enzymy jsou regulovány natriuretickými peptidy, inhibovány inzulínem a aktivovány, resp. inhibovány katecholaminy (Cignarelli et al. 2019).

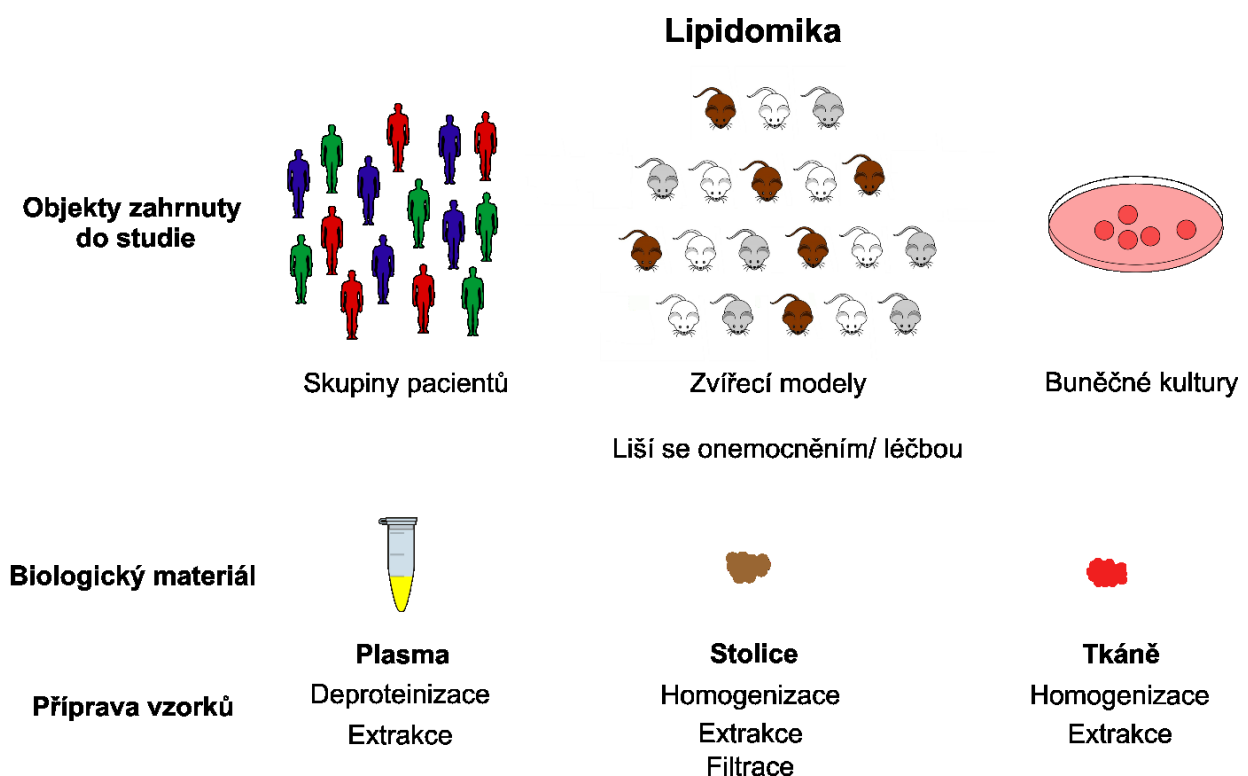
Naopak k lipogenezi dochází při přebytku sacharidů, které se přemění na tuk. Lipogeneze probíhá hlavně v játrech a tukové tkáni. Glukóza je glukózovým transportérem přenesena do buňky. V cytoplazmě je přeměněna na pyruvát a ten dále v mitochondriích na citrát. Citrát je transportován z mitochondrií a přeměněn na acetyl-CoA, který je prekurzorem pro syntézu mastných kyselin. Tyto reakce jsou katalyzovány enzymy, které podléhají regulaci (Ameer et al. 2014).

## 2.6 Lipidomika

V roce 2006 A.D. Watson definoval lipidomiku jako podobor metabolomiky, zabývající se studiem lipidů, jejich funkcí v buňce a molekulami, s kterými lipidy interagují. Důležitou roli

hraje lipidomika v pozorování změn způsobených přítomností onemocnění a vlivu léčby (Watson 2006). Nedávné výzkumy odhalily, že lipidy mohou být prostředníkem mezi environmentálními a genetickými faktory ovlivňujícími vznik aterosklerózy, DM2T a dalších onemocnění (Abdel-latif et al. 2016). Běžné screeningové laboratorní testy zaměřující se na lipidový profil zdaleka neobsáhnou konkrétní dopady onemocnění na lipidový metabolismus. Zde může být lipidomika ideálním nástrojem hodnotící stovky lipidových molekul jako potenciální biomarkery různých onemocnění.

Z hlediska analytického přístupu lze lipidomiku dělit na cílenou a necílenou. V další části práce se budu zabývat rozdíly v těchto přístupech ke stanovení lipidů. Obrázek 4 znázorňuje možnosti lipidomické analýzy a subjekty, jejichž biologický materiál lze zpracovat. Subjekty zahrnuté do studie jsou rozděleny do skupin podle onemocnění nebo léčby.



**Obrázek 4: Studium lipidů u pacientů, zvířecích modelů a buněčných kultur**



### 2.6.1.1 Analytické přístupy v lipidomice

#### 2.6.1.1.1 Necílená lipidomika

Necílená lipidomika je komplexní stanovení lipidového spektra v biologickém vzorku. Necílený přístup umožní současné stanovení několika stovek molekul z různých lipidových tříd. Další její nespornou výhodou je rychlá a jednoduchá příprava vzorku, která umožní velmi šetrné zacházení se vzorkem. Analyty ve vzorku jsou proto stanoveny ve své nativní koncentraci a chemické podobě.

Při necílené lipidomice se využívá téměř výhradně jako způsob detekce MS. I přes vysokou citlivost MS je tento přístup zatížen interferencemi z velkého množství analytů ve vzorku a může docházet k potlačení signálu minoritních metabolitů. Dále je metoda omezena dynamickým rozsahem. Dostupné přístroje pro necílenou analýzu mají dynamický rozsah v rozmezí tří řádů, což v některých případech neumožňuje současnou analýzu metabolitů o vysoké koncentraci a minorit, které se vyskytují v biologických vzorcích v nižších koncentracích (až o 5 řádů než majoritní složky) (Jové et al. 2014; Wu, Shon a Liu 2014). Pomocí MS získáme informaci o poměru hmoty k náboji částice ( $m/z$ ), která je pak jedním z hlavních parametrů sloužících při identifikaci.

Pracovním postupem necílené lipidomiky při stanovení hladiny metabolitů je nejprve samotná analýza, druhým krokem je zpracování dat, dále statistické vyhodnocení a následuje identifikace signifikantně změněných metabolitů.

#### 2.6.1.2 Cílená lipidomika

Cílená lipidomika se zaměřuje na určitou lipidovou třídu, či na některé její konkrétní zástupce. Velice často se zaměřuje pouze na analýzu FA obsažených v lipidové třídě bez konkrétního přiřazení k lipidové molekule. Výhodou tohoto postupu je stanovení analytů i o velmi nízkých koncentracích. Nevýhodou je ztráta informace o komplexní změně, časová náročnost postupu, riziko zanesení chyby nebo kontaminace (Błachnio-Zabielska et al. 2012; Pati et al. 2016; Pezeshkian a Mahtabipour 2013).

## 2.6.2 Metody používané v lipidomice

V posledních letech se metody analýzy lipidů rychle rozvíjejí a modernizují. Především se klade důraz na vysokou citlivost metody a na přesnou identifikaci lipidů. Postup při analýze lze rozdělit do několika kroků. Postupy v přípravě vzorku, detekci, zpracování dat a identifikaci ovlivňuje, jaký přístup k analýze zvolíme, zda cílený nebo necílený (Tabulka 1).

**Tabulka 1: Rozdíly mezi cílenou a necílenou lipidomickou analýzou**

Lipidomická analýza	Cílená	Necílená
Separace	Ano	ne
Derivatizace	Ano	Ne
Chromatografická separace	Ano	ano / ne („shotgun“ neboli přímý nástřik)
Detekce	předem určených metabolitů, optimalizace pomocí standardů	všech metabolitů vyskytujících se ve vzorku nad limitem detekce
Mód měření	SRM, MRM přechody	Full scan (monitorování vybraného hmotnostního rozsahu)
Zpracování dat	Kvantifikace Integrace píků ve spektrech Absolutní koncentrace z kalibračních křivek	Detekce hmot, odstranění šumu, dekonvoluce, filtrování, odstranění izotopické interference a aduktů, zarovnání píků, export matice dat Relativní zastoupení
Statistické vyhodnocení	Jednorozměrná analýza	Jednorozměrná /vícerozměrná analýza
Identifikace	Standardy	Databáze, přesná hmota, izotopový vzorec, fragmenty, standardy
Výhody	Cena MS/citlivost	Rychlost přípravy vzorku/ Široký profil metabolitů
Nevýhody	Omezené množství metabolitů/ dlouhá příprava vzorku	Cena MS/složité zpracování dat

*Zkratky: SRM - monitorování jedné přechodové reakce (single reaction monitoring), MRM - monitorování více přechodových reakcí (multiple reaction monitoring), MS - hmotnostní spektrometr (mass spectrometer)*

### 2.6.2.1 Příprava vzorku

Lipidové spektrum lze hodnotit v různých typech biologického materiálu. Nejčastěji se lipidy stanovují v séru nebo plazmě, dále pak mozkomíšním moku, plodové vodě a dalších podobných matricích. Prvním krokem zpracování těchto vzorků je extrakce/deproteinizace (Holčápek, Liebisch a Ekroos 2020).

V současné době je v popředí vědeckého zájmu studium lipidů v dalších typech tkání, jako jsou játra, tuková tkáň a jiné (Hyötyläinen a Orešič 2015; Jové et al. 2014; Li et al. 2014; Narváez-Rivas a Zhang 2016). Při zpracování vzorků tkání je nutné nejdříve vzorek homogenizovat, a pak teprve následuje extrakce, která je stejná nebo podobná jako při zpracování kapalných vzorků biologického materiálu.

#### **Homogenizace**

Extrakci lipidů ze vzorku tkáně předchází homogenizace vzorku. K homogenizaci lze použít homogenizační nože, keramické kuličky, různé druhy mlýnků a třecí misky. Před homogenizací je vhodné k vzorku tkáně přidat extrakční činidlo či rozpouštědlo, které usnadní rozmělnění vzorku. Tímto způsobem se také minimalizuje zahřívání vzorku vzniklé třením. Udržení pokojové teploty je důležité pro omezení potenciální degradace metabolitů (Burden 2012).

#### **Extrakce**

Nedílnou součástí stanovení lipidů v biologickém materiálu je jejich extrakce ze vzorku. Při extrakci je nutné překonat dvě hlavní výzvy, tj. rozdílnou účinnost extrakce lipidů pro různé lipidové třídy a odstranění nelipidového obsahu ze vzorku. Extrakci lze rozdělit podle principu na extrakci kapalina/kapalina a kapalina/pevná fáze. Extrakce kapalina/kapalina se využívá při extrakci kapalného biologického vzorku pomocí směsi organických rozpouštědel. Extrakce kapalina/pevná látka se používá v případě extrakcí lipidů z tkání. Optimalizací postupu se musí dosáhnout vysoká účinnost a reprodukovatelnost výtěžku.

Vzhledem k tomu, že lipidy jsou látky dobře rozpustné v organických rozpouštědlech, využívá se extrakce s organickými rozpouštědly. Pro extrakci polárních lipidů obsahujících ve své molekule jak hydrofilní, tak hydrofobní skupiny, se používá postup na základě směsí

chloroform/metanol v různém poměru. Neznámější a nejdéle používaná je extrakce Folchovou metodou s využitím extrakčního média metanol : chloroform v poměru 1:2 (v/v) z roku 1957. Tato metoda se vyznačuje vysokou účinností separace lipidů v porovnání s jinými postupy (Folch, Lees a Sloane Stanley 1957). Na podobném principu je založena Bligh-Dyerova metoda (Bligh a Dyer 1959). Po extrakci pomocí směsi metanol : chloroform následuje promývání extraktu vodou, během tohoto kroku se odstraní nelipidová složka vzorku. Vždy je nutné dodržet poměr vody k organickým rozpouštědlům, v tomto případě chloroform : metanol : voda 8:4:3 (v/v), aby nedocházelo k vymytí polárních analytů do vody. Zatímco Folchova metoda je používána především při extrakci pevných vzorků, tj. tkání, Bligh-Dyerova metoda se používá i pro tělní tekutiny (Pati et al. 2016). Kvůli kancerogenním účinkům chloroformu byly metody později modifikovány a místo chloroformu se v současné době používá dichlormetan s podobnými extrakčními vlastnostmi (Cequier-sa et al. 2008). Pro extrakci nepolárních lipidů (jako jsou TAG a steroly) je vhodné použít alkany (Pati et al. 2016). Poměrně nedávno byla vyvinutá metoda extrakce pomocí metyl-terc-butyléteru (MTBE), tzv. Matyashova metoda (Matyash et al. 2008). Kromě nižší toxicity MTBE než v metodách používaných chloroform má postup i další výhodu, a to je nižší hustota MTBE oproti vodě. Extrakt lipidů je pak obsažen v horní vrstvě v MTBE a precipitované proteiny se nacházejí na dně zkumavky na rozdíl od Folchovy metody, kde proteiny tvoří mezivrstvu mezi vodnou a chloroformovou (dichlormethanovou) fází. Z tohoto důvodu není nutné lipidový vzorek odebírat skrz horní vrstvu a nehrozí tak riziko kontaminace (Pati et al. 2016; Patterson et al. 2016).

V extrakčních metodách může také figurovat jako samostatné činidlo metanol, který není typické organické rozpouštědlo pro extrakci lipidů. Metanol při extrakci působí spíše na rozrušení vazby mezi lipidy a biopolymery. K podobnému účelu lze použít také 1-propanol, 2-propanol, etanol nebo případně méně účinný n-butanol (Pati et al. 2016).

Při extrakci lipidů z tkání je v závěrečném kroku nutné oddělení zbytků tkání např. filtrací. K tomuto účelu lze použít filtrační papír, který se před použitím nasytí extrakčním rozpouštědlem, čímž zabráníme případným přechodům kontaminantů z filtračního papíru do extraktu.

### 2.6.2.2 *Separace analytů*

Zjednodušení matrice nám umožní jednodušší analýzu bez větších interferencí. Při separaci dochází k odstranění ostatních složek vzorku a extrakci specifické lipidové třídy. Nejčastějším způsobem, jak lze oddělit lipidové třídy, je tenkovrstvá chromatografie (TLC, thin layer chromatography) nebo extrakce na pevné fázi obsažené v kolonkách (SPE, Solid Phase Extraction).

Dlouho používanou separační technikou pro široké aplikační použití je TLC. Využívá se i k separaci jednotlivých lipidových tříd. Stacionární fází může být silikagel, což je bílá krystalická amorfni porézní látka. Před použitím desky je důležité odstranit přebytečnou vlhkost zahřátím na teplotu 105°C. Udržení relativně nízké vlhkosti zvyšuje opakovatelnost dělení lipidů na desce. Komerčně dostupné desky obsahují anorganický fluoreskující indikátor, který fluoreskuje pod UV zářením při 254 nm (Wall 2005). V současné době se také používá dvoudimenzionální TLC, která umožňuje vyšší účinnost separace. Tato technika je výhodná z hlediska cenové dostupnosti, vysokého rozlišení, jednoduchosti, ale bohužel je to metoda zatížená nižší výtěžností, degradací lipidů a nízkou citlivostí (Pati et al. 2016). TLC se vyznačuje vysokou schopností separace jednotlivých podtříd fosfolipidů (Fuchs et al. 2011).

Dalším způsobem rozdělení lipidových tříd je SPE. Principem SPE metody je zadržení lipidů z hydrofobního media na stacionární fázi obsažené v SPE kolonce. Nelipidová hydrofilní složka se na kolonkách nezachytí a je vhodným rozpouštědlem vymyta. Lipidy jsou následně uvolněny z kolonky pomocí rozpouštědla o nižší polaritě. SPE lze použít pro široké spektrum aplikací, různé koncentrace vzorků, matrice a objemy. Metodu lze i automatizovat a použít pro větší série vzorků. Vhodnou stacionární fází pro extrakci lipidů je reverzní fáze C18. Na tento typ pevné fáze lze nanést například extrakt získaný pomocí Folchovy extrakce, kolonku lze propláchnout vodou a lipidy extrahovat směsí chloroform : metanol (1:2 v/v). Lipidy lze také postupně extrahovat z kolonky, například pomocí metanolu : vody (12:1 v/v) a následně chloroformem : metanolem (1:2 v/v). První frakce obsahuje gangliosidy, fosfatidylseriny, fosfatidylinositoly, kyselinu fosfatidovou a sulfatidy. Druhá frakce obsahuje fosfolipidy, cerebrosidy a cholesterol (Kyrklund 1987; Pati et al. 2016).

SPE kolonky, obsahující normální fázi, dělí lipidy na základě polární interakce. Řadíme mezi ně kolonky obsahující jako stacionární fázi silikagel, který může být modifikovaný skupinami např.

amino nebo kyano. Další variantou je iontově výměnná SPE. Příkladem těchto fází je kyselina benzensulfonová, kyselina propylsulfonová, karboxylové kyseliny, případně kolony obsahující ionty stříbra či oxid zirkoničitý. V tomto případě je důležité dodržet a optimalizovat pH roztoků (López-Bascón et al. 2018; Pati et al. 2016).

### **Chromatografické separační metody**

Extrakt lipidů lze přímo dávkovat do detekčního přístroje, kterým je v lipidomických analýzách nejčastěji hmotnostní spektrometr (MS, mass spectrometry) - tzv. shotgun lipidomika, nebo lze extrakt dále podrobit další separaci s cílem zvýšení kvality i kvantity měření. Mezi nejčastější užívané separační techniky v lipidomice řadíme kapalinovou (LC, liquid chromatography) a plynovou chromatografii (GC, gas chromatography), kapilární elektroforézu a superkritickou fluidní chromatografii (SFC, supercritical fluid chromatography) (Li et al. 2014; Narváez-Rivas a Zhang 2016; Kostal, Katzenmeyer a Arriaga 2008; Wolrab et al. 2020).

#### **Plynová chromatografie**

GC je vhodná především pro analýzu volných mastných kyselin, sterolů a analýzu fosfolipidů. Analýza pomocí GC vyžaduje převedení molekul na těkavé estery. K tomuto účelu se používá derivatizace, nejčastěji silylace. Další nevýhodou GC je, že separace vyžaduje vysokou teplotu, čímž dochází k degradaci vzorku. Pro separaci je důležitý výběr stacionární fáze v koloně s vhodnými parametry (homogenita zrnění, velikost zrn, pórovitost pro náplňové kolony či tloušťka filmu pro kapilární kolony a samozřejmě také chemické složení). Výhodou je vysoká separační účinnost a reprodukovatelnost (Dunn et al. 2011).

#### **Kapalinová chromatografie**

Kapalinová chromatografie, resp. vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC, high pressure liquid chromatography) je nejčastěji používanou separační technikou v lipidomice. Tuto pozici obsadila především kvůli širokému aplikačnímu použití. LC nevyžaduje zplynění analytů, a proto je vhodná i pro analýzu fosfolipidů, sfingolipidů a neutrálních lipidů. Další

výhodou LC je vynechání kroku derivatizace. Pro LC separaci se využívá retence analytů na stacionární fázi obsažené v chromatografické koloně. K účelům separace lipidů se využívá především reverzní fáze (např. C8, C18, C30), normální fáze (silica, alumina, kyano- kolony) nebo hydrofobní interakce (HILIC) (Li et al. 2014).

Při použití reverzní fáze je stacionární fáze nepolární a mobilní fáze polární. Lipidy jsou na těchto kolonách separovány na základě délky řetězce a přítomnosti nebo počtu dvojných vazeb. Nevýhodné je použití těchto kolon při separaci hydrofilních lipidů. Jako mobilní fáze se používá nejčastěji metanol, 2-propanol nebo acetonitril případně v kombinaci s vodou. Při separaci na koloně s normální stacionární fází se lipidy dělí podle vlastností jejich polárních struktur. Speciální skupinou separací na normální fázi je HILIC, kde se uplatňuje kombinace polární stacionární fáze a organických rozpouštědel jako mobilní fáze. Pokud chceme využít separace oběma způsoby, lze techniky kombinovat v dvourozměrnou LC (Pati et al. 2016).

#### Kapilární elektroforéza

Kapilární elektroforéza se používá v lipidomice méně než dříve zmíněné GC a HPLC. Kromě analýzy lipidů je využívána k měření nukleových kyselin, peptidů, proteinů a cukrů. Z lipidů se používá například pro separaci sterolů, lipoproteinových částic, lipoglykanů a další aplikace (Lamari et al. 2002; Kostal, Katzenmeyer a Arriaga 2008).

#### Superkritická fluidní chromatografie

Tato metoda se používá v cílené i necílené lipidomice. Lze pomocí ní separovat většinu lipidových tříd. Díky společným vlastnostem s GC a LC má výhody z obou metod, např. vysokou účinnost separace či schopnost separovat látky o různé polaritě (Wolrab et al. 2020; Yang et al. 2019).

### 2.6.2.3 Provedení analýzy

Nejčastějším způsobem provedení analýz v lipidomice jsou kombinace HPLC nebo GC s MS. Zahrnutím kroku separace vzorku před vlastní detekcí lze v některých případech rozdělit i metabolity o stejné molekulové hmotnosti. Podrobnostmi tohoto způsobu přípravy biologického materiálu jsem se zabývala výše v kapitole 2.6.2.1 Příprava vzorku. Při necíleném způsobu analýzy se také využívá tzv. „shotgun“ lipidomiky, při kterém extrakt lipidů není již dále separován pomocí chromatografie, ale je přímo nastříknut do iontového zdroje. Výhodou tohoto přístupu je vysoká rychlost. Nevýhodou pak je častý překryv lipidů o stejném  $m/z$ , potlačení signálu, nutnost vysoké koncentrace lipidů a významná interference s matricí vzorku. I přes tyto nevýhody je tento postup stále často používán (Hsu 2019; Pati et al. 2016).

### 2.6.2.4 Detekce

Chromatografické přístroje jsou kombinovány s různými druhy detektorů, přičemž pro analýzu lipidů se nejčastěji používá MS-detekce. Výhodou MS je především vysoká citlivost, robustnost a vysoký dynamický rozsah. Metabolity jsou někdy identifikovány podle přesné hmoty (možné pouze u MS s vysokým rozlišením). Nevýhodou MS jsou vyšší pořizovací náklady přístroje a vyšší náklady na jeho provoz. Složky vzorku jsou v MS ionizovány a vznikající ionizované molekuly nebo fragmenty molekul jsou detekovány na základě poměru hmoty/náboj ( $m/z$ ) iontu. Poměr  $m/z$  iontu je jedním z hlavních parametrů sloužících při identifikaci molekul.

Z důvodu zvýšení ionizace metabolitů ve vzorku a citlivosti jejich stanovení se k mobilní fázi přidává např. kyselina mravenčí, octová, amonné ionty a metylamin. Podle nastavení ionizačního zdroje mohou vznikat pozitivní (pozitivní ionizační mód) nebo negativní ionty (negativní ionizační mód). Součástí optimalizace analýzy je nastavení parametrů na iontovém zdroji. Zatímco v necílené lipidomice se využívá výhradně MS, v cílené se používá také plamenově ionizační detektor (FID) především v kombinaci s GC. Tato kombinace se nejčastěji používá pro detekci FA v různých lipidových třídách.



#### 2.6.2.5 Zpracování dat

Získaná data z necílené analýzy je nutné převést na matici, tzv. binů obsahujících poměr plocha nebo výška píku, přiřazenou k identifikačním parametrům. Tento proces probíhá pomocí softwaru vhodného pro zpracování dat z necílené MS lipidomiky. Jedním z těchto programů je MZmine (Pluskal et al. 2010). Při zpracování dat program odfiltruje šum pomocí zadaných parametrů. Program umožňuje jak pevné nastavení hladiny šumu, které lze ověřit přímo v reálných spektrech, tak pomocí poměru signál/šum, který se liší v různých m/z a relativní výškou píku. Dalším parametrem vymezující hranice jednotlivých binů je tolerance rozdílu mezi jednotlivými m/z. V absolutních mezích dosahuje tato hranice 0,003 m/z a v relativních 10 ppm. Program umožňuje nastavení minimální doby, po kterou musí být iont pozorován, aby byl zařazen do dalšího zpracování dat. Stejně tak je důležité i nastavení maximální délky píku. Program umožňuje dekonvoluci spekter, spojí data ze všech analýz do jedné matice a dohledává píky, které neodpovídají přesně původně zadaným parametrům. Program provádí automatickou integraci a odečtení výšky píku pro dané m/z a retenční čas. Plocha nebo výška píku je přímo úměrná koncentraci metabolitu ve vzorku v lineární oblasti křivky (Marchetti a Mignerey 1993; Pluskal et al. 2010).

Kvůli různému naředění vzorků maticí je dobré přistoupit k normalizaci dat. Většinou se provádí normalizace na poměr celková plocha/výška píků, kdy se sečtou hodnoty od všech píků a touto hodnotou se podělí příslušně plochy/intenzity jednotlivých píků. U takto zpracovaných dat se dají porovnávat průměrné relativní intenzity mezi skupinami. Detektor není stejně citlivý ke všem metabolitům, a proto nelze porovnávat metabolity mezi sebou bez přepočtu koncentrací z kalibračních křivek.

Necílená analýza poskytuje velké množství dat, což znesnadňuje efektivní statistické zpracování a formování výsledků včetně jejich interpretace. Statistické přístupy v analýzách metabolomických dat jsou vícerozměrná a jednorozměrná analýza.

Při cílené analýze provedeme manuální nebo automatickou integraci píků. Plochy pod křivkou jsou úměrné koncentraci. Normalizují se na interní standard přidávaný do vzorku při jeho přípravě a z kalibračních křivek je vypočítána absolutní koncentrace. Tyto koncentrace dále použijeme pro další statistické zpracování.

### **Vícerozměrná analýza dat**

Mezi nejoblíbenější vícerozměrné analýzy v lipidomice patří analýza hlavních komponent (Principal component analysis, PCA) a částečná regrese nejmenších čtverců-diskriminační analýza (Partial least squares-discriminant analysis, PLS-DA). Při PCA dochází k neřízené redukci dimenzí, což umožňuje první pohled na vztahy mezi skupinami. Tento způsob je vhodný, především pokud je variace v rámci jedné skupiny menší než mezi skupinami. V opačném případě je nutné přistoupit k PLS-DA, která je technikou řízenou a zohledňuje příslušnost ke skupině pacientů. V případě PLS-DA dochází k řízené redukci dimenzí. Podrobné vysvětlení matematických principů obou metod přesahuje rámec této disertační práce. Výsledky této analýzy se často prezentují v grafické formě elips s body pro jednotlivé vzorky. Plochy elips obvykle reprezentují 95% spolehlivost výskytu dat v dané oblasti za předpokladu normálního rozložení dat. Čím více se plochy elips vzorků z různých skupin překrývají, tím méně se skupiny mezi sebou liší. V jednotlivých score plotech, jak se toto grafické znázornění nazývá, najdeme hodnotu skóre vypovídajícího o míře rozdílnosti mezi skupinami. Model PLS-DA je nutné podrobit validaci pro ověření, zda variabilita v rámci skupiny významně nepřispěla k zvýšeným hodnotám skóre (Worley a Powers 2013).

Nejprve se provádí křížová validace, aby se odhalila prediktivní schopnost modelu. Jedním parametrem je hodnota Q<sup>2</sup>, která poskytuje kvalitativní měřítko konzistence mezi předpokládanými a původními daty. Dalšími výstupy této analýzy jsou R<sup>2</sup> a správnost. Teoretické maximum pro všechny tři veličiny je 1 (Xua a Liang 2001).

### **Jednorozměrná analýza dat**

Jednorozměrné statistické metody používané v metabolomice mohou být t-test nebo Wilcoxonův test. Výběr testu závisí na normalitě rozložení dat. Pro ověření normality rozložení dat je třeba provést vhodný test, např. Jarque–Bera test. Test určí, zda jsou data odlišná od normálního rozdělení. Normálně rozdělená data jsou pak posuzována pomocí t-testu a nenormálně rozdělená data pomocí Wilcoxonova testu.

### 2.6.2.7 Identifikace lipidů při necílené lipidomické analýze

V necílené lipidomice jsou identifikovány pouze metabolity, jejichž intenzita je signifikantně rozdílná mezi skupinami, tzn. neprovádí se identifikace všech hmot ve spektrech, ale pouze signifikantně změřených. Identifikace lipidů pomocí MS probíhá na základě změřených poměrů přesné  $m/z$ , retenčního času, specifických fragmentů a vzoru izotopové obálky molekuly.

Platforma MS vhodná pro necílenou analýzu musí dosahovat vysokých hodnot rozlišení a schopnosti určení přesné hmoty neboli  $m/z$ . K identifikaci lipidů je nutné stanovení přesné hmoty s přesností pod 10 ppm. Hodnota  $m/z$  se porovnává s databázemi, teoreticky vypočítanými přesnými hmotami a případně se standardem. Databáze vhodné pro identifikaci lipidů jsou LIPID MAPS<sup>®</sup> Structure Database (<https://www.lipidmaps.org/data/structure/index.php>) a The Human Metabolome Database (<https://hmdb.ca/>). Při výpočtu přesné hmoty nebo při hledání metabolitu v databázi musíme zohlednit, že lipid se může vyskytovat i ve formě aduktových iontů typu  $[M+Na]^+$ ,  $[M+H]^+$ ,  $[M+NH_4]^+$ ,  $[M+K]^+$  v pozitivním ionizačním modu nebo  $[M-H]^-$ ,  $[M-COO]^-$  v negativním ionizačním modu.

S výhodou se pro identifikaci také využívá charakteristická retence lipidů na chromatografických kolonách. Pomocí směsi standardů lze odvodit retenci podle příslušnosti k lipidové třídě, nasycenosti nebo délce řetězce FA. Hodnotu je také vhodné ověřit s příslušným standardem. Kvůli vysoké ceně standardů a jejich obtížné dostupnosti se toto vždy neprovádí.

Charakteristické fragmenty molekul lipidů jsou dalším parametrem nutným pro identifikaci. Toto lze provést na platformách umožňujících měření kolizních spekter. V kolizní cele MS dochází ke srážce kolizního plynu s iontem. Vazby v molekule se rozštěpí a vznikají fragmenty, jejichž  $m/z$  můžeme změřit pomocí MS. Jako kolizní plyn se používají  $N_2$  nebo Ar. Pro identifikaci je vhodné mít alespoň dva fragmentové píky, které vznikly charakteristickou ztrátou části molekuly. Pro identifikaci se obvykle nepoužívají fragmenty vzniklé při ztrátě vody nebo  $OH^-$ , které jsou velmi časté. Molekuly o nízkých hmotách však často neposkytují dostatek fragmentů v měřitelném rozmezí do 100  $m/z$  či dostatečné intenzitě, proto je jejich identifikace obtížná.

Dalším identifikačním parametrem je izotopový vzor, který je charakteristický pro každý přirozeně se vyskytující prvek v přírodě. U komplexních molekul, jako jsou lipidy, je izotopový vzor pro danou molekulu odvozen ze zastoupení prvků a porovnán s naměřenou hodnotou pomocí softwarů vhodných pro lipidomickou analýzu.

V cílené lipidomice se provádí před analýzou vzorků měření standardů metabolitů, které chceme měřit. Tímto přístupem tedy měříme pouze předem vybrané metabolity. Omezujeme si tím množství hodnocených metabolitů, ale dosahujeme vyšší citlivosti nejméně o jeden řád proti necílenému přístupu.

#### *2.6.2.8 Optimalizace metod pro necílenou analýzu*

Komplexní analýza, kterou poskytuje necílená lipidomika, vyžaduje přesnou kontrolu nad preanalytickou fází, analýzou i zpracováním dat. U celého procesu se hodnotí především opakovatelnost a reprodukovatelnost. Při postupech optimalizace metody se využívají dostupné standardy metabolitů a testují se jednotlivé kroky analytického postupu, například výtěžnost extrakce. Účinnost lipidové extrakce lze ověřit přidáním interního standardu na začátku extrakce a porovnat jeho intenzitu s přidáním až po extrakci. Účinnost extrakce lze samozřejmě měnit volbou extrakčních médií, ale i optimalizací pH a teploty. Bohužel nedodržení optimálního rozmezí pH může vést při extrakci lipidů k porušení esterové vazby a hydrolýze. Snížení teploty může napomoci zabránění degradaci vlivem pH, ale vede také k snížení účinnosti extrakce (Pati et al. 2016). Opakovatelnost a reprodukovatelnost extrakce lze otestovat opakovanou extrakcí směsného vzorku a porovnáním výsledků. Nejprve je však nutné ověřit opakovatelnost samotného měření, a to buď opakovaným nástřikem jednoho extraktu, nebo opakovaným nástřikem směsi standardů.

Stabilitu systému ověřujeme v necílené metabolomice opakovaným nástřikem kontrolního vzorku (quality control, QC). Tyto vzorky si připravíme smísením alikvoty od každého vzorku ze všech skupin. Vzorky QC musí být nástřikovány rovnoměrně v průběhu celé sekvence a musí být vyhodnoceny společně se všemi ostatními vzorky. Tímto ověříme nejen stabilitu vzorku, ale také zda nedocházelo ke kontaminaci systému (Hyötyläinen a Orešič 2015).

U necílené lipidomiky dopředu neznáme stabilitu našich analytů, proto je nutné se vzorkem zacházet co nejšetrněji. Není možná analýza opakovaně rozmraženého vzorku a vzorek nesmí být dlouho při přípravě a analýze při pokojové teplotě. Standardizované postupy pro lipidomiku doporučují nepřekročit uchovávání vzorku déle než 8 hodin při teplotě 2-8 °C. Stabilita v autosampleru při chlazení na 4 °C se udává maximálně po dobu 24 hodin. Dlouhodobé uchovávání vzorku je nutné při -80 °C.

Při necílené analýze je také nutné dodržet dostatečný počet vzorků na skupinu, aby následná statistická analýza měla dostatečnou sílu pro použité testy.

Necílená lipidomika poskytuje velké množství dat. Tato data je nutné roztřídit a odfiltrovat signál od šumu, metabolity se stejným retenčním časem a m/z přiřadit k sobě napříč všemi vzorky. Dále je nutné z dat odstranit signály pocházející z izotopických interferencí a vzniklé z aduktů. K tomuto účelu slouží v lipidomice softwary MetAlign (Lommen 2009), MZmine (Pluskal et al. 2010), XCMS (C. A. Smith et al. 2006) a SpectConnect (Styczynski et al. 2007).

#### *2.6.2.9 Identifikace při cílené lipidomice*

Hmotnostní spektrometr při této aplikaci pracuje v módu monitorující jeden přechod z molekulárního iontu na fragment (single reaction monitoring, SRM) nebo v módu monitorující více přechodů z molekulárního iontu na fragment (multiple reaction monitoring, MRM). Nedochozí ke skenování celého spektra iontů. Pro optimalizaci podmínek měření je vždy potřeba standard daného metabolitu. Metodu lze zavést na omezené množství přechodů.

Před samotnou analýzou vzorků provedeme optimalizaci podmínek měření SRM nebo MRM přechodů na standardech. Změříme, jaký je mateřský iont s nejvyšší intenzitou, kolizní energií pro vznik jednotlivých fragmentů a napětí na čočkách, které je vhodné pro vstup těchto iontů. Pro optimální separaci metabolitů je vhodné optimalizovat HPLC gradient. Dále změříme retenční čas, abychom mohli analýzu rozdělit na segmenty a nastavit parametry pro tento časový úsek. Součástí optimalizace analýzy je měření kalibračních křivek, které nám umožní stanovení absolutního množství metabolitu ve vzorku. Následuje optimalizace přípravy

vzorku, opakovatelnost a reprodukovatelnost analýzy, případně stanovení limitu detekce či stanovitelnosti, výtěžnost a matriční efekty.

### 2.6.3 Lipidomika při studiu poruch metabolismu

Vzhledem k tomu, že lipidy se vyskytují v nejrůznějších biologických maticích, našla lipidomika své uplatnění ve studiu řady metabolických onemocnění, jako je DM2T, obezita, kardiovaskulární onemocnění, vysoký krevní tlak a mnoho dalších, které jsou spojovány s poruchou jedné nebo i více metabolických drah.

#### 2.6.3.1 Změny lipidového spektra pacientů s kardiovaskulárním onemocněním

Kardiovaskulární onemocnění a hypertenze jsou spojovány se změnami v zastoupení neutrálních lipidů, sfingolipidů i fosfolipidů v séru a/nebo plazmě. U těchto pacientů byly pozorovány zvýšené koncentrace TAG a některých DAG. Fosfolipidy u této skupiny pacientů vykazovaly snížené hladiny PC s 18 atomy uhlíku a naopak zvýšené hladiny PC s FA 20:4. Dále se vyskytovaly snížené hladiny SM konkrétně SM(d18:1/16:0), SM(d18:1/22:0) a SM(d18:1/23:0) (Djekic et al. 2016). Pomocí lipidomické a proteomické analýzy bylo na modelech potkanů s ICHS zjištěno postižení mitochondrií a dýchacího řetězce v myokardu (J. Wu et al. 2019). Snížení hladiny membránových lipidů vedlo ke změně fluidity membrány a propustnosti iontových kanálů pro Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup> ionty. Jak bylo dříve popsáno, důležitou roli při vzniku ICHS hraje endoteliální dysfunkce, v jejíž patogenezi hrají nespornou roli volné FA, přičemž za rozvoj ICHS jsou nejvíce zodpovědné SFA, zatímco nenasycené FA spíše brání vzniku aterosklerózy. Receptory citlivé na FA jsou guaninového typu a jsou navázané s G-proteinem (Ghosh et al. 2017). S ICHS je nejčastěji asociována kyselina palmitová (16:0). Nedávné výzkumy prokázaly souvislost mezi 16:0 a stárnutím srdečních fibroblastů, které probíhá prostřednictvím aktivace TLR 4. Dále 16:0 zvyšuje produkci reaktivních forem kyslíku v mitochondriích a způsobuje mitochondriální dysfunkci. Další studie prokázaly vliv 16:0 na apoptózu buněk hladké svaloviny přes aktivaci TLR 4 (Ghosh et al. 2017).

V tukové tkáni jsou patrné rozdíly ve složení lipidů v souvislosti s umístěním i typem tkáně. Dominantní lipidovou třídou ve všech typech tukové tkáně jsou TAG. Jejich dominantní postavení v tukové tkáni se nezmění ani vlivem výživy nebo vysokotukové stravy. Jedná se o 97 % - 99 % z celkového počtu identifikovaných molekul lipidů. V bílé tukové tkáni jsou druhou nejvíce zastoupenou lipidovou třídou DAG. V hnědé tukové tkáni je obsah DAG srovnatelný s obsahem PC a PE i s obsahem dalších lipidových tříd, jako jsou PI, kardiolipiny, LPC nebo PG, které se v bílé tukové tkáni nevyskytují v množstvích nad limitem detekce. Zajímavé je, že pokud jsou zvířata na vysokotukové dietě, molekuly TAG obsahují více nenasycených mastných kyselin s delším řetězcem (Grzybek et al. 2019).

#### *2.6.3.2 Lipidomické změny u diabetes mellitus 2. typu*

Zvýšené hladiny neutrálních lipidů, jako jsou TAG a estery cholesterolu, jsou často spojovány s DM2T. Tyto trendy byly pozorovány jak u lidí, tak na zvířecích modelech. Lipidy obsahující nižší počet dvojných vazeb nebo nasycené FA přispívaly k rozvoji DM2T. Naopak mastné kyseliny s dlouhým řetězcem a více dvojnými vazbami by mohly mít souvislost s nižším rizikem DM2T. Další markery DM2T byly především fosfolipidy, a to sice zvýšené zastoupení LysoPC(18:0), LysoPC(18:2) a LysoPC(20:4). V molekulách PC, obsahujících dvě mastné kyseliny, trend změny závisel na vlastnostech FA. Pro další třídy fosfolipidů je u pacientů s DM2T charakteristické stoupající zastoupení PE a klesající obsah PI. Uvedené změny se týkají především plazmy a séra (Wu, Shon a Liu 2014; Zhang et al. 2020). U obezity a DM2T byla popsána také vysoká hladina volných FA (FFA) v plazmě. Mastné kyseliny jsou za fyziologického stavu podstatným zdrojem energie a jejich hladina se zvyšuje především v období hladovění. Zvýšená hladina FFA u obezity je způsobena především velkou hmotností tukové tkáně. Vysoká hladina FFA inhibuje antilipolytickou funkci inzulínu, což vede k dalšímu zvýšení hladiny FFA a rozvoji inzulínové rezistence (Ghosh et al. 2017).

### 3 Hypotéza a cíle práce

Endokrinní funkce tukové tkáně se významně liší v závislosti na jejím umístění. Z toho důvodu lze předpokládat, že i složení lipidů může být rozdílné a může mít vliv na funkci a mechanismus působení tukové tkáně, hlavně při některých patologických stavech, jako např. obezitou. Obezita je často asociována s některými metabolickými chorobami a zvyšuje riziko kardiovaskulární morbidity a mortality. Z tohoto důvodu jsem předpokládala, že analýza epikardiální tukové tkáně může pomoci objasnit patogenezi ischemické choroby srdeční a přidruženého diabetes mellitus 2. typu.

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).

Specifickými cíli práce bylo:

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



## 4 Metodika studie

Disertační práce je tematicky členěná na dvě části.

1. Optimalizace HPLC-MS metody stanovení lipidů v tukové tkáni
2. Využití zavedené lipidomické metody HPLC-MS v klinické praxi.

### 4.1 Chemikálie a přístroje

#### **Chemikálie**

Směs standardů lipidů (SPLASH® Lipidomix® Mass Spec Standard) od firmy Avanti Polar Lipids (Alabama, USA) obsahovala následujících 14 sloučenin (výrobce neuvádí pozici FA podle sn- značení):

- PC(15:0,18:1n-9(d7))
- PE(15:0,18:1n-9(d7))
- PS(15:0,18:1n-9(d7))
- PG(15:0,18:1n-9(d7))
- PI(15:0,18:1n-9(d7))
- PA(15:0,18:1n-9(d7))
- LysoPC(18:1n-9(d7))
- LysoPE(18:1n-9(d7))
- Cholesteryl oleát (d7)
- MAG(18:1n-9(d7))
- DAG(15:0,18:1n-9(d7))
- TAG(15:0,18:1n-9(d7),15:0)
- SM(18:1n-9(d9))
- Cholesterol (d7)

Chemikálie, jako heptan, dietyléter (obojí HPLC čistoty), ledová kyselina octová byly od firmy Chromservis, spol. s r. o. (Praha, Česká Republika), propan-2-ol, acetonitril, metanol, dichlormetan, hexan a voda (vše LC-MS čistoty) byly od firmy VWR International France (Fonteney-Sous-Bois, Francie). Butylhydroxytoluen (BHT, 2,6-Di-tert-butyl-4-methylphenol, 2,6-Di-tert-butyl-p-cresol) byl od firmy Sigma - Aldrich spol. s r. o. (Praha, Česká Republika), silikagel 60 PF<sub>254 + 366</sub> byl od firmy Merck spol. s r. o. (Praha, Česká Republika).

## Přístroje

Vysokoučinný kapalinový chromatograf s hmotnostním spektrometrickým detektorem (HPLC-MS) Agilent 1200 LC, (Agilent Technologies, Kalifornie, USA) s kolonou Accucore C30 (150x2.1 mm, 2,6 µm, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) a micrOTOF-Q III (Bruker Daltonics, USA).

## Drobné laboratorní přístroje a další pomůcky

K homogenizaci vzorků byl použit tkáňový homogenizátor IKA®-Werke GmbH & Co. KG (Staufen, Německo). Dále byly použity pipety, mikrostříkačky Hamilton a třepačka.

## 4.2 Soubor pacientů

Do studie byli zařazeni pacienti, kteří podstoupili kardiochirurgickou operaci (implementace štěpu koronární tepny a/nebo operace srdeční chlopně) na Klinice anesteziologie, resuscitace a intenzivní medicíny 1. LF UK a Všeobecné fakultní nemocnice v Praze.

Pro splnění 2. cíle disertační práce bylo zařazeno 10 pacientů. Pro splnění 3. cíle bylo zařazeno dalších 34 pacientů.

V rámci řešení 3. cíle byli pacienti rozděleni do tří skupin podle diagnózy ICHS a DM2T. První skupina zahrnovala 11 pacientů bez ICHS a bez DM2T (ICHS-, T2DM-), druhá skupina 13 pacientů s ICHS a bez DM2T (ICHS+, T2DM-) a třetí skupina 10 pacientů s ICHS a DM2T (ICHS+, T2DM+). Léčba dyslipidémie a hypertenze se neměnila minimálně jeden měsíc před vstupem

do studie. Diabetická léčba byla uskutečněna podáváním metforminu (4 pacienti), inhibitorů dipeptidylpeptidázy-4 (3 pacienti), derivátů sulfonylurey (1 pacient) a syntetického inzulínu Humulin R a Humulin N (2 pacienti). Ze studie byli vyloučeni pacienti mladší 18 let, s chronickým nebo akutním onemocněním ledvin, s maligním typem rakoviny, s poruchou štítné žlázy nebo s akutní infekcí. Předoperační protokol se nelišil mezi pacienty. Kardiologická operace začala mezi 7 a 8 hodinou ranní po celonočním lačnění.

Studie byla schválena Etickou komisí 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Všeobecné fakultní nemocnice v Praze. Studie byla provedena v souladu s pokyny navržené v Helsinské deklaraci Světové zdravotnické organizace z roku 2000. Všichni pacienti podepsali informovaný souhlas.

#### 4.3 Antropometrická měření, základní biochemická vyšetření a odběr biologického materiálu

Před operací byli pacienti vyšetřeni antropometricky. Každému pacientovi byla změřena tělesná výška a hmotnost a byl vypočítán index tělesné hmotnosti [BMI = hmotnost v kg/(výška v m)<sup>2</sup>].

Vzorky krve pro základní biochemickou analýzu byly odebrány před kardiologickou operací před zahájením anestezie. Zkumavka s odebranou krví byla centrifugována 10 min při otáčkách odpovídajících 3000 g. Získané sérum bylo použito na měření základních biochemických parametrů.

Vybrané biochemické parametry jako glykémie nalačno, celkový cholesterol, HDL cholesterol a triacylglyceroly byly stanoveny standardními laboratorními metodami v Ústavu lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky Všeobecné fakultní nemocnice a 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze.

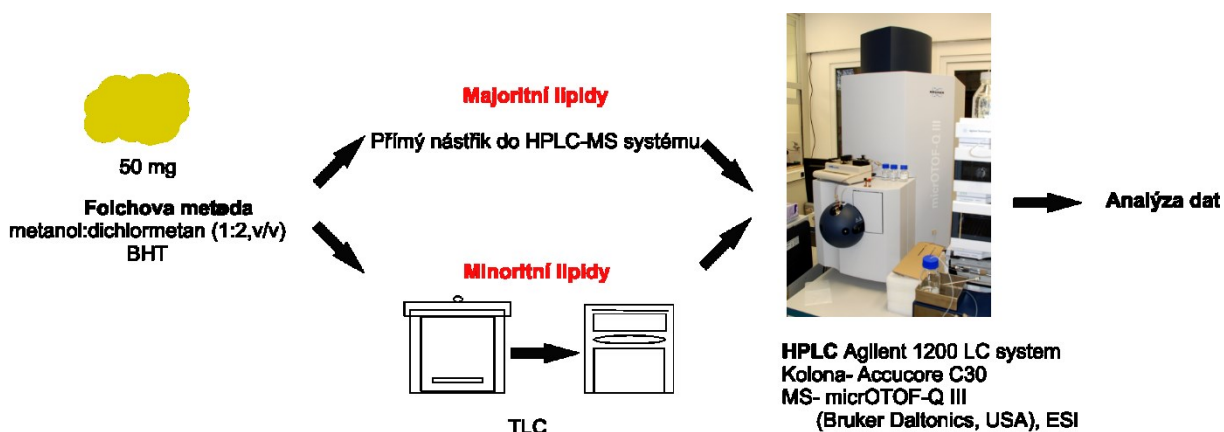
Vzorky STT a ETT (1 - 2 g) pro lipidomickou analýzu byly odebrány pacientům na začátku kardiologické operce po střední sternotomii z přibližně stejného místa. Vzorky tukové tkáně byly uloženy do fosfátového pufru (1 ml, 0,01 M PBS, pH 7,4) nebo RNAlateru (Qiagen GmbH, Hilden, Německo) a skladovány při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

## Optimalizace HPLC metody stanovení lipidů v tukové tkáni

Lipidomickou analýzu tukové tkáně lze rozdělit do několika dílčích kroků

- Preanalytická fáze – homogenizace vzorku, extrakce lipidů z tukové tkáně a jejich případná separace pomocí TLC
- HPLC-MS metoda
- Identifikace píků v chromatogramu
- Analýza dat a jejich statistické zpracování

Schéma experimentu je znázorněno na obrázku 5.



### Obrázek 5: Schéma experimentu

Zkratky: BHT- Butylhydroxytoluen, MS- hmotnostní spektrometr (mass spectrometry), TLC- tenkovrstvá chromatografie (thin layer chromatography), HPLC- vysokoúčinná kapalinová chromatografie (high performance liquid chromatography), ESI- ionizace pomocí elektrospreje (electrospray ionization)

#### 4.4 Preanalytická fáze lipidomické analýzy

Preanalytická fáze spočívá v homogenizaci a extrakci lipidů z tukové tkáně. Lipidový extrakt byl buď přímo podroben analýze (dále v textu označeno jako necílená analýza) nebo rozdělen pomocí TLC na jednotlivé lipidové třídy (následně byly TAG odstraněny a byly analyzovány pouze minoritní lipidy, dále v textu označeno jako analýza minoritních lipidů). Z chromatografické desky byly v prvním kroku odděleny TAG, které tvoří převážnou část lipidů tukové tkáně.

#### 4.4.1 Homogenizace, extrakce a separace pomocí tenkovrstvé chromatografie

##### **Homogenizace a extrakce lipidů z tukové tkáně**

Tuková tkáň byla po rozmrznutí a vyjmutí ze stabilizačního média vysušena proudem dusíku a zvážená. Lipidy byly extrahovány ze vzorku pomocí modifikované metody podle Folche (Cequier-sa et al. 2008; Folch, Lees a Sloane Stanley 1957). 50 mg vysušené tkáně bylo vloženo do extrakční zkumavky se skladovacím médiem (0,01 M PBS, pH 7,4) a byly přidány 2 ml metanolu (LC-MS čistoty), který obsahoval BHT v koncentraci 10 µg/ml. Tkáň byla homogenizována pomocí tkáňového homogenizátoru IKA®-Werke GmbH & Co. KG (Staufen, Německo). Pro naše použití jsme využili homogenizačních nožů, které umožňují provádět homogenizaci přímo ve zkumavce bez ztrát vzorku. Po rozdrčení tkáně byly homogenizační nože opláchnuty 4 ml dichlormetanu a 4 ml směsí metanol : dichlormetan (1:2, v/v). Vzorek byl 1 min vortexován a inkubován na třepačce po dobu 20 min. Po přidání 2,5 ml vody byl vzorek opět protřepán a centrifugován 20 min. při 1500 rpm a 4 °C. Spodní vrstva byla odpipetována a rozdělena do dvou podílů.

První podíl byl použit pro necílenou lipidovou analýzu. Extrakt byl vysušen proudem dusíku a rozpuštěn ve směsi propan-2-ol : acetonitril : voda (1:2:1, v/v/v), 1 min třepán a 1 µl byl použit pro HPLC-MS.

Druhý podíl extraktu tukové tkáně byl použit k stanovení TAG a minoritních lipidů. K oddělení triacylglycerolů od minoritních lipidů byla použita chromatografie na tenké vrstvě (TLC).

##### **Tenkovrstvá chromatografie**

Skleněná deska 20 x 20 cm byla odmaštěna 96% etanolem a byla pokryta silikagelem 60 PF<sub>254+366</sub> suspendovaným ve vodě. Deska s nanesenou vrstvou se nechá vysušit a před samotným TLC se aktivuje 20 min při 110°C. Extrakt tukové tkáně byl odpařen pod proudem dusíku a následně rozpuštěn ve 200 µl směsí metanol : hexan (2:1, v/v) a protřepán po dobu 1 min. Jako mobilní fáze byla použita směs heptan : dietyleter : kyselina octová (80:20:1, v/v/v) s 100 µg/ml BHT. Chromatografická vana s deskou byla nasycena parami mobilní fáze po dobu 1 hod. při pokojové teplotě. Vana byla zakryta alobalem, aby se minimalizovalo vystavení desky

světlu a oxidaci lipidů při jejich separaci. Extrakt tukové tkáně (200  $\mu$ l) byl nanesen na desku a ta vložena do chromatografické vany. Po chromatografii byla deska vyjmuta z vany, vysušena ve vakuu a ve tmě. TAG byly vizualizovány na silikagelové desce pomocí UV světla. Migrace dalších lipidových tříd byla určena pomocí směsi standardů lipidů (SPLASH® Lipidomix® Mass Spec Standard). Oblasti silikagelu, kde byly přítomny ostatní lipidové třídy (minoritní lipidy v tukové tkáni) mimo TAG, byly seškrábnuty a dvakrát extrahovány směsí metanol : hexan (2:1, v/v, 10 ml, 5 ml). Extrakt byl vysušen proudem dusíku a rozpuštěn nejprve v 200  $\mu$ l a poté ve 100  $\mu$ l směsi propanol-2-ol : acetonitril : voda (1:2:1, v/v/v). Každý vzorek byl vždy 30 s vortexován, 30 s sonikován a 10 s vortexován a následně centrifugován 5 min při 15000 rpm. Vzorky byly přemístěny do chromatografické vialky a použity pro cílenou metabolomiku metodou HPLC-MS. Objem nástřiku pro HPLC byl 15  $\mu$ l.

Kromě reálných vzorků byly připraveny slepé vzorky, které podstoupily stejný postup přípravy jako reálné vzorky. Slepé vzorky byly připraveny k oběma postupům preanalytické fáze pro cílenou a necílenou metabolomiku. Vzorky obsahovaly vodu místo reálných extraktů tukové tkáně.

#### 4.5 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie s detekcí pomocí hmotnostního spektrometru

Extrakt lipidů byly separovány vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC) a následně byly detekovány pomocí hmotnostního spektrometru (MS). Vzorky byly extrahovány a měřeny v náhodném pořadí. Každý pátý vzorek v sekvenci analýz byl vzorek obsahující pouze mobilní fázi ve složení odpovídajícím začátku gradientové metody pro kontrolu kontaminace systému. Po HPLC-MS byla provedena analýza dat a identifikace signifikantně změněných lipidových molekul.

##### 4.5.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Separace lipidů byla provedena pomocí HPLC na přístroji Agilent 1200 LC, (Agilent Technologies, Kalifornie, USA) s kolonou Accucore C30 (150 x 2,1 mm, 2,6  $\mu$ m, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) při 40 °C (Narváez-Rivas a Zhang 2016). Mobilní fáze A obsahovala

10 mM mravenčan amonný v 60 % acetonitrilu s 0,1% kyselinou mravenčí. Mobilní fáze B obsahovala 10 mM mravenčan amonný ve směsi acetonitril : propan-2-ol (1:9, v/v) s 0,1% kyselinou mravenčí. Průtok mobilní fáze byl nastaven na 0,24 ml/min. Eluční gradient mobilní fáze B byl následující: 5 min 30 %, 2 min 30 % - 43 %, 1,3 min 43 % - 50 %, 11,3 min 50 % - 70 %, 7 min 100 % a 10 min 30 %.

#### 4.5.2 Detekce pomocí hmotnostního spektrometru

Detekce hmot analytů byla stanovena pomocí MS micrOTOF-Q III detektoru (Bruker Daltonics, USA) s elektrosprejovou ionizací v pozitivním i negativním ionizačním módu v rozmezí 100 - 2000 m/z. Teplota na iontovém zdroji byla nastavena na 270 °C, průtok sušícího plynu byl 9 l/min a průtok rozprašovacího plynu byl 1,4 l/min. Napětí na kapiláře bylo 4500 V. Další parametry byly nastaveny následovně: čas transferu iontů 80  $\mu$ s, uložení před pulzem (prepulse storage) 10  $\mu$ s a čas spektra 1 s. MS detektor byl kalibrován na přesné hmoty pomocí sodíkových klastrů kyseliny mravenčí během přímé infúze před zahájením měření vzorků. Současně byl stejný kalibrační vzorek nastříknut přímo do iontového zdroje v mrtvém čase kolony. Tento pík byl použit k interní kalibraci každého spektra.

#### 4.6 Analýza dat

Zpracování dat proběhlo stejným způsobem pro všechny vzorky. Získaná kalibrovaná spektra byla nejprve konvertována pomocí skriptu v programu DataAnalysis 4.2 (Bruker Daltonics, USA) do .cdf formátu. Dále byla exportována do MZmine 2.23 (Pluskal et al. 2010) a byla vybrána data, která reprezentují jednotlivé lipidy. Parametry pro zpracování dat byly nastaveny následovně: poměr signál/šum 5, práh intenzity 1000, rozmezí hmot 100 - 1500 m/z, rozmezí retenčních časů 1 až 45 min, tolerance v rozdílu retenčních časů byla 0,15 min, tolerance v přesnosti naměřené hmoty byla 10 ppm, minimální šířka píku 0,2 min, maximální šířka píku 1,2 min. Spektra byla dekonvoluována, což je matematický algoritmus, pomocí něhož se zvýší rozlišení spektra (Marchetti a Mignerey 1993; Wojtowicz et al. 2013).

#### 4.7 Identifikace lipidů

Identifikace lipidů byla provedena na základě přesné hmoty, hodnoty mSigma (míra shody s vypočítanou izotopovou obálkou), specifických fragmentů, porovnání retenčních časů se standardy a literaturou (López-Bascón et al. 2018; Narváez-Rivas a Zhang 2016). V softwaru DataAnalysis 4.2 byl použit nástroj SmartFormula pro predikci sumárního vzorce. Sumární vzorec byl vyhledán v nástroji CompoundCrowler pro přiřazení sumárního vzorce k lipidu a získání možných struktur. Z těchto struktur byly pomocí nástroje FragmentationExplorer vypočítány fragmenty odpovídající dané struktuře a fragmenty byly porovnány s naměřenými spektry. Dále byla přesná hmota vyhledána v databázích LIPID MAPS® (<http://www.lipidmaps.org>) a Human Metabolome Database (<http://hmdb.ca>) s maximální tolerancí hmot 10 ppm a přepokládanou tvorbou aduktů ( $[M + H]^+$ ,  $[M + NH_4]^+$ ,  $[M + Na]^+$ ,  $[M - COO]^-$ ,  $[M - H]^-$ ). Intenzity píků byly normalizovány na celkovou intenzitu píků ze spektra.

#### 4.8 Ověření metody

Pro ověření opakovatelnosti HPLC-MS systému byl použit směsný standard lipidů SPLASH® Lipidomix® Mass Spec Standard. 1  $\mu$ l směsi standardů lipidů byl analyzován 5-krát výše uvedeným postupem.

Opakovatelnost extrakce lipidů z tukové tkáně byla ověřena pomocí směsného vzorku tukové tkáně. Po důkladné homogenizaci vzorků tukové tkáně od několika pacientů byl připraven směsný vzorek STT, který byl rozdělen na 5 alikvotů. Každý alikvot byl extrahován výše zmíněným postupem. Správnost TLC metody byla ověřena porovnáním obsahu jednotlivých TAG ve vzorku získaného pomocí necílené lipidomiky a ve vzorku tukové tkáně zpracované TLC před vlastní HPLC-MS.

Postup byl dále hodnocen na základě porovnání zastoupení jednotlivých TAG získaných metodou necílené lipidomiky a po oddělení minoritních lipidů od TAG pomocí TLC. TAG byly odstraněny z desky, vyextrahovány stejným způsobem jako minoritní lipidy a analyzovány. Spektrum TAG bylo porovnáno s výsledky necílené lipidomiky.



Dále byl testován vliv skladovacího média na kvalitu a kvantitu lipidů v tukové tkáni. Vzorek tukové tkáně od jednoho pacienta byl skladován jak v RNAlateru, tak v PBS. Alikvoty těchto vzorků byly extrahovány a porovnány (v RNAlateru  $n = 5$ ; v PBS  $n = 5$ ).

#### 4.9 Statistika

Z naměřených biochemických a antropometrických parametrů byly vypočítány základní statistické charakteristiky jako průměr, medián a směrodatná odchylka. U lipidomické analýzy bylo nejprve ověřeno normální rozložení datového souboru pomocí Jarque-Bera testu. Pokud data neměla normální rozdělení, byl použit neparametrický test. Významnost rozdílů mezi skupinami byla stanovena pomocí Wilcoxonova rank sum testu (neparametrický test). Pomocí Benjamini a Yekutieli testu byla ověřena  $p$  hodnota (Benjamini a Yekutieli 2001). K ověření, zda se skupiny lišily, byla použita metoda dílčích nejmenších čtverců - diskriminační analýzy (PLS-DA). Byla provedena korelační analýza lineární závislosti mezi antropometrickými a biochemickými parametry a mezi daty lipidomické analýzy. Při normálním rozložení dat byl použit Pearsonův korelační test a pro nenormální rozložení dat byl použit Spearmanův pořadový korelační test. Jednorozměrné a vícerozměrné analýzy byly provedeny pomocí software MATLAB (verze 9.0 R2016a) a MetaboAnalyst 4.0. Hladina statistické významnosti byla určena na  $p < 0,05$ .

## 5 Výsledky

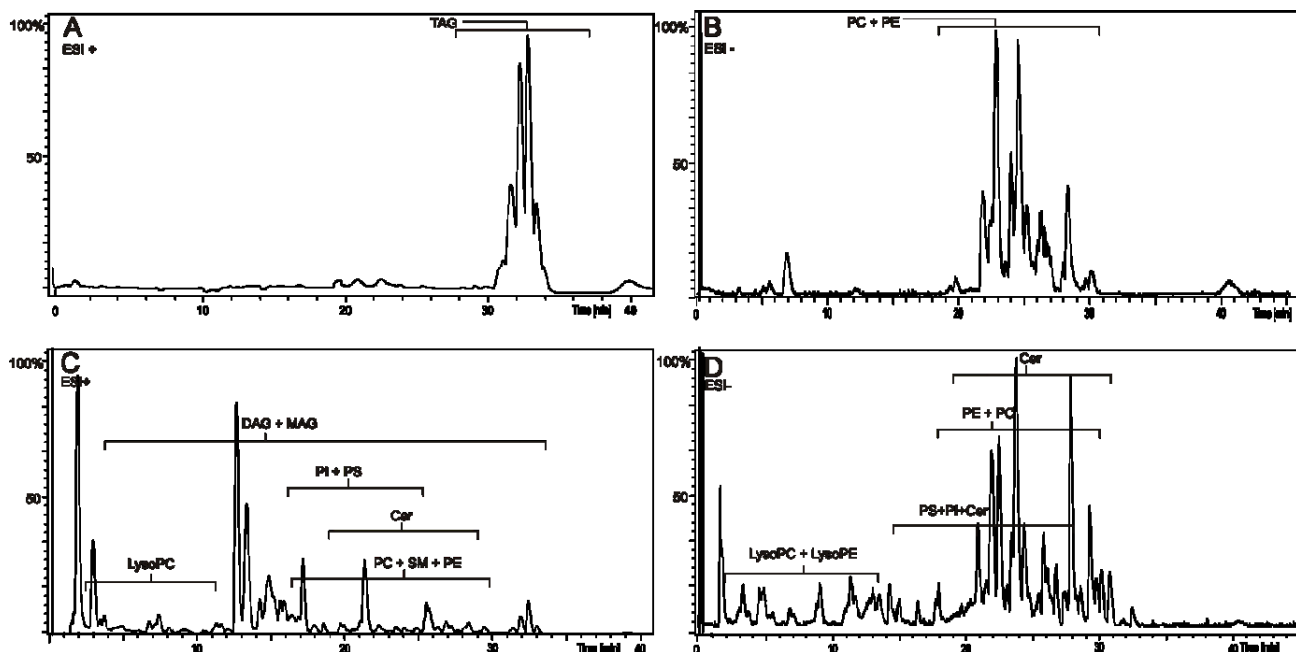
### 5.1 Optimalizace metody

První část této práce se zaměřuje na optimalizaci preanalytické fáze metody stanovení širokého spektra lipidů v tukové tkáni s využitím moderních technik HPLC-MS. Prvním krokem bylo zavedení necílené metabolomiky, resp. lipidomiky. Vzhledem k tomu, že hlavní složkou tukové tkáně jsou TAG, bylo stanovení ostatních lipidových tříd necílenou lipidomikou obtížně realizovatelné, protože byly přítomny v koncentracích pod limitem detekce této metody. Z toho důvodu byl postup stanovení spektra lipidů rozšířen o separaci TAG od dalších lipidových tříd pomocí TLC. Zařazení toho kroku do preanalytické fáze umožnilo stanovit navíc 37 molekulárních entit lipidů v tukové tkáni k 169 lipidům identifikovaných pomocí necílené lipidomiky. 115 z 206 stanovených lipidů byly TAG. Zbývající lipidy byly z třídy diacylglycerolů (DAG), monoacylglycerolů (MAG), fosfatidylcholinů (PC), fosfatidyletanolaminů (PE), ceramidů (Cer), sfingomyelinů (SM), fosfatidylinositolů (PI) a fosfatidylserinů (PS). Kompletní seznam identifikovaných lipidů je součástí přílohy disertační práce (Příloha 1).

#### 5.1.1 Identifikace lipidů

K identifikaci píku lipidu v chromatogramu byly použity parametry jako retenční čas, poměr přesné hmoty a náboje ( $m/z$ ), izotopový vzor a fragmenty. Parametry identifikace jednotlivých lipidových tříd jsou uvedeny v Tabulce 2.

Typické chromatogramy získané změřením extraktů tukové tkáně ukazuje Obrázek 6. Obrázky 6 A a B znázorňují celkový iontový chromatogram (TIC) získaný necílenou lipidomikou tukové tkáně v pozitivním (A) a negativním (B) ionizačním módu. TIC znázorňuje chromatogram celkového iontového proudu všech  $m/z$  v závislosti na čase. Obrázky 6 C a D ukazují chromatogramy minoritních lipidů po separaci TAG pomocí TLC v pozitivním (C) a negativním (B) módu. Retenční časy byly ověřeny pomocí směsi standardů lipidů (SPLASH® Lipidomix® Mass Spec Standard).



**Obrázek 6: Typické chromatogramy lipidového spektra v tukové tkáni**

A) Celkový iontový chromatogram (TIC) necílené lipidomiky - pozitivní mód; B) TIC necílené lipidomiky - negativní mód; C) TIC lipidového extraktu po odstranění TAG - pozitivní mód; D) TIC lipidového extraktu po odstranění TAG - negativní mód.

Zkratky: TAG - triacylglyceroly, PE - glycerofosfatidyletanolaminy, LysoPC - Lysofosfatidylcholin, PC - glycerofosfatidylcholin, SM - sfingomyeliny, Cer - ceramidy, MAG - monoacylglyceroly, DAG - diacylglyceroly, LysoPE - Lysofosfatidyletanolaminy, PS - glycerofosfatidylseriny, PI – fosfatidylinositoly.

Převzato a upraveno: Tomášová a spol. (Tomášová et al. 2019)

**Tabulka 2: Parametry identifikace lipidové třídy**

Lipidová třída	Retenční čas [min]	Adukty		Fragmenty	
		Pozitivní mód	Negativní mód	Pozitivní mód	Negativní mód
TAG	28-36	$[M+NH_4]^+$ $[M+Na]^+$	-	$[M-FA+NH_4]^+$	-
DAG	18-30	$[M+NH_4]^+$ $[M+Na]^+$	-	$[M-FA+H]^+$	-
MAG	3-15	$[M+H]^+$ $[M+NH_4]^+$ $[M+Na]^+$	-	$[M-FA+H]^+$	-
LysoPC	3-11	$[M+H]^+$	$[M+HCOO]^-$	Ion m/z 184,07 Neutrální ztráta m/z 184,07	$[FA-H]^-$ , $[M-CH_3]^-$
PC	19-29	$[M+H]^+$	$[M-H]^-$ , $[M+HCOO]^-$	Ion m/z 184,07 Neutrální ztráta m/z 184,07	$[FA-H]^-$ , $[M-CH_3]^-$
LysoPE	2-6	$[M+H]^+$	$[M-H]^-$	Neutrální ztráta m/z 141,02	$[FA-H]^-$

<b>PE</b>	20-26	[M+H] <sup>+</sup>	[M-H] <sup>-</sup>	Neutrální ztráta m/z 141,02	[FA-H] <sup>-</sup> , [LysoPE-H] <sup>-</sup>
<b>Cer</b>	16-30	[M+H] <sup>+</sup>	[M+HCOO] <sup>-</sup>	Ion m/z 264,23	[FA-H] <sup>-</sup>
<b>SM</b>	18-28	[M+H] <sup>+</sup>	-	Ion m/z 184,07 Neutrální ztráta m/z 168,07	-
<b>PI</b>	20-23	-	[M-H] <sup>-</sup>	-	Ion m/z 241,01, Ion m/z 264,22 [FA-H] <sup>-</sup>
<b>PS</b>	20-24	[M+H] <sup>+</sup>	[M-H] <sup>-</sup>	-	[FA-H] <sup>-</sup> [M-H-Ser] <sup>-</sup>

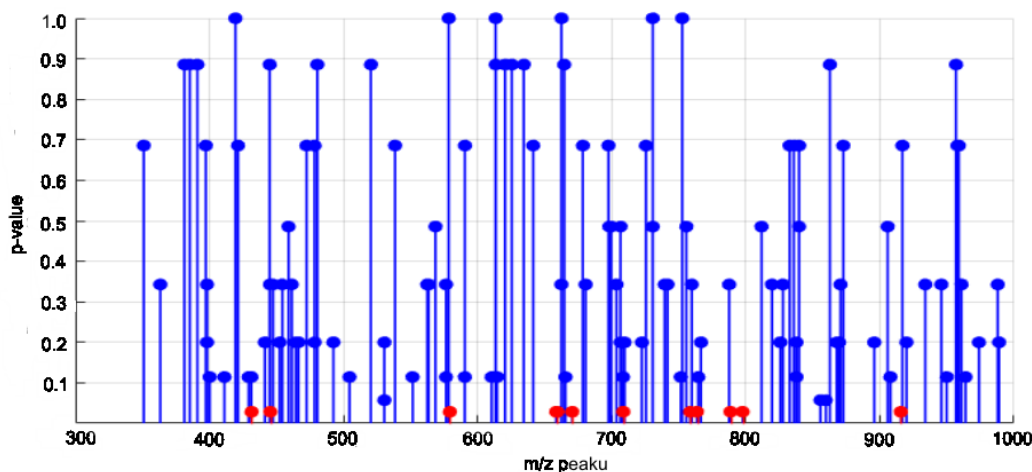
Zkratky: TAG - triacylglyceroly, MAG - monoacylglyceroly, DAG - diacylglyceroly, LysoPC - Lysofosfatidylcholin, PC - glycerofosfatidylcholin, LysoPE - Lysofosfatidyletanolaminy, PE - glycerofosfatidyletanolaminy, Cer - ceramidy, SM - sfingomyeliny, PI - glycerofosfatidylinositoly, PS – glycerofosfatidylseriny, FA - mastná kyselina, Ser - serin

### 5.1.2 Optimalizace metody

Před využitím HPLC-MS chromatografie pro zpracování klinických vzorků bylo nutné ověřit některé analytické parametry. Vzhledem k tomu, že preanalytická fáze přípravy vzorků byla rozšířena o separaci TAG od ostatních lipidových tříd, bylo nutné ověřit přesnost a opakovatelnost extrakční metody. Mimoto tuková tkáň byla skladována v médiu RNAlater (Qiagen GmbH, Hilden, Německo), které se běžně používá pro vzorky, v kterých je potřeba měřit genovou mRNA expresi, a proto bylo nutné ověřit vliv použitého skladovacího média na výsledky HPLC-MS analýzy.

- Vliv skladování vzorků tukové tkáně na výsledky analýzy

Vliv skladovacího media RNAlater nebo fosfátového pufru byl testován pro analýzu minoritních lipidů. K vyhodnocení byl použit neparametrický Wilcoxonův test na základě testu normality rozložení dat. Bylo zjištěno, že z celkového počtu identifikovaných struktur (n=163) u 11 píků byl prokázán vliv skladovacího media na jejich intenzitu a zbylých 152 metabolitů ovlivněno nebylo. Žádný z výše zmíněných 11 píků nebyl identifikován jako lipid. Obrázek 7 ukazuje vliv skladovacího média na hladiny minoritních lipidů, závislost p hodnoty na m/z.



**Obrázek 7: Efekt skladovacího média na rozdílné zastoupení minoritních lipidů (pozitivní mód)**

Statistické vyhodnocení bylo provedeno pomocí Wilcoxonova rank sum testu. Červené body reprezentují píky změněné signifikantně ( $p < 0,05$ ) a modré body označují lipidy, na které neměl druh skladovacího media vliv ( $p > 0,05$ ).

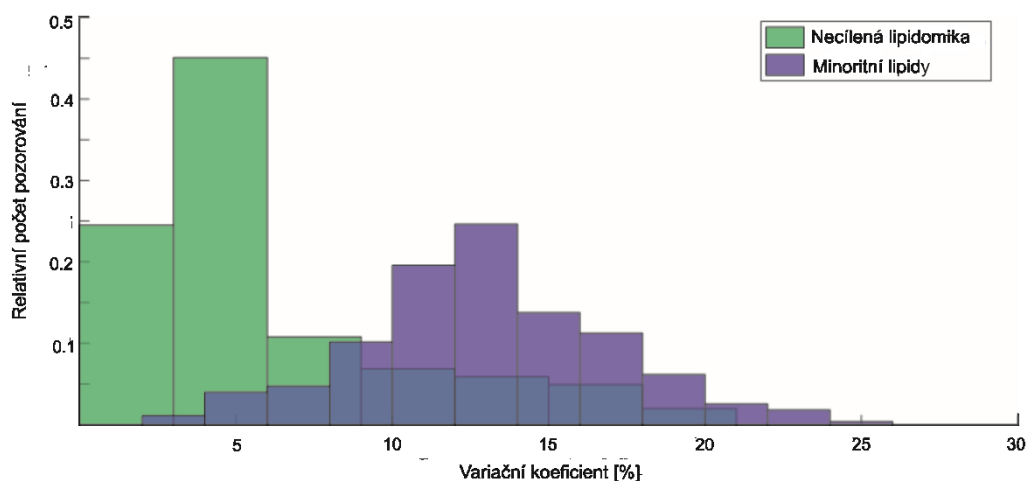
Převzato a upraveno: Tomášová a spol. (Tomášová et al. 2019)

- Opakovatelnost měření HPLC-MS

Opakovatelnost měření HPLC-MS chromatografie byla ověřena pěti analýzami směsi standardů lipidů (SPLASH® Lipidomix® Mass Spec Standard). Byla vyjádřena variačním koeficientem (CV) a pohybovala se v rozmezí od 0 až 3 %. Průměrná hodnota opakovatelnosti byla 1 %.

- Opakovatelnost extrakce lipidů

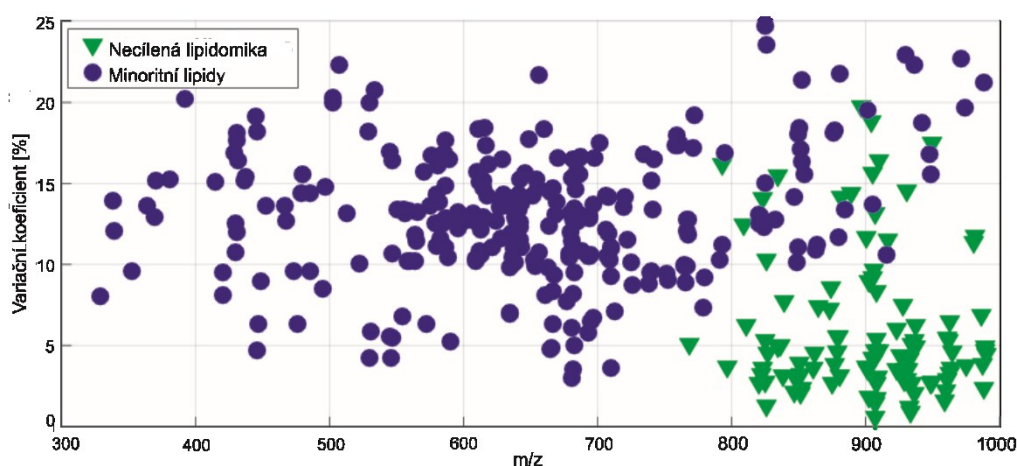
Folchova extrakce je nejčastěji používaný způsob extrakce nepolárních a středně polárních metabolitů z biologického materiálu. Vzhledem k tomu, že lipidy jsou nepolární nebo středně polární sloučeniny, nebylo nutné tento postup měnit (Cequier-sa et al. 2008; Folch, Lees, a Sloane Stanley 1957). Opakovatelnost extrakce byla vyjádřena pomocí relativní intenzity píků. CV byly u necílené lipidomiky v pozitivním a negativním ionizačním módu v rozmezí 1 až 20 %, medián byl 4,5 %. U vzorků po odstranění TAG (obsahují pouze minoritní lipidy) byly CV v rozmezí 3 až 25 % v pozitivním a negativním módu. Medián v tomto případě dosahuje 12,8 %. Grafické znázornění frekvence výskytu CV je znázorněno na Obrázku 8 a 9.



**Obrázek 8: Frekvence variačních koeficientů**

*Necílená lipidomika- zelený histogram, minoritní lipidy (lipidy po odstranění TAG pomocí TLC)- fialový histogram*

*Převzato a upraveno: Tomášová a spol. (Tomášová et al. 2019)*



**Obrázek 9: Variační koeficienty pro jednotlivé lipidy podle m/z**

*Necílená lipidomika- zelené body, minoritní lipidy (lipidy po odstranění TAG pomocí TLC)- fialové body*

*Převzato a upraveno: Tomášová a spol. (Tomášová et al. 2019)*

- Správnost metody

Správnost metody byla ověřena srovnáním množství TAG stanovených necílenou lipidomikou a po jejich separaci na TLC. Mezi metodami se významně lišilo jen 12 metabolitů ze 138 ( $p$  hodnota  $< 0,05$ ). Žádný z těchto metabolitů nebyl nakonec identifikován jako TAG.

Stupeň shody analýzy s/bez TLC je vyjádřen jako rozdíl mezi průměrem relativní intenzity píků a relativní intenzity píku v procentech. Průměrný stupeň shody byl 19 %, kde 0 % je absolutní shoda.

## 5.2 HPLC-MS analýza vzorků tukové tkáně pacientů s ICHS a T2DM

Druhá část práce se týkala aplikace HPLC-MS metody stanovení lipidového spektra v tukové tkáni v klinických projektech. Metoda byla použita pro zjištění rozdílů lipidového spektra mezi podkožní vs. epikardiální tukovou tkání a vlivu ICHS a DM2T.

- Rozdíly lipidového spektra mezi podkožní a epikardiální tukovou tkání
- Sledování vlivu ICHS a T2DM na profil lipidů v tukové tkáni.

### 5.2.1 Porovnání spektra lipidů v subkutánní a epikardiální tukové tkáni

Jedním z úkolů této práce (cíl 2) bylo zjistit rozdíly ve složení lipidů v STT a ETT u pacientů s ICHS. K tomuto účelu byla vybrána skupina 10 pacientů s ICHS.

#### 5.2.1.1 *Antropometrické a biochemie parametry pacientů*

Antropometrické a biochemické parametry studovaných pacientů jsou uvedeny v Tabulce 3. Pacienti trpěli nadváhou, a měli mírně zvýšenou průměrnou glykémii na lačno. TAG, celkový cholesterol, HDL byly v rozmezí referenčních hodnot uvedených v Databázi laboratorních vyšetření z Všeobecné fakultní nemocnice v Praze (<https://laboratore.vfn.cz/vysetreni/>).

**Tabulka 3: Antropometrické a biochemické parametry pacientů**

Parametr	Medián (25% a 75% kvartil)	Referenční rozmezí
Počet pacientů	10	-
Věk [roky]	64,5 (58,6-68,7)	-
BMI [kg/m <sup>2</sup> ]	26,3 (25,0-30,3)	18,0 – 25,0
Celkový cholesterol [mmol/l]	3,61 (2,98-3,76)	2,9 - 5,2
HDL cholesterol [mmol/l]	1,01 (0,89-1,19)	1,0 - 2,7
TAG [mmol/l]	1,38 (1,00-1,68)	0,5 - 1,7
Glykémie nalačno [mmol/l]	5,55 (5,10-6,38)	3,9 - 5,6

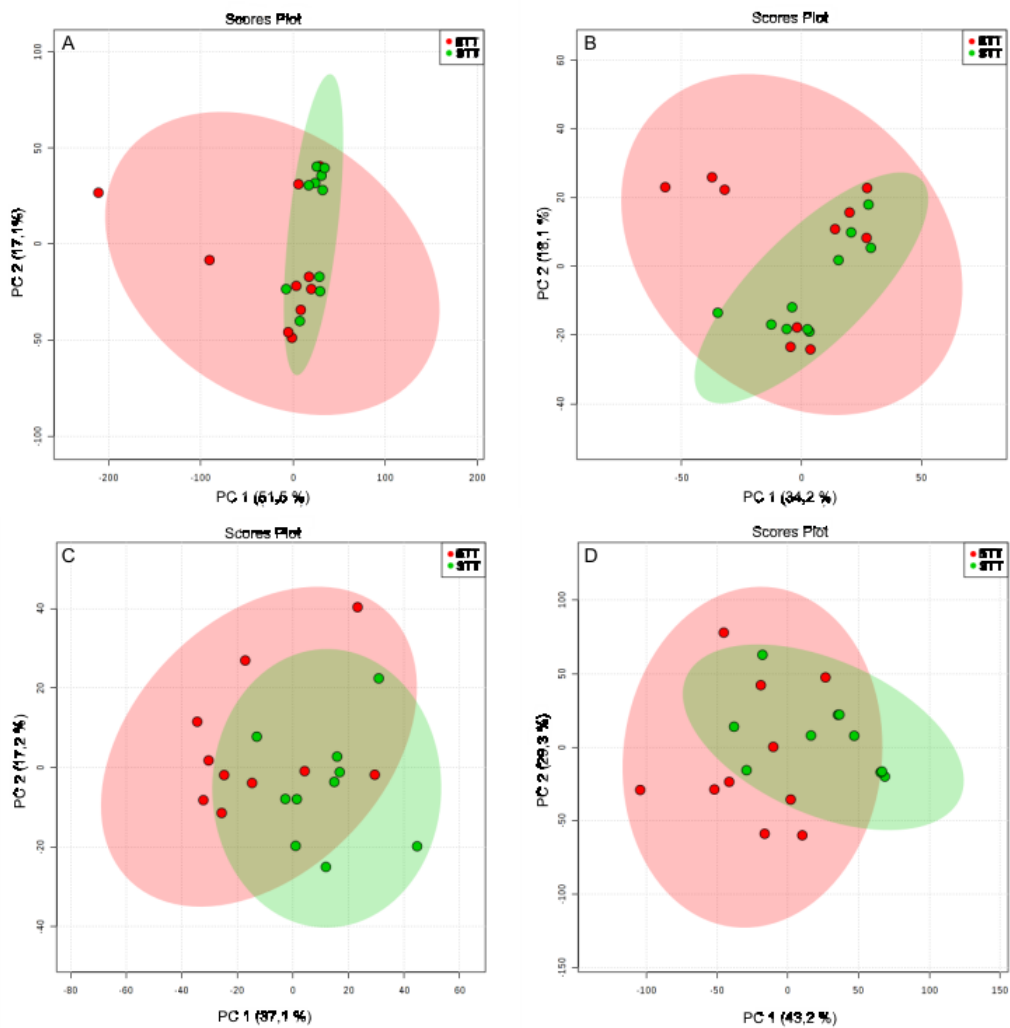
Data jsou uvedena jako medián (25% a 75% kvartil), Referenční hodnoty byly převzaty z databáze laboratorních vyšetření z Všeobecné fakultní nemocnice v Praze (<https://laboratore.vfn.cz/vysetreni/>).

Zkratky: TAG - triacylglyceroly, BMI – body mass index

#### 5.2.1.2 Lipidomika

Vícerozměrná analýza byla použita pro analýzu dat k získání popisu rozdílů mezi STT a ETT. Výstupy z analýzy dat pomocí PCA a PLS-DA jsou uvedeny na Obrázku 10 a 11. Všechny analýzy vysvětlují rozdílnost v prvních dvou komponentách. Podle osy x se data dělí podle první komponenty, osa y znázorňuje příspěvek druhé komponenty. Hodnoty procent na osách udávají, kolik procent variability vysvětluje daná komponenta.

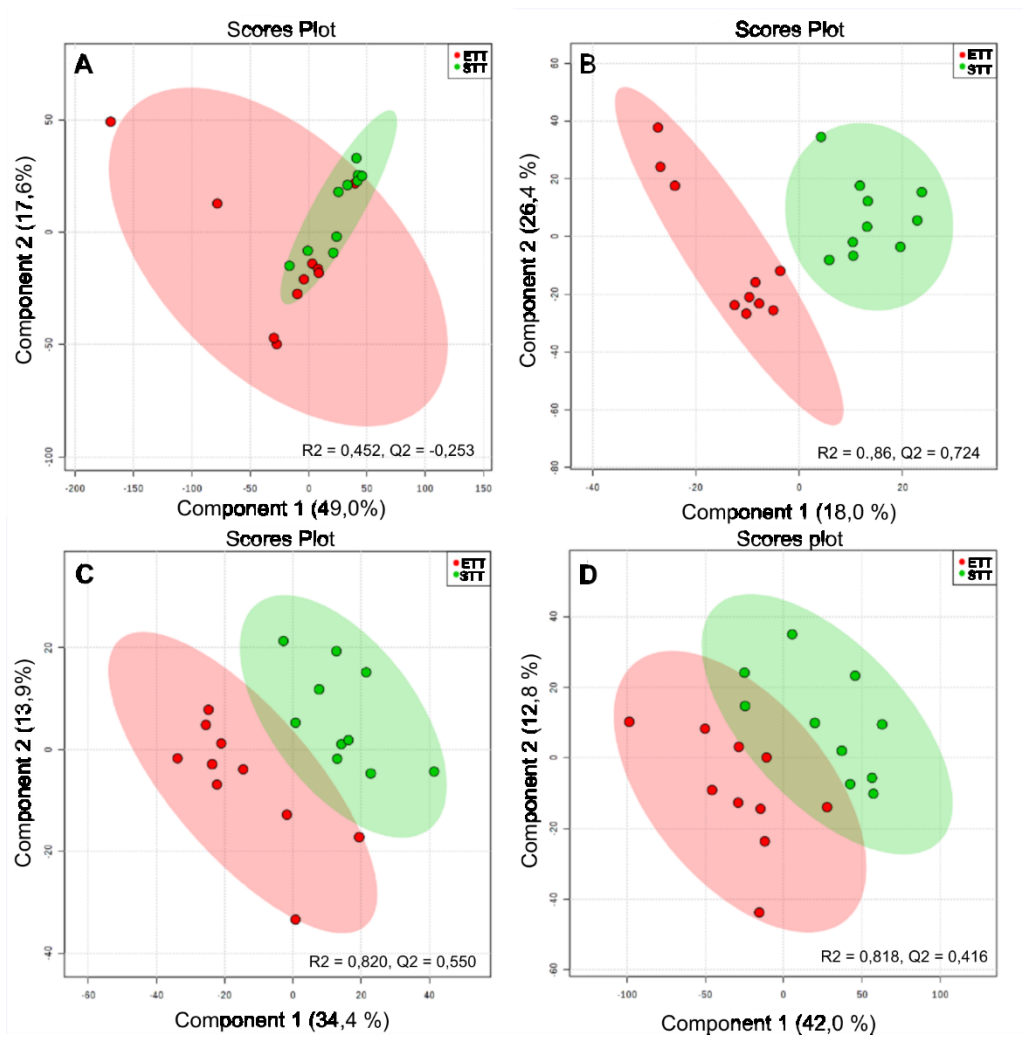




**Obrázek 10: Analýza hlavních komponent (PCA) pro porovnání ETT a STT**

*Analýza hlavních komponent (PCA) pro porovnání ETT a STT: A) necílená lipidomika - pozitivní mód, B) necílená lipidomika - negativní mód, C) minoritní lipidy - pozitivní mód, D) minoritní lipidy - negativní mód. ETT (červené body) a STT (zelené body)*

Převzato a upraveno: Tomášová a spol. (Tomášová et al. 2019)



**Obrázek 11: Analýza dílčích nejmenších čtverců - Diskriminační analýza (PLS-DA) pro porovnání ETT a STT**

Analýza dílčích nejmenších čtverců pro porovnání ETT a STT - Diskriminační Analýza (PLS-DA) pro porovnání ETT a STT: A) necílená lipidomika - pozitivní mód (výsledky křížové validace modelu: počet komponent: 2, přesnost: 0,60, p hodnota permutačního testu (2000 opakování) 0,621), B) necílená lipidomika - negativní mód (výsledky křížové validace modelu: počet komponent: 2, přesnost: 0,95, p hodnota permutačního testu (2000 opakování) 0,102), C) minoritní lipidy - pozitivní mód (výsledky křížové validace modelu: počet komponent: 2, přesnost: 0,95, p hodnota permutačního testu (2000 opakování) 0,428), D) minoritní lipidy - negativní mód (výsledky křížové validace modelu: počet komponent: 3, přesnost: 0,85, p hodnota permutačního testu (2000 opakování) 0,056). ETT (červené body) a STT (zelené body)

Převzato a upraveno: Tomášová a spol. (Tomášová et al. 2019)

Jednorozměrná statistická analýza dat získaných z lipidomických analýz odhalila rozdíly mezi ETT a STT v zastoupení TAG, PC a v některých zástupcích DAG, PI, SM i PE. Souhrnně lze říci, že ETT je obecně bohatší na PC a zároveň obsahuje méně TAG než STT. PI(20:4,18:1) a PE(36:4)

byly v ETT méně obsaženy v porovnání s STT, zatímco SM(34:1) byly obsaženy ve vyšší koncentraci v ETT než v STT. Pro lepší pochopení rozdílu mezi množstvím lipidů v STT a ETT byl vypočítán poměr relativní průměrné intenzity píků jednotlivých metabolitů v ETT/STT (hodnoty > 1 odpovídají zvýšenému množství lipidu v ETT a naopak hodnoty < 1 odpovídají sníženému množství lipidu v ETT). Výsledky jsou uvedeny v Tabulce 4. Pro přehlednost je Tabulka 4 doplněna o hodnoty retenčních časů a m/z poměr pro jednotlivé metabolity lipidů.

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

Data jsou uvedena jako poměr intenzity lipidu v ETT/ STT. Statistická signifikance p hodnota < 0,05 odpovídá neparametrickému testu (Wilcoxonův 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.

## 5.2.2 Vliv ischemické choroby srdeční a diabetes mellitus druhého typu na složení lipidů v tukové tkáni

Cílená a necílená HPLC-MS byla po optimalizaci použita k sledování vlivu onemocnění T2DM a ICHS na lipidový profil v STT a ETT. Do této studie bylo zařazeno celkem 34 pacientů, kteří byli rozděleni celkem do tří skupin podle přítomnosti onemocnění T2DM a ICHS: první skupina pacienti bez ICHS a T2DM (ICHS-,DM2T-), druhá skupina s ICHS a bez T2DM (ICHS+,DM2T- ) a třetí skupina s ICHS a T2DM (ICHS+,DM2T+).

### 5.2.2.1 Antropometrické a biochemické parametry

Antropometrické a biochemické parametry pacientů v této studii jsou vedeny v Tabulce 5. Parametry jako BMI, celkový a HDL cholesterol, celkový TAG a poměr obvodu pas/boky se nelišily mezi skupinami. Zvýšená hladina glukózy nalačno byla pozorována u pacientů s DM2T a ICHS.

**Tabulka 5: Antropometrické a biochemické parametry pacientů**

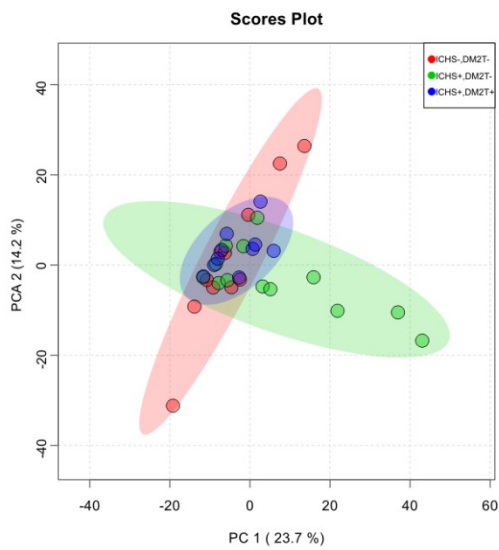
Parametr	ICHS-,DM2T-	ICHS+,DM2T-	ICHS+,DM2T+
Počet pacientů	11	13	10
Pohlaví muž/žena	6/5	11/2	7/3
Věk [roky]	70,1 (59,625-74,3)	61,1 (57,2-68,7)	69,0 (65,4- 73,2)
BMI [kg/m <sup>2</sup> ]	27,3 (23,2-29,3)	26,1 (24,6-30,4)	28,4 (25,5-29,3)
Celkový cholesterol [mmol/l]	4,19 (3,40-4,68)	3,49 (2,94-3,83)	3,69 (3,48-4,17)
HDL cholesterol [mmol/l]	1,21 (0,80-1,47)	0,98 (0,85-1,16)	1,23 (0,92-1,76)
TAG [mmol/l]	1,25 (1,01-1,52)	1,35 (1,03-1,87)	1,22 (0,95-1,59)
Glukóza nalačno [mmol/l]	5,40 (5,00-6,10)	5,72 (5,10-6,45)	7,90 (6,13-9,43)***,+++
Poměr pas/boky	0,95 (0,88-0,98)	0,94 (0,90-1,00)	0,96 (0,92-0,98)

Data jsou uvedena jako medián (25. a 75. percentil). K statistickému vyhodnocení byl použit Wilcoxonův rank-sum test (neparametrický test); \*\*\* p - hodnota < 0,001 vs. ICHS-, DM2T- nebo +++ p - hodnota < 0,001 vs. ICHS+, DM2T-; ICHS-,DM2T-: skupina bez ICHS a bez DM2T, ICHS+, DM2T-: skupina s ICHS a bez DM2T, ICHS+, DM2T+ -skupina s ICHS a s DM2T  
Zkratka: TAG- triacylglyceroly

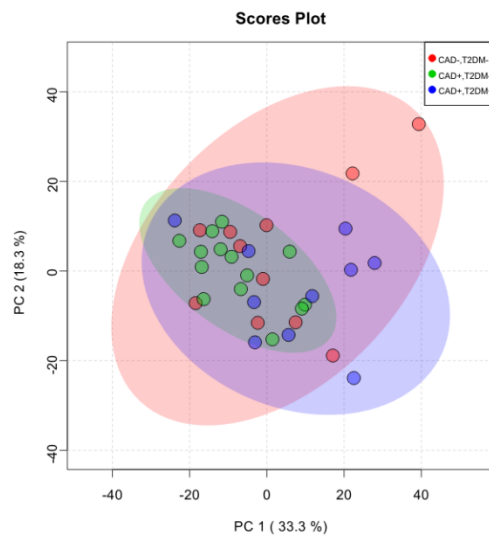
### 5.2.2.2 Lipidomika

K porovnání rozdílů v lipidovém spektru mezi skupinami ICHS-, DM2T-; ICHS+, DM2T-; ICHS+, DM2T+ v pozitivním i negativním módu pro oba způsoby analýzy s/bez TLC byla použita vícerozměrná analýza. Grafické výstupy analýzy hlavních komponent (Principal Component Analysis, PCA) jsou uvedeny na Obrázku 12 pro STT a na Obrázku 13 pro ETT. Z grafů je zřejmé, že v STT nejsou žádné odlehlé vzorky. Naopak v analýze ETT byl vždy jeden vzorek odlehlý v každé studované skupině. Vzhledem k tomu, že tyto vzorky nebyly odlehlé při dalších způsobech měření, byly i dále zahrnuty do analýzy. Kromě metody vyhodnocení PCA byla použita i PLS-DA (Partial least squares-discriminant analysis). Grafy/křivky jsou uvedeny na Obrázku 14 pro STT a Obrázku 15 pro ETT.

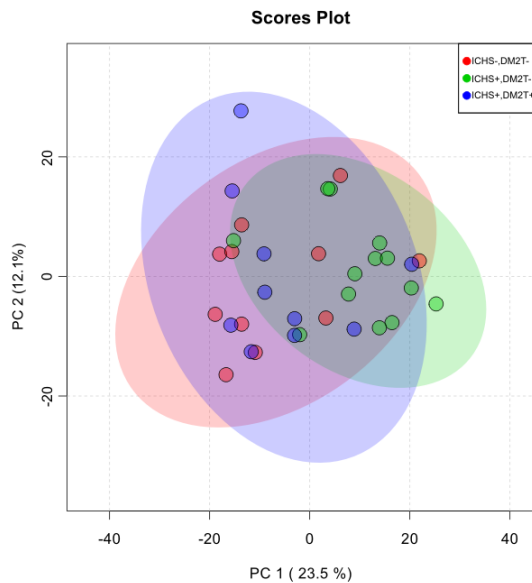
A



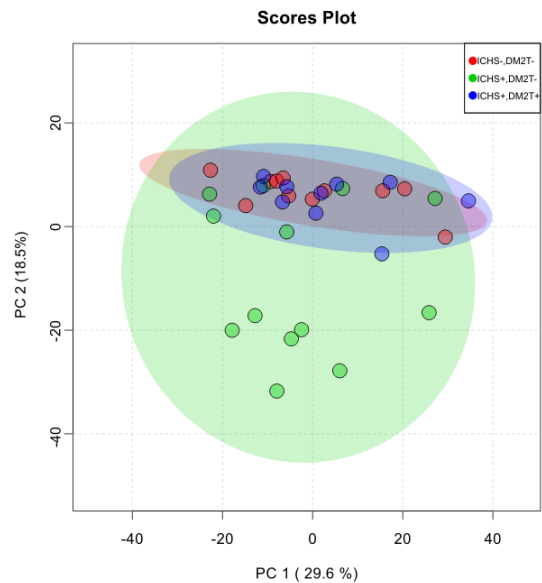
B



C



D



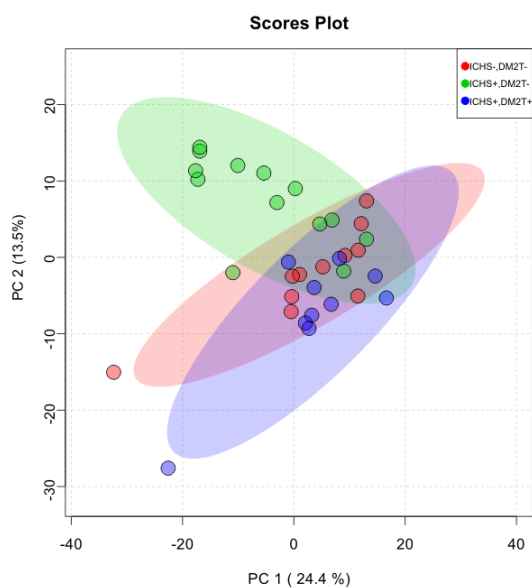
### Obrázek 12: Analýza hlavních komponent (PCA) pro STT

A) necílená lipidomika - pozitivní mód, B) necílená lipidomika - negativní mód, C) minoritní lipidy - pozitivní mód D) minoritní lipidy - negativní mód

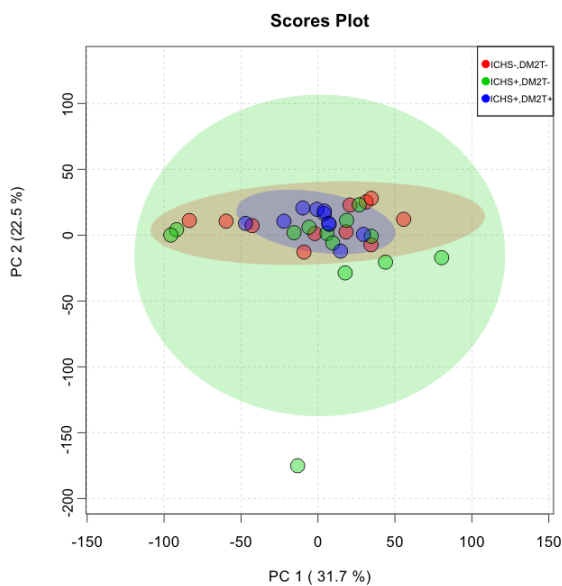
ICHS-,DM2T-: skupina bez ICHS a bez DM2T (červené body), ICHS+,DM2T-: skupina s ICHS a bez DM2T (zelené body), ICHS+,DM2T+ -skupina s ICHS a s DM2T (modré body)

Převzato a upraveno: Tomášová a spol. (Tomášová et al. 2020)

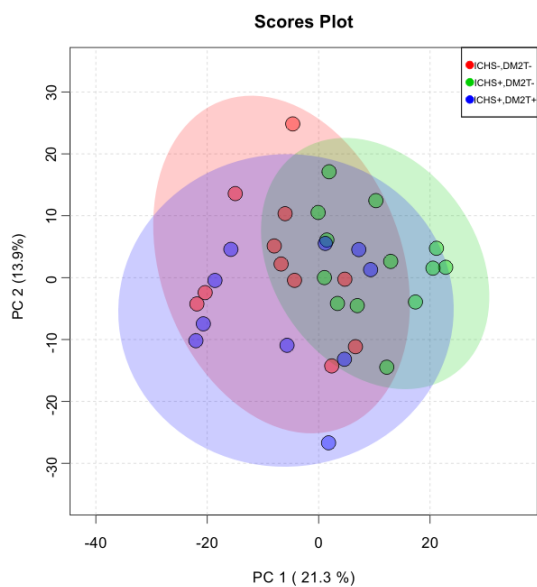
A



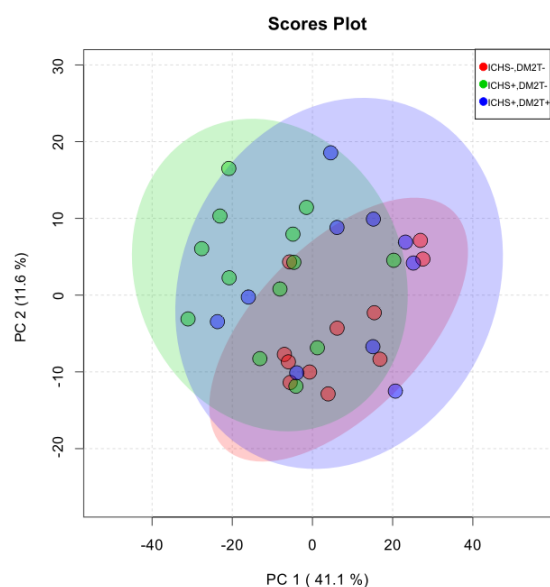
B



C



D

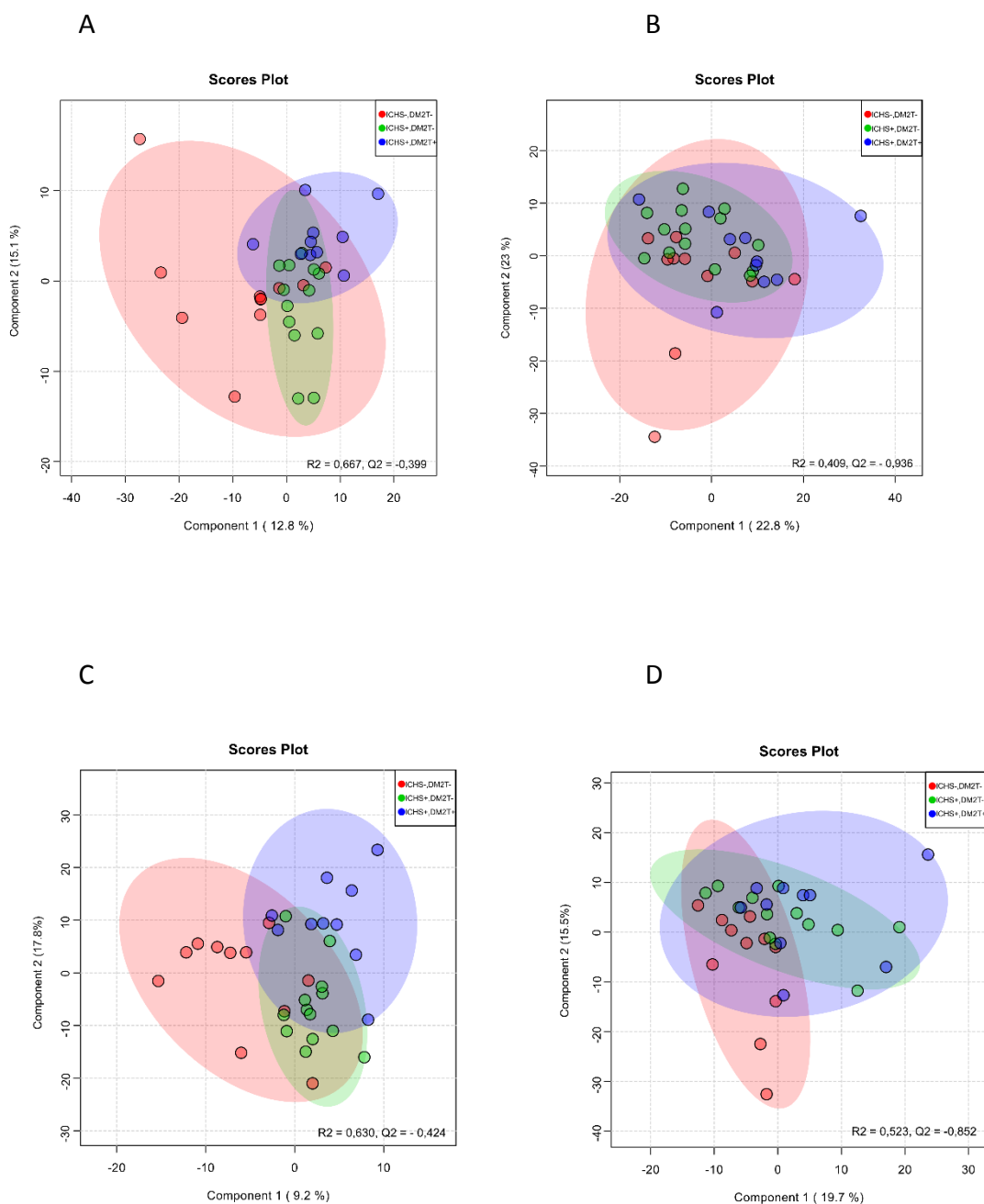


### Obrázek 13: Analýza hlavních komponent (PCA) pro ETT

A) necílená lipidomika - pozitivní mód, B) necílená lipidomika - negativní mód, C) minoritní lipidy - pozitivní mód D) minoritní lipidy - negativní mód

ICHS-, DM2T-: skupina bez ICHS a bez DM2T (červené body), ICHS+, DM2T-: skupina s ICHS a bez DM2T (zelené body), ICHS+, DM2T+ -skupina s ICHS a s DM2T (modré body)

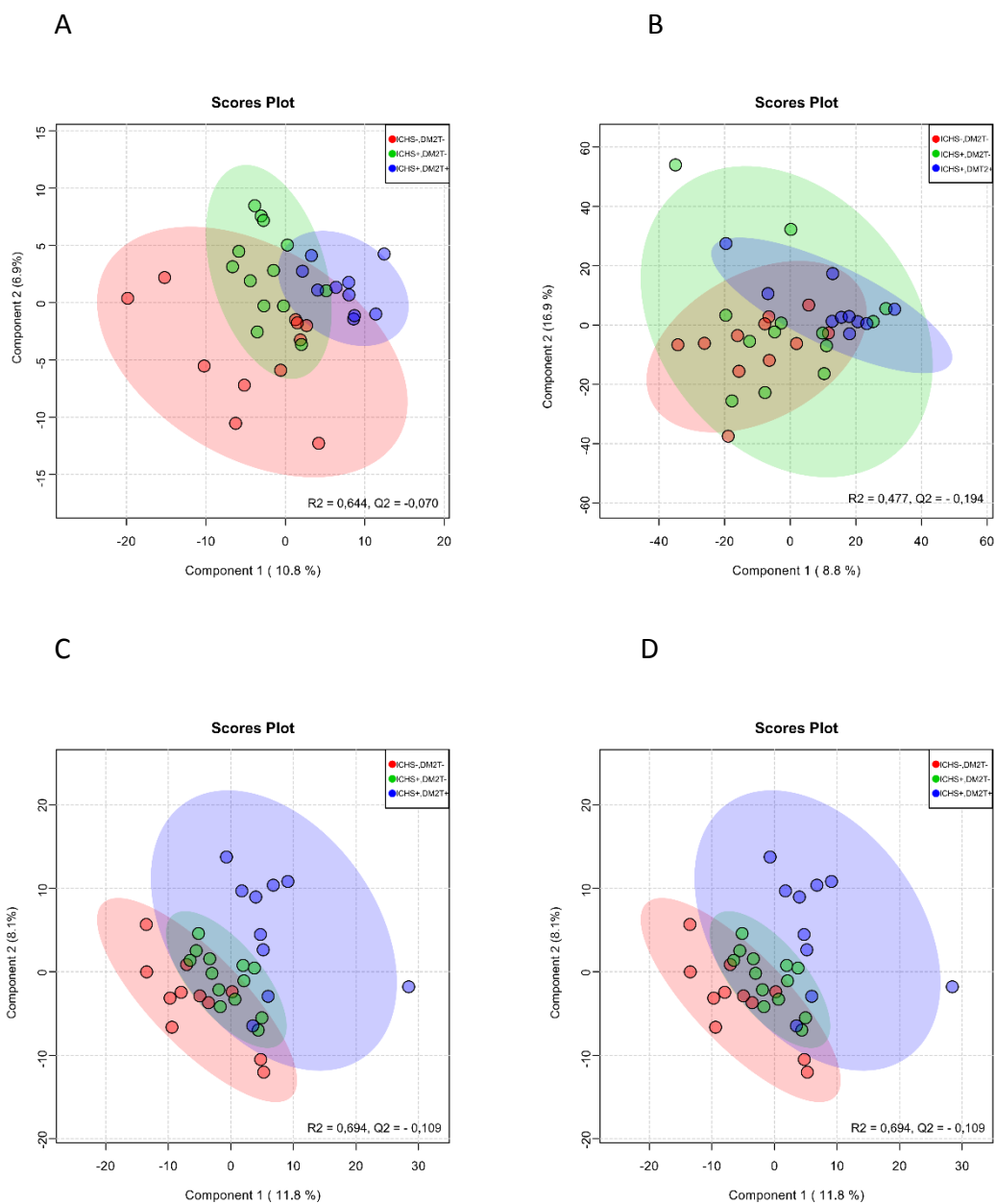
*Převzato a upraveno: Tomášová a spol. (Tomášová et al. 2020)*



### Obrázek 14: PLS-DA pro STT

A) necílená lipidomika - pozitivní mód (výsledky křížové validace modelu: počet komponent: 3, přesnost: 0,62,  $p$  hodnota permutačního testu = 0,283 (2000 opakování), B) necílená lipidomika - negativní mód (výsledky křížové validace modelu: počet komponent: 3, přesnost = 0,57,  $p$  hodnota permutačního testu = 0,104 (2000 opakování)), C) minoritní lipidy - pozitivní mód (výsledky křížové validace: počet komponent 2, přesnost= 0,47,  $p$  hodnota permutačního testu = 0,626 (2000 opakování) D) minoritní lipidy - negativní mód (výsledky křížové validace: počet komponent: 3, přesnost = 0,411,  $p$  hodnota permutačního testu < 0,001 (2000 opakování); ICHS-, DM2T-: skupina bez ICHS a bez DM2T (červené body), ICHS+, DM2T-: skupina s ICHS a bez DM2T (zelené body), ICHS+, DM2T+ -skupina s ICHS a s DM2T (modré body)  
Převzato a upraveno: Tomášová a spol. (Tomášová et al. 2020)





### Obrázek 15: PLS-DA pro ETT

A) necílená lipidomika - pozitivní mód (výsledky křížové validace modelu: počet komponent: 2, přesnost = 0,53,  $p$  hodnota permutačního testu = 0,406 (2000 opakování), B) necílená lipidomika - negativní mód (výsledky křížové validace: počet komponent: 3, přesnost = 0,500,  $p$  hodnota permutačního testu = 0,148 (2000 opakování), C) minoritní lipidy - pozitivní mód (výsledky křížové validace: počet komponent: 2, přesnost = 0,62,  $p$  hodnota permutačního testu = 0,300 (2000 opakování) D) minoritní lipidy - negativní mód (výsledky křížové validace: počet komponent: 3, přesnost = 0,471,  $p$  hodnota permutačního testu = 0,462 (2000 opakování); ICHS-,DM2T-: skupina bez ICHS a bez DM2T (červené body), ICHS+,DM2T-: skupina s ICHS a bez DM2T (zelené body), ICHS+,DM2T+ -skupina s ICHS a s DM2T (modré body)

Převzato a upraveno: Tomášová a spol. (Tomášová et al. 2020)

Vícerozměrná analýza PCA a PLS-DA zaměřující se na porovnání pacientů podle diagnózy ICHS a DM2T ukazuje mírnou tendenci dělení skupin ICHS-,DM2T-; ICHS+,DM2T-; ICHS+,DM2T+.

Vzhledem k tomu, že výsledky z vícerozměrné analýzy nejsou úplně jednoznačné pro interpretaci změn lipidového spektra v tukové tkáni ve vztahu k onemocnění ICHS a T2DM, byla použita jednorozměrná analýza dat, která odhalila řadu významných rozdílů mezi skupinami. Pro lepší interpretaci výsledků byla data metabolitů vyjádřena jako poměr relativní intenzity píků pro skupinu ICHS+, DM2T- vs. ICHS-, DM2T-; ICHS+, DM2T+ vs. ICHS-, DM2T- a ICHS+, DM2T+ vs. ICHS+, DM2T- (hodnoty > 1 odpovídají zvýšenému množství lipidů ve skupině uvedené ve jmenovateli poměru v záhlaví tabulky a naopak hodnoty < 1 odpovídají sníženému množství lipidů ve skupině uvedené ve jmenovateli). Lipidy lišící se signifikantně mezi skupinami jsou uvedeny v Tabulce 6. Identifikované lipidy v tukové tkáni byly rozděleny podle přesné hodnoty molekulové hmotnosti do skupin podle příslušnosti k lipidové třídě.

**Tabulka 6. 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-
	<b>Glycerolipidy</b>					
MAG(16:0)	0,39	1,06	2,73	0,37	3,20	<b>8,64*</b>
DAG(16:0,18:1)	1,39	1,13	0,82	<b>2,48*</b>	2,40	0,97
DAG(18:2,18:2)	0,49	2,01	<b>4,10***</b>	<b>0,29*</b>	1,29	<b>4,52*</b>
TAG(18:1,16:0,14:0)	<b>1,52*</b>	1,02	<b>0,67*</b>	1,03	0,77	0,75
TAG(10:0,14:0,16:0)	1,00	<b>0,56*</b>	0,56	0,77	0,57	0,74
TAG(18:1,16:0,12:0)	1,09	0,57	<b>0,52*</b>	0,70	0,55	0,79
TAG(18:1,16:1,12:0)	1,37	0,78	<b>0,57*</b>	0,84	0,61	0,73
TAG(20:1,18:1,18:2)	<b>1,28*</b>	1,22	0,96	<b>2,22*</b>	<b>2,53*</b>	1,14
TAG(16:1,16:0,15:1)	1,35	0,89	<b>0,66*</b>	0,83	0,89	1,07
TAG(18:1,16:0,15:0)	1,20	0,77	<b>0,65*</b>	0,89	0,88	0,99
TAG(16:1,18:1,15:1)	1,19	0,81	<b>0,68**</b>	1,18	0,98	0,83
TAG(16:0,14:0,18:0)	0,93	<b>0,59*</b>	0,63	0,70	<b>0,47*</b>	0,68
TAG(16:0,18:1,17:0)	<b>1,30**</b>	0,95	<b>0,73*</b>	1,18	0,84	0,71
TAG(17:0,18:0,16:0)	<b>1,31*</b>	0,79	<b>0,61***</b>	1,11	0,95	0,86
TAG(18:1,18:1,17:1)	<b>1,25*</b>	1,01	0,81	0,96	1,00	1,05
<b>Fosfolipidy</b>						
PS(18:0,18:1)	1,04	<b>1,59*</b>	1,53	<b>4,80*</b>	3,23	0,67
LysoPE(20:4)	0,93	<b>2,18*</b>	<b>2,34*</b>	0,75	1,12	<b>1,48*</b>

LysoPE(18:1)	1,23	<b>3,01*</b>	<b>2,44**</b>	0,78	1,54	1,98
LysoPE(18:2)	0,91	2,23	<b>2,46*</b>	0,63	1,14	1,80
LysoPC(16:0)	0,56	1,13	<b>2,03*</b>	1,17	1,98	1,70
LysoPC(18:1)	1,32	2,07	<b>1,58*</b>	1,46	<b>3,40*</b>	<b>2,32*</b>
LysoPC(18:2)	0,52	1,68	3,22	1,24	<b>2,72*</b>	<b>2,20*</b>
PC(34:0)	0,42	1,39	<b>3,36*</b>	1,10	1,95	1,77
PC(32:0)	0,52	1,94	<b>3,75**</b>	2,40	3,84	1,60
PC(32:1)	0,34	1,77	<b>5,14*</b>	1,83	<b>3,88*</b>	2,12
<b>Sfingolipidy</b>						
Cer(d18:1,22:0)	1,01	1,35	1,33	1,49	<b>2,39*</b>	1,60
SM(d36:1)	0,53	1,74	<b>3,28*</b>	2,62	<b>4,09*</b>	1,56
SM(d40:1)	0,95	2,38	<b>2,50*</b>	1,50	1,91	1,28
SM(d42:2)	0,65	1,78	<b>2,75*</b>	1,97	4,06	2,07

Data jsou vyjádřena jako poměr průměrů 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.

Lipidomická analýza ukázala změny v STT i ETT v souvislosti s přítomností ICHS a DM2T v lipidových třídách monoacylglycerolů (MAG), diacylglycerolů (DAG), triacylglycerolů (TAG), glycerofosfatidylserinů (PS), glycerofosfatidyletanolaminů (PE), glycerofosfatidylcholinů (PC), ceramidů (Cer) a sfingomyelinů (SM). Zjištěné rozdíly byly jak v ETT, tak v STT v souvislosti s DM2T a ICHS, avšak změny v ETT byly častěji (Tabulka 6).

Jak je patrné z Tabulky 6, hlavní rozdíly mezi skupinami byly zaznamenány pro glycerolipidy. Molekuly v této lipidové třídě se lišily v délce uhlíkového řetězce a počtu dvojných vazeb v acylu FA. Většina těchto změn byla způsobena vlivem DM2T u pacientů s ICHS a ETT jako typem tukové tkáně.

Vyšší zastoupení MAG(16:0) bylo zjištěno u pacientů s DM2T a ICHS v porovnání s pacienty s ICHS a bez DM2T, avšak signifikantní rozdíl byl pouze v STT. V odlišně zastoupených molekulách DAG byly přítomny FA 16:0, 18:1 a 18:2. Zastoupení DAG s FA 16:0 a 18:1 bylo signifikantně zvýšené u pacientů s ICHS a bez DM2T ve srovnání se skupinou bez ICHS i DM2T v STT a přítomnost ICHS u pacientů bez DM2T způsobila snížení DAG(18:2,18:2) v obou tkáních.

Přítomnost ICHS u pacientů měla za následek zvýšení hladiny TAG obsahující nasycené FA (14:0, 16:0, 17:0, 18:0) a mononenasyčené FA (18:1 a 17:1) hlavně v ETT u pacientů bez DM2T.

Dále přítomnost onemocnění ICHS způsobila zvýšení TAG s FA 20:1 v obou tukových tkáních. TAG(20:1,18:1,18:2) byl také zvýšen v STT u pacientů s ICHS i DM2T ve srovnání se skupinou bez ICHS a DM2T.

Na druhou stranu TAG s nasycenými FA (10:0, 12:0, 14:0, 15:0, 16:0, 17:0, 18:0) byly sníženy u pacientů s DM2T a ICHS v porovnání s pacienty bez DM2T v ETT. Nejvýraznější změny byly pozorovány v nasycených FA 16:0 a 14:0 a mononenasycených FA 16:1 a 15:1. Osm z dvanácti TAG obsahovalo ve své molekule FA 18:1. Zajímavé je, že molekuly TAG, které obsahovaly ve své molekule FA s lichým počtem uhlíků (15:0, 15:1, 17:0, 17:1), byly signifikantně sníženy u pacientů s DM2T a s ICHS. Dále TAG s 17:0 a 17:1 FA byly signifikantně zvýšeny ve skupině ICHS a bez DM2T. Tyto změny nebyly pozorovány v STT.

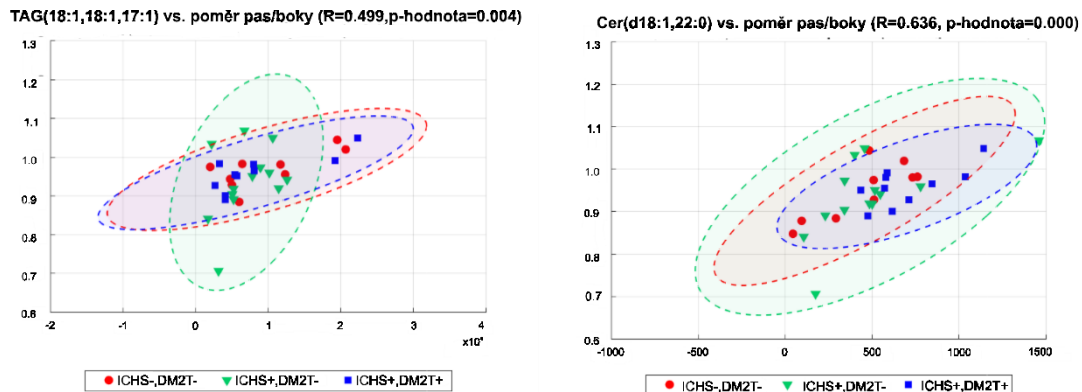
Další změny byly pozorovány v lipidové třídě fosfolipidů. Zvýšené hladiny PS(18:0,18:1) byly zjištěny v STT u pacientů s ICHS a bez DM2T ve srovnání se skupinou pacientů s oběma onemocněními. V ETT bylo signifikantní zvýšení pozorované také v souvislosti s ICHS k DM2T. Další změny ve fosfolipidech byly způsobeny přítomností DM2T u pacientů s ICHS a byly častější v ETT než STT. Tyto lipidy, LysoPE a LysoPC, obsahovaly především FA 16:0, 18:1, 18:2 a 20:4. Trend byl stejný pro všechny jmenované FA.

Hladiny PC s FA 34:0, 32:0 nebo 32:1 byly více než třikrát zvýšené v ETT při srovnání skupiny pacientů s ICHS s/bez DM2T. V STT vzrostl PC(32:1) u pacientů s ICHS a DM2T oproti pacientům bez obou onemocnění. Poslední lipidová třída, ve které byly pozorovány změny, byly sfingolipidy. Ve vzorcích STT byl Cer(d18:1,22:0) zvýšen u osob s oběma nemocemi, avšak tato změna nebyla pozorována v ETT. Hladina SM(d36:1, d40:1 nebo d42:2) byla zvýšena v ETT u pacientů jak s ICHS, tak s DM2T ve srovnání se skupinou pouze s ICHS bez DM2T. Hladina SM(d36:1) byla zvýšena u pacientů s kombinací obou onemocnění v porovnání s pacienty bez ICHS a DM2T.

#### 5.2.2.3 *Korelace*

Signifikantně změněné hladiny lipidů v obou tukových tkáních u pacientů rozdělených do třech skupin byly korelovány s výše zmíněnými biochemickými a antropometrickými parametry z Tabulky 5. Signifikantní parciální korelace TAG(18:1,18:1,17:1) a Cer(d18:2,22:0) s poměrem

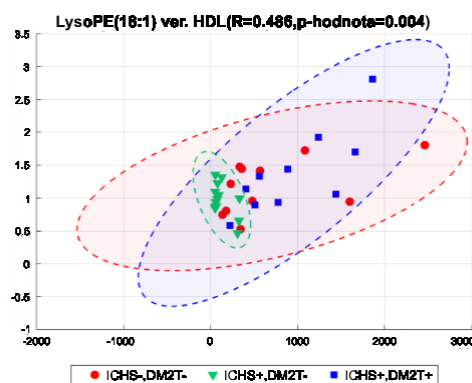
obvodu pasu a boků v STT jsou uvedeny na obrázku 16. Signifikantní parciální korelace LysoPE(18:1) s HDL v ETT jsou uvedeny na obrázku 17. Méně významné parciální korelace ( $R < 0,49$ ) lipidů s věkem, BMI, celkovým a HDL cholesterolem, celkovými TAG, glukózou nalačno, a poměrem obvodu pasu a boků, jsou uvedeny v příloze (Příloha 2). Jedná se o velmi slabé korelace, které nejsou dále diskutovány.



**Obrázek 16. 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

Převzato a upraveno: Tomášová a spol. (Tomášová et al. 2020)



**Obrázek 17: 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

Převzato a upraveno: Tomášová a spol. (Tomášová et al. 2020)

## 6 Diskuze

Tuková tkáň je tvořena především z glycerolipidů (u neobézních z 99 %), dále glycerofosfolipidů, sfingolipidů, sterolů a FA (Jové et al. 2014). V této práci byla optimalizována lipidomická analýza HPLC-MS pro stanovení majoritních a minoritních lipidů v tukové tkáni s užitím preanalytické fáze zahrnující TLC separaci minoritních lipidových tříd od vysoce zastoupených TAG.

Pomocí necílené lipidomiky lze identifikovat mnoho zástupců rozličných lipidových tříd v plazmě (Narváez-Rivas a Zhang 2016; Patterson et al. 2016). To však není možné v tukové tkáni, protože současné lipidomické analýzy tukové tkáně se potýkají s nízkou senzitivitou metod pro minoritní lipidy (lipidy o nízké koncentraci ve vzorku) a mohou být použity pouze pro analýzu majoritních lipidů (lipidy o vysoké koncentraci ve vzorku). Druhým možným přístupem, tj. pomocí cílené lipidomické metody, je možné analyzovat pouze relativně malý počet lipidů během jednoho stanovení. Navíc v tomto případě mohou být výsledky analýzy ovlivněny komplikovanou přípravou vzorku. V mé práci se mi podařilo necílenou lipidomickou analýzou identifikovat 169 lipidových molekul. Zahrnutí TLC do preanalytické fáze umožnilo identifikovat dalších 37 lipidů, které jsou v tukové tkáni přítomny v nízké koncentraci. Tímto krokem se metoda rozšířila na analýzu celkem 206 lipidových molekul. Identifikované lipidy zahrnovaly třídu triacylglycerolů (TAG), diacylglycerolů (DAG), ceramidů (Cer), glycerofosfatidylserinů (PS), glycerofosfatidylinositolů (PI), sfingomyelinů (SM), glycerofosfatidylcholinů (PC) a glycerofosfatidyletanolaminů (PE).

V další fázi práce byl zhodnocen vliv uložení tukové tkáně v organismu a vliv přítomnosti onemocnění ICHS a DM2T na složení lipidů. Současné studie porovnávající různé typy tukových tkání se zaměřují především na porovnání STT a viscerální tukové tkáně. Většinou se jedná o analýzy pouze FA, nikoli celých lipidových molekul (Jové et al. 2014; Pezeshkian et al. 2009; Rosqvist et al. 2017). Stejně tak u studií zaměřujících se na vliv onemocnění ICHS nebo DM2T se zkoumá především otázka zastoupení FA (Pezeshkian a Mahtabipour 2013).

## 6.1 Optimalizace metody

Před aplikací metody HPLC-MS na analýzu reálných vzorků bylo nutné provést optimalizaci postupu. Metoda byla otestována pro reprodukovatelnost v pozitivním i negativním ionizačním módu měření (umožňující analýzu negativně i pozitivně vzniklých iontů analytu). Variabilita metody vyjádřená pomocí CV byla dostačující pro necílenou analýzu (4,5 %) i pro analýzu minoritních lipidů (12,8 %).

Přestože i analýza minoritních lipidů byla dostatečně reprodukovatelná, separace pomocí TLC přispěla k zvýšené variabilitě naměřených hodnot. Tento efekt může být způsoben hlavně tím, že během TLC jsou lipidy na desce vystaveny vzdušnému kyslíku, který může způsobovat oxidaci nenasycených FA. Jako preventivní opatření proti oxidaci lipidů bylo přidáno do vzorku a do chromatografické vany BHT. Další opatření zabraňující oxidaci FA bylo umístění vany do tmy a desky byly sušeny za vakua. Navzdory všem preventivním opatřením byla opakovatelnost vyjádřená CV vyšší pro alikvot TAG po separaci TLC od minoritních lipidů ve srovnání s necílenou lipidomikou (Metherel a Stark 2016).

Lopéz-Bascón vyvinul metodu separace minoritních lipidů pomocí SPE. Při optimalizaci se zaměřil především na efektivitu extrakčního media (López-Bascón et al. 2018). Výhodou naší metody, používající pro separaci TLC, je jednoduchá kontrolovatelnost desky proti přetížení vzorkem. Přesycení stacionární fáze může například způsobit potlačení separace minoritních komponent. Na TLC desce je možné vzorek nanést v šířce téměř celé desky a zabránit tím jejímu případnému přesycení. Během tohoto postupu můžeme použít celý dostupný vzorek, což může být klíčové pro analýzu minoritních lipidů.

Vzorky využívané v této studii byly skladovány v RNAlateru. Z tohoto důvodu bylo nutné ověřit vliv skladovacího media na lipidový profil. Byly porovnány relativní koncentrace lipidů ve vzorcích skladovaných v RNAlateru a v PBS, přičemž nebyl pozorován vliv druhu skladovacího média na zastoupení zkoumaných lipidových molekul.

## 6.2 Porovnání epikardiální a subkutánní tukové tkáně

HPLC-MS metoda s optimalizovanou preanalytickou fází byla dále užita pro identifikaci rozdílů v profilu lipidů mezi ETT a STT (uvedeno v Tabulka 2). Multivariační analýza PCA a PLS-DA odhalila pouze mírné dělení na základě profilu lipidů v ETT a STT (obrázek 10 a 11). Z důvodu neúplného určení rozdílů mezi tukovými tkáněmi tímto postupem byla použita i jednorozměrná analýza, pomocí které byly zjištěny nejvýznamnější rozdíly v relativním zastoupení lipidů patřících do tříd TAG a PC.

Signifikantně změněné lipidy z třídy TAG byly ve vyšším relativním zastoupení v STT. TAG jsou skladovány v tukové tkáni v lipidových kapénkách (Meex, Schrauwen a Hesselink 2009). Meex a spol. ve své práci demonstrovali, že vyšší obsah TAG v STT než v omentální tukové tkáni je způsoben rozdílnou expresí genů účastnících se homeostáze TAG a také genů účastnících se tvorby lipidových kapének (ACSL1, FSP27, PPAR $\gamma$  a DGAT1) (Meex, Schrauwen a Hesselink 2009).

Narozdíl od TAG, relativní zastoupení signifikantně změněných PC bylo vyšší v ETT než v STT. PC tvoří 40 – 50 % a PE 40 % celkových fosfolipidů v buňce. V buňce jsou nejčastěji zastoupenými lipidy ve strukturách membrán (Kahle et al. 2015; van der Veen et al. 2017). Lipidové kapénky uskladňující TAG jsou pokryty jednou vrstvou fosfolipidů. Kardiomyocyty jsou vysoce senzitivní buňky na lipotoxicitu způsobenou degradací FA (Engin 2017; Nakanishi a Kato 2014). Kardiomyocyty a ETT jsou úzce spojeny a nemají mezi sebou žádnou pevnou bariéru, proto je nutné, aby byly TAG pevně ukotveny v LD (Matloch et al. 2016). Uzavření TAG v LD pomocí pevné vrstvy fosfolipidů je hlavní způsob ochrany proti lipotoxicitě lipidů vůči myokardu (Pol, Gross a Parton 2014). Poměr PC a PE je zásadní pro velikost LD. Inhibice syntézy PC nebo vzestup relativního obsahu PE vede ke spojování malých LD do větších jednotek (Krahmer et al. 2011; van der Veen et al. 2017). V této naší studii zvýšený obsah PC a snížený obsah PE (20:4,18:0) v ETT ve srovnání s STT může naznačovat tvorbu menších lipidových částic v ETT. Domníváme se, že to může být charakteristická vlastnost LD v ETT. Tvorba menších LD umožňuje pevnější ukotvení FA v adipocytech ETT než v STT (Jové et al. 2014; Ortega et al. 2010).



Syme a spol. publikovali studii zaměřenou na spojení kardiovaskulárních onemocnění a hladin PC v séru během dospívání. Autoři korelovali hladiny PC s rizikovými faktory ICHS, jako jsou objem viscerálního tuku, krevní tlak, inzulínová rezistence, ateroskleróza a dyslipidémie. Popsali negativní korelace PC(16:0/2:0), agonisty receptoru pro platelet-activating factor (aktivační faktor krevních destiček), s objemem viscerální tukové tkáně, s krevním tlakem a TAG na lačno. Na druhou stranu pozorovali pozitivní korelaci lysoPC(14:1) s obsahem viscerálního tuku a koncentrací TAG (Syme et al. 2016). Navíc Guasch-Ferré a spol. navrhli, že intermediáty syntézy PC hrají důležitou roli při rozvoji ICHS (Guasch-Ferré et al. 2017). Z literatury je také známo, že zvýšený objem ETT je spojován s přítomností ICHS (Ding et al. 2009) a endokrinní aktivita ETT je nižší v porovnání s STT (Harada et al. 2014). Adipocyty ETT neslouží tedy primárně jako zásobárna energie, jako je tomu u STT, ale mohly by přispívat k ochraně proti lipotoxicitě.

Nová modifikace preanalytické fáze nám umožnila analýzu dalších minoritních lipidů, z nichž u některých bylo zjištěno signifikantně rozdílné zastoupení v různých typech tukové tkáně. Je to například zvýšená hladina PI(20:4,18:1) v STT ve srovnání s ETT. PI se účastní fosforylační kaskády katalyzované fosfatidylinositol-3-kinázou a účastní se mnoha buněčných procesů (Beretta, Bauer a Hirsch 2015; Suh et al. 2008).

Další podtřída fosfolipidů detekovaná v tukové tkáni jsou PS. Margolis a spol. popsali sníženou hladinu PS v prsní tukové tkáni u myši s rakovinou prsu a obezitou (Margolis et al. 2015). Dále jsou PS popsány jako důležité signální molekuly makrofágů (Calderon et al. 2008; Kurosaka et al. 2003). Sfingolipidy a jejich deriváty jsou známy jako signální molekuly a druzí poslové (Hannun a Obeid 2008). Dysregulace jejich metabolismu byla již dříve asociována s obezitou a zvýšeným výskytem ICHS (Samad et al. 2011). V mé práci byly molekuly sfingolipidů detekovány v obou tkáních, avšak pouze SM(d34:1) byl signifikantně zvýšen v ETT ve srovnání s STT.

### 6.3 Vliv onemocnění ICHS a DM2T

Tato studie byla provedena na skupině pacientů rozdělených do skupin podle přítomnosti onemocnění ICHS a DM2T. Skupiny pacientů se nelišily v zastoupení pacientů léčených

s hypertenzí a zvýšenou hladinou lipidů. Pacienti s DM2T byli kompenzováni a měli odpovídající diabetickou léčbu. Skupiny se nelišily v hodnotách vybraných antropometrických parametrů a ve sledovaných biochemických parametrech kromě glukózy na lačno, která byla zvýšena u skupiny s DM2T.

Vícerozměrná analýza PCA a PLS-DA neodhalila významné dělení mezi skupinami (Obrázky 12-15). Jednorozměrná analýza lipidomických dat odhalila změny v lipidech patřících do tříd především glycerolipidů, fosfolipidů a sfingolipidů. Efekt DM2T a ICHS na lipidový profil byl často opačný, a proto u skupiny s oběma onemocněními dochází často ke kompenzaci efektů (Tabulka 6).

Popis změn vychází především z porovnání skupin pacientů, kde obě skupiny neměly DM2T, ale jedna skupina měla ICHS a druhá ne. V tomto případě hodnotíme vliv ICHS na složení lipidů v ETT a STT (Tabulka 6, první a čtvrtý sloupec). Druhý způsob porovnání vychází z poměru zastoupení u pacientů s ICHS mezi skupinami, z nichž jedna měla DM2T a druhá ne. V tomto případě hodnotíme vliv DM2T na složení lipidů v ETT a STT u pacientů s ICHS (třetí a šestý sloupec Tabulky 6).

Pacienti s diagnózou ICHS a DM2T se lišili od pacientů bez těchto onemocnění především v relativním zastoupení glycerolipidů i fosfolipidů a obecně výraznější změny se projevovaly v ETT. Molekuly acylglycerolů, jejichž relativní zastoupení bylo zvýšené v důsledku ICHS, často obsahovaly FA 16:0, 18:1 a 17:0 a méně často FA 14:0, 17:1, 18:0, 18:2, 20:1. Protože hlavní třídou lipidů v tukové tkáni jsou glycerolipidy, můžeme říci, že změny v této třídě zhruba odpovídají studiím zaměřeným pouze na obsah FA (Jové et al. 2014). Olejová kyselina (18:1n-9) zvyšuje a naopak palmitová kyselina (16:0) snižuje genovou expresi proteinů zodpovědných za regulaci proliferace buněk hladké svaloviny (Zhang et al. 2007). Naše metoda neumožňuje rozlišit polohu ani orientaci dvojně vazby u řetězce mastné kyseliny 18:1. Změny tudíž mohou být způsobené i přítomností 18:1n-7, 18:1n-10 a mastnými kyselinami s dvojnou vazbou v orientaci trans. Obecně tyto FA jsou v tukové tkáni řádově v nižší koncentraci než 18:1n-9 (Pezeshkian a Mahtabipour 2013). Bohužel v dostupné literatuře dosud nebyl vliv hladiny těchto FA v tukové tkáni popsán u pacientů s ICHS. Chei a spol. popsali vzestup FA 14:0 a 16:0 v plazmě u pacientů s ICHS. Autoři našli souvislost mezi hladinami těchto FA a vyšší prevalencí ICHS (Chei et al. 2018). V souladu s tímto se domníváme, že zvýšené zastoupení TAG,

obsahujících ve své molekule FA 18:1 a 16:0, je důsledkem porušení regulace proliferace hladké svaloviny u ICHS, a také důsledkem vyššího aterogenního potenciálu těchto FA.

Zastoupení molekul TAG obsahujících ve své molekule nejčastěji FA 18:1 a 16:0 bylo naopak u pacientů s DM2T sníženo. Stejný efekt byl pozorován i pro další struktury TAG obsahující některé další saturevané a mononenasyčené mastné kyseliny. Změny byly pozorovány především v ETT. Pezeshkian a spol. popsali snížený obsah FA 16:0 ve skupině s DM2T v ETT u pacientů, kteří podstoupili koronární bypass. Naopak u FA 18:1 nenašli žádnou změnu, především u majoritní kyseliny olejové (18:1n-9). Změnu pozorovali pouze u minoritní FA 18:1 trans, kde je dvojná vazba v konfiguraci *trans*-. Naší metodou nebylo možné odlišit FA v pozici *trans*- nebo *cis*- (Pezeshkian a Mahtabipour 2013).

Zastoupení DAG(18:2,18:2) bylo sníženo v STT u pacientů s ICHS. DAG jsou prekurzory syntézy TAG na vnitřní straně buněčné membrány. V buňce hrají roli druhých posílů (Perreault et al. 2018). Chei a spol. popsali sníženou hladinu FA 18:2 v plazmě u pacientů s ICHS (Chei et al. 2018). Autoři dále v článku hodnotili úlohu FA 18:2 při snižování hladin LDL cholesterolu a její efekt proti arytmiím. Dudek a spol. popsali FA 18:2, jejíž acyl se nejčastěji váže v difosfatidylglycerolech v tkáni srdce. Tyto výsledky korespondují s naším pozorováním snížení zastoupení DAG(18:2,18:2) v STT, přestože v ETT byl pozorován pouze trend změny. Z tohoto důvodu se domníváme, že jedna z příčin mitochondriální dysfunkce vyskytující se u ICHS může být i nedostatek FA 18:2 (Dudek, Hartmann a Rehling 2019).

Naopak u pacientů s DM2T byl DAG(18:2,18:2) zvýšen v obou tkáních. Z literatury jsou DAG známy jako mediátory inzulínové rezistence v játrech a svalech prostřednictvím snížené aktivity proteinkinázy C (Erion a Shulman 2013). Pezeshkian a spol. nepozorovali signifikantní změnu FA 18:2 v tukové tkáni způsobenou DM2T u pacientů s ICHS. To lze přičíst rozdílné metodice stanovení FA (Pezeshkian et al. 2009). Naopak sníženou hladinu FA 18:2 pozorovali v plazmatických fosfolipidech u pacientů s DM2T a ICHS v porovnání s pacienty bez DM2T a s ICHS (Pezeshkian a Mahtabipour 2013). Domníváme se, že námi pozorované až čtyřnásobné zvýšení hladiny DAG(18:2,18:2) v ETT i STT může souviset s IR u DM2T.

Další změna týkající se glycerolipidů zahrnovala molekuly s FA s lichým počtem uhlíků. Jejich hladina byla zvýšena u pacientů s ICHS. Crow a spol. popsali zvýšenou syntézu FA s lichým počtem uhlíků v tukové tkáni v přítomnosti zvýšeného množství propionyl-CoA, který byl

získán degradací aminokyselin s rozvětveným řetězcem (BCAA), jako jsou leucin a valin (Crown, Marze a Antoniewicz 2015). Změny v hladinách FA s lichým počtem uhlíků mohou být způsobeny také změnami v aktivitě metylmalonyl-CoA mutázy, což již bylo popsáno v souvislosti s ICHS nebo DM2T (Connelly, Wolak-Dinsmore a Dullaart 2017). Kombinace těchto faktorů pravděpodobně přispěla k zvýšenému zastoupení FA s lichým počtem uhlíků v ETT u pacientů s ICHS v naší studii. Zajímavé je, že trend nebyl pozorován v STT, což může napovídat tomu, že v této tkáni nedochází k zvýšené oxidaci BCAA jako v ETT (Green et al. 2016).

U pacientů s DM2T byl trend v hladinách FA s lichým počtem uhlíků opačný. Souvislost mezi snížením exprese enzymů spojených s metabolismem BCAA v tukové tkáni, IR a DM2T u obézních pacientů byla již publikována (Lackey et al. 2013). Fillmore a spol. popsali sníženou oxidaci BCAA v srdeční tkáni u pacientů s inzulínovou rezistencí. Snížená oxidace BCAA u pacientů s DM2T v tukové tkáni může vést k následnému snížení syntézy FA s lichým počtem uhlíků (Fillmore et al. 2019). Inzulínová rezistence v ETT u pacientů zahrnutých v této studii pravděpodobně vedla k snížené oxidaci BCAA, čímž snížila hladinu prekursoru pro syntézu FA s lichým počtem uhlíků.

Další lipidová třída, ve které byly pozorovány změny, byly fosfolipidy. Zvýšené hladiny některých zástupců této lipidové třídy byly pozorovány především v ETT a byly způsobeny přítomností DM2T. Celkový podíl fosfatidylcholinů v ETT byl také zvýšen ve skupině s DM2T. Barber a spol. popsali zvýšené koncentrace fosfatidylcholinů u modelu myší na dietě vyvolávající obezitu a DM2T (Barber et al. 2012). Na základě těchto poznatků se zaměřili na tkáně, které se účastní homeostázy glukózy, jako jsou svaly, játra a tuková tkáň (Barber et al. 2012). Změny v tkáních byly však méně výrazné. Navzdory snížení lysofosfatidylcholinů (LysoPC) v plazmě, svalech a játrech pozorovali autoři studie zvýšení LysoPC v tukové tkáni, což je v souladu s pozorováními prezentovanými v této práci. Navíc relativní zastoupení některých LysoPE v obou tkáních korelovalo s celkovým a HDL cholesterolem. Snížení LysoPC v plazmě, které je diskutováno v kontextu rozvoje IR, může být způsobeno akumulací LysoPC v tkáních, kde k rozvoji IR dochází. Kurano a spol. pozorovali vliv lysofosfolipidů na metabolismus lipoproteinových částic v plazmě a jejich vzájemnou regulaci (Kurano et al. 2019).

Vztahy mezi sfingolipidy v tukové tkáni a DM2T u pacientů byly již dříve popsány (Bhagirath et al. 2016; Błachnio-Zabielska et al. 2012). Biosyntetická dráha ceramidů začíná v endoplazmatickém retikulu kondenzací palmitoyl CoA a serinu. Porušení této biochemické dráhy vede k dysfunkci adipocytů a inzulínové rezistenci. Kyselá a neutrální sfingomyelináza katalyzují hydrolýzu sfingolipidů na ceramidy. V poškozených adipocytech vznikají ceramidy především hydrolýzou sfingolipidů, nikoli syntézou *de novo* v endoplazmatickém retikulu (Xu et al. 2013). Změny v hladinách sfingomyelinů mohou být způsobeny inzulínovou rezistencí, která je u pacientů s DM2T vyjádřena také v tukové tkáni. Korelace zastoupení Cer(d18:1,22:0) a stejně tak TAG(18:1,18:1,17:1) v lipidech STT s poměrem obvodu pasu a boků naznačuje, že ukládání tuků v oblasti pasu je doprovázeno zvýšeným ukládáním těchto minoritních lipidů.

## 7 Závěr

Výsledky předkládané práce ukazují, že optimalizovaná preanalytická fáze lipidomických analýz s využitím TLC je vhodná i pro analýzu tukové tkáně. Rozšířila analýzu lipidů o dalších 37 minoritních lipidových struktur, které by nebylo možné stanovit pouze necíleným způsobem pomocí HPLC-MS. Dále bylo ověřeno, že složení lipidů se liší v závislosti na místě uložení tkáně. Podkožní tuková tkáň obsahuje adipocyty s jednou větší lipidovou kapénkou, a tedy je bohatší na TAG a obsahuje méně PC. Naopak zvýšený obsah PC a snížený obsah PE (FA 20:4,18:0) v epikardiální tukové tkáni naznačuje tvorbu drobných lipidových částic.

V klinické části práce jsem se zaměřila na změny lipidového spektra v ETT a STT způsobené přítomností ICHS a DM2T. U pacientů s ICHS jsem zjistila v ETT zvýšené zastoupení některých TAG, nejčastěji v kombinaci s nasycenou kyselinou palmitovou nebo nenasycenou kyselinou olejovou. Vliv DM2T u pacientů s ICHS jsem pozorovala v ETT převážně v lipidovém profilu fosfolipidů a sfingolipidů (navýšení až 3x v porovnání s pacienty s ICHS a bez DM2T). Změny lipidů v STT nebyly u vyšetřovaných pacientů tak významné. Změny v metabolitech lipidů pacientů s ICHS v kombinaci s DM2T mohou být způsobeny rozvinutím mitochondriální dysfunkce v adipocytech.

## 8 Souhrn

Ischemická choroba srdeční (ICHS) je jednou z nejčastějších příčin úmrtí v České republice i ve světě. Hlavním důvodů rozvojem ICHS je tvorba aterogenních plátů v tepnách, což vede k nedostatečnému zásobení myokardu kyslíkem a živinami. Rozvoj aterosklerózy úzce souvisí s lipidovým metabolismem. Nejčastější komorbidity ICHS jsou diabetes mellitus 2. typu (DM2T) a obezita. Diabetes mellitus 2. typu se vyznačuje hromaděním glukózy v plazmě v důsledku nedostatečné reakce tkání na přítomnost inzulínu. Mezi na inzulín citlivé tkáně řadíme tukovou tkáň, kosterní svalovou tkáň a játra. Inzulín se účastní regulace mnoha biochemických procesů v těle, jako regulace hladiny glukózy i lipidového metabolismu.

Tuková tkáň byla dříve považována za pouhou zásobárnu přebytečné energie. Dnes je často skloňována jako důležitý endokrinní orgán. Její produkty, adipokiny, mají dopad na metabolismus celého těla. Společným jmenovatelem ICHS a DM2T je rozvoj subklinického zánětu, který je provázen produkcí zánětlivých adipokinů v tukové tkáni.

Jednou z hlavních složek tukové tkáně jsou adipocyty. Tukovou tkáň můžeme charakterizovat jako bílou, hnědou a béžovou. Ve své práci se zabývám především bílou tukovou tkání. Podstatnou část cytoplazmy adipocytu bílé tukové tkáně zabírají lipidové kapénky, které jsou na svém povrchu pokryty vrstvou fosfolipidů. Uvnitř kapénky jsou uchovány acylglyceroly, především triacylglyceroly (TAG), sloužící jako zásobní zdroj energie. Další lipidy jsou v adipocytech obsaženy v malém množství a nepřesahují 1-3 % z celkového množství lipidů.

Nejlepším a nejjednodušším způsobem stanovení lipidů v tukové tkáni je necílená lipidomická analýza. Separaci lipidových molekul lze provádět pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie, na kterou navazuje detekce prostřednictvím hmotnostního spektrometru. Limitujícím faktorem při této analýze je potlačení signálu minoritních lipidů vysokým obsahem TAG v tukové tkáni. Z tohoto důvodu byly extrakty tukové tkáně rozděleny na dva alikvoty, jeden pro přímé měření a druhý pro separaci minoritních lipidů od TAG pomocí tenkovrstvé chromatografie. Tímto způsobem se podařilo analyzovat dalších 37 molekul navíc k původním 169 lipidovým molekulám.

Po optimalizaci metody HPLC-MS jsme tento postup dále použili na porovnání profilu lipidů v epikardiální tukové tkáni s podkožní tukovou tkání. Dále jsme touto metodou porovnali vliv onemocnění ICHS a DM2T na složení lipidů obou tukových depotech.

Subkutánní tuková tkáň obsahovala významně nižší množství některých fosfatidylcholinů a fosfatidyletanolaminů v porovnání s epikardiální. Na druhou stranu obsahovala vyšší množství TAG. Tyto rozdíly mohou být způsobeny především menší velikostí lipidových částic v adipocytech epikardiální tukové tkáně. Výsledky jsou v souladu s pozorováním, že funkcí epikardiální tukové tkáně je především ochrana myokardu proti lipotoxicitě.

Dále byl hodnocen vliv onemocnění ICHS a DM2T na lipidový profil tukových tkání. Vliv onemocnění ICHS a DM2T se projevoval často opačně. Výraznější změny byly pozorovány v epikardiální tukové tkáni. Zajímavé rozdíly byly v molekulách lipidů s mastnými kyselinami s lichým počtem uhlíků. Dále byl pozorován rozdíl v některých zástupcích sfingolipidů a fosfolipidů. Výsledky ukazují na rozvíjející se mitochondriální dysfunkci u adipocytů pacientů s ICHS. Dále naznačují přítomnost subklinického zánětu v tukové tkáni.



## 9 Summary

Coronary artery disease (CAD) is one of the most common cause of death both in the Czech Republic and in the worldwide. The main reason for the development of CAD is the formation of atherogenic plaques in the arteries, which leads to an insufficient supply of oxygen and nutrients to the myocardia. The development of atherosclerosis is closely related to lipid metabolism. CAD is commonly associated with type 2 diabetes mellitus and obesity. Type 2 diabetes mellitus is characterized by the accumulation of glucose in plasma due to insufficient tissue response to the presence of insulin. Insulin-sensitive tissues are adipose tissue, muscles and liver. Insulin is involved in many biochemical processes in the body, such as regulation of glucose levels and regulation of lipid metabolism.

Adipose tissue was previously considered a store of excess energy. Nowadays, it is often classified as an important endocrine organ. Adipose tissue products, adipokines, have an impact on the whole body metabolism. The common denominator of both CAD and T2DM is the development of subclinical inflammation, which is accompanied by the production of inflammatory adipokines in adipose tissue.

One of the main components of adipose tissue are adipocytes. Adipose tissue can be characterized as white, brown and beige. In this thesis, I deal with white adipose tissue. Lipid droplets occupy a substantial part of the cytoplasm of adipocytes. The lipid droplet is covered with a layer of phospholipids on its surface. Acylglycerols, especially triacylglycerols (TAG), are stored inside the droplets. Triacylglycerols function is as a source of energy. The other lipids are present in minor amounts in adipocytes and do not exceed 1 to 3 % of the total amount of lipid.

The best and easiest way to analyze lipids in adipose tissue is nontargeted lipidomics. The sample separation was performed by high pressure liquid chromatography coupled with detection by mass spectrometry. The method is limited by signal suppression of minor lipids by high content of TAG in adipose tissue. For this reason, the adipose tissue extract was divided into two aliquots. The first aliquot was used for direct analyses, whereas the second one was separated by thin layer chromatography and fraction of TAG was separated. This

approach enabled to identify another 37 lipid compounds in addition to the previously identified 169 lipid molecules.

After optimizing the HPLC-MS method, I used the approach to compare the lipid profiles in epicardial and subcutaneous adipose tissue. Furthermore, I evaluated the effect of CAD and T2DM on lipid profiles in both adipose tissue depots.

Subcutaneous adipose tissue contained significantly lower amounts of some phosphatidylcholines and phosphatidylethanolamines compared to the epicardial one. However, EAT contained higher amounts of TAG. These differences may be due to the smaller lipid droplet size in adipocytes in ETT. The results are consistent with the observation that the function of ETT is primarily to protect the myocardium against lipotoxicity.

In addition, the effect of CAD and T2DM on the lipid profile in adipose tissue was evaluated. The effect of CAD and T2DM was often the opposite. Significant changes were observed in ETT. Interesting differences were observed in molecules including fatty acids chains with odd carbon numbers. In addition, the variance was observed in some members of sphingolipids and phospholipids. The results confirm the development of mitochondrial dysfunction in adipose tissue of patient with CAD. Next, they confirm the presence of subclinical inflammation in adipose tissue.

## 10 Literatura

- Abdel-latif, A. et al. 2016. "Lysophospholipids in Coronary Artery and Chronic Ischemic Heart Disease." *Curr Opin Lipidol* 26(5): 432–37.
- Abel, E. et al. 2001. "Adipose-Selective Targeting of the GLUT4 Gene Impairs Insulin Action in Muscle and Liver." *Nature* 409: 729–33.
- Akash, M. S. H., Kanwal R. a Shuqing Ch. 2013. "Role of Inflammatory Mechanisms in Pathogenesis of Type 2 Diabetes Mellitus." *Journal of Cellular Biochemistry* 114(3): 525–31.
- Alizargar, J. et al. 2020. "Use of the Triglyceride - Glucose Index ( TyG ) in Cardiovascular Disease Patients." *Cardiovascular Diabetology* 19(8): 2–4. <https://doi.org/10.1186/s12933-019-0982-2>.
- Ameer, F. et al. 2014. "De Novo Lipogenesis in Health and Disease." *Metabolism: Clinical and Experimental* 63(7): 895–902. <http://dx.doi.org/10.1016/j.metabol.2014.04.003>.
- Appari, M., Channon, K.,M. a McNeill, E. 2018. "Metabolic Regulation of Adipose Tissue Macrophage Function in Obesity and Diabetes." 29(3): 297–312.
- Baker, A. R. et al. 2006. "Human Epicardial Adipose Tissue Expresses a Pathogenic Profile of Adipocytokines in Patients with Cardiovascular Disease." *Cardiovascular Diabetology* 7: 1–7.
- Bambace, C. et al. 2014. "Inflammatory Profile in Subcutaneous and Epicardial Adipose Tissue in Men with and without Diabetes." *Heart Vessels* 29: 42–48.
- Barber, M. N. et al. 2012. "Plasma Lysophosphatidylcholine Levels Are Reduced in Obesity and Type 2 Diabetes." *PLoS ONE* 7(7): 1–12.
- Barchuk, M. et al. 2020. "Untargeted Lipidomics Reveals a Specific Enrichment in Plasmalogens in Epicardial Adipose Tissue and a Specific Signature in Coronary Artery Disease." *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 40(April): 986–1000.
- Barthel, A. a Hans-Georg J. 2008. "Insulin Receptor." In *Encyclopedia of Molecular Pharmacology*, eds. Stefan Offermanns and Walter Rosenthal. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 632–36. [https://doi.org/10.1007/978-3-540-38918-7\\_80](https://doi.org/10.1007/978-3-540-38918-7_80).
- Beretta, M., Bauer, M. a Hirsch E. 2015. "PI3K Signaling in the Pathogenesis of Obesity: The Cause and the Cure." *Advances in Biological Regulation* 58: 1–15. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbior.2014.11.004>.
- Chaurasia, B. et al. 2016. "Adipocyte Ceramides Regulate Subcutaneous Adipose Browning , Inflammation , and Metabolism." *Cell Metabolism* 24(6): 820–34. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2016.10.002>.
- Błachnio-Zabielska, A. U. et al. 2012. "Increased Bioactive Lipids Content in Human Subcutaneous and Epicardial Fat Tissue Correlates with Insulin Resistance." *Lipids* 47(12): 1131–41.
- Bligh, E. G. a W J Dyer, W. J. 1959. "A Rapid Method of Total Lipid Extraction and Purification." *Canadian journal of biochemistry and physiology* 37(8): 911–17.
- Blüher, M. 2016. "Adipose Tissue Inflammation : A Cause or Consequence of Obesity-Related Insulin Resistance ?" *Clinical Science* 130: 1603–14.
- Boden, G. 1999. "Free Fatty Acids, Insulin Resistance a Type 2 Diabetes Mellitus." *Proceedings of the Association of American Physicians* 111(3): 241–48.

- Budoff, M. 2016. "Triglycerides and Triglyceride-Rich Lipoproteins in the Causal Pathway of Cardiovascular Disease." *The American Journal of Cardiology* 118(1): 138–45.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.amjcard.2016.04.004>.
- Burden, D. W. 2012. "Guide to the Disruption of Biological Samples – 2012." *Random primers* 25(12): 1–25.
- Calderon, C. L. et al. 2008. "Involvement of Protein Kinase C and Not of NF  $\kappa$  B in the Modulation of Macrophage Nitric Oxide Synthase by Tumor-Derived Phosphatidyl Serine." *016960*: 713–21.
- Cequier-sa, E. et al. 2008. "Dichloromethane as a Solvent for Lipid Extraction and Assessment of Lipid Classes and Fatty Acids from Samples of Different Natures Dichloromethane as a Solvent for Lipid Extraction and Assessment of Lipid Classes and Fatty Acids from Samples of Different." *Society*: 4297–4303.
- Chei, C. et al. 2018. "Serum Fatty Acid and Risk of Coronary Artery Disease." *Circulation* 82(December): 3013–20.
- Chylikova, J. et al. 2018. "M1 / M2 Macrophage Polarization in Human Obese Adipose Tissue." *Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacký, Olomouc, Czechoslovakia* 162(2): 79–82.
- Cignarelli, A. et al. 2019. "Insulin and Insulin Receptors in Adipose Tissue Development." *International Journal of Molecular Sciences* 20(3): 759.
- Connelly, M. A. et al. 2017. "Branched Chain Amino Acids Are Associated with Insulin Resistance Independent of Leptin and Adiponectin in Subjects with Varying Degrees of Glucose Tolerance." *Metabolic syndrome and related disorders* 15(4): 183–86.
- Crown, S. B., Nicholas M. a Maciek R. A. 2015. "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(12): 1–22.
- Curat, C. A. et al. 2006. "Macrophages in Human Visceral Adipose Tissue : Increased Accumulation in Obesity and a Source of Resistin and Visfatin." *Diabetologia* 49: 744–47.
- Czech, M. P. 2020. "Mechanisms of Insulin Resistance Related to White , Beige , and Brown Adipocytes." *Molecular Metabolism* 34(January): 27–42.  
<https://doi.org/10.1016/j.molmet.2019.12.014>.
- Ding, J. et al. 2009. "The Association of Pericardial Fat with Incident Coronary Heart Disease: The Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA)." *American Journal of Clinical Nutrition* 90: 499–504.
- Djekic, D. et al. 2016. "Replication of LC-MS Untargeted Lipidomics Results in Patients with Calcific Coronary Disease: An Interlaboratory Reproducibility Study." *International journal of cardiology* 222: 1042–48.
- Dobiášová, M. a Frohlich J. 2001. "The Plasma Parameter Log (TG/HDL-C) as an Atherogenic Index: Correlation with Lipoprotein Particle Size and Esterification Rate in ApoB-Lipoprotein-Depleted Plasma (FER(HDL))." *Clinical biochemistry* 34(7): 583–88.
- Dudek, J., Hartmann, M. a Rehling P. 2019. "The Role of Mitochondrial Cardiolipin in Heart Function and Its Implication in Cardiac Disease." *BBA - Molecular Basis of Disease* 1865(4): 810–21.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2018.08.025>.
- Dunn, W. B. et al. 2011. "Procedures for Large-Scale Metabolic Profiling of Serum and Plasma Using Gas Chromatography and Liquid Chromatography Coupled to Mass Spectrometry." *Nature*

*Protocols* 6(7): 1–9.

- Engin, A. B. 2017. "What Is Lipotoxicity?" *Advances in experimental medicine and biology* 960: 197–220.
- Erion, D. M. a Shulman, G. I. 2013. "Diacylglycerol-Mediated Insulin Resistance." *Nature Medicine* 16(4): 400–402.
- Fang, Z., Pyne, S. a Pyne, N. J. 2019. "Ceramide and Sphingosine 1-Phosphate in Adipose Dysfunction." *Progress in Lipid Research* 74(April): 145–59.  
<https://doi.org/10.1016/j.plipres.2019.04.001>.
- Fasshauer, M. a Blüher, M. 2015. "Adipokines in Health and Disease." *CellPress* 36(7): 461–70.
- Feng, L. et al. 2018. "Lipid Biomarkers in Acute Myocardial Infarction Before and After Percutaneous Coronary Intervention by Lipidomics Analysis." *Medical science monitor* 24: 4175–82.
- Fillmore, N. et al. 2019. "Cardiac Branched-Chain Amino Acid Oxidation Is Reduced during Insulin Resistance in the Heart." *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 315: 1046–52.
- Folch, J., Lees, M. a Stanley, G. S. 1957. "A Simple Method for the Isolation and Purification of Total Lipides from Animal Tissues." *The Journal of biological chemistry* 226(1): 497–509.
- Fuchs, B. et al. 2011. "Lipid Analysis by Thin-Layer Chromatography — A Review of the Current State." *Journal of Chromatography A* 1218(19): 2754–74.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2010.11.066>.
- Gao, S. et al. 2018. "Cross-Sectional Positive Association of Serum Lipids and Blood Pressure with Serum Sodium within the Normal Reference Range of 135-145 Mmol/L." *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 37(3): 598–606.
- Ghosh, A. et al. 2017. "Role of Free Fatty Acids in Endothelial Dysfunction." *Journal of Biomedical Science* 24:50: 1–15.
- Ghosh, S. et al. 2012. "Macrophage Cholesteryl Ester Mobilization and Atherosclerosis." *Vascul Pharmacol* 23(1): 1–7.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3624763/pdf/nihms412728.pdf>.
- Green, C. R. et al. 2016. "Branched Chain Amino Acid Catabolism Fuels Adipocyte Differentiation and Lipogenesis." *Physiology & behavior* 176(1): 139–48.
- Grzybek, M. et al. 2019. "Comprehensive and Quantitative Analysis of White and Brown Adipose Tissue by Shotgun Lipidomics." *Molecular Metabolism* 22(January): 12–20.  
<https://doi.org/10.1016/j.molmet.2019.01.009>.
- Guasch-Ferré, M. et al. 2017. "Plasma Metabolites from Choline Pathway and Risk of Cardiovascular Disease in the PREDIMED (Prevention with Mediterranean Diet) Study." *Journal of the American Heart Association* 6(11).
- Guilherme, A. et al. 2020. "Molecular Pathways Linking Adipose Innervation to Insulin Sensitivity in Obesity and Type 2 Diabetes." *Nature Reviews Endocrinology* 15(4): 207–25.
- Guillou, H. et al. 2010. "The Key Roles of Elongases and Desaturases in Mammalian Fatty Acid Metabolism : Insights from Transgenic Mice." *Progress in Lipid Research* 49(2): 186–99.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.plipres.2009.12.002>.
- Ha, E. E. a Bauer, R. C. 2019. "ATVB Recent Highlights: Emerging Roles for Adipose Tissue in Cardiovascular Disease." *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 38(8): 1–15.

- Haluzík, M., Haluzíková, P. a Trachta D. 2010. "Hormony Tukové Tkáně." *Vnitřní lékařství* 56(10): 1028–34.
- Haluzík, M. 2018. *Průvodce Léčbou Diabetu 2. Typu pro Internisty*. Aeskulap. Mladá fronta.
- Hannun, Y. A. a Obeid, L. M. 2008. "Principles of Bioactive Lipid Signalling: Lessons from Sphingolipids." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 9(2): 139–50.
- Harada, K. et al. 2014. "Impact of Abdominal and Epicardial Fat on the Association between Plasma Adipocytokine Levels and Coronary Atherosclerosis in Non-Obese Patients." *Atherosclerosis* 237(2): 671–76. <http://dx.doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2014.10.014>.
- Hatting, M. et al. 2019. "Insulin Regulation of Gluconeogenesis." *Annals of the New York Academy of Sciences* 1411(1): 21–35.
- Herder, C., Carstensen, M. a Ouwens, D. M. 2013. "Anti-Inflammatory Cytokines and Risk of Type 2 Diabetes." *Diabetes, obesity & metabolism* 15: 39–50.
- Hodson, L., Skeaff, C. M. a Fielding B. A. 2008. "Fatty Acid Composition of Adipose Tissue and Blood in Humans and Its Use as a Biomarker of Dietary Intake." *Progress in Lipid Research* 47: 348–80.
- Holčapek, M., Liebisch, G. a Ekroos K. 2020. "Lipidomic Analysis." *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 412: 2187–89.
- Hradec, J. a Býma., S. 2007. "Centrum doporučených postupů pro praktické lékaře *Ischemická Choroba Srdeční*." Centrum doporučených postupů pro praktické lékaře.
- Hsu, Fong-fu. 2019. "Mass Spectrometry Based Shotgun Lipidomics-a Critical Review." *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 410(25): 6387–6409.
- Huang, P. L. 2009. "A Comprehensive Definition for Metabolic Syndrome." *Disease models & mechanisms* 2(5–6): 231–37.
- Hyötyläinen, T. a Orešič, M. 2015. "Optimizing the Lipidomics Workflow for Clinical Studies — Practical Considerations." *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 407: 4973–93.
- Gianluca, I. et al. 2005. "Adiponectin Expression in Human Epicardial Adipose Tissue in Vivo Is Lower in Patients with Coronary Artery Disease." *Cytokine* 29(6): 251–55.
- Gianluca, I. et al. 2015. "Local and Systemic Effects of the Multifaceted Epicardial Adipose Tissue Depot." *Nature reviews. Endocrinology* 11(6): 363–71.
- Itani, S. I. et al. 2002. "Lipid-Induced Insulin Resistance in Human Muscle Is Associated With Changes in Diacylglycerol , Protein." *Diabetes* 3(17): 2005–11.
- Jové, M. et al. 2014. "Human Omental and Subcutaneous Adipose Tissue Exhibit Specific Lipidomic Signatures." *FASEB Journal* 28(3): 1071–81.
- Kahle, M. et al. 2015. "High Fat Diet-Induced Modifications in Membrane Lipid and Mitochondrial-Membrane Protein Signatures Precede the Development of Hepatic Insulin Resistance in Mice." *Molecular Metabolism* 4(1): 39–50.
- Karen, I. a Svačina, Š. 2018. "*Doporučené Diagnostické a Terapeutické Postupy pro Všeobecné Praktické Lékaře- Diabetes Mellitus*." Novelizace. Centrum doporučených postupů pro praktické lékaře.
- Kelley, D. et al. 1988. "Skeletal Muscle Glycolysis , Oxidation , and Storage of an Oral Glucose Load." *The American Society for Clinical Investigation* 81: 1563–71.

- Kohno, S. et al. 2018. "Lipidomic Insight into Cardiovascular Diseases." *Biochemical and biophysical research communications* 504(3): 1–12.
- Konukoglu, D. a Uzun, H. 2017. *2 Hypertension : From Basic Research to Clinical Practice*.
- Kostal, V., Katzenmeyer, J. a Arriaga, E., A. 2008. "Capillary Electrophoresis in Bioanalysis." *Analytical Chemistry* 80(12): 4533–50.
- Krahmer, N. et al. 2011. "Phosphatidylcholine Synthesis for Lipid Droplet Expansion Is Mediated by Localized Activation of CTP:Phosphocholine Cytidyltransferase." *Cell Metabolism* 14(4): 504–15. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2011.07.013>.
- Kurano, M. et al. 2019. "Regulation of Plasma Glycero-Lysophospholipid Levels by Lipoprotein Metabolism." *Biochemical Journal* 476(23): 3565–81. <https://doi.org/10.1042/BCJ20190498>.
- Kurosaka, K. et al. 2003. "Silent Cleanup of Very Early Apoptotic Cells by Macrophages." *The Journal of Immunology* 171(9): 4672–79. <http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.171.9.4672>.
- Kyrklund, T. 1987. "Two Procedures to Remove Polar Contaminants from a Crude Brain Lipid Extract by Using Prepacked Reversed-Phase Columns." *Lipids* 22(4): 274–77.
- Lackey, D. E. et al. 2013. "Regulation of Adipose Branched-Chain Amino Acid Catabolism Enzyme Expression and Cross-Adipose Amino Acid Flux in Human Obesity." *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 304(11): E1175–87.
- Lamari, F. N. et al. 2002. "Structure Analysis of Lipoglycans and Lipoglycan-Derived Carbohydrates by Capillary Electrophoresis and Mass Spectrometry." *Biomedical chromatography : BMC* 16(2): 116–26.
- Li, M. et al. 2014. "Analytical Methods in Lipidomics and Their Applications." *Analytical Chemistry* 86(1): 161–75.
- Lommen, A. 2009. "MetAlign : Interface-Driven , Versatile Metabolomics Tool for Hyphenated Full-Scan Mass Spectrometry Data Preprocessing." *Analytical Chemistry* 81(8): 3079–86.
- Longo, M. et al. 2019. "Adipose Tissue Dysfunction as Determinant of Obesity-Associated Metabolic Complications." *International Journal of Molecular Sciences* 20(9): 2358.
- Lopaschuk, G. D. et al. 2010. "Myocardial Fatty Acid Metabolism in Health and Disease." *Physiological reviews* 90: 207–58.
- López-Bascón, M. A. et al. 2018. "Influence of Sample Preparation on Lipidomics Analysis of Polar Lipids in Adipose Tissue." *Talanta* 177(September 2017): 86–93. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0039914017309608>.
- Marchetti, A. A. a Mignerey, A. C. 1993. "Deconvolution of Mass Spectra." *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research* 324: 288–96.
- Margolis, M. et al. 2015. "Phospholipid Makeup of the Breast Adipose Tissue Is Impacted by Obesity and Mammary Cancer in the Mouse: Results of a Pilot Study." *Biochimie* 108: 133–39.
- Matloch, Z. et al. 2016. "The Role of Epicardial Adipose Tissue in Heart Disease." *Physiol. Res* 65: 23–32.
- Matyash, V. et al. 2008. "Methods Lipid Extraction by Methyl- Tert -Butyl Ether for High-Throughput Lipidomics." *Journal of Lipid Research* 49.
- Meex, R. C. R, Schrauwen, P. a Hesselink, M. K. C. 2009. "Modulation of Myocellular Fat Stores: Lipid

- Droplet Dynamics in Health and Disease." *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 297(4): R913-24.  
<http://ajpregu.physiology.org/content/297/4/R913.abstract>.
- Mehrotra et al. 2015. "Endothelium as a Gatekeeper of Fatty Acid Transport." *Trends in endocrinology and metabolism* 25(2): 99–106.
- Metherel, A. H. a Stark, K. D. 2016. "The Stability of Blood Fatty Acids during Storage and Potential Mechanisms of Degradation: A Review." *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 104: 33–43.
- Miller, M. et al. 2011. "Triglycerides and Cardiovascular Disease A Scientific Statement From the American Heart Association." *AHA Scientific Statement*: 2292–2333.
- Moseti, D., Regassa, A. a Kim, W. K. 2016. "Molecular Regulation of Adipogenesis and Potential Anti-Adipogenic Bioactive Molecules." *International Journal of Molecular Sciences* 17(1): 1–24.
- Nakanishi, T. a Kato, S. 2014. "Impact of Diabetes Mellitus on Myocardial Lipid Deposition: An Autopsy Study." *Pathology Research and Practice* 210(12): 1018–25.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.prp.2014.04.008>.
- Narváez-Rivas, M. a Zhang Q. 2016. "Comprehensive Untargeted Lipidomic Analysis Using Core-Shell C30 Particle Column and High Field Orbitrap Mass Spectrometer." *Journal of Chromatography A* 1440: 123–34. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2016.02.054>.
- Ortega, F. J. et al. 2010. "Thyroid Hormone Responsive Spot 14 Increases during Differentiation of Human Adipocytes and Its Expression Is Down-Regulated in Obese Subjects." *International Journal of Obesity* 34(3): 487–99.
- Otoki, Y. et al. 2017. "Plasma Phosphatidylethanolamine and Triacylglycerol Fatty Acid Concentrations Are Altered in Major Depressive Disorder Patients with Seasonal Pattern." *Lipids* 52(6): 559–71.
- Pakiet, A., Stepnowski, P. a Sledzinski, T. 2019. "Changes in Lipids Composition and Metabolism in Colorectal Cancer : A Review." *Lipids in Health & Disease* 18: 1–21.
- Park, Gyung-min et al. 2020. "Triglyceride Glucose Index Is a Useful Marker for Predicting Subclinical Coronary Artery Disease in the Absence of Traditional Risk Factors." *Lipids in Health & Disease* 19(7): 1–7.
- Patel, T. P. et al. 2016. "Insulin Resistance : An Additional Risk Factor in the Pathogenesis of Cardiovascular Disease in Type 2 Diabetes." *Heart Failure Reviews* 21(1): 11–23.
- Pati, S. et al. 2016. "Extraction, Chromatographic and Mass Spectrometric Methods for Lipid Analysis." *Biomedical Chromatography* 30(February): 695–709.
- Patterson, R. E. et al. 2016. "Comparison of Blood Plasma Sample Preparation Methods for Combined LC-MS Lipidomics and Metabolomics." *J Chromatogr B* 1002: 260–66.
- Paul, A.. 2018. *Adipose Tissue Heterogeneity - Development and Application of Nonlinear Microscopy Methods*. [https://research.chalmers.se/publication/500015/file/500015\\_Fulltext.pdf](https://research.chalmers.se/publication/500015/file/500015_Fulltext.pdf).
- Perreault, L. et al. 2018. "Intracellular Localization of Diacylglycerols and Sphingolipids Influences Insulin Sensitivity and Mitochondrial Function in Human Skeletal Muscle." *JCI insight* 3(3): 1–21.
- Petersen, M. C. et al. 2018. "Mechanims of Insulin Action and Insulin Resistance." *Physiol. Res* 98: 2133–2223.
- Pezeshkian, M a Mahtabipour, M. R. 2013. "Epicardial and Subcutaneous Adipose Tissue Fatty Acids



- Profiles in Diabetic and Non-Diabetic Patients Candidate for Coronary Artery Bypass Graft.” *Bioimpacts* 3(2): 83–89.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23878791><http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3713874/pdf/bi-3-83.pdf>.
- Pezeshkian, M. et al. 2009. “Fatty Acid Composition of Epicardial and Subcutaneous Human Adipose Tissue.” *Metabolic syndrome and related disorders* 7(2): 125–31.
- Pickersgill, L. et al. 2007. “Key Role for Ceramides in Mediating Insulin Resistance in Human Muscle Cells \*.” *The Journal of biological chemistry* 282(17): 12583–89.
- Pluskal, T. S., Villar-Briones, C. A a Orešič M. 2010. “MZmine 2: Modular Framework for Processing, Visualizing, and Analyzing Mass Spectrometry-Based Molecular Profile Data.” *BMC Bioinformatics* 11(395): 1471–2105.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2918584/pdf/1471-2105-11-395.pdf><http://www.biomedcentral.com/1471-2105/11/395>.
- Pol, A., Gross, S. P. a Parto., R. G. 2014. “Biogenesis of the Multifunctional Lipid Droplet: Lipids, Proteins, and Sites.” *Journal of Cell Biology* 204(5): 635–46.
- Poss, A. M. et al. 2020. “Machine Learning Reveals Serum Sphingolipids as Cholesterol-Independent Biomarkers of Coronary Artery Disease Find the Latest Version : Machine Learning Reveals Serum Sphingolipids as Cholesterol-Independent Biomarkers of Coronary Artery Disease.” *The journal of clinical investigation* 130(3): 1363–76.
- Quehenberger, O. et al. 2010. “Lipidomics Reveals a Remarkable Diversity of Lipids in Human Plasma,.” *Journal of Lipid Research* 51(11): 3299–3305.  
<http://www.jlr.org/lookup/doi/10.1194/jlr.M009449>.
- Rabkin, S W. 2007. “Epicardial Fat: Properties, Function and Relationship to Obesity.” *Obesity reviews : an official journal of the International Association for the Study of Obesity* 8(3): 253–61.
- Rauschert, S. et al. 2016. “Lipidomics Reveals Associations of Phospholipids With Obesity and Insulin Resistance in Young Adults.” *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 101(March): 871–79.
- Rauschert, S. et al. 2019. “Phospholipids in Lipoproteins: Compositional Differences across VLDL, LDL, and HDL in Pregnant Women.” *Lipids in Health and Disease* 18(1): 1–11.
- Rezaee, F. a Dashty, M. 2013. “Role of Adipose Tissue in Metabolic System Disorders Adipose Tissue Is the Initiator of Metabolic Diseases.” *Journal of Diabetes & Metabolic Disorders* S13(008): 1–9.
- Rosqvist, F. et al. 2017. “Fatty Acid Composition in Serum Cholesterol Esters and Phospholipids Is Linked to Visceral and Subcutaneous Adipose Tissue Content in Elderly Individuals: A Cross-Sectional Study.” *Lipids in Health and Disease* 16(1): 1–10.
- Sá, P. M. et al. 2017. “Transcriptional Regulation of Adipogenesis Adipose Tissue : A Dynamic Organ.” *Comprehensive Physiology* 7(April): 635–74.
- Saburkina, I. et al. 2011. “The Epicardial Neural Ganglionated Plexus of the Ovine Heart: Anatomical Basis for Experimental Cardiac Electrophysiology and Nerve Protective Cardiac Surgery.” *Heart Rhythm* 7(7): 942–50.
- Sacks, H. S. et al. 2009. “Uncoupling Protein-1 and Related Messenger Ribonucleic Acids in Human Epicardial and Other Adipose Tissues : Epicardial Fat Functioning As.” *Endocrine Research - Brief Report* 94(September): 3611–15.

- Samad, F. et al. 2011. "Adipose Tissue and Ceramide Biosynthesis in the Pathogenesis of Obesity." *Advances in experimental medicine and biology* 721: 67–86.
- Samaras, K. et al. 2010. "Subcutaneous and Visceral Adipose Tissue Gene Expression of Serum Adipokines That Predict Type 2 Diabetes." *Obesity* 18(5): 884–89. <http://dx.doi.org/10.1038/oby.2009.443>.
- Sarjeant, K. a Stephens, J. M. 2012. "Adipogenesis." *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4: 1–19.
- Sfyri, P. a Matsakas, A. 2017. "Crossroads between Peripheral Atherosclerosis , Western-Type Diet and Skeletal Muscle Pathophysiology : Emphasis on Apolipoprotein E Deficiency and Peripheral Arterial Disease." *Journal of Biomedical Science* 24(1): 1–25.
- Smith, C. A. et al. 2006. "XCMS : Processing Mass Spectrometry Data for Metabolite Profiling Using Nonlinear Peak Alignment , Matching , and Identification." *Analytical Chemistry* 78(3): 779–87.
- Smith, U. 2002. "Impaired ('diabetic') Insulin Signaling and Action Occur in Fat Cells Long before Glucose Intolerance--Is Insulin Resistance Initiated in the Adipose Tissue?" *International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity* 26(7): 897–904.
- Smith, U. a Kahn B. 2016. "Adipose Tissue Regulates Insulin Sensitivity: Role of Adipogenesis, de Novo Lipogenesis and Novel Lipids." *Journal of Internal Medicine* 280(5): 465–75. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/joim.12540>.
- Sobczak, A. I. S., Blindauer, C. A. a Stewart A. J. 2019. "Changes in Plasma Free Fatty Acids Associated with Type-2 Diabetes." *Nutrients* 11(2022): 1–42.
- Song, Y. et al. 2020. "The Roles of Epicardial Adipose Tissue in Heart Failure." *Heart Failure Reviews* (2999).
- Souček, F. a Novák, J. 2018. "Role Epikardiálního Tuku v Patofyziologii Srdečních Onemocnění." *Kardiologická revue - Interní medicína* 20(3): 212–17.
- Sprecher, H. 2000. "Metabolism of Highly Unsaturated N-3 and n-6 Fatty Acids." *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1486(2–3): 219–31.
- Styczynski, M. P. et al. 2007. "Systematic Identification of Conserved Metabolites in GC / MS Data for Metabolomics and Biomarker Discovery." *Analytical Chemistry* 79(3): 966–73.
- Suh, P. et al. 2008. "Multiple Roles of Phosphoinositide-Specific Phospholipase C Isozymes." *BMB reports* 41(6): 415–34.
- Sukhorukov, V. N., Karagodin, V. P. a Orekhov, A. N. 2016. "Atherogenic modification of low-density lipoproteins." *Biomeditsinskaja khimiia* 62(4): 391–402.
- Summerhill, V. I. et al. 2019. "The Atherogenic Role of Circulating Modified Lipids in Atherosclerosis." *Molecular Sciences* 20(14): 3561.
- Syme, C. et al. 2016. "Glycerophosphocholine Metabolites and Cardiovascular Disease Risk Factors in Adolescents: A Cohort Study." *Circulation* 134(21): 1629–36.
- Toczyłowski, K. et al. 2019. "Plasma Concentration and Expression of Adipokines in Epicardial and Subcutaneous Adipose Tissue Are Associated with Impaired Left Ventricular Filling Pattern." *Journal of Translational Medicine* 17(310): 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12967-019-2060-7>.
- Tomášová, P. et al. 2019. "Minor Lipids Profiling in Subcutaneous and Epicardial Fat Tissue Using LC / MS with an Optimized Preanalytical Phase." *Journal of Chromatography B* 1113(October 2018): 50–59. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2019.03.006>.

- Tomášová, P. et al. 2020. "Lipid Profiling in Epicardial and Subcutaneous Adipose Tissue of Patients with Coronary Artery Disease." *Journal of proteome research* 19(10): 3993–4003.
- Veen, J. N. et al. 2017. "The Critical Role of Phosphatidylcholine and Phosphatidylethanolamine Metabolism in Health and Disease." *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* 1859(9): 1558–72. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2017.04.006>.
- Vianello, E. et al. 2016. "Epicardial Adipocyte Hypertrophy : Association with M1-Polarization and Toll-like Receptor Pathways in Coronary Artery Disease Patients." *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases* 26(3): 246–53. <http://dx.doi.org/10.1016/j.numecd.2015.12.005>.
- Wall, P. E. 2005. *Thin-Layer Chromatography*. ed. R.M. Smith. The Royal Society of Chemistry.
- Watson, A. D. 2006. "Lipidomics : A Global Approach to Lipid Analysis in Biological Systems." *Journal of Lipid Research* 47: 2101–11.
- Wojtowicz, P. et al. 2013. "Techniky Metabolomiky v Biomedicíně." *Chemické listy* 107: 3–11.
- Wolrab, D. et al. 2020. "Determination of One Year Stability of Lipid Plasma Profile and Comparison of Blood Collection Tubes Using UHPSFC/MS and HILIC-UHPLC/MS." *Analytica Chimica Acta* 1137: 74–84.
- World Health Organization. 2019. "*Classification of Diabetes Mellitus.*" 2019.
- Worley, B. a Powers R. 2013. "Multivariate Analysis in Metabolomics." *Current metabolomics* 1(1): 92–107.
- Wu, J. et al. 2019. "Integrative Analyses of Myocardial Lipidome and Proteome Implicate Mitochondrial Dysfunction in Lethal Ventricular Tachyarrhythmia ( LVTA ) Induced by Acute Myocardial Ischemia ( AMI )." *Journal of Proteomics* 197(January): 14–22. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2019.01.021>.
- Wu, Z., Shon, J. C. and Liu, K. 2014. "Mass Spectrometry-Based Lipidomics and Its Application to Biomedical Research." *Journal of Lifestyle Medicine* 4(1): 17–33.
- Xu, F. et al. 2013. "Metabolic Signature Shift in Type 2 Diabetes Mellitus Revealed by Mass Spectrometry-Based Metabolomics." *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 98(6): 1060–65.
- Xu, H. et al. 2003. "Chronic Inflammation in Fat Plays a Crucial Role in the Development of Obesity-Related Insulin Resistance." *Journal of Clinical Investigation* 112(12): 1821–30.
- Xua, Q. a Liang, Y. 2001. "Monte Carlo Cross Validation." *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 56: 1–11.
- Yang, Y. et al. 2019. "Advances of Supercritical Fluid Chromatography in Lipid Profiling." *Journal of Pharmaceutical Analysis* 9(1): 1–8.
- Benjamini Y. and Yekutieli D. 2001. "The Control of the False Discovery Rate in Multiple Testing under Dependency." *The Annals of Statistics* 29(4): 1165–88.
- Zhang, H. et al. 2020. "Identification of Potential Serum Metabolic Biomarkers of Diabetic Kidney Disease : A Widely Targeted Metabolomics Study." *Journal of Diabetes Research* 2020: 11.
- Zhang, Y. et al. 2007. "PGC-1 a Inhibits Oleic Acid Induced Proliferation and Migration of Rat Vascular Smooth Muscle Cells." *PLoS ONE* 2(11): e1137.
- Zhang, Y. et al. 1994. "Positional Cloning of the Mouse Obese Gene and Its Human Homologue." *Nature* 372(6505): 425–32.

- Zhao, J. et al. 2019. "Triglyceride Is an Independent Predictor of Type 2 Diabetes among Middle - Aged and Older Adults : A Prospective Study with 8 - Year Follow - Ups in Two Cohorts." *Journal of Translational Medicine* 17: 403. <https://doi.org/10.1186/s12967-019-02156-3>.
- Zimmet, P. Z., George, K. a Alberti M.M. 2006. "Introduction: Globalization and the Non-Communicable Disease Epidemic." *OBESITY* 14(1): 1–3.
- Zlobine, I., Gopal, K. a Ussher, J. R. 2016. "Biochimica et Biophysica Acta Lipotoxicity in Obesity and Diabetes-Related Cardiac Dysfunction." *Biochimica et Biophysica Acta* 1861(10): 1555–68. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbaliip.2016.02.011>.

## 11 Publikační činnost

### 11.1 Publikační činnost vztahující se k tématu práce

#### 11.1.1 Publikace v časopisech s 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)**

### 11.2 Aktivní účast na konferenci přednášek/posterů:

#### 11.2.1 Poster

##### **1 34th Informal meeting of on Mass Spectrometry (15. - 18.5. 2016, Itálie)**

**Mass spectrometry based metabolomics in mice with diet-induced obesity and type 2 diabetes mellitus: effect of antidiabetic treatment by metformin, vildagliptin and their combination**

##### **2 5. konference České společnosti pro hmotnostní spektrometrii (13. - 15.4. 2016, České Budějovice)**

**Analysis of minor lipids in subcutaneous and epicardial fat tissue**

##### **3 ADVANCES IN CHROMATOGRAPHY AND ELECTROPHORESIS 2018 & CHIRANAL(29.1. - 1.2. 2018, Olomouc)**

**Untargeted metabolomics and lipidomics of subcutaneous and epicardial fat tissue - new preanalytical phase**

#### 11.2.2 Přednášky

##### **1 7. konference České společnosti pro hmotnostní spektrometrii (11. - 13. 4 2018, Praha)**

**Analysis of minor lipids in subcutaneous and epicardial fat tissue**

##### **2 20. Studentská vědecké konference 1. Lékařské fakulty UK (23.5. 2019, Praha)**

## **Comprehensive lipid profiling in adipose tissue of patients with ischemic heart disease and type 2 diabetes mellitus**

11.3 Publikační činnost bez vztahu k tématu práce

11.3.1 Publikace v časopisech 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)**

Prochazkova P, Roubalova R, Dvorak J, Kreisinger J, Hill M, Tlaskalova-Hogenova H, **Tomasova P**, Pelantova H, Cermakova M, Kuzma M, Bulant J, Bilej M, Smitka K, Lambertova A, Holanova P, Papezova 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)**

*11.3.1.1 Publikace v časopisech 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). <https://doi.org/10.1007/s42452-019-1576-z>

## 12 Seznam příloh

### **Příloha 1**

**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)**

### **Příloha 2**

**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)**





Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Chromatography B

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jchromb](http://www.elsevier.com/locate/jchromb)

## Minor lipids profiling in subcutaneous and epicardial fat tissue using LC/MS with an optimized preanalytical phase



Petra Tomášová<sup>a,b</sup>, Martina Čermáková<sup>a,c</sup>, Helena Pelantová<sup>a</sup>, Marek Vecka<sup>b</sup>,  
Helena Kratochvílová<sup>e,h</sup>, Michal Lipš<sup>f</sup>, Jaroslav Lindner<sup>g</sup>, Blanka Šedivá<sup>d,a</sup>, Martin Haluzík<sup>e,h</sup>,  
Marek Kuzma<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Institute of Microbiology, Czech Academy of Sciences, Vídeňská 1083, 142 20 Prague 4, Czech Republic

<sup>b</sup> 4th Medical Department, First Faculty of Medicine, Charles University and General Faculty Hospital in Prague, U Nemocnice 2, 128 08 Praha 2, Czech Republic

<sup>c</sup> Faculty of Chemical Technology, University of Chemistry and Technology Prague, Technická 5, 166 28 Prague 6, Czech Republic

<sup>d</sup> Faculty of Applied Sciences, University of West Bohemia, Univerzitní 8, 306 14 Plzeň, Czech Republic

<sup>e</sup> Institute of Medical Biochemistry and Laboratory Diagnostics, First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital in Prague, U Nemocnice 2, 128 08, Prague 2, Czech Republic

<sup>f</sup> Department of Anaesthesiology, Resuscitation and Intensive Care, First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital, Prague, Czech Republic

<sup>g</sup> 2nd Department of Surgery - Department of Cardiovascular Surgery, First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital, Prague, Czech Republic

<sup>h</sup> Centre for Experimental Medicine, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Vídeňská 1958/9, 140 21, Prague 4, Czech Republic

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Epicardial adipose tissue  
Subcutaneous adipose tissue  
Mass spectrometry  
Lipidomics  
Minor lipids

### ABSTRACT

Analysis of bioactive lipids in adipose tissue could lead to better understanding of the pathogenesis of obesity and its complications. However, current MS methods are limited by a high content of triacylglycerols (TAGs), which markedly surpasses the amount of other lipids and suppresses their ionization. The aim of our study was thus to optimize the preanalytical phase of lipid analysis in adipose tissue, focusing in particular on less-abundant lipids. Next, the optimized method was used to describe the differences between epicardial and subcutaneous adipose tissues obtained from patients undergoing cardiac surgery.

Lipids were extracted using a modified Folch method with subsequent detachment of TAGs by thin layer chromatography (TLC). The extracts with/without TAGs were analyzed by tandem LC/MS. The repeatability of the presented method expressed by the median of the coefficients of variation was 12/5% for analysis with/without TAGs separation, respectively. The difference in the relative abundance of TAGs gained with/without TLC was, on average, 19% and did not reach significance ( $p$  value > 0.05) for any identified TAG.

The novel preanalytical step allowed us to detect 37 lipids, which could not have been detected without TAG separation, because their signal to noise ratio is < 5 in current methods of untargeted lipidomics. These lipids belong predominately to ceramides, glycerophosphatidylserines, glycerophosphatidylinositols, sphingomyelins, glycerophosphatidylcholines, glycerophosphatidylethanolamines, diacylglycerols. The two adipose tissue depots differed mainly in the following lipid classes: glycerophosphatidylcholines, glycerophosphatidylinositols, glycerophosphatidylethanolamine, and sphingomyelins. Moreover, other major lipids showed distinctly different distributions between the two adipose tissues. Among these, the changes in TAGs were the most striking, which correspond to previously published data describing the differences between omental and subcutaneous adipose tissue.

Implementation of the TLC step for the elimination of TAGs was crucial for enhancing the MS detection limit of minor lipids in adipose tissue. The differences between the overall lipid profiles of subcutaneous and epicardial tissue reflect their different functions arising from their location.

### 1. Introduction

Obesity is a major public health threat that is commonly associated

with type 2 diabetes mellitus (T2DM), arterial hypertension, and dyslipidemia, collectively increasing the risk of cardiovascular morbidity and mortality. Obesity markedly affects the function of adipose tissue

\* Corresponding author.

E-mail address: [kuzma@biomed.cas.cz](mailto:kuzma@biomed.cas.cz) (M. Kuzma).

<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2019.03.006>

Received 11 October 2018; Received in revised form 5 March 2019; Accepted 6 March 2019

Available online 12 March 2019

1570-0232/ © 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

and, subsequently, leads to the development of other metabolic diseases [1]. This implies that the risk of metabolic diseases significantly depends on the adipose tissue distribution and its characteristics [2,3]. For a long time, adipose tissue was considered as passive depot for energy storage in the form of lipids. Over the last 20 years, adipose tissue has come to the forefront as an important endocrine organ, secreting adipokines that extensively contribute to whole-body homeostasis regulation [4]. Lipids represent the main component of adipose tissue and have multiple functions in the human body, including being the main components of cell membranes, membrane receptors and ion channels. Furthermore, some lipids are signaling molecules and play important regulatory roles in cellular processes such as proliferation, apoptosis, metabolism and migration, glucose metabolism, energy homeostasis and inflammation [5–7].

Fat depots are anatomically divided into two main classes: subcutaneous (SAT) and visceral white adipose tissue (VAT) [8,9]. Epicardial adipose tissue (EAT) is considered a subtype of VAT, and its volume is strongly positively correlated with the presence of coronary artery disease (CAD) [10–12].

The lipidomic approach allows a detailed description of lipid metabolites and their differences—in particular, adipose tissues or biofluids at the molecular level. For lipid analysis, numerous methods were developed using NMR or HPLC, GC or LC coupled with MS [13–19]. Of these, the best choice available seems to be MS-based lipidomics, with its high sensitivity, specificity and accuracy.

Targeted and untargeted lipidomics are the two main strategies applied currently for lipid analyses of various biological samples including adipose tissue. The targeted approach aims to determine specific groups of metabolites selected beforehand, while untargeted analysis aims to characterize the overall lipid content.

Blachnio-Zabielska et al. used targeted MS-based analyses of sphingolipids, diacylglycerols and long-chain acylCoA and correlated their levels with insulin resistance (IR) parameters in adipose tissue [20]. In another study, Margolis et al. focused on changes in the phospholipid content caused by breast cancer and obesity in breast adipose tissue [21]. Jové et al. described the lipid profile of human omental and SAT using LC-MS. As expected, most of the identified lipids (97% in obese and 99% in nonobese patients) were glycerolipids (mono-, di-, tri- acylglycerols). Furthermore, they also identified minor lipids such as glycerophospholipids, sphingolipids, sterols, and free fatty acids [9]. Regarding EAT, one study suggested that characteristic features include a higher content of saturated fatty acids (as 14:0, 16:0, 18:0) and a lower content of unsaturated fatty acids (as 16:1n-7, 18:1n-9, 18:2n-6, 18:3n-3) compared to SAT [17]. In contrast to the adipose tissue lipid content, the most abundant plasma lipid classes are glycerophosphatidylcholines (PCs), triacylglycerols (TAGs) and then glycerophosphatidylethanolamines (PEs) [22].

Evidently, the current GC analyses provide us mostly with total fatty acids and TAGs profiles, while the changes in fatty acids reflect mostly changes in TAGs [18]. This is caused by the fact that untargeted lipidomic analysis of adipose tissue is limited by the high content of glycerolipids, which markedly exceeds the content of other lipid classes and, subsequently, leads to suppression of their signals. Therefore, the detection of minor lipids requires separation of TAGs prior to analysis *per se*. Moreover, there are still some gaps in the knowledge of the lipid content of EAT.

Taken together, several untargeted and targeted lipidomic studies have been conducted in different adipose tissues, but up to now, minimal attention has been paid to the simultaneous measurement of both minor and major lipids. Therefore, the principal aim of our study was to optimize the method for the simultaneous analysis of both major and minor bioactive lipids. Afterwards, the optimized method was applied to lipidomic analysis of clinical samples of SAT and EAT from patients undergoing cardiac surgery.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Chemicals and reagents

The lipid standard (SPLASH® Lipidomix® Mass Spec Standard) was obtained from Avanti Polar Lipids (Alabama, USA). Heptane, ethylether (both HPLC-grade) and glacial acetic acid were purchased from Chromservis (Prague, Czech Republic). Propan-2-ol, acetonitrile, methanol, dichloromethane, hexane, and water (all LC-MS-grade) were purchased from VWR chemicals (Fontenay-Sous-Bois, France). Butylhydroxytoluene (BHT) was purchased from Sigma Aldrich (St. Louis, USA). Silica gel 60 PF 254 + 366 was obtained from Merck (Darmstadt, Germany). Tissue homogenization was performed using a hand tissue grinder, IKA®-Werke GmbH & Co. KG (Staufen, Germany).

### 2.2. Patients and tissue sampling

All participants included in the study signed written informed consent prior to enrollment into the study. The study was approved by the Human Ethics Review Board, First Faculty of Medicine, Charles University and General Faculty Hospital, Prague, Czech Republic and was performed in accordance with the guidelines proposed in the Declaration of Helsinki (2000) of the World Medical Association.

All patients had ischemic heart disease and underwent elective cardiac surgery at the 2nd Department of Surgery - Department of Cardiovascular Surgery, First Faculty of Medicine, Charles University and General Faculty Hospital, Prague, Czech Republic. Basic biochemical parameters were measured, and the patients were measured and weighed and BMI values were calculated. Blood samples were taken prior to initiation of anesthesia before the operation. Samples of SAT (thoracic region) and EAT for lipidomic analyses were collected from all patients at the beginning of the surgery from approximately the same location in all patients. Tissue samples were collected into phosphate-buffered saline (PBS) or to 1 ml of RNAlater reagent (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until further analysis. The validated method was used for lipidomic analysis of samples of SAT ( $n = 10$ ) and EAT ( $n = 10$ ). Samples were measured in random order.

Blood glucose, cholesterol, HDL cholesterol and triacylglycerols were measured at the Department of Biochemistry, General Faculty Hospital, Prague, Czech Republic by standard laboratory methods.

### 2.3. Tissue sample preparation for lipidomics

#### 2.3.1. Adipose tissue extraction

Prior to lipid extraction, the RNAlater reagent (or PBS) was removed from the tissue sample into another tube. The sample was dried under nitrogen and weighed. Lipids were obtained using a modified Folch extraction [23,24]. Briefly, approximately 50 mg of dried tissue was transferred into the extraction tube with the used RNAlater, and 2 ml of methanol containing 100  $\mu\text{g/ml}$  BHT was added. Tissue cells were disrupted using a hand tissue grinder. Next, hand tissue grinder was washed with 4 ml of dichloromethane and 4 ml of a mixture of methanol and dichloromethane (1:2, v/v). The wash solvents were added to the sample. The sample was vortexed for 1 min and incubated on shaker for an additional 20 min at  $4^{\circ}\text{C}$ . After the addition of 2.5 ml of water, the sample was vortexed for 1 min and centrifuged at 1500 rpm for 20 min at  $4^{\circ}\text{C}$  [23]. The bottom layer of dichloromethane was collected and divided into 2 aliquots.

#### 2.3.2. Sample extract processing

The first of two aliquots obtained in the previous step underwent untargeted lipidomic analysis. For this, 1 ml of the bottom layer was dried under nitrogen, and the resulting dry matter was then dissolved in 1 ml of propan-2-ol:acetonitrile:water (1:2:1, v/v/v) and vortexed for

1 min. Separation was performed by an HPLC Agilent 1200 LC system (Agilent Technologies, California, USA) equipped with an Accucore column C30 (150 × 2.1 mm, 2.6 μm, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) [25]. The column temperature was kept at 40 °C. Mobile phase A contained 10 mM ammonium formate in 60% acetonitrile and 0.1% formic acid, and mobile phase B contained a 10 mM ammonium formate in acetonitrile:propan-2-ol (1:9, v/v) mixture with 0.1% formic acid. The flow rate was 0.24 ml/min. The elution gradient was: 30% B for 5 min, 30% - 43% B for 2 min, 43% - 50% B for 1.3 min, 50%–70% B for 11.3 min, 100% B for 7 min, and 18% B for 10 min. The injection volume was 1 μl.

MS spectra of the analyzed samples were acquired using a micrOTOF-Q III (Bruker Daltonics, USA) with electrospray ionization in positive and negative modes and with a full scan ( $m/z$  100–2000). The drying temperature was set to 270 °C, the drying gas to  $91 \text{ l min}^{-1}$ , and the nebulizer gas to  $1.41 \text{ l min}^{-1}$ . The capillary voltage was set to 4500 V. The transfer time was set to 80 μs, the prepulse storage to 10 μs, and the spectra time to 1 s. The MS was calibrated by clusters of sodium formate for exact mass.

The second aliquot was first rid of TAGs using thin layer chromatography (TLC) to enable profiling of the minor lipid classes, which were under limit of detection without TAGs separation. The TLC plates were prepared in-house by the following procedure. A glass plate (20 × 20 cm) was covered with silica gel suspended in water. The second aliquot was first dried under nitrogen, then reconstituted in 200 μl of a methanol and hexane mixture (2:1, v/v) and vortexed for 1 min and applied onto the plate. The TLC plate was placed into the chamber saturated with vapors of a heptane:ethyl ether:glacial acetic acid mixture (80:20:1, v/v/v) with the addition of 100 μg/ml of BHT. The chamber was covered with alumina to minimize exposure of the plate to light. Afterwards, the plate was dried in a vacuum and in the dark. Lipid fractions were visualized by UV light. TAGs were identified on the plate using UV detection. The distances of the minor lipid compounds from the start were estimated using the lipid standard mixture. The identified spots of TAGs were marked, and the residual silica gel was scraped off into another tube. The lipids were extracted from the silica gel with a mixture of methanol and hexane (2:1, v/v), first with 10 ml and then with 5 ml. The extract was evaporated under nitrogen and diluted with 200 μl of propan-2-ol:acetonitrile:water (1:2:1, v/v/v), vortexed for 30 s, sonicated for 30 s and vortexed again for 10 s. It was then centrifuged at 15,000 rpm for 5 min, and the supernatant was transferred to chromatographic vials. Furthermore, 100 μl of a propan-2-ol:acetonitrile:water (1:2:1, v/v/v) mixture was added to the remaining sample, and the sample was vortexed for 30 s, sonicated for 30 s, vortexed for 10 s, centrifuged at 15,000 rpm for 5 min and the transferred to chromatographic vials. Lipid extract was after removal of TAGs (in following text referred to as the minor lipid extract), measured using the same (untargeted) procedure as previously described for the first aliquot. The injection volume was set to 15 μl. For verification of the accuracy of the TLC method, TAGs from untargeted lipidomic analysis were compared with TAGs from the second aliquot separated by TLC.

### 2.3.3. Blank samples

Blank samples were prepared in parallel with both fractions and every step of both kind of preanalytical phase to exclude possible cross-contamination. The obtained chromatograms underwent the same peak search as did the samples. Every fifth sample in the sequence was a blank, which contained used mobile phase corresponding to the initial gradient to check for contamination of the device.

### 2.4. Data analysis

The analysis of the data resulted from samples with and without TAGs was performed using the same process to maximize the number of

identified lipids. DataAnalysis 4.2 software (BrukerDaltonics, USA) was used to calibrate the spectra for exact mass and to convert the spectra to .cdf format. The raw data was exported to MZmine 2.23 software [26]. The processing parameters were as follows: signal-to-noise ratio of 5, intensity threshold of  $1 \times 10^3$ , mass range of 100–1500, retention time ranging from 1 to 45 min, time tolerance of 0.15 min, mass tolerance of 10 ppm, minimal peak duration of 0.2 min, and maximal peak duration of 1.2 min. Chromatogram deconvolution was conducted.

Lipids identification was based on the isotopic pattern expressed by the value of  $m\text{Sigma}$  and the predicted formula from the tool SmartFormula of the software DataAnalysis 4.2 (BrukerDaltonics, USA). The predicted formula was searched through CompoundCrowler software. Consequently, the exact mass was searched in the LIPID MAPS website (<http://www.lipidmaps.org>) database and the Human Metabolome Database (<http://www.hmdb.ca>) with a maximum tolerance of 10 ppm and possible adducts formation ( $[M + H]^+$ ,  $[M + NH_4]^+$ ,  $[M + Na]^+$ ,  $[M - COO]^-$ ,  $[M - H]^-$ ). The fragmentation explorer tool in DataAnalysis 4.2 was used to calculate theoretical fragmentations. The calculated MS/MS fragments were compared to the original spectra. Moreover, if available, the fragment was confirmed using spectra from databases, e.g., the Human Metabolome Database (<http://www.hmdb.ca>) or MetFrag or by comparison of the retention time with standards or published data [25,27]. Peak intensities were normalized by the sum of all peaks.

### 2.5. Method validation

First, the repeatability of the HPLC method was tested. A SPLASH® Lipidomix® Mass Spec Standard was measured five times using the same method described in chapter 2.3.2. The injection volume of the standard mixture was 1 μl. Further, the repeatability, reproducibility and accuracy of the extraction process, as well as the different ways of storage of adipose tissue (in RNAlater or in PBS), were verified, too.

The repeatability of the extraction procedure was evaluated by the following process. Mixed samples of SAT were divided into 5 aliquots and underwent the same processing mentioned above. Reproducibility and accuracy were tested by comparison of the relative contents of TAGs separated with or without TLC.

The effect of the sample storage medium on the content of lipids in adipose tissue was assessed as follows. Samples of SAT coming from one patient, stored either in RNAlater or PBS, were mixed and divided into five aliquots. All aliquots underwent the extraction process and data analysis.

### 2.6. Statistical analysis

Anthropometric and biochemical parameters of patients were expressed as the mean ± standard deviation (SD). The variabilities of data were measured by the coefficient of variation (CV). The Gaussian distribution of the data sets was assessed by Jarque–Bera tests. If the normality assumption was rejected, the nonparametric statistics were preferred. The significant differences between groups were detected by a standard Student's two-sample *t*-test (parametric approach) or Wilcoxon rank sum test (nonparametric approach). The Benjamini & Yekutieli [28] procedure for controlling the false discovery rate (FDR) of a family of hypothesis tests was executed. FDR is the expected proportion of rejected hypotheses that are mistakenly rejected. Partial least squares-discriminant Analysis (PLS-DA) was executed to examine the quality of the group separations. The Pearson's coefficient of correlation (parametric approach) or Spearman's rank correlation coefficient (nonparametric approach) were used to identify a linear relationship. Univariate and multivariate statistical analysis was performed using MATLAB software (version 9.0 R2016a) and MetaboAnalyst 4.0. The significance level was set to  $p < 0.05$ .

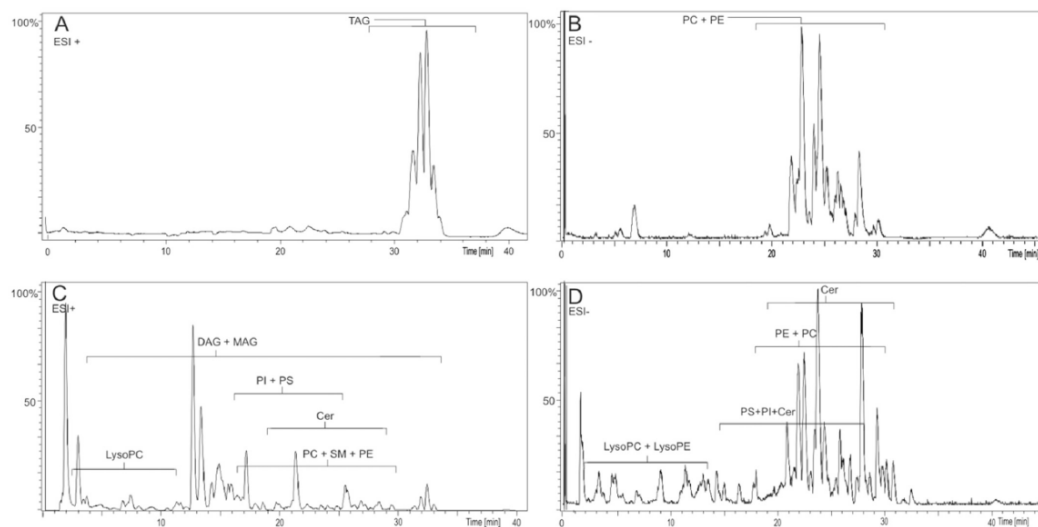


Fig. 1. Representative lipid spectra of subcutaneous adipose tissue: A) Total ion chromatogram (TIC) of lipid extract with TAGs - positive mode; B) TIC of lipid extract with TAGs - negative mode; C) TIC of lipid extract after TAGs removal by TLC - positive mode; D) TIC of lipid extract after TAGs removal by TLC - negative mode; TAGs - triacylglycerols, PEs - glycerophosphatidylethanolamines, LysoPCs - Lysophosphatidylcholines, PCs - glycerophosphatidylcholines, SMs - sphingomyelins, Cers - ceramides, MAGs - monoacylglycerols, DAGs - diacylglycerols, LysoPEs - Lysophosphatidylethanolamines, PSs - glycerophosphatidylserines, PIs - phosphatidylinositols.

### 3. Results

In the current study, we attempted to separate TAGs as the major component of adipose tissue lipids from other lipid classes. Implementation of this step allowed us to assign 37 lipids in addition to 169 lipids identified without TAG removal (115 from them were TAGs). A complete list of identified lipids is presented in supplementary material Table S1. In the next step, we applied a tandem HPLC-MS method to identify differences among the lipid contents of SAT and EAT, particularly that of minor lipids.

Fig. 1 shows the typical chromatograms of lipidomic analyses. Fig. 1 A and B present the total ion chromatograms (TIC) obtained from untargeted lipidomic analysis of adipose tissue extracts with TAGs in positive (A) and negative mode (B). The dominant peaks in positive mode were unequivocally TAGs. Fig. 1 C and D show chromatograms of adipose tissue extract after separation of TAGs by TLC in positive and negative mode, respectively. The retention times were verified by a standard mixture (SPLASH® Lipidomix® Mass Spec Standard). Parameters used for identification are summarized in Table 1.

#### 3.1. Method validation

The application of a novel preanalytical step for the minor lipid compounds analysis of adipose tissue requires an appropriate validation, including determination of the repeatability and accuracy of the extraction procedure. Since the adipose tissues were stored in a specific medium called RNAlater (Qiagen GmbH, Hilden, Germany), of which usage in lipidomics is rather rare, it was necessary to regard the sample storage conditions.

The repeatability of the HPLC-MS method was tested by repetitive measurement of the SPLASH® Lipidomix® Mass Spec Standard ( $n = 5$ ), and the coefficient of variation (CV) of the relative intensity was, on average, 1% and ranged up to 3%. The Folch extraction, used for the purpose of lipids extraction, is a commonly used method suitable for the extraction of nonpolar and medium-polar metabolites [23,24].

The repeatability of the extraction is expressed by the CV of the relative intensities of peaks. The CV within untargeted lipidomic analysis in positive and negative mode ranged from 1 to 20% with a median of 4.54% (Figs. 2 and 3). In samples after the removal of TAGs (minor lipids) in positive and negative mode, the CV ranged from 3 to 25%. The median CV was 12.84% (Figs. 3 and 4).

The accuracy of the extraction method was verified by comparison of the TAGs content yielded from the analysis using TAGs separation by TLC with the TAGs content in the original sample (obtained by untargeted lipidomics). Only 12 out of 138 picked peaks differed significantly ( $p$  value  $< 0.05$ ), while no significant ( $p$  value  $> 0.05$ ) changes were detected between the remaining 126 peaks.

The degree of compliance is expressed as the difference between the means of the relative intensities obtained by processes with and without TLC separation for every peak. The averaged degree of compliance was 19%. The value of the degree of compliance was negatively correlated with the relative intensity (Spearman's rank correlation coefficient  $R = -0.148$  and corresponding  $p$  value-determined significance of  $p = 0.073$  for TAGs without TLC separation, and  $R = -0.175$ ,  $p = 0.037$  for TAGs obtained using TLC).

The influence of sample collection into either RNAlater reagent or PBS was tested for minor lipids. (Based on the result of the normality test, a nonparametric Wilcoxon test was chosen for identification of the significant differences.) In total, 152 lipids were not affected by the sample storage medium. Only 11 out of 163 lipids were affected significantly. However, none of them was identified by exact mass. Fig. 4 shows the distribution of the masses identified as significantly affected by the sample storage medium.

#### 3.2. Clinical samples

Clinical samples were obtained from patients who underwent elective cardiac surgery ( $n = 10$ ). The anthropometric and biochemical characteristics of patients are presented in Table 2. Profiling of lipids revealed numerous differences between SAT and EAT in both negative

**Table 1**  
Parameters for identification of lipid classes.

Lipid class	R.T. [min]	Adducts		Fragments	
		Positive	Negative	Positive	Negative
TAGs	28–36	[M + NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup> [M + Na] <sup>+</sup>	–	[M-FA + NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	–
DAGs	18–30	[M + NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup> [M + Na] <sup>+</sup>	–	[M-FA + H] <sup>+</sup>	–
MAGs	3–15	[M + H] <sup>+</sup>	–	[M-FA + H] <sup>+</sup>	–
LysoPCs	3–11	[M + NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup> [M + Na] <sup>+</sup>	[M + HCOO] <sup>–</sup>	Ion m/z 184.07	[FA-H] <sup>–</sup>
		[M + H] <sup>+</sup>		Neutral loss of m/z 184.07	[M-CH <sub>3</sub> ] <sup>–</sup>
PCs	19–29	[M + H] <sup>+</sup>	[M-H] <sup>–</sup> , [M + HCOO] <sup>–</sup>	Ion m/z 184.07	[FA-H] <sup>–</sup>
				Neutral loss of m/z 184.07	[M-CH <sub>3</sub> ] <sup>–</sup>
LysoPEs	2–6	[M + H] <sup>+</sup>	[M-H] <sup>–</sup>	Neutral loss of m/z 141.02	[FA-H] <sup>–</sup>
PEs	20–26	[M + H] <sup>+</sup>	[M-H] <sup>–</sup>	Neutral loss of m/z 141.02	[FA-H] <sup>–</sup> , [LysoPE-H] <sup>–</sup>
Cers	16–30	[M + H] <sup>+</sup>	[M + HCOO] <sup>–</sup>	Ion m/z 264.23	[FA-H] <sup>–</sup>
SMs	18–28	[M + H] <sup>+</sup>	–	Ion m/z 184.07	–
				Neutral loss of m/z 168.07	–
PIs	20–23	–	[M-H] <sup>–</sup>	–	Ion m/z 241.01, Ion m/z 264.22
				–	[FA-H] <sup>–</sup>
PSs	20–24	[M + H] <sup>+</sup>	[M-H] <sup>–</sup>	–	[FA-H] <sup>–</sup>
				–	[M-H-Ser] <sup>–</sup>

R.T. - retention time, TAGs - triacylglycerols, MAGs - monoacylglycerols, DAGs - diacylglycerols, LysoPCs - Lysophosphatidylcholines, PCs - glycerophosphatidylcholines, LysoPEs - Lysophosphatidylethanolamines, PEs - glycerophosphatidylethanolamines, Cers - ceramides, SMs - sphingomyelins, PIs - glycerophosphatidylinositols, PSs - glycerophosphatidylserines, FA - fatty acid.

and positive mode using untargeted lipidomics or the profiling of low-abundance lipids obtained after separation of TAGs. Multivariate analysis was applied to the lipidomic data to describe the differences between the SAT and EAT lipid profiles of the patients undergoing cardiac surgery. The resulting PLS-DA scores plots are presented in Fig. 5. Based on all four score plots, we can summarize that both untargeted and minor lipids analyses in both positive and negative mode were able to explain variance by the first two components with > 50% covered.

The reference values were taken from Database of laboratory examinations in General Faculty Hospital in Prague, Czech Republic.

Statistical analyses revealed changes in many members of lipid classes such as TAGs, PCs and, rarely, from DAG, PI, SM, and PE (Table 3). The MS/MS spectra used for their identification are presented in supplementary material Fig. S1–S16. EAT is generally richer in PCs. On the other hand, the content of TAGs was lower than was the content of SAT. PI (20:4/18:1) and PE (36:4) had lower levels, while SM (34:1) were higher in EAT than in SAT.

#### 4. Discussion

In this study, we introduced the lipidomics of major and minor lipids in adipose tissue with the use of a novel preanalytical phase including TLC separation of minor lipid classes from highly abundant TAGs. Untargeted plasma lipidomics successfully identified many members of various lipid classes; however, it is not suitable for the analysis of adipose tissue [25,29]. So far, the use of available untargeted lipidomic MS methods to analyze adipose tissue has struggled with low sensitivity toward minor lipids and has been considered useful only for analysis of the most abundant lipids. Otherwise, targeted lipidomic methods are influenced by complicated sample preparation and deal only with a limited number of identified lipids. Lopéz-Bascón et al. developed a solid phase extraction (SPE)-based separation method focused on the effect of the extraction medium. However, in this study, the authors did not address the effect of SPE separation on minor lipids levels. Furthermore, they did not confirm the method on real samples

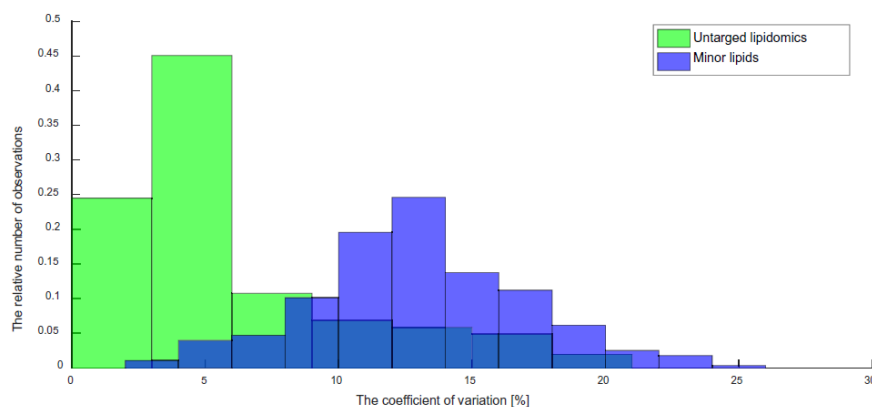


Fig. 2. Frequency of the coefficient of variation of lipids in processed adipose tissue fractions (Untargeted lipidomics: green histogram, Minor lipids: blue histogram). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

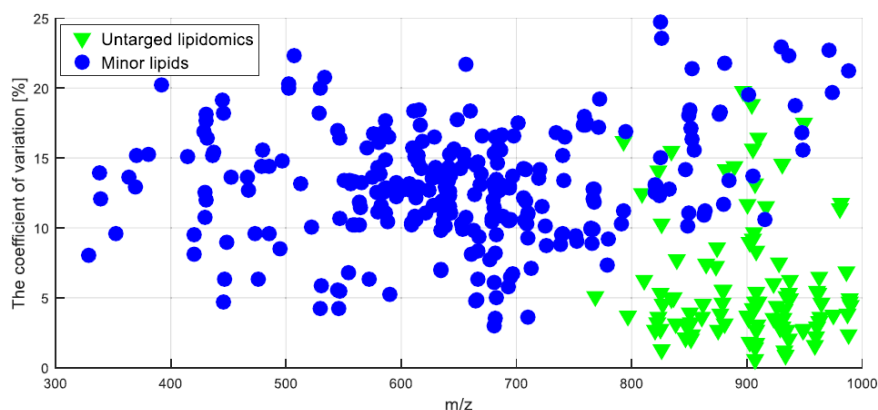


Fig. 3. Coefficient of variation of adipose tissue lipids presented by their exact mass (Untargeted lipidomics: green points; Minor lipids: blue points). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

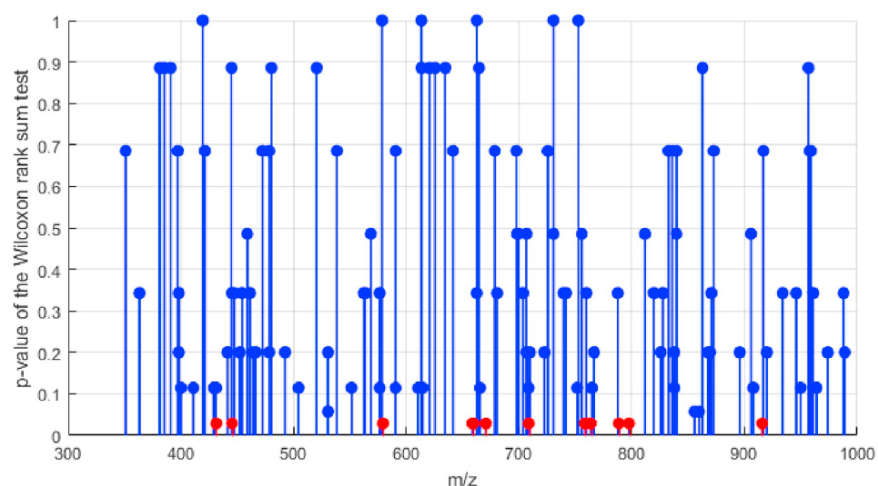


Fig. 4. Effect of adipose tissue sample storage in RNAlater reagent with and without RNAlater for minor lipids (positive mode). Statistics were based on the Wilcoxon rank sum test. Red points are lipids with significant differences ( $p$  value  $< 0.05$ ), and blue points are lipids without significant differences ( $p$  value  $> 0.05$ ). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Table 2  
Anthropometric and biochemical characterization of patients, who underwent elective cardiac surgery.

Parameters	Mean $\pm$ SD	Reference ranges
Number of subjects	10	–
Age [years]	64.8 $\pm$ 7.7	–
BMI [ $\text{kg}/\text{m}^2$ ]	28.2 $\pm$ 5.7	18.0–25.0
Total cholesterol [mmol/l]	3.5 $\pm$ 0.7	2.9–5.2
HDL cholesterol [mmol/l]	1.1 $\pm$ 0.2	1.0–2.7
TAGs [mmol/l]	1.4 $\pm$ 0.7	0.5–1.7
Fasting glucose [mmol/l]	5.9 $\pm$ 1.0	3.9–5.6
Fasting insulin [mIU/ml]	31.5 $\pm$ 16.1	2.6–24.9

[27]. Our minor lipids profiling in adipose tissue with TLC separation focused on lipids involved in membrane structure and/or acting as signaling molecules.

#### 4.1. Method validation

Before application of our method for the analysis of clinical samples, it was necessary to perform optimization and validation. We tested our method for repeatability both in positive and negative ionization modes. The variability of the method as measured by the CV was satisfactory for untargeted lipidomics and minor lipid analyses. On the other hand, TLC separation caused an increase in the CV when performing repeated sample measurements. During TLC, lipids are exposed to oxygen, which leads to the oxidation of unsaturated fatty acids. To

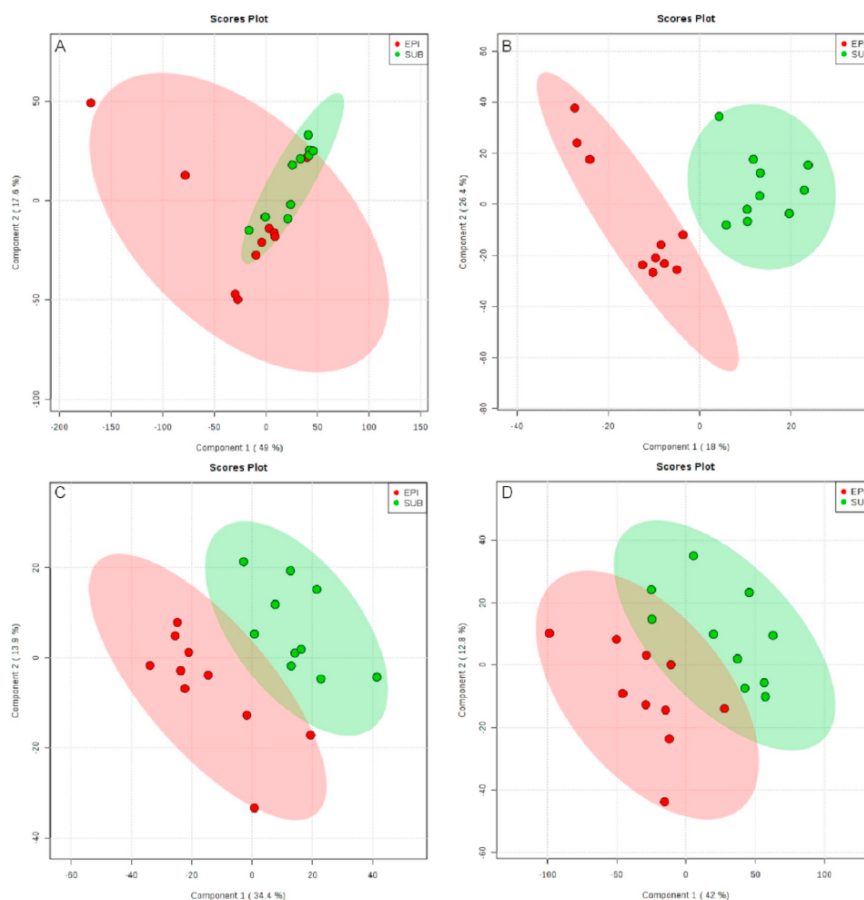


Fig. 5. Partial least squares Discriminant Analysis (PLS-DA) score plots of real-patient samples of epicardial (red points) and subcutaneous (green points) adipose tissue; A) PLS-DA score plot of untargeted lipidomics - positive mode (The model cross validation results: number of component: 2, accuracy: 0.60,  $R^2 = 0.452$ ,  $Q^2 = -0.253$ , p value of permutation test (2000 repetitions) 0.621) B) PLS-DA score plot of untargeted lipidomics - negative mode (The model cross validation results: number of component: 2, accuracy: 0.95,  $R^2 = 0.886$ ,  $Q^2 = 0.724$ , p value of permutation test (2000 repetitions) 0.102) C) PLS-DA score plot of minor lipids - positive mode (The model cross validation results: number of component: 2, accuracy: 0.95,  $R^2 = 0.820$ ,  $Q^2 = 0.550$ , p value of permutation test (2000 repetitions) 0.428) D) PLS-DA score plot of minor lipids - negative mode (The model cross validation results: number of component: 3, accuracy: 0.85,  $R^2 = 0.818$ ,  $Q^2 = 0.416$ , p value of permutation test (2000 repetitions) 0.056). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

prevent lipid oxidation, the addition of BHT was required. Another oxidation-preventing step during development and drying of the plate was its placement in darkness and in a vacuum. Despite of all preventive measures, the repeatability expressed by the CV was higher for the aliquot with TAGs separation compared to that for untargeted lipidomics.

Another advantage of our method using TLC is the easily controlled plate overload. Overload of the stationary phase, for example, in SPE, can suppress the extraction of minor compounds, with possible misleading results. Sample overload was prevented by applying the sample to a bigger spot. Due to this feature, we could use the whole available sample, which is highly important in the analysis of minor lipids. Since the available tissue samples were stored in RNAlater, we compared the relative intensities of picked peaks of lipids coming from samples stored

in RNAlater and in PBS. The storage medium does not seem to have a substantial effect on any lipid classes. However, the test was performed on five aliquots of a single sample only due to limited number of samples, thus one has to be cautious about interpretation.

Finally, the preparation and evaluation of blank samples was of importance, since using more preparation steps may introduce sample contamination. Blank samples successfully verified the origin of each peak and prevented false-positive identifications.

#### 4.2. Clinical samples

Using our optimized method, multiple differences in lipid content and composition between EAT and SAT were observed (Table 3). The most significant changes were observed in the TAGs and PCs relative

**Table 3**  
Lipids significantly differing between subcutaneous and epicardial adipose tissue.

	m/z	R.T. (min)	FC (EAT/SAT)	P value	FDR adjusted P value
SM(16:1)	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

FC - fold change (relative intensity of epicardial adipose tissue versus the relative intensity of subcutaneous adipose tissue), R.T. - retention time, PC - glycerophosphocholine, DAG - diacylglycerol, TAG - triacylglycerol, SM - sphingomyelin, Cer - ceramide, PI - glycerophosphatidylinositol, PE - glycerophosphatidylethanolamine; p value determined by nonparametric Wilcoxon rank sum test, FDR - false discovery rate determined by Benjamini & Yekutieli, bolded p value were significant (p value < 0.05).

contents. The level of TAGs was higher in SAT. TAGs are stored in adipose tissue as lipid droplets, which are sorted into adipocyte organelles with high-powered lipid metabolism [30]. Meex et al. demonstrated higher TAGs levels in SAT compared with omental adipose tissue owing to differential expression of the genes involved in TAGs homeostasis and lipid droplets formation (FSP27, ACSL1, DGAT1 and PPAR $\gamma$ ) [30].

On the other hand, the levels of some PCs were significantly higher in EAT compared to SAT in our study. PCs form 40–50% and PEs represent 40% of the total phospholipids in the cell [31,32]. Cardiomyocytes are highly sensitive to lipotoxicity caused by fatty acids degradation [33,34]. Cardiomyocytes and EAT are closely interconnected, and they are not restricted by a firm layer; therefore, strong anchoring of TAGs in lipid droplets is very important [11]. Lipid droplets are covered with a monolayer of phospholipids, and their formation is essential for protection against lipotoxicity [35]. The ratio of PCs and PEs is essential to the size of lipid droplets. Inhibition of the synthesis of PCs or an increase in the relative content of PEs leads to fusion of small droplets into larger ones [32,36]. The higher content of PCs and decreased level of PE (20:4/18:0) in our study in EAT compared to SAT could imply smaller lipid droplet formation in EAT. We hypothesize that this could be an intrinsic property of EAT, retaining fatty acids more strongly than SAT. PEs were put in context with the dynamic state in adipose tissue, which was supported by transcriptomic analysis of genes involved in the differentiation of adipose tissue [9,37].

Syme et al. published studies focused on association of cardiovascular disease with serum PCs levels during adolescence. They correlated PCs levels with typical risk factors for the development of CVD such as visceral adiposity, blood pressure, insulin resistance, and atherogenic dyslipidemia. Negative correlations of PC 16:0/2:0 (plate activating factor) with visceral fat volume, blood pressure and fasting TAGs were observed. On the other hand, a positive correlation was most significant for the relationship of LysoPC 14:1 with visceral fat, fasting insulin and TAGs [38]. Furthermore, Guasch-Ferré et al. suggested that intermediates of the PCs synthesis pathway play a role in the development of CVD, too [39]. An increased volume of EAT is associated with coronary heart disease [40]. We hypothesized that adipocytes of EAT did not serve as energy storage, as do those of SAT. Moreover, their endocrine activity is also less significant [41].

Using our method, we identified other minor lipids; however, their function connected with adipose tissue has not yet been described. The

level of PI (20:4/18:1) was higher in SAT compared with EAT. PI are closely connected with phosphatidylinositol 3-kinase, a member of an important signaling cascade [42,43]. Other phospholipids detected in adipose tissue were PS. Their content did not differ significantly according to adipose tissue location. Margolis et al. described decreased levels of PS in breast adipose tissue in obese mice [21]. Furthermore, PS are discussed as important signaling molecules in macrophages [44,45]. Sphingolipids and their derivatives are known as signaling molecules and second messengers [46]. Dysregulation of their metabolism was previously associated with obesity and increased incidence of cardiovascular disease [47]. Representatives of sphingolipid classes were present in both adipose tissue depots, but only SM (16:1) was significantly higher in EAT compared with SAT.

## 5. Conclusions

In this study, we identified a number of different lipid profiles in SAT and EAT samples of patients undergoing elective cardiac surgery using lipids analysis with or without preanalytical removal of TAGs. Our optimized method makes the detection of members of several lipid classes, even those less abundant, possible. The current results are very important, since with previous methods, these lipids were under the limit of detection. These findings could help to clarify the function of different lipids within EAT or other fat depots. A lower content of TAGs and PE (20:4/18:0) as well as a higher content of PCs in EAT could imply a rather protective function of EAT, sheltering cardiomyocytes against lipid overload rather than primarily being a depot of energetically rich lipids. However, from the lipids classes, involved in signaling pathway, differed significantly only SM (16:1), DAG (18:1/18:0), and PI (20:4/18:1) between SAT and EAT. This finding may suggest that these pathways use the same signaling mechanism in both types of adipose tissue. Further studies are necessary to clarify whether these differences are specific to CAD patients and whether they can play a role in the etiopathogenesis of heart diseases.

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2019.03.006>.

## Acknowledgments

This work was financially supported by the National Program of Sustainability (NPU I Lo1509) and research projects RVO-VFN64165,



PROGRES-Q25/LF1/2, SVV 260370-2017, NV15-26854A. The research was conducted within the infrastructure built from the support of the Operational Programme Prague – Competitiveness (CZ.2.16/3.1.00/24023).

## References

- [1] M. Blüher, Adipose tissue dysfunction contributes to obesity related metabolic diseases, *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 27 (2013) 163–177, <https://doi.org/10.1016/j.beem.2013.02.005>.
- [2] G.I. and A.M. Sharma, Epicardial adipose tissue as new cardio-metabolic risk marker and potential therapeutic target in the metabolic syndrome, *Curr. Pharm. Des.* 13 (2007) 2180–2184, <https://doi.org/10.2174/138161207781039670>.
- [3] G. Winkler, S. Kiss, L. Keszthelyi, Z. Sági, I. Öry, F. Salamon, M. Kovács, P. Vargha, O. Szekeres, G. Speer, I. Karádi, M. Sikter, E. Kaszás, O. Dworak, G. Gerő, K. Cseh, Expression of tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  protein in the subcutaneous and visceral adipose tissue in correlation with adipocyte cell volume, serum TNF- $\alpha$ , soluble serum TNF-receptor-2 concentrations and C-peptide level, *Eur. J. Endocrinol.* 149 (2003) 129–135, <https://doi.org/10.1530/eje.0.1490129>.
- [4] K. Samaras, N.K. Botelho, D.J. Chisholm, R.V. Lord, Subcutaneous and visceral adipose tissue gene expression of serum adipokines that predict type 2 diabetes, *Obesity*, 18 (2010) 884–889, <https://doi.org/10.1038/oby.2009.443>.
- [5] M. Blüher, Clinical relevance of adipokines, *Diabetes Metab. J.* 36 (2012) 317–327, <https://doi.org/10.4093/dmj.2012.36.5.317>.
- [6] L.F. Van Gaal, L.L. Mertens, C.E. De Block, Mechanisms linking obesity with cardiovascular disease, *Nature*, 444 (2006) 875–880, <https://doi.org/10.1038/nature05487>.
- [7] H.A. Korkeas, N. Sass, A.F. Moron, N.O.S. Câmara, T. Bonetti, A.S. Cerdeira, I.D.C.G. Da Silva, L. De Oliveira, Lipidomic assessment of plasma and placenta of women with early-onset preeclampsia, *PLoS One* 9 (2014), <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110747>.
- [8] J. Liu, C.S. Fox, D.A. Hickson, W.D. May, K.G. Hairston, J.J. Carr, H.A. Taylor, Impact of abdominal visceral and subcutaneous adipose tissue on Cardiometabolic risk factors: the Jackson heart study, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 95 (2010) 5419–5426, <https://doi.org/10.1210/jc.2010.1378>.
- [9] M. Jové, J.M. Moreno-Navarrete, R. Pamplona, W. Ricart, M. Portero-Otín, J.M. Fernández-Real, Human omental and subcutaneous adipose tissue exhibit specific lipidomic signatures, *FASEB J* 28 (2014) 1071–1081, <https://doi.org/10.1096/fj.13.234419>.
- [10] M. Shimabukuro, Y. Hirata, M. Tabata, M. Dagvasumberel, H. Sato, H. Kurobe, D. Fukuda, T. Soeki, T. Kitagawa, S. Takanashi, M. Sata, Epicardial adipose tissue volume and adipocytokine imbalance are strongly linked to human coronary atherosclerosis, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 33 (2013) 1077–1084, <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.112.300829>.
- [11] Z. Matloch, T. Kotulák, M. Haluzik, M. Haluzik, The role of Epicardial adipose tissue in heart disease, *Physiol. Res.* 65 (2016) 23–32, [www.biomed.cas.cz/physiolres](http://www.biomed.cas.cz/physiolres).
- [12] K. Karastergiou, I. Evans, N. Ogston, N. Miheisi, D. Nair, J.C. Kaski, M. Jahangiri, V. Mohamed-Ali, Epicardial adipokines in obesity and coronary artery disease induce atherogenic changes in monocytes and endothelial cells, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 30 (2010) 1340–1346, <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.110.204719>.
- [13] T. Igarashi, M. Aursand, Y. Hirata, I.S. Gribbestad, S. Wada, M. Nonaka, Nondestructive quantitative determination of docosahexaenoic acid and n-3 fatty acids in fish oils by high-resolution 1H nuclear magnetic resonance spectroscopy, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 7 (2003) 737–748.
- [14] B.S. Barbosa, L.G. Martins, T.B.B.C. Costa, G. Cruz, L. Tasic, Qualitative and quantitative NMR approaches in blood serum Lipidomics, *Methods Mol. Biol.* 1735 (2018) 365–379, [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7614-0\\_25](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7614-0_25).
- [15] R. Harkewicz, E.A. Dennis, Applications of Mass Spectrometry to Lipids and Membranes, *Applications*, 2012, pp. 301–325, <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060409-092612>.
- [16] S. Samino, M. Vinaixa, M. Diaz, A. Beltran, M.A. Rodriguez, R. Mallol, M. Heras, A. Cabre, L. Garcia, N. Canela, F. de Zegher, X. Correig, I. Ibanez, O. Yanes, Metabolomics reveals impaired maturation of HDL particles in adolescents with hyperinsulinemic androgen excess, *Sci. Rep.* 5 (2015), <https://doi.org/10.1038/srep11496>.
- [17] M. Pezeshkian, M. Noori, H. Najjarpour-Jabbari, A. Abolfathi, M. Darabi, M. Darabi, M. Shaaker, G. Shahmohammadi, Fatty acid composition of epicardial and subcutaneous human adipose tissue, *Metab. Syndr. Relat. Disord.* 7 (2009) 125–131.
- [18] M. Pezeshkian, M.R. Mahtabipour, Epicardial and subcutaneous adipose tissue fatty acids profiles in diabetic and non-diabetic patients candidate for coronary artery bypass graft, *Bioimpacts*, 3 (2013) 83–89, <https://doi.org/10.5681/bi.2013.004>.
- [19] M. Li, L. Yang, Y. Bai, H. Liu, Analytical methods in lipidomics and their applications, *Anal. Chem.* 86 (2014) 161–175, <https://doi.org/10.1021/ac403554h>.
- [20] A.U. Blachnio-Zabielska, M. Baranowski, T. Hirmle, P. Zabielski, A. Lewczuk, I. Dmitruk, J. Górski, Increased bioactive lipids content in human subcutaneous and epicardial fat tissue correlates with insulin resistance, *Lipids*, 47 (2012) 1131–1141, <https://doi.org/10.1007/s11745-012-3722-x>.
- [21] M. Margolis, O. Perez, M. Martinez, A.M. Santander, A.J. Mendez, M. Nadji, A. Nayer, S. Bhattacharya, M. Torroella-Kouri, Phospholipid makeup of the breast adipose tissue is impacted by obesity and mammary cancer in the mouse: results of a pilot study, *Biochimie*, 108 (2015) 133–139, <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2014.11.009>.
- [22] O. Quehenberger, A.M. Armando, A.H. Brown, S.B. Milne, D.S. Myers, A.H. Merrill, S. Bandyopadhyay, K.N. Jones, S. Kelly, R.L. Shaner, C.M. Sullards, E. Wang, R.C. Murphy, R.M. Barkley, T.J. Leiker, C.R.H. Raetz, Z. Guan, G.M. Laird, D.A. Six, D.W. Russell, J.G. McDonald, S. Subramaniam, E. Fahy, E.A. Dennis, Lipidomics reveals a remarkable diversity of lipids in human plasma, *J. Lipid Res.* 51 (2010) 3299–3305, <https://doi.org/10.1194/jlr.M009449>.
- [23] E. Cequier-sa, C. Rodri, A.G. Ravelo, R. Za, Dichloromethane as a solvent for lipid extraction and assessment of lipid classes and fatty acids from samples of different natures dichloromethane as a solvent for lipid extraction and assessment of lipid classes and fatty acids from samples of different, *Society*, (2008) 4297–4303, <https://doi.org/10.1021/jf073471e>.
- [24] J. Folch, M. Lees, G.H. Sloane Stanley, A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues, *J. Biol. Chem.* 226 (1957) 497–509.
- [25] M. Narváez-Rivas, Q. Zhang, Comprehensive untargeted lipidomic analysis using core-shell C30 particle column and high field orbitrap mass spectrometer, *J. Chromatogr. A* 1440 (2016) 123–134, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.02.054>.
- [26] T. Pluskal, S. Castillo, A. Villar-Briones, M. Orešič, MZmine 2: modular framework for processing, visualizing, and analyzing mass spectrometry-based molecular profile data, *BMC Bioinforma.* 11 (2010) 1471–2105, <https://doi.org/10.1186/1471-2105-11-395>.
- [27] M.A. López-Bascón, M. Calderón-Santiago, J. Sánchez-Ceinos, A. Fernández-Vega, R. Guzmán-Ruiz, J. López-Miranda, M.M. Malagon, F. Priego-Capote, Influence of sample preparation on lipidomics analysis of polar lipids in adipose tissue, *Talanta*, 177 (2018) 86–93, <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.09.017>.
- [28] Y. Benjamini, D. Yekutieli, The control of the false discovery rate in multiple testing under dependency, *Ann. Stat.* 29 (2001) 1165–1188.
- [29] R.E. Patterson, A.J. Ducroq, D.J. McDougall, T.J. Garrett, R.A. Yost, U. States, Comparison of blood plasma sample preparation methods for combined LC-MS lipidomics and metabolomics, *J. Chromatogr. B* 1002 (2016) 260–266, <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2015.06.018>.
- [30] R.C.R. Meex, P. Schrauwen, M.K.C. Hesselink, Modulation of myocellular fat stores: lipid droplet dynamics in health and disease, *Am. J. Phys. Regul. Integr. Comp. Phys.* 297 (2009) R913–R924, <https://doi.org/10.1152/ajpregu.91053.2008>.
- [31] M. Kahle, A. Schäfer, A. Seelig, J. Schultheiß, M. Wu, M. Aichler, J. Leonhardt, B. Rathkolb, J. Rozman, H. Sarioglu, S.M. Hauck, M. Ueffing, E. Wolf, G. Kastenmueller, J. Adamski, A. Walch, M. Hrabé de Angelis, S. Neschen, High fat diet-induced modifications in membrane lipid and mitochondrial-membrane protein signatures precede the development of hepatic insulin resistance in mice, *Mol. Metab.* 4 (2015) 39–50, <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2014.11.004>.
- [32] J.N. van der Veen, J.P. Kennelly, S. Wan, J.E. Vance, D.E. Vance, R.L. Jacobs, The critical role of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine metabolism in health and disease, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 1859 (2017) 1558–1572, <https://doi.org/10.1016/j.bbame.2017.04.006>.
- [33] T. Nakanishi, S. Kato, Impact of diabetes mellitus on myocardial lipid deposition: an autopsy study, *Pathol. Res. Pract.* 210 (2014) 1018–1025, <https://doi.org/10.1016/j.prp.2014.04.008>.
- [34] A.B. Engin, What is lipotoxicity? *Adv. Exp. Med. Biol.* 960 (2017) 197–220, [https://doi.org/10.1007/978-3-319-48382-5\\_8](https://doi.org/10.1007/978-3-319-48382-5_8).
- [35] A. Pol, S.P. Gross, R.G. Parton, Biogenesis of the multifunctional lipid droplet: lipids, proteins, and sites, *J. Cell Biol.* 204 (2014) 635–646, <https://doi.org/10.1083/jcb.201311051>.
- [36] N. Krahmer, Y. Guo, F. Wilfling, M. Hilger, S. Lingrell, K. Heger, H.W. Newman, M. Schmidt-Supprian, D.E. Vance, M. Mann, R.V. Farese, T.C. Walther, Phosphatidylcholine synthesis for lipid droplet expansion is mediated by localized activation of CTP:Phosphocholine cytidylyltransferase, *Cell Metab.* 14 (2011) 504–515, <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.07.013>.
- [37] F.J. Ortega, A. Vazquez-Martin, J.M. Moreno-Navarrete, J. Bassols, J. Rodriguez-Hermosa, J. Gironés, W. Ricart, B. Peral, F.J. Tinahones, G. Frühbeck, J.A. Menendez, J.M. Fernandez-Real, Thyroid hormone responsive spot 14 increases during differentiation of human adipocytes and its expression is down-regulated in obese subjects, *Int. J. Obes.* 34 (2010) 487–499, <https://doi.org/10.1038/ijo.2009.263>.
- [38] C. Syme, S. Czajkowski, J. Shin, M. Abrahamowicz, G. Leonard, M. Perron, L. Richer, S. Veillette, D. Gaudet, L. Strug, Y. Wang, H. Xu, G. Taylor, T. Paus, S. Bennett, Z. Pausova, Glycerophosphocholine metabolites and cardiovascular disease risk factors in adolescents: a cohort study, *Circulation*, 134 (2016) 1629–1636, <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.116.022993>.
- [39] M. Guasch-Ferré, F.B. Hu, M. Ruiz-Canela, M. Bulló, E. Toledo, D.D. Wang, D. Corella, E. Gómez-Gracia, M. Fiol, R. Estruch, J. Lapetra, M. Fitó, F. Arós, L. Serra-Majem, E. Ros, C. Dennis, L. Liang, C.B. Clish, M.A. Martínez-González, J. Salas-Salvadó, Plasma metabolites from choline pathway and risk of cardiovascular disease in the PREDIMED (prevention with Mediterranean diet) study, *J. Am. Heart Assoc.* 6 (2017), <https://doi.org/10.1161/JAHA.117.006524>.
- [40] J. Ding, F.-C. Hsu, T.B. Harris, Y. Liu, S.B. Kritchevsky, M. Szklo, P. Ouyang, M.A. Espeland, K.K. Lohmann, M.H. Criqui, M. Allison, D.A. Blumenthal, J.J. Carr, The association of pericardial fat with incident coronary heart disease: the multi-ethnic study of atherosclerosis (MESA), *Am. J. Clin. Nutr.* 90 (2009) 499–504, <https://doi.org/10.3945/ajcn.2008.27358>.
- [41] K. Harada, T. Amano, T. Kataoka, M. Takeshita, K. Harada, A. Kunimura, Y. Takayama, N. Shinoda, B. Kato, T. Uetani, M. Kato, N. Marui, H. Ishii, Y. Matsubara, T. Murohara, Impact of abdominal and epicardial fat on the association between plasma adipocytokine levels and coronary atherosclerosis in non-obese patients, *Atherosclerosis*, 237 (2014) 671–676, <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2014.10.014>.
- [42] P.-G. Suh, J.-I. Park, L. Manzoli, L. Cocco, J.C. Peak, M. Katan, K. Fukami, T. Kataoka, S. Yun, S.H. Ryu, Multiple roles of phosphoinositide-specific phospholipase C isozymes, *BMB Rep.* 41 (2008) 415–434, <https://doi.org/10.5483/bmb.2008.41.05>.

- BMBRep.2008.41.6.415.
- [43] M. Beretta, M. Bauer, E. Hirsch, PI3K signaling in the pathogenesis of obesity: the cause and the cure, *Adv. Biol. Regul.* 58 (2015) 1–15, <https://doi.org/10.1016/j.jbior.2014.11.004>.
- [44] C.L. Calderon, M. Torroella-kouri, M.R. Dinapoli, D.M. Lopez, Involvement of Protein Kinase C and not of NF  $\kappa$  B in the Modulation of Macrophage Nitric Oxide Synthase by Tumor-derived Phosphatidyl Serine, 16960 (2008), pp. 713–721, <https://doi.org/10.3892/jjo.32.3.713>.
- [45] K. Kurosaka, M. Takahashi, N. Watanabe, Y. Kobayashi, Silent cleanup of very early apoptotic cells by macrophages, *J. Immunol.* 171 (2003) 4672–4679, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.171.9.4672>.
- [46] Y.A. Hannun, L.M. Obeid, Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9 (2008) 139–150, <https://doi.org/10.1038/nrm2329>.
- [47] F. Samad, L. Badeanlou, C. Shah, G. Yang, Adipose tissue and ceramide biosynthesis in the pathogenesis of obesity, *Adv. Exp. Med. Biol.* 721 (2011) 67–86, [https://doi.org/10.1007/978-1-4614-0650-1\\_5](https://doi.org/10.1007/978-1-4614-0650-1_5).

## Lipid Profiling in Epicardial and Subcutaneous Adipose Tissue of Patients with Coronary Artery Disease

Petra Tomášová, Martina Čermáková, Helena Pelantová, Marek Vecka, Helena Kratochvílová, Michal Lipš, Jaroslav Lindner, Peter Ivák, Ivan Netuka, Blanka Šedivá, Martin Haluzík, and Marek Kuzma\*

Cite This: *J. Proteome Res.* 2020, 19, 3993–4003

Read Online

ACCESS |

Metrics & More

Article Recommendations

Supporting Information

**ABSTRACT:** Coronary artery disease is one of the most frequent causes of morbidity and mortality worldwide. It is even more prevalent in patients with type 2 diabetes mellitus who suffer from obesity and increased accumulation of epicardial fat with a possible contributing role in the development of coronary artery disease. We performed an MS-based lipidomic analysis of subcutaneous and epicardial adipose tissue in 23 patients with coronary artery disease stratified for the presence/absence of type 2 diabetes mellitus and a control group of 13 subjects aiming at identification of factors from epicardial fat contributing to the development of coronary artery disease. The samples of adipose tissues were obtained during elective cardiac surgery. They were extracted and analyzed with and without previous triacylglycerols separation by high-pressure liquid chromatography–mass spectrometry (HPLC-MS). Multivariate and univariate analyses were performed. Lipidomics data were correlated with biochemical parameters. We identified multiple changes in monoacylglycerols, diacylglycerols, triacylglycerols, glycerophosphatidylserines, glycerophosphatidylethanolamines, glycerophosphatidylcholines, ceramides, sphingomyelins, and derivatives of cholesterol. Observed changes included molecules with fatty acids with odd (15:0, 15:1, 17:0, 17:1) and even (10:0, 12:0, 14:0, 16:0, 16:1, 18:0, 18:1, 18:2, 20:4, 20:1, 22:0) fatty acids in both types of adipose tissue. More pronounced changes were detected in epicardial adipose tissue compared to subcutaneous adipose tissue of patients with coronary artery disease and type 2 diabetes. Lipidomic analysis of subcutaneous and epicardial adipose tissue revealed different profiles for patients with coronary artery disease and type 2 diabetes, which might be related to coronary artery disease and the presence of type 2 diabetes.

**KEYWORDS:** epicardial adipose tissue, subcutaneous adipose tissue, coronary artery disease, type 2 diabetes mellitus, lipidomics

### INTRODUCTION

Coronary artery disease (CAD) has reached epidemic proportions worldwide and is one of the most frequently occurring causes of death.<sup>1</sup> The World Health Organization estimated that approximately 17.9 million patients die of CAD each year worldwide. The importance of adipose tissue as an endocrine organ and a substantial causal factor in the development of atherosclerosis including CAD and its progression was identified in the last two decades.<sup>2</sup> Epicardial fat is an adipose tissue that is connected with myocardium not only by its close anatomic position and function but also through blood supplementation. This close relation of both tissues could play an important role in the induction and progression of CAD with a production of possible pathological factors in epicardial fat and their direct delivery to myocardium and coronary arteries.<sup>2</sup>

CAD is characterized by progression of atherosclerosis in coronary arteries with subsequent impairment of blood flow and insufficient blood supplementation to the myocardium. Multiple risk factors play a role in the development and

progression of CAD, including arterial hypertension, dyslipidemia, obesity, and type 2 diabetes mellitus (T2DM).<sup>3,4</sup> De Rosa et al. described similarities between the genetic origin of CAD and T2DM.<sup>5</sup> The authors revealed changed microRNA expression associated with both T2DM and CAD, which are involved in lipid metabolism (miR-29, miR-122, miR-26a) and jointly modulate lipid and glucose metabolism.<sup>5</sup> The presence of T2DM significantly increases the risk of CAD and worsens its progression and subsequent mortality and morbidity.<sup>6</sup>

Obesity, characterized by increased accumulation of adipose tissue, is among the leading risk factors of CAD. In the last two decades, adipose tissue has gained attention as an essential

Received: April 20, 2020  
Published: August 24, 2020



Downloaded via CHARLES UNIV IN PRAGUE on February 27, 2022 at 07:32:58 (UTC).  
See <https://pubs.acs.org/sharingguidelines> for options on how to legitimately share published articles.

endocrine organ.<sup>7,8</sup> Structural composition and metabolism of adipose tissue are characteristic for specific regions/adipose tissue depots. The adipose tissue can be in general subdivided into two main depots according to its localization and functional characteristics: subcutaneous adipose tissue (SAT) and visceral adipose tissue.<sup>9</sup> Furthermore, the limited capacity of adipose tissue to store additional lipids in obese subjects leads to a lipid spillover to nonadipose tissues such as the skeletal muscle, liver, and heart. This ectopic lipid storage impairs insulin signaling and contributes to insulin resistance in the affected tissues.

Epicardial fat lies in the close vicinity of myocardium, and its size typically correlates with the levels of visceral obesity. Epicardial adipocytes are typically smaller compared to those in other adipose tissue depots.<sup>10</sup> Furthermore, epicardial adipose tissue (EAT) is metabolically and endocrinologically more active than subcutaneous fat.<sup>11</sup> Due to the close anatomic connection of EAT with myocardium and the same blood supply, EAT is of particular importance as a contributor to etiopathogenesis of CAD through the production of pro- and anti-inflammatory eicosanoids, adipokines, and cytokines.<sup>2,3,11–13</sup> Moreover, the association between the volume of EAT and risk of CAD was previously described.<sup>14,15</sup>

The composition of adipose tissue significantly affects its functional characteristics. Under normal circumstances, 97–99% of total lipids in adipose tissue are triacylglycerols (TAG).<sup>16</sup> Fatty acid oxidation of TAG in EAT plays a role as an important source of energy for the myocardium. Goldberg et al. hypothesized that the relation between TAG and vascular disease could be caused either by the increased deposition of TAG from lipoproteins or by lipotoxicity of lipolysis products by patients with hypertriglyceridemia.<sup>17</sup>

SAT and EAT differ mainly by the content of TAG and glycerophosphatidylcholines (PC).<sup>10,16</sup> SAT has a higher content of TAG, while EAT is typical with a higher content of PC. The TAG are stored in adipose tissue as lipid droplets, which have a phospholipid membrane on the surface. Thus, decreased TAG-to-PC ratio could imply that lipid droplets in EAT are smaller and more stable.<sup>18</sup>

Gas chromatography (GC) combined with flame ionization detection or mass spectrometry (MS) detection and high-pressure liquid chromatography combined with MS (HPLC-MS) are the most common analytical platforms used for lipidomics.<sup>19,20</sup> The main limitation of GC analysis is the measurement of individual fatty acid (FA) chains released from ester bond in lipid molecules within one lipid class in one chromatographic run. On the other hand, HPLC-MS is limited by the excess of TAG in tissue. Solid-phase extraction or thin-layer chromatography (TLC) can be used for the prepreparation of vast amounts of TAG. López-Bascón et al. described a method using solid-phase extraction to eliminate glycerophospholipids selectively.<sup>21</sup> We previously introduced a method that uses TLC, which enables us to identify more than 206 lipid species, of which are 37 minor lipids.<sup>10</sup>

We hypothesized that the presence of CAD is accompanied by the changes of lipid profile of adipose tissue, in particular in the epicardial fat, which could be further modified by the presence of T2DM. To this end, the current study aimed to determine the lipid composition of SAT and EAT and to explore the connection between CAD and the resulting lipid profile in the presence or absence of T2DM.

## METHODS

### Patients and Tissue Sampling

Patients who underwent elective cardiac surgery (coronary artery bypass graft implantation and/or valvular surgery) at the 2nd Department of Surgery—Department of Cardiovascular Surgery, First Faculty of Medicine, Charles University and General Faculty Hospital and Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague, Czech Republic, were included in the study. The diagnosis of coronary artery disease was established by presurgical coronarography. The preoperative protocol did not differ between patients; surgery started between 7 and 8 AM after overnight fasting. The patients were divided into three groups according to the presence of CAD and T2DM. Group 1 included 11 subjects without CAD and T2DM (CAD–, T2DM–), group 2 included 13 subjects with CAD and without T2DM (CAD+, T2DM–), and group 3 included 10 subjects with both CAD and T2DM (CAD+, T2DM+). Thirty-three of participating patients had arterial hypertension, and 32 had dyslipidemia treated by statins. T2DM treatment included metformin (4 subjects), dipeptidylpeptidase-4 inhibitors (3 subjects), sulfonylurea derivatives (1 subject), and insulin therapy with multiple daily injections (2 subjects). Exclusion criteria were age <18 years, acute or chronic kidney disease, malignancy, thyroid disease, or acute infection.

### Anthropometric Examination, Blood, and Tissue Sampling

All subjects included in the study were measured and weighed, and their body mass index (BMI) was calculated 1 day before surgery. Blood samples for biochemical measurements were taken after overnight fasting before initiation of anesthesia (at the beginning of the surgery). Blood samples were centrifuged for 10 min at 3000g within 30 min after withdrawal. Serum samples were subsequently stored in aliquots at –80 °C until further analysis. Samples of SAT and EAT were taken at the start of the surgery after sternotomy. SAT was obtained from the sternotomy site. EAT was taken from the anterior interventricular sulcus or the right margin of the heart. A 1–2 g aliquot of adipose tissue sample was collected in 1 mL of RNAlater reagent (Ambion, Invitrogen, Carlsbad, California) and stored at –80 °C until lipidomic analysis.

### Biochemical Assays

Routine biochemical parameters were measured at the Department of Biochemistry, General University Hospital, Prague, Czech Republic, by standard laboratory methods.

### Tissue Sample Preparation for Lipidomics

Lipid extraction and further sample processing and analysis were conducted as previously described.<sup>10</sup> The patients' samples were prepared in a random order. Blank samples were prepared in parallel with the patients' samples. Briefly, approximately 50 mg of tissue was extracted by the modified Folch method.<sup>22</sup> Tissue cells were ground by a hand tissue homogenizer (IKA-Werke GmbH & Co. KG (Staufen, Germany)). The bottom dichloromethane layer was divided into two aliquots.

The first of two aliquots underwent untargeted lipidomic analysis. In the second aliquot, the minor lipid classes were separated from abundant TAG by TLC, as previously described.<sup>10</sup> The extracts were reconstituted in a 2-propanol/ acetonitrile/water (1:2:1, v:v:v) mixture and analyzed by an HPLC Agilent 1200 LC system (Agilent Technologies, California) equipped with an Accucore column C30 (Thermo

Fisher Scientific, Waltham).<sup>19</sup> A microTOF-Q III mass spectrometer (Bruker Daltonics) with electrospray ionization in positive and negative modes was used for detection. Parameters for separation were set as follows: column temperature, 40 °C, and flow rate, 0.24 mL/min. The elution gradient was performed by mobile phase A (10 mM ammonium formate in 60% acetonitrile and 0.1% formic acid), and mobile phase B (10 mM ammonium formate in acetonitrile/2-propanol, 1:9 (v:v) mixture containing 0.1% formic acid). For the first 5 min, the gradient was set at 30% B, then for 2 min, 30–43% B, for 1.3 min, 43–50% B, for 11.3 min, 50–70% B, for 7 min, 100% B, and for 10 min, 18% B. MS spectra were obtained in a *m/z* range of 100–1500. The MS was calibrated for exact mass by clusters of sodium formate before analysis (external calibration) and also during analysis in the first minute of each sample run (internal calibration).

#### Data Analysis

The obtained data were calibrated in DataAnalysis 4.2 software (Bruker Daltonics) for exact mass. Further, the data were converted to .cdf format and imported to MZmine 2.23 software.<sup>23</sup> The processing parameters were as follows: signal-to-noise ratio, 5; time tolerance, 0.15 min; mass tolerance, 10 ppm. The significantly changed metabolites were identified based on the isotopic pattern, exact mass, fragments, retention time, and published data.<sup>19</sup> The MS/MS spectra of significantly changed lipids are presented in Figures S1–S29. Predicted formula from the software DataAnalysis 4.2 (Bruker Daltonics) was searched through CompoundCrawler software to get all possible structures. The exact mass was searched with a maximum tolerance of 10 ppm and adduct formation ([M + H]<sup>+</sup>, [M + NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>, [M + Na]<sup>+</sup>, [M – COO]<sup>–</sup>, [M – H]<sup>–</sup>) in the following databases: LIPID MAPS website (<http://www.lipidmaps.org>) and the Human Metabolome Database (<http://www.hmdb.ca>).<sup>24</sup> Normalization was based on the proportion of peak intensities and sum of all peaks.

#### Statistical Analysis

The anthropometric and biochemical parameters presented in Table 1 were expressed as mean ± standard deviation (SD). The Jarque–Bera test was used to confirm the Gaussian distribution of the datasets. If the data had non-normal distribution, nonparametric statistics was applied. Univariate tests, such as standard Student's two-sample *t*-test (parametric approach) or Wilcoxon rank-sum test (nonparametric approach), were used to detect significant differences between groups. The significance level was set to *p* < 0.05. Principal component analysis (PCA) and partial least-squares discriminant analysis (PLS-DA) were executed to examine the quality of the group separations. Spearman's rank correlation coefficient (nonparametric approach) was used to identify a linear relationship between the obtained biochemical parameters and lipid content. Statistical analysis was conducted using MATLAB software (version 9.0 R2016a) and MetaboAnalyst 4.0.

## RESULTS

In the present study, the patients who underwent elective cardiac surgery were divided into three groups according to their diagnoses of CAD and T2DM. The biochemical and anthropometric parameters were measured, and the lipid analysis of adipose tissue was performed.

**Table 1. Anthropometric and Biochemical Characterization of Patients<sup>a</sup>**

parameters	CAD–, T2DM–	CAD+, T2DM–	CAD+, T2DM+
number of subjects	11	13	10
sex male/female	6/5	11/2	7/3
age [years]	70 ± 12.7	61 ± 7.4	69 ± 5.4
BMI [kg/m <sup>2</sup> ]	27.3 ± 4.3	26.1 ± 5.2	28.4 ± 2.1
total cholesterol [mmol/l]	4.19 ± 1.19	3.49 ± 0.63	3.69 ± 0.86
HDL cholesterol [mmol/l]	1.21 ± 0.42	0.98 ± 0.25	1.23 ± 0.64
total TAG [mmol/l]	1.25 ± 0.46	1.35 ± 0.61	1.22 ± 0.41
fasting glucose [mmol/l]	5.40 ± 0.60	5.72 ± 0.91	7.90 ± 1.99***,+++
waist/hip ratio	0.95 ± 0.06	0.94 ± 0.09	0.96 ± 0.05

<sup>a</sup>Data are presented as median ± standard deviation (SD). Nonparametric Wilcoxon rank-sum test was used; \*\*\* *p* value < 0.001 vs CAD–, T2DM– or +++ *p* value < 0.001 vs CAD+, T2DM–; CAD–, T2DM–: without coronary artery disease and without type 2 diabetes mellitus; CAD+, T2DM–: with coronary artery disease and without type 2 diabetes mellitus; CAD+, T2DM+: with both coronary artery disease and type 2 diabetes mellitus. TAG—triacylglycerols, BMI—body mass index.

#### Body Composition and Biochemical Characteristics of the Studied Patients

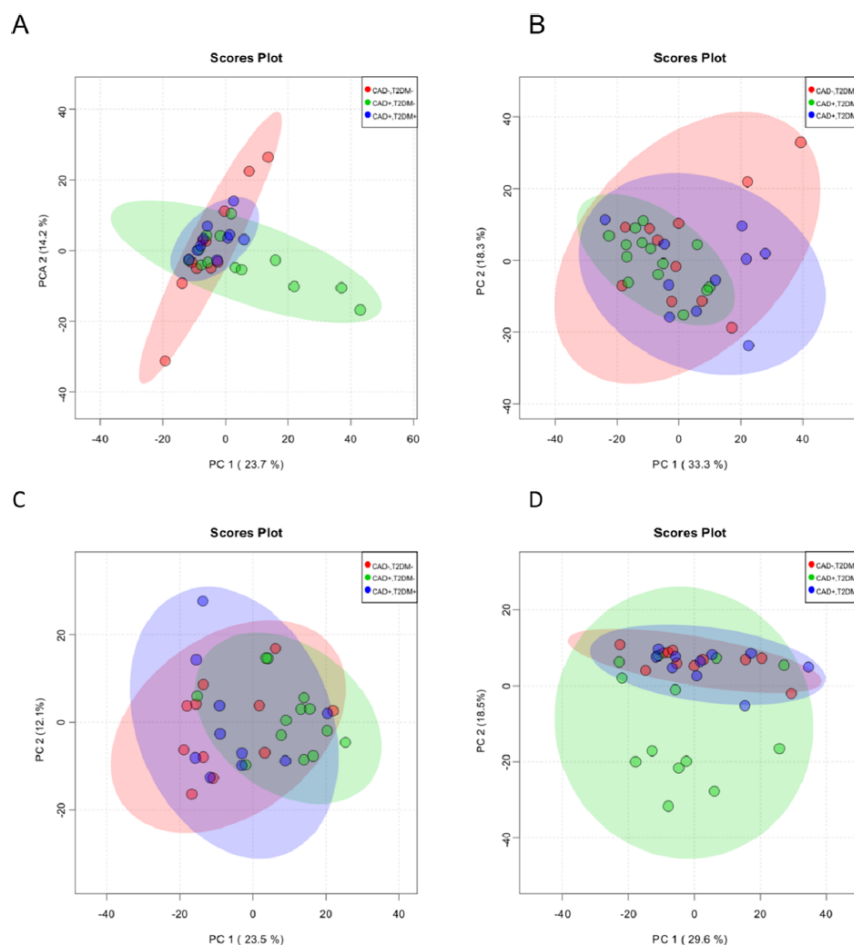
Anthropometric and biochemical parameters, such as BMI, total, and HDL cholesterol, total TAG, and waist/hip ratio did not differ significantly between groups, apart from fasting blood glucose level, which was increased in the group with T2DM, as expected by definition of the group (Table 1).

#### MS-Based Lipidomic Analyses of Adipose Tissues

Lipidomic analysis was conducted using both SAT and EAT for each patient. Multivariate data analysis of lipids was applied to describe the differences between groups separately for each adipose tissue depot. The PCA score plots for SAT and EAT are presented in Figures 1 and 2, respectively, for both untargeted lipidomics and minor lipid analysis. PCA did not show any outliers in SAT. However, in EAT, one outlier was observed within each group in untargeted lipidomics in the positive mode and one in untargeted lipidomics in the negative mode in the group with CAD and without T2DM. The outliers determined by PCA were not excluded from univariate statistics because they were assigned as outliers using only one of the methods. Further, we applied PLS-DA (presented in Figures S30 and S31).

Taken together, multivariate analysis showed rather poor tendencies in the particular groups' separation. Further, the univariate statistical analysis revealed numerous differences between the groups. The lipids, which differed among groups, are presented in Table 2. The boxplots of these lipids are presented in Figure S32. Furthermore, we clustered all identified lipids into lipid classes and compared the sum of relative intensities among groups. Phosphatidylcholines were significantly increased (*p*-value = 0.021) in the group with both diseases contrary to the group only with CAD in EAT.

The lipid analysis of both adipose tissues revealed multiple changes depending on the presence of CAD and T2DM in lipid classes of monoacylglycerols (MAG), diacylglycerols (DAG), triacylglycerols (TAG), glycerophosphatidylserines (PS), glycerophosphatidylethanolamines (PE), glycerophosphocholines (PC), ceramides (Cer), sphingomyelins (SM),



**Figure 1.** PCA scores plot for SAT (A) positive ionization mode untargeted lipidomics, (B) negative ionization mode untargeted lipidomics, (C) positive ionization mode minor lipids, (D) negative ionization mode minor lipids; CAD<sup>−</sup>, T2DM<sup>−</sup> (red points): without coronary artery disease and without type 2 diabetes mellitus; CAD<sup>+</sup>, T2DM<sup>−</sup> (green points): with coronary artery disease and without type 2 diabetes mellitus; CAD<sup>+</sup>, T2DM<sup>+</sup> (blue points): with both coronary artery disease and type 2 diabetes mellitus.

and derivatives of cholesterol. Moreover, many differences were detected in both adipose tissue types depending on the presence of T2DM and CAD. In general, the decrease/increase of particular lipid class among the groups of patients is maintained for both EAT and SAT; however, these substantially differ in significance.

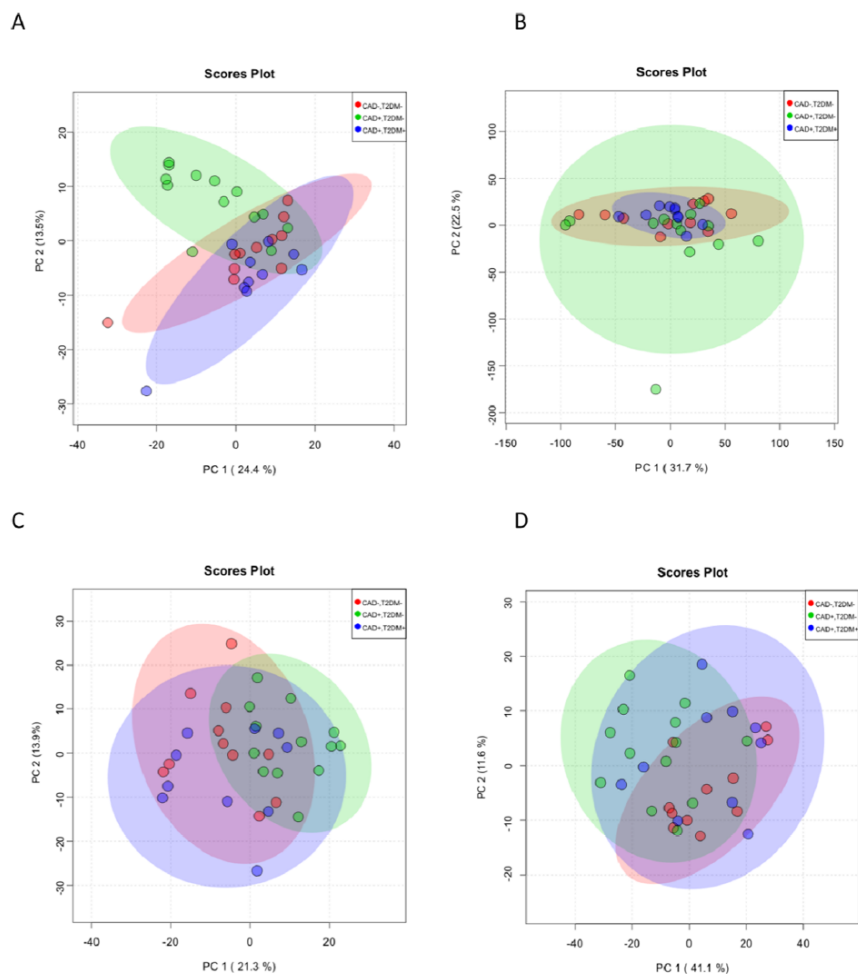
We were able to identify differences in various glycerolipids differing in the saturation and carbon number of fatty acids (FAs) present in their molecules (Table 2). Significant differences were observed mainly in EAT, much less in SAT in all groups. The most pronounced differences in glycerolipids were caused by the presence of T2DM in patients with CAD in EAT.

CAD increased the levels of TAG, including saturated FA (18:0, 17:0, 16:0, 14:0) and monounsaturated FA (18:1 and 17:1), mainly in EAT in patients without T2DM. Further, CAD increased TAG (20:1/18:1/18:2) in both tissues and in

SAT patients with CAD and T2DM compared to group patients without CAD and T2DM.

On the other hand, TAG with saturated FA, as 18:0, 17:0, 16:0, 15:0, 14:0, 10:0, 12:0, were decreased by T2DM in patients with CAD in EAT. The most pronounced effect was observed in saturated FA 16:0 and 14:0. Some effects were also observed in TAG with monounsaturated FA as 16:1 and 15:1. Six of eight changed TAG molecules contained FA 18:1. Interestingly, TAG containing FA with the odd number of carbons, such as 15:0, 15:1, 17:0, 17:1, were significantly decreased by T2DM in patients with CAD. Further, the TAG with FA 17:0 and 17:1 were significantly increased in the group with CAD without T2DM. These changes were not observed in SAT.

Other alterations were observed in phospholipid classes. In EAT, the similar significant increase of this PS was associated with the occurrence of both CAD and T2DM. Other changes



**Figure 2.** PCA score plot for EAT (A) positive ionization mode untargeted lipidomics, (B) negative ionization mode untargeted lipidomics, (C) positive ionization mode minor lipids, (D) negative ionization mode minor lipids; CAD<sup>−</sup>, T2DM<sup>−</sup> (red points): without coronary artery disease and without type 2 diabetes mellitus; CAD<sup>+</sup>, T2DM<sup>−</sup> (green points): with coronary artery disease and without type 2 diabetes mellitus; CAD<sup>+</sup>, T2DM<sup>+</sup> (blue points): with both coronary artery disease and type 2 diabetes mellitus.

in LysoPE and LysoPC were caused by the presence of T2DM in patients with CAD and were more notable in EAT than in SAT. Trends in these molecules did not depend on the FA type. The levels of PC with FA 34:0, 32:0, or 32:1 were more than 3 times increased in EAT comparing the groups of CAD patients with and without T2DM. In SAT, an increase in PC (32:1) was seen only in patients with CAD and T2DM compared to patients without both diseases. The last lipid class affected were the sphingolipids. Only in SAT, an increased level of Cer (18:1/22:0) was induced by the presence of both diseases. The levels of SM were increased in EAT by T2DM.

#### Relationship of Lipids in Adipose Tissue with Other Studied Parameters

The above-mentioned biochemical and anthropometric parameters were correlated with significantly changed lipids

between groups from Table 2. Age, BMI, total TAG, and fasting glucose did not correlate with these lipids. The significant correlations ( $p$ -value < 0.05) between lipid and total HDL cholesterol and waist/hip ratio with  $r > 0.49$  are shown in Figures 3 and 4 for SAT and EAT, respectively. The significant correlation with  $r < 0.49$  and  $>0.30$  are shown in Figure S32, and for EAT in Figure S33. The strength and significance of correlation are included in each figure.

Significant positive correlation was observed between dihydroxycholesterol in EAT and total blood cholesterol. Interestingly, this correlation was not observed with dihydroxycholesterol in SAT. The positive correlation of Cer (18:1/22:0) with waist/hip ratio was found in SAT, and only weak but still significant positive correlation was also detected with the same ceramide in EAT. The other correlations were

Table 2. Lipid Changes in Patients with CAD and T2DM in Subcutaneous and Epicardial Adipose Tissue<sup>a</sup>

	Metabolic pathway	Epicardial adipose tissue			Subcutaneous adipose tissue		
		CAD+,T2DM- vs.CAD-,T2DM-	CAD+,T2DM+ vs. CAD-,T2DM-	CAD+,T2DM+ vs. CAD+,T2DM-	CAD+,T2DM- vs. CAD-,T2DM-	CAD+,T2DM+ vs. CAD-,T2DM-	CAD+,T2DM+ vs. CAD+,T2DM-
<b>Glycerolipids</b>							
MAG(16:0)	T2DM association	0.39	1.06	2.73	0.37	3.20	<b>8.64*</b>
DAG(16:0/18:1)	Higher prevalence of CAD	1.39	1.13	0.82	<b>2.48*</b>	2.40	0.97
DAG(18:2/18:2)	Mediate IR	0.49	2.01	<b>4.10***</b>	<b>0.29*</b>	1.29	<b>4.52*</b>
TAG(18:1/16:0/14:0)	Atherogenic FA	<b>1.52*</b>	1.02	<b>0.67*</b>	1.03	0.77	0.75
TAG(12:0/12:0/16:0)	T2DM association	1.00	<b>0.56*</b>	0.56	0.77	0.57	0.74
TAG(18:1/16:0/12:0)	T2DM association	1.09	0.57	<b>0.52*</b>	0.70	0.55	0.79
TAG(18:1/16:1/12:0)	T2DM association	1.37	0.78	<b>0.57*</b>	0.84	0.61	0.73
TAG(20:1/18:1/18:2)	Atherogenic FA	<b>1.28*</b>	1.22	0.96	<b>2.22*</b>	<b>2.53*</b>	1.14
TAG(16:1/16:0/15:1)	T2DM association	1.35	0.89	<b>0.66*</b>	0.83	0.89	1.07
TAG(18:1/16:0/15:0)	T2DM association	1.20	0.77	<b>0.65*</b>	0.89	0.88	0.99
TAG(16:1/18:1/15:0)	T2DM association	1.19	0.81	<b>0.68**</b>	1.18	0.98	0.83
TAG(16:0/14:0/14:0)	T2DM association	0.93	<b>0.59*</b>	0.63	0.70	<b>0.47*</b>	0.68
TAG(16:0/18:1/17:0)	Atherogenic FA	<b>1.30**</b>	0.95	<b>0.73*</b>	1.18	0.84	0.71
TAG(17:0/18:0/16:0)	Atherogenic FA	<b>1.31*</b>	0.79	<b>0.61***</b>	1.11	0.95	0.86
TAG(18:1/18:1/17:1)	Atherogenic FA	<b>1.25*</b>	1.01	0.81	0.96	1.00	1.05
<b>Sterol lipids</b>							
Dihydroxycholesterol	Oxidative stress	1.09	<b>5.55*</b>	<b>5.10*</b>	0.91	1.50	1.64
<b>Phospholipids</b>							
PS(18:0/18:1)	Prevalence of CAD	1.04	<b>1.59*</b>	1.53	<b>4.80*</b>	3.23	0.67
LysoPE(20:4)	Mediate IR	0.93	<b>2.18*</b>	<b>2.34*</b>	0.75	1.12	1.48
LysoPE(18:1)	Mediate IR	1.23	<b>3.01*</b>	<b>2.44**</b>	0.78	1.54	1.98
LysoPE(18:2)	Mediate IR	0.91	2.23	<b>2.46*</b>	0.63	1.14	1.80
LysoPC(16:0)	Mediate IR	0.56	1.13	<b>2.03*</b>	1.17	1.98	1.70
LysoPC(18:1)	Mediate IR	1.32	2.07	<b>1.58*</b>	1.46	<b>3.40*</b>	<b>2.32*</b>
LysoPC(18:2)	Mediate IR	0.52	1.68	3.22	1.24	<b>2.72*</b>	<b>2.20*</b>
PC(34:0)	Mediate IR	0.42	1.39	<b>3.36*</b>	1.10	1.95	1.77
PC(32:0)	Mediate IR	0.52	1.94	<b>3.75**</b>	2.40	3.84	1.60
PC(32:1)	Mediate IR	0.34	1.77	<b>5.14*</b>	1.83	<b>3.88*</b>	2.12
<b>Sphingolipids</b>							
Cer (18:1/22:0)	Mediate IR	1.01	1.35	1.33	1.49	<b>2.39*</b>	1.60
SM(36:1)	Mediate IR	0.53	1.74	<b>3.28*</b>	2.62	<b>4.09*</b>	1.56
SM(40:1)	Mediate IR	0.95	2.38	<b>2.50*</b>	1.50	1.91	1.28
SM(42:2)	Mediate IR	0.65	1.78	<b>2.75*</b>	1.97	4.06	2.07

<sup>a</sup>Data are calculated as fold changes of medians of relative intensity between groups of patients; *p*-value determined by nonparametric Wilcoxon rank-sum test, \* *p* < 0.05, \*\* *p* < 0.01, and \*\*\* *p* < 0.001 between groups listed in the table header; CAD-, T2DM-: without coronary artery disease and without type 2 diabetes mellitus; CAD+, T2DM-: with coronary artery disease and without type 2 diabetes mellitus; CAD+, T2DM+: with both coronary artery disease and type 2 diabetes mellitus; MAG—monoacylglycerol, DAG—diacylglycerol, TAG—triacylglycerol, PS—glycerophosphatidylserine, PE—glycerophosphatidylethanolamine, PC—glycerophosphocholine, Cer—ceramide, SM—sphingomyelin, IR—insulin resistance, FA—fatty acid.

significant but weak. DAG (18:2/18:2) and DAG (16:0/18:1) positively correlated with total cholesterol, and HDL or waist/hip ratio in EAT. In SAT, MAG (16:0) and DAG (16:0/18:1) positively correlated with waist/hip ratio, while DAG (18:2/18:2) positively correlated with HDL cholesterol. Some TAG positively correlated significantly with the waist/hip ratio in both tissues. Several phospholipids and SM showed positive correlation mainly with total cholesterol, as well as HDL.

## DISCUSSION

The present study is focused on the analysis of lipids in epicardial and subcutaneous adipose tissues of patients with or without CAD and T2DM. To the best of our knowledge, the existing studies analyzed only representation of various FA in adipose tissue, not whole lipid molecule range.<sup>25,26</sup> Adipose tissue is mostly composed of glycerolipids (99% in nonobese patients), but it also contains significant amounts of



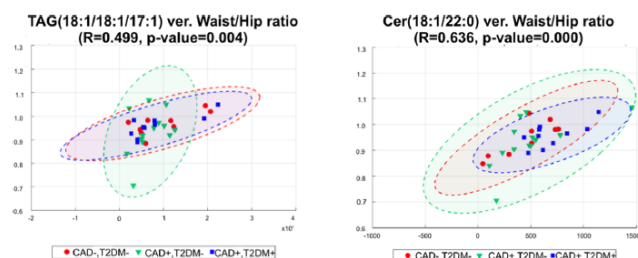


Figure 3. Spearman's rank correlation of significantly changed lipid in SAT and biochemical parameters.

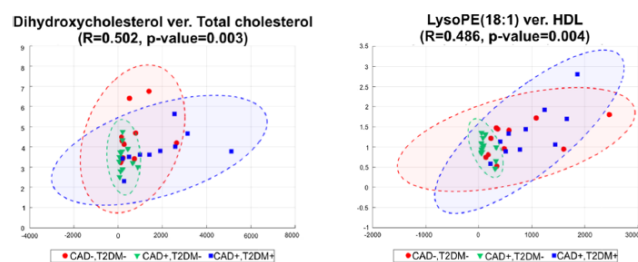


Figure 4. Spearman's rank correlation of significantly changed lipid in EAT and biochemical parameters.

glycerophospholipids, sphingolipids, sterols, and fatty acids.<sup>16</sup> Due to our previously optimized method, we are able to analyze both major and minor lipid molecules.<sup>10</sup> The major lipids included 169 lipid species, 115 of which were TAG. The minor lipids included other 37 representatives from ceramides, glycerophosphatidylserines, glycerophosphatidylinositols, sphingomyelins, glycerophosphatidylcholines, glycerophosphatidylethanolamines, and diacylglycerols.

This study was conducted on the group of patients that did significantly not differ in the blood pressure values or circulating lipid levels or in anthropometric and biochemical parameters except for fasting glycemia in diabetics vs nondiabetics. Patients were subcategorized according to the diagnosis of CAD and T2DM. Lipid analysis revealed multiple changes in SAT and EAT in lipid classes, such as glycerolipids, phospholipids, sterols, and sphingolipids among the groups suggesting that differences in lipid composition might be related to the presence of CAD.

The direction of trends in lipid profiles caused by T2DM and CAD were often opposite in EAT than in SAT, which prompts some compensation of the particular effects in lipids. It was evident when comparing the group with both diseases and the one with neither T2DM nor CAD.

The effect of the diseases was most pronounced in the acylglycerol class. The molecules of glycerolipids, which were increased by CAD, often included FA 14:0, 16:0, 18:0, and 18:1. On the other hand, the effect of T2DM on the same glycerolipids was often opposed to the effect of CAD. Due to the predominance of glycerolipids in adipose tissue, previously published FA analyses correspond mainly with glycerolipid profiles. Pezeshkian et al.<sup>25</sup> described decreased content of FA 16:0 and 18:1n-11 in the group with T2DM in EAT in patients undergoing coronary artery bypass graft. These findings correspond to our results as well. Despite that palmitic acid (16:0) is known for its preventive effect on proliferation and

migration of vascular smooth muscle,<sup>27</sup> the effect of CAD alone on these FA in adipose tissue was not described so far. Chei et al. described an increase in FA 14:0 and 16:0 in plasma in patients with CAD. They found an association between the elevated levels of these FA and higher prevalence of CAD.<sup>28</sup> Accordingly, we assumed that the observed increase in TAG (20:1/18:1/18:2) in both tissues was caused more by FA 18:1 and 18:2 than 20:1, which is included in TAG molecules in adipose tissue very rarely.

DAG (18:2/18:2) was increased by T2DM in both tissues and decreased in SAT in patients with CAD. DAG is a precursor of TAG localized on the inner side of the cell membrane, acting as a second messenger signaling lipid.<sup>29</sup> Diacylglycerol may mediate insulin resistance in the liver and the muscle by decreasing protein kinase C activity.<sup>30</sup> Pezeshkian et al. did not find significant differences in FA 18:2 in any of the adipose tissues caused by the presence of T2DM in patients with CAD. However, they observed the opposite trend in plasma within the T2DM group.<sup>25</sup> Chei et al. described similar trends as we observed in SAT as a consequence of CAD, but they found them in plasma.<sup>28</sup> They described the role of FA 18:2 in lowering the low-density lipoprotein (LDL) cholesterol and its antiarrhythmic effect. Dudek et al. reported FA 18:2 as a predominant acyl linked to mitochondrial cardiolipins in the heart. Diphosphate-diacylglycerols are intermediates of cardiolipins synthesis. Deficiency of FA 18:2 could lead to mitochondrial dysfunction and, subsequently, to ischemic heart disease.<sup>31</sup>

Other changes in glycerolipids were observed in molecules with odd-chain FA as 15:1, 15:0, 17:0, and 17:1 increased by CAD and decreased by T2DM. Crown et al. described the synthesis of odd-chain FA in adipose tissues through propionyl-CoA obtained from the catabolism of branched-chain amino acids (BCAA, valine, isoleucine, leucine).<sup>32</sup> Decrease in the levels of odd-chain fatty acids can be caused

by vitamin B12-dependent methylmalonyl CoA mutases, which was previously described to be associated with T2DM.<sup>32,33</sup> Moreover, the decrease in the expression of enzymes connected with the BCAA metabolism in adipose tissue was reported as well in obese and T2DM association.<sup>34</sup> Fillmore et al. described the reduction in BCAA oxidation during insulin resistance in the heart, which could lead to a decrease in the level of substrate propionyl-CoA for odd-chain FA synthesis.<sup>35</sup> On the other hand, McNulty et al. described that utilization of BCAA by myocardium by patients with CAD is dependent on their level in plasma and insensitive on insulin level.<sup>36</sup>

The connection between dihydroxycholesterol and T2DM in adipose tissue has not been described previously. Aires et al. described the accumulation of cholesterol and its oxy-derivatives in adipose tissue during weight gain. They hypothesized that oxidative stress leads to an increase in potentially toxic lipid accumulation.<sup>37</sup> Samadi et al. reported oxysterols as biomarkers of oxidative stress.<sup>38</sup> These findings are in agreement with our data as dihydroxycholesterol increased 5 times in the group with T2DM and dihydroxycholesterol correlates with total cholesterol.

Furthermore, it was described that increased levels of oxysterols correspond to CAD.<sup>38</sup> However, in our study, CAD did not have any effect on dihydroxycholesterol. However, it is the only member of the sterol lipid group that changed significantly, so we cannot rule out other effects.

Phospholipids were another substantially affected lipid class. The increased levels were observed mainly in EAT and were caused by T2DM. Also, the total content of phosphatidylcholines identified in EAT was increased significantly in the group with T2DM. Barber et al. described changes in plasma phospholipids after high-fat-diet-induced obesity and T2DM in mice model.<sup>39</sup> Based on this finding, they focused on tissues with major influence on glucose homeostasis, such as muscle, liver, and adipose tissue. The changes in tissues were very modest. Despite the decrease of lysophospholipids in plasma, muscles, and liver, they observed increased lysophospholipids in adipose tissue, which corresponded to our findings.<sup>39</sup> Further, we observed a positive correlation of a few LysoPE in both adipose tissues with total cholesterol and HDL. Kurano et al. described the effect of lysoglycerophospholipids on lipoprotein particles in plasma.<sup>40</sup>

The relation between increased sphingolipids in adipose tissue of patients with T2DM was described previously.<sup>41,42</sup> Ceramide synthesis pathway begins in the endoplasmic reticulum by condensation of palmitoyl CoA and serine. Dysregulation of this pathway leads to adipocytes dysfunction and insulin resistance. Acid and neutral sphingomyelinases catalyze hydrolysis of sphingomyelins into ceramides. In perturbed adipocytes, the sphingomyelinase pathway plays a more prominent role than de novo synthesis of ceramides in endoplasmic reticulum.<sup>43</sup> Alterations observed in our study could implicate that changes in sphingomyelins levels are caused by insulin resistance present in adipose tissue in patients with T2DM. Correlation of Cer (18:1/22:0), as well as TAG (18:1/18:1/17:1), in SAT with waist/hip ratio in all groups of patients could mean that storage of adipose tissue in the waist area is escorted by saving minor lipids in adipocytes during weight gaining. These lipids could have metabolic effects on disease progression.

## CONCLUSIONS

Even though the number of samples available is limited, the results are interesting and conclusive. They are discussed in context and in accordance with previously published data. Lipid composition in SAT and EAT was affected by CAD and T2DM. More pronounced changes were observed in EAT than in SAT. The effect of CAD and T2DM on the lipid profile of adipose tissue was often the opposite. Both diseases influenced members of lipid classes as monoacylglycerols, diacylglycerols, triacylglycerols, glycerophosphatidylserines, glycerophosphatidylethanolamines, glycerophosphatidylcholines, ceramides, sphingomyelins, and derivatives of cholesterol. The amount of lipids molecules with, e.g., FA 16:0 were increased by CAD and decreased by T2DM. Patient adipocytes with CAD were characterized by a decreased level of DAG (18:2/18:2), a precursor in the synthesis of cardiolipins. The presence of T2DM is accompanied by the development of insulin resistance in adipose tissue, resulting in lipid profile, suggesting sphingolipid metabolism disruption and decrease in odd fatty acids synthesis.

## ASSOCIATED CONTENT

### Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge at <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jproteome.0c00269>.

MS/MS of significantly changed lipids in adipose tissue, PLS-DA score plots for SAT and EAT, boxplots of significantly changed lipids, and correlations of significantly changed lipids in EAT and SAT with biochemical parameters; MS/MS spectrum of MAG(16:0) in adipose tissue obtained using positive ionization mode (Figure S1); MS/MS spectrum of DAG(18:1/16:0) in adipose tissue obtained using positive ionization mode (Figure S2); MS/MS spectrum of DAG(18:2/18:2) in adipose tissue obtained using positive ionization mode (Figure S3); MS/MS spectrum of TAG(16:0/18:1/15:0) in adipose tissue obtained using positive ionization mode (Figure S4); MS/MS spectrum of TAG(18:1/17:0/16:0) in adipose tissue obtained using positive ionization mode (Figure S5); MS/MS spectrum of TAG(18:1/16:1/12:0) in adipose tissue obtained using positive ionization mode (Figure S6); MS/MS spectrum of TAG(18:1/16:0/12:0) in adipose tissue obtained using positive ionization mode (Figure S7); MS/MS spectrum of TAG(18:1/16:0/14:0) in adipose tissue obtained using positive ionization mode (Figure S8); MS/MS spectrum of TAG(18:1/18:1/17:1) in adipose tissue obtained using positive ionization mode (Figure S9); MS/MS spectrum of TAG(18:1/18:2/20:1) in adipose tissue obtained using positive ionization mode (Figure S10); MS/MS spectrum of TAG(16:0/14:0/14:0) in adipose tissue obtained using positive ionization mode (Figure S11); MS/MS spectrum of TAG(16:1/18:1/15:0) in adipose tissue obtained using positive ionization mode (Figure S12); MS/MS spectrum of TAG(16:0/12:0/12:0) in adipose tissue obtained using positive ionization mode (Figure S13); MS/MS spectrum of TAG(16:1/16:0/15:1) in adipose tissue obtained using positive ionization mode (Figure S14); MS/MS spectrum of dihydroxycholesterol in adipose tissue obtained using positive ionization mode (Figure S15); MS/MS spectrum of PS(18:0/18:1) in adipose tissue

obtained using negative ionization mode (Figure S16); MS/MS spectrum of LysoPE(18:1) in adipose tissue obtained using negative ionization mode (Figure S17); MS/MS spectrum of LysoPE(18:2) in adipose tissue obtained using negative ionization mode (Figure S18); MS/MS spectrum of LysoPE(20:4) in adipose tissue obtained using negative ionization mode (Figure S19); MS/MS spectrum of LysoPC(16:0) in adipose tissue obtained using positive ionization mode (Figure S20); MS/MS spectrum of LysoPC(18:1) in adipose tissue obtained using positive ionization mode (Figure S21); MS/MS spectrum of LysoPC(18:2) in adipose tissue obtained using positive ionization mode (Figure S22); MS/MS spectrum of PC(32:0) in adipose tissue obtained using positive ionization mode (Figure S23); MS/MS spectrum of PC(32:1) in adipose tissue obtained using positive ionization mode (Figure S24); MS/MS spectrum of PC(34:0) in adipose tissue obtained using positive ionization mode (Figure S25); MS/MS spectrum of Cer(d18:1/22:0) in adipose tissue obtained using positive ionization mode (Figure S26); MS/MS spectrum of SM(36:1) in adipose tissue obtained using positive ionization mode (Figure S27); MS/MS spectrum of SM(40:1) in adipose tissue obtained using positive ionization mode (Figure S28); MS/MS spectrum of SM(42:2) in adipose tissue obtained using positive ionization mode (Figure S29); PLS-DA scores plot for SAT (Figure S30); PLS-DA scores plot for EAT (Figure S31); Boxplots of significantly changed lipids (Figure S32); correlation of significantly changed lipid in EAT and biochemical parameters (Figure S33); correlation of significantly changed lipid in SAT and biochemical parameters (Figure S34) (PDF)

## ■ AUTHOR INFORMATION

### Corresponding Author

Marek Kuzma – *Institute of Microbiology, Czech Academy of Sciences, 142 20 Prague 4, Czech Republic*; [orcid.org/0000-0001-7415-2734](https://orcid.org/0000-0001-7415-2734); Email: [kuzma@biomed.cas.cz](mailto:kuzma@biomed.cas.cz)

### Authors

Petra Tomášová – *Institute of Microbiology, Czech Academy of Sciences, 142 20 Prague 4, Czech Republic; 4th Medical Department, First Faculty of Medicine, Charles University and General Faculty Hospital in Prague, 128 08 Praha 2, Czech Republic*

Martina Čermáková – *Institute of Microbiology, Czech Academy of Sciences, 142 20 Prague 4, Czech Republic*; [orcid.org/0000-0002-4945-0630](https://orcid.org/0000-0002-4945-0630)

Helena Pelantová – *Institute of Microbiology, Czech Academy of Sciences, 142 20 Prague 4, Czech Republic*

Marek Vecka – *4th Medical Department, First Faculty of Medicine, Charles University and General Faculty Hospital in Prague, 128 08 Praha 2, Czech Republic*

Helena Kratochvílová – *Institute of Medical Biochemistry and Laboratory Diagnostics, First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital in Prague, 128 08 Prague 2, Czech Republic; Centre for Experimental Medicine, Institute for Clinical and Experimental Medicine, 140 21 Prague 4, Czech Republic*

Michal Lipš – *Department of Anaesthesiology, Resuscitation and Intensive Care, First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital in Prague, 128 08 Prague 2, Czech Republic*

Jaroslav Lindner – *2nd Department of Surgery - Department of Cardiovascular Surgery, First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital in Prague, 128 08 Prague 2, Czech Republic*

Peter Ivák – *Department of Cardiovascular Surgery, Institute for Clinical and Experimental Medicine, 140 21 Prague 4, Czech Republic*

Ivan Netuka – *Department of Cardiovascular Surgery, Institute for Clinical and Experimental Medicine, 140 21 Prague 4, Czech Republic*

Blanka Šedivá – *Institute of Microbiology, Czech Academy of Sciences, 142 20 Prague 4, Czech Republic; Faculty of Applied Sciences, University of West Bohemia, 306 14 Plzeň, Czech Republic*

Martin Haluzík – *Institute of Medical Biochemistry and Laboratory Diagnostics, First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital in Prague, 128 08 Prague 2, Czech Republic; Diabetes Centre, Institute for Clinical and Experimental Medicine, 140 21 Prague 4, Czech Republic*

Complete contact information is available at:

<https://pubs.acs.org/10.1021/acs.jproteome.0c00269>

### Notes

The authors declare no competing financial interest.

Datasets are deposited in MassIVE: <ftp://massive.ucsd.edu/MSV000085910/>, doi:10.25345/CSFF2S

Before enrollment into the study, all participants signed informed consent. The study was approved by the Human Ethics Review Board, First Faculty of Medicine, Charles University and General Faculty Hospital, Prague, Czech Republic, and was performed by the guidelines proposed in the Declaration of Helsinki (2000) of the World Medical Association.

## ■ ACKNOWLEDGMENTS

P.T., M.K., H.P., M.Č., and B.Š. received funding from the National Program of Sustainability (NPU I Lo1509). P.T. and M.V. received funding from research projects RVO-VFN64165, PROGRES-Q25/LF1/2, and SVV 260370-2017. H.K., M.L., J.L., P.I., I.N., M.H., and M.K. received funding from AZV NV19-02-00118. The research was conducted within the infrastructure built from the support of the Operational Programme Prague Competitiveness (CZ.2.16/3.1.00/24023).

## ■ ABBREVIATIONS

BCAA, branched-chain amino acids; BMI, body mass index; CAD, coronary artery disease; Cer, ceramide; CoA, coenzyme A; DAG, diacylglycerol; EAT, epicardial adipose tissue; FA, fatty acids; GC, gas chromatography; HDL, high-density lipoproteins; HPLC, high-pressure liquid chromatography; LDL, low-density lipoproteins; MAG, monoacylglycerol; MS, mass spectrometry; PC, glycerophosphocholine; PCA, principal component analysis; PE, glycerophosphatidylethanolamine; PLS-DA, partial least-squares-discriminant analysis; PS, glycerophosphatidylserine; RNA, ribonucleic acid; SAT, subcutaneous adipose tissue; SD, standard deviation; SM, sphingono-

myelin; TAG, triacylglycerol; T2DM, type 2 diabetes mellitus; TLC, thin-layer chromatography; TOF, time of flight

## REFERENCES

- (1) Malandrino, M. I.; et al. Enhanced fatty acid oxidation in adipocytes and macrophages reduces lipid-induced triglyceride accumulation and inflammation. *Am. J. Physiol.: Endocrinol. Metab.* **2015**, *308*, E756–E769.
- (2) Matloch, Z.; Kotulák, T.; Haluzík, M. The Role of Epicardial Adipose Tissue in Heart Disease. *Physiol. Res* **2016**, *65*, 23–32.
- (3) Liu, J.; et al. Impact of Abdominal Visceral and Subcutaneous Adipose Tissue on Cardiometabolic Risk Factors: The Jackson Heart Study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2010**, *95*, S419–S426.
- (4) Patel, T. P.; et al. Insulin resistance: an additional risk factor in the pathogenesis of cardiovascular disease in type 2 diabetes. *Heart Failure Rev.* **2016**, *21*, 11–23.
- (5) De Rosa, S.; Arcidiacono, B.; Chiefari, E.; Brunetti, A.; Indolfi, C.; Foti, D. P. Type 2 Diabetes Mellitus and Cardiovascular Disease: Genetic and epigenetic Links. *Front. Endocrinol.* **2018**, *9*, 2.
- (6) Ayala, D. E.; et al. Circadian Pattern of Ambulatory Blood Pressure in Hypertensive Patients With and Without Type 2 Diabetes. *Chronobiol. Int.* **2013**, *30*, 99–115.
- (7) Unamuno, X.; Gómez-Ambrosi, J.; Rodríguez, A.; et al. Adipokine dysregulation and adipose tissue inflammation in human obesity. *Eur. J. Clin. Invest.* **2018**, *48*, No. e12997.
- (8) Kang, Y. E.; et al. The Roles of Adipokines, Proinflammatory Cytokines, and Adipose Tissue Macrophages in Obesity-Associated Insulin Resistance in Modest Obesity and Early Metabolic Dysfunction. *PLoS One* **2016**, *11*, No. e0154003.
- (9) Borén, J.; Taskinen, M.; Olofsson, S.; Levin, M. Ectopic lipid storage and insulin resistance: a harmful relationship. *J. Intern. Med.* **2013**, *274*, 25–40.
- (10) Tomášová, P.; et al. Minor lipids profiling in subcutaneous and epicardial fat tissue using LC/MS with an optimized preanalytical phase. *J. Chromatogr. B* **2019**, *1113*, 50–59.
- (11) Berg, G.; Miksztovcz, V.; Morales, C.; Barchuk, M. Epicardial Adipose Tissue in Cardiovascular Disease. In *Bioactive Lipids in Health and Disease*; Trostchansky, A.; Rubbo, H., Eds.; Springer International Publishing, 2019; pp 131–143.
- (12) Ding, J.; et al. The association of pericardial fat with incident coronary heart disease: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *Am. J. Clin. Nutr.* **2009**, *90*, 499–504.
- (13) Hjelmggaard, K.; Eschen, R.; Schmidt, E.; Andreasen, J.; Lundbye-Christensen, S. Fatty Acid Composition in Various Types of Cardiac Adipose Tissues and Its Relation to the Fatty Acid Content of Atrial Tissue. *Nutrients* **2018**, *10*, 1506.
- (14) Gaborit, B.; et al. Assessment of epicardial fat volume and myocardial triglyceride content in severely obese subjects: Relationship to metabolic profile, cardiac function and visceral fat. *Int. J. Obes.* **2012**, *36*, 422–430.
- (15) Shimabukuro, M.; et al. Epicardial adipose tissue volume and adipocytokine imbalance are strongly linked to human coronary atherosclerosis. *Arterioscler., Thromb., Vasc. Biol.* **2013**, *33*, 1077–1084.
- (16) Jové, M.; et al. Human omental and subcutaneous adipose tissue exhibit specific lipidomic signatures. *FASEB J.* **2014**, *28*, 1071–1081.
- (17) Goldberg, I. J. Fat in the blood, fat in the artery, fat in the heart; Triglyceride in physiology and disease. *Arterioscler., Thromb., Vasc. Biol.* **2018**, *38*, 700–706.
- (18) Kraemer, N.; et al. Phosphatidylcholine synthesis for lipid droplet expansion is mediated by localized activation of CTP:Phosphocholine cytidylyltransferase. *Cell Metab.* **2011**, *14*, 504–515.
- (19) Narváez-Rivas, M.; Zhang, Q. Comprehensive untargeted lipidomic analysis using core – shell C30 particle column and high field orbitrap mass spectrometer. *J. Chromatogr. A* **2016**, *1440*, 123–134.
- (20) Szczuko, M.; Kaczkan, M.; Drozd, A.; Maciejewska, D.; et al. Comparison of Fatty Acid Profiles in a Group of Female Patients with Chronic Kidney Diseases (CKD) and Metabolic Syndrome (MetS)—Similar Trends of Changes, Different Pathophysiology. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 1719.
- (21) López-Bascón, M. A.; et al. Influence of sample preparation on lipidomics analysis of polar lipids in adipose tissue. *Talanta* **2018**, *177*, 86–93.
- (22) Folch, J.; Lees, M.; Sloane Stanley, G. H. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.* **1957**, *226*, 497–509.
- (23) Pluskal, T.; Castillo, S.; Villar-Briones, A.; Orešič, M. MZmine 2: Modular framework for processing, visualizing, and analyzing mass spectrometry-based molecular profile data. *BMC Bioinf.* **2010**, *11*, No. 395.
- (24) Wishart, D. S.; et al. HMDB 4.0: the human metabolome database for 2018. *Nucleic Acids Res.* **2018**, *46*, 608–617.
- (25) 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* **2013**, *3*, 83–89.
- (26) Pezeshkian, M.; et al. Fatty acid composition of epicardial and subcutaneous human adipose tissue. *Metab. Syndr. Relat. Disord.* **2009**, *7*, 125–131.
- (27) Zhang, Y.; et al. PGC-1  $\alpha$  Inhibits Oleic Acid Induced Proliferation and Migration of Rat Vascular Smooth Muscle Cells. *PLoS One* **2007**, *2*, No. e1137.
- (28) Chei, C.; et al. Serum Fatty Acid and Risk of Coronary Artery Disease. *Circ. J.* **2018**, *82*, 3013–3020.
- (29) Perreault, L.; et al. Intracellular localization of diacylglycerols and sphingolipids influences insulin sensitivity and mitochondrial function in human skeletal muscle. *JCI Insight* **2018**, *3*, No. e96805.
- (30) Erion, D. M.; Shulman, G. I. Diacylglycerol-mediated insulin resistance. *Nat. Med.* **2010**, *16*, 400–402.
- (31) Dudek, J.; Hartmann, M.; Rehling, P. The role of mitochondrial cardiolipin in heart function and its implication in cardiac disease  $\star$ . *Biochim. Biophys. Acta, Mol. Basis Dis.* **2019**, *1865*, 810–821.
- (32) 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* **2015**, *10*, No. e0145850.
- (33) 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.* **2017**, *15*, 183–186.
- (34) 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.* **2013**, *304*, E1175–87.
- (35) Fillmore, N.; Wagg, C. S.; Zhang, L.; Fukushima, A.; Lopaschuk, G. D. Cardiac branched-chain amino acid oxidation is reduced during insulin resistance in the heart. *Am. J. Physiol.: Endocrinol. Metab.* **2018**, *315*, E1046–E1052.
- (36) McNulty, P. H.; Jacob, R.; Deckelbaum, L. I.; Young, L. H. Effect of Hyperinsulinemia on Myocardial Amino Acid Uptake in Patients With Coronary Artery Disease. *Metabolism* **2000**, *49*, 1365–1369.
- (37) Aires, V.; et al. Healthy adiposity and extended lifespan in obese mice fed a diet supplemented with a polyphenol-rich plant extract. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, No. 9134.
- (38) Samadi, A.; et al. Oxysterol species: reliable markers of oxidative stress in diabetes mellitus. *J. Endocrinol. Invest.* **2019**, *42*, 7–17.
- (39) Barber, M. N.; et al. Plasma Lysophosphatidylcholine Levels Are Reduced in Obesity and Type 2 Diabetes. *PLoS One* **2012**, *7*, No. e41456.
- (40) Kurano, M.; et al. Regulation of plasma glycerol-lysophospholipid levels by lipoprotein metabolism. *Biochem. J.* **2019**, *476*, 3565–3581.

(41) Chaurasia, B.; Kaddai, V. A.; Lancaster, G. I.; Henstridge, D. C.; Sriram, S.; Galam, D. L. A.; Gopalan, V.; Prakash, K. N. B.; Velan, S. S.; Bulchand, S.; Tsong, T. J.; Wang, M.; Siddique, M. M.; et al. Adipocyte Ceramides Regulate Subcutaneous Adipose Browning, Inflammation, and Metabolism. *Cell Metab.* 2016, 24, 820–834.

(42) Blachnio-Zabielska, A. U.; et al. Increased bioactive lipids content in human subcutaneous and epicardial fat tissue correlates with insulin resistance. *Lipids* 2012, 47, 1131–1141.

(43) Fang, Z.; Pyne, S.; Pyne, N. J. Ceramide and sphingosine 1-phosphate in adipose dysfunction. *Prog. Lipid Res.* 2019, 74, 145–159.