FAKULTNÍ NEMOCNICE® OLOMOUC

Univerzita Palackého v Olomouci

4. PRACOVNÍ DNY
KLINICKÉ HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE

16.–17. 4. 2026

Pevnost poznání, Přírodovědecká fakulta UP Olomouc

ODBORNÝ GARANT
prof. RNDr. David Friedecký, Ph.D.

POŘADATEL
Oddělení klinické biochemie, Fakultní nemocnice Olomouc
Laboratoř růstových regulátorů, Univerzita Palackého v Olomouci

SBORNÍK ABSTRAKT

SBORNÍK ABSTRAKT

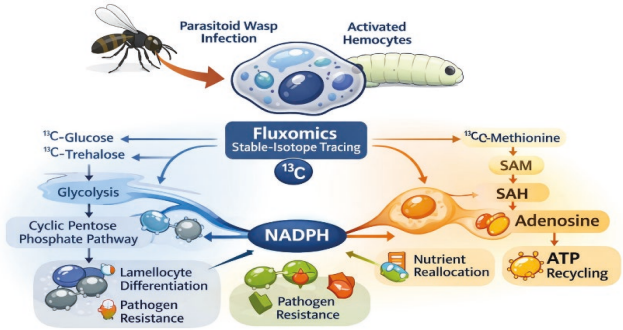
SEKCE I

Fluxomics in Practice: How Metabolic Flux Analysis Reveals Metabolic Reprogramming during the Immune Response

Martin Moos[1], Tomáš Doležal[2], Michalina Kazek[2], Pavla Nedbalová[2]

[1] Laboratory of Analytical Biochemistry and Metabolomics, Institute of Entomology, Biology Centre, Czech Academy of Sciences, České Budějovice, Czech Republic
[2] Department of Molecular Biology and Genetics, Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic

Abstract
Fluxomics complements conventional metabolomics by going beyond metabolite abundances to capture the flow of substrates through metabolic networks. By employing stable isotope-labelled tracers, metabolic flux analysis enables direct assessment of pathway activity and provides mechanistic insight into metabolic adaptations that cannot be inferred from steady-state metabolite levels alone. Following a brief introduction to the theoretical basis of fluxomic analysis, two case studies will be presented to illustrate how metabolic tracing can be used to dissect metabolic reprogramming associated with immune activation.



Both case studies are based on the immune response of *Drosophila melanogaster* larvae to parasitoid wasp infection and address distinct aspects of metabolic adaptation in activated hemocytes. The first study demonstrates that immune activation is associated with increased uptake and utilization of glucose and trehalose, with carbon flux redirected into glycolysis and the cyclic pentose phosphate pathway. This metabolic reconfiguration supports NADPH production, lamellocyte differentiation, effective immune defence, and protection of the host against the detrimental consequences of its own immune response. The second study focuses on the S-adenosylmethionine transmethylation pathway and shows that adenosine generated during transmethylation is not merely a metabolic by-product, but functions as a systemic signal that coordinates nutrient allocation in support of immune activity. At the same time, efficient recycling of adenosine back into ATP is required for proper immune-cell function.

Together, these examples illustrate that metabolic flux analysis provides a powerful framework for linking pathway activity with cellular function, systemic physiological regulation, and the biological consequences of immune activation.

The support by project reg. no. CZ.02. 01. 01/00/23_021/0008906 (BudDiag), co-funded by the European Union.

Reference
1. Kazek M. et al., 2024, PLoS Biol 22(5): e3002299. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3002299
2. Nedbalová M. et al., 2025, eLife. 13:RP105039 https://doi.org/10.7554/eLife.105039.2

Využití MALDI-TOF MS v rutinní praxi klinické mikrobiologie

Gabriela Kroneislová [1], Jan Závora [1,2]

[1] Klinická mikrobiologie a antibiotické centrum, Ústav lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky, Všeobecná fakultní nemocnice, Praha, CZ
[2] Ústav mikrobiologie, Lékařská fakulta, Univerzita Palackého, Olomouc, CZ

Abstrakt
Metoda matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight hmotnostní spektrometrie (MALDI-TOF MS) představuje jednu z nejvýznamnějších inovací v diagnostice klinické mikrobiologie posledních desetiletí. Její zavedení do rutinní laboratorní praxe zásadně změnilo způsob identifikace mikroorganismů díky vysoké rychlosti, přesnosti a relativně nízkým provozním nákladům. Princip metody spočívá v analýze proteinového spektra mikrobiálních buněk, zejména ribozomálních proteinů, které vytvářejí charakteristický profil. Získané spektrum je porovnáno se spektry v databázi a výsledkem je identifikace mikroorganismu.

V rutinní diagnostice je MALDI-TOF MS využívána především pro rychlou identifikaci bakterií a mikromycet z čistých kultur, přičemž výsledky jsou dostupné během několika minut. Ve srovnání s tradičními biochemickými metodami dochází k výraznému zkrácení času potřebného k identifikaci patogenu, což může mít přímý dopad na včasné zahájení cílené antimikrobiální terapie a celkový management pacienta. V posledních letech se rozšiřují také aplikace zahrnující přímou identifikaci mikroorganismů z pozitivních hemokultur, detekci některých mechanismů antimikrobiální rezistence či epidemiologické typování vybraných patogenů.

Přestože má metoda řadu výhod, její využití je spojeno i s určitými omezeními. Patří mezi ně například obtížnější identifikace některých blízce příbuzných druhů, závislost na kvalitě a rozsahu referenčních databází či omezené možnosti přímé detekce rezistence. Navzdory těmto limitacím se MALDI-TOF MS stala standardním nástrojem moderních mikrobiologických laboratoří a významně přispívá ke zrychlení a zkvalitnění laboratorní diagnostiky infekčních onemocnění.

Možnosti analýzy terapeutických oligonukleotidů pomocí LC-MS

Zuzana Vosáhlová[1], Sylwia Studzińska[2], Květa Kalíková[3], Martin Gilar[4], Veronika Šubrtová[1], Michal Holčapek[1]

[1] Katedra analytické chemie, Fakulta chemicko-technologická, Univerzita Pardubice, Česká republika
[2] Department of environmental chemistry and bioanalysis, Faculty of chemistry, Nicolaus Copernicus University, Torun, Polsko
[3] Katedra fyzikální a makromolekulární chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova, Praha, Česká republika
[4] Waters Corporation, Milford, USA

Abstrakt
Význam oligonukleotidů v genové terapii v posledních letech významně roste. Jedním z příkladů je využití nusinersenu (obsaženého v přípravku Spinraza) v případě léčby spinální svalové atrofie (SMA) [1].

Terapeutické oligonukleotidy jsou strukturně modifikovány za účelem zvýšení jejich rezistence vůči nukleázám, což zvyšuje nejen jejich stabilitu, ale i účinnost. Jedna z typických modifikací, tzv. thiofosfátová substituce, ale značně komplikuje jejich chromatografickou analýzu, protože vnáší do oligonukleotidu chirální centrum, a tím vede k tvorbě diastereomerů. Řešením je potlačení separace diastereomerů, ke které se využívají dva hlavní přístupy: i) iontově-párová chromatografie na reverzních stacionárních fází (IPRPLC; přítomnost iontově-párových činidel potlačuje separaci diastereomerů); nebo ii) hydrofilní interakční kapalinová chromatografie (HILIC; hydrofobní interakce zodpovědné za separaci diastereomerů poskytuje pouze velmi omezeně). Oba přístupy mají své nevýhody – ty nejzásadnější z nich jsou spojené s MS detekcí. Zatímco u využití IPRPLC dochází ke kontaminaci hmotnostního spektrometru iontově-párovými činidly, HILIC vykazuje mnohem nižší citlivost z důvodu tvorby velkého množství aduktů.

Výběr vhodné metody a podmínek je klíčový pro správnou identifikaci a kvantifikaci nejen samotné účinné látky (tedy terapeutického oligonukleotidu), ale i jeho nečistot a metabolitů. Informace získané z analýzy vzorků krve SMA pacientů mohou být korelovány s jejich zdravotním stavem a důsledkem může být včasné vyhodnocení účinků léčby.

Cílem je shrnout základní přístupy a úskalí jednotlivých metod a ukázat potenciál hmotnostní spektrometrie v oblasti analýzy DNA i RNA oligonukleotidů.

Reference
1. K. Ostrowska, *et.al*, Short review on determination of nusinersen for spinal muscular atrophy treatment, *Microchem. J.* **213** (2025) 113559.

Molekulární remodelace sklivce při amoci sítnice: časová dynamika a okno biologické reverzibility

Jaroslava Friedecká[1*], Jan Havlík[2,3], Antonín Bednář[4], Radana Brumarová[4], Martin Šín[2,3], David Friedecký[4], René Lenobel[1], Ondřej Novák[1]

[1] Laboratoř růstových regulátorů, Ústav experimentální botaniky AV ČR a Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého, Šlechtitelů 27, 783 71 Olomouc, Česká republika.
[2] Oční klinika, Ústřední vojenská nemocnice Praha, Praha, Česká republika.
[3] 1. lékařská fakulta Univerzity Karlovy, Praha, Česká republika.
[4] Laboratoř dědičných metabolických poruch, Ústav klinické chemie, Univerzita Palackého a Fakultní nemocnice Olomouc, Olomouc, Česká republika.
[*] *jaroslava.friedecka@upol.cz*

Abstrakt
Amoce sítnice vyvolává výrazné biochemické změny ve sklivci, které se v čase vyvíjejí a zásadně ovlivňují další osud tkáně. Molekulární rozdíly mezi časnými a pozdními stadii však dosud nejsou dostatečně charakterizovány, což omezuje možnosti přesné diagnostiky, prognostické stratifikace i včasné terapeutické intervence.

V rámci pilotního experimentu bylo analyzováno 20 vzorků sklivce: 7 od pacientů s časnou amocí sítnice (≤ 5 dní), 5 s pozdní amocí (≥ 10 dní) a 8 od kontrolních osob. K analýze byl využit integrovaný proteomický, metabolomický a cílený lipidomický přístup. Multivariační statistické metody v kombinaci s analýzou biologických drah umožnily definovat časově závislé molekulární profily odpovídající odlišným biologickým stavům v jednotlivých fázích onemocnění.

Časná amoce sítnice byla charakterizována metabolickou flexibilitou a adaptivní remodelací tkáně. Proteomická analýza sklivce ukázala na dynamický obrat extracelulární matrix a zachovanou buněčnou signalizaci bez známek akutní zánětlivé odpovědi. Metabolomické profilování odhalilo zvýšené hladiny uridinu, porfobilinogenu a malých glycinem bohatých peptidů, což svědčí pro aktivní syntézu RNA, zachovalý mitochondriální metabolismus a kontrolovaný obrat proteinů. Lipidomická analýza prokázala relativní pokles komplexních fosfolipidů, odpovídající zvýšenému obratu membrán a strukturální plasticitě, tedy fázi potenciálně biologicky reverzibilní.

Naopak pozdní amoce sítnice vykazovala odlišný molekulární profil odpovídající chronické maladaptaci. Proteomické změny zahrnovaly akumulaci strukturálních proteinů extracelulární matrix, aktivaci lysozomálních proteáz a přítomnost markerů perzistujícího subklinického zánětu s rysy funkčně oslabené imunitní odpovědi. Metabolomické nálezy byly charakterizovány zvýšenými hladinami acylkarnitinů, dokosahexaenové kyseliny a glukonátu, což odráží porušenou mitochondriální β-oxidaci mastných kyselin a narušenou redoxní rovnováhu. Lipidomická analýza dále ukázala akumulaci etherových fosfolipidů, plazmalogenů a sfingomyelinů, svědčící pro snížený obrat lipidů a stabilizaci membrán.

Naše výsledky potvrzují, že amoce sítnice představuje dynamický, časově závislý proces s existencí omezeného okna biologické reverzibility. Multiomické analýzy sklivce tak umožňují molekulární staging onemocnění a poskytují mechanistický základ pro přesnější prognostickou stratifikaci i optimální načasování terapeutických intervencí.

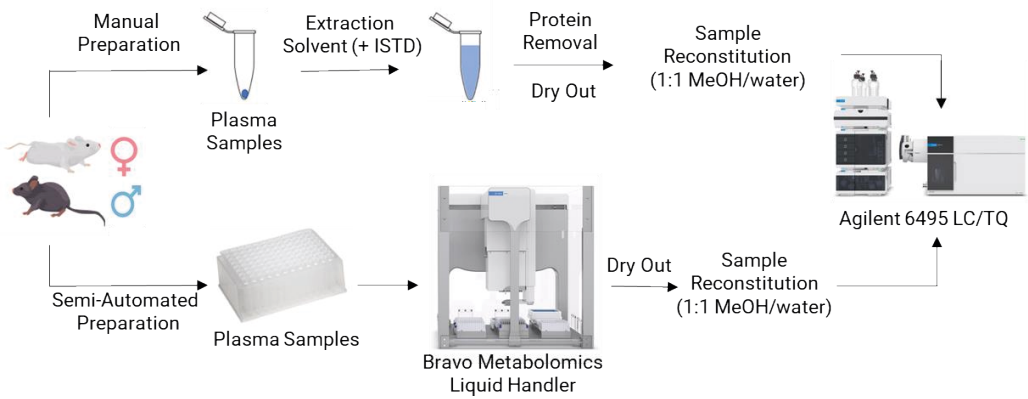
Poděkování: Tato práce byla podpořena z Evropského fondu pro regionální rozvoj – projekt „Interdisciplinární přístupy pro vývoj a aplikaci nových materiálů v medicínské praxi – nové omické technologie“ (č. CZ.02. 01. 01/00/23_021/0009224).

Analýza žlučových kyselin v biologických vzorcích pomocí UHPLC/MS/MS pro klinický výzkum

Ondřej Lacina, Jitka Zrostliková, Altium International s.r.o.

Abstrakt
Žlučové kyseliny získávají rostoucí klinický i výzkumný význam — od diagnostiky cholestázy a sledování terapie UDCA až po studium interakce mezi střevním mikrobiomem a hostitelem v kontextu metabolických a nádorových onemocnění. Jejich stanovení pomocí LC-MS/MS naráží na několik problémů: panel obsahuje desítky strukturně blízkých izomerů a izobarů, široký rozsah polarity od taurinových konjugátů až po lipofilní LCA a nekonjugované formy navíc fragmentují v CID jen omezeně.

Přednáška představí aktuální standardizovaný workflow s Agilent 6495D LC/TQ se 4. generací iFunnel technologie a kolonou InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, který umožňuje kvantifikaci 68 žlučových kyselin v plazmě, séru nebo stolici. Hlavním přínosem je příprava vzorku kompatibilní s automatizes na platformě Agilent Bravo a s Captiva EMR-Lipid pro odstranění fosfolipidů.



SEKCE II

Kombinovaný klinicko-laboratorní marker pro hodnocení Fabryho choroby

Kuchar L[1], Dvořáková L[2], Berná L[1,2], Ledvinova J[1], Poupetova H[1,2], Dostálová G[3], Linhart A[3], Sikora J[1]

[1] Laboratoř pro studium vzácných nemocí, Klinika pediatrie a dědičných poruch metabolismu 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze a Všeobecné fakultní nemocnice v Praze
[2] Diagnostické laboratoře, Klinika pediatrie a dědičných poruch metabolismu 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze a Všeobecné fakultní nemocnice v Praze
[3] II. interní klinika kardiologie a angiologie, 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze a Všeobecné fakultní nemocnice v Praze

Abstrakt
Fabryho choroba je X-vázané lysosomální střádavé onemocnění způsobené mutacemi v genu **GLA**, které vedou k poruše enzymu α-galaktosidázy A (AGAL). Následkem je akumulace glykosfingolipidu Gb3 v lysozomech a narušení buněčné homeostázy. Kromě klasického střádání byl popsán i tzv. AGALopatický mechanismus spojený s mislokalizací proteinu AGAL a rozvojem atypické formy onemocnění. X-vázaná dědičnost vede k odlišnému průběhu u mužů a žen; u žen hraje významnou roli inaktivace chromozomu X (XCI).

Za nejvýznamnější biomarker je považován lysoGb3 stanovovaný v plazmě pomocí LC-MS. V této studii jsme analyzovali koncentraci lysoGb3 a aktivitu AGAL u mužů s Fabryho chorobou a u žen navíc i míru XCI. Parametry byly porovnány mezi skupinami pacientů podle klinického fenotypu včetně nově popsaných AGALopatií.

Na základě těchto dat jsme navrhli nový výpočtový marker – poměr **AGAL/lysoGb3**, který prokázal vyšší diagnostickou účinnost než samotný lysoGb3. U žen byl marker rozšířen o parametr XCI do podoby **TCM (Triparametric Computational Marker)**. Slabá korelace laboratorních výsledků s klinickým skóre MSSI vedla k návrhu upraveného skóre **gMSSI+** a integrativního ukazatele **ICLq (Integrative Clinical-Laboratory quotient)**, který kombinuje klinické a laboratorní parametry.

Tento přístup může poskytovat komplexnější hodnocení pacientů s Fabryho chorobou, protože spojuje klinickou manifestaci onemocnění s jeho geneticko-biochemickým pozadím. Klíčovou roli v tomto konceptu hraje klinická hmotnostní spektrometrie umožňující stanovení lysoGb3 a potenciálně i enzymové aktivity AGAL.

Podpořeno z programového projektu Ministerstva zdravotnictví ČR s reg. č. NU21-08-00324. Tato práce vznikla též za podpory projektu MULTIOMICS_CZ, (Operační program Jan Amos Komenský, Ministerstvo školství, mládeže a tělovýchovy České republiky, reg. č. Z.02. 01. 01/00/23_020/0008540) – Spolufinancováno Evropskou unií.

Využitie tandemovej hmotnostnej spektrometrie v Centre DMP NÚDCH

Matúš Prídavok[1], Katarína Lászlová[1], Danka Maceková[1], Claudia Šebová[1]

[1] entrum dedičných metabolických porúch, Oddelenie laboratórnej medicíny, Národný ústav detských chorôb, Bratislava

Abstrakt

Technológia kvapalinovej chromatografie spojenej s tandemovou hmotnostnou spektrometriou (LC-MS/MS) sa od 90. rokov 20. storočia etablovala ako významný nástroj v oblasti kvantitatívnej bioanalýzy, predovšetkým vďaka svojej vysokej špecificite, senzitivite a analytickej rýchlosti. Jej uplatnenie sa výrazne rozšírilo aj v diagnostike dedičných metabolických porúch (DMP), ktoré predstavujú rozsiahlu, heterogénnu skupinu zriedkavých geneticky podmienených ochorení; v súčasnosti je popísaných viac ako 1450 ochorení. V NÚDCH v Bratislave bola LC-MS/MS implementovaná do rutinnej laboratórnej praxe v roku 2019; využíva sa na analýzu profilu acylkarnitínov v suchej kvapke krvi, vrátane chromatografickej separácie izomérov C5-karnitínu, na kvantifikáciu voľného karnitínu v sére a moči, na stanovenie profilu purínov a pyrimidínov v moči, ako aj na analýzu guanidínoacetátu a kreatínu v moči. Okrem toho sa pomocou LC-MS/MS realizuje terapeutické monitorovanie hladiny ambroxolu v plazme.

Vyšetrenie profilu acylkarnitínov predstavuje kľúčový skríningový nástroj pri diagnostike porúch karnitínového cyklu a porúch β-oxidácie mastných kyselín. Metóda umožňuje zachytiť aj niektoré biomarkery organických acidémií, avšak pre definitívne potvrdenie väčšiny z nich je nevyhnutné doplniť ďalšie analytické vyšetrenia. Tieto môžu byť realizované buď z identickej vzorky prostredníctvom chromatografickej separácie (tzv. second-tier testy), alebo využitím alternatívnych analytických prístupov. Stanovenie koncentrácie voľného karnitínu v sére a moči má zásadný význam pre diagnostiku primárneho deficitu karnitínu; sérové vyšetrenie sa zároveň rutinne využíva na monitorovanie pacientov s potvrdenou DMP alebo v iných klinických indikáciách. Analýza profilu purínov a pyrimidínov umožňuje identifikáciu 15 metabolických ochorení, stanovenie guanidínoacetátu a kreatínu slúži ako diagnostický marker troch syndrómov deficitu kreatínu v mozgu. Stanovenie hladiny ambroxolu (chaperónová liečba) je indikované u pacientky s Gaucherovou chorobou. Ročne sa v laboratóriu analyzuje približne 1000 vzoriek séra na stanovenie koncentrácie voľného karnitínu, 400 vzoriek suchej kvapky krvi na profil acylkarnitínov a 400 vzoriek moču na stanovenie exkrécie guanidínoacetátu a kreatínu.

Vzhľadom na široké analytické možnosti technológie LC-MS/MS možno v budúcnosti očakávať rozšírenie spektra realizovaných vyšetrení. Medzi hlavné výhody tejto metodiky patrí nízka spotreba biologického materiálu, minimálna spotreba reagencií a relatívne jednoduchá príprava vzoriek. Limitujúcimi faktormi zostávajú vysoké vstupné investičné náklady a následná finančne náročná údržba prístrojového vybavenia. Napriek tomu predstavuje LC-MS/MS optimálnu technológiu pre rýchlu, presnú a spoľahlivú diagnostiku v podmienkach klinického laboratória.

Several authors of this publication are members of the European Reference Network for Rare Hereditary Metabolic Disorders (MetabERN).

Diagnostika a molekulární mechanismy hetereditárních amyloidóz

Aleš Hnízda, Jakub Sikora

Klinika pediatrie a dědičných poruch metabolismu, 1. lékařská fakulta University Karlovy

Amyloidózy jsou heterogenní skupinou klinicko-patologických jednotek charakterizovaných extracelulární akumulací proteinů složených dominantně z beta-skládaných listů (tzv. amyloidů). Některé amyloidózy jsou získané (např. nehereditární transthyretinová amyloidóza), jiné jsou vzácná monogenní dědičná onemocnění. Příčiny a patogeneze abnormální fibrilogeneze a depozice amyloidu jsou stále poměrně neznámé.

V této práci představím náš vědecký program zabývající se dědičnými amyloidózami, na kterém spolupracujeme se specializovanou laboratoří v Mayo Clinic (Rochester, Minnesota, USA). Toto pracoviště poskytuje standardizovanou analýzu amyloidních depozit v tkáních pomocí laserem-asistované mikrodisekce s následnou hmotnostně-spektrometrickým měřením. V rámci těchto aktivit jsme identifikovali doposud nepopsané případy vzácných amyloidóz způsobené patogenními variantami v SAA-1 nebo ApoA-4. Každá patogenní varianta vykazuje specifické molekulární parametry a k patogenezi tak přispívá odlišnými mechanismy. Tohoto jsme využili k návrhu individualizovaných terapií. V prezentaci budu diskutovat naše zkušenosti s využitím hmotnostní spektrometrie pro diagnostiku a studium patogenetických mechanismů u vrozených amyloidóz.

Tato práce byla podpořena programem MŠMT INTER-ACTION-LUAUS25.

Komplexní hmotnostně spektrometrické profilování krevního séra pediatrických pacientů s Crohnovou chorobou a ulcerózní kolitidou: přínos pro diagnostiku a monitoring onemocnění

Jakub Rozhon[1], Eliška Ivanovová[1], Barbora Piskláková[1], Aleš Kvasnička[1], Radana Brumarová[1], Jaroslava Friedecká[3], René Lenobel[3], David Friedecký[1,2], Eva Karásková[2]

[1] Laboratoř dědičných metabolických poruch, Oddělení klinické biochemie, Fakultní nemocnice Olomouc, 77900 Olomouc, Česká republika
[2] Dětská klinika, Fakultní nemocnice Olomouc, 77900 Olomouc, Česká republika
[3] Laboratoř růstových regulátorů, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého, Olomouc, Česká republika

Úvod: Idiopatické střevní záněty (IBD), reprezentované především Crohnovou chorobou (CD) a ulcerózní kolitidou (UC), patří mezi chronická autoimunitní onemocnění s rostoucí incidencí již v dětském věku. Jejich klinický průběh je značně heterogenní a stávající laboratorní ukazatele často neumožňují dostatečně přesné rozlišení jednotlivých forem onemocnění ani spolehlivé hodnocení aktivity a odpovědi na léčbu. Kombinované hodnocení lipidového, metabolického a proteinového profilu séra proto představuje perspektivní přístup k detailnější charakterizaci biologických procesů spojených s IBD a k identifikaci skupinových markerů využitelných v klinické praxi.

Cíle: Cílem studie bylo posoudit, zda integrovaná analýza sérového lipidového, metabolického a proteinového profilu umožní přesnější charakterizaci pediatrických pacientů s CD a UC, odlišení těchto skupin od zdravých kontrol a identifikaci změn relevantních pro diagnostiku a sledování průběhu onemocnění.

Metody: Do studie byli zařazeni pediatričtí pacienti s CD, pacienti s UC a zdravé kontroly. Lipidomická a cílená metabolomická analýza séra byla provedena pomocí LC-MS/MS (Sciex QTRAP 6500+), přičemž bylo hodnoceno přes 700 lipidů v rámci více než 20 lipidových tříd a také více než 110 metabolitů. Proteomická analýza vybraných vzorků byla realizována pomocí nanoLC ve spojení s vysokorozlišovací tandemovou hmotnostní spektrometrií na systému timsTOF Pro 2 (Bruker Daltonics), s identifikací více než 150 proteinů a peptidů. Soubor výsledků byl zpracován pomocí univariantních a multivariantních statistických modelů včetně analýz vzájemných souvislostí mezi lipidomickými, metabolomickými a proteomickými daty.

Výsledky: Multiomické sérové profiování ukázalo, že IBD pacienti vykazují odlišný molekulární profil ve srovnání se zdravými kontrolami, přičemž změny byly výraznější zejména u pacientů s CD. V lipidové části bylo pozorováno především systematické snížení hladin fosfatidylcholinových plasmalogenů a sfingomyelinů. Rovněž došlo u všech IBD pacientů ke zvýšení hladiny kyseliny dokosahexaenové (FA 22:6).

Metabolomická analýza současně poukázala na narušení drah souvisejících s metabolismem argininu, vitamin-dependentními procesy i metabolity mikrobiálního původu. Proteomická data prokázala změny v proteinech spojených se systémovou zánětlivou odpovědí, akutní fází, komplementovým systémem, koagulací, antioxidační ochranou a transportem lipidů. Integrované multiomické hodnocení napříč analytickými vrstvami naznačilo propojení mezi poruchou lipidového metabolismu, metabolickým stresem a aktivací imunitně-zánětlivých mechanismů, které se u CD a UC liší svým rozsahem i intenzitou.

Závěr: Komplexní profilování krevního séra založené na současném hodnocení lipidového, metabolického a proteinového spektra přináší detailnější pohled na biologické pozadí CD a UC v pediatrické populaci. Získané výsledky ukazují, že tento přístup může přispět k přesnějšímu rozlišení jednotlivých forem IBD, k lepšímu posouzení aktivity onemocnění a v budoucnu také k individualizaci monitoringu léčby. Identifikované změny na molekulární úrovni tak představují základ pro hledání nových sérových skupinových biomarkerů s potenciálním využitím v rutinní klinické péči.

Grantová podpora: DRO (FNOL, 00098892), MZČR (NW26-01-00189).

Kam až sahají možnosti technologií Waters

Jan Bohuslavek

Waters

Abstrakt
Rostoucí komplexita klinického a toxikologického testování vyžaduje analytické platformy, které poskytují nekompromisní citlivost, specificitu a robustnost. Tato prezentace představuje využití trojitého kvadrupólového hmotnostního spektrometru Xevo TQ Absolute XR a hmotnostního spektrometru s vysokým rozlišením Xevo MRT v moderních klinických a toxikologických laboratořích. Xevo TQ Absolute XR, díky vylepšené iontové optice a mimořádně nízkým detekčním limitům, umožňuje vysoce citlivou kvantifikaci terapeutických léčiv, endogenních biomarkerů a stopových analytů v náročných biologických matricích, jak bude ukázáno na příkladu analýzy 17β-estradiolu a estronu v séru. Jeho rychlost a odolnost podporují pracovní postupy nezbytné pro rutinní klinické prostředí s velkým množstvím vzorků. Xevo MRT tyto možnosti doplňuje poskytováním vysokého rozlišení a přesné hmoty s výjimečnou hmotnostní stabilitou, což umožňuje spolehlivou identifikaci neznámých látek, strukturální elucidaci a širokospektrální toxikologický screening. Další příklady ukážou, jak tyto technologie zjednodušují pracovní postupy, zvyšují kvalitu dat a podporují vyvíjející se regulatorní a klinické požadavky.

SEKCE III

Využitie hmotnostnej spektrometrie v predklinickom výskume liečiv na neurodegeneratívne ochorenia.

Andrej Kováč, Dominika Olešová, Juraj Piešťanský, Petra Majerová

Neuroimunologický ústav SAV, Bratislava, Slovenská republika

Abstrakt
Kvapalinová chromatografia spojená s tandemovou hmotnostnou spektrometriou (LC/MS) je jednou z kľúčových techník v predklinickom výskume liečiv na neurodegeneratívne ochorenia. Vďaka vysokej citlivosti, špecificite a schopnosti simultánnej analýzy viacerých analytov umožňuje presnú identifikáciu a kvantifikáciu biomolekúl, vrátane proteínov, metabolitov a lipidov, v komplexných biologických systémoch. V animálnych modeloch ochorení, ako sú Alzheimerova a iné tauopátie, LC/MS prístupy prispievajú k charakterizácii patologických procesov – agregácia proteínov, oxidačný stres alebo zmeny metabolómu. Okrem toho sa LC/MS využíva pri farmakokinetických a farmakodynamických štúdiách, hodnoteniach väzby potenciálnych liečiv na cieľ a pri identifikácii nových biomarkerov. Pokročilé techniky, ako zobrazovacia MS, poskytujú priestorové a časové informácie o distribúcii skúmaných molekúl a biochemických zmenách v tkanivách. Celkovo MS významne prispieva k pochopeniu mechanizmov ochorení a urýchľuje vývoj účinných terapeutických stratégií pre neurodegeneratívne poruchy.

Poďakovanie: APVV-22-0313, EU NextGenerationEU through the Recovery and Resilience Plan for Slovakia under the project No. 09I03-03-V03- 00086

Metabolomický pohled na neurodegeneraci: Cílená analýza neuroaktivních látek pomocí UHPLC–MS/MS

Michal Kaleta[1,2], Jana Oklešťková[1], Ivan Petřík[1], Eva Hényková[1], Miroslav Kvasnica[1], Kateřina Menšíková[2], David Friedecký[3], Aleš Kvasnička[3], Kateřina Klíčová[2], Dorota Šebelová[2], Miroslav Strnad[1], Petr Kaňovský[2], Ondřej Novák[1]

[1] Laboratoř růstových regulátorů, Univerzita Palackého v Olomouci & Ústav experimentální botaniky Akademie věd ČR, Olomouc, Česká republika
[2] Neurologická klinika, Fakultní nemocnice Olomouc & Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc, Česká republika
[3] Laboratoř dědičných metabolických poruch, Fakultní nemocnice Olomouc & Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc, Česká republika

Abstrakt
Současné diagnostické možnosti neurodegenerativních onemocnění jsou omezené a převážně založené na klinických projevech, což zdůrazňuje potřebu spolehlivých biomarkerů pro časnou diagnostiku, diferenciální diagnostiku i sledování progrese onemocnění. Metabolomika představuje slibnou strategii, neboť neurodegenerativní procesy narušují metabolické dráhy a vedou ke změnám v celkovém metabolickém profilu.

Tato práce využívá cílený metabolomický přístup založený na UHPLC–MS/MS zaměřený na dvě chemicky odlišné, avšak zajímavé skupiny bioaktivních látek – tryptofanové metabolity a oxysteroly. Pomocí již zavedené metody byly stanovovány hladiny 18 metabolitů tryptofanu v krevním séru a mozkomíšním moku u zdravých kontrol a pacientů s vybranými neurodegenerativními onemocněními, což umožnilo sledovat změny ve třech hlavních větvích tryptofanového metabolismu a posoudit jejich biomarkerový potenciál. Na tento koncept navazuje vývoj nové UHPLC–MS/MS analytické metody umožňující simultánní kvantifikaci vybraných oxysterolů v lidském séru. Oxysteroly, jako významné regulátory lipidového metabolismu, buněčné signalizace a neurozánětlivých procesů, představují další perspektivní třídu markerů, která může doplnit informace získané ze změn tryptofanového metabolismu. Komplementární využití těchto dvou analytických přístupů spolu s integrací jejich výstupů by mohlo umožnit komplexnější charakterizaci metabolických dysregulací spojených s neurodegenerací a vytvořit základ pro identifikaci nových biomarkerů i hlubší porozumění patogenezi těchto onemocnění.

Tato práce vznikla za podpory projektu „Interdisciplinární přístupy pro vývoj a aplikace nových materiálů v medicínské praxi – Nové omické technologie“, reg.č.: CZ.02. 01. 01/00/23_021/0009224 spolufinancovaného z EU.

Synovial Fluid Lipidomics for the Detection of Infectious Inflammation in Arthritis

Radana Brumarová[1], Martina Kadláčková[1], Aleš Kvasnička[1,2], Hana Janečková[1], Eva Hlídková[1], Vojtěch Bekárek[1], Markéta Trajerová[3], Eva Kriegová[3], David Friedecký[1] and Jiří Gallo[4]

[1] Laboratory for Inherited Metabolic Disorders, Department of Medical Genetics, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacký University, Olomouc, Czech Republic
[2] Department of Medical Biochemistry, Oslo University Hospital, Oslo, Norway
[3] Institute of Immunology, University Hospital Olomouc, Olomouc, Czech Republic
[4] Department of Orthopaedics, University Hospital Olomouc, Olomouc, Czech Republic

Abstract
Accurate differentiation between infectious and non-infectious arthritis remains a major diagnostic challenge, as routinely used microbiological and inflammatory markers do not consistently achieve sufficient sensitivity and specificity. This study evaluates whether lipidomic profiling of synovial fluid can provide reliable biomarkers for the detection of infectious inflammation.

Targeted lipidomics using LC–MS/MS was performed on 250 synovial fluid samples obtained from patients with osteoarthritis, native joint infections, aseptic total joint revisions, and periprosthetic joint infections. The study was conducted in two independent phases, including a discovery cohort and a validation phase with blinded samples. In total, 378 lipid species across 20 classes were quantified and analyzed using multivariate and univariate statistical analyses and LASSO-based modeling.

Infectious arthritis was characterized by a distinct lipidomic signature, including depletion of lysophospholipids and enrichment of ether-linked phospholipids and unsaturated triacylglycerols. A supervised classification model achieved high diagnostic accuracy, with 93.1% for infection and 99.0% for osteoarthritis in the discovery cohort, and 100% and 97.6%, respectively, in the validation cohort. A composite score based on nine selected lipids demonstrated strong diagnostic performance, with sensitivity up to 1.00 and specificity up to 0.98.

These findings indicate that synovial fluid lipidomics captures a robust host-response signature associated with infection and may serve as a clinically useful tool for rapid differentiation of infectious and non-infectious arthritis, particularly in diagnostically uncertain cases. This signature likely reflects infection-driven phospholipid remodeling associated with oxidative stress, activation of phospholipase-mediated pathways, and adaptive enrichment of ether-linked lipids.

The work was supported by the Ministry of Health of the Czech Republic AZV NU20-08-00367, AZV NU21-06-00370, MH CZ - DRO FNOl, 00098892 and European Regional Development Fund-Project "Interdisciplinary Approaches for the Development and Application of New Materials in Medical Practice - New Omic Technologies" (No. CZ.02.01.01/00/23_021/0009224).

High-throughput automation and rapid LC-MS for enhanced metabolomics and lipidomics workflows

Tomas Cajka[1], Jiri Hricko[1], Lucie Rudl Kulhava[1], Veronika Hola[1], Michaela Paucova[1], Michaela Novakova[1], Ondrej Kuda[1]

[1] Institute of Physiology of the Czech Academy of Sciences, Vídeňská 1083, 142 00 Prague 4, Czech Republic

Abstract
Untargeted metabolomics and lipidomics of biofluids are powerful approaches for biomarker discovery and systems-level insights into physiology and disease. However, large-scale studies are often limited by labor-intensive sample preparation and long analysis times [1]. To address this, we developed an automated, high-throughput workflow combining streamlined sample preparation with rapid LC-MS to efficiently and reproducibly profile plasma/serum metabolomes and lipidomes.

The workflow was optimized on a Bravo Automated Liquid Handling Platform (Agilent) and includes automated addition of internal standards to plasma/serum samples in a 96-well format, followed by mixing, protein precipitation with organic solvent, centrifugation, and aliquoting for LC-MS analysis. Extracts are either directly injected or evaporated and reconstituted, depending on platform requirements.

To further increase throughput, we established fast LC-MS methods for polar metabolites (HILIC-ESI(+), RPLC-ESI(–)) and complex lipids (RPLC-ESI(+/–)), all with injection-to-injection times under 5 minutes and MS/MS acquisition for metabolite annotation [2].

This integrated workflow enables rapid sample preparation (<1 hour per 96-well plate) and analysis (<8 hours per plate per platform). In validation using human serum and MS-DIAL for data processing, over 500 metabolites, lipids, and exposome compounds were consistently detected with <20% RSD across 96 replicates, demonstrating high reproducibility.

Overall, this scalable platform substantially reduces time and labor for large-scale plasma/serum metabolomics, making it well-suited for clinical and epidemiological applications.

The work was supported by grants LUAUS24169, funded by the Ministry of Education, Youth and Sport of the Czech Republic, and LX22NPO5104, funded by the European Union–Next Generation EU.

Reference
1. Rakusanova, T. Cajka: Tips and tricks for LC–MS-based metabolomics and lipidomics analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **180**, 117940 (2024).

2. Rudl Kulhava, L. et al., Circadian Ontogenetic Metabolomics Atlas: An interactive resource with insights from rat plasma, tissues, and feces. *Cellular and Molecular Life Sciences* **82**, 264 (2025).

SEKCE IV

Steroidy pod kontrolou: komplexní analytická metoda pro moderní endokrinologii

Marcela Kotasová[1], Jan Ševčík[1], Ondřej Lacina[2], Drahomíra Springer[1], Tomáš Brutvan[3], Jana Ježková[3], Tomáš Zima[1]

[1] Ústav lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky Všeobecné fakultní nemocnice v Praze a 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy, U Nemocnice 499/2, 128 08 Praha 2
[2] Altium International s.r.o., Na Jetelce 69/2, 190 00 Praha 9
[3] III. interní klinika (Klinika endokrinologie a metabolismu) Všeobecné fakultní nemocnice v Praze a 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy

Abstract
Přesné stanovení steroidních hormonů je klíčové pro správnou interpretaci různých endokrinologických onemocnění, sledování účinnosti jejich léčby či hodnocení dynamických testů, jako je dexametazonový supresní test. Rutinní imunochemické metody však trpí křížovými reakcemi, nižší specificitou a senzitivitou, což může vést k nesprávné interpretaci. Metody LC-MS/MS tyto limity překonávají díky vyšší selektivitě, citlivosti a možnosti multiplexního stanovení.

Vyvinutá 2D-LC-MS/MS metoda umožňuje komplexní analýzu 15 endogenních steroidů a dexametazonu (DXM). Využívá jednoduchou přípravu vzorku založenou na principu QuEChERS a dvoudimenzionální chromatografii s kombinací HILIC a RP kolon, která zajišťuje účinné odstranění interferencí, spolehlivou separaci izomerů s následnou MS detekcí. Celková příprava jednoho vzorku trvá přibližně 10 minut, samotná analýza 18 minut. Pro následnou interpretaci bazálních hodnot steroidních hormonů jsme stanovili referenční intervaly u rozsáhlého souboru zdravých dárců.

Metoda v klinické praxi umožňuje multiplexní stanovení celého panelu steroidů a výrazně zpřesňuje interpretaci dexametazonového supresního testu díky simultánnímu stanovení kortizolu i DXM, což snižuje riziko falešně pozitivních výsledků. Současně představuje cenný nástroj při monitoraci léčby, zejména u pacientů s hyperkortizolismem užívající blokátory steroidogeneze, protože eliminuje falešně zvýšené koncentrace kortizolu způsobené zkříženou reaktivitou v imunochemických metodách a umožňuje přesnější nastavení terapie i prevenci hypokortikálního stavu. Dále dokáže odlišit terapeuticky používané syntetické glukokortikoidy, které významně interferují s imunochemickými stanoveními kortizolu, a tím umožňuje přesnější monitoraci stavu i u pacientů léčených těmito léčivy.

Tato versatilní metoda přináší moderní endokrinologii vyšší spolehlivost, rychlost a možnost multiplexní analýzy, a tím umožňuje přesnější interpretaci dynamických stavů steroidogeneze, reakce na léčbu i výsledků dexametazonového supresního testu.

Tato práce vznikla za podpory grantu MZ CR RVO-VFN 64165 a SVV 260373.

Hmotnostní spektrometrie v rutinní i výzkumné analýze steroidních hormonů a endokrinních disruptorů

Lucie Kolátorová[1], Ludmila Máčová[1], Tereza Škodová[1], Jana Vítků[1]

[1] Oddělení steroidů a proteofaktorů, Endokrinologický ústav, Národní 8, 116 94 Praha 1

Abstrakt
Současná endokrinologická praxe klade tlak na stálé zlepšování laboratorní diagnostické praxe především s důrazem na přesnost, správnost a rychlost laboratorních výsledků. Hmotnostní spektrometrie spojená s kapalinovou chromatografií (LC-MS) se tak díky těmto vlastnostem dostává do popředí také v diagnostice mnohých endokrinopatií. Na našem pracovišti rutinně stanovujeme hladiny testosteronu, androstendionu, 11-deoxykortisolu, 11-deoxykortikosteronu, 21-deoxykortisolu, 17-hydroxyprogestero-

nu a dehydroepiandrosteron-sulfátu pomocí analytické komerční soupravy. Dále se systematicky věnujeme mnoha patologickým stavům, včetně nádorových a neurodegenerativních onemocnění, v jejichž diagnostice hrají zásadní roli také metabolity méně běžných steroidních hormonů. Pro spolehlivou kvantifikaci těchto látek jsme vyvinuli a validovali LC-MS/MS metodiky umožňující stanovení 27 nekonjugovaných steroidů (3 estrogenů, 15 androgenů, a 12 C21-steroidů), 17 steroidů konjugovaných a metabolitů vitamínu D v plasmě, tkáních i mozkomíšním moku. Dále se v rámci výzkumu zabýváme také antropogenními látkami uvolněnými do životního prostředí, které mohou svou interakcí se steroidními receptory narušovat endokrinní systém – endokrinní disruptory. Ze zmíněných biologických materiálů stanovujeme až 16 endokrinních disruptorů (7 bisphenolů, 5 parabenů, 2 benzophenony, a 2 fytoestrogeny) v nekonjugované i konjugované formě.

Podpořeno AZV ČR NW25J-04-00127, NU23-04-00551, NW26J-01-00095 a MZ ČR – RVO (Endokrinologický ústav – EÚ, 00023761).

Vývoj metody pro stanovení vitamínu D a jeho metabolitů v pacientských vzorcích séra pomocí kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí.

Kateřina Krátká[1,2,3], Romana Uřinovská[1,3,4], Ivana Olivková[1,2,3], Pavel Šištík[1,5], Marek Bužga[1,3,6], Michaela Montalbano[7]

[1] Ústav laboratorní medicíny, Lékařská fakulta, Ostravská univerzita
[2] Ústav laboratorní medicíny, Fakultní nemocnice Ostrava
[3] LAB4LIFE Ostrava FN OU, Lékařská fakulta, Ostravská univerzita
[4] Oddělení klinické farmakologie, Ústav laboratorní medicíny, Fakultní nemocnice Ostrava
[5] Ústav soudního lékařství, Fakultní nemocnice Ostrava
[6] Ústav fyziologie a patofyziologie, Lékařská fakulta, Ostravská univerzita
[7] EPS biotechnology, s.r.o., Výzkumně-vývojové centrum, Kunovice

Abstrakt
Inovativní trendy ve zvyšování biodostupnosti vitaminu D, využívající technologie jako kvasinkové matrice, mikronizaci či řízené uvolňování, kladou zvýšené nároky na citlivost a selektivitu metod pro sledování jeho hladin v lidském séru. Cílem této práce bylo vyvinout a validovat rychlou LC-MS/MS metodu pro současné stanovení vitaminu D_3, 25-hydroxyvitaminu D_2 [25(OH)D_2] a 25-hydroxyvitaminu D_3 [25(OH)D_3] v lidském séru.

Příprava vzorků byla založena na proteinové precipitaci 200 µL séra směsí ACN:MeOH obsahující 5,6% $ZnSO_4$, následované extrakcí kapalina–kapalina hexanem (PPT-LLE). Chromatografická separace probíhala na koloně Kinetex PFP (1,7 µm, 50 × 2,1 mm) za gradientové eluce mobilní fáze v systému voda/methanol při průtoku 0,45 mL/min. Teplota kolony byla nastavena na 40 °C, objem nástřiku činil 10 µL a celková doba chromatografické analýzy byla 7,5 min. Detekce využívala hmotnostní spektrometr typu trojitého kvadrupólu v režimu ESI+ MRM. Pro analyty byly použity přechody m/z 385,2→259,2 pro D_3, 413,4→395,4 pro 25(OH)D_2 a 401,5→365,5 pro 25(OH)D_3. Pro kvantifikaci byly použity izotopově značené interní standardy: D_3-d_7 a 25(OH)D_2-d_6. Metoda byla validována v kalibračním rozsahu 0,5–100 ng/mL a dosáhla LLOQ 0,5 ng/mL. Validace potvrdila vysokou linearitu (r > 0,999), opakovatelnost v rozmezí 2,8–10,0 % CV, mezilehlou preciznost 1,3–7,3 % CV a výtěžnost 97,7–116,0 % napříč sledovanými analyty a validačními hladinami.

Nově vyvinutá metoda kombinuje jednoduchou a rychlou přípravu vzorku, krátkou dobu chromatografické analýzy a dostatečnou citlivost i selektivitu pro rutinní stanovení vitaminu D a jeho hlavních metabolitů v séru. Metoda byla aktuálně aplikována na soubor 300 pacientských vzorků získaných ve třech odběrových bodech za účelem sledování změn sérových koncentrací v souvislosti se suplementací vitaminu D.

Projekt „Strategie ke zvýšení biodostupnosti vitaminu D“, registrační číslo: CZ.01.01.01/01/22_002/0000865 je spolufinancován Evropskou unií.

Unexpected linezolid underexposure revealed by LC-MS based therapeutic drug monitoring

Zuzana Javorová Rihová[1,2], Ivana Jankechová[1], Aneta Čináková[1], Lucia Krčmárová[1], Natália Stollárová[1,3], Anna Šándorová[1]

[1] Department of Clinical Pharmacology, Faculty Hospital Trnava, A. Žarnova 11, 917 02 Trnava, Slovakia
[2] Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Slovak Medical University Bratislava, Limbová 12, 833 03 Bratislava, Slovakia
[3] Department of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Pharmacy, Comenius University Bratislava, Odbojárov 10, 832 32 Bratislava, Slovakia

Background
Antibiotic exposure in hospitalized patients is highly variable, and standard dosing regimens may not ensure optimal therapeutic concentrations. Therapeutic drug monitoring (TDM) can support individualized dosing, particularly in patients with altered pharmacokinetics. Liquid chromatography–mass spectrometry (LC-MS) enables accurate and sensitive quantification of multiple antibiotics and represents a reliable tool for clinical TDM. We present a case illustrating the clinical value of LC-MS-based monitoring of linezolid and meropenem.

Case description
A 66-year-old critically ill male ICU patient with impaired renal function was treated with linezolid and meropenem for a suspected severe bacterial infection. Linezolid was administered at the standard dose of 600 mg every 12 hours, while meropenem dosing was individualized based on renal function and prior clinical experience with TDM. Given the high risk of pharmacokinetic variability with the potential risk of antibiotic accumulation or insufficient exposure, TDM was performed.

Plasma concentrations were measured using a validated LC-MS method. The lower limit of quantification (LLOQ) for linezolid was 0.245 mg/L. Despite standard dosing and impaired renal function, which would typically predispose to drug accumulation, the measured linezolid trough concentration was below the LLOQ, indicating markedly subtherapeutic exposure (target range 2–8 mg/L). Meropenem concentrations were also evaluated, and adequate exposure was confirmed.

Based on the TDM results, linezolid dosing was adjusted, and follow-up measurements confirmed attainment of target concentrations.

Discussion
This case highlights the considerable pharmacokinetic variability observed in critically ill patients and demonstrates that dosing based on renal function alone may not reliably predict antibiotic exposure. LC-MS-based TDM enabled identification of unexpected subtherapeutic concentrations and directly supported individualized dose optimization in a clinically relevant setting.

Conclusion
LC-MS represents a powerful analytical tool for therapeutic drug monitoring of antibiotics and provides clinically relevant information for optimizing antimicrobial therapy in complex patients.

FIA-MS/MS screening pro stanovení hypoglycinu A, MCPA-karnitinu a panelu acylkarnitinů ze suché krevní skvrny bez derivatizace

Martina Kadláčková[1,2], Eliška Ivanovová[1,2], Richard Masař[1,2], Petr Jahn[3], Eva Šamonilová[3], David Friedecký[1,2], Radana Brumarová[1,2]

[1] Laboratoř dědičných metabolických poruch, Lékařská fakulta Univerzity Palackého, Hněvotínská 3, 779 00 Olomouc, Česká republika
[2] Laboratoř dědičných metabolických poruch, Oddělení klinické biochemie, Fakultní nemocnice Olomouc, Zdravotníků 248/7, 779 00 Olomouc, Česká republika
[3] Klinika chorob koní, Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární univerzita Brno, Palackého třída 1946/1, 612 00, Brno-Královo Pole, Česká republika

Abstrakt
Průtoková injekční analýza ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií (FIA-MS/MS) představuje rychlou alternativu k LC-MS/MS metodám se separačním krokem a umožňuje výrazné zkrácení doby analýzy. V této práci byla vyvinuta rychlá FIA-MS/MS metoda bez nutnosti derivatizace pro simultánní stanovení hypoglycinu A (HGA), methylencyklopropylacetyl-karnitinu (MCPA-karnitinu) a panelu acylkarnitinů s krátkým a středně dlouhým řetězcem ze suché krevní skvrny (DBS). Hypoglycin A (HGA) je po požití metabolizován na MCPA-karnitin, který inhibuje β-oxidaci mastných kyselin. Metoda umožňuje

simultánní stanovení těchto dvou biomarkerů intoxikace a acylkarnitinového profilu v rámci jedné MRM akvizice bez chromatografické separace. Analytický postup je založen na jednoduché extrakci a přímé injekci, přičemž celková doba analýzy je 1 minuta na vzorek.

Identifikace analytů byla ověřena na základě iontových poměrů („ion ratios"), které ve všech případech splňovaly stanovené akceptační limity. Bylo rovněž dosaženo linearity s $R^2 > 0{,}994$ a limitů kvantifikace v rozmezí 0,01–0,1 µmol/l. Stabilita analytů v DBS byla potvrzena při laboratorní teplotě po dobu 7 dní a při -20 °C po dobu 30 dní, včetně stability při opakovaných cyklech zmrazení a rozmrazení a v autosampleru. Matricové efekty byly reprodukovatelné a kompenzovatelné pomocí interního standardu a matricově odpovídající kalibrace.

Diagnostická specificita metody byla potvrzena analýzou DBS vzorků pacientů intoxikovaných HGA a zdravých kontrol, přičemž HGA a MCPA-karnitin byly detekovány výhradně u postižených jedinců. Současně byl u této skupiny pozorován zvýšený profil sledovaných acylkarnitinů.

Použití DBS jako vstupní matrice umožňuje jednoduchý odběr malého objemu vzorku (~50 µl krve) a zjednodušuje logistiku transportu a skladování. Navržený přístup představuje rychlou a analyticky efektivní platformu umožňující simultánní analýzu širšího spektra analytů z DBS v rámci jednoho měření.

Práce byla podpořena Ministerstvem zemědělství ČR (NAZV, Grant QL24010403), ITI OP JAK (CZ.02. 01. 01/00/23_021/0009224) a Ministerstvem zdravotnictví ČR – DRO (FNOl, 00098892).

Fully-Automated and Derivatization-free GC-MS Analysis of SCFA in Human Biospecimen Implementing Full Scan-SIM Data Acquisition

Hana Seličová[a], Elliott J. Price[a,b], Kateřina Coufalíková[a,b]

[a] RECETOX, Faculty of Science, Masaryk University, Kamenice 5, Brno 625 00, Czechia
[b] EIRENE-CZ, Brno, Czech Republic

Abstract

Short-chain fatty acids (SCFA) are end products of gut microbiota fermentation of dietary fiber and indigestible protein and play key roles in epithelial barrier integrity and cholesterol metabolism. Altered SCFA levels are associated with inflammatory bowel disease, obesity, diabetes, and colorectal cancer[1-3], underscoring the need for robust, scalable assays for routine quantification in human biospecimens. Gas chromatography–mass spectrometry (GC-MS) is widely used for SCFA analysis due to high sensitivity; however, most methods rely on chemical derivatization to improve volatility and stability. Derivatization increases analysis time and involves toxic reagents, while recently proposed direct approaches often retain complex and time-consuming sample preparation and high solvent consumption, and frequently overlook total sample-to-result time.

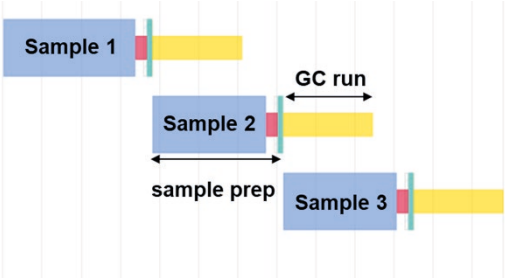


Figure 1 – Overlapping of the automated sample preparation and data acquisition

To address these limitations, we developed an accurate, efficient, and fully automated derivatization-free method for SCFA determination using single-quadrupole GC-MS. The workflow integrates sample acidification with MTBE extraction in an automated sequence that overlaps preparation with instrumental acquisition (Figure 1). This configuration minimizes time-dependent signal loss and preanalytical vari-

ability while reducing sample-to-sample cycle time to 12 min in total – also including the instrumental bake-out, that is usually not considered as part of the method length and thus the authors exclude this factor and therefore distort the resulting analysis time. The method enables absolute quantification of nine SCFA (C2–C7, including branched isoforms) across human biospecimens using widely accessible instrumentation. An additional innovation is the implementation of combined full-scan and selected-ion monitoring acquisition (full-scan–SIM).

The standardized, automation-ready protocol minimizes preanalytical error and supports reproducible multi-site deployment, providing a practical platform for high-throughput clinical and metabolomics studies of gut-derived SCFA.

The work was supported from Program JAC - project SALVAGE (CZ.02.01.01/00/22_008/0004644) financed by the Ministry of Education, Youth and Sports – Co-funded by the European Union.

1. Zhang S, Wang H, Zhu MJ. A sensitive GC/MS detection method for analyzing microbial metabolites short chain fatty acids in fecal and serum samples. *Talanta*. 2019;196(October 2018):249-254. doi:10.1016/j.talanta.2018.12.049

2. Zhao G, Nyman M, Jönsson JÅ. Rapid determination of short-chain fatty acids in colonic contents and faeces of humans and rats by acidified water-extraction and direct-injection gas chromatography. *Biomed Chromatogr*. 2006;20(8):674-682. doi:10.1002/bmc.580

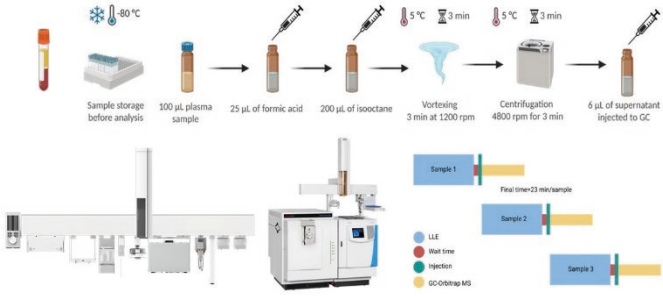
3. Bain JT, Taal MW, Selby NM, Reynolds JC, Heaney LM. Simple, high-throughput measurement of gut-derived short-chain fatty acids in clinically relevant biofluids using gas chromatography-mass spectrometry. *J Mass Spectrom Adv Clin Lab*. 2022;25(February):36-43. doi:10.1016/j.jmsacl.2022.07.002

Population-scale human chemical exposomics by automated liquid-liquid extraction coupled to gas chromatography – Orbitrap mass spectrometry

Kateřina Coufalíková[1,2], Romana Ševčíková[1,2], Moira Zanaboni[3], Manuela Bergna[3], Renzo Picenoni[4], Akrem Jbebli[1], Elliott James Price[1,2]

[1] RECETOX, Faculty of Science, Masaryk University, Brno, Czech Republic
[2] Czech node of the European Infrastructure for Human Exposome Research (EIRENE-CZ), Brno, Czech Republic
[3] Thermo Fisher Scientific, Milan, Italy
[4] CTC Analytics AG, Zwingen, Switzerland

Abstract



Profiling chemical exposure in large-scale human population studies is analytically challenging in terms of robustness and reproducibility, as well as laboriousness of the entire procedure. Few academic settings conduct routine analysis of studies comprising > 1000 samples. Manual sample preparation is time consuming, requires high solvent consumption, and contributes to sample-to-sample variation. Sequential on-line sample preparation offers a solution, but adoption is currently lacking in routine application.

Within the framework of ERIENE-CZ, we have developed a fully automated sample preparation workflow coupled to gas chromatography - Orbitrap mass spectrometry (GC-Orbitrap MS) for large-scale screening of chemical exposure agents in blood serum and plasma. A fully automated liquid-liquid extraction of

blood (100 µL) has been developed using a cartesian autosampler coupled to GC-Orbitrap MS. In brief, analytes are separated on a Rxi-5Sil MS column with ~14 min temperature gradient (80 °C to 330 °C), electron ionisation at 70eV, and mass spectra recorded from 70-700 m/z at 60K resolving power. Quality assurance and quality control (QA/QC) includes the analysis of certified mixtures of alkanes and polychlorinated biphenyls, alongside the standard reference materials (SRM) NIST 1950, NIST 1957, NIST 1958 in each analytical batch.

We shall present i) a critical appraisal of the implemented method, including the interventional maintenance schedule and systematically recorded errors, such as vial drop rates; ii) updates on the status of multi-country, multi-site method standardisation and harmonisation; and iii) report on application to multiple cohort studies, each comprising > 1000 samples.

The research has been conducted within the European Infrastructure for Human Exposome Research (EIRENE RI), in cooperation with the Network of Exposomics in the US (NEXUS) and within the collaborative framework of the International Human Exposome Network (IHEN; HEU programme grant agreement 101137317). The authors acknowledge the EU's H2020 grant agreements 857560 (CETOCOEN Excellence), 874583 (ATHLETE) and 874627 (EXPANSE); the HEU grant agreements 101079789 (EIRENE PPP) and 101096888 (DISCERN); and the RECETOX Research Infrastructure (LM2023069) financed by the MEYS (CZ.02.1.01/0.0/0.0/17_043/0009632). The views expressed are those of the author(s) and do not necessarily reflect those of the EU or REA.

Reference

1. Xin Hu et al. A scalable workflow to characterize the human exposome. Nature Communications. 12, 5575 (2021)

SEKCE V

Vitamíny rozpustné v tucích a jejich předávkování

Jakub Minář, Peter Loučka, Martin Radina, SPADIA LAB Ostrava

Abstrakt

Vitaminy rozpustné v tucích (A, E, D, K) hrají klíčovou roli v řadě fyziologických procesů, od podpory zraku a imunitního systému až po koagulační kaskádu, udržování kalciové homeostázy a ochranu buněk před oxidativním stresem. Vzhledem k rostoucí popularitě doplňků stravy a riziku toxicity při jejich nadměrném příjmu nabývá na významu přesné monitorování jejich hladin v krevním séru.

Metodika: Tato práce se zaměřuje na využití vysokoúčinné kapalinové chromatografie (**HPLC**) jako standardu v klinické diagnostice těchto mikronutrientů. Hlavní výhodou HPLC je vysoká selektivita a citlivost, která umožňuje současnou separaci a kvantifikaci retinolu (vit. A), alfa-tokoferolu (vit. E) a rozlišení forem vitaminu D (**D2 – ergokalciferolu a D3 – cholekalciferolu**). Proces zahrnuje kritické kroky přípravy vzorku, zejména deproteinizaci a následnou separací na reverzní fázi a detekcí UV/Vis.

Klinické aspekty a rizika: Zatímco deficit těchto vitaminů je dobře popsán, prezentace klade důraz na odvrácenou stranu suplementace – **hypervitaminózu**.

- **Vitamin A:** Riziko hepatotoxicity a teratogenity.
- **Vitamin D:** Nebezpečí hyperkalcémie, která může vést k poškození ledvin a kalcifikaci měkkých tkání.
- **Vitamin E:** Možné ovlivnění srážlivosti krve a interakce s antikoagulační léčbou.
- **Vitamin K:** Interakce s léky pro ředění krve.

Závěr: Precizní analýza pomocí HPLC je nezbytným nástrojem pro prevenci toxicity a pro nastavení personalizované suplementace. Správná interpretace výsledků v kontextu klinických rizik je důležité pro bezpečnost pacienta.

Klíčová slova:

HPLC, vitamin A, vitamin E, vitamin D2/D3, vitamin K, sérum, hypervitaminóza, toxicita.

Metabolomic profile of the placenta in spontaneous preterm delivery

Eva Cifkova[1], Miroslav Lisa[1], Rona Karahoda[2], Jaroslav Stranik[3], Cilia Abad[2], Tetiana Synova[2], Antonin Libra[4], Marian Kacerovsky[3,5], Frantisek Staud[2]

[1] Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Hradec Kralove, Rokitanskeho 62, 50003, Hradec Kralove, Czech Republic
[2] Department of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Pharmacy in Hradec Kralove, Charles University, Akademika Heyrovskeho 1203/8, 50005, Hradec Kralove, Czech Republic
[3] Department of Obstetrics and Gynecology, University Hospital Hradec Kralove, Sokolska 581, 50005, Hradec Kralove, Czech Republic
[4] Department of Clinical Biochemistry and Diagnostics, University Hospital Hradec Králové, 50005 Hradec Králové, Czech Republic
[5] Department of Obstetrics and Gynaecology, University Hospital Olomouc, Zdravotníků 248/7, 779 00 Olomouc, Czech Republic

Abstract
Spontaneous preterm delivery represents one of the most complex challenges in obstetrics and remains a leading cause of perinatal morbidity and mortality. To better understand the placental response to these triggers, we performed a comprehensive metabolomic investigation of placental tissue from a well-defined cohort of 102 pregnancies spanning extremely preterm to full-term deliveries (1). Utilizing an ultra-high performance liquid chromatography-mass spectrometry platform (2), we described metabolomic profiles, which were then rigorously assessed using multivariate statistical analyses. These methods successfully distinguished preterm from term groups and, together with correlation analyses and linear regression, allowed us to evaluate the profound influence of gestational age on the placental metabolome. Through this statistical framework, we identified significant alterations in 34 polar metabolites involved in intracellular energy metabolism and biochemical activity, including amino acids, purine metabolites, and small organic acids. These findings were further integrated with an exploration of the endocannabinoid system as a critical regulator of pregnancy. Integrated gene-metabolite analyses indicate that molecular variation within the endocannabinoid system primarily reflects developmental regulation, suggesting that preterm birth represents an earlier phase of these physiological processes rather than a distinct pathological state.

This work was supported by the Czech Science Foundation project (No. 22-13967S) and the Czech Health Research Council (No. NW24-07-00129).

Reference
1. Cifkova, E.; Karahoda, R.; Stranik, J.; Abad, C.; Kacerovsky, M.; Lisa, M.; Staud, F. Metabolomic Analysis of the Human Placenta Reveals Perturbations in Amino Acids, Purine Metabolites, and Small Organic Acids in Spontaneous Preterm Birth. *EXCLI J.* **2024**, *23*, 264–282.
2. Cifkova, E.; Neuerova, Z.; Lisa, M. Reversed-Phase Liquid Chromatography/Mass Spectrometry Approach for (Un)Targeted Analysis of Polar to Mid-Polar Metabolites. *Talanta* **2025**, *291*, 127853.

Untargeted Serum Proteomics for Clinical Medicine: How Close Are We?

René Lenobel[1] *, Jaroslava Friedecká[1], David Friedecký [2], Jana Petřková [3,4], Ondřej Novák [1]

[1] Laboratory of Growth Regulators, Institute of Experimental Botany of the Czech Academy of Sciences, and Faculty of Science, Palacký University, Czech Republic.
[2] Laboratory of Inherited Metabolic Disorders, Department of Clinical Chemistry, Palacký University and University Hospital Olomouc, Olomouc, Czech Republic.
[3] Department of Internal Medicine I - Cardiology, University Hospital Olomouc, Olomouc, Czech Republic.
[4] Department of Pathological Physiology, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University, Olomouc, Czech Republic.
* *rene.lenobel@upol.cz*

Abstract
Mass spectrometry has become an indispensable tool in laboratory medicine, yet the routine clinical use of untargeted proteomics remains challenging. In this contribution, we address a key translational

question: can untargeted serum proteomics be performed in a way that is robust, reproducible, and sufficiently practical for clinical applications? We compared native serum with two simple pretreatment strategies based on perchloric acid and 70% methanol and evaluated their performance using DDA and DIA acquisition, including short LC gradients suitable for higher-throughput analysis.

The workflows were assessed with focus on qualitative and quantitative proteome readout and on intra- and inter-run reproducibility. This design allowed us to examine not only analytical depth, but also the practical trade-offs between workflow simplicity, proteome coverage, and robustness. The optimized approach was subsequently applied to serum samples from patients with myocardial infarction and aortic stenosis as a model of clinically relevant group comparison.

Our findings support the use of untargeted serum proteomics as a valuable platform for translational clinical research. In particular, simplified sample preparation and DIA-based acquisition provide a promising route toward more robust serum profiling. Although untargeted proteomics is not yet a routine clinical assay, the presented data show that it is already capable of delivering reproducible molecular information from clinically important serum samples and may serve as a bridge between discovery research and future targeted clinical testing.

Acknowledgements The work was supported from European Regional Development Fund-Project "Interdisciplinary Approaches for the Development and Application of New Materials in Medical Practice – New Omic Technologies" (No. CZ.02.01.01/00/23_021/0009224) co-funded by the European Union and by the Ministry of Health of the Czech Republic, the research grant – DRO (FNOl, 00098892)..

LC/MS in clinical guidelines

Peter Sečník[1]

[1] SK-LAB, s.r.o. – Klinické laboratórium, Júliusa Szabóa 2, 984 01 Lučenec, Slovenská republika.

Abstract
Liquid chromatography with mass spectrometry (LC/MS) is one of the most accurate analytical techniques used in modern clinical biochemistry. In recent years, its importance has significantly increased in the context of clinical guidelines, which define LC-MS not only as a reference method but also as a routine tool of choice for the measurement of several biomarkers.

The lecture focuses on the role of LC/MS in clinical practice, particularly in areas where high specificity and sensitivity are required. Special attention is given to applications of this method in the determination of hormones, vitamin D, therapeutic drug monitoring, and biomarkers of alcohol consumption. The lecture also highlights the advantages of LC-MS compared to traditional methods, especially in terms of selectivity and the minimization of interferences. Practical aspects of the broader implementation of LC-MS in clinical laboratories are also discussed, including the economic and organizational challenges of routine setting.

The aim of the lecture is to provide an overview of why LC-MS is a key tool of modern laboratory medicine and what role it plays in the implementation of clinical guidelines in nephrology, endocrinology, hepatology, and other fields of medicine.

In-house metody vs. komerční LC-MS/MS kity: rozhodování v éře IVDR

Mária Mellová[1], Eva Klapková[1]

[1] Ústav lékařské chemie a klinické biochemie 2. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Fakultní nemocnice Motol a Homolka, V úvalu 84, 150 00 Praha, Česká republika

Abstrakt
Kapalinová chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií (LC-MS/MS) se stala nepostradatelným analytickým nástrojem v rutinních klinických laboratořích. Tradičně byly LC-MS/MS metody vyvíjeny přímo v laboratoři (in-house) a optimalizovány vzhledem k přístrojovému vybavení a požadavkům kliniků. V posledních letech dochází k rychlému rozšiřování komerčně dostupných LC-MS/MS kitů, které nabízejí standardizované pracovní postupy a jednodušší implementaci, avšak mohou být spo-

jeny s vyššími náklady, omezenou flexibilitou a tzv. “black-box” charakterem. Současně zavedení nařízení IVDR významně zvyšuje nároky na in-house metody, zejména v oblasti validace, dokumentace a řízení rizik. Tato situace vede k zásadní praktické otázce: jak se v rutinní praxi rozhodovat mezi in-house metodami a komerčními kity a má za těchto podmínek vývoj in-house LC-MS/MS metod stále své opodstatnění?

V příspěvku je podán přehled současných LC-MS/MS aplikací v klinických laboratořích, včetně terapeutického monitorování léčiv, stanovení steroidních hormonů, vitaminů, biogenních aminů a toxikologického screeningu. Kriticky je zhodnocena dostupnost komerčních kitů pro tyto aplikace, s důrazem na oblasti, kde vhodná komerční řešení chybí a kde je vývoj in-house metod stále nezbytný. Dále jsou diskutovány výhody a nevýhody obou přístupů z praktického hlediska společně s konkrétním příkladem z praxe. Na základě těchto skutečností je navržen praktický rámec pro rozhodování, který zohledňuje faktory jako jsou objem vzorků, analytická komplexita, dostupnost personálních kapacit či regulatorní a finanční zátěž. V závěru jsou diskutovány současné mezery na trhu a potenciál nových služeb zaměřených na vývoj metod na míru. Cílem příspěvku je poskytnout praktický pohled jak se v rutinní praxi rozhodovat mezi dostupnými přístupy k LC-MS/MS metodám v měnícím se regulatorním prostředí.

IVD-R 12/2025 update

David Friedecký

OKB, FN Olomouc

Abstrakt
Nařízení Evropského parlamentu a Rady (EU) 2017/746 (IVDR) zásadně redefinovalo regulační rámec pro diagnostické zdravotnické prostředky in vitro v Evropské unii. V oblasti klinické hmotnostní spektrometrie, která je z velké části založena na laboratorně vyvinutých testech (LDT), vyvolala jeho implementace významné obavy ohledně udržitelnosti rutinní diagnostiky.

V průběhu roku 2025 však došlo k důležitému posunu v interpretaci a aplikaci IVDR, zejména ve vztahu k článku 5(5). Regulační orgány i odborné společnosti reflektovaly omezenou dostupnost CE-IVD metod a specifika vysoce specializovaných analytických přístupů. Výsledkem je pragmatičtější přístup k in-house metodám, včetně větší flexibility při prokazování absence komerčních alternativ a důrazu na proporcionalitu požadavků.

K prosinci 2025 tak dochází spíše k určitému „rozvolnění“ praktické implementace IVDR pro LDT, při zachování klíčových principů bezpečnosti, kvality a dokumentace. Klinické laboratoře nadále musí plnit požadavky na validaci, řízení rizik a systém kvality, avšak s větším důrazem na reálnou klinickou potřebu a dostupnost diagnostiky.

Hmotnostní spektrometrie v tomto kontextu představuje modelový příklad technologie, kde je in-house přístup nezastupitelný. Příspěvek diskutuje aktuální regulační vývoj, praktické dopady na laboratorní praxi a sdílí zkušenosti s implementací IVDR v prostředí klinické hmotnostní spektrometrie.