

**Univerzita Palackého v Olomouci**

**Bakalářská práce**

**Olomouc 2013**

**Markéta Machálková**

**Univerzita Palackého v Olomouci**  
**Přírodovědecká fakulta**  
**Katedra buněčné biologie a genetiky**



**Necílená metabolomika T-lymfoblastických  
leukemických buněk ovlivněných derivátem  
chinolinonu**

**Bakalářská práce**

**Markéta Machálková**

Studijní program: Biologie  
Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie  
Forma studia: Prezenční

**Olomouc 2013**

**Vedoucí práce: Mgr. Lukáš Najdekr**

Prohlašuji, že jsem svoji bakalářskou práci vypracovala samostatně za pomoci vedoucího práce a s použitím citované literatury.

V Olomouci dne

.....

# Souhrn

Studium metabolismu na buněčné úrovni je jednou z mnoha možností, jak sledovat vliv léčiva na nádorové buňky. Takový přístup využívá metabolomika, věda zkoumající malé molekuly - metabolity (aminokyseliny, nukleotidy, atd.). Soubor těchto malých molekul se nazývá metabolom. Cílená metabolomika se soustředí na určitou skupinu vybraných známých látek a sleduje jejich různé koncentrace ve vzorcích (v krevní plazmě, buněčných extraktech, moči) a jejich vzájemný vztah. Oproti tomu necílený metabolomický přístup (použitý v této práci) detekuje všechny látky, které se ve vzorku nachází a snaží se je identifikovat pomocí metabolomických databází (METLIN, The Human Metabolome Database). Pro detekci metabolitů, jako látek s molekulovou hmotností pod 1500 daltonů, byla v této práci využita vysokoúčinná kapalinová chromatografie ve spojení s Orbitrap hmotnostním spektrometrem, což poskytlo potřebné rozlišení a přesnost měření. V praktické části práce byl testován vliv potenciálního kancerostatika - experimentální látky 05-0777 (derivátu chinolinonu) na metabolom CEM buněčné linie odvozené od T-lymfoblastické leukemie. Pro zpracování výsledných dat byl použit program R-project se softwarovými nástavbami XCMS a CAMERA. Vizualizace výsledků byla provedena pomocí analýzy hlavních komponent, diskriminační analýzy a shlukové analýzy. Po vyhodnocení všech naměřených dat bylo zjištěno, že experimentální látka 05-0777 má vliv na buněčný metabolom a ovlivňuje určité skupiny metabolitů.

# Summary

The study of metabolism at the cellular level is one way how to monitor the effects of certain treatment on tumor cells. This is an approach used by metabolomics, science investigating small molecules - metabolites (amino acids, nucleotides, etc.). Set of these small molecules is called metabolome. Targeted metabolomics focuses on a selected group of known compounds and monitors various concentrations in samples (plasma, cell extracts, urine) and relations between them. In contrast, untargeted metabolomic approach (used in this work) detects all substances that can be found in the sample and tries to identify these compounds using metabolomics databases (METLIN, The Human Metabolome Database). In this experiment for detection metabolites, compounds with a molecular weight up to 1500 daltons, ultra high performance liquid chromatography coupled with Orbitrap mass spectrometer was used, providing the necessary resolution and mass accuracy. In the practical part of the thesis, the effect of potential cancerostatic - experimental compound 05-0777 (quinolinone derivate) - on the metabolome of CEM cell line derived from T-lymphoblastic leukemia was tested. For data processing, software R-project was used coupled with additional software packages XCMS and CAMERA. Visualisation of the results was done by principal component analysis, discriminant analysis and cluster analysis. After evaluation of all measured data was found, that experimental compound 05-0777 has influence on cellular metabolome and it is influencing certain groups of metabolites.

## **Poděkování**

Na tomto místě bych ráda poděkovala především vedoucímu práce Mgr. Lukáši Najdekrovi za odborné vedení, cenné rady, pomoc s vyhodnocováním dat a hlavně věnování mi svého času a trpělivosti.

Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Gabriele Rylové z Laboratoře experimentální medicíny za přípravu buněčných linií, RNDr. Davidu Friedeckému, Ph.D., Doc. RNDr. Tomáši Adamovi, Ph.D. a všem spolupracovníkům a studentům Metabolomické laboratoře na Ústavu molekulární a translační medicíny v Olomouci za ochotu mi vždy pomoci.

Tato práce vznikla za podpory projektu, jehož infrastrukturální část (ÚMTM) byla podpořena Operačním programem Výzkum a vývoj pro inovace (projekt CZ.1.05/2.1.00/01.0030).

# Obsah

|  |    |
|--|----|
| 1 ÚVOD .....   | 8  |
| 2 LITERÁRNÍ PŘEHLED .....                              | 9  |
| 2.1 <i>Metabolomika</i> .....                          | 9  |
| 2.2 <i>Hmotnostní spektrometrie</i> .....              | 10 |
| 2.2.1 Historie hmotnostní spektrometrie .....          | 10 |
| 2.2.2 Části hmotnostního spektrometru .....            | 10 |
| 2.2.2.1 Iontové zdroje a způsoby ionizace .....        | 11 |
| 2.2.2.2 Hmotnostní analyzátory .....                   | 14 |
| 2.3 <i>Orbitrap hmotnostní spektrometr</i> .....       | 17 |
| 2.3.1 Úvod a historie vzniku Orbitrapu .....           | 17 |
| 2.3.2 Specifika Orbitrap analyzátoru .....             | 17 |
| 2.3.3 Orbitrap Elite .....                             | 18 |
| 2.3.3.1 Elektrosprejová ionizace .....                 | 19 |
| 2.3.3.2 Transport iontů .....                          | 20 |
| 2.3.3.3 Orbitrap analyzátor a detektor .....           | 20 |
| 2.3.3.4 Parametry přístroje Orbitrap Elite .....       | 21 |
| 2.3.4 Hmotnostní spektrometrie ve spojení s HPLC ..... | 21 |
| 2.4 <i>Experimentální látka 05-0777</i> .....          | 23 |
| 2.5 <i>Šikonin</i> .....                               | 24 |
| 2.5.1 Historie a stanovení struktury šikoninu .....    | 24 |
| 2.5.2 Produkce šikoninu .....                          | 26 |
| 2.5.3 Účinky šikoninu .....                            | 27 |

|   |  |
|---|--|
| 2.5.3.1 Inhibice dimerní formy PKM2 ..... | 28                                     |
| Pyruvátkinasa M .....                     | 28                                     |
| Warburgův efekt .....                     | 29                                     |
| Ovlivnění formy PKM2 .....                | 29                                     |
| 2.5.3.2 Inhibice nekroptosy .....         | 30                                     |
| 2.5.4 Metabolizace šikoninu .....         | 30                                     |
| <b>3 CÍL PRÁCE</b> .....                  | <b>33</b>                              |
| <b>4 MATERIÁL A METODIKA</b> .....        | <b>34</b>                              |
| 4.1 Buněčná kultura .....                 | 34                                     |
| 4.2 Přístrojové vybavení .....            | 34                                     |
| 4.3 Chemikálie .....                      | 34                                     |
| 4.4 Příprava roztoků .....                | 35                                     |
| 4.5 Pracovní postup .....                 | 35                                     |
| 4.6 Nastavení přístrojů .....             | 36                                     |
| 4.7 Statistické vyhodnocování dat .....   | 38                                     |
| 4.8 Identifikace detekovaných látek ..... | 38                                     |
| <b>5 VÝSLEDKY</b> .....                   | <b>39</b>                              |
| 5.1 Identifikace metabolitů .....         | <b>Chyba! Záložka není definována.</b> |
| 5.2 Statistické výstupy experimentu ..... | <b>Chyba! Záložka není definována.</b> |
| <b>6 DISKUSE</b> .....                    | <b>50</b>                              |
| <b>7 ZÁVĚR</b> .....                      | <b>52</b>                              |
| <b>8 LITERATURA</b> .....                 | <b>53</b>                              |
| <b>9 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK</b> .....   | <b>62</b>                              |



# 1 ÚVOD

Metabolomika je nově se rozvíjející věda, která studuje buněčný metabolom. Zabývá se metabolickými ději v buňkách a odráží tak jejich aktuální stav. Metabolické profilování je oblastí s potenciálním praktickým využitím - můžeme detekovat malé molekuly, které jsou charakteristicky přítomné při určitém onemocnění (markery), sledovat vliv léčiva na metabolismus a také zjišťovat účinnost zvolené léčby. Ke studiu rozličných metabolitů je zapotřebí účinných analyzačních a detekčních metod jako je hmotnostní spektrometrie, která je založena na měření poměru hmotnosti a náboje ( $m/z$ ) částic. Jedním z vhodných hmotnostních spektrometrů je například přístroj založený na orbitální pasti - Orbitrap, který byl představen Alexanderem Makarovem v roce 2000 a detekuje analyty na základě frekvence jejich axiálních oscilací. Nejnovější model, hybridní Orbitrap Elite, se vyznačuje potřebným rozlišením, přesností měření a dynamickým rozsahem, a proto je ideální pro metabolomické studie. Jak již bylo zmíněno, studium metabolismu buněk umožňuje monitorovat účinek různých protirakovinných látek. V rámci této bakalářské práce je necíleným metabolomickým přístupem *in vitro* studován vliv experimentální látky 05-0777 na CEM buněčnou linii odvozenou od T-lymfoblastické leukemie. Experimentální látka 05-0777 je derivát chinolinonu, který může potenciálně vykazovat podobné účinky jako přírodní naftochinon šikonin, jenž již prokázal značnou biologickou aktivitu - antibakteriální, protizánětlivou, protinádorovou a další. Cílem této práce je necíleným metabolomickým přístupem zjistit, jak experimentální látka 05-0777, derivát chinolinonu, ovlivňuje metabolismus rakovinných buněk, popřípadě přiblížit, jaký je cíl jeho působení. Tato látka by se pak v budoucnosti mohla stát potenciálním protirakovinným léčivem.

## 2 LITERÁRNÍ PŘEHLED

### 2.1 Metabolomika

Metabolomika je vědní disciplína zabývající se studiem malých molekul metabolismu - metabolitů (Patti et al., 2012). Tato věda se začala rozvíjet počátkem 90. let 20. století (Baker, 2011) a řadí se k nově vzniklým „omickým“ vědám jako jsou genomika, proteomika a transkriptomika. Její hlavní výhodou oproti zmíněným vědám je větší návaznost na fenotyp - odráží aktuální stav buněk, jejich metabolismus a biochemickou aktivitu (Patti et al., 2012).

Metabolity jsou rozmanité látky s molekulární hmotností pod 1500 daltonů (D'Alessandro et Zolla, 2012) - aminokyseliny, nukleotidy, sacharidy, lipidy atd. Množství metabolitů v těle člověka se odhaduje na několik tisíc, z nichž mluvíme jak o látkách endogenně se v těle vyskytujících, tak i o produktech metabolismu střevních mikrobů a látkách přijatých z okolního prostředí (léky, potrava, polutanty) (Baker, 2011).

Metabolomické přístupy se dělí na cílené a necílené. Pomocí cílené metabolomiky hledáme ve vzorku pouze určité spektrum pro nás zajímavých látek a jejich přítomnost můžeme kvantifikovat porovnáním se standardy. Necílená metabolomika se oproti tomu snaží detekovat všechny látky obsažené ve vzorku (Patti et al., 2012). Identifikovat nalezené látky potom můžeme s využitím znalosti jejich přesné hmoty pomocí webových databází METLIN (<http://metlin.scripps.edu/> - 29. 3. 2013) (Smith et al., 2005) a The Human Metabolome Database (<http://www.hmdb.ca/> - 29. 3. 2013) (Wishart et al., 2009), které obsahují tisíce látek identifikovaných na základě získaných experimentálních dat. Pro identifikaci lipidů můžeme využít také databázi LIPID MAPS (<http://www.lipidmaps.org/> - 29. 3. 2013) (Sud et al., 2007).

Pro studium metabolomu jsou využívány především vzorky biologických tekutin (krev, plazma, moč) a tkáňové a buněčné lyzáty (Patti et al., 2012). Z hlavních analytických metod lze zmínit hmotnostní spektrometrii, kapalinovou a plynovou chromatografii, nukleární magnetickou rezonanci a kapilární elektroforézu. Kombinací těchto metod lze detekovat značné množství metabolitů, ale prozatím zhruba jen čtvrtinu z nalezených identifikovat (Baker, 2011).

Praktické využití metabolomiky spočívá v klinické diagnostice - pomocí metabolomického profilování můžeme stanovit metabolismus, farmakokinetiku, účinky a toxicitu léků a detekovat biomarkery charakterizující výskyt určitého onemocnění

(Kell, 2006; Patti et al., 2012). Při spojení metabolomických, proteomických a genomických analýz pak můžeme získat komplexnější a ucelenější náhled na stav buňky (organismu), jaké děje v ní probíhají, jak se navzájem ovlivňují, regulují apod. (Baker, 2011).

## 2.2 Hmotnostní spektrometrie

### 2.2.1 Historie hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie je analytická metoda, která vznikla počátkem 20. století. První hmotnostní spektrometr byl vynalezen Thomsonem v roce 1897 na základě snah o dokázání částicové povahy katodového záření. Skládal se z plynové výbojky, která produkovala ionty a ty byly po průchodu magnetickým a elektrickým polem detekovány na fotografické desce (Thomson, 1897). Velmi dlouho byla hmotnostní spektrometrie využívána především ve světě fyziky, až později se její použití rozšířilo na oblast chemie a biologie. První experimenty byly provázeny snahou určit hmotnosti atomů a potvrdit existenci izotopů, ve 40. letech byla poté hmotnostní spektrometrie využívána komerčně ke kontrole složení různých průmyslových směsí. Rozvoj této metody v oblasti chemie nastal především až v 50. a 60. letech. Právě tehdy vznikaly první pokusy o stanovení struktury různých sloučenin, k čemuž z velké části přispělo i zjištění, že látky uvnitř přístroje specificky fragmentují (Griffiths, 2008). Od té doby se metoda hmotnostní spektrometrie velmi intenzivně rozvíjela, dnes existuje řada různých hmotnostních spektrometrů založených na odlišných principech měření poměru hmotnosti a náboje ( $m/z$ ) látek. Měří se fyzikální veličiny jako momentum v magnetickém sektoru, kinetická energie, orbitální frekvence, rychlost a stabilita dráhy částic, přičemž každý z těchto přístupů má své výhody a nevýhody a je vhodný pro určitý typ analýzy (Hu et al., 2005).

### 2.2.2 Části hmotnostního spektrometru

Hmotnostní spektrometr se skládá ze tří základních částí - iontového zdroje, hmotnostního analyzátoru a detektoru. V iontovém zdroji je analyt převáděn do plynného stavu a zároveň dochází k ionizaci molekul analytu, analyzátor dělí ionty podle poměru jejich hmotnosti a náboje (za použití různých technologií) a signál je převáděn pomocí

hmotnostního detektoru na hmotnostní pík s určitou hodnotou  $m/z$  (de Hoffman et Stroobant, 2007).

### 2.2.2.1 Iontové zdroje a způsoby ionizace

Ionizační techniky se dělí na měkké a tvrdé. Měkké ionizační techniky jsou šetrnější, nedochází při nich k fragmentaci a zůstávají tak zachovány vesměs neporušené ionizované molekuly (např. CI, FI, ESI). Oproti tomu při tvrdých ionizačních technikách jsou molekuly díky absorpci vysoké energie rozbity na fragmenty (např. EI) (de Hoffman et Stroobant, 2007).

Elektronová ionizace (Electron ionization - EI) je technika založená na dopadu elektronů na molekuly vzorku v plynném stavu. Zdrojem elektronů je žhavené vlákno, k jejich emitaci slouží vlákno katodové. Elektrony se při cestě k anodě srážejí s molekulami vzorku a jsou zároveň urychlovány. Při tomto typu ionizace dochází ke vzniku především kladně nabitých radikálových částic a častá je fragmentace molekul analytu (de Hoffman et Stroobant, 2007; Ekman et al., 2009).

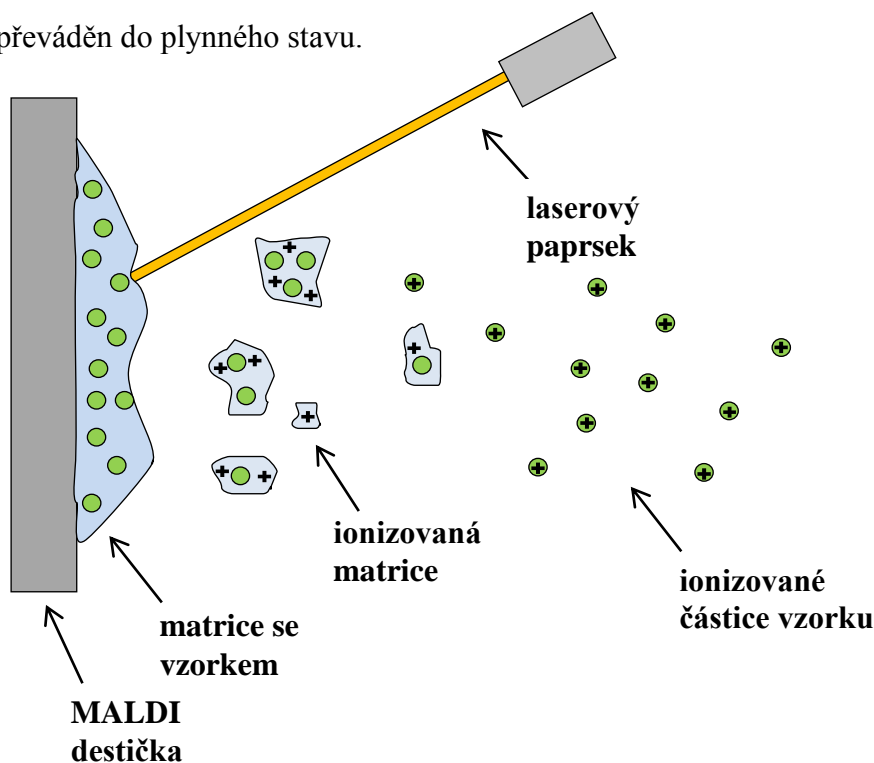
Chemická ionizace (Chemical ionization - CI) je charakteristická srážkami molekul analytu s ionty přítomnými ve zdroji. Zdrojem iontů je reakční plyn (metan, isobutan, amoniak, atd.), který je sám ionizován pomocí elektronové ionizace. Při reakci vzorku s ionty zdroje dochází k přenosu protonů, výměně nábojů a dalším reakcím, a vznikají tak různé typy iontů. Chemická ionizace se řadí k jemnějším typům ionizace, protože při ní dochází k menší fragmentaci molekul (de Hoffman et Stroobant, 2007; Ekman et al., 2009).

Ionizace polem (Field ionization - FI) je technika založená na ionizaci plynného vzorku pomocí silného elektrického pole. Toto pole vzniká na základě potenciálového rozdílu mezi emitorem (anodou) a „counter“-elektrodou (proti-elektrodou - katodou). Na povrch emitoru přechází elektron z molekuly plynného vzorku. Zbývající molekulový kation je emitorem odražen a postupuje na katodu a následně do analyzátoru. Tento typ ionizace poskytuje nefragmentované molekuly, ale dosahuje poměrně nízké ionizační účinnosti (de Hoffman et Stroobant, 2007).

Desorpce pomocí pole, plasmu nebo laseru jsou techniky založené jak na ionizaci vzorku, tak na desorpci, tedy uvolňování iontů z povrchu vzorku. Při desorpci polem (Field desorption - FD) je vzorek uložen ve formě roztoku na vláknu pokrytém uhlíkovými

mikrojehličkami. Zahříváním vlákna dochází k tání vzorku a akumulaci iontů na špičkách jehliček, kde dochází k jejich desorpci. FD jako i FI patří mezi měkké ionizační metody. Při desorpci plasmou (Plasma desorption - PD) je vzorek v pevném stavu bombardován fragmenty izotopu kalifornia  $^{252}_{98}\text{Cf}$ , čímž dochází k desorpci iontů. Při desorpci laserem (Laser desorption - LD) je vzorek vystaven působení laserových pulsů. Laserový paprsek způsobí jak ionizaci vzorku, tak jeho vaporizaci, tedy změnu z kapalného skupenství na plynné. Tato technika se využívá především při studiu lokálního složení vzorku, např. buněčných organel (de Hoffman et Stroobant, 2007; Ekman et al., 2009).

Matricí asistovaná laserová desorpce/ionizace (Matrix-assisted laser desorption ionization - MALDI) je technika vynalezená koncem 80. let vědci Franzem Karasem, Michaellem Hillenkampem (Karas et al., 1987) a Koichi Tanakou (Tanaka et al., 1988). Tato technika se používá pro analýzu složitějších látek biologického původu (proteiny, DNA, cukry) ale i molekul nepřírodního původu, např. syntetických polymerů. Nejprve je vzorek rozpuštěn v rozpouštědle, které obsahuje malé organické molekuly, tzv. matrici. Poté je tekuté rozpouštědlo odpařeno a následnými krátkými laserovými pulzy je vzorek spolu s matricí postupně převáděn do plynného stavu.



Obr. 1: Schematické znázornění MALDI (vytvoreno podle

<http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Maldi.png> - 7. 3. 2013)

Následně dochází k ionizaci matrice pomocí protonu a proton je poté přenesen na částici vzorku a ionizuje ji. Funkce matrice spočívá především v absorpci energie laserového pulzu a v obklopení a ochraně jednotlivých částic vzorku. Technika MALDI se vyznačuje velkou citlivostí a její výhodou je jednoduchá příprava vzorku a snášenlivost vůči znečištění, proto mohou být analyzovány i nezpracované vzorky tělních tekutin nebo celé buňky (de Hoffman et Stroobant, 2007; Ekman et al., 2009).

Ionizace urychlenými atomy (Fast atom bombardment - FAB) je technika charakteristická dopadem proudu atomů, molekul nebo iontů na molekuly vzorku. Nejčastěji se využívá paprsek neutrálních molekul argonu nebo xenonu, přičemž vzorek musí být rozpuštěn v netěkavé viskózní matrici, například v glycerolu. Částice paprsku bombardují směs vzorku a matrice, a ionty vzorku z povrchové vrstvy opouštějí směs. Ionty jsou poté urychlovány a postupují směrem k analyzátoru. Během FAB nedochází k téměř žádné ionizaci, tato metoda slouží spíše k převedení iontů přítomných ve vzorku do plynné fáze. Její nevýhodou je také značné chemické pozadí vznikající interakcemi částic vzorku s matricí (de Hoffman et Stroobant, 2007; Ekman et al., 2009).

Ionizace za atmosférického tlaku (Atmospheric pressure ionization - API) zahrnuje skupinu velmi účinných ionizačních technik, které probíhají za atmosférického tlaku-chemickou ionizací za atmosférického tlaku (Atmospheric pressure chemical ionization - APCI), fotoionizací za atmosférického tlaku (Atmospheric pressure photoionization - APPI) a elektrosprejovou ionizací (Electrospray ionization - ESI). Chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI) je technika, kdy je kapalný vzorek přiváděn do rozprašovače. Zde je roztok přeměněn na kapičky aerosolu pomocí přiváděného plynu (dusíku). Kapky jsou poté přeneseny tokem plynu do horké komory, kde nastává odpařování mobilní fáze a převedení analytu do plynné fáze. K ionizaci vzniklého plynu dochází poté na výbojové elektrodě - jehle. Fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI) je modifikovaná forma APCI, která se používá především pro nepolární sloučeniny. Převedení kapalného skupenství vzorku do plynného se děje obdobně jako v případě APCI. Liší se ale způsobem ionizace, kdy je použita UV lampa (např. z kryptonu), která produkuje fotony. Interakcí fotonů s plynným vzorkem dochází k jeho ionizaci (de Hoffman et Stroobant, 2007; Ekman et al., 2009).

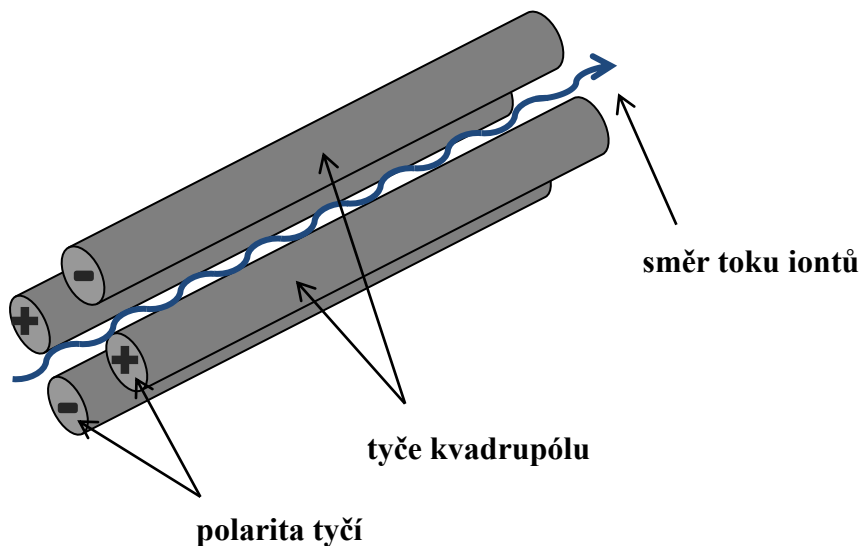
Elektrosprejová ionizace (ESI) viz kapitola 2.3.3.1 Elektrosprejová ionizace.

### 2.2.2.2 Hmotnostní analyzátory

Analyzátor doby letu (Time-of-flight analyser - TOF) je hmotnostní analyzátor založený na měření času průletu iontů přístrojem. Tento typ analyzátoru je většinou spojený s ionizační metodou MALDI, kdy laserový pulz použitý pro převedení vzorku do plynného stavu, slouží jako počáteční signál. Jako čas letu se poté označuje doba, za kterou urazí ion cestu od prvotního signálu (pulzu) k detektoru. Ionty jsou po vstupu do analyzátoru urychleny potenciálem a prochází částí, kde není přítomno elektrické pole. Zde dochází k rozdělení iontů podle jejich rychlostí, ionty o menších  $m/z$  poměrech (lehčí) letí k detektoru rychleji, ionty o větších  $m/z$  poměrech (těžší) letí pomaleji. Detektor může pracovat ve dvou módech. Při lineárním módu přicházejí ionty z iontového zdroje přímo k detektoru, ale toto nastavení poskytuje poměrně malé rozlišení. Při reflektorovém módu jsou naopak ionty v určitém místě odrazeny reflektorem, který působí jako zrcadlo a odráží ionty směrem k druhému detektoru. Funkce reflektoru spočívá ve zpomalení rychleji se pohybujících se iontů - ty pronikají hlouběji do elektrického pole vytvořeného reflektorem a dochází k prodloužení délky jejich letu. Na detektor tak dopadají všechny ionty o stejném poměru  $m/z$  téměř současně, přestože při pohybu oblastí bez elektrického pole dosahovaly různých rychlostí a měly jinou kinetickou energii. TOF analyzátor není omezen rozsahem  $m/z$  poměrů, je citlivý a ve spojení s MALDI ionizací lze získat celé hmotnostní spektrum během jednoho laserového pulzu (Ekman et al., 2009; Gross, 2004).

Kvadrupólový hmotnostní filtr (Quadrupole mass filter) vychází z konceptu kvadrupólu, který je tvořen čtyřmi paralelními tyčemi, na něž je zavedeno stejnosměrné (DC - direct current) a vysokofrekvenční střídavé napětí (RF - radiofrequency), přičemž protilehlé tyče mají vždy stejnou polaritu. V závislosti na poměru daných napětí jsou filtrem propouštěny pouze ionty v určitém rozsahu  $m/z$  poměrů. Tyto ionty se stabilními trajektoriemi prochází přes kvadrupól až k detektoru, ionty o ostatních  $m/z$  poměrech (s nestabilními trajektoriemi) jsou na tyčích kvadrupólu zachyceny a nejsou detekovány. Jednotlivé páry tyčí pracují protichůdně jako filtry, jeden pár funguje jako „high pass“ filtr, který propouští k detektoru těžší ionty a lehčí podrobí srážce s tyčemi, druhý funguje jako „low pass“ filtr - propouští lehčí ionty a těžší jsou zachyceny tyčemi. Spojením tří, za sebou následujících kvadrupólů, vzniká trojitý kvadrupól (Triple quadrupole - QqQ). První kvadrupól (Q1) působí jako hmotnostní analyzátor a slouží k selekci iontů. Ionty jsou urychleny a postupují do druhého hybridního kvadrupólu (q2), který funguje jako kolizní cela a kde dochází

k fragmentaci iontů vlivem jejich srážek s kolizním plynem. V třetím kvadrupólu (Q3), který působí také jako hmotnostní analyzátor, jsou fragmentované ionty analyzovány (de Hoffman et Stroobant, 2007; Ekman et al., 2009; Gross, 2004).

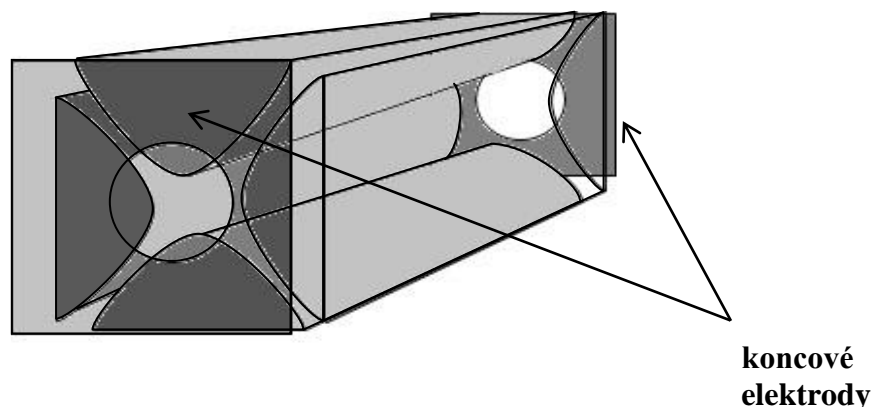


Obr. 2: Schématické znázornění kvadrupólu (vytvořeno podle

[http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Quadrupole\\_en.gif](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Quadrupole_en.gif) - 7. 3. 2013)

3D iontová past (3D ion trap) neboli kvadrupólová iontová past, obdobně Paulova past, je založena na záchytu iontů vlivem trojrozměrného kvadrupólového RF pole. Past je vlastně modifikovaný kvadrupól a skládá se z vstupní a výstupní koncové elektrody a dvou kruhových elektrod. Ionty ze zdroje vstupují do pasti otvorem ve vstupní koncové elektrodě a jsou chyceny do středu pasti. K zachycení iontů uprostřed pasti napomáhá kolizní plyn (helium), které navíc slouží k pohlcování kinetické energie částic a tím k chlazení systému. Při injekci iontů do pasti je amplituda RF stálá, postupnou změnou amplitudy zůstávají v pasti pouze stabilní ionty o daných  $m/z$  poměrech. Ostatní ionty jsou destabilizovány a sřetávají se stěnami pasti anebo opouští past směrem k detektoru. Vybrané ionty s danými  $m/z$  poměry setrvávající v pasti mohou být následně využity v  $MS^n$  analýze. 2D iontová past (2D ion trap) nebo také lineární iontová past vychází z kvadrupólového hmotnostního filtru, ale navíc se zde objevují koncové elektrody. Ty slouží spolu s RF napětím na koncích kvadrupólových tyčí k zachycení iontů. Od 3D iontové pasti se 2D past liší dvourozměrným elektrickým polem a pohybem iontů i v axiálním ( $z$ ) směru. 2D pasti jsou navíc účinnější v zachycování iontů (Ekman et al., 2009; de Hoffman et Stroobant, 2007; Gross, 2004).





Obr. 3: 2D iontová past (vytvořeno podle Ekman et al., 2009)

Iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací (Fourier transform ion cyclotron resonance - FT-ICR) je analytická metoda založená na rozdělení iontů podle cyklotronové rezonance v magnetickém poli. Ionty jsou z ionizačního zdroje převedeny transferovou optikou do cely, která se nachází uvnitř silného magnetického pole a skládá se ze zachycovacích, excitačních a detekčních elektrod. Ionty jsou vlivem magnetického pole zachyceny v cyklotronové cele a rotují kolem centrální magnetické osy (pozitivně nabitě ionty jedním směrem, negativně nabitě opačným). Nejprve se všechny ionty pohybují po trajektoriích o malých poloměrech s danou cyklotronovou frekvencí. Jakmile však excitační elektrody vytvoří radiofrekvenční puls o frekvenci, která odpovídá cyklotronové frekvenci iontů s vhodnými (a stejnými)  $m/z$  poměry, přijmou tyto ionty kinetickou energii a rozšíří trajektorie svého pohybu. Tím se přiblíží k detekčním elektrodám, ve kterých iniciují změnu elektrického proudu a ta je zaznamenána. Postupně jsou excitovány ionty o všech různých  $m/z$  poměrech dokud nezískáme frekvenční spektrum (závislé na  $m/z$  poměrech, ale nezávislé na rychlosti iontů), které po převedení Fourierovou transformací odpovídá hmotnostnímu spektru. Metoda FT-ICR se vyznačuje velkým rozlišením (okolo 1 000 000 FWHM (Brown et al., 2005)) a vysokou přesností měření. Oproti ostatním hmotnostním analyzátorům je nedestruktivní vůči iontům, tudíž ty mohou být následně použity pro MS<sup>n</sup> experimenty, které slouží k určení specifické fragmentace (Ekman et al., 2009; de Hoffman et Stroobant, 2007). Nevýhodou FT-ICR je poměrně vysoká cena (Lei et al., 2011) a složitost údržby přístroje (chlazení supravodivého magnetu pomocí tekutého hélia (Schmid et al., 2000), nutnost silného vakua pro dosažení vysokého rozlišení (de Hoffman et Stroobant, 2007)).

Orbitrap viz kapitola 2.3 Orbitrap hmotnostní spektrometr

## 2.3 Orbitrap hmotnostní spektrometr

### 2.3.1 Úvod a historie vzniku Orbitrapu

Pro analýzu složitějších směsí, které jsou využívány při metabolomických, proteomických a genomických měřeních je zapotřebí vysokého rozlišení, hmotnostní přesnosti a dynamického rozsahu. To poskytují hmotnostní analyzátoři založené na orbitální pasti, jako je Orbitrap (Hu et al., 2005).

Technologie Orbitrapu vychází především z Kingdonovy pasti z roku 1923 (Kingdon, 1923). V roce 1981 modifikoval Knight tvar vnější elektrody pasti, čímž došlo při iontovém odchytu ke vzniku kvadrupólového potenciálu v axiálním směru (kromě již existujícího logaritmického potenciálu v radiálním směru) (Knight, 1981). Bylo dosaženo tzv. kvadrologaritmického potenciálu, znázorněného na Obr. 4 (Knight, 1981; Gillig et al., 1996; Gall et al., 1986). Koncept Orbitrapu (jako modifikace Kingdonovy či kvadrupólové iontové pasti (Hu et al., 2005)) byl poté navržen Alexanderem Makarovem v roce 2000 (Makarov, 2000) a uveden na obchodní trh roku 2005 (Makarov et al., 2006).

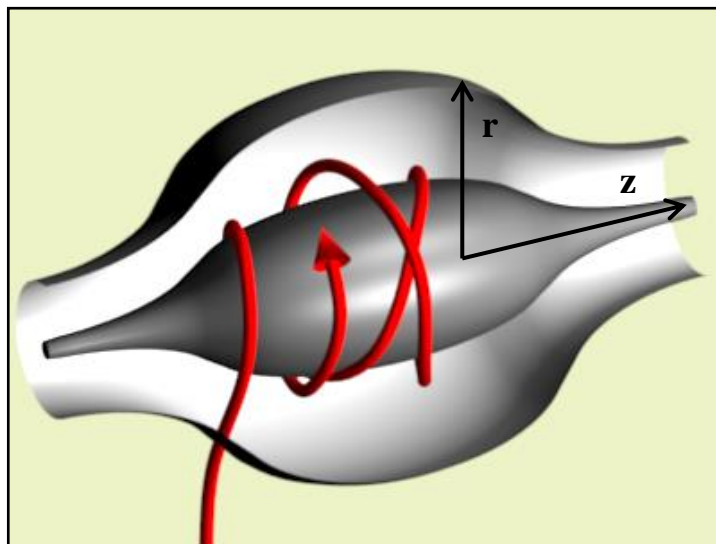
$$U(r,z) = \frac{k}{2} \left( z^2 - \frac{r^2}{2} \right) + \frac{k}{2} (R_m)^2 \ln \left[ \frac{r}{R_m} \right] + C$$

Obr. 4: Rovnice kvadrologaritmického potenciálu ( $r, z$  - koordináty válce,  $k$  - zakřivení pole,  $R_m$  - charakteristický poloměr a  $C$  - konstanta) (Makarov, 2000)

### 2.3.2 Specifika Orbitrap analyzátoru

Orbitrap analyzátor se soustředí na odchyt iontů v elektrostatickém poli - na rozdíl od jiných analyzátorů využívajících dynamické nebo magnetické elektrické pole, a zároveň také na samotnou detekci signálu. Analyzátor je složen z centrální a vnější elektrody, přičemž

ionty konají orbitální pohyb kolem centrální elektrody v radiálním směru a oscilují ve směru z neboli axiálním - znázorněno na Obr. 5 (Makarov, 2000; Hu et al., 2005).



Obr. 5: Trajektorie pohybu iontů okolo centrální elektrody Orbitrap analyzátoru (upraveno podle <http://en.wikipedia.org/wiki/File:Orbitrappe.png> - 1. 10. 2012)

Pouze však axiální frekvence oscilací je nezávislá na energii a prostorové pozici iontů, proto je po následné Fourierově transformaci vhodná pro získání hmotnostního spektra (Obr. 6) (Makarov, 2000).

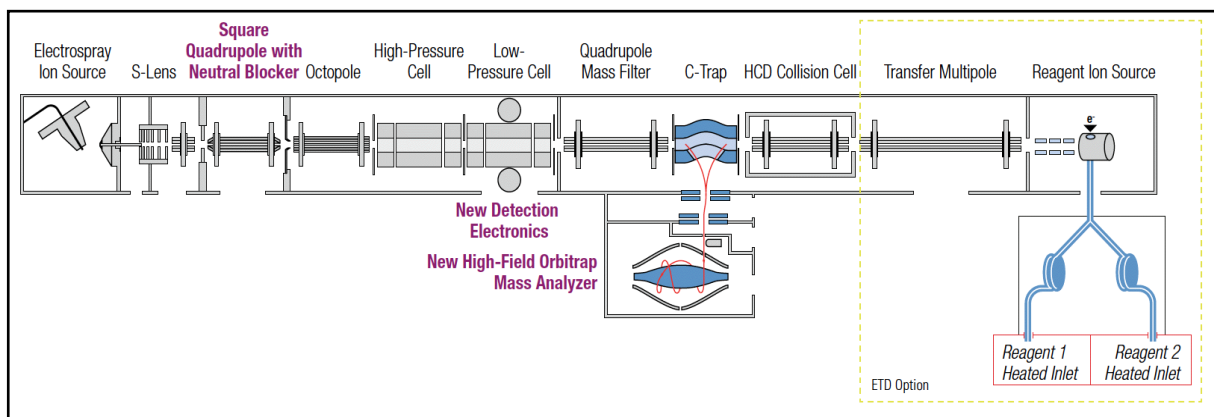
$$\omega = \sqrt{\left(\frac{z}{m}\right)} \cdot k$$

Obr. 6: Rovnice frekvence iontových oscilací v axiálním směru ( $\omega$  - frekvence oscilací,  $z$  - náboj částice,  $m$  - hmotnost částice,  $k$  - zakřivení pole) (Makarov, 2000)

### 2.3.3 Orbitrap Elite

Nejnovějším modelem ze skupiny hmotnostních spektrometrů na principu Orbitrapu je hmotnostní spektrometr Orbitrap Elite, kombinující poslední model Velos Pro (duálně

tlakovou lineární iontovou past) s novou „high-field“ technologií Orbitrapu. Mezi základní součásti tohoto přístroje patří iontový zdroj, S-čochka, transferová iontová optika a Orbitrap hmotnostní analyzátor (Obr. 7) (Orbitrap Elite Hardware Manual, 2011).



Obr. 7: Schéma Orbitrapu Elite, hybridního hmotnostního spektrometru (převzato z <http://planetorbitrap.com/orbitrap-elite#tab:schematic> - 1. 10. 2012)

### 2.3.3.1 Elektrosprejová ionizace

Nedílnou součástí každého hmotnostního spektrometru je iontový zdroj, který má za úkol převést zkoumaný analyt do plynného stavu a zároveň ionizovat molekuly analytu. V tomto případě je zastoupen elektrosprejem, ale lze použít i jiné iontové zdroje a podobné techniky (Orbitrap Elite Hardware Manual, 2011). Elektrosprejová ionizace byla vynalezena Johnem Fennem v roce 1988 (Fenn et al., 1989) a je založena na principu tvorby malých kapek, které se vytváří na konci kapilární kolony vlivem silného elektrického pole. Toto pole vzniká na základě potenciálového rozdílu mezi kolonou a elektrodou a způsobuje akumulaci náboje na povrchu kapaliny. Jakmile velikost náboje překoná povrchové napětí v kapalině, kapalina postupně mění svůj tvar za vzniku tzv. Taylorova kuželu (Taylor, 1964). Stoupá elektrostatický odpor (množství náboje) na povrchu, až překročí povrchové napětí kapky - tzv. Rayleighův limit (Rayleigh, 1879). Nastává coulombická exploze a z povrchu kapky se oddělují kapičky (sprej), které se pomocí plynu disperzně rozptýlí do prostoru. Zbytky rozpouštědla jsou poté postupně odstraněny průchodem kapek přes horký inertní plyn nebo horkou kapiláru, čímž dochází k deformaci kapiček a oddělování iontů z jejich povrchů (de Hoffman et Stroobant, 2007, Gross, 2004). Efektivním zdrojem ionizace je například

Heated electrospray ionization (H-ESI), kdy zahřívání plynu napomáhá lepšímu odpařování rozpouštědla ze vzorku (HESI-II Probe User Guide, 2008).

### 2.3.3.2 Transport iontů

Ionty z elektrospreje jsou poté zachyceny S-čočkou, což je radiofrekvenční zařízení převádějící a spojující ionty do paprsku, který dále směřuje k transferové iontové optice. Tato část přístroje je tvořena čtvercovým kvadrupólem s neutrálním blokátorem pro eliminaci nenabitých molekul, oktopólem a duálně tlakovou iontovou pastí („Dual-pressure ion trap Velos Pro“). Důležitou roli v této iontové pasti mají právě dvě cely (Obr. 7) - vysokotlaká cela přispívá ke zlepšení účinnosti iontového zachycení, izolace a fragmentace, zatímco nízkotlaká cela zvyšuje skenovací rychlost, rozlišení a hmotnostní přesnost (Orbitrap Elite Hardware Manual, 2011).

Ionty se poté dostávají do C-pasti, kde dochází k jejich shromažďování. C-past je schopna uložit i více injektovaných vzorků a přitom je pak současně detekovat v orbitrap analyzátoru získáním jednoho hmotnostního spektra (Olsen et al., 2005). Tvar pasti připomínající písmeno T umožňuje její spojení jak s kvadrupólovým hmotnostním filtrem, tak s HCD („higher-energy collisional dissociation“) kolizní celou sloužící k fragmentaci iontů (McAlister et al., 2008).

### 2.3.3.3 Orbitrap analyzátor a detektor

Ionty jsou ve formě malých balíčků pomocí krátkého pulzu injektovány z C-pasti do orbitrap analyzátoru. Tyto iontové balíčky jsou zaměřeny přímo na vstupní otvor vnější elektrody, a jakmile se dostanou do prostoru mezi elektrodami, začnou axiálně oscilovat a zároveň rotovat v radiálním směru. Axiální oscilace probíhají díky silnému elektrickému poli vznikajícímu na centrální elektrodě držené při vysokém napětí. Toto pole tlačí iontové balíčky směrem ke středu elektrody („elektrodynamický squeezing“ - Makarov, 1999), tudíž se zmenšuje poloměr iontového oblaku. K pádu iontů na elektrodu však nedochází díky souběžné orbitální rotaci iontů. Každý iontový balíček se potom rozšíří po určité angulární koordinátě a vytvoří tenký rotující kroužek, který harmonicky osciluje s frekvencí úměrnou  $\left(\frac{m}{z}\right)^{\frac{1}{2}}$ , kdy  $m$  je hmotnost a  $z$  náboj fragmentu (Makarov et Scigelova, 2010).

Do analyzátoru vstupují další a další ionty, a jakmile nastane stabilizace napětí na centrální elektrodě a každý ion dosáhne harmonického axiálního potenciálu, započne detekce obrazu proudu („image current detection“). Shromažďování dat probíhá, dokud nedojde ke ztrátě iontové soudržnosti anebo ztrátě iontů z pasti a tím pádem ke snížení intenzity signálu, který se postupně ztratí v šumu (Hu et al., 2005). Následným převedením získaného signálu pomocí algoritmu Fourierovy transformace pak získáme výsledná  $m/z$  spektra (Senko et al., 1996; Marshall et al., 1990).

#### **2.3.3.4 Parametry přístroje Orbitrap Elite**

Hmotnostní přesnost Orbitrapu Elite se pohybuje do 3 ppm RMS („RootMeanSquare“ - odmocnina průměru čtverců - efektivní hodnota) při externí kalibraci a až do 1 ppm RMS při interní kalibraci (Orbitrap Elite Hardware Manual, 2011). Této skutečnosti lze využít například při metabolickém profilování (necílená metabolomika) a současné cílené analýze látek v jednom experimentu (cílená metabolomika) (Koulman et al., 2009). Neméně důležitým parametrem je rozlišovací schopnost, která souvisí především se správným určením hmotnosti analytů (Makarov et Scigelova, 2010). U Orbitrapu dosahuje 240 000 FWHM („full width at half maximum“ - šířka píku v polovině jeho maximální výšky). Zmínit můžeme také dynamický rozsah až 500, hmotnostní rozsah 50-2000  $m/z$  a 200-4000  $m/z$  a vysokou skenovací rychlost s využitím MS skenovací síly  $MS^n$  (kdy  $n = 1-10$ ) (Orbitrap Elite Hardware Manual, 2011).

### **2.3.4 Hmotnostní spektrometrie ve spojení s HPLC**

Vysokoučinná kapalinová chromatografie (High performance liquid chromatography - HPLC) je separační analytická metoda založená na rozdělování látek mezi stacionární a mobilní fázi. Mobilní fází je v tomto případě kapalina (narozdíl od plynové chromatografie, kde je mobilní fáze plyn), která je do systému přiváděna pod vysokým tlakem (Ardrey, 2003; Ekman et al., 2009). Existují dva typy HPLC - v normální a reverzní fázi. Při HPLC v normální fázi je stacionární fáze polární a mobilní fáze nepolární povahy. Při určitých analýzách (např. metabolických, proteomických), kde se studují látky biochemické povahy, je vhodnější chromatografie v reverzní fázi (RP-HPLC) (Makarov et Scigelova, 2010), kdy je stacionární fáze nepolární a mobilní fáze polární (Ekman et al., 2009). Jako

stacionární fáze se používají sloučeniny křemíku (silikagel), na které jsou navázány alkylové skupiny (C18, C8) nebo například kolony s navázanými amidovými skupinami. Mobilní polární fáze je představována roztoky (pufrů) o daném pH obsahujícími vodu a organická rozpouštědla (metanol, acetonitril, hexan atd.), jejichž poměr v mobilní fázi se v čase mění (gradientová eluce) nebo je konstantní (izokratická eluce) (Ardrey, 2003; Snyder et al., 2010).

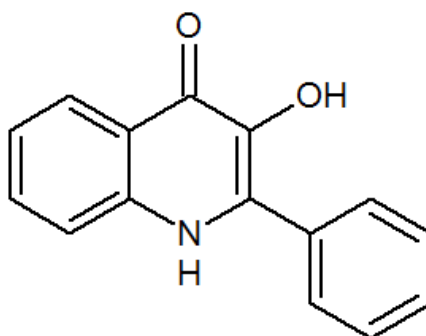
Standardní HPLC se skládá z rezervoáru mobilní fáze, pumpy, dávkovače vzorku, kolony a detektoru. Mobilní fáze je pumpována z rezervoáru do dávkovače, přičemž vzniká potřebná rychlost a tlak, aby došlo k plynulému průtoku mobilní fáze se vzorkem kolonou. Při pohybu mobilní fáze kolonou, látky obsažené ve vzorku interagují se stacionární fází (Ardrey, 2003). U RP-HPLC se méně polární látky na nepolární stacionární fázi zdržují delší dobu a eluují se z kolony později (jejich retenční čas je delší) než více polární látky, u HPLC na normální fázi je tento jev opačný (Ardrey, 2003; Snyder et al., 2010).

Pro detekci velmi polárních (hydrofilních) látek, které nedostatečně interagují se stacionární fází, se používá hydrofilní interakční chromatografie (Hydrophilic interaction liquid chromatography - HILIC). Při této technice reagují molekuly vody obsažené v mobilní fázi se stacionární fází a zdržují tak hydrofilní analyty v koloně, čímž dochází k jejich lepšímu odlišení (Snyder et al., 2010).

Detekce výstupu z HPLC se provádí pomocí UV záření, elektrochemicky, měřením fluorescence nebo hmotnostním spektrometrem (Ardrey, 2003). Výhodou spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií je efektivnější identifikace a kvantifikace látek obsažených ve složitých směsích (Ardrey, 2003). Jelikož jsou ale separované komponenty získané pomocí HPLC v kapalném eluátu, před vstupem do hmotnostního spektrometru (Orbitrapu) musí být převedeny do plynné formy (de Hoffman et Stroobant, 2007). Jako rozhraní v tomto případě funguje například dříve zmíněný elektrosprej (Orbitrap Elite Hardware Manual, 2011). Při metabolomických analýzách se často také využívá nanosprej (Nano-ESI), který pracuje s nanolitrovými průtoky a navazuje na speciální nano nebo kapilární kolony HPLC, což umožňuje zvýšení citlivosti (de Hoffman et Stroobant, 2007). Častěji než klasická HPLC se také používá vysokotlaká kapalinová chromatografie (Ultra high performance liquid chromatography - UHPLC), která pracuje při ještě vyšších tlacích, čímž je dosaženo lepšího rozlišení (Makarov et Scigelova, 2010).

## 2.4 Experimentální látka 05-0777

Experimentální látka 05-0777 je derivát 3-hydroxy-2-fenyl-4(1*H*)-chinolinonu (Obr. 8, syntetizován Oddělením organické chemie, PřF UP). Tato sloučenina a další deriváty chinolinonu jsou strukturní aza-analogy flavonů a jsou testovány Laboratoří experimentální medicíny na potenciální protirakovinné účinky podobné účinkům šikoninu (viz kapitola 2.5 Šikonin). Chinolinony již prokázaly svou biologickou aktivitu, byly pozorovány *in vitro* protirakovinné, antibakteriální a imunosupresivní účinky (Hradil et al., 2009). Výhodou derivátů chinolinonu oproti šikoninu je jejich jednodušší chemická syntéza - využívá se SPOS (nekovalentní organická syntéza na pevné fázi) doplněná o znalosti kombinatorní chemie, kdy výchozí sloučeninou je kyselina antranilová upevněná na polystyrénové pryskyřici (Soural et Krchnak, 2007). Snadnější syntéza a cytotoxické účinky na rakovinné buněčné linie (např. CEM) činí z těchto látek potenciální protirakovinná léčiva (Hradil et al., 2009).



Obr. 8: 3-hydroxy-2-fenyl-4(1*H*)-chinolinon



## 2.5 Šikonin

### 2.5.1 Historie a stanovení struktury šikoninu

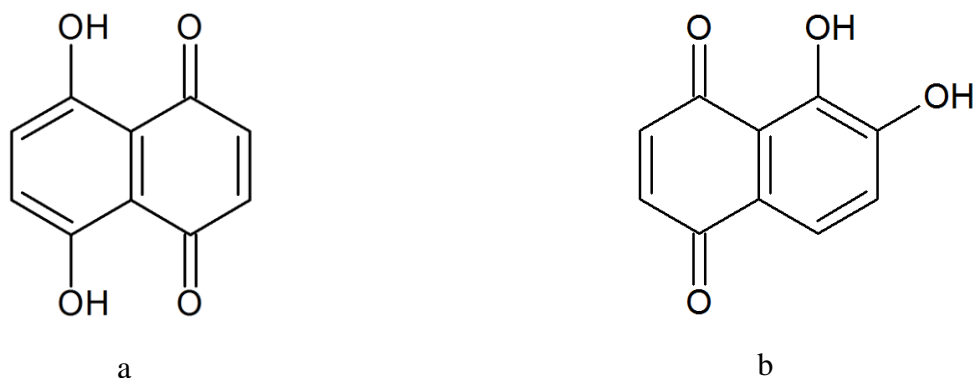
Šikonin je biologicky aktivní látka známá v oblasti Orientu již po celá staletí. Tato sloučenina je hlavní součástí červeného pigmentu izolovaného z kořene rostliny *Lithospermum erythrorhizon* (Obr. 9). Extrakty z kořenů této rostliny byly odedávna využívány jako barviva a později jako léčiva v tradiční čínské medicíně. Léčebné účinky šikoninu byly poprvé objeveny pravděpodobně v druhém století čínským chirurgem Hua To (Hyatt, 1978), ale využívány především až od konce šestnáctého století na sklonku vlády dynastie Ming (Read et Ju-ch'iang, 1936). Šikonin byl tehdy používán například na léčbu vředů, ran, popálenin, hemoroidů a dermatitidy. I v dnešní době má šikonin své uplatnění, v Číně, Japonsku a Koreji je nadále využíván pro léčebné účely, v Japonsku pak navíc v kosmetice a jako barvivo (Papageorgiou et al., 1999).



Obr. 9: *Lithospermum erythrorhizon* (převzato

z <http://molbiol.ru/forums/uploads/a002/b044/post-12526-1286109053.jpg> - 8. 1. 2013)

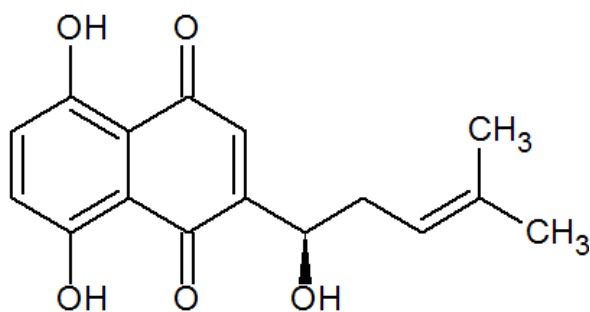
První izolace šikoninu z kořene *Lithospermum erythrorhizon* byla provedena v roce 1922 japonskými chemiky Rikem Majimou a Chikou Kurodou, kdy byla tato sloučenina získána ve formě acetátu. Tito vědci stanovili některé chemické vlastnosti šikoninu, zvláště jeho strukturní podobnost se sloučeninou naftazarinem. Zásadním omylem ovšem bylo přijetí tehdy uznávaného, ovšem chybného strukturního vzorce naftazarinu, jako 5,6-dihydroxy-1,4-naftochinonu (Obr. 10b). Proto byla i jimi navrhovaná struktura šikoninu nesprávná (Majima et Kuroda, 1922).



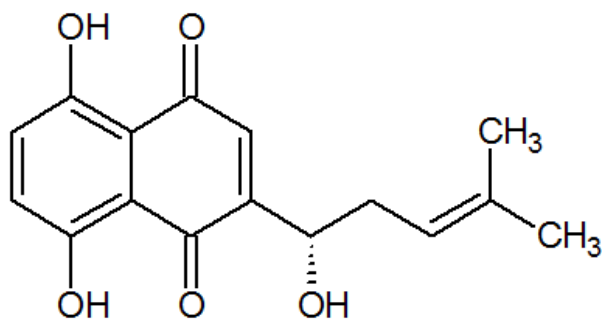
Obr. 10: Správný strukturní vzorec naftazarinu (a) a původně uznávaný (špatný) vzorec naftazarinu (b)

Ze správného vzorce naftazarinu (5,8-dihydroxy-1,4-naftochinonu - Obr. 10a) již pak vycházel Hans Brockmann, který jako první roku 1936 objevil enantiomerickou povahu šikoninu (Brockmann, 1936). Tímto objevem odhalil důležitou paralelu mezi dvěma isomery dosud spolu nesouvisejícími, šikoninem a alkaninem. Tak jako byly totiž již dlouho známy účinky šikoninu (R enantiomer) v oblasti Orientu, byl alkanin (S enantiomer) pro podobné vlastnosti využíván v Evropě (Papageorgiou et al., 1999).

Absolutní struktura šikoninu byla stanovena až v roce 1961 (Arakawa et Nakazaki, 1961). Z chemického hlediska se jedná o naftochinon, přesněji 5,8-dihydroxy-2-[(1S)-1-hydroxy-4-methylpent-3-en-1-yl]naftalen-1,4-dion, se sumárním molekulovým vzorcem  $C_{16}H_{16}O_5$  (Obr. 11). Jak již bylo zmíněno, existují dvě optické formy této sloučeniny – R-enantiomer - šikonin a S-enantiomer - alkanin. Alkanin (Obr. 12) se nachází primárně v kořenech rostliny *Alkanna tinctoria*, ale spolu s šikoninem také v kořenech *Lithospermum erythrorhizon* a dalších rostlin. Oba enantiomery jsou v kořenech v různém poměru v závislosti na druhu rostliny (Fukui et al., 1983).



Obr. 11: Strukturní vzorec šikoninu (R enantiomer)

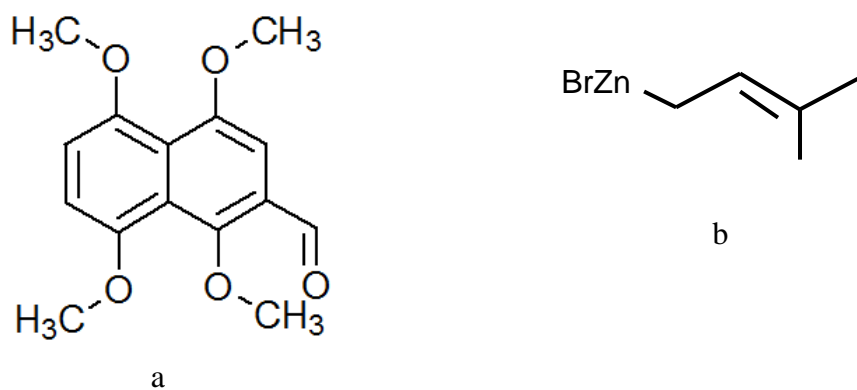


Obr. 12: Strukturní vzorec alkanninu (S enantiomer)

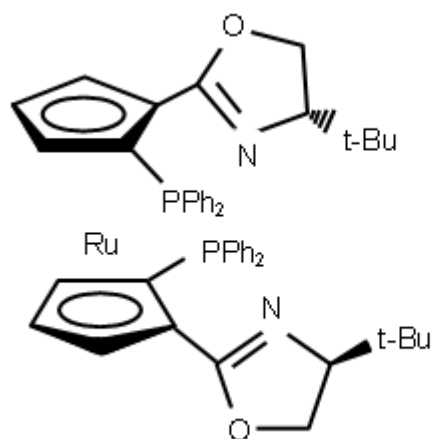
## 2.5.2 Produkce šikoninu

Extrakce šikoninu z kořene rostliny *Lithospermum erythrorhizon* se ukázala jako velmi neefektivní. Obsah látky v kořenu je nízký (1-2 %) a stáří rostliny musí být 5-7 let (Papageorgiou et al., 1999). Proto byla zavedena produkce šikoninu pomocí tkáňových kultur. První úspěšné pokusy pochází z roku 1974, kdy byly použity kalusové kultury získané z klíčících semen *Lithospermum erythrorhizon* (Tabata et al., 1974). Jako médium vhodné pro produkci šikoninu se ukázalo být Linsmaier-Skoogovo (LS) a M9 médium (Fujita et al., 1981). Celý proces kultivace musí probíhat za nepřítomnosti světla, protože některé klíčové enzymy biosyntetických drah jsou citlivé na světlo (Papageorgiou et al., 1999).

Šikonin lze získat nejen biosyntetickou cestou, kde hlavními prekurzory jsou kyselina 4-hydroxybenzoová a geranyl pyrofosfát, ale také chemickou syntézou (Papageorgiou et al., 1999). Bylo navrženo více postupů, jak získat syntetický šikonin, ale vždy se potýkaly s jedním nebo více problémy. Často byly výchozí sloučeniny velmi drahé nebo vzácné, proces syntézy velmi složitý a zdlouhavý anebo byla získána jen velmi malá množství žádané látky (Wang et al., 2012). Nejnovějším pokusem o úspěšnější syntézu šikoninu byla šestikroková syntéza z prekurzoru 1,4,5,8-tetramethoxy-2-naftaldehydu (Obr. 13a) přidáním organozinečnaté sloučeniny prenyl bromidu (1-bromo-3-methylbut-2-en, Obr. 13b) (Zhao et al., 2008). Klíčovými kroky této metody syntézy bylo zařazení Ru(II) katalyzované asymetrické hydrogenace pomocí C2 symetrického planárního chirálního ruthenocenového fosfinooxazolinového ligandu (L-3, Obr. 14) a odstranění ochranných methylových skupin (ochrana šikoninu methylenovými skupinami je nezbytná, protože jádro odvozené od naftazarinu je velmi citlivé na světlo, teplo a vzduch) (Wang et al., 2012).



Obr. 13: Prekurzory syntézy šikoninu: 1,4,5,8-tetramethoxy-2-naftaldehyd (a) a organozinečnatý prenyl bromid (b)



Obr. 14: C2 symetrický planární chirální ruthenocenový fosfinooxazolinový ligand (L-3)

### 2.5.3 Účinky šikoninu

Šikonin je látka s velmi komplexními účinky. Z mnoha účinků lze zmínit především aktivitu protinádorovou, dále protizánětlivou (prokázáno u potkanů (Tanaka et al., 1986)), antifungální (šikonin působí např. proti *Candida crusei*, *Saccharomyces cerevisiae* (Sasaki et al., 2002)), antibakteriální, antiamební, antipyretickou a analgetickou (Papageorgiou et al., 1999). Protinádorové účinky vycházejí především z indukce apoptozy (např. u buněčných linií CCRF-CEM a mnohočetně lékově resistantních buněčných linií CEM/ADR5000 cílením na mitochondrie (Wiench et al., 2012)), inhibice proliferace (např. inhibice proliferace

a indukce apoptosy v lidských HepG2 buňkách (Yingkun et al., 2010)) a inhibice angiogeneze (testováno na myších a kuřecích embryích *in vivo* a na endoteliálních buňkách *in vitro* (Hisa et al., 1998)).

### **2.5.3.1 Inhibice dimerní formy PKM2**

#### **Pyruvátkinasa M**

Jedním z mechanismu účinku šikoninu v nádorových buňkách je inhibice nádorové pyruvátkinasy (PKM2) (Chen et al., 2011). Pyruvátkinasa (E.C. 2.7.1.40) je enzym glykolytické dráhy, který přeměňuje fosfoenolpyruvát na pyruvát za vzniku ATP. Tento enzym má řadu isoform, přičemž u člověka jsou exprimovány isoenzymy pyruvátkinasa M (PKM), pyruvátkinasa L (PKL) a pyruvátkinasa R (PKR) (Mazurek, 2011). Pyruvátkinasa M se dále ještě dělí na dva typy - PKM1 a PKM2, kdy obě kinasy jsou kódovány genem *PKM*. Tento gen je tvořen 12 exony a 11 introny, přičemž jeho produkty PKM1 a PKM2 vznikají odlišným splicingem a liší se od sebe pouhými 23 aminokyselinami (Noguchi et al., 1986). PKM1 je exprimována především v mozku a svalech a PKM2 v určitých diferencovaných tkáních, proliferujících a embryonálních buňkách a převažuje u většiny nádorových buněk (Mazurek, 2011).

PKM2 se může vyskytovat v tetramerní nebo dimerní formě. Tetramerní forma má vysokou afinitu ke svému substrátu (fosfoenolpyruvátu) a je více exprimována v normálních buňkách. Za aerobních podmínek je v cytosolu normálních buněk fosfoenolpyruvát přeměněn při glykolýze na pyruvát a následně dekarboxylován na acetyl-CoA a oxid uhličitý pomocí pyruvát-dehydrogenázového komplexu. Acetyl-CoA poté vstupuje do citrátového cyklu, kde slouží především k tvorbě energie a redukovaných koenzymů. Elektrony získané z redukovaných koenzymů (FADH<sub>2</sub> a NADPH) jsou v dýchacím řetězci přenášeny přes proteinové komplexy až na kyslík za vzniku protonového gradientu a tvorby ATP. Při nedostatku kyslíku je ovšem z fosfoenolpyruvátu vzniklý pyruvát redukován na laktát pomocí laktátdehydrogenasy. Při tom dochází k regeneraci NAD<sup>+</sup>, který je dále opět využit v glykolýze (Eigenbrodt et Glossmann, 1980, Eigenbrodt et al., 1992, Mazurek et al., 2005; Mazurek et al., 2007).

## **Warburgův efekt**

Warburgův efekt neboli aerobní glykolýza je stav, kdy je buňkou upřednostňována glykolýza (a následná přeměna pyruvátu na laktát) před dekarboxylací pyruvátu na acetylkoenzym A (a následným vstupem acetylkoenzymu A do Krebsova cyklu a oxidativní fosforylaci). V normální buňce je glykolýza a přeměna pyruvátu na laktát za aerobních podmínek po většinu času inhibována a probíhá energeticky výhodnější buněčná respirace. Ovšem v nádorových a rychle proliferujících buňkách probíhá přednostně glykolýza i za aerobních podmínek (Warburg, 1956).

V nádorové buňce převažuje dimerní forma PKM2, která má menší afinitu k fosfoenolpyruvátu a nepřeměňuje ho na pyruvát (Eigenbrodt et Glossmann, 1980, Eigenbrodt et al., 1992, Mazurek et al., 2005; Mazurek et al., 2007). Tím dochází k hromadění meziproductů glykolýzy jako glukosa-6-fosfátu, fruktosa-6-fosfátu, glyceraldehyd-3-fosfátu a 3-fosfoglycerátu, které slouží jako základní stavební prvky pro syntézu nukleotidů, aminokyselin a fosfolipidů (Mazurek, 2011). Pokud má buňka dostatek stavebního materiálu, může se rychleji dělit a šířit, což je pro rakovinné buňky typické.

## **Ovlivnění formy PKM2**

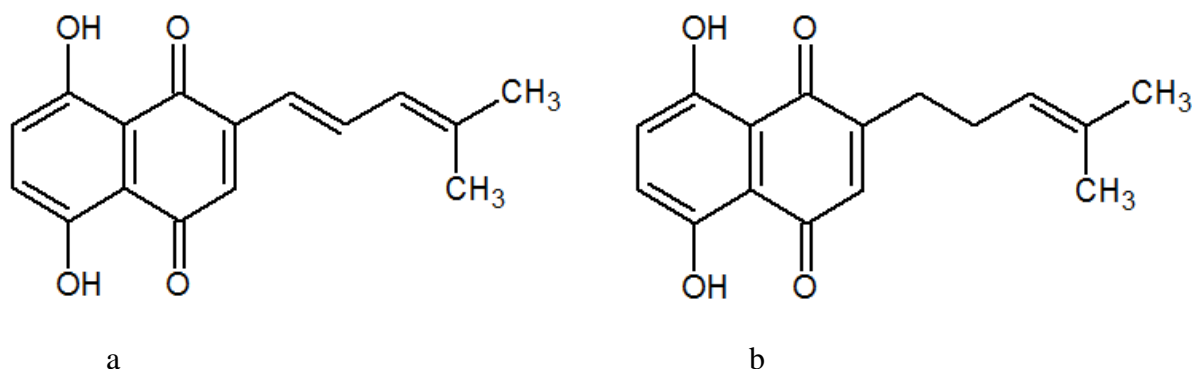
Poměr tetramerní a dimerní formy PKM2 není konstatní, je ovlivňován například množstvím fruktosa-1,6-bisfosfátu, některými aminokyselinami (serinem, cysteinem, alaninem, fenylalaninem, methioninem,...) (Mazurek, 2011), fosfotyrosinovými peptidy a vazbou onkoproteinů (např. onkoproteinem E7 lidského papiloma viru typu 16 (Mazurek et al., 2001), tumor supresorovým proteinem promyelocytické leukemie (Shimada et al., 2008)). Pokud je fruktosa-1,6-bisfosfátu nadbytek, tetramerní forma PKM2 přeměňuje fosfoenolpyruvát na pyruvát. Jakmile je však fruktosa-1,6-bisfosfát spotřebován, začne převažovat forma dimerní, která fosfoenolpyruvát na pyruvát nepřeměňuje. Proto opět dojde k nahromadění fruktosa-1,6-bisfosfátu, což aktivuje tetramerní formu PKM2 (Ashizawa et al., 1991; Dombrauckas et al., 2005). Vzhledem k tomu, že je dimerní forma PKM2 klíčová pro rychlé množení rakovinných buněk, její inhibice šikoninem vede k nedostatku glykolytických intermediátů a buňka na základě neschopnosti syntézy nových stavebních součástí umírá (Chen et al., 2011).

### 2.5.3.2 Inhibice nekroptosy

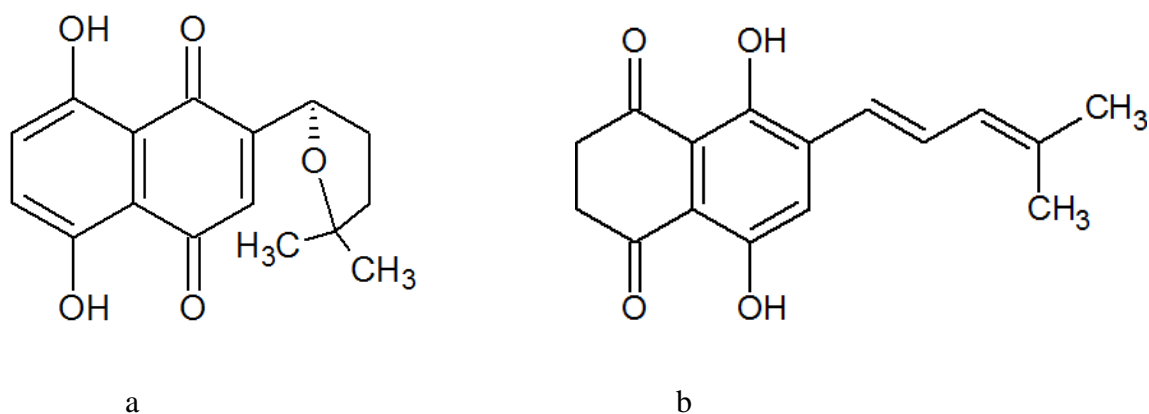
Zajímavým způsobem jak bojovat proti nádorovým buňkám je schopnost šikoninu vyvolávat nekroptickou smrt. Nekroptosa jako typ buněčné smrti byla poprvé popsána Alexeiem Degterevem v roce 2005. Vyznačuje se ztrátou celistvosti cytoplazmatické membrány, ztrátou membránového potenciálu mitochondrií, aktivací autofágie, zvýšeným množstvím reaktivních kyslíkových radikálů a typickou přítomností necrostatinu-1, který naopak chrání buňky před nekroptosou (Degterev et al., 2005). Mechanismus účinku většiny chemoterapeutik je založen na indukci apoptosy, bohužel nádorové buňky se po čase vůči tomuto účinku stávají resistantní. Specifická schopnost šikoninu indukovat nekroptickou smrt by mohla mít potenciál u nádorových buněk resistantních k léčbě chemoterapeutiky. Tím, že šikonin v rakoviných buňkách indukuje jinou než apoptickou smrt - nekroptosou, by mohl tuto resistenci obejít (Han et al., 2007).

### 2.5.4 Metabolizace šikoninu

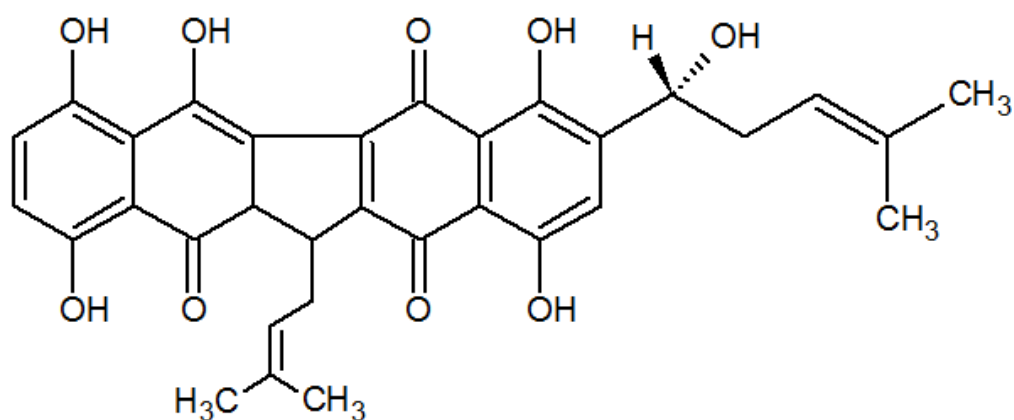
Metabolizace šikoninu není paradoxně zatím příliš prozkoumanou oblastí. Byla studována biotransformace šikoninu v lidských intestinálních bakteriích (Meselhy et al., 1994), *in vitro* metabolizace šikoninu na jaterních mikrozomech potkana (Li et al., 1999b) a *in vivo* metabolizace u živého potkana (Li et al., 1999a). Při experimentu s bakteriemi lidského střeva bylo stanoveno 10 metabolitů šikoninu, z toho 5 monomerů a 5 dimerů. Monomery byly označeny jako anhydroalkanin, deoxyšikonin, cyklošikonin a metabošikonin I a II, dimery jako šikometaboliny A, B, C, D a E (Meselhy et al., 1994).



Obrázek 15: Anhydroalkanin (a) a deoxyšikonin (b)



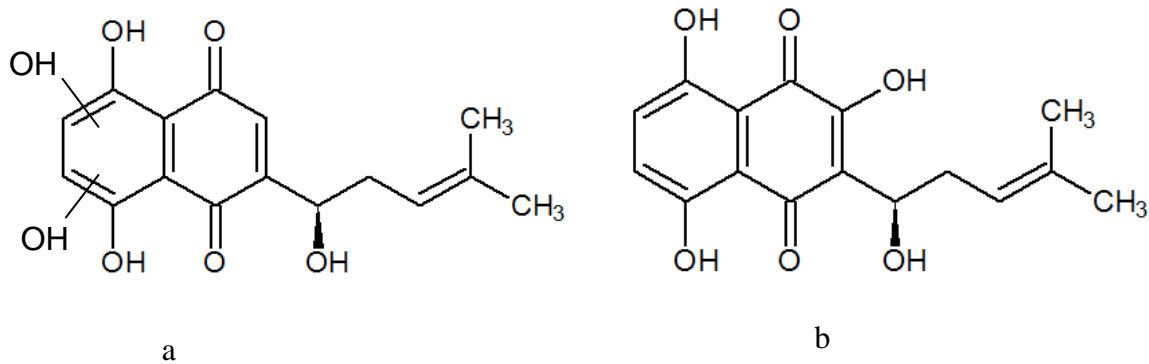
Obrázek 16: Cyklošikonin (a) a metabošikonin I (b)



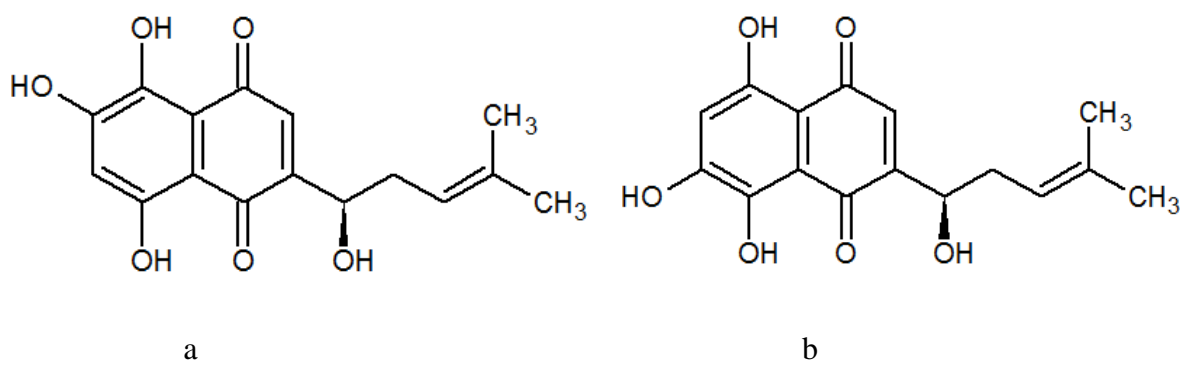
Obrázek 17: Šikometabolin A

V případě *in vitro* metabolizace byly stanoveny 3 metabolity - S-1, S-2 a S-3. S-1 byl dihydroxylovaný šikonin, S-2 2-OH šikonin a S-3 6-OH nebo 7-OH šikonin, přičemž hydroxylace probíhaly na naftochinonovém jádře a zvyšovaly polaritu šikoninu (Li et al., 1999b). *In vivo* metabolizace byla komplexnější, bylo stanoveno 10 metabolitů, z nichž čtyři sloučeniny odpovídaly sloučeninám nalezeným při *in vitro* metabolizaci - šikoninu, S-1, S-2 a S-3. U zbylých šesti sloučenin byla předpokládána hydroxylace v bočním řetězci šikoninu (Li et al., 1999a).





Obr. 18: S-1 šikonin (a) a S-2 šikonin (b)



Obrázek 19: S-3 šikonin: 6-OH (a) a 7-OH (b)

### 3 CÍL PRÁCE

Cílem této bakalářské práce je:

- zjištění vlivu experimentální látky 05-0777 na metabolom CEM buněčné linie (odvozené od T-lymfoblastické leukemie) s využitím necílené metabolomiky
- stanovení metabolitů, které nejvíce ovlivňovaly buněčný metabolom
- stanovení metabolitů, které se svým zastoupením („koncentrací“) nejvíce lišily u vzorků inkubovaných s derivátem chinolinonu a vzorků kontrolních
- přiblížení účinku (cíle působení) zmíněné látky

# 4 MATERIÁL A METODIKA

## 4.1 Buněčná kultura

- suspenzní buněčná linie CCRF-CEM (T-lymfoblastická leukemie)

## 4.2 Přístrojové vybavení

- váhy ABT 120-5DM (Kern, Německo)
- centrifuga Rotina 420R (Hettich Zentrifugen, Německo)
- vortex V1 plus (BioSan, Litva)
- lyofilizátor FreeZone (Labconco, USA)
- pipety (5 ml, 1 ml, 200  $\mu$ l) Eppendorf Research Plus (Eppendorf, Německo)
- kapalinová chromatografie UHPLC Dionex Ultimate 3000 RS (Thermo Scientific, USA)  
s kolonou Luna 3  $\mu$ m NH<sub>2</sub> 100A (150 x 2.00 mm) (Phenomenex, USA)
- hmotnostní spektrometr Orbitrap Elite (Thermo Scientific, USA)
- magnetická míchačka Intelli-Stirrer MSH-300i (BioSan, Litva)
- pH metr CyberScan 510 (Thermo Scientific, USA)

## 4.3 Chemikálie

- metanol - CH<sub>3</sub>OH (Sigma Aldrich, USA)
- LC-MS voda (Sigma Aldrich, USA)
- ammonium bikarbonát (AMBIC) - NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (Sigma Aldrich, USA)
- kyselina octová - CH<sub>3</sub>COOH (Sigma Aldrich, USA)
- hydroxid amonný - NH<sub>4</sub>OH (Sigma Aldrich, USA)
- acetonitril - CH<sub>3</sub>CN (Sigma Aldrich, USA)
- šikoinin - C<sub>16</sub>H<sub>16</sub>O<sub>5</sub> (Sigma Aldrich, USA)
- experimentální látka 05-0777 (derivát 3-hydroxy-2-fenyl-4(1*H*)-chinolinonu)
- tekutý dusík

## 4.4 Příprava roztoků

Quenchovací roztok (60% methanol s přidavkem ammonium bikarbonátu o koncentraci 8,5 g/l)

Pro přípravu 800 ml quenchovacího roztoku bylo naváženo 6,8 g ammonium bikarbonátu a toto množství bylo rozpuštěno ve 320 ml LC-MS vody. K roztoku bylo přidáno 480 ml metanolu a vše bylo promícháno. Výsledný roztok byl vytemperován na -80 °C.

80% metanol pro extrakci metabolitů

Pro přípravu 40 ml 80 % metanolu bylo smícháno 32 ml metanolu a 8 ml LC-MS vody. Roztok byl vytemperován na -80 °C.

50% metanol pro přípravu vzorku pro měření na LC-MS

Pro přípravu 10 ml 50% metanolu bylo smícháno 5 ml metanolu a 5 ml LC-MS vody.

Mobilní fáze pro kapalinovou chromatografii (20 mmol/l octan amonný)

Pro přípravu 500 ml mobilní fáze bylo smícháno 0,5 l LC-MS vody a 0,573 ml kyseliny octové. Roztok byl následně titrován hydroxidem amonným na pH 9,45.

## 4.5 Pracovní postup

Kultivace buněk

CEM buněčné linie byly připraveny a poskytnuty Mgr. Gabrielou Rylovou z Laboratoře experimentální medicíny (ÚMTM). Bylo připraveno 20 vzorků, každý o objemu 5 ml a koncentraci  $2 \times 10^6$  buněk/ml. Z toho byly 4 vzorky inkubovány s šikoninem (S1-S4), 4 kontroly šikoninu (buňky pouze s DMSO - dimethylsulfoxidem - SK1-SK4), 6 inkubováno s experimentální látkou 05-0777 (CH1-CH6) a 6 kontrol 05-0777 (buňky pouze s DMSO - CHK1-CHK6). Buňky byly 2 hodiny před inkubací s látkami zcentrifugovány a bylo jim vyměněno médium. Šikonin a látka 05-0777 byly přidávány k buňkám rozpuštěné v DMSO tak, aby výsledná koncentrace DMSO byla vždy 0,5 %. Buňky byly inkubovány s látkami poloviční dobu do apoptosy (buňky s šikoninem 4 hodiny, buňky s 05-0777 12 hodin) a koncentrace přidaných látek odpovídala  $1 \times IC_{50}$ , tedy koncentraci, která inhibuje růst poloviny buněk (u šikoninu 0,912  $\mu\text{mol/l}$ , u experimentální látky 05-0777 1,42  $\mu\text{mol/l}$ ).

#### Quenching buněk (Sellick et al., 2009)

Jednotlivé vzorky buněčných suspenzí (5 ml, 10 milionů buněk) byly přelity z kultivačních nádob do 50ml Falconových zkumavek a quenchovány pomocí 25 ml vytemperovaného quenchovacího roztoku. Buňky byly centrifugovány v chlazené centrifuze (4°C) při 1500 otáčkách (s poloměrem rotoru 184 mm, což se rovná 464 g) po dobu 5 minut. Supernatant byl slit a k peletu bylo přidáno 0,5 ml extrakčního 80% metanolu vytemperovaného na -80°C. Pelet byl resuspendován pomocí pipety v metanolu a rychle zchlazen v kapalném dusíku („snap-freezing“). Po rozmražení na ledu byly vzorky centrifugovány při 4000 otáčkách (3297 g) po dobu 5 minut. Supernatant (extrakt) byl slit do 15ml Falconových zkumavek. Celý extrakční postup byl ještě jednou zopakován a získaný supernatant byl přidán k předchozímu extraktu. Stejným způsobem byl zpracován vzorek „blank“ a médium. Blank obsahoval 30 ml quenchovacího roztoku a médium 5 ml DMSO bez buněk a 25 ml quenchovacího roztoku. Následně byly vzorky zlyofilizovány.

#### Příprava vzorku pro měření na LC-MS

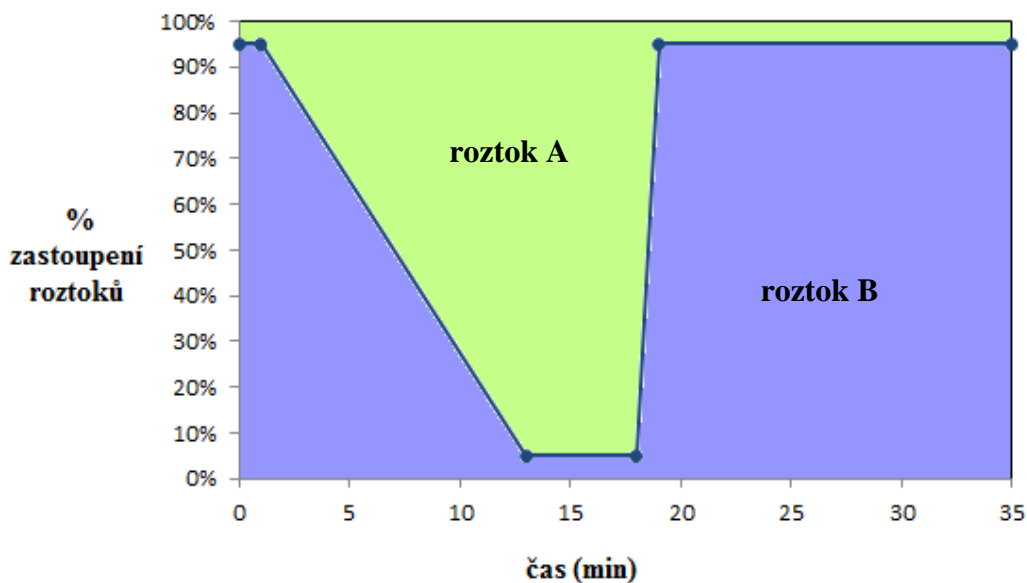
Lyofilizát byl pipetou resuspendován ve 100  $\mu$ l 50% metanolu a přepipetován do zkumavky eppendorf. Následně byl zcentrifugován při 12060 otáčkách (s poloměrem rotoru 97 mm - 15800 g) po dobu 15 minut. Supernatant z jednotlivých vzorků byl rozpipetován po 60  $\mu$ l do chromatografických vialek.

## **4.6 Nastavení přístrojů**

#### Kapalinová chromatografie (UHPLC)

Na separaci analytů byla použita metoda HILIC (hydrofilní interakční chromatografie) s využitím techniky gradientové eluce - mobilní fáze byla tvořena dvěma různými kapalinami, jejichž poměr se v čase měnil. Roztok A byl octan amonný (20 mmol/l), roztok B čistý acetonitril. Změna gradientu je znázorněna na Obr. 20. Od počátku separace do 1. minuty byl obsah roztoku B 95 % a obsah roztoku A 5 %. Od 1. do 13. minuty obsah roztoku B postupně klesal z 95 % až k 5 %, přičemž obsah roztoku A narůstal k 95 %. Od 13. do 18. minuty zůstaly poměry obou roztoků zachovány, od 18. do 19. minuty vzrostl obsah roztoku B opět

na 95 % a obsah roztoku A tak klesl na 5 %. Od 19. do 35. minuty zůstaly podmínky totožné, přičemž v čase 35 minut byla separace ukončena. Rychlost průtoku byla 0,3 ml za minutu.



Obr. 20: Gradient mobilní fáze

### Elektrosprejová ionizace (ESI)

Na elektrospreji byly nastaveny parametry viz Tab. 1.

Tab. 1: Nastavení elektrospreje

|                              |        |
|------------------------------|--------|
| teplota sprejovací kapiláry  | 300 °C |
| teplota transférové kapiláry | 350 °C |
| napětí spreje                | 3 kV   |
| průtok „sheath“ plynu        | 35 arb |
| průtok pomocného plynu       | 10 arb |
| průtok „sweep“ plynu         | 5 arb  |

### Hmotnostní spektrometr (Orbitrap Elite)

Na hmotnostním spektrometru bylo nastaveno rozlišení 120 000 FWHM, hmotnostní rozsah 70-1200  $m/z$ , měření v pozitivním módu, typ měření - plný sken a spektra byla ukládána v podobě profilových dat. Hmotnostní přesnost byla určena do 5,5 ppm.

## 4.7 Statistické vyhodnocování dat

Data byla vyhodnocena softwarem R (<http://www.r-project.org/> - 1. 4. 2013) s využitím softwarových nástaveb XCMS (pro detekci a „matching“ píků – Smith et al., 2006; Benton et al., 2010; Tautenhahn et al., 2008) a CAMERA (pro zjištění izotopů a aduktů - Kuhl et al., 2012). Byla provedena interpolace dat (Dunn et al., 2011) pro odstranění systémových chyb přístrojů a výpočet variačních koeficientů (podíl směrodatné odchylky a průměru - Miller et Miller, 2007). Analyty s variačním koeficientem nad 30 % byly z měření odstraněny a nulové (chybějící) hodnoty byly nahrazeny 2/3 z nejmenší hodnoty v rámci skupiny (šumem) (Wojtowicz et al., 2013). U naměřených analytů nebylo cílem zjistit jejich absolutní hodnoty, nýbrž poměry mezi nimi - data byla chápána jako kompoziční (Hron, 2010). Následně byla aplikována CLR transformace (centered logratio transformation - Aitchison, 1986) a centrování (odečtení průměrné hodnoty od všech jednotlivých hodnot objektů ze souboru dat - Gemperline, 2006) sloužící k seskupení dat. Grafickými výstupy statistické analýzy byly analýza hlavních komponent, diskriminační analýza a shluková analýza. Analýza hlavních komponent (PCA - principal component analysis) je matematická metoda, která slouží k redukci velkého množství dat jejich převedením do soustavy nízkého počtu hlavních komponent (proměnných) ale se zachováním původní velké variability (Wojtowicz et al., 2013; Miller et Miller, 2007). Shluková analýza (cluster analysis) třídí podobné objekty do skupin bez předchozího stanovení skupin či předurčení distribuce proměnných (Miller et Miller, 2007). Diskriminační analýza (DFA- discriminant functional analysis) také rozděluje objekty do skupin, ovšem tyto skupiny jsou předem dané a cílem je správně zařadit nové neznámé objekty do daných skupin podle určitého vzorce (Miller et Miller, 2007).

## 4.8 Identifikace detekovaných látek

Vybrané metabolity byly identifikovány na základě přesné hmoty (hodnot  $m/z$ ) s využitím webových databází METLIN (<http://metlin.scripps.edu/>), The Human Metabolome Database (<http://www.hmdb.ca/>) a LIPID MAPS (<http://www.lipidmaps.org/>).

## **5 VÝSLEDKY**

**NELZE ZVEŘEJNIT**



**NELZE ZVEŘEJNIT**

**NELZE ZVEŘEJNIT**

**NELZE ZVEŘEJNIT**

**NELZE ZVEŘEJNIT**

**NELZE ZVEŘEJNIT**

**NELZE ZVEŘEJNIT**

**NELZE ZVEŘEJNIT**

**NELZE ZVEŘEJNIT**



**NELZE ZVEŘEJNIT**

**NELZE ZVEŘEJNIT**

## **6 DISKUSE**

**NELZE ZVEŘEJNIT**

**NELZE ZVEŘEJNIT**

## **7 ZÁVĚR**

**NELZE ZVEŘEJNIT**

## 8 LITERATURA

- Aitchison, J. (1986) *The Statistical Analysis of Compositional Data*. Chapman & Hall, London.
- Arakawa, H., Nakazaki, M. (1961) Absolute Configuration of Shikonin and Alkannin. *Chemistry & Industry* 25, 947.
- Ardrey, R. E. (2003) *Liquid Chromatography - Mass spectrometry: An introduction*, pp 2, 3, 8, 10-12, 14-16. John Wiley & Sons Ltd, England.
- Ashizawa, K., Willingham, M. C., Liang, C. M., Cheng, S. Y. (1991) In vivo regulation of monomer-tetramer conversion of pyruvate kinase subtype M2 by glucose is mediated via fructose 1,6-bisphosphate. *The Journal of Biological Chemistry* 266, 16842-16846.
- Baker, M. (2011) Metabolomics: from small molecules to big ideas. *Nature Methods* 8, 117-121.
- Benton, H. P., Want, E. J., Ebbels, T. M. (2010) Correction of mass calibration gaps in liquid chromatography-mass spectrometry metabolomics data. *Bioinformatics* 26, 2488-2489.
- Berg, J. M., Tymoczko, J. L., Stryer, L. (2002) *Biochemistry, Fifth Edition*, pp 92, 196 (v elektronické podobě). W. H. Freeman, New York.
- Brockmann, H. (1936) Die Konstitution des Alkannins, Shikonins und Alkannans. *Justus Liebigs Annalen der Chemien* 521, 1-47.
- Brown, S. C., Kruppa, G., Dasseux, J. L. (2005) Metabolomics applications of FT-ICR mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews* 24, 223-231.
- D'Alessandro, A., Zolla, L. (2012) Metabolomics and cancer drug discovery: let the cells do the talking. *Drug Discovery Today* 17, 4-9.
- de Hoffman, E., Stroobant, V. (2007) *Mass spectrometry: Principles and Applications, Third Edition*, pp 4-5, 15-40, 42-61, 88-122, 159-164, 221. John Wiley and Sons, Ltd., England.

- Degterev, A., Huang, Z., Boyce, M., Li, Y., Jagtap, P., Mizushima, N., Cuny, G. D., Mitchison, T. J., Moskowitz, M. A., Yuan, J. (2005) Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. *Nature Chemical Biology* 1, 112-119.
- Dombrauckas, J. D., Santarsiero, B. D., Mesecar, A. D. (2005) Structural basis for tumor pyruvate kinase M2 allosteric regulation and catalysis. *Biochemistry* 44, 9417-9429.
- Dunn, W. B., Broadhurst, D., Begley, P., Zelena, E., Francis-McIntyre, S., Anderson, N., Brown, M., Knowles, J. D., Halsall, A., Haselden, J. N., Nicholls, A. W., Wilson, I. D., Kell, D. B., Goodacre, R. (2011) Procedures for large-scale metabolic profiling of serum and plasma using gas chromatography and liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Nature protocols* 6, 1060-1083.
- Eigenbrodt E., Glossmann, H. (1980) Glycolysis - one of the keys to cancer? *Trends in Pharmacological Sciences* 1, 240-245.
- Eigenbrodt, E., Reinacher, M., Scheefers-Borchel, U., Scheefers, H., Friis, R. (1992) Double role for pyruvate kinase type M2 in the expansion of phosphometabolite pools found in tumor cells. *Critical Reviews in Oncogenesis* 3, 91-115.
- Ekman, R., Silberring, J., Westman-Brinkmalm, A. M., Kraj A. (2009) *Mass Spectrometry: Instrumentation, Interpretation, and Applications*, pp 23-24, 26-27, 33-34, 35-37, 40-45, 49-55, 58-62, 107-108. A John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey.
- Fenn, J. B., Mann, M., Meng, C. K., Wong, S. F., Whitehouse, C. M. (1989) Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* 246, 64-71.
- Fujita, Y., Hara, Y., Suga, C., Morimoto, T. (1981) Production of shikonin derivatives by cell suspension cultures of *Lithospermum erythrorhizon*. *Plant Cell Reports* 1, 61-63.
- Fukui, H., Tsukada, M., Mizukami, H., Tabata, M. (1983) Formation of stereoisomeric mixtures of naphthoquinone derivatives in *Echium lycopsis* callus cultures. *Phytochemistry* 22, 453-456.
- Gall, L. N., Golikov, Y. K., Aleksandrov, M. L., Pechalina, Y. E., Holin, N. A. (1986) USSR Inventor's Certificate 1247973.

- Gemperline, P. (2006) *Practical Guide to Chemometrics, Second Edition*, pp 78. Taylor & Francis Group, Boca Raton, Florida.
- Gillig, K. J., Bluhm, B. K., Russell, D. H. (1996) Ion motion in a Fourier transform ion cyclotron resonance wire ion guide cell. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* 157, 129-147.
- Griffiths, J. (2008) A brief history of mass spectrometry. *Analytical Chemistry* 80, 5678-5683.
- Gross, J. H. (2004) *Mass spectrometry: A Textbook*, pp 113-131, 145-164, 453. Springer-Verlag, Heidelberg.
- Han, W., Li, L., Qiu, S., Lu, Q., Pan, Q., Gu, Y., Luo, J., Hu, X. (2007) Shikonin circumvents cancer drug resistance by induction of a necroptotic death. *Molecular Cancer Therapeutics* 6, 1641-1649.
- Hisa, T., Kimura, Y., Takada, K., Suzuki, F., Takigawa, M. (1998) Shikonin, an ingredient of *Lithospermum erythrorhizon*, inhibits angiogenesis in vivo and in vitro. *Anticancer Research* 18, 783-790.
- Hradil, P., Hlavac, J., Soural, M., Hajduch, M., Kolar, M., Vecerova, R. (2009) 3-Hydroxy-2-phenyl-4(1H)-quinolinones as promising biologically active compounds. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* 9, 696-702.
- Hron, K. (2010) Elementy statistické analýzy kompozičních dat. *Informační Bulletin ČStS* 21, 41-48.
- Hu, Q., Noll, R. J., Li, H., Makarov, A., Hardman, M., Graham Cooks, R. (2005) The Orbitrap: a new mass spectrometer. *Journal of Mass Spectrometry* 40, 430-443.
- Hyatt, R., Feldmann, R. (1978) *Chinese herbal medicine: ancient art and modern science*. Schocken Books, New York, 17-28.
- Chen, J., Xie, J., Jiang, Z., Wang, B., Wang, Y., Hu, X. (2011) Shikonin and its analogs inhibit cancer cell glycolysis by targeting tumor pyruvate kinase-M2. *Oncogene* 30, 4297-4306.



- Karas, M., Bachmann, D., Bahr, U., Hillenkamp, F. (1987) Matrix-assisted ultraviolet laser desorption of non-volatile compounds. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* 78, 53–68.
- Kell, D. B. (2006) Systems biology, metabolic modelling and metabolomics in drug discovery and development. *Drug Discovery Today* 11, 1085-1092.
- Kingdon, K. H. (1923) A method for the neutralization of electron space charge by positive ionization at very low gas pressures. *Physical Review* 21, 408-418.
- Knight, R. D. (1981) Storage of ions from laser-produced plasmas. *Applied Physics Letters* 38, 221-223.
- Koulman, A., Woffendin, G., Narayana, V. K., Welchman, H., Crone, C., Volmer, D. A. (2009) High-resolution extracted ion chromatography, a new tool for metabolomics and lipidomics using a second-generation orbitrap mass spectrometer. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 23, 1411-1418.
- Kuhl, C., Tautenhahn, R., Bottcher, C., Larson, T. R., Neumann, S. (2012) CAMERA: an integrated strategy for compound spectra extraction and annotation of liquid chromatography/mass spectrometry data sets. *Analytical Chemistry* 84, 283-289.
- Lei, Z., Huhman, D. V., Sumner, L. W. (2011) Mass spectrometry strategies in metabolomics. *The Journal of Biological Chemistry* 286, 25435-25442.
- Li, H. Y., Luo, S. R., Zhou, T. H. (1999a) Metabolism of shikonin in rats. *Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences* 8, 148-151.
- Li, H. Y., Luo, S. R., Zhou, T. H. (1999b) Studies on in vitro metabolism of shikonin. *Phytotherapy Research* 13, 236-238.
- Majima, R., Kuroda, C. (1922) Studies on the derivatives of naphthoquinones. *Acta Phytochem* XIII, 43 - 65.
- Makarov, A. (1999) U.S. Patent 5,886,346.
- Makarov, A. (2000) Electrostatic axially harmonic orbital trapping: a high-performance technique of mass analysis. *Analytical Chemistry* 72, 1156-1162.

- Makarov, A., Denisov, E., Kholomeev, A., Balschun, W., Lange, O., Strupat, K., Horning, S. (2006) Performance evaluation of a hybrid linear ion trap/orbitrap mass spectrometer. *Analytical Chemistry* 78, 2113-2120.
- Makarov, A., Scigelova, M. (2010) Coupling liquid chromatography to Orbitrap mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1217, 3938-3945.
- Marshall, A. G., Verdun, F. R. (1990) *Fourier transforms in nmr, optical, and mass spectrometry: a user's handbook*. Elsevier, Amsterdam, 450.
- Mazurek, S. (2011) Pyruvate kinase type M2: a key regulator of the metabolic budget system in tumor cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 43, 969-980.
- Mazurek, S., Boschek, C. B., Hugo, F., Eigenbrodt, E. (2005) Pyruvate kinase type M2 and its role in tumor growth and spreading. *Seminars in Cancer Biology* 15, 300-308.
- Mazurek, S., Drexler, H. C., Troppmair, J., Eigenbrodt, E., Rapp, U. R. (2007) Regulation of pyruvate kinase type M2 by A-Raf: a possible glycolytic stop or go mechanism. *Anticancer Research* 27, 3963-3971.
- Mazurek, S., Zwerschke, W., Jansen-Durr, P., Eigenbrodt, E. (2001) Effects of the human papilloma virus HPV-16 E7 oncoprotein on glycolysis and glutaminolysis: role of pyruvate kinase type M2 and the glycolytic-enzyme complex. *Biochemical Journal* 356, 247-256.
- McAlister, G. C., Berggren, W. T., Griep-Raming, J., Horning, S., Makarov, A., Phanstiel, D., Stafford, G., Swaney, D. L., Syka, J. E., Zabrouskov, V., Coon, J. J. (2008) A proteomics grade electron transfer dissociation-enabled hybrid linear ion trap - orbitrap mass spectrometer. *Journal of Proteome Research* 7, 3127-3136.
- Meselhy, M. R., Kadota, S., Tsubono, K., Hattori, M., Namba, T. (1994) Biotransformation of shikonin by human intestinal bacteria. *Tetrahedron* 50, 3081-3098.
- Miller, J. N., Miller, J. C. (2005) *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*, Fifth Edition, pp 20, 215, 220, 223. Pearson education limited, Essex, England.

- Noguchi, T., Inoue, H., Tanaka, T. (1986) The M1- and M2-type isozymes of rat pyruvate kinase are produced from the same gene by alternative RNA splicing. *The Journal of Biological Chemistry* 261, 13807-13812.
- Olsen, J. V., de Godoy, L. M., Li, G., Macek, B., Mortensen, P., Pesch, R., Makarov, A., Lange, O., Horning, S., Mann, M. (2005). Parts per million mass accuracy on an Orbitrap mass spectrometer via lock mass injection into a C-trap. *Molecular & Cellular Proteomics* 4, 2010-2021.
- Papageorgiou, V. P., Assimopoulou, A. N., Couladouros, E. A., Hepworth, D., Nicolaou, K. C. (1999) The chemistry and biology of alkannin, shikonin, and related naphthazarin natural products. *Angewandte Chemie-International Edition* 38, 270-301.
- Patti, G. J., Yanes, O., Siuzdak, G. (2012) Metabolomics: the apogee of the omics trilogy. *Nature Reviews* 13, 263-269.
- Rayleigh, L. (1879) On the capillary phenomena of jets. *Proceedings of the Royal Society* 29, 71-97.
- Read, B. E., Ju-ch'iang, L. (1936) Chinese Medicinal Plants from the Pen-Ts'ao Kang Mu, 1596 A.D. *Peking Natural History Bulletin*, Peking, 38.
- Roos, W. P., Kaina, B. (2006) DNA damage-induced cell death by apoptosis. *Trends in Molecular Medicine* 12, 440-450.
- Sasaki, K., Abe, H., Yoshizaki, F. (2002) In vitro antifungal activity of naphthoquinone derivatives. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 25, 669-670.
- Sellick, C. A., Hansen, R., Maqsood, A. R., Dunn, W. B., Stephens, G. M., Goodacre, R., Dickson, A. J. (2009) Effective quenching processes for physiologically valid metabolite profiling of suspension cultured mammalian cells. *Analytical Chemistry* 81, 174-183.
- Senko, M. W., Canterbury, J. D., Guan, S., Marshall, A. G. (1996) A high-performance modular data system for Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 10, 1839-1844.

- Shimada, N., Shinagawa, T., Ishii, S. (2008) Modulation of M2-type pyruvate kinase activity by the cytoplasmic PML tumor suppressor protein. *Genes to Cells* 13, 245-254.
- Schmid, D. G., Grosche, P., Bandel, H., Jung, G. (2000) FTICR-mass spectrometry for high-resolution analysis in combinatorial chemistry. *Biotechnology and Bioengineering* 71, 149-161.
- Smith, C. A., O'Maille, G., Want, E. J., Qin, C., Trauger, S. A., Brandon, T. R., Custodio, D. E., Abagyan, R., Siuzdak, G. (2005) METLIN: a metabolite mass spectral database. *Therapeutic Drug Monitoring* 27, 747-751.
- Smith, C. A., Want, E. J., O'Maille, G., Abagyan, R., Siuzdak, G. (2006) XCMS: processing mass spectrometry data for metabolite profiling using nonlinear peak alignment, matching, and identification. *Analytical Chemistry* 78, 779-787.
- Snyder, L. R., Kirkland, J. J., Dolan, J. W. (2010) Introduction to Modern Liquid Chromatography, pp 3, 22, 363, 395-396. A John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey.
- Soural, M., Krchnak, V. (2007) Efficient solid-phase synthesis of 2-substituted-3-hydroxy-4(1H)-quinolinone-7-carboxamides with two diversity positions. *Journal of Combinatorial Chemistry* 9, 793-796.
- Sud, M., Fahy, E., Cotter, D., Brown, A., Dennis, E. A., Glass, C. K., Merrill, A. H., Jr., Murphy, R. C., Raetz, C. R., Russell, D. W., Subramaniam, S. (2007) LMSD: LIPID MAPS structure database. *Nucleic Acids Research* 35, D527-532.
- Tabata, M., Mizukami, H., Hiraoka, N., Konoshima, M. (1974) Pigment formation in callus cultures of *Lithospermum erythrorhizon*. *Phytochemistry* 13, 927-932.
- Tanaka, K., Waki, H., Ido, Y., Akita, S., Yoshida, Y., Yoshida, T. (1988) Protein and Polymer Analyses up to  $m/z$  100,000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2, 151-153.
- Tanaka, S., Tajima, M., Tsukada, M., Tabata, M. (1986) A comparative study on anti-inflammatory activities of the enantiomers, shikonin and alkannin. *Journal of Natural Products* 49, 466-469.

- Tautenhahn, R., Bottcher, C., Neumann, S. (2008) Highly sensitive feature detection for high resolution LC/MS. *BMC Bioinformatics* 9, 504.
- Taylor, G. (1964) Disintegration of water drops in an electric field. *Proceedings of the Royal Society A* 280, 383-397.
- Thermo Fisher Scientific (2008) HESI-II Probe User Guide (70005-97000 Revision B).
- Thermo Fisher Scientific (2011) Orbitrap Elite Hardware Manual (P/N 1288170, Revision A).
- Thomson, J. J. (1897) "Cathode Rays". *The Electrician* 39, 104.
- Wang, R. B., Guo, H., Cui, J. H., Li, S. S. (2012) A novel and efficient total synthesis of shikonin. *Tetrahedron Letters* 53, 3977-3980.
- Warburg, O. (1956) On the origin of cancer cells. *Science* 123, 309–314.
- Wiench, B., Eichhorn, T., Paulsen, M., Efferth, T. (2012) Shikonin directly targets mitochondria and causes mitochondrial dysfunction in cancer cells. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2012, 1-15.
- Wishart, D. S., Knox, C., Guo, A. C., Eisner, R., Young, N., Gautam, B., Hau, D. D., Psychogios, N., Dong, E., Bouatra, S., Mandal, R., Sinelnikov, I., Xia, J., Jia, L., Cruz, J. A., Lim, E., Sobsey, C. A., Shrivastava, S., Huang, P., Liu, P., Fang, L., Peng, J., Fradette, R., Cheng, D., Tzur, D., Clements, M., Lewis, A., De Souza, A., Zuniga, A., Dawe, M., Xiong, Y., Clive, D., Greiner, R., Nazyrova, A., Shaykhutdinov, R., Li, L., Vogel, H. J., Forsythe, I. (2009) HMDB: a knowledgebase for the human metabolome. *Nucleic Acids Research* 37, D603-610.
- Wojtowicz, P., Janečková, H., Friedecký, D., Adam, T. (2013) Techniky metabolomiky v biomedicíně. *Chemické listy* 107, 3-11.
- Yingkun, N., Lvsong, Z., Huimin, Y. (2010) Shikonin inhibits the proliferation and induces the apoptosis of human HepG2 cells. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 88, 1138-1146.
- Zhang, J. H., Xu, M. (2000) DNA fragmentation in apoptosis. *Cell Research* 10, 205-211.

Zhao, L. M., Xu, D. F., Zhou, W., Li, S. S. (2008) Concise formal synthesis of (+/-)-shikonin via a highly alpha-regioselective prenylation of 1,4,5,8-tetramethoxynaphthalene-2-carbaldehyde. Letters in Organic Chemistry 5, 234-236.

### **Seznam hypertextových odkazů:**

<http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Maldi.png>

[http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Quadrupole\\_en.gif](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Quadrupole_en.gif)

<http://en.wikipedia.org/wiki/File:Orbitrappe.png>

<http://metlin.scripps.edu/>

<http://molbiol.ru/forums/uploads/a002/b044/post-12526-1286109053.jpg->

<http://planetorbitrap.com/orbitrap-elite#tab:schematic>

<http://www.hmdb.ca/>

<http://www.lipidmaps.org/>

## 9 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ADP - adenosindifosfát

acetylCoA - acetylkoenzym A

AMBIC - ammonium bikarbonát

APCI - atmospheric pressure chemical ionization (chemická ionizace za atmosférického tlaku)

API - atmospheric pressure ionization (ionizace za atmosférického tlaku)

APPI - atmospheric pressure photoionization (fotoionizace za atmosférického tlaku)

ATP - adenosintrifosfát

CI - chemical ionization (chemická ionizace)

DC - direct current (stejnoseměrný elektrický proud)

DFA - discriminant functional analysis (diskriminační analýza)

DMSO - dimethylsulfoxid

DNA - deoxyribonukleotidová kyselina

EI - electron ionization (elektronová ionizace)

ESI - electrospray ionization (elektrosprejová ionizace)

FAB - fast atom bombardment (ionizace urychlenými atomy)

FADH<sub>2</sub> - redukovaný flavinadenin dinukleotid

FD - field desorption (desorpce polem)

FI - field ionization (ionizace polem)

FT-ICR - Fourier transform ion cyclotron resonance (iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací)

FWHM - full width at half maximum (šířka píku v polovině jeho maximální výšky)

H-ESI - heated electrospray ionization (ionizace vyhříváním elektrosprejem)

HCD - higher-energy collision dissociation (vysokoenergetická kolizní disociace)

HILIC - hydrophilic interaction liquid chromatography (hydrofilní interakční chromatografie)

HPLC - high performance liquid chromatography (vysokoučinná kapalinová chromatografie)

LC-MS - liquid chromatography coupled with mass spectrometry (kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií)

LD - laser desorption (desorpce laserem)

MALDI - matrix-assisted laser desorption ionization (matricí asistovaná laserová desorpce/ionizace)

MS - mass spectrometry (hmotnostní spektrometrie)

$m/z$  - poměr hmotnosti a náboje

NAD<sup>+</sup> - nikotinamidadeninukleotid

NADPH - redukovaný nikotinamidadeninukleotidfosfát

Nano-ESI - nano electrospray ionization (nanosprejová ionizace)

PD - plasma desorption (desorpce plasmou)

PCA - principal component analysis (analýza hlavních komponent)

PKL - pyruvátkinasa L

*PKM* - gen pro pyruvátkinasu M

PKM - pyruvátkinasa M



PKM1 - pyruvátkinasa M1

PKM2 - pyruvátkinasa M2

PKR - pyruvátkinasa R

ppm - parts per million

RP-HPLC - reversed phase high performance liquid chromatography (vysokoučinná chromatografie v reverzní fázi)

QqQ - triple quadrupole (trojitý kvadrupól)

RF - radiofrequency (v MS vysokofrekvenční střídavé napětí)

RMS - root mean square (odmocnina průměru čtverců)

TOF - time-of-flight (analyzátor doby letu)

UHPLC - ultra high performance liquid chromatography (vysokotlaká kapalinová chromatografie)

UV - ultraviolet (ultrafialové záření)

2D, 3D - 2 dimenze, 3 dimenze