

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Vliv kancerostatik na intracelulární metabolom

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Barbora Halířová
Studijní program:	N1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Hana Janečková
Konzultant práce:	RNDr. David Friedecký, Ph.D.
Termín odevzdání práce:	2. 5. 2013

Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou práci vypracovala samostatně za použití citované literatury.

V Olomouci dne 2. 5. 2013

.....

Ráda bych tímto poděkovala všem pracovníkům Laboratoře dědičných metabolických poruch a Laboratoře metabolomiky v Olomouci za veškerou pomoc při vypracování této diplomové práce. Mé poděkování patří především Mgr. Haně Janečkové a RNDr. Davidu Friedeckému, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, trpělivost, ochotu a připomínky k mé práci. Chtěla bych také poděkovat Mgr. Gabriele Rylové za poskytnutí buněčného biologického materiálu, RNDr. Janě Tomkové, Ph.D. a Mgr. Petru Wojtowiczovi za pomoc při analýze vzorků, Mgr. Alžbětě Kalivodové za pomoc při statistickém zpracování dat a doc. RNDr. Tomáši Adamovi, Ph.D. za poskytnuté konzultace.

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

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora	Bc. Barbora Halířová
Název práce	Vliv kancerostatik na intracelulární metabolom
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Laboratoř metabolomiky, Ústav molekulární a translační medicíny, UP Olomouc
Vedoucí práce	Mgr. Hana Janečková
Rok obhajoby práce	2013
Abstrakt	<p>Rakovina je v dnešní době velice častou příčinou úmrtí, proto je snaha naleznout nová protinádorová léčiva. Jedním z nich je přírodní naftochinon shikonin, který je hlavní složkou červeného pigmentu extrahovaného z kořenů rostliny <i>Lithospermum erythrorhizon</i>. Biologické aplikace shikoninu jsou velice rozsáhlé, jednou z vlastností je také protinádorová aktivita.</p> <p>Cílem práce bylo sledovat vliv látek s potenciálním protirakovinným účinkem (shikonin, látka 05-0777) na metabolismus rakovinných buněk (T lymfoblastická leukemie, linie CCRF-CEM). K tomuto účelu byla použita kapalinová chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií a dvoudimenzionální plynová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií. Data byla statisticky zpracována. Vlivem studovaných látek byly pozorovány změny v metabolismu, především v hladinách nukleotidů, cukerných složek, aminokyselin, organických kyselin. Dále bylo provedeno srovnání použitých analytických metod.</p>
Klíčová slova	Rakovina, shikonin, metabolomika, pyruvátkinasa
Počet stran	101
Počet příloh	2
Jazyk	Český

Bibliographical identification:

Autor's first name and surname	Bc. Barbora Halířová
Title	Effect of cancerostatics on intracelular metabolome
Type of thesis	Master
Department	Laboratory of Metabolomics, Institute of Molecular and Translational Medicine, Palacký University Olomouc
Supervisor	Mgr. Hana Janečková
The year of presentation	2013
Abstrakt	<p>Nowadays cancer is a very common cause of death, therefore effort is to find new anticancer drugs. One of them is natural naphthoquinone shikonin, which is the main component of red pigment extracted from roots of <i>Lithospermum erythrorhizon</i>. Biological applications of shikonin are very large, one of the characteristics is also antitumor activity.</p> <p>The aim was to study the influence of compounds with potential anticancer effect (shikonin, substance 05-0777) on the metabolism of cancer cells (T lymphoblastic leukemia, line CCRF-CEM). For this purpose liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry and two-dimensional gas chromatography coupled with mass spectrometry were used. Data were statistically processed. Changes in metabolism were observed under effect of studied compounds, particularly in levels of nucleotides, sugar components, amino acids and organic acids, respectively. In addition, a comparison of used analytical methods was performed.</p>
Keywords	Cancer, shikonin, metabolomics, pyruvate kinase
Number of pages	101
Number of appendices	2
Language	Czech

OBSAH

Cíle práce:	8
Teoretická část	9
1. Rakovina	10
1.1. Vznik nádorového onemocnění	10
1.1.1. Fáze kancerogeneze	10
1.1.2. Vnější kancerogenní faktory	11
1.2. Mechanismy vzniku nádorů	11
1.2.1. Vlastnosti DNA	11
1.2.2. Klíčové geny nádorové transformace.....	11
1.2.3. Protoonkogeny a onkogeny	12
1.2.4. Nádorové supresorové geny.....	14
1.2.5. Geny regulující apoptózu.....	14
1.3. Léčba nádorových onemocnění.....	15
1.3.1. Chirurgická léčba.....	15
1.3.2. Radioterapie	16
1.3.3. Chemoterapie.....	16
2. Shikonin	18
2.1. Produkce shikoninu	19
2.1.1. Produkce shikoninu z rostlinných tkáňových kultur	19
2.1.2. Biosyntéza shikoninu.....	20
2.1.3. Organická syntéza shikoninu	21
2.2. Biologická aktivita shikoninu	21
2.2.1. Protirakovinná aktivita shikoninu.....	21
3. Metabolomika	27
3.1. Metabolismus	27
3.1.1. Metabolické dráhy	27
3.1.2. Metabolismus rakovinných buněk.....	28
3.2. Metabolom	29
3.3. Strategie metabolomického výzkumu	30
3.4. Příprava vzorků pro metabolomickou analýzu	31
3.5. Metabolomické databáze.....	35

4.	<i>Analytické přístupy</i>	36
4.1.	Kapalinová chromatografie	36
4.2.	Plynová chromatografie.....	38
4.2.1.	Dvoudimenzionální plynová chromatografie	38
4.3.	Hmotnostní spektrometrie	39
4.2.2.	Tandemová hmotnostní spektrometrie.....	41
	<i>Praktická část</i>	42
5.	<i>Materiál a metody</i>	43
5.1.	Chemikálie	43
5.2.	Přístroje.....	43
5.3.	Biologický materiál	43
5.3.1.	Quenching a extrakce buněk	44
5.3.2.	Zpracování vzorků pro LC-MS/MS analýzu.....	44
5.3.3.	Zpracování vzorků pro GC×GC-TOF MS analýzu.....	44
5.4.	LC-MS/MS analýza	44
5.5.	GC×GC-TOF MS analýza.....	46
5.6.	Statistické zpracování dat.....	46
6.	<i>Výsledky</i>	48
6.1.	Identifikace metabolitů.....	48
6.2.	Statistické vyhodnocení.....	64
6.2.1.	Vliv shikoninu	64
6.2.2.	Vliv látky 05-0777	72
6.3.	Profily vybraných metabolitů.....	79
6.4.	Metabolické mapy	83
6.5.	Srovnání LC-MS/MS a GC×GC-TOF MS	83
7.	<i>Diskuze</i>	85
8.	<i>Závěr</i>	87
9.	<i>Použitá literatura</i>	88
10.	<i>Seznam použitých zkratk</i>	95
11.	<i>Seznam příloh</i>	101

Cíle práce:

- Zpracování literární rešerše na téma rakovina, shikonin, metabolomika a analytické přístupy
- Plánování a provedení experimentu - inkubace vybrané buněčné kultury (CEM) s kancerostatikem (Shikonin, 05-0777)
- Zpracování buněčné kultury
- Metabolomická analýza pomocí kapalinové chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií (LC-MS/MS) a dvoudimenzionální plynové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií (GC×GC-TOF MS)
- Vyhodnocení dat - sledování změn v metabolismu po vystavení buněk kancerostatiku

Teoretická část

1. Rakovina

Nádorová onemocnění, respektive rakovina, jsou v dnešní době velice častou příčinou úmrtí. V roce 2008 bylo odhadováno ve světě asi 12,7 milionů případů rakoviny a 7,6 milionu úmrtí. U žen je nejčastějším typem rakovina prsu, u mužů rakovina plic (Jemal et al., 2011).

Jedná se o skupinu nemocí vyznačující se nekoordinovaným dělením a růstem abnormálních buněk (Petruželka et al., 2003). Proliferace a růst těchto abnormálních buněk má za následek vznik masy tkáně, která je považována za nádor, někdy označován jako neoplazma. Pokud se neoplastické buňky nestanou invazivními, je nádor označován jako benigní (nezhoubný). Odstranění této masy tkáně vede většinou ke kompletnímu vyléčení. Naopak pokud je nádor maligní (zhoubný), tumorové buňky mají schopnost napadat okolní tkáně. Právě tato invazivita je esenciálním znakem rakovinných buněk, které jsou schopné oddělit se od primárního nádoru a krví nebo lymfatickým systémem mohou být transportovány do dalších částí těla a vytvořit sekundární nádor neboli metastázi (Alberts et al., 2008). Můžeme rozlišit několik typů metastazování. U lokálního metastazování dochází k šíření rakovinných buněk pouze do nejbližšího okolí nádoru. Solitární metastazování je označení pro jedinou metastázi v celém těle. Histohomologní typ je metastazování do stejného orgánu a u pozdního metastazování se nádor objevuje až po době latence (Koutecký et al., 1989). Maligní nádory jsou klasifikovány podle výchozí tkáně nebo typu buněk, ze kterých vznikly. Jedná se o sarkomy, což jsou zhoubné nádory pojivové tkáně a svalových buněk, karcinomy vznikající z epiteliálních buněk, leukemie a lymfomy vycházející z krve a lymfatické tkáně a další méně často se vyskytující typy nádorů (Alberts et al., 2008).

1.1. Vznik nádorového onemocnění

1.1.1. Fáze kancerogeneze

Proces kancerogeneze (vznik nádoru) je výsledkem působení vnitřních i vnějších faktorů. Vznik a vývoj nádorového onemocnění můžeme rozdělit do tří hlavních fází. Jedná se o iniciaci, promoci a progresi. Ve fázi iniciace vzniká první genetická změna přenášená na potomstvo původní změněné buňky. Tato změna může být podkladem k nádorové transformaci. Během promoce dochází k celé řadě dalších změn, jejichž výsledkem je nekontrolovaně proliferující buněčný klon. Změny genetické informace v této fázi kancerogeneze vedou k nezvratnému rozvoji nádorového bujení. Progrese je konečná fáze, která nastává díky genetické nestabilitě a aktivaci dalších genů vedoucích k malignímu neregulovanému chování buněk a ke kompletnímu rozvoji nádorového onemocnění (Petruželka et al., 2003).

1.1.2. Vnější kancerogenní faktory

Pojmem kancerogen se rozumí látka nebo faktor, který vyvolává zhoubné bujení. Mezi fyzikální faktory způsobující vznik rakoviny se řadí především ultrafialová část slunečního záření v rozmezí vlnových délek 290 až 320 nm a ionizační záření. Do skupiny chemických kancerogenních faktorů spadá celá řada chemických látek, jedná se například o polycyklické aromatické uhlovodíky (3,4-benzpyren; 3-methylcholantren), nitrosaminy, aromatické aminy (2-naftylamin; benzidin), benzen, vinylchlorid, dichlordifenyltrichlorethan (DDT), anorganické látky obsahující prvky jako arsen, nikl, chrom a další. Také v přírodě se můžeme setkat s látkami, které mají kancerogenní účinky. Jde například o mykotoxiny vznikající v plísniích. Z tohoto pohledu mají největší význam aflatoxiny produkované plísní *Aspergillus flavus*. Biologické faktory zahrnují širokou škálu virů, z nichž lze uvést virus Epstein-Barrové, *herpes simplex virus 2*, retroviry a další (Koutecký et al., 1989).

1.2. Mechanismy vzniku nádorů

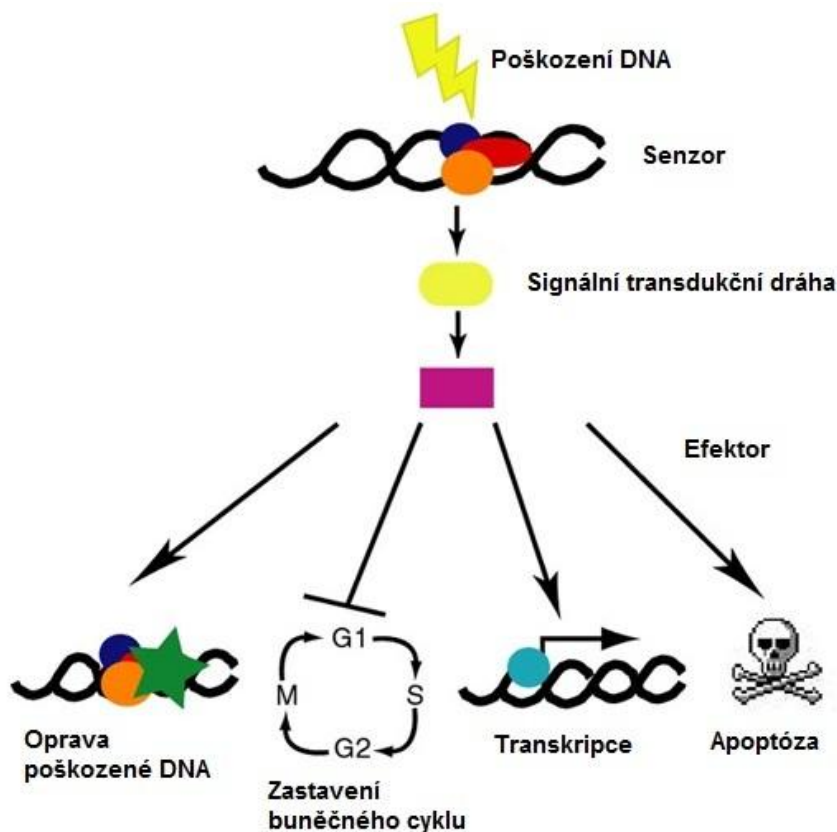
1.2.1. Vlastnosti DNA

K transformaci normální buňky na buňku nádorovou dochází v důsledku změn genetické informace uložené v deoxyribonukleotidové kyselině (DNA) (Petruželka et al., 2003). DNA se skládá ze tří složek – dusíkaté báze (purinové a pyrimidinové), sacharidu (2-deoxy-*D*-ribosa) a kyseliny fosforečné. Funkce DNA vyplývá z její struktury. Základem je primární struktura, která je dána pořadím nukleotidových zbytků a její pevnost je určena pevností kovalentních vazeb. Důležitým faktem je vysoká stabilita diesterových vazeb fosfátu v DNA vůči hydrolýze. Sekundární strukturu DNA vyřešili v roce 1953 Watson a Crick, jejichž model vychází z principu komplementarity. Na jeho základě se párují báze adenin s thyminem pomocí dvou vodíkových vazeb a cytosin s guaninem pomocí tří vodíkových vazeb (Šípal et al., 1992).

1.2.2. Klíčové geny nádorové transformace

Konkrétní úseky DNA se označují jako geny. Ty nesou genetickou informaci nezbytnou pro tvorbu proteinů, které umožňují nejen stavbu buňky, ale jsou důležité i pro řízení životních buněčných pochodů. Klíčové geny, jejichž poškození má za následek nádorovou transformaci, dělíme do tří základních skupin – onkogeny (respektive protoonkogeny), tumor supresorové geny (antionkogeny) a geny regulující apoptózu (vysoce kontrolovaný proces umožňující eliminaci abnormálních, nefunkčních nebo potenciálně nebezpečných buněk). Kromě těchto základních genů, které se podílí

na regulaci vzniku a zániku buněk hrají v procesu kancerogeneze velice důležitou roli tzv. reparační geny, jež kódují proteiny, které se vyznačují schopností opravovat změny v poškozené DNA („Obr. 1“) (Petruželka et al., 2003; Alberts et al., 2008).



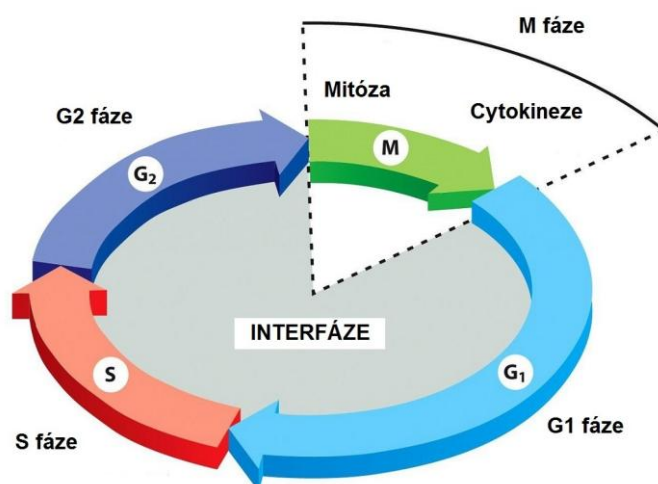
Obr. 1: Důsledky poškození DNA

Ačkoliv je DNA nositelkou genetické informace a je poměrně stabilní, působením vnitřních či vnějších faktorů může dojít k jejímu poškození. Toto poškození je rozpoznáno senzory a dojde ke spuštění signální transdukční dráhy. Následkem je tvorba efektorů, čímž buňka rozhodne, jak na dané poškození DNA zareaguje. Pomocí reparačních mechanismů může dojít k opravě poškozené DNA nebo se zastaví buněčný cyklus, případně proběhne transkripce i přes dané poškození. Poslední možností je aktivace procesu apoptózy (upraveno dle Zhou & Elledge, 2000).

1.2.3. Protoonkogeny a onkogeny

Pojmem protoonkogen se označuje strukturální gen eukaryotické buňky kódující protein, který se podílí na regulaci dělení a diferenciaci buněk. Výskyt protoonkogenů v buňce je jedním z předpokladů jejího normálního růstu, dělení a diferenciace. Onkogen vznikající z protoonkogenu způsobuje nádorovou transformaci buňky. Jeho transkripce a následná translace vede ke vzniku onkoproteinů. Pro pochopení funkce

protoonkogenů je nezbytné znát průběh proliferace, kterou lze popsat v několika krocích. Signál pro zahájení proliferace je buňce předán prostřednictvím růstového faktoru, který se naváže na receptor v cytoplazmatické membráně. Dočasně aktivovaný receptor poté zmíněný signál přenáší k proteinům na vnitřní straně membrány a pomocí druhých posílů je signál směřován do buněčného jádra. V jádře dochází k aktivaci transkripčních faktorů, díky nimž může probíhat transkripce DNA nezbytná pro tvorbu proteinů důležitých pro zahájení a řízení buněčného cyklu (Petruželka et al., 2003). Buněčný cyklus je komplexní proces duplikace a dělení buňky, jehož výsledkem je vznik dvou dceřiných buněk. Buněčný cyklus můžeme rozdělit do 4 fází: G₁, S, G₂ a M. V G₁ a G₂ fázi buňka roste a nabírá na objemu, v S fázi probíhá syntéza DNA a M fáze zahrnuje dělení jádra (mitóza) a dělení buňky (cytokineze). Doba mezi dvěma M fázemi se označuje jako interfáze a zahrnuje G₁, S a G₂ fázi („Obr. 2“) (Alberts et al., 2008).



Obr. 2: Buněčný cyklus (upraveno dle Alberts et al., 2008)

Na základě buněčné proliferace můžeme onkogeny, respektive onkoproteiny rozdělit na růstové faktory, receptory pro růstové faktory, proteiny zúčastněné v přenosu signálu a transkripční faktory. Růstové faktory jsou polypeptidy, interagující s příslušnými receptory. U nádorových buněk se s mutací genů pro růstové faktory setkáváme pouze zřídka. V normální buňce jsou receptory s růstovým faktorem rychle inaktivovány, čímž je umožněna fyziologická regulace a stanovena časová mez stimulace. U rakovinných buněk může být exprese receptoru zvýšena a stimulační účinek je prodloužen. Do této skupiny patří například receptory pro destičkový růstový faktor (PDGF), nervový růstový faktor (NGF) a další. Proteiny zúčastněné v přenosu signálu jsou v buňce uloženy u vnitřní části cytoplazmatické membrány. Tyto molekuly zprostředkovávají přenos signálu do buněčného jádra. Onkogeny této skupiny jsou

GTP-vázající proteiny z rodiny ras ($p21^{Ras}$). Transkripční faktory jsou proteiny podílející se na správné expresi genů v jádře buňky. Onkoproteiny transkripčních faktorů nejsou ve většině případů samy o sobě schopné způsobit rakovinné bujení a to ani při jejich nadměrné expresi. Umožňují vznik tzv. imortalizovaných buněk, které mají normální fenotyp.

Je známo několik mechanismů, jimiž dochází ke změnám v aktivitě protoonkogenů. Jedná se o bodovou mutaci (indukována vnějšími faktory nebo je spontánně zaměněna jedna báze v genu protoonkogenu), amplifikaci (zmnožení) a přestavbu chromosomů (translokace – vyštěpení části původního chromosomu a připojení k jinému chromosomu, inverze – otočení části chromosomu, atd).

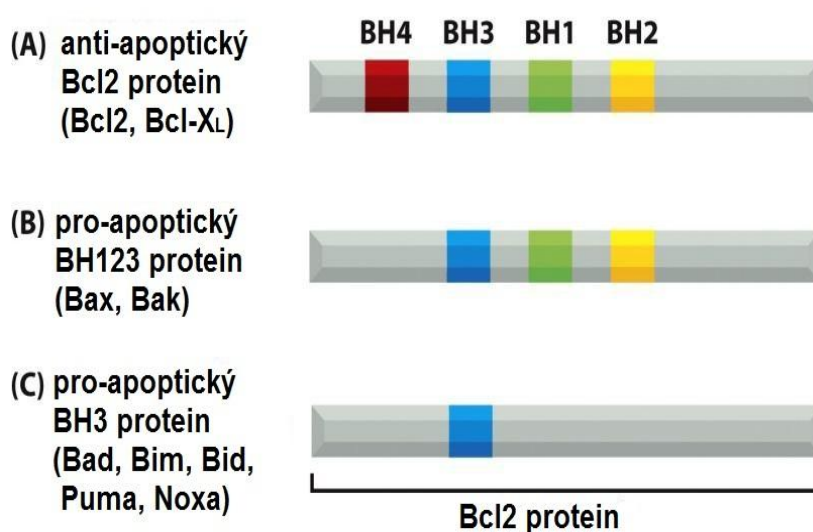
1.2.4. Nádorové supresorové geny

Produkty tumor supresorových genů jsou proteiny zapojené do regulace buněčného cyklu, podílí se na řízení diferenciaci, apoptózy a odpovědi na stresové podmínky. Do této skupiny se řadí např. Rb protein, což je jaderný fosfoprotein, který v neaktivním stavu váže transkripční faktory rodiny E2F. Fosforylace Rb proteinu má za následek uvolnění molekuly E2F a může být zahájena translace. Mutovaný Rb protein není schopen tvořit komplex a je tedy znemožněna regulace transkripčních faktorů E2F v postižených buňkách. Další nádorový supresorový gen je *p53*. P53 reaguje na několik signálů zahrnující poškození DNA, hypoxii, nedostatek substrátů pro syntézu DNA, zvýšenou expresi některých onkogenů. Je odpovědný za zástavu buněčného cyklu, opravu genomové DNA a regulaci apoptózy. Mutace genu *p53* mají za následek vznik mutovaného p53 proteinu, který není schopen vykonávat své regulační funkce a v buňce může docházet ke hromadění genetických změn a k nádorové transformaci. Mezi tumor supresorové geny se dále řadí gen *APC*, *NF-1* a další (Petruželka et al., 2003).

1.2.5. Geny regulující apoptózu

Základními výkonnými molekulami v procesu apoptózy jsou proteolytické enzymy, které obsahují cystein ve svých aktivních místech a štěpí cílové proteiny specificky na kyselině asparagové. Proto se tyto enzymy nazývají kaspasy (z angl. caspase, c - cystein, asp - asparagová kyselina). Kaspasy vznikají v buňce proteolytickým štěpením inaktivních prekurzorů neboli prokaspas. Je známa tzv. vnitřní a vnější apoptóza. U vnější apoptózy je potřeba extracelulárního signálního proteinu, který se naváže na receptor na povrchu buňky. Vnitřní apoptóza je startována uvnitř buňky a je odpovědí na buněčné poranění, poškození DNA, nedostatek kyslíku a výživy či nepřítomnost vnějších signálů pro přežití. Základem vnitřní apoptózy je

uvolnění cytochromu c (součást mitochondriálního elektronového transportního řetězce) z mitochondrií do cytosolu. Tato fáze apoptózy je regulována pomocí proteinů z Bcl2 rodiny, které lze rozdělit do dvou skupin. Pro-apoptické Bcl2 proteiny, které podporují programovanou buněčnou smrt, zahrnují dvě podskupiny: BH123 proteiny (Bax, Bak) a BH3 proteiny (Bad, Bim, Bid, Puma, Noxa). Naopak anti-apoptické proteiny apoptózu inhibují, neboť blokují uvolňování cytochromu c z mitochondrií. Do této skupiny patří samotný Bcl2 a Bcl-X_L. Tendence buňky k indukci apoptózy je dána poměrem mezi anti-apoptickými a pro-apoptickými proteiny („Obr. 3“). Uvolnění Ca²⁺ do cytosolu napomáhá aktivovat mitochondriální apoptotickou dráhu (Alberts et al., 2008).



Obr. 3: Třídy Bcl2 proteinů (upraveno dle Alberts et al., 2008)

1.3. Léčba nádorových onemocnění

K léčbě nádorových onemocnění se uplatňuje několik terapeutických postupů. Jedná se především o radioterapii, chemoterapii a chirurgii. V další řadě jde o hormonální léčbu (pro onkologickou léčbu se nejvíce využívají pohlavní hormony a kortikoidy), imunoterapii (záměrem je obnovit narušenou funkci protinádorové imunity a začlenit ji do léčby rakovinného onemocnění), hypertermii (účinek zvýšené teploty), fototerapii (účinek neionizujícího záření), podpůrnou léčbu a další.

1.3.1. Chirurgická léčba

Chirurgickou léčbu lze rozlišit na radikální, při níž dochází k úplnému odstranění nádoru a paliativní, čímž rozumíme odstranění nádorového ložiska, ale některé metastázy zůstávají operací neovlivněné (Koutecký et al., 1989).

1.3.2. Radioterapie

Radioterapie spočívá v opakovaném ozařování nádoru. Cílem je zničit nebo výrazným způsobem omezit růst nádoru, přičemž je kladen důraz na snahu příliš nepoškodit zdravou tkáň.

Léčba rakoviny radioterapií nese vedlejší účinky, mezi které patří zvýšená únava, nevolnost, pocity zvracení, pokles bílých krvinek, kožní a slizniční změny, nefritida, radiačně indukovaná neplodnost a další (Petruželka et al., 2003).

1.3.3. Chemoterapie

Chemoterapie spočívá v podávání léků s cytotoxickým účinkem. Tyto léky mohou být syntetické nebo se jedná o deriváty přírodních látek (Petruželka et al., 2003). Cytostatika jsou účinná především na proliferující buňky, a to nejen na rakovinné, ale i na přirozeně proliferující buňky. Po intenzivním cyklu chemoterapie musí dojít k přerušení léčby, přičemž v tomto časovém intervalu se normální i nádorová proliferace obnoví a obě populace projdou procesem doplňování. U nádorových buněk je ovšem generační čas delší v porovnání s normálními buňkami, a proto proběhne doplnění normální buněčné populace rychleji. V dalším cyklu léčby nedosahuje nádorová populace výchozího množství a opakováním těchto cyklů chemoterapie je možno rakovinné buňky zlikvidovat (Koutecký et al., 1989).

Zhoubná nádorová onemocnění mají různou citlivost k chemoterapii. Podle stupně senzitivity k chemoterapii je lze rozdělit do 4 skupin. Do první skupiny patří onemocnění, u nichž může mít chemoterapie kurativní účinek (léčba může vést k vyléčení nemoci). Do této skupiny patří například akutní lymfoblastická leukemie u dětí, Burkittův nádor, Hodgkinova choroba, Wilmsův nádor, retinoblastom, kožní karcinomy a další. Ve druhé skupině jsou zařazeny nádory, u kterých má chemoterapie paliativní účinek (vysoké procento remisí, prodloužení délky života). Do této skupiny se řadí akutní myeloblastická leukemie u dospělých, neuroblastom, karcinom prostaty, karcinom prsu, osteosarkom, karcinom kůry nadledvin a další. U nádorů třetí skupiny může být účinek chemoterapie zjevný, ovšem citlivost k chemoterapii je nejednoznačná a výsledky této léčby jsou nespolehlivé. Z tohoto důvodu se používá jako metoda doplňková. Tato skupina nádorů zahrnuje karcinomy trávicího ústrojí, nádory centrální nervové soustavy (CNS), sarkomy měkkých tkání atd. Čtvrtou skupinou jsou nádory s velice malou citlivostí na používaná cytostatika. Zde patří karcinom močového měchýře, karcinom jícnu, karcinom pankreatu, karcinom žlučníku, štítné žlázy atd. Uvedené rozdělení nádorových onemocnění do skupin má pouze orientační charakter, neboť s vývojem nových kancerostatik může docházet ke změnám. Je snaha vyvinout nové, účinnější látky s co nejmenšími vedlejšími účinky.

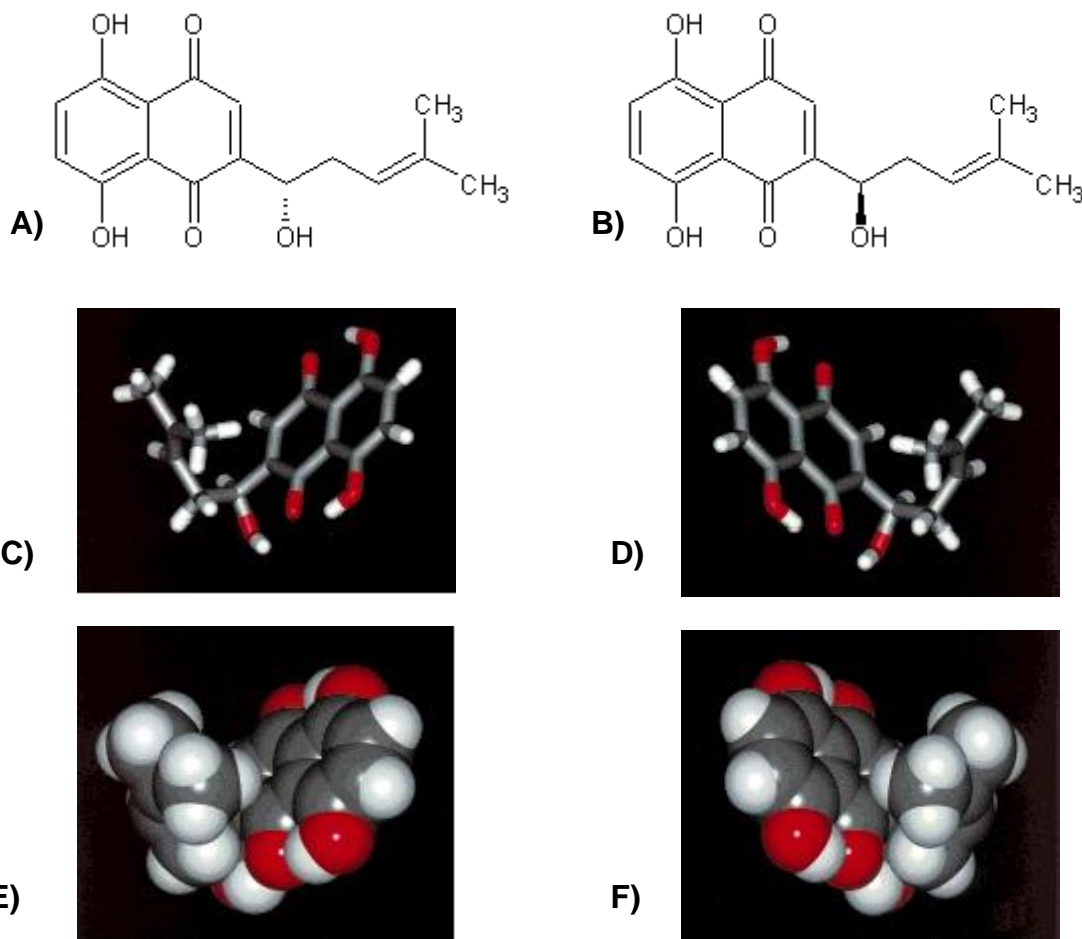
Důležitá je pro chemoterapii tzv. farmakokinetika cytostatik, která zahrnuje několik dílčích pochodů. Jedná se o resorpci, distribuci, biotransformaci a vylučování. Resorpce závisí na řadě faktorů a to na aplikační formě, průniku cytostatik membránami a aplikační cestě cytostatika – perorálně, intravenózně, intramuskulárně, subkutánně, v zahraničí se někdy používá aplikace intraoseální (cytostatikum je podáno zvláštní jehlou do dřevnaté dutiny kostí). Rozložení aplikovaného cytostatika mezi distribuční prostory je dáno velikostí molekuly a rychlostí průniku. Biotransformace pak mění nejen účinnost léčiva, ale také jeho fyzikální vlastnosti. Metabolity jsou ve většině případů polárnější, méně rozpustné v lipidech a naopak více rozpustné ve vodě. Tím dochází ke zvýšení schopnosti průniku membránami a také k urychlení vylučování, které probíhá převážně ledvinami a játry, méně slinami, mlékem, plícemi. Cytostatika je možné podle mechanismu účinku rozdělit do několika skupin („Tab. 1“) (Klener, 1996).

Tab. 1: Rozdělení cytostatik podle mechanismu účinku (Klener, 1996):

	Inhibice klíčových enzymů metabolismu. Tato inhibice vede k narušení biosyntézy nukleových kyselin a následně dochází k inhibici buněčného dělení.
1	Látky působící tímto mechanismem jsou například analoga kyseliny listové, purinová analoga (např. 6-merkaptopurin), pyrimidinová analoga (např. 5-fluorouracil), inhibitory ribonukleotidreduktasy, analoga aminokyselin.
2	Přímé poškození struktury již utvořených nukleových kyselin. K tomuto poškození dochází alkylací, interkalací (nekovalentní vazba cytostatika na DNA), inhibicí topoizomeras, rozštěpením molekuly DNA.
3	Alterace mikrotubulárního proteinu. Pro tuto skupinu cytostatik se někdy používá označení „mitotické jedy“, neboť způsobují abnormální průběh mitózy tím, že poškozují strukturu a funkci mikrotubulů, které jsou součástí dělicího vřeténka. Většina léčiv z této skupiny omezuje tvorbu tubulinu (dimerní protein tvořící mikrotubuly).
4	Inhibice proteosyntézy.
5	Kombinované účinky. Cytostatika této skupiny uplatňují již zmíněné mechanismy účinku, ale i některé zvláštní účinky.
6	Poškození buněčné membrány.

2. Shikonin

Shikonin je přírodní naftochinon. Jedná se o R – enantiomer, je znám i S – enantiomer, alkanin („Obr. 4“).



Obr. 4: A) alkanin, B) shikonin, C) až F) počítačově generované molekulární modely, šedá – uhlík, bílá – vodík, červená – kyslík, C) + E) alkanin, D) + F) shikonin (Papageorgiou et al., 1999).

Alkanin se nachází v kořenech rostliny *Alkanna tinctoria*, také známá jako *Anchusa tinctoria*. Sloučenina je hlavní složkou tmavě červeného pigmentu, který lze snadno extrahovat z kořenů rostliny. Shikonin je hlavní složkou červeného pigmentu extrahovaného z kořenů rostliny *Lithospermum erythrorhizon* (LE). V přírodě se můžeme setkat celou řadou derivátů. Například acetylalkanin (kořeny *Alkanna tinctoria*, *Arnebia euchroma*), teracrylalkanin (*Arnebia densiflora*), acetylshikonin (kořeny *Arnebia decumbens*, *Echium vulgare*), propionylshikonin (*Lithospermum erythrorhizon*), angelyshikonin (kořeny *Alkanna hirsutissima*) a další (Papageorgiou et al., 1999).

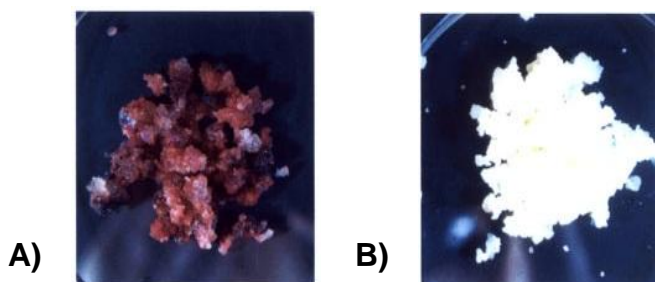
2.1. Produkce shikoninu

Shikonin byl poprvé izolován jako jeho acetát z kořenů rostliny *LE* japonskými chemiky Majima a Kuroda v roce 1922 (Majima & Kuroda, 1922).

Rostliny *LE* musí růst pět až sedm let, aby koncentrace shikoninu v jejich kořenech dosáhla 1 – 2%. Proto byla věnována pozornost produkci shikoninu pomocí rostlinných tkáňových kultur a organickou syntézou (Papageorgiou et al., 1999).

2.1.1. Produkce shikoninu z rostlinných tkáňových kultur

První úspěšné produkce shikoninu a jeho derivátů z kalusových kultur dosáhl Tabata a jeho kolektiv roku 1974. Biosyntéza shikoninu v tkáňových kulturách *LE* byla kontrolována rostlinným hormonem auxinem a světlem. U kalusových kultur kultivovaných ve tmě na médiu obsahující auxin kyselinu indol-3-octovou (IAA) obsah pigmentu lineárně narůstá, zatímco po nahrazení IAA kyselinou 2,4-dichlorfenoxycetovou (2,4-D) nebo ozářením modrým světlem dochází k jeho poklesu („Obr. 5“). K úspěšnému formování naftochinonových pigmentů je třeba kultivaci provádět ve tmě, což je v souladu s lokalizací přírodního shikoninu v kořenech rostliny. Světlo silně inhibuje aktivitu jednoho z klíčových enzymů *p*-hydroxybenzoátgeranyltransferasy (PHB geranyltransferasa, EC 2.5.1.93), což vede k zastavení produkce shikoninu (Tabata et al., 1974; Papageorgiou et al., 1999; Heide et al., 1989).



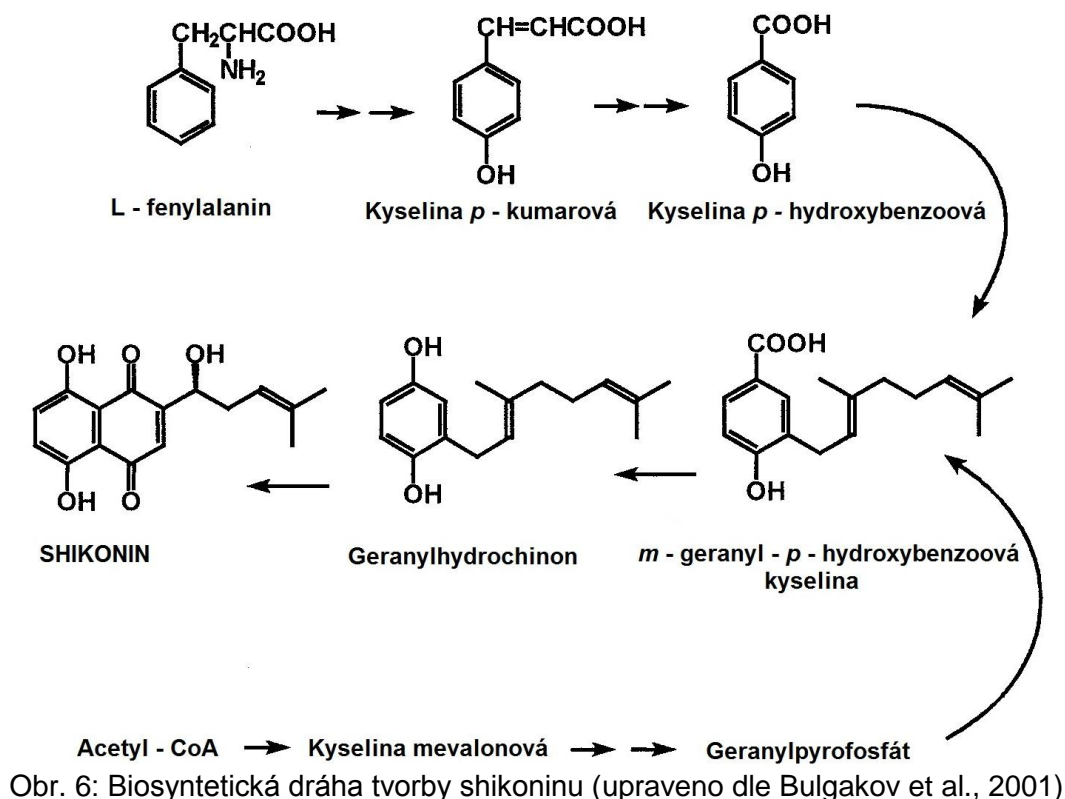
Obr. 5: **A)** kalusová kultura *LE* produkující shikonin **B)** kalusová kultura *LE* neprodukující shikonin. (Yamamura et al., 2003).

Tvorba shikoninu je ovlivněna různými faktory. Při použití kapalného Linsmaier & Skoog (LS) média k formování pigmentu nedochází. Ovšem s využitím agarového LS média je situace jiná. Bylo prokázáno, že endogenní oligogalakturonidy jsou schopné indukovat biosyntézu naftochinonových pigmentů. Analýza ukázala, že minimální stupeň polymerizace nutný pro syntézu shikoninu je 12 (Tani et al., 1992; Papageorgiou et al., 1999). Pro produkci shikoninu a jeho derivátů bylo vytvořeno nové M9 médium, které obsahuje dusičnanové ionty jako zdroj dusíku, namísto amonných

iontů inhibujících biosyntézu shikoninu. Další komponenty média mající vliv na produkci shikoninu jsou Cu^{2+} ionty, které stimulují tvorbu pigmentu, fosfát, jehož optimální koncentrace byla stanovena na 0,12 mmol/l a sulfát s optimální koncentrací 13,5 mmol/l. Další složky média již nemají takový efekt na tvorbu shikoninu jako předchozí výše popsané (Fujita et al., 1981; Papageorgiou et al., 1999). Ovšem bylo prokázáno, že přidání glutaminu do M9 média vedlo k inhibici produkce shikoninu (Yazaki et al., 1987).

2.1.2. Biosyntéza shikoninu

Pro biosyntézu shikoninu jsou důležité dva klíčové prekurzory, kyselina *p*-hydroxybenzoová (PHB) a geranylpyrofosfát (GPP). Tyto dvě komponenty jsou základem reakce zprostředkované enzymem PHB geranyltransferasa, jejímž výsledkem je *m*-geranyl-*p*-hydroxybenzoová kyselina. Geranylpyrofosfát je odvozen z tzv. isoprenoidní dráhy, která začíná acetyl-CoA a přes kyselinu mevalonovou na zmiňovaný GPP. Kyselina *p*-hydroxybenzoová je formována fenylpropanoidovou dráhou. L-fenylalanin je prostřednictvím enzymu fenylalaninamoniaklyasy přeměněn na kyselinu skořicovou a přes kyselinu *p*-kumarovou vzniká PHB („Obr. 6“) (Papageorgiou et al., 1999). Bylo prokázáno, že přídavek exogenní kyseliny *p*-hydroxybenzoové způsobuje zvýšení produkce shikoninu. Při koncentraci PHB 10 $\mu\text{mol/l}$ se zvýšila produkce shikoninu v *Lithospermum* buněčné kultuře (M9 médium) přibližně o 50 % (Yazaki et al., 1997).



2.1.3. Organická syntéza shikoninu

Při syntéze shikoninu je třeba překonat určité komplikace. Shikonin je totiž citlivý na kyselé podmínky (probíhá cyklizace postranního řetězce za vzniku cykloshikoninu) a při vystavení světlu na vzduchu snadno probíhá fotooxidace. Většiny úspěšných syntéz bylo dosaženo použitím 1,4,5,8-tetramethoxynaftalenu a jeho derivátů (Cheng et al., 1995; Papageorgiou et al., 1999).

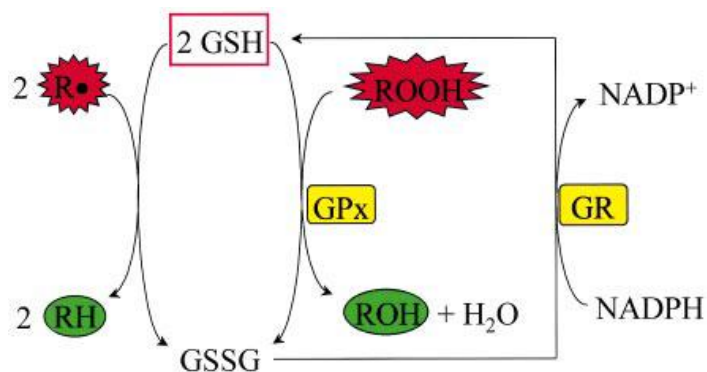
2.2. Biologická aktivita shikoninu

Biologické aplikace shikoninu jsou velice rozsáhlé. Pro své léčivé účinky je kořen *LE* využíván v čínské a v dalších orientálních medicínách k léčbě popálenin, hemeroidů, proleženin, vnějších ran a zánětů kůže (Papageorgiou et al., 1999). Shikonin má protizánětlivé účinky, mírný antipyretický a analgetický efekt a účinně léčí kožní poranění (Hayashi M., 1977; Papageorgiou et al., 1999). Bylo prokázáno, že inhibuje alergický zánět u myšního astmatického modelu, a proto se shikonin jeví jako vhodný lék na léčbu alergického astmatu (Lee et al., 2010). Další významnou vlastností shikoninu je jeho schopnost inhibovat replikaci HIV-1 (Chen et al., 2003). Podstatná je také antimikrobiální, antitrombotická a protirakovinná aktivita (Papageorgiou et al., 1999).

2.2.1. Protirakovinná aktivita shikoninu

Existuje několik možností, jak obecně chinony mohou narušovat buněčné procesy. Jeden z běžných mechanismů chinonové cytotoxicity je oxidativní stres. U chinonů může probíhat jednoelektronová redukce katalyzovaná enzymem NADPH-cytochrom P-450 reduktasou, která vede ke vzniku semichinonového radikálu. V přítomnosti kyslíku může dojít k autooxidaci a tím i k regeneraci chinonu a formování superoxidového radikálu. Tyto radikály mohou způsobovat poškození buňky, což přispívá k jejich cytotoxicitě. Byly zkoumány tři strukturně podobné naftochinony (1,4-naftochinon; 2-methyl-1,4-naftochinon; 2,3-dimethyl-1,4-naftochinon) a u všech došlo k rozsáhlému vyčerpání intracelulárního glutathionu (Miller et al., 1986; Papageorgiou et al., 1999). Glutathion (L- γ -glutamyl-L-cysteinylglycin) je tripeptid složený z cysteinu, kyseliny glutamové a glycinu. Jeho aktivní skupina je reprezentována thiolem (-SH) cysteinového rezidua. Glutathion má antioxidační vlastnosti, je transportní a skladovací formou cysteinu, je reakční partner pro detoxikaci xenobiotik, podílí se na detoxikaci peroxidů a volných radikálů a slouží jako kofaktor při izomeračních reakcích. Intracelulárně se nachází v milimolární koncentraci, v plazmě a moči je jeho úroveň nižší. V buňkách může být glutathion volný nebo vázaný na

proteiny. Volný glutathion je přítomen především v redukované formě (GSH), ale během oxidativního stresu může být převeden na formu oxidovanou (GSSG – glutathion disulfid). Enzymem glutathionreduktasou je možné zpětné převedení na formu redukovanou („Obr. 7“). Poměr oxidovaného a redukovaného glutathionu (GSH/GSSG) slouží jako ukazatel míry buněčné toxicity nebo jako indikátor antioxidantní kapacity buňky (Dringen et al., 2000; Pastore et al., 2003; Perricone et al., 2009).



Obr. 7: Funkce GSH jako antioxidantu. GSH reaguje neenzymaticky s radikály (R•) a je donorem elektronů pro redukci peroxidů (ROOH) v reakci katalyzované enzymem glutathionperoxidasou (GPx). GSH je regenerován z GSSG za katalýzy enzymem glutathionreduktasou (GR), která využívá NADPH jako kofaktor (Dringen et al., 2000).

Cytotoxické působení chinonů lze také vysvětlit jejich reakcí jako elektrofilů s buněčnými nukleofily (např. DNA, glutathion), což může vést až ke smrti buňky (Papageorgiou et al., 1999).

Shikonin je schopen ovlivňovat mitochondrie. Dochází k nadprodukcii reaktivních forem kyslíku (ROS) a zvyšuje se intracelulární hladina vápníku, což vede ke zhroucení membránového potenciálu a indukci mitochondriální apoptotické dráhy (Wiench et al., 2012).

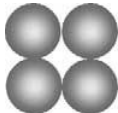

Chinony jsou také pro buňky toxické z toho důvodu, že inhibují enzymy důležité pro metabolismus buněk nebo replikaci. Shikonin a jeho deriváty (např. acetylshikonin) inhibují topoisomerasu-I, která způsobuje jednořetězcové štěpení DNA během procesu replikace (Papageorgiou et al., 1999; Ahn et al., 1995; Alberts et al., 2008). Klíčovým enzymem v protinádorové aktivitě shikoninu je pyruvátkinasa (ATP: pyruvát 2-O-fosfotransferasa, EC: 2.7.1.40.), která katalyzuje defosforylaci fosfoenolpyruvátu (PEP) na pyruvát. Tato reakce umožňuje získání energie ve formě ATP během procesu glykolýzy. Na rozdíl od mitochondriální respirace, ATP uvolňované během pyruvátkinasové reakce je nezávislé na přístupu kyslíku a umožňuje přežití za hypoxických podmínek. Rozlišujeme několik isoenzymů pyruvátkinasy („Tab. 2“) (Mazurek, 2011).

Tab. 2: Molekulární a kinetické charakteristiky isoenzymů pyruvátkinasy. pyruvátkinasa M1 (M1-PK), pyruvátkinasa M2 (M2-PK), pyruvátkinasa L (L-PK), pyruvátkinasa R (R-PK) (Mazurek, 2011):

	M1-PK	M2-PK	L-PK	R-PK
Distribuce v tkáních	Mozek, svaly	Adipocyty, pankreatický ostrůvek, sítnice, plíce, všechny proliferující buňky (normálně proliferující buňky, embryonální buňky, kmenové buňky, rakovinné buňky)	Játra, ledviny, střevo	erythrocyty
Kódující gen	PKM	PKM	PKL	PKL
Počet aminokyselin	531	531	543	574
Molekulová hmotnost podjednotky	58 kDa	58 kDa	59 kDa	62 kDa
Kinetické charakteristiky	Tetramerní forma s vysokou afinitou k substrátu	Tetramerní forma s vysokou afinitou k substrátu, ale i dimerní forma s nízkou afinitou k substrátu	Tetramerní forma s nízkou afinitou k substrátu	Tetramerní forma s nízkou afinitou k substrátu
Regulace	Není alostericky regulována, není fosforylována, není ovlivněna dietou	Regulováno metabolickými intermediáty, jako fruktosa-1,6-bisfosfát (F-1,6-P2), několik aminokyselin a mastných kyselin, fosforylace, vazba onkoproteinu a peptidu	Aktivováno F-1,6-P2, Inhibováno ATP a cAMP-dependentní fosforylací, regulováno dietou	Aktivováno F-1,6-P2, Inhibováno ATP a cAMP-dependentní fosforylací, regulováno dietou

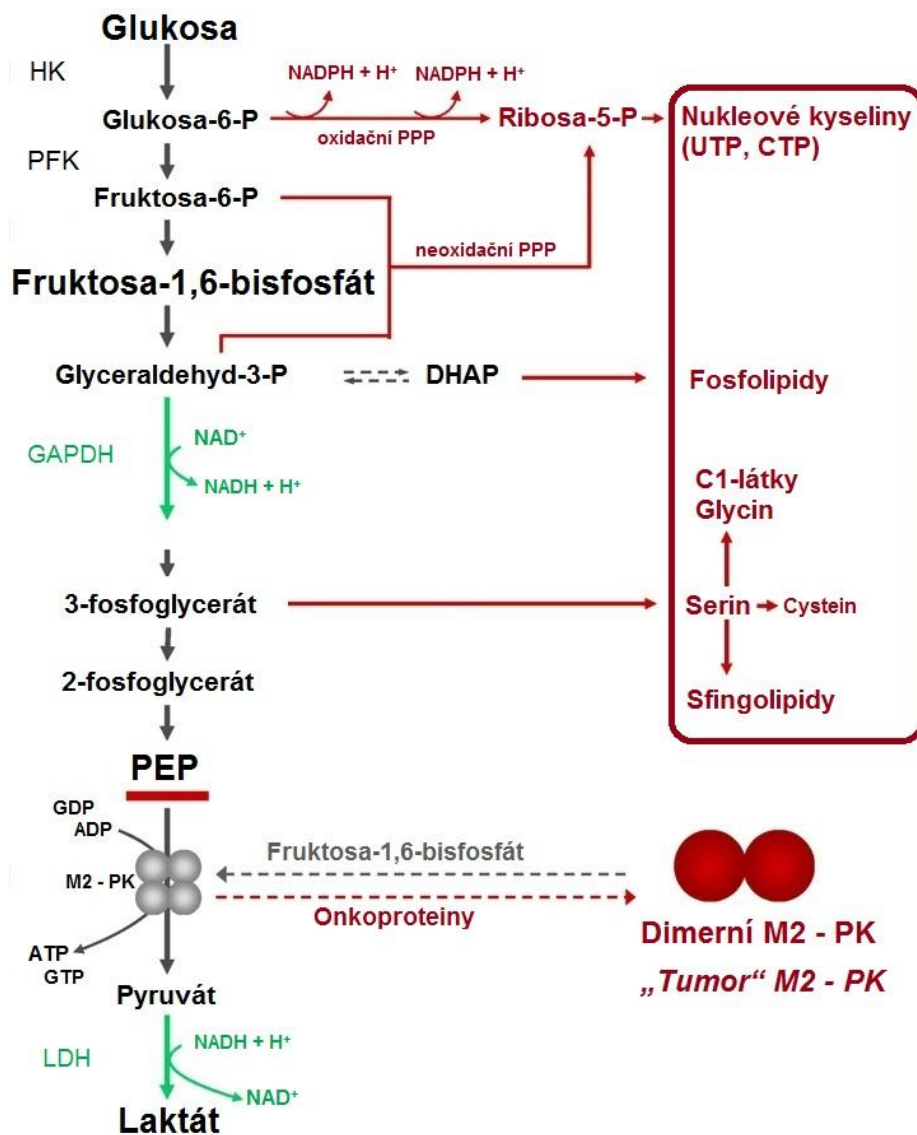
Isoenzymy pyruvátkinasy se skládají ze 4 podjednotek. Jsou známy i hybridní formy, jako L-PK a M2-PK, M1-PK a M2-PK hybrid (Saheki et al., 1978; Mazurek, 2011). Pyruvátkinasy M1 a M2 jsou kódovány stejným genem, ale vznikají jeho alternativním sestřihem (Noguchi et al., 1986). Pyruvátkinasa M1 se vyskytuje pouze v tetramerním uspořádání, zatímco pyruvátkinasa M2 může mít jak tetramerní, tak dimerní formu („Tab. 3“). Rakovinné buňky obvykle využívají dimerní formu, u normálně proliferující buněk se naopak vyskytuje tetramerní (Mazurek, 2011; Mazurek et al., 2005).

Tab. 3: Charakteristika tetramerní a dimerní formy M2-PK (Mazurek et al., 2005):

M2-PK		
Afinita k PEP	Vysoká	Nízká
Aktivita při fyziologické koncentraci PEP	Vysoká	Inaktivní
Asociace s glykolytickým enzymovým komplexem	Asociuje	Neasociuje
Hladina ADP a GDP	Nízká	Vysoká
Hladina ATP a GTP	Vysoká	Nízká
Poměr ATP:ADP	Vysoký	Nízký
Poměr GTP:GDP	Vysoký	Nízký
Hladina fosfometabolitů	Nízká	Vysoká
Glukosové uhlíky	Využity pro získání energie	Směřují do syntetických procesů
(ATP+GTP):(UTP+CTP)	Vysoký	Nízký

Tetramerní forma M2-PK asociuje s několika dalšími glykolytickými enzymy (hexokinasa, glycerinaldehyd-3-fosfátdehydrogenasa, fosfoglycerátkinasa, fosfoglyceromutasa, enolasa, pyruvátkinasa, laktátdehydrogenasa) a dalšími enzymy (nukleotiddifosfátkinasa, adenylátkinasa, glukosa-6-fosfátdehydrogenasa). Poměr mezi tetramerní a dimerní formou M2-PK není stacionární hodnotou, ale mění se v závislosti na přítomnosti onkoproteinů a klíčových metabolických intermediátů. Důležitým metabolickým regulátorem M2-PK je glykolytický meziprodukt fruktosa-1,6-bisfosfát. Pokud koncentrace fruktosy-1,6-bisfosfátu dosáhne určité vysoké hodnoty, inaktivní dimerní forma M2-PK reasociuje na vysoce aktivní tetramerní formu. Následkem toho je glukosa přeměňována na laktát s produkcí energie. Při poklesu hladiny fruktosy-1,6-bisfosfátu na kritickou hodnotu, tetramerní forma disociuje

na inaktivní dimerní formu a glykolytické meziproducty nad pyruvátkinasou jsou akumulovány a použity jako prekurzory v syntetických procesech. Tento proces probíhá do okamžiku, než fruktosa-1,6-bisfosfát dosáhne dostatečné koncentrace k indukci nové tetramerizace („Obr. 8“) (Ashizawa et al., 1991; Mazurek et al., 2005; Mazurek, 2011).



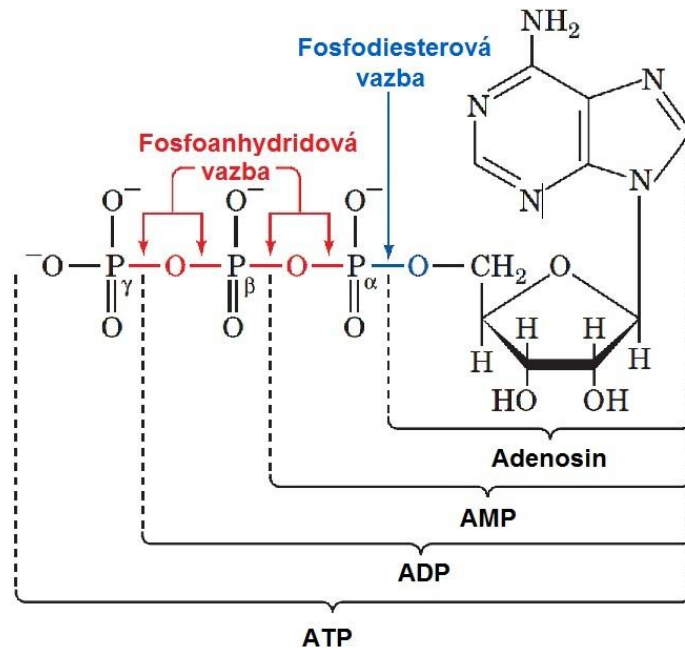
Obr. 8: Glykolýza a spojené procesy. HK – hexokinasa, PFK – fosfofruktokinasa, GAPDH – glycerinaldehyd-3-fosfátdehydrogenasa, LDH – laktátdehydrogenasa, PPP – pentosafosfátová dráha, DHAP - dihydroxyacetonfosfát (upraveno dle Mazurek, 2011).

Dalším aktivátorem M2-PK je aminokyselina serin, která je formována z glykolytického meziprojektu 3-fosfoglycerátu („Obr. 8“). Serin alostericky zvyšuje afinitu M2-PK k substrátu PEP a tím se snižuje množství fruktosy-1,6-bisfosfátu potřebné pro tetramerizaci. Naopak aminokyseliny alanin, cystein, methionin, fenylalanin, valin, leucin, isoleucin a prolin inhibují pyruvátkinasu. Také mastné kyseliny inhibují pyruvátkinasu (Mazurek et al., 2005; Mazurek, 2011; Marchut et al., 1986). Disociace tetramerní formy na dimerní je také indukována onkoproteiny („Obr. 8“). První onkoprotein, u něhož byla pozorována interakce s M2-PK, je aktivovaná pp60^{v-src} kinasa, dochází k fosforylaci M2-PK na tyrosinovém reziduu. Další onkoprotein, který vede k dimerizaci M2-PK je HPV-16 E7, který se na pyruvátkinasu váže přímo (Mazurek et al., 2002; Presek et al., 1988). Velká glykolytická kapacita společně s pyruvátkinasou M2 umožňuje nádorovým buňkám přežít v hypoxických podmínkách a migrovat (Mazurek et al., 2005). V nedávné studii bylo prokázáno, že shikonin inhibuje rakovinnou M2-PK, enzym esenciální pro proliferaci a přežití rakovinných buněk (Chen et al., 2011).

3. Metabolomika

3.1. Metabolismus

Pojmem metabolismus je označován proces, jehož prostřednictvím živé systémy získávají a využívají volnou energii, která je nezbytná pro uskutečnění jejich různých funkcí. Podle způsobu získávání této volné energie lze organismy dělit do dvou skupin. Fototrofní organismy (rostliny a některé bakterie) využívají k získání volné energie sluneční záření prostřednictvím procesu fotosyntézy. Chemotrofní organismy mají přístup k volné energii díky oxidaci organických molekul (sacharidy, lipidy, proteiny) získaných z jiných organismů (především z fototrofních). Organismy využívají energii většinou ve formě vysokoenergetických fosfátových sloučenin, z nichž nejvýznamnější je adenosin trifosfát (ATP) („Obr. 9“). Jeho centrální roli v energetickém metabolismu poprvé popsali roku 1941 Fritz Lipmann a Herman Kalckar.



Obr. 9: Struktura ATP a vztah mezi adenosinem, AMP, ADP a ATP (upraveno dle Voet & Voet, 2011)

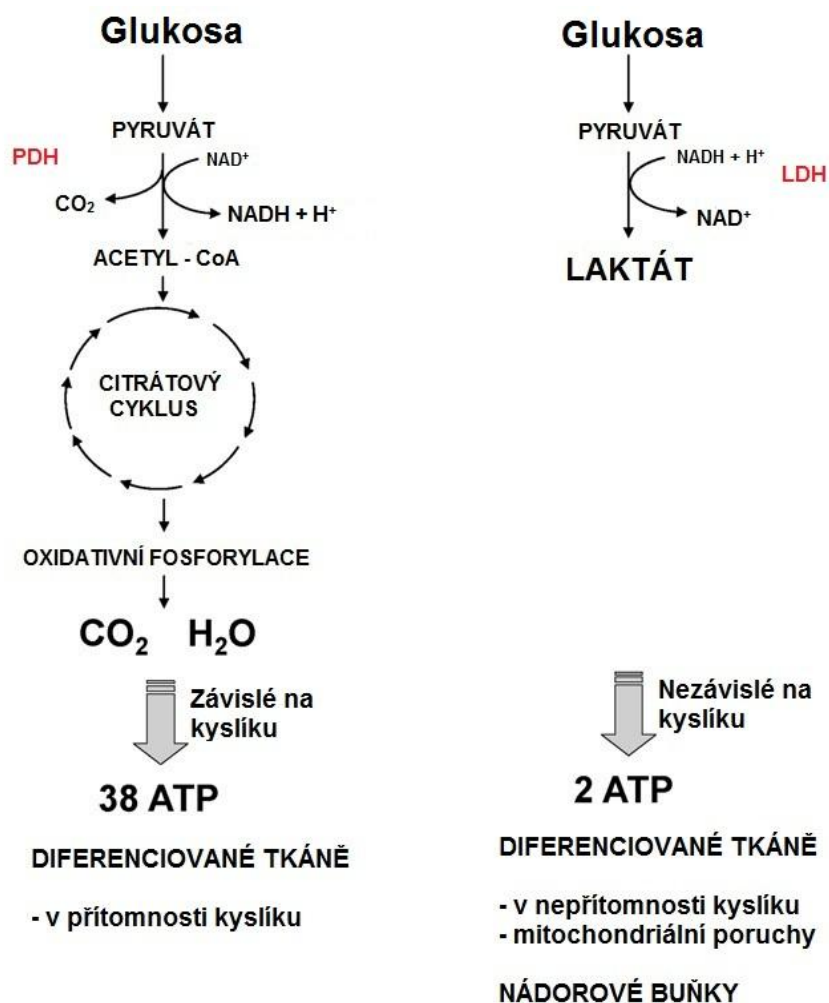
3.1.1. Metabolické dráhy

Metabolické dráhy jsou série po sobě jdoucích enzymových reakcích, které vedou k tvorbě určitých produktů. Reaktanty, intermediáty a produkty metabolických drah jsou označovány jako metabolity. Každý organismus ke svému správnému fungování využívá velké množství metabolitů, a proto v něm probíhá mnoho metabolických drah, mezi které patří například glykolýza, citrátový cyklus, syntéza purinů a pyrimidinů a další.

Reakce, které tvoří metabolické dráhy, lze dělit do dvou kategorií. Katabolismus, někdy označován jako degradační dráhy, zahrnuje štěpení živin a některých buněčných složek, což je spojeno se získáním energie. Anabolismus, někdy označován jako biosyntetické dráhy, zahrnuje syntézu molekul z jednodušších komponent. Metabolické dráhy mají pět základních vlastností, které vycházejí z jejich funkce tvorby produktů. 1. Metabolické dráhy jsou nevratné. Aby sled reakcí proběhl správně, jsou reakce exergonické (velká změna negativní volné energie). Tato vlastnost metabolické dráhy jí udává směr. 2. Katabolické a anabolické dráhy se musí lišit. 3. Každá metabolická dráha má první určující krok. 4. Všechny metabolické dráhy jsou regulované. 5. Metabolické dráhy v eukaryotních buňkách probíhají na specifických místech (Voet & Voet, 2011).

3.1.2. Metabolismus rakovinných buněk

Metabolismus rakovinných buněk je založen na několika efektech. Otto Heinrich Warburg roku 1924 objevil, že rakovinné buňky přeměňují velké množství glukosy na laktát i v přítomnosti kyslíku. Tento jev se po něm označuje jako Warburgův efekt. Diferenciované tkáně na rozdíl od rakovinných buněk v přítomnosti kyslíku glukosu kompletně degradují na oxid uhličitý a vodu prostřednictvím glykolýzy, citrátového cyklu a oxidativní fosforylace. Diferenciované tkáně, jako například svaly, mohou glukosu také degradovat na laktát. V případě mitochondriální poruchy může dojít ke zvýšení hladiny laktátu i v přítomnosti kyslíku. U zdravých diferenciovaných tkání se tato cesta přeměny glukosy uskutečňuje pouze při nízkých hladinách kyslíku („Obr. 10“) (Mazurek, 2011). Přeměna dvou forem respirace, aerobní a anaerobní, byla poprvé popsána koncem 19. století Pasteurem, podle něhož, byl pojmenován tzv. Pasteurův efekt. Ten zahrnuje snížení oxidativní fosforylace a naopak zvýšení anaerobní fermentace (Seagroves et al., 2001). Vysoké exogenní koncentrace určitých hexos (glukosa, fruktosa, manosa, 2-deoxyglukosa) mohou způsobovat inhibici mitochondriální respirace u normálně proliferujících buněk a u některých typů nádorových buněk. Tento jev se označuje jako Crabtreeho efekt, neboť Crabtree ho pozoroval jako první roku 1929 (Ibsen, 1961; Mazurek, 2011).



Obr. 10.: Degradace glukosy v diferenciovaných tkáních a nádorových buňkách.

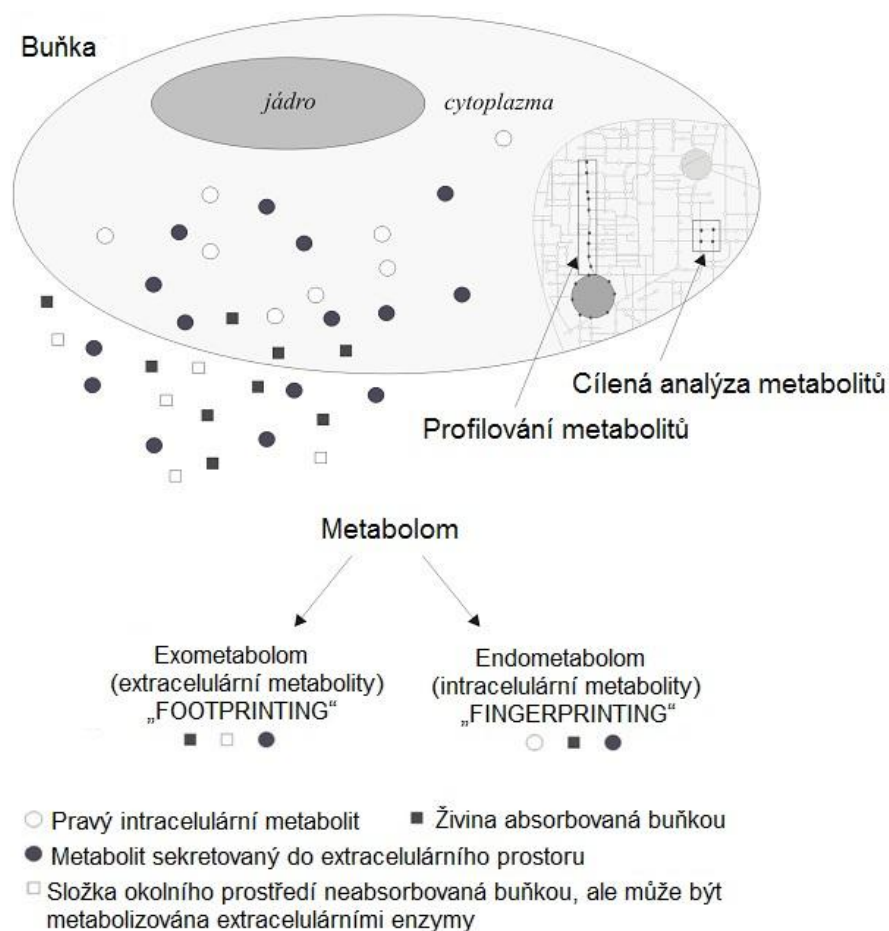
PDH – pyruvátdehydrogenasa, LHD – laktátdehydrogenasa (upraveno dle Mazurek, 2011).

3.2. Metabolom

Metabolomika je považována za koncový bod takzvané „-omické“ kaskády. Zatímco genomika se zabývá analýzou kompletního genomu, transkriptomika je zaměřena na analýzu exprese genů (transkriptom), kompletní analýze proteinů se věnuje proteomika (proteom), tak metabolomika se zabývá studiem metabolomu (Dettmer & Hammock, 2004; Fiehn, 2002). Pojmem metabolom se označuje celkový soubor všech nízkomolekulárních látek, které se účastní metabolických reakcí potřebných pro růst a normální funkci organismu (Dunn et al., 2005). Velikost metabolomu se mění v závislosti na studovaném organismu. Metabolom *Escherichia coli* zahrnuje 745 metabolitů (Nobeli et al., 2003), *Saccharomyces cerevisiae* 584 metabolitů (Förster et al., 2003), rostlinná říše až 200 000 různých metabolitů (Fiehn, 2001).

3.3. Strategie metabolického výzkumu

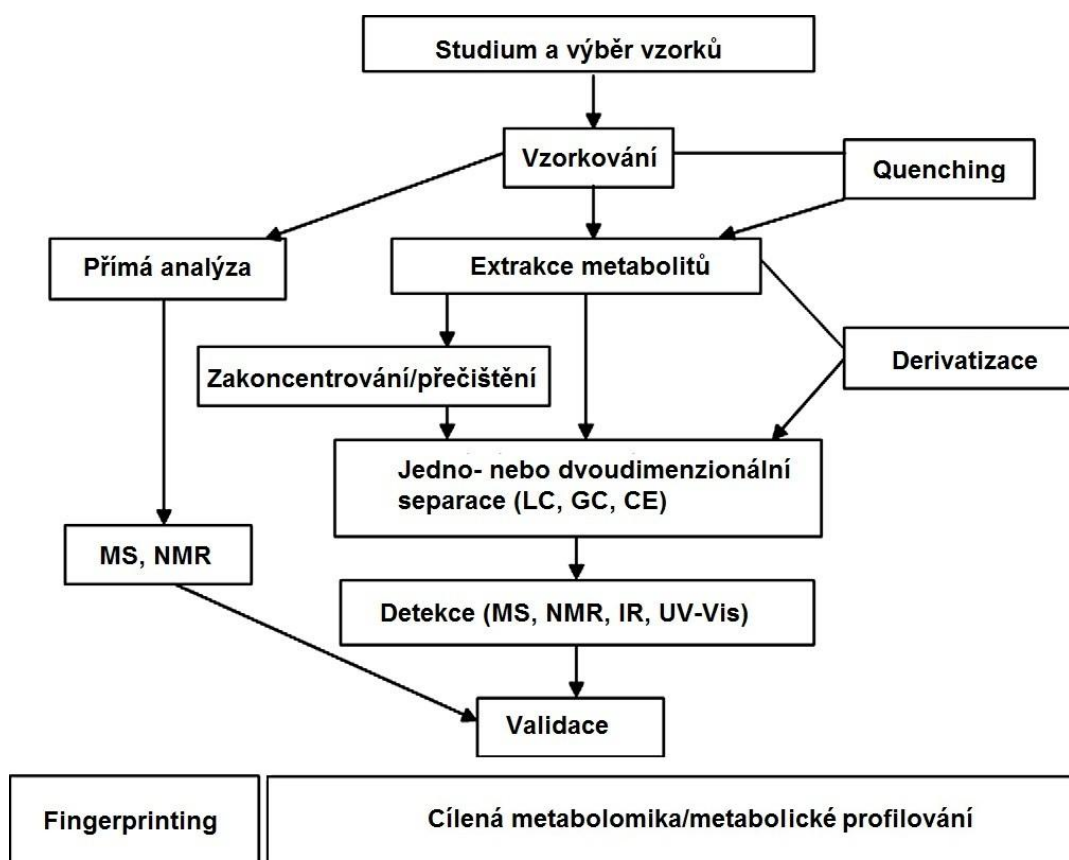
V metabolomice existuje několik metod studia metabolomu. Cílená analýza („target analysis“) je stanovení jednoho nebo několika konkrétních metabolitů souvisejících se specifickou metabolickou drahou. Příprava vzorku zahrnuje jeho rozsáhlé přečištění pro zabránění interferencí. Metabolické profilování („metabolic profiling“, někdy „metabolite profiling“) je analýza umožňující identifikaci a kvantifikaci určité skupiny metabolitů, které mají podobné chemické vlastnosti (např. polární lipidy, isoprenoidy nebo sacharidy) nebo se nacházejí v konkrétní metabolické dráze. Strategie „fingerprintingu“ umožňuje rychlou klasifikaci vzorků podle původu nebo jejich biologické relevance. Tímto přístupem získáváme informace o intracelulárních metabolitech (endometabolom). Takzvaný „footprinting“ podává naopak informaci o extracelulárních metabolitech (exometabolom) („Obr. 11“). Cílem metabonomiky je sledování metabolické odpovědi živých systémů na patofyziologické podněty, genetické modifikace, podávání léčiv nebo přítomnost toxických látek (Fiehn, 2002; Dunn et al., 2005; Musilová & Glatz, 2011).



Obr. 11: Přehled metod studia metabolomu (Musilová & Glatz, 2011)

3.4. Příprava vzorků pro metabolickou analýzu

Při studiu metabolitů se uplatňuje obecný pracovní postup („Obr. 12“).



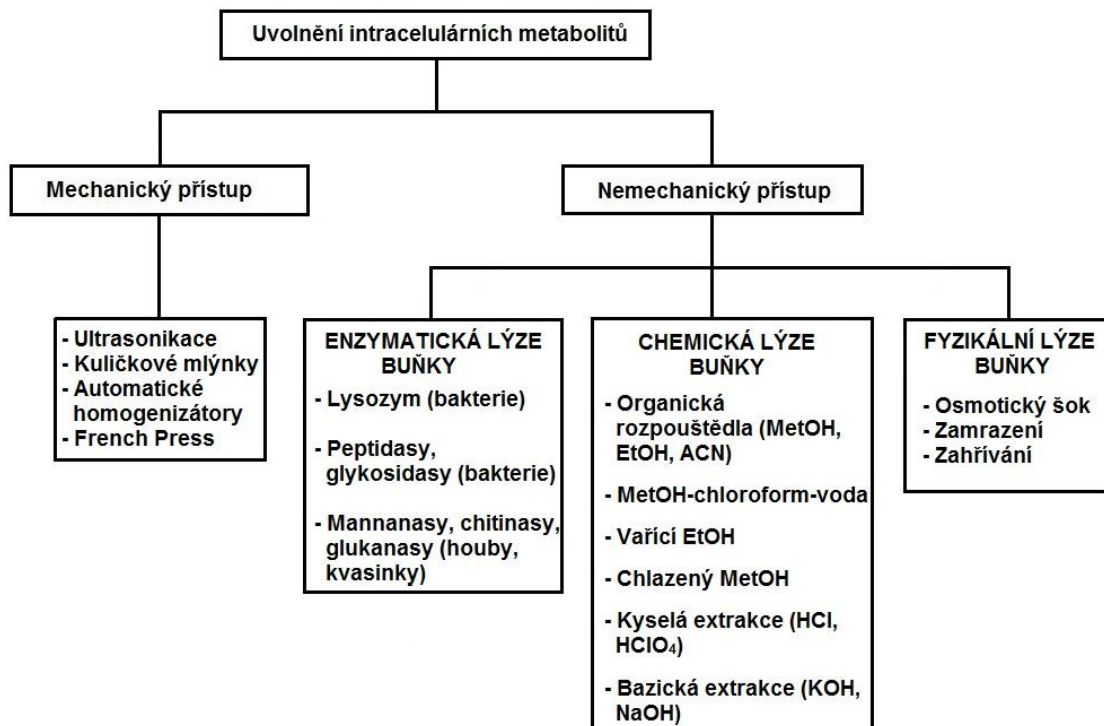
Obr. 12: Obecný pracovní postup hlavních kroků zapojených do běžné metabolické analýzy (upraveno dle Álvarez-Sánchez et al., 2010a).

Metabolický experiment začíná výběrem biologického materiálu, kterým jsou obvykle biologické tekutiny (krev, plazma, moč a další), buňky a méně často tkáně. Následuje odběr vzorku, což je v metabolomice limitující krok. Odběr vzorku by v ideálním případě měl být neinvazivní a měl by zajistit reprezentativnost. Navíc je třeba vyhnout se významným změnám ve fyzikálních a chemických vlastnostech a také změnám v koncentracích metabolitů (Álvarez-Sánchez et al., 2010a).

Reprezentativnosti vzorku dosáhneme v metabolomice pouze pokud efektivně přerušíme metabolismus během odběru vzorku. Toho dosáhneme pomocí tzv. quenchingu (zhášení), jehož cílem je okamžitě zastavit metabolismus inhibicí endogenních enzymů. Poté můžeme získat informaci o daném metabolickém stavu. Deaktivace metabolismu je zvláště důležitá u analýzy buněk a tkání, kde je cílem objasnit metabolický profil uvnitř (endometabolom) a mimo (exometabolom) buňku (Álvarez-Sánchez et al., 2010b). Strategie quenchingu musí splňovat určité požadavky.

Inaktivace metabolismu by měla být rychlejší než metabolické změny probíhající ve vzorku (quenching v ideálním případě okamžitě zastaví metabolickou činnost v buňce). V průběhu procesu musí být zachována integrita vzorku, neboť zejména v případě buněk, poškození buněčné membrány může vést ke ztrátě intracelulárních metabolitů. Procedura by neměla způsobovat významné změny v chemických a fyzikálních vlastnostech nebo v koncentracích metabolitů. Výsledný quenčovaný vzorek by měl být kompatibilní pro následné kroky analytického procesu. Běžné strategie quenčingu jsou založeny na rychlé změně podmínek u vzorku (Mashego et al., 2007; Álvarez-Sánchez et al., 2010b). Rychlé quenčování mikrobiální metabolické aktivity je tradičně prováděno pomocí okamžité změny teploty, například na -40 °C nebo naopak na 80 °C, případně může být inaktivace metabolismu provedena extrémní změnou pH. V alkalické oblasti se využívá například hydroxid sodný nebo draselný a v kyselé oblasti kyselina chlorovodíková, perchloristá a trichloroctová (Mashego et al., 2007). Dalším běžným protokolem pro studium mikrobiálního metabolomu je quenčing založený na použití vychlazeného vodného methanolu (např. 60%) (Bolten & Wittmann, 2008). Jedno z hlavních omezení použití metody s vychlazeným methanolem je možnost úniku metabolitů. Některé typy buněk jsou známy svou citlivostí na osmotické změny okolního prostředí, přičemž u nich může docházet ke změnám v koncentraci intracelulárních metabolitů v důsledku narušení buněčné membrány. Proto mnoho protokolů zahrnuje quenčovací pufr, např. tricin, HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethanesulfonová kyselina) a uhličitan amonný, za účelem kontroly iontové síly, čímž se zabrání poškození buněčné membrány (Álvarez-Sánchez et al., 2010b; Faijes et al., 2007; Winder et al., 2008). Uhličitan amonný se ukazuje jako nejvhodnější quenčovací pufr (quenčovací roztok 60% methanol) pro metabolomickou studii *Lactobacillus plantarum*, protože únik metabolitů je minimální, metabolismus je dobře fixován a všechny komponenty jsou snadno odstraněny v průběhu lyofilizace (Faijes et al., 2007). Inaktivace metabolismu rostlinných a živočišných buněk se většinou provádí rychlou změnou teploty kapalným dusíkem (Álvarez-Sánchez et al., 2010b; Musilová & Glatz, 2011).

Dalším krokem v metabolomické analýze je extrakce metabolitů. Jejím cílem je efektivně uvolnit metabolity ze vzorku, odstranit interferující látky (např. soli, proteiny), před analýzou zakoncentrovat stopové metabolity a získat vzorek kompatibilní s analytickými metodami (Álvarez-Sánchez et al., 2010b). K extrakci intracelulárních metabolitů se využívají dva přístupy, a to mechanický a nemechanický („Obr. 13“) (Musilová & Glatz, 2011).



Obr. 13: Přístupy k získání intracelulárních metabolitů (Musilová & Glatz, 2011)

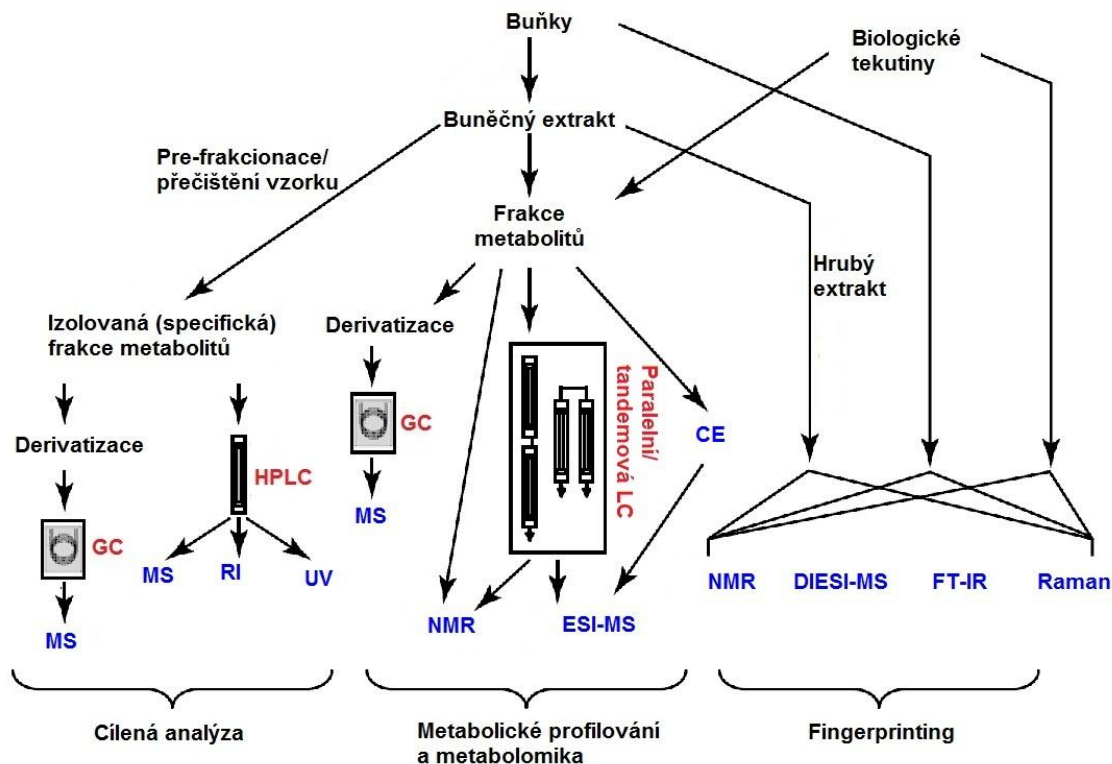
Zakoncentrování metabolitů je možné například prostřednictvím odpaření rozpouštědla na vakuové odparce, lyofilizací nebo zachycením na koloně s pevnou fází (Álvarez-Sánchez et al., 2010a; Álvarez-Sánchez et al., 2010b).

Metabolomická analýza buněk může být provedena dvěma přístupy. Quenching a extrakce mohou být realizovány sekvenčně nebo simultánně. U sekvenčního postupu jsou buňky separovány od okolního média a teprve poté jsou metabolity extrahovány příslušnou extrakční metodou. V tomto módu je quenching následován rozdělením vzorku do dvou frakcí (např. centrifugací). V supernatantu můžeme kvantifikovat extracelulární metabolity a vhodnou extrakcí buněčné frakce lze stanovit intracelulární metabolity (Álvarez-Sánchez et al., 2010b; Hiller et al., 2007). U simultánního přístupu slouží quenchovací roztok zároveň i jako roztok extrakční. V tomto módu jsou extracelulární i intracelulární metabolity kvantifikovány společně (nelze rozlišit endometabolom a exometabolom). Studované metabolity jsou zředěny ve velkém objemu tvořeného z extracelulárního média a quenchovacího (respektive extrakčního) roztoku. Pro globální analýzu metabolomu musí extrakční metoda splňovat určitá kritéria. Optimální metoda by měla zahrnovat extrakci co největšího počtu metabolitů, být neselektivní, nedestruktivní a nemělo by dojít k vyloučení molekul s konkrétními chemickými nebo fyzikálními vlastnostmi (Álvarez-Sánchez et al., 2010b; Maharjan & Ferenci, 2003). Oba tyto přístupy mají výhody a nevýhody („Tab. 4“).

Tab. 4: Výhody a nevýhody simultánního a sekvenčního přístupu studia buněk (Mashego et al., 2007)

	Výhody	Nevýhody
Sekvenční přístup	Separace biomasy ze supernatantu (specifické zkoumání)	Mnoho extrakčních procedur pro specifické metabolity
	Čistější matrix vzorku (méně solí)	Možnost úniku metabolitů během quenchingu
	Oddělená extrakce (cílená na vybrané metabolity)	Pracný
Simultánní přístup	Procedura jednodušší na provedení	Obtížná interpretace dat
	Není třeba separovat biomasu a supernatant	Vysoký obsah solí ve vzorku
	Současná kvantifikace intracelulárních i extracelulárních metabolitů	Metabolity příliš naředěné (špatná detekce a kvantifikace)
	Nespecifický	Komplexní matrice vzorku

Výsledný vzorek je následně analyzován analytickými technikami („Obr. 14“), jako je nukleární magnetická rezonance (NMR), hmotnostní spektrometrie (MS), infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací (FT-IR) nebo Ramanova spektrometrie. V metabolomické analýze se využívají i běžné separační techniky, z nichž jde především o kapalinovou chromatografii (LC), vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii (HPLC), kapilární elektroforézu (CE) a plynovou chromatografii (GC), které jsou kombinovány s vhodnou detekční metodou (MS, IR, absorpční spektrometrie v ultrafialové a viditelné oblasti) (Álvarez-Sánchez et al., 2010a; Musilová & Glatz, 2011).



Obr. 14: Techniky pro analýzu metabolomu. DIESI (přímý nástřik do ESI-MS), RI (refraktometrický detektor) (upraveno dle Goodacre et al., 2004)

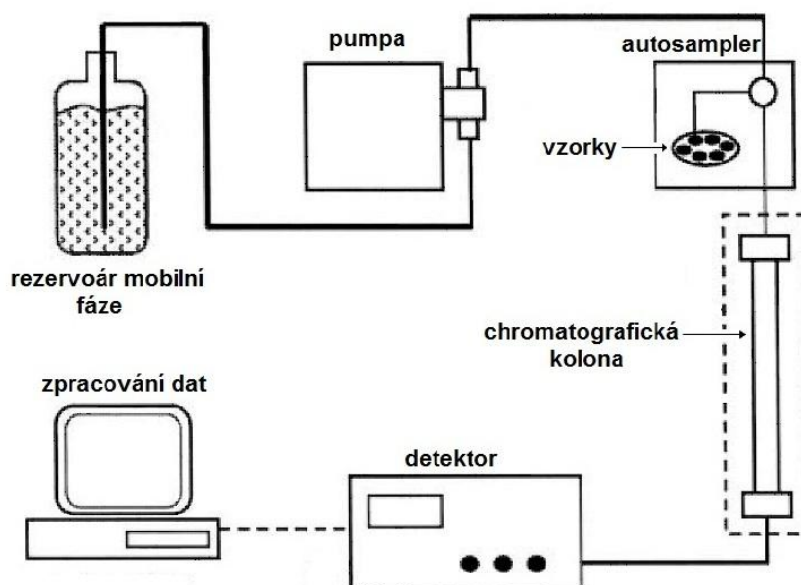
3.5. Metabolomické databáze

Stejně jako ostatní „-omické“ vědy, tak i metabolomika využívá elektronické databáze. Existuje nejméně pět typů databází, které jsou využívány v metabolických studiích. Jedná se o databáze metabolických drah, specifických sloučenin, spektrální databáze, databáze zabývající se nemocemi a fyziologií a komplexní databáze specifických organismů. Jednou z nich je „The Human Metabolome Database (HMDB)“, která obsahuje kvantitativní, analytické a molekulární informace o metabolitech, jejich asociovaných enzymech či transportérech a vlastnostech souvisejících s nemocemi (Wishart et al., 2007; Wishart et al., 2009). Další běžně používanou databází je KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes), která zahrnuje informace o molekulárních interakcích, genech a proteinech a informace o biochemických sloučeninách a reakcích (Kanehisa et al., 2004). Jiným příkladem je databáze MetaCyc, která obsahuje metabolické dráhy více jak 150 různých organismů, popisuje metabolické dráhy, reakce, enzymy a substráty (Bino et al., 2004). AraCyc je databáze věnovaná biochemickým drahám rostliny *Arabidopsis* (Mueller et al., 2003).

4. Analytické přístupy

4.1. Kapalinová chromatografie

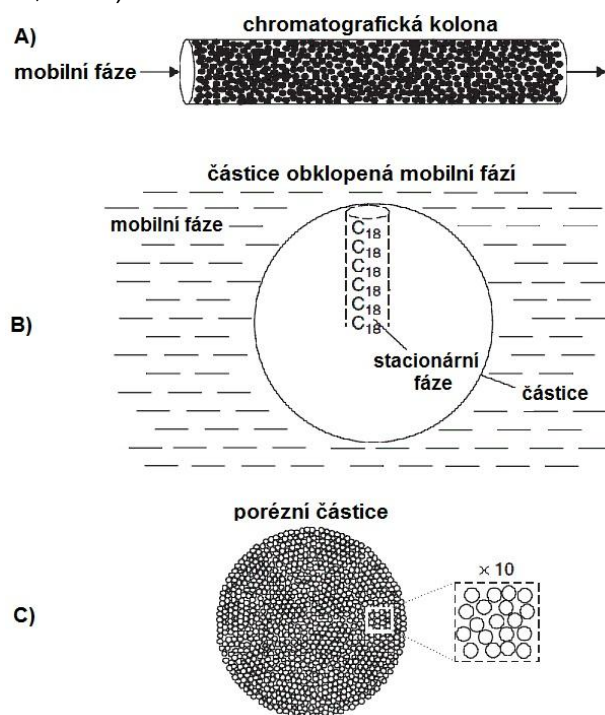
Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC) je jednou z několika chromatografických metod umožňující separaci a analýzu chemických směsí. V kapalinové chromatografii se uplatňuje chromatografický systém zahrnující tok rozpouštědla od svého rezervoáru až po detektor. Toto rozpouštědlo je označováno jako mobilní fáze. K analýze je třeba provést nástřik vzorku následovaný separací na chromatografické koloně. Separované komponenty vzorku jsou eluovány do vhodného detekčního systému, mezi které patří například absorpční spektrometrie v ultrafialové oblasti (UV) nebo hmotnostní spektrometrie („Obr. 15“) (Snyder et al., 2010).



Obr. 15: Schéma HPLC systému (upraveno dle Snyder et al., 2010)

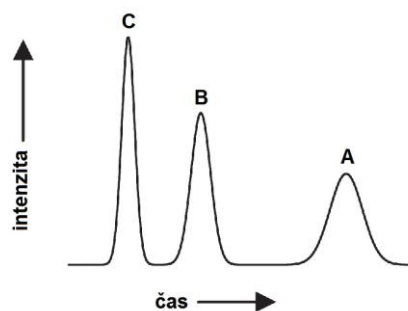
Chromatografická kolona je cylindrická trubice vyplněná malými sférickými částicemi (obvykle o průměru 1,5 – 5 μm), které jsou obvykle porézní (např. oxid křemičitý) a tvoří tzv. stacionární fázi („Obr. 16“). Lze rozlišit několik chromatografických módů. Chromatografie na reverzní fázi využívá nepolární kolonu (např. C18) a mobilní fází je polární směs vody a organického rozpouštědla (např. acetonitril). Tento mód je vhodný pro vzorky rozpustné ve vodě. U chromatografie na normální fázi se uplatňuje polární kolona (např. oxid křemičitý) a mobilní fází je směs méně polárních organických rozpouštědel (např. hexan a methylenchlorid). Je vhodná především pro vzorky rozpustné ve vodě, preparativní HPLC a separaci isomerů. Chromatografie s hydrofilními interakcemi (Hydrophilic interaction chromatography,

HILIC) využívá polární kolonu (např. oxid křemičitý, amidová fáze) a jako mobilní fázi směs vody a organického rozpouštědla (např. acetonitril). Využívá se především pro vysoce polární vzorky. U iontoměničové chromatografie obsahuje kolona nabitě skupiny, na které se váží ionty vzorku s opačným nábojem. Mobilní fází je obvykle vodný roztok soli a pufru. Tento mód je užitečný pro oddělování ionizovatelných vzorků a je vhodný pro separaci velkých biomolekul (např. proteinů a nukleových kyselin). Existuje i varianta chromatografie na reverzní fázi, která využívá nepolární kolonu (např. C18) a jako mobilní fázi směs organických rozpouštědel (např. acetonitril a methylenchlorid). Používá se pro velmi hydrofobní, ve vodě nerozpustné vzorky (Snyder et al, 2010).



Obr. 16: A) kolona se sférickými částicemi, B) schéma individuální částice, stacionární fáze C18, C) detail porézní částice (upraveno dle Snyder et al., 2010)

Pro chromatografii je důležitý retenční čas daného analytu, což je doba od nástřiku vzorku po objevení vrcholu píku v chromatogramu („Obr. 17“) (Snyder et al., 2010).



Obr. 17: chromatogram (upraveno dle (Snyder et al., 2010).

4.2. Plynová chromatografie

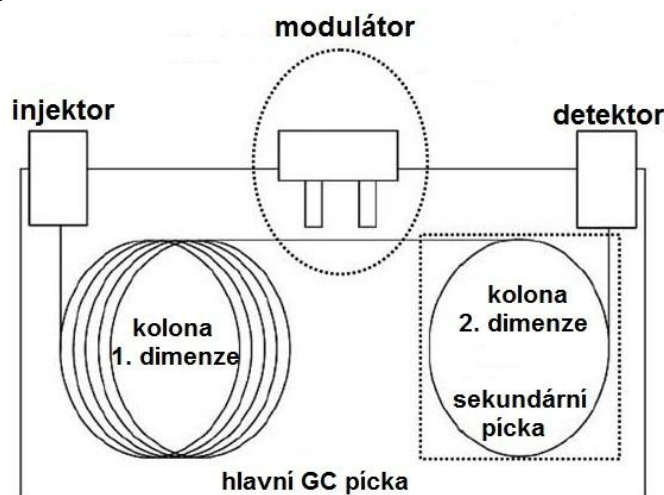
Plynová chromatografie (GC) je separační technika, kterou lze provádět v několika režimech. Prvním je systém plyn-kapalina (GLC), který využívá kolonu naplněnou kapalnou stacionární fází ukotvenou na inertních nosičích. Druhým systémem je plyn-pevná látka (GSC) využívající kolonu naplněnou pevnými částicemi, jejichž povrch tvoří stacionární fázi. Kromě náplňových kolon se také využívají kapilární GC kolony, u nichž se jako stacionární fáze může uplatňovat jak kapalná, tak pevná látka. V plynové chromatografii se k separaci využívá plynná mobilní fáze transportující komponenty ve formě páry přes fázi stacionární. Separace je založena na interakci jednotlivých složek se stacionární fází, což vede k opožďování (retardaci) na základě distribučního poměru K definovaného:

$$K = \frac{C_{SP}}{C_{MP}}$$

kde C_{SP} je koncentrace dané komponenty ve stacionární fázi a C_{MP} je koncentrace dané složky v mobilní fázi (Braithwaite & Smith, 1999).

4.2.1. Dvoudimenzionální plynová chromatografie

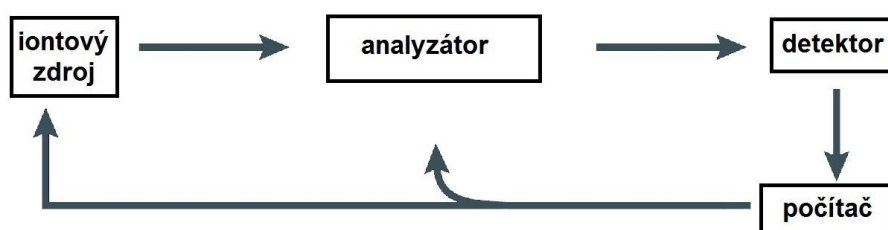
U GC × GC analýzy se uplatňují dvě kolony, které mají odlišnou separační selektivitu. Ve většině aplikací jsou vzorky nejprve separovány na první koloně obsahující nepolární stacionární fázi a využívající teplotní programování s rychlostí ohřívání méně než 1-5 °C/min. Druhá kolona je kratší a polární, separace tudíž probíhá na základě polarit. Obě kolony jsou vzájemně propojeny pomocí modulátoru, jehož hlavní funkcí je zaostření úzkých přilehlých frakcí eluátu z první kolony a po zaostření umožňuje uvolnění do kolony druhé („Obr. 18“) (Adahchour et al., 2006; Dallüge et al., 2003).



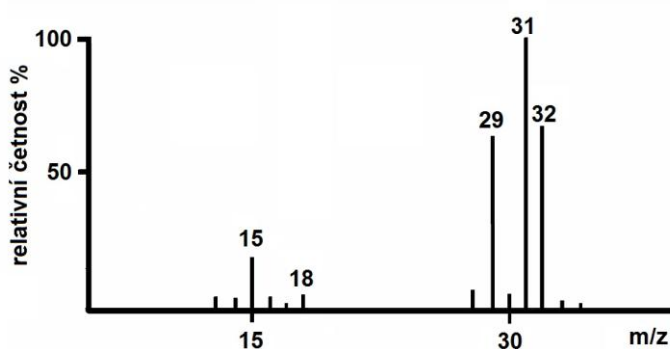
Obr. 18: Schéma GC × GC (upraveno dle Adahchour et al., 2006)

4.3. Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie je fyzikálně-chemická metoda, která poskytuje jak kvantitativní (molekulová hmotnost, koncentrace), tak kvalitativní (struktura) informaci o molekule analytu, jež je třeba nejprve převést na ionty. Molekuly nejprve vstupují do iontového zdroje hmotnostního spektrometru, kde se ionizují a získají kladný nebo záporný náboj. Následně ionty putují přes hmotnostní analyzátor k detektoru podle jejich poměru hmoty a náboje (m/z) („Obr. 19“). Po kontaktu iontů s detektorem je generován signál, který je díky počítačovému vyhodnocení znázorněn graficky jako hmotnostní spektrum (závislost relativní četnosti signálu na poměru m/z) („Obr. 20“) (Ho et al., 2003).



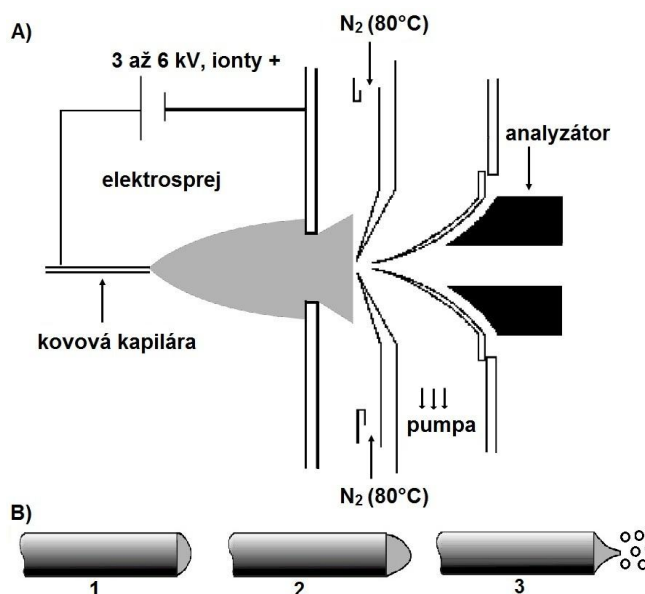
Obr. 19: Obecné schéma hmotnostní spektrometrie (upraveno dle Glish & Vachet, 2003)



Obr. 20: Hmotnostní spektrum methanolu (de Hoffmann & Stroobant, 2007)

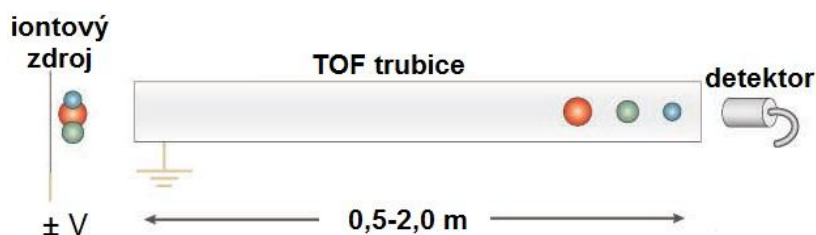
V hmotnostní spektrometrii se využívá celá řada ionizačních technik. Elektronová ionizace (EI) využívá vyhřívané vlákno, které poskytuje elektrony. Ty jsou urychlovány směrem k anodě a dochází ke kolizi s plynnými molekulami analyzovaného vzorku. Chemická ionizace (CI) produkuje ionty prostřednictvím kolize zkoumané molekuly s primárními ionty přítomnými ve zdroji (de Hoffmann & Stroobant, 2007). U ionizace laserem s využitím matrice (MALDI) vznikají ionty pulzním laserovým ozařováním vzorku, ten krystalizuje s pevnou matricí, která absorbuje vlnové délky světla emitovaného laserem (Glish & Vachet, 2003). Při použití ionizace elektrosprejem (ESI) je aplikováno elektrické pole za atmosférického tlaku na výstupní kapiláru. Toto pole indukuje akumulaci náboje na kapalině nacházející se na konci kapiláry a dochází

ke vzniku nabitých kapek. Kapky jsou vystřikovány proti proudu ohřátého plynu (nejčastěji dusíku), čímž dojde k odstranění rozpouštědla („Obr. 21“) (de Hoffmann & Stroobant, 2007).



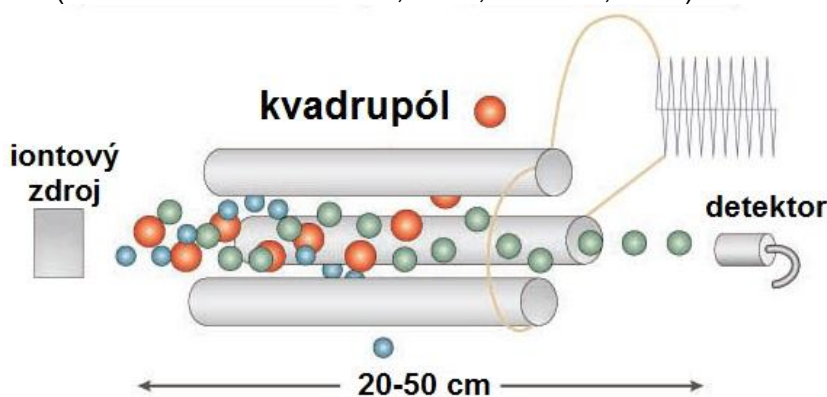
Obr. 21: A) Diagram ionizace elektrosprejem, B) Vliv elektrosprejového potenciálu na kapku na konci kapiláry. 1 při nízkém napětí je kapka téměř sférická. 2 při napětí 1 až 2 kV (ale stále pod mezním potenciálem) se kapka prodlužuje a kumuluje se na ní náboj. 3 při mezním napětí je tlak větší než povrchové napětí a tvar kapky se mění do tzv. Taylorova kužele a následně jsou uvolňovány malé kapky (upraveno dle de Hoffmann & Stroobant, 2007)

Jakmile jsou vytvořeny ionty v plynné fázi, je třeba provést separaci podle jejich hmot (respektive podle m/z), k čemuž slouží hmotnostní analyzátoři. Pro účely hmotnostní spektrometrie se využívá několik analyzátorů. Jedním z nich je analyzátor doby letu (TOF, time-of-flight), který separuje ionty na základě jejich rychlosti. Ionty jsou formovány ve stejnou dobu a na stejném místě v iontovém zdroji a poté jsou akcelerovány prostřednictvím fixního potenciálu do TOF trubice. Ionty s nižší hodnotou m/z dosáhnou vyšší rychlosti než ty s vyšší hodnotou m/z . Takto urychlené ionty musí překonat danou vzdálenost, než dorazí k detektoru („Obr. 22“). Měřením času potřebného k dosažení detektoru iontem může být stanovena hodnota m/z (de Hoffmann & Stroobant, 2007; Glish & Vachet, 2003).



Obr. 22: Analyzátor doby letu (upraveno dle Glish & Vachet, 2003)

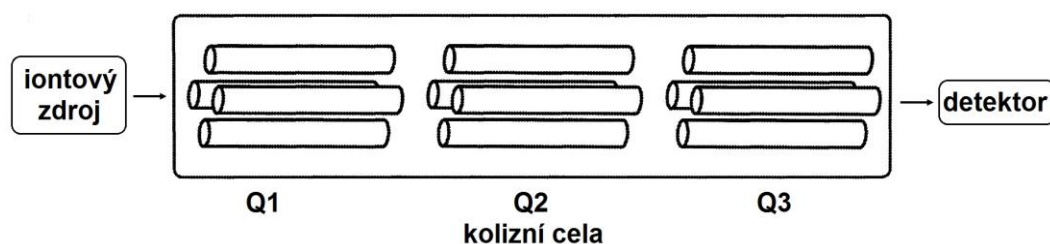
Dalším typem je kvadrupólový analyzátor („Obr. 23“), který využívá stabilitu trajektorie v oscilačním elektrickém poli k separaci iontů podle jejich m/z . Kvadrupólový analyzátor je složen ze 4 kovových tyčí, které mají kruhový nebo hyperbolický profil, a jsou umístěny paralelně. Protější tyče jsou spojeny elektricky a dvojice mají stejné napětí vzájemně se lišící polaritou. Výsledné elektrické pole ovlivňuje pohyb iontů, přičemž pouze ionty s vhodným m/z dosáhnou detektoru. Zbylé ionty jsou zachyceny na tyčích (de Hoffmann & Stroobant, 2007; Ho et al., 2003).



Obr. 23: Kvadrupólový analyzátor (upraveno dle Glish & Vachet, 2003)

4.2.2. Tandemová hmotnostní spektrometrie

V typickém tandemovém kvadrupólovém systému jsou 3 kvadrupóly seřazené lineárně. Toto uskupení se často nazývá „triplequad“. Analyzovaný ion (nazývaný prekurzorový) je selektován pomocí prvního kvadrupólu (Q1) a poté směřuje do kolizní cely (Q2), kde dochází ke srážce s kolizním plynem (např. argon). V Q2 probíhá fragmentace (tento proces je znám jako kolizí indukovaná disociace CID). Dceřinné ionty, jež jsou výsledkem CID, jsou monitorovány třetím kvadrupólem (Q3) („Obr. 24“). Jednou z možností získávání dat je použití tzv. „multiple reaction monitoring (MRM)“ módu (sledování produktu rozpadu molekulárního iontu), kde Q1 i Q3 jsou statické pro předem stanovený pár prekurzorového a produktového iontu (Ho et al., 2003).



Obr. 24: Schéma trojitého kvadrupólu (upraveno dle Ho et al., 2003)

Praktická část

5. Materiál a metody

Cílem praktické části této práce bylo sledovat vliv látek s potenciálním protirakovinným účinkem (shikonin, látka 05-0777) na metabolismus rakovinných buněk (T lymfoblastická leukemie, linie CCRF-CEM). K tomuto účelu bylo především využito techniky kapalinové chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií. Získané výsledky byly též porovnávány s technikou dvoudimenzionální plynové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií.

5.1. Chemikálie

Acetonitril LC-MS, hydroxid amonný, kyselina octová, methanol LC-MS, hydrogenuhličitan amonný, N-methyl-N-(trimethylsilyl) trifluoroacetamid (MSTFA), LC-MS voda, pyridin, ethoxyamin byly zakoupeny u firmy Sigma Aldrich (St. Louis, USA)

5.2. Přístroje

K přípravě vzorků byla použita centrifuga (Rotina 420R, Hettich Zentrifugen, Německo), vortex (V-1 plus; Biosan, Lotyšsko), analytické váhy (KERN ABT 120-5DM, Německo), lyofilizátor (FreeZone, Labconco, USA), ultrazvuková lázeň (Jeken, Čína), pH metr (Cyberscan pH 510, Thermo scientific, Waltham, MA, USA).

K měření vzorků byl použit vysokoúčinný kapalinový chromatograf UltiMate 3000 RS (Dionex, Sunnyvale, CA) ve spojení s tandemovým hmotnostním spektrometrem QTRAP 5500 (AB Sciex, Foster City, CA, USA), dále plynový chromatograf Agilent 7890 (Agilent Technologies, Palo Alto, USA), systém MPS2/CIS4/ALEX (Gerstel, Mülheim an der Ruhr, Německo) a hmotnostní spektrometr Pegasus HT (LECO Co., St. Joseph, USA).

5.3. Biologický materiál

K analýze byly použity rakovinné buňky (T lymfoblastická leukemie, linie CCRF-CEM), které byly inkubovány s testovanými látkami (shikonin, 05-0777) poloviční dobu do apoptózy. Tyto buňky byly získány z Laboratoře experimentální medicíny, Ústav molekulární a translační medicíny, Univerzita Palackého v Olomouci.

Buňky byly inkubovány v médiu s obsahem shikoninu o koncentraci 0,912 $\mu\text{mol/l}$ po dobu 4 hodin, dále byly buňky inkubovány v médiu s obsahem látky 05-0777 o koncentraci 1,42 $\mu\text{mol/l}$ po dobu 12 hodin. Jako kontroly sloužily buňky, ke kterým byl přidán pouze dimethylsulfoxid (0,5%), ve kterém byly zkoumané látky

rozpuštěny. K testování byly připraveny vždy 4 biologické replikáty od každé sady vzorku.

5.3.1. Quenching a extrakce buněk

K 5 ml buněčné suspenze bylo nalito 25 ml quenchovacího roztoku (60% methanol s přísadkou hydrogenuhličitanu amonného ve výsledné koncentraci 8,5 g/l) vychlazeného na -50 °C. Poté byly vzorky centrifugovány (400 g, 5 min). Oddělený supernatant byl odstraněn a metabolity extrahovány resuspendováním buněčné pelety v 0,5 ml extrakčního roztoku (80% methanol vychlazený na -50 °C) a rychle zchlazen v kapalném dusíku. Následně byl vzorek rozmrazen na ledu, peleta byla resuspendována a centrifugována (1700 g, 5 min). Supernatant byl odebrán a ponechán k analýze. Zbylá peleta byla stejným způsobem znovu extrahována, aby byl získán co největší podíl intracelulárních metabolitů. Supernatant z obou extrakcí byl lyofilizován (modifikováno dle Sellick et al., 2009).

Před lyofilizací extraktů bylo z každého vzorku odebráno 20 µl a smícháno v jeden vzorek, který byl použit jako kontrola kvality.

5.3.2. Zpracování vzorků pro LC-MS/MS analýzu

K lyofilizovaným vzorkům bylo přidáno 100 µl LC-MS vody, vortexováno a centrifugováno (15800 g, 15 min). Supernatant byl přepipetován do vialky a analyzován.

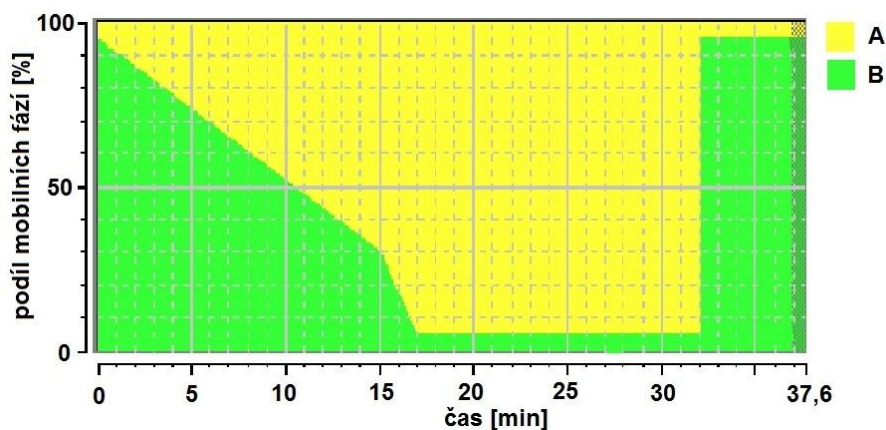
5.3.3. Zpracování vzorků pro GC×GC-TOF MS analýzu

K lyofilizovaným vzorkům bylo přidáno 40 µl deionizované vody a 160 µl methanolu. Vzorky byly vortexovány a centrifugovány (15800 g, 15 min). Poté byly přepipetovány do vialky s inzertem, odfoukány dusíkem a následně derivatizovány. Jako derivatizace byla použita silylace – vzorky byly inkubovány s 10 µl ethoxyaminu (roztok v pyridinu, 56 mg/ml) a 50 µl pyridinu po dobu 60 min při 50 °C. Poté bylo přidáno 50 µl derivatizačního činidla (MSTFA) a inkubováno po dobu 45 min při 50 °C.

5.4. LC-MS/MS analýza

Pro kapalinovou chromatografii byl použit přístroj UltiMate 3000 RS (Dionex, Sunnyvale, CA). Chromatografické separace byly prováděny při 25 °C na aminopropylkové koloně (Luna 3 µm NH₂, 2×150 mm). Byla aplikována gradientová eluce při průtokové rychlosti 0,3 ml/min při použití mobilní fáze A - 20 mM octan amonný (pH 9,45) a mobilní fáze B - acetonitril („Obr. 25“). Podíl mobilních fází na začátku analýzy byl 95 % B a 5 % A. Tento podíl klesal lineárně po dobu 15 min na

hodnotu 30 % B a v dalších 2 min klesl až na hodnotu 5 % B, která byla do 32. min konstantní. Poté během 0,1 min došlo k navrácení systému k iniciálním podmínkám (95 % B). Celkový čas analýzy byl 37 min. Nástřik připraveného vzorku činil 5 μ l.



Obr. 25: Gradient mobilních fází

Pro detekci byl použit tandemový hmotnostní spektrometr QTRAP 5500 (AB Sciex, Foster City, CA, USA) s ionizací elektrosprejem s přepínáním pozitivního a negativního módu. Hmotnostní spektrometr pracoval v tzv. multiple-reaction monitoring módu (MRM, sledování produktu rozpadu molekulárního iontu). Tato metoda umožňovala analýzu celkem 412 látek („Tab. 7 až 19“), z nichž některé z nich zahrnovaly více látek, které se nepodařilo rozlišit na základě MRM přechodu ani retenčního času. Jedná se například o cukry (proto se uvádí suma hexos - glukosa, fruktosa, galaktosa, manosa), citrát / isocitrát, leucin / isoleucin a další.

Tab. 5: Parametry MS/MS použité při cílené metabolické analýze

parametr	hodnota
tlak „curtain gas“	30 [psi]
tlak kolizního plynu	medium [psi]
tlak zmlžujícího plynu	40 [psi]
tlak sušícího plynu	40 [psi]
napětí na kapiláře v iontovém zdroji	+/-4500 [V]
teplota zmlžujícího plynu	400 [°C]

Všechny vzorky byly měřeny v jedné sérii. Na začátku byl desetkrát za sebou nastříkovan vzorek kontroly kvality, poté již následovaly samotné vzorky, po analýze každého třetího vzorku byl opět proveden nástřik vzorku kontroly kvality. Vyhodnocování dat bylo prováděno v softwaru MultiQuant (integrace ploch píků). Před statistickým zpracováním dat bylo prvních osm analýz vzorku kontroly kvality odstraněno.

5.5. GC×GC-TOF MS analýza

V první dimenzi byla zvolena nepolární kolona BPX5 (28 m × 0,25 mm × 0,25 μm), do druhé dimenze byla zařazena kolona se stacionární fází na bázi polyethylenglykolu (SOLGEL-wax 1m × 0,25 mm × 0,25 μm). Jako nosný plyn bylo použito helium (99,999 %, Messer, ČR).

Počáteční teplota primární pece byla 80 °C, poté narůstala 4 °C/min do 130 °C; 6 °C/min do 200 °C a 12 °C/min do 285 °C, při které byla udržována minimálně 10 min. Program sekundární pece kopíroval program primární pece s offsetem +5 °C. Modulační perioda byla 4 s a délka horkého pulsu 0,5 s. Nástřik vzorku byl 1 μl v režimu splitless (1 min) s programovatelným nástřikem injektoru. Iničiální teplota byla 40 °C, poté narůstala 10 °C/s do 250 °C, kde byla udržována 1,5 min. Další zvýšení teploty bylo 10 °C/s do 350 °C. Při této teplotě byl injektor udržován 3 min. Elektronová ionizace analytů v průletovém hmotnostním analyzátoru probíhala při -70 eV (250 °C). Teplota transferové linie byla 250 °C. Sběr dat v rozmezí m/z 35 – 650 probíhal rychlostí 100 Hz.

5.6. Statistické zpracování dat

Na základě vlastností naměřených dat bylo na ně pohlíženo jako na data kompoziční (představují podíly na celku, nesou relativní informaci). Získaná data byla statisticky zpracována v softwaru „R“ (www.r-project.org), verze 2.15.3. Byla provedena interpolace dat sloužící k odstranění systematické chyby. U vzorků kontroly kvality byl vypočítán variační koeficient (CV), na jehož základě byly metabolity mající variaci nad 30 % ze statistické analýzy vyloučeny. Na data byla využita tzv. „clr“ (centred logratio) transformace vyjádřená rovnicí 1.

$$\text{clr}(\mathbf{x}) = \left(\ln \frac{x_1}{g(\mathbf{x})}, \ln \frac{x_2}{g(\mathbf{x})}, \dots, \ln \frac{x_D}{g(\mathbf{x})} \right)^T \quad (1)$$

kde vektor \mathbf{x} představuje jeden buněčný vzorek, x_i jsou jednotlivé látky v něm obsažené a $g(\mathbf{x})$ je geometrický průměr těchto látek.

Byly použity následující statistické nástroje: analýza hlavních komponent (PCA), diskriminační analýza (DA), biplot, shluková analýza (třídění do skupin na základě podobnosti), tzv. „Heatmap“ a Bland-Altmanův graf - hodnotí vztah rozdílu hodnot získaných dvěma analytickými postupy (osa y) k průměru těchto hodnot (osa x).

Byla sestavena mapa metabolických drah v softwaru „pathway projector“ (<http://ws.g-language.org/g4/>) dostupného online („příloha A, příloha B“). V mapě metabolických drah jsou vyobrazeny metabolity nalezené v metabolické analýze. Velikost bodu odpovídá statistickému významu rozdílů mezi kontrolními buňkami a buňkami kultivovanými s testovanou látkou (p -value, $y = (\ln(1/Pvalue) * 10)$). Barva odpovídá poměru průměrů mezi buňkami kontrolními a kultivovanými s testovanou látkou („Tab. 6“).

Tab. 6: Barevné označení v metabolických drahách vytvořených v internetovém rozhraní „pathway projector“.

Barevné označení	Kód barvy	Rozmezí barev	Význam
Modrá	0000ff	> 0,1	snížená hladina oproti kontrolním buňkám
	3333cc	0,1 – 0,3	
	666990	0,3 – 0,5	
Šedá	666666	0,5 - 2,0	nebyly pozorovány významné rozdíly v poměrech průměrů mezi buňkami kontrolními a kultivovanými s testovanou látkou
Červená	cc3330	2,0 - 10	zvýšená hladina oproti kontrolním buňkám
	ff0000	< 10	

NELZE ZVEŘEJNIT

NELZE ZVEŘEJNIT

NELZE ZVEŘEJNIT

NELZE ZVEŘEJNIT

NELZE ZVEŘEJNIT

NELZE ZVEŘEJNIT

NELZE ZVEŘEJNIT

NELZE ZVEŘEJNIT

NELZE ZVEŘEJNIT

NELZE ZVEŘEJNIT

NELZE ZVEŘEJNIT

NELZE ZVEŘEJNIT

NELZE ZVEŘEJNIT

NELZE ZVEŘEJNIT

NELZE ZVEŘEJNIT

NELZE ZVEŘEJNIT

NELZE ZVEŘEJNIT

NELZE ZVEŘEJNIT

NELZE ZVEŘEJNIT

NELZE ZVEŘEJNIT

NELZE ZVEŘEJNIT

NELZE ZVEŘEJNIT

NELZE ZVEŘEJNIT

NELZE ZVEŘEJNIT

NELZE ZVEŘEJNIT

NELZE ZVEŘEJNIT

NELZE ZVEŘEJNIT

NELZE ZVEŘEJNIT

NELZE ZVEŘEJNIT

NELZE ZVEŘEJNIT

NELZE ZVEŘEJNIT

NELZE ZVEŘEJNIT

NELZE ZVEŘEJNIT

NELZE ZVEŘEJNIT

NELZE ZVEŘEJNIT

NELZE ZVEŘEJNIT

NELZE ZVEŘEJNIT

NELZE ZVEŘEJNIT

NELZE ZVEŘEJNIT

NELZE ZVEŘEJNIT

9. Použitá literatura

Adahchour M., Beens J., Vreuls R. J. J., Brinkman U. A. Th. (2006) Recent developments in comprehensive two-dimensional gas chromatography (GC×GC) I. Introduction and instrumental set-up. *Trac-Trends Anal. Chem.* **25**, 438-454.

Ahn B.-Z., Baik K.-U., Kweon G.-R., Lim K., Hwang B.-D. (1995) Acylshikonin analogues: Synthesis and inhibition of DNA topoisomerase-I. *J. Med. Chem.* **38**, 1044-1047.

Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. (2008) Molecular biology of the cell, fifth edition, pp. 3, 278, 1053-1055, 1115, 1206, Garland Science, Taylor & Francis group, USA.

Álvarez-Sánchez B., Priego-Capote F., Luque de Castro M. D. (2010a) Metabolomics analysis I. Selection of biological samples and practical aspects preceding sample preparation. *Trac-Trends Anal. Chem.* **29**, 111-119.

Álvarez-Sánchez B., Priego-Capote F., Luque de Castro M. D. (2010b) Metabolomics analysis II. Preparation of biological samples prior to detection. *Trac-Trends Anal. Chem.* **29**, 120-127.

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. *J. Biol. Chem.* **266**, 16842-16846.

Bino R. J., Hall R. D., Fiehn O., Kopka J., Saito K., Draper J., Nikolau B. J., Mendes P., Roessner-Tunali U., Beale M. H., Trethewey R. N., Lange B. M., Wurtele E. S., Sumner L. W. (2004) Potential of metabolomics as a functional genomics tool. *Trends Plant Sci.* **9**, 418-425.

Bolten C. J., Wittmann Ch. (2008) Appropriate sampling for intracellular amino acids analysis in five phylogenetically yeasts. *Biotechnol. Lett.* **30**, 1993-2000.

Braithwaite A., Smith F. J. (1999) Chromatographic methods, fifth edition, pp. 165-166, Kluwer academic publishers, The Netherlands.

Bulgakov V. P., Kozyrenko M. M., Fedoreyev S. A., Mischenko N. P., Denisenko V. A., Zvereva L. V., Pokushalova T. V., Zhuralev Y. N. (2001) Shikonin production by *p*-fluorophenylalanine resistant cells of *Lithospermum erythrorhizon*. *Fitoterapia* **72**, 394-401.

Dallüge J., Beens J., Brinkman U. A. Th. (2003) Comprehensive two-dimensional gas chromatography: a powerful and versatile analytical tool. *J. Chromatogr. A* **1000**, 69-108.

de Hoffmann E., Stroobant V. (2007) Mass spectrometry, principles and application, third edition, pp. 2-88, John Wiley & Sons Ltd, England.

Dettmer K., Hammock B. D. (2004) Metabolomics – A new exciting field within the „omic“ science. *Environ. Health Perspect.* **112**, 396-397.

Dringen R., Gutterer J. M., Hirrlinger J. (2003) Glutathione metabolism in brain. Metabolic interaction between astrocytes and neurons in the defense against reactive oxygen species. *Eur. J. Biochem.* **267**, 4912-4916.

Dunn W. B., Bailey N. J. C., Johnson H. E. (2005) Measuring the metabolome: current analytical technologies. *Analyst* **130**, 606-625.

Faijes M., Mars A. E., Smid E. J. (2007) Comparison of quenching and extraction methodologies for metabolome analysis of *Lactobacillus plantarum*. *Microb. Cell. Fact.* **6**, doi: 10.1186/1475-2859-6-27.

Fiehn O. (2001) Combining genomics, metabolome analysis, and biochemical modelling to understand metabolic network. *Compar. Funct. Genom.* **2**, 155-168.

Fiehn O. (2002) Metabolomics – the link between genotypes and phenotypes. *Plant Mol. Biol.* **48**, 155-171.

Förster J., Famili I., Fu P., Palsson B., Nielsen J. (2003) Genome-scale reconstruction of the *Saccharomyces cerevisiae* metabolic network. *Genome Res.* **13**, 244-253.

Fujita Y., Hara Y., Suga C., Morimoto T. (1981) Production of shikonin derivatives by cell suspension cultures of *Lithospermum erythrorhizon*. II. A new medium for the production of shikonin derivatives. *Plant Cell Reports* **1**, 61-63.

Glish G. L., Vachet R. W. (2003) The basics of mass spectrometry in the twenty-first century. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2**, 140-150.

Goodacre R., Vaidyanathan S., Dunn W. B., Harrigan G. G., Kell D. B. (2004) Metabolomics by numbers: acquiring and understanding global metabolite data. *Trends Biotechnol.* **22**, 245-252.

Hayashi M. (1977) Pharmacological studies of Shikon and Tooki. (2) Pharmacological effects of the pigment components, shikonin and acetylshikonin. *Nihon Yakurigaku Zasshi* **73**, 193-203.

Heide L. Nishioka N., Fukui H., Tabata M. (1989) Enzymatic regulation of shikonin biosynthesis in *Lithospermum erythrorhizon* cell cultures. *Phytochemistry* **28**, 1873-1877.

Hiller J., Franco-Lara E., Papaioannou V., Weuster-Botz D. (2007) Fast sampling and quenching procedures for microbial metabolic profiling. *Biotechnol. Lett.* **29**, 1161-1167.

Ho C. S., Lam C. W. K., Chan M. H. M., Cheung R. C. L., Law L. K., Lit L. C. W., Ng K. F., Suen M. W. M., Tai H. L. (2003) Electrospray ionization mass spectrometry: principles and clinical applications. *Clin Biochem Rev* **24**, 3-12.

Hradil P., Hlaváč J., Soral M., Hajdúch M., Kolář M., Večeřová R. (2009) 3-hydroxy-2-phenyl-4(1*H*)-quinolinones as promising biologically active compounds. *Mini-Rev. Med. Chem.* **9**, 696-702.

Chen X., Yang L., Zhang N., Turpin J. A., Buckheit R. W., Osterling C., Oppenheim J. J., Howard O. M. Z. (2003) Shikonin, a component of chinese herbal medicine, inhibits chemokine receptor function and suppresses human immunodeficiency virus type 1. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**, 2810-2816.

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.

Cheng H.-W., Chen F.-A., Hsu H.-C., Chen C.-Y. (1995) Photochemical decomposition of alkanin/shikonin enantiomers. *Int. J. Pharm.* **120**, 137-144.

Ibsen K. H. (1961) The Crabtree effect: A review. *Cancer Res.* **21**, 829-841.

Jemal A., Bray F., Center M. M., Ferlay J., Ward E., Forman D. (2011) Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* **61**, 69-90.

Kanehisa M., Goto S., Kawashima S., Okuno Y., Hattori M. (2004) The KEGG resource for deciphering the genome. *Nucleic Acids Res.* **32**, 277-280.

Klener P. (1996) Protinádorová chemoterapie, pp. 29-80, nakladatelství Galén, Praha

Koutecký J. a kolektiv (1989) Klinická onkologie, učebnice pro lékařské fakulty, pp. 19-117, nakladatelství Avicenum, Praha.

Lee C.-C., Wang C.-N., Lai Y.-T., Kang J.-J., Liao J.-W., Chiang B.-L., Chen H.-C., Chen Y.-W. (2010) Shikonin inhibits maturation of bone marrow-derived dendritic cells and suppresses allergic airway inflammation in a murine model of asthma. *Br. J. Pharmacol.* **161**, 1496-1511.

Maharjan R. P., Ferenci T. (2003) Global metabolite analysis: the influence of extraction methodology on metabolome profiles of *Escherichia coli*. *Anal. Biochem.* **313**, 145-154.

Majima R., Kuroda C. (1922) Studies on the derivatives of naphthoquinones. XIII. *Acta Phytochemistry* **1**, 43-65.

Marchut E., Gumińska M., Kedryna T. (1986) The inhibitory effect of various fatty acids on aerobic glycolysis in Ehrlich ascites tumour cells. *Acta Biochim. Pol.* **33**, 7-16.

Mashego M. R., Rumbold K., De Mey M., Vondamme E., Soetaert W., Heijnen J. J. (2007) Microbial metabolomics: past, present and future methodologies. *Biotechnol. Lett.* **29**, 1-16.

Mazurek S. (2011) Pyruvate kinase type M2: A key regulator of the metabolic budget system in tumor cells. *Int J Biochem Cell Biol* **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. *Semin. Cancer Biol.* **15**, 300-308.

Mazurek S., Grimm H., Boschek C. B., Vaupel P., Eigenbrodt E. (2002) Pyruvate kinase type M2: a crossroad in the tumor metabolome. *Br. J. Nutr.* **87**, 23-29.

Miller M. G., Rodgers A., Cohen G. M. (1986) Mechanisms of toxicity of naphthoquinones to isolated hepatocytes. *Biochem. Pharmacol.* **35**, 1177-1184.

Mueller L. A., Zhang P., Rhee S. Y. (2003) AraCyc: A biochemical pathway database for Arabidopsis. *Plant Physiol.* **132**, 453-460.

Musilová J., Glatz Z. (2011) Metabolomika – základní pojmy, strategie a metodologie. *Chem. Listy* **105**, 745-751.

Nobeli I., Ponstingl H., Krissinel E. B., Thornton J. M. (2003) A structure – based anatomy of the *E. coli* metabolome. *J. Mol. Biol.* **334**, 697-719.

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. *J. Biol. Chem.* **261**, 13807-13812.

Papagergiou V. P., Assimopoulou A. N., Couladouros E. A., Hepworth D., Nicolau K. C. (1999) The chemistry and biology of alkanin, shikonin, and related naphthazarin natural products. *Angew. Chem. Int. Ed.* **38**, 270-300.

Pastore A., Federici G., Bertini E., Piemonte F. (2003) Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. *Clin. Chim. Acta*, **333**, 19-39.

Perricone C., De Carolis C., Perricone R. (2009) Glutathione: A key player in autoimmunity. *Autoimmun. Rev.* **8**, 697-701.

Petruželka L., Konopásek B., Aschermannová A., Helmichová E., Janků F., Kleibl Z., Mališ J., Mareš P., Novotný J., Přibylková O., Špička I., Tesařová P. (2003) Klinická onkologie, pp. 9-56, nakladatelství Karolinum, Praha.

Presek P., Reinacher M., Eigenbrodt E. (1988) Pyruvate kinase type M2 is phosphorylated at tyrosine residues in cells transformed by Rous sarcoma virus. *FEBS Lett* **242**, 194-198.

Saheki S., Harada K., Sanno Y., Tanaka T. (1978) Hybrid isozymes of rat pyruvate kinase. Their subunit structure and developmental changes in the liver. *Biochim Biophys Acta*. **536**, 116-128.

Seagroves T. N., Ryan H. E., Lu H., Wouters B. G., Knapp M., Thibault P., Laderoute K., Johnson R. S. (2001) Transcription factor HIF-1 is a necessary mediator of the Pasteur effect in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 3436-3444.

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. *Anal. Chem.* **81**, 174-183.

Snyder L. R., Kirkland J. J., Dolan J. W. (2010) Introduction to modern liquid chromatography, third edition, pp. 1-89, John Wiley & Sons, Inc., USA.

Šípál Z., Anzenbacher P., Peč P., Pospíšil J., Růžička I. (1992) *Biochemie*, pp. 356-370, Státní pedagogické nakladatelství, Praha.

Tabata M., Mizukami H., Hiraoka N., Konoshima M. (1974) Pigment formation in callus cultures of *Lithospermum erythrorhizon*. *Phytochemistry* **13**, 927-932.

Tani M., Fukui H., Shimomura M., Tabata M. (1992) Structure of endogenous oligogalacturonides inducing shikonin biosynthesis in *Lithospermum erythrorhizon* cell cultures. *Phytochemistry* **31**, 2719-2723.

Voet D., Voet J. G. (2011) *Biochemistry*, fourth edition, pp. 559-562, 578, John Wiley & Sons, Inc., USA.

Wiench B., Eichhorn T., Paulsen M., Efferth T. (2012) Shikonin directly targets mitochondria and causes mitochondrial dysfunction in cancer cells. *Evid.-based Complement Altern. Med.* **2012**, doi:10.1155/2012/726025.

Winder C. L., Dunn W. B., Schuler S., Broadhurst D., Jarvis R., Stephens G. M., Goodacre R. (2008) Global metabolic profiling of *Escherichia coli* cultures: an evaluation of methods for quenching and extraction of intracellular metabolites. *Anal. Chem.* **80**, 2939-2948.

Wishart D. S., Tzur D., Knox C., Eisner R., Guo A. C., Young N., Cheng D., Jewell K., Arndt D., Sawhney S., Fung C., Nikolai L., Lewis M., Coutouly M. A., Forsythe I., Tang P., Shrivastava S., Jeroncic K., Stothard P., Amegbey G., Block D., Hau D. D., Wagner J., Miniaci J., Clements M., Gebremedhin M., Guo N., Zhang Y., Duggan G. E., MacInnis G. D., Weljie A. M., Dowlatbadi R., Bamforth F., Clive D., Greiner R., Li L., Marrie T., Sykes B. D., Vogel H. J., Querengesser L. (2007) HMDB: the human metabolome database. *Nucleic Acids Res.* **35**, 521-526.

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., Shaykhtudinov R., Li L., Vogel H. J., Forsythe I. (2009) HMDB: a knowledgebase for the human metabolome. *Nucleic Acids Res.* **37**, 603-610.

Yamamura Y., Sahin F. P., Nagatsu A., Mizukami H. (2003) Molecular cloning and characterization of a cDNA encoding a novel apoplastic protein preferentially expressed in a shikonin-producing callus strain of *Lithospermum erythrorhizon*. *Plant Cell Physiol.* **44**, 437-446.

Yazaki K., Fukui H., Kikuma M., Tabata M. (1987) Regulation of shikonin production by glutamine in *Lithospermum erythrorhizon* cell cultures. *Plant Cell Reports* **6**, 131-134.

Yazaki K., Fukui H., Nishikawa Y., Tabata M. (1997) Measurement of phenolic compounds and their effect on shikonin production in *Lithospermum erythrorhizon* cultured cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **61**, 1674-1678.

Zhou Bin-Bing S., Elledge S. J. (2000) The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature* **408**, 433-439.

10. Seznam použitých zkratk

3MHis	3-methylhistidin
3-P-Gly	3-fosfoglycerát
5OPro	5-oxoprolin
A	adenin
ADP	adenosin-5'-difosfát
AICAr	5-aminoimidazol-4-karboxamidribosid
AICAR	5-aminoimidazol-4-karboxamidribotid
Alr	5-aminoimidazolribosid
Ala	alanin
AMP	adenosin-5'-monofosfát
AR	adenosin
Arg	arginin
Asn	asparagin
Asp	kyselina asparagová
ATP	adenosin-5'-trifosfát
b-ala	beta-alanin
C	cytosin
C10	dekanoylkarnitin
C10-1	decenoylkarnitin
C10-2	dekadienylkarnitin
C12	dodekanoylkarnitin
C12:1	dodecenoylkarnitin
C12-DC	dodekandioylkarnitin
C14	tetradekanoylkarnitin
C14-1	tetradecenoylkarnitin
C14-1OH	hydroxytetradecenoylkarnitin
C14-2	tetradekadienylkarnitin
C14-2OH	hydroxytetradekadienylkarnitin
C16	hexadekanoylkarnitin (palmitoylkarnitin)
C16:2	hexadekadienylkarnitin
C16:2-OH	hydroxyhexadekadienylkarnitin
C16-1	hexadecenoylkarnitin
C16-1OH	hydroxyhexadecenoylkarnitin
C16-OH	hydroxyhexadekanoylkarnitin (hydroxypalmitoylkarnitin)

C18	oktadekanoylkarnitin (stearoylkarnitin)
C18-1	oktadecenoylkarnitin (oleoylkarnitin)
C18-1OH	hydroxyoktadecenoylkarnitin (hydroxyoleoylkarnitin)
C18-2	oktadekadienylkarnitin (linoleoylkarnitin)
C18-3	oktadekatrienylkarnitin
C18-4	oktadekatetraenylkarnitin
C2	acetylkarnitin
C20	eikosanoylkarnitin
C20-1	eikosenoylkarnitin
C20-2	eikosadienylkarnitin
C20-DC	eikosandioylkarnitin
C22	dokosadekanoylkarnitin
C22-1	dokosadecenylkarnitin
C22-2	dokosadienylkarnitin
C22-5	dokosapentaenylkarnitin
C22-DC	dokosadekandioylkarnitin
C26	hexakosanoylkarnitin
C26-1	hexakosenoylkarnitin
C26-DC	hexakosandioylkarnitin
C3	propionylkarnitin
C3:1	propeonylkarnitin
C3-DC/C4-OH	malonylkarnitin/hydroxybutyrylkarnitin
C3-OH	hydroxypropionylkarnitin
C4	butyrylkarnitin
C4:1	butenylkarnitin
C4-DC/C5-OH	sukcinylkarnitin/hydroxyvalerylkarnitin
C5	valerylkarnitin
C5:1-DC	glutakonylkarnitin
C5-1	tiglylkarnitine
C5-DC	glutarylkarnitin
C6	hexanoylkarnitin
C6:1	hexenoylkarnitin
C6-DC/C7-OH	hexandioylkarnitin (adipoyl; methylglutaryl) /hydroxyheptanoylkarnitin
C7-DC	pimelylkarnitin (heptandioylkarnitin)
C8	oktanoylkarnitin
C8-1	oktenoylkarnitin

C9	nonanoylkarnitin
CAI _r	aminoimidazolkarboxyribosid
CCRF-CEM	buněčná linie, T lymfoblastická leukemie
CDP	cytidin-5'-difosfát
CE	kapilární elektroforéza
CE	kolizní energie
CI	chemická ionizace
Cit	citrulin
CMP	cytidin-5'-monofosfát
CoA	koenzym A
CR	cytidin
CTP	cytidin-5'-trifosfát
cy	cystin
Cys	cystein
DA	diskriminační analýza
dADP	2'-deoxyadenosin-5'-difosfát
dAMP	2'-deoxyadenosin-5'-monofosfát
dAR	deoxyadenosin
dATP	2'-deoxyadenosin-5'-trifosfát
dCDP	2'-deoxycytidin-5'-difosfát
dCMP	2'-deoxycytidin-5'-monofosfát
dCTP	2'-deoxycytidin-5'-trifosfát
dGDP	2'-deoxyguanosin-5'-difosfát
dGMP	2'-deoxyguanosin-5'-monofosfát
dGTP	2'-deoxyguanosin-5'-trifosfát
DHAP	dihydroxyacetonfosfát
DIESI	přímý nástřik do ESI-MS
diOH-acetone-P	dihydroxyacetonfosfát
dITP	2'-deoxyinosin-5'-trifosfát
DP	deklasterační potenciál
dTDP	2'-deoxythymidin-5'-difosfát
dTMP	2'-deoxythymidin-5'-monofosfát
dTTP	2'-deoxythymidin-5'-trifosfát
dUMP	2'-deoxyuridin-5'-monofosfát
dUTP	2'-deoxyuridin-5'-trifosfát
EI	elektronová ionizace
erythrose 4-P	erythroza-4-fosfát

ESI	ionizace elektrosprejem
F-1,6-P2	fruktosa-1,6-bisfosfát
FAD	flavinadenindinukleotid
FAICAr	5-formaminoimidazol-4-karboxamidribosid
FGAr	formylglycinamidribosid
FMN	flavinmononukleotid
FT-IR	infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací
G	látka 05-0777
GAPDH	glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenasa
PPP	pentosafosfátová dráha
GC × GC	dvoudimenzionální plynová chromatografie
GC	plynová chromatografie
GDP	guanosin-5'-difosfát
GLC	plynová chromatografie systém plyn-kapalina
Gln	glutamin
Glu	glutamát
Glu-1-P	glukosa-1-fosfát
Glu-6-P	glukosa-6-fosfát
Gly	glycin
GMP	guanosin-5'-monofosfát
GPP	geranylpyrofosfát
GR	guanosin
GSC	plynová chromatografie systém plyn-pevná látka
GSH	glutathion
GSSG	glutathion disulfid
GTP	guanosin-5'-trifosfát
Hcys	homocystein
His	histidin
HK	hexokinasa
HMDB	„The Human Metabolome Database“
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HPro	hydroxyprolin
HR	inosin
HX	hypoxanthin
IAA	kyselina indol-3-octová
IDP	inosin-5'-difosfát
IMP	inosin-5'-monofosfát

ITP	inosin-5'-trifosfát
KEGG	„Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes“
KG	kontrolní buňky neovlivněné látkou 05-0777
KS	kontrolní buňky neovlivněné shikoninem
LC	kapalinová chromatografie
LC-MS/MS	kapalinová chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií
<i>LE</i>	rostlina <i>Lithospermum erythrorhizon</i>
Leu	leucin
LHD	laktátdehydrogenasa
L-PK	pyruvátkinasa L
Lys	lysin
M1-PK	pyruvátkinasa M1
M2-PK	pyruvátkinasa M2
MALDI	ionizace laserem s využitím matrice
Met	methionin
MMA	methylmalonát
MRM	„multiple reaction monitoring“, sledování produktu rozpadu molekulárního iontu
MS	hmotnostní spektrometrie
MSTFA	derivatizační činidlo N-methyl-N-(trimethylsilyl) trifluoroacetamid
NAD ⁺	nikotinamidadenindinukleotid (oxidovaná forma)
NADH	nikotinamidadenindinukleotid (redukováná forma)
NADP ⁺	nikotinamidadenindinukleotidfosfát (oxidovaná forma)
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát (redukováná forma)
NMR	nukleární magnetická rezonance
OA	orotát
Orn	ornitin
P	fosfát
PCA	analýza hlavních komponent („principal component analysis“)
PDH	pyruvátdehydrogenasa
PEP	fosfoenolpyruvát
P-ethanolamin	fosfoethanolamin
PFK	fosfofruktokinasa
PHB	kyselina <i>p</i> -hydroxybenzoová
Phe	fenylalanin
PheSer	fenylserin

Pro	prolin
Q1	první kvadrupól
Q2	kolizní cela
Q3	třetí kvadrupól
RI	refraktometrický detektor
Rib-5-P	ribosa-5-fosfát
ROS	reaktivní formy kyslíku
R-PK	pyruvátkinasa R
RT	retenční čas
S	shikonin
SAICAr	5-aminoimidazol-4-(N-sukcinylkarboxamid)ribosid
SAICAR	5-aminoimidazol-4-(N-sukcinylkarboxamid)ribotid
SAMP	sukcinyladenosenmonofosfát
Sar	sarkosin
Ser	serin
sphingosine 1-P	sfingosin-1-fosfát
T	thymin
Tau	taurin
Thr	treonin
TOF	analyzátor doby letu („time-of-flight“)
Trp	tryptofan
Tyr	tyrosin
U	uracil
UDP	uridin-5'-difosfát
UMP	uridin-5'-monofosfát
UR	uridin
UTP	uridin-5'-trifosfát
Val	valin
vit D3	vitamin D3
X	xantin

11. Seznam příloh

Metabolické mapy vytvořené v softwaru „pathway projector“

Příloha A: Metabolická mapa CEM buněk ovlivněných shikoninem

Příloha B: Metabolická mapa CEM buněk ovlivněných látkou 05-0777

Použité zkratky – viz kapitola 10. Seznam použitých zkratek