

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Buněčná metabolomika pro predikci a léčbu
rakovinných onemocnění**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Veronika Šťastná
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	doc. RNDr. Tomáš Adam, Ph.D.
Termín odevzdání práce:	6. 5. 2011

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

V Olomouci dne 3. 5. 2011

.....

Veronika Šťastná

Děkuji vedoucímu své bakalářské práce doc. RNDr. Tomáši Adamovi, Ph. D. za odborné vedení, konzultace a ochotu, Mgr. Petru Wojtowiczovi za čas a trpělivost při zpracování experimentální části mé bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat všem pracovníkům a studentům Laboratoře dědičných metabolických poruch Oddělení klinické biochemie Fakultní nemocnice v Olomouci.

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora	Veronika Šťastná
Název práce	Buněčná metabolomika pro predikci a léčbu rakovinných onemocnění
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Laboratoř dědičných metabolických poruch, Univerzita Palackého a Fakultní nemocnice Olomouc
Vedoucí práce	doc. RNDr. Tomáš Adam, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2011
Abstrakt	Metabolomika je nová vědní disciplína, která studuje metabolity a jejich interakce, například s léky, v komplexních biologických maticích (moč, tkáně). Fibroblasty jsou buňky pojivové tkáně, jsou nejméně specializované a lze je snadno kultivovat v laboratorním prostředí. 5-Fluorouracil je lék, který patří do skupiny cytostatik a používá se k léčení rakovinných onemocnění. Tato práce se zabývá rozdíly v metabolitech kontrolních fibroblastů a fibroblastů, které byly vystaveny 5-fluorouracilu. Analýza byla provedena pomocí dvoudimenzionální plynové chromatografie. V quenchovaných buněčných extraktech bylo kvantifikováno 393–451 analytů (převážně aminokyseliny a organické kyseliny) a byly identifikovány hlavní rozdíly.
Klíčová slova	Dvoudimenzionální plynová chromatografie, metabolomika, 5-fluorouracil, fibroblasty.
Počet stran	40
Počet příloh	-
Jazyk	Český

Bibliographical identification:

Autor's first name and surname	Veronika Šťastná
Title	Cellular metabolomics for prediction and treatment of cancers
Type of thesis	Bachelor
Department	Laboratory of Inherited Metabolic Disorders, Palacky University and University Hospital Olomouc
Supervisor	doc. RNDr. Tomáš Adam, Ph.D.
The year of presentation	2011
Abstract	Metabolomics is a recent way to study metabolites and their interactions e.g. with drugs in complex biological matrices (urine, tissue samples.) Fibroblasts are the least specialized connective tissue cells and it is easy to cultivate them in a laboratory environment. 5-Fluorouracil is a drug that belongs to the group of cytostatics and it is used to the treatment of cancers. This work deals with the differences between the metabolite levels of control fibroblasts and fibroblasts that were exposed to 5-fluorouracil. Analyses were performed using two-dimensional gas chromatography. 393–451 analytes (mainly amino and organic acids) were quantified in quenched cell extracts and major differences were identified.
Keywords	Two-dimensional gas chromatography metabolomics, 5-fluorouracil, fibroblasts
Number of pages	40
Number of appendices	-
Language	Czech

Obsah:

1	CÍLE PRÁCE	8
2	TEORETICKÁ ČÁST	9
2.1	Plynová chromatografie.....	9
2.1.1	Základy chromatografie.....	9
2.1.2	Instrumentace.....	11
2.2	Hmotnostní spektrometrie	14
2.2.1	Ionizace	14
2.2.2	Hmotnostní analyzátor	15
2.3	Komprehenzivní dvoudimenzionální chromatografie (GC×GC).....	18
2.3.1	Instrumentace.....	18
2.3.2	GC×GC-TOFMS	18
2.3.3	Vznik contour plotu a využití GC×GC-TOF	19
2.4	5-Fluorouracil	20
2.4.1	Metabolismus 5FU.....	20
2.5	Fibroblasty	22
2.6	Metabolomika	23
2.6.1	Metabolismus	23
2.6.2	Metabolom	24
2.6.3	Metody studia metabolomu.....	25
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	26
3.1	Instrumentace a materiál.....	26
3.1.1	Instrumentace.....	26
3.1.2	Biologický materiál.....	27
3.1.3	Použité chemikálie.....	27
3.1.4	Příprava kožních fibroblastů	27
3.1.5	Derivatizace	28
3.2	Výsledky	29
3.2.1	Zjištění retenčních indexů	29

3.2.2	Vytvoření reference	31
3.2.3	Analýza extraktů fibroblastů	32
3.2.4	Statistické zpracování	32
3.3	Diskuze	36
4	ZÁVĚR	37
5	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	38
6	LITERATURA.....	39

1 CÍLE PRÁCE

- Vypracování rešerše na téma: metabolomika, GC×GC-TOF, 5-fluorouracil
- Seznámení se se softwarem pro zpracování dat z GC×GC-TOF
- Optimalizace metody analýzy buněčného obsahu touto technikou
- Provedení a hodnocení experimentu s fibroblasty inkubovanými s 5-fluorouracilem

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Plynová chromatografie

2.1.1 Základy chromatografie

Plynová chromatografie (GC) patří mezi analytické separační metody a slouží k separaci a identifikaci plyných a těkavých kapalných látek. Metoda je založena na rozdělení látek mezi mobilní a stacionární fázi. Koncentrace těchto látek je definována distribuční konstantou K_D charakterizovanou rovnicí (1), kde c_S a c_M jsou koncentrace látek ve stacionární a mobilní fázi.

$$K_D = c_S / c_M \quad (1)$$

Proces separace popisuje několik veličin. *Retenční čas* je doba, kterou látka urazí kolonou od nástřiku po dosažení detektoru, může být popsán rovnicí (2), kde t_M je *mrtvý čas*, tedy doba, kterou projde látka kolonou, aniž by se na ní zdržovala. *Redukovaný retenční čas* t'_R je doba, kterou látka stráví ve stacionární fázi při průchodu kolonou. Důležitou veličinou je i *kapacitní poměr* k' , který udává poměr doby analytu strávené ve stacionární a mobilní fázi (rovnice 3). Čím je tedy kapacitní faktor vyšší, tím déle je látka zdržována ve stacionární fázi. Poměr kapacitních faktorů dvou látek udává separační faktor α (rovnice 4).

$$t_R = t_M + t'_R \quad (2)$$

$$k' = \frac{t_R - t_M}{t_M} \quad (3)$$

$$\alpha = \frac{k'_A}{k'_B} = \frac{t_{RA} - t_M}{t_{RB} - t_M} \quad (4)$$

V plynové chromatografii je důležitá hodnota *rozlišení* R (rovnice 5). Udává míru separace dvou složek. Aby se látka dostatečně rozdělila, musí být její R rovno nebo větší než 1,5, při této hodnotě jsou píky separovány z 99,7%. Hodnota w_b udává šířku píku při základně a w_h šířku píku v polovině výšky píku.

$$R = 2 * \frac{(t_{R,2} - t_{R,1})}{w_{b1} + w_{b2}} = 1,18 * \frac{(t_{R,2} - t_{R,1})}{w_{h,1} + w_{h,2}} \quad (5)$$

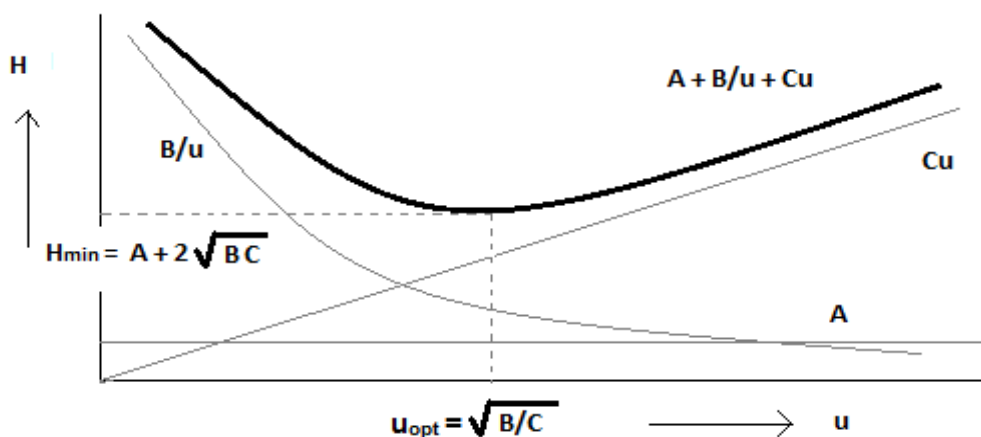
Čím je kolona účinnější, tím lépe od sebe dokáže oddělit složky směsi. Při vyšší účinnosti dochází k menšímu rozmývání zóny separované látky, když prochází kolonou, to má za následek i užší pík. Mírou účinnosti chromatografické kolony je počet *teoretických pater* n (rovnice 6). Teoretické patro je pomyslná část kolony, na které dochází k ustanovení rovnováhy. Čím více má kolona teoretických pater, tím je účinnější.

$$n = 5,545 * \left(\frac{t_R}{w_h}\right)^2 = 16 * \left(\frac{t_R}{w_b}\right)^2 \quad (6)$$

Kinetiku chromatografické separace popisuje tzv. van Deemterova rovnice (7). Podle této teorie způsobují rozmývání zóny v koloně: vířivá difúze (A), molekulární difúze (B) a odpor proti převodu hmoty (C, příčná difúze). Hodnota H udává výšku teoretického patra a je dáno podílem délky kolony a počtem teoretických pater. Hodnota u je lineární rychlost mobilní fáze (Opekar et al., 2003; Clement, 1990; Štulík, 2004; Harold & Miler, 1998).

$$H = A + \frac{B}{u} + Cu \quad (7)$$

Deemterova křivka (Obr.1) ukazuje závislost výšky teoretického patra (H) na lineární rychlosti mobilní fáze (u).

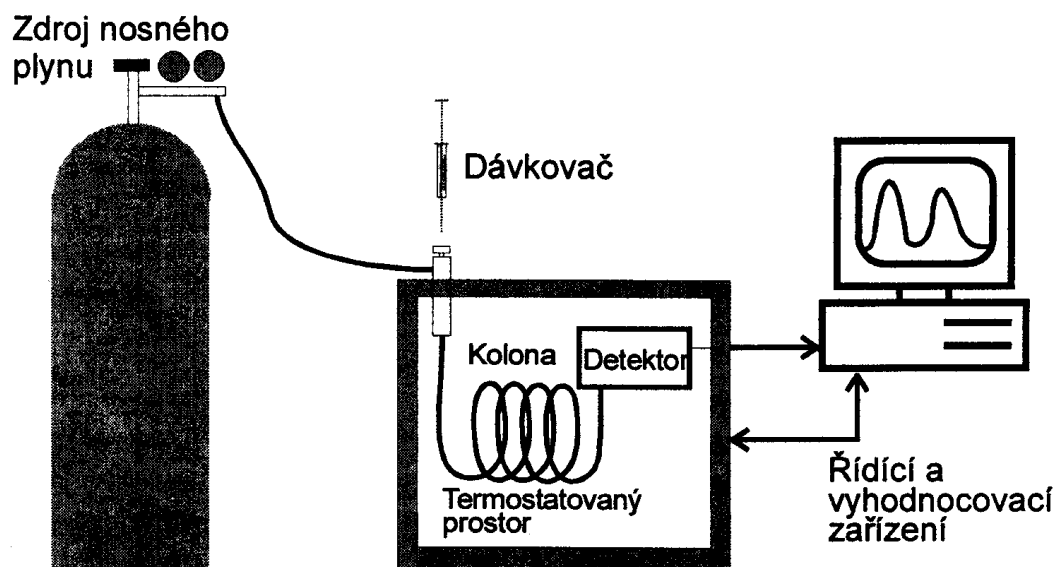


Obr. 1: Závislost výšky teoretického patra (H) na lineární rychlosti mobilní fáze (u) (upraveno podle Opekar et al. 2003).

2.1.2 Instrumentace

GC se dělí na chromatografii v systému plyn–kapalná látka (GLC) a plyn–pevná látka (GSC). Mobilní fází je inertní nosný plyn, např. helium, dusík, vodík nebo argon, který nese vzorek kolonou, nereaguje s ním a separačního procesu se přímo neúčastní. U GLC se separovaná látka rozdělí mezi plynnou a kapalnou fází na základě rozpustnosti. Kapalná fáze je ukotvena na nosiči, musí být chemicky stabilní, mít nízkou tenzi par a malou viskozitu. Jako nosiče se nejčastěji používají různé druhy křemeliny, silikagel nebo teflon. Kapalně fáze jsou například polysiloxany, polyestery či polypropylenglykoly. V případě GSC se analyt separuje na základě adsorbce. Jako sorbenty lze použít aktivní uhlí, grafitické saze nebo molekulová síta.

Plynový chromatograf je složen z několika základních částí (Obr. 2): ze zásobníku plynné fáze, dávkovače, kolony a detektoru (Opekar et al., 2003; Harold & Miler, 1998).



Obr. 2: Schéma plynového chromatografu (převzato z Opekar et al. 2003).

Dávkování vzorku se provádí mikrostříkačkou do nástřikové komůrky opatřené septem. V nástřikové komůrce dochází ke zplynění a převodu analytu na kolonu (Opekar et al., 2003).

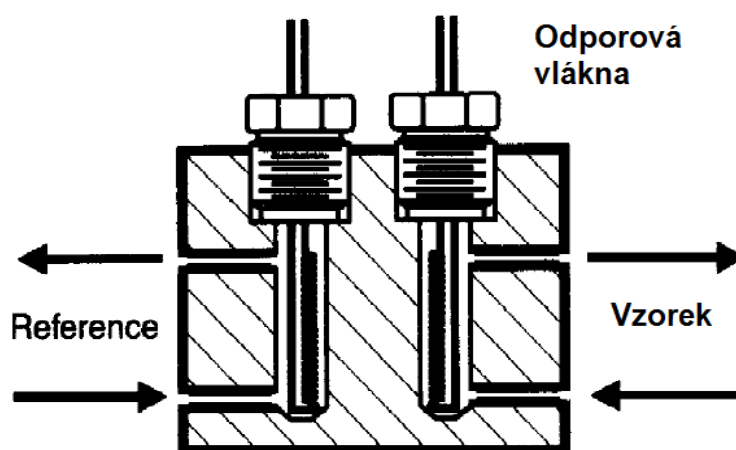
Kolony

V plynové chromatografii se používají 2 typy kolon. *Náplňové kolony* mají vnitřní průměr 2 až 5 mm a jsou kovové nebo skleněné. Jsou vyplněny pevným adsorbentem nebo nosičem s kapalnou fází a jejich délka se pohybuje od desítek centimetrů po několik metrů. *Kapilární kolony* jsou tvořeny křemennou kapilárou o průměru 30–350 μm . Jejich délka může dosahovat až několik stovek metrů a stacionární fáze je zde rozprostřena na vnitřních stěnách kapiláry (Zýka et al., 1966; Opekar et al., 2003).

Detektory

Mezi nejčastěji používané detektory v plynové chromatografii patří tepelně vodivostní detektor (TCD), plamenově ionizační detektor (FID), detektor elektronového záchytu (ECD) a hmotnostní spektrometr (MS).

TCD je univerzální detektor, uvnitř kterého je odporové vlákno uložené ve vyhřívaném bloku a žhavené pomocí elektrického proudu (Obr. 3). V přítomnosti analytu dochází ke změně elektrického odporu kolem vlákna.

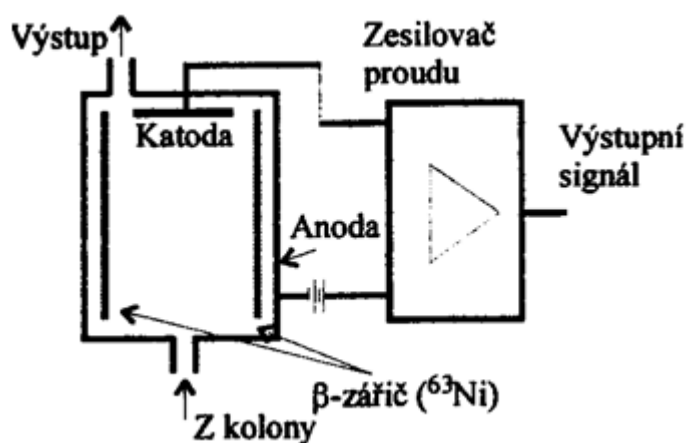


Obr. 3: Schéma tepelně vodivostního detektoru (upraveno podle Harold & Miler, 1998).

FID patří mezi destruktivní detektory. Součástí FID je hořák s kyslíko-vodíkovým plamenem, jež hoří mezi dvěma elektrodami. Do plamene je přiváděna směs z chromatografické kolony a chemionizační reakce způsobuje vznik nabitých částic, tím dojde ke vzrůstu vodivosti procházejícího proudu.

FID detektor poskytuje odezvu zejména na organické látky (látky obsahující spalitelný uhlík), naopak skoro žádnou odezvu nemají látky anorganické. V případě uhlovodíků je odezva přímo úměrná počtu uhlíků.

Při detekci pomocí ECD (Obr. 4) nedochází k destrukci analyzované směsi jako u plamenově ionizačního detektoru, společným znakem však je, že jsou oba detektory selektivní. ECD je citlivý především na sloučeniny obsahující elektronegativní prvek (halogeny). V ECD detektoru dochází k ionizaci nosného plynu β zářičem a vzniká konstantní proud pomalých elektronů. Elektronegativní atomy tyto pomalé elektrony vychytávají a tím se ionizační proud snižuje. Snížení je úměrné koncentraci analytu (Opekar et al., 2003; Harold & Miler, 1998; Haleem et al., 2008).



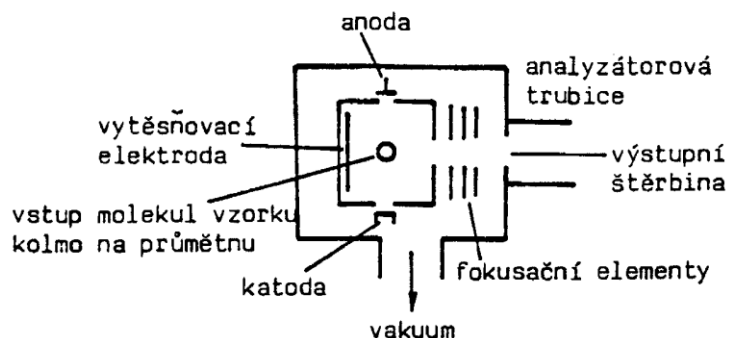
Obr. 4: Schéma detektoru elektronového záchytu (převzato z Opekar et al., 2003).

2.2 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie (MS) je fyzikálně chemická metoda, díky které můžeme určit strukturu a hmotnost molekul a atomů. Tato metoda je založena na ionizaci analyzované látky vedoucí ke vzniku fragmentů, které jsou rozděleny podle poměru hmotnosti a náboje (m/z) a následně detekovány. Hlavními částmi hmotnostního spektrometru jsou iontový zdroj, hmotnostní analyzátor, detektor a vakuový systém, který brání srážkám iontů (Ubik et al., 1999; Hoffmann & Stroobant, 2007).

2.2.1 Ionizace

Proces ionizace probíhá v iontovém zdroji a dochází při něm k ionizaci analyzované látky a případně následnému rozpadu na fragmenty. Ionizační techniky můžeme rozdělit na dvě základní. Při *měkké ionizaci* dochází k menší fragmentaci, protože dodaná energie stačí pouze na vytvoření iontu z neutrální molekuly. Energie při *tvrdé ionizaci* je dostatečně velká, aby se z neutrální molekuly vytvořil ion a aby se vzniklé ionty dále štěpily. Mezi ionizační techniky patří ionizace elektrosprejem, ionizace rychlými atomy, chemická ionizace za atmosférického tlaku, desorpce laserem za účasti matrice, desorpce polem, ionizace elektronem a chemická ionizace. Pro plynovou chromatografii se používá chemická ionizace, ale hlavně ionizace elektronem. Ionizace elektronem (Obr. 5) je velmi účinná pro organické sloučeniny a látky v plynné fázi. Z vyhřívaného vlákna (W nebo Re) se uvolňují elektrony, které předají část své kinetické energie molekulám analyzované látky za vzniku tzv. molekulárních iontů. Jelikož se jedná o tvrdou ionizační techniku, je zde přebytek energie a molekulární ionty podléhají další fragmentaci. Chemická ionizace se řadí mezi měkké techniky a probíhá za sníženého tlaku. Aby proběhla ionizace, musí být v iontovém zdroji přítomen nadbytek reakčního plynu, například methan, amoniak, isobutan nebo voda. Nejprve dojde k ionizaci reakčního plynu proudem elektronů, který potom ionizuje molekuly analytu na základě iontově molekulových reakcí (Ubik et al., 1999; Hoffmann & Stroobant, 2007; Churáček et al., 2003).

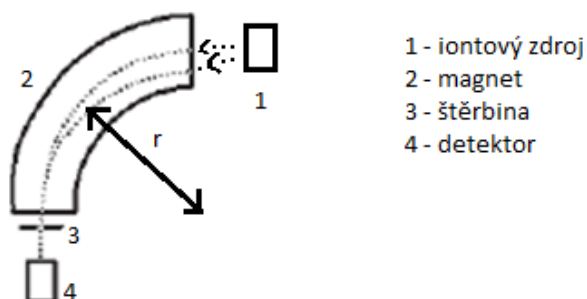


Obr. 5: Popis iontového zdroje při elektronové ionizaci (převzato z Ubik et al., 1999).

2.2.2 Hmotnostní analyzátor

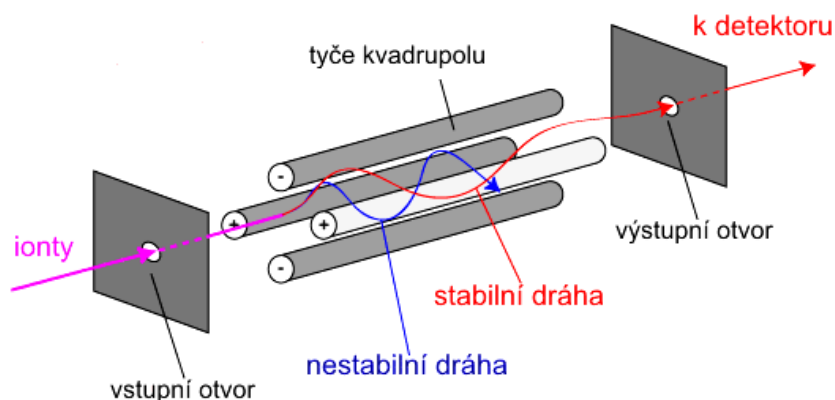
Ionty putují z iontového zdroje a poté je nutno je rozdělit podle poměru hmotnosti a náboje. Tento proces probíhá v analyzátoru iontů. Stejně jako u ionizace i zde se používá několik druhů analyzátorů.

Sektorové přístroje (Obr. 6) patří mezi starší detektory a k separaci využívají magnetického a elektrického sektoru. Úsek, kterým musí ionty proletět, má tvar kruhové výseče a síly vyvolané elektromagnetickým polem způsobují, že částice s různou hmotností opisují různý poloměr dráhy.



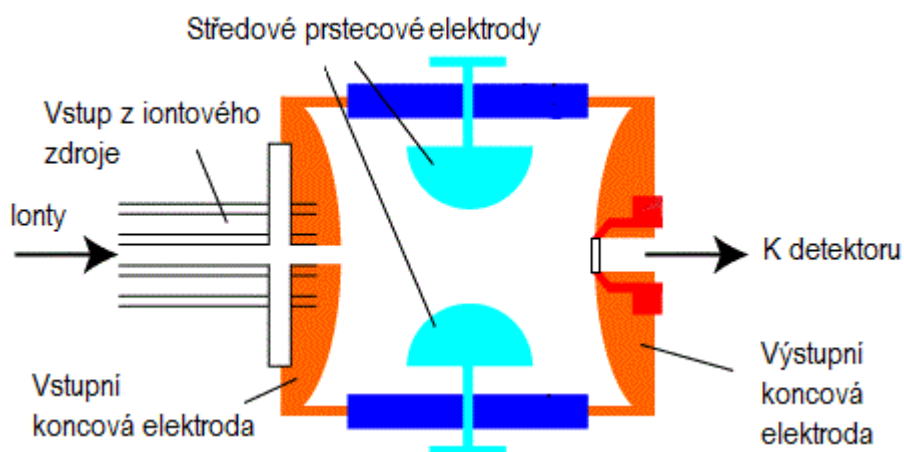
Obr. 6: Schéma sektorového analyzátoru (upraveno podle Hoffmann & Stroobant, 2007).

Kvadrupólový analyzátor (Obr. 7) je tvořen čtyřmi paralelními kovovými tyčemi o hyperbolickém průřezu, které jsou připojeny ke stejnosměrnému a vysokofrekvenčnímu zdroji napětí. Jakmile se ion dostane mezi tyče, začne oscilovat díky střídavému elektrickému poli. Tyče propouští k detektoru ionty se stabilní oscilací o vhodném m/z . Pro ostatní ionty fungují tyče jako tzv. filtr, zachytávající ionty s určitým m/z , které se dostanou do nestabilní oscilace (Zýka et al., 1966; Ubik et al., 1999; Hoffmann & Stroobant, 2007).



Obr. 7: Schéma kvadrupólového analyzátoru (upraveno podle Gates P, citováno 23.3.2011).

Iontová past je v podstatě trojrozměrný kvadrupól, skládá se ze vstupní a výstupní kruhové elektrody a ze středové prstencové elektrody (Obr. 8). Při separaci iontů se používá vysokofrekvenční napětí s měnící se amplitudou. Pokud se zvyšuje amplituda napětí, dostávají se do nestabilní dráhy ionty s vyšší hodnotou m/z a jsou z iontové pasti vypuzeny k detektoru (Zýka et al., 1966; Ubik et al., 1999, Hoffmann & Stroobant, 2007).



Obr. 8: Schéma iontové pasti (upraveno podle Gates P., citováno 23.3.2011).

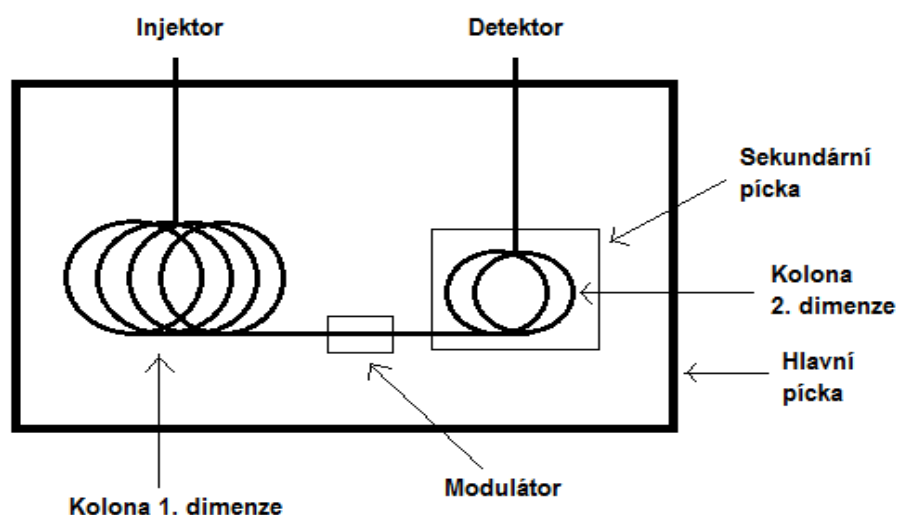
V případě průletového analyzátoru (time of flight, TOF) je m/z iontu stanoveno pomocí doby doletu od iontového zdroje k detektoru. Všechny ionty mají stejnou kinetickou energii charakterizovanou rovnicí (8). Ionty jsou akcelerovány elektrickým polem a ty s menší hodnotou m/z se pohybují průletovou trubicí rychleji a k detektoru dorazí dříve (Zýka et al., 1966; Ubik et al., 1999; Hoffmann & Stroobant, 2007; Weckwerth & Motgenthal, 2005).

$$E_{kin} = \frac{1}{2}mv^2 \quad (8)$$

2.3 Komprehenzivní dvoudimenzionální chromatografie (GC×GC)

2.3.1 Instrumentace

Komprehenzivní dvoudimenzionální chromatografie (GC×GC) umožňuje analýzu komplexních vzorků. V hlavní píčce GC×GC se nacházejí dvě kolony s různou separační selektivitou (Obr. 9). První kolona je obvykle delší a nepolární, separace probíhá na základě bodu varu, druhá kolona je obvykle krátká a polární, separuje látky na základě polariry. Obě kolony jsou spojeny tzv. modulátorem, který pouští studené a teplé pulzy plynu (vzduch, dusík) a tím nejdříve zachycuje eluent v první dimenzi a následně jej pouští do dimenze druhé (Adahchour, 2006).



Obr. 9: Schéma GC×GC.

2.3.2 GC×GC-TOFMS

Pro GC×GC je nejvhodnějším detektorem TOF. Díky kryofokusaci na modulátoru dochází k velmi rychlému uvolňování eluentu ze sekundární kolony a je tedy zapotřebí rychlý sběr dat (alespoň 50 Hz). TOF je v současnosti jediný analyzátor, který je schopen tuto podmínku uspokojivě splnit. Spojení těchto dvou technik přináší značné výhody při analýze: zvýšení poměru signál/šum, selektivní a citlivé určení velkého množství látek během jediné analýzy komplexního vzorku (metabolity rostlin, mikroorganismů, savců, atd.) (Wang et al., 2010).

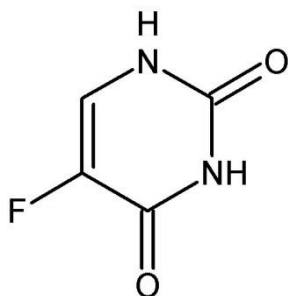
2.3.3 Vznik contour plotu a využití GC×GC-TOF

Výsledkem analýzy je dvourozměrný vrstevnicový diagram, tzv. contour plot. Speciální software zpracovává surová data následujícím způsobem: nejprve spočítá základní linii, signál dekonvoluuje, vytvoří jednotlivé píky v první dimenzi, které pak kombinuje – vzniká 2D chromatogram, jehož osy X a Y představují retenční časy na první a druhé koloně a na osu Z je nanesena intenzita. Tento 2D chromatogram je převeden do podoby contour plotu. Následuje počítání charakteristik píků (plocha...) a spektrální identifikace dle knihovny spekter (Adahchour, 2006).

Metoda GC×GC-TOF se využívá při analýze metabolitů tělních tekutin, identifikace biomarkerů, zjišťování anabolik v těle, diagnostice dědičných metabolických poruch atd. (Kouremenos, 2010, Wojtowicz, 2010, Mitrevski, 2010). Ve srovnání s metodou GC-TOF se rozšířil rozsah detekovatelných látek z 538 na více než 1200 (Oldiges, 2007).

2.4 5-Fluorouracil

5-Fluorouracil (5FU) je lék odvozený od pyrimidinu (Obr. 10), byl syntetizován Charlesem Heidelbergerem v roce 1957 a používá se k léčení rakovinných onemocnění. Jako mnoho protinádorových léků má 5-FU široký účinek, ale největší dopad má na rychle se dělící buňky, kterým ztěžuje syntézu jejich nukleotidů. Patří do skupiny antimetabolik a při léčbě je často podáván společně s leukovorinem, který zvyšuje jeho aktivitu. Účinnou látkou leukovorinu je kyselina folinová, derivát kyseliny listové. Řadou reakcí zastavuje leukovorin opravu a tvorbu nukleových kyselin.



Obr. 10: Struktura 5-fluorouracilu.

2.4.1 Metabolismus 5FU

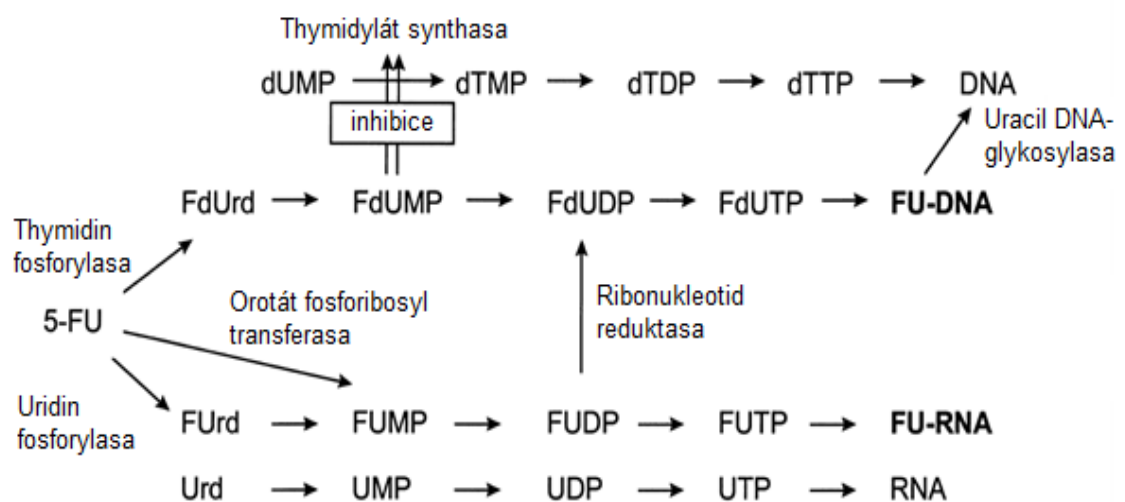
Typicky se 5FU projevuje jako inhibitor thymidylátsynthasy (Obr. 11). Pokud přeruší reakci tohoto enzymu, blokuje tím syntézu thymidinu, který je důležitým prvkem při replikaci DNA. Thymidylátsyntasa methyloje deoxyuridin monofosfát (dUMP) na thymidin monofosfát (dTMP). V důsledku nedostatku dTMP dochází u rychle se dělících rakovinných buněk k buněčné smrti a smrti z nedostatku thymidinu. Tato látka je typická pro S-fázi buněčného cyklu (Longley et al., 2003).

5-Fluorouracil inhibuje syntézu jak DNA, tak i RNA. V případě DNA zablokuje methylaci kyseliny deoxyuridilové na kyselinu thymidylovou. Při syntéze RNA se do její struktury zabudovává 5-fluorodeoxyuridil monofosfát jako falešný prekurzor.

Metabolická aktivita 5FU uvnitř buňky vede ke vzniku mnoha různých metabolitů a mnohé z nich mají v buňce výrazně rozdílné účinky. Základní

kroky aktivace zahrnují ribosylaci a fosforylaci. 5FU může být přeměněn na fluorouridin (FUrd) nebo fluorodeoxyuridin (FdUrd) pomocí uridininfosforylasy nebo thymidininfosforylasy. Tyto reakce produkují substráty pro intracelulární kinasy (uridinkinasy nebo thymidinkinasy), které katalyzují přeměnu nukleosidů na nukleotidy. Substráty mohou být například fluorouridintrifosfát (FUTP) nebo fluorodeoxyuridintrifosfát (FdUTP), které mohou být využity RNA nebo DNA polymerasou a dojde k falešnému začlenění fluoropyrimidinu. Kromě toho může být 5-fluorouridindifosfát (5UDP) přeměněn na 5-fluorodeoxyuridin-difosfát (FdUDP) díky ribonukleotidreduktase.

Jiná cesta 5FU zahrnuje převod 5-fluorouracilu na fluorouridintrifosfát (FUMP) za pomoci orotátfosforibosyltransferasy (OPRT). Během této cesty se vytváří meziprodukt, který by mohl být začleněn do DNA nebo RNA, nebo by se mohl přeměnit na fluorodeoxyuridinmonofosfát (FdUMP), jež je inhibitorem thymidylátsynthasy (Mader, 1998).



Obr. 11: Metabolismus 5-fluorouracilu (upraveno podle Mader, 1998).

2.5 Fibroblasty

Fibroblasty jsou nejběžnější a nejméně specializované buňky vazivové tkáně a jsou rozptýleny v různých částech těla. Jsou štíhlé, vřetenovité až hvězdicovité. Jejich buněčné jádro je ploché a oválné a obsahuje jedno nebo dvě jádérka. Pro aktivní fibroblasty je charakteristické velké množství hrubého endoplasmatického retikula. Jejich funkcí je udržování tkáňové homeostázy a produkce extracelulární matrix v podobě tropokolagenu, což je základní jednotka kolagenu. Fibroblasty jsou také důležitou složkou při hojení ran. Při poškození tkáně migrují na místo poškození, kde vkládají nový kolagen a usnadňují proces hojení. Jelikož jsou fibroblasty nejméně specializované, mohou se za určitých podmínek přeměňovat na jiné buňky pojivové tkáně, například na buňky chrupavky (chondrocyty), buňky kostní tkáně (osteoblasty) nebo na svalové buňky hladké svaloviny (Enestein J. & Furcht L. T., 1984).

2.6 Metabolomika

2.6.1 Metabolismus

Metabolismus je děj, nezbytný pro život organismu a zahrnuje přijímání důležitých látek z okolí, přeměnu těchto látek na jiné důležité látky a využití uvolněné energie k dalším procesům a nakonec uvolnění odpadních látek zpět do okolí. Metabolismus můžeme rozdělit na dva základní děje: anabolismus a katabolismus. Tyto děje jsou protichůdné, ale vzájemně se doplňují. Katabolismus zahrnuje degradační procesy, při kterých dochází k rozkladu složitějších výchozích látek na jednodušší produkty za současného uvolnění energie. Uvolněná energie se ukládá ve formě ATP (syntetizovaného z ADP a fosfátu) nebo NADPH (vzniklého redukcí NADP^+). Při anabolismu naopak dochází k tvorbě složitějších látek a energie ve formě ATP musí být dodávána. Jako metabolity jsou označovány produkty, meziprodukty a reakční složky metabolismu (Voet & Voetová, 1995). Metabolity se od sebe liší chemickými a fyzikálními vlastnostmi (Tab. 1).

Tab. 1: Dělení metabolitů podle chemické struktury (upraveno podle Terabe et al., 2001)

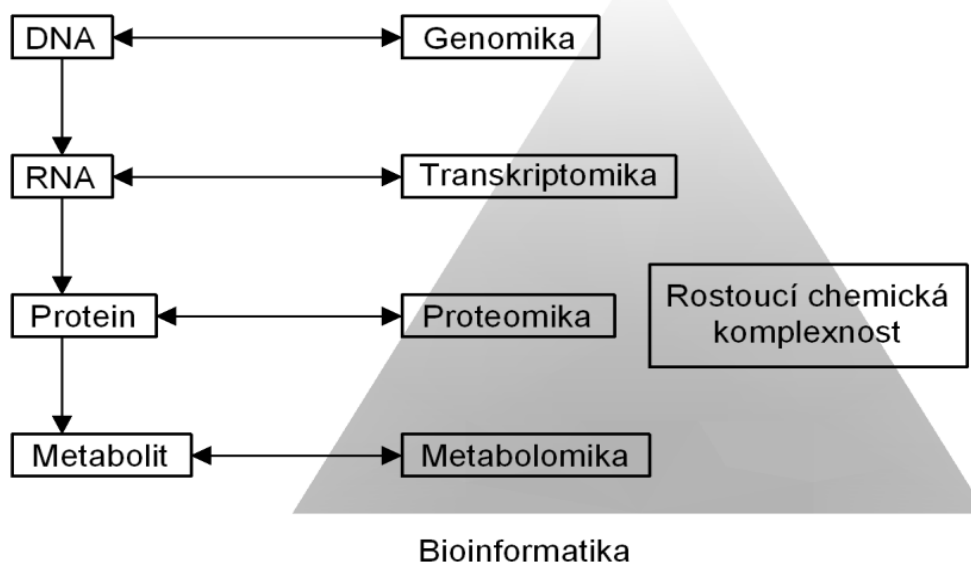
Chemická třída	Typické příklady
Aminokyseliny, aminy	L-glutamát, L-aspartát
Karboxylové kyseliny	k. pyrohroznová, k. 2-oxoglutarová
Alkoholy	glycerol
Aldehydy	acetaldehyd, formaldehyd
Fosfátové estery, nukleotidy	D-glukosa-1-fosfát
Nukleové kys. a příbuzné sloučeniny	ATP, ADP
Sacharidy	D-glukosa, D-fruktosa
Lipidy, steroidy a mastné kyseliny	estron, cholesterol
Vitaminy a koenzymy	NAD^+ , NADH
Anorganické ionty	Fosforečnany, dusitany

Metabolismus lze také rozdělit na primární a sekundární. Primární metabolismus představuje základní chemické děje v organismu, které jsou nezbytné pro život (dodávání energie a stavebních látek). Jsou to například fotosyntéza, glykolýza nebo respirační řetězec. Pro sekundární metabolismus

je charakteristické, že sekundární metabolity se neúčastní růstu a vývoje organismu (Vodrážka, 2007).

2.6.2 Metabolom

Metabolomika je vědní obor zabývající se studiem celkového souboru nízkomolekulárních metabolitů přítomných v buňce nebo organismu. Tyto metabolity se účastní metabolických reakcí potřebných pro růst, udržování aktivity a normálních funkcí. Kompletní soubor všech metabolitů buňky v daném okamžiku se nazývá metabolom (Dunn et al., 2005). Změny v metabolomu jsou odpovědí na genetické změny, nemoci nebo vlivy životního prostředí. Metabolomika může být považována za závěrečný bod „ómické pyramidy“ (Obr. 12). Genomika se zabývá analýzou kompletního genomu za účelem zjištění funkcí jednotlivých genů. Většina funkčních genomických studií je v současnosti založena na analýze genové exprese (transkriptomika) a detailní analýze proteinů (proteomika) (Dettmer & Hammock, 2004).



Obr. 12: Přehled post-genomických věd (upraveno podle Tomita & Nishioka, 2005).

2.6.3 Metody studia metabolomu

Studium metabolomu zahrnuje analýzu velkého množství chemických látek. Od nízkomolekulárních těkavých polárních látek jako ethanol až po vysokomolekulární polární glykosidy, nepolární lipidy a anorganické látky. Koncentrace metabolitů se také mohou lišit a to až o devět řádů (pikomolární až milimolární). Metabolomika zahrnuje analýzu celého metabolomu avšak analýza všech složek by byla časově i finančně náročná, a proto se často provádí analýzy pouze části metabolomu. Mezi tyto postupy patří - metabolické profilování, metabolický footprinting, metabolický fingerprinting a cílená analýza metabolitů.

Metabolické profilování zahrnuje identifikaci a kvantifikaci metabolitů, které mají podobné chemické složení nebo podobné metabolické dráhy a před detekcí se nejčastěji používá chromatografická separace.

Metabolický footprinting se zabývá analýzou extracelulárních metabolitů.

Metabolický fingerprinting zahrnuje celkovou metodu, při níž dochází ke klasifikaci vzorku díky porovnávání vzorků metabolitů nebo "otisků prstů" z MS nebo nukleární magnetické rezonance, které se mění při reakci na nemoc, změny životního prostředí nebo genetické odchylky. Při této metodě se neprovádí identifikace ani kvantifikace.

Cílená analýza metabolitů se zabývá kvantitativním stanovením jednoho nebo více metabolitů souvisejících s konkrétní metabolickou drahou.

Cílem metabonomiky je kvantitativní měření dynamické metabolické odpovědi organismu na patofyziologické podněty nebo genetické modifikace zkoumáním jeho tkání nebo tělních tekutin (Dunn et al., 2005; Dettmer & Hammock, 2004).

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Instrumentace a materiál

3.1.1 Instrumentace

GC×GC-TOF

Pro analýzy byl použit systém Pegasus 4D, který se skládal z plynového chromatografu Agilent 7890 (Agilent Technologies, Palo Alto, USA), systému MPS2/CIS4/ALEX (Gerstel, Mülheim an der Ruhr, Německo) a Pegasus HT hmotnostního spektrometru (LECO Co., St. Joseph, USA). GC×GC systém byl umožněn dvoustupňovým čtyřtryskovým modulátorem a sekundární pecí, oboje vestavěné do primární pece. Stlačený vzduch byl použit jak pro horké i studené pulzy. Pro horký pulz byl vzduch ohříván teplotou modulátoru a pro studený pulz procházel vzduch nejprve filtrem, aby se odstranila přebytečná vlhkost a následně byl ochlazován imerzně (−80 °C).

Jako kolona pro první dimenzi byla použita BPX-5 (30 m × 0,25 mm × 0,25 μm) a kolona pro druhou dimenzi BPX-50 (2,0 m × 0,1 mm × 0,1 μm, obě SGE, Ringwood, Austrálie). Pro spojení kolon byla použita spojka SilTite Mini Union (SGE, Ringwood, Austrálie). Spojení bylo uskutečněno mezi modulátorem a sekundární pecí, modulace tedy probíhala na primární koloně.

Program primární pece byl následující: 60 °C (1,5 min), 15 °C/min, 300 °C (2,5 min).

Program sekundární pece kopíroval primární s offsetem +10 °C, program modulátoru s offsetem +30 °C. Modulační perioda 3 s (s hot pulzem 0,6 s).

Jako nosný plyn bylo použito helium (99,999 %, Messer, ČR) v režimu korigovaného konstantního průtoku 1 ml/min. Byl použit CIS4 programovatelný nástřík (splitless 1 μl, 1 min): 40 °C, 10 °C/min, 250 °C (1,5 min), 10 °C/min, 300 °C (3 min).

Ionizace TOFMS probíhala v režimu elektronové ionizace (−70 eV), s teplotou iontového zdroje 250 °C, teplota transferové linie byla také 250 °C.

Bylo snímáno hmotové rozmezí m/z 35–550 při rychlosti 100 Hz. Napětí na detektoru bylo $-1\ 500\ \text{V}$, solvent delay 300 s.

Software ChromaTOF 4.33 (LECO Co., St. Joseph, USA) byl použit pro ovládání systému a sběr a zpracování dat (výpočet baseline, TruePEAK dekonvoluce signálu, automatická detekce píků a jejich kombinace, identifikace na základě knihovny spekter, výpočet plochy píků, export dat). Pro ovládání systému Gerstel (MPS2 Dual Rail: příprava vzorku a autosampler; CIS4: PTV injektor s Peltiereovým chlazením; ALEX: automatický systém výměny linerů) byl užit software Maestro 1.3 (Gerstel, Mülheim an der Ruhr, Německo). Pro statistické zpracování výsledků byl použit program Statistica 7.0 (www.statsoft.cz).

3.1.2 Biologický materiál

Lidské kožní fibroblasty byly získány od dobrovolných dárců z laboratoře.

3.1.3 Použité chemikálie

Chloroform (99,9%), síran sodný (99%), methylchloroformiát (99%), Dulbecco's modified egle's medium (DMEM), trypsin/EDTA (10x), antibiotikum amfotericin B a standardy methylesterů mastných kyselin (C6–C24) byly zakoupeny u SIGMA ALDRICH (USA). Hydroxid sodný (99,9%) byl zakoupen u firmy Kulich HK, pyridin (99,5%) u firmy LOBA CHEMIE, fetální hovězí sérum u firmy PANBiotech (Německo), fyziologický roztok u firmy Braun (Německo), 5-fluorouracil (250 mg v 5 ml) u firmy EBEWE Pharma a standard směsi aminokyselin EZ:faast u firmy Phenomenex.

3.1.4 Příprava kožních fibroblastů

Kultivace

Fibroblasty byly kultivovány v médiu DMEM, které obsahovalo 10 % fetálního hovězího séra a 0,1 % antibiotika amfotericin B. Buňky byly kultivovány v inkubátoru (37 °C, 5% CO₂). Po nárůstu dostatečného množství buněk (celkem 18 lahvíček, 85% konfluence) byly buňky inkubovány v médiu s obsahem 5-fluorouracilu o koncentraci 50 $\mu\text{mol/l}$ po dobu 6, 24 a 48 h.

Sklízení a extrakce

Ke sklízení byla použita technika quenchingu. Kultivační nádobka byla vyndána z inkubátoru a propláchnuta 20 ml quenčovacího roztoku (60% methanol, -50°C) pomocí stříkačky se zahnutou jehlou. Nádobka byla oklepána důkladně o gázu a byl přidán 1 ml 80% roztoku methanolu. Roztok fibroblastů byl seškrabán škrabkou a přenesen do centrifugační zkumavky. Poté byl přidán opět 1 ml 80% methanolu a celý proces se zopakoval. Extrakt byl centrifugován (5 min, 3000 rpm), supernatant byl přelit do čisté zkumavky, zlyofilizován a uložen do mrazícího boxu (-50°C).

3.1.5 Derivatizace

Použitou derivatizační technikou byla nepřímá alkylace pomocí methylchloroformiátu (MCF) v prostředí NaOH za katalýzy pyridinem. Zvolená technika převádí karboxylovou skupinu na methylester a aminoskupinu na N-methylkarbamáty.

Ke 100 μl standardu směsi aminokyselin EZ:faast (200 nmol/l) nebo ke zlyofilizovanému extraktu buněk v centrifugační zkumavce bylo přidáno 200 μl NaOH (1 mol/l) a 200 μl methanolu, poté bylo přidáno 50 μl interního standardu norvalinu (200 nmol/l) a 50 μl pyridinu. Směs byla vortexována (1 min) a sonifikována (1 min). Vzorek byl převeden do skleněné derivatizační zkumavky, bylo přidáno 40 μl MCF a opět vortexováno. Přídavek MCF a vortexování byly ještě jednou zopakovány. Poté bylo přidáno 200 μl chloroformu pro extrakci derivatizovaných látek, vortexováno a nakonec přidáno 200 μl roztoku NaHCO_3 (50 mmol/l) pro odstranění nezreagovaného MCF a opět vortexováno. Ve zkumavce se vytvořily 2 vrstvy, horní vodná vrstva byla odstraněna. Chloroformový extrakt obsahující derivatizované analyty byl vysušen pomocí bezvodého Na_2SO_4 a převeden do vialky s inzertem.

3.2 Výsledky

3.2.1 Zjištění retenčních indexů

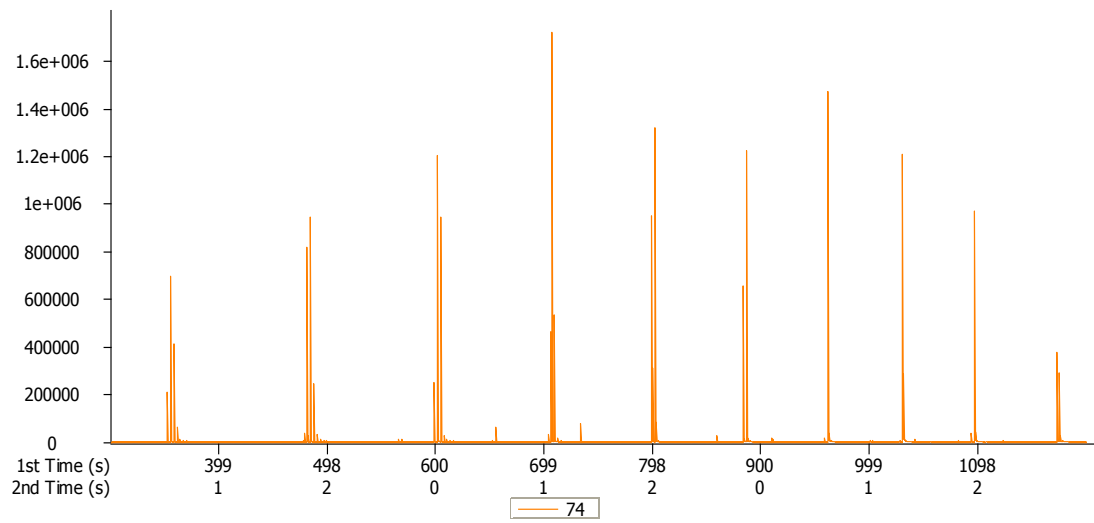
Pro srovnání retenčních indexů byla použita standardní směs methylesterů mastných kyselin (FAME). Retenční indexy FAME byly spočteny dle Kovatsovy řady n-alkanů (Tab. 2).

Tab. 2: Látky používané jako retenční standardy (methylestery mastných kyselin).

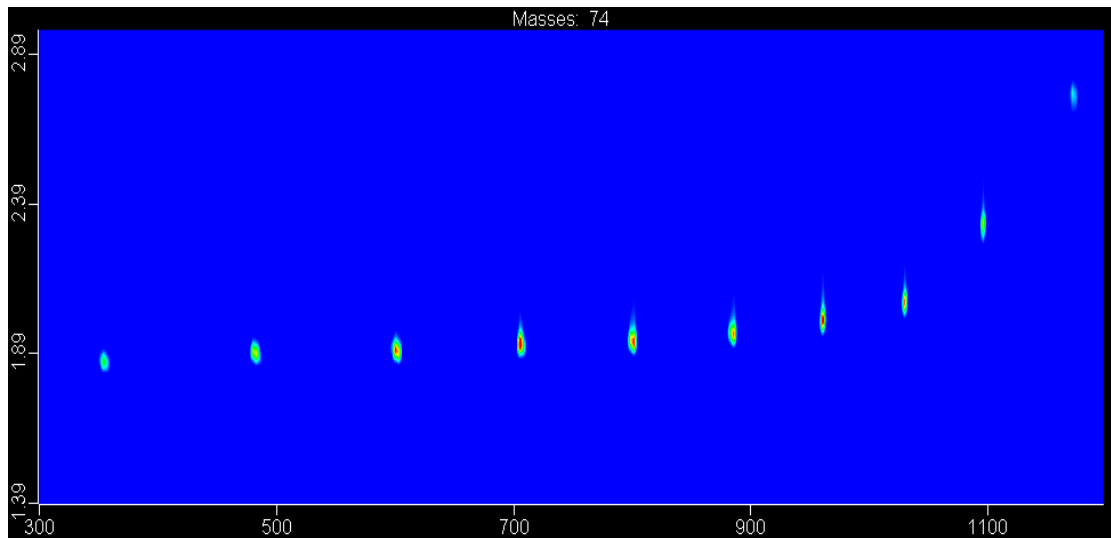
Název	Mr	Retenční čas v 1. a 2. dimenzi (s)	RI
Kyselina kapronová (C6:0)	130,2	344; 2,140	1007
Kyselina kaprylová (C8:0)	158,1	476; 2,150	1150
Kyselina kaprinová (C10:0)	186,3	596; 2,150	1326
Kyselina laurová (C12:0)	214,4	700; 2,160	1521
Kyselina myristová (C14:0)	242,4	796; 2,170	1731
Kyselina palmitová (C16:0)	270,5	880; 2,190	1938
Kyselina stearová (C18:0)	298,0	952; 2,240	2142
Kyselina arachová (C20:0)	326,6	1024; 2,290	2261
Kyselina behenové (C22:0)	354,6	1088; 2,520	2358
Kyselina lignocerová (C24:0)	382,0	1160; 2,940	2454

Na Obr. 13 jsou ukázána možná zobrazení chromatogramů standardní směsi FAME pro m/z 74, což je charakteristická hmota pro tyto kyseliny.

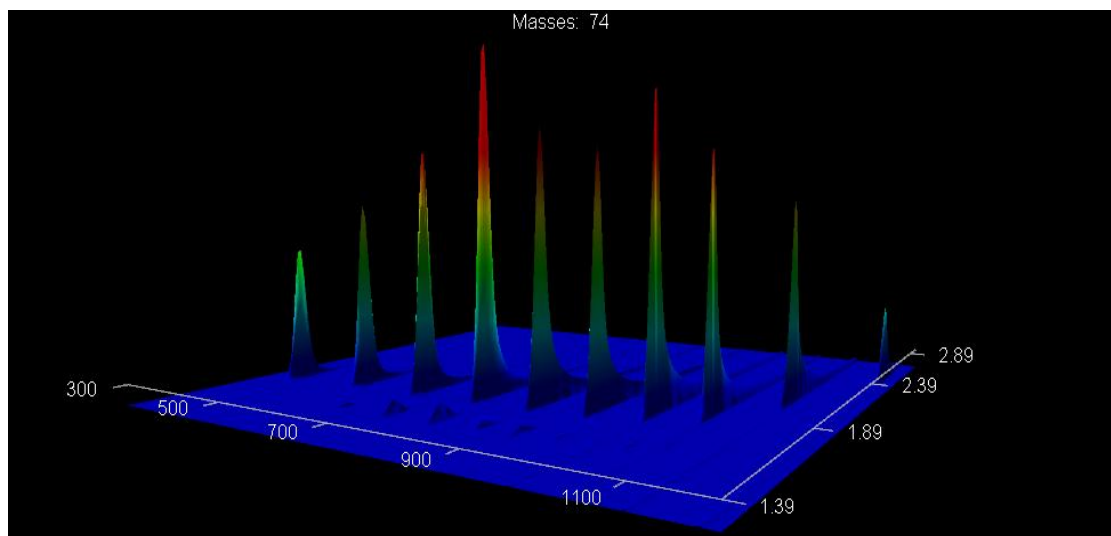
A)



B)



C)



Obr. 13: 1D modulovaný chromatogram (A), cotour plot (B) a 3D zobrazení contour plotu (C); zobrazeno m/z 74

3.2.2 Vytvoření reference

Součástí experimentální části bylo vytvoření tzv. reference (softwarový nástroj v programu ChromaTOF). Reference byla vytvořena ze standardu směsi aminokyselin EZ:faast (Tab. 3) a obsahovala informace např. o retenčních časech 1. a 2. dimenze, retenčních indexech, charakteristických hmotách jednotlivých látek. Dále byly do reference přidány další látky vyskytující se v buněčném extraktu (např. organické kyseliny).

Tab. 3: Některé z použitých aminokyselin (standart EZ:faast)

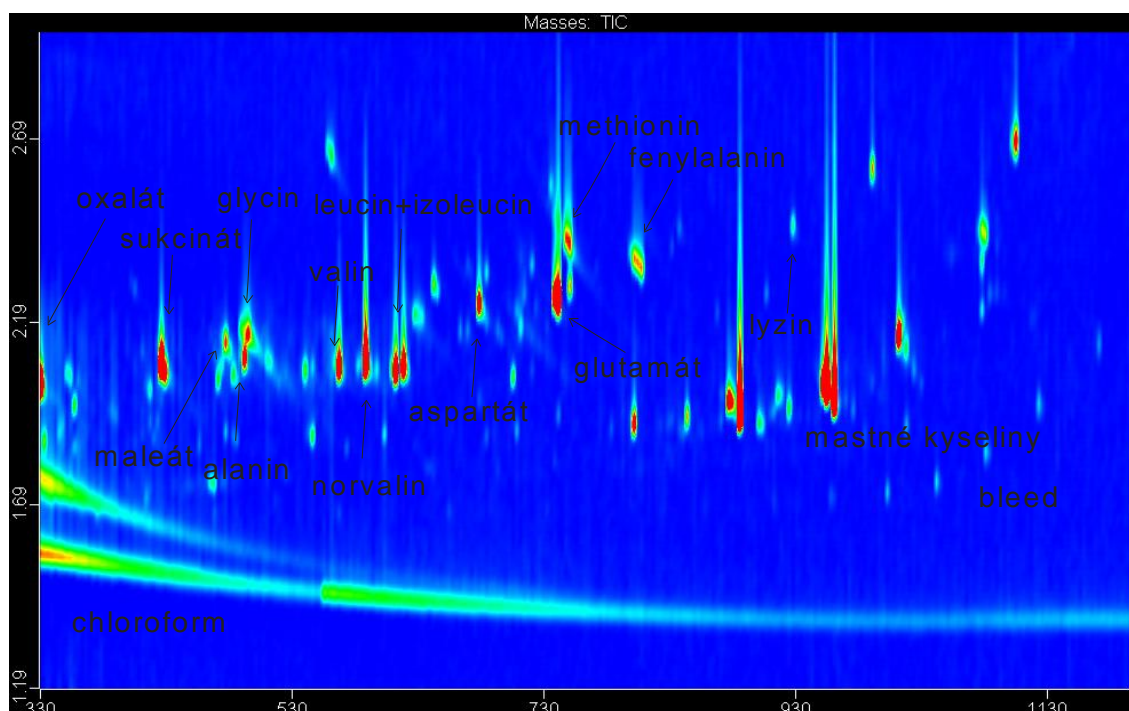
Název	RT 1, 2 [s]	RI	Unique Mass	Mr	BP	P2	P3
Alanin MCF	476; 2,44	1142	102	161	102	42/65	59/63
Fenylalanin MCF	796; 2,68	1720	42	237	42	91/65	59/57
Kyselina glutamová MCF	732; 2,54	1578	114	233	114	59/76	42/70
Asparagin MCF	636; 2,64	1390	127	262	42	127/75	56/72
Valin MCF	556; 2,38	1255	130	189	130	42/88	59/82
Histidin MCF	940; 3,00	2088	59	227	59	81/76	42/73
Kyselina aminoadipová MCF	784; 2,51	1693	114	247	114	55/70	59/69
Kyselina aminoisomáselná MCF	564; 2,40	1268	88	175	88	44/51	56/41
Cystin MCF	1116; 0,15	2397	160	398	42	59/99	160/87
Hydroxyprolin MCF	744; 2,71	1604	144	203	144	41/56	59/47
Sarkosin MCF	504; 2,39	1179	102	161	102	42/78	59/49
Ornitin MCF	884; 2,71	1937	128	262	128	42/51	59/51

*RT 1, 2 - retenční časy 1. a 2. dimenze; unique mass – charakteristická hmota; BS – base peak (pík s největší intenzitou ve spektru); P2 - intenzita (% BP); P3 intenzita (% BP)

3.2.3 Analýza extraktů fibroblastů

V extraktech fibroblastů (Obr. 14) byly metabolity automaticky identifikovány a kvantifikovány na základě vytvořené reference.

Celkem bylo metodou GC×GC detekováno 393–451 látek (S/N > 50). Většina z těchto látek byly metabolity z fibroblastů, ovšem některé byly například vedlejší produkty derivatizace, zbytky rozpouštědla nebo bleed kolon (látky uvolňované permanentně z kolony, např. siloxany), počet látek detekovaných v blanku se pohyboval v rozmezí 80–114.

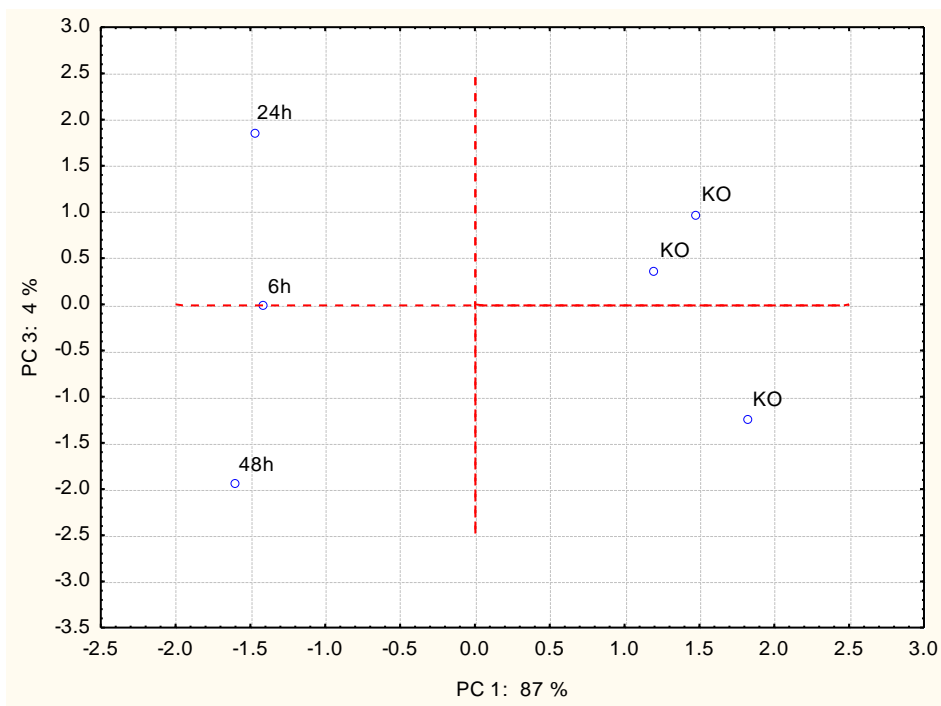


Obr. 14: Contour plot zobrazující reálnou analýzu extraktu fibroblastů.

3.2.4 Statistické zpracování

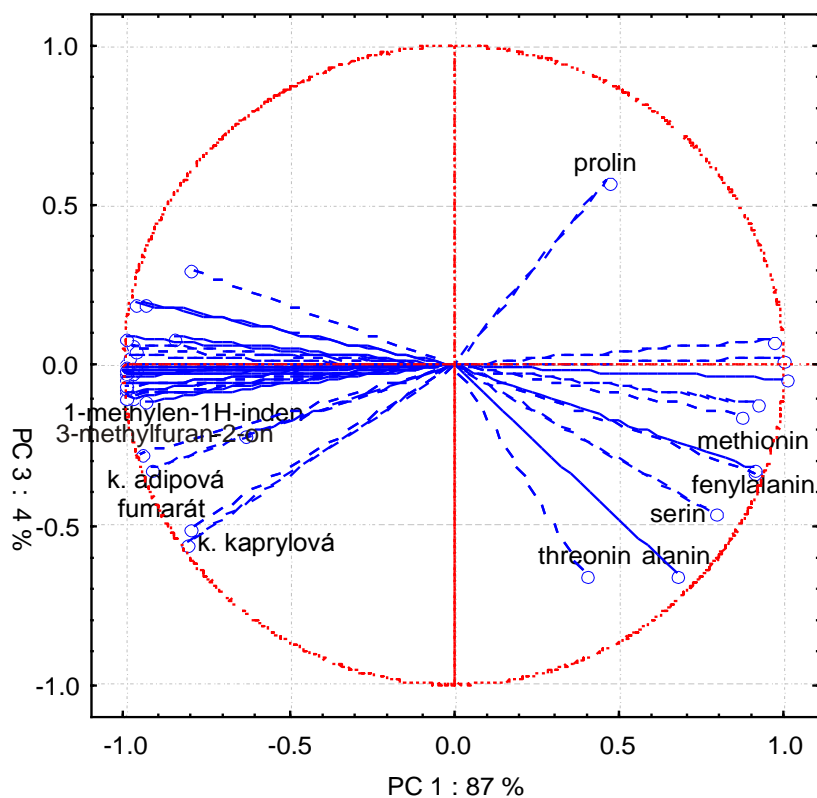
Ke statistickému vyhodnocení vlivu 5FU na fibroblasty bylo vybráno 77 látek, u nichž byla známa identita a které byly přítomny ve všech analyzovaných vzorcích. Shoda těchto látek s knihovnou NIST byla nad 80 %. Vyhodnocení dat bylo provedeno pomocí analýzy hlavních komponent (PCA, principal component analysis). Na obrázcích je možné pozorovat projekci případů (Obr. 15) a proměnných (Obr. 16) do komponentní roviny 1-3 pro kontroly a vzorky inkubované s 5FU. Data byla řádkově centrována a normalizována, celkové procento variability bylo 91%.

Při vyhodnocování dat došlo k rozdělení kontrolních vzorků od fibroblastů inkubovaných s 5FU (Obr. 15). Je tedy zřejmé, že ve vzorcích inkubovaných s 5FU dochází ke změnám v hladinách metabolitů. Každý bod představuje průměr ze 3 analyzovaných vzorků.

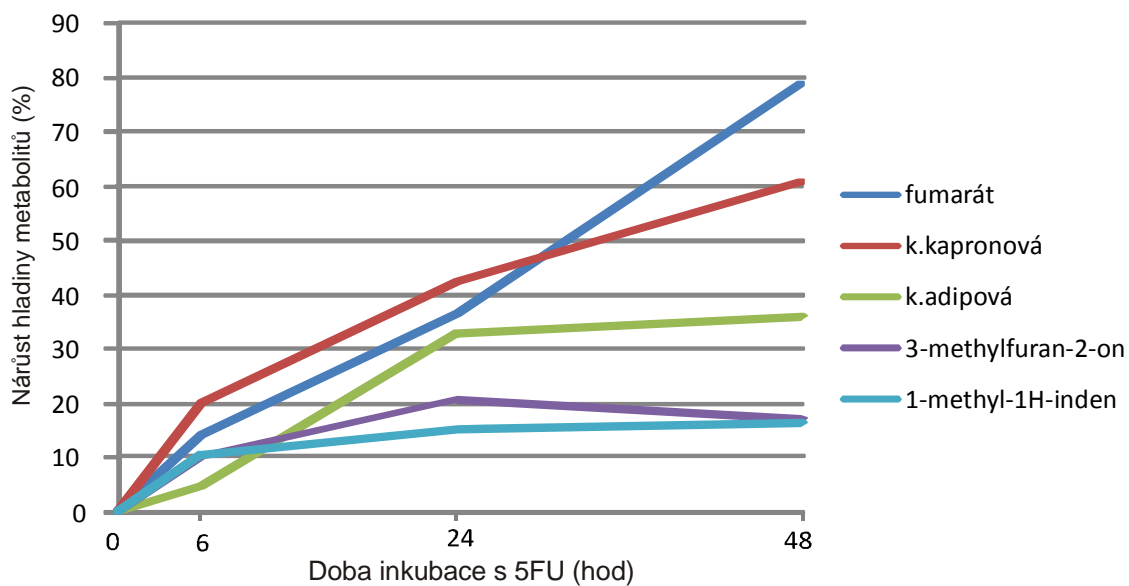


Obr. 15: Projekce případů do komponentní roviny (KO - kontrola)

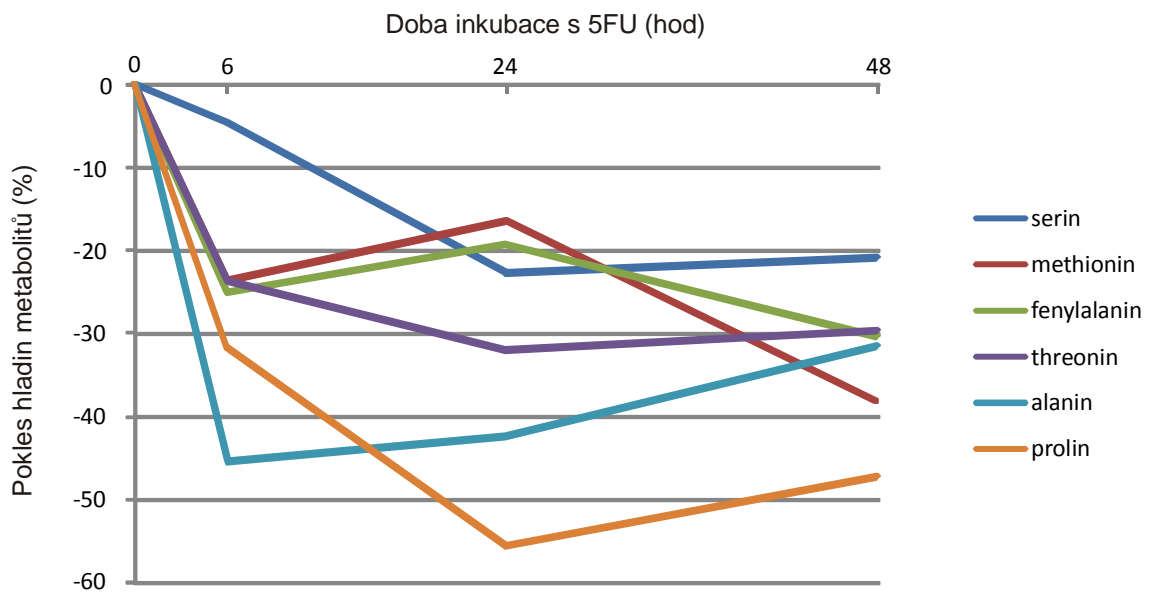
Během inkubace fibroblastů s 5-fluorouracilem se hladiny některých látek zvýšily a některé hladiny naopak poklesly. Do grafů (Obr. 17, 18) znázorňujících pokles a nárůst hladin bylo vybráno několik příkladů s jednoznačným trendem. Grafy udávají relativní změnu hladin metabolitů vzhledem ke kontrolám.



Obr. 16: Projekce proměnných do komponentní roviny, identifikace látek, které nesou hlavní rozdíly.



Obr. 17: Vybrané metabolity, u kterých se zvyšovala jejich hladina během inkubace s 5FU.



Obr. 18: Vybrané metabolity, u kterých se snižovala jejich hladina během inkubace s 5FU.

3.3 Diskuze

Nejdříve bylo nutno zjistit retenční indexy, které by sloužily k porovnání. Pro srovnání retenčních indexů byla analyzována standardní směs FAME, z níž byly spočteny retenční indexy podle Kovatsovy řady n-alkanů. Tyto látky byly vybrány také proto, že se po zvolené derivatizaci v analyzovaných buněčných extraktech nacházejí přirozeně, není nutno je přidávat.

Součástí práce bylo také vytvoření reference ze standardu směsi aminokyselin, jejíž údaje byly potřebné pro vyhodnocení, většina takto derivatizovaných aminokyselin se totiž v NIST databázi MS spekter nenachází.

Cílem této práce bylo zjištění změn hladin metabolitů v buněčném extraktu fibroblastů. Fibroblasty byly kultivovány s 5-fluorouracilem po dobu 6, 24 a 48 h. Výsledný extrakt byl lyofilizován a derivatizován pomocí methylchloroformiátu. Vzorky byly poté analyzovány pomocí GC×GC s TOFMS detektorem. Průměrně bylo v extraktech přítomno 393–451 látek, z nichž 77 bylo zahrnuto do statistického vyhodnocení PCA analýzou. Tyto látky byly porovnávány s látkami v knihovně NIST a shoda těchto látek byla vyšší než 80 %. 5-Fluorouracil nezpůsobil viditelné změny ve struktuře nebo počtu fibroblastů, nedocházelo tedy k úhynu buněk a ani se neměnil jejich tvar. Přesto se podařilo při vyhodnocení dat odlišit vzorky kontrol od vzorků s 5-fluorouracilem, díky změně hladin metabolitů ve vzorcích. U některých metabolitů docházelo ke zvýšení hladiny (např. fumarát, k. adipová a k. kapronová) a u některých docházelo naopak k jejich snížení (např. serin, alanin, prolin).

4 ZÁVĚR

V teoretické části této bakalářské práce byla zpracována rešerše na téma metabolomika, 5-fluorouracil a fibroblasty. Také zde byla popsána metoda dvoudimenzionální plynové chromatografie jako jedna z metod používaných v metabolomice.

V rámci experimentální části byl zjišťován vliv 5-fluorouracilu na kožní fibroblasty. Nejdříve bylo nutné spočítat retenční indexy methylesterů mastných kyselin a následně vytvořit referenci ze standardu aminokyselin. Analýza extraktů fibroblastů byla provedena metodou GC×GC-TOF. Celkem bylo detekováno až 451 látek, pro statistickou analýzu bylo vybráno 77 látek. Bylo zjištěno, že některé metabolity se vlivem 5FU zvyšovaly (fumarát, k. kapronová), některé naopak snižovaly (serin, alanin). Na buněčných kulturách však nebyly porovány viditelné účinky tohoto cytostatika (buňky neumíraly, jejich tvar se neměnil).

Cílem další práce bude identifikovat neznámé látky vyskytující se v extraktu fibroblastů a zahrnout je do dalšího statistického zpracování. Dále bude nutná validace metody za účelem zjištění přesných koncentrací jednotlivých metabolitů.

5 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

5-FU	5-Fluorouracil
5UDP	5-Fluorouridindifosfát
ADP	Adenosin-5'-difosfát
ATP	Adenosin-5'-trifosfát
DMEM	Dulbecco's modified eggle's medium
dUMP	2'-deoxyuridin-5'-monofosfát
dTMP	2'-deoxythymidin-5'-monofosfát
ECD	Detektor elektronového záchytu
FAME	Methylestery mastných kyselin
FdUDP	5-Fluorodeoxyuridindifosfát
FdUMP	Fluorodeoxyuridinmonofosfát
FdUrd	Fluorodeoxyuridin
FdUTP	Fluorodeoxyuridintrifosfát
FID	Plamenově ionizační detektor
FUMP	Fluorouridintrifosfát
FUrd	Fluorouridin
FUTP	Fluorouridintrifosfát
GC	Plynová chromatografie
GC×GC	Komprehenzivní dvoudimenzionální chromatografie
GLC	Plynová chromatografie s kapalnou stacionární fází
GSC	Plynová chromatografie s pevnou stacionární fází
MCF	Methylchloroformiát
MS	Hmotnostní spektrometrie
NAD ⁺	β-nikotinamidadeninukleotid, oxidovaná forma
NADH	β-nikotinamidadeninukleotid, redukována forma
NADP ⁺	β-nikotinamidadeninukleotidfosfát (NADP ⁺), oxidovaná forma
NADPH	β-nikotinamidadeninukleotidfosfát, redukována forma
OPRT	Orotátfosforibosyltransferasy
PCA	Principal component analysis = analýza hlavních komponent
TCD	Tepelně vodivostní detektor
TOF	Průletový analyzátor

6 LITERATURA

- Adahchour M., Beens J., Vreuls R. J. J., Brinkman U. A. Th. (2006) Recent developments in comprehensive two-dimensional gas chromatography (GCxGC) I. Introduction and instrumental set-up. *Trends Analyt Chem.* **25**, 438-454.
- Clement R. E. (1990) Gas chromatography: biochemical, biomedical, and clinical applications, pp. 6-10, Wiley J. & sons, New York, USA.
- Dettmer K., Hammock B. D. (2004) Metabolomics-A new exciting field within the "omics" sciences. *Environ Health Perspect.* **112**, 396-397.
- Dunn W. B., Bailey N. J., Johnson H. E. (2005) Measuring the metabolome: current analytical technologies. *Analyst.* **130**, 606-625.
- E. de Hoffmann and V. Stroobant (2007) Mass Spectrometry Principles and Applications, pp. 1-4, Wiley J. & sons, New York, USA.
- Enenstein J., Furcht L. T. (1984) Isolation and characterization of epinectin, a novel adhesion protein for epithelial cells. *J Cell Biol.* **99**: 464-470.
- Gates P.: Techniques GC/MS. Stránky katedry chemie, Techniques GC/MS, University of Bristol. Dostupné z <http://www.bris.ac.uk/nerclsmf/techniques/gcms.html> (23.3.2011).
- Gates P.: Mass spectrometry. Stránky katedry chemie, Mass spectrometry, University of Bristol. Dostupné z <http://www.chm.bris.ac.uk/ms/theory/qit-massspec.html> (23.3.2011).
- Harold M. M. a Miler J. M. (1998) Basic Gas Chromatography, pp. 3-13, Wiley J. & sons, New York, USA.
- Churáček J. a kol. (2003) Nové trendy v teorii a instrumentaci vybraných analytických metod, pp. 314-324, Nakladatelství Akademie věd České republiky, Praha.
- Kouremenos K. A., Pitt J., Marriot P. J. (2010) Metabolic profiling of infant urine using comprehensive two-dimensional gas chromatography: Application to the diagnosis of organic acidurias and biomarker discovery. *J Chromatogr A.* **1217**, 104-111.
- Longley D. B., Harkin D. P., Johnston P. G. (2003) 5-Fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat Rev Cancer* **3**, 330-338.
- Mader R. M., Müller M., Steger G. G. (1998) Resistance to 5-Fluorouracil. *Gen. Pharmac.* **31**, 661-666.

- Mitreviski B. S., Wilairat P., Marriott P. J. (2010) Comprehensive two-dimensional gas chromatography improves separation and identification of anabolic agents in doping control. *J Chromatogr A*. **1217**, 127-135.
- Oldiges M., Lütz S., Pflug S., Schroer K., Stein N., Wiendahl C. (2007) Metabolomics: current state and evolving methodologies and tools. *Appl Microbiol Biotechnol*. **76**, 495-511.
- Opekar F. (2003) Základní analytická chemie, pp. 149-159, Nakladatelství Karolinum, Univerzita Karlova, Praha.
- Štulík a kol. (2004) Analytické separační metody, pp. 24-38, Nakladatelství Karolinum, Praha.
- Terabe S., Markuszewski M. J., Inoue N., Otsuka K., Nishioka T. (2001) Capillary electrophoretic techniques toward the metabolome analysis, *Pure Appl. Chem.* **73**, 1563–1572.
- Tomita M., Nishioka T. (2005) Metabolomics: The Frontier of Systems Biology, pp. 143-144.
- Ubik K. (1999) Fyzikálně-chemické metody (Hmotnostní spektrometrie), cyklus Organická chemie, svazek 24, pp. 17-93, Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, Praha.
- Vodrážka Z. (2007) Biochemie, kniha druhá, pp. 9-18, Nakladatelství Academia, Praha.
- Voet D., Voetová J. G. (1995) Biochemie, pp. 435-438, Victoria Publishing, Praha.
- Wang B., Fang A., Heim J., Bogdanov B., Pugh S., Libardoni M., Zhang X. (2010) DISCO: distance and spectrum correlation optimization alignment for two-dimensional gas chromatography time-of-flight mass spectrometry-based metabolomics. *Anal. Chem.* **82**, 5069-5081.
- Weckwerth W., Motgenthal K. (2005) Metabolomics: from pattern recognition to biological interpretation. *Drug Discov Today*. **22**, 1551-1558.
- Wojtowicz P., Zrostlíková J., Kovalczuk T., Schůrek J., Adam T. (2010) Evaluation of comprehensive two-dimensional gas chromatography coupled to time-of-flight mass spectrometry for the diagnosis of inherited metabolic disorders using an automated data processing strategy. *J Chromatogr A*. **1217**, 8054-8061.
- Zýka J. a kol. (1966) Analytická příručka, pp. 652-706, Státní nakladatelství technické literatury, Praha.