

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI**

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Vliv imatinibu na metabolismus buněk  
v buněčné kultuře chronické myeloidní leukemie**

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Autor:	<b>Iveta Fikarová</b>
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	<b>doc. RNDr. Tomáš Adam, Ph.D.</b>
Termín odevzdání práce:	6. 5. 2011

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

V Olomouci dne 6. 5. 2011

Ráda bych poděkovala svému vedoucímu bakalářské práce doc. RNDr. Tomáši Adamovi, PhD. za odborné vedení, ochotu a vstřícnost. Poděkování patří také Mgr. Haně Krätschmerové, RNDr. Davidu Friedeckému, PhD. a Mgr. Petru Wojtowiczovi za pomoc a cenné rady při realizaci experimentální části.

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	Iveta Fikarová
Název práce	Vliv imatinibu na metabolismus buněk v buněčné kultuře chronické myeloidní leukemie
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 vědní obor, který slouží pro detekci a kvantifikaci nízkomolekulárních metabolitů vytvořených žijícími buňkami. Chronická myeloidní leukemie (CML) je onemocnění krevních buněk projevující se množením bílých krvinek. Je charakteristické přítomností Filadelfského chromosomu, který je výsledkem reciproké translokace mezi chromosomy 9 a 22. V současnosti je velmi rozšířená léčba pomocí tyrosinkinasových inhibitorů. Z této nové třídy léků se nejdříve začal používat imatinib jako lék 1. generace pro standardní léčbu pacientů s CML. Cílem experimentální části byl vývoj metody pro analýzu nukleotidů a jejich derivátů pomocí ultraúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií. Optimalizovaná metoda byla poté aplikována na leukocyty izolované z plné krve nově diagnostikované pacientky s CML. Byly sledovány změny hladin nukleotidů v leukocytech inkubovaných s imatinibem o různé koncentraci. V extraktech bylo celkem identifikováno až 39 studovaných látek. Data byla statisticky vyhodnocena pomocí analýzy hlavních komponent
Klíčová slova	Metabolomika, chronická myeloidní leukemie, imatinib, leukocyty, nukleotidy, tandemová hmotnostní spektrometrie
Počet stran	57
Počet příloh	0
Jazyk	Český

## Bibliographical identification:

Autor's first name and surname	Iveta Fikarová
Title	Effect of imatinib on cell metabolism in a cell culture of chronic myeloid leukemia
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 science used for detection and quantification of low molecular weight metabolites generated by living cells. Chronic myeloid leukemia (CML) is a disease of blood cells connected with the proliferation of white blood cells. It is characterized by the presence of Philadelphia chromosome, which is the result of reciprocal translocation between chromosomes 9 and 22. At present, a treatment with tyrosine kinase inhibitors is widespread. From this new class of drugs, first-generation imatinib was primarily used for a standard treatment of patients with CML. The aim of the experimental part of this thesis was development of a high performance liquid chromatographic method with tandem mass spectrometric detection for analysis of nucleotides and their derivatives. The optimised method was applied to leukocytes isolated from whole blood of newly diagnosed patient with CML. Nucleotide level changes in leukocytes incubated with various concentrations of imatinib were observed. Up to 39 compounds were identified in the leukocytes extracts. Data were statistically processed using principle component analysis.
Keywords	Metabolomics, chronic myeloid leukemia, imatinib, leukocytes, nucleotides, tandem mass spectrometry
Number of pages	57
Number of appendices	0
Language	Czech

## OBSAH

<b>Cíle práce .....</b>	<b>8</b>
<b>Teoretická část .....</b>	<b>9</b>
<b>1 Metabolomika .....</b>	<b>10</b>
1.1 Úvod.....	10
1.2 Metabolomická studie.....	11
1.3 Metabolomické databáze.....	11
1.4 Metabolity .....	12
<b>2 Analytické metody .....</b>	<b>13</b>
2.1 Hmotnostní spektrometrie.....	13
2.1.1 Instrumentace MS .....	13
2.1.2 Tandemová hmotnostní spektrometrie.....	15
2.2 Kapalinová chromatografie .....	16
<b>3 Leukemie .....</b>	<b>17</b>
3.1 Úvod.....	17
3.2 Typy leukemií .....	18
3.3 Chronická myeloidní leukemie.....	19
3.3.1 Mechanismus vzniku Ph chromosomu.....	20
3.3.2 Diagnostika CML .....	20
3.3.3 Léčba CML .....	21
<b>4 Imatinib .....</b>	<b>22</b>
4.1 Úvod.....	22
4.2 Mechanismus účinku imatinibu .....	23
4.3 Farmakologie.....	24
4.4 Dávkování .....	24
4.5 Nežádoucí účinky .....	24
<b>Experimentální část.....</b>	<b>26</b>
<b>5 Materiál .....</b>	<b>27</b>
5.1 Chemikálie.....	27
5.2 Přístrojové vybavení .....	28
5.3 Biologický materiál.....	28
5.3.1 Izolace leukocytů .....	28
5.3.2 Počítání leukocytů .....	29
5.3.3 Zpracování leukocytů pro analýzu .....	29
<b>6 Metody .....</b>	<b>30</b>
6.1 Příprava standardů.....	30

6.2	Optimalizace podmínek MS/MS.....	30
6.3	Optimalizace UHPLC podmínek .....	30
6.4	Analýza směsi standardů.....	31
6.5	Analýza reálných vzorků leukocytů.....	31
6.6	Statistické vyhodnocení.....	31
<b>7</b>	<b>Výsledky .....</b>	<b>32</b>
7.1	Optimalizace podmínek MS/MS.....	32
7.2	Optimalizace UHPLC podmínek .....	38
7.3	Analýza standardů.....	38
7.4	Analýza biologického materiálu .....	44
7.5	Statistické vyhodnocení.....	46
<b>8</b>	<b>Diskuze .....</b>	<b>50</b>
<b>9</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>51</b>
	<b>Použitá literatura.....</b>	<b>52</b>
	<b>Seznam použitých zkratk .....</b>	<b>55</b>

## Cíle práce

- Vypracování literární rešerše na téma: Metabolomika, chronická myeloidní leukemie a imatinib
- Optimalizace metody pro analýzu nukleotidů a jejich derivátů pomocí ultraúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií
- Aplikace metody na reálných vzorcích - zkoumání vlivu imatinibu na metabolismus leukocytů od pacientky s chronickou myeloidní leukemií



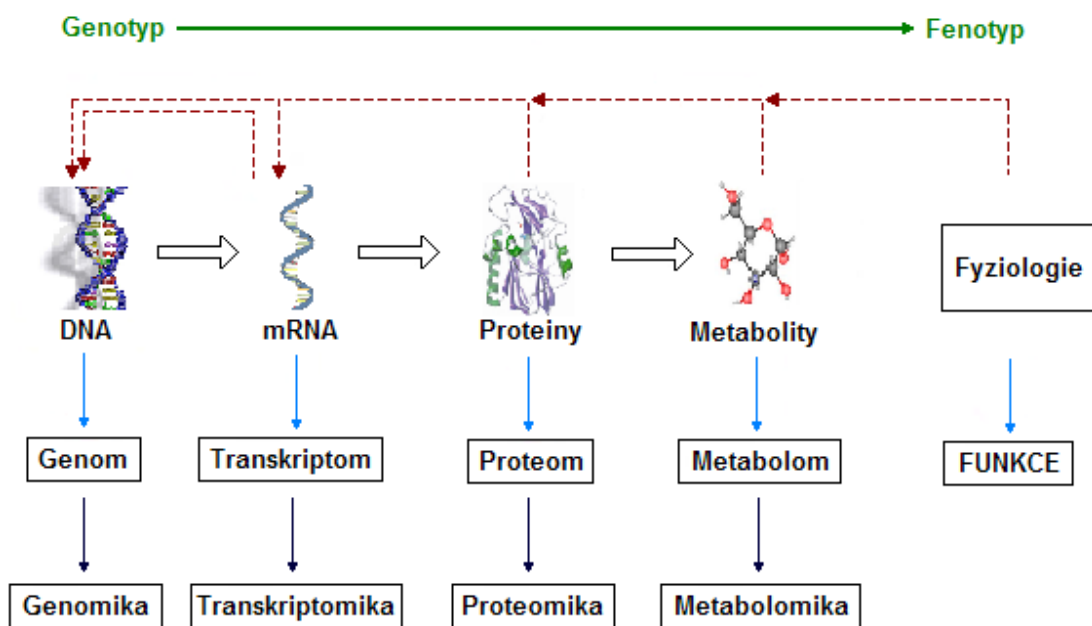
# **Teoretická část**

# 1 Metabolomika

## 1.1 Úvod

Metabolomika je vědní obor, který slouží pro detekci a kvantifikaci nízkomolekulárních metabolitů vytvořených žijícími buňkami (Yang et al., 2011).

V posledních desetiletích 20. a na počátku 21. století došlo k revoluci v biomedicinském výzkumu, která umožnila přejít od studií jednotlivých genů, mRNA transkriptů, proteinů a metabolitů ke studiím zahrnující kompletní genom, transkriptom, proteom a metabolom (Obr. 1) (Kaddurah-Daouk et al., 2008).



**Obr. 1:** Hierarchické úrovně buněčné organizace od genotypu k fenotypu (upraveno dle: Roberts et al., 2011)

Systémová biologie zahrnuje nejen schopnost měřit všechny prvky buněčného systému jako je DNA, mRNA, proteiny, metabolity a konstrukční prvky (buněčné stěny a membrány), ale také schopnost určit vztah těchto prvků k sobě navzájem. Proto údaje získané z jiných vědních oborů, genomiky, transkriptomiky a proteomiky doplnila o nové informace metabolomika. Tento rychle se rozvíjející vědní obor poskytuje ucelenější pohled na vztah mezi genotypem a fenotypem buněk, na funkce buňky, identifikaci nových metabolitů a specifické změny v metabolitech (Villas-Bôas et al., 2005; Roessner & Bowne, 2009).

Existuje řada různých typů metabolomických přístupů, které jsou využívány jak pro měření charakteristik všech metabolitů v jednom vzorku, tak pro měření vybraných skupin analytů. Jedním z typů je klinická metabolomika, jejímž cílem je hodnocení a predikce rizika onemocnění u jednotlivců při vyšetřeních metabolomu v tělních tekutinách nebo tkáních, které jsou geneticky ovlivněny (Ceglarek et al., 2008).

## 1.2 Metabolomická studie

Pro analýzu metabolomu jsou nejdříve shromážděny biologické vzorky (plazma, mozkomíšni mok, tkáně atd.). Pro zpracování buněčné kultury (př. lidských fibroblastů) je důležité rychlé zastavení (quenching) metabolismu buněk a extracelulární enzymové aktivity (běžně přídatkem chladného roztoku methanolu). Následně jsou ze vzorků extrahovány extracelulární a intracelulární metabolity, které jsou pomocí analytických technik identifikovány a kvantifikovány. Při extrakci metabolitů je třeba pracovat rychle a účinně, aby se předešlo ztrátám způsobeným jejich degradací a dalším biochemickým reakcím. Extrakce se provádí v závislosti na pH do vhodného vodného roztoku, nejčastěji methanolu či chloroformu.

Mezi nejvíce využívané analytické techniky v metabolomice patří mimo jiné kapalinová (LC) a plynová chromatografie, hmotnostní spektrometrie (MS), nukleární magnetická rezonanční spektroskopie, kapilární elektroforeza nebo kapilární zónová elektroforeza. Pro lepší separaci molekul se při analýze metabolomu využívají i kombinace jednotlivých analytických technik. V experimentální části své bakalářské práce jsem se zabývala analýzou metabolitů pomocí ultraúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií, proto těmto technikám věnuji celou kapitolu.

Soubory dat jsou poté statisticky zpracovány odpovídajícím softwarem. Po celkové analýze vzorků jsou tvořeny databáze, které obsahují zjištěné hladiny jednotlivých metabolitů, jejich totožnost nebo i celkový popis jejich vlastností (Kaddurah-Daouk et al., 2008; de Koning & van Dam, 1992).

## 1.3 Metabolomické databáze

Metabolomika je velmi závislá na dostupnosti a kvalitě elektronických databází. Protože metabolomika kombinuje molekulární biologii s chemií a fyziologií, je třeba široká škála elektronických zdrojů. Vývoj biologických databází je nezbytným základem pro budoucí výzkum a vývoj ve všech biologických vědách. Databáze jsou důležité pro další šetření především tehdy, pokud jsou údaje kvantitativně srovnatelné. V současné

době existuje nejméně 5 typů databází využívaných v metabolickém výzkumu. Mezi nejvyhledávanější zdroje patří např. databáze KEGG - „Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes“, která poskytuje bližší informace o genomu, resp. o propojení genomu s biologickými systémy nebo databáze HMDB - „Human Metabolome Database“, jež obsahuje různé informace o jednotlivých metabolitech, např. chemické vlastnosti, chemické struktury, taxonomii, hmotnostní spektra nebo koncentrace v biologických vzorcích. Tuto databázi využívají při řešení problematiky analýzy metabolomu vědci z řad biochemiků, klinických chemiků, lékařů a genetiků. Od svého prvního vydání byly informace z této databáze použity k usnadnění výzkumu téměř 100 publikovaných studií v metabolice, klinické biochemii a systematické biologii (Wishart et al., 2009; Kanehisa et al., 2006; German et al., 2002).

## 1.4 Metabolity

Metabolity jsou konečné produkty buněčných regulačních procesů a jejich hladina může být považována za konečnou reakci biologických systémů na genetické a environmentální změny. Stejně jako v případě transkriptomu a proteomu, soubor metabolitů vzniklých v biologickém systému tvoří jeho metabolom.

Metabolomika se zabývá studiem nízkomolekulárních metabolitů přítomných v buňkách, tkáních, orgánech nebo biologických tekutinách. Jedná se o endogenní molekuly podílející se nebo vycházející z primárního metabolismu a látkové výměny. Mezi nejznámější a nejvíce studované endogenní molekuly patří např. glukosa, cholesterol, ATP, biogenní aminy nebo signální lipidové molekuly. Výběrem vhodných separačních a detekčních technologií mohou být tyto molekuly analyzovány na základě jejich individuálních vlastností (polarita, rozpustnost, stabilita atd.). Široká škála metod používaných k separaci a kvantifikaci složek metabolomu umožňuje zachytit všechny metabolické informace ve vzorku (Kaddurah-Daouk et al., 2008).

Pro stanovení hladin metabolitů ve vzorku jsou běžně používány dva hlavní postupy - cílená a necílená analýza. Cílená analýza zahrnuje kvantifikaci souboru metabolitů, jejichž chemické složení je již známo. Proto se pro cílenou analýzu používají jen přesně definované metody, které jsou pro každou látku specifické. Naopak necílená analýza zahrnuje analýzu metabolitů bez znalosti jejich identity a chemického složení (Bajad & Shulaev, 2007).

## 2 Analytické metody

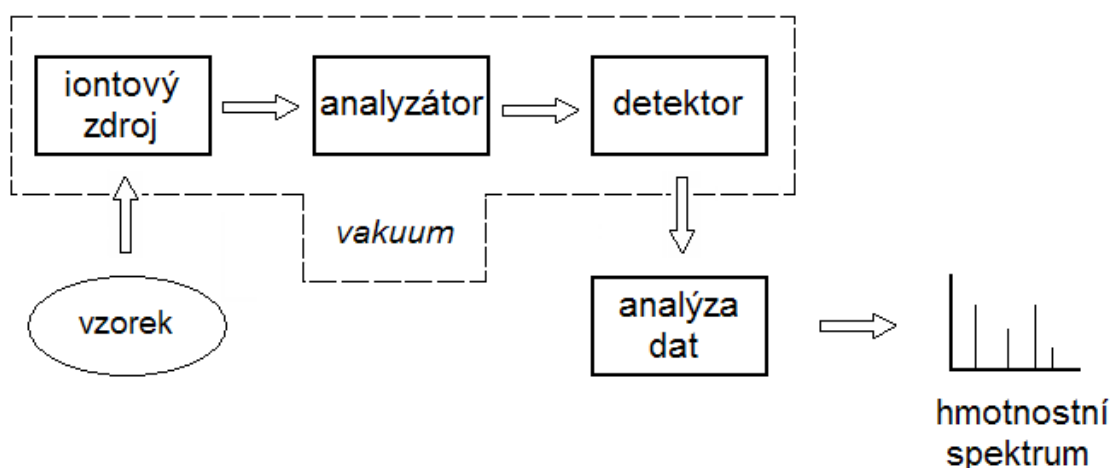
### 2.1 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie je analytická technika, která poskytuje kvalitativní (struktura) a kvantitativní (molekulová hmotnost a koncentrace) informace o analyzovaných molekulách po jejich přeměně na ionty (Ho et al., 2003).

Hmotnostní spektrometr je optické zařízení, které umožňuje separaci iontů v plynné fázi na základě jejich molekulových hmotností, umožňuje stanovit hodnotu této hmotnosti a počet přítomných iontů. Z elektroneutrálních molekul se v hmotnostním spektrometru ionizací vytvoří molekulární ionty, které se mohou rozštěpit na fragmenty nesoucí náboj a na radikály. Takto vzniklé nabitě částice (molekulární a fragmentové ionty) jsou následně separovány v magnetickém nebo vysokofrekvenčním poli. Výsledkem této analýzy je hmotnostní spektrum, které zaznamenává četnost iontů proti poměru jejich hmotnosti a počtu elementárních nábojů ( $m/z$ ) (Westman-Brinkmalm & Brinkmalm, 2009).

#### 2.1.1 Instrumentace MS

Hmotnostní spektrometr se skládá ze tří hlavních částí – iontový zdroj, hmotnostní analyzátor a detektor (Obr. 2).

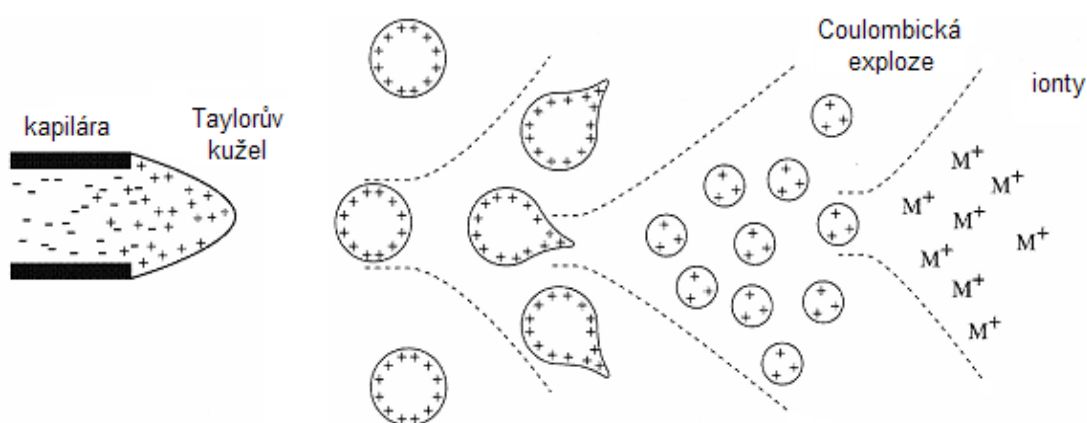


**Obr. 2:** Obecné schéma hmotnostního spektrometru

Hlavním úkolem *iontového zdroje* je vytvořit ionty v plynné fázi. Analyzované atomy, molekuly nebo klastry jsou do plynné fáze převedeny a následně ionizovány buď souběžně (ionizace elektrosprejem) nebo samostatně (doutnavý výboj). Podle typu analyzované látky lze použít několik ionizačních technik. Nejvyužívanější ionizační

technikou je ionizace při atmosférickém tlaku (API), do které můžeme zařadit ionizaci elektrosprejem (ESI), chemickou ionizaci za atmosférického tlaku a fotoionizaci za atmosférického tlaku. Mezi další ionizační techniky patří ionizace a desorpce laserem za účasti matrice nebo konvenční elektronová ionizace. Dříve byly využívány ionizace termosprejem a ionizace urychlenými atomy či ionty. V současnosti však mají tyto techniky mnohem menší význam vzhledem k dobré univerzálnosti API technik (Westman-Brinkmalm & Brinkmalm, 2009; Lemr, 2011).

V experimentální části této práce byla použita *ionizace elektrosprejem* (Obr. 3). Tento typ ionizace využívá elektrickou energii na převod iontů z roztoku do plynné fáze. Vzorek prochází nerezovou nebo křemennou kapilárou, která je udržována pod vysokým napětím (obvykle 2,5 – 6,0 kV). Na výstupu z kapiláry vznikají nabitě kapičky se stejnou polaritou (záporným nebo kladným nábojem). Iontovým zdrojem prochází proud horkého plynu (obvykle dusíku), který způsobuje odpařování rozpouštědla a tím dochází ke zmenšování povrchové velikosti kapiček (počet nábojů v nich se však nemění). Pokud jsou odpuzivé síly vyvolané přiblížením iontů se stejným nábojem v rovnováze se silami odpovídajícími povrchovému napětí, kapičky se přibližují tzv. Rayleighově mezi stability. Ještě před dosažením této meze stability dochází k dalšímu štěpení, které je označováno jako Coulombická exploze. Většinou není pozorován rozpad kapiček na stejně velké části. Z rodičovské kapičky je emitována celá řada menších kapiček, čímž se zbaví dostatečného počtu nábojů a stabilizují se, dokud nedojde k dalšímu štěpení. Takto vzniklé velmi malé kapičky jsou prekurzory iontů v plynné fázi, které jsou emitovány do analyzátoru (Ho et al., 2003; Kebarle & Verkerk, 2009, Lemr, 2011).



**Obr. 3:** Mechanismus ionizace elektrosprejem (upraveno dle: Ho et al., 2003)

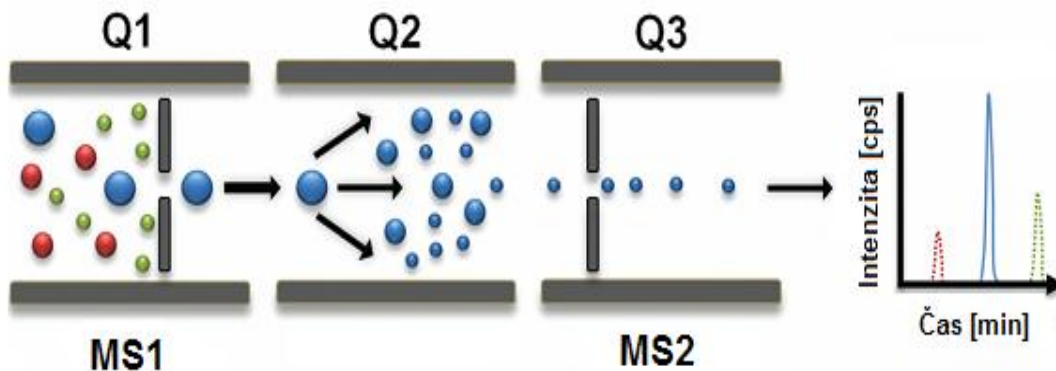
*Hmotnostní analyzátor* je zařízení, které slouží k separaci atomů, molekul nebo klastrů podle jejich molekulové hmotnosti (resp. podle poměru  $m/z$ ). V hmotnostní spektrometrii se využívají různé typy hmotnostních analyzátorů. V klinických laboratořích je to nejčastěji tzv. kvadrupólový hmotnostní analyzátor nebo kvadrupólová iontová past. Kvadrupólový analyzátor je sestaven ze čtyř kovových paralelních tyčí kruhového nebo hyperbolového průřezu. Protější tyče jsou elektricky spojeny do dvojic, které mají v daném čase potenciál o stejné velikosti ale s jiným znaménkem. Na tyče je vloženo napětí tvořené složkou stejnosměrnou a radiofrekvenční. Výsledné elektrické pole způsobuje, že se ionty za současného kmitání pohybují. Amplituda kmitání je dána poměrem  $m/z$ , který je ovlivněn změnou napětí.

Dalším typem hmotnostních analyzátorů je iontová past nebo trojitý kvadrupól, který je využíván v tzv. tandemové hmotnostní spektrometrii.

### 2.1.2 *Tandemová hmotnostní spektrometrie*

Trojitý kvadrupól je kombinací dvou kvadrupólových hmotnostních analyzátorů, které jsou odděleny kolizní celou (Obr. 4). V prvním kvadrupólu (Q1) je ze vzorku vybrán specifický molekulární ion. Tento ion poté vstupuje do kolizní cely (druhý kvadrupól, Q2), v níž dochází k interakci s kolizním plynem (argonem nebo dusíkem) a následné fragmentaci na produktové ionty. Struktury takto vzniklých iontů jsou monitorovány ve třetím kvadrupólu (Q3) a následně detekovány v detektoru (Ho et al., 2003).

Pro získávání dat se v tandemové hmotnostní spektrometrii používá mód sledování produktu rozpadu molekulárního iontu (MRM - „multiple reaction monitoring“), při němž s vysokou citlivostí sledujeme 1 nebo více přechodů iontů. Při MRM lze Q1 nastavit na konkrétní molekulární ion o určitém poměru  $m/z$ , pro něhož je optimalizována kolizní energie, aby mohl být ion fragmentován na produktové ionty. V Q3 jsou poté tyto ionty monitorovány a ze skupiny iontů je vybrán jeden specifický fragment, který je detekován. MRM se používá pro cílenou analýzu např. peptidů a malých molekul.



**Obr. 4:** Schéma trojitého kvadrupólu (upraveno dle: Boja & Rodriguez, 2011)

## 2.2 Kapalinová chromatografie

V kapalinové chromatografii (LC) molekuly analytu putují přes chromatografický systém a interagují s povrchem stacionární fáze. Jako mobilní fáze se v případě LC používá kapalina a stacionární fáze se obvykle skládá z malých porézních částic s velkým povrchem (př. oxid křemičitý). Molekuly silně interagující se stacionární fází se budou separovat déle než molekuly, které se stacionární fází interagují pouze málo nebo téměř vůbec (Westman-Brinkmalm et al., 2009).

Kapalinové chromatografy se skládají z částí zabezpečujících transport mobilní fáze, dávkování vzorku, jeho separaci a následnou detekci, záznam a zpracování výsledků. Mobilní fáze se dávkuje do separační kolony, která je termostatována a odtud je dávkována do detektoru poskytujícího elektrický signál. Výsledkem jsou chromatogramy závislosti intenzity elektrického signálu na čase retence. K identifikaci složek vzorků se využívá maxim chromatografických píků a obsah složek se určuje z výšek nebo ploch píků po jejich kalibraci pomocí standardů.

Složení a charakter mobilní a stacionární fáze značně ovlivňují retenci a selektivitu studovaných látek. Podle distribuce látek mezi fázemi a lze rozlišit chromatografii v systémech s obrácenými či normálními fázemi.

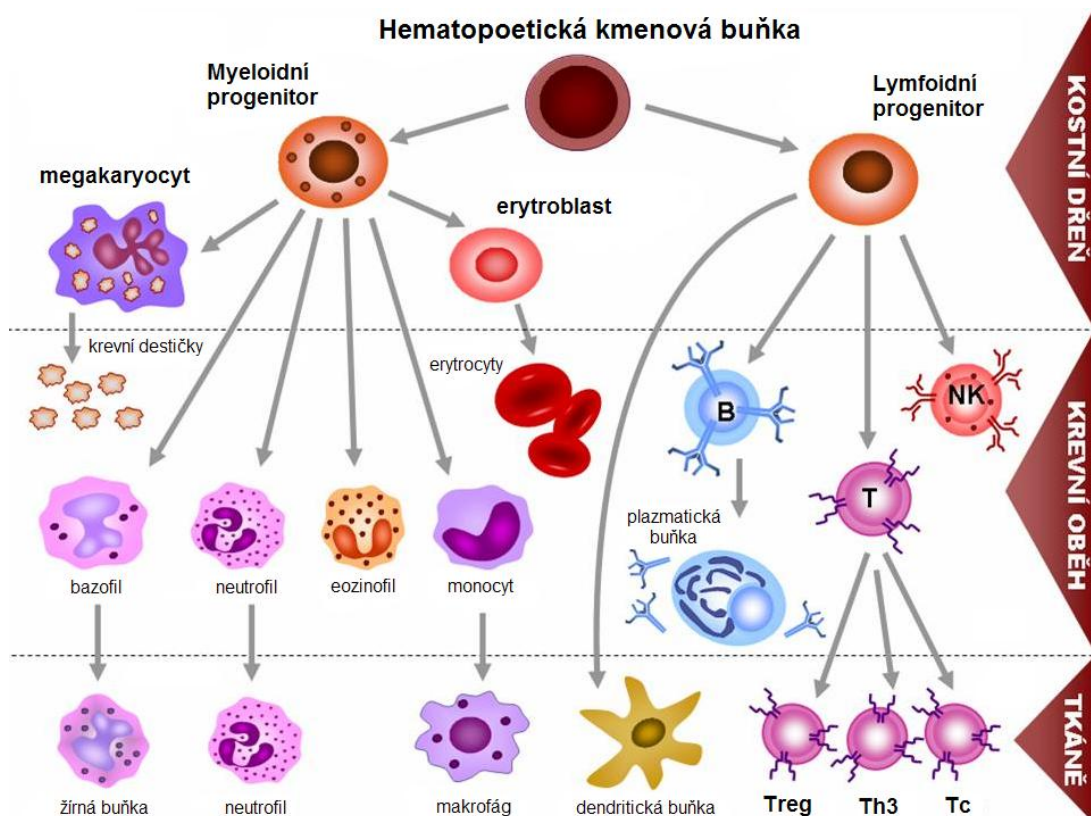
V současnosti hojně využívaným typem chromatografie je vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC - „High performance liquid chromatography“), používá se především pro analýzu tepelně nestálých a málo těkavých látek. Typické jsou pro tuto metodu analytické kolony s jemně zrněnými náplněmi a vysokou separační účinností (Jandera, 2011).



## 3 Leukemie

### 3.1 Úvod

Jsou známy tři základní typy krevních buněk – červené krvinky (erythrocyty), bílé krvinky (leukocyty) a krevní destičky (trombocyty). Bílé krvinky se rozdělují na 3 hlavní typy – monocyty, granulocyty a lymfocyty, z nichž každý hraje důležitou roli především v obraně proti infekcím. Všechny krevní buňky vznikají v kostní dřeni procesem hematopoézy z tzv. hematopoetických kmenových buněk (Obr. 5), jejichž charakteristickými znaky jsou schopnost sebeobnovy a diferenciace. Vznik těchto krevních buněk, jejich růst, vývoj a cyklus obnovy je v organismu složitě řízen z buněčného jádra tak, aby se stále vytvářela potřebná množství jednotlivých buněk. Každou vteřinu se v kostní dřeni vytvoří asi 3 milióny červenýchrvinek a 120 tisíc bílýchrvinek. Životnost červenýchrvinek je asi 120 dnů, zatímco bílé krvinky a krevní destičky přežívají v krvi jen několik dnů (Protivánková & Vorlíček, 2001; Reya et al., 2001).



**Obr. 5:** Hematopoetická řada – vznik krevních buněk (Faber, 2002)

Leukemie je nádorové onemocnění vyznačující se množením bílých krvinek, které jsou nezralé a neplní tak svou normální funkci. U pacientů můžeme takové bílé krvinky nalézt v kostní dřeni, v krvi a někdy i v jiných orgánech. Leukemii způsobuje neoplastická transformace již zmiňovaných hematopoetických kmenových nebo progenitorových buněk. Na molekulární úrovni se leukemie vyznačuje opakující se chromosomální aberací a genovou mutací, což hraje klíčovou roli ve vzniku tohoto onemocnění (Testa, 2011).

### 3.2 Typy leukemií

Podle typu množení bílých krvinek se leukemie rozděluje do čtyř základních typů. Jedná se o akutní myeloidní leukemii, chronickou myeloidní leukemii (CML), akutní lymfoblastickou leukemii a chronickou lymfatickou leukemii.

Leukemie bývá označována jako myeloidní, pokud je ovlivněna tvorba monocytů nebo granulocytů, v případě lymfatické leukemie bývá ovlivněna tvorba lymfocytů. Podle rychlosti průběhu onemocnění pak rozlišujeme leukemii chronickou či akutní. Chronické formy mají pomalý, postupný průběh a mohou trvat i několik let, než je choroba rozpoznána. U akutních forem je naopak průběh onemocnění rychlý a bez včasné léčby může vést až ke smrti pacienta. Pro akutní leukemii je typické množení nejčasnějších buněk - tzv. blastů (Obr. 6), zatímco u chronické leukemie se množí zralější buňky (Protivánková & Vorlíček, 2001).



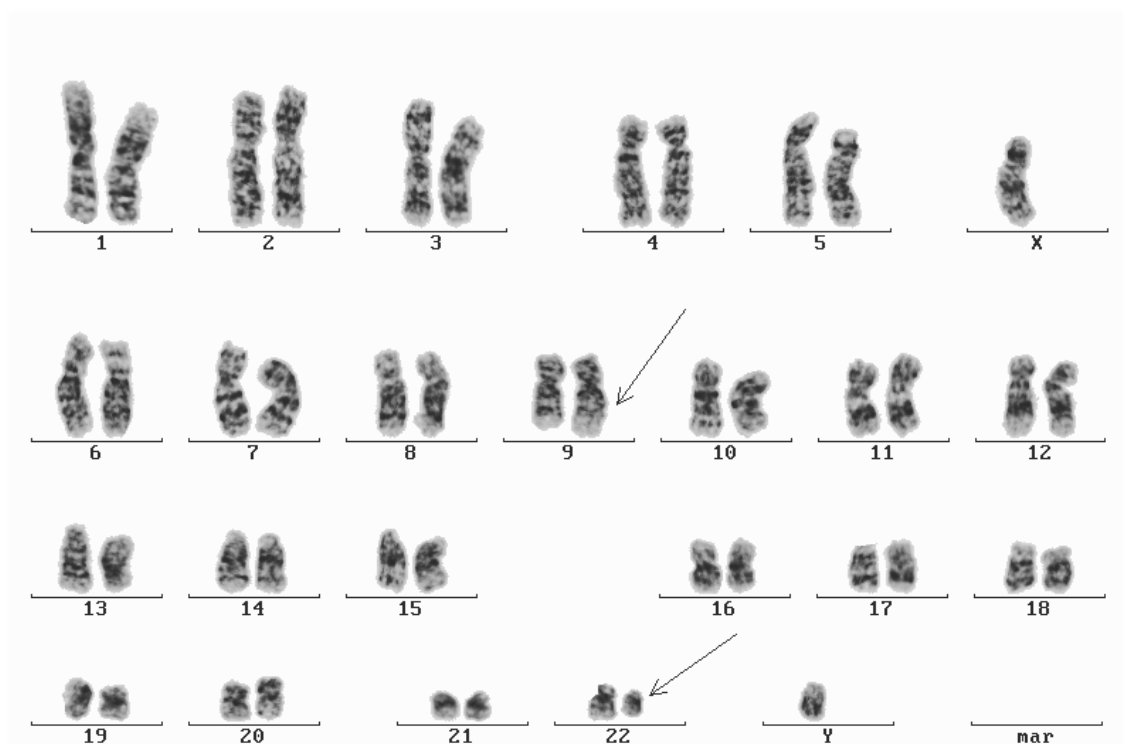
**Obr. 6:** Blast s adherovanými trombocyty a probíhající mitóza  
(Faber, 2002)

### 3.3 Chronická myeloidní leukemie

CML je prvním popsaným typem leukemie. Nezávisle na sobě ji rozpoznali John Hughes Bennett a David Craigie v Edinburgu a Rudolf Virchow v Berlíně, kteří prokázali, že CML je hematologické onemocnění krevních buněk projevující se nadměrnou proliferací bílých krvinek. (Deininger, 2008)

Toto onemocnění začíná chronickou fází, která může trvat měsíce nebo roky a vykazuje pouze malé nebo žádné příznaky onemocnění. Časem chronická fáze přechází do závažnější akcelerované nebo akutní fáze (fáze blastického zvratu), během které dochází u leukemických buněk k dalším genetickým změnám, buňky se množí rychleji a stávají se rezistentní k apoptóze (Clarkson et al., 2003).

CML je prvním lidským nádorovým onemocněním, jehož vznik byl dán do souvislosti se specifickou chromosomovou změnou. V roce 1960 objevili filadelfští cytogenetici Peter Novell a David Hungerford v karyotypech nemocných s CML malý chromosom, který dnes nazýváme Filadelfský chromosom (Ph). (Obr. 7)



**Obr. 7:** Filadelfský chromosom – šipky ukazují chybu v chromosomech 9 a 22  
(Faber et al., 2004)

### 3.3.1 Mechanismus vzniku Ph chromosomu

V roce 1973 zjistila Janet Rowleyová, že Ph je výsledkem reciproké translokace mezi chromosomy 9 a 22, t(9;22) (q34;q11). Do translokace je zapojen protoonkogen *ABL*, který je normálně lokalizovaný na chromosomu 9 a který je lidským homologem virového onkogenu Abelsonovy myší leukemie. Partnerský gen *BCR* – „breakpoint cluster region“ se účastní translokace na chromosomu 22.

Na molekulární úrovni tato translokace odpovídá vytvoření *BCR-ABL* fúzního genu. Tento gen kóduje onkoprotein o velikosti 210 kDa zvaný p210<sup>ABL-BCR</sup> (Jarošová et al., 2010; Lugo et al., 1990).

Jakým mechanismem translokace s výsledným fúzním genem *BCR-ABL* vzniká, není dosud přesně známo. Předpokládá se, že iniciální událostí translokace je vznik zlomů dvoušroubovice DNA, tzv. double strand breaks na obou chromosomech 9 a 22. Takové zlomy mohou vznikat např. chybou v jádře buňky. Na opravách zlomů se podílí homologní rekombinace a nehomologní spojení konců chromosomů. Výsledkem spojení nesprávných konců chromosomů jsou genomické přestavby včetně translokací (Agawal, 2006).

### 3.3.2 Diagnostika CML

V krevním obraze pacientů s CML se vyskytuje leukocytóza, která téměř u všech nemocných přesahuje hodnotu  $25 \times 10^9/l$ . Typické je vyplavení nezralých forem leukocytů – blastů, promyelocytů a vysoký výskyt metamyelocytů a myelocytů. U nadpoloviční většiny pacientů bývá zvýšen také počet trombocytů (vzácně se mohou vyskytnout i hodnoty přes  $5000 \times 10^9/l$ ).

Charakteristickým nálezem v kostní dřeni pacientů je zvýšený podíl bílých krvinek – granulocytů. Zmnoženy jsou zejména bazofily a eozinofily, obvykle je ale také zvýšený počet megakaryocytů. V kostní dřeni dále dochází k hypercelularitě, která se projevuje redukcí až vymizením tukových buněk.

Při biochemickém vyšetření bývá přítomna vysoká hladina kyseliny močové, což vede k intenzivnějšímu metabolismu nukleových kyselin. U některých pacientů se vyskytuje zvýšená hladina LDH, vitamínu B12 a beta-2-mikroglobulinu (Faber, 2002).

### 3.3.3 Léčba CML

Pro léčbu CML v chronické fázi se využívají různé terapeutické postupy. Mezi nejčastější způsoby léčby patří chemoterapie, transplantace kostní dřeně (hematopoetických buněk), imunoterapie, léčba TKI (tyrosinkinasovými inhibitory) a kombinovaná léčba.

*Chemoterapií* se rozumí podávání látek (cytostatik) zabíjejících leukemické buňky. V chronické fázi CML je nejčastěji podávanou látkou hydroxyurea nebo busulfan, který má však řadu nežádoucích účinků, jako jsou neplodnost, útlumy krvetvorby či zhoršení výsledků alogenní transplantace. Podávání cytostatik na počátku léčby vede ke snížení příznaků CML, ale nikdy nevede k vymizení Ph z kostní dřeně.

*Imunoterapie* využívá při léčbě CML vlastního imunitního systému pacienta. Při imunoterapii jsou podávány interferony (interferon alfa), což jsou bílkoviny, které se využívají při léčbě zhoubných nádorů. Navázání interferonu na jeho specifický buněčný receptor způsobuje syntézu řady proteinů, které mají antivirové, antibakteriální a antiproliferační účinky. Interferon zvyšuje expresi adhezivních molekul a naopak snižuje expresi některých cytokinů a onkogenů. Dále má také vliv na buněčný cyklus, regulaci diferenciaci, růstu a proliferace.

*Transplantace kostní dřeně* hraje v léčbě CML významnou roli. Podle zdroje krvetvorných buněk rozeznáváme transplantace syngenní, při níž je dárce kostní dřeně jednovaječné dvojče nemocného, a alogenní, v jejímž případě je kostní dřeň odebrána jiné osobě. Jedná se buď o osobu příbuzenskou (nejčastěji sourozenec) nebo nepříbuzenskou a dárce je pak vyhledáván v registru dárců kostní dřeně. U pacientů s CML může být výjimečně provedena i transplantace autogenní, kdy jsou pacientovi transplantovány jeho vlastní krvetvorné buňky, které jsou od něj získány před podáním cytostatik.

Transplantace je však spojena s řadou rizik, s infekcí a poměrně častá bývá i reakce štěpu proti hostiteli při alogenní transplantaci. Proto je třeba zvolit vhodného dárce s úplně stejnými krvetvornými buňkami, jinak může dojít k odmítnutí transplantátu. Před transplantací je také nutné, aby lékaři zvážili všechny okolnosti, na jejichž základě může být transplantace provedena. O jejím výsledku rozhoduje velké množství faktorů, mezi které patří především věk pacienta, stadium onemocnění, interval od diagnózy k transplantaci či pohlaví dárce.

(Faber, 2002; Protivánková & Vorlíček, 2001)

V současnosti je velmi rozšířená léčba pomocí *TKI*, která představuje první molekulární cílenou terapii určenou k léčbě nádorových onemocnění. Z této nové třídy

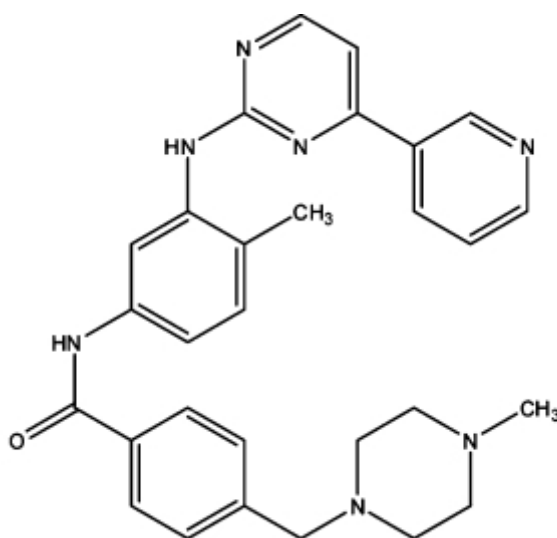
léků se nejdříve začal používat imatinib (IM) jako lék 1. generace pro standardní léčbu pacientů v chronické fázi CML. TKI 2. generace (dasatinib a nilotinib) jsou indukovány u pacientů, kteří jsou rezistentní nebo intolerantní na imatinib. Vazbou TKI do kinasové domény dochází k zabránění fosforylace tyrosinu bílkovin patřících k substrátům proteinu Bcr/Abl, což vede k zabránění genetických změn v maligním procesu. (Bumbea et al., 2010)

V experimentální části své bakalářské práce jsem se zabývala vlivem imatinibu na metabolismus buněk CML, proto mu věnuji celou kapitolu.

## 4 Imatinib

### 4.1 Úvod

Imatinib (Obr. 8) označovaný jako Gleevec (dříve STI-571 - signal transduction inhibitor), je derivát 2-fenylaminopyrimidinu s chemickým názvem 4-[(4-methyl-1-piperazinyl)methyl]-*N*-[4-methyl-3[[4-(3-pyridinyl)-2-pyrimidinyl]aminophenyl]benzamid methansulfonát. Jeho molekulová hmotnost je 493,6 g/mol (Deininger et al., 1997).



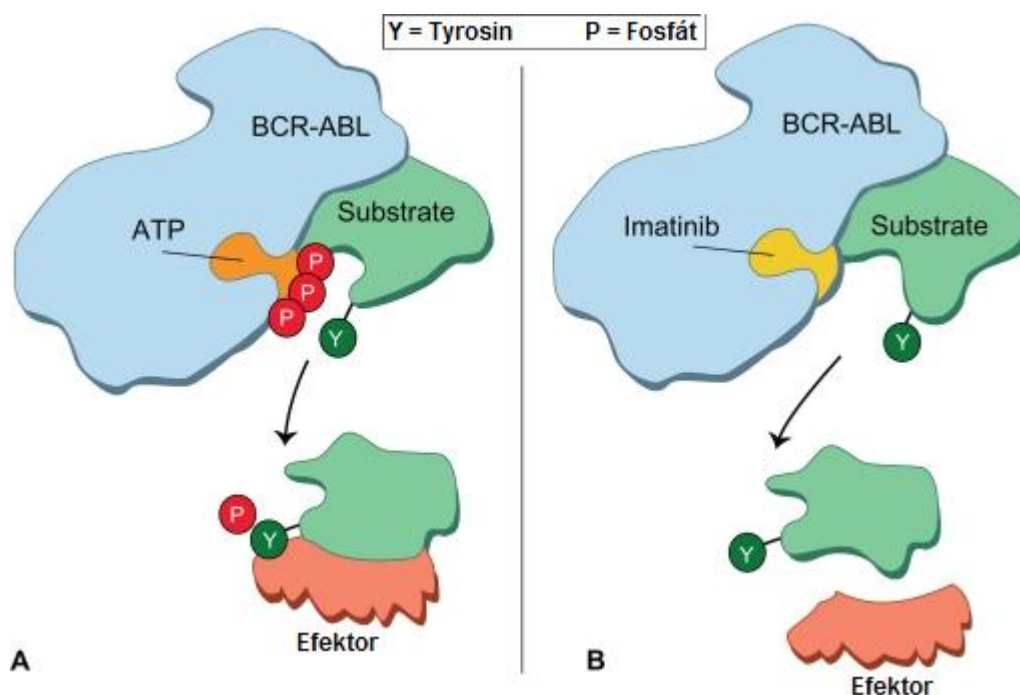
**Obr. 8:** Strukturní vzorec imatinibu (Salah et al., 2011)

Imatinib je indikován u nově diagnostikovaných pacientů s CML v chronické fázi v první linii léčby. Dále je indikován při léčbě pacientů s Ph<sup>+</sup> akutní lymfoblastickou leukemií, gastrointestinálním stromálním nádorem, chronickou eozinofilní leukemií, resp. hypereozinofilním syndromem a systémovou mastocytózou s pozitivitou FIP1L1-PDGFR $\alpha$  nebo ETV6-PDGFR $\beta$  (Faber & Indrák, 2010).

## 4.2 Mechanismus účinku imatinibu

IM je nejčastěji využívaný TKI, jehož mechanismus účinku je nejlépe prozkoumán v *BCR-ABL* pozitivních buňkách. IM interaguje s bílkovinou Bcr-Abl (p210) na nukleotidovém vazebném místě, čímž zabraňuje ve vazbě ATP a stabilizuje tak protein Bcr-Abl v inaktivní konformaci (Obr. 9). Blokadí fosforylace tyrosinových zbytků proteinů je zastavena aktivace řady signálních procesů podílejících se na vzniku leukemického fenotypu buňky. IM tak sice nezabrání vzniku leukemického genu *BCR-ABL*, jenž má při vzniku CML klíčovou roli, ale brání jeho účinku na proteinové úrovni.

Působení IM na leukemické buňky vede k jejich apoptóze a inhibici proliferace patologického klonu. IM podle experimentálních studií nepůsobí na leukemické progenitorové buňky, čímž nedokáže CML zcela vyléčit, ale velmi účinně potlačí růst leukemického klonu. V současnosti se proto doporučuje jeho trvalé užívání i v situaci dosažení stabilní a dlouhotrvající molekulární negativity BCR-ABL (Faber & Indrák, 2010; Graham et al., 2002).



**Obr. 9:** Mechanismus účinku IM - bez inhibice IM (A) a s inhibicí IM (B)  
(Mughal & Schrieber, 2010)

### **4.3 Farmakologie**

IM je metabolizován v játrech cytochromatickým systémem P450 a poté vázán v plazmě na bílkoviny (zejména na albumin). Výsledkem degradace IM je řada metabolitů, které se z organismu vylučují ze 70 % stolicí a z 10 % močí, pouze 20 % IM se vyloučí stolicí v původní formě. Významnou výhodou IM je, že je účinný i při jeho podávání ve formě tablet. Mnoho protirakovinných léčiv je účinných pouze tehdy, když jsou pacientům injektovány (Faber & Indrák, 2010).

IM je klinicky testován od roku 1998 a dosavadní výsledky poukazují na to, že jde o nejučinnější lék, který byl kdy při léčbě CML použit. Asi 20 % pacientů léčených ve fázi blastického zvratu a více než 90 % pacientů léčených v chronické fázi CML rezistentních na interferon dosáhlo po několika týdnech kompletní hematologickou remisi. Průměrná délka léčby pacientů s CML nepřesáhla jeden rok (Faber, 2002).

### **4.4 Dávkování**

Po perorálním požití se IM vstřebává velmi rychle a maximální hladiny dosahuje asi 1 až 3 hodiny po aplikaci, a to bez ohledu na současné požití jídla (Peng, 2004).

U dětí je doporučeno lék podávat v dávkách 260-340 mg, což odpovídá dávce 400-600 mg u dospělých. Studie prokázaly, že není třeba upravovat dávku v závislosti na hmotnosti nebo výšce nemocného. Byly však popsány případy obézních pacientů s hmotností nad 100 kg, u kterých vedlo zvýšení dávky léku ke zvýšení účinnosti léčby (Faber & Indrák, 2010).

V případech nedostatečné odpovědi na IM nebo při podezření, že pacient lék neužívá, je doporučováno vyšetření hladin IM v tělních tekutinách 24 hodin po užití poslední dávky (Peng, 2004).

### **4.5 Nežádoucí účinky**

IM je dobře tolerovaný lék, u něhož se výskyt závažných nežádoucích účinků (stupeň 3 a 4) pohybuje řádově od desetin procenta do několika procent (s výjimkou hematologických účinků) (Tab. 1). Nejčastěji se vyskytují nežádoucí účinky, které jsou spjaty s trávicím systémem, jako je nevolnost a žaludeční dyspepsie. Řada nemocných upozornila na zvýšení chuti k jídlu během užívání IM, proto je dobré pravidelně sledovat hmotnost a její možné kolísání. Působení IM na receptor c-kit ve střevech může vyvolat průjmy. Nebezpečná je i hypertoxicity, která vzácně může vést k selhání jater.



Další nežádoucí účinky souvisí především s pohybovým aparátem (svalové křeče, bolesti svalů, kostí a kloubů), vnitřním prostředím (otoky, retence tekutin) a také s imunitním systémem (alergie, prutitus).

Klinicky nejdůležitější nežádoucí účinky jsou hematologické, mezi které patří neutropenie a trombocytopenie. Jejich největší výskyt je u nemocných s CML v akcelерованé fázi a fázi blastického zvratu. Cytopenie také souvisí s rozvojem fibrózy kostní dřeně a neutropenie vede ke vzniku nezávažných infekcí, které se po přerušení léčby IM léčí antibiotiky (Faber & Indrák, 2010).

**Tab. 1:** Výskyt nežádoucích účinků IM u nemocných s CML z vybraných studií (Faber & Indrák, 2010)

Nežádoucí účinky	Výskyt [%]	
	Všechny stupně	Stupeň 3 a 4
Retence tekutin, otoky	54 – 76	1 – 11
Nevolnost	43 – 73	0,4 – 5
Zvracení	15 – 58	0,9 – 4
Křeče svalů	28 – 62	0,4 – 2
Bolest kostí a svalů	34 – 49	2 – 9
Průjem	30 – 57	1,3 – 5
Slabost, únavnost	30 – 48	1 – 4
Kožní vyrážka	32 – 47	2 – 5
Horečka	11 – 41	0,5 – 8
Bolesti kloubů	25 – 40	1 – 6
Bolesti břicha, dyspepsie	12 – 33	0 – 6
Bolesti hlavy	27 – 36	0,4 – 5
Jaterní toxicita	6 – 12	3 – 6
<b>Hematologická toxicita</b>	<b>Stupeň 3</b>	<b>Stupeň 4</b>
Neutropenie	23 – 29,6	8,1 – 35
Trombocytopenie	19 – 55,6	0,9 – 18,5
Anemie	6 – 48,2	1,1 – 6

# **Experimentální část**

## 5 Materiál

### 5.1 Chemikálie

Acetonitril LC-MS (AcCN,  $\geq 99,9\%$ ), hydroxid amonný (25%), kyselina octová (100%) a methanol LC-MS ( $\geq 99,9\%$ ) byly zakoupeny u firmy Fluka (Německo), fetální hovězí sérum (FBS) u firmy PANBiotech (Německo) a imatinib u firmy Novartis (Curych, Švýcarsko). Dimethylsulfoxid (DPMO), chloroform ( $\geq 99,9\%$ ), histopaque, směs antibiotik penicil a streptomycin (PEN/STREP), proplachovací médium IMDM byly zakoupeny u firmy Sigma Aldrich (St. Louis, USA). Pro přípravu všech roztoků byla použita LC-MS voda, která byla také zakoupena u firmy Sigma Aldrich (St. Louis, USA).

Adenosin-5'-difosfát (ADP) sodná sůl (96%), adenosin-5'-monofosfát (AMP) sodná sůl (99%), adenosin-5'-trifosfát (ATP) disodná sůl (99%), cytidin-5'-difosfát (CDP) sodná sůl (98%), cytidin-5'-monofosfát (CMP) disodná sůl (99%), cytidin-5'-trifosfát (CTP) disodná sůl (98%), flavinadenindinukleotid (FAD) disodná sůl hydrát (95%), riboflavin-5'-monofosfát (FMN) sodná sůl dihydrát (74%), guanosin-5'-difosfát (GDP) sodná sůl (98%), guanosin-5'-monofosfát (GMP) disodná sůl (100%), guanosin-5'-trifosfát (GTP) sodná sůl (95%), inosin-5'-difosfát (IDP) sodná sůl (96%), inosin-5'-monofosfát (IMP) disodná sůl (99%), inosin-5'-trifosfát (ITP) trisodná sůl (97%), uridin-5'-difosfát (UDP) sodná sůl (96%), uridin-5'-monofosfát (UMP) disodná sůl (98%), uridin-5'-trifosfát (UTP) sodná sůl (98%),  $\beta$ -nikotinamidadenindinukleotid (NAD<sup>+</sup>; 99%),  $\beta$ -nikotinamidadenindinukleotid (NADH) redukováná disodná sůl hydrát (98%),  $\beta$ -nikotinamidadenindinukleotidfosfát (NADP<sup>+</sup>) sodná sůl (99%),  $\beta$ -nikotinamidadenindinukleotidfosfát (NADPH) redukováná tetrasodná sůl (96%), 2'-deoxyadenosin-5'-difosfát (dADP) sodná sůl (98%), 2'-deoxyadenosin-5'-monofosfát (dAMP; 98%), 2'-deoxyadenosin-5'-trifosfát (dATP) disodná sůl (100%), 2'-deoxycytidin-5'-difosfát (dCDP) sodná sůl ( $\geq 96\%$ ), 2'-deoxycytidin-5'-monofosfát (dCMP) sodná sůl (100%), 2'-deoxycytidin-5'-trifosfát (dCTP) disodná sůl (98%), 2'-deoxyguanosin-5'-difosfát (dGDP) sodná sůl (98%), 2'-deoxyguanosin-5'-monofosfát (dGMP) sodná sůl hydrát (98%), 2'-deoxyguanosin-5'-trifosfát (dGTP) sodná sůl hydrát (96%), 2'-deoxyinosin-5'-trifosfát (dITP) trisodná sůl (98,2%), 2'-deoxythymidin-5'-difosfát (dTDP) trisodná sůl ( $> 90\%$ ), 2'-deoxythymidin-5'-monofosfát (dTMP) disodná sůl hydrát ( $> 99\%$ ), 2'-deoxythymidin-5'-trifosfát (dTTP) sodná sůl ( $> 96\%$ ), 2'-deoxyuridin-5'-monofosfát (dUMP) disodná sůl (100%), 2'-deoxyuridin-5'-trifosfát (dUTP) sodná sůl (95%), 2',3'-cyklický-CMP (cCMP) sodná sůl (95-99%), adenosin-5'-fosfosulfát (APS) sodná sůl (90%), ADP-ribose sodná sůl

(99%), 5-aminoimidazol-4-carboxamid-1- $\beta$ -D-ribofuranosyl 5'-monofosfát (AICAR; 94,3%), CDP-cholin sodná sůl hydrát ( $\geq 99\%$ ), CMP-N-acetylneuraminát (CMP-Neu-NAc) sodná sůl (94%), GDP-L-fukosa sodná sůl ( $>85\%$ ), GDP-mannosa sodná sůl (97%),  $\beta$ -nikotinamid mononukleotid (NMN; 97%), UDP-galaktosa disodná sůl (95%), UDP-glukosa disodná sůl (98%), UDP-glukuronát triamonná sůl (99,6%), UDP-N-acetylneuraminát (UDP-Glc-NAc) sodná sůl (94%), adenylosukcinát (SAMP; 96%), 8-brom-AMP (Br-AMP; 98%) byly zakoupeny u firmy Sigma Aldrich (St. Louis, USA).

## 5.2 Přístrojové vybavení

Studované látky byly analyzovány pomocí ultraúčinné kapalinové chromatografie Dionex Ultimate 3000 RS (Sunnyvale, CA, USA) ve spojení s tandemovým hmotnostním spektrometrem QTRAP 5500 (AB Sciex, Foster City, CA, USA).

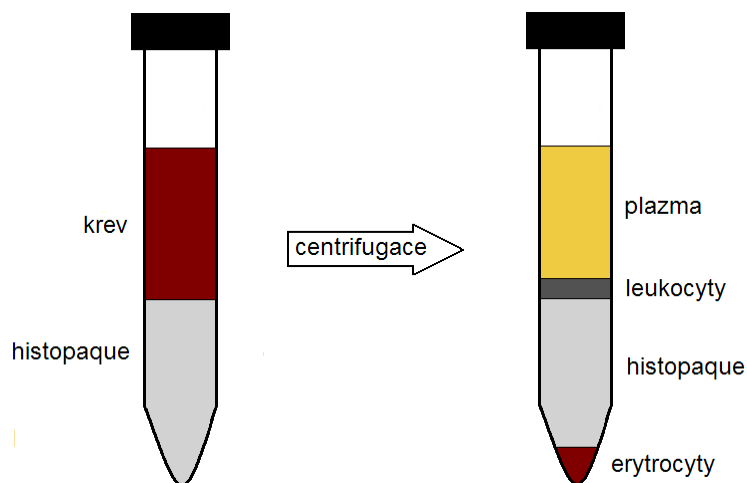
Dále byly použity vortex (IKA Works, USA), centrifuga (Micro 120, Hettich, Německo), analytické váhy (KERN ABT 120-5DM, Belling, Německo), pH metr (Cyberscan ph 510, Thermo scientific, Waltham, MA, USA), lyofilizátor (FreeZone, Labconco, USA), ultrazvuková lázeň (Kraintek K12, Slovensko), termostatovaná míchačka (PST-60 HL plus, Biosan, Lotyšsko).

## 5.3 Biologický materiál

K analýze byly použity leukocyty izolované z plné krve nově diagnostikované pacientky s CML, která byla získána z Hemato-onkologického oddělení, FN Olomouc.

### 5.3.1 Izolace leukocytů

Plná krev (9 ml) byla odebrána do heparinových zkumavek (zabránění srážlivosti krve) a následně zředěna proplachovacím roztokem IMDM (2 % FBS + 1 % PEN/STREP) v poměru 1:1. Krev byla poté ve zkumavce navrstvena na roztok histopaque (na 3 ml histopaque navrstveno 3 ml naředěné krve). Takto navrstvená krev byla pomalu centrifugována (20 min, 1400 rpm) při laboratorní teplotě za tvorby hustotního gradientu. Po centrifugaci na dno zkumavky klesly erytrocyty, na rozhraní plazmy a histopaque se vytvořil prstenec leukocytů (Obr. 10). Prstenec leukocytů byl odebrán umělohmotnou Pasteurovou pipetou do zkumavky, v níž byly leukocyty promyty deseti násobkem proplachovacího roztoku IMDM. Buňky byly pomalu centrifugovány (7 min, 1400 rpm). Po centrifugaci byl supernatant odlit a buněčná peleta byla rozsuspendována v 10 ml média Optima (10 % FBS + 1 % PEN/STREP).



**Obr. 10:** Izolace leukocytů

### 5.3.2 Počítání leukocytů

K buněčné suspenzi leukocytů byla přidána 3 % kyselina octová pro lepší fixaci buněk. Poté byly buňky přeneseny na hodinové sklíčko, na němž byly smíchány s trypanovou modří (v poměru 1:1). Směs byla dostatečně promíchána ve špičce pipety a přenesena do Bürkerovy komůrky. Živé buňky byly počítány pod mikroskopem v 25 čtvercích komůrky (buňky uvnitř čtverců i buňky, které se dotýkaly vnějších stran dvou přilehlých stran čtverce). Zjištěný počet leukocytů v krvi pacientky s CML byl  $7,23 \times 10^8$  buněk v 10 ml buněčné suspenze.

### 5.3.3 Zpracování leukocytů pro analýzu

Buněčné suspenze (10 ml) byla rozdělena na 3 stejné podíly, každý z nich byl inkubován při 37°C s různou koncentrací IM – 0, 2 a 10  $\mu\text{mol/l}$  v DMSO.

Před inkubací a v časech 1, 2, 5 a 10 hod bylo z každého podílu odebráno 600  $\mu\text{l}$  vzorku, který byl dále zpracován. 200  $\mu\text{l}$  vzorku bylo centrifugováno (2 min, 10 000 rpm) a supernatant uschován pro případné odečtení metabolitů z média od konečného buněčného extraktu. Zbytek vzorku byl extrahován pomocí chloroformu, methanolu a vody (4:4:2). Ke 400 vzorku bylo přidáno 1600  $\mu\text{l}$  chloroformu a 1600  $\mu\text{l}$  methanolu. Směs byla vortexována (10 s) a sonifikována (2,5 min). Poté bylo přidáno 800  $\mu\text{l}$  vody a opět následovalo vortexování (10 s) a sonifikace (2,5 min). Po centrifugaci (5 min, 1400 rpm) se mezi fázemi vytvořil celistvý prstenec. Chloroformová fáze (dolní) byla následně odfoukána dusíkem a vodná fáze (horní) byla lyofilizována. Poté byly vzorky zamraženy na -20°C. Lyofilizovaný extrakt vodné fáze byl před analýzou rozpuštěn ve 100  $\mu\text{l}$  vody s přídatkem Br-AMP (10  $\mu\text{mol/l}$ ).

## 6 Metody

### 6.1 Příprava standardů

Pro analýzu bylo vybráno 50 nukleotidů a jejich derivátů. Standardy těchto látek byly naváženy a následně rozpuštěny ve vodě na výslednou koncentraci 0,1 mmol/l.

### 6.2 Optimalizace podmínek MS/MS

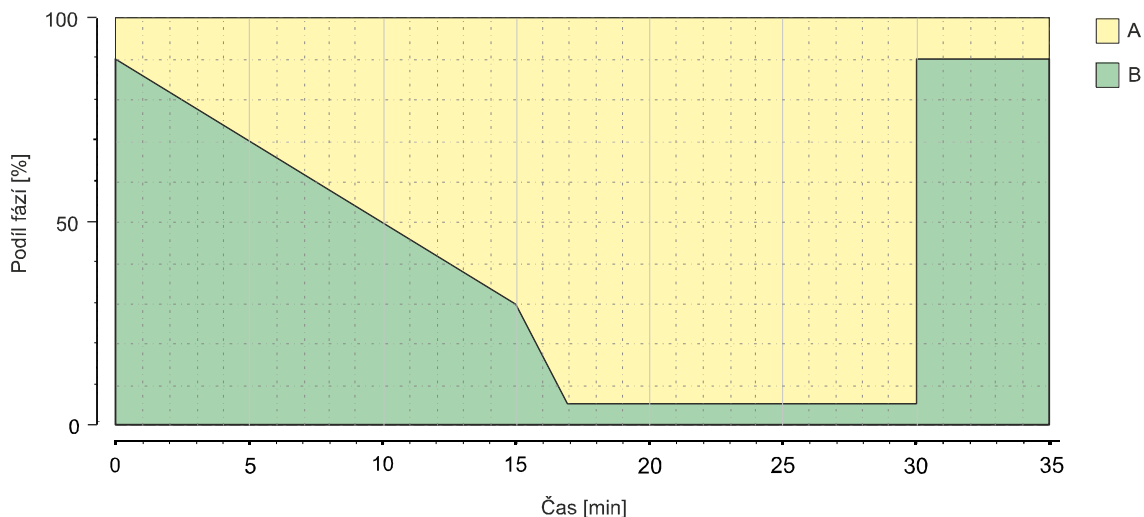
Roztoky standardů nukleotidů (0,1 mmol/l) byly naředěny alkalickým pufrům (20 mmol/l octan amonný, pH 9,45 : acetonitril; 1:1) na koncentraci 1  $\mu$ mol/l a byly dávkovány syringe pumpou o průtoku 7  $\mu$ l/min přímo do iontového zdroje hmotnostního spektrometru. Pro každou látku bylo na základě monoizotopových hmotnostní vybráno 5 neintenzivnějších MRM přechodů. Hmotnostní spektrometr také provedl automatickou optimalizaci podmínek, při nichž dané MRM přechody vznikaly. Byl optimalizován deklasterační potenciál, kolizní energie, vstupní potenciál a výstupní potenciál kolizní cely.

### 6.3 Optimalizace UHPLC podmínek

Pro analýzu studovaných látek pomocí UHPLC byla modifikována již dříve publikovaná metoda (Bajad et al., 2011). Bylo optimalizováno složení a pH mobilních fází, podmínky gradientové eluce (složení, průtok), teplota kolony a množství nastříkovaného vzorku.

Chromatografická separace probíhala na koloně Luna s aminopropylovou stacionární fází ( $\text{NH}_2$ ) o délce 150 mm a průměru částic 3  $\mu$ m. Jako mobilní fáze A byl použit 20 mmol/l octan amonný (pH 9,45) a jako mobilní fáze B AcCN.

Průběh gradientové eluce je znázorněn na Obr. 11. 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 30. min konstantní. Poté během 0,1 min došlo k navrácení systému k iniciálním podmínkám (95 % B). Na koloně termostatované na 25 °C byla nastavena průtoková rychlost 0,3 ml/min a množství nastříkovaného vzorku činilo 5  $\mu$ l. Kolona byla před každou další analýzou ekvilibrována 5 min při iniciálních podmínkách. Celková doba analýzy byla 35 min.



**Obr. 11:** Průběh gradientové eluce

#### 6.4 Analýza směsi standardů

Standardy nukleotidů a jejich derivátů byly rozděleny do 5 směsí tak, aby se v žádné z nich nevyskytovaly látky s podobnou monoizotopovou hmotností (minimální rozdíl 2 Da). Jejich výsledná koncentrace byla 10  $\mu\text{mol/l}$ . Všechny směsi byly analyzovány s přidavkem interního standardu (Br-AMP) za optimalizovaných podmínek.

#### 6.5 Analýza reálných vzorků leukocytů

Lyofilizovaný extrakt vodné fáze rozpuštěný ve 100  $\mu\text{l}$  vody byl analyzován s přidavkem interního standardu (Br-AMP) za optimalizovaných podmínek.

#### 6.6 Statistické vyhodnocení

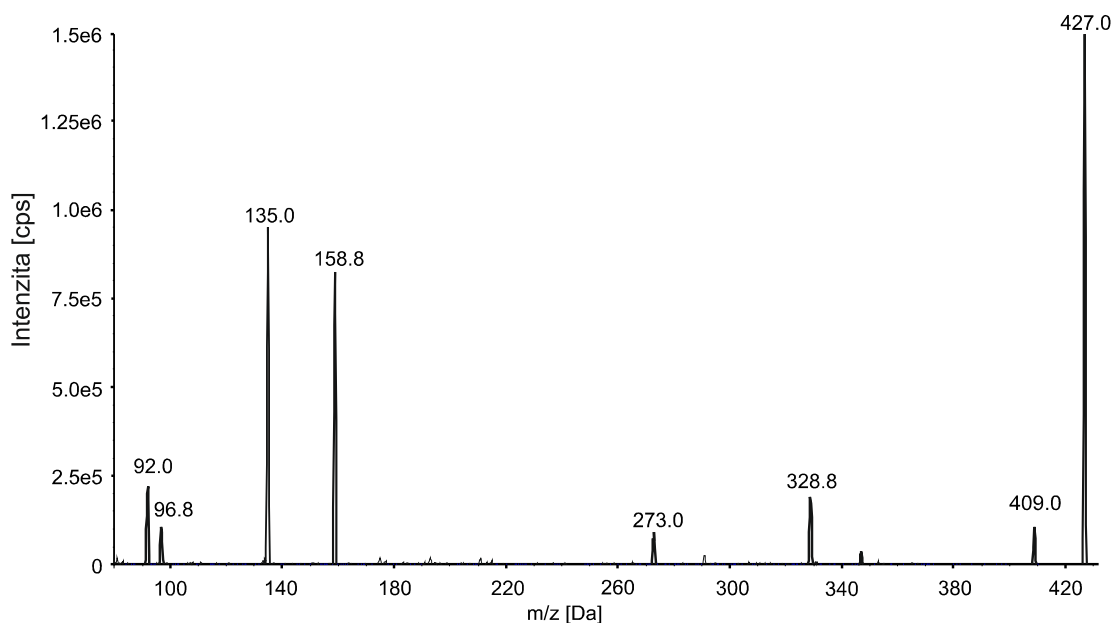
Pro statistické zpracování výsledků byl použit program Statistica 7.0 ([www.statsoft.cz](http://www.statsoft.cz)).

## 7 Výsledky

### 7.1 Optimalizace podmínek MS/MS

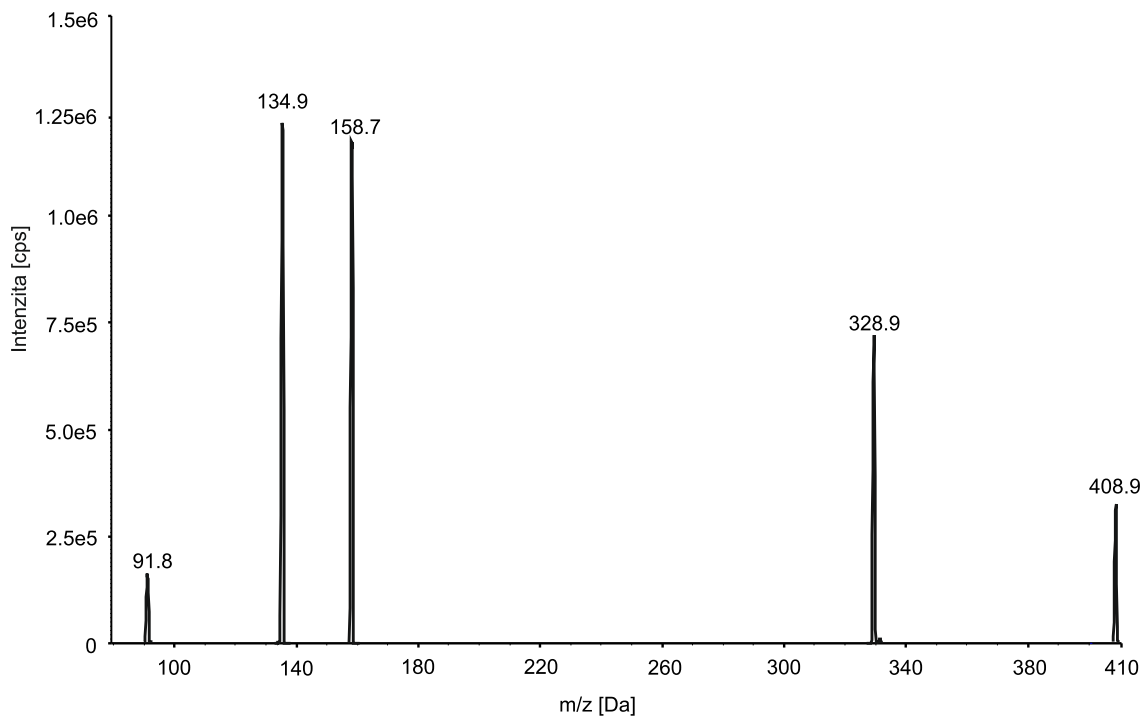
Při optimalizaci MS/MS podmínek byla změřena fragmentační a hmotnostní spektra jednotlivých standardů nukleotidů a jejich derivátů. Hmotnostní spektrometr automaticky vybral 5 nejintenzivnějších fragmentů, u nichž optimalizoval hodnoty deklasteračního potenciálu (DP), kolizní energie (CE), vstupního potenciálu (EP) a výstupního potenciálu kolizní cely (CXP). Hmotnostní spektra vznikla již za optimalizovaných hodnot těchto parametrů.

Pro názornost uvádím příklad hmotnostního (Obr. 12) a fragmentačního (Obr. 13) spektra IDP. Hmotnostní spektrum, které vzniklo za optimalizované hodnoty DP (Obr. 14), je tvořeno deprotonovaným molekulárním iontem o  $m/z = 427$  Da a dalšími produktovými ionty, které vznikly po jeho fragmentaci. Jedná se např. o fragment s  $m/z = 134,9$  Da představující bázi po odštěpení ribosy a 2 fosfátů,  $m/z = 158,7$  Da odpovídající odštěpeným 2 fosfátům a  $m/z = 328,9$  Da odpovídající molekule po odštěpení fosfátu (Obr. 15). Poté byla pro všech 5 nejintenzivnějších fragmentů optimalizována hodnota CE (Obr. 16) a CXP (Obr. 17).

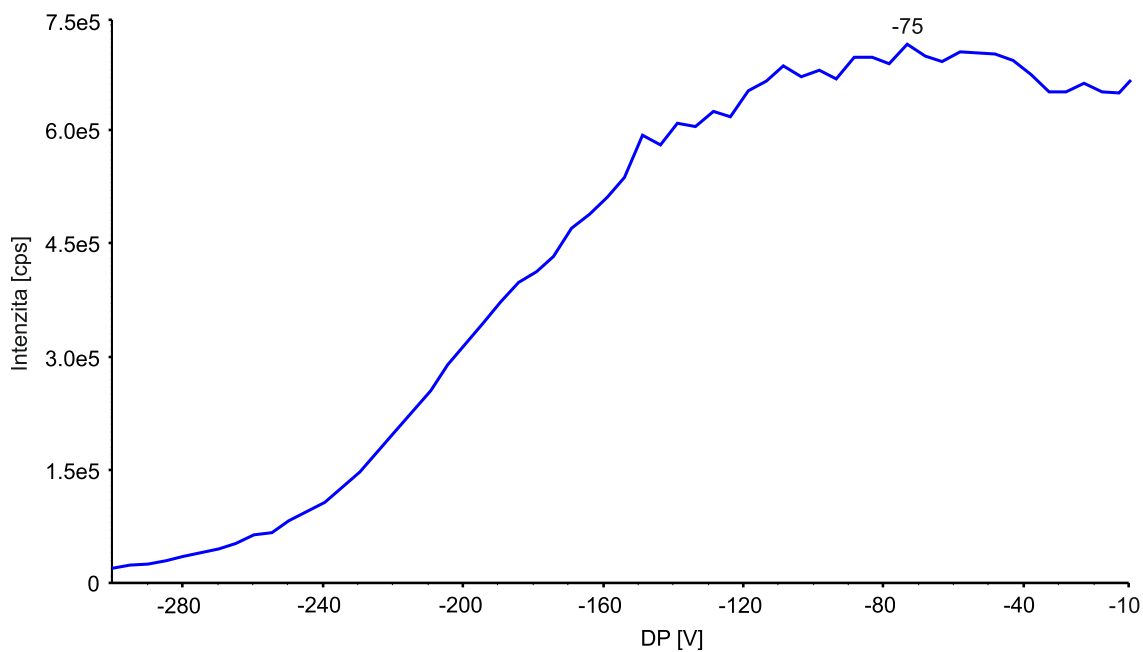


Obr. 12: Hmotnostní spektrum IDP (negativní mód).

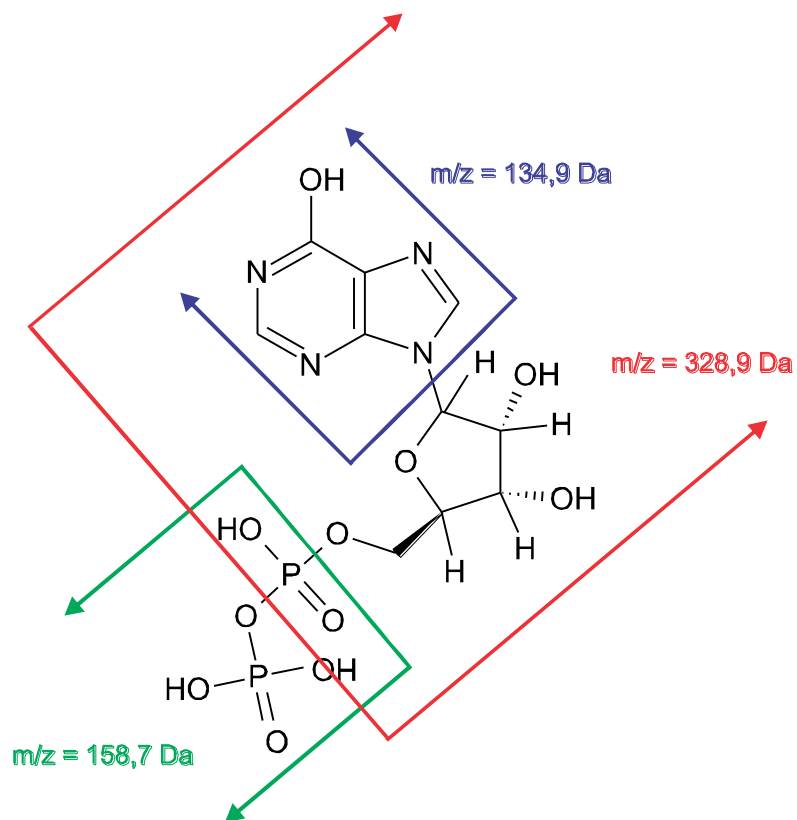




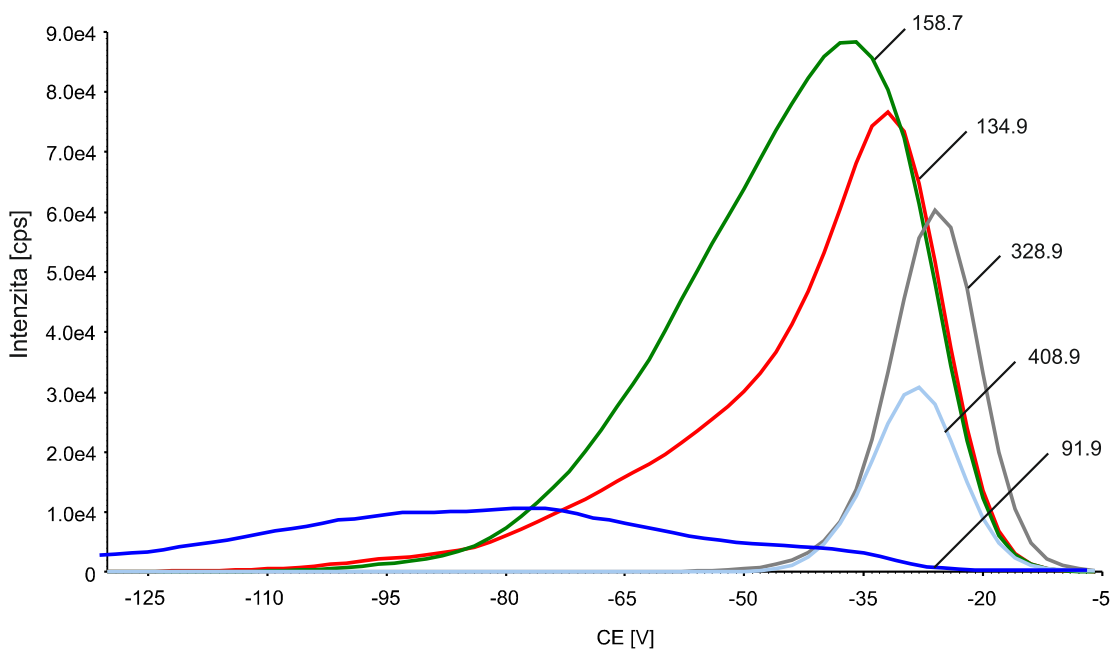
**Obr. 13:** Fragmentační spektrum IDP (negativní mód).



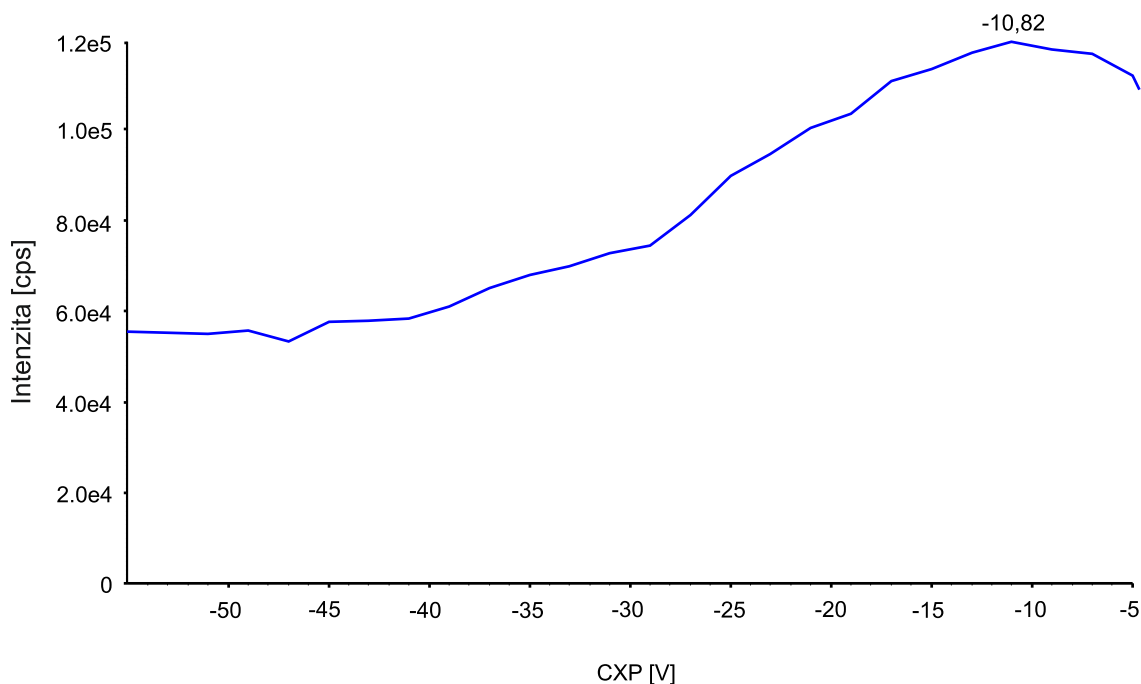
**Obr. 14:** Optimalizace DP pro molekulární ion IDP ( $m/z = 427$  Da)



**Obr. 15:** Fragmentace IDP



**Obr. 16:** Optimalizace CE pro jednotlivé fragmenty IDP



**Obr. 17:** Optimalizace CXP pro fragment IDP ( $m/z = 134,9$  Da)

Všechny nukleotidy a jejich deriváty byly analyzovány v pozitivním i negativním módu. Vybrané MRM přechody a optimalizované hodnoty DP, CE, EP a CXP pro jednotlivé studované látky jsou shrnuty v tabulce (Tab. 2).

Na základě intenzit produktových iontů však bylo zjištěno, že většina nukleotidů se lépe fragmentuje, pokud jsou měřeny v negativním módu. Výjimkou byly obecně monofosfáty, kofaktor FAD a také některé deriváty nukleotidů jako např. SAMP nebo AICAR. Tyto látky byly štěpeny v obou módech za vzniku fragmentů s vysokou intenzitou, proto u nich byly zvoleny 2 MRM přechody (jeden pro pozitivní a jeden pro negativní mód).

Pro MS/MS metodu v pozitivním i negativním módu byly také optimalizovány hodnoty tlaku kolizního plynu (CAD), zmlžujícího (GS1) a sušícího plynu (GS2), „curtain gas“ (CUR), teploty zmlžujícího plynu (TEM) a napětí na kapiláře v iontovém zdroji (IS). Optimalizované hodnoty jednotlivých parametrů jsou shrnuty v tabulce (Tab. 3).

**Tab. 2:** Optimalizované parametry MS/MS pro jednotlivé nukleotidy a jejich deriváty

Metabolit	Mód	Q1	Q3	DP [V]	EP [V]	CE [V]	CXP [V]
ADP	-	425,8	133,9	-95	-10	-32	-11
ADP-ribosa	-	557,7	158,7	-45	-10	-56	-13
AICAR	-	336,8	124,8	-65	-10	-36	-11
	+	339,0	109,9	131	10	45	12
AMP	-	345,8	96,9	-90	-10	-28	-9
	+	348,1	135,9	116	10	27	14
APS	-	425,8	346,0	-50	-10	-26	-25
ATP	-	505,7	407,9	-75	-10	-30	-29
cCMP	-	303,8	109,9	-50	-10	-22	-7
	+	305,9	111,9	61	10	29	12
CDP	-	401,8	158,9	-60	-10	-32	-13
CDP-cholin	-	486,8	427,9	-155	-10	-20	-11
CMP	-	321,8	96,8	-55	-10	-28	-9
	+	323,8	111,9	46	10	21	10
CMP-Neu-NAc	-	612,8	321,9	-50	-10	-28	-21
	+	615,1	323,9	56	10	19	28
CTP	-	481,7	158,9	-70	-10	-44	-13
dADP	-	409,8	158,8	-30	-10	-32	-13
dAMP	-	329,8	134,0	-65	-10	-32	-11
	+	331,9	135,9	41	10	23	14
dATP	-	489,7	158,7	-60	-10	-36	-13
dCDP	-	385,8	158,9	-30	-10	-30	-13
dCMP	-	305,8	194,9	-55	-10	-24	-17
	+	307,9	112,0	56	10	19	10
dCTP	-	465,7	158,9	-65	-10	-36	-15
dGDP	-	425,8	158,9	-70	-10	-32	-15
dGMP	-	345,8	150,0	-35	-10	-34	-11
	+	348,1	80,9	1	10	31	12
dGTP	-	505,7	158,8	-70	-10	-38	-13
dITP	-	490,7	158,8	-65	-10	-40	-13
dTDP	-	400,9	158,8	-60	-10	-34	-13
dTMP	-	320,8	194,9	-35	-10	-24	-15
	+	322,8	81,0	86	10	35	10
dTTP	-	480,7	158,8	-70	-10	-46	-9
dUMP	-	306,8	195,0	-50	-10	-22	-5
	+	308,7	80,9	61	10	35	8
dUTP	-	466,7	158,9	-55	-10	-36	-11

Metabolit	Mód	Q1	Q3	DP [V]	EP [V]	CE [V]	CXP [V]
FAD	-	783,7	437,0	-40	-10	-42	-11
	+	785,8	347,9	1	10	31	30
FMN	-	454,9	96,9	-75	-10	-52	-9
GDP	-	441,8	158,8	-95	-10	-36	-13
GDP-L-fukosa	-	587,7	441,9	-95	-10	-34	-35
GDP-mannosa	-	603,7	423,9	-35	-10	-42	-29
GMP	-	361,8	211,0	-45	-10	-26	-11
	+	363,8	151,9	36	10	25	14
GTP	-	521,6	158,8	-90	-10	-50	-9
IDP	-	426,8	134,9	-75	-10	-32	-11
IMP	-	346,8	96,9	-60	-10	-28	-5
	+	349,0	136,9	31	10	19	12
ITP	-	506,7	158,7	-60	-10	-48	-13
NAD+	-	662,7	540,9	-55	-10	-20	-3
NADH	-	663,7	397,0	-35	-10	-44	-17
NADP+	-	742,7	620,9	-70	-10	-24	-17
NADPH	-	743,7	425,9	-30	-10	-42	-35
NMN	-	332,9	210,8	-45	-10	-12	-9
	+	334,9	123,0	36	10	23	12
SAMP	-	461,8	96,8	-55	-10	-30	-9
	+	464,1	251,9	71	10	31	20
UDP	-	402,9	158,8	-70	-10	-34	-9
UDP-D-galaktosa	-	564,7	322,9	-75	-10	-34	-21
UDP-glukosa	-	564,7	322,9	-70	-10	-34	-23
UDP-glucuronát	-	578,7	402,9	-70	-10	-34	-31
UDP-Glc-NAc	-	605,7	384,9	-85	-10	-38	-29
UMP	-	322,8	210,9	-65	-10	-22	-21
UTP	+	324,9	96,9	51	10	25	10
	-	482,7	158,7	-80	-10	-48	-13

**Tab. 3:** Optimalizované parametry MS/MS

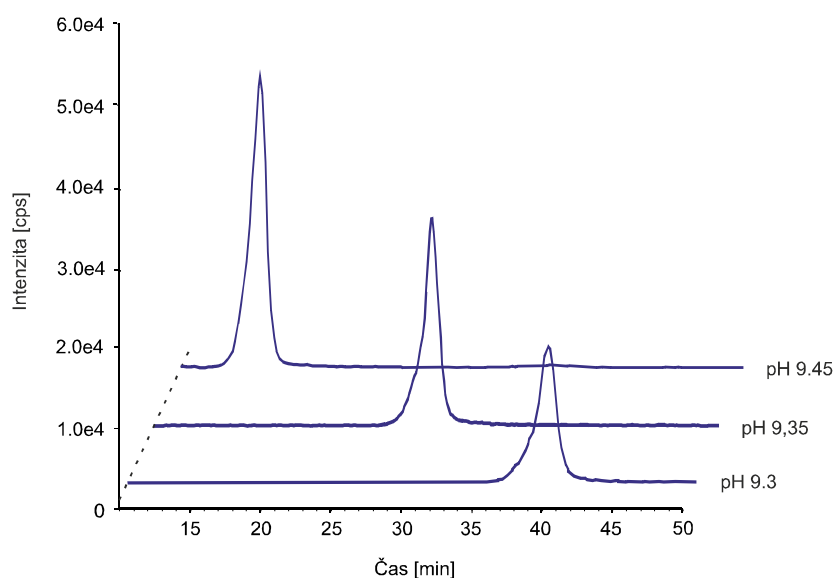
Mód	CAD [psi]	GS1 [psi]	GS2 [psi]	CUR [psi]	TEM [°C]	IS [V]
-	medium	40	40	30	500	-4500
+	medium	40	40	30	500	5500

## 7.2 Optimalizace UHPLC podmínek

Optimalizace UHPLC podmínek byla prováděna v rámci vývoje metabolické metody, která zahrnovala nejen analýzu nukleotidů a jejich derivátů, ale také různých aminokyselin, peptidů, organických kyselin, purinových a pyrimidinových látek, cukrů atd. Byla modifikována již dříve publikovaná metoda (Bajad et al., 2011), optimalizovalo složení a pH mobilních fází, podmínky gradientové eluce (složení, průtok), teplota kolony a množství nastříkovaného vzorku.

Jedním z důležitých parametrů byl výběr pH mobilní fáze A (20 mmol/l octan amonný), které nejvíce ovlivňovalo separaci trifosfátů. Při pH nižším než 9,3 se trifosfáty zdržovaly na koloně velmi silně a nestačila doba 30 min při 95 % podílu mobilní fáze A k jejich eluci z kolony. Se zvyšujícím se pH se jejich retence snižovala (Obr. 18). Jako optimální pH bylo zvoleno 9,45.

Po výběru pH mobilní fáze A byl gradient ještě pozměněn a to s cílem od sebe rozdělit např. monofosfáty se stejným MRM přechodem. Finální metoda je popsána v kapitole Metody.



Obr.18: Vliv pH na retenční čas dITP

## 7.3 Analýza standardů

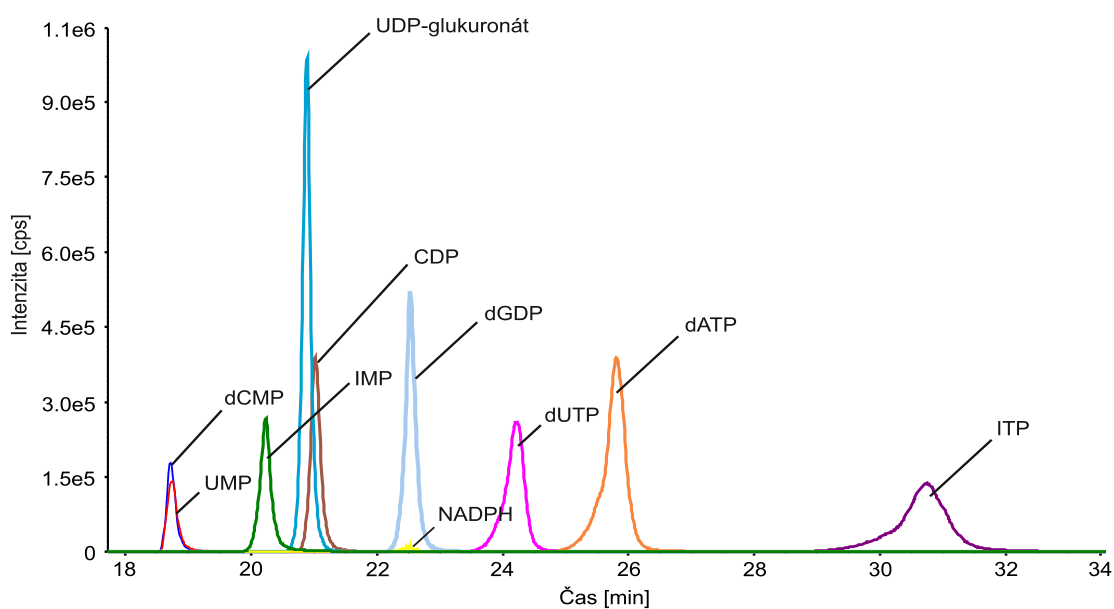
Všechny směsi standardů nukleotidů a jejich derivátů (NTD 1–5) byly analyzovány metodou UHPLC-MS/MS za optimalizovaných podmínek a byly zjištěny jejich retenční časy (Tab. 4). Podařilo se identifikovat všechny studované látky (Obr. 19–23). Nejdříve byly identifikovány všemi 5 MRM přechody z MS/MS optimalizace a poté už pouze jedním vybraným MRM přechodem, který se vyznačoval

nejvyšším poměrem signálu k šumu a zároveň u něj nebyla pozorována interference. Intenzita signálu jednotlivých standardů (koncentrace 10  $\mu\text{mol/l}$ ) byla v rozmezí  $1,5 \times 10^5 - 2 \times 10^6$  cps, výjimkou byly dGTP a NADPH s intenzitou nižší než  $1 \times 10^5$  cps a ADP-ribosa, NMN a AICAR s intenzitou nižší než  $3 \times 10^4$  cps.

**Tab. 4:** Retenční časy jednotlivých nukleotidů a jejich derivátů

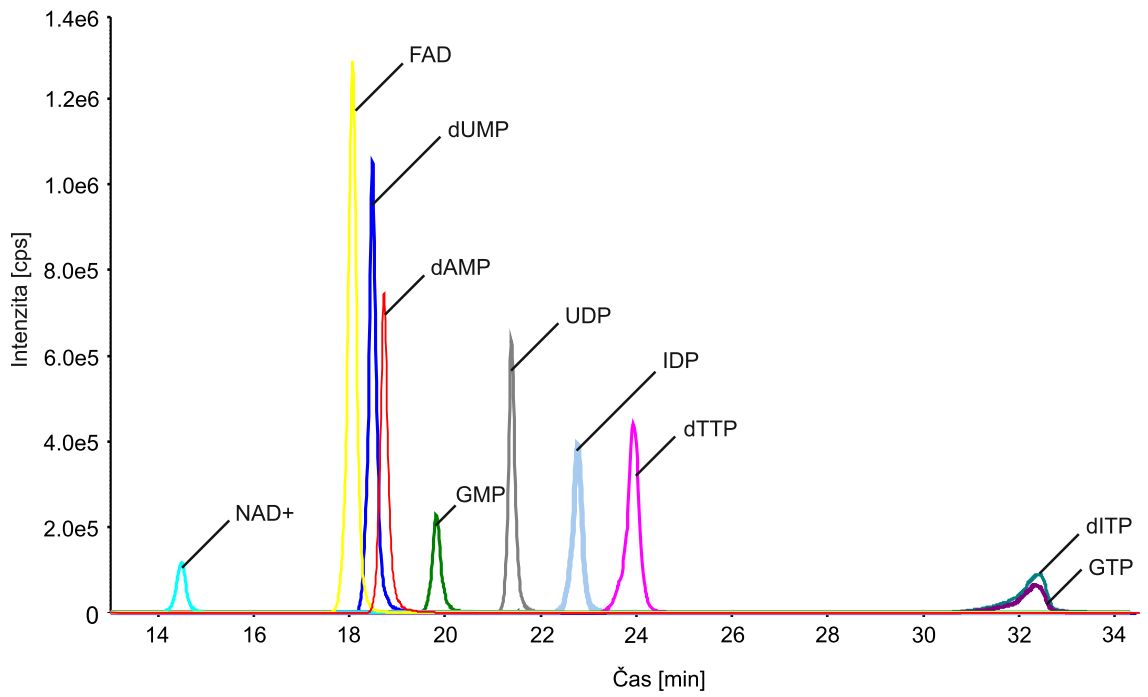
<b>Metabolit</b>	<b>Mr</b>	<b>Ret t [min]</b>
ADP	427,0	21,9
ADP-ribosa	559,1	21,0
AICAR	338,1	18,6
AMP	347,1	18,7
APS	427,0	19,0
ATP	507,0	27,2
cCMP	305,0	13,7
CDP	403,0	21,0
CDP-cholin	488,1	14,5
CMP	323,1	18,3
CMP-Neu-NAc	614,1	17,5
CTP	483,0	23,7
dADP	411,0	21,8
dAMP	331,1	18,6
dATP	491,0	26,0
dCDP	387,0	21,1
dCMP	307,1	18,3
dCTP	467,0	24,1
dGDP	427,0	22,5
dGMP	347,1	19,9
dGTP	507,0	32,2
dITP	492,0	32,4
dTDP	402,0	21,3
dTMP	322,1	18,3
dTTP	482,0	24,0
dUMP	308,0	18,5
dUTP	468,0	24,3
FAD	785,2	18,1
FMN	456,1	18,5
GDP	443,0	23,0
GDP-L-fukosa	589,1	19,2
GDP-mannosa	605,1	19,2

Metabolit	Mr	Ret t [min]
GMP	363,1	19,8
GTP	523,0	32,4
IDP	428,0	22,7
IMP	348,0	20,2
ITP	508,0	32,0
NAD+	664,1	14,5
NADH	665,1	18,1
NADP+	744,1	20,7
NADPH	745,1	22,5
NMN	334,1	15,0
SAMP	463,1	22,1
UDP	404,0	21,4
UDP-D-galaktosa	566,1	18,1
UDP-glukosa	566,1	18,1
UDP-glucuronát	580,0	20,9
UDP-Glc-NAc	607,1	17,9
UMP	324,0	18,6
UTP	484,0	25,5

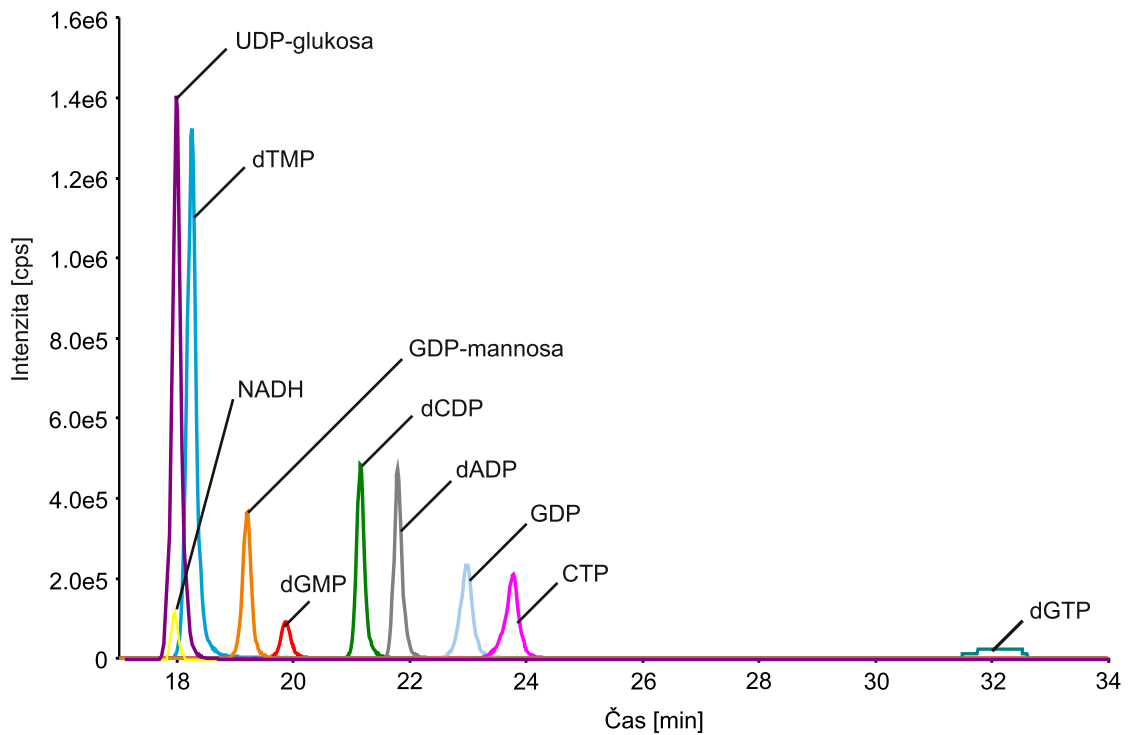


**Obr. 19:** Chromatogram směsi NTD 1 (negativní mód)

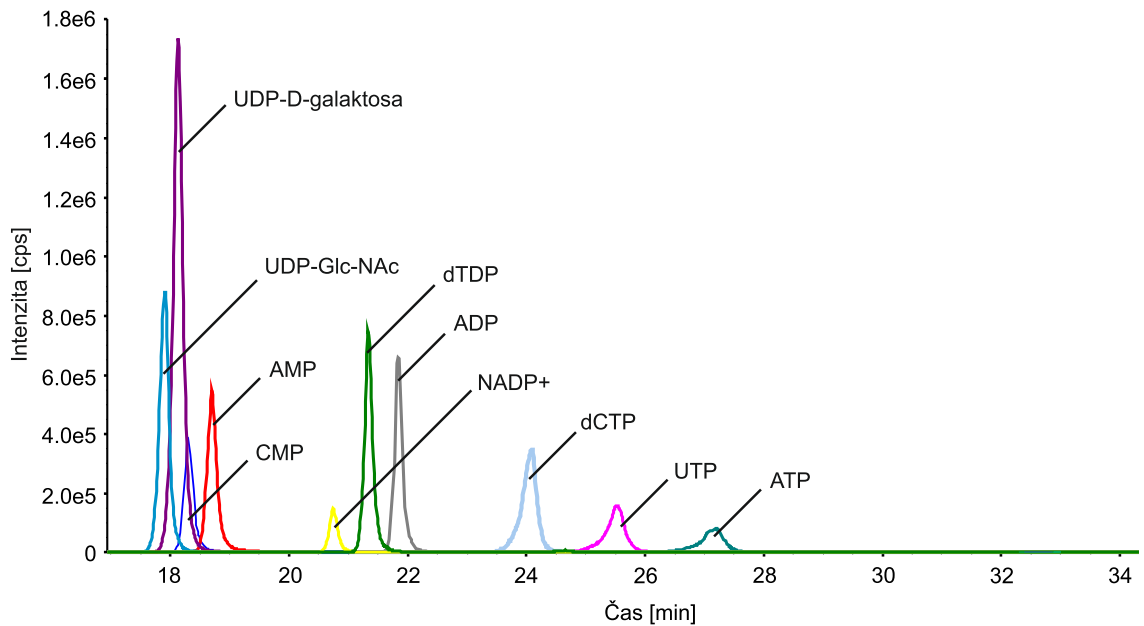




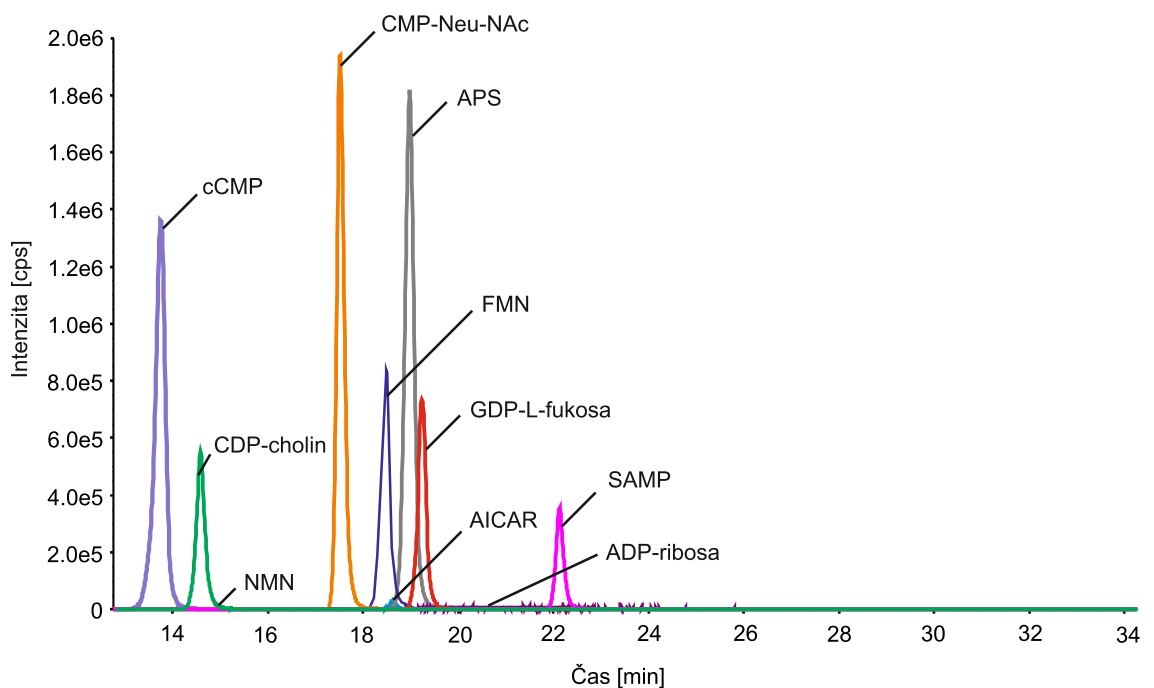
**Obr. 20:** Chromatogram směsi NTD 2 (negativní mód)



**Obr. 21:** Chromatogram směsi NTD 3 (negativní mód)

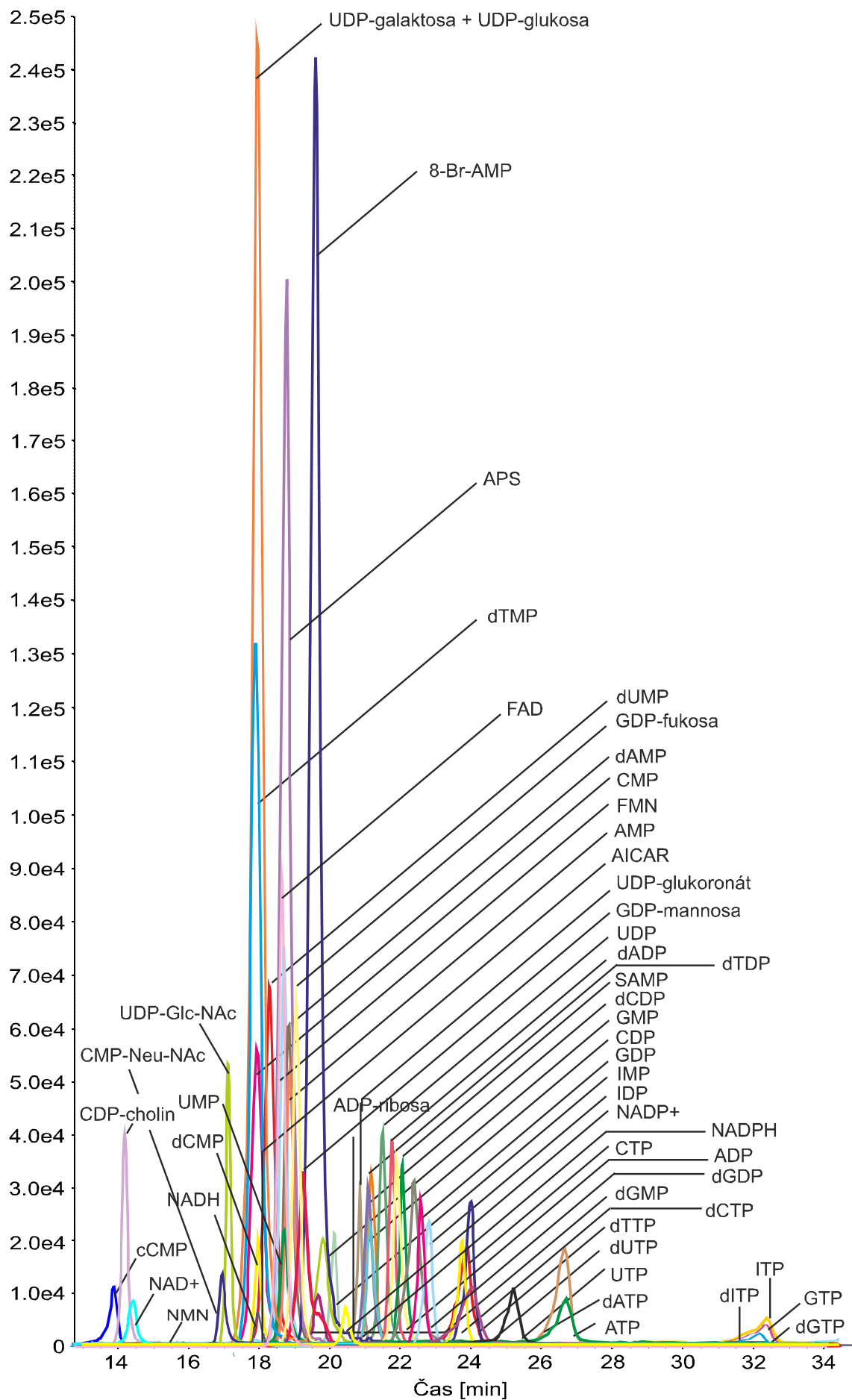


**Obr. 22:** Chromatogram směsi NTD 4 (negativní mód)



**Obr. 23:** Chromatogram směsi NTD 5 (negativní mód)

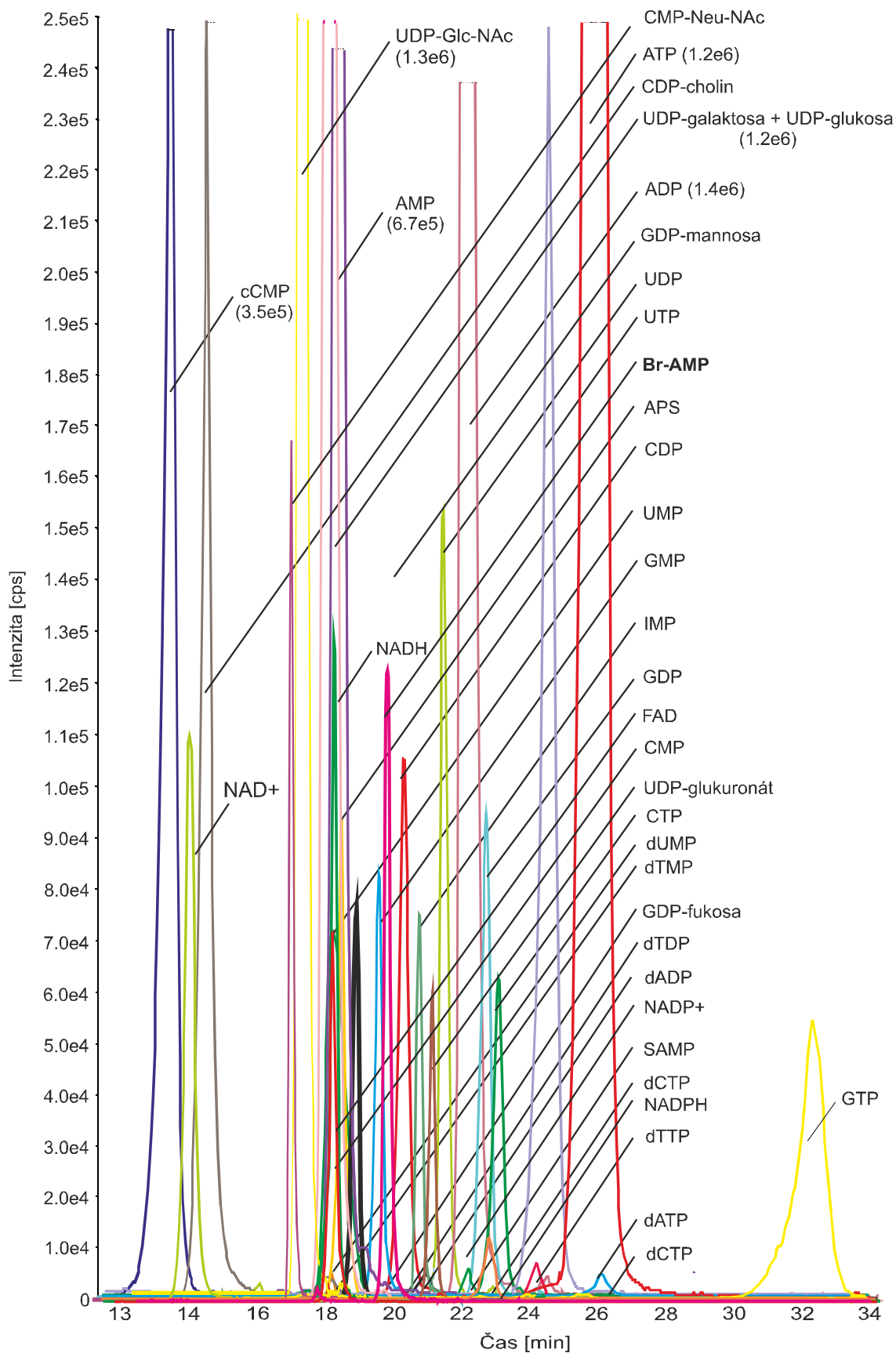
Poté byla vytvořena jedna celková směs všech studovaných látek, v níž se nám na základě retenčních časů podařilo rozlišit látky s podobnou (liší se o 1 Da) i stejnou monoizotopovou hmotností, respektive se stejným MRM přechodem (Obr. 24). Výjimkou byly pouze UDP-D-galaktosa a UDP-glukosa, jejichž MRM přechody i retenční časy byly shodné. V chromatogramu lze tak vidět pouze jeden pik, který je sumou obou těchto látek



**Obr. 24:** Chromatogram celkové směsi všech studovaných nukleotidů a jejich derivátů

## **7.4 Analýza biologického materiálu**

Lyofilizovaný extrakt vodné fáze byl před analýzou rozpuštěn ve 100  $\mu\text{l}$  vody s přídávkem Br-AMP (10  $\mu\text{mol/l}$ ) a poté byl analyzován za optimalizovaných podmínek. V extraktech leukocytů bylo identifikováno celkem až 39 studovaných látek (Obr. 25). Ve vzorcích byly v největší intenzitě nalezeny ADP, ATP, směs UDP-glukosy a UDP-galaktosy a CMP-N-acetylneuraminát.

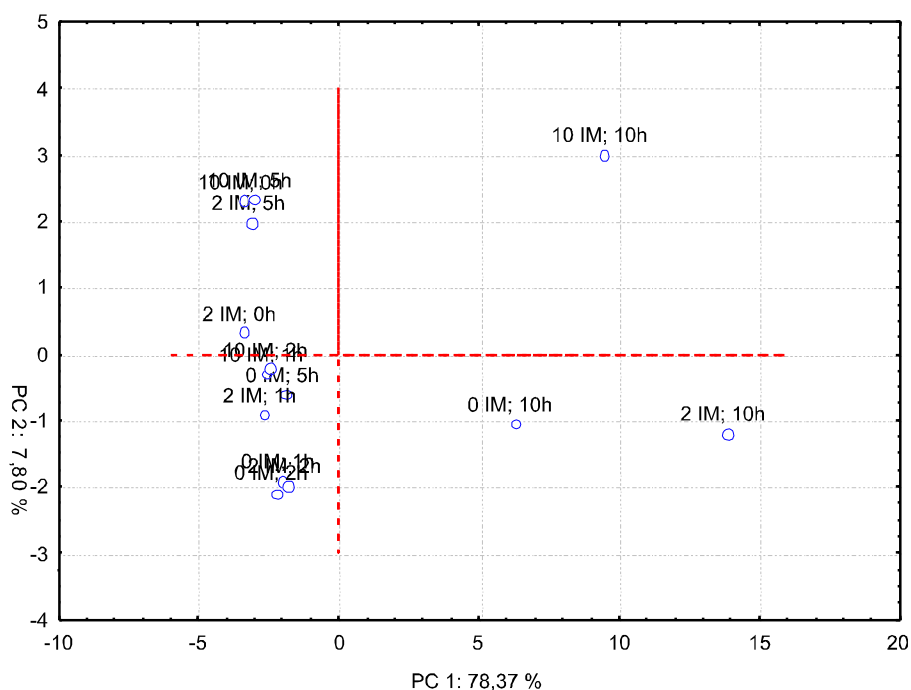


**Obr. 25:** Analýza extraktu leukocytů inkubovaných s IM o koncentrace 2  $\mu\text{mol/l}$  po dobu 10 hod

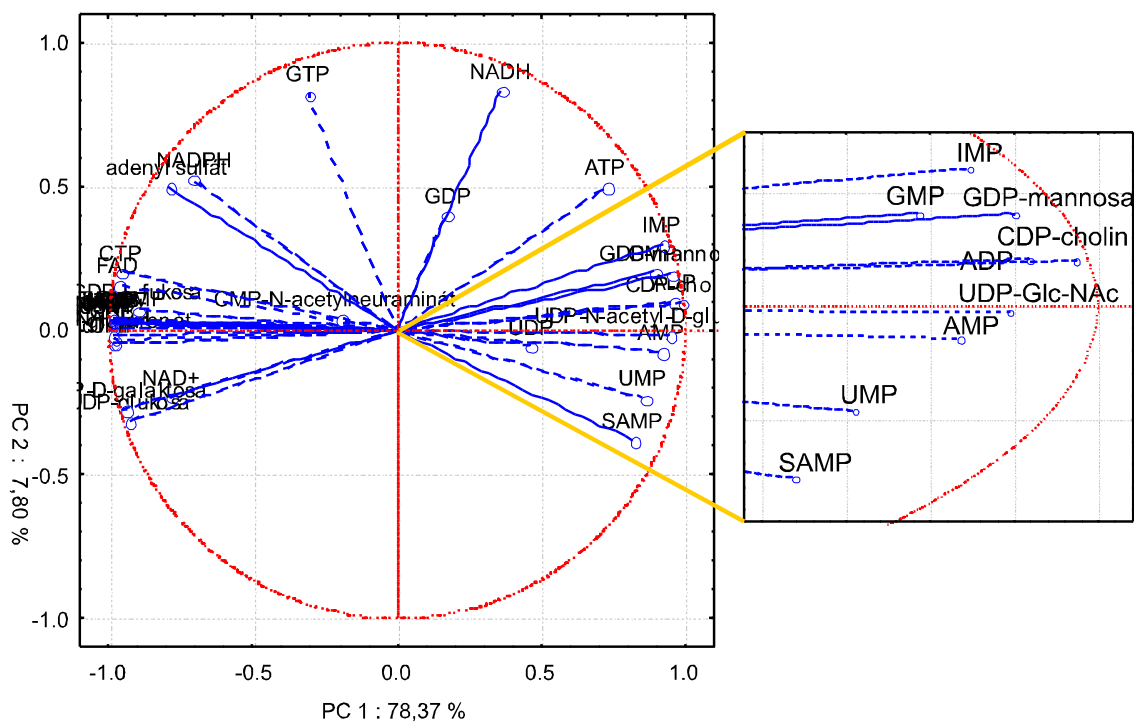
## 7.5 Stastické vyhodnocení

V rámci statistického vyhodnocení vlivu IM na leukocyty byly uvažovány poměry ploch jednotlivých analytů k ploše interního standardu (Br-AMP). Vyhodnocení dat bylo provedeno pomocí analýzy hlavních komponent (PCA, principal component analysis). Na obrázcích je možné pozorovat projekci případů (Obr. 26) a proměnných (Obr. 27) do komponentní roviny 1-2. Data byla řádkově centrována a normalizována.

Při vyhodnocování dat došlo k významnému rozlišení leukocytů inkubovaných po dobu 10 hod (Obr. 26) od ostatních vzorků bez ohledu na to, jestli byly inkubovány s nebo bez přídávku IM. Bylo to způsobeno výraznými změnami hladin některých metabolitů. Jednalo se hlavně o látky SAMP, UMP, AMP, UDP-glukosa, ADP, GDP-manosa, IMP, GDP, UDP a CDP-cholin (Obr. 27). Toto může být vysvětleno tím, že u všech inkubovaných leukocytů docházelo postupně během 10 hod k apoptóze v důsledku nepřírodných podmínek kultivace. Zvýšené hladiny SAMP, AMP a IMP svědčily např. o poruše adeninového nukleotidového cyklu.

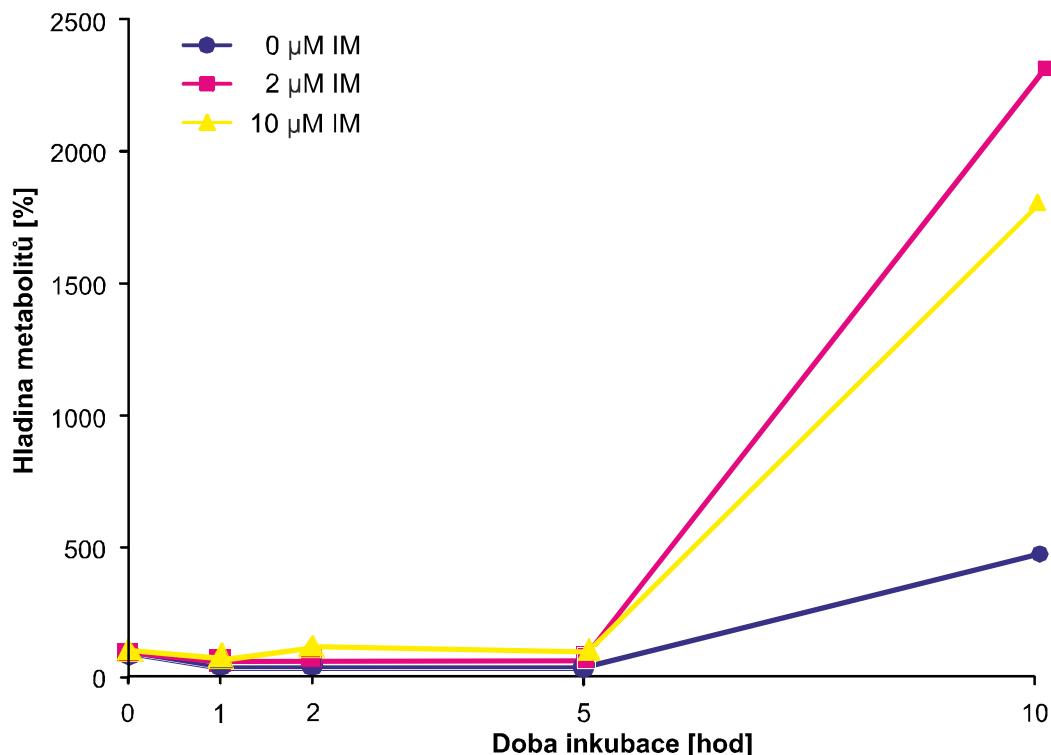


Obr. 26: Projekce případů do komponentní roviny 1-2



**Obr. 27:** Projekce proměnných do komponentní roviny 1-2

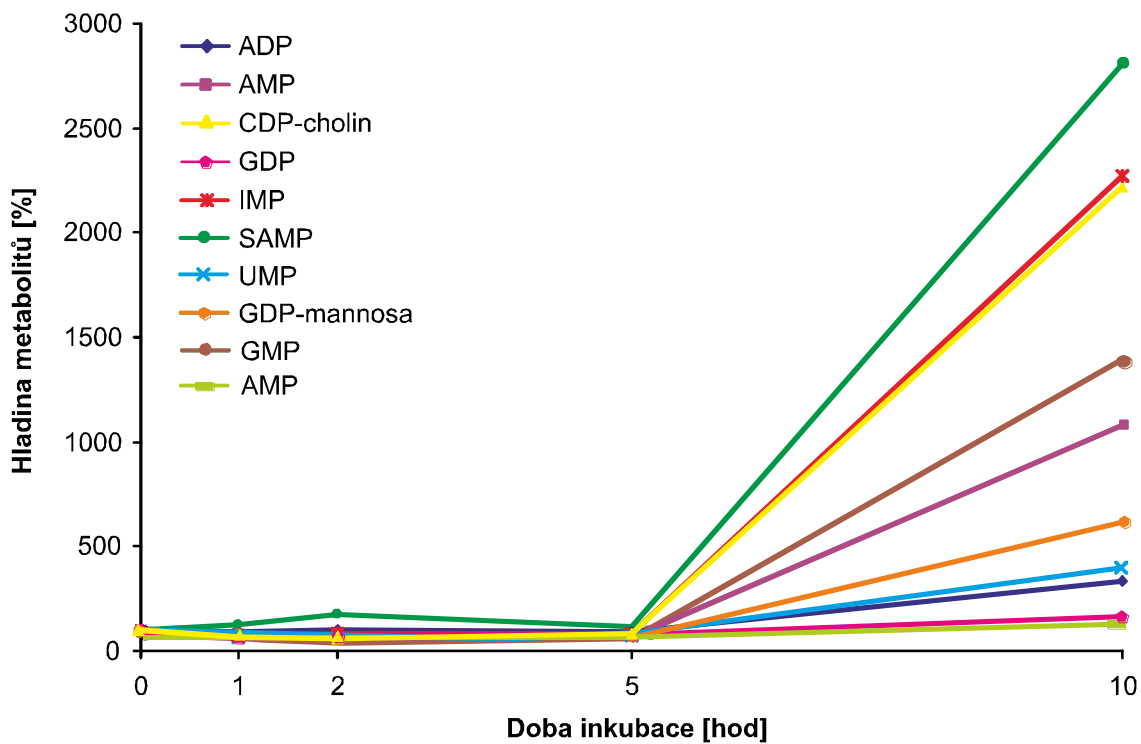
Přestože hlavním zjištěným důvodem změny hladin metabolitů byla doba inkubace, byly též pozorovány změny v závislosti na koncentraci IM. Příkladem je IMP, jehož hladina se u leukocytů inkubovaných bez IM zvýšila během 10 hod asi 4,5 krát ve srovnání s leukocyty inkubovanými s imatinibem o koncentraci 2  $\mu\text{mol/l}$ , kde došlo téměř k třicetnásobnému navýšení (Obr. 28). Tyto nálezy svědčí pravděpodobně o tom, že nejen samotná inkubace leukocytů v nepřírozených podmínkách, ale i působení IM vedlo u nich k apoptóze.



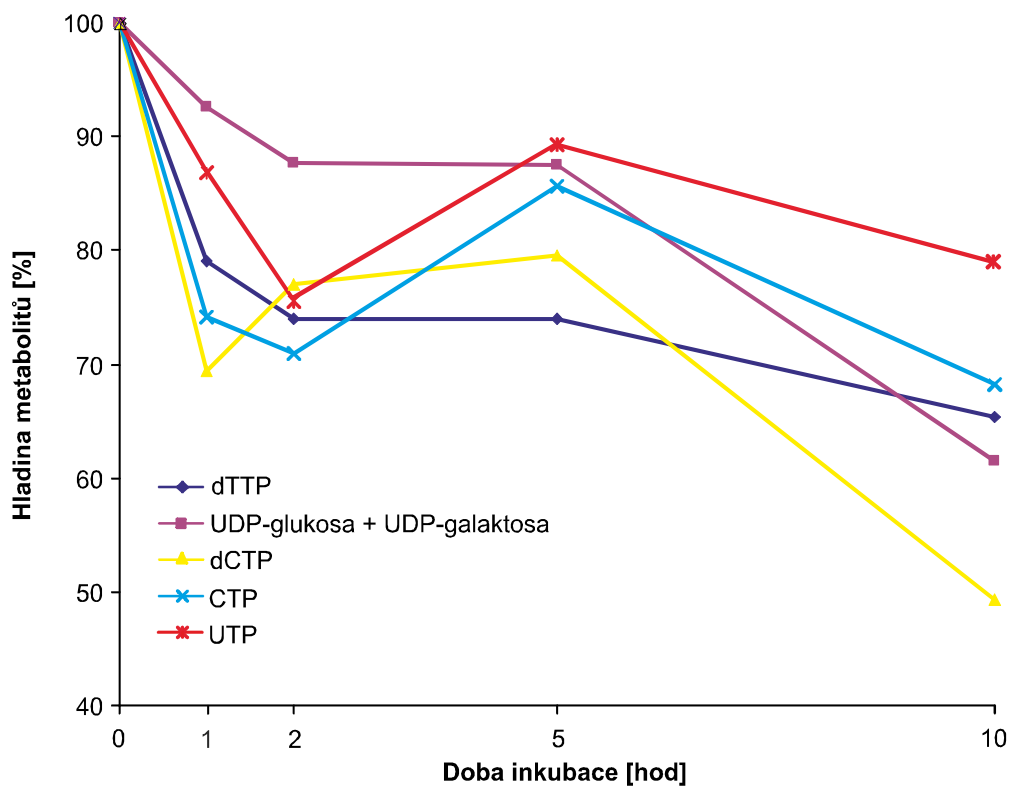
**Obr. 28:** Narůst hladiny IMP v závislosti na době inkubace leukocytů bez a s přidavkem IM o koncentraci 2 a 10  $\mu\text{mol/l}$  I,

Na Obr. 29 a 30 jsou dále znázorněny nejvýznamnější změny v hladinách metabolitů vzhledem k začátku inkubace (v čase 0 hod 100 %). Jednalo se hlavně o monofosfáty (SAMP, IMP AMP, GMP a UMP), ADP, CDP-cholin a GDP-mannosu, jejichž hladina se mezi 5. a 10. hod inkubace významně zvyšovala. (Obr. 29). Naopak k poklesům hladin docházelo především u trifosfátů (dTTP, dCTP, CTP, UTP), ale také UDP-glukosy a UDP-galaktosy (Obr. 30).





**Obr. 29:** Hladiny metabolitů zvyšující se s dobou inkubace (s IM 2 μmol/l)



**Obr. 30:** Hladiny metabolitů snižující se s dobou inkubace (s IM 2 μmol/l)

## 8 Diskuze

V experimentální části své bakalářské práce jsem se zabývala analýzou nukleotidů a jejich derivátů metodou UHPLC-MS/MS.

Při MS optimalizaci byla změřena hmotnostní a fragmentační spektra všech 50 studovaných látek. Na jejich základě bylo poté vybráno 5 nejintenzivnějších MRM přechodů, které byly porovnány s již dříve publikovanými výsledky (Bajad et al., 2006). Všechny nukleotidy a jejich deriváty byly analyzovány v pozitivním i negativní módu, ale na základě intenzit produktových iontů bylo zjištěno, že většina nukleotidů se lépe fragmentuje, pokud jsou měřeny v negativním módu. Výjimkou byly monofosfáty, kofaktor FAD a také některé deriváty nukleotidů jako např. SAMP nebo AICAR. Tyto látky byly štěpeny v obou módech za vzniku fragmentů s vysokou intenzitou.

Pro analýzu studovaných látek pomocí UHPLC byla modifikována již dříve publikovaná metoda (Bajad et al., 2011). Bylo zjištěno, že pro separaci trifosfátů je nejdůležitější výběr pH mobilní fáze. Při pH nižším než 9 byly trifosfáty silně vázány na koloně a při pH vyšším než 9,5 se naopak separovaly v podobných retenčních časech jako difosfáty, proto jako optimální pH byla vybrána hodnota 9,45. Dále byl měněn gradient a to tak, abychom docílili chromatografického rozdělení látek, především monofosfátů, se stejným a podobným MRM přechodem (př. AMP a dGMP, dTMP a CMP, UMP a CMP) a zároveň, aby se trifosfáty separovaly co v nejkratším čase. Oddělit tyto látky se nám nakonec podařilo, výjimkou byly pouze UDP-D-galaktosa a UDP-glukosa jejichž MRM přechody i retenční časy byly shodné. Stejného výsledku dosáhli i autoři dříve publikované studie (Bajad et al., 2006).

Cílem této práce bylo zjištění změn hladin metabolitů v buněčném extraktu leukocytů. Leukocyty byly izolovány z plné krve nově diagnostikované pacientky s CML a následně byly inkubovány při 37 °C s IM o různých koncentracích – 0, 2 a 10 μmol/l v DMSO. Jednotlivé alikvóty byly odebírány v časech 0, 1, 2, 5 a 10 hod a výsledný vodný extrakt byl lyofilizován. Před analýzou UHPLC-MS/MS byl extrakt rozpuštěn ve 100 μl vody s přídavkem Br-AMP.

V extraktech leukocytů bylo identifikováno celkem až 39 studovaných látek, v největší intenzitě byly nalezeny ADP, ATP, směs UDP-glukosy a UDP-galaktosy a CMP-N-acetylneuraminát. Data byla dále statisticky vyhodnocena PCA analýzou. Největší změny hladin metabolitů byly pozorovány po 10 hod inkubace. Bylo zjištěno, že již samotná inkubace leukocytů bez IM vedla u nich pravděpodobně k apoptóze a že přítomnost IM měla synergický účinek. Obecně byl pozorován intenzivní vzrůstající trend především u monofosfátů (SAMP, IMP AMP, GMP a UMP), naopak u trifosfátů (dTTP, dCTP, CTP, UTP) docházelo k poklesům jejich hladin.

## 9 Závěr

V teoretické části bakalářské práce byly shrnuty poznatky o nově se rozvíjející se vědní disciplíně – metabolomice a metodách, které se v metabolomice nejvíce využívají. Dále jsem se věnovala chronické myeloidní leukemii, její diagnostice, průběhu a léčbě. Pro léčbu CML v chronické fázi se v současnosti hojně využívají TKI, proto jsem celou kapitolu věnovala také léku 1. generace – imatinibu.

V experimentální části byla vyvíjena metoda UHPLC-MS/MS pro analýzu nukleotidů a jejich derivátů. Optimalizovaná metoda byla poté aplikována na buněčný extrakt leukocytů z plné krve nově diagnostikované pacientky s CML. Cílem bylo objasnit vliv imatinibu na metabolismus buněk buněčné kultury CML. V extraktech leukocytů bylo celkem identifikováno až 39 studovaných látek. Data byla následně statisticky vyhodnocena PCA analýzou.

Cílem další práce bude optimalizace inkubace izolovaných leukocytů tak, aby nedocházelo k jejich apoptóze. Dále se do vyvíjené UHPLC-MS/MS metody zahrnou i další metabolity, jejichž změna by mohla více objasnit metabolismus inkubovaných leukocytů s imatinibem. Za účelem zjištění přesných koncentrací jednotlivých metabolitů pak bude nutná též validace metody.

## Použitá literatura

- Agarwal S., Tafel A.A., Kanaar R. (2006) DNA double-strand break repair and chromosome translocations. *DNA repair (Amst.)* **5**, 1075-1081.
- Bajad S.U., Lu W., Kimball E.H., Yuan J., Peterson C., Rabinowitz J.D. (2006) Separation and quantitation of water soluble cellular metabolites by hydrophilic interaction chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* **1125**, 76-88.
- Bajad S., Shulaev V. (2007) Highly-parallel metabolomics approaches using LC-MS<sup>2</sup> for pharmaceutical and environmental analysis. *Trends Analyt Chem* **26**, 625-636.
- Bajad S., Shulaev V. (2011) LC-MS-Based metabolomics. *Methods Mol Biol* **708**, 213-228.
- Boja E.S., Rodriguez H. (2011) The path to clinical proteomics research: integration of proteomics, genomics, clinical laboratory and regulatory science. *Korean J Lab Med* **31**, 61-71.
- Bumbea H., Vladareanu A.M., Voican I., Cisleanu D., Barsan L., Onisai M. (2010) Chronic myeloid leukemia therapy in the era of tyroxine kinase inhibitors. The first molecular targeted treatment. *J Med Life* **3**, 162-166.
- Ceglarek U., Leichtle A., Brügel M., Kortz L., Brauer R., Bresler K., Thiery J., Fiedler G.M. (2009) Challenges and developments in tandem mass spectrometry based clinical metabolomics. *Mol Cell Endocrinol* **301**, 266-271.
- Clarkson B., Strife A., Wiskiewski D., Lambdo C.L., Liu C. (2003) Chronic myelogenous leukemia as a paradigm of early cancer and possible curative strategie. *Leukemia* **17**, 1211-62.
- De Koning W., van Dam K. (1992) A metod for the determination of changes of glycolytic metabolites in yeast on a subsecond time scale using extraction at neutral pH. *Anal Biochem* **204**, 118-123.
- Deininger M.W.N., Goldman J.M., Lydon N., Melo J.V. (1997) The tyroxine kinase inhibitor CGP57148B selectively inhibits the growth of BCR-ABL-positive cell. *Blood* **90**, 3691-3698.
- Deininger M.W. (2008) Milestones and monitoring in patients with CML greated with imatinib. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 419-426
- Faber E. (2002) Chronická myeloidní leukemie. V knize Leukemie (Mayer J., Starý J., ed.), pp.300-311, GRADA Publishing, Praha, ČR.

- Faber E., Kajaba V., Typnerová S, Luxová V. (2004) Diagnóza CML–Chronická myeloidní leukémie, informační brožura pro pacienty a jejich blízké. pp. 3-35, Leukaemia Research Fund (LRF), GB
- Faber E., Indrák K. (2010) Léčba imatinibem. V knize Chronická myeloidní leukémie, (Faber E., Indrák K., ed.), pp.93-109, Galén, Praha, ČR.
- German J.B, Roberts M.A., Fay L., Watkins S.M. (2002) Metabolomics and individual metabolite assessment: The next great challenge for nutrition. *J Nutr* **132**, 2486-2487.
- Graham S.M., Jørgensen H.G., Allan E., Pearson C., Alcorn M.J., Richmond L., Holyoake T.L. (2002) Primitive, quiescent, Philadelphia-positive stem cells from patients with chronic myeloid leukemia are insensitive to STI571 in vitro. *Blood* **99**, 319-325.
- Ho C.S., Lam C.W., Chan M.H., Cheung R.C., Law L.K., Lit L.C., Ng K.F., Suen M.W., Tai H.L. (2003) Electrospray ionisation mass spectrometry: principles and clinical applications. *Clin Biochem Rev* **24**, 3-12.
- Jandera P. (2011) Přehled technik kapalinové chromatografie pro spojení s hmotnostní spektrometrií. Ve sborníku přednášek Spojení vysokoúčinné kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie (HPLC/MS), (Holčápek M., ed.), pp.51-59, Univerzita Pardubice, ČR.
- Jarošová M, Moravcová J., Machová-Poláková K. (2010) V knize Chronická myeloidní leukémie, (Faber E., Indrák K., ed.), pp.93-109, Galén, Praha, ČR.
- Kaddurah-Daouk R., Kristal B.S., Weinshilboum R.M. (2008) Metabolomics: A global biochemical approach to drug response and disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **48**, 653-683.
- Kanehisa M., Goto S., Hattori M., Aoki-Kinoshita K.F., Itoh M., Kawashima S., Katayama T., Araki M., Hirakawa M. (2006) From genomics to chemical genomics: new developments in KEGG. *Nucleic Acids Res* **34**, D354-357
- Kebarle P., Verkerk U.H. (2009) Electrospray: from ions in solution to ions in the gas phase, what we know now. *Mass Spectrom Rev* **28**, 898-917.
- Lemr K. (2011) Ionizace elektrosprejem. Ve sborníku přednášek Spojení vysokoúčinné kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie (HPLC/MS), (Holčápek M., ed.), pp.51-59, Univerzita Pardubice, ČR.
- Lugo T.G, Pendergast A.M., Muller A.J., Witte O.N. (1990) Tyroxine dinase activity and transformation potency of *bcr-abl* oncogene products. *Science* **247**, 1079-1082.

- Mughal T.I., Schrieber A. (2010) Principal long-term adverse effects of imatinib in patients with chronic myeloid leukemia in chronic phase. *Biologics* **4**, 315-323.
- Peng B., Hayes M., Resta D., Racine-Poon A., Druker B.J., Talpaz M., Sawyers C.L., Rosamilia M., Ford J., Lloyd P., Capdeville R. (2004) Pharmacokinetics and pharmacodynamics of imatinib in a phase I trial with chronic myeloid leukemia patients. *J Clin Oncol* **22**, 935-942.
- Protivánková M., Vorlíček J. (2001) Chronická myeloidní leukemie – informace pro pacienty a jejich blízké. pp 4-7, Vydavatelství MU, Brno – Kraví Hora, ČR
- Reya T., Morrison S.J., Clarke M.F., Weissman I.L. (2001) Stem cells, cancer, and cancer stem cell. *Nature* **414**, 105-111.
- Roberts M.J., Schirra H.J., Lavin M.F., Gardiner R.A. (2011) Metabolomics: A Novel Approach to Early and Noninvasive Prostate Cancer Detection. *Korean J Urol* **52**, 79-89.
- Roessner U., Bowne J. (2009) What is metabolomics all about? *Biotechniques* **46**, 363-365.
- Salah E., Uqochukwu E., Barr A.J., von Delft F., Knapp S., Elkins J.M. (2011) Crystal Structure of ABL-Related Gene (ABL2) in Complex with Imatinib, Tozasertib (VX-680), and a Type I Inhibitor of the Triazole Carbothioamide Class. *J Med Chem* **54**, 2359-2367.
- Testa U. (2011) Leukemia stem cells. *Ann Hematol* **90**, 245-271.
- Villas-Bôas S.G., Mas S., Åkesson M., Smedsgaard J., Nielsen J. (2005) Mass spectrometry in metabolome analysis. *Mass Spectrom Rev* **24**, 613-646.
- Westman-Brinkmalm A., Brinkmalm G. (2009a) A mass spectrometer's building blocks. V knize *Mass spectrometry: Instrumentation, Interpretation, and Applications* (Ekman R., Silberring J., Westman-Brinkmalm A., Kraj A., ed.), pp. 15-87, John Wiley & Sons, Hoboken, NJ, USA.
- Westman-Brinkmalm A., Silberring J., Brinkmalm G. (2009) Separation methods. V knize *Mass spectrometry: Instrumentation, Interpretation, and Applications* (Ekman R., Silberring J., Westman-Brinkmalm A., Kraj A., ed.), pp. 15-87, John Wiley & Sons, Hoboken, NJ, USA.
- 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. et al. (2009) HMDB: a knowledgebase for the human metabolome. *Nucleic Acids Res* **37**, D603-610.

## Seznam použitých zkratk

ABL	část 9. chromosomu (Abelson tyrosin kinase gen)
AcCN	acetonitril
ADP	adenosin-5'-difosfát
AICAR	5-aminoimidazol-4-carboxamid-1- $\beta$ -D-ribofuranosyl 5'-monofosfát
AMP	adenosin-5'-monofosfát
API	ionizace při atmosférickém tlaku (atmospheric pressure ionization)
APS	adenosin-5'-fosfosulfát
ATP	adenosin-5'-trifosfát
BCR	část 22. chromosomu
cCMP	2',3'-cyklický-CMP
CDP	cytidin-5'-difosfát
CE	kolizní energie (collision energy)
CML	chronická myeloidní leukemie
CMP	cytidin-5'-monofosfát
CMP-Neu-NAc	CMP-N-acetylneuraminát
CTP	cytidin-5'-trifosfát
CXP	výstupní potenciál kolizní cely (collision cell exit potential)
dADP	2'-deoxyadenosin-5'-difosfát
dAMP	2'-deoxyadenosin-5'-monofosfát
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
dITP	2'-deoxyinosin-5'-trifosfát
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina (deoxyribonucleic acid)
DP	deklasterační potenciál (declustering potential)
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
EP	vstupní potenciál (entrance potential)
ESI	ionizace elektrosprejem (electrospray ionisation)
FAD	flavinadenindinukleotid
FBS	fetální hovězí sérum (fetal bovine serum)
EP	vstupní potenciál (entrance potential)
FMN	riboflavin-5'-monofosfát
GDP	guanosin-5'-difosfát
GMP	guanosin-5'-monofosfát
GTP	guanosin-5'-trifosfát
HMDB	Human Metabolome Database
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IDP	inosin-5'-difosfát
IM	imatinib
IMDM	Iscoe's Modified Dulbecco's Medium
IMP	inosin-5'-monofosfát
ITP	inosin-5'-trifosfát
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
LC	kapalinová chromatografie (liquid chromatography)
LC-MS	kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií
MRM	multiple-reaction monitoring
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
MS	hmotnostní spektrometrie (mass spectrometry)
MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie (tandem mass spectrometry)
NAD <sup>+</sup>	β-nikotinamidadenindinukleotid (oxidovaná forma)
NADH	β-nikotinamidadenindinukleotid (redukováná forma)
NADP <sup>+</sup>	β-nikotinamidadenindinukleotidfosfát (oxidovaná forma)
NADPH	β-nikotinamidadenindinukleotidfosfát (redukováná forma)
NMN	β-nikotinamid mononukleotid
PEN	penicilin
Ph	Filadelfský chromosom (Philadelphia chromosome)
Ret t	retenční čas (retention time)
SAMP	adenylosukcinát
STREP	streptomycin
TKI	inhibitor tyrosinkinas
UDP	uridin-5'-difosfát



UMP	uridin-5'-monofosfát
UDP-Glc-NAc	UDP-N-acetylneuraminát
UHPLC	ultraúčinná kapalinová chromatografie
UTP	uridin-5'-trifosfát