UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie

Studium vlivu metabolických cest cytidinu na léčbu hematologických malignit cytarabinem

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	**Bc. Martina Horejšová**
Studijní program:	N0512A130009 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	**Mgr. Barbora Pisklákova**
Rok:	2024

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním diplomové práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne .....

Poděkování

Nejprve bych ráda poděkovala mé vedoucí práce Mgr. Barboře Pisklákové za ochotu, vstřícnost a trpělivost při vedení mé práce v laboratoři. Dále bych ráda poděkovala prof. RNDr. Davidovi Friedeckému, Ph.D. za cenné rady a připomínky při sepisování mé závěrečné práce. V neposlední řadě bych ráda poděkovala všem zaměstnancům laboratoře DMP FNOL za ochotu a užitečné rady při práci v laboratoři.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Martina Horejšová
Název práce	Studium vlivu metabolických cest cytidinu na léčbu hematologických malignit cytarabinem
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	Mgr. Barbora Piskláková
Rok obhajoby práce	2024
Abstrakt	Hematologické malignity jsou nádorová onemocnění krve zahrnující akutní a chronické myeloproliferativní či lymfoproliferativní onemocnění. Možnou léčbou hematologických malignit, především pak akutních myeloproliferativních forem jako je akutní myeloidní leukémie, může být nukleosidový analog cytarabin vyznačující se antineoplastickou aktivitou. Teoretická část diplomové práce je věnována charakteristice hematologických malignit, popisu jejich léčby, dále charakteristice nukleosidových analog, především pak cytarabinu. Experimentální část diplomové práce byla zaměřena na analýzu aktivity enzymu cytidindeaminasy v buňkách nádorových linií, v liniích tvořených diploidními buňkami, v liniích tvořených imortalizovanými diploidními buňkami, ve vzorcích tumoru a krevní plasmy po ošetření cytarabinem či dalšími vybranými nukleosidovými analogy metodou kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií. Rozdílná aktivita cytidindeaminasy byla pozorovatelná v rámci nádorových buněčných linií, ve zbylých případech byla zaznamenána nulová aktivita enzymu. Byla však zaznamenána rozdílná substrátová specifita cytidindeaminasy.
Klíčová slova	Hematologické malignity, cytidin, cytarabin, cytidindeaminasa

Počet stran	82
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Bc. Martina Horejšová
Title	Study of the effect of cytidine metabolic pathways on the treatment of hematological malignancies with cytarabine
Type of thesis	Diploma
Department	Department of biochemistry
Supervisor	Mgr. Barbora Piskláková
The year of presentation	2024
Abstract	Hematological malignancies are blood cancers including acute and chronic myeloproliferative or lymphoproliferative diseases. A possible treatment of hematological malignancies, particularly acute myeloproliferative forms such as acute myeloid leukaemia, may be the nucleoside analogue cytarabine, which has antineoplastic activity. The theoretical part of the thesis is focused on the characteristics of hematological malignancies, description of their treatment, and characteristics of nucleoside analogues, especially cytarabine. The experimental part of the thesis consists of the analysis of the activity of the enzyme cytidine deaminase in tumour cell lines, in lines formed by diploid cells, in lines formed by immortalised diploid cells, in tumour and blood plasma samples after treatment with cytarabine or other relevant nucleoside analogues by liquid chromatography with mass spectrometry. Different cytidine deaminase activity was observed within the tumor cell lines, whereas in the remaining cases no enzyme activity was observed. However, different substrate specificity of cytidine deaminase was reporteded.
Keywords	Hematological malignancies, cytidine, cytarabine, cytidine deaminase
Number of pages	82

Number of appendices	0
Language	Czech

OBSAH

1	**Úvod**	**1**
2	**Současný stav řešené problematiky**	**2**
2.1	Hematologické malignity	2
2.1.1	Akutní myeloidní leukémie	3
2.1.1.1	Patofyziologie nemoci	3
2.1.1.2	Klinický obraz	4
2.1.1.3	Léčba	6
2.1.2	Chronická myeloidní leukémie	7
2.1.2.1	Patofyziologe nemoci	7
2.1.2.2	Klinický obraz	8
2.1.2.3	Léčba	9
2.1.3	Lymfoproliferativní onemocnění	9
2.1.3.1	Lymfomy	9
2.1.3.2	Lymfocytární leukémie	12
2.1.3.3	Mnohočetný myelom	13
2.2	Nukleosidová analoga	14
2.2.1	Cytarabin	17
2.2.1.1	Metabolismus cytarabinu	18
2.2.1.2	Cytotoxicita cytarabinu	21
2.2.1.3	Rezistence na cytarabin	22
2.3	Analytické metody studia vlivu metabolických cest cytidinu	24
2.3.1	Nukleární magnetická rezonance	25
2.3.2	Chromatografické metody ve spojení s hmotnostní spektrometrií	26
2.3.2.1	Plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií	26
2.3.2.2	Kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií	29
2.3.2.3	Hmotnostní spektrometrie	30
2.3.3	Kapilární elektroforéza s hmotnostní spektrometrií	35
3	**Experimentální část**	**37**
3.1	Materiál a přístroje	37
3.1.1	Chemikálie	37
3.1.2	Roztoky	37
3.1.3	Přístroje a pomůcky	37
3.1.4	Biologický materiál	38
3.2	Metody	38
3.2.1	Příprava standardů	38
3.2.2	Optimalizace LC-MS parametrů standardů	39
3.2.3	Příprava vzorků	41
3.2.1.1	Optimalizace parametrů a podmínek pro inkubaci lyzátů s ara-C	41
3.2.1.2	Stanovení aktivity cytidindeaminasy v devíti vybraných buněčných linií	41
3.2.1.3	Stanovení aktivity cytidindeaminasy v synchronních buněčných liniích HeLa a HepG2	42
3.2.1.4	Sledování aktivity cytidindeaminasy HeLa lyzátu a lidského rekombinantního enzymu	42
3.2.1.5	Stanovení aktivity cytidindeaminasy ve vzorcích myšího tumoru a plasmy	42
3.2.4	Inkubace vzorků	43
3.2.5	Příprava kalibrační řady	45
3.2.6	Analýza vzorků kapalinovou chromatografií s hmotnostní spektrometrií	47
3.2.7	Zpracování výsledků	47
4	**Výsledky**	**49**

4.1 Finální metoda pro analýzu pomocí LC-MS/MS 49
4.2 Optimalizace podmínek pro inkubaci lyzátů s ara-C 52
4.3 Stanovení aktivity cytidindeaminasy v devíti vybraných buněčných linií 56
4.4 Stanovení aktivity cytidindeaminasy v buněčných lyzátech HeLa a HepG2 58
4.5 Stanovení aktivity cytidindeaminasy HeLa lyzátu a lidského rekombinantního enzymu 61
4.6 Stanovení aktivity cytidindeaminasy ve vzorcích myšího tumoru a plasmy 64
5 Diskuse 68
6 Závěr 72
7 Literatura 73
8 Seznam použitých symbolů a zkratek 81

CÍLE PRÁCE

1. Vypracování literární rešerše o možnosti léčby hematologických malignit a mechanismu účinku těchto léčiv.
2. Vypracování literární rešerše o dosavadních poznatcích o metabolických drahách cytidinu a jejich vliv na léčbu hematologických malignit.
3. Analýza vlivu aktivity cytidindeaminasy v nádorových buňkách a krevní plasmě s ohledem na průběh a účinnost léčby cytarabinem.
4. Příprava vzorků buněčných lyzátů a plasmy pro metabolomickou analýzu pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií, vyhodnocení výsledků, statistické zpracování a interpretace naměřených dat.

1 ÚVOD

Hematologické malignity jsou nádorová onemocnění krve, která zahrnují formy akutních a chronických myeloproliferativních a lymfoproliferativních onemocnění. Mezi charakteristické znaky nádorových buněk patří ve srovnání se zdravými buňkami odlišný metabolický fenotyp, onkogenní signalizace, buněčné regulační defekty či odolávání buněčné smrti. Tyto metabolické rozdíly mezi zdravou a nádorovou buňkou jsou pilířem protirakovinné léčby, kdy jednou z možností léčby hematologických malignit se nabízí léčba nukleosidovými analogy. Cytarabin je nukleosidový analog deoxycytidinu s antineoplastickou aktivitou využívaný především pro léčbu akutní myeloidní leukémie, a to jak v indukční fázi léčby, tak i ve fázi postremisní, a rovněž přispívá k vysoké míře kompletní remise tohoto onemocnění. Mechanismus účinku cytarabinu spočívá v tříkrokové fosforylaci na jeho trifosfátovou cytotoxickou formu, která se inkorporuje do DNA a působí jako inhibor DNA polymeras. Účinek cytarabinu je však snížen jeho deaminací na biologicky neaktivní metabolit uracilarabinosid enzymem cytidindeaminasou. Podrobným popisem procesu účinku cytarabinu, jeho cytotoxicitou a rezistencí na toto léčivo se zabývá teoretická část diplomové práce. Tato část práce se rovněž věnuje charakteristice nukleosidových analog a hematologických malignit, jejich klasifikaci a v neposlední řadě jejich léčbě.

Experimentální část diplomové práce je zaměřena na stanovení aktivity cytidindeaminasy. Aktivita byla stanovována v nádorových buněčných liniích, liniích tvořených diploidními buňkami a v linii imortalizovaných diploidních buněk po inkubaci s vybranými substráty, včetně cytarabinu. Aktivita cytidindeaminasy byla stanovována kapalinovou chromatografií ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií. Pro hmotnostní spektrometrii byly optimalizovány MRM přechody pro všechny vybrané standardy nukleosidových analog.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Hematologické malignity

Hematologické malignity jsou nádorová onemocnění krve zahrnující četné formy akutních a chronických myeloproliferativních a lymfoproliferativních onemocnění. Pocházejí z jedné ze dvou hlavních krevních linií – myeloidních a lymfoidních buněk. Akutní a chronická myeloidní leukémie jsou myeloidního původu, zatímco lymfomy, lymfocytární leukémie a myelom patří do lymfoidní linie (Giordano et al, 2013). Klasifikace těchto patologických stavů je založena na kombinaci znaků, které zahrnují morfologii nádorových buněk, imunofenotyp (Giordano et al, 2013), původ tkáně, histologické charakteristiky a genetické defekty, které v podstatě mohou určit abnormální chování nádorových buněk (Zvara et al, 2002). Tyto genetické defekty lze analyzovat pomocí znalosti téměř celé sekvence lidského genomu. Metody molekulární biologie, např. sekvenování, analýza chromosomů, metoda DNA čipů nebo oligonukleotidových čipů, Northernova hybridizace apod., napomáhají získat více informací o maligních transformacích na systémových úrovních jako je genom, transkriptom a proteom (Zvara et al, 2002).

Charakteristické znaky rakoviny jsou souborem funkčních schopností získaných normálními buňkami při transformaci buněk do neoplastického růstu, tedy schopností, které jsou klíčové pro tvorbu zhoubných nádorů (Hanahan, 2022). Tyto znaky zahrnují odlišný metabolický fenotyp ve srovnání se zdravými buňkami, který jim umožňuje přežití, rychlejší růst a rychlejší proliferaci. Dále se jedná o onkogenní signalizace, díky kterým buňka efektivněji vykonává bioenergetické procesy a efektivněji syntetizuje makromolekuly důležité pro růst buněk, nebo o regulační defekty, které řídí normální buněčnou proliferaci a homeostázu či o odolávání buněčné smrti (Hanahan & Weinberg, 2011). Na základě těchto metabolických rozdílů mezi normálními a rakovinnými buňkami se výzkum pro léčbu s protirakovinnými účinky zaměřil na metabolity a enzymy, které hrají centrální roli v onkogenních signalizacích, a na blokaci abnormálních metabolických cest, kterými se rakovinné buňky vyznačují (Parsons et al., 2008; Stein et al., 2019). Příkladem enzymatické léčby může být 2-deoxy-D-glukosa, která inhibuje glykolýzu vazbou na hexokinasu a následně potlačuje růst nádorových buněk (Dwarakanath et al., 2009). Výzkum léčby se rovněž zaměřil na možné mutace v genech a na léčiva inhibující tyto genetické změny (Stein et al., 2019) Pro přesnou a účinnou protirakovinnou léčbu je tedy důležité vyhledat metabolické rozdíly mezi

zdravými a rakovinnými buňkami a při vývoji léčby se zacílit na signální dráhu a metabolickou dráhu, která specificky ovlivňuje nádor (Shao et al., 2021).

2.1.1 Akutní myeloidní leukémie

Akutní myeloidní leukemie (AML) je skupina maligních onemocnění krvetvorby, pro kterou je charakteristická proliferace a hromadění nezralých hematopoetických buněk (myeloblastů) v kostní dřeni s následným vyplavováním těchto buněk do periferní krve. AML je charakterizovaná jako klonální expanze myeloblastů tvořících více jak 20 % všech jaderných buněk v dřeni (Adam et al., 2008).

Jedná se o onemocnění s prudkým nástupem, a to i u osob, které netrpí žádnou jinou krevní chorobou. Pokud nejsou tolerovány první příznaky nemoci, objevující se již několik týdnů před plným rozvinutím nemoci, není zavčas stanovena diagnóza nebo nemoc není dostatečně léčená, choroba může postiženého zabít během 2–3 měsíců od vzniku nemoci. AML tedy vyžaduje okamžitou a poměrně náročnou léčbu (Mayer et al., 2002). AML je primárně onemocnění starších dospělých, incidence AML je tedy vztažena na věk postižených osob. Incidence onemocnění se u osob ve věku 65 let a starších pohybuje kolem 20ti nemocných na 100 000 zdravých jedinců ročně. V případě osob mladších 65ti let je incidence rovna 2 nemocným na 100 000 zdravých jedinců ročně. Z toho pak muži mají 1,2-1,6 krát vyšší pravděpodobnost rozvoje AML během svého života (Shallis et al., 2019).

2.1.1.1 Patofyziologie nemoci

Patofyziologie AML je zakořeněna v genetické poruše hematopoetických progenitorových kmenových buněk, která podporuje klonální a maligní přeměnu a expanzi nezralých myeloblastů (Shallis et al., 2019), méně častěji erytroidních či megakaryocytárních blastů (Faber et al., 2012). Pro buňky AML je tedy charakteristická zástava diferenciace na úrovni blastů, jejichž proliferace se vymyká fyziologickým autoregulačním mechanismům. Důsledkem je potlačení krvetvorby, tedy pokles počtu krvinek v periferní krvi, zapříčiněným narůstajícím počtem leukemických blastů v dřeni kosti (Adam et al., 2008).

Z genetického hlediska sekvenováním celého genomu byly identifikovány mutace v genech *IDH1* (gen kódující enzym isocitátdehydrogenasa 1 (EC 1.1.1.42) katalyzující oxidativní dekarboxylaci isocitrátu na 2-oxoglutarát) a *IDH2* (gen kódující enzym isocitrátdehydrogenasa 2 (EC 1.1.1.42)) s četností výskytu 12 % pro mutantní *IDH1* (Parsons et al., 2008) a 8-19 % pro mutantní *IDH2* (Stein et al., 2019). Další mutace byly

zaznamenány v genech *DNMTA3A* (gen kódující enzym DNA methyltransferasa (EC 2.1.1.72) s četností výskytu 22,1 % (Ley et al., 2010), *TET2* (jeho funkce není stále známa, nicméně přítomnost karboxy-terminální domény ve fúzním proteinu naznačuje jeho potenciální význam v buněčné transformaci) s četností výskytu 22 % (Delhommeau et al., 2009) či *ASXL1* (gen kódující protein, který funguje jako ligand-dependentní koaktivátor pro receptor kyseliny retinové) s četností výskytu 11 % (Gelsi-Boyer et al., 2009).

Nádory mohou též pocházet z deregulace epigenetického aparátu, který následně indukuje změny struktury chromatinu a genové exprese. Jedním z charakteristických epigenetických mechanismů je methylace DNA a modifikace histonů (Figueroa el al., 2010). Typickým methylačním typem je hypermethylace CpG ostrůvků, přičemž se hypermethylované CpG nacházejí v promotorech genu. Naproti tomu hypomethylované CpG jsou detekovány především v tělech genů, kdy díky nim může docházet k chromozomálním delecím či translokacím (Esteller, 2008). Narušení normální distribuce methylace DNA je charakteristickým znakem nádorového bujení, které může hrát zásadní roli při iniciaci či progresi AML (Figueroa el al., 2010).

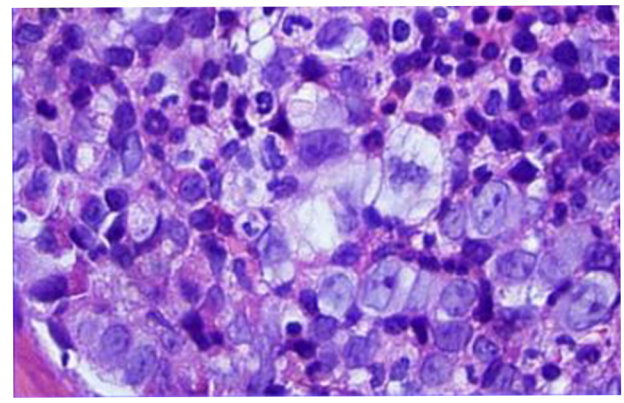
Sekundární AML vzniká poškozením DNA vyvolaným předchozí expozicí chemoterapeutiky či jinými léčivy, radioterapií, toxickou expozicí nebo může vznikat v doprovodu jiných hematologických malignit jako např. myelodysplastické syndromy či myeloproliferativní novotovary (Boddu et al., 2017).

2.1.1.2 Klinický obraz

Klinický obraz AML může být kombinací pro nemoc specifickými symptomy jako je porucha počtu erytrocytů, leukocytů či trombocytů a nespecifickými příznaky, např. slabost, únava, malátnost, nechutenství či hubnutí (Mayer et al., 2002). Poruchy počtu erytrocytů a trombocytů se dominantně projevují jejich poklesem. V případě závažného poklesu se může jednat o náznak trombocytopenie či koagulopatie. Koncentrace leukocytů mohou být při AML různorodé, může se projevit jak nízký počet leukocytů, tak i zvýšený či extrémně vysoký. Zvýšené koncentrace leukocytů jsou spjaty s hyperleukocytózou (Mayer et al., 2002).

Leukemické buňky (Obr. 1) jsou tuhé a velké, na základě čehož mohou ucpávat mikrocirkulaci. Rovněž mohou infiltrovat jakýkoliv orgán, avšak bez vážné poruchy funkce daného orgánu, vyjma centrální nervové soustavy (Mayer et al., 2002). Buňky mají kulatý či nepravidelný tvar jádra s jedním či několika jadérky. Cytoplazma je

většinou šedivého zbarvení, slabě bazofilní a může tvořit úzký lem či v případě monoblastické a myelomonocytární leukémie je v buňce přítomna ve vyšších množstvích (Faber et al., 2012).



Obr. 1: Kostní dřeň s leukemickými buňkami s velkými nepravidelnými jádry, rozptýleným chromatinem, variabilními jadérky a bazofilní cytoplazmou s mnoha cytoplazmatickými vakuolami, zvětšení 600x. Převzato a upraveno z Chen at al., 2011.

2.1.1.3 Léčba

Léčba AML zahrnuje dvě samostatné léčebné fáze – indukční fázi a postremisní fázi (Stone et al, 2004). Prvním krokem léčby je indukční fáze, neboli úvodní, jejímž cílem je kompletní remise AML pomocí myelosupresivní chemoterapie. Cílem této chemoterapie je eliminovat benigní i maligní hematopoetické elementy v kostní dřeni a následně umožnit repopulaci dřeně fyziologicky zdravými buňkami (Stone et al, 2004). Standardním režimem této fáze je intravenózní podání cytarabinu a antracyklinu, obvykle daunoribicinu, a to v kombinaci podávání cytarabinu po dobu sedmi dnů a daunoribicinu po dobu tří dnů. V klinických studiích jsou užívány i alternativní atracyklinová léčiva (např. idarubicin), vysoké dávky substituovaného cytarabinu nebo etoposid (Burnett et al, 2011).

Druhým krokem léčby je postremisní fáze nutná k zabránění relapsu (Burnett at al, 2011). Pro tuto fázi může být využito několik postupů, které napomáhají k udržení remise. Obecně mohou být tyto postupy nazvány jako konsolidační léčba, kam se řadí intenzivní chemoterapie, chemoradioterapie, vysokodávkovaná chemoterapie s alogenní transplantací kostní dřeně či kmenových krvetvorných buněk z periferní krve a imunoterapie (Mayer et al., 2002). Při intenzivní chemoterapii se standardně využívají vysoké dávky cytarabinu a to v několika cyklech, konkrétně se jedná o dávku 3 $g \cdot m^{-2}$ a celkem čtyři cykly. Méně častěji je pak volena dávka 400 $mg \cdot m^{-2}$ (Burnett et al, 2011).

Nové režimy intenzivní chemoterapie indukční i postremisní fáze pro mladší pacienty zahrnují kromě vysokých dávek cytarabinu vysoké dávky i jiných nukleosidových analog, jako např. fludarabin nebo kladribin, či cílených látek, jako jsou např. inhibitory ligand tyrosinkinasy 3 související s FMS (EC 2.7.10.1) nebo venetoklax. Režimy s nižší intenzitou léčby jsou pak doporučovány pacientům vyššího věku a pacientům nezpůsobilých pro intenzivní chemoterapii. Jedná se o léčbu hypomethylačními látkami, např. azacitidin, decitabin, s možností parenterálního i perorálního podávání, případně pak o léčbu nízkými dávkami kladribinu/cytarabinu v kombinaci s venetoklaxem či jiným cíleným inhibitorem (Kantarjian et al., 2021). Velmi účinnou léčbou se zdá být i transplantace hematopoetických buněk, protože tato léčba v porovnání s jinými není komplikována cytotoxicitou související s imunoterapií a relapsem onemocnění. Díky neustále se zvyšujícímu počtu vhodných dárců krvetvorných buněk je tato léčba pro pacienty přívětivější (Stone et al., 2004). Proti genetickým mutacím, především na genech

IDH1 a *IDH2*, byly vyvinuty účinné látky ivosidenib, který inhibuje mutantní gen *IDH1* (Parsons et al., 2008), a enasidenib, který inhibuje mutantní gen *IDH2* (Stein et al., 2019).

Demethylační léčba, hrající důležitou roli v léčbě AML, je zaměřena na deregulaci epigenetického aparátu (Figueroa el al., 2010). Při této léčbě jsou pacientům běžně podávána léčiva 5-azacytidin a 5-aza-2'-deoxycytidin, která fungují jako inhibitory DNA methyltransferasy. Terapie kombinující inhibitory DNA methyltransferasy s modulátory methylace histonů, např. 3-deazaneplanocin-A, je rovněž běžným režimem léčby (Przybilla el al., 2017).

Jedním z nejúspěšnějších léčebných přístupů AML založených na imunoterapii využívá T-buňky, které exprimují chimérické antigenní receptory (CAR), kde T buněčná specifita je přesměrována na povrchové antigeny nadměrně exprimované na rakovinné buňce (El Khawanky et al., 2021). Použití CAR T buněk zacílené na antigen CD123, receptor interleukin-3, se zdá nejslibnější strategií ze všech zkoumaných antigenů díky jeho všudypřítomné expresi na blastech AML (Jordan, 2010). Studie Mardiros et al., 2013 uvádí silnou antileukemickou aktivitu anti-CD123 CAR T buněk proti AML.

2.1.2 Chronická myeloidní leukémie

Chronická myeloidní leukémie (CML) je myeloproproliferativní onemocnění vznikající v kompartmentu hemopoetických kmenových buněk, které je charakterizováno reciproční t(9;22) chromozomální translokací (Chereda & Melo, 2015). CML je rovněž charakterizována výrazným zvýšením počtu bílých krvinek a krevních destiček a progredující chronickou, akcelerovanou a blastickou fází (Kimura et al, 2014).

CML je myeloproliferativní novotovar s incidencí 1-2 případy na 100 000 dospělých, a tedy tvoří přibližně 15 % nově diagnostikovaných případů leukémie u dospělých (Jabbour & Kantarjian, 2020). Většina pacientů nacházející se v chronické fázi onemocnění dosahuje stejné délky života jako zdraví jedinci stejného věku (Hochhaus et al., 2017). Pokud však není v chronické fázi zahájena léčba, CML progreduje až do blastické fáze. Blastická fáze pak vede vždy k mortalitě pacientů (Chereda & Melo, 2015).

2.1.2.1 Patofyziologe nemoci

CML je způsobena výskytem chromosomu Philadelphia v důsledku reciproční translokace mezi chromosomy 9 a 22, tedy fúzí genu *abl* na chromosomu 9 s genem *bcr* na chromosomu 22 a následným vývojem chimérického genu *brc-abl*. Tento gen produkuje protein BRC-ABL, který má silnější kinasovou aktivitu než klasický ABL

protein (Kimura et al, 2014). Zásadní roli v patogenezi CML tedy hraje exprese tohoto BCR-ABL proteinu v hematopoetických kmenových buňkách (Ohmine et al., 2001). Tyrosinkinasová signalizace tohoto proteinu přispívá k takovému přeprogramování buňky, které způsobí nekontrolovatelnou proliferaci vedoucí k myeloidní hyperplasii a indolentním symptomům chronické fáze. Bez léčby CML následně progreduje do blastické fáze, podobně jako je tomu u AML. Blastická fáze vede vždy k úmrtí pacientů na infekci, trombózu nebo anémii, a to vše jako důsledek selhání kostní dřeně v důsledku nedostatečné buněčné diferenciace a infiltrace nezralými blasty (Chereda & Melo, 2015).

Většina případů CML (90 % - 95 %) je diagnostikována v tzv. chronické fázi, kdy jsou hladiny všech typů krvinek v periferní krvi zvýšeny (Ohmine et al, 2001). Stav většiny pacientů přechází do akcelerované fáze, která je charakteristická zhoršující se anémií, splenomegálií a orgánovou infiltrací. Terminálním stádiem je tzv. blastická fáze projevující se jako akutní myeloidní leukémie. Tato fáze je typická zhoršujícími se konstitučními symptomy, krvácením, horečkou a infekcemi. Prognóza pacientů v blastické fázi je již tak špatná, že medián doby přežití je pouze 3–4 měsíce (Ohmine et al, 2001; Jabbour & Kantarjian, 2018).

2.1.2.2 Klinický obraz

Klinický obraz je tvořen specifickými i nespecifickými symptomy tak, jako je tomu u AML. Asi 50 % pacientů s diagnostikovanou CMLje asymtomatických, k diagnóze CML dochází během rutinního fyzikálního vyšetření nebo krevních testů (Jabbour & Kantarjian, 2020). Při diagnóze CML je většina pacientů (90 %-95 %) přítomna v chronické fázi onemocnění (Hochhaus el al., 2017). Běžné symptomy chronické fáze jsou výsledkem anémie a splenomegalie, např. únava, hubnutí, malátnost či snadné zasycení (Hochhaus el al., 2017). Vzácnější jsou pak symptomy zahrnující krvácení spojené s nízkým počtem nebo dysfunkcí krevních destiček, nebo naopak zvýšený počet krevních destiček (trombocytóza). Dále se pak jedná o zvýšené hladiny kyseliny močové spojené s artritidou, retinální krvácení nebo krvácení v horní části gastrointestinálního traktu. V chronické fázi CML jsou rovněž málo časté leukostatické symptomy vzniklé v důsledku usazování leukemických buněk v cévách, např. ztráta koordinace, ospalost či dušnost (Jabbour & Kantarjian, 2020). Naopak velmi častým symptomem je splenomegalie vyskytující se u 40 %-50 % případů (Hochhaus el al., 2017).

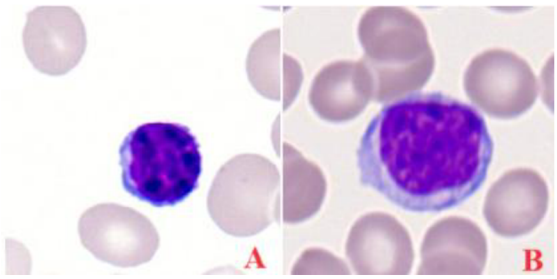
2.1.2.3 Léčba

Obecný mechanismus působení léčiv proti CML v chronické fázi spočívá ve schopnosti léčiva inhibovat ABL tyrosinkinasu (EC 2.7.10.2) kompeticí s ATP potřebným pro aktivaci ABL tyrosinkinasy (Kimura et al, 2014). První volbou pro inhibici ABL tyrosinkinasy je lék imatinib. Účinná terapie tímto lékem minimalizuje dopad prognostických faktorů CML, jako je např. vyšší věk, trombocytóza, splenomegalie, bazofilie apod. (Kantarjian el at., 2012). Před dostupností imatinibu byl standardním režimem léčby interferon v kombinaci s cytarabinem (Baccarani et al., 2002). Při užívání imatinibu byla však u pacientů v akcelerované nebo blastické fázi CML zaznamenána rezistence či intolerance (Deininger et al., 2009), proto musí být často volena léčiva se silnější afinitou k ABL, mezi která patří dasatinib, nilotinib, bosutinib či bafetinib, který je účinný nejen při CML, ale také u Parkinsonovy choroby (Kimura et al., 2014). Pokud odpověď na léčiva není stále dostatečná, nabízí se transplantace krvetvorných buněk či podání interferonu alfa nebo hydroxyurey (Kimura et al, 2014).

2.1.3 Lymfoproliferativní onemocnění

2.1.3.1 Lymfomy

Lymfomy jsou klonální nádorová onemocnění, která vznikají maligní transformací lymfoidních buněk (lymfocytů) (Obr. 2). Tato transformace může postihnout lymfocyty v jakémkoliv stádiu jejich vývoje, a to již od tvorby lymfocytů v primárních lymfoidních orgánech - brzlíku a kostní dřeni (tzv. prekurzorové lymfomy), přes vznik lymfocytů periferních zúčastňujících se imunitních pochodů (T-pomocný lymfocyt), cytotoxických reakcí (NK-buňka, T-cytotoxický lymfocyt) a tvorby imunoglobulinů (plazmatická buňka, B-lymfocy) (tzv. nodální lymfomy) až po vznik konečně diferenciované buňky - plazmocytu (tzv. mnohočetný myelom) (Faber et al., 2012).



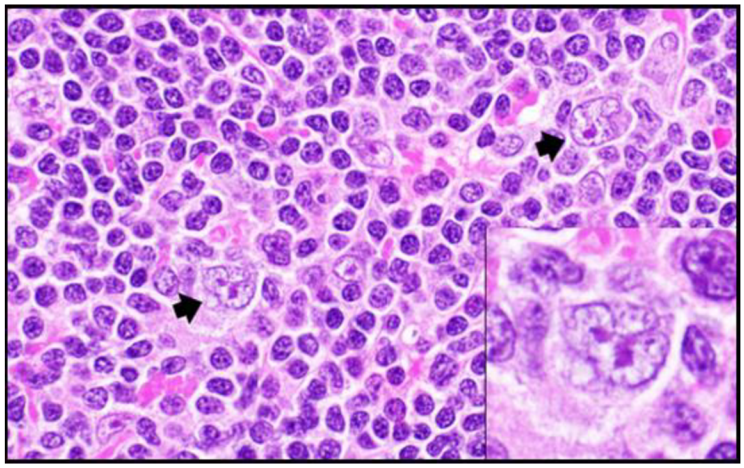
Obr. 2: Abnormální lymfocyt (A) v porovnání se zdravým lymfocytem (B). Převzato a upraveno z Roy & Ameer, 2022.

Klasifikace maligních lymfomů je uvedena v Tab. 1:

Tab. 1: Klasifikace maligních lymfomů dle Faber et al. (2012).

Název maligního lymfomu	Klasifikace maligních lymfomů
Hodgkinův lymfom	Hodgkinův lymfom s převahou nodulárních lymfocytů
	Klasický Hodgkinův lymfom
Nehodgkinské lymfomy z B-buněk	B-lymfoblastická leukemie
	Nádory ze zralých B-buněk (vč. chronické lymfocytární leukemie)
	Mnohočetný myelom
Nehodgkinské lymfomy z T-buněk	B-lymfoblastická leukemie
	Nádory ze zralých T-buněk
	Nádory ze zralých NK-buněk

Hodgkinovy lymfomy, známé i pod názvem Hodgkinova choroba (HD), jsou maligní klonální onemocnění, které jsou odvozeny z postgerminálních B-lymfocytů, které slouží jako podklad pro vznik Sternberg-Reedovy buněk (HRS) (Wang et al., 2019). Nález těchto buněk tvoří společně se zvýšenou sedimentací, leukocytózou, normocytární normochromní anémií a trombocytózou základní klinický obraz. Typická je i vysoká aktivita laktátdehydrogenasy (EC 1.1.1.27) (Faber et al., 2012). Histologický nález lymfocytárních predominantních buněk (LP buňky) je charakteristický pro Hodgkinův lymfom s převahou nodulárních lymfocytů (NLPHL). Tyto buňky (Obr. 3) jsou charakteristické polylobulárním jádrem ve tvaru „popcornu“ a jadérky u okraje membrány, dále bazofilní cytoplazmou (Faber et al., 2012). Klasické Hodgkinovy lymfomy (CHL) představují přibližně 85 % všech případů Hodgkinova lymfomu (Wang et al., 2019). Charakteristické pro tyto lymfomy je přítomnost zánětlivého pozadí (Faber et al., 2012) a přítomnost HRS buněk, které potlačují funkci B-buněk a vykazují defektní expresi imunoglobulinu. Na základě histologických znaků jsou rozlišeny čtyři podtypy CHL, mezi které patří nodulární skleróza, CHL se smíšenou buněčností, CHL s deplecí lymfocytů a CHL bohatá na lymfocyty (Wang et al., 2019).



Obr. 3: Mikroskopický snímek krevních buněk s převahou LP buněk s polylobovanými jádry, zvětšení 600×. Vložka prezentuje LP buňku, zvětšení 1000×. Převzato a upraveno z Wang et al., 2019.

Nehodgkinské lymfomy (NHL) jsou mnohem méně předvídatelné než ty Hodgkinovy a mají mnohem větší předpoklad k šíření do nodálních lokalizací. Nejběžnějšími podtypy NHL jsou difúzní velkobuněčný B-lymfom (30 % četnosti výskytu) a folikulární lymfom (20 % četnosti výskytu), všechny ostatní podtypy NHL mají frekvenci nižší než 10 % (Ekström-Smedby, 2006). Mezi hlavní patogenetické mechanismy patří chronická antigenní stimulace, která zvyšuje proliferaci B-buněk, což vede ke zvýšení pravděpodobnosti náhodné genetické chyby související především s přeuspořádáním imunoglobulinových genů (Fisher & Fisher, 2004). Dalším patogenetickým stimulantem je imunosuprese, zejména ve vztahu k disregulaci nebo supresi funkce T-buněk (např. po transplantaci orgánů nebo při nakažením se virem HIV), což umožňuje proliferaci a transformaci B-buněk řízenou virem Epstein-Barrové, virem hepatitidy C, lidským T- lymfotropním virem, lidským herpes virem 8 či bakterií *Helicobacter pyroli* (Fisher & Fisher, 2004). Klinický obraz je charakteristický vysokou koncentrací laktátdehydrogenasy a β2-mikroglobulinu (Adam et al., 2008).

2.1.3.2 Lymfocytární leukémie

Chronická lymfocytární leukémie (CLL) je charakterizována klonální proliferací a akumulací zralých, typicky CD5-positivních B-buněk v krvi, kostní dřeni, lymfatických uzlinách a slezině (Hallek, 2019). Onemocnění může být často iniciováno chromozomálními translokacemi, jako je delece 11q (18% četnost výskytu), trizomie 12 (16% četnost výskytu), delece chromozomálních oblastí 17p (7% četnost výskytu) a delece 13q, která představuje nejběžnější genomovou aberaci u CLL (55% četnost výskytu) (Klein et al., 2010). Delece na dlouhém raménku chromozomu 13, konkrétně zahrnující pás 13q14 (*del[13q14]*), představují jedinou nejčastěji pozorovanou cytogenetickou aberaci u CLL, která se vyskytuje přibližně v 55 % všech případů (Klein et al., 2010). Delece dlouhého raménka chromozomu 11 (*del[11q]*) lze nalézt přibližně u 25 % pacientů dosud neléčených chemoterapií s pokročilým stadiem onemocnění a u 10 % pacientů s časným stadiem onemocnění. Pacienti s delecí raménka chromozomu 11 mají rychlejší progresi onemocnění a kratší dobu přežití. Trizomie 12 pak je pozorována u 10 % až 20 % pacientů s CLL (Seiffert et al., 2012).

Ve většině případů je diagnóza CLL stanovena krevním obrazem, diferenciálním počtem, krevním nátěrem a imunofenotypizací. Diagnóza vyžaduje přítomnost ≥ 5000 B- lymfocytů/μl v periferní krvi po dobu alespoň 3 měsíců, klonalita cirkulujících B- lymfocytů musí být potvrzena průtokovou cytometrií. V rámci krevního nátěru jsou

leukemické buňky malé s jádrem postrádajícím rozpoznatelná jadérka a majícím částečně agregovaný chromatin (Hallek, 2019). V rámci léčby CLL se při počáteční léčbě využívá perorálně podávaného cytostatika chlorambucilu, dále pak purinových analogů fludarabinu, pentostatinu či kladaribinu (Hallek, 2019). Další druh léčby je založen na zavedení anti-CD20 protilátky rituximab proti CD20 glykosylovanému fosfoproteinu, který je exprimován u většiny B-buněčných malignit (Hagemeister, 2010). Rovněž se využívá látek zaměřující se na signalizaci v buňkách CLL či v jejich prostředí, jako např. idelalisibu či ibrutinibu. Dále se zdá být účinným typem léčby chemoimunoterapie s použitím rituximabu, obinutuzumabu, ofatumumabu či alemtuzumabu (Hallek, 2019).

2.1.3.3 Mnohočetný myelom

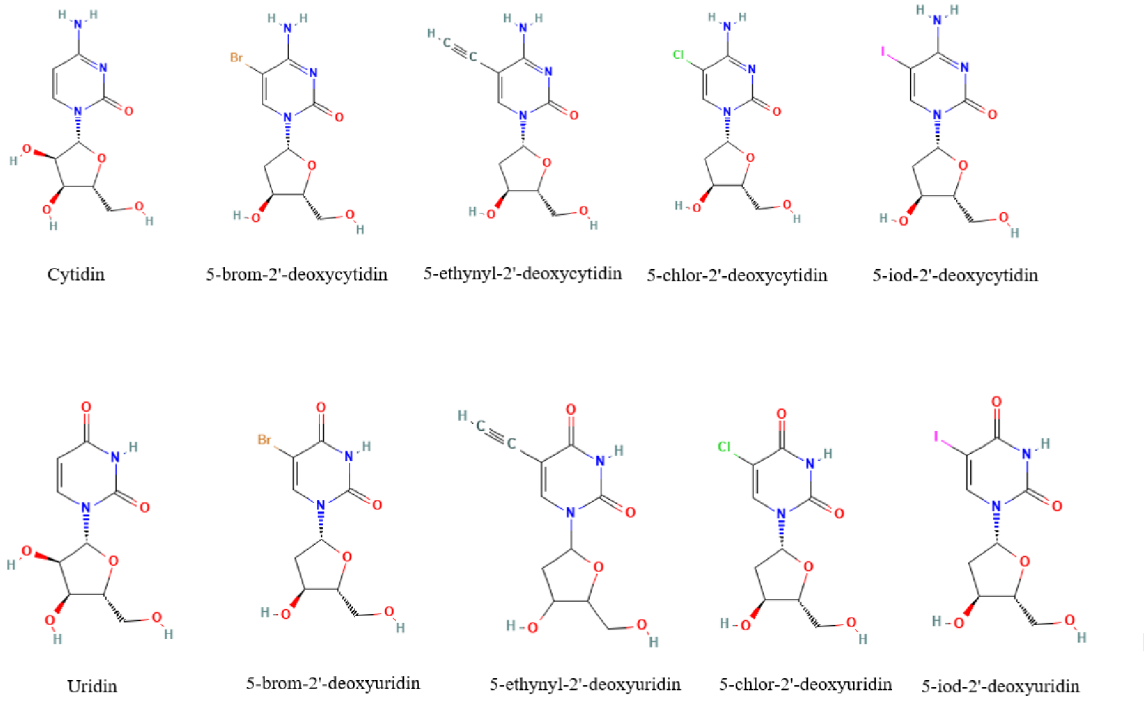
Mnohočetný myelom je charakterizován abnormálními klonálními plazmatickými buňkami v kostní dřeni, s potenciálem pro nekontrolovatelný růst způsobující destruktivní kostní léze, akutní poškození ledvin, anémii a hyperkalcémii (Cowan et al., 2020). Klonální plasmatické buňky mají původ v postgerminálních centrech B- lymfocytů. Vývoj populace klonálních plazmatických buněk napodobuje normální biologické procesy, kdy B-buňky po expozici antigenu proliferují a následně podléhají somatické hypermitaci IgH a IgL *VDJ* sekvence, avšak dochází k nadměrné tvorbě intaktního imunoglobulinu (Anderson & Carrasco, 2011). U téměř všech pacientů začíná mnohočetný myelom jako monoklonální gamapatie neurčitého významu a je spojena s progresí do aktivního (symptomatického) mnohočetného myelomu (Kyle et al., 2018). Klinické projevy typicky zahrnují anémii definovanou jako hladina hemoglobinu <12 g/dl, abnormality (léze) na konvenčních rentgenových snímcích, zvýšená hladina sérového kreatininu, dále pak hyperkalcémii, lymfadenopatii, leukopenii a trombocytopenii (Kyle et al., 2003). S agresivnějším průběhem onemocnění je spojeno extramedulární onemocnění (Usmani et al., 2012). Přibližně u 10 % až 15 % pacientů s mnohočetným myelomem je v průběhu onemocnění diagnostikována souběžná amyloidóza lehkého řetězce imunoglobulinů, která je charakterizována ukládáním špatně složených řetězců v orgánech (Bahlis & Lazarus, 2006). Postižení centrálního nervového systému se obecně projevuje jako postižení hlavových nervů, léčba pak spočívá v podání cytarabinu, methotrexátu nebo kombinací obou látek. V tomto případě je doba přežití krátká (přibližně 7 měsíců) (Jurczyszyn et al., 2016). Obecně se terapie zaměřuje na snížení množství maligních plazmatických buněk v kostní dřeni, čehož se dosahuje maximálním snížením monoklonálního imunoglobulinu (Lonial & Anderson, 2014).

Prognosticky nejvýhodnější je absolutní vymizení M-Ig, avšak jeho koncentrace v krvi často klesá na určitou hladinu, na které zůstává i při dalších cyklech léčby (Adam et al., 2008). Pokrokem v léčbě je pak zavedení inhibitorů proteazomu (např. bortezomib, ixazomib a carfilzomib), imunomodulačních látek (např. thalidomid, lenalidomid či pomalidomid) (Lonial & Anderson, 2014), monoklonálních protilátek proti povrchovým antigenům myelomu (např. daratumumab či elotuzumab) (Cowan et al., 2020) a autologní transplantace krvetvorných buněk (Lonial & Anderson, 2014).

2.2 Nukleosidová analoga

Nukleosidová analoga jsou molekuly vyznačující se podobnými strukturními rysy, avšak odlišnými mechanismy účinku (Ewald et al., 2008). Díky rozmanité škále účinků našla nukleosidová analoga uplatnění především v medicíně jako léčiva používaná v chemoterapii hematologických malignit či k léčbě virových onemocnění (Yoshio et al., 2007), v experimentální biologii při monitorování rychlosti buněčné proliferace a detekci buněčné replikační aktivity (Salic & Mitchison, 2008) či ve farmacii při vývoji léků (Hao et al., 2023).

Jedna z nejběžnějších modifikací při vývoji nukleosidových analog je modifikace ribosové části nukleosidu, kdy je například ribosa nahrazena acyklickými analogy, deoxyfluorovanými sacharidy, analogy karbocyklických sacharidů či analogů sacharidu s menšími (např. pětičlennými) nebo většími (např. šestičlennými) kruhy (Hao et al., 2023). Obr. 4 uvádí příklady pyrimidinových analog odvozených od svých fyziologických nukleosidových protějšků cytidinu a uridinu.



Obr. 4: Příklady pyrimidinových nukleosidových analog vzniklých modifikací svých fyziologických protějšků cytidinu a uridinu. Převzato a upraveno z https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/.

Mechanismus účinku nukleosidových analog souvisí se zachováním si základní nukleosidové struktury, což umožňuje začlenění nukleosidových analog do nově syntetizované DNA během S fáze buněčného cyklu, kdy díky jejich již zmíněným modifikacím je možné nově syntetizovanou DNA odlišit od nereplikující se DNA (Manska et al., 2020). Přímým začleněním do prodlužujících se řetězců DNA pomocí DNA polymeráz nukleosidová analoga uplatňují své cytotoxické účinky získané svou fosforylací narušením syntézy DNA, tedy blokace prodlužování vznikajícího řetězce a zastavení replikačních vidlic. Totoho účinku se využívá v protinádorové léčbě. Nukleosidová analoga však nejsou nádorově specifická léčiva, jejich terapeutický účinek je založen na fázích buněčného cyklu buňky, proto analoga vykazují toxické účinky i v proliferativních normálních tkáních (Tsesmetzis et al., 2018). Naopak některá analoga využívající se při léčbě indolentních onemocnění, tj. onemocnění, při kterých se buňky aktivně nereplikují, mohou přímo iniciovat apoptózu aktivací apoptozomu (Ewald et al., 2008).

Dříve nejběžněji užívaným deoxynukleosidem pro testování replikace DNA, kinetiky buněčného cyklu a výměny sesterských chromatid byl radioaktivním tritiem značený thymidin ([3H]thymidin). [3H]Thymidin inkorporovaný do DNA se obvykle detekoval pomocí autoradiografie. Nicméně tato metoda je velmi pracná a pomalá (detekce může trvat až několik měsíců) a není vhodná pro rychlý a efektivní výzkum. Práce s [3H]thymidinem je náročná díky jeho radioaktivitě, konečné mikroskopické snímky DNA značené tímto analogem mají špatné rozlišení a nízký poměr signálu ku šumu (Salic & Mitchison, 2008). Užívání [3H]thymidinu bylo pro tyto důvody nahrazeno 5-brom-2'-deoxyuridinem (BrdU), vhodným pro hodnocení buněčné proliferace normálních či patologických buněk či pro testování kinetiky buněčného cyklu (Salic & Mitchison, 2008). BrdU je rovněž běžně využíván pro léčbu hematologických malignit. Detekce BrdU se provádí imunologicky prostřednictvím protilátek proti BrdU (anti-BrdU). Na rozdíl od autoradiografie je imunologické barvení BrdU například propidium jodidem rychlejší a umožňuje lepší mikroskopické zobrazení značené DNA (Muramatsu at al., 2024). Jednou z nevýhod užití tohoto analogu je to, že párování komplementárních bazí v DNA blokuje přístup protilátky anti-BrdU k BrdU. Po expozici epitopu BrdU jsou buňky vystaveny silným denaturačním podmínkám barvení (např. koncentrovaná kyselina chlorovodíková či směs methanolu a kyseliny octové), které degradují strukturu vzorku (Salic & Mitchison, 2008).

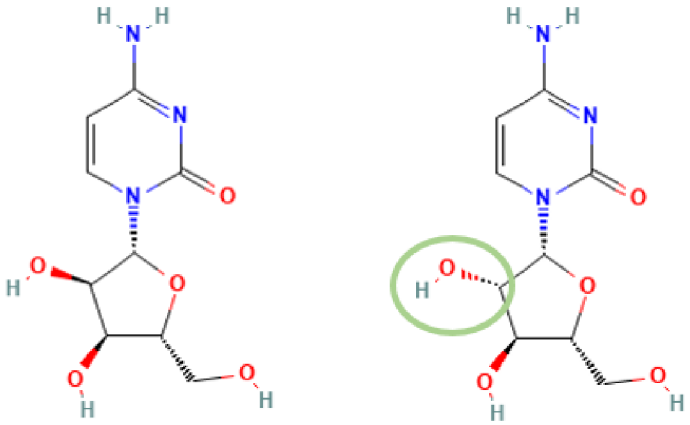
BrdU byl v novějších metodách nahrazen 5-ethynyl-2'-deoxycytidinem (EdC) a 5- ethynyl-2'-deoxyuridinem (EdU), tedy analogy 2'-deoxycytidinu a 2'-deoxyuridinu, k detekci buněčné replikační aktivity (Ligasová et al., 2016). EdU i EdC obsahují koncovou ethynylovou skupinu v poloze 5, která se snadno začlení do buněčné DNA během replikace DNA. Tato skupina je následně detekována prostřednictvím své reakce s fluorescenčními azidy, která je katalyzovaná mědí v oxidačním stupni I (Cu(I)). Jedná se o tzv. reakci „click“ chemie (Salic & Mitchison, 2008). Výhoda využití EdU a EdC oproti užití BrdU spočívá ve snížení počtu specifických kroků, které vyžaduje detekce BrdU, čili celý proces značení je značně urychlen. Na druhou stranu využití těchto analogů je omezováno jejich cytotoxicitou. Cytotoxicita EdU je značně vyšší než cytotoxicita EdC (Ligasová et al., 2016). Cytotoxicita EdU pak vyplývá ze dvou hlavních příčin. První příčinou je inhibice thymidylátsyntasy (EC 2.1.1.45), tedy klíčového enzymu nezbytného pro katalýzu konverze dUMP (deoxyuridin monofosfát) na dTMP (deoxythymidin monofosfát) a konverzi 5,10-methylentetrahydrofolátu na 7,8- dihydrofolát. Druhou příčinou je začlenění EdU do DNA, což má za následek indukci

signální dráhy vedoucí k poškození DNA, kdy uracil-DNA glykosylasa (EC 3.2.2.28) způsobí jednovláknový zlom během excize uracilu. Spuštění této dráhy inhibuje progresi buněčného cyklu, může vést až k apoptóze. Pro snížení cytotoxicity EdU, v souvislosti zachování schopnosti značení DNA, je preferováno využití EdC (Manska et al., 2020). EdC je však před začleněním deaminován cytidindeaminasou (CDA; EC 3.5.4.5) na EdU, které je následně inkorporováno do DNA. Hlavní metabolickou drahou EdC v buňkách je jeho tříkroková fosforylace na 5-ethynyl-2'-deoxycytidintrifosfát (EdCTP), který slouží ve spojení s fluorescenčním značením k analýze dynamiky procesů zaměřených na DNA, jako je oprava DNA, demethylace cytosinu a již zmíněná replikace DNA (Ligasová et al., 2016; Guan et al., 2011).

2.2.1 Cytarabin

Cytarabin (ara-C, 1-β-D-arabinofuranosylcytosin) (Obr. 5) je chemoterapeutikum s antineoplastickou aktivitou využívaný především pro léčbu akutní myeloidní leukémie, rovněž přispívá k vysoké míře kompletní remise tohoto onemocnění, a jiných hematologických malignit (Yamauchi et al., 2009). Často se používá v kombinované chemoterapii, např. v kombinaci s fluorouracilem, methotrexátem a dexamethasonem proti solidním nádorům a leukémiím (Hamada et al, 2002).

Ara-C je nukleosidovým analogem deoxycytidinu, ve kterém byl sacharid ribosa nahrazen arabinosou. Má stejnou molekulovou hmotnost jako cytidin, liší se však trans orientací 2´hydroxylové skupiny, díky čemuž má ara-C podobný metabolismus jako deoxycytidin (Hamada et al., 2002).

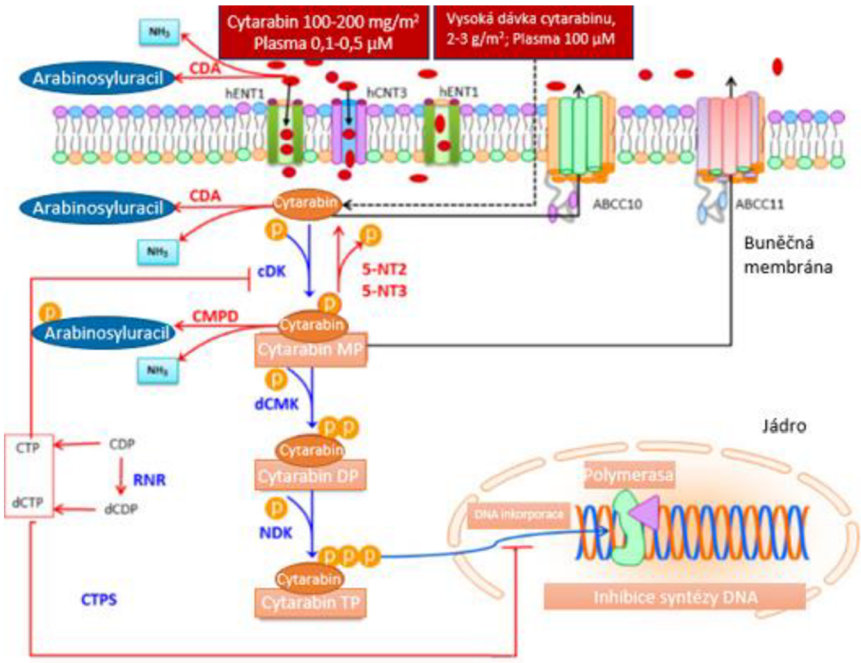


Obr. 5: Porovnání struktur cytidinu a cytarabinu lišící se v prostorové orientaci 2´hydroxylové skupiny (zaznačena zeleně). Převzato a upraveno z https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/.

2.2.1.1 Metabolismus cytarabinu

Cytarabin vyžaduje vzhledem ke svým hydrofilním vlastnostem transport do buněk a následnou intracelulární aktivaci prostřednictvím sekvenční fosforylace na cytotoxickou trifosfátovou formu (Di Francia et al., 2021). Při léčbě s ara-C (Obr. 6) tedy dochází k jeho transportu do leukemických buněk specializovanými nukleosidovými transportními proteiny rodiny SLC, lidskými ekvilibračními nukleosidovými transportéry hENT1 a hENT2 (kódovaných genem *SLC29A1* a *SCL29A2*, v tomto pořadí) (Yoshio et al., 2007) a lidskými koncentračními transportéry hCNT3 (kódované genem *SLC28A3*) (Errasti-murugarren et al., 2007). Vychytávání a akumulace ara-C jsou regulovány transmembránovými transportními proteiny rodiny ABC, konkrétně se jedná o transportní proteiny ABCC4, ABCC5 a ABCC11. Jedná se o proteiny asociující s rezistencí na léčiva, známé též jako MRP proteiny, které rovněž mají schopnost zvyšovat eflux cyklických nukleotidů, které jsou důležitými signálními molekulami v regulaci buněčné proliferace, diferenciace a apoptózy, zejména v rámci krvetvorby (Guo et al., 2009). Vstup cytarabinu do buněk pak silně koreluje s množstvím transportérů hENT1 na buněčném povrchu (Yoshio et al., 2007). V buňce je ara-C enzymem deoxycytidinkinasou (cDK, EC 2.7.1.74) fosforylován na ara-C monofosfát (ara-CMP). Ara-C monofosfát je dále fosforylován deoxycytidinmonofosfátkinasou (EC 2.7.4.14) na ara-C difosfát (ara-CDP) a enzymem difosfátkinasa (EC 2.7.4.6) na ara-C trifosfát

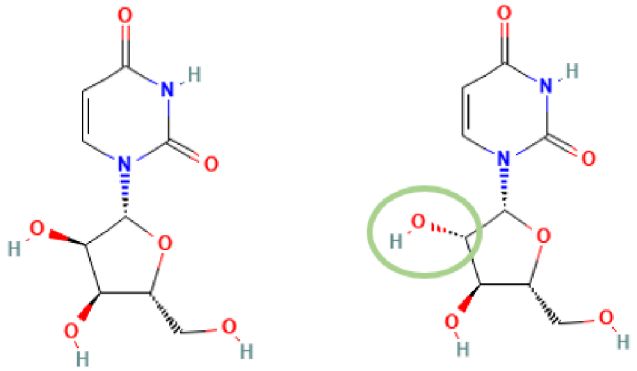
(ara- CTP), tedy na aktivní metabolit ara-C (Yamauchi & Ueda, 2005; Yamauchi et al., 2009). Akumulace ara-C trifosfátu je saturována při plazmatických koncentracích ara-C přesahujících 8-10 µmol/l. Ara-CTP se vyznačuje cytotoxickými účinky, je též inhibitorem DNA polymeras. Kompetitivně se inkorporuje do DNA během S-fáze buněčného cyklu leukemické buňky, čímž dochází k blokaci syntézy DNA na základě inhibice aktivity primeru (Hamada et al., 2002). Kromě aktivace na ara-C trifosfát se ara- C intracelulárně přeměňuje i na minoritní metabolity, jako je např. cytarabin difosfocholin. Jedná se o analog fyziologického lipidového prekurzoru cytidin difosfocholin (Di Francia et al., 2021).



Obr. 6: Schéma metabolismu cytarabinu v leukemické buňce (cDK- deoxycytidinkinasa; dCMK- deoxycytidinmonofosfátkinasa; NDK- difosfátkinasa; CDA- cytidindeaminasa; CMPD- deoxycytidynmonofosfátdeaminasa; RNR- ribonukleotidreduktasa; CTPS- cytidintrifosfátsynthetasa; CTP- cytidintrifosfát; dCTP- deoxycytidintrifosfát; CDP- ; dCDP- ; 5-NT2 a 5-NT3- enzymy rodiny 5'-nukleotidas; hENT1- lidský ekvilibrační nukleosidový transportér; hCNT3- lidskými koncentračními transportéry, ABCC10 a ABCC11- transmembránové transportní proteiny rodiny ABC). Převzato a upraveno z Di Francia et al., 2021.

Po vstupu ara-C do leukemické buňky může však dojít i k jeho přeměně na neaktivní produkt. Aktivita ara-C je pak snížena jeho rychlou deaminací CDA na biologicky neaktivní metabolit uracilarabinosid (ara-U, 1-β-D-arabinofuranosyluracil, Obr. 7) (Hamada et al., 2002). CDA se vyznačuje svou deaminasovou funkcí, která katalyzuje matabolickou přeměnu cytidinu a deoxycytidinu na uridin a deoxyuridin, v tomto pořadí, hydrolýzou aminové části na keton za uvolnění amoniaku. Ve zdravých buňkách deaminace cytidinu přispívá k udržení rovnovážných koncentrací nukleotidů pro syntézu DNA a RNA a je rovněž nezbytná pro katabolismus pyrimidinového cyklu. Při léčbě rakovinných buněk cytarabinem není pro aktivaci cytarabinu aktivita tohoto enzymu žádoucí (Frances & Cordelier, 2020). Účinek ara-C může být též snížen defosforylací ara- CMP cytosolickou 5´-nukleotidasou II (cN-II, EC 3.1.3.5), což vede k blokaci produkce aktivní formy ara-C trifosfát (Yamauchi at al., 2009).

V systémové cirkulaci je ara-C katabolizován ve dvou fázích – s počátečním plazmatickým poločasem (t½α) 7-20 minut a terminálním poločasem (t ½β) 2-3 hodiny, a je následně eliminován močí. Ara-C není pacientům podáván perorálně z důvodu jeho rychlé deaminace především v játrech, slezině a ledvinách. Relativně nízká aktivita CDA je zaznamenána v krevní plasmě, proto je ara-C pacientům podáván intravenózně přerušovanou injekcí nebo kontinuální infuzí po dobu pěti až deseti dnů (Di Francia et al., 2021; Hamada et al, 2002)



Obr. 7: Struktura uridinu a uracilarabinosidu lišící se v prostorové orientaci 2´hydroxylové skupiny (zaznačena zeleně). Převzato a upraveno z https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/.

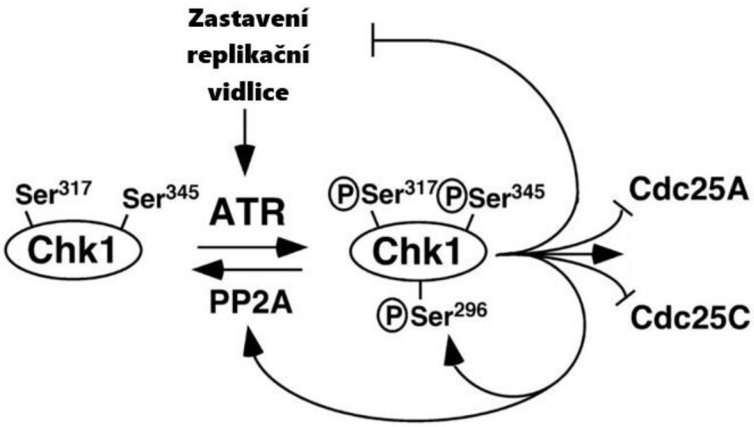
Mechanismus bioaktivace a účinku cytarabinu souvisí s dávkováním tohoto léčiva. Běžně jsou pacientům předepsány dávky 3-10 $mg \cdot m^{-2}$ (nízká dávka), 70-100 $mg \cdot m^{-2}$ (střední dávka) nebo 1-3 $g \cdot m^{-2}$ (vysoká dávka) (Yamauchi & Ueda, 2005).

2.2.1.2 Cytotoxicita cytarabinu

Nukleosidová analoga uplatňují své cytotoxické účinky připodobněním se k endogenním nukleosidům, případně po následující fosforylaci k nukleotidům. To může být zprostředkováno buď inhibicí enzymu, nebo substitucí endogenních nukleosidových druhů jako substrátů, což vede k poškození DNA a RNA a interferenci s methylací DNA (Tsesmetzis et al., 2018).

Pro zvýšení cytotoxicity ara-C a zesílení interakce mezi tímto léčivem a leukemickými buňkami je často volena kombinace léčby ozařováním a užíváním cytarabinu. Léčba ozařováním může napomáhat proti tvorbě rezistence na léčivo. V závislosti na hustotě energie záření může ozařování narušit aktivitu enzymu proteinkinasa C (EC 2.7.11.13) (Horvát-Karajz et al., 2009), který zprostředkovává aktivaci MDRIP-glykoproteinu v leukemických buňkách a tím spouští mechanismus resistence na protirakovinnou léčbu (Shtil at al., 2000).

Regulace enzymu kontrolní kinasa 1 (Chk1; EC 2.7.11.1) vede rovněž ke zvýšení cytotoxicity ara-C, ale i jiných nukleosidových analog. Chk1 je evolučně konzervovaná proteinkinasa, která reguluje progresi buněčného cyklu v reakci na aktivaci kontrolního bodu. Látky, které blokují replikaci DNA, např. cytarabin, nebo způsobují určité formy poškození DNA, indukují fosforylaci lidské Chk1 serin/threonin proteinkinasou ATR (ataxie telangiektasie a kinasa související s Rad3, EC 2.7.11.1). Aktivní Chk1 následně fosforyluje fosfatasu Cdc25A (EC 3.1.3.48), což vede k její degradaci, a dochází k zastavení buněčného cyklu (Obr. 8). Kombinace ara-C s vysoce selektivním inhibitorem pro Chk1 SCH 900776 ještě více zvyšuje účinky cytarabinu (Schenk et al., 2012; Zhao & Piwnica-Worms, 2001).



Obr. 8: Schéma dráhy ATR/Chk1 (Chk1- kontrolní kinasa 1; ATR- ataxie telangiektasie a kinasa související s Rad3; PP2A- proteinová fosfatasa 2; Ser- serotonin; Cdc25A- fosfatasa cyklu buněčného dělení 25A ; Cdc25C- fosfatasa cyklu buněčného dělení 25C). Převzato a upraveno z Schenk et al., 2012.

Pro zvýšení cytotoxické aktivity ara-C se do terapeutických režimů při léčbě AML a CLL začleňují i látky fludarabin, gemcitabin a kladribin. Tyto látky zvyšují akumulaci ara-CTP díky tomu, že působí jako inhibitor ribonukleotidreduktasy (RR, EC 1.17.4.2) (Di Francia et al., 2021). RR přeměňuje ribonukleotidy na deoxyribonukleotidy a je proto klíčovým enzymem v procesech syntézy DNA, opravy poškození DNA, buněčného růstu a přežití. RR je složena z dimerizované velké regulační (RRM1) a malé katalytické (RRM2) podjednotky. Právě RRM1 je inhibována nukleosidovými analogy, jako je například gemcitabin či fludarabin, přičemž inhibice RR vyčerpává intracelulární zásoby deoxyribonukleotidů a jejich trifosforylovaných forem (dNTP) (Karp et al., 2008).

2.2.1.3 Rezistence na cytarabin

Indukční terapie s cytarabinem vede ke kompletní remisi u 50-70 % dospělých lidí trpících akutní myeloidní leukemií a zahrnuje rovněž i postremisní část s 1-2 cykly střední nebo vysoké dávky ara-C. Nicméně i přes užití této terapie jsou zaznamenány případy osob s relapsem AML. Rezistence na cytarabin je pak jednou z možných příčin selhání léčby cytarabinem (Wu et al., 2021).

Biologický mechanismus základní rezistence na cytarabin není stále objasněný. Mezi faktory ovlivňující citlivost na cytarabin mohou patřit např. nedostatek membránových transportérů pro ara-C či snížená aktivita cDK (Yin et al., 2006). Leukemické buňky, vykazující nedostatek tohoto enzymu, vykazují pak menší inhibici syntézy DNA cytarabinem. Jedním z možných přístupů k překonání tohoto problému je léčba

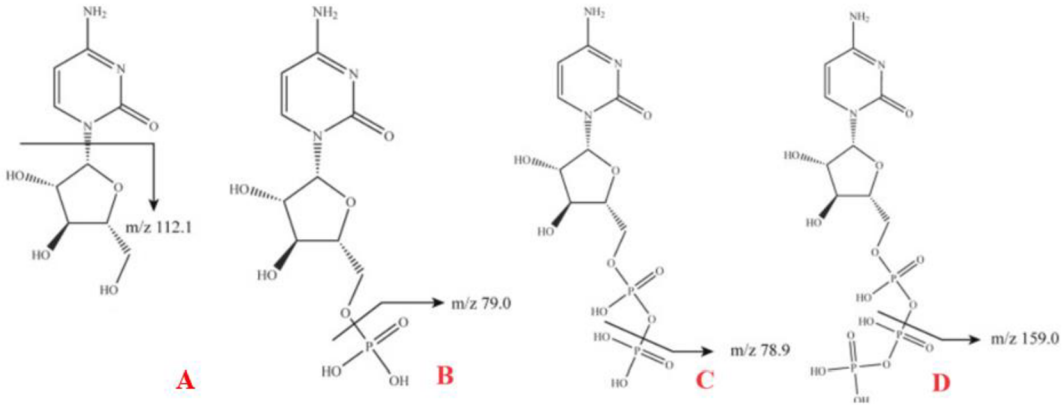
3- deazauridinem (3-DU). 3-DU je kompetitivním inhibitorem CTP synthetasy (EC 6.3.4.2), který snižuje hladiny cytidintrifosfátu (CTP) a deoxycytidintrifosfátu (dCTP), který je silným inhibitorem cDK zajišťující fosforylaci ara-C. Snížení koncentrace dCTP vede ke zvýšené rychlosti fosforylace ara-C, což vede ke zvýšení cytotoxicity ara-C a jeho následné inkorporaci do DNA leukemických buněk (Momparler, 2013). Dalšími faktory ovlivňující rezistenci na cytarabin mohou být zvýšená exprese CDA či deoxycytidinmonofosfátdeaminasy (CMPD, EC 3.5.4.12) přeměňující ara-C a ara-CMP a na neaktivní metabolity uracilarabinosid a arabinosyluracilmonofosfát, které jsou vedlejším produktem léčiva (Di Francia et al., 2021), či zvýšená intracelulární hladina dCTP v leukemických buňkách, který je inhibuje aktivitu cDK, jak již bylo popsáno výše (Yin et al., 2006). Rezistence může být též spojena s mutacemi v genech *TP53*, *NF1* či v dalších genech (Wu et al., 2021), kdy například mutace genu *TP53* vede k horší prognóze onemocnění a je faktorem krátkého přežití (Yin et al., 2006). Jedním z možných přístupů ke studiu rezistence spojené s genovými mutacemi je molekulárně genetická analýza k určení změn, které se objevily během vývoje rezistence (Wu et al., 2021).

Rezistenci na ara-C i jiná nukleosidová analoga lze z klinického hlediska interpretovat tak, že koncentrace pacientovy podávané látky nutné k vyléčení rakoviny nelze dosáhnout z důvodu nepřijatelných toxicit. To tedy znamená, že klinická rezistence na nukleosidová analoga může být způsobena i tím, že terapeutické dávky nelze podávat kvůli výši toxickým účinkům. Výsledkem je, že ačkoliov je dané léčivo účinné proti rakovinným buňkám, pacient nemůže tolerovat dostatečně vysoké dávky k dosažení terapeutického efektu (Tsesmetzis et al., 2018).

2.3 Analytické metody studia vlivu metabolických cest cytidinu

Metabolity přítomné v biologických vzorcích mohou mít širokou škálu fyzikálně-chemických vlastností, jako jsou polarita, rozpustnost, těkavost, určitá molekulová hmotnost daného metabolitu nebo jeho koncentrace ve vzorku. Vzhledem k rozmanitosti fyzikálně-chemických vlastností je současná charakterizace všech metabolitů obtížná a vyžaduje kombinaci technik k rozšíření profilu metabolitů. Pro přesnou detekci a charakterizaci metabolitů se využívá nejmodernějších analytických přístrojů a technologií, mezi které patří například nukleární magnetická rezonance, plynová chromatografie spojená s hmotnostní spektrometrií, kapalinová chromatografie spojená s hmotnostní spektrometrií, případně kapilární elektroforéza opět kombinovaná s hmotnostní spektrometrií (Shao et al., 2021; Nath & Dias, 2023).

Měření intracelulárních koncentrací terapeutických nukleosidtrifosfátů je kvůli přítomnosti vysokých hladin endogenních sloučenin náročné (Crauste et al., 2009). Vývoj metody pro současné stanovení ara-C a jeho intracelulárních metabolitů proto představoval mnoho problémů. Ara-C je analog a stereoisomer cytidinu, čili ara-C a jeho fosfátové formy ara-CMP, ara-CDP a ara-CTP mají podobné struktury a molekulovou hmotnost jako CMP, CDP a CTP. V případě metody LC-MS za využití trojitého kvadrupólu to tedy znamená podobnou retenci a stejný hmotnostní přechodový iontový pár (Obr. 9), jako který tvoří endogenní nukleosidy a nukleotidy (Huang et al., 2022). Endogenní CTP a ara-CTP vykazují rovněž stejnou molekulovou hmotnost (Crauste et al., 2009). Fofátové formy ara-C mají i podobné profily fragmentace, proto všechny tyto analyty spolu při hmotnostní detekci vzájemně interferují. Potíže vyplývají i ze silné polarity těchto látek, která brání jejich retenci při chromatografii na reverzní fázi za použití typických vodně-organických mobilních fází. Možným řešením tohoto problému je užití analytické metody LC-MS/MS, která využívá činidel iontových párů, např. diethanolamin, trimethylamin či dimethylhexylamin (Huang et al., 2022). Též jsou optimalizovány parametry hmotnostní spektrometrie pro každý analyt. V případě ara- CMP, ara-CDP a ara-CTP jsou intenzity signálu vyšší v negativním iontovém módu než v pozitivním. Naopak odezva ara-C je významně vyšší v pozitivním módu (Liang et al., 2014). Pro klinické sledování koncentrací ara-C v leukemických buňkách na úrovni DNA je využívána HPLC s elucí pomocí mobilní fáze A: mravenčan amonný a mobilní fáze B: acetonitril a využitím kolon s porézním grafitickým uhlíkem (Hypercarb kolony) či katexových kolon (Yamauchi & Ueda, 2005; Huang et al., 2022).



Obr. 9: Chemické struktury a příklady fragmentací ara-C (A), ara-CMP (B), ara-CDP (C) a ara-CTP (D). Převzato a upraveno z Huang et al., 2022.

2.3.1 Nukleární magnetická rezonance

Jednou z prvních technik aplikovanou na metabolomickou analýzu byla nukleární magnetická rezonance (NMR, Nuclear magnetic resonance) (Shao et al., 2021).

NMR je metoda sloužící ke studiu magnetických vlastností a souvisejících energií jader. Je typem spektroskopie založené na interakci mezi hmotou a elektromagnetickým zářením. Využívá radiofrekvenční energie v rozsahu 10-1000 MHz, která je absorbována jádry hmoty umístěné do silného elektromagnetického pole. Toto magnetické pole vzniká působením supravodivých magnetů, tzv. kryomagnetů (de Graaf, 2019). NMR následně využívá energetických změn atomových jader v magnetickém poli k získávání informací o zkoumaném buněčném jádře. Běžně jsou využívány techniky s izotopovým značením ^{13}C-NMR, ^{15}N-NMR, ^{3}P-NMR, nejčastěji ^{1}H-NMR (Shao et al., 2021).

Mezi hlavní výhody NMR patří identifikace neznámých sloučenin s objasněním jejich struktur, nedestruktivní analýza a vysoké rozlišení. Nevýhodou může být nízká citlivost, která však může být vylepšena zvýšením síly magnetického pole a zavedením kryogenně chlazených sond. Nevýhodou může být i vyšší počet vzorků v rámci jedné analýzy, kdy značné překrytí signálů v NMR by mohlo ztížit identifikaci a správnou integraci píků. Nicméně vývoj hardwaru NMR a použití dvourozměrné NMR může alespoň částečně vyřešit problém překrývání píků (Shao et al., 2021; Nath & Dias, 2023).

V metabolomice, v souvislosti s lékařským odvětvím, našla metoda NMR využití v monitoringu léčby cílené proti rakovinným buňkám. Příkladem může být kombinace léčiv cytarabinu a methotrexátu za využití liposomů k transportu těchto léčiv k nádorovým buňkám. NMR pak slouží k analýze vzájemné interakce mezi oběma léčivy

a zmíněnými fosfolipidy (Pentak et al., 2016). Ve farmaceutické oblasti je běžně využívána kvantitativní NMR (qNMR) při současné identifikaci a kvantifikaci léčiva a při stanovení čistoty léčiva. qNMR poskytuje oproti jiným analytickým metodám, které vyžadují kalibraci specifickou pro analyt, kvantifikaci vícesložkového vzorku pomocí jediného referenčního standardu, která vychází z přímé úměry mezi intenzitou signálu a rezonančními protony. V rámci farmaceutického průmyslu je qNMR užívána i pro standardizaci rostlinných léčiv obsahujících fytochemikálie, jako jsou terpenoidy a flavonoidy (Khalil & Kashif, 2023).

2.3.2 Chromatografické metody ve spojení s hmotnostní spektrometrií

Chromatografie je separační metoda, objevena ruským botanikem M. S. Cvětem (Tswett, 1903), která umožňuje separaci, identifikaci a purifikaci složek směsi pro kvalitativní a kvantitativní analýzu. Chromatografie je založena na principu separace složek analytu mezi dvěma fázemi – stacionární fází (pevná látka či vrstva adsorbované kapaliny na povrchu pevné látky) a mobilní fází (kapalná či plynná látka) (Coskun, 2016). Po nástřiku vzorku do systému vzorek interaguje se stacionární fází, transport složek vzorku přes stacionární fázi je zajištěn kontinuálním průtokem mobilní fáze. Distribuce jednotlivých složek vzorku je závislá na relativní afinitě dané složky k fázím, na molekulární struktuře a mezimolekulárních silách. Složky s vysokou afinitou ke stacionární fázi se budou systémem pohybovat pomaleji (jedná se o tzv. retenci) než složky s nižší afinitou ke stacionární fázi, které budou systémem migrovat naopak rychleji. V průběhu analýzy kolonu později opouští tedy ty látky, které vykazují vyšší retenci a látka má proto delší retenční čas než látky s nižší afinitou ke stacionární fázi. Výsledné kvalitativní a kvantitativní informace o analýze poskytuje chromatogram – závislost odezvy detektoru na čase (Robards & Ryan, 2021).

2.3.2.1 Plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií

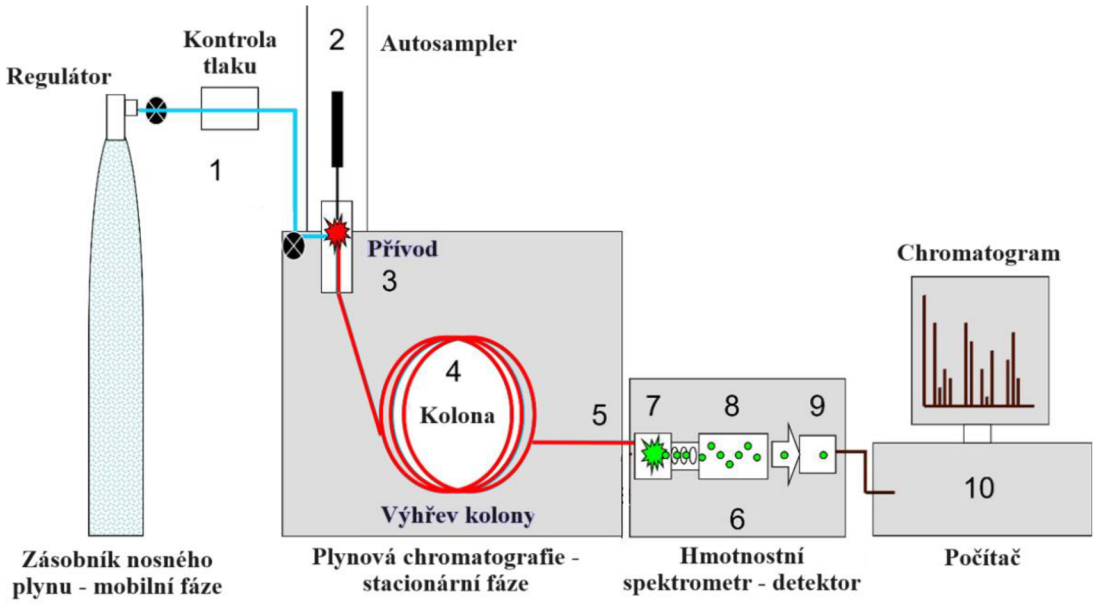
Plynová chromatografie spojená s hmotnostní spektrometrií (GC-MS) je analytická metoda, která kombinuje separační schopnost plynové chromatografie s identifikací založené na přesném měření hmotnosti pomocí MS. GC-MS je metoda vhodná pro identifikaci a objasnění struktury neznámých těkavých a polotěkavých organických sloučenin (Špánik & Machyňáková, 2018). V metabolomických studiích je považována za jednu z nejúčinnějších a reprodukovatelných analytických technik, především pro všestrannou detekci sloučenin s širokou škálou molekulových hmotností a polarit. Řada

sloučenin, které nemají těkavé vlastnosti, bývají před analýzou derivatizovány (Nath & Dias, 2023).

Při analýze pomocí GC (Obr. 10) prochází vzorek analytu získaný v předešlém extrakčním kroku chromatografickou kolonou složenou ze stacionární a mobilní fáze. Mobilní fázi v případě GC tvoří plyn, tzv. nosný plyn. Plyn musí mít vysoký stupeň čistoty a neměl by obsahovat kyslík ani vodní páru, které by mohly poškodit kolonu. Nejběžněji využívaným plynem je vodík, helium nebo dusík (Nath & Dias, 2023). Obecně se dá využít více druhů plynů, které však nesmí reagovat se složkami vzorku ani s materiálem, ze kterého je kolona sestrojena (Waters, 2020). V GC se běžně využívají dva typy kolon – kolony plněné a kolony kapilární. Preferovanější jsou kapilární kolony z důvodu lepšího separačního rozlišení. K oddělení dochází na základě bodu varu sloučeniny a její interakce se stacionární fází (Nath & Dias, 2023). Vzorek analytu je tedy speciálním ventilem v malém množství vstříknut do proudícího nosného plynu v koloně, vzorek se po vstříknutí okamžitě vypařuje. Nosný plyn unáší teď již vzorek plynu kolonou, kde se dostává do kontaktu se stacionární fází, která zajišťuje požadovanou separaci (Waters, 2020).

Nejvíce využívané uspořádání pro následnou analýzu látek separovaných pomocí GC je GC-MS, které je schopné detekovat všechny ionizovatelné sloučeniny a získat hmotnostní spektra v každém časovém bodě, což poskytuje informace o struktuře sloučenin (Nath & Dias, 2023). Nejběžněji se pak užívají hmotnostní analyzátory typu kvadrupól, iontová past, analyzátory doby letu či magnetický sektorový hmotnostní analyzátor (Kang, 2012).

GC může být spojena s různými detektory, jako jsou detektor tepelné vodivosti (TCD, thermal conductivity detector), plamenový ionizační detektor (FID, flame ionization detector), plamenový fotometrický detektor (FPD, flame photometric detector), fotoionizační detektor, detektor elektronového záchytu, heliový ionozační detektor nebo detektor s pulzním výbojem (Waters, 2020).



Obr. 10: Zjednodušené schéma GC-MS znázorňující nosný plyn (1), autosampler (2), přívod (3), analytickou kolonu (4), rozhraní (5), vakuum (6), iontový zdroj (7), hmotnostní analyzátor (8), detektor (9) a PC (10). Převzato a upraveno z https://www.technologynetworks.com/analysis/articles/gc-ms-principle-instrument-and-analyses-and-gc-msms-362513.

2.3.2.2 Kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií

Kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií (LC-MS) se stala dominantní analytickou technikou v oblasti globálního profilování metabolitů. Jejími výhodami jsou přímá injekce extraktů, snadná příprava vzorků a snadná extrakce, kdy na rozdíl od GC-MS není předpokladem derivatizace (Nath & Dias, 2023).

V rámci metabolomických analýz metodou LC-MS je užíváno několik typů kapalinové chromatografie, mezi které patří například chromatografie s reverzní fází (RP-LC, reversed-phase liquid chromatographic), s normální fází (NP-LC, normal-phase liquid chromatography), chromatografie s hydrofilní interakcí (HILIC, hydrophilic interaction chromatography) či iontově výměnná chromatografie (IEX, ion-exchange chromatography) (Zhou et al., 2012). RP-LC využívá pro separaci semipolárních sloučenin, jako jsou fenolové kyseliny, flavonoidy, glykosylované steroidy, alkaloidy či další glykosylované látky (Zhou et al., 2012), nepolární stacionární fáze a polární vodně-organické mobilní fáze. Retence se pak zvyšuje se zvýšením hydrofobicity rozpuštěných látek, povrchu stacionární faźe a s polaritou mobilní fáze (Rafferty et al., 2007). V režimu NP-LC vykazuje stacionární fáze vyšší stupeň polarity než fáze mobilní. V důsledku toho pořadí eluce závisí na polaritě analytů, tedy nejprve probíhá eluce hydrofobních sloučenin, následně pak hydrofilních sloučenin (Žuvela at al., 2019). Silně hydrofilní sloučeniny, které nelze analyzovat systémem NP-LC kvůli jejich ireverzibilní adsorpci a nedostatečné rozpustnosti v nepolárních či slabě polárních mobilních fázích, lze analyzovat v režimu HILIC (Jandera, 2011). Separační vlastnosti tohoto režimu silně závisí jak na stacionární fázi a složení mobilní fáze, tak na polárních, hydrofobních či iontoměničových interakcí, které přispívají k odlišné retenci sloučenin (Jandera, 2011). HILIC pak využívá polární stacionární fáze, např. aminopropylové kolony (Zhou et al., 2012), a vodně-organické mobilní fáze s obsahem organického rozpouštědla vyšším než 50 % (Jandera & Janás, 2017), proto je HILIC vhodnou metodou k separaci polárních sloučenin jako jsou sacharidy, aminokyseliny, vitaminy, karboxylové kyseliny, nukleotidy apod. (Zhou et al., 2012). IEX je z klinického hlediska široce využívanou metodou pro charakterizaci terapeutických proteinů a pro kvalitativní a kvantitativní hodnocení jejich náboje. Kladně nabité molekuly lze separovat pomocí kolon katexové chromatografie (CEX, cation-exchange chromatography), které obsahují záporně nabité kyselé funkční skupiny. Kolony anexové chromatografie (AEX, anion-exchange

chromatography) jsou tvořeny stacionární fází kladně nabitých funkčních skupin, které jsou schopné vázat záporně nabité molekuly (Fekete et al., 2015).

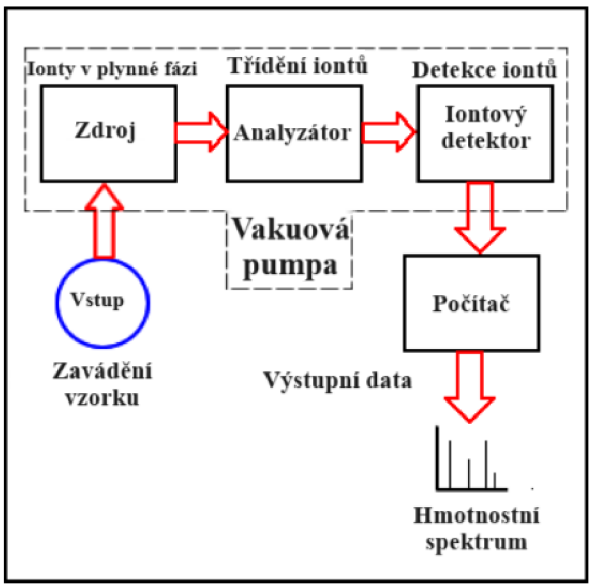
V oblasti metabolomiky v klinických aplikacích našla užití především kapalinová chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií (LC-MS/MS) v rutinních aplikacích. Metoda je rovněž nepostradatelnou v diagnostice dědičných metabolických poruch, jako je například galaktosémie, kdy je LC-MS/MS využívána pro měření aktivity enzymů metabolizujících galaktosu, ke stanovení monofosfátu hexosy v zaschlých krevních skvrnách (Jensen et al., 2001) či ke stanovení markerů různých onemocnění jako je například leucinosa, kdy je metoda využívána pro stanovení koncentrací propionylkarnitinu, leucinu, isoleucinu, valinu či hydroxyprolinu (Matern et al., 2007). Ve studiích nádorových onemocnění našla metoda využití ke stanovení rakovinných markerů (Spratlin et al., 2009), rovněž pak pro stanovení léčiv a jejich metabolitů, například léčiva cytarabinu a jeho fosfátových metabolitů v cytosolu a jádře leukemické buňky (Huang et al., 2022). V klinickém využití našla využití rovněž v analýze metabolitů a biomarkerů kardiovaskulárních onemocnění a diabetu 2. typu (Newgard et al., 2009).

2.3.2.3 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie (MS) je analytická technika, kterou lze využít pro detekci, k určení elementárního složení a molekulární struktury analytu. Má jak kvalitativní, tak kvantitativní využití (Watson & Sparkman, 2007). Základním principem MS je převod vzorku do plynného skupenství a následná ionizace molekul plynu pomocí iontového zdroje za vzniku iontových molekul. Tyto molekuly následně podléhají fragmentaci na ionty různého poměru m/z (poměr hmotnosti iontů ku jejich náboji), které procházejí hmotnostním analyzátorem až k detektoru. Když se ionty srazí s detektorem, dojde k tvorbě elektrického signálu, který je převáděn do digitální odpovědi, kterou může počítač následně uložit. MS tedy charakterizuje zkoumané molekuly na základě poměru m/z (Kang, 2012). Výsledným záznamem analýzy MS je hmotnostní spektrum charakterizující závislost četnosti iontů (tedy intenzity signálu) na poměru m/z (Watson & Sparkman, 2007).

Hmotnostní spektrometry se tedy skládají ze tří hlavních částí – iontového zdroje, hmotnostního analyzátoru a detektoru. Iontový zdroj převádí vzorek v plynné fázi na ionty, hmotnostní analyzátor pak tyto ionty třídí na základě m/z pomocí

elektromagnetického pole, detektor poskytuje data pro zisk informací o každém iontu (Kang, 2012). Zjednodušené schéma analýzy pomocí MS je znázorněno na Obr. 11.



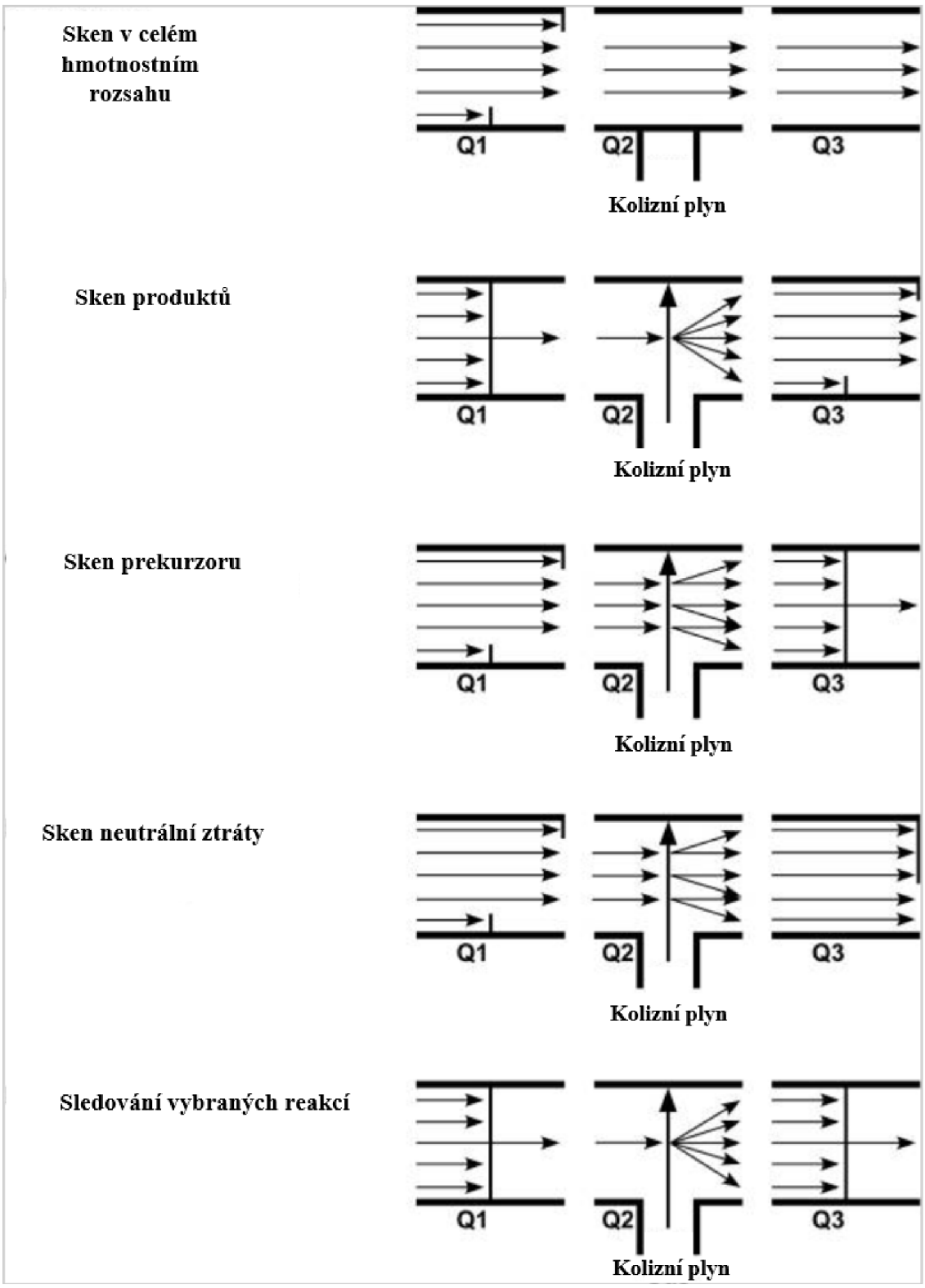
Obr. 11: Základní schéma znázorňující jednotlivé části hmotnostního spektrometru. Převzato a upraveno z Kang, 2012.

Typů iontových zdrojů, respektive ionizačních metod, existuje mnoho. Jedná se především o chemickou ionizaci za atmosférického tlaku (APCI, atmospheric pressure chemical ionization), matricí asistovanou laserovou desorpci/ ionizaci (MALDI, matrix-assisted laser desorption ionization), desorpci/ ionizaci na křemíku (DIOS, desorption/ ionization on silicon), ionizaci rychlým bombardováním atomů/ iontů (FAB, fast atom/ ion bormbardment), elektronovou ionizaci (EI, electron ionization) či chemickou ionizaci (CI, chemical ionization) (Kang, 2012). V oblasti metabolomiky se však nejvíce preferovanou ionizační metodou stala elektrosprejová ionizace (ESI, electrospray ionization), především pak ve spojení hmotnostní spektrometrie s elektrosprejovou ionizací s kapalinovou chromatografií (LC/ESI-MS) (Tugizimana at el., 2018). ESI je typ ionizace, při kterém dochází působením elektrického pole k rozprášení eluentu z LC kolony. Do MS je sprejovací kapilárou přiváděn přes sondu eluent z LC v rozpouštědle. Mezi tuto kapiláru a vstupem do komory s vakuem je vkládáno vysoké napětí. Elektrické pole polarizuje rozpouštědlo čímž dochází k akumulaci iontů se stejným nábojem ve špičce kapiláry v tzv. menisku kapaliny. Pokud elektrické pole vykazuje určitou intenzitu, meniskus kapaliny se deformuje a vzniká Taylorův kužel z jehož vrcholu vyvěrá proud kapaliny. Proud se ihned rozpadá za vzniku nabitých kapek. Tyto kapky jsou stejně nabité, proto se vzájemně odpuzují, což vede k tvorbě spreje. Rozpouštědlo se poté odpaří pomocí desolvatačního ohřívače. Ionty analytu jsou následně převedeny extrakčním kuželem do analyzátoru (Lemr & Borovcová, 2020; Tugizimana at el., 2018).

Tak, jako se při hmotnostní detekci využívá vícero typů iontových zdrojů, existuje rovněž i mnoho typů hmotnostních analyzátorů. Především se jedná o sektorový analyzátor, analyzátor doby letu (TOF, time-of-flight), kvadrupólový analyzátor, kvadrupólová iontová past či lineární kvadrupólová iontová past (LIT, linear quadrupole ion trap), orbitrap nebo analyzátor využívající cyklotronové iontové rezonance s Fourierovou transformací (FT-MS, Fourier transform mass spectrometry) (Kang, 2012). V oblasti metabolomiky jsou preferovány především analyzátory TOF, kvadrupólový analyzátor a orbitrap (Liu et al., 2019). Princip TOF analyzátoru spočívá v tom, že ionty se stejnou energií ale s různými poměry m/z se analyzátorem pohybují různou rychlostí, a proto jim trvá různou dobu, než projdou drahou v analyzátoru. Aplikací periodicky se měnícího nebo pulzního elektrického pole v určitých částech dráhy lze iontům udělit různou energii a rychlost, čímž je umožněno jejich oddělení a postupná interakce s detektorem (Mamyrin, 2001).

Kvadrupólový analyzátor je složen ze čtyř paralelních pólů, které jsou tvořeny kovovými tyčemi, umístěných v rozích čtverce. Na tyče je aplikováno napětí, dvojice protilehlých tyčí mají pak stejnou polaritu. Podstatou analyzátoru je oscilující elektrické pole, které působí na trajektorii pohybujících se iontů, které tímto polem procházejí (Havlíček & Tureček, 2020). Orbitrap funguje na principu orbitálního zachycování iontů kolem axiální centrální elektrody s elektrostatickým polem. Zachycené ionty podléhají rotaci kolem centrální elektrody a harmonickým oscilacím podél její délky. Poměr m/z zachycených iontů je vztažen k frekvencím jejich harmonických kmitů (Dass, 2007).

Tandemová hmotnostní spektrometrie (MS/MS) může využívat spojení dvou či více analyzátorů. MS/MS lze pak popsat dvěma způsoby. V prvním případě MS/MS využívá dvou hmotnostních analyzátorů za sebou, tzv. MS/MS v prostoru, kdy k izolaci prekurzorového iontu a ověření jeho molekulové hmotnosti je využíván první analyzátor. Prekurzorový ion následně podléhá fragmentaci srážkou s inertním plynem. Ionty vzniklé touto fragmentací jsou následně analyzovány druhým hmotnostním analyzátorem. Druhým případem je tzv. MS/MS v čase využívající analyzátory typu iontové pasti, FT-MS či orbitrap, kdy analyzátor zachytí již specifický ion (Madeira & Florêncio, 2012). MS/MS v prostoru naopak využívá kvadrupólových analyzátorů, např. trojitý kvadrupól, TOF či trojitá kvadrupólová lineární iontová past (QTRAP, triple-quadrupole-linear ion trap). V případě trojitého kvadrupólu je využíváno spojení třech kvadrupólových analyzátorů. První kvadrupólový analyzátor provádí scan prekurzorového iontu a ověří jeho molekulovou hmotnost. Prekurzorový ion je následně podroben ve druhém kvadrupólovém analyzátoru, který funguje jako kolizní cela, fragmentaci na ionty s nižší molekulovou hmotností. Do analyzátoru je zaváděn kolizní plyn, který se střetne s prekurzotovým iontem, čímž dochází k narušení vazeb, tedy ke zmíněné fragmentaci. Z druhého analyzátoru přechází ionty do třetího kvadrupólového analyzátoru, kde jsou ionty vzniklé fragmentací selektovány dle m/z (Xie et al., 2021). Pro MS/MS v prostoru se nabízí široké spektrum metod analýzy (Obr. 12) – sken v celém hmotnostním rozsahu, sken produktů, sken prekurzoru, sken neutrální ztráty, sledování vybraných reakcí (MRM, multiple reaction monitoring) (Grebe & Singh, 2011). V oblasti cílené metabolomiky je preferována anylzýza MRM, pro kterou je důležitá znalost a optimalizace přechodu iontových párů a jejich odpovídající hmotnostní parametry. První analyzátor je zaměřen na m/z prekurzorového iontu, druhý pak na m/z všech možných produktových iontových přechodů, které jsou současně analyzovány ve vysokém rozlišení a s vysokou přesností (Liu et al., 2019).



Obr. 12: Metody analýzy MS/MS v prostoru. Q1 – první kvadrupólový analyzátor pro scan prekurzorového iontu, Q2 – kolizní cela s přívodem kolizního plynu, Q3 – třetí kvadrupólový analyzázor skenující ionty dle m/z. Převzato a upraveno z Grebe & Singh, 2011.

2.3.3 Kapilární elektroforéza s hmotnostní spektrometrií

Další separační metodou v metabolomice, avšak dnes již ne tak užívanou, je kapilární elektroforéza (CE, capillary electrophoresis) (Nath & Dias, 2023).

Zatímco GC je omezena na těkavé a termostabilní sloučeniny, LC se vyznačuje schopností separovat semipolární sloučeniny. Protože spousta metabolitů je silně polárních na to, aby byly zadrženy na kolonách reverzních fází, je vhodné užití kapilární elektroforézy ve spojení s hmotnostní spektrometrií (CE-MS). Obecné výhody CE jsou nízká spotřeba vzorku, rychlá a nízkonákladová analýza, účinná separace a není potřeba náročné předúpravy vzorku pro analýzu. Nevýhodou může být nízká citlivost ke koncentracím, kterou lze zmírnit spojením s tandemovou hmotnostní detekcí (Nath & Dias, 2023).

CE-MS je vhodná například pro identifikaci a kvantifikaci glykoalkaloidů (Nath & Dias, 2023). Při spojení těchto dvou technik konečný výsledek silně závisí na charakteristikách rozhraní a typu hmotnostního spektrometru (Barbas et al., 2011), kdy v rámci biomolekulárních analýz se nejčastěji využívá ionizace ESI a MALDI. V metabolomice je však více preferováno ESI (Monton & Soga, 2007). MALDI není v metabolomice široce užívána kvůli silné interferenci matricových iontů při detekci sloučenin s nízkou molekulovou hmotností, své uplatnění však našla v proteomice (Edwards & Kennedy, 2005). V případě ESI je pak využíváno dvou typů rozhraní, které slouží jako propojení technik CE a MS. Prvním typem rozhraním je plášť-tok (sheath-flow). Toto rozhraní využívá přídavný tok kapaliny, která se mísí s analytem eluovaným z kapiláry CE. Tento tok slouží k vytvoření elektrického kontaktu mezi elektrodou a elektrolytem pozadí uvnitř kapiláry, dále slouží k úpravě CE elektrolytu tak, aby byl co nejvíce kompatibilní s ESI a následnou MS detekcí (Maxwell & Chen, 2008). Druhým typem rozhraní je bezplášťové rozhraní, které využívá elektrosprejový zářič. Zářič je umístěn na výstupu kapiláry CE a je potažen vodivým materiálem pro zajištění elektrického kontaktu pro CE i ESI. Napětí ESI-MS je poté aplikováno na vodivý povlak nanesený na vnějším povrchu hrotu zářiče (Sanz-Nebot et al., 2005). Zářiče mají však omezenou životnost kvůli mechanickému poškození povlaku, proto mohou být nahrazovány bezelektrodovým nanosprejovým rozhraním. Pokud je emitor umístěn velmi blízko hmotnostnímu analyzátou, je napětí přiváděné do oddělení s pufrem schopno řídit CE, iniciovat a udržovat nanosprej, ačkoliv není na emitor spreje přiváděno žádné napětí (Gysler et al., 2000).

V metabolomice našla metoda CE-MS využití jako citlivá analýza nederivatizovaných aminokyselin v lidském séru (Jeong et al., 2012), jako současná analýza devíti endogenních nukleotidů v plazmě potkanů (Bhowmik & Jung, 2012). V rámci biomedicínské a klinické aplikace našla metoda uplatnění při komplexním profilování volných estrogenů a jejich intaktních glukuronidových a sulfátových konjugátů (Kuehnbaum & Britz-Mckibbin, 2011), při purifikaci metabolitů pro necílené metabolické profilování lidských buněk rakoviny tlustého střeva (Simó et al., 2011) či při detekci vrozených poruch metabolismu purinů a pyrimidinů (Friedecký et al., 2007).

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiál a přístroje

3.1.1 Chemikálie

Acetonitril LC-MS čistota (VWR Chemicals BDH, Čína)

Kyselina octová (CentralChem, Slovensko)

Methanol LC-MS čistota (Biosolve, Francie)

Voda LC-MS čistota (Honeywell Riedel-de Haën, Německo)

3.1.2 Roztoky

20 mmol·l^{-1} octan amonný (pH 9,75)

20-22% vodný roztok amoniaku (VWR Chemicals BDH, UK)

80% ledový methanol

CDA (Sigma-Aldrich, USA)

Kalibrační roztok pH 10,01 (Hamilton Company, USA)

Standard 5-brom-2'-deoxycytidinu (BrdC) o koncentraci 100 μmol·l^{-1}

Standard 5-fluorocytidin (FC) o koncentraci 100 mmol·l^{-1}

Standard 5-fluorouridin (FU) o koncentraci 100 mmol·l^{-1}

Standard 5-chlor-2'-deoxycytidinu (CldC) o koncentraci 100 μmol·l^{-1}

Standard 5-chlor-2'-deoxyuridinu (CldU) o koncentraci 100 μmol·l^{-1}

Standard 5-iod-2'-deoxycytidinu (IdC) o koncentraci 100 μmol·l^{-1}

Standard 5-iod-2'-deoxyuridinu (IdU) o koncentraci 100 μmol·l^{-1}

Standard ara-C o koncentraci 100 μmol·l^{-1}

Standard ara-U o koncentraci100 μmol·l^{-1}

Standard BrdU o koncentraci 100 μmol·l^{-1}

Standard cytidinu (Cr) o koncentraci 100 μmol·l^{-1}

Standard EdC o koncentraci 10 mmol·l^{-1}

Standard EdU o koncentraci 10 mmol·l^{-1}

Standard uridinu (Ur) o koncentraci 100 μmol·l^{-1}

Tris pufr o koncentraci 10 mmol·l^{-1} s KCl o koncentraci 10 mmol·l^{-1} (pH 7,5)

3.1.3 Přístroje a pomůcky

Automatické pipety v rozmezí objemů 0,5-10 μl, 10-100 μl, 100-1000 μl (Eppendorf Research Plus, Německo)

Digestoř (Flores Valles, Španělsko)

Hmotnostní spektrometr QTRAP 6500^{+} (Sciex, USA)

Chladící box PHCbi VIP ECO (PHC Group)

Kapalinový chromatograf ExionLC Controller (Sciex, USA)

Kolona pro kapalinovou chromatografii NH_2 Luna, 3µm, 100mm x 2 mm (Phenomenex, USA)

Laboratorní sklo (kádinky, odměrný válec, nálevky)

Mikrocentrifuga Z 216 MK Hermle (Hermle Labortechnik, Německo)

pH metr Orion Star A111 (Thermo Scientific, USA)

Plynotěsná stříkačka 1 ml (Hamilton, USA)

Pipetovací špičky (Eppendorf, Německo)

Plastové mikrozkumavky 0,5 ml se šroubovacími víčky (SSIbio, USA)

Polypropylenové mikrozkumavky 15 ml (Syntesys, Itálie)

Total recovery vialky 1,5 ml (MACHEREY-NAGEL, Německo)

Vialky s integrovaným insertem

Třepačka micro-Plate Incubator (MIULAB, Čína)

Vortex MIX AGROlab (AGROlab, Itálie)

3.1.4 Biologický materiál

Pro účely experimentální části diplomové práce byly využity nádorové buněčné linie HeLa lidských epiteliálních buněk z karcinomu děložního hrdla, HepG2 z rakovinné tkáně jater, NCl-H2009 z rakovinné tkáně plic, A549 lidských epiteliálních buněk z adenokarcinomu alveol a 143B PML BK TK složená z fibroblastů z kostní tkáně postižené osteosarkomem. Dále byly využity buněčné linie tvořené diploidními buňkami, IMR-90 z plicní tkáně 16 týdnů staré ženy kavkazkého plodu, WI-38 složená z fibroblastů z plicní tkáně plodu ženského pohlaví, MRC-5 složená z fibroblastů z plicní tkáně plodu mužského pohlaví a imortalizované diploidní buňky hTERT PRE-1 lidských epiteliárních buněk sítnice. Rovněž byly využity myší vzorky tumoru a krevní plasmy PDX (patient-derived murine xenografts) modelu. Všechny typy buněčných lyzátů byly připraveny na Ústavu molekulární a translační medicíny, LF UPOL.

3.2 Metody

3.2.1 Příprava standardů

Standardy EdC, EdU, FdC a FdU dodané o koncentraci 100 $mmol \cdot l^{-1}$ byly připraveny ředěním vodou LC-MS čistoty na koncentraci 100 $\mu mol \cdot l^{-1}$, případně 10 $\mu mol \cdot l^{-1}$. Zbylé standardy byly v požadované koncentraci 100 $\mu mol \cdot l^{-1}$ již dodány. Připravené standardy byly uchovávány v chladicím boxu při -20° C před jejich následným využitím.

3.2.2 Optimalizace LC-MS parametrů standardů

Pro optimalizaci MS parametrů zaměřenou na optimalizaci MRM přechodů bylo potřeba připravit roztoky standardů nukleosidových analog o koncentraci 1 $\mu mol \cdot l^{-1}$. Tyto standardy byly připraveny ředěním zásobních standardů o koncentraci 100 $\mu mol \cdot l^{-1}$ ve směsi mobilní fáze A a mobilní fáze B v poměru 1:1. Pro přípravu každého standardu bylo tedy pipetováno 10 µl zásobního standardu do 990 µl směsi mobilních fází, která byla připravena smícháním 495 µl mobilní fáze A a 495 µl mobilní fáze B. Mobilní fázi A představuje mravenčan amonný o koncentraci 20 $mmol \cdot l^{-1}$ (pH 9,75), mobilní fázi B 100% acetonitril LC-MS čistoty.

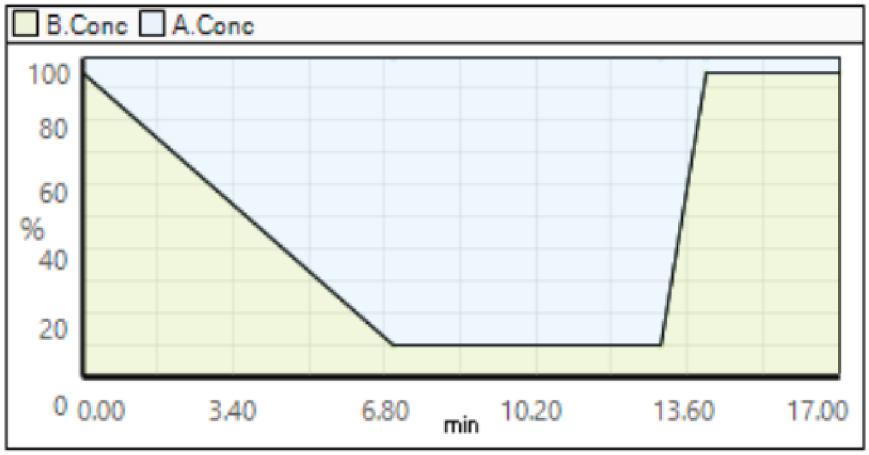
Optimalizace MS parametrů byla provedena pro všechny standardy zvlášť pomocí hmotnostního spektrometru QTRAP 6500^{+} (SCIEX). Nejprve bylo potřeba 3x promýt injekční stříkačku LC-MS MeOH, následně stejným postupem kapiláru hmotnostního spektrometru. Do stříkačky bylo nabráno 0,5 ml standardu o koncentraci 1 $\mu mol \cdot l^{-1}$, k pumpě byla připevněna kapilára. Standard byl do spektrometru dávkován injekční pumpou po 7 $\mu l \cdot min^{-1}$. Optimalizace byla dále prováděna za využití softwaru Analyst (1.7) (SCIEX), který automaticky selektuje 10 píků s nejvyšší intenzitou. Optimalizace byla provedena v pozitivním MRM módu (+MRM) i v negativním MRM módu (-MRM).

Pro každé takto optimalizované parametry MS pro daný standard byla ve výsledku získána data o přechodech v +MRM a v -MRM módu, údaje o vstupním potenciálu (EP), kolizní energii (CE) druhého kvadrupólu, o potenciálu kolizní cely (CXP) a o deklasteračním potenciálu (DP) při výstupu z kolizní cely v pozitivním i negativním módu. Tyto údaje byly následně využity pro vytvoření finální metody pro analýzu LS- MS/MS.

Následně byly roztoky standardů o koncentraci 10 $\mu mol \cdot l^{-1}$ nejprve separovány kapalinovým chromatografem ExionLC Controller (SCIEX) za využití aminoprolylové kolony NH_2 Luna (Phenomenex), 3µm, 100 mm x 2 mm již zavedenou chromatografickou metodou pro optimalizaci separace (Ligasová et al., 2023). Byla využita mobilní fáze A: mravenčan amonný o koncentraci 20 $mmol \cdot l^{-1}$ (pH 9,75) a mobilní fáze B: 100% LC-MS acetonitril, průtok kolonou byl nastaven na 0,3 $ml \cdot min^{-1}$. Separace byla provedena pomocí gradientové eluce se zvyšujícím se podílem mobilní fáze A po dobu 17 min následovně: 0 min=5% A, 7-13 min 90% A, 14-17 min=5% A (Obr. 13). Následně byla realizována hmotnostní detekce na základě údajů získaných v předchozím kroku optimalizace MRM přechodů, kdy byl vybrán přechod s největším

poměrem S/N. Izomerní sloučeniny byly analyzovány jak samostatně, tak ve směsi příbuzných izomerů pro zjištění možnosti jejich případného rozlišení.

Na závěr byly parametry získané optimalizací doplněny do finální metody.



Obr. 13: Graf popisující binární gradient využitého při separaci standardů pomocí kapalinového chromatografu.

3.2.3 Příprava vzorků

Byla provedena řada experimentů, pro které bylo vždy potřeba poskytnutou buněčnou linii ve formě cytoplazmatického lyzátu vhodně naředit Tris pufrem o koncentraci 10 mmol·l^{-1} s KCl o koncentraci 10 mmol·l^{-1} (pH 7,5) a substrátem o vhodné koncentraci dle požadavků pro daný experiment na požadovanou výslednou koncentraci proteinu ve vzorku.

Obecný postup přípravy vzorků platný pro všechny typy experimentů je následující. Jaderné a cytoplazmatické lyzáty uchovávané při teplotě -80°C byly rozmraženy na ledu. Z každého vzorku lyzátu bylo odpipetováno do mikrozkumavky s Tris pufrem o koncentraci 10 mmol·l^{-1} s KCl o koncentraci 10 mmol·l^{-1} (pH 7,5) předem vypočítané množství tak, aby finální koncentrace proteinů ve vzorku odpovídala parametrům pro daný experiment. K této směsi byl přidán substrát pro následnou inkubaci. Parametry přípravy vzorků pro jednotlivé experimenty jsou shrnuty v následujících podkapitolách.

3.2.1.1 Optimalizace parametrů a podmínek pro inkubaci lyzátů s ara-C

V tomto experimentu byla provedena optimalizace inkubačních podmínek buněčných lyzátů se substrátem ara-C, která byla potřebná pro provedení následujících experimentů. Pro experiment byly zvoleny buněčné linie HeLa a HepG2. Výsledná koncentrace proteinů ve vzorku činila 500 µg·ml^{-1} a 200 µg·ml^{-1}, každá směs lyzátu s Tris pufrem byla inkubována se 7 µl 1 µmol·l^{-1}/10 µmol·l^{-1} ara-C. Celkový objem každého takto připraveného vzorku činil 70 µl. Následně byly z této směsi odebírány v různých časových intervalech alikvoty, parametry pro tento postup shrnuje Tab. 2.

3.2.1.2 Stanovení aktivity cytidindeaminasy v devíti vybraných buněčných linií

Pro experiment byly zvoleny následující buněčné linie – NCl-H2009, A549, HeLa, HepG2, hTERT PRE-1, IMR-90, WI-38, MRC-5 a 143B PML BK TK. Výsledná koncentrace proteinů ve vzorku činila 200 µg·ml^{-1}, každá směs lyzátu s Tris pufrem byla inkubována se 7 µl ara-C o výsledné koncentraci 10 µmol·l^{-1}. Celkový objem každého takto připraveného vzorku činil 70 µl. Vzorky byly připraveny v triplikátech. Následně byly z každého vzorku odebírány v různých časových intervalech alikvoty, parametry pro tento postup shrnuje Tab. 2.

3.2.1.3 Stanovení aktivity cytidindeaminasy v synchronních buněčných liniích HeLa a HepG2

V tomto experimentu byly inkubovány lyzáty buněčných linií HeLa a HepG2, vždy o výsledné koncentraci proteinů ve vzorku 50 $\mu g \cdot ml^{-1}$. Každá směs lyzátu s Tris pufrem byla inkubována s 8 µl Cr o koncentraci 10 $\mu mol \cdot l^{-1}$. Celkový objem každého takto připraveného vzorku činil 80 µl, každý vzorek byl připraven ve třech replikátech. Z každého vzorku byly následně odebírány v různých časových intervalech alikvoty, parametry pro tento postup shrnuje Tab. 2.

3.2.1.4 Sledování aktivity cytidindeaminasy HeLa lyzátu a lidského rekombinantního enzymu

Pro stanovení aktivity CDA v lyzátech buněčné linie HeLa bylo zvoleno sedm substrátů – ara-C, EdC, Cr, CldC, BrdC a FC. Pro srovnání aktivity byl využit lidský rekombinantní enzym hCDA o koncentraci 2 $\mu g \cdot ml^{-1}$, což odpovídalo 1000x ředění zásobního roztoku CDA. Výsledná koncentrace proteinů ve vzorku v případě lyzátu buněčné linie HeLa činila 200 $\mu g \cdot ml^{-1}$, směs lyzátu či roztoku CDA s Tris pufrem byla inkubována s 10 µl zmíněných substrátů, vždy o koncentraci 10 $\mu mol \cdot l^{-1}$. Výsledná koncentrace proteinu ve srovnávacím vzorku s hCDA byla rovna 2 $\mu g \cdot ml^{-1}$a inkubována rovněž se zmíněnými substráty o koncentraci 10 $\mu mol \cdot l^{-1}$. Celkový objem každého takto připraveného vzorku činil 100 µl, ze kterého byl odebrán v rozdílných časových intervalech alikvot (Tab. 2).

3.2.1.5 Stanovení aktivity cytidindeaminasy ve vzorcích myšího tumoru a plasmy

Pro účely tohoto experimentu byly využity vzorky myších PDX modelů, které byly rozděleny dle typu tumoru, který byl do nich inkorporován. V případě modelů M11, M5R1 a M1 se jedná o inkorporovaný lymfom plášťových buněk, v případě modelu B2 o Burkitův lymfom. Pro stanovení aktivity CDA byly v tomto experimentu využity lyzáty tumorů a vzorky plasmy těchto myších modelů.

V případě stanovení aktivity CDA byly vzorky lyzátů tumorů (n=58) naředěny na finální koncentraci proteinů ve vzorku 200 $\mu g \cdot ml^{-1}$. Tato směs lyzátu s Tris pufrem byla inkubována s 1 µl ara-C o výsledné koncentraci 10 $\mu mol \cdot l^{-1}$, finální objem směsi činil 100 µl. Každý vzorek tumoru byl připraven v jednom replikátu.

Pro stanovení aktivity CDA ve vzorcích myší plasmy (n=69) platil poněkud odlišný postup přípravy vzorků. Pro tyto vzorky byl v přípravě vynechán Tris pufr, tedy každý

vzorek plasmy o objemu 22,5 µl byl inkubován s 2,5 µl ara-C o finální koncentraci 10 $\mu mol \cdot l^{-1}$. Každý vzorek plasmy byl připraven v jednom replikátu.

Z každého připraveného vzorku tumoru a plasmy byl odebrán alikvot v rozdílných časových intervalech. Množství odebraného alikvotu a časové intervaly jsou popsány v Tab. 2.

3.2.4 Inkubace vzorků

Připravené vzorky byly následně promíchány na vortexu a zahřáty na 37°C pomocí třepačky s nastavitelnou teplotou. Doba inkubace lyzátu se substrátem byla stanovena zvlášť pro každý experiment. Pro dobu inkubace 0 min bylo do nové mikrozkumavky odebráno množství připravené směsi. Tuto směs bylo potřeba ihned převrstvit 80% ledovým methanolem v poměru 1:4 z důvodu zastavení enzymatické aktivity. Zbylá směs byla dále inkubována na třepačce (37°C, 300 rpm) po dobu stanovenou experimentem. Po uplynutí této doby bylo do nové zkumavky opět odpipetováno množství směsi, která byla opět smíchána s 80% ledovým methanolem. Zbylá směs byla dále inkubována na třepačce za stejných podmínek. Tento postup byl opakován pro vzorky všech zvolených inkubačních dob. Specifikace pro inkubace v jednotlivých experimentech zaznamenává Tab. 2. Po inkubaci byly vzorky následně umístěny do chladicího boxu při -80°C a při této teplotě byly ponechány přes noc z důvodu efektivnější deproteinace vzorků.

Tab. 2: Množství odebrané směsi po inkubaci do nové mikrozkumavky (µl), množství 80% ledového MeOH (µl) potřebného k převrstvení odebrané směsi a doba inkubace (min) pro jednotlivé experimenty.

Název experimentu	Množství odebrané směsi (µl)	Množství 80% ledového MeOH (µl)	Doba inkubace (min)	Finální koncentrace proteinů ($\mu g \cdot ml^{-1}$)	Finální koncentrace substrátu ($\mu mol \cdot l^{-1}$)
Optimalizace podmínek pro inkubaci lyzátů s ara-C	15	60	0, 10, 30, 60	500, 200	1, 10
Stanovení aktivity CDA v devíti vybraných buněčných linií	30	120	0, 10	200	10
Stanovení aktivity CDA v synchronních buněčných liniích HeLa a HepG2	30	120	0, 10	50	10
Stanovení aktivity CDA HeLa lyzátu a lidského rekombinantního enzymu	30	120	0, 30	200, 2	10
Stanovení aktivity CDA ve vzorcích myšího tumoru	30	120	0, 10	200	10
Stanovení aktivity CDA ve vzorcích myší plasmy	10	80	0, 10	-	10

3.2.5 Příprava kalibrační řady

Pro každý experiment byla připravena zvlášť desetibodová kalibrace substrátů a produktů CDA pomocí dvojkové ředící řady ve vodě a to dle očekávaného množství produktů ve vzorcích. Kalibrační řady pro každý experiment shrnuje Tab. 3.

V případě stanovení aktivity CDA HeLa lyzátu a lidského rekombinantního enzymu byla vzhledem k interferenci ara-C s Cr a ara-U s Ur jedna směs kalibrátorů připravena bez Cr a Ur a pro tyto analyty byla kalibrace sestrojena zvlášť.

Tab. 3: Desetibodové kalibrační řady sestrojené pro každý experiment.

Název experimentu	Název analytu	Koncentrace [$\mu mol \cdot l^{-1}$]
Optimalizace podmínek pro inkubaci lyzátů s ara-C	ara-C, Ur	2; 1; $5 \cdot 10^{-1}$; $2{,}5 \cdot 10^{-1}$; $1{,}25 \cdot 10^{-1}$; $6{,}25 \cdot 10^{-2}$; $3{,}13 \cdot 10^{-2}$; $1{,}56 \cdot 10^{-2}$; $7{,}81 \cdot 10^{-3}$; $3{,}91 \cdot 10^{-3}$
Stanovení aktivity CDA v devíti vybraných buněčných linií	ara-C, ara-U	2; 1; $5 \cdot 10^{-1}$; $2{,}5 \cdot 10^{-1}$; $1{,}25 \cdot 10^{-1}$; $6{,}25 \cdot 10^{-2}$; $3{,}13 \cdot 10^{-2}$; $1{,}56 \cdot 10^{-2}$; $7{,}81 \cdot 10^{-3}$; $3{,}91 \cdot 10^{-3}$
Stanovení aktivity CDA v synchronních buněčných liniích HeLa a HepG2	Cr, Ur	2; 1; $5 \cdot 10^{-1}$; $2{,}5 \cdot 10^{-1}$; $1{,}25 \cdot 10^{-1}$; $6{,}25 \cdot 10^{-2}$; $3{,}13 \cdot 10^{-2}$; $1{,}56 \cdot 10^{-2}$; $7{,}81 \cdot 10^{-3}$; $3{,}91 \cdot 10^{-3}$
Stanovení aktivity CDA HeLa lyzátu a lidského rekombinantního enzymu	Cr, Ur, ara-U, ara-C, EdC, EdU, BrdC_79Br, BrdU_79Br, IdC, IdU, CldC, CldU, FC a FU	2; 1; $5 \cdot 10^{-1}$; $2{,}5 \cdot 10^{-1}$; $1{,}25 \cdot 10^{-1}$; $6{,}25 \cdot 10^{-2}$; $3{,}13 \cdot 10^{-2}$; $1{,}56 \cdot 10^{-2}$; $7{,}81 \cdot 10^{-3}$; $3{,}91 \cdot 10^{-3}$
Stanovení aktivity CDA ve vzorcích myšího tumoru	ara-C, Ur	2; 1; $5 \cdot 10^{-1}$; $2{,}5 \cdot 10^{-1}$; $1{,}25 \cdot 10^{-1}$; $6{,}25 \cdot 10^{-2}$; $3{,}13 \cdot 10^{-2}$; $1{,}56 \cdot 10^{-2}$; $7{,}81 \cdot 10^{-3}$; $3{,}91 \cdot 10^{-3}$
Stanovení aktivity CDA ve vzorcích myší plasmy	ara-C, Ur	2; 1; $5 \cdot 10^{-1}$; $2{,}5 \cdot 10^{-1}$; $1{,}25 \cdot 10^{-1}$; $6{,}25 \cdot 10^{-2}$; $3{,}13 \cdot 10^{-2}$; $1{,}56 \cdot 10^{-2}$; $7{,}81 \cdot 10^{-3}$; $3{,}91 \cdot 10^{-3}$

3.2.6 Analýza vzorků kapalinovou chromatografií s hmotnostní spektrometrií

Pro analýzu byly vzorky uchované přes noc v chladicím boxu při -80°C. Vzorky byly promíchány na třepačce a odstředěny pomocí centrifugy po dobu 20 min (15 000 rpm, 0°C). Podle množství vzorky bylo převedeno 100 µl vzorku do skleněné vialky s integrovaným insertem, v případě vzorků myší plasmy 70 µl do total recovery vialky. Vialky se vzorky a vialky s připravenou kalibrací byly následně vloženy do autosampleru chromatografu. Vzorky byly analyzovány modifikovanou in-house cílenou metabolomickou LC-MS metodou (Ligasová et al., 2023).

Pro analýzu byla zvolena kolona NH_2 Luna (Phenomenex), 3µm, 100mm x 2 mm. Všechny analýzy probíhaly při teplotě 35°C, objem dávkování vzorku do kolony byl nastaven na 1 µl, průtok kolonou byl pak nastaven na 0,3 $ml \cdot min^{-1}$. Analyty byly na koloně separovány pomocí greadientové eluce za využití mobilní fáze A mravenčanu amonného o koncentraci 20 $mmol \cdot l^{-1}$ (pH 9,75) a mobilní fáze B 100% acetonitrilu LC-MS čistoty. Gradient byl nastaven následovně: 0 min=5% A, 7 min=90% A, 7-13 min 90% A, 14 min=5% A, 14-17 min=5% A.

Hmotnostní spektrometire byla provedena pomocí hmotnostního spektrometru QTRAP 6500^+ (SCIEX) v režimu MRM módu při přepínání polarity (analýza provedena současně v kladné i záporné polaritě). Nastavení hmotnostního spektrometru bylo následující: napětí iontového spreje ±4 500V, teplota 450°C, tlak iontového zdroje plynu 1 a 2 40 psi za využití dusíku jako srážkového plynu, tlak clonového plynu 40 psi.

3.2.7 Zpracování výsledků

Pro zpracování získaných dat byl využit software Sciex OS (2.0.0). V tomto softwaru byla provedena integrace píků a na základě koncentrací kalibrační řady vytvořeny kalibrační přímky pro každou analýzu. Pomocí kalibrace byly vypočteny koncentrace substrátů a produktů nukleosidových analog, cytidinu a uridinu ve vzorcích. Získaná data o plochách píků, jejich výšce, a o koncentracích nukleosidů byla převedena ve formě tabulky do tabulkového procesoru Microsoft Excel, kde byla vypočtena aktivita CDA, vždy v jednotce µmol min^{-1}. Aktivita CDA byla získána z přírůstku produktu za jednotku času. Výpočet byl proveden dle následující rovnice:

$$CDA_{aktivita} = \frac{c_e - c_0}{t} \quad [\mu mol \cdot min^{-1}]$$

kde c_e je vypočtená koncentrace pro experimentem stanovenou dobu inkubace v minutách, c_0 je vypočtená koncentrace v čase 0 minut a t je inkubační doba. Pro aktivitu CDA byl následně sestrojen graf závislosti aktivity CDA na typu zvoleného substrátu v softwaru GraphPad Prism (10.2.0). Výsledky měření aktivity jsou v grafech vyobrazeny jako medián a rozptyl, pro porovnání výsledků v krabicových grafech byly výsledky mezi sebou srovnávány pomocí jednosměrné analýzy rozptylu (ANOVA) a Tukeyho post-hoc testu na hladině významnosti α=0,05.

4 VÝSLEDKY

4.1 Finální metoda pro analýzu pomocí LC-MS/MS

Pro doplnění finální metody pro stanovení aktivity CDA metodou LC-MS/MS bylo potřeba provést optimalizaci MRM přechodů pro substráty EdC, EdU a pro substráty obsahující ve své molekule atom halogenu, tedy substráty IdC a IdU, CldC a CldU, BrdC a BrdU, FC a FU. V případě substrátů obsahující atom bromu či chloru bylo potřeba brát v potaz existenci v přírodě běžně se vyskytujících izotopů těchto halogenů a jejich molekulových hmotností. V případě bromu se jedná o izotopy ^{79}Br a ^{81}Br, v případě chloru ^{35}Cl a ^{37}Cl. Při optimalizaci MRM přechodů pro CldC a CldU byla optimalizace prováděna pomocí hmotnosti izotopu ^{35}Cl. Tab. 4 shrnuje molekulové hmotnosti substrátů, procentuální zastoupení izotopů a monoizotopovou hmotnost.

Tab. 4: Molekulová hmotnost, monoizotopová hmotnost a procentuální zastoupení izotopů v přírodě.

Název analytu	Molekulová hmotnost [g · mol^{-1}]	Monoizotopová hmotnost [g · mol^{-1}]	Izotopy
IdC	353,11	352,987	^{127}I (100 %)
IdU	354,10	353,971	
CldC	261,66	261,052	^{35}Cl (75 %)
CldU	262,65	262,036	^{37}Cl (25 %)
BrdC	306,11	305,001	^{79}Br (50 %)
BrdU	307,10	305,985	^{81}Br (50 %)
FC	261,21	261,08	Stabilní pouze ^{19}F
FU	262,19	262,06	

Po následné separaci standardů pomocí LC-MS/MS provedené na základě předchozí optimalizace MRM přechodů byly vybrány vhodné přechody s největším podílem signálu ku šumu (S/N) pro dané standardy, pro které byla finální metoda doplněna o údaje o prekurzorovém iontu (Q1), produktovém iontu (Q3), DP, EP, CE a CXP. Tab. 5 shrnuje tyto údaje pro standardy separované v režimu -MRM a +MRM.

Tab. 5: Údaje doplněné do finální metody zahrnující data o prekurzorovém iontu (Q1), o produktrovém iontu (Q3), retenčním čase (RT), deklasteračních potenciálech (DP), vstupních potenciálech (EP), kolizní energii (CE) a potenciálech kolizní cely (CXP) pro standardy separované v režimu –MRM a +MRM.

Q1 [Da]	Q3 [Da]	Název	MRM okno [sec]	Polarita	RT [min]	DP [V]	EP [V]	CE [V]	CXP [V]
249,9	116,9	EdC	180	-	2,5	-55	-10	-20	13
250,9	134,8	EdU	180	-	2,8	-50	-10	-16	-9
352,0	218,7	IdC	180	-	2,4	-40	-10	-22	-17
353,0	41,9	IdU	180	-	3,1	-50	-10	-64	-19
259,8	126,8	CldC	180	-	2,4	-35	-10	-18	-15
260,9	170,6	CldU	180	-	3,6	-5	-10	-20	-27
303,9	170,7	BrdC_79Br	180	-	2,3	-35	-10	-20	-19
306,9	41,9	BrdU_81Br	180	-	3,5	-5	-10	-60	-19
304,8	42,1	BrdU_79Br	180	-	3,5	-20	-10	-82	-3
259,9	106,8	FC	180	-	2,9	-40	-10	-20	-11
260,9	170,8	FU	180	-	4,4	-35	-10	-20	-15
262,1	129,9	FC	180	+	2,9	6	10	15	16
244,1	112,1	Ara-C/Cr	180	+	3,2	40	10	19	10
245,0	113,0	Ara-U/Ur	180	+	2,8	4	10	10	10

4.2 Optimalizace podmínek pro inkubaci lyzátů s ara-C

Byla provedena optimalizace inkubačních podmínek se substrátem ara-C. Pro optimalizaci bylo využito buněčných linií HeLa a HepG2 o finální koncenraci proteinu ve vzorku 500 a 200 $\mu g \cdot ml^{-1}$. Pro inkubaci byly zvoleny následující koncentrace ara-C: 1 $\mu mol \cdot l^{-1}$ a 10 $\mu mol \cdot l^{-1}$.

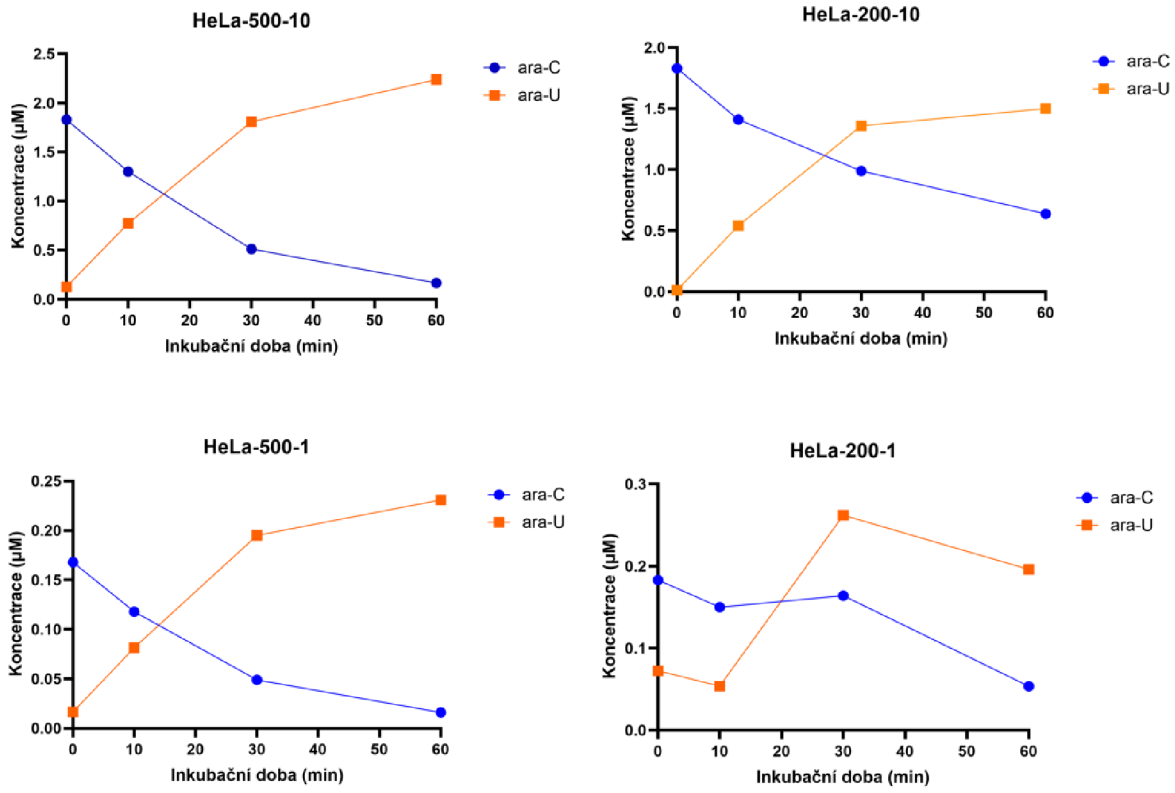
V rámci optimalizace inkubace bylo potřeba stanovit takový čas inkubace, při kterém je reakce v lineární fázi. To tedy znamená dobu, kdy dochází k počátku deaminace substrátu enzymem CDA, v tomto případě ara-C, na jeho uridinový produkt, ara-U. Podmínkou pro tento inkubační čas je viditelná změna koncentrace substrátu a jeho produktu, tedy pokles koncentrace ara-C a vzrůstající koncentrace ara-U. Delší doba inkubace však nebyla žádoucí z důvodu možné degradace metabolitů v buňkách. Rovněž byl pak v rámci LC-MS/MS separace kladen důraz na tvar píků a jeho intenzitu, kdy bylo potřeba analyzovat píky výrazně nad úrovní šumu.

Pro optimalizaci byla sestrojena kalibrační řada pro ara-C a Ur. Tab. 6 shrnuje parametry kalibračních přímek pro oba standardy.

Tab. 6: Vážení, rovnice a hodnota r^2 popisující kalibraci ara-C a Ur.

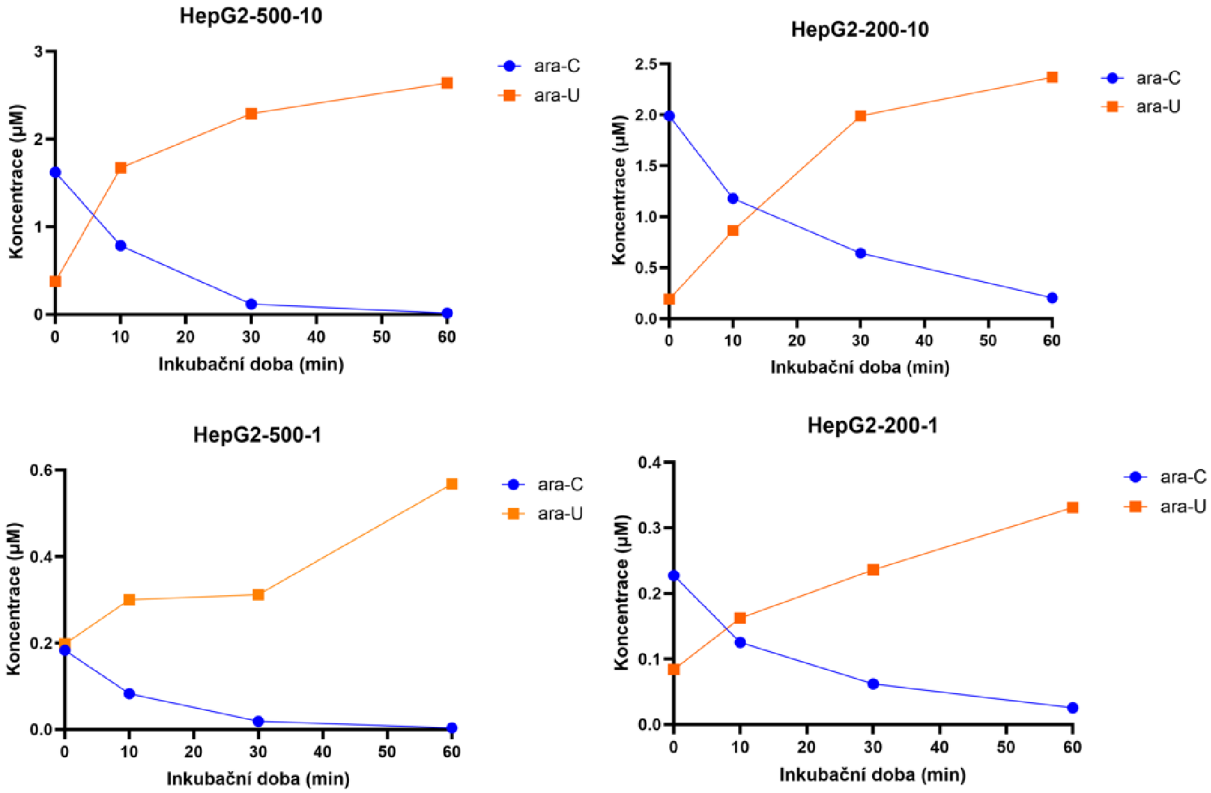
Název analytu	Vážení	Rovnice	r^2
Ur	$1/x$	y=3,23e5x+896,39	0,976
ara-C	$1/x$	y=9,10e6x+5107,43	0,999

Obr. 14 znázorňuje výsledek optimalizace inkubace ara-C o koncentraci 1 µmol·l^{-1} a 10 µmol·l^{-1} s HeLa buněčnými lyzáty. Patrný nárůst koncentrace ara-U a naopak pokles koncentrace ara-C je již při inkubačním čase 10 min. Tento trend je patrný pak pro obě zvolené finální koncentrace proteinu ve vzorku. V případě finální koncentrace proteinu ve vzorku 500 µg·ml^{-1} je patrný exponenciální nárůst koncentrace ara-U i při 60 min inkubaci. Stejný trend je patrný v případě finální koncentrace proteinu ve vzorku 200 µg·ml^{-1} při inkubaci s 10 µmol·l^{-1} ara-C. V případě finální koncentrace proteinu ve vzorku 200 µg·ml^{-1} je patrný pravý opak v případě inkubace s 1 µmol·l^{-1} ara-C. Koncentrace ara-C je velmi nízká, což odráží i klesající aktivita CDA po inkubaci delší 30 minut. Při inkubaci po dobu 60 minut je již patrný značný pokles aktivity CDA a tedy i koncentrace ara-C i ara-U.



Obr. 14: Graf vyobrazující výsledek optimalizace inkubace ara-C o koncentraci 1 µmol·l^{-1} a 10 µmol·l^{-1} s HeLa buňkami o finální koncenraci proteinu ve vzorku 500 a 200 µg·ml^{-1} ve zvolených časových intervalech.

Obr. 15 reprezentuje výsledné grafy optimalizace inkubace ara-C s HepG2 buněčnými lyzáty. Je zcela patrné, že jako v případě buněčných linií HeLa, i zde je optimální dobou inkubace 10 min, což platí pro obě zvolené finální koncentrace proteinu ve vzorku i pro obě zvolené koncentrace ara-C, neboť se poté dostává reakce do exponenciální závislosti.



Obr. 15: Graf vyobrazující výsledek optimalizace inkubace ara-C o koncentraci 1 µmol·l^{-1} a 10 µmol·l^{-1} s HepG2 buňkami o finální koncenraci proteinu ve vzorku 500 a 200 µg·ml^{-1} ve zvolených časových intervalech.

Ze získaných dat optimalizace v případě obou buněčných linií vyplývá, že vhodnou finální koncentrací proteinu ve vzorku pro následující experimenty je koncentrace 200 $\mu g \cdot ml^{-1}$. V tomto případě je pro inkubaci vyhovující koncentrace substrátu ara-C 10 $\mu mol \cdot l^{-1}$. Čas inkubace buněčného lyzátu s ara-C byl snanoven na 10 minut. Pro následující experimenty je vhodné ředit vzorky lyzátů na finální koncentraci proteinu 200 $\mu g \cdot ml^{-1}$. Protein v zásobních buněčných lyzátech nedosahuje vždy tak vysokých koncentrací jako je koncentrace 500 $\mu g \cdot ml^{-1}$ či vyšších, proto by nebylo vždy možné pracovat v následujících experimentech s ředěním na 500 $\mu g \cdot ml^{-1}$ proteinů. Z výsledných grafů vyplývá, že pro finální koncentraci proteinu ve vzorku 200 $\mu g \cdot ml^{-1}$ je vhodnější inkubace se substrátem o koncentraci 10 $\mu mol \cdot l^{-1}$ než o koncentraci 1 $\mu mol \cdot l^{-1}$.

4.3 Stanovení aktivity cytidindeaminasy v devíti vybraných buněčných linií

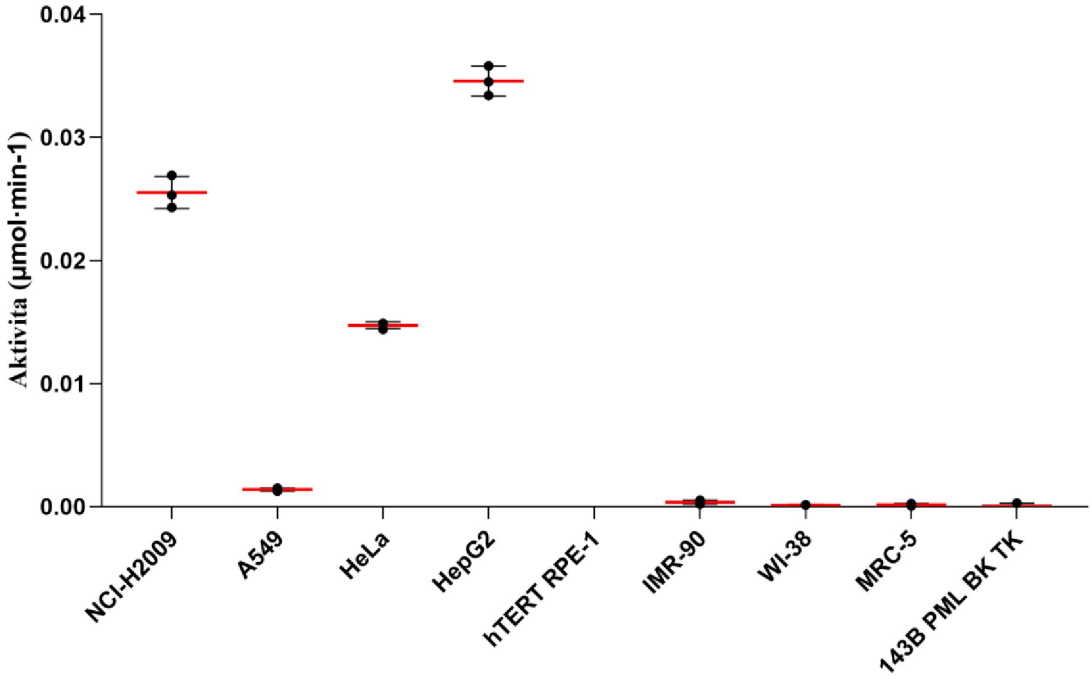
Byla porovnávána aktivita CDA v devíti vybraných buněčných liniích. Pro tento experiment byly vybrány nádorové buňky linií HeLa, HepG2, NCl-H2009, A549 a 143B PML BK TK, diploidní buňky linií IMR-90, WI-38 a MRC-5 a imortalizované diploidní buňky linie hTERT PRE-1. Buňky ve formě lyzátu o finální koncentraci proteinu ve vzorku 200 $\mu g \cdot ml^{-1}$ byly inkubovány s ara-C o výsledné koncentraci 10 $\mu mol \cdot l^{-1}$, posléze byla stanovena aktivita CDA v jednotlivých buněčných liniích.

Pro stanovení změny koncentrace ara-C a ara-U byla sestrojena desetibodová kalibrační kalibrační řada. Parametry kalibračních přímek pro ara-C a Ur shrnuje Tab. 7.

Tab. 7: Vážení, rovnice a hodnota r^2 popisující kalibraci ara-C a Ur.

Název analytu	Vážení	Rovnice	r^2
Ara-C	$1/x$	y=1,52e7x+(-8904,43)	0,999
Ara-U	$1/x$	y=3,04e5x+781,85	0,998

Měření bylo provedeno v triplikátech pro každý vzorek. Pro každý triplikát byl měřen i blank pro ověření, zda nedošlo k interferenci ara-C s Cr. Aktivita CDA byla vypočítána z koncentrace ara-U vzniklého přeměnou substrátu ara-C enzymem CDA pro každou buněčnou linii. Na základě vypočtené aktivity CDA byl sestrojen výsledný graf (Obr. 16) pro porovnání aktivit CDA mezi každou buněčnou linií.



Obr. 16: Graf reprezentující porovnání aktivity CDA mezi jednotlivými buněčnými liniemi. Statistická významnost byla hodnocena pomocí p-hodnot metodou jednosměrné ANOVA a Tukeyho post-hoc testování. $p < 0{,}0001$ až na srovnání linií A549, hTERT PRE-1, IMR-90, WI-38 a MRC-5 mezi sebou. Hodnoty u linie hTERT RPE1 nejsou uvedeny z důvodu velmi nízké až neměřitelné aktivity enzymu CDA.

Z vypočtených hodnot aktivit vyplývá, že k deaminaci ara-C na uridinový produkt ara-U došlo pouze v případě nádorových buněčných linií NCl-H2009, HeLa a HepG2. Nejvyšší aktivita CDA byla přitom zaznamenána v případě buněčné linie HepG2. Naopak buněčné linie hTERT-PRE1, IMR-90, WI-38, MRC-5 a 143B PML BK TK nevykazovaly žádnou aktivitu CDA, proto tedy nedošlo k přeměně ara-C na ara-U. V těchto případech byla tedy zaznamenána nulová koncentrace ara-U.

4.4 Stanovení aktivity cytidindeaminasy v buněčných lyzátech HeLa a HepG2

Byla stanovena aktivita CDA ve dvou typech buněčných linií – HeLa a HepG2. V rámci každé buněčné linie byl experiment proveden s devíti vzorky. Prvním vzorkem byl vzorek kontrolní (CTRL), který představoval nesynchronní buňky v různých fázích buněčného cyklu. Následující vzorky synchroních buněk se mezi sebou lišily různou dobou kultivace bez faktorů omezující růstu buněk, jako jsou faktory čerpání živin, limity pH, indukce stárnutí apod., a které by se měly nacházet již v určité fázi buěčného cyklu. Kultivace byla prováděna po dobu 2h, 4h, 8h, 12h, 16h, 20h, 24h a 28h. Pro experiment byl každý vzorek inkubován s Cr o koncentraci 10 $\mu mol \cdot l^{-1}$ a následně byla stanovena aktivita CDA v buňkách jednotlivých buněčných linií.

Pro optimalizaci byla sestrojena kalibrační řada pro ara-C a Ur. Tab. 6 shrnuje parametry kalibračních přímek pro oba standardy.

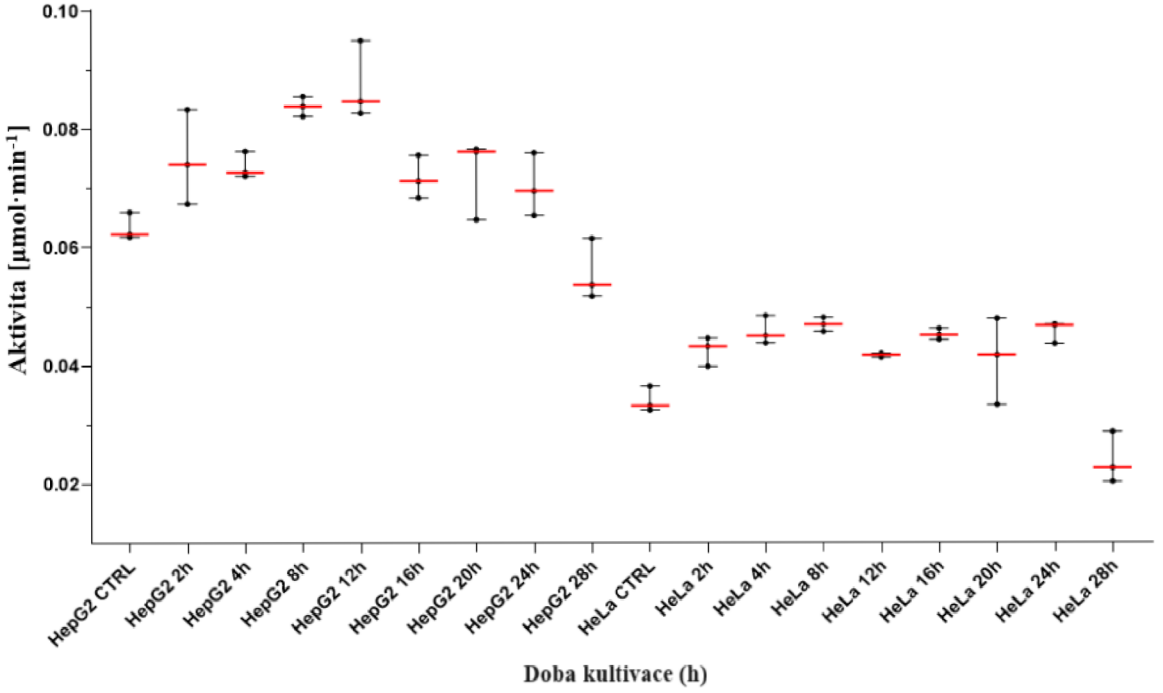
Pro stanovení aktivity CDA byla sestrojena kalibrační řada, Tab. 8 pak shrnuje parametry kalibračních přímek pro Cr a Ur.

Tab. 8: Vážení, rovnice a hodnota r^2 popisující kalibraci ara-C a Ur.

Název analytu	Vážení	Rovnice	r^2
Ur	$1/x$	y=6,29e5x+455,27	0,997
Cr	$1/x$	y=4,46e6x+1,19e5	0,999

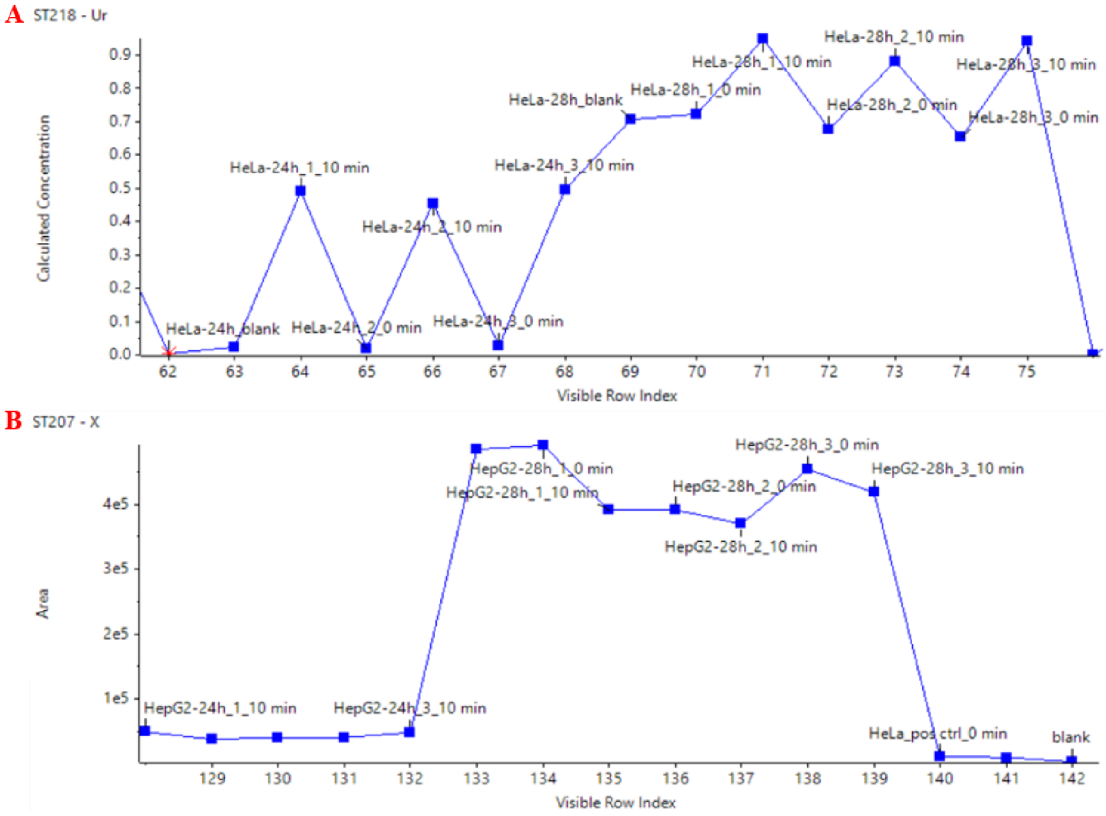
Pomocí kalibrace byly vypočteny koncentrace substrátu a koncentrace Ur, tedy konečného produktu vzniklého enzymatickou přeměnou Cr enzymem CDA.

Na základě výpočtu aktivity CDA byl sestrojen graf závislosti aktivity CDA na zvolených dobách kultivace jednotlivých vzorků (Obr. 17).



Obr. 17: Aktivita CDA v HeLa a HepG2 buněčných linií. Červeně je zaznamenán medián v rámci rozpětí hodnot pro tři replikáty daného časového intervalu.

Je patrné, že v případě buněk HepG2 linie byla zaznamenána vyšší aktivita CDA v porovnání s aktivitou CDA v HeLa buněčných liniích. V případě buněčné linie HepG2 byla nejvyšší aktivita CDA zaznamenána u buněk s 12ti hodinovou kultivací v médiu, kdy průměrná aktivita CDA v rámci triplikátů je rovna 0,0875 $\mu mol \cdot min^{-1}$.V případě HeLa buněk byla nejvyšší aktivita CDA stanovena pro čas kultivace 8h, kdy průměrná aktivita CDA v rámci triplikátů je rovna 0,0469 $\mu mol \cdot min^{-1}$. V případě obou buněčných linií byla zaznamenána nejnižší aktivita CDA po 28ti h kultivaci buněk v médiu. Po takto dlouhé kultivaci mohlo u buněk dojít k metabolomickému rozkladu dalších buněčných složek, proto byl patrný nárůst koncentrací bazí uracilu, uridinu, xanthinu a cytidinu. Obr. 18 zaznamenává příklad nárůstu hladiny uridinu (Ur) a xanthinu (X) po zmíněných 28 h kultivace buněk.



Obr. 18: Schéma vyobrazující nárůst koncentrace uridinu (A) a plochu píku xanthinu (B) po 28 h kultivaci buněk v médiu a následné inkubaci s Cr.

4.5 Stanovení aktivity cytidindeaminasy HeLa lyzátu a lidského rekombinantního enzymu

Byla stanovena aktivita CDA v buněčné linii HeLa ve formě buněčných lyzátů o finální koncentraci proteinu 200 $\mu g \cdot ml^{-1}$ po inkubaci se substráty Cr, ara-C, EdC, CldC, BrdC, FC a IdC, vždy o koncentraci 10 $\mu mol \cdot l^{-1}$. Dále byl pro srovnání aktivity CDA inkubován se substráty hCDA, který byl 1 000x naředěn, jeho finální koncentrace v inkubační směsi byla 2 ug/ml.

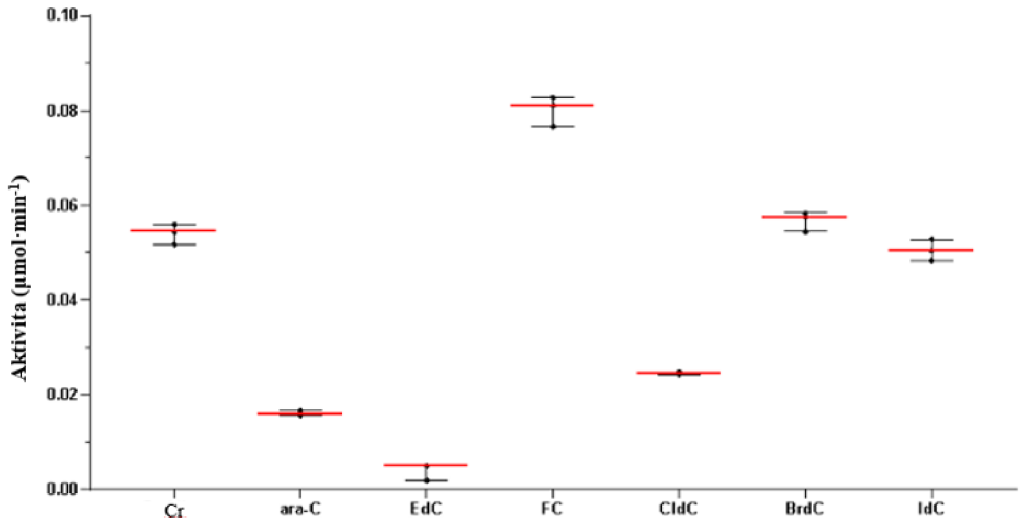
Pro stanovení aktivity CDA, a tedy sledování změn koncentrací substrátů a produktů, byla sestrojena pro každý substrát desetibodová kalibrace. Tab. 9 shrnuje parametry kalibračních přímek pro všechny využité substráty.

Tab. 9: Vážení, rovnice a hodnota r^2 popisující kalibraci Cr, Ur, ara-U, ara-C, EdC, EdU, BrdC_79Br, BrdU_79Br, IdC, IdU, CldC, CldU, FC a FU.

Název analytu	Vážení	Rovnice	r^2
Cr	$1/x$	y=4,58e6x+8510,67	0,999
Ur	$1/x$	y=5,03e5x+197,18	0,999
ara- U	$1/x$	y=4,39e5x+46,95	0,999
ara-C	$1/x$	y=6,90e6x+2587,91	0,999
EdC	$1/x$	y=2,10e6x+1392,45	0,999
EdU	$1/x$	y=2,18e5x+570,89	0,999
BrdC_79Br	$1/x$	y=7,02e5x+751,28	0,999
BrdU_79Br	$1/x$	y=4,64931e5x	0,989
IdC	$1/x$	y=1,40e6x+486,43	0,999
IdU	$1/x$	y=1,40e6x+4634,70	0,999
CldC	$1/x$	y=4,03e5x+778,89	0,999
CldU	$1/x$	y=2,62e5x+116,32	0,999
FC	$1/x$	y=3,32e5x+164,74	0,999
FU	$1/x$	y=8,24e5x+309,74	0,999

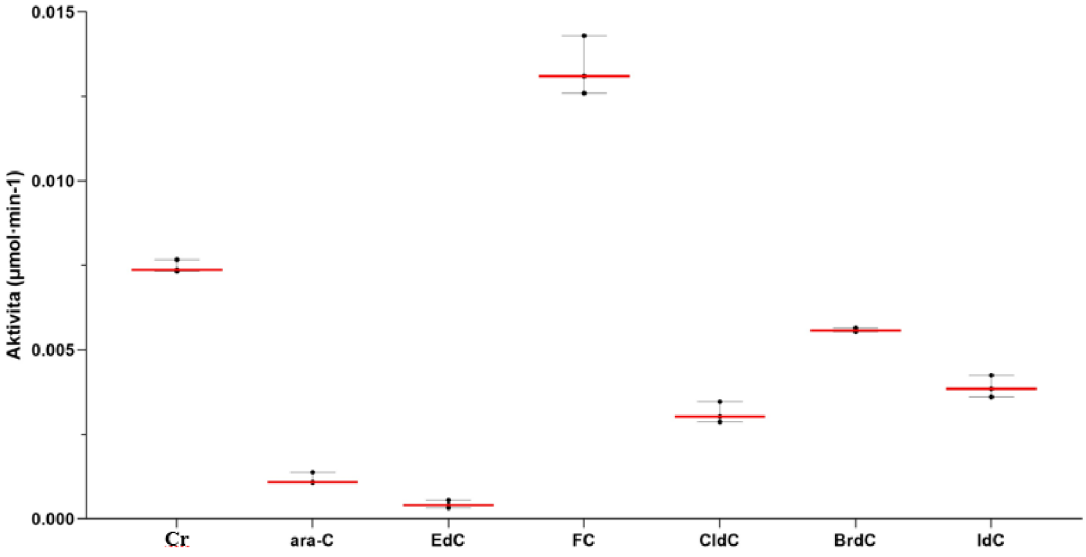
Analýzou vzorků buněčných lyzátů a s pomocí kalibrace byly vypočteny koncentrace substrátů a koncentrace Ur, ara-U, EdU, CldU, BrdU, FU a IdU jakožto konečných produktů vzniklých enzymatickou přeměnou využitých substrátů enzymem CDA. Na základě získaných koncentrací byla vypočítána aktivita CDA z nárůstu produktu, kdy snížení koncentrací substrátu a naopak zvýšení koncentrací produktu pro daný substrát charakterizovalo zdárnou enzymatickou přeměnu.

Na Obr. 19 je vyjádřena aktivita v HeLa lyzátech za inkubace s různými substráty



Obr. 19: Aktivita CDA v HeLa buněčné linii. Červeně je zaznamenán medián v rámci rozptylu hodnot pro tři replikáty daného substrátu. Statistická významnost byla hodnocena pomocí p-hodnot metodou jednosměrné ANOVA a Tukeyho post-hoc testování. $p < 0{,}0001$ až na srovnání substrátů ara-C s CldC, BrdC s IdC a Cr s BrdC a IdC mezi sebou, pro které statistická významnost nebyla signifikantní.

Ze získaných hodnot je patrné, že buněčná linie HeLa obsahuje dostatečné množství CDA k přeměně většiny typů substrátů na jejich uridinové formy. K tomu rovněž přispívá i délka inkubace, kdy s rostoucí délkou inkubace se zvyšuje koncentrace uridinových produktů. Enzym CDA v HeLa buňkách vykazoval vysokou afinitu k substrátům FC, Cr a BrdC, proto je v případě těchto substrátů patrná i vysoká aktivita CDA, nejvyšší v případě FC. Nižší aktivita CDA byla pak zaznamenána v případě IdC a CldC. Naopak nejnižší afinita substrátu k CDA byla patrná v případě EdC. Nízká aktivita CDA v případě ara-C by mohla být způsobena značně pomalejší deaminací tohoto substrátu na ara-U, možným řešením by byla delší inkubační doba. Deaminace substrátu EdC enzymem CDA by rovněž vyžadovala delší inkubační dobu. Pro přeměnu EdC na jeho uridinový protějšek byla nedostatečná koncentrace CDA v HeLa buňkách. Výsledné hodnoty aktivity CDA v případě inkubace HeLa buněk se všemi typy substrátů byly porovnány se srovnávacím experimentem s hCDA a nebyly zaznamenány signifikantní rozdíly v aktivitě CDA mezi jednotlivými experimenty (Obr. 20).



Obr. 20: Graf prezentující aktivitu ktivita hCDA po inkubaci se sedmi substráty. Červeně je zaznamenán medián v rámci rozptylu hodnot pro tři replikáty daného substrátu. Statistická významnost byla hodnocena pomocí p-hodnot metodou jednosměrné ANOVA a Tukeyho post-hoc testování. $p < 0{,}0001$ až na srovnání substrátů ara-C s CldC, BrdC s IdC a Cr s BrdC a IdC mezi sebou, pro které statistická významnost nebyla signifikantní.

4.6 Stanovení aktivity cytidindeaminasy ve vzorcích myšího tumoru a plasmy

Byla stanovena aktivita CDA v PDX (patient-derived murine xenografts) modelech vzorků myšího tumoru a plasmy: M11 (n=14 pro tumor; n=13 pro plasmu), M5R1 (n=14 pro tumor; n=13 pro plasmu), M1 (n=9 pro tumor; n=14 pro plasmu), B2 (n=6 pro tumor; n=13 pro plasmu). Oba typy vzorků byly inkubovány s ara-C o koncentraci 10 $\mu mol \cdot l^{-1}$ po dobu 10 minut.

Pro stanovení aktivity CDA byly sestrojeny dvě kalibrace, pro každý typ vzorku zvlášť. Tab. 10 shrnuje parametry kalibrační přímky sestrojené pro vzorky tumoru, Tab. 11 pak pro vzorky plasmy.

Tab. 10: Vážení, rovnice a hodnota r^2 popisující kalibraci ara-C a Ur pro vzorky myšího tumoru.

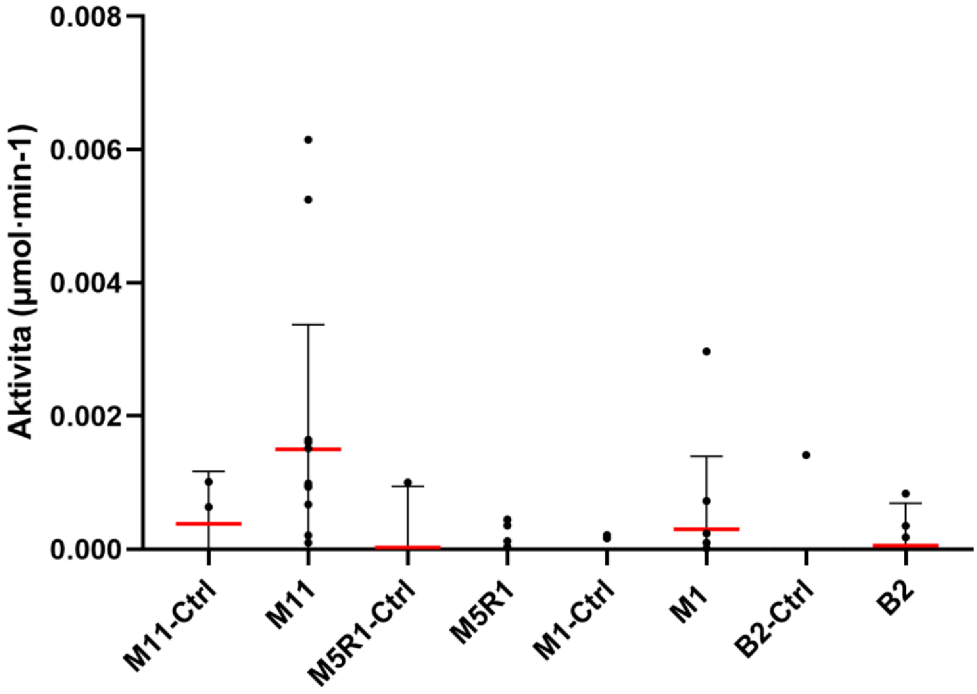
Název analytu	Vážení	Rovnice	r^2
Ara-C	$1/x$	y=1,19e7x+6884,85	0,998
Ara-U	$1/x$	y=4,32e5y+81,76	0,996

Tab. 11: Vážení, rovnice a hodnota r^2 popisující kalibraci ara-C a Ur pro vzorky myší plasmy.

Název analytu	Vážení	Rovnice	r^2
Ara-C	$1/x$	y=9,44e6x+5332,05	0,997
Ara-U	$1/x$	y=4,23e5x+521,50	0,998

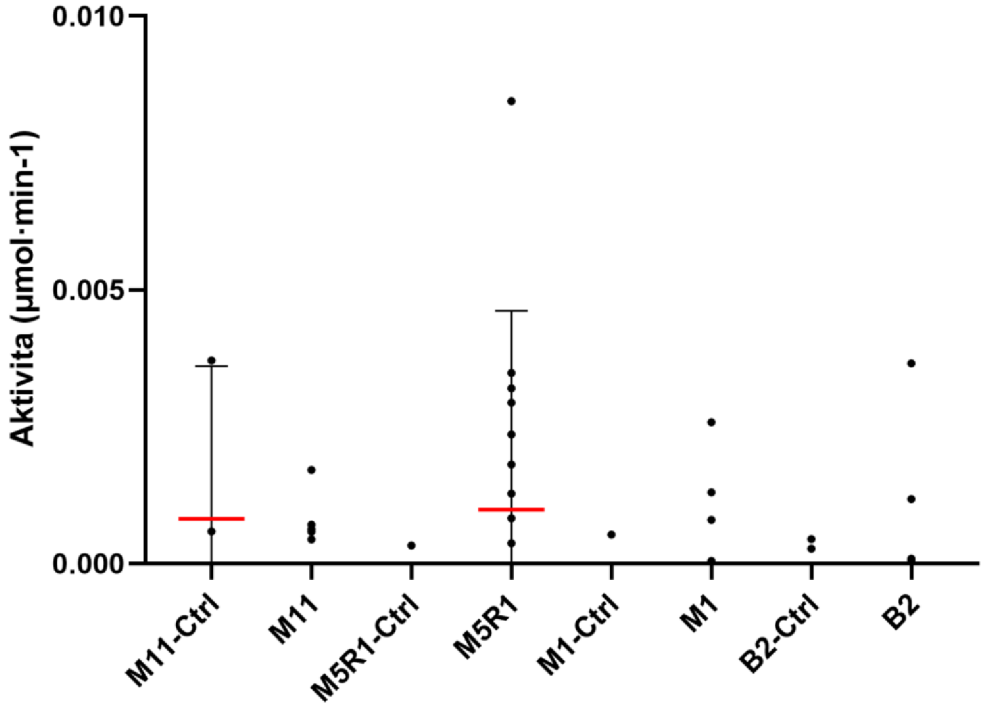
Měření bylo provedeno na jednom replikátu pro každý vzorek, aktivita CDA je v obou případech počítána z přírůstlu koncentrace ara-U. Pro každý typ myšího modelu byl rovněž zaveden kontrolní vzorek (Ctrl).

Na Obr. 21 je vyjádřena ativita CDA ve vzorcích tumoru myších PDX modelů M11, M5R1, M1 a B2.



Obr. 21: Aktivita CDA v buňkách myšího tumoru. Červeně je zaznamenán průměr ± SD. Některé hodnoty nejsou uvedeny z důvodu velmi nízké až neměřitelné aktivity enzymu CDA. Statistická významnost byla hodnocena pomocí p-hodnot metodou jednosměrné ANOVA a Tukeyho post-hoc testování. Při srovnání všech linií mezi sebou nebyla statistická významnost signifikantní.

Na Obr. 22 je vyjádřena aktivita CDA ve vzorcích plasmy myších PDX modelů M11, M5R1, M1 a B2 v podobě grafu.



Obr. 22: Aktivita CDA v buňkách myší plasmy. Červeně je zaznamenán průměr ± SD. Některé hodnoty nejsou uvedeny z důvodu velmi nízké až neměřitelné aktivity enzymu CDA. Statistická významnost byla hodnocena pomocí p-hodnot metodou jednosměrné ANOVA a Tukeyho post-hoc testování. Při srovnání všech linií mezi sebou nebyla statistická významnost signifikantní.

Z výsledků je patrné, že PDX modely vykazují velice nízkou aktivitu CDA. Molekulárně biologickými metodami bylo potvrzeno, že modely neexprimují CDA v dostatečné míře. V grafech prezentující aktivitu CDA v jednotlivých myších modelech vzorků tumoru a plasmy nejsou však patrné všechny body prezentující aktivitu CDA pro jednotlivé modely. Aktivita v těchto případech dosahovala záporných hodnot, proto nebyla graficky zaznamenána.

5 DISKUSE

Tato práce byla zaměřena na metabolické přeměny nukleosidových analog v modelových buněčných lyzátech a myších PDX modelech. Ara-C je běžně intravenózně podávaným chemoterapeutikem při léčbě AML, a to jak v indukční fázi léčby v kombinaci s antracykliny, tak i ve fázi postremisní (Burnett el al., 2011). Experimentální část práce je pak konkrétně zaměřena na stanovení aktivity enzymu CDA, díky němuž je aktivita cytarabinu snížena, a to jeho deaminací na neaktivní formu uracilarabinosid (Hamada et al., 2002).

Pro stanovení aktivity enzymu CDA byla z počátku experimentální části stěžejní optimalizace LC-MS parametrů pro nukleosidová analoga, se kterými se později pracovalo v další části. Tato optimalizace byla konkrétně zaměřena na MS optimalizaci MRM přechodů všech v experimentální části využívaných standardů – EdC, EdU, IdC, IdU, CldC, CldU, BrdC, BrdU, FC, FU, ara-C a ara-U. Optimalizací byly zíkány parametry Q1, Q3, DP, EP, CE a CXP pro každý standard zvlášť. Následnou chromatografickou separací na koloně byl získán záznam o retenčním čase a nakonec byl vybrán pík o nejvyšší hodnotě S/N. Parametry byly doplněny do výsledné LC-MS/MS metody, která byla aplikována na všechny analýzy experimentální části. Tato metoda byla již využita pro následující krok optimalizace, která především spočívala ve stanovení optimální doby inkubace buněčných lyzátů, v tomto případě prezentovaných rakovinnou linií HeLa a HepG2, s ara-C. Tato doba představovala signifikantní nárůst koncentrace uridinového produktu vzniklého aktivitou CDA, v tomto případě ara-U, a naopak pokles koncentrace substrátu, v tomto případě ara-C. Na základě získaných dat bylo usouzeno, že je potřeba alespoň 10 minutové inkubace lyzátu s ara-C, ne však delší 30 minut z důvodu vznikající exponenciální závislosti mezi koncentracemi ara-U a ara-C. Rovněž bylo potřeba stanovit vhodnou finální koncentraci celkových proteinů ve vzorku, z toho důvodu byly zvoleny dvě koncentrace s vysokým rozestupem: 500 $\mu g \cdot ml^{-1}$ a 200 $\mu g \cdot ml^{-1}$. Výsledné grafy optimalizace prokázaly, že pro práci s lyzáty jsou vhodné obě koncentrace. Nicméně reakce vzorků o koncentraci 500 $\mu g \cdot ml^{-1}$ je příliš rychlá, což není žádoucí při práci s vyšším počtem vzorků v rámci experimentu. Z toho důvodu pro následující experimenty bylo tedy vhodnější ředit zásobní lyzáty na koncentraci 200 $\mu g \cdot ml^{-1}$. Dalším důvodem je, že koncentrace zásobních buněčných lyzátů nedosahuje vždy tak vysokých koncentrací jako je 500 $\mu g \cdot ml^{-1}$, proto by v případě těchto lyzátů bylo možné ředění pouze na koncentrace nižší než 500 $\mu g \cdot ml^{-1}$.

V následující části experimentální části práce byla provedena řada experimentů s cílem stanovení aktivity CDA. Postup přípravy vzorků a standardů byl pro každý experiment totožný, experimenty se pak lišily v typu zkoumaného buněčného lyzátu, myšího PDX modelu buněčné linie a typu využitého substrátu. Počáteční vývoj metody pro stanovení aktivity CDA vycházel z Huang et al. (2022). Měření koncentrace nukleosidů a nukleosidtrifosfátů je obecně poměrně náročné kvůli vysokým hladinám jejich fyziologických protějšků a kvůli jejich polárnímu charakteru, který brání jejich retenci pomocí klasické RP-LC (Crauste et al., 2009). Z tohoto důvodu byla pro chromatografickou separaci zvolena dle Zhou et al. (2012) aminopropylová HILIC kolona, vhodná pro separaci polárních sloučenin. Chromatografická separace byla provedena metabolomickou metodou dle Ligasová et al. (2023b), MS detekce proběhla dle optimalizovaných podmínek.

S ohledem na experiment porovnávající míru aktivity CDA mezi rakovinnými buněčnými liniemi, liniemi diploidních buněk a linií imortalizovaných diploidních buněk je ze získaných dat zřetelné, že pouze buněčné linie obsahující významné množství CDA, tedy linie NCl-H2009, HeLa a HepG2, přeměnily testovaný substrát ara-C na ara-U. Výsledek tohoto experimentu podpořil experiment provedený na pracovišti Ústavu molekulární a translační medicíny Lékařské fakulty Univerzity palackého, kde bylo provedeno stanovení koncentrace CDA pomocí Western blotu ve všech zkoumaných buněčných linií v této práci. Výsledná koncentrace CDA v těchto liniích (Obr. 23) byla úměrná aktivitě CDA, která byla měřená v této práci. Doposud však nebyla v literatuře porovnána míra aktivity CDA mezi těmito buněčnými liniemi.

Obr. 23: Výsledek Western blot analýzy pro stanovení koncentrace CDA v jednotlivých buněčných liniích.

Substrátová specifita CDA HeLa buněčné linie byla však odlišná. CDA vykazovala nejvyšší afinitu k FC, dále pak k BrdC, Cr a IdC. Ligasová et al. (2023b) se mimo jiné zabývali aktivitou CDA ve vybraných buněčných liniích. Byla zaznamenána vyšší substrátová afinita CDA k cytidinu než k ara-C a EdC. Výsledky experimentu v této práci korespondují s výsledky této studie. EdC naopak není deaminován na EdU takovou rychlostí jako zmíněné substráty na své uridinové protějšky, proto byla zvolena doba inkubace 30 minut. Pro kompletní přeměnu EdC na EdU jsou dle Ligasová et al. (2016) 4 hodiny dostatečnou dobou. V případě některých vzorků v experimentu dosahovala koncentrace EdU záporných hodnot, k čemuž mohlo dojít chybou v měření, nebo pokud chromatografické píky byly chybně zintegrovány. Studium deaminace nukleosidových analog enzymem CDA má potenciál v souvislosti s jejich využitím při léčbě hematologických malignit (Yoshio el al., 2007). Například deaminace ara-C vede ke snížení terapeutických účinků tohoto analogu (Hamada et al., 2002). Naopak deaminace EdC vede ke vzniku EdU s vysokou toxicitou pro buněčný růst, což je v případě protinádorové léčbě žádoucí (Ligasová et al., 2015).

Aktivita CDA je do jisté míry liší v různých fázích buněčného cyklu, jak dokazuje výsledek experimentu popsaného v podkapitole 3.2.1.3. Ara-C je do rakovinných buněk transportován nukleosidovými transportéry rodiny SLC (Yoshio el al., 2007), kde je v cytoplazmě řadou enzymů podroben tříkrokové fosforylaci na aktivní formu ara-CTP (Yamauchi & Ueda, 2005). Rovněž v cytoplazmě se vyskytující CDA může však této třikrokové fosforylaci zabránit přeměnou ara-C na neaktivní metabolit ara-U (Hamada et al, 2002). Dle Wang et al. (2017) vykazuje CDA v cytoplasmě rakovinných buněk v G1-fázi buněčného cyklu nevyšší aktivitu, což dokazuje zvyšující se koncentrace uracilu. Na základě výsledků je možné tedy soudit, že kultivované buňky linií HeLa a HepG2 dosáhly v době kultivace 8-12h v případě HepG2 a 4-8h v případě HeLa nejvyšší aktivity CDA, která zabránila již zmíněné fosforylaci ara-C na ara-CTP a tedy jeho inkorporaci do molekuly DNA během následující S-fáze buněčného cyklu. V porovnání s metodami analýzy buněčného cyklu popsanými Ligasová et al. (2023a) nemusí být určení fáze buněčného cyklu na základě aktivity CDA metodou LS-MS/MS přesné. V tomto případě by bylo vhodnější nejprve přesně definovat fáze buněčného cyklu metodami Ligasová et al. (2023a), následně pak provést stanovení aktivity CDA v jednotlivých fázích buněčného cyklu metodou LC-MS/MS.

Byla rovněž porovnávána aktivita CDA v PDX modelech myšího tumoru a plasmy. PDX modely jsou široce používány ve farmaceutickém průmyslu pro testování vlivu

léčiv. Odkazují na implantaci bioptického vzorku nebo chirurgicky resektovaného vzorku nádoru do imunodeficientních myší (Miserocchi et al., 2017). Dle experimentu popsaným v podkapitole 3.2.1.5 zkoumané PDX modely myšího tumoru a plasmy neexprimují takové množství CDA jako buněčné linie zkoumané v předchozích experimentech této práce. Z tohoto důvodu již nebudou tyto myší PDX modely využívány pro experimenty zabývající se aktivitou CDA. Mohly by však najít potenciál v budoucích experimentech pro stanovení aktivity deoxycytidindeaminasy (dCDA; EC 3.5.4.5), enzym deaminující deoxycytosin na produkt deoxyuridin (Kang et al., 2014).

6 ZÁVĚR

Teoretická část diplomové práce charakterizuje hematologické malignity, jejich klasifikaci a možnosti léčby, především pak popis mechanismu účinku, cytotoxicity a rezistence cytarabinu, v lékařství běžně užívaného chemoterapeutika pro léčbu AML. Tato část se dále zabývala obecným popisem nukleosidových analog.

Experimentální část byla věnována stanovení aktivity CDA pomocí kapalinové chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií. Byly optimalizovány MRM přechody pro všechny vybrané substráty a výsledné parametry byly doplněny do finální metody LC-MS/MS, kterou byly provedeny všechny analýzy v rámci experimentální části práce. Rovněž byla provedena optimalizace inkubace buněčných lyzátů s ara-C, kdy byla stanovena nejvhodnější délka inkubace, a to 30 minut, a výsledná koncentrace proteinu ve vzorku, tedy 200 $\mu g \cdot ml^{-1}$, pro kterou je nejvhodnější inkubace s ara-C o koncentraci 10 $\mu mol \cdot l^{-1}$.

Na základě provedených optimalizací byla provedena série experimentů pro stanovení aktivity CDA. Analýza aktivity CDA byla provedena v rámci nádorových buněčných linií, liniích tvořenými diploidními buňkami a linii imortalizovaných diploidních buněk, přičemž nejvyšší aktivita CDA byla zaznamenána v rakovinných liniích. Byla také zkoumána substrátová specifita, kdy byla zaznamenána vysoká afinita CDA buněčné linie HeLa k ara-C, v porovnání s ostatními vybranými substráty vykazovala nejvyšší afinitu jednoznačně k substrátu FC. V porovnání se zkoumanými buněčnými liniemi vykazovaly modely PDX vzorků myšího tumoru a plasmy nízkou aktivitu CDA.

7 LITERATURA

Adam, Z., Krejčí, M., Vorlíček, J., a kol. (2008). *Hematologie: Přehled maligních hematologických nemocí* (2. vydání). Grada.

Anderson, K. C., & Carrasco, R. D. (2011). Pathogenesis of myeloma. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, *6*, 249–274. https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-011110-130249

Baccarani, M., Rosti, G., De Vivo, A., Bonifazi, F., Russo, D., Martinelli, G., Testoni, N., Amabile, M., Fiacchini, M., Montefusco, E., et al. (2002). A randomized study of interferon-α versus interferon-α and low-dose arabinosyl cytosine in chronic myeloid leukemia. *Blood*, *99*(5), 1527–1535. https://doi.org/10.1182/blood.V99.5.1527

Bahlis, N. J., & Lazarus, H. M. (2006). Multiple myeloma-associated AL amyloidosis: Is a distinctive therapeutic approach warranted? *Bone Marrow Transplantation*, *38*, 7-15. https://doi.org/10.1038/sj.bmt.1705395

Barbas, C., Moraes, E. P., & Villaseñor, A. (2011). Capillary electrophoresis as a metabolomics tool for non-targeted fingerprinting of biological samples. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 55*, 823–831. https://doi.org/10.1016/j.jpba.2011.02.001

Bhowmik, S. K., & Jung, B. H. (2012). Analysis of plasma nucleotides in rat by micellar electrokinetic capillary chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, *26*(12), 1426–1436. https://doi.org/10.1002/rcm.6245

Boddu, P., Kantarjian, H. M., Garcia-Manero, G., Ravandi, F., Verstovsek, S., Jabbour, E., Borthakur, G., Konopleva, M., Bhalla, K. N., Daver, N., et al. (2017). Treated secondary acute myeloid leukemia: A distinct high-risk subset of AML with adverse prognosis. *Blood Advances*, *1*(17), 1312–1323. https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2017008227

Burnett, A., Wetzler, M., & Löwenberg, B. (2011). Therapeutic advances in acute myeloid leukemia. *Journal of Clinical Oncology*, *29*, 487–494. https://doi.org/10.1200/JCO.2010.30.1820

Coskun, O. (2016). Separation techniques: Chromatography. *North Clin Istanbul*, *3*(2), 156-160. doi:10.14744/nci.2016.32757

Cowan, A. J., Baldomero, H., Atsuta, Y., Mikhael, J., Aljurf, M., Seber, A., Greinix, H., Koh, M., Worel, N., Libby, E. N., et al. (2020). The Global State of Hematopoietic Cell Transplantation for Multiple Myeloma: An Analysis of the Worldwide Network of Blood and Marrow Transplantation Database and the Global Burden of Disease Study. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, *26*(12), 2372–2377. https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2020.08.018

Crauste, C., Lefebvre, I., Hovaneissian, M., Puy, J. Y., Roy, B., Peyrottes, S., Cohen, S., Guitton, J., Dumontet, C., & Perigaud, C. (2009). Development of a sensitive and selective LC/MS/MS method for the simultaneous determination of intracellular 1-beta-d-arabinofuranosylcytosine triphosphate (araCTP), cytidine triphosphate (CTP) and deoxycytidine triphosphate (dCTP) in a human follicular lymphoma cell line. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life* Sciences, *877*(14–15), 1417–1425. https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2009.02.071

Dass, Ch. (2007). *Fundamentals of Contemporary Mass Spectrometry* (First edition). John Wiley & Sons Ltd.

de Graaf, R. A. (2019). *In Vivo NMR Spectroscopy: Principles and Techniques* (third edition). John Wiley & Sons Ltd.

Deininger, M., O'Brien, S. G., Guilhot, F., Goldman, J. M., Hochhaus, A., Hughes, T. P., Radich, J. P., Hatfield, A. K., Mone, M., Filian, J., et al. (2009). International Randomized Study of Interferon Vs STI571 (IRIS) 8-Year Follow up: Sustained Survival and Low Risk for Progression or Events in Patients with Newly Diagnosed Chronic Myeloid Leukemia in Chronic Phase (CML-CP) Treated with Imatinib. *Blood*, *114*(22), 1126–1126. https://doi.org/10.1182/blood.v114.22.1126.1126

Delhommeau, F., Dupont, S., Valle, V. D., James, C., Trannoy, S., Massé, A., Kosmider, O., Le Couedic, J.-P., Robert, F., Alberdi, A., et al. (2009). Mutation in TET2 in Myeloid Cancers.

New England Journal of Medicine, *360*(22), 2289–2301. https://doi.org/10.1056/nejmoa0810069

Di Francia, R., Crisci, S., De Monaco, A., Cafiero, C., Re, A., Iaccarino, G., De Filippi R., Frigeri F., Corazzelli G., Micera A., & Pinto, A. (2021). Response and toxicity to cytarabine therapy in leukemia and lymphoma: From dose puzzle to pharmacogenomic biomarkers. *Cancers*, *13*, 1-36. doi:10.3390/cancers13050966

Edwards, J. L., & Kennedy, R. T. (2005). Metabolomic Analysis of Eukaryotic Tissue and Prokaryotes Using Negative Mode MALDI Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Analytichal chemistry*, *77*(7), 2201-2209. https://doi.org/10.1021/ac048323r

Ekström-Smedby, K. (2006). Epidemiology and etiology of non-Hodgkin lymphoma - A review. *Acta Oncologica*, *45*, 258-271. https://doi.org/10.1080/02841860500531682

El Khawanky, N., Hughes, A., Yu, W., Myburgh, R., Matschulla, T., Taromi, S., Aumann, K., Clarson, J., Vinnakota, J. M., Shoumariyeh, K., et al. (2021). Demethylating therapy increases anti-CD123 CAR T cell cytotoxicity against acute myeloid leukemia. *Nature Communications*, *12*(1). https://doi.org/10.1038/s41467-021-26683-0

Errasti-murugarren, E., Pastor-Anglada, M., & Casado, F. J. (2007). Role of CNT3 in the transepithelial flux of nucleosides and nucleoside-derived drugs. *Journal of Physiology*, *582*(3), 1249–1260. https://doi.org/10.1113/jphysiol.2007.130138

Esteller, M. M. D. (2008). Epigenetics in CancerMolecular origins of cancer. *The New England Journal of Medicine*, *358*(11), 1148-1159. https://doi.org/10.1056/NEJMra072067

Ewald, B., Sampath, D., & Plunkett, W. (2008). Nucleoside analogs: Molecular mechanisms signaling cell death. *Oncogene*, *27*, 6522-6537. https://doi.org/10.1038/onc.2008.316

Faber, E. a kol. (2012). *Základy hematologické diagnostiky* (1. vydání). Univerzita Palackého v Olomouci.

Fekete, S., Beck, A., Veuthey, J. L., & Guillarme, D. (2015). Ion-exchange chromatography for the characterization of biopharmaceuticals. J*ournal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *113*, 43–55 . https://doi.org/10.1016/j.jpba.2015.02.037

Figueroa, M. E., Lugthart, S., Li, Y., Erpelinck-Verschueren, C., Deng, X., Christos, P. J., Schifano, E., Booth, J., van Putten, W., Skrabanek, L., et al. (2010). DNA Methylation Signatures Identify Biologically Distinct Subtypes in Acute Myeloid Leukemia. *Cancer Cell*, *17*(1), 13–27. https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.11.020

Fisher, S. G., & Fisher, R. I. (2004). The epidemiology of non-Hodgkin's lymphoma. *Oncogene*, *23*, 6524-6534. https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207843

Frances, A., & Cordelier, P. (2020). The Emerging Role of Cytidine Deaminase in Human Diseases: A New Opportunity for Therapy? *Molecular Therapy*, *28*, 357–366. https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2019.11.026

Friedecký, D., Tomková, J., Maier, V., Janošťková, A., Procházka, M., & Adam, T. (2007). Capillary electrophoretic method for nucleotide analysis in cells: Application on inherited metabolic disorders. *Electrophoresis*, *28*(3), 373–380. https://doi.org/10.1002/elps.200600262

Gelsi-Boyer, V., Trouplin, V., Adélaïde, J., Bonansea, J., Cervera, N., Carbuccia, N., Lagarde, A., Prebet, T., Nezri, M., Sainty, D., et al. (2009). Mutations of polycomb-associated gene ASXL1 in myelodysplastic syndromes and chronic myelomonocytic leukaemia. *British Journal of Haematology*, *145*(6), 788–800. https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2009.07697.x

Giordano, M., Croci, D. O., & Rabinovich, G. A. (2013). Galectins in hematological malignancies. *Current Opinion in Hematology*, *20*, 327-335. https://doi.org/10.1097/MOH.0b013e328362370f

Grebe, S. K. G., & Singh, R. J. (2011). LC-MS/MS in the clinical laboratory - Where to from here? *Clinical Biochemist Reviews*, *32*(1), 5–31. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3052391/

Guan, L., van der Heijden, G. W., Bortvin, A., & Greenberg, M. M. (2011). Intracellular detection of cytosine incorporation in genomic DNA by using 5-ethynyl-2'-deoxycytidine. *ChemBioChem*, *12*(14), 2184–2190. https://doi.org/10.1002/cbic.201100353

Guo, Y., Kock, K., Ritter, C. A., Chen, Z. S., Grube, M., Jedlitschky, G., Illmer, T., Ayres, M., Beck, J., Siegmund, W., et al (2009). Expression of ABCC-type nucleotide exporters in blasts

of adult acute myeloid leukemia: Relation to long-term survival. *Clinical Cancer Research*, *15*(5), 1762–1769. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-0442

Gysler, J., Tjaden, U. R., & Van Greef, J. D. (2000). Chip-based capillary electrophoresis with an electrodeless nanospray interface. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, *14*(18), 1682–1688. https://doi.org/10.1002/1097-0231(20000930)14:18<1682::AID-RCM78>3.0.CO;2-E

Hagemeister, F. (2010). Rituximab for the Treatment of Non-Hodgkin's Lymphoma and Chronic Lymphocytic Leukaemia. *Drugs*, *70*, 261–272. https://doi.org/10.2165/11532180-000000000-00000

Hallek, M. (2019). Chronic lymphocytic leukemia: 2020 update on diagnosis, risk stratification and treatment. *American Journal of Hematology*, *94*(11), 1266–1287. https://doi.org/10.1002/ajh.25595

Hamada, A., Kawaguchi, T., & Nakano, M. (2002). Clinical pharmacokinetics of cytarabine formulations. *Clinical Pharmacokinetics*, *41*, 705–718. https://doi.org/10.2165/00003088-200241100-00002

Hanahan, D. (2022). Hallmarks of Cancer: New Dimensions. Cancer Discovery. *American Association for Cancer Research Inc*, *12*(1), 31-46. https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059

Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, *144*(5), 646-674. https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013

Hao, W., Wu, M., Tian, X., Hu, Z., Zhang, H., Huang, F., Li, S., & Chen, Y. L. (2023). Preparation of bicyclo[1.1.1]pentane-derived nucleoside analogues. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, *42*(12), 959–966. https://doi.org/10.1080/15257770.2023.2218446

Havlíček, V., & Tureček, F. (2020). Kvadrupólový analyzátor a iontové pasti. *Chemické listy*, *114*(2), 106-112. http://www.chemicke-listy.cz/ojs3/index.php/chemicke-listy/article/view/3537

Hochhaus, A., Saussele, S., Rosti, G., Mahon, F. X., Janssen, J. J. W. M., Hjorth-Hansen, H., Richter, J., & Buske, C. (2017). Chronic myeloid leukaemia: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*, *28*, iv41–iv51. https://doi.org/10.1093/annonc/mdx219

Horvát-Karajz, K., Balogh, Z., Kovács, V., Hámori, A., Sréter, L., & Uher, F. (2009). In vitro effect of carboplatin, cytarabine, paclitaxel, vincristine, and low-power laser irradiation on murine mesenchymal stem cells. *Lasers in Surgery and Medicine*, *41*, 463–469. doi:10.1002/lsm.20791

Huang, S., Liu, L., Liu, X., Song, L., Huang, C., & Miao, L. (2022). Development and application of a rapid and sensitive liquid chromatography-mass spectrometry method for simultaneous analysis of cytarabine, cytarabine monophosphate, cytarabine diphosphate and cytarabine triphosphate in the cytosol and nucleus. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *211*. https://doi.org/10.1016/j.jpba.2022.114582

Chen, M., Kim, Y., Huang, Q., Chang, K., Gaal, K. K., & Weiss, L. M. (2011). Acute myeloid leukemia with an unusual histologic pattern mimicking metastatic carcinoma in bone marrow: A diagnostic pitfall. *Journal of Hematopathology*, *4*(2), 117–122. https://doi.org/10.1007/s12308-011-0090-z

Chereda, B., & Melo, J. V. (2015). Natural course and biology of CML. *Annals of Hematology*, *94*, 107-121. https://doi.org/10.1007/s00277-015-2325-z

Jabbour, E., & Kantarjian, H. (2018). Chronic myeloid leukemia: 2018 update on diagnosis, therapy and monitoring. *American Journal of Hematology*, *93*(3), 442–459. https://doi.org/10.1002/ajh.25011

Jabbour, E., & Kantarjian, H. (2020). Chronic myeloid leukemia: 2020 update on diagnosis, therapy and monitoring. *American Journal of Hematology*, *95*(6), 691–709. https://doi.org/10.1002/ajh.25792

Jandera, P. (2011). Stationary and mobile phases in hydrophilic interaction chromatography: A review. *Analytica Chimica Acta*, *692*, 1–25. https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.02.047

Jandera, P., & Janás, P. (2017). Recent advances in stationary phases and understanding of retention in hydrophilic interaction chromatography. A review. *Analytica Chimica Acta*, *967*, 12–32. https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.01.060

Jensen, U. G., Brandt, N. J., Christensen, E., Skovby, F., Nørgaard-Pedersen, B., & Simonsen, H. (2001). Neonatal screening for galactosemia by quantitative analysis of hexose monophosphates using tandem mass spectrometry: A retrospective study. *Clinical Chemistry*, *47*(8), 1364–1372. https://doi.org/10.1093/clinchem/47.8.1364

Jeong, J. S., Kim, S. K., & Park, S. R. (2012). Capillary electrophoresis mass spectrometry with sheathless electrospray ionization for high sensitivity analysis of underivatized amino acids. *Electrophoresis*, *33*(14), 2112–2121. https://doi.org/10.1002/elps.201200005

Jordan, C. T. (2010). Targeting Myeloid Leukemia Stem Cells. *Science Translational Medicine*, *2*(31). DOI:10.1126/scitranslmed.3000914

Jurczyszyn, A., Grzasko, N., Gozzetti, A., Czepiel, J., Cerase, A., Hungria, V., Crusoe, E., Silva Dias, A. L. M., Vij, R., Fiala, M. A., et al. (2016). Central nervous system involvement by multiple myeloma: A multi-institutional retrospective study of 172 patients in daily clinical practice. *American Journal of Hematology*, *91*(6), 575–580. https://doi.org/10.1002/ajh.24351

Kang, J. S. (2012). Principles and Applications of LC-MS/MS for the Quantitative Bioanalysis of Analytes in Various Biological Samples. In J. K. Prasain, *Tandem Mass Spectrometry – Applications and Principles* (459-510). InTech.

Kang, T. M., Yuan, J., Zhou, A., Beppler, C., & Miller, J. H. (2014). Deoxycytidine deaminase-deficient Escherichia coli strains display acute sensitivity to cytidine, adenosine, and guanosine and increased sensitivity to a range of antibiotics, including vancomycin. *Journal of Bacteriology*, *196*(11), 1950–1957. https://doi.org/10.1128/JB.01383-13

Kantarjian, H., O'Brien, S., Jabbour, E., Garcia-Manero, G., Quintas-Cardama, A., Shan, J., Rios, M. B., Ravandi, F., Faderl, S., Kadia, T., et al. (2012). Improved survival in chronic myeloid leukemia since the introduction of imatinib therapy: A single-institution historical experience. *Blood*, *119*(9), 1981–1987. https://doi.org/10.1182/blood-2011-08-358135

Kantarjian, H. M., Kadia, T. M., DiNardo, C. D., Welch, M. A., & Ravandi, F. (2021). Acute myeloid leukemia: Treatment and research outlook for 2021 and the MD Anderson approach. *Cancer*, *127*, 1186-1207. https://doi.org/10.1002/cncr.33477

Karp, J. E., Giles, F. J., Gojo, I., Morris, L., Greer, J., Johnson, B., Thein, M., Sznol, M., & Low, J. (2008). A Phase I study of the novel ribonucleotide reductase inhibitor 3-aminopyridine-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone (3-AP, Triapine®) in combination with the nucleoside analog fludarabine for patients with refractory acute leukemias and aggressive myeloproliferative disorders. *Leukemia Research*, *32*(1), 71–77. https://doi.org/10.1016/j.leukres.2007.05.003

Khalil, A., & Kashif, M. (2023). Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy for Quantitative Analysis: A Review for Its Application in the Chemical, Pharmaceutical and Medicinal Domains. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, *53*, 997–1011. https://doi.org/10.1080/10408347.2021.2000359

Kimura, S., Ando, T., & Kojima, K. (2014). Ever-advancing chronic myeloid leukemia treatment. *International Journal of Clinical Oncology*, *19*, 3–9. https://doi.org/10.1007/s10147-013-0641-7

Klein, U., Lia, M., Crespo, M., Siegel, R., Shen, Q., Mo, T., Ambesi-Impiombato, A., Califano, A., Migliazza, A., Bhagat, G., et al. (2010). The DLEU2/miR-15a/16-1 Cluster Controls B Cell Proliferation and Its Deletion Leads to Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cancer Cell*, *17*(1), 28–40. https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.11.019

Kuehnbaum, N. L., & Britz-Mckibbin, P. (2011). Comprehensive profiling of free and conjugated estrogens by capillary electrophoresis-time of flight/mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, *83*(21), 8063–8068. https://doi.org/10.1021/ac201980w

Kyle, R. A., Gertz, M. A., Witzig, T. E., Lust, J. A., Lacy, M. Q., Dispenzieri, A., Fonseca, R., Rajkumar, S. V., Offord, J. R., Larson, D.R., et al. (2003). Review of 1027 patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Mayo Clinic Proceedings*, *78*(1), 21–33. https://doi.org/10.4065/78.1.21

Kyle, R. A., Larson, D. R., Therneau, T. M., Dispenzieri, A., Kumar, S., Cerhan, J. R., & Rajkumar, S. V. (2018). Long-Term Follow-up of Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance. *New England Journal of Medicine, 378*(3), 241–249. https://doi.org/10.1056/nejmoa1709974

Lemr, K., & Borovcová, L. (2020). Elektronová ionizace. *Chemické listy*, *114*(2), 101-105. http://www.chemicke-listy.cz/ojs3/index.php/chemicke-listy/article/view/3536

Lemr, K., & Borovcová, L. (2020). Ionizace elektrosprejem. *Chemické listy*, *114*(3), 169-178. http://www.chemicke-listy.cz/ojs3/index.php/chemicke-listy/article/view/3559

Ley, T. J., Ding, L., Walter, M. J., McLellan, M. D., Lamprecht, T., Larson, D. E., Kandoth, C., Payton, J. E., Baty, J., Welch, J., et al. (2010). DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia Supplementary Appendix. *New England Journal of Medicine*, *363*(25), 2424–2433. DOI: 10.1056/NEJMoa1005143

Liang, D., Wang, W., Jiang, X., & Yin, S. (2014). Simultaneous determination of 1-β-d-Arabinofuranosylcytosine and two metabolites, 1-β-d-Arabinofuranosyluracil and 1-β-d-Arabinofuranosylcytosine triphosphate in leukemic cell by HPLC-MS/MS and the application to cell pharmacokinetics. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, *962*, 14–19. https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2014.05.003

Ligasová, A., Strunin, D., Friedecký, D., Adam, T., & Koberna, K. (2015). A fatal combination: A thymidylate synthase inhibitor with DNA damaging activity. *PLoS ONE*, *10*(2). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117459

Ligasová, A., Liboska, R., Friedecký, D., Mičová, K., Adam, T., Ozdian, T., Rosenberg, I., & Koberna, K. (2016). Dr Jekyll and Mr Hyde: A strange case of 5-ethynyl-2′-deoxyuridine and 5-ethynyl-2′-deoxycytidine. *Open Biology*, *6*(1). https://doi.org/10.1098/rsob.150172

Ligasová, A., Frydrych, I., & Koberna, K. (2023a). Basic Methods of Cell Cycle Analysis. *International Journal of Molecular Sciences*, *24*. https://doi.org/10.3390/ijms24043674

Ligasová, A., Pisklákova, B., Friedecký, D., & Koberna, K. (2023b). A new technique for the analysis of metabolic pathways of cytidine analogues and cytidine deaminase activities in cells. *Scientific Reports*, *13*(1). https://doi.org/10.1038/s41598-023-47792-4

Liu, X., Zhou, L., Shi, X., & Xu, G. (2019). New advances in analytical methods for mass spectrometry-based large-scale metabolomics study. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, *121*. https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.115665

Madeira, P. J. A., & Florêncio, M. H. (2012). Applications of Tandem Mass Spectrometry: From Structural Analysis to Fundamental Studies. In J. K. Prasain, *Tandem Mass Spectrometry – Applications and Principles* (459-510). InTech.

Mamyrin, B. A. (2001). Time-of-flight mass spectrometry (concepts, achievements, and prospects). *International Journal of Mass Spectrometry*, *206*(3), 251–266. https://doi.org/10.1016/S1387-3806(00)00392-4

Manska, S., Octaviano, R., & Rossetto, C. C. (2020). 5-Ethynyl-2-deoxycytidine and 5-ethynyl-2-deoxyuridine are differentially incorporated in cells infected with hsv-1, hcmv, and kshv viruses. *Journal of Biological Chemistry*, *295*(18), 5871–5890. https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.012378

Mardiros, A., Dos Santos, C., McDonald, T., Brown, C. E., Wang, X., Budde, L. E., Hoffman, L., Aguilar, B., Chang, W. C., Bretzlaff, W., et al. (2013). T cells expressing CD123-specific chimeric antigen receptors exhibit specific cytolytic effector functions and antitumor effects against human acute myeloid leukemia. *Blood*, *122*(18), 3138–3148. https://doi.org/10.1182/blood-2012-12-474056

Matern, D., Tortorelli, S., Oglesbee, D., Gavrilov, D., & Rinaldo, P. (2007). Reduction of the false-positive rate in newborn screening by implementation of MS/MS-based second-tier tests: The Mayo Clinic experience (2004-2007). In *Journal of Inherited Metabolic Disease*, *30*, 585–592. https://doi.org/10.1007/s10545-007-0691-y

Maxwell, E. J., & Chen, D. D. Y. (2008). Twenty years of interface development for capillary electrophoresis-electrospray ionization-mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, *627*, 25–33. https://doi.org/10.1016/j.aca.2008.06.034

Mayer, J., Starý, J., a kol. (2002). *Leukemie* (1. vydání). Grada.

Miserocchi, G., Mercatali, L., Liverani, C., De Vita, A., Spadazzi, C., Pieri, F., Bongiovanni, A., Recine, F., Amadori, D., & Ibrahim, T. (2017). Management and potentialities of primary cancer cultures in preclinical and translational studies. *Journal of Translational Medicine*, *15*. https://doi.org/10.1186/s12967-017-1328-z

Momparler, R. L. (2013). Optimization of cytarabine (ARA-C) therapy for acute myeloid leukemia. *Experimental Hematology and Oncology*. BioMed Central Ltd. https://doi.org/10.1186/2162-3619-2-20

Monton, M. R. N., & Soga, T. (2007). Metabolome analysis by capillary electrophoresis-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A, 1168*, 237–246. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.02.065

Muramatsu, N., Ichikawa, M., Katagiri, T., Taguchi, Y., Hatanaka, T., Okuda., T., & Okamoto, H. (2024). p53 dry gene powder enhances anti-cancer effects of chemotherapy against malignant pleural mesothelioma. *Gene Therapy*, *31*, 119–127. https://doi.org/10.1038/s41434-023-00424-y

Nath, S., & Dias, L. G. (2023). Metabolomics in Natural Product Discovery and Their Applications. In V. Soni, & T. E. Hartman, *Metabolomics: Recent Advances and Future Applications* (First edition, 269-286). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-031-39094-4

Newgard, C. B., An, J., Bain, J. R., Muehlbauer, M. J., Stevens, R. D., Lien, L. F., L.F., Haqq, A.M., Shah, S.H., Arlotto, M., Slentz, C.A., et al. (2009). A Branched-Chain Amino Acid-Related Metabolic Signature that Differentiates Obese and Lean Humans and Contributes to Insulin Resistance. *Cell Metabolism*, *9*(4), 311–326. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2009.02.002

Ohmine, K., Ota, J., Ueda, M., Ueno, S. I., Yoshida, K., Yamashita, Y., Kirito, K., Imagawa, S., Nakamura, Y., Saito, K., et al (2001). Characterization of stage progression in chronic myeloid leukemia by DNA microarray with purified hematopoietic stem cells. *Oncogene*, *20*(57), 8249–8257. https://doi.org/10.1038/sj.onc.1205029

Parsons, D. W., Jones, S., Zhang, X., Lin, J. C. H., Leary, R. J., Angenendt, P., Mankoo, P., Carter, H., Siu, I. M., Gallia, G. L., et al. (2008). An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science*, *321*(5897), 1807–1812. https://doi.org/10.1126/science.1164382

Pentak, D., Kozik, V., Bąk, A., Dybał, P., Sochanik, A., & Jampilek, J. (2016). Methotrexate and cytarabine - Loaded nanocarriers for multidrug cancer therapy. Spectroscopic study. *Molecules*, *21*(12). https://doi.org/10.3390/molecules21121689

PubChem. https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/ (4. 4. 2024)

Rafferty, J. L., Zhang, L., Siepmann, J. I., & Schure, M. R. (2007). Retention mechanism in reversed-phase liquid chromatography: A molecular perspective. *Analytical Chemistry*, *79*(17), 6551–6558. https://doi.org/10.1021/ac0705115

Robards., K., & Ryan., D. (2021). *Principles and Practice of Modern Chromatographic Methods* (Second edition). Academic Press.

Roy, R. M., & Ameer, P. M. (2022). Identification of white blood cells for the diagnosis of acute myeloid leukemia. *International Journal of Imaging Systems and Technology*, *32*(4), 1307–1317. https://doi.org/10.1002/ima.22702

Przybilla, J., Hopp, L., Lübbert, M., Loeffler, M., & Galle, J. (2017). Targeting DNA hypermethylation: Computational modeling of DNA demethylation treatment of acute myeloid leukemia. *Epigenetics*, *12*(10), 886–896. https://doi.org/10.1080/15592294.2017.1361090

Salic, A., & Mitchison, T. J. (2008). A chemical method for fast and sensitive detection of DNA synthesis in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*(7), 2415–2420. https://doi.org/10.1073/pnas.0712168105

Sanz-Nebot, V., Balaguer, E., Benavente, F., & Barbosa, J. (2005). Comparison of sheathless and sheath-flow electrospray interfaces for the capillary electrophoresis-electrospray ionization-mass spectrometry analysis of peptides. *Electrophoresis*, *26*(7–8), 1457–1465. https://doi.org/10.1002/elps.200410087

Seiffert, M., Dietrich, S., Jethwa, A., Glimm, H., Lichter, P., & Zenz, T. (2012). Exploiting biological diversity and genomic aberrations in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia and Lymphoma*, *53*, 1023–1031. https://doi.org/10.3109/10428194.2011.631638

Shallis, R. M., Wang, R., Davidoff, A., Ma, X., & Zeidan, A. M. (2019). Epidemiology of acute myeloid leukemia: Recent progress and enduring challenges. *Blood Reviews*, *36*, 70-87. https://doi.org/10.1016/j.blre.2019.04.005

Shao, Ch., Lu, W., Hao, H., & Ye, H. (2021). Functional Metabolomics and Chemoproteomics Approaches Reveal Novel Metabolic Targets for Anticancer Therapy. In S. Hu, *Cancer Metabolomics: Methods and Applications* (First edition, 131-147). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-030-51652-9

Shtil, A. A., Ktitorova, O. V., Kakpakova, E. S., & Holian, O. (2000). Differential Effects of the MDRl (Multidrug Resistance) Gene-Activating Agents on Protein Kinase C: Evidence for Redundancy of Mechanisms of Acquired MDR in Leukemia Cells. *Leukemia and Lymphoma*, *40*(1-2), 191-195. https://doi.org/10.3109/10428190009054896

Schenk, E. L., Koh, B. D., Flatten, K. S., Peterson, K. L., Parry, D., Hess, A. D., Smith, B. D., Karp, J. E., Karnitz, L. M., & Kaufmann, S. H. (2012). Effects of selective checkpoint kinase 1 inhibition on cytarabine cytotoxicity in acute myelogenous leukemia cells in vitro. *Clinical Cancer Research, 18*(19), 5364–5373. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-0961

Simó, C., Ibáñez, C., Gómez-Martínez, Á., Ferragut, J. A., & Cifuentes, A. (2011). Is metabolomics reachable? Different purification strategies of human colon cancer cells provide different CE-MS metabolite profiles. *Electrophoresis*, *32*(13), 1765–1777. https://doi.org/10.1002/elps.201100019

Spratlin, J. L., Serkova, N. J., & Eckhardt, S. G. (2009). Clinical applications of metabolomics in oncology: A review. *Clinical Cancer Research*, *15*, 431-440. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-1059

Stein, E. M., DiNardo, C. D., Fathi, A. T., Pollyea, D. A., Stone, R. M., Altman, J. K., Roboz, G. J., Patel, M. R., Collins, R., Flinn, I. W., et al. (2019). Molecular remission and response patterns in patients with mutant-IDH2 acute myeloid leukemia treated with enasidenib. *Blood*, *133*(7), 676–687. https://doi.org/10.1182/blood-2018-08-869008

Stone, R. M., O'Donnell, M. R., & Sekeres, M. A. (2004). Acute myeloid leukemia. *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology. American Society of Hematology. Education Program*, 98–117. https://doi.org/10.1182/asheducation-2004.1.98

Špánik, I., & Machyňáková, A. (2018). Recent applications of gas chromatography with high-resolution mass spectrometry. *Journal of Separation Science*, *41*, 163-179. https://doi.org/10.1002/jssc.201701016

TechnologyNetworks. https://www.technologynetworks.com/analysis/articles/gc-ms-principle-instrument-and-analyses-and-gc-msms-362513 (29. 2. 2024).

Tsesmetzis, N., Paulin, C. B. J., Rudd, S. G., & Herold, N. (2018). Nucleobase and nucleoside analogues: Resistance and re-sensitisation at the level of pharmacokinetics, pharmacodynamics and metabolism. *Cancers*, *10*. https://doi.org/10.3390/cancers10070240

Tswett, M. (1903). On a new category of adsorption phenomena and their application to biochemical analysis. Tr. Varshavskogo obschestva estestvoispytatelei. *Otd. Biolol*, *14*, 1-20.

Tugizimana, F., Steenkamp, P. A., Piater, L. A., & Dubery, I. A. (2018). Mass spectrometry in untargeted liquid chromatography/mass spectrometry metabolomics: Electrospray ionisation parameters and global coverage of the metabolome. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, *32*(2), 121–132. https://doi.org/10.1002/rcm.8010

Usmani, S. Z., Heuck, C., Mitchell, A., Szymonifka, J., Nair, B., Hoering, A., Alsayed, Y., Waheed, S., Haider, S., Restrepo, A., et al. (2012). Extramedullary disease portends poor prognosis in multiple myeloma and is over-represented in high-risk disease even in the era of novel agents. *Haematologica*, *97*(11), 1761–1767. https://doi.org/10.3324/haematol.2012.065698

Wang, H. W., Balakrishna, J. P., Pittaluga, S., & Jaffe, E. S. (2019). Diagnosis of Hodgkin lymphoma in the modern era. *British Journal of Haematology*, *184*, 45–59. https://doi.org/10.1111/bjh.15614

Wang, Q., Kieffer-Kwon, K. R., Oliveira, T. Y., Mayer, C. T., Yao, K., Pai, J., Cao, Z., Dose, M., Casellas, R., Jankovic, M., et al. (2017). The cell cycle restricts activation-induced cytidine deaminase activity to early G1. *Journal of Experimental Medicine*, *214*(1), 49–58. https://doi.org/10.1084/jem.20161649

Waters, T. (2020). *Process Gas Chromatograph: Fundamentals, Design and Implementation* (First edition). John Wiley & Sons Ltd.

Watson, J. T., & Sparkman, O. D. (2007). Introduction to Mass Spectrometry: Instrumentation, Applications and Strategies for Data Interpretation (Fourth edition). John Wiley & Sons Ltd.

Wu, B., Mao, Z. J., Wang, Z., Wu, P., Huang, H., Zhao, W., Zhang, L., Zhang, Z., Yin, H., Gale, R. P., et al. (2021). Deoxycytidine Kinase (DCK) Mutations in Human Acute Myeloid Leukemia Resistant to Cytarabine. *Acta Haematologica*, *144*(5), 534–541. https://doi.org/10.1159/000513696

Xie, Y., Wu, Z., Qin, Z., Wu, B., Lv, X., Wei, F., & Chen, H. (2021). Methods of Lipidomic Analysis: Extraction, Derivatization, Separation, and Identifcation of Lipids. In S. Hu, *Cancer Metabolomics: Methods and Applications* (First edition, 173-187). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-030-51652-9

Yamauchi, T., & Ueda, T. (2005). A sensitive new method for clinically monitoring cytarabine concentrations at the DNA level in leukemic cells. *Biochemical Pharmacology*, *69*, 1795–1803. doi:10.1016/j.bcp.2005.03.013

Yamauchi, T., Negoro, E., Kishi, S., Takagi, K., Yoshida, A., Urasaki, Y., Iwasaki, H., & Ueda, T. (2009). Intracellular cytarabine triphosphate production correlates to deoxycytidine kinase/cytosolic 5′- nucleotidase II expression ratio in primary acute myeloid leukemia cells. *Biochemical Pharmacology*, *77* (12), 1780-1786. doi:10.1016/j.bcp.2009.03.011

Yin, B., Kogan, S. C., Dickins, R. A., Lowe, S. W., & Largaespada, D. A. (2006). Trp53 loss during in vitro selection contributes to acquired Ara-C resistance in acute myeloid leukemia. *Experimental Hematology*, *34*(5), 631–641. https://doi.org/10.1016/j.exphem.2006.01.015

Yoshio, E., Obata, T., Murata, D., Ito, M., Sakamoto, K., Fukushima, M., Yamasaki, Y., Yamada, Y., Natsume, N., & Sasaki, T. (2007). Cellular localization and functional characterization of the equilibrative nucleoside transporters of antitumor nucleosides. *Cancer Science*, *98*(10), 1633–1637. https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2007.00581.x

Zeng, C., Pan, F., Jones, L. A., Lim, M. M., Griffin, E. A., Sheline, Y. I., Mintun, M. A., Holtzman, D. M., & Mach, R. H. (2010). Evaluation of 5-ethynyl-2′-deoxyuridine staining as a sensitive and reliable method for studying cell proliferation in the adult nervous system. *Brain Research*, *1319*, 21–32. https://doi.org/10.1016/j.brainres.2009.12.092

Zhao, H., & Piwnica-Worms, H. (2001). ATR-Mediated Checkpoint Pathways Regulate Phosphorylation and Activation of Human Chk1. *Molecular and Cellular Biology*, *21*(13), 4129–4139. https://doi.org/10.1128/mcb.21.13.4129-4139.2001

Zhou, B., Xiao, J. F., Tuli, L., & Ressom, H. W. (2012). LC-MS-based metabolomics. *Molecular BioSystems*, *8,* 470-481. https://doi.org/10.1039/C1MB05350G

Zvara, Á., Hackler, L., Nagy, B. Z., Micsik, T., & Puskás, L. G. (2002). New molecular methods for classification, diagnosis and therapy prediction of hematological malignancies. *Pathology and Oncology Research*, *8*(4), 231–240. https://doi.org/10.1007/BF03036737

Žuvela, P., Skoczylas, M., Jay Liu, J., Baczek, T., Kaliszan, R., Wong, M. W., & Buszewski, B. (2019). Column Characterization and Selection Systems in Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography. Chemical Reviews. *American Chemical Society*, *119*, 3674-3729. https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00246

8 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

3-DU	3-deazauridin
AEX	Anion-exchange chromatography
AML	akutní myeloidní leukemie
APCI	Atmospheric pressure chemical ionization
ara- CTP	cytarabin trifosfát
ara-C	cytarabin
ara-CDP	cytarabin difosfát
ara-CMP	cytarabin monofosfát
ara-U	uracilarabinosid
BrdC	5-brom-2'-deoxycytidin
BrdU	5-brom-2'-deoxyuridin
CDA	cytidindeaminasa
CE	Capillary electrophoresis
CE-MS	Capillary electrophoresis-mass spektrometry
CEX	Cation-exchange chromatography
CI	Chemical ionization
CldC	5-chlor-2'-deoxycytidin
CldU	5-chlor-2'-deoxyuridin
CLL	chronická lymfocytární leukemie
CML	chronická myeloidní leukemie
CN-II	cytosolická 5'-nukleotidasa II
Cr	cytidin
dCTP	deoxycytidin trifosfát
DIOS	Desorption/ionization on silicon
dNTP	deoxyribonukleosidtrifosfát
dTMP	deoxythymidin monofosfát
dUMP	deoxyuridin monofosfát
EdC	5-ethynyl-2'-deoxycytidin
EdU	5-ethynyl-2'-deoxyuridin
EI	Electron ionization
ESI	Electrospray Ionization
FAB	Fast atom/ion bormbardment

FdC	5-fluor-2'-deoxycytidin
FdU	5-fluor-2'-deoxyuridin
FT-MS	Fourier transform mass spectrometry
GS-MS	Gas chromatography-mass spektrometry
HILIC	Hydrophilic interaction chromatography
Chk1	kontrolní kinasa 1
IdC	5-iod-2'-deoxycytidin
IdU	5-iod-2'-deoxyuridin
IEX	Ion-exchange chromatography
LC/ESI MS	Liquid chromatography- electrospray ionization -mass spectrometry
LC-MS	Liquid chromatography-mass spectrometry
LIT	Linear quadrupole ion trap
MALDI	Matrix-assisted laser deesorption ionization
MeOH	methanol
MRM	Multiple reaction monitoring
MS/MS	Tandem mass spectrometry
NMR	Nuclear magnetic resonance
NP-LC	Normal-phase liquid chromatography
qNMR	Quantitative nuclear magnetic resonance
QTRAP	Triple-quadrupole-linear ion trap
RP-LC	Reversed-phase liquid chromatographic
RR	ribonukleotidreduktasa
RRM1	velká regulační podjednotka ribonukleotidreduktasy
RRM2	malá katalytická podjednotka ribonukleotidreduktasy
TOF	Time-of-flight
Ur	uridin
X	xanthin