

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Cílená metabolomická analýza vzorků
plazem pacientů s karcinomem ledvin**

Diplomová práce

Bc. Veronika Fryzelková

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2022

Vedoucí práce: Mgr. Dana Dobešová

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně s odborným vedením Mgr. Dany Dobešové a za použití citované literatury.

V Olomouci dne:

Podpis:

Bc. Veronika Fryzelková

Poděkování:

Ráda bych poděkovala především své vedoucí diplomové práce Mgr. Daně Dobešové za odborné vedení, velkou vstřícnost, trpělivost, ochotu a cenné rady při vypracování a snahu mi ve všem pomoci. Poděkování patří rovněž kolektivu a pracovníkům Laboratoře dědičných metabolických poruch, Fakultní nemocnice v Olomouci za pomoc s provedením experimentů i statistickým zpracováním dat. Dále bych chtěla poděkovat Fakultní nemocnici Olomouc a nemocnici Pardubice za vzorky, se kterými jsem v rámci Diplomové práce pracovala.

Tato práce vznikla za podpory projektu, jehož infrastrukturální část (Lékařská fakulta Univerzity Palackého v Olomouci) byl podpořen Grantovou agenturou České republiky (projekt č. 18-12204S).

SOUHRN

Diplomová práce je zaměřena na identifikaci signifikantních metabolitů v plazmatických vzorcích získaných od pacientů s karcinomem ledvin porovnávaných se zdravými jedinci. Pro tento účel byl použit metabolomický přístup s využitím ultraúčinné kapalinové chromatografie s tandemovým hmotnostním spektrometrem. Získaná data byla zpracována, podrobena statistické analýze a interpretována.

V teoretické části je shrnuta stavba, funkce a metabolismus ledvin. Následně je představen světlolobový renální karcinom, jeho diagnostika a léčba, v neposlední řadě také metabolomika a hmotnostní spektrometrie.

Experimentální část zahrnuje metodiku, ve které je popsána příprava mobilních fází, extrakce metabolitů ze vzorků plazem od pacientů s karcinomem ledvin a kontrol, cílená metabolomická analýza a statistické zpracování dat.

Pacienti renálního karcinomu byli porovnávaní s kontrolami v závislosti na pohlaví a jejich metabolické profily se významně lišily. Mezi signifikantními metabolity patřily především aminokyseliny, které byly u obou skupin vzorků významně sníženy oproti kontrolám. Jednalo se o aminokyseliny asparagin, arginin a methionin, které byly významné pro pacienty ženského i mužského pohlaví. U mužů byly navíc identifikovány snížené hladiny isoleucinu, alaninu, valinu, tyrosinu a tryptofanu. Vzorky odebrané pacientkám vykazovaly snížené hladiny histidinu, lysinu a threoninu a také sníženou hladinu hypoxantinu. Dále byly pozorovány změny metabolismu u pseudouridinu a malonylkarnitinu a 2-hydroxybutanoátu u žen. U mužů byla navíc zaznamenána změna metabolismu kyseliny sialové a sperminu.

Snížená hladina aminokyselin v séru pacientů naznačuje existenci renálního karcinomu. Nádorové buňky tyto metabolity využívají pro průběh biosyntetických procesů.

SUMMARY

The diploma thesis is focused on the identification of significant metabolites in plasma samples obtained from patients with kidney cancer compared with healthy individuals. For this purpose, was used a metabolomic approach using ultra-performance liquid chromatography with a tandem mass spectrometer. The obtained data were processed, subjected to statistical analysis and interpreted.

The theoretical part summarizes the structure, function and metabolism of the kidneys. Subsequently, kidney cancer, its diagnosis and treatment, and finally metabolomics and mass spectrometry.

The experimental part includes a methodology that describes the preparation of mobile phases, extraction of metabolites from plasma samples from patients with kidney cancer, targeted metabolomic analysis and statistical data processing.

Patients with renal cell carcinoma were compared with controls in a sex-dependent manner, and their metabolic profiles was significantly differed. Among the significant metabolites were mainly amino acids, which were significantly reduced in both groups of samples compared to the controls. Aminoacids significant for both genders were asparagine, arginine and methionine. Additionally, in men samples were reduced levels of isoleucine, alanine, valine, tyrosine and tryptophan. Samples taken from female patients have reduced levels of histidine, lysine and threonine as well as reduced hypoxanthine levels. On the contrary, increased levels were observed for the pseudouridine in both groups of samples. Malonylcarnitine and 2-hydroxybutanoate levels were also elevated in female patients. Male samples have mainly elevated levels of sialic acid and spermine.

A reduced level of amino acid in the serum of patients suggests the existence of renal cell carcinoma. Tumor cells use these metabolites for biosynthetic processes.

CÍLE PRÁCE

- Vypracování literární rešerše na téma – stavba, funkce a metabolismus ledvin, karcinomy ledvin, metabolomika, kapalinová chromatografie a hmotnostní spektrometrie
- LC-MS analýza vzorků plazem pacientů s karcinomem ledvin a statistické zpracování dat
- Biochemická interpretace dat a diskuze výsledků

OBSAH

1	ÚVOD	1
2	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	2
2.1	Stavba a funkce ledvin	2
2.2	Metabolismus ledvin	4
2.3	Karcinomy ledvin	5
2.3.1	Karcinom renálních buněk	7
2.3.2	Diagnostika.....	13
2.3.3	Léčba	14
2.3.3.1	Cílené terapie (cílená léčba)	14
2.3.3.2	Imunoterapie	15
2.4	Metabolomika	16
2.4.1	Metabolomická analýza	18
2.4.1.1	Cílená metabolomická analýza	19
2.4.1.2	Metabolomické profilování	19
2.4.1.3	Metabolický „fingerprinting“ a „footprinting“	20
2.5	Hmotnostní spektrometrie	20
2.5.1	Hmotnostní spektrometr	20
2.5.1.1	Ionizační techniky	21
2.5.1.2	Hmotnostní analyzátory	23
2.5.1.3	Tandemová hmotnostní spektrometrie.....	26
2.5.1.4	Detektor.....	27
2.5.2	Kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostním spektrometrem.....	28
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	29
3.1	Materiál a chemikálie	29
3.1.1	Biologický materiál	29
3.1.2	Chemikálie.....	30
3.2	Přístrojové vybavení	30
3.3	Metody	30
3.3.1	Příprava mobilních fází.....	30
3.3.2	Extrakce metabolitů ze vzorků plazem.....	31
3.3.3	LC-MS cílená metabolomická analýza vzorků plazem pacientů s karcinomem ledvin	31
3.3.4	Statistická analýza dat	33
4	VÝSLEDKY	35
4.1	Cílená metabolomická analýza vzorků plazmy	35
4.1.1	Vícerozměrná statistická analýza všech skupin vzorků	39
4.1.2	Statistická analýza jednotlivých skupin vzorků.....	41
5	DISKUZE	52
6	ZÁVĚR	56
7	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	57
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK:	77

1 ÚVOD

Předložená diplomová práce je zaměřena na cílenou metabolickou analýzu vzorků plazmy pacientů se světlobuněčným renálním karcinomem. Cílem této práce bylo určení významných metabolitů a jejich interpretace v rámci biochemických drah u pacientů v porovnání se zdravými jedinci.

Světlobuněčný renální karcinom (ccRCC) představuje nejběžnější podtyp rakoviny ledvin. Je tvořen buňkami s čirou cytoplazmou, která vzniká důsledkem vysokého obsahu cytoplazmatických lipidů a glykogenu. Jeho vznik je podmíněn sporadickou nebo dědičnou mutací. Mezi nejčastější dědičné mutace patří Von Hippel Lindau syndrom, který vzniká v důsledku ztráty funkce *VHL* supresorového genu (Grignon *et Che*, 2005; Bielecka *et al.*, 2014). Výskyt renálního karcinomu celkově stále narůstá a v současnosti je 7. nejčastěji diagnostikovaným zhoubným nádorem u mužů. Prognóza metastatického ccRCC je velmi špatná, především z důvodu, že bývá nalezena až v pozdním stadiu onemocnění. S novějšími terapiemi se však celková míra u pacientů zlepšuje (Padala *et Kallam.*, 2022). Popis metabolických změn, vyvolaných karcinomem ledvin může tedy pomoci při vývoji cílené léčby a mimo jiné i zlepšit prognózu pacientů.

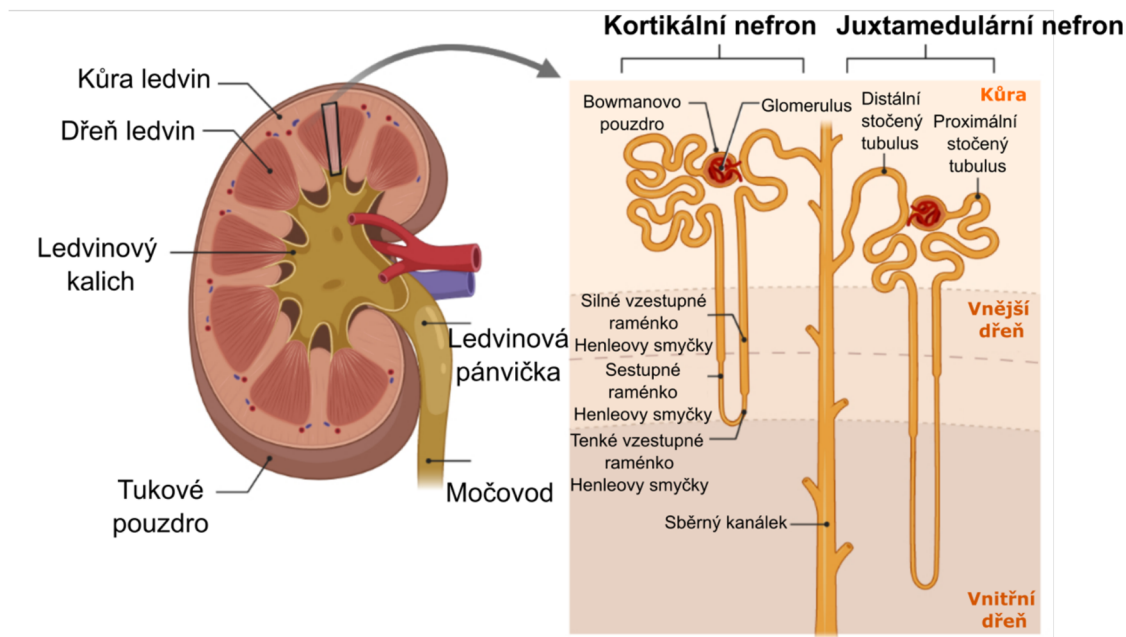
Pro analýzu metabolického profilu vzorků plazem byl použit cílený metabolický přístup, který byl proveden pomocí ultraúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií. Získaná data byla vyhodnocena metodami jednorozměrné i vícerozměrné statistické analýzy. V rámci vícerozměrné statistiky byly aplikovány supervizované i nesupervizované metody s následným provedením biochemické interpretace dat.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Stavba a funkce ledvin

Ledviny jsou párovým orgánem, který společně s močovými cestami tvoří vylučovací soustavu. Mají specifický fazolovitý tvar a hmotnost v rozmezí 120–170 g (Obr. 1). Leží po stranách bederní páteře v prostoru mezi pobřišnicí a zadní břišní stěnou. Pravá ledvina je (vzhledem k poloze jater) umístěna níže než levá. Jsou uloženy v tukovém pouzdru, které slouží jako tepelná izolace a ochrana před mechanickým poškozením. Na mediální straně ledvin se nachází ledvinová branka, která je místem vstupu a výstupu cév i močovodu.

Parenchym ledvin se dělí na kůru a dřeň (Wallace, 1998; Holibková *et* Laichman, 2004). Dřeň ledvin má tmavé, červenošedé zbarvení a je složena z 10–18 ledvinných pyramid. Báze ledvinných pyramid směřují k povrchu orgánu a jejich vrcholy vytvářejí ledvinné papily, které ústí do kalichů. Spojením papil vzniká ledvinová pánvička (Holibková *et* Laichman, 2004). Kůra ledvin má světle červenou barvu. Je místem výskytu základních funkčních jednotek ledvin nazývaných nefrony. V jedné lidské ledvině se nachází přibližně 1,3 milionu nefronů. Jsou tvořeny glomerulární a tubulární částí. Glomerulární část představuje Malpighiho tělísko, které se skládá z glomerulu (klubíčko kapilár) a Bowmanova pouzdra. Do glomerulu se zanořuje přívodná céva (aférentní arteriola) zajišťující přívod krve, která se dále větví v hojně kapilární větvičky sbíhající se do odvodné cévy (eferentní arteriola). Tubulární část tvoří proximální stočený tubulus, Henleova klička a distální stočený tubulus. Distální tubuly se spojují ve sběrné kanálky. Na základě umístění a délce Henleovy klíčky se rozlišují dva typy nefronů – kortikální a juxtamedulární. Kortikální nefrony mají glomeruly uložené ve vnější části kůry ledvin a vytváří krátké Henleovy klíčky. Nefrony druhého typu mají glomeruly v těsné blízkosti dřene ledvin a jsou pro ně charakteristické dlouhé Henleovy klíčky. U člověka převažují kortikální nefrony, zatímco juxtamedulární nefrony představují pouze 15 % všech nefronů (Wallace, 1998; Holibková *et* Laichman, 2004; Ganong, 2005).



Obr. 1: Podélný řez ledviny, její stavba a struktura nefronu. Převzato a upraveno podle (<https://thebiologynotes.com/nephron-structure-functions/>).

Ledviny se vyznačují vysokou vaskularitou. Za minutu jimi proteče přibližně 1,2 litru krve, což představuje 25 % klidového srdečního výdeje těla. Mezi primární funkce ledvin se řadí regulace rovnováhy tělních tekutin a elektrolytů, zajištění stabilního prostředí pro metabolismus tkání a buněk, dále vylučování odpadních látek z těla tvorbou moči a endokrinní funkce. Procesem glomerulární filtrace vzniká ultrafiltrát krevní plazmy známý také jako primární moč. Probíhá v endotelu glomerulárních kapilár a za fyziologických podmínek se vytvoří až 180 litrů za den (Wallace, 1998; Holibková *et Laichman*, 2004; Ganong, 2005). Filtrát je dále zpracováván v proximálním tubulu, kde dochází ke zpětné resorpci důležitých látek pro organismus (bílkoviny, glukóza, voda, ionty, aminokyseliny, organické látky). V Henleově kličce následně vzniká hypotonická tekutina obsahující vysokou koncentraci solí a pouze 20 % filtrované vody (Wallace, 1998; Ganong, 2005, Gonzalez *et al.*, 2020). Na buňky distálních tubulů a sběrných kanálků působí především dva hormony – vasopresin (antidiuretický hormon) a aldosteron. Vasopresin se váže na V2 receptory a tím zvyšuje propustnost stěny pro vodu a zahušťuje primární moč. Aldosteron ovlivňuje vstřebávání sodíku doprovázené pasivním vstřebáváním vody. Těmito procesy vzniká definitivní moč obsahující cizorodé a odpadní látky organismu (močovina, amonné ionty, kreatinin, kyselina močová). Množství definitivní moči představuje pouze 1,5 litru ze zmíněných 180 litrů primární moče. 99% primární moči je tedy vstřebáno zpět do krve (Dylevský, 2013).

Pro ledviny je také velmi důležitá endokrinní činnost. Produkují eikosanoidy a enzym renin (EC 3.4.23.15), který přispívá k regulaci krevního tlaku. Dále tvoří hormon erythropoetin stimulující tvorbu červených krvinek a kalcitriol, který je důležitým regulátorem metabolismu vápníku a fosfátu (Gilbert *et al.*, 2014).

2.2 Metabolismus ledvin

Ledviny se vyznačují vysokou rychlostí metabolismu (400 kcal na kg tkáně za den). Více než 80 % kyslíku spotřebovaného ledvinami se využívá k aktivnímu transportu. Průtok krve a okysličení tkání se v jednotlivých oblastech ledvin liší. Hodnota parciálního tlaku kyslíku (pO_2) je nejvyšší v kůře ledvin (Legouis *et al.*, 2020; Tian *et Liang*, 2021).

V případě delšího hladovění (více než 48 hodin) je v ledvinách stimulován proces glukoneogeneze. Glukoneogeneze probíhá v proximálním tubulu, kde jsou exprimovány klíčové specifické enzymy (pyruvátkarboxylasa, fosfoenolpyruvátkarboxykinasa, fruktosa-1,6-bisfosfatasa a glukosa-6-fosfatasa). Glukóza je produkována z různých prekurzorů (glycerol, laktát, aminokyseliny – především alanin a glutamin). Proximální tubuly reabsorbují glukózu prostřednictvím aktivních glukózových transportérů závislých na sodíku (SGLT1 a SGLT2) a mohou zásobovat další orgány. Proces je hormonálně regulován stresovými hormony (hydrokortizon, epinefrin, noradrenalin, glukagon). Vzhledem k vysokému využití laktátu jako glukoneogenního substrátu, hrají ledviny také důležitou roli v systémovém ostraňování laktátu z organismu (Legouis *et al.*, 2020).

Ledviny jsou také místem, kde probíhá glutaminasová reakce vyvolaná metabolickou acidózou, která může být navozena rozvojem karcinomu. Při normální acidobazické rovnováze ledviny metabolizují jen velmi málo glutaminu, metabolická acidóza však vede ke zvýšené renální extrakci plazmatického glutaminu. Reakce je katalyzována enzymem glutaminsyntetasou (EC 6.3.1.2) (Curthoys *et Watford*, 1995).

Mimo jiné v ledvinách a v menší míře v játrech probíhá syntéza karnitinu ze dvou esenciálních aminokyselin (lysinu a methioninu). Nejprve dochází k methylaci lysinu S-adenosylmethioninem za vzniku N-trimethyllysinu (TML). Dále vzniká hydroxymethyllysin (HTML), který je následně rozštěpen na trimethylaminobutyraldehyd (TMABA) a glycin. TMABA je postupně oxidován na butyrobetain (BB). V konečné fázi je BB hydroxylován za vzniku L-karnitinu, který je transportován do ostatních tkání, především srdce a kosterních svalů. Jednotlivé kroky

přeměny jsou katalyzovány enzymy trimethyllysindioxygenasou (EC 1.14.11.8), serinhydroxymethyltransferasou (EC 2.1.2.1) a dioxygenasou (EC 1.13.11.25) (Cibulka, 2005).

Tvorba kreatininu je další proces probíhající v ledvinách se zakončením v játrech. Reakce začíná transamiací argininu na glycin katalyzovanou enzymem glycinamindinotransferasou (EC 2.1.4.1) za uvolnění ornitinu a vzniku guanidinoacetátu. Guanidinoacetát je následně transportován do jater, kde je methylován S-adenosylmethioninem za vzniku kreatinu. Kreatin přechází do krve a je vychytáván a skladován ve svalové tkáni, srdci a mozku. Většina svalového kreatinu je následně fosforylována na kreatinfosfát, který poté slouží jako rychlý zdroj ATP vlivem neenzymatické přeměny na kreatinin, vylučován močí. Produkce kreatininu závisí na množství svalové hmoty v těle a klesá se zvyšujícím se věkem, a tedy úbytkem svalové hmoty (Hosten, 1990).

2.3 Karcinomy ledvin

Karcinomy ledvin představují heterogenní skupinu a celosvětově je 15. nejčastěji diagnostikovaným zhoubným nádorem. Diagnostika karcinomů ledvin a úmrtnost pacientů spojená s tímto onemocněním celosvětově roste (Harrison et al., 2021).

V rámci diagnostiky onemocnění jsou důležitými kritérii histologická klasifikace a patologické stádium nádorů. Organizace pro mezinárodní kontrolu rakoviny „Union for international cancer control“ (UICC) proto společně s Americkým výborem pro rakovinu „American joint committee on cancer“ (AJCC) zavedla mezinárodní jednotnou klasifikaci jednotlivých maligních nádorů, lymfatických uzlin a metastáz uváděná pod zkratkou „TNM“ (The tumor, lymph nodes and metastasis) (Moch *et al.*, 2000; Ficarra *et al.*, 2005) (Tab. 1). Kategorie „T“ charakterizuje velikost nádoru a rovněž udává, zda se nádor rozšiřuje do jiných tkání. V případě karcinomu ledvin určuje jeho šíření z ledvin přes velkou žílu, renální žílu, dutou žílu, okolního tuku až do nadledvin. Kategorie „N“ popisuje stav regionálních mízních uzlin v souvislosti s výskytem karcinomu a kategorie „M“ udává vznik vzdálených metastáz. Dalším nezbytným prognostickým faktorem, který doplňuje TNM klasifikaci je histologická diference rakovinných buněk známá jako kategorie „G“ (Sobin *et al.*, 2009). Na základě stupně diference buňky se přiřazuje stupeň nádoru, přičemž buňkám s nejnižším stupněm diference je přiřazen nejvyšší stupeň nádoru. V rámci TNM klasifikace se používá také

kategorie „p“ popisující histologicky se zvětšující velikost nebo rozsah nádoru či mízních uzlin (Singh *et al.*, 2015).

Tab 1: Přehled jednotlivých kategorií TNM klasifikace u karcinomu ledvin

Primární nádor (T)	
Tx	Primární nádor nelze hodnotit
T0	Bez známek primárního nádoru
T1	Nádor do 7 cm, omezen na ledvinu
T1a	Nádor do 4 cm
T1b	Nádor 4 – 7 cm
T2	Nádor > 7 cm, omezen na ledvinu
T2a	Nádor 7 – 10 cm
T2b	Nádor < 10 cm
T3	Nádor se šíří do velkých žil nebo perineálních tkání, ne do stejnostranné nadledviny, ne přes Gerotovu fascii
T3a	Makroskopické číření do renální žíly nebo postihuje perirenální tuk a/nebo tuk renálního sinu, nepřesahuje Gerotovu fascii
T3b	Makroskopické šíření do duté žíly pod bránicí
T3c	Makroskopické šíření do duté žíly nad bránicí /postihuje stěnu duté žíly
T4	Přímé šíření přes Gerotovu fascii do stejnostranné ledviny
Regionální mízní uzliny (N)	
Nx	Regionální mízní uzliny nelze hodnotit
N0	Regionální mízní uzliny bez metastáz
N1	Metastázy v jedné regionální mízní uzlině
Vzdálené metastázy (M)	
Mx	Vzdálené metastázy nelze hodnotit
M0	Bez vzdálených metastáz
M1	Vzdálené metastázy
Histologická diferenciacie rakovinných buněk (G)	
Gx	Stupeň diferenciacie nelze hodnotit

G1	Dobře diferencovaný
G2	Středně diferencovaný
G3-4	Nízce diferencovaný/nediferencovaný

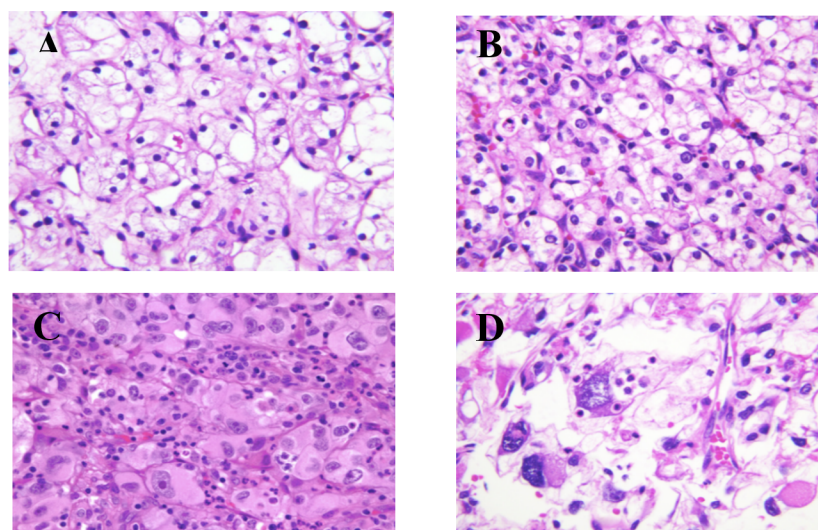
Nejvyšší míra výskytu karcinomu ledvin je ve vyspělých zemích. Mezi hlavní faktory podmiňující rozvoj onemocnění patří zvyšující se věk, kouření, hypertenze a zejména obezita (Rossi *et al.*, 2018). Dále se karcinom ledvin může vyskytovat u pacientů s chronickým onemocněním ledvin, získaným cystickým onemocněním ledvin, hemodialýzou, u pacientů po transplantaci ledvin nebo pacientů s diagnostikovaným *diabetes mellitus*. Vznik karcinomu podporuje také špatný životní styl či stravovací a environmentální faktory (Hsieh *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2018). Nejčastěji postihuje pacienty mezi 60. – 70. rokem života s vyšším výskytem u mužů (Lindblad, 2004).

2.3.1 Karcinom renálních buněk

Světová zdravotnická organizace (WHO – „World health organisation“) zavedla klasifikaci urogenitálních karcinomů do jednotlivých podtypů na základě histologické odlišnosti, klinického průběhu a genetického základu. Více než 85 % zhoubných nádorů ledvin představuje karcinom renálních buněk (RCC), který může být rovněž označován jako adenokarcinom ledvin či konvenční (Grawitz) tumor. Mezi zbývajících 15 % nádorů se řadí karcinomy metanefrické, nefroblastické a mezenchymální. RCC ovlivňuje parenchym proximálních tubulů nefronů, zatímco ostatní typy karcinomů postihují dřeň ledvin nebo ledvinovou pánvičku (Sobczuk *et al.*, 2020).

RCC představuje přibližně 4 % všech maligních nádorů a je třetí nejčastější příčinou úmrtí pacienta na urologický tumor (Alzubaidi *et al.*, 2022). Histologicky se dělí do tří hlavních podtypů – světlobuněčný, papilární a chromofobní RCC (Shingarev *et al.*, 2017).

Nejčastěji se vyskytujícím podtypem RCC je světlobuněčný renální karcinom (ccRCC), který vzniká z epiteliálních buněk proximálního tubulu nefronu. Tvoří 75 % všech zhoubných nádorů ledvin a vykazuje intratumorální heterogenitu (Udager *et al.*, 2016; Nilsson *et al.*, 2020; Lai *et al.*, 2019). Makroskopicky je ccRCC dobře ohraničen. Mikroskopicky je tvořen buňkami s čirou cytoplazmou (Obr. 2). Mezi buňkami je typická vaskulární síť. Se zvyšujícím stupněm malignity mohou mít buňky granulární eozinofilní charakter (Podhola, 2009).

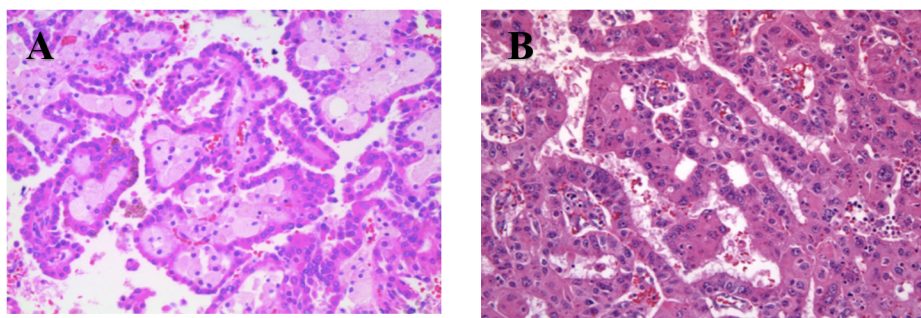


Obr. 2: Mikroskopické snímky ccRCC jednotlivých stadií rakoviny podle TNM klasifikace. ccRCC stadium 1 (A), ccRCC stadium 2 (B), ccRCC stadium 3 (C), ccRCC stadium 4 (D). Převzato a upraveno z (<https://www.pathologyoutlines.com/topic/kidneytumormalignantreclear.html>).

Rozvoj ccRCC je podmíněn genetickými aberacemi, které ve většině případů inaktivují gen Von Hippel-Lindau (*VHL* gen) a tím způsobují rozvoj tumorigeneze. Genetická aberace může rovněž narušit funkci epigenetických regulátorů nebo savčí signalizační dráhu rapamycinu (mTOR) (Shingarev *et* Jaimes, 2017). mTOR je serin/threoninproteinkinasa (EC 2.7.11.1), která nukleuje 2 různé komplexy mTORC1 a mTORC2. mTORC1 je proteinový komplex, který funguje jako specifický regulátor syntézy proteinů. V případě upregulace mTORC1 dochází také k upregulaci exprese podjednotky HIF-1 α . Za podmínek nízké tenze kyslíku (hypoxie) se VHL protein inaktivuje, což vede ke konstitutivní aktivaci HIF dráhy (Bielecka *et al.*, 2014). Genetická aberace genů dráhy mTOR zahrnuje geny *PTEN*, *AKT1*, *PIK3CA* a *mTOR* (Shingarev *et* Jaimes, 2017). Epigenetické regulátory jsou spjaty s geny pro remodelaci chromatinu. V případě jejich narušení dochází k negativnímu ovlivnění genů *PBRM1* (Polybromo 1), *BAP1* (BRCA-associated protein 1) nebo *SETD2* (SET domain containing 2) (Shingarev *et* Jaimes, 2017) Vznikem jedné z uvedených genetických inaktivací následně dochází k rozvoji rezistence vůči apoptose a vzniku nádorového bujení (Lai *et al.*, 2019).

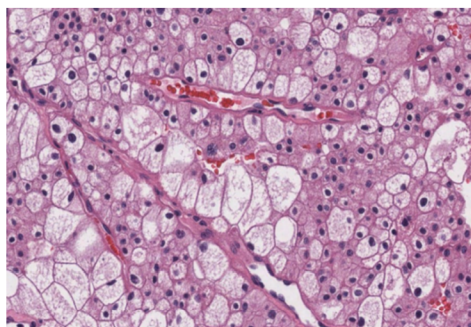
Druhým podtypem onemocnění je papilární renální karcinom (pRCC). Představuje přibližně 15 % případů karcinomů ledvin a je nejčastěji diagnostikovaným histologickým podtypem RCC u mladistvých (Xia *et al.*, 2021). Makroskopicky bývá karcinom dobře ohraničený, šedý až nažloutlý (Podhola, 2009). Histologicky se dále dělí na dva typy – I a II. Typ I se vyznačuje papilami a tubulárními strukturami lemovanými

malými buňkami s basofilní cytoplazmou a malými oválnými jádry s nevýraznými jádérky. Mikroskopicky je druhý typ II výrazně odlišný (Obr. 3). Je více heterogenní a papily jsou lemovány velkými buňkami s bohatou eozinofilní cytoplazmou. Jádra jsou velká, kulatá a s výraznými jádérky. Průběh onemocnění je u některých pacientů mírný, u jiných se naopak vyskytují solitární léze (lokalizované) s agresivním klinickým průběhem. Rozvoj pRCC typu I je podmíněn somatickou, a vzácně i dědičnou mutací genu *MET*. pRCC typu II způsobuje dědičná mutace genu *FH* kódujícího fumaráthydratasu (EC 4.2.1.2). U sporadických pRCC dochází k mutacím genů *CUL3* a *NFE2L2* regulující dráhu NRF2/ARE (Trebani *et al.*, 2016; Connor Wells *et al.*, 2017).



Obr. 3: Mikroskopický snímek pRCC typu I (A) a typu II (B). Převzato z (<https://www.pathologyoutlines.com/topic/kidneytumormalignantrecpap.html>).

Nejméně se vyskytujícím podtypem je chromofobní renální karcinom (chRCC) (Unverzagt *et al.*, 2017; Mitchell *et al.*, 2018). Postihuje buňky distálních tubulů nefronů a oproti předešlým typům RCC vykazuje nejlepší prognózu. Mohou se však objevit i agresivní varianty onemocnění spojené se vznikem metastáz rezistentních na léčbu. Makroskopicky bývá velmi dobře ohraničený, světle hnědý. Mikroskopicky vykazuje charakteristické znaky, kterými se odlišuje od ostatních typů RCC (Obr. 4). Buňky mají světlou retikulární cytoplazmu se zřetelnými buněčnými hranicemi nebo eozinofilní granulózní charakter cytoplazmy. Jádra buněk jsou hyperchromní s nepravidelnou membránou a cytoplazma obsahuje velké množství kyselých mucinů umožňující dobrou barvitelnost koloidním železem (Podhola, 2009; Macek *et al.*, 2000; Shinmura *et al.*, 2015). Vznik chRCC podmiňují dědičné nebo sporadické mutace jednotlivých genů. Rozvoj dědičného chRCC je způsoben mutací genu *FLCN*. Sporadický chRCC vzniká mutací genů *TP53*. Dále může být chRCC vyvolán sporadickou nebo dědičnou mutací genu *PTEN*. Vzhledem k nízkému výskytu tohoto typu karcinomu je oproti ostatním RCC nádorům méně prostudován (Yang *et al.*, 2017).



Obr. 4: Mikroskopický snímek chRCC. Převzato z (<https://www.pathologyoutlines.com/topic/kidneytumormalignantrecchromo.html>)

2.3.1.1 Hereditární karcinomy renálních buněk

RCC vzniká zejména sporadicky, pouze 3 – 5 % případů představují hereditární (dědičné) karcinomy (hRCC) vzniklé genetickou mutací. Řada hRCC způsobuje multisystémové poruchy vyžadující komplexní léčbu. Je proto důležité jejich odlišení od sporadických karcinomů (Hsieh *et al.*, 2017; Shingarev *et al.*, 2017; Lattouf *et al.*, 2016).

Jedinci s rodinnou anamnézou rakoviny ledvin mají dvojnásobně vyšší pravděpodobnost rozvoje renálního onemocnění. U těchto pacientů byly prokázány mutace genů *BAP1*, *FLCN*, *FH*, *MET*, *PTEN*, *SDHB*, *SDHC*, *SDHD*, *TSC1*, *TSC2* a *VHL* (Hsieh *et al.*, 2017). Nicméně, mutace genů predisponujících ke vzniku RCC však mohou vznikat i *de novo* (Maher, 2018).

Většina hRCC vzniká vlivem patogenní mutace genu *VHL* rozvíjející von Hippel-Lindau syndrom. Mezi další syndromy způsobené genetickou mutací se řadí hereditární leiomyomatosa, syndrom Birt-Hogg-Dubé, hereditární pRCC a komplex tuberózní sklerózy. Všechny zmíněné syndromy vykazují autozomálně dominantní typ dědičnosti (Christensen *et al.*, 2019).

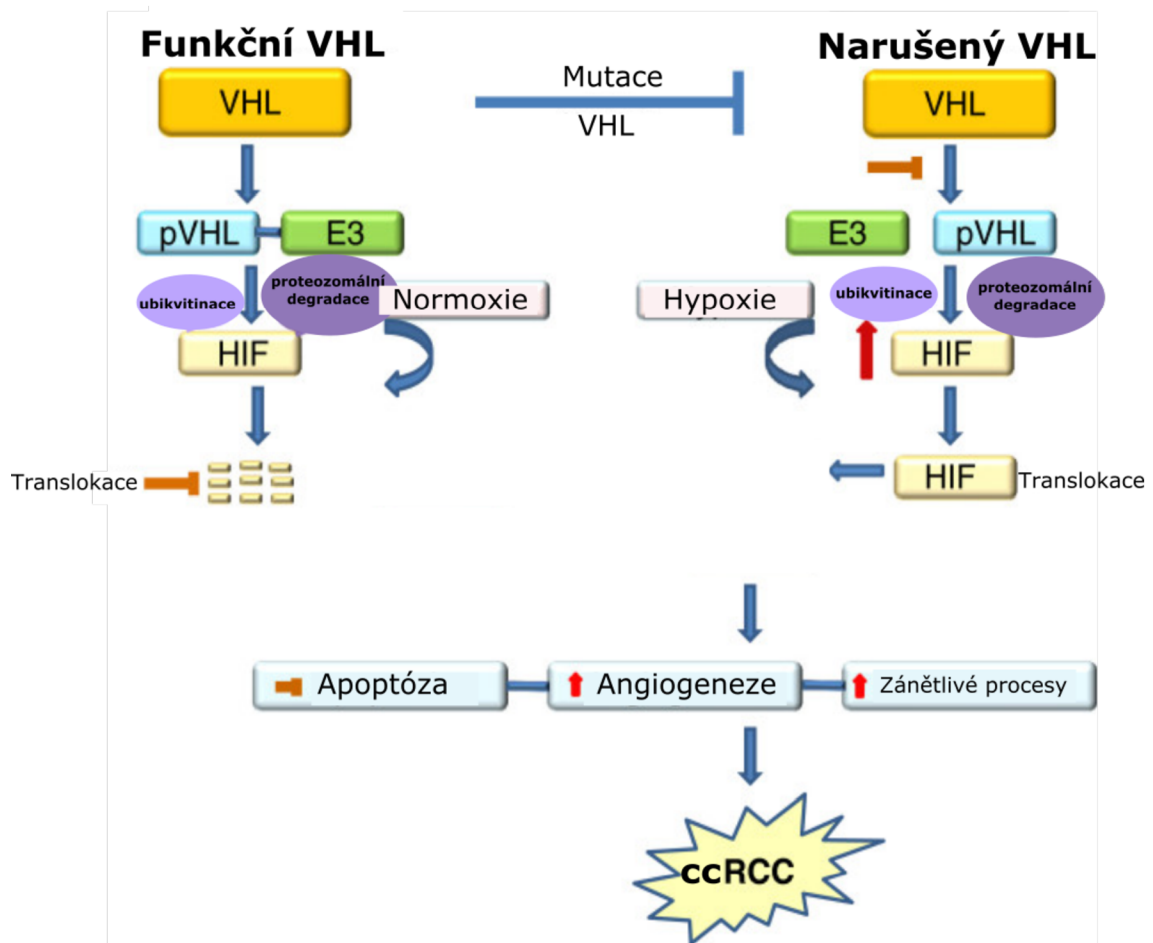
Von Hippel-Lindau syndrom

K nejčastěji mutovaným genům, které způsobují rozvoj ccRCC patří nádorový supresorový gen *VHL*. Je lokalizován na krátkém raménku 3. chromozomu v oblasti 3p25 a byl identifikován v roce 1993 (Latif *et al.*, 1993). *VHL* gen potlačuje vývoj nádoru a jeho narušení podporuje nádorové bujení a vznik von Hippel-Lindau syndromu (VHL syndrom). VHL syndrom je multiorgánová porucha, která kromě ccRCC vyvolává také hemangioblastomy sítnice a centrálního nervového systému, feochromocytomy, karcinomy endolymfatického vaku, pankreatických cyst, pankreatické endokrinní

karcinomy, cystadenomy nadvarlat, cysty na vaječnicích či onemocnění slinivky břišní (Chesnel *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2015; González-Rodríguez *et al.*, 2019).

VHL gen kóduje VHL protein (pVHL), který je společně s dalšími proteiny (elongin B a C, cullin-2 a Rbx1) klíčovou komponentou komplexu E3 ubikvitin ligázy, potřebné pro ubikvitin-proteazomový systém (Obr. 5). pVHL cílí na transkripční hypoxií indukované faktory (HIF). HIF se skládá ze dvou α podjednotek (HIF-1 α a HIF-2 α), které tvoří heterodimer s podjednotkou β (HIF- β). Hlavní funkcí *VHL* genu je sledování snímání hodnoty kyslíku buněk regulací α podjednotek HIF. Během normoxie je podjednotka HIF-1 α ubikvitinována a degradována v proteazomu. HIF- β se konstitutivně exprimuje nezávisle na stavu kyslíku ve tkáni (Shively *et al.*, 2011; Chesnel *et al.*, 2015; Shi *et al.*, 2020). Bialelickou mutací *VHL* genu se navozuje hypoxický stav tkáně s následnou ztrátou funkce proteinového komplexu E3 ubikvitin ligázy (González-Rodríguez *et al.*, 2019). HIF-1 α se akumulují a translokací do jádra vyvolávají nadměrnou expresi genů klíčových pro buněčnou proliferaci a migraci a také pro angiogenezi (proces novotvorby krevních kapilár) související s rozvojem nádoru. Jedná se o vaskulární endoteliální růstový faktor A (VEGFA), destičkový růstový faktor (PDGF), prolylhydroxylázu (PHD), transformující růstový faktor (TGF), erytropoetin, glukozový transportér 1 (GLUR-1) a karboanhydrázu IX (CAIX) (Patard *et al.*, 2009; Shively *et al.*, 2011; Diaz de Leon *et al.*, 2019; Shi *et al.*, 2020).

VHL syndrom má více než 90 % penetranci (možnost projevu) ve věku 65 let, ale příznaky se v některých případech mohou projevit už během dětství (Liu *et al.*, 2019).



Obr.5.: Schéma funkce VHL genu za normálních a hypoxických podmínek. Převzato a upraveno dle (Morais *et al.*, 2013).

Hereditární papilární renální karcinom

Hereditární papilární renální karcinom (HPRC) je vzácné onemocnění, které způsobuje rozvoj pRCC typu I. K jeho vzniku dochází následkem mutace *MET* protoonkogenu lokalizovaného na chromozomu 7q31. *MET* kóduje receptorovou tyrosinkinásu (EC 2.7.10.1) nazývanou c-met, která je exprimovaná v epiteliálních buňkách. Ligandem pro c-met receptor je růstový faktor hepatocytů (HGF). Mutace *MET* inaktivuje tyrosinkinázovou doménu HGF a tím vyvolává stimulaci buněčného dělení, zvýšené buněčné motility a angiogenezi podporující proces karcinogeneze (Lubensky *et al.*, 1999; Schmidt *et al.*, 1999; Mikhaylenko *et al.*, 2020).

Dědičná leiomyomatos a karcinom renálních buněk

Syndrom dědičné leiomyomatosy a karcinomu renálních buněk (HLRCC) je asociován se zárodečnou mutací genu kódující fumaráthydratasu (FH, EC 4.2.1.2), která je klíčovým enzymem Krebsova cyklu. *FH* gen je lokalizován na chromozomu 1 v oblasti

1q43. Pro onemocnění je charakteristický výskyt kožních leiomyomů, mnohočetných leiomyomů dělohy a rozvoj agresivní formy pRCC typu II (Udager *et al.*, 2014; Choi *et al.*, 2019).

Birt – Hogg – Dubé syndrom

Birt-Hogg-Dubé syndrom (BHD syndrom) je vzácné onemocnění (Schmidt *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2019). Syndrom je způsoben mutací genu *FLCN* lokalizovaného na krátkém raménku 17. chromozomu v oblasti 17p11.2. *FLCN* je tumor supresorový gen kódující protein folikulin, který je přednostně exprimován v ledvinách, kůži a plicích a slouží k regulaci růstu a dělení buněk (Kumasaka *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2019).

Komplex tuberózní sklerózy

Vznik komplexu tuberózní sklerózy (TSC komplex) je způsoben genetickými mutacemi v jednom ze dvou tumor supresorových genů - *TSC1* nebo *TSC2* (Kingswood *et al.*, 2017). Gen *TSC1* kóduje protein hamartin a je lokalizován na chromozomu 9q34. *TSC2* gen je uložen na chromozomu 16q13 a kóduje protein tuberin (Ebrahimi-Fakhari *et al.*, 2018). Hamartin a tuberin spolu asociují a vytváří funkční heterodimer. Vzniklý komplex vykazuje inhibiční účinek na signální dráhu mTOR, která je klíčovým intracelulárním regulátorem buněčného růstu a proliferace. Mutace jednoho z genů *TSC1* nebo *TSC2* vedou k rozvoji tumorigeneze a rozvoji ccRCC (Chu-Shore *et al.*, 2010; Kingswood *et al.*, 2017).

2.3.2 Diagnostika

RCC karcinomy mohou způsobovat bolesti břicha a hematurii. Ve většině případů jsou však zpočátku asymptomatické a příznaky se začínají objevovat až v pokročilém stádiu onemocnění (Kim *et al.*, 2011; Vasudev *et al.*, 2020). Více než 50 % případů je proto náhodně objeveno během léčby nesouvisející s karcinomem ledvin nebo během vyšetření s podezřením na jiný typ onemocnění (Kim *et al.*, 2011; Johnson *et al.*, 2015). U třetiny pacientů je kvůli pozdní detekci již diagnostikován metastatický typ RCC se špatnou prognózou. Způsoby diagnostiky, které umožňují detekci onemocnění v raném stádiu, jsou proto velmi důležité (Kim *et al.*, 2011).

Renální léze jsou obvykle sférické s hladkým povrchem. Jejich tvar se však může lišit v závislosti na oblasti výskytu (uvnitř či na povrchu ledvin), na pevnosti a vaskularitě nádoru či vlivem vlastností okolní tkáně (Linguraru *et al.*, 2011).

Pro diagnostiku RCC se využívají radiologické metody, ke kterým se řadí kontrastní počítačová tomografie (CT), ultrazvuk, magnetická rezonance a pozitronová emisní tomografie. Uvedené metody však nejsou dostatečně přesné a neumožňují spolehlivou diagnostiku. Finální diagnóza RCC se proto určuje na základě výsledků biopsie nebo histologie, které jsou však invazivní a časově náročné (Linguraru *et al.*, 2011; Zheng *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2019).

2.3.3 Léčba

Vzhledem k heterogenitě nádoru jsou pacienti s diagnostikovaným RCC rezistentní ke standardní léčbě pomocí radioterapie a chemoterapie. Z tohoto důvodu nejsou tyto léčebné přístupy doporučovány (Beneš, 2010).

Pro lokalizovaný karcinom je základním lékařským postupem jeho chirurgické odstranění. Dle rozsahu nálezu se provádí nefrektomie parciální (odstranění postižené části ledviny) nebo radikální (odstranění celé postižené ledviny). Dalším způsobem odstranění maligní tkáně je ablace, při které dochází k destrukci tkáně teplem či chladem. Po provedené chirurgické resekci však dochází přibližně u 40 % pacientů k relapsu onemocnění či vzniku metastáz (nejčastěji v plicích, kostech, mozku, lymfatických uzlinách nebo játrech). Proto je nezbytné přistupovat k systémové léčbě (Hsieh *et al.*, 2017; Qin *et al.*, 2020).

Nejvíce využívanými přístupy léčby pacientů s RCC je cílená terapie a imunoterapie (Beneš, 2010).

2.3.3.1 Cílená terapie (cílená léčba)

Míra přežití se u pacientů s RCC zvyšuje především díky zdokonalování technik včasné detekce a cílené terapie. V současné době je možná pětiletá doba přežití předpokládána u 75 % pacientů bez metastáz a pouze 12 % pacientů se vzdálenými metastázemi. Cílená terapie blokuje růst, proliferaci a přežití nádorových buněk pomocí inhibice signálních molekul, které navozují proces karcinogeneze (Alsaab *et al.*, 2018; Lai *et al.*, 2019; Qin *et al.*, 2020).

Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv („Food and Drug Administration“ – FDA) je pro léčbu RCC klinicky schváleno využívání několika inhibitorů receptorových tyrosinkinás (TKI, EC 2.7.1.112) a dráhy mTOR. Léky inhibující TKI blokuji hypoxickou dráhu VEGF, který hraje zásadní roli v angiogenezi. Do této skupiny léků se řadí sorafenib, sunitinib, pazopanib, axitinib, cabozantinib a lenvatinib. Dále se k léčbě využívá monoklonální protilátka bevacizumab, která se váže na VEGF dříve, než dojde k jeho interakci s receptorem. Schválené léky inhibující dráhu mTOR jsou známy pod názvy everolimus a temsirolimus a využívají se k léčbě pacientů s TSC komplexem (MacKeigan *et al.*, 2015; Diaz de Leon *et al.*, 2019). Lék schválen k léčbě pacientů s mutacemi genu *VHL* dráhy se nazývá belzutifan (Jonasch, 2021).

Cílená léčba je omezena vývojem rezistence organismu na podávaná léčiva a úplná odpověď na tuto terapii je pouze vzácná. Proto jsou využívány další způsoby léčby, především imunoterapie (Khetani *et al.*, 2020).

2.3.3.2 Imunoterapie

RCC představuje imunogenní nádor. Má vysokou intratumorální infiltraci (prostoupení tkáně nádorovými buňkami) imunitních buněk a rychlost spontánní remise (Unverzagt *et al.*, 2017). Chronické zánětlivé reakce hrají zásadní roli ve výskytu a vývoji karcinomů. Na interakcích mezi zánětem a RCC se podílí řada zánětlivých faktorů a buněk zapojených do imunitní odpovědi organismu (cytokiny, chemokiny a další malé zánětlivé proteiny) (Shi *et al.*, 2020).

Chemokiny jsou chemické cytokiny s nízkou molekulovou hmotností, které jsou vylučovány nádorovými, imunitními a stromálními buňkami v mikroprostředí nádoru. Moduluji transport imunitních buněk a růst lymfoidné tkáně, čímž regulují protinádorovou imunologickou odpověď. Chemokiny CXC (cysteinové zbytky odděluje 1 aminokyselina) jsou zkoumány jako potenciální terapeutické cíle a prognostické biomarkery pro mnoho typů nádorů, včetně RCC (Zeng *et al.*, 2020).

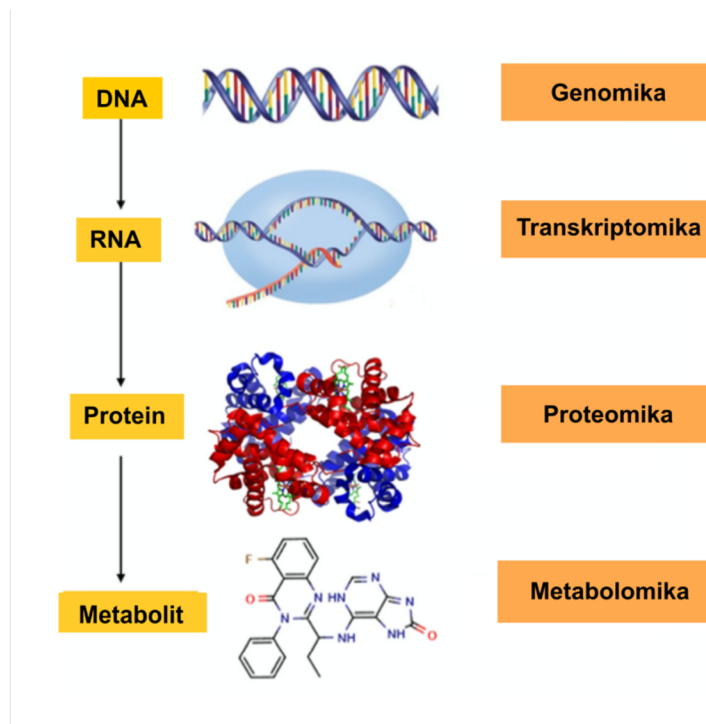
Nejnovější možností léčby metastatických RCC pomocí imunoterapie jsou léky ze skupiny inhibitorů imunitního kontrolního bodu (ICI). Cílí na specifické dráhy související s imunitní odpovědí, která je procesem tumorigeneze narušena. Cílenou inhibicí daných drah se reaktivuje specifická imunitní odpověď proti nádorovým buňkám (Lopez-Beltran *et al.*, 2018). Mezi dráhy, na které ICI cílí, patří receptor programované smrti 1 (PD-1), ligand receptoru programované smrti 1 (PD-L1) a cytotoxický antigen 4

asociovaný s T-lymfocyty (CTLA-4). PD-1 a PDL-1 jsou transmembránové glykoproteiny exprimované na aktivovaných T-lymfocytech. Vazba PDL-1 na PD-1 stimuluje apoptózu T-lymfocytů a chrání nádorové buňky před imunitní odpovědí organismu. Jejich inhibicí se naopak zvyšuje aktivita T-lymfocytů, které jsou opět schopny degradovat rakovinné buňky. Inhibice CTLA-4 rovněž umožňuje aktivaci a proliferaci efektorových T-lymfocytů (Khetani *et al.*, 2020).

FDA schválila dva inhibitory PD-1 (nivolumab a pembrolizumab) a jeden inhibitor CTLA-4 (ipilimumab) jako látky účinné pro léčbu RCC. Mezi vyvíjené inhibitory PD-L1 se řadí atezolizumab a durvalumab. Za poslední dobu byl ve výzkumu také další inhibitor CTLA-4, známý jako tremelimumab (Khetani *et al.*, 2020).

2.4 Metabolomika

Metabolomika se společně s genomikou, transkriptomikou a proteomikou řadí mezi tzv. „omické“ vědy (Obr. 6). Cílem genomiky je komplexní analýza genomu za účelem pochopení funkce jednotlivých genů. Transkriptomika se zabývá analýzou genové exprese a proteomika komplexní proteinovou analýzou. Metabolomika je posledním a nejnovějším kvalitativním a kvantitativním přístupem této „omické“ kaskády. Zahrnuje studium metabolických procesů za účelem analýzy příslušných metabolitů v různých organismech, tkáních, buňkách, tělních tekutinách a dalších materiálů za daných fyziologických podmínek v určitý moment (Villas-Bôas *et al.*, 2007; Do *et al.*, 2014).



Obr. 6: Obecný přehled „omických“ věd. Převzato a upraveno podle (Yu *et al.*, 2017).

Metabolity jsou definovány jako různorodá skupina nízkomolekulárních látek (lipidy, mastné kyseliny, acylkarnitiny, aminy, aminokyseliny, peptidy, nukleotidy, nukleosidy a báze, organické kyseliny, vitamíny, thiole, sacharidy, apod.), které představují jednotlivé substráty, meziprodukty či produkty metabolických drah (Zhang *et al.*, 2012; Johnson *et al.*, 2016). Soubor všech metabolitů přítomných v buňce v danou chvíli, které se účastní metabolických reakcí nezbytných pro udržení, růst a normální funkci buňky se nazývá metabolom (Dunn *et al.*, 2005). Metabolom je dle původu metabolitů klasifikován do dvou skupin – endometabolom a exometabolom. Endometabolom charakterizuje kompletní sadu intracelulárních metabolitů, zatímco exometabolom je souborem extracelulárních metabolitů vylučovaných do růstového média nebo extracelulárního prostředí. Metabolity fungují jako „biomarkery“ reprezentující fenotyp v reakci na genetické nebo environmentální změny. Jeden metabolit ale může být součástí mnoha metabolických drah a hladiny jednotlivých metabolitů závisí na fyziologickém, vývojovém a patologickém stavu daného biologického systému (Villas-Bôas *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2012).

Metabolomické studie jsou velmi citlivé přístupy nezbytné pro diagnostiku onemocnění, studium účinků toxických látek na fenotyp a také slouží ke zkoumání odpovědi organismu na podávaná léčiva. Hrají důležitou roli ve farmaceutickém

průmyslu při preklinickém a klinickém vývoji léčiv (Peng *et al.*, 2015). Metabolomická analýza může být využívána samostatně nebo v rámci systémové biologie (Do *et al.*, 2014).

2.4.1 Metabolomická analýza

Pro charakterizaci metabolitů v tělních tekutinách, tkáních a buňkách nejčastěji slouží detekční techniky, mezi které se řadí nukleární magnetická rezonance (NMR) a techniky založené na hmotnostní spektrometrii (MS) (Li *et al.*, 2014).

NMR umožňuje práci s menším objemem vzorku bez předchozí separace a poskytuje *in situ* způsob monitorování určitých tříd metabolitů s vysokou reprodukovatelností. Slouží k rychlé, nedestruktivní a automatizované analýze extraktů a kvantitativní detekci mnoha různých skupin metabolitů. Hlavní nevýhodou NMR je nízká citlivost a omezený dynamický rozsah. Vzhledem k tomu je možné pozorovat pouze nejhojněji zastoupené skupiny metabolitů (Lin *et al.*, 2011; Weiss *et al.*, 2011; Peng *et al.*, 2015).

MS slouží pro analýzu široké škály metabolitů s vysokou reprodukovatelností a citlivostí. Za účelem lepšího pokrytí škály metabolitů a rozšíření rozsahu identifikace se při metabolomické analýze kombinuje MS se separačními technikami (Shulaev, 2006; Álvarez-Sánchez *et al.*, 2010). Nejčastěji se využívá spojení MS s plynovou chromatografií (GC-MS), kapalinovou chromatografií (LC-MS) nebo kapilární elektroforézou (CE-MS). GC-MS poskytuje vysoké rozlišení, reprodukovatelnost separace a je vhodná pro analýzu těkavých sloučenin. LC-MS naopak slouží pro analýzu tepelně labilních sloučenin a detekuje širokou škálu molekul (od polárních cukrů, nearomatických organických kyselin až po lipidy). CE-MS se využívá k profilování polárních a nabitých sloučenin přítomných v biologických vzorcích (Peng *et al.*, 2015).

Pro metabolomickou analýzu je využíván různorodý biologický materiál. Krevní sérum se zdá pro screening metabolitů jako nejvhodnější. Za normálních fyziologických podmínek vykazuje nízkou variabilitu a obsahuje komplexní směs metabolitů, které odráží globální změny z celosystémového katabolismu a anabolismu (Lin *et al.*, 2011).

Metabolomický výzkum využívá tři hlavní přístupy – cílenou analýzu metabolitů, profilování metabolitů (necílená analýza) a metabolický „fingerprinting“ a

„footprinting“ (semikvantitativní analýza) (Shulaev, 2006; Álvarez-Sánchez *et al.*, 2010).

2.4.1.1 Cílená metabolická analýza

Cílená metabolická analýza je díky vysoké citlivosti a širokému dynamickému rozsahu nejvíce využívaným přístupem (Kato *et al.*, 2012). Zahrnuje identifikaci a kvantitativní analýzu vybraného počtu chemicky charakterizovaných a biochemicky anotovaných metabolitů, které souvisí se specifickou metabolickou dráhou nebo třídou sloučenin. Studium předem definovaných metabolitů osvětluje nové asociace mezi konkrétními metabolity. Identifikaci a kvantifikaci metabolitů usnadňuje použití izotopově značených standardů (Dettmer *et al.*, 2006; Shulaev, 2006; Roberts, 2012; Ribbenstedt *et al.*, 2018).

Analýza vyžaduje kroky selektivní přípravy vzorku optimalizované pro fyzikálně-chemické vlastnosti sledovaných sloučenin (Almontashiri *et al.*, 2020). Pro analýzu jsou využívány platformy jako GC, vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC), ultra účinná kapalinová chromatografie (UHPLC) nebo CE ve spojení s MS či NMR spektroskopii. Vzhledem ke složitosti metabolomu neumožňuje jediná analytická platforma detekovat všechny metabolity přítomné v biologickém vzorku. Pro citlivou a spolehlivou detekci velkého počtu metabolitů se proto využívají integrované platformy kombinující více analytických přístupů (Zhang, 2012).

Přístup cílené metabolomiky není vhodný pro identifikaci nových metabolických biomarkerů nebo k průzkumu globálních metabolických změn. Hlavní nevýhodou je omezené pokrytí metabolomu (Shulaev, 2006).

2.4.1.2 Metabolické profilování

Metabolické profilování neboli necílená metabolická analýza umožňuje komplexní a kvalitativní analýzu všech měřitelných metabolitů ve vzorku, které nejsou dopředu známe. Má tedy vysoké uplatnění při objevu nových biomarkerů (Roberts *et al.*, 2012; Almontashiri *et al.*, 2020). Analýza pokrývá několik stovek metabolitů a v biomedicíně se běžně používá pro diagnostiku zdravotního stavu pacientů. Necílené metabolické studie umožňují rozšíření spektra metabolitů asociovaných s daným onemocněním a poskytují další diagnostické informace doplňující získaná data z cílené metabolické analýzy (Shulaev, 2006; Álvarez-Sánchez *et al.*, 2010; Miller *et al.*, 2015).

2.4.1.3 Metabolický „fingerprinting“ a „footprinting“

Metabolický „fingerprinting“ a „footprinting“ se řadí mezi semikvantitativní analýzy, které jsou využívány především v klinické diagnostice, screeningu léků a toxikologických studiích (Dettmer *et al.*, 2006; Álvarez-Sánchez *et al.*, 2010). Hlavní výhodou této metody je vysoká citlivost na modulační biologických drah (Ash *et al.*, 2019).

Metabolický „fingerprinting“ umožňuje rychlou klasifikaci intracelulárních metabolitů (Jäpelt *et al.*, 2015). Přístup neslouží k identifikaci nebo přesné kvantifikaci všech metabolitů ve vzorku, ale porovnává metabolické vzory - „fingerprinty“, které se mění vlivem vnějších podnětů (vývoj onemocnění, působení toxinů nebo léků, environmentální či genetické změny) (Shulaev, 2006).

Kromě intracelulárních metabolitů může v systémech buněčných kultur poskytnout důležité informace o fenotypu a fyziologickém stavu buněk také analýza extracelulárních metabolitů (footprinty). Takový přístup je pak označován jako metabolický „footprinting“ (Shulaev, 2006).

2.5 Hmotnostní spektrometrie

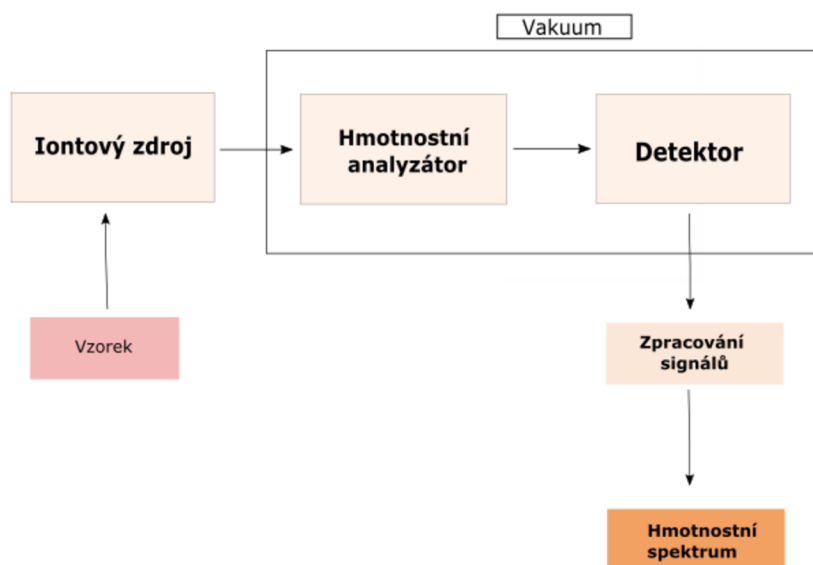
Hmotnostní spektrometrie (Mass spektrometry – MS) je vysoce citlivá analytická technika nezbytná pro chemické, biochemické, farmaceutické či medicínské výzkumy. Poskytuje kvalitativní (struktura) a kvantitativní (molekulová hmotnost, případně koncentrace po použití standardů) informace o studovaném analytu. Základním principem MS je ionizace nenabitých organických nebo anorganických molekul či jejich fragmentů do plynného stavu, které jsou následně odděleny na základě poměru hmotnosti ku náboji (m/z) a detekovány (Ho *et al.*, 2003; Gross J. H., 2006). Výsledkem analýzy je hmotnostní spektrum zaznamenané jako graf závislosti intenzity na m/z generovaných iontů analytů (De Hoffmann *et Stroobant*, 2008).

2.5.1 Hmotnostní spektrometr

Hmotnostní spektrometr umožňuje analýzu velmi složitých směsí. Tvoří jej zpravidla tři základní části – iontový zdroj, hmotnostní analyzátor a detektor. Poslední nezbytnou částí je systém pro zpracování dat, jehož výsledkem je hmotnostní spektrum (Obr. 7)

(Villas-Bôas *et al.*, 2007; De Hoffmann *et Stroobant*, 2008; Banarjee *et Mazumdar*, 2012).

Zkoumaný vzorek je přiváděn do iontového zdroje, kde dochází k jeho zplynění a následné tvorbě nabitých iontů z nenabitých molekul procesem ionizace. K tvorbě nabitých plynných iontů se využívají tvrdé nebo měkké ionizační techniky (viz následující kapitola). Vzniklé ionty jsou fokusovány do úzkého svazku, urychlovány a převáděny do hmotnostního analyzátoru, kde se pomocí elektrického nebo magnetického pole na základě naměřené hodnoty m/z separují. Hmotnostní analyzátor a detektor pracují za vysokého vakua, aby nedocházelo ke srážkám iontů s jinými plynnými molekulami, které by způsobily odchylku trajektorie iontů a ztrátu jejich náboje. K dosažení vysokého vakua se obvykle využívají olejová difuzní čerpadla nebo turbomolekulární čerpadla. V jednom hmotnostním spektrometru může být hmotnostních analyzátorů několik, v tomto případě se jedná o tandemovou hmotnostní spektrometrii. Ionty vycházející z hmotnostního analyzátoru jsou měřeny detektorem, který je převádí na elektrické signály. Počítač následně graficky zobrazuje signály jako hmotnostní spektrum (Ho *et al.*, 2003; De Hoffmann *et Stroobant*, 2008).



Obr. 7: Zjednodušené schéma hmotnostního spektrometru.

2.5.1.1 Ionizační techniky

Proces ionizace ovlivňuje především vnitřní energie přenášená během ionizačního procesu a fyzikálně-chemické vlastnosti ionizovaného analytu. Některé ionizační techniky způsobují rozsáhlou fragmentaci (tvrdé ionizační techniky), zatímco

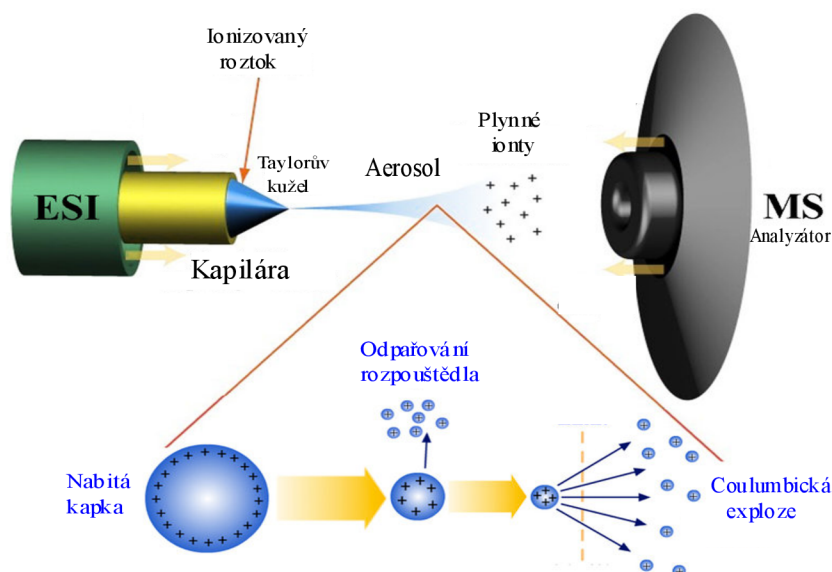
jiné techniky produkují pouze určité ionty (měkké ionizační techniky). Mezi tvrdé ionizační techniky se řadí elektronová ionizace (EI) a chemická ionizace (CI). Tyto techniky se však v dnešní době moc nevyužívají. Měkké ionizační techniky zahrnují elektrosprejovou ionizaci (ESI) a ionizaci laserem za přítomnosti matrice (MALDI) (Villas-Bôas *et al.*, 2007). Umožňují převod téměř jakékoliv netěkavé a tepelně labilní sloučeniny a v dnešní době jsou uplatňovány nejčastěji (Glish *et Vachet.*, 2003; Villas-Bôas *et al.*, 2007).

Vzhledem k tomu, že jsem v rámci diplomové práce využívala techniku ESI, její princip fungování blíže specifikuji v následujícím textu.

▪ **Elektrosprejová ionizace**

Technika ESI byla poprvé představena v roce 1989 americkým profesorem Johnem Bennettem Fennem (Fenn *et al.*, 1989). Za tento důležitý objev mu byla v roce 2002 udělena Nobelova cena (Banerjee *et Mazumdar*, 2012). Jedná se o měkkou ionizační techniku, během které nedochází k fragmentaci makromolekul (Loo, 2000). Pracuje za atmosférického tlaku a mírné teploty (do 80 °C) a je jednou z nejšetnějších ionizačních technik. ESI je dále vysoce citlivá a umožňuje analýzu široké škály malých i velkých molekul. Nejvíce se využívá ve spojení s LC-MS analýzou (Bruins, 1998; Page *et al.*, 2007).

Během procesu ESI (Obr. 8) je studovaný analyt vnášen do kapiláry s nízkým průtokem (obvykle 1 – 10 $\mu\text{l}/\text{min}$), kam je vkládáno silné elektrické napětí vzniklé rozdílem potenciálů (2 – 5 kV) mezi kapilárou a protielektrodou (De Hoffmann *et Stroobant*, 2008). Elektrické pole způsobuje polarizaci rozpouštědla a hromadění iontů se stejným nábojem ve špičce sprejovací kapiláry. Opačně nabitě ionty jsou naopak oddáleny. Při dostatečné intenzitě elektrického pole se kapalina v menisku deformuje a vytvoří se tzv. Taylorův kužel. Z vrcholu Taylorova kuželu poudí jemný tok roztoku a pomocí zmlžujícího plynu dochází k jeho rozprášení za vzniku elektricky nabitých kapiček (aerosolu). Působením tepla a suchého dusíku dochází k postupnému odpařování rozpouštědla a tím ke zvýšení hustoty povrchového náboje nabitých kapiček. Silou elektrického pole v nabitě kapičce dojde k překonání povrchového náboje (vzniku kritického bodu), kapka je nestabilní a dochází ke Coulombické explozi a tvorbě plynných iontů. Uvolněné nabitě ionty analytů jsou poté urychlovány a transportovány z oblasti atmosférického tlaku do hmotnostního analyzátoru umístěného ve vysokém vakuu (Glish *et Vachet.*, 2003; Ho *et al.*, 2003; Lemr *et Borovcová*, 2020).



Obr. 8: Princip fungování ionizační techniky ESI. Převzato a upraveno podle (Watanabe, 2019).

Účinnost ionizace je ovlivněna řadou faktorů, jako je průtok kapilárou, složení rozpouštědla a vlastnosti analytu (Bruins, 1998; Page *et al.*, 2007).

Mezi nevýhody ESI patří především velká spotřeba vzorku. V dnešní době je proto vyvinuta spousta modifikací této techniky, z nichž je nejvíce využívána nanoelektrosprejové ionizace (nano-ESI) rozšiřující rozsah aplikací ESI. Nano-ESI vyžaduje pouze velmi nízkou koncentraci (nanomol/ml) a malý objem vzorku (10^{-5} – 10^{-8} M) Využívá kapiláru z borosilikátového skla, na kterou je kladeno napětí v rozmezí 0,7 – 1,1 kV a tok roztoku analytu je poháněn pouze kapilárními silami. Zatímco ESI generuje počáteční nabitě kapky o průměru 1 – 2 μm , nano-ESI produkuje kapičky o průměru menším než 200 nm (Banerjee *et Mazumdar*, 2012, Karas *et al.*, 200).

2.5.1.2 Hmotnostní analyzátoři

Princip fungování analyzátorů závisí na interakci nabitých iontů s elektrickým (statické nebo dynamické) nebo magnetickým polem, případně jejich kombinací (Friedecký *et Lemr*, 2012).

Výkonnost hmotnostního analyzátoru se hodnotí na základě jeho hmotnostního rozsahu, rozlišení, účinnosti, přesnosti hmotnostního měření, lineárního dynamického rozsahu, rychlosti měření a citlivosti. Pohybující se nabitý iont lze od jiného iontu odlišit na základě rozdílů jejich kinetické energie a rychlosti (Dass, 2007). Hmotnostní rozlišení se určuje podle schopnosti hmotnostního spektrometru rozlišit dva ionty s nepatrným

rozdílem poměru m/z . Matematicky se jedná o inverzní hodnotu rozlišovací schopnosti (RP – „resolving power“), která je definována jako:

$$RP = m / \Delta m$$

Hodnota m představuje průměrnou hmotnost iontu a Δm odpovídá šířce píku iontu v polovině jeho výšky (FWHM – „full width at half maximum“) (Dass, 2007).

Jiná definice rozlišovací schopnosti se využívá především u magnetických analyzátorů a je založena na překryvu dvou píků:

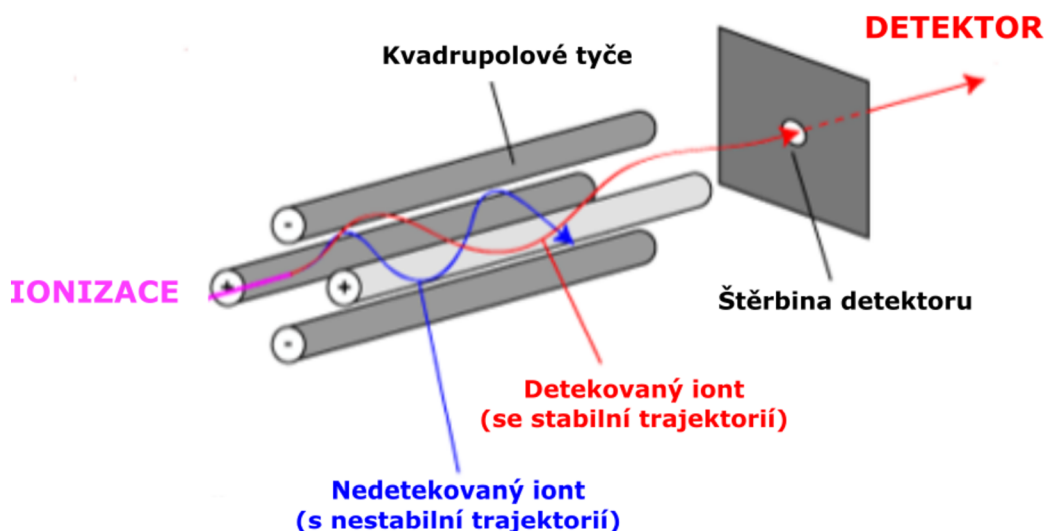
$$RP = m_1 / (m_2 - m_1)$$

Rovnice udává poměr hmotnosti iontu m_1 a rozdílu hmotností iontů m_1 a m_2 s jednotkovým nábojem. Oba píky musí být stejně vysoké a vykazovat 10 % překryv (údolí mezi píky je 10 %) (Dass, 2007).

Byla vyvinuta celá řada analyzátorů. Obecně se dělí do tří skupin – skenující analyzátor (kvadrupólový analyzátor), průletové analyzátor (TOF – „Time of flight“) a iontové pasti (Friedecký *et* Lemr, 2012). V následujícím textu jsou blíže představeny hmotnostních analyzátor, které jsou součástí LC-MS využívaného v rámci experimentální části přiložené diplomové práce.

▪ **Kvadrupólový analyzátor**

Kvadrupólový analyzátor se řadí mezi skenující analyzátor, které změnami hodnot stejnosměrného napětí a amplitudy střídavého napětí postupně propouští všechny nabitě ionty na detektor. K separaci iontů využívá stability trajektorií v oscilujících elektrických polích. Stabilní ionty o určité hodnotě m/z jsou následně propouštěny do detektoru (De Hoffmann *et* Stroobant, 2007). Kvadrupólový analyzátor se skládá ze čtyř rovnoběžných kovových tyčí (elektrody) s kruhovým nebo hyperbolickým průřezem, které jsou připojeny ke zdroji stejnosměrného a střídavého napětí. Protilehlé páry tyčí mají vždy stejnou polaritu (Obr.9).



Obr. 9: Schéma a princip kvadrupólového analyzátoru. Převzato a upraveno dle (www.bris.ac.uk/nerclsmsf/techniques/gcms.html)

Aplikací napětí je ve vnitřním prostoru mezi tyčemi vytvořeno oscilační pole, do kterého vstupují nabitě ionty (De Hoffmann *et* Stroobant, 2007). Na základě velikosti stejnosměrného napětí a amplitudy střídavého napětí prochází v daném okamžiku pouze ionty s určitou hodnotou m/z , pro které je vzniklá oscilace stabilní. Tyto ionty jsou detekovány detektorem. Ionty s nestabilní trajektorií jsou vychýleny, narazí na tyč kvadrupólu a nejsou detekovány. Kvadrupólový analyzátor je hojně využíván v tandemové hmotnostní spektrometrii (De Hoffmann *et* Stroobant, 2007; Friedecký *et* Lemr, 2012; Van Galen *et* Feiters, 2016).

▪ Lineární iontová past

Lineární iontová past (LIT), známá také pod názvem 2D kvadrupolová iontová past, je novějším modelem iontové pasti. Tvoří ji dva páry hyperbolických tyčí (kvadrupólů), na jehož koncích jsou umístěny elektrody. Na kvadrupól je aplikováno vysokofrekvenční střídavé napětí a na koncové elektrody je vloženo nízké stejnosměrné napětí, které umožňuje záchyt iontů v prostoru pasti a selektivní vypuzení iontů o určitém poměru m/z . Uchování iontů je umožněno pomocí tzv. vyrovnávacího plynu (argon, dusík) (Dass, 2007). Tento typ analyzátoru je rovněž často využíván v tandemové hmotnostní spektrometrii (De Hoffmann *et* Stroobant, 2017).

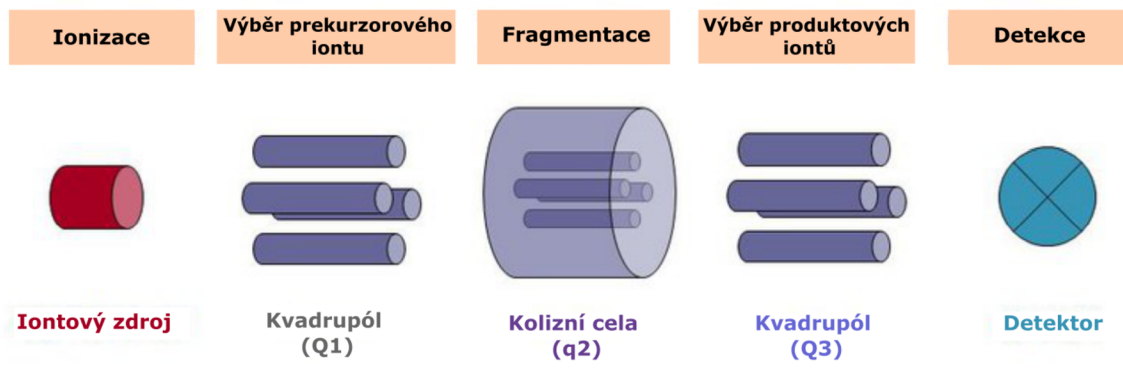
2.5.1.3 Tandemová hmotnostní spektrometrie

Termín tandemová hmotnostní spektrometrie (MS/MS) označuje spektrometrickou techniku využívající dva a více analyzátorů, řazené v sérii za sebou. Umožňuje specifickou separaci iontů s vybranými hodnotami m/z a poskytuje strukturní informace o fragmentech stanovovaných analytů. Měření MS/MS lze shrnout třemi základními kroky. Úvodní je, že první analyzátor vybere ze směsi iontů určitý prekurzorový iont, který následně přechází do kolizní cely. Zde je fragmentován za vzniku produktových iontů, které procházejí následujícím analyzátozem, kde jsou separovány. Jednotlivé analyzátozy jsou od sebe fyzicky odděleny, proto je tato technika nazývána jako MS/MS v prostoru. Druhým způsobem tandemové hmotnostně-spektrometrické techniky je MS/MS v čase. V tomto případě je využívána iontová past, přičemž izolace prekurzorového iontu probíhá v různých časových úsecích změnou výsledného elektromagnetického pole (Sadílek, 2020).

Tandemová hmotnostní spektrometrie může kromě spojení stejných typů analyzátorů využívat také kombinaci různých analyzátorů, která je známá jako hybridní MS/MS. Jejím cílem je spojení výhodných vlastností jednotlivých analyzátorů za účelem získání lepších výsledků (De Hoffmann *et* Strobant, 2007; Sadílek, 2020).

▪ Trojité kvadrupólový analyzátor

Trojité kvadrupólový analyzátor se skládá ze tří kvadrupólů (Q1, q2, Q3) řazených za sebou (Obr. 10). Mezi kvadrupóly Q1 a Q3, které představují hmotnostní analyzátozy, je umístěn kvadrupól q2 označovaný jako kolizní cely. Analyzátor Q1 vybírá prekurzorový iont, který následně přechází do kolizní cely (q2) naplněné inertním plynem (dusík nebo argon). Srážkami molekul plynu s prekurzorovými ionty se zvyšuje vnitřní energie iontů. Tím dochází k jejich fragmentaci na specifické produktové ionty, které vstupují do kvadrupólu (Q3), kde jsou separovány. Následně vstupují postupně do detektoru (De Hoffmann *et* Strobant, 2007).



Obr. 10: Schéma uspořádání trojitého kvadrupólu. Převzato a upraveno podle (https://www.biologie.hu-berlin.de/de/gruppenseiten/oekologie/meth/massspec/mass_sp).

System, který pracuje v režimu trojitého kvadrupólu se nazývá scheduled MRM mód („scheduled multiple reaction monitoring“ – sledování produktových iontů vzniklých fragmentací více prekurzorových molekul). Trojité kvadrupólové analyzátoři hojně se využívají u systémů GC-MS/MS a LC-MS/MS (Dass, 2007).

Pro dokonalejší metabolickou analýzu byly vyvinuty také hybridní přístroje. Jedním z nich jsou hmotnostní spektrometry, které kombinují detekci založenou na trojitém kvadrupólu s detekcí v lineární iontové pasti (QTrap). Tento typ přístroje umožňuje využití poslední části kvadrupólu (Q3) jako lineární iontové pasti, která slouží ke skenování produktových iontů a zajišťuje vyšší citlivost při měření spektra v porovnání s kvadrupólem (Mueller *et al.*, 2005).

2.5.1.4 Detektor

Ionty po průchodu hmotnostním analyzátořem dopadají na detektor, který generuje elektrický proud úměrný jejich hodnotě m/z . Signál je následně převeden do digitálního formátu (De Hoffmann *et Stroobant*, 2007).

Iontové detektory lze rozdělit do dvou tříd – detektory s ohniskovým bodem a detektory s ohniskovou rovinou. První třída postupně detekuje dopad všech iontů bez závislosti na velikosti m/z (bodové iontové kolektory). Princip jeho fungování je založen na přímém měření elektrického proudu a následném zesílení proudu pomocí násobičů. Detektory s ohniskovou rovinou umožňují detekovat dopad všech iontů s různými hodnotami m/z v rovině současně (pole kolektorů). Tyto detektory jsou účinné pro většinu aplikací v hmotnostní spektrometrii (De Hoffmann *et Stroobant*, 2007; Dass, 2007; Friedecký *et Lemr*; 2012).

2.5.2 Kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostním spektrometrem

Pro analýzu a separaci jednotlivých složek analytů se využívá analytická technika kapalinové chromatografie (separační technika) ve spojení s hmotnostním spektrometrem (detekční technika) známá pod zkratkou LC-MS. Separace pomocí LC prováděná před MS odděluje jednotlivé složky vzorku, zvyšuje citlivost detekce MS a slouží k získání lepší kvality dat (Pitt, 2009; Zhou *et al.*, 2012).

Mobilní fázi LC tvoří kapalina, která je poháněna pumpami a prostupuje stacionární fází (kolonou). Složky zkoumaného vzorku (analyty) unášené mobilní fází prochází kolonou a na základě síly interakce ji opouštějí v různé době (retenční časy). Látky, které se stacionární fází interagují slabě jsou eluovány dříve než látky se silnou interakcí. Pro účinnou separaci složitých vzorků se využívá technika vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC), která pracuje za vysokého tlaku a s využitím velmi malé částicové kolony (3 – 10 μm) poskytuje vysoké rozlišení separace. Podle polarity se rozlišuje na chromatografii na normální fázi (stacionární fáze je polární) a chromatografii na reverzní fázi (stacionární fáze je nepolární). Na základě složení mobilní fáze umožňuje HPLC dva typy eluce – izokratickou eluci (složení mobilní fáze zůstává během separace konstantní) a gradientovou eluci (poměry mobilní fáze A a B se během separace mění). Gradientová eluce poskytuje rychlejší analýzu, vyšší rozlišení a citlivost (Klouda, 2003; Zhou *et al.*, 2012).

Mezi rozpouštědla, která tvoří mobilní fázi LC kompatibilní s ESI patří voda, acetonitril, methanol, ethanol a chloroform. Mobilní fáze LC nesmí obsahovat pufrů s anorganickými ionty (fosfát, octan sodný), aby se zabránilo tvorbě aduktů a nedocházelo k potlačení iontů. Vyšší obsah organické mobilní fáze zlepšuje ionizační účinnost ESI (Pitt, 2009).

K dosažení spolehlivých a přesných kvantitativních výsledků se používá stabilní izotopové značení za použití interních standardů. Interní standardy mají téměř identické chemické vlastnosti jako zkoumané analyty. Izotopové značení umožňuje korekci ztrát při přípravě vzorku a eliminaci interferentů (Pitt, 2009).

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiál a chemikálie

3.1.1 Biologický materiál

V experimentální části této diplomové práce byly vzorky krevní plazmy odebrány ve spolupráci s Fakultní nemocnicí Olomouc a nemocnicí v Pardubicích. Pro cílenou metabolickou analýzu byly použity vzorky pacientů s ccRCC a kontrolních osob bez předchozí anamnézy (Tab. 2). Údaje o nádorovém onemocnění jednotlivých pacientů jsou shrnuty v Tabulce 3.

Tab. 2: Základní údaje o vzorcích zahrnutých do studie.

<i>Pohlaví</i>	Pacienti s ccRCC		Kontroly	
	<i>Muži</i>	<i>Ženy</i>	<i>Muži</i>	<i>Ženy</i>
<i>Počet vzorků</i>	66	40	69	32
<i>Průměrný věk</i>	65	71	59	50

Tab. 3: Souhrn informací o TNM klasifikaci pacientů s ccRCC.

	Kategorie	Muži	Ženy	
	TNM klasifikace	G	Gx	2
G1			13	8
G1-2			-	1
G2			23	16
G3			22	10
G4			6	3
T		pT1a	34	13
		pT1b	7	5
		pT2a	3	7
		pT2b	1	1
		pT3a	20	10
		pT3b	1	1
N		N0	60	38
		N1	6	2
M		M0	60	35

3.1.2 Chemikálie

Hydroxid amonný, kyselina octová, voda, acetonitril, methanol (všechny o čistotě LC-MS); interní STD (konkrétní přehled uveden v Tabulce 4). Chemikálie byly zakoupeny u firmy Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Tab.4: Přehled finální směsi interních standardů přidávané do extrakčního činidla.

Finální směs interních standardů	Molekulová hmotnost	Sumární vzorec	Koncentrace zásobních roztoků [mM]	Čistota standardů [%]
Kyselina adipová	156,22	C ₆ H ₁₀ O ₄	20	98
Butyrylkarnitin	234,31	C ₁₁ H ₂₁ NO ₄	5	98
Leucin	134,19	C ₆ H ₁₃ NO ₂	10	99
Methylsukcinát	138,15	C ₅ H ₆ O ₄	20	99
Uracil	114,07	C ₄ H ₄ N ₂ O ₂	20	99

3.2 Přístrojové vybavení

Sonikátor (Ultrasonic Homogenizer 4710 series, Cole and Palmer); chlazená centrifuga (Rotina 410, Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Německo); vortex (V-1 plus, Biosan, Riga, Lotyšsko); ultrazvuková lázeň (PS-40A, Jeken, Guangdong, Čína); pH metr (Cyberscan pH 510, Thermo scientific, Waltham, MA, USA); lyofilizátor (Freezone, Labconco, USA); kapalinový chromatograf UHPLC ExionLCTM a tandemový hmotnostní spektrometr QTRAP® 6500+ (Sciex, Framingham, MA, USA).

3.3 Metody

3.3.1 Příprava mobilních fází

Mobilní fázi A tvořil octan amonný o koncentraci 0,02 mol/l a pH 9,75. Nejdříve byl smísením 1000 ml vody a 1,14 ml koncentrované kyseliny octové připraven

zředěný roztok kyseliny octové. Titrací hydroxidem amonným byl následně vytvořen octan amonný. Jako mobilní fáze B byl použit čistý acetonitril.

3.3.2 Extrakce metabolitů ze vzorků plazem

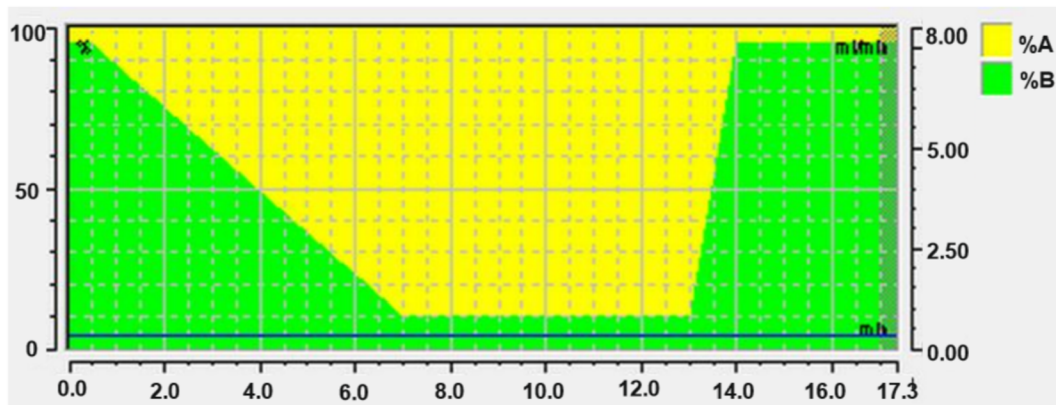
Vzorky plazmy byly nejprve volně rozmrazeny na ledu. Pro extrakci metabolitů a vysrážení plazmatických proteinů bylo připraveno extrakční činidlo z methanolu a směsi interních standardů v poměru 8:1. V kádince bylo tedy smícháno 32 ml methanolu a 4 ml směsi interních standardů (I-STD). Ke 20 μ l každého vzorku plazmy bylo přidáno 90 μ l extrakčního činidla. Blank byl vytvořen stejným způsobem, ale místo vzorku bylo k extrakčnímu činidlu přidáno 20 μ l vody. Připravené roztoky byly přes noc vloženy do mrazáku (-80 °C), aby proběhl proces deproteinace.

Následující den byly vzorky zvortexovány a vloženy do centrifugy (15 000 RPM, 15 min, 4 °C). Vzniklé supernatanty byly přepipetovány do vialek. Z každého vzorku bylo odebráno 5 μ l na přípravu vzorku kontroly kvality (QC), který byl následně rozdělen do 7 alikvotů po 100 μ l. QC vzorek sloužil ke kontrole kvality průběhu analýz a reprezentativnosti měření v rámci zpracování dat.

3.3.3 LC-MS cílená metabolická analýza vzorků plazem pacientů s karcinomem ledvin

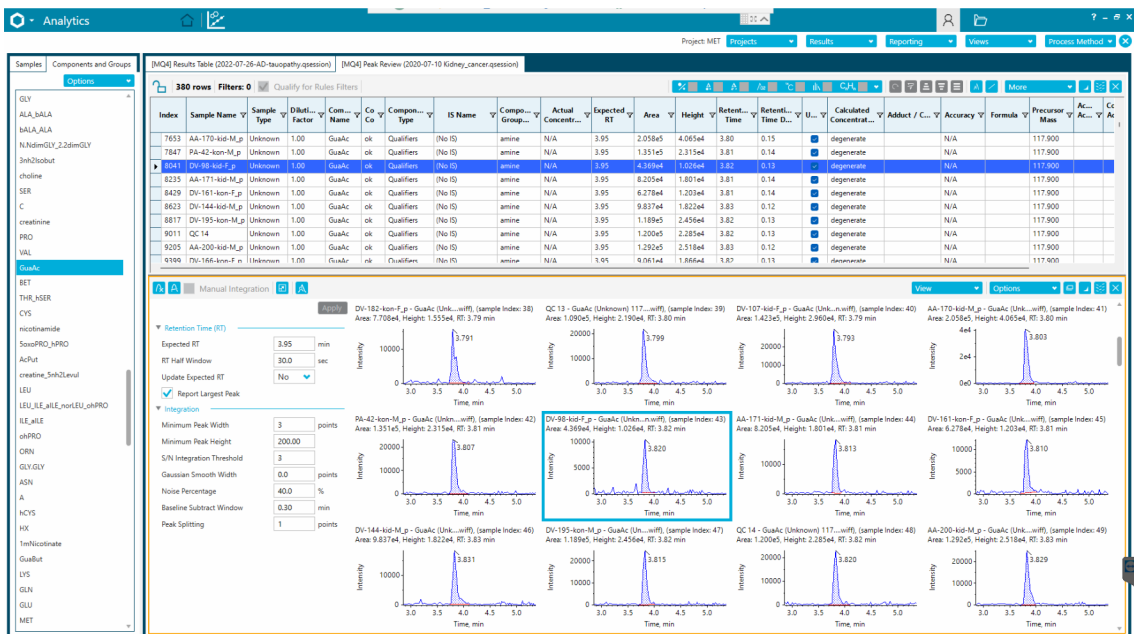
LC-MS cílená metabolická analýza byla provedena pomocí separační metody UHPLC spojené s tandemovým hmotnostním spektrometrem QTRAP 6500+. Separace probíhala na koloně Luna NH₂ 3 μ m, 100 Å, 100 x 2 mm (Phenomenex, Torrance, USA) za použití aminopropylové stacionární fáze. Kolona byla vyhřívána na teplotu 35 °C. Separace byla provedena v systému normálních fází hydrofilní interakční chromatografie „Hydrophilic Interaction Chromatography“ – (HILIC). Mobilní fáze A tvořil roztok octanu amonného (0,02 mol/l; pH 9,75). Jako mobilní fáze B byl použit acetonitril. Průběh gradientové eluce byl následující – poměr mobilních fází byl v první minutě analýzy 5 % A a 95 % B. Tento podíl následně rostl v rozmezí 2. – 7. min ve prospěch mobilní fáze A. V průběhu 7. – 13. minuty analýzy byl podíl mobilních fází konstantní, tedy 90 % A a 10 % B. Dále došlo v průběhu 1 minuty k poklesu podílu zpět do původního poměru. Počátkem 14. minuty až do konce separace byl podíl mobilních fází zachován (5 % A a 95 % B). Záznam gradientové eluce je shrnut na obrázku 11.

Nástřik vzorků činil 1 μl a během separace byl konstantní průtok mobilních fází 0,3 ml/min.



Obr.11: Schéma záznamu použité gradientové eluce.

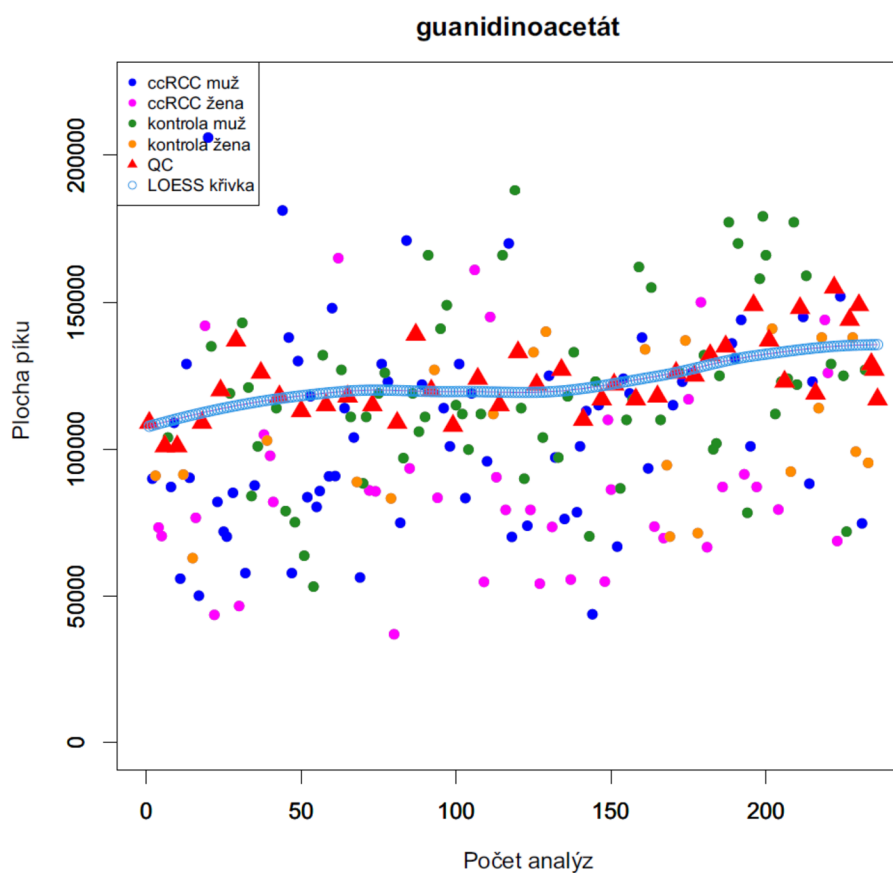
V rámci jedné analýzy bylo aplikováno přepínání polarit ESI („polarity switching“), pro detekci co největšího počtu různě polárních analytů k docílení komplexního popisu metabolomu pacientů s ccRCC. Teplota v iontovém zdroji byla 400 °C, napětí na kapiláře v iontovém zdroji bylo v rozmezí 4,5-5,5 kV. Tlak zmlžovacího plynu byl 40 psí. Analýza probíhala celkem 17 minut. Detekce metabolitů probíhala ve scheduled MRM módu. Získaná data byla zpracována v programu Sciex OS (Obr. 12) (Sciex, Framingham, MA, USA).



Obr. 12: Ilustrační obrázek integrace píků guanidinoacetátu v jednotlivých plazmatických vzorcích ccRCC pacientů a kontrol v programu Sciex OS.

3.3.4 Statistická analýza dat

Data získaná cílenou metabolickou analýzou byla dále zpracována v programu „R studio“ (verze 4.0.3, 2020, www.r-project.org) pomocí balíčku, přístupného na adrese: <https://zenodo.org/record/3235775#.Ysg6RnZBxaQ>. Metodou „LOESS“ („locally weighted regression“) byla nejprve provedena interpolace dat pro odstranění systémových chyb (Obr. 13). Následně byl z QC vzorků vypočten variační koeficient (CV), přičemž všechny vzorky s hodnotou CV vyšší než 30 % byly vyloučeny. Na data byla aplikována transformace přirozeného logaritmu s následným centrováním na nulu. Následně byly metabolity vztaženy na příslušné interní standardy (viz kapitola výsledky).



Obr. 13 Ilustrační obrázek interpolace guanidinoacetátu po aplikaci LOESS křivky.

Pro zvýšení objektivitu získaných výsledků byly aplikovány metody zahrnující jednorozměrnou a vícerozměrnou statistiku se supervizovaným i nesupervizovaným přístupem. Grafickými výstupy vícerozměrné statistické analýzy byly skórové grafy analýzy hlavních komponent (PCA – „Principal Component Analysis“), diskriminační analýzy nejmenších čtverců (PLS-DA – „Partial Least Squares Discriminant Analysis“), a ortogonální diskriminační analýzy nejmenších čtverců (OPLS-DA – „Orthogonal Partial Least Squares Discriminant Analysis“) s permutačními testy a S-ploty. Výsledky jednorozměrné statistiky (p-hodnoty a rozdíl mediánů) byly vizualizovány pomocí vulkánových a krabicových grafů. Byla aplikována Bonferroniho korekce pro zabránění falešné pozitivitu signifikance výsledků jednorozměrné statistiky.

Na základě výsledků S-plot metody OPLS-DA bylo pro muže a ženy zvlášť vybráno 30 nejvýznamnějších metabolitů vyskytujících se u pacientů s ccRCC ve srovnání s kontrolními jedinci. Tyto výstupy byly srovnávány s vulkánovými grafy a hladiny významných metabolitů, které se u obou přístupů shodovaly byly dále zobrazeny pomocí krabicových grafů a byly diskutovány.

4 VÝSLEDKY

4.1 Cílená metabolická analýza vzorků plazmy

Pomocí cílené metabolické analýzy bylo ve zkoumaných vzorcích detekováno celkem 130 metabolitů. Avšak po zpracování dat interpolací bylo po určení CV vyřazeno 14 metabolitů s překračující hodnotou 30 %. Výsledná skupina 116 metabolitů byla následně podrobena statistické analýze formou vícerozměrných a jednorozměrných metod. Jednalo se o zástupce z řad acylkarnitinů, aminů, aminokyselin, organických kyselin, sacharidů, purinů, pyrimidinů, koenzymů a vitamínů (včetně příslušných derivátů u každé skupiny). Tyto metabolity jsou včetně parametrů retenčního času, jejich celého názvu, skupiny, do které se řadí, použitých interních standardů (IS), hodnoty prekurzorového iontu (Q1) a produktového iontu (Q3) uvedeny v tabulkách pro jednotlivé módy ESI. V pozitivním módu bylo ionizováno 86 (Tab. 5) metabolitů a v negativním 30 (Tab. 6).

Tab. 5 Souhrn 86 metabolitů detekovaných v plazmatických vzorcích, které byly ionizovány pozitivním módu ESI. Hodnoty Rt představují retenční čas, Mr molekulovou hmotnost, IS použitý interní standard, Q1 hodnotu prekurzorového iontu a Q3 hodnotu produktového iontu

Metabolit	Celý název metabolitu	Skupina	IS	Mr	Q1	Q3	Rt
ALA_bALA	L-alanin/ β-alanin	Aminokyselina	leucin	89,1/ 89,1	89,9	44,1	3,9
ALA.VAL/ ALA.norVAL	L-alanyl-L-valin/ L-alanyl-L-norvalin	Aminokyselina	leucin	188,2/ 188,2	188,9	117,9	4,5
Ar	adenosin	Purin	uracil	267,2	268,2	136,1	3,1
ASN	L-asparagin	Aminokyselina	leucin	132,1	132,9	74,1	4,6
BET	betain	Aminokyselina	leucin	117,1	118,0	58,1	3,5
C0	L-karnitin	Acylkarnitin	butyrylkarnitin	161,2	161,9	102,9	4,0
C10	dekanoyl-L-karnitin	Acylkarnitin	butyrylkarnitin	315,4	316,2	85,1	3,0
C10.1	4-cis-decenoyl-L-karnitin	Acylkarnitin	butyrylkarnitin	313,4	314,2	85,1	3,0
C10.2	2-trans.4-cis-dekadienoyl-L-karnitin	Acylkarnitin	butyrylkarnitin	311,4	312,2	85,1	3,0
C12	dodekanoyl-L-karnitin (lauroyl-L-karnitin)	Acylkarnitin	butyrylkarnitin	343,5	344,3	85,1	2,9
C12.1	trans-2-dodecenoyl-L-karnitin	Acylkarnitin	butyrylkarnitin	341,5	342,3	85,1	2,9
C14.1	trans-2-tetradecenoyl-L-karnitin (cis-5-tetradecenoylkarnitin)	Acylkarnitin	butyrylkarnitin	369,5460 (369,5387)	370,3	85,1	2,9
C14.1.OH	3-hydroxytetradec-9-enoyl-L-karnitin	Acylkarnitin	butyrylkarnitin	385,5	386,3	85,1	2,9
C14.2	tetradeka-5.8-dienoyl-L-karnitin	Acylkarnitin	butyrylkarnitin	367,5	368,3	85,1	2,9
C14.2.OH	3-hydroxytetradekadienoyl-L-karnitin (5-cis, 8-cis)	Acylkarnitin	butyrylkarnitin	383,5	384,3	85,1	2,9

C16.1	trans-2-hexadecenoyl-L-karnitin	Acylkarnitin	butyrylkarnitin	397,6	398,3	85,1	2,9
C16.1.OH	3-hydroxyhexadec-9-enoyl-L-karnitin	Acylkarnitin	butyrylkarnitin	413,6	414,3	85,1	2,9
C16.2	hexadeka-9.12-dienoyl-L-karnitin	Acylkarnitin	butyrylkarnitin	395,6	396,3	85,1	2,9
C16.2.OH	3-hydroxyhexadeka-9.12-dienoyl-L-karnitin (cis isomery)	Acylkarnitin	butyrylkarnitin	411,6	412,.	85,1	2,9
C18.1	oktadec-9-enoyl-L-karnitin	Acylkarnitin	butyrylkarnitin	425,6	426,4	85,1	2,9
C18.1.OH	(oleoyl-L-karnitin) 3-hydroxyoktadec-9-enoyl-L-karnitin	Acylkarnitin	butyrylkarnitin	441,7	442,4	85,1	3,0
C18.2	oktadeka-9.12-dienoyl-L-karnitin (linoleoyl-L-karnitin)	Acylkarnitin	butyrylkarnitin	423,6	424,.	85,1	2,9
C18.3	otadeka-9.12.15-trienoyl-L-karnitin (alfa-linolenyl-L-karnitin)	Acylkarnitin	butyrylkarnitin	421,6	422,6	85,0	2,9
C2	acetyl-L-karnitin	Acylkarnitin	butyrylkarnitin	203,2	204,1	85,1	3,5
C20	ikosanoyl-L-karnitin (arachidoyl-L-karnitin)	Acylkarnitin	butyrylkarnitin	455,7	456,7	85,0	3,0
C20.1	ikosa-enoyl-L-karnitin	Acylkarnitin	butyrylkarnitin		454,7	85,1	2,9
C3	propionyl-L-karnitin	Acylkarnitin	butyrylkarnitin	217,3	218,1	85,1	3,3
C3.DC/ C4.OH	malonyl-L-karnitin/ 3-hydroxybutyryl-L-karnitin	Acylkarnitin	butyrylkarnitin	247,2/ 247,3	248,1	85,1	3,6
C4	butyryl-L-karnitin/ isobutyryl-L-karnitin	Acylkarnitin	butyrylkarnitin	231,3/231,3	232,2	85,1	3,2
C4.1	butenyl-L-karnitin	Acylkarnitin	butyrylkarnitin	229,3	230,1	85,1	3,3
C4.DC/ C5.OH	sukcinyln-L-karnitin (methylmalonyl-L-karnitin)/ 3-hydroxyisovaleryl-L-karnitin	Acylkarnitin	butyrylkarnitin	261,3/ 261,3	262,2	85,1	3,5
C5	valeryl-L-karnitin (pentanoyl-L-karnitin)/ isovaleryl-L-karnitin (3-methylbutyryl-L-karnitin)/ 2-methylbutyryl-L-karnitin	Acylkarnitin	butyrylkarnitin	246,3/ 245,3/ 245,3	246,2	85,1	3,1
C5.1	tiglyl-L-karnitin (2-methylbut-2-enoyl-L-karnitin)/3-methylkrotonyl-L-karnitin	Acylkarnitin	butyrylkarnitin	243,3/ 243,3	244,2	85,1	3,2
C6	karnitin (3-methylbut-2-enoyryl-L-karnitin) hexanoyl-L-karnitin (kaproyl-L-karnitin)	Acylkarnitin	butyrylkarnitin	259,3	260,2	85,1	3,1
C6.1	2-trans-hexenoyl-L-karnitin	Acylkarnitin	butyrylkarnitin	257,3	258,2	85,1	3,1
C7.DC/ C8.OH	pimelyl-L-karnitin/ 3-hydroxyoktanoyl-L-karnitin	Acylkarnitin	butyrylkarnitin	303,4/ 303,4	304,2	85,1	3,2
C8	oktanoyl-L-karnitin	Acylkarnitin	butyrylkarnitin	287,4	288,2	85,1	3,0
C8.1	2-trans-oktenoyl-L-karnitin	Acylkarnitin	butyrylkarnitin	285,4	286,2	85,1	3,0
C9	nonanoyl-L-karnitin	Acylkarnitin	butyrylkarnitin	301,4	302,2	85,1	2,9
kreatin/ 5nh2Levul	kreatin (N-methyl-N-guanylglycin)/ 5-	Amin	metylsukcinát	131,1/ 131,1	131,9	89,9	3,9

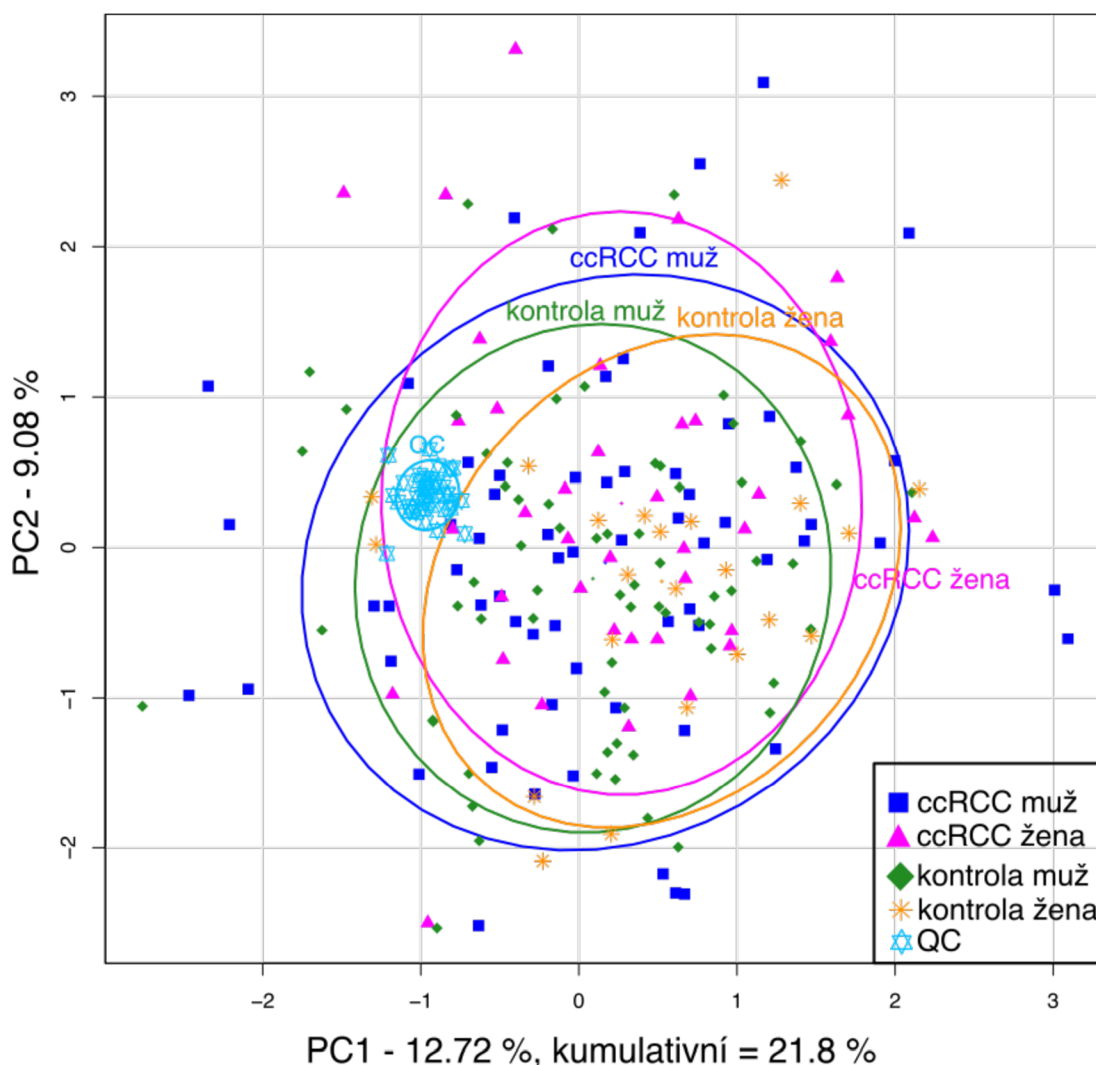
	aminolevulinát (5- amino-4-oxoalérát)						
kreatinin	kreatinin	Amin	methylsukcinát	113,1	113,9	86,0	2,9
CYS	L-cystein	Aminokyselina	leucin	121,2	121,9	58,9	6,5
cystathionin	L-cystathionin	Peptid	leucin	222,3	222,9	88,1	5,6
CYSTin	L-cystin	Peptid	leucin	240,3	240,9	151,8	6,5
GLN	L-glutamin	Aminokyselina	leucin	146,1	146,9	83,9	4,4
GLU	L-glutamát	Aminokyselina	leucin	147,1	147,8	83,9	6,2
GLY	glycin	Aminokyselina	leucin	75,1	75,9	29,9	4,4
GuaAc	guanidinoacetát	Amin	methylsukcinát	117,1	117,9	75,9	4,1
hCYS	L-homocystein	Derivát aminokyseliny	leucin	135,2	135,9	91,0	4,0
hippurát	hippurát (N-benzoyl- glycin)	Organická kyselina	Kyselina adipová	179,2	179,8	104,9	4,6
HIS	L-histidin	Aminokyselina	leucin	155,2	155,9	110,0	4,7
HX	hypoxanthin	Purinová báze	uracil	136,1	136,9	109,9	4,2
cholin	cholin	Aminokyselina	leucin	104,2	104,3	60,0	4,2
ILE_aILE	L-isoleucin/ L- alloisoleucin	Aminokyselina	leucin	131,2/ 131,2	132,0	69,0	4,1
kynurenin	L-kynurenin	Aminokyselina	leucin	208,2	208,9	93,9	4,0
LEU	L-leucin	Aminokyselin	leucin	131,2	132,0	43,0	3,9
LYS	L-lysin	Aminokyselina	leucin	146,2	146,9	83,9	5,0
MET	L-methionin	Aminokyselina	leucin	149,2	149,9	104,0	4,1
N.NdimGLY/ 2.2dimGLY	N.N-dimethylglycin/ 2.2-dimethylglycin (2-aminoisobutanoát)	Aminokyselina	leucin	103,1/ 103,1	103,9	58,0	4,0
nikotinamid	nikotinamid	Koenzymy	kyselina adipová	122,1	122,9	79,9	1,4
ohPRO	4-hydroxy-L-prolin	Derivát aminokyseliny	leucin	131,1	132,0	68,0	4,2
ORN	L-ornithin	Aminokyselina,	leucin	132,2	132,9	115,6	5,0
PHE	L-fenylalanin	aminokyselina	leucin	165,2	165,9	119,9	4,0
PRO	L-prolin	aminokyselina	leucin	115,1	115,9	69,9	4,0
riboflavin	riboflavin (vitamin B2)	Koenzym	uracil	376,4	376,9	243,0	3,0
SER	L-serin	Aminokyselina	leucin	105,1	105,8	60,0	4,6
spermin	spermin	Amin	methylsukcinát	202,3	203,9	138,0	3,4
THR/ hSER	L-threonin/ L- homoserin	Aminokyselina	leucin	119,1/ 119,1	119,9	73,9	4,4
TRP	L-tryptofan	Aminokyselina	leucin	204,2	204,9	145,8	4,1
TYR	L-tyrosin	Aminokyselina	leucin	181,2	181,9	136,0	4,4
VAL	L-valin	Aminokyselina	leucin	117,1	117,9	72,1	4,0
1mNicotinate	1-methylnikotinát (trigonellin)	Organická kyselina	Kyselina adipová	137,1	138,0	92,1	3,7
2nh2Adip	2-aminoadipát (2- aminohexanedioát)	Organická kyselina	Kyselina adipová	161,2	161,8	98,0	6,2
3mHIS_1mHI S	3-methylhistidin/ 1- methylhistidin	Derivát aminokyseliny	leucin	169,2/ 169,2	169,9	123,9	4,3
3nh2Isobut	3-aminoisobutanoát	Amin	methylsukcinát	103,1	104,0	86,1	4,4
4pyridoxate	4-pyridoxát	Koenzym	uracil	183,2	184,0	148,2	4,3
5mthioAr	5-methylthioadenosin	Purinový nukleosid	uracil	297,3	297,9	135,9	2,3
5oxoPRO/ hPRO	5-oxoprolin (pyroglutamát)/ L- homoprolin (L- pipecolát. L- piperidin-2- karboxylát)	Aminokyselina	leucin	129,1/ 129,2	129,9	83,9	3,8

Tab. 6: Souhrn 30 metabolitů detekovaných v plazmatických vzorcích, které byly ionizovány pozitivním modu ESI. Hodnoty Rt představují retenční čas, Mr molekulovou hmotnost, IS použitý interní standard, Q1 hodnotu prekurzorového iontu a Q3 hodnotu produktového iontu

Metabolit	Celý název metabolitu	Skupina	IS	Mr	Q1	Q3	Rt
močovina	močovina (karbonyldiamid)	Amin	Methylsukcinát	60,1	59,0	42,0	2,6
urát	urát (kyselina močová)	Amin	Methylsukcinát	168,1	167,0	124,0	7,0
laktát	L-laktát (2-hydroxypropanoát)	Organická kyselina	Kyselina adipová	90,1	88,9	43,0	4,9
AcALA	N-acetyl-L-alanin	Derivát aminokyseliny	Leucin	131,1	130,0	88,1	4,9
AcMET	N-acetylmethionine	Derivát aminokyseliny	Leucin	191,2	189,9	141,9	4,5
allantoin	allantoin (2.5-dioxo-4-imidazolidinylmočovina)	Amin	Methylsukcinát	158,1	156,9	114,1	3,6
ASP	L-aspartát	Aminokyselina	Leucin	133,1	132,0	88,1	6,2
citruilin	L-citruilin	Aminokyselina	Leucin	175,2	174,0	131,2	4,4
DHA	Dokosahexaenoová kyselina	Organická kyselina	Kyselina adipová	328,5	327,2	283,2	3,5
FgAr	N-formylglycinamid ribosid	Purinový nukleosid	Uracil		233,0	143,1	3,2
fukóza	L-fukóza (6-deoxy-L-galaktóza)	Derivát sacharidu	fruktóza	164,2	162,8	59,1	
Galaktitol_mannitol	D-galaktitol/ D-mannitol	Alkohol sacharidu	fruktóza	182,2/ 182,2	180,8	100,8	3,5
Glycerol3P	glycerol-3-fosfát	Organická kyselina	Kyselina adipová	172,1	170,9	78,9	7,5
hexózy	D-glukóza/ D-fruktóza/ D-galaktóza/ D-manóza	Sacharid	fruktóza	180,2/ 180,2/ 180,2/ 180,2	178,9	88,9	3,5
cholát	cholát	Aminokyselina	Leucin	408,6	407,2	289,3	4,7
LEU.LEU	L-leucyl-L-leucin	Aminokyselina	Leucin	244,3	243,1	130,2	4,0
leucinát	leucinát (2-hydroxyisokaproát)	Organická kyselina	Kyselina adipová	132,2	130,8	84,7	4,2
myoinositol	D-myo-inositol	Alkohol sacharidu	fruktóza	180,2	178,9	124,9	3,8
pantotenát	pantotenát (vitamin B5)	Koenzym	Kyselina adipová	219,2	217,9	88,0	5,0
fenyllaktát	fenyllaktát (2-hydroxy-3-fenylpropanoát)	Organická kyselina	Kyselina adipová	166,2	165,0	101,1	4,2
pseuUr	pseudouridine	Nukleosid pyrimidinu	Uracil	244,2	242,8	153,0	3,7
Kyselina sialová	N-acetylneuraminát	Organická kyselina	Kyselina adipová	309,3	309,0	87,0	5,6
TAU	taurin	Aminokyselina	Leucin	125,2	123,8	79,9	4,4
threonát	threonát	Sacharid	fruktóza	136,1	135,0	75,1	5,6
U	uracil	Pyrimidinová báze	Uracil	112,1	1101,0	42,1	2,4
Ur	uridin	Nukleosid pyrimidinu	Uracil	244,2	242,8	110,0	3,0
X	xantin	Purinová báze	Uracil	152,1	150,9	108,0	5,6
1mX	1-methylxantin	Purinová báze	Uracil	166,1	164,9	108,0	4,5
2ohBut_2ohIsobut	2-hydroxybutanoát/ 2-hydroxyisobutanoát	Organická kyselina	Kyselina adipová	104,1/ 104,1	102,9	57,0	4,5
2ohGlutar	2-hydroxyglutarát	Organická kyselina	Kyselina adipová	148,1	146,9	128,9	7,5
2ohIsovaler	2-hydroxyisovalerát (2-hydroxy-3-methylbutyrát)	Organická kyselina	Kyselina adipová	118,1	116,9	71,1	4,3
3indoxylS	3-indoxylsulfát	Aminokyselina	Leucin	213,2	212,0	81,0	4,0
7mG	7-methylguanin	Purinová báze	Uracil	165,2	164,0	106,1	3,3

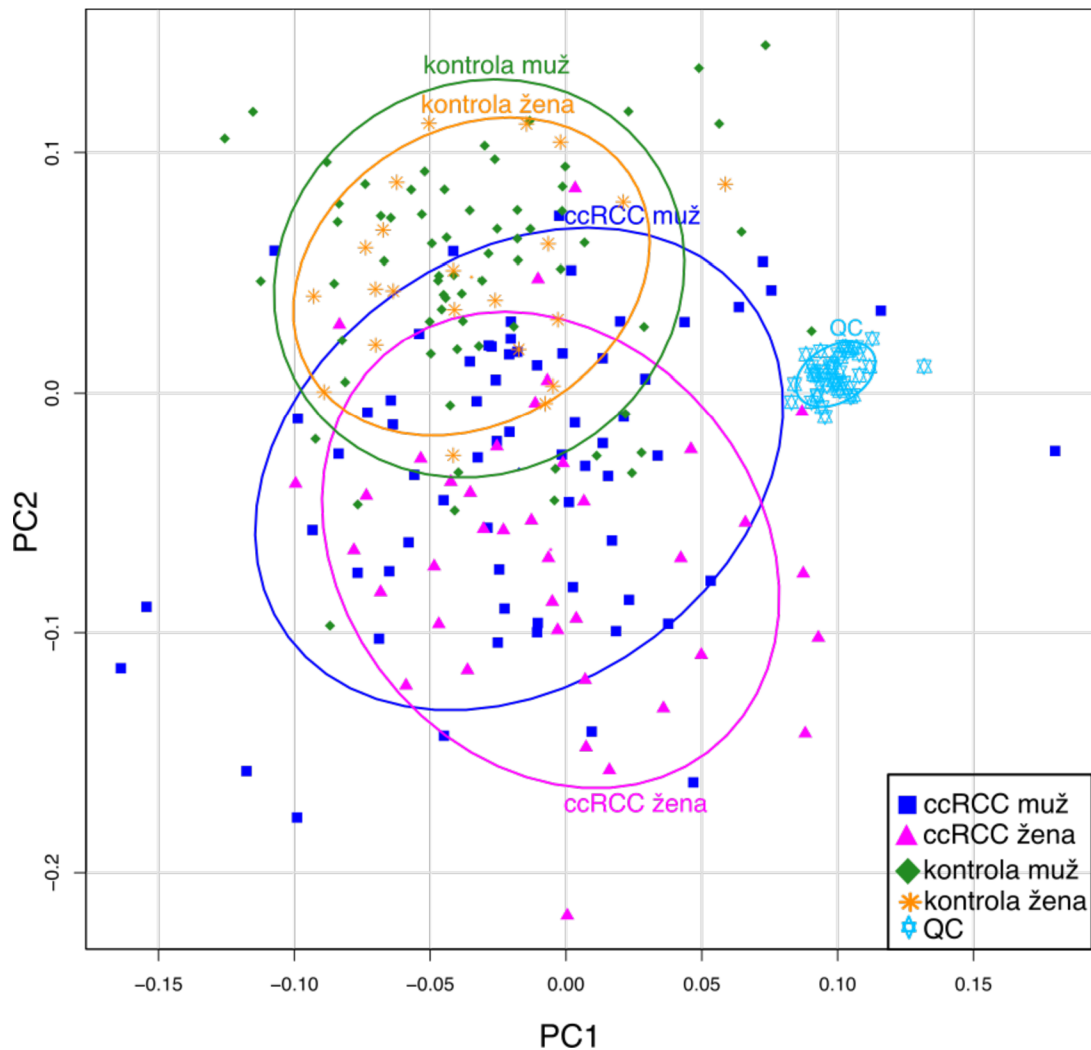
4.1.1 Vícerozměrná statistická analýza všech skupin vzorků

Nesupervizovanou metodou PCA (Obr. 14) nedošlo téměř k žádnému oddělení vzorků do skupin: muži s ccRCC, ženy s ccRCC, kontroly muži a kontroly ženy. Většina vzorků se překrývala. Jednalo se o dvoudimenzionální zobrazení vztahů mezi jednotlivými vzorky, které však nebyly dle metabolomického profilu odděleny. Hodnoty na jednotlivých osách dosahovaly velmi nízkého skóre hlavního komponent (PC). Skóre PC1 zobrazené na ose x bylo 12,72 %. Na ose y bylo skóre PC2 9,08 %. Procento variability získané součtem obou komponent tedy činilo 21,8 %. QC vzorky se shlukovaly do jednoho místa uprostřed grafu a nevykazovaly trend, což značí kvalitní průběh analýzy a vysokou reprezentativnost měření.



Obr. 14: PCA analýza vzorků plazem od pacientů s ccRCC a kontrolních vzorků. Každý barevný bod představuje vzorek ze skupin: muži s ccRCC (tmavě modrá), ženy s ccRCC (růžová), kontrolní vzorky mužů (zelená), kontrolní vzorky žen (oranžová) a QC vzorky jsou vyznačeny světle modře.

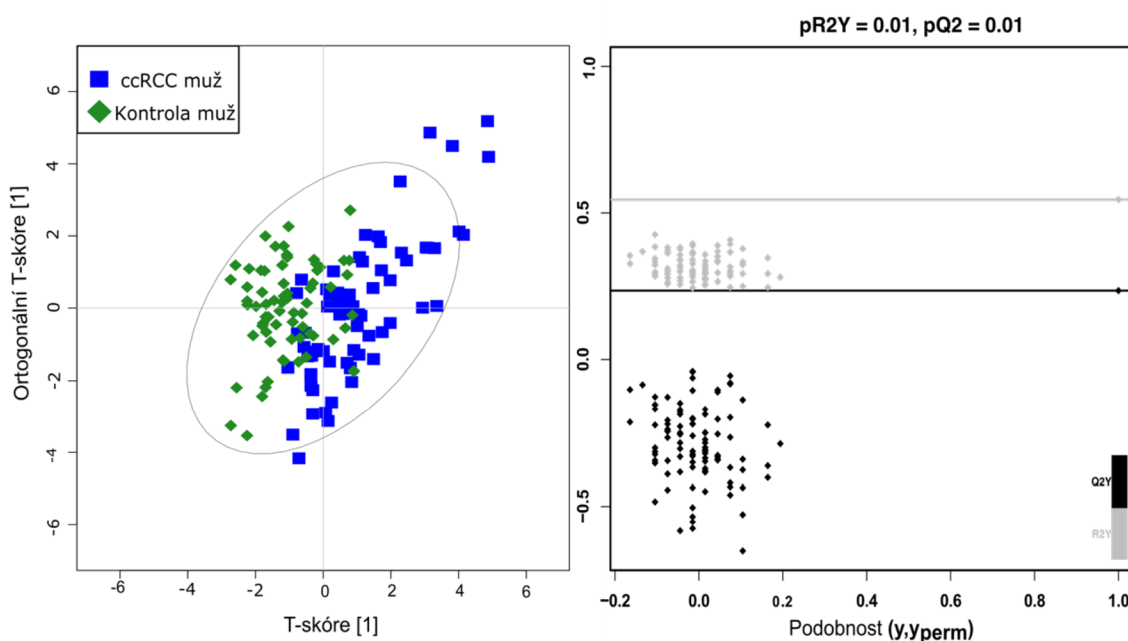
Pomocí skórového grafu supervizované metody PLS-DA došlo především k oddělení vzorků pacientů od obou kontrolních skupin, které se mírně překrývaly. Lze tedy usoudit, že se metabolický profil pacientů s ccRCC liší v porovnání s kontrolami. Vzorky pacientů se poté částečně separovaly od sebe podle pohlaví, které nejspíš mělo vliv na fungování biochemických drah ovlivněných patologií renálního karcinomu. (Obr. 15). Kontrolní vzorky se neoddělily, což je způsobeno nejspíše vysokou podobností jejich metabolických profilů.



Obr. 15: PLS-DA analýza vzorků plazem od pacientů s ccRCC a kontrolních vzorků. Každý bod představuje jeden konkrétní vzorek ze skupin muži s ccRCC (tmavě modrá), ženy s ccRCC (ružová), kontrolní vzorky mužů (zelená), kontrolní vzorky žen (oranžová) a QC vzorky jsou vyznačeny světle modře.

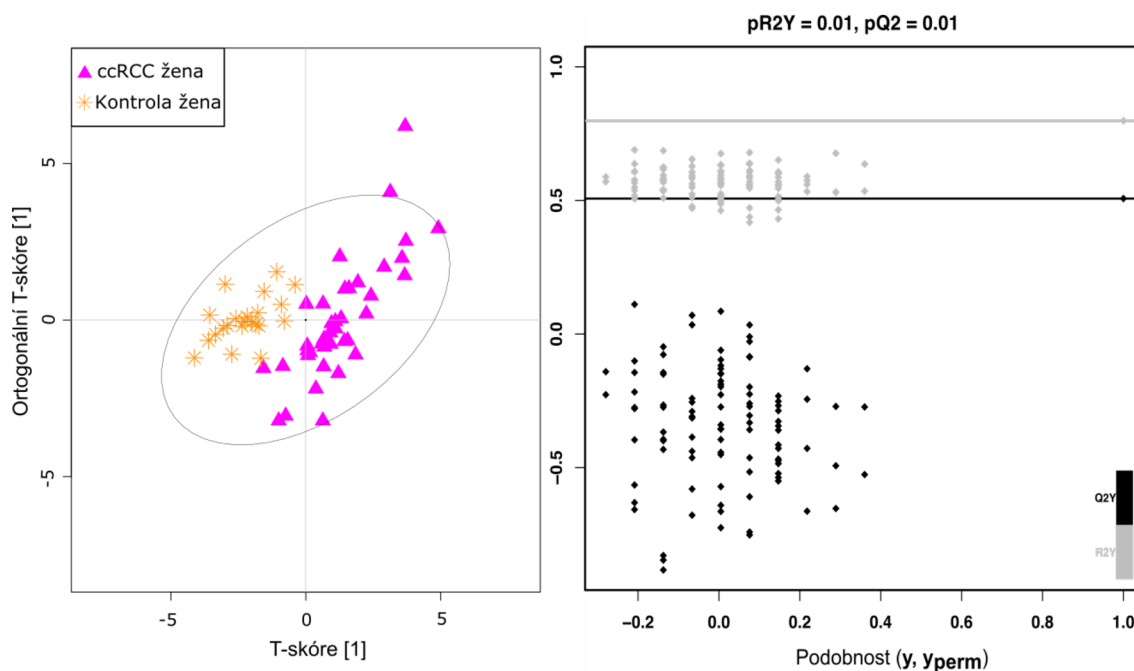
4.1.2 Statistická analýza jednotlivých skupin vzorků

Vzorky mužů a žen (pacienti vs. kontroly) byly tedy na základě výsledků PLS-DA analýzy, která odhalila separaci vzorků do skupin, nezávisle na sobě vyhodnoceny supervizovanou metodou OPLS-DA s grafickou reprezentací skórových grafů, které byly ověřeny permutačními testy (Obr. 16 a Obr. 17). OPLS-DA skórové grafy potvrzují výstup metody PLS-DA, protože došlo k oddělení vzorků pacientů od zdravých jedinců. V případě mužů se obě zkoumané skupiny lehce překrývaly, ale separace u žen byla úplná.



Obr. 16: Skórový graf metody OPLS-DA zobrazující oddělení vzorků do skupin muži s ccRCC (modré body) a kontrolní vzorky mužů (zelené body) s příslušným permutačním testem.

Obrázek 17 zobrazuje oddělení vzorků ženského pohlaví do skupin ženy s ccRCC a kontrolní vzorky.



Ob. 17: Skórový graf metody OPLS-DA zobrazující oddělení vzorků do skupin ženy s ccRCC (růžové body) a kontrolní vzorky žen (oranžové body) s příslušným permutačním testem.

Permutační testy byly použity pro potvrzení správnosti a schopnosti predikce OPLS-DA modelů. Výstupy u obou pohlaví byly na základě p-hodnot parametrů R^2y a Q^2y vyhodnoceny jako statisticky významné (jejich hodnota byla nižší než 0,05). Výsledky permutačního testu jsou zaznamenány v Tabulce č. 7.

Tab. 7: Souhrn parametrů permutačních testů zmíněných OPLS-DA skórových grafů s příslušnými p-hodnotami z t-testu

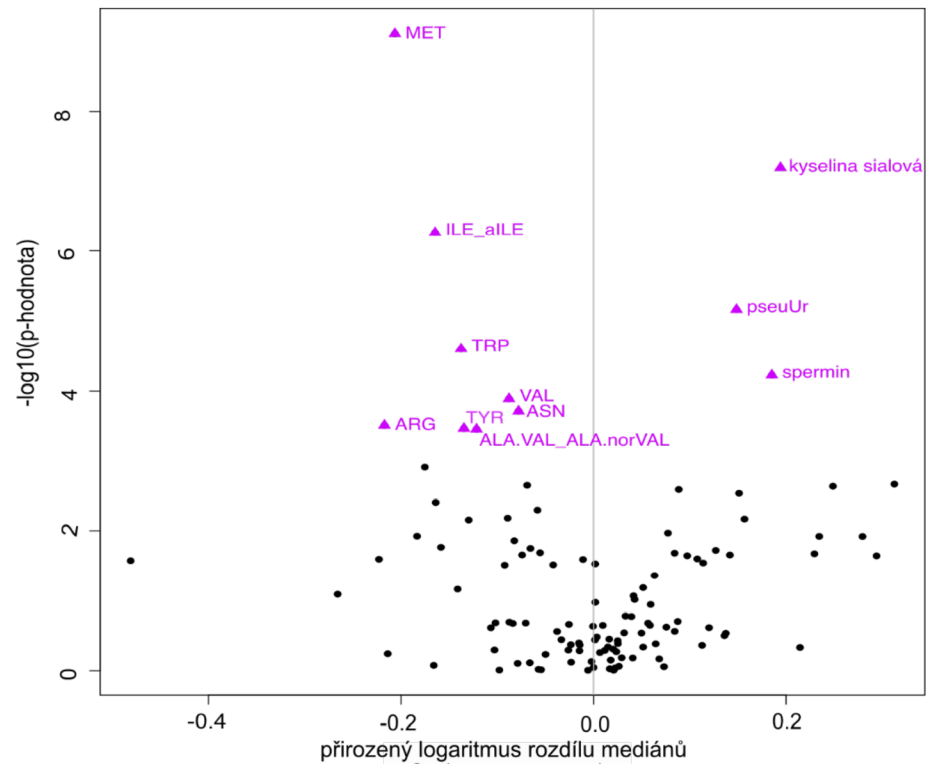
Muži pacienti/ muži kontroly			
R^2y	Q^2y	<i>p-hodnota R^2y</i>	<i>p-hodnota Q^2y</i>
0,166	0,546	0,01	0,01
Ženy pacientky/ ženy kontroly			
R^2y	Q^2y	<i>p-hodnota R^2y</i>	<i>p-hodnota Q^2y</i>
0,178	0,798	0,01	0,01

Na základě ověřených OPLS-DA modelů pomocí permutačních testů bylo tedy vhodné přistoupit k odhalení změn v metabolických profilech, na základě kterých se skupiny vzorků pacientů a kontrol oddělily.

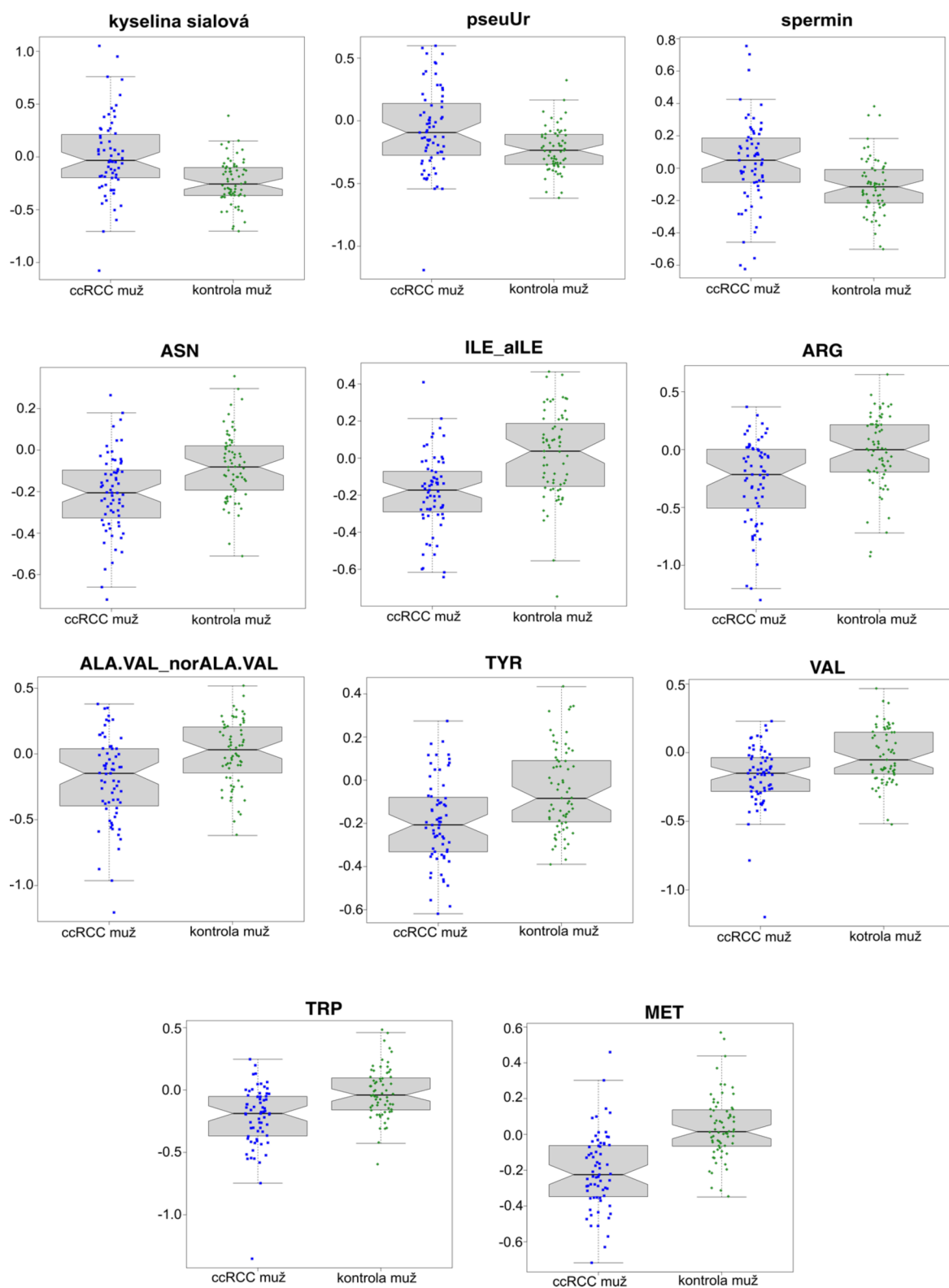
Pomocí výstupů statistické analýzy OPLS-DA S-plot (Obr. 18) bylo ve vzorcích mužských pacientů s ccRCC ve srovnání s kontrolami prezentováno 30 nejvýznamnějších metabolitů (Tab. 8). Mezi tyto metabolity se řadily (ne)nasyčené a hydroxylované acylkarnitiny s krátkým, středním i dlouhým řetězcem (C4.1, C16.1, C3.DC_C4.OH, C18.1.OH, C2), aminy (spermin, guanidinoacetát), aminokyseliny se svými deriváty (alanin/valin a jejich deriváty, tyrosin, arginin, lysin, isoleucin a jeho derivát, tryptofan, histidin, threonin/homoserin, asparagin, methionin, valin, fenylalanin, acetylalanin), organické kyseliny (2-hydroxyglutarát, 2-hydroxyisovalerát, kyselina sialová) deriváty sacharidů (arabitol/ribitol, myoinositol, threonát) a meziprodukty purinového/pyrimidinového metabolismu (pseudouridin, xantin, xypoxantin, 7-methylguanin).

Tab.8: Třicet nejvýznamnějších metabolitů OPLS-DA S-plot u ccRCC pacientů mužského pohlaví porovnávané s vzorky zdravých mužů. Zkratky metabolitů jsou vysvětleny v kapitole č 8.

Pořadí	Metabolit	P _{corr} [1]	p[1]	Rozdíl mediánů	p-hodnota
1	kyselina sialová	0,64	0,56	0,20	6,49 E-08
2	pseUr	0,59	0,46	0,15	6,82 E-06
3	C3.DC_C4.OH	0,58	0,70	0,23	1,20 E-02
4	arabitol_ribitol	0,53	0,51	0,08	2,08 E-02
5	C18.1.OH	0,47	0,50	0,00	2,97 E-02
6	C4.1	0,46	0,58	0,23	2,12 E-02
7	myoinositol	0,42	0,32	0,04	9,70 E-02
8	7mG	0,42	0,33	0,09	2,60 E-03
9	C2	0,41	0,35	0,09	1,97 E-01
10	2ohGlutar	0,40	0,28	-0,01	2,56 E-02
11	C16.1	0,39	0,40	0,11	2,51 E-02
12	spermin	0,39	0,31	0,19	6,01 E-05
13	X	0,39	0,45	0,16	6,77 E-03
14	threonát	0,39	0,32	0,10	2,27 E-02
15	AcALA	0,38	0,31	0,15	2,94 E-03
16	2ohIsovaler	0,37	0,44	0,12	2,42 E-01
17	HX	0,37	0,46	0,31	2,17 E-03
18	THR_hSER	-0,39	-0,29	-0,04	3,06 E-02
19	ASN	-0,43	-0,30	-0,08	1,93 E-04
20	PHE	-0,43	-0,27	-0,06	5,05 E-03
21	ILE_aILE	-0,47	-0,36	-0,16	5,46 E-07
22	ARG	-0,48	-0,49	-0,22	3,08 E-04
23	GuaAc	-0,49	-0,43	-0,09	3,09 E-02
24	ALA.VAL_ALA.norVAL	-0,52	-0,47	-0,12	3,50 E-04
25	TYR	-0,55	-0,41	-0,13	3,41 E-04
26	VAL	-0,57	-0,42	-0,09	1,28 E-04
27	HIS	-0,58	-0,51	-0,18	1,24 E-03
28	LYS	-0,58	-0,43	-0,07	2,26 E-03
29	TRP	-0,61	-0,50	-0,14	2,51 E-05
30	MET	-0,70	-0,54	-0,21	7,72E-10



Obr. 19: Vulkánový graf zobrazující metabolity signifikantní podle p-hodnot (jejich záporného dekadického logaritmu) v závislosti na přirozeném logaritmu rozdílu mediánů u vzorků od pacientů mužů v porovnání s kontrolami (označeny červeně). Všechny signifikantní metabolity byly mezi 30 nejvýznamnějšími na základě OPLS-DA S-plot.



Obr. 20: Krabicové grafy vizualizující hladiny signifikantních metabolitů společných pro vícerozměrnou i jednorozměrnou statistickou analýzu u pacientů mužského pohlaví ve srovnání s kontrolami.

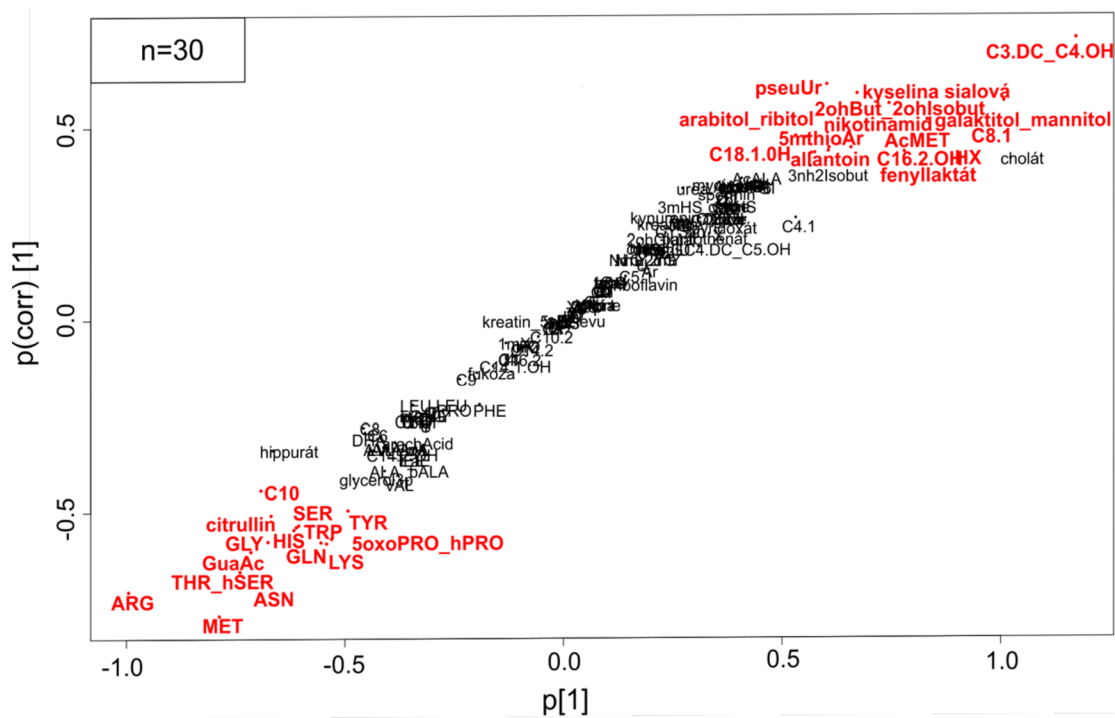
Ve vzorcích odebraných ženám s ccRCC bylo pomocí S-plot supervizované metody OPLS-DA (Obr. 21) ve srovnání s kontrolními vzorky prezentováno rovněž 30 nejvýznamnějších metabolitů (Tab. 9). Uvedené metabolity se řadily do skupin vitaminy (nikotinamid), (ne)nasyčené a hydroxylované acylkarnitiny se středním a dlouhým řetězcem (C18.1.OH, C3.DC_C4.OH, C8.1, C16.2.OH, C10), aminy (guanidinoacetát, allantoin, aminokyseliny se svými deriváty (methionin, acetylmethionin, asparagin, tryptofan, glycin, arginin, lysin, threonin/homoserin, serin, histidin, 5-oxoprolin/homoprolin, tyrosin a glutamin), organické kyseliny (citrulin, kyselina sialová, 2-hydroxybutanoát/2-hydroxyisobutanoát, fenyllaktát), meziprodukty purinového/pyrimidinového metabolismu a deriváty sacharidů (arabitol/ribitol, 5-methylthioadenosin, pseudouridin).

Uvedených 30 nejvýznamnějších metabolitů vyhodnocených u vzorků žen je znázorněno na S-plot (Obr. 21). Signifikantní metabolity byly dále porovnávány s významnými metabolity jednorozměrné statistiky vizualizací vulkánového grafu (Obr. 22). Všechny 10 nejvýznamnějších metabolitů vulkánového grafu se nacházelo mezi 30 signifikantními S-plot. Pro vizualizaci rozdílů v hladinách těchto metabolitů byly následně vytvořeny krabicové grafy (Obr. 23).

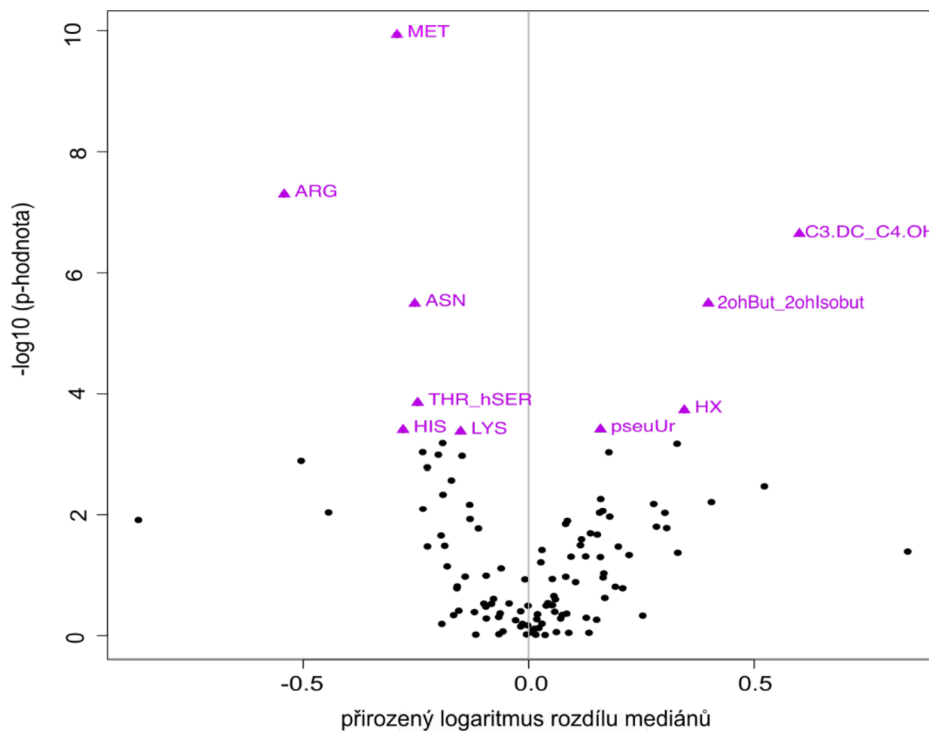
Zvýšené hladiny u pacientek s ccRCC byly v porovnání s kontrolami pozorovány u pseudouridinu (pseuUr), malonylkarnitinu (C3.DC_C4.OH) a 2--hydroxybutanoátu/2-hydroxyizobutanoátu (2ohBut_2ohIsobut). Dále bylo identifikováno zvýšení hladiny hypoxantinu (HX), který je metabolitem purinového metabolismu. Zatímco snížení hladin bylo zaznamenáno u aminokyselin, konkrétně histidinu (HIS), lysinu (LYS), threoninu/homoseerinu (THR_hSER), asparaginu (ASN), argininu (ARG) a methioninu (MET).

Tab. 9: Třicet nejvýznamnějších metabolitů OPLS-DA S-plot u ccRCC pacientek porovnávaných se vzorky zdravých žen. Zkratky metabolitů jsou vysvětleny v kapitole č. 8.

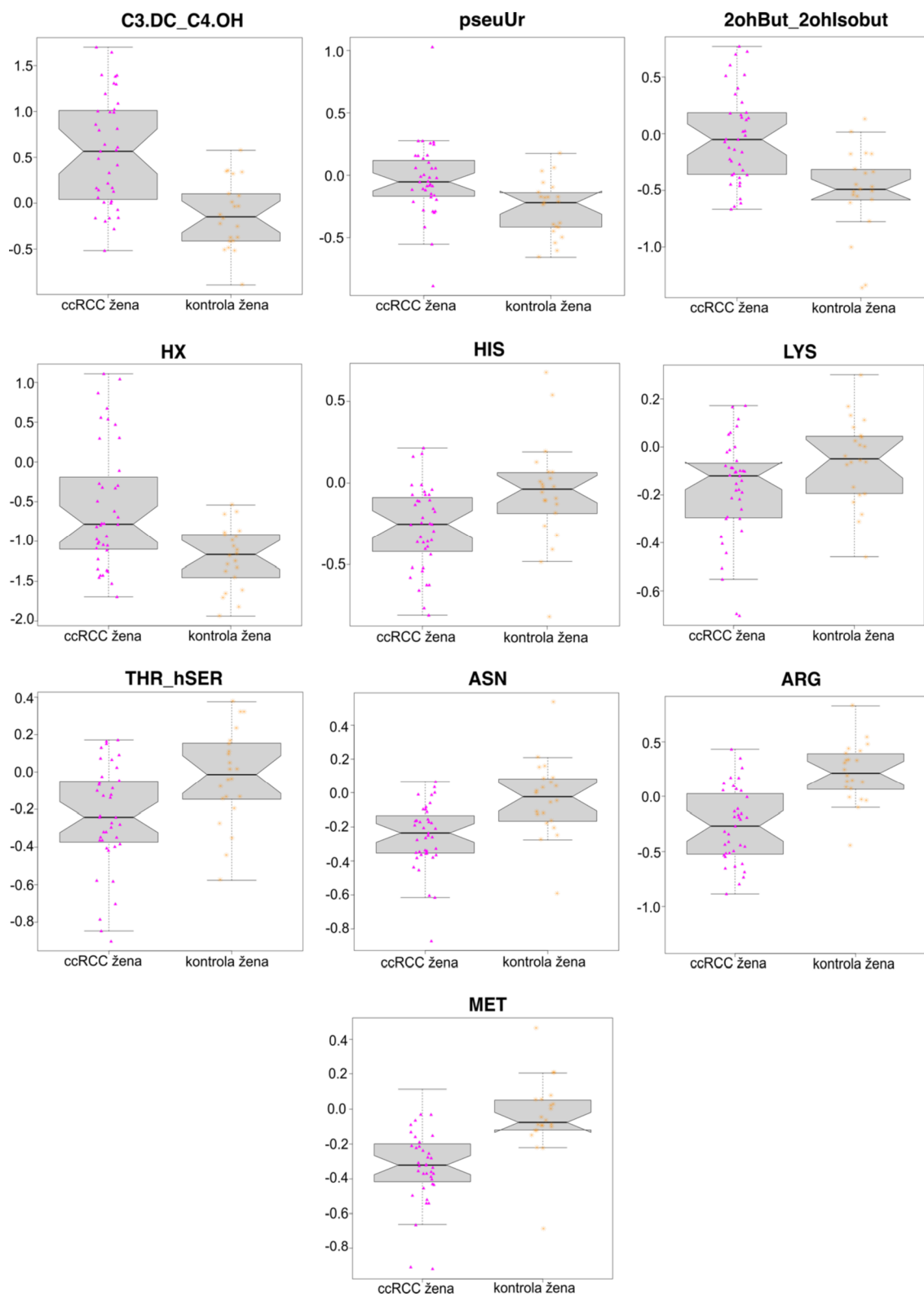
Pořadí	Metabolit	p-corr[1]	p[1]	Rozdíl mediánů	p-hodnota
1	C3.DC_C4.OH	0,73	1,17	0,63	2,33 E-07
2	pseuUr	0,61	0,60	0,16	3,88 E-04
3	Kyselina sialová	0,59	0,67	0,16	5,39 E-03
4	galaktitol_mannitol	0,57	1,01	0,52	3,32 E-03
5	2ohBut_2ohIsobut	0,56	0,74	0,40	3,23 E-06
6	C8.1	0,52	0,83	0,41	6,05 E-03
7	arabitol_ribitol	0,48	0,53	0,08	1,42 E-02
8	5mthioAr	0,47	0,55	0,15	2,14 E-02
9	nikotinamid	0,45	0,63	0,22	4,64 E-02
10	fenyllaktát	0,44	0,61	0,17	1,09 E-01
11	AcMET	0,44	0,66	0,33	4,26 E-02
12	C16.2.OH	0,44	0,61	0,28	1,58 E-02
13	HX	0,43	0,78	0,35	1,87 E-04
14	C18.1.OH	0,43	0,57	0,30	9,31 E-03
15	allantoin	0,43	0,57	0,31	1,66 E-02
16	C10	-0,44	-0,69	-0,50	1,29 E-03
17	TYR	-0,50	-0,49	-0,19	6,53 E-04
18	citruilin	-0,51	-0,67	-0,17	2,67 E-03
19	SER	-0,53	-0,61	-0,23	7,96 E-03
20	TRP	-0,54	-0,61	-0,15	1,06 E-03
21	HIS	-0,55	-0,62	-0,28	3,95 E-04
22	5oxoPRO_hPRO	-0,57	-0,53	-0,11	1,69 E-02
23	GLY	-0,58	-0,68	-0,24	9,22 E-04
24	GLN	-0,58	-0,55	-0,13	1,18 E-02
25	LYS	-0,58	-0,54	-0,15	4,22 E-04
26	GuaAc	-0,60	-0,71	-0,20	1,02 E-03
27	THR_hSER	-0,65	-0,74	-0,25	1,41 E-04
28	ASN	-0,68	-0,69	-0,25	3,25 E-06
29	ARG	-0,71	-0,99	-0,54	5,07 E-08
30	MET	-0,77	-0,79	-0,29	1,16 E-10



Obr. 21 S-plot metody OPLS-DA zobrazující signifikantní metabolity (červené) pro vzorky od pacientů s ccRCC ženského pohlaví v porovnání se vzorky kontrolními.



Obr. 22: Vulkánový graf zobrazující metabolity signifikantní podle p-hodnot (jejich záporného dekadického logaritmu) na přirozeném logaritmu rozdílu mediánů u vzorků od ccRCC pacientek v porovnání s kontrolami (označeny fialově). Všechny tyto signifikantní metabolity byly mezi 30 nejvýznamnějšími na základě OPLS-DA S-plot.



Obr. 23: Krabicové grafy zobrazující zvýšené/snížené hladiny signifikantních metabolitů pro vícerozměrnou i jednorozměrnou statistickou analýzu u pacientek ženského pohlaví ve srovnání s kontrolami.

5 DISKUZE

Předložená diplomová práce byla zaměřena na sledování metabolických změn mezi pacienty s ccRCC (mužů i žen) v porovnání se zdravými jedinci za využití cíleného přístupu metabolomické analýzy.

Po zpracování a korekci dat bylo detekováno 116 metabolitů ve zkoumaných plazmatických vzorcích, u kterých byla provedena statistická analýza. Nesupervizovaným přístupem PCA nedošlo k téměř žádnému oddělení vzorků do jednotlivých skupin. Dále byly vzorky podrobeny supervizované metodě PLS-DA, u které došlo k oddělení pacientů (muži s ccRCC, ženy s ccRCC) od obou kontrolních skupin, které zůstaly neodlišeny. Supervizovaná metoda OPLS-DA poté potvrdila u obou pohlaví zvláště, že se metabolické profily pacientů a kontrol výrazně lišily. Výstupy S-plot byly porovnány s vulkánovými grafy a shodné statisticky významné metabolity jsou v následujícím textu diskutovány.

U pacientů mužského pohlaví byly mezi signifikantními metabolity skupiny aminokyselin (včetně jejich derivátů), organických kyselin, aminů a metabolitů pyrimidinového metabolismu. U ženských pacientek byly identifikovány metabolity, které se řadí do skupin aminokyselin (a jejich derivátů), organických kyselin, acylkarnitinů a metabolitů purinového a pyrimidinového metabolismu. Onemocnění ccRCC tedy nejspíše obecně způsobuje metabolickou změnu hladin aminokyselin, aminů, organických kyselin a metabolitů pyrimidinového metabolismu bez ohledu na pohlaví. Naopak změny hladin metabolitů purinového metabolismu a acylkarnitinů jsou rozdílné na základě pohlaví pacientů.

Obě skupiny pacientů vykazovaly oproti kontrolním vzorkům několik společných trendů. Prvním význačným trendem bylo snížení hladin aminokyselin v krevní plazmě. Aminokyseliny tvořily největší část signifikantních metabolitů. U pacientů mužského pohlaví bylo z 11 nejvýznamnějších metabolitů identifikováno 7 aminokyselin a jejich derivátů. Konkrétně se jednalo o asparagin, isoleucin a allisoleucin, arginin, alanin/valin, tyrosin, tryptofan a methionin. U vzorků žen s ccRCC bylo identifikováno celkem 6 aminokyselin z 10 signifikantních metabolitů. U této skupiny vzorků byla rovněž snížena hladina methioninu, asparaginu a argininu, stejně jako u mužů. Navíc byla u ženských pacientek identifikována nižší hladina histidinu, lysinu a threoninu/homoserinu. Je tedy pravděpodobné, že změna metabolismu konkrétních typů aminokyselin může souviset s pohlavím pacientů. Také by se dalo předpokládat,

že existuje určitá míra korelace mezi asparaginem, argininem a methioninem, jelikož došlo ke snížení jejich hladiny u obou skupin pacientů. Aminokyseliny jsou hlavním zdrojem živin pro buněčnou proliferaci (Zhang *et al.*, 2017). Ledviny navíc hrají důležitou roli v regulaci hladin aminokyselin v krevní plazmě. Klíčovou funkcí normálních epiteliálních buněk renálních tubulů je reabsorpce aminokyselin z glomerulárního filtrátu (Mustafa *et al.*, 2011). Na základě dříve prováděné studie Mustafa *et al.*, 2011 bylo zjištěno, že obecně snížené hladiny sérových aminokyselin odrazem zvýšeného využití těchto metabolitů nádorem pro průběh biosyntetických procesů. Hladiny aminokyselin v séru jsou považovány za potenciální prediktivní biomarker pro detekci pacientů s ccRCC (Zhang *et al.*, 2017; Mustafa *et al.*, 2011).

Dalším významným metabolitem identifikovaným u pacientů mužského pohlaví byla kyselina sialová, jejíž hladina v plazmě pacientů byla oproti kontrolám zvýšená. Tento metabolit patří mezi sacharidy a je umístěn na terminálních pozicích glykanů připojených ke glykoproteinům a glykolipidům, kde hraje důležitou roli v regulaci interakcí s ligandy. Kyselina sialová je spjata s genem *ST3GAL1* (ST3- β -Galaktosid- α -2,3-Sialyltransferasa1). Membránový protein kódovaný tímto genem katalyzuje přenos kyseliny sialové na substráty obsahující galaktózu a přispívá k progresi nádoru. Změny struktury glykanových řetězců jsou jedním z nejvíce sdílených rysů maligní transformace. (Bai *et al.*, 2015). Zmíněná studie Bai *et al.*, 2015 rovněž uvádí, že u pacientů s karcinomem bývají často zaznamenány vysoké hladiny kyseliny sialové, která souvisí s klíčovými patofyziologickými ději během progresu nádorů. U pacientek ženského pohlaví se kyselina sialová mezi 10 nejvýznamnějšími metabolity nevyskytovala. Je tedy pravděpodobné, že tento metabolit vykazuje výrazné zvýšení sérové hladiny pouze u pacientů mužského pohlaví.

U žen s ccRCC byl ve srovnání s kontrolami pozorován trend značně zvýšené hladiny acylkarnitinu malonylkarnitinu/hydroxybutyrylkarnitinu. Acylkarnitiny vznikají přenosem acylové skupiny na karnitin za katalýzy enzymu karnitinacyltransferasy (EC 2.3.1.7). Acylkarnitiny jsou nutné pro transport mastných kyselin do vnitřní mitochondriální membrány a pomáhají při procesu β -oxidace mastných kyselin. Tím nejspíše ovlivňují přežití nádorových buněk (Jing *et al.*, 2019). Experimenty prováděné ve studii Ganti *et al.*, 2012 prokazují, acylkarnitiny mohou být prospěšné pro RCC z hlediska růstu a přežití nádorových buněk. Nádorové buňky RCC totiž vyžadují více energie, a tedy i více β -oxidace mastných kyselin k udržení vyšší rychlosti buněčného

dělení a růstu, proto pacienti s renálním karcinomem vykazují zvýšenou hladinu acylkarnitinů (Ganti *et al.*, 2012).

Mezi významnými metabolity byly také meziprodukty purinového a pyrimidinového metabolismu. U skupiny vzorků ženského pohlaví byla zaznamenána zvýšená hladina hypoxantinu, která nejspíše odráží narušenou funkci enzymu xantindehydrogenasy (XDH, EC 1.17.1.4). XDH hraje klíčovou roli v metabolismu purinů při oxidaci hypoxantinu na xantin a katalýze přeměny xantinu na kyselinu močovou. Wang *et al.*, 2022 ve své nedávné studii prokázali, že exprese XDH byla ve tkáních ccRCC významně snížena v porovnání s normálními renálními tkáněmi. Společným trendem obou skupin vzorků bylo zvýšení sérové hladiny pseudouridinu. Pseudouridin je nejrozšířenějším modifikovaným nukleosidem vznikající posttranskripční modifikací t-RNA. NA základě již dříve popsanych studií jako jsou Rasmuson *et al.*, 1991 a Motyl *et al.*, 1993 je známo, že koncentrace pseudouridinu v krevní plazmě pacientů je trvale vyšší a koreluje s velikostí a stupněm nádoru. Studie He *et al.*, 2022 popisuje důležitou roli pseudouridinu také u pacientů s akutní myeloidní leukémií. Jeho zvýšené hladiny jsou tedy zjevné i u jiných typů karcinomů.

Významně vysoká hladina metabolitu 2-hydroxybutanoátu/2-hydroxyisobutanoátu byla zaznamenána u vzorků pacientek ženského pohlaví, zatímco u mužů koncentrace tohoto metabolitu zvýšená nebyla. Uvedený metabolit tedy pravděpodobně souvisí s pohlavím pacientů. 2-hydroxybutanoát představuje organickou kyselinu, která vzniká jako vedlejší produkt při syntéze cystathionu za podmínek oxidačního nebo metabolického stresu. Ve studii Buckendahl *et al.*, 2010 byla zaznamenána jeho zvýšená hladina u pacientek s karcinomem vaječnicků. U pacientů s renálním karcinomem zatím nebyla metabolická změna tohoto metabolitu popsána.

Významným metabolitem u pacientů mužského pohlaví, který vykazoval zvýšenou hladinu, byl spermin. Spermin patří mezi polyaminy, které jsou přítomné ve všech eukaryotických buňkách. Jejich biosyntéza je u pacientů s karcinomem značně zvýšena z důvodu udržení rychlé proliferace nádorových buněk (Rioux-Leclercq *et al.*, 2004). Četné studie prokázaly, že u různých nádorů bývají hladiny těchto metabolitů ve srovnání s homologními buněčnými tkáněmi zvýšeny. V dnešní době je již známé také použití anti-sperminových monoklonálních protilátek jako prognostického nástroje vývoje karcinomů, které bylo použito ve studii Rioux -Leclercq *et al.*, 2004 pro studium RCC buněk. U pacientek ženského pohlaví však hladina tohoto metabolitu v krevním séru

oproti kontrolám změněna nebyla, je tedy zřejmé, že se jedná o metabolit významný pouze u pacientů mužského pohlaví.

6 ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo provedení cílové metabolomické analýzy vzorků odebraných pacientům s ccRCC ve srovnání se vzorky zdravých jedinců.

V rámci teoretické části byla vypracována literární rešerše sestávající z následujících částí. První kapitola se zabývala stavbou a funkcí ledvin. V následující kapitole byl popsán metabolismus ledvin. Dále byl charakterizován karcinom ledvin a jeho podtypy, diagnostika a léčba jednotlivých typů karcinomů. Poslední část byla věnována metabolomice a hmotnostní spektrometrii.

LC-MS analýza byla provedena pomocí separační techniky UHPLC spojené s tandemovou hmotnostní spektrometrií. Následně byla získaná data podrobena statistické analýze. Za účelem zvýšení objektivnosti výsledků byly aplikovány nesupervizované a supervizované metody vícerozměrné statistiky v kombinaci s jednorozměrnou statistikou.

Cílenou metabolomickou analýzou bylo detekováno celkem 116 metabolitů. Nejvíce zastoupenou skupinou významných metabolitů u obou skupin pacientů byly aminokyseliny. Hladiny těchto metabolitů byly u mužů i žen významně sníženy. Dále byl zaznamenán společný trend zvýšené hladiny pseudouridinu u obou skupin vzorků. U pacientek ženského pohlaví byla identifikována zvýšená sérová koncentrace acylkarnitinu malonylkarnitinu/hydroxybutyrylkarnitinu a organické kyseliny 2-hydroxybutanoátu/2-hydroxy-isobutanoátu. Zatímco u mužů byla identifikována zvýšená hladina kyseliny sialové a sperminu.

7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Almontashiri N. A. M., Zha L., Young K., Law T., Kellogg M. D., Bodamer O. A., Peake R. W. A. (2020): Clinical Validation of Targeted and Untargeted Metabolomics Testing for Genetic Disorders: A 3 Year Comparative Study. *Scientific Reports*, 10(1).
- Alsaab H. O., Sau S., Alzhrani R. M., Cheriyan V. T., Polin L. A., Vaishampayan U., Rishi A. K., Iyer A. K. (2018). Tumor hypoxia directed multimodal nanotherapy for overcoming drug resistance in renal cell carcinoma and reprogramming macrophages. *Biomaterials*, 183: 280–29.4
- Álvarez-Sánchez B., Priego-Capote F., Luque de Castro, M. D. (2010). Metabolomics analysis I. Selection of biological samples and practical aspects preceding sample preparation. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 29(2): 111–119.
- Alzubaidi A.N., Sekoulopoulos S., Pham J., Walter V., Fuletra J.G., Raman J.D. (2022): Incidence and Distribution of New Renal Cell Carcinoma Cases: 27-Year Trends from a Statewide Cancer Registry. *J Kidney Cancer VHL* 9(2):7-12.
- Ash J. R., Kuenemann M. A., Rotroff D., Motsinger-Reif A., & Fourches D. (2019). Cheminformatics approach to exploring and modeling trait-associated metabolite profiles. *Journal of cheminformatics*, 11(1): 43.
- Bai Q., Liu L., Xia Y., Long Q., Wang J., Xu J., Guo J. (2015): Prognostic significance of ST3GAL-1 expression in patients with clear cell renal cell carcinoma. *BMC Cancer* 15(880): 1 – 9.
- Banerjee S., Mazumdar S. (2012). Electrospray Ionization Mass Spectrometry: A Technique to Access the Information beyond the Molecular Weight of the Analyte. *International Journal of Analytical Chemistry*, 2012: 1–40.
- Bielecka Z.F., Sczylik C., Czarnecka A. (2014). Genomic Analysis as the First step toward Personalized Treatment in Renal Cell Carcinoma. *Frontier Oncology* 4(194): 1 – 15.
- Bruins, A. P. (1998). Mechanistic aspects of electrospray ionization. *Journal of Chromatography A*, 794(1-2): 345–357.

- Buckendahl A. Ch., Budczies J., Fiehn O., Darb-Esfahani S., Kind T., Noske A., Weichert W., Sehouli J., Braicu E., Dietel M., Denkert C. (2010): Prognostic impact of AMP-activated protein kinase expression in ovarian carcinoma: Correlation of protein expression and GC/TOF-MS-based metabolomics. *Oncology Reports* 25: 1005 – 1012.
- Camposano S. E., Greenberg E., Kwiatkowski D. J., Thiele, E. A. (2009). Distinct clinical characteristics of tuberous sclerosis complex patients with no mutation identified. *Annals of human genetics*, 73(2): 141–146.
- Cibulka R. (2005): Metabolické účinky karnitinu a jeho význam v medicíně. *Klinická biochemie a metabolismus* 13(34): 24 – 28.
- Connor Wells J., Donskov F., Fraccon A. P., Pasini F., Bjarnason G. A., Beuselinck B., Knox J. J., Rha S. Y., Agarwal N., Bowman I. A., Lee J. L., Pal S. K., Srinivas S., Scott Ernst D., Vaishampayan U. N., Wood L. A., Simpson R., De Velasco G., Choueiri T. K., Heng D. (2017). Characterizing the outcomes of metastatic papillary renal cell carcinoma. *Cancer medicine*, 6(5): 902–909.
- Curthoys N. P., Watford M. (1995): Regulation of Glutaminase Activity and Glutamine Metabolism. *Annual Review of Nutrition* 15(1): 133 – 159.
- Darshi M., Van Espen B., Sharma K. (2016). Metabolomics in Diabetic Kidney Disease: Unraveling the Biochemistry of a Silent Killer. *American journal of nephrology*, 44(2): 92–103.
- Dass, Ch. (2007). *Fundamentals of contemporary mass spectrometry*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, USA, ISBN: 978-0-471-68229-5.
- Dettmer K. *et* Hammock B. D. (2004). Metabolomics--a new exciting field within the "omics" sciences. *Environmental health perspectives*, 112(7): A396–A397.
- Dettmer K., Aronov P. A., Hammock B. D. (2006). Mass spectrometry-based metabolomics. *Mass spectrometry reviews*, 26(1): 51–78.8
- Dettmer K., Nürnberger N., Kaspar H., Gruber M. A., Almstetter M. F., Oefner P. J. (2011): Metabolite extraction from adherently growing mammalian cells for

metabolomics studies: optimization of harvesting and extraction protocols. *Anal Bioanal Chem.*, 399(3):1127-39.

- Dias F., Teixeira A. L., Ferreira M., Adem B., Bastos N., Vieira J., Fernandes M., Sequeira M. I., Maurício J., Lobo F., Morais A., Oliveira J., Kok K., Medeiros, R. (2017). Plasmatic miR-210, miR-221 and miR-1233 profile: potential liquid biopsies candidates for renal cell carcinoma. *Oncotarget*, 8(61): 103315–103326.
- Diaz de Leon A., Pirasteh A., Costa D. N., Kapur P., Hammers H., Brugarolas J., Pedrosa I. (2019). Current Challenges in Diagnosis and Assessment of the Response of Locally Advanced and Metastatic Renal Cell Carcinoma. *Radiographics: a review publication of the Radiological Society of North America, Inc*, 39(4): 998–1016.
- Do K. T., Kastenmüller G., Mook-Kanamori D. O., Yousri N. A., Theis F. J., Suhre K., Krumsiek J. (2014): Network-based approach for analyzing intra- and interfluid metabolite association in human blood, urine, and saliva. *Journal of proteome research* 14(2): 1183–1194.
- Dunn W. B. *et* Ellis D. I. (2005): Metabolomics: Current analytical platforms and methodologies. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 24(4): 285–294.
- Ebrahimi-Fakhari D., Mann L. L., Poryo M., Graf N., von Kries R., Heinrich B., Ebrahimi-Fakhari D., Flotats-Bastardas M., Gortner L., Zemlin M., Meyer, S. (2018). Incidence of tuberous sclerosis and age at first diagnosis: new data and emerging trends from a national, prospective surveillance study. *Orphanet journal of rare diseases*, 13(1): 117.
- El-Aneed A., Cohen A., Banoub J. (2009). Mass Spectrometry, Review of the Basics: Electrospray, MALDI, and Commonly Used Mass Analyzers. *Applied Spectroscopy Reviews*, 44(3): 210–230.
- Fania L., Mazzati C., Camplone E., Candi E., Abeni D., Dellambra E. (2019): Role of Nicotinamide in Genomic Stability and Skin Cancer Chemoprevention. *International Journal of Molecular Science* 20(5946):1 – 17.

- Fenn J., Mann M., Meng C., Wong S., & Whitehouse C. (1989). Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* 246(4926): 64–71.
- Ficarra V., Guille F., Schips L., de la Taille A., Galetti T. P., Tostain J., Cindolo L., Novara G., Zigeuner R., Bratti E., Li G., Altieri V., Abbou C. C., Zanolla L., Artibani W., Patard J. J. (2005). Proposal for revision of the TNM classification system for renal cell carcinoma. *Cancer* 104(10): 2116 – 2123.
- Fiehn O. (2001). Combining genomics, metabolome analysis, and biochemical modelling to understand metabolic networks. *Comparative and functional genomics*, 2(3): 155–168.
- Friedecký D., Lemr K. (2012). Úvod do hmotnostní spektrometrie. *Klinická biochemie a metabolismus*, 20 (41), No. 3: 152 – 157.
- Ganong W. F. (2005): *Přehled lékařské fyziologie: dvacáté vydání*. Praha: Galén, c2005. ISBN 80-7262-311-7.
- Ganti S., Taylor S.L., Kim K., Hoppel C.L., Guo L., Yang J., Evans C., Weiss R. H. (2012): Urinary acylcarnitines are altered in human kidney cancer. *Int J Cancer* 130(12): 2791 – 2800.
- Gaur S., Turkbey B., Choyke, P. (2017). Hereditary Renal Tumor Syndromes: Update on Diagnosis and Management. *Seminars in ultrasound, CT, and MR*, 38(1): 59–71.
- Glish, G. et Vachet, R (2003).: The basics of mass spectrometry in the twenty-first century. *Nat Rev Drug Discov* 2:140–150.
- Gonzalez A. A., Salinas-Parra N., Cifuentes-Araneda F., Reyes-Martinez C. (2020): Vasopressin actions in the kidney renin angiotensin system and its role in hypertension and renal disease. *Vitamins and Hormones*, 113: 217-238.
- González-Rodríguez B., Villar Gómez de Las Heras K., Aguirre D. T., Rodríguez-Padial L., Albiñana V., Recio-Poveda L., Cuesta A. M., Botella L. M., Jiménez-Escribano R. M. (2019). Evaluation of the safety and effectiveness of oral propranolol in patients with von Hippel-Lindau disease and retinal hemangioblastomas: phase III clinical trial. *BMJ open ophthalmology*, 4(1): e000203

- Grignon D. J., Che M. (2005): Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Clinics In Laborator Medicine* 25: 305 – 3016.
- Gross H. J. (2006): *Mass Spectrometry: A Textbook*. Springer Science & Business Media, Heidelberg: 1
- Guijas C., Montenegro-Burke J. R., Warth B., Spilker M. E., Siuzdak G. (2018). Metabolomics activity screening for identifying metabolites that modulate phenotype. *Nature Biotechnology*, 36(4): 316–320.
- Harrison H., Thompson R. E., Lin Z., Rossi S.H. Stewart G.D., Griffin. S. J., Usher-Smith J. A. (2021): Risk Prediction Models for Kidney Cancer: A Systematic Review: 7(6): 1380 – 1390.
- He R., Qiao J., Wang X., Chen W., Yin T. (2022): A new quantitative method for pseudouridine and uridine in human serum and its clinical application in acute myeloid leukemia. *Journal of Pharmaceutical and Bichemical Analysis* 20(219): 114934.
- Ho C. S., Lam C. W. K., Chan M. H. M., Cheung R. C. K., Law L. K., Lit L. C. W., Ng K. F., Suen M. W. M., Tai H. L. (2003): Electrospray ionisation mass spectrometry: Principles and clinical applications. *The Clinical Biochemist Reviews* 24: 3-12.
- Hong B., Zhang Z., Zhou J., Ma K., Zhang J., Cai L., Zhang N.,Gong K. (2019). Distinctive clinicopathological features of Von Hippel-Lindau-associated hereditary renal cell carcinoma: A single-institution study. *Oncology letters*, 17(5): 4600–4606.
- Hosten A.O. (1990): BUN and Creatinine. Walker H.K., Hall W.D., Hurst J.W., editors. *Clinical Methods: The History, Physical, and Laboratory Examinations*. 3rd edition. (Boston): Chapter 193.
- Hou X., Zhou Y., Peng Y., Qiu R., Xia K., Tang B., Zhuang W., Jiang, H. (2018). Birt-Hogg-Dubé syndrome in two Chinese families with mutations in the FLCN gene. *BMC medical genetics*, 19(1): 14

- Hsieh J. J., Purdue M. P., Signoretti S., Swanton CH., Albiges L., Schmidinger M., Heng D. Y., Larkin J., Ficarra V. (2017): Renal cell carcinoma, Nature reviews. Disease primers 3(17009): 1 – 19.
- Chesnel F., Hascoet P., Gagné J., Couturier A., Jouan F., Poirier G.G., Le Goff C., Vigneau C., Danger Y., Verite F., Le Goff X., Arlot-Bonnemains Y. (2015). The von Hippel–Lindau tumour suppressor gene: uncovering the expression of the pVHL172 isoform. Br J Cancer **113**: 336–344
- Choi Y., Keam B., Kim M., Yoon S., Kim D., Choi J. G., Seo J. Y., Park I., Lee, J. L. (2019). Bevacizumab Plus Erlotinib Combination Therapy for Advanced Hereditary Leiomyomatosis and Renal Cell Carcinoma-Associated Renal Cell Carcinoma: A Multicenter Retrospective Analysis in Korean Patients. Cancer research and treatment, 51(4): 1549–1556.
- Christensen M. B., Wadt K., Jense U. B., Lautrup C. K., Bojesen A., Krogh L. N., Overeem Hansen T. V., Gerdes A. M. (2019). Exploring the hereditary background of renal cancer in Denmark. PloS one, 14(4): e0215725.
- Chu-Shore C. J., Major P., Camposano S., Muzykewicz D., Thiele, E. A. (2010). The natural history of epilepsy in tuberous sclerosis complex. Epilepsia, 51(7): 1236–1241.
- Idle J. R. et Gonzalez F. J. (2007). Metabolomics. Cell Metabolism, 6(5): 348–351.
- Ito R., Narita S., Huang M., Nara T., Numakura K., Takayama K., Tsuruta H., Maeno A., Saito M., Inoue T., Tsuchiya N., Satoh S., Habuchi, T. (2017): The impact of obesity and adiponectin signaling in patients with renal cell carcinoma: A potential mechanism for the "obesity paradox". PloS one, 12(2): e0171615.
- Jäpelt K. B., Christensen J. H., Villas-Bôas S. G. (2015): Metabolic fingerprinting of *Lactobacillus paracasei*: the optimal quenching strategy. Microbial cell factories, 14: 132.
- Ježek P. (2020): 2-Hydroxyglutarate in cancer cells. Antioxidants & Redox Signaling 33(13): 903 – 926.

- Jing L., Guignonis J.M., Borchiellini D., Durand M., Pourcher T., Ambrosetti D. (2019): LC-MS based metabolomic profiling for renal cell carcinoma histologic subtypes. *Nature* 9 (15635): 1 – 10.
- Johnson C. H., Ivanisevic J., Siuzdak G. (2016). Metabolomics: beyond biomarkers and towards mechanisms. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 17(7): 451–459.
- Johnson C. H., Ivanisevic J., Siuzdak G. (2016). Metabolomics: beyond biomarkers and towards mechanisms. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 17(7): 451–459.
- Johnson D.C., Vukina J., Smith A.B., Meyer A.M., Wheeler S.B., Kuo T.M., Tan H.J., Woods M.E., Raynor M.C., Wallen E.M., Pruthi R.S., Nielsen M.E. (2015). Preoperatively misclassified, surgically removed benign renal masses: a systematic review of surgical series and United States population level burden estimate. *J Urol*. 193(1): 30-5.
- Jonasch E., Donskov F., Iliopoulos O., Rathmell W K., Narayan V. K., Maughan B. L., Oudard S., Else T., Maranchie J. K., Welsh S. J., Thamake S., Park E. K., Perini R. F., Linehan W. M., Srinivasan R., M.D. (2021): Belzutifan for Renal Cell Carcinoma in von Hippel-Lindau Disease. *The New England Journal of Medicine* 385(22): 2036 – 2046.
- Jonscher K.R., Yates J.R. (1997). The quadrupole ion trap mass spectrometer – a small solution to a big challenge. *Analytical biochemistry*, 244: 1 – 15.
- Kaiser K. A., Merrywell C. E., Fang F., Larive C. K. (2008). NMR Spectroscopy in Pharmaceutical Analysis. *Metabolic Profiling*, 233–267.
- Kamai T., Tomosugi N., Abe H., Kaji Y., Oyama T., Yoshida, K. (2012). Protein profiling of blood samples from patients with hereditary leiomyomatosis and renal cell cancer by surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *International journal of molecular sciences*, 13(11): 14518–14532.2

- Karas M., Bahr U., Dülcks T. (2000). Nano-electrospray ionization mass spectrometry: addressing analytical problems beyond routine. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 366(6-7): 669 – 676.
- Kato H., Izumi Y., Hasunuma T., Matsuda F., Kondo A. (2012). Widely targeted metabolic profiling analysis of yeast central metabolites. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 113(5): 665–673.
- Kerins M. J., Milligan J., Wohlschlegel J. A., Ooi, A. (2018). Fumarate hydratase inactivation in hereditary leiomyomatosis and renal cell cancer is synthetic lethal with ferroptosis induction. *Cancer science*, 109(9): 2757–2766.
- Khetani V. V., Portal D. E., Shah M. R., Mayer T., Singer E. A. (2020): Combination drug regimens for metastatic clear cell renal cell carcinoma, *World journal of clinical oncology*, 11(8): 541–562
- Kim K., Taylor S. L., Ganti S., Guo L., Osier M. V., Weiss, R. H. (2011). Urine metabolomic analysis identifies potential biomarkers and pathogenic pathways in kidney cancer. *Omics: a journal of integrative biology*, 15(5): 293–303.
- Kingswood J. C., d'Augères G. B., Belousova E., Ferreira J. C., Carter T., Castellana R., Cottin V., Curatolo P., Dahlin M., de Vries P. J., Feucht M., Fladrowski C., Gislimberti G., Hertzberg C., Jozwiak S., Lawson J. A., Macaya A., Nabbout R., O'Callaghan F., Benedik M. P., Qin J., Marques R., Sandre V., Sauter M., Takahashi Y., Touraine R., Youroukos S., Zonnenberg B., Jansen A. C., TOSCA consortium and TOSCA investigators (2017). Tuberous Sclerosis registry to increase disease Awareness (TOSCA) - baseline data on 2093 patients. *Orphanet journal of rare diseases*, 12(1): 2.
- Křepelová A., Puchmajerová A., Vasovčák P., Chocholatý M. (2012): Syndrom Birt-Hogg-Dubé. *Klinická onkologie* 25: S18 – S20.
- Kucejova B., Pena-Llopis S., Yamasaki T., Sivanad S., Tran T. A. T., Alexander S., Wolff N. C., Lotan Y., Xie X. J., Kabbani W., Kapur P., Brugarolas J. (2011): Interplay Between pVHL and mTORC1 Pathways in Clear-Cell Renal Cell Carcinoma. *Molecular Cancer Research* 9(9): 1255 – 1265.

- Kumasaka T., Hayashi T., Mitani K., Kataoka H., Kikkawa M., Tobino K., Kobayashi E., Gunji Y., Kunogi M., Kurihara M., Seyama, K. (2014). Characterization of pulmonary cysts in Birt-Hogg-Dubé syndrome: histopathological and morphometric analysis of 229 pulmonary cysts from 50 unrelated patients. *Histopathology*, 65(1): 100–110.
- Lai Y., Zeng T., Liang X., Wu W., Zhong F., Wu W. (2019): Cell death-related molecules and biomarkers for renal cell carcinoma targeted therapy. *Cancer cell international*, 19, 221.
- Lai Y., Zeng T., Liang X., Wu W., Zhong F., Wu, W. (2019). Cell death-related molecules and biomarkers for renal cell carcinoma targeted therapy. *Cancer cell international*, 19: 221.
- Latif F., Tory K., Gnarr J., Yao M., Duh F., Orcutt M., *et al.* (1993). Identification of the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene. *Science*, 260(5112): 1317–1320
- Lattouf J. B., Pautler S. E., Reaume M. N., Kim R. H., Care M., Green J., So A., Violette P. D., Saliba I., Major P., Silver S., Leicht R., Basiuk J., Tanguay S., Jewett M. A., Drachenberg D. (2016): Structured assessment and followup for patients with hereditary kidney tumour syndromes, *Canadian Urological Association journal = Journal de l'Association des urologues du Canada*, 10(7-8): E214–E222.
- Lee J. H., Jeon M. J., Song J. S., Chae E. J., Choi J. H., Kim G. H., Song, J. W. (2019). Birt-Hogg-Dubé syndrome in Korean: clinicoradiologic features and long term follow-up. *The Korean journal of internal medicine*, 34(4): 830–840.
- Legouis D., Faivre A., Cippá P. E., de Seigneux A. (2020): Renal gluconeogenesis: an underestimated role of the kidney in systematic glucose metabolism. *Nephrol Dial Transplant* : 10: 1 – 9.
- Lemr K, Borovcová A. (2020): Ionizace elektroprčejem. *Chemické listy* 114: 169 – 178.

- Li Y, Song X, Zhao X, Zou L, Xu G (2014): Serum metabolic profiling study of lung cancer using ultra high performance liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 966:147–153.
- Liang Q., Wang C., Li B., Zhang A. H. (2015). Metabolic fingerprinting to understand therapeutic effects and mechanisms of silybin on acute liver damage in rat. *Pharmacognosy magazine*, 11(43): 586–593.
- Lin L., Huang Z., Gao Y., Yan X., Xing J., Hang, W. (2011). LC-MS based serum metabonomic analysis for renal cell carcinoma diagnosis, staging, and biomarker discovery. *Journal of Proteome Research*, 10(3): 1396–1405.
- Lindblad P. (2004): Epidemiology of renal cell carcinoma. *Scandinavian Journal of Surgery*, 93: 88 – 96.
- Linguraru M. G., Wang S., Shah F., Gautam R., Peterson J., Linehan W. M., Summers R. M. (2011): Automated noninvasive classification of renal cancer on multiphase CT, *Medical physics*, 38(10): 5738–5746.
- Liu P., Zhu F., Li M., Dube D. A., Liu Q., Wang C., Xiao Q., Zhang L., Gao S., Li Z., Zhang B., Liu J., Liu L., Chen, X. (2019). Von Hippel-Lindau "Black Forest" mutation inherited in a large Chinese family. *Gland surgery*, 8(4): 343–353.
- Liu X., Sun Q., Hou H., Zhu K., Wang Q., Liu H., Zhang Q., Ji L., Li D. (2018). The association between BMI and kidney cancer risk: An updated dose-response meta-analysis in accordance with PRISMA guideline. *Medicine*, 97(44): e12860.
- Liu X., Zhang M., Liu X., Sun H., Guo Z., Tang X., Wang Z., Li J., Li H., Sun W., Zhang, Y. (2019). Urine Metabolomics for Renal Cell Carcinoma (RCC) Prediction: Tryptophan Metabolism as an Important Pathway in RCC. *Frontiers in oncology*, 9: 663.
- Loo J. A. (2000). Electrospray ionization mass spectrometry: a technology for studying noncovalent macromolecular complexes. *International Journal of Mass Spectrometry*, 200(1-3): 175–186.

- Lopez-Beltran A., Henriques V., Cimadamore A., Santoni M., Cheng L., Gevaert T., Blanca A., Massari F., Scarpelli M., Montironi, R. (2018). The Identification of Immunological Biomarkers in Kidney Cancers. *Frontiers in oncology*, 8: 456.
- Lössl P., van de Waterbeemd M., Heck A. J. (2016). The diverse and expanding role of mass spectrometry in structural and molecular biology. *The EMBO journal*, 35(24): 2634–2657.
- Lu W., Bennett B. D., Rabinowitz J. D. (2008): Analytical strategies for LC–MS-based targeted metabolomics. *Journal of Chromatography B*, 871(2): 236–242.
- Lubensky I. A., Schmidt L., Zhuang Z., Weirich G., Pack S., Zambrano N., Walther M. M., Choyke P., Linehan W. M., Zbar B. (1999). Hereditary and sporadic papillary renal carcinomas with c-met mutations share a distinct morphological phenotype. *The American journal of pathology*, 155(2): 517–526.
- Macek P., Veselský Z., Navrátil P. (2000). Chromofobní karcinom nativních ledvin u pacientů po transplantaci kadeverózní ledviny. *Klinická onkologie* 13: 191 – 193.
- MacKeigan J. P., et Krueger D. A. (2015): Differentiating the mTOR inhibitors everolimus and sirolimus in the treatment of tuberous sclerosis complex, *Neuro-oncology*, 17(12): 1550–1559.
- Maher E. R. (2018). Hereditary renal cell carcinoma syndromes: diagnosis, surveillance and management. *World journal of urology*, 36(12): 1891–1898.
- Mal M. (2016). Noninvasive metabolic profiling for painless diagnosis of human diseases and disorders. *Future science OA*, 2(2): FSO106.
- Mezger S., Mingels A., Bekers O., Cillero-Pastor B., Heeren R. (2019). Trends in mass spectrometry imaging for cardiovascular diseases. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 411(17): 3709–3720.
- Mikhaylenko D. S., Klimov A. V., Matveev V. B., Samoylova S. I., Strelnikov V. V., Zaletaev D. V., Lubchenko L. N., Alekseev B. Y., Nemtsova, M. V. (2020).

Case of Hereditary Papillary Renal Cell Carcinoma Type I in a Patient With a Germline *MET* Mutation in Russia. *Frontiers in oncology*, 9: 1566.

- Miller M. J., Kennedy A. D., Eckhart A. D., Burrage L. C., Wulff J. E., Miller L. A. D., Milburn M. V., Ryals J. A., Beaudet A. L., Sun Q., Sutton V. R., Elsea, S. H. (2015): Untargeted metabolomic analysis for the clinical screening of inborn errors of metabolism. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 38(6): 1029–1039.
- Mitchell T. J., Turajlic S., Rowan Nicol D., Farmery J., O'Brien T., Martincorena I., Tarpey P., Angelopoulos N., Yates L. R., Butler A. P., Raine K., Stewart G. D., Challacombe B., Fernando A., Lopez, J. I., Hazell S., Chandra A., Chowdhury S., Rudman S., Soultati A., Stamp G., Fotiadis N., Pickering L., Au L., Spain L., Lynch J., Stares M., Teague J., Maura F., Wedge D. C., Horswell S., Chambers T., Litchfield K., Xu H., Stewart A., Elaidi R., Oudard S., McGranahan N., Csabaj I., Gore M., Futreal P.A., Larkin J., Lynch A. G., Szallasi Z., Swanton Ch., Campbell P. J., TRACERx Renal Consortium (2018): Timing the Landmark Events in the Evolution of Clear Cell Renal Cell Cancer: TRACERx Renal. *Cell*, 173(3): 611–623.e17.
- Moch H., Gasser T., Amin M. B., Torhorst J., Sauter G., Mihatsch M. J. (2000). Prognostic utility of the recently recommended histologic classification and revised system of renal cell carcinoma. *Cancer* 89(3): 604 – 614.
- Morais Ch., Johnson D.W., Vesey D. A., Gobe G. C. (2013): Functional significance of erythropoietin in renal cell carcinoma. *BMC Cancer* 13 (14): 1 – 7.
- Motyl T., Traczyk Z., Ciesluk S., Daniewska-Michalska D., Kukulska W., Kaluzny Z., Podgurniak M., Orzechowski A., Dfbski B. (1993): Blood Plasma Pseudouridine in Patients with Malignant Proliferative Diseases. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 31(11): 765 – 771.
- Mueller C. A., Weinmann W., Dresen S., Schreiber A., Gergov M. (2005): Development of a multi-target screening analysis for 301 drugs using a QTrap liquid chromatography/tandem mass spectrometry system and automated library searching. *Rapid Communications In Mass Spectrometry* 19: 1332 – 1338.

- Mustafa A., Gupta S., Hudes G.R., Egleston B.L., Uzzo R.G., Kruger W. D. (2011): Serum amino acid levels as a biomarker for renal cell carcinoma. *The Journal of Urology* 186(4):1206-12.
- Nam G. E., Cho K. H., Han K., Kim C. M., Han B., Cho S. J., Jung S. J., Kwon Y., Kim Y. H., Kim D. H., Kim S. M., Choi Y. S., Roh Y. K., Park Y. G. (2019). Obesity, abdominal obesity and subsequent risk of kidney cancer: a cohort study of 23.3 million East Asians. *British journal of cancer*, 121(3): 271–277.
- Nilsson H., Lindgren D., Axelson H., Brueffer C., Saal L. H., Lundgren J., Johansson M. E. (2020). Features of increased malignancy in eosinophilic clear cell renal cell carcinoma. *The Journal of pathology*, 252(4): 384–397.
- Nizioł J., Ossoliński K., Tripet B. P., Copié V., Arendowski A., Ruman T. (2020): Nuclear magnetic resonance and surface-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry-based serum metabolomics of kidney cancer. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 412(23): 5827–5841.
- Ochocki J.D., Khare S., Hess M., Ackerman D., Qui B., Daisak J.I., Worth A. J., Lin N., Lee P., Xie H. Li b., Wubbenhorst B., Maguire T. D., Nathanson K. L., Awine J. C., Blair I. A., Nissim I., Keith B., Simon M. C. (2018): Arginase 2 suppresses Renal Carcinoma Progression via Biosynthetic Cofactor Pyridoxal Phosphate Depletion and Increased Polyamine Toxicity. *Cell Metabolism*, 27(6): 1263 – 1280.
- Padala S.A., Kallam A. Clear Cell Renal Carcinoma. [Updated 2022 May 24]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557644/>
- Page J. S., Kelly R. T., Tang K., Smith R. D. (2007). Ionization and transmission efficiency in an electrospray ionization—mass spectrometry interface. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 18(9): 1582–1590.
- Patard J-J., Rioux-Leclercq N., Masson D., Zerrouki S., Jouan F., Collet N., Dubourg C., Lobel B., Denis M., Fergelot P. (2009). Absence of *VHL* gene alteration and high VEGF expression are associated with tumour aggressiveness and poor survival of renal-cell carcinoma. *Br J Cancer* **101**: 1417–1424

- PDQ Cancer Genetics Editorial Board. Genetics of Kidney Cancer (Renal Cell Cancer) (PDQ®): Health Professional Version. 2020 Nov 18. In: PDQ Cancer Information Summaries [Internet]. Bethesda (MD): National Cancer Institute (US); 2002-. Available from:
- Peng B., Li H., Peng X. X. (2015). Functional metabolomics: from biomarker discovery to metabolome reprogramming. *Protein & cell*, 6(9): 628–637.
- Pitt J. J. (2009): Principles and applications of liquid chromatography-mass spectrometry in clinical biochemistry. *The Clinical biochemist. Reviews*, 30(1), 19–34.
- Podhola M. (2009): Karcinom ledvin dospělých. *Onkologie*, 3 (2): 80 – 82.
- Porta Siegel T., Hamm G., Bunch J., Cappell J., Fletcher J. S., Schwamborn, K. (2018). Mass Spectrometry Imaging and Integration with Other Imaging Modalities for Greater Molecular Understanding of Biological Tissues. *Molecular imaging and biology*, 20(6): 888–901..
- Puente J., Láinez N., Dueñas M., Méndez-Vidal M. J., Esteban E., Castellano D., Martínez-Fernández M., Basterretxea L., Juan-Fita M. J., Antón L., León L., Lambea J., Pérez-Valderrama B., Vázquez S., Suarez C., Del Muro X. G., Gallardo E., Maroto J. P., Samaniego M. L., Suárez-Paniagua B. (2017): Novel potential predictive markers of sunitinib outcomes in long-term responders versus primary refractory patients with metastatic clear-cell renal cell carcinoma. *Oncotarget*, 8(18): 30410–30421.
- Qin Z., Xu Q., Hu H., Yu L., Zeng, S. (2020). Extracellular Vesicles in Renal Cell Carcinoma: Multifaceted Roles and Potential Applications Identified by Experimental and Computational Methods. *Frontiers in oncology*, 10: 724.
- Rasmuson T., Björk G. R., Hietala S. O., Stenling R., Ljunberg B. (1991). Excretion of pseudouridine as an independent prognostic factor in renal cell carcinoma. *Acta Oncologica* 30(1): 11 – 15.
- Reustle A., Di Marco M., Meyerhoff C., Nelde A., Walz J. S., Winter S., Kandabarau S., Büttner F., Haag M., Backert L., Kowalewski D. J., Rausch

- S., Hennenlotter J., Stühler V., Scharpf M., Fend F., Stenzl A., Rammensee H. G., Bedke J., Stevanović S., Schaeffeler E. (2020). Integrative-omics and HLA-ligandomics analysis to identify novel drug targets for ccRCC immunotherapy. *Genome medicine*, 12(1): 32. Ribbenstedt A., Ziarrusta H., Benskin J. P. (2018): Development, characterization and comparisons of targeted and non-targeted metabolomics methods. *PLOS ONE*, 13(11).
- Rioux-Lexlercq N., DeLcros J. - G., Bansard J. - Y., Epstein J. I., Patard J. – J., Lobel B., Guilé F., Jouan F., Bellaud P., Moulinoux J. – P. (2004): Immunohistochemical Analysisi of Tumor Polyamines Discriminates High-Risk Patients Udergoing Nephrectomy for Renal Cell Carcinoma. *Human Pathology* 35(10): 1279 – 1284.
 - Roberts L. D., Souza A. L., Gerszten R. E., Clish C. B. (2012). Targeted metabolomics. *Current protocols in molecular biology*, Chapter 30: Unit30.2–30.2.24.
 - Rossi S. H., Klatte T., Usher-Smith J., Stewart G. D. (2018). Epidemiology and screening for renal cancer. *World journal of urology*, 36(9): 1341–1353.
 - Shariatgorji M., Svenningsson P., Andrén P. E. (2014). Mass spectrometry imaging, an emerging technology in neuropsychopharmacology. *Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 39(1): 34–49.
 - Shi J., Wang K., Xiong Z., Yuan C., Wang C., Cao Q., Yu H., Meng X., Xie K., Cheng Z., Yang H., Chen K., Zhang, X. (2020). Impact of inflammation and immunotherapy in renal cell carcinoma. *Oncology letters*, 20(5): 272.
 - Shingarev R., & Jaimes E. A. (2017): Renal cell carcinoma: new insights and challenges for a clinician scientist, *American journal of physiology. Renal physiology*, 313(2): F145–F154.
 - Shingarev R., & Jaimes E. A. (2017). Renal cell carcinoma: new insights and challenges for a clinician scientist. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 313(2): F145–F154.

- Shinmura K., Igarashi H., Kato H., Koda K., Ogawa H., Takahashi S., Otsuki Y., Yoneda T., Kawanishi Y., Funai K., Takayama T., Ozono S., Sugimura H. (2015). BSND and ATP6V1G3: Novel Immunohistochemical Markers for Chromophobe Renal Cell Carcinoma. *Medicine*, 94(24): 1 - 10.
- Shively S. B., Falke E. A., Li J., Tran M. G., Thompson E. R., Maxwell P. H., Roessler E., Oldfield E. H., Lonser, R. R., Vortmeyer A. O. (2011). Developmentally arrested structures preceding cerebellar tumors in von Hippel-Lindau disease. *Modern pathology: an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 24(8): 1023–1030.
- Shulaev V. (2006). Metabolomics technology and bioinformatics. *Briefings in Bioinformatics*, 7(2): 128–139.
- Schmidt L. S., Linehan W. M. (2016). Genetic predisposition to kidney cancer. *Seminars in oncology*, 43(5): 566–574.
- Schmidt L. S., Nickerson M. L., Warren M. B., Glenn G. M., Toro J. R., Merino M. J., Turner M. L., Choyke P. L., Sharma N., Peterson J., Morrison P., Maher E. R., Walther M. M., Zbar B., Linehan, W. M. (2005). Germline BHD-mutation spectrum and phenotype analysis of a large cohort of families with Birt-Hogg-Dubé syndrome. *American journal of human genetics*, 76(6): 1023–1033.
- Schmidt L., Junker K., Nakaigawa N., Kinjerski T., Weirich G., Miller M., Lubensky I., Neumann H. P. H., Brauch H., Decker J., Vocke C., Brown J.A., Jenkins R., Richard S., Bergerheim U., Gerrard B., Dean M., Linehan W. M., Zbar B. (1999). Novel mutations of the MET proto-oncogene in papillary renal carcinomas. *Oncogene* **18**: 2343–2350.
- Singh R. R., Murugan P., Patel L. R., Voicu H., Yoo S. Y., Majewski T., Mehrotra M., Wani K., Tannir N., Karam J. A., Jonasch E., Wood C. G., Creighton C. J., Medeiros L. J., Broaddus R. R., Tamboli P., Baggerly K. A., Aldape K. D., Czerniak B., Luthra R., Sircar K. (2015): Intratumoral morphologic and molecular heterogeneity of rhabdoid renal cell carcinoma: Challenges for personalized therapy, *Modern pathology: an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 28(9): 1225–1235.

- Sobczuk P., Brodziak A., Khan M. I., Chhabra S., Fiedorowicz M., Wełniak-Kamińska M., Synoradzki K., Bartnik E., Cudnoch-Jędrzejewska A., Czarnecka A. M. (2020): Choosing the right animal model for renal cancer research. *Translation Onkology* 13: 100745
- Sobin L. H., Gospodarowicz M. K., Wittekind CH. (2009) (7th ed.). TNM classification of malignant tumors. International union against cancer. Wiley-Blackwell, John Wiley & sons, LTD., Publication, West Sussex: 206 – 209.
- Song W., He D., Chen Y., Yeh C. R., Hsu I., Huang Q., Zhang X., Chang L. S., Zuo L., Chen J., Doersch K. M., Chang C., Li L., Yeh S. (2018). Targeting newly identified ER β /TGF- β 1/SMAD3 signals with the FDA-approved anti-estrogen Faslodex or an ER β selective antagonist in renal cell carcinoma. *Molecular oncology*, 12(12): 2055–2071.
- Tebani A., Abily-Donval L., Afonso C., Marret S., Bekri S. (2016). Clinical Metabolomics: The New Metabolic Window for Inborn Errors of Metabolism Investigations in the Post-Genomic Era. *International journal of molecular sciences*, 17(7): 1167.
- Tian Z., Liang M. (2021): Renal metabolism and hypertension. *Nature Communications*: 12 (963): 1 – 12.
- Tovar E. A., et Graveel C. R. (2017). MET in human cancer: germline and somatic mutations. *Annals of translational medicine*. 5(10): 205.
- Tretyakova N., Goggin M., Sangaraju D., Janis G. (2012). Quantitation of DNA adducts by stable isotope dilution mass spectrometry. *Chemical research in toxicology*, 25(10): 2007–2035.
- Trifonova O., Lokhov P., Archakov A. (2013). Postgenomics diagnostics: metabolomics approaches to human blood profiling. *Omics: a journal of integrative biology*, 17(11): 550–559.9
- Udager A. M., Alva A., Chen Y. B., Siddiqui J., Lagstein A., Tickoo S. K., Reuter V. E., Chinnaiyan A. M., Mehra, R. (2014). Hereditary leiomyomatosis and renal

cell carcinoma (HLRCC): a rapid autopsy report of metastatic renal cell carcinoma. *The American journal of surgical pathology*, 38(4): 567–577.

- Udager A. M., Mehra R. (2016). Morphologic, Molecular and Taxonomic Evolution of Renal Cell Carcinoma: A Conceptual Perspective With Emphasis on Updates to the 2016 World Health Organization Classification. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 140(10): 1026-1037.
- Unverzagt S., Moldenhauer I., Nothacker M., Roßmeißl D., Hadjinicolaou A. V., Peinemann F., Greco F., Seliger B. (2017): Immunotherapy for metastatic renal cell carcinoma. *The Cochrane database of systematic reviews*, 5(5): CD011673.
- Van Galen P.M., Feiters M.C. (2016): Mass spectrometry part of the instrumental analysis in (bio) molecular chemistry course. Department of organic chemistry, Radboud University, Nijmegen, 37 – 38.
- Vasudev N. S., Wilson M., Stewart G. D., Adeyolu A., Cartledge J., Kimuli M., Datta S., Hanbury D., Hrouda D., Oades G., Patel P., Soomro N., Sullivan M., Webster J., Selby P. J., Banks R. E. (2020). Challenges of early renal cancer detection: symptom patterns and incidental diagnosis rate in a multicentre prospective UK cohort of patients presenting with suspected renal cancer. *BMJ open*, 10(5): e035938.
- Villas-Bôas S. G., Roessner U., Hansen M. A. E., Smedsgaard J., Nielsen J. (2007): *Metabolome analysis: An introduction*, ed. New Jersey: J. Wiley.
- Wallace, M. A. (1998): Anatomy and Physiology of the Kidney. *AORN Journal*, 68(5): 799–820.
- Weiss R. H., Kim K. (2011). Metabolomics in the study of kidney diseases. *Nature Reviews Nephrology*, 8(1): 22–33.
- Xia S., Lin Y., Lin J., Li X., Tan X., Huang Z. (2021). Increased Expression of *TICRR* Predicts Poor Clinical Outcomes: A Potential Therapeutic Target for Papillary Renal Cell Carcinoma. *Frontiers in genetics*, 11. 605378.
- Yang Y., Vocke C. D., Ricketts C. J., Wei D., Padilla-Nash H. M., Lang M., Sourbier C., Killian J. K., Boyle S. L., Worrell R., Meltzer P. S., Ried T., Merino

- M. J., Metwalli A. R., Linehan W. M. (2017). Genomic and metabolic characterization of a chromophobe renal cell carcinoma cell line model (UOK276). *Genes, chromosomes & cancer*, 56(10): 719–729
- Zeng Q., Sun S., Li Y., Li X., Li Z., Liang, H. (2020): Identification of Therapeutic Targets and Prognostic Biomarkers Among CXC Chemokines in the Renal Cell Carcinoma Microenvironment. *Frontiers in oncology*, 9: 1555.
 - Zhang A., Sun H., Wang P., Han Y., Wang X. (2012): More analytical techniques in metabolomics analysis. *Analyst*, 137: 293–300.
 - Zhang F., Ma X., Li H., Guo G., Li P., Li H., Gu L., Li X., Chen L., Zhang X. (2017): The predictive and prognostic values of serum amino acid levels for clear cell renal cell carcinoma. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations* 35: 392 – 400.
 - Zhang J., Ma J., Du X., Wu D., Ai H., Bai J., Dong S., Yang Q., Qu K., Lyu Y., Valenzuela R. K., Liu C. (2015): Clinical and genetic investigation of a multi-generational Chinese family afflicted with Von Hippel-Lindau disease. *Chinese medical journal*, 128(1): 32–38
 - Zheng H., Ji J., Zhao L., Chen M., Shi A., Pan L., Huang Y., Zhang H., Dong B., Gao, H. (2016): Prediction and diagnosis of renal cell carcinoma using nuclear magnetic resonance-based serum metabolomics and self-organizing maps. *Oncotarget*, 7(37): 59189–59198.
 - Zhou B., Xiao J. F., Tuli L., Ransom H. W. (2012): LC-MS-based metabolomics. *Mol. BioSyst.*, 8(2): 470–481.
 - Wang Y., Liu S., Tian S., Du R., Lin T., Xiao X., Wang R., Chen R., Geng H., Subramanian S., Niu Y., Wang Y., Yue D. (2022): C1QBP regulates apoptosis of renal cell carcinoma via modulating xanthine dehydrogenase (XDH) mediated ROS generation. *Internal Journal of Medical Sciences* 19(5): 842-857.
 - Yoshino H., Nohata N., Miyamoto K., Yonemori M., Sakaguchi T., Sugita S., Itesako T., Kofuji S., Nakagawa M., Dahiya R., Enokida H. (2017): PHGDH as a Key Enzyme for Serine Biosynthesis in HIF2- α -Targeting Therapy for Renal Cell Carcinoma. *Cancer Research* 77(22): 6321 – 6329.

- Yu L., Li K., Zhang X. (2017): Next-generation metabolomics in lung cancer diagnosis, treatment and precision medicine: mini review. *Oncotarget*: 1 – 13.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK:

2ohBut_2ohIsobut	2-hydroxybutanoát/2-hydroxy-isobutanoát
2ohGlutar	2-hydroxyglutarát
2ohIsovaler	2-hydroxyisovalerát (2-hydroxy-3-methylbutyrát)
5mthioAr	5-methylthioadenosin
5oxoPRO_hPRO	5-oxoproline (pyroglutamát)/ L-homoproline (L-pipekolát, L-piperidin-2-karboxylát)
7mG	7-methylguanin
AcALA	N-acetyl-L-alanin
AcMET	N-acetylmethionin
AJCC	„American joint committee on cancer“
ALA.VAL_ALA.norVAL	L-alanyl-L-valin/L-alanyl-L-norvalin
ARG	arginin
ASN	asparagin
<i>BAP1 gen</i>	Gen BRCA-associated protein 1
BB	Butyrobetain
C10	dekanoylkarnitin
C10.1	decenoylkarnitin
C10.2	dekadienylkarnitin
C12	dodekanoylkarnitin
C14.2	tetradekadienylkarnitin
C16.1	Trans-2-hexadecenoyl-L-karnitin
C16.2.OH	3-hydroxyhexadeka-9,12-dienoyl-L-karnitin (cis izomer)
C18.1.OH	hydroxyoktadecenoylkarnitin
C18.2	oktadekadienylkarnitin (linoleoylkarnitin)
C2	Acetyl-L-karnitin
C3.DC_C4.OH	malonylkarnitin/hydroxybutyrylkarnitin
C4.1	butenoylkarnitin
C6	hexanoylkarnitin
C8	oktanoylkarnitin
C8.1	oktadecenoylkarnitin (oleoylkarnitin)

CAIX	karboanhydráza IX
ccRCC	Světlobuněčný renální karcinom
ccRCC	Světlobuněčný renální karcinom
CE-MS	Kapilární elektroforéza spojená s hmotnostní spektrometrií
CI	Chemická ionizace
CT	Kontrastní počítačová tomografie
CTLA-4	cytotoxický antigen 4 asociovaný s T-lymfocyty
CV	Variační koeficient
EI	Elektronová ionizace
ESI	Elektrosprejová ionizace
ESI	Elektrosprejová ionizace
FDA	„Food and Drug Administration“
FWHM	„Full width at half maximum“
GC	Plynová chromatografie
GC-MS	Plynová chromatografie spojená s hmotnostní spektrometrií
GLN	glutamin
GLUR-1	Glukozový transportér 1
GLY	Glycin
GuaAc	Guanidinoacetát
HGF	Růstový faktor hepatocytů
HILIC	„Hydrophilic Interaction Chromatography“ – hydrofilní interakční chromatografie
HIS	Histidin
HLRCC	Syndrom dědičné leiomyomatosy a karcinomu renálních buněk
HPLC	„High Performance Liquid Chromatography“ – vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HPRC	Hereditární papilární renální karcinom
HTML	hydroxymethyllysin
HX	hypoxantin
chRCC	Chromofobní renální karcinom

I-STD (IS)	Interní standardy
ICI	inhibitorů imunitního kontrolního bodu
ILE_aILE	L-isoleucin/L-alloisoleucin
LC	Kapalinová chromatografie
LC-MS	kapalinová chromatografie spojená s hmotnostní detekcí
LIT	Lineární iontová past
LOESS metoda	„locally weighted regression“
LYS	lysin
<i>m/z</i>	poměr hmotnosti a náboje
MALDI	ionizaci laserem za přítomnosti matrice
MET	methionin
MRM mód	„scheduled multiple reaction monitoring“
MS	Hmotnostní spektrometrie
MS/MS	Tandemová hmotnostní spektrometrie
mTOR	savčí signalizační dráhu rapamycinu
Nano-ESI	Nanoelektrosprejová ionizace
NMR	Nukleární magnetická rezonance
OPLS-DA	„Orthogonal Partial Least Squares Discriminant Analysis – Ortogonální diskriminační analýza nejmenších čtverců
<i>PBRM1 gen</i>	Gen Polybromo 1
PCA	„Principal Component Analysis“ – Analýza hlavních komponent
PD-1	receptor programované smrti 1
PDGF	destičkový růstový faktor
PDL-1	ligand receptoru programované smrti 1
PHD	prolylhydroxyláza
PHE	L-fenylalanin
PLS-DA	„Partial Least Squares Discriminant Analysis – Diskriminační analýza nejmenších čtverců
pO ₂	Hodnota parciálního tlaku kyslíku
pRCC	Papilární renální karcinom
pseuUr	pseudouridin

QC vzorek	„Quality Control“ - vzorek kontroly kvality
QqQ	Tandemový hmotnostní spektrometr s trojitým kvadrupólem
QTrap	trojitý kvadrupól s detekcí v lineární iontové pasti
RCC	Karcinom renálních buněk
RP	Rozlišovací schopnost
S-plot graf	„Scatter plot“ graf (bodový graf)
SER	serin
<i>SETD2</i> gen	Gen SET domain containing 2
SGLT1, SGLT2	glukózoové transportéry závislé na sodíku
<i>ST3GAL1</i> gen	ST3-β-Galaktosid-α-2,3-Sialyltransfer1
TGF	transformující růstový faktor
THR_hSER	L-threonin/L-homoserin
TKI	inhibitorů receptorových tyrosinkinás
TMABA	trimethylaminobutyraldehyd
TML	N-trimethyllysin
TNM klasifikace	The tumor, lymph nodes and metastasis classification
TOF	Průletový analyzátor
TRP	tryptofan
TSC komplex	Komplex tuberózní sklerózy
TYR	L-tyrosin
UHPLC	„Ultra-High Performance Liquid Chromatography“ – ultraúčinná kapalinová chromatografie
UICC	„Union for international cancer control“
VAL	L-valin
VEGF	Vaskulární endoteliální růstový faktor
VEGFA	vaskulární endoteliální růstový faktor A
VHL gen	Von Hippel-Lindau gen
VIP graf	„Variable Importance for the Projection“ – graf významnosti proměnných v projekci

WHO

„World Health Organization“ – Světová
zdravotnická organizace

X

xantin