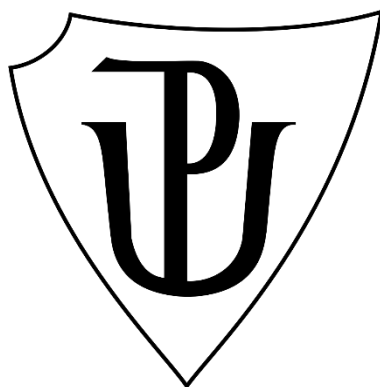


UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Metabolomická analýza moči pacientů s karcinomem ledvin

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor: **Daniela Vašková**
Studijní program: B0512A130008 Biochemie
Studijní obor: Biochemie
Forma studia: Prezenční
Vedoucí práce: **Mgr. Barbora Pisklaková**
Rok: 2024

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

V Olomouci dne

.....

Podpis studenta

Ráda bych upřímně poděkovala své vedoucí bakalářské práce Mgr. Barboře Pisklákové za odborné vedení, velkou trpělivost a ochotu, vstřícný přístup a cenné rady při vypracování mé práce. Chtěla bych také poděkovat pracovníkům Laboratoře dědičných metabolických poruch, Fakultní nemocnice v Olomouci za pomoc s provedením experimentů i statistickým zpracováním dat. Fakultní nemocnici Olomouc a Pardubické nemocnici též děkuji za poskytnutí vzorků pro mou bakalářskou práci.

Bibliografická identifikace

| | |
|-------------------------|---|
| Jméno a příjmení autora | Daniela Vašková |
| Název práce | Metabolomická analýza moči pacientů s karcinomem ledvin |
| Typ práce | Bakalářská |
| Pracoviště | Katedra biochemie |
| Vedoucí práce | Mgr. Barbora Piskláková |
| Rok obhajoby práce | 2024 |

Abstrakt

Incidence rakoviny ledvin ve světě stále stoupá. Jejím nejběžnějším podtypem je renální buněčný karcinom, jehož patobiochemie ještě stále nebyla zcela objasněna. Tato práce si klade za cíl analyzovat vzorky moči pacientů s tímto onemocněním a zdravých kontrol cílenou metabolomickou analýzou za účelem lepšího pochopení patobiochemie tohoto onemocnění. V teoretické části práce jsou shrnuty dosavadní poznatky ohledně stavby a funkce ledvin, aktuálního stavu problematiky karcinomu ledvin, patobiochemií a možnostech studia tohoto onemocnění pomocí omických metod.

Metabolomická analýza byla provedena pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií, výsledky byly zpracovány a statisticky vyhodnoceny jednorozměrnými a vícerozměrnými statistickými metodami. Bylo změřeno 169 metabolitů ve 247 vzorcích. Byl potvrzen rozdíl mezi pohlavími u zdravých kontrol a pacientů. Statistickou analýzou bylo zjištěno 17 statisticky významných společných změněných hladin metabolitů mužů i žen, několik desítek statisticky významných změněných hladin metabolitů a 13 vysoce signifikantních unikátních změněných hladin metabolitů pro jednotlivá pohlaví.

| | |
|---------------|--|
| Klíčová slova | Renální buněčný karcinom, metabolomika, hmotnostní spektrometrie, vysokoúčinná kapalinová chromatografie |
| Počet stran | 90 |
| Počet příloh | 1 |
| Jazyk | Český |

Bibliographical identification

| | |
|--------------------------------|---|
| Autor's first name and surname | Daniela Vašková |
| Title | Metabolomic analysis of urine from patients with renal cell carcinoma |
| Type of thesis | Bachelor |
| Department | Department of biochemistry |
| Supervisor | Mgr. Barbora Pisklákova |
| The year of presentation | 2024 |

Abstract

The incidence of kidney cancer continues to rise worldwide. The most common subtype is renal cell carcinoma, the pathobiochemistry of which has not yet been fully elucidated. This work aims to analyze urine samples from patients with this disease and healthy controls by targeted metabolomic analysis to better understand the pathobiochemistry of this disease. The theoretical part of the thesis summarizes the existing knowledge regarding the structure and function of the kidney, the current status of renal cell carcinoma, the pathobiochemistry and the possibilities of studying this disease using omics methods.

Metabolomic analysis was performed by high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry, and the results were processed and statistically evaluated by univariate and multivariate statistical methods. The amount of 169 metabolites in 247 samples was measured. The gender difference between healthy controls and patients was confirmed. Statistical analysis revealed 17 statistically significant common altered metabolite levels for both males and females, several dozen statistically significant altered metabolite levels, and 13 highly significant unique altered metabolite levels for each sex.

| | |
|----------------------|---|
| Keywords | Renal cell carcinoma, metabolomics, mass spectrometry, high performance liquid chromatography |
| Number of pages | 90 |
| Number of appendices | 1 |
| Language | Czech |

OBSAH

| | |
|---|-----------|
| 1 ÚVOD | 1 |
| 2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY | 2 |
| 2. 1 Ledviny | 2 |
| 2. 1. 1 Stavba ledvin..... | 2 |
| 2. 1. 2 Strukturní biochemie ledvin..... | 4 |
| 2. 1. 3 Metabolismus ledvin | 6 |
| 2. 1. 3. 1 Kreatinin..... | 7 |
| 2. 2 Kancerogeneze..... | 9 |
| 2. 3 Karcinom ledvin | 12 |
| 2. 3. 1 Typy karcinomu ledvin | 13 |
| 2. 3. 2 Patobiochemie rakoviny ledvin..... | 15 |
| 2. 3. 3 Diagnostika | 21 |
| 2. 3. 4 Léčba..... | 21 |
| 2. 4 Metabolomika..... | 22 |
| 2. 5 Vybrané metabolomické analytické metody pro studium metabolomu | 24 |
| 2. 5. 1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie..... | 24 |
| 2. 5. 2 Hmotnostní spektrometrie..... | 25 |
| 2. 5. 2. 1 Ionizační techniky | 25 |
| 2. 5. 2. 2 Analyzátor | 26 |
| 2. 5. 2. 3 Tandemová hmotnostní spektrometrie | 27 |
| 2. 5. 3 Průtoková injekční analýza ve spojení s hmotnostní spektrometrií..... | 28 |
| 2. 5. 4 Spektroskopie nukleární magnetické rezonance | 29 |
| 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST | 31 |
| 3. 1 Materiál a chemikálie | 31 |
| 3. 1. 1 Biologický materiál..... | 31 |
| 3. 1. 2 Přístrojové vybavení | 32 |
| 3. 1. 3 Chemikálie | 33 |
| 3. 2 Metody..... | 34 |
| 3. 2. 1 Stanovení kreatininu v moči | 34 |
| 3. 2. 1. 1 Příprava vzorků a mobilní fáze | 34 |
| 3. 2. 1. 2 Optimalizace MS podmínek pro kvantitativní stanovení kreatininu..... | 34 |
| 3. 2. 1. 3 Měření koncentrace kreatininu..... | 34 |
| 3. 2. 2 LC-MS cílená metabolomická analýza vzorků moči pacientů s karcinomem ledvin a zdravých kontrol..... | 35 |
| 3. 2. 2. 1 Příprava interních standardů..... | 35 |
| 3. 2. 2. 2 Příprava vzorků a mobilní fáze | 35 |

| | |
|--|-----------|
| 3. 2. 2. 3 Metabolomická analýza..... | 36 |
| 3. 2. 3 Zpracování dat a statistická analýza..... | 36 |
| 4 VÝSLEDKY..... | 38 |
| 4. 1 Stanovení kreatininu v moči..... | 38 |
| 4. 2 Cílená metabolomická analýza vzorků moči..... | 39 |
| 4. 2. 1 Vícerozměrná analýza s nesupervizovaným přístupem..... | 44 |
| 4. 2. 2 Vícerozměrná analýza se supervizovaným přístupem..... | 45 |
| 4. 2. 3 Statistická analýza jednotlivých skupin..... | 46 |
| 5 DISKUZE..... | 56 |
| 6 ZÁVĚR..... | 60 |
| 7 LITERATURA..... | 61 |
| 8 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK..... | 76 |
| 9 PŘÍLOHY..... | 79 |

Cíle práce

Teoretická část

Vypracování literární rešerše o poznatcích ohledně stavby a funkce ledvin.

Vypracování literární rešerše o aktuálním stavu problematiky karcinomu ledvin, patobiochemii a možnostech studia tohoto onemocnění pomocí omických metod.

Praktická část

Příprava vzorků moči pro metabolickou analýzu pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií, vyhodnocení výsledků, statistické zpracování a interpretace naměřených dat.

1 ÚVOD

Ledviny jsou lidským tělním orgánem, jejichž hlavní funkcí je odvod metabolitů těla a cizorodých látek ve formě moči. Působením hormonů (erythropoetin, kalcitriol, prostaglandiny a angiotenzin II) regulují také objem vody v těle, vylučování odpadních či toxických látek, acidobazickou rovnováhu a iontové složení vnitřního prostředí. Zastávají tedy nenahraditelnou roli v udržování rovnováhy v celém organismu.

Jedním z jejich mnoha onemocnění je i karcinom ledvin („renal cell carcinoma“, RCC). V rámci všech rakovin ledvin, jejichž celosvětová incidence za rok 2020 byla přibližně 430 000 případů (mortalita přibližně 180 000 pacientů) a z toho v České republice 3 314 případů (mortalita 1 150 pacientů), tvoří karcinom ledvin přibližně 90 % případů (Bukavina *et al.*, 2022). Česká republika má v rámci EU jednu z nejvyšších incidencí rakoviny ledvin na obyvatele (Ervik *et al.*, 2021). Podle nejnovější klasifikace dle WHO (z r. 2022) rozlišujeme 14 histologických typů a 7 molekulárně definovaných typů karcinomu ledvin, z nichž nejpočetnější je histologický typ jasnobuněčný karcinom („clear cell renal cell carcinoma“, ccRCC). Druhým nejčastějším typem je papilární renální karcinom („papillary renal cell carcinoma“, pRCC), který tvoří přibližně 10–15 % všech typů karcinomů ledvin, a třetím je chromofóbní renální karcinom („chromophobe renal cell carcinoma“, chRCC), který tvoří přibližně 5 % všech typů karcinomů ledvin (Bukavina *et al.*, 2022).

Neexistují v praxi zavedené biomarkery karcinomu ledvin, proto jsou nálezy nejčastěji náhodné, hlavně skrze ultrazvukové vyšetření břicha. Karcinomy ledvin jsou většinou chemorezistentní, a tak se na jejich léčbu používá hlavně chirurgický zákrok (nefrektomie), radioterapie nebo TKI (inhibitory tyrosinkinasové aktivity) a imunitní terapie (Cvek *et al.*, 2023). Míra celkového 1letého, 3letého a 5letého přežití je variabilní dle typu RCC, průměrně je míra celkového 5letého přežití 49 %, a tedy nepříznivá. Metabolomicky je nejvíce prozkoumaný ccRCC, ale přesto jeho patobiochemie není stále zcela popsána. Tato práce si klade za cíl provést cílenou metabolomickou analýzu moči pacientů s karcinomem ledvin pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií (MS/MS) pro lepší pochopení patobiochemie tohoto onemocnění.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2. 1 Ledviny

Ledviny jsou párovým orgánem fazolovitého tvaru s hladkým povrchem. Jsou uloženy v retroperitoneálním prostoru (oblast mezi zadní břišní stěnou a nástěnnou pobřišnicí) na pomezí hrudních a bederních obratlů. Ledviny jsou součástí vylučovací soustavy (Čihák, 2004). Hlavní funkcí ledvin je odvod metabolitů těla a cizorodých látek ve formě moči. Regulují složení, a tedy osmolaritu, moči a významně se tak podílí na homeostáze a osmolaritě vnitřního prostředí těla. (Ledvina *et al.*, 2020; Nečas, 2021) Tvoří se v nich hormony erythropoetin, kalcitriol (D-hormon), prostaglandiny a enzym renin, který proteolýzou angiotenziogenu vytváří hormon angiotenzin II. Vylučováním těchto hormonů a moči regulují také objem vody v těle, vylučování odpadních či toxických látek, acidobazickou rovnováhu a iontové složení vnitřního prostředí (Pokorný, 2002; Ledvina *et al.*, 2020).

2. 1. 1 Stavba ledvin

Ledvina je přibližně široká 5–6 cm, dlouhá 10–12 cm s tloušťkou 3,5–4 cm. Většinou váží 120–170 g, přičemž u žen bývá menší. Je uložena ve vazivovém pouzdru (*capsula fibrosa*), které je vloženo do tukového pouzdra. Capsula přiléhá k ledvině těsně, ale pevně pouze v oblasti průniku cév do ledviny (ledvinová branka, *hilum renale*) (Čihák, 2004). Ledvinová branka se nachází uprostřed vydatého okraje ledviny. V místě ledvinové branky vstupuje do ledviny tepna (*arteria renalis dextra et sinistra*), která se odděluje od břišní aorty, vystupuje žíla (*vena renalis*), do níž se sbíhají všechny žíly ledviny, a vystupuje ledvinová pánvička jako odvodná močová cesta (Holibková & Laichman, 2010).

Tkáň ledviny lze makroskopicky rozdělit na kůru ledviny a dřev ledviny. Kůra ledviny je narůžovělá, jemně zrnitá, uložena těsně pod povrchem ledviny, oproti dřevu je více prokrvovaná. Dřev ledviny má tmavou šedočervenou barvu, žíhanou kresbu a oproti kůře je v ledvině situována více centrálně (Čihák, 2004).

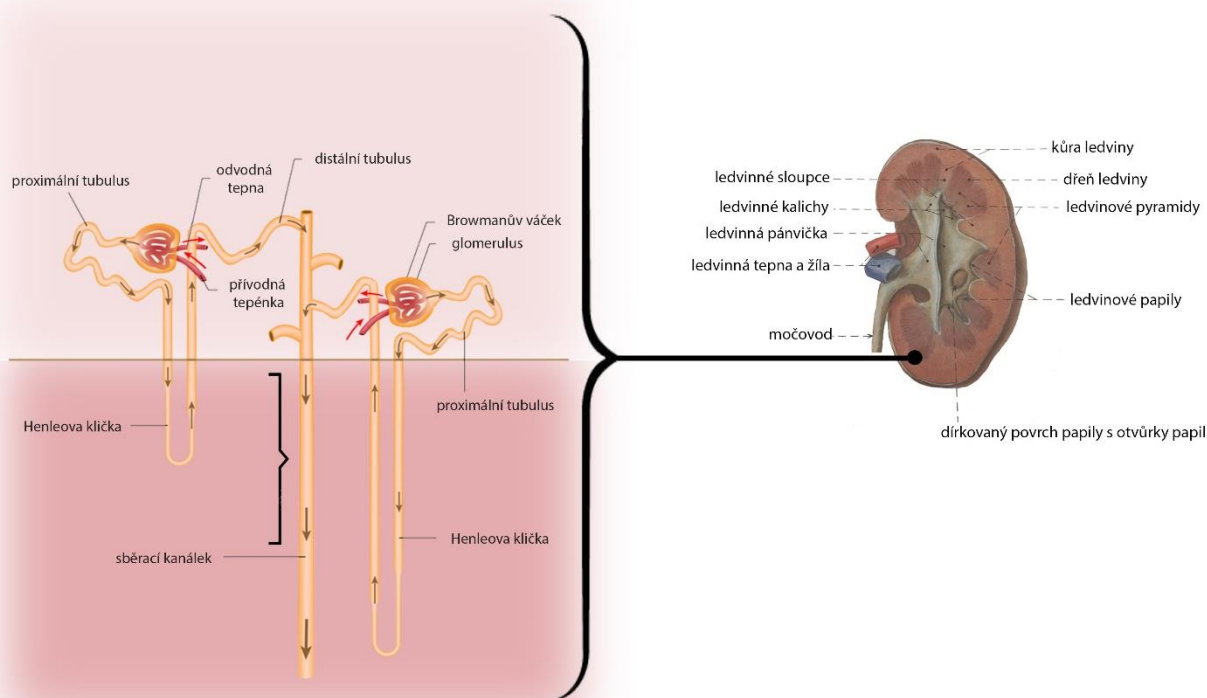
Dřev ledviny tvoří ledvinové pyramidy tvaru kužele, jehož základna je obrácena směrem ke kůře ledviny a vrchol k ledvinové brance. Spolu s přilehlou částí kůry tvoří ledvinové laloky. Vrcholem ledvinové pyramidy je ledvinná papila, jejíž povrch je osazen dírkami (*foramina papillaria*), do kterých jsou přivedeny odvodné kanálky ledvin (sběrací kanálky spojené do papilárních vývodů). Na ně navazují ledvinové kalichy, počátek vlastních odvodných cest močových, které mají pohárkovitý tvar a obepínají ledvinné papily po jedné až třech. Jednotlivé ka-

lichy se sbíhají do ledvinové pánvičky. Ledvinová pánvička se nachází v centru ledviny a v ledvinné brance a ústí z ní močovod (Čihák, 2004; Grim *et al.*, c2005).

Ledvina je složena z tubulů (nefronů) (viz obr. 1), je proto nazývána složenou tubulózní žlázou. Nefron je základní funkční a morfologickou jednotkou ledvin. Skládá se z Malpighiho tělíska, Bowmanova pouzdra, glomerulu, proximálního tubulu, Henleovy kličky, distálního tubulu a sběracího kanálku. Začíná v kůře ledviny jako Malpighiho tělísko přibližně polokulatého tvaru, v jehož centru se nachází glomerulus (Čihák, 2004; Grim *et al.*, c2005). Ten je tvořen kapilárami, jeho přívodná tepénka se větví na povrchu glomerulu v širší kapiláry, ze kterých se odděluje síť tenčích kapilár směrem dovnitř glomerulu, jenž se poté spojují v odvodnou žilku (Žlábek, 1950). Mezi větvením kapilár se nacházejí mesangiální buňky, které mají mnoho funkcí, např. regulují velikost filtrační plochy, sekretují bioaktivní peptidy, některé fagocytózou čistí filtrační plochu. Mezi endotelem kapilár jsou póry a na povrch endotelu přiléhá třívrstevná bazální membrána, kterými je z krve filtrován glomerulární filtrát (Čihák, 2004; Grim *et al.*, c2005).

Glomerulus je obepínán Bowmanovým pouzdrem. To se skládá z tenkého vnějšího listu a vnitřního listu, jenž těsně přiléhá ke tenkostěnným kapilárám glomerulu. Mezi listy se nachází glomerulární filtrát (primární moč). Vnitřní list je tvořen specializovanými buňkami epitelu, tzv. podocyty, jejichž výběžky (pedikly) obepínají kapiláry glomerulu a zapadají do sebe. Mezi nimi je dvouvrstevná ultratenká blanka fibrilárního uspořádání se štěrbinami, kde probíhá ultrafiltrace. (Čihák, 2004; Grim *et al.*, c2005; Matouš *et al.*, c2010).

Nefron dále pokračuje jako ledvinový kanálek, jenž je členěn na proximální tubulus, Henleovu kličku a distální tubulus. Proximální i distální tubulus je složen ze stočeného kanálku a přímého úseku. Obklopuje je peritubulární kapilární pleteň, v níž je nižší tlak než v glomerulu, což usnadňuje zpětné vstřebávání vody a látek. Henleova klička se sestupným raménkem (směrem k ledvinné pánvičce) a vzestupným raménkem, tvořená tenkou a tlustou částí, zasahuje do dřeně. Nefrony, nacházející se blízko dřeně, mají dlouhou Henleovu kličku, slouží k produkci hypertonické moči a nazývají se juxtamedulární nefrony. Nefrony dále od dřeně s kratší Henleovou kličkou se nazývají kortikální nefrony. Henleova klička přechází v distální tubulus a pokračuje do sběracího kanálku. Ten ústí do odvodných kanálků a ty v papilách do ledvinových kalichů (Čihák, 2004; Grim *et al.*, c2005; Matouš *et al.*, c2010).



Obr. 1: Schéma stavby nefronu a ledviny. Převzato a upraveno dle Čiháka (2004) a <https://hallowlab.uga.edu/about.html>.

Macula densa jsou epitelové buňky distálního tubulu dotýkající se glomerulu. Mají apikálně soustředěné mitochondrie a mikroklyky na povrchu lumen, které slouží jako chemoreceptor. Juxtaglomerulární buňky jsou součástí přívodné tepénky glomerulu v místě dotyku s *macula densa*, jsou velké a mají mnoho mitochondrií a vezikul. Na základě signálu z *macula densa*, tlaku v přívodné tepénce a snížení sodíku v krvi produkují hormon renin (Čihák, 2004; Grim *et al.*, c2005).

Lymfa z ledvin je odváděna ze tří pletení lymfatických cév, z nichž mizní cévy ústí do lumbálních mizních uzlin uložených blízko aorty a horní duté žíly. Inervace ledvin je z pleteně *plexus renalis* okolo přívodné tepny ledvin a vstupuje také ledvinovou brankou. Vystupují z něj sympatická a parasympatická vlákna, jež řídí stahování cév, a senzitivní vlákna do vazivového pouzdra. Ledvinový parenchym je téměř necitlivý (Čihák, 2004; Grim *et al.*, c2005).

2. 1. 2 Strukturní biochemie ledvin

Vylučovací funkce ledvin se odvíjí od jejich anatomické stavby. Vylučování je regulovaný proces, ve kterém nejzásadnější roli hraje glomerulus a ledvinový kanálek nefronu. V glomerulu

je filtrace prováděna skrze póry endotelu kapilár a přiléhající negativně nabitou bazální membránu podocytů, která působí jako filtr i jako molekulární síto (iontoměnič). Jejím nábojem jsou odpuzovány nabitě látky, do glomerulárního filtrátu tak prochází pouze velmi málo proteinů, urea, glukosa, aminokyseliny, elektrolyty, kreatinin a další (Matouš *et al.*, c2010; Ledvina *et al.*, 2020). Mezi pedikly na glomerulu se nachází ultratenká blanka, která funguje jako specificky selektivní filtr, který na základě ultrafiltrace propouští ve vodě rozpuštěné malé molekuly až do velikosti hemoglobinu (přibližně 64 500 Da) (Walker & Hall, Hurst, 1990; Čihák, 2004). Tyto děje jsou regulovány hlavně prostaglandiny a systémem renin-angiotensin. Glomerulárního filtrátu vzniká denně přibližně 180 l, po průchodu nefrony se objem snižuje na 1,5 l (Grim *et al.*, c2005; Matouš *et al.*, c2010).

V ledvinovém kanálku je sekrece a exkrece daných látek odlišná dle jeho části. V proximálním tubulu dochází k sekreci organických kyselin, aniontů, kreatininu a určitých léků a k resorpci aktivním transportem iontů, aminokyselin, vitamínů a veškeré glukosy a k pasivní resorpci močoviny a většiny vody. Dochází zde také k reabsorpci proteinů endocytózou (tzv. defekace). V Henleově kličce nastává pasivní sekrece močoviny, v sestupném raménku resorpce vody a ve vzestupném raménku resorpce iontů Na^+ a Cl^- vlivem antidiuretického hormonu (ADH). V distálním tubulu probíhá sekrece iontů K^+ a H^+ (ovlivňována ADH), sekrece HCO_3^- , resorpce vody a Na^+ (Matouš *et al.*, c2010; Ledvina *et al.*, 2020).

Homeostatickými mechanismy, jež řídí vodní a látkovou exkreci, je v ledvinách regulován objem a složení tekutin. Tyto mechanismy jsou v rámci těla jedinečné, uplatňuje se při nich mnoho transportních mechanismů a zahrnují 31 transportních rodin nazývaných zkratkou SLC („solute carrier series“), mezi něž patří např. facilitované transportéry glukosy SGLT1 a GLUT1. Vodní exkrece je regulována akvaporiny (AQP). Regulace hladiny glukosy je pomocí její resorpce, jež nastává ve dvou krocích pomocí SGLT1 a GLUT1 transportérů. Regulace hladiny kyseliny močové je způsobována změnou pH prostředí a ovlivňováním metabolismu purinů, jehož je produktem. Zvýšení její hladiny nastává např. při nádorovém bujení či při ozáření. (Matouš *et al.*, c2010).

Acidobazická rovnováha je v těle udržována ledvinami hlavně pomocí regulovaného transportu regenerovaného HCO_3^- a H^+ . HCO_3^- vzniká při tvorbě amoniaku v ledvinách. Filtrovaný HCO_3^- v tubulech nefronu reaguje s protonem za vzniku kyseliny uhličitě, jež se rozpadá na vodu a oxid uhličitý. Ten je v buňkách proximálního tubulu přeměněn opět na kys. uhličitou enzymem kyselina uhličitá hydro-lyasou (karboanhydratasa, CA, EC 4.2.1.1). Rozpadem kys. uhličitě vzniká regenerovaný HCO_3^- , který je regulovaně reabsorbován do krve, a proton, jež

je secrenován pomocí H^+ -ATPasy a karbonátdehydratasy do lumen tubulu. (Matouš *et al.*, c2010; Ledvina *et al.*, 2020).

V ledvinách se tvoří několik hormonů a ledviny samy podléhají hormonální regulaci, jak už bylo popsáno výše. V ledvinových juxtamedulárních buňkách vzniká při nedostatečném přísunu kyslíku do ledvin erythropoetin, jenž zvyšuje počet červených krvinek různými procesy (např. stimulací zrání růstu erytroblastů v kostní dřeni), a také enzym renin, který proteolýzou angiotenziogenu vytváří hormon angiotenzin II, jenž ovlivňuje krevní tlak a stimuluje tvorbu aldosteronu. V dřeni ledvin jsou syntetizovány prostaglandiny, jenž stimuluje transport Na^+ iontů a také inhibují ADH v distálním tubulu (Matouš *et al.*, c2010; Ledvina *et al.*, 2020). Dále v ledvinách vzniká hormon kalcitriol (1,25-dihydroxycholecalciferol, D-hormon) hydroxylací vitamínu D na pozici 1. Kalcitriol je nezbytný pro správné ukládání vápníku do kostí a jeho reabsorpci v trávicí soustavě (Hall & Guyton, c2011).

2. 1. 3 Metabolismus ledvin

Ledviny mají jeden z nejintenzivnějších metabolismů orgánů v těle, čemuž odpovídá i jejich druhé místo ve spotřebě kyslíku na gram tkáně hned po srdci, vysoký průtok krve a značná spotřeba energie. Hlavním zdrojem energie je glukosa, jejíž spotřeba je v rámci tělních orgánů v ledvinách nejvyšší. Dalšími základními zdroji energie jsou mastné kyseliny, laktát, pyruvát, ketolátky a některé aminokyseliny. Energie je získávána hlavně v procesech oxidativní fosforylace, glykolýzy a β -oxidace. V rámci ledvin je metabolismus nejintenzivnější v kůře, ve dřeni je pomalejší a energie je zde získávána hlavně anaerobní glykolýzou. Je zde také syntetizován L-karnitin a začíná zde syntéza keratinu (Higdon, Drake & Delage, c2002-2023; Matouš *et al.*, c2010; Ledvina *et al.*, 2020).

Aminokyseliny jsou v ledvinách, hlavně v proximálním tubulu, buď resorbovány z glomerulárního filtrátu, syntetizovány (např. histidin, arginin a serin) anebo degradovány (glycin, glutamin) (Matouš *et al.*, c2010; Rovenská, Kučera, 2018). Glycin je v ledvinách transaminován na glyoxalát a následně oxidován na oxalát, jenž nejčastěji způsobuje tvorbu ledvinových kamenů v tubulech (Rovenská, Kučera, 2018; Ledvina *et al.*, 2020). Degradace glutaminu deaminací je druhým nejvýznamnějším přispěvatelem k odstranění dusíku z těla (Fontana *et al.*, 2018). Glutamin je syntetizován v kosterním svalstvu, játrech, plicích a adipocytech, odkud je krví veden do ledvin, střev, buněk imunitního systému, mozku a také zpět do plic a adipocytů; je nejvýznamnější transportní formou amoniaku v krvi (Cruzat *et al.*, 2018; Fontana *et al.*, 2018). V ledvinách je v mitochondriích tubulárních buněk soustavou L-glutamin amidohydro-

lasa (glutaminasa, GLS, EC 3.5.1.2) / L-glutamát:NAD⁺ oxidoreduktasa (deaminační) (glutamátdehydrogenasa, GLDH, EC 1.4.1.2) degradován postupnou deaminací na α -ketoglutarát, jenž lze přeměnit na glukosu glukoneogenezí, hydrogenkarbonát nebo na oxid uhličitý a vodu. Vzniklý NH₃ reaguje s protonem a poté jako NH₄⁺ difunduje do lumen tubulů, což přispívá k ionickému transportu dalších molekul NH₃. Amoniogenezí lze vyloučit proton do moči bez ovlivnění jejího pH (Matouš *et al.*, c2010; Fontana *et al.*, 2018).

Metabolismus sacharidů v ledvinách závisí na stavu organismu, pH prostředí a koncentraci glukosy a pyruvátu v krvi. Za fyziologických podmínek ledviny produkují glukosu, při hladovění se zvyšuje glukoneogeneze i na vyšší intenzitu na gram tkáně než v játrech. Glukoneogeneze probíhá v proximálním tubulu. Za fyziologických podmínek je zdrojem laktát, jehož využití závisí na pH vnitřního prostředí, pyruvát, jehož využití závisí na jeho koncentraci v krvi, nebo glukogenní aminokyseliny. Při hladovění jsou zdrojem aminokyseliny podléhající deaminaci (např. glutamin), přičemž tento proces reguluje kortizol. Glykolýza probíhá v celém nefronu kromě proximálního tubulu. Při zvýšení glykémie nad renální práh pro glukosu (cca 10 mmol·l⁻¹) není ledvina schopná ji vstřebat cele zpět a vylučuje ji močí (nastává glykosurie) (Matouš *et al.*, c2010; Rovenská, Kučera, 2018).

Lipidy jsou v ledvinách významným zdrojem energie. Mastné kyseliny jsou využívány v kůře, v nefronu hlavně v proximálním tubulu, a zevní dřeni. V nefronu jsou vychytávány a též předávány do krve volné i esterifikované mastné kyseliny a jejich oxidace je v ledvinách velmi intenzivní a aktivuje transport organických kationtů. Ledviny mohou v menší míře syntetizovat ketolátky z dlouhých rozvětvených mastných kyselin *de novo*, zároveň ale např. acetoacetát je intenzivně vychytáván a přeměňován (Matouš *et al.*, c2010).

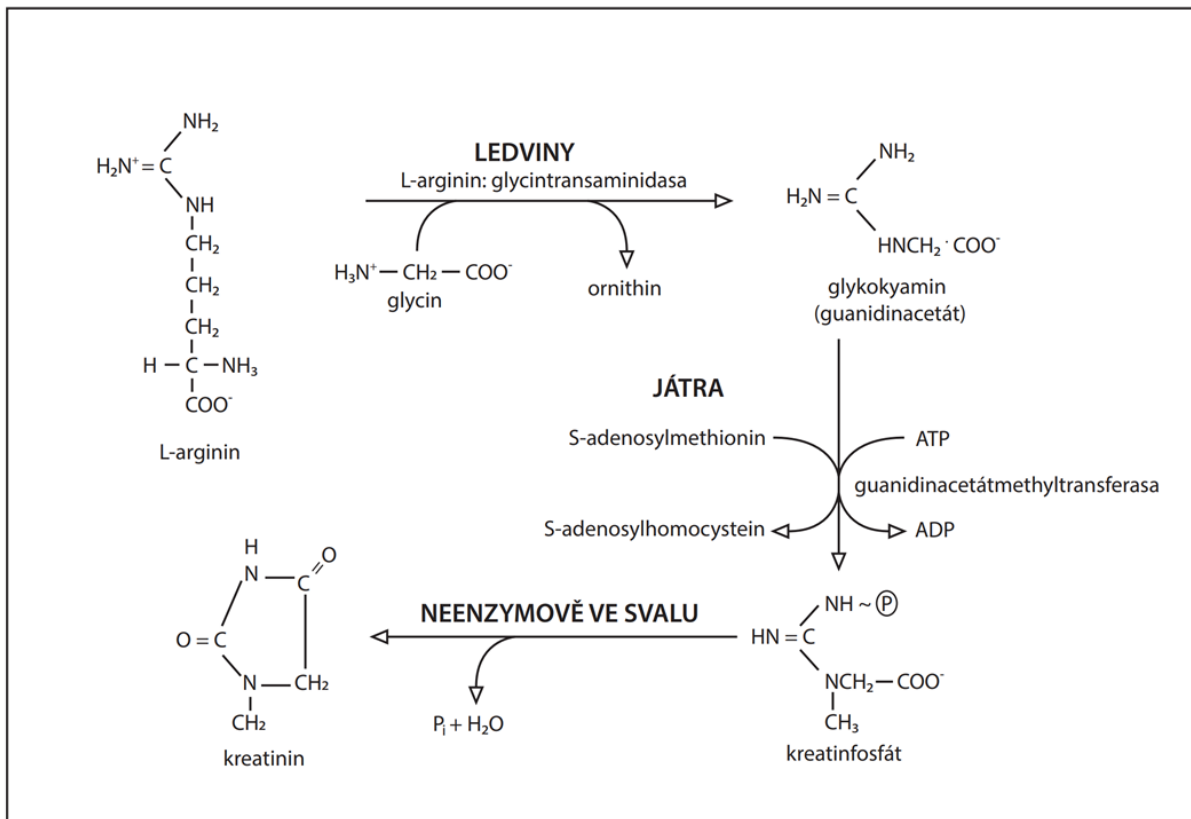
Močovina je hlavní látkou pro odstranění dusíku (toxického amoniaku) z těla. Tvoří se v játrech jako odpadní produkt bílkovinného metabolismu, poté je krví transportována do ledvin, kde je v Henleově kličce sekrenována a v tubulech reabsorbována do krve. Tvoří přibližně polovinu hmotnosti sušiny moče a je tak její hlavní složkou (Fontana *et al.*, 2018; Ledvina *et al.*, 2020).

2. 1. 3. 1 Kreatinin

Kreatinin (systematickým názvem 2-amino-1-methylimidazolin-4-on) je cyklická dusíkatá organická látka, jenž je druhou nejvíce vylučovanou dusíkatou odpadní látkou v moči hned po močovině. Denně je kreatininu za fyziologických podmínek vylučováno 20 – 25 mg/kg tělesné

hmotnosti (Ledvina *et al.*, 2020). Kreatinin vzniká neenzymatickou dehydratací kreatinu (viz obr. 2). Kreatin je přibližně z poloviny získáván z potravin na bázi bílkovin a z poloviny endogenní syntézou. Endogenní syntéza začíná transamidinační reakcí argininu a glycinu pomocí enzymu glycin amidinotransferasy (L-arginin: glycine amidinotransferasa, AGAT, EC 2.1.4.1) za vzniku ornithinu a guanidinacetátu v ledvinách. Glykokyamin je pak přenesen do jater, kde je methylován S-adenosylmethioninem enzymem S-adenosyl-L-methionin: N-guanidinoacetát methyltransferasa (guanidinoacetát methyltransferasa, GAMT, EC 2.1.1.2) na kreatin. Ten je pak krví dopraven do kosterních svalů, kde je reverzibilně fosforylován na fosfokreatin enzymem ATP:kreatin N-fosfotransferasou (kreatinkinasa, CK, EC 2.7.3.2). Fosfokreatin slouží jako zdroj energie pro mozek a kosterní a srdeční svalstvo během prvních pár sekund intenzivního svalového nebo nervového úsilí, kdy předává fosfát na ADP za vzniku ATP pomocí guanidinfosfátové skupiny. Poměr kreatinu a fosfokreatinu je přibližně 40:60. Denně je ve svalech přibližně 1–2 % kreatinu a fosfokreatinu neenzymaticky cyklizováno na kreatinin (Matouš *et al.*, 2010; Allen, 2012; Wishart *et al.*, 2022).

Množství kreatininu je nejvýznamněji ovlivněno množstvím svalové hmoty, jelikož svalová hmota je přímo úměrná množství kreatinu (Zima *et al.*, 2009). Kreatinin je za fyziologických podmínek filtrován glomerulárními procesy a téměř nedochází k resorpci, což dokazuje jeho koncentrační kvocient (= konc. v moči: konc. v krvi), jenž je roven 133 (Ledvina *et al.*, 2020). Proto je používán pro stanovení hodnoty glomerulární filtrace pomocí hodnoty clearance endogenního kreatininu. Vzhledem k tomu, že je jeho vylučování oproti ostatním vylučovaným látkám relativně konstantní, používá se jako normalizační parametr pro metabolické analýzy. (Zima *et al.*, 2009; Racek & Rajdl, [2021])



Obr. 2: Schéma syntézy kreatininu. Převzato a upraveno dle Matouše *et al.* (c2010).

2. 2 Kancerogeneze

Jako kancerogenezi označujeme mnohastupňový proces vzniku nádoru, který může trvat měsíce až roky. Nádor (též novotvar, tumor a další názvy) zahrnuje velkou skupinu nemocí, jež se vykazují vznikem abnormálních patologických buněk schopných nekontrolovatelného (autonomního) růstu (Hanahan & Weinberg, 2011; Cvek *et al.*, 2023). Jedná se o genetické onemocnění, jelikož započítává velké množství patologických změn v genetické výbavě buňky. Může postihnout jakoukoliv část těla a rozšířit se (metastázovat) do dalších orgánů a tkání (Cvek *et al.*, 2023). Je také celosvětovou druhou nejčastější příčinou úmrtí (Dattani *et al.*, 2023). Některé nádory vycházejí ze skupiny buněk, většina však z jedné buňky (tzv. monoklonální počátek). V rámci kancerogeneze rozlišujeme tři stádia, a to iniciaci, promoci a progresi (Nečas, 2021; Cvek *et al.*, 2023).

Ve stádiu iniciace dochází u somatické buňky k mutaci jednoho nebo více řídících („driver“) genů, či epigenetické informace, přičemž tyto změny nejsou letální a jsou předávány na dceřiné buňky. Pouze řídící mutace jsou příčinou zahájení stádia iniciace, promoci a progresi. Velká většina vzniklých mutací jsou pasažérské mutace, které vznikají většinou v důsledku genové

nestability iniciovaných buněk. Iniciované buňky tak získávají nové vlastnosti, mezi které patří např. vyšší odolnost vůči apoptóze, zvýšená proliferace nebo snížená schopnost opravy DNA (Nečas, 2021). Toto stádium je spuštěno buď špatnou či žádnou opravou mutací DNA vzniklých buď přirozeně nebo vlivem mutagenů (Cvek *et al.*, 2023). Mutageny jsou buď chemické povahy (např. alkylační látky nebo aflatoxiny), fyzikální povahy (ultrafialové a ionizující záření) nebo biologické povahy (papilomaviry a některé retroviry). K iniciaci kancerogeneze také dochází pomocí vlivu vzácných dědičných predispozic (Basu, 2018; Nečas, 2021).

Mezi řídicí geny patří protoonkogeny a tumor-supresorové geny (Morjaria, 2021). Protoonkogeny jsou geny podporující růst, migraci a dělení buněk a sebeobnovu při buněčném dělení. K mutacím, které protoonkogeny mění na onkogeny, dochází často vlivem translokace, amplifikace nebo bodové mutace. Tyto mutace zvyšují účinnost produktů těchto genů (transkripčních faktorů, signálních drah, receptorů) a dochází tak k trvalé aktivaci kaskády mitogenem aktivované proteinkinasy (MAPK), což způsobuje proliferaci bez mitogenního signálu. Tumor-supresorové geny kódují molekuly, jež spouští apoptózu, omezují buněčné dělení regulací buněčného cyklu, migraci, ovlivňují buněčnou diferenciaci nebo např. opravují poškozenou DNA (Nečas, 2021; Cvek *et al.*, 2023). Celkově tedy hlídají integritu DNA („gate keepers“) nebo jsou za ni přímo zodpovědné („care takers“) (Cvek *et al.*, 2023). Onkogenní mutace těchto genů jsou inhibiční vlivem snížení exprese těchto genů nebo účinnosti jejich bílkovinných produktů. Děje se tak často v důsledku epigenetických procesů, delecí části chromozomů nebo bodových mutací (Nečas, 2021). Nastává tak deregulace buněčného cyklu, což vede ke genové nestabilitě a proliferaci. K některým mutacím tumor-supresorových genů přispívá genetická predispozice (Nečas, 2021; Cvek *et al.*, 2023).

V rámci stádia promoce jsou v iniciovaných buňkách, jež unikly imunitnímu systému, hromaděny další genetické či epigenetické mutace, což způsobuje výraznější odchýlení od fyziologického chování buněk (Nečas, 2021; Cvek *et al.*, 2023). Dle diferenciace (míra podobnosti s tkání, ze které vznikl nádor), rychlosti růstu a ohraničení rozlišujeme nádory na benigní a maligní, případně premaligní (benigní nádory časem přecházející do maligního stádia) a semi-maligní (vykazující znaky benigních i maligních nádorů). Benigní nádory jsou tvořeny vysoce diferenciovanými buňkami, rostou většinou pomalu a jsou ohraničeny vazivovým pouzdrém. Pro organismus jsou škodlivé hlavně utlačováním okolní tkáně, nebo u nádorů endokrinních orgánů narušováním homeostázy nadprodukcí hormonů (Nečas, 2021; Cvek *et al.*, 2023).

Ve stádiu progresu dochází k dalším zásadním změnám vlastností nádorově transformovaných buněk, a tedy k vzniku maligního nádoru (Basu, 2018; Nečas, 2021). Růst nádoru se stává

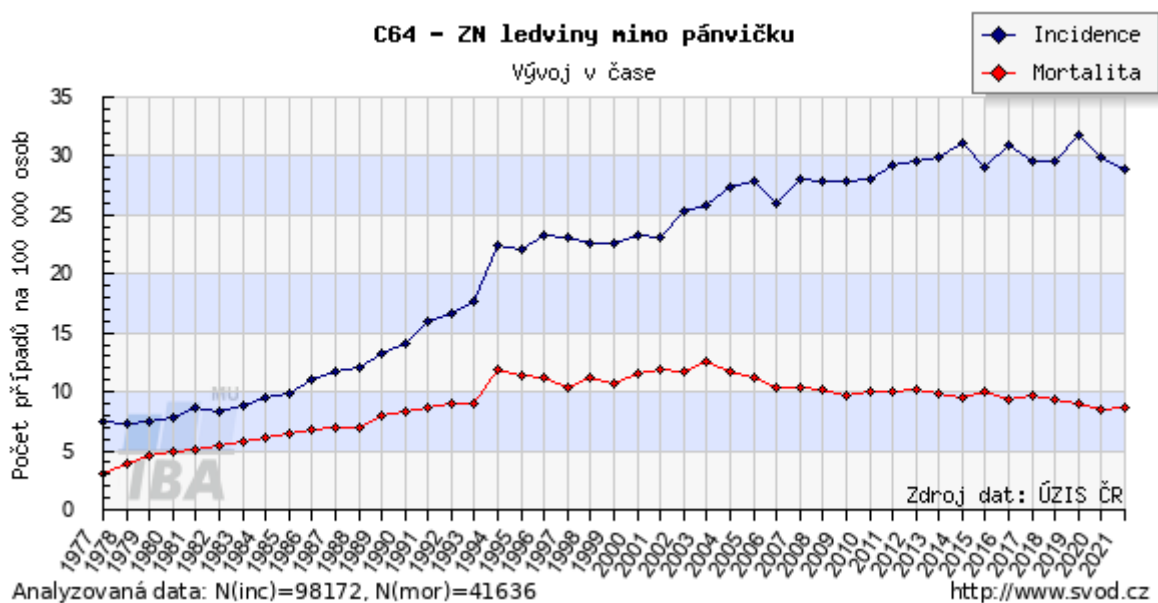
nezávislým na působení růstových faktorů a na koordinaci s regulačními mechanismy jeho okolí a jeho genom je závažně porušen. V samotném stádiu progresu nastává změna v proteomu, přestává syntetizovat normální komunikační molekuly a začíná syntetizovat nádorově specifické molekuly, roste i invazivně pomocí výběžků (invadopodií) do okolních tkání, díky čemuž mohou jeho buňky proniknout i do krevního a lymfatického cévního systému. Takto se maligní nádor může pomocí svých přilnavých molekul rozšířit do anatomicky vzdálených částí těla a vytvořit metastázy (sekundární nádorová ložiska). Ty bývají neidentické s původním nádorem, ale jsou od něj odvozené, a destruktivnější (metastázy jsou častou příčinou celkového katabolismu, jenž vede k orgánovému selhání a smrti). Rozvojem maligního nádoru se snižuje diferenciace a funkce buněk, a naopak zvyšuje heterogenita nádoru (Nečas, 2021). Subkulturou nádoru jsou rakovinné kmenové buňky („cancer stem cells“, CSC). CSC mohou vzniknout z kmenových buněk nebo ze somatických buněk. Dokáží řídit iniciaci nádoru, svou schopností sebeobnovy bez diferenciace dokáží obnovit nádor po jeho potlačení a jsou rezistentní k nádorové terapii. Byly nalezeny jejich biomarkery, jenž slouží k diagnóze, prognóze a sledování terapie nádorového onemocnění (Walcher *et al.*, 2020; Nečas, 2021).

Vlivem růstu maligního nádoru nestačí jeho zásobování kyslíkem a živinami a odvádění metabolitů a CO₂ difuzí (ta dostačuje pouze do velikosti nádoru přibližně 1 mm²). Vlivem takto vzniklé hypoxie, acidózy a nedostatku živin se buňky vícečetně metabolicky adaptují, např. zmnožením monokarboxylátových transportérů MCT1 a MCT4 (pro účinný odvod kyseliny mléčné) nebo Warburgovým efektem, což je jev, kdy buňky preferují anaerobní glykolýzu a aktivaci pentózového cyklu (Warburg, 1956; Nečas, 2021; Pouysségur *et al.*, 2022). Hypoxie nádorové tkáně také skrze stabilizaci transkripčního faktoru HIF-1 α , a tak iniciovanou produkcí růstového faktoru VEGF, vyvolává novotvorbu cév (neovaskularizaci). Neovaskularizací též vzniká stroma nádorové tkáně. Vnitřní prostředí obsahuje vlivem nedokonalé neovaskularizace a nesprávné mikrocirkulaci ložiska hypoxie a acidózy. Makrofágy diferencované do M2 fenotypu v buněčné části jsou zodpovědné za ochranu nádorových buněk před cytotoxickou imunitní reakcí produkcí cytokinů IL-10 a TGF- β (Nečas, 2021).

Maligní nádory lze dle stupně diferenciace, původní tkáně či orgánu klasifikovat. Dle původní tkáně jsou děleny na karcinomy (vznik z epitelů, nejčastější), sarkomy (vznik z mezenchymu), leukemie a lymfomy (nádory krvevorné tkáně), neuroektodermální (vznik z buněk nervového systému), germinální a smíšené nádory. Rozsah nádorového postižení je nejčastěji hodnocen dle systému TumorNodiMeta (TNM klasifikace) (Nečas, 2021; Cvek *et al.*, 2023).

2. 3 Karcinom ledvin

Karcinom ledvin („renal cell carcinoma“, RCC) je nejčastější podskupina nádorových onemocnění ledvin (tvoří 90 % případů), jenž vznikají z buněk epitele ledvin (Ervik *et al.*, 2021; Bukavina *et al.*, 2022). Za rok 2020 celosvětově přibylo přibližně 430 000 případů rakoviny ledvin (a zemřelo přibližně 180 000 pacientů), z toho v České republice 3 314 případů (a zemřelo 1 150 pacientů) (Ervik *et al.*, 2021). Česká republika má v Evropě nejvyšší incidenci rakoviny ledvin u mužů a druhou nejvyšší průměrnou incidenci po Litvě (Ervik *et al.*, 2021). V ČR navzdory rostoucí incidenci velmi mírně klesá mortalita (viz obr. 3) (Dušek *et al.*, [2005]). RCC má celkem špatnou prognózu, jelikož míry 3letého celkového přežití jsou 58 % a pětiletého celkového přežití jsou 49 % (Wahlgren *et al.*, 2013). U metastatického RCC je prognóza výrazně horší, jelikož míra celkového přežití po 1, 3 a 5 letech byla 49,4 %, 18,9 % a 8,2 % (Tsimafeyeu *et al.*, 2017).



Obr. 3: Graf incidence a mortality nádorů ledviny mimo pánvičku (kam spadá i RCC) v České republice. Převzato z <http://www.svod.cz>.

Incidence rakoviny ledvin je mírně zvýšená u dětí do 10 let (vlivem Wilmsova tumoru neboli nefroblastomu, jenž je nejčastějším dětským nádorovým onemocněním ledvin neepiteliálního původu), nejnižší je u pacientů mezi 10–24 rokem, s vyšším věkem lineárně stoupá a nejvyšší je ve věku 70–80 let (Ervik *et al.*, 2021; WHO Classification of Tumours Editorial Board, 2022; National Cancer Institute, 2023). U dětí a dospívajících je karcinom ledvin relativně neobvyklé onemocnění, přičemž nejčastější histologický podtyp je translokační RCC s mikroftalmiovým transkripčním faktorem (MiT-tRCC) (Cajaiba *et al.*, 2018; National Cancer Institute, 2023). Na jejich pětileté celkové přežití má vliv hlavně rasa, přítomnost metastáz, typ operace a histologický typ nádoru (Zhao *et al.*, 2023). Mezi hlavní rizikové faktory u dospělých patří věk (nejvyšší výskyt RCC je mezi 70–80 lety) a pohlaví (muži tvoří přibližně dvakrát větší počet pacientů než ženy) (Ervik *et al.*, 2021). Mezi rizikové faktory týkajících se životního stylu náleží např. kouření, někteří průmysloví činitelé (Capitano *et al.*, 2019), užívání některých analgetik (Choueiri *et al.*, 2014), dlouhodobá dialýza, hypertenze a obezita (Macleod *et al.*, 2013). Mezi genetické rizikové faktory patří autozomálně dominantní onemocnění způsobené zárodečnými mutacemi genů, např. mutacemi genu *VHL* způsobující von Hippel Lindauův (VHL) syndrom (Latif *et al.*, 1993), genu *FH* způsobující hereditární leiomyomatosu a RCC (HLRCC) (Tomlinson *et al.*, 2002), genu *MET* zapříčiňující hereditární papilární RCC (HPRC) (Schmidt *et al.*, 1997) a genu *FLCN* způsobující Birt-Hogg-Dubého (BHD) syndrom (Toro *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2018). Naopak jako preventivní faktory vzniku RCC je označována např. zvýšená fyzická aktivita (Behrens & Leitzmann, 2013) a zvýšený příjem alkoholu (Xu *et al.*, 2015). U všech histologických typů RCC může nastat vzácná sarkomatoidní diferenciaci, která zhoršuje prognózu (Blum *et al.*, 2020). Karcinomy ledvin nejčastěji metastázuji do plic, jater a skeletu a to hemangioinvasí (krevní cestou) (Cvek *et al.*, 2023).

2. 3. 1 Typy karcinomu ledvin

Histologicky lze karcinom ledvin rozdělit na několik typů, dohromady bylo popsáno 21 hlavních typů RCC (World Health Organization classification of tumours, 2022). Jejich charakteristika je shrnuta v tabulce v příloze 1. Bylo také popsáno sedm typů molekulárně definovaných RCC, jako např. RCC s deficitem sukcinát:chinon oxidoreduktasy (sukcinátdehydrogenasa, SDH, EC 1.3.5.1).

Nejčastějším typem je jasnobuněčný renální karcinom (ccRCC, nesprávně nazývaný Grawitzův tumor (Hora & Hes, 1998)). Je tvořen z jasných buněk, které získaly název podle průsvitné cytoplazmy způsobené vysokým obsahem zásobních kapének lipidů a glykogenu (Muglia &

Prando, 2015). Mimo jiné je ve většině případů spojen s mutací genu *VHL* (Kaelin, 2004; Nabi *et al.*, 2018) Mutace *VHL* jsou převážně sporadické (přibližně 96 %), nebo familiární (přibližně 4 %, hlavně vlivem VHL syndromu) (Cairns *et al.*, 2011). *VHL* kóduje VHL protein (pVHL), který po vytvoření komplexu VBC (s elonginem B a C, celulinem 2 a dalšími buněčnými proteiny) reguluje mimo jiné hladinu HIF-1 α a HIF-2 α svým navázáním, čímž spustí polyubikvitinaci, a tedy jejich degradaci. Pokud k regulaci nedochází vlivem defektu *VHL* nebo nedostatkem kyslíku, tak tyto HIF transkripční faktory způsobují zvýšení transkripce mRNA, jenž kóduje růstové faktory jako např. vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF), růstový faktor odvozený z beta krevních destiček (PDGFB) nebo transformující růstový faktor alfa (TGFA), které jsou zásadní pro rozvoj nádoru (Barry & Krek, 2004; Kim & Kaelin, 2004; Nabi *et al.*, 2018). Existuje více histologických a genových podtypů ccRCC. Nejčastější podtypy jsou ccA a ccB, jenž se liší hlavně v prognóze a exprimovaných genech. Typ A má výrazně lepší prognózu než typ B a jsou při něm nadměrně exprimovány geny spojené se složkami drah hypoxie a angiogeneze (jež jsou u ccRCC disregulovány) a se složkami metabolismu mastných kyselin a organických kyselin (Brannon *et al.*, 2010; Muglia & Prando, 2015). Dalším podtypem ccRCC je multilokulární cystický RCC, jenž zahrnuje 5 % případů ccRCC (v poměru 3:1 pro muže a ženy) Je charakterizován delecí 3p a velmi dobrou prognózu, jelikož je od ledviny oddělen vazivovým pouzdrém a nevyskytují se při něm metastáze (Zhou & He, 2013; Muglia & Prando, 2015).

Druhým nejčastějším histologickým typem je papilární renální karcinom (pRCC), který má lepší prognózu než ccRCC (Muglia & Prando, 2015). Může být buď indolentní, bilaterální a multifokální, nebo se vyskytuje jako solitární léze, které mají agresivní klinický průběh (The Cancer Genome Atlas Research Network, 2016). Rozlišujeme dva typy pRCC dle histologie a biologického chování – typ 1 (bazofilní) a typ 2 (eozinofilní), který se dále dělí na tři podtypy dle molekulárních a fenotypových znaků. Typ 1 např. více exprimuje cytokeratin 7 než typ 2 (Delahunt & Eble, 1997; Delahunt *et al.*, 2001; Muglia & Prando, 2015; The Cancer Genome Atlas Research Network, 2016). Papilární RCC se objevuje buď jako sporadické či familiární onemocnění. Familiární pRCC je spojen s HLRCC, a tedy mutací v tumor supresorovém genu *FH* (Kiuru *et al.*, 2001), a s HPRC, a tedy mutací v onkogenu *MET* (Schmidt *et al.*, 1997; Yang *et al.*, 2021). V typu 2 je např. zvýšená exprese dráhy NRF2-ARE. Pokud se u typu 2 vyskytuje CIMP a ztráta *CDKN2A*, je prognóza zhoršená (The Cancer Genome Atlas Research Network, 2016).

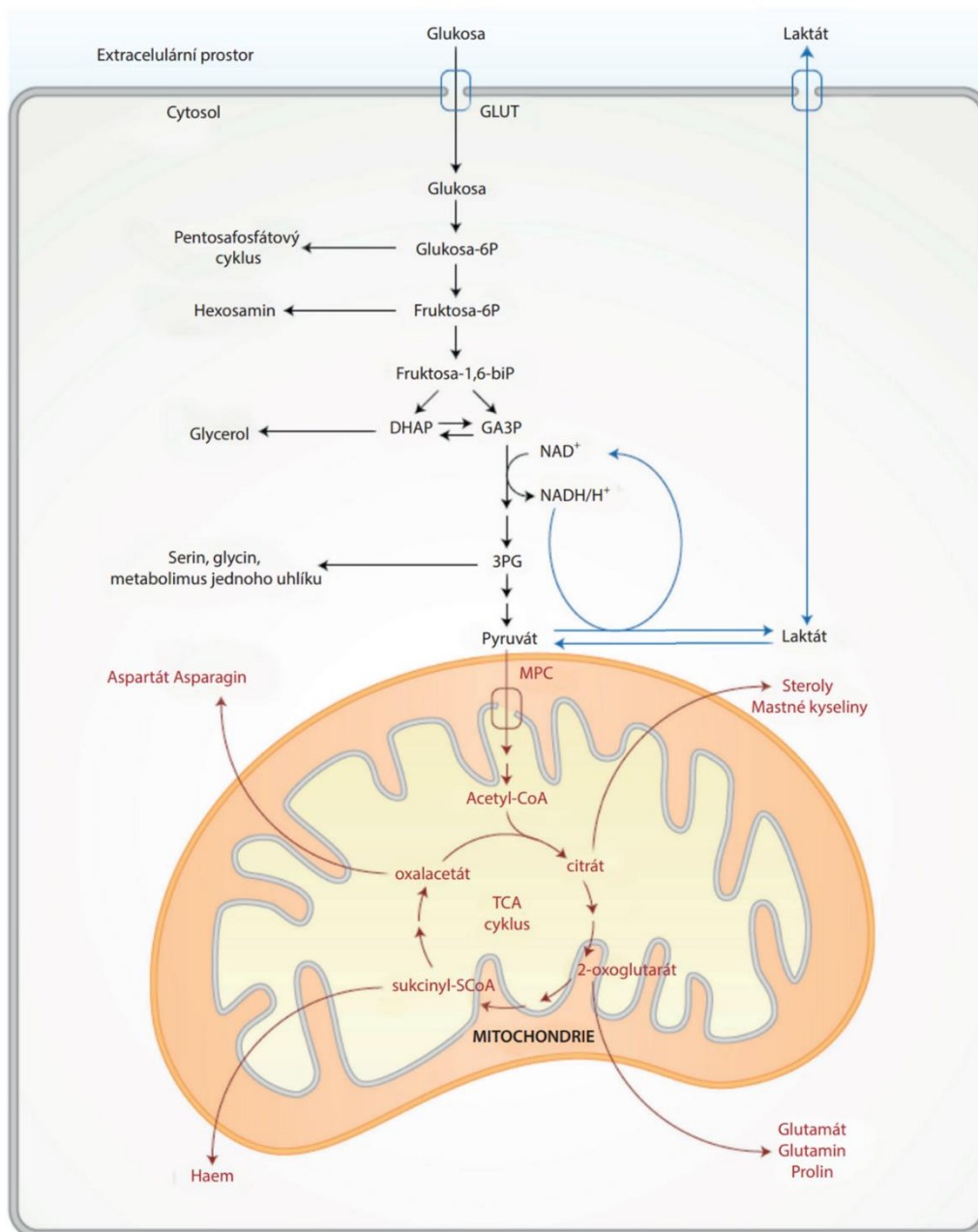
Třetím nejčastějším histologickým typem je chromofóbní renální karcinom (chRCC nebo crRCC). Metastázy se vyskytují pouze v 7 % případů, což je i jedním z důvodů proč má tento typ nejlepší prognózu z RCC. Magnetickou rezonancí jsou nálezy chRCC nerozeznatelné od onkocytomů (benigní nádory tvořené z interkalovaných buněk typu B z kortikálních sběrných kanáleků) (Muglia & Prando, 2015). Ztráta transkripčního faktoru HNF1B a mutace *TP53* může vést k agresivnějšímu fenotypu s aneuploidií a zvýšenou buněčnou proliferací (Sun *et al.*, 2017). Chromofóbní RCC se opět objevuje buď jako sporadické či familiární onemocnění. Familiární chRCC je spojen s BHD syndromem, a tedy mutací v genu *FLCN* (Pavlovich *et al.*, 2002), a s Cowdenovým syndromem, tedy mutací genu *PTEN* (Shuch *et al.*, 2013). Všechny chRCC mají zvýšenou expresi genů kódujících enzymy Krebsova cyklu (naopak u ccRCC je jejich exprese potlačena), což odpovídá zvýšenému využití Krebsova cyklu a elektronového transportního řetězce pro tvorbu ATP u tohoto typu RCC (Davis *et al.*, 2014). Nastává také zvýšení počtu mitochondrií, což může být kompenzace neúčinnosti oxidativní fosforylace způsobené ztrátou komplexu I (Gasparre *et al.*, 2008; Davis *et al.*, 2014).

Jako čtvrtý nejčastější typ jsou nezařazené karcinomy ledvin (uRCC). Kromě výše jmenovaných typů jsou mezi hlavními typy RCC např. RCC se změnou v *TFEB*, karcinom sběrného (cdRCC), renální medulární karcinom s deficitem SMARCB1 (dříve pouze medulární renální karcinom (mRCC)) a mucinózní tubulární vřetenobuněčný karcinom (MTSCC) (Muglia & Prando, 2015; WHO Classification of Tumours Editorial Board, 2022; Alaghebandan *et al.*, 2023).

2. 3. 2 Patobiochemie rakoviny ledvin

Změny v biochemických drahách rakovin ledviny (tzv. metabolické přeprogramování) jsou jako i u ostatních druhů rakovin způsobené chromosomálními řídicími a poté i pasažérskými mutacemi (Hoerner *et al.*, 2019; Nečas, 2021). Tyto změny způsobují aktivaci onkogenních drah a jsou pro každý histologický typ i podtyp odlišné, ale vždy poskytují nádorovým buňkám selekční výhodu a jsou jedním ze základních znaků rakoviny (Hanahan & Weinberg, 2011; Masson & Ratcliffe, 2014; Nečas, 2021). Nádorové buňky také využívají alternativní biochemické dráhy kvůli přizpůsobení se stavu prostředí (hypoxie, acidóza, apod.), stresu způsobeném imunitním systémem a léky a vysoké energetické spotřebě způsobené nadměrnou proliferací a celkovým růstem nádoru. Tyto alternativní metabolické dráhy jsou s onkogeními drahami spojeny v mnoha bodech. Příkladem využití takovéto alternativní dráhy je např. Warburgův efekt, nebo glutaminásová dráha (Warburg, 1956; Masson & Ratcliffe, 2014; Nabi *et al.*, 2018).

Vlivem mutace *VHL* (výskyt asi u 80 % RCC) (Kinnaird *et al.*, 2016) a hypoxie (pokud nastane ztráta pVHL, tak hypoxie nemusí být pro aktivaci HIF přítomna (Myszczyzyn *et al.*, 2015)) je metabolismus rakovinných buněk přeprogramován stabilizací transkripčních faktorů HIF-1 α (fungující jako nádorový supresor) a HIF-2 α (fungující jako onkogen) (Zhu *et al.*, 2023). HIF-1 α způsobuje (kromě výše zmíněných efektů v kapitole Typy karcinomu ledvin) zvýšení anaerobní glykolýzy a potlačení oxidace glukosy v mitochondriích indukcí ATP:[pyruvát dehydrogenasa (acetyltransferová)] fosfotransferasy (pyruvátdehydrogenasová kinasa, PDK, EC 2.7.11.2), a tak snížením vstupu pyruvátu do mitochondrií (narušení Krebsova cyklu) a zvýšením produkce laktátu, čímž podporují buněčnou proliferaci a odvrací buněčnou smrt v důsledku nedostatku kyslíku. Tento jev se také nazývá Warburgův efekt (viz obr. 4) (Warburg, 1956; Papandreou *et al.*, 2006; Kinnaird *et al.*, 2016; Nabi *et al.*, 2018; Zhu *et al.*, 2023).



Obr. 4: Schéma Warburgova efektu. Černé šipky a sloučeniny označují glykolýzu a její následné produkty, červené šipky a sloučeniny Krebsův cyklus a jeho následné produkty a modré šipky označují napojený metabolismus laktátu (DHAP představuje dihydroxyacetonfosfát, GA3P glyceraldehyd-3-fosfát, 3PG 3-fosfoglycerát a MPC mitochondriální pyruvátový nosič). Převzato a upraveno dle DeBerardinise & Chandela (2020) a D'Elia Zanella & Borgesové (2021).

Vysoká produkce laktátu a pyruvátu v důsledku tohoto jevu je také jedním ze základních rozlišovacích znaků zdravých kontrol a pacientů s RCC, a některými dalšími karcinomy, jak ve tkáních (Dong *et al.*, 2016), tak v moči (Ragone *et al.*, 2016). HIF-1 α také zvyšuje expresi glykolytických enzymů (umocňujících tak Warburgův efekt), jako jsou ATP:D-hexosa 6-fosfotransferasy (hexokinasy 1 a 2, HK1 a HK2, EC 2.7.1.1) (S)-laktát:NAD+

oxidoreduktasa (laktátdehydrogenasa A, LDH-A, EC 1.1.1.27), ATP:3-fosfo-D-glycerát 1-fosfotransferasa (fosfoglycerátkinasa 1, PGK1, EC 2.7.2.3) a ATP:pyruvát 2-O-fosfotransferasa (pyruvátkinasa, PKM2, EC 2.7.1.40), přičemž vysoká exprese HK2 a hlavně LDH-A je spojena s nejhorší prognózou ccRCC (Fantin *et al.*, 2006; Xie & Simon, 2017; Zhao *et al.*, 2017; Soni & Hartman, 2023; Zhu *et al.*, 2023). Laktát se zásadně podílí na tvorbě a udržování nádoru a při léčebné odpovědi (di Meo *et al.*, 2022). Kromě zvýšení koncentrace HIF-1, jsou při Warburgově efektu aktivovány např. také transkripční faktory c-Myc a NF-κB (Shim *et al.*, 1997; Johnson & Perkins, 2012; di Meo *et al.*, 2022). Jeho dalšími efekty jsou například buněčná signalizace, např. syntézou a regulací reaktivních forem kyslíku (ROS) a změnami stavu chromatinu (Liberti & Locasale, 2016).

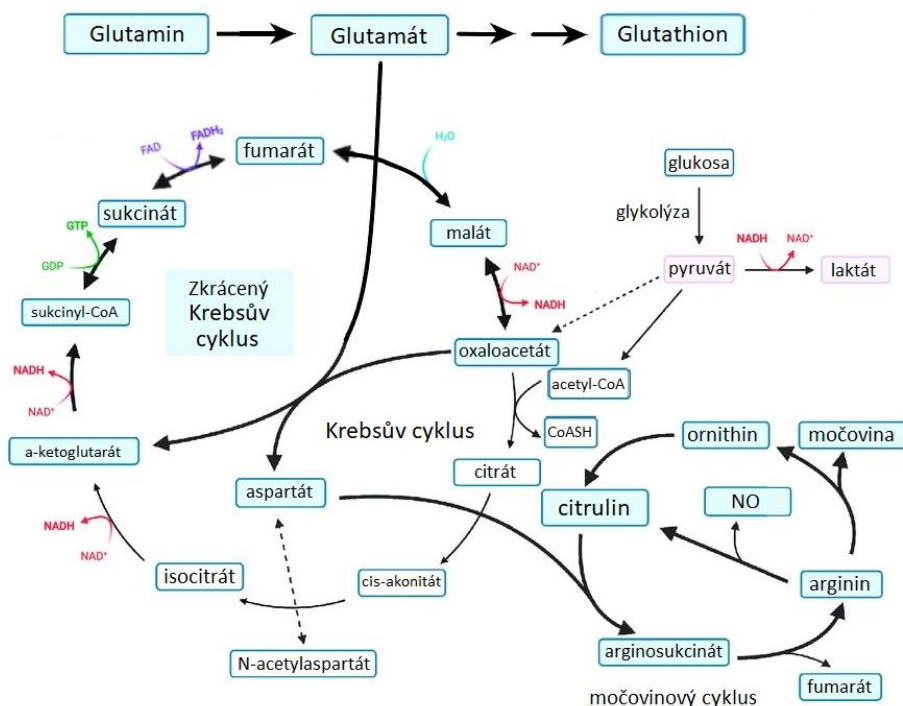
Zvýšená rychlost glykolýzy rakovinných buněk spotřebovává většinu živin v okolním mikroprostředí, což významně podporuje tvorbu nádorového mikroprostředí a snižuje schopnost reakce T-lymfocytů (Cassim & Pouyssegur, 2020). Vzhledem k tomu, že glukosa je v RCC hlavním zdrojem energie kvůli preferenci anaerobní glykolýzy, jsou v nádorových buňkách hojně syntetizovány glukosové transportéry GLUT-1, které v buňkách RCC vychytávají glukosu a na nichž jsou tyto buňky životně závislé (Chan *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2012). Upřednostnění anaerobní glykolýzy může být také indukováno snížením počtu enzymu D-fruktosa-1,6 1-fosfohydrolasy (fruktosa-1,6-difosfatasa, FBP1, EC 3.1.3.11) (Li *et al.*, 2014).

Změnu v Krebsově cyklu, vlivem aktivace transkripčních faktorů HIF, vyvolává také absence nádorového supresoru (S)-malát hydro-lyasy (fumarát hydratasa, FH, EC 4.2.1.2) u některých typů RCC (např. u pRCC typu 2 (The Cancer Genome Atlas Research Network, 2016)). Tato změna se u RCC projevuje charakteristicky snížením koncentrace (vlivem výše zmíněných faktorů) a změnou poměru fumarátu a malátu (vlivem absence FH) (Isaacs *et al.*, 2005; Dong *et al.*, 2016).

Přeprogramování metabolismu aminokyselin je pro RCC velmi důležité, jelikož aminokyseliny jsou nezbytnými nutričními substráty, zdroje energie a faktory pro proliferaci a tvorbu metastází RCC, jelikož jsou spojeny s metabolismem glukosy, nukleotidů a lipidů (Boroughs & DeBerardinis, 2015; Zhang *et al.*, 2022). Metabolismus aminokyselin se také výrazně podílí na ferroptóze (programovaná buněčná smrt závislá na intracelulárním železe řízená mnoha molekulárními a metabolickými cestami) (Dixon *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2022) anebo lékové rezistenci, např. udržováním redoxní homeostázy a biosyntetických procesů, regulací epigenetické modifikace, tvorbou protirakovinné imunitní reakce nebo imunosupresivního mikroprostředí (Yoo & Han, 2022).

Glutaminásová dráha (viz obr. 5) je aktivovaná pouze u rakovinných buněk vlivem reprogramování. Jejím prostřednictvím je glutamin přeměňován na glutamát, který zvyšuje syntézu aspartátu a α -ketoglutarátu skrze Krebsův cyklus. Aspartát, a tedy i glutamin, je pro růst nádoru nezbytný, jelikož je v buňkách s mutacemi ve *VHL* nepřímě potřebný pro syntézu DNA (skrze syntézu pyrimidinů) a potřebný pro syntézu esenciálních lipidů, citrátu a glutathionu (významný antioxidant pro boj se stresem) (Okazaki *et al.*, 2017; Nabi *et al.*, 2018; Zhu *et al.*, 2023). Buňky RCC jsou tak závislé na exogenní dodávce glutaminu (Hoerner *et al.*, 2019). Tato dráha je také spoluzodpovědná za rezistenci vůči cílené terapii (Okazaki *et al.*, 2017).

Změny v metabolické dráze tryptofanu u RCC byly identifikovány jako možný způsob, jak rozlišit RCC a ostatní typy rakovin (Liu *et al.*, 2019). Dráhy přeměny tryptofanu vedoucí k syntéze imunosupresivních látek, jako např. kynurenin, chinolinát jsou u RCC silně upřednostněny oproti drahám vedoucím k syntéze ostatních sloučenin (např. k serotoninu a indolacetátu) (Wettersten *et al.*, 2015) Metabolity tryptofanu se mohou také podílet na kancerogenezi obecně (Chung & Gadupudi, 2011).



Obr. 5: Schéma glutaminasové dráhy s propojením glykolyzy, Krebsova a močovinového cyklu. Plně modré metabolity jsou metabolity glutaminasové dráhy a následných produktů, fialové metabolity jsou produkty glykolyzy, bíle vyplněné modré rámečky představují ostatní metabolity (metabolity Krebsova cyklu a glukosu). Převzato a upraveno dle Sowerse *et al.*, 2021.

U některých genů, které jsou součástí močovinového cyklu, např. u genů kódujících L-arginin:NADPH:kyslík oxidoreduktasu (tvořící NO) (syntasa oxidu dusnatého, NOS, EC 1.14.13.39) a L-arginin amidinohydrolasu (arginasa 2, ARG2, EC 3.5.3.1), je snížena exprimace (Pandey *et al.*, 2020). V metabolismu vitamínů je u RCC odlišná produkce některých vitamínů, např. zvýšená koncentrace vitamínu E, která může být u RCC způsobena nadměrným příjmem lipidů a mastných kyselin (Mardones & Rigotti, 2004; Catchpole *et al.*, 2011), nebo potřebou ochrany nádorových buněk před vysokým oxidačním stresem (Ham & Liebler, 1997; Catchpole *et al.*, 2011).

V ranném stádiu RCC jsou v moči některé acylkarnitiny jako např. 2-methylbutyrylkarnitin, propionylkarnitin, acetylkarnitin, isobutyrylkarnitin, a taky L-karnitin sníženy oproti zdravým kontrolám, ale v pokročilém stádiu RCC jsou naopak zvýšeny. Acylkarnitiny mají cytotoxické, ale i imunomodulační vlastnosti, které mohou být prospěšné pro růst a přežití nádoru (Ganti *et al.*, 2012). Jsou produkty katabolismu BCAA (aminokyselin s rozvětveným řetězcem) a tak jejich vyšší hladina může také odrážet vyšší potřebu BCAA pro metabolismus RCC (Newgard *et al.*, 2009; Ganti *et al.*, 2012). Acylkarnitiny mohou být spoluzodpovědné za chemorezistenci RCC, jelikož zvyšují oxidaci mitochondriálních mastných kyselin a mohou tak podporovat mitochondriální rozpojování („uncoupling“), které by mohlo být příčinou chemorezistence RCC (Samudio *et al.*, 2009; Ganti *et al.*, 2012).

Nejčastějším a také nejvíce zmapovaným histologickým typem rakoviny ledvin je jasnobuněčný karcinom. U něj jsou nejpatrnější změny v metabolismu glukosy a oxidativní fosforylace (Cassim & Pouyssegur, 2020). Ve většině případů je spojen se ztrátou *VHL*, je u něj patrný silný Warburgův efekt, zvláště u pozdějších stádiích tohoto onemocnění (The Cancer Genome Atlas Research Network, 2013) a má aktivní glutaminásovou dráhu (Cassim & Pouyssegur, 2020). Je v něm, vlivem mutací *VHL*, změněn metabolismus lipidů a glukosy, což dokazuje průsvitná cytoplazma, která je způsobena vysokou akumulací zásobních kapének lipidů (hlavně cholesterolu, mastných kyselin a triglyceridů) a glykogenu. Jejich vznik je způsoben zpomalením transportu lipidů do mitochondrií vlivem HIF (Du *et al.*, 2017; Zhu *et al.*, 2023). Tyto lipidová a glukosová depozita také slouží jako ochrana před hypoxií a farmakologickou toxicitou (Qiu *et al.*, 2015). V rámci metabolismu lipidů je u ccRCC zvýšená syntéza mastných kyselin a ukládání do zásobních kapének a snížena jejich spotřeba a β -oxidace, což má za následek zvýšení syntézy buněčné membrány a proliferaci (Zhu *et al.*, 2023). U ccRCC je také zintenzivněno využití pentózofosfátové dráhy (PPP) pro tvorbu více NADPH k udržení redoxní homeostázy, ochranu před poškozením buněk vlivem ROS (Nogueira & Hay, 2013) a pro

dostatek ribosa-5-fosfátu pro syntézu nukleotidů (Jiang *et al.*, 2014). Buňky ccRCC mají sníženou koncentraci nebo jim úplně chybí L-citrulin:L-aspartát ligasa (tvořící AMP) (argininosukcinát syntasa 1, ASS1, EC 6.3.4.5), což vede k jejich závislosti na příjmu exogenního argininu (Yao *et al.*, 2021; Zhu *et al.*, 2023).

Metabolismus ostatních typů RCC není tak dobře popsán jako u ccRCC, ale z velké části odpovídá obecnému metabolismu RCC. Například u pRCC je také přítomen Warburgův efekt a s tím spojená vysoká exprese glukosových a monokarboxylových transportérů (Almeida *et al.*, 2017). A u chRCC je oproti ccRCC např. změna v hladině lysofosfatidylcholinů a sфинomyelinů a změna v koregulační síti lipidů (Schaeffeler *et al.*, 2019). Dále byla u chRCC utlumena biotransformace xenobiotik, již se účastní cytochrom P450 (Pandey *et al.*, 2020).

2. 3. 3 Diagnostika

Diagnóza a léčba karcinomu ledvin byla díky identifikaci více typů RCC zpřesněna, jelikož byla identifikována jedinečná biologie jednotlivých podtypů, kterou je při léčbě nutno brát v potaz (Maughan, 2022). Toto onemocnění je dlouho asymptomatické, proto je diagnóza ztížena a nález je tak náhodný (je diagnostikován jako tzv. incidentalom). U pokročilých stádií RCC se projevuje např. makrohématurie (přítomnost moči patrná pouhým okem), výrazná bolest v křížové a bederní oblasti, hmatný tumor a paraneoplastický syndrom (klinické projevy nádoru v jiné tkáni, než ve které se nádor nachází) (Büchler, [2020]; Cvek *et al.*, 2023). Může být také přítomná akutní renální kolika. Časná stádia lze zachytit ultrazvukem, diagnóza je pak upřesněna kontrastní výpočetní tomografií (CT) břicha a pánve. Doplňkovým vyšetřením pro detailnější upřesnění zasažení ledviny nádorem je magnetická rezonance (MR). Pro vyloučení metastáz je prováděno scintigrafické vyšetření skeletu a CT mozku a plic (případně rentgenové vyšetření plic) (Cvek *et al.*, 2023). Screening není zaveden, jelikož dosud nebyly identifikovány žádné klinicky ověřené biomarkery moči nebo séra, je relativně nízká prevalence onemocnění a je možnost falešně pozitivních výsledků (Diana *et al.*, 2023).

2. 3. 4 Léčba

Základní léčba je parciální či radikální nefrektomie (chirurgické odstranění části nebo celé poškozené ledviny), u pokročilejších stádií nádoru také lymfadenektomie (chirurgické odstranění mízních uzlin). V případě kontraindikace a u pacientů se RCC solitérní ledviny se přistupuje k lokální ablativní léčbě stereotaktickou terapií a radiofrekvenční nebo mikrovlnou ablací (Cvek *et al.*, 2023). RCC není citlivý na chemoterapii (Motzer & Russo, 2000).

V přítomnosti vzdálených metastáz není chirurgický zákrok používán, pouze v případě jinak neřešitelných těžkých místních projevů (anemizace, krvácení, invaze do trávicí soustavy apod.), v případě nízkého počtu bližších metastáz je vykonávána metastazektomie (chirurgické odstranění všech metastáz). Pokud není metastazektomie možná, je léčba prováděna stereotaktickou radioterapií a radiochirurgií. U mnohočetných metastáz se přistupuje k paliativní léčbě systémovou terapií (Cvek *et al.*, 2023). Většinou se indikují cílená terapie inhibitory tyrosinkinase (TKI) a imunoterapie monoklonálními protilátkami – inhibitory imunitních kontrolních bodů aktivujících protinádorovou imunitu (např. léčiva nivolumab, pembrolizumab a ipilimumab) (Büchler, [2020]; Maughan, 2022; Cvek *et al.*, 2023). Dále se indikuje léčba inhibitory angiogeneze (např. inhibitory VEGF léčivy sunitinib, pazopanib, bevacizumab, apod.) a inhibitory mTOR (např. léčiva everolimus a temsirolimus), nebo kombinací výše uvedených systémových terapií (Büchler, [2020]; Cvek *et al.*, 2023). Systémová terapie se také někdy používá k adjuvantní (pooperační) léčbě (Cvek *et al.*, 2023). Dříve bylo RCC považováno za nevléčitelné onemocnění, ale nedávné výsledky ukazují částečnou nebo úplnou regresi RCC, a to u 2-3 % pacientů léčených TKI a u přibližně 10 % pacientů léčených imunoterapií (Büchler, [2020]).

Ve výzkumu nových léčiv a jejich klinickém testování je několik látek. Například inhibitor glutaminasové dráhy CB-839 (způsobující zástavu buněčného cyklu a neschopnost odolávat oxidačnímu stresu) je testován na léčbu ccRCC a metastatického RCC s dobrými výsledky (Meric-Bernstam *et al.*, 2016). Dalším příkladem nových testovaných léčiv jsou blokátory GLUT1 WZB117 nebo STF-31, které způsobují nekrózu nádorových buněk, ale pro zdravou tkáň nejsou toxické, jelikož ta využívá i jiných glukosových transportérů (např. GLUT2) (Chan *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2012). Ve výzkumu je také léčba inhibicí enzymů glykolýzy (Kinnaird *et al.*, 2016), či deplece aminokyselin, která vede k vyhladovění rakovinných buněk (Butler *et al.*, 2021).

2. 4 Metabolomika

Omické vědy se zabývají analýzou velkého množství dat, které reprezentují celou danou buněčnou strukturu na určité úrovni (Dai & Shen, 2022). Velké a základní omické obory jsou genomika, transkriptomika, proteomika a metabolomika (Kordalewska & Markuszewski, 2015; Dai & Shen, 2022; Soni & Hartman, 2023). Genomika zkoumá individuální variace na zárodečné i somatické úrovni prostřednictvím sekvenování požadovaného genomu, transkriptomika zkoumá veškerou RNA v dané části organismu (tzv. transkriptom, jež je na rozdíl od genomu dynamický) jejím sekvenováním a proteomika se zabývá identifikací,

kvantifikací, charakterizací a funkční souvislostí všech exprimovaných proteinů v dané části organismu (tzv. proteom, který je také dynamický) sekvenováním naštěpených peptidů (Dai & Shen, 2022; Soni & Hartman, 2023). Metabolomika zkoumá metabolom, kvalitativní a kvantitativní soubor všech nízkomolekulárních látek v dané části organismu v daném čase (Fiehn, 2001; Wood, c2021). Metabolom se skládá z vlastních metabolitů, metabolitů mikrobiomu (Visconti *et al.*, 2019), xenobiotik nebo metabolitů ze stravy (Jain *et al.*, 2019; Dufour-Rainfray *et al.*, 2020). V rámci výše uvedených omických oborů je metabolomika nejkompexnější, jelikož genom a proteom podléhá epigenetickým a posttranslačním modifikacím, naopak metabolom odráží funkční úroveň biologického systému (i s vlivem okolního stresu), tedy nejaktuálnější stav – fenotyp (Kordalewska & Markuszewski, 2015; Agin *et al.*, 2016; Soni & Hartman, 2023). Metabolomika je využívána pro hledání biomarkerů (měřitelné indikátory určitého biologického stavu nebo podmínek s biologickým vysvětlením) a popis zdravotních či patologických stavů, jelikož mimo jiné pokrývá širokou škálu strukturně heterogenních a fyzikálně-chemicky různorodých molekul o koncentracích v rozsahu devíti řádů (Dunn *et al.*, 2005; Dufour-Rainfray *et al.*, 2020). V důsledku různorodosti metabolomu, a tak nemožnosti jej zachytit jako celek jednou analytickou platformou, vznikly metabolomické podobory, jako např. lipidomika, metalomika nebo metabolomika malých molekul (Wood, c2021).

V metabolomice je obecně užíváno dvou přístupů, a to necílené a cílené metabolomické analýzy. Necílená metabolomická analýza je používána při identifikaci nových oblastí metabolismu (a dává tak vzniknout hypotézám (Naz *et al.*, 2014; Soni & Hartman, 2023)), kde je analyzováno co největší množství analytů bez předchozí znalosti jejich povahy a identity. Je při ní prováděna minimální předúprava pro zachování co nejvyššího počtu metabolitů, ale i přes to nejsou všechny metabolity charakterizovány (Raterink *et al.*, 2014; Agin *et al.*, 2016). Používá se při ní např. infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací, spektroskopie nukleární magnetické rezonance (NMR) a hmotnostní spektrometrie (MS) ve spojení s různými separačními technikami (např. plynovou a kapalinovou chromatografií), či přímým vstřikováním (Naz *et al.*, 2014; Soni & Hartman, 2023).

Cílená metabolomická analýza je užívána při známé hypotéze a používá se pro identifikaci a také kvantifikaci koncentrace omezeného počtu známých a očekávaných metabolitů. Většinou vyžaduje předchozí validaci měřených molekul (Griffiths *et al.*, 2010; Soni & Hartman, 2023). K cílené metabolomické analýze se využívají specifické signály pro dané metabolity, což vede k vysoké přesnosti a správnosti, jako například pomocí monitorování vybraných reakcí (SRM)

při tandemové hmotnostní spektrometrii (MS/MS), nebo záznamu vybraných iontů (SIR) pomocí plynové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií (GC-MS). Je potřeba speciální předúpravy vzorku dle typu sledovaných metabolitů (Griffiths *et al.*, 2010).

2. 5 Vybrané metabolomické analytické metody pro studium metabolomu

Mezi nejčastější metabolomické analytické metody patří nukleární magnetická rezonance a (tandemová) hmotnostní spektrometrie v kombinaci s kapalinovou (LC) a plynovou (GC) chromatografií, kapilární elektroforézou nebo fotodiodovým polem (Moco *et al.*, 2007). Hmotnostní spektrometrie je nejcitlivější a nejspecifičtější metodou pro identifikaci a kvantifikaci metabolitů (Wood, c2021). Samostatně nedokáže žádná technika analýzy obsáhnout celý metabolom, proto je pro jeho popis účinnější jejich kombinace (Moco *et al.*, 2007; Agin *et al.*, 2016).

2. 5. 1 Vysokoučinná kapalinová chromatografie

Vysokoučinná kapalinová chromatografie („high-performance liquid chromatography“, HPLC) je druhem kapalinové chromatografie, separační techniky, jež separuje analyty na základě jejich afinitě ke stacionární fázi, přičemž mobilní fáze je kapalina. Součástí aparatury HPLC je vysokotlaké čerpadlo, jež umožňuje vhánění mobilní fáze s analyty do kolony pod větším tlakem a mohou se tak používat menší kolony s vyšší účinností za kratší čas oproti běžné kapalinové chromatografii. Používají se při ní kolony o délce 10–100 cm (nejčastěji 10–20 cm) s vnitřním průměrem od 0,2 do 2 cm s velikostí částic sorbentu přibližně mezi 1,1–50 μm (nejčastěji mezi 5–10 μm) (Henry, 2014; Křížek & Šíma, 2015). Pro ochranu kolony se někdy používá předkolona zachycující balastní částice. HPLC se používá jak v systému normálních fází (polární stacionární fáze a spíše nepolární mobilní fáze), tak především v systému reverzních fází (nepolární stacionární fáze a spíše polární mobilní fáze). Jako mobilní fáze se nejčastěji používají směsi vody, methanolu, acetonitrilu, tetrahydrofuranu či dioxanu. (Křížek & Šíma, 2015). Umožňuje separaci především tepelně nestálých a málo těkavých látek, ale zároveň sloučenin širokého rozsahu polaritativity pouze s mírnou předúpravou oproti GC (Holčapek, 2001; Moco *et al.*, 2007). Pomocí kolon s reverzní fází dokáže oddělit semipolární sloučeniny (fenolové kyseliny, flavonoidy, alkaloidy a další glykosylované látky) a pomocí hydrofilních kolon oddělit polární sloučeniny (cukry, aminocukry, aminokyseliny, vitamíny, karboxylové kyseliny a nukleotidy). Nejčastěji se v metabolomické analýze využívá v sériovém zapojení

s hmotnostní spektrometrií (Moco *et al.*, 2007; Zhang & Wang, 2022), kde toto spojení přidává další dimenzi analýzy (Holčapek, 2001).

2. 5. 2 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie je separační technika založená na interakci nabitých částic s elektrickým nebo magnetickým polem ve vakuu, která zahrnuje mnoho různých metod s jedinečnými vlastnostmi. Může poskytnout jak kvalitativní, tak kvantitativní informace o analytu (Ho *et al.*, 2003; McCullagh & Oldham, [2019]). Hmotnostní spektrometr se skládá ze čtyř hlavních částí: vstupu vzorku, iontového zdroje, analyzátoru a detektoru; jeho součástí je i vakuový systém a počítač (Greaves & Roboz, c2014; McCullagh & Oldham, [2019]).

2. 5. 2. 1 Ionizační techniky

V iontovém zdroji jsou pomocí ionizačních technik tvořeny ze vzorku a matrice ionty v plynné fázi, jelikož s neutrálními molekulami nelze manipulovat elektrickým nebo magnetickým polem. Jsou tvořeny kladně a záporně nabitě molekulární a aduktivní ionty a u některých nestabilních látek i fragmenty vstupující molekuly (Friedecký & Lemr, 2012; Greaves & Roboz, c2014). Na základě množství dodané energie při ionizaci lze ionizační techniky dělit na tvrdé a měkké. Tvrdou ionizační technikou je například elektronová ionizace (EI), kdy je energie (cca 70 eV) pro ionizaci předávána z elektronů, pocházejících ze žhavého vlákna uvnitř vakuové komory, přímo na analyt. Jelikož je předávána energie v nadbytku oproti potřebné energii k ionizaci organických látek, nazývá se EI tvrdou ionizační technikou. Vytvoří se tak velmi početné spektrum fragmentů analytu. Toto spektrum pak lze dobře identifikovat pomocí knihovny spekter. Tato technika se nejčastěji využívá ve spojení s GC (Greaves & Roboz, c2014; McCullagh & Oldham, [2019]).

U měkkých ionizačních technik je dříve ionizován reakční plyn a až poté samotný analyt, což vede k předání nižší energie na analyt, a tak vznik méně početného spektra fragmentů (hlavně iontu $[M+H]^+$ díky kterému lze zjistit molekulovou hmotnost analytu). Oproti tvrdým ionizačním technikám jsou méně efektivní, ale více strukturně selektivní. Nejčastější měkkou ionizační technikou je ionizace elektrosprejem (ESI) kvůli využitelnosti pro širší spektrum molekul (Bruins, 1998; Friedecký & Lemr, 2012; Greaves & Roboz, c2014). Přivedením vysokého napětí (přibližně 2-5 kV) na kapiláru (elektrodu), kterou je vstříkovan vzorek, a přiváděním kolmo proudícího zmlžujícího plynu (např. dusíku) jsou generovány malé nabitě kapičky ze špičky kapiláry (které jsou uvolněny, když se elektrické odpuzování stane silnější než povr-

chové napětí). Při jejich letu k opačné elektrodě jsou vystaveny smykovým silám, které deformací kapiček pomáhají jejich rozpadnutí, a je z nich postupně odpařeno rozpouštědlo, čímž se zvyšuje jejich náboj až dojde k rozpadu kapičky. Nově vzniklé kapičky díky své malé velikosti uvolňují ionty v plynné fázi do vakua se stejnou polaritou jako je aplikované napětí (nastává tzv. iontové vypařování) (Iribarne *et al.*, 1983; Bruins, 1998; Friedecký & Lemr, 2012; Greaves & Roboz, c2014). Tato technika je velmi robustní a funguje i při vyšších průtocích mobilní fáze (nad 1 ml/min). Je ovšem potřeba odstranit složky snižující iontový výtěžek (látky, které jsou ve vyšší koncentraci než zkoumané analyty a ze kterých vznikají konkurenční ionty) (Friedecký & Lemr, 2012).

Dalším příkladem měkké ionizační techniky může být desorpční ionizace vzorku laserem za asistence matrice (MALDI). Používá se pro analýzu biomakromolekul a syntetických polymerů. Vzorek je při ní smíchán s nadbytkem nejčastěji organické kyseliny (mající aromatickou část, která dokáže absorbovat fotony z laseru) jako matrice, vysušen a poté desorbován krátkým pulsem laseru (fotony o maximu absorpce matrix) ve vakuu, přičemž dochází k ionizaci matrice, která tuto energii předá analytu a dojde tak k tvorbě iontů (Marvin *et al.*, 2003; Greaves & Roboz, c2014; Niessen & Falck, Kool, 2015). Vakuum je nutné k zajištění toho, že se ionty většinou pohybují bez kolizí (Baldwin, 2005; Agin *et al.*, 2016)

2. 5. 2. 2 Analyzátor

V analyzátoru hmotnostního spektrometru dochází k separaci iontů vzniklých ionizačními technikami dle poměru hmotnosti a náboje (m/z) na základě interakce iontů s elektrickým nebo magnetickým polem. Analyzátor slouží též k dopravě iontů na detektor nebo do kolizní cely. Lze je rozdělit na tři skupiny, a to na skenující, průletové a zachycující analyzátory (v pasti nebo cele). Skenující analyzátory po celou dobu měření separují ionty s určitou hodnotou m/z , které pak jako jediné nasměrují k detektoru. Nejčastěji užívaný je kvadrupól, dále např. sektorové přístroje (Friedecký & Lemr, 2012; Greaves & Roboz, c2014). Kvadrupól (neboli iontový filtr, Q) je složen ze čtyř tyčí s vnitřním hyperbolickým nebo válcovým povrchem, na které je přiváděno stejnosměrné a vysokofrekvenční napětí, přičemž na základě jejich velikosti a amplitudy jsou dostředivou a odstředivou silou selektovány ionty s určitou hodnotou m/z , které jako jediné zaujmou stabilní oscilační trajektorii skrze kvadrupól. Všechny tyče leží ve stejné vzdálenosti od osy, přičemž protilehlé tyče mají vždy stejný náboj, který se periodicky mění vlivem fázového posunutí radiofrekvenčních složek o 180° (McCullagh & Oldham, [2019]; Thomas, 2019; Havlíček & Tureček, 2020). Kvadrupól je méně citlivý (hlavně ve skenovacím

módu kvůli jeho jednotkovému rozlišení v celém jeho hmotnostním rozsahu), má horší rozlišení a nižší horní hmotnostní rozsah než sektorové přístroje, ale je relativně levný, má kompaktní velikost a lze snadno propojit s GC nebo LC (Greaves & Roboz, c2014; Thomas, 2019). Může pracovat ve dvou módech, a to ve skenovacím, kdy jsou proměřeny ionty s celou škálou hodnot m/z , nebo v módu SIM, kdy jsou analyzovány pouze ionty s určitou hodnotou m/z (Greaves & Roboz, c2014).

Mezi průletové analyzátory patří např. analyzátor s dobou letu (TOF). Vyžaduje pulzní iontový zdroj (např. MALDI), z něž jsou ionty analytu odváděny v pulzech, nebo ortogonální posunovač, který spojitý proud iontů změní na přerušovaný (Niessen & Falck, Kool, 2015; McCullagh & Oldham, [2019]). Z doby letu trubici, délky trubice a velikosti aplikovaného elektrického pole lze pro daný iont vypočítat poměr m/z (Niessen & Falck, Kool, 2015). TOF analyzátory mají vysokou rozlišovací schopnost, kterou lze ještě zvýšit použitím reflektromu (iontového zrcadla) (Greaves & Roboz, c2014).

Jedním ze zachycujících analyzátorů je iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací (FT-ICR), která ve své měřící cele kombinuje analyzátor i detektor, kde zachycuje ionty pomocí silného magnetického pole. Cela ICR je složena ze dvojic záchytných desek (přední a zadní), excitačních desek a přijímacích desek, které jsou vždy protilehlé. Ionty jsou excitovány radiofrekvenčním pulsem na vyšší orbit a je detekován vzniklý indukovaný proud, který je Fourierovou transformací převeden do frekvenčního spektra. Vzniklé spektrum je pak přepočteno pomocí regrese na odpovídající hodnoty m/z . ICR má velmi vysoké rozlišení, jenž je přímo úměrné době zachycení iontu a velikosti magnetického pole (Niessen & Falck, Kool, 2015; McCullagh & Oldham, [2019]; Škríba *et al.*, 2020). Dalším zachycujícím analyzátozem je orbitrap, jenž na rozdíl od ICR nevyvíjí žádné magnetické pole, ale je založen na Fourierově transformaci zachycených iontů. Ionty v orbitrapu axiálně oscilují při rotaci kolem vřetenovité vnitřní elektrody vlivem napětí mezi vnitřní a vnějšími elektrodami, přičemž jejich signál proudu obrazu je detekován dvěma vnějšími pohárkovitými elektrodami, které jej převede Fourierovou transformací na frekvenční spektrum, jenž je poté převedeno do hmotnostního spektra (Zubarev & Makarov, 2013; Niessen & Falck, Kool, 2015).

2. 5. 2. 3 Tandemová hmotnostní spektrometrie

Tandemová hmotnostní spektrometrie (MS/MS) kombinuje více druhů analýzy v jednom analyzátoru (tandemové uspořádání v čase, např. u iontové pasti) či analyzátorů (tandemové uspořádání v prostoru), čímž nabývá řady výhod. Umožňuje zkoumat nejen hmotnost, ale i strukturu

iontů oproti jednoduché hmotnostní spektrometrii. (Greaves & Roboz, c2014; Niessen & Falck, Kool, 2015).

Nejznámější je trojitý kvadrupól, který sestává z dvou kvadrupólů, mezi kterými je kolizní cela (QqQ). Kolizní cela může a nemusí být na principu kvadrupólu. Prekursorové ionty vzniklé v prvním kvadrupólu jsou přiváděny do kolizní cely, kde jsou vlivem vyššího tlaku, urychlení el. polem z předchozího kvadrupólu (kolizní energie) a srážkám s atomy nebo molekulami kolizního plynu (např. dusík, argon) fragmentovány na produktové ionty (nastane tzv. kolizně indukovaná disociace, CID), které poté procházejí druhým kvadrupólem (Friedecký & Lemr, 2012; Greaves & Roboz, c2014; McCullagh & Oldham, [2019]). Ve většině případů dochází ke ztrátě hmotnosti (např. ztrátou neutrálního fragmentu z prekursorového iontu) nebo změně náboje iontu analytu (Niessen & Falck, Kool, 2015). Kromě CID může mezi prvním a druhým kvadrupólem také nastat např. disociace elektronového přenosu (ETD) nebo separace iontové mobility (IMS) (Greaves & Roboz, c2014). Trojitý kvadrupól může pracovat ve čtyřech režimech. První režim je sken produktových iontů, kdy první Q pracuje ve SIM módu a druhý ve skenovacím módu, který se používá pro kvalitativní analýzu. Dalším je sken prekursorových iontů, kdy první Q je ve skenovacím módu a druhý v SIM módu, který se využívá pro analýzu molekul se stejnou funkční skupinou. Třetím je sken neutrální ztráty, kdy oba Q jsou ve skenovacím módu, jež je využit pro selektivní rozpoznání všech iontů, které fragmentací vedou ke ztrátě daného neutrálního fragmentu (de Hoffmann, 1996; Zhang & Wang, 2022). Poslední režim je sledování rozpadu iontu (SRM, někdy nazývaný také MRM), kdy jsou oba Q v SIM módu, ve kterém je měřen kvalitativní parametr hmotnostní přechod (definován dvěma hodnotami m/z) a který se používá pro kvantifikaci (McCullagh & Oldham, [2019]; Zhang & Wang, 2022).

Existují také hybridní tandemová uspořádání, kde jsou místo dvou kvadrupólů dva odlišné typy analyzátorů, např. první analyzátor kvadrupól a poslední analyzátor lineární iontová past (Q-LIT) nebo uspořádání první analyzátor kvadrupól a poslední analyzátor TOF (Q-TOF) (Guo & Turesky, 2019).

2. 5. 3 Průtoková injekční analýza ve spojení s hmotnostní spektrometrií

Průtoková injekční analýza ve spojení s hmotnostní spektrometrií (FIA-MS) je automatická nebo poloautomatická analytická metoda, při které jsou vzorky vstříkovány do plynule tekoucího proudu kapaliny s následnou detekcí analytu v MS. To umožňuje rychlé měření více ana-

lytů s vysokou citlivostí a specificitou (Stewart, 1981; Yue *et al.*, 2022). FIA byla speciálně navržena pro analýzu kapalin (Nanita & Kaldon, 2016).

Oproti chromatografickým metodám ve spojení s MS je FIA-MS rychlejší a jednodušší, ale méně selektivnější (nedokáže purifikovat analyty a odstranit matricové efekty) a může vyžadovat častější čištění iontového zdroje (pro prevenci je často používáno vysoké ředění vzorku, což je tzv. zřed' a vystřel, anglicky dilute-and-shoot, přístup) (Stahnke *et al.*, 2012; Nanita & Kaldon, 2016). Samotná FIA má oproti jiným průtokovým metodám, např. kontinuální průtokové analýze (CFA), jiný tvar chromatografických píků vlivem např. odstranění vzduchové segmentace nosného proudu a vstřikování omezeného objemu roztoku vzorku (Trojanowicz & Kołacińska, 2016). Všechny analyty jsou u FIA eluovány v jednom čase, a tak samostatná FIA není separační technikou (*FIA: Flow Injection Analysis (pressure only, NO voltage)*, 2020). Pro své vlastnosti je spojení FIA-MS využívána pro kvantitativní screening chemikálií (např. léčiv, pesticidů a látek znečišťujících prostředí) jak v metabolomice, tak v klinické diagnostice, environmentálních vědách, toxikologii a detekci padělaného zboží (Nanita & Kaldon, 2016).

2. 5. 4 Spektroskopie nukleární magnetické rezonance

NMR je jednou z nejčastějších analytických metod v metabolomice. (Moco *et al.*, 2007; Emwas *et al.*, 2019). NMR je založena na měření napětí vzniklé vychýlené (o 90' nebo 180') makroskopické magnetizace vybraných jader pomocí cívky. Jádra jsou přiměna k rezonanci vlivem radiofrekvenčního pulsu, při kterém lze velikostí statického (B_0) a transverzálního (B_T) magnetického pole zvolit typ jader, jež budou měřena. Po určité době po pulsu se jádra opět vrací do původního stavu (tzv. relaxační zpoždění). Měřit lze pouze jádra s lichým počtem protonů nebo neutronů, jelikož pouze ony mají nenulový magnetický moment (Mitschke *et al.*, 2023).

NMR je vysoce selektivní, nedestruktivní a reprodukovatelná metoda, která vyžaduje malou nebo žádnou přípravu vzorku, ale s relativně nižší citlivostí oproti MS, kvůli čemuž jsou potřeba větší objemy vzorku (Horgan *et al.*, 2009; Lei *et al.*, 2011). Touto metodou lze analyzovat i neporušené tkáně a orgány např. pomocí NMR v pevném stavu (ssNMR), ale také živé vzorky např. prostřednictvím magnetické rezonance (MRI) (Emwas *et al.*, 2019). Využívá se k určení primárních a stereochemických struktur biomakromolekul, syntetických i přírodních látek (Kikuchi *et al.*, 2018). Možností zaznamenávat NMR spektra pro více různých jader lze studovat různé třídy metabolitů (Emwas *et al.*, 2019). NMR lze dělit na více typů, např. na protonovou ^1H , uhlíkovou ^{13}C a fosforovou ^{31}P magnetickou rezonanční spektroskopii (Emwas *et al.*, 2019).

NMR byla aplikována pro studium metabolomu moči pacientů s RCC, a to samostatně (Monteiro *et al.*, 2016), v kombinaci s LC-MS a strojovým učením (Bifarin *et al.*, 2021) nebo kupříkladu v kombinaci s transkriptomikou (Ragone *et al.*, 2016), nebo také pro studium metabolomu moči pacientů s kolorektálním karcinomem (Kim *et al.*, 2019) či např. pacientů se zá-
nětlivým onemocněním střev (IBD) (Schicho *et al.*, 2012).

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiál a chemikálie

3.1.1 Biologický materiál

Vzorky moči pro experimentální část bakalářské práce byly poskytnuty skrze Fakultní nemocnici Olomouc a Fakultu chemicko-technologickou Univerzity Pardubice. Vzorky byly odebírány průběžně od r. 2015 do 2020 a to od pacientů s RCC a od zdravých kontrol bez předchozí anamnézy. Pohlaví, počet vzorků, medián a rozptyl věků pacientů s RCC a zdravých kontrol jsou uvedeny v tab. 1 a kategorie klasifikace nádorů pacientů s RCC pro jednotlivá pohlaví jsou uvedeny v tab 2.

Tab. 1: Pohlaví, počet vzorků, medián a rozptyl věků pacientů s RCC a zdravých kontrol

| | Pacienti s RCC | | Zdravé kontroly | |
|--------------|----------------|-------|-----------------|-------|
| | Muži | Ženy | Muži | Ženy |
| Pohlaví | Muži | Ženy | Muži | Ženy |
| Počet vzorků | 94 | 53 | 68 | 32 |
| Medián věků | 68 | 71 | 59 | 53 |
| Rozptyl věků | 35-92 | 45-83 | 30-79 | 29-68 |

Tab. 2: Kategorie klasifikace nádorů pacientů s RCC pro jednotlivá pohlaví dle normy 7. vydání TNM klasifikace (dostupné z <https://www.uzis.cz/sites/default/files/knihovna/tnm-7.pdf>)

| Kategorie | | Muži | Ženy | |
|-----------------|-----|------|------|----|
| TNM klasifikace | Gx | 5 | 4 | |
| | G1 | 16 | 8 | |
| | G | G1-2 | 0 | 1 |
| | | G2 | 28 | 17 |
| | | G3 | 25 | 9 |
| | | G4 | 7 | 2 |
| | Tx | 1 | 0 | |
| | T | cT1a | 1 | 1 |
| | | pT1a | 41 | 14 |
| | | pT1b | 9 | 6 |
| | | pT2 | 1 | 1 |
| | | pT2a | 2 | 6 |
| | | pT2b | 1 | 1 |
| | | cT3 | 0 | 1 |
| | | pT3 | 2 | 0 |
| | | pT3a | 21 | 12 |
| | | cT3b | 1 | 0 |
| | | pT3b | 1 | 1 |
| | N | N0 | 67 | 38 |
| | | N1 | 2 | 0 |
| | | cN0 | 1 | 1 |
| | | cN1 | 1 | 0 |
| | | pNx | 0 | 1 |
| | | pN0 | 4 | 1 |
| | | pN1 | 3 | 1 |
| | | pN2 | 2 | 0 |
| | M | M0 | 68 | 37 |
| M1 | | 5 | 2 | |
| pM0 | | 2 | 1 | |
| cM1 | | 3 | 2 | |
| | pM1 | 3 | 0 | |
| Benigní nádor | | 5 | 6 | |
| Neznámá | | 4 | 1 | |

3. 1. 2 Přístrojové vybavení

Kapalinový chromatograf Exion LC (Sciex, Framingham, MA, USA), hmotnostní spektrometr QTRAP 6500+ (Sciex, Framingham, MA, USA); ESI (gas ½: 50 psi, -4500/+5500, 450 °C), kolona Luna (3 µm NH₂, 100 Å, 2 × 100 mm, Phenomenex, Torrance, USA), kapalinový chromatograf UltiMate 3000 RS (Dionex, Sunnyvale, CA, USA), hmotnostní spektrometr

Triple Quad 6500+ (Sciex, Framingham, MA, USA); ESI (gas 1/2: 50 psi, -4500/+5500 V, 450 °C), pH metr (Orion Star A111, Thermo scientific, Waltham, MA, USA), třepačka (V-1 plus, Biosan, Riga, Lotyšsko), pipeta elektronická osmikanálová (Picus, Sartorius AG, Göttingen, Německo), automatické pipety (Eppendorf), mikrozkušavky.

3. 1. 3 Chemikálie

Acetonitril (MeCN, HiPerSolv CHROMANORM® for LC-MS, VWR International, Radnor, PA, USA)

Deionizovaná voda (H₂O, CHROMASOLV™ LC-MS, Riedel-de Haën, Honeywell, Charlotte, NC, USA)

Kyselina mravenčí (HCOOH, 98%, w/v, ACS grade, Carl Roth, Karlsruhe, Německo)

Kyselina octová (CH₃COOH, HiPerSolv CHROMANORM® for LC-MS, VWR International, Radnor, PA, USA)

Methanol (MeOH, HiPerSolv CHROMANORM® for LC-MS, VWR International, Radnor, PA, USA)

Roztok amoniaku (20-22 %, VWR International, Radnor, PA, USA)

Roztok butyryl-L-karnitinu-(N-methyl-D3) (C4-D3) o koncentraci 100 μmol·l⁻¹

Roztok hexanoyl glycinu-¹³C₂,¹⁵N o koncentraci 11,5 μmol·l⁻¹

Roztok homovanilové kyseliny-¹³C₆,¹⁸O (HVA-13C₆,18O) o koncentraci 200 μmol·l⁻¹

Roztok isovaleryl-DL-karnitinu-D9 (C5-D9) o koncentraci 0,1 μmol·l⁻¹

Roztok kreatininu-D3 o koncentraci 20 000 μmol·l⁻¹

Roztok kyseliny adipové-D10 o koncentraci 20 000 μmol·l⁻¹

Roztok kyseliny orotové-¹⁵N₂ o koncentraci 10 μmol·l⁻¹

Roztok laktátu-¹³C₃ o koncentraci 490 μmol·l⁻¹

Roztok leucinu-D3 o koncentraci 10 000 μmol·l⁻¹

Roztok methylmalonové kyseliny-D3 (MMA D3) o koncentraci 200 μmol·l⁻¹

Roztok methylsukcinátu-D6 (MetSucc D6) o koncentraci 20 000 μmol·l⁻¹

Roztok standardu kreatininu o koncentraci $100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$

Roztok uracilu- $^{15}\text{N}_2$ o koncentraci $20\,000 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$

3. 2 Metody

3. 2. 1 Stanovení kreatininu v moči

3. 2. 1. 1 Příprava vzorků a mobilní fáze

Jako mobilní fáze byla použita směs methanolu, acetonitrilu a vody v poměru 2:2:1 (v/v) a 0,1% kys. mravenčí. Vzorky moči byly nejprve rozmrazeny a poté ředěny ve dvou krocích. V prvním kroku bylo smícháno 20 μl moče a 1 980 μl vody. V druhém kroku byly smíchány 2 μl naředěné moče z 1. kroku, 10 μl $20\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ IS (kreatinin D3) a 188 μl mobilní fáze pro každý vzorek. Moč tak byla 10 000x zředěna. Zároveň byla sestrojena i 10 bodová kalibrační řada, která byla vytvořena smícháním 4 μl kalibrátoru (standard kreatininu), 10 μl IS a 186 μl mobilní fáze. Jednotlivé kalibrační body byly o koncentracích: $2 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, $1,5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, $1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, $0,8 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, $0,6 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, $0,4 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, $0,2 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, $0,1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, $0,05 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a $0,025 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$.

3. 2. 1. 2 Optimalizace MS podmínek pro kvantitativní stanovení kreatininu

Optimalizace podmínek MS metody pro stanovení kreatininu bylo provedeno pomocí přímého nástřiku standardů kreatininu ($c = 1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) a kreatininu-D3 ($c = 1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) do hmotnostního spektrometru Triple Quad 6500 (Sciex) s průtokem $7 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$. Tyto standardy byly naředěny ze zásobních roztoků v mobilní fázi. Analyty byly takto podrobeny fragmentační analýze, kdy systém automaticky vybírá 10 MRM přechodů s nejvyšší intenzitou. Následně byly tyto standardy o $c = 10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ podrobeny FIA-MS analýze pomocí kapalinového chromatografu UltiMate 3000 (Dionex) s průtokovou rychlostí $0,2 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ a nástřikem vzorku 1 μl pro zjištění nejvhodnějších přechodů pro následnou kvantitativní analýzu. Pro kreatinin-D3 byly vybrány přechody $117,245 > 47,1$ a $117,245 > 43,0$, pro standard kreatininu přechody $114,221 > 43,9$ a $114,221 > 86,1$. Ostatní fragmenty byly vyloučeny z důvodu nízké hodnoty signálu ku šumu (S/N).

3. 2. 1. 3 Měření koncentrace kreatininu

Kreatinin byl u všech vzorků moči a roztoků bodů kalibrace změřen metodou FIA-MS za pomoci kapalinového chromatografu UltiMate 3000 RS a hmotnostního spektrometru Triple

Quad 6500 s průtokovou rychlostí $0,2 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ a nástřikem vzorku $1 \mu\text{l}$. Se vzory byly zároveň analyzovány i slepé vzorky (blank) pro zjištění případné interference ve vzorcích. Jako blank 1 byla použita výše popsaná MF a jako blank 2 roztok $12 \mu\text{l}$ vody LC-MS kvality a $188 \mu\text{l}$ MF. Koncentrace kreatininu ve vzorcích byla poté vypočítána pomocí vytvořené kalibrace (viz obr. 6).

3. 2. 2 Cílená metabolická analýza vzorků moči pacientů s karcinomem ledvin a zdravých kontrol

3. 2. 2. 1 Příprava interních standardů

Směs interních standardů byla připravena smísením roztoků IS tak, aby výsledné hodnoty jejich koncentrací byly co nejbližší hodnotám koncentrací jednotlivých sloučenin v moči (viz tab. 3); směs byla poté doplněna vodou LC-MS kvality do 3 ml.

Tab. 3: Hodnoty koncentrací jednotlivých IS ve směsi a ve vzorku

| Název IS | Koncentrace IS ve směsi ($\mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$) | Koncentrace IS ve vzorku ($\mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$) |
|--|--|---|
| Methylmalonová kyselina-D3 | 186,67 | 16,97 |
| Hexanoyl glycin- $^{13}\text{C}2, ^{15}\text{N}$ | 10,73 | 0,98 |
| Homovanilová kyselina- $^{13}\text{C}6, ^{18}\text{O}$ | 186,67 | 16,97 |
| isovaleryl-DL-karnitin-D9 | 0,09 | 0,01 |
| Kyselina orotová- $^{15}\text{N}2$ | 9,33 | 0,85 |
| Laktát- $^{13}\text{C}3$ | 457,33 | 41,58 |
| Kreatinin-D3 | 220,00 | 20,00 |
| Uracil- $^{15}\text{N}2$ | 22,00 | 2,00 |
| Methylsukcinát-D6 | 55,00 | 5,00 |
| Kyselina adipová-D10 | 110,00 | 10,00 |
| Butyryl-L-karnitin-(N-methyl-D3) | 0,55 | 0,05 |
| Leucin-D3 | 55,00 | 5,00 |

3. 2. 2. 2 Příprava vzorků a mobilní fáze

Vzorky moči byly rozmrazeny na ledu, promíchány a zředěny vodou LC-MS kvality tak, aby jejich koncentrace odpovídala $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ kreatininu ve 100 μl vzorku. Ke zředěným vzorkům o objemu 100 μl bylo vždy přidáno 10 μl směsi IS, vzniklé roztoky byly promíchány na třepačce a z každého bylo odebráno 5 μl na tvorbu 9 vzorků kontroly kvality (QC). Jako blank 1 byla použita voda LC-MS kvality, jako blank 290 μl vody LC-MS kvality a 10 μl směsi IS.

Mobilní fáze A pro metabolomickou analýzu byla vytvořena smícháním 1,48 ml kyseliny octové s 1,2985 l vody LC-MS kvality tak, aby výsledná koncentrace kys. octové byla 20 mmol/l. U vzniklého roztoku bylo pak upraveno pH na 9,75 pomocí roztoku amoniaku za použití pH metru při 25 °C. Jako mobilní fáze B byl použit čistý acetonitril LC-MS kvality.

3. 2. 2. 3 Metabolomická analýza

Pořadí přípravy a analýzy vzorků bylo podrobena dvojitě randomizaci. Cílená metabolomická LC-MS/MS analýza vzorků moči pacientů s RCC a zdravých kontrol byla provedena metabolomickou metodou dle Karlíkové *et al.* (2016) pomocí kapalinového chromatografu Exion LC, hmotnostního spektrometru QTRAP 6500+ a aminopropylové kolony Luna (3 μm NH_2 , 100 Å, $2 \times 100 \text{ mm}$, Phenomenex). Kolona byla udržována při 35 °C. Parametry iontového zdroje a plynů hmotnostního spektrometru byly nastaveny na: napětí iontového spreje +5500 V a -4500 V; clonový plyn 40 psi; oba plyny iontového zdroje 40 psi a teplota zdroje 400 °C. Analýza probíhala v režimu plánované vícenásobné sledování reakcí (scheduled MRM) v systému přepání polarit během analýzy. Každý osmý nástřik v sekvenci byl nástřik směšného QC vzorku.

Lineární gradient eluce mobilních fází byl následující: 0 min: 95 % MF B a 5 % MF A; 7 min: 10 % MF B a 90 % MF A; 13 min: 10 % MF B a 90 % MF A; 13,5 min: 95 % MF B a 5 % MF A; 17 min: 95 % MF B a 5 % MF A. Průtok MF byl $0,3 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$, celková doba analýzy byla 17 minut a nástřik vzorku byl nastaven na 1,0 μl .

3. 2. 3 Zpracování dat a statistická analýza

Záznam LC-MS/MS dat byl proveden v softwaru Analyst 1.7 (Sciex) a následně byla naměřená data zpracována v softwaru Sciex OS 2.0.0 (Sciex). Surová data byla exportována jako plochy všech změřených analytů a dále zpracována v programovacím jazyku R (verze 3.6.3, 2020, www.r-project.org) a programu R studio (2023.12.1+402, 2024, dostupný na adrese

<https://posit.co/download/rstudio-desktop/>) pomocí balíčku Metabol (AlzbetaG, 2019). Jeden vzorek kontroly DV 200 byl úplně odstraněn úplně z důvodu chybně naměřené koncentrace kreatininu.

Korekce ploch analytů a interpolace dat byla provedena metodou LOESS („locally weighted regression“) na základě analýzy QC vzorků a centrována na nulu. Metabolity s variačním koeficientem (CV) vyšším než 30 % u vzorků QC byly vyloučeny. Dále byla data převedena na plochy vynásobením mediánem ploch QC vzorků pro každý analyt a vztažena na plochu příslušného interního standardu (viz tab. 4).

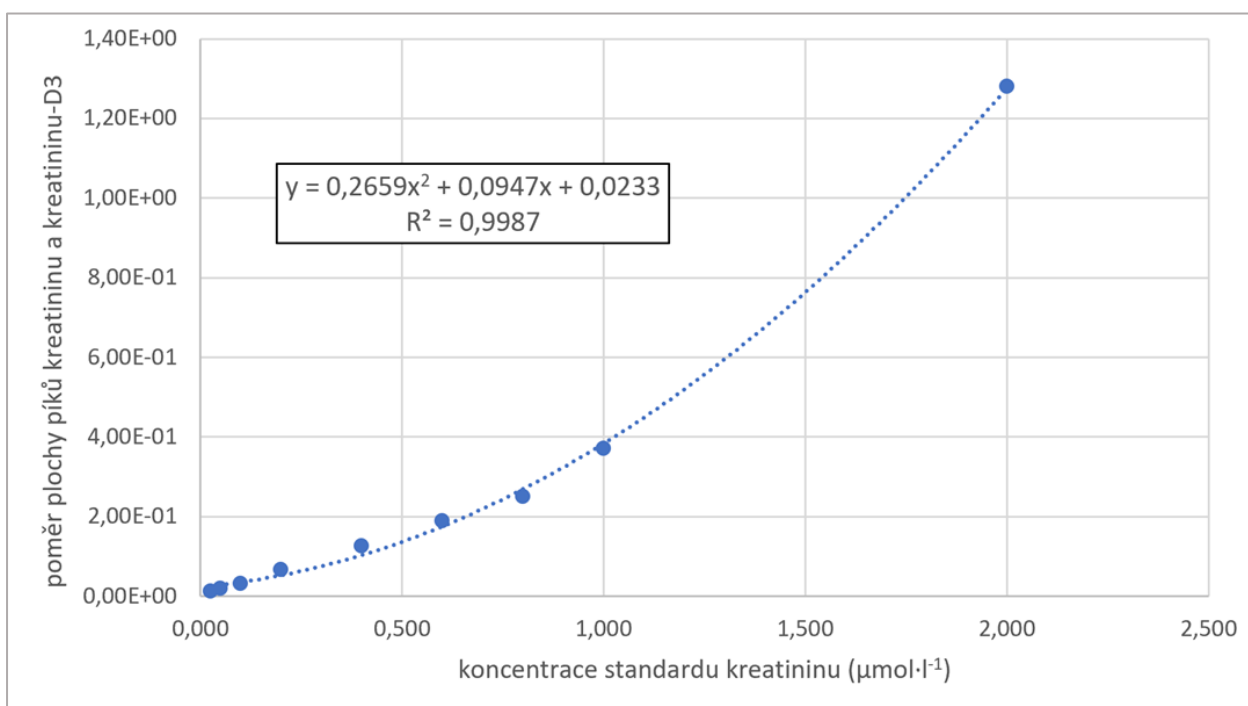
Na získané výsledky byly použity metody vícerozměrné analýzy s grafickými výstupy, a to jak s nesupervizovaným přístupem (metoda analýzy hlavních komponent (PCA)), tak se supervizovaným přístupem – metoda diskriminační analýzy nejmenších čtverců (PLS-DA) a také metoda ortogonální diskriminační analýzy nejmenších čtverců (OPLS-DA) s S-ploty a permutačními testy. Byly použity i metody jednorozměrné analýzy ($\alpha = 0,05$), kdy získané rozdíly mediánů a p-hodnoty byly zobrazeny pomocí krabicových a vulkánových grafů.

Pomocí metod PCA a PLS-DA a vulkánových grafů byly mezi sebou porovnány skupiny: pacienti s RCC (muži i ženy), zdravé kontroly (muži i ženy), pacienti (muži) s RCC, pacientky s RCC, zdravé kontroly muži a zdravé kontroly ženy. Na základě statistické významnosti bylo vybráno 17 metabolitů společných pro muže a ženy. Vybrané statisticky významné metabolity byly pak zobrazeny pomocí krabicových grafů.

4 VÝSLEDKY

4.1 Stanovení kreatininu v moči

Hodnoty získané analýzou koncentrace kreatininu kalibračních bodů byly použity na vytvoření kalibrační křivky a kvadratické regresní rovnice (viz obr. 6), pomocí které byly vypočítány koncentrace kreatininu ve všech vzorcích moči.



Obr. 6: Graf závislosti koncentrace standardu kreatininu na poměru plochy pík kreatininu a kreatininu-D3 s kalibrační křivkou.

4. 2 Cílená metabolomická analýza vzorků moči

Cílenou metabolomickou analýzou bylo v 247 vzorcích, z nichž bylo 147 vzorků pacientů s RCC a 100 vzorků zdravých kontrol (viz tab. 1), zjištěno 174 metabolitů. Z těchto metabolitů bylo vyřazeno pět metabolitů (N-acetyl-L-methionin, 2-fenylacetát, 3-fenylserin, hexanoylglycin a tetradekanoyl-L-karnitin) z důvodu překročení hodnoty CV 30 %; dále se tedy pracovalo se 169 metabolity. Následně byla kohorta rozdělena do čtyř skupin: muži, ženy, zdravé kontroly a pacienti, na základě známých alterací v metabolomu žen a mužů. Na získané výsledky byly poté použity metody statistické analýzy, a to jak vícerozměrné analýzy se nesupervizovaným a supervizovaným přístupem, tak metody jednorozměrné analýzy. Seznam takto zpracovaných metabolitů je uveden v tab. č. 4.

Tab. 4: Zkrácené a celé názvy metabolitů s příslušnými použitými interními standardy

| Zkrácený název metabolitu | Celý název metabolitu | IS |
|------------------------------|--|----------------------------|
| 1mHIS | 1-methylhistidin | leucin-D3 |
| 1mHISamine | 1-methylhistamin | leucin-D3 |
| 1mNicotinate | 1-methylnikotinát (trigonellin) | methylmalonová kyselina-D3 |
| 1mX | 1-methylxantin | uracil-15N2 |
| 2aminoAdipate | 2-aminoadipát (2-aminohexanedioát) | methylsukcinát-D6 |
| 2ohButanoate_2ohIsobutanoate | 2-hydroxybutanoát/ 2-hydroxyisobutanoát | methylsukcinát-D6 |
| 2ohGlutarate | 2-hydroxyglutarát | methylsukcinát-D6 |
| 2ohIsovalerate | 2-hydroxyisovalerát (2-hydroxy-3-methylbutyrát) | methylmalonová kyselina-D3 |
| 3aminoIsobutanoate | 3-aminoisobutanoát | methylsukcinát-D6 |
| 3indoxylSulphate | 3-indoxylsulfát | leucin-D3 |
| 3mHIS | 3-methylhistidin | leucin-D3 |
| 3ohPhenylProp | 3-hydroxyfenylpropionát | methylsukcinát-D6 |
| 4ohBenzaldehyde | 4-hydroxybenzaldehyd | methylsukcinát-D6 |
| 4Pyridoxate | 4-pyridoxát | methylsukcinát-D6 |
| 5mthioAr | 5-methylthioadenosin | kreatinin-D3 |
| 5ohIndolAcetate | 5-hydroxyindolacetát | methylsukcinát-D6 |
| 5oxoPRO_homoPRO | 5-oxoprolin (pyroglutamát)/ L-homoprolin (L-pipecolát, L-piperidin-2-karboxylát) | leucin-D3 |
| 7mG | 7-methylguanin | uracil-15N2 |
| 16anhydroGLC | 1,6-anhydro- β -D-glucose | methylsukcinát-D6 |
| acetylALA | N-acetyl-L-alanin | leucin-D3 |
| acetylASP | N-acetylaspartát | leucin-D3 |
| acetylGLU | N-acetylglutamát | leucin-D3 |
| acetylHexosesNH2.2 | N-acetyl-3-amino hexosy | kreatinin-D3 |
| acetylORN | N-acetylornitin | leucin-D3 |
| acetylPutrescine | N-acetylputrescin | kreatinin-D3 |

Tab. 4: Zkrácené a celé názvy metabolitů s příslušnými použitými interními standardy (pokračování)

| | | |
|-------------------|---|----------------------------------|
| Aconitate | akonitát | methylmalonová kyselina-D3 |
| AICAriboside | akadesin | uracil-15N2 |
| AIr | 5-aminoimidazol ribotid | uracil-15N2 |
| ALA | alanin | leucin-D3 |
| Allantoin | allantoin | uracil-15N2 |
| Ar | hypoxkreatinin | kreatinin-D3 |
| Ar.homoCYS | S-adenosyl-L-homocystein | kreatinin-D3 |
| Ar.MET | S-adenosyl methionin | kreatinin-D3 |
| Arabitol_Ribitol | arabitol, ribitol | methylsukcinát-D6 |
| ARG | L-arginin | leucin-D3 |
| Argininosuccinate | argininosukcinát | methylsukcinát-D6 |
| ASN | L-asparagin | leucin-D3 |
| ASP | kyselina asparagová | leucin-D3 |
| benzoylALA | N-benzoyl-L-alanin | leucin-D3 |
| betaALA | β-alanin | leucin-D3 |
| betaALA.3mHIS | β-alanin, 3-methylhistidin | leucin-D3 |
| Betain | betain | leucin-D3 |
| C | cytosin | uracil-15N2 |
| Car00 | L-karnitin | butyryl-L-karnitin-(N-methyl-D3) |
| Car02 | acetyl-L-karnitin | butyryl-L-karnitin-(N-methyl-D3) |
| Car02.DC_Car03.OH | 3-hydroxypropionyl-L-karnitin | butyryl-L-karnitin-(N-methyl-D3) |
| Car03 | propionyl-L-karnitin | butyryl-L-karnitin-(N-methyl-D3) |
| Car03.DC_Car04.OH | malonyl-L-karnitin/3-hydroxybutyryl-L-karnitin | butyryl-L-karnitin-(N-methyl-D3) |
| Car04 | butyryl-L-karnitin/isobutyryl-L-karnitin | butyryl-L-karnitin-(N-methyl-D3) |
| Car04.1 | butenyl-L-karnitin | butyryl-L-karnitin-(N-methyl-D3) |
| Car04.DC_Car05.OH | sukcinyln-L-karnitin(methylmalonyl-L-karnitin)/3-hydroxyisovaleryl-L-karnitin | butyryl-L-karnitin-(N-methyl-D3) |
| Car05 | valeryl-L-karnitin(pentanoyl-L-karnitin)/isovaleryl-L-karnitin(3-methylbutyryl-L-karnitin)/2-methylbutyryl-L-karnitin | butyryl-L-karnitin-(N-methyl-D3) |
| Car05.1 | tiglyl-L-karnitin(2-methylbut-2-enoyl-L-karnitin)/3-methylkrotonyl-L-karnitin(3-methylbut-2-enoyryl-L-karnitin) | butyryl-L-karnitin-(N-methyl-D3) |
| Car05.DC_Car06.OH | glutaryl-L-karnitin/ 3-hydroxyhexanoyl-L-karnitin | butyryl-L-karnitin-(N-methyl-D3) |
| Car06 | hexanoyl-L-karnitin(kaproyl-L-karnitin) | butyryl-L-karnitin-(N-methyl-D3) |
| Car06.1 | 2-transhexenoyl-L-karnitin | butyryl-L-karnitin-(N-methyl-D3) |

Tab. 4: Zkrácené a celé názvy metabolitů s příslušnými použitými interními standardy (*pokračování*)

| | | |
|-----------------------------------|---|--------------------------------------|
| Car06.DC_Car07.OH | hexandioylkarnitin (adipoyl; methylglutaryl) /hydroxyheptanoylkarnitin | butyryl-L-karnitin- (N-methyl-D3) |
| Car07.DC_Car08.OH | pimelyl-L-karnitin/3- hydroxyoktanoyl-L-karnitin | butyryl-L-karnitin- (N-methyl-D3) |
| Car08 | oktanoyl-L-karnitin | butyryl-L-karnitin- (N-methyl-D3) |
| Car08.1 | 2-transoktenoyl-L-karnitin | butyryl-L-karnitin- (N-methyl-D3) |
| Car09 | nonanoyl-L-karnitin | butyryl-L-karnitin- (N-methyl-D3) |
| Car10 | dekanoyl-L-karnitin | butyryl-L-karnitin- (N-methyl-D3) |
| Car10.1 | 4-cis-decenoyl-L-karnitin | butyryl-L-karnitin- (N-methyl-D3) |
| Car10.2 | 2-trans-4-cisdekadienoyl-L- karnitin | butyryl-L-karnitin- (N-methyl-D3) |
| Car12 | dodekanoyl-L-karnitin (lauroyl-L- karnitin) | butyryl-L-karnitin- (N-methyl-D3) |
| Car12.1 | trans-2-dodecenoyl-L-karnitin | butyryl-L-karnitin- (N-methyl-D3) |
| Car14.1 | trans-2-tetradecenoyl-L-karnitin (cis-5-tetradecenoylkarnitin) | butyryl-L-karnitin- (N-methyl-D3) |
| Car14.1.OH | 3-hydroxytetradec-9-enoyl-L- karnitin | butyryl-L-karnitin- (N-methyl-D3) |
| Car14.2 | tetradeka-5,8-dienoyl-L-karnitin | butyryl-L-karnitin- (N-methyl-D3) |
| Car14.2.OH | 3-hydroxytetradekadienoyl-L- karnitin(5-cis, 8-cis) | butyryl-L-karnitin- (N-methyl-D3) |
| Car16 | palmitoyl-L-karnitin | butyryl-L-karnitin- (N-methyl-D3) |
| Car18.1.OH | 3-hydroxyoktadec-9-enoyl-L- karnitin | butyryl-L-karnitin- (N-methyl-D3) |
| Carnosine | karnosin | leucin-D3 |
| Citrate_Isocitrate | citrát, isocitrát | methylsukcinát-D6 |
| Citrulline | L-citrulin | leucin-D3 |
| Cr | kreatin | kreatinin-D3 |
| Creatine_5nh2Levil | kreatin(N-methyl-N- guanylglycin)/5-aminolevulinát(5- amino-4-oxovalerát) | kreatinin-D3 |
| Creatinine | kreatinin | kreatinin-D3 |
| CYS | L-cystein | leucin-D3 |
| Cystathionine | L-cystathionin | leucin-D3 |
| Cystine | L-cystin | leucin-D3 |
| dimethylARG | dimethylarginin | leucin-D3 |
| FGAr | N-formylglycinamid ribosid | kreatinin-D3 |
| Fumarate_Caproate_3m2oxoButanoate | fumarát, kapronát, 3-methyl-2- oxobutanoát | methylsukcinát-D6 |
| fuoylGLY | fuoylglycin | leucin-D3 |
| Galactitol_Mannitol | D-galaktitol/D-mannitol | methylsukcinát-D6 |

Tab. 4: Zkrácené a celé názvy metabolitů s příslušnými použitými interními standardy (pokračování)

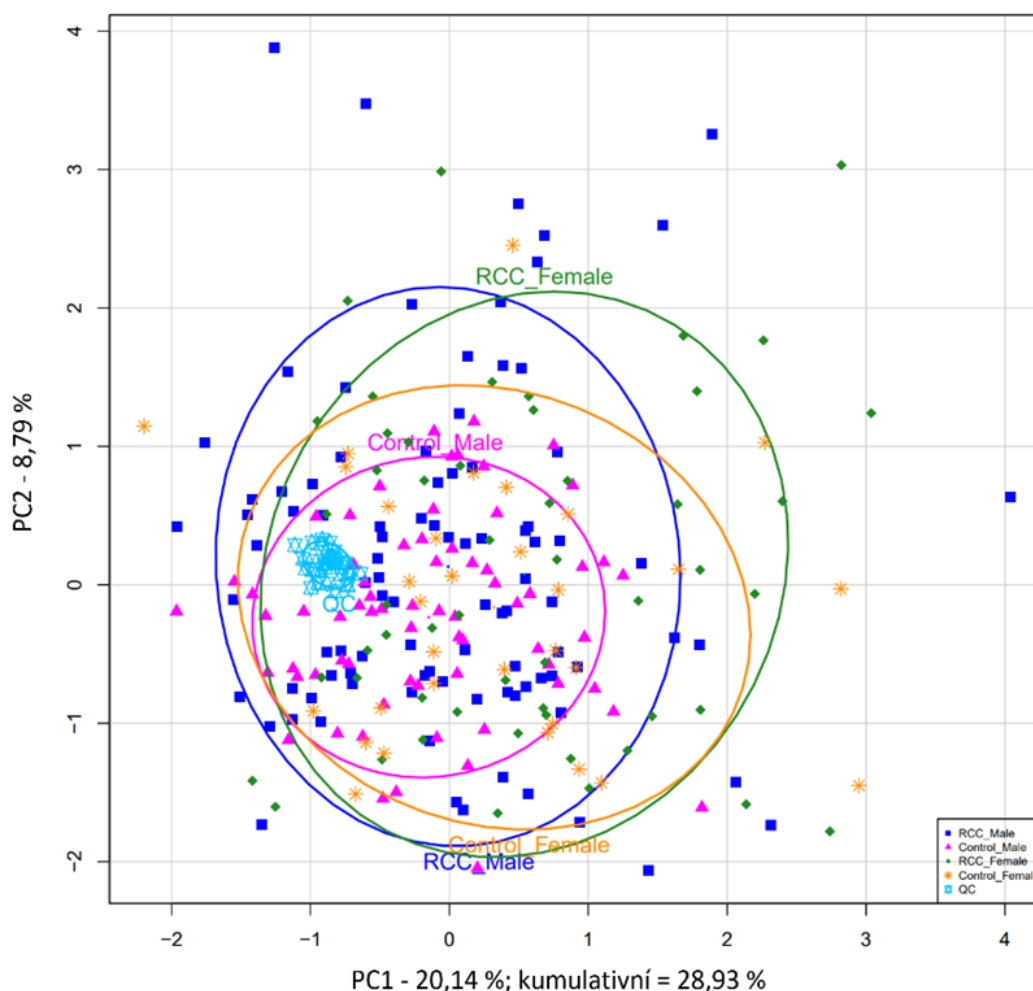
| | | |
|--|--|----------------------------|
| GLCnh2 | glukosamin (2-amino-2-deoxy-D-glukopyranosa) | kreatinin-D3 |
| GLN | L-glutamin | leucin-D3 |
| GLU | L-glutamát | leucin-D3 |
| Gluconate | glukonát | methylsukcinát-D6 |
| Glucuronate | glukuronát | methylsukcinát-D6 |
| Glutaconate_ketoLEU_MevalonoLactone_2-oxoILE | glutakonát, ketoleucin, mevalonolakton, 2-oxoisoleucin | methylsukcinát-D6 |
| GLY | glycin | leucin-D3 |
| GLY.PHE | dipeptid glycinu a fenylalaninu | leucin-D3 |
| Glycerate | glycerát | methylsukcinát-D6 |
| GuaAcetate | guanidinoacetát | kreatinin-D3 |
| GuaButanoate | guanidinobutanoát | kreatinin-D3 |
| Hexose2 | hexosy 2 | methylsukcinát-D6 |
| Hexoses | hexosy | methylsukcinát-D6 |
| hippurate | hippurát (N-benzoylglycin) | leucin-D3 |
| HIS | L-histidin | leucin-D3 |
| homoARG | L-homoarginin | leucin-D3 |
| homoCYS | L-homocystein | leucin-D3 |
| homoVanillate | homovanilát | methylsukcinát-D6 |
| Hr | inosin | kreatinin-D3 |
| Hx | hypoxanthin | kreatinin-D3 |
| Choline | cholin | kreatinin-D3 |
| ILE_aILE | L-isoleucin/L-alloisoleucin | leucin-D3 |
| indole3Acetate | indol-3-acetát | methylsukcinát-D6 |
| indolePropionate | indol-3-propionát | methylsukcinát-D6 |
| isobutyrylGLY_butrylGLY | isobutyrylglycin, butyrylglycin | leucin-D3 |
| Kynurenate | kynurenát | methylsukcinát-D6 |
| Kynurenine | kynurenin | leucin-D3 |
| LAC_MAL_MEL_SUC | laktosa, maltosa, melibiosa, sacharosa | methylsukcinát-D6 |
| Lactate | Laktát | methylmalonová kyselina-D3 |
| LEU.2 | L-leucin 2 | leucin-D3 |
| LEU_ILE_aILE_norLEU_ohPRO | L-leucin, L-isoleucin, L-norleucin, L-hydroxyprolin | leucin-D3 |
| Leucinate | leucinát (2-hydroxyisokaproát) | methylsukcinát-D6 |
| Levulinate | levulinát | methylsukcinát-D6 |
| LYS | L-lysin | leucin-D3 |
| Malate | malát | methylsukcinát-D6 |
| Malonate_3ohButanoate | malonát, 3-hydroxybutanoát | methylsukcinát-D6 |
| MET | methionin | leucin-D3 |
| methylbutyrylGLY_isoalerylGLY | 2-methylbutyrylglycin, L-isoalerylglycin | leucin-D3 |

Tab. 4: Zkrácené a celé názvy metabolitů s příslušnými použitými interními standardy (pokračování)

| | | |
|----------------------------------|---|----------------------------|
| Mevalonate | mevalonát | methylsukcinát-D6 |
| Myoinositol | D-myo-inositol | methylsukcinát-D6 |
| N.NdimGLY_2.2dimGLY | N,N-dimethylglycin/2,2-dimethylglycin(2-aminoisobutanoát) | leucin-D3 |
| Nicotinamide | nikotinamid | methylmalonová kyselina-D3 |
| ohPRO | L-hydroxyprolin | leucin-D3 |
| Orotate | orotát | leucin-D3 |
| OxaloAce_Glutarate_Ethylmalonate | oxaloacetát, glutarát, ethylmalonát | methylsukcinát-D6 |
| Pantothenate | pantotenát (vitamin B5) | methylmalonová kyselina-D3 |
| PHE | L-fenylalanin | leucin-D3 |
| phenylproGLY | fenylpropionylglycin | leucin-D3 |
| Porphobilinogen | porfobilinogen | methylsukcinát-D6 |
| PRO | L-prolin | leucin-D3 |
| proGLY | propylglycin | leucin-D3 |
| pseuUr | pseudouridin | kreatinin-D3 |
| Pyruvate | pyruvát | methylsukcinát-D6 |
| Riboflavin | riboflavin (vitamin B2) | kreatinin-D3 |
| Ribose | ribosa | methylsukcinát-D6 |
| SAdo | sukcinyladenoin | kreatinin-D3 |
| SAICAr | fosforibosylaminoimidazolsukcinokarboxamid | kreatinin-D3 |
| Salicylate_4ohBenzoate | salicylát, 4-hydroxybenzoát | methylsukcinát-D6 |
| Sarcosine | sarkosin (N-methylglycin) | leucin-D3 |
| Sebacate | sebakát | methylsukcinát-D6 |
| SER | L-serin | leucin-D3 |
| Sialic.acid | kyselina sialová (N-acetylneuraminát) | methylsukcinát-D6 |
| Spermine | spermin | kreatinin-D3 |
| Suberate | suberát | methylsukcinát-D6 |
| suberylGLY | suberylglycin | leucin-D3 |
| Succinate_Methylmalonate | sukcinát, methylmalonát | methylsukcinát-D6 |
| Tartrate | tartrát (vinan) | methylsukcinát-D6 |
| Taurin | L-taurin | leucin-D3 |
| Thiamin | thiamin (vitamin B1) | kreatinin-D3 |
| THR_homoSER | L-threonin/L-homoserin | leucin-D3 |
| Threonate | L-threonát | methylsukcinát-D6 |
| tiglylGLY_3methylcrotonylGLY | tiglylglycin, 3-methylkrotonylglycin | leucin-D3 |
| TRP | L-tryptofan | leucin-D3 |
| TYR | L-tyrosin | leucin-D3 |
| U | uracil | kreatinin-D3 |
| Ur | uridin | kreatinin-D3 |
| urate | urát | kreatinin-D3 |
| Urea | močovina | kreatinin-D3 |
| Vanillylmandelate | Vanilmandelát | methylsukcinát-D6 |
| X | xanthin | kreatinin-D3 |
| Xanthurenate | xanthurenát | kreatinin-D3 |
| Xr | xanthosin | uracil-15N2 |

4. 2. 1 Vícerozměrná analýza s nesupervizovaným přístupem

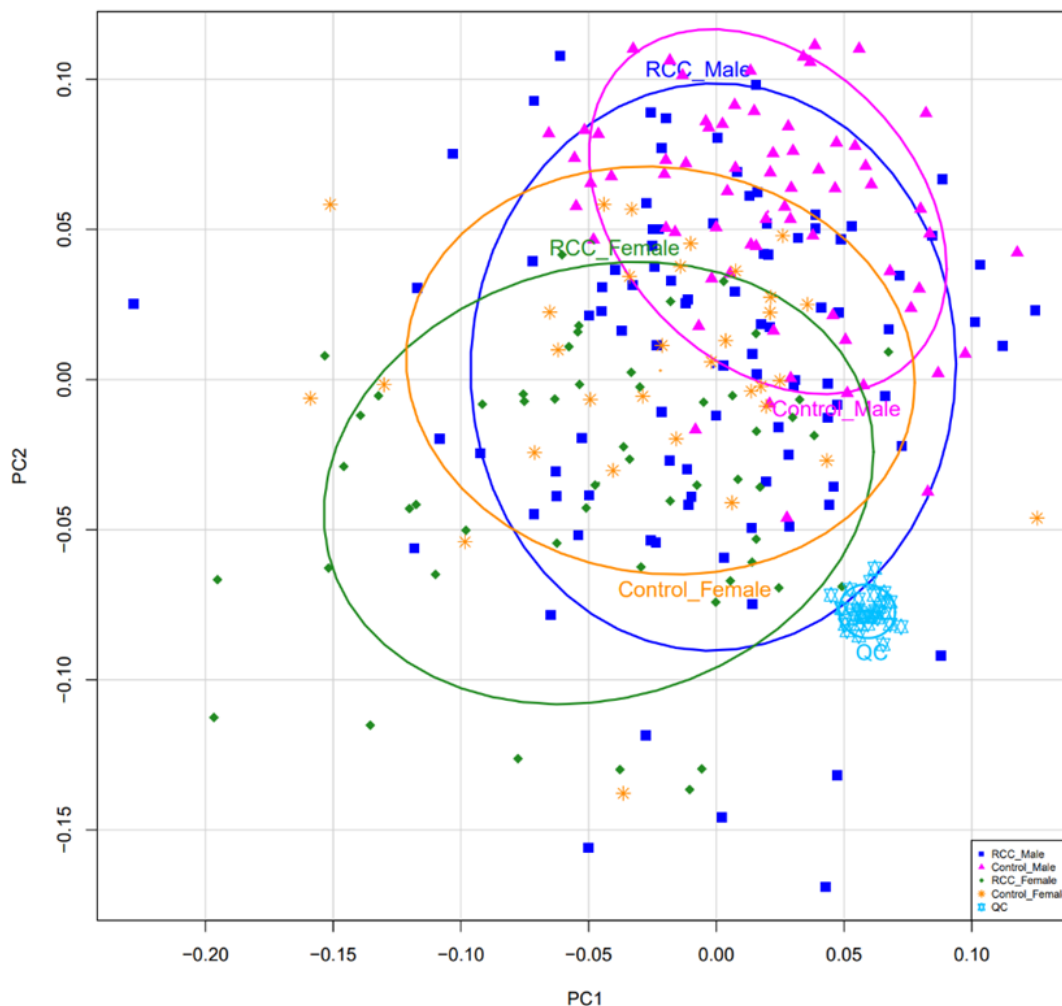
Metodou PCA byly porovnány skupiny: pacienti (muži) s RCC („RCC_Male“, 94 vzorků), pacientky s RCC („RCC_Female“, 53 vzorků), zdravé kontroly muži („Control_Male“, 68 vzorků) a zdravé kontroly ženy („Control_Female“, 32 vzorků) (viz obr. 7, analýza A). Skóre hlavních komponent bylo na ose x $PC1 = 20,14 \%$, na ose y $PC2 = 8,79 \%$ a procento variability bylo rovno $28,93 \%$. QC vzorky se dobře shlukovaly bez určitého trendu, což ukazuje na vysokou reprezentativnost měření a kvalitní průběh analýzy.



Obr. 7: Analýza hlavních komponent (PCA) vzorků moči. Každý barevný bod představuje vzorek ze skupin: pacienti (muži) s RCC (tmavě modrá), zdravé kontroly muži (růžová), pacientky s RCC (zelená), zdravé kontroly ženy (oranžová); QC vzorky jsou vyznačeny světle modře.

4. 2. 2 Vícerozměrná analýza se supervizovaným přístupem

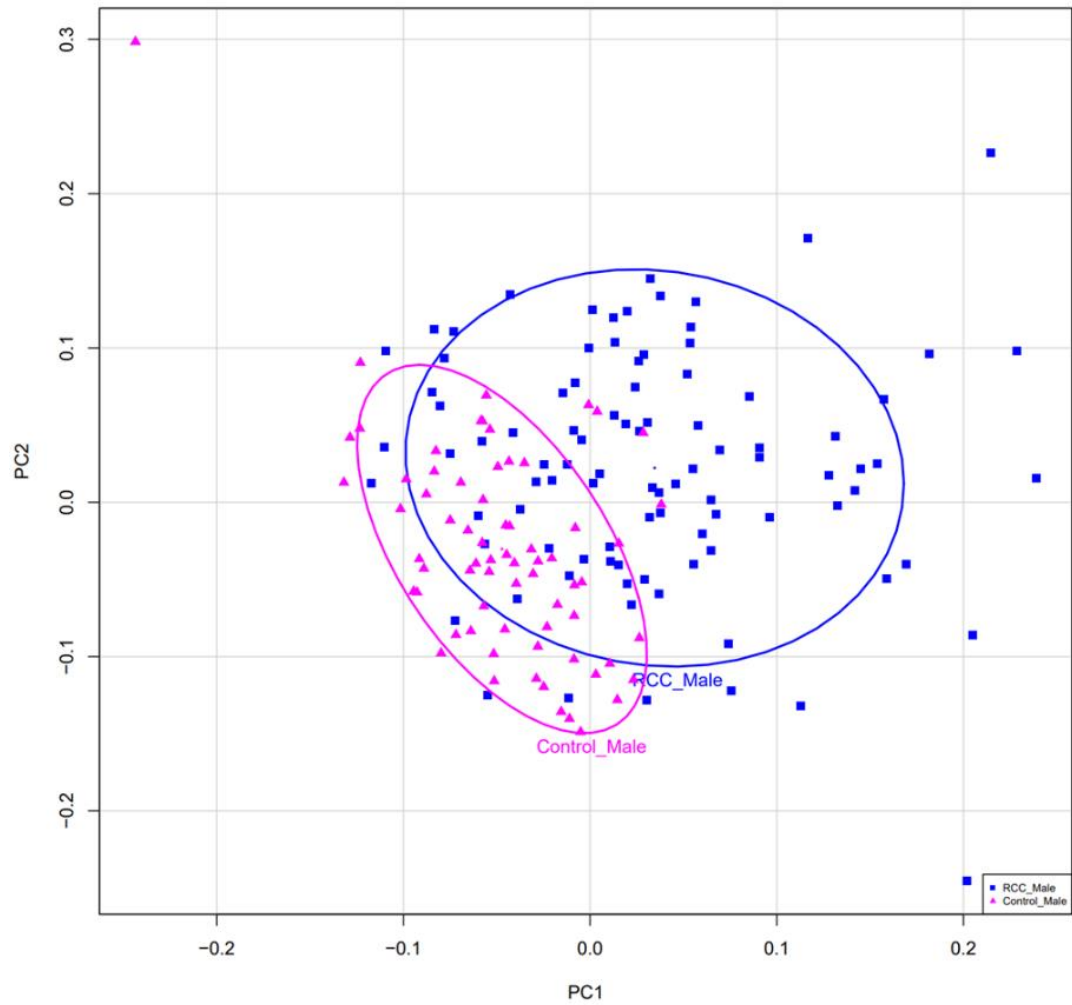
Statistickou metodou se supervizovaným přístupem PLS-DA byly porovnány skupiny: pacienti (muži) s RCC („RCC_Male“), pacientky s RCC („RCC_Female“), zdravé kontroly muži („Control_Male“) a zdravé kontroly ženy („Control_Female“) (viz obr. 8). Analýza PLS-DA potvrdila výsledky PCA s jasnějším zobrazením trendů. To odpovídá známému rozdílu mezi pohlavími jak ve zdravém metabolismu, tak v metabolismu pacientů s RCC. Zároveň jsou od sebe různou mírou odděleny vzorky pacientů s RCC a zdravých kontrol, což dokazuje rozdíl mezi složením jejich močového metabolomu.



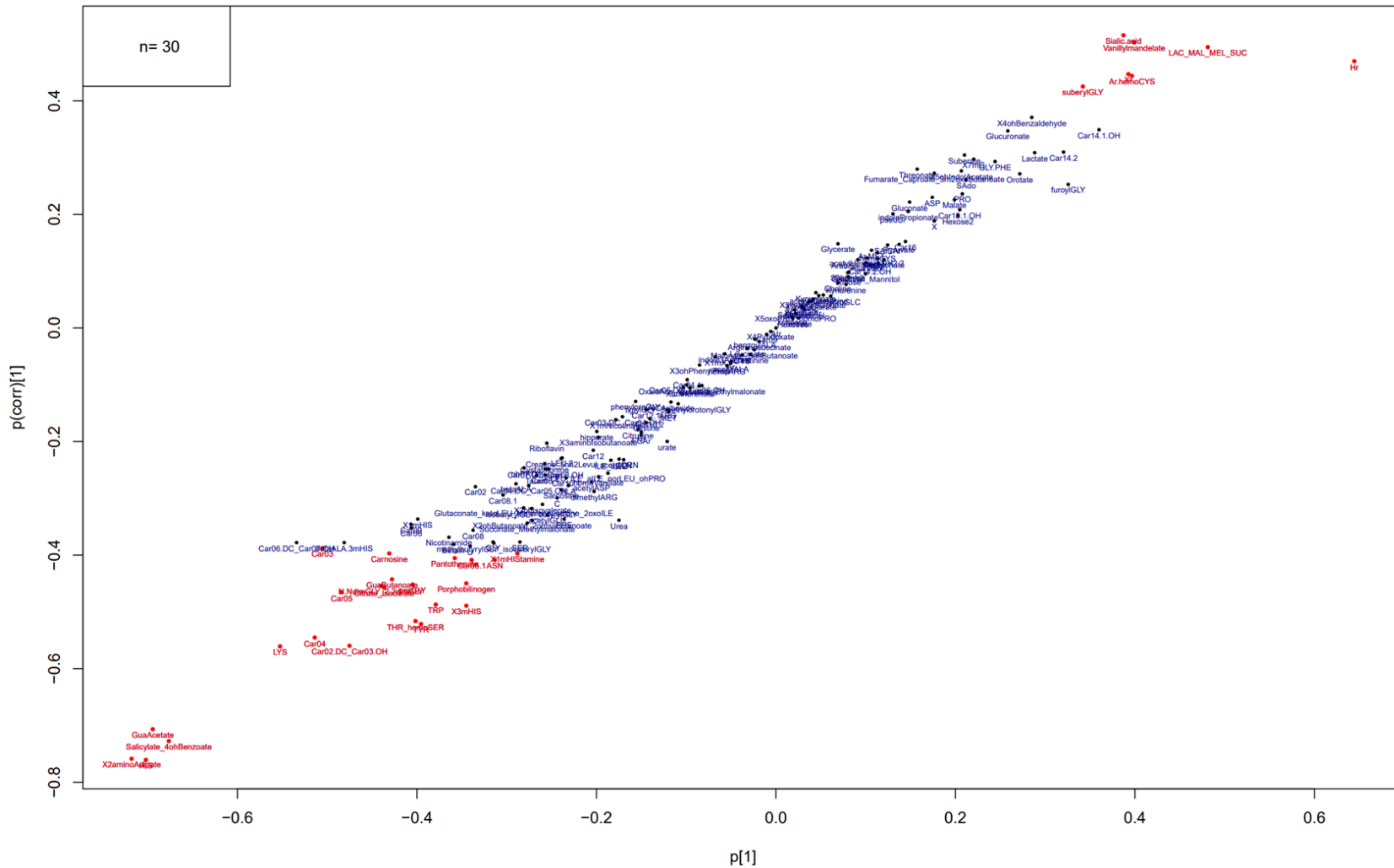
Obr. 8: Diskriminační analýza nejmenších čtverců (PLS-DA) vzorků moči. Každý barevný bod představuje vzorek ze skupiny: pacienti (muži) s RCC (tmavě modrá), zdravé kontroly muži (ružová), pacientky s RCC (zelená), zdravé kontroly ženy (oranžová) a QC vzorky (světle modrá).

4. 2. 3 Statistická analýza jednotlivých skupin

Dále byly statisticky analyzovány skupiny pacienti (muži) s RCC (označená jako „RCC_Male“) a zdravé kontroly muži (označená jako „Control_Male“) statistickou vícerozměrnou metodou se supervizovaným přístupem PLS-DA (viz obr. 9) a jednorozměrnou statistickou metodou jako vulkánový graf, kde byly porovnány pacienti s RCC vůči zdravým kontrolám (mužům) (viz obr. 10). Na grafickém výstupu metody PLS-DA je možné vidět oddělení skupin s částečným překryvem. Dle vulkánového grafu byla statisticky významně změněna hladina 35 metabolitů, jejichž koncentrace byly sníženy, a 23 metabolitů, jejichž koncentrace byly zvýšeny, u pacientů s RCC oproti zdravým kontrolám. Z těchto metabolitů patří mezi nejvíce diskriminující proměnné zvýšení deseti metabolitů – skupiny disacharidů laktosy, maltosy, melibiosy a sacharosy, orotátu, vanilmandelátu, furoylglycinu, suberylglycinu, skupiny metabolitů fumarátu, kaproátu a 3-methyl-2-oxobutanoátu, S-adenosyl-L-homocysteinu, dipeptidu glycinu a fenylalaninu, kys. sialové a 4-hydroxybenzaldehydu; a snížené hodnoty deseti metabolitů – skupiny metabolitů salicylátu a 4-hydroxybenzoátu, histidinu, nikotinamidu, guanidinoacetátu, uracilu, 2-aminoadipátu, skupiny metabolitů citrátu a isocitrátu, 3-hydroxypropionyl-L-karnitin, karnosinu a porfobilinogenu. Alterace těchto uvedených metabolitů byly částečně potvrzeny také v S-plotu modelu OPLS-DA (viz obr. 11).



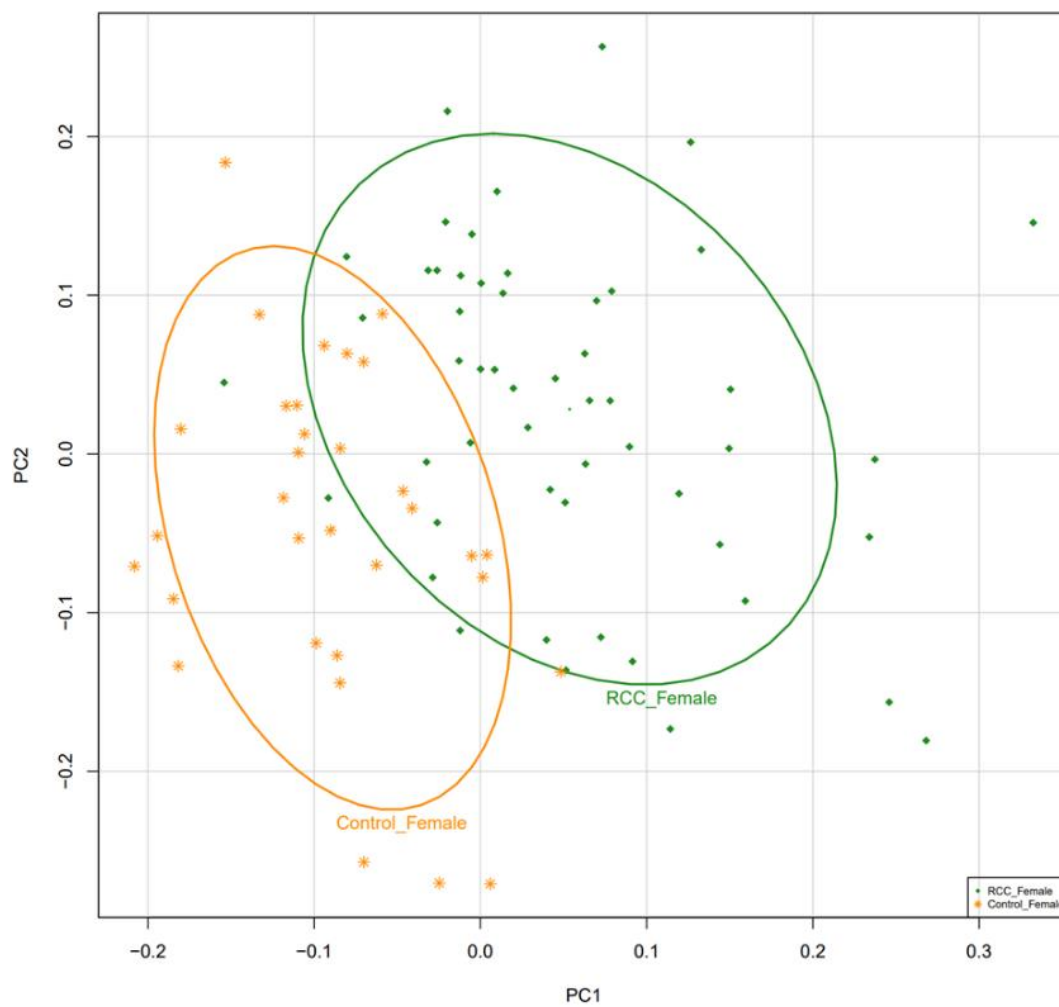
Obr. 9: Diskriminační analýza nejmenších čtverců (PLS-DA) vzorků moči. Každý barevný bod představuje vzorek ze skupin: pacienti (muži) s RCC (tmavě modrá) a zdravé kontroly muži (růžová).



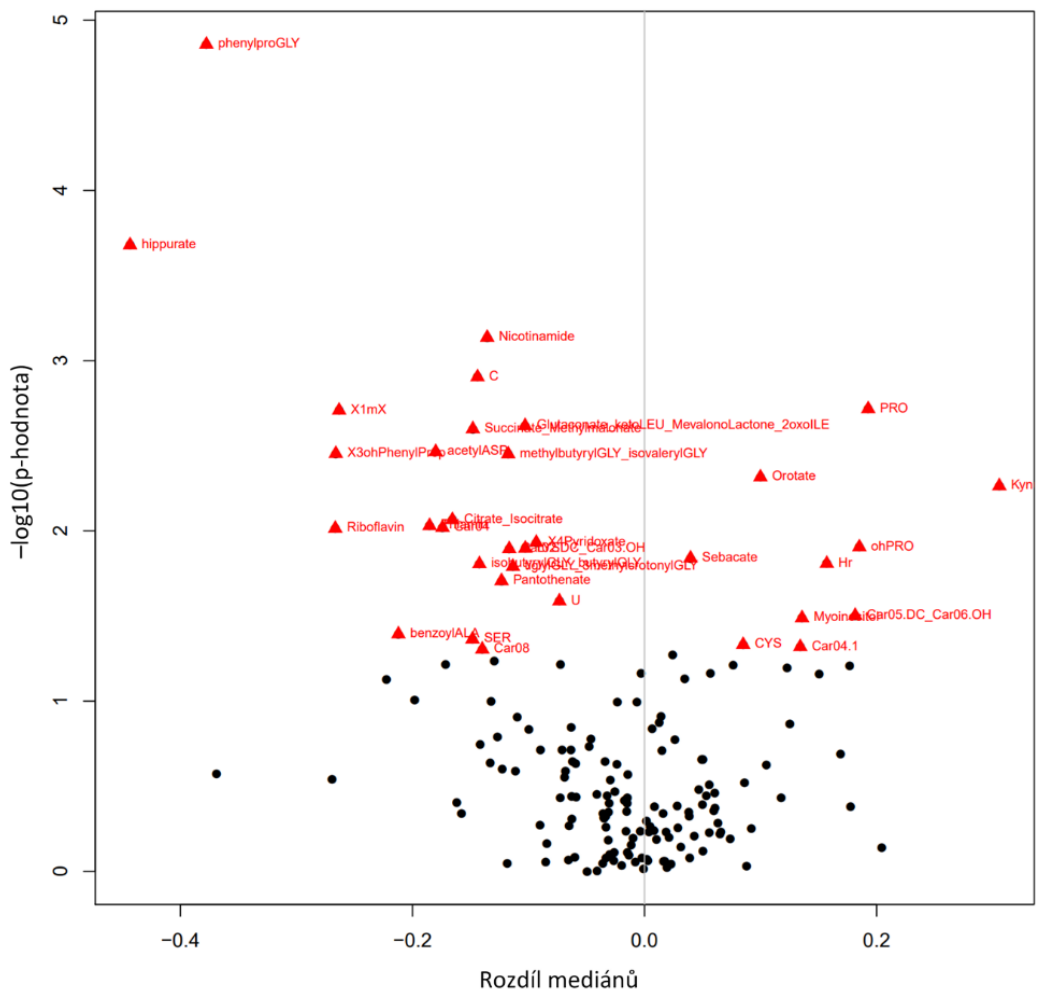
Obr. 11: S-plot metody ortogonální diskriminační analýzy nejmenších čtverců (OPLS-DA) vzorků moči zobrazující 30 nejvíce signifikantních metabolitů (červené) pro vzorky od pacientů mužů s RCC v porovnání se zdravými kontrolami (muži).

Nakonec byly statisticky analyzovány skupiny pacientky s RCC (označená jako „RCC_Female“) a zdravé kontroly ženy (označená jako „Control_Female“) statistickou vícerozměrnou metodou se supervizovaným přístupem PLS-DA (viz obr. 12) a jednorozměrnou statistickou metodou jako vulkánový graf, kde byly porovnány pacientky s RCC vůči zdravým kontrolám (ženám) (viz obr. 13). Na grafickém výstupu metody PLS-DA je možné vidět oddělení skupin s částečným překryvem, který je menší než u předchozí analýzy skupin pacientů (mužů) s RCC a zdravých kontrol mužů, což potvrzují i výsledky metody OPLS-DA. Dle vulkánového grafu bylo u pacientek s RCC oproti zdravým kontrolám ženám statisticky významně změněných 24 metabolitů, jejichž hladina byla snížena, a 10 metabolitů, jejichž hladina byla zvýšena. Z těchto metabolitů patří mezi nejvíce diskriminující proměnné zvýšení koncentrace deseti metabolitů – L-prolinu, orotátu, kynureninu, L-hydroxyprolinu, sebakátu, inosinu, glutaryl-L-karnitin/3-hydroxyhexanoyl-L-karnitin, D-myo-inositolu, L-cysteinu a butenyl-L-karnitinu; a snížené hodnoty deseti metabolitů – fenypropionylglycinu, hippurátu, nikotinamidu, cytosinu, 1-methylxantinu, skupiny metabolitů glutakonátu, ketoleucinu, mevalonolaktonu a 2-oxoisoleucinu, skupiny metabolitů sukcinátu a methylmalonátu, 3-hydroxyfenylpropionátu, N-acetylaspartátu a skupiny metabolitů 2-methylbutyrylglycinu a L-isovalerylglycinu. Alterace těchto uvedených metabolitů v S-plotu modelu OPLS-DA (viz obr. 14) byly potvrzeny pouze ty se sníženými hladinami.

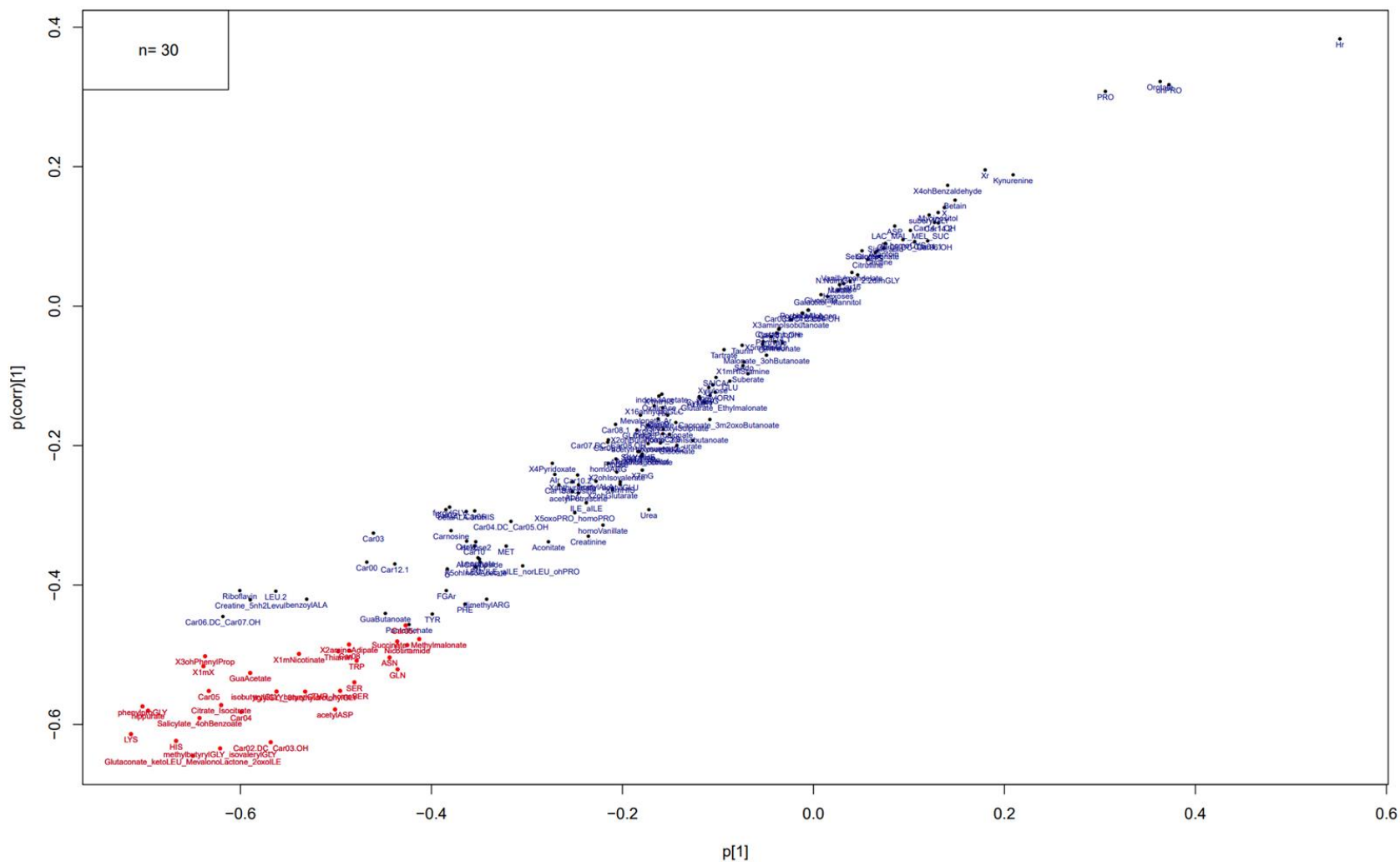
Vulkánové grafy mezi pacienty s RCC a zdravými kontrolami (muži i ženy; mezi pacienty (muži) s RCC a zdravými kontrolami mužů (analýza B; viz obr. 9) a mezi pacientkami s RCC a zdravými kontrolami žen (analýza C; viz obr. 12) odhalily jen dva společné statisticky významné změněné metabolity z nejvýznamnějších výše uvedených metabolitů u pacientů s RCC. Jsou to zvýšená hladina orotátu a snížená hladina nikotinamidu. Mezi další společné změněné metabolity mezi muži a ženami s RCC, které jsou méně statisticky významné, patří zvýšené koncentrace L-prolinu, kynureninu a inosinu, dále pak snížené koncentrace hippurátu, 1-methylxantinu, skupiny metabolitů glutakonátu, ketoleucinu, mevalonolaktonu a 2-oxoisoleucinu, skupiny metabolitů sukcinátu a methylmalonátu, skupiny metabolitů 2-methylbutyrylglycinu a L-isovalerylglycinu, skupiny metabolitů citrátu a isocitrátu, butyryl-L-karnitinu/isobutyryl-L-karnitinu, thiaminu, 4-pyridoxátu, 3-hydroxypropionyl-L-karnitinu, skupiny metabolitů isobutyrylglycinu a butyrylglycinu, uracilu a N-benzoyl-L-alaninu. Vybrané výše zmíněné metabolity byly zobrazeny pomocí krabicových grafů (viz obr. 15 a 16).



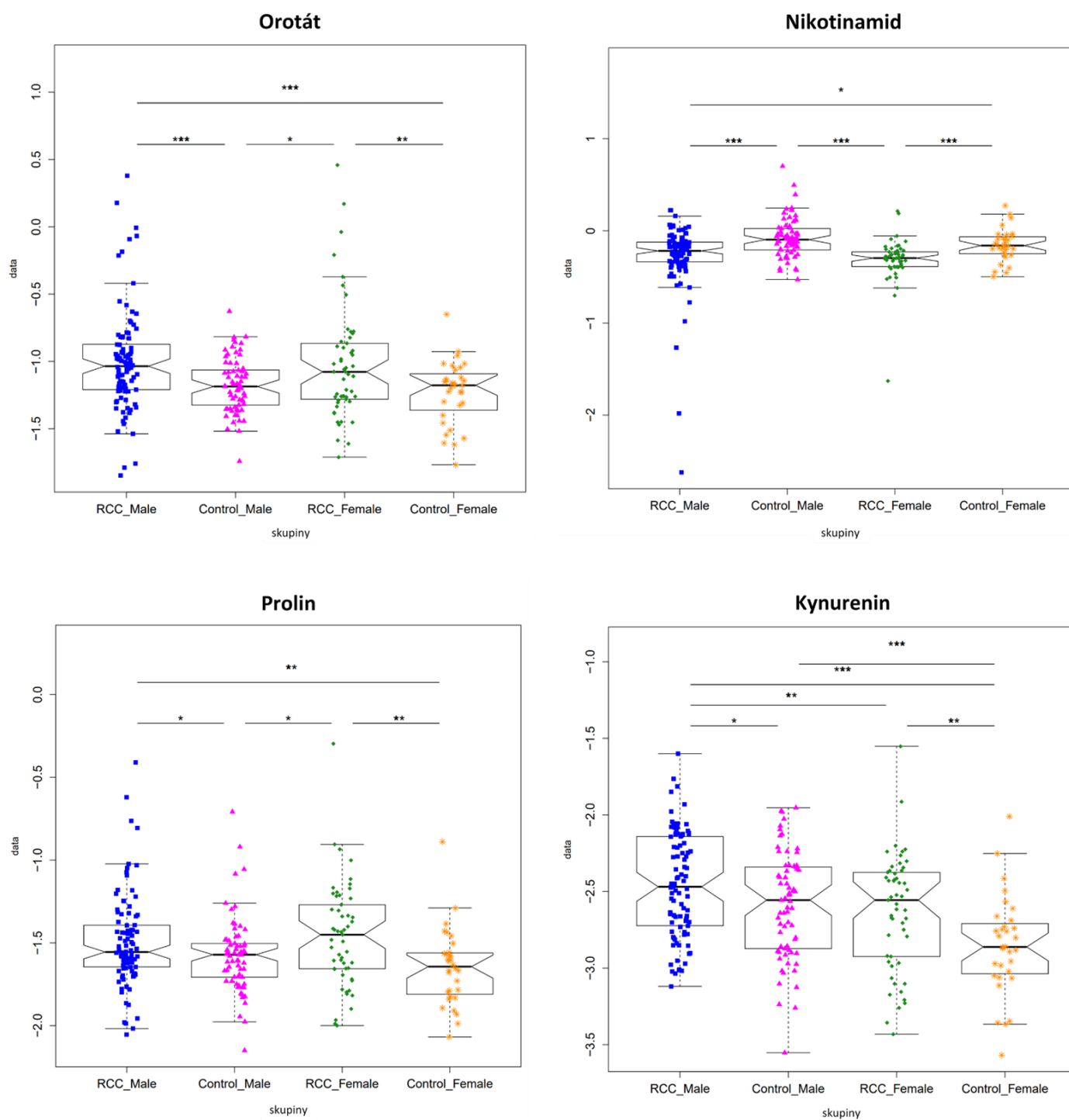
Obr. 12: Diskriminační analýza nejmenších čtverců (PLS-DA) vzorků moči patientek s RCC (zelená) a zdravých kontrol (žlutá).



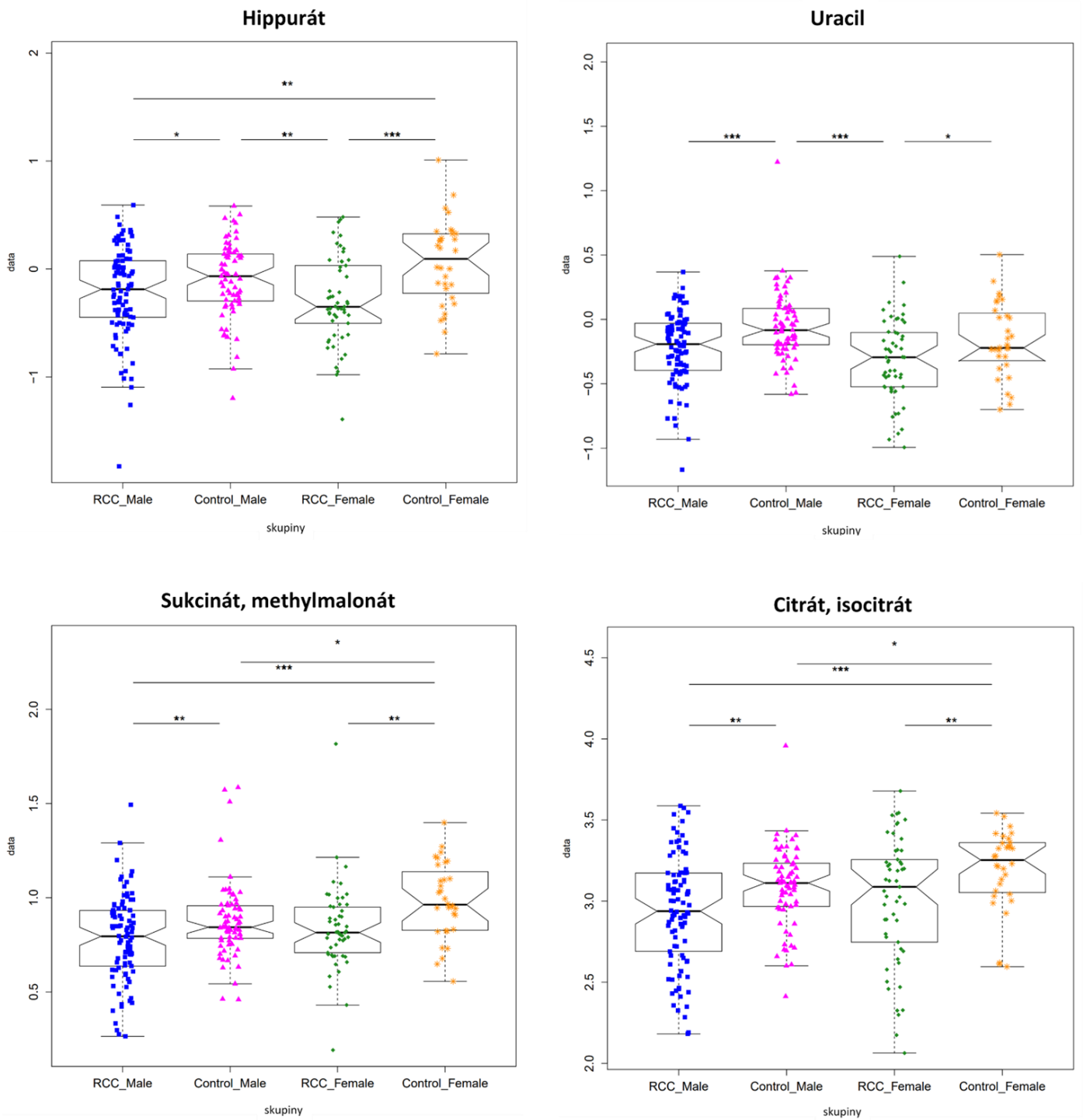
Obr. 13: Vulkánový graf vzorků moči porovnávající rozdíly mediánů pačientek s RCC vůči zdravým kontrolám (ženám) dle jejich statistické významnosti (p-hodnoty). Červené body znázorňují statisticky významné diskriminující metabolity, černé body statisticky nevýznamné diskriminující metabolity.



Obr. 14: S-plot metody ortogonální diskriminační analýzy nejmenších čtverců (OPLS-DA) vzorků močí zobrazující 30 nejvíce signifikantních metabolitů (červené) pro vzorky od pacientek s RCC v porovnání se zdravými kontrolami (ženami).



Obr. 15: Krabicové grafy metabolitů orotátu, nikotinamidu, prolinu a kynureninu pro skupiny pacienti (muži) s RCC („RCC_Male“), zdravé kontroly muži („Control_Male“), pacientky s RCC („RCC_Female“) a zdravé kontroly ženy („Control_Female“). Statistická významnost byla hodnocena pomocí p-hodnot studentových t-testem (*<0,01, **<0,001, ***<0,0001, ****<0,00001), osa y představuje relativní abundanci po LOESS korekci, vztažení na interní standardy a log10 transformaci.



Obr. 16: Krabicové grafy metabolitů hippurátu, uracilu, skupiny metabolitů sukcinátu a methylmalonátu a skupiny metabolitů citrátu a isocitrátu pro skupiny pacienti (muži) s RCC („RCC_Male“), zdravé kontroly muži („Control_Male“), pacientky s RCC („RCC_Female“) a zdravé kontroly ženy („Control_Female“). Statistická významnost byla hodnocena pomocí p-hodnot studentových t-testem (*<0,01, **<0,001, ***<0,0001, ****<0,00001), osa y představuje relativní abundanci po LOESS korekci, vztažení na interní standardy a log10 transformaci.

5 DISKUZE

Cílenou metabolickou analýzou bylo ve 247 vzorcích pacientů s RCC a zdravých kontrol změřeno 169 metabolitů. Získaná data byla podrobena statistické analýze (jednorozměrné a vícerozměrné se supervizovaným i nesupervizovaným přístupem).

Nejvýznamější z nich byly snížená koncentrace nikotinamidu a zvýšená koncentrace orotátu (viz obr. 15). Nikotinamid je zapojený ve svém a nikotinovém metabolismu, stejně jako S-adenosyl-L-homocystein, další metabolit se statisticky významnou zvýšenou hladinou (ale pouze u mužů). Hladina nikotinamidu může být snížena vlivem nadměrné exprese enzymu S-adenosyl-L-methionin:nikotinamid N-methyltransferasy (nikotinamid N-methyltransferasa, NNMT, EC 2.1.1.1) pozorované u RCC, přičemž tato změna exprese byla navržena i jako marker pro velikost nádoru RCC (Sartini *et al.*, 2006). Toto snížení hladiny nikotinamidu je pro rozvoj RCC výhodné, jelikož nikotinamid inhibuje enzym NAD⁺:poly(ADP-D-ribosyl)-akceptor ADP-D-ribosyl-transferasu (NAD⁺ ADP-ribosyltransferasa, PARP1, EC 2.4.2.30), který je mimo jiné důležitý při opravě DNA prostřednictvím sirtuinů (SIRT), a také je zapojen (jako součást jiných struktur) v procesech produkce energie, buněčné odolnosti vůči stresu, zranění nebo dlouhověkosti (Sartini *et al.*, 2006; Salech *et al.*, 2020). Zvýšená exprese a enzymatická aktivita NNMT může být i vysvětlením pro zvýšenou koncentraci S-adenosyl-L-homocysteinu, jelikož se jedná o produkt tohoto enzymu. S-adenosyl-L-homocystein ve vysokých koncentracích inhibuje transmetylační reakce, které jsou potřebné pro účinnou aktivaci a funkci lymfocytů (T-buněk a makrofágů) a působí tak imunosupresivně (Wu *et al.*, 2005).

Orotát je zapojený v metabolismu pyrimidinu a v biosyntéze kofaktorů, kde je tvořen enzymem orotidin-5'-fosfát:difosfát fosfo-alfa-D-ribosyl-transferasou (orotát fosforibosyltransferasa, OPRT, EC 2.4.2.10), jehož zvýšená aktivita byla pozorována u pacientů s RCC (Mizutani *et al.*, 2007). Orotát inhibuje fosforylaci (a tím aktivaci) enzymu ATP:[hydroxymethylglutaryl-CoA reduktasa (NADPH)] fosfotransferasy (protein kinasa aktivovaná AMP, AMPK, EC 2.7.11.31), nádorového supresoru (Jung *et al.*, 2011; Keerthana *et al.*, 2023). Ve stejných metabolických drahách jsou zapojeny i dusíkaté baze uracil a cytosin, jejichž hladiny byly sníženy u pacientů s RCC, což by mohlo být způsobené tím, že se jedná o prekurzory orotátu v metabolismu pyrimidinu, a tudíž by mohly být urychleně odčerpávány k syntéze orotátu. Snížení hladiny uracilu může být způsobeno nadměrnou expresí enzymu uracil hydro-lyasy (přidávající D-ribose 5-fosfát; tvořící pseudouridin-5'-fosfát) (pseudouridin syntasa 1, PUS1, EC 4.2.1.70), kterou Li *et al.* (2023) pozorovali u pacientů s RCC a která se

podílí na zvýšené životaschopnosti, migraci a invazi RCC buněk (Li *et al.*, 2023). Snížení hladiny uracilu mohlo být způsobeno i vysokou koncentrací enzymu pyrimidin-nukleosid:fosfát (2'-deoxy)-alfa-D-ribosyltransferasy (pyrimidin-nukleosid fosforylasa, PyNPasa, EC 2.4.2.2), který je zapojen do angiogeneze (Toge *et al.*, 2009).

Druhou statisticky nejvýznamnější zvýšenou koncentrací u mužů i u žen je koncentrace L-kynureninu (viz obr. 15). Dle transkriptomické analýzy, tkáňové imunohistochemie a dat genové exprese Hornigolda *et al.* (2020) je u RCC běžná ztráta exprese enzymu L-kynurenin, NADPH:kyslík oxidoreduktasy (3-hydroxylující) (kynurenin 3-monooxygenasa, KMO, EC 1.14.13.9) a zvýšení exprese enzymu D-tryptofan:kyslík 2,3-oxidoreduktasa (otvírající kruh) (indolamin 2,3-dioxygenasa, IDO, EC 1.13.11.52). Zvýšení hladiny L-kynureninu tak mohlo nastat v důsledku změny exprese těchto enzymů. L-kynurenin je zapojen do metabolismu tryptofanu a biosyntézy kofaktorů, má imunosupresivní vlastnosti (např. inhibuje proliferaci T buněk a NK buněk) a podporuje přežívání a motilitu RCC buněk (Frumento *et al.*, 2002; Opitz *et al.*, 2011; Hornigold *et al.*, 2020).

Hladina 1-methylxanthinu, derivátu purinu a produktu přeměny kofeinu, je také u mužů i žen statisticky významně snížena. 1-methylxanthin vzniká z hypoxanthinu za vzniku reaktivních forem kyslíku, které ve vyšších koncentracích způsobují apoptózu RCC (Saugstad, 1988; Battelli *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2022). 1-methylxanthin také zvyšuje citlivost na radioterapii a další genotoxické látky u rakovin např. blokováním opravy dvouvláknových zlomů DNA způsobených ozařováním, proto by nízká koncentrace 1-methylxanthinu mohla být pro přežití RCC buněk výhodná (Sarkaria *et al.*, 1999; Youn *et al.*, 2009).

Mezi statisticky významnými změněnými metabolity u mužů i u žen je i snížená hladina sukcinátu (jako součást skupiny metabolitů sukcinátu a methylmalonátu, přičemž změna hladiny methylmalonátu u RCC nebyla v žádných dostupných zdrojích nalezena a také methylmalonát je v moči oproti sukcinátu v nižších koncentracích (Bouatra *et al.*, 2013); viz obr. 16), který je sice i součástí nikotinamidové a nikotinové metabolické dráhy, ale snížení jeho hladiny je pravděpodobně způsobeno zvýšením exprese enzymů Krebsova cyklu, metabolismu propanoátu a degradace valinu, leucinu a isoleucinu (Popławski *et al.*, 2017; Huang *et al.*, 2014). V této práci byly pozorovány i zvýšené hladiny fumarátu (jako součást skupiny metabolitů fumarátu, kapronátu a 3-methyl-2-oxobutanoátu, přičemž změna hladin kapronátu a 3-methyl-2-oxobutanoátu u RCC nebyla v žádných dostupných zdrojích nalezena) a snížené hladiny skupiny metabolitů citrátu a isocitrátu, kdy tyto metabolity jsou také zapojeny do Krebsova cyklu. V Krebsově cyklu, jak už bylo zmíněno v teoretické části v kapitole

Patobiochemie rakoviny ledvin, dochází k základním patobiochemickým změnám u RCC, což tedy dokazuje i tato práce a například i výzkum Bezwady *et al.* (2023). Zvýšená koncentrace fumarátu působí jako kompetitivní inhibitor hypoxii indukční faktor-L-prolin, 2-oxoglutarát:kyslík oxidoreduktasy (4-hydroxylující) (HIF prolylhydroxylasa, HPH, EC 1.14.11.29), a tak stabilizuje transkripční faktory HIF tím, že brání jejich proteasomální degradaci způsobovanou HPH (Isaacs *et al.*, 2005; Yogev *et al.*, 2010).

Hippurát je statisticky významně snížen u mužů i u žen (viz obr. 16), vzniká za účasti jaterního enzymu acyl-CoA:glycin N-acyltransferasy (glycin N-acyltransferasa, GLYAT, EC 2.3.1.13), který tvoří hippurát z N-benzoylCoA a glycinu, a je tak důležitým prvkem detoxikace těla od kys. benzoové. Míra exprese tohoto enzymu koreluje se stupněm nádoru (Muñoz & Calaf, 2023). Hippurát může být dále tvořen střevním bakteriálním metabolismem fenylalaninu, kdy jsou bakteriemi vyprodukované fenylpropanové kyseliny z fenylalaninu, mezi nimi i v této studii pozorovaný snížený 3-hydroxyfenylpropionát, přeměněny v játrech na hippurát (Catchpole *et al.*, 2011; Clayton, 2012; Muñoz & Calaf, 2023; Ticinesi *et al.*, 2023). Důvodem snížení hippurátu mohou být kancerogenní vlastnosti kys. benzoové (projevující se při dlouhodobému vystavení se této sloučenině (Wu, 2021)), a tudíž by mohlo být výhodné pro růst karcinomu kys. benzoovou neobourávat.

Koncentrace L-cysteinu je statisticky významně zvýšena u žen, stejně jako koncentrace jeho prekurzoru L-cystathioninu (L-cystein je u žen zvýšen unikátně, kdežto L-cystathionin ne). Zvýšená hladina L-cysteinu může být pro RCC výhodná, jelikož L-cystein je prekurzorem sirovodíku tvořeného enzymem L-cystein-S-konjugát thiol-lyasou (deaminující; tvořící 2-aminoprop-2-enoát) (cystathionin beta-lyasa, CSE, EC 4.4.1.13), který je u RCC také zvýšeně exprimován (Sogutelen *et al.*, 2020). Sirovodík při hypoxii podporuje glykolýzu, antiapoptotické signalizace a podílí se na angiogenezi interakcí s růstovým faktorem VEGF (Sen *et al.*, 2012; Sogutelen *et al.*, 2020). L-cystein má řadu vlastností podporujících růst buněk, a tedy i buněk RCC. Je nezbytný pro syntézu esenciálních mastných kyselin, a proto je důležitý pro stavbu buněčných membrán, je prekurzorem taurinu, který je zapojený v protizánětlivých a detoxikačních procesech, podílí se na syntéze acetylCoA a cysteinové zbytky podporují řadu procesů v mitochondriích a endoplazmatickém retikulu (Inam-u-llah *et al.*, 2018; Bak *et al.*, 2019; Rehman *et al.*, 2020).

Se vzorky plasmy stejné kohorty pacientů s RCC a zdravých kontrol jako v této práci byla již dříve provedena cílená metabolická analýza V. Fryzelkovou v rámci její diplomové práce. Ve většině změřených metabolitech se naše výsledky shodují, jako např. u významně

zvýšené hladiny kyseliny sialové, zvýšené hladiny pseudouridinu, hladiny skupiny metabolitů 2-hydroxybutanoátu a 2-hydroxyisobutanoátu u obou pohlaví anebo zvýšené hladiny malonylkarnitinu/hydroxybutyrylkarnitinu u žen (Fryzelková, 2022).

Změněné hladiny statisticky nejvýznamnějších metabolitů pacientů s RCC vůči zdravým kontrolám, zjištěných v této práci, odpovídají zjištěným informacím publikovaných v jiných studiích, kromě drobných odchylek. Dle di Meové *et al.* (2022) byly v moči naměřeny zvýšené hodnoty glukosy pacientů s RCC vůči zdravým kontrolám, kdežto v této práci byly zjištěny snížené hodnoty glukosy; našli také některé jiné významné změněné metabolity, např. zvýšená koncentrace 3-hydroxy-L-kynureninu, 5-hydroxy-L-tryptofanu a serotoninu. Skupina Ragonové *et al.* (2016), jejichž studie byla založena na NMR v kombinaci s transkriptomikou, našla i jiné statisticky významné změněné hladiny metabolitů, jako např. 3-hydroxybutyrát. Dle Popławskeho *et al.* (2017), jejichž výzkum byl proveden pomocí GC-MS a transkriptomické analýzy, byly v moči naměřeny snížené hladiny myo-inositolu, glukosy a methioninu, v této práci byla ale naměřena zvýšená hladina myo-inositolu a glukosy u mužů i žen a mírně zvýšená hladina methioninu u žen. I tato skupina našla několik statisticky významných změněných metabolitů, které se nevyskytovaly v této práci, jako např. snížené koncentrace fosfátu a sacharosy.

6 ZÁVĚR

Cílem této práce bylo analyzovat vzorky moči pacientů s RCC a zdravých kontrol cílenou metabolomickou analýzou za účelem lepšího pochopení patobiochemie RCC. V teoretické části práce byly shrnuty dosavadní poznatky ohledně stavby, funkce a metabolismu ledvin, aktuálního stavu problematiky karcinomu ledvin, jehož součástí bylo i shrnutí dosavadních zjištění ohledně jednotlivých podtypů RCC, patobiochemii a možnostech studia tohoto onemocnění pomocí omických metod se zvláštním zaměřením na metabolomiku. Byly také popsány základní principy nejčastějších nástrojů metabolomické analýzy – vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií a spektroskopii nukleární magnetické rezonance.

Metabolomická analýza byla provedena pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií, naměřená data byla zpracována a statisticky vyhodnocena jednorozměrnými a vícerozměrnými statistickými metodami se supervizovaným i nesupervizovaným přístupem. Bylo detekováno 169 metabolitů ve 247 vzorcích moče pacientů s RCC a zdravých kontrol. Byl pozorován rozdíl v metabolismu zdravých kontrol a pacientů s RCC. Statistickou analýzou bylo zjištěno 17 statisticky významných společných metabolitů u pacientů (mužů i žen) v porovnání se zdravými kontrolami, několik desítek statisticky významných metabolitů u mužů a žen a 13 statisticky vysoce významných unikátních změněných metabolitů pro dané pohlaví, jejichž hladiny byly významně snižené či zvýšené. Nejvýznamější ze společných metabolitů mužů i žen byly snižené hladiny nikotinamidu a zvýšené hladiny orotátu. U obou pohlaví byl dále signifikantně snižený uracil, 1-methylxanthin, hypoxanthin, sukcinát, hippurát, 3-hydroxyfenylpropionát. Zvýšenými metabolity u obou pohlaví byla například kyselina sialová a pseudouridin.

Nejvíce alterovaný byl energetický metabolismus, metabolismus biosyntézy kofaktorů, biosyntézy aminokyselin a metabolismus pyrimidinů. Alterace byly nalezeny i v dalších biochemických drahách, např. v metabolismu tryptofanu, nikotinu a nikotinamidu nebo metabolismu mastných kyselin či citrátovém cyklu. U vybraných metabolitů byly popsány dosavadní znalosti o jejich patobiochemii a významu v rámci RCC, v případě chybějících údajů byly u některých metabolitů navrženy příčiny pro změnu jejich hladin. Výsledky statistické analýzy byly porovnány s dalšími studii zkoumající RCC na vzorcích moči pomocí omických metod.

7 LITERATURA

- Agin, A., Heintz, D., Ruhland, E., Chao de la Barca, J. M., Zumsteg, J., Moal, V., Gauchez, A. S., & Namer, I. J. (2016). Metabolomics – an overview. From basic principles to potential biomarkers (part 1). *Médecine Nucléaire*, *40*(1), 4-10. <https://doi.org/10.1016/j.mednuc.2015.12.006>
- Alaghehbandan, R., Siadat, F., & Trpkov, K. (2023). What's new in the WHO 2022 classification of kidney tumours? *Pathologica*, *115*(1), 1-15. <https://doi.org/10.32074/1591-951X-818>
- Allen, P. J. (2012). Creatine metabolism and psychiatric disorders: Does creatine supplementation have therapeutic value? *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *36*(5), 1442-1462. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2012.03.005>
- Almeida, L. M. C. A., Silva, R., Cavadas, B., Lima, J., Pereira, L., Soares, P., Sobrinho-Simões, M., Lopes, J. M., & Máximo, V. (2017). GLUT1, MCT1/4 and CD147 overexpression supports the metabolic reprogramming in papillary renal cell carcinoma. *Histology and Histopathology*, *32*, 1029-1040. <https://doi.org/10.14670/HH-11-863>
- AlzbetaG. (2019). AlzbetaG/Metabol: First version (v1.0.0). Zenodo. <https://zenodo.org/records/3235775>
- Bak, D. W., Bechtel, T. J., Falco, J. A., & Weerapana, E. (2019). Cysteine reactivity across the subcellular universe. *Current Opinion in Chemical Biology*, *48*, 96-105. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2018.11.002>
- Baldwin, M. A. (2005). Mass Spectrometers for the Analysis of Biomolecules. *Biological Mass Spectrometry*, *40*(2), 3-48. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(05\)02001-X](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(05)02001-X)
- Barry, R. E., & Krek, W. (2004). The von Hippel–Lindau tumour suppressor: a multi-faceted inhibitor of tumorigenesis. *Trends in Molecular Medicine*, *10*(9), 466-472. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2004.07.008>
- Basu, A. (2018). DNA Damage, Mutagenesis and Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(4). <https://doi.org/10.3390/ijms19040970>
- Battelli, M. G., Polito, L., Bortolotti, M., & Bolognesi, A. (2016). Xanthine oxidoreductase in cancer: more than a differentiation marker. *Cancer Medicine*, *5*(3), 546-557. <https://doi.org/10.1002/cam4.601>
- Behrens, G., & Leitzmann, M. F. (2013). The association between physical activity and renal cancer: systematic review and meta-analysis. *British Journal of Cancer*, *108*(4), 798-811. <https://doi.org/10.1038/bjc.2013.37>
- Bezwada, D., Lesner, N. P., Brooks, B., Vu, H. S., Wu, Z., Cai, L., Kasitinon, S., Kelekar, S., Cai, F., Aurora, A. B., Patrick, M., Leach, A., Ghandour, R., Zhang, Y., Do, D., Sudderth, J., Dumesnil, D., House, S., Rosales, S., et al. (2023). Mitochondrial metabolism in primary and metastatic human kidney cancers. *BioRxiv: the preprint server for biology*, 2023.02.06.527285. <https://doi.org/10.1101/2023.02.06.527285>
- Bifarin, O. O., Gaul, D. A., Sah, S., Arnold, R. S., Ogan, K., Master, V. A., Roberts, D. L., Bergquist, S. H., Petros, J. A., Edison, A. S., & Fernández, F. M. (2021). Urine-Based Metabolomics and Machine Learning Reveals Metabolites Associated with Renal Cell Carcinoma Stage. *Cancers*, *13*(24), 6253. <https://doi.org/10.3390/cancers13246253>
- Blum, K. A., Gupta, S., Tickoo, S. K., Chan, T. A., Russo, P., Motzer, R. J., Karam, J. A., & Hakimi, A. A. (2020). Sarcomatoid renal cell carcinoma: biology, natural history and management. *Nature Reviews Urology*, *17*(12), 659-678. <https://doi.org/10.1038/s41585-020-00382-9>
- Boroughs, L. K., & DeBerardinis, R. J. (2015). Metabolic pathways promoting cancer cell survival and growth. *Nature Cell Biology*, *17*(4), 351-359. <https://doi.org/10.1038/ncb3124>
- Bouatra, S., Aziat, F., Mandal, R., Guo, A. C., Wilson, M. R., Knox, C., Bjorndahl, T. C., Krishnamurthy, R., Saleem, F., Liu, P., Dame, Z. T., Poelzer, J., Huynh, J., Yallou, F. S., Psychogios, N., Dong, E., Bogumil, R., Roehring, C., Wishart, D. S., et al. (2013). The Human Urine Metabolome. *PLoS ONE*, *8*(9), e73076. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073076>
- Brannon, A. R., Reddy, A., Seiler, M., Arreola, A., Moore, D. T., Pruthi, R. S., Wallen, E. M., Nielsen, M. E., Liu, H., Nathanson, K. L., Ljungberg, B., Zhao, H., Brooks, J. D., Ganesan, S., Bhanot, G., & Rathmell, W. K. (2010). Molecular Stratification of Clear Cell Renal Cell Carcinoma by Consensus Clustering Reveals Distinct Subtypes and Survival Patterns. *Genes Cancer*, *1*(2), 152-163. <https://doi.org/10.1177/1947601909359929>

- Bruins, A. P. (1998). Mechanistic aspects of electrospray ionization. *Journal of Chromatography A*, 794(1-2), 345-357. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(97\)01110-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(97)01110-2)
- Büchler, T. ([2020]). *Speciální onkologie* (2. vydání). Maxdorf.
- Bukavina, L., Bensalah, K., Bray, F., Carlo, M., Challacombe, B., Karam, J. A., Kassouf, W., Mitchell, T., Montironi, R., O'Brien, T., Panebianco, V., Scelo, G., Shuch, B., van Poppel, H., Blosser, C. D., & Psutka, S. P. (2022). Epidemiology of Renal Cell Carcinoma: 2022 Update. *European Urology*, 82(5), 529-542. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2022.08.019>
- Butler, M., van der Meer, L. T., & van Leeuwen, F. N. (2021). Amino Acid Depletion Therapies: Starving Cancer Cells to Death. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 32(6), 367-381. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2021.03.003>
- Cairns, P., Srivastava, S., & Grizzle, W. E. (2011). Renal cell carcinoma. *Cancer Biomarkers*, 9(1-6), 461-473. <https://doi.org/10.3233/CBM-2011-0176>
- Cajaiba, M. M., Dyer, L. M., Geller, J. I., Jennings, L. J., George, D., Kirschmann, D., Rohan, S. M., Cost, N. G., Khanna, G., Mullen, E. A., Dome, J. S., Fernandez, C. V., & Perlman, E. J. (2018). The classification of pediatric and young adult renal cell carcinomas registered on the children's oncology group (COG) protocol AREN03B2 after focused genetic testing. *Cancer*, 124(16), 3381-3389. <https://doi.org/10.1002/cncr.31578>
- Capitano, U., Bensalah, K., Bex, A., Boorjian, S. A., Bray, F., Coleman, J., Gore, J. L., Sun, M., Wood, C., & Russo, P. (2019). Epidemiology of Renal Cell Carcinoma. *European Urology*, 75(1), 74-84. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2018.08.036>
- Cassim, S., & Pouyssegur, J. (2020). Tumor Microenvironment: A Metabolic Player that Shapes the Immune Response. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(1), 157. <https://doi.org/10.3390/ijms21010157>
- Catchpole, G., Platzer, A., Weikert, C., Kempkensteffen, C., Johannsen, M., Krause, H., Jung, K., Miller, K., Willmitzer, L., Selbig, J., & Weikert, S. (2011). Metabolic profiling reveals key metabolic features of renal cell carcinoma. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 15(1), 109-118. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2009.00939.x>
- Cimadamore, A., Cheng, L., Scarpelli, M., Massari, F., Mollica, V., Santoni, M., Lopez-Beltran, A., Montironi, R., & Moch, H. (2021). Towards a new WHO classification of renal cell tumor: what the clinician needs to know—a narrative review: what the clinician needs to know—a narrative review. *Translational Andrology and Urology*, 10(3), 1506-1520. <https://doi.org/10.21037/tau-20-1150>
- Clayton, T. A. (2012). Metabolic differences underlying two distinct rat urinary phenotypes, a suggested role for gut microbial metabolism of phenylalanine and a possible connection to autism. *FEBS Letters*, 586(7), 956-961. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2012.01.049>
- Cruzat, V., Macedo Rogero, M., Noel Keane, K., Curi, R., & Newsholme, P. (2018). Glutamine: Metabolism and Immune Function, Supplementation and Clinical Translation. *Nutrients*, 10(11), 1564. <https://doi.org/10.3390/nu10111564>
- Cvek, J., Halámka, M., Blažek, T., Bravencová, Z., & Hurník, P. (2023). *Onkologie pro neonkology*. Grada Publishing.
- Čihák, R. (2004). *Anatomie* (2., upr. a dopl. vyd). Grada.
- Dai, X., & Shen, L. (2022). Advances and Trends in Omics Technology Development. *Frontiers in Medicine*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmed.2022.911861>
- Dattani, S., Spooner, F., Ritchie, H., & Roser, M. (2023). *Causes of Death*. OurWorldInData.org. Retrieved March 21, 2024, from <https://ourworldindata.org/causes-of-death>
- Davis, C. F., Ricketts, C. J., Wang, M., Yang, L., Cherniack, A. D., Shen, H., Buhay, C., Kang, H., Kim, S. C., Fahey, C. C., Hacker, K. E., Bhanot, G., Gordenin, D. A., Chu, A., Gunaratne, P. H., Biehl, M., Seth, S., Kaiparettu, B. A., Bristow, C. A., et al. (2014). The somatic genomic landscape of chromophobe renal cell carcinoma. *Cancer Cell*, 26(3), 319-330. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2014.07.014>
- DeBerardinis, R. J., & Chandel, N. S. (2020). We need to talk about the Warburg effect. *Nature Metabolism*, 2(2), 127-129. <https://doi.org/10.1038/s42255-020-0172-2>
- de Hoffmann, E. (1996). Tandem mass spectrometry: A primer. *Journal of Mass Spectrometry*, 31(2), 129 - 137. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9888\(199602\)31:2<129::AID-JMS305>3.0.CO;2-T](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9888(199602)31:2<129::AID-JMS305>3.0.CO;2-T)
- Delahunt, B., & Eble, J. N. (1997). Papillary renal cell carcinoma: a clinicopathologic and immunohistochemical study of 105 tumors. *Modern pathology: an official journal of the United*

- States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 10(6), 537-544.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9195569/>
- Delahunt, B., Eble, J. N., McCredie, M. R. E., Bethwaite, P. B., Stewart, J. H., & Bilous, A. M. (2001). Morphologic typing of papillary renal cell carcinoma: Comparison of growth kinetics and patient survival in 66 cases. *Human Pathology*, 32(6), 590-595. <https://doi.org/10.1053/hupa.2001.24984>
- D'Elia Zanella, L. G. F. A. B., & Borges, M. M. (2021). The Placental Buffer Effect and the Pathophysiology of COVID-19: Possibilities for a Guide Aimed at Pregnant and Postpartum Women Considering Praxis: Theory, Clinical and Laboratory Observation. *Journal of Infectious Diseases and Epidemiology*, 7(11), 234. <https://doi.org/10.23937/2474-3658/1510234>
- Diana, P., Klatte, T., Amparore, D., Bertolo, R., Carbonara, U., Erdem, S., Ingels, A., Kara, O., Marandino, L., Marchioni, M., Muselaers, S., Pavan, N., Pecoraro, A., Pecoraro, A., Roussel, E., & Campi, R. (2023). Screening programs for renal cell carcinoma: a systematic review by the EAU young academic urologists renal cancer working group. *World Journal of Urology*, 41(4), 929-940. <https://doi.org/10.1007/s00345-022-03993-6>
- di Meo, N. A., Lasorsa, F., Rutigliano, M., Loizzo, D., Ferro, M., Stella, A., Bizzoca, C., Vincenti, L., Pandolfo, S. D., Autorino, R., Crocetto, F., Montanari, E., Spilotros, M., Battaglia, M., Ditunno, P., & Lucarelli, G. (2022). Renal Cell Carcinoma as a Metabolic Disease: An Update on Main Pathways, Potential Biomarkers, and Therapeutic Targets. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(22), 14360. <https://doi.org/10.3390/ijms232214360>
- Dixon, S. J., Lemberg, K. M., Lamprecht, M. R., Skouta, R., Zaitsev, E. M., Gleason, C. E., Patel, D. N., Bauer, A. J., Cantley, A. M., Yang, W. S., Morrison, B., & Stockwell, B. R. (2012). Ferroptosis: An Iron-Dependent Form of Nonapoptotic Cell Death. *Cell*, 149(5), 1060-1072. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.03.042>
- Dong, B., Gao, Y., Kang, X., Gao, H., Zhang, J., Guo, H., You, M. J., Xue, W., Cheng, J., & Huang, Y. (2016). SENP1 promotes proliferation of clear cell renal cell carcinoma through activation of glycolysis. *Oncotarget*, 7(49), 80435-80449. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.12606>
- Dufour-Rainfray, D., Lambérioux, M., Boulard, P., Guidotti, M., Delaye, J. -B., Ribeiro, M. -J., Gauchez, A. -S., Balageas, A. -C., Emond, P., & Agin, A. (2020). Metabolomics – an overview. From basic principles to potential biomarkers (part 2). *Médecine Nucléaire*, 44(3), 158-163. <https://doi.org/10.1016/j.mednuc.2020.02.004>
- Dunn, W. B., Bailey, N. J. C., & Johnson, H. E. (2005). Measuring the metabolome: current analytical technologies. *The Analyst*, 130(5), 606-625. <https://doi.org/10.1039/b418288j>
- Du, W., Zhang, L., Brett-Morris, A., Aguila, B., Kerner, J., Hoppel, C. L., Puchowicz, M., Serra, D., Herrero, L., Rini, B. I., Campbell, S., & Welford, S. M. (2017). HIF drives lipid deposition and cancer in ccRCC via repression of fatty acid metabolism. *Nature Communications*, 8(1), 1769. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01965-8>
- Elwood, H., Chaux, A., Schultz, L., Illei, P. B., Baydar, D. E., Billis, A., Sharma, R., Argani, P., Epstein, J. I., & Netto, G. J. (2011). Immunohistochemical Analysis of SMARCB1/INI-1 Expression in Collecting Duct Carcinoma. *Urology*, 78(2), 474.e1-474.e5. <https://doi.org/10.1016/j.urology.2011.04.043>
- Emwas, A. -H., Roy, R., McKay, R. T., Tenori, L., Saccenti, E., Gowda, G. A. N., Raftery, D., Alahmari, F., Jaremko, L., Jaremko, M., & Wishart, D. S. (2019). NMR Spectroscopy for Metabolomics Research. *Metabolites*, 9(7), 123. <https://doi.org/10.3390/metabo9070123>
- Ervik, M., Lam, F., Laversanne, M., Ferlay, J., & Bray, F. (2021). *Global Cancer Observatory: Cancer Over Time*. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. <https://gco.iarc.fr/overtime>
- Fantin, V. R., St-Pierre, J., & Leder, P. (2006). Attenuation of LDH-A expression uncovers a link between glycolysis, mitochondrial physiology, and tumor maintenance. *Cancer Cell*, 9(6), 425-434. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.04.023>
- FIA: Flow Injection Analysis (pressure only, NO voltage). (2020). Analytical Sciences Digital Library. Retrieved April 25, 2024, from <https://chem.libretexts.org/@go/page/62645>
- Fiehn, O. (2001). Combining Genomics, Metabolome Analysis, and Biochemical Modelling to Understand Metabolic Networks. *Comparative and Functional Genomics*, 2(3), 155-168. <https://doi.org/10.1002/cfg.82>

- Fontana, J., Trnka, J., Maďa, P., & Ivák, P. (2018). *Přeměna látek a energie v buňce*. Funkce buněk a lidského těla: Multimediální skripta. Retrieved November 27, 2023, from <http://fbt.cz/skripta/iipremena-latek-a-energie-v-bunce/>
- Friedecký, D., & Lemr, K. (2012). Úvod do hmotnostní spektrometrie. *Klinická biochemie a metabolismus*, 20(41), 152-157. <https://www.cskb.cz/res/file/KBM-pdf/2012/2012-3/KBM12-3-Friedecky-152.pdf>
- Fryzelková, V. (2022). *Cílená metabolická analýza vzorků plazem pacientů s karcinomem ledvin* [Diplomová práce]. Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta, Katedra buněčné biologie a genetiky.
- 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. *International Journal of Cancer*, 130(12), 2791-2800. <https://doi.org/10.1002/ijc.26274>
- Gasparre, G., Hervouet, E., de Laplanche, E., Demont, J., Pennisi, L. F., Colombel, M., Mège-Lechevallier, F., Scoazec, J. -Y., Bonora, E., Smeets, R., Smeitink, J., Lazar, V., Lespinasse, J., Giraud, S., Godinot, C., Romeo, G., & Simonnet, H. (2008). Clonal expansion of mutated mitochondrial DNA is associated with tumor formation and complex I deficiency in the benign renal oncocytoma. *Human Molecular Genetics*, 17(7), 986-995. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddm371>
- Gatalica, Z., Lilleberg, S. L., Monzon, F. A., Koul, M. S., Bridge, J. A., Knezetic, J., Legendre, B., Sharma, P., & McCue, P. A. (2011). Renal medullary carcinomas: histopathologic phenotype associated with diverse genotypes. *Human Pathology*, 42(12), 1979-1988. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2011.02.026>
- Gong, P., Zhuang, Q., Wang, X., Xu, R., Ding, T., Yin, S., & He, X. (2020). Mucinous tubular and spindle cell carcinoma of the kidney: Five case reports and review of the literature. *Oncology Letters*, 20(6), 337. <https://doi.org/10.3892/ol.2020.12201>
- Greaves, J., & Roboz, J. (c2014). *Mass spectrometry for the novice*. CRC Press.
- Griffiths, W. J., Koal, T., Wang, Y., Kohl, M., Enot, D. P., & Deigner, H. -P. (2010). Targeted Metabolomics for Biomarker Discovery. *Angewandte Chemie International Edition*, 49(32), 5426-5445. <https://doi.org/10.1002/anie.200905579>
- Grim, M., Druga, R., Páč, L., Pospíšilová, B., & Smetana, K. (c2005). *Základy anatomie*. Galén.
- Guo, J., & Turesky, R. J. (2019). Emerging Technologies in Mass Spectrometry-Based DNA Adductomics. *High-Throughput*, 8(2), 13. <https://doi.org/10.3390/ht8020013>
- Hacking, S. M., Pavlick, D., Wang, Y., Carneiro, B. A., Mullally, M., Lu, S., Canepa, M., Bratslavsky, G., Jacob, J., Necchi, A., Spiess, P. E., Wang, L., Yakirevich, E., & Ross, J. (2023). Comprehensive Genomic Profiling of NF2 -Mutated Kidney Tumors Reveals Potential Targets for Therapy. *The Oncologist*, 28(7), e508-e519. <https://doi.org/10.1093/oncolo/oyad040>
- Hall, J. E., & Guyton, A. C. (c2011). *Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology* (12th ed.). Saunders, an imprint of Elsevier.
- Ham, A. J. L., & Liebler, D. C. (1997). Antioxidant Reactions of Vitamin E in the Perfused Rat Liver: Product Distribution and Effect of Dietary Vitamin E Supplementation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 339(1), 157-164. <https://doi.org/10.1006/abbi.1996.9856>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144(5), 646-674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Havlíček, V., & Tureček, F. (2020). Kvadrupolový analyzátor a iontové pasti. *Chemické Listy*, 114(2), 106-112. <http://www.chemicke-listy.cz/ojs3/index.php/chemicke-listy/article/view/3537>
- Henry, R. A. (2014). Impact of Particle Size Distribution on HPLC Column Performance. *LCGC Supplements*, 32(4), 12-19. <https://www.chromatographyonline.com/view/impact-particle-size-distribution-hplc-column-performance>
- Higdon, J., Drake, V. J., & Delage, B. (Eds.). (c2002-2023). *L-karnitin*. Oregon State University. Retrieved November 27, 2023, from <https://lpi.oregonstate.edu/mic/dietary-factors/L-carnitine>
- Ho, C. S., Lam, C. W., Chan, M. H., Cheung, R. C., Law, L. K., Lit, L. C., Ng, K. F., Suen, M. W., & Tai, H. L. (2003). Electrospray ionisation mass spectrometry: principles and clinical applications. *The Clinical biochemist. Reviews*, 24(1), 3-12. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1853331/>

- Hoerner, C. R., Chen, V. J., & Fan, A. C. (2019). The 'Achilles Heel' of Metabolism in Renal Cell Carcinoma: Glutaminase Inhibition as a Rational Treatment Strategy. *Kidney Cancer*, 3(1), 15-29. <https://doi.org/10.3233/KCA-180043>
- Holčapek, M. (Ed.). (2001). *Spojení vysokoúčinné kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie (HPLC/MS): sborník přednášek kurzu HPLC/MS pořádaného Spektroskopickou společností Jana Marka Marci a Univerzitou Pardubice*. Univerzita Pardubice.
- Holibková, A., & Laichman, S. (2010). *Přehled anatomie člověka* (5. vyd). Univerzita Palackého v Olomouci.
- Holmes, C., Carlson, S. M., McDonald, F., Jones, M., & Graham, J. (2016). Exploring the post-genomic world: differing explanatory and manipulatory functions of post-genomic sciences. *New Genetics and Society*, 35(1), 49-68. <https://doi.org/10.1080/14636778.2015.1133280>
- Hora, M., & Hes, O. (1998). Histologie nádorů ledvin dospělých. *Česká urologie*, 5, 29-32. <https://www.czechurol.cz/pdfs/cur/1998/05/09.pdf>
- Hornigold, N., Dunn, K. R., Craven, R. A., Zougman, A., Trainor, S., Shreeve, R., Brown, J., Sewell, H., Shires, M., Knowles, M., Fukuwatari, T., Maher, E. R., Burns, J., Bhattarai, S., Menon, M., Brazma, A., Scelo, G., Feulner, L., Riazalhosseini, Y., *et al.* (2020). Dysregulation at multiple points of the kynurenine pathway is a ubiquitous feature of renal cancer: implications for tumour immune evasion. *British Journal of Cancer*, 123(1), 137-147. <https://doi.org/10.1038/s41416-020-0874-y>
- Huang, H., Tang, Y., He, W., Huang, Q., Zhong, J., & Yang, Z. (2014). Key pathways and genes controlling the development and progression of clear cell renal cell carcinoma (ccRCC) based on gene set enrichment analysis. *International Urology and Nephrology*, 46(3), 539-553. <https://doi.org/10.1007/s11255-013-0511-2>
- Chan, D. A., Sutphin, P. D., Nguyen, P., Turcotte, S., Lai, E. W., Banh, A., Reynolds, G. E., Chi, J. -T., Wu, J., Solow-Cordero, D. E., Bonnet, M., Flanagan, J. U., Bouley, D. M., Graves, E. E., Denny, W. A., Hay, M. P., & Giaccia, A. J. (2011). Targeting GLUT1 and the Warburg Effect in Renal Cell Carcinoma by Chemical Synthetic Lethality. *Science Translational Medicine*, 3(94), 94ra70. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3002394>
- Chen, Y. -B., Xu, J., Skanderup, A. J., Dong, Y., Brannon, A. R., Wang, L., Won, H. H., Wang, P. I., Nanjangud, G. J., Jungbluth, A. A., Li, W., Ojeda, V., Hakimi, A. A., Voss, M. H., Schultz, N., Motzer, R. J., Russo, P., Cheng, E. H., Giacotti, F. G., *et al.* (2016). Molecular analysis of aggressive renal cell carcinoma with unclassified histology reveals distinct subsets. *Nature Communications*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/ncomms13131>
- Choueiri, T. K., Je, Y., & Cho, E. (2014). Analgesic use and the risk of kidney cancer: A meta-analysis of epidemiologic studies. *International Journal of Cancer*, 134(2), 384-396. <https://doi.org/10.1002/ijc.28093>
- Choueiri, T. K., Vaishampayan, U., Rosenberg, J. E., Logan, T. F., Harzstark, A. L., Bukowski, R. M., Rini, B. I., Srinivas, S., Stein, M. N., Adams, L. M., Ottesen, L. H., Laubscher, K. H., Sherman, L., McDermott, D. F., Haas, N. B., Flaherty, K. T., Ross, R., Eisenberg, P., Meltzer, P. S., *et al.* (2013). Phase II and Biomarker Study of the Dual MET/VEGFR2 Inhibitor Foretinib in Patients With Papillary Renal Cell Carcinoma. *Journal of Clinical Oncology*, 31(2), 181-186. <https://doi.org/10.1200/JCO.2012.43.3383>
- Chung, K. -T., & Gadupudi, G. S. (2011). Possible roles of excess tryptophan metabolites in cancer. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 52(2), 81-104. <https://doi.org/10.1002/em.20588>
- Inam-u-llah, Piao, F., Aadil, R. M., Suleman, R., Li, K., Zhang, M., Wu, P., Shahbaz, M., & Ahmed, Z. (2018). Ameliorative effects of taurine against diabetes: a review. *Amino Acids*, 50(5), 487-502. <https://doi.org/10.1007/s00726-018-2544-4>
- Intlekofer, A. M., Dematteo, R. G., Venneti, S., Finley, L. W. S., Lu, C., Judkins, A. R., Rustenburg, A. S., Grinaway, P. B., Chodera, J. D., Cross, J. R., & Thompson, C. B. (2015). Hypoxia Induces Production of L-2-Hydroxyglutarate. *Cell Metabolism*, 22(2), 304-311. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.06.023>
- Iribarne, J. V., Dziedzic, P. J., & Thomson, B. A. (1983). Atmospheric pressure ion evaporation-mass spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Physics*, 50(3), 331-347. [https://doi.org/10.1016/0020-7381\(83\)87009-0](https://doi.org/10.1016/0020-7381(83)87009-0)
- Isaacs, J. S., Jung, Y. J., Mole, D. R., Lee, S., Torres-Cabala, C., Chung, Y. -L., Merino, M., Trepel, J., Zbar, B., Toro, J., Ratcliffe, P. J., Linehan, W. M., & Neckers, L. (2005). HIF overexpression

- correlates with biallelic loss of fumarate hydratase in renal cancer: Novel role of fumarate in regulation of HIF stability. *Cancer Cell*, 8(2), 143-153. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2005.06.017>
- Jain, A., Li, X. H., & Chen, W. N. (2019). An untargeted fecal and urine metabolomics analysis of the interplay between the gut microbiome, diet and human metabolism in Indian and Chinese adults. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45640-y>
- Jiang, F., Richter, J., Schraml, P., Bubendorf, L., Gasser, T., Sauter, G., Mihatsch, M. J., & Moch, H. (1998). Chromosomal Imbalances in Papillary Renal Cell Carcinoma. *The American Journal of Pathology*, 153(5), 1467-1473. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)65734-3](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)65734-3)
- Jiang, P., Du, W., & Wu, M. (2014). Regulation of the pentose phosphate pathway in cancer. *Protein & cell*, 5(8), 592-602. <https://doi.org/10.1007/s13238-014-0082-8>
- Johnson, R. F., & Perkins, N. D. (2012). Nuclear factor- κ B, p53, and mitochondria: regulation of cellular metabolism and the Warburg effect. *Trends in Biochemical Sciences*, 37(8), 317-324. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2012.04.002>
- Jung, E. -J., Kwon, S. -W., Jung, B. -H., Oh, S. -H., & Lee, B. -H. (2011). Role of the AMPK/SREBP-1 pathway in the development of orotic acid-induced fatty liver. *Journal of Lipid Research*, 52(9), 1617-1625. <https://doi.org/10.1194/jlr.M015263>
- Kaelin, W. G. (2004). The Von Hippel-Lindau Tumor Suppressor Gene and Kidney Cancer. *Clinical Cancer Research*, 10(18), 6290S-6295S. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-sup-040025>
- Karlíková, R., Šíroková, J., Friedecký, D., Faber, E., Hrdá, M., Mičová, K., Fikarová, I., Gardlo, A., Janečková, H., Vrobel, I., & Adam, T. (2016). Metabolite Profiling of the Plasma and Leukocytes of Chronic Myeloid Leukemia Patients. *Journal of Proteome Research*, 15(9), 3158-3166. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.6b00356>
- Keerthana, C. K., Rayginia, T. P., Shifana, S. C., Anto, N. P., Kalimuthu, K., Isakov, N., & Anto, R. J. (2023). The role of AMPK in cancer metabolism and its impact on the immunomodulation of the tumor microenvironment. *Frontiers in Immunology*, 14, 1114582. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1114582>
- Kikuchi, J., Ito, K., & Date, Y. (2018). Environmental metabolomics with data science for investigating ecosystem homeostasis. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, 104, 56-88. <https://doi.org/10.1016/j.pnmrs.2017.11.003>
- Kim, E. R., Kwon, H. N., Nam, H., Kim, J. J., Park, S., & Kim, Y. -H. (2019). Urine-NMR metabolomics for screening of advanced colorectal adenoma and early stage colorectal cancer. *Scientific Reports*, 9(1), 4786. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41216-y>
- Kim, W. Y., & Kaelin, W. G. (2004). Role of VHL Gene Mutation in Human Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 22(24), 4991-5004. <https://doi.org/10.1200/JCO.2004.05.061>
- Kinnaird, A., Dromparis, P., Saleme, B., Gurtu, V., Watson, K., Paulin, R., Zervopoulos, S., Stenson, T., Sutendra, G., Pink, D. B., Carmine-Simmen, K., Moore, R., Lewis, J. D., & Michelakis, E. D. (2016). Metabolic Modulation of Clear-cell Renal Cell Carcinoma with Dichloroacetate, an Inhibitor of Pyruvate Dehydrogenase Kinase. *European Urology*, 69(4), 734-744. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2015.09.014>
- Kiuru, M., Launonen, V., Hietala, M., Aittomäki, K., Vierimaa, O., Salovaara, R., Arola, J., Pukkala, E., Sistonen, P., Herva, R., & Aaltonen, L. A. (2001). Familial Cutaneous Leiomyomatosis Is a Two-Hit Condition Associated with Renal Cell Cancer of Characteristic Histopathology. *The American Journal of Pathology*, 159(3), 825-829. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)61757-9](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)61757-9)
- Koide, T. (1992). The clinical significance of tissue, blood and urine polyamine in renal cell carcinoma. *The Japanese Journal of Urology*, 83(8), 1228-1237. <https://doi.org/10.5980/jpnjurol1989.83.1228>
- Kordalewska, M., & Markuszewski, M. J. (2015). Metabolomics in cardiovascular diseases. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 113, 121-136. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2015.04.021>
- Kovacs, G. (1993). Molecular differential pathology of renal cell tumours. *Histopathology*, 22(1), 1-8. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.1993.tb00061.x>
- Křížek, M., & Šíma, J. (2015). *Analytická chemie*. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta. http://kch.zf.jcu.cz/vyuka/download/Analyticka_chemie_komplet.pdf
- Latif, F., Tory, K., Gnarra, J., Yao, M., Duh, F. -M., Orcutt, M. L., Stackhouse, T., Kuzmin, I., Modi, W., Geil, L., Schmidt, L., Zhou, F., Li, H., Wei, M. H., Chen, F., Glenn, G., Choyke, P., Walther, M. C. M., Weng, Y., *et al.* (1993). Identification of the von Hippel-Lindau Disease Tumor Suppressor Gene. *Science*, 260(5112), 1317-1320. <https://doi.org/10.1126/science.8493574>

- Ledvina, M., Stoklasová, A., & Cerman, J. (2020). *Biochemie pro studující medicíny, II. díl* (3. vydání). Univerzita Karlova, nakladatelství Karolinum.
- Lei, Z., Huhman, D. V., & Sumner, L. W. (2011). Mass Spectrometry Strategies in Metabolomics. *Journal of Biological Chemistry*, 286(29), 25435-25442. <https://doi.org/10.1074/jbc.R111.238691>
- Liberti, M. V., & Locasale, J. W. (2016). The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? *Trends in Biochemical Sciences*, 41(3), 211-218. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2015.12.001>
- Li, B., Qiu, B., Lee, D. S. M., Walton, Z. E., Ochocki, J. D., Mathew, L. K., Mancuso, A., Gade, T. P. F., Keith, B., Nissim, I., & Simon, M. C. (2014). Fructose-1,6-bisphosphatase opposes renal carcinoma progression. *Nature*, 513(7517), 251-255. <https://doi.org/10.1038/nature13557>
- Li, L., Zhu, C., Xu, S., Xu, Q., Xu, D., Gan, S., Cui, X., & Tang, C. (2023). PUS1 is a novel biomarker for evaluating malignancy of human renal cell carcinoma. *Aging*, 15(11), 5215–5227. <https://doi.org/10.18632/aging.204799>
- Ling, W., Ma, X., Luo, Y., Chen, L., Wang, H., Wang, X., Chen, N., Zeng, H., Li, Y., & Cai, D. (2017). Ultrasonographic Findings of Renal Cell Carcinomas Associated with Xp11.2 Translocation/TFE3 Gene Fusion. *Contrast Media Mol Imaging*, 2017(2958357), 1-5. <https://doi.org/10.1155/2017/2958357>
- 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, 633. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00663>
- Liu, Y., Cao, Y., Zhang, W., Bergmeier, S., Qian, Y., Akbar, H., Colvin, R., Ding, J., Tong, L., Wu, S., Hines, J., & Chen, X. (2012). A Small-Molecule Inhibitor of Glucose Transporter 1 Downregulates Glycolysis, Induces Cell-Cycle Arrest, and Inhibits Cancer Cell Growth In Vitro and In Vivo. *Molecular Cancer Therapeutics*, 11(8), 1672-1682. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-12-0131>
- Lopez-Beltran, A., Scarpelli, M., Montironi, R., & Kirkali, Z. (2006). 2004 WHO Classification of the Renal Tumors of the Adults. *European Urology*, 49(5), 798-805. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2005.11.035>
- Macleod, L. C., Hotaling, J. M., Wright, J. L., Davenport, M. T., Gore, J. L., Harper, J., & White, E. (2013). Risk Factors for Renal Cell Carcinoma in the VITAL Study. *Journal of Urology*, 190(5), 1657-1661. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2013.04.130>
- Mardones, P., & Rigotti, A. (2004). Cellular mechanisms of vitamin E uptake: relevance in α -tocopherol metabolism and potential implications for disease. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 15(5), 252-260. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2004.02.006>
- Marvin, L. F., Roberts, M. A., & Fay, L. B. (2003). Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in clinical chemistry. *Clinica Chimica Acta*, 337(1-2), 11-21. <https://doi.org/10.1016/j.cccn.2003.08.008>
- Masson, N., & Ratcliffe, P. J. (2014). Hypoxia signaling pathways in cancer metabolism: the importance of co-selecting interconnected physiological pathways. *Cancer & metabolism*, 2(1). <https://doi.org/10.1186/2049-3002-2-3>
- Matouš, B., Bubnová, E., Buděšínská, A., Černý, R., Kazda, A., Kleibl, Z., Kotyza, J., Křemen, J., Kvasnička, J., Pelouch, V., Štípek, S., & Zima, T. (c2010). *Základy lékařské chemie a biochemie*. Galén.
- Maughan, B. L. (2022). Start of a New Era: Management of Non-Clear Cell Renal Cell Carcinoma in 2022: Management of Non-Clear Cell Renal Cell Carcinoma in 2022. *Current Oncology Reports*, 24(9), 1201-1208. <https://doi.org/10.1007/s11912-022-01269-1>
- McCullagh, J., & Oldham, N. ([2019]). *Mass spectrometry*. Oxford University Press.
- Meric-Bernstam, F., Tannir, N. M., Mier, J. W., DeMichele, A., Telli, M. L., Fan, A. C., Munster, P. N., Carvajal, R. D., Orford, K. W., Bennett, M. K., Iliopoulos, O., Owonikoko, T. K., Patel, M. R., McKay, R., Infante, J. R., Voss, M. H., & Harding, J. J. (2016). Phase 1 study of CB-839, a small molecule inhibitor of glutaminase (GLS), alone and in combination with everolimus (E) in patients (pts) with renal cell cancer (RCC). *Journal of Clinical Oncology*, 34(15_suppl), 4568-4568. https://doi.org/10.1200/JCO.2016.34.15_suppl.4568

- Minoru, M., Masao, O., Toshihiko, K., Takao, S., Kenji, S., & Teruo, N. (1978). Concentrations of polyamines in renal cell carcinoma. *Clinica Chimica Acta*, 87(1), 93-99. [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(78\)90062-1](https://doi.org/10.1016/0009-8981(78)90062-1)
- Mitschke, N., Vemulapalli, S. P. B., & Dittmar, T. (2023). NMR spectroscopy of dissolved organic matter: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 21(2), 689-723. <https://doi.org/10.1007/s10311-022-01528-4>
- Mizutani, Y., Toiyama, D., Shiraishi, T., Nakamura, T., Mikami, K., Takaha, N., Okihara, K., Ukimura, O., Kawauchi, A., & Miki, T. (2007). Enhanced orotate phosphoribosyltransferase activity in renal cell carcinoma and its prognostic significance. *Journal of Clinical Oncology*, 25(18_suppl), 15590-15590. https://doi.org/10.1200/jco.2007.25.18_suppl.15590
- Moco, S., Vervoort, J., Moco, S., Bino, R. J., De Vos, R. C. H., & Bino, R. (2007). Metabolomics technologies and metabolite identification. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 26(9), 855-866. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2007.08.003>
- Mondul, A. M., Weinstein, S. J., Moy, K. A., Männistö, S., & Albanes, D. (2014). Vitamin D-binding protein, circulating vitamin D and risk of renal cell carcinoma. *International Journal of Cancer*, 134(11), 2699-2706. <https://doi.org/10.1002/ijc.28596>
- Monteiro, M. S., Barros, A. S., Pinto, J., Carvalho, M., Pires-Luís, A. S., Henrique, R., Jerónimo, C., Bastos, M. de L., Gil, A. M., & Guedes de Pinho, P. (2016). Nuclear Magnetic Resonance metabolomics reveals an excretory metabolic signature of renal cell carcinoma. *Scientific Reports*, 6(1), 37275. <https://doi.org/10.1038/srep37275>
- Morjaria, S. (2021). Driver mutations in oncogenesis. *International Journal of Molecular and Immuno Oncology*, 6(2), 100-102. https://doi.org/10.25259/IJMIO_26_2020
- Motzer, R. J., & Russo, P. (2000). Systematic therapy for renal cell carcinoma. *Journal of Urology*, 163(2), 408-417. [https://doi.org/10.1016/S0022-5347\(05\)67889-5](https://doi.org/10.1016/S0022-5347(05)67889-5)
- Msaouel, P., Malouf, G. G., Su, X., Yao, H., Tripathi, D. N., Soeung, M., Gao, J., Rao, P., Coarfa, C., Creighton, C. J., Bertocchio, J. -P., Kunnimalaiyaan, S., Multani, A. S., Blando, J., He, R., Shapiro, D. D., Perelli, L., Srinivasan, S., Carbone, F., *et al.* (2020). Comprehensive Molecular Characterization Identifies Distinct Genomic and Immune Hallmarks of Renal Medullary Carcinoma. *Cancer Cell*, 37(5), 720-734.e13. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2020.04.002>
- Muglia, V. F., & Prando, A. (2015). Renal cell carcinoma: histological classification and correlation with imaging findings. *Radiologia Brasileira*, 48(3), 166-174. <https://doi.org/10.1590/0100-3984.2013.1927>
- Muñoz, J. P., & Calaf, G. M. (2023). Downregulation of Glycine N-Acyltransferase in Kidney Renal Clear Cell Carcinoma: A Bioinformatic-Based Screening. *Diagnostics*, 13(23), 3505. <https://doi.org/10.3390/diagnostics13233505>
- Myszczyszyn, A., Czarnecka, A. M., Matak, D., Szymanski, L., Lian, F., Kornakiewicz, A., Bartnik, E., Kukwa, W., Kieda, C., & Szczylik, C. (2015). The Role of Hypoxia and Cancer Stem Cells in Renal Cell Carcinoma Pathogenesis. *Stem Cell Reviews and Reports*, 11(6), 919-943. <https://doi.org/10.1007/s12015-015-9611-y>
- Nabi, S., Kessler, E. R., Bernard, B., Flaig, T. W., & Lam, E. T. (2018). Renal cell carcinoma: a review of biology and pathophysiology. *F1000Research*, 7, 307. <https://doi.org/10.12688/f1000research.13179.1>
- Nagakura, K., Abe, E., Suda, T., Hayakawa, M., Nakamura, H., & Tazaki, H. (1986). Inhibitory effect of 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ on the growth of the renal carcinoma cell line. *Kidney International*, 29(4), 834-840. <https://doi.org/10.1038/ki.1986.74>
- Nanita, S. C., & Kaldon, L. G. (2016). Emerging flow injection mass spectrometry methods for high-throughput quantitative analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 408(1), 23-33. <https://doi.org/10.1007/s00216-015-9193-1>
- National Cancer Institute. (2023). *NCCR*Explorer: An interactive website for NCCR cancer statistics*. NCCR*Explorer. Retrieved December 13, 2023, from <https://nccrexplorer.ccdi.cancer.gov>
- Naz, S., Vallejo, M., García, A., & Barbas, C. (2014). Method validation strategies involved in non-targeted metabolomics. *Journal of Chromatography A*, 1353, 99-105. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.04.071>
- Nečas, E. (2021). *Obecná patologická fyziologie* (Vydání páte, upravené). Univerzita Karlova, nakladatelství Karolinum.

- Newgard, C. B., An, J., Bain, J. R., Muehlbauer, M. J., Stevens, R. D., Lien, L. F., Haqq, A. M., Shah, S. H., Arlotto, M., Slentz, C. A., Rochon, J., Gallup, D., Ilkayeva, O., Wenner, B. R., Yancy, W. S., Eisenson, H., Musante, G., Surwit, R. S., Millington, D. S., *et al.* (2009). A Branched-Chain Amino Acid-Related Metabolic Signature that Differentiates Obese and Lean Humans and Contributes to Insulin Resistance. *Cell Metabolism*, 9(4), 311-326. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2009.02.002>
- Niessen, W. M. A., & Falck, D., Kool, J. (Ed.). (2015). Introduction to Mass Spectrometry, a Tutorial. In *Analyzing Biomolecular Interactions by Mass Spectrometry*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. <https://doi.org/10.1002/9783527673391.ch1>
- Nogueira, V., & Hay, N. (2013). Molecular Pathways: Reactive Oxygen Species Homeostasis in Cancer Cells and Implications for Cancer Therapy. *Clinical Cancer Research*, 19(16), 4309-4314. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-1424>
- Nowak, G., Clifton, G. L., & Bakajsova, D. (2008). Succinate Ameliorates Energy Deficits and Prevents Dysfunction of Complex I in Injured Renal Proximal Tubular Cells. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 324(3), 1155-1162. <https://doi.org/10.1124/jpet.107.130872>
- Ohe, C., Smith, S. C., Sirohi, D., Divatia, M., de Peralta-Venturina, M., Paner, G. P., Agaimy, A., Amin, M. B., Argani, P., Chen, Y. -B., Cheng, L., Colechia, M., Compérat, E., Werneck da Cunha, I., Epstein, J. I., Gill, A. J., Hes, O., Hirsch, M. S., Jochum, W., *et al.* (2018). Reappraisal of Morphologic Differences Between Renal Medullary Carcinoma, Collecting Duct Carcinoma, and Fumarate Hydratase-deficient Renal Cell Carcinoma. *American Journal of Surgical Pathology*, 42(3), 279-292. <https://doi.org/10.1097/PAS.0000000000001000>
- Okazaki, A., Gameiro, P. A., Christodoulou, D., Laviollette, L., Schneider, M., Chaves, F., Stemmer-Rachamimov, A., Yazinski, S. A., Lee, R., Stephanopoulos, G., Zou, L., & Iliopoulos, O. (2017). Glutaminase and poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors suppress pyrimidine synthesis and VHL-deficient renal cancers. *Journal of Clinical Investigation*, 127(5), 1631-1645. <https://doi.org/10.1172/JCI87800>
- Oto, J., Fernández-Pardo, Á., Roca, M., Plana, E., Solmoirago, M. ^a J., Sánchez-González, J. V., Vera-Donoso, C. D., Martínez-Sarmiento, M., España, F., Navarro, S., & Medina, P. (2020). Urine metabolomic analysis in clear cell and papillary renal cell carcinoma: A pilot study. *Journal of Proteomics*, 2020(218), 103723. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2020.103723>
- Pal, S. K., Choueiri, T. K., Wang, K., Khaira, D., Karam, J. A., Van Allen, E., Palma, N. A., Stein, M. N., Johnson, A., Squillace, R., Elvin, J. A., Chmielecki, J., Yelensky, R., Yakirevich, E., Lipson, D., Lin, D. I., Miller, V. A., Stephens, P. J., Ali, S. M., *et al.* (2016). Characterization of Clinical Cases of Collecting Duct Carcinoma of the Kidney Assessed by Comprehensive Genomic Profiling. *European Urology*, 70(3), 516-521. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2015.06.019>
- Pandey, N., Lanke, V., & Vinod, P. K. (2020). Network-based metabolic characterization of renal cell carcinoma. *Scientific Reports*, 10(1), 5955. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-62853-8>
- Papandreou, I., Cairns, R. A., Fontana, L., Lim, A. L., & Denko, N. C. (2006). HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption. *Cell Metabolism*, 3(3), 187-197. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2006.01.012>
- Pavlovich, C. P., Walther, M. C. M., Eyler, R. A., Hewitt, S. M., Zbar, B., Linehan, W. M., & Merino, M. J. (2002). Renal Tumors in the Birt-Hogg-Dubé Syndrome. *The American Journal of Surgical Pathology*, 26(12), 1542-1552. <https://doi.org/10.1097/00000478-200212000-00002>
- Pilátová, K. (2008). *Metabolomika* [Bakalářská práce, Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, Ústav biochemie]. https://is.muni.cz/th/pequ8/Bakalarska_prace_final.pdf
- Pokorný, J. (2002). *Přehled fyziologie člověka: díl 2* (3. vydání). Karolinium.
- Ponnusamy, L., Mahalingaiah, P. K. S., & Singh, K. P. (2015). Chronic Oxidative Stress Increases Resistance to Doxorubicin-Induced Cytotoxicity in Renal Carcinoma Cells Potentially Through Epigenetic Mechanism. *Molecular Pharmacology*, 89(1), 27-41. <https://doi.org/10.1124/mol.115.100206>
- Popławski, P., Tohge, T., Bogusławska, J., Rybicka, B., Tański, Z., Treviño, V., Fernie, A. R., & Piekiełko-Witkowska, A. (2017). Integrated transcriptomic and metabolomic analysis shows that disturbances in metabolism of tumor cells contribute to poor survival of RCC patients. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1863(3), 744-752. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2016.12.011>

- Pouysségur, J., Marchiq, I., Parks, S. K., Durivault, J., Ždravlević, M., & Vucetic, M. (2022). 'Warburg effect' controls tumor growth, bacterial, viral infections and immunity – Genetic deconstruction and therapeutic perspectives. *Seminars in Cancer Biology*, 86, 334-346. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2022.07.004>
- Prasad, S. R., Narra, V. R., Shah, R., Humphrey, P. A., Jagirdar, J., Catena, J. R., Dalrymple, N. C., & Siegel, C. L. (2007). Segmental disorders of the nephron: histopathological and imaging perspective. *The British Journal of Radiology*, 80(956), 593-602. <https://doi.org/10.1259/bjr/20129205>
- Qiu, B., Ackerman, D., Sanchez, D. J., Li, B., Ochocki, J. D., Grazioli, A., Bobrovnikova-Marjon, E., Diehl, J. A., Keith, B., & Simon, M. C. (2015). HIF2 α -Dependent Lipid Storage Promotes Endoplasmic Reticulum Homeostasis in Clear-Cell Renal Cell Carcinoma. *Cancer Discovery*, 5(6), 652-667. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-14-1507>
- Racek, J., & Rajdl, D. ([2021]). *Klinická biochemie* (Třetí, přepracované a rozšířené vydání). Galén.
- Ragone, R., Sallustio, F., Piccinonna, S., Rutigliano, M., Vanessa, G., Palazzo, S., Lucarelli, G., Ditunno, P., Battaglia, M., Fanizzi, F., & Schena, F. (2016). Renal Cell Carcinoma: A Study through NMR-Based Metabolomics Combined with Transcriptomics. *Diseases*, 4(1), 7. <https://doi.org/10.3390/diseases4010007>
- Raterink, R. -J., Lindenburg, P. W., Vreeken, R. J., Ramautar, R., & Hankemeier, T. (2014). Recent developments in sample-pretreatment techniques for mass spectrometry-based metabolomics. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 61, 157-167. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2014.06.003>
- Rehman, T., Shabbir, M. A., Inam-Ur-Raheem, M., Manzoor, M. F., Ahmad, N., Liu, Z. -W., Ahmad, M. H., Siddeeg, A., Abid, M., & Aadil, R. M. (2020). Cysteine and homocysteine as biomarker of various diseases. *Food Sci Nutr*, 8(9), 4696-4707. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1818>
- Reta, G. F., Tonn, C. E., Ríos-Luci, C., León, L. G., Pérez-Roth, E., Padrón, J. M., & Donadel, O. J. (2012). Cytotoxic Bioactivity of some Phenylpropanoic Acid Derivatives. *Natural product communications*, 7(10), 1341–1346. <https://journals.sagepub.com/doi/pdf/10.1177/1934578X1200701023>
- Roomi, M., Ivanov, V., Kalinovsky, T., Niedzwiecki, A., & Rath, M. (2006). Anticancer effect of lysine, proline, arginine, ascorbic acid and green tea extract on human renal adenocarcinoma line 786-0. *Oncology Reports*. <https://doi.org/10.3892/or.16.5.943>
- Salech, F., Ponce, D. P., Paula-Lima, A. C., SanMartin, C. D., & Behrens, M. I. (2020). Nicotinamide, a Poly [ADP-Ribose] Polymerase 1 (PARP-1) Inhibitor, as an Adjunctive Therapy for the Treatment of Alzheimer's Disease. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 12, 255. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2020.00255>
- Samudio, I., Fiegl, M., & Andreeff, M. (2009). Mitochondrial Uncoupling and the Warburg Effect: Molecular Basis for the Reprogramming of Cancer Cell Metabolism. *Cancer Research*, 69(6), 2163-2166. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-3722>
- Sarkaria, J. N., Busby, E. C., Tibbetts, R. S., Roos, P., Taya, Y., Karnitz, L. M., & Abraham, R. T. (1999). Inhibition of ATM and ATR Kinase Activities by the Radiosensitizing Agent, Caffeine. *Cancer Research*, 59(17), 4375–4382. <https://aacrjournals.org/cancerres/article/59/17/4375/505493/Inhibition-of-ATM-and-ATR-Kinase-Activities-by-the>
- Sartini, D., Muzzonigro, G., Milanese, G., Pierella, F., Rossi, V., & Emanuelli, M. (2006). Identification of Nicotinamide N-Methyltransferase as a Novel Tumor Marker for Renal Clear Cell Carcinoma. *Journal of Urology*, 176(5), 2248-2254. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2006.07.046>
- Saugstad, O. D. (1988). Hypoxanthine as an Indicator of Hypoxia: Its Role in Health and Disease through Free Radical Production. *Pediatric research*, 23(2). <https://www.nature.com/articles/pr1988227.pdf>
- Sen, N., Paul, B. D., Gadalla, M. M., Mustafa, A. K., Sen, T., Xu, R., Kim, S., & Snyder, S. H. (2012). Hydrogen Sulfide-Linked Sulfhydration of NF- κ B Mediates Its Antiapoptotic Actions. *Molecular Cell*, 45(1), 13-24. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.10.021>
- Shahin, N. N., El-Nabarawy, N. A., Gouda, A. S., & Mégarbane, B. (2019). The protective role of spermine against male reproductive aberrations induced by exposure to electromagnetic field – An experimental investigation in the rat. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 370, 117-130. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2019.03.009>

- Sheng, X., Cao, D., Yuan, J., Zhou, F., Wei, Q., Xie, X., Cui, C., Chi, Z., Si, L., Li, S., Mao, L., Lian, B., Tang, B., Yan, X., Wang, X., Kong, Y., Dai, J., Bai, X., Zhou, L., *et al.* (2018). Sorafenib in combination with gemcitabine plus cisplatin chemotherapy in metastatic renal collecting duct carcinoma: A prospective, multicentre, single-arm, phase 2 study. *European Journal of Cancer*, *100*, 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2018.04.007>
- Shen, C., Huang, Y., Yi, S., Fang, Z., & Li, L. (2015). Association of Vitamin E Intake with Reduced Risk of Kidney Cancer: A Meta-Analysis of Observational Studies. *Medical Science Monitor*, *21*, 3420-3426. <https://doi.org/10.12659/MSM.896018>
- Shim, E. -H., Livi, C. B., Rakheja, D., Tan, J., Benson, D., Parekh, V., Kho, E. -Y., Ghosh, A. P., Kirkman, R., Velu, S., Dutta, S., Chenna, B., Rea, S. L., Mishur, R. J., Li, Q., Johnson-Pais, T. L., Guo, L., Bae, S., Wei, S., *et al.* (2014). L-2-Hydroxyglutarate: An Epigenetic Modifier and Putative Oncometabolite in Renal Cancer. *Cancer Discovery*, *4*(11), 1290-1298. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-13-0696>
- Shim, H., Dolde, C., Lewis, B. C., Wu, C. -S., Dang, G., Jungmann, R. A., Dalla-Favera, R., & Dang, C. V. (1997). C-Myc transactivation of LDH-A: Implications for tumor metabolism and growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *94*(13), 6658-6663. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.13.6658>
- Shuch, B., Ricketts, C. J., Vocke, C. D., Komiya, T., Middelton, L. A., Kauffman, E. C., Merino, M. J., Metwalli, A. R., Dennis, P., & Linehan, W. M. (2013). Germline PTEN Mutation Cowden Syndrome: An Underappreciated Form of Hereditary Kidney Cancer. *Journal of Urology*, *190*(6), 1990-1998. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2013.06.012>
- Schaeffeler, E., Büttner, F., Reustle, A., Klumpp, V., Winter, S., Rausch, S., Fisel, P., Hennenlotter, J., Kruck, S., Stenzl, A., Wahrheit, J., Sonntag, D., Scharpf, M., Fend, F., Agaimy, A., Hartmann, A., Bedke, J., & Schwab, M. (2019). Metabolic and Lipidomic Reprogramming in Renal Cell Carcinoma Subtypes Reflects Regions of Tumor Origin. *European Urology Focus*, *5*(4), 608-618. <https://doi.org/10.1016/j.euf.2018.01.016>
- Schicho, R., Shaykhtudinov, R., Ngo, J., Nazyrova, A., Schneider, C., Panaccione, R., Kaplan, G. G., Vogel, H. J., & Storr, M. (2012). Quantitative Metabolomic Profiling of Serum, Plasma, and Urine by 1 H NMR Spectroscopy Discriminates between Patients with Inflammatory Bowel Disease and Healthy Individuals. *Journal of Proteome Research*, *11*(6), 3344-3357. <https://doi.org/10.1021/pr300139q>
- Schmidt, L., Duh, F. -M., Chen, F., Kishida, T., Glenn, G., Choyke, P., Scherer, S. W., Zhuang, Z., Lubensky, I., Dean, M., Allikmets, R., Chidambaram, A., Bergerheim, U. R., Feltis, J. T., Casadevall, C., Zamarron, A., Bernues, M., Richard, S., Lips, C. J. M., *et al.* (1997). Germline and somatic mutations in the tyrosine kinase domain of the MET proto-oncogene in papillary renal carcinomas. *Nature Genetics*, *16*(1), 68-73. <https://doi.org/10.1038/ng0597-68>
- Sirohi, D., Smith, S. C., Agarwal, N., & Maughan, B. L. (2018). Unclassified renal cell carcinoma: diagnostic difficulties and treatment modalities. *Research and Reports in Urology*, *10*, 205-217. <https://doi.org/10.2147/RRU.S154932>
- Sobotka, R., Čapoun, O., Kalousová, M., Hanuš, T., Zima, T., Košťířová, M., & Soukup, V. (2017). Prognostic Importance of Vitamins A, E and Retinol-binding Protein 4 in Renal Cell Carcinoma Patients. *Anticancer Research*, *37*(7), 3801-3806. <https://doi.org/10.21873/anticancer.11757>
- Sogutelen, E., Pacoli, K., Juriasingani, S., Akbari, M., Gabril, M., & Sener, A. (2020). Patterns of Expression of H 2 S-Producing Enzyme in Human Renal Cell Carcinoma Specimens: Potential Avenue for Future Therapeutics. *In Vivo*, *34*(5), 2775-2781. <https://doi.org/10.21873/invivo.12102>
- Soni, V., & Hartman, T. E. (Eds.). (2023). *Metabolomics: Recent Advances and Future Applications*. Springer Cham.
- Sowers, J. L., Sowers, M. L., Shavkunov, A. S., Hawkins, B. E., Wu, P., DeWitt, D. S., Prough, D. S., & Zhang, K. (2021). Traumatic brain injury induces region-specific glutamate metabolism changes as measured by multiple mass spectrometry methods. *IScience*, *24*(10), 103108. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.103108>
- Srigley, J. R., & Delahunt, B. (2009). Uncommon and recently described renal carcinomas. *Modern Pathology*, *22*, S2-S23. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2009.70>
- Srigley, J. R., & Eble, J. N. (1998). Collecting duct carcinoma of kidney. *Seminars in diagnostic pathology*, *15*(1), 54-67. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9503506/>

- Stahnke, H., Kittlaus, S., Kempe, G., & Alder, L. (2012). Reduction of Matrix Effects in Liquid Chromatography–Electrospray Ionization–Mass Spectrometry by Dilution of the Sample Extracts: How Much Dilution is Needed? *Analytical Chemistry*, 84(3), 1474-1482. <https://doi.org/10.1021/ac202661j>
- Stewart, K. (1981). Flow-injection analysis: A review of its early history. *Talanta*, 28(11), 789-797. [https://doi.org/10.1016/0039-9140\(81\)80019-7](https://doi.org/10.1016/0039-9140(81)80019-7)
- Sun, M., Tong, P., Kong, W., Dong, B., Huang, Y., Park, I. Y., Zhou, L., Liu, X. -D., Ding, Z., Zhang, X., Bai, S., German, P., Powell, R., Wang, Q., Tong, X., Tannir, N. M., Matin, S. F., Rathmell, W. K., Fuller, G. N., *et al.* (2017). HNF1B Loss Exacerbates the Development of Chromophobe Renal Cell Carcinomas. *Cancer Research*, 77(19), 5313-5326. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-17-0986>
- Škríba, A., Houšť, J., & Havlíček, V. (2020). Iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací. *Chemické Listy*, 114(2), 119–125. <http://www.chemicke-listy.cz/ojs3/index.php/chemicke-listy/article/view/3539>
- Tacchini, L., Gammella, E., De Ponti, C., Recalcati, S., & Cairo, G. (2008). Role of HIF-1 and NF-κB Transcription Factors in the Modulation of Transferrin Receptor by Inflammatory and Anti-inflammatory Signals. *Journal of Biological Chemistry*, 283(30), 20674-20686. <https://doi.org/10.1074/jbc.M800365200>
- Taki, K., Noda, S., Hayashi, Y., Tsuchihashi, H., Ishii, A., & Zaitso, K. (2020). A preliminary study of rapid-fire high-throughput metabolite analysis using nano-flow injection/Q-TOFMS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 412(17), 4127-4134. <https://doi.org/10.1007/s00216-020-02645-1>
- The Cancer Genome Atlas Research Network. (2016). Comprehensive Molecular Characterization of Papillary Renal-Cell Carcinoma. *New England Journal of Medicine*, 374(2), 135-145. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1505917>
- The Cancer Genome Atlas Research Network. (2013). Comprehensive molecular characterization of clear cell renal cell carcinoma. *Nature*, 499(7456), 43-49. <https://doi.org/10.1038/nature12222>
- Thomas, S. N. (2019). Mass spectrometry. In *Contemporary Practice in Clinical Chemistry* (pp. 171-185). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815499-1.00010-7>
- Thomas, T., & Thomas, T. J. (2001). Polyamines in cell growth and cell death: molecular mechanisms and therapeutic applications. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 58(2), 244-258. <https://doi.org/10.1007/PL00000852>
- Ticinesi, A., Guerra, A., Nouvenne, A., Meschi, T., & Maggi, S. (2023). Disentangling the Complexity of Nutrition, Frailty and Gut Microbial Pathways during Aging: A Focus on Hippuric Acid. *Nutrients*, 15(5), 1138. <https://doi.org/10.3390/nu15051138>
- Toge, H., Inagaki, T., Kojimoto, Y., Shinka, T., & Hara, I. (2009). Angiogenesis in renal cell carcinoma: The role of tumor-associated macrophages. *International Journal of Urology*, 16(10), 801-807. <https://doi.org/10.1111/j.1442-2042.2009.02377.x>
- Tomlinson, I. P., Alam, N. A., Rowan, A. J., Barclay, E., Jaeger, E. E., Kelsell, D., Leigh, I., Gorman, P., Lamlum, H., Rahman, S., Roylance, R. R., Olpin, S., Bevan, S., Barker, K., Hearle, N., Houlston, R. S., Kiuru, M., Lehtonen, R., Karhu, A., *et al.* (2002). Germline mutations in FH predispose to dominantly inherited uterine fibroids, skin leiomyomata and papillary renal cell cancer. *Nature Genetics*, 30(4), 406-410. <https://doi.org/10.1038/ng849>
- Toro, J. R., Wei, M. -H., Glenn, G. M., Weinreich, M., Toure, O., Vocke, C., Turner, M., Choyke, P., Merino, M. J., Pinto, P. A., Steinberg, S. M., Schmidt, L. S., & Linehan, W. M. (2008). BHD mutations, clinical and molecular genetic investigations of Birt-Hogg-Dube syndrome: a new series of 50 families and a review of published reports. *Journal of Medical Genetics*, 45(6), 321-331. <https://doi.org/10.1136/jmg.2007.054304>
- Trojanowicz, M., & Kołacińska, K. (2016). Recent advances in flow injection analysis. *The Analyst*, 141(7), 2085-2139. <https://doi.org/10.1039/C5AN02522B>
- Tsimafeyeu, I., Zolotareva, T., Varlamov, S., Zukov, R., Petkau, V., Mazhbich, M., Statsenko, G., Safina, S., Zaitsev, I., Sakaeva, D., Popov, A., Borisov, P., & Vladimirova, L. (2017). Five-year Survival of Patients With Metastatic Renal Cell Carcinoma in the Russian Federation: Results From the RENSUR5 Registry. *Clinical Genitourinary Cancer*, 15(6), e1069-e1072. <https://doi.org/10.1016/j.clgc.2017.07.017>

- Visconti, A., Le Roy, C. I., Rosa, F., Rossi, N., Martin, T. C., Mohny, R. P., Li, W., de Rinaldis, E., Bell, J. T., Venter, J. C., Nelson, K. E., Spector, T. D., & Falchi, M. (2019). Interplay between the human gut microbiome and host metabolism. *Nature Communications*, *10*(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12476-z>
- Wahlgren, T., Harmenberg, U., Sandström, P., Lundstam, S., Kowalski, J., Jakobsson, M., Sandin, R., & Ljungberg, B. (2013). Treatment and overall survival in renal cell carcinoma: a Swedish population-based study (2000–2008). *British Journal of Cancer*, *108*(7), 1541-1549. <https://doi.org/10.1038/bjc.2013.119>
- Walden, W. E., Selezneva, A. I., Dupuy, J., Volbeda, A., Fontecilla-Camps, J. C., Theil, E. C., & Volz, K. (2006). Structure of Dual Function Iron Regulatory Protein 1 Complexed with Ferritin IRE-RNA. *Science*, *314*(5807), 1903-1908. <https://doi.org/10.1126/science.1133116>
- Walcher, L., Kistenmacher, A. -K., Suo, H., Kitte, R., Dluczek, S., Strauß, A., Blaudszun, A. -R., Yevsa, T., Fricke, S., & Kossatz-Boehlert, U. (2020). Cancer Stem Cells—Origins and Biomarkers: Perspectives for Targeted Personalized Therapies. *Frontiers in Immunology*, *11*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01280>
- Walker, H. K., & Hall, W. D., Hurst, J. W. (Ed.). (1990). *Clinical Methods: The History, Physical, and Laboratory Examinations* (3rd edition). Butterworths.
- Wang, Y. -P., Li, J. -T., Qu, J., Yin, M., & Lei, Q. -Y. (2020). Metabolite sensing and signaling in cancer. *Journal of Biological Chemistry*, *295*(33), 11938-11946. <https://doi.org/10.1074/jbc.REV119.007624>
- Wang, Y., Liu, S., Tian, S., Du, R., Lin, T., Xiao, X., Wang, R., Chen, R., Geng, H., Subramanian, S., Niu, Y., & Wang, Y. (2022). C1QBP regulates apoptosis of renal cell carcinoma via modulating xanthine dehydrogenase (XDH) mediated ROS generation. *International Journal of Medical Sciences*, *19*(5), 842–857. <https://doi.org/10.7150/ijms.71703>
- Warburg, O. (1956). On respiratory impairment in cancer cells. *Science*, *124*(3215), 269–270.
- Wettersten, H. I., Hakimi, A. A., Morin, D., Bianchi, C., Johnstone, M. E., Donohoe, D. R., Trott, J. F., Aboud, O. A., Stirdivant, S., Neri, B., Wolfert, R., Stewart, B., Perego, R., Hsieh, J. J., & Weiss, R. H. (2015). Grade-Dependent Metabolic Reprogramming in Kidney Cancer Revealed by Combined Proteomics and Metabolomics Analysis. *Cancer Research*, *75*(12), 2541-2552. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-1703>
- WHO Classification of Tumours Editorial Board. (2022). *WHO Classification of Tumours: Urinary and Male Genital Tumours* (5th Edition, Volume 8). World Health Organization.
- Wishart, D. S., Guo, A. C., Oler, E., Wang, F., Anjum, A., Peters, H., Dizon, R., Sayeeda, Z., Tian, S., Lee, B. L., Berjanskii, M., Mah, R., Yamamoto, M., Jovel, J., Torres-Calzada, C., Hiebert-Giesbrecht, M., Lui, V. W., Varshavi, D., Varshavi, D., *et al.* (2022). HMDB 5.0: the Human Metabolome Database for 2022. *Nucleic Acids Research*, *50*(D1), D622-D631. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1062>
- Wood, P. L. (Ed.). (c2021). *Metabolomics*. Humana New York, NY.
- World Health Organization classification of tumours. (2022). *Urinary and male genital tumours* (5th edition, Volume 8). International Agency for Research on Cancer.
- Wu, L. (2021). Analysis of food Additives. In *Innovative Food Analysis* (pp. 157-180). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819493-5.00007-8>
- Wu, Q. -L., Fu, Y. -F., Zhou, W. -L., Wang, J. -X., Feng, Y. -H., Liu, J., Xu, J. -Y., He, P. -L., Zhou, R., Tang, W., Wang, G. -F., Zhou, Y., Yang, Y. -F., Ding, J., Li, X. -Y., Chen, X. -R., Yuan, C., Lawson, B. R., & Zuo, J. -P. (2005). Inhibition of S -Adenosyl-l-homocysteine Hydrolase Induces Immunosuppression. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *313*(2), 705-711. <https://doi.org/10.1124/jpet.104.080416>
- Xiao, R., Liu, C., He, W., Ma, L., & Kim, J. K. (2021). Prognostic Factors and a Nomogram Predicting Overall Survival and Cancer-Specific Survival for Patients with Collecting Duct Renal Cell Carcinoma. *BioMed Research International*, *2021*, 1-15. <https://doi.org/10.1155/2021/6736008>
- Xie, H., & Simon, M. C. (2017). Oxygen availability and metabolic reprogramming in cancer. *Journal of Biological Chemistry*, *292*(41), 16825-16832. <https://doi.org/10.1074/jbc.R117.799973>
- Xu, W., Hu, X., Anwaier, A., Wang, J., Liu, W., Tian, X., Zhu, W., Ma, C., Wan, F., Shi, G., Qu, Y. -Y., Zhang, H., & Ye, D. (2021). Fatty Acid Synthase Correlates With Prognosis-Related Abdominal

- Adipose Distribution and Metabolic Disorders of Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 7, 610229. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2020.610229>
- Xu, X., Zhu, Y., Zheng, X., & Xie, L. (2015). Does beer, wine or liquor consumption correlate with the risk of renal cell carcinoma? A dose-response meta-analysis of prospective cohort studies. *Oncotarget*, 6(15), 13347-13358. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.3749>
- Xu, Y., Wu, G., Ma, X., Li, J., Ruan, N., Zhang, Z., Cao, Y., Chen, Y., Zhang, Q., & Xia, Q. (2020). Identification of CPT1A as a Prognostic Biomarker and Potential Therapeutic Target for Kidney Renal Clear Cell Carcinoma and Establishment of a Risk Signature of CPT1A-Related Genes. *International journal of genomics*, 2020, 9493256. <https://doi.org/10.1155/2020/9493256>
- Yang, C., Cimera, R. S., Aryeequaye, R., Jayakumaran, G., Sarungbam, J., Al-Ahmadie, H. A., Gopalan, A., Sirintrapun, S. J., Fine, S. W., Tickoo, S. K., Epstein, J. I., Reuter, V. E., Zhang, Y., & Chen, Y. -B. (2021). Adverse histology, homozygous loss of CDKN2A/B, and complex genomic alterations in locally advanced/metastatic renal mucinous tubular and spindle cell carcinoma. *Modern Pathology*, 34(2), 445-456. <https://doi.org/10.1038/s41379-020-00667-9>
- Yang, J., Dai, X., Xu, H., Tang, Q., & Bi, F. (2022). Regulation of Ferroptosis by Amino Acid Metabolism in Cancer. *International Journal of Biological Sciences*, 18(4), 1695-1705. <https://doi.org/10.7150/ijbs.64982>
- Yang, Y., Ricketts, C. J., Vocke, C. D., Killian, J. K., Padilla-Nash, H. M., Lang, M., Wei, D., Lee, Y. H., Wangsa, D., Sourbier, C., Meltzer, P. S., Ried, T., Merino, M. J., Metwalli, A. R., Ball, M. W., Srinivasan, R., & Linehan, W. M. (2021). Characterization of genetically defined sporadic and hereditary type 1 papillary renal cell carcinoma cell lines. *Genes, Chromosomes and Cancer*, 60(6), 434-446. <https://doi.org/10.1002/gcc.22940>
- Yao, S., Janku, F., Subbiah, V., Stewart, J., Patel, S. P., Kaseb, A., Westin, S. N., Naing, A., Tsimberidou, A. M., Hong, D., Piha-Paul, S. A., Shi, N., Johnston, A., Bomalaski, J., & Fu, S. (2021). Phase 1 trial of ADI-PEG20 plus cisplatin in patients with pretreated metastatic melanoma or other advanced solid malignancies. *British Journal of Cancer*, 124(9), 1533-1539. <https://doi.org/10.1038/s41416-020-01230-8>
- Yogev, O., Yogev, O., Singer, E., Shaulian, E., Goldberg, M., Fox, T. D., Pines, O., & Elledge, S. (2010). Fumarase: A Mitochondrial Metabolic Enzyme and a Cytosolic/Nuclear Component of the DNA Damage Response. *PLoS Biology*, 8(3), e1000328. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000328>
- Yong, C., Stewart, G. D., & Frezza, C. (2020). Oncometabolites in renal cancer. *Nature Reviews Nephrology*, 16(3), 156-172. <https://doi.org/10.1038/s41581-019-0210-z>
- Yoo, A., Lee, H., Jung, J., Koh, S. S., & Lee, S. (2021). Monocarboxylate transporter 9 (MCT9) is down-regulated in renal cell carcinoma. *Genes Genom*, 43(4), 351-359. <https://doi.org/10.1007/s13258-020-01035-2>
- Yoo, H. -C., & Han, J. -M. (2022). Amino Acid Metabolism in Cancer Drug Resistance. *Cells*, 11(1), 140. <https://doi.org/10.3390/cells11010140>
- Youn, H., Hee Kook, Y., Oh, E. -T., Jeong, S. -Y., Kim, C., Kyung Choi, E., Uk Lim, B., & Park, H. J. (2009). 1-Methylxanthine enhances the radiosensitivity of tumor cells. *International Journal of Radiation Biology*, 85(2), 167-174. <https://doi.org/10.1080/09553000902741190>
- Yue, X., Liu, W., Liu, Y., Shen, M., Zhai, Y., Ma, Z., & Cao, Z. (2022). Development, validation, and clinical application of an FIA-MS/MS method for the quantification of lysophosphatidylcholines in dried blood spots. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 36(1). <https://doi.org/10.1002/jcla.24099>
- Zhang, A., & Wang, W. (Eds.). (2022). *Mass Spectrometry-Based Metabolomics in Clinical and Herbal Medicines: Strategies, Technologies, and Applications*. John Wiley.
- Zhang, F., Lin, J., Zhu, D., Tang, Y., Lu, Y., Liu, Z., & Wang, X. (2022). Identification of an amino acid metabolism-associated gene signature predicting the prognosis and immune therapy response of clear cell renal cell carcinoma. *Frontiers in Oncology*, 12, 970208. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.970208>
- Zhang, M., Pan, Y., Jiang, R., Hou, P., Shan, H., Chen, F., Jiang, T., Bai, J., & Zheng, J. (2018). DKC1 serves as a potential prognostic biomarker for human clear cell renal cell carcinoma and promotes its proliferation, migration and invasion via the NF- κ B pathway. *Oncology Reports*, 40(2), 968-978. <https://doi.org/10.3892/or.2018.6484>

- Zhang, Z., Chen, F., & Shang, L. (2018). Advances in antitumor effects of NSAIDs. *Cancer Management and Research*, *10*, 4631-4640. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S175212>
- Zhao, J., Huang, X., Xu, Z., Dai, J., He, H., Zhu, Y., & Wang, H. (2017). LDHA promotes tumor metastasis by facilitating epithelial-mesenchymal transition in renal cell carcinoma. *Molecular Medicine Reports*, *16*(6), 8335-8344. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.7637>
- Zhao, L., Liu, W., Chu, L., & Luo, L. (2023). Factors associated with survival in paediatric and adolescent renal cell carcinoma: a population-based study. *ANZ Journal of Surgery*, *93*(11), 2710-2715. <https://doi.org/10.1111/ans.18614>
- 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. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.10830>
- Zhu, H., Wang, X., Lu, S., & Ou, K. (2023). Metabolic reprogramming of clear cell renal cell carcinoma. *Frontiers in Endocrinology*, *14*(1195500), 1195500. <https://doi.org/10.3389/fendo.2023.1195500>
- Zhu, X., Al-Danakh, A., Zhang, L., Sun, X., Jian, Y., Wu, H., Feng, D., Wang, S., & Yang, D. (2022). Glycosylation in Renal Cell Carcinoma: Mechanisms and Clinical Implications. *Cells*, *11*(16), 2598. <https://doi.org/10.3390/cells11162598>
- Zima, T., Teplan, V., Tesař, V., Racek, J., Schück, O., Janda, J., Friedecký, B., Kubíček, Z., & Kratochvíla, J. (2009). Doporučení k vyšetřování glomerulární filtrace. *Klinická biochemie a metabolismus*, *17*(vol. 2), 109–117. https://www.cskb.cz/res/file/KBM-pdf/2009/2-09/KBM0209_Dop_eGF.pdf
- Zubarev, R. A., & Makarov, A. (2013). Orbitrap Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*, *85*(11), 5288-5296. <https://doi.org/10.1021/ac4001223>
- Žlábek, K. (1950). *Přehled anatomie člověka* (2., upr. a dopl. vyd). Zdravotnické nakladatelství.

8 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

| | |
|----------------|---|
| 3PG | 3-fosfoglycerát |
| α | hladina významnosti |
| AQP | akvaporiny |
| BCAA | aminokyseliny s rozvětveným řetězcem |
| BHD syndrom | Birt-Hogg-Dubého syndrom |
| c | klinické vyšetření |
| C4-D3 | butyryl-L-karnitin-(N-methyl-D3) |
| C5-D9 | isovaleryl-DL-karnitin-D9 |
| CAF | fibrioblasty spojené s rakovinou |
| ccA | podtyp jasnobuněčného renálního buněčného karcinomu A |
| ccB | podtyp jasnobuněčného renálního buněčného karcinomu B |
| ccRCC | jasnobuněčný renální buněčný karcinom |
| cdRCC | karcinom sběrného (Belliniho) kanálku |
| CFA | kontinuální průtoková analýza |
| CID | kolizně indukovaná disociace |
| c-Myc | odina regulačních a onkogenních genů |
| CSC | rakovinné kmenové buňky |
| CT | výpočetní tomografie |
| DCA | dichloracetát |
| DHAP | dihydroxyacetonfosfát |
| D-hormon | kalcitriol |
| EI | elektronová ionizace |
| ESI | ionizace elektrosprejem |
| ETD | disociace elektronového přenosu |
| FIA-MS | průtoková injekční analýza ve spojení s hmotnostní spektrometrií |
| FT-ICR | iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací |
| G | histopatologický stupeň diferenciac |
| GA3P | glyceraldehyd-3-fosfát |
| HIF-1 α | hypoxii inducibilní faktor 1-alfa |
| HIF-2 α | hypoxii inducibilní faktor 2-alfa |
| Hippo-YAP | dráha Hippo protein kinasy a protein asociovaný s Yes |
| HLRCC | hereditární leiomyomatosa s renálním buněčným karcinomem |
| HNF1B | hepatocytární nukleární faktor 1 beta (transkripční faktor) |
| HPRC | hereditární papilární renální buněčný karcinom |
| HVA-13C6,18O | homovanilová kyselina- ¹³ C6, ¹⁸ O |
| chRCC | chromofóbní renální buněčný karcinom |
| ICR | iontová cyklotronová rezonance |
| IL-10 | interleukin 10 (typ cytokinu) |
| IMS | separace iontové mobility |
| IRE motiv | RNA motiv vyvolávající odezvu v expresi genu v závislosti na hladině železa |
| LOESS | statistická metoda, typ lokální polynomiální regrese |
| M | vzdálené metastáze |
| M2 | typ fenotypu makrofágů |
| MAPK | kaskáda mitogenem aktivované proteinkinasy |
| MCT1 | monokarboxylátový transportér 1 |
| MCT4 | monokarboxylátový transportér 4 |
| MetSucc D6 | methylsukcinát-D6 |

| | |
|----------|--|
| MF | mobilní fáze |
| MiT-tRCC | translokační renální buněčný karcinom s mikroftalmiovým transkripčním faktorem |
| MMA D3 | methylnalonová kyselina-D3 |
| MPC | mitochondriální pyruvátový nosič |
| MR | magnetická rezonance |
| mRCC | medulární renální karcinom |
| MRI | magnetická rezonance |
| MRM | sledování produktových iontů vzniklých fragmentací více prekurzorových molekul (mód tandemového hmotnostního spektrometru) |
| mTOR | savčí cíl rapamycinu |
| mTORC1 | savčí cíl rapamycinového komplexu |
| MTSCC | mucinózní tubulární vřetenobuněčný karcinom |
| N | metastázy v regionálních místních uzlinách |
| NF-κB | nukleární faktor kappa B |
| NMR | spektroskopie nukleární magnetické rezonance |
| NRF2-ARE | dráha faktoru souvisejícího s erytroidním nukleárním faktorem 2 a antioxidačně responzivního prvku |
| OPLS-DA | metoda ortogonální diskriminační analýzy nejmenších čtverců |
| p | patologické vyšetření |
| PC1 | první hlavní složka metody analýzy hlavních komponent |
| PC2 | druhá hlavní složka metody analýzy hlavních komponent |
| PCA | metoda analýzy hlavních komponent |
| PDGFB | růstový faktor odvozený z beta krevních destiček |
| PLS-DA | metoda diskriminační analýzy nejmenších čtverců |
| pRCC | papilární renální buněčný karcinom |
| psi | libra síly na čtverečný palec (anglosaská jednotka tlaku) |
| pVHL | von Hippel Lindauův nádorový supresor |
| Q | kvadrupól |
| QC | (vzorky) kontroly kvality |
| Q-LIT | spojení kvadrupólu a lineární iontové pasti (tandemové uspořádání hmotnostního spektrometru) |
| QqQ | trojitý kvadrupól |
| Q-TOF | spojení kvadrupólu a analyzátoru času letu (tandemové uspořádání hmotnostního spektrometru) |
| RCC | renální buněčný karcinom |
| SGLT1 | sodíkovo-glukózový kotransportér 1 |
| SIR | záznamu vybraných iontů (mód hmotnostního spektrometru ve spojení s plynovou chromatografií) |
| SLC | rodina transportérů přenášející hydrofilní látky v ledvinách |
| S-plot | Korelační diagram |
| SRM | monitorování vybraných reakcí, sledování rozpadu iontu (mód tandemového hmotnostního spektrometru) |
| ssNMR | spektroskopie nukleární magnetické rezonance v pevném stavu |
| T | rozsah primárního nádoru |
| TfR1 | transferinový receptor 1 |
| TGFA | transformující růstový faktor alfa |
| TGF-β | růstový faktor fibroblastu beta |
| TKI | inhibitory tyrosinkinasové aktivity |

| | |
|-------------|--|
| TNM | klasifikační systém nádorového postižení |
| tRCC | translokační karcinom ledvin |
| uRCC | nezařazené karcinomy ledvin |
| VBC komplex | komplex von Hippel Lindauova nádorového supresoru a elonginu B a C |
| VEGF | vaskulární endotelální růstový faktor |
| VHL syndrom | von Hippel Lindauův syndrom |
| WHO | Světová zdravotnická organizace |

9 PŘÍLOHY

Příloha 1: Tabulka původ vzniku, popisu buněk karcinomu, histopatologického popisu, procentuálního zastoupení v rámci karcinomů ledvin, nejčastějšího genomického profilu a nejčastější spojené mutace v genech pro jednotlivé vybrané typy renálního buněčného karcinomu

| Typ karcinomu (zkratka) | | Původ vzniku | Popis buněk karcinomu | Histopatologický popis | Procentuální zastoupení v rámci karcinomů ledvin | Nejčastější genomický profil | Nejčastější spojené mutace v genech |
|-------------------------|-------|---|--|---|--|---|--|
| ccRCC | | Epitel stočeného kanálku proximálního tubulu* | Jasně buňky* | Pevné nažloutlé léze s různým stupněm krvácení, nekrózy a cystické degradace s možnou kalcifikací* | 70 % [†] | Ztráta 3p, 9p, částečná ztráta 14q, delece 8p, zisk 7q a 5q ^{‡, §} | <i>VHL</i> , <i>PBRM1</i> , <i>SETD2</i> , <i>BAP-1</i> , <i>KDM5C</i> a <i>MTOR</i> ^{‡, **, §} |
| pRCC | Typ 1 | Epitel stočeného kanálku distálního tubulu* | Malé buňky se světlou cytoplazmou a hyperchromatickými malými jádry, jež jsou v jedné vrstvě na bazální membráně těla papil ^{††, ‡‡, *} | Hypovaskularizované a méně heterogenní nádory než u ccRCC s možným krvácením, nekrózou a kalcifikací* | 10–15 % [†] | Trizomie chromozomu 7 a 17, ztráta chromozomu Y, zisky 7p a 17p (u některých také chromozomu 2, 3 12, 16 a 20) ^{§§, †††, ††††} | <i>FH</i> , <i>MET</i> ^{††††, †††††, §§§§§} |
| | Typ 2 | | Velké buňky s objemnou eozinofilní cytoplasmou a výraznými jádřky (spojenými v místech nekrózy) na papilách ^{††, ‡‡, *} | | | Trizomie chromozomu 7 a 17, ztráta chromozomu Y, více zisků a ztrát chromosomálních oblastí ^{††, §§, †††, ††††} | <i>FH</i> , <i>CDKN2A</i> , <i>SETD2</i> , fúze <i>TFE3</i> ^{††, §§, †††, ††††} |
| chRCC nebo crRCC | | Interkalární buňky distálního tubulu a kortikálního sběracího kanálku ^{§§§, ***} | Velké světlé buňky se síťovanou cytoplazmou a perinukleárním projasněním* | Oranžový, hypovaskularizovaný, homogennější než ccRCC a u větších nádorů se může objevit nekróza* | 5 % [†] | Ztráta jedné kopie celého chromozomu 1, 2, 6, 10, 13 a 17, někdy i ztráty chromozomů 3, 5, 8, 9, 11, 18 a 21 ^{***} | <i>FLCN</i> , <i>PTEN</i> ^{****, ††††} |

| | | | | | | | |
|---------------------------------|---------------------------|--|--|--|-------------------------|---|---|
| uRCC | | Variabilní ^{††††} | Mohou produkovat mucin, směs epiteliálních a stromálních prvků a obsahovat nerozpoznatelné typy buněk; variabilní ^{††††} | Variabilní a sarkomatoidní ^{§§§§} | 4-5 % ^{*****} | Variabilní ^{††††} | <i>NF2</i> , a <i>BAP1</i> a <i>SETD2</i> ^{*****, ††††††} |
| tRCC | Translokace v <i>TFE3</i> | Proximální nebo distální tubulus ^{*****} | Papilární růstový vzor, složený z jasných buněk a obsahují psamomatózní tělíska ^{†††††} | Podobný ccRCC a pRCC ^{††††††} | 1-4 % ^{††††††} | Nejčastěji translokace v Xp11 na <i>TFE3</i> ^{††††††} | Fúze alespoň jednoho z genů <i>TFE3</i> , <i>TFEB</i> a <i>MITB</i> ^{††††††, ††††††} |
| | Translokace v <i>TFEB</i> | | Vnořený růstový vzor, skládají se z větších a menších epiteloidních buněk ^{†††††} | | | Translokace p21 a q12 v <i>TFEB</i> ^{††††††} | |
| cdRCC | | Stěny sběrného kanálku ve dřeni ledvin* | Nepravidelné infiltrující uspořádání buněk s desmoplazií a eozinofilní cytoplasmou* | Šedobílý heterogenní a hypovaskularizovaný nádor s možnou nekrózou, krvácením, cystickou degenerací a kalcifikací ^{*, §§§§} | Pod 1 % [†] | Ztráta heterozygotnosti 1q, 6p, 8p, 13q, 21q a vzácně 3q chromozomů ^{§§§§} | Genomické alterace v <i>NF2</i> , mutace <i>SETD2</i> , amplifikace <i>HER2</i> a ztráta exprese <i>SMARCB1/INI1</i> ^{§§§§§§, *****, ††††††} |
| mRCC s deficitem <i>SMARCB1</i> | | Buňky distálního tubulu a sběrného kanálku nefronu* | Epiteliální buňky s retikulárním, adenoidně cystickým nebo žlutkovým váčkem, nekrózou, stromální desmoplazií a značným zánětem ^{††††††} | Hypovaskulární infiltrující léze způsobující dilataci a obstrukci ledvinového kalichu, často spojená s adenopatií* | Pod 1 % [†] | Ztráta 22q11.23, ložisková amplifikace 11q14.3 a zisk 8q ^{§§§§§§§} | Úplná ztráta exprese tumor supresorového genu <i>SMARCB1/INI1</i> ^{*****} |
| MTSCC | | Pravděpodobně Henleho smyčka nebo sběrný kanálek ^{††††††††} | Dlouhé a úzké tubulární epiteliální buňky uspořádané ve sputu, vyplněné bílou mucinózní matricí a vřetenovými buňkami ^{††††††††} | Žlutohnědý, šedý nebo světle žlutý povrch řezu, s neobvyklými oblastmi nekrózy ^{††††††††} | Pod 1 % [†] | Ztráty chromozomů 1, 4, 6, 8, 9, 13, 14, 15 a 22 ^{§§§§§§§§, *****} | Homozygotní delece <i>CDKN2A/B</i> ^{††††††††††} |

* Muglia & Prando, 2015
† Bukavina *et al.*, 2022
‡ Kaelin, 2004
§ Nabi *et al.*, 2018
** The Cancer Genome Atlas Research Network, 2013
†† Delahunt & Eble, 1997
‡‡ Delahunt *et al.*, 2001
§§ Kovacs, 1993
††† Jiang *et al.*, 1998
‡‡‡ The Cancer Genome Atlas Research Network, 2016
†††† Schmidt *et al.*, 1997
‡‡‡‡ Kiuru *et al.*, 2001
§§§§ Yang *et al.*, 2021
§§§ Prasad *et al.*, 2007
*** Davis *et al.*, 2014
**** Pavlovich *et al.*, 2002
†††† Shuch *et al.*, 2013
‡‡‡‡ Sirohi *et al.*, 2018
§§§§ Lopez-Beltran *et al.*, 2006
***** Chen *et al.*, 2016
††††† Maughan, 2022
***** Ling *et al.*, 2017
‡‡‡‡‡ Cimadamore *et al.*, 2021
§§§§§ Elwood *et al.*, 2011
***** Pal *et al.*, 2016
†††††† Hacking *et al.*, 2023
‡‡‡‡‡‡ Gatalica *et al.*, 2011
§§§§§§ Msaouel *et al.*, 2020
***** Ohe *et al.*, 2018
††††††† Gong *et al.*, 2020
‡‡‡‡‡‡‡ Srigley & Delahunt, 2009
§§§§§§§ Rakozy *et al.* 2002
***** Pecková *et al.* 2015
†††††††† Yang *et al.*, 2021