

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Stanovení vlivu imatinibu na metabolismus
buněk chronické myeloidní leukemie metodou
HPLC-MS/MS**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Iveta Fikarová
Studijní program:	N1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Marcela Župková
Konzultant:	RNDr. David Friedecký, PhD.
Termín odevzdání práce:	2. 5. 2013

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

V Olomouci dne 2. 5. 2013

Ráda bych poděkovala své vedoucí diplomové práce Mgr. Marcele Župkové za odborné vedení, pomoc při vypracovávání experimentální i teoretické části práce a především za její obrovskou ochotu a vstřícnost. Poděkování také patří RNDr. Davidu Friedeckému, PhD. za pomoc a cenné rady při realizaci experimentální části a Mgr. Alžbětě Kalivodové za statistickou analýzu a cenné rady při interpretaci získaných dat.

Tato práce vznikla za podpory projektu, jehož infrastrukturální část (Ústav molekulární a translační medicíny) byla podpořena Operačním programem Výzkum a vývoj pro inovace (projekt CZ.1.05/2.1.00/01.0030).

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora	Bc. Iveta Fikarová
Název práce	Stanovení vlivu imatinibu na metabolismus buněk chronické myeloidní leukemie metodou HPLC-MS/MS
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Laboratoř metabolomiky Ústav molekulární a translační medicíny Fakultní nemocnice Olomouc
Vedoucí práce	Mgr. Marcela Župková
Rok obhajoby práce	2013
Abstrakt	Chronická myeloidní leukemie (CML) je onemocnění krevních buněk projevující se zmnožením bílých krvinek. CML se vyznačuje translokací mezi chromosomy 9 a 22, jejímž výsledkem je tzv. Filadelfský chromosom. V současnosti je velmi rozšířená léčba pomocí tyrosinkinasových inhibitorů. Imatinib je lékem 1. generace z této nové třídy léků a používá se pro standardní léčbu pacientů s CML. Imatinib kompetitivně inhibuje ATP-vazebné místo BCR-ABL. Metabolomika je vědní obor, který slouží pro detekci a kvantifikaci nízkomolekulárních metabolitů vytvořených žijícími buňkami, tkáněmi nebo orgány. Cílem experimentální části bylo stanovení vlivu imatinibu na metabolismus buněk CML pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií. Optimalizovaná metoda byla poté aplikována na leukocyty izolované z plné krve nově diagnostikovaných pacientů s CML a kontrolních vzorků. Byly sledovány změny hladin metabolitů v leukocytech inkubovaných s imatinibem o různé koncentraci. V extraktech bylo celkem identifikováno 87 studovaných látek. Data byla statisticky vyhodnocena pomocí analýzy hlavních komponent, diskriminační analýzy, biplotu, shlukové analýzy, heat mapy a metody PARAFAC.
Klíčová slova	Chronická myeloidní leukemie, imatinib, leukocyty, metabolomika, tandemová hmotnostní spektrometrie
Počet stran	102
Počet příloh	5
Jazyk	Český

Bibliographical identification:

Autor's first name and surname	Bc. Iveta Fikarová
Title	To determinate the effect of imatinib on cell metabolism of chronic myeloid leukemia by HPLC-MS/MS
Type of thesis	Diploma
Department	Laboratory of metabolomics Institute of molecular and translation medicine University Hospital Olomouc
Supervisor	Mgr. Marcela Župková
The year of presentation	2013
Abstract	Chronic myeloid leukemia (CML) is a disease of blood cells connected with the proliferation of white blood cells. CML is characterized by a translocation of chromosome 22 onto chromosome 9. Result of this translocation is known as the Philadelphia chromosome. At present, a treatment with tyrosine kinase inhibitors is widespread. Imatinib is a drug first-generation from this new class of drugs, which is primarily used for treatment of patients with CML. Imatinib functions through competitive inhibition at the ATP-binding site of the BCR-ABL enzyme. Metabolomics is a science used for detection and quantification of low molecular weight metabolites generated by living cells, tissue or organs. The aim of the experimental part of this diploma thesis was determination of the effect of imatinib on cell metabolism of chronic myeloid leukemia by a high performance liquid chromatographic method with tandem mass spectrometric detection for analysis of metabolites changes in leukocytes. The optimised method was applied to leukocytes isolated from whole blood of newly diagnosed patients with CML and controls. Nucleotide level changes in leukocytes incubated with various concentrations of imatinib were observed. In leukocytes extracts were identified 87 compounds. Data were statistically processed using principle component analysis, discriminant analysis, biplot, cluster analysis, heat map and PARAFAC.
Keywords	Chronic myeloid leukemia, imatinib, leukocytes, metabolomics, tandem mass spectrometry
Number of pages	102
Number of appendices	5
Language	Czech

OBSAH

Cíle práce	9
Teoretická část	10
1 Hematopoéza.....	11
1.1 Krevní buňky a krevetvorné orgány	11
1.2 Regulace hematopoézy	12
1.3 Leukopoéza – vývoj granulocytů z prekurzorové buňky	14
1.3.1 Tvorba granul	14
1.3.2 Funkce granulocytů	15
1.4 Maligní onemocnění krve a krevetvorných orgánů.....	15
1.4.1 Etiologie hematologických malignit	16
1.4.2 Patofyziologie hematologických malignit.....	16
2 Leukemie	17
2.1 Úvod.....	17
2.2 Klasifikace	17
2.3 Chronická myeloidní leukemie	17
2.3.1 Myeloproliferativní choroby	18
2.3.2 Molekulární podstata nemoci	19
2.3.3 Zlomy v BCR a ABL genu a velikost onkoproteinu	19
2.3.4 Stádia CML	21
2.3.5 Diagnostika CML	21
2.3.6 Historie a současnost léčby CML	23
3 Imatinib.....	25
3.1 Úvod.....	25
3.2 Syntéza	25
3.3 Použití	26
3.4 Mechanismus účinku na BCR-ABL.....	26
3.5 Proteinkinasy.....	27
3.5.1 Struktura proteinkinasy	27
3.5.2 Vazba IM na TK.....	28
3.6 Rezistence na IM.....	29
3.6.1 Primární rezistence	30
3.6.2 Sekundární rezistence	31
3.6.3 Reaktivní formy kyslíku	32
3.7 Pacienti a dávkování IM.....	33

4	Metabolomika	34
4.1	Úvod a historie	34
4.2	Aplikace.....	34
4.3	Metabolity	35
4.4	Metabolomická studie.....	36
4.5	Analytické metody	37
4.5.1	Kontrola kvality	38
4.6	Metabolomické databáze.....	38
4.7	Statistická analýza vícerozměrných dat.....	38
4.7.1	Analýza hlavních komponent	39
4.7.2	Diskriminační analýza	39
4.7.3	Shluková analýza.....	40
	Experimentální část	41
5	Materiál	42
5.1	Chemikálie.....	42
5.2	Přístrojové vybavení a software.....	42
5.3	Biologický materiál.....	42
5.3.1	Izolace leukocytů	43
5.3.2	Počítání leukocytů	43
5.3.3	Inkubace a extrakce leukocytů.....	44
6	Metody	45
6.1	HPLC-MS/MS.....	45
7	Výsledky	47
7.1	Analýza biologického materiálu	47
7.2	Zpracování získaných dat.....	52
7.2.1	Porovnání kontrol a pacientů	54
7.2.2	Porovnání pacientů mezi sebou.....	58
7.2.3	Porovnání časů a koncentrací.....	58
7.3	Statistické vyhodnocení	60
7.3.1	Interpolace dat.....	60
7.3.2	Analýza hlavních komponent (PCA).....	62
7.3.3	Diakriminační analýza (DA).....	69
7.2.4	Shluková analýza (CLU)	73
7.2.5	Heat mapa	74
7.2.6	PARAFAC.....	77
8	Diskuse	81
9	Závěr	84

Použitá literatura.....	85
Seznam použitých zkratk 94	94
Přílohy 97	97

Cíle práce

- **Teoretická část**
- vypracování literární rešerše na téma: chronická myeloidní leukemie, imatinib a rrdmetabolomika

- **Experimentální část**
- vývoj a optimalizace metody pro analýzu metabolomu pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií (HPLC-MS/MS)

- zpracování plné krve a následná inkubace izolovaných leukocytů s vybraným kancerostatikem (imatinib)

- aplikace optimalizované metody na reálných vzorcích - zkoumání vlivu imatinibu na metabolismus leukocytů od pacientů s chronickou myeloidní leukemií i od zdravých jedinců (pacienti X kontroly)

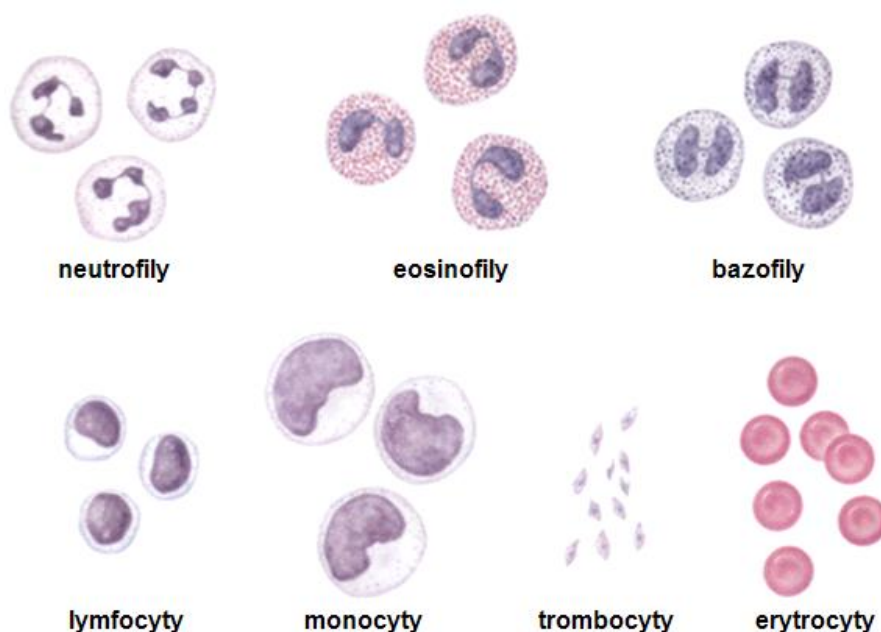
- interpretace získaných dat a statistické vyhodnocení

Teoretická část

1 Hematopoéza

1.1 Krevní buňky a krvetvorné orgány

Krevní buňky - červené krvinky (erythrocyty), bílé krvinky (leukocyty) a krevní destičky (trombocyty; Obr. 1) - jsou neustále vytvářeny v procesu zvaném hematopoéza (někdy také hemopoéza) z hematopoetických kmenových buněk (Fox, 1999).

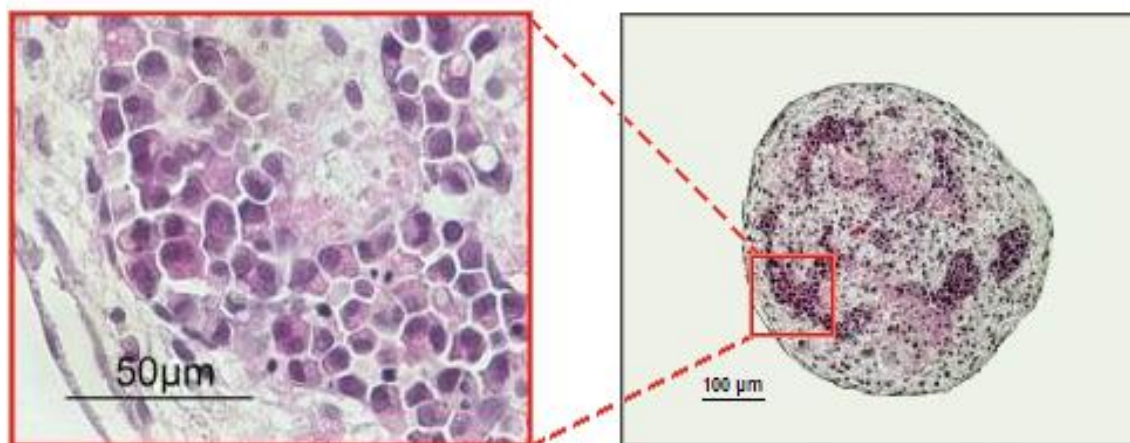


Obr. 1: Typy krevních buněk. Zobrazeny erythrocyty, trombocyty a 2 typy leukocytů - granulocyty (neutrofilly, eozinofily, bazofily) a agranulocyty (lymfocyty a monocyty) (upraveno dle: Fox, 1999).

Prenatální hematopoéza se dělí na 3 hlavní období - mezoblastové, hepatolienální a dřeňové - a to podle typu krvetvorného orgánu, v němž právě tento proces probíhá (Smetana, 2001).

Tvorba krevních buněk začíná již v průběhu vývoje embrya, kdy se ve stěně žloutkového váčku vytváří krevní ostrůvky (shluky mezenchymových buněk; Obr. 2), které produkují první hemoglobinizované buňky (*mezoblastové období*). Od 6 týdne do 7 měsíce těhotenství nastává *hepatolienální období*, při němž hematopoéza probíhá především v játrech a ve slezině, poté se hlavním zdrojem krvinek stává kostní dřeň. *Období dřeňové* krvetvorby se postupně stupňuje a po narození během fyziologického vývoje zcela nahradí krvetvornou činnost jiných orgánů s výjimkou lymfatických orgánů

a lymfatické tkáně, kde lymfopoéza probíhá celý život jedince. Hematopoéza po narození probíhá v kostní dřeni téměř každé kosti. S věkem je však aktivní krvetvorná tkáň nahrazena tukem. V dospělosti se aktivní tkáň nachází pouze v axiálním (osovém) skeletu, který tvoří páteř, kostra hrudníku (hrudní kost a žebra), pánev a v proximálních koncích stehenní a pažní kosti. Z tohoto důvodu je kostní dřeň určená k transplantaci odebírána právě z těchto částí kostry (Murphy, 1998; Smetana, 2001; Wang & Berliner, 2010).



Obr. 2: Žlutkový váček s krevními ostrůvky – barvení hematoxylin-eosin (Pryzhkova et al., 2010).

Kostní dřeň je ústředním a zároveň největším krvetvorným orgánem proto, že obsahuje nejvíce pluripotentních kmenových buněk a také mikroprostředí (stroma), které indukuje diferenciaci kmenových buněk v jednotlivé buněčné linie. Jako sekundární (periferní) krvetvorné orgány jsou označovány slezina či lymfatické uzliny.

Kmenové buňky, progenitorové buňky a jiné krvetvorné buňky pravidelně putují krví mezi krvetvornými tkáněmi a z nich následně do tkání cílových. Přítomnost kmenových buněk dělá také z periferní krve krvetvornou tkáň (Klener & Friedmann, 2001).

1.2 Regulace hematopoézy

Krevní elementy pochází z nediferencované pluripotentní kmenové buňky, jenž má schopnost vlastní sebeobnovy a diferenciaci. Diferenciaci jednotlivých krevních buněk a také některé jejich funkce ovlivňují růstové faktory, tzv. **cytokiny**. Jedná se o glykoproteiny, které působí na receptory hematopoetických buněk v různých stádiích vývoje a zvyšují produkci jedné či více buněčných linií jako odpověď na poškození či stres (ztráta krve či infekce). Pluripotentní kmenové buňky jsou pod vlivem počtu he-

matopoetických růstových faktorů zahrnujících interleukin-3 (IL-3), IL-6, IL-11 a růstový faktor SCF (stem cell factor), označovaný také jako c-kit ligand. Faktor CSF (colony stimulating factor) spolu s erythropoetinem stimulují proliferaci jednotlivých buněčných kolonií. Thrombopoetin je, stejně jako erythropoetin, produkován v ledvinách a játrech a spolu s IL-6 a IL-11 kontroluje produkci krevních destiček. Faktory, které se v procesu krvetvorby ulatňují nejvíce, jsou shrnuty v Tab. 1. Existují však také jiné faktory, které hematopoézu naopak inhibují. Do této skupiny můžeme zařadit tumor (nádor) nekrotizující faktor (TNF, tumor necrosis factor) a transformující růstový faktor β (TGF- β , transforming growth factor) (Murphy, 1998; Klener & Friedmann, 2001).

Tab. 1: Faktory stimulující hematopoézu

Název	Funkce
SCF	stimuluje proliferaci kmenových buněk zvysuje citlivost kmenových buněk na jiné faktory
Flt-3 ligand	stimuluje proliferaci a diferenciaci hematopoetických prekurzorů působí na generaci funkčně aktivních dendritických buněk
Interleukin-3	stimuluje růst granulocytů, monocytů, eozinofilů a žirných buněk zvysuje syntézu fetálního hemoglobinu
GM-CSF	stimuluje kolonie granulocytů a makrofágů částečně ovlivňuje i megakaryocytovou řadu
M-CSF	stimuluje kolonie makrofágů ovlivňuje vzestup počtu makrofágů a jejich funkční aktivitu
G-CSF	stimuluje kolonie granulocytů působí zmnožení neutrofilů a urychluje jejich výdej do cirkulace
Meg-CSF	stimuluje kolonie megakaryocytů zvysuje produkci krevních destiček
Erythropoetin	<i>in vitro</i> stimuluje erytrocytové kolonie, <i>in vivo</i> červenou krvetvorbu částečně ovlivňuje i trombocytopoézu
Trombopoetin	s IL-6 a IL-11 kontroluje produkci trombocytů váže se na specifické receptory na progenitorech megakaryocytů působí diferenciaci CD34+ buněk do megakaryocytové řady

Mnohé růstové faktory jsou produkovány aktivovanými T-lymfocyty, monocyty, stromálními buňkami kostní dřene, fibroblasty, endoteliálními buňkami či makrofágy. Růstové faktory ale mohou být produkovány také technologií rekombinantní DNA a následně klinicky využity. Příkladem je G-CSF, který se využívá pro urychlení obnovy

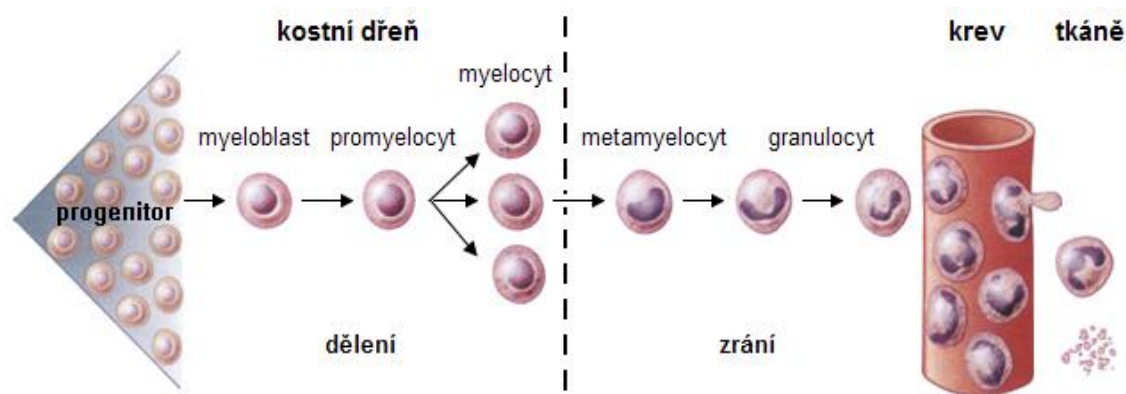
hematopoézy po chemoterapii a při transplantaci hematopoetických buněk nebo erythropoetin využívaný k léčbě anémie u pacientů s chronickým selháním ledvin. Klinicky zkoušený je i trombopoetin a to pro redukci potřeby transfúze trombocytů po intenzivní chemoterapii u pacientů léčených s maligní chorobou (Murphy, 1998).

1.3 Leukopoéza – vývoj granulocytů z prekurzorové buňky

Diferenciace a zrání granulocytů - neutrofilů, eosinofilů a bazofilů - probíhá za normálních podmínek v kostní dřeni a trvá déle než jeden týden. Poté se zralé granulocyty uvolňují do periferní krve, v níž neutrofilové (počínaje neutrofilní tyčkou) cirkulují jen několik hodin, zatímco eosinofily a bazofily až jeden týden. Určité množství granulocytů v periferní krvi necirkuluje, ale vytváří mobilizovatelnou zásobu pod vnitřním povrchem cév. K zániku granulocytů dochází v tkáních. Typ tkáně se však liší a to v závislosti na jejich funkční angažovanosti. Jedná se především o plíce, játra, slezinu a také sliznici trávicího či dýchacího ústrojí (Smetana, 2001).

1.3.1 Tvorba granul

Charakteristickým znakem granulocytové řady je tvorba granul v jejich cytoplasmě. Nejprve se vytváří hrubá azurofilní (primární) granula, později dochází k tvorbě sekundárních granul, které jsou specifické pro každý typ granulocytů, tj. granul neutrofilní, eosinofilní a bazofilní (označované podle barvitelnosti). Tvorba granul začíná již v prekurzorové kmenové buňce, kterou je v případě granulocytových řad **myeloblast** vznikající z progenitorové buňky pro granulocyty. Morfologicky jsou myeloblasty pro neutrofilní, eosinofilní a bazofilní granulocyty těžko odlišitelné. Z myeloblastu nejprve vznikají největší buňky granulocytové řady – **promyelocyty**, z nichž se poté vyvíjí poslední dělicí se buňky granulocytové řady – **myelocyty**. Dělením myelocytů vznikají **metamyelocyty**, které zrají v **granulocyty** s jádrem nejprve nesegmentovaným (tzv. tyče). Do periferní krve se dostávají zralé granulocyty s již segmentovaným jádrem a pouze v malé míře granulocyty ve tvaru tyče (Obr. 3). Za fyziologických podmínek se počet jaderných segmentů obvykle pohybuje kolem tří. Průměrný počet segmentů připadajících na jeden neutrofil udává tzv. *Hynkovo číslo*, které se u dospělých osob pohybuje kolem hodnoty 2,7 (Smetana, 2001).



Obr. 3: Vývoj neutrofilů (upraveno dle: Kaushansky, 2008).

1.3.2 Funkce granulocytů

Hlavní funkcí granulocytů je **fagocytóza** (mikrofagocytóza) a sekrece obsahu granul z buňky, jež může mít toxické a ničící vlastnosti proti mikrobům, ale mnohdy také proti buňkám vlastního organismu. Granulocyty jsou na místo působení přilákány chemotaktickými faktory, z nichž nejvýznamnější jsou faktory zprostředkované komplementem a ty faktory, které jsou produkovány lymfocyty a monocyty. Eosinofilní granulocyty jsou navíc cytotoxické pro parazitní organismy a účastní se alergických reakcí. Bazofily mohou produkovat mediátory a proteasy ovlivňující zánětlivé procesy a také látky, které podmiňují anafylaktickou reakci. S uvedenými funkcemi jednotlivých granulocytů souvisí i obsah jejich granul (Smetana, 2001).

1.4 Maligní onemocnění krve a krvetvorných orgánů

Ve vyspělých zemích tvoří hematologické malignity u mužů 7 % ze všech malignit a 6 % malignit u žen. U obou pohlaví je 6. nejčastějším maligním onemocněním leukemie. V Evropě jsou u mužů ve věkové kategorii 15-34 let tato onemocnění jako 4. nejčastější příčina úmrtí. Nejčastější je opět leukemie, těsně následovaná maligními lymfomy. U žen v tomto věku je nejčastější malignitou karcinom mléčné žlázy. Od 35 let věku narůstá incidence maligních onemocnění u obou pohlaví. Incidence leukemie také stoupá, ale je předstihována častějšími solidními nádory jako jsou karcinom plic u mužů, karcinom mléčné žlázy u žen a malignitami trávicího a urogenitálního ústrojí (Kozák, 2001).

1.4.1 Etiologie hematologických malignit

Etiologie hematologických malignit není ve většině případů zcela známa, ale protože existuje více rizikových faktorů, které jednotlivé malignity ovlivňují, bývá označována jako **multifaktoriální**. Je známo 5 rizikových faktorů majících vztah ke vzniku hematologických malignit: ionizující záření (rtg, γ -paprsky), chemikálie (benzen, toluen či dehet v cigaretovém kouři), cytostatická léčba (především alkylační látky), infekce viry a genetické faktory (např. trisomie 21. chromosomu) (Kozák, 2001).

1.4.2 Patofyziologie hematologických malignit

Hematologické malignity mají **klonální charakter**. Z jedné maligně transformované buňky totiž vzniká klon, jenž neodpovídá na vnitřní ani vnější kontrolní signály, autonomně proliferuje a jednotlivé buňky ztrácejí schopnost apoptózy a programované buněčné smrti. Na počátku maligní transformace je fragilita chromosomální DNA s ireverzibilní aberací v některém místě genomu. Taková specifická změna může vést k postižení nebo k deregulaci transkripce **protoonkogenu**, což je gen, který se vyskytuje normálně v genomu a je fyziologicky různou měrou transkribován. Protoonkogen je následně přeměněn v aktivní **onkogen** a dochází tak k maligní transformaci buňky. Celkově je známo více než 80 párů protoonkogen-onkogen. Na maligní transformaci lidské buňky, jejíž schopností je invadovat další tkáň a metastazovat, se podílejí mimo onkogenů také geny, které kódují adhezní povrchové molekuly a tzv. homing receptory. Jejich mutace potom vedou k tomu, že transformovaná buňka opouští svoji tkáň a chová se agresivně vůči ostatním tkáním (Kozák, 2001)

2 Leukemie

2.1 Úvod

Leukemie je nádorové onemocnění projevující se nadměrnou produkcí abnormálních bílých krvinek, která je způsobena mutací myelogenních nebo lymfogenních buněk (Guyton & Hall, 2000). Termín leukemie, zprvu bílá krev (německy Leukämie nebo weisses Blut), poprvé použil v roce 1845 Rudolf Virchow (Virchow, 1845).

2.2 Klasifikace

Leukemie může být rozdělena na základě rychlosti vývoje onemocnění na akutní a chronickou. Každá z nich se pak dále dělí na myeloidní a lymfatickou a to podle buněčného typu bílých krvinek, který je zmnožen. **Lymfatická leukemie** je způsobena produkcí nádorových lymfoidních buněk, která nejčastěji probíhá v lymfatických uzlinách nebo v jiných lymfatických tkáních a poté se šíří do celého těla. Oproti tomu pro **myeloidní leukemii** je charakteristická produkce nádorových buněk myeloidní řady v kostní dřeni, odkud se dále šíří a poté jsou produkovány v mnoha orgánech jako jsou lymfatické uzliny, slezina či játra. Při myeloidní leukemii se tvoří buňky granulocytové nebo monocytární řady, proto se někdy používá označení *neutrofilní*, *bazofilní*, *eosinofilní* nebo *monocytární* leukemie. Odtud jsou odvozeny základní 4 typy leukemie: akutní myeloidní leukemie (AML), akutní lymfatická leukemie (ALL), chronická myeloidní leukemie (CML) a chronická lymfatická leukemie (CLL) (Murphy, 1998; Guyton & Hall, 2000).

Ve své diplomové práci se věnuji studiu metabolismu buněk chronické myeloidní leukemie, proto se budou následující kapitoly věnovat pouze tomuto typu leukemie.

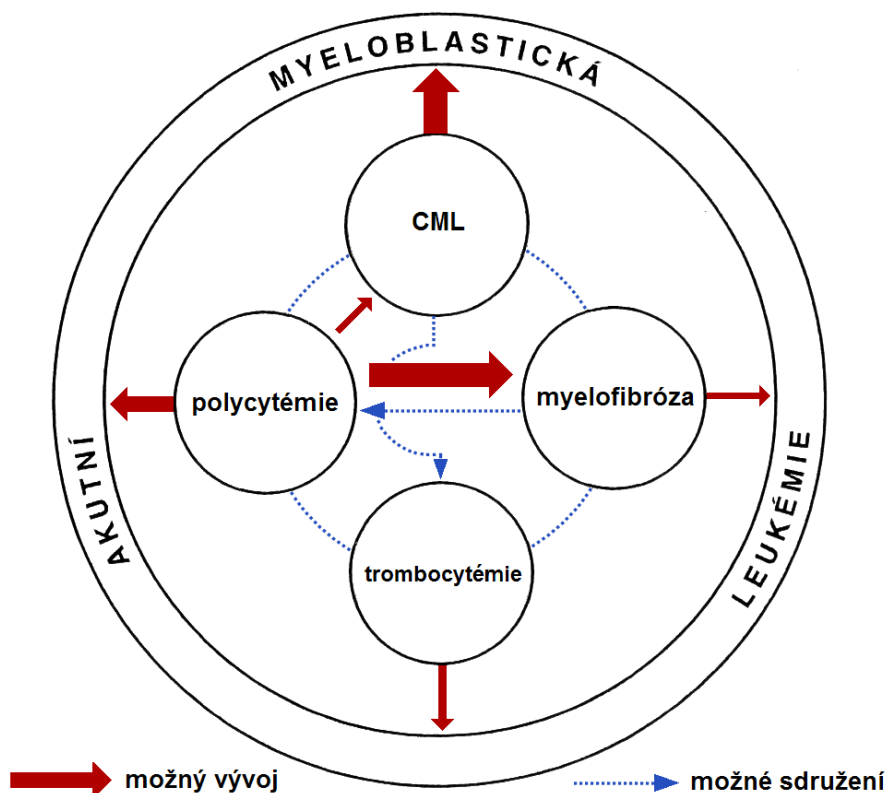
2.3 Chronická myeloidní leukemie

Jedná se o první maligní chorobu, která byla dána do souvislosti se specifickou genetickou abnormalitou. První exaktní popis případu pravděpodobné CML podal britský patolog John Hughes Bennet ve studii, která vyšla v Edinburgu v roce 1845 (Bennett, 1845). CML je druhou nejčastější leukemii u dospělých vykazující vyšší výskyt po 50. roce věku (Kozák, 2001).

2.3.1 Myeloproliferativní choroby

CML se řadí mezi tzv. myeloproliferativní choroby. Takto označujeme stavy, jejichž společným znakem je primární proliferace hematopoetických kmenových buněk myeloidní řady v kostní dřeni nebo extramedulárně, u kterých se předpokládá maligní transformace (viz kapitola 2.4.2 Patofyziologie hematologických malignit). Jednotlivé myeloproliferativní choroby mají odlišný krevní obraz, protože se liší buněčnou řadou, do níž jsou původní kmenové buňky diferencovány. Na počátku těchto chorob dochází ke značnému zmnožení krevních buněk jedné řady. Ve většině případů jsou současně zmnoženy, i když v menší míře, i buňky dalších řad. Myeloproliferativní choroby mají kromě krevního obrazu odlišný také biologický průběh. Vztahy mezi jednotlivými chorobami jsou znázorněny na Obr. 4 (Doubek & Adam, 2001; Klener & Friedmann, 2001).

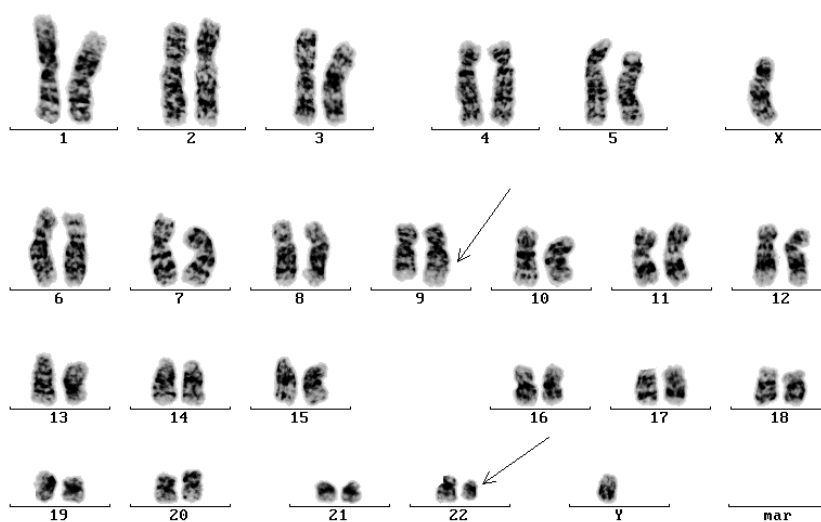
Podle Francouzsko-americko-britské klasifikace se k myeloproliferativním chorobám řadí kromě CML, také pravá polycytemie neboli polycytemia vera, esenciální nebo primární trombocytémie a idiopatická myelofibróza. Nová klasifikace maligních chorob, publikovaná Světovou zdravotní organizací, rozčleňuje choroby této skupiny ještě na více kategorií (Doubek & Adam, 2001).



Obr. 4: Vzájemné vztahy myeloproliferativních chorob. Červenými šipkami je znázorněn možný vývoj a přerušovanými modrými šipkami možné sdužení (upraveno dle: Klener & Friedmann, 2001).

2.3.2 Molekulární podstata nemoci

V roce 1960 vědci z Filadelfie Peter Nowell a David Hungerford (Nowell & Hungerford, 1960) zpozorovali shodnou chromosomální abnormalitu u 7 pacientů s CML. Jednalo se o malý akrocentrický chromosom, jenž byl považován za chromosomální delecii. Přestože bylo jejich pozorování sepsáno v pouhých dvou odstavcích, postupem času se ukázalo jako naprosto zásadní. O 13 let později, v roce 1973, objasnila Janet Rowleyová (Rowley, 1973) vznik onoho malého zkráceného chromosomu 22 (22q-), který je dnes známý jako tzv. Filadelfský chromosom (Ph, Philadelphia chromosome; Obr. 5). Tento Ph je produktem reciproké translokace mezi chromosomy 9 a 22 $t(9:22)(q34;q11)$. V podstatě se jedná o vzájemnou výměnu ramének těchto dvou chromosomů. Do translokace je zapojen protoonkogen *ABL* lokalizovaný na chromosomu 9 v oblasti odpovídající N-terminální části Abl tyrosinové kinasy a jenž je lidským homologem virového onkogenu Abelsonovy myší leukemie (Heisterkamp et al., 1983). Partnerským genem účastnící se translokace na chromosomu 22 je tzv. breakpoint cluster region (*BCR*) (Groffen et al., 1984). Interakce mezi protoonkogenem *ABL* a genem *BCR* vede k vytvoření fúzního genu *BCR-ABL*, označovaného také jako *BCR-ABL1*, který kóduje onkoprotein o velikosti 210 kDa zvaný p210^{ABL-BCR} (konstitutivně aktivovaná kinasa) (Ben-Neriah et al., 1986).



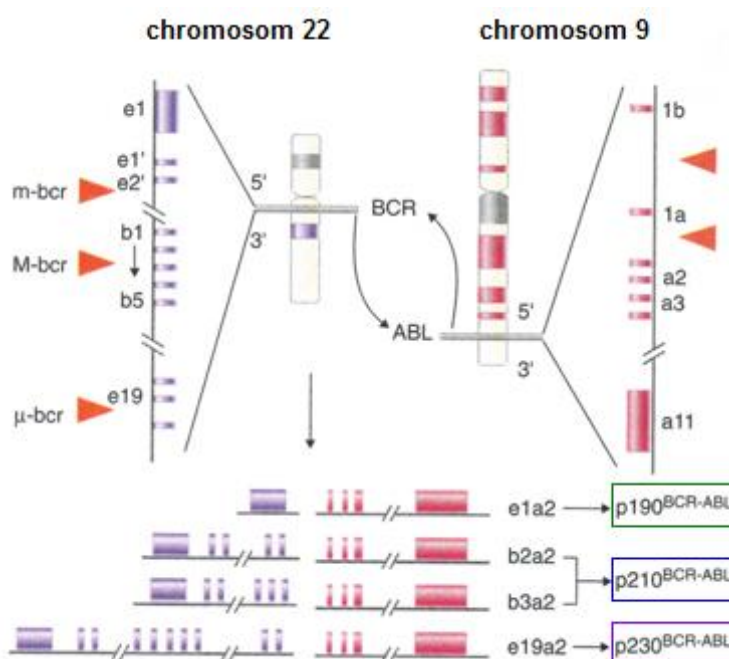
Obr. 5: Filadelfský chromosom (Faber, 2010).

2.3.3 Zlomý v *BCR* a *ABL* genu a velikost onkoproteinu

Ke zlomům v protoonkogenu *ABL* dochází u 99 % Ph⁺ případů na jeho 5' konci před exonem a2. V některých případech dochází ke zlomům v intronu mezi exony la a lb. Velikost výsledného onkoproteinu však určuje pozice zlomu v genu *BCR* obsahu-

jícího 25 exonů (kódující oblasti genu), ke kterým může při translokaci docházet na intronech (nekódující oblasti genu) tří oblastí (Obr. 6). U velké většiny CML pacientů a asi u jedné třetiny pacientů s ALL se místa zlomu v *BCR* genu nachází uvnitř regionu o velikosti 5,8 kb známého jako major bcr (**M-bcr**), který je tvořený 5 exony historicky pojmenovanými b1 až b5 (nově exony e12 až e16). V případě zlomů v oblasti **M-bcr** dochází ke tvorbě dvou molekulárních variant fúzního genu *BCR/ABL* se spojením exonů genů *BCR* a *ABL* buď b2a2 nebo b3a2 (výjimečně b2a3). U některých pacientů nacházíme v důsledku alternativního sestřihu obě varianty tohoto genu, tedy b2a2 i b3a2. Tyto geny kódují onkoprotein o velikosti 210 kDa zvaný p210^{BCR-ABL}. U dvou třetin pacientů s ALL a jen u velmi vzácných případů CML a AML se místo zlomu v *BCR* genu nachází na 54,4 kb dlouhém intronu mezi dvěma exony e2' a e2, který je známý jako minor bcr (**m-bcr**). Za těchto okolností jsou exony e1' a e2' odstraněny sestřihem a fúzní gen *BCR-ABL* tak obsahuje spojené exony e1a2 (také výjimečně e1a3). Takto vzniklý gen kóduje menší onkoprotein o velikosti 190 kDa tzv. p190^{BCR-ABL} (Melo et al., 1993; Chissoe et al., 1995).

Obě zmiňované oblasti zlomů M-bcr i m-bcr se nachází na 5' konci genu *BCR*. První případ CML se zlomem na 3' konci genu *BCR* popsal v roce 1990 Saglio se svými spolupracovníky (Saglio et al., 1990). Jedná se o zlom v oblasti mezi exony e19 a e20 (také exony c3 a c4) známé jako micro bcr (**μ-bcr**), čímž vzniká fúzní gen *BCR-ABL* se spojením mezi exony e19a2 (c3a2) kódující největší onkoprotein o velikosti 230 kDa označovaný p230^{BCR-ABL} (Wada et al., 1995).



Obr. 6: Zlomy v genu *BCR-ABL* (upraveno dle: Kantarjian & O'Brien, 2008).

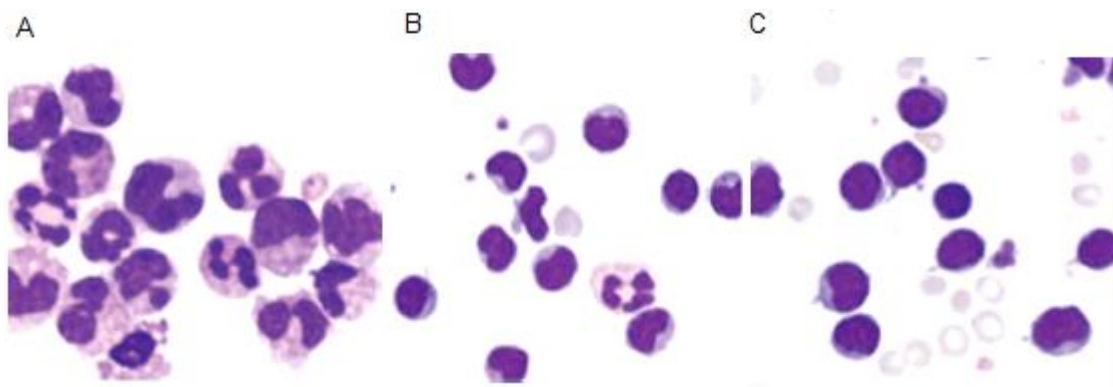
2.3.4 Stádia CML

Průběh CML lze u většiny pacientů rozdělit do 3 fází – chronické, akcelerované a blastické fáze. Počáteční **chronická fáze** (CP, chronic phase) může dlouho probíhat bez výrazných klinických příznaků, tedy nepoznaně. Průměrně trvá 3 až 4 roky, ale vzhledem k výrazné variabilitě tohoto onemocnění nejsou výjimkou pacienti, u nichž trvá jen několik měsíců nebo naopak až 10 let. U mnoha pacientů je CP diagnostikována až při náhodném vyšetření krevního obrazu. Časem se však začíná zvyšovat rychlost proliferace buněk a mizí jejich citlivost k léčbě. CML se postupně dostává do **akcelerované fáze** (AP, accelerated phase), v níž se u pacientů častěji projevuje únava a především se jim progresivně zvětšuje slezina. Ta může tlačit na břišní orgány a dochází v ní k bolestivým infarktům. Nemocní trpí úbytkem hmotnosti, progresí trombocytopenie a anémie, v periferní krvi přibývá blastů a při cytogenetickém vyšetření jsou navíc zjišťovány chromosomální aberace mimo Ph chromosom. CML vrcholí **fází blastickou** (BP, blastic phase), pro niž se v české literatuře objevuje také termín *blastický zvrát*. Pro případ, kdy se blastický zvrát objevuje náhle bez zřejmé fáze akcelerace, se používá název *blastická krize*. Při této fázi se v periferní krvi objevuje minimální počet funkčních granulocytů a naopak velké množství blastů. Nejčastěji (v 70 % případů) se jedná o myeloblastický zvrát (Westfall et al., 2008), dochází však také k lymfoblastickému (30 %) nebo myelo-lymfoblastickému zvrátu (Doubek & Adam, 2001; Voglová, 2010).

2.3.5 Diagnostika CML

Zhruba 90% nemocných je diagnostikováno v CP, u které se historicky udává medián přežití 5 let. CML se může u některých pacientů eventuálně vyvinout až do fáze BP, při níž je prognóza poměrně špatná a medián přežití v této fázi je pouhé 3-6 měsíců. Dvě třetiny pacientů v CML-BP nejprve prochází AP, u níž se udává medián přežití 1-2 roky (Cortes et al., 2006).

V diagnostice CML patří k základním vyšetřením krevní obraz a diferenciální rozpočet bílých krvinek. Typickým znakem CML v periferní krvi je výrazná leukocytóza. Počet leukocytů v době stanovení dosahuje hodnot $20 \times 10^9/l$ až $500 \times 10^9/l$. Pro toto onemocnění je diagnostický posun doleva, k nezralým formám granulocytů. V krevním obraze převažují neutrofilní granulocyty, ale i jejich nezralé formy (myelocyty, metamyelocyty, promyelocyty, blasty; Obr. 7). Mnohdy bývají zmnožené i krvinky bazofilní a eosinofilní řady (Doubek & Adam, 2001).



Obr. 7: Krevní obraz. A, pacient s CML – krevní obraz obsahuje nezralé formy granulocytů; B, pacient s kompletní cytogenetickou odpovědí (remise); C, zdravý jedinec (Engler et al., 2011).

V minulosti už bylo vytvořeno mnoho definic a kritérií pro jednotlivé fáze tohoto onemocnění. Roku 2006 navrhl J. E. Cortes (Cortes et al., 2006) na základě vyhodnocení více než 800 nemocných pro určení fází CML nová kritéria, která jsou shrnuta v Tab. 2.

Tab. 2: Kritéria pro určení fází CML (upraveno dle: Cortes et al., 2006)

Blastický zvrat

Blasty v krvi nebo kostní dřeni $\geq 30\%$

Extramedulární blastická infiltrace

Akcelerovaná fáze

Blasty v krvi nebo kostní dřeni 10-29%

Splenomegalie, leukocyty $> 10 \times 10^9/l$ nebo trombocyty $> 1000 \times 10^9/l$ - neodpovídající na nepřerušovanou léčbu

Trombocyty $< 100 \times 10^9/l$ - nesouvisející s léčbou

Bazofily v krvi nebo kostní dřeni $\geq 20\%$

Blasty a promyeocyty $\geq 30\%$

Chronická fáze

Vysoké riziko

Trombocyty $> 1000 \times 10^9/l$ před zahájením léčby

V době diagnózy nepřítomná případná cytogenetická změna

Nízké riziko

Bazofily v krvi nebo kostní dřeni $< 10\%$

Blasty a promyeocyty v krvi nebo kostní dřeni $< 20\%$

V době diagnózy přítomná případná cytogenetická změna

2.3.6 Historie a současnost léčby CML

Intenzivní výzkum v oblasti léčby CML má své kořeny již v 1. polovině 20. století. Významnou událostí byla katastrofa během 2. světové války, při níž došlo k explozi lodi vezoucí 100 tun yperitu používaného jako toxickou bojovou látku. Tato příhoda vedla k odhalení, že má yperit mimo jiné také antiproliferativní vlastnosti a proto byly zanedlouho syntetizovány další chemicky podobné látky. Takto byla zahájena éra protinádorové cytostatické chemoterapie alkylačními látkami, z nichž se mnohé používají dodnes (Mayer, 2010).

Chemoterapie - cytostatika

Jedním z prvních používaných cytostatik byl **busulfan** (známý také jako mylelan). O jeho syntéze a prvním klinickém použití jsou poznatky již z roku 1953 (Haddow & Timmis, 1953). Této studii se účastnilo 19 pacientů a již tehdy se zjistilo, že busulfan CML nevyлéčí. I přesto byl k terapii CML dlouhou dobu využíván.

Další studovanou látkou byla **hydroxyurea**, která je známá už od roku 1869. Její antitumorózní účinek byl však systematicky studován až od konce 50. let 20. století. Výsledkem byla studie publikovaná v roce 1963 (Thurman et al., 1963). Pro klinické užití je tento lék k dispozici v několika formách již více než 30 let. Z farmakodynamického hlediska však nemá intravenózní aplikace žádnou výhodu oproti perorálnímu podání (Rodriguez et al., 1998).

Alogenní transplantace krvetvorných buněk

Podstatou alogenní transplantace krvetvorných buněk (HSCT, human stem cell transplantation) je přenos dárcovské (alogenní) krvetvorné tkáně za účelem obnovy kostní dřeně. Cesta k transplantacím nebyla lehká a byla blokována řadou neznalostí v problematice imunitního systému a infekcí nebo imunosuprese (Mayer, 2010). První studii o alogenní HSCT publikoval Doney v roce 1978 (Doney et al., 1978). Popisovala 14 pacientů v pokročilé fázi onemocnění s mediánem přežití 43 dnů, z nichž jeden pacient přežíval 16 měsíců, než u něj došlo k fatálnímu kolapsu. Od té doby bylo publikováno nezpocet studií o problematice alogenních HSCT u CML a stala se jednou z rutinních léčebných procedur. Postupem času se tato technologie výrazně zlepšila a s transplantacemi lze dnes dosáhnout velmi dobrých výsledků (Krejčí et al., 2006). I přesto se stále nepodařilo překonat klíčový problém s oddělením žádoucí imunologické reakce transplantátu proti nádoru od nežádoucí až fatální reakce transplantátu proti hostiteli. Proto může mít pacient po transplantaci různé i dlouhodobé problémy a v tom nejhorším případě může i na následky transplantace zemřít. Přestože tato metoda řadu

pacientů vyléčila nebo jim alespoň prodloužila život, tak se nyní i v případě CML nachází pod nezadržitelným tlakem moderních cílených léků a je tak výrazně na ústupu (Gratwohl et al., 2006; Mayer, 2010).

Imunoterapie – interferon α

V léčbě CML se uplatnila i metoda imunochemie využívající interferonu α . První studie provedená na toto téma byla publikovaná v roce 1983 (Talpoz et al., 1983) a vzbudila velký zájem. Časem se interferon α stal novým standardem netransplantační terapie CML. Dnes se však využití tohoto léku výrazně snížilo a to především pro velkou řadu jeho nežádoucích účinků a nespecifický účinek na CML. Interferon α lze získat z aktivovaných leukocytů, produkován je také makrofágy či lymfocyty. Takto získaný interferon však není oproti přirozeně se vyskytujícímu glykosilován. I přesto, že je pro klinické využití k dispozici mnoho různých interferonů, nejvíce zkušeností v léčbě CML je právě s interferonem α (Mayer, 2010).

Léčba tyrosinkinasovými inhibitory 1. a 2. generace

Objev tyrosinkinasových inhibitorů (TKI) na konci milénia znamenal v léčbě CML zásadní pokrok a v současnosti patří k nejvyužívanějším způsobům terapie této nemoci. Jedná se o první molekulární cílenou terapii určenou k léčbě nádorových onemocnění. Prvním syntetizovaným specifickým TKI byl imatinib. Používá se jako lék 1. generace pro standardní léčbu pacientů v chronické fázi CML. TKI 2. generace, dasatinib a nilotinib, jsou indukovány u pacientů rezistentních nebo intolerantních na imatinib (Faber, 2010).

Dasatinib, dříve známý jako BMS-354825, je silný Abl-kinasový inhibitor podobný IM. Jeho výhodou je to, že se může vázat na aktivní i inaktivní konformaci Abl kinasové domény, v důsledku čehož je tento lék účinný proti téměř všem imatinib rezistentním BCR-ABL mutacím in vitro (Shah et al., 2004).

Nilotinib, dříve známý jako AMN107, je nový vysoce selektivní inhibitor BCR-ABL tyrosinkinasy, který prokázal větší účinnost než imatinib. Tento lék také nevykazuje běžné vedlejší účinky jako je to v případě imatinibu (př. otok či přírůstek hmotnosti) (Kantarjian et al., 2006).

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

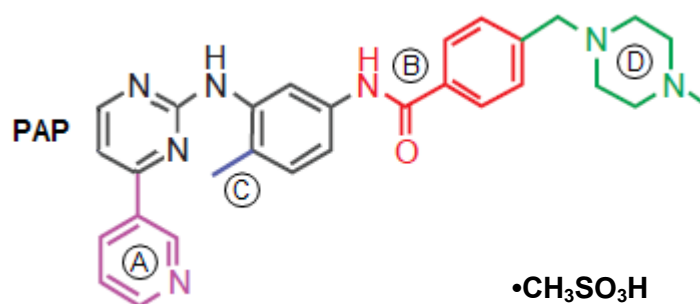
3 Imatinib

3.1 Úvod

Imatinib mesylát (IM; Obr. 8) je nejsilnějším derivátem 2-fenylaminopyrimidinu s chemickým názvem 4-[(4-methyl-1-piperazinyl)methyl]-N-[4-methyl-3[[4-(3-pyridinyl)-2-pyrimidinyl]aminophenyl]benzamid methansulfonát. Dříve byl označován jako STI-571 (signal transduction inhibitor) nebo CGP 57148B (Buchdunger et al., 1995; Buchdunger et al., 1996). IM byl identifikován v roce 1996, ve kterém zároveň došlo k zásadnímu objevu, že IM inhibuje Abl kinasovou aktivitu *in vitro* i *in vivo* (Buchdunger et al., 1996) a blokuje růst BCR-ABL transformovaných buněčných linií (Druker et al., 1996).

3.2 Syntéza

Výchozí sloučeninou při vývoji IM se stal 2-fenylaminopyrimidin (PAP, 2-phenylaminopyrimidin), což je poměrně slabý inhibitor proteinkinasy C. Následné studium vlivu modifikací této sloučeniny na její inhibiční schopnosti poté vedlo k syntéze výrazně účinnější a selektivnější molekuly IM. Připojením pyridylu (Obr. 8A) k PAP došlo ke zvýšení buněčné aktivity, amidická skupina poté zesílila interakci s tyrosinovými kinasami (Obr. 8B) a vnesení methylové skupiny omezilo nežádoucí vliv na proteinkinasu C a navíc zvýšila aktivitu tohoto derivátu (Obr. 8C). Finální podoby IM se docílilo připojením vysoce polárního postranního řetězce na bázi *N*-methylpiperazinu, což zároveň vedlo ke zlepšení rozpustnosti inhibitoru (Obr. 8D) (Winger et al., 2009).



Obr. 8: Strukturní vzorec IM odvozený od PAP. (A) připojení pyridylu, (B) amidické skupiny, (C) methyly, (D) *N*-methylpiperazinu.

3.3 Použití

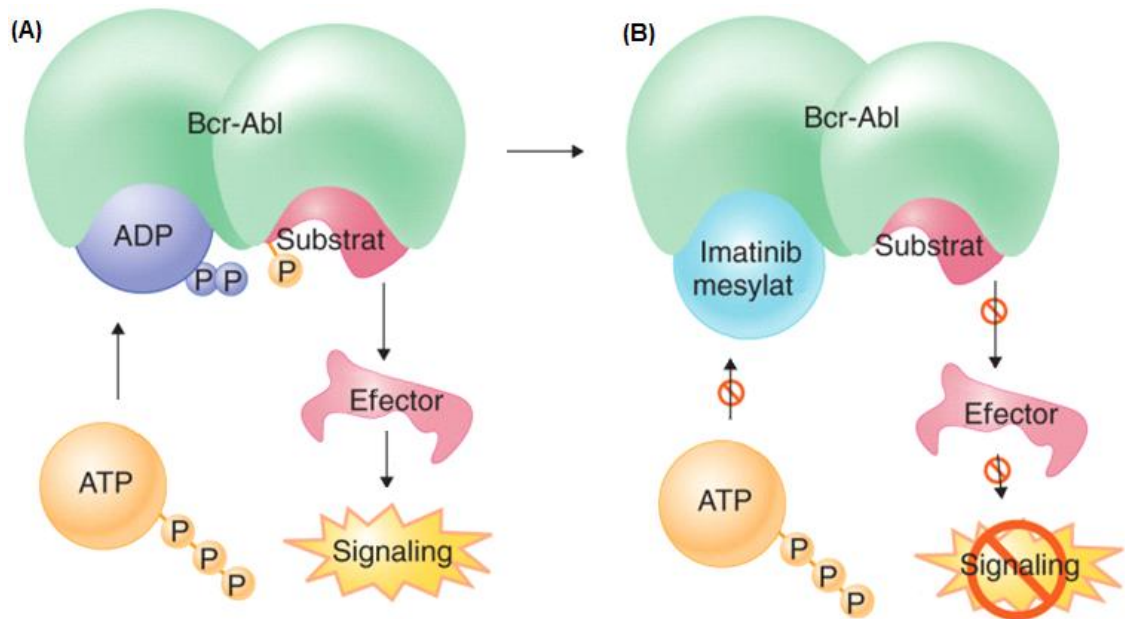
Poprvé byl IM použit v roce 1998 k léčbě pacientů s CML v chronické fázi, u nichž se projevila netolerance či rezistence na interferon- α . Tato studie probíhala od června 1998 do května 2001 a účastnilo se jí celkem 83 pacientů (55 mužů a 28 žen), z nichž 37 vykazovalo hematologickou rezistenci či recidivu, 33 vykazovalo cytogenetickou rezistenci či recidivu a 13 bylo netolerantních na interferon- α . Výsledky této studie ukázaly, že IM je schopný obnovit Ph^- (pravděpodobně normální) hematopoézu u většiny těchto pacientů (Druker et al., 2001).

IM vykazuje silnou inhibiční aktivitu proti TK jako jsou *BCR-ABL1* u CML, receptoru KIT nebo PDGF (platelet-derived growth factor) u gastrointestinálních stromálních tumorů (GIST, gastrointestinal stromal tumours). Vazba KIT-ligandu, růstového faktoru kmenových buněk, na KIT tyrosinkinázový receptor (KIT-RTK) má za následek homodimerizaci a autofosforylaci RTK s následnou kinasovou aktivitou. Fosforylace specifického tyrosinového zbytku na KIT spouští a aktivuje sekundární signální dráhy. GIST jsou nejběžnější mezenchymální tumory gastrointestinálního (trávicího) traktu, které jsou vysoce odolné proti konvenční chemoterapii a radioterapii. U takových nádorů obvykle dochází k aktivačním mutacím na KIT-RTK (75-80 %), méně častěji na PDGFRA/B (5-10 %) (Rubin et al., 2007).

3.4 Mechanismus účinku na BCR-ABL

Účinek IM je nejlépe prozkoumán u BCR-ABL pozitivních buněk (Obr. 9). Mechanismus účinku tohoto léku je podobný jako u KIT a spočívá v zabránění fosforylace tyrosinových zbytků signálních proteinů, která jinak vede k aktivaci intracelulárních drah spojených se zvýšenou buněčnou proliferací a inhibicí apoptózy. ATP se váže na BCR-ABL TK a poskytuje tak fosfátové skupiny, které jsou pro fosforylaci nezbytné. TKI jsou ATP-mimetické (podobné) sloučeniny a proto s ATP soutěží o ATP-vazebné místo na BCR-ABL TK (kompetitivní inhibice). Pokud se tedy do onoho vazebného místa naváže TKI místo ATP, nedojde k fosforylaci proteinů, protože není k dispozici žádná fosfátová skupina. V důsledku toho není aktivována onkogenní signální dráha a CML buňky prochází apoptózou (Faber & Indrák, 2010; Kantarjian & O'Brien, 2008).

Podle experimentálních studií IM nepůsobí na leukemické progenitorové buňky, čímž nedokáže CML zcela vyléčit, ale velmi účinně potlačí růst leukemického klonu. V současné době se proto doporučuje jeho trvalé užívání i v situaci dosažení stabilní a dlouhotrvající molekulární negativity BCR-ABL (Faber & Indrák, 2010; Kantarjian & O'Brien, 2008).



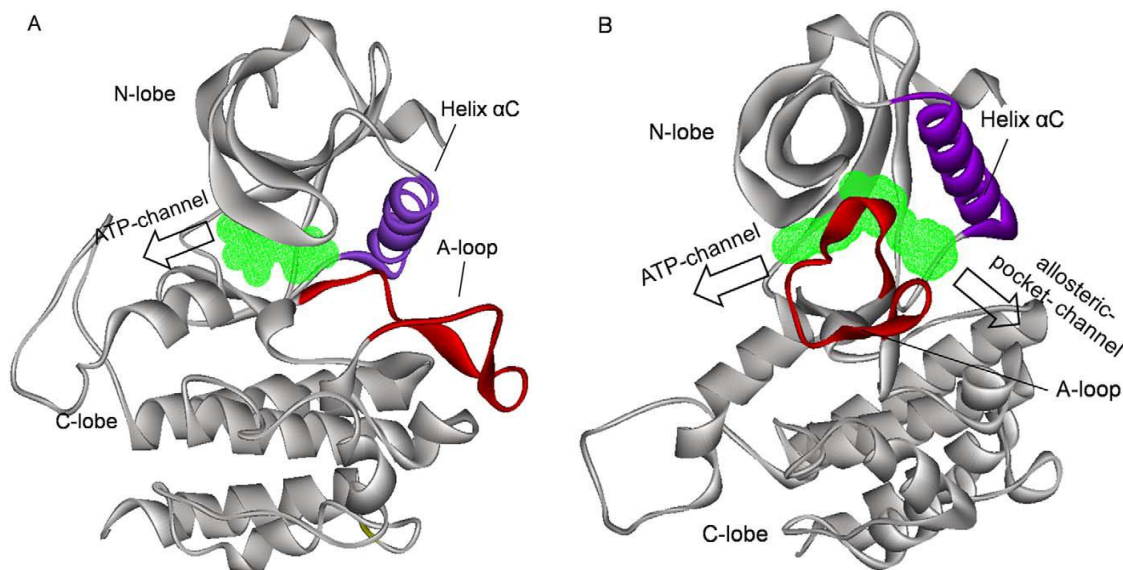
Obr. 9: Mechanismus účinku IM. (A) bez inhibice IM; (B) s inhibicí IM
(upraveno dle: Kantarjian & O'Brien, 2008).

3.5 Proteinkinasy

3.5.1 Struktura proteinkinasy

3D struktura eukaryotní proteinkinasy (PK) byla poprvé vizualizována v roce 1991 rentgenovou strukturální analýzou (X-ray krystalografie). Jednalo se o cAMP dependentní proteinkinasy známou jako proteinkinasa A (Knighton et al., 1991).

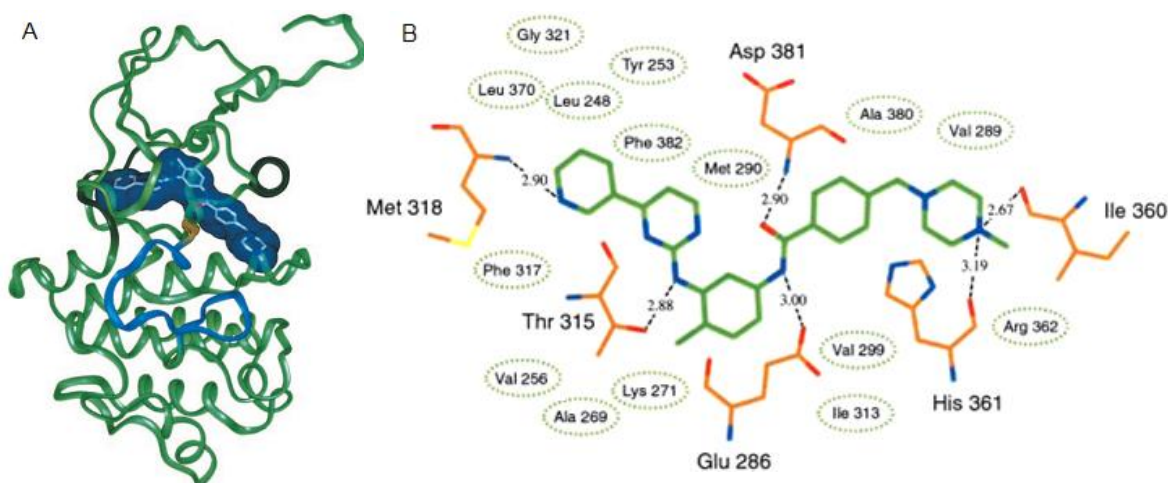
Všechny PK katalyzují stejnou reakci a to přenos γ -fosfátu získaného hydrolyzou ATP na hydroxylovou skupinu aminokyseliny serinu, threoninu nebo tyrosinu na molekule substrátu. Strukturně jsou PK tvořeny 2 doménami. Menší N-terminální doména (N-lobe) obsahuje 5 β -skládaných listů a 1 α helix označovaný jako helix α C. Větší C-doména je převážně tvořena helixy. Mezi tyto domény se do vazebného místa bohatého na glycin (tzv. P-smyčky, P-loop) váže ATP. Tato doména je díky molekulám glycinu v nepřítomnosti ATP velmi flexibilní, což umožňuje snadnější vazbu malých molekul inhibitorů do vazebného místa pro ATP (Mohammadi et al., 1997; Schindler et al., 2000). PK přechází mezi 2 konformačními stavy - aktivní a inaktivní, což závisí na konformaci tzv. aktivační smyčky (A-loop). Pokud je tato smyčka fosforylována, enzym se nachází v aktivní konformaci. V nefosforylovaném stavu dochází k inhibici vazby nukleotidu či peptidu (Johnson et al., 1996; Hubbard et al., 1994; Obr. 10).



Obr. 10: Konformace PK. *A*, aktivní konformace; *B*, inaktivní konformace (Yang et al., 2009).

3.5.2 Vazba IM na TK

Dusíkatá báze adenin na ATP vytváří 2 vodíkové vazby s atomy peptidového řetězce spojujícího obě domény PK (Zheng et al., 1993). Aminoskupina adeninu vytváří vodíkovou vazbu s $-CO$ zbytkem, který odpovídá aminokyselině Glu-316 na Abl doméně a dusík N1 tohoto purinu je vodíkovou vazbou spojen s amidickou skupinou aminokyseliny Met-318. Malé molekuly inhibitorů PK jsou zakotveny v kinasové doméně vodíkovými vazbami, které jsou podobné těm, jež vytváří adenin ATP. IM a jeho dříve analyzované varianty (Schindler et al., 2000) také vytváří s Abl doménou podobné vazby jako ATP (Obr. 11A). IM však na pyridylu postrádá aminoskupinu, proto tuto druhou vodíkovou vazbu v ATP vazebné doméně nevytváří. Zato je v TK upevněn mezi αC helix a aktivační smyčkou, která se nachází v inaktivní konformaci. IM je k Abl doméně vázán nejen vodíkovými vazbami, ale i pomocí Van der Waalsových sil. Celkem s TK vytváří 6 vodíkových vazeb (s Met-318 v ATP vazebné doméně, dále pak s Thr-315, Glu-286, His-361, Ile-360 a Asp-381), ale většina interakcí je zprostředkována pomocí Van der Waalsových sil. Takové interakce působí mezi IM a aminokyselinami jako jsou např. Tyr-253, Leu-370 nebo Phe-382 (Obr. 11B; Nagar et al., 2002).



Obr. 11: Interakce mezi IM a Abl doménou TK. A, 3D struktura; B, schematický diagram - vodíkový můstek znázorněn přerušovanou čarou, Van der Waalsovy síly znázorněny kruhy (Nagar et al., 2002).

3.6 Rezistence na IM

Nejzávažnějším problémem spojeným s podáváním IM je rozvoj rezistence na léčbu. V tomto případě můžeme rezistencí rozumět neschopnost léku navodit nebo udržet léčebnou odpověď. V závislosti na počátku rozvoje rezistence se rozeznávají dva základní typy – primární a sekundární. Pokud se u pacienta nepodařilo odpověď na léčbu navodit vůbec, jedná se o tzv. **primární** rezistenci. V případě, že po dosažení cílové léčebné odpovědi náhle dojde k její ztrátě, mluvíme tehdy o tzv. **sekundární** (vnější) rezistenci. U pacientů s CML se rezistence většinou vyvíjí až v pokročilých stádiích nemoci. Dále můžeme rezistenci dělit podle vyšetřovacích metod, s jejichž pomocí je stanovována, na *hematologickou*, *cytogenetickou* a *molekulární* (Faber, 2010).

Výskyt rezistence na IM závisí především na fázi CML, v níž se pacient nachází a také na délce trvání onemocnění. Nejnižší výskyt je udáván v časně chronické fázi. Po léčbě nemocných interferonem α (pozdní chronické fáze) je riziko vzniku rezistence popisováno asi u 40 % případů (Kantarjian et al., 2004). V AP dosahuje pravděpodobnost rozvoje rezistence 70 % a v BP přes 90 % (Talpaž et al., 2002; Sawyers et al., 2002).

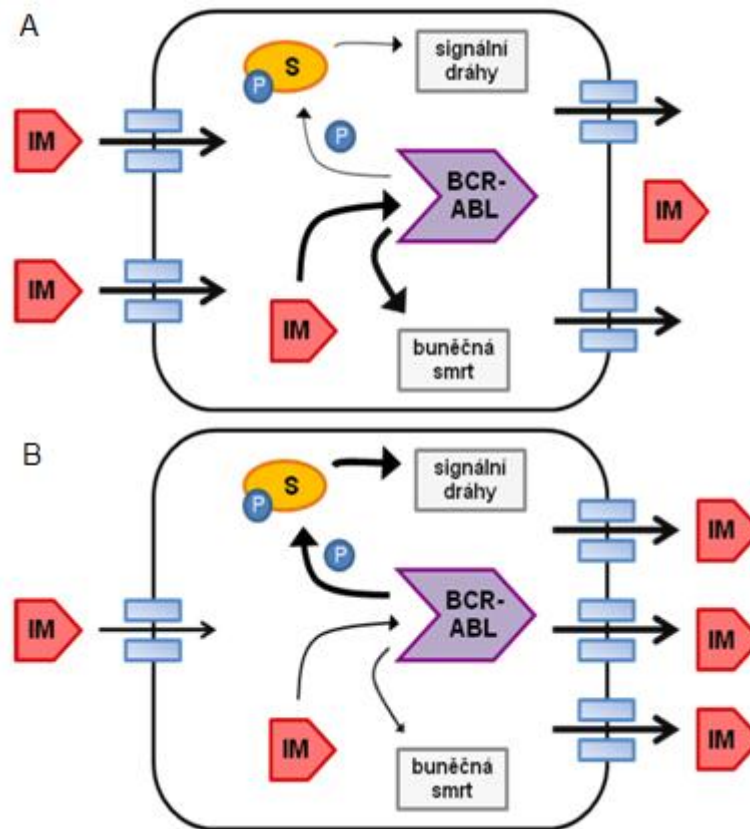
3.6.1 Primární rezistence

Při *primární rezistenci* mají velký význam faktory ovlivňující farmakokinetiku léku. Zásadní roli má např. plasmatická hladina léku (Peng et al., 2004; Picard et al., 2007), která může být ovlivněna α -1-kyselým glykoproteinem. Při zvýšené koncentraci má totiž tato bílkovina schopnost vázat velké množství IM a snižovat tak koncentraci jeho volné frakce v plazmě. Experimentálně bylo dále zjištěno, že podání erytromycinu, který se také váže na α -1-kyselý glykoprotein, dokáže překonat primární rezistenci (Gambacorti-Passerini et al., 2000). Pro inhibici tyrosinkinasy Bcr-Abl je také důležitá aktivita transportérů pro IM.

Aktivní transport

Aktivní transport léku do nitra a ven z rakovinné buňky významně ovlivňuje přecitlivělost a rezistenci na tento lék. Změna jeho transportu v průběhu onemocnění souvisí s odlišnou odpovědí pacienta na léčbu (Thomas et al., 2004).

Pro aktivní transport TKI existují především ATP-dependentní transportéry jako je ABCB1 (MDR1, multidrug resistance protein) a také organický kationtový transportér hOCT-1 (human organic cationic transporter). ABCB1 je efluxní pumpa sloužící k exportu léku ven z buňky. Jedná se o jeden ze 7 ABC transportérů (ABCA-ABCG), které jsou zodpovědné za multilékovou rezistenci (odtud označení MDR-1) (Mahon et al., 2003; White et al., 2006). Na rozdíl od toho hOCT-1 je hlavním aktivním influxním transportérem IM do nitra CML buněk, čímž způsobuje zvýšení intracelulární hladiny tohoto léku. Inhibice *BCR-ABL* genu při vysoké intracelulární hladině IM vede k CML buněčné smrti. Při exportu IM z buňky naopak dochází k poklesu intracelulární hladiny IM a inhibice BCR-ABL je tak potlačena (Obr. 12). Měření aktivity transportéru hOCT-1 se využívá zejména pro detekci rezistence (Thomas et al., 2004; Engler et al., 2011). Nedávno bylo navíc doloženo, že na dosažení molekulární odpovědi po roce léčby IM mají zásadní vliv i polymorfismy MDR-1 (Dulucq et al., 2008).



Obr. 12: Závislost inhibice BCR-ABL na koncentraci IM v buňce. *A*, vysoká intracelulární hladina IM vede k buněčné smrti CML buněk; *B*, nízká intracelulární hladina IM vede k inhibici buněčné smrti CML buněk (upraveno dle: Thomas et al., 2004).

3.6.2 Sekundární rezistence

Při sekundární rezistenci rozvíjející se po předchozí příznivé léčebné odpovědi, hrají významnou roli mutace a amplifikace genu *BCR-ABL1*, mechanismy závislé na přídatných cytogenetických abnormalitách leukemického klonu nebo na *BCR-ABL1* nezávislé aktivaci signálních drah např. Src kinasy (Diamond & Melo, 2011).

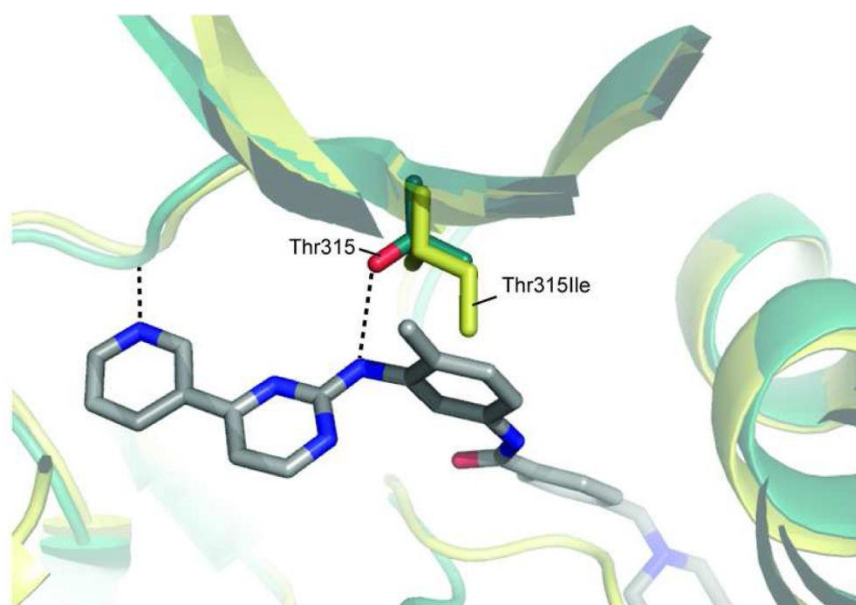
Bodové mutace *BCR-ABL* genu

Bodové mutace na Abl kinasové doméně (KD) tyrosinkinasy jsou nejčastějším a nejvýznamnějším mechanismem vzniku rezistence. Předpokládá se, že zapříčiňují až 90 % případů sekundární rezistence a 10 až 40 % případů primární rezistence. Projevují se záměnou jedné aminokyseliny za jinou, což způsobuje zamezení vstupu IM do ATP vazebného místa. Zároveň je však zachována afinita tyrosinkinasy k ATP i enzymová aktivita. K bodovým mutacím dochází jak na ATP vazebné doméně, což

přímo brání vazbě IM, tak i mimo tuto doménu - na aktivační smyčce či katalytické doméně. Mutace mimo ATP vazebnou doménu způsobuje změnu konformace celého proteinu a následně blokaci vazby IM (Faber, 2010; Diamond & Melo, 2011). Celkem je známo více než 70 typů mutací. Největší klinický význam při léčbě IM a nejvyšší výskyt má však asi 20 z nich (Ernst et al., 2008).

První bodová mutace popsaná v roce 2001 u pacientů rezistentních na IM bývá označována jako **T351I** (nebo také Thr315/Ile; Obr. 13). Spočívá totiž v záměně polární aminokyseliny *threoninu* na pozici 315 Abl domény, který interaguje vodíkovým můstkem s aminoskupinou inhibitoru, za nepolární a objemnější *isoleucin*, jenž na místo hydroxyly obsahuje methylovou skupinu a vodíkový můstek tedy s inhibitorem netvoří (Gorre et al., 2001).

Další aminokyselina, která tvoří vazbu s IM, je fenylalanin. Na Abl doméně v pozici 317 dochází k jeho záměně za leucin a proto také tato bodová mutace zvaná **F317L** (Phe317/Leu) způsobuje resistenci (Gorre et al., 2001).

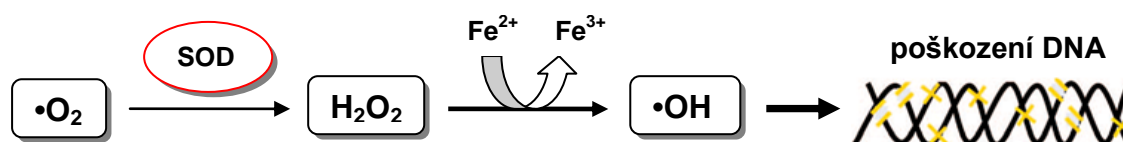


Obr. 13: Bodová mutace **T315I** (Gorre et al., 2001).

3.6.3 Reaktivní formy kyslíku

Reaktivní formy kyslíku (ROS, reactive oxygen species) jsou malé, přechodné a vysoce reaktivní molekuly (radikály) obsahující kyslík a jeden nepárový elektron. Nejvýznamnější ROS je superoxidový anion-radikál ($\bullet\text{O}_2^-$). V buňce je $\bullet\text{O}_2^-$ vytvářen různými mechanismy (mitochondriálním dýchacím řetězcem nebo NADPH oxidasou), při nichž dochází k neúplné jednoelektronové redukci kyslíku. Toxicita $\bullet\text{O}_2^-$ je založena především na tvorbě dalších ROS, které jsou pak schopné napadnout DNA. Dismutace

$\cdot\text{O}_2^-$ enzymem superoxidodismutase (SOD) má za následek produkci peroxidu vodíku (H_2O_2), který může snadno proniknout membránou do buňky. V přítomnosti Fe^{2+} nebo Cu^+ dochází k přeměně H_2O_2 na hydroxylový radikál ($\cdot\text{OH}$), který způsobuje nejsilnější poškození DNA (Obr. 14). BCR-ABL transformované buňky obsahují 2x-6x více ROS (H_2O_2 a $\cdot\text{OH}$) než buňky normální (CML-BP > CML-CP > normální) (Koptýra et al., 2006; Nowicki et al., 2004; Skorski, 2011).



Obr. 14: Generace ROS (upraveno dle: Skorski, 2011).

Oxidativní poškození DNA indukuje bodové mutace v BCR–ABL tyrosinkinase způsobující rezistenci k TKI a produkci chromosomové aberace přispívající k vývoji CML-BP. Toto poškození pozitivně ovlivňují **antioxidanty**, které slouží k redukci ROS a předcházejí tak genomové nestabilitě. Dále také omezují hromadění rezistentních klonů vůči TKI nesoucí bodové mutace v BCR–ABL1 kinase (Koptýra et al., 2006).

3.7 Pacienti a dávkování IM

Jako iniciační dávka se ve většině indikací, tedy i v chronické fázi CML, používá dávka 400 mg IM denně. Při neoptimální odpovědi, v některých případech rezistence nebo u nemocných v pokročilých fázích nemoci se dávka zvyšuje na 600 až 800 mg IM denně. V dosavadních studiích nebyla zjištěna maximální tolerovaná dávka IM, ale udává se, že dávky nad 1000 mg IM denně nevedou ke zvýšení účinnosti, spíše zvyšují toxicitu léčby. V závislosti na kompletní hematologické odpovědi byla stanovena nejnižší dávka podávaná pacientům v chronické fázi CML na 350 mg IM denně (Peng et al., 2004).

4 Metabolomika

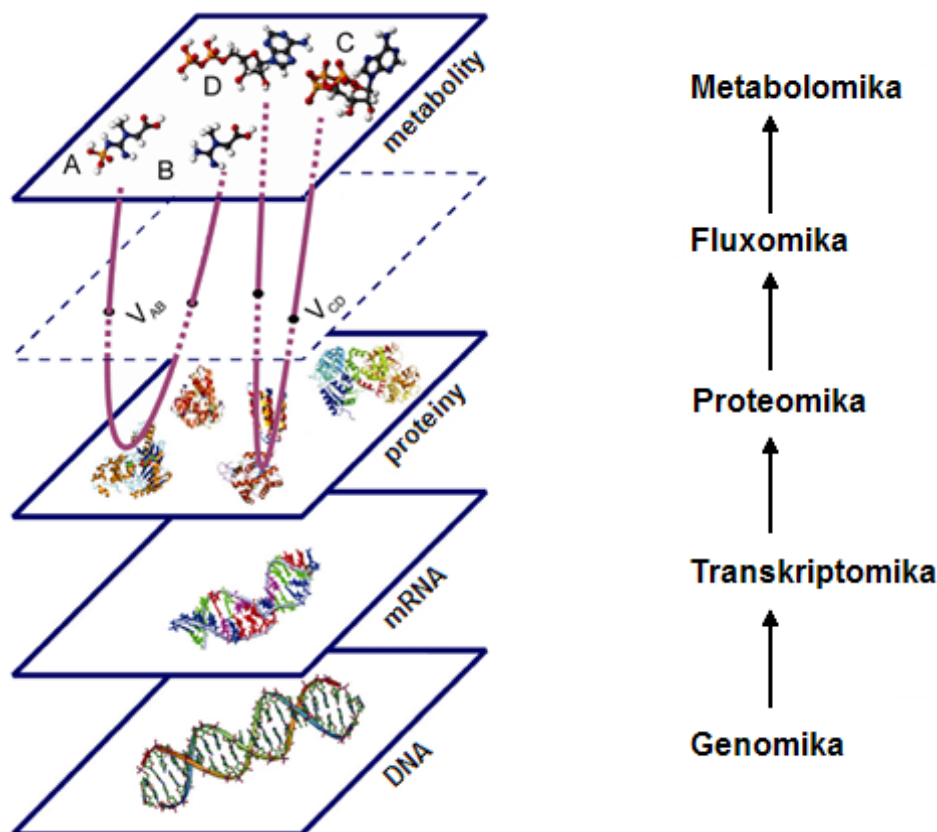
4.1 Úvod a historie

Metabolomika je rozvíjející se vědní obor, který se zabývá studiem nízkomolekulárních látek (metabolitů) a jejich specifických změn v buňkách, tkáních či orgánech (Han et al., 2008).

Metabolické změny v lidském organismu většinou souvisí s onemocněním nebo bývají odpovědí na aktuální léčbu. Artur Robinson a Linus Pauling provedli v roce 1971 kvantitativní analýzu moči a dechu plynovou chromatografií (GC, gas chromatography), čímž poukázali na vztah mezi funkcemi biologického systému a metabolity obsaženými v tělních tekutinách (Pauling et al., 1971). Ve stejném roce Horning a Horning poprvé použili termín **metabolické profilování** k popisu výsledků analýzy vzorku moči novorozence a dospělého jedince pomocí GC, při níž využily metodu sloužící k identifikaci skupiny metabolitů (př. steroidů či organických kyselin) v průběhu jedné analýzy (Horning & Horning, 1971). O 4 roky později se Henri Dirren zaměřil na profilování aminokyselin v moči pro následnou statistickou analýzu detekující profilové rozdíly mezi pohlavími (Dirren et al., 1975). Až po téměř 30. letech byl tento nový přístup pro kvantitativní metabolické profilování velkého počtu metabolitů v tělních tekutinách označen Nicholsonem jako tzv. **metabonomika** (Nicholson et al., 1999), později jinými vědci jako **metabolomika**.

4.2 Aplikace

Žijící buňky představují integrovanou síť genů, transkriptů, proteinů, malých signálních molekul a metabolitů, které se vzájemně ovlivňují a zároveň definují jejich fenotyp a funkce. Rozvoj metabolomiky a také fluxomiky (metabolická analýza toku) rozšířil tzv. kaskádu "omik" (Obr. 15), v níž tyto vědy doplňují genomiku, transkriptomiku a proteomiku právě při stanovení fenotypu živého organismu. Rozvoj metabolomiky s sebou neustále přináší nové technologie do klinické praxe pro zlepšení diagnostiky jednotlivých onemocnění a predikce rizika onemocnění s následnou terapií odpovídajícím léčivem pro každý jedinečný metabolomický profil. Obecně tyto vědy našly své uplatnění v systémové biologii, fyziologii, medicíně či farmakologii (Nielsen & Oliver, 2005; Nemutlu et al., 2012).



Obr. 15: Od genomu k metabolomu (upraveno dle: Nemitlu et al., 2012).

4.3 Metabolity

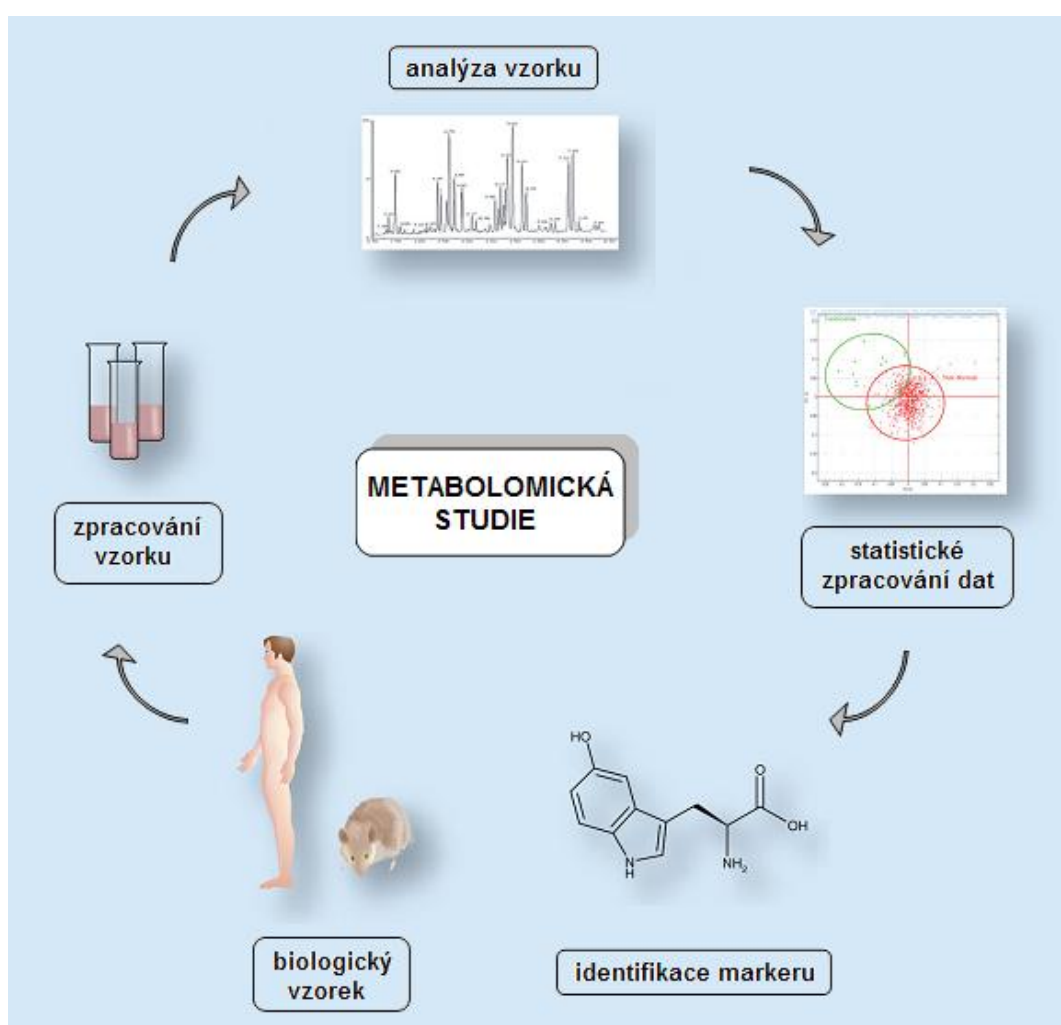
Metabolity jsou konečné produkty komplexních procesů probíhajících v buňce, tkáních či organismu. Metabolom může být definován jako komplexní soubor všech metabolitů (<1500 Da) identifikovaných ve specifické buňce, orgánu či organismu v daném čase. Lidský metabolom sestává z přibližně 3000 endogenních metabolitů a zahrnuje různorodé skupiny chemických sloučenin jako jsou aminokyseliny, cukry, lipidy, peptidy, nukleotidy, alkoholy, organické kyseliny a další. Tyto metabolity jsou v jednotlivých tkáních a tělních tekutinách zastoupeny v různých koncentracích. Metabolické změny identifikované v lidském metabolismu mohou poskytovat detailnější náhled do průběhu jednotlivých onemocnění (Wishart et al., 2007).

Pro stanovení hladin metabolitů ve vzorcích jsou v metabolomice běžně používané dva analytické přístupy - cílená a necílená analýza. Používanějším je tzv. **cílená analýza**, která slouží pro stanovení již známých metabolitů v biologických vzorcích. K tomu je třeba znát struktury hledaných metabolitů a vyvinout přesnou a citlivou analytickou metodu, která je pro každou látku specifická (Shulaev, 2006).

Cílená analýza pro stanovení hladin metabolitů byla použita i v experimentální části této diplomové práce.

4.4 Metabolomická studie

Metabolomická studie, jejíž průběh je znázorněn na Obr. 16, může být provedena *in vitro* nebo *in vivo* s využitím buněčných kultur, tělních tekutin či tkání. Vzhledem k relativní jednoduchosti zpracování vzorků se v metabolomice jako biologický materiál nejčastěji využívají tělní tekutiny a to především krev, plasma a moč, ale také sérum, mozkomíšní mok, sliny, prostatické sekrety či fekální voda (Caudle et al., 2010).



Obr. 16: Průběh metabolomické studie (upraveno dle: Caudle et al., 2010).

Pro analýzu metabolomu jsou nejprve shromážděny biologické vzorky od pacientů a zdravých jedinců, které slouží jako vzorky kontrolní. Při zpracování vzorků je třeba dodržovat jednotné postupy (např. použití stejného antikoagulačního činidla pro

izolaci plasmy z plné krve, jednotného postupu deproteinace nebo derivatizace v případě GC) a zabránit tak možným rozdílům. Získané vzorky by měly být v co nejkratší době od odebrání zpracovány a před analýzou zamrazeny při - 20 nebo lépe při - 80 °C. Pro dlouhodobé skladování je vhodné zamražení vzorků v tekutém dusíku (Caudle et al., 2010).

Výběr vzorku se odvíjí od zvolené metabolické studie, analytické metody a v neposlední řadě od populace pacientů. Kvůli rozmanitosti metabolitů ve vzorcích však neexistuje jednotná analytická metoda, která by byla schopná analyzovat všechny látky v biologických tekutinách a tkáních (př. lipidy X polární látky) během jedné analýzy a proto se v laboratorní praxi používá kombinací odlišných analytických metod (Caudle et al., 2010).

Po analýze je velmi důležitým krokem statistické zpracování dat, které nám může mimo jiné napomoci k identifikaci biomarkerů studovaných nemocí (Caudle et al., 2010).

4.5 Analytické metody

K nejpopulárnějším analytickým metodám používaným v metabolice patří nukleární magnetická rezonance (NMR) a hmotnostní spektrometrie (MS, mass spectrometry). NMR má ve srovnání s MS nižší citlivost, ale její výhodou je vysoká reprodukovatelnost a zároveň nedochází k destrukci vzorků. MS je oproti tomu efektivní technika pro komplexní profilování metabolomu v tělních tekutinách či buňkách a její velký význam pro metaboliku tkví především v její rychlosti, citlivosti a také možnosti spojení s chromatografickými technikami. Nejčastěji používané chromatografické techniky pro spojení s MS jsou kapalinová chromatografie (LC, liquid chromatography) či GC a z novějších metod např. kapilární elektroforéza. LC-MS metody jsou závislé na chromatografických podmínkách, např. na použité chromatografické koloně - s reverzní fází, normální fází či kolona s hydrofobními interakcemi, elučním gradientu, mobilní fází nebo vhodně zvoleném pH mobilní fáze, jehož změna výrazně ovlivňuje retenční časy (Ret t, retention time) jednotlivých metabolitů. U všech analytických metod se také využívají vnitřní standardy pro monitorování změn v analytickém systému a ke kvantifikaci jednotlivých metabolitů (Want et al., 2007; Wikoff et al., 2008; Caudle et al., 2010).

V experimentální části této diplomové práce byla provedena analýza metabolitů pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií (HPLC-MS/MS, high-performance liquid chromatography-tandem mass

spectrometry). Stejná metoda byla použita a popsána v mé bakalářské práci, proto nebude v této práci více popisována (Fikarová, 2011).

4.5.1 *Kontrola kvality*

Analýza komplexních biologických vzorků pomocí HPLC-MS/MS skýtá s ohledem na získání spolehlivých dat řadu problémů. Stabilita analytického systému je nezbytná k zajištění opakovatelnosti metabolických analýz. Z důvodu sledování této stability je v průběhu analýz zapotřebí kontrolovat případné změny - retenční čas, intenzitu signálu a přesnou hmotu (poměr m/z) – a zahrnout je do následného zpracování. Za účelem prokázání, zda-li LC-MS systém poskytuje užitečná a spolehlivá data, se využívá tzv. vzorku kontroly kvality (QC, quality control). Obvykle se QC vzorek připravuje smícháním malých alikvótů (5 -10 μ l) z každého vzorku dané studie. Následně se QC vzorky dávají v pravidelných intervalech (každých pět až deset vzorků) po celou dobu analýzy a to za účelem poskytování dat, z nichž lze posoudit opakovatelnost použité metody (Want et al., 2010).

4.6 **Metabolomické databáze**

Pro metabolomiku je velmi důležitá dostupnost a kvalita elektronických databází. Protože metabolomika kombinuje molekulární biologii s chemií a fyziologií, je třeba široká škála elektronických zdrojů. V současné době existuje mnoho typů databází využívaných v metabolomickém výzkumu. Mezi nejvyhledávanější zdroje patří např. KEGG - „Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes“, což je komplexní databáze obsahující informace o mikrobiálním, rostlinném i živočišném metabolomu (metabolické dráhy, reakce, enzymy) nebo databáze HMDB - „Human Metabolome Database“, která obsahuje chemická, klinická a molekulárně biologická data o jednotlivých metabolitech. Tuto databázi využívají při řešení problematiky analýzy metabolomu vědci z řad biochemiků, klinických chemiků, lékařů nebo genetiků. Od svého prvního vydání byly informace z této databáze použity k usnadnění výzkumu velkého počtu studií v metabolomice, klinické biochemii a systematické biologii (Kanehisa & Goto, 2000; Wishart et al., 2007; Wojtowicz et al., 2013).

4.7 **Statistická analýza vícerozměrných dat**

Vícerozměrná data jsou taková data, u nichž *zdrojová matice* (matice výchozích dat) obsahuje **proměnné** v m sloupcích a **objekty** v n řádcích, na kterých jsou tyto proměnné (vlastnosti) měřeny. Mnohdy však mají měřené proměnné různé jednotky

nebo se liší řádově, proto bývá zdrojová matice před zpracováním upravována *škálováním*. Jedná se buď o (a) *centrování*, kdy se od prvků sloupce odečte jejich sloupcový aritmetický průměr, nebo (b) *standardizaci* čili *normování*, kdy se prvky centrovaných sloupců ještě vydělí svou sloupcovou směrodatnou odchylkou. Postup analýzy více-rozměrných dat záleží na typu dat a na druhu požadované informace, jenž se má z daných dat získat (Meloun & Militký, 2002).

K transformaci dat se často užívá logaritmus. Na naše data však bylo pohlíženo jako na tzv. kompoziční data. Tyto datové soubory jsou často charakterizovány více-rozměrnými pozorováními s kvantitativně vyjádřenými relativními příspěvky částí na celku. Jediná relevantní informace v datech je obsažena v podílech mezi jejich složkami. Zajímaly nás tedy podíly hodnot, nikoliv jejich absolutní hodnoty. Škála těchto dat je relativní.

V metabolomice jsou nejvyužívanější multidimenzionální statistické postupy, jejichž hlavními úkoly jsou systematizace dat, nalezení vyšších struktur, trendů a souvislostí (Wojtowicz et al., 2013).

4.7.1 Analýza hlavních komponent

Cílem analýzy hlavních komponent (PCA, principal component analysis) je transformace dat z původních proměnných do menšího počtu latentních proměnných. Latentní proměnné jsou u PCA nazvány **hlavními komponentami** a jsou to lineární kombinace původních proměnných. Hlavní komponenty jsou sestrojovány tak, aby vyjadřovaly co nejvíce informace o původním datovém souboru. Součet rozptylů všech hlavních komponent je roven součtu rozptylů vstupujících původních proměnných, proto můžeme z podílu rozptylů jednotlivých hlavních komponent usuzovat na část proměnlivosti vysvětlenou dotyčnou hlavní komponentou. Jestliže součet prvních (nejvyšších) A podílů proměnlivosti je dostatečně blízký jedné, resp. 100 % (obvykle však stačí 80 % - 90 %), postačí brát v úvahu právě těchto prvních A hlavních komponent pro "dostatečné" vysvětlení variability původních proměnných. Trojrozměrnou formou PCA je tzv. PAFARAC (parallel factor analysis) (Meloun & Militký, 2002).

4.7.2 Diskriminační analýza

Diskriminační analýza (DA, discriminant analysis) patří mezi metody zkoumání závislosti mezi skupinou p nezávisle proměnných (sloupců zdrojové matice) nazývaných *diskriminátory* a jednou kvalitativní závisle proměnnou. Umožňuje zařazení objektu do jedné z již existujících tříd. Ve vstupních datech jsou svými hodnotami diskriminá-

torů u všech objektů dány *zařazené objekty do primárních tříd* a také jsou dány *nezařazené objekty*, pro které budeme hledat zařazení do třídy. Objekt zařadíme do třídy na základě jeho největší míry podobnosti. Při DA se snažíme vyčíslit hodnotu *diskriminační funkce*, která nám usnadní zařazení do primární třídy (Meloun & Militký, 2002).

Dvojný graf (**Biplot**) vychází z PCA i DA a je přehledným spojením grafu komponentních vah a rozptylového diagramu komponentního skóre. Biplot znázorňuje interakci objektů a proměnných. Úhel mezi vektory dvou proměnných je nepřímo úměrný velikosti korelace mezi těmito proměnnými. Čím menší je úhel, tím větší je korelace. Každý vektor má své souřadnice na první a na druhé hlavní komponentě. Délka této souřadnice je úměrná příspěvku původní proměnné do hlavní komponenty, čili je úměrná komponentní váze. Když se ve dvojném grafu nachází objekt v blízkosti určité proměnné, znamená to, že tento objekt "obsahuje" hodně právě této proměnné a je s ní v interakci (Meloun & Militký, 2002).

4.7.3 Shluková analýza

Shluková analýza (CLU, cluster analysis) patří mezi metody zabývající se vyšetřováním podobnosti vícerozměrných objektů a jejich klasifikací do tříd čili shluků. Využívá se zejména tam, kde objekty projevují přirozenou tendenci se seskupovat. Podle způsobu shlukování se postupy dělí na hierarchické a nehierarchické (Meloun & Militký, 2002).

Hierarchické postupy jsou založeny na postupném spojování objektů a jejich shluků do dalších větších shluků. U těchto postupů se nejdříve vypočte základní matice vzdáleností mezi objekty. Diagramem shlukové analýzy je tzv. **dendrogram** neboli vývojový strom zobrazující hodnoty ve dvojrozměrném prostoru, kde osy tvoří zadané proměnné (Meloun & Militký, 2002).

Jednou z metod metriky, která byla využita i v této diplomové práci, je tzv. Wardova metoda, která je založena na minimalizaci ztráty informace při spojení dvou tříd (Meloun & Militký, 2002).

S CLU úzce souvisí i tzv. teplotní mapa (**heat-map**), která je formou vícerozměrového shlukování. Jedná se o klastrovaná data pro mnoho vzorků a/nebo analytů. Kvantitativní stránka datového souboru je v tomto případě vyjádřena pomocí barevné škály, nejčastěji dvoubarevné, vyjadřující zvýšení a snížení hodnot. Toto uspořádání umožňuje jednoduše vizualizovat i rozsáhlé datové soubory (Moon et al., 2009).

Experimentální část

5 Materiál

5.1 Chemikálie

Acetonitril LC-MS (AcCN, $\geq 99,9\%$), hydroxid amonný (25%), kyselina octová (100%) a methanol LC-MS ($\geq 99,9\%$) byly zakoupeny u firmy Fluka (Německo), fetální hovězí sérum (FBS, fetal bovine serum) u firmy PANBiotech (Německo) a imatinib u firmy Novartis (Curych, Švýcarsko). Chloroform ($\geq 99,9\%$), histopaque, směs antibiotik (ATB) penicil a streptomycin (PEN/STREP), médiu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) byly zakoupeny u firmy Sigma Aldrich (St. Louis, USA). PBS (phosphate buffered saline) a lyzační roztok byly zakoupeny ve sterilní lékárně FN Olomouc. Pro přípravu všech roztoků byla použita LC-MS voda, která byla také zakoupena u firmy Sigma Aldrich (St. Louis, USA).

Složení roztoků:

Lyzační roztok 10x (41,45 g NH_4Cl ; 3,95 g NH_4NO_3 , 50 ml 0,1 M EDTA pH = 8,0)

PBS 10x (80 g NaCl, 2 g KCl, 36,4 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$; 2,4 g KH_2PO_4)

Médium DMEM (s ATB PEN/STREP a 2 % FBS)

5.2 Přístrojové vybavení a software

Studované látky byly analyzovány pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie Dionex Ultimate 3000 RS (Sunnyvale, CA, USA) ve spojení s tandemovým hmotnostním spektrometrem QTRAP 5500 (AB Sciex, Foster City, CA, USA). Jako ovládací software pro HPLC-MS/MS systém byl použit Analyst 6.1 (AB Sciex, Framingham, Massachusetts, USA). Metabolity byly identifikovány v softwaru MultiQuant™ 2.1.1 (AB Sciex, Framingham, Massachusetts, USA).

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

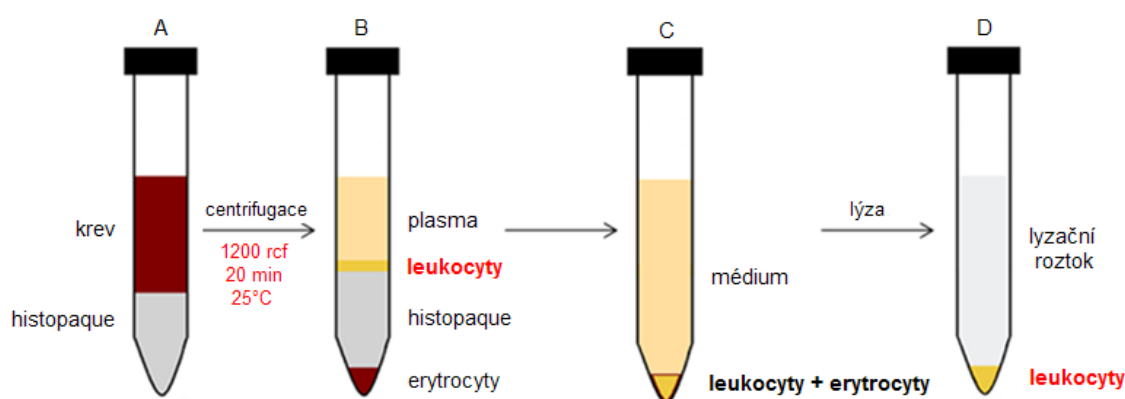
5.3 Biologický materiál

K analýze byly použity leukocyty izolované z plné krve nově diagnostikovaných pacientů s CML a zdravých jedinců (kontrolní vzorky), která byla získána z Hemato-

onkologického oddělení, FN Olomouc na základě informovaného souhlasu schváleného etickou komisí FN Olomouc.

5.3.1 Izolace leukocytů

Plná krev (2 x 9 ml) byla odebrána do zkumavek s antikoagulačním činidlem K₃EDTA (tri-draselná sůl kyseliny ethylendiamintetraoctové), které vyvazuje vápenaté ionty a blokuje tak koagulační kaskádu. Krev byla naředěna 25 ml kultivačního média DMEM na výsledných 34 ml. Takto naředěná krev byla opatrně po stěně navrstvena pomocí Pasteurových pipet na roztok histopaque (cca 4 ml krve na 3,5 ml histopaque; Obr. 17A) a navrstvené zkumavky byly následně centrifugovány (20 min, 1200 rcf) při laboratorní teplotě (RT, room temperature) za tvorby hustotního gradientu (Obr. 17B). Po centrifugaci na dno zkumavky klesly erytrocyty, na rozhraní plasmy a histopaque se vytvořil prstenec leukocytů, který byl odebrán do zkumavky. Buňky byly doplněny na 12-13 ml médiem DMEM a centrifugovány (7 min, 1200 rcf) při RT. Pro zbavení se zbytkového množství erytrocytů byla provedena jejich lýza - 10 ml lyzačního roztoku 1x (10 naředěný zásobní roztok) bylo ponecháno působit 5 min v inkubátoru a centrifugováno (8 min, 1300 rpm) při RT (Obr. 17C, D). Po odlití lyzačního roztoku byly buňky 2x promyty 10 ml PBS a poté centrifugovány (6 min, 1300 rpm) při RT. Leukocyty byly rozsuspendovány v médiu DMEM a následně byly inkubovány s vybraným kancerostatikem IM.



Obr. 17: Průběh izolace leukocytů.

5.3.2 Počítání leukocytů

Po 1. promytí PBS bylo z 10 ml suspenze leukocytů odebrán alikvót a smíchán s trypanovou modří (1:1). Směs byla dostatečně promíchána ve špičce pipety a přenesena na Bürkerovu komůrku. Živé buňky byly počítány pod mikroskopem v 16

čtvercích komůrky. Zjištěný počet leukocytů v krvi pacientů s CML byl 10-100x vyšší než v případě zdravých jedinců.

5.3.3 Inkubace a extrakce leukocytů

Buněčná suspenze (10 ml) byla rozdělena na 3 stejné podíly (cca po 3,3 ml) na 6 jamkovou kultivační destičku a každý z nich byl inkubován při 37°C s různou koncentrací IM – 0, 2 a 10 $\mu\text{mol/l}$ v médiu.

Před inkubací a v časech 1, 2, 5 a 10 hodin bylo z každého podílu odebráno 0,5 ml vzorku. Odebrané alikvóty byly centrifugovány (5 min, 1500 rpm) při 4°C. Po odlití supernatantu byly buňky 2x promyty 2 ml ledového PBS a opět centrifugovány (5 min, 1500 rpm) při 4°C. U alikvótů odebraných před inkubací v čase 0 hodin byl po centrifugaci uchován supernatant média, 1. PBS a 2. PBS pro případné odečtení metabolitů od konečného buněčného extraktu.

Extrakce buněk byla provedena pomocí chloroformu, methanolu a vody (1:1:0,8). Nejprve byly buňky deproteinovány směsí chloroform a methanol (1:1). Směs byla vortexována (30 s) a sonifikována (1 min). Poté byla přidána voda a směs byla opět vortexována (1 min) a sonifikována (2 min). Centrifugací (5 min, 1400 rpm) došlo k oddělení fází, na jejichž rozhraní se vytvořil celistvý prstenec tvořený buněčnými zbytky membrán, organel, jader a také proteiny. Horní fáze (voda + methanol) byla odebrána a zlyofilizována. Poté byly vzorky zamrazeny na -20°C.

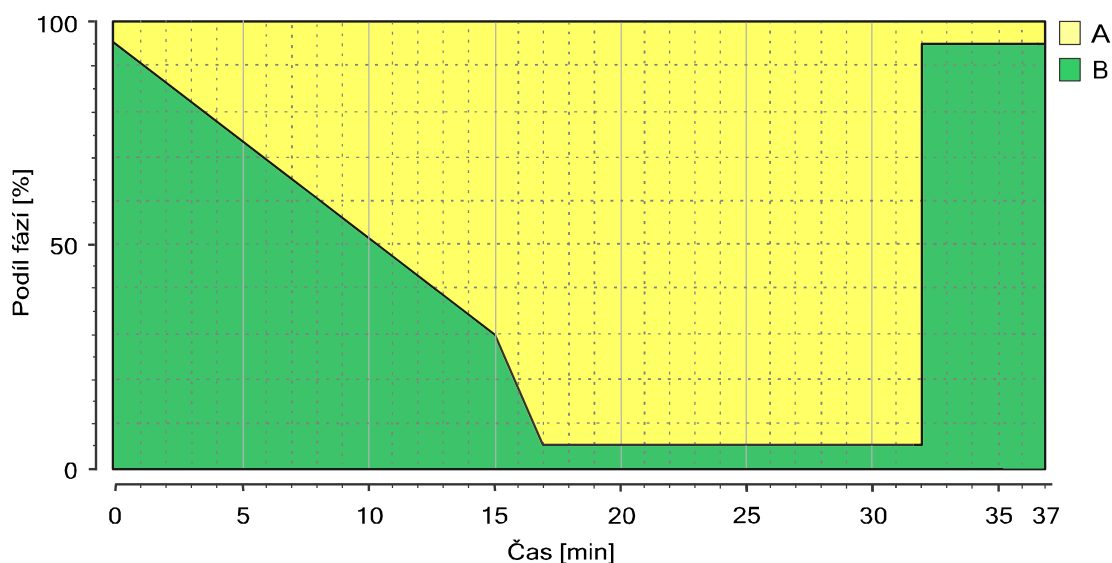
6 Metody

Pro analýzu studovaných metabolitů pomocí HPLC- MS/MS byla modifikována již dříve publikovaná metoda (Bajad & Shualev, 2011). Optimalizováno bylo složení a pH mobilních fází, teplota kolony a množství nastříkovaného vzorku (není součástí této diplomové práce).

6.1 HPLC-MS/MS

Chromatografická separace probíhala na koloně Luna s aminopropylovou stacionární fází (NH₂) o délce 150 mm, průměru 2 mm a velikosti částic 3 μm. Jako mobilní fáze A byl použit 20 mmol/l octan amonný (pH 9,45) a jako mobilní fáze B AcCN.

Pro HPLC systém byla aplikována gradientová eluce, jejíž průběh je znázorněn na Obr. 18. Podíl mobilních fází na začátku analýzy byl 95 % B a 5 % A. Tento podíl lineárně klesal po dobu 15 min na hodnotu 30 % B a v dalších 2 min klesl až na hodnotu 5 % B, která byla do 32. min analýzy konstantní. Poté během 0,1 min došlo k navracení systému k iniciálním podmínkám (95 % B). Na koloně termostátované na 25°C byla nastavena průtoková rychlost 0,3 ml/min a množství nastříkovaného vzorku bylo upraveno podle počtu buněk v jednotlivých vzorcích (Tab. 3). Chromatografická kolona byla před každou další analýzou ekvilibrována 5 min při iniciálních podmínkách. Celková doba analýzy byla 37 min.



Obr. 18: Průběh gradientové eluce.

Tab. 3: Počet buněk a nástřik pro jednotlivé vzorky

Vzorek	Počet buněk / 100 μl	Nástřik [μl]
kontrola 1	$1,2 \times 10^6$	10
kontrola 2	$1,5 \times 10^6$	10
kontrola 3	$1,1 \times 10^6$	10
pacient 1	37×10^6	2
pacient 2	37×10^6	2
pacient 3	70×10^6	1

Použitá metoda zahrnovala celkem 411 metabolitů z toho 184 v negativním a 227 v pozitivním módu. Pro detekci přítomných metabolitů byl využit MRM princip s přepínáním pozitivního a negativního módu. Optimalizované MS/MS podmínky jsou uvedeny v sekci výsledky (viz. Tab. 4-11) pouze pro identifikované metabolity.

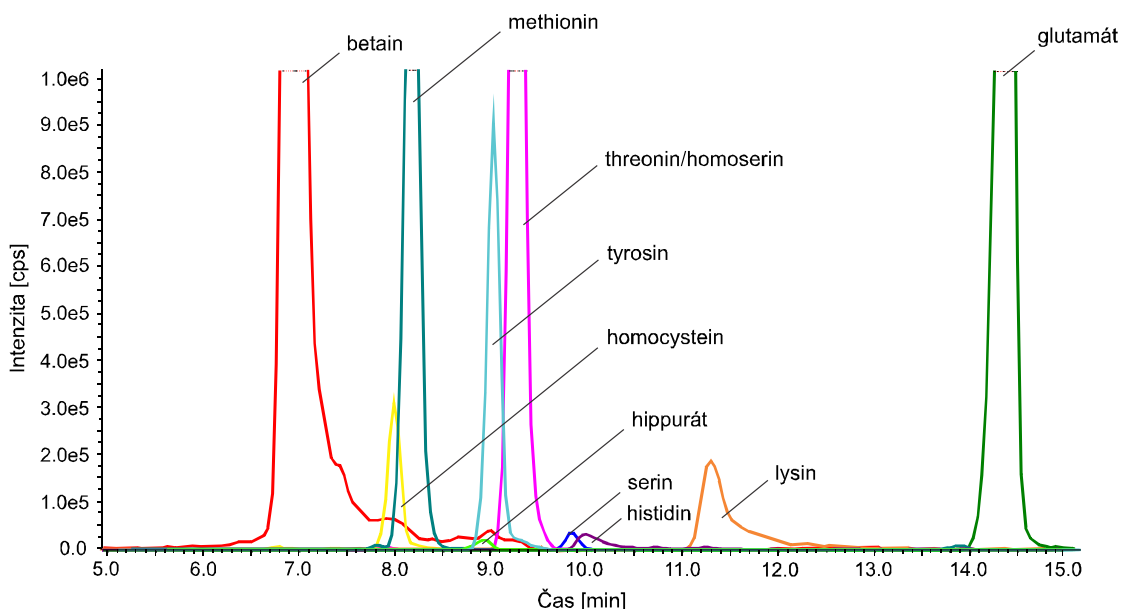
Pro zajištění validity experimentu byly vzorky analyzovány v randomizovaném pořadí.

7 Výsledky

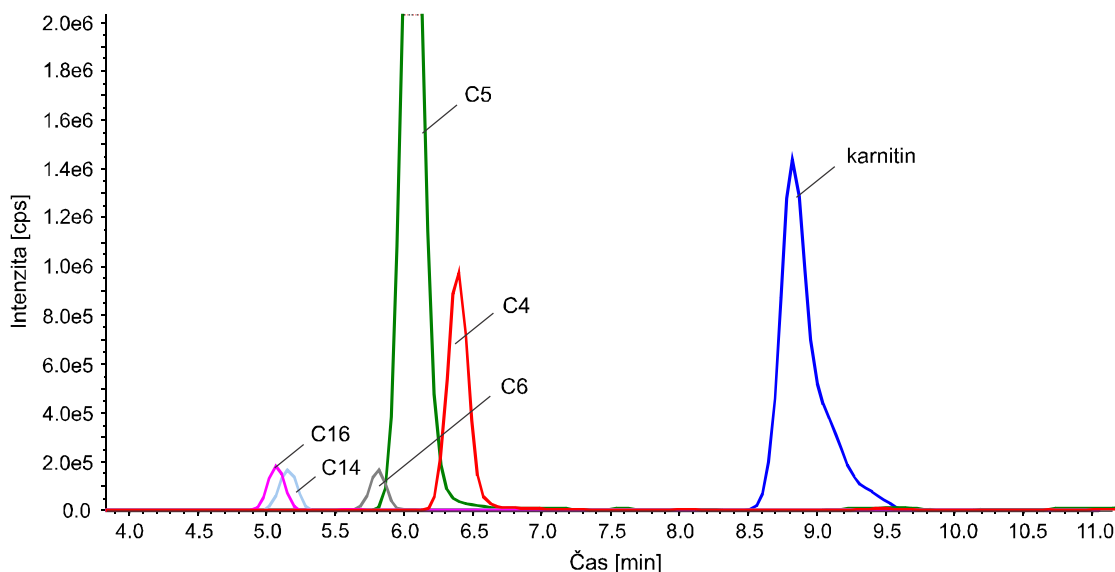
Byla provedena cílená metabolická analýza 3 vzorků pacientů a 3 kontrolních vzorků s definovaným počtem buněk (viz Tab. 3). Z podílů buněčné suspenze o různé koncentraci IM (0, 2 a 10 μM) byly odebírány 0,5 ml alikvóty v 5 časech (0, 1, 2, 5 a 10 hodin; viz kapitola 5.3.3 Inkubace a extrakce leukocytů). Pacienti byli značeni P1-P3 (kontroly K1-K3), druhá číslice za označením pacienta znamená koncentraci a třetí číslice odpovídá času odběru. Například P1 2.2 tedy znamená, že se jedná o vzorek prvního pacienta o 2 μM koncentraci IM a odběru v čase 2 hodiny.

7.1 Analýza biologického materiálu

Lyofilizované extrakty vodné a methanolové fáze byly před analýzou rozpuštěny ve 100 μl mobilní fáze A:B v poměru 1:1 a poté byly analyzovány za optimalizovaných podmínek. V programu Analyst byl sledován průběh jednotlivých analýz a následně byly vyextrahovány chromatogramy jednotlivých metabolitů. Jako příklad je uveden chromatogram vybraných aminokyselin (Obr. 19), karnitinu a jeho acylovaných derivátů (Obr. 20).



Obr. 19: Chromatogram vybraných aminokyselin extraktu pacienta P1 2.2. v pozitivním módu; zobrazena 5-15 minuta analýzy.



Obr. 20: Chromatogram karnitinu a jeho acylovaných derivátů v extraktu pacienta P1 2.2. v pozitivním módu; zobrazena 4-11 minuta analýzy.

V extraktech leukocytů bylo pomocí softwaru MultiQuant identifikováno 87 studovaných metabolitů ze skupin aminokyselin (Tab. 4), karnitinu a acylovaných karnitinů (Tab. 5), karbohydrátů (Tab. 6), nukleotidů a jejich derivátů (Tab. 7), purinů a pyrimidinů (Tab. 8), organických kyselin (Tab. 9), peptidů (Tab. 10) a dalších metabolitů (Tab. 11). Mezi identifikovanými metabolity jsou však i látky, které se nám nepodařilo odlišit. Jedná se o látky, jejichž MRM přechody i retenční časy jsou shodné (v tabulkách rozděleny lomítkem „/“). Také se jedná o látky, které sice odlišíme na základě jejich retenčních časů, ale kvůli stejné fragmentaci nemůžeme s jistotou říct, o který z daných metabolitů se jedná, např. v případě překrývajících se píků (v tabulkách rozděleny středníkem „;“). V tabulkách níže jsou uvedeny MRM přechody, retenční časy (Ret t) a módy, ve kterých byly metabolity identifikovány. Deklasterační potenciál, kolizní energie, vstupní potenciál a výstupní potenciál kolizní cely pro tyto metabolity jsou blíže specifikovány v příloze 1A a 1B. V tabulkách uvedené metabolity byly dále statisticky zpracovány. Na základě QC bylo ze statistické analýzy vyřazeno 6 metabolitů, které měly variační koeficient (CV, coefficient of variation) nad 30 % (v tabulkách označeny červeně). Vyřazeny byly také metabolity identifikované pouze u pacientů nebo kontrol (např. antranilát) a také metabolity s intenzitou přesahující kapacitu detektoru (např. acylované karnitiny C2 a C3, cholin, aminokyseliny valin, tryptofan, prolin, glutamin, fenylalanin).

Tab. 4: Optimalizované parametry identifikovaných aminokyselin

Metabolit	mód	Q1	Q3	Ret t [min]
betain	+	118,0	58,1	7,0
kynurenin	+	208,9	93,9	7,9
homocystein	+	135,9	91,0	8,0
N,N-dimethylglycin/2-aminoisobutyrate	+	103,9	58,0	8,0
methionin	+	149,9	104,0	8,2
cysteát	+	169,9	105,8	8,3
5-aminolevulinát; kreatin	+	131,9	89,9	8,3
hippurát	+	179,8	104,9	8,9
alanin/sarkosin; beta-alanin	+	89,9	44,1	8,9
4-guanidinobutanoát	+	145,9	86,9	9,0
3-methylhistidin; N-methylhistidin	+	169,9	123,9	9,1
tyrosin	+	181,9	136,0	9,1
taurin	-	123,8	79,9	9,1
N-acetyl-L-alanin	-	130,0	88,1	9,1
threonin/homoserin	+	119,9	73,9	9,4
citruilin	-	174,0	131,2	9,4
serin	+	105,8	60,0	9,8
histidin	+	155,9	110,0	10,0
lysin	+	146,9	84,0	11,2
arginin	-	173,0	131,1	11,3
glutamát	+	147,8	83,9	14,4
N-acetylglutamát*	-	187,9	102,0	17,1
3-sulfinoalanin	-	150,8	89,0	17,9

* metabolit vyřazený ze statistické analýzy (CV > 30 %)

Tab 5: Optimalizované parametry identifikovaného karnitinu a acylovaných karnitinů

Metabolit	mód	Q1	Q3	Ret t [min]
C14	+	372,3	85,1	5,2
C16	+	400,3	85,1	5,2
C6	+	260,2	85,1	5,9
C5	+	246,2	85,1	6,1
C4	+	232,2	85,1	6,4
karnitin	+	161,9	102,9	8,6

Tab 6: Optimalizované parametry identifikovaných karbohydrátů

Metabolit	mód	Q1	Q3	Ret t [min]
ribitol; arabitól	-	150,9	71,0	6,5
N-acetylglukosamin; N-acetylgalaktosamin; N-acetylmannosamin	+	221,9	138,1	6,9
hexosy - Glu Fru Man Gal	-	178,9	88,9	7,1
glukonát	-	194,8	129,0	13,4
G-1-P/ Gal-1-P; G-6-P/ F-6-P*	-	258,8	78,9	17,6
glycerol-3-fosfát	-	170,9	78,9	17,7
G-6-P/ F-6-P; G-1-P/ Gal-1-P	-	258,9	96,8	18,7

* metabolit vyřazený ze statistické analýzy (CV > 30 %)

Tab 7: Optimalizované parametry identifikovaných nukleotidů a jejich derivátů

Metabolit	mód	Q1	Q3	Ret t [min]
2'.3'- cCMP	-	303,8	109,9	13,6
CMP-N-acetylneuraminát	+	615,1	323,9	17,2
UDP-N-acetyl-D-glukosamin	-	605,7	384,9	17,5
UDP-D-galaktosa/UDP-glukosa	-	564,7	322,9	17,8
FAD	+	785,8	347,9	17,9
AMP	+	348,0	135,9	18,4
GMP	+	363,8	151,9	19,7
IMP	+	349,0	136,9	20,2
UDP	-	402,9	158,8	21,2
ADP	-	425,8	133,9	21,4
dGDP	-	425,8	158,9	22,4
GDP	-	441,8	158,8	22,6
UTP*	-	482,7	158,7	23,0
ATP; dGTP	-	505,7	158,8	24,0
ITP*	-	506,7	158,7	28,0

* metabolity vyřazené ze statistické analýzy (CV > 30 %)

Tab 8: Optimalizované parametry identifikovaných purinů a pyrimidinů

Metabolit	mód	Q1	Q3	Ret t[<i>min</i>]
uracil	-	110,9	42,1	3,4
uridin	-	242,8	110,0	5,8
adenosin	+	267,9	118,9	5,9
adenin	+	135,9	118,9	6,5
AICA*	+	259,1	110,0	6,7
cytidin	+	244,0	111,9	7,0
pseudouridin	-	242,8	153,0	7,7
guanosin	+	284,0	151,9	8,5
inosin	+	268,9	136,9	9,1

* metabolit vyřazený ze statistické analýzy (CV > 30 %)

Tab 9: Optimalizované parametry identifikovaných organických kyselin

Metabolit	mód	Q1	Q3	Ret t[<i>min</i>]
hydrocinnamát	-	149,0	105,1	6,8
fenylacetát	-	135,0	91,1	7,3
salicylát/4-hydroxybenzoát	-	136,9	92,9	7,4
benzoát	-	120,9	76,9	8,7
laktát	-	88,9	43,0	10,4
oxalát	-	88,9	70,9	10,5
pantotenát	-	217,9	88,0	10,9
2-oxoadipát	-	158,9	58,9	11,7
2-hydroxyglutarát	-	146,9	128,9	17,3
malát	-	132,9	71,1	17,5
fumarát; kaproát	-	114,9	71,0	17,6
citrát/isocitrát	-	190,8	110,9	20,7

Tab 10: Optimalizované parametry identifikovaných peptidů

Metabolit	mód	Q1	Q3	Ret t [<i>min</i>]
glutathion	+	307,9	178,9	15,9
glutathion disulfid	+	612,9	484,0	18,8

Tab 11: Optimalizované parametry dalších metabolitů

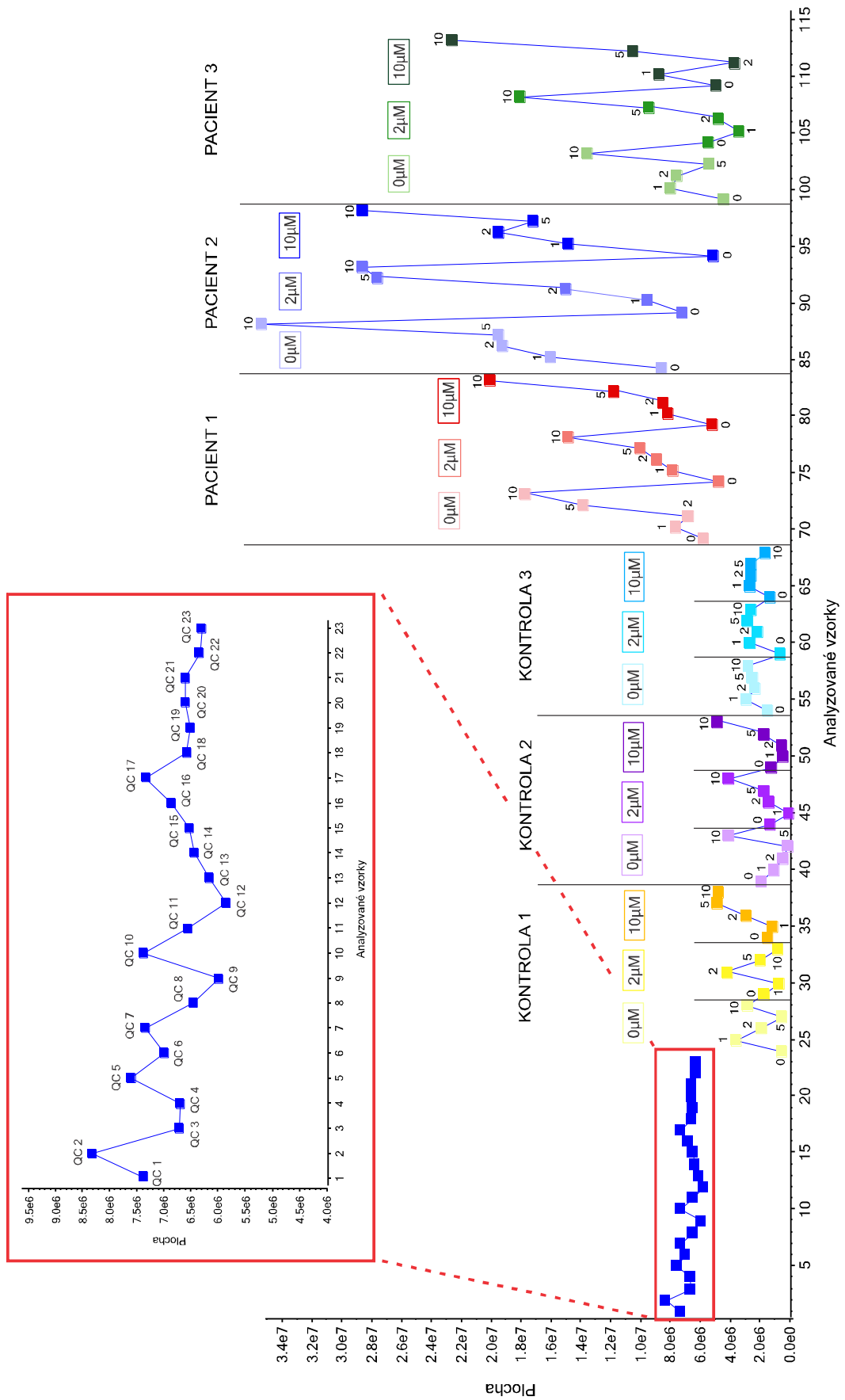
Metabolit	mód	Q1	Q3	Ret t [min]
2-aminofenol	+	109,9	65,1	2,1
nikotinamid	+	122,9	79,9	2,4
N-acetylserotonin	+	218,9	159,9	2,5
4-hydroxybenzaldehyd	-	120,8	92,0	4,9
kreatinin	+	113,9	86,0	5,2
riboflavin	+	376,9	243,0	5,8
pyridoxin	+	169,9	133,9	6,7
spermin	+	203,9	138,0	6,7
trigonelin	+	138,0	92,1	7,6
N-methylhistamin	+	125,9	109,0	8,8
ethanolamin fosfát	-	139,8	78,9	16,5
fenylacetaldehyd/merkaptopyruvát	-	118,9	95,8	17,7
acetyl-CoA*	+	809,7	303,0	22,1

* metabolit vyřazený ze statistické analýzy (CV > 30 %)

7.2 Zpracování získaných dat

Ve vyhodnocovacím programu MultiQuant bylo využito automatické integrace píků na základě MRM přechodů a Ret t. Následně byly píky integrovány manuálně. Plochy píků získaných metabolitů v jednotlivých vzorcích byly porovnány mezi sebou. Z tohoto pozorování byl zřejmý rozdíl v intenzitě metabolitů, což odpovídá odlišnému počtu buněk v patientských a kontrolních vzorcích. Na základě počtu buněk byl upraven nástřík vzorku, ale i přesto patientské vzorky přibližně 7x více leukocytů než vzorky kontrolní (viz Tab. 3).

Pro názornost je uveden příklad zpracování metabolitu tyrosinu v programu MultiQuant (Obr. 21). Na ose X jsou zobrazeny vzorky v tomto pořadí: prvních 23 vzorků odpovídá vzorkům QC, které jsou pro lepší viditelnost přiblíženy, následují 3 sady kontrolních a patientských vzorků. Barevně jsou odlišeny jednotlivé kontrolní a patientské vzorky. Čtverce znázorňují plochy píků, jejichž intenzita je uvedena na ose Y. Jednomu vzorku náleží 15 čtverců rozdělených do 3 sloupců podle koncentrace IM – 0, 2 a 10 μM . V každém sloupci je možné pozorovat 5 hodnot času, ve kterých byly zpracovány jednotlivé alikvóty. Tento případ znázorňuje rozdíl v intenzitách metabolitu tyrosinu v jednotlivých vzorcích. Vyšší intenzita je pozorována u pacientů.



Obr. 21: Zpracování metabolitu tyrosinu v programu MultiQuant. Popis uveden výše v textu.

7.2.1 Porovnání kontrol a pacientů

V této studii bylo identifikováno více metabolitů o vyšší intenzitě u pacientů (Tab. 12). Výrazný rozdíl byl pozorován např. u threoninu/homoserinu, který byl u kontrol identifikován v o 2 řády nižší intenzitě než u pacientů (Tab. 13; Příloha 2). S ohledem na počet buněk mají větší význam metabolity identifikované o vyšší intenzitě u kontrol (Tab. 14). Pro ilustraci je uveden příklad metabolitu salicylátu/hydroxybenzaldehydu (Příloha 3). Některé metabolity byly u pacientů i kontrol nalezeny ve srovnatelné intenzitě (Tab. 15). Pro ilustraci je uveden příklad metabolitu citrát/isocitát (Příloha 4). Kvůli velmi různorodému profilu (velkým rozdílům v intenzitách) se metabolit betain zcela odlišil od ostatních metabolitů (Tab. 16). V tabulkách jsou uvedeny také metabolické dráhy, do nichž jsou jednotlivé metabolity zapojeny. Pro každý metabolit byla z databáze KEGG zvolena pouze jedna hlavní metabolická dráha.

Tab 12: Metabolity identifikované o vyšší intenzitě u pacientů

Metabolit	Metabolická dráha
C14	Lipidový metabolismus
C16	Lipidový metabolismus
C4	Lipidový metabolismus
C5	Lipidový metabolismus
C6	Lipidový metabolismus
tyrosin	Tyrosinový metabolismus
serin	Glycinový, serinový a threoninový metabolismus
pantotenát	beta-Alaninový metabolismus
methionin	Cysteinový a methioninu metabolismus
histidin	Histidinový metabolismus
glutamát	Metabolismus alaninu, aspartátu a glutamátu Metabolismus alaninu, aspartátu a glutamátu
alanin/sarkosin; beta-alanin	Glycinový, serinový a threoninový metabolismus Beta-alaninový metabolismus
oxalát	Glyoxylátový a dikarboxylátový metabolismus
malát	Citrátový cyklus
spermin	Metabolismus argininu a cytosinu
homocystein	Cysteinový a methioninový metabolismus
fumarát; kaproát	Močovinový cyklus a metabolismus aminoskupin
N-acetylserotonin	Tryptofanový metabolismus

Metabolit	Metabolická dráha
citrulin	Argininový a prolinový metabolismus
4-guanidinobutanoát	Močovinový cyklus a metabolismus aminoskupin
N-methylhistamin	Histidinový metabolismus
ATP; dGTP	Purinový metabolismus
3-methylhistidin; N-methylhistidin	Histidinový metabolismus
AMP	Purinový metabolismus
laktát	Glykolýza/Glukoneogeneze
N,N-dimethylglycin/ 2-aminoisobutyrát	Degradace valinu, leucinu a isoleucinu
ribitol; arabitól	Pentosová a glukuronová interkonverze
taurin	Taurinový a hypotaurinový metabolismus
glukonát	Pentosafosfátová dráha
riboflavin	Riboflavinový metabolismus
adenin	Purinový metabolismus
adenosin	Purinový metabolismus
kreatinin	Argininový a prolinový metabolismus
nikotinamid	Nikotinový a nikotinamidový metabolismus
ethanolamin fosfát	Glycerofosfolipidový metabolismus
5-aminolevulinát; kreatin	Glycinový, serinový a threoninový metabolismus
lysin	Biosyntéza lysinu
arginin	Argininový a prolinový metabolismus
GDP	Purinový metabolismus
GMP	Purinový metabolismus
IMP	Purinový metabolismus
UDP	Pyrimidinový metabolismus
dGDP	Purinový metabolismus
ADP	Purinový metabolismus
FAD	Riboflavinový metabolismus
UDP-galaktosa/UDP-glukosa	Galaktosový metabolismus
UDP-N-acetyl-D-glukosamin	Amino sugar and nucleotide sugar metabolism
CMP-N-acetylneuraminát	Amino sugar and nucleotide sugar metabolism
karnitin	Lipidový metabolismus
glutathion disulfid	Glutathionový metabolismus
G-6-P/ F-6-P; G-1-P/ Gal-1-P	Galaktosový metabolismus
2'.3'- cCMP	Pyrimidinový metabolismus

2-hydroxyglutarát	Butanoátový metabolismus
N-acetylglukosamin; N-acetylgalaktosamin; N-acetylmannosamin	Metabolismus sacharidů
N-acetyl-L-alanin	beta-Alaninový metabolismus

Tab 13: Metabolit o výrazně nižší intenzitě u kontrol

Metabolit	Metabolická dráha
threonin/homoserin	Glycinový, serinový a threoninový metabolismus

Tab 14: Metabolity identifikované o vyšší intenzitě u kontrol

Metabolit	Metabolická dráha
2-oxoadipát	Biosyntéza lysinu
hippurát	Fenylalaninový metabolismus
fenylacetaldehyd/merkaptopyruvát	Fenylalaninový metabolismus Cysteinový a methioninový metabolismus
benzoát	Fenylalaninový metabolismus
4-hydroxybenzaldehyd	Degradace benzolu, bisfenolu A, xylenu nebo toluenu
hexosy - Glu Fru Man Gal	Galaktosový metabolismus
salicylát/4-hydroxybenzoát	Fenylalaninový metabolismus Biosyntéza ubiquinonu a ostatních quinonů
uracil	Pyrimidinový metabolismus
glutathion	Glutathionový metabolismus
hydrocinamát	Fenylalaninový metabolismus
fenylacetát	Fenylalaninový metabolismus

Tab. 15: Metabolity o srovnatelné intenzitě u pacientů i kontrol

Metabolit	Metabolická dráha
cysteát	Cysteinový a methioninový metabolismus
citrát/isocitrát	Citrátový cyklus
glycerol-3-fosfát	Glycerofosfolipidový metabolismus
3-sulfinoalanin	Cysteinový a methioninový metabolismus
pyridoxin	Metabolismus vitamínu B6
kynurenin	Tryptofanový metabolismus
inosin	Purinový metabolismus
guanosin	Purinový metabolismus
pseudouridin	Pyrimidinový metabolismus

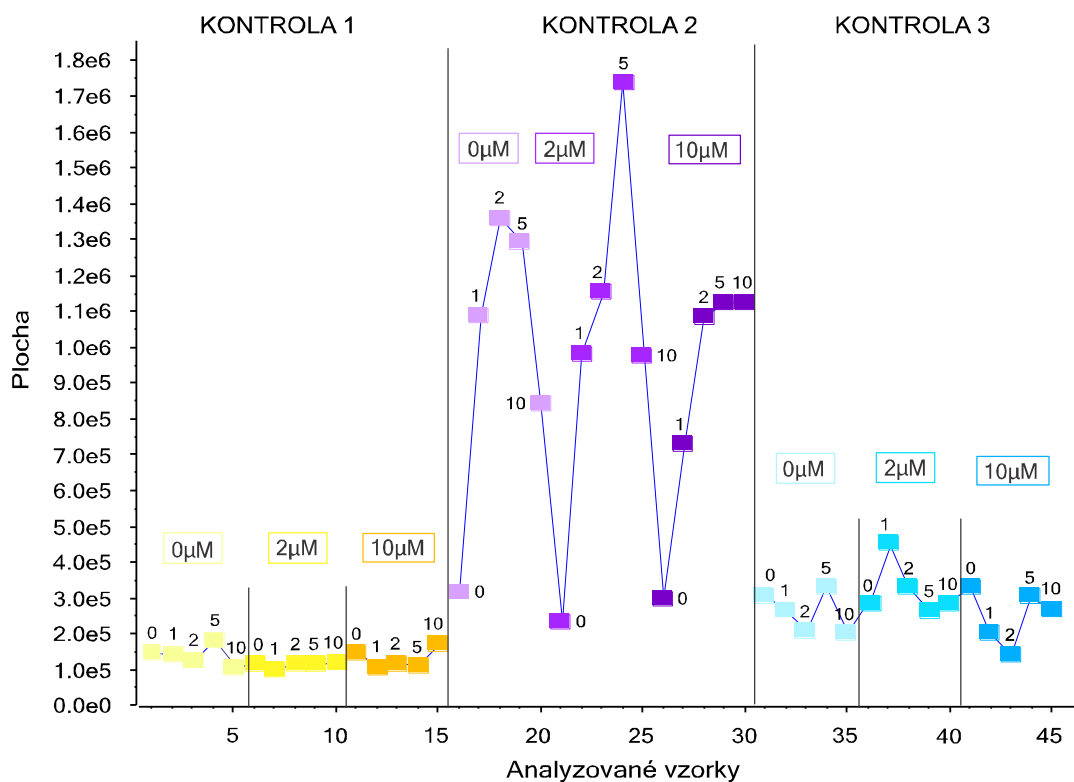
Metabolit	Metabolická dráha
uridin	Pyrimidinový metabolismus
2-aminofenol	Tryptofanový metabolismus
cytidin	Pyrimidinový metabolismus
trigonelin	Nikotinový and nikotinamidový metabolismus

Tab. 16: Metabolit s velmi různorodým profilem

Metabolit	Metabolická dráha
betain	Glycinový, serinový a threoninový metabolismus

Pro grafické znázornění jednotlivých metabolických drah byla v databázi KEGG vytvořena metabolická mapa (Příloha 5) zahrnující většinu z identifikovaných metabolitů. Tato mapa umožňuje vizualizaci rozdílů v intenzitách vybraných metabolitů mezi vzorky. Přiložená mapa porovnává rozdíly ploch píků mezi K3 a P1. Jednotlivé metabolity jsou znázorněny kuličkami, které jsou barevně rozlišeny podle míry odlišnosti.

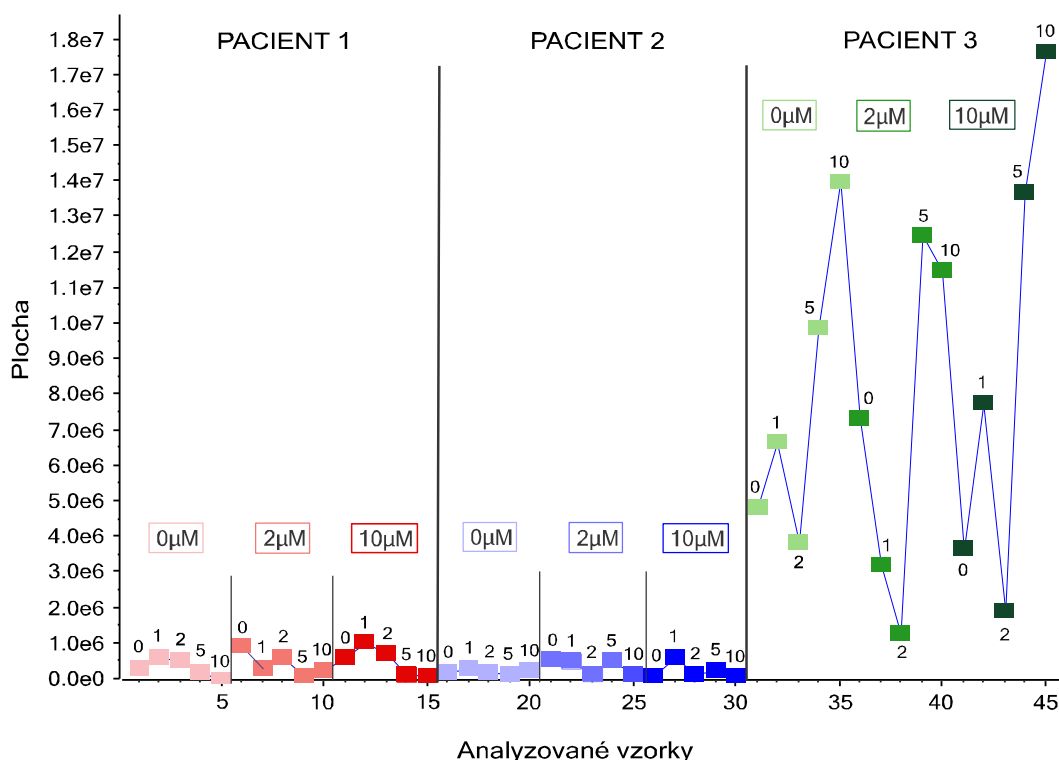
Některé metabolity, např. antranilát, byly identifikovány pouze u kontrol (Obr. 22).



Obr. 22: Zpracování metabolitu antranilátu v programu MultiQuant. Znázorněny jsou pouze 3 kontrolní vzorky, které jsou barevně odlišeny.

7.2.2 Porovnání pacientů mezi sebou

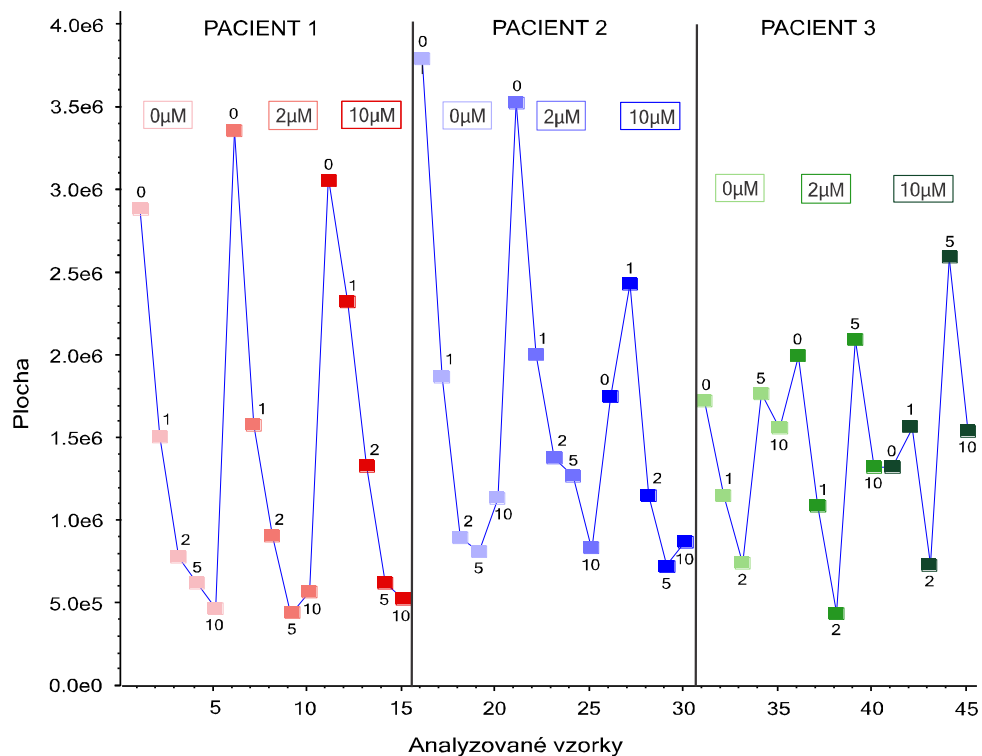
Kromě rozdílů mezi kontrolními a patientskými vzorky byly pozorovány i rozdíly v rámci skupin kontrol a pacientů. Nejvýznamnější odlišnosti byly identifikovány u P3 oproti P1 a P2, jejichž výsledky byly srovnatelné. Ve většině případů byly metabolity v extraktech P3 identifikovány oproti P1 a P2 v nižší intenzitě. Tato intenzita byla srovnatelná s intenzitou píků u kontrolních vzorků. Výjimkou byl např. metabolit pipekolát (Obr. 23), jehož intenzita byla u pacienta 3 až o řád vyšší než v případě P1 a P2.



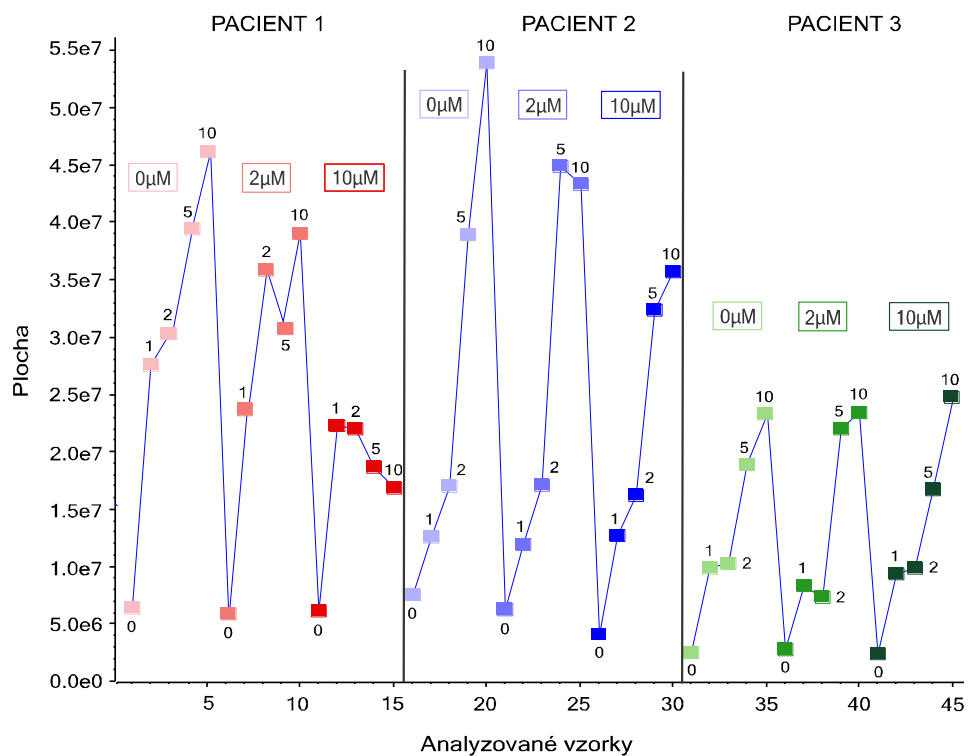
Obr. 23: Zpracování metabolitu pipekolátu v programu MultiQuant. Znázorněny jsou pouze 3 patientské vzorky, které jsou barevně odlišeny.

7.2.3 Porovnání časů a koncentrací

Rozdíly byly pozorovány také v závislosti na čase odběru. U metabolitů byla v čase pozorována rostoucí i klesající (Obr. 24) tendence. Oproti tomu v závislosti na koncentraci IM nebyl pozorován výrazný trend. V případě acylovaného karnitinu C5 (Obr. 25), který byl identifikován pouze u pacientů, byl pozorován vliv času i koncentrace. Vliv času i koncentrace byl dále posuzován v rámci statistické analýzy.



Obr. 24: Zpracování metabolitu pipekolátu v programu MultiQuant. Znázorněny jsou pouze 3 pacientské vzorky, které jsou barevně odlišeny.



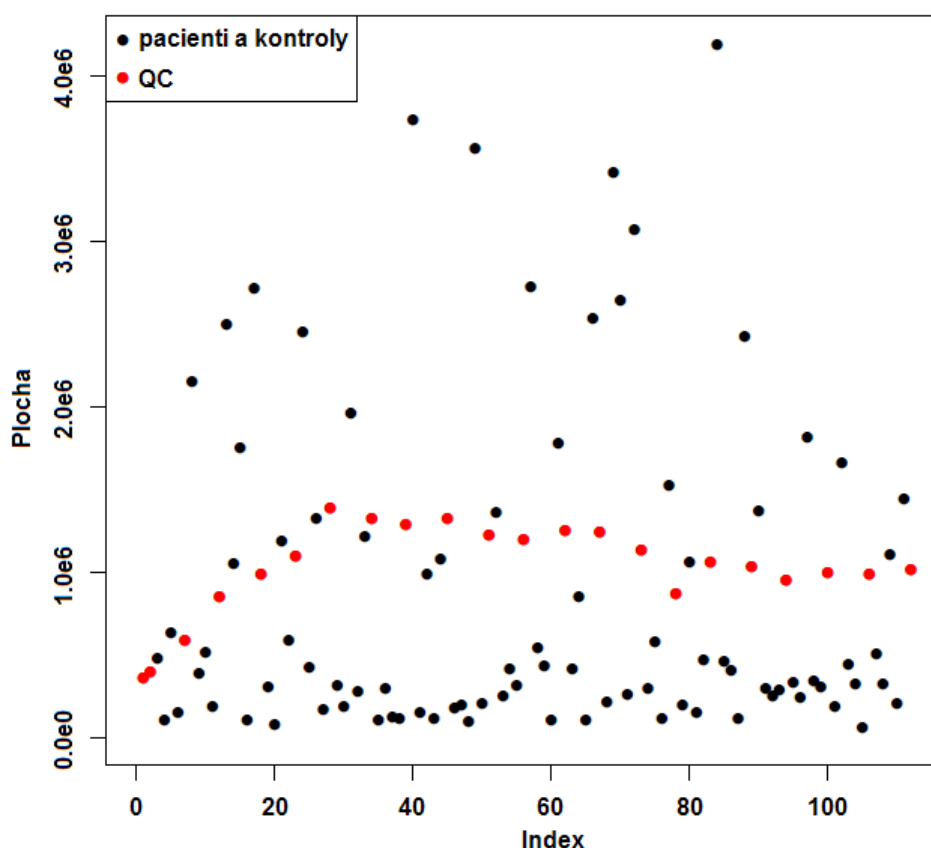
Obr. 25: Zpracování acylovaného karnitinu C5 v programu MultiQuant. Znázorněny jsou pouze 3 pacientské vzorky. Znázorněn je rostoucí trend v čase a mírný vliv koncentrace.

7.3 Statistické vyhodnocení

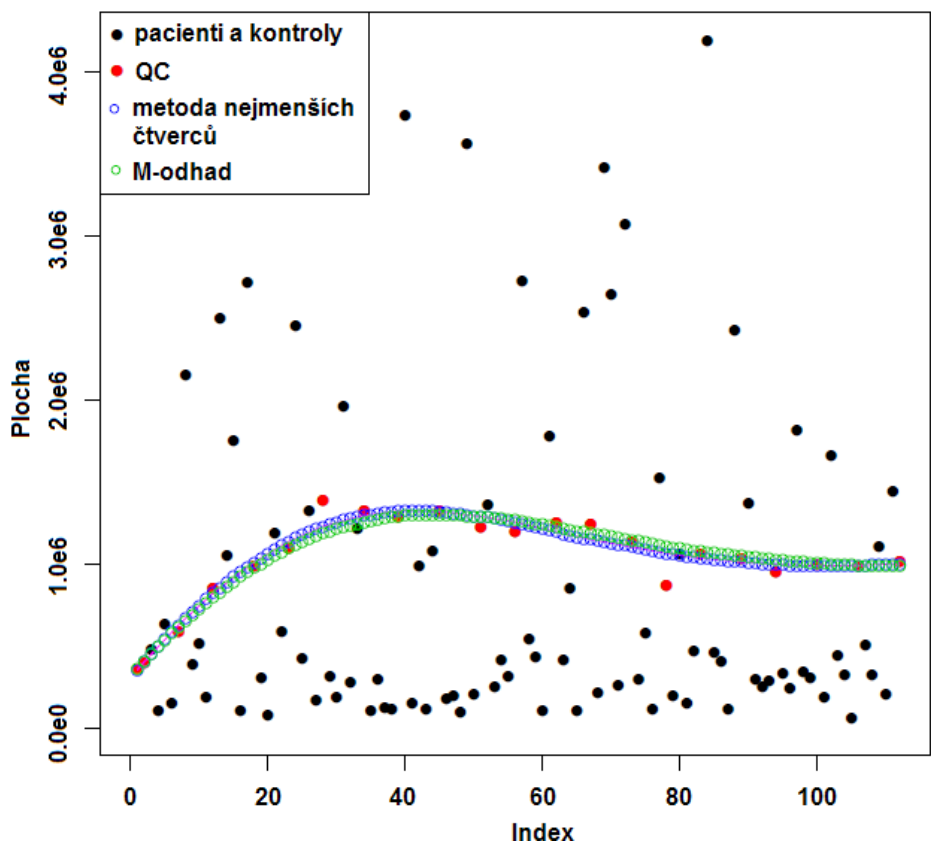
7.3.1 Interpolace dat

Před statistickým vyhodnocením byla získaná prvotní data (Obr. 26) nejprve upravena. Pro odstranění vlivu systematických chyb byla data interpolována a to využitím metody LOESS (Dunn et al., 2011). Pro každý metabolit byly QC vzorky proloženy tzv. "korekční" křivkou (Obr. 27), na jejímž základě byly jednotlivé metabolity interpolovány (Obr. 28). Ze statistické analýzy byly následně vyřazeny metabolity s CV nad 30% (viz Tab. 4-11). Ze statistické analýzy byl dále vyřazen vzorek K1 0.10 kvůli jeho odlehkým hodnotám ploch píků oproti ostatním vzorkům, které mohly být způsobeny vnese- ním náhodné chyby při zpracování vzorku. Kvůli ekvilibraci systému byly ze statistiky také vyřazeny QC vorky QC1-QC8, u nichž byly pozorovány změny v intenzitách píků. Na Obr. 21 je znázorněno číslování QC až po vyřazení prvních 8 QC vzorků ze statisti- ky.

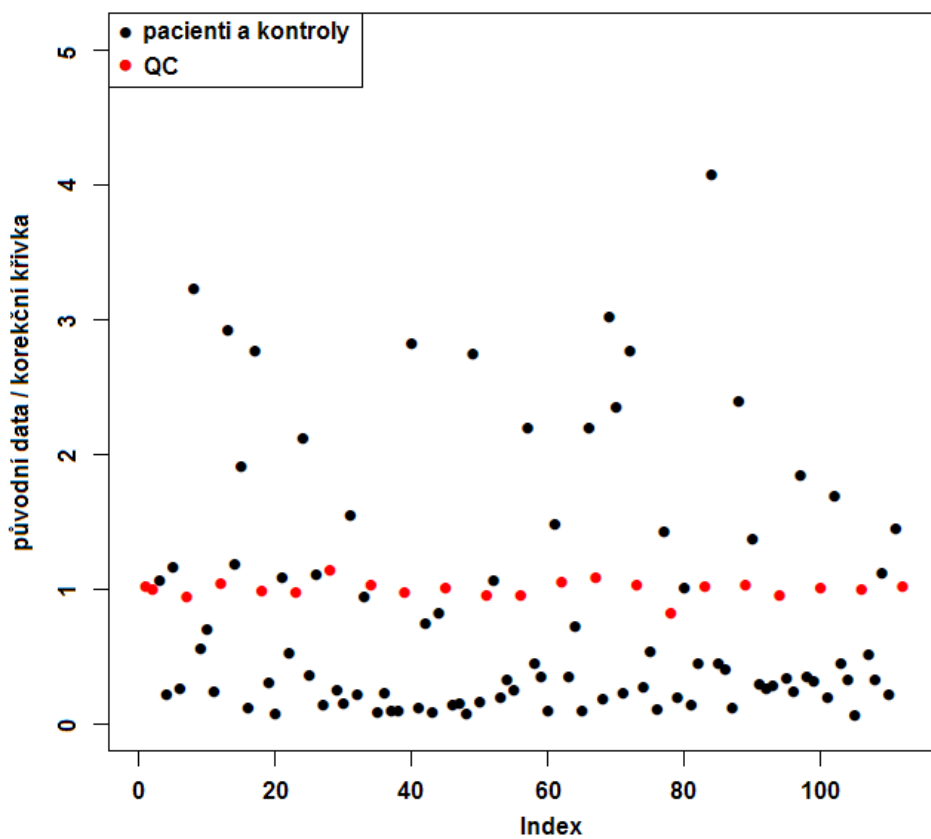
Pro názornost je uveden příklad interpolace metabolitu laktátu (Obr. 26 – 28).



Obr. 26: Zpracování prvotních dat (ploch píků) metabolitu laktátu.



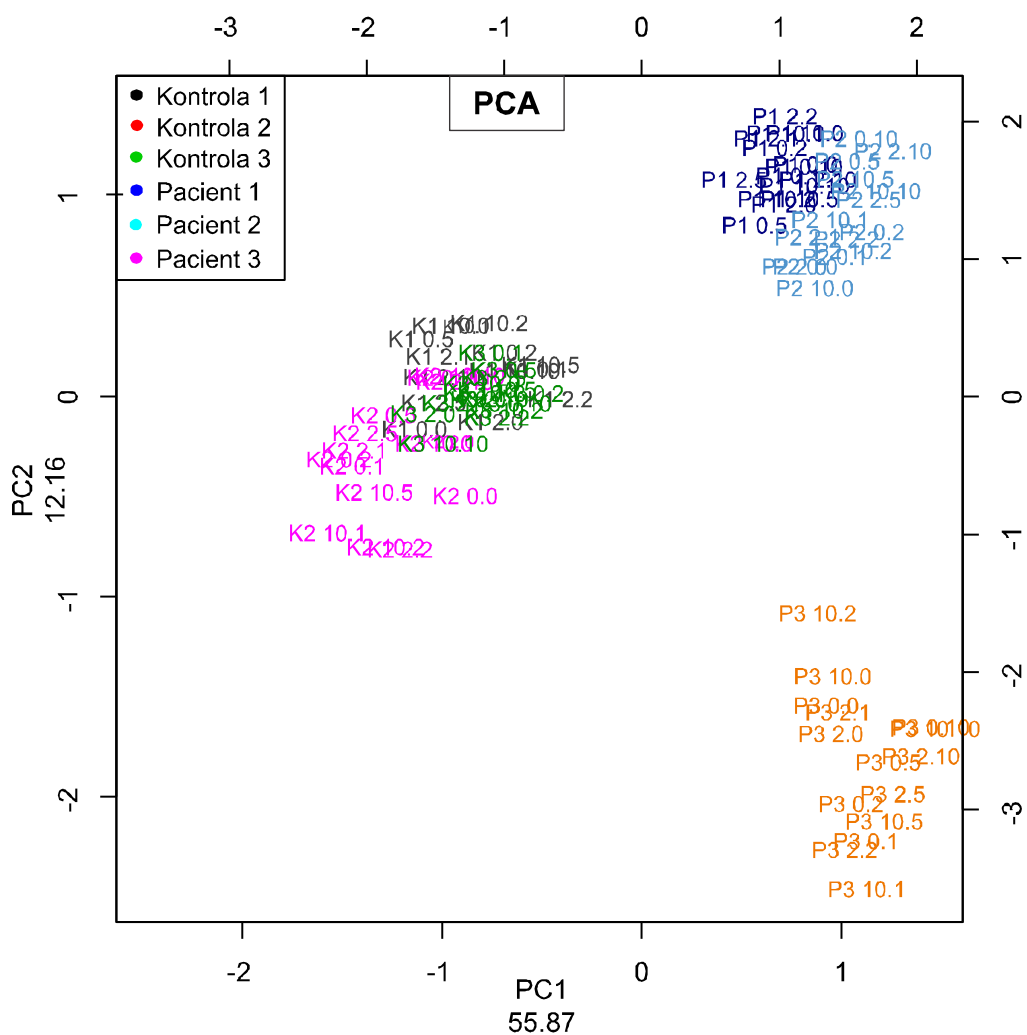
Obr. 27: Proložení QC vzorků “korekční” křivkou u metabolitu laktátu.



Obr. 28: Interpolace dat na základě “korekční” křivky u metabolitu laktátu.

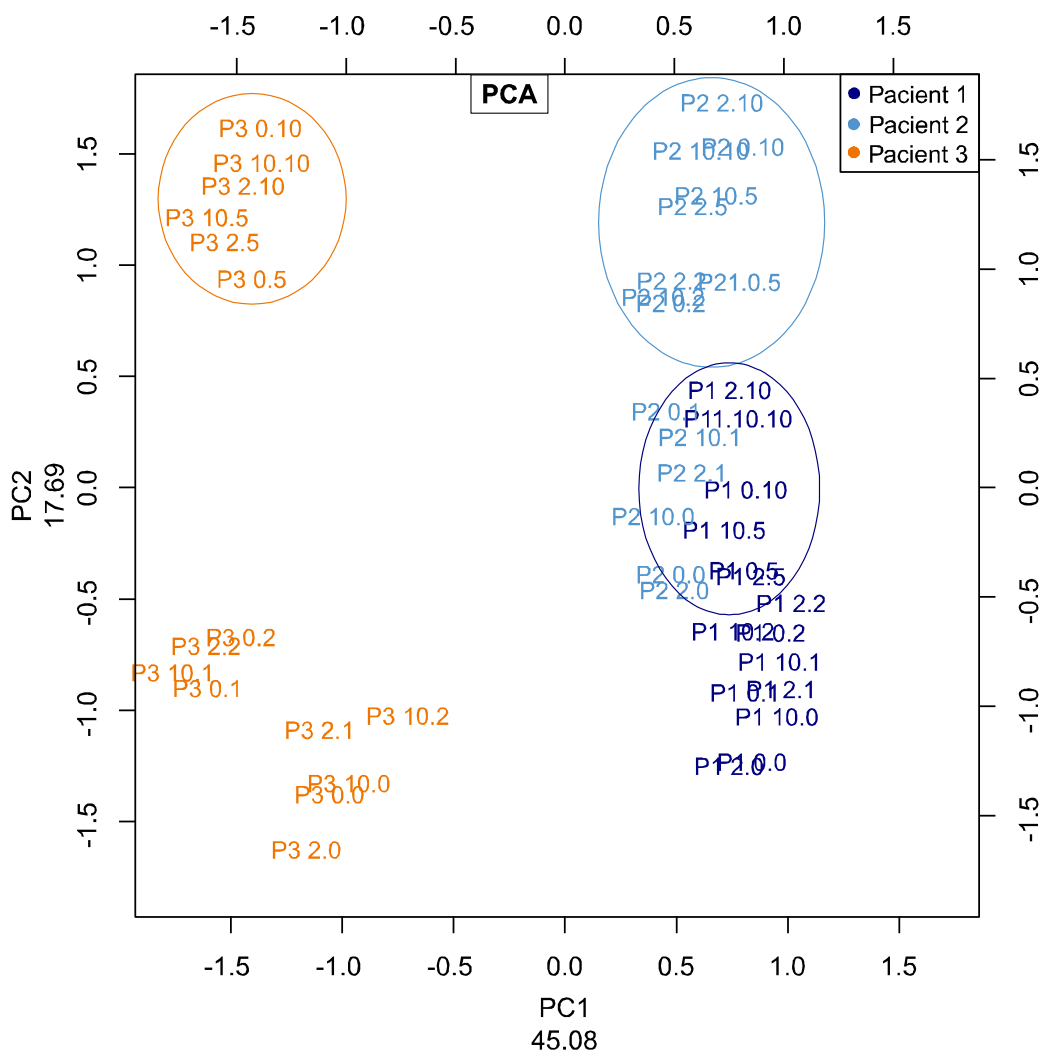
7.3.2 Analýza hlavních komponent (PCA)

PCA analýza aplikovaná na interpolovaná data potvrdila rozdíly mezi pacientskými vzorky. Na výsledném grafu (Obr. 29) bylo pozorováno výrazné odlišení P3 od ostatních pacientů P1 a P2. Naopak všechny 3 kontroly vytvořily jeden shluk.



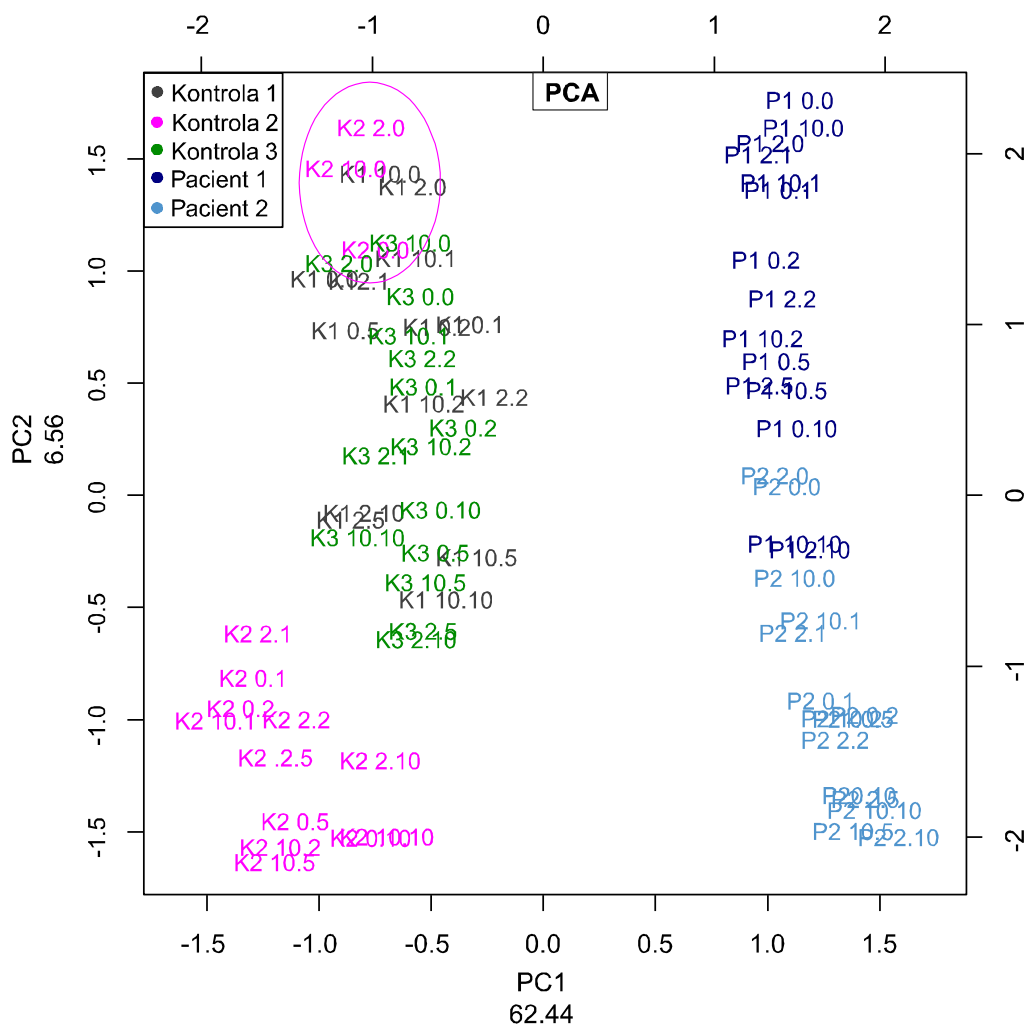
Obr. 29: PCA analýza kontrol i pacientů. Znázorněno výrazné odlišení P3 od ostatních pacientů P1 a P2. Součet hodnot pod osami grafu (55,87 + 12,16) udává procento vysvětlené variability souboru.

Pro bližší pozorování rozdílů mezi pacienty byly z PCA vyřazeny kontrolní vzorky a metoda byla aplikována pouze na vzorcích patientských (Obr. 30). Opět bylo patrné odlišení P3 od ostatních pacientů P1 a P2. Na výsledném grafu je pozorována také tvorba shluků na základě časů a to především v případě času 5 a 10 hodin.



Obr. 30: PCA analýza pacientů. Znáznorněno výrazné odlišení P3 od ostatních pacientů P1 a P2. V grafu je také možné pozorovat tvorbu shluků na základě časů a to především v případě času 5 a 10 hodin (graficky znázorněno ovály). Součet hodnot pod osami grafu (45,08 + 17,69) udává procento vysvětlené variability souboru.

Kvůli výraznému odlišení P3 a pro detailnější pohled na vztahy v rámci skupin kontrol a P1 a P2 byl z PCA analýzy P3 vyřazen (Obr. 31). Z grafu je patrné, že K1 a K3 jsou srovnatelné oproti K2, naopak u P1 a P2 je patrné rozdělení do 2 shluků. V grafu je také možné pozorovat oddělení vzorků v čase 0 hodin od ostatních vzorků u K2.

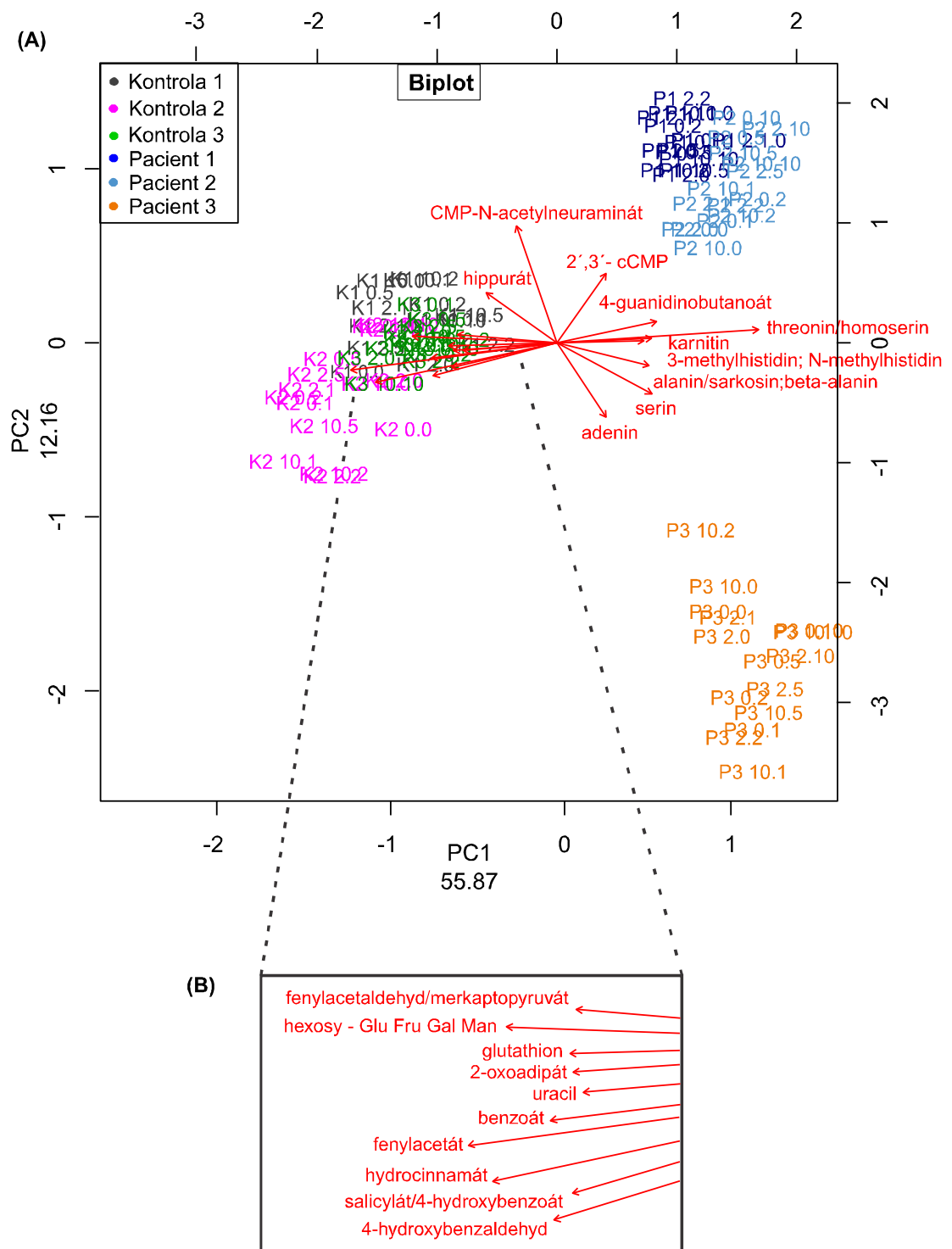


Obr. 31: PCA analýza kontrol i pacientů, bez P3. Znáznorněna tvorba shluků jednotlivých vzorků. V grafu je také možné pozorovat oddělení vzorků v čase 0 hodin u K2 (graficky znázorněno oválem). Součet hodnot pod osami grafu (62,44+6,56) udává procento vysvětlené variability souboru.

PCA biplot

Po provedené PCA analýze byl na kontrolní i pacientské vzorky aplikován biplot. Bez předchozího zařazení vzorků do skupin (nesupervizovaný přístup) je patrné jejich rozdělení do 6 shluků na základě podobnosti (Obr. 32). V grafu je znázorněno 20 nejvíce diskriminujících metabolitů, které jsou pro větší přehlednost seřazeny v Tab. 17. Jako nejvíce diskriminující byly identifikovány **fenylacetát** a **hydrocinnamát**, jejichž vektory směřují ke kontrolám. Srovnatelná diskriminace byla pozorována u **threoninu/homoserinu**, jehož vektor ale naopak směřuje mezi pacienty.

Významným ukazatel vektorů u biplotu je jejich délka, směr a úhel mezi jednotlivými vektory. Jak je uvedeno v kapitole 4.7.2 Diskriminační analýza, délka vektorů metabolitů odpovídá komponentní váze. Úhel mezi vektory udává míru korelace - čím menší je úhel, tím větší je korelace.



Obr. 32: PCA Biplot zahrnující pacienty i kontroly. (A) Zobrazeno 20 nejvíce diskriminujících látek s vektory; (B) Detail 10 vektorů a látek směřujících ke kontrolním vzorkům.

Tab. 17: Nejvíce diskriminující látky - biplot PCA (kontroly i pacienti)

Pořadí dle diskriminace	Metabolit
1.	<i>fenylacetát</i>
2.	<i>threonin/homoserin</i>
3	<i>hydrocinnamát</i>
4.	hexosy - Glu Fru Gal Man
5.	4-hydroxybenzaldehyd
6.	benzoát
7.	CMP-N-acetylneuraminát
8.	glutathion
9.	serin
10.	salicylát/4-hydroxybenzoát
11.	2-oxoadipát
12.	4-guanidinobutanoát
13.	fenylacetaldehyd/merkaptopyruvát
14.	alanin/sarkosin; beta-alanin
15.	3-methylhistidin; N-methylhistidin
16.	uracil
17.	adenin
18.	karnitin
19.	hippurát
20.	2',3'- cCMP

Biplot byl aplikován dále pouze na pacientské vzorky a na vzorky kontrol a pacientů po vyřazení P3. Ze všech uvedených biplotů bylo získáno 20 nejvíce diskriminujících metabolitů, které jsou pro větší přehlednost seřazeny v Tab. 18.

Tab. 18: Nejvíce diskriminující látky - biplot PCA (pacienti)

Pořadí	Metabolit (všichni pacienti)	Metabolit (K1, K2, K3, jen P1, P2)
1.	<i>CMP-N-acetylneuraminát</i>	<i>hydrocinnamát</i>
2.	<i>2-aminofenol</i>	<i>fenylacetát</i>
3	<i>methionin</i>	<i>threonin/ homoserin</i>
4.	FAD	hexosy - Glu Fru Gal Man
5.	adenin	4-hydroxybenzaldehyd
6.	2',3'- cCMP	benzoát
7.	UDP-D-galaktosa/UDP-glukosa	salicylát/4-hydroxybenzoát
8.	serin	4-guanidinobutanoát
9.	hippurát	glutathion
10.	spermin	2-oxoadipát
11.	N-acetylglukosamin*	3-methylhistidin; N-methylhistidin
12.	pantotenát	uracil
13.	trigonelin	fenylacetaldehyd/merkaptopyruvát
14.	histidin	2',3'- cCMP
15.	alanin/sarkosin; beta-alanin	karnitin
16.	adenosin	alanin/sarkosin; beta-alanin
17.	UDP-N-acetyl-D-glukosamin	serin
18.	kreatinin	trigonelin
19.	ATP; dGTP	citrulin
20.	C14	N-acetylserotonin

* N-acetylglukosamin; N-acetylgalaktosamin; N-acetylmannosamin

7.3.3 Diskriminační analýza (DA)

Jak je uvedeno v kapitole 4.7.2 Diskriminační analýza, DA řadí objekty na základě vlastností do již existujících skupin. Jedná se o tzv. supervizovanou metodu.

Pro DA byly všechny vzorky postupně rozděleny na skupiny:

1. kontroly a pacienti
2. kontroly, P1 společně s P2 a zvlášť P3
3. kontroly a pacienti bez P3

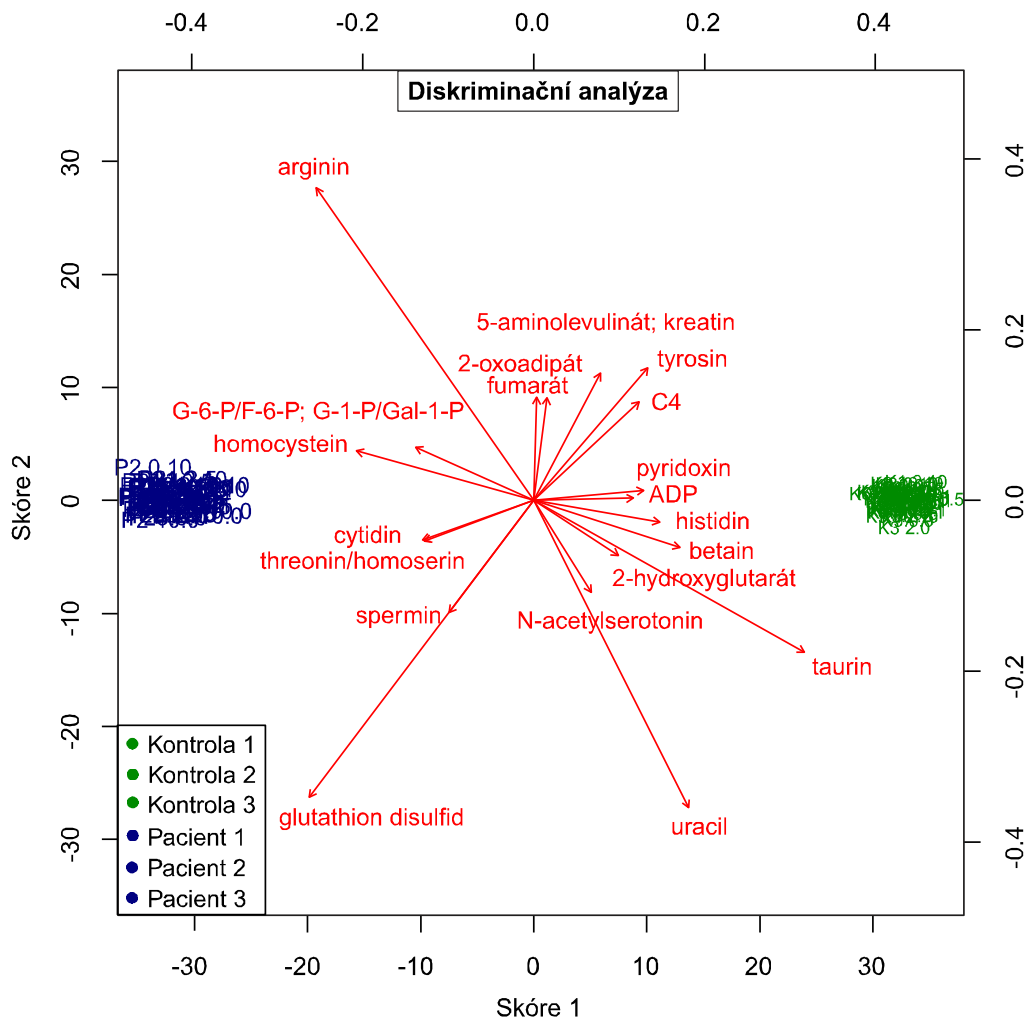
V rámci pacientů bylo provedeno rozdělení na 2 skupiny:

4. P1 společně s P2 a zvlášť P3

Po provedené DA byl na všechny výše uvedené případy aplikován biplot.

DA biplot – 1. kontroly a pacienti

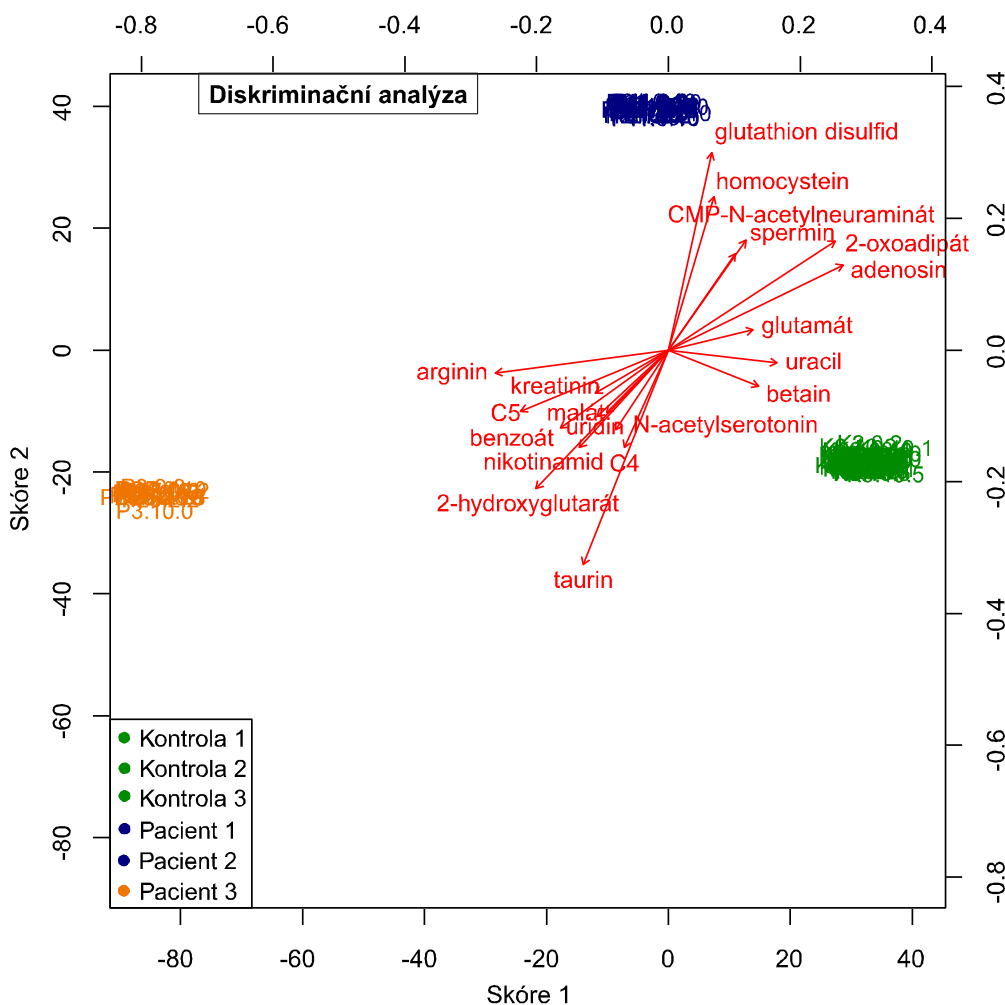
V grafu je znázorněno 20 nejvíce diskriminujících metabolitů (Obr. 33). Jako nejvíce diskriminující byly identifikovány **arginin** a **glutathion disulfid**, jejichž vektory směřují k pacientům. Srovnatelná diskriminace byla pozorována u **uracilu**, jehož vektor ale naopak směřuje ke kontrolám.



Obr. 33: DA biplot při rozdělení vzorků na 2 skupiny (kontroly a pacienti) s vyznačením 20 nejvíce diskriminujících látek.

DA biplot – 2. kontroly, P1 společně s P2 a zvlášť P3

V grafu je znázorněno 20 nejvíce diskriminujících metabolitů (Obr. 34). Jako nejvíce diskriminující byl identifikován **taurin**, jehož vektor směřuje mezi kontroly a P3. Srovnatelná diskriminace byla pozorována u **glutathionu disulfidu**, jehož vektor směřuje k pacientům P1 a P2 a u **2-oxoadipátu**, jehož vektor směřuje mezi kontroly a skupinu P1 a P2.



Obr. 34: DA biplot při rozdělení vzorků na 3 skupiny (kontroly, P1 a P2, P3) s vyznačením 20 nejvíce diskriminujících látek.

Ze všech uvedených biplotů bylo získáno 20 nejvíce diskriminujících metabolitů, které jsou pro větší přehlednost seřazeny v Tab. 19 a Tab. 20.

Tab. 19: Nejvíce diskriminující látky - biplot DA

Pořadí	Metabolit (kontroly i pacienti)	Metabolit (K, P1 a P2, zvláště P3)
1.	<i>arginin</i>	<i>taurin</i>
2.	<i>glutathion disulfid</i>	<i>glutathion disulfid</i>
3.	<i>uracil</i>	<i>2-oxoadipát</i>
4.	<i>taurin</i>	<i>adenosin</i>
5.	<i>homocystein</i>	<i>2-hydroxyglutarát</i>
6.	<i>tyrosin</i>	<i>arginin</i>
7.	<i>betain</i>	<i>C5</i>
8.	<i>C4</i>	<i>homocystein</i>
9.	<i>5-aminolevulinát; kreatin</i>	<i>CMP-N-acetylneuraminát</i>
10.	<i>spermin</i>	<i>benzoát</i>
11.	<i>G-6-P/F-6-P; G-1-P/Gal-1-P</i>	<i>nikotinamid</i>
12.	<i>histidin</i>	<i>spermin</i>
13.	<i>cytidin</i>	<i>uracil</i>
14.	<i>threonin/homoserin</i>	<i>C4</i>
15.	<i>pyridoxin</i>	<i>uridin</i>
16.	<i>N-acetylserotonin</i>	<i>betain</i>
17.	<i>2-oxoadipát</i>	<i>N-acetylserotonin</i>
18.	<i>fumarát</i>	<i>malát</i>
19.	<i>2-hydroxyglutarát</i>	<i>glutamát</i>
20.	<i>ADP</i>	<i>kreatinin</i>

Tab. 20: Nejvíce diskriminující látky - biplot DA

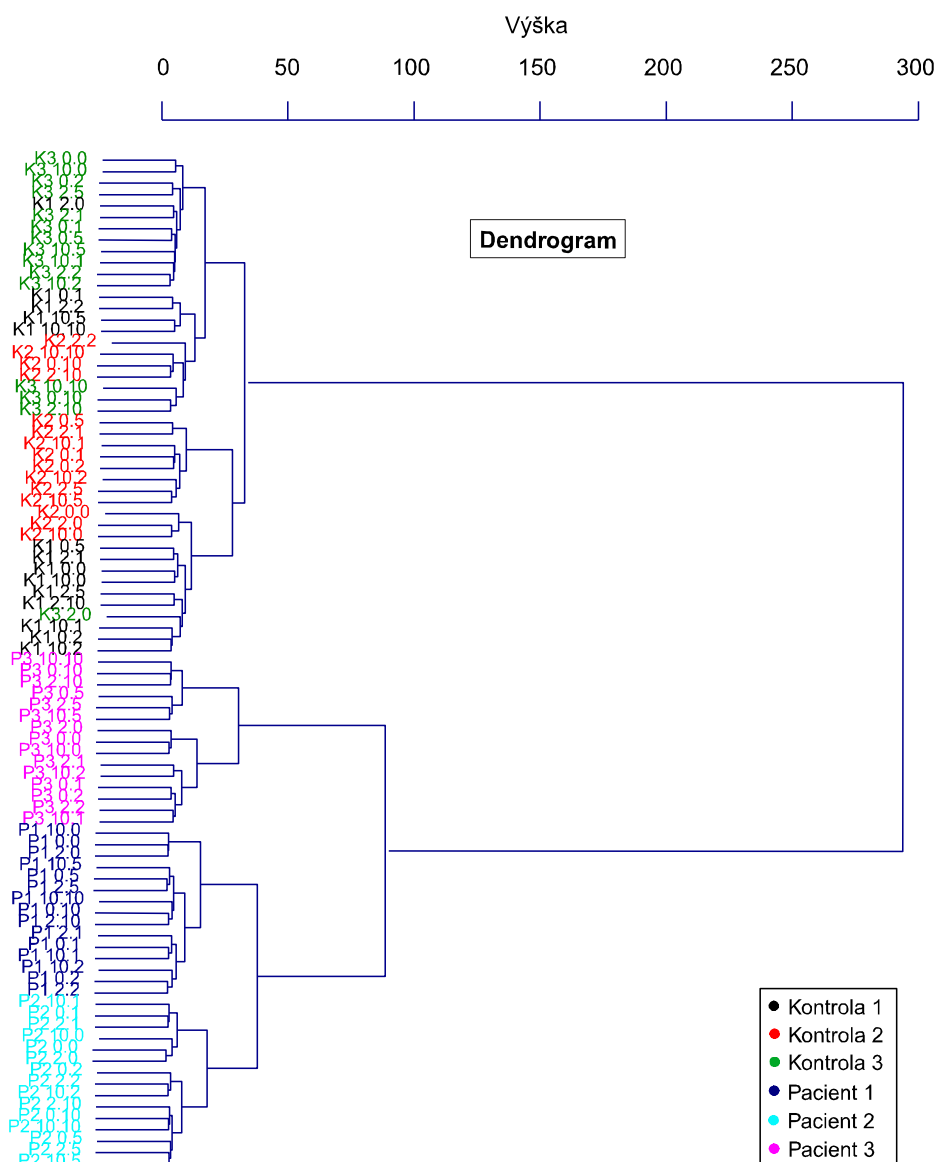
Pořadí	Metabolit (kon, pac bez P3)	Metabolit (P1 a P2, zvláště P3)
1.	<i>glutathion disulfid</i>	<i>uracil</i>
2.	<i>taurin</i>	<i>CMP-N-acetylneuraminát</i>
3.	<i>2-oxoadipát</i>	<i>benzoát</i>
4.	<i>histidin</i>	<i>N-methylhistamin</i>
5.	<i>C4</i>	<i>pseudouridin</i>
6.	<i>AMP</i>	<i>riboflavin</i>
7.	<i>C14</i>	<i>2-hydroxyglutarát</i>
8.	<i>lysin</i>	<i>fenylacetaldehyd/merkaptopyruvát</i>
9.	<i>betain</i>	<i>C14</i>
10.	<i>pseudouridin</i>	<i>serin</i>
11.	<i>alanine/sarkosin; beta-alanin</i>	<i>threonin/homoserin</i>
12.	<i>threonin/homoserin</i>	<i>glycerol-3-fosfát</i>
13.	<i>adenosin</i>	<i>2-aminofenol</i>
14.	<i>5-aminolevulinát; kreatin</i>	<i>homocystein</i>
15.	<i>ATP; dGTP</i>	<i>adenin</i>
16.	<i>laktát</i>	<i>fenylacetát</i>
17.	<i>fenylacetát</i>	<i>5-aminolevulinát; kreatin</i>
18.	<i>2-hydroxyglutarát</i>	<i>spermin</i>
19.	<i>serin</i>	<i>inosin</i>
20.	<i>benzoát</i>	<i>4-guanidinobutanoát</i>

7.2.4 Shluková analýza (CLU)

Při CLU byly využity tzv. hierarchické postupy. Jak je uvedeno v kapitole 4.7.3 Shluková analýza, tyto postupy jsou založeny na postupném spojování objektů a jejich shluků do dalších větších shluků. Diagramem shlukové analýzy je tzv. dendrogram, který je znázorněn na Obr.35.

V této diplomové práci byla využita tzv. Wardova metoda, která je založena na minimalizaci ztráty informace při spojení dvou tříd.

Pomocí CLU se nám podařilo odlišit vzorky kontrolní od patientských. U obou skupin je patrné shlukování, s tím rozdílem, že u kontrol na rozdíl od pacientů je viditelné smísení vzorků. Významná je délka větví shlukující kontroly oproti pacientům, která tak znázorňuje výraznou odlišnost mezi těmito vzorky.



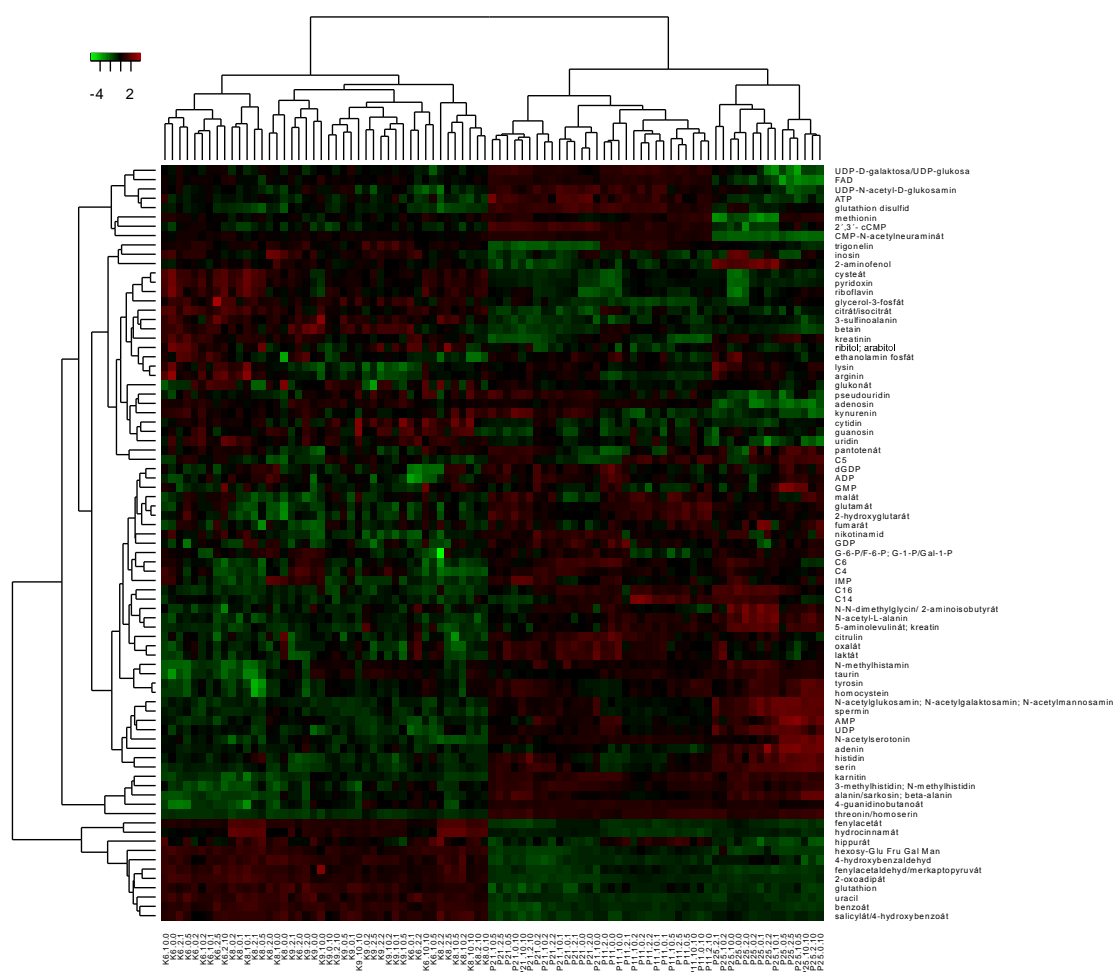
Obr. 35: Dendrogram

7.2.5 Heat mapa

Jak je uvedeno v kapitole 4.7.3 Shluková analýza, heat mapa je formou více-rozměrového shlukování. Kvantitativní stránka datového souboru je v tomto případě vyjádřena pomocí barevné škály vyjadřující zvýšení a snížení hodnot.

Pořadí metabolitů je dáno CLU analýzou na levé straně mapy a pořadí vzorků je dáno CLU analýzou na horní části mapy.

Výsledná heat mapa zahrnující všechny vzorky a všechny identifikované metabolity je znázorněna na Obr. 36.



Obr. 36: Celková heat mapa. Pořadí metabolitů je dáno CLU analýzou na levé straně mapy. Rozdělení vzorků je dáno CLU analýzou na horní části mapy.

Pro větší přehlednost je přiložen detail heat mapy bez identifikovaných metabolitů a CLU analýz (Obr. 37). Tímto vícerozměrným shlukováním se nám podařilo odlišit vzorky kontrolní od patientských. Rozdělení na skupiny kontrol a pacientů je zvláště patrné bílým křížem. U obou skupin je patrné shlukování, s tím rozdílem, že u kontrol je opět viditelné smíšení vzorků.

Nejvýznamnější rozdíl je zřejmý u K2 2.2, který odpovídá hexosám-P (G-6-P/F-6-P; G-1-P/Gal-1-P), jejichž intenzita je v tomto případě výrazně snižena (graficky znázorněno žlutým kruhem). Tyto metabolity však byly identifikovány u všech vzorků o nízké intenzitě a proto se i malý rozdíl v intenzitě může takto výrazně projevit.

Rozdíly na heat mapě jsou patrné nejen mezi kontrolami a pacienty, ale také v rámci skupiny pacientů. Opět bylo potvrzeno odlišení P3 oproti P1 a P2. Nejvýznamnější rozdíl u P3 byl identifikován u prvních 11 metabolitů (graficky znázorněno růžovým čtvercem). Výrazný rozdíl oproti ostatním pacientům je pozorován i u P1. Metabolit hippurát je v tomto případě oproti ostatním pacientům zvýšený.

Tab. 21: Pořadí metabolitů v heat mapě

Pořadí	Metabolit	Pořadí	Metabolit
1.	UDP-D-galaktosa/UDP-glukosa	42.	G-6-P/F-6-P; G-1-P/Gal-1-P
2.	FAD	43.	C6
3.	UDP-N-acetyl-D-glukosamin	44.	C4
4.	ATP; dGTP	45.	IMP
5.	glutathion disulfid	46.	C16
6.	methionin	47.	C14
7.	2',3'- cCMP	48.	N,N-dimethylglycin/2-aminoisobutyřát
8.	CMP-N-acetylneuraminát	49.	N-acetyl-L-alanin
9.	trigonelin	50.	5-aminolevulinát; kreatin
10.	inosin	51.	citrulin
11.	2-aminofenol	52.	oxalát
12.	cysteát	53.	laktát
13.	pyridoxin	54.	N-methylhistamin
14.	riboflavin	55.	taurin
15.	glycerol-3-fosfát	56.	tyrosin
16.	citrát/isocitrát	57.	homocystein
17.	3-sulfinoalanin	58.	N-acetylglukosamin; N-acetylgalaktosamin; N-acetylmannosamin
18.	betain	59.	spermin
19.	kreatinin	60.	AMP
20.	ribitol; arabitol	61.	UDP
21.	ethanolamin fosfát	62.	N-acetylserotonin
22.	lysin	63.	adenin
23.	arginin	64.	histidin

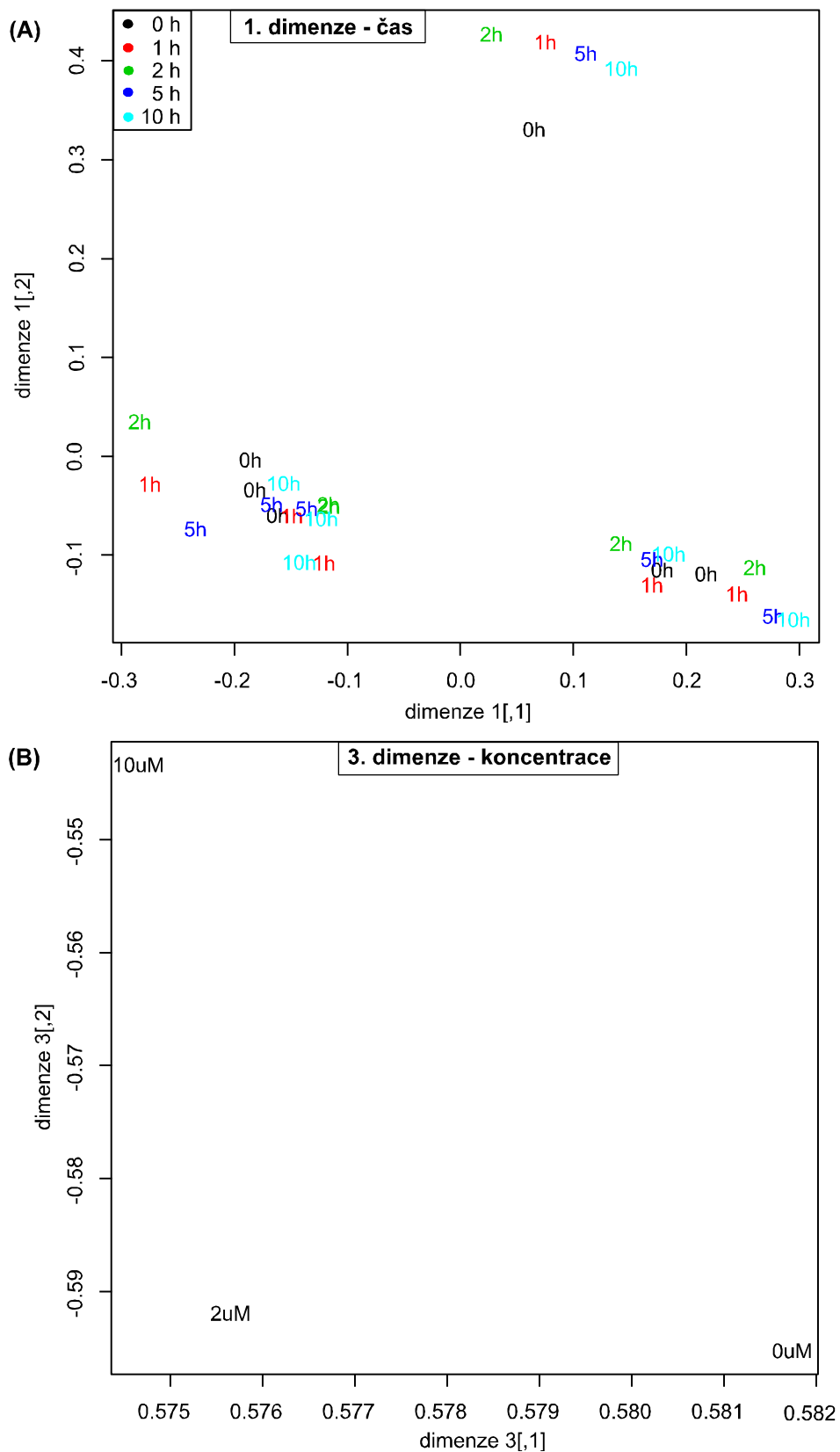
Pořadí	Metabolit	Pořadí	Metabolit
24.	glukonát	65.	serin
25.	pseudouridin	66.	karnitin
26.	adenosin	67.	3-methylhistidin; N-methylhistidin
27.	kynurenin	68.	alanin/sarkosin; beta-alanin
28.	cytidin	69.	4-guanidinobutanoát
29.	guanosin	70.	threonin/homoserin
30.	uridin	71.	fenylacetát
31.	pantothenát	72.	hydrocinamát
32.	C5	73.	hippurát
33.	dGDP	74.	hexosy- Glu Fru Gal Man
34.	ADP	78.	4-hydroxybenzaldehyd
35.	GMP	76.	fenylacetaldehyd; merkaptopyruvát
36.	malát	77.	2-oxoadipát
37.	glutamát	78.	glutathion
38.	2-hydroxyglutarát	79.	uracil
39.	fumarát	80.	benzoát
40.	nikotinamid	81.	salicylát/4-hydroxybenzoát
41.	GDP		

7.2.6 PARAFAC

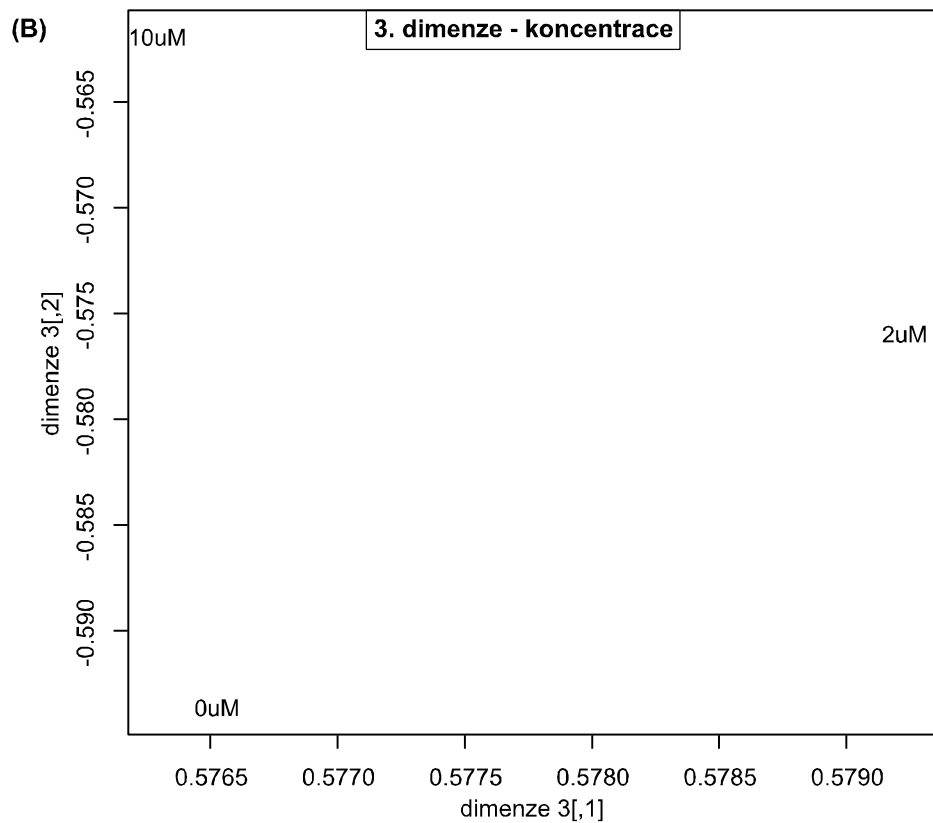
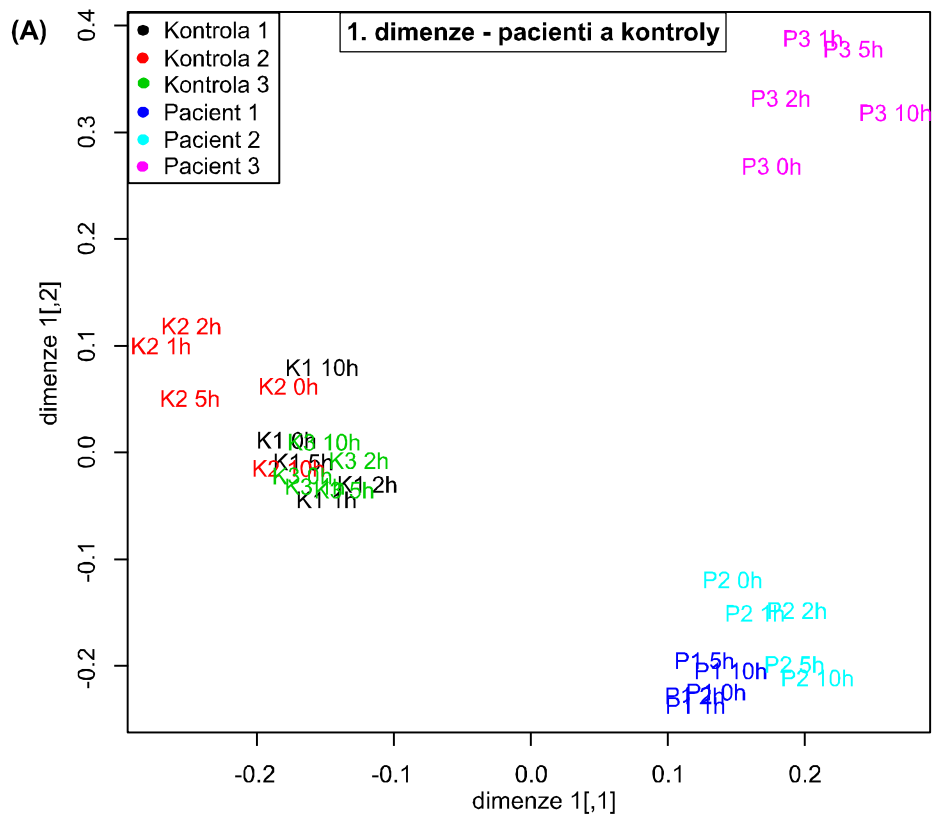
Jak bylo řečeno v kapitole 4.7.1 Analýza hlavních komponent, PARAFAC je trojrozměrná forma PCA. Zobrazuje tedy 3 grafy (dimenze) PCA najednou.

V našem experimentu byly však pozorovány 4 dimenze (čas, koncentrace, metabolity a pacienti + kontroly), proto musela být vždy jedna dimenze zanedbána. Nejprve byla zanedbáno rozdělení vzorků na pacienty a kontroly. V tomto případě byly pozorovány dimenze času (Obr. 38A) a koncentrace (Obr. 38B). Poté byla zanedbána dimenze času (Obr. 39) a dimenze koncentrace (Obr. 40). Pro lepší přehlednost byla pro účel této práce zanedbána dimenze metabolitů.

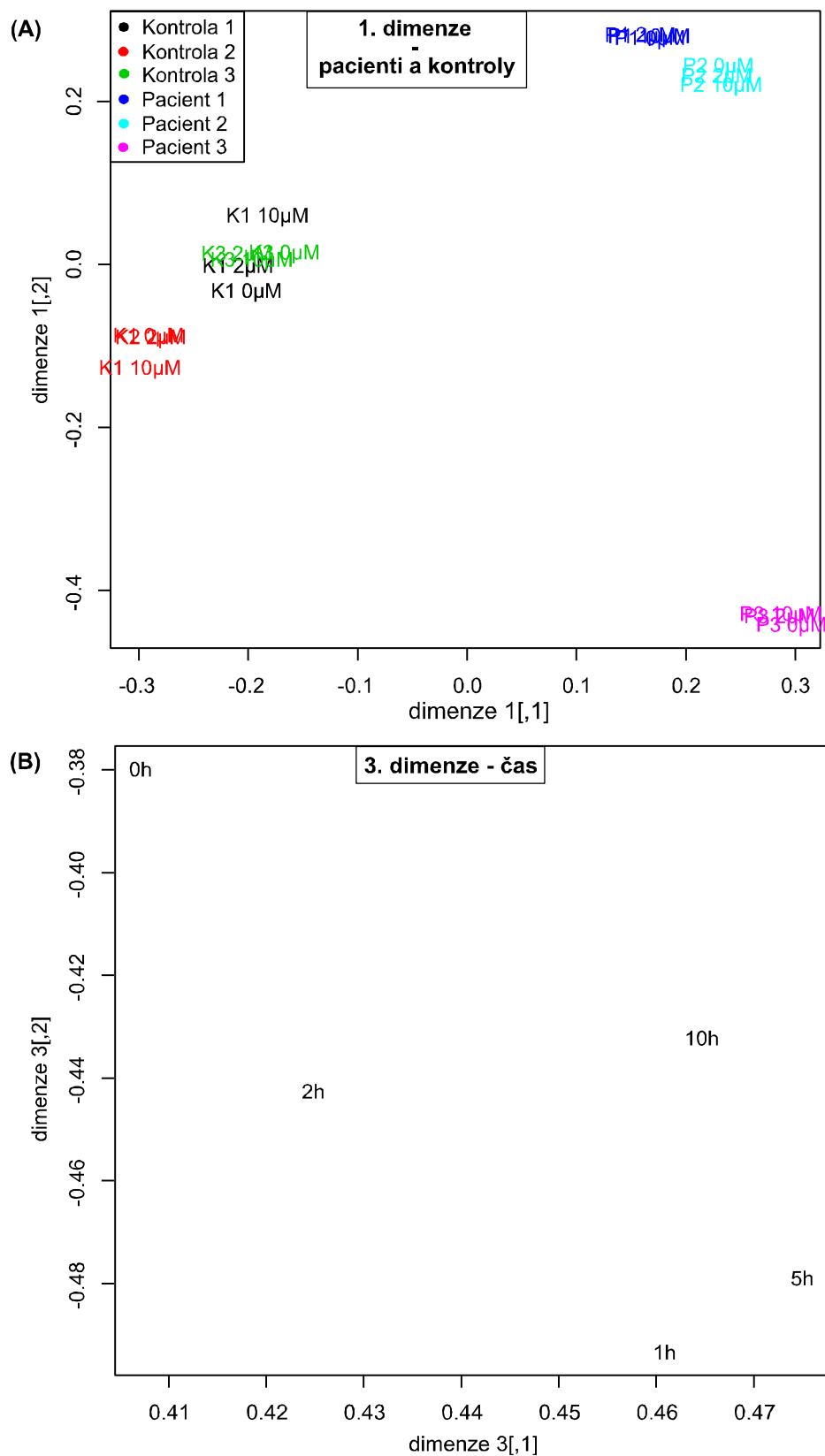
Z jednotlivých grafů je zřejmé, že největších změn bylo dosaženo v rámci rozdělení vzorků na kontroly a pacienty, resp. P3. Výraznější rozdíly jsou však pozorovány v závislosti na čase než na koncentraci, z čehož vyplývá, že všechny koncentrace měly porovnatelný výsledek.



Obr. 38: PARAFAC – bez rozdělení vzorků na pacienty a kontroly. (A) 1. dimenze – čas; (B) 3. dimenze – koncentrace; 2. dimenze – metabolity je zanedbána.



Obr. 39: PARAFAC – zanedbání času. (A) 1. dimenze – pacienti a kontroly; (B) 3. dimenze – koncentrace; 2. dimenze – metabolity je zanedbána.



Obr. 40: PARAFAC – zanedbání kocentrace. (A) 1. dimenze – pacienti a kontroly; (B) 3. dimenze – čas; 2. dimenze – metabolity je zanedbána.

8 Diskuse

Cílem této práce bylo stanovení změn hladin metabolitů v buněčném extraktu leukocytů pacientů s chronickou myeloidní leukemií (CML) působením vybraného kancerostatika – imatinibu IM v porovnání s kontrolními vzorky.

Pro analýzu studovaných metabolitů pomocí HLPC- MS/MS byla modifikována již dříve publikovaná metoda (Bajad & Shualev, 2011). Upraveny byly především podmínky gradientové eluce (složení, průtok) a to tak, abychom docílili chromatografického rozdělení látek se stejným MRM přechodem. I přesto se nám některé látky rozlišit nepodařilo. Jedná se o látky, jejichž MRM přechody i retenční časy jsou shodné (např. UDP-D-galaktosa a UDP-glukosa nebo hexosy – glukosa, fruktosa, galaktosa a manosa). Stejný jev byl pozorován v dříve publikované studii (Bajad et al., 2006). Dále bylo upraveno množství nastříkovaného vzorku a to na základě počtu buněk v jednotlivých vzorcích. Také byla použita kolona s menší velikostí částic – 3 μ m.

Leukocyty byly izolovány z plné krve nově diagnostikovaných pacientů s CML a zdravých jedinců, které sloužili jako vzorky kontrolní. Následně byly buňky inkubovány při 37 °C s různou koncentrací IM – 0, 2 a 10 μ mol/l v médiu DMEM. Jednotlivé alikvóty byly odebírány v časech 0, 1, 2, 5 a 10 hodin a po extrakci byla odebrána vodná fáze, která byla následně zlyofilizována. Před analýzou metodou HPLC-MS/MS byly extrakty rozpuštěny ve 100 μ l mobilní fáze A:B v poměru 1:1 a poté byly analyzovány za optimalizovaných podmínek.

V extraktech leukocytů bylo pomocí programu MultiQuant identifikováno 87 studovaných metabolitů ze skupin aminokyselin, karbohydrátů, karnitinů a jejich acylováných derivátů, nukleotidů a jejich derivátů, purinů a pyrimidinů, organických kyselin, peptidů a dalších metabolitů. Plochy píků získaných metabolitů v jednotlivých vzorcích byly porovnány mezi sebou. Z tohoto pozorování byl zřejmý rozdíl v intenzitě metabolitů, což odpovídá odlišnému počtu buněk v e vzorcích kontrol a pacientů.

V této studii bylo identifikováno více metabolitů o vyšší intenzitě u pacientů, což ovšem v závislosti na rozdílném počtu buněk nemá významnou výpovědní hodnotu. Výjimkou byl např. metabolit threonin/homoserin, který byl u kontrol identifikován v o 2 řády nižší intenzitě než u pacientů. S ohledem na počet buněk mají větší význam metabolity identifikované o vyšší intenzitě u kontrol (např. salicylát/hydroxybenzaldehyd). Některé metabolity byly u pacientů i kontrol nalazeny ve srovnatelné intenzitě (např. citrát/isocitát).

Kromě rozdílů mezi kontrolními a patientskými vzorky byly pozorovány i rozdíly v rámci skupin kontrol a pacientů. Nejvýznamnější odlišnosti byly identifikovány u P3

oproti P1 a P2, jejichž výsledky byly srovnatelné. Ve většině případů byly metabolity v extraktech P3 stanoveny oproti P1 a P2 v nižší intenzitě. Tato intenzita byla srovnatelná s intenzitou píků u kontrolních vzorků. Výjimkou byl např. metabolit pipekolát, jehož intenzita byla u P3 až o řád vyšší než v případě P1 a P2.

Rozdíly byly pozorovány také v závislosti na čase odběru. U metabolitů byla v čase pozorována rostoucí i klesající tendence. Oproti tomu v závislosti na koncentraci IM nebyl pozorován výrazný trend. V případě acylovaného karnitinu C5, který byl identifikován pouze u pacientů, byl pozorován vliv času i koncentrace.

Všechny identifikované metabolity byly statisticky zpracovány. Ze statistické analýzy bylo na základě QC vyřazeno 6 metabolitů, které měly CV nad 30 %. Vyřazeny byly také metabolity identifikované pouze u pacientů nebo kontrol (např. antranilát) a také metabolity s intenzitou přesahující kapacitu detektoru (např. acylované karnitiny C2 a C3, cholin, aminokyseliny valin, tryptofan, prolin, glutamin, fenylalanin).

Pomocí statistických metod tzv. analýzy hlavních komponent, diskriminační analýzy, biplotu, shlukové analýzy, heat mapy a metody PARAFAC byly prokázány rozdíly mezi kontrolními a patientskými vzorky. Všechny uvedené statistické metody poukázaly na podobnost kontrolních vzorků a naopak rozdílnost vzorků pacientů. Nejvýraznějších rozdílů bylo opět dosaženo u P3 oproti P1 a P2. Výrazné odlišení P3 může být důsledkem rezistence tohoto pacienta na imatinib. V rámci statistické analýzy byl také posuzován vliv času a koncentrace. Metodou PARAFAC byl pozorován větší vliv času než koncentrace, kde byly rozdíly pouze minimální.

U pacientů oproti kontrolám byly pozorovány zvýšené hladiny všech identifikovaných nukleotidů (výjimkou byly metabolity UDP-D-galaktosa/UDP-glukosa, FAD, UDP-N-acetyl-D-glukosamin, 2',3'- cCMP a CMP-N-acetylneuraminát, které byly u P3 identifikovány naopak ve snížené intenzitě). Zvýšené koncentrace byly pozorovány také u karnitinu a jeho acylovaných derivátů a taurinu. Tyto metabolity se ve srovnání s literaturou dají považovat za metabolické biomarkery nádových onemocnění (Griffin & Shockcor, 2004).

Pouze u pacientů byly identifikovány metabolity myo-inositol zapojený do procesu osmoregulace a glycin, který je prekurzorem *de novo* syntézy purinů a ve srovnání s literaturou se i tyto metabolity dají považovat za metabolické biomarkery nádových onemocnění (Griffin & Shockcor, 2004).

V literatuře se uvádí, že rakovinné buňky potřebují pro růst a tvorbu látek pro výživu dostatek energie. Jako hlavní zdroj energie (ve formě ATP) rakovinné buňky preferují glykolýzu, namísto oxidativní fosforylace, která je co do produkce ATP efektivnější. Glykolýza je však rychlejším způsobem tvorby ATP a proto ji tyto buňky upřednostňují. Tento jev je známý jako tzv. Warburgův efekt a u rakovinných buněk je pova-

žován za nejpodstatnější metabolickou změnu (Warburg, 1956; Kominsky et al., 2009). Warburgův efekt je také spojen s laktátem, jakožto konečným produktem glykolýzy (Berners-Price et al., 1991). Dřívější studie prokázaly, že imatinib u CML buněk způsobuje převrácení Warburgova efektu přechodem z glykolýzy na mitochondriální glukosový metabolismus, což má u imatinib senzitivních buněk za následek snížení příjmu glukosy a naopak zvýšení energetického stavu (Serkova & Boros, 2005). Koncentrace glukosy je snížena translokací GLUT-1 transportérů z buněčné membrány do cytosolu a inhibicí glykolýzy a zvýšení energetického stavu je způsobeno produkcí ATP z Krebsova cyklu (Kominsky et al., 2009; Klawitter et al, 2009; A et al, 2010). Podobného výsledku bylo dosaženo i v naší studii. U imatinib senzitivních buněk P1 a P2 byla oproti rezistentnímu P3 pozorována zvýšená hladina ATP avšak snížená hladina glukosy (obecně hexos) byla pozorována u všech pacientů (P1, P2 i P3). Výsledek opačný než v předešlých studiích byl pozorován v případě laktátu, který byl identifikován ve větší intenzitě u senzitivních P1 a P2 oproti nižší intenzitě u P3.

Cílem další práce bude analýza extraktů většího souboru pacientů. Dále bude stanoven metabolický profil u vzorků bez inkubace s imatinibem (0 uM) v čase 0 hodin. K tomuto experimentu budou využity vzorky od nově diagnostikovaných pacientů, pacientů léčených hydroxyureou, nilotonibem, dasatinibem a imatinibem a také vzorky kontrolní.

9 Závěr

V teoretické části diplomové práce byly shrnuty poznatky o chronické myeloidní leukemii, její diagnostice, průběhu a léčbě. V současnosti patří k nejvyužívanějším způsobům terapie této nemoci tyrosinkinasové inhibitory. Prvním syntetizovaným specifickým TKI byl imatinib, kterému byla věnována celá kapitola. Dále zde byly shrnuty poznatky o nově se rozvíjející vědní disciplíně - metabolomice.

Cílem experimentální části bylo aplikovat vyvinutou metodu HPLC-MS/MS na buněčné extrakty leukocytů, které byly izolovány z plné krve nově diagnostikovaných pacientů s CML a zdravých jedinců (kontrolní vzorky). Byla provedena cílená metabolická analýza 3 patientských a 3 kontrolních vzorků s odlišným počtem buněk. V extraktech leukocytů bylo identifikováno celkem 87 studovaných látek. Data byla následně statisticky vyhodnocena využitím statistických metod, pomocí nichž byly prokázány rozdíly mezi kontrolními a patientskými vzorky a také rozdíly v rámci skupin pacientů. Nejvýraznějších rozdílů bylo dosaženo u pacienta 3 oproti pacientům 1 a 2, což mohlo být důsledkem rezistence tohoto pacienta na imatinib. Tímto experimentem se podařilo potvrdit ovlivnění Warburgova efektu u imatinib senzitivních buněk.

Použitá literatura

- A J., Qian S., Wang G., Yan B., Zhang S., Huang Q., Ni L., Zha W., Liu L., Cao B., Hong M., Wu H., Lu H., Shi J., Li M., Li J. (2010) Chronic myeloid leukemia patients sensitive and resistant to imatinib treatment show different metabolite responses. *PLoS One* **5**, e13186.
- Bajad S.U., Lu W., Kimball E.H., Yuan J., Peterson C., Rabinowitz J.D. (2006) Separation and quantitation of water soluble cellular metabolites by hydrophilic interaction chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* **1125**, 76-88.
- Bajad S., Shulaev V. (2011) LC-MS-Based metabolomics. *Methods Mol Biol* **708**, 213-228.
- Ben-Neriah Y., Daley G. Q., Mes-Masson A. M., Witte O. N., Baltimore D. (1986) The chronic myelogenous leukemia-specific P210 protein is the product of the bcr/abl hybrid gene. *Science*. **233**, 212-214.
- Bennett J. H. (1845) Case of hypertrophy of the spleen and liver in which death took place from suppuration of the blood. *Edinb Med Surg J.* **64**,413-423.
- Berners-Price S. J., Sant M. E., Christopherson R. I., Kuchel P. W. (1991) ¹H and ³¹P NMR and HPLC studies of mouse L1210 leukemia cell extracts: the effect of Au(I) and Cu (I) diphosphine complexes on the cell metabolism. *Magn Reson Med.* **18**, 142-158.
- Buchdunger E., Zimmermann J., Mett H., Meyer T., Müller M., Regenass U., Lydon N. B. (1995) Selective inhibition of the platelet-derived growth factor signal transduction pathway by a protein-tyrosine kinase inhibitor of the 2-phenylaminopyrimidine class. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92**, 2558-2562.
- Buchdunger E., Zimmermann J., Mett H., Meyer T., Müller M., Druker B. J., Lydon N. B. (1996) Inhibition of the Abl protein-tyrosine kinase in vitro and in vivo by a 2-phenylaminopyrimidine derivative. *Cancer Res.* **56**, 100–104.
- Caudle W. M., Bammler T. K., Lin Y., Pan S., Zhang J. (2010) Using 'omics' to define pathogenesis and biomarkers of Parkinson's disease. *Expert Rev Neurother* **10**, 925-942.
- Cortes J. E., Talpaz M., O'Brien S., Faderl S., Garcia-Manero G., Ferrajoli A., Verstovsek S., Rios M. B., Shan J., Kantarjian H. M. (2006) Staging of chronic myeloid leukemia in the imatinib era: an evaluation of the World Health Organization proposal. *Cancer.* **106**, 1306-1315.
- Diamond J. M., Mělo J. V. (2011) Mechanisms of resistance to BCR–ABL kinase inhibitors. *Leuk Lymphoma* **52**, 12–22.

- Dirren H., Robinson A. B., Pauling L. (1975) Sex-related patterns in the profiles of human urinary amino acids. *Clin Chem.* **21**, 1970-1975.
- Doney K., Buckner C. D., Sale G. E., Ramberg R., Boyd C., Thomas E. D. (1978) Treatment of chronic granulocytic leukemia by chemotherapy, total body irradiation and allogeneic bone marrow transplantation. *Exp Hematol.* **6**, 738-747.
- Doubek M., Adam Z. (2001) Myeloproliferativní choroby. V knize Hematologie II – Přehled maligních hematologických nemocí, (Adam Z., Vorlíček J., et al. ed.), pp. 65-125, Grada, Praha, ČR.
- Druker B. J., Tamura S., Buchdunger E., Ohno S., Segal G. M., Fanning S., Zimmermann J, Lydon N. B. (1996) Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nat Med.* **2**, 561-566.
- Druker B. J., Talpaz M., Resta D. J., Peng B., Buchdunger E., Ford J. M., Lydon N. B., Kantarjian H., Capdeville R., Ohno-Jones S., Sawyers C. L. (2001) Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med.* **344**, 1031-1037.
- Dulucq S., Bouchet S., Turcq B., Lippert E., Etienne G., Reiffers J., Molimard M., Krajcinovic M., Mahon F. X. (2008) Multidrug resistance gene (MDR1) polymorphisms are associated with major molecular responses to standard-dose imatinib in chronic myeloid leukemia. *Blood.* **112**, 2024-2027.
- Dunn W. B., Broadhurst D., Begley P., Zelena E., Francis-McIntyre S., Anderson N., Brown M., Knowles J. D., Halsall A., Haselden J. N., Nicholls A. W., Wilson I. D., Kell D. B., Goodacre R. (2011) Procedures for large-scale metabolic profiling of serum and plasma using gas chromatography and liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Nat Protoc.* **6**, 1060-1083.
- Engler J. R., Zannettino A. C. W., Bailey C. G., Rasko J. E. J., Hughes T. P., White D. L. (2011) OCT-1 function varies with cell lineage but is not influenced by BCR-ABL. *Haematologica* **96**, 213-220.
- Ernst T., Erben P., Müller M. C., Paschka P., Schenk T., Hoffmann J., Kreil S., La Rosée P., Hehlmann R., Hochhaus A. (2008) Dynamics of BCR-ABL mutated clones prior to hematologic or cytogenetic resistance to imatinib. *Haematologica.* **93**, 186-192.
- Faber E. (2010) Rezistence k inhibitorům tyrozinové kinázy. V knize Chronická myeloidní leukémie, (Faber E., Indrák K., ed.), pp. 132-141, Galén, Praha, ČR.

- Faber E., Indrák K. (2010) Léčba imatinibem. V knize Chronická myeloidní leukémie, (Faber E., Indrák K., ed.), pp.93-109, Galén, Praha, ČR.
- Fikarová I. (2011) Vliv imatinibu na metabolismus buněk v buněčné kultuře chronické myeloidní leukemie. Bakalářská práce, pp. 13-16, Přírodovědecká fakulta, Palackého univerzita, Olomouc, ČR.
- Fox S. I. (1999) Human Physiology, pp. 365-369, The McGraw-Hill Companies, New York City, USA.
- Gambacorti-Passerini C., Barni R., le Coutre P., Zucchetti M., Cabrita G., Cleris L., Rossi F., Gianazza E., Brueggen J., Cozens R., Pioltelli P., Pogliani E., Corneo G., Formelli F., D'Incalci M. (2000) Role of alpha1 acid glycoprotein in the in vivo resistance of human BCR-ABL(+) leukemic cells to the abl inhibitor STI571. *J Natl Cancer Inst.* **92**, 1641-1650.
- Gorre M. E., Mohammed M., Ellwood K., Hsu N., Pagnette R., Rao P. N., Sawyers C. L. (2001) Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification. *Science* **293**, 876-880.
- Gratwohl A., Baldomero H., Frauendorfer K., Urbano-Ispizua A. (2006) EBMT activity survey 2004 and changes in disease indication over the past 15 years. *Bone Marrow Transplant.* **37**, 1069-85.
- Griffin J. L., Shockcor J. P. (2004) Metabolic profiles of cancer cells. *Nat Rev Cancer.* **4**, 551-561.
- Groffen J., Stephenson J. G., Heisterkamp N., de Klein A., Bartman C. R., Grosveld G. (1984) Philadelphia chromosomal breakpoints are clustered within a limited region, bcr, on chromosome 22. *Cell.* **36**, 93-99.
- Guyton A. C., Hall J. E. (2000) Textbook of medical physiology, pp. 400, W. B. Saunders, Philadelphia, USA.
- Haddow A., Timmis G. M. (1953) Myleran in chronic myeloid leukaemia; chemical constitution and biological action. *Lancet.* **264**, 207-208.
- Han J., Danell R. M., Patel J. R., Gumerov D. R., Scarlett C. O., Speir J. P., Parker C. E., Rusyn I., Zeisel S., Borchers C. H. (2008) Towards high-throughput metabolomics using ultrahigh-field Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Metabolomics.* **4**, 128-140.
- Heisterkamp N., Stephenson J. G., Groffen J., Hansen P. F., de Klein A., Bartman C. R., Grosveld G. (1983) Localization of the c-ab1 oncogene adjacent to a translocation break point in chronic myelocytic leukaemia. *Nature* **306**, 239-242.
- Horning E. C., Horning M. G. (1971) Metabolic profiles: gas-phase methods for analysis of metabolites. *Clin Chem.* **17**, 802-809.

- Hubbard S. R., Wei L., Ellis L., Hendrickson W. A. (1994). Crystal structure of the tyrosine kinase domain of the human insulin receptor. *Nature* **372**, 746-754.
- Chisoe S. L., Bodenteich A., Wang Y. F., Wang Y. P., Burian D., Clifton S. W., Crabtree J., Freeman A., Iyer K., Jian L., Ma Y., McLaury H. J., Pan H. Q., Sarhan O. H., Toth S., Wang Z., Zhang G., Heisterkamp N., Groffen J., Roe B. A. (1995) Sequence and analysis of the human ABL gene, the BCR gene, and regions involved in the Philadelphia chromosomal translocation. *Genomics* **27**, 67-82.
- Johnson L. N., Noble M. E., Owen D. J. (1996) Active and inactive protein kinases: structural basis for regulation. *Cell* **85**, 149-158.
- Kanehisa M., Goto S. (2000) KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res.* **28**, 27-30.
- Kantarjian H., O'Brien S. (2008) Oncology – The Chronic Leukemias. V knize Goldman's Cecil medicine (Goldman L., Schafer A. I., ed.), pp. 1209-1217, W. B. Saunders, Philadelphia, USA.
- Kantarjian H. M., Cortes J. E., O'Brien S., Luthra R., Giles F., Verstovsek S., Faderl S., Thomas D., Garcia-Manero G., Rios M. B., Shan J., Jones D., Talpaz M. (2004) Long-term survival benefit and improved complete cytogenetic and molecular response rates with imatinib mesylate in Philadelphia chromosome-positive chronic-phase chronic myeloid leukemia after failure of interferon-alpha. *Blood*. **104**, 1979-1988.
- Kantarjian H., Giles F., Wunderle L., Bhalla K., O'Brien S., Wassmann B., Tanaka C., Manley P., Rae P., Mietlowski W., Bochinski K., Hochhaus A., Griffin J. D., Hoelzer D., Albitar M., Dugan M., Cortes J., Alland L., Ottmann O. G. (2006) Nilotinib in Imatinib-Resistant CML and Philadelphia Chromosome-Positive ALL. *N Engl J Med* **354**, 2542-2551.
- Kaushansky K. (2008) Hematologic disease – Hematopoiesis and Hematopoietic Growth Factors. V knize Goldman's Cecil medicine (Goldman L., Schafer A. I., ed.), pp. 1022-1024, W. B. Saunders, Philadelphia, USA.
- Klawitter J., Kominsky D. J., Brown J. L., Klawitter J., Christians U., Leibfritz D., Mělo J. V., Serkova N. J. (2009) Metabolic characteristics of imatinib resistance in chronic myeloid leukaemia cells. *Br J Pharmacol.* **158**, 588-600.
- Klener P., Friedmann B. (2001) Hematologie – anatomické a fyziologické poznámky, nádorové choroby krvetvorby. V knize Vnitřní lékařství (Klener P., et al., ed.), pp. 325-328, 360-385, Galén, Praha, ČR.

- Knighton D. R., Zheng J. H., Ten Eyck L. F., Ashford V. A., Xuong N. H., Taylor S. S., Sowadski J. M. (1991) Crystal structure of the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase. *Science* **253**, 407-414.
- Kominsky D. J., Klawitter J., Brown J. L., Boros L. G., Melo J. V., Eckhardt S. G., Serkova N. J. (2009) Abnormalities in glucose uptake and metabolism in imatinib-resistant human BCR-ABL-positive cells. *Clin Cancer Res.* **15**, 3442–3450.
- Koptyra M., Falinski R., Nowicki M. O., Stoklosa T., Majsterek I., Nieborowska-Skorska M., Blasiak J., Skorski T. (2006) BCR/ABL kinase induces self-mutagenesis via reactive oxygen species to encode imatinib resistance. *Blood* **108**, 319-327.
- Kozák T. (2001) Maligní onemocnění krve a krvetvorných orgánů. V knize Vnitřní lékařství (Anděl M., Gregor P., Horák J., Kment M., Widimský P., ed.), pp. 131-136, Galén, Praha, ČR.
- Krejčí M., Mayer J., Doubek M., Brychtova Y., Pospisil Z., Racil Z., Dvorakova D., Lengerova M., Horky O., Koristek Z., Dolezal T., Vorlicek J. (2006) Clinical outcomes and direct hospital costs of reduced-intensity allogeneic transplantation in chronic myeloid leukemia. *Bone Marrow Transplant.* **38**, 483-491.
- Mahon F. X., Belloc F., Lagarde V., Chollet C., Moreau-Gaudry F., Reiffers J., Goldman J. M., Melo J. V. (2003) MDR1 gene overexpression confers resistance to imatinib mesylate in leukemia cell line models. *Blood.* **101**, 2368-2373.
- Mayer J. (2010) Historické poznámky. V knize Chronická myeloidní leukémie, (Faber E., Indrác K., ed.), pp. 1-8, Galén, Praha, ČR.
- Melo J. V., Gordon D. E., Tuszynski A., Dhut S., Young B. D., Goldman J. M. (1993) Expression of the ABL-BCR fusion gene in Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **81**, 2488-2491.
- Meloun M., Militký J. (2002) Statistická analýza vícerozměrných dat. V knize Kompendium statistického zpracování dat, (Meloun M., Militký J., ed.), pp.213-350, Academia, Praha, ČR.
- Mohammadi M., McMahon G., Sun L., Tang C., Hirth P., Yeh B. K., Hubbard S. R., Schlessinger J. (1997) Structures of the tyrosine kinase domain of fibroblast growth factor receptor in complex with inhibitors. *Science* **276**, 955-960.
- Moon J. Y., Jung H. J., Moon M. H., Chung B. C., Choi M. H. (2009) Heat-map visualization of gas chromatography-mass spectrometry based quantitative

- signatures on steroid metabolism. *J Am Soc Mass Spectrom.* **20**, 1626-1637.
- Murphy M. F. (1998) Haematological disease. V knize Clinical medicine, A text-book for medical students and doctors (Kumar P., Clark M., ed.), pp. 353-414, W. B. Saunders, Philadelphia, USA.
 - Nagar B., Bornmann W. G., Pellicena P., Schindler T., Veach D. R., Miller W. T., Clarkson B., Kuriyan J. (2002) Crystal structures of the kinase domain of c-Abl in complex with the small molecule inhibitors PD173955 and imatinib (STI-571). *Cancer Res.* **62**, 4236-4243.
 - Nemutlu E., Zhang S., Juranic N. O., Terzic A., Macura S., Dzeja P. (2012) ¹⁸O-assisted dynamic metabolomics for individualized diagnostics and treatment of human diseases. *Croat Med J* **53**, 529-534.
 - Nicholson J. K., Lindon J. C., Holmes E. (1999) 'Metabonomics': understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. *Xenobiotica.* **29**, 1181-1189.
 - Nielsen J., Oliver S. (2005) The next wave in metabolome analysis. *Trends Biotechnol* **23**, 544-546.
 - Nowell P. C., Hungerford D. A. (1960) A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Science.* **132**, 1497.
 - Nowicki M. O., Falinski R., Koptyra M., Slupianek A., Stoklosa T., Gloc E., Nieborowska-Skorska M., Blasiak J., Skorski T. (2004) BCR/ABL oncogenic kinase promotes unfaithful repair of the reactive oxygen species -dependent DNA double-strand breaks. *Blood* **104**, 3746-3753.
 - Pauling L., Robinson A. B., Teranishi R., Cary P. (1971) Quantitative Analysis of Urine Vapor and Breath by Gas-Liquid Partition Chromatography. *Proc Natl Acad Sci U S A* **68**, 2374-2376.
 - Peng B., Hayes M., Resta D., Racine-Poon A., Druker B. J., Talpaz M., C. L. Sawyers, Rosamilia M., Ford J., Lloyd P., Capdeville R. (2004) Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Imatinib in a Phase I Trial With Chronic Myeloid Leukemia Patients. *J Clin Oncol* **22**, 935-942.
 - Picard S., Titier K., Etienne G., Teilhet E., Ducint D., Bernard M. A., Lassalle R., Marit G., Reiffers J., Begaud B., Moore N., Molimard M., Mahon F. X. (2007) Trough imatinib plasma levels are associated with both cytogenetic and molecular responses to standard-dose imatinib in chronic myeloid leukemia. *Blood* **109**, 3496-3499.

- Pryzhkova M. V., Peters A., Zambidis E. T. (2010) Erythropoietic differentiation of a human embryonic stem cell line harbouring the sickle cell anaemia mutation. *Reprod Biomed Online* **21**, 196-205.
- Rodriguez G. I., Kuhn J. G., Weiss G. R., Hilsenbeck S. G., Eckardt J. R., Thurman A., Rinaldi D. A., Hodges S., Von Hoff D. D., Rowinsky E. K. (1998) A bioavailability and pharmacokinetic study of oral and intravenous hydroxyurea. *Blood*. **91**, 1533-1541.
- Rowley J. D. (1973) A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and giemsa staining. *Nature* **243**, 290-293.
- Rubin B. P., Heinrich M. C., Corless C. L. (2007) Gastrointestinal stromal tumour. *Lancet*. **369**, 1731-1741.
- Saglio G., Guerrasio A., Rosso C., Zaccaria A., Tassinari A., Serra A., Rege-Cambrin G., Mazza U., Gavosto F. (1990) New type of Bcr/Abl junction in Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia. *Blood* **76**, 1819-1824.
- Sawyers C. L., Hochhaus A., Feldman E., Goldman J. M., Miller C. B., Ottmann O. G., Schiffer C. A., Talpaz M., Guilhot F., Deininger M. W., Fischer T., O'Brien S. G., Stone R. M., Gambacorti-Passerini C. B., Russell N. H., Reiffers J. J., Shea T. C., Chapis B., Coutre S., Tura S., Morra E., Larson R. A., Saven A., Peschel C., Gratwohl A., Mandelli F., Ben-Am M., Gathmann I., Capdeville R., Paquette R. L., Druker B. J. (2002) Imatinib induces hematologic and cytogenetic responses in patients with chronic myelogenous leukemia in myeloid blast crisis: results of a phase II study. *Blood*. **99**, 3530-3539.
- Serkova N., Boros L. G. (2005) Detection of resistance to imatinib by metabolic profiling: clinical and drug development implications. *Am J Pharmacogenomics*. **5**, 293-302.
- Shah N. P., Tran C., Lee F. Y., Chen P., Norris D., Sawyers C. L. (2004) Overriding imatinib resistance with a novel ABL kinase inhibitor. *Science* **305**, 399-401.
- Shulaev V. (2006) Metabolomics technology and bioinformatics. *Brief Bioinform*. **7**, 128-139.
- Schindler T., Bornmann W., Pellicena P., Miller W. T., Clarkson B., Kuriyan J. (2000) Structural mechanism for STI-571 inhibitor of abelson tyrosine kinase. *Science* **289**, 1938-1942.

- Skorski T. (2011) Chronic myeloid leukemia cells refractory/resistant to tyrosine kinase inhibitors are genetically unstable and may cause relapse and malignant progression to the terminal disease state. *Leuk Lymphoma* **52**, 23-29.
- Smetana K. (2001) Leukopoeza. V knize Vnitřní lékařství (Anděl M., Gregor P., Horák J., Kment M., Widimský P., ed.), pp. 24-26, Galén, Praha, ČR.
- Talpaz M., McCredie K. B., Mavligit G. M., Gutterman J. U. (1983) Leukocyte interferon-induced myeloid cytoreduction in chronic myelogenous leukemia. *Blood*. **62**, 689-692.
- Talpaz M., Silver R. T., Druker B. J., Goldman J. M., Gambacorti-Passerini C., Guilhot F., Schiffer C. A., Fischer T., Deininger M. W., Lennard A. L., Hochhaus A., Ottmann O. G., Gratwohl A., Baccarani M., Stone R., Tura S., Mahon F. X., Fernandes-Reese S., Gathmann I., Capdeville R., Kantarjian H. M., Sawyers C. L. (2002) Imatinib induces durable hematologic and cytogenetic responses in patients with accelerated phase chronic myeloid leukemia: results of a phase 2 study. *Blood*. **99**, 1928-1937.
- Thomas J., Wang L., Clark R. E., Pirmohamed M. (2004) Active transport of imatinib into and out of cells: implications for drug resistance. *Blood* **104**, 3739-3745.
- Thurman W. G., Bloedow C., Howe C. D., Levin W. C., Davis P., Lane M., Sullivan M. P., Griffith K. M. (1963) A phase I study of hydroxyurea. *Cancer Chemother Rep*. **29**, 103-107.
- Virchow R. (1845) Weisses Blut. *Frorieps Notizen* **36**, 151-156.
- Voglová J. (2010) Průběh a prognóza. V knize Chronická myeloidní leukémie, (Faber E., Indrák K., ed.), pp. 65-72, Galén, Praha, ČR.
- Wada H., Mizutani S., Nishimura J., Usuki Y., Kohsaki M., Komai M., Kaneko H., Sakamoto S., Delia D., Kanamaru A., Kakishita E. (1995) Establishment and molecular characterization of a novel leukemic cell line with Philadelphia chromosome expressing p230 BCR/ABL fusion protein. *Cancer Res*. **55**, 3192-3196.
- Wang E. S., Berliner N. (2010) Hematopoiesis and Hematopoietic Failure. V knize Andreoli and Carpenter's Cecil Essentials of medicine (Andreoli T. E., Benjamin I. J., Griggs R. C., Wing E. J., ed.), pp. 496-499, Saunders, Philadelphia, USA.
- Want E. J., Nordström A., Morita H., Siuzdak G. (2007) From exogenous to endogenous: the inevitable imprint of mass spectrometry in metabolomics. *J Proteome Res*. **6**, 459-468.

- Want E. J., Wilson I. D., Gika H., Theodoridis G., Plumb R. S., Shockcor J., Holmes E., Nicholson J. K. (2010) Global metabolic profiling procedures for urine using UPLC–MS. *Nat Protoc.* **5**, 1005-1018.
- Warburg O. (1956) On respiratory impairment in cancer cells. *Science* **124**, 269–270.
- Westfall D. E., Zhang L., Song S., Lee S. (2008) Concurrent megakaryocytic and erythroid chronic myelogenous leukemia blast crisis. *Arch Pathol Lab Med.* **132**, 1021-1025.
- White D. L., Saunders V. A., Dang P., Engler J., Zannettino A. C. W., Cambareri A. C., Quinn S. R., Manley P. W., Hughes T. P. (2006) OCT-1-mediated influx is a key determinant of the intracellular uptake of imatinib but not nilotinib (AMN107): reduced OCT-1 activity is the cause of low in vitro sensitivity to imatinib. *Blood* **108**, 697-704.
- Wikoff W. R., Pendyala G., Siuzdak G., Fox H. S. (2008) Metabolomic analysis of the cerebrospinal fluid reveals changes in phospholipase expression in the CNS of SIV-infected macaques. *J Clin Invest.* **118**, 2661-2669.
- Winger J. A., Hantschel O., Superti-Furga G., Kuriyan J. (2009) The structure of the leukemia drug imatinib bound to human quinone reductase 2 (NQO2). *BMC Struct Biol.* **9**, 7.
- Wishart D. S., Tzur D., Knox C., Eisner R., Guo A. C., Young N., Cheng D., Jewell K., Arndt D., Sawhney S., Fung C., Nikolai L., Lewis M., Coutouly M. A., Forsythe I., Tang P., Shrivastava S., Jeroncic K., Stothard P., Amegbey G., Block D., Hau D. D., Wagner J., Miniaci J., Clements M., Gebremedhin M., Guo N., Zhang Y., Duggan G. E., Macinnis G. D., Weljie A. M., Dowlatabadi R., Bamforth F., Clive D., Greiner R., Li L., Marrie T., Sykes B. D., Vogel H. J., Querengesser L. (2007) HMDB: the Human Metabolome Database. *Nucleic Acids Res.* **35**, D521-D526.
- Wojtowicz P., Janečková H., Friedecký D., Adam T. (2013) Techniky metabolomiky v biomedicíně. *Chem. Listy* **107**, 3-11.
- Yang L. J., Zou J., Xie H. Z., Li L. L., Wei Y. Q., Yang S. Y. (2009) Steered Molecular Dynamics Simulations Reveal the Likelier Dissociation Pathway of Imatinib from Its Targeting Kinases c-Kit and Abl. *PLoS ONE* **4**, e8470.
- Zheng J., Knighton D. R., ten Eyck L. F., Karlsson R., Xuong N., Taylor S. S., Sowadski J. M. (1993) Crystal structure of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase complexed with MgATP and peptide inhibitor. *Biochemistry* **32**, 2154-2161.

Seznam použitých zkratek

2',3'- cCMP	2',3'- cyklický cytidin-5'-monofosfát
ABL	část 9. chromosomu (homologe virového onkogenu Abelsonovy myší leukemie)
AcCN	acetonitril
Acetyl-CoA	acetyl-koenzym A
ADP	adenosin-5'-difosfát
AICAr	5-aminoimidazol-4-carboxamid-1-β-D-ribofuranosyl5'-monofosfát
ALL	akutní lymfatická leukemie
AML	akutní myeloidní leukemie
AMP	adenosin-5'-monofosfát
AP	akcelerovaná fáze (accelerated phase)
ATB	antibiotika
ATP	adenosin-5'-trifosfát
BCR	část 22. Chromosomu (breakpoint cluster region)
BP	blastická fáze (blastic phase)
CE	kolizní energie (collision energy)
CLL	chronická lymfatická leukemie
CLU	shluková analýza (cluster analysis)
CML	chronická myeloidní leukemie
CSF	faktor stimuluje proliferaci jednotlivých buněčných kolonií. (colony stimulating factor)
CP	chronická fáze (chronic phase)
CXP	výstupní potenciál kolizní cely (collision cell exit potential)
CV	variační koeficient (coefficient of variation)
DA	diskriminační analýzy (discriminant analysis)
dGDP	2'-deoxyguanosin-5'-difosfát
dGTP	2'-deoxyguanosin-5'-trifosfát
DMEM	médium (Dulbecco's Modified Eagle Medium)
DNA	deoxyribonukleová kyselina (deoxyribonucleic acid)
DP	deklasterační potenciál (declustering potential)
EP	vstupní potenciál (entrance potential)
FAB	Francouzsko-americko-britská klasifikace
FAD	flavinadenindinukleotid
FBS	fetální hovězí sérum (fetal bovine serum)
EP	vstupní potenciál (entrance potential)

F-6-P	fruktosa-6-fosfát
G-1-P	glukosa-1-fosfát
G-6-P	glukosa-6-fosfát
Gal-1-P	galaktosa-1-fosfát
GS	plynová chromatografie (gas chromatography)
GDP	guanosin-5'-difosfát
GIST	gastrointestinálních stromálních tumorů (gastrointestinal stromal tumours)
GMP	guanosin-5'-monofosfát
HMDB	Human Metabolome Database
hOCT-1	organický kationtový transportér (human organic cationic transporter)
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (high-performance liquid chromatography)
HPLC-MS/MS	vysokoúčinná kapalinová chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií
HSCT	transplantace lidských krvetvorných buněk (human stem cell transplantation)
IL-3 (-6, - 11)	interleukin-3 (-6, -11)
IM	imatinib
IMP	inosin-5'-monofosfát
ITP	inosin-5'-trifosfát
K1 (2, 3)	kontrola 1 (2, 3)
K ₃ EDTA	tri-draselná sůl kyseliny etylen-diamin-tetraoctové
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
KIT	
LC	kapalinová chromatografie (liquid chromatography)
LC-MS	kapalinová chromatografie-hmotnostní spektrometrií
MDR1	multiléková rezistence (multidrug resistance protein)
MRM	multiple-reaction monitoring
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
MS	hmotnostní spektrometrie (mass spectrometry)
MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie (tandem mass spectrometry)
P1 (2, 3)	pacient 1 (2, 3)
PAP	2-fenylaminopyridin (2-phenylaminopyrimidine)
PAFARAC	trojrozměrná forma PCA (parallel factor analysis)

PBS	fosfátový pufr (phosphate buffered saline)
PCA	analýza hlavních komponent (principal component analysis)
PDGF	růstový faktor (platelet-derived growth factor)
PEN	penicilin
Ph	Filadelfský chromosom (Philadelphia chromosome)
PK	proteinkinasa
QC	vzorek kontroly kvality (quality control)
Ret t	retenční čas (retention time)
ROS	reaktivní formy kyslíku (reactive oxygen species)
RT	laboratorní teplota (room temperature)
RTK	tyrosinkinásový receptor
SCF	růstový faktor kmenových buněk (stem cell factor)
SOD	superoxiddismutasou
STREP	streptomycin
TK	tyrosinkinasa
TKI	inhibitor tyrosinkinás
TGF- β	transformující růstový faktor (transforming growth factor)
TNF	(nádor) nekrotizující faktor (tumor necrosis factor)
UDP	uridin-5'-difosfát
UTP	uridin-5'-trifosfát

Přílohy

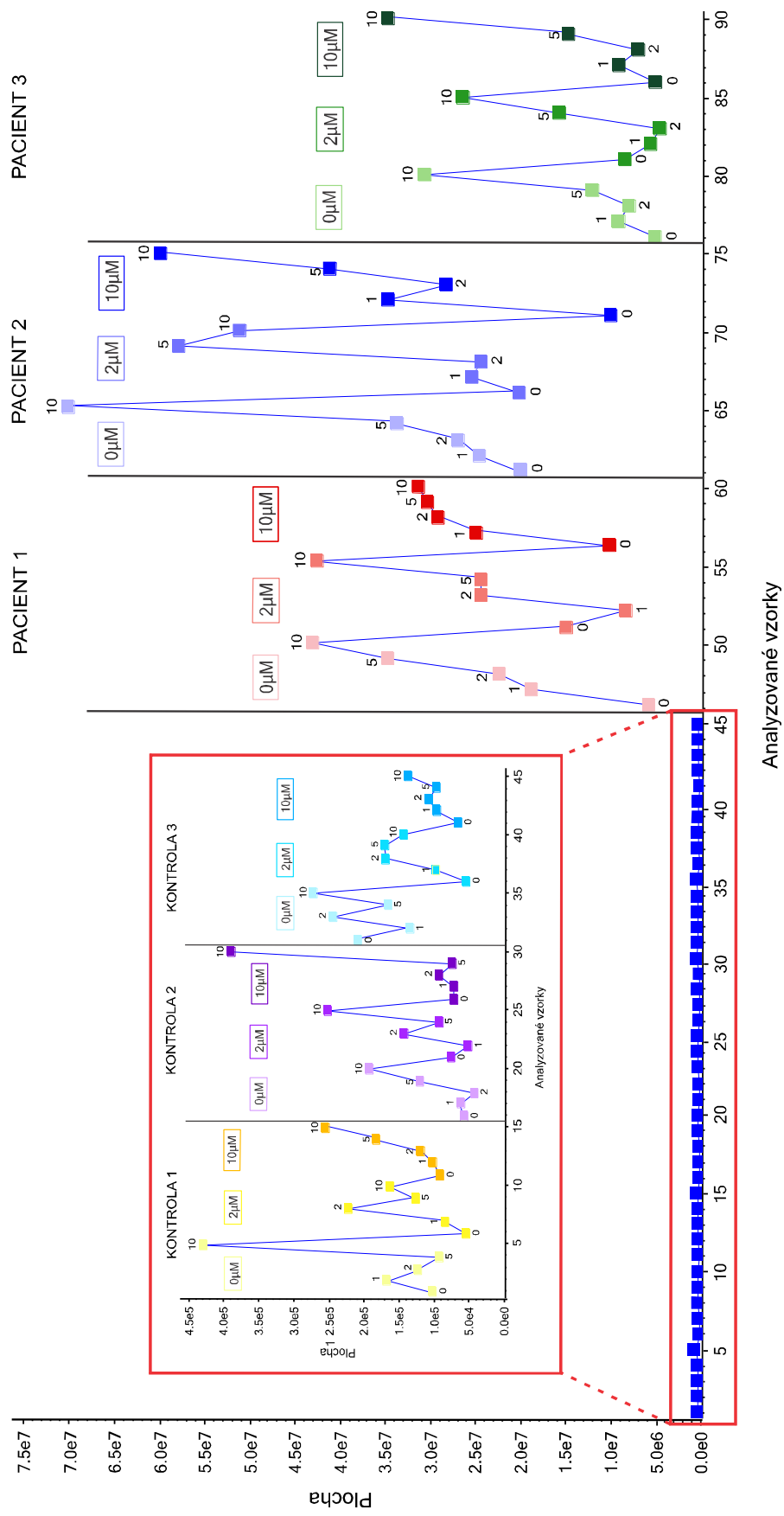
Příloha 1A: MS parametry pro jednotlivé metabolity – negativní mód

Metabolit	DP	EP	CE	CXP
pantotenát	-75	-10	-20	-7
2-oxoadipát	-40	-10	-18	-5
oxalát	-45	-10	-14	-9
malát	-35	-10	-20	-7
fumarát; kaproát	-38	-10	-13	-7
citrulin	-40	-10	-16	-9
citrát/isocitrát	-40	-10	-18	-11
fenylacetaldehyd/merkaptopyruvát	-80	-10	-29	-9
3-sulfinoalanin	-35	-10	-16	-7
4-hydroxybenzaldehyd	-15	-10	-32	-9
hexosy – Glu Fru Gal Man	-40	-10	-12	-9
ATP; dGTP	-75	-10	-40	-13
AMP	-90	-10	-46	-13
laktát	-30	-10	-16	-7
ribitol; arabitol	-38	-10	-24	-9
taurin	-45	-10	-28	-7
glukonát	-40	-10	-18	-11
salicylát/4-hydroxybenzoát	-35	-10	-22	-7
uracil	-35	-10	-22	-11
pseudouridin	-35	-10	-20	-11
uridin	-95	-10	-22	-11
ethanolamin fosfát	-20	-10	-16	-7
arginin	-55	-10	-22	-17
GDP	-95	-10	-36	-13
GMP	-45	-10	-26	-11
IMP	-60	-10	-28	-5
ITP	-60	-10	-48	-13
UDP	-70	-10	-34	-9
UTP	-80	-10	-48	-13
ADP	-95	-10	-32	-11
UDP-D-galaktosa/UDP-glukosa	-75	-10	-34	-21
UDP-N-acetyl-D-glukosamin	-85	-10	-38	-29
G-6-P/F-6-P; G-1-P/Gal-1-P	-30	-10	-22	-9
G-1-P/Gal-1-P; G-6-P/F-6-P	-40	-10	-58	-9
2'.3'-cCMP	-50	-10	-22	-7
2-hydroxyglutarát	-25	-10	-16	-13
N-acetyl-L-alanin	-5	-10	-16	-11
hydrocinamát	-50	-10	-14	-11
fenylacetát	-35	-10	-12	-9

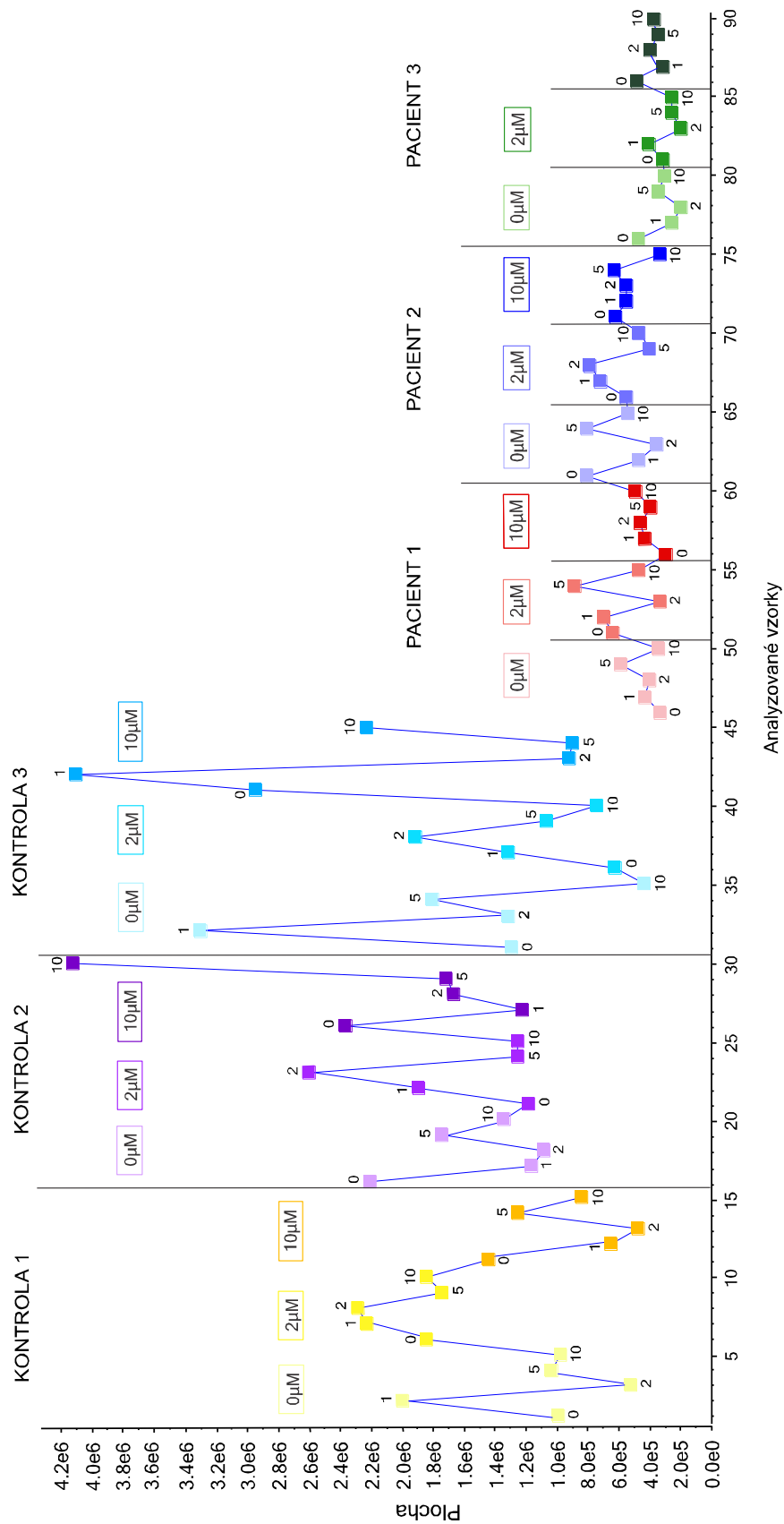
Příloha 1B: MS parametry pro jednotlivé metabolity – pozitivní mód

Metabolit	DP	EP	CE	CXP
C14	86	10	45	15
C16	84	10	51	15
C4	46	10	29	15
C5	46	10	29	15
C6	56	10	27	15
tyrosin	46	10	19	12
threonin/homoserin	41	10	15	8
serin	16	10	15	8
methionin	41	10	15	10
histidin	46	10	19	10
glutamát	41	10	23	8
cysteát	96	10	27	12
alanin/sarkosin; beta-alanin	51	10	23	6
spermin	66	10	17	12
N-acetylserotonin	101	10	21	14
hippurát	36	10	19	10
4-guanidinobutanoát	51	10	21	10
N-methylhistamin	56	10	19	10
betain	161	10	39	8
3-methylhistidin; N-methylhistidin	46	10	21	14
AMP	116	10	27	14
N,N-dimethylglycin/2-aminoisobutyrate	63	10	18	8
pyridoxin	121	10	29	12
kynurenin	56	10	21	10
riboflavin	11	10	33	20
adenin	171	10	31	14
inosin	81	10	21	12
adenosin	41	10	67	10
guanosin	51	10	27	14
kreatinin	46	10	15	10
nikotinamid	1	10	27	8
2-aminofenol	71	10	29	6
5-aminolevulinát; kreatin	61	10	19	8
GMP	36	10	25	14
IMP	31	10	19	12
cytidin	31	10	27	10
FAD	1	10	31	30
CMP-N-acetylneuraminát	56	10	19	28
karnitin	56	10	23	10
glutathion disulfid	56	10	27	42
glutathion	41	10	17	16

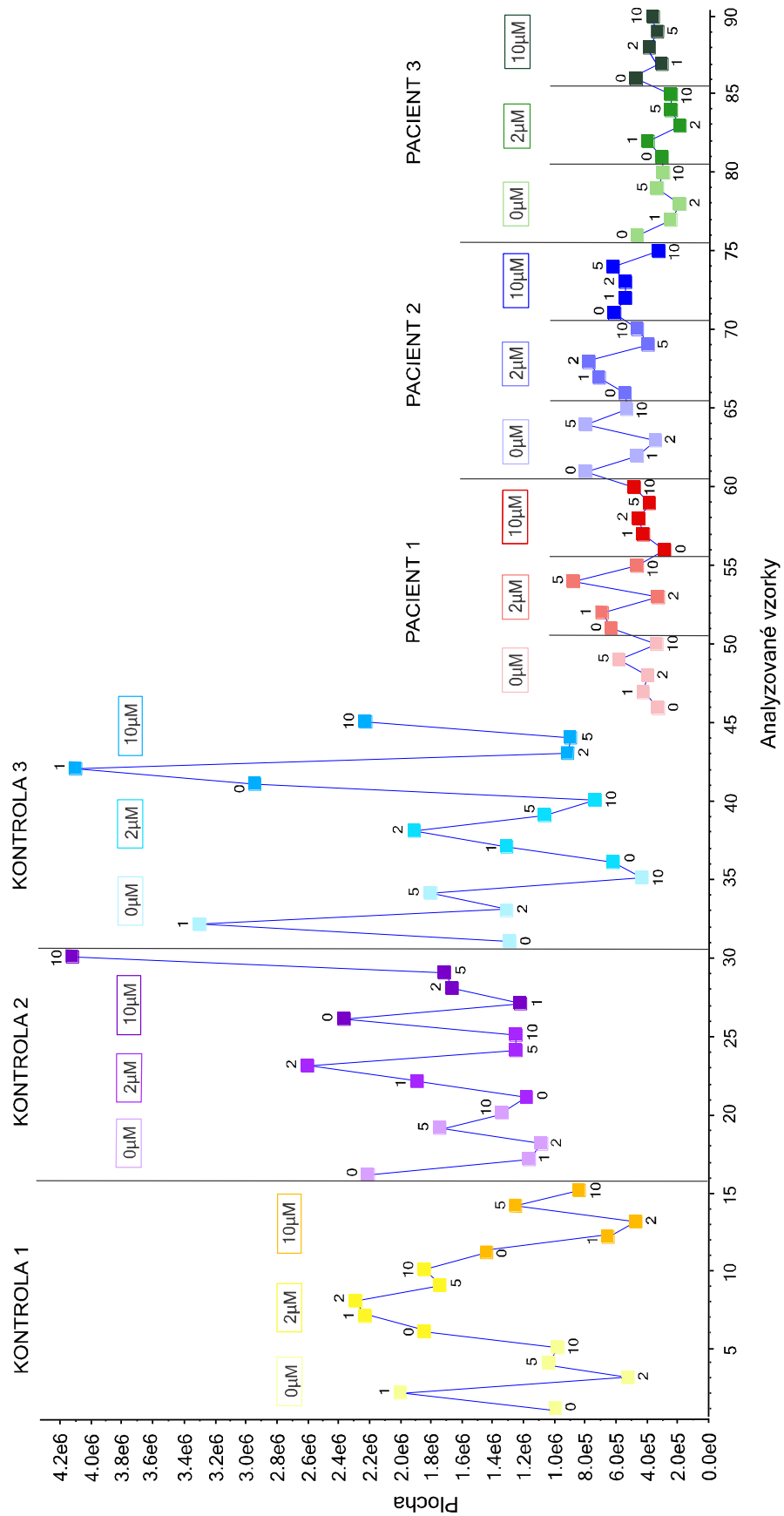
acetyl-CoA	36	10	41	26
N-acetylglukosamin; N-acetylgalaktosamin; N-acetylmannosamin	41	10	23	16
trigonelin	1	10	29	10
AICAr	61	10	31	10



Příloha 2: Zpracování metabolitu threoninu/homoserinu v programu MultiQuant. Popis v textu viz výše.



Příloha 3: Zpracování metabolitu salicylátu/hydroxybenzaldehydu v programu MultiQuant. Pozorována vyšší intenzita u kontrol oproti pacientům (vzorky barevně odlišeny).



Příloha 4: Zpracování metabolitu citrátu/isocitrátu v programu MultiQuant. Pozorována srovnatelná intenzita u kontrol i pacientů (vzorky barevně odlišeny).