

**Univerzita Palackého v Olomouci**

**Bakalářská práce**

**Olomouc 2019**

**Eliška Haasová**

**Univerzita Palackého v Olomouci**  
**Přírodovědecká fakulta**  
**Katedra buněčné biologie a genetiky**



**Souvislost klinické odpovědi pacientů  
s chronickou myeloidní leukemií  
s hladinami metabolitů léčiv**

**Bakalářská práce**

**Eliška Haasová**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

**Olomouc 2019**

**Vedoucí práce: doc. RNDr. David Friedecký, Ph.D.**

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením doc. RNDr. Davida Friedeckého, Ph.D. a za využití citované literatury.

V Olomouci

Eliška Haasová

## Souhrn

Chronická myeloidní leukémie je maligní myeloproliferativní onemocnění s charakteristickým výskytem tzv. Filadelfského chromozomu, který vzniká následkem translokace částí chromozomu 9 na chromozom 22. Takto vzniká fúzní onkogen *BCR-ABL*, při jehož translaci vzniká tyrozinkináza Bcr-Abl. Cílená terapie pomocí inhibitorů tyrozinkináz (imatinib, nilotinib, dasatinib) způsobila přelom v léčbě této nemoci. Inhibitory tyrozinkináz vykazují velký úspěch při léčbě chronické myeloidní leukémie, avšak ani tento typ léčby se neobejde bez řady vedlejších účinků. U imatinibu je jedním z vedlejších účinků selhání ledvin u části pacientů. Existuje pouze málo studií, které se tímto problémem zabývají. Jako možné příčiny selhání ledvin, které tyto studie navrhují, jsou akutní tubulární nekróza, Fanconiho syndrom nebo blokace receptorů růstového faktoru odvozeného z trombocytů.

V experimentální části této bakalářské práce byly srovnány metabolické profily dvou skupin pacientů s chronickou myeloidní leukémií na léčbě imatinibem. U první skupiny pacientů byla pravděpodobnost selhání ledvin minimální, tato skupina sloužila jako kontrolní, u druhé skupiny bylo naopak riziko selhání ledvin velmi vysoké. Hlavním kritériem u vzorků pro analýzu byly hodnoty glomerulární filtrace. Hodnoty glomerulární filtrace u zdravého pacienta se pohybují okolo  $1,5 \text{ ml} \cdot \text{s}^{-1}$ , čímž nižších hodnot glomerulární filtrace dosáhne, tím je riziko selhání ledvin vyšší. Vzorky plazem pacientů byly analyzovány vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií ve spojení s tandemovým hmotnostním spektrometrem. Získaná data u jednotlivých metabolitů byla mezi sebou porovnána pomocí Studentova t-testu a krabicových grafů. Bylo zjištěno, že většina metabolitů imatinibu u skupiny s nízkými hodnotami glomerulární filtrace je tvořena ve vyšších koncentracích než u skupiny kontrolní.

## Summary

Chronic myeloid leukemia is a malignant myeloproliferative disease with characteristic presence of the Philadelphia chromosome, which is created by translocation of part of the chromosome 9 and chromosome 22. This creates the fusion oncogene *BCR-ABL*. Translation of this gene causes a formation of tyrosinkinase Bcr-Abl. Target therapy with inhibitors of tyrosinkinasis (imatinib, nilotinib, dasatinib) brought about a turn in the treatment of this illness. Inhibitors of tyrosinkinases show a big success in the treatment of chronic myeloid leukemia, however this treatment is not without side effects. One of the imatinib's side effect is renal failure in the part of the patients. Only few of studies, dealing with those problematic, exist. The possible causes of the renal failure proposed by those studies, are acute tubular necrosis, Fanconi syndrome or the blocation of the platelet-derived growth factor receptors.

In the experimental part of this bachelor thesis we compared metabolic profiles of two groups of patients with chronic myeloid leukemia on the imatinib treatment. The probability of renal failure in the patients from the first group was minimum, this group acted as a control group, on the contrary the second group created an elevated risk of renal failure. The main standard in samples used for analysis was the value of glomerula filtration. The value of glomerular filtration of healthy patients is around  $1,5 \text{ ml}\cdot\text{s}^{-1}$ , the lower the value of glomerular filtration, the higher the risk of the renal failure. The samples of plasmas of the patients were analysed with high performance liquid chromatography tandem with a mass spectrometer. The received datas of the individual metebolites were compared among each other using Student t-test and boxplots. It was discovered, that most of the metabolites of imatinib in the group with low values of glomerular filtration are formed in a higher concentration than those metabolites in a control group.

## Poděkování

Ráda bych poděkovala svému vedoucímu, doc. RNDr. Davidu Friedeckému, Ph.D., za jeho odborné vedení a cenné rady a připomínky při zpracování této bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Kateřině Mičové, Ph.D. za její velkou pomoc, ochotu, trpělivost a veškeré rady při vypracování této bakalářské práce. Mé díky také patří Mgr. Radaně Karlíkové, Ph.D. za velkou pomoc při přípravě vzorků a zpracování dat, a také za její vstřícnost a pomoc při vypracování této bakalářské práce. Také bych chtěl poděkovat všem pracovníkům Laboratoře dědičných metabolických poruch za jejich pomoc a ochotu.

# Obsah

Souhrn .....	ii
Summary .....	iii
Poděkování.....	iv
Obsah .....	v
Seznam symbolů a zkratek .....	vi
1. ÚVOD .....	1
2. CÍLE PRÁCE .....	2
3. LITERÁRNÍ PŘEHLED .....	3
3.1 Chronická myeloidní leukémie .....	3
3.1.1 Rizikové faktory a příčiny onemocnění .....	4
3.1.2 Filadelfský chromozom a <i>BCR-ABL</i> gen .....	4
3.1.3 Fáze a symptomy CML .....	5
3.1.4 Léčba CML .....	6
3.2 Metabolizace léčiv .....	12
3.3 Vysokoučinná kapalinová chromatografie .....	13
3.4 Hmotnostní spektrometrie .....	14
4. MATERIÁL A METODY .....	16
4.1 Biologický materiál .....	16
4.2 Použité chemikálie, soupravy a roztoky .....	16
4.2.1 Použité chemikálie .....	16
4.3 Seznam použitých přístrojů a zařízení.....	16
4.4 Seznam použitého software .....	17
4.5 Použité experimentální a vyhodnocovací postupy .....	17
4.5.1 Výběr vzorků pro analýzu .....	17
4.5.2 Příprava zásobního roztoku .....	18
4.5.3 Příprava vzorků .....	18
4.5.4 Příprava vzorků kontroly kvality .....	18
4.5.5 Příprava blanku .....	18
4.5.6 Měření pomocí HPLC-MS/MS.....	18
5. VÝSLEDKY .....	20
5.1 Výběr vzorků pro analýzu .....	20
5.2 Analýza vzorků pomocí HPLC-MS/MS.....	23
5.3 Vyhodnocení výsledků analýzy .....	27
6. DISKUZE .....	36
7. ZÁVĚR .....	38
8. LITERATURA .....	39
9. PŘÍLOHY .....	44

## Seznam symbolů a zkratek

ABL	gen na 9. chromozomu (gen Abelsonovy myši leukémie)
AKN	akutní tubulární nekróza
ATP	adenosintrifosfát
BCR	gen na 22. chromozomu (breakpoint cluster region)
BUS	busulfan
CE	kolizní energie
CML	chronická myeloidní leukémie
CNS	centrální nervová soustava
CUR	clonící plyn
CV	variační koeficient
CXP	výstupní potenciál na kolizní cele
DDR	discoidin doménový receptor
decarb	dekarboxylovaný
des/demethyl	demetylovaný
desat	desaturovaný
didesat	didesaturovaný
diox	dioxidovaný
DMSO	dimethylsulfoxid
DP	deklasterizační potenciál
EP	vstupní potenciál
GF	glomerulární filtrace
glu	glukuronid
gly	glycin
GS1	zmlžující plyn
GS2	sušící plyn
HLA	histokompatibilní systém leukocytárních antigenů
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High Performance Liquid Chromatography)
HU	hydroxyurea
ICR	iontově cyklotronová rezonance
IMA	imatinib



INF- $\alpha$	interferon- $\alpha$
KIT	receptor pro faktor kmenových buněk
LC	kapalinová chromatografie (Liquid Chromatography)
LLC	kapalinová rozdělovací chromatografie
LSC	kapalinová adsorpční chromatografie
MALDI	ionizace laserem za přítomnosti matrice (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization)
MF	mobilní fáze
MRM	sledování produktu rozpadu molekulárního iontu (multiple reaction monitoring)
MS	hmotnostní spektrometrie (Mass Spectrometry)
ox	oxidovaný
PDGFR	receptory růstového faktoru odvozeného z trombocytů (Platelet Derived Growth Factor Receptor)
Ph	Filadelfský chromozom
QC	vzorky kontroly kvality
SF	stacionární fáze
TKB	transplantace kmenových buněk
TK	tyrozinkinázy
TKI	inhibitory tyrozinkináz
TOF	detektor doby letu (Time of Flight)
val	valin

# 1. ÚVOD

Chronická myeloidní leukémie (CML) je myeloproliferativní onemocnění s typickou translokací části chromozomu 9 na chromozom 22 (tzv. Filadelfský chromozom), zároveň vzniká fúzní gen *BCR-ABL*. Protein Bcr-Abl, který vzniká přepisem tohoto fúzního genu, má zvýšenou tyrozinkinázovou aktivitu, jež narušuje signalizační dráhy, což vede k nekontrolovatelné proliferaci buněk.

Imatinib (IMA) je první z řady inhibitorů tyrozinkináz (TKI), které jsou využívány jako nejnovější léčba pacientů s CML. Na rozdíl od předchozích typů léčby TKI působí specificky, blokuje vazebné místo pro ATP na onkoproteinu Bcr-Abl, čímž zabraňuje fosforylaci tyrozinkinázových zbytků proteinů. Díky tomu léčba pomocí TKI dosahuje výborných výsledků, přesto však není zcela bez vedlejších účinků. Jedním z vedlejších účinků je akutní nebo chronické selhání ledvin u části pacientů léčených IMA (viz Marcolino *et al.*, 2011).

Cílem experimentální části této práce je srovnání metabolického profilu IMA u skupiny pacientů s CML na léčbě IMA s konstantní hodnotou glomerulární filtrace (GF) během dlouhodobé léčby IMA se skupinou pacientů s postupně klesajícími hodnotami GF během léčby IMA značící postupné selhávání funkce ledvin. K získání profilu metabolitů byla využita vysokoúčinná kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií.

## **2. CÍLE PRÁCE**

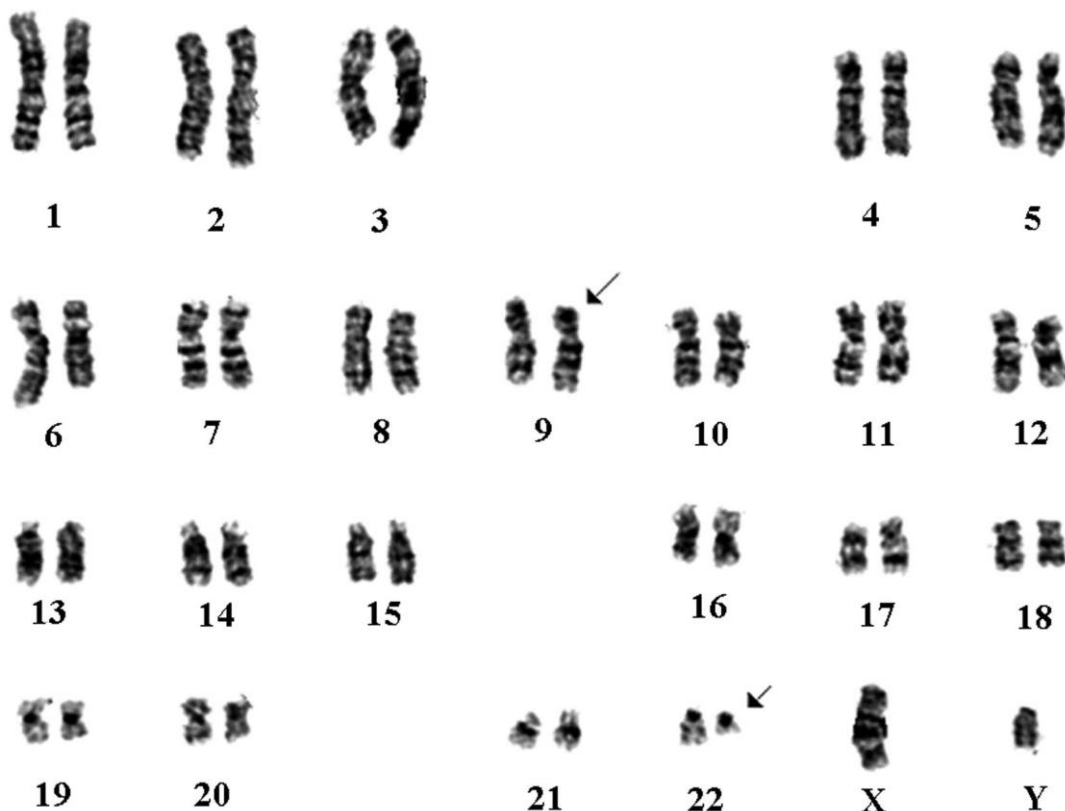
- ❖ Vypracování rešerše na téma: Chronická myeloidní leukemie (CML) a její léčba, hmotnostní spektrometrie a vysokoúčinná kapalinová chromatografie.
- ❖ Analýza vzorků plasmy pacientů s CML léčených tyrozinkinázovými inhibitory pomocí kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií s vysokým rozlišením.
- ❖ Vyhodnocení metabolického profilu léčiva u jednotlivých pacientů.
- ❖ Organizace klinických dat pacientů.
- ❖ Statistické vyhodnocení a následná interpretace výsledků.

### 3. LITERÁRNÍ PŘEHLED

#### 3.1 Chronická myeloidní leukémie

Chronická myeloidní leukémie (CML) je klonální myeloproliferativní onemocnění, které je charakterizováno výskytem tzv. Filadelfského chromozomu (Ph) a leukemického fúzního onkogenu *BCR-ABL*. Filadelfský chromozom slouží jako marker pro diagnostiku CML a vyskytuje se u nejméně 90 % nemocných (viz Obrázek 1) (Kantarijian *et al.*, 2002).

Ze všech typů leukémií CML tvoří asi 15 až 20 %. Incidence onemocnění se udává v rozsahu od 1,0 do 1,5 na 100 000 obyvatel za rok. Zavedení specifické léčby pomocí inhibitorů tyrozinkináz (TKI) na přelomu 20. a 21. století došlo ke zvýšení míry přežití pacientů více než dvojnásobně (Faber *et Urbanová* 2010).



Obrázek 1: Karyotyp člověka s CML (šipkou vyznačena translokace t(9;22)) (Liu *et al.*, 2016)

### 3.1.1 Rizikové faktory a příčiny onemocnění

Příčiny CML jsou nejasné, existuje však řada rizikových faktorů, které mohou k onemocnění přispívat. Jedním z nich je vysoký věk. Ze všech případů CML jsou jen 3 % pacienti v dětském věku a 10 % v adolescentním věku (Faber *et Urbanová* 2010). Medián věku onemocněných CML 66 let (Cortes *et al.*, 2016).

Dalším z rizikových faktorů je obezita. Obézní pacienti ve věku 25 let mají riziko CML zvýšeno až čtyřnásobně, pacienti s obezitou ve věku 40 let mají toto riziko zvýšeno až pětinašobně (Strom *et al.*, 2009).

Rizikové faktory mohou být i enviromentální, kdy u jedinců podrobených expozici jaderného záření (a to včetně terapeutického) byl zaznamenán zvýšený výskyt CML (Cortes *et al.*, 2016). Důkazem tohoto tvrzení je zvýšený výskyt leukemie u přeživších atomového bombardování v japonských městech Nagasaki a Hirošima na konci druhé světové války (Masanobu, 1962).

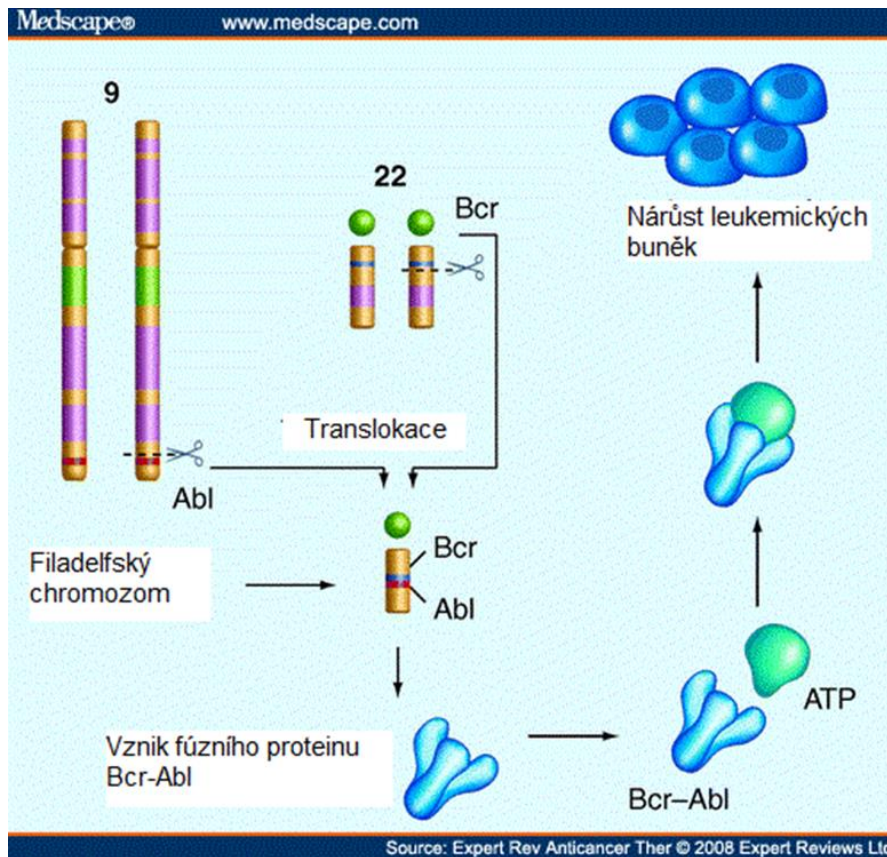
Riziko je spojeno i se životostí pacienta. Kromě zmíněné obezity představuje výrazný rizikový faktor i kouření (při porovnání silného kuřáka, který vykouří více jak 21 cigaret denně s nekuřákem) (Kabat *et al.*, 2013).

### 3.1.2 Filadelfský chromozom a *BCR-ABL* gen

Roku 1960 byl popsán vědcem Peterem C. Nowellem za spolupráce s Davidem Hungerfordem na univerzitě ve Filadelfii malý abnormálně vypadající chromozom, který se nacházel pouze v leukocytech pacientů s CML (Nowell *et Hngerford*, 1960).

Na základě tohoto objevu se předpokládalo, že právě tato genetická anomálie by mohla být příčinnou růstové výhody leukemických buněk. S rozvíjející se technikou bylo zjištěno, že abnormální chromozom je výsledkem chromozomální translokace dlouhých ramen chromozomů 9 a 22. Útvar byl nazván Filadelfský chromozom. Molekulárním důsledkem této reciproké translokace je vznik chimérického fúzního genu *BCR-ABL* (viz Obrázek 2) (Stam *et al.*, 1985).

Fúzní gen *BCR-ABL*, nacházející se na Ph, exprimuje onkoproteiny Bcr-Abl (existují izoformy p210, p190 a p 230), které mají zvýšenou tyrozinkinázovou aktivitu. Tyto aberantně aktivované tyrozinkinázy (TK) narušují signalizační dráhy v organismu, což má za následek zvýšení proliferace, zastavení diferenciace buněk a rezistenci vůči buněčné smrti. S objasněním struktury proteinu Bcr-Abl byly vyvinuty specifické TKI, díky čemuž došlo k rozvoji léčby CML (Li *et al.*, 1999).



Obrázek 2: Vznik Filadelfského chromozomu a fúzního proteinu Bcr-Abl a jeho vliv na růst leukemických buněk (upraveno dle Ruriko *et Shinya*, 2008)

### 3.1.3 Fáze a symptomy CML

Klinický průběh nemoci lze rozdělit na tři fáze, a sice na fázi chronickou, akcelerovanou a blastickou. Nejčastějším symptomem je přítomnost Ph, který se vyskytuje až u 95 % pacientů. Dalšími příznaky jsou například únava, ztráta hmotnosti, pocit plnosti, krvácivost, purpura, zvětšení sleziny, leukocytóza, chudokrevnost, myeloidní hyperplazie kostní dřeně a trombocytóza. V 50 % případů je nález CML náhodný (Faderl *et al.*, 1999).

Nejčastěji dochází k postupu z chronické fáze CML do fáze akcelerace s následujícím blastickým zvratem. Avšak asi u 1/3 pacientů se fáze akcelerace nevyskytuje a hned po chronické fázi dochází k náhlému blastickému zvratu (Faber, Indrák *et al.*, 2010).

**Chronická fáze** je obvykle nejdelší (trvá v průměru 3 až 5 let) a nejlépe odpovídající na léčbu. Hladina leukocytů se pohybuje okolo  $>50 \cdot 10^9/l$ , hladina blastů mezi 1 až 15 %, úroveň hemoglobinu je normální či mírně snižena, úroveň krevních destiček může být jak normální, tak i vysoká či nízká. Příznaky jsou únava, ztráta hmotnosti, pocit plnosti, krvácivost a purpura (Faderl *et al.*, 1999).

**Akcelerovaná fáze** trvá obvykle 6 až 9 měsíců. Hladina blastů je více než 15 %, úroveň hemoglobinu je nízká, úroveň krevních destiček může být jak vysoká, tak i nízká. Příznaky jsou nevysvětlitelné horečky, bolest kostí a kloubů, zvětšení sleziny a jater, slabost a noční pocení (Faderl *et al.*, 1999).

**Blastická fáze** tvoří s fází akcelerovanou fází pokročilou. Trvá obvykle 3 až 6 měsíců. Hladina blastů je více než 30 %, úroveň hemoglobinu a krevních destiček je velmi nízká. Příznaky jsou těžká chudokrevnost, enormně zvětšená slezina, krvácivost, zvýšení infekcí, nemoci centrální nervové soustavy (CNS) a lymfadenopatie (Faderl *et al.*, 1999).

### 3.1.4 Léčba CML

Historie léčby CML začíná roku 1865, kdy se u pacienta podařilo snížit počet bílých krvinek za pomoci arzenu. Do tohoto roku léčba vůbec neprobíhala a nemocní umírali cca do 3 let od projevů prvních symptomů. Na počátku 20. století byla zavedena radioterapie, která pouze snížila problémy spojené se zvětšením sleziny, ale k prodloužení života nemocných nevedla. V 50. letech 20. století došlo k zavedení perorální chemoterapie, která způsobila úlevu od bolestí a také prodloužení života pacientů (Žáčková, 2014).

#### 3.1.4.1 Perorální chemoterapie

Perorální chemoterapie byla zavedena v 50. letech 20. století, kdy radioterapii nahradila léčba pomocí busulfanu (BUS). Busulfan je perorální cytostatikum, které snižuje počet leukocytů a také příznaky nemoci u většiny pacientů s CML, způsobuje však četné nežádoucí účinky jako srdeční, plicní a jaterní fibrózu a myelosupresi, proto byl o několik let později nahrazen hydroxyureou (HU). Hydroxyurea inhibuje ribonukleosid-difosfát-reduktázy, které způsobuje narušení syntézy DNA. Oproti BUS má rychlejší nástup účinku a lepší profil

vedlejších účinků. Zároveň, stejně jako BUS, nevyvolává cytogenetickou remisi. Nežádoucí účinky způsobované HU jsou myelosuprese, nevolnost, horečka, kožní atrofie a gastrointestinální problémy, při dlouhodobé terapii vředy, lichenoidní dermatie, kožní karcinom skvamózních buněk, gangréna prstů, vaskulitida a život ohrožující plicní problémy (Stone, 2004).

#### **3.1.4.2 Interferon- $\alpha$**

Interferon- $\alpha$  (INF- $\alpha$ ) se stal hlavní metodou léčby CML od 80. let 20. století až do objevení TKI. Díky této léčbě došlo u pacientů k úplně cytogenetické a molekulární odpovědi, což bylo také spojeno s vynikající dlouhodobou prognózou (Mahon *et al.*, 2002).

Interferon- $\alpha$  účinkuje prostřednictvím několika drah zahrnující genovou expresi cytokinů, regulaci buněčného cyklu, diferenciaci, proliferaci a apoptózu. Podněcuje autologní cytotoxické T lymfocyty ke specifickému rozpoznávání *BCR-ABL* či *BCR-ABL*-dependentních antigenů jako je např.: proteináza-3 (Guilhot *et al.*, 2009).

Léčba pomocí INF- $\alpha$  vyvolává také mnoho nežádoucích účinků jako je horečka, zimnice, bolesti hlavy, myalgie, malátnost, anorexie, nevolnost, zvracení a průjem. Obvykle tyto nežádoucí účinky vymizí při pokračující léčbě nebo mohou být překonány pomocí antipyretik. Dalšími nežádoucími účinky jsou psychologické a nervové problémy včetně deprese (Masuda, 2004).

#### **3.1.4.3 Alogenní transplantace kmenových buněk**

Alogenní transplantace je proces přenosu živých buněk, tkáně či orgánu z donorového do akceptorového organismu téhož druhu s co možná nejbližší genetickou výbavou. Kromě transplantace alogenní existují i další typy: autologní, kdy donorem a akceptorem je tentýž organismus a syngenní, kdy transplantace probíhá mezi jednovaječnými dvojčaty (Tinková, 2007).

K započetí léčby pomocí alogenní transplantace kmenových buněk (TKB) došlo v 60. letech 20. století s objevem histokompatibilního systému leukocytárních antigenů (HLA). Dříve byla tato léčba dosažitelná pouze pro děti s HLA identickým sourozencem, dnes se ale díky registru dobrovolných dárců kostní dřeně stala standartním léčebným postupem. Při vybírání vhodných dárců se kromě úrovně HLA shody mezi dárcem a příjemcem sleduje i např. věk, pohlaví, hmotnost, krevní skupina atd. Před alogenní TKB je pacient podroben



intenzivní mnohadenní chemoterapii (někdy v kombinaci s ozářením), při kterém je jeho imunitní systém oslaben a dochází k poškození maligních buněk a ke snížení jejich počtu. Dále dochází k TKB, které jsou získány z kostní dřeně. Transplantace kmenových buněk probíhá pomocí nitrožilní infuze. Poté jsou pacientovi podávány imunosupresiva, které zmenší riziko imunitní reakce štěpu proti tkáním hostitele. Alogenní TKB se pro léčbu CML používá až v případě, kdy intenzivní chemoterapie se ukáže jako nedostatečně účinnou léčbou. Výhodou transplantace je její účinnost, nese však vysoké riziko časných a pozdějších komplikací jako je poškození tkání a orgánů (katarakty, sklerodermie, aseptické nekrózy atd.), psychické problémy a infekce (Sedláček *et* Říha, 2014).

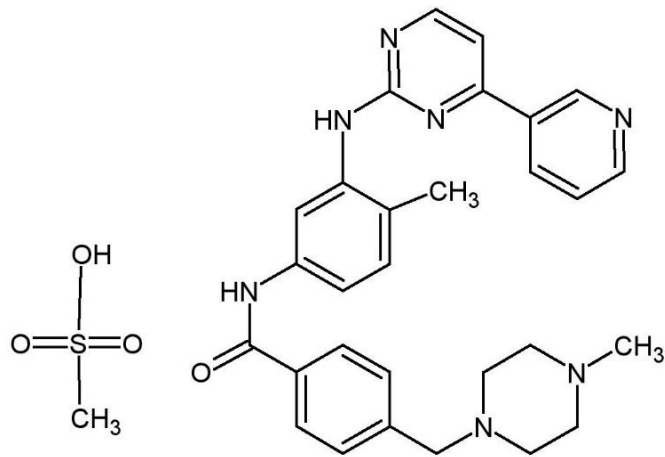
#### **3.1.4.4 Inhibitory tyrozinkináz**

Inhibitory tyrozinkináz v léčbě CML byly zavedeny na přelomu 20. a 21. století a znamenaly výrazný pokrok v její léčbě. Dosahují lepších výsledků než výše zmíněné léky a vedou k dlouhodobé cytogenetické, hematologické a molekulární remisi. Staly se tak primárním léčebným postupem u pacientů s CML (Özen *et al.*, 2017).

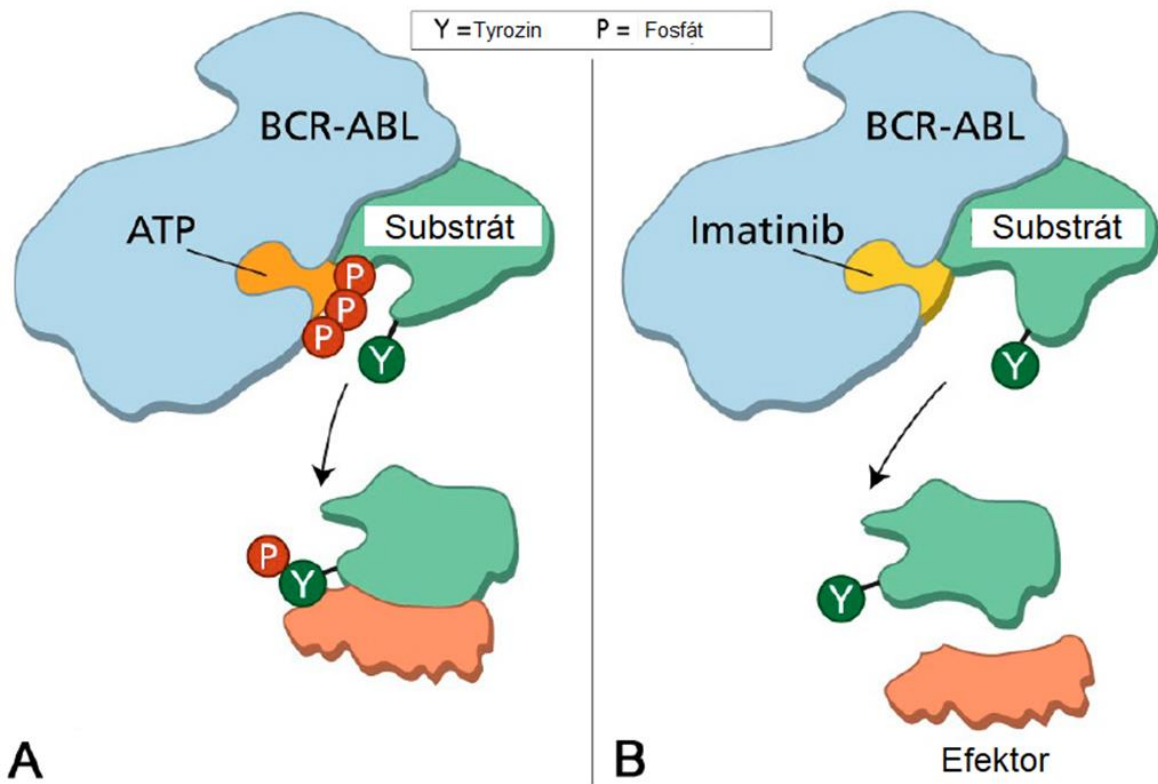
#### **Imatinib (Glivec)**

Imatinib je prvním zavedeným TKI v léčbě CML, tudíž je o jeho účinnosti a vedlejších účincích dostupných nejvíce informací ze všech TKI (Negrin *et* Schliffer, 2018).

Imatinib mezylát je derivát 2-fenylaminopyrimidinu, který se používá k cílené terapii u pacientů s CML v chronické nebo akcelerované fázi či v blastické krizi (viz Obrázek 3). Působí na maligní buňky, u kterých je zvýšená patologická TK aktivita v důsledku vysoké exprese genu *BCR-ABL* na Filadelfském chromozomu. Fúzní gen *BCR-ABL* kóduje enzym TK Bcr-Abl. Tento enzym přenáší fosfátovou skupinu z donorové molekuly (ATP) na molekulu cílovou, čímž aktivuje řadu proteinů důležitých při proliferaci a diferenciaci hematopoetických buněk. Imatinib mezylát specificky inhibuje TK Bcr-Abl tím, že se naváže na vazebné místo pro ATP, čímž ho zablokuje a zabrání tak procesu fosforylace, což má za následek zpomalení proliferace u maligních buněk (viz Obrázek 4). Kromě této funkce dokáže IMA blokovat receptory růstového faktoru odvozeného z trombocytů (PDGFR) a kinázovou aktivitu c-kit (Lyseng-Williamson *et* Blair, 2001).



Obrázek 3: Strukturální vzorec imatinib mezylátu (vytvořeno v programu ChemSketch)



Obrázek 4: Mechanismu účinku IMA; A: mechanismus působení TK Bcr-Abl (na obrázku označen jako Substrát); B: inhibiční funkce IM A (upraveno dle Goldman *et* Mughal, 2013)

Standartní dávka pro pacienty s CML je 400 až 800 mg za den (dávky nad 600 mg jsou u pokročilejší fáze CML). Imatinib mezylát s sebou nese i možné nežádoucí účinky, přestože je u většiny pacientů dobře snášen. Tyto nežádoucí účinky mohou být neutropenie, trombocytopenie, bolesti svalů, kostí a kloubů, problémy trávicího traktu (např.: diareta, nevolnost atd.), otoky dolních končetin, obličeje a víček a potenciální hepatotoxicita spojená s poškozením jater. V případě selhání nebo intolerance léčby je IMA nahrazen jiným TKI (Turjap *et al.*, 2015).

Dalším nežádoucím účinkem, který je hlavním tématem této bakalářské práce, je selhání ledvin spojené se snížením hodnot GF. Nedávno bylo dokázáno, že léčba pomocí IMA vyvolává akutní selhání ledvin či chronické selhání ledvin u části pacientů s CML. Důvod snížení hodnot GF a selhání ledvin u těchto pacientů není známý a mnohé studie se zabývají hypotézami příčiny těchto komplikací. Některé studie prokázaly spojitost mezi zvýšeným rizikem selhání ledvin a vyšším věkem pacientů s CML, diabetem, hypertenzí a také předchozí léčbou INF- $\alpha$  (Marcolino *et al.*, 2011). Některé studie indikují, že selhání ledvin má za následek akutní tubulární nekróza (AKN) (Pou *et al.*, 2003). Jiné studie naznačují, že selhání ledvin je spojeno s Fanconiho syndromem (François *et al.*, 2008).

Jak bylo již zmíněno, IMA dokáže blokovat PDGFR. Některé studie uvádějí, že blokace PDGF dráhy může způsobit selhání ledvin. Expres PDGF- $\beta$  byla zaznamenána v proximálních tubulech a v mesangiových a vmezeřených buňkách. Na zvířecích modelech bylo prokázáno, že osa PDGF- $\beta$ /PDGFR má důležitou roli při regeneraci renálních tubulárních buněk po AKN. Pomocí inhibice PDGFR může IMA interferovat s tubulárními opravnými mechanismy (Takikita-Suzuki *et al.*, 2003).

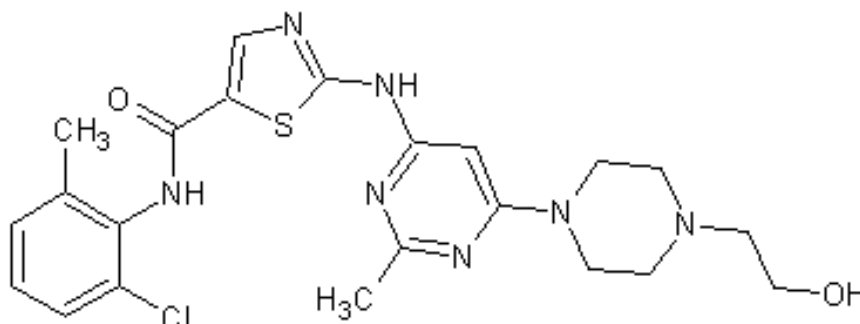
Imatinib mezylát se z trávicího traktu absorbuje velmi rychle a účinně, maximální plazmatické koncentrace dosahuje za 2 až 4 hodiny po užití léku. Jeho biologická dostupnost je 98 %, asi z 95 % je vázán na proteiny plazmy. Jeho biotransformace na N-demethylovaný biologicky aktivní metabolit probíhá v játrech za účasti různých typů cytochromů. Je vylučován převážně stolicí a močí. Biologický eliminační čas IMA je asi 18 hodin, 40 hodin u jeho hlavního metabolitu (Lyseng-Williamson *et Blair*, 2001).

## Dasatinib

Dasatinib (BMS-354825) (viz Obrázek 5) se k léčbě CML používá od roku 2006 a má stejně jako IMA inhibiční aktivitu Bcr-Abl. K léčbě CML se používá v případě rezistence či intolerance k IMA (Baker S. J. *et* Reddy E. P., 2010).

Pro nezmutovaný *BCR-ABL* je *in vitro* 325x účinnější než IMA, čímž může překonat rezistenci vůči IMA zapříčiněnou zvýšenou expresí *BCR-ABL*. Selhání léčby pomocí IMA je nejčastěji způsobeno mutací genu *BCR-ABL*, kterou v některých případech dokáže dasatinib inhibovat. Dasatinib inhibuje také kinázy z rodiny Src, c-Kit, PDGFR a Epherin A receptor. Doporučená denní dávka je 100 až 140 mg. Je převážně metabolizován v játrech (Stein *et* Smith, 2010).

Ačkoliv je dasatinib obvykle velmi dobře snášen, vyskytují se u pacientů (převážně na počátku léčby) některé nežádoucí účinky jako cytopenie, zadržování tekutin, pleurální výpotky, dušnost, poruchy trávicího traktu (průjem, nauzea atd.), kožní vyrážka, problémy se srdcem, bolest hlavy, krvácení, horečka a únava (Conchon *et al.*, 2011).



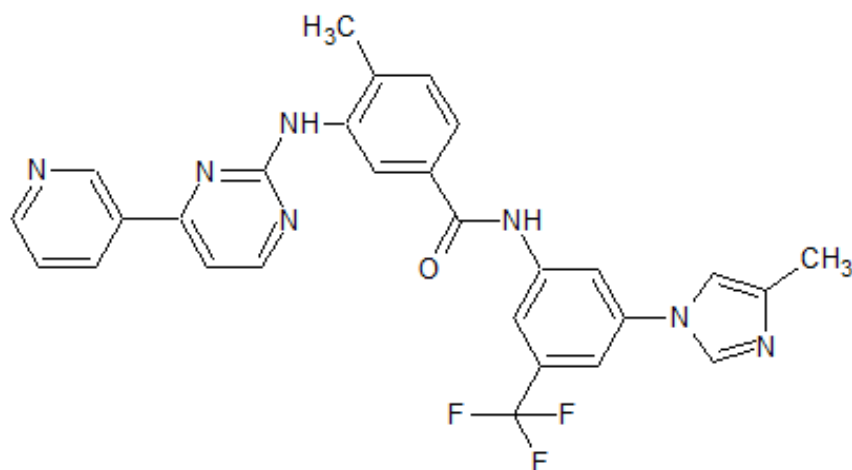
Obrázek 5: Strukturální vzorec dasatinibu (vytvořeno v programu ChemSketch)

## Nilotinib

Nilotinib (viz Obrázek 6), dříve známý jako AMN107, je derivát fenylaminopyrimidinu, který byl navržen na základě krystalové struktury IMA ve vazbě s TK Bcr-Abl, a to pro léčbu CML v případě rezistence pacientů k IMA. Nilotinib, kromě inhibice Bcr-Abl, působí na discoidin doménový receptor (DDR), receptor pro faktor kmenových buněk (KIT) a PDGFR (Weisberg *et al.*, 2005).

Standartní denní dávka je 400 mg dvakrát denně. Nilotinib je vesměs dobře tolerován, ale mohou se vyskytnout nežádoucí účinky jako vyrážka, průjem, bolest hlavy a krvácení (Kantarijan *et al.*, 2011).

Nově se i diskutuje o spojitosti léčby nilotinibem s vyšším výskytem diabetu, zvýšenou hladinou tuku v krvi a výskytem mozkového infarktu (Racil *et al.*, 2013).



Obrázek 6: Strukturální vzorec nilotinibu (vytvořeno v programu ChemSketch)

### 3.2 Metabolizace léčiv

Metabolismus léčiv zahrnuje jejich absorpci, distribuci, biotransformaci a eliminaci. Metabolizace probíhá pomocí mnoha reakcí, které společně tvoří metabolickou dráhou. Ta se skládá ze dvou fází (fáze I a fáze II). Fáze I zahrnuje tzv. funkcionalizační reakce, jimiž jsou oxidace, redukce, hydrolýza, hydratace a isomerizace. Fáze II zahrnuje tzv. konjugační reakce, kterými jsou glukosidace, sulfonace, metylace, acetylace, kondenzace, konjugace s aminokyselinami, s glutationem a s mastnými kyselinami. V I fázi dochází v molekule metabolizovaných xenobiotik k zavádění nové funkční skupiny (např. hydroxylové nebo karboxylové) a k pozměnění dosavadních funkčních skupin na polárnější, a to převážně za účasti enzymů cytochromu P450. Ve II fázi dochází ke spojení mezi novou skupinou s původním xenobiotikem či s jejím metabolitem prostřednictvím transferáz. Některé reakce v této fázi způsobují zvýšení polarity, což má za následek zvýšení exkrece xenobiotika. Jiné reakce ukončí léčebnou aktivitu xenobiotika, další reakce slouží jako ochrana proti reaktivním metabolitům. Důležitou roli při metabolizaci mají také transportní proteiny, které se zapojují při příjmu a výdeji xenobiotik v různých tkáních. Jejich indukce a inhibice způsobuje vznik interakcí, které vyvolávají nežádoucí účinky či vymizení účinku léčiv (Vokřál, 2012).

### 3.3 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

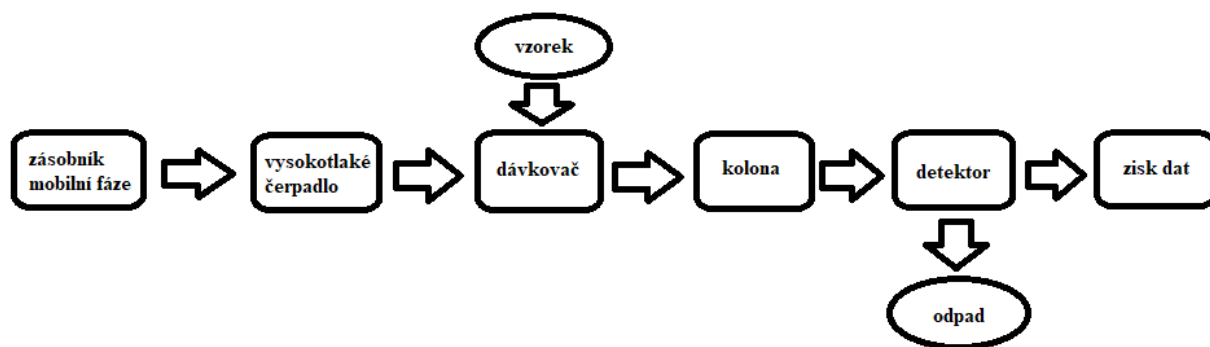
Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) je kvantitativní a kvalitativní analytická separační metoda založená na rozdílné distribuci analytu mezi stacionární a mobilní fází za vysokého tlaku. Mobilní fáze (MF) je kapalina, jež je vysokotlakovým čerpadlem vháněna do chromatografického přístroje. Stacionární fáze (SF) je ukotvená v koloně a MF jí protéká. Analyt je po nástřiku do chromatografického systému unášen MF přes separační kolonu až k detektoru. Mezi SF a MF dochází k neustálému ustavování rovnováhy při rozdělávání složek směsi (tento jev lze popsat tzv. distribuční konstantou) (Růžička, 2017).

Metoda HPLC má řadu výhod, k nimž patří vysoká rychlost a citlivost stanovení, potřeba malého množství vzorku a možnost automatizace. Mobilní fáze u HPLC musí být čistá, bez rozpuštěných plynů a s vhodnou eluční účinností. U chromatografie s reverzní fází se jako MF nejčastěji používá voda s metanolem či s acetonitrilem. Je-li složení MF stále během celé analýzy, jedná se o isokratickou eluci, pokud se mění poměr jednotlivých složek MF, jde o gradientovou eluci (Lukšíková, 2009).

Jako SF se u HPLC používá pevná látka nebo film kapaliny, který je ukotvený na nosiči. Stacionární fáze můžeme dělit dle více parametrů. Nejstarší dělení je dle skupenství na tuhé (mluvíme pak o kapalinové adsorpční chromatografii – LSC) a kapalné (mluvíme pak o kapalinové rozdělovací chromatografii – LLC). Stacionární fáze má mít určité vlastnosti, a sice musí být tepelně a chemicky stabilní, nesmí reagovat s MF a nesmí se v MF rozpouštět. Nejčastěji se jako SF fáze používá silikagel (Nováková *et* Douša, 2013).

Přístroj pro HPLC se nazývá kapalinový chromatograf a skládá se z 5. hlavních částí: z vysokotlakového čerpadla, které zabezpečuje nepřetržitý průtok MF ostatními částmi chromatografického přístroje, dále z dávkovače, který zajišťuje nástřik kapalných vzorků do přístroje (používá se např.: injekční ventil, automatické dávkovače atd.), z kolony vyrobené z nekorozivního materiálu (nejčastěji ocel), ve které se nachází SF, a na které závisí selektivita a účinnost separace, z detektoru s vysokou citlivostí (např.: spektrofotometrické, fluorimetrické, elektrochemické detektory atd.) a ze systému pro sběr a vyhodnocování dat pro analýzu signálů vycházejících z detektoru. Dále může HPLC zahrnovat přídatná zařízení (např.: termostat, přídatné filtry atd.) (viz Obrázek 7) (Matysová, 2006).

Výstupem HPLC je množství píků, které představují jednotlivé látky ve vzorku. Dle velikosti plochy píku můžeme stanovit množství dané látky ve vzorku (Růžička, 2017).



Obrázek 7: Obecné schéma HPLC systému.

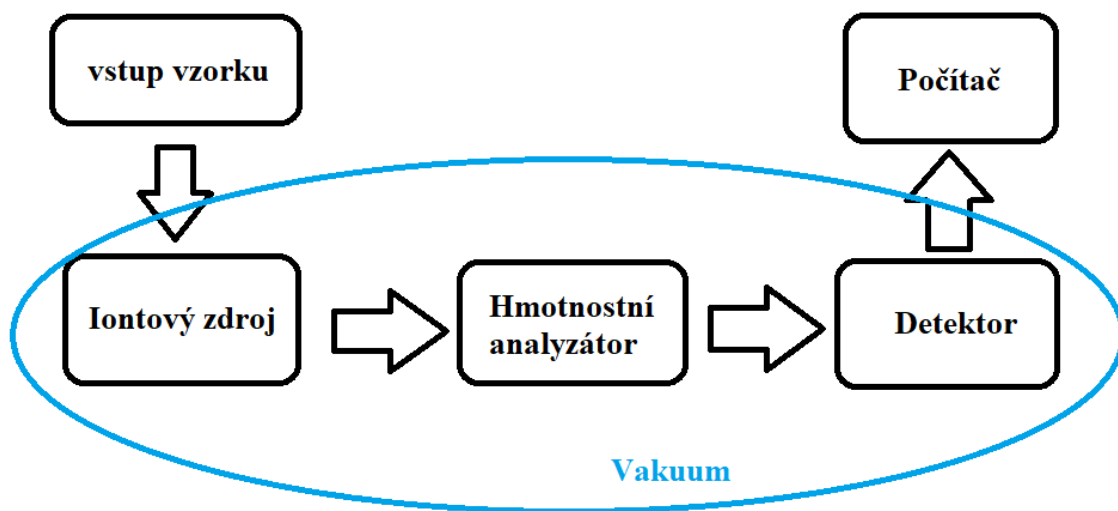
### 3.4 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie (MS) je v současné době jedna z nejvíce používaných analytických technik. Tato technika disponuje vysokou citlivostí, selektivitou a rychlostí, ale také velkou složitostí a vysokou cenou (Schwab *et* Eberlin, 2012).

Počátky MS jsou spojeny s fyziky J. J. Thomsonem a F. W. Astonem, kteří vypracovali elementární instrumentaci MS. Tato technika prošla velkým vývojem a v současné době má velikou škálu využití (např.: povrchová analýza, anorganická elementární analýza, organická strukturní analýza, sekvencování biopolymerů, mini analyzátory ve vesmírných sondách atd.). Jednotlivé MS metody jsou od sebe velmi odlišné, ale mají stejný základ, a sice měření vlastností nabitých částic v plynné fázi (McLafferty, 2008).

Hmotnostní spektrometrie je založena na interakci iontů s elektrickým či magnetickým polem ve vakuu. Hmotnostní spektrometr sestává ze tří hlavních částí, a sice z iontového zdroje, analyzátoru a detektoru částic (viz Obrázek 8). Iontový zdroj vytváří pozitivně či negativně nabitě molekulární nebo aduktové částice v plynné fázi. Existuje více typů ionizačních technik, které rozdělujeme na měkké (k fragmentaci téměř nedochází – chemická ionizace, elektrosprej, ionizace laserem za účasti matrice (MALDI), ...) a tvrdé (vzniká řada fragmentů – elektronová ionizace). Další součástí je hmotnostní analyzátor, v němž dochází k rozdělení nabitých částic ve vakuu dle poměru jejich hmotnosti ( $m$ ) k náboji ( $z$ ), tedy  $m/z$ . Tyto analyzátory využívají magnetické, statické či dynamické elektrické pole či jejich kombinaci. Analyzátory dělíme dle způsobu separace iontů. Kvadrupólové analyzátory neustále rozdělují ionty a posílají ty s konkrétním poměrem  $m/z$  k detektoru. U průletových analyzátorů Time of Flight (TOF) dochází k separaci nabitých částic v letové trubici díky rozdílnému času letu k detektoru. Iontové pasti, orbitální pasti (Orbitrap) a iontové cyklotronová rezonance (ICR) zadržují nabitě částice v pasti nebo v cele, navíc Orbitrap a ICR reprezentuje sestavu analyzátoru s detektorem

s využitím Fourierovy transformace. Poslední částí je detektor, který zaznamenává analyzátozem vybrané ionty a transformuje jejich signál do digitální formy. Detektory nejčastěji rozdělujeme dle jejich schopnosti záznamu nabitých částic a sice detektory, jež neberou v úvahu velikost  $m/z$  iontů a zaznamenávají všechny ionty (měří velikost elektrického proudu vzniklého při srážce elektronu s dynodou a zesíleného za pomoci násobičů), a detektory jejichž záznam iontů je spojený s velikostí na jejich  $m/z$ , kterými jsou výše zmíněné analyzátozem spojené s detektory ICR a Orbitrap (Friedecký *et* Lemr, 2012).



Obrázek 8: Obecné schéma MS systému



## 4. MATERIÁL A METODY

### 4.1 Biologický materiál

Jako biologický materiál byla k analýze použita krevní plazma pacientů s diagnózou CML užívající IMA. Vzorky plazmy pacientů byly získány z Hemato-onkologického oddělení Fakultní nemocnici v Olomouci. Do analýzy byly uchovávány při -20 °C.

### 4.2 Použité chemikálie, soupravy a roztoky

#### 4.2.1 Použité chemikálie

- ❖ dimethylsulfoxid (DMSO) 99,7% (Sigma-Aldrich, USA, kat.č. D2650)
- ❖ ethanol 70% (Sigma-Aldrich, USA, kat.č. 793213)
- ❖ LC-MS Chromasolv voda (Sigma-Aldrich, USA, kat.č. 39253)
- ❖ destilovaná voda
- ❖ kyselina mravenčí 98% (Honeywell Fluka, Německo, kat.č. 56302)
- ❖ acetonitril 99,9% LC-MS Chromasolv (Honeywell Riedel-de Haën, Německo, kat.č. 34967)
- ❖ methanol 99,9% (Honeywell Riedel-de Haën, Německo, kat.č. 34966)
- ❖ hydroxid amonný 25% (Sigma-Aldrich, USA, kat.č. 30501)
- ❖ stabilně značený standard imatinibu D8IMA (LC Laboratories, USA, kat.č. I5577)

### 4.3 Seznam použitých přístrojů a zařízení

- ❖ třepačka MS3 basic (IKA, Německo)
- ❖ centrifuga minispin (Eppendorf, Německo)
- ❖ magnetická míchačka RH basic (IKA, Německo)
- ❖ pH metr Orion Star A111 (Thermo Fisher Scientific, USA)
- ❖ analytické váhy ABT 120-5DM (KERN, Německo)
- ❖ kapalinový chromatograf Dionex Ultimate 3000 (Thermo Fisher Scientific, USA)
- ❖ tandemový hmotnostní spektrometr Triple Quad 6500 (SCIEX, Framingham, USA)

## 4.4 Seznam použitého software

- ❖ Analyst 1.6.2 Software (SCIEX, USA)
- ❖ Dionex Chromatography MS Link 2:12.0.3414 (Thermo Fisher Scientific, USA)
- ❖ MultiQuant Software 3.0.5373.0 (SCIEX, USA)
- ❖ Microsoft Office Excel 2016
- ❖ R software 2.15.3 ([www.r-project.org](http://www.r-project.org))
- ❖ Statistica 13.4.0.

## 4.5 Použité experimentální a vyhodnocovací postupy

### 4.5.1 Výběr vzorků pro analýzu

1. Vzorky plazem vhodné pro analýzu byly vybrány na základě hodnot GF u pacientů s CML na léčbě IMA
2. Vzorky plazem byly rozděleny do 8. skupin:
  - ❖ **1. skupina:** hodnoty GF: cca  $1,5 \text{ ml} \cdot \text{s}^{-1}$ ; denní dávka IMA: 300-400 mg; doba užití IM před odběrem: cca 20 hod;
  - ❖ **2. skupina:** hodnoty GF: cca  $1,5 \text{ ml} \cdot \text{s}^{-1}$ ; denní dávka IMA: 300-400 mg; doba užití IM před odběrem: cca 15 hod;
  - ❖ **3. skupina:** hodnoty GF: cca  $1,5 \text{ ml} \cdot \text{s}^{-1}$ ; denní dávka IMA: 300-400 mg; doba užití IM před odběrem: cca 10 hod;
  - ❖ **4. skupina:** hodnoty GF: cca  $1,5 \text{ ml} \cdot \text{s}^{-1}$ ; doba užití IMA před odběrem: v podobný čas u 7 vzorků téhož pacienta;
  - ❖ **5. skupina:** hodnoty GF: snižující se nebo nízké; denní dávka IMA: 400 mg; doba užití IM před odběrem: cca 20 hod;
  - ❖ **6. skupina:** hodnoty GF: snižující se nebo nízké; denní dávka IMA: 400 mg; doba užití IM před odběrem: cca 15 hod;
  - ❖ **7. skupina:** hodnoty GF: snižující se nebo nízké; denní dávka IMA: 300-400 mg; doba užití IM před odběrem: cca 10 hod;
  - ❖ **8. skupina:** hodnoty GF: snižující se nebo nízké; doba užití IMA před odběrem: v podobný čas u 7 vzorků téhož pacienta;

Vzorky ze skupin 1. až 4. měly konstantní hodnoty GF a sloužily jako kontroly pro analýzu. Hodnoty GF u vzorků pacientů ze skupin 5. až 8. postupně klesaly nebo byly nízké, u těchto pacientů bylo predikováno postupné selhání funkce ledvin.

#### **4.5.2 Příprava zásobního roztoku**

1. Stabilně značený standard D8IMA byl rozpuštěn v DMSO o získané koncentraci 1 mg/ml.
2. Koncentrace zásobního roztoku byla upravena přidáním methanolu na konečnou koncentraci 200 ng/ml.

#### **4.5.3 Příprava vzorků**

1. 150  $\mu$ l připraveného zásobního roztoku (viz odstavec 4.5.2) bylo smícháno s 50  $\mu$ l plazmy (celkem 195 vzorků)
2. Získaná směs v mikrozkuvkách byla zvortexovaná a deproteinovaná přes noc na -80 °C.
3. Poté byly vzorky zcentrifugovány 15 min při 12000 rpm a 4°C.
4. Pro analýzu bylo odebráno 100  $\mu$ l supernatantu z každého vzorku do HPLC vialek.

#### **4.5.4 Příprava vzorků kontroly kvality**

1. Vzorky kontroly kvality (QC) byly připraveny odebráním 10  $\mu$ l supernatantu z každého vzorku do mikrozkuvky (provedlo se zároveň při 4. kroku přípravy vzorků).
2. Vzorky QC byly centrifugovány 5 min při 1200 rpm.
3. Po centrifugaci byly QC vzorky rozděleny do HPLC vialek po 100  $\mu$ l v každé vialce.

#### **4.5.5 Příprava blanku**

1. Vzorek blanku byl připraven smísením 50  $\mu$ l LC-MS vody s 150  $\mu$ l zásobního roztoku.
2. Blank byl zcentrifugován 5 min při 12000 rpm.
3. Poté bylo odebráno 100  $\mu$ l do HPLC vialek.

#### **4.5.6 Měření pomocí HPLC-MS/MS**

1. Všechny vzorky plazmy všech 8 skupin byly analyzovány v jedné analýze. Vzorky QC byly použity pro prvních 5 nástřiků ke stabilizaci systému a také jako každý sedmý nástřik. Vzorky blanku byly analyzovány na začátku, uprostřed a na konci analýzy (viz Tabulka 1).
2. Analýza probíhala na kapalinovém chromatografu Dionex Ultimate 3000 ve spojení s hmotnostním spektrometrem tandem Triple Quad 6500. Separace probíhala na koloně Kinetex C18 (100 $\times$ 2 mm; 1,7  $\mu$ m; Phenomenex, USA) nahřáté na 40 °C. Nástřik vzorků

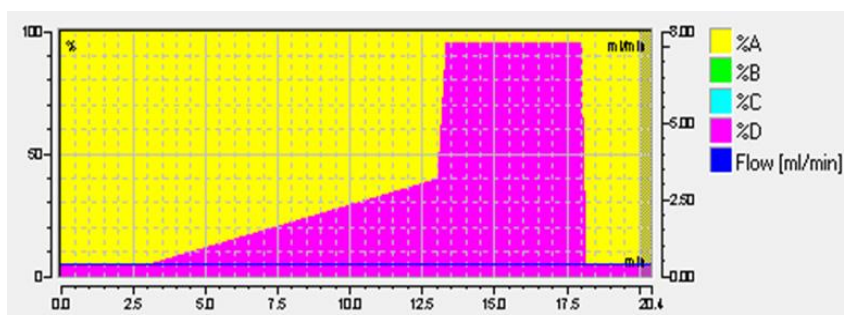
byl 5 µl. Jako MF A byla použita kyselina mravenčí titrovaná hydroxidem amonným na konečné pH 4. Jako MF D byl použit acetonitril.

3. Gradientová eluce při průtoku 0,5 ml/min byla v případě MF D následující: 0–3 min 5 %; 3–13 min lineární gradient z 5 % na 40 %; 13–13,5 min gradient ze 40 % na 95 %; 13,5–18 min 95 %; 18–18,5 min gradient z 95 % na 5 %; 18,5–20 min 5 %; ekvilibrace kolony probíhala 1,5 min. Celková analýza jednoho vzorku trvala 20 min (viz Obrázek 9).
4. Měření na MS bylo provedeno v módu multiple reaction monitoring (MRM), tj. sledováním produktu rozpadu molekulárního iontu. Nastavení iontového zdroje bylo: teplota 500 ° C; napětí 5,5 kV; zmlžující plyn (GS1) 40 psi; sušící plyn (GS2) 40 psi; clonící plyn (CUR) 40 psi.

Tabulka 1: Pořadí analyzovaných vzorků v HPLC-MS/MS

Blank	QC13	vzorky 84-89	QC29	vzorky 183-188
QC1-QC5	vzorky 43-48	QC21	vzorky 137-142	QC38
vzorky 1-5	QC14	vzorky 90-95	QC30	vzorek 189
QC6	vzorek 49	QC22	vzorky 143-146	QC39
vzorky 6-11	Blank	vzorky 96-101	QC31	Blank
QC7	vzorky 50-53	QC23	vzorky 147-152	Blank
vzorky 12-17	QC15	vzorky 102-107	QC32	
QC8	vzorky 54-59	QC24	vzorky 153-158	
vzorky 18-23	QC16	vzorky 108-112	QC33	
QC9	vzorky 60-65	QC25	vzorky 159-164	
vzorky 24-28	QC17	vzorky 113-118	QC34	
QC 10	vzorky 66-71	QC26	vzorky 165-170	
vzorky 25-30	QC18	vzorky 119-124	QC35	
QC 11	vzorky 72-77	QC27	vzorky 171-176	
vzorky 31-36	QC19	vzorky 125-130	QC36	
QC12	vzorky 78-83	QC28	vzorky 177-182	
vzorky 37-42	QC20	vzorky 131-136	QC37	

Pozn.: Pořadí vzorků je znázorněno po sloupcích a vzorky v rámci skupin měly randomizovaná čísla.



Obrázek 9: Schéma gradientové eluce u HPLC

## 5. VÝSLEDKY

### 5.1 Výběr vzorků pro analýzu

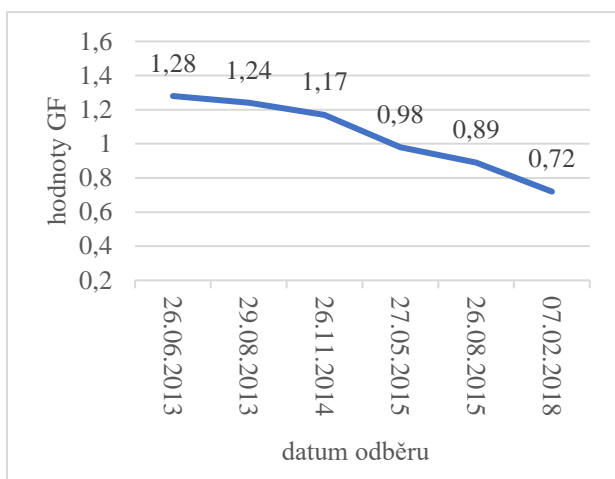
Normální funkci ledvin nebo jejich poškození je možné určit z hodnot GF jednotlivých pacientů. U pacientů bez poškození ledvin se hodnoty GF pohybují okolo  $1,5 \text{ ml}\cdot\text{s}^{-1}$ . Snížení hodnot GF značí poškození ledvin a může vést až k jejich selhání (hodnoty GF méně než  $0,25 \text{ ml}\cdot\text{s}^{-1}$ ). Jeden z vedlejších účinků léčby IMA je selhání ledvin u části pacientů. Pro analýzu byly vybrány vhodné vzorky plazem od pacientů s CML na léčbě IMA. U každého jednotlivého pacienta byly porovnány hodnoty GF mezi všemi jeho vzorky z let 2013 až 2018. Byla sledována změna hodnot GF během léčby, hodnoty GF se zvyšovaly, klesaly či zůstaly konstantní. Také bylo sledováno, s jakými hodnotami GF pacient léčbu započal. Byly vytvořeny dvě skupiny pacientů, první skupina měla hodnoty GF konstantní v čase a pro analýzu sloužila jako kontrolní skupina. Hodnoty GF se pohybovaly kolem  $1,5 \text{ ml}\cdot\text{s}^{-1}$ . U druhé skupiny pacientů byl zaznamenán pokles hodnot GF, což značí postupné selhávání ledvin. Z celkového počtu 269 pacientů bylo vybráno 35 pacientů jako kontrolní skupina a 27 pacientů jako analyzovaná skupina s poškozením ledvin. Užší výběr vhodných vzorků byl proveden na základě ověření dostupnosti daných vzorků, denní dávky IM u jednotlivých pacientů a doby užití IMA před odběrem plazmy. Vzorky pacientů byly rozděleny do 8 skupin (viz Tabulka 2). Finální počet všech použitých vzorků pro analýzu byl 195, kdy bylo použito 107 vzorků z kontrolní skupiny a 88 vzorků ze skupiny s nízkými hodnotami GF.

Tabulka 2: Přehled skupin vzorků pacientů pro analýzu rozdělených na základě hodnot GF, denní dávky IMA a doby užití IMA před odběrem

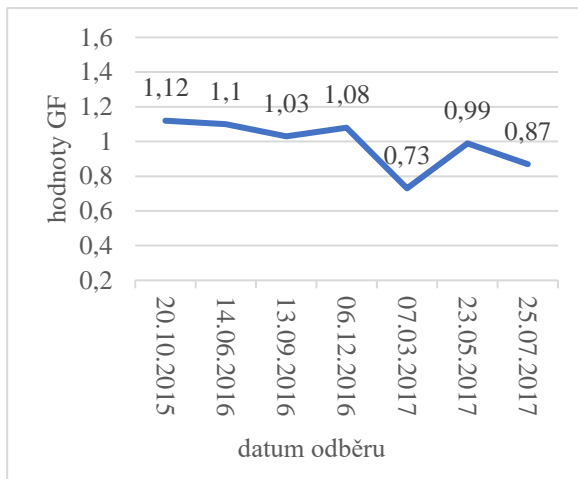
číslo skupiny	hodnoty GF	denní dávka IMA	doba užití IMA před odběrem	počet vzorků ve skupině	počet vzorků od jednoho pacienta
1.	cca $1,5 \text{ ml} \cdot \text{s}^{-1}$	400 mg + 1 vzorek 300 mg	cca 20 hod	12	1
2.	cca $1,5 \text{ ml} \cdot \text{s}^{-1}$	400 mg + 1 vzorek 300 mg	cca 15 hod	7	1
3.	cca $1,5 \text{ ml} \cdot \text{s}^{-1}$	400 mg + 3 vzorky 300 mg	cca 10 hod	11	1
4.	cca $1,5 \text{ ml} \cdot \text{s}^{-1}$	různá	7 vzorků téhož pacienta v podobný čas (20, 15 a 10 hod)	77	7
5.	nízké	400 mg	cca 20 hod	14	1
6.	nízké	400 mg	cca 15 hod	6	1
7.	nízké	300-400 mg	cca 10 hod	2	1
8.	snižující se/nízké	různá	4-7 vzorků téhož pacienta v podobný čas (20, 15 a 4 hod)	66	4 až 7

Skupiny 1. až 4. byly skupiny kontrolní, skupiny 5. až 8. byly skupiny pacientů s nízkými hodnotami GF. U skupin 1. a 5. byl odběr plazmy proveden cca 20 hod po užití IMA pacientem, u 2. a 6. cca 15 hod a u 3. a 7. cca 10 hod. U všech těchto skupin byl vybrán vždy jeden vzorek od jednoho pacienta s denní dávkou IMA 300 až 400 mg. U 4. a 8. skupiny bylo vybráno 4 až 7 vzorků od jednoho pacienta na základě podobné doby užití IMA před odběrem. Seznam všech použitých vzorků pro analýzu s informacemi ohledně denní dávky, přesných hodnot GF, času užití IMA před odběrem, koncentraci IMA v plazmě a data odběru se nachází v příloze (viz Příloha 1). Změna hodnot GF po dobu léčby u jednotlivých pacientů z 8. skupiny je vyobrazena na grafech (viz Obrázek 10 a 11).

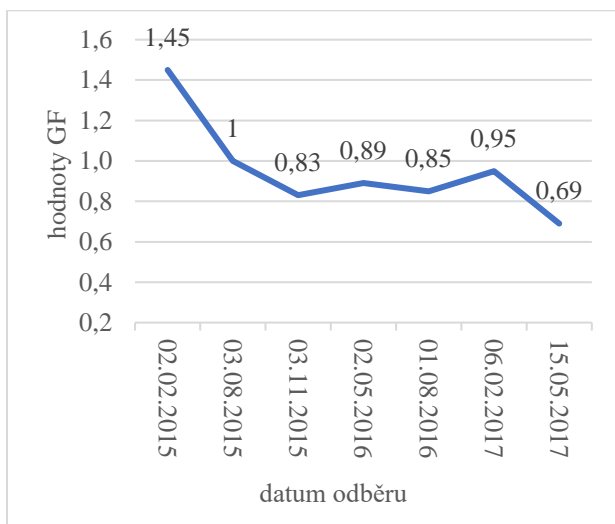
A: pacient Dráb.



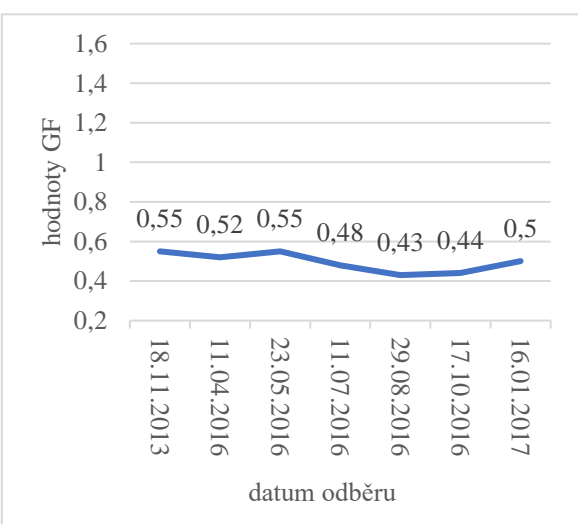
B: pacient Hara.



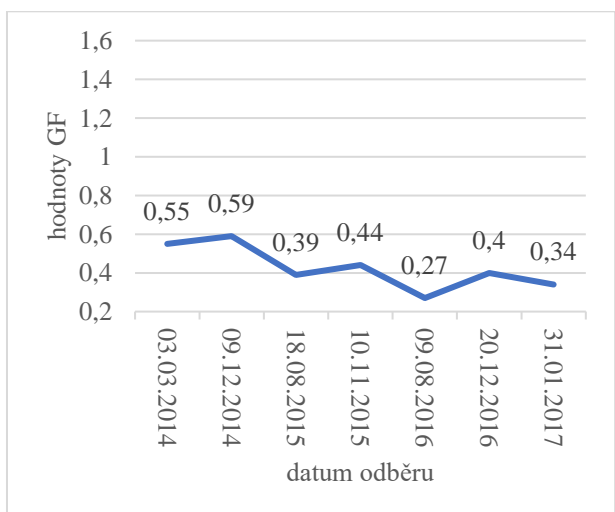
C: pacient Kolo.



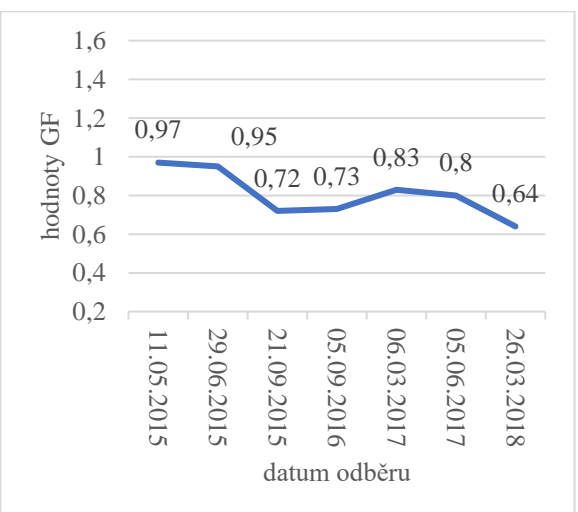
D: pacient Kova.



E: pacient Pitr.



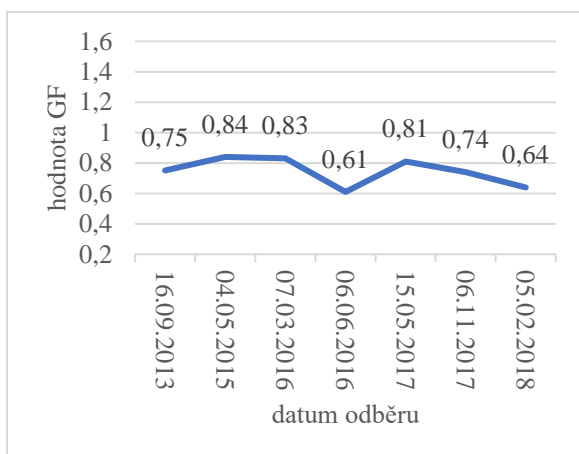
F: pacient Proch. L.



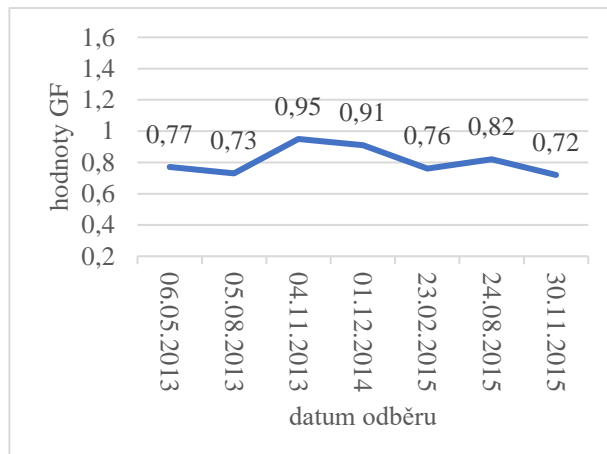
Obrázek 10 (A-F): Vývoj poklesu hodnot GF [ $\text{ml} \cdot \text{s}^{-1}$ ] během léčby pomocí IMA u analyzovaných vzorků pacientů v 8. skupině, pacienti 1 až 6

A: pacient Juli.

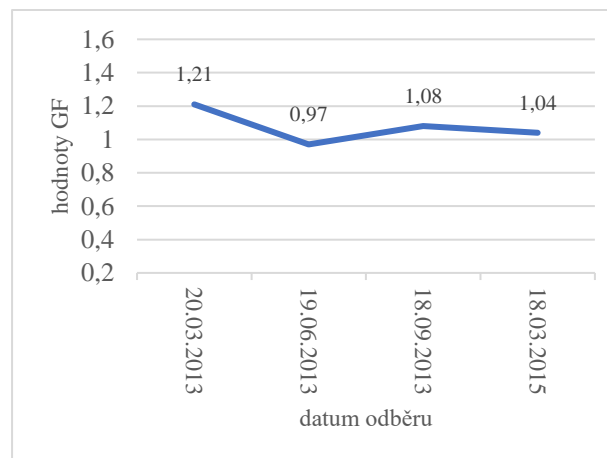
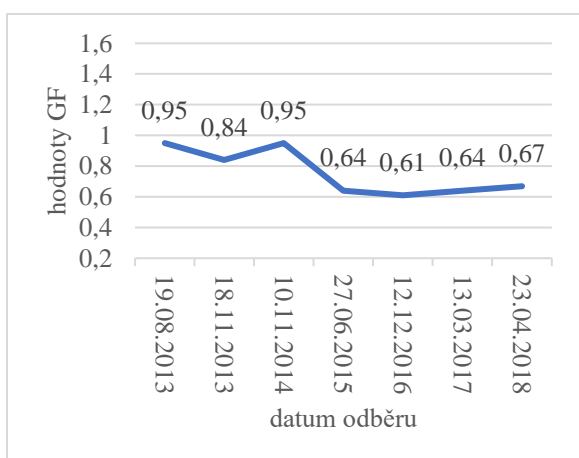
B: pacient Kopa.



C: pacient Tesa.



D: Siek.



Obrázek 11 (A-D): Vývoj poklesu hodnot GF [ $\text{ml} \cdot \text{s}^{-1}$ ] během léčby pomocí IMA u analyzovaných vzorků pacientů v 8. skupině, pacienti 7 až 10

## 5.2 Analýza vzorků pomocí HPLC-MS/MS

U každého vzorku bylo metodou HPLC-MS/MS zaznamenáno 25 biotransformací IMA (viz Tabulka 3). Samotný standard IMA má hmotu  $m/z$  494,3. Některé biotransformace byly z analýzy vyřazeny kvůli velmi malým plochám jejich píků. Finálně byly vyhodnoceny metabolity u 18 biotransformací.



Tabulka 3: Biotransformace IM pomocí HPLC-MS/MS

Kvadrupolový analyzátor Q1 <i>m/z</i>	Kvadrupolový analyzátor Q3 <i>m/z</i>	Čas prodlevy [s]	Biotransformace	DP	EP	CE	CXP
609.2	478.2	20	M609 cysteinový konjugát	100	10	40	15
785.2	609.2	100	M785 glukuronid M609	100	10	40	15
595.2	464.2	100	M595 demethyl M609	100	10	30	15
771.2	595.2	100	M771 glukuronid M595	100	10	40	15
730.2	533.2	100	M730 cystinový konjugát	100	10	40	15
716.2	494.2	100	M716 demethyl M730	100	10	30	15
622.3	228.1	20	M622 demethyl M636	100	10	40	15
636.3	394.2	20	M636 unknown (val-gly konj.)	100	10	60	15
670.3	494.3	20	IMA-glu/des-desat-ox-IMA-glu	100	10	30	15
480.3	394.2	20	des-IMA	100	10	35	15
656.3	480.3	20	des-IMA-glu	100	10	30	15
510.3	410.2	20	ox-IMA I	100	10	35	15
510.3	492.3	20	ox-IMA II	100	10	35	15
510.3	394.2	20	ox-IMA III	100	10	35	15
686.3	510.3	20	ox-IMA-glu	100	10	35	15
496.2	395.2	20	des-ox-IMA I	100	10	40	15
496.2	410.2	20	des-ox-IMA II	100	10	35	15
672.3	496.2	20	des-ox-IMA-glu	100	10	30	15
702.3	526.3	100	diox-IMA-glu	100	10	35	15
478.2	394.2	100	des-desat-IMA	100	10	35	15
508.2	231.1	20	desat-ox-IMA/demethyl 522/met-IMA	100	10	35	15
684.3	508.2	20	desat-ox-IMA-glu/demethyl 522glu	100	10	35	15
524.2	478.2	20	diox-desat-IMA/ox-met-IMA	100	10	30	15
528.3	510.3	20	ox-hydrol-IMA	100	10	35	15
494.3	394.2	20	IMA/des-desat-ox-IMA	100	10	35	15
551.3	508.2	20	gly-IMA	100	10	30	15
642.3	510.3	20	IMA-glu-decarb	100	10	35	15
522.2	394.2	20	M522 diox+didesat	100	10	40	15

Legenda: DP = deklasterizační potenciál

CE = kolizní energie

ox = oxidovaný

glu = glukuronid

diox = dioxidovaný

decarb = dekarboxylovaný

val = valin

EP = vstupní potenciál

CXP = výstupní potenciál na kolizní cele

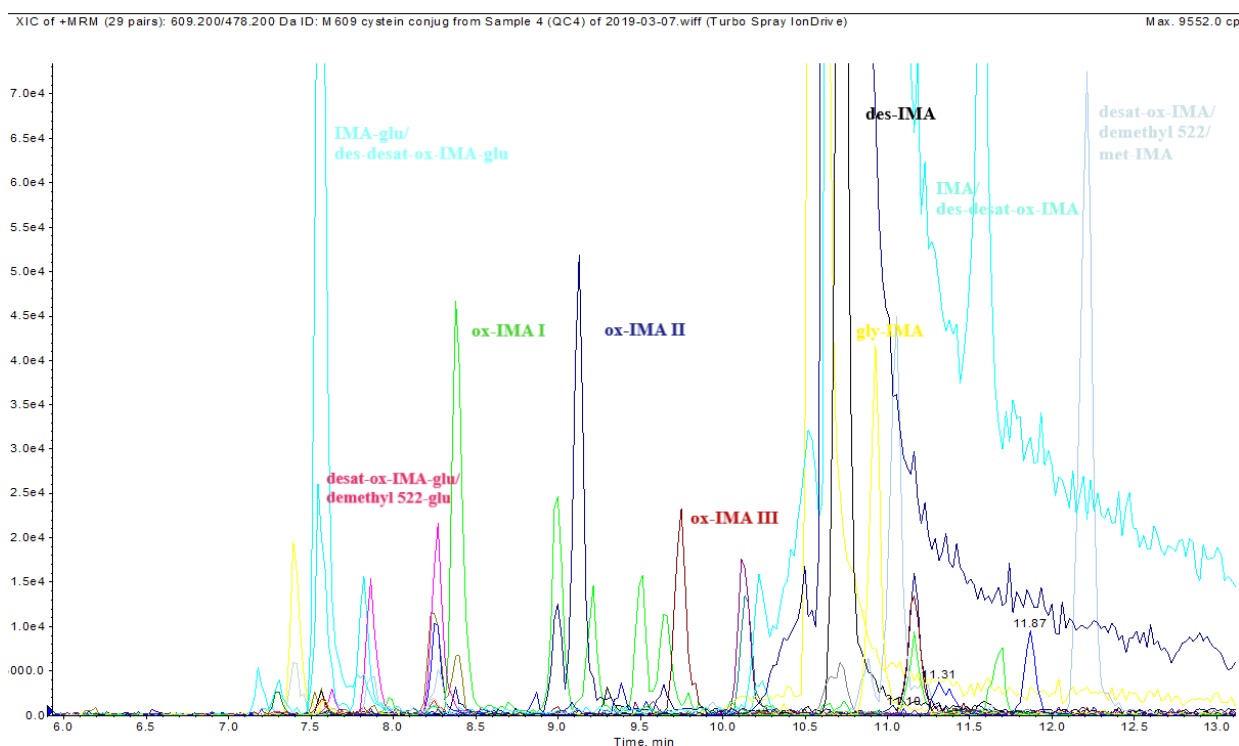
desat = desaturovaný

des/demethyl = demethylovaný

gly = glycin

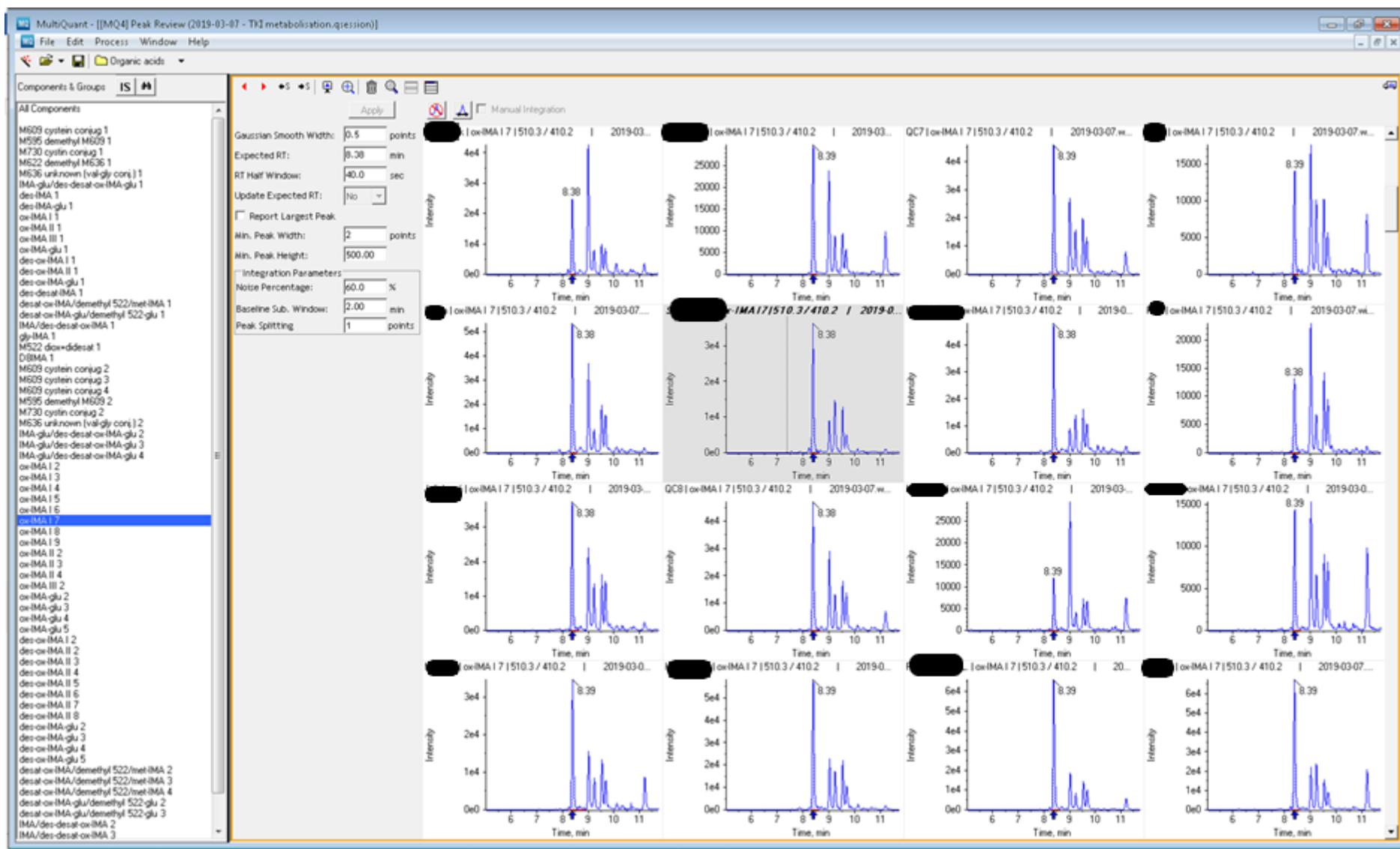
didesat = didesaturovaný

Výstupem analýzy pomocí HPLC-MS/MS je soubor detekovaných analytů ve formě píků. Každý pík reprezentuje jeden vytvořený metabolit (viz Obrázek 12).



Obrázek 12: Chromatografický záznam metabolitů IMA vytvořen v softwaru Analyst

Následně byla provedena integrace plochy píků. Plocha píku vyjadřuje relativní koncentraci daného analytu. U každé biotransformace u vzorku QC13 byly vybrány všechny rozpoznatelné píky, které poté byly srovnány s píky u ostatních vzorků včetně u ostatních QC vzorků a u vzorků blanku (u blanku se nesmí vyskytovat žádné píky, opak by evokoval chybu při analýze). Píky, které se nacházely u většiny vzorků pacientů a QC, byly integrovány pomocí softwaru MultiQuant. Nejprve byly identifikovány jednotlivé metabolity označením danou biotransformací + číslem, které vyjadřuje pořadí v dané biotransformaci (např. ox-IMA I 1). Poté byla plocha daného píku zaznačena u všech vzorků. Takto byly integrovány všechny vzorky analýzy (viz Obrázek 13).



Obrázek 13: Příklad integrace pík v softwaru MultiQuant (na obrázku je uvedena integrace píku s označením ox-IMA I 7)

### 5.3 Vyhodnocení výsledků analýzy

Následně byla na základě integrace získána data, která byla dále zpracována v softwaru „R“. Byla provedena interpolace dat pomocí metody „locally weighted regression“ (LOESS), jejíž cílem bylo odstranění systematické chyby. Následně byl u QC vzorků vypočítán variační koeficient (CV). Metabolity s CV vyšší než 30 % byly z analýzy vyřazeny. Data byla následně logaritmicky transformována.

Dále byly vyselektovány metabolity, které vykazovaly silnou korelační závislost ( $R > 0,95$ ) za účelem eliminace opakujících se metabolitů. Bylo zjištěno, že metabolity se silnou korelací jsou: ox-IMA I/2 s ox-IMA II/1 s hodnotou korelace 0,98; ox-IMA I/1 s ox-IMA-glu 5 s hodnotou korelace 0,95; ox-IMA I/9 s ox-IMA II/4 a s ox-IMA III/2, kdy hodnota korelace u všech kombinací těchto tří píků byla okolo 0,98. Ox-IMA II/1, ox-IMA I/1, ox-IMA I/9 a ox-IMAI/4 byly vyřazeny z vyhodnocování.

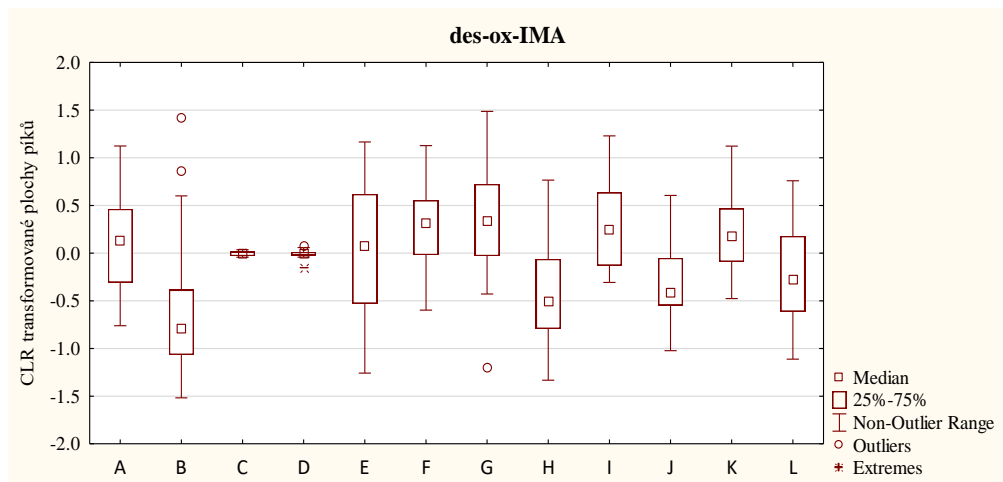
Pomocí nepárového Studentova t-testu byly porovnány koncentrace metabolitů u všech jednotlivých biotransformací u 26 vzorků skupiny pacientů z 5.- 8. skupiny, u kterých byly hodnoty  $GF < 0,64 \text{ ml} \cdot \text{s}^{-1}$  (skupina označena jako skupina GF) s 25 vzorky skupin 1. a 4. – 20 hod (konkrétně kontrolní pacienti s GF hodnotami okolo  $1,5 \text{ ml} \cdot \text{s}^{-1}$  a s dobou užití IMA 20 hod před odběrem, tato skupina označena jako skupina KON) (viz Tabulka 4-18). Nepárový Studentův t-test slouží k porovnání středních hodnot jedné skupiny (pacienti s hodnotami  $GF < 0,64 \text{ ml} \cdot \text{s}^{-1}$ , skupina GF) se středními hodnotami skupiny druhé (kontrolní pacienti, skupina KON). Čím nižších hodnot t-test dosáhne, tím větší je rozdíl mezi koncentrací daného metabolitu mezi skupinou GF a KON. Hodnoty t-testu, které byly nejnižší, byly u těchto metabolitů: 3. metabolit u ox-IMA-glu  $5,11 \cdot 10^{-15}$ ; 3. a 2 metabolit u desat-ox-IMA-glu/demethyl 522-glu  $2,89 \cdot 10^{-13}$ ;  $7,03 \cdot 10^{-12}$ ; 2., 4. a 1. metabolit u des-ox-IMA-glu  $2,15 \cdot 10^{-13}$ ;  $1,14 \cdot 10^{-12}$ ;  $7,75 \cdot 10^{-10}$ ; 1. metabolit u ox-IMA I  $4,26 \cdot 10^{-12}$ ; 3. metabolit u IMA-glu/des-desat-ox-IMA-glu  $1,08 \cdot 10^{-12}$ ; 1. metabolit u biotransformace M730 cystinového konjugátu  $8,29 \cdot 10^{-11}$ ;

Poté byly vytvořeny krabicové grafy (viz Obrázek 14-28) u stejných skupin jako v případě t-testu (skupina GF s GF hodnotami  $< 0,64 \text{ ml} \cdot \text{s}^{-1}$  x skupina KON kontrolní s užitím IMA 20 hod před odběrem). Porovnány byly jednotlivé metabolity biotransformací mezi GF a KON skupinou.

Tabulka 4: Statistická významnost metabolizace IMA na demetylovaný oxidovaný IMA (des-ox-IMA) pro skupiny GF vs. KON.

pořadí metabolitu	1	2	3	4	5	6
GF v KON	A/B	C/D	E/F	G/H	I/J	K/L
t-test	$5,69 \cdot 10^{-4}$	0,94	0,18	$7,63 \cdot 10^{-6}$	$5,92 \cdot 10^{-5}$	$5,56 \cdot 10^{-4}$

Pozn.: A, C, E, G, I, K = metabolity skupiny GF      B, D, F, H, J, L = metabolity skupiny KON

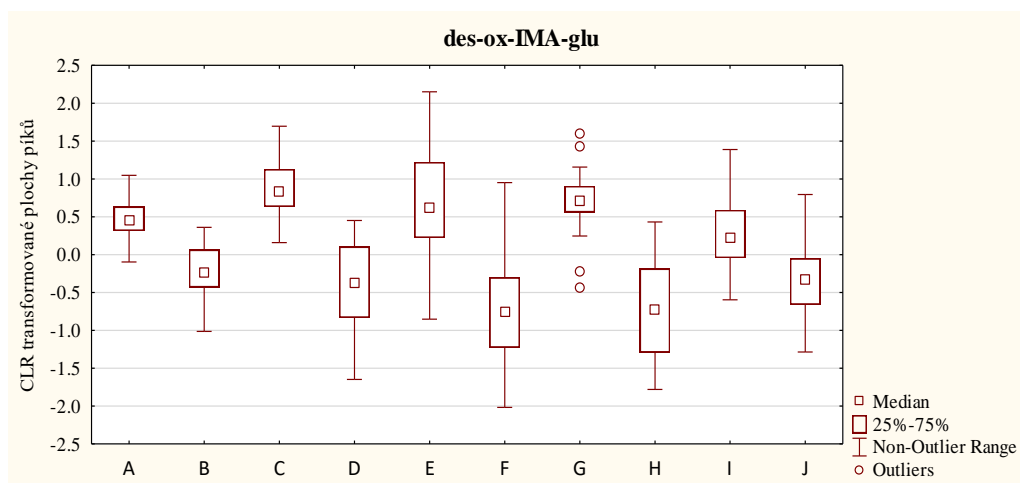


Obrázek 14: Krabicové grafy metabolizace IMA na demetylovaný oxidovaný IMA (des-ox-IMA) pro skupiny GF vs. KON (popisky krabicových grafů viz Tabulka 4).

Tabulka 5: Statistická významnost metabolizace IMA na demetylovaný oxidovaný IMA glukuronid (des-ox-IMA-glu) pro skupiny GF vs. KON.

pořadí metabolitu	1	2	3	4	5
GF vs. KON	A/B	C/D	E/F	G/H	I/J
t-test	$7,75 \cdot 10^{-10}$	$2,15 \cdot 10^{-13}$	$2,07 \cdot 10^{-8}$	$1,14 \cdot 10^{-12}$	$4,49 \cdot 10^{-5}$

Pozn.: A, C, E, G, I = metabolity skupiny GF      B, D, F, H, J = metabolity skupiny KON

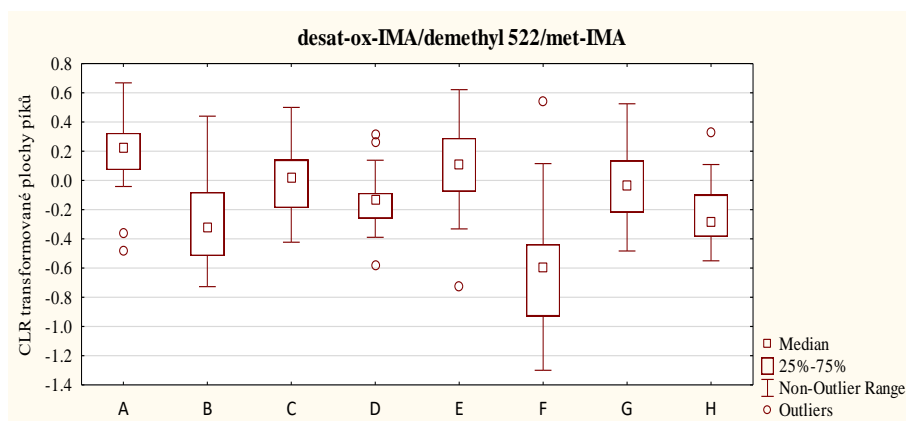


Obrázek 15: Krabicové grafy metabolizace IMA na demetylovaný oxidovaný glukuronid IMA (des-ox-IMA-glu) pro skupiny GF vs. KON (popisky krabicových grafů viz Tabulka 5).

Tabulka 6: Statistická významnost metabolizace IMA na desaturovaný oxidovaný IMA/ demetylovaný 522/ methylovaný IMA (desat-ox-IMA/demethyl 522/met-IMA) pro skupiny GF vs. KON.

pořadí metabolitu	1	2	3	4
GF vs. KON	A/B	C/D	E/F	G/H
t-test	$1,05 \cdot 10^{-6}$	0,061	$1,48 \cdot 10^{-8}$	$2,23 \cdot 10^{-3}$

Pozn.: A, C, E, G= metabolity skupiny GF B, D, F, H = metabolity skupiny KON

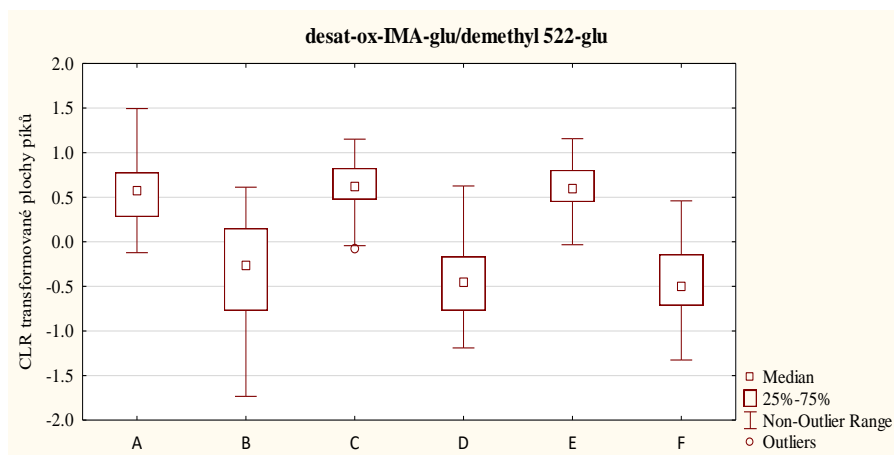


Obrázek 16: Krabicové grafy IMA na desaturovaný oxidovaný IMA/ demetylovaný 522/ methylovaný IMA (desat-ox-IMA/demethyl 522/met-IMA) pro skupiny GF vs. KON (popisky krabicových grafů viz Tabulka 6).

Tabulka 7: Statistická významnost metabolizace IMA na desaturovaný oxidovaný IMA glukuronid/ demetylovaný 522 glukuronid (desat-ox-IMA-glu/demethyl 522-glu) pro skupiny GF vs. KON.

pořadí metabolitu	1	2	3
GF vs. KON	A/B	C/D	E/F
t-test	2,99	$7,03 \cdot 10^{-12}$	$2,89 \cdot 10^{-13}$

Pozn.: A, C, E = metabolity skupiny GF B, D, F = metabolity skupiny KON

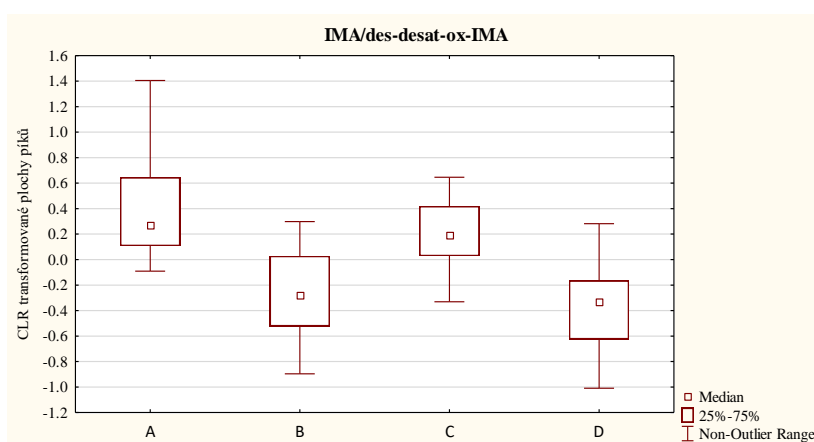


Obrázek 17: Krabicové grafy metabolizace IMA na desaturovaný oxidovaný IMA glukuronid/ demetylovaný 522 glukuronid (desat-ox-IMA-glu/demethyl 522-glu) pro skupiny GF vs. KON (popisky krabicových grafů viz Tabulka 7).

Tabulka 8: Statistická významnost metabolizace IMA na demetylovaný desaturovaný oxidovaný IMA (IMA/des-desat-ox-IMA) pro skupiny GF vs. KON.

pořadí metabolitu	1	2
GF vs. KON	A/B	C/D
t-test	$1,87 \cdot 10^{-8}$	$3,46 \cdot 10^{-8}$

Pozn.: A, C= metabolity skupiny GF B, D = metabolity skupiny KON

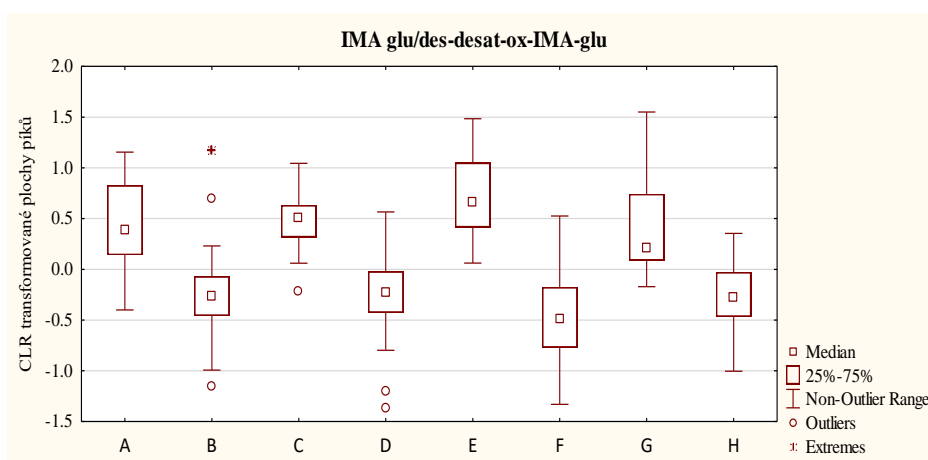


Obrázek 18: Krabicové grafy metabolizace IMA na demetylovaný desaturovaný oxidovaný IMA (IMA/des-desat-ox-IMA) pro skupiny GF vs. KON (popisky krabicových grafů viz Tabulka 8).

Tabulka 9: Statistická významnost metabolizace IMA na demetylovaný desaturovaný oxidovaný glukuronid IMA (IMA-glu/des-desat-ox-IMA-glu) pro skupiny GF vs. KON.

pořadí metabolitu	1	2	3	4
GF vs. KON	A/B	C/D	E/F	G/H
t-test	$4,92 \cdot 10^{-6}$	$1,27 \cdot 10^{-9}$	$1,08 \cdot 10^{-12}$	$1,86 \cdot 10^{-7}$

Pozn.: A, C, E, G = metabolity skupiny GF B, D, F, H = metabolity skupiny KON

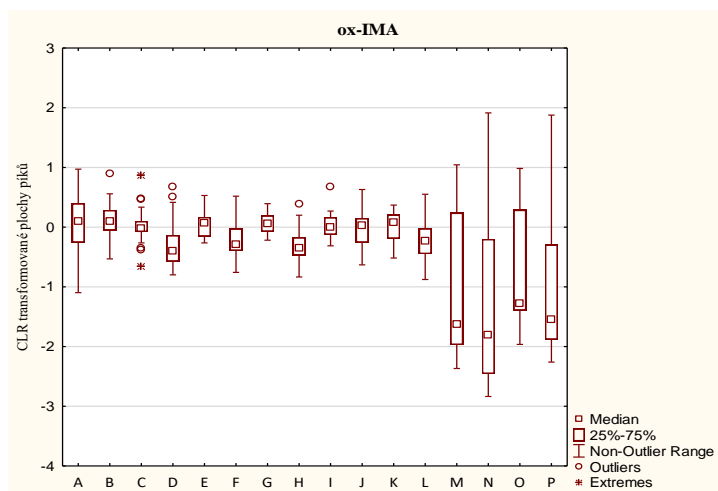


Obrázek 19: Krabicové grafy metabolizace IMA na demetylovaný desaturovaný oxidovaný glukuronid IMA (IMA-glu/ des-desat-ox-IMA-glu) pro skupiny GF vs. KON (popisky krabicových grafů viz Tabulka 9).

Tabulka 10: Statistická významnost metabolizace IMA na oxidovaný IMA (ox-IMA) pro skupiny GF vs. KON.

pořadí metabolitu	1	2	3	4	5	6	7	8
GF vs. KON	A/B	C/D	E/F	G/H	I/J	K/L	M/N	O/P
t-test	0,88	$5 \cdot 10^{-3}$	$8,2 \cdot 10^{-4}$	$3,62 \cdot 10^{-7}$	0,36	$6,64 \cdot 10^{-3}$	0,71	0,49

Pozn.: A, C, E, G, I, K, M, O = metabolity skupiny GF B, D, F, H, J, L, N, P = metabolity skupiny KON

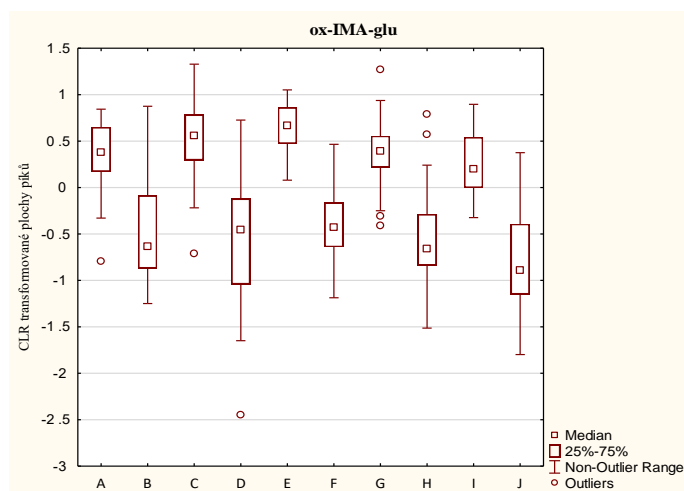


Obrázek 20: Krabicové grafy metabolizace IMA na oxidovaný IMA (ox-IMA) pro skupiny GF vs. KON (popisky krabicových grafů viz Tabulka 10).

Tabulka 11: Statistická významnost metabolizace IMA na oxidovaný IMA glukuronid (ox-IMA-glu) pro skupiny GF vs. KON.

pořadí metabolitu	1	2	3	4	5
GF vs. KON	A/B	C/D	E/F	G/H	I/J
t-test	$2,06 \cdot 10^{-7}$	$5,38 \cdot 10^{-7}$	$5,11 \cdot 10^{-15}$	$4,01 \cdot 10^{-9}$	$4,26 \cdot 10^{-12}$

Pozn.: A, C, E, G, I = metabolity skupiny GF B, D, F, H, J = metabolity skupiny KON

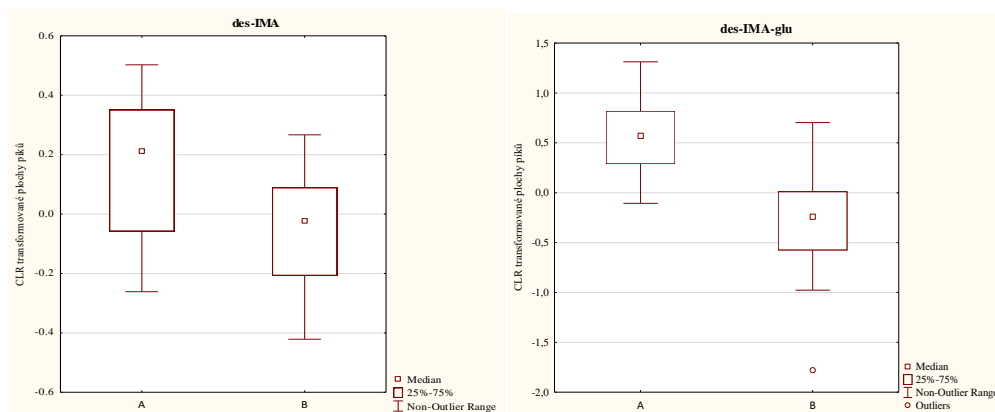


Obrázek 21: Krabicové grafy metabolizace IMA na oxidovaný IMA glukuronid (ox-IMA-glu) pro skupiny GF vs. KON (popisky krabicových grafů viz Tabulka 11).



Tabulka 12: Statistická významnost metabolizace IMA na demetylovaný IMA (des-IMA) (vlevo) a na demetylovaný IMA glukuronid (des-IMA-glu) (vpravo) pro skupiny GF vs. KON.

metabolit	t-test	metabolit	t-test
des-IMA	$6,9 \cdot 10^{-4}$	des-IMA-glu	$2,16 \cdot 10^{-9}$

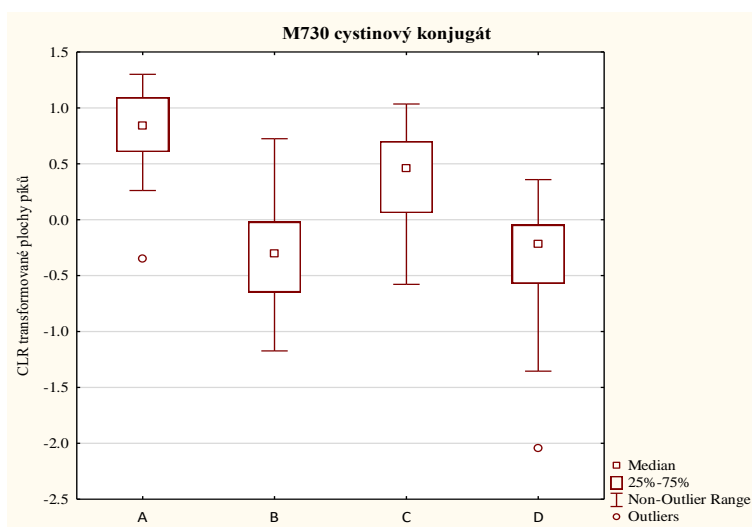


Obrázek 22: Krabicové grafy metabolizace IMA na demetylovaný IMA (des-IMA) (vlevo) a na demetylovaný IMA glukuronid (des-IMA-glu) (vpravo) pro skupiny GF vs. KON (metabolit A u GF skupiny, B u skupiny KON).

Tabulka 13: Statistická významnost metabolizace IMA na M730 cystinový konjugát pro skupiny GF vs. KON.

pořadí metabolitu	1	2
GF vs. KON	A/B	C/D
t-test	$8,29 \cdot 10^{-11}$	$2,24 \cdot 10^{-6}$

Pozn.: A, C = metabolity skupiny GF B, D = metabolity skupiny KON

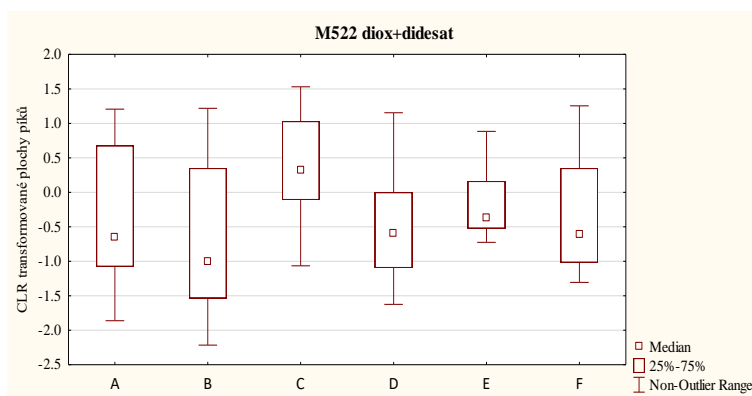


Obrázek 23: Krabicové grafy metabolizace IMA na M730 cystinový konjugát pro skupiny GF vs. KON (popisky krabicových grafŕŕ viz Tabulka 13).

Tabulka 14: Statistická významnost metabolizace IMA na M522 dioxidovaný didesaturovaný (M522 diox+didesat) pro skupiny GF vs. KON.

pořadí metabolitu	1	2	3
<b>GF vs. KON</b>	A/B	C/D	E/F
<b>t-test</b>	0,41	$3,89 \cdot 10^{-5}$	0,29

Pozn.: A, C, E = metabolity skupiny GF B, D, F = metabolity skupiny KON

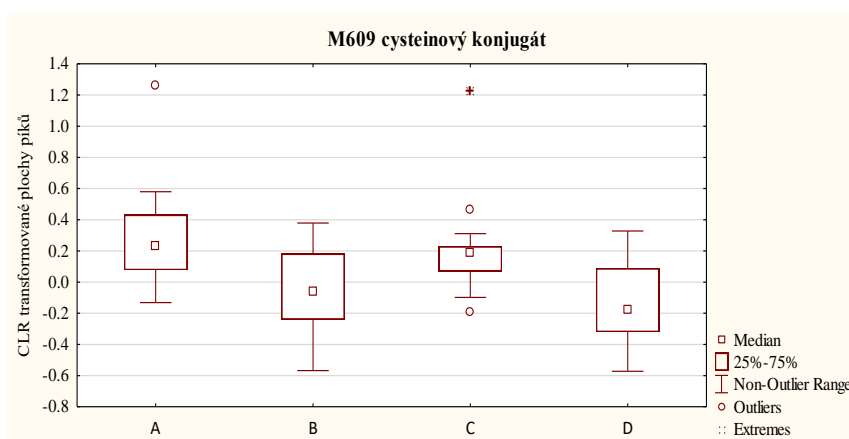


Obrázek 24: Krabicové grafy metabolizace IMA na M522 dioxidovaný-didesaturovaný (M522 diox+didesat) pro skupiny GF vs. KON (popisky krabicových grafů viz Tabulka 14).

Tabulka 15: Statistická významnost metabolizace IMA na M609 cysteinový konjugát pro skupiny GF vs. KON.

pořadí metabolitu	1	2
<b>GF vs. KON</b>	A/B	C/D
<b>t-test</b>	$2,58 \cdot 10^{-4}$	$9,6 \cdot 10^{-5}$

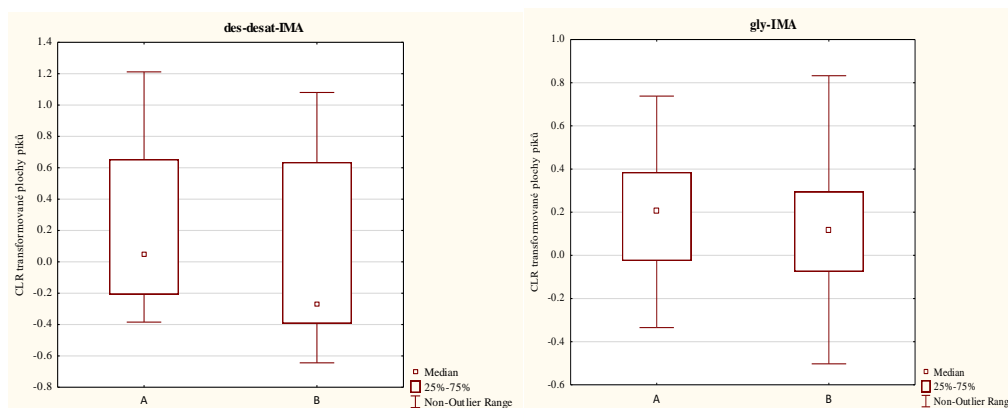
Pozn.: A, C = metabolity skupiny GF B, D = metabolity skupiny KON



Obrázek 25: Krabicové grafy metabolizace IMA na M609 cysteinový konjugát pro skupiny GF vs. KON (popisky krabicových grafů viz Tabulka 15).

Tabulka 16: Statistická významnost metabolizace IMA na demetylovaný desaturovaný IMA (des-desat-IMA) (vlevo) a na glycin IMA (gly-IMA) (vpravo) pro skupiny GF vs. KON.

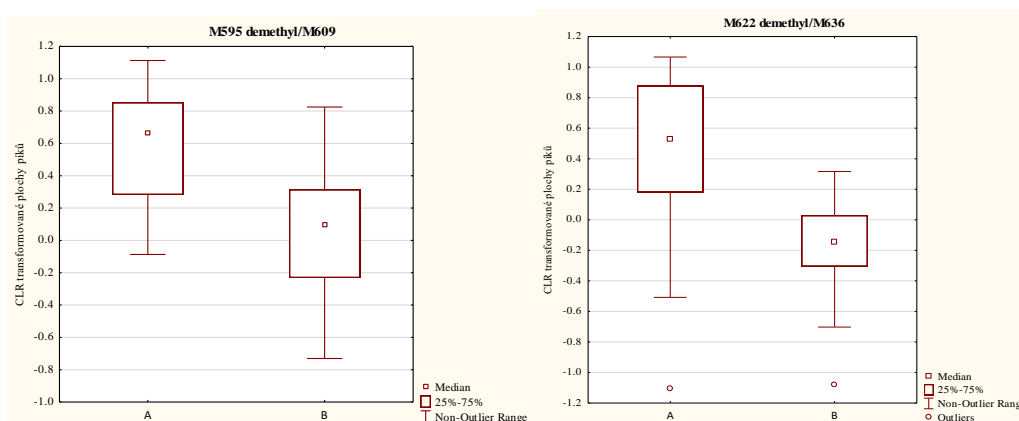
metabolit	t-test	metabolit	t-test
des-desat-IMA	0,35	gly-IMA	0,85



Obrázek 26: Krabicové grafy metabolizace IMA na demetylovaný desaturovaný IMA (des-desat-IMA) (vlevo) a na glycin IMA (gly-IMA) (vpravo) pro skupiny GF vs. KON (metabolit A u GF skupiny, B u skupiny KON).

Tabulka 17: Statistická významnost metabolizace IMA na M595 demetylovaný/M609 (M595 demethyl/M609) (vlevo) a M622 demetylovaný/M636 (M622 demethyl/M636) (vpravo) pro skupiny GF vs. KON.

metabolit	t-test	metabolit	t-test
M595 demethyl/M609	$3.43 \cdot 10^{-5}$	M622 demethyl/M636	$1.09 \cdot 10^{-6}$

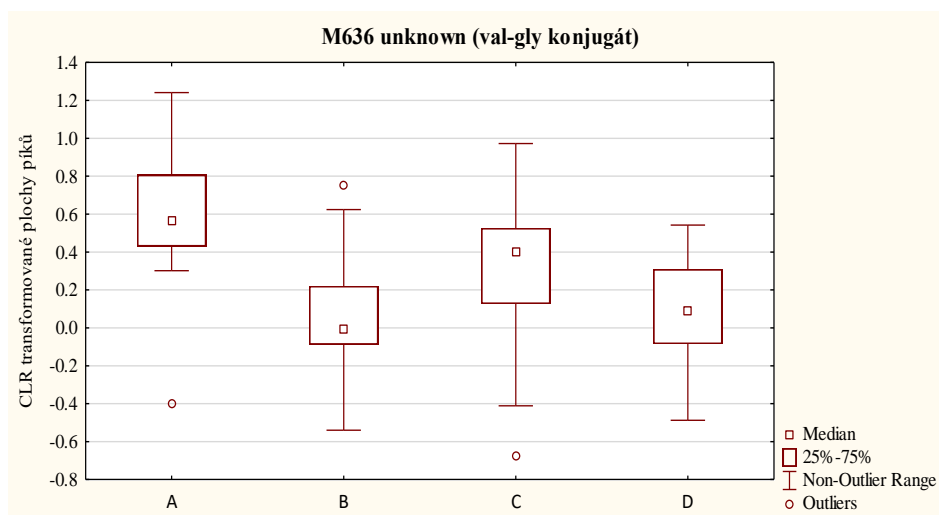


Obrázek 27: Krabicové grafy metabolizace IMA na M595 demetylovaný/M609 (M595 demethyl/M609) (vlevo) a M622 demetylovaný/M636 (M622 demethyl/M636) (vpravo) pro skupiny GF vs. KON (metabolit A u skupiny GF, B u skupiny KON).

Tabulka 18: Statistická významnost metabolizace IMA na M636 valin-glycin konjugát (M636 unknown val-gly konjugát) pro skupiny GF vs. KON.

pořadí metabolitu	1	2
GF vs. KON	A/B	C/D
t-test	$2,65 \cdot 10^{-7}$	$9,7 \cdot 10^{-6}$

Pozn.: A, C = metabolity skupiny GF B, D = metabolity skupiny KON



Obrázek 28: Krabicové grafy metabolizace IMA na M636 valin-glycin konjugát (M636 unknown val-gly konjugát) pro skupiny GF vs. KON (popisky krabicových grafů viz Tabulka 15).

Při porovnání jednotlivých krabicových grafů (viz Obrázek 14-28) bylo zjištěno, že u většiny vzorků od pacientů ze skupiny GF (pacienti s GF hodnotami  $<0,64 \text{ ml} \cdot \text{s}^{-1}$ ) dosahuje koncentrace jednotlivých metabolitů vyšších hodnot než u kontrolní skupiny KON. Tento rozdíl je dobře patrný např.: u Obrázku 15, 17, 18, 19, 21 a 23. Z toho vyplývá, že u pacientů s predikcí selhání ledvin je převážná část metabolitů tvořena ve větších koncentracích než u kontrolních pacientů s normální funkcí ledvin.

## 6. DISKUZE

Cílená terapie pacientů s chronickou myeloidní leukémií pomocí inhibitorů tyrozinkináz se stala díky mimořádně velkému zlepšení prognózy nemocných hlavním léčebným postupem této nemoci. Bohužel ani tento druh léčby není zcela bez vedlejších účinků. Jedním z vedlejších účinků u imatinibu je akutní nebo chronické selhání ledvin u části pacientů. Tato bakalářská práce byla zaměřena právě na tento nežádoucí účinek. Cílem této práce bylo najít rozdíl mezi metabolickým profilem pacientů s predikcí selhání ledvin vůči kontrolním pacientům. Jako hlavní kritérium sloužila hodnota glomerulární filtrace. U pacientů s konstantní hodnotou glomerulární filtrace (kontrolní skupina) byly hodnoty glomerulární filtrace okolo  $1,5 \text{ ml}\cdot\text{s}^{-1}$ , u pacientů s rizikem selhání ledvin byly hodnoty glomerulární filtrace postupně se snižující či nízké. K analýze byly použity vzorky plazmy těchto pacientů odebrané mezi lety 2013-2018. Pacienti byly rozděleni do 8 skupin podle hodnot glomerulární filtrace, času užití imatinibu před odběrem plazmy a denní dávky léčiva. Vzorky byly analyzovány pomocí HPLC-MS/MS. Výsledná data byla integrována, upravena a logaritmicky transformována.

Bylo zaznamenáno 25 biotransformací imatinibu, kdy po vyloučení biotransformací s velmi malými plochami píků z analýzy byly dále zpracovány metabolity 18 biotransformací. Ve srovnání s dříve publikovanými pracemi (Vrobel *et al.*, 2017 a Friedecký *et al.*, 2015) byl zaznamenán nižší počet biotransformací (u daných publikací zaznamenáno dohromady 35 biotransformací). Na rozdíl od těchto publikací, kde bylo dohromady identifikováno 114 metabolitů, bylo v této práci identifikováno pouze 52 metabolitů. Důvodem tohoto rozdílu byla rozdílná metoda analýzy, kdy publikace použily LTQ Orbitrap Elite hmotnostní spektrometr pracující s vysokým rozlišením, zatímco v této analýze byl použit tandemový hmotnostní spektrometr Triple Quad 6500, pracující s jednotkovým rozlišením. Dalším důvodem byl malý počet vzorků s úzkou specifikací u daných publikací, kdežto v rámci tohoto projektu bylo zahrnuto celkem 195 vzorků.

Pro porovnání výsledků analýzy byl použit Studentův t-test a grafické vyjádření dat pomocí krabicových grafů. Bylo zjištěno, že většina metabolitů imatinibu vykazuje vyšší hladiny u skupiny pacientů se sníženými hodnotami glomerulární filtrace (skupina GF,  $<0,64 \text{ ml}\cdot\text{s}^{-1}$ ) než u kontrolní skupiny pacientů (skupina KON). Ačkoliv t-test ukázal celou řadu statických významností (hladina pod hodnotou p-hodnoty = 0,05), vzhledem k velkému počtu analyzovaných vzorků, a ne vždy vizuálně jasné separace (skupina GF x KON) metabolitů u krabicových grafů, se tato práce zabývá pouze metabolity s nejnižšími hodnotami t-testu.

Při porovnání jednotlivých výsledků t-testu bylo zjištěno, že největších statických významností dosahují metabolity glukuronidy. O tomto fenoménu není více informací v dostupné literatuře a vyžaduje budoucí studium.

Do budoucna je v plánu k detailnějšímu prozkoumání této problematiky vyhotovení korelační analýzy vzorků pacientů z 8. skupiny, vyhotovení logistické regrese pro nejvíce diskriminující metabolity (s nejnižšími hodnotami t-testu) a ROC analýza.

## 7. ZÁVĚR

V teoretické části této práce byla vypracována rešerše na téma chronická myeloidní leukémie, Filadelfský chromozom, rizikové faktory vzniku tohoto typu leukémie, její fáze a symptomy, způsoby její léčby včetně principu působení inhibitorů tyrozinkináz. Dále byly zahrnuty části zabývající se metabolizací léčiv, vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií a hmotnostní spektrometrií.

Experimentální část byla zaměřena na porovnání metabolických profilů pacientů s chronickou myeloidní leukémií na léčbě imatinibem. Pacienti byli rozděleni do dvou skupin podle hodnot glomerulární filtrace. Dle hodnot glomerulární filtrace lze predikovat selhání ledvin u jednotlivých pacientů. V první skupině byly pacienti s normálními hodnotami glomerulární filtrace (okolo  $1,5 \text{ ml}\cdot\text{s}^{-1}$ ). Ve druhé skupině byly pacienti s vysokým rizikem selhání ledvin s postupně snižujícími se či nízkými hodnotami glomerulární filtrace. Vzorky plazem těchto pacientů byly analyzovány pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s tandemovým hmotnostním spektrometrem. Pomocí této analýzy byly nalezeny diskriminované metabolity. Většina metabolitů imatinibu u skupiny pacientů s nízkými hodnotami glomerulární filtrace byla detekována ve vyšších koncentracích než metabolity u kontrolní skupiny.

## 8. LITERATURA

- ❖ Baker, S. J., Reddy, E. P. (2010): Targeted inhibition of kinases in cancer therapy. *The Mount Sinai journal of medicine* 77(6): 573–586.
- ❖ Conchon M., Boquimpani de C. M., Freitas M., Carmo Rego do M. A., Braga Junior J. W. R. (2011): Dasatinib – clinical trials and management of adverse events in imatinib resistant/ intolerant chronic myeloid leukemia. *The Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia* 33(2): 131–139.
- ❖ Cortes J., Silver R., Khoury J., Kantarjian H. (2016): Chronic Myeloid Leukemia. [online] [navštíveno 12.8.2018] Dostupné z <https://www.cancernetwork.com/chronic-myeloid-leukemia/chronic-myeloid-leukemia>
- ❖ Faber E., Urbanová R. (2010): Chronická myeloidní a chronická lymfatická leukemie. *Interní medicína pro praxi* 12(6): 321–324.
- ❖ Faber E., Indrák K., Divoký V., Jarošová M., Kašparová P., Klamová H., Koza V., Poláková K. M., Mayer J., Michálek J., Moravcová J., Mužík J., Pelouchová J., Piterková L., Rohoň P., Sedláček P., Škrobánková A., Veselovská J., Voglová J., Vrbacký F., Krč I., Starý J. (2010): Chronická myeloidní leukémie. Galén, Praha.
- ❖ Faderl S., Talpaz M., Estrov Z., Susan O'Brien S., Kurzrock R., Kantarjian H. (1999): The Biology of Chronic Myeloid Leukemia. *The New England Journal of Medicine* 341: 164–172.
- ❖ François H., Coppo P., Hayman J.-P., Fouqueray B., Mougenot B., Ronco, P. (2008): Partial Fanconi Syndrome Induced by Imatinib Therapy: A Novel Cause of Urinary Phosphate Loss. *American Journal of Kidney Diseases* 51(2): 298–301.
- ❖ Friedecký D., Lemr K. (2012): Úvod do hmotnostní spektrometrie. *Klinická Biochemie Metabolitů* 20(41): 210–215.
- ❖ Friedecký D., Míčová K., Faber E., Hrdá M., Šířoká J., Adam T. (2015): Detailed study of imatinib metabolism using high-resolution mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1409: 173–181.
- ❖ Goldman J. M., Mughal T. I. (2013): Chronic Myeloid Leukaemia. Wiley online library. [online] [navštíveno 27.8.2018] Dostupné z <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/9780470015902.a0002181.pub2>



- ❖ Guilhot F., Roy L., Saulnier P., Guilhot J. (2009): Interferon in chronic myeloid leukaemia: past and future. *Best Practice and Research Clinical Haematology* 22: 315-329.
- ❖ Kabat G., Wu J., Moore S., Morton L., Park Y., Hollenbeck A., Rohan T. (2013): Lifestyle and Dietary Factors in Relation to Risk of Chronic Myeloid Leukemia in the NIH-AARP Diet and Health Study. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention* 22(5): 848–854.
- ❖ Kantarjian H., Giles F. J., Bhalla K. N., Pinilla-Ibarz J. A., Larson R. A., Gattermann N., Ottmann O. G., Hochhaus A., Radich J. P., Saglio G., Hughes T. P., Martinelli G., Kim D.-W., Shou Y., Gallagher N. J., Blakesley R., Baccarani M., Cortes J., le Coutre P. D. (2011): Nilotinib is effective in patients with chronic myeloid leukemia in chronic phase following imatinib resistance or intolerance: 24-month follow-up results. *Blood* 117(4): 1141–1145.
- ❖ Kantarjian H., Sawyers Ch., Hochhaus A., Guilhot F., Schiffer Ch., Gambacorti-Passerini C., Niederwieser D., Resta D., Capdeville R., Zoellner U., Talpaz M., Drucker B. (2002): Hematologic and Cytogenetic Responses to Imatinib Mesylate in Chronic Myelogenous Leukemia. *The New England Journal of Medicine* 346: 645–652.
- ❖ Li S., Ilaria R. L., Million R. P., Daley G. Q., Van Etten R. A. (1999). The P190, P210, and P230 forms of the BCR/ABL oncogene induce a similar chronic myeloid leukemia-like syndrome in mice but have different lymphoid leukemogenic activity. *The Journal of experimental medicine* 189(9): 1399–1412.
- ❖ Lyseng-Williamson K., Jarvis B. (2001): Imatinib. *Drugs* 61: 1765–1774.
- ❖ Liu B., Zhang W., Ma H. (2016): Complete cytogenetic response to Nilotinib in a chronic myeloid leukemia case with a rare e13a3(b2a3) BCR-ABL fusion transcript: A case report. *Molecular Medicine Reports* 13: 2635–2638.
- ❖ Lukšíková L. (2009): HPLC analýza léčiv. Diplomová práce. Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova v Praze.
- ❖ Mahon F., Delbrel X., Cony-Makhoul P., Faberes C., Boiron J., Barthe C., Bilhou-Nabera C., Pigneux A., Marit G., Reiffers J. (2002): Follow-up of complete cytogenetic remission in patients with chronic myeloid leukemia after cessation of interferon alfa. *Journal of Clinical Oncology* 20: 214–220.

- ❖ Marcolino M. S., Boersma E., Clementino N. C. D., Macedo A. V., Marx-Neto A. D., Silva M. H., Gelder T., Akkerhuis K. M., Ribeiro A. L. (2011): Imatinib treatment duration is related to decreased estimated glomerular filtration rate in chronic myeloid leukemia patients. *Annals of Oncology* 22: 2073–2079.
- ❖ Masanobu T. (1962): Leukaemia in Nagasaki Atomic Bomb Survivors from 1945 through 1959. *Bull. Org. mond. Sante, Bull. Wld Hlth Org* 26: 619–631.
- ❖ Masuda M. (2004): Interferon Therapy for Leukemia. *Journal of the Japan Medical Association* 47(1): 13–17.
- ❖ Matysová L. (2006): Vývoj a validace HPLC metod pro analýzu léčivých přípravků. Disertační práce. Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova, Praha.
- ❖ Mc Lafferty F. (2008): Mass spectrometry across the sciences. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105(47): 18088–18089.
- ❖ Negrin R. S., Schiffer Ch. A. (2018): Patient education: Chronic myeloid leukemia (CML) in adults (Beyond the Basics) [online] [navštíveno 22.8.2018] Dostupné z <https://www.uptodate.com/contents/chronic-myeloid-leukemia-cml-in-adults-beyond-the-basics/print>
- ❖ Nováková L., Douša M. a kolektiv (2013): Moderní HPLC separace v teorii a praxi I. Europrint a. s., Praha.
- ❖ Nowell, P., Hungerford, D. (1960): A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Science*. 132: 1497.
- ❖ Özen M., Üstün C., Öztürk B., Topçuoğlu P., Arat M., Gündüz M., Atilla E., Bolat G., Arslan Ö., Demirer T., Akan H., İlhan O., Beksaç M., Gürman G., Özcan M. (2017): Allogeneic Transplantation in Chronic Myeloid Leukemia and the Effect of Tyrosine Kinase Inhibitors on Survival: A Quasi-Experimental Study. *Turkish Journal of Hematology* 34: 16–26.
- ❖ Pou M., Saval N., Vera M., Saurina A., Solé M., Cervantes F., Botey A. (2003): Acute Renal Failure Secondary to Imatinib Mesylate Treatment in Chronic Myeloid Leukemia. *Leukemia and Lymphoma* 44(7): 1239–1241.
- ❖ Racil Z., Razga F., Drapalova J., Buresova L., Zackova D., Palackova M., Semerad L., Malaskova L., Haluzik M., Mayer J. (2013): Mechanism of impaired glucose metabolism during nilotinib therapy in patients with chronic myelogenous leukemia. *Haematologica* 98(10): 124–126.

- ❖ Ruriko T., Shinya K. (2008): Abl Tyrosine Kinase Inhibitors for Overriding Bcr-Abl/T315I: From the Second to Third Generation. *Expert Review of Anticancer Therapy* 8(9): 1387–1398.
- ❖ Růžička Š. (2017): Vývoj HPLC metody pro stanovení vybraných karotenoidů v ovoci. Diplomová práce. Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova, Praha.
- ❖ Schwab N. V., Eberlin M. N. (2012): Mass spectrometry made easy: The quest for simplicity. *Drug Testing and Analysis* 5(3): 137–144.
- ❖ Sedláček P., Říha P. (2014): Alogenní transplantace kmenových buněk v léčbě maligních onemocnění krve tvorby u dětí. *Onkologie* 8(3): 121–123.
- ❖ Stam K., Heisterkamp N., Grosveld G., de Klein A., Verma R., Coleman M., Dosik H., Groffen J. (1985): Evidence of a new chimeric bcr/c-abl mRNA in patients with chronic myelocytic leukemia and the Philadelphia chromosome. *The New England Journal of Medicine* (23): 1429–1433.
- ❖ Stein B., Smith B. D. (2010): Treatment options for patients with chronic myeloid leukemia who are resistant to or unable to tolerate imatinib. *Clinical therapeutics* 32(5): 804–820.
- ❖ Stone R. M. (2004): Optimizing Treatment of Chronic Myeloid Leukemia: A Rational Approach. *The Oncologist* 9: 259–270.
- ❖ Strom S., Yamamura Y., Kantarijian H., and Jorge C. (2009): Obesity, Weight Gain, and Risk of Chronic Myeloid Leukemia. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention* 18(5): 1501–1506.
- ❖ Takikita-Suzuki M., Haneda M., Sasahara M., Owada M. K., Nakagawa T., Isono M., Takikita S., Koya D., Ogasawara K., Kikkawa R. (2003): Activation of Src kinase in platelet-derived growth factor-B-dependent tubular regeneration after acute ischemic renal injury. *The American Journal of Pathology* 163: 277–286.
- ❖ Tinková N. (2007): Problematika transplantací se zaměřením na kostní dřeň. Bakalářská práce. Přírodovědecká fakulta, Masarykova Univerzita, Brno.
- ❖ Turjap M., Juřica J., Demlová R. (2015): Možný klinický přínos terapeutického monitorování hladin imatinibu v onkologii. *Klinická onkologie* 28(2): 105–111.
- ❖ Vokřál I. (2012): Využití LC/MS pro studium biotransformace xenobiotik u helmintů. Disertační práce. Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova, Praha.
- ❖ Vrobel I., Friedecký D., Faber E., Najdekr L., Míčová K., Karlíková R., Adam T. (2017): Novel sulphur-containing imatinib metabolites found by untargeted LC-HRMS analysis. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 104: 335–343.

- ❖ Weisberg E., Manley P. W., Breitenstein W., Brügger J., Cowan-Jacob S. W., Ray A., Huntly B., Fabbro D., Fendrich G., Hall-Meyers E., Kung A. L., Mestan J., Daley G. Q., Callahan L., Catley L., Cavazza C., Azam M., Neuberg D., Wright R. D., Gilliland D. G., Griffin J. D. (2005): Characterization of AMN107, a selective inhibitor of native and mutant Bcr-Abl. *Cancer Cell* 7(2): 129–141.
- ❖ Žáčková D. (2014): Optimalizace léčby chronické myeloidní leukemie. Disertační práce. Lékařská fakulta, Masarykova Univerzita, Brno.

## 9. PŘÍLOHY

- ❖ Příloha 1: Seznam všech použitých vzorků z 8 skupin pro analýzu včetně data odběru plazmy, hodnoty GF, denní dávky, koncentrace IM v plazmě a doby užití IM před odběrem

Příloha 1: Seznam všech použitých vzorků z 8 skupin pro analýzu včetně data odběru plazmy, hodnoty GF, denní dávky, koncentrace IM v plazmě a doby užití IM před odběrem

skupina	číslo vzorku	jméno pacienta	datum odběru	hodnoty GF [ml·s <sup>-1</sup> ]	denní dávka [mg]	c IM v plazmě [ng·ml <sup>-1</sup> ]	doba užití IM před odběrem [hod]
1. skupina kontroly 20 hod	1	Horv.	22.06.2016	1,5	400	1000	21
	2	Horv.2	09.01.2017	1,5	400	3160	22
	3	Jasi.	15.08.2016	1,5	400	1020	18
	4	Kolá.	04.08.2015	1,5	400	899	20
	5	Kren.	07.10.2013	1,5	300	1670	20
	6	Kutr.	12.03.2013	1,49	400	1230	24
	7	Miku.	28.08.2017	1,5	400	2100	20
	8	Netk.	19.09.2013	1,5	400	1040	23
	9	Pika.	15.12.2014	1,5	400	666	20
	10	Vých.	09.03.2015	1,5	400	148	17
	11	Kotl.	23.11.2015	1,5	400	1350	20
	12	Pešl.	16.05.2016	1,48	400	1330	20
2. skupina kontroly 15 hod	13	Horv.2	04.09.2017	1,5	400	3470	14
	14	Jasi.	22.05.2017	1,5	400	166	14
	15	Vých.	07.04.2015	1,5	400	664	16
	16	Čere.	06.10.2014	1,5	300	1170	14
	17	Kemp.	13.06.2017	1,5	400	197	15
	18	Nevř.	09.11.2015	1,5	400	1900	14
	19	Pešl.	30.11.2015	1,41	400	1410	15
3. skupina kontroly 10 hod	20	Brad.	08.06.2017	1,47	300	1900	11
	21	Čáp.	02.02.2015	1,49	400	1280	10
	22	Horv.	04.12.2017	1,5	300	3160	11
	24	Knej.	06.06.2016	1,5	400	1580	10
	25	Kren.	08.07.2013	1,5	300	2790	12,5
	26	Kutr.	24.09.2013	1,48	400	999	11,5
	27	Vémo.	12.04.2016	1,5	400	1070	11,5
	28	Čermá.	13.04.2015	1,5	400	2330	12
	29	Hrub.	20.07.2017	1,5	400	1650	11
	30	Slow.	14.10.2015	1,5	400	1740	11
	4. skupina kontroly 7 vzorků-1 pacient 20 hod	31	Horv.	17.12.2014	1,5	400	748
32		Horv.	18.03.2015	1,5	400	615	25
33		Horv.	17.06.2015	1,5	400	1700	24
34		Horv.	16.09.2015	1,5	400	1240	23
35		Horv.	23.03.2016	1,5	400	1060	26
36		Horv.	22.06.2016	1,5	400	1000	21

	číslo vzorku	jméno pacienta	datum odběru	hodnoty GF [ml·s <sup>-1</sup> ]	denní dávka [mg]	c IM v plazmě [ng·ml <sup>-1</sup> ]	doba užití IM před odběrem [hod]
	37	Horv.	21.09.2016	1,5	400	1390	25
	38	Miku.	23.09.2013	1,44	400	942	19
	39	Miku.	25.11.2013	1,33	500	1120	20
	40	Miku.	17.03.2014	1,36	500	1150	20
	41	Miku.	20.10.2014	1,44	500	1330	20
	42	Miku.	13.04.2015	1,5	500	729	20
	43	Miku.	12.10.2015	1,27	500	3000	21
	44	Miku.	23.11.2015	1,32	500	3770	21
	45	Pika.	27.10.2014	1,5	400	449	19
	46	Pika.	10.11.2014	1,5	400	552	19
	47	Pika.	01.12.2014	1,5	400	466	19
	48	Pika.	25.04.2016	1,44	400	933	19
	49	Pika.	27.04.2015	1,5	400	1000	19
	50	Pika.	21.11.2016	1,5	400	2120	19
	51	Pika.	24.04.2017	1,5	400	1350	20
	52	Kotl.	03.11.2014	1,5	400	897	20
	53	Kotl.	16.02.2015	1,5	400	1370	21
	54	Kotl.	18.05.2015	1,45	400	1480	17
	55	Kotl.	05.08.2013	1,43	400	1480	19
	56	Kotl.	29.02.2016	1,5	400	1390	19
	57	Kotl.	23.05.2016	1,44	400	1560	20
	58	Kotl.	14.11.2016	1,5	400	1740	19
	59	Pešl.	29.02.2016	1,43	400	1570	18
	60	Pešl.	15.08.2016	1,5	600	1330	19
	61	Pešl.	06.02.2017	1,5	400	1400	19
	62	Pešl.	14.08.2017	1,47	400	1290	21
	63	Pešl.	04.12.2017	1,48	400	1250	17
	64	Pešl.	09.04.2018	1,5	400	1300	18
	65	Pešl.	15.05.2017	1,38	400	1490	19
	66	Čere.	20.04.2015	1,48	300	1250	20
	67	Čere.	13.06.2016	1,47	300	1400	21
	68	Čere.	26.09.2016	1,5	300	1090	20
	69	Čere.	16.01.2017	1,5	300	1830	21
	70	Čere.	10.04.2017	1,5	300	1160	21
	71	Čere.	19.06.2017	1,48	300	1080	22
	72	Čere.	19.02.2018	1,5	300	1180	21
4. skupina kontroly 7 vzorků-1 pacient 15 hod	73	Nevř.	11.05.2015	1,5	400	1510	14
	74	Nevř.	27.07.2015	1,5	400	1880	12
	75	Nevř.	21.09.2017	1,45	400	1730	13
	76	Nevř.	02.03.2016	1,5	400	1640	14

	číslo vzorku	jméno pacienta	datum odběru	hodnoty GF [ml·s <sup>-1</sup> ]	denní dávka [mg]	c IM v plazmě [ng·ml <sup>-1</sup> ]	doba užití IM před odběrem [hod]
	77	Nevř.	22.06.2016	1,5	400	1530	14
	78	Nevř.	19.09.2016	1,5	400	690	14
	79	Nevř.	09.01.2017	1,5	400	1670	13
4. skupina kontroly 7 vzorků-1 pacient 10 hod	80	Čáp.	01.12.2014	1,5	400	1520	11
	81	Čáp.	19.09.2016	1,5	400	999	11
	82	Čáp.	04.05.2015	1,49	400	1940	11
	83	Čáp.	29.02.2016	1,5	300	1240	11
	84	Čáp.	21.08.2017	1,44	400	1370	12
	85	Čáp.	27.11.2017	1,5	400	1170	10
	86	Čáp.	12.03.2018	1,5	400	1540	11
	87	Knej.	05.12.2016	1,44	400	1220	11
	88	Knej.	05.09.2016	1,35	400	1360	11
	89	Knej.	06.03.2017	1,5	400	1240	11,5
	90	Knej.	05.06.2017	1,5	400	1230	12
	91	Knej.	07.09.2017	1,5	400	1160	12
	92	Knej.	14.12.2017	1,5	400	1360	11
	93	Knej.	15.03.2018	1,5	400	1660	11
	94	Čerm.	11.04.2016	1,5	400	2150	12
	95	Čerm.	27.06.2016	1,5	400	2450	12
	96	Čerm.	26.09.2016	1,39	400	2190	14
	97	Čerm.	13.03.2017	1,48	400	1580	11
	98	Čerm.	19.06.2017	1,38	400	1930	12
	99	Čerm.	18.09.2017	1,42	400	1830	12
100	Čerm.	15.01.2018	1,5	400	1910	12	
101	Hrub.	03.11.2014	1,5	400	1490	11	
102	Hrub.	20.04.2015	1,5	400	1750	10	
103	Hrub.	13.07.2015	1,5	400	1630	9	
104	Hrub.	18.07.2016	1,5	400	1390	10	
105	Hrub.	26.10.2017	1,5	400	1410	11	
106	Hrub.	01.02.2018	1,5	400	1730	11	
107	Hrub.	03.05.2018	1,5	400	1330	10	
5. skupina nízké hodnoty GF 20 hod	108	Dude.	06.03.2013	0,87	400	1130	20
	109	Hara.	08.03.2016	1,2	400	491	22
	110	Kolo.	04.05.2015	1,19	400	1610	22,5
	111	Kova.	14.09.2015	0,54	400	1840	19
	112	Pitr.	08.11.2016	0,27	400	1500	23
	113	Proch.L.	13.04.2015	1	400	939	20
	114	Proch.M.	01.04.2015	0,57	400	2120	20
	115	Stro.	10.07.2013	0,82	400	1360	25
	116	Zdrá.	17.09.2013	0,64	400	1450	20



	číslo vzorku	jméno pacienta	datum odběru	hodnoty GF [ml·s <sup>-1</sup> ]	denní dávka [mg]	c IM v plazmě [ng·ml <sup>-1</sup> ]	doba užití IM před odběrem [hod]
	117	Kojd.	10.04.2013	1,18	400	1780	20
	118	Novo.	13.09.2017	1,17	400	1680	20
	119	Ceku.	17.04.2013	0,57	400	1350	21
	120	Juli.	24.06.2013	0,86	400	1110	17
	121	Osla.	30.07.2013	1,05	400	840	22
6. skupina nízké hodnoty GF 15 hod	122	Kolo.	27.05.2013	1,2	400	1180	13
	123	Kova.	08.12.2014	0,51	400	2110	16
	124	Svob.	18.01.2018	0,8	400	610	14
	125	Tesa.	20.05.2013	0,92	400	1140	14
	126	Siek.	20.03.2013	1,21	400	1110	14,5
	127	Juli.	29.04.2013	0,85	400	935	15
7. skupina nízké hodnoty GF 10 hod	128	Hara.	12.09.2017	0,61	300	495	10,5
	129	Svob.	15.06.2016	0,81	400	817	12
8. skupina nízké hodnoty GF 7 vzorků-1 pacient 20 hod	130	Drab.	26.06.2013	1,28	200	684	21
	131	Drab.	29.08.2013	1,24	200	477	20
	132	Drab.	26.11.2014	1,17	300	870	20
	133	Drab.	27.05.2015	0,98	300	2780	20
	134	Drab.	26.08.2015	0,89	300	1300	19,5
	135	Drab.	07.02.2018	0,72	300	1300	19
	136	Hara.	20.10.2015	1,12	400	453	23
	137	Hara.	14.06.2016	1,1	400	591	21
	138	Hara.	13.09.2016	1,03	400	571	22
	139	Hara.	06.12.2016	1,08	400	798	23
	140	Hara.	07.03.2017	0,73	400	894	22,5
	141	Hara.	23.05.2017	0,99	400	563	23
	142	Hara.	25.07.2017	0,87	400	399	12
	143	Kolo.	02.02.2015	1,45	400	1140	23
	144	Kolo.	06.02.2017	0,95	400	1290	23,5
	145	Kolo.	03.08.2015	1	400	1120	23
	146	Kolo.	03.11.2015	0,83	400	1150	23
	147	Kolo.	02.05.2016	0,89	400	2800	23,5
	148	Kolo.	01.08.2016	0,85	400	1710	24
	149	Kolo.	15.05.2017	0,69	400	1300	23
150	Kova.	18.11.2013	0,55	400	3060	20	
151	Kova.	11.04.2016	0,52	400	1170	20	
152	Kova.	23.05.2016	0,55	400	1720	20	
153	Kova.	11.07.2016	0,48	400	1790	21	
154	Kova.	29.08.2016	0,43	400	1930	19,5	
155	Kova.	17.10.2016	0,44	400	1930	19	

	číslo vzorku	jméno pacienta	datum odběru	hodnoty GF [ml·s <sup>-1</sup> ]	denní dávka [mg]	c IM v plazmě [ng·ml <sup>-1</sup> ]	doba užití IM před odběrem [hod]
	156	Kova.	16.01.2017	0,5	500	1840	20
	157	Pitr.	09.12.2014	0,59	400	644	24
	158	Pitr.	03.03.2014	0,55	400	682	23
	159	Pitr.	18.08.2015	0,39	400	747	23
	160	Pitr.	10.11.2015	0,44	400	672	23,5
	161	Pitr.	09.08.2016	0,27	400	1040	23
	162	Pitr.	31.01.2017	0,34	200	720	22,5
	163	Pitr.	20.12.2016	0,4	200	682	23
	164	Proch.L.	05.09.2016	0,73	400	1110	20,5
	165	Proch.L.	11.05.2015	0,97	400	1110	21
	166	Proch.L.	29.06.2015	0,95	400	1030	20,5
	167	Proch.L.	21.09.2015	0,72	400	1200	20
	168	Proch.L.	06.03.2017	0,83	400	833	21
	169	Proch.L.	05.06.2017	0,8	400	858	24
	170	Proch.L.	26.03.2018	0,64	400	1270	21
	171	Juli.	06.11.2017	0,74	400	1340	20
	172	Juli.	16.09.2013	0,75	400	1270	17
	173	Juli.	04.05.2015	0,84	400	1420	17
	174	Juli.	07.03.2016	0,83	400	2100	17
	175	Juli.	06.06.2016	0,61	400	1660	18
	176	Juli.	15.05.2017	0,81	400	1400	20
	177	Juli.	05.02.2018	0,64	400	1500	19
	178	Kopa.	06.05.2013	0,77	300	1900	20
	179	Kopa.	05.08.2013	0,73	300	1920	19
	180	Kopa.	04.11.2013	0,95	300	2010	20
	181	Kopa.	01.12.2014	0,91	300	1270	21
	182	Kopa.	23.02.2015	0,76	300	1890	20
	183	Kopa.	24.08.2015	0,82	300	2140	20
	184	Kopa.	30.11.2015	0,72	300	2050	20
8. skupina nízké hodnoty GF 7 vzorků-1 pacient 15 hod	185	Tesa.	19.08.2013	0,95	400	1260	13,5
	186	Tesa.	18.11.2013	0,84	400	1470	13
	187	Tesa.	10.11.2014	0,95	400	1380	14,5
	188	Tesa.	23.04.2018	0,67	300	1160	14
	189	Tesa.	27.06.2015	0,64	300	1040	13
	190	Tesa.	12.12.2016	0,61	300	1250	14
	191	Tesa.	13.03.2017	0,64	300	1120	14
	192	Siek.	20.03.2013	1,21	400	1110	14,5
	193	Siek.	19.06.2013	0,97	400	1190	15
	194	Siek.	18.09.2013	1,08	400	844	15
	195	Siek.	18.03.2015	1,04	400	1230	15