

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2013

Helena Rezková

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Stanovení intracelulárních hladin imatinibu
v leukocytech u pacientů s chronickou
myeloidní leukemií**

Bakalářská práce

Helena Rezková

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2013

Vedoucí práce: Mgr. Kateřina Mičová

Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením
Mgr. Kateřiny Mičové, s použitím uvedených literárních zdrojů.

V Olomouci dne 25. 4. 2013

.....

Souhrn

Chronická myeloidní leukemie je maligní myeloproliferativní onemocnění charakteristické přítomností Filadelfského chromosomu, který vzniká v důsledku reciproké translokace chromosomů 9 a 22. Dochází tak k vzniku fúzního onkogenu *BCR-ABL*, který produkuje konstitutivně aktivní tyrosinkinasu Bcr-Abl. Cílená inhibice tohoto proteinu je dnes standardní terapií chronické myeloidní leukemie. Jedním z tyrosinkinasových inhibitorů je imatinib, jehož plasmatické hladiny jsou monitorovány. Byla prokázána souvislost mezi plasmatickými hladinami imatinibu a mírou léčebné odpovědi. Hladiny imatinibu v leukocytech by mohly mít vyšší klinickou relevanci než plasmatické, a to z důvodu jeho intracelulárního mechanismu účinku. Cílem této práce bylo optimalizovat rychlou a šetrnou izolaci leukocytů z plné krve a vyvinout metodu pro stanovení intracelulárního obsahu imatinibu. Analýza byla provedena pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií. Tyto postupy byly aplikovány na leukocyty izolované z plné krve pacientů s chronickou myeloidní leukemií. Byla sledována souvislost mezi stanovenými intracelulárními hladinami imatinibu, plasmatickými hladinami imatinibu, krevním obrazem leukocytů a časem od podání poslední dávky léku. Mezi sledovanými pacienty byla zaznamenána výrazná interindividuální variabilita.

Summary

Chronic myeloid leukemia is a malignant myeloproliferative disorder, characterized by the presence of the Philadelphia chromosome, which is a consequence of reciprocal translocation of chromosomes 9 and 22. This translocation leads to the formation of fusion oncogene *BCR-ABL*, which produces a constitutively active tyrosine kinase Bcr-Abl. Targeted inhibition of this protein is a current standard therapy for this disease. One of these tyrosine kinase inhibitors whose plasma levels are monitored is also imatinib. The correlation between imatinib plasma levels and clinical response rate was proved. The levels of imatinib in leukocytes could be more clinically relevant than the plasma levels because of its intracellular mechanism of action. The aim of this thesis was to optimize rapid and gentle isolation of leukocytes from whole blood and to develop a method for the determination of intracellular content of imatinib. The analysis was performed by high performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry. These procedures were applied on the leukocytes isolated from whole blood of patients with chronic myeloid leukemia. There was observed a relationship between the determined intracellular levels of imatinib, imatinib plasma levels, white blood cell count and the time since the last dose of the drug. A significant interindividual variability among the monitored patients was observed.

Největší poděkování patří vedoucí mé bakalářské práce Mgr. Kateřině Mičové za její trpělivost, cenné rady a odborné vedení při studiu daného tématu a provedení experimentální části. Dále bych chtěla poděkovat RNDr. Davidu Friedeckému, Ph.D.; Mgr. Marcele Župkové; Mgr. Lukáši Najdekrovi a všem pracovníkům Laboratoře dědičných metabolických poruch za pomoc s plněním daného úkolu.

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).

Obsah

1 Úvod	8
2 Literární přehled	9
2.1 Leukemie	9
2.1.1 Chronická myeloidní leukemie.....	9
2.1.1.1 Průběh CML	10
2.1.1.2 Filadelfský chromosom	10
2.1.1.3 Diagnostika CML	12
2.1.1.4 Léčba CML.....	12
2.2 Imatinib.....	15
2.2.1 Mechanismus účinku IM	16
2.2.2 Farmakologie a dávkování IM.....	17
2.2.3 Rezistence na léčbu IM.....	17
2.3 Význam stanovení plasmatických a intracelulárních hladin IM	19
2.3.1 Plasmatické hladiny IM	19
2.3.2 Intracelulární hladiny IM.....	20
2.4 Využití MS v terapeutickém monitorování léčiv	22
2.4.1 Kapalinová chromatografie	23
2.4.2 Hmotnostní spektrometrie	23
2.4.2.1 Ionizace elektrosprejem.....	25
2.4.2.2 Orbitrap.....	25
3 Cíle práce.....	27
4 Materiál a metodika	28
4.1 Materiál.....	28
4.2 Přístrojové vybavení	28
4.3 Izolace leukocytů z krve	29

4.4 Extrakce IM z plasmy	31
4.5 Metoda	31
4.6 Vyhodnocení.....	33
5 Výsledky.....	33
5.1 Analýza IM v leukocytech pacientů s CML.....	38
6 Diskuse	40
7 Závěr.....	42
8 Literatura	43
9 Seznam použitých zkratk	54

1 Úvod

Chronická myeloidní leukemie je onemocnění krvetvorby vycházející z transformované hematopoetické kmenové buňky. Tvoří zhruba 15 % všech leukemií dospělého věku. V dnešní době je standardním postupem léčba za použití tyrosinkinasových inhibitorů, mezi které se řadí také imatinib. V několika studiích byla popsána závislost mezi hladinou imatinibu v plasmě a mírou léčebné odpovědi. Imatinib má však intracelulární mechanismus účinku a stanovení jeho koncentrace v leukocytech by mohlo být důležité pro klinickou praxi. Cílem experimentální části této práce je tedy stanovení intracelulárních hladin imatinibu v leukocytech pacientů trpících chronickou myeloidní leukemií, kteří jsou léčeni imatinibem, pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie spojené s hmotnostní spektrometrií.

2 Literární přehled

2.1 Leukemie

Leukemie je nádorové onemocnění krvetvorby, které se vyznačuje zmnožením nezralých leukocytů neplnících svou normální funkci. Tyto leukocyty se nacházejí v krvi, kostní dřeni a v některých případech i jiných orgánech pacienta. Podle typu zmnožených leukocytů a rychlosti průběhu rozlišujeme hlavní 4 typy leukemií: akutní myeloidní leukemii, chronickou myeloidní leukemii, akutní lymfoblastickou leukemii a chronickou lymfatickou leukemii. Leukemie postihující tvorbu monocytů nebo granulocytů označujeme jako myeloidní. Pokud je ovlivněna tvorba lymfocytů, pak leukemie označujeme jako lymfatické. Akutní formy onemocnění mají rychlý průběh a bez léčby dochází velmi rychle k úmrtí pacienta. Chronické leukemie mají postupný průběh a nemocný může žít bez léčby i několik let. V těle pacientů s akutní leukemií se zpravidla hromadí nezralé blasty, na rozdíl od chronické formy, kde se hromadí zralejší, ale ne plně funkční buňky (Protivánková *et* Vorlíček, 2001).

2.1.1 Chronická myeloidní leukemie

Chronická myeloidní leukemie (CML) je maligní klonální myeloproliferativní onemocnění, které vychází z poškozené kmenové pluripotentní hematopoetické buňky a dominuje zde proliferace myeloidní řady (Křejič *et al.*, 2008). Poprvé ji roku 1845 nezávisle na sobě popsali Rudolf Virchow a John Hughes Bennett (Deininger, 2008). Je prvním popsaným lidským nádorovým onemocněním, jehož vznik souvisí se specifickou chromosomovou změnou. Zásadním rokem pro pochopení podstaty CML byl rok 1960, kdy Peter Nowell a David Hungerford popsali malý akrocentrický chromosom přítomný u 7 pacientů s CML. Tento chromosom byl podle místa objevení nazván Filadelfský chromosom (Ph) (Nowell *et* Hungerford, 1960). Na Ph chromosomu vzniká fúzní gen *BCR-ABL*, který produkuje onkoprotein Bcr-Abl.

Incidence Ph pozitivní CML se pohybuje mezi 0,6 až 2 případy na 100 000 obyvatel. Zvýšený výskyt byl zaznamenán u osob vystavených radioaktivnímu záření. Podle provedených multicentrických studií se vyskytuje u osob vyššího věku s mediánem 48-49 let. U mužů se udává vyšší frekvence výskytu než u žen, a to zhruba v poměru 1,3-1,8 : 1 (Rohrbacher *et* Hasford, 2009). U dospělé populace tvoří CML 15 % všech druhů leukemií a v 85 % případů je diagnostikována v průběhu chronické fáze (Faderl *et al.*, 1999).

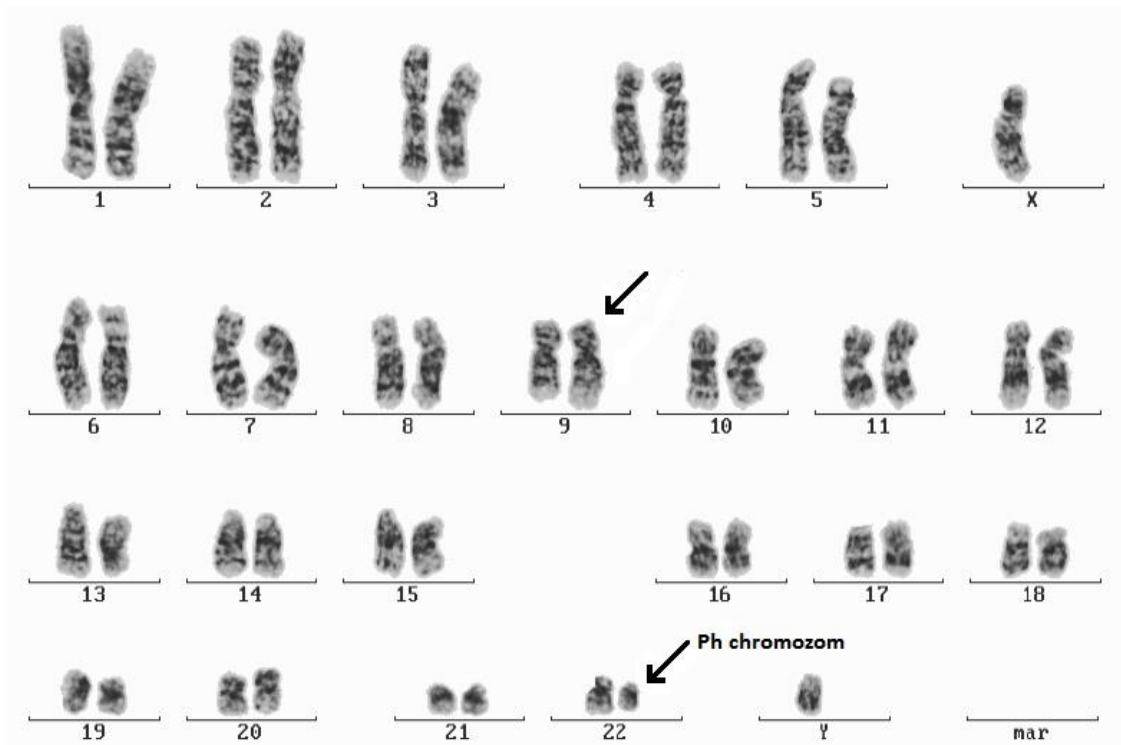
2.1.1.1 Průběh CML

Ve většině případů probíhá léčbou nekontrolovaná CML ve 3 fázích: chronické fázi, akcelerované fázi a fázi blastického zvratu. Většina pacientů je diagnostikována v chronické fázi a projevují se u nich příznaky jako např. únava, nechutenství nebo zvýšená teplota. Tato fáze může trvat několik měsíců až let, počet leukocytů je možné pomocí běžné léčby snadno snížit. Chronická fáze se může po několika letech transformovat do akcelerované fáze. Projevem akcelerované fáze CML je zvýšení počtu leukocytů, přídatné chromosomové změny, bolesti kostí, noční pocení nebo bolest břicha. Pacient přestává reagovat na léčbu a není schopen vykonávat běžné životní aktivity. Akcelerovaná fáze ve většině případů trvá několik měsíců. Pacient v akcelerované fázi se může znovu dostat do chronické fáze, pokud však léčba selže, nastává fáze blastického zvratu. V této poslední fázi přestává pacient zcela reagovat na léčbu a v kostní dřeni se výrazně zvyšuje počet nezralých blastů. Možnosti léčby CML jsou ve fázi blastického zvratu omezené (Protivánková *et* Vorlíček, 2001; Voglová *et al.*, 2010).

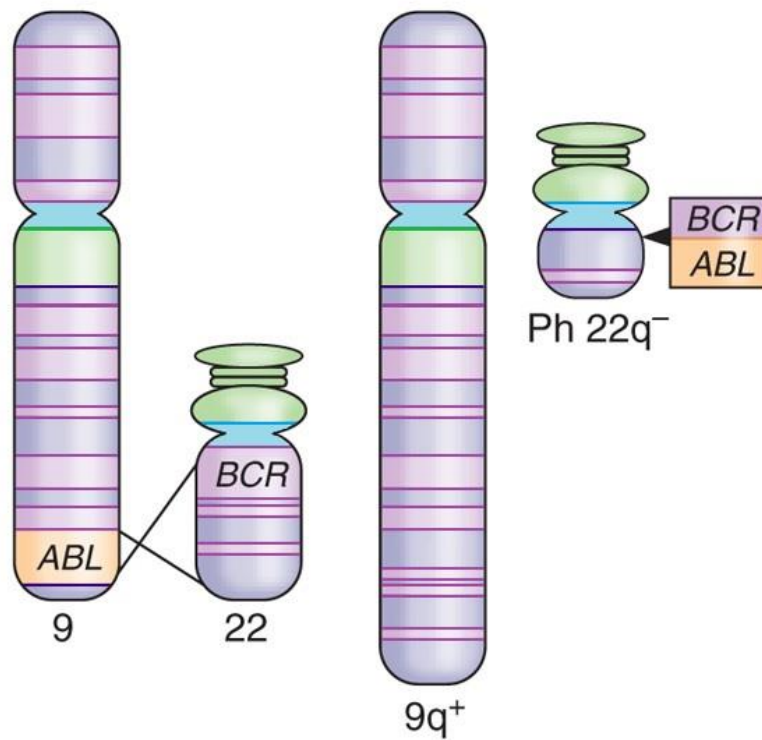
2.1.1.2 Filadelfský chromosom

Filadelfský chromosom (Obr. 1) je přítomen v kostní dřeni 90 % pacientů s CML, 15-30 % dospělých s akutní lymfoblastickou leukemií a 2 % pacientů s akutní myeloidní leukemií (Kurzrock *et al.*, 1988; Specchia *et al.*, 1995). Jedná se o zkrácený chromosom 22, který vzniká v důsledku reciproké translokace $t(9;22)(q34;q11)$ mezi dlouhými raménky chromosomů 9 a 22 (Rowley, 1973). Iniciální událostí v translokaci je zřejmě vznik dvouvláknových zlomů dvoušroubovice DNA na obou chromosomech, které vstupují do translokace. Na Ph chromosomu dochází tedy ke spojení protoonkogenu *ABL* z chromosomu 9 a genu *BCR* na chromosomu 22 (Obr. 2). Výsledkem je fúzní gen *BCR-ABL*, který je přepisován do chimerické BCR-ABL mRNA. Fúzní mRNA je následně překládána do chimerického 210 kDa proteinu označovaného jako p210^{bcr-abl} (Kurzrock *et al.*, 1988). Tento cytoplasmatický protein má konstitutivní tyrosinkinasovou aktivitu a je zásadní pro přežití a růst leukemických buněk. Protein Bcr-Abl může neregulovaně vstupovat do různých signálních drah a aktivovat je (Daley *et al.*, 1990).

S progresí CML se u 50-80 % pacientů objevují přídatné chromosomové změny. Nejčastějšími jsou trisomie 8. chromosomu, $i(17q)$ - izochromosom dlouhých ramen chromosomu 17, trisomie 19. chromosomu a dvojitý Ph chromosom. Nejčastějším cytogenetickým nálezem v akutní fázi CML je trisomie chromosomu 8 (Mitelman, 1993).



Obr. 1: Karyotyp pacienta s CML - šipky ukazují na translokované chromosomy 9 a 22, chromosom 22 je nazýván Filadelfský (Faber *et al.*, 2004).



Obr. 2: Vznik fúzního genu *BCR-ABL* (upraveno dle: Lydon, 2009).

2.1.1.3 Diagnostika CML

K základním vyšetřením v diagnostice CML patří krevní obraz a diferenciální rozpočet leukocytů. Počet leukocytů je v době stanovení zvýšen a dosahuje hodnot $20-500 \cdot 10^9/l$. V počtu převažují neutrofilní granulocyty. V periferní krvi se mohou vyskytovat zvětšené trombocyty a také jádra megakaryocytů. Významnou roli hraje také cytologie kostní dřeně, kde je pozorována redukce erytropoézy na úkor hyperplazie granulocytů a zvýšené megakaryopoézy. V průběhu akcelerované fáze se v kostní dřeni zvyšuje počet bazofilních granulocytů a blastů. Ve fázi blastického zvratu je hematopoéza nahrazena infiltrací blastických elementů (Bain *et al.*, 2002).

Cytologické vyšetření umožňuje detekci Ph chromosomu v hematopoetických buňkách, ale je časově náročné. U každého pacienta se hodnotí minimálně 20 metafází ve světelném mikroskopu a minimálně 10 metafází by mělo být karyotypováno. U 10 % pacientů s CML není možné detekovat Ph chromosom pomocí cytogenetické analýzy. U poloviny pacientů je detekován fúzní gen *BCR-ABL* pomocí molekulární analýzy, metodami fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) nebo polymerázové řetězové reakce spojené s reverzní transkripcí (RT-PCR). Pro rozeznání zlomů fúzních genů jsou využívány metody genomická PCR nebo Southern blotting. RT-PCR a Northern blotting detekují transkripty *BCR-ABL* na úrovni RNA. Western blotting a imunoprecipitace rozpoznávají protein p210^{bcr-abl} (Guo, 1991).

2.1.1.4 Léčba CML

Radioterapie byla jedním z prvních léčebných postupů aplikovaných v terapii CML. Především se využívalo ozařování celého těla nebo sleziny. Tento postup však nevedl k výraznému prodloužení života pacientů a v dnešní době je používán jen zřídka. Dříve byla k léčbě CML využívána také splenektomie. Při srovnání pacientů s odstraněnou slezinou a pacientů bez provedené splenektomie však nebyl pozorován přínos tohoto zákroku pro terapii CML (Faderl *et al.*, 1999; Faber *et al.*, 2004).

Při léčbě CML chemoterapií je využíváno cytostatik, která redukuje růst a dělení buněk. Prvním použitým cytostatikem byl roku 1953 busulfan, který prodlužoval medián přežití o několik měsíců, ale byl pro svoji vysokou toxicitu postupně nahrazen hydroxyureou (Galton, 1953; Hehlmann *et al.*, 1993). Hydroxyurea je v současnosti nejčastěji podávaným cytostatikem, a to zejména v počáteční fázi nemoci, kdy jejím působením dochází k rychlému snížení počtu leukocytů. Busulfan i hydroxyurea navozují

u 50-80 % pacientů kompletní hematologickou remisi, cytogenetická remise byla popsána pouze v několika případech (Kantarjian *et al.*, 1998; Protivánková *et Vorlíček*, 2001).

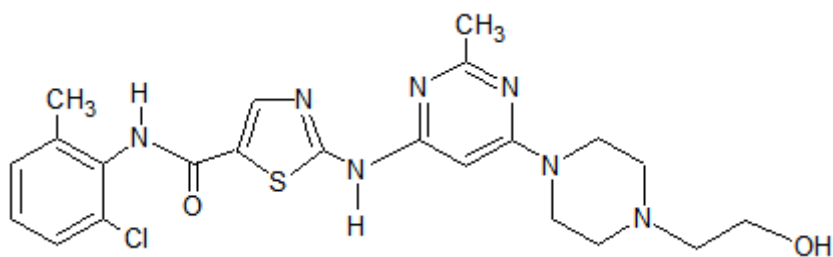
Další možností léčby CML je imunoterapie, kdy je k léčbě používán glykoprotein interferon α , který je tvořen v leukocytech při imunitní reakci. Při léčbě interferonem α dosáhlo 46-80 % pacientů kompletní hematologické odpovědi a 13-32 % pacientů kompletní cytogenetické odpovědi (CCR). Vyšší úspěšnosti léčby bylo dosaženo v kombinaci s cytosinarabiosidem nebo hydroxyureou. Před objevem tyrosinkinasových inhibitorů byl interferon α lékem první linie u pacientů, kterým nemohla být provedena transplantace krvetvorných buněk (Faderl *et al.*, 1999; Protivánková *et Vorlíček*, 2001).

Transplantace krvetvorných buněk (HSCT) hraje v terapii zásadní roli, protože je jediným léčebným postupem dosahujícím úplného vyléčení CML. Transplantace mohou být syngenní, alogenní nebo autologní. První syngenní HSCT, provedená transplantací buněk pocházejících z jednovaječného dvojčete pacienta, byla publikována v roce 1979 (Fefer *et al.*, 1979). Autologní HSCT spočívá v transplantaci vlastních hematopoetických buněk pacienta, které byly odebrány před zahájením léčby cytostatiky. V případě alogenní transplantace je nutný vhodný dárcce se shodnými HLA antigeny. Vhodným dárcem je často sourozenec nebo jiný příbuzný pacienta. Pokud není nalezen dárcce v rodině, tak je vyhledáván v registru dárců kostní dřeně. Transplantovaný štěp může pocházet z periferní krve nebo z kostní dřeně. Před provedením transplantace musí být zohledněn věk pacienta, stadium onemocnění, pohlaví dárcce i příjemce a také doba uplynulá od diagnózy do transplantace. Po transplantaci je pravděpodobnost dlouhodobého přežití u 50-80 % pacientů a možnost úplného vyléčení u 30-70 % pacientů (Horowitz *et al.*, 1996). Bohužel je HSCT spojena s řadou komplikací a rizik. Výsledkem může být infekce, relaps onemocnění nebo reakce štěpu vůči hostiteli (Protivánková *et Vorlíček*, 2001; Koza, 2010).

Objev tyrosinkinasových inhibitorů (TKI) zásadně změnil terapii CML. Mechanismus účinku spočívá v selektivní kompetitivní inhibici proteinu Bcr-Abl, což je konstitutivně aktivní tyrosinkinasa. V současné době jsou k léčbě CML schváleny 3 druhy TKI: imatinib (IM), dasatinib a nilotinib. Pro nově diagnostikované pacienty v chronické fázi CML je lékem první linie nejčastěji imatinib. V případě vzniku rezistence nebo přítomnosti silných vedlejších účinků při podávání imatinibu, je zahájena léčba TKI druhé generace - dasatinibem a nilotinibem (Jabbour *et Kantarjian*, 2012).

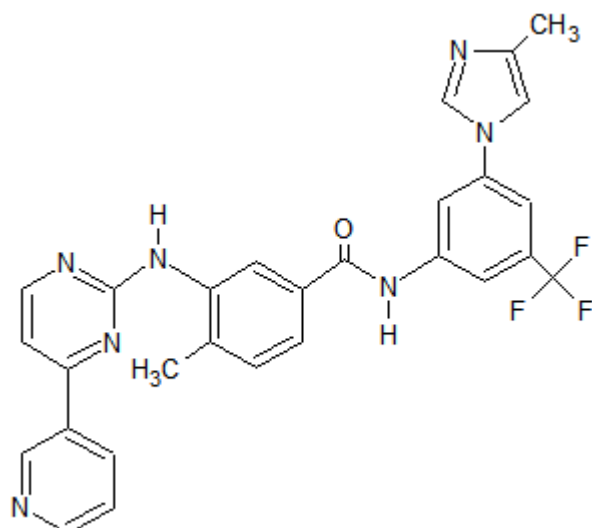
Stanovení intracelulárních hladin imatinibu je náplní praktické části mé bakalářské práce, proto tomuto léčivu věnuji samostatnou kapitolu.

Dasatinib (Obr. 3) je derivát aminopyrimidinu, který interaguje s tyrosinkinasou Bcr-Abl na ATP vazebném místě a to v inaktivní i aktivní konformaci enzymu. Dasatinib je díky této vlastnosti účinný u většiny mutovaných forem Bcr-Abl, které jsou rezistentní k imatinibu (Tokarski *et al.*, 2006). Dasatinib je při relativním srovnání účinnosti na leukemických liniích (s nemutovanou Bcr-Abl doménou) *in vitro* 325krát účinnější než imatinib a 16krát účinnější než nilotinib. S největší pravděpodobností není dasatinib účinný na leukemické kmenové buňky (Copland *et al.*, 2006). Původně byl dasatinib podáván perorálně 2krát denně v dávce 70 mg. V dnešní době se pro pacienty v chronické fázi z důvodu účinnosti a výskytu nežádoucích účinků doporučuje podávat jej jednou denně v dávce 100 mg (Shah *et al.*, 2008; Kantarjian *et al.*, 2009). V chronické fázi CML byla při dávce 100 mg jednou denně zaznamenána CCR u 98 % pacientů a velká molekulární odpověď (MMR) u 82 % pacientů. Je podáván nejen pacientům s CML, ale také pacientům s Bcr-Abl pozitivní akutní lymfatickou leukémií (Cortes *et al.*, 2009; Faber, 2007).



Obr. 3: Strukturální vzorec dasatinibu.

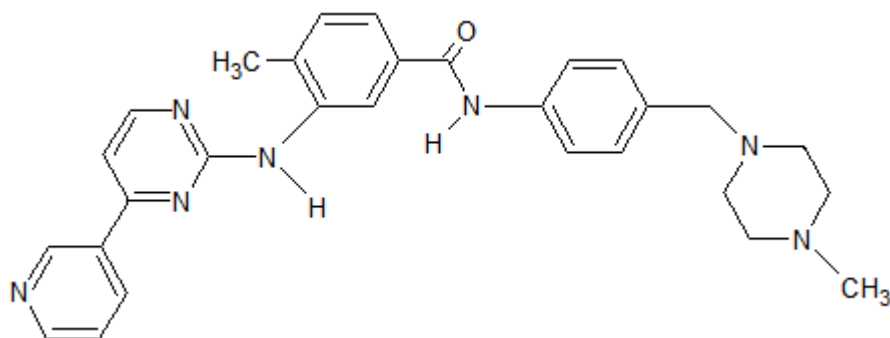
Nilotinib (Obr. 4) je selektivním TKI Bcr-Abl druhé generace na bázi aminopyrimidinu. Prokazatelně se váže k Abl kinasové doméně s 30krát větší afinitou než imatinib, takže dochází k silnější inhibici proteinu Bcr-Abl. Je používán především k léčbě pacientů rezistentních nebo netolerujících imatinib. Doporučená dávka v chronické fázi je 400 mg dvakrát denně nalačno, dvě hodiny po jídle a nejpozději hodinu před jídlem. Lék musí být podáván nalačno, protože je jeho vstřebávání ovlivněno požitím jídla. Pokud bylo nově diagnostikovaným pacientům v chronické fázi podáváno dvakrát denně 400 mg nilotinibu, dosáhlo 98 % pacientů CCR a 76 % MMR. Dále je využíván při léčbě gastrointestinálního stromálního tumoru (GIST) a systémové mastocytosy (Cortes *et al.*, 2010; Indrák *et Faber*, 2007).



Obr. 4: Strukturní vzorec nilotinibu.

2.2 Imatinib

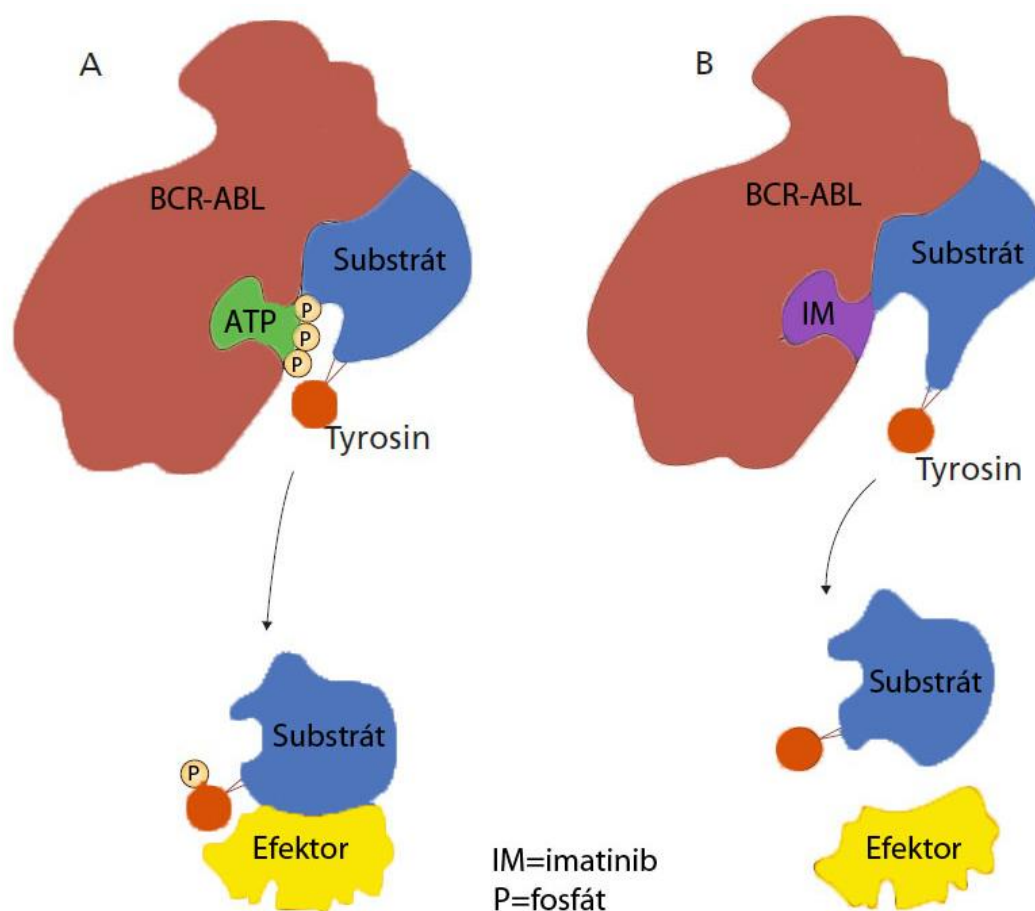
Imatinib (Obr. 5) je derivátem fenylaminopyrimidinu, který účinkuje jako selektivní kompetitivní inhibitor tyrosinových kinas Abl, Bcr-Abl, c-Kit, PDGFR α , PDGFR β a Arg. Chemicky se jedná o 4-[[4-methyl-1-piperaziny]methyl]-N-[4-methyl-3-[[4-(3-pyridinyl)-2-pyrimidinyl]amino]-fenyl]benzamidmethansulfonát. Imatinib (dále jen IM) je také označován jako Gleevec, STI-571 nebo CGP57148B. Byl syntetizován roku 1992 a od roku 2001 je v USA povolen pro léčbu CML. V České republice je od roku 2002 dostupný pod obchodním názvem Glivec (Novartis) a v přípravku je obsažen ve formě mesylátu. V současnosti je indikován jako lék první linie pro nově diagnostikované pacienty v chronické fázi CML. Dále je využíván v léčbě Ph pozitivní lymfoblastické leukemie, GIST, chronické eozinofilní leukemie a FIP1L1-PDGFR α nebo ETV6-PDGFR β pozitivní systémové mastocytosy (Faber *et* Indrák, 2010).



Obr. 5: Strukturní vzorec imatinibu.

2.2.1 Mechanismus účinku IM

Mechanismus účinku IM je nejlépe prostudován v *BCR-ABL* pozitivních buňkách. Imatinib se váže do nukleotidového vazebného místa proteinu Bcr-Abl (p210) a zabraňuje tak vazbě ATP. Enzym Bcr-Abl je vazbou IM stabilizován v inaktivní konformaci a nedochází k přenosu aktivního fosfátu na tyrosin proteinů, které patří k substrátům tohoto enzymu (Obr. 6). Díky zablokování fosforylace tyrosinových zbytků proteinů je zastavena aktivace signálních drah, které mají podíl na vzniku leukemického fenotypu buňky. Imatinib nezabraňuje vzniku genu *BCR-ABL*, ale zabraňuje uplatnění jeho účinku na proteinové úrovni. Působení IM vede u leukemických buněk k jejich apoptóze a zastavení proliferace patologického klonu. Podle současných studií nepůsobí IM na progenitorové buňky, proto nedokáže CML vyléčit, ale pouze výrazně utlumí růst leukemického klonu na klinicky bezpečnou úroveň. Proto je v dnešní době doporučováno jeho trvalé užívání i v případě, kdy pacient dosáhl dlouhodobé molekulární negativity na přítomnost *BCR-ABL* při RT-PCR (Faber, 2005; Graham *et al.*, 2002).



Obr. 6: Schéma mechanismu účinku IM: (A) Bcr-Abl bez inhibice IM, (B) Bcr-Abl inhibován IM (upraveno dle: Faber, 2005).

2.2.2 Farmakologie a dávkování IM

Po perorálním požití je IM vstřebáván rychle a nejvyšší plasmatické koncentrace dosahuje za 1-3 hodiny (Peng *et al.*, 2004). Po podání IM je jeho biologická dostupnost 98 %. K metabolizaci IM dochází převážně v játrech pomocí enzymu cytochrom P450 a to zejména jeho izoenzymem CYP3A4. Tento enzym produkuje hlavní aktivní N-demetylovaný metabolit imatinibu CGP-74588. Látky vzniklé odbouráváním IM jsou vylučovány především stolicí (80 %) a z menší části v moči (10 %). Zhruba 20 % IM je vyloučeno stolicí v původní formě. Poločas působení IM je 15-20 hodin, takže může být podáván v jedné denní dávce. V plasmě se IM váže téměř kompletně na bílkoviny, zejména albuminy a α -1-kyselý glykoprotein. Farmakokinetické parametry se po opakovaném podávání (zhruba 1 měsíc) ustalují na plasmatických hladinách 1,5-3krát vyšších než po jediném požití. Poločas terminální eliminace léku po jedné dávce dosahuje 3 týdnů (Le Coutre *et al.*, 2003; Faber, 2005).

U dětí je imatinib užíván v dávce 260-340 mg/m². U dospělých se obvykle podává 400-600 mg a ve většině případů není nutno upravovat dávku podle hmotnosti nebo povrchu těla pacienta. Účinnost léčby souvisí s dosaženou hladinou IM v plasmě. Podle jedné z provedených studií je pro dosažení velké molekulární odpovědi nutná plasmatická koncentrace IM 1002 ng/ml (Picard *et al.*, 2007). Prozatím nebyla popsána maximální tolerovatelná dávka IM, ale podle dosavadních studií nevedou dávky vyšší než 1000 mg k zvýšení účinnosti. Pokud byla naopak podávána dávka nižší než 300 mg, tak nebylo dosaženo účinné plasmatické hladiny. V chronické fázi CML je IM podáván v dávce 400 mg jednou denně během jídla s dostatečným množstvím tekutin. V pokročilých fázích onemocnění nebo při suboptimální odpovědi se denní dávka zvyšuje na 600-800 mg (Faber *et al.*, 2010).

2.2.3 Rezistence na léčbu IM

Ačkoli má většina pacientů vynikající odpověď na léčbu IM, zhruba 20 % pacientů, kterým je IM podáván, nemá kompletní cytogenetickou odpověď, další mohou mít silné nežádoucí účinky nebo mohou v průběhu terapie získat rezistenci na léčbu. Rezistence je způsobena převážně bodovými mutacemi, které vedou k snížení afinity IM k ATP vazebnému místu proteinu Bcr-Abl (Hughes *et al.*, 2010). Rezistencí můžeme rozumět neschopnost léku navodit nebo udržet požadovanou léčebnou odpověď. Rozlišujeme rezistenci primární a sekundární, kdy se v případě primární rezistence nepodařilo odpověď

navodit vůbec a v případě sekundární bylo odpovědi dosaženo, ale postupně došlo k její ztrátě (Faber, 2010).

Primární rezistence je spojena s α -1-kyselým glykoproteinem, transportním systémem hOCT-1, nadměrnou expresí genu MDR-1 nebo současným podáváním léků indukujících aktivitu CYP3A4. V důsledku vazby IM na α -1-kyselý glykoprotein se snižuje hladina léku v plasmě a je potlačena schopnost IM interagovat s Bcr-Abl kinasou. Na *in vitro* modelu bylo prokázáno, že látka erythromycin dokáže zvýšit terapeutickou hladinu IM a navodit léčebnou odpověď, protože je také schopna vazby na α -1-kyselý glykoprotein (Gambacorti-Passerini *et al.*, 2000). Influxní transportní protein hOCT-1 zabezpečuje přenos IM do vnitřního prostoru leukemických buněk. Pokud není tento protein exprimován v dostatečném množství, pak po podání IM nedochází v intracelulárním prostoru buňky k náležité inhibici proteinu Bcr-Abl a nedochází tedy k potlačení leukemického fenotypu buňky (White *et al.*, 2006). Dalším faktorem vzniku primární rezistence je nadměrná exprese genu mnohočetné lékové rezistence *MDR-1*. Tento gen kóduje P-glykoprotein, což je efluxní transmembránová pumpa, jejímž substrátem je také IM. Pokud je P-glykoproteinová pumpa přítomna v buňkách ve větším množství, pak dochází k nadměrnému vyčerpávání IM ven z buněk, snížení jeho hladiny a vzniku rezistence (Mahon *et al.*, 2003). K snížení plasmatické hladiny IM mohou přispět také lékové interakce při současném podání silných induktorů CYP3A4, kterými jsou např. dexametazon, fenobarbital, karbamazepin, rifampicin nebo třezalka (Faber, 2010).

Při vzniku sekundární rezistence hrají roli mutace v kinasové doméně Bcr-Abl, amplifikace *BCR-ABL* genu nebo aktivace *BCR-ABL* nezávislých signálních drah (Src kinasy). Nejčastěji identifikovaným mechanismem získané rezistence k IM jsou bodové mutace v Bcr-Abl kinasové doméně. Tyto mutace zeslabují vazbu IM zásahem do vazebného místa nebo stabilizací Bcr-Abl v konformaci s nižší afinitou k imatinibu. Vazba léku pak není optimální nebo je zcela znemožněna. Bodové mutace jsou detekovány zejména v oblastech P-kličky, aktivační kličky nebo katalytické domény (Hochhaus *et La Rosée*, 2004). Amplifikace genu *BCR-ABL* a nadměrná exprese proteinů Bcr-Abl jsou dalším důvodem vzniku sekundární rezistence. Tento mechanismus je závislý na aktivitě Bcr-Abl kinasy a tato rezistence může být překonána zvýšením dávky IM. Zvýšení aktivity myeloidních Src kinas způsobuje rezistenci k IM prostřednictvím mechanismu, který zřejmě zahrnuje přímou fosforylaci Bcr-Abl (Pene-Dumitrescu *et Smithgall*, 2010).

2.3 Význam stanovení plasmatických a intracelulárních hladin IM

Testování hladiny IM v krvi může být cenným nástrojem pro klinickou praxi, a to zejména pro pacienty, kteří na léčbu neodpovídají podle očekávání, u kterých je podezření na nedodržování léčebného režimu, nebo u nichž je možnost interakce IM s jinými léčivými, dále také u pacientů se silnými vedlejšími účinky. Měření plasmatických hladin IM je důležité pro optimalizaci dávkování pro konkrétního pacienta. V doposud provedených studiích bylo zjištěno, že plasmatické hladiny IM korelují s výší léčebné odpovědi (Larson *et al.*, 2008; Picard *et al.*, 2007; Takahashi *et al.*, 2010). Intracelulární hladiny IM by mohly být pro klinickou praxi důležitější než plasmatické, protože IM účinkuje uvnitř buněk, ale měření intracelulárních hladin je v dnešní době bohužel příliš komplexní pro použití v klinické praxi. Prozatím nebyla zjištěna souvislost mezi intracelulárními hladinami a mírou léčebné odpovědi (Mahon *et al.*, 2010).

Pro stanovení hladin IM v tělních tekutinách je nejčastěji využíváno metody kapalinové chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií (LC-MS/MS) (Haouala *et al.*, 2009; Titier *et al.*, 2005). Mohou být použity i další metody, např. vysokoúčinná kapalinová chromatografie ve spojení s UV detekcí a detektorem diodového pole (HPLC-UV/DAD) (Roth *et al.*, 2010). Dalším publikovaným postupem pro stanovení IM je metoda přímého nástřiku do hmotnostního spektrometru (FIA-MS/MS) (Mičová *et al.*, 2010). V moči byl IM detekován také pomocí zónové kapilární elektroforézy (Rodríguez-Flores *et al.*, 2003).

2.3.1 Plasmatické hladiny IM

Picard *et al.* (2007) provedli studii zaměřenou na stanovení plasmatických hladin IM u 68 pacientů s CML, kteří byli léčeni alespoň po dobu 12 měsíců. Z těchto pacientů bylo 50 v chronické fázi s denní dávkou IM 400 mg a 18 pacientů v akcelerované fázi s denní dávkou 600 mg. Průměrné plasmatické hladiny byly variabilní a pohybovaly se od 181 do 2947 ng/ml. Bylo zjištěno, že pacienti s CCR i s MMR dosahují významně vyšších plasmatických hladin. Konkrétní stanovené koncentrace byly u 56 pacientů s CCR 1132 ± 617 ng/ml, u 12 pacientů bez CCR 694 ± 556 ng/ml a u 34 pacientů s MMR 1452 ± 649 ng/ml, u 34 pacientů bez MMR 869 ± 427 ng/ml. Variabilita mezi pacienty byla zřejmě způsobena genetickým polymorfismem, faktory životního prostředí, jiným souběžným onemocněním nebo současně podávanými léky. Tyto faktory mohou mít vliv na farmakokinetiku IM: absorpci, distribuci, metabolismus nebo eliminaci. Podle této

studie je účinná plasmatická hladina IM 1002 ng/ml a tato nebo vyšší koncentrace je spojena s dosažením MMR (Picard *et al.*, 2007; Wilkinson, 2005).

Larson *et al.* (2008) také publikovali práci, která dokazuje korelaci mezi hladinou IM v plasmě a stupněm léčebné odpovědi. Do této studie bylo zapojeno 351 pacientů s dávkou 400 mg IM denně, kterým byly krevní vzorky odebrány 2. a 29. den od začátku léčby vždy po 24 ± 2 hodinách od podání léku. U pacientů, u kterých byla v průběhu studie zaznamenána CCR, dosahovaly plasmatické hladiny 1009 ± 544 ng/ml a u pacientů bez CCR 812 ± 409 ng/ml. Po 1 roce sledování dosáhlo MMR pouze 25 % pacientů s hladinami nižšími než 647 ng/ml. Pokud však byly plasmatické hladiny vyšší než 647 ng/ml, dosáhlo MMR 40 % nemocných. Tato studie stejně jako předchozí dokazuje souvislost mezi koncentrací IM v plasmě a mírou léčebné odpovědi (Larson *et al.*, 2008). Z výsledků těchto dvou a několika dalších studií (Ishikawa *et al.*, 2010; Sakai *et al.*, 2009; Takahashi *et al.*, 2010) je patrné, že koncentrace IM v plasmě 1000 ng/ml a vyšší, je důležitým faktorem pro dosažení lepších hodnot CCR a MMR.

2.3.2 Intracelulární hladiny IM

V posledních letech několik laboratoří publikovalo práce, ve kterých byla stanovena koncentrace TKI v plasmě. Pro stanovení intracelulárních hladin TKI však v současnosti nejsou dostupná téměř žádná data. Pokud IM účinně nevstupuje do buněk, pak se může objevit ztráta léčebné odpovědi, stejně jako tomu je u nízké koncentrace IM v plasmě. Intracelulární hladinu IM a míru odpovědi na léčbu výrazně ovlivňuje aktivita influxních a efluxních buněčných transportérů, jako hOCT-1 a P-glykoproteinová pumpa (D'Avolio *et al.*, 2011; Picard *et al.*, 2007).

D'Avolio *et al.* (2011) provedli paralelní kvantifikaci IM, dasatinibu a nilotinibu v mononukleárních buňkách z periferní krve. Pacientům bylo odebráno 10-14 ml nesrážlivé krve do zkumavek s EDTA. Buňky byly izolovány pomocí centrifugace v hustotním gradientu na vrstvě Lymphoprep. Mononukleární buňky byly následně 2krát propláchnuty 40 ml ledového PBS a centrifugovány. Pelet buněk byl rozpuštěn v 1 ml extrakčního roztoku (methanol:voda, 70:30), rozdělen do 2 kryozkumavek po 500 μ l a uložen v -80 °C do doby analýzy. Čas od odebrání krve pacientovi do rozpuštění v extrakčním roztoku nebyl delší než 1 hodina a vzorky byly udržovány v chladu, aby se zamezilo ztrátě léčiv. Analýza byla provedena s použitím vysokoúčinné kapalinové chromatografie spojené s hmotnostní spektrometrií (HPLC-MS). Průměrné poměry

koncentrací (buňky/plasma) byly 7,8; 35,3 a 5,7 pro IM, dasatinib a nilotinib (D'Avolio *et al.*, 2011).

Mlejnek *et al.* (2011) publikovali metodu pro stanovení intracelulárních hladin IM v buněčné linii K562 a její k IM rezistentní variantě K562/Dox. U rezistentní varianty byla dokázána nadměrná exprese P-glykoproteinu. Buňky byly inkubovány v kultivačním médiu s IM nebo jeho hlavním metabolitem CGP-74588 v 5% atmosféře CO₂ při 37 °C. Separace buněk z média probíhala centrifugací přes silikonový olej. Pelet buněk byl extrahován 400 µl ledového roztoku buď 4% kyseliny trichloroctové, 4% kyseliny mravenčí, 100% methanolem, 50% methanolem ve vodě, 1% kyseliny trichloroctové s 50% methanolem ve vodě nebo 1% kyselinou mravenčí s 50% methanolem ve vodě. Buněčné extrakty byly pročištěny centrifugací a následně 10krát zředěny vodou pro analýzu kapalinovou chromatografií spojenou s tandemovou hmotnostní spektrometrií (LC-MS/MS). Podle výsledků byla nejúčinnějším extrakčním roztokem 4% kyselina mravenčí. Po 1,5-12 hodinách byly intracelulární hladiny IM a CGP-74588 v obou buněčných liniích bez výrazných změn. V obou buněčných liniích byla pozorována lineární závislost mezi extracelulární a intracelulární koncentrací IM. Podle očekávání byla hladina IM v rezistentní linii K562/Dox 7-8krát nižší než v linii citlivé K562 (Mlejnek *et al.*, 2011).

Klawitter *et al.* (2009) ve své práci použili pro kvantifikaci IM v krvi a v buňkách buněčné linie K562 metodu LC/LC-MS/MS. Jediným manuálním krokem v průběhu extrakce vzorků krve a buněčných kultur byla precipitace proteinů. Roztok pro precipitaci obsahoval vnitřní standard trazodon o koncentraci 2 ng/ml. Do 200 µl vzorku bylo přidáno 800 µl precipitačního roztoku, výsledný roztok byl 10 minut vortexován a 10 minut centrifugován při 4 °C. Leukemické buňky byly před extrakcí spočítány a propláchnuty ledovým PBS, aby došlo k odstranění extracelulárního IM. Po centrifugaci byly pelety zmrazeny tekutým dusíkem a naředěny 200 µl vody s 800 µl precipitačního roztoku s trazodonem. Následně byly vzorky 10 minut vortexovány, 10 minut sonifikovány v ultrazvukové lázni a 10 minut centrifugovány. Supernatanty byly přeneseny do HPLC vialek a následně byla provedena analýza. Tento postup byl úspěšně použit pro kvantifikaci intracelulárních a extracelulárních koncentrací IM v leukemických buňkách a jejich kultivačním médiu. V buňkách buněčné linie K562 kultivovaných po dobu 24 hodin s 1 µM IM byla intracelulární koncentrace 0,08 µM IM/10⁷ buněk (Klawitter *et al.*, 2009).

2.4 Využití MS v terapeutickém monitorování léčiv

V posledních letech bylo zjištěno, že je možné díky měření hladin léčiv v krvi optimalizovat terapeutické využití vybraných léků pomocí individualizace jejich dávkování. Proto bylo do praxe zavedeno terapeutické monitorování léčiv (TDM), které spočívá ve stanovení hladin léků v daných intervalech, s cílem dosažení stálé koncentrace v krevním oběhu pacienta. Plasmatická koncentrace léčiv musí být udržována v rozmezí terapeutického okna, při vyšších koncentracích hrozí toxicita a při nižších ztráta terapeutického účinku. Léčiva, která jsou monitorována, mají většinou úzké terapeutické okno, výraznou farmakokinetickou variabilitu, je obtížné monitorovat jejich cílové koncentrace a vyvolávají nežádoucí účinky. Monitorována jsou např. imunosupresiva, antibiotika, antiepileptika, antidepresiva, protirakovinná léčiva, antivirotika nebo antimykotika. Koncentrace léčiv mohou být stanoveny různými metodami, mezi které se řadí fluorescenční polarizační imunoanalýza (FPIA), enzymová multiplikační imunoanalýza (EMIT), enzymová imunoabsorbční analýza (ELISA) a také kapalinová chromatografie spojená s UV detekcí nebo hmotnostní spektrometrií (Kang *et Lee*, 2009; Haouala *et al.*, 2009).

K významným monitorovaným protirakovinným léčivům lze zařadit právě imatinib, který je monitorován z důvodu své toxicity při vyšších plasmatických hladinách a ztrátě terapeutického účinku při nižších hladinách. Variabilita v plasmatických hladinách mezi jednotlivými pacienty může být způsobena genetickým polymorfismem, současně podávanými léky nebo dalším onemocněním. Pro IM je doporučená cílová koncentrace v plasmě 1000 ng/ml (Takahashi *et Miura*, 2011). Dalším příkladem monitorovaného léčiva je imunosupresivum cyklosporin A, monitorované u pacientů pro svou variabilitu v adsorpci, úzké terapeutické okno a léky indukovanou nefrotoxicitu. Terapeutické okno cyklosporinu A je stanoveno mezi 100-250 ng/ml. Při plasmatických hladinách vyšších než 300 ng/ml je nefrotoxický (Mohammadpour *et al.*, 2010; Schulz *et Schmoldt*, 2003). Digoxin je používané antiarytmikum s velmi úzkým terapeutickým oknem (0,5-2 ng/ml). Pokud je jeho plasmatická hladina vyšší než 2,5-3,0 ng/ml; způsobuje tachykardie a fibrilace komor (Kang *et Lee*, 2009; Schulz *et Schmoldt*, 2003). Dalším příkladem monitorovaného léku je cytostatikum 5-fluorouracil, které je indikováno k léčbě solidních nádorů. Jeho terapeutické okno je 50-300 ng/ml a v plasmatických hladinách vyšších než 400-600 ng/ml působí toxicky pro trávicí soustavu nebo myelosupresivně (Gamelin *et al.*, 1996; Schulz *et Schmoldt*, 2003).

2.4.1 Kapalinová chromatografie

Kapalinová chromatografie (LC) je separační technika, ve které jsou složky vzorku separovány a selektivně distribuovány mezi dvě nemísitelné fáze: mobilní a stacionární. Mobilní fází je v případě LC kapalina, která nese molekuly vzorku skrze stacionární fází vázanou v koloně. Stacionární fáze se skládá z malých porézních částic s velkým povrchem (např. oxid křemičitý) pokrytých různými ligandy. Separace molekul vzorku je založena na jejich různé afinitě k povrchu stacionární fáze a na jejich interakci s fází mobilní. Pokud molekuly interagují se stacionární fází silně, pak se budou v chromatografické koloně pohybovat pomaleji a jejich retenční časy budou delší. Pokud molekuly interagují silněji s mobilní fází než s fází stacionární, pak budou eluovány dříve a jejich retenční časy budou kratší. Základními komponenty kapalinového chromatografu jsou vysokotlaká pumpa pro mobilní fází, injektor vzorku, separační kolona a detektor. Pokud je eluát veden pro analýzu a detekci přímo do hmotnostního spektrometru, pak musí být na rozhraní odstraněny těkavé komponenty mobilní fáze a analyzované látky musí být převedeny do plynné fáze (Ardrey, 2003a; McMaster, 2005; Westman-Brinkmalm *et al.*, 2009).

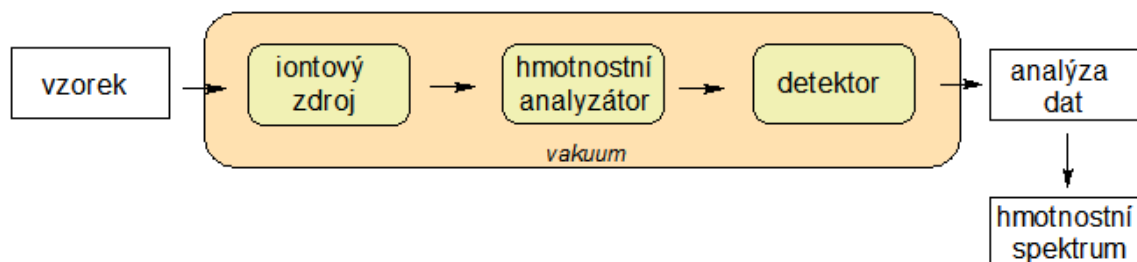
V případě vysokoúčinné kapalinové chromatografie je mobilní fáze pumpována pod vysokým tlakem (větším než $4 \cdot 10^7$ Pa), aby byl zajištěn konstantní průtok skrze stacionární fází v koloně, která musí odolat těmto vysokým tlakům. V praktické části této práce byla použita kolona C18 s reverzní fází. V kolonách s reverzní fází je stacionární fází často oxid křemičitý s kovalentně vázanými uhlíkovými řetězci. Retenční čas je delší pro hydrofobnější molekuly a může být snížen přidáním nepolárního rozpouštědla do mobilní fáze. Hydrofobicita molekul vzorku je závislá na pH, proto jsou často k mobilní fází přidávány organické kyseliny, jako kyselina mravenčí nebo kyselina octová (Ardrey, 2003a; Westman-Brinkmalm *et al.*, 2009).

2.4.2 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie (MS) je citlivá analytická technika, která je schopná kvantifikovat známé analyty a identifikovat množství a koncentraci neznámé molekuly na úrovni pikomolů až femtomolů. Elektroneutrální atomy nebo molekuly jsou ionizovány a následně analyzovány jako nabitě ionty v plynné fází, které jsou charakterizovány svou hmotou (m) a nábojem (z) a jsou separovány na základě poměru m/z . Hmotnostní spektrometr je přístroj, který přesně měří množství molekul, které byly přeměněny

na ionty. V hmotnostním spektru, které je výsledkem této analýzy, je pak použito poměru m/z jako nezávisle proměnné bezrozměrné veličiny (Hopfgartner, 2007).

Hmotnostní spektrometr se skládá z následujících částí: zařízení pro zavádění vzorku, iontový zdroj, jeden nebo více hmotnostních analyzátorů, detektor pro měření množství iontů a systém pro analýzu dat (Obr. 7). Většina hmotnostních analyzátorů pracuje ve vakuu nebo při nízkém tlaku, aby se nabitě částice nevychylovaly ze svých drah a doputovaly až k detektoru.



Obr. 7: Obecné schéma hmotnostního spektrometru.

Vzorek je v iontovém zdroji převeden na ionty v plynné fázi. K dispozici je poměrně velký počet typů iontových zdrojů, které jsou voleny zejména na základě aplikace a podle typu vzorku. V posledních desetiletích byl hledán vhodný iontový zdroj, který by propojil HPLC s MS/MS. Zavedení ionizace za atmosférického tlaku (API) umožnilo HPLC-MS stát se standardní analytickou technikou pro mnoho farmaceutických aplikací. Dvěma nejdůležitějšími API technikami jsou ionizace elektrosprejem (ESI) a chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI) (Hsieh, 2005; Westman-Brinkmalm *et Brinkmalm*, 2009).

Hmotnostní analyzátor je zařízení, které je schopno separovat atomy, molekuly nebo klastry na základě jejich hmoty. V současnosti používané analyzátorů jsou založeny na elektromagnetismu, takže mohou separovat pouze nabitě částice. Analyzátor separuje ionty přicházející z iontového zdroje na základě poměru jejich m/z . Existuje několik typů hmotnostních analyzátorů, např. magnetický, elektrostatický, kvadrupólový, analyzátor doby letu nebo iontová past. Jedním z používaných hmotnostních analyzátorů je také Orbitrap, který byl použit v rámci praktické části této práce (Westman-Brinkmalm *et Brinkmalm*, 2009).

2.4.2.1 Ionizace elektrosprejem

V praktické části této práce byla použita ionizace elektrosprejem (ESI) probíhající za atmosférického tlaku. Vzorek je přiváděn do kovové kapiláry, na které je udržováno vysoké napětí. Pro tvorbu pozitivních iontů je obvykle používáno napětí 3-4 kV a pro tvorbu negativních iontů je napětí nepatrně nižší. Toto vysoké napětí rozptýlí proud vzorku a vytvoří tak mnoho malých vysoce nabitých kapek, ze kterých je následně při průchodu iontovým zdrojem hmotnostního spektrometru odpařováno rozpouštědlo. Velikost kapek se zmenšuje až do bodu, kdy jsou odpudivé síly mezi náboji na povrchu kapek dostatečné pro překonání kohezních sil povrchového napětí. Po překonání tohoto bodu dojde ke Coulombické explozi, která produkuje velký počet menších kapek s poloměrem odpovídajícím zhruba 10 % poloměru původní kapky. Po několika explozích je dosaženo bodu, kdy je v kapičkách přítomen dostatek iontů příslušných analytů. Tyto kapičky s ionty jsou následně přenášeny přes sérii čoček do hmotnostního spektrometru (Ardrey, 2003b).

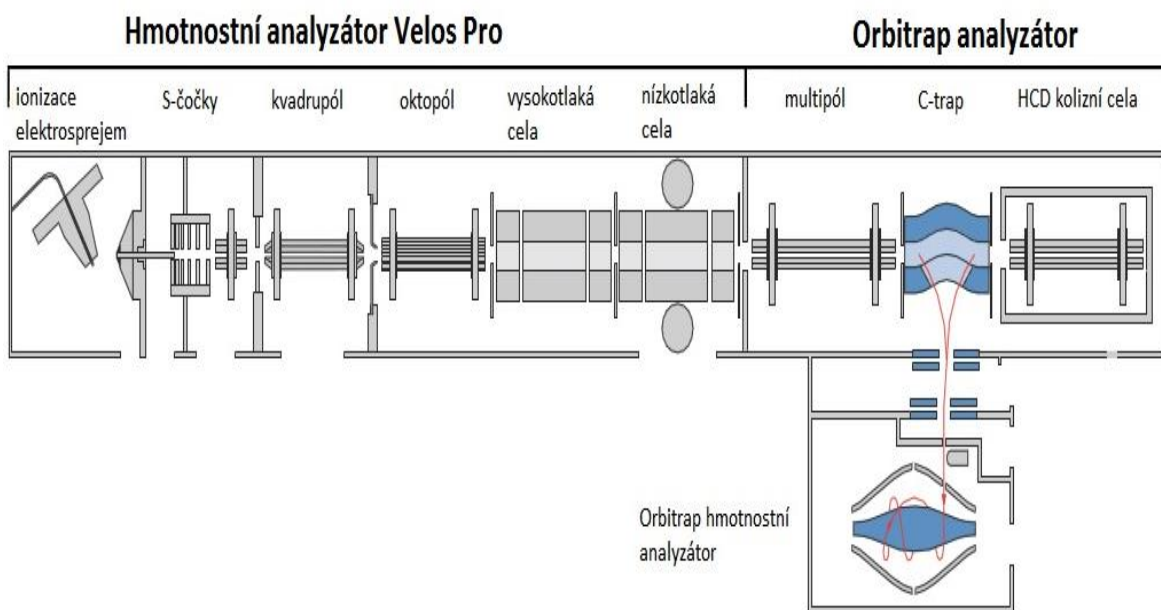
2.4.2.2 Orbitrap

Orbitrap je novým typem hmotnostního analyzátoru, který zachycuje ionty v elektrostatickém poli a kombinuje kvadrupólový a logaritmický potenciál. Díky absenci magnetického a radiofrekvenčního pole je stability iontů dosaženo rotací iontů kolem speciálně tvarované axiální elektrody. Byl představen Alexanderem Makarovem v době, kdy bylo potřebné vyvinout metodu hmotnostní spektrometrie levnou na údržbu a provoz, která by určila přesnou hmotnost analytů. Výhodné je využití hybridního systému, který je tvořen lineární iontovou pastí (LTQ), C-trap a Orbitrap analyzátozem. Tento hybridní systém umožňuje mnohonásobnou fragmentaci (MS^n) a kombinuje různé zdroje ionizace jako je ESI, nanoelektrosprej, APCI apod. Technologie Orbitrap je využívána pro řadu aplikací od rutinní identifikace sloučenin po analýzu stopových množství látek v komplexních směsích, např. v proteomice, metabolismu léčiv, kontrole dopingů nebo detekci kontaminace v jídle a krmivech (Makarov, 2000; Makarov *et Scigelova*, 2010).

Orbitrap analyzátor je tvořen dvěma osově souměrnými elektrodami. Vnitřní elektroda je vřetenovitého tvaru a vnější je tvaru soudkovitého. Mezi tyto dvě elektrody je přiveden konstantní elektrický potenciál. Elektrické pole mezi povrchy elektrod se mění. Ionty jsou do Orbitrap analyzátoru přiváděny z C-trap v pravém úhlu k ose analyzátoru, jako jednotlivé svazky s danou kinetickou energií. C-trap je zakřivená lineární iontová

past, která skládá je ionty před vstupem do Orbitrap analyzátoru. Správně injektované ionty se pak v analyzátoru pohybují po kruhových drahách nad vnějším povrchem vřetenovité elektrody a pod vnitřním povrchem soudkovité elektrody. Poloměr kruhové dráhy je dán rovnováhou mezi elektrodynamickou dostředivou silou a odstředivou silou, která působí na ionty ovlivněné svou původní tangenciální rychlostí. Ionty v kruhových drahách oscilují podél vnitřní elektrody s určitou frekvencí, která vytváří proud. Tento signál je detekován a zpracován pomocí Fourierovy transformace, která jej převádí na hmotnostní spektrum. Orbitrap dosahuje vysoké rozlišovací schopnosti, hmotnostní přesnosti a dynamického rozsahu (Makarov *et Scigelova*, 2010; Watson *et Sparkman*, 2007).

V praktické části této práce byl konkrétně použit Orbitrap Elite, který poskytuje hmotnostní rozlišení větší než 240 000 FWHM (při m/z 400). Jednotlivé části tohoto hmotnostního spektrometru jsou popsány na Obr. 8 (Hardware manual, Thermo Fisher Scientific, 2011).



Obr. 8: Schéma hmotnostního spektrometru Orbitrap Elite (upraveno dle: Hardware manual, Thermo Fisher Scientific, 2011).

3 Cíle práce

- Optimalizace rychlé a šetrné izolace leukocytů z plné krve
- Vývoj a optimalizace metody pro stanovení intracelulárního obsahu imatinibu v leukocytech u pacientů s CML
- Aplikace na reálné vzorky pacientů s CML na terapii imatinibem

4 Materiál a metodika

4.1 Materiál

Krev pacientů byla získána z Hematoonkologického oddělení (HOK), FN Olomouc. Pacientům s CML byla odebrána nesrážlivá krev do zkumavek s EDTA. Krev byla ihned zpracována dle níže uvedeného postupu.

Imatinib získaný od firmy LC laboratories (Woburn, MA, USA), byl použit ve formě methansulfonové soli a rozpuštěn v DMSO na výslednou koncentraci 1 mg/ml. Jako interní standard byl použit deuterovaný IM rozpuštěný v DMSO na koncentraci 1 mg/ml a následně naředěný do methanolu na výslednou koncentraci 100 ng/ml.

Reagencie hydroxid amonný, kyselina mravenčí, methanol, acetonitril a voda měly analytický stupeň čistoty a byly získány od firmy Sigma Aldrich (Saint Louis, MO, USA). Separční médium Histopaque také pocházelo od firmy Sigma Aldrich. Lyzační roztok a roztok PBS pocházely z lékárny FN Olomouc. Pro přípravu složky A mobilní fáze byla použita kyselina mravenčí o koncentraci 10 mmol/l, titrovaná hydroxidem amonným na pH 4. Složka B obsahovala čistý acetonitril.

Lyzační roztok obsahoval 41,45 g chloridu amonného; 3,95 g hydrogenuhličitanu amonného; 50 ml EDTA o koncentraci 0,1 mol/l (pH=8), byl doplněn do 500 ml H₂O a pH bylo upraveno na výslednou hodnotu 6,5. Roztok PBS obsahoval 80 g chloridu sodného; 2 g chloridu draselného; 36,4 g dodekahydrátu hydrogenfosforečnanu disodného; 2,4 g dihydrogenfosforečnanu draselného a doplněn do 1 l H₂O. Následně byl roztok PBS upraven pomocí hydroxidu sodného na výsledné pH 7,4.

4.2 Přístrojové vybavení

Chlazená centrifuga Rotina 420 R (Hettich zentrifugen, Německo)

Vortex V-1 plus (BioSan, ČR)

Světelný mikroskop CK 40 (Olympus, Japonsko)

Centrifuga Mikro 120 (Hettich zentrifugen, Německo)

pH metr CyberScan PC 510 (Thermo scientific, Waltham, MA, USA)

Ultrazvuková lázeň PS-40 (Jeken, Čína)

Analytické váhy ABT 120-5DM (Kern, Německo)

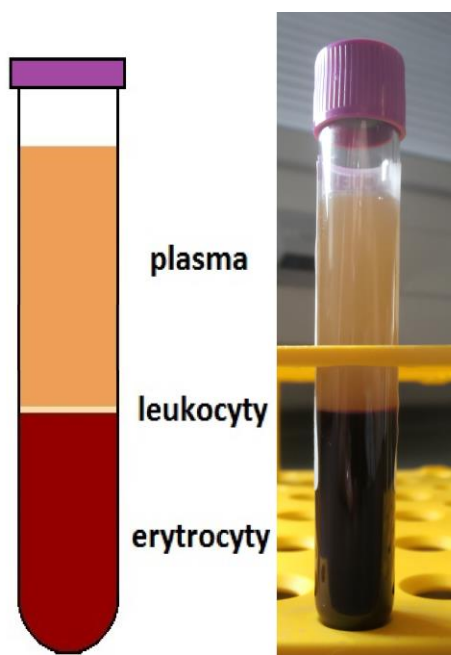
Lyofilizátor (FreeZone, Labconco, USA)

Orbitrap Elite (Thermo scientific, Waltham, MA, USA)

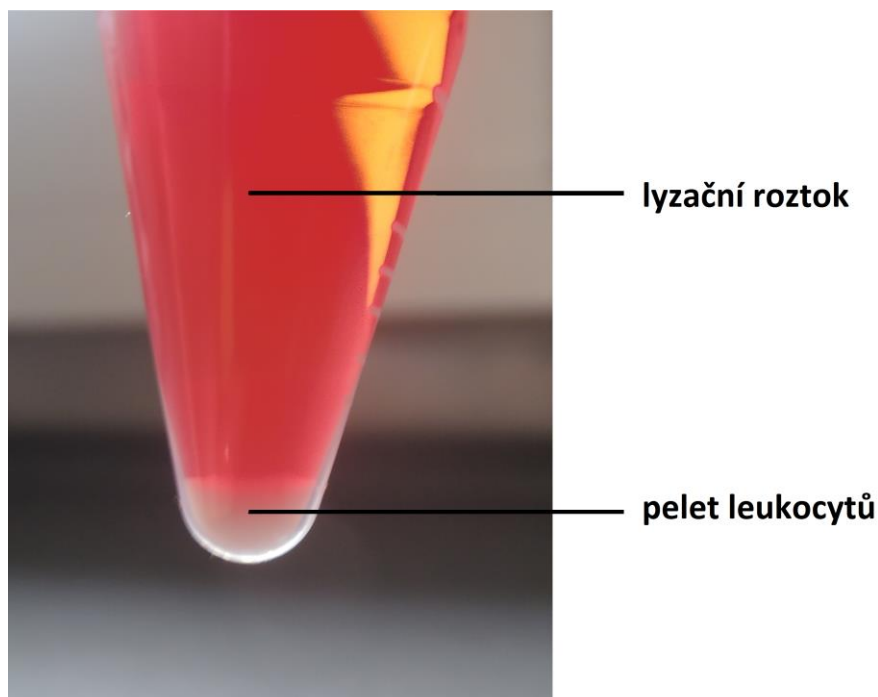
HPLC Ultima 3000 RS (Dionex, Sunnyvale, CA, USA)

4.3 Izolace leukocytů z krve

Nesrážlivá krev o objemu 9 ml ve zkumavkách s EDTA byla po odebrání pacientovi centrifugována na chlazené centrifuze Hettich Rotina 420 R po dobu 15 minut při 4 °C a 1 400 RPM. Následně byla do mikrozkušavky typu Eppendorf odebrána plazma a do 15 ml zkumavky pomocí Pasteurovy pipety sesbírána separovaná vrstva leukocytů (Obr. 9). Do zkumavky bylo přidáno 10 – 12 ml lyzačního roztoku a po 5 minutách, kdy došlo k lýze erytrocytů, byla zkumavka znovu centrifugována po dobu 10 min při 4 °C a 1 400 RPM (Obr. 10). Supernatant byl odebrán a vzniklý pelet rozpuštěn v 500 µl PBS. Vzorek byl následně lyofilizován, rozpuštěn v 200 µl methanolu z důvodu deproteinace a centrifugován po dobu 10 minut při pokojové teplotě a 14 000 RPM. Vzniklý supernatant byl převeden do vialek a následně analyzován.



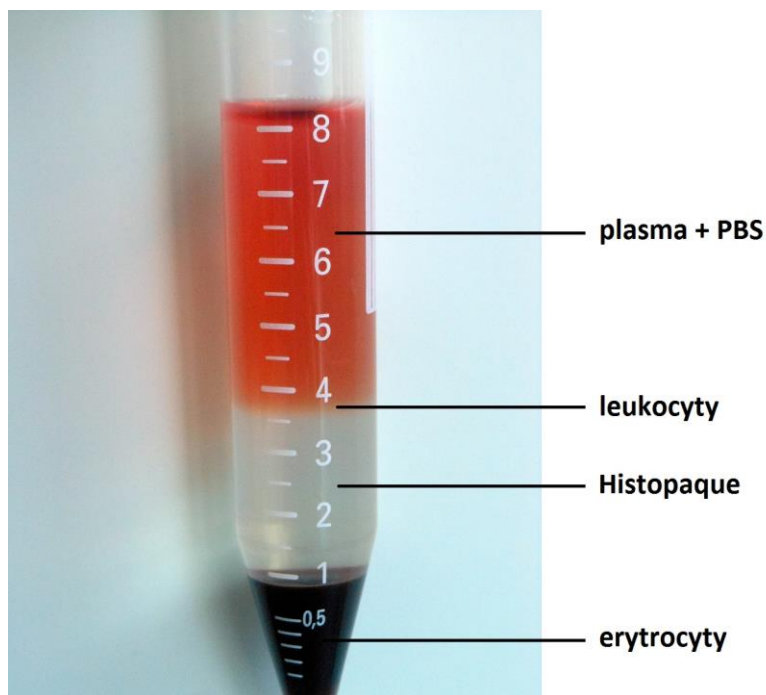
Obr. 9: Oddělení krevních složek po centrifugaci (schéma a reálný vzorek).



Obr. 10: Pelet leukocytů po centrifugaci s lyzačním roztokem.

Nejprve jsme pro separaci leukocytů využívaly gradientovou centrifugaci přes vrstvu Histopaque. Krev byla naředěna s PBS v poměru 3:5, navrstvena na separační médium v poměru 2:1, centrifugována a následně byla pipetou odebrána separovaná vrstva leukocytů (Obr. 11). Tímto postupem se však doba izolace leukocytů výrazně prodloužila, proto jsme zvolily centrifugaci plné krve bez použití tohoto separačního média. Pokud jsme krev centrifugovaly při otáčkách vyšších než 1 500 RPM, docházelo k poškození buněk. Při nižších otáčkách (1 200 – 1 300 RPM) bylo pro zabezpečení úplné separace leukocytů nutno vzorek centrifugovat delší dobu. Kvůli aktivitě buněčných transportérů jsme však potřebovaly leukocyty separovat co nejrychleji. Jako optimální podmínky byly tedy stanoveny otáčky 1 400 RPM, čas 15 minut a teplota 4 °C.

Krevní obrazy pacientů byly získány z oddělení HOK, FN Olomouc.



Obr. 11: Centrifugace krve naředěné s PBS přes separační médium Histopaque.

4.4 Extrakce IM z plasmy

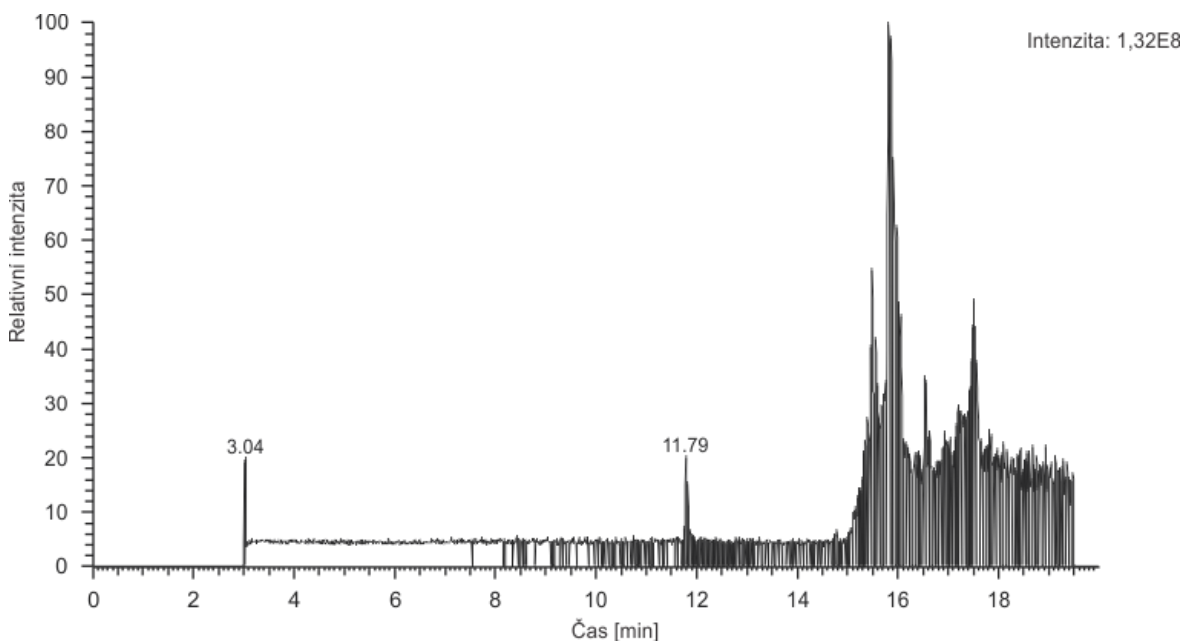
Po rozmražení plasmy, odebrané po centrifugaci plné krve, bylo pro analýzu použito 50 μ l vzorku, ke kterému bylo přidáno 150 μ l methanolu s deuterovaným IM, aby došlo k precipitaci plasmatických proteinů. Vzorky byly následně 30 sekund vortexovány, 1 minutu sonifikovány v ultrazvukové lázni a uloženy v mrazáku po dobu 30 minut při teplotě -20 $^{\circ}$ C pro lepší vysrážení plasmatických proteinů. Poté byly centrifugovány po dobu 10 minut a 14 000 RPM. Vzniklý supernatant byl převeden do vialek a analyzován. Tato analýza probíhala jako rutinní stanovení plasmatických hladin IM v Laboratoři dědičných metabolických poruch (LDMP), FN Olomouc.

4.5 Metoda

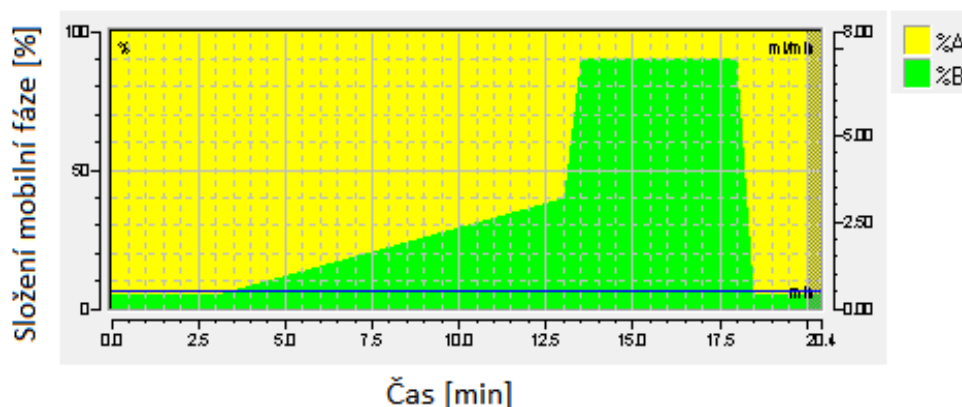
Veškeré experimenty byly provedeny na přístroji Dionex Ultima 3000 RS ve spojení s hmotnostním spektrometrem Orbitrap Elite od firmy Thermo scientific.

Chromatografická separace (Obr. 12) probíhala na koloně s reverzní fází Kinetex C18 1,7 μ m (2,1x100 mm, Phenomenex, Torrance, UCA). Mobilní fáze A byla složena z mravenčanu amonného o koncentraci 10 mmol/l a pH 4 a mobilní fáze B byla složena z čistého acetonitrilu. V čase 0-3 minuty byla mobilní fáze složena z 5 % B, v čase

3-13 minut byl aplikován gradient z 5 % na 40 %. Poté bylo během půl minuty zvýšeno množství mobilní fáze B z 40 % na 90 %; v čase 13,5-18 minut byla udržována konstantní hladina B na 90 %. Následně byly během půl minuty navráceny iniciální podmínky složení mobilní fáze na 5 % B, které byly udržovány na této hodnotě až do konce analýzy (Obr. 13). Celková doba analýzy byla 20 minut. Kolona byla termostatována na 40 °C; průtok mobilní fáze byl nastaven na hodnotu 0,5 ml/min; separace probíhala při tlaku zhruba 600 barů.



Obr. 12: Záznam celkového iontového proudu (TIC, total ion chromatogram) separace.



Obr. 13: Schéma gradientové eluce.

Pro detekci a kvantifikaci byl použit hmotnostní spektrometr Orbitrap Elite (Thermo Scientific) s ionizací elektrosprejem v pozitivním módu. Měření bylo provedeno v plném skenu („full scan“) v rozsahu m/z 350-800 při rozlišení 60 000 FWHM a přesnost měření byla stanovena do 5 ppm. Při měření MS^2 spekter bylo použito módu CID („Collision induced dissociation“) s kolizní energií 35 V. Parametry iontového zdroje byly optimalizovány na nastavení uvedeného v tabulce I.

Tabulka I: Parametry nastavení iontového zdroje.

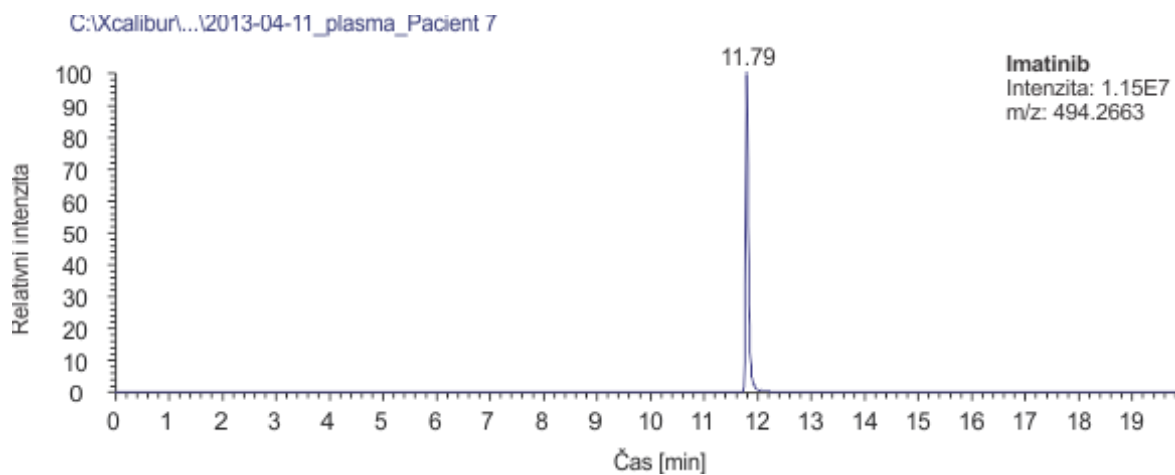
Teplota sprejovací kapiláry [°C]	360
Průtok „sheath gas“ [arb.]	35
Průtok „auxillary gas“ [arb.]	10
Průtok „sweep gas“ [arb.]	0
Napětí zdroje [kV]	3
Teplota vnitřní kapiláry [°C]	350

4.6 Vyhodnocení

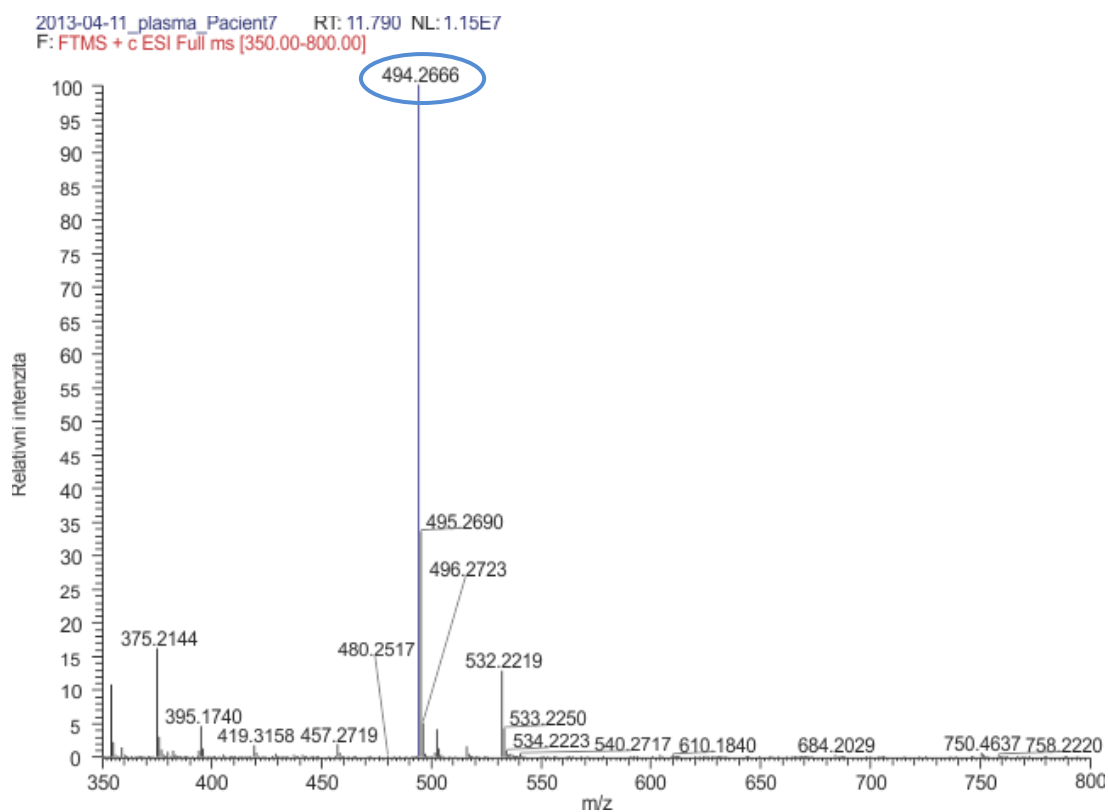
Veškerá vyhodnocení analytů při měření reálných vzorků pacientů byla provedena vztážením IM na interní standard (deuterovaný IM). Data byla zpracovávána programem Xcalibur 2.2 SP1, koncentrace byla vypočtena z ploch pík analytu a interního standardu pomocí programu Metworks 1.3 SP3.

5 Výsledky

Metoda byla aplikována na vzorky leukocytů a plasmy pacientů s CML na terapii IM. Celkem bylo zpracováno 11 vzorků plné krve pacientů užívajících 400 mg léčiva denně či obden. Krev byla odebírána v časovém intervalu 2 až 48 hodin od poslední podané dávky IM. Sledované analyty byly IM; demetylovaný IM a deuterovaný IM o přesných hmotách m/z 494,2663; 480,2506 a 502,3165. Pro identifikaci byly z TIC chromatogramu vyextrahovány přesné hmoty námi sledovaných analytů (Obr. 14; Obr. 17; Obr. 20), pro ověření byly použity MS (Obr. 15; Obr. 18) a MS^2 spektra (Obr. 16; Obr. 19).

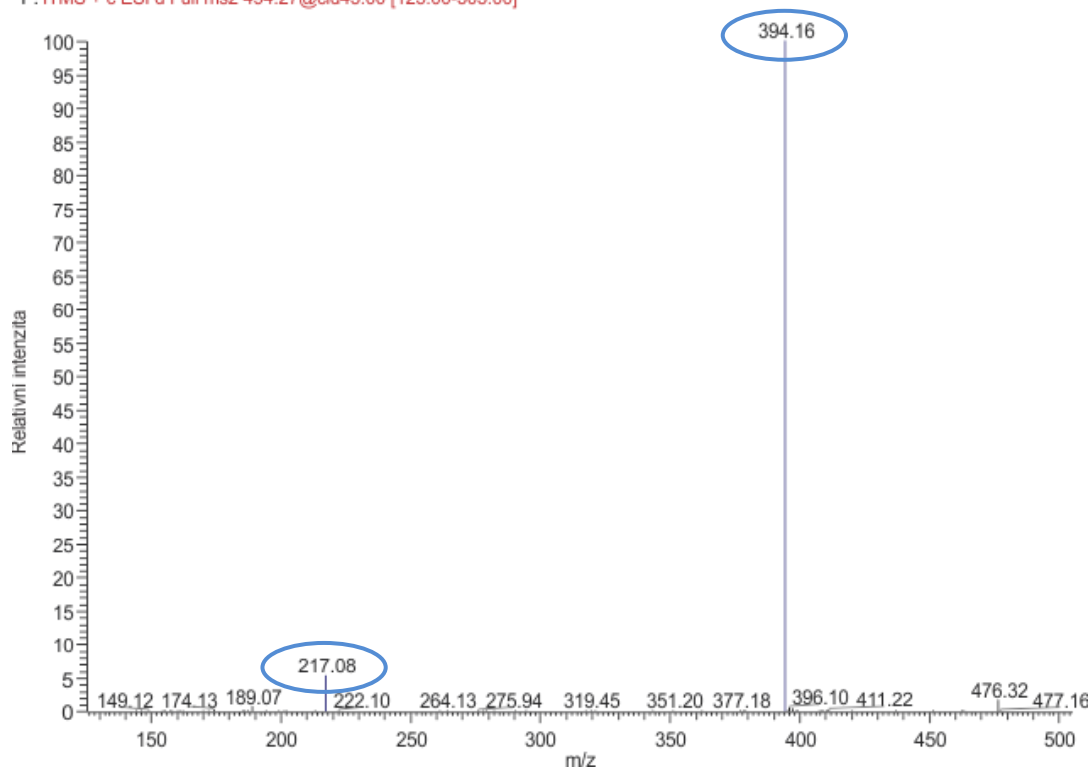


Obr. 14: Extrahovaný chromatogram IM.



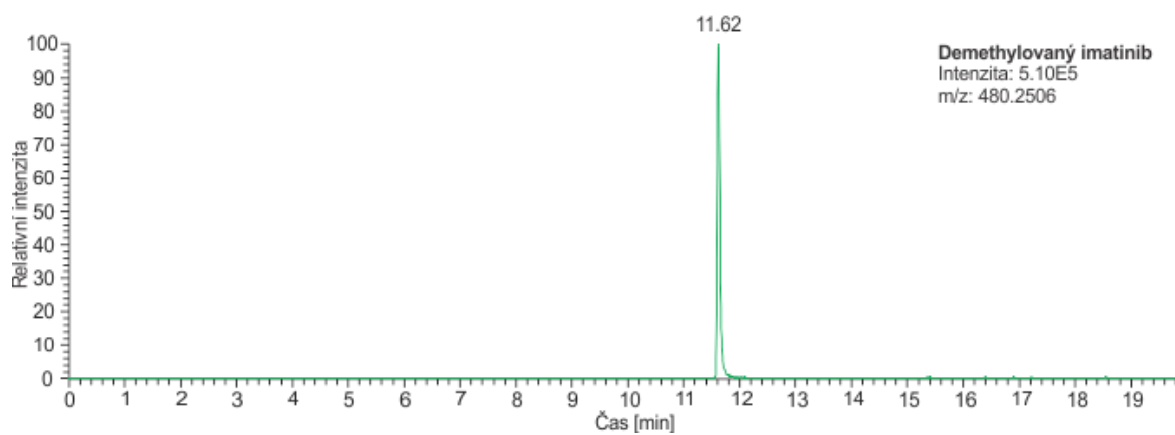
Obr. 15: Hmotnostní spektrum IM.

2013-04-11_plasma_Pacient 7 RT: 11.796 NL:9.06E6
F: ITMS + c ESI d Full ms2 494.27@cid45.00 [125.00-505.00]



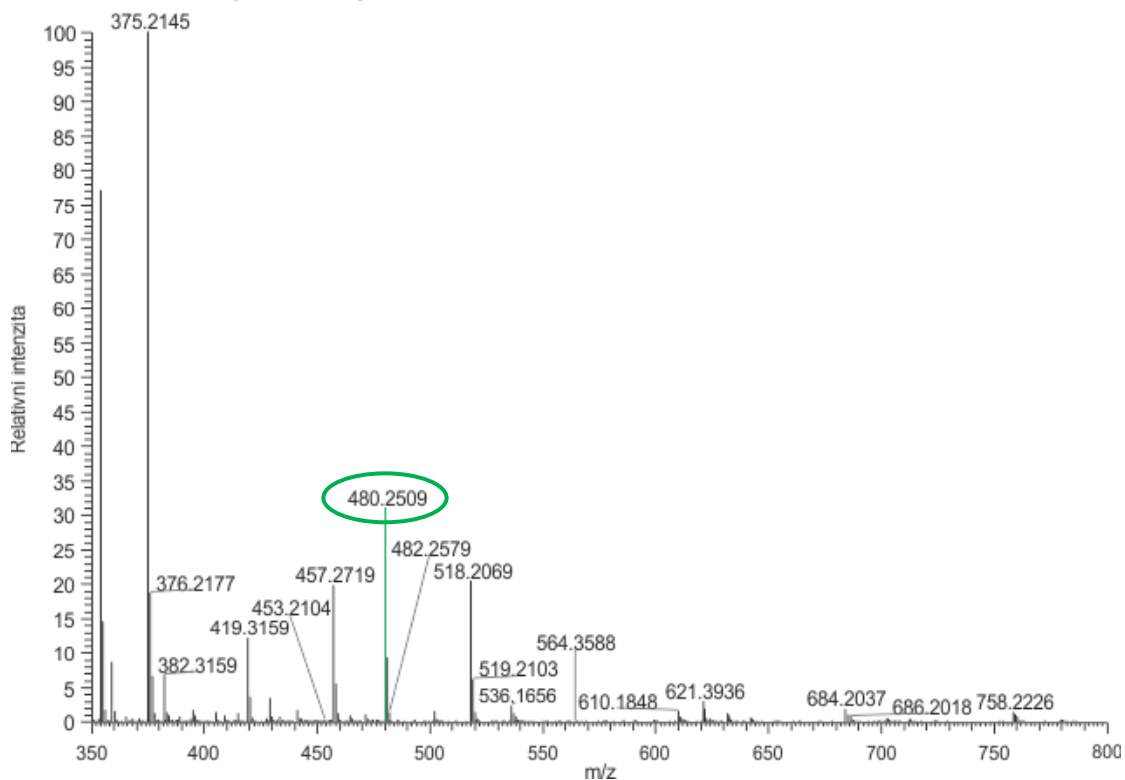
Obr. 16: Fragmentační spektrum IM s typickými fragmenty o m/z 394,16 a 217,08.

C:\Xcalibur\...2013-04-11_plasma_Pacient 7



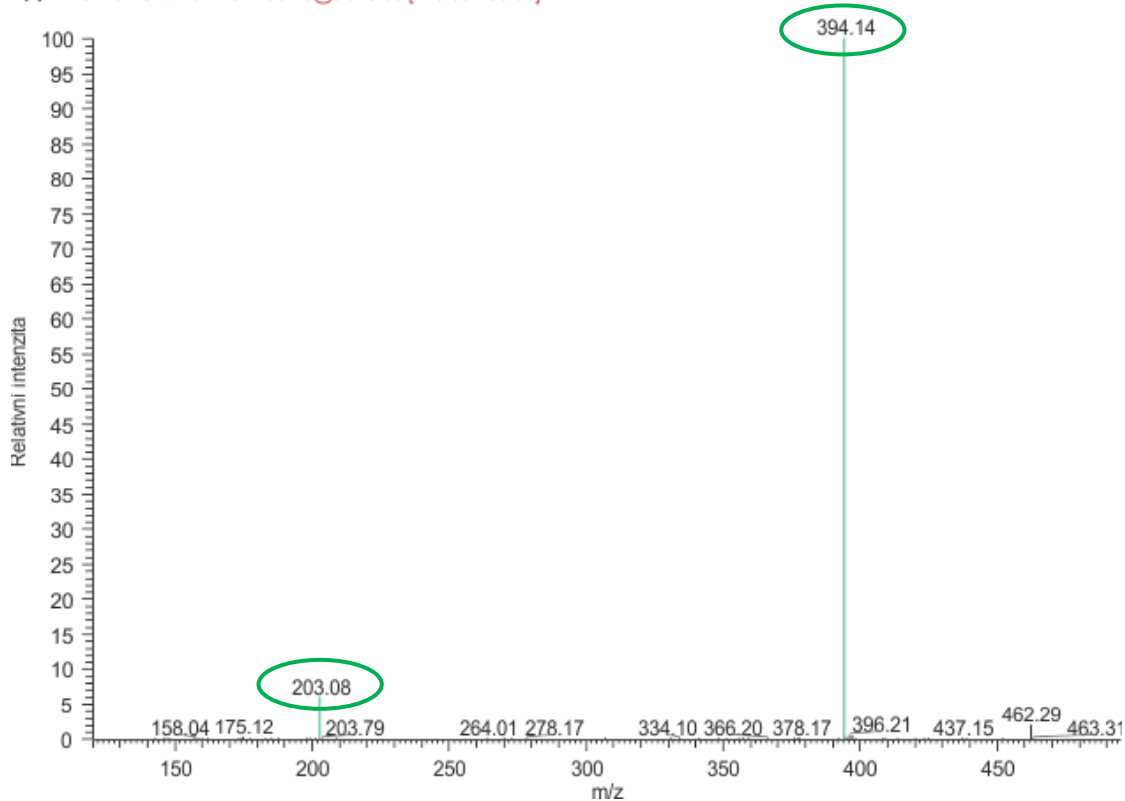
Obr. 17: Extrahovaný chromatogram demethylovaného IM.

2013-04-11_plasma_Pacient 7 RT: 11.625 NL: 1.64E6
F: FTMS + c ESI Full ms [350.00-800.00]

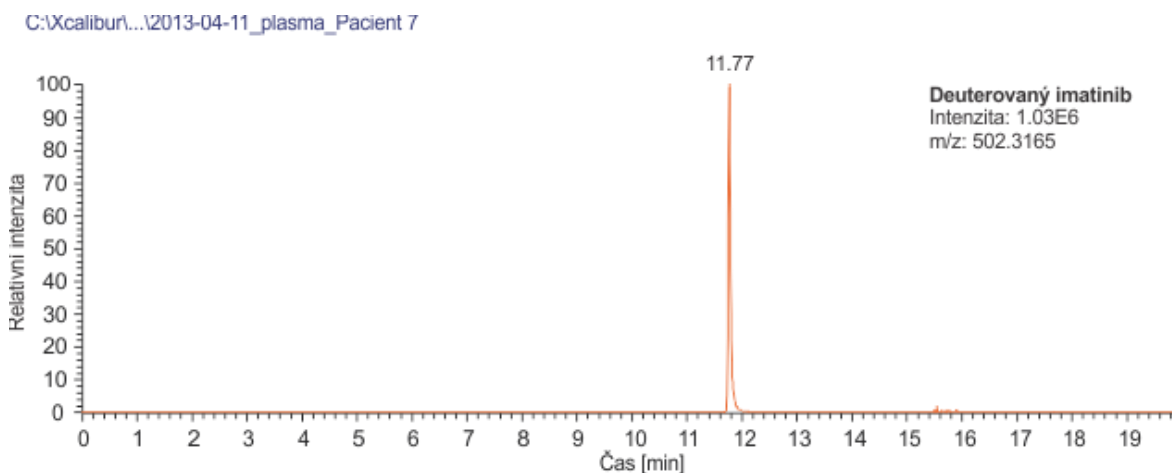


Obr. 18: Hmotnostní spektrum demetylovaného IM.

2013-04-11_plasma_Pacient 7 RT: 11.632 NL: 3.32E5
F: ITMS + c ESI d Full ms2 480.25@cid45.00 [120.00-495.00]

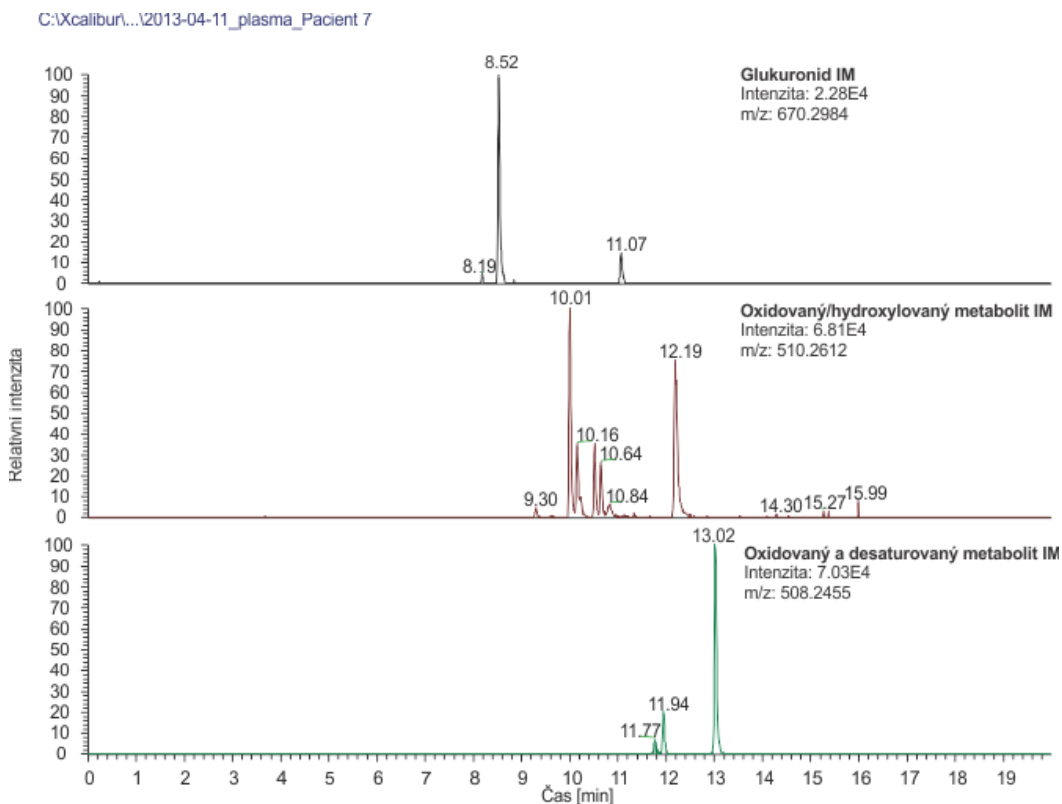


Obr. 19: Fragmentační spektrum demetylovaného IM s fragmenty o m/z 394,14 a 203,08.

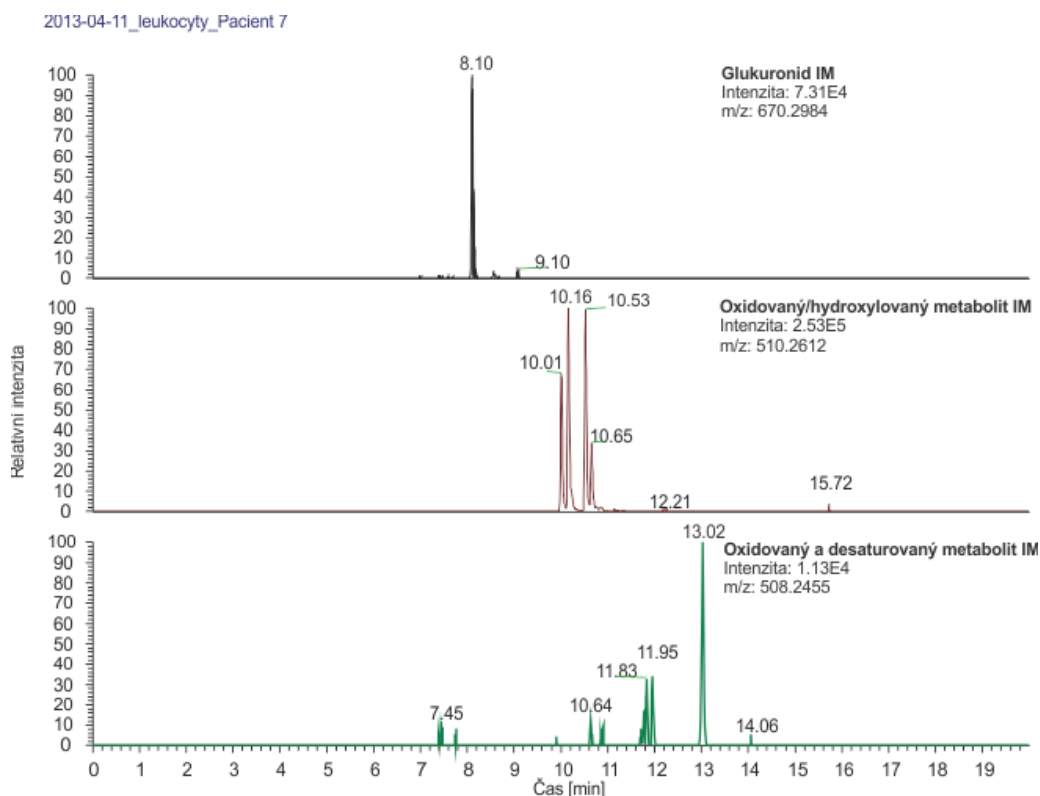


Obr. 20: Extrahovaný chromatogram deuterovaného IM.

Kromě těchto analytů byly sledovány i ostatní přítomné metabolity a jejich glukuronidy. Detekovaly jsme řádově desítky látek, jejichž identifikace bude náplní budoucí práce. Jako příklad lze uvést glukuronid IM, hydroxylované/oxidované metabolity nebo oxidovaný a zároveň desaturovaný metabolit (Obr. 21 a Obr. 22).



Obr. 21: Extrahované chromatogramy vybraných metabolitů IM v plasmě.



Obr. 22: Extrahované chromatogramy vybraných metabolitů IM v leukocytech.

5.1 Analýza IM v leukocytech pacientů s CML

Byla sledována souvislost mezi intracelulárními hladinami IM, plasmatickými hladinami IM, počtem leukocytů a časem od podání poslední dávky léku (tabulka II). U pacientů 2 a 6 byly intracelulární hladiny IM stanoveny na 95,12 a 45,26 ng/ml. Plasmatické hladiny IM poskytnuté z pracoviště LDMP byly nižší než u ostatních pacientů (647 a 698 ng/ml). Tito pacienti užívají IM v dávce 400 mg obden a vzorek byl odebrán v čase 44 a 48 hodin od poslední podané dávky léku. Z těchto údajů se dá usuzovat, že delší interval dávkování může mít za následek nižší hladiny jak plasmatických, tak i intracelulárních hladin. U pacienta 7 můžeme pozorovat intracelulární koncentraci IM rovnou 242,21 ng/ml a plasmatickou koncentraci rovnou 3280 ng/ml. Tyto vysoké hladiny zřejmě souvisí s kratším časem od podání léčiva (10 hodin) a vyšší koncentrace uvnitř buněk zároveň odpovídá většímu počtu leukocytů v krevním obraze pacienta 7 ($9,76 \cdot 10^6$ leukocytů/ml). U pacienta 8 byl počet leukocytů v krevním obraze nižší ($7,43 \cdot 10^6$ leukocytů/ml) a také stanovená intracelulární koncentrace IM byla nižší (163,18 ng/ml), než u předchozího pacienta 7.

Tabulka II: Porovnání intracelulárních a plasmatických koncentrací IM s počtem leukocytů a časem od podání dávky u CML pacientů.

	intracelulární koncentrace		plasmatické koncentrace	Počet leukocytů [*10 ⁶ /ml]	Čas [hod]
	IM [ng/ml]	Demethylovaný IM [ng/ml]	IM [ng/ml]		
Pacient 1	97,16	109,27	1130	8,25	21
Pacient 2	95,12	32,63	647	4,58	48
Pacient 3	80,20	57,40	1860	5,52	14
Pacient 4	88,93	34,13	1780	3,53	20
Pacient 5	36,65	16,70	1260	5,38	27
Pacient 6	45,26	62,86	698	8,59	44
Pacient 7	242,21	71,59	3280	9,76	10
Pacient 8	163,18	29,00	1250	7,43	26
Pacient 9	41,89	48,30	635	6,39	20
Pacient 10	110,95	34,44	1940	6,97	2
Pacient 11	24,52	30,78	1640	4,53	21

6 Diskuse

Cílená terapie využívající tyrosinkinasových inhibitorů, mezi které se řadí také imatinib, je v současnosti standardním postupem při léčbě chronické myeloidní leukemie. Terapeutické monitorování plasmatických hladin imatinibu je dnes základním nástrojem pro úspěšnou individuální léčbu pacientů z důvodu výrazné interindividuální variability. Koncentrace v leukocytech by mohly být z klinického hlediska důležitější než plasmatické, protože imatinib má intracelulární mechanismus účinku.

Jedním z cílů této studie bylo optimalizovat izolaci leukocytů z plné krve. Kvůli potřebě urychlené izolace bílých krvinek nebylo použito separační médium a vrstva leukocytů tak byla odebírána přímo z centrifugované krve. Erytrocyty byly odstraněny pomocí lyzačního roztoku a proteiny byly vysráženy pomocí methanolu s přídavkem interního standardu. Ve studii provedené na Masarykově univerzitě v Brně (Potěšil *et al.*, 2010) se také zaměřili na optimalizaci přípravy buněčných vzorků a z jejich výsledků vyplývá, že k nejmenším ztrátám buněk dochází při trojnásobném proplachu buněčné linie K562 v PBS. Před analýzou byl do vzorku přidán interní standard a buňky byly zlyzovány pomocí ultrazvuku. Imatinib byl extrahován do buněčného rozpouštědla (ethylacetát:hexan). Organická fáze byla vakuově odpařena, výsledný odparek rozpuštěn v methanolu a získaný roztok analyzován pomocí LC-MS/MS. Stejný postup byl použit i pro leukocyty izolované z plné krve. V již zmíněné studii D'Avolio *et al.* (2011) byla použita separace přes vrstvu Lymphoprep, vzorky byly dvakrát propláchnuty PBS a následně extrahovány methanolem. Analýza byla provedena za použití HPLC-MS. Hodnoty naměřené námi byly v průměru nižší než hodnoty stanovené v Brně. Zatímco naše výsledky intracelulárních koncentrací se pohybují od 24,52-242,24 ng/ml; u brněnských pacientů byly stanoveny hodnoty v rozmezí 230-824 ng/ml, což může být způsobeno například nedostatečnou izolací leukocytů z plné krve

Farmakokinetika imatinibu v plasmě je v dnešní době na rozdíl od intracelulární již známa. V plasmě dosahuje imatinib nejvyšší koncentrace za 3-4 hodiny od podání a jeho biologický poločas eliminace je zhruba 17 hodin (Le Coutre *et al.*, 2004). V naší studii byla pozorována souvislost mezi intracelulární hladinou IM, jeho plasmatickou hladinou, počtem leukocytů a dobou od podání léku pouze u několika pacientů. Byla pozorována interindividuální variabilita; která může být způsobena nedodržením léčebného režimu, aktivitou transportérů nebo chybou v přípravě vzorku. Například u pacienta 5 mohou být

nízké koncentrace uvnitř buněk, ve srovnání s vyšší plasmatickou hladinou, způsobeny nedostatečnou aktivitou hOCT-1 nebo nadměrnou aktivitou P-gp.

7 Závěr

Tato práce byla zaměřena na stanovení koncentrace imatinibu v leukocytech pacientů trpících chronickou myeloidní leukemií. Byla vyvinuta metoda pro izolaci leukocytů z plné krve a následné stanovení intracelulární koncentrace imatinibu. Pro analýzu byla použita technika vysokoúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií.

V teoretické části této práce byla vypracována rešerše na téma chronická myeloidní leukemie, imatinib, význam stanovení plasmatických a intracelulárních hladin imatinibu a využití hmotnostní spektrometrie v terapeutickém monitorování léčiv.

V experimentální části byla popsána optimalizace izolace leukocytů z plné krve, vývoj a optimalizace metody pro stanovení intracelulárního obsahu imatinibu a tyto postupy byly aplikovány na reálné vzorky pacientů trpících chronickou myeloidní leukemií.

Další výzkum bude směřován do oblasti určení jednotlivých metabolitů a popřípadě sledování závislosti koncentrací imatinibu a jeho metabolitů s různými klinickými parametry za účelem lepší individualizace léčby.

8 Literatura

- Ardrey, R. E. (2003a): Liquid Chromatography. In: Ardrey, R. E.: Liquid chromatography-mass spectrometry: an introduction, pp. 7-31, John Wiley & sons, Ltd, Chichester, England.
- Ardrey, R. E. (2003b): Interface Technology. In: Ardrey, R. E.: Liquid chromatography-mass spectrometry: an introduction, pp. 75-127, John Wiley & sons, Ltd, Chichester, England.
- Bain, B. J., Clark, D. M., Lampert, I. A., Wilkins, B. S. (2008): Chronic Myeloproliferative and Myeloproliferative/Myelodysplastic Disorders. In: Bone Marrow Pathology, pp. 1-40, Blackwell Science Ltd, Oxford, UK.
- Copland, M., Hamilton, A., Elrick, L. J., Baird, J. W., Allan, E. K., Jordanides, N., Barow, M., Mountford, J. C., Holyoake, T. C. (2006): Dasatinib (BMS-354825) targets an earlier progenitor population than imatinib in primary CML but does not eliminate the quiescent fraction. *Blood*. 107.11: 4532-4539.
- Cortes, J. E., Jones, D., O'Brien, S., Jabbour, E., Konopleva, M., Kadia, T., Borthakur, G., Stigliano, D., Shan, J., Kantarjian, H. (2010): Nilotinib as front-line treatment for patients with chronic myeloid leukemia in early chronic phase. *Journal of Clinical Oncology*. 28.3: 392-397.
- Cortes, J. E., Jones, D., O'Brien, S., Jabbour, E., Ravandi, F., Koller, F., Borthakur, G., Walker, B., Zhao, W., Shan, J., Kantarjian, H. (2010): Results of dasatinib therapy in patients with early chronic-phase chronic myeloid leukemia. *Journal of Clinical Oncology*. 28.3: 398-404.
- Daley, G. Q., Van Etten, R. A., Baltimore, D. (1990): Introduction of chronic myelogenous leukemia in mice by the P210bcr/abl gene of the Philadelphia chromosome. *Science*. 247: 824-830.

- D'Avolio, A., Simiele, M., De Francia, S., Ariaudo, A., Baietto, L., Cusato, J., Fava, C., Saglio, G., Di Carlo, F., Di Perri, G. (2011): HPLC-MS method for the simultaneous quantification of the antileukemia drugs imatinib, dasatinib and nilotinib in human peripheral blood mononuclear cell (PBMC). *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 59: 109-106.
- Deininger, M. W. (2008): Milestones and monitoring in patients with CML treated with imatinib. *ASH Education Program book*. 1: 419-426.
- Faber, E. (2007): Dasatinib. *Farmakoterapie*. 2: 135-137.
- Faber, E. (2005): Imatinib. *Farmakoterapie*. 3: 233-238.
- Faber, E. (2010): Rezistence k inhibitorům tyrozinové kinázy. In: Faber, E., Indrák, K.: *Chronická myeloidní leukemie*, pp. 132-141, Galén, Praha.
- Faber, E., Indrák, K. (2010): Léčba imatinibem. In: Faber, E., Indrák, K.: *Chronická myeloidní leukemie*, pp. 93-109, Galén, Praha.
- Faber, E., Kajaba, V., Typnerová, S., Luxová, V. (2004): Diagnóza CML-*Chronická myeloidní leukemie*, informační brožura pro pacienty a jejich blízké, pp. 3-29, Leukaemia Research Fund (LRF).
- Faderl, S., Talpaz, M., Estro, Z., Kantarjian, H. M. (1999): Chronic myelogenous leukemia: Biology and therapy. *Ann Intern Med*. 131: 207-209.
- Fefer, A., Cheever, M. A., Thomas, E. D., Boyd, C., Ramberg, R., Glucksberg, H., Buckner D., Storb, R. (1979): Disappearance of Ph1-positive cells in four patients with chronic granulocytic leukemia after chemotherapy, irradiation and marrow transplantation from an identical twin. *New England Journal of Medicine* 300.7: 333-337.

- Galton, D. A. (1953): Myleran in chronic myeloid leukemia. Results of treatment. *Lancet*. 1: 208-213.
- 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 α 1 acid glycoprotein in the in vivo resistance of human BCR-ABL+ leukemic cells to the Abl inhibitor STI571. *Journal of the National Cancer Institute*. 92.20: 1641-1650.
- Gamelin, E. C., Danquechin-Dorval, E. M., Dumesnil, Y. F., Maillart, P. J., Goudier, M. J., Burtin, P. C., Delva, R. G., Lortholary, A. H., Gesta, P. H., Larra, F. G. (1996): Relationship between 5-fluorouracil (5-FU) dose intensity and therapeutic response in patients with advanced colorectal cancer receiving infusional therapy containing 5-FU. *Cancer*. 77.3: 441-451.
- Graham, S. M., Jørgensen, H. G., Allan, E., Pearson, C., Alcorn, M. J., Richmond, L., Holyoake, T. L. (2002): Primitive, quiescent, Philadelphia-positive stem cells from patients with chronic myeloid leukemia are insensitive to STI571 in vitro. *Blood*. 99.1: 319-325.
- Guo, J. Q., Wang, J. Y., Arlinghaus, R. B. (1991): Detection of BCR-ABL proteins in blood cells of benign phase chronic myelogenous leukemia patients. *Cancer research*. 51: 3048-3051.
- Haouala, A., Zanolari, B., Rochat, B., Montemurro, M., Zaman, K., Duchosal, M. A., Ris, H. B., Leyvraz, S., Widmer, N., Decosterd, L. A. (2009): Therapeutic drug monitoring of the new targeted anticancer agents imatinib, nilotinib, dasatinib, sunitinib, sorafenib and lapatinib by LC tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*. 877.22: 1982-1996.
- Hehlmann, R., Heimpel, H., Hasford, J., Kolb, H. J., Pralle, H., Hossfeld, D. K., Queisser, W., Loffler, H., Heinze, B., Georgii, A. (1993): Randomized comparison

of busulfan and hydroxyurea in CML: Prolongation of survival by hydroxyurea. *Blood*. 82: 398-407.

- Hochhaus, A., La Rosse, P. (2004): Imatinib therapy in chronic myelogenous leukemia: strategies to avoid and overcome resistance. *Leukemia*. 18.8: 1321-1331.
- Hopfgartner, G. (2007): Mass spectrometry in bioanalysis-methods, principles and instrumentation. In: Wanner, K. T., Höfner, G.: *Mass spectrometry in medicinal chemistry*, pp. 3-58, Wiley-VCH.
- Horowitz, M. M., Rowings, P. A., Passweg, J. R. (1996): Allogeneic bone marrow transplantation for CML: a report from the International Bone Marrow Transplant Registry. *Bone marrow transplantation*. 17: S5.
- Hsieh, Y. (2005): APPI: new ionization source for LC and MS/MS assays. In: Korfmacher, W. A.: *Using mass spectrometry for drug metabolism studies*, pp. 253-277, CRC Press, LLC.
- Hughes, T. P., Hochhaus, A., Branford, S., Muller, M. C., Kaeda, J. S., Foroni, L., Druker, B. J., Guilhot, F., Larson, R. A., O'Brien, S. G., Rudoltz, M. S., Mone, M., Wehrle, E., Modur, V., Goldman, J. M., Radich, J. P. (2010): Long-term prognostic significance of early molecular response to imatinib in newly diagnosed chronic myeloid leukemia: an analysis from the International Randomized Study of Interferon and STI571 (IRIS). *Blood*. 116.19: 3758-3765.
- Indrák, K., Faber, E. (2007): Nilotinib. *Farmakoterapie*. 2: 105-109.
- Ishikawa, Y., Kiyoi, H., Watanabe, K., Miyamura, K., Nakano, Y., Kitamura, K., Kohno, A., Sugiura, I., Yokozawa, T., Hanamura, A., Yamamoto, K., Iida, H., Emi, N., Suzuki, R., Ohnishi, K., Naoe, T. (2010): Trough plasma concentration of imatinib reflects BCR-ABL kinase inhibitory activity and clinical response in chronic-phase chronic myeloid leukemia: A report from the BINGO study. *Cancer science*. 101.10: 2186-2192.

- Jabbour, E., Kantarjian, H. (2012): Chronic myeloid leukemia: 2012 update of diagnosis, monitoring, and management. *American Journal of Hematology*. 87: 1037-1045.
- Kang, J. S., Lee, M. H. (2009): Overview of therapeutic drug monitoring. *Korean journal of internal medicine*. 24.1: 1-10.
- Kantarjian, H., Cortes, J., Kim, D. W., Dorlhiac-Llacer, P., Pasquini, R., DiPersio, J., Müller, M. C., Radich, J. P., Khoury, H. J., Khoroshko, N., Bradley-Garelik, M. B., Zhu, C., Tallman, M. S. (2009): Phase 3 study of dasatinib 140 mg once daily versus 70 mg twice daily in patients with chronic myeloid leukemia in accelerated phase resistant or intolerant to imatinib: 15-month median follow-up. *Blood*. 113.25: 6322-6329.
- Kantarjian, H. M., Giles, F. J., O'Brien, S. M., Talpaz, M. (1998): Clinical course and therapy of chronic myelogenous leukemia with interferon-alpha and chemotherapy. *Hematology/oncology Clinics of North America*. 12.1: 31-80.
- Klawitter, J., Zhang, Y. L., Klawitter, J., Anderson, N., Serkova, N. J., Christians, U. (2009): Development and validation of sensitive assay for the quantification of imatinib using LC/LC-MS/MS in human whole blood and cell culture. *Biomedical Chromatography*. 23.12: 1251-1258.
- Koza, V. (2010): Transplantace krvetvorných buněk. In: Faber, E., Indrák, K.: *Chronická myeloidní leukemie*, pp. 142-151, Galén, Praha.
- Krejčí, M., Šmardová, J., Adam, Z., Mayer, J. (2008): Chronická myeloidní leukemie (CML). In: Adam, Z., Krejčí, M., Vorlíček, J.: *Hematologie přehled maligních hematologických nemocí*, pp. 47-53, Grada, Praha.
- Kurzrock, R., Gutterman, J. U., Talpaz, M. (1988): The molecular genetics of Philadelphia chromosome-positive leukemias. *N Eng J Med*. 319: 990-998.

- Larson, R. A., Druker, B. J., Guilhot, F., O'Brien, S. G., Riviere, G. J., Krahnke, T., Gathmann, I., Wang, Y. (2008): Imatinib pharmacokinetics and its correlation with response and safety in chronic-phase chronic myeloid leukemia: a subanalysis of the IRIS study. *Blood*. 111.8: 4022-4028.
- Le Coutre, P., Kreuzer, K. A., Pursche, S., Bonin, M. V., Leopold, T., Baskaynak, G., Dörken, B., Ehninger, G., Ottman, O., Jenke, A., Bornhäuser, M., Schleyer, E. (2004): Pharmacokinetics and cellular uptake of imatinib and its main metabolite CGP74588. *Cancer chemotherapy and pharmacology*. 53.4: 313-323.
- Lydon, N. (2009): Attacking cancer at its foundation. *Nature Medicine*. 15: 1153-1157.
- 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*. 101.6: 2368-2373.
- Mahon, F. X., Molimard, M., Foryciarz, K., Davies, A., Fava, C., Friedecky, D., Schleyer, E., Schuld, P., Guilhot, F. (2010): Imatinib blood level testing-current perspectives and key questions. *European Haematology*. 4: 59-64.
- Makarov, A. (2000): Electrostatic axially harmonic orbital trapping: a high-performance technique of mass analysis. *Analytical chemistry*. 72.6: 1156-1162.
- Makarov, A., Scigelova, M. (2010): Coupling liquid chromatography to Orbitrap mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1217.25: 3938-3945.
- McMaster, M. (2005): The HPLC system. In: McMaster, M.: *LC/MS: a practical user's guide*, pp. 9-20, John Wiley & sons, Inc., Hoboken, New Jersey.
- Mičová, K., Fridecký, D., Faber, E., Polýnková, A., Adam, T. (2010): Flow injection analysis vs. ultra high performance liquid chromatography coupled with

tandem mass spectrometry for determination of imatinib in human plasma. *Clinica Chimica Acta*. 411.23: 1957-1962.

- Mitelman, F. (1993): The cytogenetic scenario of chronic myeloid leukemia. *Leukemia & Lymphoma*. 11: 11-15.
- Mlejnek, P., Novak, O., Dolezel, P. (2011): A non-radioactive assay for precise determination of intracellular levels of imatinib and its main metabolite in Bcr-Abl positive cells. *Talanta*. 83.5: 1466-1471.
- Mohammadpour, N., Elyasi, S., Vahdati, N., Mohammadpour, A. H., Shamsara, J. (2011): A Review on Therapeutic Drug Monitoring of Immunosuppressant Drugs. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*. 14.6: 485-498.
- Nowell, P. C., Hungerford D. A. (1960): A minute chromosome in human chronic myelocytic leukemia. *Science*. 132: 1497.
- Pene-Dumitrescu, T., Smithgall, T. E. (2010): Expression of Src family kinase in chronic myelogenous leukemia cells induces resistance to imatinib in a kinase-dependent manner. *Journal of Biological Chemistry*. 285.28: 21446-21457.
- Peng, B., Hayes, M., Resta, D., Racine-Poon, A., Druker, B. J., Talpaz, M., Sawyers, C. L., Rosamilia, M., Ford, J., Lloyd, P., Capdeville, R. (2004): Pharmacokinetics and pharmacodynamics of imatinib in a phase I trial with chronic myeloid leukemia patients. *Journal of clinical oncology*. 22.5: 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*. 109.8: 3496-3499.
- Potěšil, D., Rázga, F., Stejskal, S., Tesařová, L., Šimara, P., Peterková, M., Dvořáková, D., Maláškova, L., Koutná, I., Ráčil, Z., Mayer, J., Zdráhal, Z. (2010):

Stanovení intracelulární koncentrace imatinibu u pacientů s CML, 24. Olomoucké hematologické dny, 24. - 26. 6. 2010, Olomouc.

- Protivánková, M., Vorlíček, J. (2001): Chronická myeloidní leukemie - informace pro pacienty a jejich blízké, pp. 4-15, Vydavatelství MU, Brno-Kraví hora.
- Rodríguez-Flores, J., Berzas, J. J., Castaneda, G., Rodríguez, N. (2003): Direct and fast capillary zone electrophoretic method for the determination of Gleevec and its main metabolite in human urine. *Journal of Chromatography B*: 794.2: 381-388.
- Rohrbacher, M., Hasford J. (2009): Epidemiology of chronic myeloid leukaemia (CML). *Best practise & research Clinical haematology*. 22.3: 295-302.
- Roth, O., Spreux-Varoquaux, O., Bouchet, S., Rousselot, P., Castaigne, S., Rigaudeau, S., Ragueneau, V., Therond, P., Devillier, P., Molimard, M., Maneglier, B. (2010): Imatinib assay by HPLC with photodiode-array UV detection in plasma from patients with chronic myeloid leukemia: Comparison with LC-MS/MS. *Clinica Chimica Acta*. 411.3: 140-146.
- Rowley, J. D. (1973): A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature*. 243: 290-293.
- Sakai, M., Miyazaki, Y., Matsuo, E., Moriuchi, Y., Hata, T., Fukushima, T., Imaizumi, Y., Imanishi, D., Taguchi, J., Iwanaga, M., Tsushima, H., Inoue, Y., Takasaki, Y., Tsuchiya, T., Komoda, M., Ando, K., Horio, K., Moriwaki, Y., Tominaga, S., Itonaga, H., Nagai, K., Tsukasaki, K., Tsutsumi, C., Sawayama, Y., Yamasaki, R., Ogawa, D., Kawaguchi, Y., Ikeda, S., Yoshida, S., Onimaru, Y., Tawara, M., Atogami, S., Koida, S., Joh, T., Yamamura, M., Matsuo, Y., Soda, H., Nonaka, H., Jinnai, I., Kuriyama, K., Tomonaga, M. (2009): Long-term efficacy of imatinib in a practical setting is correlated with imatinib trough concentration that is influenced by body size: a report by the Nagasaki CML Study Group. *International journal of hematology*. 89.3: 319-325.

- Schulz, M., Schmoldt, A. (2003): Therapeutic and toxic blood concentrations of more than 800 drugs and other xenobiotics. *Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences*. 58.7: 447-474.
- Shah, N. P., Kantarjian, H. M., Kim, D. W., Réa, D., Dorlhiac-Llacer, P. E., Milone, J. H., Vela-Ojeda, J., Silver, R. T., Khoury, H. J., Charbonnier, A., Khoroshko, N., Paquette, R. L., Deininger, M., Collins, R. H., Otero, I., Hughes, T., Bleickard, E., Strauss, L., Francis, S., Hochhaus, A. (2008): Intermittent target inhibition with dasatinib 100 mg once daily preserves efficacy and improves tolerability in imatinib-resistant and-intolerant chronic-phase chronic myeloid leukemia. *Journal of Clinical Oncology*. 26.19: 3204-3212.
- Specchia, G., Mininni, D., Guerrasio, A., Palumbo, G., Pastore, D., Liso, V. (1995): Ph positive acute lymphoblastic leukemia in adults: molecular and clinical studies. *Leukemia & Lymphoma*. 18: 37-42.
- Takahashi, N., Miura, M. (2011): Therapeutic drug monitoring of imatinib for chronic myeloid leukemia patients in the chronic phase. *Pharmacology*. 87.5-6: 241-248.
- Takahashi, N., Wakita, H., Miura, M., Scott, S. A., Nishii, K., Masuko, M., Sakai, M., Maeda, Y., Ishige, K., Kashimura, M., Fujikawa, K., Fukazawa, M., Katayama, T., Monma, F., Narita, M., Urase, F., Furukawa, T., Miyazaki, Y., Katayama, N., Sawada, K. (2010): Correlation between imatinib pharmacokinetics and clinical response in Japanese patients with chronic-phase chronic myeloid leukemia. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 88.6: 809-813.
- Thermo Fisher Scientific (2011): Orbitrap Elite Hardware Manual (P/N 1288170, Revision A).
- Titier, K., Picard, S., Ducint, D., Teihet, E., Moore, N., Berthaud, P., Mahon, F. X., Molimard, M. (2005): Quantification of imatinib in human plasma by high-

performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Therapeutic drug monitoring*. 27.5: 634-640.

- Tokarski, J. S., Newitt, J. A., Chang, C. Y. J., Cheng, J. D., Wittekind, M., Kiefer, S. E., Kish, K., Lee, F. Y. F., Borzilleri, R., Lombardo, L. J., Xie, D., Zhang, Y., Klei, H. E. (2006): The structure of dasatinib (BMS-354825) bound to activated ABL kinase domain elucidates its inhibitory activity against imatinib-resistant ABL mutants. *Cancer Research*. 66.11: 5790-5797.
- Voglová, J., Kašparová, P., Vrbacký, F. (2010): Průběh a prognóza. In: Faber, E., Indrák, K.: *Chronická myeloidní leukemie*, pp. 65-69, Galén, Praha.
- Watson, J. T., Sparkman, O. D. (2007): *The Mass Spectrometer*. In: Watson, J. T., Sparkman, O. D.: *Introduction to mass spectrometry: instrumentation, applications, and strategies for data interpretation*, pp. 53-103, John Wiley & sons, Ltd, Chichester, England.
- Westman-Brinkmalm, A., Brinkmalm, G. (2009): A mass spectrometer's building blocks. In: Ekman, R., Silberring, J., Westman-Brinkmalm, A., Kraj, A.: *Mass spectrometry: instrumentation, interpretation and applications*, pp. 15-71, John Wiley & sons, Inc., Hoboken, New Jersey.
- Westman-Brinkmalm, A., Silberring, J., Brinkmalm, G. (2009): Separation methods. In: Ekman, R., Silberring, J., Westman-Brinkmalm, A., Kraj, A.: *Mass spectrometry: instrumentation, interpretation and applications*, pp. 105-113, John Wiley & sons, Inc., Hoboken, New Jersey.
- 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*. 108.2: 697-704.

- Wilkinson, G. R. (2005): Drug metabolism and variability among patients in drug response. *New England Journal of Medicine*. 352.21: 2211-2221.

9 Seznam použitých zkratek

ABL	úsek na chromosomu 9 (pojmenován podle Abelson murine leukemia virus)
APCI	chemická ionizace za atmosférického tlaku (atmospheric pressure chemical ionisation)
API	ionizace za atmosférického tlaku (atmospheric pressure ionisation)
arb.	arbitrární jednotka
Arg	Abl-related gene
ATP	adenosintrifosfát
BCR	úsek na chromosomu 22 (breakpoint cluster region)
CID	kolizně indukovaná disociace (collision induced dissociation)
c-Kit	stem-cell factor receptor tyrosin kinase
CCR	kompletní cytogenetická odpověď (complete cytogenetic response)
CML	chronická myeloidní leukemie
CYP3A4	izoforma cytochromu P450
DNA	deoxyribonukleová kyselina (deoxyribonucleic acid)
DMSO	dimethylsulfoxid
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
ELISA	enzymová imunoabsorbční analýza (enzyme-linked immunosorbent assay)
EMIT	enzymová multiplikační imunoanalýza (enzyme multiplied immunoassay technique)
ESI	ionizace elektrosprejem (electrospray ionisation)
ETV6-PDGFR β	fúzní protein vzniklý spojením genu ETV6 a receptoru pro destičkový růstový faktor (platelet-derived growth factor receptor)
FIA-MS/MS	metoda přímého nástřiku do hmotnostního spektrometru
FIP1L1-PDGFR α	fúzní protein vzniklý spojením genu FIP1L1 a receptoru pro destičkový růstový faktor (platelet-derived growth factor receptor)
FISH	fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace (fluorescence <i>in situ</i> hybridization)
FPIA	fluorescenční polarizační imunoanalýza (fluorescence polarization immunoassay)
FWHM	šířka píku v polovině jeho maximální výšky (full width at half maximum)

GIST	gastrointestinální stromální tumor (gastrointestinal stromal tumor)
HLA	hlavní histokompatibilní systém (human leukocyte antigen)
hOCT-1	lidský transportér organických kationtů (human organic cationic transporter)
HOK	oddělení hematonekologie
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (high-performance liquid chromatography)
HPLC-MS	vysokoúčinná kapalinová chromatografie spojená s hmotnostní spektrometrií
HPLC-UV/DAD	vysokoúčinná kapalinová chromatografie ve spojení s UV detekcí a detektorem diodového pole
HSCT	transplantace hematopoetických kmenových buněk (hematopoietic stem cell transplantation)
IM	imatinib (imatinib mesylate)
K562	parentální buněčná linie odvozená od chronické myeloidní leukemie
K562/Dox	buněčná linie rezistentní k imatinibu a s nadměrnou expresí P-glykoproteinu
kDA	kilodalton
LC-MS/MS	kapalinová chromatografie spojená s tandemovou hmotnostní spektrometrií
LC/LC-MS/MS	dvourozměrná kapalinová chromatografie spojená s tandemovou hmotnostní spektrometrií
LDMP	laboratoř dědičných metabolických poruch
MDR-1	gen mnohočetné lékové rezistence (multidrug resistance)
MMR	velká molekulární odpověď (major molecular response)
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
MS	hmotnostní spektrometrie (mass spectrometry)
<i>m/z</i>	poměr hmoty a náboje
PBS	fosfátový pufr ve fyziologickém roztoku (phosphate buffered saline)
PCR	polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)
PDGFR	receptor pro destičkový růstový faktor (platelet-derived growth factor receptor)
Ph	Filadelfský chromosom (Philadelphia chromosome)
ppm	parts per milion (%), relativní přesnost

RNA	ribonukleová kyselina (ribonucleid acid)
RT-PCR	polymerázová řetězová reakce spojená s reverzní transkripcí (reverse transcriptase-polymerase chain reaction)
RPM	počet otáček za minutu (revolutions per minute)
TDM	terapeutické monitorování léčiv (therapeutic drug monitoring)
TIC	celkový iontový proud (total ion current chromatogram)
TKI	tyrosinkinasový inhibitor (tyrosine kinase inhibitor)