

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Metody stanovení hladiny nových léků pro
chronickou myeloidní leukemii v tělních
tekutinách**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Kateřina Mičová
Studijní program:	N1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	RNDr. David Friedecký, Ph.D.
Termín odevzdání práce:	26.4.2010

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

V Olomouci dne

Poděkování:

Největší poděkování patří vedoucímu mé diplomové práce RNDr. Davidu Friedeckému, Ph.D. za jeho trpělivost a cenné rady při studiu daného tématu a provádění praktické části. Velké poděkování rovněž věnuji všem pracovníkům laboratoře dědičných metabolických poruch, zejména Doc. RNDr. Tomáši Adamovi, Ph.D. za velkou pomoc a užitečné připomínky při plnění zadaného úkolu.

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora	Kateřina Mičová
Název práce	Metody stanovení hladiny nových léků pro chronickou myeloidní leukemii v tělních tekutinách
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Fakultní Nemocnice Olomouc, Oddělení klinické biochemie, Laboratoř dědičných metabolických poruch, I. P. Pavlova 6, 775 20 Olomouc
Vedoucí práce	RNDr. David Friedecký, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2010
Abstrakt	Chronická myeloidní leukemie je myeloproliferativní onemocnění charakteristické přítomností Filadelfského chromosomu, který vzniká translokací chromosomu 9 a 22. Nově vzniklý gen BCR/ABL má za následek produkci proteinu p210, konstitutivně aktivní tyrosinkinasy zapříčiňující vznik choroby. Její léčba je v současnosti úspěšná díky nově vyvinutým lékům založených na selektivní inhibici těchto tyrosinkinás. Imatinib poskytuje velmi dobrou hematologickou, cytogenetickou a molekulární odpověď, ale znevýhodňuje jej možný vznik rezistence. Monitorování hladin léku v tělních tekutinách má důležitý význam především u pacientů se špatnou odpovědí na léčbu, u nichž se na základě plasmatických hladin upravuje dávkování IM. Dále pak u pacientů se špatnou snášenlivostí léku, u nichž se snižuje dávkování v případě vysokých hladin imatinibu. Cílem této práce je vyvinout novou, rychlou a citlivou LC/MSMS metodu pro stanovení plasmatické hladiny imatinibu založenou na isotopovém zředňování deuterovaným standardem. Byla vyvinuta separační metoda na principu reverzní fáze využívající ultraúčinné kapalinové chromatografie za vysokých tlaků o celkové době analýzy 3,2 min. Pro detekci byl použit trojitý kvadrupolový analyzátor s ionizací elektrosprejem v pozitivním módu v režimu "multiple reaction monitoring". Dále byla vyvinuta metoda přímého nástřiku bez použití separace, která poskytuje významně rychlejší stanovení avšak s nižší citlivostí. Metody byly validovány a následně aplikovány na stanovení imatinibu v krevní plasmě pacientů trpících chronickou myeloidní leukémií na terapii imatinibem. Vyvinuté metody poskytují dostatečnou správnost a přesnost pro rutinní stanovení imatinibu v plasmě a byly zavedeny do rutinní praxe v Laboratoři dědičných metabolických poruch, Oddělení klinické biochemie, Fakultní nemocnice Olomouc.
Klíčová slova	Chronická myeloidní leukemie, imatinib, rezistence, cytogenetická a molekulární odpověď, tandemová hmotnostní spektrometrie
Počet stran	70
Počet příloh	-
Jazyk	Český

Bibliographical identification:

Author's first name and surname	Kateřina Mičová
Title	Methods for determination of new drugs for the treatment of chronic myeloid leukemia in body fluids
Type of thesis	Diploma
Department	University Hospital Olomouc, Department of clinical biochemistry, Laboratory of inherited metabolic disorders, I. P. Pavlova 6, 775 20 Olomouc
Supervisor	RNDr. David Friedecký, Ph.D.
The year of presentation	2010
Abstract	Chronic myeloid leukemia is a myeloproliferative disease characterized by presence of Philadelphia chromosome rising by translocation of chromosome 9 and 22. The production of protein p210 (a tyrosine kinase) is a consequence of the new gene BCR/ABL. Recently, the treatment is very successful because of newly developed drugs based on selective inhibition of these tyrosine kinases. Imatinib provides very good hematologic, cytogenetic and molecular response. Drug monitoring in body fluids is significant in patients with poor response to treatment; dosage of the drug is modified according to its plasmatic levels. Furthermore, it is significant in patients with poor toleration of the drug; in case of high plasmatic levels the dosage is reduced. The aim of this study is to develop a fast and sensitive LC/MSMS method for imatinib plasmatic levels determination based on isotopic dilution by a deuterated standard. A separation method founded on reverse phase using ultra high performance liquid chromatography with total run time of 3.2 min was developed. A triple quadrupole with electrospray ionization in positive mode and multiple reaction monitoring mode was used for detection. Furthermore, a flow injection analysis was developed, which provides significantly faster determination but with less sensitivity. Methods were validated and subsequently applicated on plasma of patients with chronic myeloid leukemia on imatinib treatment. Developed methods provide sufficient accuracy and precision for routine determination of imatinib in plasma and they were established to routine practice in Laboratory of inherited metabolic disorders, University Hospital Olomouc.
Keywords	Chronic myeloid leukemia, imatinib, resistance, cytogenetic and molecular response, tandem mass spectrometry
Number of pages	70
Number of appendices	-
Language	Czech

Obsah:

1. Cíle práce:	- 7 -
2. Teoretická část	- 8 -
2.1. Chronická myeloidní leukemie	- 9 -
2.1.1. Co je to chronická myeloidní leukemie?	- 9 -
2.1.2. Co způsobuje a jak vzniká CML?	- 9 -
2.1.3. Detekce BCR/ABL	- 12 -
2.1.4. Průběh CML	- 12 -
2.1.5. Léčba CML	- 13 -
➤ Dasatinib	- 16 -
➤ Nilotinib	- 18 -
2.2. Imatinib	- 20 -
2.2.1. Mechanismus účinku	- 21 -
2.2.2. Farmakologické vlastnosti a metabolismus IM	- 22 -
2.2.3. Klinické studie	- 25 -
2.2.4. Příčiny vzniku rezistence léčby na IM	- 26 -
2.2.5. Význam stanovení hladiny imatinibu v tělních tekutinách	- 31 -
2.2.6. Metody stanovení IM	- 32 -
2.3. Hmotnostní spektrometrie	- 33 -
2.3.1. Úvod	- 33 -
2.3.2. Instrumentace	- 33 -
2.3.3. Ionizační techniky	- 34 -
➤ Ionizace elektrosprejem (Electrospray ionization, ESI)	- 35 -
2.3.4. Hmotnostní analyzátory	- 37 -
➤ Magnetický analyzátor s jednoduchou fokusací iontů	- 38 -
➤ Elektrostatický (elektrický) analyzátor	- 39 -
➤ Kvadrupólový analyzátor	- 39 -
➤ Iontová past	- 40 -
➤ Analyzátor doby letu	- 40 -
➤ Iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací	- 41 -
2.3.5. Tandemová hmotnostní spektrometrie	- 42 -
➤ Trojitý kvadrupolový analyzátor (QqQ)	- 42 -
3. Experimentální část	- 44 -
3.1. Materiál	- 45 -
3.2. Extrakce imatinibu z plasmy	- 46 -
3.3. Metoda	- 46 -

3.4.	Kvantifikace.....	- 47 -
3.5.	Validace metody.....	- 47 -
3.5.1.	Linearita.....	- 47 -
3.5.2.	Návratnost (recovery)	- 47 -
3.5.3.	Nepřesnost	- 47 -
3.5.4.	Iontové suprese	- 48 -
3.6.	Výsledky.....	- 48 -
3.6.1.	Optimalizace MS/MS podmínek.....	- 48 -
3.6.2.	Validace metod.....	- 52 -
	➤ UHPLC-MS/MS	- 52 -
	➤ FIA	- 54 -
3.7.	Analýza imatinibu v plasmě pacientů s CML na terapii imatinibem	- 56 -
3.8.	Srovnání metod.....	- 58 -
4.	Diskuse.....	- 60 -
5.	Závěr	- 61 -
6.	Seznam použitých zkratk	- 68 -

1. Cíle práce:

- Vypracování rešerše na téma: Chronická myeloidní leukemie, imatinib a hmotnostní spektrometrie
- Vývoj a optimalizace metod pro stanovení imatinibu a jeho demethylovaného metabolitu v plasmě
- Validace metod
- Aplikace metod na vzorky plasmy pacientů trpících CML na terapii Glivecem

2. Teoretická část

2.1. Chronická myeloidní leukemie

2.1.1. Co je to chronická myeloidní leukemie?

Chronická myeloidní leukémie (CML) je myeloproliferativní onemocnění s klonální expanzí transformované prvotní hematopoetické progenitorové buňky. Tvoří téměř 15 % všech druhů leukemií a 25 % leukemií dospělého věku, většinou bývá zachycena mezi 45. – 55. rokem života. Její četnost výskytu (1–2/100000) stoupá s věkem a poměr mezi nemocnými muži a ženami je 1,3 : 1. Podstatou CML je nekontrolovatelné množení nezralých buněk (blastů) jednoho typu - basofilních granulocytů. (Protivánková & Vorlíček, 2001; Faderl S. et al, 1999)

Charakteristickým cytogenetickým znakem patologické buněčné populace je v 90 % případů CML přítomnost Ph chromosomu (Filadelfský chromosom), zkráceného chromosomu 22, produkující nový gen BCR/ABL, jehož transkripce jsou produkovány proteiny rozdílné velikosti a molekulové hmotnosti. Jejich role spočívá v aktivaci signálních transdukčních drah vedoucích k nekontrolovatelné proliferaci buňky, blokaci apoptózy a následně k maligní transformaci buňky. (Faderl S. et al, 1999)

Léčba CML je u pacientů závislá na mnoha faktorech zahrnujících věk, váhu, celkový stav pacienta i jiné prodělané choroby a onemocnění. Alogenní transplantace kmenových buněk může mít léčebný účinek u pacientů s vhodnými dárči, biologické prostředky, jako např. interferon α , potlačují leukemické klony a prodlužují tím délku života nemocného. Díky mnoha vědeckým výzkumům se v posledních dvaceti letech docílilo značného pokroku ve znalostech molekulární a buněčné biologie CML buněk, byly identifikovány cílové molekuly pro terapii a tudíž i specifické a selektivní látky inhibující onkoproteiny. (Kantarjian H.M. et al, 1996)

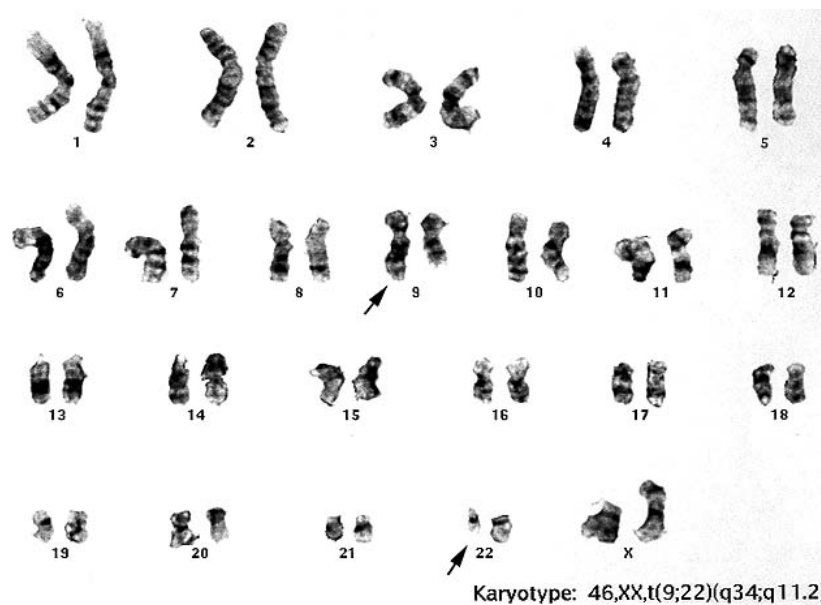
2.1.2. Co způsobuje a jak vzniká CML?

Charakteristická genetická abnormalita CML, Filadelfský chromosom (Obr. 1), je přítomný v buňkách kostní dřeně u více než 90 % všech pacientů s CML a u 15-30 % pacientů s akutní lymfoblastickou leukemií (ALL). Filadelfský chromosom, který byl poprvé popsán u pacientů s CML ve Filadelfii v roce 1960, vzniká v důsledku reciproké translokace t(9;22)(q34;q11). Fúzí genu BCR – „breakpoint cluster region“ na 22. chromozomu s genem ABL - „Abelson tyrosine kinase gen“ na 9. chromozomu vzniká

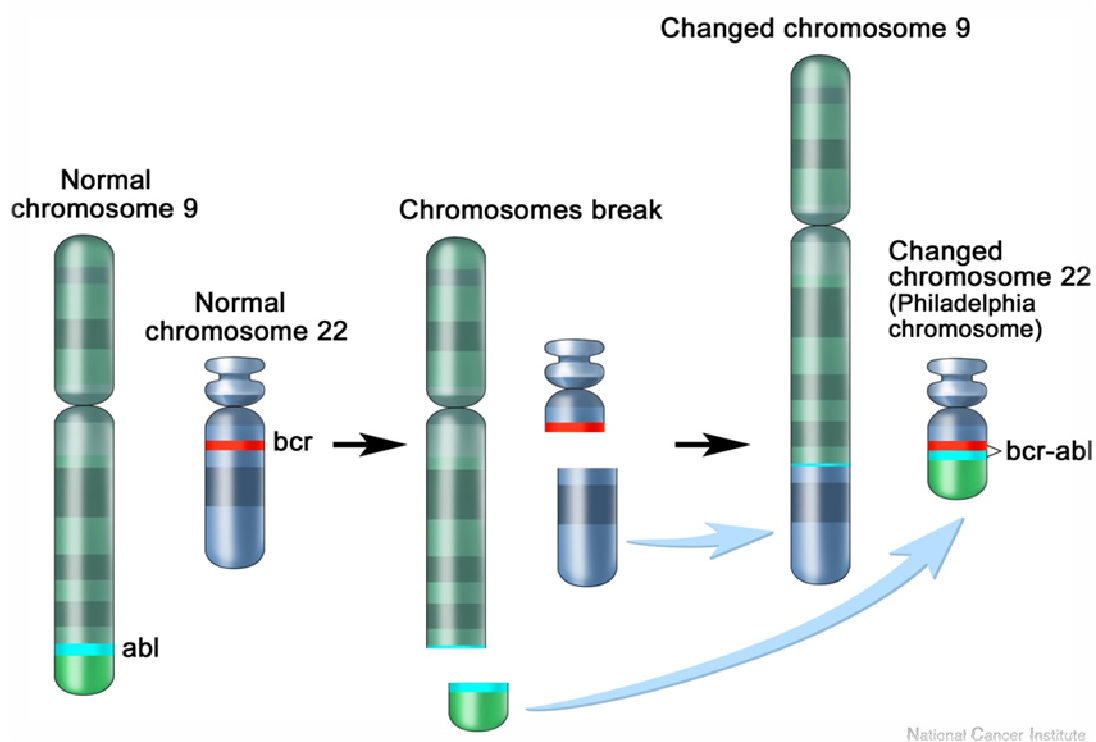
onkogen BCR/ABL, který vede ke vzniku chimerického onkogenního proteinu Bcr/Abl, konstitutivně aktivní cytoplasmatické formy Abl kinasy (Obr. 2). Aktivita tohoto fúzního proteinu již není pod regulačním kontrolním mechanismem pro ABL, tudíž navozuje maligní onemocnění aktivací rozmanitých cytoplasmatických a jaderných signálních transdukčních drah, které ovlivňují růst a přežití hematopoetických buněk. Tato kinasa má rovněž různý efekt na reparaci DNA, což může podporovat další chromosomální změny a mutace zahrnuté v progresi choroby a můžou hrát roli v agresivní povaze pozdějších stádií CML. Velikost fúzního proteinu Bcr/Abl se v závislosti na breakpointu v BCR genu mění od 185 do 230 kD. Většina pacientů s CML exprimuje protein o velikosti 210 kD zvaný p210^{bcr-abl} (2. 7. 10. 2.). Ve vzácných případech CML, ale u 50 % dospělých a 80 % dětí s Ph pozitivní ALL, je výsledkem genu BCR/ABL translace do menšího onkogenního proteinu o hmotnosti 190 kD zvaného p190^{bcr-abl}, který vykazuje vyšší tyrosinkinasovou aktivitu než p210^{bcr-abl}, vyúsťující k většímu potenciálu navodit rakovinné bujení. (Kantarjian H.M. et al, 2006)

U většiny pacientů (85 %) je choroba diagnostikována v chronické fázi, akcelerovaná a blastická fáze je objevena jen u 5-10 % případů. Mezi společné symptomy můžeme zařadit např. nevolnost, úbytek váhy, pocit plného břicha v důsledku zvětšení sleziny, krvácení, pocení, purpuru (tečkovité krvácení pod kůží) a již zmíněnou splenomegalii. Laboratorní testy dále většinou prokáží leukocytosu, anemii a trombocytosu. Diagnóza je stanovena po kvantifikaci celkového počtu krevních elementů a procentuálního zastoupení krevních destiček, blastů a basofilů; dále se provádí biopsie kostní dřeně a cytogenetické vyšetření pro stanovení Ph chromosomu. U pacientů negativních na Ph chromosom jsou pro detekci BCR/ABL provedeny molekulárně biologické studie (Southern blot a PCR). (Faderl S. et al, 1999)

Jako je tomu u jiných druhů leukemie, není přesná příčina vzniku tohoto onemocnění do podrobností známa. Větší pravděpodobnost vzniku CML se vyskytuje u lidí, kteří byli vystaveni vysoké dávce radioaktivity nebo u pacientů, jež jsou z různých důvodů ozařováni. U většiny nemocných však CML vzniká bez zjiitelného vlivu radiace. Nebyl rovněž jednoznačně prokázán vliv jiných látek, léků, chemikálií nebo virů. Na druhé straně je prokázáno, že CML není dědičná a rovněž nepatří mezi nakažlivé choroby. (Faber E., 2006)



Obr. 1: Karyotyp pacienta s CML - translokace chromosomů 9 a 22, kdy chromosom 22 se jeví jako Filadelfský. (<http://path.upmc.edu/cases/case271/images/fig15.jpg>)



Obr 2: Vznik Filadelfského chromosomu.
(<http://www.meb.uni-bonn.de/cancer.gov/Media/CDR0000533336.jpg>)

2.1.3. Detekce BCR/ABL

Cytogenetická analýza je u CML standardní diagnostická metoda oceňovaná rovněž pro možnost prokázání přídatných karyotypových abnormalit, které se objevují při rezistenci choroby nebo její transformace do pokročilejšího stádia (trisomie 8. a 19. chromosomu, isochromosom i(17q) a přídatný Ph chromosom („dvojitý Ph“).

Diagnostické laboratorní vyšetření pro CML se skládá ze stanovení kompletního krevního obrazu, aspirace kostní dřeně (včetně stanovení procenta blastů a basofilů), biopsie kostní dřeně, cytogenetické studie pro Ph chromosom (Ph⁺) a markerů pro karyotypovou evoluci. U Ph⁻ pacientů jsou pro detekci BCR/ABL přeskupení indikovány molekulární metody jako například Southern Blot nebo PCR.

Nicméně cytogenetická analýza je časově velmi náročná, navíc je prozkoumáno pouze 20 – 25 metafází u každého vzorku. U 10 % pacientů nemůže být Ph chromosom prokázán cytogenetickými studiemi, ale u více než poloviny pacientů je přeskupení BCR/ABL detekováno pomocí molekulárních analýz. Genová PCR a Southern Blot mohou stanovit přesné „breakpointy“ fúzního genu. RT-PCR (RT = reverzní transkripce) a Northern Blot analýza detekují BCR/ABL transkript na úrovni RNA. Western Blot analýza nebo imunoprecipitace demonstrují přítomnost proteinu p210^{bcr-abl} pomocí monoklonálních protilátek proti Bcr a Abl.

Molekulárně biologické metody jsou užitečné i při monitorování průběhu nemoci při léčbě. Kvantitativní RT-PCR je používána pro další sledování pacientů po alogenní transplantaci kostní dřeně. Navzdory její citlivosti nemusí RT-PCR zaznamenat Ph⁺ buňky, které v daný okamžik analýzy netranskribují příslušný genový produkt. Hybridizace s fluorescencí in situ (FISH) je vhodná pro analýzu metafázních buněk a nedělících se interfázních buněk. Tato metoda je rychlá, analyzuje více buněk a je jednoduše kvantifikovatelná. (Guo J.Q. *et al*, 1991, Faderl S. *et al* 1999)

2.1.4. Průběh CML

Průběh CML může být rozdělen do počáteční chronické fáze a následné fáze transformace – do více agresivní a akutní fáze onemocnění.

U většiny pacientů je choroba diagnostikována v chronickém stádiu, které trvá od několika měsíců i do několika let (3 - 6 let). Toto stádium je dobře regulovatelné léky a krevní obraz nemocného zůstává téměř v normálním rozmezí. Charakteristický je

zvýšený počet leukocytů a krevních destiček, počet blastů v kostní dřeni nepřesahuje 10 %. Rovněž dochází ke zvětšení sleziny, což může být stejně tak jako počet leukocytů potlačeno podávanými léky.

Problém nastává, pokud po několika letech chronické fáze onemocnění nastane změna v jeho průběhu – transformace. Nemoc od této chvíle začíná probíhat mnohem agresivněji. Zpočátku má transformace podobu tzv. akcelerované fáze, která může být diagnostikována více způsoby. Dochází při ní i přes léčbu k opětovnému zvětšování sleziny (splenomegalie) a počtu bílých krvinek (leukocytosa). Počet blastů v kostní dřeni se pohybuje od 10 do 30 % a basofilů do 20 %. Rovněž dochází k trombocytopenii a klonální evoluci. Medián trvání této fáze se pohybuje od 6 do 9 měsíců.

Pokud se pomocí léčby nepodaří stádium převést zpět na fázi chronickou, dostává se choroba do fáze blastického zvratu s klinickými příznaky již rozvinuté akutní leukemie s mediánem trvání od 2 do 4 měsíců. Počet blastů v kostní dřeni překračuje 30 %, myeloidní prekursorů mohou rovněž tvořit nádory v lymfatických uzlinách, kůži a kostech. Některé studie prokazují, že u jedné čtvrtiny vyšetřovaných pacientů se blastická fáze rozvinula bez předchozí transformace fáze chronické do fáze akcelerované. U jedné třetiny pacientů mají blasty lymfoidní strukturu a exprimují lymfoidní markery, jako například terminální deoxynukleotidyltransferasu, CD19, CD20 nebo CD10 (společné antigeny akutní lymfoblastické leukemie). Dvě třetiny pacientů mají fenotyp akutní myeloblastické nebo nediferenciované leukemie. (Faber E. 2006; Kantarjian H.M. et al, 2006; Faderl S. et al 1999)

2.1.5. Léčba CML

Výběr vhodné léčby pro pacienta s CML je založen na posouzení mnoha faktorů, které zahrnují věk pacienta, celkový stav pacienta i doprovodné choroby a onemocnění, která dosud prodělal. Cílem léčby je redukce nádorové masy, eliminace Ph+ chromosomu a zabránění vývoje nemoci do akcelerované a blastické fáze. Úspěšnost léčby je hodnocena dosažením hematologické remise (normalizace počtu krevních buněk), cytogenetické remise (eliminace dřeňových buněk pozitivních na Ph chromosom) a molekulární odpovědi (vymizení Ph chromosomu). (Protivánková M. & Vorlíček J., 2001; Faderl S. et al., 1999)

Dříve se leukemie považovala za nevyléčitelné onemocnění, doba života pacienta od sdělení diagnózy byla 3 roky, u méně než 20% až 5 let. Léčba spočívala pouze v ozáření leukemických buněk či sleziny nebo splenektomii v domněnku, že člověk bude

vystaven pouze malému riziku infekce. Po intenzivním zkoumání nebyl potvrzen přínos této operace, 85 % pacientů přecházelo rychle do blastické fáze a přežívalo jen několik měsíců od stanovení diagnózy. (Faderl S. et al., 1999)

Dalším způsobem léčby byla chemoterapie, kdy se k redukci nádorové masy používala cytostatika, která ničí leukemické buňky a navodí dočasnou hematologickou odpověď, ale neoddálí progresi choroby. V 50. letech byl do léčby zaveden busulfan (derivát kyseliny sulfonové, obchodní název - Mylecytan, Myleran), který při relativně nízkých dávkách poskytoval dobrou kontrolu krevního obrazu a projevů onemocnění. Jeho dlouhodobé používání je však doprovázeno nežádoucími účinky, jako například neplodnost a nevratný útlum krvetvorby. Nejzávažnější vedlejší účinek však může být při dlouhodobějším užívání poškození funkce plic. Právě plicní toxicita způsobila, že v současné době je busulfan používán prakticky výhradně jen v rámci přípravných vysokodávkovaných režimů před provedením transplantace krvetvorných buněk.

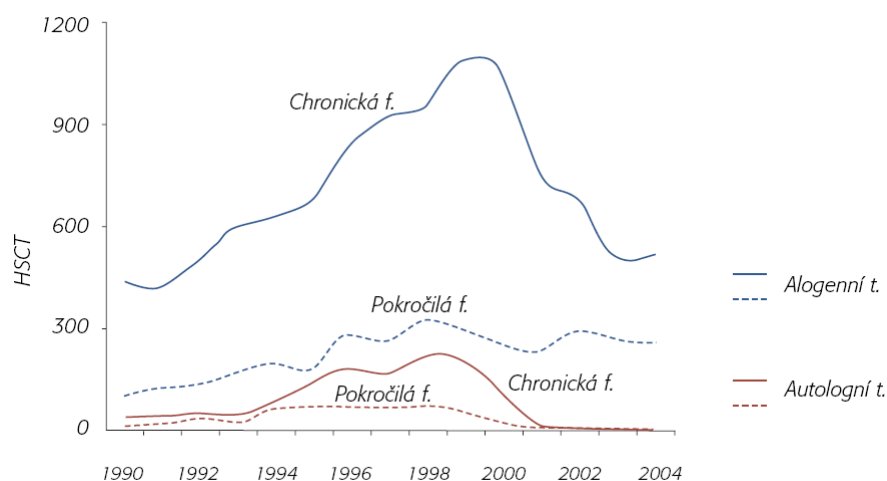
Další zavedené cytostatikum je také inhibitor ribonukleotidreduktasy – hydroxyurea (hydroxykarbamid, firemní název Litalir), která měla své místo zejména v počátku léčby a do provedení transplantace, kdy je potřeba výrazně snížit počet leukocytů. Je to specifický inhibitor buněčného cyklu, který zabraňuje syntéze DNA. Díky velmi dobré snášenlivosti mohla být používána i u starších nemocných, kteří těžko snášeli jinou dlouhodobou léčbu. Vedlejší účinky hydroxyurey byly většinou mírné: nevolnost, průjemy, bolesti žaludku, kožní ekzém, bolest hlavy, jen ve větších množstvích užívaného léku byly sledován výskyt aft v ústní dutině nebo zvětšování červených krvinek (makrocytosa) a výjimečně i chudokrevnost.

Podávání cytostatik na počátku léčby navozuje kompletní hematologickou odpověď v 50 % až 80 % případech. Cytogenetická remise je ovšem vzácná, nedochází k vymizení Filadelfského chromosomu a látky neovlivňují progresi onemocnění. Pacienti nevyhnutelně prodělají transformaci do blastické fáze a po maximálně 3 až 6-ti letech umírají. (Protivánková M. & Vorlíček J., 2001; Faderl S. et al., 1999; Faber E. et al., 2004)

V 70. letech se jako jediná možnost úplného vyléčení choroby stala alogenní transplantace hemopoetických kmenových buněk, jejíž provedení je však limitováno existencí vhodného dárce a věkem nemocného. Krvetvorné buňky se získávají od přesně vybraného dárce se zcela shodnými HLA antigeny a jsou nemocnému podány podobně jako krevní transfuze. Před transplantací jsou pacienti většinou předléčeni chemoterapeutiky, což ovlivňuje pokračování v životě bez nemoci. Transplantace dovoluje v léčbě použití vysokých dávek cytostatik často v kombinaci s radioterapií, které by bez použití transplantace vedly k úplnému a definitivnímu zničení krvetvorby. Dochází ke zničení zbývajících leukemických buněk v organismu a obnovení

krvetvorby je zajištěno podáním (transplantací) krevetvorných buněk po této vysokodávkované léčbě. Nejúčinnější je provádět transplantaci v chronické fázi onemocnění, v pokročilejších fázích nastává větší riziko recidivy a úmrtnosti spojené s léčbou (Obr. 3). Jako dárce se nejčastěji uplatňují sourozenci či nejbližší rodinní příslušníci nemocného se souhlasnými antigeny. Studie prokazují, že pacienti po transplantaci kmenových buněk, kteří byli předtím předléčeni chemoterapeutiky, přežívají bez návratu onemocnění mnohem delší dobu, a to zvláště ve srovnání s léčbou hydroxyureou a busulfanem (61 % : 45 %). U 10 – 20 % pacientů v chronické fázi CML se po transplantaci objevuje recidiva, u fáze blastické je to až 70 – 80 %. Interferon- α (viz dále) navozuje dlouhotrvající cytogenetickou odpověď u 20 – 40 % pacientů, u kterých se po transplantaci v chronické fázi CML objevuje opakování onemocnění.

Pro zmírnění projevů nemoci u pacientů, kteří nemají dostupného vhodného dárce, se zvažuje možnost autologní transplantace, kdy se v časném stádiu nemoci izolují krevetvorné buňky pacienta, ty jsou skladovány při nízké teplotě v tekutém dusíku tak, aby mohly přežít několik let. V pozdějším stádiu nemoci, kdy je schopnost krevetvorby pacienta značně omezena užíváním vysokých dávek cytostatik poškozujících i normální kostní dřeň, je umožněna její obnova transfúzí rozmražených buněk pacienta, což vede k prodloužení chronické fáze onemocnění. (Protivánková M. & Vorlíček J., 2001; Faderl S. et al., 1999; Faber E. et al., 2004)



Obr. 3: Počty provedených transplantací v Evropě podle registru EBMT. Rozděleno podle typu transplantace (alogenní, autologní) a stadia CML.

Další možností léčby CML je imunoterapie, kdy jsou k léčbě použity vlastní imunitní mechanismy pacienta. Interferony jsou bílkoviny, které jsou součástí imunitního systému a ochraňují tělo proti škodlivým účinkům virů. Tyto látky jsou využívány v léčbě zhoubných nádorů. V 80. letech byl do léčby zaveden interferon – α (v České

republiky jsou nejznámější přípravky Roferon-A, Introna), který se stal lékem pro pacienty, kteří nemají HLA shodného dárce. Pomocí tohoto biologického modulátoru, glykoproteinu s inhibičním účinkem na leukemickou kmenovou buňku, je dosaženo vysokého procenta hematologických odpovědí a současně také určitého procenta cytogenetických odpovědí. Se zvyšující se dávkou interferonu- α se také zvyšuje rychlost hematologické a cytogenetické odpovědi. Jeho nevýhodou je nutnost podávat lék formou podkožních injekcí, zpravidla v jedné denní dávce, a častý výskyt nežádoucích účinků. Počáteční obtíže, které připomínají chřipku (horečky, únava, bolesti v kloubech a kostech), obvykle během týdne ustupují a dají se zmírnit podáním paracetamolu před injekcí interferonu. Při dlouhodobém podávání se u nemocných může objevit nechutenství, únava, hubnutí, vyrážky, padání vlasů, snížená funkce štítné žlázy, změny nálady až deprese.

Objev interferonu byl důležitým mezníkem v léčbě CML. Je to první lék, za jehož podávání bylo dosaženo úplného vymizení Ph chromosomů z kostní dřeně pacientů bez transplantace krvetvorných buněk. Dále byla zjištěna vysoká účinnost kombinované terapie interferonem a cytostatiky, zejména hydroxyureou a cytosinarabinsidem. Výsledky byly natolik povzbudivé, že tato kombinovaná léčba nahrazovala často u pacientů středního a vyššího věku léčbu transplantační. (Faber E., 2006; Kantarjian H.M. et al, 1996; Voglová J., 2007; Faderl S. et al, 1999)

Díky novým poznatkům v molekulární biologii a patofyziologii CML jsou hledány ještě účinnější a cílenější metody léčby. Nadějným objevem nových léků se stal vývoj selektivních inhibitorů tyrosinkinasy používaných k inhibici maligního růstu buněk a utváření metastáz. V druhé polovině 90. let vedla tato snaha k objevení derivátů 2-fenylaminopyrimidinu. K těmto novým přípravkům řadíme imatinib, dasatinib a nilotinib.

➤ Imatinib (STI-571, GLEEVEC, GLIVEC – Novartis)

Stanovení imatinibu v krevní plasmě pacientů s CML je hlavní náplní mé diplomové práce, proto mu věnuji samostatnou kapitulu - viz později.

➤ Dasatinib (BMS-354825 SPRYCEL - Bristol-Myers Squibb)

Dasatinib (Obr. 4) je derivát aminopyrimidinu, jeho chemický název je N-(2-chlor-6-methyl-fenyl)-2-[6-[4-(2-hydroxyethyl)-piperazin-1-yl]-2-methylpyrimidin-4-ylamino]thiazol-karboxamid monohydrát. Jeho sumární vzorec je $C_{22}H_{26}ClN_7O_2S \cdot H_2O$,

který odpovídá molekulové hmotnosti $506,02 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ (monohydrát) a $488,01 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ (bezvodý). Dasatinib je bílý až mírně nažedlý prášek s teplotou tání mezi $280 - 286 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Látka je nerozpustná ve vodě, ale lehce rozpustná v methanolu a ethanolu.

Je to malá molekula s multityrosinkinasovou inhibiční aktivitou. Jeho selektivní kompetitivní inhibiční účinek je popsán nejen u BCR/ABL a ABL, ale také u c-Kit, PDGFR- β , kinas rodiny Src (SFK), kam řadíme kinas Lck, Fyn, Hck, Lyn a Src. Dasatinib byl *in vitro* aktivní u několika leukemických buněčných linií senzitivních nebo rezistentních na imatinib a inhiboval růst buněčných linií CML a akutní lymfoblastické leukemie (ALL) nadměrně exprimujících BCR/ABL. Předchozí studie prokázaly, že četné domény BCR/ABL interagují s aktivovanými Src kinasami nezávisle na BCR/ABL kinasové aktivitě. Src kinas mohou přispívat k proliferaci a přežívání myeloidní řady buněk exprimujících BCR/ABL. (Lombardo L.J. *et al*, 2004; Faber E., 2007, Brave M. *et al.*, 2008)

Mechanismus účinku dasatinibu spočívá v interakci s konstitutivně aktivní tyrosinkinasou Bcr/Abl na vazebném místě pro ATP, a to jak v inaktivní tak v aktivní konformaci enzymu. Blokáda aktivní formy enzymu není v jeho případě závislá na poloze aktivační klíčky díky tomu, že při vazbě s kinasou vytváří méně kontaktních míst a jeho požadavky na konformaci vazebného místa jsou menší než u imatinibu. Dasatinib je díky tomu účinný u naprosté většiny mutovaných forem kinas Bcr/Abl rezistentních na IM. (Faber E., 2007)

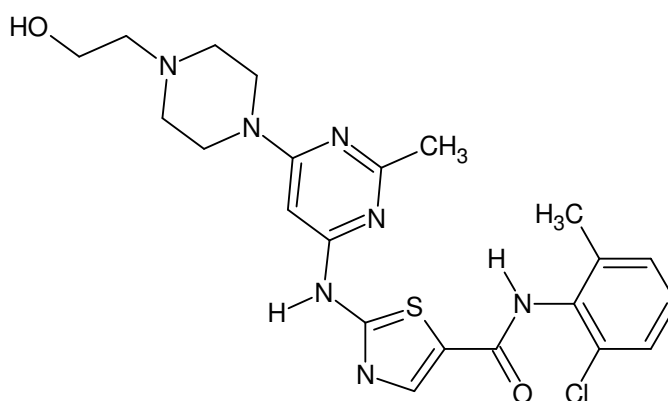
V neklinických studiích byla zkoumána akutní a chronická toxicita, jako například kardiovaskulární toxicita, elektrolytická nerovnováha, lymfoidní degradace, zvýšená hladina triglyceridů a cholesterolu, jaterních enzymů, tvorby moči, poruchy ledvin, přeměna klků a krvácení v trávicím traktu, reprodukční toxicita. (Brave M. *et al.*, 2008)

V první fázi klinické studie byla zkoumána bezpečnost a snášenlivost dasatinibu u pacientů, kteří byli z 86 % rezistentní na terapii imatinibem. Kompletní hematologická odpověď (CHR) u pacientů v chronické fázi byla dosažena z 92 %, a také ze 45 % u akcelerované fáze a z 35 % u blastické fáze CML, což jsou výsledky velmi povzbudivé. U imatinibu se u pokročilých stádií onemocnění nepodařilo dosáhnout takového procenta hematologické odpovědi.

Další studie prokázaly, že u pacientů léčených dasatinibem se výrazně prodloužila doba přežití bez progresu choroby. Mezi hlavní nepříznivé účinky se řadí pleurální efuze, která se objevila jen u několika procent pacientů.

Předmětem následujících studií bylo prokázat jeho účinnost v léčbě pacientů rezistentních na terapii imatinibem užívajících od 400 do 600 mg látky denně. Část pacientů pokračovala v terapii imatinibem, ovšem s jeho zvýšenou dávkou, která odpovídala 800 mg jedenkrát denně, druhá část pacientů byla léčena 70 mg dasatinibu

dvakrát denně. Po 10 měsících byla dosažena CHR 92 % u dasatinibu a 82 % u imatinibu; významná cytogenetická odpověď (CyR) byla 48 % u dasatinibu a 33 % u imatinibu; kompletní cytogenetická odpověď (CCyR) byla dosažena u 35% pacientů s dasatinibem a u 16% s imatinibem. Tyto výsledky jasně prokazují, že dasatinib je v léčbě CML rezistentní na imatinib kvalitnější než pouhé zvýšení dávky imatinibu. (Frame D., 2007; Faber E., 2007)



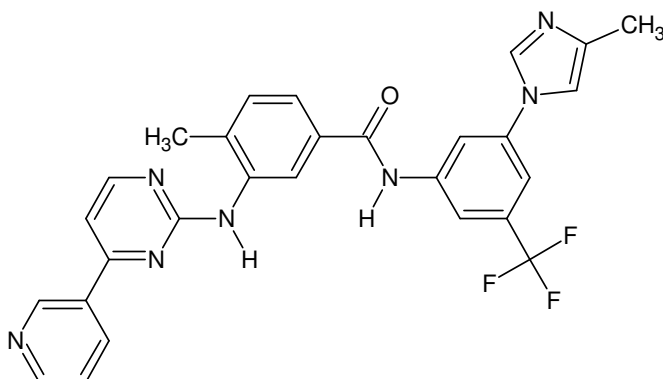
Obr. 4: Molekula dasatinibu

➤ Nilotinib (AMN-107, TASIGNA - Novartis)

Díky vzniku rezistentních mutací BCR/ABL na léčbu imatinibem byl na základě krystalové struktury komplexu IM-Abl navržen nový více účinný inhibitor této tyrosinkinasy (Obr. 5). Krystalografické studie AMN107 skutečně naznačovaly, že malé rozdíly ve způsobu vazby do Abl a lepší topologické začlenění se do proteinu Abl odpovídá většímu účinku látky.

Podobně jako imatinib, nilotinib inhibuje Bcr/Abl vazbou do inaktivní konformace Abl kinasové domény, tudíž chrání enzym před získáním katalyticky aktivní konformace a blokuje fosforylaci tyrosinů proteinů zahrnutých v Bcr/Abl signální transdukci. Lepší vazba nilotinibu má za následek i větší účinek a selektivitu proti KIT a PDGF receptorovým kinasám, proto je využíván v léčbě gastrointestinálního stromálního tumoru a systémové mastocytosy, ale nemá žádnou aktivitu proti tyrosinkinasám typu Src. V preklinických studiích byl u buněčných linií citlivých na IM nilotinib 30x účinnější než samotný IM a byla sledována aktivita u 32 ze 33 na imatinib rezistentních mutací BCR/ABL, což velmi povzbudilo vývoj léčby CML. Jediný případ, vůči kterémuž je nilotinib neúčinný, je mutace T315I (viz. dále). Nilotinib rovněž vykazuje 30 až 40x vyšší efektivitu v inhibici proliferace Ph pozitivních buněk exprimujících p190^{bcr/abl} u ALL

než imatinib. (Kantarjian H.M. et al, 2007a; Golemovic M. et al, 2005; Weisberg E. et al., 2006)



Obr. 5: Molekula nilotinibu

Cílem klinické studie I. fáze bylo zjistit bezpečnost, snášenlivost a biologickou aktivitu nilotinibu v séru, jeho farmakokinetický profil, maximální snášenou dávku a maximální denní snášenou dávku u nemocných s CML nebo Ph+ ALL rezistentních na IM. Do studie byli zařazeni většinou pacienti rezistentní na léčbu imatinibem, v pokročilém stádiu onemocnění a ti, kteří byli léčeni vysokou dávkou imatinibu. Vrcholové koncentrace v séru bylo dosaženo za 3 hodiny po podání léku, k dosažení žádané (3,6 µM) stabilní koncentrace v séru došlo při dávkování 2x denně 400 mg nilotinibu již 8. den. CHR byla dosažena u 92% pacientů v chronické fázi, u 72 % v akcelerované fázi a u 42 % v myeloblastickém zvratu. CCyR dosáhlo 53 % pacientů v chronické fázi, 48 % v akcelerované fázi a 29 % v blastické fázi onemocnění. U části pacientů se projeví vedlejší nebo nežádoucí účinky, a to zvláště po vystavení vyšší jednorázové dávce okolo 800 mg nebo u pacientů v pokročilém stádiu onemocnění. K hematologickým toxickým účinkům se řadí trombocytopenie, neutropenie a anemie. Dále se objevovala reverzibilní nepřímá hyperbilirubinémie, kdy normální hladiny bilirubinu bylo dosaženo až po vysazení léku, pankreatitida a bolesti břicha, vzestup lipasy, suchá kůže, vyrážky a svědění, nevolnost, únava a v několika případech i vypadávání vlasů. V jednom případě byla dokonce popsána kardiotoxicita.

V druhé fázi klinické studie byl nilotinib podáván v dávce 400 mg 2x denně pacientům rezistentních na imatinib nebo nesnášejících léčbu. CHR byla dosažena u 74 % pacientů, velká CyR u 52 % a CCyR u 34 % pacientů. K nežádoucím účinkům patří myelosuprese: anemie, neutropenie a trombocytopenie; dále se v minimálních případech vyskytovala bolest hlavy, průjem, kožní vyrážky, bolesti svalů a kloubů. Rovněž byly pozorovány biochemické abnormality, jako například elevace lipasy,

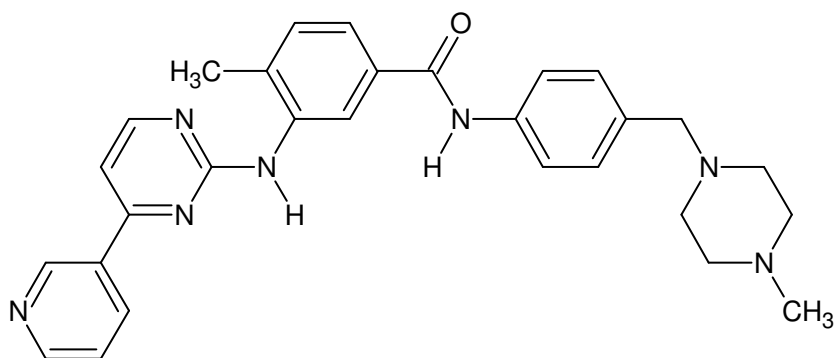
hypofosfatemie, hyperglykemie, hyperbilirubinemie, a zvýšení hodnot ALT a kreatinu. Ve výjimečných případech byla sledována pleuritida, perikarditida a plicní edém.

Mnohem účinnější indikace nilotinibu je jeho podávání jako léku první linie - nově diagnostikovaným pacientům v ranné chronické fázi CML. Po podávání 400 mg 2x denně byla po šesti měsících dosažena CCyR u 100 % pacientů. Po 3, 6 a 9 měsících byla provedena kvantitativní PCR, která určila poměr BCR/ABL ku ABL 3,4; 1,8 a 0,54 %. Tyto výsledky byly získány ze studie na malém počtu pacientů, proto je třeba je ověřit na větším souboru. (Faber E. & Indrák K., 2007)

2.2. Imatinib

Vývoj imatinibu mesylátu (Gleevec, Novartis Pharmaceuticals, Basilej, Švýcarsko) představuje hlavní úspěch pro cíleně řízenou chemoterapii v léčbě nádorových onemocnění a průlom v řízení CML. Předtím byly možnosti léčby omezeny. Alogenní transplantace kostní dřeně zůstávala limitována dostupností vhodného dárce a s transplantací spojenými úmrtími a chorobami. Interferon- α způsobuje CCyR u 5 - 20 % pacientů v rané chronické fázi CML, ale je spojen s vážnými toxicitami a redukcí účinnosti s narůstající dobou trvání chronické fáze choroby. V dnešní době je to lék první linie u nově diagnostikovaných pacientů CML, který působí jako inhibitor $p210^{bcr/abl}$ produkovaného leukemickým genem BCR/ABL tak, že obsadí ABL doménu ATP-vazebného místa, udržuje protein v inaktivní konformaci a tím inhibuje jeho aktivitu. Jeho inhibiční aktivita byla prokázána nejen pro tyrosinkinasy ABL a BCR/ABL, ale i pro tyrosinkinasy receptoru SCF (stem cell factor - c-Kit ligand) a PDGF (platelet-derived growth factor). Získaná mutace c-Kit genu a následná proliferace buněk exprimujících tento mutovaný gen byla zjištěna např. u gastrointestinálního stromálního tumoru (GIST); PDGF je mitogenem pro pojivové tkáně a může se uplatnit v patogenezi některých myeloproliferací, jako například v eosinofilní proliferaci, za niž je zodpovědný gen FIPIL1-PDGF- α . Proto se Imatinib používá k léčbě nejen Ph pozitivní CML a ALL, ale i výše zmiňovaného GIST, hypereosinofilního syndromu, chronické eosinofilní leukemie a systémové mastocytosy. (Faber E., 2005; Kantarjian H.M. et al., 2006)

Tento selektivní inhibitor konstitutivně aktivní tyrosinkinasy je derivát fenyalminopyrimidinu označovaný také jako STI-571 (signal transduction inhibitor) nebo CGP57148B. Konkrétně se jedná o 4-[(4-methylpiperazin-1-yl)methyl]-N-[4-methyl-3-[(4-pyridin-3-yl)pyrimidin-2-yl)amino]-phenyl]-benzamid methansulfonát (Obr. 6). (Deininger M.W.N. & Druker B.J., 2003)



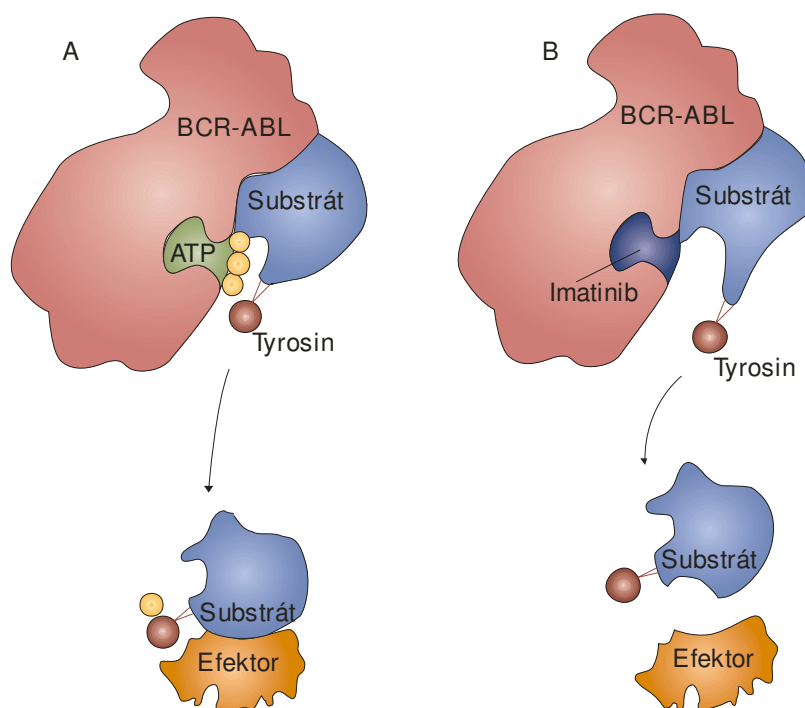
Obr. 6: Molekula imatinibu

IM byl syntetizován v roce 1992 a už o několik málo let později byla prokázána jeho velmi vysoká účinnost u myšího modelu CML – působil necytostaticky a velmi selektivně. Poprvé se Glivec podrobil klinickým zkouškám v červnu 1998, jeho pozitivní výsledky byly publikovány o rok později, kdy už probíhaly studie II. fáze. Na základě výsledků klinických studií III. fáze z roku 2000 bylo užívání IM u nemocných CML v roce 2001 schváleno Úřadem pro potraviny a léčiva (Food and Drug Administration – FDA) a to v dávce 400 mg/den v chronické fázi a 600 mg/den v akcelerované a blastické fázi. Od července 2002 je schválena plná úhrada IM pojišťovnami i v České republice.

Jedna z mála nevýhod tohoto přípravku je vznik rezistence při dlouhodobém užívání přípravku a jeho menší úspěšnost při léčbě pokročilejších stádiích onemocnění. (Faber E., 2005)

2.2.1. Mechanismus účinku

Imatinib (IM) interaguje s bílkovinou p210^{bcr/abl} tak, že obsadí ABL doménu enzymu ve vazebném místě pro ATP, stabilizuje protein v inaktivní konformaci a nedochází k fosforylaci tyrosinu bílkovin patřících k substrátům tohoto onkoproteinu. Zablokováním fosforylace tyrosinových zbytků bílkovin dochází k zastavení celé řady signálních drah, které hrají roli ve vzniku leukemického fenotypu buňky. Působením IM dochází k apoptóze buněk exprimujících p210^{bcr/abl} a také k inhibici jejich proliferace. Tato látka tedy nezabraňuje vzniku leukemického genu BCR/ABL, jenž hraje u CML klíčovou roli, ale brání v uplatnění jeho účinku na proteinové úrovni. (Obr. 7) (Faber E., 2005)



Obr. 7: Mechanismus účinku imatinibu. (Faber E., 2005)

2.2.2. Farmakologické vlastnosti a metabolismus IM

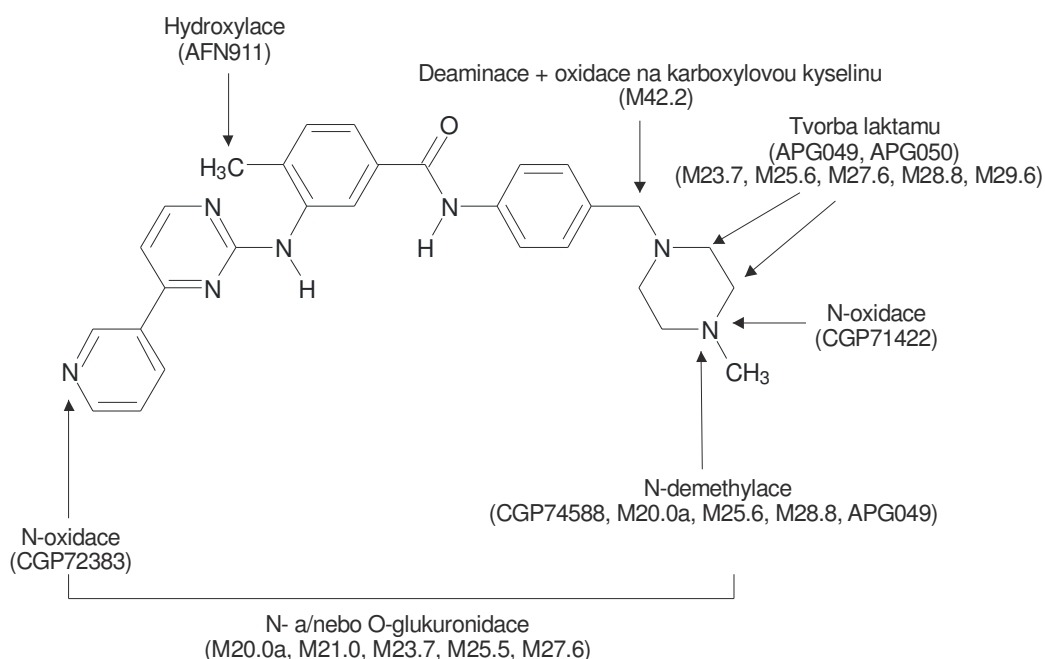
Ve studii vlastností IM u skupiny zdravých dobrovolníků po dávce 239 mg IM podané orálně dosáhla koncentrace IM a jeho hlavního demethylovaného metabolitu CGP74588 maximální hodnoty 1 – 2 hodiny po užití. IM a jeho metabolity jsou přítomny převážně v plasmě (77 %), zbytková část je distribuována do erytrocytů. Biologický poločas eliminace je 13,5 hodiny. Odbourání (clearance) IM v plasmě odpovídá asi 4,2 (ml/min)/kg. Farmakokinetické vlastnosti se po pravidelném užívání léku nemění, rovnovážného stavu je dosaženo přibližně po měsíci pravidelného užívání. (Gschwind H.P. et al, 2005)

Velký vliv na farmakokinetické vlastnosti má rovněž vazba IM na plasmatické proteiny, zejména na albumin. Přímým měřením koncentrace radioaktivně značeného přípravku v plasmě byla jasně dokázána vysoká vazebná afinita IM také k α_1 -kyselému glykoproteinu. Velmi důležitá je rovněž vazba jeho hlavního demethylovaného metabolitu kvůli jeho farmakologické aktivitě. Data ze studií zobrazují velmi podobnou charakteristiku jako u IM. (Kretz O. et al, 2004)

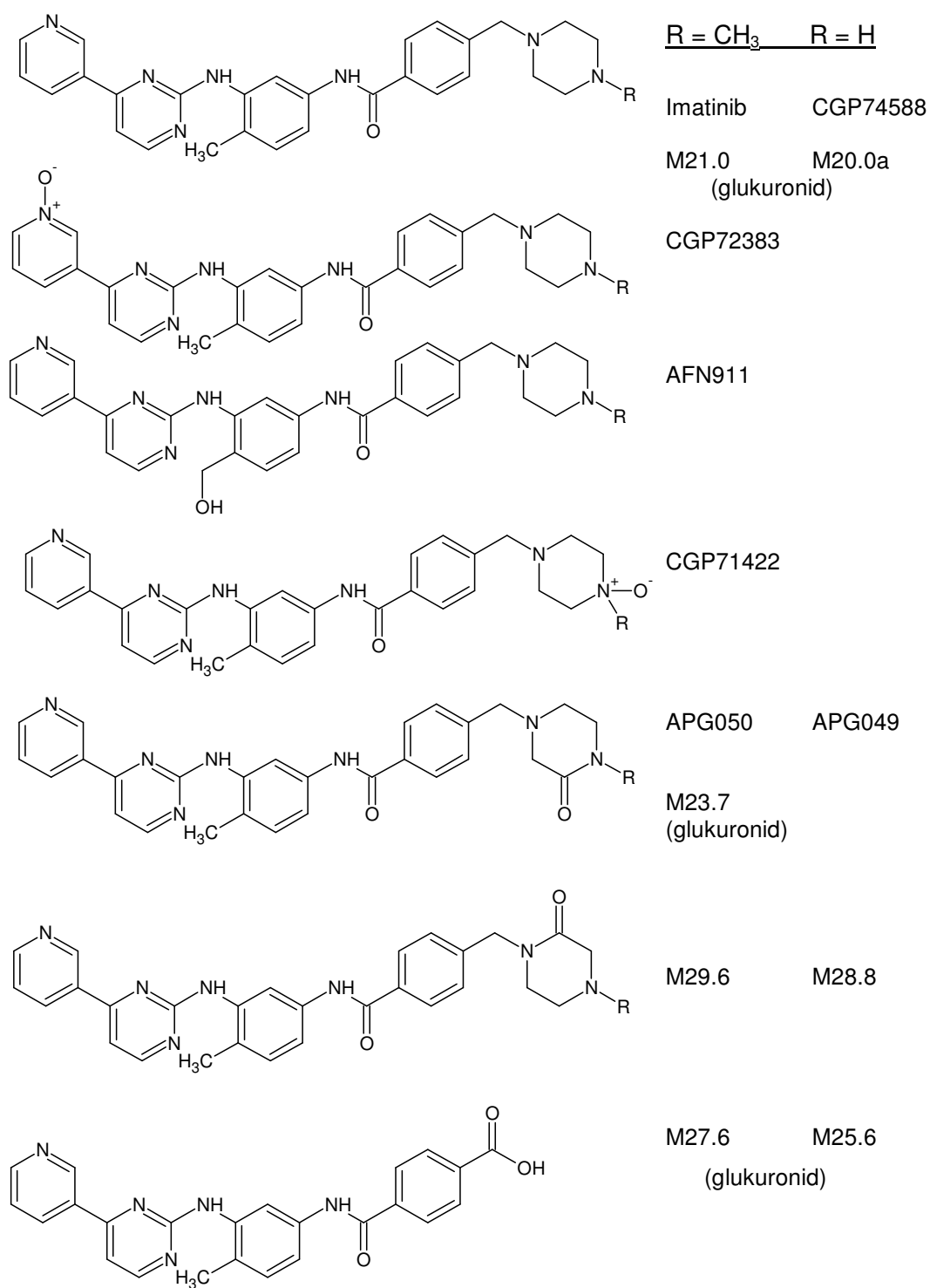
Hlavním způsobem odbourávání IM je oxidativní metabolismus. První fáze zahrnuje N-demethylaci (vznik CGP74588), oxidace piperazinového cyklu s tvorbou laktamu

(APG049, APG050, M29.6 a M28.8), piperazin-N-4 oxidace (CGP71422), pyridin N - oxidace (CGP72383) a benzylová hydroxylace (AFN911). Mimo to byla sledována ztráta piperazinové části oxidativní deaminací a další rychlá oxidace meziproductového aldehydu na příslušnou karboxylovou kyselinu M42.2. Studie metabolismu *in vitro* s lidskými jaterními mikrosomy ukázaly, že IM je katalyzován hlavně cytochromem P450, zejména izoenzymem CYP3A4, tudíž je odbourávání IM v lidském těle ve velké míře závislé právě na tomto jaterním enzymu. Druhá fáze metabolické dráhy zahrnuje přímou konjugaci IM a N-demethylovaného metabolitu s glukuronovou kyselinou (M21.0 a M20.0a). (Obr. 8, 9)

Látky se z těla vylučují z 80 % stolicí a močí. Asi 23 % látky se vyloučí stolicí v původní formě, což může být spojeno s a) biliární exkrecí IM, b) nestabilními meziprodukty, které mohou být zpětně přeměněny na IM (N-oxidy, glukuronidy) a/nebo c) s imatinibem spojenými komponenty vylučovanými přes gastrointestinální stěnu obcházející žlučovou cestu. Celkové odbourání je dosaženo zpravidla do tří týdnů po podané dávce. (Gschwind H.P. et al, 2005)



Obr. 8: Znázornění oxidativního metabolického odbourání imatinibu u člověka. (Gschwind H.P. et al, 2005)



Obr. 9: Imatinib a jeho hlavní metabolity (Gschwind H.P. *et al*, 2005)

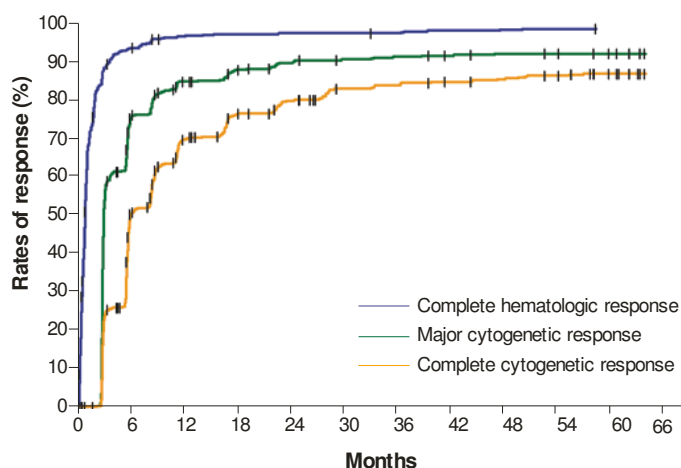
2.2.3. Klinické studie

V klinických studiích, které probíhaly od konce 90. let 20. stol., se imatinib ukázal jako velmi úspěšný nový prostředek k léčbě do té doby těžko léčitelné choroby. V léčbě pacientů v blastickém zvratu CML, jehož medián přežití je 3 - 6 měsíců, je zaznamenána menší a krátkodobá účinnost IM. Hematologické remise dosáhlo pouze 26 - 55 % pacientů, velká cytogenetická odpověď (pokles zastoupení klonu Ph+ pod 35 % vyšetřených buněk) byla dosažena pouze u 11 - 14 % nemocných. V naprosté většině případů ovšem vzniká rezistence na léčbu, tudíž je IM indikován výhradně k optimalizaci přípravy k provedení alogenní transplantaci krvetvorných buněk.

Lepších výsledků bylo dosaženo v léčbě pacientů v akcelerované fázi Ph+ CML. CHR byla dosažena u 39 % pacientů, CCyR u 17 % nemocných. Rovněž byla prokázána vyšší účinnost léčby při vyšším dávkování léku (400 vs. 600 mg denně).

Další studie byly prováděny u pacientů v chronické fázi CML s hematologickou a cytogenetickou rezistencí na interferon- α nebo s jeho nesnášenlivostí.

Nejdůležitější studií, která potvrdila místo IM v léčbě nově diagnostikovaných pacientů s CML, byla prospektivní randomizovaná studie IRIS (International Randomized Study of Interferon and STI571). Byl srovnáván IM v dávce 400 mg/den s kombinovanou léčbou interferon- α a cytarabin (Ara-C). V obou studiích bylo hodnoceno 553 pacientů a dosažené výsledky jednoznačně potvrdily přednosti IM (Obr. 10). Pravděpodobnost dosažení velké cytogenetické remise po 18 měsících byla 87 % vs. 35 %, pravděpodobnost přežití bez progresu po 18 měsících byla 96,7 % vs. 91,5 %. Rovněž byla prokázána lepší kvalita života u pacientů léčených IM. Celková účinnost a dobrá snášenlivost léčby se projevily i na podílu nemocných pokračujících v iniciální léčbě (u IM 85,7 % a u interferonu 10,8 %) a podílu nemocných, kterým bylo umožněno přijít při neúčinnosti na srovnávanou léčbu (57,5 % nemocných původně léčených interferonem přešlo na léčbu IM, zatímco k opačné změně došlo pouze u 2 %). Cytogenetická odpověď na molekulární úrovni byla sledována pomocí kvantitativní PCR a byl zjištěn pokles množství Ph+ buněk o více než 3 řády u 39 % nemocných léčených IM a pouze u 2 % ve skupině druhé. Dalším sledováním pacientů bylo potvrzeno pokračující zlepšování cytogenetické odpovědi (po 30 měsících je pravděpodobnost dosažení CCyR 82 %, pravděpodobnost přežití bez návratu onemocnění 88 % a celkové přežití činí 95 %). U malého procenta pacientů nemoc nešla prokázat ani kvalitativní PCR, tudíž dosáhli kompletní „molekulárně genetické remise“.



Obr. 10: Stupně odpovědí po 12 měsících léčby IM jako lékem první linie: CHR – 96 %; majoritní CyR – 85 %; CCyR – 69 %. Po 60 měsících léčby byly příslušné stupně odpovědí následující: 98 %, 92 % a 87 %. (Druker J.B. et al, 2006)

Kromě hematologických nežádoucích účinků je IM obecně velmi dobře snášen. Nejčastěji se vyskytující nežádoucí účinky souvisí s gastrointestinálním traktem (nevolnost, žaludeční dyspepsie, průjem), vnitřním prostředím (otoky víček, obličeje, dolních končetin, retence tekutin), pohybovým aparátem (svalové křeče, bolesti svalů, kloubů a kostí) a imunitním systémem (alergické kožní reakce, pruritus, zhoršení existujících alergických onemocnění). Klinicky nejvýznamnějšími nežádoucími účinky jsou hematologické – neutropenie a trombocytopenie. (Faber E., 2005; Druker J.B. et al, 2006)

Jako nejzávažnější problém léčby CML pomocí IM je rozvoj rezistence po jeho dlouhodobějším užívání nebo při léčbě pokročilejších stádií choroby. V těchto případech je potřeba modifikovat léčbu buď zvýšením dávky IM nebo jeho kombinací s jinými prostředky, užíváním jiných tyrosinkinasových inhibitorů, alogenicou transplantací kmenových buněk nebo jinými investigativními způsoby léčby.

2.2.4. Příčiny vzniku rezistence léčby na IM

Rezistence k IM může být rozdělena na primární, u které pacienti vykazují nedostatečnou účinnost tohoto TKI od začátku terapie, a sekundární (rovněž zvaná „získaná rezistence“), která vzniká až po prvotním dosažení určitého stupně odpovědi k IM trvající různě dlouhou dobu. Získaná rezistence může být přesně charakterizována v případě ztráty majoritní CyR a CCyR. Rezistence může být dále rozdělena na hematologickou (nedostatečná normalizace počtu krevních elementů

v periferní krvi), cytogenetickou (přetrvávání Ph chromosomu) a molekulární (přetrvávání BCR/ABL1 transkriptu u RT-PCR). Dále je rezistence k imatinibu definována jako nedosažení CHR do tří měsíců, CR do šesti měsíců, částečné CyR do dvanácti měsíců CCyR do 18 měsíců. (Tab. 1) Obecně lze mechanismus rezistence rozdělit do dvou hlavních skupin: závislý a nezávislý na Bcr/Abl. (Ramirez P. & DiPersio J.F, 2008; Quitás-Cardama A. et al, 2009)

Tab. 1: Definice odpovědí na léčbu (Ramirez P. & DiPersio J.F, 2008)

Odpověď	Definice
Kompletní hematologická (CHR)	WBC < $10 \times 10^9/l$ s normální diferenciací, počet trombocytů < 450×10^9 ; $\leq 1\%$ cirkulujících nezralých buněk (skládající se z metamyelocytů); zmizení všech znaků a symptomů nemoci včetně hmatatelné splenomegalie
Částečná hematologická (PHR)	WBC $10-20 \times 10^9/l$; normální počet WBC s $>1\%$ nezralých periferních buněk (blasty, promyelocyty, myelocyty nebo metamyelocyty), hmatatelná splenomegalie nebo přítomnost dalších příznaků choroby
Cytogenetická (CyR)	Musí být prozkoumáno minimálně 20 metafázních buněk kostní dřeně
Majoritní	0 % Ph+ metafázních buněk – kompletní (CCyR)
Minoritní	1-35 % Ph+ metafázních buněk – parciální 36-95 % Ph+ metafázních buněk
Molekulární	
Nedetekovatelný BCR/ABL	BCR/ABL transkript nedetekovaný pomocí nested RT-PCR nebo poměr [BCR/ABL]/ABL < 0,001 %
Majoritní	Poměr [BCR/ABL]/ABL < 0,1 % nebo > redukce 3 řády

Mechanismus rezistence závislý na Bcr/Abl

Tento mechanismus je považován za nejčastější důvod pro rozvoj rezistence. Nejčastěji se jedná o vznik bodových mutací v Abl kinasové doméně fúzního proteinu Bcr/Abl, které zabraňují vazbě IM (Obr. 11). Tyto mutace mohou být rozděleny do dvou skupin. První skupina zahrnuje mutace, které brání kontaktu mezi Bcr/Abl a IM. Substitucí jednoho z přibližně 20 residuí Abl-kinasové domény zahrnutých ve vazbě IM může vyústit v redukovanou afinitu pro vazbu IM nebo sterickou inhibici vazby. Druhá skupina zahrnuje mutace, které mění prostorové uspořádání proteinu a většinou způsobuje přechod z inaktivního do aktivního stavu. Struktura BCR/ABL obsahuje 2 flexibilní klíčkové struktury: vazebnou klíčku pro fosfát z ATP a aktivační klíčku, která má specifické uspořádání v inaktivní konformaci Bcr/Abl a která stabilizuje tuto strukturu. Krystalografické studie ukázaly vysokou selektivitu a účinnost IM kvůli jeho schopnosti vázat se a uzamknout Bcr/Abl v jeho inaktivní, auto-inhibované konformaci. Proto mutace v těchto klíčcích destabilizují jejich uspořádání tak, že kinasová doména

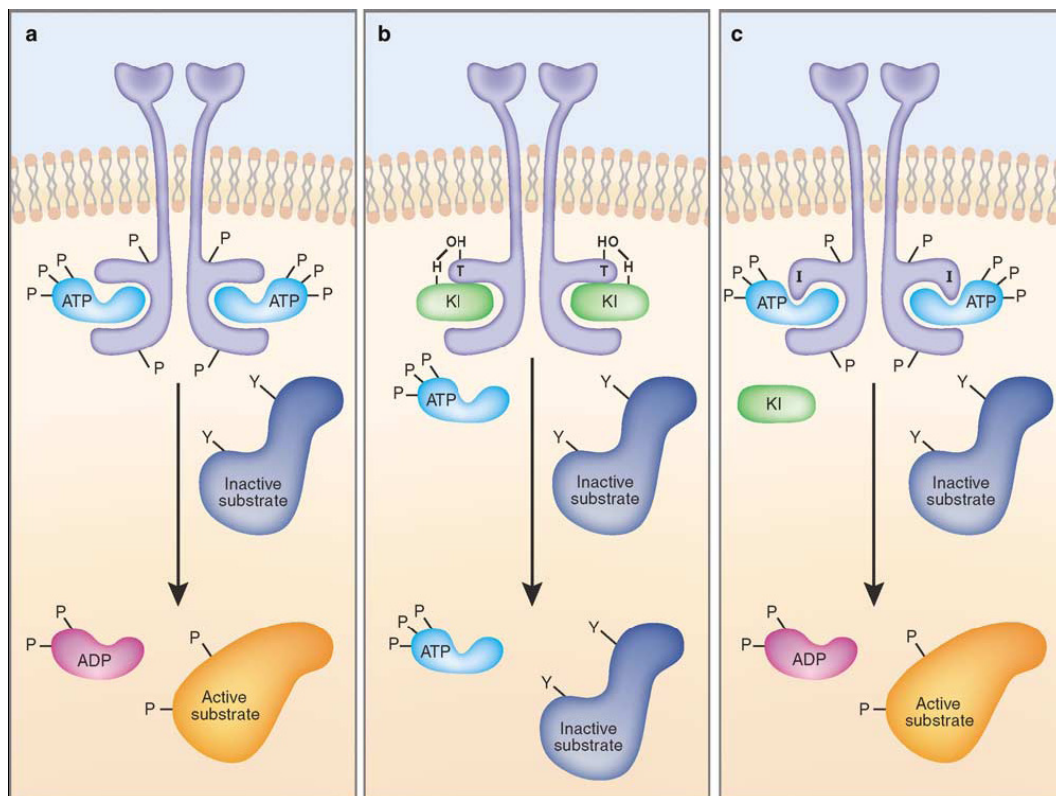
nemůže zaujmout inaktivní konformaci potřebnou pro vazbu IM. (Kantarjian H.M. et al, 2006; Ramirez P. & DiPersio J.F, 2008)

Konkrétně můžeme mutace rozdělit ještě podrobněji do 4 skupin, a to podle místa, kde se vyskytují. První skupina mutací (G250E, Q252R, Y253F/H, E255K/V) zahrnuje aminokyseliny, které tvoří vazebnou kličku pro fosfát z ATP (rovněž známá jako P-klička). Druhá skupina (V289A, F311L, T315I, F317L) se nachází ve vazebném místě pro IM a interaguje přímo s inhibitory přes vodíkové můstky nebo Van der Waalsovy interakce. Třetí skupina mutací (M351T, E355G) se shlukuje v uzavřené blízkosti katalytické domény. Čtvrtá skupina (H396R/P) je lokalizovaná v aktivační kličce, jejíž konformace je molekulárním vypínačem kontrolujícím kinasovou aktivaci či inaktivaci. (Martinelli G. et al, 2005).

Přídavný mechanismus rezistence závislý na Bcr/Abl zahrnuje zvýšenou amplifikaci a expresi genu BCR/ABL. Pokud se zvyšuje počet Ph pozitivních chromosomů, dochází k růstu exprese proteinu p210^{BCR/ABL} v buňkách a účinnost IM tudíž výrazně klesá.

Další zprostředkovatel rezistence na IM je plasmatický α -1-kyselý glykoprotein (AGP), který vede ke snížení intracelulární koncentrace léku vázajícího se na tento protein ve fyziologické koncentraci a vyúsťující v redukované inhibici Abl kinasy. Míra inhibice je závislá na dávkování léku.

Mimoto je IM substrát několika proteinů odčerpávajících látky z buněk, a to včetně P-glykoproteinové pumpy (P-gp). In vitro studie demonstrují, že zvýšená exprese tohoto proteinu vede ke vzniku rezistence. (Frame D., 2007; Ramirez P. & DiPersio J.F, 2008)



Obr. 11: a) Grafické znázornění onkogenicky aktivovaného receptoru tyrosinkiny. b) Inhibice onkogenicky aktivované kinasy malou molekulou inhibitoru (KI) c) Rezistence k inhibici malou molekulou díky mutaci, která přerušuje rozhodující vodíkové vazby mezi inhibitorem kinasy a receptorem tyrosinkiny, který má objemný postranní řetězec interagující s vazebným místem. (Rubin B.P. & Duensing A., 2006)

Mechanismus rezistence nezávislý na Bcr/Abl

Ačkoliv mechanismus závislý na Bcr/Abl je primárně zodpovědný za rozvoj sekundární (získané) rezistence v chronické fázi CML, existuje řada nezávislých mechanismů vyúsťujících ve vývoj této rezistence.

Jedním z těchto mechanismů je konstitutivní aktivace molekul účastnících se signálních drah, jež mají za následek aktivaci drah bez ohledu na inhibici Bcr/Abl a zapříčiňující vznik rezistence. Jako příklad lze uvést kinasy rodiny Src (SFKs), u kterých bylo prokázána regulace proliferace a přežívání buněk a mající rovněž za následek rozvoj pozdějších stádií CML.

Další studie prokázaly, že u buněčných linií CML vykazující rezistenci na IM nezávislou na Bcr/Abl se objevuje zvýšená exprese Lyn a Hck. Mimoto koinhibice Bcr/Abl a SFKs prokázala navození zvýšené apoptotické odpovědi. Je zde zjevně silné logické odůvodnění pro užívání duálních inhibitorů při léčbě pacientů s CML rezistentní na IM. (Ramirez P. & DiPersio J.F., 2008)

Jedna strategie léčby pacientů rezistentních k IM se zaměřuje na zvýšení jeho dávky. Data podporující tuto hypotézu se skládají ze srovnání pěti nezávislých studií. Stupně odpovědí jsou znázorněny v tabulce. (Tab. 2)

Tab. 2: Stupně odpovědí pacientů s nově diagnostikovanou chronickou fází CML
(Frame D., 2007)

Odpověď	IM + nízká dávka Ara-C	IM + vysoká dávka Ara-C	IM+ pegylovaný interferon-α	Vysoká dávka IM	Standardní dávka IM
Pacienti (n)	30	127	76	114	114
Čas sledování (měsíce)	12	18	12	12	18
CHR (%)	100	nezaznamenáno	97	98	96
MCR (%)	83	83	83	96	87
CCyR (%)	70	67	70	95	76
MMR (%)	nezaznamenáno	51	47	60	39
CMR (%)	2/15	28	14	26	4
Neutropenie 3. a 4. stupně (%)	27	nezaznamenáno	63	36	14
Trombocytopenie 3. a 4. stupně (%)	37	nezaznamenáno	28	25	8

Další možnost v léčbě pacientů rezistentních na IM je podávání tyrosinkinasových inhibitorů druhé generace – dasatinibu a nilotinibu. V prvním případě se v klinické studii porovnával účinek dasatinibu (70mg/den) proti IM (800 mg/den). U dasatinibu byla z 92 % dosažena CHR a z 35 % CCyR. Oproti tomu u IM dosáhlo CHR „jen“ 82 % a CCyR 16 %. U pacientů s dřívější žádnou cytogenetickou odpovědí jich 44 % dosáhlo majoritní CyR, u IM to bylo jen 7%. Tyto výsledky jasně naznačují, že dasatinib je k léčbě rezistentní CML mnohem vhodnější než zvýšení dávky IM. V klinické studii účinku nilotinibu u pacientů rezistentních na IM byla použita stupňující se dávka nilotinibu v rozsahu 50 mg, 100 mg, 200 mg, 400 mg 600 mg, 800 mg a 1200 mg jednou denně a 400 mg nebo 600 mg dvakrát denně. Pacienti v blastické fázi dosáhli z 39 % hematologické remise a 27 % cytogenetické remise; u akcelerované fáze byly výsledky povzbudivější: 72 % HR a 48 % CyR. Nejlepší výsledky byly dosaženy u chronické fáze, kdy 11 ze 12 pacientů dosáhlo CHR. Lék měl rovněž relativně příznivý

bezpečnostní profil, proto je dnes používán jako jedna z alternativ léčby rezistentní na IM. (Kantarjian H. et al, 2006)

2.2.5. Význam stanovení hladiny imatinibu v tělních tekutinách

Stanovení léčebné dávky IM je problematické, podobně jako bakteriální rezistence k antibiotikům, protože rezistentní CML mutace mohou být selektivní a rychle se šířící. Nově generovaná data naznačují, že hladina IM určuje stupeň cytologické a molekulární odpovědi. Monitorování hladiny IM je velmi užitečné, ale jen málo laboratoří je schopno toto měření vykonávat, zejména kvůli náročné instrumentaci a vysokým finančním nákladům. Proměnná odpověď na léčbu IM může být způsobena buněčným mechanismem rezistence k IM, jako např. mutacemi v kinasové doméně Bcr/Abl, amplifikací genu BCR/ABL, zvýšenou expresí Src kinas, vylučováním léku prostřednictvím P-glykoproteinové pumpy apod. Další hypotéza vysvětlující proměnnou odpověď se opírá o farmakokinetickou variabilitu. Nízké plasmatické hladiny IM mohou signalizovat neúčinný režim léku, nedostatečné dosažení CCyR a MMR.

V jedné ze studií bylo zkoumáno 68 pacientů, z nichž 50 bylo v chronické fázi na terapii 400 mg/den a 18 v akcelерованé fázi s dávkou 600 mg IM/den. Průměrné plasmatické hladiny byly velmi proměnné v rozmezí 181-2947 ng/ml, střední hodnota pro dávku 400 mg byla 1058 ± 557 ng/ml a pro 600 mg 1444 ± 710 ng/ml. Tato interní variabilita může být multifaktoriální a zahrnující různé faktory jako genetický polymorfismus, enviromentální faktory, doprovodné nemoci nebo doprovodně podávané léky. Tyto faktory mohou být zahrnuty ve farmakokinetice IM: absorpce, distribuce, metabolismus nebo exkrece. Role transportérů odčerpávajících látky z buňky, jako např. P-glykoproteinová pumpa (ABCB1) nebo transportér organických kationů (hOCT1), rovněž nemůže být vyloučena, ale jejich role je významná převážně v modifikaci intracelulární koncentrace látky. Pacienti byli rozčleněni do skupin podle dosažení MMR (n=34) a CCyR (n=56) a bez dosažení MMR (n=34) a CCyR (n=12). Průměrné plasmatické hladiny byly významně vyšší ve skupině pacientů s MMR ($1452,1 \pm 649,1$ ng/ml) a CCyR (1123 ± 617 ng/ml) než u pacientů bez MMR ($869,3 \pm 427,5$ ng/ml) a bez CCyR (694 ± 556 ng/ml). Byla nalezena významná korelace mezi hladinou imatinibu a stupněm odpovědi. (Picard S. et al, 2007)

Další studie (IRIS) ukázala, že průměrná plasmatická hladina IM byla významně vyšší u pacientů, kteří dosáhli CCyR 1009 ng/ml vs. 812 ng/ml. Krevní vzorky byly obdrženy od 551 pacientů s CML první den od započetí léčby (odebrané průměrně 24 hodin od první podané dávky) a poté 29. den po ustálení plasmatické hladiny. Stupně

molekulární odpovědi po jednom roce ukázaly, že jen 25 % pacientů s hladinami <647 ng/ml dosáhlo molekulární odpovědi, zatímco u pacientů s hladinami >647 ng/ml dosáhlo molekulární odpovědi 40 %. Po 4 letech dosáhlo MMR 53 % pacientů s nižšími hladinami oproti 80 % pacientů s hladinami vyššími. Každý z těchto pacientů dostával IM v dávce 400 mg, ale jejich hladiny v plasmě byly významně variabilní, tak jako jejich odpovědi. (Frame D., 2007)

2.2.6. Metody stanovení IM

Imatinib se stanovuje v tělních tekutinách různými separačními technikami (HPLC, HPCE). K nejrozšířenějším patří kapalinová chromatografie ve spojení s UV detekcí nebo tandemovou hmotnostní spektrometrií. Využívá se obvykle systém reverzních fází na krátkých C18 kolonách, IM je eluován mobilní fází obsahující kombinaci kyselý pufr / MeOH nebo AcCN. Pro ionizaci v hmotnostním spektrometru se používá nejčastěji elektrosprejová ionizace v pozitivním módu a látky se detekují v MRM (multiple reaction monitoring) režimu (Titier K. *et al*, 2005; Parise R.A. *et al.*, 2003). Pro kvantifikaci se využívá metody isotopového zředňování nebo interního standardu, např. deuterovaný imatinib, chinoxalin, klozapin (De Francia S. *et al.*, 2009; Titier K. *et al*, 2005; Parise R.A. *et al.*, 2003). Vzhledem k podobným strukturním vlastnostem ostatních TKI byly vyvinuty metody pro simultánní stanovení nilotinibu, dasatinibu, sunitinibu, sorafenibu a lapatinibu (Haouala A. *et al*, 2009; De Francia S. *et al.*, 2009). V současnosti má diagnostický význam stanovení IM v krevním séru nebo plasmě, moči a kostní dřeni (Rodríguez-Flores J. *et al.*, 2005; Kutsev S., 2009).

Pro stanovení IM v plasmě byla také vyvinuta metoda využívající HPLC s UV detekcí, kdy je plasma adovaná klozapinem jako interním standardem zředěná vodou a extrahovaná pevnou fází na koloně C18. Poté jsou komponenty matrix eluovány 2000 µl vody, imatinib je eluován 3x500 µl methanolu; 50 µl objemu je zavedeno na Nucleosil 100–5 µm C18 AB kolonu. Imatinib je analyzován pomocí gradient-elučního programu s rozpouštěcí směsí skládající se z methanolu a vody, kdy obě složky obsahují 0,05% octanu amonného. IM je detekován pomocí UV při 261 nm. (Widmer N. *et al*, 2004)

Další technikou pro stanovení IM a jeho hlavního metabolitu je kapilární zónová elektroforeza (CZE), kdy byla pro stanovení použita lidská moč. Analýza byla provedena na přístroji Beckman P/ACE s detektorem diodového pole, kdy tavená křemenná kapilára měla rozměry 75 µm I.D. x 60cm celková délka, 10 cm efektivní

délka. Separace byla provedena při napětí 25 kV a teplotě 25 °C. Jako elektrolyt byl použit 100 mM fosfátový pufr, jehož pH bylo upraveno na hodnotu pH = 2 pomocí triethanolaminu. (Rodríguez-Flores J. et al, 2003)

Dále byla pro stanovení IM v lidské moči aplikována nevodná kapilární elektroforeza (NACE). Základní separace byla provedena pomocí bezvodého pufru o složení: 12 mM octan amonný a 87,6 mM kyselina octová v roztoku methanol-acetonitril (80:20, V:V). Analýza byla provedena na přístroji Beckman P/ACE 5510 s detektorem diodového pole. Tavená křemenná kapilára měla celkovou délku 37 cm a efektivní délku 30 cm. (Rodríguez-Flores J. et al, 2005)

2.3. Hmotnostní spektrometrie

2.3.1. Úvod

Hmotnostní spektrometrie je fyzikálně-chemická technika pro určování hmot volných molekul a jejich částí, jež je třeba k tomu účelu převést na kladné nebo záporné ionty. Hmotnostní spektrometr je pak iontově optické zařízení, které ze směsi plyných molekul, jejich nenabitých fragmentů a iontů separuje nabitě částice podle jejich efektivních hmotností m/z , umožňuje stanovit hodnotu této hmotnosti, udat relativní zastoupení iontů jedné hmotnosti z celkového množství iontů a molekul obsažených ve směsi a zjistit relace mezi jednotlivými ionty. Během převádění molekul na ionty vznikají nejen ionty celých molekul, a to jak s nábojem, tak i bez něho. Registraci molekulárních a fragmentových iontů se získá záznam, který je charakteristický pro danou látku, podle typu ionizace podává cenné informace o její struktuře a na jeho základě lze zpravidla strukturu měřené látky odvodit nebo potvrdit. Tato destruktivní metoda má velkou výhodu v minimální spotřebě vzorku a vysoké citlivosti, což ji řadí na jedno z nejpřednějších míst v používaných analytických technikách. (Ubík K., 2000)

2.3.2. Instrumentace

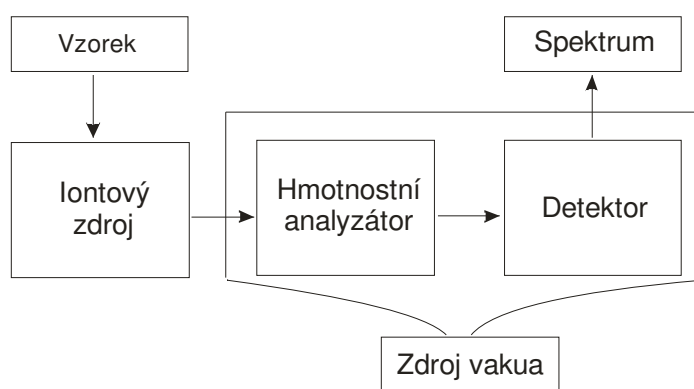
Hmotnostní spektrometr obsahuje zpravidla iontový zdroj, hmotnostní analyzátor, detektor a vyhodnocovací zařízení. (Obr. 12)

Vzorek je přiváděn do iontového zdroje, který vytváří ionty, jež se v iontově optickém systému fokusují na úzký svazek, urychlují a „injekují“ do analyzátoru. Ionty

jsou separovány jedním nebo více analyzátory, jež mohou být tvořeny elektrickými či magnetickými poli, nebo je separace založena na rozdílné rychlosti iontů.

Hmotnostní spektrometr pracuje za velmi nízkých tlaků při 10^{-6} až 10^{-3} Pa především z toho důvodu, že vznikající ionty musí překonat určitou vzdálenost, než jsou detekovány a je tedy třeba, aby měly dostatečně dlouhou střední volnou dráhu a nedocházelo k jejich ztrátě srážkami s neutrálními molekulami. (Ubik K., 2000; Klouda P., 2003)

Poslední částí hmotnostního spektrometru je detektor pro záznam iontového proudu, k čemuž slouží elektronový násobič s diskrétní nebo kontinuální dynodou, nebo také scintilační fotonásobič. Pro sektorové přístroje je možno použít i detektor diodového pole.



Obr 12: Obecné schéma hmotnostního spektrometru.

2.3.3. Ionizační techniky

V současné době mají největší praktický význam ionizace za atmosferického tlaku, kam řadíme ionizaci elektrosprejem (ESI), chemickou ionizaci za atmosferického tlaku (APCI) a fotoionizaci za atmosferického tlaku (APPI) pro spojení HPLC/MS a ionizaci laserem za přítomnosti matrice (MALDI) pro analýzu biomolekul. Tyto ionizační techniky (ESI, APCI a APPI) pracují za atmosferického tlaku a znamenají průlom v řešení spojení HPLC-MS, která je dnes díky ESI/APCI rutinní a spolehlivá analytická technika s velkým potenciálem v řadě oborů.

Ionizační techniku volíme podle několika hledisek, například podle těkavosti (souvisí s polaritou a Mr), molekulové hmotnosti, tepelné stability látky, čistoty látky apod. (<http://holcapek.upce.cz/teaching.htm>; Ubik K., 2000)

V našich experimentech jsme používali ionizaci elektrosprejem, proto se jejímu popisu budu věnovat blíže.

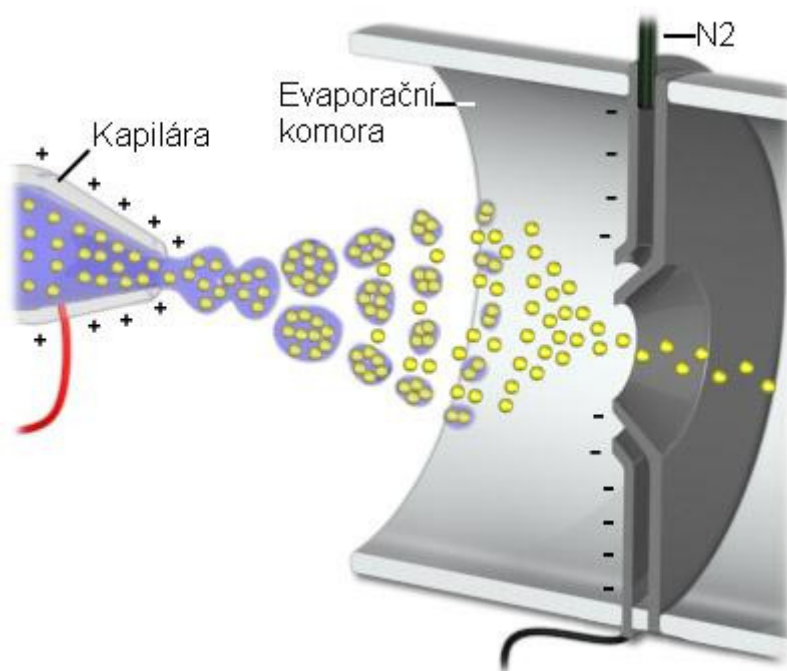
➤ Ionizace elektrosprejem (Electrospray ionization, ESI)

Ionizace elektrosprejem se stala populární od doby, kdy Dr. John Bennett Fenn ukázal možnost vícenásobného nabití biomakromolekul (proteinů), což umožnilo jejich stanovení pomocí přístrojů majících limitovaný hmotnostní rozsah. Za vyvinutí ESI pro analýzu biomakromolekul byl Dr. Fenn v roce 2002 oceněn Nobelovou cenou za chemii. (De Hoffmann E. & Stroobant V., 2008)

Při ESI je analyt rozpuštěný ve vhodném eluentu přiveden kovovou kapilárou, na kterou je vloženo vysoké elektrické napětí. Pomocí zmlžujícího plynu je eluent s analytem na výstupu z kapiláry rozprášen za vzniku kapiček, které na svém povrchu nesou velké množství nábojů. Odpařováním rozpouštědla dochází ke zvýšení hustoty povrchového náboje, při dosažení kritické hodnoty dochází k tzv. Coulombické explozi (rozpad na ještě menší kapičky s rozdělením původních nábojů). Opakování tohoto procesu vede až k uvolnění kvazimolekulárních iontů. (Obr. 13)

(<http://holcapek.upce.cz/teaching.htm>; De Hoffmann E. & Stroobant V., 2008)

Prvním krokem mechanismu ESI je tedy zmlžení roztoku vzorku na malé elektricky nabitě kapičky, jejichž tvorba závisí na složení a průtoku eluentu, obsahu a koncentraci aditiv (zejména iontových a povrchově aktivních látek), průměru a geometrii kapiláry, zmlžujícím plynu (typ, průtok, teplota) a analytu (koncentrace, struktura). V druhém kroku dochází k uvolnění iontů z kapiček podle dvou modelů: vypaření iontů (ion evaporation) a zbytkového náboje (charge residue). Základem třetího kroku je transport iontů z atmosferické oblasti zdroje do vakua a hmotnostního analyzátoru. Při vstupu do vakua dochází k velkému ochlazení iontů a nežádoucí tvorbě klastrů, čemuž lze zabránit některými preventivními opatřeními, jako například použití protiproudu dusíku jako sušícího plynu, kdy teplota a průtok plynu se volí dle průtoku a složení mobilní fáze. Dochází k odstranění vodních par a dalších neutrálních molekul z transportní části vakuového systému. Jako další opatření lze zvolit vyhřátí iontového zdroje, kdy vzniklé ionty zůstanou dostatečně teplé i po expanzi do vakua, aby nemohlo dojít ke vzniku klastrů. (<http://holcapek.upce.cz/teaching.htm>)



Obr. 13: Princip ionizace elektrosprejem.

(http://www.magnet.fsu.edu/education/tutorials/tools/images/ionization_esi.jpg)

Hlavní výhodou ESI je univerzální použití pro široké pole analytů, problém není ani termální nestabilita a těkavost, dochází k minimální fragmentaci molekulárního iontu a jednou z nejvýznamnějších vlastností je skutečnost, že může generovat adicí nebo subtrakcí protonů vícenásobně nabitě ionty sloučenin, které mají více potenciálních nábojových center (peptidy, oligonukleotidy). V případě záporných iontů nebývá úbytek protonů tak významný (3-8), ale u kladných iontů jdou adice protonů do desítek. Jako výsledek měření se potom získá spektrum pouze kvazimolekulárních iontů s různým počtem nábojů. Toto zjištění znamenalo velký průlom do hmotnostní spektrometrie velkých molekul. Ukázalo se, že s poměrně jednoduchým a nenákladným zařízením, jako je kvadrupolový spektrometr nebo iontová past s rozsahem hmot do 2000 Da, lze s přesností ± 2 Da stanovit molekulární hmotu i látek s velikostí molekuly několik desítek tisíc Da. (Ubik K., 2000)

V poslední době se často používá modifikace pomocí nanoelektrospreje, kdy průtoky dosahují jednotek až stovek nl/min. Oproti klasickému ESI se nepoužívá zmlžující plyn, jsou nižší teploty sušícího plynu, konce sprejující kapiláry jsou speciálně adjustovány pomocí mikrometrických šroubů a mikroskopu, obvykle se sprejuje přímo proti vstupní kapiláře do analyzátoru ve vzdálenosti 1 – 2 mm. Používají se speciální kovové špičky kapiláry vytažené do velmi úzkého konce (průměr 5 – 10 μm) pro dosažení stabilního spreje. Tato technika má mnoho výhod, jako například extrémně

nízkou spotřebu vzorku, vysokou koncentrační citlivost, vyšší toleranci vůči obsahu solí v roztoku, což snižuje nároky na úpravu vzorku před analýzou.

Nanosprej lze použít v uspořádání off-line, kdy se rozpuštěný vzorek čerpá infúzní pumpou, nebo on-line, a to ve spojení CE/MS nebo kapilární LC/MS.

V porovnání s konvenčním ESI je tato metoda experimentálně náročnější a méně robustní. (<http://holcapek.upce.cz/teaching.htm>)

2.3.4. Hmotnostní analyzátory

Z iontového zdroje vystupuje směs obsahující ionty různých hmot m nesoucích jeden i více nábojů z a je třeba je před detekcí rozseparovat. K rozlišení iontů podle jejich účinných hmot m/z slouží hmotnostní analyzátory a kvalita rozlišení se udává jako rozlišovací schopnost (RP – resolving power) přístroje, již je možno definovat dvěma způsoby:

První definice udává rozlišovací schopnost jako poměr účinné hmoty iontů tvořících pík k šířce tohoto píku v polovině jeho výšky (FWHM – full width at half maximum)

$$RP = m / \Delta m$$

Druhá definice udává rozlišovací schopnost poměr hmotnosti iontu m_1 a rozdílu iontů m_1 a m_2 s jednotkovým nábojem, přičemž oba píky musí být stejně vysoké, údolí mezi píky je 10 % (překrývají se z 10%) a mají jednotkový náboj.

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

Separace iontů podle poměru m/z lze dosáhnout na základě různých fyzikálních principů:

- 1) zakřivení dráhy letu iontů v magnetickém (nebo elektrickém) poli – magnetické analyzátory
- 2) různá stabilita oscilací iontů ve dvoj- nebo trojrozměrné kombinaci stejnosměrného a vysokofrekvenčního střídavého napětí – kvadrupóly a iontové pasti
- 3) různá doba letu iontů v oblasti bez pole - analyzátory doby letu
- 4) různé absorpce energie při cykloidálním pohybu iontů v kombinovaném magnetickém a elektrickém poli – iontová cyklotronová rezonance

Přesnost určení hodnoty m/z (Mass Accuracy) je bezrozměrná veličina vyjádřená v ppm a je definována jako relativní rozdíl mezi experimentálně získanou hodnotou a teoreticky vypočtenou hmotností vztáženou k teoretické hmotnosti.

$$\text{Přesnost určení } m/z = \frac{(m/z)_{\text{exp}} - (m/z)_{\text{teor}}}{(m/z)_{\text{teor}}} \cdot 10^6$$

Vysoká přesnost určení hmoty umožňuje určení elementárního složení iontu. Jako naprosté minimum pro možnost určení elementárního složení se uvádí přesnost 5 ppm s externí kalibrací hmotnostní stupnice. (<http://holcapek.upce.cz/teaching.htm>, Ubik K., 2000)

Typy analyzátorů:

➤ Magnetický analyzátor s jednoduchou fokusací iontů

Jedná se o jednoduchou fokusaci, protože přístroj má před detekci pouze jeden magnetický analyzátor.

Ionty s nábojem z vznikající v iontovém zdroji jsou při svém výstupu z tohoto zdroje urychleny potenciálem (urychlovacím napětím) V a získávají tak kinetickou energii $mv^2/2$:

$$zV = mv^2/2$$

kde m je hmota iontu (ne účinná) a v jeho rychlost. Při průchodu magnetickým polem dojde k většímu zakřivení dráhy iontů s nižší hodnotou m/z (dráhy těžších iontů se tolik nezakříví kvůli větší odstředivé síle těžšího iontu). Po vstupu do magnetického pole indukce B sektorového magnetu působí na ion s nábojem z a rychlostí v dostředivá síla Bzv , která je v rovnováze s odstředivou silou mv^2/r , kde r je poloměr dráhy iontu, takže platí:

$$B \cdot z \cdot v = m \cdot v^2 / r$$

z čehož lze odvodit základní rovnici pro magnetický analyzátor:

$$m/z = B^2 \cdot r^2 / 2 \cdot V$$

Plynulou změnou (tzv. skenováním) B (magnetické skenování) nebo V (potenciálové skenování) při konstantním poloměru r daným pro použitý přístroj projdou výstupní štěrbinou na detektor postupně všechny ionty a zaznamenají se intenzity iontů pro jednotlivé m/z , čímž získáme hmotnostní spektrum.

(<http://holcapek.upce.cz/teaching.htm>; Ubik K., 2000)

➤ Elektrostatický (elektrický) analyzátor

Ionty vznikají v různých místech iontového zdroje, a proto mají různou energii. Fokusaci iontů podle energie zabezpečuje elektrostatický analyzátor, který si lze představit jako kondenzátor se zakřivenými plochami. Jak již bylo zmíněno výše, ionty opouštějí iontový zdroj s kinetickou energií $zV = mv^2/2$. V elektrickém analyzátoru na tyto ionty působí odstředivá síla mv^2/r , která je v rovnováze s dostředivou silou zE , takže:

$$mv^2/r = zE$$

kde E je intenzita elektrického pole. Řešením rovnic se získá vztah pro poloměr zakřivení trajektorie v elektrickém poli:

$$R = 2 \cdot V/E$$

Z rovnice vyplývá, že fokusace iontů v elektrickém poli nezávisí na poměru m/z , ale pouze na jejich kinetické energii. To znamená, že při udržování konstantní intenzity elektrického pole se fokusace v elektrickém analyzátoru uskutečňuje vzhledem k odpovídajícím energiím postupného pohybu iontů a z analyzátoru vychází monoenergetický iontový svazek, přičemž ionty s jinou hodnotou energie se zachytí na stěnách elektrického analyzátoru. (<http://holcapek.upce.cz/teaching.htm>, Ubik K., 2000)

➤ Kvadrupólový analyzátor

Kvadrupolový hmotnostní filtr je dynamický analyzátor, u něhož je separace iontů dosaženo jejich průchodem mezi čtyřmi kovovými tyčemi kruhového či hyperbolického průřezu a o délce 20-30 cm, na dvě protilehlé je vloženo kladné stejnosměrné napětí, na zbývající dvě záporné stejnosměrné napětí, na všechny je superponováno vysokofrekvenční střídavé napětí, pro páry tyčí tedy platí:

$$F_+ = + (U - V \cdot \cos \omega t) \text{ a } F_- = - (U - V \cdot \cos \omega t)$$

kde F_+ a F_- je potenciál vložený na protilehlé dvojice tyčí, ω je angulární frekvence [rad/s] = $2\pi\nu$, U je stejnosměrné napětí, V je amplituda střídavého napětí.

$$F_x = m \cdot d^2x/dt^2, F_y = m \cdot d^2y/dt^2,$$

Odvozením získáme Mathieuovu rovnici stability

$$a_u = a_x = -a_y = (8zeU)/(mw^2r_0^2), q_u = q_x = -q_y = (4zeV)/(mw^2r_0^2),$$

Z čehož odvodíme vztah pro U , V :

$$U = a_u \cdot m/z \cdot (w^2r_0^2)/8e, V = q_u \cdot m/z \cdot (w^2r_0^2)/4e$$

Princip kvadrupolu spočívá v přivedení iontu do středu osy kvadrupolu a jeho následnou oscilací, kdy v daný časový okamžik pro určitý poměr U/V jsou oscilace stabilní pro ion s určitou hodnotou m/z , který projde kvadrupolem a dostane se na detektor. Všechny ostatní ionty jsou zachyceny na tyčích kvadrupolu, plynulou změnou

(skenováním) hodnot stejnosměrného napětí U a amplitudy V , kdy jejich poměr ovšem zůstává konstantní, jsou postupně propouštěny všechny ionty na detektor.

➤ Iontová past

Stejně jako kvadrupol patří i iontová past do kategorie dynamických hmotových spektrometrů. Je to v podstatě trojrozměrný kvadrupol, u něhož lze pohyb iontů popsat podobnými rovnicemi jako u kvadrupolu.

Iontová past se skládá z prstencové střední elektrody s hyperbolickým průřezem a dvou kruhových elektrod rovněž s hyperbolickým průřezem, které prstenec volně uzavírají. Horní a dolní elektroda jsou uzemněny a na střední prstenec se při konstantní frekvenci přivádí vysokofrekvenční napětí s měnící se amplitudou. Na rozdíl od kvadrupolu se zde neuplatňuje žádné stejnosměrné napětí.

Všechny ionty nad určitou hodnotu m/z odpovídající amplitudě vysokofrekvenčního napětí mají trajektorie, které je udržují uvnitř elektrod. Jestliže se vysokofrekvenční amplituda zvyšuje, potom se ionty s rostoucí hmotou m/z postupně stávají nestabilní a jsou ejektovány z pasti („hmotově selektivní nestabilita“).

Do pasti se otvorem v jedné z kruhových elektrod dávkuje puls elektronů, které ionizují plyný vzorek a nebo ionizace probíhá mimo past a do pasti jsou injikovány přímo ionty. Prstencová elektroda je při tom udržována na nízké hodnotě amplitudy, aby zadržela všechny ionty, které se během ionizačního procesu vytvořily. Vysokofrekvenční amplituda se potom skenuje směrem nahoru. Z pasti jsou tímto způsobem do elektronového násobiče otvorem ve středu druhé kruhové elektrody postupně vypuzovány ionty se vzrůstající hodnotou m/z . Tím, že je iontová past přístroj uchovávací ionty (ion-storage device), je možno po relativně dlouhou dobu akumulovat i slabé signály. Pokud je signál dostatečně silný, je doba akumulace signálu cca 10 μ s, ale může být prodloužena až na jednu sekundu. Typické akumulační časy pro záchyt iontů se pohybují přibližně od 0,01 do 200 ms v závislosti na množství přiváděných iontů, doba excitace a kolize v pasti se pohybuje okolo 20 – 60 ms. Do pasti se zavádí helium jako tzv. tlumící plyn o tlaku asi $5 \cdot 10^{-3}$ Pa, protože tlumí oscilace v ose z , čímž se dosáhne významného zvýšení RP a zlepšení záchytu iontů. (Ubík K., 2000)

➤ Analyzátor doby letu

Průletový analyzátor rozděluje ionty na základě doby letu. V iontovém zdroji se periodicky vytvářejí krátké pulsy iontů, které po urychlení potenciálem V získávají kinetickou energii $zV = mv^2/2$ a vstupují do analyzátorové trubice délky l , kde se měří

čas jejich dopadu t . Tím se zjistí rychlost podle vztahu $v = l/t$. Řešením obou rovnic se obdrží rovnice průletového hmotnostního spektrometru:

$$m/z = 2Vt^2/l^2$$

ze které je zřejmé, že čím je ion lehčí, tím dříve dosáhne kolektoru. Rozlišovací schopnost přístrojů je závislá na délce letové trubice a dalších faktorech, u lineárního TOF analyzátoru není příliš vysoká (cca. 1000 – 3000), ale použitím dále uvedených technik lze výrazně zvýšit RP až na 15 – 25000.

a) analyzátor doby letu s reflektorem (rTOF)

Používá se tzv. iontové zrcadlo neboli reflektrom, který slouží k vyrovnání různých kinetických energií pro ionty se stejnou hodnotou m/z (při ionizaci získají ionty kinetickou energii s určitou distribucí, což vede k rozšíření jejich píků a tím ke zhoršení RP).

b) opožděná extrakce iontů (Delayed Extraction)

Ionty jsou ze zdroje extrahovány s malým zpožděním, čímž dojde díky vzájemným srážkám ke sjednocení jejich kinetických energií.

Ve srovnání s jinými hmotnostními analyzátorů má TOF spektrometr několik výhod: rozsah měřených hodnot je v podstatě neomezen; každým laserovým pulzem je generováno kompletní spektrum; je možno registrovat až 100 hmotových spekter za sekundu (číslo omezeno jen kapacitou počítače); rozlišovací schopnost vzrůstá s rostoucí hmotou.

➤ Iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací

Technika cyklotronové rezonance iontů dovoluje získat ionty s dlouhou dobou života a značně ulehčuje sledování iontově-molekulárních reakcí. Princip iontové cyklotronové rezonance s využitím Fourierovy transformace (FT-ICR) je založen na pohybu iontů v homogenním magnetickém poli tak, jak k němu dochází v cyklotronové (ICR) cele. Ionty vznikají v iontovém zdroji za atmosférického tlaku a postupně prochází přes několik stupňů se vzrůstajícím vakuem až do ICR cely s tlakem 10^{-11} mbar a teplotou blízkou absolutní nule. ICR cely, která je ve své podstatě elektromagnetickou iontovou pastí, je umístěna uvnitř prostorově homogenního supravodivého magnetu s vysokým statickým magnetickým polem. Tento permanentní magnet je zpravidla chlazen kapalným héliem a dusíkem.

Ionty se vytvářejí v tzv. odkrytém iontovém zdroji (nemá výstupní štěrby). Pod vlivem protínajícího se magnetického a elektrického pole opisují ionty cykloidální trajektorie s frekvencí $\omega_c = zV/m$ a mají rychlost orientovaného pohybu $v = V/H$, kde V je napětí elektrického pole, H intenzita magnetického pole, m hmota iontu a z jeho náboj. Kladné i záporné ionty se řídí stejnými zákony a liší se pouze směrem otáčení.

Dopadání iontů na stěny analyzátoru zabraňuje vložený odrazový potenciál. V oblasti kolektoru odrazový potenciál není a dopadající ionty se registrují jako iontový tok.

Na rozdíl od ostatních hmotnostně spektrometrických metod nedochází v FTMS při detekci iontů k jejich destrukci na detektoru. Této vlastnosti je s výhodou využíváno pro provádění dalších experimentů na zachycených iontech, jako jsou následné fragmentace v cele, studium reakcí v plynné fázi, disociace iontů nebo interakcí mezi iontem a molekulami. Díky tomu, že frekvence je fyzikálně měřitelná veličina, stanovitelná s vysokou přesností a magnetické pole supravodivého magnetu v FTMS systému může být vysoce homogenní a stabilní, může být také hodnota m/z získaná touto metodou určena s vysokou přesností. Z těchto důvodů je FTMS známá jako metoda, při které se dosahuje vysokého rozlišení ($>100\,000$ při $m/z\,1000$), vysoké přesnosti hmoty (až na úrovni sub ppm), ale i vysoce přesně rozlišené izolace iontů před MS/MS nebo MS^n experimenty. (Ubik K., 2000)

2.3.5. Tandemová hmotnostní spektrometrie

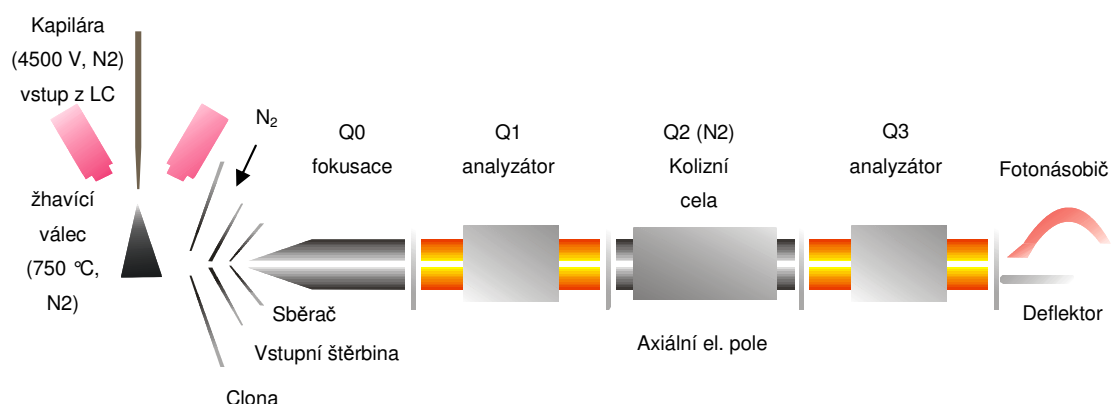
Tandemovou hmotnostní spektrometrií se označuje spektrometrie s takovým uspořádáním analyzátorů, kdy jeden nebo dva analyzátory vyberou ze směsi iontů určený prekursor a následující analyzátor, příp. skenovací mód (u iontové pasti a cyklotronové rezonance iontů) separuje dceřiné ionty, které fragmentací tohoto prekursoru vznikly. Uvedený proces se může několikrát opakovat, počet stupňů je dán kromě počtu analyzátorů také citlivostí detekce, protože výtěžek se v každém stupni pohybuje maximálně do několika procent množství iontů získaných v předcházejícím stupni.

Použití tandemové hmotnostní spektrometrie má těžiště v několika oblastech. Jsou to identifikace látek ze směsí, kvantifikace látek a studium struktur iontů. Použití techniky MS/MS pro identifikaci jedné látky ze směsi je efektivní, protože je rychlé a specifické. Pokud je ale třeba ze směsi identifikovat látek více, tak je výhodnější kombinovat hmotnostní spektrometrii s některou chromatografickou technikou. V našem experimentu byl používán trojitý kvadrupolový analyzátor popsáný dále. (<http://holcapek.upce.cz/teaching.htm>; Ubik K., 2000)

➤ Trojitý kvadrupolový analyzátor (QqQ)

Přístroj se skládá ze tří kvadrupolů řazených za sebou (Obr. 14), přičemž prostřední z nich (q_2) slouží jako kolizní cela. Zavedením kolizního plynu do q_2 je

způsobena kolizní aktivace vybraných iontů kvadrupolovým analyzátozem Q1 s kolizním plynem a jejich následnou fragmentací.



Obr. 14: Trojitý kvadrupol.

3. Experimentální část

3.1. Materiál

Plasma pacientů a kontrolních zdravých jedinců byla získána z Hemato-onkologického oddělení, FN Olomouc. Pacientům s CML byla odebrána nesrážlivá krev do zkumavek s EDTA v průměru 24 hodin po užití poslední dávky přípravku Glivec. Krev byla poté zcentrifugována a plasma byla zamražena při teplotě -20 °C.

Imatinib obdrženy od firmy Novartis (Curych, Švýcarsko) byl rozpuštěn v methanolu na výslednou koncentraci 0,5 mg/ml. Tento zásobní roztok byl použit pro přípravu všech ostatních standardů. Deuterovaný imatinib byl rozpuštěn v methanolu na přibližnou výslednou koncentraci 30 ng/ml.

Všechny reagenty měly analytický stupeň čistoty a byly získány od firmy Sigma (St. Luis, MO, USA). K přípravě složky A mobilní fáze byla použita kyselina mravenčí (HCOOH), která byla rozpuštěna v deionizované vodě na koncentraci 4 mmol/l a následně titrována hydroxidem amonným (NH₄OH) na pH = 3,2. Složka B obsahovala čistý acetonitril (CH₃CN).

Přístrojové vybavení: Vortex (IKA Works, USA)

Centrifuga (Micro 120, Hettich, Německo)

Sonifikátor (Kraintek s.r.o., Slovensko)

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

Tandemový hmotnostní spektrometr API 4000 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)

Analytické váhy (KERN ABT 120-5DM, Belling, Německo)

pH metr Cyberscan ph 510 (Thermo scientific, Waltham, MA, USA)

Termostatovaná míchačka (Biosan, ČR)

Magnetická míchačka RCT Basic (IKA labortechnik, Staufen, Německo)

Přípravna deionizované vody (Werner Reinstwassersytem, Německo)

3.2. Extrakce imatinibu z plasmy

Po rozmražení plasmy pacientů s CML bylo odebráno 20 µl vzorku. Pro vysrážení plasmatických proteinů bylo použito 180 µl methanolu s přidavkem ISTD (deuterovaný imatinib; D8IM). Poté byl vzorek 1 minutu sonifikován, 5 minut třepán na termostatované míchačce, umístěn na 30 minut do mrazáku na -20 °C a následně 5 minut centrifugován při 14 000 RPM. Supernatant byl analyzován nebo uchován při -20 °C pro pozdější analýzu.

3.3. Metoda

Veškeré experimenty byly prováděny na přístroji Dionex Ultima 3000 RS ve spojení s tandemovým hmotnostním spektrometrem API 4000.

Pro stanovení hladiny imatinibu v plasmě pacientů s CML byly použity dvě metody: ultraúčinná kapalinová chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií (UHPLC-MS/MS) a metoda přímého nástřiku do hmotnostního spektrometru (FIA – flow injection analysis).

Chromatografická separace probíhala na koloně s reverzní fází Acquity UHPLC®BEH C18 1,7 µm (2,1x50 mm; Waters). Mobilní fáze se skládala z formiátu amonného (NH₄COOH) o koncentraci 4 mmol/l a pH 3,2 (A) a acetonitrilu (B). V čase 0 - 1 min bylo složení mobilní fáze 17 % B; 1 - 2 min byl aplikován gradient 17 - 50 % B; 2,0 - 2,1 obsahovala mobilní fáze 50 % B a v 2,1 - 2,2 min byl systém navrácen do iniciálních podmínek. Na koloně termostatované na 40 °C byla nastavena průtoková rychlost 0,5 ml/min, separace probíhala při tlaku 300 – 400 bar. Množství nástřikovaného vzorku činilo 2 µl. Před každým měřením byla kolona ekvilibrována 1 min mobilní fází (17 % B) při průtokové rychlosti 0,5 ml/min. Celková doba analýzy včetně proplachu autosampleru byla 3,2 min.

Pro metodu přímého nástřiku se mobilní fáze skládala z methanolu a 0,1% kys. mravenčí. Do 0,1 min byl nastaven průtok 0,3 ml/min, v měřícím čase 0,1 – 0,4 min byl průtok snížen na 0,03 ml/min, poté byl autosampler proplachován po dobu desetiny minuty. Do hmotnostního analyzátoru se nástřikovalo 0,5 µl vzorku a celková doba analýzy činila 45 s do dalšího nástřiku včetně proplachu autosampleru.

Pro detekci a kvantifikaci byl použit tandemový hmotnostní spektrometr (API 4000, Applied Biosystems) s ionizací elektrosprejem v pozitivním módu. Hmotnostní

spektrometr pracoval módu MRM (multiple reaction monitoring). Optimalizace MS/MS podmínek je popsána dále.

3.4. Kvantifikace

Veškeré kvantifikace analytu při validačních experimentech a měření reálných vzorků pacientů byly provedeny vztahením IM na interní standard (D8IM). Koncentrace byla vypočtena pomocí programu Analyst 1.5 z ploch píků a pomocí FIA metody z průměrné výšky signálu analytu v programu Chemview 2.0.

3.5. Validace metody

3.5.1. Linearita

Linearita neboli kalibrační závislost je chápána jako přímková závislost mezi dvěma náhodnými proměnnými, tj. odezvou instrumentace (analytickým signálem) a koncentrací analytu. Těsnost vzájemné závislosti dvou náhodných proměnných charakterizuje korelační koeficient (R). Při optimální lineární závislosti nabývá hodnoty +1 a čím více se blíží jedné, tím je závislost obou proměnných těsnější. Linearita metody byla počítána metodou nejmenších čtverců a pro vyhodnocení kalibrační přímky byla použita rovnice $y = ax + b$.

Linearita byla vyhodnocena užitím plasmy zdravého jedince, do které byl přidán standard IM (deset mikrolitrů různě zředěného imatinibu bylo přidáno k 90 μ l plasmy a třepáno 2 minuty); byla získána koncentrace v rozmezí 100 až 5000 ng/ml (100, 300, 500, 1000, 3000 a 5000 ng/ml). Vzorky byly připravovány v tripletu.

3.5.2. Návratnost (recovery)

Návratnost se měří na vzorku biologické matrice na třech různých koncentračních hladinách (nižší, ve středu a vyšší než fyziologická koncentrace).

V našem případě byla návratnost měřena užitím 3 vzorků směsné plasmy zdravých jedinců adované imatinibem na výslednou koncentraci 300, 1000 a 3000 ng/ml; 6 vzorků pro každou koncentraci.

3.5.3. Nepřesnost

Nepřesnost se měří v sérii (intraassay, within-run), kdy analyzuje jeden pracovník, v jeden den, při jedné kalibraci, stejnou metodou, přístrojem a v jedné laboratoři. Pokud

se měří mezi sériemi (interassay, between-run), analýza se provádí stejnou metodou, na stejném přístroji a v jedné laboratoři, měří stejný pracovník, v různý den a při různé kalibraci.

Nepřesnost v jednom dni a mezi deseti dny byla rovněž měřena směsnou plasmou zdravých jedinců adovanou imatinibem na finální koncentraci 300, 1000 a 3000 ng/ml.

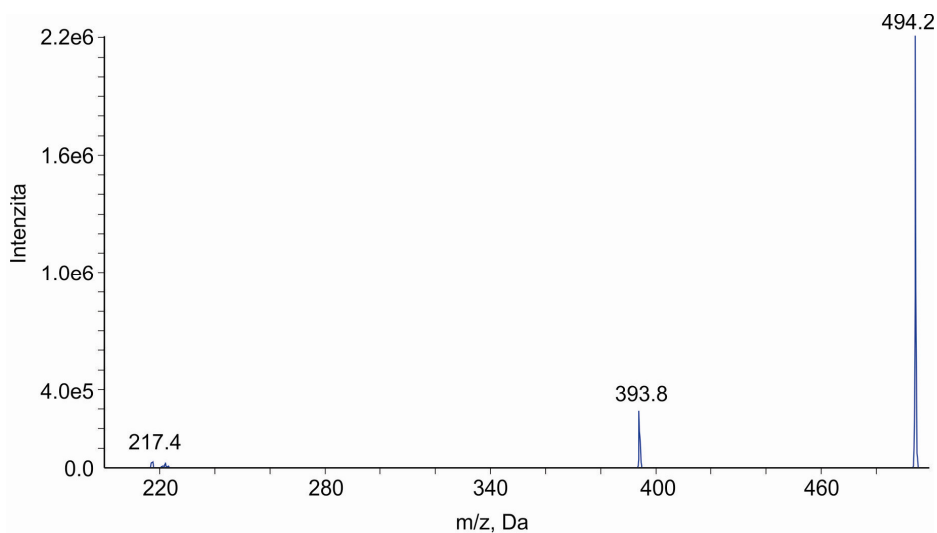
3.5.4. Iontové suprese

Byl pozorován chromatografický záznam u 8 čistých neadovaných plasem při postkolonovém kontinuálním nástřiku (10 µl/min) standardu IM o koncentraci 1 µg/ml. Dále byly sledovány možné oblasti s výraznou iontovou supresí.

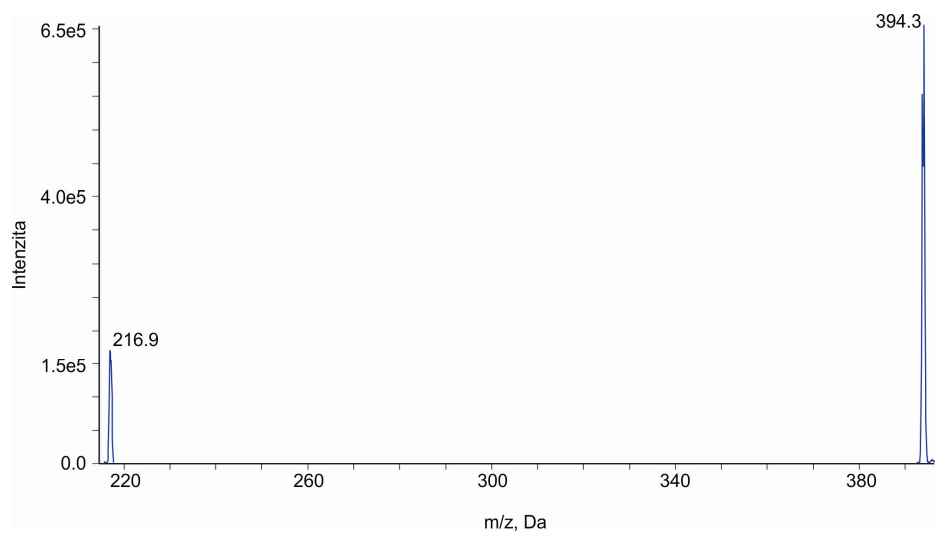
3.6. Výsledky

3.6.1. Optimalizace MS/MS podmínek

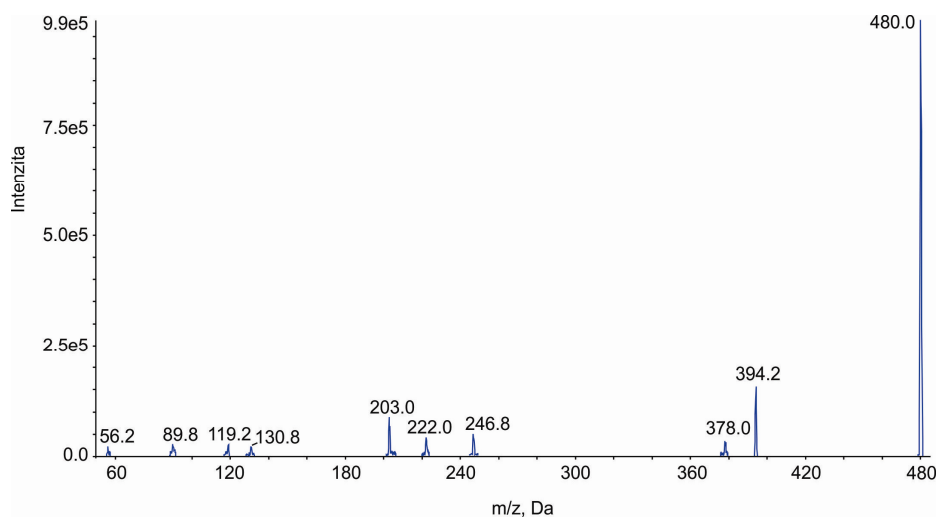
V iniciální části experimentu byla změřena hmotnostní a fragmentační spektra pro imatinib (obr. 15, 16), demethylovaný metabolit imatinibu (obr. 17, 18) a deuterovaný imatinib (obr. 19, 20) pro nalezení optimálních MRM přechodů ke sběru dat.



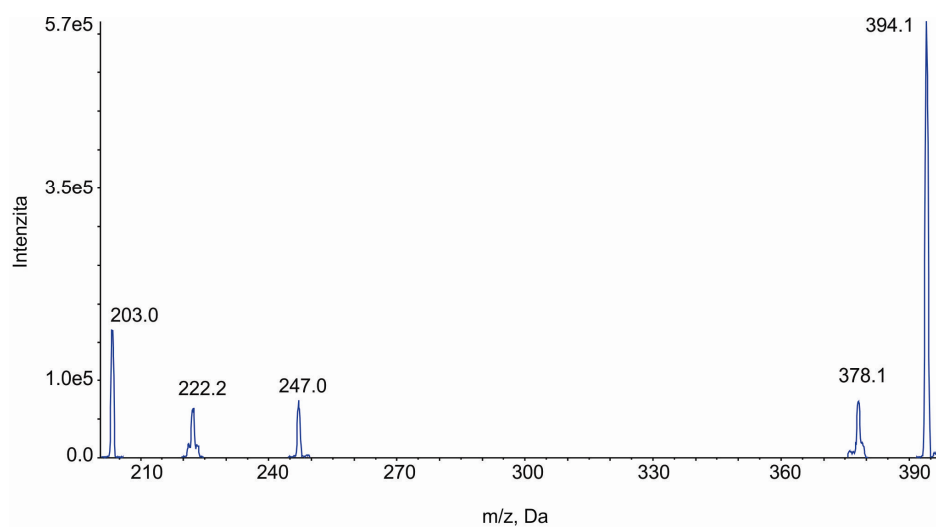
Obr. 15: Hmotnostní spektrum IM.



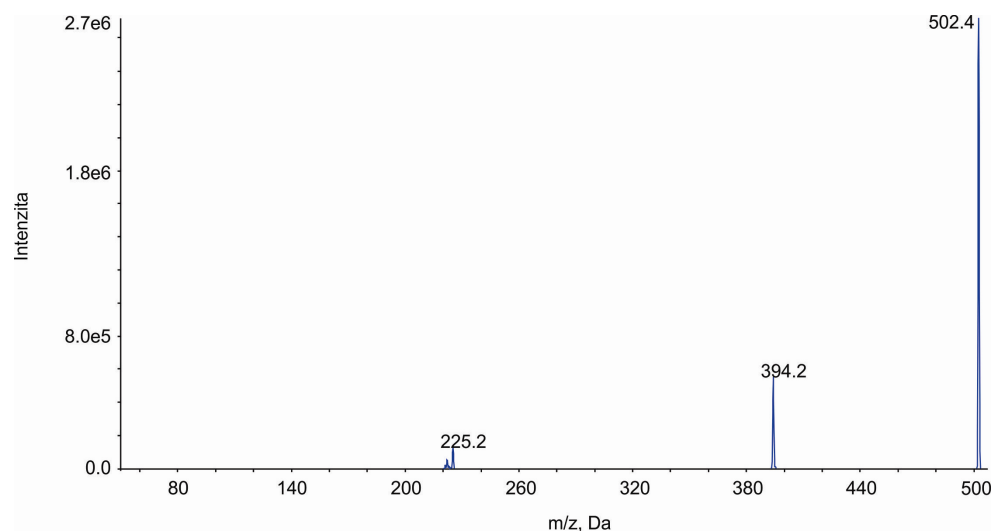
Obr. 16: Fragmentační spektrum IM. Jako vhodné MRM přechody byly zvoleny 494→394 a 494→217.



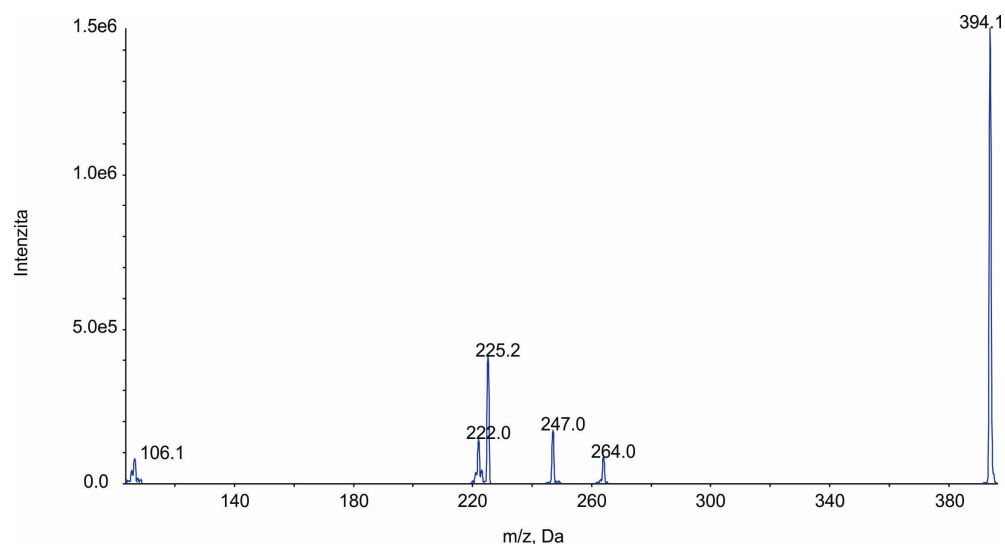
Obr. 17: Hmotnostní spektrum desIM.



Obr. 18: Fragmentační spektrum desIM. Pro sběr dat byl zvolen MRM přechod 480→394.

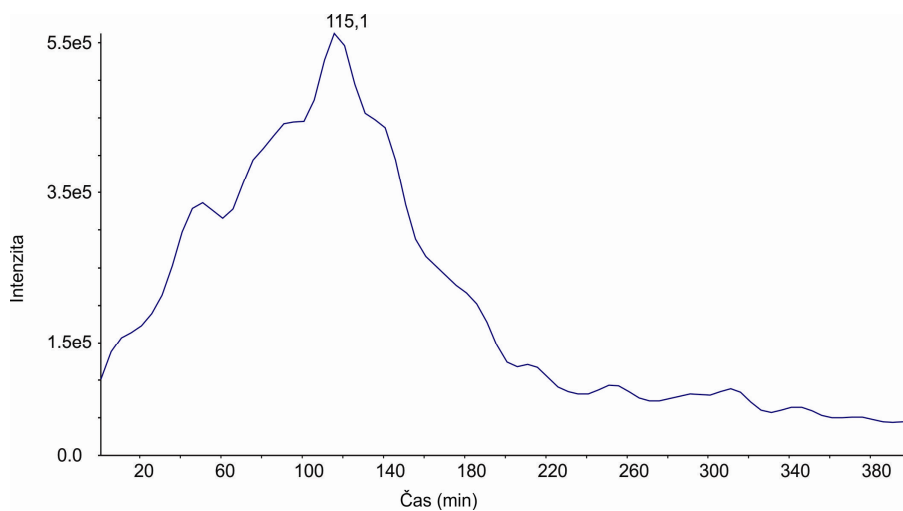


Obr. 19: Hmotnostní spektrum D8IM.

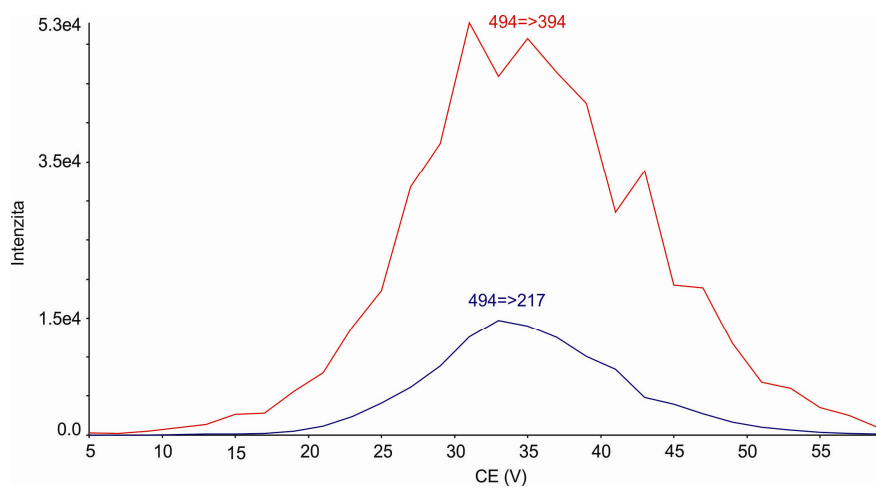


Obr. 20: Fragmentační spektrum D8IM. Pro sběr dat byl zvolen MRM přechod 502→394

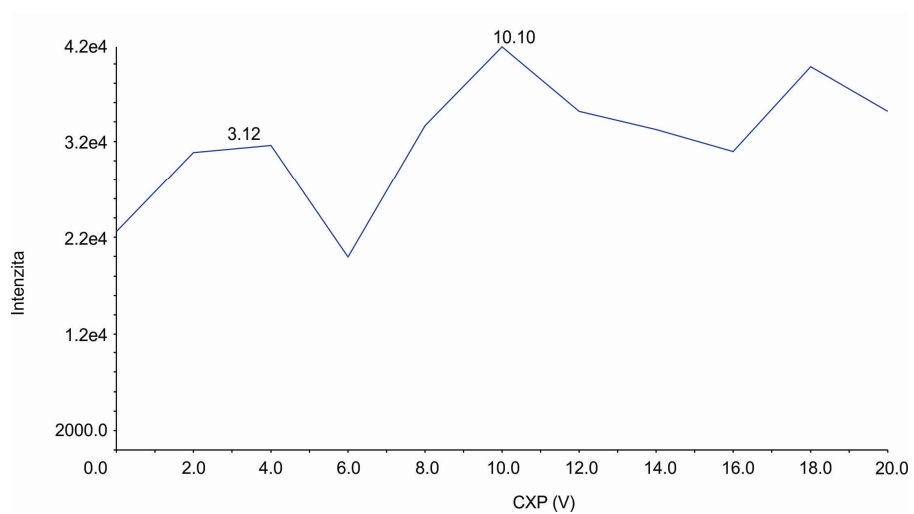
V další části experimentu byly přístrojem automaticky optimalizovány hodnoty deklasteračního potenciálu (DP), kolizní energie (CE) a výstupního potenciálu kolizní cely (CXP). DP byl měřen v rozmezí 0 – 400 V a jako optimální hodnota bylo pro IM zvoleno 115 V (obr. 21) stejně tak jako pro D8IM, u desIM hodnota dosahovala 123 V. CE byla optimalizována v rozmezí 5 – 60 V, nejlepších výsledků bylo dosaženo při hodnotě 33 V (obr. 22), optimální hodnota CXP měřeného v rozmezí 0 – 20 V byla 10 V (obr. 23).



Obr. 21: Optimalizace DP pro IM.



Obr. 22: Optimalizace CE pro IM - .



Obr. 23: Optimalizace CXP pro IM.

Dále byly pro jednotlivé metody optimalizovány hodnoty tlaku kolizního plynu (CAD), zmlžujícího (GS1) a sušícího plynu (GS2), „curtain gas“ (CUR), vstupního potenciálu (EP), napětí na kapiláře v iontovém zdroji (IS) a teploty zmlžujícího plynu (TEM). Výsledky jsou uvedeny v tabulce (tab. 3)

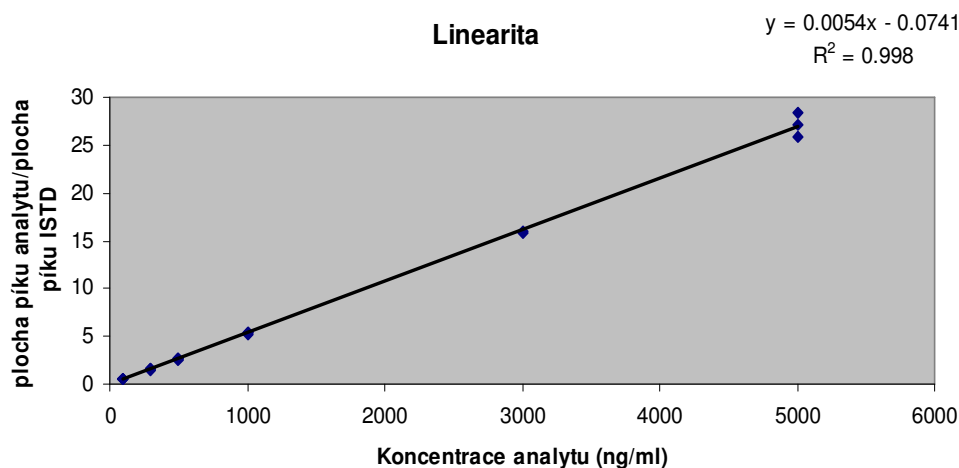
Tab. 3: Další optimalizované hodnoty pro jednotlivé metody.

metoda	CAD (psi)	EP (V)	CUR (psi)	GS1 (psi)	GS2 (psi)	IS (V)	TEM (°C)
UHPLC-MS/MS	6	10	20	40	40	5500	400
FIA	3	10	14	20	40	5000	450

3.6.2. Validace metod

➤ UHPLC-MS/MS

Rovnice kalibrační křivky má tvar $y = 0,0054x - 0,0741$; ($R = 0,998$) (Obr. 24). Návratnost stanovená ve spikované plasmě se pohybovala v rozmezí 98,85 % - 99,80 %. (Tab. 4) Nepřesnost ($n = 6$) byla 3,73 %; 3,52 % a 4,02 % (měřeno během jednoho dne) (Tab. 5); 3,02 %; 5,05 %; 5,72 % (měřeno mezi jednotlivými dny) (Tab. 6) pro plasmu adovanou imatinibem na výslednou koncentraci 300, 1000 a 3000 ng/ml. Limit detekce ($LOD = 1,24$ ng/ml) byl počítán z analýz ($c_{IM} = 100$ ng/ml) jako trojnásobek šumu ($S/N = 3$) a limit kvantifikace ($LOQ = 4,12$ ng/ml) jako desetinásobek šumu ($S/N = 10$).



Obr. 26: Validace metody UHPLC-MS/MS: kalibrační přímka – linearita pro koncentrace 100, 300, 500, 1000, 3000 a 5000 ng/ml.

Tab. 4: Validace metody UHPLC-MS/MS: návratnost (recovery) pro adovanou plasmu o koncentraci 300, 1000 a 3000 ng/ml.

Koncentrace analytu	Vzorek č.1	Vzorek č.2	Vzorek č.3	Vzorek č.4	Vzorek č.5	Vzorek č.6	Průměr (%)
3000 ng/ml	2836,67	2791,67	3068,33	3084,00	3248,00	2940,00	
Recovery (%)	94,56	93,06	102,28	102,80	108,27	98,00	99,80
1000 ng/ml	964,50	926,33	1041,83	1055,00	978,83	1029,00	
Recovery (%)	96,45	92,63	104,18	105,50	97,83	102,90	99,92
300 ng/ml	289,17	289,50	293,83	306,17	291,17	309,50	
Recovery (%)	96,39	96,50	97,94	102,06	97,06	103,17	98,85

Tab. 5: Validace metody UHPLC-MS/MS: nepřesnost měřena po dobu 6-ti dnů.

analýza	3000 ng/ml	1000 ng/ml	300 ng/ml
1	2836,67	964,50	289,17
2	2791,67	926,33	289,50
3	3068,33	1041,83	293,83
4	3084,00	1055,00	306,17
5	3248,00	978,83	291,17
6	2940,00	1029,00	309,50
průměr	2994,78	999,25	296,56
SD	171,31	50,49	8,95
RSD	5,72	5,05	3,02

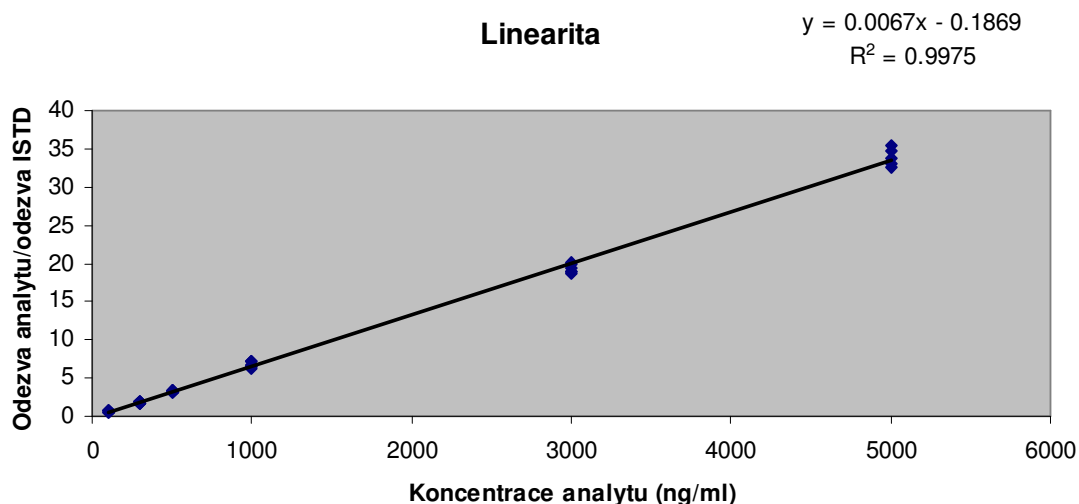
Tab. 6: Validace metody UHPLC-MS/MS: nepřesnost měřena během jednoho dne.

*Hodnoty nejsou započítávány do průměru kvůli jejich velké odchylce.

analýza	3000 ng/ml RSD (%)	1000 ng/ml RSD (%)	300 ng/ml RSD (%)
1	4,39	3,51	2,44
2	3,59	2,05	4,5
3	4,52	4,25	4,25
4	4,49	3,35	4,99
5	3,12	3,74	3,45
6	*6,94	4,17	2,77
průměr	4,02	3,51	3,73

➤ FIA

Rovnice kalibrační křivky má tvar $y = 0,0067x - 0,1869$; ($R = 0,9975$) (Obr. 27). Návratnost stanovená ve spikované plasmě se pohybovala v rozmezí 97,04 – 99,11 % (Tab. 7). Nepřesnost ($n = 6$) byla 4,80 %; 3,67 %; 4,02 % (měřeno během jednoho dne) (Tab. 8); 2,64 %; 4,48 % a 5,06 % (měřeno mezi jednotlivými dny) (Tab. 9) pro plasmu adovanou imatinibem na výslednou koncentraci 300, 1000 a 3000 ng/ml. Limit detekce a kvantifikace byly 9,2 a 30,8 ng/ml v případě kalkulace z poměru signálu ku šumu. Dále byly limity stanoveny na základě kalibrační závislosti v software QC Expert 3.0 (viz Tab. 10).



Obr. 27: Validace metody FIA: kalibrační přímka – linearita pro koncentrace 100, 300, 500, 1000, 3000 a 5000 ng/ml.

Tab. 7: Validace metody FIA: návratnost (recovery) pro spikovanou plasmu o koncentraci 300, 1000 a 3000 ng/ml. *Hodnoty nejsou započítávány do průměru kvůli jejich velké odchylce.

Koncentrace analytu	Vzorek č.1	Vzorek č.2	Vzorek č.3	Vzorek č.4	Vzorek č.5	Vzorek č.6	Průměr (%)
3000 ng/ml	*2577,02	2855,52	2912,01	3145,55	2806,85	3097,18	
Recovery (%)	*85,90	95,18	97,07	104,85	93,56	103,24	98,78
1000 ng/ml	*908,86	1001,39	992,56	1057,36	938,81	965,36	
Recovery (%)	90,89	100,14	99,26	105,74	93,88	96,54	99,11
300 ng/ml	*265,56	282,45	289,50	301,18	285,95	296,58	
Recovery (%)	*88,52	94,15	96,50	100,39	95,32	98,86	97,04

Tab. 8: Validace metody FIA: nepřesnost měřena po dobu 6-ti dnů. *Hodnoty nejsou započítávány do průměru kvůli jejich velké odchylce.

analýza	3000 ng/ml	1000 ng/ml	300 ng/ml
1	*2577,02	*908,86	*265,56
2	2855,52	1001,39	282,45
3	2912,01	992,56	289,50
4	3145,55	1057,36	301,18
5	2806,85	938,81	285,95
6	3097,18	965,36	296,58
SD	149,88	44,43	7,67
průměr	2963,42	991,10	291,13
RSD	5,06	4,48	2,64

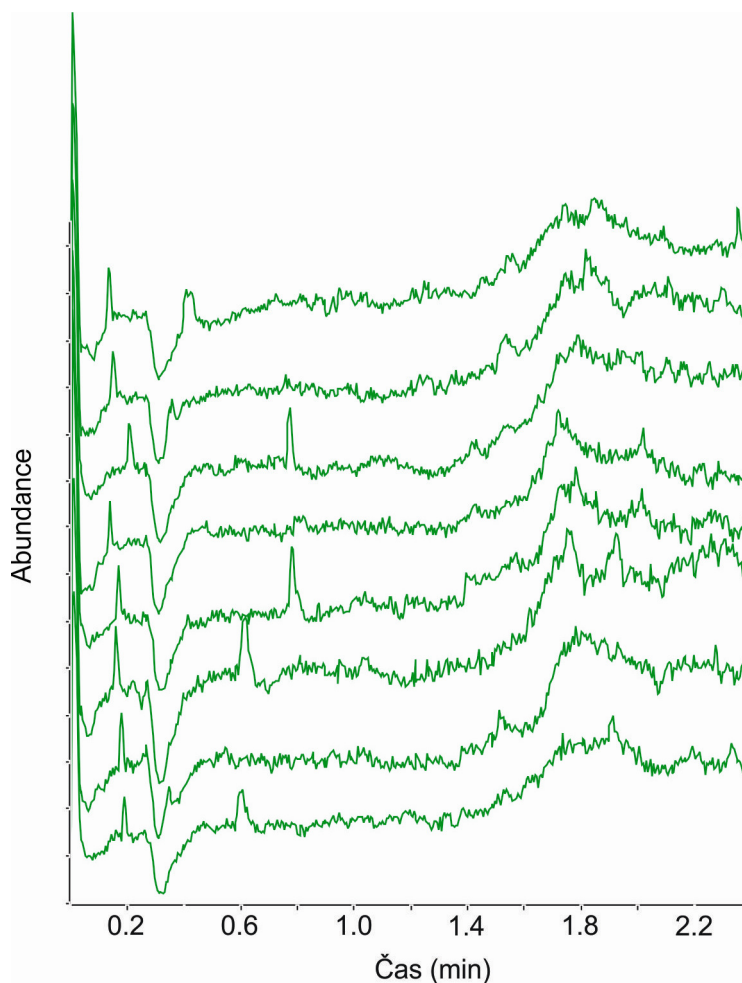
Tab. 9: Validace metody FIA: nepřesnost měřena během jednoho dne.

	3000 ng/ml	1000 ng/ml	300 ng/ml
analýza	RSD (%)	RSD (%)	RSD (%)
1	3,53	2,76	5,76
2	3,90	4,90	4,90
3	4,63	2,48	4,08
4	3,50	3,49	5,13
5	4,16	4,12	5,24
6	4,37	4,25	4,20
průměr	4,02	3,67	4,88

Tab. 10: Výpočet LOD a LOQ pomocí různých metod v programu QC Expert.

Xc = kritická hodnota, Xd = LOD, Xq = LOQ.

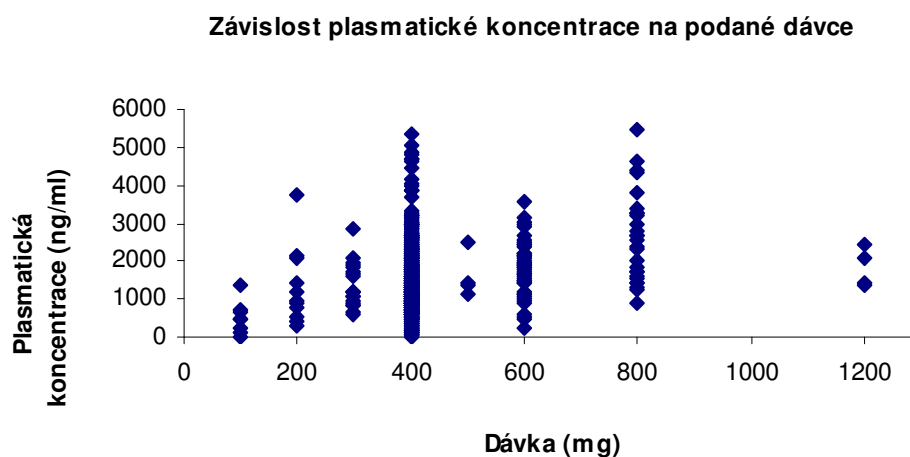
Metoda	Xc	Xd	Xq
Metoda podle ISO 11843-2	3,8	4,6	7,5
Přímá metoda analytu	8,6	15,4	21,7
Přímá metoda signálu, IUPAC	8,6	16,2	23,0
Kombinovaná metoda Ebel, Kamm	7,7	15,4	21,6
Metoda K*Sigma z regrese	8,6	17,1	25,7



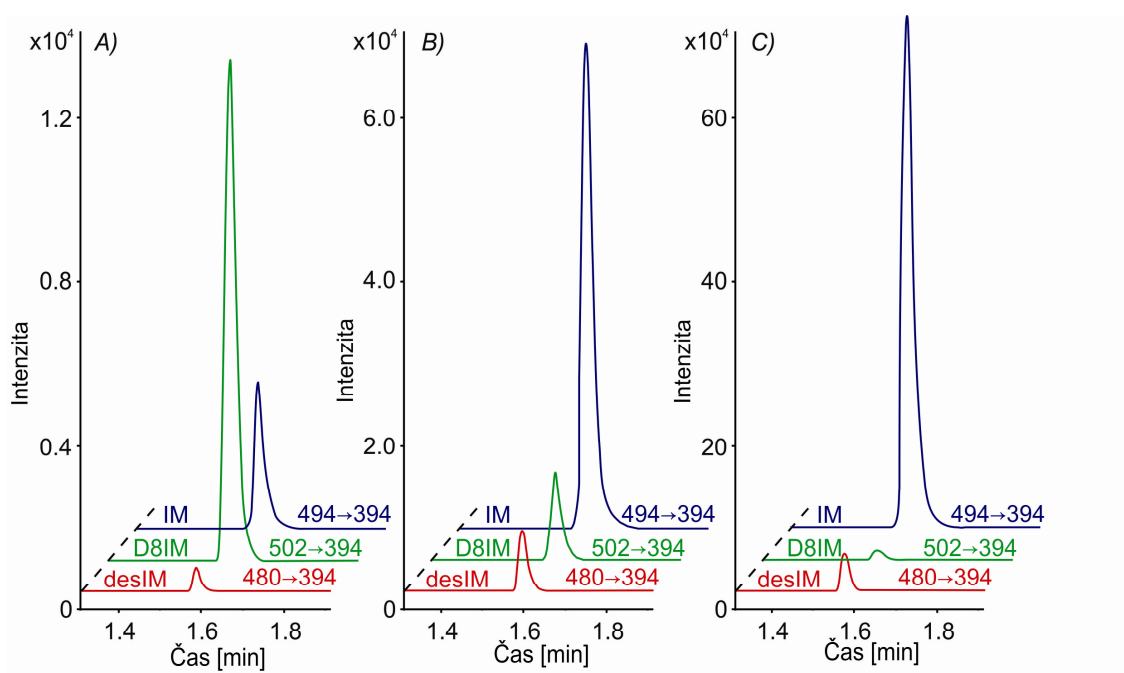
Obr. 28: Iontové suprese – v retenčním čase IM nebyly sledovány žádné významné matricové efekty.

3.7. Analýza imatinibu v plasmě pacientů s CML na terapii imatinibem

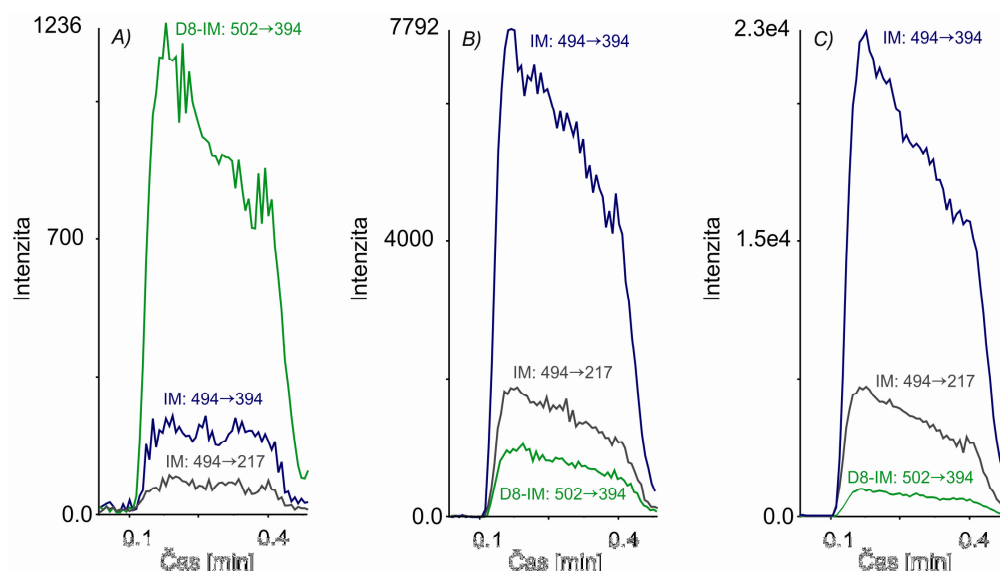
Byly stanoveny hladiny imatinibu v plasmě u 897 vzorků pacientů s CML v rozmezí 135 – 5440 ng/ml. V žádném analyzovaném vzorku nebyly pozorovány interference. Plasmatická koncentrace imatinibu byla v souladu s množstvím užívané dávky (100 – 1200 mg/den) (Obr. 29, 30, 31), s dobou odběru krve po poslední podané dávce (0,25 – 97 hod.) a jiných parametrech pacientů (váha, věk, apod). Z dat je patrné, že hladina imatinibu vykazuje vysokou interindividuální variabilitu.



Obr. 29: Vzdávající trend u plasmatické koncentrace v závislosti na velikosti denní dávky IM.



Obr. 30: Analýzy reálných vzorků pacientů s CML na terapii IM – měřeno pomocí UHPLC-MS/MS; pacient s nízkou (A), střední (B) a vysokou hladinou (C).

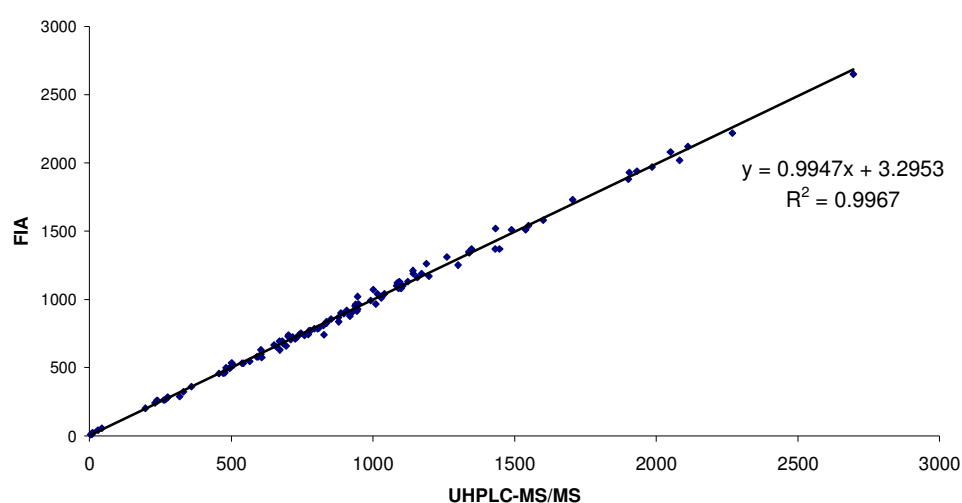


Obr. 31: Analýzy reálných vzorků pacientů s CML na terapii IM – měřeno pomocí FIA; pacient s nízkou (A), střední (B) a vysokou hladinou (C).

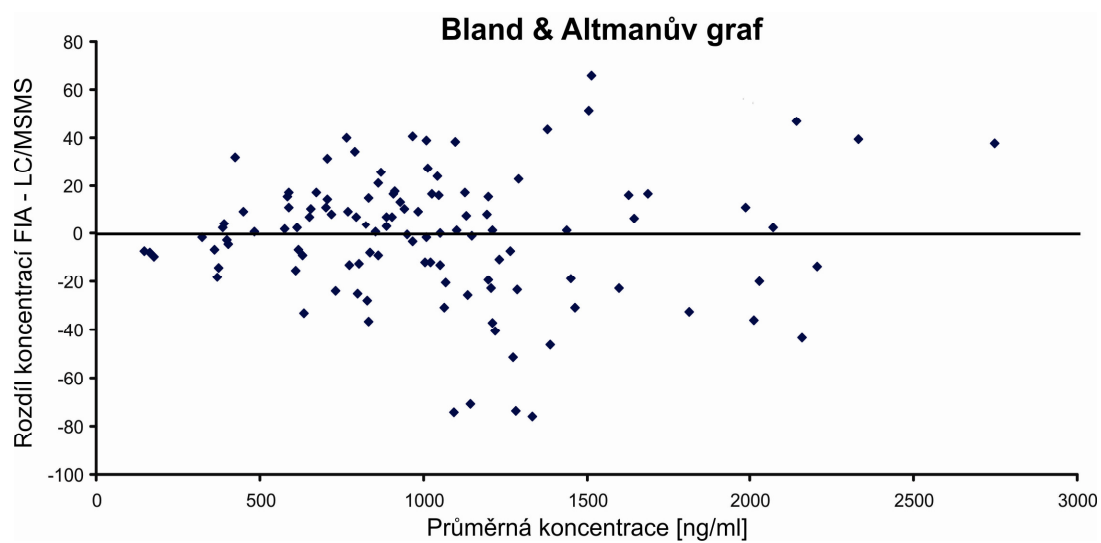
3.8. Srovnání metod

Plasmatické koncentrace změřené pomocí dvou různých metod byly srovnány pomocí regresní analýzy a Bland Altmanova grafu (Obr. 32, 33). Obě vyvinuté metody poskytují srovnatelné výsledky s akceptovatelnou nepřesností. Pro další analýzy bude používána metoda FIA kvůli menšímu objemu nastříkovaného vzorku, kratší době analýzy a nižším celkovým nákladům.

Srovnání UHPLC-MS/MS x FIA



Obr. 32: Korelace mezi plasmatickými koncentracemi u pacientů na terapii imatinibem měřené pomocí UHPLC-MS/MS a FIA metody.



Obr. 33: Bland-Altmanův graf pro srovnání UHPLC-MS/MS a FIA metody.

4. Diskuse

Cílená terapie založená na inhibici proteinových tyrosinkinas pomocí imatinibu představuje vysoce účinnou terapeutickou strategii pro léčbu CML. Monitorování hladiny léků se stalo nezbytným nástrojem v péči o pacienty s CML. Měření plasmatické koncentrace je užitečné ke zhodnocení adherence pacientů k denní dávce, účinnosti léčby, vážným nežádoucím účinkům spojených s lékem, potenciálních lékových interakcí, a to obzvláště u pacientů, kteří musí brát léky interferující s cytochromem P450.

Cílem naší studie bylo vyvinout metodu pro stanovení plasmatické hladiny imatinibu pomocí techniky kapalinové chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií. Této problematice se věnují pouze vybraná pracoviště na světě zejména kvůli nezbytné koordinaci se specializovaným zdravotnickým zařízením, náročnosti na instrumentaci a personál.

Byly optimalizovány separační podmínky chromatografické metody na základě publikovaných článků. Dále byly optimalizovány podmínky pro detekci a kvantifikaci analytu pomocí MS/MS. V první části byla změřena hmotnostní a fragmentační spektra pro analyzované látky, následně byly optimalizovány hodnoty deklasteračního potenciálu, kolizní energie, výstupního potenciálu kolizní cely a rovněž hodnoty vstupního potenciálu, tlaku kolizního plynu, sušícího a zmlžovacího plynu, „curtain gas“, napětí na vstupní kapiláře v iontovém zdroji a teploty zmlžujícího plynu.

Pro stanovení plasmatické koncentrace IM byly použity dvě metody: FIA-MS/MS a UHPLC-MS/MS. Obě metody poskytují srovnatelné výsledky, proto se pro rutinní analýzu bude dále využívat metoda FIA, kdy objem nastříkovaného vzorku je 4x menší (0,5 µl) a doba analýzy je významně kratší (45 s), s čím souvisí menší spotřeba materiálu. Metody byly validovány (linearita, návratnost a nepřesnost) pomocí plasmy adované imatinibem. Díky dostatečné citlivosti jsou obě vyvinuté metody vhodné k využití terapeutickému monitorování plasmatických hladin imatinibu.

Vyvinuté metody byly aplikovány na reálné vzorky krevní plasmy pacientů trpících chronickou myeloidní leukemií na terapii imatinibem, obě jsou použitelné v rutinní klinické praxi. Byla prokázána závislost koncentrace látky v plasmě pacienta na podávané dávce léku a na čase odběru po poslední požití dávce.

5. Závěr

Tato práce je zaměřená na vývoj nových metod pro stanovení imatinibu v krevní plasmě pacientů trpících chronickou myeloidní leukemií, a to pomocí technik ultraúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií a metody přímého nástřiku do hmotnostního spektrometru.

V teoretické části byla vypracována rešerše na téma: chronická myeloidní leukemie a imatinib. Dále zde byla v základu popsána technika hmotnostní spektrometrie.

V experimentální části byla popsána optimalizace, validace, aplikace a srovnání metod. Práce bude publikována v zahraničním impaktovaném časopise. Metody jsou v současné době součástí rutinní praxe v Laboratoři dědičných metabolických poruch, Oddělení klinické biochemie, FN Olomouc.

Další výzkum bude směřován do oblasti stanovení plasmatických koncentrací ostatních inhibitorů tyrosinkinas a stanovení imatinibu v leukocytech a kostní dřeni pacientů s CML.

Použitá literatura:

- * Brave M., Goodman V., Kaminskas E., Farrell A., Timmer W., Pope S., Harapanhalli R., Saber H., Morse D., Bullock J., Men A., Noory C., Ramchandani R., Kenna L., Booth B., Gobburu J., Jiang X., Sridhara R., Justice R. and Pazdur R. (2008) Sprycel for Chronic Myeloid Leukemia and Philadelphia Chromosome Positive Acute Lymphoblastic Leukemia Resistant to or Intolerant of Imatinib Mesylate. Clin Cancer Res 14; 352-359
- * De Francia S., D'Avolio A., De Martino F., Pirro E., Baietto L., Siccardi M., Simiele M., Racca S., Saglio G., Di Carlo F., Di Perri G. (2009) New HPLC-MS method for the simultaneous quantification of the antileukemia drugs imatinib, dasatinib, and nilotinib in human plasma. Journal of chromatography B, 877; 1721-1726
- * De Hoffmann E., Stroobant V. (2008) Mass spectrometry – Principles and applications (3rd edition), pp. 1-216, Wiley, Chichester
- * Deininger M.W.N., Druker B.J. (2003) Specific targeted therapy of chronic myelogenous leukemia with imatinib. Pharmacol Rev 55, 401-423
- * Druker B.J., Guilhot F., O'Brien S.G., Gathmann I., Kantarjian H., Gatterman N., Deininger M.W., Silver R.T., Goldman J.M., Stone R.M., Cervantes F., Hochhaus A., Powell B.L., Gahrilove J.L., Rousselot P., Reiffers J., Cornelissen J.J., Hughes T., Agis H., Fischer T., Verhoef G., Shepherd J., Saglio G., Grawohl A., Nielsen J.L., Radich J.P., Simonsson B., Taylor K., Baccarani M., So C., Letvak L., Larson R.A. (2006) Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia. N Engl J Med. 355, 2408-2417
- * Faber E. (2006) Informace o podstatě chronické myeloidní leukemie. Encyklopedie leukemie 1, 1-12
- * Faber E. (2007) Dasatinib. Farmakoterapie 2, 135-137
- * Faber E. (2005) Imatinib. Farmakoterapie 3, 233-238

- * Faber E., Indrák K. (2007) Nilotinib. Farmakoterapie 2,105-109

- * Faber E., Kajaba V., Typnerová S, Luxová V. (2004) Diagnóza CML – Chronická myeloidní leukemie, informační brožura pro pacienty a jejich blízké. pp. 3-35, Leukaemia Research Fund (LRF)

- * Faderl S., Talpaz M., Estrov Z., Kantarjian H.M. (1999) Chronic myelogenous leukemia: Biology and therapy. Ann Intern Med. 131, 207-219

- * Frame D. (2007) New strategies in controlling drug resistance. J Manag Care Pharm. 13, S13-S17 (suplement)

- * Golemovic M., Verstovsek S., Giles F., Cortes J., Manshouri T., Manley P.W., Mestan J., Dugan M., Alland L., Griffin J.D., Arlinghaus R.B., Sun T., Kantarjian H., Beran M. (2005) AMN107, a novel aminopyrimidine inhibitor of Bcr-Abl, has *in vitro* activity against imatinib-resistance chronic myeloid leukemia. Clin Cancer Res. 11, 4941-4947

- * Gschwind H.P., Pfaar U., Waldmeier F., Zoolinger M., Sayer C., Zbinden P., Gates M., Pokorny R., Seiberling M., Ben-Am M., Peng B., Gross G. (2005) Metabolism and disposition of imatinib mesylate in healthy volunteers. Drug metabolism and disposition 33, 1503-1512

- * 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 Res. 51, 3048-3051

- * Kantarjian H., Giles F., Wunderle L., Bhatta K., O'Brian S., Wassmann B., Tanaka Ch., Manley P., Rae P., Mietlowski W., Bochinski K., Hochhaus A., Griffin J.D., Hoelzer D., Albitar M., Dugan M., Cortes J., Alland L., Ottmann O.G. (2006) Nilotinib in imatinib-resistant CML and philadelphia chromosome-positive ALL. N Engl J Med 354, 2542-2551

- * Kantarjian H.M., Giles F., Gattermann N., Bhatta K., Alimena G., Palandri F., Ossenkoppele G.J., Nicolini F.E., O'Brien S.G., Litzow M., Bhatia R., Cervantes F., Haque A., Shou Y., Resta D.J., Weitzman A., Hochhaus A., Coutre P.

(2007) Nilotinib (formely AMN107), a highly selective BCR-ABL tyrosine kinase inhibitor, is effective in patients with philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia in chronic phase following imatinib resistance and intolerance. Blood 110; 3540-3546

- * Kantarjian H.M., O'Brien S., Anderlini P., Talpaz M. (1996) Treatment of myelogenous leukemia: current status and investigational options. Blood 87, 3069-3081
- * Kantarjian H., O'Brien S., Talpaz M., Borthakur G., Ravandi F., Faderl S., Verstovsek S., Rios M.B., Shan J., Giles F., Cortes J. (2007) Outcome of patients with Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia post-imatinib mesylate failure. Cancer 109, 1556-1560
- * Kantarjian H.M., Talpaz M., Giles F., O'Brien S., Cortes J. (2006) New insight into the pathophysiology of chronic myeloid leukemia and imatinib resistance. Ann Intern Med. 145, 913 – 923
- * Kantarjian H.M., O'Brien S., Anderlini P. and Talpaz M. (1996) Treatment of chronic myelogenous leukemia: Current status and investigational options. Blood 87; 3069-3081
- * Klouda P. (2003) Moderní analytické metody, pp. 33-40, nakladatelství Pavel Klouda, Ostrava
- * Kretz O., Weiss H.M., Schumacher M.H., Gross G. (2004) In vitro blood distribution and plasma protein binding of the tyrosine kinase inhibitor imatinib and its active metabolite, CGP74588, in rat, mouse, dog, monkey, healthy humans and patients with acute lymphatic leukaemia. Br J Clin Pharmacol 58, 212-216
- * Kutsev S. (2009) EUTOS Blood Level Testing summit, TKI therapy in Russian Federation., Bordeaux, 16. - 17. 11. 2009
- * Lombardo L.J., Lee F.Y., Chen P., Norris D., Barrish J.C., Behnia K., Castaneda S., Cornelius L.A.M., Das J., Doweiko A.M., Farchild C., Hunt J.T.,

- Inigo I., Johnson K., Kamath A., Kan D., Klei H., Marathe P., Pang S., Peterson R., Pitt S., Schieven G.L., Schmidt R.J., Tokarski J., Wen M.L., Wityak J., Borzilleri R.M. (2004) Discovery of N-(2-Chloro-6-methyl-phenyl)-2-(6-(4-(2-hydroxyethyl)-piperazin-1-yl)-2-methylpyrimidin-4-ylamino)thiazole-5-carboxamide (BMS-354825), a dual Src/Abl kinase inhibitor with potent antitumor activity in preclinical assays. *J Med Chem.* 47, 6658-6661
- * Martinelli G., Severini S., Rosti G., Cilloni D., Baccarini M. (2005) New tyrosine kinase inhibitors in chronic myeloid leukemia. *Haematologica* 90, 534–541
- * Parise R.A., Ramanathan R.K., Hayes M.J., Egorin M.J. (2003) Liquid chromatographic-mass spectrometric assay for quantitation of imatinib and its main metabolite (CGP 74588) in plasma. *Journal of chromatography B*, 791; 39-44
- * Picard S., Titier K., Etienne G., Teihelt E., Ducint D., Bernard M.A., Lasalle R., Marit G., Reiffers J., Begaud B., Moore N., Molimard M., Mahon F.X. (2007) Trough imatinib plasma levels are associated with both cytogenetic and molecular responses to standard-dose imatinib in chronic myeloid leukemia. *Blood*, 109; 3496-3499
- * Protivánková M., Vorlíče J. (2001) Chronická myeloidní leukemie – informace pro pacienty a jejich blízké. pp 4-7, Vydavatelství MU, Brno – Kraví Hora
- * Quintás- Cardama A., Kantarjian H.M., Cortes J.E. (2009) Mechanisms of primary and secondary resistance to imatinib in chronic myeloid leukemia. *Cancer control*, 16; 122-131
- * Ramirez P., DiPersio (2008) Therapy options in imatinib failures. *The oncologist*, 13; 424-434
- * Rodríguez-Flores J., Berzas J.J., Castaneda G., Rodríguez N. (2003) Direct and fast capillary zone electrophoresis Method for the determination of Gleevec and its main metabolite in human urine. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 794, 381-388

- * Rodríguez-Flores J., Berzas Nevado J.J., Contento Salcedo A.M., Cabello Díaz M.P. (2005) Nonaqueous capillary electrophoresis method for the analysis of gleevec and its main metabolite in human urine. *J Chromatogr A* 1068, 175-182

- * Rubin B.P., Duensing A. (2006) Mechanism of resistance to small molecule kinase inhibition in the treatment of solid tumors. *Laboratory Investigation* 86, 981–986

- * Titier K, Picard S, Ducint D, Teilhet E, Moore N, Berthaud P, Mahon FX, Molimard M. (2005) Quantification of imatinib in human plasma by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Ther Drug Monit.* 27, 634-640

- * Ubik K. (2000) Fyzikálně-chemické metody, pp. 1-105, Vydavatel cyklu: Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, Praha

- * Voglová J. (2007) Léčba chronické myeloidní leukemie. *Encyklopedie leukemie* 3, 1-12

- * Weisberg E., Manley P., Mestan J., Jacobs-Cowan S., Ray A., Griffin J.D. (2006) AMN107 (nilotinib): a novel and selective inhibitor of BCR-ABL. *Br J Cancer* 94, 1765-1769

- * Widmer N., Béguin A., Rochat B., Buclin T., Kovacsics T., Duchosal M.A., Leyvraz S., Rosselet A., Biollaz J., Decosterd L.A. (2004) Determination of imatinib (Gleevec®) in human plasma by solid-phase extraction–liquid chromatography–ultraviolet absorbance detection. *J Chromatogr B* 803, 285-292

Internetové zdroje:

<http://path.upmc.edu/cases/case271/images/fig15.jpg> 13.4.2010

<http://www.meb.uni-bonn.de/cancer.gov/Media/CDR0000533336.jpg> 13.4.2010

<http://holcapek.upce.cz/teaching.htm> 13.4.2010

6. Seznam použitých zkratk

ABL	část 9. chromosomu („Abelson tyrosin kinase gen“)
ALL	akutní lymfoblastická leukemie
AGP	kyselý glykoprotein
APCI	chemická ionizace za atmosferického tlaku („atmospheric pressure chemical ionization“)
APPI	fotoionizace za atmosferického tlaku („atmospheric pressure photoionization“)
ATP	adenosintrifosfát
BCR	část 22. chromosomu („breakpoint cluster region“)
(C)CyR	(kompletní) cytogenetická odpověď („complete cytogenetic response“)
CE	kapilární elektroforeza („capillary electrophoresis“)
(C)HR	(kompletní) hematologická odpověď („complete hematologic response“)
CI	chemická ionizace („chemical ionization“)
CXP	výstupní potenciál kolizní cely („colission cell exit potential“)
CAD	tlak kolizního plynu („collision gas pressure“)
c-Kit	onkogen kódující transmembránovou tyrosin kinasu
CML	chronická myeloidní leukemie
(C)MR	(kompletní) molekulární remise („complete molecular remission“)
CNL	chronická neutrofilní leukemie
CUR	„curtain gas“
CZE	kapilární zónová elektroforeza („capillary zone electrophoresis“)
DNA	deoxyribonukleová kyselina („deoxyribonucleic acid“)
DP	deklasterační potenciál („declustering potencial“)
D8IM	deuterovaný imatinib
EDTA	ethyldiamintetraoctová kyselina
EI	ionizace elektronem („electron ionization“)

EP	vstupní potenciál („entrance potential“)
ESI	ionizace elektrosprejem („electrospray ionization“)
FIA	metoda přímého nástřiku („flow injection analysis“)
FISH	fluorescenční in situ hybridizace („fluorescence in situ hybridization“)
(FT)ICR	iontová cyklotronová rezonance (s Fourierovou transformací) („(Fourier transform) ion cyclotron resonance“)
FWHM	šířka píku v polovině výšky („full width at half maximum“)
Fyn	kinasa rodiny Src (SFK)
GC	plynová chromatografie („gas chromatography“)
GIST	gastrointestinální stromální tumor („gastrointestinal stromal tumor“)
GS1	zmlžující plyn („nebulizing gas“)
GS2	sušící plyn („heater gas“)
Hck	kinasa rodiny Src (SFK)
HLA	lidské leukocytární antigeny („human leukocyte antigens“)
hOCT	lidský transportér organických kationtů („human organic cation transporter“)
HPCE	vysokoúčinná kapilární elektroforeza („high performance capillary electrophoresis“)
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie („high performance liquid chromatography“)
HR	hematologická odpověď („hematologic response“)
IM	imatinib
IRIS	(„International Randomized Interferon versus STI571“)
IS	napětí na kapiláře v iontovém zdroji („ion spray voltage“)
ISTD	interní standard
LC	kapalinová chromatografie („liquid chromatography“)
Lck	kinasa rodiny Src (SFK)
Lyn	kinasa rodiny Src (SFK)
MALDI	desorpce/ionizace laserem za účasti matrice („matrix assisted laser desorption/ionization“)
MCyR	majoritní cytogenetická odpověď („major cytogenetic response“)
(M)MR	(majoritní) molekulární remise („major molecular remission“)

MRM	„multiple reaction monitoring“
MS	hmotnostní spektrometrie („mass spectrometry“)
MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie
NACE	bezvodá kapilární elektroforeza („nonaqueous capillary electrophoresis“)
PCR	polymerasová řetězová reakce („polymerase chain reaction“)
PDGF	destičkový růstový faktor („platelet derived grow factor“)
PDGFR	receptor pro destičkový růstový faktor
P-gp	P-glykoproteinová pumpa
Ph	Filadelfský chromosom („Philadelphia chromosome“)
RP	rozlišovací schopnost („resolving power“)
RT-PCR	polymerasová řetězová reakce založená na reversní transkripci mRNA na cDNA
SCF	růstový faktor kmenových buněk („stem cell factor“)
SFK (Src)	rodina nerekceptorových (celulárních) tyrosinkinas podílejících se na růstu buňky
TEM	teplota zmlučujícího plynu („source temperature“)
TKI	inhibitor tyrosinkinas („tyrosine kinase inhibitor“)
TOF	průletový analyzátor („time of flight“)
UHPLC	ultraúčinná kapalinová chromatografie („ultra high performance liquid chromatography“)