

STANOVENÍ 2-HYDROXYGLUTARÁTU V PLAZMĚ PACIENTŮ S AML

Hrdličková A.^(1,2,3), Hlaváčková A.⁽¹⁾, Suttar J.⁽¹⁾

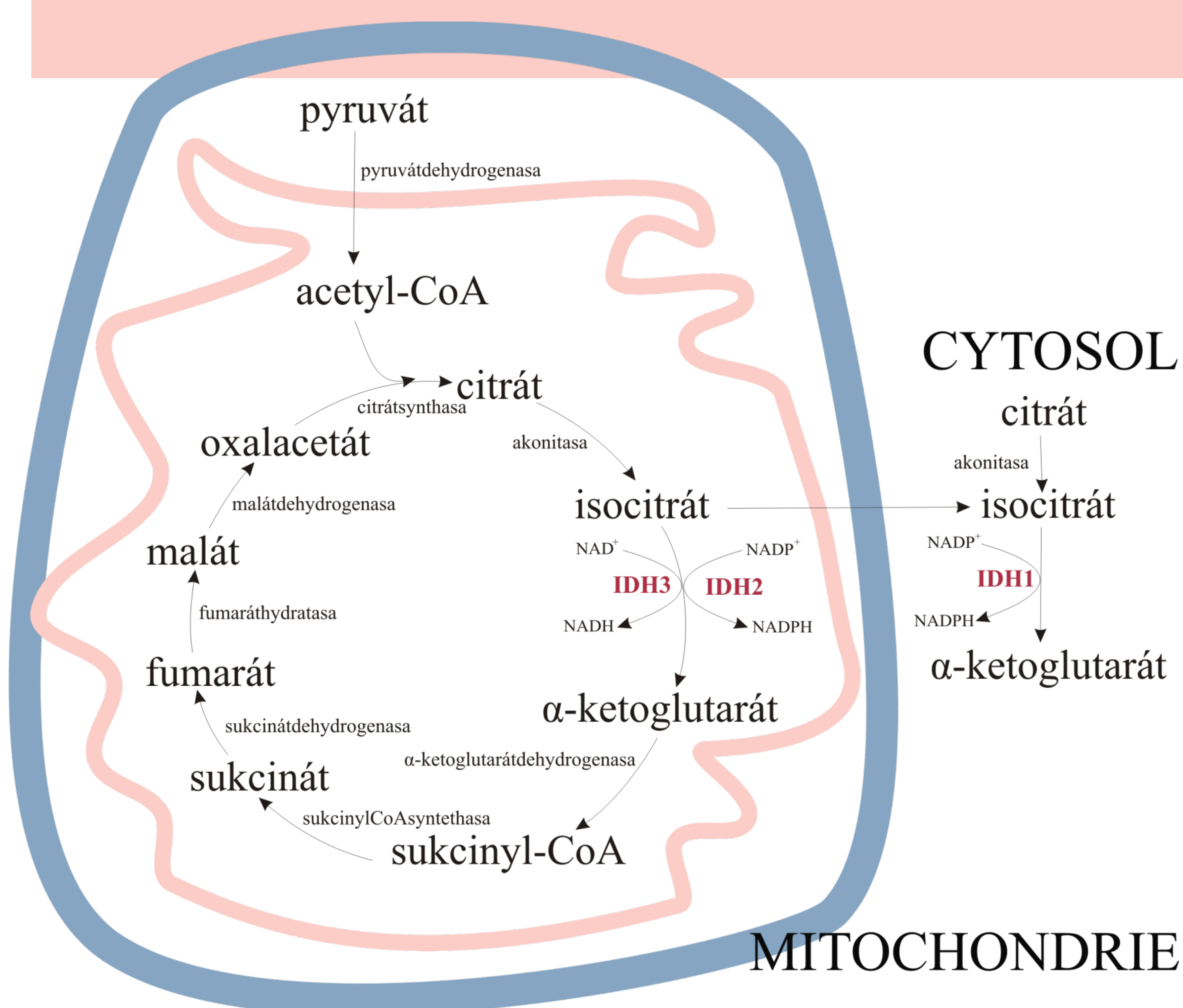
⁽¹⁾Ústav hematologie a krevní transfuze, Oddělení biochemie, Praha.

⁽²⁾Univerzita Karlova, 3. lékařská fakulta, Praha.

⁽³⁾Vysoká škola chemicko-technologická, Fakulta potravinářské a biochemické technologie, Ústav biochemie a mikrobiologie, Praha.

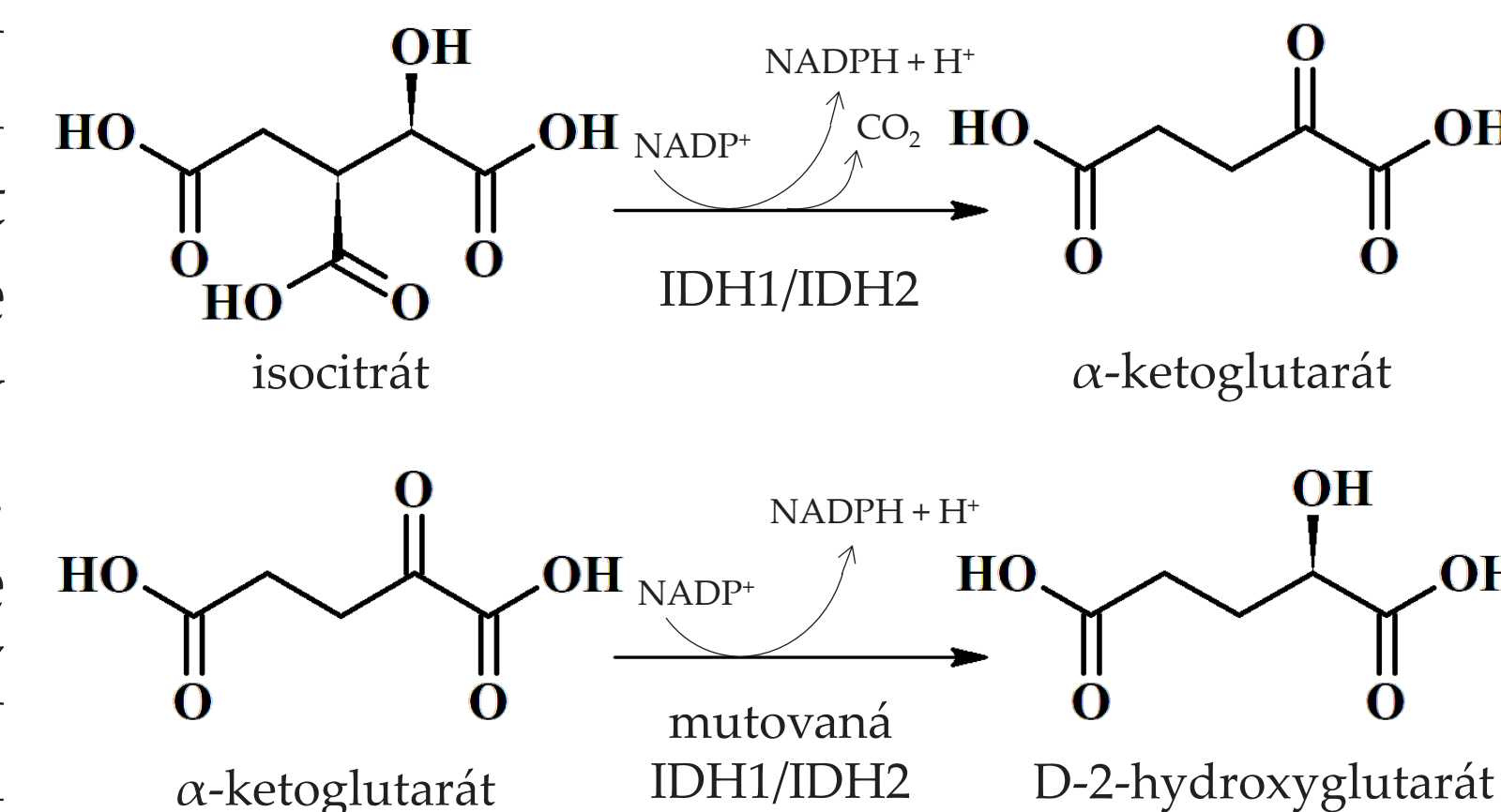


VYSOKÁ ŠKOLA
CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ
V PRAZE



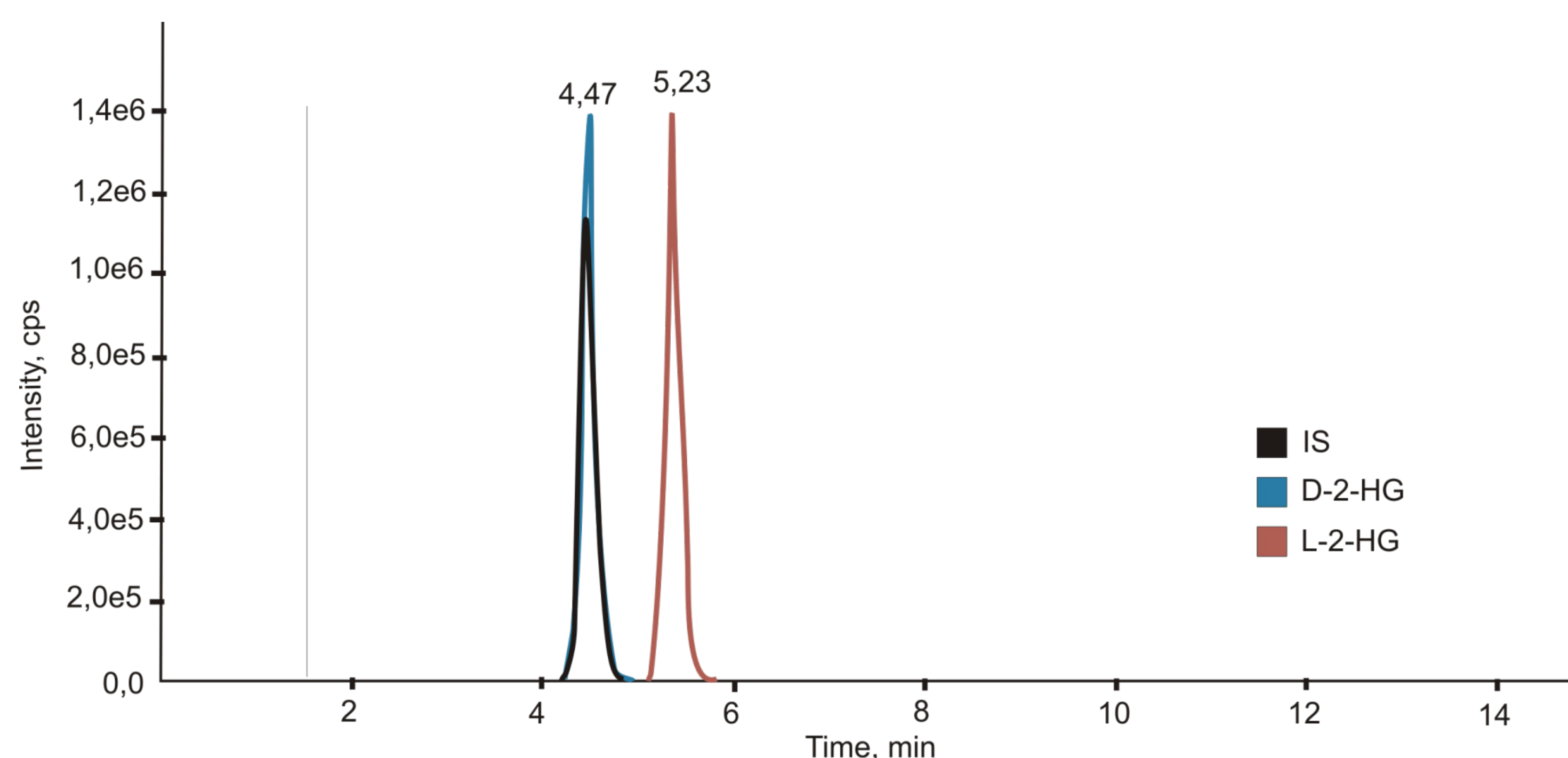
ÚVOD

Akutní myeloidní leukémie (AML) patří do skupiny maligních klonálních onemocnění hematopoézy, kdy počet blastů v periferní krvi přesahuje 20%. AML tvoří 80% akutních leukémií u dospělých, u dětí představuje 15% ze všech leukémií, přičemž vysoká část pacientů umírá do jednoho roku od stanovení diagnózy. V 97% případů AML byla prokázána některá genetická mutace (Kouchkovsky a Abdul-Hay, 2016). Jedním z mutovaných genů při AML je gen enzymu isocitrátdehydrogenasy (IDH). IDH patří do rodiny β -dekarboxylujících dehydrogenas a je součástí Krebsova cyklu. Zde enzym katalyzuje oxidativní dekarboxylaci isocitrátu za vzniku α -ketoglutarátu (α -KG) a ekvimolárně generuje NADPH z NADP⁺ (Dang *et al.*, 2010). Díky neomorfním mutacím IDH dochází v těle k přeměně α -ketoglutarátu na onkogen D-2-hydroxyglutarát (D-2-HG), který se v organismu ve zvýšené koncentraci fyziologicky nevyskytuje (Rakjeha *et al.*, 2012). L-2-HG není onkogenní, proto je nutné nalézt metodu umožňující stanovit koncentraci obou enantiomerů zvlášť.



ZÁVĚR A DISKUZE

Sestavená metoda umožňuje chromatografické dělení enantiomerů 2-HG po jejich převedení na diastereomerní deriváty a jejich kvantifikaci. Během experimentů se podařilo optimalizovat délku retenčních časů i pozici a výšku píků na chromatogramu. Experimenty probíhají i nadále. Stanovení hladiny D-2-HG v plazmě pacientů by mohlo být málo invazivní a snadnou metodou pro určení diagnózy, sledování účinnosti léčby a identifikaci minimální residuální nemoci u AML.



Elektroforeogram: Separace směsi D-2-HG a L-2-HG po derivatizaci s DATAN na koloně ZIC-HILIC s použitím D-2-HG(C13) jako IS.

PODĚKOVÁNÍ A LITERATURA

Ráda bych poděkovala vedoucímu své bakalářské práce Ing. Jiřímu Suttarovi, CSc., za rady a odborné vedení. Děkuji Ing. Alžbětě Hlaváčové, Ph.D., za pomoc s pracovními technikami a za čas, který mi věnovala, a také kolektivu zaměstnanců laboratoře biochemie ÚHKT za vytvoření příjemné pracovní atmosféry.

Podpora: Grant VZ MZ 00002373601 ÚHKT

Zdroje:

Dang L., Jin S., Shinshan M. S. (2010): IDH mutations in glioma and acute myeloid leukemia. *Trends in Molecular Medicine*, 16:9. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1471491410000985>.
Kouchkovsky D., Abdul-Hay I. M. (2016): Acute myeloid leukemia: a comprehensive review and 2016 update. *Blood Cancer Journal*, 6:7. <http://www.nature.com/articles/bcj201650>.
Poisignon V., Mercier L., Nakabayashi K., *et al.* (2016): Quantitation of isocitrate dehydrogenase (IDH)-induced D and L enantiomers of 2-hydroxyglutaric acid in biological fluids by a fully validated liquid tandem mass spectrometry method, suitable for clinical applications. *Journal of Chromatography B*, 1022, 290-297. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1570023216302495>.
Rakjeha D., Konoplev S., Medeiros J., *et al.* (2012): IDH mutations in acute myeloid leukemia. *Human Pathology*, 43:10. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0046817712001657>.

MATERIÁL A METODY

2-HG byl z plazmy izolován pomocí SPE na anexu. Pro následnou přípravu derivátů D-2-HG, L-2-HG, D-2-HG(C13), byla použita reakce s D-anhydridem O,O'-diacetylvinné kyseliny (DATAN) (Poisignon *et al.*, 2016). Pro dělení D a L diastereomerních derivátů byla použita kapalinová chromatografie s detekcí pomocí hmotnostního spektrometru. Pro dělení byla vyzkoušena kolona pracující s reverzní fází Atlantis C18, Synergy Polar a Luna C18, dále pak kolona ZIC-HILIC. Jako vnitřní standardy (internal standard - IS) byl využit D-2-HG(C13) a poté kyselina hydroxymalonová. Pokus také proběhl s použitím derivatizačního činidla a) anhydridu S(-)-2-acetoxyjantarové kyseliny a b) Naproxen chloridu. Příprava vzorků byla experimentálně provedena také bez použití SPE. Kalibrační křivka byla sestavena pomocí šesti bodů, kdy horní koncentrace měla hodnotu 20 μ g/ml a každý následující bod vznikl čtyřnásobným ředěním. Analýze byly podrobeny vzorky malé skupiny pacientů s normální a mutovanou IDH. Výsledky byly kvantifikovány pomocí programu Analyst.

VÝSLEDKY

Jako nejvýhodnější metoda se ukázala derivatizace s DATAN s použitím extrakce na pevnou fázi (solid-phase extraction - SPE) a IS D-2-HG(C13) následovaná dělením na koloně ZIC-HILIC.

Vzorek plazmy o objemu 125 μ l byl zředěn 125 μ l vody a bylo přidáno 25 μ l IS D-2-HG(C13) o koncentraci 5 μ g/ml. Kolony SPE200 byly ekvilibrovány postupně nejdříve 2 ml metanolu a poté 2 ml vody. Do SPE byly předloženy 2 ml vody a přidány vzorky. Promytí probíhalo 1 ml 25mM octanu amonného a poté 1 ml metanolu. Kolony byly vysušeny. Eluce z SPE byla provedena 2 krát 800 μ l roztoku metanolu s obsahem 5% kyseliny mravenčí. Ze vzorku byla odpařena kapalina při 80 $^{\circ}$ C. Reakce vzorku s roztokem DATAN a směsí methylenchloridu a kyseliny octové (4:1) probíhala při 80 $^{\circ}$ C po dobu 40 minut. Po reakci byl vzorek vysušen a uchováván při -70 $^{\circ}$ C. Vzorek byl pro analýzu rozpuštěn v roztoku fáze A. Kapalná fáze pro ZIC-HILIC obsahovaly výslednou koncentraci 10mM HCOONH₄o pH=3,2, přičemž fáze A se skládala z 90% z ACN, fáze B z 50% z ACN.

Chromatografie probíhala v izokratickém režimu s mobilní fází tvořenou 30% fází B při 30 $^{\circ}$ C za průtoku 200 μ l/min. D-2-HG a IS eluovaly v 4,47 min a L-2-HG v 5,23 min. Celková doba analýzy činila 14 minut.