

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Bc. Matúš Kolárik

STUDIUM PŮSOBENÍ TYROSINKINASOVÝCH INHIBITORŮ A JEJICH
METABOLITŮ NA BUNĚČNÉ LINIE NÁDORŮ

Study of effects of tyrosine kinase inhibitors and their metabolites on tumour cell lines

Diplomová práce

Vedoucí práce: Mgr. Radek Indra, Ph.D.

Konzultant: prof. MUDr. Tomáš Eckschlager, CSc.

Praha, 2021

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracoval samostatně pod vedením školitele Mgr. Radka Indry, Ph.D., a konzultanta prof. MUDr. Tomáše Eckschlagera, CSc. a všechny použité prameny jsem řádně citoval.

V Praze dne:

Podpis:

Poděkování:

In memoriam děkuji své školitelce prof. RNDr. Marii Stiborové, DrSc. za přidělení zajímavého tématu práce, všem její pomoc, rady a laskavý přístup do posledního dne.

Rád bych se poděkoval svému školiteli Mgr. Radku Indrovi, Ph.D. i svému konzultantovi prof. MUDr. Tomášovi Eckschlagerovi, CSc. za jejich profesionální přístup, trpělivost, pomoc při práci a cenné rady při psaní práce.

Touto cestou bych se rád poděkoval MVDr. Janu Hrabětovi, Ph.D., Mgr. Tereze Feglarové Ph.D., a Mgr. et Ing. Barbaře Feriančíkové z Laboratoře biologie solidních nádorů, Kliniky dětské hematologie a onkologie 2. Lékařské fakulty, Univerzity Karlovy a Fakultní nemocnice v Motole, za všechnu jejich pomoc při práci s buněčnými liniemi.

Moje velké poděkování patří paní Anně Ammerové za její neocenitelnou pomoc, praktické rady v laboratoři a zabezpečení nadstandartního technického zázemí na katedře.

Práce byla finančně podporována grantem: „Komplexní pohled na mechanismus působení a metabolismus inhibitorů tyrosinkinás a studium přístupů k potenciaci jejich protinádorové účinnosti“ (GAČR: 18 – 10251S)

Abstrakt

Vandetanib, lenvatinib a cabozantinib jsou inhibitory receptorových tyrosinkinas schválené k terapii lokálně pokročilých a metastázujících nádorů štítné žlázy, ledvin a jater. Tyto multikinasové inhibitory inhibují fosforylaci tyrosinových zbytků proteinů, čímž ovlivňují buněčnou signalizaci v nádorových buňkách. Metabolity vandetanibu, lenvatinibu a cabozantinibu byly detekovány *in vitro* i *in vivo* v séru a moči. Cytochromy P450 (CYP) a flavinové monooxygenasy byly identifikovány jako klíčové enzymy přeměňující výše zmíněné léky. Literatura poskytuje pouze limitované informace o farmakologické účinnosti metabolitů vandetanibu, lenvatinibu a cabozantinibu.

Předkládaná diplomová práce se zabývala srovnáním farmakologické účinnosti výše uvedených tyrosinkinasových inhibitorů a jejich metabolitů, *N*-oxidů, k čemuž bylo využito sledování vlivu na viabilitu buněk v normoxických i hypoxických podmínkách. Dále byl pomocí „western blottingu“ i průtokové cytometrie zkoumán vliv na expresi enzymů první fáze biotransformace xenobiotik (CYP 450 1A1, 1B1, 3A4 a CYP 450 oxidoreduktasy) i receptorových tyrosinkinas RET a VEGFR2, včetně mechanismů změn exprese těchto proteinů. V neposlední řadě bylo pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) zkoumáno, zda probíhá v použité buněčné linii metabolismu tyrosinkinasových inhibitorů a jejich *N*-oxidů.

Tyrosinkinasové inhibitory jsou ve všech případech víc cytotoxické v hypoxii než v normoxii. Metabolity jsou bez ohledu na obsah kyslíku při kultivaci vysoce signifikantně méně cytotoxické než jejich parentální sloučeniny. Inhibitory tyrosinkinas snižují expresi VEGFR2 ale ne RET. Snížení exprese VEGFR2 bylo způsobeno hypoxií, přičemž ta měla synergický účinek s lenvatinibem. Induktory autofagie vyvolali snížení exprese VEGFR2 analogicky jako lenvatinib. Naopak inhibitor autofagie zastavil snížení exprese VEGFR2 v přítomnosti lenvatinibu. Prezentované výsledky ukazují, že lenvatinib může zvyšovat autofagii. Metabolity tyrosinkinasových inhibitorů nebyly detekovány v médiích po kultivaci s buňkami a nebyly zaznamenány ani změny exprese biotransformačních enzymů.

Výsledky práce naznačují sníženou farmakologickou účinnost metabolitu inhibitorů tyrosinkinas. Prezentované výsledky ukazují, že tyrosinkinasové inhibitory mohou indukovat autofagii a tím snížit expresi VEGFR2.

Klíčová slova: tyrosinkinasové inhibitory, farmakologická účinnost, metabolity, VEGFR2, RET, autofagie, hypoxie,

Abstract

Vandetanib, lenvatinib and cabozantinib are inhibitors of receptor tyrosine kinases approved to treat locally advanced or metastatic thyroid gland, kidney and liver cancers. These multi-kinase inhibitors, inhibit phosphorylation of tyrosine moieties of protein, thus modulate cell signalization in cancer cells. Metabolites of vandetanib, lenvatinib and cabozantinib were detected *in vitro* as well as *in vivo* in blood and urine. Cytochromes P450 and flavin monooxygenases were identified as primary enzymes participating in metabolism of these drugs. Literature lacks information regarding pharmacological efficacy of vandetanib, lenvatinib and cabozantinib metabolites.

The aim of this diploma thesis was the investigation of pharmacological efficacy of *N*-oxides of vandetanib, lenvatinib and cabozantinib. The viability measurement under normoxic and hypoxic conditions was employed to determined their efficacy. The expression of enzymes of the first phase of xenobiotics metabolism (CYP 450 1A1, 1B1, 3A4 a CYP 450 oxidoreductase) and receptor tyrosine kinases RET and VEGFR2, as well as mechanism of changes in their expression were investigated using western blotting and flow cytometry. High performance liquid chromatography was utilised to investigate possible metabolism of tyrosine kinase inhibitors and their *N*-oxides.

Tyrosine kinase inhibitors exhibit increased toxicity under hypoxic conditions in comparison to normoxic conditions. Metabolites were highly significantly less effective than their parental molecules, irrespectively of oxygen content. Tyrosine kinase inhibitors decreased expression of VEGFR2 but not RET. Hypoxia decreased VEGFR2 expression and proved synergy with decrease caused by lenvatinib. Inductors of autophagy decreased VEGFR2 in the same manner as lenvatinib. In contrary autophagy inhibitors prevented the decrease of VEGFR2 by lenvatinib. Results indicate possibility that autophagy is responsible for decreased VEGFR2 expression. Metabolites of tyrosine kinase inhibitors were not detected in cultivation medias and expression of biotransformation enzymes was not altered.

Overall results indicate lower pharmacological efficacy of tyrosine kinase inhibitor metabolites. Based on results showed in this thesis tyrosine kinase inhibitors may increase autophagy thus decrease expression of VEGFR2.

Key words: tyrosine kinase inhibitors, pharmacological efficacy, metabolites VEGFR2, RET, autophagy, hypoxia [IN CZECH]

Obsah

Seznam zkratk	8
1. Teoretický úvod	10
1.1. Nádory štítné žlázy	10
1.1.1. Diferencovaný karcinom štítné žlázy	10
1.1.2. Anaplastický karcinom štítné žlázy	11
1.1.3. Medulární karcinom štítné žlázy	11
1.2. Cytochromy P450	12
1.2.1. Cytochromy P450 podrodiny 1A	13
1.2.2. Cytochromy P450 podrodiny 3A	14
1.3. Hypoxie	14
1.4. Receptorové tyrosinkinasy	14
1.4.1. Protoonkogen RET	15
1.4.2. Receptory růstového faktoru cévního endotelu	15
1.5. Inhibitory tyrosinkinas	16
1.5.1. Vandetanib	16
1.5.1.1. Metabolismus vandetanibu	17
1.5.2. Lenvatinib	18
1.5.2.1. Metabolismus lenvatinibu	19
1.5.3. Cabozantinib	20
1.5.3.1. Metabolismus cabozantinibu	20
2. Cíle práce	22
3. Materiál a metody	23
3.1. Použité chemikálie	23
3.2. Použitý materiál	25
3.3. Použité přístroje	26
3.4. Metody	28
3.4.1. Kultivace buněk	28
3.4.2. Subkultivace buněk	28
3.4.3. Rozmrazování buněk	29
3.4.4. Zamrazování buněk	29
3.4.5. Zkoumání exprese tyrosinkinas v buněčných liniích	29

3.4.6.	Stanovení vlivu tyrosinkinasových inhibitorů a jejich vybraných metabolitů na viabilitu buněk.....	30
3.4.7.	Stanovení vlivu tyrosinkinasových inhibitorů a jejich vybraných metabolitů na expresi vybraných proteinů a zkoumání metabolismu těchto látek	31
3.4.8.	Stanovení vlivu tyrosinkinasových inhibitorů a jejich vybraných metabolitů na expresi VEGFR2 průtokovou cytometrií	33
3.4.9.	Stanovení reversibility změn exprese VEGFR2	34
3.4.10.	Zkoumání mechanismu snížení exprese VEGFR2	34
3.4.11.	Izolace proteinů	35
3.4.12.	Stanovení koncentrace proteinů	36
3.4.13.	Separace proteinů elektroforézou v přítomnosti dodecylsírany sodného na polyakrylamidovém gelu.....	36
3.4.14.	Přenos proteinů z gelu po elektroforéze na membránu elektrickým proudem s následnou imunodetekcí „Western blotting“	38
3.4.15.	Analýza metabolitů vandetanibu, lenvatinibu a cabozantinibu a jejich <i>N</i> -oxidů v kultivačním médiu.....	40
3.4.15.1.	Separace metabolitů vandetanibu	41
3.4.15.2.	Separace metabolitů lenvatinibu	41
3.4.15.3.	Separace metabolitů cabozantinibu.....	42
3.4.16.	Analýza dat.....	42
4.	Výsledky	43
4.1.	Výběr experimentálního modelu	43
4.2.	Vliv tyrosinkinasových inhibitorů a jejich <i>N</i> -oxidů na viabilitu buněk	44
4.3.	Vliv tyrosinkinasových inhibitorů a jejich <i>N</i> -oxidů na expresi RET a VEGFR2	46
4.4.	Vliv tyrosinkinasových inhibitorů a jejich <i>N</i> -oxidů na expresi biotransformačních enzymů	51
4.5.	Metabolismus vandetanibu, lenvatinibu a cabozantinibu TT buňkami.....	54
5.	Diskuse.....	61
6.	Závěr	64
7.	Použitá literatura	65

Seznam použitých zkratek

AMPK – AMP aktivovaná proteinkinasa

ATC – anaplastický karcinom štítné žlázy

BSA – hovězí sérový albumin

CYP – cytochrom P450

DMSO – dimethylsulfoxid

DSMZ – Německá kolekce mikroorganismů a buněčných kultur

DTC – diferencovaný karcinom štítné žlázy

EC₅₀ – koncentrace látky, která snižuje růst buněk o 50 % oproti kontrole

EDTA – kyselina ethylendiamintetraoctová

EGFR – receptor epidermálního růstového faktoru (z angl. Epidermal Growth Factor Receptor)

ERK – kinasa regulována extracelulárním signálem (z angl. Extracellular-signal Regulated Kinase)

FBS – fetální telecí sérum

FGFR – receptor růstového faktoru fibroblastů (z angl. Fibroblast Growth Factor Receptor)

FMO – flavinová monooxygenasa

FTC – folikulární karcinom štítné žlázy

GDNF – neurotrofní faktory odvozené od gliálních buněčných linií (z angl. Glial cell line Derived Neurotrophic Factor)

HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie

IC₅₀ – koncentrace látky, která snižuje aktivitu enzymu o 50 % oproti kontrole

KIT – receptor růstového faktoru kmenových/žírných buněk

MEN – syndrom mnohočetné endokrinní neoplázie

MET – receptor růstového faktoru hepatocytů

MTC – medulární karcinom štítné žlázy

mTOR – savčí cíl rapamycinu (z angl. mammalian Target Of Rapamycin)

PBS – fosfátový pufr s chloridem sodným

PDGFR - receptor růstového faktoru krevních destiček (z angl. Platelets Derived Growth Factor Receptor)

POR – cytochrom P450 oxidoreduktasa

PTC – papilární karcinom štítné žlázy

RET – přeuspořádán během transfekce (z angl. REarranged during Transfection)

RTK – receptorová tyrosinkinasa

SDS – dodecylsírán sodný

ŠŽ – štítná žláza

TEMED – N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin

Tris – tris(hydroxymethyl)aminomethan

VEGFR – receptor růstového faktoru cévního endotelu (z angl. Vascular Endothelial Growth Factor Receptor)

1. Teoretický úvod

1.1. Nádory štítné žlázy

Nádory štítné žlázy (ŠŽ) jsou nejčastější nádory endokrinního systému. Tvoří asi 92 % případů zhoubných nádorů endokrinních žláz. Na všech případech rakoviny se však podílí z méně než procenta. Skupina nádorů ŠŽ je skupinou zahrnující široké spektrum nádorů od téměř neškodných až po velmi agresivní maligní tumory. Prognóza pacientů je závislá na mnoha faktorech [Vlček 2011a].

1.1.1. Diferencovaný karcinom štítné žlázy

Diferencovaný karcinom štítné žlázy (DTC), pocházející z folikulárních buněk ŠŽ, tvoří asi 90 % všech nádorů ŠŽ. Diferencovaný karcinom štítné žlázy se dělí na papilární karcinom štítné žlázy (PTC), folikulární karcinom štítné žlázy (FTC) a karcinom štítné žlázy z Hürthleho buněk. Agresivita DTC je nižší v porovnání s nediferencovaným karcinomem ŠŽ [Cabanillas a kol. 2016].

Papilární karcinom štítné žlázy se nejčastěji vyskytuje u pacientů mezi čtvrtou a šestou dekádou života, může však, postihnout i mladé dospělé a děti. Tvoří 80 % všech případů DTC. Ženy postihuje PTC pětkrát častěji než muže. Prognóza pacientů s PTC je dobrá, jelikož biologická agresivita PCT je nízká [Vlček 2011a]. Papilární karcinomy mají často mutace genů *BRAF*, *RAS* a fúzi s *RET* [Bendlová a kol. 2011].

Folikulární karcinom štítné žlázy tvoří asi 10-15% případů DTC a nejčastěji se vyskytuje u žen v páté a šesté dekáde života. Tendence k tvorbě vzdálených metastáz je u FTC vyšší než u PTC, přičemž metastázy postihují nejčastěji plíce a kosti. [Vlček 2011a]. Nejčastější genetické mutace u pacientů s FTC jsou mutace *RAS* a fúze *PAX8/PPAR γ* [Bendlová a kol. 2011].

Terapie DTC zahrnuje chirurgickou resekci. U nádorů a metastáz, které akumulují jód je možná systémová terapie radiojódem ¹³¹I. Suprese sekrece tyreotropinu má pozitivní efekt na dlouhodobé přežívání pacientů. U vybraných pacientů se používají cílená léčiva jako inhibitory tyrosinkinasy lenvatinib a sorafenib [Cabanillas a kol. 2016].

1.1.2. Anaplastický karcinom štítné žlázy

Anaplastický karcinom štítné žlázy (ATC) je vzácný, ale agresivní nádor štítné žlázy, tvořící méně než 1 % všech nádorů ŠŽ. Klinicky se ATC prezentuje jako rychle rostoucí hmatná léze na štítné žláze, metastázy bývají jak lokální tak vzdálené. Vzdálené metastázy jsou nejčastěji přítomné na plicích, dále v kostech a mozku. Prognóza pacientů s ATC je velmi špatná. Nádor může vznikat *de novo*, nebo se vyvinout z DTC či s ním koexistovat [Cabanillas a kol. 2016]. Anaplastický karcinom štítné žlázy mnohdy sdílí mutace genů jako u DTC. Jedná se zejména o mutace genů *RAS*, *BRAF*, *p53* a beta-*katenin* [Bendlová a kol. 2011]. Cílená terapie ATC je předmětem klinických studií, zejména použití terapií cílících na mutaci *BRAF*^{V600F}. Dále využití jiných tyrosinkinasových inhibitorů a imunoterapie [Cabanillas a kol. 2016].

1.1.3. Medulární karcinom štítné žlázy

Medulární karcinom štítné žlázy (MTC) vzniká z C-buněk produkujících kalcitonin, který se zároveň využívá jako onkomarker [Bendlová a kol. 2011]. Údaje o četnosti výskytu se liší od asi 8 – 10 % všech nádorů štítné žlázy [Vlček 2011b], po pouze asi 1 – 2 % [Cabanillas a kol. 2016].

Známé jsou dvě formy MTC a to sporadická forma (75 % pacientů) a dědičná forma (25 % pacientů). Dědičná forma je spojena se syndromem mnohočetné endokrinní neoplazie (MEN) 2A a 2B nebo s familiární formou MTC [Vlček 2011b]. Klinicky se nádor projevuje jako hmatný uzel ve štítné žláze. V pozdějším stádiu bývá přítomen i průjem a příznaky vyvolané metastázami [Cabanillas a kol. 2016]. Metastázy bývají v regionálních lymfatických uzlinách, vzdálené metastázy postihují typicky játra, méně často mozek, kosti a plíce [Vlček 2011b].

Molekulární podstatou onemocnění bývají mutace protoonkogenu *RET* přítomné v 95 % dědičných MTC kde se jedná o germinální mutace. U 50 % sporadických MTC jsou typické somatické mutace *RET* [Bendlová a kol. 2011].

Terapie MTC zahrnuje operaci primárního tumoru i metastáz, pokud je to možné. U části pacientů pomáhá radioterapie jaterních metastáz. Konvenční chemoterapie je poměrně málo

účinná [Vlček 2011b]. V současné době jsou v terapii používány tysinkinasové inhibitory [Cabanillas a kol. 2014] a [Karras a kol. 2014].

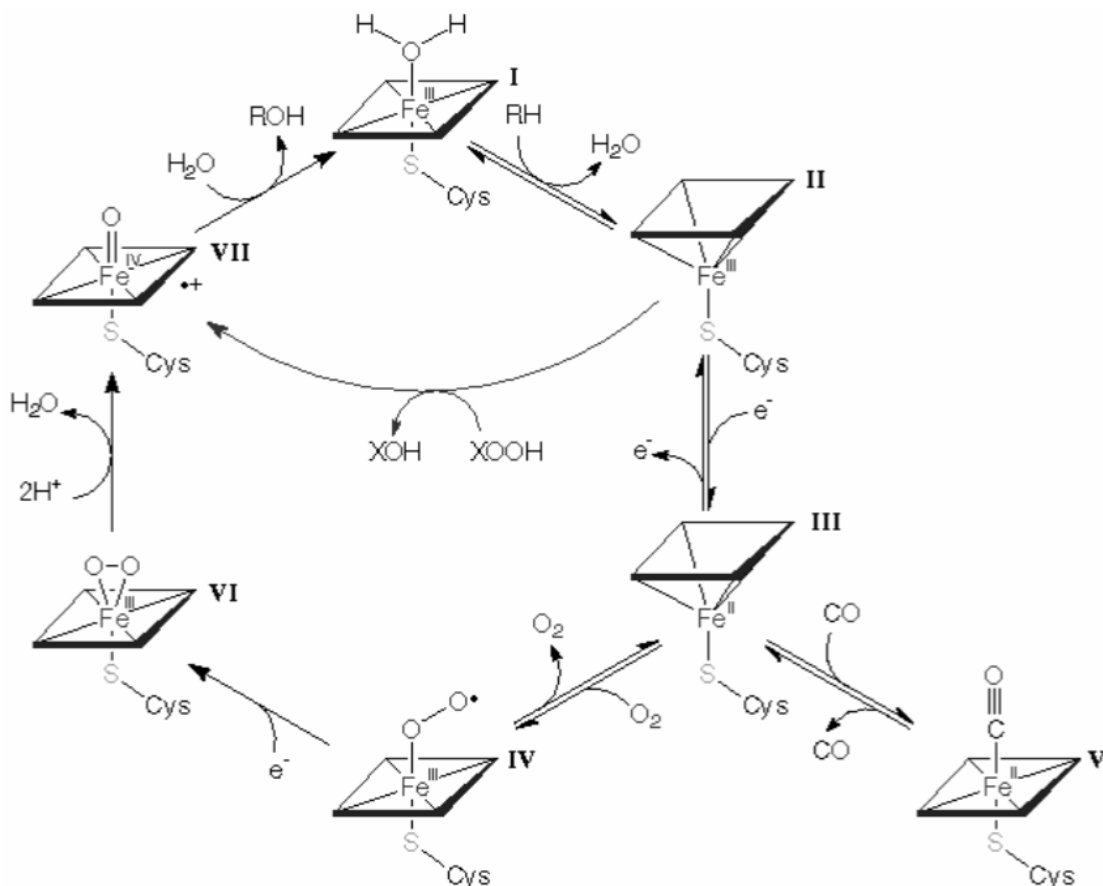
1.2. Cytochromy P450

Cytochromy P450 jsou nadrodinou hemthiolátových proteinů. Mají širokou substrátovou specifitu a mají důležité postavení v metabolismu xenobiotik i eobiotik. Na základě aminokyselinové sekvence jsou rozdělené do rodin při shodnosti sekvence 40%. Podrodiny obsahují proteiny se shodou sekvence aminokyselin nad 60% [Skálová a kol. 2011]

Metabolismu xenobiotik zajišťují cytochromy P450 z rodin 1 – 3. Eobiotika jsou přeměňována cytochromy P450 z rodin 4, 5, 7, 11, 17, 19, 21, 24 a 27. Tyto rodiny se podílí na biosynthese tromboxanů, cholesterolu, steroidních hormonů, metabolismu mastných kyselin i aktivaci vitamínu D [Skálová a kol. 2011].

Název cytochromy P450 tyto proteiny získaly tím, že v redukovaném stavu na sebe váže atom železa molekulu oxidu uhelnatého za vzniku charakteristického absorpčního pásu při 450 nm [Omura a Sato 1964]

Reakční cyklus cytochromu P450 začíná v klidovém stavu, vytěsněním molekuly vody z aktivního místa substrátem. To má za následek konformační změnu, kdy hemový kruh vystoupí nad úroveň atomu železa. Přejít ze stavu I do II na obrázku 1.1. na straně 13. Dochází k redukci atomu železa z oxidačního čísla +3 na +2 elektronem, který donuje cytochrom P450 oxidoreduktasa (POR) (stav III obr. 1.1. na straně 13). Atom železa váže molekulu kyslíku, čímž se oxiduje na oxidační stav +3 a vzniká ferrisuperoxidový radikál (stav IV obr. 1.1. na straně 13), který je redukován na peroxidový komplex elektronem od POR (stav VI obr. 1.1. na straně 13). Homolytickým štěpením vazby mezi kyslíky vzniká voda a ferrioxeniový kationt radikál, který je silným oxidačním činidlem a oxygenuje molekulu substrátu (přejít ze stavu VI do VII, obr. 1.1. na straně 13). Metabolit je na závěr vytěsněn molekulou vody a enzym se vrací do „klidového“ stavu [Stiborová a kol. 2004].



Obrázek 1.1. Schéma reakčního cyklu cytochromu P450. Převzato z <http://metallo.scripps.edu/promise>

1.2.1. Cytochromy P450 podrodiny 1A

Podrodina 1A zahrnuje u lidí dva cytochromy P450 1A1 a 1A2. Tyto dva enzymy mají vysokou homologii aminokyselinové sekvence a jsou vysoce konzervované. Podílejí se na aktivaci asi 90 % známých karcinogenů, včetně těch v cigaretovém kouři [Stiborová a kol. 1999].

Enzymy se od sebe liší zejména lokalizací. CYP1A2 je typicky hepatální enzym, zatímco CYP1A1 je exprimován v extrahepatální tkáni jako plíce, gastrointestinální trakt, kůže a placenta [Rendic a Di Carlo 1997].

Cytochrom P450 1A2 se podílí na metabolismu léků jako např. warfarin ale i antidepresiv a steroidů [Rendic a Di Carlo 1997] a [Stiborová a kol. 1999].

1.2.2. Cytochromy P450 podrodiny 3A

Cytochromy podrodiny 3A jsou mimo jater exprimovány v tkáni zažívacího ústrojí, děloze, plodu, placentě, ledvinách a plicích [Rendic a Di Carlo 1997]. Co se týče množství substrátů, které přeměňují i míry exprese patří CYP3A4 k nejvýznamnějším cytochromům P450 v lidském organismu [Stiborová a kol. 1999].

Aktivita CYP3A4 je značně ovlivněna stravou, životním prostředím ale i léky. Díky vysoké plasticitě aktivního místa má nízkou substrátovou specificitu a podílí se na metabolismu asi 50 % léků [Skálová a kol. 2011].

1.3. Hypoxie

Fyziologie nádorové tkáně je odlišná od fyziologie normální tkáně. Charakteristická je pro ni hypoxie nebo anoxie. Ta je způsobena překotnou tvorbou cév v nádoru. Následkem toho je systém nezralých cév s defektní stavbou, nízkou efektivitou perfuze a chaotickým a heterogenním tokem krve, v jehož důsledku se mohou vyskytovat místa se špatným zásobením kyslíkem a živinami [Vaupel 2004].

Hypoxické podmínky vyvolávají rozsáhlé změny v buňkách. Dochází k změnám v metabolismu eobiotik i xenobiotik. Zvyšuje se exprese p-glykoproteinu, snižuje se mitochondriální funkce a stimuluje se autofagie. Tyto mechanismy vedou ke vzniku rezistence vůči onkologické léčbě [Rohwer a Cramer 2014] a [Zhou a kol. 2018].

Proces adaptace na hypoxii je řízen transkripčním faktorem HIF1 který reguluje expresi genů umožňujících adaptaci na hypoxii. Za normoxických podmínek je prolylový zbytek na proteinu hydroxylován, čím dochází k jeho destabilizaci, a degradaci. V hypoxických podmínkách k tomu však nedochází a HIF1 začne modulovat genovou expresi [Brahimi-Horn a kol. 2007]

1.4. Receptorové tyrosinkinasy

Receptorové tyrosinkinasy (RTK) jsou transmembránové glykoproteiny, které přenášejí signály z extracelulárního prostředí na základě vazby ligandu na jejich extracelulární část. Mezi RTK patří receptory inzulinu, růstových faktorů jako například epitheliální růstový faktor (EGFR) či růstový faktor krevních destiček (PDGFR), a další [Hubbard a Till 2000].

1.4.1. Protoonkogen RET

Protoonkogen RET je transmembránový protein, který patří mezi tyrosinkinasy. Kinasa RET je zapojena do přenosu signálů z neurotrofních faktorů odvozených od gliálních buněčných linií (GDNF). Rodina receptorů pro GDNF jsou koreceptory RET kinasy. Jejich asociací a dimerizací dochází k autofosforylaci a přenosu signálu v buňce [Mulligan 2014].

Signalizace zprostředkovaná RET kinasou je spřažená s proteinem RAS, který následně aktivuje ERK1 a 2 (kinasa regulovaná extracelulárním signálem). Další signální dráhy vedou přes ERK5, fosfolipasu C- γ , MAPK a fosfatidylinositol-3-kinasu spřaženou s dráhou Akt kinasy [Arighi a kol. 2005], [Borrello a kol. 1996], [Hayashi a kol. 2001], [Kurokawa a kol. 2003], [Trupp a kol. 1999].

Význam RET v nádorech je patrný u medulárního a papilárního karcinomu ŠŽ. Fúze *RET* s homologními geny je častá u pacientů s PTC. Podle zdrojů se vyskytuje u 5 – 70 % pacientů. U pacientů s medulárním karcinomem štítné žlázy jsou často přítomny bodové mutace v na cysteiny bohaté oblasti na extracelulární části, nebo v kinasové doméně. Tyto mutace zapříčiňují aktivaci RET signalizace [Arighi a kol. 2005]. Mutace *RET* byly nalezeny i u jiných onkologických onemocnění jako je adenokarcinom plic a chronická myelomonocytární leukémie. Karcinom pankreatu, prsu a akutní myeloidní leukémie jsou nemoci, kde je zaznamenána změna exprese RET kinasy [Mulligan 2014].

1.4.2. Receptory růstového faktoru cévního endotelu

Receptory růstového faktoru cévního endotelu (VEGFR) jsou skupinou strukturně příbuzných receptorových tyrosinkinás které, jsou exprimované buňkami cévního endotelu (VEGFR1 a VEGFR2) nebo lymfatickými endotheliálními buňkami (VEGFR3) [Claesson-Welsh 2003].

Receptor růstového faktoru cévního endotelu 2 (VEGFR2) s jeho ligandem růstovým faktorem cévního endotelu se podílí na angiogenezi, migraci a proliferaci endotheliálních buněk [Claesson-Welsh 2003].

Exprese VEGFR2 byla zjištěna v nádorech prsu, kde je asociována s horší prognózou a kratším celkovým přežitím [Yan a kol. 2015]. Dále byl VEGFR2 detekován v nádorech ledviny, močového měchýře, karcinomu tlustého střeva a dalších [Song a kol. 2014], [Kopparapu a kol. 2013] a [Jayasinghe a kol. 2015].

Signalizace spojená s vazbou ligandu na VEGFR začíná dimerizací VEGFR, přičemž VEGFR1-3 mohou tvořit jak homodimery tak heteromery [Ollson a kol. 2006] a [Ruch a kol. 2007]. Následně dochází k fosforylaci tyrosinových zbytků. Struktura VEGFR2 obsahuje sedm tyrosinů v pozicích 801, 951, 996, 1054, 1059, 1175 a 1214. Fosforylace umožňuje přenos signálu v kaskádách spojených se savčím cílem rapamycinu (mTOR), AMP aktivovanou proteinkinasou (AMPK) a Akt [Abhinand a kol. 2016].

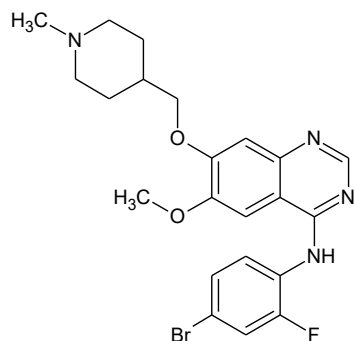
1.5. Inhibitory tyrosinkinas

Tyrosinkinasové inhibitory patří mezi cílená léčiva používaná hlavně v onkologii ale i v terapii revmatických nemocí. V porovnání s konvenční chemoterapií mají širší terapeutické okno, nižší toxicitu a mohou se používat v kombinaci s chemoterapií nebo radioterapií [Arora a Scholar 2005].

Inhibitory tyrosinkinas nejsou dosud kurativní léčbou. Mají pouze limitovaný vliv na dobu přežití pacientů. Obecně jsou doporučovány pro pacienty s omezenými možnostmi léčby, a to převážně u rychle postupujících nádorů [Weitzman a Cabanillas 2015].

1.5.1. Vandetanib

Vandetanib je inhibitor široké škály tyrosinkinas. Jeho schopnost v submikromolárních koncentracích inhibovat VEGFR2, VEGFR3, EGFR a RET prokázaly experimenty *in vitro* i *in vivo* [Wedge a kol. 2002] a [Karras a kol. 2014]. Struktura vandetanibu je na obrázku 1.2.



Obrázek 1.2. Struktura vandetanibu

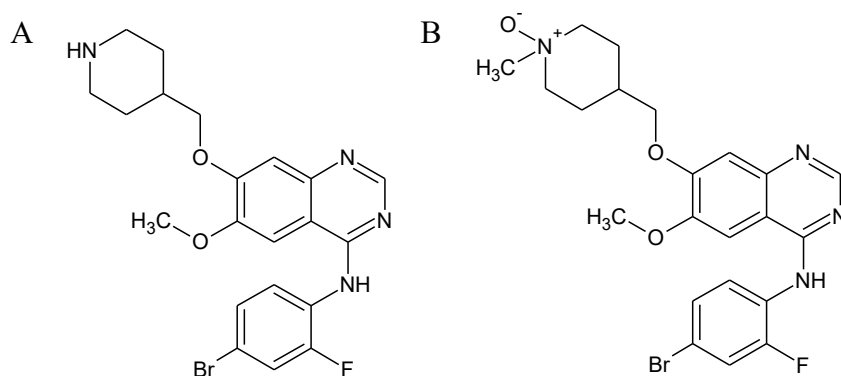
Klinická studie u pacientů s nemalobuněčným karcinoměm plic ukázala, že vandetanib prodloužil dobu přežívání bez progresu v porovnání s jiným tyrosinkinasovým inhibítorem gefítinibem. Další studie prováděné u pacientů s maligním melanoměm a karcinoměm prsu neprokázaly terapeutický efekt vandetanibu [Herbst a kol. 2007].

Pod obchodním jménem Caprelsa je vandetanib schválen k terapii medulárního karcinomu štítné žlázy. Ve studiích byl také aplikován u pacientů s DTC, kde v porovnání s placebem prodloužil dobu přežití pacientů [Karras a kol. 2014].

1.5.1.1. Metabolismus vandetanibu

Metabolismus vandetanibu byl nejprve zkoumán *in vitro* na jaterních mikrozomech potkana a *in vivo* ve vzorcích moči potkanů. Byly identifikovány metabolity první i druhé fáze biotransformace: *N*-desmethylvandetanib, vandetanib-*N*-oxid a glukuronid vandetanibu [Attwa a kol. 2018]. Nicméně tato studie neidentifikovala, jaké biotransformační enzymy se podílejí na tvorbě metabolitů vandetanibu.

Pozdější studie identifikovala shodně dva metabolity první fáze biotransformace a to *N*-desmethylvandetanib a vandetanib-*N*-oxid. *N*-desmethylvandetanib je produktem oxidace vandetanibu cytochromy P450, zejména CYP3A4, zatímco vandetanib-*N*-oxid je metabolitem produkovaným flavinovou monooxygenasou (FMO) 1 a v menší míře FMO3 [Indra a kol. 2019]. Struktura *N*-desmethylvandetanibu a vandetanib-*N*-oxidu je znázorněna na obrázcích 1.3. A resp. B.

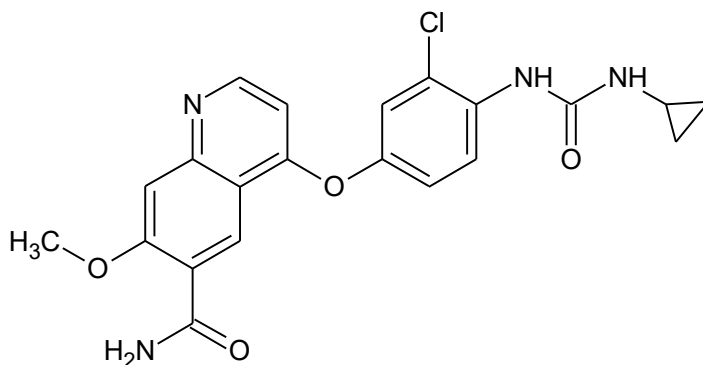


Obrázek 1.3. Struktura *N*-desmethylvandetanibu (A) a vandetanib-*N*-oxidu (B).

Data z *in vivo* pokusů na dobrovolnících ukazují, že po perorální aplikaci vandetanibu je hladina metabolitů, *N*-desmethylvandetanibu a vandetanib-*N*-oxidu v séru velmi nízká, což značí nízkou míru metabolismu [Martin a kol. 2011]. Chybí však data z *in vivo* nebo *in vitro* pokusu zkoumajícího účinnost metabolitů vandetanibu vůči buněčným nádorovým liniím.

1.5.2. Lenvatinib

Lenvatinib je tyrosinkinasový inhibitor, který inhibuje škálu tyrosin kinas a je proto považován za tzv. multikinasový inhibitor. Mezi inhibované kinasy patří VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, RET, FGFR, PDGFR, KIT - receptor růstového faktoru kmenových/žírných buněk [Matsui a kol. 2008] a [Okamoto a kol. 2013]. Struktura lenvatinibu je na obrázku 1.4.



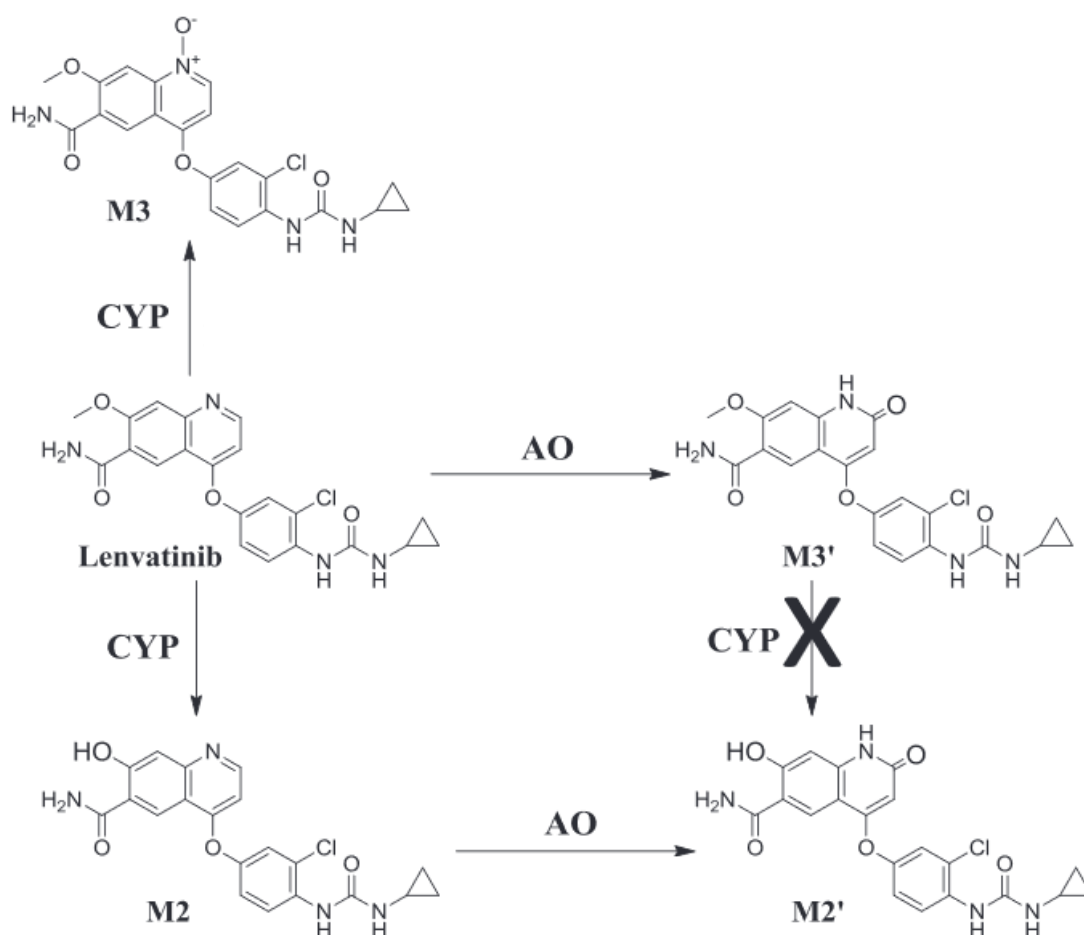
Obrázek 1.4. Struktura lenvatinibu

Lenvatinib zlepšil dobu přežití u pacientů s různými onkologickými onemocněními, jako je pokročilý karcinom ledviny, kde se užívá v kombinaci s everolimem [Roviello a kol. 2018], či neoperovatelný hepatocelulární karcinom, kde je lenvatinib první linií terapie [Personeli a kol. 2019].

V klinických studiích na pacientech s diferencovaným karcinomem štítné žlázy rezistentním na radiojod prodloužil lenvatinib dobu přežití bez progresu a celkovou dobu přežití pacientů v porovnání s placebem [Cabanillas a Habra 2016]. Podle Modré knihy České onkologické společnosti je lenvatinib schválen i v některých případech karcinomu žlučníku a žlučových cest.

1.5.2.1. Metabolismus lenvatinibu

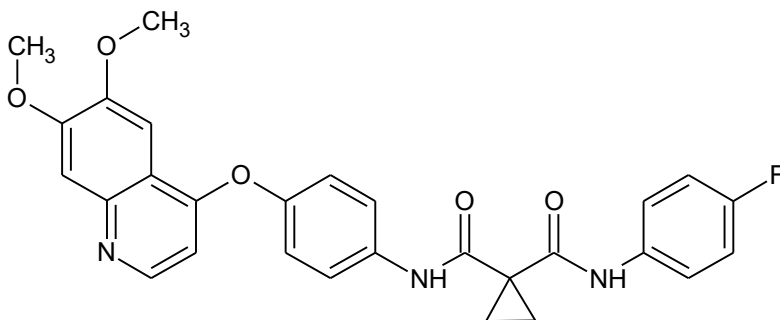
Studie metabolismu na subcelulárních frakcích lidských jater identifikovaly celkem čtyři metabolity lenvatinibu, desmethyllenvatinib (M2 na obrázku 1.5.), chinolinon desmethyllenvatinibu (M2' na obrázku 1.5.), lenvatinib-*N*-oxid (M3 na obrázku 1.5.) a chinolinon lenvatinibu (M3' na obrázku 1.5.). Vznik desmethyllenvatinib a lenvatinib-*N*-oxid je katalyzován cytochromy P450, zatímco za tvorbu chinolinonů je odpovědná aldehydoxidasa [Inoue a kol. 2014]. Schéma metabolismu lenvatinibu je na obrázku 1.5. Hlavní isoformou cytochromu P450 v metabolismu lenvatinibu je 3A4 jehož podíl je 80% [Hussein a kol. 2017].



Obrázek 1.5. Schéma metabolismu lenvatinibu, převzato a upraveno z Inoue a kol. 2014 (AO – aldehydoxidasa)

1.5.3. Cabozantinib

Cabozantinib je multikinasový inhibitor stejně jako vandetanib a lenvatinib. Inhibuje zejména kinasy VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, RET, KIT a MET - receptor růstového faktoru hepatocytů [Yakes a kol. 2011] a [Lacy a kol. 2015]. Struktura cabozantinibu je na obrázku 1.6.



Obrázek 1.6. Struktura cabozantinibu

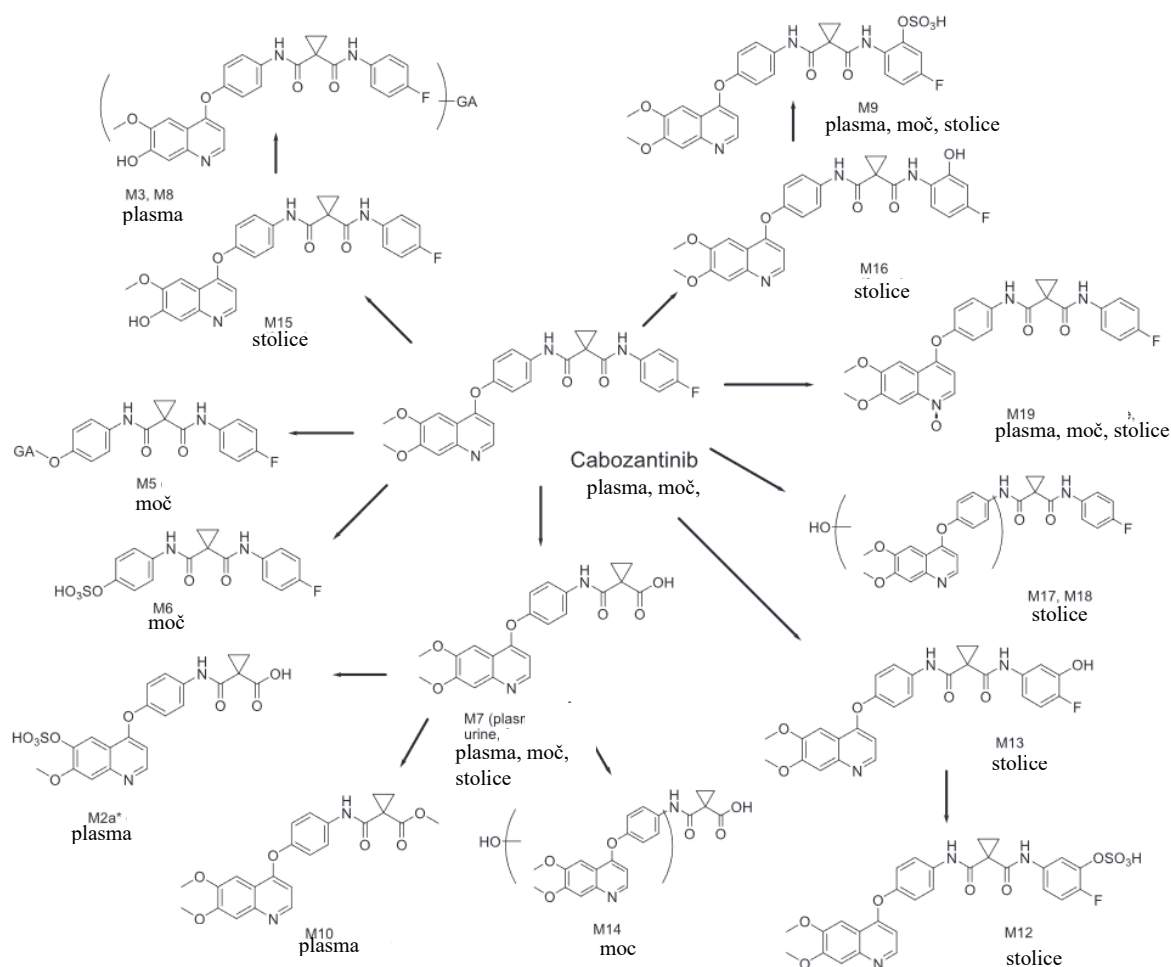
Klinické studie ukázaly pozitivní účinek cabozantinibu na dobu bez progresu onemocnění u pacientů trpících MTC. Efekt na celkové přežití však nebyl prokázán [Weitzman a Cabanillas 2015]. Dále data z klinické studie ukazují účinnost cabozantinibu i u DTC (redukce metastáz, prodloužení doby přežití bez progresu) [Cabanillas a kol. 2014].

Mimo nádorů štítné žlázy byl cabozantinib zkoumán i v terapii dalších nádorů. Prokazatelně zlepšil celkové přežívání u pacientů s hepatocelulárním karcinomem [Abou-Alfa a kol. 2018]. Cabozantinib je schválený k terapii karcinomu ledviny po alespoň jedné předchozí léčbě cílené na VEGFR. V klinických studiích také vykazoval vyšší účinnost v první linii léčby karcinomu ledvin v porovnání se sunitinibem [Abdelaziz a Vaishampayan 2017]. V druhé fázi klinického zkoušení byl cabozantinib perspektivní i v terapii karcinomu prostaty [Smith a kol. 2018]. Ve třetí fázi však nebyl prokázán klinický přínos. Studie na jiných maligních nádorech dále pokračují [Abdelaziz a Vaishampayan 2017].

1.5.3.1. Metabolismus cabozantinibu

Metabolismus cabozantinibu byl zkoumán na zdravých dobrovolnících. V jejich plasmě, moči a stolici byly nalezeny metabolity, jejichž struktury jsou na obrázku 1.7. na straně 21. Hlavní metabolit nalezený v plasmě byl metabolit M2a viz obrázek 1.7. na straně 21. Inhibiční účinky metabolitů M2a, M7, M9 a M19 na tyrosinkinasy byly porovnány

s parentální sloučeninou, cabozantinibem. Ukázalo se, že hlavní metabolit, M2a a metabolit M7 mají minimální inhibiční účinek na tyrosinkinasy. Metabolity M9 a M19 mají vyšší hodnoty IC_{50} než cabozantinib, nicméně pořád submikromolární [Lacy a kol. 2015]. Práce Lacy a kol. 2015 však nezkoumala, jaké biotransformační enzymy se podílely na metabolismu cabozantinibu. Pozdější práce odhalila že CYP3A4 je hlavní isoformou cytochromů P450 metabolizující cabozantinib [Indra a kol. 2020].



Obrázek 1.7. Struktury metabolitů cabozantinibu nalezené v plasmě, moči a stolici zdravých dobrovolníků, převzato a upraveno z publikace Lacy a kol. 2015. GA – zbytek kyseliny glukuronové.

2. Cíle práce

Cílem předkládané diplomové práce je porovnání farmakologického účinku inhibitorů tyrosinkinas vandetanibu, lenvatinibu a cabozantinibu s jejich vybranými metabolity a zjištění, zda dochází k metabolismu inhibitorů tyrosinkinas v používané buněčné linii.

- ❖ Výběr vhodné linie buněk jako modelu pro zkoumání farmakologické účinnosti inhibitorů tyrosinkinas a jejich vybraných metabolitů.

- ❖ Stanovení vlivu inhibitorů tyrosinkinas a jejich vybraných metabolitů na viabilitu buněk.

- ❖ Stanovení vlivu inhibitorů tyrosinkinas a jejich vybraných metabolitů na expresi vybraných proteinů včetně enzymů první fáze biotransformace xenobiotik.

- ❖ Zkoumání metabolismu inhibitorů tyrosinkinas buněčnými liniemi *in vitro*.

3. Materiál a metody

3.1. Použité chemikálie

Acetonitril pro HPLC	VWR Chemicals, USA
Akrylamid	Fluka, Švýcarsko
Antibiotikum PenStrep	Biosera, Francie
Bisakrylamid	Fluka, Švýcarsko
Bafilomycin A1	Sigma-Aldrich, USA
Cabozantinib	LC Laboratories, USA
Cabozantinib- <i>N</i> -oxid	Toronto Research Chemicals, Kanada
Coomasie Brilliant Blue R250	Fluka, Švýcarsko
cOmplete™, směs proteasových inhibitorů	Roche, Švýcarsko
Deoxycholát sodný	Sigma-Aldrich, USA
Dichlormethan	Lach:Ner, ČR
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Lach:Ner, ČR
Dimethylsulfoxid pro tkáňové kultury	Sigma-Aldrich, USA
Dodecylsírán sodný (SDS)	Carl Roth, Německo
Dusík	Linde, ČR
Elektrodotový pufr, koncentrát	BioRad, USA
Ethanol, denaturovaný	Lach:Ner, ČR
Formaldehyd 36%	Lach:Ner, ČR
Fosfátový pufr s chloridem sodným (PBS)	Gibco, ThermoScientific, USA
Hovězí fetální sérum (FBS), tepelně inaktivované	Gibco, ThermoScientific, USA
Hovězí sérový albumin (BSA)	Carl Roth, Německo
Hydroxid sodný	Lach:Ner, ČR
Chlorid sodný	Lach:Ner, ČR
Kultivační médium RPMI 1640 s Glutamaxem™	Gibco, ThermoScientific, USA

Kyselina chlorovodíková	Lach:Ner, ČR
Kyselina octová	Lach:Ner, ČR
Lenvatinib	LC Laboratories, USA
Lenvatinib- <i>N</i> -oxid	Toronto Research Chemicals, Kanada
Merkaptoethanol	Carl Roth, Německo
Methanol	Penta, ČR
Methanol pro HPLC	VWR Chemicals, USA
MG-132	Sigma-Aldrich, USA
N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin (TEMED)	Fluka, Švýcarsko
Octan amonný	Lach:Ner, ČR
Odtučněné sušené mléko	BioRad, USA
Oxid uhličitý	Linde, ČR
Peroxidisíran amonný	BioRad, USA
PrestoBlue™	Invitrogen, ThermoScientific, USA
Primární králičí protilátka proti CYP1A1	Millipore, USA
Primární králičí protilátka proti CYP1B1	VWR, USA
Primární králičí protilátka proti RET	Cell Signaling Technology, USA
Primární králičí protilátka proti VEGFR2	Cell Signaling Technology, USA
Primární myší protilátka proti β -aktinu	Sigma-Aldrich, USA
Primární myší protilátka proti CYP3A4	Santa Cruz Biotechnology, USA
Přenosový pufr, koncentrát	BioRad, USA
Rapamycin	Cell Signaling Technology, USA
Sekundární kozí protilátka proti králičím imunoglobulinům značená fluoroforem AlexaFluor™ 488	ThermoScientific, USA

Sekundární kozí protilátka proti králičím imunoglobulinům značená komplexem europia	Molecular Devices, USA
Sekundární kozí protilátka proti myším imunoglobulinům značená komplexem europia	Molecular Devices, USA
Standard molekulových hmotností proteinů Precision plus protein Dual Color™	BioRad, USA
Suchý led	Linde, ČR
Tekutý dusík	Linde, ČR
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	Sigma-Aldrich, USA
Triethylamin	Sigma-Aldrich, USA
Trypsin EDTA roztok	Lonza, Švýcarsko
Tween 20	Sigma-Aldrich, USA
Vandetanib	LC Laboratories, USA
Vandetanib- <i>N</i> -oxid	Toronto Research Chemicals, Kanada
Vzorkový pufr pro elektroforézu	BioRad, USA

3.2. Použitý materiál

Buněčná špátle	TPP, Švýcarsko
Filtrační systém Express plus 0,22 μm	Millipore, USA
Kolona Nucleosil 100-5, C18, 5 μm, 4 × 100 mm	Macherey Nagel, Německo
Kolona Nucleosil 100-5, C18, 5 μm, 4,6 × 150 mm	Macherey Nagel, Německo
Kolona Nucleosil 100-5, C18, 5 μm, 4 × 250 mm	Macherey Nagel, Německo
Kultivační destička s 96 jamkami	TPP, Švýcarsko
Kultivační lahev o ploše 25 cm ²	TPP, Švýcarsko
Kultivační lahev o ploše 75 cm ²	Greiner, Německo
Kultivační miska o ploše 22,1 / 60,1 cm ²	TPP, Švýcarsko

Linie buněk 8505C	DSMZ, Německo
Linie buněk B-CPAP	DSMZ, Německo
Linie buněk BHT-101	DSMZ, Německo
Linie buněk TT	ATCC, USA
Stříkačkový filtr s porozitou membrány 0,22 µm	TPP, Švýcarsko
Zmrazovací stojan CoolCell	BioCision, USA

3.3. Použité přístroje a softwary

Analytická váha Discovery	Ohaus, Švýcarsko
Aparatura pro elektroforézu Mini Protean Tetra Cell	BioRad, USA
Aparatura pro elektropřenos Mini Trans-Blot Cell	BioRad, USA
Automatické pipety Research plus	Eppendorf, Německo
Box s laminárním prouděním vzduchu MSC12	Jouan, USA
Centrifuga Allegra X-30	Beckman Coulter, USA
Centrifuga Universal 320	Hettich, Německo
Centrifuga Universal 320R	Hettich, Německo
Čtečka SpectraMax i3x	Molecular Devices, USA
Čtečka mikrotitračních destiček VersaMax	Molecular Devices, USA
Digitální fotoaparát DS126741	Canon, Japonsko
Evaporační centrifuga CentriVap	Labconco, USA
HPLC systém DIONEX Ultimate 3000 složený z:	ThermoScientific, USA
Čerpadla RS Pump	
Podavače vzorků RS Autosampler	
Termostatu pro kolonu RS Column Compartment	
UV/VIS detektoru RS Diode Array Detector	
Detektoru fluorescence RS Fluorescence Detector	
Hypoxická komora Proox C21	Biospherix, USA
Inkubátor HeraCell Vios 160i	ThermoScientific, USA

Inkubátor Shel lab	SheldonManufacturing, USA
Konfokální mikroskop IX51	Olympus, Japonsko
Lyofilizátor LYOVAC GT 2E	Finn-Aqua, Finsko
Míchačka mikrotitračných destiček GyroTwister	Labnet, USA
Multikanálová pipeta Reference 2	Eppendorf, Německo
Ohřevný blok Dri-Bloc DB-2A	Techne, Velká Británie
pH metr HI2211	Hanna Instruments, USA
Počítadlo buněk TC20™	BioRad, USA
Průtokový cytometr FACSCelesta™	BD Biosciences, USA
Rotační míchačka Labroller II	Labnet, USA
Software Flowlogic6.0	Inivai Technologies, Austrálie
Software Chromeloen 7™	ThermoScientific, USA
Software SoftMax6.0™	Molecular Devices, USA
System k promývání membrán Snap I.D. 2.0™	Millipore, USA
Vakuová pumpa MZ 2C NT	Vacuumbrand, Německo
Vakuová pumpa TRIVAC	Leybold, Německo
Vodní lázeň JB Academy	Grant Instruments, Velká Británie
Vortex mixer	Labnet, USA
Vortex MS1	IKA, Německo
Zdroj jednosměrného elektrického proudu PowerPacBasic	BioRad, USA

3.4. Metody

3.4.1. Kultivace buněk

Linie buněk TT odvozená od medulárního karcinomu štítné žlázy, byla zakoupena od společnosti ATCC, USA. Linie nediferencovaného karcinomu štítné žlázy 8505C, málo diferencovaného karcinomu štítné žlázy B-CPAP a anaplastického karcinomu štítné žlázy BHT-101 byly koupeny z Německé kolekce mikroorganismů a buněčných kultur (DSMZ z německého Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen). Všechny výše zmíněné linie jsou lidské a rostou adherentně.

Buňky byly kultivovány v kultivačních lahvích z polystyrenu o ploše 75 cm² v kultivačním médiu RPMI 1640 glutamax™ s obsahem 1% roztoku antibiotik Penstrep (penicilin a streptomycin) a s obsahem tepelně inaktivovaného hovězího fetálního séra. Linie 8505C a B-CPAP rostly v médiu suplementovaném 10% FBS, zatímco linie BHT-101 a TT byly kultivovány v médiu s 20% FBS. Kultivace linií probíhala v inkubátoru Hera Cell Vios 160i (Thermofisher, USA) při teplotě 37°C, vlhkosti 100 % a koncentraci CO₂ 5 %.

Všechna sterilní práce s buňkami probíhala v boxu s laminárním prouděním vzduchu MSC12 (Jouan, USA)

3.4.2. Subkultivace buněk

Když buňky pokryly povrch kulivační lahve z asi 70-80% byly subkultivovány. Subkultivace neboli „pasážování“ bylo provedeno následovně. Médium bylo sterilně vylito z lahve a buňky byly dvakrát důkladně omyty roztokem PBS. Následně byly buňky omyty roztokem trypsinu s EDTA. Přebytek roztoku byl vylit z lahve a buňky byly inkubovány v inkubátoru při 37°C. Když trypsin a EDTA oddělily buňky z povrchu, bylo přidáno kompletní médium. Buňky byly suspendovány na jednobuněčnou suspenzi serologickou pipetou opakovaným nasáváním a vypouštěním. Buňky byly rozděleny do dalších kultivačních lahví, zředěny vhodným kompletním médiem a vráceny do inkubátoru. Kultivace probíhala v inkubátoru Hera Cell Vios 160i (Thermofisher, USA) při teplotě 37°C, vlhkosti 100 % a koncentraci CO₂ 5 %. Na pokusy byly používány buňky z maximálně desáté subkultivace.

3.4.3. Rozmrazování buněk

Alikvot buněk uskladněný v parách kapalného dusíku se nechal roztát na vodní lázni o teplotě 37°C. Následně byl ihned smíchán s 5 ml kompletního média předeřátého na teplotu 37°C v centrifugační zkumavce o objemu 15 ml. Buňky byly odděleny centrifugací při zrychlení 300× g po dobu 3 minut na centrifuze Universal 320 (Hettich, Německo). Médium obsahující zbytky kryoprotektantu bylo odstraněno. Buňky byly resuspendovány serologickou pipetou v 8 ml kompletního média a přeneseny do kultivační lahve o ploše 25 cm². Kultivace probíhala v inkubátoru Hera Cell Vios 160i (ThermoFisher, USA) při teplotě 37°C, vlhkosti 100 % a koncentraci CO₂ 5 %.

3.4.4. Zamrazování buněk

Buňky byly převedeny do suspenze podle postupu popsaného v kapitole 3.4.2. na straně 28. Suspenze buněk byla centrifugována v centrifuze Universal 320 (Hettich, Německo) po dobu 3 minut při zrychlení 300× g. Médium bylo odděleno od pelety buněk. Ta byla resuspendována v kompletním kultivačním médiu pro příslušnou linii buněk viz 3.4.1. na straně 28 s 10% DMSO jako kryoprotektantem. Suspenze buněk byla alikvotována do zmrazovacích zkumavek. Ty byly vloženy do zamrazovacího stojanu CoolCell (BioCision, USA) a vloženy do hluboko mrazícího boxu s teplotou -80 °C. Zamražené buňky byly skladovány v Dewarově nádobě v parách nad kapalným dusíkem.

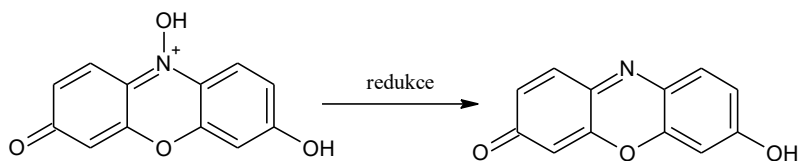
3.4.5. Zkoumání exprese tyrosinokinas v buněčných liniích

Suspenze buněk byla připravena podle postupu v části 3.4.2. na straně 28. Na misku o kultivační ploše 60,1 cm² bylo pipetováno 11 ml suspenze buněk o koncentraci 1·10⁵ buněk/ml v případě linií buněk 8505C a B-CPAP, v případě linie BHT-101 byla koncentrace 2·10⁵ buněk/ml a v případě linie TT byla koncentrace 4·10⁵ buněk/ml. Buňky byly kultivovány 72 hodin v inkubátoru HeraCell Vios 160i (ThermoScientific, USA) při 37°C, s 5 % CO₂, 100% vlhkostí a s atmosférickou koncentrací kyslíku i paralelně v hypoxické komoře Proox C21 s 1 % kyslíku (Biospherix, USA) umístěné v inkubátoru Shel lab (Sheldon Manufacturing, USA).

Po ukončení doby inkubace byly buňky mechanicky „sklizeny“ špátlí (TPP, Švýcarsko) a miska byla vymyta studeným PBS. Buňky byly odděleny centrifugací při zrychlení $300\times g$ po dobu 3 minut na centrifuze Universal 320 (Hettich, Německo). Médium bylo odděleno a buňky 2-krát promyty PBS. Peleta buněk byla zamrzána a uchovávána při -80°C .

3.4.6. Stanovení vlivu tyrosinkinasových inhibitorů a jejich vybraných metabolitů na viabilitu buněk

Viabilita buněk byla stanovena pomocí sledování redukčního prostředí buněk. Bylo k tomuto použito činidlo PrestoBlue™ obsahující resazurin, který je v živých buňkách redukován širokou škálou redukovadel jako NADH, NADPH, FADH, FMNH a redukované cytochromy. Reakcí vzniká resorufin, který na rozdíl od resazurinu, jenž nefluoreskuje má silnou fluorescenci [Rampersad 2012]. Schéma redukce resazurinu na resorufin je znázorněna na obrázku č. 3.1.



Obrázek č. 3.1. Schéma redukce resazurinu na resorufin v živých buňkách.

Tyrosinkinasové inhibitory vandetanib, lenvatinib a cabozantinib i jejich *N*-oxidy byly rozpuštěny v DMSO na 5 mM roztok a sterilizovány filtrací přes stříkačkový filtr o velikosti pórů $0,22\ \mu\text{m}$ (TPP, Švýcarsko) do sterilních zkumavek. Zásobní roztoky byly skladovány při teplotě -20°C v mrazáku chráněné před světlem.

Testy viability byly prováděny v 96 jamkových destičkách (TPP, Švýcarsko). Do prvního z 12 sloupců jamek bylo pipetováno pouze kompletní médium o objemu $100\ \mu\text{l}$, které slouží pro odečtení pozadí. Do zbylých sloupců bylo pipetováno $50\ \mu\text{l}$ média. Zásobní roztoky TKIs a jejich metabolitů byly zředěny kompletním médiem. Roztoky v médiu o objemu $50\ \mu\text{l}$ byly pipetovány v kvadrupletech do 12. sloupce jamek na destičky. Po důkladném promíchání obsahu jamky bylo $50\ \mu\text{l}$ přeneseno do 11. sloupce jamek. Analogicky se postupovalo až do třetího sloupce, z kterého bylo po promíchání odebráno $50\ \mu\text{l}$ média. Tímto postupem bylo dvojkovou ředící řadou získáno 10 koncentrací zkoumaných

sloučenin. Nejvyšší finální koncentrace vandetanibu a vandetanib-*N*-oxidu byla 100 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$. Lenvatinib, lenvatinib-*N*-oxid, cabozantinib a cabozantinib-*N*-oxid byly používány v maximální koncentraci 40 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$. Důvodem použití nižších koncentrací je tvorba krystalů lenvatinibu, cabozantinibu a cabozantinib-*N*-oxidu v médiu při vyšších koncentracích.

Suspenze TT buněk byla připravena pomocí trypsin-EDTA roztoku podle postupu popsaneho v části 3.4.2. strana 28. Buňky v suspenzi byly spočítány počítadlem buněk TC20™ (Bio-Rad, USA). Suspenze byla naředěna kompletním médiem tak aby koncentrace buněk byla $4 \cdot 10^5$ buněk/ml. Do druhého až dvanáctého sloupce jamek bylo pipetováno 50 μl buněčné suspenze. Každá z těchto jamek obsahovala 20 000 buněk.

Buňky byly kultivovány 72 hodin v inkubátoru HeraCell Vios 160i (ThermoScientific, USA) při 37°C, s 5 % CO₂, 100% vlhkostí a s atmosferickou koncentrací kyslíku i paralelně v hypoxické komoře Proox C21 s 1 % kyslíku (Biospherix, USA) umístěné v inkubátoru Shel lab (Sheldon Manufacturing, USA). Po inkubaci bylo do každé jamky přidáno 5 μl činidla PrestoBlue™ (Invitrogen, USA). Kultivace s činidlem probíhala 30 minut za stejných podmínek jako inkubace se zkoumanými látkami. Po inkubaci byla změřena fluorescence na čtečce SpectraMax i3x (Molecular Devices, USA) při excitační vlnové délce 565 nm, a emisní 610 nm. Detekce probíhala u dna kultivační destičky. Hodnoty koncentrace sloučenin, které snížili růst buněk o 50 % v porovnání s kontrolou (EC₅₀), byly vypočítány programem SoftMax6.0™ (Molecular Devices, USA). Grafické zpracování dat bylo provedeno programem Microsoft Excel 2016.

3.4.7. Stanovení vlivu tyrosinkinasových inhibitorů a jejich vybraných metabolitů na expresi vybraných proteinů a zkoumání metabolismu těchto látek

Suspenze TT buněk byla připravena podle postupu v kapitole 3.4.2. na straně 28. Na misku o kultivační ploše 60,1 cm² bylo pipetováno 5,5 ml suspenze buněk o koncentraci $1 \cdot 10^6$ buněk/ml. K suspenzi bylo přidáno 5,5 ml média s obsahem zkoumaných látek. Ve výsledku bylo, smícháním s buněčnou suspenzí dosaženo finálních koncentrací zkoumaných látek uvedených v tabulce 3.1. na straně 32. Kontrolní vzorek obsahoval pouze kompletní médium s DMSO.

Buňky byly kultivovány 72 hodin v inkubátoru HeraCell Vios 160i (ThermoScientific, USA) při 37°C, s 5 % CO₂, 100% vlhkostí a s atmosférickou koncentrací kyslíku i paralelně v hypoxické komoře Proox C21 s 1 % kyslíku (Biospherix, USA) umístěné v inkubátoru Shel lab (Sheldon Manufacturing, USA).

Po ukončení doby inkubace byly buňky mechanicky „sklizeny“ špátlí (TPP, Švýcarsko), miska byla vymyta studeným PBS. Buňky byly odděleny centrifugací při zrychlení 300× g po dobu 3 minut, centrifuga Universal 320 (Hettich, Německo). Médium bylo odděleno a buňky 2-krát promyty PBS. Peleta buněk byla zamrazena a uchovávána při -80°C.

Kontrolní buňky byly vystaveny pouze DMSO v médiu. Druhá sada kontrolních vzorků neobsahovala buňky, ale pouze média se zkoumanými sloučeninami nebo DMSO. „Sklízení“ buněk pro analýzu metabolitů je popsáno v kapitole 3.4.15. na straně 40.

Tabulka 3.1. Koncentrace tyrosinkinasových inhibitorů používaných pro inhibiční pokusy. Používané koncentrace zkoumaných látek vycházejí ze zaokrouhlených hodnot EC₅₀ v hypoxii.

Zkoumaná sloučenina	Finální koncentrace / [μmol/dm ³]
Vandetanib	2
Vandetanib- <i>N</i> -oxid	2
Lenvatinib	1,75
Lenvatinib- <i>N</i> -oxid	1,75
Cabozantinib	7
Cabozantinib- <i>N</i> -oxid	7

3.4.8. Stanovení vlivu tyrosinkinasových inhibitorů a jejich vybraných metabolitů na expresi VEGFR2 průtokovou cytometrií

Vzorky byly připraveny podle postupu v kapitole 3.4.7. na straně 31, s následujícími změnami. Suspenze buněk o koncentraci $8 \cdot 10^5$ buněk/ml a objemu 2 ml byla v kultivační misce o povrchu $22,1 \text{ cm}^2$ smíchána s 2 ml média s obsahem lenvatinibu nebo lenvatinib-*N*-oxidu. Koncentrace jsou uvedeny v tabulce 3.1. na straně 32. Kontrolní vzorky obsahovaly pouze DMSO. Pro každou zkoumanou situaci (kontrola, lenvatinib, lenvatinib-*N*-oxid) bylo připraveno 7 paralelních vzorků, 4 vzorky k normoxické kultivaci a 3 ke kultivaci v hypoxii s 1 % kyslíku.

Po kultivaci, která proběhla za výše popsaných podmínek, byly buňky „sklizeny“. Všechno médium bylo přeneseno do zkumavky a buňky v misce byly 2-krát omyty 1 ml PBS. PBS z promývání bylo přidáno k médiu ve zkumavce. Buňky byly uvolněny inkubací s 1 ml roztoku trypsinu a EDTA. Buňky byly suspendovány promícháním s médiem. Buňky byly odděleny centrifugací při zrychlení $300 \times g$ po dobu 3 minut na centrifuze Universal 320 (Hettich, Německo). Médium bylo odděleno a buňky 2-krát promyty PBS. Za stálého míchání na vortexu (Labnet, USA) byl k buňkám přidán 1 ml 4% formaldehydu v PBS. Fixace probíhala 10 minut při laboratorní teplotě. Formaldehyd byl separován centrifugací za výše popsaných podmínek. Buňky byly promyty PBS a permeabilizovány přidáním 1 ml ledového, 90% methanolu po kapkách za stálého míchání na vortexu (Labnet, USA). Permeabilizace probíhala přes noc v mrazáku při -20°C .

Druhý den byly buňky 2-krát promyty 1 ml PBS aby se zbavily zbytků methanolu. Monoklonální králičí protilátka proti VEGFR2 byla zředěna 1:200 0,5% BSA v PBS. Peleta buněk byla suspendována v 50 μl zředěné protilátky a inkubována 60 minut při laboratorní teplotě. Buňky byly 2-krát promyty 1 ml 0,5% BSA v PBS. Buňky byly 30 minut inkubovány se sekundární protilátkou (kozí sekundární protilátka proti králičím imunoglobulinům značená AlexaFlourem 488™ ředění 1:400 0,5% BSA v PBS) ve tmě. Po promytí 1 ml 0,5% BSA v PBS byly suspendovány ve 300 μl PBS a následně analyzovány na průtokovém cytometru. Kontrolní vzorek u každé zkoumané situace (kontrola, lenvatinib, lenvatinib-*N*-oxid) byl připraven bez primární protilátky. Tento vzorek byl použit pro nastavení průtokového cytometru a zároveň pro vyloučení nespecifické vazby sekundární protilátky. Průtokový cytometr FACSCelesta™ (BD Biosciences, USA) byl nastaven na střední rychlost toku vzorku. Fluorofor byl excitován modrým laserem o vlnové délce

488 nm, detekce emise probíhala v kanálu 530 ± 30 nm. Analýza byla provedena na 10000 buňkách v každém vzorku. Data byla analyzována softwarem Flowlogic6.0 (Inivai Technologies, Austrálie).

3.4.9. Stanovení reversibility změn exprese VEGFR2

Kontrolní buňky a buňky vystavené lenvatinibu a jeho *N*-oxidu byly připraveny jako v kapitole 3.4.7. na straně 31 s následujícími změnami. Suspenze buněk o koncentraci $1 \cdot 10^6$ buněk/ml a objemu 2 ml byla v kultivační misce o povrchu $22,1 \text{ cm}^2$ smíchána s 2 ml media s obsahem lenvatinibu nebo lenvatinib-*N*-oxidu, koncentrace jsou uvedeny v tabulce 3.1. na straně 32. Kontrolní vzorky obsahovaly pouze DMSO. Pro každou zkoumanou situaci (kontrola, lenvatinib, lenvatinib-*N*-oxid) byli připraveny 2 paralelní vzorky.

Kultivace probíhala 72 hodin v inkubátoru HeraCell Vios 160i (ThermoScientific, USA) při 37°C , s 5 % CO_2 , 100% vlhkostí a s atmosférickou koncentrací kyslíku. Polovina vzorků byla mechanicky „sklizena“ jako v kapitole 3.4.7. na straně 31. Druhé části vzorků bylo sterilně odděleno médium a buňky byly jemně omyty 1 ml kompletního média. Do misky byly pipetovány sterilně 4 ml kompletního media a následně byly buňky dalších 72 hodin kultivovány za výše popsaných podmínek. Zbytek buněk byl po ukončení kultivace mechanicky „sklizen“ viz výše.

3.4.10. Zkoumání mechanismu snížení exprese VEGFR2

Suspenze TT buněk byla připravena podle postupu v části 3.4.2. na straně 28. Na kultivační misku o ploše $22,1 \text{ cm}^2$ bylo nasazeno 5 ml suspenze buněk o koncentraci $4 \cdot 10^5$ buněk/ml. Buňky byly 3 dny kultivovány v inkubátoru HeraCell Vios 160i (ThermoScientific, USA) při 37°C , s 5 % CO_2 , 100% vlhkostí a s atmosférickou koncentrací kyslíku. Po 3 dnech bylo médium kompletně odsáto a nahrazeno 4 ml kultivačního média s obsahem zkoumaných látek a jejich kombinací. Koncentrace jsou uvedeny v tabulce 3.2. na straně 35. Kontrolní vzorky obsahovaly pouze DMSO. Buňky pak byly kultivovány 24 hodin za výše uvedených podmínek.

Po ukončení doby inkubace byly buňky mechanicky „sklizeny“ špátlí (TPP, Švýcarsko) a miska byla vymyta studeným PBS. Buňky byly odděleny centrifugací při zrychlení

300× g po dobu 3 minut na centrifuze Universal 320 (Hettich, Německo). Médium bylo odděleno a buňky 1-krát promyty ledovým PBS. Peleta buněk byla zamrazena a uchovávána při -80°C.

Tabulka 3.2. Používané koncentrace látek pro zkoumání mechanismu snížení exprese VEGFR2

Použitá látka	Koncentrace
Lenvatinib	1,75 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$
Bafilomycin A1	10 nmol/dm^3
MG-132	1 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$
Rapamycin	100 nmol/dm^3

3.4.11. Izolace proteinů

Lyzační pufr RIPA: 125 mmol/dm^3 NaCl, 25 mmol/dm^3 Tris, 1 % Triton X-100, 0,5 % deoxycholát sodný, 0,1 % SDS pH 7,5

Těsně před izolací proteinu byl připraven kompletní lyzační pufr RIPA s obsahem proteasového inhibitoru Complete™ a inhibitoru fosfatů PhosSTOP™, podle protokolu výrobce.

Zmražené buňky byly na ledu smíchány s kompletním lyzačním pufrem o objemu přibližně 3-násobku objemu pelety buněk. Buňky byly lyzovány na ledu 45 minut. Suspenze byla centrifugována 20 minut při 20000× g a teplotě 4°C v centrifuze Universal 320R (Hettich, Německo). Supernatant byl přenesen do nových mikrozkušavek, zamražen a uchováván při teplotě -80°C.

3.4.12. Stanovení koncentrace proteinů

Použité roztoky:

DC Protein assay činidla A, S, B

Standardní roztoky BSA ve vodě: 0,125 ; 0,25 ; 0,50 ; 0,75 ; 1,00 ; 1,50 ; 2,00 ; 2,80 mg/ml

Vzorky lyzátů buněk v RIPA pufru byly 10-krát zředěny deionizovanou vodou. Do jamek mikrotitrační destičky bylo pipetováno 5 μ l blanku, standardů a zředěných lyzátů. Blank a standardy se pipetovali v duplikátech a vzorky v triplikátech. Činidla A a S byla smíchána v poměru 50:1. Do jamek se pipetovalo 25 μ l směsi činidel A a S a následně 200 μ l činidla B. Reakce probíhala 15 minut za míchání ve tmě na míchačce mikrotitračních destiček GyroTwister (Labnet, USA). Následně byla změřena absorbance při 750 nm na spektrofotometru VersaMax (Molecular Devices, USA). Koncentrace proteinů byly vypočteny programem SoftMax (Molecular Devices, USA).

3.4.13. Separace proteinů elektroforézou v přítomnosti dodecylsírany sodného na polyakrylamidovém gelu

Použité roztoky:

Polymerační roztok: 38,67 % akrylamid, 1,33 % bis-akrylamid

Pufr A: 1,5 mol/dm³ Tris pH 8,8

Pufr B: 1,0 mol/dm³ Tris pH 6,8

10% SDS

10% peroxidisíran amonný

Elektrodový pufr: 192 mmol/dm³ glycin, 25 mmol/dm³ Tris, 0,1 % SDS pH 8,3, připraven zředěním koncentrátu

Redukující vzorkový pufr 4× koncentrovaný Laemmli Sample Buffer, Bio-Rad

Gely:

10 % separační gel: 4,79 ml deionizovaná voda, 2,5 ml polymerační roztok, 2,5 ml pufr A, 100 µl 10% SDS, 10 µl TEMED, 100 µl 10% peroxodisíran amonný

6 % zaostřovací gel: 2,89 ml deionizovaná voda, 750 µl polymerační roztok, 1,25 ml pufr B, 50 µl 10% SDS, 10 µl TEMED, 50 µl 10% peroxodisíran amonný

Vzorky o známé koncentraci proteinů byly smíchány s deionizovanou vodou a redukujícím vzorkovým pufrům tak, aby vzorek měl objem 16 µl. Pokud není uvedeno jinak, vzorek obsahoval 40 µg proteinu na jamku. Směs byla inkubována při teplotě 100°C po dobu 5 minut na ohřevném bloku DB-2A (Techne, Velká Británie). Pak byly vzorky uloženy na led.

Skla aparatury pro elektroforézu Mini Protean Tetra Cell (BioRad, USA), byly důkladně očištěny deionizovanou vodou a ethanolem. Po úplném usušení byla skla sestavena v aparatuře na nalévání gelů. První byl připraven separační gel. V kádince byla smíchána voda, polymerační roztok, pufr A, roztok SDS, TEMED a na závěr roztok peroxodisíranu amonného. Přesné objemy složek jsou uvedeny výše. Směs byla rychle promíchána a nalita mezi skla tak, aby sahala asi 1 cm pod úroveň „hřebenu“ a byla převrstvena deionizovanou vodou. Polymerace probíhala asi 30 minut při laboratorní teplotě.

Přebytečná voda byla odstraněna z povrchu gelu. Mezi skla byla až po okraj nalita směs na zaostřovací gel, která byla připravena analogickým způsobem jako v případě separačního gelu, jen za použití pufru B. Přesné objemy složek jsou uvedeny výše. Mezi skla byl vložen „hřeben“. Polymerace probíhala asi 15 minut.

„Hřeben“ byl vytažen z gelu a skla s gelem byla vložena do aparatury na elektroforézu. Prostor mezi skly a spodní prostor aparatury byly naplněny elektrodovým pufrům. Do první jamky na gelu byly pipetovány 4 µl standardu molekulových hmotností proteinů Precision protein plus Dual Color (Bio-Rad, USA). Do ostatních jamek v gelu bylo pipetováno 16 µl roztoku vzorku. Aparatura byla uzavřena a připojena na zdroj stejnosměrného elektrického proudu PowerPac Basic (BioRad, USA). Elektroforéza probíhá s konstantním proudem 40 mA/gel. Dokud linie indikátoru vzorkového pufru nedosáhla po spodní hranu skla. Gel byl dále použit pro elektropřenos proteinů na membránu.

3.4.14. Přenos proteinů z gelu po elektroforéze na membránu elektrickým proudem s následnou imunodetekcí „Western blotting“

Použité roztoky:

Přenosový pufr: 192 mmol/dm³ glycin, 25 mmol/dm³ Tris, 10 % methanol pH 8,3, připraven zředěním koncentrátu

TBS pufr: 137 mmol/dm³ NaCl, 20 mmol/dm³ Tris pH 7,6

TBS pufr s Tweenem 20 (TBST): 137 mmol/dm³ NaCl, 20 mmol/dm³ Tris, 0,1 % Tween 20, pH 7,6

Blokovací roztok A: 5 % BSA v TBST

Blokovací roztok B: 5 % odtučněné sušené mléko v TBST

Roztok pro sekundární protilátku: 0,1% BSA v TBST

Barvicí lázeň: 0,25 % Coomassie Brilliant Blue R-250, 45 % methanol, 10 % kyselina octová

Odbarvovací lázeň: 25 % ethanol, 10 % kyselina octová

Odmývací roztok: 0,5 mol/dm³ NaCl, 0,5 mol/dm³ kyselina octová

Primární protilátky:

monoklonální anti-RET, králíčí, ředěna 1:1000 v 5% BSA v TBST

monoklonální anti-VEGFR2, králíčí, ředěna 1:1000 5% BSA v TBST

polyklonální anti-CYP1A1, králíčí, ředěna 1: 1000 v 5% odtučněném sušeném mléce v TBST

monoklonální anti-CYP3A4, myší, ředěna 1: 500 v 5% odtučněném sušeném mléce v TBST

polyklonální anti-POR, králíčí, ředěna 1: 500 v 5% odtučněném sušeném mléce v TBST

monoklonální anti-β-aktin myší, ředěna 1: 3000 v 5% odtučněném sušeném mléce v TBST

Sekundární protilátky:

kozi anti-Ig králíka, konjugovaná s komplexem europia, ředěna 1: 5000 v 0,1% BSA v TBST

kozi anti-Ig myši, konjugovaná s komplexem europia, ředěna 1: 5000 v 0,1% BSA v TBST

Po elektroforéze byl gel vyňat ze skel a omyt přenosovým puftrem. Do aparatury na elektropřenos byla na černou plochu položena vláknitá podložka s „blotovacím“ papírem nasáknutá přenosovým puftrem. Pak následoval gel. Na gel byla položena membrána z nitrocelulózy s póry velikosti 0,2 μm nasáknutá přenosovým puftrem. Pak byla umístěna vrstva papíru a vláknitá podložka, obě nasáknuté přenosovým puftrem. Případné vzduchové bubliny byly odstraněny válečkem. Kazeta byla uzavřena a vložena do aparatury pro elektropřenos Mini Trans-Blot Cell (BioRad, USA) s chladicí vložkou. Aparatura byla naplněna studeným přenosovým puftrem, uzavřena a připojena ke zdroji stejnosměrného elektrického proudu. Přenos probíhal za konstantního proudu 400 mA v lednici po dobu 80 minut. Membrána byla následně vyjmuta z aparatury a omyta TBS roztokem. Membrána byla rozstřížena na poloviny podél standardu molekulových hmotností odpovídající 75 kDa. Blokování probíhalo hodinu na míchačce mikrotitračních destiček GyroTwister (Labnet, USA) v blokovacím roztoku A nebo B podle doporučení výrobce protilátky nebo na základě optimalizace viz tabulka 3.3. na straně 40. Gel byl pro kontrolu přenosu barven 60 minut v barvicí lázni a následně odbarven v odbarvovací lázni. Zablokovaná membrána byla třikrát promyta roztokem TBST po dobu 5 minut. Membrána byla vložena do centrifugační zkumavky o objemu 50 ml se 4 ml roztoku primární protilátky, která byla naředěna na výše uvedenou koncentraci. Inkubace probíhala přes noc v lednici na rotační míchačce LabRoller (Labnet, USA).

Druhý den byla membrána umístěna do vložky aparatury na promývání membrán, Snap ID 2.0 TM (Millipore, USA). Membrána byla promyta TBST puftrem. Na membránu bylo nalito 5 ml roztoku sekundární protilátky v roztoku pro sekundární protilátku, inkubace probíhala 10 minut při laboratorní teplotě. Přebytek roztoku byl odsán, membrána byla promyta 3-krát TBST puftrem a vyjmuta z aparatury. Membrána byla zabalena do plastové fólie, umístěna do držáku pro skenování membrán a vložena do Spectra Max i3x (Molecular Devices, USA). Detekce byla provedena excitačním zářením o vlnové délce 340 nm, emitované záření bylo detekováno při 616 nm. Membrána byla zdokumentována v programu Soft MaxTM (Molecular Devices, USA).

Protilátky z membrány byly odstraněny inkubací v odmyvacím roztoku po dobu 8 minut za míchání na míchačce GyroTwister (Labnet, USA). Pak byla membrána 2-krát omyta TBS roztokem, blokována v blokovacím roztoku B 60 minut, 3-krát omyta TBST roztokem a 1 hodinu inkubována s protilátkou proti β -aktinu při laboratorní teplotě. Detekce, vizualizace a dokumentace β -aktinu na membráně byla vykonána podle výše uvedeného postupu.

Tabulka 3.3. Použité blokovací roztoky podle protilátek

Blokovací roztok A (5% BSA v TBST pufri)	Blokovací roztok B (5% odtučněné sušené mléko v TBST pufri)
anti-RET anti-VEGFR2	anti- β -aktin anti-CYP1A1 anti-CYP3A4 anti-POR

3.4.15. Analýza metabolitů vandetanibu, lenvatinibu a cabozantinibu a jejich *N*-oxidů v kultivačním médiu a buňkách

Buňky byly připraveny podle kapitoly 3.4.7. na straně 31, byly mechanicky „sklizeny“ špátlí (TPP, Švýcarsko) a přeneseny s celým objemem média do 15ml centrifugační zkumavky. Miska byla 2-krát omyta 2,5 ml ledového PBS, které bylo přidáno do zkumavky. Buňky byly separovány centrifugací při 300× g v centrifuze Universal 320 (Hettich, Německo) po dobu 3 minut. Médium bylo odděleno do nové zkumavky a pelety buněk byly použity ke zkoumání exprese proteinů. Médium bylo zamrazeno při -20°C a za stejných podmínek uskladněno do analýzy. Kontrolní vzorky neobsahovaly buňky, ale pouze kompletní kultivační médium.

Deproteinizace média byla provedena podle [Sádecká a Purdešová 2012]. Jeden objemový díl studeného média byl smíchán s jeden a půl násobným objemem studeného acetonitrilu pro HPLC. Po promíchání na vortexu MS1 (IKA, Německo) byla směs 10 minut inkubována při laboratorní teplotě. Precipitát proteinů byl oddělen 5 minutovou centrifugací při 4000×g v centrifuze Allegra X-30 (Beckman Coulter, USA). Supernatant byl přenesen do baňky s kulatým dnem. Precipitát byl smíchán s 2 ml acetonitrilu pro HPLC a centrifugován za výše popsaných podmínek. Supernatant s přidaným acetonitrem byl v tenké vrstvě namrazen na stěny baňky otáčením baňky pomožené v lázni z ethanolu se suchým ledem. Deproteinované médium bylo lyofilizováno 60 minut na lyofilizátoru LYOVAC GT 2E (Finn-Aqua, Finsko). Zbytek po lyofilizaci byl rozmrazen a přenesen do zkumavky. Baňka byla 2-krát promyta 50 % acetonitrem pro HPLC. Extrakce byla provedena 3 ml dichlormethanu v případě vandetanibu a vandetanib-*N*-oxidu, pro ostatní

látky byl použit ethyl-acetát. Směs byla 1 minutu míchána na vortexu MS1 (IKA, Německo) a fáze byly odděleny centrifugací při 4000× g po dobu 5 minut v centrifuze Allegra X-30 (Beckman Coulter, USA). Organická fáze byla oddělena a extrakce opět provedena 3 ml příslušného organického rozpouštědla. Spojené organické fáze byly odpařeny v evaporační centrifuze CentriVap Concentrator (Labconco, USA) a do analýzy uskladněny při -20°C v mrazáku.

3.4.15.1. Separace metabolitů vandetanibu

Odparky byly rozpuštěny v 50 µl methanolu pro HPLC. Nástřik na kolonu byl 20 µl. Separace probíhala za použití kolony NUCLEOSIL 100-5, C18 (Macherey Nagel, Německo) o rozměrech 250 × 4 mm, naplněné oktadecylovaným oxidem křemičitým o velikosti zrn 5 µm. Eluce probíhala isokraticky, při průtoku mobilní fáze 0,6 ml/minuta. Detekce byla prováděna při 254 nm. Mobilní fáze obsahovala 30 % acetonitrilu pro HPLC v pufru obsahujícím 0,5 % triethylaminu o pH 3,0. pH bylo upraveno roztokem HCl. Eluce probíhala 30 minut. Vandetanib byl detekován kolem 7,8 minuty a vandetanib-*N*-oxid kolem 8,7 minuty.

3.4.15.2. Separace metabolitů lenvatinibu

Odparky byly rozpuštěny v 50 µl methanolu pro HPLC. Nástřik na kolonu byl 20 µl. Separace probíhala za použití kolony NUCLEOSIL 100-5, C18 Macherey Nagel, o rozměrech 150 × 4 mm, naplněné oktadecylovaným oxidem křemičitým o velikosti zrn 5 µm. Detekce byla prováděna při 254 nm. Eluce probíhala isokraticky, rychlost průtoku mobilní fáze byla 0,7 ml/minuta. Mobilní fáze obsahovala 70 % methanolu pro HPLC v pufru obsahujícím 0,125 mM octan amonný o pH 4,0. pH bylo upraveno roztokem kyseliny octové. Eluce probíhala 30 minut, lenvatinib byl detekován kolem 7,5 minuty a lenvatinib-*N*-oxid kolem 5. minuty

3.4.15.3. Separace metabolitů cabozantinibu

Odparky byly rozpuštěny v 50 μ l methanolu pro HPLC. Nástřik na kolonu byl 20 μ l. Separace probíhala za použití kolony NUCLEOSIL 100-5, C18 Macherey Nagel, o rozměrech 150 \times 4,6 mm, naplněné oktadecylovaným oxidem křemičitým o velikosti zrn 5 μ m. Detekce byla prováděna při 254 nm. Eluce probíhala isokraticky, při průtoku mobilní fáze 1 ml/minuta. Mobilní fáze obsahovala 60 % acetonitrilu v pufru 5mM octanu amonného o pH 5,0. pH bylo upraveno roztokem kyseliny octové. Eluce probíhala 30 minut. Cabozantinib byl detekován kolem 7. minuty a cabozantinib-*N*-oxid kolem 5. minuty

3.4.16. Analýza dat

Hodnoty EC₅₀ při stanoveních viabilitu TT buněk byly stanoveny pomocí programu SoftMax 6.0TM s funkcí pro analýzu viability buněk.

Vyhodnocení chromatogramů zaznamenané HPLC systémem bylo provedeno v programu Chromeleon 7TM (Thermo Scientific, USA). Identifikace látek na chromatogramu byla provedena srovnáním retenčních časů, s retenčními časy standardů, které byly stanoveny v průběhu toho jistého měření.

Data z průtokové cytometrie byla zpracována v programu Flowlogic6.0 (Inivai Technologies, Austrálie)

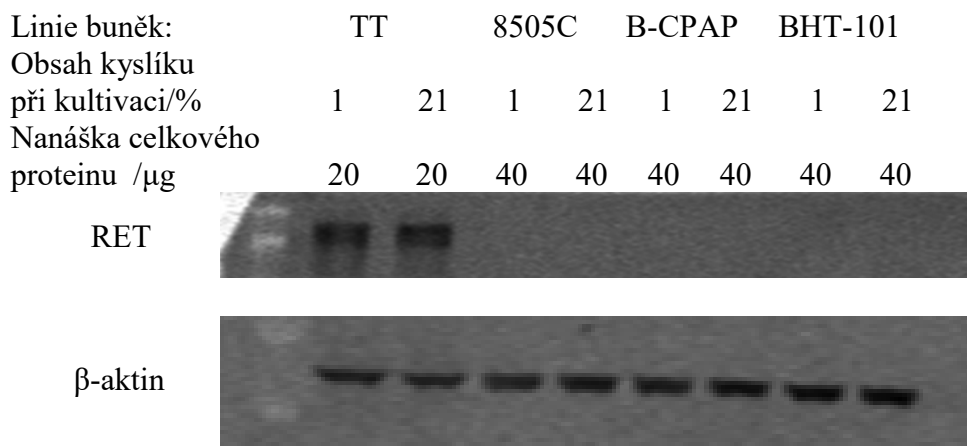
Statistická analýza dat byla provedena pomocí *F*-testu a Studentova *t*-testu v programu MS Excel 2016TM. Hodnota $P < 0,05$ byla považována za signifikantní (*), hodnota $P < 0,01$ byla považována za velice signifikantní (**), a hodnota $P < 0,001$ byla výrazně signifikantní (***).

4. Výsledky

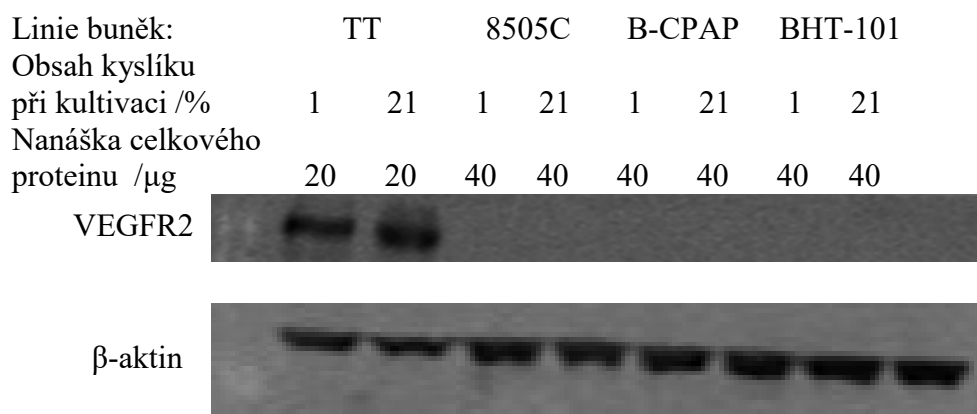
4.1. Výběr experimentálního modelu

Vandetanib, lenvatinib a cabozantinib inhibují širokou škálu tyrosinkinasy. Dvě receptorové tyrosinkinasy jsou však inhibovány všemi třemi zkoumanými látkami. Jedná se o RET a VEGFR2 [Lacy a kol. 2015], [Matsui a kol. 2008], [Okamoto a kol. 2013], [Wedge a kol. 2002] a [Yakes a kol. 2011]. RET a VEGFR2 proto byly zvoleny jako cíle dalších experimentů.

Expresce RET a VEGFR2 byla zkoumána u čtyř buněčných linií odvozených od nádorů štítné žlázy, konkrétně linie TT (medulární karcinom štítné žlázy), 8505C (nediferencovaný karcinom štítné žlázy), B-CPAP (málo diferencovaný papilární karcinom štítné žlázy) a BHT-101 (anaplastický karcinom štítné žlázy). Na obrázcích 4.1. a 4.2. na straně 44 je zřejmé, že RET a VEGFR2 jsou exprimovány pouze v linii TT buněk. Ostatní linie buněk tyto receptorové tyrosinkinasy neexprimují. Z tohoto důvodu byly všechny následující experimenty provedeny na linii TT buněk. Změny exprese VEGFR2 i RET nebyly na základě dat získaných obrazovou analýzou záznamu z imunodetekcí (data nejsou uvedena) signifikantně odlišné mezi normoxickými a hypoxickými podmínkami kultivace.



Obrázek 4.1. Imunodetekce RET a β -aktinu v lyzátech buněk. Ukázka membrány po elektropřenosu proteinů metodou „western blotting“. Detekce proteinů v lyzátech buněk proběhla pomocí primárních protilátek proti RET a β -aktinu, vizualizace byla provedena pomocí detekce fluorescence sekundární protilátky značené komplexem europia. Buněčné linie: TT – medulární karcinom štítné žlázy, 8505C – nediferencovaný karcinom štítné žlázy, B-CPAP – málo diferencovaný papilární karcinom štítné žlázy a BHT-101 – anaplastický karcinom štítné žlázy.



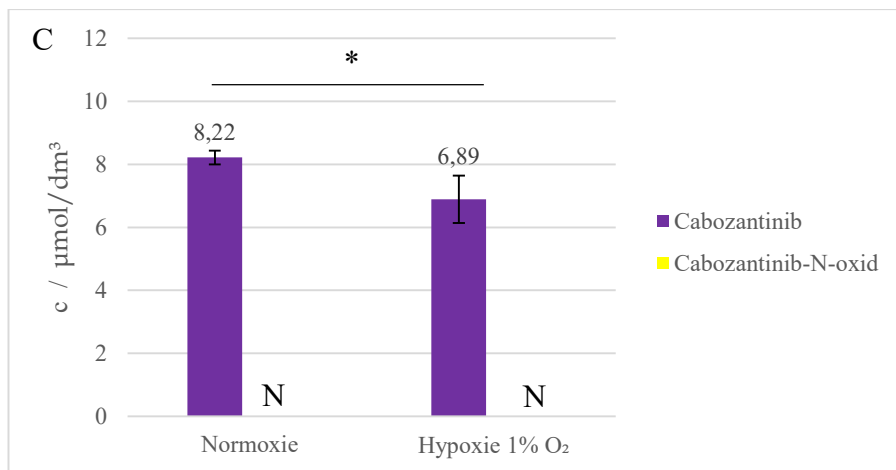
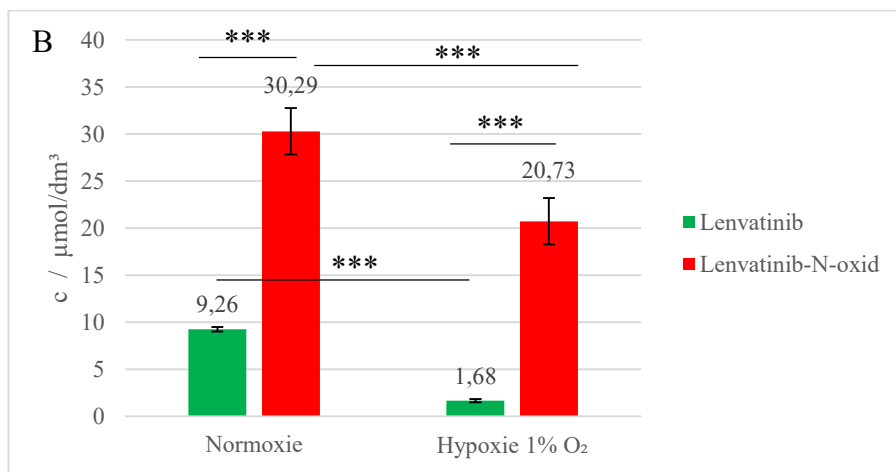
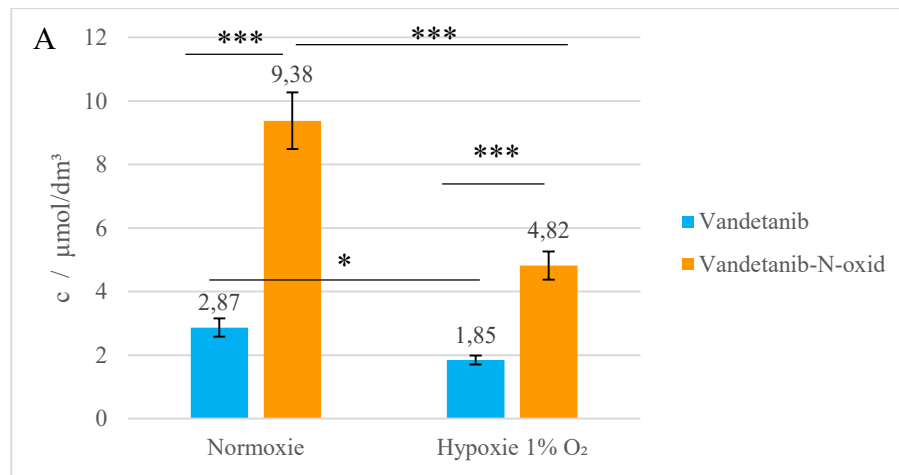
Obrázek 4.2. Imunodetekce VEGFR2 a β -aktinu v lyzátech buněk. Ukázka membrány po elektropřenosu proteinů metodou „western blotting“. Detekce proteinů v lyzátech buněk proběhla pomocí primárních protilátek proti VEGFR2 a β -aktinu, vizualizace byla provedena pomocí detekce fluorescence sekundární protilátky značené komplexem europia. Buněčné linie: TT – medulární karcinom štítné žlázy, 8505C – nediferencovaný karcinom štítné žlázy, B-CPAP – málo diferencovaný papilární karcinom štítné žlázy a BHT-101 – anaplastický karcinom štítné žlázy.

4.2. Vliv tyrosinkinasový inhibitorů a jejich *N*-oxidů na viabilitu TT buněk

Vliv zkoumaných látek na viabilitu TT buněk byl hodnocen pomocí hodnot EC_{50} , což je koncentrace látky, která způsobí snížení viability buněk na polovinu v porovnání s kontrolními buňkami, které nebyly exponovány zkoumané látce. Hodnoty EC_{50} testovaných látek jsou uvedeny v obrázcích 4.3. A – C na straně 45.

Vandetanib-*N*-oxid je méně cytotoxický v porovnání s vandetanibem, přičemž rozdíl hodnot EC_{50} je výrazně signifikantní v normoxii i hypoxii. Hypoxické podmínky s 1 % kyslíku signifikantně zvýšily cytotoxicitu vandetanibu v porovnání s normoxií obrázek 4.3. A na straně 45.

Lenvatinib je výrazně signifikantně toxičtější v hypoxických podmínkách než v normoxii, což platí i pro jeho metabolit, lenvatinib-*N*-oxid. Lenvatinib-*N*-oxid je zároveň méně cytotoxický než lenvatinib v normoxii i hypoxii, obrázek 4.3. B na straně 45.



Obrázek 4.3. Koncentrace zkoumaných látek, které snížily viabilitu buněk na 50% v porovnání s kontrolou, v normoxických i hypoxických podmínkách vandetanibu a vandetanib-*N*-oxidu (A), lenvatinibu a lenvatinib-*N*-oxidu (B) a cabozantinibu a cabozantinib-*N*-oxidu (C). Uvedené hodnoty jsou průměrem tří až pěti nezávislých experimentů. Data byla analyzována pomocí Studentova *t*-testu, *** $P < 0,001$; ** $P < 0,01$; * $P < 0,05$; N - neurčeno. Byly analyzovány rozdíly hodnot EC_{50} mezi parentálními sloučeninami resp. metabolity v normoxii a hypoxii. Analyzovány byly i rozdíly hodnot EC_{50} mezi parentální látkou a metabolitem v normoxii resp. hypoxii.

Cytotoxicita cabozantinibu byla signifikantně vyšší v hypoxii v porovnání s normoxickými podmínkami, obrázek 4.3. C na straně 45. Hodnota EC_{50} cabozantinib-N-oxidu nebyla stanovena z důvodu tvorby krystalů při koncentracích nad $50 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$, přičemž tato koncentrace nebyla dostatečně toxická, aby vyvolala snížení viability TT buněk na polovinu v porovnání s kontrolou. Krystaly cabozantinib-N-oxidu jsou zdokumentovány na obrázku 4.4.

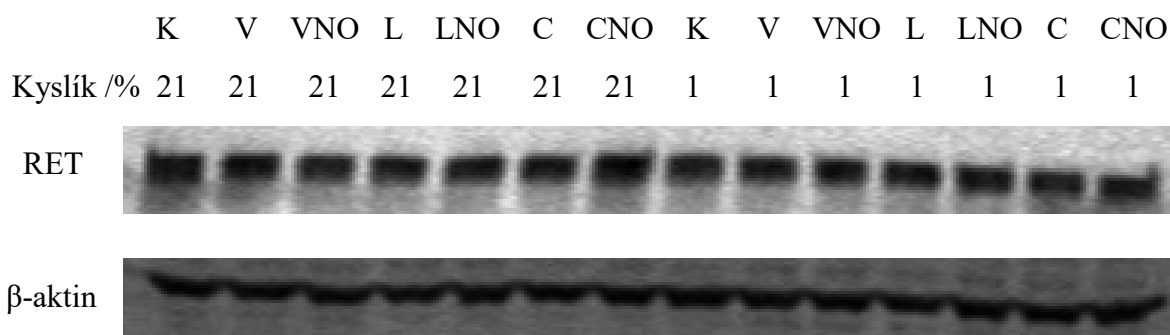


Obrázek 4.4. Krystaly cabozantinib-*N*-oxidu v médiu po 72 hodinové kultivaci s buňkami při 40-násobném zvětšení. Koncentrace cabozantinib-*N*-oxidu v čase přípravy vzorku byla $100 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$.

4.3. Vliv tyrosinkinasových inhibitorů a jejich *N*-oxidů na expresi RET a VEGFR2

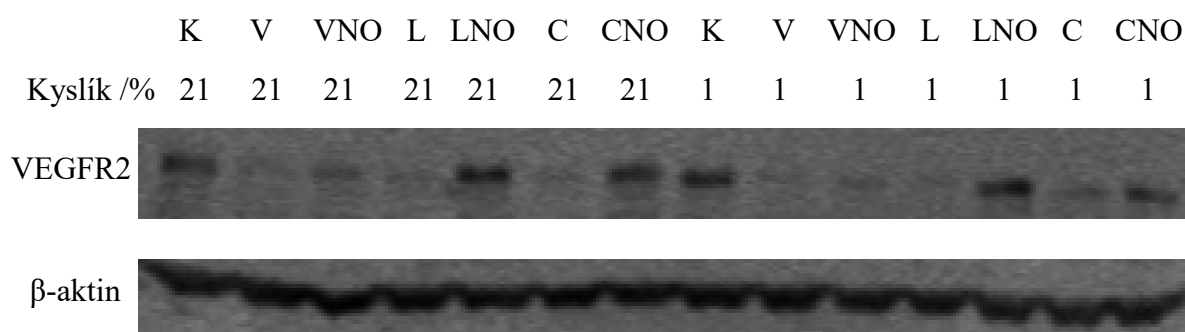
Expresí receptorových tyrosinkinas RET a VEGFR, které jsou farmakologickými cíli vandetanibu, lenvatinibu a cabozantinibu, byla v lyzátech TT buněk zkoumána pomocí „western blottingu“.

Tyrosinkinasa RET po 72 hodinové kultivaci s vandetanibem, lenvatinibem, cabozantinibem a jejich *N*-oxidy, v normoxických i hypoxických podmínkách s 1 % kyslíku nejevila žádné známky změny exprese obr. 4.5. na straně 47.



Obrázek 4.5. Imunodetekce RET a β-aktinu v lyzátech TT buněk po 72 hodinové kultivaci se zkoumanými sloučeninami v normoxii (21 % kyslíku) nebo hypoxii (1 % kyslíku). Ukázka membrány po elektropřenosu proteinů metodou „western blotting“. Detekce proteinů v lyzátech buněk proběhla pomocí primárních protilátek proti RET a β-aktinu, vizualizace byla provedena pomocí detekce fluorescence sekundární protilátky značené komplexem europia. K - kontrola (médiu s obsahem DMSO), V - vandetanib (2 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$), VNO – vandetanib-*N*-oxid (2 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$), L - lenvatinib (1,75 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$), LNO - lenvatinib-*N*-oxid (1,75 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$), C - cabozantinib (7 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$), CNO - cabozantinib-*N*-oxid (7 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$)

Další zkoumanou receptorovou tyrosinkinasou je VEGFR2. Její exprese je na rozdíl od výše zmíněné kinasy RET výrazně ovlivněna. Na obrázku 4.6. je zaznamenáno snížení exprese VEGFR2 po expozici vandetanibu, vandetanib-*N*-oxidu, lenvatinibu a canbozantinibu. Snížení exprese se projevilo bez ohledu na to, zda buňky byly kultivovány v normoxických nebo hypoxických podmínkách.



Obrázek 4.6. Imunodetekce VEGFR2 a β-aktinu v lyzátech TT buněk po 72 hodinové kultivaci se zkoumanými sloučeninami v normoxii (21 % kyslíku) nebo hypoxii (1 % kyslíku). Ukázka membrány po elektropřenosu proteinů metodou „western blotting“. Detekce proteinů v lyzátech buněk proběhla pomocí primárních protilátek proti VEGFR2 a β-aktinu, vizualizace byla provedena pomocí detekce fluorescence sekundární protilátky značené komplexem europia. K - kontrola (médiu s obsahem DMSO), V - vandetanib (2 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$), VNO – vandetanib-*N*-oxid (2 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$), L - lenvatinib (1,75 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$), LNO - lenvatinib-*N*-oxid (1,75 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$), C - cabozantinib (7 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$), CNO - cabozantinib-*N*-oxid (7 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$)

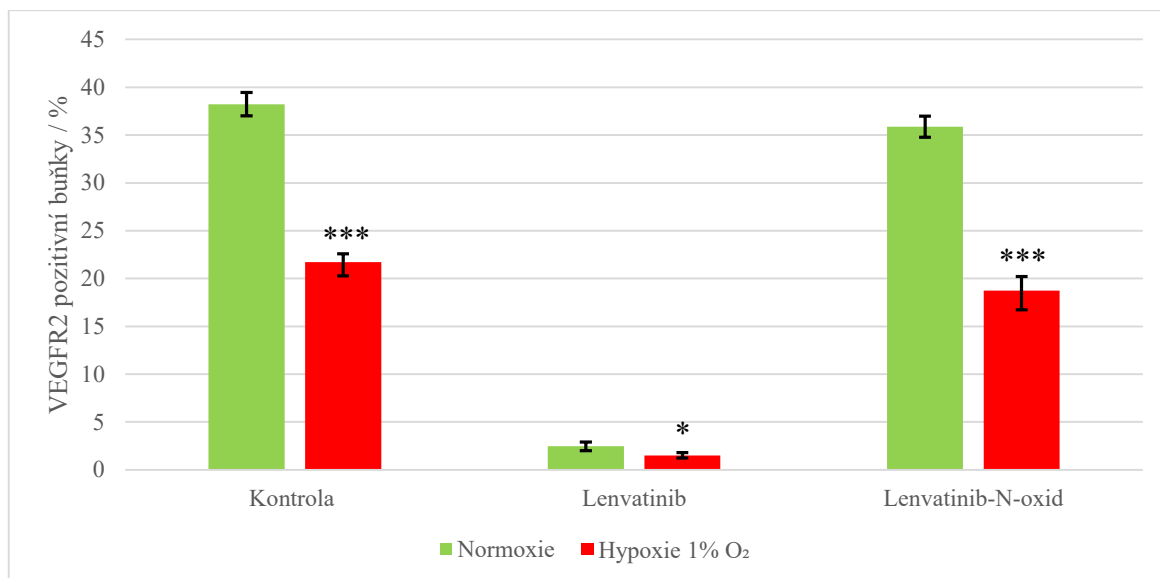
Podrobnější pokusy objasňující změny exprese VEGFR2 byly prováděny pouze u dvojice látek lenvatinib, lenvatinib-*N*-oxid z důvodu, že lenvatinib má nejvyšší rozdíl cytotoxicity při srovnání normoxických a hypoxických podmínek.

Expres VEGFR2 byla analyzována i citlivější metodou schopnou analyzovat populaci buněk, průtokovou cytometrií. Fixované a permeabilizované buňky byly inkubovány s primární protilátkou proti VEGFR2 a následně sekundární protilátkou značenou fluoroforem. Expres VEGFR2 byla v každém případě (kontrola, lenvatinib, lenvatinib-*N*-oxid) vztažena k další kontrole, která nebyla inkubována s primární, ale pouze se sekundární protilátkou. Cílem bylo vyloučení vlivu nespecifické vazby sekundární protilátky, která by mohla vyvolat falešnou pozitivitu. Souhrn výsledků průtokové cytometrie je na obrázku 4.7. na straně 49.

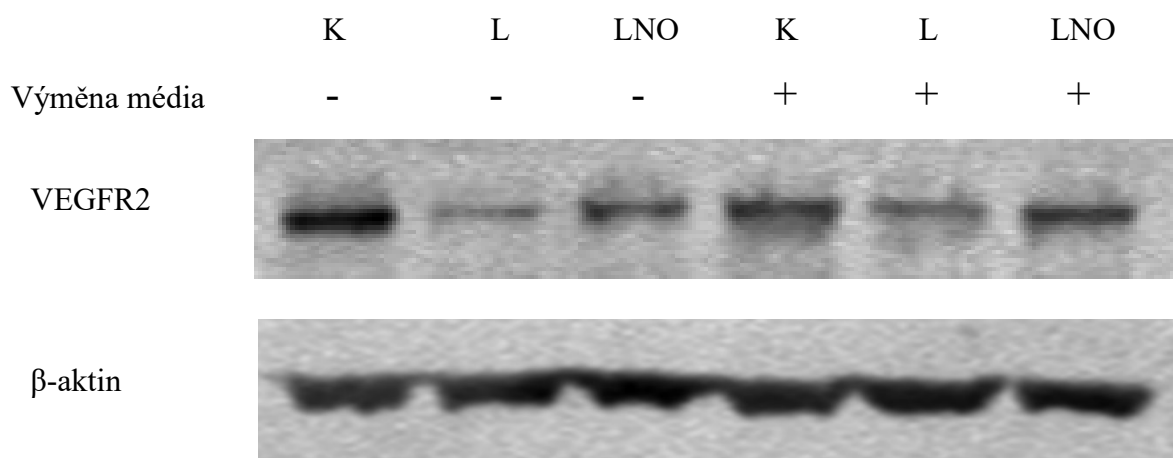
Analýza dat z průtokové cytometrie ukazuje, že podíl TT buněk exprimujících VEGFR2 se snížil asi o 40 % v hypoxických podmínkách v porovnání s normoxickými. Toto snížení je statisticky signifikantní v případě lenvatinibu a výrazně signifikantní u kontroly a lenvatinib-*N*-oxidu (obr. 4.7. strana 49).

Lenvatinib snižuje počet VEGFR2 exprimujících buněk v normoxii i v hypoxii. Tato změna je statisticky výrazně signifikantní (obr. 4.7. strana 49). Snížení exprese VEGFR2 je proporční při srovnání normoxických a hypoxických podmínek a je asi 93%. Lenvatinib-*N*-oxid neměl žádný signifikantní vliv ($P \sim 0,06$) na populaci TT buněk exprimujících VEGFR2 v normoxii i hypoxii.

Změna exprese VEGFR2 není reverzibilní, buňky exponované lenvatinibu po dobu 72 hodin měly sníženou expresi VEGFR2 v porovnání s kontrolou a lenvatinib-*N*-oxidem. Po výměně média za nové médium bez lenvatinibu nedošlo u buněk, které byly vystaveny lenvatinibu, po 72 hodinách k obnovení exprese VEGFR2. Expres VEGFR2 v buňkách vystavených lenvatinib-*N*-oxidu nebyla výměnou média výrazně ovlivněna (obr. 4.8. na straně 49).



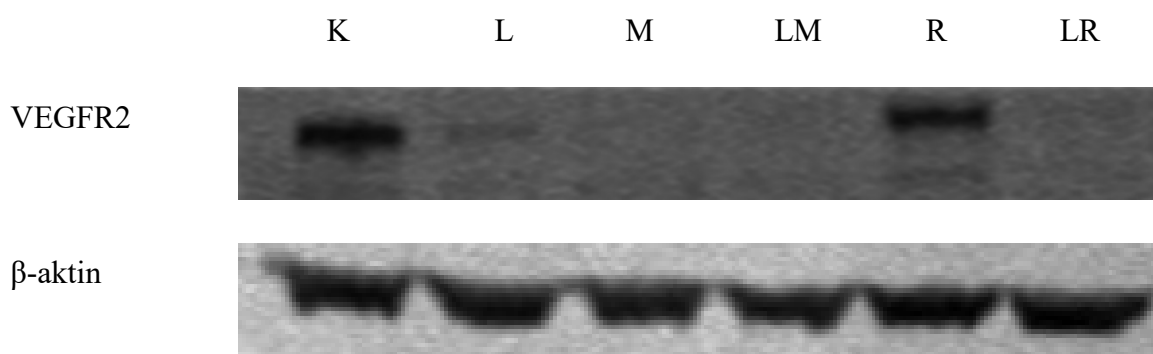
Obrázek 4.7. Exprese VEGFR2 v populaci TT buněk analyzována průtokovou cytometrií se statistickou analýzou srovnávající normoxické a hypoxické podmínky. Kontrola je médium s obsahem DMSO, lenvatinib (1,75 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$), lenvatinib-*N*-oxid (1,75 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$). Data z tří paralelních měření byla analyzována pomocí Studentova *t*-testu * $P < 0,001$; ** $P < 0,01$; * $P < 0,05$;**



Obrázek 4.8. Imunodetekce VEGFR2 a β -aktinu v lyzátech TT buněk po 72 hodinové kultivaci se zkoumanými sloučeninami v normoxii a po dalších 72 hodinách v čistém kompletním médiu. Ukázka membrány po elektropřenosu proteinů metodou „western blotting“. Detekce proteinů v lyzátech buněk proběhla pomocí primárních protilátek proti VEGFR2 a β -aktinu, vizualizace byla provedena pomocí detekce fluorescence sekundární protilátky značené komplexem europia. K - kontrola (médium s obsahem DMSO), L - lenvatinib (1,75 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$), LNO - lenvatinib-*N*-oxid (1,75 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$). – nebyla výměna média, + médium bylo vyměněno za nové kompletní médium

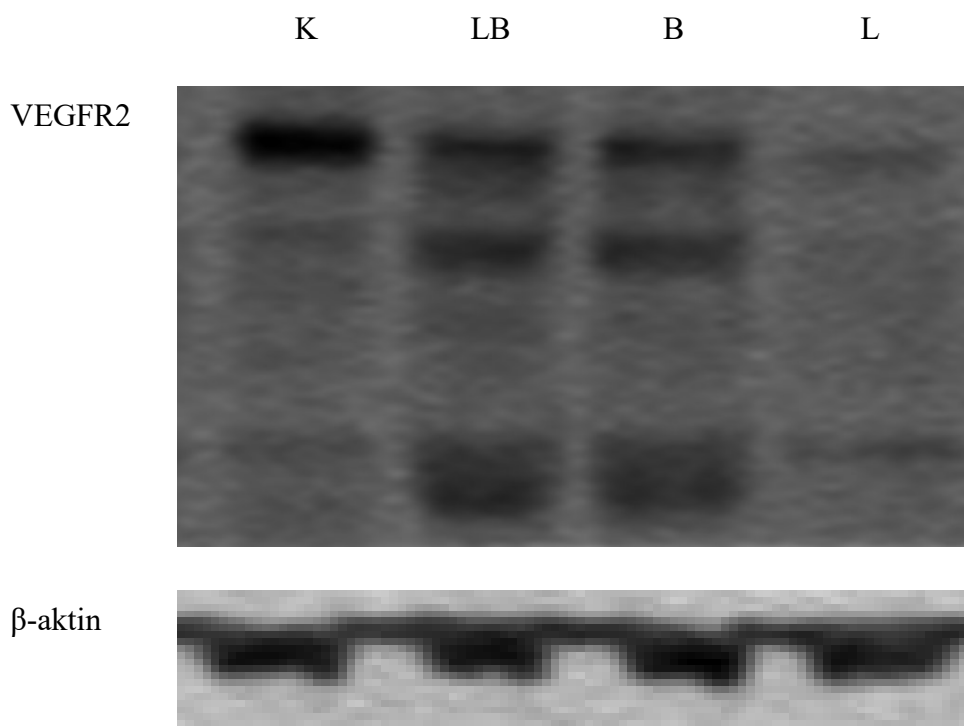
Pro objasnění mechanismu snížení exprese VEGFR2 byly použity inhibitory nebo induktory vybraných buněčných procesů. Sloučenina MG-132 je účinným inhibitorem proteasomu [Tsubuki a kol. 1996]. Rapamycin je inhibitorem mTOR kinasy, která zabraňuje autofagii, reguluje metabolismus buňky a proteosynthesu [Li a kol. 2014]. Bafilomycin A1 je specifickým inhibitorem V-ATPasy lysosomů, čímž inhibuje acidifikaci a degradaci proteinů v lysozomech [Yoshimori a kol. 1991].

Lenvatinib snižuje expresi VEGFR2. Inhibitor proteasomu MG-132 samostatně i v kombinaci s lenvatinibem snižuje expresi VEGFR2 na téměř nedetekovatelnou úroveň. Rapamycin podporující autofagii mírně snížil VEGFR2, přičemž kombinace rapamycinu s lenvatinibem snížila expresi VEGFR2 na prakticky nedetekovatelnou úroveň, viz obrázek 4.9.



Obrázek 4.9. Imunodetekce VEGFR2 a β-aktinu v lyzátech TT buněk po 24 hodinové kultivaci se zkoumanými sloučeninami v normoxii. Ukázka membrány po elektropřenosu proteinů metodou „western blotting“. Detekce proteinů v lyzátech buněk proběhla pomocí primárních protilátek proti VEGFR2 a β-aktinu, vizualizace byla provedena pomocí detekce fluorescence sekundární protilátky značené komplexem europia. K - kontrola (médiu s obsahem DMSO), L - lenvatinib (1,75 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$), M – MG-132 (1 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$), LM - lenvatinib (1,75 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$) a MG-132 (1 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$), R – rapamycin (100 nmol/dm^3), LR - lenvatinib (1,75 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$) a rapamycin (100 nmol/dm^3),

Bafilomycin A1 inhibuje lysosomální degradaci VEGFR2 a tím způsobil, že byly detekovány i fragmenty VEGFR2 s nižší molekulovou, které jsou viditelné jako dva níže položené signály na membráně. Lenvatinib v kombinaci s bafilomycinem A1 neměl za následek snížení množství VEGFR2 v porovnání se samotným bafilomycinem A1. (obr. 4.10. na straně 51).

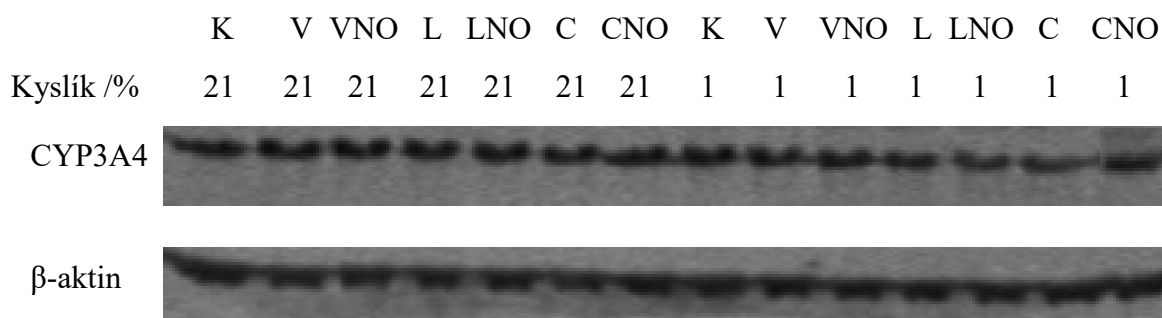


Obrázek 4.10. Imunodetekce VEGFR2 a β-aktinu v lyzátech TT buněk po 24 hodinové kultivaci se zkoumanými sloučeninami v normoxii. Ukázka membrány po elektropřenosu proteinů metodou „western blotting“. Detekce proteinů v lyzátech buněk proběhla pomocí primárních protilátek proti VEGFR2 a β-aktinu, vizualizace byla provedena pomocí detekce fluorescence sekundární protilátky značené komplexem europia. K - kontrola (médiu s obsahem DMSO), LB - lenvatinib ($1,75 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$) a bafilomycin A1 ($10 \text{ nmol}/\text{dm}^3$), B – bafilomycin A1 ($10 \text{ nmol}/\text{dm}^3$), L - lenvatinib ($1,75 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$)

4.4. Vliv tyrosinkinasový inhibitorů a jejich *N*-oxidů na expresi biotransformačních enzymů

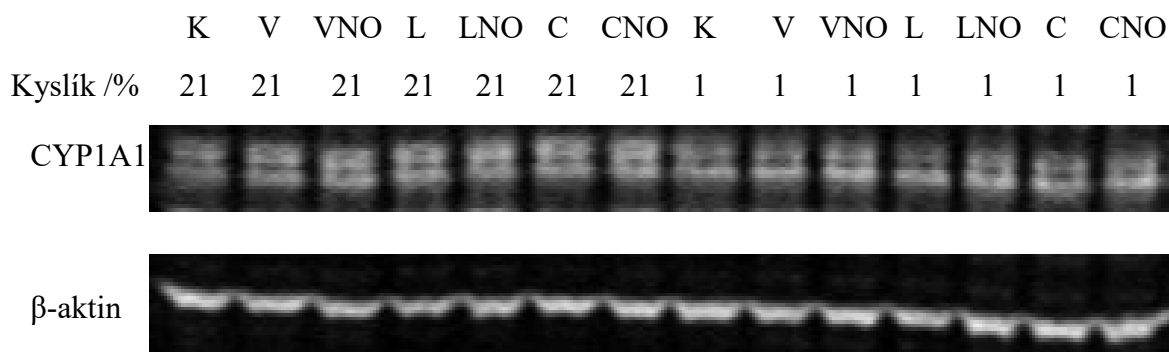
Vliv inhibitorů tyrosinkinas na expresi biotransformačních enzymů byl zkoumán za pomoci „western blottingu“. Expze byla sledována po 72 hodinové expozici inhibitorům a jejich *N*-oxidům.

Jak bylo již v teoretickém úvodu zmíněno, metabolismus vandetanibu, lenvatinibu a cabozantinibu probíhá zejména za katalýzy CYP3A4. Na obrázku 4.11. na straně 52 je viditelné, že vandetanib, lenvatinib, cabozantinib a jejich *N*-oxidy nemají vliv na expresi CYP3A4 v normoxických i hypoxických podmínkách.

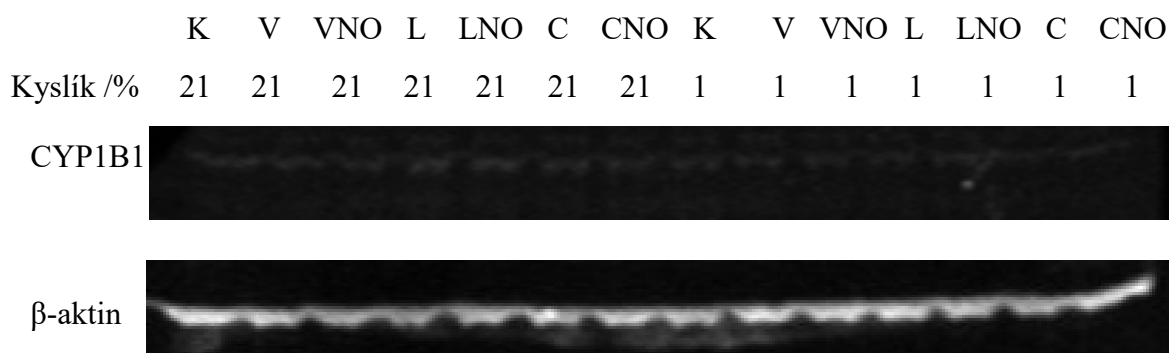


Obrázek 4.11. Imunodetekce CYP3A4 a β-aktinu v lyzátech TT buněk po 72 kultivaci se zkoumanými sloučeninami v normoxii (21 % kyslíku) nebo hypoxii (1 % kyslíku). Ukázka membrány po elektropřenosu proteinů metodou „western blotting“. Detekce proteinů v lyzátech buněk proběhla pomocí primárních protilátek proti CYP3A4 a β-aktinu, vizualizace byla provedena pomocí detekce fluorescence sekundární protilátky značené komplexem europia. K - kontrola (médiu s obsahem DMSO), V - vandetanib (2 μmol/dm³), VNO – vandetanib-*N*-oxid (2 μmol/dm³), L - lenvatinib (1,75 μmol/dm³), LNO - lenvatinib-*N*-oxid (1,75 μmol/dm³), C - cabozantinib (7 μmol/dm³), CNO - cabozantinib-*N*-oxid (7 μmol/dm³)

Dále byla zkoumána exprese CYP1A1 a CYP1B1. Analogicky jako v případě CYP3A4 vandetanib, lenvatinib, cabozantinib a jejich *N*-oxidy nezpůsobily změny exprese CYP1A1 v normoxický i hypoxických podmínkách, obr. 4.12. Exprese CYP1B1 byla na hranici detekovatelnosti, (obr. 4.13. na straně 53).

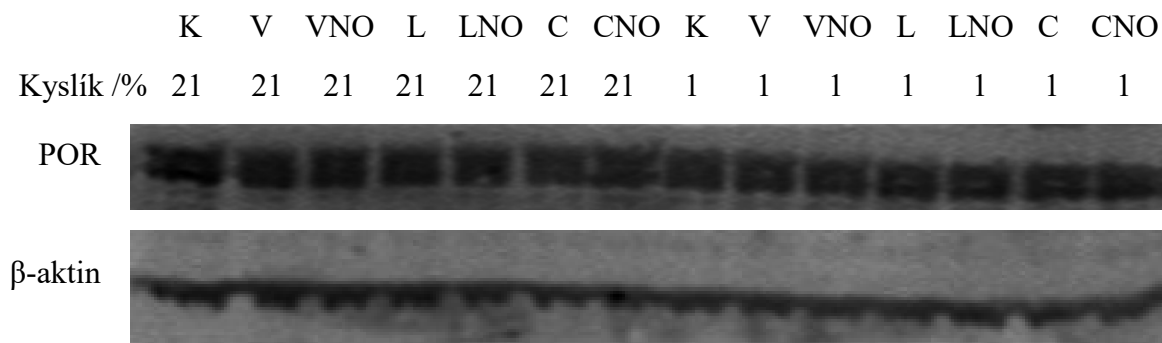


Obrázek 4.12. Imunodetekce CYP1A1, a β-aktinu v lyzátech TT buněk po 72 kultivaci se zkoumanými sloučeninami v normoxii (21 % kyslíku) nebo hypoxii (1 % kyslíku). Ukázka membrány po elektropřenosu proteinů metodou „western blotting“. Detekce proteinů v lyzátech buněk proběhla pomocí primárních protilátek proti CYP1A1 a β-aktinu, vizualizace byla provedena pomocí detekce fluorescence sekundární protilátky značené komplexem europia. K - kontrola (médiu s obsahem DMSO), V - vandetanib (2 μmol/dm³), VNO – vandetanib-*N*-oxid (2 μmol/dm³), L - lenvatinib (1,75 μmol/dm³), LNO - lenvatinib-*N*-oxid (1,75 μmol/dm³), C - cabozantinib (7 μmol/dm³), CNO - cabozantinib-*N*-oxid (7 μmol/dm³)



Obrázek 4.13. Imunodetekce CYP1B1 a β-aktinu v lyzátech TT buněk po 72 kultivaci se zkoumanými sloučeninami v normoxii (21 % kyslíku) nebo hypoxii (1 % kyslíku). Ukázka membrány po elektropřenosu proteinů metodou „western blotting“. Detekce proteinů v lyzátech buněk proběhla pomocí primárních protilátek proti CYP1B1 a β-aktinu, vizualizace byla provedena pomocí detekce fluorescence sekundární protilátky značené komplexem europia. K - kontrola (médium s obsahem DMSO), V - vandetanib (2 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$), VNO – vandetanib-*N*-oxid (2 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$), L - lenvatinib (1,75 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$), LNO - lenvatinib-*N*-oxid (1,75 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$), C - cabozantinib (7 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$), CNO - cabozantinib-*N*-oxid (7 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$)

Poslední zkoumaný enzym asociovaný s biotransformací xenobiotik byla reduktasa cytochromů P450. Tyrosinkinase inhibitory a jejich metabolity neměly efekt na míru exprese POR viz obr. 4.14.



Obrázek 4.14. Imunodetekce POR a β-aktinu v lyzátech TT buněk po 72 kultivaci se zkoumanými sloučeninami v normoxii (21 % kyslíku) nebo hypoxii (1 % kyslíku). Ukázka membrány po elektropřenosu proteinů metodou „western blotting“. Detekce proteinů v lyzátech buněk proběhla pomocí primárních protilátek proti POR a β-aktinu, vizualizace byla provedena pomocí detekce fluorescence sekundární protilátky značené komplexem europia. K - kontrola (médium s obsahem DMSO), V - vandetanib (2 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$), VNO – vandetanib-*N*-oxid (2 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$), L - lenvatinib (1,75 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$), LNO - lenvatinib-*N*-oxid (1,75 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$), C - cabozantinib (7 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$), CNO - cabozantinib-*N*-oxid (7 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$)

4.5. Metabolismus vandetanibu, lenvatinibu, cabozantinibu a jejich *N*-oxidů v TT buňkách

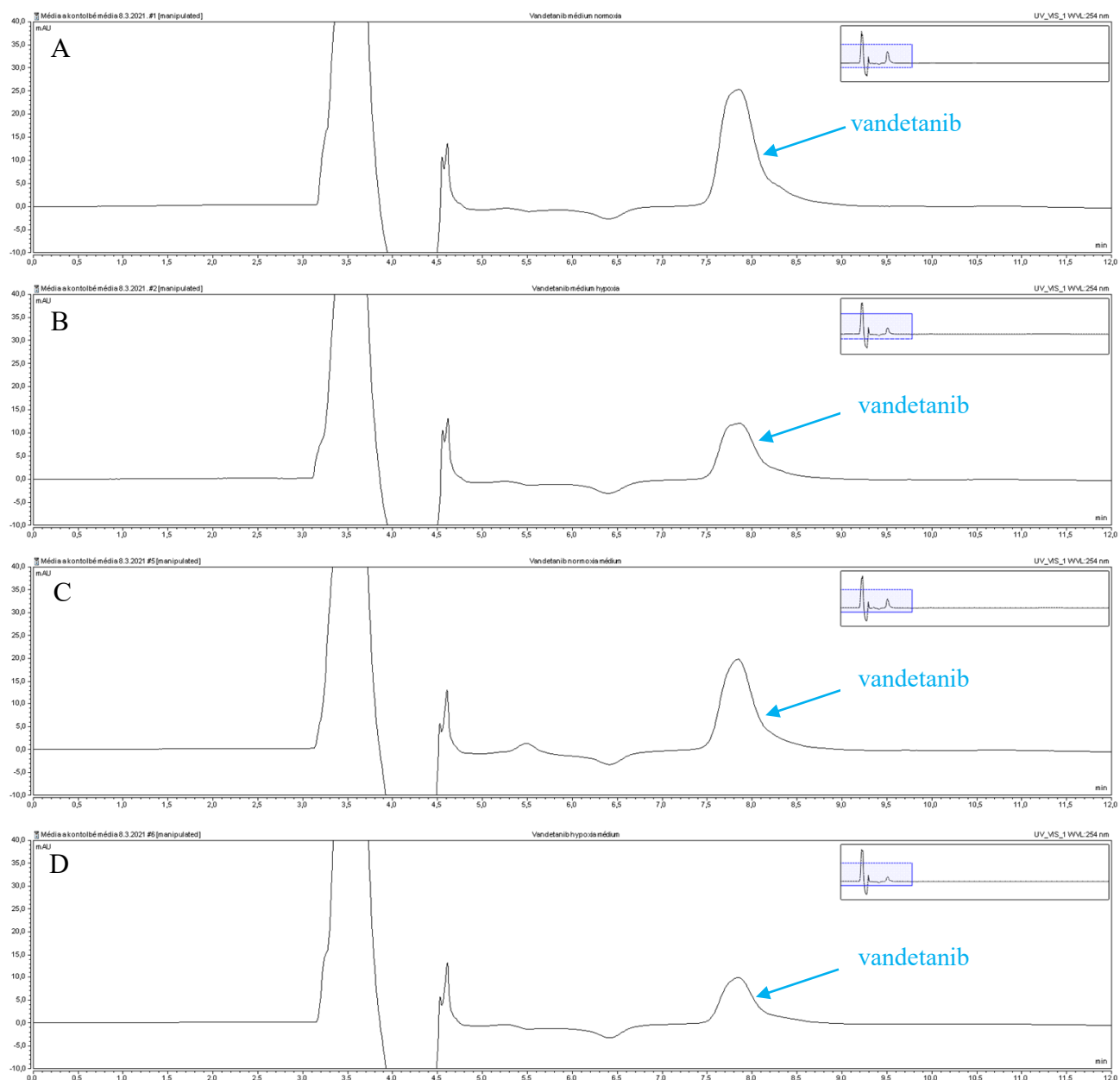
Vysoko účinná kapalinová chromatografie (HPLC) vzorků médií, které obsahovaly vandetanib viz obr. 4.15. na straně 55, nedetekovala přítomnost metabolitů vandetanibu jak v normoxickém prostředí tak v hypoxii s 1 % kyslíku.

Na chromatogramech vzorků médií obsahujících vandetanib-*N*-oxid jsou přítomny dva píky. Pík s retenčním časem asi 7,8 minuty je vandetanib, pík s retenčním časem asi 8,7 minuty připadá vandetanib-*N*-oxidu. Vandetanib byl detekován ve všech vzorcích bez ohledu na přítomnost buněk. Tato skutečnost naznačuje kontaminaci vandetanib-*N*-oxidu vandetanibem (obr. 4.16. na straně 56).

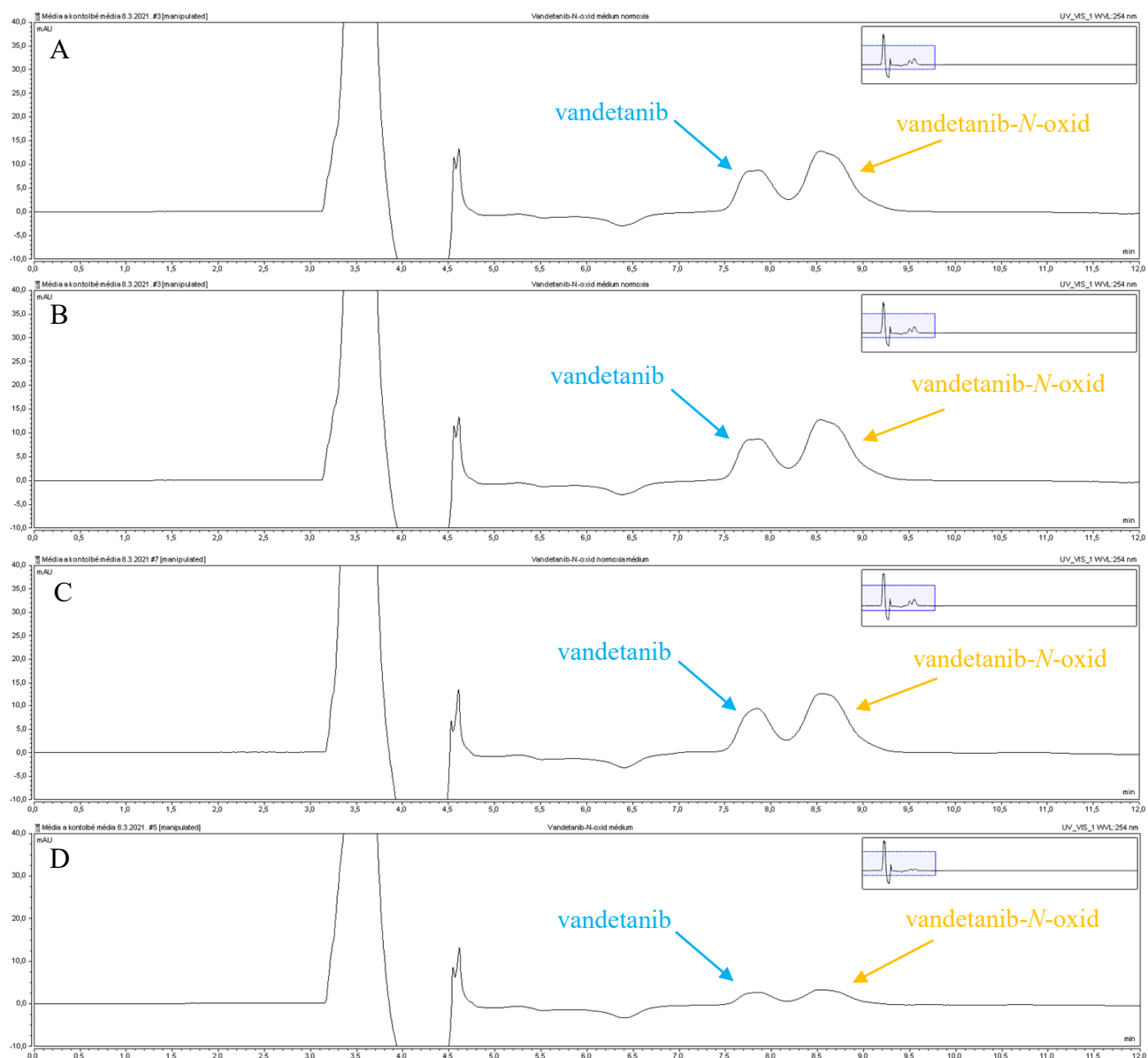
Lenvatinib i lenvatinib-*N*-oxid nebyly metabolizovány TT buňkami po 72 hodinách v normoxickém prostředí stejně jako i v hypoxickém prostředí obr. 4.17. na straně 57 resp. obr. 4.18. na straně 58.

Chromatogram separace cabozantinibu ukazuje, že pík je zdvojený. Identický průběh chromatogramu je v kontrolách (obr. 4.19. A-B na straně 59) a stejně i ve vzorcích které byly kultivovány s buňkami (obr. 4.19. C-D na straně 59).

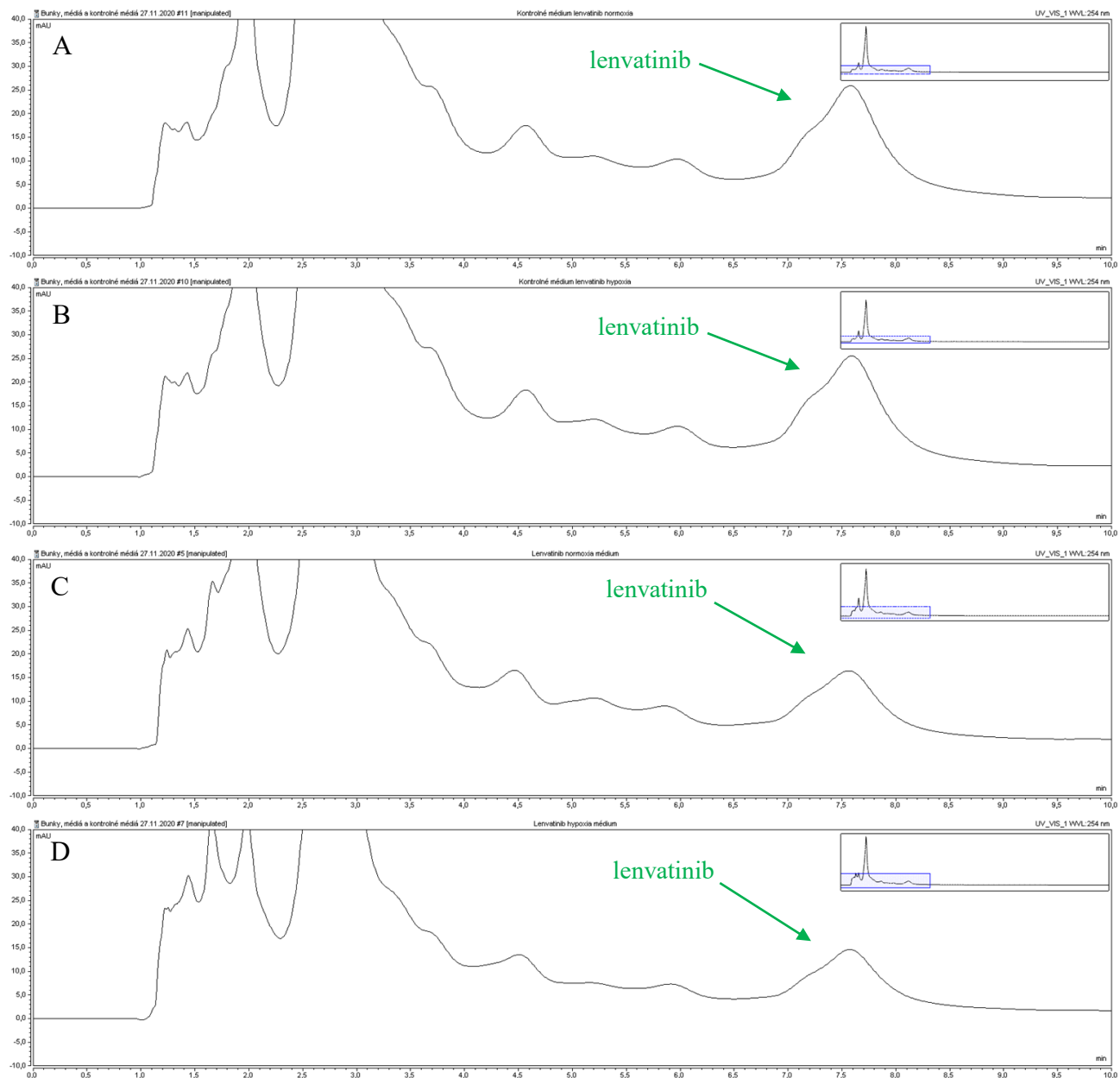
Analogicky jako v případě cabozantinibu i u cabozantinib-*N*-oxidu byl pík zdvojený a zároveň byl ve všech chromatogramech přítomný zdvojený pík s retenčním časem asi 3 – 3,5 minuty (obr. 4.20. na straně 60).



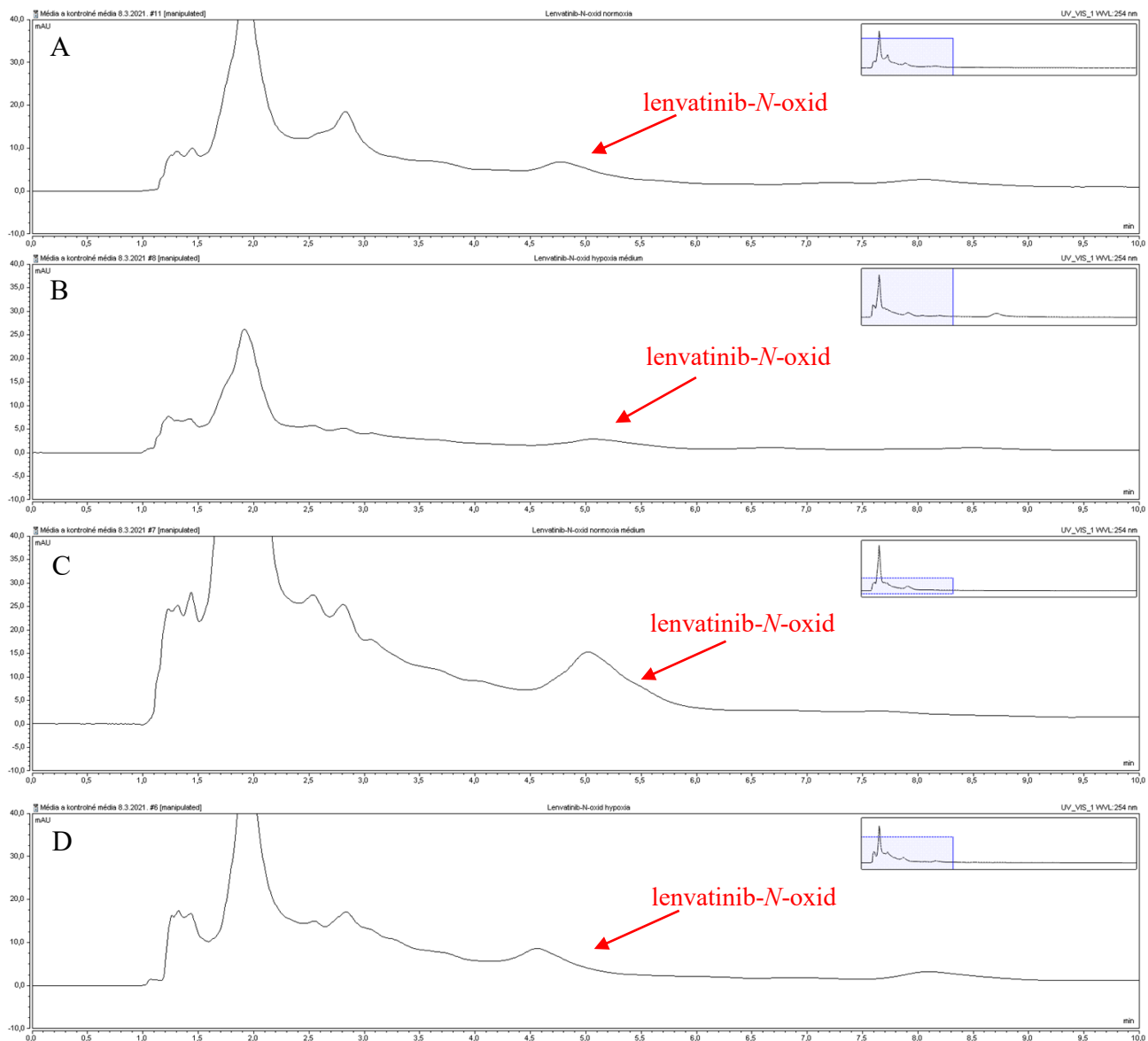
Obrázek 4.15. HPLC kultivačního média obsahujícího vandetanib. Kontrolní vzorek s vandetanibem inkubovaný při atmosférické (normoxické) koncentraci kyslíku (A), kontrolní vzorek s vandetanibem inkubovaný v hypoxickém prostředí s 1 % kyslíku (B), médium s vandetanibem po kultivaci za atmosférické (normoxické) koncentrace kyslíku (C), médium s vandetanibem po kultivaci v hypoxickém prostředí s 1 % kyslíku (D). Kultivační médium (11 ml) obsahovalo vandetanib o koncentraci $2 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$, kultivace probíhala 72 hodin. Separace probíhala na koloně NUCLEOSIL 100-5, C18 (Macherey Nagel, Německo) o rozměrech $250 \times 4 \text{ mm}$, naplněné oktadecylovaným oxidem křemičitým o velikosti zrn $5 \mu\text{m}$. Eluce probíhala isokraticky, průtok mobilní fáze byl $0,6 \text{ ml}/\text{minuta}$. Detekce byla prováděna při 254 nm . Mobilní fáze obsahovala 30 % acetonitrilu pro HPLC v pufru obsahujícím 0,5% triethylaminu o pH 3,0. pH bylo upraveno roztokem HCl.



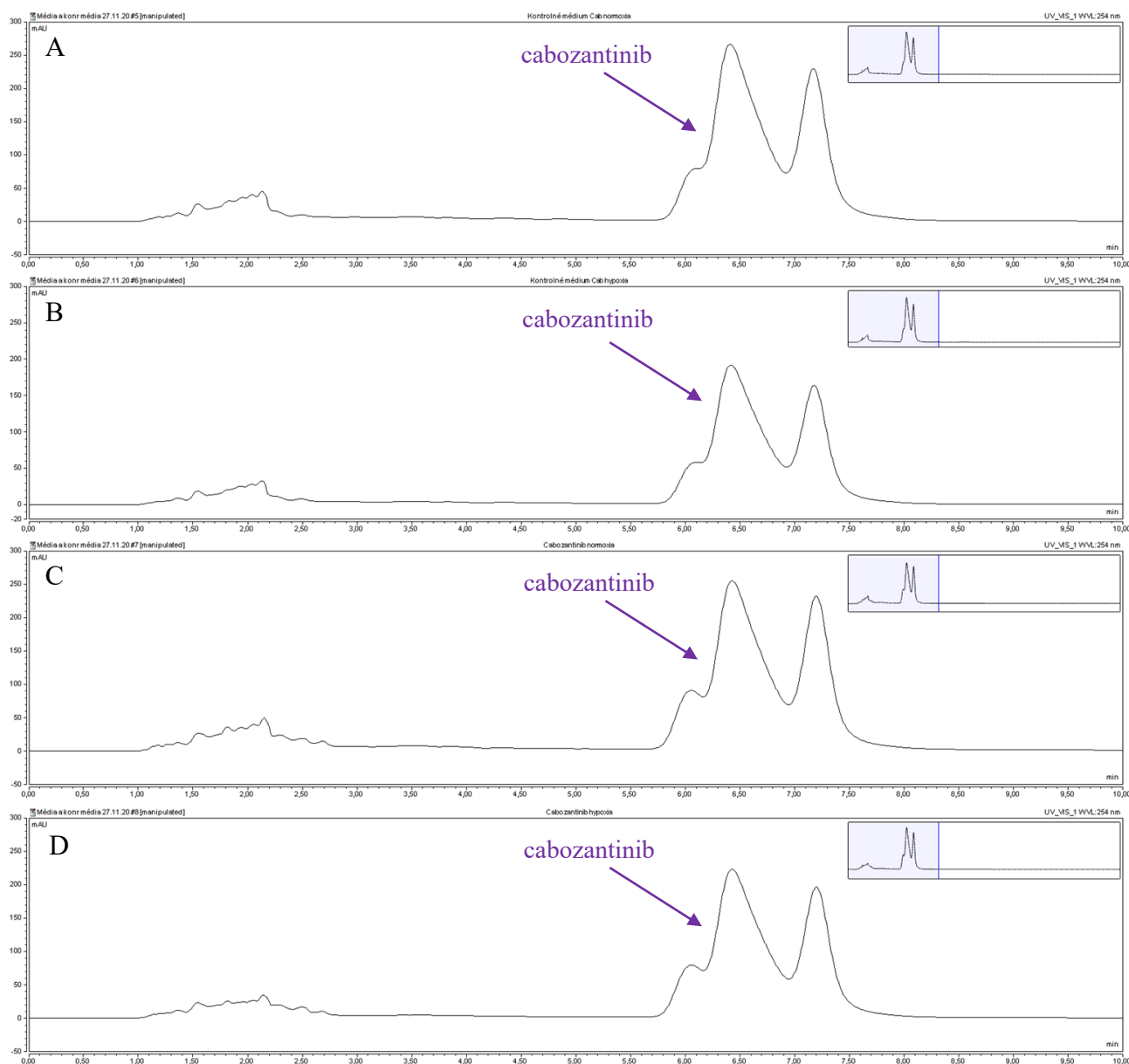
Obrázek 4.16. HPLC kultivačního média obsahujícího vandetanib-*N*-oxid. Kontrolní vzorek s vandetanib-*N*-oxidem inkubovaný při atmosférické (normoxické) koncentraci kyslíku (A), kontrolní vzorek s vandetanib-*N*-oxidem inkubovaný v hypoxickém prostředí s 1 % kyslíku (B), médium s vandetanib-*N*-oxidem po kultivaci za atmosférické (normoxické) koncentrace kyslíku (C), médium s vandetanib-*N*-oxidem po kultivaci v hypoxickém prostředí s 1 % kyslíku (D). Kultivační médium (11 ml) obsahovalo vandetanib-*N*-oxid o koncentraci 2 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$, kultivace probíhala 72 hodin. Separace probíhala na koloně NUCLEOSIL 100-5, C18 (Macherey Nagel, Německo) o rozměrech 250 \times 4 mm, naplněné oktadecylovaným oxidem křemičitým o velikosti zrn 5 μm . Eluce probíhala isokraticky, průtok mobilní fáze byl 0,6 ml/minuta. Detekce byla prováděna při 254 nm. Mobilní fáze obsahovala 30 % acetonitrilu pro HPLC v pufru obsahujícím 0,5% triethylaminu o pH 3,0. pH bylo upraveno roztokem HCl.



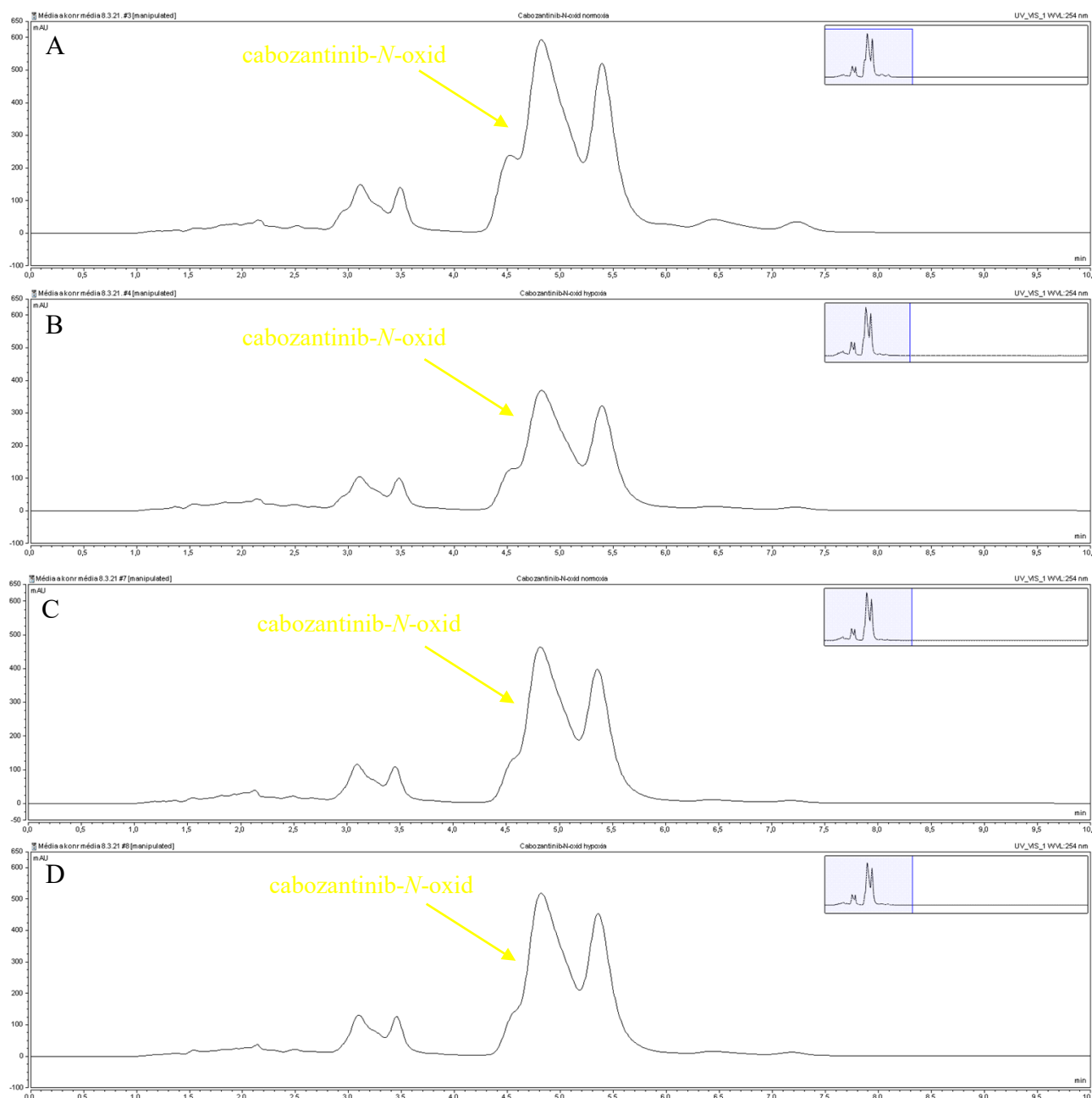
Obrázek 4.16. HPLC kultivačního média obsahujícího lenvatinib. Kontrolní vzorek s lenvatinibem inkubovaný při atmosférické (normoxické) koncentraci kyslíku (A), kontrolní vzorek s lenvatinibem inkubovaný v hypoxickém prostředí s 1 % kyslíku (B), médium s lenvatinibem po kultivaci za atmosférické (normoxické) koncentrace kyslíku (C), médium s lenvatinibem po kultivaci v hypoxickém prostředí s 1 % kyslíku (D). Kultivační médium (11 ml) obsahovalo lenvatinib o koncentraci $1,75 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$, kultivace probíhala 72 hodin. Separace probíhala za použití kolony NUCLEOSIL 100-5, C18 Macherey Nagel, o rozměrech $150 \times 4 \text{ mm}$, naplněné oktadecylovaným oxidem křemičitým o velikosti zrn $5 \mu\text{m}$. Detekce byla prováděna při 254 nm. Eluce probíhala isokraticky průtok mobilní fáze byl $0,7 \text{ ml}/\text{minuta}$. Mobilní fáze obsahovala 70 % methanolu pro HPLC v pufru obsahujícím $0,125 \text{ mM}$ octanu amonného o pH 4,0. pH bylo upraveno roztokem kyseliny octové.



Obrázek 4.17. HPLC kultivačního média obsahujícího lenvatinib-*N*-oxid. Kontrolní vzorek s lenvatinib-*N*-oxidem inkubovaný při atmosférické (normoxické) koncentraci kyslíku (A), kontrolní vzorek s lenvatinib-*N*-oxidem inkubovaný v hypoxickém prostředí s 1 % kyslíku (B), médium s lenvatinib-*N*-oxidem po kultivaci za atmosférické (normoxické) koncentrace kyslíku (C), médium s lenvatinib-*N*-oxidem po kultivaci v hypoxickém prostředí s 1 % kyslíku (D). Kultivační médium (11 ml) obsahovalo lenvatinib-*N*-oxid o koncentraci 1,75 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$, kultivace probíhala 72 hodin. Separace probíhala za použití kolony NUCLEOSIL 100-5, C18 Macherey Nagel, o rozměrech 150 \times 4 mm, naplněné oktadecylovaným oxidem křemičitým o velikosti zrn 5 μm . Detekce byla prováděna při 254 nm. Eluce probíhala isokraticky průtok mobilní fáze byl 0,7 ml/minuta. Mobilní fáze obsahovala 70 % methanolu pro HPLC v pufru obsahujícím 0,125 mM octanu amonného o pH 4,0. pH bylo upraveno roztokem kyseliny octové.



Obrázek 4.18. HPLC kultivačního média obsahujícího cabozantinib. Kontrolní vzorek s cabozantinibem inkubovaný při atmosférické (normoxické) koncentraci kyslíku (A), kontrolní vzorek s cabozantinibem inkubovaný v hypoxickém prostředí s 1 % kyslíku (B), médium s cabozantinibem po kultivaci za atmosférické (normoxické) koncentrace kyslíku (C), médium s cabozantinibem po kultivaci v hypoxickém prostředí s 1 % kyslíku (D). Kultivační médium (11 ml) obsahovalo cabozantinib o koncentraci $7 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$, kultivace probíhala 72 hodin. Separace probíhala za použití kolony NUCLEOSIL 100-5, C18 Macherey Nagel, o rozměrech $150 \times 4,6 \text{ mm}$, naplněné oktadecylovaným oxidem křemičitým o velikosti zrn $5 \mu\text{m}$. Detekce byla prováděna při 254 nm. Eluce probíhala isokraticky průtok mobilní fáze byl 1 ml/minuta. Mobilní fáze obsahovala 60 % acetonitrilu v pufru obsahujícím 5mM octan amonný o pH 5,0. pH bylo upraveno roztokem kyseliny octové.



Obrázek 4.19. HPLC kultivačního média obsahujícího cabozantinib-*N*-oxid. Kontrolní vzorek s cabozantinib-*N*-oxidem inkubovaný při atmosférické (normoxické) koncentraci kyslíku (A), kontrolní vzorek s cabozantinib-*N*-oxidem inkubovaný v hypoxickém prostředí s 1 % kyslíku (B), médium s cabozantinib-*N*-oxidem po kultivaci za atmosférické (normoxické) koncentrace kyslíku (C), médium s cabozantinib-*N*-oxidem po kultivaci v hypoxickém prostředí s 1 % kyslíku (D). Kultivační médium (11 ml) obsahovalo cabozantinib-*N*-oxid o koncentraci 7 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$, kultivace probíhala 72 hodin. Separace probíhala za použití kolony NUCLEOSIL 100-5, C18 Macherey Nagel, o rozměrech 150 \times 4,6 mm, naplněné oktadecylovaným oxidem křemičitým o velikosti zrn 5 μm . Detekce byla prováděna při 254 nm. Eluce probíhala isokraticky průtok mobilní fáze byl 1 ml/minuta. Mobilní fáze obsahovala 60 % acetonitrilu v pufru obsahujícím 5mM octan amonný o pH 5,0. pH bylo upraveno roztokem kyseliny octové.

5. Diskuse

Předkládaná diplomová práce si kladla za cíl porovnat účinnost tyrosinkinasových inhibitorů vandetanibu, lenvatinibu a cabozantinibu (parentálních sloučenin) a jejich metabolitů – *N*-oxidů v biologickém modelu – linii nádorových buněk. V literatuře chybí poznatky o účinnosti metabolitů tyrosinkinasových inhibitorů. K dispozici jsou pouze limitované informace o perorální farmakokinetice nebo z *in vitro* testů na rekombinantních proteinech, případně pouze rekombinantně připravené kinasové doměně.

Vandetanib, lenvatinib a cabozantinib patří do skupiny tyrosinkinasových inhibitorů přičemž všechny jsou tzv. multikinasové inhibitory (inhibují víc než jednu kinasu) [Wedge a kol. 2002], [Karras a kol. 2014], [Matsui a kol. 2008,] [Okamoto a kol. 2013], [Yakes a kol. 2011] a [Lacy a kol. 2015]. Společnými cíli výše uvedených látek jsou protoonkogen RET a VEGFR2, na které se tato práce zaměřila. Pro zkoumání léčiv a jejich metabolitů, které mají specifický cíl, byla použita linie buněk, která exprimuje cílové receptorové tyrosinkinasy. Touto linií byla linie TT buněk odvozená z medulárního karcinomu štítné žlázy, ve kterém byla dříve detekována mRNA RET [Zabel a Grzeszkowiak 1997]. V předkládané práci bylo zjištěno, že linie TT buněk exprimuje obě cílové tyrosinkinasy RET i VEGFR2 viz obr. 4.1. na straně 43 a obr. 4.2. na straně 44.

Srovnání účinnosti parentálních molekul a jejich *N*-oxidů bylo provedeno pomocí stanovení hodnot EC_{50} . Tedy určení koncentrace, která potlačí růst buněk o 50 % v porovnání s kontrolou. Srovnání hodnot EC_{50} parentálních látek a jejich metabolitů ukázalo ve všech případech, že metabolit je méně farmakologicky účinný. V případě vandetanib-*N*-oxidu byl nejmenší rozdíl. Cabozantinib-*N*-oxid byl prakticky neúčinný, krystalizoval při koncentracích, které nedosahovaly 50% inhibiční efekt, obr. obr. 4.3. na straně 45 a obr. 4.4. na straně 46.

Unikátním výsledkem, je průkaz zvýšené cytotoxicity zkoumaných látek v hypoxickém prostředí (1 % kyslíku) ve srovnání s normoxickým prostředím (atmosférická koncentrace kyslíku). U vandetanibu a cabozantinibu je tento rozdíl signifikantní, v případě lenvatinibu je rozdíl mezi EC_{50} v normoxii a hypoxii výrazně signifikantní a největší (9,26 vs. 1,68 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$). Analogicky jako parentální látky i metabolity mají vyšší cytotoxicitu v hypoxických podmínkách obr. 4.3. na straně 45 . Hypoxie má z pravidla opačný efekt a podporuje vznik rezistence vůči řadě cytostatik a radioterapii různými

mechanismy. V hypoxii dochází ke zvýšení autofagie, zvýšení exprese P-glykoproteinu, metabolickým změnám, inhibici apoptosy a dalším [Rohwer a Cramer 2014].

Hypotetickou příčinou zvýšení cytotoxicity v hypoxickém prostředí mohlo být snížení detoxikace tyrosinkinasový inhibitorů v hypoxii prostředí, jelikož jejich metabolismus probíhal aerobně jak *in vitro* [Indra a kol. 2019], [Inoue a kol. 2014] a [Indra a kol. 2020] tak *in vivo* u zdravých dobrovolníků [Lacy a kol. 2015]. Informace o metabolismu xenobiotik v hypoxii u zvířat naznačují snížení metabolismu [Zhou a kol. 2018]. Jiné studie nezaznamenaly rozdíly [Jurgens a kol. 2002]. Detailnější zkoumání mechanismů, které stojí za zvýšenou cytotoxicitou v hypoxii, nebylo možné z důvodu technické závady na hypoxické komoře.

V médiích po kultivaci nebyly za pomoci HPLC nalezeny metabolity vandetanibu, lenvatinibu a ani cabozantinibu. Příčinou může být nízká úroveň exprese biotransformačních enzymů v linii TT buněk. Z důvodu komplexní matrice vzorků, kterými jsou kultivační média s obsahem telecího fetálního séra a antibiotik, nebyla prováděna analýza hmotnostní spektrometrií. Analýza metabolitů neprokázala spojitost změn metabolismu se zvýšením cytotoxicity tyrosinkinasových inhibitorů v hypoxii. Zdvojení píků v chromatogramech ze separace cabozantinibu, resp. cabozantinib-*N*-oxidu mohlo být hypoteticky zapříčiněno degradací či reakcí se složkami média, nebo následkem složitého zpracování vzorku daného charakterem vstupního materiálu (médiu pro kultivaci buněk).

Zajímavým výsledkem je snížení exprese VEGFR2 po expozici TT buněk vandetanibu, vandetanib-*N*-oxidu, lenvatinibu a cabozantinibu. Toto snížení exprese bylo patrné jak v normoxii tak v hypoxii, (obr. 4.6. na straně 47). Nedošlo však ke změnám exprese RET (obr. 4.5. na straně 47). Hlubší zkoumání snížení exprese VEGFR2 bylo provedeno za použití lenvatinibu a lenvatinib-*N*-oxidu z důvodu největšího rozdílu hodnot EC_{50} lenvatinibu mezi normoxií a hypoxií. Průtoková cytometrie potvrdila vysoce signifikantní snížení exprese VEGFR2. Toto snížení bylo o 93% v porovnání s kontrolou, lenvatinib-*N*-oxid nesnižoval expresi VEGFR2 v populaci TT buněk. Samotné hypoxické podmínky ve všech případech snížily expresi VEGFR2 a to asi o 40% oproti normoxii (obr. 4.7. na straně 49). Tato změna byla ireverzibilní (obr. 4.8. na straně 49). Příčinou může být klonální heterogenita populace buněk, kdy buňky exprimující VEGFR2 byly „přerostlé“ VEGFR2 negativní populací buněk v důsledku potlačení jejich růstu.

Mechanismus snížení VEGFR2 byl zkoumán za pomoci inhibitoru proteasomu - MG-132, inhibitoru mTOR - rapamycinu a inhibitoru V-ATPasy – bafilomycin A1. MG-132 snižuje expresi VEGFR2 v podobné míře jako lenvatinib. Rapamycin měl také za následek snížení VEGFR2 exprese. Kombinace MG-132 resp. rapamycinu s lenvatinibem působily synergicky v případě rapamycinu (nebyl detekován VEGFR2), nebo identicky jako samotný MG-132 (obr. 4.9. na straně 50). Bafilomycin A1 zastavil odbourávání VEGFR2 bez ohledu na přítomnost lenvatinibu (obr. 4.10. na straně 51).

Na základě výše uvedených výsledků předpokládáme, že možným mechanismem snížení exprese VEGFR2 je zvýšení autofagie. Hypoxie a stejně tak i stres endoplasmatického retikula mohou být spojeny s dráhou mTOR přes změny cytoplasmatické koncentrace vápenatých kationtů. Hypoxie stimuluje eflux z endoplasmatického retikula, což stimuluje AMPK, čímž dochází k inaktivaci mTOR a autofagii. [Toescu 2004] a [Hoyer-Hansen a Jaattela 2007]. Induktorem stresu endoplasmatického retikula a autofagie je inhibitor proteasomu MG-132 [Ding a kol. 2007]. Rapamycin je přímým inhibitorem mTOR, čímž sám podporuje autofagii [Li a kol. 2014]. Kinasa mTOR je propojena se signalizací zprostředkovanou VEGFR2 [Abhinand a kol. 2016]. Tím pádem inhibice VEGFR2 může mít za následek inhibici i mTOR, čímž se zvýší autofagie a sníží se exprese VEGFR2.

V procesu autofagie, je klíčová fúze autofagosomu s lysozomem [Mizushima 2007]. Bafilomycin A1, který snižuje lysosomální degradaci proteinů tím, že zabraňuje acidifikaci inhibicí V-ATPasy, tedy zabraňuje degradaci VEGFR2. Způsobuje i to, že byly detekovány fragmenty VEGFR2 s nižší molekulou hmotností, viz obr. 4.10. na straně 51.

Proces degradace VEGFR2 byl už předtím popsán ve dvou nezávislých publikacích, a tyto výsledky jsou konzistentní s výsledky prezentovanými v této diplomové práci pro MG-132 a bafilomycin [Bruns a kol. 2010] a [Ash a kol. 2021].

Není možné jednoznačně ověřit účinek vandetanib-*N*-oxidu na TT buňky. Na základě chromatogramů je vandetanib-*N*-oxid kontaminován parentální molekulou, vandetanibem. Cytotoxicita a snížení exprese VEGFR2 vandetanib-*N*-oxidem mohou být ve skutečnosti následkem příměsi kontaminantu (vandetanibu) viz obr. 4.16. na straně 56.

6. Závěr

Výsledky v předkládané diplomové práci jsou příspěvkem k porozumění o účincích tyrosinkinasových inhibitorů a jejich vybraných metabolitů – *N*-oxidů *in vitro* na buněčné linii medulárního karcinomu štítné žlázy.

- ❖ Linie TT buněk je vhodný model pro zkoumání vandetanibu, lenvatinibu, cabozantinibu a jejich *N*-oxidů, jelikož exprimuje receptorové tyrosinkinasy RET a VEGFR2.
- ❖ Metabolity vandetanibu, lenvatinibu a cabozantinibu jsou ve všech případech méně toxické než parentální molekuly, což naznačuje nižší protinádorovou účinnost.
- ❖ Vandetanib, lenvatinib a cabozantinib mají vyšší toxicitu hypoxii v porovnání s normoxií. Zvýšená cytotoxicita v hypoxii není spojena s detoxifikačním metabolismem. Přesný mechanismus nebyl v této práci z technických příčin objasněn.
- ❖ Expresi VEGFR2 byla snížena vandetanibem, lenvatinibem a cabozantinibem. Na základě výsledků provedených experimentů (větší snížení exprese VEGFR2 v hypoxii, inhibice degradace VEGFR2 bafilomicinem A1 i přes přítomnost lenvatinibu a další), předpokládáme, že příčinou je zvýšení autofagie, o které je známo, že snižuje expresi VEGFR2. Samotný důkaz indukce autofagie zkoumanými látkami však v předkládané práci nebyl proveden.
- ❖ Inhibitory tyrosinkinas neměly vliv na expresi protoonkogenu RET.
- ❖ Zkoumané tyrosinkinasové inhibitory neměly vliv na expresi vybraných biotransformačních enzymů (CYP1A1, CYP3A4 a POR) v normoxických i hypoxických podmínkách.
- ❖ Vandetanib, lenvatinib a cabozantinib a jejich *N*-oxidy nejsou metabolizovány *in vitro* linií TT buněk.
- ❖ Všechny výsledky získané pro vandetanib-*N*-oxid nejsou průkazné z důvodu kontaminace vandetanibem.

7. Použitá literatura

1. Abdelaziz A.; Vaishampayan U.: Cabozantinib for the treatment of kidney cancer, 17:7, 577-584, (2017)
2. Abhinand C. S.; Raju R.; Soumya S.; Aray P. S.; Sudhakaran P. R.: VEGF-A/VEGFR2 signaling network in endothelial cells relevant to angiogenesis, *J. Cell Commun. Signal.*, 10, 347-354, (2016)
3. Abou-Alfa G. K.; Meyer T.; Cheng A.-L.; El-Khoueiry A. B.; Rimassa L.; Ryoo B.-Y.; Cicin I.; Merle P.; Chen Y. H.; Park J.-W.; Blanc J.-F.; Bolondi L.; Klumpen H.-J.; Chan S. L.; Zagonel V.; Pressiani T.; Ryu M.-H.; Venook A. P.; Hessel C.; Borgman-Hagey A. E.; Schwab G.; Kelley R. K.: Cabozantinib in patients with advanced and progressing hepatocellular carcinoma, *N. Engl. J. Med.*, 379, 54-63, (2018)
4. Arighi E.; Borrello M. G.; Sariola H.: RET tyrosine kinase signaling in development and cancer, *Cytokine Growth Factor Rev.*, 16, 441-467, (2005)
5. Arora A.; Scholar E. M.: Role of tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 315:3, 971-979, (2005)
6. Ash D.; Sudhakar V.; Youn S.-W.; Okur M. N.; Das A.; O'Bryan J. P.; McManamin M.; Hou Y.; Kaplan J. H.; Fukai T.; Ushio-Fukai M.: The P-type ATPase transporter ATP7A promotes angiogenesis by limiting autophagic degradation of VEGFR2, *Nat. Commun.*, 12, 1-16, (2021)
7. Attwa M. W.; Kadi A. A.; Darwish H. W.; Amer S. M.; Al-shakliah N. S.: Identification and characterization of in vivo, in vitro and reactive metabolites of vandetanib using LC-ESI-MS/MS, *Chem. Cent. J.*, 12:1, 99, (2018)
8. Bendlová B.; Dvořáková Š.; Sýkorová V.; Hálková T.; Václavíková E.: Genetika nádorů štítné žlázy a jejich molekulárně cílená léčba, *Onkologie*, 5:6, 325-328 (2011)

9. Borrello M. G.; Alberti L.; Arighi E.; Bongarzone I.; Battistini C.; Bardelli A.; Pasini B.; Piutti C.; Rizzetti M. G.; Mondellini P.; Radice M. T.; Pierotti M. A.: The full oncogenic activity of Ret/ptc2 depends on tyrosine 539, a docking site for phospholipase Cgamma, *Mol. Cell. Biol.*, 16:5, 2151-2163, (1996)
10. Brahim-Horn C. M.; Chiche J.; Pouyssegur J.: Hypoxia and cancer, *J. Mol. Med.*, 85, 1301-1307, (2007)
11. Bruns A. F.; Herbert S. P.; Odell A. F.; Jopling H. M.; Hooper N. M.; Zachary I. C.; Walker J. H.; Pannambalam S.: Ligand-stimulated VEGFR2 signaling is regulated by coordinated trafficking and proteolysis, *Traffic*, 11, 161-174, (2010)
12. Cabanillas E. M.; Brose M. S.; Holland J.; Ferguson K. C.; Sherman S. I.: A phase I study of cabozantinib (XL184) in patients with differentiated thyroid cancer, *Thyroid*, 24:10, 1508-1514, (2014)
13. Cabanillas E. M.; Habra M. A.: Lenvatinib: Role in thyroid cancer and other solid tumors, *Cancer Treat. Rev.*, 42, 47-55, (2016)
14. Cabanillas E. M.; McFadden D. G.; Durante C.: Thyroid cancer, *Lancet*, 388, 2783-2795 (2016)
15. Claesson-Welsh L.: Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors, *Biochem. Soc. Trans.*, 31:1, 20-24 (2003)
16. Ding W.-X.; Ni H.-M.; Gao W.; Yoshimori T.; Stolz D. B.; Ren D.; Yin X.-M.: Linking of autophagy to ubiquitin-proteasome system is important for the regulation of endoplasmic reticulum stress and cell viability, *Am. J. Pathol.*, 171:2, 513-524, (2007)
17. Hayashi Y.; Iwashita T.; Murakamai H.; Kato Y.; Kawai K.; Kurokawa K.; Tohno I.; Ueda M.; Takahashi M.: Activation of BMK1 via Tyrosine 1062 in RET by GDNF and MEN2A Mutation, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 281:3, 682-689, (2001)

18. Herbst R. S.; Heymach J. V.; O'Reilly M. S.; Onn A.; Ryan A. J.: Vandetanib (ZD6474): an orally available receptor tyrosine kinase inhibitor that selectively targets pathways critical for tumor growth and angiogenesis, *Expert Opin. Investig. Drugs*, 16:2, 239-249, (2007)
19. Hoyer-Hansen M.; Jaattela M.: Connecting endoplasmic reticulum stress to autophagy by unfolded protein response and calcium, *Cell Death Differ.*, 14, 1576-1582, (2007)
20. Hubbard S. R.; Till J. H.: Protein tyrosine kinase structure and function, *Annu. Rev. Biochem.*, 69, 373-398, (2000)
21. Hussein Z.; Mizuo H.; Hayato S.; Namiki M.; Shumaker R.: Clinical pharmacokinetic and pharmacodynamic profile of lenvatinib, an orally active, small-molecule, multitargeted tyrosine kinase inhibitor, *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.*, 42, 903-914, (2017)
22. Indra R.; Pompach P.; Martínek V.; Takáčzová P.; Vavrová K.; Heger Z.; Adam V.; Eckschlager T.; Kopečková K.; Arlt V. M.; Stiborová M.: Identification of human enzymes oxidizing the anti-thyroid-cancer drug vandetanib and explanation of the high efficiency of cytochrome P450 3A4 in its oxidation, *Int. J. Mol. Sci.*, 20:14, 3392-3414, (2019)
23. Indra R.; Vavrová K.; Pompach P.; Heger Z.; Hodek P.: Identification of enzymes oxidizing the tyrosine kinase inhibitor cabozantinib: Cabozantinib is predominantly oxidized by CYP3A4 and its oxidation is stimulated by CYP2B5 activity, *Biomedicines*, 8:12, 1-14, (2020)
24. Inoue K.; Mizuo H.; Kawaguchi S.; Fukuda K.; Kusano K.; Yoshimura T.: Oxidative metabolic pathway of lenvatinib mediated by aldehyde oxidase, *Drug Metab. Dispos.*, 42, 1326-1333, (2014)
25. Jayasinghe C.; Simiantonaki N.; Habedank S.; Kirkpatrick C.-J.: The relevance of cell type- and tumor zone-specific VEGFR-2 activation in locally advanced colon cancer, *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, 34, 42, (2015)

26. Jurgens G.; Christensen H. R.; Bronsen K.; Sonne J.; Loft S.; Olsen N. V.: Acute hypoxia and cytochromeP450-mediated hepatic drug metabolism in humans, *Clin. Pharm. Therap.*, 71:4, 214-220, (2002)
27. Karras S.; Anagnostis P.; Krassas G. E.: Vandetanib for the treatment fo thyroid cancer: an update, *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.*, 10:3, 469-481 (2014)
28. Kopparapu P. K.; Boojian S. A.; Robinson B. D.; Downes M.; Gudas L. J.; Morgan N. P.; Persson J. L.: Expression of VEGF and its receptors VEGFR1/VEGFR2 is associated with invasiveness of bladder cancer, *Anticancer Res.*, 33, 2381-2390 (2013)
29. Kurokawa K.; Kawai K.; Hashimoto M.; Ito Y.; Takahashi M.: Cell signalling and gene expression mediated by RET tyrosine kinase, *J. Intern. Med.*, 253:6, 627-33 (2003)
30. Lacy S.; Hsu B.; Miles D.; Aftab D.; Wang R.; Nguyen L.: Metabolism and disposition of cabozantinib in healthy male volunteers and pharmacologic characterization of its major metabolites, *Drug Metab. Dispos.*, 43, 1190-1207, (2015)
31. Li J.; Kim S. G.; Blenis J.: Rapamycin: One drug many effects, *Cell Metab.*, 3:4, 373-379, (2014)
32. Martin P.; Oliver S.; Robertson J.; Kennedy S. J.; Read J.; Duvauchelle T.: Pharmacokinetic drug onteractions with vandetanib during coadministrationwith rifampicin or itraconazole, *Drugs R. D.*, 11, 37-51, (2011)
33. Matsui J.; Yamamoto Y.; Funahashi Y.; Tsuruoka A.; Watanabe T.; Wakabayashi T.; Uenaka T.; Asada M.: E7080, a novel inhibitor that targets multiple kinases, has potent antitumor activities against stem cell factor producing human small cell lung cancer H146, based on angiogenesis inhibition, *Int. J. Cancer*, 122, 664-671, (2008)
34. Mizushima N.: Autophagy: proces and function, *Genes Dev.*, 21, 2861-2873, (2007)
35. Mulligan L. M: RET revisited: expanding the oncogenic portfolio, *Nat. Rev. Cancer*, 14, 173-186,(2014)

36. Okamoto K.; Komada K.; Takase K.; Sugi N. H.; Yamamoto Y.; Iwata M.; Tsuruoka A.: Antitumor activities of the targeted multi-tyrosine kinase inhibitor lenvatinib (E7080) against RET gene fusion-driven tumor models, *Cancer Let.*, 340, 97-103, (2013)
37. Ollson A.-K.; Dimberg A.; Claesson-Welsh L.: VEGF receptor signalling ? in control of vascular function, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 7, 359-371, (2006)
38. Omura T.; Sato R.: The carbon monoxide – binding pigment of liver microsomes, *J. Biol. Chem.*, 239, 2370-2378, (1964)
39. Personeli N.; Pressiani T.; Rimassa L.: Lenvatinib for the treatment of unresectable hepatocellular carcinoma: evidence to date, *J. Hepatocell. Carcinoma*, 6, 31-39, (2019)
40. Rampersad S. N.: Multiple applications of alamar blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays, *Sensors*, 12, 12347-12360, (2012)
41. Rendic S.; Di Carlo F.: Human cytochromes P450 enzymes: A status report summarizing their reactions, substrates, inducers and inhibitors, *Drug Metab. Rev.*, 1&2, 413-580 (1997)
42. Rohwer N.; Cramer T.: Hypoxia-mediated drug resistance: Novel insights on the functional interaction of HIF and cell death pathways, *Drug Resist. Updates*, 14, 191-201, (2014)
43. Roviello G.; Corona S. P.; Bozza G.; Aieta M.; Generali D.; Rodriquenz G.; Mileo A. M.; Imperateri M.; Ianza A.; Conca R.; Sobhani N.: Lenvatinib for the treatment of renal cell carcinoma, *Expert Opin. Invest. Drugs*, 27:5, 507-512, (2018)
44. Ruch C.; Shiniotis G.; Steinmetz M. O.; Walz T.; Ballmer-Hofer K.: Structure of a VEGF–VEGF receptor complex determined by electron microscopy, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 14:3, 249-250, (2007)
45. Sádecká J.; Purdešová A.: *Úprava vzorky v analytickej chémii*, Bratislava, Nakladateľstvo STU, 2012, s. 16

46. Skálová L.; Boušová I.; Machala M.; Pávek P.; Podlipná R.; Souček P.; Szotáková B.; Vondráček J.; Wsól V.: *Metabolismus léčiv a jiných xenobiotik*, Praha, Karolinu Nakladatelství univerzity Karlovi, 2011
47. Stiborová M.; Hudeček J.; Hodek P.; Frei E.: Význam cytochrome P450 pro lidské zdraví, *Chem. Listy*, 93, 229-237 (1999)
48. Stiborová M.; Hudeček J.; Páca J. Jr.; Martínek V.; Páca J.: Enzymy metabolizující kontaminanty životního prostředí, *Chem. Listy*, 98, 876-890 (2004)
49. Smith D. C.; Smith M. R.; Sweeney C.; Elfiky A. A.; Logothetis C.; Corn, P. G.; Vogelzang N. J.; Small J.C.; Harsztak A. L.; Gordon M. S.; Vaishampayan U.; Haas N. B.; Spira A. I.; Lara P. N.; Lin C.-C.; Srinivas S.; Sella A.; Schöffski P.; Scheffold C.; Weitzman A. L.; Hussain M.: Cabozantinib in patients with advanced prostate cancer: results of a phase II randomized discontinuation trial, *J. Clin. Oncol.*, 31:4, 412-419, (2013)
50. Song S. H.; Jeong I. B.; You D.; Hong J. H.; Hong B.; Song C.; Jung W. Y.; Cho Y. M.; Ahn H.; Kim C.-Y.: VEGF/VEGFR2 and PDGF-B/PDGFR- β expression in non-metastatic renal cell carcinoma: a retrospective study in 1,091 consecutive patients, *Int. J. Clin. Exp. Pathol.*, 7:11, 7681-7689, (2014)
51. Toescu E. C.: Hypoxia sensing and pathways of cytosolic Ca²⁺ increases, *Cell Calcium*, 36, 187-199, (2004)
52. Tsubuki S.; Saito Y.; Tomioka M.; Ito H.; Kawashima S.: Differential Inhibition of Calpain and Proteasome Activities by Peptidyl Aldehydes of Di-Leucine and Tri-Leucine, *J. Biochem.*, 119, 572-576, (1996)
53. Trupp M.; Scott R.; Whitemore S. R.; Ibanez C. F.: Ret-dependent and -independent mechanisms of glial cell line-derived neurotrophic factor signaling in neuronal cells, *J. Biol. Chem.*, 274:30, 20885-20894, (1999)
54. Vaupel P.: Tumor microenvironmental physiology and its implications for radiation onkology, *Semin. Radiat. Oncol.*, 14:3, 198-206, (2004)

55. Vlček P.: Diferencovaný karcinom štítné žlázy – nový pohled na jeho léčbu, *Onkologie*, 5:6, 329-332 (2011a)
56. Vlček P.: Medulární karcinom štítné žlázy – diagnostické a léčebné možnosti, *Onkologie*, 5:6, 336-339 (2011b)
57. Wedge S. R.; Ogilvie D. J.; Dukes M.; Kendrew J.; Chester R.; Jackson J. A.; Boffey S. J.; Valentine P. J.; Curwen J. O.; Musgrove H. L.; Graham G. A.; Hughes G. D.; Thomas P. A.; Stokes E. S. E.; Curry B.; Richmosnd G. H. P.; Wadsworth P. F.; Bigley A. L.; Hennequin L. F.: ZD6474 inhibits vascular endothelial growth factor signaling, angiogenesis, and tumor growth following oral administration, *Cancer Res.*, 62, 4645-4655, (2002)
58. Weitzman S. P.; Cabanillas M. E.: The treatment landscape in thyroid cancer: a focus on cabozantinib, *Cancer Manage. Res.*, 7, 265-278, (2015)
59. Yakes M. F.; Chen J.; Tan J.; Yamaguchi K.; Shi Y.; ; Yu P.; Qian F.; Chu F.; Bentzien F.; Cancilla B.; Orf J.; You A.; Laird D. A.; Engst S.; Lee L.; Lesch J.; Chou Y.; Joly A. H.: Cabozantinib (XL184), a novel MET and VEGFR2 inhibitor, simultaneously suppresses metastasis, angiogenesis, and tumor growth, *Mol. Cancer Ther.*, 10:12, 2298-2308, (2011)
60. Yan J.-D.; Liu Y.; Zhang Z.-Y.; Liu G.-Y.; Xu J.-H.; Liu L.-Y.; Hu Y.-M.: Expresion and prognostic signifkance of VEGFR-2 in breast cancer, *Pathol., Res. Pract.*, 211:7, 539-543, (2015)
61. Yoshimori T.; Yamamoto A.; Moriyama Y.; Futai M.; Tashiro Y.: Bafilomycin AI, a specific inhibitor of vacuolar-type H⁺-ATPase, inhibits acidification and protein degradation in lysosomes of cultured cells, *J. Biol. Chem.*, 266:26, 17707-17712, (1991)
62. Zabel M.; Grzeszkowiak J.: Characterisation of thyroid medullary carcinoma TT cell line, *Histol. Histopathol.*, 12, 283-289, (1997)

63. Zhou X.; Nian Y.; Qiao Y.; Yang M.; Xin Y.; Li Y.: Hypoxia plays a key role in the pharmacokinetic changes of drugs at high altitud, *Curr. Drug Metab.*, 19, 960-969, (2018)
64. *Modrá kniha české onlogické společnosti*, Brno, Masarykův onkologický ústav, (2021),
Platnost od 01.03.2021

