

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie

Studijní program: Biochemie



BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Vzájemný vliv tyrosinkinázových inhibitorů a bakterie E. coli

Interaction between tyrosine kinase inhibitors and E. coli

Daria Molodchinina

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

Praha 2025

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně a uvedla všechny prameny a použitou literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 16. 05. 2025

.....
Daria Molodchinina

Poděkování

Ráda bych poděkovala Mgr. Radku Indrovi, Ph.D., za trpělivé vedení bakalářské práce, za strávený čas se mnou při konzultacích, cenné rady a ochotu zabývat se vzniklými problémy. Zároveň děkuji své rodině za velkou trpělivost a podporu při celém mém studiu.

Abstrakt:

Tato bakalářská práce se zabývá vztahem mezi vybranými tyrosinkinázovými inhibitory (TKI) a střevní bakterií *Escherichia coli*, která je přirozenou součástí lidského mikrobiomu. Bylo testováno pět různých inhibitorů – lenvatinib, vandetanib, lapatinib, sunitinib a cabozantinib.

Téma této bakalářské práce je velmi aktuální, protože propojuje dvě klíčové oblasti současného biomedicínského výzkumu, které v posledních letech získávají stále větší pozornost – moderní onkologickou léčbu a střevní mikrobiom. Tyrosinkinázové inhibitory představují důležitou skupinu cílených protinádorových léčiv. TKI inhibují specifické enzymy zvané tyrosinkinázy, které hrají zásadní roli v signálních drahách regulujících růst a dělení buněk.

Stále více se ukazuje, že složení mikrobiomu může ovlivňovat nejen účinnost protinádorových léků, ale také výskyt vedlejších účinků, například průjmů. Přestože se TKI běžně používají v klinické praxi, jejich možné interakce se střevními bakteriemi – konkrétně s běžnými druhy jako *Escherichia coli* – dosud nejsou dostatečně prozkoumány. Studium těchto vztahů proto může přispět k lepšímu pochopení individuální odpovědi na léčbu a pomoci při optimalizaci onkologické terapie v budoucnosti.

Z výsledků měření absorpance vyplývá, že některé tyrosinkinázové inhibitory mohou mít stimulační (např. cabozantinib, lapatinib) nebo naopak inhibiční účinek (např. lenvatinib) na růst *E. coli* v závislosti na koncentraci. HPLC analýza neprokázala vznik žádných detekovatelných metabolitů TKI, což naznačuje, že *E. coli* tyto látky za daných podmínek nemetabolizuje. Metoda SDS-PAGE ukázala, že TKI mohou ovlivňovat expresi proteinů u *E. coli*, přičemž nejvýraznější pokles byl zaznamenán při vyšších koncentracích inhibitorů. Výjimkou byl cabozantinib, který naopak vedl ke zvýšení exprese.

Klíčová slova: tyrosinkinasové inhibitory, rakovina, mikrobiom, protinádorová léčiva, lenvatinib, vandetanib, lapatinib, sunitinib, cabozantinib, *E. coli*.

Abstract:

This bachelor's thesis focuses on the relationship between selected tyrosine kinase inhibitors (TKIs) and the intestinal bacterium *Escherichia coli*, which is a natural component of the human microbiome. Five different inhibitors were tested: lenvatinib, vandetanib, lapatinib, sunitinib, and cabozantinib.

The topic of this thesis is highly relevant, as it connects two key areas of current biomedical research that have been gaining increasing attention in recent years – modern cancer therapy and the gut microbiome. Tyrosine kinase inhibitors represent an important class of targeted anticancer drugs. They inhibit specific enzymes known as tyrosine kinases, which play a crucial role in signaling pathways that regulate cell growth and division.

It is becoming increasingly evident that the composition of the microbiome may influence not only the effectiveness of anticancer drugs but also the occurrence of side effects, such as diarrhea. Although TKIs are commonly used in clinical practice, their potential interactions with intestinal bacteria – specifically common species such as *Escherichia coli* – have not yet been sufficiently explored. Studying these interactions may contribute to a better understanding of individual responses to treatment and help optimize cancer therapy in the future.

The results of absorbance measurements indicate that some tyrosine kinase inhibitors may have a stimulatory effect (e.g., cabozantinib, lapatinib) or, conversely, an inhibitory effect (e.g., lenvatinib) on the growth of *E. coli*, depending on the concentration. HPLC analysis did not detect the formation of any identifiable TKI metabolites, suggesting that *E. coli* does not metabolize these compounds under the tested conditions. The SDS-PAGE method showed that TKIs can influence protein expression in *E. coli*, with the most pronounced decrease observed at higher inhibitor concentrations. An exception was cabozantinib, which instead led to an increase in protein expression.

Keywords: tyrosine kinase inhibitors, cancer, microbiome, anticancer drugs, lenvatinib, vandetanib, lapatinib, sunitinib, cabozantinib, *E. coli*.

Obsah

Prohlášení	2
Poděkování.....	3
Abstrakt	4
Abstract	5
1. Úvod	9
1.1 Nádorová onemocnění	9
1.2 Tyrosinkinázy.....	9
1.3 Léčba rakoviny	10
1.3.1 Inhibitory tyrosinkináz (TKI)	11
1.4 Mikrobiom člověka	16
1.4.1 Možné interakce střevního mikrobiomu s léčbou TKI vedoucí k průjmu	17
1.5 <i>Escherichia coli</i>	17
1.5.1 Vliv změn množství <i>E. coli</i> ve střevě na trávení a imunitní systém	18
2. Cíl práce	19
3. Materiál	20
3.1 Chemikálie a biologické materiály	20
3.2 Pufry a zásobní roztoky.....	21
3.3 Použité přístroje	21
4. Metody.....	23
4.1 Změření nárůstu <i>E. coli</i> v přítomnosti TKI s pomocí růstovou křivky	23
4.1.1 Práce s buňkami	23
4.2 Zjištění produkce metabolitů TKI <i>E. coli</i> pomocí HPLC.....	23
4.2.1 Kontrola	23
4.2.2 Analýza metabolitů TKI ve vzorcích <i>E. coli</i>	24
4.3 Zjištění vlivu TKI na exprese proteinů u <i>E. coli</i> pomocí SDS-PAGE	26
4.3.1 Příprava gelů	26
4.3.2 Příprava vzorků.....	26
4.3.3 Příprava aparatury	27
4.4 Statistika.....	27
5. Výsledky	28
5.1 Změření nárůstu <i>E. coli</i> v přítomnosti TKI	28
5.1.1 Lenvatinib	28
5.1.2 Vandetanib.....	28
5.1.3 Lapatinib.....	29
5.1.4 Sunitinib.....	30

5.1.5 Cabozantinib	30
5.2 Zjištění produkce metabolitů TKI <i>E. coli</i> pomocí HPLC	31
5.2.1 Kontrola účinnosti extrakce léčiv	31
5.2.2 Analýza suspenze TKI s <i>E. coli</i>	31
5.3 Zjištění vlivu TKI na expresi proteinů u <i>E. coli</i> pomocí SDS-PAGE	33
5.3.1 Lenvatinib	33
5.3.2 Vandetanib	35
5.3.3 Lapatinib	36
5.3.4 Sunitinib	38
5.3.5 Cabozantinib	39
6. Diskuze	41
6.1 Vliv tyrosinkinázové inhibitory na růst <i>E. coli</i>	41
6.2 Schopnost <i>E. coli</i> metabolizovat TKI	42
6.3 Vliv TKI na expresi proteinů u <i>E. coli</i>	42
Závěr	44
Literatura	45

Seznam zkratk:

APS - Aminopersíran

DMSO - Dimethylsulfoxid

E. coli - *Escherichia coli*

EGFR - (*Epidermal growth factor receptor*) Receptor epidermálního růstového faktoru

HPLC - (*High-performance liquid chromatography*) Vysokoučinná kapalinová chromatografie

LB médium - Luria-Bertani médium

RPM - (*Revolutions per minute*) Otáčky za minutu

RTK - Receptorové tyrosinkinázy

SDS - Dodecylsírany sodný

SDS-PAGE - (*Sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis*) Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu za přítomnosti dodecylsírany sodného

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

TKI - Tyrosinkinázové inhibitory

v/v - (*volume/volume*) objemová procenta

VEGF - (*Vascular endothelial growth factor receptor*) Receptor vaskulárního endoteliálního růstového faktoru

w/v - (*weight/volume*) hmotnostní procenta

1. Úvod

1.1 Nádorová onemocnění

Nádorová onemocnění – rakovina jsou skupina onemocnění charakterizovaných neregulovaným růstem buněk a jejich invazí a šířením z místa vzniku (primárního místa) do jiných částí těla [1]. Rakovina je jednou z hlavních příčin úmrtí na celém světě – v roce 2020 způsobila téměř 10 milionů úmrtí, což představuje přibližně jedno z šesti úmrtí [2]. V roce 2000 Hanahan a Weinberg při důkladné analýze definovali šest hlavních znaků většiny, ne-li všech rakovin. Navrhli, že klíčovými schopnostmi rakovinných buněk jsou autonomní růst, vyhýbání se růstovým inhibičním signálům, vyhýbání se apoptóze (buněčné smrti), neomezený replikační potenciál, angiogeneze (tvorba nových krevních cév), a invazivnost spojená s metastázováním [1].

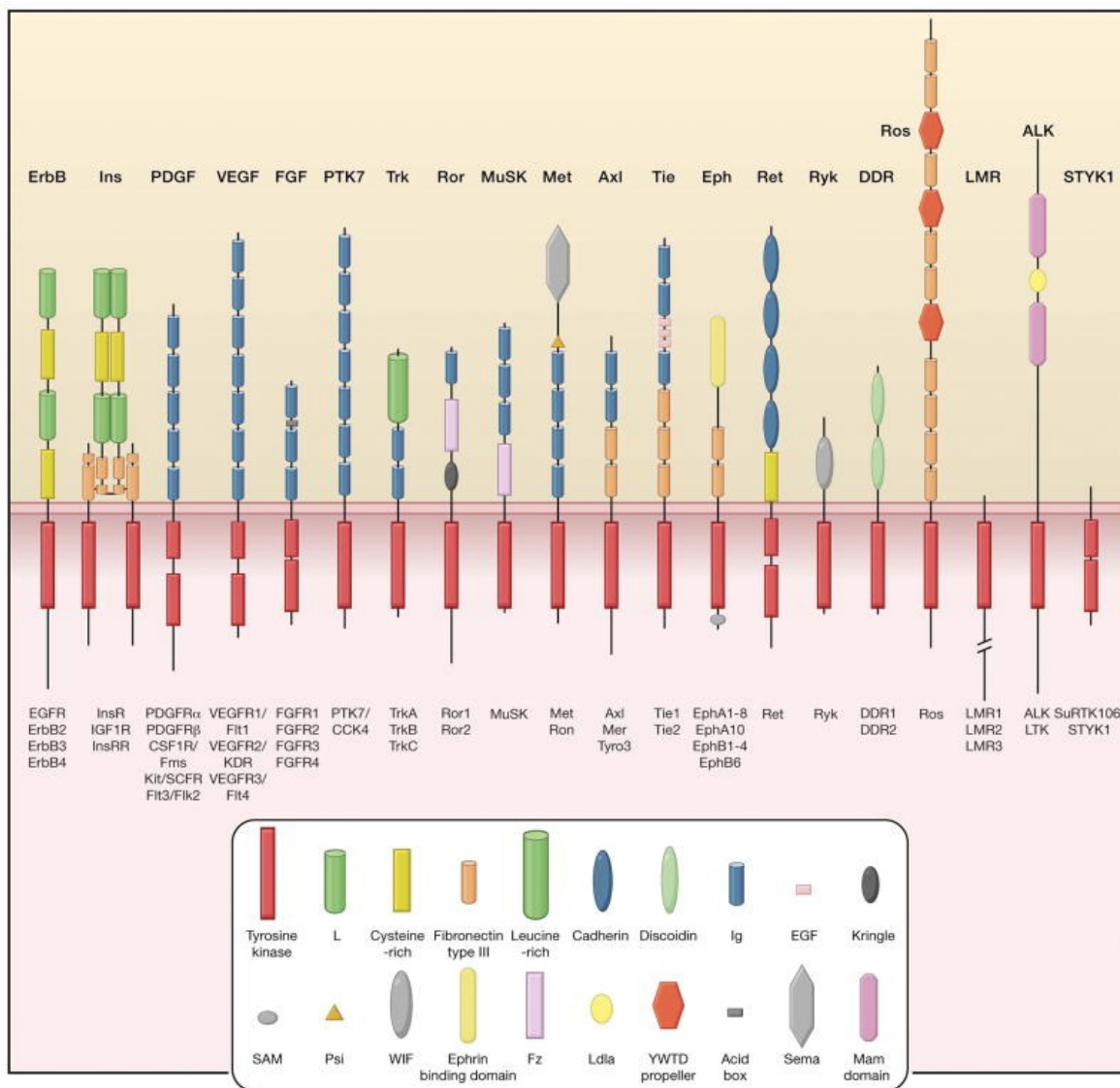
Nezákladnějším znakem rakovinných buněk je jejich schopnost udržovat chronickou proliferaci. Normální tkáň pečlivě kontrolují produkci a uvolňování signálů podporujících růst, které řídí vstup do buněčného cyklu a jeho průběh, čímž zajišťují homeostázi počtu buněk a tím i udržování normální architektury tkáň a funkce. Rakovinné buňky deregulují tyto signály. Zajišťující signály jsou do značné míry přenášeny růstovými faktory, které se vážou na receptory na povrchu buněk, obvykle obsahující intracelulární tyrosinkinázové domény. Tyto signály následně vyvolávají změny prostřednictvím větvených intracelulárních signálních drah, které regulují průběh buněčného cyklu a růst buněk (tedy zvyšování velikosti buněk); často tyto signály ovlivňují i jiné vlastnosti buněk, jako je přežití a energetický metabolismus [3].

1.2 Tyrosinkinázy

Proteinové kinázy fosforylují (přidávají fosfátovou skupinu) na hydroxylovou skupinu specifických aminokyselin v proteinech. Tyrosinové kinázy fosforylují tyrosinové zbytky, zatímco serin/threoninové kinázy fosforylují serinové a threoninové zbytky. Fosforylace vede ke konformační změně a je důležitým mechanismem pro regulaci aktivity proteinu. Kinázy se nacházejí na povrchu buněk jako transmembránové receptory, uvnitř buněk jako intracelulární přenašeče nebo uvnitř jádra. Hrají klíčovou roli v hlavních buněčných funkcích, včetně progresu buněčného cyklu, přenosu signálů a transkripce, a jsou důležitými molekulárními cíli pro návrh léků proti rakovině. Fosforylace je také regulována fosfatázami – enzymy, které odstraňují fosfátové skupiny. Mutace v genech kódujících lidské proteinové tyrosinové fosfatázy naznačují, že některé z nich fungují jako nádorové supresory u některých typů rakoviny [1].

V lidském genomu se nachází přibližně 94 tyrosinkináz (TK), z nich 57 bylo popsáno jako receptorové tyrosinkinázy (RTK), které spadají do 20 rodin (Obrázek 1). RTK mají extracelulární oblast na N-konci proteinu, která obsahuje ektodomény sloužící k rozpoznávání extracelulárních signálních molekul, jednu transmembránovou alfa-helixovou doménu a C-koncovou tyrosinkinázovou doménu [4], [5].

Nereceptorové tyrosinkinázy (nereceptorové TK) postrádají ektodomény a transmembránové oblasti, a tudíž nereagují přímo na extracelulární signály. Některé z těchto tyrosinkináz se však mohou vázat na plazmatickou membránu (například prostřednictvím FBAR domény) a mohou tak reagovat jak na určité extracelulární signály, tak na signály uvnitř buňky [5].



Obr. 1. Rodiny receptorových tyrosinkináz. Lidské receptorové tyrosinkinázy (RTK) obsahují 20 rodin, zobrazených zde schematicky s členy rodiny uvedenými pod každým receptorem. Strukturní domény v extracelulárních oblastech, identifikované určením struktury nebo analýzou sekvencí, jsou označeny podle klíče. Intracelulární domény jsou zobrazeny jako červené obdélníky [4].

1.3 Léčba rakoviny

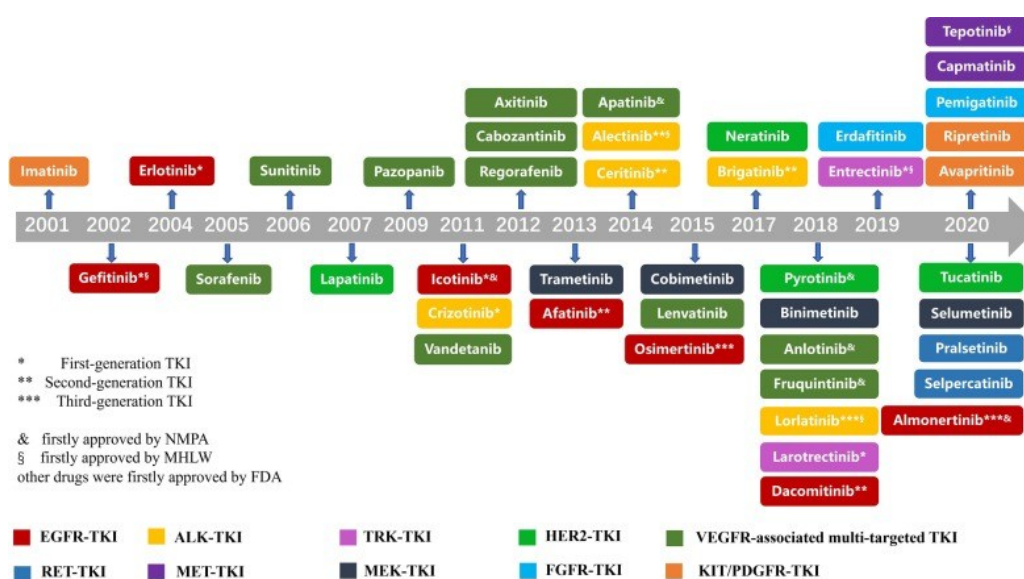
Rakovina je chronické onemocnění, které vážně ohrožuje lidský život. Pro její léčbu bylo vyvinuto mnoho strategií, včetně chirurgie, radioterapie, chemoterapie a cílené terapie. Díky těmto léčebným metodám zůstává standardizovaný výskyt rakoviny u žen na počátku 21. století (2006–2015) stabilní a u mužů mírně poklesl. Míra úmrtnosti na rakovinu (2007–2016) také klesla [6].

Cílená terapie je typ léčby rakoviny, který se zaměřuje na proteiny řídící růst, dělení a šíření rakovinných buněk. Většina cílených terapií jsou buď malé molekulární léky, nebo monoklonální protilátky. Malé molekulární léky jsou dostatečně malé na to, aby snadno pronikly do buněk, takže se používají pro cíle uvnitř buněk [7].

Cílená terapie a personalizovaná medicína jsou nově vznikající obory výzkumu rakoviny zaměřené na léčbu a prevenci [8]. Přejít od cytotoxické chemoterapie k objevování a vývoji molekulárně cílených léků na rakovinu vedl k rostoucímu počtu úspěšných terapií, které ovlivnily životy velkého množství pacientů s rakovinou [9].

1.3.1 Inhibitory tyrosinkináz (TKI)

Tyrosinkinázy se podílejí na vzniku a progresi nádorových onemocnění a staly se hlavními cíli pro objevování nových léků. Inhibitory tyrosinkináz (TKI) blokují odpovídající kinázy, aby nemohly fosforylovat tyrosinové zbytky svých substrátů, a tím brání aktivaci následných signálních drah. Během posledních 20 let bylo vyvinuto mnoho účinných a dobře tolerovaných TKI (Obrázek 2), které cílí na jednotlivé RTK nebo více RTK současně, včetně EGFR, ALK, ROS1, HER2, NTRK, VEGFR, RET, MET, MEK, FGFR, PDGFR a KIT. Tyto léky přispěly k naplnění konceptu precizní onkologické medicíny, založené na genetických alteracích konkrétního pacienta. TKI významně zlepšily přežití a kvalitu života pacientů a změnily léčebný přístup k různým solidním nádorům [10].

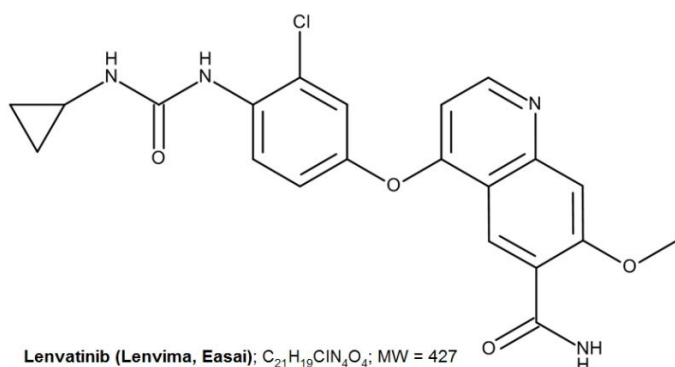


Obr. 2. Schématické shrnutí schválených TKI v letech 2001–2020 [10].

K 27. únoru 2025 existuje 85 inhibitorů proteinových kináz, malých molekul schválených Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA), jak je uvedeno v přehledu Roberta Roskoského Jr. [11]. Tato bakalářská práce se věnuje pěti z těchto schválených inhibitorů.

1.3.1.1 Lenvatinib

Lenvatinib patří do třídy chinolinů; je to karboxamid kyseliny 4-{3-chlor-4-[(cyklopropylkarbamoyl)amino]fenoxy}-7-methoxychinolin-6-karboxylové, který je zobrazen na obrázku 3. [12].



Obr. 3. Zobrazení chemické struktury lenvatinibu [11].

Lenvatinib (Lenvima) je schválen FDA pro léčbu diferencovaného karcinomu štítné žlázy (DTC), který je refrakterní na radioaktivní jód, neresekovatelného nebo pokročilého hepatocelulárního karcinomu (HCC), pokročilého karcinomu ledvin (RCC) a pokročilého karcinomu endometria [13].

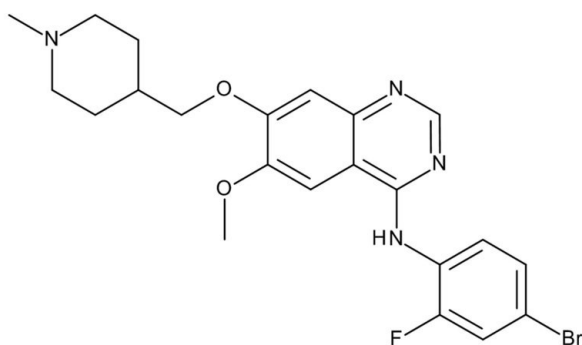
Lenvatinib je zařazen mezi inhibitory typu I $\frac{1}{2}$ A. Tento typ se váže na ATP-vazebné místo kinázy v konformaci DFG-in (aspartát – fenylalanin – glycin), ale s vychýlenou α C-helixovou doménou. Tím stabilizuje částečně aktivní stav receptoru, což umožňuje selektivní inhibici řady kináz, včetně VEGFR, FGFR, RET, PDGFR α a KIT [14].

Inhibice receptorů pro vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF) brání angiogenezi nádorů. Inhibice FGFR, RET, PDGFR α a KIT zabraňuje další proliferaci maligních buněk [13], [14].

Hlavní metabolické dráhy lenvatinibu zahrnují enzymové procesy zprostředkované enzymem CYP3A, aldehydoxidázou a také neenzymové procesy [13].

1.3.1.2 Vandetanib

Vandetanib je derivát chinazolinu. Jeho systematický chemický název je N-(4-bromo-2-fluorfenyl)-6-methoxy-7-[(1-methylpiperidin-4-yl)methoxy]chinazolin-4-amin, který je zobrazen na obrázku 4 [15].



Vandetanib (Caprelsa, IPR Pharms); C₂₂H₂₄BrFN₄O₂; MW = 475

Obr. 4. Zobrazení chemické struktury vandetanibu [11].

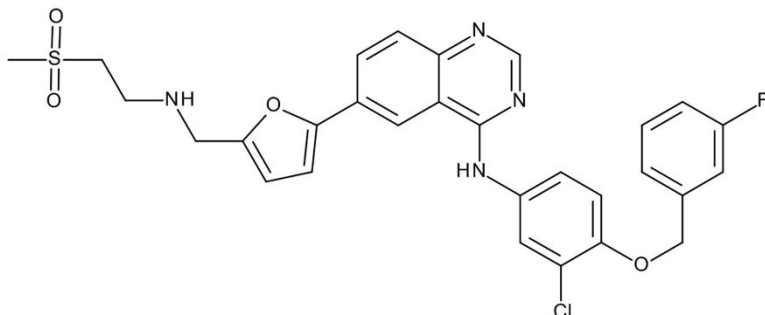
Vandetanib (Caprelsa) je indikován k léčbě symptomatického nebo progredujícího medulárního karcinomu štítné žlázy u pacientů s neresekovatelným lokálně pokročilým nebo metastatickým onemocněním [16].

Vandetanib je inhibitor tyrosinkinázy typu I, který se váže na aktivní (DFG-in) konformaci kinázové domény. Inhibuje RET, VEGFR-2 a EGFR, čímž narušuje signální dráhy podporující růst nádorových buněk a angiogenezi, dále inhibuje receptory RET, BRK, TIE2 a také členů rodiny EPH receptorů a Src kináz [14], [15].

Nezměněný vandetanib a jeho metabolity – vandetanib *N*-oxid a *N*-desmethyl-vandetanib – byly detekovány v plazmě, moči a stolici. Metabolit *N*-desmethyl-vandetanib vzniká primárně působením enzymu CYP3A4, zatímco vandetanib-*N*-oxid je produkován převážně enzymy flavin-dependentními monooxygenázami FMO1 a FMO3 [15].

1.3.1.3 Lapatinib

Lapatinib je malá molekula a patří do třídy 4-anilinochinazolinových inhibitorů kináz. Systematický chemický název je N-[3-chlor-4-[(3-fluorfenyl)methoxy]fenyl]-6-[5-[(2-methylsulfonyl)ethylamino)methyl]furan-2-yl]chinazolin-4-amin, který je zobrazen na obrázku 5 [17].



Lapatinib (Tykerb, SmithKline); $C_{29}H_{26}ClFN_4O_4S$; MW = 581

Obr. 5. Zobrazení chemické struktury lapatinibu [11].

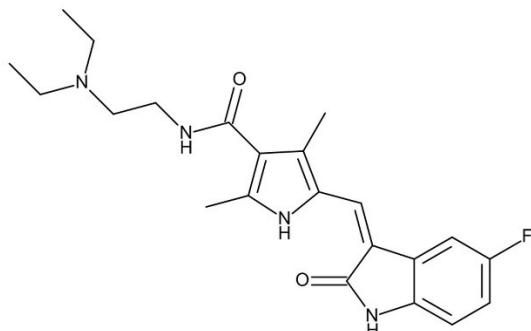
Lapatinib (Tykerb) je protinádorové léčivo ze skupiny tyrosinkinazových inhibitorů, který se používá k léčbě pokročilé nebo metastazující HER-pozitivní rakoviny prsu u pacientek, které již dříve podstoupily chemoterapeutickou léčbu [18].

Lapatinib je zařazen jako inhibitor typu I $\frac{1}{2}$ A. To znamená, že se váže na konformaci kinázy, která má aktivní orientaci DFG motivu (DFG-in), ale neaktivní polohu α C-helixu. Tím stabilizuje nestandardní, částečně neaktivní stav receptoru HER2 a EGFR, což umožňuje účinné a selektivní blokování jejich aktivity [14].

Lapatinib je rozsáhle metabolizován v játrech enzymy CYP3A4 a CYP3A5, s menším podílem CYP2C19 a CYP2C8, třemi hlavními cestami: O-dealkylací, N-dealkylací a N-hydroxylací [18], [19].

1.3.1.4 Sunitinib

Sunitinib patří mezi pyroly a amidy monokarboxylových kyselin. Systematický chemický název je N-[2-(diethylamino)ethyl]-5-[(Z)-(5-fluoro-2-oxo-1H-indol-3-ylidene)methyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrol-3-karboxamide, který je zobrazen na obrázku 6 [20].



Sunitinib (Sutent, Pfizer); $C_{22}H_{27}FN_4O_2$; MW = 398

Obr. 6. Zobrazení chemické struktury sunitinibu [11].

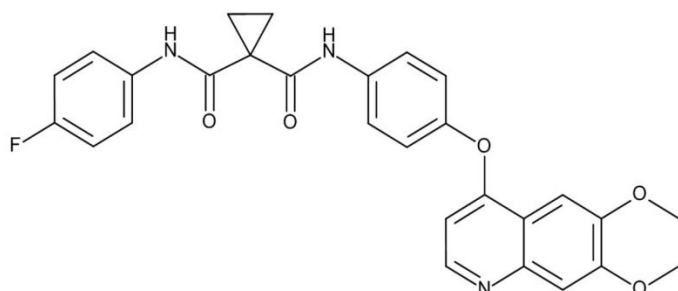
Sunitinib (Sutent) je lék, který patří mezi tzv. inhibitory tyrosinkináz. Dne 26. ledna 2006 byl sunitinib schválen ve Spojených státech pro léčbu rakoviny ledvin a také pro léčbu nádorů trávicího traktu, které už nereagují na jiný lék – imatinib [20].

Sunitinib je podle strukturálních studií řazen jako inhibitor typu I $\frac{1}{2}$ B nebo IIB, což znamená, že se váže na přechodný nebo částečně neaktivní stav kinázové domény. Ve většině případů interaguje s ATP-vazebným místem při zachování DFG-in konformace, ale s neaktivní pozicí α C-helixu [14]. Sunitinib v těle působí tak, že zpomaluje růst nádorových buněk tím, že blokuje různé receptory, které tyto buňky potřebují k růstu. Patří mezi ně receptory pro růstové faktory, které podporují vznik nových cév (VEGF-R), receptory ovlivňující růst buněk (PDGF-R), a také KIT – což je bílkovina, která je často zodpovědná za růst GIST nádorů. Kromě toho sunitinib ovlivňuje i další receptory, jako jsou RET, CSF-1R a FLT3 [20].

Sunitinib je metabolizován převážně enzymem CYP 3A prostřednictvím *N*-deethylace za vzniku hlavního aktivního metabolitu *N*-desethylsunitinibu, který je dále metabolizován enzymem CYP 3A. Metabolit *N*-desethyl má srovnatelnou účinnost se sunitinibem a přispívá k celkovému účinku léčiva. Další metabolické cesty sunitinibu zahrnují: oxidaci na monohydroxylované a *N*-oxidové metabolity, oxidační defluoraci na defluorosunitinib, a přímou glukuronidaci za vzniku glukuronidového konjugátu [21].

1.3.1.5 Cabozantinib

Cabozantinib je diamid dikarboxylové kyseliny. Jeho systematický chemický název je 1-N-[4-(6,7-dimethoxychinolin-4-yloxy)fenyl]-1-N'-(4-fluorfenyl)cyklopropan-1,1-dikarboxamid, který je zobrazen na obrázku 7 [22].



Cabozantinib (Cometriq/Cabometyx, Exelixis);
 $C_{28}H_{24}FN_3O_5$; MW = 501

Obr. 7. Zobrazení chemické struktury cabozantinibu [11].

Cabozantinib (Cometriq/ Cabometyx) byl poprvé schválen v roce 2012 a jedná se o nespecifický inhibitor tyrosinkinázy. Původně byl schválen v USA pod obchodním názvem Cometriq, který je určen k léčbě metastazujícího medulárního karcinomu štítné žlázy. V roce 2016 byla schválena kapslová formulace (Cabometyx) k léčbě pokročilého karcinomu ledvin, a tato stejná formulace získala v roce 2019 další schválení jak v USA, tak v Kanadě pro léčbu hepatocelulárního karcinomu u předléčených pacientů. Od té doby získal Cabometyx několik dalších schválení pro léčbu endokrinních nádorů, včetně diferencovaného karcinomu štítné žlázy a neuroendokrinních tumorů [23].

Cabozantinib je klasifikován jako inhibitor kinázy typu I, který se váže na aktivní konformaci kinázové domény a inhibuje specifické receptorové tyrosinkinázy, jako jsou VEGFR-1, -2 a -3, KIT, TRKB, FLT-3, AXL, RET, MET a TIE-2 [14] , [22].

Cabozantinib je metabolizován převážně enzymem CYP3A4 a v menší míře také enzymem CYP2C9. Oba enzymy produkují N-oxidový metabolit [22].

1.4 Mikrobiom člověka

Lidské tělo hostí biliony mikrobiálních buněk, jejichž koordinované působení je považováno za důležité pro lidský život. Tyto mikrobiální populace dosahují nejvyšší hustoty v oblasti střev, kde společně tvoří komplexní mikrobiální společenství známé jako střevní mikrobiota, které se vyvíjí v průběhu raného věku hostitele, až postupně dosáhne své dospělé formy. Členové střevní mikrobioty mohou patřit ke kterémukoliv ze tří domén života – tj. Archaea, Bacteria a Eukarya – a zahrnují také viry. Je známo, že mezi sebou a s lidským hostitelem vytvářejí komplexní trofické vztahy, sahající od symbiózy po parazitismus.

Rozmanití a početní členové lidské střevní mikrobioty hrají zásadní roli v udržování lidského zdraví tím, že napomáhají rozkladu potravinových látek a uvolňují živiny, které by jinak byly pro hostitele nepřístupné, podporují diferenciaci buněk hostitele, chrání hostitele před kolonizací patogeny a stimulují či modulují imunitní systém [24].

Střevní mikrobiom chrání hostitele před patogeny soutěžením o vazebná místa, soutěžením o živiny a přímou inhibicí prostřednictvím uvolňování inhibičních molekul [25].

Složení gastrointestinální mikrobioty může být ovlivněno řadou environmentálních faktorů, jako je pH, hladina kyslíku/redoxní stav, dostupnost živin, aktivita vody a teplota, což umožňuje různým mikrobiálním populacím prosperovat, vyvíjet různé aktivity a interagovat s prostředím, včetně prostředí lidského hostitele [24].

Střevní mikrobiota dospělého člověka obsahuje až přibližně 1 kg bakterií, z nichž většinu tvoří obligátní anaeroby z rodů *Bacteroides*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Escherichia* a *Bifidobacterium* [26]. V lidském střevním mikrobiomu se nachází nejméně 400 různých druhů bakterií [27].

Složení střevního mikrobiomu může být ovlivněno léky, ale naopak střevní mikrobiom může ovlivňovat individuální odpověď na lék tím, že enzymově mění strukturu léčiva a mění jeho biologickou dostupnost, biologickou aktivitu nebo toxicitu [28].

Střevní mikrobiota je schopna provádět širokou škálu metabolických reakcí na léčivech, jejich metabolitech i dalších xenobiotických. Nejdůležitější biotransformace zahrnují redukční metabolismus a hydrolytické reakce. Kromě toho také dekarboxylace, dehydroxylace, dealkylace, dehalogenace a deaminace [26].

1.4.1 Možné interakce střevního mikrobiomu s léčbou TKI vedoucí k průjmu

Stále více důkazů naznačuje, že střevní mikrobiom by mohl ovlivňovat vznik průjmu vyvolaného inhibitory tyrosinkinázy (TKI) [29]. Dlouhodobá léčba TKI může vést k dysbióze střevního mikrobiomu. Kromě toho přímá inhibice receptorů EGFR nebo VEGFR ve střevě může ovlivnit funkci střevní sliznice – například změny v buněčné proliferaci a kapilární síti – což dále ovlivňuje složení mikrobiomu. Tyto změny mohou vyvolat zánětlivé reakce. Alternativně může zvýšená sekrece chloridových iontů ve střevě (která sama o sobě způsobuje průjem) vést k významným změnám ve složení mikrobiomu, které pak mohou zesílit průjem jako následek kombinovaného účinku [30].

1.5 *Escherichia coli*

Escherichie je gramnegativní tyčinkovitá bakterie patří do kmene Proteobacteria, třídy Gammaproteobacteria, řádu Enterobacteriales, čeledi Enterobacteriaceae a rodu *Escherichia*. Hlavním druhem je *Escherichia coli* (*E. coli*), která je známá jako součást

normální střevní flóry, ale může také způsobovat střevní i mimo střevní onemocnění u lidí [31], [32], [33].

Escherichia coli byla poprvé izolována a popsána bavorským lékařem Theodorem Escherichem v roce 1885 [34].

Escherichie jsou polymorfní přímé nebo mírně zakřivené tyčinky se zaoblenými konci střední velikosti (délka 2–6 μm a šířka 0,4–0,6 μm). Tyčinky se vyskytují jednotlivě, vzácněji v párech. Spory netvoří. Buňky *E. coli* mají pili (fimbrie) a jsou pohyblivé díky peritrichiálně uspořádaným bičíkům. *Escherichie* jsou aerobní nebo fakultativně anaerobní. Optimální teplota růstu je 35–37 °C. Dobře rostou na jednoduchých živných médiích [31].

1.5.1 Vliv změn množství *E. coli* ve střevě na trávení a imunitní systém

1. Pokles *E. coli* a rovnováha mikrobiomu:

Úbytek běžných *E. coli* znamená ztrátu některých jejích funkcí: Udržování efektivního anaerobního prostředí ve střevě, produkce vitamínů (např. vitamínu K), ochrana proti střevním infekcím způsobeným patogeny [34], [35].

2. Nadměrné přemnožení *E. coli* a imunitní odpověď

E. coli je gramnegativní bakterie a její buněčná stěna obsahuje lipopolysacharid (LPS, endotoxin), který silně aktivuje imunitní systém. Při přemnožení *E. coli* tedy dochází k intenzivnější stimulaci imunitních receptorů (např. TLR4) ve střevě, což může vyústit v chronický nízký stupeň zánětu i narušení funkce střevní bariéry. V experimentálních modelech kolitidy se ukázalo, že zvýšená hojnost *E. coli* (například po narušení mikrobiomu antibiotiky) vedla k průniku těchto bakterií skrz střevní stěnu do oběhu a k aktivaci zánětlivých imunitních drah, jako je inflamazóm [36].

Je-li *E. coli* přemnožena v nesprávné části trávicí trubice (např. v tenkém střevě, kde se běžně vyskytuje jen minimálně), může způsobit syndrom bakteriálního přerůstání. V takovém případě nadbytečné bakterie spotřebovávají živiny dříve, než jsou vstřebány hostitelem, a jejich metabolity (plyny, toxiny) vedou k nadýmání, průjmům a zánětlivému dráždění – celkově narušují normální trávení [37].

2. Cíl práce

Cílem této práce bylo zjistit, zda tyrosinkinázové inhibitory ovlivňují mikrobiom člověka, konkrétně *Escherichia coli*.

Při analýze tohoto tématu byly provedeny dílčí fáze:

- a) Změření nárůstu *E. coli* v přítomnosti TKI s pomocí růstové křivky
- b) Zjištění produkce metabolitů TKI *E. coli* pomocí HPLC
- c) Zjištění vlivu TKI na expresi proteinů u *E. coli* pomocí SDS-PAGE

3. Materiál

3.1 Chemikálie a biologické materiály

Escherichia coli	Rosetta 2 (DE3)
Acetonitril	VWR, USA
Akrylamid / bis -akrylamid	Sigma-Aldrich, USA
Aminopersíran (APS)	Sigma-Aldrich, USA
Cabozantinib	LC Laboratories, USA
Dichlormethan	Lach-Ner, Česká republika
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Lach-Ner, Česká republika
Ethylacetát	VWR, USA
Kvasničný extrakt (Yeast Extract)	Oxoid, Veľká Británie
Lapatinib	MedChemExpress, USA
Lenvatinib	LC Laboratories, USA
Methanol	Lach-Ner, Česká republika
NaCl	Lach-Ner, Česká republika
Octan amonný	Penta, Česká republika
Precision Plus Protein™ Dual Colour Standards	Sigma-Aldrich, USA
Sunitinib	MedChemExpress, USA
TEMED	Sigma-Aldrich, USA
Trimethylamin	Sigma-Aldrich, USA
Trisma base (Tris-HCl)	Sigma-Aldrich, USA
Tryptonový prášok	Bio Basic, Kanada
Vandetanib	LC Laboratories, USA

3.2 Pufry a zásobní roztoky

Barvicí roztok:

0,25 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R 250	Serva, Německo
45 % (v/v) methanol	Lach-Ner, Česká republika
10 % (v/v) kyselina octová]	Lach-Ner, Česká republika

Elektrodový pufr: (pH 8,3)

0,025 M Tris/HCl	Lach-Ner, Česká republika
0,192 M glycin	Lach-Ner, Česká republika
0,1 % SDS (w/v)	Sigma-Aldrich, USA

Odbarvovací roztok:

25% (v/v) ethanol	Lach-Ner, Česká republika
10% (v/v) kyselina octová	Lach-Ner, Česká republika

Vzorkový pufr (pH = 6,8):

0,063 M Tris/HCl	Lach-Ner, Česká republika
10% (v/v) glycerol	Lach-Ner, Česká republika
2% (w/v) SDS	Sigma-Aldrich, USA
5% (v/v) β -merkaptoetanol	Fluka, Švýcarsko
0,003% (w/v) bromfenolová modř	Lach-Ner, Česká republika

3.3 Použité přístroje

Aparatura pro elektroforézu Mini-PROTEAN 3 Cell	Bio-Rad, USA
Automatické pipety	Eppendorf, Německo
Centrifuga 5418	Eppendorf, Německo
Centrifuga allegra X-30R	Beckman Coulter, USA
HPLC Systém Ultimate 3000	Thermo Scientific Dionex, USA
Čerpadla RS Pump	
Podavač vzorku RS Autosampler	
Termostat RS Column Compartment	
UV/Vis detektor RS Diode Array Detector	
Incubátor mini Dry Bath MiniB-100	Miulab, Čína
Minicentrifuga	Labnet, Korea
Sonikátor UC 005 AJ1	Tesla, Česká republika

Spektrometr

Metash Instruments Co, Čína

Thermomixer compact

Eppendorf, Německo

Třepací inkubátor

Hangzhou Miu Instruments, Čína

Třepačka WiseShake SHO-2D

Witeg, Německo

4. Metody

4.1 Změření nárůstu *E. coli* v přítomnosti TKI s pomocí růstovou křivky

4.1.1 Práce s buňkami

Změření nárůstu *E. coli* bylo prováděno zvlášť pro každý inhibitor.

Buňky *E. coli* kmene Rosetta 2 (DE3) byly napipetovány do flakónku a následně inkubovány přes noc v 10 ml LB média při 37 °C.

Ráno byly připraveny vzorky léčiv (vandetanibu, lenvatinibu, cabozantinibu, sunitinibu, lapatinibu) o koncentracích 0; 0,1; 1; 5 mg/ml, které byly rozpuštěny v DMSO. Do dvanácti flakónků (triplikáty pro každou testovanou koncentraci inhibitoru) bylo přidáno 150 µl inhibitoru, 15 ml LB média a 100 µl suspenze *E. coli* v LB médiu. Následně bylo odebráno 1 ml roztoku do Eppendorfových zkumavek a byla prováděna měření absorbance v časech 0; 0,5; 1; 2; 3; 5; 7; 9; 12 a 24 hodin při vlnové délce 600 nm. Po změření byly vzorky uloženy do mrazicího boxu pro další analýzu.

4.2 Zjištění produkce metabolitů TKI *E. coli* pomocí HPLC

4.2.1 Kontrola

Před analýzou vzorků *E. coli* s TKI byla provedena kontrola účinnosti extrakce léčiv zvlášť pro každý inhibitor.

Extrakce vzorků byla prováděna za použití dichlormethanu pro vandetanib, zatímco pro ostatní léčiva byl použit ethylacetát. Pipetované objemy jednotlivých rozpouštědel jsou uvedeny v tabulce 1. Postup extrakce byl shodný s tím, který byl použit u vzorků obsahujících *E. coli* (viz kapitola 4.2.2)

Tab. 1. Přehled objemů pro kontrolu účinnosti extrakce léčiv

Konc. TKI [mg/ml]	Objem TKI [µl]	Objem Médium [µl]	1.Extrakce [µl]	2.Extrakce [µl]	Odebráno z extrakce [µl]
0,1	10	90	100	100	75 a 75
0,1	10	90	100	0	75
1	10	90	100	100	75 a 75
1	10	90	100	0	75
5	10	90	100	100	75 a 75
5	10	90	100	0	75
0,1	10	0	200	0	0
1	10	0	200	0	0
5	10	0	200	0	0

4.2.2 Analýza metabolitů TKI ve vzorcích *E. coli*

Detekce produkce metabolitů TKI bakteriemi *E. coli* byla prováděna samostatně pro každý jednotlivý tyrosinkinázový inhibitor.

Po provedení kontroly účinnosti extrakce léčiv bylo zjištěno, že pro všechna léčiva postačuje jedna extrakce, s výjimkou vandetanibu, u něhož jsou nutné dvě extrakce. Po rozmrazení vzorků, které byly po měření absorbance skladovány v mrazicím boxu, byl do každé zkumavky přidán 1 ml dichlormethanu pro vandetanib, zatímco pro ostatní léčiva byl přidán 1 ml ethylacetátu.

Všechny zkumavky byly umístěny na třepačku na 2 minuty (37 °C, 1400 RPM). Po uplynutí doby byly vzorky centrifugovány po dobu 3 minut při 15 000 g. Následně bylo odebráno 800 µl organické fáze do skleněných zkumavek. U vzorků s vandetanibem byla poté provedena druhá extrakce za shodných podmínek. Odebraná organická fáze z druhé extrakce byla sloučena se vzorkem z první extrakce ve stejné zkumavce. Vzorky byly vloženy na cca 45 minut na odparku, kde došlo k odpaření do sucha. Následně bylo ke každému vzorku přidáno 50 µl methanolu a bylo provedeno měření na HPLC. Parametry HPLC metody jsou shrnuty v tabulce 2 a 3. Pro všechny léčiva byl použit UV detektor.

Tab. 2. Parametry HPLC pro všechna léčiva.

Léčiva	Průběh a složení mobilní fáze	Typ kolony	Teplota kolony [°C]	Objem nástřiku [μl]	Průtok [ml/min]	Čas analýzy [min]	Detekční vlnová délka [nm]
Vandetanib	Gradient 0,5% trimethylamin o pH 7 a acetonitril (viz tabulka 3)	Nucleosil 100-5, C18, 5μm, 4,6 × 250 mm	40	15	1,0	15	254
Lapatinib	Isokratický 20mM octan amonný o pH 7 a acetonitril	Nucleosil 100-5, C18, 5μm, 4,6 × 150 mm	40	15	0,7	10	310
Lenvatinib	Isokratický 20mM octan amonný o pH 7 a acetonitril	Nucleosil 100-5, C18, 5μm, 4,6 × 150 mm	37	15	0,7	15	254
Sunitinib	Gradient 20mM octan amonný o pH 7 a acetonitril (viz tabulka 3)	Nucleosil 100-5, C18, 5μm, 4,6 × 150 mm	40	15	1,0	12	431
Cabozantinib	Isokratický 60 % acetonitril a 40% octan amonný	Nucleosil 100-5, C18, 5μm, 4,6 × 150 mm	37	15	1,0	10	254

Tab. 3. Parametry gradientu HPLC pro sunitinib a vandetanib.

Sunitinib Gradient		Vandetanib Gradient	
Čas [min]	Acetonitril [%]	Čas [min]	Acetonitril [%]
0	5	0	15
4	5	15	60
7	80		
11	80		
12	5		

4.3 Zjištění vlivu TKI na exprese proteinů u *E. coli* pomocí SDS-PAGE

Pro separaci proteinů podle jejich molekulové hmotnosti byla využita metoda SDS-PAGE (elektroforéza v polyakrylamidovém gelu za přítomnosti dodecylsírany sodného).

4.3.1 Příprava gelů

Byl připraven stojan pro odlévání gelu. V kádince byla připravena směs pro 12% separační gel (tabulka 4), která byla následně nalita mezi skla pomocí pipety. Na povrch separačního gelu byla přidána vrstva destilované vody. Gel byl ponechán ztuhnout po dobu 45 min. Po ztuhnutí separačního gelu byl na něj nanesen 4% zaostřovací gel (tabulka 5), vložen hřeben a gel byl ponechán ztuhnout dalších 45 minut.

Tab. 4. Příprava 12 % separačního gelu pro 2 gely

Složení 12 % separačního gelu (gel A)	Objem
Pufr A: 1,5 M TRIS/HCl (pH 8,8)	6,0 ml
Polymerační roztok (30 %): 29 % akrylamid (w/v), 1 % bis-akrylamid (w/v)	4,0 ml
TEMED	10 μ l
APS 100mg/ml	100 μ l

Tab. 5. Příprava 4 % zaostřovacího gelu pro 2 gely

Složení 4 % zaostřovacího gelu (gel B)	Objem
Pufr B: 1,0 M TRIS/HCl (pH 6,8)	3,5 ml
Polymerační roztok (30 %): 29 % akrylamid (w/v), 1 % bis-akrylamid (w/v)	533 μ l
TEMED	4 μ l
APS 100mg/ml	80 μ l

4.3.2 Příprava vzorků

Vzorky ve flakoncích po 24hodinové inkubaci byly centrifugovány po dobu 5 minut při 3000 g. Po centrifugaci zůstal pouze tuhý zbytek, zatímco roztok byl odstraněn. Vzorky byly rozpuštěny v 0,5 ml destilované vody za použití vortexu a sonikace po dobu 30 sekund. Z každého vzorku bylo odebráno 10 μ l do 0,5 ml Eppendorfovy zkumavky, následně bylo přidáno 5 μ l destilované vody a 5 μ l 4 \times koncentrovaného redukujícího vzorkového pufru. Marker Bio-Rad Precision Plus Protein Dual Colour Standards byl připraven 2 \times ředěním.

4.3.3 Příprava aparatury

Do aparatury Bio-Rad pro SDS elektroforézu byly vloženy ztuhnuté gely, zality elektrodoým pufrem, hřeben byl opatrně odstraněn a do jednotlivých drah byly pipetovány vzorky (tabulka 6).

Tab. 6. Pipetování vzorků do jednotlivých drah a objemy nanesené pro SDS elektroforézu.

Draha	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Vzorek	Marker	0A	0B	0C	0,1A	0,1B	0,1C	1A	1B	1C	5A	5B	5C
Objem [μl]	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10

Aparatura byla uzavřena víkem a připojena ke zdroji. Napětí bylo nastaveno na 120 V a aplikováno po dobu 10 minut. Poté bylo napětí zvýšeno na 210 V a separace probíhala po dobu přibližně 1 hodiny. Po dokončení elektroforézy byl gel barven v barvicím roztoku po dobu 20 minut. Gel byl následně přenesen do odbarvovacího roztoku, kde byl odbarvován dvakrát a ponechán přes noc. K vyhodnocení výsledků gelů byl použit program GelAnalyzer.

4.4 Statistika

Prezentované hodnoty představují průměry ze tří nezávislých měření včetně směrodatných odchylek. Pro zhodnocení statistické významnosti byl použit Studentův t-test, přičemž hladina významnosti byla stanovena na 0,05.

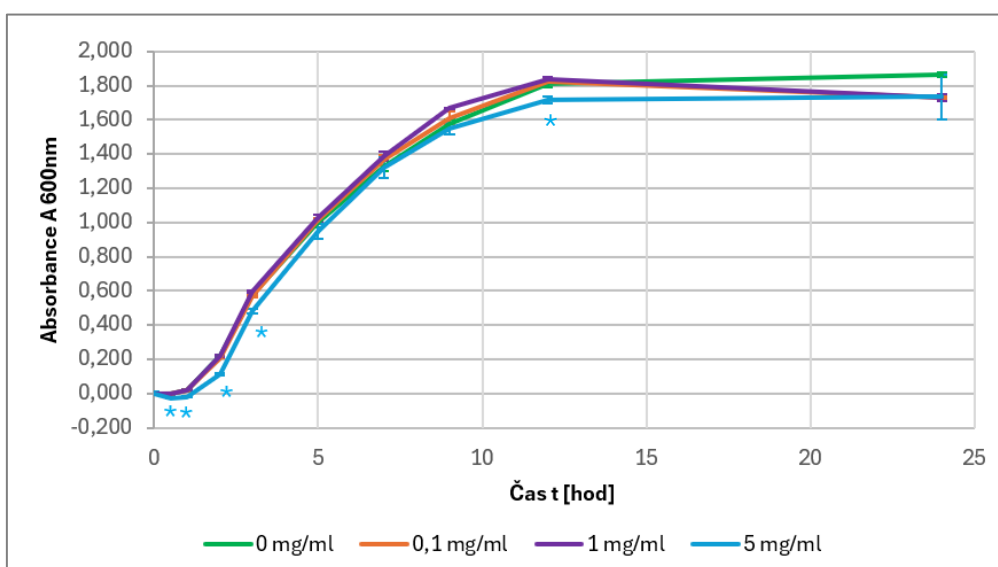
5. Výsledky

5.1 Změření nárůstu *E. coli* v přítomnosti TKI

Pro sledování růstu *E. coli* v přítomnosti tyrosinkinázových inhibitorů (TKI) byla měřena absorbance roztoku obsahujícího *E. coli* v LB médiu při vlnové délce 600 nm. Měření byla prováděna v časových intervalech 0; 0,5; 1; 2; 3; 5; 7; 9; 12 a 24 hodin v tripletu. Na základě získaných hodnot byly sestaveny růstové křivky, které jsou zobrazeny na obrázcích 8–12 pro každý jednotlivý inhibitor.

5.1.1 Lenvatinib

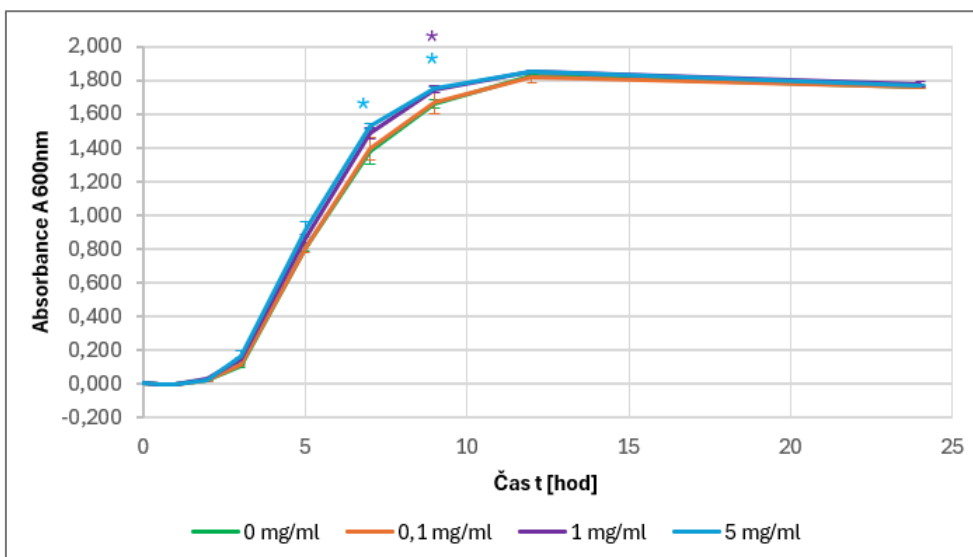
Na obrázku 8 je patrné, že při koncentracích lenvatinibu 0,1 mg/ml a 1 mg/ml došlo k mírnému nárůstu absorbance, což naznačuje, že lenvatinib v těchto koncentracích může mírně stimulovat růst *E. coli*. Naopak při koncentraci 5 mg/ml byl pozorován mírný pokles absorbance, což ukazuje na možný inhibiční účinek lenvatinibu na růst *E. coli* při vyšší koncentraci.



Obr. 8. Zavislost absorbance na čase při různých koncentracích lenvatinibu. Hvězdička „*“ označuje signifikantní rozdíl ($p < 0,05$) oproti kontrolní skupině pro příslušnou koncentraci.

5.1.2 Vandetanib

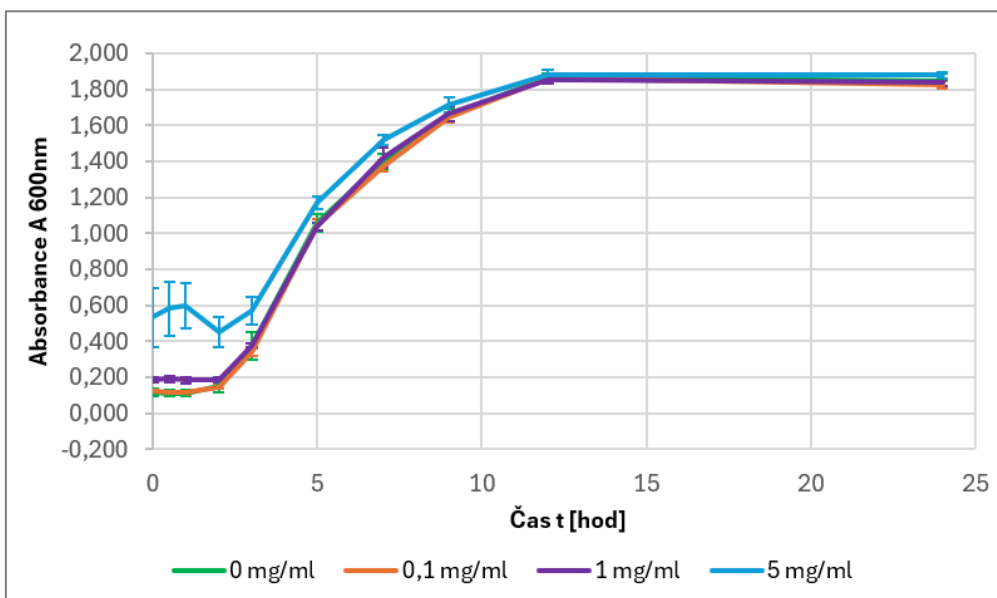
Na obrázku 9 je patrné, že při koncentraci vandetanibu 0,1 mg/ml se hodnoty absorbance nelišily od kontrolního vzorku, což naznačuje, že nízká koncentrace vandetanibu nemá vliv na růst *E. coli*. Se zvyšující se koncentrací vandetanibu byl pozorován nárůst absorbance, což znamená, že při koncentracích 1 mg/ml a 5 mg/ml došlo ke stimulaci růstu *E. coli*.



Obr. 9. Zavislost absorbance na čase při různých koncentracích vandetanibu. Hvězdička „*“ označuje signifikantní rozdíl ($p < 0,05$) oproti kontrolní skupině pro příslušnou koncentraci.

5.1.3 Lapatinib

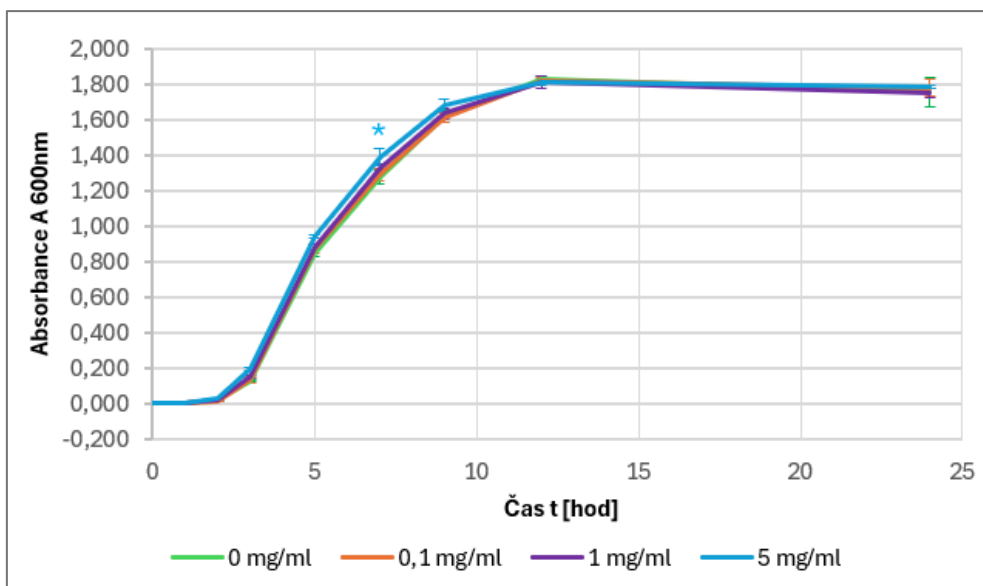
Na obrázku 10 je patrné, že při nejvyšší koncentraci lapatinibu (5 mg/ml) bylo možné pozorovat zvýšení hodnot absorbance, což naznačuje, že lapatinib možná stimuluje růst *E. coli* pouze při vysoké koncentraci, ale rozptyl je vysoký, a výsledek tak nelze považovat za významný (viz diskuse 6.1).



Obr. 10. Zavislost absorbance na čase při různých koncentracích lapatinibu.

5.1.4 Sunitinib

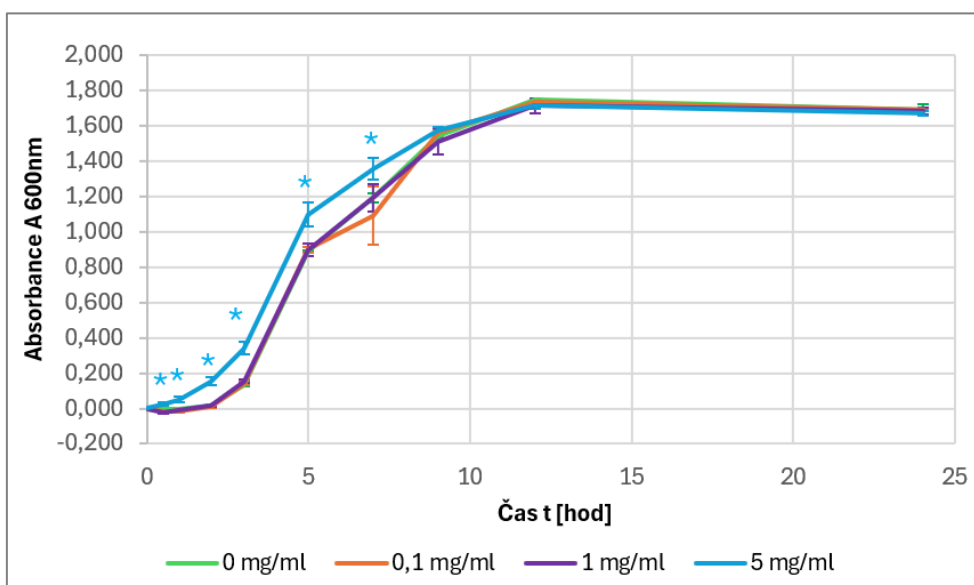
Na obrázku 11 je patrné, že se zvyšující se koncentrací sunitinibu dochází k mírnému nárůstu hodnot absorbance, což naznačuje, že sunitinib má výraznější stimulační účinek na růst *E. coli* při vyšších koncentracích.



Obr. 11. Zavislost absorbance na čase při různých koncentracích sunitinibu. Hvězdička „*“ označuje signifikantní rozdíl ($p < 0,05$) oproti kontrolní skupině pro příslušnou koncentraci.

5.1.5 Cabozantinib

Na obrázku 12 je patrné, že při koncentracích cabozantinibu 0 mg/ml, 0,1 mg/ml a 1 mg/ml byla růstová křivka téměř totožná s kontrolním vzorkem, což naznačuje, že cabozantinib v těchto koncentracích nemá vliv na růst *E. coli*. Při vysoké koncentraci (5 mg/ml) došlo k výrazné stimulaci růstu *E. coli*.



Obr. 12. Zavislost absorbance na čase při různých koncentracích cabozantinibu. Hvězdička „*“ označuje signifikantní rozdíl ($p < 0,05$) oproti kontrolní skupině pro příslušnou koncentraci.

5.2 Zjištění produkce metabolitů TKI *E. coli* pomocí HPLC

5.2.1 Kontrola účinnosti extrakce léčiv

Byla provedena kontrola účinnosti extrakce léčiv z LB média za použití extrakčních činidel – pro vandetanib byl použit dichlormethan, pro ostatní léčiva ethylacetát. Analyzované vzorky byly zpracovány pomocí HPLC. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 7, ze které vyplývá, že pro všechna léčiva s výjimkou vandetanibu postačuje jedna extrakce.

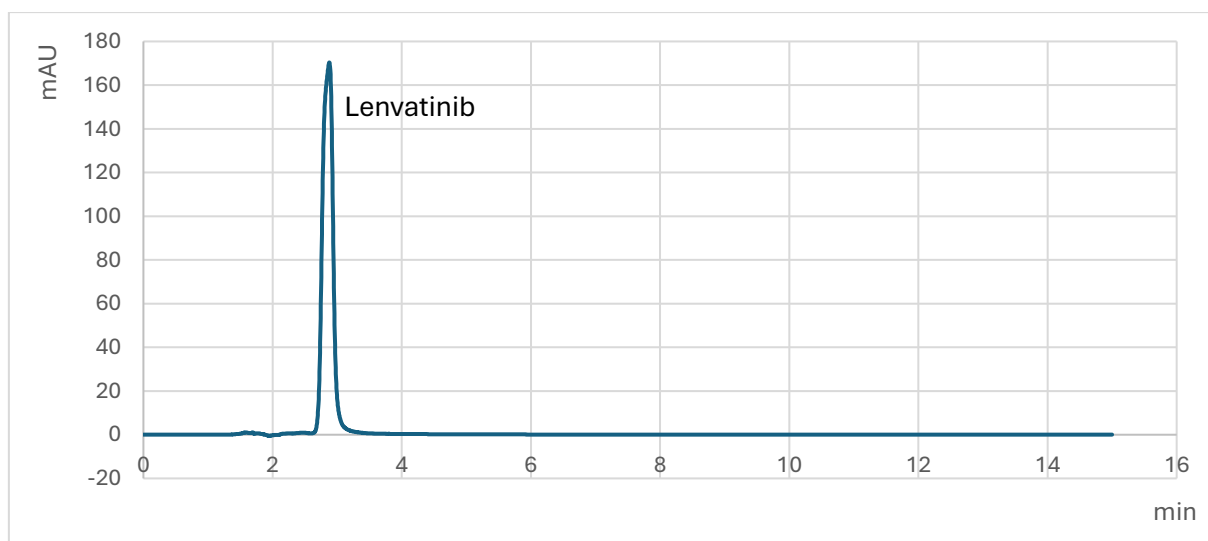
Tab. 7. Výsledky kontroly extrakce léčiv

Léčivo	Účinnost při 1.extrakci [%]			Účinnost při 2.extrakci [%]		
	0,1 mg/ml	1 mg/ml	5 mg/ml	0,1 mg/ml	1 mg/ml	5 mg/ml
Lenvatinib	98 ± 3	95 ± 8	97 ± 3	95 ± 2	95 ± 4	102 ± 4
Vandetanib	87 ± 5	80 ± 8	60 ± 12	94 ± 3	101 ± 7	92 ± 3
Lapatinib	96 ± 6	95 ± 4	94 ± 7	93 ± 4	95 ± 6	99 ± 6
Sunitinib	89 ± 4	91 ± 3	87 ± 2	91 ± 4	92 ± 4	90 ± 3
Cabozantinib	94 ± 11	92 ± 5	95 ± 8	93 ± 7	94 ± 8	104 ± 6

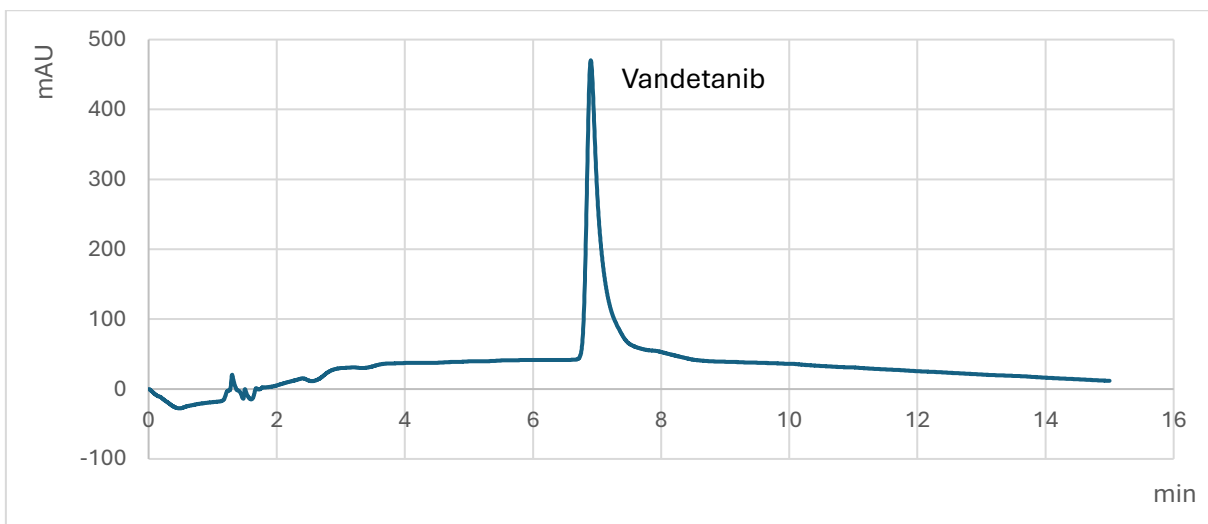
5.2.2 Analýza suspenze TKI s *E. coli*

Byla provedena časová analýza produkce metabolitů tyrosinkinázových inhibitorů (TKI) u *E. coli* během inkubační periody. Vzorky byly odebírány v časových bodech: 0, 0,5, 1, 2, 3, 5, 7, 9, 12 a 24 hodin po zahájení inkubace. K analýze metabolitů byla použita vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC). Pro každý z testovaných inhibitorů byl pomocí softwaru Chromeleon 7 získán chromatografický záznam, jehož výsledky jsou znázorněny na obrázcích 13–17.

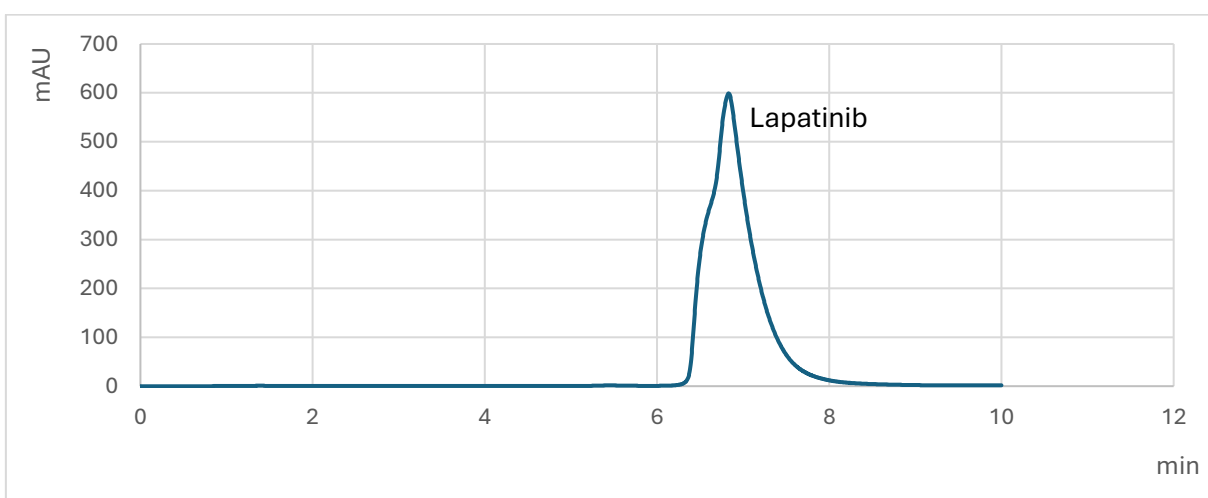
Ve všech analyzovaných časových bodech (0 až 24 hodin) byl na HPLC chromatogramech detekován jediný výrazný pík odpovídající příslušnému léčivu. Během inkubace nebyly pozorovány žádné další separované píky, které by naznačovaly tvorbu detekovatelných metabolitů.



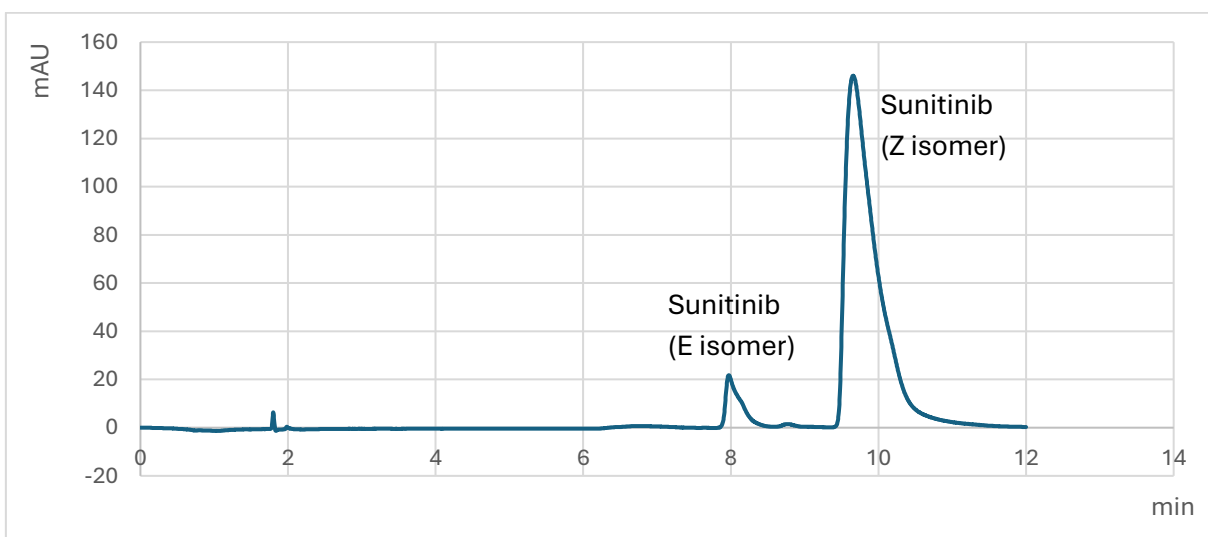
Obr. 13. Chromatografický záznam přeměny lenvatinibu u *E. coli*.



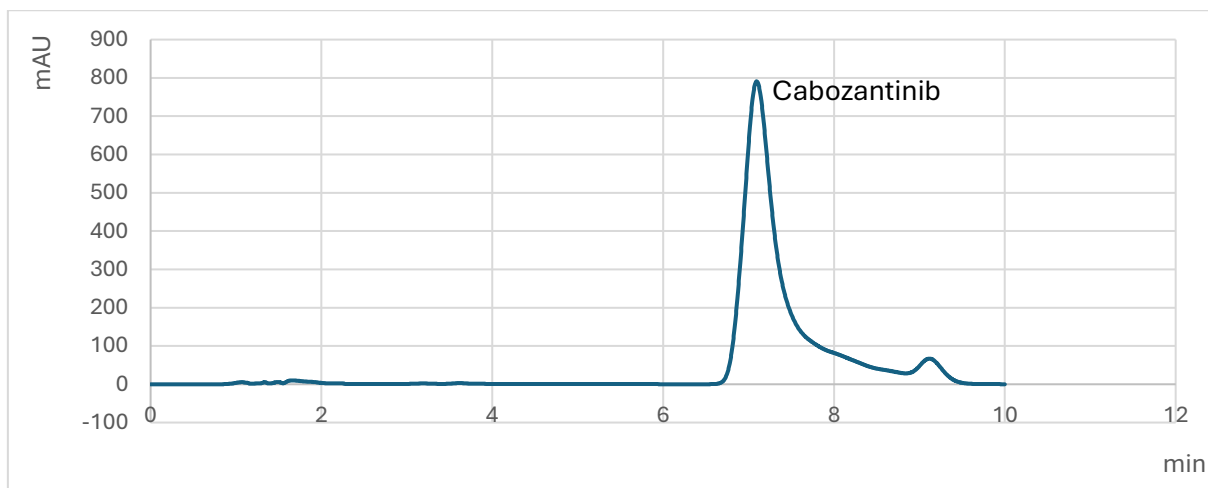
Obr. 14. Chromatografický záznam přeměny vandetanibu u *E. coli*.



Obr. 15. Chromatografický záznam přeměny lapatinibu u *E. coli*.



Obr. 16. Chromatografický záznam přeměny sunitinibu u *E. coli*.



Obr. 17. Chromatografický záznam přeměny cabozantinibu u *E. coli*.

5.3 Zjištění vlivu TKI na expresi proteinů u *E. coli* pomocí SDS-PAGE

K vyhodnocení vlivu lenvatinibu na expresi proteinů *Escherichia coli* byla použita metoda SDS-PAGE. Elektroforéza byla provedena po 24hodinové inkubaci bakteriálních kultur s různými koncentracemi tyrosinkinazových inhibitorů. Vzorky byly separovány na 12% polyakrylamidovém gelu při konstantním napětí 210 V po dobu cca 60 minut.

Pomocí této metody byly získány gely, které jsou zobrazeny na obrázcích 18–22, pro jednotlivé tyrosinkinázové inhibitory. Na těchto gelech bylo možné sledovat změny v expresi proteinů *E. coli* v závislosti na použité koncentraci inhibitoru. Intenzita jednotlivých proteinových pásů byla kvantifikována pomocí programu GelAnalyzer, který umožňuje objektivní porovnání mezi jednotlivými vzorky. Výsledky této analýzy jsou uvedeny v tabulkách 8–17. Popis a objemy použitých vzorků jsou uvedeny v tabulce 6.

5.3.1 Lenvatinib

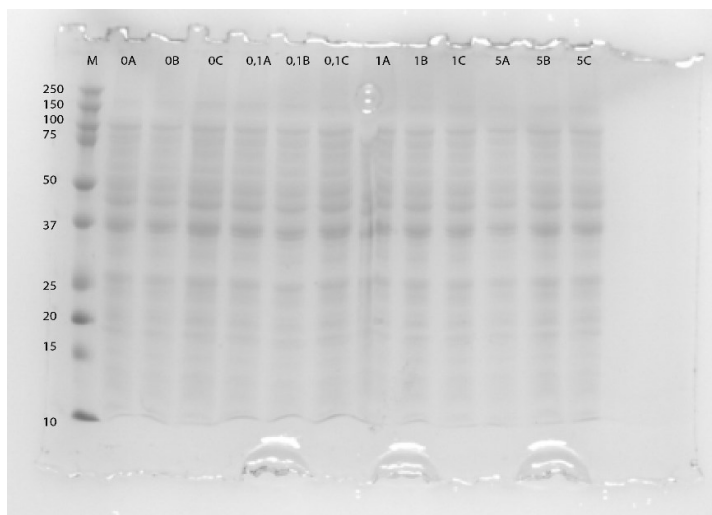
Při kvantitativním vyhodnocení gelu, který je zobrazen na obrázku 18, pomocí programu GelAnalyzer byly zaznamenány změny v intenzitě proteinových pásů. Při koncentraci 0,1 mg/ml dosahovala celková relativní intenzita proteinových pásů hodnoty $(0,964 \pm 0,049)$ oproti kontrole, zatímco při koncentraci 5 mg/ml klesla na $(0,901 \pm 0,059)$. Tyto výsledky naznačují, že se zvyšující se koncentrací dochází k výraznější inhibici celkové exprese proteinů v buňkách *Escherichia coli*.

Z tabulky 9 je patrné, že ve vysokomolekulových hmotnostních pásmech dochází k mírnému nárůstu exprese při nižších koncentracích lenvatinibu. Nejvýraznější zvýšení exprese bylo pozorováno při koncentraci 1 mg/ml v pásmu nad 250 kDa $(1,099 \pm 0,064)$, což může naznačovat aktivaci proteinů s vyšší molekulovou hmotností. Naopak ve středně vysokých hmotnostních pásmech byl při vyšších koncentracích lenvatinibu zaznamenán pokles exprese – například v pásmu (50–37) kDa byla při koncentraci 0,1 mg/ml relativní intenzita $(0,932 \pm 0,074)$, zatímco při 5 mg/ml byla pozorovaná nejmenší hodnota $(0,845 \pm 0,070)$. Také v pásmu nízké molekulové hmotnosti došlo k poklesu exprese – např. v pásmu (25-20) kDa intenzita klesla z

($0,935 \pm 0,071$) při 0,1 mg/ml na ($0,854 \pm 0,074$) při 5 mg/ml. Tento trend může naznačovat selektivní ovlivnění syntézy proteinů v závislosti na jejich molekulové hmotnosti.

Většina proteinových pásů vykazovala pokles exprese při koncentraci 5 mg/ml, což může naznačovat inhibiční efekt lenvatinibu při vysoké koncentraci.

Na základě výsledků uvedených v tabulkách 8 a 9 bylo zjištěno, že se zvyšující se koncentrací lenvatinibu dochází k postupnému poklesu jak celkové exprese, tak i exprese jednotlivých proteinových frakcí *E. coli*.



Obr. 18. Výsledky SDS-PAGE analýzy proteinů *E. coli* po inkubaci s lenvatinibem. Ve sloupci M je marker (Bio-Rad Precision Plus Protein Dual Colour Standards) s referenčními molekulovými hmotnostmi. Ostatní sloupce představují vzorky s rostoucí koncentrací lenvatinibu ve formě tripletů.

Tab. 8. Změna exprese proteinů v přítomnosti lenvatinibu v celkové dráze oproti kontrole.

Zelenou barvou jsou označeny statisticky signifikantní rozdíly ($p < 0,05$).

	0,1mg/ml	1 mg/ml	5mg/ml
Celková	0,964 ± 0,049	0,946 ± 0,045	0,901 ± 0,059

Tab. 9. Změna exprese proteinů v přítomnosti lenvatinibu v jednotlivých pásmech

molekulové hmotnosti oproti kontrole. Zelenou barvou jsou označeny statisticky signifikantní rozdíly ($p < 0,05$).

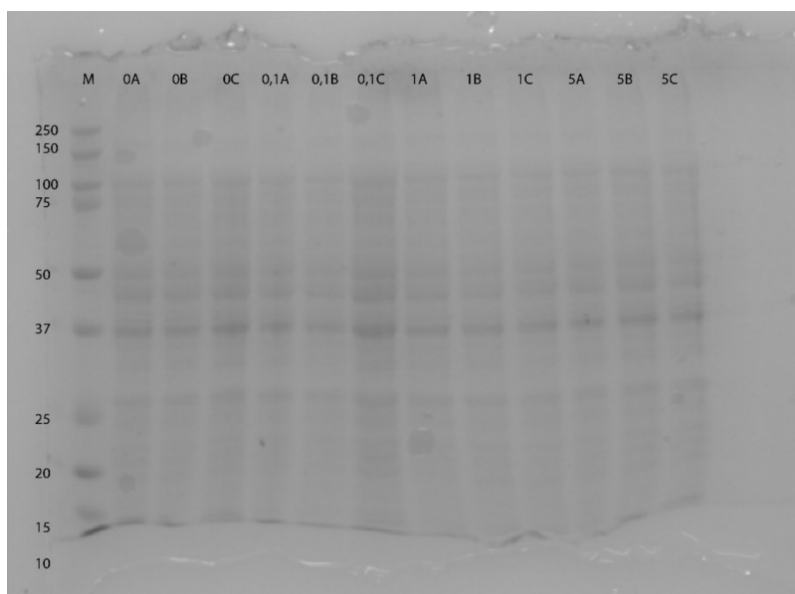
M [kDa]	0,1mg/ml	1 mg/ml	5mg/ml
>250	1,031 ± 0,082	1,099 ± 0,064	0,968 ± 0,056
150-100	1,004 ± 0,066	1,050 ± 0,070	1,007 ± 0,068
100-75	0,951 ± 0,075	0,946 ± 0,058	0,890 ± 0,067
75-50	0,955 ± 0,074	0,942 ± 0,101	0,872 ± 0,070
50-37	0,932 ± 0,074	0,919 ± 0,077	0,845 ± 0,070
37-25	0,986 ± 0,032	0,937 ± 0,052	0,867 ± 0,076
25-20	0,935 ± 0,071	0,910 ± 0,072	0,854 ± 0,074
20-15	0,950 ± 0,066	0,904 ± 0,065	0,863 ± 0,079
15 -10	0,950 ± 0,047	0,936 ± 0,051	0,861 ± 0,042

5.3.2 Vandetanib

Při kvantitativním vyhodnocení gelu, který je zobrazen na obrázku 19, pomocí programu GelAnalyzer byly zaznamenány změny v intenzitě proteinových pásů. Tabulka 10 ukazuje, že při koncentraci 0,1 mg/ml byla celková intenzita proteinových pásů ($0,991 \pm 0,026$), zatímco při 5 mg/ml poklesla jen mírně na ($0,967 \pm 0,011$). Při nízké koncentraci vandetanibu téměř nedochází ke změně exprese proteinů. Při koncentraci 5 mg/ml má pouze slabý vliv na celkovou expresi proteinů *E. coli*, avšak může selektivně inhibovat expresi některých proteinů v buňkách *Escherichia coli*.

Z tabulky 11 je patrné, že ve vysokomolekulových hmotnostních pásmech dochází pravděpodobně k mírnému zvýšení exprese, zejména v oblasti nad 250 kDa ($1,023 \pm 0,025$ při 5 mg/ml). Naopak ve středně- a nízkomolekulárních pásmech byl při vysoké koncentraci pozorován mírný pokles exprese, což může souviset s inhibicí určitých proteinů. Nejnižší hodnota byla naměřena v pásmu (75-50) kDa při 5 mg/ml ($0,938 \pm 0,025$). Při nízké koncentraci vandetanibu nebyl pozorován žádný vliv na expresi proteinů.

Celkově lze říct, se zvýšením koncentrace vandetanibu dochází k mírnému poklesu exprese proteinů *E. coli*.



Obr. 19. Výsledky SDS-PAGE analýzy proteinů *E. coli* po inkubaci s vandetanibem. Ve sloupci M je marker (Bio-Rad Precision Plus Protein Dual Colour Standards) s referenčními molekulovými hmotnostmi. Ostatní sloupce představují vzorky s rostoucí koncentrací vandetanibu ve formě tripletů.

Tab. 10. Změna exprese proteinů v přítomnosti vandetanibu v celkové dráze oproti kontrole. Zelenou barvou jsou označeny statisticky signifikantní rozdíly ($p < 0,05$).

	0,1mg/ml	1 mg/ml	5mg/ml
Celková	0,991 ± 0,026	0,969 ± 0,016	0,967 ± 0,011

Tab. 11. Změna exprese proteinů v přítomnosti vandetanibu v jednotlivých pásmech molekulové hmotnosti oproti kontrole. Zelenou barvou jsou označeny statisticky signifikantní rozdíly ($p < 0,05$).

M [kDa]	0,1mg/ml	1 mg/ml	5mg/ml
>250	1,000 ± 0,030	1,002 ± 0,026	1,023 ± 0,025
250-150	0,995 ± 0,029	0,966 ± 0,034	0,974 ± 0,019
150-75	0,995 ± 0,033	0,976 ± 0,017	0,989 ± 0,015
75-50	0,979 ± 0,034	0,962 ± 0,032	0,938 ± 0,025
50-37	0,995 ± 0,034	0,958 ± 0,011	0,963 ± 0,031
37-25	0,996 ± 0,038	0,971 ± 0,045	0,969 ± 0,047
25-20	0,997 ± 0,018	0,977 ± 0,016	0,974 ± 0,006
20-15	0,982 ± 0,042	0,967 ± 0,013	0,968 ± 0,104

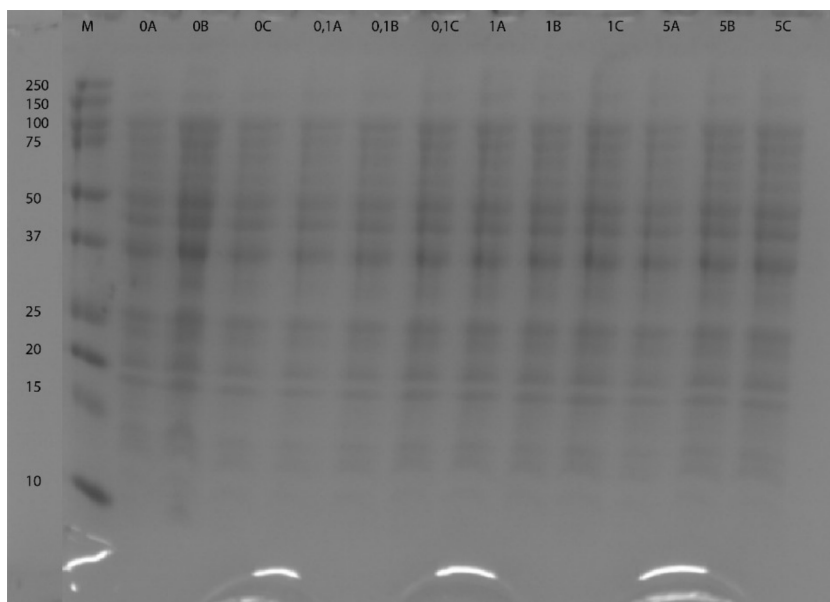
5.3.3 Lapatinib

Při kvantitativním vyhodnocení gelu, který je zobrazen na obrázku 20, pomocí programu GelAnalyzer byly zaznamenány změny v intenzitě proteinových pásů. Jak ukazuje tabulka 12, celková exprese proteinů *E. coli* mírně klesá se zvyšující se koncentrací lapatinibu. Při koncentraci 0,1 mg/ml činí celková relativní intenzita ($0,996 \pm 0,029$), zatímco při 5 mg/ml klesá na ($0,965 \pm 0,028$). Při nízké koncentraci lapatinibu téměř nedochází ke změně celkové exprese proteinů v buňkách *Escherichia coli*.

Z tabulky 13 vyplývá, že ve vysokomolekulárních a středních hmotnostních pásmech dochází při vysoké koncentraci lapatinibu k mírnému poklesu exprese určitých proteinů. Naproti tomu v pásmu o velikosti (37–25) kDa bylo pozorováno mírné zvýšení exprese specifických proteinů, přičemž nejvyšší hodnota činila ($1,005 \pm 0,048$) při koncentraci 1 mg/ml. V nejnižším molekulovém pásmu (<10 kDa) došlo k výraznému poklesu exprese ($0,734 \pm 0,082$ při 1 mg/ml a $0,783 \pm 0,101$ při 5 mg/ml). Přestože výsledky vykazují poměrně vysoký rozptyl, rozdíl oproti kontrole byl signifikantní. To naznačuje, že pozorovaný efekt je pravděpodobně reálný, avšak vzhledem k variabilitě dat je vhodné interpretovat tento výsledek s určitou opatrností.

Tento trend může naznačovat selektivní ovlivnění syntézy proteinů v závislosti na jejich molekulové hmotnosti.

Výsledky naznačují, že lapatinib má jen mírný inhibiční účinek, a u některých proteinových frakcí může naopak docházet k mírné indukci.



Obr. 20. Výsledky SDS-PAGE analýzy proteinů *E. coli* po inkubaci s lapatinibem. Ve sloupci M je marker (Bio-Rad Precision Plus Protein Dual Colour Standards) s referenčními molekulovými hmotnostmi. Ostatní sloupce představují vzorky s rostoucí koncentrací lapatinibu ve formě tripletů.

Tab. 12. Změna exprese proteinů v přítomnosti lapatinibu v celkové dráze oproti kontrole.

	0,1mg/ml	1 mg/ml	5mg/ml
Celková	0,996 ± 0,029	0,976 ± 0,028	0,965 ± 0,028

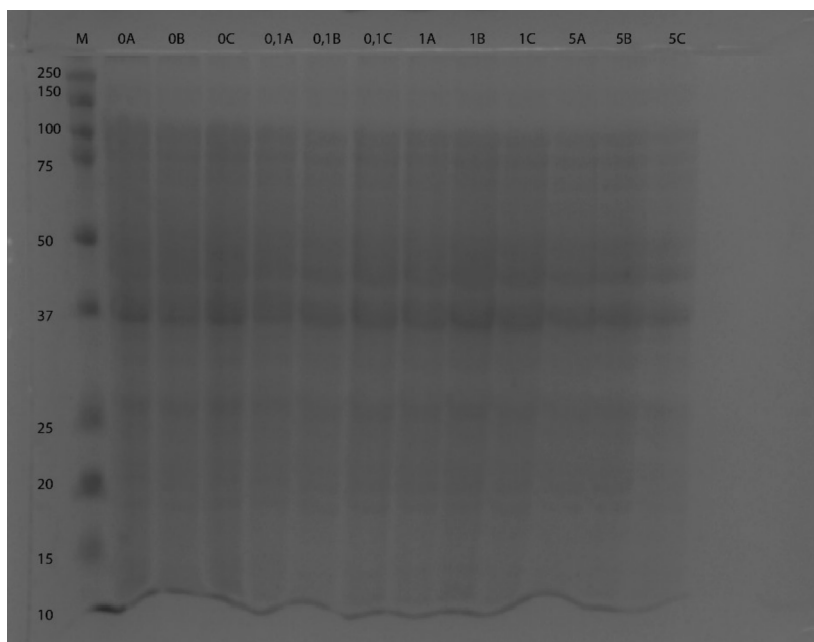
Tab. 13. Změna exprese proteinů v přítomnosti lapatinibu v jednotlivých pásmech molekulové hmotnosti oproti kontrole. Zelenou barvou jsou označeny statisticky signifikantní rozdíly ($p < 0,05$).

M [kDa]	0,1mg/ml	1 mg/ml	5mg/ml
>250	0,987 ± 0,014	0,993 ± 0,013	0,979 ± 0,010
150-75	0,983 ± 0,022	1,022 ± 0,030	0,984 ± 0,023
75-50	0,980 ± 0,025	0,996 ± 0,026	0,976 ± 0,013
50-37	0,950 ± 0,058	0,981 ± 0,058	0,950 ± 0,057
37-25	0,967 ± 0,043	1,005 ± 0,048	1,001 ± 0,036
25-20	0,969 ± 0,033	0,993 ± 0,027	0,977 ± 0,027
20-15	0,969 ± 0,038	0,997 ± 0,033	0,982 ± 0,039
15 -10	0,977 ± 0,044	0,994 ± 0,039	0,999 ± 0,051
<10	0,890 ± 0,110	0,734 ± 0,082	0,783 ± 0,101

5.3.4 Sunitinib

Při kvantitativním vyhodnocení gelu, který je zobrazen na obrázku 21, pomocí programu GelAnalyzer byly zaznamenány změny v intenzitě proteinových pásů. Tabulka 14 ukazuje, že s rostoucí koncentrací sunitinibu dochází k postupnému snižování celkové exprese proteinů. Při koncentraci 0,1 mg/ml je celková relativní exprese ($0,983 \pm 0,006$), zatímco při 5 mg/ml klesá na ($0,939 \pm 0,015$). Tento pokles naznačuje mírný inhibiční účinek na celkovou expresi v buňkách *Escherichia coli*, zejména při vyšších koncentracích.

Detailní pohled do tabulky 15 ukazuje, že ve většině molekulových hmotnostních pásem dochází rovněž ke snižování exprese. Sunitinib tedy nevyvolává výrazné změny v expresi jednotlivých proteinových frakcí, ale celkově působí tlumivě. Při koncentraci 1 mg/ml byla exprese proteinů vyšší než při 0,1 mg/ml, avšak při koncentraci 5 mg/ml opět klesla. Tyto výsledky naznačují, že sunitinib inhibuje proteinovou expresi *E. coli* závisle na koncentraci, přičemž tento účinek není ovlivněn molekulovou hmotností proteinů.



Obr. 21. Výsledky SDS-PAGE analýzy proteinů *E. coli* po inkubaci se sunitinibem. Ve sloupci M je marker (Bio-Rad Precision Plus Protein Dual Colour Standards) s referenčními molekulovými hmotnostmi. Ostatní sloupce představují vzorky s rostoucí koncentrací sunitinibu ve formě tripletů.

Tab. 14. Změna exprese proteinů v přítomnosti sunitinibu v celkové dráze oproti kontrole. Zelenou barvou jsou označeny statisticky signifikantní rozdíly ($p < 0,05$).

	0,1mg/ml	1 mg/ml	5mg/ml
Celková	0,983 ± 0,006	0,968 ± 0,006	0,939 ± 0,015

Tab. 15. Změna exprese proteinů v přítomnosti sunitinibu v jednotlivých pásmech molekulové hmotnosti oproti kontrole. Zelenou barvou jsou označeny statisticky signifikantní rozdíly ($p < 0,05$).

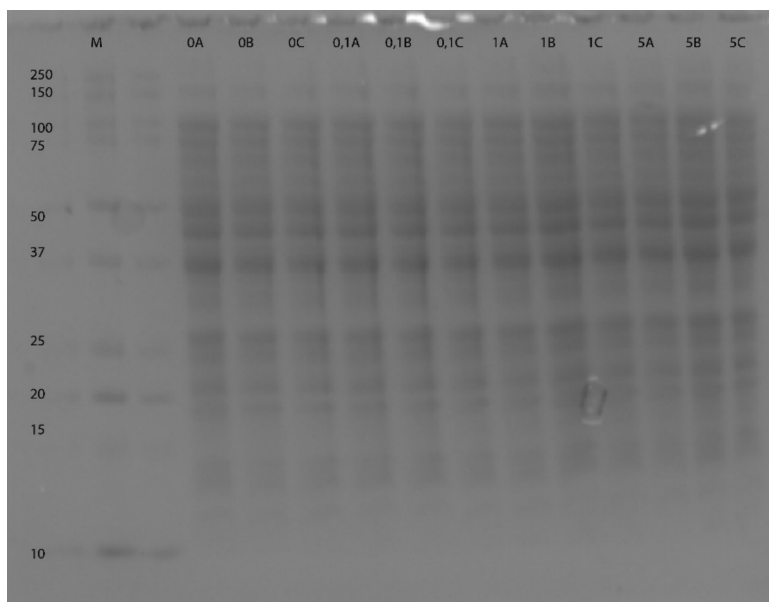
M [kDa]	0,1mg/ml	1 mg/ml	5mg/ml
250-150	0,981 ± 0,033	0,977 ± 0,029	0,973 ± 0,038
150-75	0,969 ± 0,013	0,971 ± 0,027	0,954 ± 0,021
75-50	0,978 ± 0,006	0,996 ± 0,016	0,952 ± 0,021
50-37	0,980 ± 0,007	0,989 ± 0,009	0,954 ± 0,025
37-25	0,992 ± 0,018	0,990 ± 0,010	0,963 ± 0,029
25-20	0,975 ± 0,017	0,990 ± 0,006	0,952 ± 0,020
20-15	0,982 ± 0,004	0,986 ± 0,005	0,961 ± 0,016
15-10	0,982 ± 0,015	0,991 ± 0,015	0,970 ± 0,018

5.3.5 Cabozantinib

Při kvantitativním vyhodnocení gelu, který je zobrazen na obrázku 21, pomocí programu GelAnalyzer byly zaznamenány změny v intenzitě proteinových pásů. Tabulka 16 ukazuje, že celková exprese proteinů se s rostoucí koncentrací cabozantinibu mírně zvyšuje, což je odlišné od předchozích čtyř případů. Při koncentraci 0,1 mg/ml byla exprese ($1,006 \pm 0,009$), tedy téměř shodná s kontrolní hodnotou, zatímco při 5 mg/ml vzrostla na ($1,026 \pm 0,016$). Tento trend naznačuje, že cabozantinib může stimulovat expresi proteinů v buňkách *Escherichia coli*, zejména při vyšších koncentracích.

Podrobnější rozbor v tabulce 17 potvrzuje, že ve většině molekulových hmotnostních pásem dochází ke zvýšení exprese v závislosti na koncentraci cabozantinibu, přičemž tento účinek není ovlivněn molekulovou hmotností proteinů. Nejvýraznější nárůst byl zaznamenán v pásmu (50–37) kDa, kde exprese dosáhla hodnoty ($1,056 \pm 0,018$). Naopak v pásmu (>250 kDa) dochází s rostoucí koncentrací k mírnému poklesu exprese.

Celkově lze tedy říct, že cabozantinib stimuluje jak expresi většiny jednotlivých proteinových frakcí *E. coli*, tak i celkovou proteinovou expresi.



Obr. 22. Výsledky SDS-PAGE analýzy proteinů *E. coli* po inkubaci s cabozantinibem. Ve sloupci M je marker (Bio-Rad Precision Plus Protein Dual Colour Standards) s referenčními molekulovými hmotnostmi. Ostatní sloupce představují vzorky s rostoucí koncentrací cabozantinibu ve formě tripletů.

Tab. 16. Změna exprese proteinů v přítomnosti cabozantinibu v celkové dráze oproti kontrole. Zelenou barvou jsou označeny statisticky signifikantní rozdíly ($p < 0,05$).

	0,1mg/ml	1 mg/ml	5mg/ml
Celková	1,006 ± 0,009	1,024 ± 0,020	1,026 ± 0,016

Tab. 17. Změna exprese proteinů v přítomnosti cabozantinibu v jednotlivých pásmech molekulové hmotnosti oproti kontrole. Zelenou barvou jsou označeny statisticky signifikantní rozdíly ($p < 0,05$).

M [kDa]	0,1mg/ml	1 mg/ml	5mg/ml
>250	1,013 ± 0,040	0,999 ± 0,035	0,992 ± 0,034
250-100	1,017 ± 0,022	1,049 ± 0,024	1,028 ± 0,024
75-50	1,021 ± 0,006	1,052 ± 0,033	1,031 ± 0,028
50-37	1,031 ± 0,011	1,041 ± 0,023	1,056 ± 0,018
37-25	1,017 ± 0,008	1,043 ± 0,031	1,032 ± 0,033
25-20	1,030 ± 0,025	1,049 ± 0,025	1,035 ± 0,016
20-15	1,007 ± 0,011	1,029 ± 0,019	1,019 ± 0,012
15-10	0,951 ± 0,050	0,971 ± 0,054	1,025 ± 0,050

6. Diskuze

Tyrosinkinázové inhibitory (TKI) jsou látky, které blokují aktivitu tyrosinkináz – enzymů zodpovědných za fosforylaci tyrosinových zbytků a následnou aktivaci signálních drah. TKI představují cílenou protinádorovou terapii, která se využívá při léčbě různých typů rakoviny.

Cílem této práce bylo prozkoumat možný vzájemný vliv tyrosinkinázových inhibitorů (TKI) na střevní mikroorganismus *Escherichia coli*. Byly analyzovány tři základní aspekty: růst bakterií v přítomnosti různých TKI (lenvatinibu, vandetanibu, lapatinibu, sunitinibu a cabozantinibu), schopnost *E. coli* metabolizovat tyto látky a vliv TKI na expresi bakteriálních proteinů.

6.1 Vliv tyrosinkinázové inhibitory na růst *E. coli*

Pro analýzu růstu *E. coli* v přítomnosti TKI byly sledovány růstové křivky. Z těchto křivek vyplývá, že v přítomnosti vandetanibu a sunitinibu byl při vyšších koncentracích pozorován mírný stimulační účinek na růst *E. coli*. Některé hodnoty jsou statisticky signifikantní, a tedy lze tento výsledek považovat za reálný. V případě cabozantinibu byl pozorován výrazný stimulační účinek, jehož hodnoty jsou rovněž signifikantní, což potvrzuje reálnost tohoto výsledku. U lapatinibu byl zaznamenán silný aktivační účinek, nicméně počáteční fáze růstové křivky vykazuje odchylky, které mohou souviset s použitím nové lahve s LB médiem. Přestože výsledek působí neobvykle, hodnoty jsou signifikantní, což může zároveň naznačovat reálný biologický efekt na buňky *E. coli*. To může vést k dysbióze, která následně zhoršuje střevní bariérovou funkci a zvyšuje propustnost střeva, čímž může vznikat nebo zhoršovat průjem.

V Austrálii byly provedeny klinické studie, které potvrdily podobné výsledky po léčbě malomolekulárními inhibitory tyrosinkináz (SM-TKI): došlo ke snížení celkového množství a diverzity střevních bakterií, zejména ke snížení zastoupení komensálních rodů, jako jsou *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*, a současně ke zvýšení výskytu rodů *Bacteroidetes* a *Escherichia coli* [31]. Tento klinický výzkum byl spojen s teorií, že u pacientů dochází k rozvoji průjmu jako nežádoucího účinku v důsledku zvýšeného množství *E. coli* ve střevě. Dále je známo, že při nadměrném množství *E. coli* může docházet ke zvýšené stimulaci receptorů TLR4 a tvorbě lipopolysacharidů (LPS), které indukují chronický zánět, což by mohlo zhoršovat průjem nebo jeho průběh u pacientů léčených TKI [36].

Naopak v přítomnosti lenvatinibu při vysoké koncentraci byl pozorován mírný inhibiční účinek, i zde byly hodnoty signifikantní, a výsledek tak lze považovat za relevantní. Úbytek běžných kmenů *E. coli* může vést ke ztrátě jejich přirozených funkcí, jako je udržování anaerobního prostředí ve střevě, syntéza některých vitaminů (například vitaminu K) a podpora ochrany proti kolonizaci patogenními mikroorganismy [34], [35].

6.2 Schopnost *E. coli* metabolizovat TKI

HPLC analýza byla provedena po 0; 0,5; 1; 2; 3; 5; 7; 9; 12 a 24 hodinách inkubace *E. coli* s TKI. Na žádném z HPLC chromatogramů nebyly zaznamenány nové píky, které by odpovídaly metabolitům těchto léčiv. Ve všech časových bodech byl detekován pouze signál odpovídající nezměněné molekule původního léčiva. To znamená, že za daných podmínek nebyly pozorovány žádné biotransformační přeměny těchto inhibitorů bakterií *E. coli*. Tento výsledek naznačuje, že *E. coli* pravděpodobně neobsahuje enzymy potřebné pro rozklad těchto molekul. Hlavní metabolismus tyrosinkinázových inhibitorů probíhá v játrech pacienta prostřednictvím enzymů cytochromu P450, zejména izoenzymu CYP3A4, který však není přítomen u *E. coli* [38]. V *E. coli* se na metabolismu xenobiotik mohou podílet jiné enzymy, jako například glutathion-S-transferázy, flavin-monooxygenázy (FMO), aldehyddehydrogenázy a nitroreduktázy [39].

Důležité je také zmínit, že ve střevním prostředí panují jiné podmínky než v laboratorním médiu – například přítomnost dalších mikroorganismů a rozdílné pH, což může mít vliv na metabolickou aktivitu. Nelze tedy vyloučit, že některé jiné bakteriální druhy nebo komplexní mikrobiální společenství by za odlišných podmínek mohly určitě TKI do jisté míry metabolizovat. Výsledky této studie však ukazují, že *E. coli* samotná v *in vitro* podmínkách k takové přeměně nedochází.

6.3 Vliv TKI na expresi proteinů u *E. coli*

Metoda SDS-PAGE ukázala, že u všech testovaných inhibitorů s výjimkou cabozantinibu docházelo při vyšších koncentracích (zejména 5 mg/ml) k poklesu celkové relativní exprese proteinů ve srovnání s kontrolní skupinou. Tento trend byl nejvýraznější u lenvatinibu. Naopak při nižších koncentracích (0,1 a 1 mg/ml) byl účinek slabší, nebo dokonce v některých proteinových frakcích mírně stimulační – zejména v oblasti vysokomolekulových proteinů. Cabozantinib oproti ostatním vykazoval stimulační účinek na expresi proteinů *E. coli*; výsledky byly statisticky signifikantní, což naznačuje, že pozorovaný efekt je reálný.

Zajímavým pozorováním byla také selektivní změna exprese proteinů v různých molekulových pásmech. Například u vandetanibu byl při střední koncentraci (1 mg/ml) zaznamenán nárůst intenzity pásů ve vysokomolekulových frakcích (nad 250 kDa), zatímco středně- a nízkomolekulární frakce vykazovaly pokles. Tento jev může naznačovat, že různé třídy proteinů reagují odlišně – některé mohou být indukovány v důsledku stresové odpovědi na přítomnost cizorodé látky, jiné jsou naopak tlumeny.

Enzymy zapojené do metabolismu xenobiotik často odpovídají nízkomolekulárním a středněmolekulárním frakcím, zejména v rozmezí 20–25 kDa, 25–37 kDa a 50–75 kDa. Do těchto frakcí spadají například glutathion-S-transferázy (GST), superoxid dismutázy (SOD), nitroreduktázy a aldehyddehydrogenázy (ALDH) [39]. U všech testovaných tyrosinkinázových inhibitorů s výjimkou cabozantinibu byla v uvedených pásmech zaznamenána snížená exprese proteinů, což může svědčit o útlumu proteosyntézy nebo o

narušení buněčné homeostázy vyvolaném přítomností těchto léčiv. Cabozantinib oproti tomu ve stejných frakcích vyvolal zvýšenou expresi proteinů, což může naznačovat aktivaci detoxikačních a antioxidačních drah. Zvýšená exprese enzymů jako GST, SOD či ALDH může být součástí stresové odpovědi buněk *E. coli* na přítomnost tohoto inhibitoru.

Na základě těchto výsledků vyplývá, že přestože TKI nejsou primárně zaměřeny na bakteriální struktury, jejich přítomnost v prostředí může ovlivnit proteinový profil střevních bakterií, a tím potenciálně i mikrobiální rovnováhu. Vliv na expresi bakteriálních proteinů by tak mohl být jedním z mechanismů, jakým TKI nepřímo modulují mikrobiom a přispívají k vedlejším účinkům, jako je průjem.

Získané výsledky jsou relevantní v kontextu laboratorních podmínek, avšak jejich přenositelnost na prostředí lidského střeva zůstává nejistá. Použitý kmen *E. coli* se navíc v lidském střevě přirozeně nevyskytuje a běžně se využívá zejména pro účely rekombinantní exprese. Skutečný dopad TKI na *E. coli in vivo* je proto obtížně predikovatelný a vyžaduje další výzkum. Například zkoumat vliv TKI na další zástupce střevního mikrobiomu; zkoumat za podmínek, které co nejvíce odpovídají fyziologickému prostředí lidského střeva, aby bylo možné přesněji hodnotit jejich dopad *in vivo*.

Závěr

V této bakalářské práci byly prováděny experimenty za účelem zjištění vzájemného vztahu mezi pěti různými tyrosinkinázovými inhibitory (TKI) a bakterií *Escherichia coli*, která je přirozeně přítomna v lidském střevním mikrobiomu, pomocí následujících metod:

1. Měření růstu *E. coli* v přítomnosti TKI pomocí růstové křivky

Bylo zjištěno, že TKI ve vysoké koncentraci (5 mg/ml) ovlivňují růst *E. coli in vitro*. Zejména u lapatinibu a cabozantinibu byl pozorován stimulační účinek, zatímco u lenvatinibu byl při stejné koncentraci patrný mírný inhibiční efekt.

2. Zjištění produkce metabolitů TKI *E. coli* pomocí HPLC

Metabolity TKI nebyly detekovány ani při různých koncentracích, ani po inkubaci v různých časových intervalech.

3. Zjištění vlivu TKI na exprese proteinů u *E. coli* pomocí SDS-PAGE

Bylo zjištěno, že zejména při vyšší koncentraci (5 mg/ml) mají TKI vliv na expresi proteinů *E. coli*. U všech léčiv, s výjimkou cabozantinibu, byl pozorován pokles exprese proteinů – čím vyšší koncentrace, tím výraznější pokles. Naopak u cabozantinibu bylo zaznamenáno zvýšení exprese proteinů.

Literatura

- [1] Pecorino Lauren, University of Greenwich. The Molecular Biology of Cancer. Mechanisms, Targets, and Therapeutics. Fifth edition. Oxford university press. (2021). ISBN 978-0-19-883302-4
- [2] The National Centre for Biological Sciences. In-Gel Digestion Protocol with Incubation Overnight. ncbs.res.in. Dostupné z: https://www.ncbs.res.in/sitefiles/120417_ingel-insolution%20digest%20SOP.pdf [cit. 20. 4. 2020].
- [3] Hanahan D., Weinberg R.A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation, *Cell*. **144**:5, 646-647 (2011).
- [4] Lemmon M.A., Schlessinger J. Cell Signaling by Receptor Tyrosine Kinases, *Cell*. **141**:7, 1117–1134 (2010).
- [5] Rygiel K.A., Elkins J.M. Recent advances in the structural biology of tyrosine kinases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **82**, 102665 (2023).
- [6] Yang L., Shi P., Zhao G., Xu J., Peng W., Zhang J., Zhang G., Wang X., Dong Z., Chen F., Cui H. Targeting cancer stem cell pathways for cancer therapy. *Signal Transduct Target Ther.* **5**:1, 8 (2020).
- [7] National cancer institute. Targeted Therapy to Treat Cancer. *cancer.gov*. Dostupné z: <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types/targeted-therapies> [cit. 25. 4. 2020].
- [8] Saeed R.F., Awan U.A., Saeed S., Mumtaz S., Akhtar N., Aslam S. Targeted Therapy and Personalized Medicine. *Cancer Treat Res.* **185**, 177-205 (2023).
- [9] Hoelder S., Clarke P.A., Workman P. Discovery of small molecule cancer drugs: Successes, challenges and opportunities. *Mol. Oncol.* **6**:2, 155–176 (2012).
- [10] Huang L., Jiang S., Shi Y. Tyrosine kinase inhibitors for solid tumors in the past 20 years (2001-2020). *J Hematol. Oncol.* **13**:1, 143 (2020).
- [11] Blue Ridge Institute for Medical Research. (n.d.). Protein kinase inhibitors. *brimr.org*. Dostupné z: <http://www.brimr.org/PKI/PKIs.htm> [cit. 26. 4. 2020].
- [12] National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary for CID 9823820, Lenvatinib. *pubchem.ncbi.nlm.nih.gov*. 2025. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Lenvatinib>. [cit. 26. 4. 2020].
- [13] Padda I.S., Patel P., Parmar M. Lenvatinib. In: StatPearls [online]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025 Jan [aktualizováno 2. 5. 2024]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK567768/> [cit. 26. 4. 2025].

- [14] Roskoski R. Classification of small molecule protein kinase inhibitors based upon the structures of their drug-enzyme complexes. *Pharmacol. Res.* **103**, 26–48 (2016).
- [15] National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary for CID 3081361, Vandetanib, *pubchem.ncbi.nlm.nih.gov*. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Vandetanib> [cit. 26. 4. 2025].
- [16] U.S. Food and Drug Administration. Caprelsa (vandetanib) Silver Spring (MD): FDA, 2022. Dostupné z: <https://www.fda.gov/drugsatfda> [cit. 26. 4. 2025].
- [17] National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary for CID 208908, Lapatinib. *pubchem.ncbi.nlm.nih.gov*. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Lapatinib> [cit. 26. 4. 2025].
- [18] DrugBank. (n.d.). Lapatinib. *DrugBank*. Dostupné z: <https://go.drugbank.com/drugs/DB01259> [cit. 26. 4. 2025].
- [19] Nardone-White D.T., Bissada J.E., Abouda A.A., Jackson K.D. Detoxication versus Bioactivation Pathways of Lapatinib In vitro: UGT1A1 Catalyzes the Hepatic Glucuronidation of Debenzylated Lapatinib. *Drug Metab. Dispos.* **9**:3, 233–244 (2021).
- [20] National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary for CID 5329102, Sunitinib. *pubchem.ncbi.nlm.nih.gov*. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Sunitinib> [cit. 27. 4. 2025].
- [21] Burnham E.A., Abouda A.A., Bissada J.E., Nardone-White D.T., Beers J.L., Lee J., Vergne M.J., Jackson K.D. Interindividual Variability in Cytochrome P450 3A and 1A Activity Influences Sunitinib Metabolism and Bioactivation. *Chem Res. Toxicol.* **35**:5, 792–806 (2022).
- [22] National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary for CID 25102847, Cabozantinib. *pubchem.ncbi.nlm.nih.gov*. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Cabozantinib>. [cit. 27. 4. 2025].
- [23] DrugBank. (n.d.). Cabozantinib. *DrugBank*. Dostupné z: <https://go.drugbank.com/drugs/DB08875> [cit. 27. 4. 2025].
- [24] Milani C., Duranti S., Bottacini F., Casey E., Turrone F., Mahony J., Belzer C., Delgado Palacio S., Arbolea Montes S., Mancabelli L., Lugli G.A., Rodriguez J.M., Bode L., de Vos W., Gueimonde M., Margolles A., van Sinderen D., Ventura M. The First Microbial Colonizers of the Human Gut: Composition, Activities, and Health Implications of the Infant Gut Microbiota. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **81**:4, e00036-17 (2017).
- [25] Cresci G.A., Bawden E. Gut Microbiome: What We Do and Don't Know. *Nutr. Clin. Pract.* **30**:6, 734–746 (2015).

- [26] Wilson I.D., Nicholson J.K. Gut microbiome interactions with drug metabolism, efficacy, and toxicity. *Transl. Res.* **179**, 204–222 (2017).
- [27] Beaugerie L., Petit J.C. Microbial-gut interactions in health and disease. Antibiotic-associated diarrhoea. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* **18**:2, 337–352 (2004).
- [28] Weersma R.K., Zhernakova A., Fu J. Interaction between drugs and the gut microbiome. *Gut.* **69**:8, 1510–1519 (2020).
- [29] Ianiro G., Rossi E., Thomas A.M., et al. Faecal microbiota transplantation for the treatment of diarrhoea induced by tyrosine-kinase inhibitors in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Nat Commun.* **11**:1, 4333 (2020).
- [30] Secombe K.R., Van Sebille Y.Z.A., Mayo B.J., Collier J.K., Gibson R.J., Bowen J.M. Diarrhea Induced by Small Molecule Tyrosine Kinase Inhibitors Compared With Chemotherapy: Potential Role of the Microbiome. *Integr. Cancer Ther.* **19**, 1534735420928493 (2020).
- [31] Litusov, N. V. Čáátná bakteriologie. Elektronická ilustrovaná učebnice. Jekatěrinburg: Uralská státní lékařská univerzita. 118-120 (2017).
- [32] Mueller M., Tainter C.R. Escherichia coli Infection. [aktualizováno 13. 7. 2023]: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK564298/> [cit. 4. 5. 2025].
- [33] Allocati N., Masulli M., Alexeyev M.F., Di Ilio C. Escherichia coli in Europe: an overview. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* **10**:12, 6235–6254 (2013).
- [34] Martinson J.N.V., Walk S.T. Escherichia coli Residency in the Gut of Healthy Human Adults. *EcoSal Plus.* **9**:1, ESP-0003-2020 (2020).
- [35] Moreira de Gouveia M.I., Bernalier-Donadille A., Jubelin G. Enterobacteriaceae in the Human Gut: Dynamics and Ecological Roles in Health and Disease. *Biology.* **13**:3, 142 (2024).
- [36] Yoo J.Y., Groer M., Dutra S.V.O., Sarkar A., McSkimming D.I. Gut Microbiota and Immune System Interactions. *Microorganisms.* **8**:10, 1587 (2020).
- [37] Ghoshal U.C., Shukla R., Ghoshal U. Small intestinal bacterial overgrowth and irritable bowel syndrome: a bridge between functional organic dichotomy. *Gut and Liver.* **11**:2, 196–208 (2017).
- [38] Liu J., Yan S., Du J., Teng L., Yang R., Xu P., Tao W. Mechanism and treatment of diarrhea associated with tyrosine kinase inhibitors. *Heliyon.* 2024 **10**:6, e27531 (2024).
- [39] UniProt Consortium. UniProt: The universal protein knowledgebase in 2025. Dostupné z: <https://www.uniprot.org/> [cit. 13. 5. 2025].