UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra biochemických věd

METABOLISMUS FLUBENDAZOLU V LIDSKÝCH JATERNÍCH SUBCELULÁRNÍCH FRAKCÍCH

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: prof. RNDr. Lenka Skálová, Ph.D.

Hradec Králové 2019 Jana Holubová

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové dne 3. 5. 2019 .....

Jana Holubová

Ráda bych poděkovala své školitelce prof. RNDr. Lence Skálové, Ph.D., za odborné vedení, cenné připomínky, rady, pomoc v průběhu řešení a zpracování diplomové práce a pečlivé pročtení rukopisu. Děkuji také Ing. Vladimíru Kubíčkovi, CSc. za provedení HPLC analýzy, PharmDr. Adamu Skarkovi, Ph.D. za provedení UHPLC analýzy a Mgr. Michaele Šadibolové za pomoc při experimentální práci.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra biochemických věd

Kandidát: Jana Holubová
Školitel: prof. RNDr. Lenka Skálová, Ph.D.
Název diplomové práce: Metabolismus flubendazolu v lidských jaterních subcelulárních frakcích

Flubendazol (FLU), benzimidazolové anthelmintikum s širokým spektrem účinku a nízkou toxicitou, se již dlouho používá ve veterinární i humánní medicíně. Vzhledem k jeho mechanismu účinku, který je založen na specifické vazbě na tubulin, je nyní FLU považován za slibné protinádorové léčivo. Nemáme však dostatek informací o jeho biotransformaci u člověka.

V této práci byly použity jaterní subcelulární frakce 12 pacientů (6 mužů a 6 žen) ke studiu stereospecificity, buněčné lokalizace, preference koenzymu a možných inter-individuálních nebo pohlavních rozdílů při redukci FLU. Dále bylo hodnoceno riziko interakce FLU s jinými léčivy. Výsledky ukázaly, že FLU je redukován zejména v cytosolu a preferovaným koenzymem je NADPH. Redukce karbonylu FLU byla prokázána jako striktně stereospecifická a karbonylreduktasa 1 byla identifikována jako hlavní enzym redukce FLU v lidských játrech. Vyšší redukce FLU a vyšší hodnota relativní exprese karbonylreduktasy 1 byla prokázána u mužů než u žen, ale celková inter-individuální variabilita byla relativně nízká. Jaterní vnitřní clearance FLU je velmi nízká a FLU nemá vliv na redukci karbonylu doxorubicinu v játrech ani v nádorových buňkách. Z těchto důvodů nejsou očekávány interakce FLU s jinými léčivy obsahující karbonylovou skupinu. Získané výsledky demonstrují bezpečnost použití FLU u člověka a podporují zavedení nové indikace FLU pro léčbu rakoviny.

ABSTRACT

Charles University
Faculty of Pharmacy in Hradec Králové
Department of Biochemical Sciences

Candidate: Jana Holubová
Supervisor: prof. RNDr. Lenka Skálová, Ph.D.
Title of diploma thesis: Metabolism of flubendazole in human liver subcellular fractions

Flubendazole (FLU), a benzimidazole anthelmintic drug with a broad spectrum of activity and low toxicity has been used in veterinary as well as human medicine for a long time. Owing its mechanism of action, based on the specific binding to tubulin, FLU is now considered a promising anti-cancer agent. However, we do not have enough information about its biotransformation in human.

In our project, subcellular fractions from the liver of 12 human patients (6 males and 6 females) were used to study the stereospecificity, cellular localization, coenzyme preference and possible inter-individual or sex differences in FLU reduction. In addition, the risk of FLU interaction with other drugs was evaluated. Results showed that FLU is predominantly reduced in cytosol and the NADPH coenzyme is preferred. The strict stereospecificity of FLU carbonyl reduction was proven and carbonyl reductase 1 was identified as the main enzyme of FLU reduction in the human liver. A higher reduction of FLU and a higher level of carbonyl reductase 1 protein was found in males than in females, but overall inter-individual variability was relatively low. Hepatic intrinsic clearance of FLU is very low, and FLU had no effect on doxorubicin carbonyl reduction in the liver and in cancer cells. For these reasons, interactions of FLU with other carbonyl bearing drugs are not expected. The obtained results demonstrate the safety of FLU use in human and support FLU repurposing for cancer treatment.

OBSAH

1 ÚVOD 9
2 TEORETICKÁ ČÁST 10
2.1 Benzimidazolová anthelmintika 10
2.1.1 Mechanismus účinku benzimidazolových anthelmintik 11
2.2 Flubendazol 11
2.2.1 Mechanismus účinku 12
2.2.2 Flubendazol jako potenciální makrofilaricid 13
2.2.3 Flubendazol jako potenciální protinádorové léčivo 14
2.2.4 Farmakokinetika a metabolismus flubendazolu 18
2.3 Enzymy redukující karbonyl 23
2.3.1 Karbonylreduktasa 1 (CBR1) 23
2.4 Doxorubicin 24
3 CÍLE PRÁCE 25
4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST 26
4.1 Chemikálie, přístroje a další materiál 26
4.1.1 Chemikálie 26
4.1.2 Přístroje 26
4.1.3 Pomůcky 27
4.1.4 Biologický materiál 27
4.2 Metodika 28
4.2.1 Příprava subcelulárních frakcí z lidských jater 28
4.2.2 Příprava subcelulárních frakcí buněčné linie SW480 29
4.2.3 Příprava roztoků 30
4.2.4 Příprava kalibrační křivky pro HPLC analýzu 32

4.2.5 Stanovení redukce flubendazolu v cytosolu a mikrosomech, sledování vlivu koenzymu....33
4.2.6 Stanovení redukce flubendazolu, sledování vlivu doby inkubace a množství cytosolu....34
4.2.7 Stanovení redukce flubendazolu, sledování vlivu pohlaví a inter-individuální rozdíly....35
4.2.8 Stanovení redukce flubendazolu, sledování inhibičního účinku menadionu a luteolinu....37
4.2.9 Stanovení aktivity karbonylreduktasy 1....39
4.2.10 Stanovení aktivit cytosolických karbonylreduktas vůči flubendazolu a doxorubicinu....40
4.2.11 Sledování inhibičního účinku flubendazolu na redukci doxorubicinu....42
4.2.12 Stanovení koncentrace proteinů metodou BCA....43
4.2.13 Stanovení relativní exprese CBR1....44
4.2.14 Kvantifikace obsahu metabolitů metodou HPLC....53
4.2.15 Zpracování dat, statistické zhodnocení....54
5 VÝSLEDKY....55
5.1 Stanovení koncentrace proteinů v subcelulárních frakcích....55
5.2 Stereospecifita a lokalizace redukce flubendazolu, sledování vlivu koenzymu....56
5.3 Sledování vlivu doby inkubace na redukci flubendazolu....57
5.4 Sledování vlivu množství cytosolu na redukci flubendazolu....58
5.5 Inter-individuální rozdíly a sex-diference v redukci flubendazolu....59
5.6 Sledování inhibičního účinku menadionu a luteolinu na redukci flubendazolu....60
5.7 Sledování inhibičního účinku flubendazolu na redukci doxorubicinu....62
5.8 Stanovení aktivity karbonylreduktasy 1....63
5.9 Stanovení aktivit cytosolických karbonylreduktas vůči flubendazolu a doxorubicinu....64

5.10 Stanovení relativní exprese CBR1 66
6 DISKUSE 68
7 ZÁVĚR 71
8 SEZNAM ZKRATEK 72
9 POUŽITÉ ZDROJE 73

1 ÚVOD

Flubendazol je benzimidazolové anthelmintikum, kterému je na katedře biochemických věd Farmaceutické fakulty již dlouhou dobu věnována velká pozornost. Vzhledem k jeho širokému spektru účinku a dlouhodobému použití ve veterinární a nyní i v humánní medicíně byl jeho metabolismus již studován nejen u různých živočišných druhů a u parazitů, ale i u rostlin.

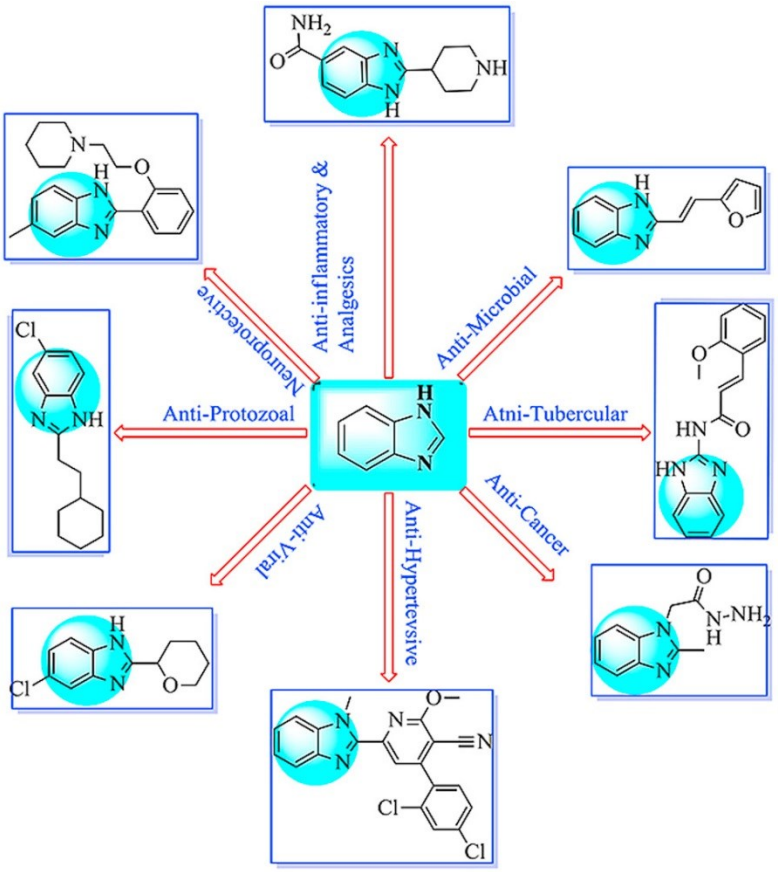
V poslední době je díky svému mechanismu účinku flubendazol rozsáhle studován v nádorových buňkách a má potenciál stát se protinádorovým léčivem. Pro zavedení nové indikace flubendazolu jako protinádorového léčiva je nutné znát jeho metabolismus u člověka, avšak současné informace, které máme k dispozici, jsou nedostatečné.

Tato diplomová práce se proto zabývá metabolismem flubendazolu v lidských jaterních subcelulárních frakcích 12 pacientů (6 mužů a 6 žen). Cílem předložené diplomové práce bylo zjistit lokalizaci redukce flubendazolu, preferenci koenzymu a stereospecifitu reakce, inter-individuální rozdíly a sex-diferenci. Dále byly měřeny aktivity enzymů zapojených do redukce flubendazolu, vliv inhibitorů karbonylreduktasy 1 (CBR1) na redukci flubendazolu a byla stanovena relativní exprese CBR1. Byl také testován vliv flubendazolu na redukci doxorubicinu s cílem zhodnotit potenciální lékové interakce.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 BENZIMIDAZOLOVÁ ANTHELMINTIKA

Benzimidazoly patří do skupiny azaheterocyklů. Zajímavou charakteristikou benzimidazolového kruhu je strukturní analogie s nukleotidy v lidském těle. Díky tomu mají tyto molekuly velkou afinitu k různým enzymům a proteinovým receptorům, což vede k výrazné biologické aktivitě. Biologicky aktivní deriváty benzimidazolu jsou schopny zasahovat různé cíle a vyvolat různé farmakologické odpovědi. Vztahy mezi strukturou a účinkem lze pozorovat na obrázku 1, mezi hlavní účinky benzimidazolů patří antihypertenzní, protizánětlivé, antibakteriální, antifungální, anthelmintické, antivirové, antioxidační, antiulcerózní, protinádorové a psychoaktivní působení (Yadav et al. 2016, Singh & Silakari 2018).



Obr. 1 Benzimidazolový kruh jako biologicky atraktivní struktura (převzato z Akhtar et al. 2016)

Do skupiny benzimidazolových anthelmintik patří albendazol, flubendazol, mebendazol, niridazol, thiabendazol a triclabendazol. Mají široké anthelmintické spektrum a vyznačují se nízkou toxicitou (*Benzimidazoles* 2016). Zatímco pro veterinární použití je k dispozici široké spektrum benzimidazolů, v humánní medicíně jsou registrovány thiabendazol, albendazol a mebendazol. Flubendazol je široce používán ve veterinární medicíně pro léčbu střevních parazitů, jakož i pro léčbu systémových parazitárních onemocnění a byl také schválen pro humánní použití pro léčbu hlístic žijících ve střevech (Hanušová et al. 2015).

2.1.1 Mechanismus účinku benzimidazolových anthelmintik

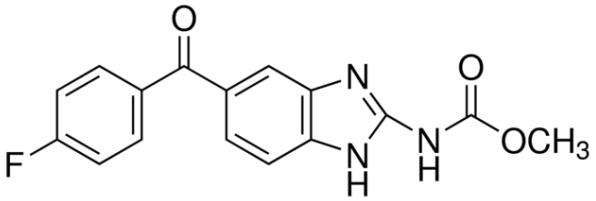
Anthelmintická účinnost benzimidazolů je způsobena selektivní blokádou vychytávání glukózy ze střevní stěny, což vede k depleci zásob glykogenu v těle helmintů a larev a ke snížení tvorby ATP, který je nepostradatelný pro přežití a reprodukci parazitů. Dalším mechanismem účinku je vazba na volný β-tubulin, čímž dochází k inhibici polymerace tubulinu a narušení struktury a funkce mikrotubulů a také zabránění absorpce glukózy závislé na mikrotubulech (*Benzimidazoles* 2016).

Nízkou toxicitu benzimidazolů u savců lze vysvětlit mnohem silnější interakcí těchto léčiv s tubulinem hlístů ve srovnání s tubulinem savců. Schopnost těchto sloučenin zasáhnout do tvorby mikrotubulů, což vede ke zhoršení progrese buněčného cyklu a indukci apoptózy, naznačuje u těchto sloučenin možné cytostatické účinky (Hanušová et al. 2015)

2.2 FLUBENDAZOL

Flubendazol, methyl-[5-(4-fluorbenzoyl)-1*H*-benzimidazol-2-yl]-karbamát byl v laboratořích Janssen Pharmaceutica poprvé syntetizován v roce 1971 (Nobilis et al. 2007). Flubendazol (FLU) má velmi širokou anthelmintickou aktivitu. Působí proti nematodám a cestodám a je hojně využíván ve veterinární medicíně (Lamka & Ducháček 2014). FLU vykazuje široký rozsah účinnosti proti gastrointestinálním infekcím způsobených nematody u prasat, drůbeže a domácích zvířat i proti plicním parazitózám prasat. V těchto indikacích je FLU obvykle podáván v dávkách přibližně 5 mg/kg po dobu

3 dnů, ale zároveň vykazuje účinnost i při podání jednorázové dávky (Mackenzie & Geary 2011). V Evropě je FLU registrován pro humánní použití pod obchodním názvem Fluvermal® pro léčbu střevních hlístic (Čáňová et al. 2017).



Obr. 2 Strukturní vzorec FLU (Sigma-Aldrich)

2.2.1 Mechanismus účinku

Jeden z předpokládaných mechanismů účinku FLU u parazitů se týká vychytávání glukózy s následnými změnami v jejím metabolismu. Při testování účinku FLU na příjem glukózy v maligních buňkách OCI-AML2 bylo ale zjištěno, že na rozdíl od pozorování u parazita FLU nezměnil příjem glukózy v nádorových buňkách. Buněčná smrt indukovaná FLU u maligních buněk na rozdíl od parazitů tedy pravděpodobně není spojena s inhibicí vychytávání glukózy (Spagnuolo et al. 2010).

Spagnuolo et al. (2010) dále prokázali, že FLU interaguje s tubulinem v místě podobném vazbě kolchicinu, ale odlišném od alkaloidů Vinca, mění strukturu tubulinu, inhibuje jeho polymeraci a narušuje celkovou strukturu mikrotubulů. Mezi další poznatky patří to, že FLU zastavuje buňky ve fázi G2 buněčného cyklu a zvyšuje počet vícejaderných buněk. Způsobuje tak zastavení buněčného cyklu a navozuje mitotickou katastrofu.

Zároveň je možné předpokládat, že mechanismus účinku se mezi jednotlivými benzimidazolovými anthelmintiky liší. Králová et al. (2013) ve své studii zjistili, že FLU a albendazol (ABZ) vykazovaly odlišný antiproliferativní účinek v některých střevních nádorových buněčných liniích a zároveň byly pozorovány určité rozdíly při porovnání účinků kombinací léčiv paklitaxelu (PTX) + FLU a PTX + ABZ s účinky léčiv ABZ a FLU samotných, což může poukazovat na odlišný mechanismus účinku jednotlivých benzimidazolů.

2.2.2 Flubendazol jako potenciální makrofilaricid

Flubendazol vykazuje vysokou makrofilaricidní účinnost v řadě preklinických modelů (Geary et al. 2019). Ivermektin pro léčbu onchocerkózy a diethylkarbamazin v léčbě lymfatické filariózy v kombinacích s albendazolem jsou běžně používaná léčiva, ale působí primárně proti mikrofilariálnímu stadiu a postrádají schopnost rychle usmrtit dospělé parazity (Mackenzie & Geary 2011, Geary et al. 2019). Dostupnost rychle účinného makrofilaricidu by znamenala významný pokrok v eliminaci filariálních onemocnění. Makrofilaricidní režimy vyžadují zejména krátké trvání, vysokou bezpečnost a účinnost terapie.

Provedené experimenty již v 70. letech identifikovaly FLU jako vysoce účinný makrofilaricid ve zvířecích modelech při parenterálním (s.c. a i.m.) podání, kdy došlo k depotnímu účinku a léčivo bylo v nízkých hladinách v plazmě udržováno po týdny až měsíce. Při provádění studie u člověka v 80. letech a i. m. podání FLU (5 týdnů, 750 mg) byla detekována 100% makrofilaricidní účinnost proti *O. volvulus*. Tato formulace a dávkování však vedly k tvorbě abscesů v místě vpichu injekce. Další studium vývoje FLU pro tuto indikaci bylo zastaveno také díky dostupnosti ivermektinu v léčbě onchocerkózy.

Vzhledem k požadavkům makrofilaricidních programů a nevhodnosti parenterálního podání byla snaha vyvinout novou formulaci FLU, která by měla dostatečnou perorální biologickou dostupnost, vysokou makrofilaricidní účinnost a krátkou dobu podávání.

V souvislosti s mechanismem účinku benzimidazolových anthelmintik byly u FLU hlášeny aneugenní a embryotoxické účinky podobné účinkům pozorovaným u ABZ, ale vzhledem k potenciálním přínosům FLU jako makrofilaricidu se předpokládalo, že při dosažení nízké dávky a krátké doby podávání tyto účinky nejsou nepřekonatelnou překážkou pro léčbu u lidí.

Došlo k vývoji amorfní pevné disperzní formulace FLU s vysokou biologickou dostupností, která byla použita pro počáteční toxikologické studie a studie účinnosti na malých zvířecích modelech, což podpořilo původní hypotézu, že podávání po dobu 5-7 dní by mohlo dosáhnout vysoké makrofilaricidní účinnosti.

Nová stabilní formulace FLU s vysokou koncentrací byla použita k provádění rozsáhlejších studií bezpečnosti, farmakokinetiky, metabolismu a účinnosti. Pro lepší porozumění farmakologickému účinku byly prováděny studie s cílovými parazity a bylo

zjištěno, že i krátká expozice FLU poškozuje parazity inhibicí tubulinu, překvapivě ale toto poškození bylo reverzibilní.

Navzdory jistým obavám, které vzbuzovala toxikologická data FLU v této indikaci se předpokládalo, že poměr risk/benefit by mohl být příznivý a pokračoval vývoj nové formulace a preklinické studie.

I přes dosažení 100% účinnosti parentálně podaného FLU však krátké dávkovací režimy u zvířecích modelů s použitím perorální formulace nevedly k vyléčení, naopak byly pozorovány závažné nežádoucí účinky. Také se dospělo k závěru, že vzhledem k toxicitě FLU a nevhodnosti parenterálního podání FLU v léčebných programech filariózy by neměly být vyvíjeny parenterální formulace FLU. Po zhodnocení všech preklinických údajů byl roku 2017 ukončen projekt vývoje a testování perorální formulace FLU jako makrofilaricidu z důvodu neočekávaných toxikologických výsledků (Geary et al. 2019).

2.2.3 Flubendazol jako potenciální protinádorové léčivo

Nádorová onemocnění jsou jednou z hlavních příčin úmrtí navzdory obrovským nákladům vloženým do jejich prevence a léčby. Vzhledem k velice nákladnému a dlouhotrvajícímu procesu vývoje nového léčiva je postupně zaváděna nová strategie založená na předpokladu, že většina již schválených léčiv má sekundární indikace, které by mohly být využity v léčbě jiných onemocnění. Nové využití u již schválených léčiv pro určitou indikaci je právě jedním z postupů objevu protinádorových léčiv. Hlavní výhodou tzv. repurposingu léčiv neboli zavedení nové indikace pro již schválená léčiva je, že jejich farmakokinetika, farmakodynamika i toxicita je již známa z preklinických studií a fáze I klinických studií. Tato léčiva by tedy mohla být rychle převedena do klinických studií fáze II a III a náklady související s vývojem léčiv by v tomto případě byly významně sníženy (Gupta et al. 2013).

Již dříve bylo objeveno mnoho léčiv s původně jinou indikací, které prokázaly protinádorovou aktivitu, patří mezi ně například thalidomid, aspirin, kyselina valproová, celekoxib, metotrexát nebo leflunomid (Gupta et al. 2013).

Mezi nově rozpoznaná potenciální cytostatika patří právě benzimidazolová anthelmintika (albendazol, mebendazol, flubendazol) a další léčiva jako antihypertenziva (doxazosin, propranolol), psychofarmaka (chlorpromazin, clomipramin) a antidiabetika

(metformin, pioglitazon). U všech těchto léčiv byl potvrzen určitý potenciál v protinádorové léčbě a možnost použití v kombinaci s dalšími cytostatiky (Hanušová et al. 2015).

Benzimidazolová anthelmintika jsou vzhledem ke svému mechanismu účinku zahrnující inhibici funkce mikrotubulů široce zkoumána jako potenciální protinádorová léčiva (Michaelis et al. 2015). Často je bohužel u pacientů pozorována rezistence vůči klasickým antimitotikům, což je výzvou k nalezení vhodných účinných alternativ (Králová et al. 2016).

Některá benzimidazolová anthelmintika, konkrétně albendazol a mebendazol, vykazují protinádorovou aktivitu v lidských nádorových buňkách, včetně buněk rezistentních na zavedená léčiva interferující s mikrotubuly (Králová et al. 2016). Benzimidazoly zahrnují významnou kategorii léčiv, u kterých již byla ověřena účinnost proti různým nádorovým buněčným liniím, jako je MCF-7 (adenokarcinom prsu), HeLa (karcinom děložního hrdla), SW620 (kolorektální karcinom), HL60 (akutní promyelocytární leukémie periferní krve), K52 (chronická myelogenní leukémie kostní dřeně), HT29 (karcinom tlustého střeva) (Yadav et al. 2016).

Spagnuolo et al. (2010) poprvé identifikovali FLU jako potenciální protinádorové činidlo. FLU snížil životaschopnost buněk s 50% inhibiční koncentrací (IC_{50}) menší než 1 μM u 8 z 8 myelomů a 4 ze 6 leukemických buněčných linií, z nichž u 2 buněčných linií byla hodnota IC_{50} 3 nM. Vzhledem k cytotoxicitě FLU vůči maligním buňkám *in vitro* byly jeho protinádorové účinky hodnoceny *in vivo* u leukemických a myelomových xenograftů, kdy flubendazol významně zpomalil růst nádoru a snížil jeho hmotnost.

Dále bylo zjištěno, že zvýšená exprese P-glykoproteinu, která je příčinou rezistence některých nádorových buněk na Vinca alkaloidy, nesnižuje antiproliferativní účinek FLU. FLU vykazuje účinnost i u buněk rezistentních na Vinca alkaloidy, protože interaguje s tubulinem prostřednictvím mechanismu odlišného od alkaloidů Vinca a vykazuje synergistický protinádorový účinek s vinblastinem a vinkristinem *in vitro* a *in vivo*. Tato léčiva by mohla být použita v kombinaci pro zvýšení protinádorové účinnosti nebo potenciálně snížení jejich toxicity (Spagnuolo et al. 2010).

Antiproliferativní účinek FLU a ABZ byl testován ve střevních nádorových buněčných liniích SW480, SW620, HCT8 a Caco2 a bylo zjištěno, že ABZ i FLU významně inhibovaly buněčnou proliferaci, přičemž buněčná linie HCT8 byla na FLU

i ABZ nejcitlivější, a zastavily dělení buněk ve fázi G2/M buněčného cyklu. Zároveň bylo zjištěno, že FLU i ABZ potencují účinek protinádorového léčiva paklitaxelu (PTX) ve střevních nádorových buňkách (Králová et al. 2013).

Michaelis et al. (2015) potvrdili účinek FLU proti leukemickým a myelomovým buňkám a identifikovali neuroblastom jako vysoce citlivý na FLU. Většina testovaných buněčných linií a všechny primární vzorky neuroblastomu od pěti různých pacientů vykazovaly hodnoty IC_{50} < 1000 nM. Hlavním problémem vysoce rizikového neuroblastomu je častá rezistence na protinádorová léčiva. Bylo zjištěno, že 85 % testovaných buněčných linií neuroblastomu s rezistencí na řadu protinádorových léčiv bylo citlivých na FLU v nanomolárních koncentracích. FLU pravděpodobně vykazuje své anti-neuroblastomové účinky prostřednictvím aktivace p53, kde významnou roli hraje PUMA (hlavní mediátor apoptózy). Dále byl zjišťován účinek FLU ve formě hydroxypropyl-β-cyklodextrin, který inhiboval tvorbu cév a nádorů v chorioallantoické membráně kuřat. To znamená, že vedle protinádorového účinku vykazuje FLU také účinky antiangiogenní.

Dále byl prokázán účinek FLU na kmenové nádorové buňky rakoviny prsu. FLU inhiboval proliferaci buněk prsního karcinomu *in vitro* a potlačil růst nádoru *in vivo*, indukoval tvorbu monopolárního vřetena inhibicí polymerace tubulinu, která byla následována zastavením buněčného cyklu ve fázi G2/M v buňkách karcinomu prsu a také zvyšoval cytotoxickou aktivitu léčiv fluorouracilu a doxorubicinu. Mezi další pozorované účinky FLU v buňkách karcinomu prsu patřily indukce buněčné diferenciace, redukce buněčné migrace a překonání rezistence na léčiva (Hou et al. 2015).

Účinek FLU byl testován v buněčných liniích SW480 a SW620 kolorektálního karcinomu *in vitro*. FLU v koncentraci 1 μM dočasně inhiboval buněčnou proliferaci, což bylo doprovázeno snížením hladin cyklinu D1 a zvýšením hladin cyklinu B1. V buňkách byla detekována zvýšená aktivita kaspasy 2 a kaspasy 3/7 doprovázená štěpením PARP, což naznačuje aktivaci apoptotické dráhy. Na rozdíl od zjištění Michaelis et al. (2015) FLU v tomto typu nádorových buněk neaktivoval p53 dependentní proapoptotickou signalizaci. Dále bylo prokázáno, že FLU je schopen indukovat předčasné stárnutí buněk. Hlavním mechanismem působení FLU v buňkách karcinomu tlustého střeva je tedy pravděpodobně porušení tvorby mikrotubulů a indukce mitotické katastrofy (Králová et al. 2016).

Cytotoxické účinky FLU byly zkoumány u buněčných linií A-375, Bowes a RPMI-7951 (různé molekulární typy) maligního melanomu. FLU inhiboval růst

a proliferaci ve všech třech buněčných liniích, což vedlo k akumulaci buněk ve fázi G2/M, k narušení struktury a funkce mikrotubulů a k dramatickým změnám v buněčné morfologii. Došlo k mitotické katastrofě charakterizované tvorbou obrovských mnohojaderných buněk s abnormálními vřeteny, zvýšenou aktivitou kaspasy 2, a následně k apoptóze závislé na kaspase 3/7 (Čáňová et al. 2018).

Dále bylo zjištěno, že FLU inhibuje buněčnou proliferaci a podporuje apoptózu gliomových buněčných linií *in vitro* a potlačuje růst nádoru v modelech xenograftu intraperitoneální injekcí. FLU v důsledku inhibice proliferace způsobil zastavení buněčného cyklu ve fázi G2/M. FLU také indukoval expresi proteinu p53 a inhiboval expresi cyklinu B1 a p-cdc2 v buňkách gliomu, navozoval apoptózu gliomových buněk prostřednictvím downregulace exprese Bcl-2, Bcl-xl a PARP-1 a zvyšoval expresi kaspasy 3, kaspasy 6 a kaspasy 9. FLU tedy v buňkách gliomu vykazuje antiproliferační a pro-apoptózový účinek (Zhou et al. 2018).

Vzhledem k vzrůstající rezistenci na trastuzumab v HER2 pozitivních buňkách karcinomu prsu byl zkoumán vliv FLU na apoptózu, vlastnosti kmenových buněk karcinomu prsu a rezistenci trastuzumabu. FLU indukoval apoptózu spojenou s aktivací kaspasy 3/7, buněčný cyklus byl zastaven ve fázi G2/M pomocí degradace tubulinu, což vedlo k mitotické katastrofě u trastuzumab-senzitivního i rezistentního HER2 pozitivního karcinomu prsu *in vitro* i *in vivo*. FLU také inhiboval vlastnosti HER2 pozitivních kmenových buněk karcinomu prsu snížením aktivity ALDH1 a potlačením tvorby buněk mléčné žlázy *in vitro* (Kim et al. 2018).

Potenciální strategií překonání rezistence na trastuzumab je inhibice intracelulární domény p95HER2. Podávání FLU vedlo k významnému snížení růstu nádoru u xenograftů rezistentních na trastuzumab, což se shodovalo s potlačením exprese p95HER2 a downregulací markerů souvisejících s kmenovými buňkami karcinomu prsu a intracelulárním HER2. FLU by tedy mohl najít své místo i při řešení rezistence na trastuzumab (Kim et al. 2018).

Účinek FLU byl studován v triple-negativním karcinomu prsu (TNBC). Bylo prokázáno, že FLU v koncentracích 0,1-0,5 μM potlačením polymerace tubulinu inhibuje růst buněk a zastavuje buněčný cyklu ve fázi G2/M, což vede k mitotické katastrofě v buňkách TNBC. Indukce apoptózy byla doprovázena aktivací kaspasy 3/7 a dysregulací aktivace STAT3 v buňkách TNBC. Podávání FLU také inhibovalo růst tumoru, angiogenezi a tvorbu metastáz v plicích a v játrech, což bylo v souladu se sníženými hladinami MMP-2 a MMP-9 v cirkulující krvi. FLU cílí na rychle proliferující nádorové

buňky, ale také účinně eradikuje kmenové buňky karcinomu prsu *in vitro* a *in vivo* (Oh et al. 2018).

FLU byl testován jako potenciální inhibitor proliferace a migrace, kdy byly jako modelové systémy použity buňky orálního spinocelulárního karcinomu PE/CA-PJ15 a H376, premaligní orální keratinocyty DOK, normální orální epiteliální buňky HOK a normální gingivální fibroblasty (GF). FLU snížil životaschopnost buněk PE/CA-PJ15, H376 a DOK, přičemž nenádorové buňky byly méně citlivé na léčbu. Migrace buněk PE/CA-PJ15 byla inhibována již 0,25 μM FLU a tato koncentrace neměla žádné antimigrační účinky na normální buňky GF (Králová et al. 2018).

Pomocí virtuálního screeningu 1841 léčiv schválených FDA byl FLU identifikován jako nejúčinnější inhibitor VEGFR2 s hodnotou IC_{50} 0,47 μM, což naznačuje potenciál FLU ve vývoji nových antiangiogenních léčiv (Zheng et al. 2019).

Účinek FLU byl zkoumán ve spinocelulárním karcinomu jícnu (ESCC), kde je aktivována signalizace jaderného faktoru kappa B (NF-κB). Tato aktivace podporuje růst nádorových buněk, buněčnou proliferaci, přežití, buněčnou invazi a zároveň může nadměrná aktivace signalizace NF-κB snižovat citlivost nádorových buněk na chemoterapeutika, a proto se signalizace NF-κB jeví jako vhodný cíl léčby ESCC. V této studii bylo zjištěno, že FLU je novým inhibitorem NF-κB a vykazuje významnou protinádorovou aktivitu potlačením signalizace NF-κB v buňkách ESCC. FLU také vykazoval synergický účinek s DOX v buňkách ESCC (Tao et al. 2019).

Dle všech poznatků získaných ze studia protinádorové aktivity by FLU mohl být účinným lékem pro několik typů nádorů.

2.2.4 Farmakokinetika a metabolismus flubendazolu

Po perorálním podání FLU se vstřebává velmi malé množství léčiva. FLU je vzhledem ke své špatné rozpustnosti ve vodě velmi málo absorbován do systémového oběhu a vykazuje velmi nízkou biologickou dostupnost. Maximální plazmatické koncentrace FLU u lidí po perorálním podání v dávce 2 g byly nižší než 5 ng/ml. Bylo zjištěno, že ke zvýšené absorpci FLU dochází, pokud je podán ihned po jídle. FLU a jeho metabolity jsou vylučovány zejména stolicí (více než 80 %) a minimálně močí (méně

než 2 %). Biologický poločas FLU ve tkáních je 1–2 dny (Nobilis et al. 2007, Čáňová et al. 2017).

Vzhledem k nízké rozpustnosti ve vodě nemůže být FLU podán parenterálně a využívány jsou pouze perorální lékové formy (Nobilis et al. 2007). Neabsorbované léčivo je klíčové pro léčbu parazitů nacházejících se v GIT, ale pro léčbu systémových helmintóz je důležitá absorbovaná část podávaného léčiva (Křížová et al. 2009). Limitem potenciálního využití FLU v protinádorové léčbě je jeho nízká biologická dostupnost, a proto je třeba vyvinout takovou modifikaci, která jeho biodostupnost zvýší. Pro zvýšení biodostupnosti byl testován hydroxypropyl-β-cyklodextrin a bylo prokázáno, že významně zvyšuje rozpustnost FLU ve vodě, zvyšuje absorpci, biodostupnost i plasmatickou c_{max} (Čáňová et al. 2017).

Metabolismus benzimidazolových anthelmintik vede k polárnějším a méně aktivním metabolitům, které mohou být snadněji eliminovány (Maté et al. 2008). První fáze biotransformace FLU, která byla rozsáhle studována u několika živočišných druhů a okrajově u člověka, zahrnuje zejména redukci ketonové skupiny za vzniku redukovaného flubendazolu (FLUR) a hydrolýzu methylkarbamátové skupiny za vzniku hydrolyzovaného flubendazolu (FLUH). (Nobilis et al. 2007, Ceballos et al. 2015). Při studiu druhé fáze biotransformace u parazitické hlístice vlasovky slézové *H. contortus* byla pozorována N-glykosidace, O-glykosidace, methylace a O-acetylace (Raisová-Stuchlíková et al. 2018)

Jako hlavní metabolit se jeví FLUR a předpokládá se, že na redukci FLU v játrech se významně podílí karbonylreduktasy, což bylo potvrzeno ve studiích, které provedli Maté et al. (2008) i Stuchlíková et al. (2018).

2.2.4.1 Metabolismus u parazitů

In vitro studie anthelmintických účinků FLU a jeho metabolitů (FLUR a FLUH) na citlivý a rezistentní izolát *Haemonchus contortus* ukázala, že anthelmintická účinnost FLUH je zanedbatelná, a FLUH je tedy pravděpodobně neaktivním produktem biotransformace FLU. V případě citlivého i rezistentního izolátu vykazoval FLUR nižší anthelmintickou aktivitu než FLU, redukci FLU lze tedy považovat za deaktivační reakci, nicméně částečná anthelmintická aktivita FLUR zůstává zachována, a to může přispět k celkovému anthelmintickému účinku při léčbě FLU (Bártíková et al. 2010).

Při sledování metabolismu FLU u kmenů *Haemonchus contortus* citlivých a rezistentních na anthelmintika byly detekovány 4 různé metabolity: FLUR, glukosid FLUR a 2 glukosidy FLU. U rezistentních kmenů *H. contortus* byla *ex vivo* tvorba metabolitů FLU významně vyšší než u citlivého kmene. Zároveň byla u rezistentních kmenů pozorována vyšší aktivita UDP-glukosyltransferasy, což vede k výraznější deaktivaci FLU prostřednictvím konjugace s glukózou, a celkově tak tyto procesy mohou chránit parazity před toxickými účinky léčiva a podporovat rezistenci parazitů (Vokřál et al. 2012).

Raisová-Stuchlíková et al. (2018) při studiu metabolismu FLU u dospělých jedinců *Haemonchus contortus*, u kterého je pozorován snadný rozvoj rezistence, prokázali přítomnost 12 metabolitů FLU, přičemž 8 z nich nebylo do té doby objeveno. Metabolismus FLU byl porovnáván u samců a samic *H. contortus* kmene citlivého a rezistentního na anthelmintika. Hlavním produktem fáze I biotransformace byl FLUR, který se nacházel ve všech vzorcích a jeho tvorba byla vyšší u rezistentního kmene. Dále byla pozorována hydroxylace a karbamátová hydrolýza FLU. Ve fázi II biotransformace probíhala N-glykosidace, O-glykosidace, methylace a O-acetylace. Hlavním metabolitem této fáze byl O-glykosid FLU, který byl detekován ve všech vzorcích, a vyšší množství bylo zjištěno u samic rezistentního kmene. Vyšší metabolismus FLU u rezistentních kmenů zároveň poukazuje na možnou souvislost s rezistencí na léčiva u *H. contortus*.

2.2.4.2 Metabolismus u zvířat

Vzhledem k dlouhodobému použití FLU ve veterinární medicíně byla jeho biotransformace studována na několika živočišných druzích, zejména pak u ovcí (Maté et al. 2008, Křížová et al. 2009, Maté et al. 2017), bažantů, skotu, prasat, slepic a potkanů (Nobilis et al. 2007, Maté et al. 2017).

Při studiu metabolismu v subcelulárních frakcích z jater a tenkého střeva bažantů a prasat byly detekovány dva metabolity první fáze biotransformace, FLUR a FLUH. U obou druhů probíhala biotransformace FLU více v játrech než ve střevě. Reduktázy FLU upřednostňují koenzym NADPH a reakce byla stereospecifická s významnou převahou (+)-FLUR (93-97 %). U obou druhů byly aktivity enzymů redukujících karbonyl významně vyšší v cytosolu ve srovnání s mikrosomy (Nobilis et al. 2007).

Metabolismus FLU byl studován v subcelulárních frakcích získaných z jater a duodenální sliznice dospělých samců ovcí. V subcelulárních frakcích docházelo k metabolizaci FLU za vzniku FLUR jako hlavního metabolitu. Byla prokázána stereospecifita redukce FLU, kdy převládala jedna enantiomerní forma FLUR (~ 98 %). Hydrolýza FLU nebyla pozorována ani v jaterních, ani ve střevních subcelulárních frakcích. Předpokládá se, že hlavním enzymatickým systémem podílejícím se na redukci FLU je NADPH dependentní karbonylreduktasa. Cytosolické i mikrosomální frakce ovčích jater a duodenální sliznice redukovaly menadion (MEN) jako substrát a FLU tuto redukci inhiboval. Aktivity měřené v jaterních frakcích byly vyšší než aktivity pozorované ve frakcích získaných z duodenální sliznice. Tyto výsledky jsou v souladu s vyšší metabolickou redukcí FLU v játrech ve srovnání s redukcí FLU ve střevní sliznici ovcí (Maté et al. 2008).

Ve farmakokinetických studiích FLU u samců a samic ovcí, mláďat a dospělých jedinců bylo zjištěno, že hlavním metabolitem FLU v plazmě je FLUR. Vzhledem ke stereospecifitě ovčích FLU reduktas docházelo přednostně k tvorbě (+)-FLUR. Byl nalezen i (-)-FLUR, nicméně jeho koncentrace v plazmě byly zanedbatelné stejně jako množství parentní látky (FLU). Dalším v plazmě identifikovaným metabolitem byl FLUH (Křížová et al. 2009).

Vzhledem ke stáří zvířat byly profily koncentrací odlišné. U jehňat byly průměrné koncentrace FLU a (-)-FLUR blízko detekčních limitů a koncentrace (+)-FLUR a FLUH v plazmě rychle klesaly. U dospělých zvířat byly průměrné koncentrace všech analytů ve vyšších koncentracích a snižovaly se pomaleji. Rozdíly ve farmakokinetických parametrech závislých na věku byly pravděpodobně způsobeny rozdíly v absorpci mateřského léčiva. Tyto rozdíly ve farmakokinetice FLU mezi jehňaty a dospělými ovcemi by měly být zohledněny při navrhování dávkovacích schémat FLU (Křížová et al. 2009).

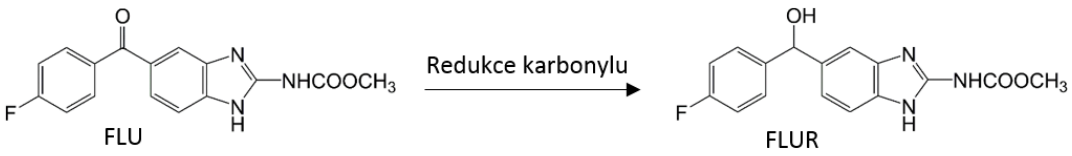
Byly také studovány rozdíly v metabolismu u různých druhů zvířat. Jaterní cesta redukce FLU byla studována v subcelulárních frakcích ovcí, skotu, prasat, slepic a potkanů. V cytosolu i mikrosomech všech těchto druhů docházelo k redukci FLU za vzniku FLUR. V subcelulárních frakcích ovcí docházelo k nejrychlejší redukci FLU a pouze u ovcí docházelo k oxidaci FLUR na FLU v reakci závislé na NADP+. U potkanů byla pozorována významně vyšší produkce FLUR v mikrosomech u samců než u samic. V cytosolu i mikrosomech prasat docházelo ke vzniku FLUR i FLUH, přičemž hydrolyzovaný metabolit lze v mikrosomech považovat za hlavní metabolit. Vzhledem

k tomu, že FLUH je považován za inaktivní metabolit (Bártíková et al. 2010), může tato skutečnost tento druh znevýhodňovat při léčbě FLU (Maté et al. 2017).

2.2.4.3 Metabolismus u člověka

Navzdory použití FLU v léčbě helmintóz u lidí a jeho potenciálnímu použití v protinádorové léčbě, není zatím k dispozici mnoho informací o jeho biotransformaci u člověka. Tyto údaje jsou ale důležité pro bezpečné použití a také pro hodnocení interakcí FLU s jinými léky (Stuchlíková et al. 2018).

Maté et al. (2017) zjistili, že v lidských jaterních subcelulárních frakcích dochází k redukci FLU za vzniku FLUR a v mikrosomech navíc dochází ke vzniku hydrolyzovaného metabolitu FLUH. Nicméně při studiu biotransformace FLU, kdy byly použity lidské jaterní řezy, byl FLUR jediným nalezeným metabolitem (Stuchlíková et al. 2018).



Obr. 3 Metabolismus FLU (úprava Stuchlíková et al. 2018)

Dále byl metabolismus FLU studován v 9 různých nádorových buněčných liniích (karcinom prsu, střeva, ústní dutiny). Ve všech těchto nádorových liniích docházelo ke vzniku FLUR, a navíc v liniích MCF7 (karcinom prsu) a SW480 (kolorektální karcinom) byl detekován methylovaný FLU (met-FLU). Rozdílná redukce FLU mezi jednotlivými nádorovými liniemi byla v souladu s různou expresí CBR1, z čehož lze usuzovat účast CBR1 na redukci FLU v nádorových buňkách (Stuchlíková et al. 2018).

2.3 ENZYMY REDUKUJÍCÍ KARBONYL

Karbonylreduktasy (CBR) můžeme rozdělit do tří nadrodin na aldo-ketoreduktasy (AKR), dehydrogenasy/reduktasy s krátkým řetězcem (SDR) a dehydrogenasy/reduktasy se středně dlouhým řetězcem, přičemž nadrodina SDR je nejrozsáhlejší skupinou enzymů a mezi nejvýznamnější enzymy této skupiny patří lidská CBR1 a mikrosomální reduktasy hydroxysteroidů (HSD), jako je 11 β-HSD (Skálová et al. 2013, Maté et al. 2017). CBR katalyzují reverzibilní oxido-redukční reakce aldehydických a ketonových skupin na odpovídající alkoholy u endogenních i exogenních sloučenin. Takové metabolity jsou buď přímo eliminovány, nebo podléhají dalším konjugačním reakcím. CBR využívají kofaktor nikotinamidadenindinukleotid (NADH) a/nebo nikotinamidadenindinukleotid fosfát (NADPH) (Rosemond & Walsh 2004).

Redukované metabolity jsou hydrofilnější než mateřská léčiva a mohou být snadněji eliminovány. Redukce karbonylu vede buď k významnému poklesu farmakologické aktivity léčiv, nebo aktivaci proléčiv. Karbonylová redukce některých léčiv (např. cytostatik doxorubicin a daunorubicin) ale způsobuje nepříznivou toxicitu (Boušová et al. 2015).

2.3.1 Karbonylreduktasa 1 (CBR1)

Enzym CBR1 je jeden z nejvýznamnějších enzymů patřících do nadrodiny dehydrogenas/reduktas s krátkým řetězcem (SDR). SDR enzymy mají v organismu zejména funkci fyziologickou, podílí se ale i na metabolismu xenobiotik. CBR1 katalyzuje NADPH-dependentní redukci endogenních látek i xenobiotik. U člověka se CBR1 nachází ve většině tkání, zejména pak v játrech, střevě, ledvinách, placentě a CNS a tyto tkáně chrání před toxickým účinkem karbonylové skupiny. Mezi substráty CBR1 patří např. menadion nebo doxorubicin (Shi & Di 2017, Skálová et al. 2013). Vzhledem k důležité roli CBR1 v metabolismu léčiv i ochraně organismu může mít modulace její aktivity významné farmakologické i toxikologické důsledky. Například polyfenol luteolin byl zjištěn jako velmi účinný inhibitor CBR1. Inhibice CBR1 by mohla zvýšit účinnost antracyklinové terapie, ale zároveň může vést k horší detoxifikaci reaktivních karbonylů (Boušová et al. 2015).

2.4 DOXORUBICIN

Doxorubicin je antracyklinové protinádorové léčivo, které je využíváno v léčbě karcinomu prsu, solidních tumorů v dětském věku, sarkomů měkkých tkání a maligních lymfomů, nicméně dávkování je omezeno z důvodu rizika kardiotoxicity. Určitou roli z hlediska kardiotoxicity hraje redukce karbonylu na C 13, protože redukované metabolity s nižší protinádorovou účinností se hromadí v srdci. Redukce karbonylu je hlavní metabolickou přeměnou doxorubicinu a významnou měrou tuto přeměnu katalyzuje CBR1. Inhibitory CBR1 jsou považovány za slibná činidla pro adjuvantní terapii, protože mohou prodloužit protinádorovou účinnost antracyklinů a současně snížit kardiotoxicitu. Z hodnocených 27 flavonoidů jako inhibitorů CBR1 vykazoval nejúčinnější inhibici luteolin patřící do skupiny monohydroxyflavonů, který je také účinnější ve srovnání se všemi známými třídami inhibitorů CBR1 (Arai et al. 2015).

3 CÍLE PRÁCE

Cílem této práce bylo přinést nové poznatky o metabolismu flubendazolu v lidských játrech. Dílčími cíli pak bylo:

- Zjistit lokalizaci, preferenci koenzymu, stereospecifitu, sex-diferenci a inter-individuální rozdíly při redukci flubendazolu

- Zhodnotit účast CBR1 na redukci flubendazolu a stanovit relativní expresi CBR1

- Stanovit potenciální riziko interakce flubendazolu s jinými léčivy obsahující karbonylovou skupinu

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 CHEMIKÁLIE, PŘÍSTROJE A DALŠÍ MATERIÁL

4.1.1 Chemikálie

- Albendazol (ABZ), Sigma-Aldrich
- Akrylamid (AA), Sigma-Aldrich
- Albumin 20% hovězí sérový, Sigma-Aldrich
- Amoniak vodný roztok 25%, Lachema
- Amonium persulfát (APS), Sigma-Aldrich
- Dimethylsulfoxid (DMSO), Sigma-Aldrich
- Doxorubicin (DOX), Sigma-Aldrich
- Flubendazol (FLU), Janssen Pharmaceutica
- Flubendazol redukovaný (FLUR), Janssen Pharmaceutica
- Isobutanol, Reachim
- Lauryl sulfát sodný (SDS), BDH Chemicals Ltd
- Luteolin (LUT), Sigma-Aldrich
- Menadion (MEN), Sigma-Aldrich
- N, N´-methylen-bis-akrylamid (bis-akrylamid), Sigma-Aldrich
- NADH, Sigma-Aldrich
- NADPH, Sigma-Aldrich
- Octan etylnatý, Sigma-Aldrich
- Roztok A $NaHCO_3$, Na_2CO_3, BCA v 0,1 M NaOH, Sigma-Aldrich
- Roztok B 4% $CuSO_4.6\ H_2O$, Sigma-Aldrich
- ostatní běžné chemikálie čistoty p. a.

4.1.2 Přístroje

- Analytické váhy Sartorius CP225D
- Biorad Trans Blot Turbo
- Centrifuga 5415 D
- Centrifuga Thermo Scientific Heraeus Biofuge Stratos

- Concentrator Eppendorf 5301
- Čtečka Biorad Microplate Reader 550
- Magnetická míchačka
- pH metr Jenway LTD 3020
- Spektrofotometr Tecan Infinite M200
- Thermomixer Eppendorf Comfort
- Třepačka IKA MS2 Minishaker
- Ultracentrifuga Beckman Coulter
- Ultrazvuková lázeň Bandelin Sonorex

4.1.3 Pomůcky

- 96-jamkové mikrotitrační destičky
- automatické pipety, multikanálové pipety, jednorázové špičky
- mikrozkumavky Eppendorf, centrifugační zkumavky
- odměrné sklo
- pomůcky pro přípravu gelu, stojánek na elektroforézu, pomůcky pro bloting
- rukavice – latex, nitro
- stojánky na mikrozkumavky
- ostatní běžné laboratorní pomůcky

4.1.4 Biologický materiál

Malé kousky jaterní tkáně byly získány ve spolupráci s Chirurgickou klinikou Fakultní nemocnice v Hradci Králové. Odběr kousků jater od pacientů v rámci resekce jaterních tumorů byl schválen Etickou komisí Fakultní nemocnice v Hradci Králové a probíhal s informovaným souhlasem pacientů. Pro transport kousku jaterní tkáně v roztoku Eurocollins byla použita termoska s ledem. Kousek jaterní tkáně byl ihned po transportu zvážen, zamrazen a uložen v hlubokomrazicím boxu při -80°C.

Buněčná linie SW480 odvozená z kolorektálního adenokarcinomu byla kultivovaná v médiu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) s 10% fetálním hovězím sérem (FBS) a 1% penicilinem/streptomycinem ve sterilních plastových Petriho miskách v CO_2 inkubátoru (37 °C, 5% CO_2).

4.2 METODIKA

4.2.1 Příprava subcelulárních frakcí z lidských jater

Před přípravou subcelulárních frakcí byly do chladicí místnosti připraveny zásobní roztoky (0,1 M Na – fosfátový pufr pH 7,4 a 0,1 M Na – fosfátový pufr pH 7,4 s 20% glycerolem), centrifugační kyvety (2 x 8 ks), homogenizátor 30 ml s pístem, nádoba s ledem a vodou, buničina, dvě 100 ml Erlenmayerovy baňky, injekční stříkačka 10 ml s dlouhou jehlou, míchačka, míchadlo, kádinky, stojánky s mikrozkumavkami, zmrazovací stojánky, pipeta 5 ml, pipeta 1 ml, špičky, nůžky, pinzeta, lihový fix, miska s drceným ledem, 8 malých mističek v krabičce s chladicím blokem.

Rovněž bylo třeba předem vychladit rotory a centrifugy Heraeus a Beckman. Byly přineseny kyvety a uzávěry do centrifugy Beckman.

V chladicí místnosti byly kousky lidských jater rozmrazeny a rozváženy do 8 malých mističek maximálně po 5 g a rozstříhány na menší kousky. Z každé mističky zvlášť byla játra postupně přendávána do 30 ml homogenizátoru a bylo přilito 15 ml 0,1 M Na – fosfátového pufru pH 7,4. Pohybem homogenizačního pístu třikrát nahoru a dolů došlo k homogenizaci, obsah byl přelit do centrifugační kyvety a píst a homogenizátor byly ještě vypláchnuty 15 ml pufru, který byl poté ještě přilit do centrifugační kyvety. Takto bylo naplněno 8 centrifugačních kyvet.

Nejprve proběhla první centrifugace na centrifuze Heraeus. Byl použit rotor #3335, program byl nastaven na 20 minut, 5 000 g, 4 °C. Peleta po první centrifugaci obsahovala potrhané buněčné membrány, vazivo, cévy a jádra. Dále byl supernatant slit do čistých kyvet a byl centrifugován podruhé ve stejném rotoru při programu na 60 minut, 20 000 g, 4 °C. Peleta po druhé centrifugaci obsahovala mitochondrie. Supernatant byl opatrně slit do centrifugačních kyvet pro následující centrifugaci v ultracentrifuze Beckman. Bylo nutné dávat pozor, aby do kyvety nenatekly kaly, ty byly vylity do odpadu. Kyvety byly plněny maximálně do tří čtvrtin, uzavřeny a vždy byly vyváženy dvě proti sobě. Kyvety byly vloženy do rotoru, bylo zašroubováno víko rotoru, rotor byl přišroubován k centrifuze a byl spuštěn program na 65 minut, 105 000 g, 4 °C. Po ukončení tohoto třetího cyklu byl rotor z ultracentrifugy Beckman vyjmut a otevřen, kyvety byly otevřeny a supernatant (v tomto případě cytosol), byl rozpipetován za stálého míchání po 1,1 ml do mikrozkumavek. Pro zisk čistých mikrosomů (hladké endoplasmatické retikulum) byla peleta ze třetí centrifugace resuspendována malým

homogenizačním pístem v 5 ml 0,1 M Na – fosfátového pufru pH 7,4, kyvety byly doplněny, vyváženy, uzavřeny, vloženy do rotoru a uzavřený rotor byl vložen do ultracentrifugy Beckman a byl znovu spuštěn program na 65 minut, 105 000 g, 4 °C. Po ukončení centrifugace a vyndání kyvet byl supernatant vylit. Peleta byla naředěna 0,1 M Na – fosfátovým pufrem pH 7,4 s 20 % glycerolu v množství odpovídajícím hmotnosti jater před homogenizací. Malým homogenizačním pístem byla peleta zhomogenizována, slita do kádinky, dále homogenizována v ultrazvukové lázni a za stálého míchání byla rozpipetována po 0,33 ml do mikrozkumavek. Takto zpracované vzorky cytosolu i mikrosomů byly ihned po rozpipetování do popsaných mikrozkumavek uloženy do mrazicího boxu.

Takto získané subcelulární frakce byly postupně využívány pro jednotlivé experimenty.

4.2.2 Příprava subcelulárních frakcí buněčné linie SW480

Petriho misky s buňkami SW480 byly vyndány z inkubátoru a bylo odsáto živné médium, ihned po odsátí média byly misky položeny na chladicí blok. Misky byly opláchnuty 4 ml PBS pufru, který byl následně odpipetován do sucha. Na každou misku byly napipetovány 2 ml chlazeného 0,1 M Na-fosfátového pufru pH 7,4. Buňky byly seškrabány z misky a suspenze byla pipetou přenesena do chlazené 15 ml centrifugační zkumavky.

Pro zahuštění suspenze nebo v případě použití většího množství Na-fosfátového pufru pH 7,4 probíhala první centrifugace, kdy byl program nastaven na 5 min, 500 g, 4 °C, supernatant byl vylit, k peletě byly přidány 3 ml Na-fosfátového pufru pH 7,4, stojánek s kyvetami v ledové lázni byl přenesen do chladicího boxu a obsah každé kyvety byl dvakrát sonikován po dobu 20 s. Kyvety byly vloženy do centrifugy Heraeus a proběhla centrifugace při programu na 20 minut, 20 000 g, 4 °C. Kyvety byly poté přeneseny zpět do chladicího boxu a supernatant byl odpipetován do zkumavek pro centrifugu Sorvall (rotor TST 60.4). Zkumavky byly vloženy do kyvet (pouzder), kyvety byly uzavřeny, připevněny k rotoru a rotor byl vložen do centrifugy Sorvall. Byl spuštěn program na 60 minut, 105 000 g, 4 °C. Rotor byl vyndán z centrifugy, kyvety byly přeneseny do chladicího boxu a supernatant ze zkumavek byl slit do lahviček. Supernatant byl za stálého míchání na míchačce rozpipetován po 0,5 ml do popsaných

mikrozkumavek v ledové lázni. Sediment v každé zkumavce byl resuspendován sonikací v 1 ml 0,1 M Na-fosfátového pufru pH 7,4 s 20 % glycerolu a rozpipetován za stálého míchání na míchačce po 200 µl do popsaných mikrozkumavek v ledové lázni. Takto připravené mikrosomy a cytosol byly uloženy do mrazicího boxu.

4.2.3 Příprava roztoků

0,1 M Na – fosfátový pufr pH 7,4

Pro přípravu bylo naváženo 35,8 g $Na_2HPO_4.12\ H_2O$, rozpuštěno v 1000 ml redestilované vody a 3,9 g $NaH_2PO_4.2\ H_2O$, rozpuštěno ve 250 ml redestilované vody. K roztoku $Na_2HPO_4.12\ H_2O$ byl za stálého míchání a průběžné kontroly pH na pH metru postupně přiléván roztok $NaH_2PO_4.2\ H_2O$, až do dosažení požadovaného pH 7,4. Zásobní roztok byl dále uchováván v lednici.

0,1 M Na – fosfátový pufr pH 7,4 s 20 % glycerolu

Ke 40 ml připraveného 0,1 M Na – fosfátového pufru pH 7,4 bylo za stálého míchání přidáno 10 ml glycerolu, takto připravený roztok byl uchováván v lednici.

0,1 M K – fosfátový pufr, pH 7,4

Do 100 ml odměrné baňky bylo naváženo 3,58 g $K_2HPO_4.12\ H_2O$ a doplněno redestilovanou vodou. Do 25 ml odměrné baňky bylo naváženo 0,39 g $KH_2PO_4.2\ H_2O$ a doplněno redestilovanou vodou. Za stálého míchání a průběžné kontroly pH na pH metru byly roztoky smíchány v takovém poměru, aby pH odpovídalo hodnotě 7,4. Zásobní roztok byl dále uchováván v lednici.

0,1 M K – fosfátový pufr, pH 6

Do 100 ml odměrné baňky bylo naváženo 1,74 g $K_2HPO_4.12\ H_2O$ a doplněno redestilovanou vodou. Do 200 ml odměrné baňky bylo naváženo 2,72 g $KH_2PO_4.2\ H_2O$ a doplněno redestilovanou vodou. Za stálého míchání a průběžné kontroly pH

na pH metru byly roztoky smíchány v takovém poměru, aby pH odpovídalo hodnotě 6. Zásobní roztok byl dále uchováván v lednici.

Roztok Eurocollins

Bylo naváženo 2,05 g KH_2PO_4, 7,4 g K_2HPO_4, 1,12 g KCl, 0,84 g $NaHCO_3$, 35,0 g glukózy, vše bylo rozpuštěno v malém množství redestilované vody a objem byl doplněn v odměrné baňce do 1000 ml redestilovanou vodou. Roztok byl rozdělen do plastových lahviček po 50–400 ml a zamražen.

Roztok flubendazolu (M_r = 313,3 $g.mol^{-1}$, c = 2 mM)

Pro přípravu zásobního roztoku flubendazolu bylo vypočítáno množství flubendazolu odpovídající výslednému 2 mM roztoku, dle skutečné navážky $1{,}930.10^{-3}$ g bylo doplněno 3,08 ml DMSO. Roztok byl protřepán na třepačce a dále uchováván v mikrozkumavce v lednici.

Roztok redukovaného flubendazolu (M_r = 315,3 $g.mol^{-1}$, c = 1 mM,)

Pro přípravu zásobního roztoku redukovaného flubendazolu bylo vypočítáno množství redukovaného flubendazolu odpovídající výslednému 1 mM roztoku, dle skutečné navážky $1{,}05.10^{-3}$ g bylo doplněno 3,33 ml DMSO. Roztok byl protřepán na třepačce a dále uchováván v mikrozkumavce v lednici.

Roztok albendazolu (M_r = 265,3 $g.mol^{-1}$, c = 10 μM)

Pro přípravu zásobního roztoku albendazolu bylo naváženo množství albendazolu odpovídající 100 μM roztoku, protože množství odpovídající 10 μM nebylo možné na analytických vahách navážit pro příliš nízkou hmotnost. Dle skutečné navážky $1{,}45.10^{-3}$ g bylo doplněno 5,466 ml DMSO a byl tak připraven 100x koncentrovanější roztok, který byl pro získání požadované koncentrace následně zředěn 1:99 (100 μl tohoto roztoku bylo zředěno 9,9 ml DMSO pro získání 10 μM roztoku albendazolu). Roztok byl protřepán na třepačce a dále uchováván v mikrozkumavce v lednici.

4.2.4 Příprava kalibrační křivky pro HPLC analýzu

Vzorky pro získání kalibrační křivky obsahovaly 20 μM nebo 2 μM nebo 0,2 μM flubendazol (FLU) a 4 μM nebo 0,4 μM nebo 40 nM redukovaný flubendazol (FLUR), 0,1 M Na – fosfátový pufr pH 7,4 a směsné vzorky cytosolu (člověk 11-16), které byly těsně před použitím rozmraženy a roztřepány. Vzorky byly připravovány ve 3 paralelkách. Biologický slepý vzorek obsahoval místo FLU nebo FLUR pouze rozpouštědlo (DMSO). Aby bylo zabráněno předčasné reakci, mikrozkumavky s reakční směsí byly umístěny v ledu.

Zásobní roztoky FLU v dimethylsulfoxidu (DMSO) byly připraveny v koncentracích 2 mM, 200 μM, 20 μM. Pro získání 200 μM FLU byl využit 2 mM FLU, který byl pomocí DMSO zředěn v poměru 1:9 (1 díl 2 mM FLU a 9 dílů DMSO). Takto získaný 200 μM FLU byl stejným způsobem zředěn v poměru 1:9 a byl tak získán 20 μM FLU.

Zásobní roztoky FLUR v DMSO měly koncentraci 400 μM, 40 μM, 4 μM a byly připraveny obdobným způsobem.

Do popsaných mikrozkumavek byly napipetovány složky dle tabulky:

Tab. 1 Příprava kalibrační křivky – složení reakční směsi a objemy jednotlivých složek

	FLU 2 mM [μl]	FLU 200 μM [μl]	FLU 20 μM [μl]	FLUR 400 μM [μl]	FLUR 40 μM [μl]	FLUR 4 μM [μl]	DMSO [μl]	CYT [μl]	Pufr [μl]
1	3	—	—	3	—	—	—	100	194
2	—	3	—	—	3	—	—	100	194
3	—	—	3	—	—	3	—	100	194
4	—	—	—	—	—	—	6	100	194

Do všech mikrozkumavek bylo ihned přidáno 30 μl koncentrovaného NH_3, 30 μl 10 μM roztoku albendazolu (interní standard, IS) a 900 μl octanu etylnatého. Následně byly vzorky protřepány na třepačce (5 minut, stupeň 4) a po protřepání byly vzorky centrifugovány (3 minuty, 7 000 otáček), přičemž došlo k oddělení spodní vodné a horní organické fáze. Poté bylo odpipetováno 800 μl organické fáze a odpařeno v koncentrátoru při 45 °C během 40 minut. Takto připravené vzorky pak byly předány pro vyhodnocení metodou HPLC.

4.2.5 Stanovení redukce flubendazolu v cytosolu a mikrosomech, sledování vlivu koenzymu

Reakční směs byla tvořena 10 μM FLU, 500 μM NADH nebo 500 μM NADPH, 0,1 M Na – fosfátový pufr pH 7,4, směsné vzorky cytosolu (člověk 9-16) nebo vzorky mikrosomů (člověk 11-16), které byly těsně před použitím rozmraženy a roztřepány. Vzorky byly připravovány ve 4 paralelkách. Chemické slepé vzorky obsahovaly místo subcelulární frakce pufr, biologické slepé vzorky obsahovaly místo FLU pouze rozpouštědlo (DMSO). Aby bylo zabráněno předčasné reakci, mikrozkumavky s reakční směsí byly umístěny v ledu.

Příprava zásobních roztoků:

NADH (M_r = 709,4 g.mol^{-1}, c = 1,5 mM)

Pro přípravu roztoku NADH bylo vypočítáno množství odpovídající výslednému 1,5 mM roztoku, dle skutečné navážky 1,34.10^{-3} g bylo doplněno 1260 μl redestilované vody. Roztok byl připraven těsně před použitím v množství odpovídajícím počtu vzorků a protřepán na třepačce.

NADPH (M_r = 833,4 g.mol^{-1}, c = 1,5 mM)

Pro přípravu roztoku NADPH bylo vypočítáno množství odpovídající výslednému 1,5 mM roztoku, dle skutečné navážky 1,6.10^{-3} g bylo doplněno 1280 μl redestilované vody. Roztok byl připraven těsně před použitím v množství odpovídajícím počtu vzorků a protřepán na třepačce.

Do popsaných mikrozkumavek byly napipetovány vzorky dle tabulek:

Tab. 2 Redukce FLU v cytosolu (CYT), vliv koenzymu – složení reakční směsi a objemy jednotlivých složek

	FLU 1 mM [μl]	DMSO [μl]	NADH 1,5 mM [μl]	NADPH 1,5 mM [μl]	Pufr [μl]	CYT [μl]
1	3	—	100	—	97	100
2	3	—	—	100	97	100
3	—	3	100	—	97	100
4	—	3	—	100	97	100
5	3	—	100	—	197	—
6	3	—	—	100	197	—

Tab. 3 Redukce FLU v mikrosomech (MIC), vliv koenzymu – složení reakční směsi a objemy jednotlivých složek

	FLU 1 mM [µl]	DMSO [µl]	NADH 1,5 mM [µl]	NADPH 1,5 mM [µl]	Pufr [µl]	MIC [µl]
11	3	—	100	—	97	100
12	3	—	—	100	97	100
13	—	3	100	—	97	100
14	—	3	—	100	97	100
15	3	—	100	—	197	—
16	3	—	—	100	197	—

Mikrozkumavky se vzorky byly přemístěny do předem nahřátého termomixéru a byly inkubovány při teplotě 37 °C, 400 otáček, 30 minut. Po uplynutí doby inkubace byly mikrozkumavky vloženy do ledové lázně a ihned bylo ke každému vzorku přidáno 30 µl koncentrovaného NH_3, 30 µl 10 µM IS a 900 µl octanu etylnatého. Následně byly vzorky protřepány na třepačce (5 minut, stupeň 4) a po protřepání byly vzorky centrifugovány (3 minuty, 7 000 otáček), přičemž došlo k oddělení spodní vodné a horní organické fáze. Poté bylo do nových mikrozkumavek odpipetováno 800 µl organické fáze a odpařeno v koncentrátoru při 45 °C během 40 minut. Takto připravené vzorky pak byly předány pro vyhodnocení metodou HPLC.

4.2.6 Stanovení redukce flubendazolu, sledování vlivu doby inkubace a množství cytosolu

Reakční směs byla tvořena 10 µM FLU, 500 µM NADPH, 0,1 M Na – fosfátový pufr pH 7,4, směsné vzorky cytosolu (člověk 11-16), které byly těsně před použitím rozmraženy a roztřepány. Vzorky byly připravovány ve 4 paralelkách. Aby bylo zabráněno předčasné reakci, mikrozkumavky s reakční směsí byly umístěny v ledu.

Příprava roztoku NADPH (M_r = 833,4 g.mol^{-1}, c = 1,5 mM)

Pro přípravu roztoku NADPH bylo vypočítáno množství odpovídající výslednému 1,5 mM roztoku, dle skutečné navážky 3,1.10^{-3} g bylo doplněno 2,480 ml redestilované vody. Roztok byl připraven těsně před použitím a protřepán na třepačce.

Do popsaných mikrozkumavek byly napipetovány vzorky dle tabulek:

Tab. 4 Vliv doby inkubace – složení reakční směsi a objemy jednotlivých složek

	FLU 1 mM [µl]	NADPH 1,5 mM [µl]	Pufr [µl]	CYT [µl]	Doba inkubace [min]
1	3	100	97	100	10
2	3	100	97	100	20
3	3	100	97	100	30

Tab. 5 Vliv množství cytosolu – složení reakční směsi a objemy jednotlivých složek

	FLU 1 mM [µl]	NADPH 1,5 mM [µl]	Pufr [µl]	CYT [µl]	Doba inkubace [min]
4	3	100	147	50	30
5	3	100	97	100	30
6	3	100	47	150	30

Mikrozkumavky se vzorky byly přemístěny do předem nahřátého termomixéru a byly inkubovány při teplotě 37 °C, 400 otáček. Vzorky 1, 2, 3 se lišily dobou inkubace (10, 20, 30 minut), vzorky 4, 5, 6 množstvím cytosolu (50, 100, 150 µl). Po uplynutí doby inkubace byly mikrozkumavky vloženy do ledové lázně a ihned bylo ke každému vzorku přidáno 30 µl koncentrovaného NH_3, 30 µl 10 µM IS a 900 µl octanu etylnatého. Následně byly vzorky protřepány na třepačce (5 minut, stupeň 4) a po protřepání byly vzorky centrifugovány (3 minuty, 7 000 otáček), přičemž došlo k oddělení spodní vodné a horní organické fáze. Poté bylo do nových mikrozkumavek odpipetováno 800 µl organické fáze a odpařeno v koncentrátoru při 45 °C během 40 minut. Takto připravené vzorky pak byly předány pro vyhodnocení metodou HPLC.

4.2.7 Stanovení redukce flubendazolu, sledování vlivu pohlaví a inter-individuální rozdíly

Reakční směs byla tvořena 10 µM FLU, 500 µM NADPH, 0,1 M Na – fosfátový pufr pH 7,4, vzorky cytosolu (6 vzorků jaterního CYT žen a 6 vzorků jaterního CYT mužů), které byly těsně před použitím rozmraženy a roztřepány. Vzorky byly

připravovány ve 4 paralelkách. Biologický slepý vzorek obsahoval místo FLU pouze DMSO. Aby bylo zabráněno předčasné reakci, mikrozkumavky s reakční směsí byly umístěny v ledu.

Příprava roztoku NADPH (M_r = 833,4 g.mol^{-1}, c = 1,5 mM)

Pro přípravu roztoku NADPH bylo vypočítáno množství odpovídající výslednému 1,5 mM roztoku, dle skutečné navážky 1,97.10^{-3} g bylo doplněno 1576 µl redestilované vody. Roztok byl připraven těsně před použitím a protřepán na třepačce.

Do popsaných mikrozkumavek byly napipetovány vzorky dle tabulky:

Tab. 6 Vliv pohlaví a inter-individuální rozdíly – složení reakční směsi a objemy jednotlivých složek

	FLU 1 mM [µl]	DMSO [µl]	NADPH 1,5 mM [µl]	Pufr [µl]	CYT [µl]
F 1, 2, 8, 13, 14, 15	3	—	100	97	100
M 3, 4, 5, 6, 7, 9	3	—	100	97	100
Slepé vzorky	—	3	100	97	100

Vzhledem k velkému počtu vzorků nebyl pokus proveden najednou, ale byl rozdělen na 4 části po třech vzorcích cytosolu.

Mikrozkumavky se vzorky byly přemístěny do předem nahřátého termomixéru a byly inkubovány při teplotě 37 °C, 400 otáček, 30 minut. Po uplynutí doby inkubace byly mikrozkumavky vloženy do ledové lázně a ihned bylo ke každému vzorku přidáno 30 µl koncentrovaného NH_3, 30 µl 10 µM IS a 900 µl octanu etylnatého. Následně byly vzorky protřepány na třepačce (5 minut, stupeň 4) a po protřepání byly vzorky centrifugovány (3 minuty, 7 000 otáček), přičemž došlo k oddělení spodní vodné a horní organické fáze. Poté bylo do nových mikrozkumavek odpipetováno 800 µl organické fáze a odpařeno v koncentrátoru při 45 °C během 40 minut. Takto připravené vzorky pak byly předány pro vyhodnocení metodou HPLC.

4.2.8 Stanovení redukce flubendazolu, sledování inhibičního účinku menadionu a luteolinu

Reakční směsi byly tvořeny 10 μM FLU, 500 μM NADPH, 50 μM nebo 25 μM nebo 10 μM nebo 1 μM luteolin (LUT), 15 μM nebo 10 μM nebo 5 μM nebo 1 μM menadion (MEN), 0,1 M Na – fosfátový pufr pH 7,4, směsné vzorky cytosolu (člověk 1-8), které byly těsně před použitím rozmraženy a roztřepány. Vzorky byly připravovány ve 4 paralelkách. Chemické slepé vzorky obsahovaly místo subcelulární frakce pufr, biologické slepé vzorky (neinhibované) obsahovaly místo inhibitoru (LUT nebo MEN) DMSO. Aby bylo zabráněno předčasné reakci, mikrozkumavky s reakční směsí byly umístěny v ledu.

Příprava roztoků:

Luteolin (M_r = 286,2 g.mol^{-1}, c = 20 mM)

Pro přípravu zásobního roztoku luteolinu bylo vypočítáno množství odpovídající výslednému 20 mM roztoku, dle skutečné navážky 2,61.10^{-3} g bylo doplněno 456 μl DMSO. Ředěním tohoto zásobního roztoku pomocí DMSO byly připraveny potřebné koncentrace zásobních roztoků LUT: 10 mM, 5 mM, 2 mM, 200 μM.

Menadion (M_r = 172,1 g.mol^{-1}, c = 20 mM)

Pro přípravu zásobního roztoku menadionu bylo vypočítáno množství odpovídající výslednému 20 mM roztoku, dle skutečné navážky 3,41.10^{-3} g bylo doplněno 991 μl DMSO. Ředěním tohoto zásobního roztoku pomocí DMSO byly připraveny potřebné koncentrace zásobních roztoků MEN: 3 mM, 2 mM, 1 mM, 200 μM.

NADPH (M_r = 833,4 g.mol^{-1}, c = 1,5 mM)

Pro přípravu roztoku NADPH bylo vypočítáno množství odpovídající výslednému 1,5 mM roztoku, dle skutečné navážky 5,5.10^{-3} g bylo doplněno 4,464 ml redestilované vody. Roztok byl připraven těsně před použitím a protřepán na třepačce.

Do popsaných mikrozkumavek byly napipetovány vzorky dle tabulek:

Tab. 7 Inhibiční účinek LUT – složení rekční směsi a objemy jednotlivých složek

	FLU 2 mM [µl]	DMSO [µl]	LUT 200 µM [µl]	LUT 2 mM [µl]	LUT 5 mM [µl]	LUT 10 mM [µl]	NADPH 1,5 mM [µl]	Pufr [µl]	CYT [µl]
1	—	1,5	—	—	—	1,5	100	197	—
2	1,5	1,5	—	—	—	—	100	97	100
3	1,5	—	1,5	—	—	—	100	97	100
4	1,5	—	—	1,5	—	—	100	97	100
5	1,5	—	—	—	1,5	—	100	97	100
6	1,5	—	—	—	—	1,5	100	97	100

Tab. 8 Inhibiční účinek MEN – složení rekční směsi a objemy jednotlivých složek

	FLU 2 mM [µl]	DMSO [µl]	MEN 200 µM [µl]	MEN 1 mM [µl]	MEN 2 mM [µl]	MEN 3 mM [µl]	NADPH 1,5 mM [µl]	Pufr [µl]	CYT [µl]
11	—	1,5	—	—	—	1,5	100	197	—
12	1,5	1,5	—	—	—	—	100	97	100
13	1,5	—	1,5	—	—	—	100	97	100
14	1,5	—	—	1,5	—	—	100	97	100
15	1,5	—	—	—	1,5	—	100	97	100
16	1,5	—	—	—	—	1,5	100	97	100

Mikrozkumavky se vzorky byly přemístěny do předem nahřátého termomixéru a byly inkubovány při teplotě 37 °C, 400 otáček, 30 minut. Po uplynutí doby inkubace byly mikrozkumavky vloženy do ledové lázně a ihned bylo ke každému vzorku přidáno 30 µl koncentrovaného NH_3, 30 µl 10 µM IS a 900 µl octanu etylnatého. Následně byly vzorky protřepány na třepačce (5 minut, stupeň 4) a po protřepání byly vzorky centrifugovány (3 minuty, 7 000 otáček), přičemž došlo k oddělení spodní vodné a horní organické fáze. Poté bylo do nových mikrozkumavek odpipetováno 800 µl organické fáze a odpařeno v koncentrátoru při 45 °C během 40 minut. Takto připravené vzorky pak byly předány pro vyhodnocení metodou HPLC.

4.2.9 Stanovení aktivity karbonylreduktasy 1

Metoda spektrofotometrického stanovení aktivity karbonylreduktasy 1 (CBR1) je založena na inkubaci cytosolické subcelulární frakce se specifickým substrátem menadionem a koenzymem NADPH. Principem je redukce substrátu za současné oxidace NADPH, což vede k poklesu absorbance (Mate et al. 2008). Následně lze kvantitativně vyjádřit aktivitu CBR1 pomocí poklesu absorbance a molárního absorpčního koeficientu NADPH = 6220 $M^{-1}.cm^{-1}$. Měření bylo prováděno v mikrotitračních destičkách na přístroji Tecan při vlnové délce 340 nm.

Reakční směsi byly tvořeny 500 μM nebo 10 μM MEN, 250 μM NADPH, 0,1 M K – fosfátový pufr pH 7,4, vzorky cytosolu (6 vzorků jaterního cytosolu žen a 6 vzorků jaterního cytosolu mužů), které byly těsně před použitím rozmraženy a roztřepány. Aby bylo zabráněno předčasné reakci, mikrozkumavky s reakční směsí byly umístěny v ledu.

Příprava zásobních roztoků:

Menadion (M_r = 172,18 $g.mol^{-1}$, c = 50 mM)

Pro přípravu roztoku menadionu bylo vypočítáno množství odpovídající výslednému 50 mM roztoku, dle skutečné navážky $5{,}74.10^{-3}$ g bylo doplněno 667 μl DMSO. Roztok byl protřepán na třepačce a uchováván v mikrozkumavce v lednici. Ředěním tohoto zásobního roztoku pomocí DMSO byl připraven 1 mM MEN.

NADPH (M_r = 833,4 $g.mol^{-1}$, c = 5 mM)

Pro přípravu roztoku NADPH bylo vypočítáno množství odpovídající výslednému 5 mM roztoku, dle skutečné navážky $1{,}1.10^{-2}$ g bylo doplněno 2640 μl redestilované vody. Roztok byl připraven těsně před použitím v množství odpovídajícím počtu vzorků a protřepán na třepačce.

Byly připraveny dvě reakční směsi (mastermix). První reakční směs byla připravena smícháním 20,16 ml 0,1 M K – fosfátového pufru, pH 7,4, 240 μl 50 mM MEN a 1200 μl NADPH. Do druhé reakční směsi bylo místo 240 μl 50 mM MEN přidáno 240 μl 1 mM MEN. Reakční směsi byly připraveny v čase potřeby a v množství odpovídajícím dvěma mikrotitračním destičkám. Vzorek s cytosolem v jedné jamce

obsahoval: 168 µl pufru, 2 µl substrátu, 10 µl NADPH a 20 µl cytosolu. Slepý vzorek obsahoval: 188 µl pufru, 2 µl substrátu, 10 µl NADPH.

Protože bylo nutno změřit 12 vzorků cytosolu se substrátem MEN ve dvou koncentracích, byly pro sledování poklesu absorbance využity dvě 96-jamkové mikrotitrační GAMA destičky s kulatým dnem, které byly v ledové lázni. Do první destičky bylo pipetováno šest vzorků cytosolu – ženy, do druhé destičky bylo pipetováno šest vzorků cytosolu – muži. Každý jeden vzorek cytosolu byl pipetován vždy do dvou sloupců vedle sebe v 7 paralelních vzorcích (A – G). Liché sloupky pak sloužily pro 50 mM MEN, sudé sloupky pro 1 mM MEN. Jako slepý vzorek byl u obou destiček využit poslední řádek „H“, kam bylo napipetováno 20 µl 0,1 M K – fosfátového pufru pH 7,4 a 180 µl reakční směsi. V první destičce v posledním řádku byl slepý vzorek s 50 mM MEN, v druhé destičce v posledním řádku pak byl slepý vzorek s 1 mM MEN. Do každé jamky mimo slepé vzorky bylo napipetováno 20 µl cytosolu a 180 µl dané reakční směsi dle rozpisu.

4.2.10 Stanovení aktivit cytosolických karbonylreduktas vůči flubendazolu a doxorubicinu

Reakční směsi byly tvořeny 10 µM FLU nebo 10 µM doxorubicin (DOX), 250 µM NADPH, 0,1 M K – fosfátový pufr pH 6, vzorky cytosolu (6 vzorků jaterního cytosolu žen a 6 vzorků jaterního cytosolu mužů), které byly těsně před použitím rozmraženy a roztřepány. Aby bylo zabráněno předčasné reakci, mikrozkumavky s reakční směsí byly umístěny v ledu.

Příprava zásobních roztoků:

DOX (c = 1 mM)

Pro získání 1 mM DOX bylo 100 µl zásobního roztoku DOX (c = 3,45 mM) zředěno 245 µl redestilované vody.

NADPH (M_r = 833,4 g.mol^{-1}, c = 5 mM)

Pro přípravu roztoku NADPH bylo vypočítáno množství odpovídající výslednému 5 mM roztoku, dle skutečné navážky 1,05.10^{-2} g bylo doplněno 2560 µl

redestilované vody. Roztok byl připraven těsně před použitím v množství odpovídajícím počtu vzorků a protřepán na třepačce.

Protože bylo nutno změřit 12 vzorků cytosolu se substráty FLU a DOX, byly pro sledování poklesu absorbance využity dvě 96-jamkové mikrotitrační GAMA destičky s kulatým dnem, které byly v ledové lázni. Do první destičky bylo pipetováno šest vzorků cytosolu – ženy, do druhé destičky bylo pipetováno šest vzorků cytosolu – muži. Každý jeden vzorek cytosolu byl pipetován vždy do dvou sloupců vedle sebe v 7 paralelkách (A – G). Liché sloupky pak sloužily pro 1 mM FLU, sudé sloupky pro 1 mM DOX. Jako slepý vzorek byl u obou destiček využit poslední řádek „H“. V první destičce v posledním řádku byl slepý vzorek s 1 mM FLU, v druhé destičce v posledním řádku pak byl slepý vzorek s 1 mM DOX.

Při těchto měřeních nebyl připraven mastermix, postupně byly do všech jamek pipetovány nejprve 2 µl substrátu, dále168 µl pufru, 10 µl NADPH a 20 µl cytosolu, do posledního řádku obou destiček (slepé vzorky) bylo místo 20 µl cytosolu pipetováno 20 µl pufru.

Takto připravené mikrotitrační destičky byly vždy vloženy do přístroje Tecan a po 30 minutách inkubace byl sledován pokles absorbance po dobu 5 minut při 340 nm. Z naměřených hodnot absorbance byla vypočítána průměrná změna absorbance za minutu. Dále byla vypočítána aktivita cytosolických karbonylreduktas pomocí molárního absorpčního koeficientu a zohledněním koncentrace proteinu byly získány hodnoty specifické aktivity cytosolických karbonylreduktas.

Vzorec pro výpočet aktivity karbonylreduktas (nmol/min/ml)

$$aktivita = \frac{\Delta A \,.\, Vi \,.\, 1000}{\varepsilon \,.\, l \,.\, Vs}$$

ΔA – rozdíl absorbance ($A_{vzorku} - A_{slepého\ vzorku}$)

V_i – objem reakční směsi (0,2 ml)

ε – molární absorpční koeficient ($\varepsilon_{NADPH} = 6{,}22\ mM^{-1}.cm^{-1}$)

l – délka měřené vrstvy (výška jamky – 0,75 cm)

V_s – objem cytosolu (0,02 ml)

4.2.11 Sledování inhibičního účinku flubendazolu na redukci doxorubicinu

Reakční směsi byly tvořeny 2 μM nebo 10 μM FLU, 20 μM DOX, 1 mM NADPH, 0,1 M Na – fosfátový pufr pH 7,4, cytosol lidských jaterních buněk (člověk 1-8) nebo cytosol lidských střevních nádorových buněk SW480, které byly těsně před použitím rozmraženy a roztřepány. Vzorky byly připravovány ve 3 paralelkách. Biologické slepé vzorky obsahovaly místo FLU pouze rozpouštědlo (DMSO). Aby bylo zabráněno předčasné reakci, mikrozkumavky s reakční směsí byly umístěny v ledu.

Příprava roztoku NADPH (M_r = 833,4 g.mol^{-1}, c = 6 mM)

Pro přípravu roztoku NADPH bylo vypočítáno množství odpovídající výslednému 6 mM roztoku, dle skutečné navážky 3,54.10^{-3} g bylo doplněno 708 μl redestilované vody. Roztok byl připraven těsně před použitím a protřepán na třepačce.

Do popsaných mikrozkumavek byly napipetovány vzorky dle tabulky:

Tab. 9 Inhibiční účinek FLU na redukci DOX – složení reakční směsi a objemy jednotlivých složek

	DMSO [μl]	FLU 200 μM [μl]	FLU 1 mM [μl]	Pufr [μl]	NADPH 6 mM [μl]	CYT jaterní [μl]	CYT nádorové [μl]	DOX 120 μM [μl]
1	1,5	—	—	23,5	25	75	—	25
2	—	1,5	—	23,5	25	75	—	25
3	—	—	1,5	23,5	25	75	—	25
4	1,5	—	—	23,5	25	—	75	25
5	—	1,5	—	23,5	25	—	75	25
6	—	—	1,5	23,5	25	—	75	25
7	—	—	1,5	98,5	25	—	—	25
8	1,5	—	—	48,5	25	75	—	—
9	1,5	—	—	48,5	25	—	75	—

Mikrozkumavky se vzorky byly přemístěny do předem nahřátého termomixéru a byly inkubovány při teplotě 37 °C, 400 otáček, 30 minut. Po uplynutí doby inkubace byly mikrozkumavky přemístěny do ledu a ke každému vzorku bylo ihned přidáno 100 μl ledového methanolu a 100 μl acetonitrilu. Vzorky v mikrozkumavkách byly následně

protřepány na třepačce (5 minut, 400 otáček). Takto připravené vzorky pak byly předány pro další zpracování a vyhodnocení metodou UHPLC.

4.2.12 Stanovení koncentrace proteinů metodou BCA

Stanovení množství proteinu ve vzorcích cytosolu a mikrosomů bylo provedeno metodou BCA. Principem je reakce proteinů s měďnatými ioty, které se redukují na měďné a v prostředí kolem pH 10 dochází k tvorbě stabilního modrofialového komplexu s BCA (bicinchoninic acid). Mezi intenzitou zabarvení a množstvím proteinu je přímá úměrnost (Smith et al. 1985). Na spektrofotometru byla měřena absorbance komplexu při 562 nm.

Příprava roztoků:

Roztok C

Pracovní roztok C byl připraven smícháním roztoku A ($NaHCO_3$, Na_2CO_3, BCA v 0,1 M NaOH) a roztoku B (4% $CuSO_4.6H_2O$) v poměru 50:1. Tento roztok byl připraven těsně před použitím. Vzhledem k počtu vzorků byly použity 2 mikrotitrační destičky. Potřeba roztoku C na jednu destičku byla 19,2 ml. Bylo připraveno celkem 51 ml roztoku C smísením 50 ml roztoku A a 1 ml roztoku B.

Kalibrační křivka:

Dle tabulky byly pro kalibraci připraveny různé koncentrace sérového albuminu vzniklé smísením 0,1% BSA (hovězí sérový albumin) a redestilované vody.

Tab. 10 Příprava vzorků pro kalibraci

	Koncentrace BSA [$\mu g.ml^{-1}$]	0,1% roztok BSA [µl]	Redestilovaná voda [µl]
1	0	0	100
2	200	20	80
3	400	40	60
4	600	60	40
5	800	80	20
6	1000	100	0

Ředění vzorků:

Cytosol i mikrosomy byly zředěny 20x redestilovanou vodou. Pro každé měření bylo potřeba 80 µl naředěného vzorku (10 µl pro 8 paralelních vzorků). Bylo proto připraveno 200 µl zásobního roztoku smísením 10 µl cytosolu nebo mikrosomů a 190 µl redestilované vody. Celkem bylo naředěno 15 vzorků cytosolu a 2 vzorky mikrosomů.

Do mikrotitrační destičky GAMA s kulatým dnem byly nejprve pipetovány připravené vzorky pro kalibrační křivku. Do prvního sloupce 10 µl redestilované vody o koncentraci 0 $\mu g.ml^{-1}$, do dalších sloupců pak 10 µl roztoku BSA o koncentracích 200 $\mu g.ml^{-1}$, 400 $\mu g.ml^{-1}$, 600 $\mu g.ml^{-1}$, 800 $\mu g.ml^{-1}$, 1000 $\mu g.ml^{-1}$. Dále byly pipetovány vzorky cytosolu a mikrosomů, do každého sloupku vždy 10 µl pro 8 paralelních měření. Do všech jamek mikrotitrační destičky bylo multikanálovou pipetou přidáno 200 µl pracovního roztoku C. Takto připravená destička se nechala protřepat a inkubovat při 37 °C v termomixéru po dobu 30 minut. Následně byla změřena absorbance v přístroji Tecan při vlnové délce 562 nm metodou BCA GAMA.

Pro výpočet proteinu ve vzorku byla sestrojena kalibrační křivka, která vyjadřuje závislost koncentrace proteinů na naměřených hodnotách absorbance kalibračních roztoků. Od naměřených hodnot všech vzorků byl nejprve odečten průměr naměřených hodnot slepých vzorků. Hodnoty absorbance vzorků cytosolu a mikrosomů pak byly vloženy do rovnice lineární regrese získané z kalibrační křivky. Následně bylo pro výpočet koncentrace proteinu zohledněno zředění vzorků.

4.2.13 Stanovení relativní exprese CBR1

4.2.13.1 Elektroforéza proteinů v polakrylamidovém gelu

Příprava roztoků:

4 M HCl

Do 150 ml redestilované vody bylo v digestoři přidáno 88 ml koncentrované HCl a objem byl doplněn do 250 ml redestilovanou vodou. Roztok byl dále uchováván v lednici.

Zásobní roztok akrylamid-bisakrylamid (AA+bisAA)

Příprava tohoto roztoku probíhala velmi opatrně v rukavicích a s rouškou. Bylo naváženo 30 g akrylamidu a 0,8 g bis-akrylamidu a rozpuštěno v malém množství redestilované vody za stálého míchání. Objem roztoku byl doplněn redestilovanou vodou v odměrné baňce na 100 ml. Roztok byl dále uchováván v lednici pod argonovou atmosférou.

1,5 M TRIS-HCl pufr, pH 8,8

Bylo naváženo 18,5 g TRIS a za stálého míchání rozpuštěno v 75 ml redestilované vody. Pomocí 4 M HCl a pH metru bylo upraveno pH na 8,8. Objem roztoku byl doplněn redestilovanou vodou v odměrné baňce na 100 ml. Roztok byl dále uchováván v lednici.

0,5 M TRIS-HCl pufr, pH 6,8

Bylo naváženo 6 g TRIS a za stálého míchání rozpuštěno v 75 ml redestilované vody. Pomocí 4 M HCl a pH metru bylo upraveno pH na 6,8. Objem roztoku byl doplněn redestilovanou vodou v odměrné baňce na 100 ml. Roztok byl dále uchováván v lednici.

10% roztok SDS

Bylo naváženo 10 g SDS, rozpuštěno v 80 ml redestilované vody. Objem roztoku byl doplněn redestilovanou vodou v odměrné baňce na 100 ml. Roztok byl dále uchováván při laboratorní teplotě.

Koncentrovaný elektrodový pufr

Bylo naváženo 72 g glycinu, 15 g TRIS, 5 g SDS a rozpuštěno v 900 ml redestilované vody. Pomocí 4 M HCl a pH metru bylo za stálého míchání upraveno pH na 8,3. Objem roztoku byl doplněn redestilovanou vodou v odměrné baňce na 1000 ml. Pufr byl rozdělen po 100 ml do plastových nádob a zamražen.

4xSDS vzorkový pufr – ředění vzorků

Pro přípravu pufru byly smíchány složky dle tabulky a roztok byl dále uchováván v mrazicím boxu.

Tab. 11 Složení 4x SDS vzorkového pufru

Konečná koncentrace složky	Koncentrace zásobního roztoku	Přidané množství
200 mM TRIS/HCl pufr, pH 6,8	1M	4 ml
40% glycerol	85 %	9,41 ml
6% SDS	prášek	1,2 g
0,2 M DTT	prášek	0,617 g
0,1 g bromfenolová modř	prášek	0,1 g
Redestilovaná voda	—	20 ml

Lyzační pufr

Pro přípravu pufru byly smíchány složky dle tabulky a roztok byl dále uchováván v mrazicím boxu.

Tab. 12 Složení lyzačního pufru

Konečná koncentrace složky	Koncentrace zásobního roztoku	Přidané množství
50 mM TRIS/HCl pufr, pH 7,4	1M	50 ml
150 mM NaCl	prášek	8,766 g
10% glycerol	85%	117,65 ml
1% Triton X-100	100%	10 ml
2 mM EDTA	prášek	0,58 g
2 mM EGTA	prášek	0,76 g
40 mM β-glycerolfosfát	prášek	8,52 g
50 mM fluorid sodný	prášek	2,09 g
10 mM pyrofosfát sodný	prášek	4,46 g
2 mM dithiotreitol	prášek	0,3085 g
200 μM vanadičnan sodný	prášek	0,03678
Redestilovaná voda	—	doplnit objem na 1 l

Před použitím bylo k 13 ml lyzačního pufru přidáno 130 μl směsi inhibitorů od dodavatele Sigma-Aldrich a 130 μl 100 mM roztoku PMSF v ethanolu. Ještě před použitím tohoto roztoku bylo 17,42 mg PMSF rozpuštěno v 1 ml ethanolu. Po úpravě byl lyzační pufr uchováván v lednici.

Isobutanol nasycený vodou

Čistý isobutanol byl smísen s redestilovanou vodou, došlo ke vzniku isobutanolu nasyceného vodou, který se nacházel v horní vrstvě. Roztok byl dále uchováván v lednici.

Pracovní roztoky:

10% APS

Pro přípravu čtyř gelů bylo naváženo 100 mg APS a rozpuštěno v 1 ml redestilované vody. Tento roztok byl připraven v čase potřeby těsně před použitím.

Separační gel 10%; 1,5 mm

Pro přípravu čtyř gelů bylo do kádinky za stálého míchání postupně přidáváno 19,6 ml redestilované vody, 10 ml pufru 1,5 M TRIS-HCl pH 8,8, 10 ml 40% roztoku AA+bisAA a 400 µl 10% roztoku SDS. Po následném přidání 400 µl 10% roztoku APS a 32 µl roztoku TEMED (přidáno v digestoři) došlo k iniciaci polymerace.

Zaostřovací gel 4%; 1,5 mm

Pro přípravu čtyř gelů bylo do kádinky za stálého míchání postupně přidáváno 12,84 ml redestilované vody, 5 ml pufru 0,5 M TRIS-HCl pH 6,8, 1,96 ml 40% roztoku AA+bisAA a 200 µl 10% roztoku SDS. Po následném přidání 400 µl 10% roztoku APS a 32 µl roztoku TEMED (přidáno v digestoři) došlo k iniciaci polymerace.

Elektrodový pufr

Pro přípravu elektrodového pufru bylo smícháno 200 ml zásobního elektrodového pufru a 800 ml redestilované vody.

Ředění vzorků:

Dle obsahu bílkoviny ve vzorcích (cytosol z jaterních buněk) byly vzorky naředěny tak, aby výsledná koncentrace proteinu byla 1µg/1µl. Vzorky byly naředěny 4xSDS vzorkovým pufrem a lyzačním pufrem s roztokem inhibitorů tak, aby SDS tvořil ¼ celkového objemu. Při přípravě vzorku o celkovém objemu 400 µl se použilo takové množství vzorku, které obsahovalo 400 µg proteinu. Dále se přidalo 100 µl pufru 4xSDS a doplnilo se do objemu 400 µl lyzačním pufrem s inhibitory. Vzorky byly naředěny dle tabulek:

Tab. 13 Ředění vzorků – ženy

	F1	F2	F8	F13	F14	F15
Koncentrace bílkoviny [µg/µl]	6,6	6,01	4,72	3,91	6,2	4,22
Vzorek [µl]	60,6	66,6	84,7	102,3	64,5	94,8
Lyzační pufr s inhibitory [µl]	239,4	233,4	215,3	197,7	235,5	205,2
4xSDS pufr [µl]	100	100	100	100	100	100

Tab. 14 Ředění vzorků – muži

	M3	M4	M5	M6	M7	M9
Koncentrace bílkoviny [µg/µl]	5,95	4,48	6,46	3,64	6,48	4,89
Vzorek [µl]	67,2	89,3	61,9	109,9	61,7	81,8
Lyzační pufr s inhibitory [µl]	232,8	210,7	238,1	190,1	238,3	218,2
4xSDS pufr [µl]	100	100	100	100	100	100

Příprava gelu:

Při přípravě gelu probíhala po celou dobu práce v rukavicích. Všechny součásti pro přípravu gelu (nalévací stojánek, sklo, sklo se spacerem, spony, hřeben) byly nejprve důkladně omyty saponátem, vodou, redestilovanou vodou a lihomethanolem. Poté, co byly všechny součásti suché, byl sestaven stojan pro nalití gelu. Nejprve byla dvě skla přiložena na sebe, utěsněna parafilmem a následně sponami spojena. Poté byla na gumové podložce v nalévacím stojánku přitlačena a upevněna vrchním kolíkem. Dle návodu byl v čase potřeby připraven separační gel a napipetován mezi skla do výšky přibližně 4,5 cm od spodního okraje. Následně byl spodní gel převrstven 300 µl isobutanolu nasyceným vodou pro vyrovnání horní hladiny separačního gelu. Polymerace separačního gelu probíhala minimálně 60 minut, po uplynutí této doby byl slit isobutanol a prostor mezi skly byl opatrně vysušen filtračním papírem. Dále byl v čase potřeby připraven zaostřovací gel a napipetován mezi skla až po horní okraj. Následně byl na gel opatrně nasazen hřeben až po drážky. Polymerace zaostřovacího gelu probíhala minimálně 30 minut.

Naředěné cytosolické vzorky, které byly uchovávány v mrazicím boxu, bylo možné opakovaně použít. V čase potřeby byly vzorky rozmraženy a potřebné množství bylo povařeno 5 minut v termobloku předem zahřátém na 95 °C.

Skla s gely byla vyndána ze stojánku a opláchnuta tekoucí i redestilovanou vodou, aby byly odstraněny zbytky přebytečného gelu. Byl odstraněn hřeben a jamky byly opatrně vymyty redestilovanou vodou. Takto připravená skla byla vložena do stojánku

na elektroforézu tak, aby byla silná skla na vnější straně, a takto byla přitlačena na těsnění a přitáhnuta sponami. Stojánek byl vložen do vaničky umístěné v ledové lázni. Nejprve bylo do vnitřního elektrodového prostoru nalito přibližně 125 ml elektrodového pufru tak, aby byl ponořen celý gel a bylo zkontrolováno, zda gel nepodtéká. Pokud gel podtékal, bylo vnitřní těsnění potřeno tukem nebo vyměněno za jiné. Do vnějšího elektrodového prostoru bylo nalito přibližně 200 ml elektrodového pufru. Do vnitřního elektrodového prostoru byl použit vždy pufr nový a po použití byl vylit, pufr z vnějšího elektrodového prostoru mohl být ve vnější části použit opakovaně. Dále byly pomocí nanášecího bloku napipetovány vzorky. Do první a desáté jamky bylo naneseno 5 µl roztoku molekulového markeru (směsi obarvených proteinů s definovanou molekulovou hmotností), do druhé až sedmé jamky bylo naneseno 25 µl naředěných cytosolických vzorků, do osmé a deváté jamky bylo naneseno 25 µl 1xSDS pufru zředěného vodou. Po napipetování byl odstraněn nanášecí blok, vanička byla přiklopena víčkem a připojena ke zdroji elektrického napětí. Bylo nastaveno konstantní napětí 90 V a elektroforéza byla spuštěna. Přibližně po 20 minutách, kdy vzorky dosáhly k separačnímu gelu, bylo napětí zvýšeno na 150 V. Elektroforéza byla ukončena přibližně po dvou hodinách, kdy čelo dosáhlo na spodní okraj gelu. Zdroj elektrického napětí byl odpojen, stojánek byl vyjmut z vaničky, vnitřní elektrodový pufr byl vylit a vnější elektrodový pufr byl uchován pro další použití. Skla s gelem byla vyndána ze stojánku a připravena pro westernbloting.

4.2.13.2 Westernbloting

Zásobní roztoky:

Blotovací pufr

Bylo naváženo 6,06 g TRIS a 28,8 glycinu a rozpuštěno v 500 ml redestilované vody. Dále bylo přidáno 400 ml methanolu a v odměrné baňce byl objem doplněn do 2 000 ml redestilovanou vodou. Roztok byl uchováván v lednici v litrových lahvích.

Po celou dobu manipulace s gelem bylo nutno pracovat v rukavicích. Skla byla pomocí klínků rozevřena, byl odstraněn horní zaostřovací gel a u separačního gelu byla odstraněna dolní část s modrým barvivem. Takto upravený separační gel byl vložen do krabičky s blotovacím pufrem a ponořen. Zároveň byla do blotovacího pufru vložena nitrocelulózová membrána (předem popsána názvem proteinu, který bude detekován) a silný filtrační papír (dva kusy pro jeden gel). Vše bylo v blotovacím pufru ponecháno

přibližně 20 minut. Pro následné blotování v přístroji Biorad Trans Blot Turbo bylo nutné naskládat do blotovacího boxu pinzetou jednotlivé vrstvy tak, aby došlo k přenosu barvy z gelu na membránu. Elektrický proud procházel odshora směrem dolů, proto byly vrstvy skládány odspodu v pořadí: silný filtrační papír, nitrocelulózová membrána, polyakrylamidový gel, silný filtrační papír. Jednotlivé vrstvy byly jemně přitlačeny a uhlazeny, aby byly odstraněny bubliny mezi membránou a gelem. Blotovací box byl uzavřen víčkem a vložen do přístroje. Následně byla vybrána metoda pro dva gely o síle 1,5 mm a doba blotování byla nastavena na 20 minut. Po ukončení byl blotovací box z přístroje vyjmut, otevřen a opatrně bylo nadzvednutím horního filtračního papíru zkontrolováno, zda došlo k přenesení barvy z markeru na nitrocelulosovou membránu. Na membráně pak byly vyznačeny nejvýraznější proužky markeru (25, 50, 75 kDa).

4.2.13.3 Detekce proteinů

Zásobní roztoky:

0,1 M TRIS-HCl pufr, pH 8,0

Bylo naváženo 12,11 g TRIS, rozpuštěno v 800 ml redestilované vody. Pomocí 4 M HCl bylo na pH metru upraveno pH na hodnotu 8,0 a objem byl v odměrné baňce doplněn redestilovanou vodou do 1000 ml. Roztok byl uchováván v lednici.

TBST

Bylo naváženo 8,77 g NaCl a rozpuštěno v 300 ml redestilované vody. Dále byly přidány 3 ml Tweenu 20 a 100 ml 0,1 M TRIS-HCl pufru, pH 8,0. Objem byl v odměrné baňce doplněn redestilovanou vodou do 1000 ml. Roztok byl uchováván v lednici.

Primární protilátky

Zásobní protilátka proti CBR1 a zásobní protilátka proti β-aktinu byly zředěny dle instrukcí výrobce (1:5000) TBST pufrem s 1% BSA (bylo naváženo 150 mg BSA a rozpuštěno v 15 ml TBST pufru a byly napipetovány 3 µl zásobní protilátky). Roztoky byly uchovávány ve zkumavce v mrazničce. Před použitím byly včas rozmraženy.

Sekundární protilátky

Zásobní protilátka byla zředěna dle instrukcí výrobce (1:10000) TBST pufrem s 1% BSA (bylo naváženo 150 mg BSA a rozpuštěno v 15 ml TBST pufru a bylo napipetováno 1,5 µl zásobní protilátky). Roztok byl uchováván ve zkumavce v mrazničce. Byly použity protilátky proti králičím a proti myším imunoglobulinům. Před použitím byly včas rozmraženy.

Membrána byla po blotingu pinzetou přenesena do kónické zkumavky se šroubovacím víčkem. Membrána byla rozprostřena po obvodu zkumavky tak, aby její vnitřní část mohla být omývána. Nejprve byla třikrát omyta redestilovanou vodou. Dále bylo na membránu nalito přibližně 15 ml čerstvě připraveného 5% mléka v TBST pufru (4 g mléka v 80 ml TBST pufru). Zkumavka s membránou byla ponechána na kývačce alespoň na dvě hodiny. Následně bylo mléko slito a membrána byla ve zkumavce opatrně opláchnuta redestilovanou vodou. Přes noc pak probíhala inkubace s primární protilátkou proti CBR1. Druhý den byla primární protilátka slita zpět do zkumavky a zamražena pro opakované použití a následovalo oplachování membrány TBST pufrem, dohromady čtyřikrát po 15 minutách, pufr byl pokaždé slit a byl použit nový. Vzhledem k tomu, že detekované proteiny (CBR1 a β-aktin) se nacházely příliš blízko sebe, nemohla být membrána rozstřižena, proto inkubace probíhala nejprve s CBR1-protilátkou a druhý den s protilátkou proti β-aktinu, inkubace probíhala opět přes noc. Druhá primární protilátka byla také slita a zamražena pro další použití. Následovalo oplachování membrány TBST pufrem, čtyřikrát po 15 minutách. Dále byla membrána inkubována se sekundární protilátkou značenou křenovou peroxidasou, která má citlivější detekci než sekundární protilátky s alkalickou fosfatasou. Inkubace s první sekundární protilátkou (detekce CBR1-protilátky) probíhala 1 hodinu, opět následovalo oplachování TBST pufrem čtyřikrát po 15 minutách a pak následovala ještě inkubace s druhou sekundární protilátkou (detekce β-aktin-protilátky) 1 hodinu, poté následoval závěrečný oplach TBST pufrem čtyřikrát po 15 minutách.

4.2.13.4 Chemiluminiscenční detekce

Zásobní roztoky:

Substrát Amersham ECL Prime Western Blotting detection reagent

Roztok A (roztok luminolu) byl smíchán s roztokem B (roztok peroxidu) v poměru 1:1. Bylo připraveno 3,6 ml tohoto roztoku, což byl objem odpovídající použití na 4 membrány. Na ochranu před světlem byl roztok ve zkumavce zabalen do alobalu.

Vývojka (negativní, Fomadon)

Koncentrát byl naředěn redestilovanou vodou v poměru 1:28, bylo připraveno přibližně 100 ml roztoku.

Ustalovač (univerzální, kyselý, Fomafix)

Koncentrát byl naředěn redestilovanou vodou v poměru 1:4, bylo připraveno přibližně 100 ml roztoku.

3% kyselina citronová

Byly naváženy 3 g kyseliny citronové, které byly rozpuštěny ve 100 ml redestilované vody.

Všechny zásobní roztoky byly připraveny těsně před použitím v potřebném množství. Ustalovač lze použít opakovaně, vývojka se ale rychle vyčerpá a v tomto případě byla chystána nově.

Detekce probíhala v temné komoře, kam byly předem nachystány: substrát ve zkumavce v alobalu, fotomisky s vývojkou a ustalovačem, 2 misky s destilovanou vodou a miska s 3% kyselinou citronovou, krabička pro aplikaci substrátu na membránu, kazeta, etanol, RTG filmy, fotopinzeta, nůžky, folie, pipeta 1000 µl, špička, propisovací tužka, fix, kádinka, pinzeta a ubrousky. Ještě před začátkem detekce byla fotopinzeta opláchnuta destilovanou vodou, dle velikosti membrány byl opatrně nastříhán RTG papír, který byl vždy uchopen pouze za hrany a vložen do kazety. Kazeta byla před použitím i po použití otřena etanolem. Z kónické zkumavky byl vylit TBST pufr, membrána byla přesunuta do krabičky, na povrch membrány bylo napipetováno 900 µl substrátu, tak, aby byla pokryta celá plocha membrány a inkubace probíhala 5 minut při tlumeném světle. Po inkubaci byla okapaná membrána pinzetou přenesena na folii, vodotěsně zabalena

a byla otřena vlhkost. Ve tmě bylo pozorováno, jaká je intenzita záření membrány, a dle toho byl odhadnut čas následné expozice. Dále byla membrána umístěna do kazety a na ni opatrně položen RTG film a kazeta byla uzavřena. Při dobré intenzitě světla byla dostatečná doba osvitu 5 minut. Ihned po ukončení expozice byl RTG film fotopinzetou přenesen a ponořen do vývojky, za neustálého kývání bylo sledováno vyvíjení. Vyvolaný film byl postupně opláchnut v 3% kyselině citronové, redestilované vodě, na 1-2 minuty byl ponořen do ustalovače a znovu opláchnut redestilovanou vodou. Poté byl ponechán ve svislé poloze, aby oschnul. Popsaný film byl dále uchováván v temnu.

Nitrocelulosová membrána byla zabalena do folie a zamražena, takto uchovávanou membránu je možné během několika týdnů ještě znovu použít. V tom případě je pak rozmražena po dobu 5 minut, opláchnuta TBST pufrem čtyřikrát po 15 minutách, vložena do 5% mléka s TBST pufrem a dále lze pokračovat dle návodu.

4.2.14 Kvantifikace obsahu metabolitů metodou HPLC

HPLC analýzu pro stanovení redukce FLU provedl Ing. Vladimír Kubíček, CSc. Dále je uveden stručný popis metody.

Pro stanovení enantiomerů redukovaného FLU: (+)-FLUR a (-)-FLUR byla využita chirální HPLC analýza. Koncentrace FLU, (+)-FLUR a (-)-FLUR ve vzorcích byly určeny s využitím metody interního standardu (IS, ABZ). Chromatografické separace byly prováděny na koloně Chiralcel OD-R 250 mm x 4,6 mm (Daicel, Japonsko), isokratická eluce 0,5 ml/min methanol a 1 M vodný roztok $NaClO_4$ (75:25, v/v, pH 6,85). K oddělení všech analytů došlo během 25 minut. Pro určení metabolitů byl využit detektor s UV diodovým polem a fluorescenční detektor, které byly řazené za sebou. Nobilis et al. (2008) popsali podrobnosti týkající se HPLC analýzy včetně validace.

UHPLC analýzu pro stanovení redukce DOX provedl PharmDr. Adam Skarka, Ph.D. Dále je uveden stručný popis metody.

DOXOL byl detekován na chromatografickém systému UHPLC Agilent 1290 s chromatografickou kolonou Zorbax C18 Eclipse Plus o rozměrech 2,1 x 50 mm, 1,8 μm s filtrem 1290 Infinity inline (Agilent). Metoda HPLC (Skarka et al., 2011) byla přizpůsobena systému UHPLC: isokratická eluce 1,0 ml/min 0,1% kyseliny mravenčí

ve vodě a acetonitrilu v poměru 76:24 při 30 °C v termostatické části kolony; fluorescenční detekce při λ_{ex} = 480 nm a λ_{em} = 560 nm.

4.2.15 Zpracování dat, statistické zhodnocení

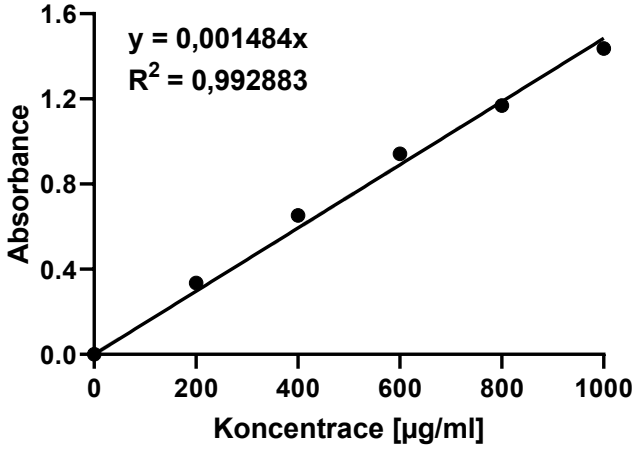
V programu Microsoft Excel byly zpracovány naměřené hodnoty jednotlivých experimentů. Všechny experimenty byly provedeny během tří samostatných pokusů. Ze všech naměřených hodnot byly vypočítány aritmetické průměry a směrodatné odchylky (SD), které jsou uvedeny v tabulkách u jednotlivých výsledků experimentů.

V programu GraphPad Prism 8.0 byly výsledky pokusů převedeny do grafů a bylo provedeno statistické zhodnocení pomocí analýzy One way analysis of variance (ANOVA) za použití testu Brown-Forsythe and Welsch ANOVA tests, statistická významnost $p < 0,05$ v případě vícenásobného porovnávání. V případě porovnání dvou průměrných hodnot byl použit Welch´s t-test, statistická významnost $p < 0,05$. Statisticky významné hodnoty jsou v grafu označeny hvězdičkou.

5 VÝSLEDKY

5.1 Stanovení koncentrace proteinů v subcelulárních frakcích

Koncentrace bílkoviny v jednotlivých vzorcích cytosolu a mikrosomů byla stanovena s využitím metody BCA (kap. 4.2.12). Kalibrační přímka byla sestrojena z hodnot absorbancí kalibračních roztoků o známých koncentracích (Obr. 4).



Obr. 4 Kalibrační křivka; graf závislosti absorbance na koncentraci bílkoviny

Z rovnice kalibrační přímky y = 0,001484x s hladinou spolehlivosti R^2 = 0,992883 byla vypočtena koncentrace proteinů v jednotlivých vzorcích cytosolu a mikrosomů. Výsledné hodnoty jsou průměrem ze dvou samostatných měření (Tab. 15).

Tab. 15 Koncentrace proteinů v jednotlivých vzorcích cytosolu a mikrosomů

	Koncentrace bílkoviny [mg/ml ± SD]
MIC 11-16	2,50 ± 0,07
CYT 1-8	4,99 ± 0,21
CYT 9-16	4,84 ± 0,36
CYT 11-16	4,71 ± 0,25
CYT F1	6,6 ± 0,38
CYT F2	6,01 ±0,37
CYT F8	4,72 ± 0,46
CYT F13	3,91 ± 0,26

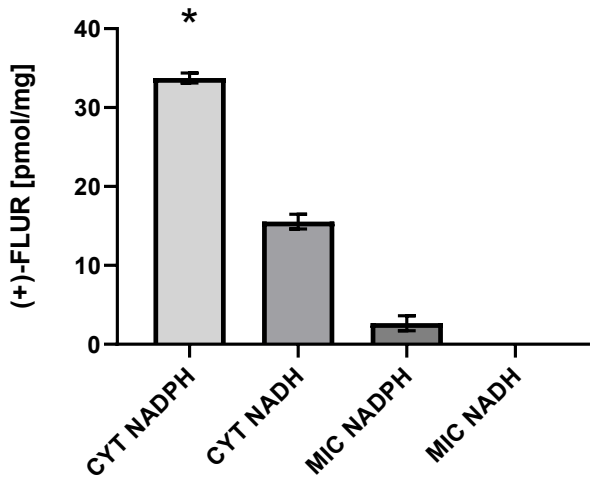
CYT F14	6,2 ± 0,51
CYT F15	4,22 ± 0,24
CYT M3	5,95 ± 0,28
CYT M4	4,48 ± 0,32
CYT M5	6,46 ± 0,45
CYT M6	3,64 ± 0,31
CYT M7	6,48 ± 0,43
CYT M9	4,89 ± 0,36

5.2 Stereospecifita a lokalizace redukce flubendazolu, sledování vlivu koenzymu

Pro stanovení stereospecifity a lokalizace redukce FLU byly směsné vzorky cytosolu nebo mikrosomů inkubovány po dobu 30 minut s 10 μM FLU a 500 μM NADH nebo 500 μM NADPH (kap. 4.2.5). Pomocí HPLC analýzy bylo zjištěno látkové množství metabolitu, tato hodnota byla vztažena na jeden mg proteinu v jednotlivých vzorcích. Výsledky měření jsou uvedeny v tabulce (Tab. 16) a znázorněny v grafu (Obr. 5).

Tab. 16 Výsledné množství FLUR ve vzorcích cytosolu a mikrosomů

	(+)-FLUR [pmol/mg ± SD]	(-)-FLUR [pmol/mg ± SD]
CYT NADPH	33,8 ± 0,6	0
CYT NADH	15,6 ± 0,9	0
MIC NADPH	2,7 ± 0,9	0
MIC NADH	0	0



*Obr. 5 Množství (+)-FLUR ve vzorcích cytosolu a mikrosomů s koenzymy NADH a NADPH, * označuje statistickou významnost při p < 0,05*

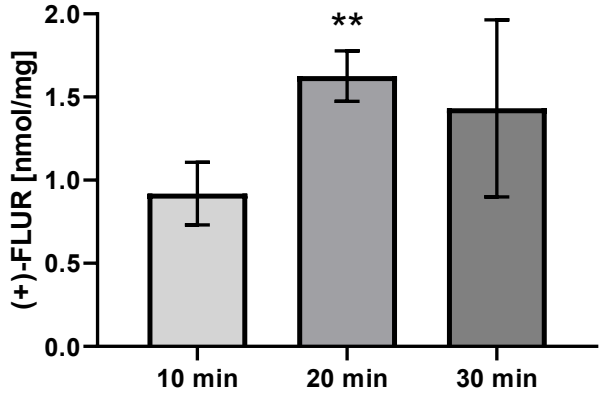
Z výsledků vyplývá, že k redukci FLU dochází mnohem více v cytosolu než v mikrosomech. Redukce je striktně stereospecifická, neboť byl detekován pouze (+)-FLUR. Zároveň je patrný rozdíl v redukci FLU vzhledem k použitému koenzymu NADPH nebo NADH v jednotlivých vzorcích. V případě vzorku cytosolu s NADPH se jednalo o statisticky významný rozdíl v množství FLUR oproti cytosolu s NADH i mikrosomů s NADPH.

5.3 Sledování vlivu doby inkubace na redukci flubendazolu

Pro sledování vlivu doby inkubace na redukci FLU bylo 100 µl směsných vzorků cytosolu inkubováno s 10 µM FLU a 500 µM NADPH po dobu 10, 20 a 30 minut (kap. 4.2.6). Pomocí HPLC analýzy bylo zjištěno látkové množství metabolitu ve vzorku, tato hodnota byla vztažena na jeden mg proteinu v jednotlivých vzorcích. Výsledky měření jsou uvedeny v tabulce (Tab. 17) a znázorněny v grafu (Obr. 6).

Tab. 17 Výsledné množství FLUR ve vzorcích cytosolu vzhledem k době inkubace

	(+)-FLUR [nmol/mg ± SD]	(-)-FLUR [nmol/mg ± SD]
10 min, 100 µl CYT	0,92 ± 0,19	0
20 min, 100 µl CYT	1,63 ± 0,15	0
30 min, 100 µl CYT	1,43 ± 0,53	0



*Obr. 6 Vliv doby inkubace na redukci FLU, ** označuje statistickou významnost při $p < 0,01$*

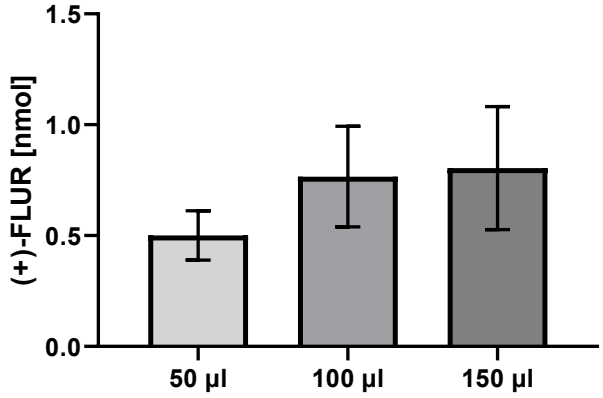
Z výsledků vyplývá, že k redukci FLU dochází mnohem více po 20 minutách inkubace. U vzorku cytosolu s dobou inkubace 30 minut je viditelný mírný pokles množství FLUR, avšak vzhledem k rozptylu hodnot není tento pokles zásadní. V případě vzorku cytosolu s dobou inkubace 20 minut se jednalo o statisticky významný rozdíl oproti vzorku cytosolu s dobou inkubace 10 minut. Potvrdila se striktní stereospecifita redukce, opět byl detekován pouze (+)-FLUR.

5.4 Sledování vlivu množství cytosolu na redukci flubendazolu

Pro sledování vlivu množství cytosolu na redukci FLU bylo 50, 100 a 150 µl směsných vzorků cytosolu inkubováno s 10 µM FLU a 500 µM NADPH po dobu 30 minut. (kap. 4.2.6). Pomocí HPLC analýzy bylo zjištěno látkové množství metabolitu ve vzorku. Výsledky měření jsou uvedeny v tabulce (Tab. 18) a znázorněny v grafu (Obr. 7).

Tab. 18 Výsledné množství FLUR ve vzorcích vzhledem k množství cytosolu

	(+)-FLUR [nmol ± SD]	(-)-FLUR [nmol ± SD]
30 min, 50 µl CYT	0,52 ± 0,11	0
30 min, 100 µl CYT	0,77 ± 0,23	0
30 min, 150 µl CYT	0,80 ± 0,28	0



Obr. 7 Vliv množství cytosolu na redukci FLU

Z výsledků vyplývá, že k redukci FLU dochází mnohem více ve vzorku se 100 µl cytosolu oproti vzorku s 50 µl cytosolu. Mezi vzorky cytosolu s 100 µl a 150 µl není zásadní rozdíl v nárůstu množství FLUR. Potvrdila se striktní stereospecifita redukce, opět byl detekován pouze (+)-FLUR.

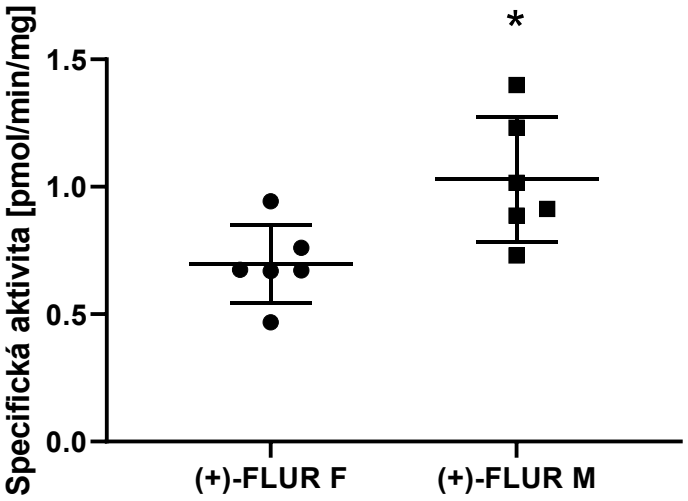
5.5 Inter-individuální rozdíly a sex-diference v redukci flubendazolu

Po stanovení vhodného množství cytosolu a doby inkubace pro experimenty byl sledován vliv pohlaví a inter-individuální rozdíly při redukci FLU. Pro stanovení redukce FLU bylo 12 individuálních vzorků jaterního cytosolu (6 vzorků žen a 6 vzorků mužů) inkubováno s 10 µM FLU a 500 µM NADPH (kap. 4.2.7). Pomocí HPLC analýzy bylo zjištěno látkové množství metabolitu, tato hodnota byla v jednotlivých vzorcích přepočtena na specifickou aktivitu. Výsledky měření jsou uvedeny v tabulce (Tab. 19) a znázorněny v grafu (Obr. 8).

Tab. 19 Výsledné hodnoty specifických aktivit ve vzorcích cytosolu žen a mužů

	(+)-FLUR [pmol/min/mg ± SD]
F1	0,67 ± 0,13
F2	0,47 ± 0,02
F8	0,76 ± 0,14
F13	0,67 ± 0,10
F14	0,67 ± 0,06
F15	0,94 ± 0,12

M3	0,91 ± 0,05
M4	1,02 ± 0,04
M5	0,89 ± 0,14
M6	1,40 ± 0,27
M7	0,73 ± 0,14
M9	1,23 ± 0,09



*Obr. 8 Sex-diference a inter-individuální rozdíly v redukci FLU, * označuje statistickou významnost při p < 0,05*

Z výsledků vyplývá, že v cytosolu z jater mužů je FLU aktivněji redukován než v cytosolu z jater žen. V redukční aktivitě vůči FLU byly zjištěny relativně malé inter-individuální rozdíly.

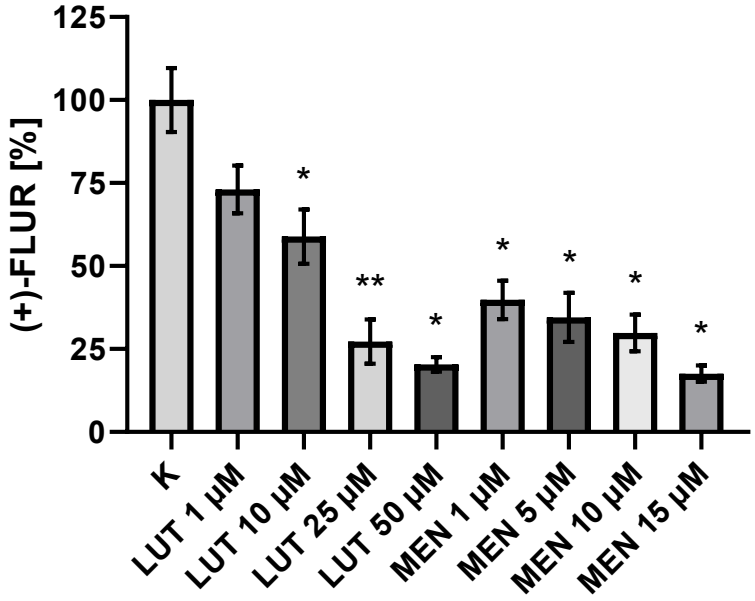
5.6 Sledování inhibičního účinku menadionu a luteolinu na redukci flubendazolu

Pro zjištění účasti CBR1 na redukci FLU byly použity dva inhibitory CBR1: LUT a MEN. Směsný vzorek cytosolu byl inkubován s 10 μM FLU a 500 μM NADPH a různými koncentracemi inhibitorů LUT a MEN (kap. 4.2.8). Pomocí HPLC analýzy bylo zjištěno látkové množství metabolitu, tyto hodnoty byly přepočteny

na procenta vzhledem ke kontrole (vzorek bez inhibitoru). Výsledky měření jsou uvedeny v tabulce (Tab. 20) a znázorněny v grafu (Obr. 9).

Tab. 20 Výsledné hodnoty FLUR ve vzorcích cytosolu, vliv inhibitorů

	(+)-FLUR [% ± SD]
K (kontrola)	100 ± 9,65
LUT 1 μM	73,30 ± 7,19
LUT 10 μM	58,90 ± 8,17
LUT 25 μM	27,22 ± 6,70
LUT 50 μM	20,35 ± 2,18
MEN 1 μM	39,83 ± 5,78
MEN 5 μM	34,55 ± 7,39
MEN 10 μM	29,84 ± 5,56
MEN 15 μM	17,58 ± 2,43



*Obr. 9 Vliv inhibitorů na redukci FLU, * označuje statistickou významnost při p < 0,05, ** označuje statistickou významnost při p < 0,01*

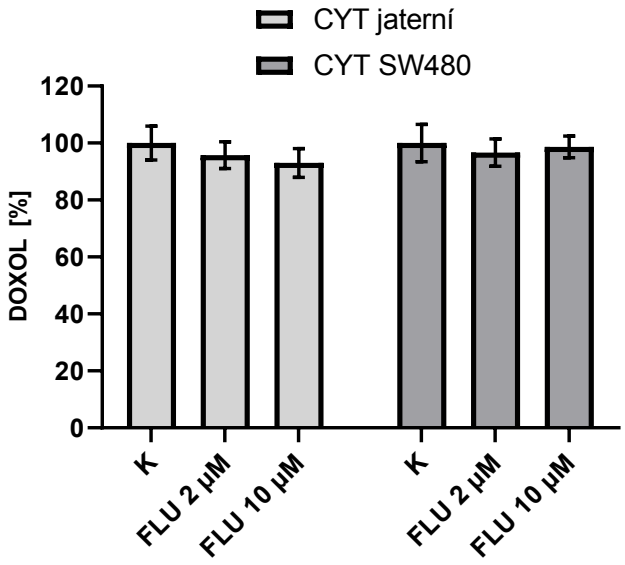
Z výsledků vyplývá, že vlivem LUT a MEN došlo k výrazné inhibici CBR1, což se odrazilo na množství vzniklého FLUR. MEN se projevil jako silnější inhibitor oproti LUT. Všechny vzorky ovlivněné inhibitory s výjimkou LUT 1 μM vykazovaly statistickou významnost oproti kontrole (vzorek bez inhibitoru).

5.7 Sledování inhibičního účinku flubendazolu na redukci doxorubicinu

Pro stanovení inhibičního účinku FLU na redukci cytostatika DOX byl použit směsný vzorek jaterního cytosolu a cytosol nádorových buněk SW 480. Cytosol jaterních i nádorových buněk byl inkubován s 0 μM nebo 2 μM nebo 10 μM FLU, 1 mM NADPH a 20 μM DOX (kap. 4.2.11). Pomocí UHPLC analýzy byla zjištěna koncentrace DOXOL. Tyto hodnoty byly přepočteny na procenta vzhledem ke kontrole (vzorek bez FLU). Výsledky měření jsou uvedeny v tabulce (Tab. 21) a znázorněny v grafu (Obr. 10).

Tab. 21 Výsledné hodnoty DOXOL ve vzorcích cytosolu jaterních a nádorových buněk, vliv FLU

	DOXOL - CYT jaterní [% ± SD]	DOXOL - CYT SW480 [% ± SD]
FLU 0 μM	100,0 ± 6,0	100,0 ± 6,6
FLU 2 μM	95,7 ± 4,7	96,7 ± 4,8
FLU 10 μM	93,0 ± 5,1	98,6 ± 3,8



Obr. 10 Inhibiční účinek FLU na redukci DOX

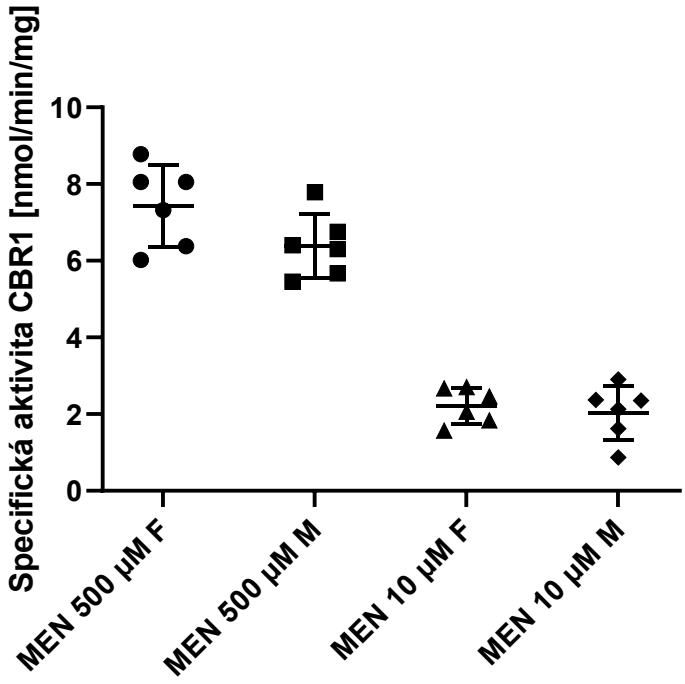
Z výsledků vyplývá, že v jaterním cytosolu ani v cytosolu buněk SW480 nedochází k signifikantnímu inhibičnímu účinku FLU na redukci DOX.

5.8 Stanovení aktivity karbonylreduktasy 1

Pro stanovení specifické aktivity CBR1 bylo použito 12 individuálních vzorků jaterního cytosolu (6 vzorků žen a 6 vzorků mužů). Vzorky byly inkubovány s MEN 500 μM nebo MEN 10 μM a 250 μM NADPH (kap. 4.2.9). Spektrofotometricky byl změřen pokles absorbance, z těchto hodnot byla vypočítána enzymová aktivita a zohledněním proteinu v jednotlivých vzorcích pak byly zjištěny hodnoty specifické aktivity, které jsou uvedeny v tabulce (Tab. 22) a znázorněny v grafu (Obr. 11)

Tab. 22 Výsledné hodnoty specifických aktivit CBR1 s MEN 500 μM a MEN 10 μM

	Specifická aktivita CBR1 [nmol/min/mg ± SD]	
	MEN 500 μM	MEN 10 μM
F1	8,78 ± 1,12	1,57 ± 0,14
F2	6,38 ± 0,68	2,06 ± 0,33
F8	6,02 ± 1,01	2,7 ± 0,7
F13	7,32 ± 1,94	2,46 ± 0,29
F14	8,05 ± 0,73	1,84 ± 0,25
F15	8,05 ± 1,34	2,67 ± 0,42
M3	6,4 ± 1,5	2,37 ± 0,42
M4	7,79 ± 1,59	2,13 ± 0,68
M5	5,45 ± 0,84	2,9 ± 0,79
M6	6,75 ± 0,84	2,35 ± 0,58
M7	5,67 ± 0,75	0,87 ± 0,38
M9	6,3 ± 1,11	1,62 ± 0,54



Obr. 11 Sex diference a inter-individuální rozdíly v redukci MEN 500 µM a MEN 10 µM

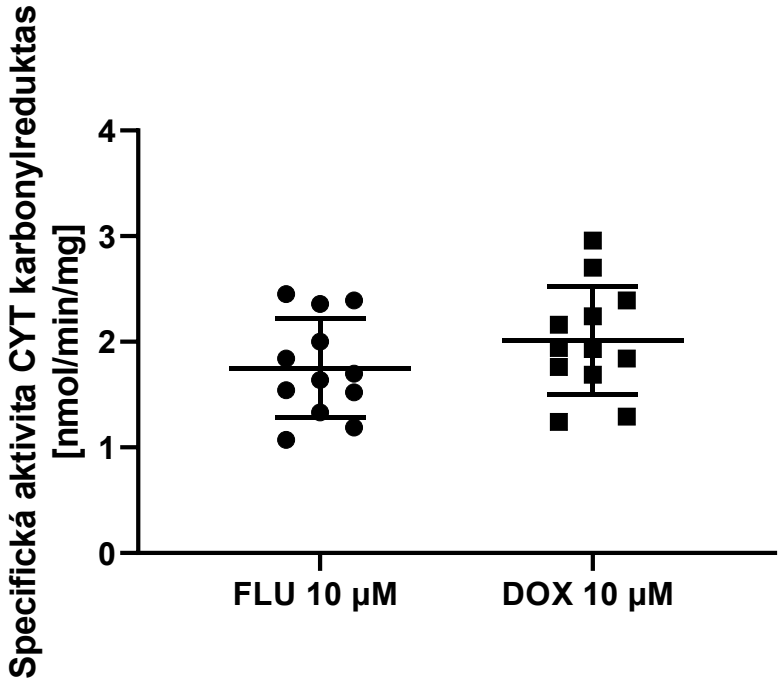
Z výsledků vyplývá, že hodnoty specifické aktivity CBR1 jsou srovnatelné u žen i u mužů u obou použitých koncentrací MEN. Ve specifické aktivitě CBR1 byly u obou použitých koncentrací MEN zjištěny relativně malé inter-individuální rozdíly.

5.9 Stanovení aktivit cytosolických karbonylreduktas vůči flubendazolu a doxorubicinu

Pro stanovení specifických aktivit cytosolických karbonylreduktas bylo použito 12 individuálních vzorků jaterního cytosolu (6 vzorků žen a 6 vzorků mužů). Vzorky byly inkubovány s FLU 10 µM nebo DOX 10 µM a 250 µM NADPH (kap. 4.2.10). Spektrofotometricky byl změřen pokles absorbance, z těchto hodnot byla vypočítána enzymová aktivita a zohledněním proteinu v jednotlivých vzorcích pak byly zjištěny hodnoty specifické aktivity, které jsou uvedeny v tabulce (Tab. 23) a znázorněny v grafu (Obr. 12).

Tab. 23 Výsledné hodnoty specifických aktivit cytosolických karbonylreduktas vůči FLU 10 μM a DOX 10 μM

	Specifická aktivita cytosolických karbonylreduktas [nmol/min/mg ± SD]	
	FLU 10 μM	DOX 10 μM
F1	1,64 ± 0,21	1,29 ± 0,29
F2	2,00 ± 0,18	1,84 ± 0,2
F8	2,39 ± 0,55	2,16 ± 0,48
F13	2,36 ± 0,25	1,93 ± 0,55
F14	1,84 ± 0,48	1,69 ± 0,17
F15	2,45 ± 0,44	2,39 ± 0,46
M3	1,33 ± 0,36	1,94 ± 0,28
M4	1,07 ± 0,35	2,7 ± 0,61
M5	1,19 ± 0,47	1,76 ± 0,56
M6	1,70 ± 0,93	2,96 ± 0,48
M7	1,54 ± 0,58	1,24 ± 0,52
M9	1,52 ± 0,62	2,24 ± 0,32



Obr. 12 Specifická aktivita cytosolických karbonylreduktas vůči FLU 10 μM a DOX 10 μM

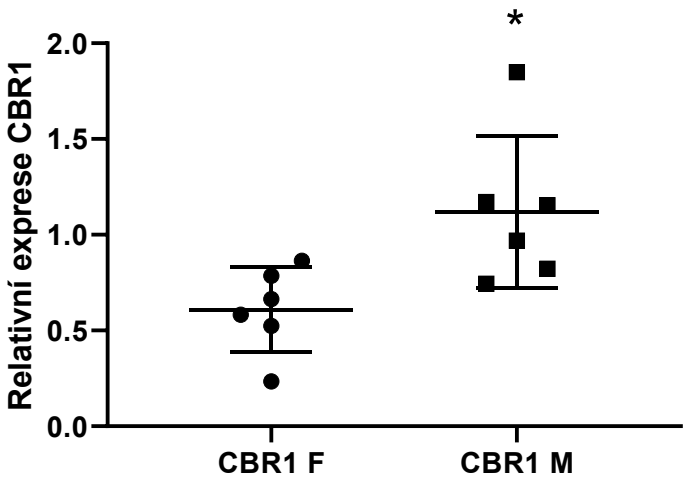
Z výsledků vyplývá, že cytosolické reduktasy mají aktivitu vůči FLU a DOX srovnatelnou. Ve specifické aktivitě cytosolických karbonylreduktas byly u FLU i DOX zjištěny relativně malé inter-individuální rozdíly.

5.10 Stanovení relativní exprese CBR1

Pro stanovení relativní exprese CBR1 byla provedena elektroforéza, westernbloting a následovala chemiluminiscenční detekce. (kap. 4.2.13). Filmy po chemiluminiscenční detekci byly hodnoceny v přístroji C-DiGit Blot Scanner. Byla provedena relativní kvantifikace proteinů a denzita proužků CBR1 byla vztažena na denzitu proužků β-aktinu. Výsledné hodnoty relativní exprese CBR1 jsou uvedeny v tabulce (Tab. 24) a znázorněny v grafu (Obr. 13).

Tab. 24 Výsledné hodnoty relativní exprese CBR1 ve vzorcích cytosolu žen a mužů

	Relativní exprese CBR1 ± SD
F1	0,66 ± 0,12
F2	0,86 ± 0,06
F8	0,58 ± 0,03
F13	0,23 ± 0,01
F14	0,79 + 0,02
F15	0,52 ± 0,06
M3	1,85 ± 0
M4	1,15 ± 0,11
M5	0,97 ± 0,23
M6	1,17 ± 0,74
M7	0,82 ± 0,58
M9	0,74 ± 0,16



*Obr. 13 Relativní exprese CBR1 v cytosolu individuálních vzorků jater mužů (M) a žen (F), * označuje statistickou významnost při $p < 0,05$*

Z výsledků vyplývá, že u vzorků jaterního cytosolu mužů je vyšší exprese CBR1 oproti jaternímu cytosolu žen. V tomto případě se jednalo o statisticky významný rozdíl v relativní expresi CBR1 mezi vzorky cytosolu žen a mužů. U mužů jsou mírně větší inter-individuální rozdíly v expresi CBR1 než u žen.

6 DISKUSE

Benzimidazolové anthelmintikum flubendazol (FLU) je v humánní medicíně používané pro léčbu střevních hlístic, ve veterinární medicíně se využívá kromě léčby nematodóz i pro léčbu cestodóz. V posledních několika letech je FLU rozsáhle studován pro své potenciální protinádorové účinky, které souvisí s jeho mechanismem účinku. Vazbou na podjednotku mikrotubulů β-tubulin dochází k narušení struktury a funkce mikrotubulů, ke zhoršení progrese buněčného cyklu a indukci apoptózy u nádorových buněk (Hanušová et al. 2015).

Protinádorová účinnost FLU byla poprvé prokázána *in vitro* i *in vivo* u leukémie a myelomu (Spagnuolo et al. 2010), antiproliferativní účinek FLU byl dále prokázán na střevních nádorových buněčných liniích (Králová et al. 2013, Králová et al. 2016), u neuroblastomu (Michaelis et al. 2015), prsního karcinomu (Hou et al. 2015, Oh et al. 2018), melanomu (Čáňová et al. 2018), gliomu (Zhou et al. 2018) nebo spinocelulárního karcinomu jícnu (Tao et al. 2019). Tyto poznatky poukazují na možnost zavedení nové indikace FLU jako protinádorového léčiva.

Vzhledem k nedostatku informací o metabolismu FLU u lidí a také z důvodu velkých rozdílů v metabolismu FLU u jednotlivých živočišných druhů (Maté et al. 2017) byl FLU testován ve vzorcích lidských jaterních subcelulárních frakcí.

Dosud byl metabolismus FLU studován pouze okrajově. Bylo zjištěno, že v lidských jaterních subcelulárních frakcích dochází k redukci FLU za vzniku FLUR, v mikrosomech byl ale nalezen i hydrolyzovaný metabolit FLUH (Maté et al. 2017). Stuchlíková et al. (2018) při studiu metabolismu v lidských jaterních řezech ale nalezli pouze jediný metabolit FLU, a to FLUR. Naše experimenty pak potvrdily, že FLUR je jediný metabolit vznikající v subcelulárních frakcích lidských jater.

Cílem naší práce bylo zjistit další informace o metabolismu FLU v lidských jaterních subcelulárních frakcích – cytosolu a mikrosomech, které v literatuře nejsou zatím k dispozici. Byla studována lokalizace, preference koenzymu a stereospecifita redukce FLU. Spolu s kolegyní PharmDr. Janou Štěpánkovou, která se v rámci své rigorózní práce (Štěpánková 2018) také zabývala metabolismem FLU, jsme zjistily, že FLU je redukován více v cytosolu než v mikrosomech a preferovaným koenzymem je NADPH oproti NADH. Vzhledem k tomu, že FLU je prochirální substrát, může redukce karbonylu vést ke vzniku dvou stereoisomerů FLUR, a proto byla využita chirální

analýza. Bylo však zjištěno, že v lidských játrech je redukce karbonylu striktně stereospecifickou reakcí a vzniká pouze jeden enantiomer, identifikovaný jako (+)-FLUR.

Ve studii Nobilise et al. (2007), bylo prokázáno, že reduktázy FLU v subcelulárních frakcích z jater a tenkého střeva bažantů a prasat upřednostňují koenzym NADPH a redukce probíhá více v cytosolu než v mikrosomech. Také byla prokázána stereospecifita redukce, ne striktní, ale s významnou převahou (+)-FLUR (93-97 %). Podobně i u ovcí docházelo k tvorbě FLUR s významnou převahou enantiomeru (+)-FLUR (Křížová et al. 2009).

Pro zjištění vhodných parametrů pro redukci FLU jsme testovali různé množství cytosolu a různou dobu inkubace, přičemž jsme zjistili, že nejlépe pozorovatelná redukce FLU je při použití 100 µl jaterního cytosolu a při době inkubace 30 minut.

Dále byly studovány inter-individuální rozdíly a sex-diference v redukci FLU, kdy bylo využito 12 individuálních vzorků jaterního cytosolu (6 vzorků mužů a 6 vzorků žen). Zatímco inter-individuální rozdíly byly relativně nízké, byl pozorován rozdíl v redukci FLU mezi pohlavími. U mužů došlo k výraznější redukci FLU než u žen. Navzdory statistické významnosti je rozdíl v redukci FLU mezi pohlavími relativně nízký a toto zjištění by nemělo znamenat zásadní farmakologické důsledky.

Lze předpokládat, že redukce FLU v játrech se účastní karbonylreduktasa CBR1, což bylo potvrzeno ve studiích, které provedli Maté et al. (2008) i Stuchlíková et al. (2018). Enzym CBR1 patřící do nadrodiny SDR je distribuovaný ve všech lidských tkáních s vysokou expresí zejména v játrech, střevě a ledvinách. Substrátem CBR1 je široká škála endogenních sloučenin i xenobiotik, které obsahují karbonyl. Redukce zprostředkovaná CBR1 preferuje koenzym NADPH a je často stereospecifická (Shi & Di 2017). Účast CBR1 na redukci FLU byla testována použitím inhibitorů luteolinu (LUT), flavonoidu významně inhibující CBR1 (Arai et al. 2015), a menadionu (MEN), substrátu a kompetitivního inhibitoru CBR1 (Hoffmann & Maser 2008). Oba tyto inhibitory významně snížily redukci FLU v lidských jaterních subcelulárních frakcích, z čehož lze usuzovat na účast CBR1 na redukci FLU.

Relativní exprese CBR1 byla měřena u 12 individuálních vzorků cytosolu (6 vzorků mužů a 6 vzorků žen) a vyšší hladina CBR1 byla nalezena u mužů než u žen, což je v souladu s vyšší redukcí FLU u mužů. Toto zjištění poukazuje na význam CBR1 v redukci FLU, nicméně nelze vyloučit účast jiných karbonylreduktas.

Dále byly ve 12 individuálních vzorcích cytosolu měřeny aktivity enzymů účastnící se redukce FLU. Pro zjištění aktivity CBR1 byl využit substrát MEN ve dvou koncentracích: v 500 μM koncentraci (saturační) a v koncentraci 10 μM, ve které byl používán FLU jako substrát. Nebyly pozorovány výrazné inter-individuální rozdíly nebo rozdíly mezi pohlavími u obou použitých koncentrací.

Vzhledem k tomu, že byla prokázána účast CBR1 na redukci FLU, byla dále zjišťována potenciální možnost interakce FLU a DOX. DOX je protinádorové léčivo s širokým spektrem aktivity obsahující karbonylovou skupinu a jedním z enzymů významně se podílející na jeho redukci je právě CBR1 (Skarka et al. 2011).

Bylo proto testováno, zda by FLU mohl působit jako kompetitivní inhibitor redukce DOX. Byl tedy testován vliv FLU na redukci DOX v cytosolu jaterních a střevních nádorových buněk SW480. Tyto buňky byly vybrány na základě výsledků studie, kterou provedli Stuchlíková et al. (2018), kdy buňky SW480 významně redukovaly FLU ve srovnání s jinými nádorovými buněčnými liniemi. Bylo zjištěno, že k inhibici redukce DOX pomocí FLU nedochází v lidských jaterních ani nádorových buňkách. Riziko interakcí FLU s DOX a pravděpodobně i s jinými léčivy obsahující karbonyl je tedy nízké a tato léčiva by mohla být použita společně.

Tyto nové poznatky z *in vitro* studie o metabolismu FLU doplňují chybějící informace nutné pro další studium protinádorové aktivity FLU a podporují zavedení nové indikace FLU jako protinádorového léčiva u lidí, nicméně by bylo vhodné tato zjištění potvrdit v dalších studiích.

7 ZÁVĚR

Výsledky této diplomové práce lze shrnout do následujících bodů:

- Redukce FLU probíhá zejména v cytosolu a preferovaným koenzymem je NADPH
- Redukce FLU je stereospecifická za vzniku enantiomeru (+)-FLUR
- Na redukci FLU se v cytosolu podílí CBR1
- Redukce FLU probíhala více u mužů než u žen, což bylo v souladu s vyšší relativní expresí CBR1 u mužů než u žen
- Inter-individuální rozdíly v redukci FLU jsou relativně nízké
- Riziko lékových interakcí FLU s jinými léčivy obsahující karbonylovou skupinu je minimální

8 SEZNAM ZKRATEK

ABZ	albendazol
AKR	aldo-ketoreduktasy
BCA	bicinchoninic acid
BSA	hovězí sérový albumin
CBR1	karbonylreduktasa 1
DMSO	dimethylsulfoxid
DOX	doxorubicin
DOXOL	doxorubicinol
FLU	flubendazol
FLUH	hydrolyzovaný flubendazol
FLUR	redukovaný flubendazol
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IS	interní standard
LUT	luteolin
MEN	menadion
NADH	nikotinamidadenindinukleotid redukovaný
NADPH	nikotinamidadenindinukleotid fosfát redukovaný
PTX	paklitaxel
SDR	dehydrogenasy/reduktasy s krátkým řetězcem
UHPLC	ultra vysokoúčinná kapalinová chromatografie

9 POUŽITÉ ZDROJE

AKHTAR W., KHAN M. F., VERMA G., SHAQUIQUZZAMAN M., RIZVI M. A., MEHDI S. H., AKHTER M. a ALAM M. M. (2016) Therapeutic evolution of benzimidazole derivatives in the last quinquennial period. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 126, 705-753. doi: 10.1016/j.ejmech.2016.12.010

ARAI Y., ENDO S., MIYAGI N., ABE N., MIURA T., NISHINAKA T., TERADA T., OYAMA M., GODA H., EL-KABBANI O., HARA A., MATSUNAGA T. a IKARI A. (2015) Structure–activity relationship of flavonoids as potent inhibitors of carbonyl reductase 1 (CBR1). *Fitoterapia*, 101, 51-56. doi: 10.1016/j.fitote.2014.12.010

BÁRTÍKOVÁ H., SKÁLOVÁ L., LAMKA L., SZOTÁKOVÁ B. a VÁRADY M. (2010) The effects of flubendazole and its metabolites on the larval development of Haemonchus contortus (Nematoda: Trichostrongylidae). *Helminthologia*, 47(4), 269-272. doi: 10.2478/s11687-010-0042-7

Benzimidazoles. (2016) In: ARONSON, J. K. (ed.) Meyler's Side Effects of Drugs. *Elsevier*, 849-856. doi: 10.1016/B978-0-444-53717-1.00364-4

BOUŠOVÁ I., SKÁLOVÁ L., SOUČEK P. a MATOUŠKOVÁ P. (2015) The modulation of carbonyl reductase 1 by polyphenols. *Drug Metabolism Reviews*, 47(4), 520-533. doi: 10.3109/03602532.2015.1089885

CEBALLOS L., ALVAREZ L., MACKENZIE C., GEARY T. a LANUSSE C. (2015) Pharmacokinetic comparison of different flubendazole formulations in pigs: A further contribution to its development as a macrofilaricide molecule. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 5(3), 178-184. doi: 10.1016/j.ijpddr.2015.09.001

ČÁŇOVÁ K., ROZKYDALOVÁ L. a RUDOLF E. (2017) Anthelmintic Flubendazole and Its Potential Use in Anticancer Therapy. *Acta Medica (Hradec Kralove, Czech Republic)*, 60(1), 5-11. doi: 10.14712/18059694.2017.44

ČÁŇOVÁ K., ROZKYDALOVÁ L., VOKURKOVÁ D. a RUDOLF E. (2018) Flubendazole induces mitotic catastrophe and apoptosis in melanoma cells. *Toxicology in Vitro*, 46, 313-322. doi: 10.1016/j.tiv.2017.10.025

GEARY T. G., MACKENZIE C. D., SILBER S. a LUSTIGMAN S. (2019) Flubendazole as a macrofilaricide: History and background. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 13(1). doi: 10.1371/journal.pntd.0006436

GUPTA S. C., SUNG B., PRASAD S., WEBB L. J. a AGGARWAL B. B. (2013) Cancer drug discovery by repurposing: teaching new tricks to old dogs. *Trends in Pharmacological Sciences*, 34(9), 508-517. doi: 10.1016/j.tips.2013.06.005

HANUŠOVÁ V., SKÁLOVÁ L., KRÁLOVÁ V. a MATOUŠKOVÁ P. (2015) Potential Anti-cancer Drugs Commonly Used for Other Indications. *Current Cancer Drug Targets*, 15(1), 35-52. doi: 10.2174/1568009615666141229152812

HOFFMANN F. a MASER E. (2008) Carbonyl Reductases and Pluripotent Hydroxysteroid Dehydrogenases of the Short-chain Dehydrogenase/reductase Superfamily. *Drug Metabolism Reviews*, 39(1), 87-144. doi: 10.1080/03602530600969440

HOU Z.-J., LUO X., ZHANG W., PENG F., CUI B., WU S.-J., ZHENG F.-M., XU J., XU L.-Z., LONG Z.-J., WANG X.-T., LI G.-H., WAN X.-Y., YANG Y.-L. a LIU Q. (2015) Flubendazole, FDA-approved anthelmintic, targets breast cancer stem-like cells. *Oncotarget*, 6(8), 6326-6340. doi: 10.18632/oncotarget.3436

KIM, Y.-J., SUNG D., OH E., CHO Y., CHO T.-M., FARRAND L., SEO J. H. a KIM J. Y. (2018) Flubendazole overcomes trastuzumab resistance by targeting cancer stem-like properties and HER2 signaling in HER2-positive breast cancer. *Cancer Letters*, 412, 118-130. doi: 10.1016/j.canlet.2017.10.020

KRÁLOVÁ V., HANUŠOVÁ V., STAŇKOVÁ P., KNOPPOVÁ K., ČÁŇOVÁ K. a SKÁLOVÁ L. (2013) Antiproliferative effect of benzimidazole anthelmintics albendazole, ricobendazole, and flubendazole in intestinal cancer cell lines. *Anti-Cancer Drugs*, 24(9), 911-919. doi: 10.1097/CAD.0b013e3283648c69

KRÁLOVÁ V., HANUŠOVÁ V., RUDOLF E., ČÁŇOVÁ K. a SKÁLOVÁ L. (2016) Flubendazole induces mitotic catastrophe and senescence in colon cancer cells in vitro. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 68(2), 208-218. doi: 10.1111/jphp.12503

KRÁLOVÁ V., HANUŠOVÁ V., CALTOVÁ K., ŠPAČEK P., HOCHMALOVÁ M., SKÁLOVÁ L. a RUDOLF E. (2018) Flubendazole and mebendazole impair migration and epithelial to mesenchymal transition in oral cell lines. *Chemico-Biological Interactions*, 293, 124-132. doi: 10.1016/j.cbi.2018.07.026

KŘÍŽOVÁ V., NOBILIS M., PRUŠKOVÁ L., CHLÁDEK J., SZOTÁKOVÁ B., CVILINK V., SKÁLOVÁ L. a LAMKA J. (2009) Pharmacokinetics of flubendazole and its metabolites in lambs and adult sheep (Ovis aries). *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 32(6), 606-612. doi: 10.1111/j.1365-2885.2009.01082.x

LAMKA J. a DUCHÁČEK L. (2014) Veterinární léčiva pro posluchače farmacie. Karolinum, Praha. Léčiva infekčních chorob – Anthelmintika. ISBN 978-80-246-2790-8

MACKENZIE C. D. a GEARY T. G. (2011) Flubendazole: a candidate macrofilaricide for lymphatic filariasis and onchocerciasis field programs. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 9(5), 497-501. doi: 10.1586/eri.11.30

MATÉ L., VIRKEL G., LIFSCHITZ A., BALLENT M. a LANUSSE C. (2008) Hepatic and extra-hepatic metabolic pathways involved in flubendazole biotransformation in sheep. *Biochemical Pharmacology*, 76(6), 773-783. doi: 10.1016/j.bcp.2008.07.002

MATÉ M. L., GEARY T., MACKENZIE C., LANUSSE C. a VIRKEL G. (2017) Species differences in hepatic biotransformation of the anthelmintic drug flubendazole. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 40(5), 493-499. doi: 10.1111/jvp.12383

MICHAELIS M., AGHA B., ROTHWEILER F., LÖSCHMANN N., VOGES Y., MITTELBRONN M., STARZETZ T., HARTER P. N., ABHARI B. A., FULDA S., WESTERMANN F., RIECKEN K., SPEK S., LANGER K., WIESE M., DIRKS W. G., ZEHNER R., CINATL J., WASS M. N. a CINATL J. (2015) Identification of flubendazole as potential anti-neuroblastoma compound in a large cell line screen. *Scientific Reports*, 5(8202). doi: 10.1038/srep08202

NOBILIS M., JIRA T., LÍSA M., HOLČAPEK M., SZOTÁKOVÁ B., LAMKA J. a SKÁLOVÁ L. (2007) Achiral and chiral high-performance liquid chromatographic determination of flubendazole and its metabolites in biomatrices using UV photodiode-array and mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A*, 1149(1), 112-120. doi: 10.1016/j.chroma.2007.01.013

NOBILIS, M., VYBÍRALOVÁ Z., KŘÍŽOVÁ V., KUBÍČEK V., SOUKUPOVÁ M., LAMKA J., SZOTÁKOVÁ B. a SKÁLOVÁ L. (2008) Sensitive chiral high-performance liquid chromatographic determination of anthelmintic flubendazole and its phase I metabolites in blood plasma using UV photodiode-array and fluorescence detection. *Journal of Chromatography B*, 876(1), 89-96. doi: 10.1016/j.jchromb.2008.10.032

OH E., KIM Y.-J., AN H., SUNG D., CHO T.-M., FARRAND L., JANG S., SEO J. H. a KIM J. Y. (2018) Flubendazole elicits anti-metastatic effects in triple-negative breast cancer via STAT3 inhibition. *International Journal of Cancer*, 143(8), 1978-1993. doi: 10.1002/ijc.31585

RAISOVÁ-STUCHLÍKOVÁ L., MATOUŠKOVÁ P., VOKŘÁL I., LAMKA J., SZOTÁKOVÁ B., SEČKAŘOVÁ A., DIMUNOVÁ D., NGUYEN L. T., VÁRADY M. a SKÁLOVÁ L. (2018) Metabolism of albendazole, ricobendazole and flubendazole in Haemonchus contortus adults: Sex differences, resistance-related differences and the identification of new metabolites. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance,* 8(1), 50-58. doi: 10.1016/j.ijpddr.2018.01.005

ROSEMOND M. J. a WALSH J. S. (2004) Human Carbonyl Reduction Pathways and a Strategy for Their Study In Vitro. Drug Metabolism Reviews, 36(2), 335-361 doi: 10.1081/DMR-120034154

SHI S. M. a DI L. (2017) The role of carbonyl reductase 1 in drug discovery and development. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 13(8), 859-870. doi: 10.1080/17425255.2017.1356820

SINGH P. K. a SILAKARI O. (2018) Benzimidazole. Key Heterocycle Cores for Designing Multitargeting Molecules. *Elsevier*, 31-52. doi: 10.1016/B978-0-08-102083-8.00002-9

SKÁLOVÁ L. a BOUŠOVÁ I. (2013) Metabolismus léčiv a jiných xenobiotik. Karolinum, Praha. Enzymy metabolizující xenobiotika – Reduktasy xenobiotik. ISBN 978-80-246-1917-0

SKARKA A., ŠKARYDOVÁ L., ŠTAMBERGOVÁ H. a WSÓL V. (2011) Anthracyclines and their metabolism in human liver microsomes and the participation of the new microsomal carbonyl reductase. *Chemico-Biological Interactions*, 191(1-3), 66-74. doi: 10.1016/j.cbi.2010.12.016

SMITH P. K., KROHN R. I., HERMANSON G. T., MALLIA A. K., GARTNER F. H., PROVENZANO M. D., FUJIMOTO E. K., GOEKE N. M., OLSON B. J. a KLENK D. C. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, 150(1), 76-8. doi: 10.1016/0003-2697(85)90442-7

SPAGNUOLO P. A., HU J., HURREN R., WANG X., GRONDA M., SUKHAI M. A., DI MEO A., BOSS J., ASHALI I., BEHESHTI ZAVAREH R., FINE N., SIMPSON C. D., SHARMEEN S., ROTTAPEL R. a SCHIMMER A. D. (2010) The antihelmintic flubendazole inhibits microtubule function through a mechanism distinct from Vinca alkaloids and displays preclinical activity in leukemia and myeloma. *Blood*, 115(23), 4824-4833. doi: 10.1182/blood-2009-09-243055

Struktruní vzorec FLU – Sigma Aldrich [online]. [cit. 2019-03-25]. Dostupné z: https://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/flubendazol313283143015611?lang=en&region=CZ

STUCHLÍKOVÁ L., KRÁLOVÁ V., LNĚNIČKOVÁ K., ZÁRYBNICKÝ T., MATOUŠKOVÁ P., HANUŠOVÁ V., AMBROŽ M., ŠUBRT Z. a SKÁLOVÁ L. (2018) The metabolism of flubendazole in human liver and cancer cell lines. *Drug Testing and Analysis*, 10(7), 1139-1146. doi: 10.1002/dta.2369

ŠTĚPÁNKOVÁ, J. (2018) *Charakterizace redukce flubendazolu u člověka in vitro.* Rigorózní práce. Katedra biochemických věd, Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy, Hradec Králové, 53 stran.

TAO J., ZHAO H., XIE X., LUO M., GAO Z., SUN H. a HUANG Z. (2019) The anthelmintic drug flubendazole induces cell apoptosis and inhibits NF-κB signaling in esophageal squamous cell carcinoma. *OncoTargets and Therapy*, 12, 471-478. doi: 10.2147/OTT.S193206

VOKŘÁL I., BÁRTÍKOVÁ H., PRCHAL L., STUCHLÍKOVÁ L., SKÁLOVÁ L., SZOTÁKOVÁ B., LAMKA J., VÁRADY M. a KUBÍČEK V. (2012) The metabolism of flubendazole and the activities of selected biotransformation enzymes in Haemonchus contortus strains susceptible and resistant to anthelmintics. *Parasitology*, 139(10), 1309-1316. doi: 10.1017/S0031182012000595

YADAV S., NARASIMHAN B. a KAUR H. (2016) Perspectives of Benzimidazole Derivatives as Anticancer Agents in the New Era. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 16(11), 1403-1425. doi: 10.2174/1871520616666151103113412

ZHENG M., CHEN L. a HUA L. (2019) In Silico Modeling of FDA-Approved Drugs for Discovery of Anticancer Agents: A Drug-Repurposing Approach. *In Silico Drug Design*. Elsevier, 527-548. doi: 10.1016/B978-0-12-816125-8.00017-1

ZHOU X., LIU J., ZHANG J., WEI Y. a LI H. (2018) Flubendazole inhibits glioma proliferation by G2/M cell cycle arrest and pro-apoptosis. *Cell Death Discovery*, 4(1). doi: 10.1038/s41420-017-0017-2