

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
Katedra biochemických věd

**CYTOSTATICKÝ ÚČINEK NOVÝCH DERIVÁTŮ
PACLITAXELU VE VYBRANÝCH NÁDOROVÝCH LINIÍCH**

Diplomová práce

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

Hradec Králové 2013

Martin Ambrož

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

Zde bych chtěl poděkovat Prof. RNDr. Lence Skálové, Ph.D. a Mgr. Veronice Hanušové za jejich ochotu, trpělivost a cenné rady při experimentech a sepisování této diplomové práce.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra biochemických věd

Kandidát: Martin Ambrož

Školitel: Prof. RNDr. Lenka Skálová, Ph.D.

Název diplomové práce: Cytostatický účinek nových derivátů paclitaxelu ve vybraných nádorových liniích

Paclitaxel (PTX) je antiproliferativní látka používaná v terapii některých nádorů prsu, plic a vaječníků. Paclitaxel zvyšuje stabilitu mikrotubulů, čímž dojde k inhibici buněčné proliferace. Bohužel, nerozlišuje zdravé a nádorové buňky, ale ovlivňuje všechny proliferující buňky. Ke zvýšení selektivity PTX k nádorovým buňkám byly v ÚEB AVČR připraveny deriváty PTX s analogy gonadoliberinu (Gn-RH).

Cílem této práce bylo porovnat antiproliferativní účinnosti těchto derivátů a samotného PTX na nádorových liniích MDA-MB-231 a CaCo-2. Linie MDA-MB-231 reprezentuje prsní nádorovou tkáň, ve které jsou exprimovány receptory pro Gn-RH. Linie CaCo-2 pochází z kolorektálního adenokarcinomu a k expresi receptorů pro Gn-RH zde nedochází. Pro stanovení antiproliferativního účinku studovaných látek byly použity dva různé testy buněčné viability a kontinuální monitorování životnosti v čase systémem x-CELLigence. Pro porovnání cytotoxicity PTX a jeho derivátů byla použita primární kultura potkaních hepatocytů.

Výsledky ukázaly nižší antiproliferativní účinek derivátu MP 264 ve srovnání s PTX a porovnatelné antiproliferativní účinky derivátů MP 265, MP394 jako PTX na buněčnou linii MDA-MB-231. Derivát MP 264 vykazoval nižší cytotoxický účinek na primární kultury potkaních hepatocytů a nižší antiproliferativní účinek na linii CaCo-2 než PTX. Stabilitní studie prokázala rychlou degradaci derivátu MP 265 v kultivačním médiu.

ABSTRACT

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biochemical Sciences

Candidate: Martin Ambrož

Supervisor: Prof. RNDr. Lenka Skálová, Ph.D.

Title of diploma thesis: Cytostatic effect of new paclitaxel derivatives in selected cancer lines

Paclitaxel (PTX) is antiproliferative drug used for therapy of some types breast, lung and ovarian cancer. It stabilizes microtubules and as a result, cause inhibition of the normal cell division. Unfortunately it makes no difference between normal and malignant cells and affect all proliferating cells. To increase selectivity of effect of PTX on cancer cells, conjugates of PTX with gonadotropin-hormon (Gn-RH) were prepared in Institute of experimental botany of Czech Academy of Sciences in Prague.

The aim of our study was to compare effect of PTX conjugates and PTX alone on cell viability and proliferation of cell lines MDA-MB-231 and CaCo2. Cell line MDA-MB-231 is human breast adenocarcinoma line which express receptors for GnRH. CaCo-2 cell line is derived from epithelial colorectal adenocarcinoma cells which don't express receptors for Gn-RH. Antiproliferative effect of tested substances was monitored by two different tests of cell viability and real-time cell analysis by system x-CELLigence. For appointment of cytotoxic effect was used primary culture of rat hepatocytes.

Obtained results showed lower antiproliferative effect of derivat MP264 in comparation of PTX. Comparable antiproliferative effect of derivates MP265 and MP394 with PTX on cell line MDA-MB-231. Derivat MP 264 showed lower cytotoxic effect in primary cell culture of rat hepatocytes and lower antiproliferative effect in CaCo-2 cell line. Stability tests proved fast degradation of MP 265 derivat in growth medium.

Obsah

1. Úvod.....	8
2. Teoretická část.....	9
2.1. Nádor prsu.....	9
2.1.1. Epidemiologie a etiologie.....	9
2.1.2. Symptomy nemoci a prevence.....	10
2.1.3. Diagnostika.....	10
2.1.3.1. Neinvazivní vyšetření.....	11
2.1.3.2. Invazivní vyšetření.....	12
2.1.4. Terapie.....	12
2.1.4.1. Chirurgická léčba.....	13
2.1.4.2. Radioterapie.....	13
2.1.4.3. Chemoterapie.....	13
2.1.4.4. Hormonální terapie.....	14
2.1.4.5. Monoklonální protilátky.....	15
2.2. Paklitaxel.....	15
2.2.1. Farmakologické informace.....	16
2.3. Gonadoliberin.....	18
2.4. Cílená léčba.....	20
2.4.1. Cílené deriváty paklitaxelu.....	21
2.5. Buněčné linie.....	22
2.5.1. Linie CaCo-2.....	23
2.5.2. Linie MDA-MB-231.....	23
3. Cíl práce.....	24
4. Experimentální část.....	25
4.1. Biologický materiál a chemikálie.....	25
4.1.1. Konjugáty MP264, MP265, MP394.....	26
4.2. Přístroje.....	26
4.3. Metody.....	27
4.3.1. Buněčné linie.....	27
4.3.1.1. Příprava kultivačních médií.....	27
4.3.1.2. Rozmrazování buněčných linií.....	28

4.3.1.3. Pasážování adherentních buněk.....	28
4.3.1.4. Určení koncentrace buněčné suspenze.....	29
4.3.2. Potkaní hepatocyty.....	30
4.3.2.1. Izolace a kultivace.....	30
4.3.3. Stanovení cytotoxicity.....	33
4.3.3.1. Neutral Red uptake test.....	33
4.3.3.2. MTT test.....	34
4.3.3.3. x-CELLigence.....	35
4.3.4. Zamrazení buněčných linií.....	36
5. Výsledky.....	37
5.1. Optimalizace kultivačních podmínek.....	37
5.2. Konjugáty MP264, MP265.....	38
5.2.1. Buněčná linie MDA-MB-231.....	38
5.2.1.1. S neovlivněnými receptory pro Gn-RH.....	38
5.2.1.2. S vysycenými receptory pro Gn-RH.....	40
5.2.1.3. x-CELLigence.....	42
5.2.2. Testování stability konjugátů paklitaxelu.....	43
5.2.3. Primární kultura potkaních hepatocytů.....	44
5.2.4. Buněčná linie CaCo-2.....	45
5.2.4.1. Účinek na dělicí se buňky.....	45
5.2.4.2. Účinek na nedělicí se buňky.....	46
5.3. Konjugát MP394.....	47
6. Diskuse.....	49
7. Závěry.....	52
Seznam zkratk.....	53
Seznam použité literatury.....	54

1. Úvod

Množství diagnostikovaných nádorových onemocnění se neustále zvyšuje, v současnosti již patří k druhému nejčastěji diagnostikovanému onemocnění. U mužů jsou nejčastěji diagnostikovány kožní nádory, nádor prostaty, nádory tlustého střeva a konečníku a nádory průdušnice, průdušek a plic. Z hlediska mortality patří k nejnebezpečnějším nádory průdušnice, průdušek a plic a nádory tlustého střeva a konečníku. U žen patří k nejčastějším onkologickým diagnózám nádory kůže, nádor prsu a nádory tlustého střeva a konečníku. Nejvyšší počet umrtí je hlášen u nádorů prsu a tlustého střeva a konečníku. Celkově v České republice umírá na nádorové onemocnění každý pátý člověk. Navzdory zvyšující se incidenci nádorových onemocnění mortalita zůstává přibližně na stejné úrovni jako v minulosti. To je způsobeno rozvojem diagnostických metod, kdy dříve diagnostikované nádory jsou lépe léčitelné. V diagnostice jsou ovšem ještě velké možnosti rozvoje, protože v současnosti diagnostikovatelné nádory jsou již značně velké. Další příčinou je rozvoj terapeutických postupů. U chemoterapie se například jedná o látky schopné selektivněji ovlivňovat cílové struktury, v ideálním případě unikátní pro daný typ nádoru, čímž dojde k eliminaci některých nežádoucích účinků (Klener 2011; Adam a kol. 2004).

Obdobné deriváty byly testované v rámci mé diplomové práce, konkrétně se jednalo o konjugáty paklitaxelu s analogy Gn-RH.

2. Teoretická část

2.1. Nádor prsu

2.1.1. Epidemiologie a etiologie

Karcinom prsu patří ve světě k nejčastějším onemocněním u žen. Tvoří až 20% ze všech maligních onemocnění žen. Jeho incidence je vysoká a neustále stoupá. Postiženo je až 6 % ženské populace. V ČR bylo hlášeno v roce 1998 4624 nových případů, to je 87,5 onemocnění na 100 000 žen. Pravděpodobnost rozvoje karcinomu prsu se zvyšuje s věkem. Prakticky se nevyskytuje do 20 let. Ve věku 20-30 let je velmi řídký. V posledních letech vzrostl počet případů hlášených ve věkové skupině 35-39 let o skoro 17 %. Nejčastěji se prsní nádor objevuje v laterálním horním kvadrantu a centrálním, retroareolární oblasti (Klener 2011; Adam a kol. 2004).

Rizikové faktory vzniku karcinomu prsu lze rozdělit na genetické, hormonální, dietní a faktory zevního prostředí. Gen BRCA1, lokalizovaný na 17. chromozomu, je spojen až s 90 násobným rizikem rozvoje karcinomu prsu. Dalšími rizikovými geny jsou BRCA2, nacházející se na 13. chromozomu a mutace tumor-supresorového genu p53 u syndromu Li-Fraumeni. Rizikový je také výskyt nádoru prsu v rodině u sestry, matky popř. babičky, zejména pokud se objeví premenopausálně. Z hormonů působí jako rizikový faktor dlouhodobá expozice estrogenům. Rizikově také působí alkohol, zvýšený přísun tuků v dětství spojený s nedostatkem pohybu, což vede k nárůstu tukových zásob spojených se zvýšenou hladinou estrogenů. Benigní změny prsní tkáně a ionizující záření, hlavně před 40. rokem života, taktéž přispívají k rozvoji nádoru prsu (Adam a kol. 2004).

2.1.2. Symptomy nemoci a prevence

Narůstající úroveň screeningu vede k nárůstu zachycení nádorů prsu bez klinických příznaků. Nejčastějším klinickým příznakem je hmatná rezistence v prsu. Ta je způsobena vazivovým stromatem a přitahováním okolních tkání. Bolestivost prsu je častý, bohužel nespecifický příznak. Většinou není zapříčiněna nádorem. Zvýšená vaskularizace a venostáza, způsobená útlakem okolní tkáně, vede ke zvýraznění kožních žil. Dalším nespecifickým příznakem je sekrece z mamily. Vyklenutí a změna tvaru prsu může být také způsobena nádorem prsu, ovšem určitá asymetrie je fyziologickou záležitostí. Další příznaky jsou změna barvy kůže, vtažení kůže či bradavky, kožní edém a nárůst tuhé kožní léze. Mezi pozdní příznaky lze zařadit zvětšené a tuhé axilární mízní uzliny, exulcerace, krvácení a zápach (Coufal a kol. 2011).

Prevenčí je jednak samovyšetření, které může vést k dalšímu podrobnému vyšetření. Pro preventivní vyšetření se využívá mamografie a ultrazvukové vyšetření prsu. Preventivní prohlídky by měly ženy absolvovat nejdéle po dosažení 50. roku života a poté každé dva roky. Ženy s rizikovými faktory by měly podstupovat preventivní vyšetření na mamografu od 35. roku života. Bylo prokázáno, že včasný záchyt vede k poklesu mortality až o 30 % (Adam a kol. 2004).

2.1.3. Diagnostika

Pro stanovení definitivní diagnózy se využívá několik typů vyšetření, která lze rozdělit na invazivní a neinvazivní. Mezi neinvazivní vyšetřovací metody patří mammografie, ultrazvukové vyšetření prsu, magnetická resonance, pozitronová emisní tomografie a výpočetní tomografie. Z invazivních vyšetřovacích metod potom aspirace tenkou jehlou, tzv. „core cut“ biopsie, otevřená chirurgická biopsie. Invazivní vyšetření slouží pro doplnění informací o histologické vyšetření. Dále je využíváno stanovení nádorových markerů (Adam a kol. 2004; Coufal a kol. 2011).

2.1.3.1. Neinvazivní vyšetření

a) mammografie

Mezi nejstarší způsoby diagnostiky patří vyšetření na mammografu. Její význam je stále velký, protože je finančně dostupná, široce rozšířená, mamografický obraz je skladovatelný a reprodukovatelný, což umožňuje srovnání starších a nových snímků, popř. konzultaci s jiným lékařem. Jedná se o rentgenologické vyšetření měkkým zářením. Hodnotí se stín na snímku. S výhodou ji lze využít u žen středního a vyššího věku, kdy je u většiny žen žláza v involuci a snímek je díky tomu přehlednější (Adam a kol. 2004; Coufal a kol. 2011).

b) ultrasonografie

Hodnocení ultrasonografického snímku je metoda silně závislá na zkušenostech vyšetřujícího. Proto většinou slouží jako doplňující vyšetření u mammografie. Preferována je pouze u mladších žen z důvodu vyšší mamografické denzity prsní tkáně a malé, ovšem nezanedbatelné radiační zátěže. Ultrasonografie také slouží jako nejčastější naváděcí metoda při punkční biopsii a předoperační lokalizaci nehmavných lézí (Adam a kol. 2004; Coufal a kol. 2011).

c) magnetická rezonance prsu

Vyšetření magnetickou rezonancí vykazuje ze všech zobrazovacích metod nejvyšší senzitivitu. Nelze jí však nahradit mamografické vyšetření ani ultrasonografií. Slouží pouze jako doplňující vyšetření. Bez aplikace kontrastní látky je využívána pouze k vyloučení ruptury silikonových implantátů. Kontrastní magnetická rezonance je vysoce senzitivní pro zobrazení invazivního karcinomu. Nižší specifita neumožňuje rozlišit nejasné léze, v těchto případech je voleno invazivní vyšetření, nejčastěji punkce (Coufal a kol. 2011).

d) počítačová tomografie

Počítačová tomografie má pouze pomocnou roli a slouží spíše k předoperačnímu lokalizaci nádoru (Coufal a kol. 2011).

2.1.3.2. Invazivní vyšetření

a) aspirace tenkou jehlou

Při této metodě je použita tenká jehla k odběru malého množství buněk. Využívá se běžná injekční stříkačka s běžnou jehlou. Cytologicky lze vyšetřit malignitu, ovšem už nelze určit expresi steroidních receptorů a další fenotypické znaky nádoru. Rizikem je podhodnocení a málo výtěžný odběr (Coufal a kol. 2011).

b) tkáňová punkční biopsie

Při odběru dochází k získání válce tkáně se zachovalou architekturou. K odběru je používána speciální jehla nasazená na mechanické pružinové nastřelovací jednotce. Tkáň lze podrobit běžnému i histopatologickému vyšetření. Získané údaje mohou být využity pro určení individuální léčby (Coufal a kol. 2011).

c) vakuová biopsie

Vakuová biopsie patří k novějším postupům. Tkáň je nasávána vakuem do odběrového výřezu jehly. Při odběru není nutné pro získání vzorku jehlu vytahovat. Výřez lze natáčet v rozsahu 360°. Zároveň je možné odebrat více vzorků bez vytažení jehly. (Coufal a kol. 2011).

2.1.4. Terapie

Léčba karcinomu prsu se vždy skládá z více součástí. Lokálně působí operační řešení a radioterapie, systémově poté chemoterapie, hormonální terapie a terapie monoklonálními protilátkami. Před začátkem léčby je nutné stanovit rozsah onemocnění a předpokládanou odpověď na různé druhy léčby. Dle rozsahu lze nádory rozdělit na neinvazivní, operabilní stádia invazivních nádorů, neoperabilní stádia invazivních nádorů a metastazující či recidivující nádory. Pravděpodobnost účinku léčby lze určit na základě určení např. estrogenních receptorů, HER-2 receptoru (Adam a kol. 2004).

2.1.4.1. Chirurgická léčba

Cílem chirurgického zákroku je odstranění nádorového ložiska i s malou částí nepostižené tkáně. Odstraněná tkáň zároveň poslouží jako vzorek pro histopatologické vyšetření. Zákrok by pokud možno neměl komplikovat pozdější kosmetickou korekci. Indikován je převážně v případech, kdy nejsou přítomny metastázy. Zákrok je dvojího typu: částečná nebo úplná ablace. Zároveň je proveden zákrok na regionálních uzlinách. Pokud uzliny jeví známky postižení už při vyšetření ultrasonografií, jsou odstraněny, v opačném případě je proveden odběr histologického materiálu (Coufal a kol. 2011).

2.1.4.2. Radioterapie

Prakticky vždy po operačním řešení přichází na řadu doplňující léčba ozařováním v rozsahu 5-7 týdnů. K zahájení radioterapie dochází, pokud nenastanou komplikace, 4-6 týdnů po zákroku. V případě současné chemoterapie je radioterapie odložena. Musí být však zahájena do 6., vyjimečně do 9. měsíce od chirurgického zákroku. Zacílení radioterapie se liší dle rozsahu operace a prognózy pacienta. Při částečném odstranění prsu je prsní oblast ozařována vždy, svodné uzliny pouze při nepříznivé prognóze. U úplného odstranění prsu je ozařování indikováno pouze u nepříznivé prognózy a to na oblasti hrudní stěny a svodných mízních uzlin. (Coufal a kol. 2011)

2.1.4.3. Chemoterapie

Využívá protinádorového působení různých chemických sloučenin, působících různými mechanismy. Lze ji rozdělit na předoperační neboli neoadjuvantní a pooperační čili adjuvantní. Předoperační předchází chirurgickému zákroku s cílem zlepšení operability nádoru. Většinou se používá 6-8 cyklů chemoterapie složené z antracyklinů a taxanů v rozmezí 4-6 měsíců. Pooperační chemoterapie má za cíl zlepšit prognózu eradikací případných mikrometastáz. Dochází tak k poklesu recidiv a snížení

pravděpodobnosti metastázy. Nejpřínosnější je pro pacientky s nádorem neobsahujícím estrogenové, progesteronové a HER-2 receptory a pozitivním nálezem v axiární uzlině. Mezi základní léčiva patří antrycykliny, taxany a cyklofosfamid. Vzhledem ke kardiotoxicitě anracyklinů a taxanů je nutné vyšetření srdce k vyloučení současného poškození srdce (Adam a kol. 2004; Coufal a kol. 2011).

Tab.1 Základní kombinace léčiv a jejich dávky využívané ve FNHK v terapii karcinomu prsu (Kubala a kol. 2010)

Zkratka schématu	cytostatika	koncentrace	Interval/ počet cyklů
AC	doxorubicin cyklofosfamid	60 mg/m ² 600 mg/m ²	3 týdny
FAC	doxorubicin cyklofosfamid 5-fluorouracyl	50 mg/m ² 500 mg/m ² 750 mg/m ²	3 týdny
FEC	5-fluorouracyl epirubicin cyklofosfamid	500 mg/m ² 75 mg/m ² 500 mg/m ²	3 týdny
paklitaxel	paklitaxel	175 mg/m ²	3 týdny 4 cykly
TAC	doxorubicin cyklofosfamid docetaxel	50 mg/m ² 500 mg/m ² 75 mg/m ²	3 týdny
AD	doxorubicin docetaxel	50 mg/m ² 75 mg/m ²	3 týdny

2.1.4.4. Hormonální terapie

Hormonální terapie je indikovaná pouze v případě výskytu nádoru s pozitivními steroidními receptory. Standardní je podávání tamoxifenu po 5 let. K nasazení dochází až po ukončení případné adjuvantní chemoterapie. U premenopausálních pacientek s horší prognózou je výhodná reverzibilní blokáda funkce ovarií na 2 roky. K té je používán goserelin. U postmenopausálních žen jsou s výhodou využitelné inhibitory aromatáz (Coufal a kol. 2011).

2.1.4.5. Monoklonální protilátky

V ČR se standardně podává léčivo trastuzumab, monoklonální protilátka proti receptoru HER-2 (Coufal a kol. 2011).

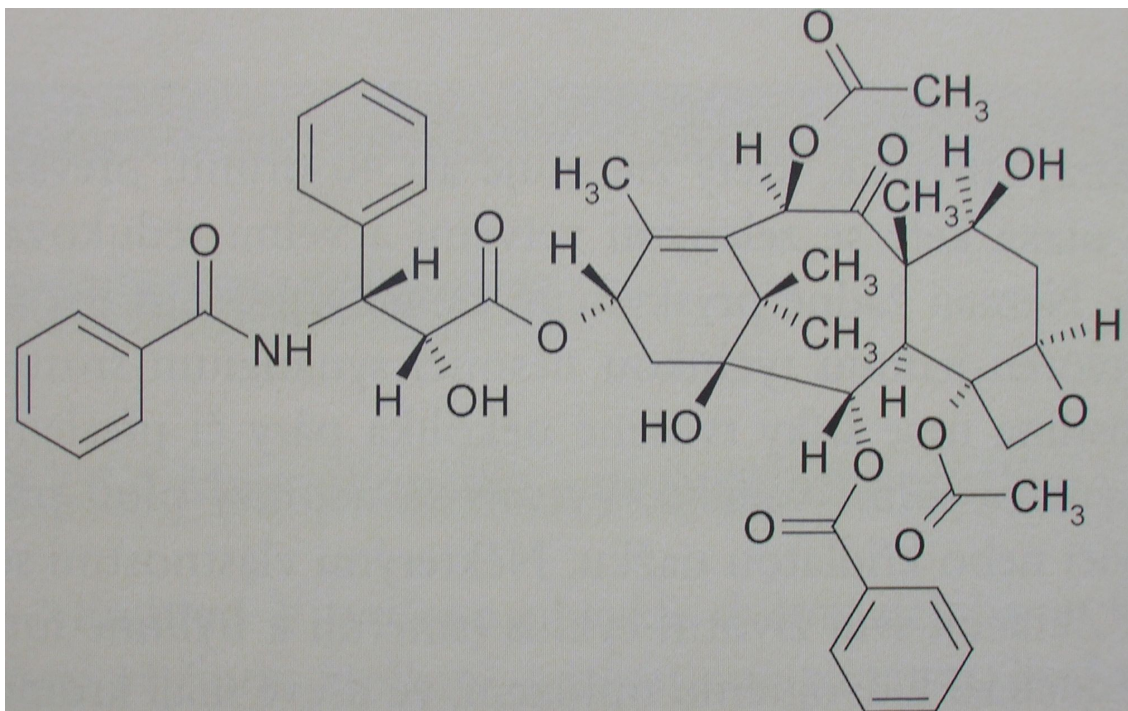
Protoonkogenní gen HER-2, také označovaný ErbB2-neu, c-erbB-2, je uložen na 17. chromozomu. Kóduje transmembránový protein, sloužící jako receptor pro epidermální růstový faktor. Ve zdravých buňkách je v malém množství a podílí se na buněčném růstu a diferenciaci. S jeho amplifikací dojde ke zvýšení počtu receptorů, což může vést až k rozvoji různých druhů nádorů. Toto se objevuje hlavně v ranných fázích karcinomu prsu a duktálního karcinomu. Z tohoto důvodu byla připravena protilátka proti HER-2 receptoru, trastuzumab. Po jeho navázání dojde k eliminaci buňkami imunitního systému. Vzhledem k vysoké finanční náročnosti terapie trastuzumabem je jeho podání možné až po ověření nadprodukce HER-2 receptorů. V praxi se nejčastěji využívá imunohistochemie a fluorescenční in situ hybridizacev (Fusek a kol. 2012).

2.2. Paklitaxel

Paklitaxel byl izolován z kůry tisu krátkolistého, *Taxus brevifolia* č. *Taxaceae*. V 1 kg kůry se vyskytuje přibližně 100 mg paklitaxelu. Z jednoho staletého stromu je možné získat asi 3 kg kůry. V přírodě se tis krátkolistý vyskytuje na západím pobřeží Severní Ameriky, kde je přísně chráněným druhem. Produkci paklitaxelu podporuje parazitická endofytická houba *Taxomyces andreanae*. U nás se vyskytuje tis červený *Taxus baccata*, který neprodukuje přímo paklitaxel, ale jeho prekurzor 10-deacetylbaaccatin. Uvedený prekurzor je izolován z listů. Volně rostoucí tis červený je rovněž chráněným druhem. Celá rostlina je toxická s výjimkou červeného dužnatého vaku, který obaluje semeno. Uměle vyšlechtěný druh poskytující dostatečnou hladinu paklitaxelu v listech je tis prostřední *Taxus media*. (Jahodář 2006)

V terapii využívaný paklitaxel je získáván izolací z přírodních zdrojů, fermentací nebo semisyntetickým postupem. Paklitaxel je popsán jako bílý nebo téměř bílý

krystalický prášek, prakticky nerozpustný ve vodě, dobře rozpustný v methanolu a snadno rozpustný v dichlormethanu. Úplný chemický název paklitaxelu je 5 β ,20-epoxy-1,7 β -dihydroxy-9-oxotan-11-en-2 α ,4,10 β ,13 α -tetrayl-4,10-diacetát-2-benzoát-13-[(2R,3S)-3-benzimidol-3-fenyl-2-hydroxypropionát] (Český lékopis 2009).



obr.1 Strukturní vzorec paklitaxelu (převzato z Jahodář, 2006)

2.2.1. Farmakologické informace

Paklitaxel brání depolymerizaci mikrotubulů zpět na tubulinové dimery. Dále podporuje vznik abnormálního uspořádání mikrotubulů. Důsledkem je vznik atypických mikrotubulů neschopných plnit interfázové a mitotické buněčné funkce (Lullmann a kol. 2004).

V terapii jsou využívány koncentrované infuzní roztoky. Po podání se paklitaxel váže z 88-98 % na plazmatické bílkoviny. Zároveň dochází k velké extravaskulární distribuci a vazbě na tkáň. Hlavní exkreční cestou je metabolizace jaterními enzymy rodiny cytochromů P450, konkrétně isoformami CYP3A4 a CYP2C9. Močí je

eliminován z méně než 10 %. Při onemocněních jater se zvýšenou aktivitou jaterních transamidáz je doporučeno nepřekračovat dávku 135mg/m² (AISLP 2013; Lincová 2007).

Při terapii paklitaxelem je nutná premedikace, jako prevence hypersenzitivní reakce. K premedikaci jsou využívány kortikoidy, antihistaminika a antagonisté H₂receptorů. Mezi indikace paklitaxelu patří pokročilý nebo rezistentní karcinom ovaria, kde je paklitaxel lékem volby v kombinaci s cisplatinou. Dále sekundární chemoterapie pro metastazující karcinom ovaria po selhání terapie platinovými přípravky. Pro karcinom prsu je paklitaxel využíván jako adjuvantní terapie pro pacienty s metastázami do uzlin po předchozí terapii antracyklinem a cyklofosfamidem. V monoterapii metastazujícího karcinomu prsu, pokud selhala, či není vhodná standardní terapie. U pokročilého malobuněčného karcinomu plic v kombinaci s cisplatinou, pokud nelze provést radikální způsob léčby, založený na kombinaci chirurgického zákroku a radioterapie. Poslední indikací paklitaxelu je léčba pokročilého Kaposiho sarkomu u pacientů s AIDS po selhání terapie lipozomálním antracyklinem (AISLP 2013).

Kontraindikací léčby paklitaxelem je hladina neutrofilů pod 1500mm³. Poté Kaposiho sarkom v kombinaci s těžko zvladatelnými infekcemi (AISLP 2013).

Mezi nežádoucí účinky léčby patří neutropenie závislá na dávce, alopecie, neuropatie, mukozitida a retence vody (Lincová 2007).

Doporučeno je u kombinované terapie podávat paklitaxel před cisplatinou, čímž dojde ke snížení rizika myelosuprese a prevenci snížení clearance paklitaxelu. U kombinace paklitaxelu s doxorubicinem je z důvodu snížené clearance doxorubicinu možné podat paklitaxel až po 24 hod. Při terapii mužů a žen ve fertilním věku je důležité dodržovat po celou dobu terapie a minimálně 6 měsíců po terapii antikoncepční opatření (AISLP 2013).

2.3. Gonadoliberin (Gn-RH)

V současnosti známe kolem 16 isoform Gn-RH. Většinou jsou u živočichů přítomny alespoň dvě isoformy. Jednotlivé isoformy jsou označovány podle druhu, ve kterém byly poprvé izolovány. Všechny jsou tvořeny řetězcem 10 aminokyselin, které se odlišují pouze v polohách 5-8. V lidském těle se vyskytuje jednak Gn-RH I, složený z aminokyselin pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-OH, dále byla v lidském těle objevena isoforma Gn-RH II, původně izolovaná z kuřecího mozku. Její struktura je pGlu-His-Trp-Ser-His-Gly-Trp-Tyr-Pro-Gly-OH. Koexistence různých isoform Gn-RH a jejich široká tkáňová distribuce napovídá množství různých funkcí (Limonta a kol. 2003).

Gn-RH I je uložen v sekrečních granulech neuronů v hypothalamu, ze kterých je v čas potřeby uvolňován exocytózou do krve. Sekrece probíhá přerušovaně vždy 1 min každých 60-90min. Krevní cestou je dopraven do hypofýzy, v jejíž přední části tzv. adenohypofýze stimuluje uvolňování folikulostimulačního hormonu (FSH) a luteinizačního hormonu (LH). FSH a LH dále řídí produkci pohlavních hormonů a gametogenezi ve vaječnících a varlotech. Regulace sekrece Gn-RH je realizována pomocí negativní zpětné vazby. Receptorem pro Gn-RH je G-protein, který jako druhé posly aktivuje diacylglycerol a inositoltrifosfát, kteří dále mobilizují intracelulární vápník a aktivují různé proteinkinasy. Gen pro Gn-RH I je uložen na 8. chromozomu (Silbernagl, Despopoulos 2004).

Receptory Gn-RH I se nenaházejí pouze v adenohypofýze a hypothalamu. Jsou přítomny fyziologicky také v endometriu, placentě, prsní tkáni, vaječnících, varlotech a prostatě. Dále jsou receptory pro Gn-RH přítomny v některých typech nádorové tkáně, například nádory prsu, prostaty, endometria, vaječníků, pankreatu a jater. Jsou přítomny i v hormonálně nezávislých nádorových tkáních jako je melanom, kde potlačuje buněčnou proliferaci a metastatickou aktivitu (Harrison a kol. 2004).

Mezi Gn-RH I agonisty patří Triptorelin, Buserelin, Goserelin, Nafarelin. Jejich kontinuální podávání ve vysokých dávkách způsobí nejprve nárůst hladin FSH a LH, poté kompletní potlačení jejich uvolňování z adenohypofýzy. Takto provedená chemická kastrace je kompletně reversibilní a s výhodou může být použita u onemocnění ovlivněných steroidními pohlavními hormony. (Limonta a kol. 2003)

V terapii karcinomu prsu byla už Albertem Schinzingerem koncem 19. století pozorována klinická odpověď na odstranění vaječnicků. Až do konce 20. století zůstávaly všechny metody invazivní a nevratné. Přitom odpověď prsního nádoru se pohybovala mezi 30 – 75 %. Analoga Gn-RH se ukázala jako reversibilní alternativa ovariectomie (Harrison a kol. 2004).

Antagonisté Gn-RH I při podání zastavují syntézu steroidních pohlavních hormonů bez počátečního nárůstu jejich hladiny. Mezi antagonisty patří Abarelix, Ganirelix, Cetrorelix. Mezi limitující faktory těchto látek patří nízká rozpustnost a sklon k tvorbě gelů. Využívány jsou v asistované reprodukci a u hormonálně-dependetních nádorů (Limonta a kol. 2003).

Pro terapii karcinomu prostaty byl prvním klinicky testovaným antagonistou abarelix. V jeho struktuře je část L-aminokyselin nahrazena nefyziologickými D-aminokyselinami. Pomocí abarelixu je možné dosáhnout hladiny testosteronu ekvivalentní chirurgické kastraci. Nežádoucími účinky po podání abarelixu jsou alergické reakce zahrnující hypotenzi a synkopy (Harrison a kol. 2004).

Další isoformou Gn-RH v lidském těle je Gn-RH II, kódovaný na 20 chromosomu. Vyskytuje se stejně jako Gn-RH I v hypothalamu, ovšem vysoké hladiny jsou i v hipokampu a amygdalech. Z dalších orgánů je ve slezině, kostní dřeni, prostatě a tkáni ženského reprodukčního systému (placentě, endometriu, vaječnicích a prsní tkáni). Z předpokládaných funkcí jmenujme například podíl na neuromodulaci, stimulaci gonadotropní sekrece a reprodukčního chování, regulaci endokrinních funkcí. V nádorově změněné tkáni ženského pohlavního systému působí inhibici proliferace. Systémy Gn-RH I a Gn-RH II se navzájem ovlivňují a antagonisté Gn-RH I mohou zároveň působit jako agonisté Gn-RH II (Limonta a kol. 2003).

Konjugáty Gn-RH s toxiny fungují na základě specifické vazby ligandu na receptor. Více o tomto tématu v kapitole cílená léčba.

2.4. Cílená léčba

Navzdory nárůstu objevených nových látek s cytostatickým účinkem v 70. a 80. letech, vždy spojených s velkým očekáváním pro klinickou praxi, se ve většině případů tato očekávání ukázala jako lichá. Postupně se jako klíčová cytostatika vyprofilovaly antracykliny, cyklofosamid, isofosamid, deriváty platiny, látky ovlivňující mikrotubuly a pro hematologii methotrexát a purinová analoga. Přelomem nového století bylo objeveno několik dalších cytostatik, většinou určených pro specifická nádorová onemocnění. Jako výhodná se proto osvědčila možnost navázat už existující cytostatika na látky měnící jejich farmakokinetiku. Pozitivně se osvědčily pegylované deriváty, liposomální formy, vazba na bílkovinu a využití makromolekul.

Pegylované deriváty mají na cytostatikum navázaný polyethylenglykol. Tato vazba je výhodná pro léčiva typu peptidů a proteinů, kde dochází k prodloužení biologického poločasu se změnou farmakokinetiky a současném zachování původního účinku.

U liposomální formy slouží jako nosič dutina ohraničená fosfolipidovou membránou. Výhodné je to u antracyklinů, kde dochází ke snížení kardiotoxicity při současném zvýšení účinku. Touto modifikací dochází ke změně farmakokinetiky i farmakodynamiky. Zvyšuje se distribuce do kožní tkáně.

Konjugáty s bílkovinami nejsou příliš rozšířené. Vazba paklitaxelu na nanočástice albuminu vyústila v novou aplikační formu s výhodnější farmakokinetikou a nižší toxicitou.

Makromolekuly, jako např. polymery, vázaná na cytostatika způsobí vznik léčiva s odlišnou biodistribucí, farmakokinetikou a intracelulární lokací. Tyto konjugáty jeví zvýšenou účinnost, nižší systémová toxicita a vyšší intracelulární lokalizaci. Konjugát je zároveň neaktivním prekursorem, což umožňuje bezpečný transport krevním řečištěm. Vlastní aktivní metabolit vzniká až po intracelulární degradaci (Klener 2011).

Důležitou roli při cílené terapii plní také tzv. spojka, která váže cytostatikum a navigační molekulu. Vazba nesmí ovlivnit schopnost navigační molekuly vázat se na cílové místo a zároveň musí být dostatečně pevná pro dopravení cytostatika až na cílové místo (Příbylová a kol. 2010).

2.4.1. Cílené deriváty paklitaxelu

Jeden z prvních cílených konjugátů paklitaxelu byl publikován roku 1999. Od té doby došlo k přípravě dalších derivátů, které lze rozdělit na deriváty s kyselinou listovou, kyselinou hyaluronovou, s protilátkami, s mastnými kyselinami, sacharidy, s peptidovými a steroidními hormony.

Receptory pro folát jsou exprimovány např. u karcinomu vaječnicků a ledvin. Jako spojka byla použita oligoethylenglykolový řetězec, případně propojení liposomu a kyseliny listové pomocí spojky z polyethylenglykolu. Tato kombinace se ukázala jako výhodná pro terapii karcinomu úst. Využití liposomů má zajistit delší cirkulaci v oběhu a eliminovat nežádoucí účinky běžně používaného rozpouštědla.

Receptory pro kyselinu hyaluronovou jsou exprimovány nádory vaječnicků, žaludku nebo akutní leukemie. Bylo potvrzeno, že k importu konjugátů slouží receptor CD44.

Mezi konjugáty s monoklonální protilátkou patří i jeden z prvních připravených konjugátů paklitaxelu. Jednalo se o konjugát s protilátkou proti receptoru HER-2 pro epidermální růstový faktor, který reguluje buněčné procesy jako buněčné rozmnožování či ochrana před buněčnou smrtí.

Z peptidových hormonů byl pro přípravu konjugátů zvolen somatostatin, oxytocin a gonadoliberin.

Somatostatin sám o sobě má antiproliferační účinek. Cílem bylo zároveň připravení jeho stabilnějšího derivátu. Oxytocin byl vybrán pro přítomnost receptorů na nádorových buňkách prsu. Jeden z konjugátů s gonadoliberinem testovaných na linii MCF-7 jevil vyšší účinnost než samotný paklitaxel. Ze steroidních hormonů byl použit 17 β -estradiol. Prsní nádory obsahují receptory pro estradiol. Receptory pro estradiol se vyskytují ve dvou isoformách α a β . Připravený konjugát jevil vyšší účinnost na buňky s receptory pro estradiol typ β .

Konjugáty s mastnými kyselinami jsou odlišné od předcházejících. Nevyužívá cílové receptory, ale zvýšenou spotřebu některých mastných kyselin nádorovými buňkami. Byl připraven derivát s kyselinou dokosaheptaenovou, který jevil v testech in vivo nižší toxicitu než samotný paklitaxel. Experimenty na myších s implantovaným karcinomem plic a lidským karcinomem tlustého střeva prokázaly vyšší účinnost než samotný paklitaxel.

Dále byla pro přípravu cílených derivátů paklitaxelu využita zvýšená spotřeba glukosy v nádorových buňkách. Ke zvýšenému importu glukosy využívají GLUT transportér. Konjugát byl připravený s methyl- α -D-glukopyranosou. Jako spojka byl použit sukcinát. Tento konjugát měl vyšší rozpustnost než samotný paklitaxel. Konjugát jevil podobnou účinnost jako paklitaxel na linii MCF-7, v linii zdravých buněk RPTEC přitom neprojevoval cytotoxicitu. Toto vede k představě, že připravený konjugát je méně toxický pro zdravé buňky (Příbylová a kol. 2010; 2011).

2.5. Buněčné linie

Využití buněčných kultur má již nezastupitelnou úlohu a na rozdíl od použití pokusného zvířete či izolovaného orgánu probíhá v jediném dobře charakterizovaném buněčném typu a jeho výsledky nejsou ovlivněny interferencí s dalšími orgány. Buněčné linie lze snadno kultivovat a v poměrně krátké době získat množství definovaného, homogeního materiálu. Poškozené, případně zničené buňky, lze snadno nahradit. Nevýhodami je růst buněk v podmínkách neodpovídajícím jejich normálnímu výskytu, např. rozdílný tlak plynů kyslíku a oxidu uhličitého, výměna látek a informací s okolními buňkami a nepřítomnost extracelulární matrix. Proto ani nemůže plně nahradit pokusy prováděné na izolovaných orgánech, zvířatech a dobrovolnících. Je však jejich cenným doplněním. Buněčné kultury kladou poměrně velké náklady na vybavení laboratoře a laboratorní postupy. Jako příklad uveďme jednorázový materiál, chemikálie specifické čistoty, školení personálu. Zdrojem pro buněčné kultury je nejčastěji člověk nebo laboratorní zvíře. Primární kultura je označení pro izolované buňky. Sekundární kultury jsou poté namnožené a naředěné části primární kultury. Kultury lze jednoduše rozdělit dle původu na nádorové a z normální tkáň. Nádorové kultury se obvykle lépe množí a některé nepodléhají stárnutí. Takové kultury jsou označovány jako immortalizované. U kultur je nutné ověřovat jejich čistotu, k tomu lze s výhodou použít imunochemické metody.

K zajištění prosperity kultury je nutné zajistit buňkám vhodné podmínky. K základním patří kultivační médium, povrch kultivační nádoby, teplota, složení atmosféry (Vejražka 2013).

2.5.1. Linie CaCo-2

Buněčná linie CaCo-2 pochází z kolorektálního adenokarcinomu 72letého europoidního muže. Jedná se o adherentní buňky. Jako základní kultivační médium slouží EMEM (Eagle's Minimum Essential Medium) doplněné o 20% fetálního hovězího séra. V buněčné linii nejsou exprimovány receptory pro Gn-RH. Exprimovány jsou receptory pro heat-stable enterotoxin, produkovaný E. coli a receptor pro epidermální růstový faktor (ATCC¹ 2013).

2.5.2. Linie MDA-MB-231

Buněčná linie MDA-MB-231 pochází z prsního adenokarcinomu 51leté europoidní ženy. Jedná se o adherentní buňky. Základním médiem pro kultivaci je L-15 médium doplněné o 10% fetálního hovězího séra. Tato buněčná linie obsahuje receptory pro Gn-RH. Dále jsou exprimovány receptory pro epidermální růstový faktor a receptor pro tumor necrosis factor α (ATCC² 2013).

3. Cíl práce

Cílem mé diplomové práce bylo:

- 1) Porovnání antiproliferačního účinku paklitaxelu a jeho derivátů MP 264, MP 265 připravených ÚEB AVČR na buněčných liniích
 - a) s receptorem pro Gn-RH (linie MDA-MB-231)
 - b) bez receptoru pro Gn-RH (linie CaCO-2)

- 2) Srovnání cytotoxicity paklitaxelu a jeho derivátů MP264, MP265 v primární kultuře potkaních hepatocytů.

- 3) Porovnání antiproliferativního účinku paklitaxelu a jeho derivátu MP 394 na linii MDA-MB-231

4. Experimentální část

4.1. Biologický materiál a chemikálie

Buněčná linie MDA-MB-231 – ATCC (Wessen, SRN)

Buněčná linie CaCo-2 – ATCC (Wessen, SRN)

DMEM (Dulbecco`s Modified Eagle Medium) – Sigma-Aldrich (Praha, ČR)

DMSO (dimethylsulfoxid) – Sigma-Aldrich (Praha, ČR)

EMEM (Eagle`s minimum essential medium) – Sigma-Aldrich (Praha, ČR)

FBS – Lonza (Praha, ČR)

gentamycin – Lonza (Praha, ČR)

glutamin – Sigma-Aldrich (Praha, ČR)

MTT – Sigma-Aldrich (Praha, ČR)

MP 264, MP 265, MP 394 – deriváty paklitaxelu připravené ÚEB AVČR Praha

neesenciální amikokyseliny – Sigma-Aldrich (Praha, ČR)

Paklitaxel – Cedarburg Hauser Pharmaceuticals Inc. (Brodway, Denver, USA)

PBS (fosfátový pufr se solemi v tabletách) – Sigma-Aldrich (Praha, ČR)

Penicilin – Lonza (Praha, ČR)

Potkan pro izolaci jater – kmen Wistar, samci 300-500 g – Konárovice (ČR)

Pyruvát sodný – Lonza (Praha, ČR)

Streptomycin – Lonza (Praha, ČR)

Trypsin – Lonza (Praha, ČR)

běžné chemikálie čistoty p.a.

4.1.1. Konjugáty MP264, MP265, MP394

Konjugáty byly připraveny ÚEB AV ČR. Pro jejich přípravu byla použita 17-hydroxylová skupina paklitaxelu.

U konjugátu MP 264 slouží jako spojka kyselina 4-maleimidomáselná. Jako analog Gn-RH byla použit peptid sekvence pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Cys-Leu-OH.

Jako spojovací část v konjugátu MP265 je použita kyselina chloroctová. Aminokyselinová sekvence analogu Gn-RH je pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Cys-Leu-OH.

Spojka u MP394 je kyselina 3,6,9-trioxadekaendiová (Příbylová a kol. 2011).

4.2. Přístroje

analytické váhy – Scaltec SBC 22

centrifuga – Eppendorf 5810R

CO₂ inkubátor – HeraCell

laminární box – BioAir AURA 2000 M.A.C.

mikroskop – Nikon Eclipse TS 100

mrazicí box (-80 °C) – HeraFreeze

spektrometrický a spektrofluorimetrický analyzátor – Tecan Infinite M 200

třepačka – IKA MS2 Minishaker

zamrazovací kontejner – Nalgene, Sigma C1562

4.3. Metody

4.3.1. Buněčné linie

4.3.1.1. Příprava kultivačních médií

Pro buněčnou linii CaCo-2

Kultivační médium pro buňky CaCo-2 bylo připraveno z EMEM (Eagle`s minimum essential medium), ke kterému bylo přidáno inaktivované FBS - fetální hovězí sérum, roztok neesenciálních aminokyselin (NEAA), glutamin a roztok antibiotik penicilinu a streptomycinu (Pen/Strep). Jednotlivá množství použitých roztoků a jejich identifikace jsou uvedeny v tabulce.

Tab.2 Složení kultivačního média pro CaCO-2

EMEM	440 ml
FBS inaktivované (10%)	50 ml
NEAA (1%)	5 ml
Glutamin (2 mM)	5 ml
Pen/Strep	2,5 ml

Pro MDA-MB-231

Kultivační médium pro buňky MDA-MB-231 bylo připraveno z DMEM (Dulbecco`s Modified Eagle Medium), inaktivovaného FBS, glukosy, HEPES, a gentamycinu. Požitá množství jednotlivých roztoků jsou uvedeny v tabulce.

Tab.3 Složení kultivačního média pro MDA-MB-231

DMEM	450 ml
FBS inaktivované (10%)	50 ml
gentamycin	500 µl
Glukoza	4,5 g/l
Hepes	5 ml

Pro inaktivaci sér byla použita zvýšená teplota (30min.; 57°C).

4.3.1.2. Rozmrazování buněčných linií

K dlouhodobému skladování buněčných linií slouží jejich zmrazení v tekutém dusíku. Před kultivací je nutné buňky rozmrazit a přenést je do kultivačního média.

Po vyjmutí z tekutého dusíku byly zamrazené buňky ponořeny na 1-2 min do vodní lázně o teplotě 37 °C. Rozmrazená buněčná suspenze byla přidána do 15 ml zkumavky ke 12 ml nezahřátého kultivačního média. Zhomogenizovaná suspenze byla podrobena centrifugaci (70 g; 5 min). Po odstranění supernatantu byla provedena resuspendace pelety v 15 ml kultivačního média. 15 ml suspenze bylo přeneseno do 75cm² kultivační lahve. Po 24 hod. kultivaci (37 °C, 5 % CO₂) byla provedena výměna kultivačního média.

Po namnožení buněk následovala běžná pasáž.

4.3.1.3. Pasážování adherentních buněk

Pasážování bylo prováděno na buněčné kultuře, která porostla 80 % plochy kultivační lahve.

Cílem pasážování je zajistit dostatek prostoru pro dělicí se buňky. Zbylé buňky byly použity k experimentům.

Po slití kultivačního média byly buňky dvakrát opláchnuty 7 ml PBS. Toto je nezbytné pro smytí vápníku, což zajistí správnou funkci trypsinu.

K opláchnutým buňkám byly přidány 2 ml roztoku 0,25 % trypsinu s EDTA (T-E). Po 30 s byl 1,5 ml odsán a kultivační lahev uzavřena a umístěna do termostatu (37 °C; 5 % CO₂).

Po 5 min v termostatu za průběžného kývání lahví měla většina buněk kulovitý tvar a plula ve shlucích v lahvi. Buňky byly sklepnuty prudkým pohybem do dna lahve.

Následným přidáním 4 ml předeřátého média byl proveden oplach stěn kultivační lahve a opakovaným nasáváním do pipety a vypouštěním bylo dosaženo homogenní buněčné suspenze.

Ze vzniklé suspenze bylo odebráno 1-2 ml do čisté, sterilní kultivační lahve a doplněno do 13ml kultivačním médiem. Kultivační lahev byla umístěna v termostatu (37 °C; 5% CO₂).

Buňky byly pasážovány vždy v úterý a v pátek.

4.3.1.4 Určení koncentrace buněčné suspenze

Určení koncentrace buněčné suspenze je nezbytné pro testy cytotoxicity i kontinuální životnosti buněk. Pro určení koncentrace buněčné suspenze byla využita Bürkerova komůrka.

Do obou částí komůrky bylo napipetováno 9 µl buněčné suspenze. V každé části komůrky byl stanoven počet buněk v 5 čtvercích ležících v úhlopříčce. V každém čtverci byly spočítány všechny buňky, které ležely uvnitř čtverce nebo se dotýkaly pravé či spodní hrany čtverce. Celkový počet buněk **B** je použit ve vzorci. Buňky dotýkající se levé nebo horní strany počítány nebyly.

Pro určení koncentrace suspenze je vztah

$$B/10 \cdot 16 = \text{počet buněk} \cdot 10^3 / 100 \mu\text{l}$$

$$x = \frac{c \cdot V}{B \cdot 1600}$$

obr.2 Vzorec pro ředění buněčné suspenze na požadovanou koncentraci, kde

c – požadovaný počet buněk ve 100µl

V – požadovaný objem naředěné suspenze [ml]

B – hodnota z Bürkerovy komůrky

x – množství koncentrované suspenze k naředění [ml]

4.3.2. Potkaní hepatocyty

4.3.2.1. Izolace a kultivace

Po usmrcení potkana dekapitací v etherové narkóze byla vyjmuta celá neporušená játra a umístěna na Büchnerovu nálevku nad odpadní Erlenmeyerovou baňkou. Následovala perfúze jaterních cév.

K perfúzi byl nejprve použit roztok bez vápníku (roztok A). Pro udržení fyziologického pH roztoku byl perfúzní roztok probublán pneumoxidem. Perfúze byla prováděna bez recirkulace až do úplného odkrvení jater (cca 200 ml roztoku A; 5 - 10 minut).

Poté následovalo promývání roztokem s kolagenasou a vápníkem (B_k) o teplotě 37 °C s recirkulací roztoku po dobu cca 5-7 minut, kdy došlo k dostatečnému natrávení kolagenových buněčných spojů vlivem kolagenasy.

Po přemístění dostatečně natrávených jater do skleněné misky na ledové lázni a následném přidání media B_v (s obsahem vápníku, albuminu, ovšem bez kolagenasy) byly třepáním uvolněny hepatocyty do média.

Získaná suspenze hepatocytů a zbytků jaterní tkáně byla zfiltrovaná přes nylonové sítko s definovanou velikostí ok a následně rozdělena do 4-8 vychlazených centrifugačních kyvet o objemu 50 ml. Vlastní centrifugace probíhala při teplotě 4 °C, 40 g 5 minut (centrifuga Eppendorf).

Po slítí supernatantu a resuspendování pelety ve vychlazeném médiu C (s obsahem vápníku) následovala další centrifugace při 40 g, 5 min. Tento postup byl zopakován dvakrát, poprvé za nesterilních podmínek, podruhé ve sterilním prostředí laminárního boxu za použití sterilního roztoku C.

Následovalo odsátí supernatantu v prostředí laminárního boxu a resuspendace pelet ve vychlazeném živném médiu ISOM (média HAM F12 a Williams v poměru 1:1).

Poslední centrifugace byla realizována ve 2-4 sterilních, vychlazených kyvetách za podmínek 40 g, 5 min.

Po odsátí supernatantu a resuspendaci pelety v živném médiu s FBS (fetální hovězí sérum) bez inzulínu byla suspenze přenesena do kádinky. Objem suspenze by

měl být 50 – 100 ml.

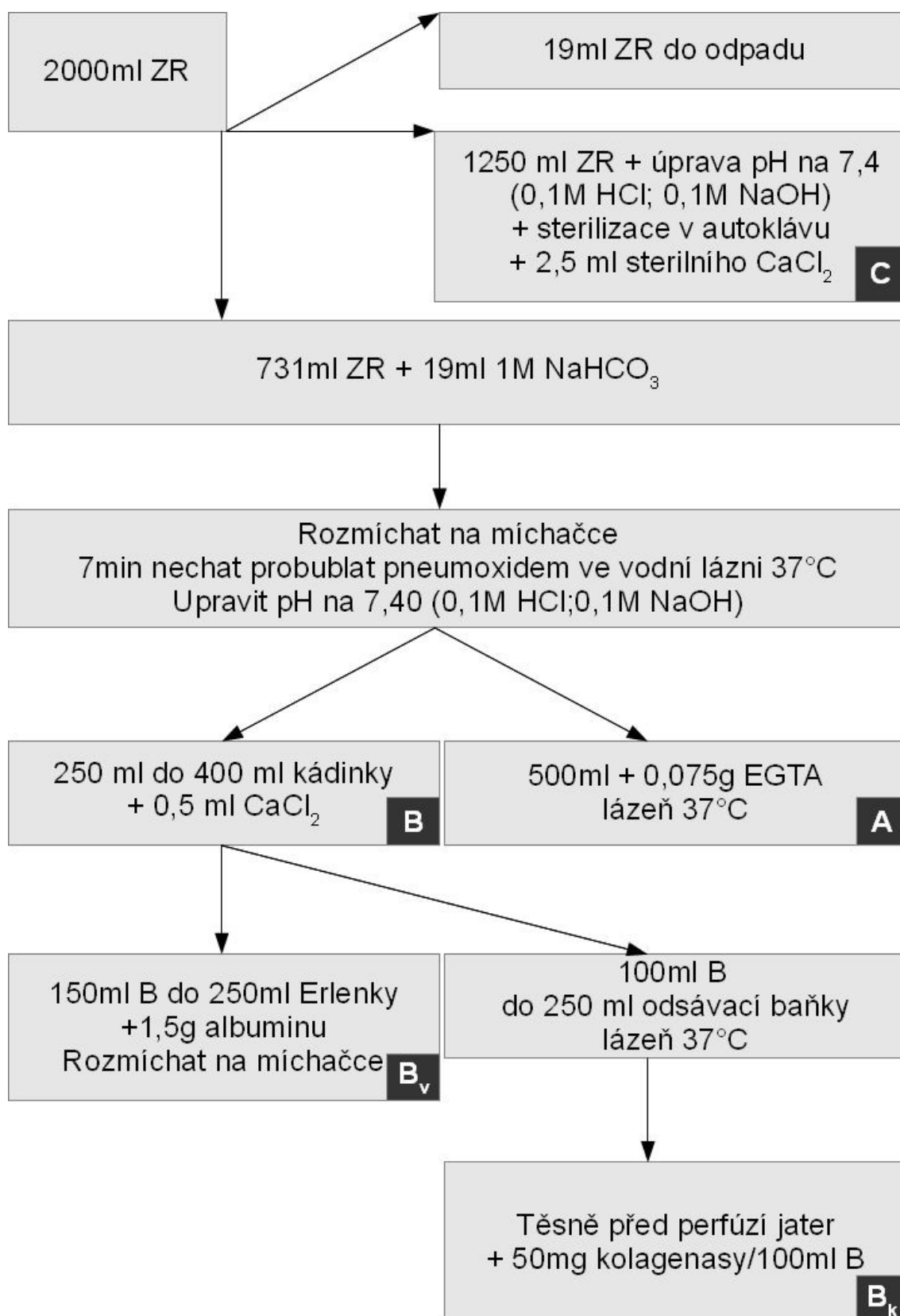
Ze suspenze byl odebrán vzorek 30 μ l do eppendorfky. Po přidání 30 μ l Trypanové modři a následném promíchání byla za pomoci Bürkerovy komůrky určena koncentrace hepatocytů v suspenzi a jejich životnost počítáním živých a mrtvých buněk.

Koncentrovaná suspenze byla naředěna pomocí živného média s FBS tak, aby obsahovala 0,8 – 1*10⁶ živých hepatocytů v ml suspenze.

Tato naředěná suspenze byla pipetována na 96-ti jamkové destičky v objemu 50 μ l do každé jamky. Destičky byly umístěny do inkubátoru a po 4 hod inkubaci (37 °C, 5 % CO₂) byly připraveny pro přidání testovaných látek.

Tab.4 Složení izolačních médií pro hepatocyty

roztok	složení	navážka
Roztok solí	NaCl KCl MgSO ₄ *7H ₂ O redestilovaná voda	16 g 0,8 g 0,4 g ad 200 ml
Fosfátový pufr	NaHPO ₄ *12H ₂ O KH ₂ PO ₄ redestilovaná voda	0,24 g 0,04 g ad 20 ml
1M NaHCO ₃	NaHCO ₃ redestilovaná voda	16,8 g ad 200 ml
Roztok CaCl ₂	CaCl ₂ redestilovaná voda	4 g 50 ml
Zásobní roztok - ZR	redestilovaná voda roztok solí fosfátový pufr	1780 ml 200 ml 20 ml



Obr.3 Schéma přípravy roztoků pro izolaci potkaních hepatocytů

4.3.3. Stanovení cytotoxicity

Na 96-ti jamkové destičky bylo nasazeno 100 μ l testované suspenze buněk o koncentraci 2500 buněk/100 μ l. Suspenze byla naředěna kultivačním médiem. Po 24 hodinách bylo k buňkám přidáno 100 μ l roztoku testovaných látek v 9-ti různých koncentracích. Do kontrolních vzorků bylo přidáno samotné kultivační médium a rozpouštědlo testovaných látek (DMSO). Každá z koncentrací testovaných látek a kontrola byla inkubována v 6-ti paralelních jamkách. Po uplynutí požadované doby inkubace byly experimenty vyhodnoceny NRU a MTT testem. Test byl opakován 3x.

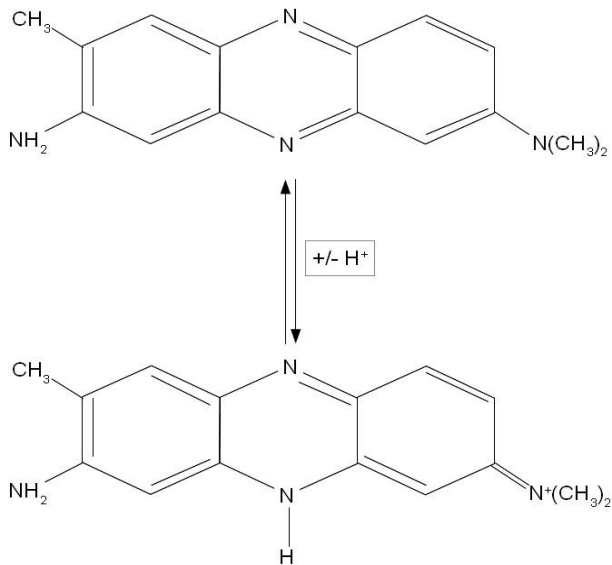
Životnost buněk byla vyjádřena v procentech, přičemž jako 100% byla brána hodnota odpovídající průměrné absorbanci směsi rozpouštědla (DMSO) a kultivačního média.

4.3.3.1. Neutral Red uptake (NRU) test

NRU test využívá schopnosti neutrální červeně přecházet cytoplazmatickou membránou pomocí neiontové difuze. V buňkách se hromadí v lysozomech, kde vlivem nižšího pH dochází ke změně náboje barviva (viz. Obr.4), což znemožní jeho úniku z lysozomu. Udržení protonového gradientu na membráně lysozomů je energeticky náročné, proto poškození nebo smrt buňky vede k jeho poklesu a úniku neutrální červeně z buňky.

Při vlastním NRU testu bylo nejprve odstraněno kultivační médium, které bylo nahrazeno 200 μ l roztoku neutrální červeně rozpuštěné v médiu na výslednou koncentraci 40 μ g/ml. Poté byly destičky inkubovány 2-3 hodiny v inkubátoru (37 °C; 5 % CO₂). Po inkubaci bylo médium s neutrální červení odstraněno a nahrazeno 100 μ l fixačního roztoku (1 g CaCl₂ ve 100 ml 0,5 % roztoku formaldehydu).

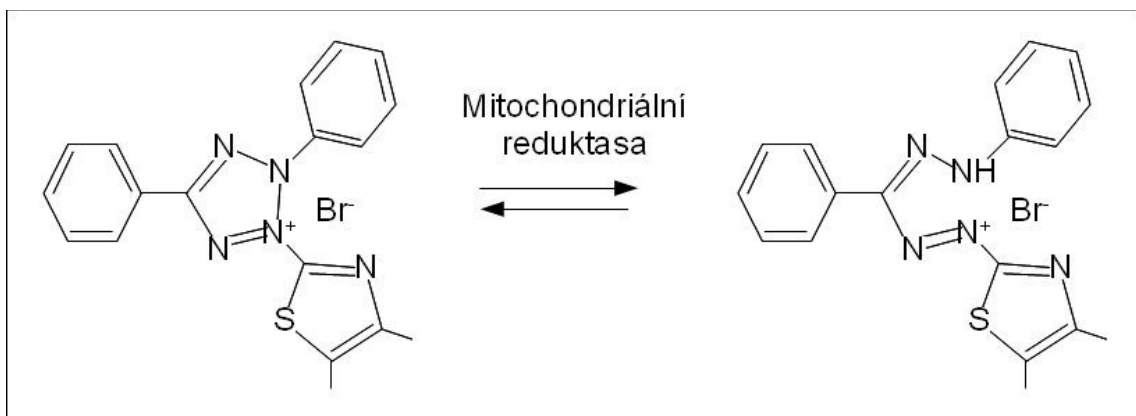
Destičky s fixačním roztokem byly ponechány 15 minut při pokojové teplotě. Následovalo odstranění fixačního roztoku a přidání 200 μ l lyzačního roztoku (1 % kyselina octová v 50 % lihu). Destičky byly třepány 30 minut na třepačce. Množství uvolněné neutrální červeně bylo změřeno fotometricky při 540 nm na Tecanu.



Obr.4 Změna struktury neurální červeně v závislosti na pH prostředí

4.3.3.2. MTT test

MTT test využívá schopnosti živých buněk redukovat na mitochondriální membráně žlutý solubilní 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyl tetrazolium bromid (MTT) na nerozpustný formazan (viz. Obr.5). Vzniklý formazan je rozpuštěn a zbarvení je vyhodnoceno spektrometricky při vlnových délkách 570 a 690 nm.



Obr.5 Redukce MTT na formazan

Při MTT testu bylo do každé jamky napipetováno 25 μ l roztoku MTT (3 mg Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromid/ 1 ml PBS) předeřátého na 37 °C.

Následovala 1-2 hodinová inkubace v inkubátoru (37 °C; 5 % CO₂). Po inkubaci bylo médium s roztokem MTT odtraněno a nahrazeno 50 μ l lyzačního roztoku (0,08 M HCl v isopropanolu). Destičky byly třepány na třepačce cca 30 minut do úplného rozpuštění. Absorbance byla měřena na Tecanu při vlnových délkách 570 a 690 nm.

4.3.3.3. Kontinuální monitorování buněk v reálném čase – systémem x-CELLigence

Principem kontinuálního monitorování je sledování změn elektrické impedance pomocí zlatých mikroelektrod ve dně destičky. Změna impedance je závislá na počtu přisedlých buněk, proto lze sledovat jejich přírůstek v čase bez nutnosti invazivního měření.

Pro tento test byly použity 16-ti jamkové destičky se zlatými mikroelektrodami. Do jednotlivých jamek bylo napipetováno 90 μ l kultivačního média. Následoval přídavek 100 μ l buněčné suspenze. Buňkám bylo ponecháno 30 minut na přisednutí a poté následovala kalibrace přístroje. Po 24 hodinách bylo k buňkám přidáno 10 μ l roztoku testovaných látek v určených koncentracích. Jednotlivé koncentrace byly inkubovány ve 4 paralelních jamkách. Jako kontrolní vzorek sloužil roztok média s rozpouštědlem (DMSO), který byl inkubován ve 12 paralelních jamkách.

4.3.4. Zamrazení buněčných linií

Pro uchovávání v tekutém dusíku slouží 1,5 ml zamrazovací ampule. Do jedné ampule se dává 1,2 ml suspenze buněk, které při 80-90% konfluenci rostou na ploše 25cm².

K suspenzi bylo přidáno 150 µl sterilního séra (PTS). Následoval přídavek 150 µl sterilního DMSO (dimethylsulfoxid). Nutné je zkumavku ihned uzavřít a obsah důkladně zhomogenizovat z důvodu toxicity DMSO. Ihned po homogenizaci byly zkumavky umístěny do zamrazovacího kontejneru (NALGENE, Sigma C1562) naplněného isopropanolem. Kontejner se umístil do mrazícího boxu, kde probíhalo gradientové zamrazení (-1 °C/min). Nejdříve po 2 hodinách (obvykle druhý den) bylo možné zamrazené buněčné suspenze umístit do tekutého dusíku pro dlouhodobé skladování.

5. Výsledky

5.1. Optimalizace kultivačních podmínek

Zpasážívané buňky byly původně před nasazením na mikrotitrační destičky ředěny na koncentraci 5000 buněk ve 100 μ l buněčné suspenze. V této koncentraci však docházelo k přerůstání buněk, proto byla zvolena koncentrace nižší, konkrétně 2500 buněk ve 100 μ l buněčné suspenze.

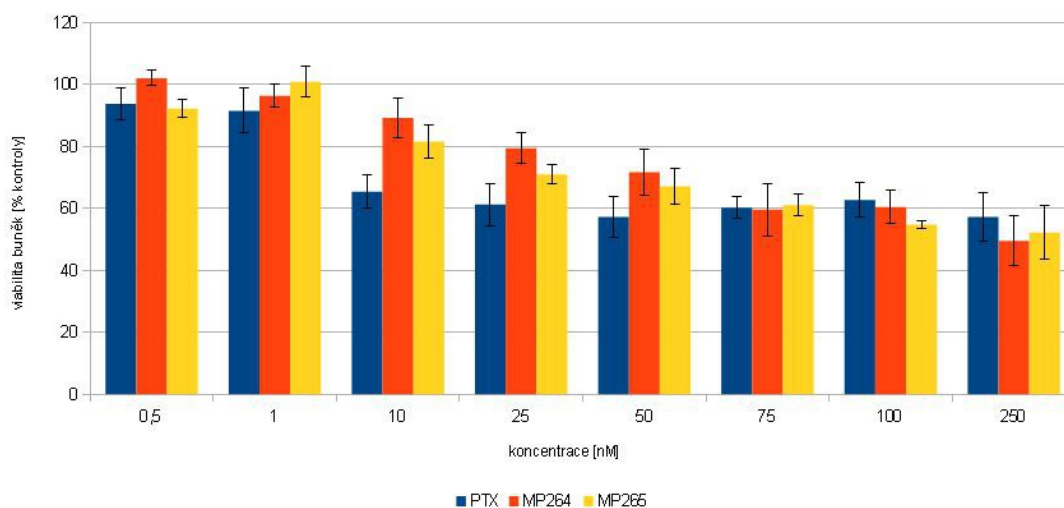
5.2. Konjugáty MP264, MP265

5.2.1. Buněčná linie MDA-MB-231

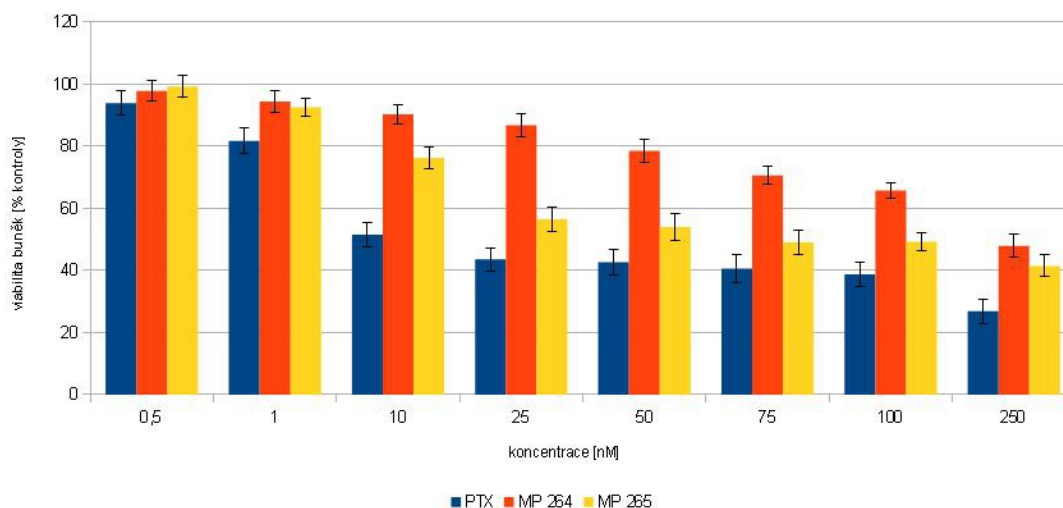
Při testech antiproliferačního účinku bylo měřeno množství buněk buněčné linie MDA-MB-231 po 48 hodinové inkubaci buněk s PTX a jeho deriváty MP264 a MP265. Testy byly hodnoceny NRU a MTT testem. Testované látky byly přidávány v koncentraci 0,5 - 250 nM. Získané hodnoty jsou uvedeny v grafu jako závislost viability buněk [% kontroly] na koncentraci látek [nM].

5.2.1.1. S neovlivněnými receptory pro Gn-RH

První série pokusů byla provedena na buňkách s nevysycenými receptory pro Gn-RH.



Obr.6 Porovnání antiproliferačního účinku paklitaxelu a jeho derivátů MP264 a MP265 na buněčnou linii MDA-MB-231 s nevysycenými receptory pro Gn-RH, hodnoceno po 48 hodinách MTT testem.



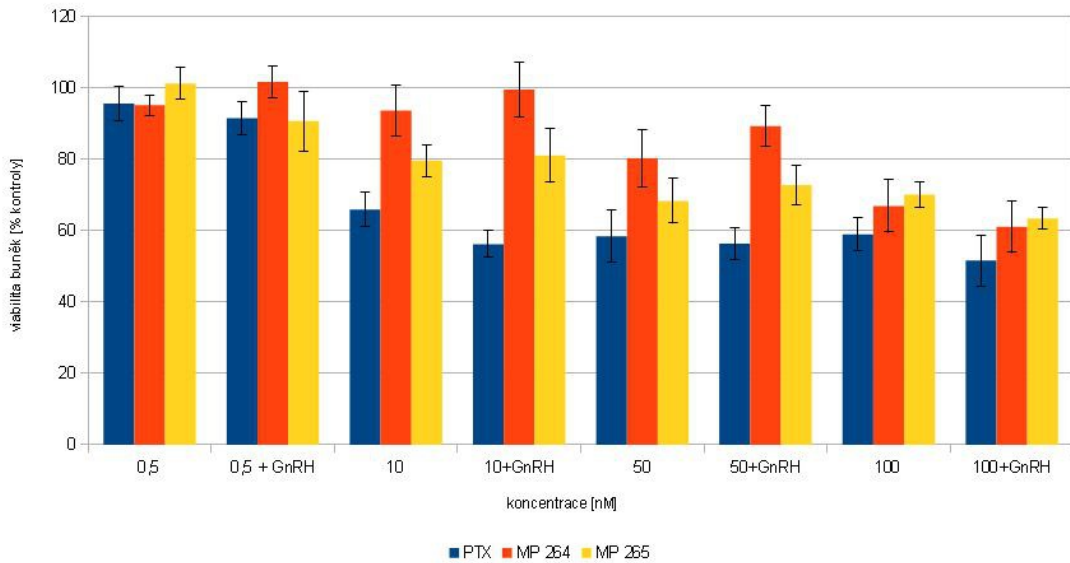
Obr.7 Porovnání antiproliferačního účinku paklitaxelu a jeho derivátů MP264 a MP265 na buněčnou linii MDA-MB-231 s nevysycenými receptory pro Gn-RH, hodnoceno po 48 hodinách NRU testem.

Graf hodnocený MTT testem ukazuje při nižších koncentracích vyšší účinek samotného paklitaxelu, při vyšších koncentracích dochází k vyrovnání antiproliferačních účinků.

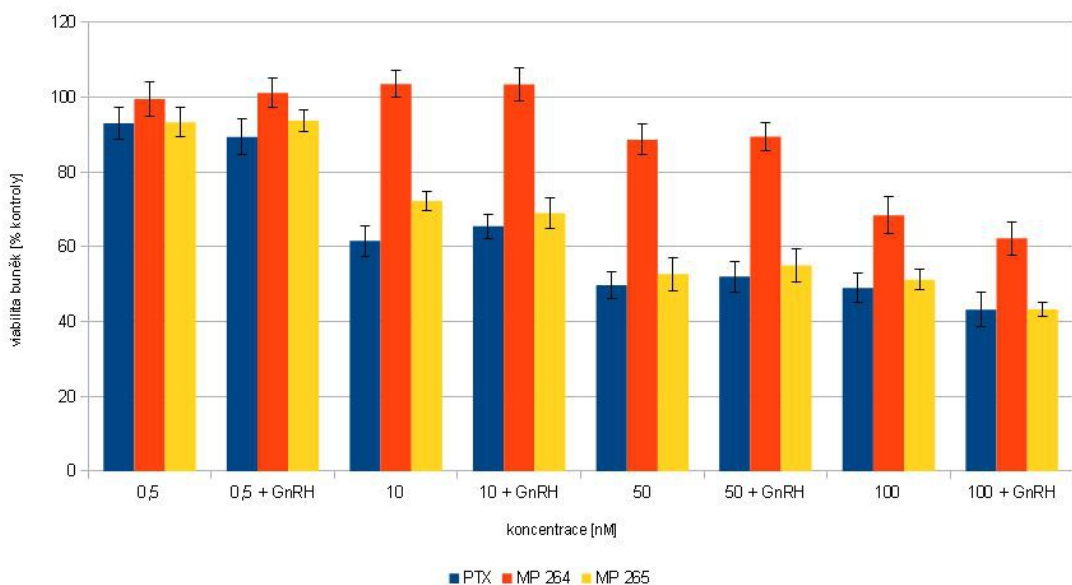
Graf hodnocený NRU testem ukazuje při nižších koncentracích vyšší účinek paklitaxelu. Od koncentrace 25 nM dochází k přibližnému vyrovnání účinku paklitaxelu a derivátu MP265. Derivát MP264 jeví nižší antiproliferační účinek než ostatní.

5.2.1.2. S vysycenými receptory pro Gn-RH

Pro ověření hypotézy pronikání konjugátů do buněk pomocí Gn-RH receptorů byly tyto receptory před přidáním látek nejprve vysyceny 30 minutovou inkubací s Gn-RH o 10-ti násobné koncentraci oproti přidávaným látkám.



Obr.8 Porovnání antiproliferačního účinku paklitaxelu a jeho derivátů na buňkách linie MDA-MB-231, u jejichž části došlo k vysycení receptorů pro Gn-RH, hodnoceno po 48 hodinách MTT testem.



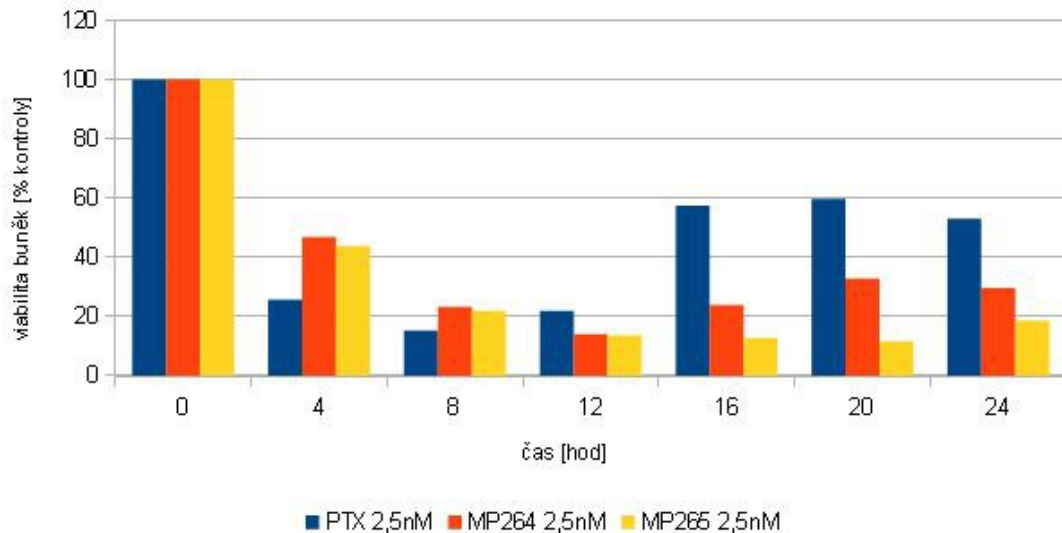
Obr.9 Porovnání antiproliferačního účinku paklitaxelu a jeho derivátů na buňkách linie MDA-MB-231, u jejichž části došlo k vysycení receptorů pro Gn-RH, hodnoceno po 48 hodinách NRU testem.

Graf hodnocený MTT nevykazuje rozdíly mezi antiproliferativním účinkem paklitaxelu a derivátu MP 265 na ovlivněné a neovlivněné buňky. Derivát MP 264 vykazuje mírný pokles antiproliferativního účinku na buňkách s vysycenými receptory pro Gn-RH.

Graf hodnocený NRU testem nevykazuje rozdíly v antiproliferativním působení paklitaxelu ani jeho derivátů MP 264, MP265 na buňky ovlivněné a neovlivněné.

5.2.1.3. x-CELLigence test

Pro test kontinuální monitorování životnosti byla použita buněčná linie MDA-MB-231. Testované látky byly použity v koncentraci 2,5 nM. Výsledky jsou uvedeny v grafu jako závislost viability buněk [% kontroly] na čase [hod].



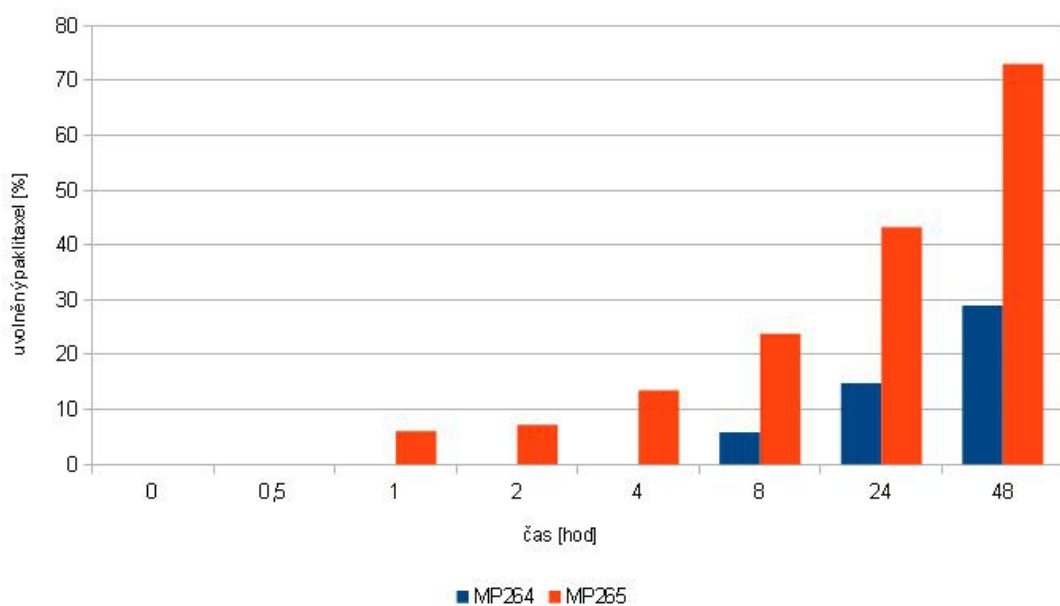
Obr.10 Účinek paklitaxelu a jeho derivátů v čase na buněčnou linii MDA-MB-231.

Z grafu je patrná nejvyšší účinnost u paklitaxelu 4 – 8 hodin po aplikaci, u derivátu MP264 8 – 16 hodin po aplikaci a u derivátu MP 265 12 – 24 hodin po aplikaci.

Kontinuální monitorování životnosti buněk ukázalo, že všechny testované látky mají v nízké koncentraci výrazný cytotoxický účinek.

5.2.2. Testování stability konjugátů paklitaxelu

Testy stability byly provedeny ÚEB AV ČR. Pro určení koncentrace jednotlivých složek byla použita HPLC. Množství paklitaxelu uvolněného z jeho derivátů je vyjádřeno jako graf závislosti % množství uvolněného paklitaxelu na čase [hod].

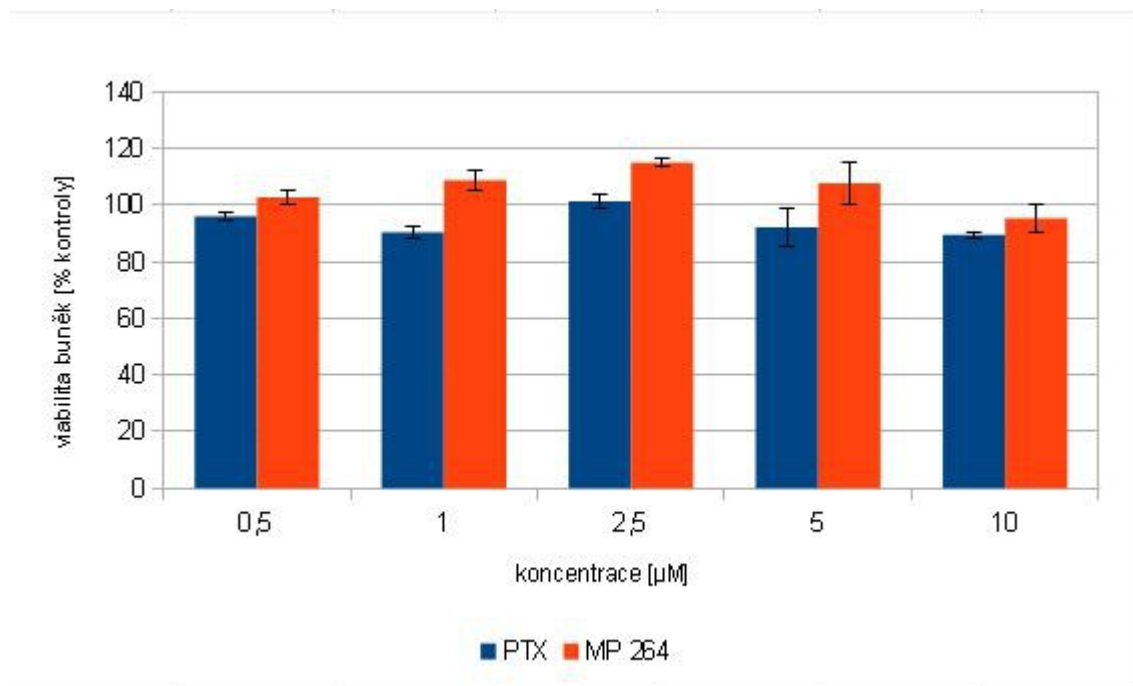


Obr.11 Graf závislosti množství uvolněného paklitaxelu z jednotlivých derivátů na čase [hod].

Graf ukazuje vysokou nestabilitu derivátu MP265 v roztoku.

5.2.3. Primární kultura potkaních hepatocytů

Testy cytotoxicity byly provedeny na primární kultuře potkaních hepatocytů. Testované látky byly nanášeny v koncentraci 0,5 – 10 μM .



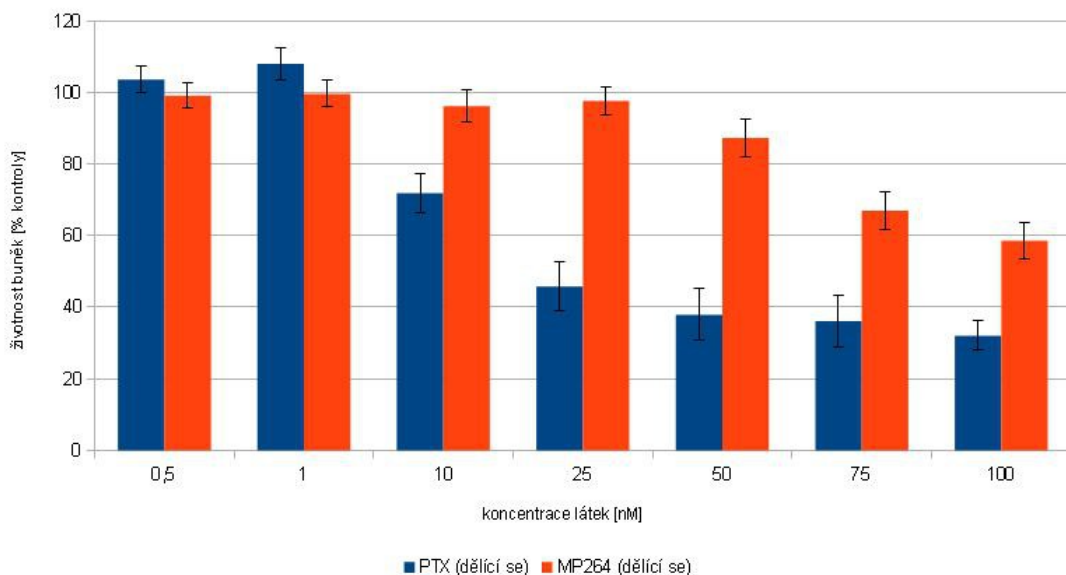
Obr.12 Porovnání cytotoxického účinku paklitaxelu a jeho derivátu MP264 na primární kulturu potkaních hepatocytů. Pokus byl hodnocen po 24 hodinách MTT testem.

Z grafu je patrný nižší cytotoxický účinek derivátu MP 264 na primární kulturu potkaních hepatocytů.

5.2.4. Buněčná linie CaCo-2

Při testech byl porovnáván antiproliferační účinek paklitaxelu a derivátu MP 264 na buněčnou linii CaCo-2. Pokus byl hodnocen NRU testem po 48 hodinové expozici. Látky byly nanášeny ve výsledné koncentraci 0,5 – 100 nM.

5.2.4.1. Účinek na dělicí se buňky

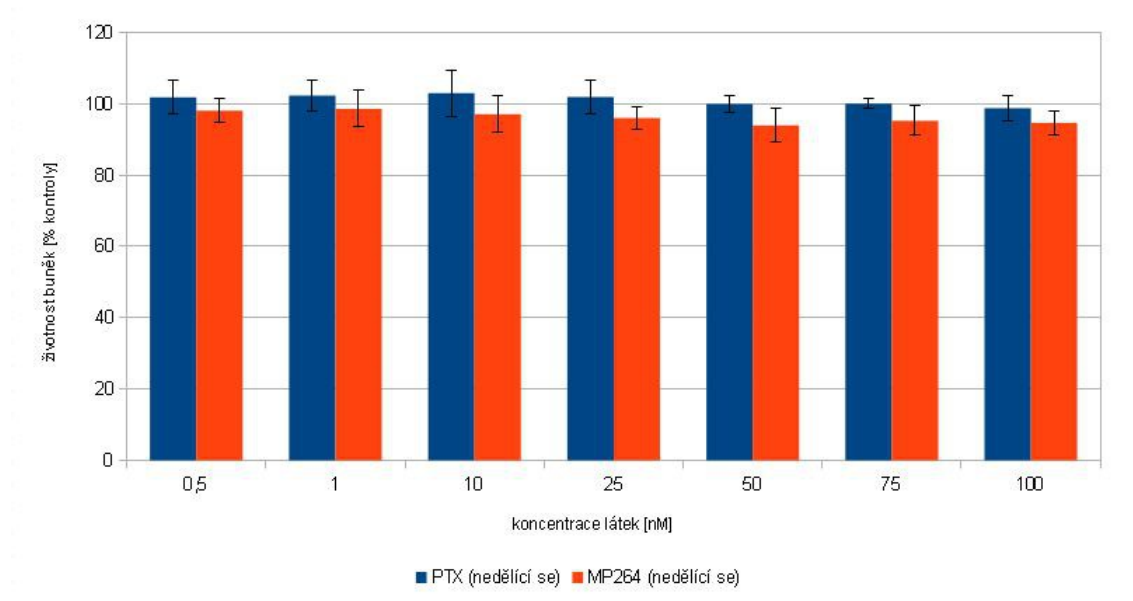


Obr.13 Porovnání antiproliferačního účinku paklitaxelu a derivátu MP 264 na dělicích se buňkách linie CaCo-2. Pokus byl hodnocen NRU testem po 48 hodinové expozici.

Graf ukazuje silnější antiproliferační účinek paklitaxelu s nástupem při koncentraci 10 nM. Derivát MP 264 vykazuje určitý antiproliferační účinek až při koncentraci 50nM a vyšší.

5.2.4.2. Účinek na nedělicí se buňky

Pro porovnání byly buňky linie CaCo-2 nasazeny mikrotitrační destičky a 14 dní inkubovány v termostatu při výměně kultivačního média vždy 2x týdně.



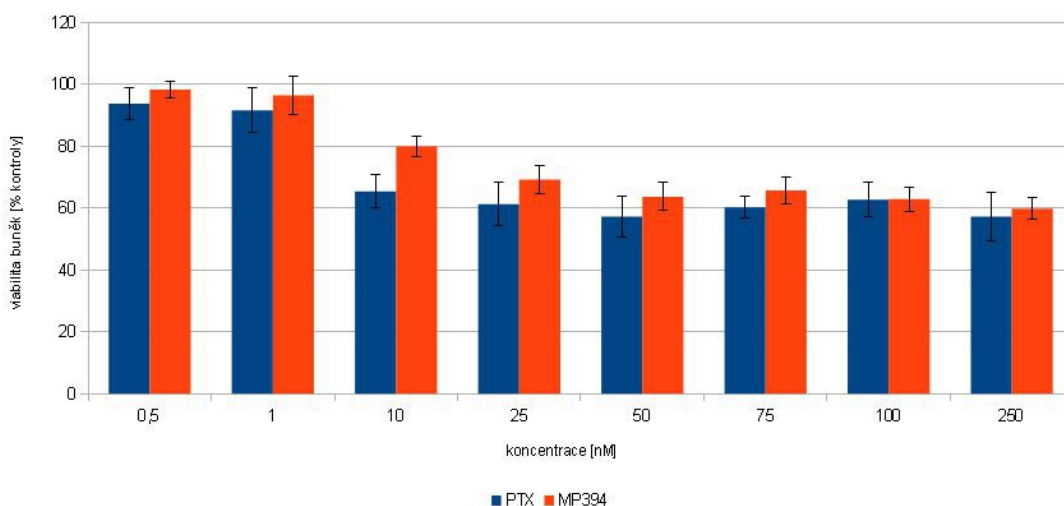
Obr.14 Cytotoxický účinek paklitaxelu a derivátu MP 264 na nedělicí se buňky linie CaCo-2. Hodnoceno NRU testem po 48 hodinové expozici.

Z grafu je patrné neovlivnění buněk paklitaxelem ani jeho derivátem MP 264.

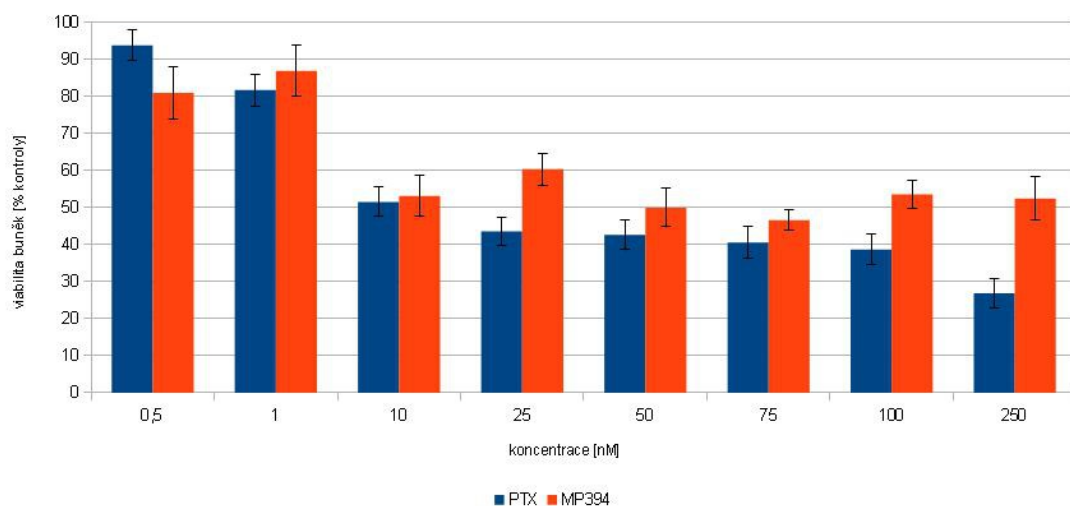
5.3. Konjugát MP394

Konjugát MP394 byl testován dodatečně pouze na linii MDA-MB-231 z důvodu nízkého účinku dalších dvou derivátů. Jeho podrobnější studium bude předmětem jiné práce.

Při testech antiproliferačního účinku bylo měřeno množství buněk buněčné linie MDA-MB-231 po 48 hodinové inkubaci buněk s PTX a derivátem MP394. K hodnocení byl použit NRU a MTT test. Testované látky byly přidávány v koncentraci 0,5 - 250 nM. Získané hodnoty jsou uvedeny v grafu jako závislost viability buněk [% kontroly] na koncentraci látek [nM]. Testované buňky neměly vysycené receptory pro Gn-RH.



Obr.15 Porovnání antiproliferačního účinku paklitaxelu a derivátu MP394 na buněčnou linii MDA-MB-231 s nevysycenými receptory pro Gn-RH, hodnoceno po 48 hodinách MTT testem.



Obr.16 Porovnání antiproliferačního účinku paklitaxelu a derivátu MP394 na buněčnou linii MDA-MB-231 s nevysycenými receptory pro Gn-RH, hodnoceno po 48 hodinách NRU testem.

Grafy hodnocené MTT i NRU testy ukazují srovnatelný antiproliferační účinek PTX a derivátu MP394.

6. Diskuze

Chemoterapie je nedílnou součástí léčby nádorových onemocnění. Jejím limitujícím faktorem je výskyt nežádoucích účinků a neselektivní působení při systémovém podání. Snaha o vyšší specifitu působení vedla k přípravě řady různých cílených derivátů léčiv. V nich je léčivo navázáno na monoklonální protilátku, protein, či hormon, jejichž schopnost vázat se na cílovou molekulu vyskytující se pouze (nebo ve zvýšené míře) v nádorové buňce by měla zabezpečit selektivní vstup cytostatika do nádorové tkáně (Nagy a kol. 1996).

Nadějným nosičem pro cílený transport cytostatik by mohl být Gn-RH. Paradoxní suprese sekrece FSH a LH při dlouhodobé zvýšené hladině Gn-RH vede k cílené odpovědi u hormonálně dependentních nádorů. Díky expresi receptoru pro Gn-RH některými nádory prsu a vaječnicků se jeví racionální jeho využití v cílené terapii. (Sealfon a kol. 2010)

V laboratořích ÚEB AV ČR bylo připraveno několik konjugátů paklitaxelu s analogy Gn-RH. Předloni byl na Katedře biochemických věd FaF UK testován antiproliferační účinek konjugátů MP 264 a MP 265 na buněčné linii MCF 7. Tato linie byla odvozena od adenokarcinomu prsu a exprimuje receptory pro Gn-RH. Konjugát MP 264 jevil v této linii antiproliferační účinek srovnatelný s PTX, konjugát MP 265 vykazoval vyšší antiproliferační účinek než PTX (Příbylová a kol. 2011)

Prvním cílem této diplomové práce bylo testovat antiproliferační účinek na buňkách prsního adenokarcinomu linie MDA-MB-231, který exprimuje receptory pro Gn-RH a buňkách kolorektálního adenokarcinomu linie CaCo-2, který receptory pro Gn-RH neexprimuje.

Antiproliferační účinek derivátů MP 264 a MP 265 byl hodnocen v linii MDA-MB-231 dvěma různými testy životnosti NRU, MTT a monitorován pomocí systému x-CELLigence. Pomocí testů NRU a MTT bylo určeno množství buněk po ukončení experimentu (48 hod.), systém x-CELLigence umožnil kontinuální sledování počtu buněk po celou dobu experimentu (24 hod.).

V linii MDA-MB-231 vykazoval derivát MP265 srovnatelný antiproliferační účinek jako PTX. Derivát MP264 vykazoval nižší antiproliferační účinek ve srovnání

s PTX. Výsledky získané NRU a MTT testy se liší, což může být způsobeno odlišným principem použitých metod. Hodnocení NRU testem se pro buněčné linie zdá být výhodnější než hodnocení MTT testem.

Pro prokázání vstupu testovaných konjugátů do buněk pomocí Gn-RH receptorů byl porovnáván účinek samotných konjugátů s účinkem konjugátů s přidavkem gonadoliberinu. Vysycení receptorů pro Gn-RH gonadoliberinem neovlivnilo antiproliferační účinek derivátu MP265, u derivátu MP264 došlo k mírnému poklesu antiproliferačního účinku při vyhodnocení MTT testem. To naznačuje, že do buněk linie MDA-MB-231 konjugát MP265 není transportován pomocí vazby na Gn-Rh receptor. U konjugátu MP264 je možné pouze částečný průnik pomocí receptoru pro Gn-RH. Je zajímavé, že v linii MCF7 byl pozorován výrazný vliv vysycení receptorů gonadoliberinem na účinek obou derivátů (Příbylová a kol. 2011). Tento rozdíl naznačuje rozdílné vlastnosti (struktura, míra exprese, afinita) Gn-RH receptorů v obou prsních nádorových liniích.

Systémem x-CELLigence byl monitorován účinek PTX a deriváty MP264 a MP265 v linii MDA-MB-231. Výsledky ukázaly rychlý cytotoxický účinek PTX, s maximem kolem 8. hodiny po aplikaci, trvajícím do 12. hodiny, poté dochází k rychlé proliferaci buněk. U derivátu MP264 došlo k maximu cytotoxicity okolo 12. hodiny po aplikaci, růst buněk byl během 24 hodin zpomalený. U derivátu MP265 se maximum cytotoxického účinku nachází mezi 12. a 20. hodinou po aplikaci.

Na základě dosažených výsledků, jsme se začali obávat nízké stability konjugátů MP264 a MP265 v kultivačním médiu pro buňky linie MDA-MB-231. Stabilita konjugátů byla následně testována pomocí HPLC a výsledky částečně potvrdily naše obavy. Konjugát MP265 je za kultivačních podmínek nestabilní a rozpadá se na volný PTX (ze 42% za 24 hod., ze 72% za 48hod.). Stabilita derivátu MP264 je výrazně vyšší, podíl uvolněného PTX činil 15% po 24 hod. a necelých 30% po 48hod. Z důvodu vysoké nestability MP265 byly další testy prováděny pouze s derivátem MP264.

Cílem dalších experimentů bylo stanovit cytotoxický účinek konjugátu MP264 na kulturu primárních potkaních hepatocytů, u kterých nedochází k expresi receptorů pro Gn-RH.

Pro testy cytotoxicity na hepatocytech byl použit pouze MTT test, protože při testu NRU by mohlo dojít, z důvodu velkého množství oplachovacích roztoků,

ke změnám množství nepříliš adherentních hepatocytů. Na kultuře primárních hepatocytů vykazoval derivát MP264 cytotoxické účinky až při koncentraci 10 μM , zatímco PTX vykazoval cytotoxické účinky už při koncentraci 1 μM . Při vyšších koncentracích než 10 μM vykazovaly oba deriváty nestabilitu v roztoku.

Dále byl antiproliferační účinek MP264 hodnocen na buněčné linii CaCo-2, u které by také nemělo docházet k expresi receptorů pro Gn-RH. K hodnocení byly použity testy MTT a NRU. V linii CaCo-2 na dělicích se buňkách vykazoval derivát MP264 nižší antiproliferační účinek než PTX. Na nedělicích se buňkách nevykazoval účinek PTX ani derivát MP264.

Při porovnání výsledků v buňkách MDA-MB-231 (s Gn-RHr) a buňkách CaCo-2 (bez Gn-RHr) je zřejmé, že antiproliferační účinek derivátu MP264 je v obou liniích srovnatelný, navzdory předpokladu jeho vyššího účinku na linii MDA-MB-231 exprimující receptory pro Gn-RH. Ani tento derivát tedy nesplnil naše očekávání.

Z tohoto důvodu byl připraven derivát MP394, který se od derivátů MP264 a MP265 liší použitým spojovacím článkem mezi PTX a analogem Gn-RH. Jako spojovací článek byla u derivátu MP394 zvolena kyselina 3,6,9-trioxadekaendiová.

Během prvních testů se jevil konjugát MP394 nadějně, protože v testech na linii MDA-MB-231 vykazoval srovnatelný antiproliferační účinek jako PTX. Teprve další testy s tímto derivátem ukáží, zda se jedná o látku vhodnou pro cílenou léčbu.

7. Závěry

Derivát MP265 vykazuje na linii MDA-MB-231 porovnatelný antiproliferační účinek jako PTX. Stabilitní studie však ukázala jeho rychlou degradaci v roztoku, proto nebyl v dalších testech hodnocen.

Derivát MP 264 vykazuje v linii MDA-MB-231 slabší antiproliferační účinek než PTX. Jeho stabilita v roztoku je relativně dobrá. V linii CaCo-2 vykazuje tento konjugát slabší antiproliferační účinek než PTX, srovnatelný s jeho účinkem v linii MDA-MB-231. Z tohoto důvodu pravděpodobně proniká do buněk jiným mechanismem než pomocí receptorů pro Gn-RH. Cytotoxický účinek MP264 na potkaní hepatocyty byl mírně nižší než účinek PTX.

Derivát MP 394 vykazuje na linii MDA-MB-231 podobný antiproliferační účinek jako PTX. Jeho hodnocení vyžaduje další experimenty.

Seznam zkratek

ATCC – American Tissue Cell Collection – Americká sbírka tkáňových kultur

CYP – cytochrom P450

DMEM – Dulbecco`s Modifated Eagle Medium

DMSO – dimethylsulfoxid

EMEM – Eagle`s Minimum Essential Medium

FBS – Fetální hovězí sérum

FNHK – Fakultní nemocnice Hradci Králové

FSH – folikuly stimulující hormon

Gn-RH – gonadoliberin

Gn-RHr – receptor pro gonadoliberin

HEPES – kyselina 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová

ISOM – směs tvořená médii HAM F12 a Williams v poměru 1:1

LH – luteinizační hormon

MTT – 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyl tetrazolium bromid

NEAA – roztok neesenciálních aminokyselin

NRU – test neutrální červění

PBS – fosfátový pufr

pen – penicilin

PTX – paklitaxel

strep – streptomycin

T-E – trypsin s kyselinou ethylendianimotetraoctovou

TNF α – tumor nekrotizující faktor α

ÚEB AV ČR – Ústav experimentální botaniky Akademie věd České republiky

Seznam použité literatury

Monografie a časopisy:

Adam Z., Vorlíček J., Vaníček J.: Diagnostické a léčebné postupy u maligních chorob, Grada, Praha, 2., aktualizované a doplněné vydání, 2004, str. 213 – 230

Coufal O., Fait V. a kol.: Chirurgická léčba karcinomu prsu, Grada, Praha, 2011, 1. vydání, str. 63 – 98

Fusek M., Vitek L., Blahoš J a kol.: Biologická léčiva Teoretické základy a klinická praxe, Grada, Praha, 1. vydání, 2012, str. 146 – 149

Harrison G., Wierman., Nett T. a kol. (2004): Gonadotropin-releasing hormone and its receptor in normal and malignant cells, Endocrine-Related Cancer 11 str. 725 – 748

Jahodář L.: Farmakobotanika semenné rostliny, Karolinum, Praha, 2006, str. 35 – 36

Klener P.: Základy klinické onkologie, Galen, Praha, 1.vydání, 2011

Limonta P., Moretti R., Marelli M. a kol. (2003): The biology of gonadotropin hormone-releasing hormone: role in the control of tumor growth and progression in humans, Frontiers in Neuroendocrinology 24, str. 279 – 295

Lincová D., Farghali H.: Základní a aplikovaná farmakologie, Galen, Praha, 2. doplněné a přepracované vydání, 2007, str. 551

Lüllmann H., Mohr K., Hein L.: Barevný atlas farmakologie, Grada, Praha, 5.přepracované a rozšířené vydání, 2007, str. 300

Ministerstvo zdravotnictví České republiky: Český lékopis 2009, Grada, Praha, 2009, str. 2847 – 2850

Nagy A., Schally A., Armatís P. a kol. (1996): Cytotoxic analogs of luteinizing hormone-releasing hormone containing doxorubicin or 2-pyrrolinodoxorubicin, a derivative 500 – 100 times more potent, Proc. Natl. Acad. Sci USA Vol. 93, str. 7269 - 7273

Příbylová M., Dvořáková M., Hanušová V. a kol. (2011): Paclitaxel conjugation with the analog of the gonadotropin-releasing hormone as a targeting moiety, International Journal of Pharmaceutics 415, str. 175 – 180

Příbylová M., Dvořáková M., Vaněk T. (2010): Deriváty paclitaxelu pro cílený transport cytostatika, Chem. Listy 104, str. 1023 – 1028

Sealfon S., Weinstein H., Millar R.: Molecular mechanisms of ligand interaction with the gonadotropin-releasing hormone receptor, Endocrine reviews 18, str. 180 – 205

Silbernagl S., Despopoulos A.: Atlas fyziologie člověka, Grada, Praha, 6. vydání, zcela přepracované a rozšířené, 2004, str. 268 – 280

Online zdroje:

American type cell culture collection¹ – Cell line CaCo-2 [online], Poslední revize 16.4.2013 [citováno 16.4.2013], Dostupné z: <http://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/HTB-37.aspx>

American type cell culture collection² – Cell line MDA-MB-231 [online], Poslední revize 16.4.2013 [citováno 16.4.2013], Dostupné z: http://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/HTB-26.aspx?geo_country=cz#357C3571006A4259B64650D34DF19048

Kubala E., Melichar B., Veselý P.: Protokol léčby karcinomu prsu [online], Poslední revize 2.4.2010 [citováno 15.4.2013] Dostupné z: <http://www.lfhk.cuni.cz/onkol/NEW/standardy-prs.html>

Státní ústav pro kontrolu léčiv – souhrn údajů o léčivém přípravku Brevitax 6 mg/ml [online], Poslední revize 2011 [citováno 14.4.2013], Dostupné z: www.sukl.cz/modules/medication/download.php?file=SPC39726.pdf&type=spc&as=brevitax-6-mg-ml-spc

Vejražka M.: Buněčné kultury [online], Poslední revize 26.9.2007 [citováno 16.4.2013] Dostupné z: <http://bioprojekty.lf1.cuni.cz/3381/sylaby-prednasek/textova-verze-prednasek/bunecne-kultury-vejrazka.pdf>