

Univerzita Karlova

1. lékařská fakulta

Autoreferát disertační práce



**Molekulární podstata etiologie toxického působení
fluoropyrimidinů se zaměřením na palmární-
plantární erythrodysesthesii a použití potenciálních
antidot**

Mgr. Jan Hartinger

2017

Doktorské studijní programy v biomedicině

Univerzita Karlova v Praze a Akademie věd České republiky

Obor: Biologie a patologie buňky

Předseda oborové rady: prof. RNDr. Ivan Raška, DrSc

Školící pracoviště: Klinická laboratoř biologie nádorů,

Onkologická klinika VFN

Školitel: MUDr. Pavel Veselý, CSc.

Konzultant: PharmDr. Irena Štenglová Netíková, PhD.

Disertační práce bude nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněna k nahlížení veřejnosti v tištěné podobě na Oddělení pro vědeckou činnost a zahraniční styky Děkanátu 1. lékařské fakulty.

Obsah

Abstrakt	4
Abstract.....	6
1. Úvod	8
2. Cíle práce, stanovené hypotesy	12
2.1. Stanovené hypotesy	12
3. Materiál a metodika	13
3.1. Kultivace buněk	13
3.2. Měření viability buněk.....	14
3.2.1. RTCA test (Real Time Cell Analyser).....	14
3.2.2. MTT test.....	14
3.2.3. NTCA (Nondestructive Test of Cellular Activity)	15
4. Výsledky	15
4.1. Toxicita 5-FU, uridinu a thymidinu	15
4.2. Protektivní efekt pyrimidinových nukleosidů.....	16
4.3. Efekt kalciumfolinátu (CF)	18
4.4. Další potenciální antidota.....	22
4.5. Výsledky s primárními keratinocyty	22
5. Diskuse	23
6. Závěry	28
7. Použitá literatura.....	30
Seznam publikací	35

Abstrakt

Palmární-plantární erythrodysesthesie (PPE) je nežádoucí účinek doprovázející antineoplastickou terapii při podávání 5-fluorouracilu formou kontinuální infuze, případně při dlouhodobé terapii kapecitabinem (proléčivo 5-FU). V nejzávažnějších případech PPE znemožňuje další pokračování v potřebné terapii. V léčbě a prevenci tohoto nežádoucího účinku je používána lokální aplikace uridinu ve formě 10 % masti, nicméně tento postup nebyl dosud ověřen randomizovanými studiemi a není všeobecně přijímán. PPE je způsobena s největší pravděpodobností přímým vlivem cytostatika na kůži dlaní a plosek nohou. Toxicita 5-FU je zprostředkována především jeho inkorporací do RNA a inhibicí thymidylát syntasy (TS), která vyústí v poruchu syntesy DNA. U odlišných typů buněk mají tyto mechanismy pro rozvoj toxicity 5-FU různý význam. Při hledání specifického antidota v terapii PPE je proto nezbytné zjistit jaký molekulární mechanismus toxicity 5-FU se uplatňuje u keratinocytů.

Jako nejvhodnější látky pro použití v lokální terapii PPE jsme vybrali pyrimidinové nukleosidy, především uridin, který je ve formě 10 % uridinové masti v této indikaci využíván v několika onkologických centrech ve Střední Evropě. Jako prostředek pro zjištění mechanismu působení 5-FU jsme dále testovali účinek kalciumfolinátu (CF), který zesiluje inhibici thymidylát syntasy 5-fluorouracilem. Jako další potenciální antidota jsme studovali uracil a pyridoxin. Pro ověření potenciálu jednotlivých látek antagonisovat toxické účinky 5-FU jsme provedli *in vitro* testy na buněčné linii spontánně imortalisovaných lidských keratinocytů HaCaT. Některé testy jsme zopakovali rovněž na primárních keratinocytech. Použili jsme 3 rozdílné a vzájemně se doplňující metody testování viability buněk: mikroskopické hodnocení vývoje morfologických změn dokumentovaných mikrofotografiemi, hodnocení metabolické aktivity pomocí MTT testu a hodnocení časového vývoje adherence buněk k podkladu pomocí RTCA testu.

Uridin významně prodlužoval přežití buněk v přítomnosti 5-FU. Uridin zabraňuje inkorporaci 5-FU do RNA a lze tedy dovozovat, že tento mechanismus účinku 5-FU je pro HaCaT keratinocyty zásadní. Pokud jsme k

uridinu přidali thymidin, došlo k dalšímu nárůstu metabolické aktivity a prodloužení přežití buněk. Tento efekt byl spíše synergický než aditivní. Samotný thymidin přežívání buněk neprodlužoval. Lze tedy dovozovat, že thymidin, který snižuje význam inhibice TS 5-fluorouracilem, prodlužuje přežití buněk až v případě, že je zablokována inkorporace 5-FU do RNA. Tuto hypotézu jsme potvrdili rovněž pomocí CF, který toxicitu 5-FU zvyšoval pouze v případě, že jsme zablokovali inkorporaci 5-FU do RNA uridinem. Pokud na buňky působil samotný 5-FU, nebyla toxicita přidáním CF zvýšena. Uridin tedy „přepíná“ mechanismus toxicity z RNA inkorporace na inhibici TS, která může být dále zesílena CF. V případě, že v médiu buněk byl přítomen 5-FU, uridin i thymidin, nebyla toxicita 5-FU dále zvyšována při přidání CF, což potvrzuje, že se inhibice TS 5-fluorouracilem v přítomnosti thymidinu významně neuplatňuje. Zároveň jsme potvrdili, že stejným způsobem jako uridin snižuje toxicitu 5-FU také cytidin, pravděpodobně poté, co je metabolisován na uridin. Uracil vykazoval významně nižší efekt než uridin. Deoxyuridin a pyridoxin neovlivňovaly toxicitu 5-FU vůbec.

Potvrdili jsme, terapie a prevence PPE 10 % uridinovou mastí lze podpořit *in vitro* důkazy o účinku uridinu jako antidota 5-FU u HaCaT keratinocytů. Tento účinek jsme navíc potvrdili rovněž několika pokusy na primárních keratinocytech. Teoreticky je možné stejným způsobem použít i cytidin, nicméně jeho nižší stabilita (nutnost skladovat v chladu) komplikuje klinické použití. Zároveň lze doporučit uvážít pro případné další klinické testování kombinaci uridinu a thymidinu za účelem zvýšení efektu v terapii PPE.

Abstract

Palmar-plantar erythrodysesthesia (PPE) frequently accompanies the therapy with a continuous 5-FU infusion or peroral capecitabine (5-FU prodrug). In the most severe cases this adverse effect leads to discontinuation of a needful therapy. Local 10 % uridine ointment is used to prevent and treat the said adverse event. Nevertheless, this method is not generally accepted as an effective one because it has never been proved in a randomized controlled clinical trial. Most probably, a direct effect of a cytostatic compound on the skin of hands and foots causes PPE. The toxicity of 5-FU is mediated primarily by its incorporation into RNA and by thymidylate synthase (TS) inhibition and subsequent DNA synthesis disruption. The importance of particular 5-FU toxicity mechanisms varies in different cell types. For choosing the best PPE local antidote it is necessary to find out which molecular mechanism applies in keratinocytes.

We have chosen pyrimidine nucleosides as the most suitable compounds for the local PPE therapy because the uridine ointment is already being used in several oncology centers in the Central Europe. In order to find out the 5-FU toxicity mechanism, we further tested the effect of calciumfolinate (CF) which strengthens the TS inhibition by 5-FU. We studied also uracil and pyridoxine as potential 5-FU antidotes. We tested *in vitro* the individual compound potential to prevent toxic 5-FU effects on the HaCaT cell line of spontaneously immortalized human keratinocytes. We used three different and complementary methods of cellular viability testing: microscopical assessment of the evolution of morphological changes documented in microphotographs, metabolic activity assessment by means of the MTT test and measuring the cellular adherence within time by the RTCA test.

We confirmed that uridine significantly prolongs the cellular survival in the 5-FU presence. We also confirmed that cytidine protects the cells to the same extent. Uridine prevents 5-FU incorporation into RNA and thus we confirmed that this mechanism is crucial for the 5-FU toxicity in the HaCaT keratinocytes. When we added thymidine to uridine, further increase in metabolic activity and prolongation of cellular survival occurred. This effect was rather synergic than additive as thymidine solely did not prolong the

cellular survival at all. This means that thymidine prolongs cellular survival by abrogating TS inhibition only when the 5-FU incorporation into RNA is blocked by uridine. We confirmed this hypothesis also by experiments with calciumfolinate (CF). CF increased the 5-FU toxicity only when the 5-FU incorporation into RNA was blocked by uridine. CF did not increase the 5-FU toxicity when no protective compound was added. Therefore uridine “switches” the 5-FU toxicity mechanism from RNA incorporation to TS inhibition which can further be strengthened by CF. When 5-FU, uridine and thymidine were present in the cell culture medium, the 5-FU toxicity was not increased by CF. This confirms the fact that TS inhibition by 5-FU is abrogated by thymidine and therefore CF cannot be effective as a 5-FU toxicity booster. Cytidine showed the same protective effect as uridine probably after its metabolisation to uridine. Uracil showed only a significantly lower protective effect in comparison with uridine. Deoxycytidine and pyridoxine did not prevent the 5-FU toxicity at all.

We confirmed that the 10 % uridine ointment application in PPE treatment and prevention can be supported by *in vitro* results of the uridine 5-FU antidotal effect in the HaCaT cells. This effect was further confirmed by several experiments on primary keratinocytes. From the theoretical point of view, cytidine would be similarly effective as uridine when placed into the ointment but the lower stability of this nucleoside (cold storing requirement) makes its clinical employment difficult. The combination of uridine with thymidine for further clinical testing is advisable so that the protective ointment efficacy could be increased.

1. Úvod

Kontinuální podání 5-FU je provázeno výskytem palmární a plantární erythrodysesthesie (PPE) (Lokich et al. 1989; Wolpin and Mayer 2008). Tento nežádoucí účinek je poměrně častý také v případě dlouhodobé terapie kapecitabinem (Biganzoli et al. 2002; Leonard et al. 2011; Yun et al. 2010), při které se vyskytuje v závislosti na dávce v cca 30-60 % případů (Hofheinz et al. 2012; Leonard et al. 2011). PPE může významně snížit kvalitu života pacientů a v některých případech vede k nutnosti snížení dávky, případně k ukončení jinak účinné antineoplastické terapie (Leonard et al. 2011; SPC_Xeloda 2006; von Moos et al. 2008; Yun et al. 2010). Histologický obraz PPE je popisován jako nespecifická reakce keratinocytů na přítomnost cytotoxické látky v kůži (Janusch et al. 2006), cílem lokální terapie by tedy mělo být antagónisování účinku 5-FU.

Metodou volby při terapii PPE způsobené léčbou capecitabinem je snížení dávky (SPC_Xeloda 2006). V případech, kdy samotné snížení dávky pro snížení toxických projevů nestačí, by bylo výhodné lokální, nebo systémové použití antidota, které ochraňuje zdravé buňky a nesnižuje protinádorovou účinnost fluoropyrimidinů. V současné době však neexistuje takováto universálně doporučená terapie, i když např. uridin tyto požadavky poměrně dobře splňuje (van Groeningen et al. 1992). Empiricky je za tímto účelem v některých centrech ve Střední Evropě používána aplikace 10 % uridinové masti (Juergen 2004; Netikova et al. 2009).

Úvahy o použití lokálních antidot při léčbě 5-FU vycházejí z možné interference s molekulární podstatou působení 5-FU v buňkách, která spočívá především v následujících dvou hlavních mechanismech:

1. *Inhibice thymidylát synthasy (TS) metabolitem fluorodeoxyuridinmonofosfátem (FdUMP)*. FdUMP se váže na aktivní místo TS a zabraňuje tak vazbě deoxyuridinmonofosfátu (dUMP) a syntéze thymidylátu (dTMP). Komplex FdTMP s TS je stabilisován redukovanou kyselinou listovou, která za normálních okolností funguje jako donor methylové skupiny pro přeměnu uracilu na thymin. Proto dochází k posílení účinku 5-FU při přidání kalciumfolinátu

(Advanced_Colorectal_Cancer_Meta-Analysis_Project 1992). Následně dochází k dysbalanci mezi koncentracemi jednotlivých nukleotidů a vzniká velké množství dUTP, který se spolu s FdUTP inkorporuje do DNA a způsobuje porušení její funkce (Longley et al. 2003; Martin et al. 1980). Inhibici TS je možné obejít suplementací thymidinu, který je následně metabolisován na thymidylát thymidinkinasou (Umeda and Heidelberger 1968). Thymidinkinasa ovšem také aktivuje 5-fluorodeoxyuridin (FdU) na FdUMP a zprostředkovává tak opět inhibici TS.

2. *Inkorporací fluorouridintrifosfátu (FUTP) do RNA.* Inkorporace FUTP do RNA vede k poruše její funkce (Longley et al. 2003; Martin et al. 1980) a je možné jí předejít aplikací uridinu (Codacci-Pisanelli et al. 2008; Sawyer et al. 1984). V klinicky využitelných dávkách je dosahováno při eskalaci dávek významnější inkorporace 5-FU to RNA (Nord et al. 1992).

Různé typy buněk mohou metabolisovat 5-FU na odlišné produkty, takže se u nich mohou rozvíjet různé mechanismy toxicity 5-FU, případně různé mechanismy resistance podle konkrétního enzymatického vybavení (Umeda and Heidelberger 1968; van Groeningen et al. 1992).

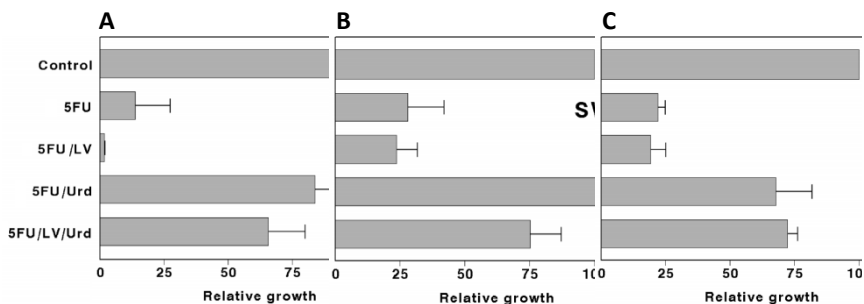
Vysoká exprese TS koreluje s výskytem resistance nádorů na terapii 5-FU (Kamoshida et al. 2004; Longley et al. 2003). Naproti tomu u nenádorových střevních buněk ukázaly pokusy na myších, že predominantní toxicita 5-FU není spojena s inhibicí TS, neboť suplementace thymidinem nevedla k jejímu snížení. Autoři zároveň potvrdili, že je možné snížit toxicitu 5-FU současným podáním uridinu, který zabraňuje inkorporaci FUTP do RNA (Pritchard et al. 1997). Na základě skutečnosti, že zdravé buňky se dělí pomaleji, než buňky nádoru a syntetisují tedy méně DNA lze předpokládat, že budou citlivější na inkorporaci 5-FU do RNA, než na inhibici TS, která vede k poškození DNA.

Kalciumfolinát (CF, syn. leukovorin) běžně v klinické praxi aplikovaný spolu s 5-FU, neboť významně zvyšuje počet odpovědí na léčbu i když neprodlužuje průměrné celkové přežívání pacientů (Advanced_Colorectal_Cancer_Meta-Analysis_Project 1992). Mechanismus účinku je zprostředkován zesílením vazby FdUMP na TS v přítomnosti tetrahydrofolátu (Longley et al. 2003). V případě studií na buněčných liniích

lze odhadnout význam inhibice TS pro účinek 5-FU pomocí přidání kalciumfolinátu. Pokud toxicita není zvýšena, je mechanismem rozvoje toxicity pravděpodobně především inkorporace 5-FU do RNA. (Codacci-Pisanelli et al. 2008).

Mezi látky, které snižují toxicitu 5-FU řadíme na toto místo především některé pyrimidinové nukleosidy, které jsme zkoumali v rámci naší práce. Codacci-Pisanelli et al. prokázali na několika buněčných liniích karcinomu tračníku, že uridin zabraňuje inkorporaci 5-FU do RNA a snižuje tak u některých buněk jeho toxicitu. Po přidání uridinu došlo u těchto buněčných linií k obnově proliferační aktivity a tento účinek byl v některých případech snížen po přidání kalciumfolinátu, který opětovně zvyšoval toxicitu 5-FU a to i v přítomnosti uridinu. Na základě této studie lze rozdělit buněčné linie podle efektu CF a uridinu na 3 skupiny (viz graf 1):

- Skupinu buněčných linií podobných C26-10 (myší karcinom tračníku), které reagují na CF zvýšením toxicity jak v přítomnosti uridinu, tak bez uridinu. Bez přítomnosti uridinu jsou projevy toxicity 5-FU výraznější (graf 1A).
- Skupinu podobnou SW984 (lidský karcinom tračníku), ve které buňky reagují zvýšenou toxicitou 5-FU v přítomnosti CF pouze pokud je v médiu také uridin. Zdá se, že u těchto buněk dojde ke zvýšení významu inhibice TS po přidání uridinu (graf 1B).
- Skupinu buněčných linií podobnou WiDr (lidský karcinom tračníku), což jsou buňky, které nereagují na přidání CF ani bez uridinu, ani v přítomnosti uridinu a inhibice TS tedy u těchto buněk nehraje žádnou roli (graf 1C).



Graf 1 – účinek 5-FU (5-FU), 5-FU + CF (5-FU/LV), 5-FU + uridin (5-FU/Urd) a 5-FU + CF + uridin (5-FU/LV/Urd) na 3 různé buněčné linie. Měřeno jako míra inhibice růstu oproti kontrolním buňkám. V případě linie C26-10 byla použita koncentrace 1 μM 5-FU a v případě linií SW948 a WiDr byla použita koncentrace 5 μM 5-FU. Převzato z (Codacci-Pisanelli et al. 2008).

Z popsaných mechanismů účinku 5-FU vyplývá, že přinejmenším u některých typů buněk s toxicitou predominantně způsobovanou inhibicí TS by mělo být možné snížit toxicitu 5-FU podáním thymidinu. Studie na některých buněčných liniích (Umeda and Heidelberger 1968), krysách a myších (Hartmann and Bollag 1986) toto potvrzují a bylo také potvrzeno, že thymidin zabraňuje toxickému účinku selektivního inhibitoru TS tomudexu na myši intestinální buňky *in vivo* (Pritchard et al. 1997).

Vliv cytidinu na toxicitu 5-FU je málo prostudovaný. Je popsána studie na buněčných liniích čínské křečka, která potvrzuje, že vyšší hladiny cytidintrifosfátu (CTP) jsou spojeny s resistencí na 5-FU (Kaufman 1984). Naopak přidání cytidinu, nebo guanosinu k 5-FU zvyšovalo účinnost léčby sarkomu u myši (Osswald and Youssef 1979). Na buněčné linii kolorektálního karcinomu (WiDr) nezabránil krátkodobě aplikovaný cytidin inkorporaci 5-FU do RNA (na rozdíl od uridinu) (van Groeningen et al. 1992). Údaje o případném podávání deoxycytidinu (obr. 9) za účelem protektivního působení při expozici 5-FU v literatuře chybí. Samotný deoxycytidin není pro buňky toxický (Akman et al. 1981).

Pro racionální vývoj lokálních antidot při terapii PPE způsobené fluorochinolony je třeba znát mechanismus účinku, kterým 5-FU účinkuje na

keratinocyty. Mechanismus účinku 5-FU u konkrétní buněčné linie lze odvodit z účinku uridinu, thymidinu a kalciumfolinátu (Codacci-Pisanelli et al. 2008).

2. Cíle práce, stanovené hypotesy

Cílem práce bylo *in vitro* stanovit citlivost keratinocytů k 5-FU a vliv uridinu, dalších pyrimidinových nukleosidů a kalciumfolinátu na toxicitu 5-FU. Okrajově byly též zkoumány další látky využívané k terapii PPE (uracil a pyridoxin). Výsledky mají potvrdit, nebo vyvrátit oprávněnost klinického použití 10 % uridinové masti (Juergen 2004; Netikova et al. 2009), neboť v současné době nelze vyloučit při absenci randomisovaných klinických studií, že za případným pozitivním účinkem stojí placebo efekt, případně efekt masťového základu. Pro doplnění preklinických informací k tomuto způsobu léčby jsme testovali lidské keratinocyty buněčné linie HaCaT a primární keratinocyty na citlivost k 5-FU a protektivní účinek výše zmíněných látek.

Vzhledem k variabilitě v molekulárním mechanismu toxického působení 5-FU u různých typů buněk (Codacci-Pisanelli et al. 2008; Umeda and Heidelberger 1968; van Groeningen et al. 1992) bylo dalším cílem zjištění mechanismu účinku 5-FU u lidských keratinocytů za účelem případného racionálního zdokonalení formulace masti pro terapii a prevenci PPE.

2.1. Stanovené hypotesy

1. *hypotese*: uridin snižuje *in vitro* toxicitu 5-FU, což potvrzuje potenciál uridinové masti v prevenci a léčbě PPE. Zároveň by v takovém případě byl potvrzen významný vliv inkorporace 5-FU do RNA, která je uridinem antagonisována.
2. *hypotese*: pokud kalciumfolinát zvyšuje toxicitu 5-FU, hraje významnou roli v molekulárním mechanismu působení 5-FU inhibice TS.
3. *hypotese*: případné snížení toxicity 5-FU po přidání thymidinu svědčí rovněž pro významnou roli inhibice TS v rozvoji toxicity 5-FU.

4. *hypotesa*: pokud uridin prodlouží přežívání buněk a zvýší citlivost buněk na kalciumfolinát dochází zde ke změně mechanismu toxicity 5-FU z inkorporace do RNA na inhibici TS. Efekt kalciumfolinátu by v takovém případě měl zmizet po přidání thymidinu do média. Buňky by pak reagovaly podobně jako buňky lidského karcinomu tračníku SW948 ve studii Codacci-Pisanelliho et al (Codacci-Pisanelli et al. 2008).
5. *hypotesa*: uracil snižuje toxicitu 5-FU, neboť jako inhibitor DPD snižoval podle literárních údajů výskyt PPE po proléčivu 5-FU (Kroep et al. 2015).
6. *hypotesa*: pyridoxin *in vitro* nesnižuje účinnost 5-FU, což potvrzuje předchozí klinické výsledky (Kang et al. 2010; Ota et al. 2014).

3. Materiál a metodika

Ke studiu toxického působení 5-FU a protektivního působení potenciálních antidot v léčbě PPE byla zvolena buněčná linie HaCaT. Jedná se o spontánně immortalisované lidské keratinocyty se zachovalou plnou diferenciační kapacitou (Boukamp et al. 1988). Zároveň byly pro potvrzení 1. hypotesy o účinnosti uridinu použity primární keratinocyty.

3.1. Kultivace buněk

Buňky HaCaT byly laskavě poskytnuty profesorem Dr. J. Bereiter-Hahnem (Kinematic Cell Research Group, Institute for Cell Biology and Neurosciences, Goethe University Frankfurt am Main, Germany). Buňky byly kultivovány v médiu H-MEM (Eaglovo minimální médium v Hanksově pufru) doplněném o neesenciální aminokyseliny, 0,12 g/L pyruvátu sodného, 1 g/L NaHCO₃, 10 % bovinní sérum, 2 % fetální bovinní sérum a antibiotika (200 U/mL G-penicilin and 100 µg/mL streptomycin). Buňky byly kultivovány v inkubátoru ve vlhké atmosféře při 37°C a 3,5 % CO₂.

Primární keratinocyty byly kultivovány na pomocné vrstvě (feeder-layer) 3T3 myších fibroblastů hustotě 25 000 buněk/cm² ozářených letální dávkou

roentgenového záření (100Gy, Gammacel 220). Bylo použito kultivační médium využívané pro kultivaci fibroblastů 3T3, které sestávalo z média H-MEM (Eaglovo minimální médium v Hanksově pufru) doplněného o neesenciální aminokyseliny, 0,12 g/L pyruvátu sodného, 1 g/L NaHCO₃, 10 % bovinní sérum, 2 % fetální bovinní sérum a antibiotika (penicilin 200 U/mL a streptomycin 100 µg/mL). Dále byl doplněn hydrokortizon 0,5 µg/mL, insulin 5 µg/mL (Actrapid, NovoNordisk), cholera toxin 10⁻¹⁰ M (Sigma Aldrich) a epidermální růstový faktor EGF 5 ng/mL (Sigma Aldrich). Buňky byly kultivovány v inkubátoru ve vlhké atmosféře při 37°C a 3,5 % CO₂.

3.2. Měření viability buněk

3.2.1. RTCA test (Real Time Cell Analyser)

Jedná se o plato s 96 jamkami, na jejichž dně jsou 2 zlaté elektrody (Real Time Cell Analyser, xCELLigence®, Roche Applied Sciences). V případě dělení a nárůstu buněk se zvýší impedance mezi elektrodami, což je zaznamenáváno jako hodnota tzv. cell indexu. Kromě růstu ovlivňují měřenou hodnotu cell indexu i povrchové změny apod., což činí jednoznačnou interpretaci výsledků poněkud složitější, nicméně ve většině případů lze cell index považovat za indikátor buněčné viability (Atienzar et al. 2011). Pro každý pokus byly nasazeny buňky v počtu 14 000 ve 100 µL média do všech jamek plata. Po nastoupení exponenciální fáze růstu cell indexu byly přidávány do jamek s buňkami testované látky ve 100 µL média. Cell index byl odečítán každých 15 min po celou dobu trvání pokusu.

3.2.2. MTT test

MTT test spočívá v přidání MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenylyltetrazolium bromid) do média zkoumaných buněk. Pomocí konstitutivních enzymů dýchacího řetězce dochází k redukci MTT na tmavý, krystalický formazan. Množství formazanu vzniklého za určitý časový úsek (6 hodin) se odečítá po rozpuštění v roztoku laurylsulfátu sodného (SDS) spektrofotometricky a je přímo úměrné viabilitě buněk, která je měřena jako jejich metabolická aktivita (Mosmann 1983). Inokulace činila 14 000 buněk na každou jamku ve 100 µL média bez fenolové červeně. V okamžiku, kdy

mikroskopické zhodnocení ukázalo lehce subkonfluentní buněčné vrstvy, byly přidány testované látky ve 100 μL kultivačního média. Pro změření metabolické aktivity bylo do jamek bylo přidáno 10 μL MTT (5 mg/mL v PBS). Po šesti hodinách byla metabolisace ukončena rozpuštěním buněk i vyprodukovaného formazanu pomocí 100 μL 10 % SDS v destilované vodě. Po 24 hodinovém působení SDS byl proveden odečet na spektrofotometru (Tecan Sunrise™ microplate reader se software Magellan™) při vlnové délce 570 nm s pozadím 630 nm. Míra absorbance je indikátorem buněčné viability.

3.2.3. NTCA (Nondestructive Test of Cellular Activity)

NTCA (Nondestructive Test of Cellular Activity) spočívá v kultivaci buněk na platech, resp. na Petriho miskách a odečítání toxického účinku podle barvy média s obsahem fenolové červeně, případně hodnocení morfologie na mikrofotografiích. Odečítání barvy media nebylo možno v našich pokusech využít, neboť uridin ve vyšších koncentracích snižoval pH a zabarvoval medium do žluta. Mikrofotografie byly pořízeny po obarvení buněk dle May-Grünwalda a Giemsy-Romanowského (Netikova et al. 2007). Buňky byly nasazovány v různém množství podle velikosti kultivační plochy (např. 100 000 buněk na Petriho misku o průměru 35 mm). Ve chvíli, kdy byly buňky lehce subkonfluentní bylo kultivační médium odsáto a rychle přidáno čerstvé médium s rozpuštěnými testovanými látkami. Po několika dnech byl pokus ukončen a buňky zabarveny.

4. Výsledky

4.1. Toxicita 5-FU, uridinu a thymidinu

Třemi různými metodami bylo zjištěno, že 5-FU je pro HaCaT keratinocyty vysoce toxický. Toxická koncentrace v NTCA testu byla 0,6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (5 μM), v MTT testu 4,8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (37 μM) a v RTCA testu 1,9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (15 μM). Toxicita uridinu a thymidinu byla řádově nižší, než toxicita 5-FU. Uridin byl toxický od koncentrace 35 mg/mL (143,3 mM), thymidin od koncentrace 17,2 mg/mL (70,8 mM).

4.2. Protektivní efekt pyrimidinových nukleosidů

Ve všech třech metodách bylo potvrzeno, že uridin účinně zabraňuje toxickým projevům 5-FU. Pokud nabývá poměr 5-FU/uridin hodnot kolem 0,5, buňky dále neproliferují, ani nezvyšují metabolickou aktivitu, nicméně přežívají cca o 2 dny déle, než buňky, na které působí 5-FU bez přidaného uridinu. Pokud je poměr 5-FU/uridin 0,02-0,08 zaznamenali jsme prvních 5 dnů nárůst metabolické aktivity. Cytidin prokázal identický protektivní efekt s uridinem.

Thymidin prokázal v NTCA testu protektivní efekt na toxicitu 5-FU až v koncentracích 60 x vyšších, než uridin (3 mg/mL oproti 50 µg/mL). V koncentraci 50-100 µg/mL, kdy uridin prodlužoval přežití buněk v přítomnosti 7,5 µg/mL 5-FU o cca 2 dny nepůsobil thymidin protektivně vůbec.

Deoxycytidin neprokázal žádný efekt na toxicitu 5-FU.

Kromě jednotlivých nukleosidů byly testovány rovněž jejich kombinace. Výsledky RTCA testu jsou shrnuty v tabulce 1. Výsledky MTT testu jsou shrnuty v tabulce 2. Tučnou kursivou jsou vyznačeny neúčinnější kombinace nukleosidů.

Nejefektivnější protektivní efekt vykazovaly kombinace uridinu s thymidinem a cytidinu s thymidinem. V těchto kombinacích dosahovaly buňky nejvyšší metabolické aktivity v MTT testech a nejdelšího přežití (doba do poklesu cell indexu) v RTCA testech. Efekt byl synergický, nikoliv aditivní. Aditivní efekt byl prokázán v kombinaci uridinu s cytidinem, neboť 50 µg/mL cytidinu v kombinaci s 50 µg/mL uridinu bylo cca stejně účinné, jako 100 µg/mL uridinu, nebo cytidinu.

Tabulka 1 – výsledky RTCA testu (Hartinger et al. 2015). Srovnání. protektivního účinku pyrimidinových nukleosidů a jejich kombinací v přítomnosti 7,5 µg/mL 5-FU.

	<i>Max. hodnota cell indexu^{a)}</i>	<i>Čas do dosažení max. hodnoty cell indexu(h)</i>	<i>Čas do odumření b. (cell index = 5)(h)</i>
Kontrolní buňky	10,4 ± 0.3	200	-
5-FU ^{b)}	11,6 ± 0.6	30	53
5-FU+U(100 µg/mL)	12,8 ± 0.4	43	105
5-FU+C(100 µg/mL)	12,7 ± 0.5	43	117
5-FU+T(100 µg/mL)	9,6 ± 0.2	37	55
5-FU+dC(100 µg/mL)	12,4 ± 0.8	25	56
5-FU+U(50 µg/mL)+T(50 µg/mL)	9,3 ± 0.4	139	273
5-FU+U(50 µg/mL)+C(50 µg/mL)	11,6 ± 0.3	42	97
5-FU+U(50 µg/mL)+dC(50 µg/mL)	12,8 ± 0.8	32	81
5-FU+C(50 µg/mL)+T(50 µg/mL)	8,7 ± 0.4	132	271
5-FU+C(50 µg/mL)+dC(50 µg/mL)	10,8 ± 1.7	29	84
5-FU+dC(50 µg/mL)+T(50 µg/mL)	6,9 ± 0.8	22	54

^{a)} Cell index je hodnota znázorňující buněčnou viabilitu v RTCA testu.

^{b)} Testovaná koncentrace 5-FU byla vždy 7,5 µg/mL

Tabulka 2 – výsledky MTT testu (Hartinger et al. 2015). Srovnání protektivního účinku pyrimidinových nukleosidů a jejich kombinací v přítomnosti 7,5 µg/mL 5-FU.

	absorbance ^{a)}	% of control
Kontrolní buňky	1.22 ± 0.03	100.0 ± 2.5
5-FU ^{b)}	0.09 ± 0.01	7.1 ± 0.5
5-FU+U(100µg/mL)	0.30 ± 0.03	24.5 ± 2.0
5-FU+C(100µg/mL)	0.30 ± 0.04	24.5 ± 3.0
5-FU+T(100µg/mL)	0.05 ± 0.01	4.2 ± 0.5
5-FU+dC(100µg/mL)	0.04 ± 0.01	3.3 ± 0.7
5-FU+U(50µg/mL)+T(50µg/mL)	1.05 ± 0.03	85.6 ± 2.6
5-FU+U(50µg/mL)+C(50µg/mL)	0.41 ± 0.03	33.2 ± 2.0
5-FU+U(50µg/mL)+dC(50µg/mL)	0.15 ± 0.04	12.6 ± 3.0
5-FU+C(50µg/mL)+T(50µg/mL)	0.93 ± 0.10	76.0 ± 8.2
5-FU+C(50µg/mL)+dC(50µg/mL)	0.17 ± 0.02	13.7 ± 1.8
5-FU+dC(50µg/mL)+T(50µg/mL)	0,16 ± 0,12	13,3 ± 9.8

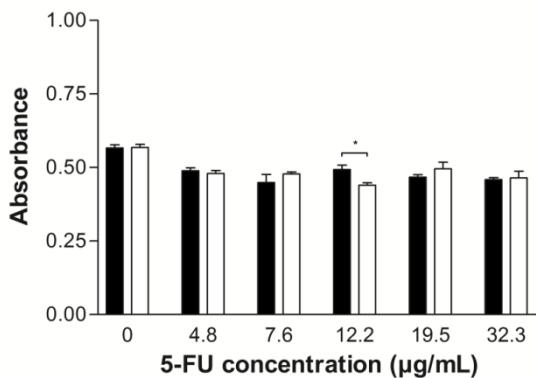
^{a)} Absorbance je přímo úměrná metabolické aktivitě buněk.

^{a)} Testovaná koncentrace 5-FU byla vždy 7,5 µg/mL

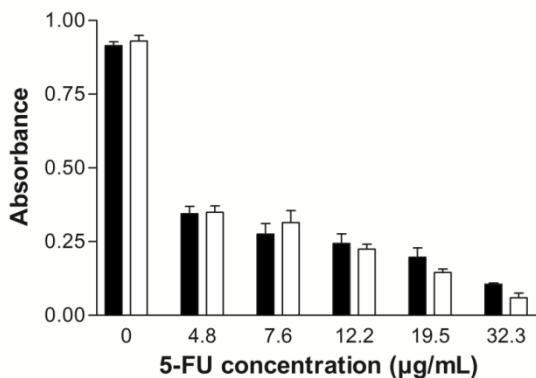
4.3. Efekt kalciumfolinátu (CF)

V MTT testu i v RTCA testu bylo prokázáno, že CF nezvyšuje toxicitu 5-FU (graf 2). Pokud byl přidán do média buněk uridin, došlo ke zvýšení toxicity 5-FU (graf 3) – metabolická aktivita buněk byla sice zvýšena vlivem uridinu, nicméně v jamkách s CF byla nižší.

A Day 2: 5-FU only and 5-FU + CF

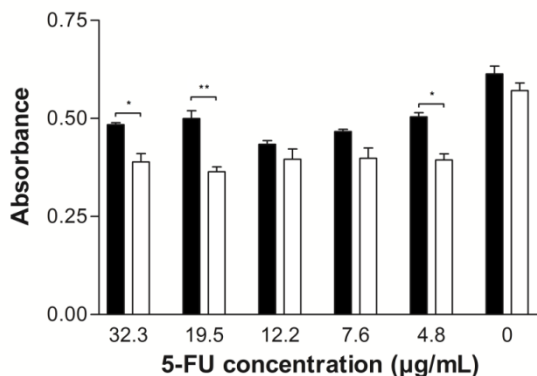


B Day 4: 5-FU only and 5-FU + CF

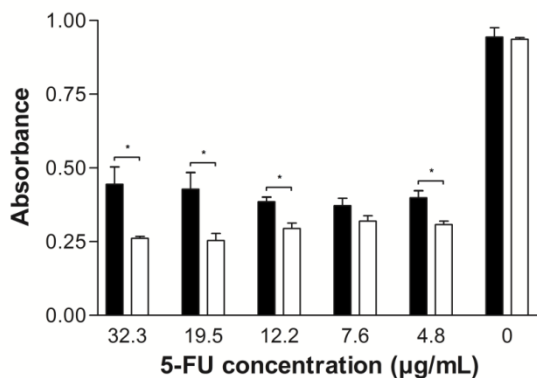


Graf 2. MTT test, keratinocyty buněčné linie HaCaT. Buňky v přítomnosti různých koncentrací 5-FU. Černé sloupce znázorňují metabolickou aktivitu buněk bez CF, bílé sloupce buňky s 20 µg/mL (42,2 µM) CF (nepublikovaná data).

A Day 2: Uridine protective effect against 5-FU toxicity is lowered by CF addition



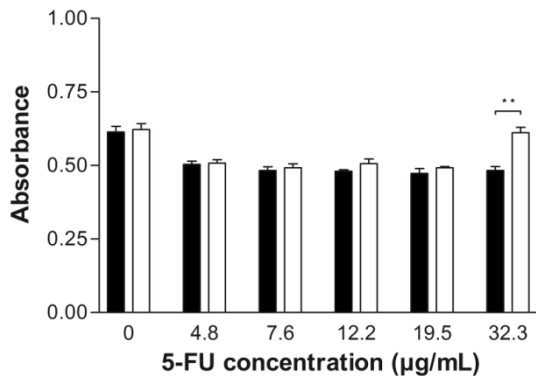
B Day 4: Uridine protective effect against 5-FU toxicity is lowered by CF addition



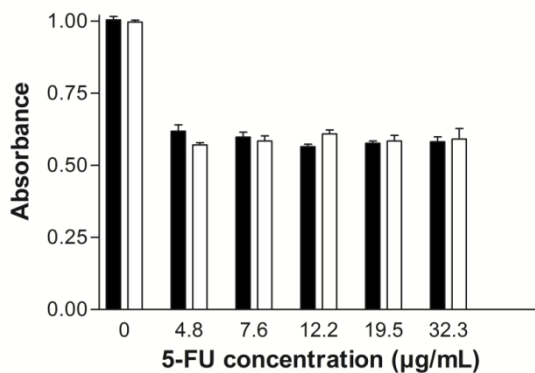
Graf 3. MTT test, keratinocyty buněčné linie HaCaT. Buňky v přítomnosti různých koncentrací 5-FU a 50 µg/mL (204,8 µM) uridinu. Černé sloupce znázorňují metabolickou aktivitu buněk bez CF, bílé sloupce buňky s 20 µg/mL (42,2 µM) CF (nepublikovaná data).

V přítomnosti uridinu i thymidinu došlo nejen ke ztrátě účinku CF, ale rovněž k výraznému prodloužení přežití buněk. Zatímco v případě samotného 5-FU (graf 2) a 5-FU s uridinem (graf 3) buňky nepřežily do 7. dne, v případě kombinace 5-FU s uridinem a thymidinem přežily buňky v nižších koncentracích 5-FU do 7. dne (graf 4C).

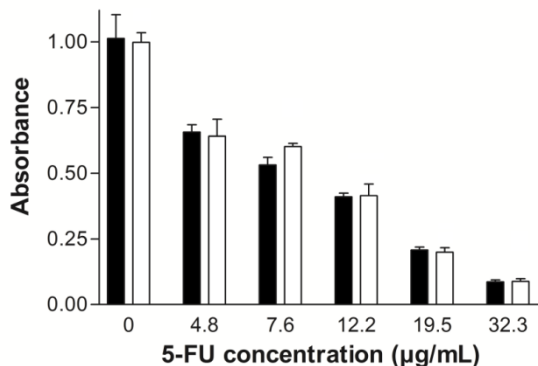
A Day 2: Uridine and thymidine protective effect is not lowered by CF addition



B Day 4: Uridine and thymidine protective effect is not lowered by CF addition



C Day 7: Uridine and thymidine protective effect is not lowered by CF addition



Graf 4. MTT test, keratinocyty buněčné linie HaCaT. Buňky v přítomnosti různých koncentrací 5-FU, 50 µg/mL (204,8 µM) uridinu a 25 µg/mL (103,2 µM) thymidinu. Černé sloupce znázorňují metabolickou aktivitu buněk bez CF, bílé sloupce buňky s 20 µg/mL (42,2 µM) CF (nepublikovaná data).

4.4. Další potenciální antidota

Uracil prokázal pouze minimální protektivní efekt ve srovnání s uridinem. Pyridixin neměl žádný vliv na toxicitu 5-FU.

4.5. Výsledky s primárními keratinocyty

Pro testy toxicity 5-FU a protektivního účinku uridinu se podařilo vykultivovat primární keratinocyty se kterými byly provedeny NTCA testy v přítomnosti 5-FU a v přítomnosti 5-FU a uridinu. 2. den nebyly na mikrofotografiích patrný rozdíly mezi buňkami ošetřenými pouze 5-FU a buňkami, které měly kromě 5-FU v mediu také uridin. Toxický efekt na buňky kultivované 5 dní v přítomnosti 5-FU byl patrný od koncentrace 31,25 µg/ml (240 µM) 5-FU. Tato koncentrace je výrazně vyšší, než v případě HaCaT buněčné linie, kde již v koncentraci 7,5 µg/ml (57,7 µM) došlo k úplnému odumření buněk 5. den. Na buňkách v jejichž mediu bylo zároveň

10 mg/mL (41,2 mM) uridinu se projevuje výrazná toxicita 5-FU až při koncentraci 125 µg/mL (511,9 µM). *Primární keratinocyty jsou tedy výrazně odolnější k působení 5-FU, než keratinocyty buněčné linie HaCaT. Prokázali jsme, že stejně jako u keratinocytů buněčné linie HaCaT dochází u primárních keratinocytů ke snížení toxicity 5-FU v přítomnosti uridinu.*

5. Diskuse

Při hledání vhodného antidota pro terapii fluoropyrimidiny vyvolané PPE, které by bylo možno aplikovat lokálně ve formě masti, jsme vycházeli z předpokladu, že PPE je vyvolávána toxickým působením 5-FU v oblasti dlaní a plosek nohou (Janusch et al. 2006). Zaměřili jsme se tedy především na zkoumání pyrimidinových nukleosidů, které mohou antagonizovat hlavní mechanismy účinku 5-FU (Codacci-Pisanelli et al. 2008). Pro zpřesnění představy o mechanismu účinku 5-FU byl rovněž zkoumán vliv CF, který zvyšuje toxicitu pouze v případě, že klíčovým mechanismem působení 5-FU je inhibice TS (Longley et al. 2003). Vzhledem k tomu, že v případě PPE dochází k poškození keratinocytů, zvolili jsme jako modelovou buněčnou linii lidské keratinocyty HaCaT (Boukamp et al. 1988). Při studiu viability buněk jsme zvolili 3 různé metody testování, které se navzájem doplňují a poskytují celistvý obraz o rozvoji toxicity 5-FU.

Letální účinek 5-FU na HaCaT keratinocyty je zjistitelný již ve velice malých koncentracích od 0,6 mg/mL (5 µM), které odpovídají dosažitelným plasmatickým koncentracím při aplikaci 5-FU v kontinuální infuzi (Blaschke et al. 2012). K nevratným změnám dochází již při 48 hodinové expozici. V této době však ve většině testů ještě nejsou změny měřitelné, což dokazuje význam ve většině publikovaných studií opomíjeného měření viability v čase. Vzhledem k tomu, že PPE se vyvíjí právě při dlouhodobé expozici nízkým koncentracím 5-FU považujeme měření viability v čase za adekvátní model pro testování potenciálních antidot.

Efekt uridinu na toxicitu 5-FU byl detailně byl popsán *in vitro* (Codacci-Pisanelli et al. 2008) a na zvířecích modelech (Codacci-Pisanelli et al. 1997; Hartmann and Bollag 1986; Martin et al. 1982; Nord et al. 1992), nicméně

nikoliv na lidských keratinocytech. Toxická koncentrace uridinu, jako endogenní substance, je přirozeně o několik řádů vyšší, než toxicita 5-FU, což jsme potvrdili v našich pokusech. Již v přítomnosti nízkých koncentrací uridinu se však významně snižuje toxicita 5-FU. Výsledky autorů Codacci-Pisanelli et al. popisují toxicitu 5-FU již při poměru molárních koncentrací 5-FU/uridin 0,05, při kterém docházelo k zástavě proliferace (Codacci-Pisanelli et al. 2008). V našem případě při poměru koncentrací 5-FU/uridin 0,5 docházelo k zástavě růstu metabolické aktivity a prodloužení přežití buněk, pokud byl tento poměr 0,02-0,08, byl prvních 5 dnů zaznamenán nárůst metabolické aktivity (a vs i mírná proliferace buněk). Tento efekt byl výraznější, pokud byl k uridinu přidán thymidin (grafy 18, 19).

V dalších experimentech na buněčné linii HaCaT byl porovnáván protektivní efekt thymidinu přímým srovnáním s uridinem ve stejné koncentraci (100 µg/mL, 0,41 mM). Thymidin na rozdíl od uridinu nevykazoval výrazný protektivní efekt (viz tabulky 1 a 2).

Mechanismus účinku 5-FU se u různých buněčných linií liší (Umeda and Heidelberger 1968; van Groeningen et al. 1992). Podle dříve publikovaných studií vede přidání uridinu k buňkám stresovaným 5-FU k zabránění jeho inkorporace do RNA (Codacci-Pisanelli et al. 2008; Sawyer et al. 1984). Naopak podáním thymidinu je možno obejít inhibici TS 5-fluorouracilem (Umeda and Heidelberger 1968). Účinek těchto nukleosidů v přítomnosti 5-FU tedy u konkrétní buněčné linie objasňuje, jakým mechanismem 5-FU účinkuje. *Dle našich výsledků mechanismus toxicity 5-FU u lidských keratinocytů spočívá především v inkorporaci 5-FU do RNA, neboť uridin snižuje toxické projevy 5-FU, na rozdíl od thymidinu, který toxicitu 5-FU významněji neovlivňuje.*

V našich pokusech kombinace thymidinu a uridinu výrazně prodlužovala přežívání buněk v přítomnosti 5-FU a udržovala jejich vyšší metabolickou aktivitu (tabulky 1 a 2 a grafy 2-4). Tento účinek byl výraznější v případě kombinace uridinu a thymidinu, než u každého z těchto nukleosidů zvlášť. *Vzhledem k tomu, že thymidin samotný není efektivní jako antidotum proti toxickým projevům 5-FU u HaCaT keratinocytů, lze uzavřít, že inhibice TS se neuplatňuje jako mechanismus toxicity u těchto buněk. Pokud však je přidán*

do média uridin zároveň s thymidinem, dochází k výraznému prodloužení přežívání buněk a zvýšení jejich metabolické aktivity oproti buňkám s uridinem samotným. Z toho lze vyvodit, že v případě, že dojde k zablokování primárního mechanismu účinku (inkorporace 5-FU do RNA) uridinem, začne se uplatňovat jako hlavní mechanismus toxicity inhibice TS. Pokud je následně snížen význam inhibice TS přidáním thymidinu, dochází k výraznému prodloužení přežití. Pro ověření této hypotese byly provedeny pokusy s kalciumfolinátem (CF).

Případný efekt CF umožní určit přesněji mechanismus účinku 5-FU u konkrétní buněčné linie, neboť ke zvýšení toxicity 5-FU může dojít pouze, pokud významným mechanismem účinku 5-FU je inhibice TS, která je v přítomnosti CF posílená (Codacci-Pisanelli et al. 2008; Longley et al. 2003). Zatímco Codacci-Pisanelli et al popisují u buněk myšího nádoru tlustého střeva (C26-10) zvýšenou toxicitu 5-FU v přítomnosti CF a pouze parciální uridinovou rescue v případě kombinace 5-FU a CF (Codacci-Pisanelli et al. 2008), v našich experimentech jsme neprokázali vliv CF na toxicitu samotného 5-FU (graf 2). *Toto zjištění potvrzuje, že primární mechanismus toxicity 5-FU v nepřítomnosti uridinu není inhibice TS.*

Pokud byl do média přidán CF současně s uridinem zaznamenali jsme vyšší toxicitu 5-FU. Toto zjištění potvrzuje, že v přítomnosti uridinu inhibice TS nabývá na významu (graf 3). Pokud bychom chtěli zařadit HaCaT keratinocyty do skupin podle citlivosti na 5-FU v přítomnosti CF a uridinu, lze konstatovat, že jsou podobné buněčné linii SW948 (graf 1B – buňky lidského karcinomu tračnicku).

Pokud byl buňkám s uridinem a CF dodán rovněž thymidin, došlo k opětovnému vymizení efektu CF, neboť inhibice TS ztrácí význam v nadbytku thymidinu. Zároveň buňky přežívaly výrazně déle a vykazovaly vyšší metabolickou aktivitu, neboť došlo k zablokování dvou různých mechanismů účinku 5-FU (graf 4). Codacci-Pisanelli sice uvádějí, že přidáním CF je možno „přepnout“ účinek 5-FU na TS inhibici (Codacci-Pisanelli et al. 2008), to jsme ale v našich experimentech neprokázali. Naopak jsme prokázali, že k tomuto „přepnutí“ se hodí uridin, který zablokuje druhý hlavní mechanismus účinku 5-FU, tedy inkorporaci 5-FU do RNA.

Poměrně překvapivé bylo zjištění, že uridin je možné beze změny protektivního účinku nahradit stejnou koncentrací cytidinu (tabulky 1 a 2). Protektivní efekt cytidinu lze vysvětlit jeho konversí na uridin cytidintrifosfátsynthetasou 2 (CTPS2). CTPS2 metabolisuje přeměnu uridintrifosfátu (UTP) na cytidintrifosfát (CTP) a zpět. Inhibice tohoto enzymu má podobný protektivní efekt na xenografty a buňky *in vitro* pěstované v přítomnosti 5-FU, jako přidání uridinu. Může to být způsobeno akumulací UTP při inhibici CTPS2 a následnou kompeticí s FdUTP o zabudování do RNA (Tan et al. 2011).

Při srovnávání efektu všech čtyř pyrimidinových nukleosidů (uridin, thymidin, cytidin a deoxycytidin) prokázaly cytidin a uridin vyšší účinnost, než thymidin a deoxycytidin. Deoxycytidin neprojevil žádný protektivní efekt a na rozdíl od thymidinu ani nesnižoval počáteční nárůst cell indexu v RTCA testu. Křivka buněk s deoxycytidinem tak věrně kopírovala křivku buněk se samotným 5-FU. Kombinace cytidinu s thymidinem prodlužuje viabilitu buněk stejně jako kombinace uridinu s thymidinem. Tento efekt je synergický, na rozdíl od aditivního efektu, kterého je dosaženo kombinací cytidinu s uridinem (tabulky 1 a 2) (Hartinger et al. 2015).

Positivní vliv cytidinu na toxicitu 5-FU u HaCaT keratinocytů je zcela v rozporu s výsledky pokusů na buňkách lidského kolorektálního karcinomu WiDr, u kterých nezabránil krátkodobě aplikovaný cytidin na rozdíl od uridinu inkorporaci 5-FU do RNA (van Groeningen et al. 1992). Přestože v našich pokusech vyšel cytidin jako ekvivalentně účinné antidotum při terapii 5-FU, není tento nukleosid vhodnou náhradou za uridin při lokální terapii PPE z praktických důvodů, neboť má nižší stabilitu, než uridin a je třeba jej uchovávat v chladu, což činí opakovanou aplikaci masti komplikovanější a pravděpodobně by tato nutnost vedla k nižší compliance pacientů.

Vzhledem k tomu, že deoxycytidin nezvyšuje významně metabolickou aktivitu buněk v přítomnosti thymidinu a 5-FU, není pravděpodobně důvodem krátkého přežívání buněk v přítomnosti 5-FU a thymidinu vlastní toxicita thymidinu, která je způsobena inhibicí ribonukleotid reduktasy, vede

k depleci deoxycytidinu a je reversibilní.

Jako potenciální antidotum byl zkoušen také uracil, který inhibuje enzym odbourávající 5-FU dihydropyridin dehydrogenasu (DPD) (Longley et al. 2003; Yen-Revollo et al. 2008). Naše výsledky potvrzují malý protektivní efekt, který je výrazně méně vyjádřen, než v případě uridinu. Tento efekt může být spojen buď s inhibicí DPD a následnou nižší produkcí degradačních produktů 5-FU, které podle některých autorů mohou stát za projevem toxicity 5-FU (Yen-Revollo et al. 2008; Zhang et al. 2012), nebo s využitím uracilu pro syntézu uridinu pomocí salvage pathway. Vzhledem k nízké účinnosti *in vitro* předpokládáme také, že v probíhající studii (ClinicalTrials.gov identifikace: NCT01100463) s 0,1 % uracilovou masťou v léčbě PPE nebude dosaženo významných úspěchů (1 % uracilová masť je registrována jako patent US 20050215514 A1).

Vzhledem k tomu, že některé studie se zabývaly také možným protektivním efektem pyridoxinu v léčbě PPE (Kang et al. 2010; Ota et al. 2014), testovali jsme rovněž jeho protektivní efekt na toxicitu 5-FU u HaCaT keratinocytů v přítomnosti 7,5 µg/mL (57,7 µM) 5-FU. V souladu s klinickými studiemi (Kang et al. 2010; Ota et al. 2014) jsme nezaznamenali v *in vitro* RTCA testu žádný protektivní efekt pyridoxinu.

Byly rovněž testovány primární keratinocyty, které na rozdíl od buněk linie HaCaT přežily až do 7. dne v koncentraci 15,6 mg/mL 5-FU (120 µM). Pro tyto buňky byl rovněž prokázán protektivní efekt uridinu v přítomnosti 5-FU. Naše výsledky tedy ukazují, že *primární keratinocyty jsou méně citlivé na 5-FU, než keratinocyty linie HaCaT a že u těchto buněk se projevuje protektivní efekt uridinu.*

6. Závěry

PPE je v současné době jedním z nejvýznamnějších nežádoucích účinků terapie fluoropyrimidiny (Lokich et al. 1989; Wolpin and Mayer 2008). Metodou volby v léčbě tohoto nežádoucího účinku je snížení dávky vyvolávajícího cytostatika (SPC_Xeloda 2006), nicméně v některých případech je nutné terapii pro závažnost PPE přerušit, čímž může dojít ke ztrátě účinné léčebné modality. Na Onkologické klinice Všeobecné fakultní nemocnice v Praze se od roku 2007 používá 10 % uridinová mast s klinickými úspěchy. Dle subjektivního hodnocení pacientů dochází ke zmírnění až odeznění projevů PPE u 2/3 pacientů (Netikova et al. 2009). Vzhledem k tomu, že efektivita této léčby není v literatuře spolehlivě doložena objektivními metodami, nelze vyloučit vliv placebo efektu. Dále nelze vyloučit terapeutický efekt samotného mastového základu. Z tohoto důvodu jsme si kladli za cíl ověřit *in vitro* efekt uridinu při aplikaci 5-FU na lidské keratinocyty. Zároveň jsme si kladli za cíl odhalit molekulární podstatu toxicity 5-FU na lidské keratinocyty, aby bylo možné na základě těchto informací cíleně vyvinout co nejefektivnější prostředek k lokální terapii PPE. Měřili jsme toxicitu 5-FU v přítomnosti různých modulátorů jeho účinku především uridinu, thymidinu a kalciumfolinátu. Za tímto účelem jsme použili 3 různé testy viability buněk: RTCA test umožňující průběžné měření adherence buněk k podkladu (Bonifas et al. 2010), MTT test umožňující měřit metabolickou aktivitu buněk (Mosmann 1983) a NTCA test umožňující zjišťovat morfologické odchylky při působení cytotoxických látek (Netikova et al. 2007).

V našich testech bylo potvrzeno, že uridin významně prodlužuje přežití buněk v přítomnosti 5-FU a antagonisuje jeden z hlavních mechanismů působení 5-FU, tedy jeho inkorporaci do RNA (Codacci-Pisanelli et al. 2008; Hartinger et al. 2012; Hartinger et al. 2015; Sawyer et al. 1984). Tyto výsledky svědčí pro to, že inkorporace 5-FU do RNA je základním mechanismem toxicity 5-FU. Za velice cenné považujeme potvrzení těchto výsledků rovněž na primárních keratinocytech. Pokud nebyl v médiu testovaných buněk uridin, inhibice TS se v rozvoji toxicity 5-FU u HaCaT keratinocytů neuplatňovala, neboť přidání thymidinu k buňkám nesnižovalo toxicitu 5-FU a přidání CF toxicitu 5-FU nezvyšovalo. Modulační aktivita

thymidinu a CF se však u některých buněčných linií významně mění v přítomnosti uridinu, neboť zde dochází ke změně mechanismu toxického působení 5-FU z inkorporace do RNA na inhibici TS (Codacci-Pisanelli et al. 2008). Zjistili jsme, že k tomuto efektu dochází rovněž u lidských keratinocytů buněčné linie HaCaT. V přítomnosti uridinu byla toxicita 5-FU zesilována přidáním CF a bylo možné ji výrazně snížit přidáním thymidinu (Hartinger et al. 2012). Primární mechanismus toxicity 5-FU u HaCaT keratinocytů je tedy inkorporace do RNA. Tento mechanismus může být „přepnut“ přidáním uridinu na inhibici TS. Protektivní efekt je výrazně více vyjádřen, pokud jsou antagonisovány oba dva hlavní mechanismy účinku 5-FU (RNA inkorporace a inhibice TS) při aplikaci uridinu a thymidinu zároveň.

Překvapením byla účinnost cytidinu, který byl v literatuře popsán v prevenci inkorporace 5-FU do RNA jako neúčinný (van Groeningen et al. 1992). V našich pokusech však prokázal cytidin stejný protektivní efekt, jako uridin. Deoxycytidin neprokázal žádný protektivní efekt, ani nezvyšoval protektivní účinek thymidinu. Toto zjištění svědčí pro to, že inhibice ribonukleotidreduktasy nadměrným množstvím thymidinu a následná deplece ostatních pyrimidinových nukleosidů se v případě HaCaT keratinocytů neuplatňuje (Hartinger et al. 2015). Dále jsme testovali uracil a pyridoxin. Uracil prokázal pouze velice malý protektivní efekt. Pyridoxin neprokázal žádný efekt, čímž se potvrdily i výsledky starších klinických studií (Kang et al. 2010; Ota et al. 2014).

Jako praktický výsledek našich testů navrhuji pro design případných klinických studií za účelem zvýšení efektivity terapie přidat do ochranné masti pro terapii PPE thymidin v koncentraci stejné, nebo poloviční oproti koncentraci uridinu. Dojde tak k antagonisování obou hlavních mechanismů účinku 5-FU a lze tedy očekávat větší terapeutickou účinnost. Záměna uridinu za cytidin by pravděpodobně vedla ke stejné terapeutické účinnosti, nicméně manipulace s výsledným přípravkem by byla složitější pro nižší stabilitu cytidinu (nutnost uchovávat v chladu), čímž by se pravděpodobně snižovala compliance pacientů.

7. Použitá literatura

- Advanced_Colorectal_Cancer_Meta-Analysis_Project (1992). "Modulation of fluorouracil by leucovorin in patients with advanced colorectal cancer: evidence in terms of response rate." *J Clin Oncol*, 10(6), 896-903.
- Akman, S. A., Ross, D. D., Rosen, H., Salinger, C., Andrews, P. A., Chou, F. E., and Bachur, N. R. (1981). "Growth inhibition by thymidine of leukemic HL-60 and normal human myeloid progenitor cells." *Cancer Res*, 41(6), 2141-2146.
- Atienzar, F. A., Tilmant, K., Gerets, H. H., Toussaint, G., Speeckaert, S., Hanon, E., Depelchin, O., and Dhalluin, S. (2011). "The use of real-time cell analyzer technology in drug discovery: defining optimal cell culture conditions and assay reproducibility with different adherent cellular models." *J Biomol Screen*, 16(6), 575-587.
- Biganzoli, L., Martin, M., and Twelves, C. (2002). "Moving forward with capecitabine: a glimpse of the future." *Oncologist*, 7 Suppl 6, 29-35.
- Blaschke, M., Blumberg, J. u., Wegner, U., Nischwitz, M., Ramadori, G., and Cameron, S. (2012). "Measurements of 5-FU Plasma Concentrations in Patients with Gastrointestinal Cancer: 5-FU Levels Reflect the 5-FU Dose Applied." *Journal of Cancer Therapy*, 3(1), 28-36.
- Bonifas, J., Scheitza, S., Clemens, J., and Blomeke, B. (2010). "Characterization of N-acetyltransferase 1 activity in human keratinocytes and modulation by para-phenylenediamine." *J Pharmacol Exp Ther*, 334(1), 318-326.
- Boukamp, P., Petrussevska, R. T., Breitkreutz, D., Hornung, J., Markham, A., and Fusenig, N. E. (1988). "Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line." *J Cell Biol*, 106(3), 761-771.
- Codacci-Pisanelli, G., Kralovanszky, J., van der Wilt, C. L., Noordhuis, P., Colofiore, J. R., Martin, D. S., Franchi, F., and Peters, G. J. (1997). "Modulation of 5-fluorouracil in mice using uridine diphosphoglucose." *Clin Cancer Res*, 3(2), 309-315.
- Codacci-Pisanelli, G., Noordhuis, P., van der Wilt, C. L., and Peters, G. J. (2008). "Selective protection by uridine of growth inhibition by 5-fluorouracil (5FU) mediated by 5FU incorporation into RNA, but not

- the thymidylate synthase mediated growth inhibition by 5FU-leucovorin." *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, 27(6), 733-739.
- Hartinger, J., Vesely, P., Matouskova, E., Argalacsova, S., Petruzzelka, L., and Netikova, I. (2012). "Local treatment of hand-foot syndrome with uridine/thymidine: in vitro appraisal on a human keratinocyte cell line HaCaT." *ScientificWorldJournal*, 2012, 421325.
- Hartinger, J., Vesely, P., Netikova, I., Matouskova, E., and Petruzzelka, L. (2015). "The protective effect of pyrimidine nucleosides on human HaCaT keratinocytes treated with 5-FU." *Anticancer Res*, 35(3), 1303-1310.
- Hartmann, H. R., and Bollag, W. (1986). "Modulation of the effects of fluoropyrimidines on toxicity and tumor inhibition in rodents by uridine and thymidine." *Med Oncol Tumor Pharmacother*, 3(2), 111-118.
- Hofheinz, R. D., Heinemann, V., von Weikersthal, L. F., Laubender, R. P., Gencer, D., Burkholder, I., Hochhaus, A., and Stintzing, S. (2012). "Capecitabine-associated hand-foot-skin reaction is an independent clinical predictor of improved survival in patients with colorectal cancer." *Br J Cancer*, 107(10), 1678-1683.
- Janusch, M., Fischer, M., Marsch, W., Holzhausen, H. J., Kegel, T., and Helmbold, P. (2006). "The hand-foot syndrome--a frequent secondary manifestation in antineoplastic chemotherapy." *Eur J Dermatol*, 16(5), 494-499.
- Juergen, B. (2004). "Letter to the editor - 5-FU induced palmar-plantar erythrodyesthesia – a hospital pharmacy developed "antidot." " *Journal of Oncology Pharmacy Practice*. , 10(57).
- Kamoshida, S., Matsuoka, H., Ishikawa, T., Maeda, K., Shimomura, R., Inada, K., and Tsutsumi, Y. (2004). "Immunohistochemical evaluation of thymidylate synthase (TS) and p16INK4a in advanced colorectal cancer: implication of TS expression in 5-FU-based adjuvant chemotherapy." *Jpn J Clin Oncol*, 34(10), 594-601.
- Kang, Y. K., Lee, S. S., Yoon, D. H., Lee, S. Y., Chun, Y. J., Kim, M. S., Ryu, M. H., Chang, H. M., Lee, J. L., and Kim, T. W. (2010). "Pyridoxine is not effective to prevent hand-foot syndrome associated with capecitabine therapy: results of a randomized, double-blind, placebo-controlled study." *J Clin Oncol*, 28(24), 3824-3829.

- Kaufman, E. R. (1984). "Resistance to 5-fluorouracil associated with increased cytidine triphosphate levels in V79 Chinese hamster cells." *Cancer Res*, 44(8), 3371-3376.
- Kroep, J. R., van Werkhoven, E., Polee, M., van Groeningen, C. J., Beeker, A., Erdkamp, F., Weijl, N., van Bochove, A., Erjavec, Z., Kapiteijn, E., Stiggelbout, A. M., Nortier, H. W., and Gelderblom, H. (2015). "Randomised study of tegafur-uracil plus leucovorin versus capecitabine as first-line therapy in elderly patients with advanced colorectal cancer--TLC study." *J Geriatr Oncol*, 6(4), 307-315.
- Leonard, R., Hennessy, B. T., Blum, J. L., and O'Shaughnessy, J. (2011). "Dose-adjusting capecitabine minimizes adverse effects while maintaining efficacy: a retrospective review of capecitabine for metastatic breast cancer." *Clin Breast Cancer*, 11(6), 349-356.
- Lokich, J. J., Ahlgren, J. D., Gullo, J. J., Philips, J. A., and Fryer, J. G. (1989). "A prospective randomized comparison of continuous infusion fluorouracil with a conventional bolus schedule in metastatic colorectal carcinoma: a Mid-Atlantic Oncology Program Study." *J Clin Oncol*, 7(4), 425-432.
- Longley, D. B., Harkin, D. P., and Johnston, P. G. (2003). "5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies." *Nat Rev Cancer*, 3(5), 330-338.
- Martin, D. S., Stolfi, R. L., Sawyer, R. C., Nayak, R., Spiegelman, S., Young, C. W., and Woodcock, T. (1980). "An overview of thymidine." *Cancer*, 45(5 Suppl), 1117-1128.
- Martin, D. S., Stolfi, R. L., Sawyer, R. C., Spiegelman, S., and Young, C. W. (1982). "High-dose 5-fluorouracil with delayed uridine "rescue" in mice." *Cancer Res*, 42(10), 3964-3970.
- Mosmann, T. (1983). "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays." *J Immunol Methods*, 65(1-2), 55-63.
- Netikova, I., Bursikova, E., Vesely, P., Prchalova, M., Kleibl, Z., and Matouskova, E. (2007). "A simple non-destructive test of cellular activity (NTCA) for in vitro assessment of cancer cell chemosensitivity/resistance." *Anticancer Res*, 27(4b), 2331-2337.
- Netikova, I., Sedláčková, E., Konopásek, B., and L., P. (2009). "Therapy of palmar-plantar erythrodysesthesia after continual fluoropyrimidin

- administration with 10% uridin ointment (ASCO Meeting Abstract)." *Journal of Clinical Oncology*, 27(15S (May 20 Supplement)).
- Nord, L. D., Stolfi, R. L., and Martin, D. S. (1992). "Biochemical modulation of 5-fluorouracil with leucovorin or delayed uridine rescue. Correlation of antitumor activity with dosage and FUra incorporation into RNA." *Biochem Pharmacol*, 43(12), 2543-2549.
- Osswald, H., and Youssef, M. (1979). "Potentiation of the chemotherapeutic action of 5-fluorouracil by combination with cytidine or guanosine on HRS-sarcoma." *J Cancer Res Clin Oncol*, 93(3), 241-244.
- Ota, M., Tatsumi, K., Suwa, H., Watanabe, J., Watanabe, K., Osada, S., Tanaka, K., Shoichi, F., Ichikawa, Y., Kunisaki, C., and Endo, I. (2014). "The Effect of Pyridoxine for Prevention of Hand-Foot Syndrome in Colorectal Cancer Patients with Adjuvant Chemotherapy Using Capecitabine: A Randomized Study." *Hepatogastroenterology*, 61(132), 1008-1013.
- Pritchard, D. M., Watson, A. J., Potten, C. S., Jackman, A. L., and Hickman, J. A. (1997). "Inhibition by uridine but not thymidine of p53-dependent intestinal apoptosis initiated by 5-fluorouracil: evidence for the involvement of RNA perturbation." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(5), 1795-1799.
- Sawyer, R. C., Stolfi, R. L., Spiegelman, S., and Martin, D. S. (1984). "Effect of Uridine on the Metabolism of 5-Fluorouracil in the CD8F 1 Murine Mammary Carcinoma System." *Pharm Res*, 1(2), 69-75.
- SPC_Xeloda (2006). "Xeloda 150mg and 500mg Film-coated Tablets - Summary of Product Characteristics (SPC) - (eMC)." Roche Products Limited.
- Tan, W. L., Bhattacharya, B., Loh, M., Balasubramanian, I., Akram, M., Dong, D., Wong, L., Thakkar, B., Salto-Tellez, M., Soo, R. A., Fichtner, I., Iacopetta, B., and Soong, R. (2011). "Low cytosine triphosphate synthase 2 expression renders resistance to 5-fluorouracil in colorectal cancer." *Cancer Biol Ther*, 11(6), 599-608.
- Umeda, M., and Heidelberger, C. (1968). "Comparative studies of fluorinated pyrimidines with various cell lines." *Cancer Res*, 28(12), 2529-2538.

- van Groeningen, C. J., Peters, G. J., and Pinedo, H. M. (1992). "Modulation of fluorouracil toxicity with uridine." *Semin Oncol*, 19(2 Suppl 3), 148-154.
- von Moos, R., Thuerlimann, B. J., Aapro, M., Rayson, D., Harrold, K., Sehoul, J., Scotte, F., Lorusso, D., Dummer, R., Lacouture, M. E., Lademann, J., and Hauschild, A. (2008). "Pegylated liposomal doxorubicin-associated hand-foot syndrome: recommendations of an international panel of experts." *Eur J Cancer*, 44(6), 781-790.
- Wolpin, B. M., and Mayer, R. J. (2008). "Systemic Treatment of Colorectal Cancer." *Gastroenterology*, 134(5), 1296-1310.
- Yen-Revollo, J. L., Goldberg, R. M., and McLeod, H. L. (2008). "Can inhibiting dihydropyrimidine dehydrogenase limit hand-foot syndrome caused by fluoropyrimidines?" *Clin Cancer Res*, 14(1), 8-13.
- Yun, J. A., Kim, H. C., Son, H. S., Kim, H. R., Yun, H. R., Cho, Y. B., Yun, S. H., Lee, W. Y., and Chun, H. K. (2010). "Oncologic outcome after cessation or dose reduction of capecitabine in patients with colon cancer." *J Korean Soc Coloproctol*, 26(4), 287-292.
- Zhang, R. X., Wu, X. J., Wan, D. S., Lu, Z. H., Kong, L. H., Pan, Z. Z., and Chen, G. (2012). "Celecoxib can prevent capecitabine-related hand-foot syndrome in stage II and III colorectal cancer patients: result of a single-center, prospective randomized phase III trial." *Ann Oncol*, 23(5), 1348-1353.

Seznam publikací

1. Publikace *in extenso*, které jsou podkladem disertace:

A) S impact faktorem:

Hartinger J, Vesely P, Netikova I, E. Matoušková and L. Petruželka: The protective effect of pyrimidine nucleosides on human HaCaT keratinocytes treated with 5-FU, *Anticancer Res*, 2015, IF: 1,826

J. Hartinger, P. Veselý, E. Matoušková, S. Argalacsová, L. Petruželka, and I. Netíková: Local Treatment of Hand-Foot Syndrome with Uridine/Thymidine: In Vitro Appraisal on a Human Keratinocyte Cell Line HaCaT, *TSWJ*, 2012, IF: 1,73

J. Hartinger, I. Netíková, P. Veselý, Z. Kleibl, E. Matoušková, L. Petruželka: Protective effect of uridine on keratinocytes treated with fluoropyrimidines, *Journal of Oncology Pharmacy Practice*, 2010, IF: 0,064 (abstrakt)

B) Bez impact faktoru:

J. Hartinger, I. Netíková, P. Veselý and E. Matoušková: Preklinické testy podporující léčbu palmární - plantární erythrodysesthesie 10% uridinovou mastí, *Onkologická farmacie*, 2012

Publikace *in extenso*, bez vztahu k tématu disertace:

Bez impact faktoru:

V. Bednářová, J. Hartinger: Intraperitoneální aplikace léčiv při peritoneální dialýze, *Budoucnost farmakoterapie v nefrologii*, Mladá fronta, Praha 2015