

Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Katedra Biochemie



**Vliv vandetanibu, lenvatinibu a ellipticinu na expresi
potkaních cytochromů P450 1A a 3A**

*The effect of vandetanib, lenvatinib and ellipticine on the
expression of rat cytochromes P450 1A and 3A*

Diplomová práce

Bc. Sandra Jelínková

Vedoucí práce: RNDr. Helena Dračínská, Ph.D.

Praha 2018

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením RNDr. Heleny Dračínské, Ph.D. a všechny použité prameny jsem řádně citovala.

V Praze dne:

Podpis:

Poděkování:

Ráda bych poděkovala své školitelce RNDr. Heleně Dračínské Ph.D. za její ochotu, trpělivost, připomínky a všechnen čas, který mi věnovala. Dále bych ráda poděkovala kolegům Bc. Kataríně Vávrové, Matúšovi Kolárikovi a Mgr. Radku Indrovi Ph.D. za pomoc při HPLC a Bc. Zuzaně Klusoňové za její spolupráci a zpříjemňování času v laboratoři. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat svému manželovi za podporu během psaní práce.

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

Abstrakt

V posledních letech se k léčbě nádorových onemocnění využívá biologická léčba způsobující inhibici tyrosinkinas, které mohou chybně regulovat některé signální dráhy. Příkladem takových inhibitorů je vandetanib a lenvatinib. Tyto dvě látky se využívají k léčbě nádorů štítné žlázy, protože inhibují receptory pro vaskulární růstový faktor nebo endotheliální růstový faktor, které mohou ovlivňovat růst a metastázi nádorů. Spolu s uvedenými inhibitory tyrosinkinas byl zkoumán i alkaloid ellipticin, který vykazuje protinádorové účinky na celou řadu nádorových onemocnění.

V rámci této diplomové práce byl studován vliv vandetanibu, lenvatinibu, ellipticinu a jejich kombinací na genovou a proteinovou expresi cytochromů P450 1A1, 1A2, 3A1 a 3A2, které patří mezi významné biotransformační enzymy, v játrech potkanů *in vivo*. Proteinová exprese byla sledována použitím metody Western blot s následnou imunodetekcí, genová exprese byla sledována pomocí kvantitativní PCR. Byla stanovena specifická aktivita CYP1A O-deethylací 7-ethoxyresorufinu, CYP1A1 oxidací Sudanu, CYP1A2 O-demethylací 7-methoxyresorufinu a CYP3A 6 β -hydroxylací testosteronu. Dále byl sledován vliv jednotlivých látek na přeměnu vandetanibu, lenvatinibu a ellipticinu jaterními mikrosomy z premedikovaných potkanů.

Bylo potvrzeno, že ellipticin výrazně indukuje expresi CYP1A1 v játrech. Tento indukční potenciál ellipticinu nebyl zásadně ovlivněn ani jeho společným podáním s vandetanibem nebo lenvatinibem. Významný nárůst exprese vyvolaný podáním ellipticinu byl pozorován i u CYP1A2. Doposud nebylo nic známo o vlivu studovaných inhibitorů tyrosinkinas na expresi cytochromů P450. Jak vandetanib tak lenvatinib zvýšily genovou a proteinovou expresi CYP1A1, nicméně s mnohem menší účinností než ellipticin. Žádný vliv na expresi nebyl pozorován u CYP1A2. Všechny studované látky, inhibitory tyrosinkinas i ellipticin, způsobily mírné zvýšení genové exprese CYP3A1 a aktivity tohoto enzymu.

Při přeměně ellipticinu jaterními mikrosomy z premedikovaných potkanů došlo k nárůstu tvorby metabolitu 9-hydroxyellipticinu při použití mikrosomálních frakcí z jater potkanů vystavených ellipticinu, vykazujících zvýšenou aktivitu CYP1A. Tento výsledek potvrzuje majoritní roli CYP1A1/2 v této metabolické reakci.

Klíčová slova: vandetanib, lenvatinib, ellipticin, cytochromy P450, inhibitory tyrosinkinas

Abstract

In recent years, the inhibition of tyrosine kinases, which may incorrectly regulate some signaling pathway has been used to treat cancer as so-called biological therapy. An example of such inhibitors are vandetanib and lenvatinib. These two substances are used to treat thyroid gland tumors because they affect vascular growth factor receptor or endothelial growth factor receptor that can regulate tumor growth and metastasis. Ellipticine, which has anti-tumor effects on lots of tumor disease, has been investigated in this study together with vandetanib and lenvatinib.

In this diploma thesis, the effect of mentioned tyrosine kinase inhibitors, ellipticine and their combinations on gene and protein expression of CYP1A1, 1A2, 3A1 and 3A2 in rat liver *in vivo* was determined. Protein expression was studied using Western blot method with immunodetection. Gene expression was assessed by quantitative PCR. Moreover, the effect of tested substances and their combinations on CYP1A activity (measured as 7-ethoxyresorufin *O*-deethylation), CYP1A2 activity (measured as 7-methoxyresorufin *O*-demethylation), CYP1A1 activity (measured as Sudan I oxidation), CYP3A specific activity (measured as testosterone 6 β -hydroxylation) and ellipticine, vandetanib, lenvatinib metabolism was determined.

It has been confirmed that ellipticine significantly induces the expression of CYP1A1 in liver. This induction potential of ellipticin was not significantly affected by its co-administration with vandetanib or lenvatinib. A significant increase in ellipticine-induced expression was observed in CYP1A2. The effect of the tyrosine kinase inhibitors on cytochrome P450 expression has not yet been known. Both vandetanib and lenvatinib increased the gene expression and protein expression of CYP1A1, however, with much less efficacy than ellipticin. No effect on expression was observed for CYP1A2. All studied, inhibitors of tyrosine kinases and ellipticine, caused a slight increase in CYP3A1 gene expression and enzyme activity. In the conversion of ellipticin from hepatic microsomes from premedicated rats, the formation of 9-hydroxyellipticine metabolite increased with the use of microsomal liver fractions of rats exposed to ellipticine, which showed increased CYP1A activity. This result confirms the significant role of CYP1A1/2 in this metabolic response. (In Czech)

Key words: vandetanib, lenvatinib, ellipticine, cytochromes P450, tyrosine kinase inhibitors

Obsah

1.	Úvod.....	12
1.1.	Nádory štítné žlázy.....	12
1.1.1.	Diferencované karcinomy štítné žlázy	12
1.1.2.	Medulární karcinom štítné žlázy	13
1.2.	Proteinové tyrosinkinasy	14
1.2.1.	Receptorové tyrosinkinasy	14
1.2.2.	Nereceptorové tyrosinkinasy	15
1.3.	Regulace funkce tyrosinkinas	16
1.4.	Inhibitory tyrosinkinas	16
1.4.1.	Cíle inhibice tyrosinkinas	16
1.4.2.	Lenvatinib.....	17
1.4.2.1.	Metabolismus lenvatinibu	18
1.4.3.	Vandetanib.....	19
1.4.3.1.	Metabolismus vandetanibu.....	20
1.5.	Ellipticin.....	21
1.5.1.	Metabolismus ellipticinu	23
1.6.	Cytochromy P450.....	23
1.6.1.	Nomenklatura cytochromů P450.....	24
1.6.2.	Inducibilita cytochromů P450	24
1.6.3.	Vliv cytochromů P450 na metabolismus karcinogenů.....	25
1.6.4.	Cytochromy P450 1A.....	25
1.6.5.	Cytochromy P450 3A.....	26
2.	Cíl práce.....	27
3.	Materiály a metody	28
3.1.	Použité materiály a chemikálie	28
3.2.	Použité přístroje	29

3.3.	Experimentální postupy	32
3.3.1.	Vystavení experimentálních zvířat zkoumaným látkám	32
3.3.2.	Izolace mikrosomů	33
3.3.3.	Stanovení množství proteinů	34
3.3.4.	Stanovení množství cytochromu P450	35
3.3.5.	SDS-PAGE elektroforéza	36
3.3.6.	Metoda přenosu proteinů „Westernblotting“ a imunodetekce	37
3.3.7.	Oxidace Sudanu I – stanovení aktivity CYP1A1	38
3.3.8.	O-deethylace 7-ethoxyresorufinu – stanovení aktivity CYP1A	39
3.3.9.	O-demethylace 7-methoxyresorufinu – stanovení aktivity CYP1A2 ..	40
3.3.10.	6-β-hydroxylace testosteronu – stanovení aktivity CYP3A	41
3.3.11.	Přeměna ellipticinu jaterními mikrosomy	42
3.3.12.	Přeměna lenvatinibu jaterními mikrosomy	43
3.3.13.	Přeměna vandetanibu jaterními mikrosomy	44
3.3.14.	Izolace RNA	45
3.3.15.	Horizontální elektroforéza RNA na agarosovém gelu	46
3.3.16.	Stanovení koncentrace a čistoty RNA	47
3.3.17.	Reverzní transkripce – syntéza cDNA	47
3.3.18.	Kvantitativní PCR	48
4.	Výsledky	51
4.1.	Charakterizace izolovaných mikrosomů	51
4.2.	Charakterizace izolované RNA	51
4.3.	Vliv vandetanibu, lenvatinibu a ellipticinu na expresi cytochromů P450 podrodiny 1A	54
4.4.	Vliv vandetanibu, lenvatinibu a ellipticinu na expresi cytochromů P450 podrodiny 3A	60
4.5.	Studium přeměny vandetanibu, lenvatinibu a ellipticinu	63

5.	Diskuze	67
6.	Závěr	71
7.	Seznam použité literatury	73

Seznam použitých zkratk

AhR	receptor pro aromatické uhlovodíky, z angl. „aryl hydrocarbon receptor“
ALP	alkalická fosfatasa
APS	persíran amonný
AO	aldehydoxidas
ATP	adenosintrifosfát
BCIP	5-bromo-4-chloro-3-indolylfosfát
BCR-ABL	„breakpoint cluster region protein – Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1“
BSA	bovinní sérový albumin
CAR	konstitutivní adrostanový receptor z angl. „constitutive adrostan receptor“
cDNA	komplementární deoxyribonukleová kyselina
CYP	cytochrom P450
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DMSO	dimethylsulfoxid
EGFR	receptor pro epidermální růstový faktor, z angl. „epidermal growth factor receptor“
EROD	<i>O</i> -deethylace 7-ethoxyresorufinu
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv z angl. „Food and drug administration“
FMO	flavinové monooxygenasy
GAPDH	glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenasa
GNDF	receptor neurotrofických faktorů odvozených od gliálních buněk, z angl. „glial cell line-derived neurotrophic factor“

GSH	glutathion
Her-2	lidský epidermální růstový faktor 2, z angl. „human epidermal growth factor receptor – 2“
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie z angl. „high pressure liquid chromatography“
Hsp90	„heat-shock protein 90“
MAPK	Map kinasy = mitogenem aktivované proteinkinasy, z angl. „mitogen-activated protein kinases“
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
MROD	<i>O</i> -demethylace 7-methoxyresorufinu
MTC	medulární karcinom štítné žlázy
NADPH	nikotinaminadenin dinukleotid fosfát
NBT	nitrobluetetrazolium
PCR	polymerázová řetězová reakce z angl. Polymerase chain reaction“
PDGFR	receptor pro růstový faktor odvozený od krevních destiček z angl. „platelet-derived growth factor receptor“
PI3K	fosfatidylinositol-3-kináza
PVDF	polyvinylidenfluorid
PXR	pregnanový receptor X z angl. Pregnan X receptor
RAS/MAP	fosforylační kaskáda kináz
RET	receptor neurotrofických faktorů odvozených od gliálních buněk
RNA	ribonukleová kyselina
RPM	otáčky za minutu, z angl. „revolutions per minute“
rRNA	ribosomální ribonukleová kyselina

RT	reverzní transkripce
SDS	dodecylsulfát sodný
SDS-PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného
TEMED	tetramethylendiamin
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
VEGFR	receptor pro vaskulární endoteliální růstový faktor, z angl. „vascular endothelial growth factor receptor“
WHO	světová zdravotnická organizace, z angl. „world health organisation“

1. Úvod

Každý rok zemře v České republice na rakovinu 27 000 lidí, což znamená, že přibližně každých 20 minut v naší zemi někdo tomuto onemocnění podlehne. Ročně nově onemocní přes 90 000 obyvatel ČR. Mezi nejčastější nádorová onemocnění patří karcinomy tlustého střeva a konečníku, nádor prsu a zhoubné nádory plic a prostaty¹. Rakovina štítné žlázy se řadí mezi méně běžná nádorová onemocnění. V roce 2013 patřila ČR podle světové zdravotnické organizace (WHO) na 13. místo z hlediska mortality pacientů s rakovinou štítné žlázy². I když za posledních 20 let v ČR mortalita u nádorů štítné žlázy mírně klesla, incidence narůstá. Průměrný věk pacientů s diagnostikovaným nádorem štítné žlázy byl 65-69 let³.

Vzhledem k tomu, že většina nádorových procesů je způsobena chybnou regulací signálních drah buňky, začalo se k léčbě nádorových onemocnění používat malých organických molekul, které mohou inhibovat celé signální dráhy. Široké využití mají především inhibitory tyrosinkinasy, které se uplatňují například při léčbě nádorů štítné žlázy^{4,5}.

V rámci této diplomové práce se prováděly *in vivo* experimenty se dvěma inhibitory tyrosinkinasy vandetanibem a lenvatinibem v kombinaci s cytostatikem ellipticinem.

1.1. Nádory štítné žlázy

Nádory štítné žlázy patří mezi nejčastější endokrinní tumory. V Evropě jsou s ročním výskytem 6,3 pacientů na 100 000 obyvatel jedním z méně častých nádorových onemocnění⁶. Většina diagnostikovaných nádorů jsou diferencované nádory štítné žlázy. Mezi další formy nádorů štítné žlázy řadíme medulární karcinom štítné žlázy, lymfom štítné žlázy, anaplastický karcinom či karcinom Hurtleho buněk^{7,8}.

1.1.1. Diferencované karcinomy štítné žlázy

Mezi diferencované karcinomy štítné žlázy můžeme zařadit karcinom folikulární, který rychle roste a může se rozšiřovat do kostí či plic. Dále karcinom papilární, který roste pomalu, ale často u něj dochází k recidivě. Papilární karcinom převládá u všech diferencovaných nádorů štítné žlázy. Za snížení incidence u tohoto nádoru může převážně jodace potravin. Pro vyléčení tohoto nádoru je na území ČR nezbytná totální tyreoidektomie a také odstranění všech uzlin z krční oblasti⁹. Následuje terapie pomocí radioaktivního jódu ¹³³I, který ničí případné metastázy. Kombinace tyreoidektomie a následné radioterapie

jodem snižuje pravděpodobnost vrácení nádoru. Pacient potom celoživotně užívá syntetická analoga hormonů štítné žlázy, čímž se nahradí chybějící hormony a inhibuje se syntéza thyreotropního hormonu v hypofýze⁷.

1.1.2. Medulární karcinom štítné žlázy

Medulární karcinom štítné žlázy vychází z neuroendokrinních buněk C, neboli parafolikulárních buněk tvořících kalcitonin¹⁰. Patří mezi karcinomy s nízkou incidencí. Toto onemocnění má dvě formy, sporadickou a familiární. Sporadická forma je častější, zatímco familiární je děděna autozomálně dominantně a má tři varianty. První variantou je familiární medulární karcinom štítné žlázy, dalším typem je mnohočetná endokrinní neoplazie typu 2A a posledním typem je mnohočetná endokrinní neoplazie typu 2B (cit.¹¹).

Léčba probíhá operačním vyjmutím štítné žlázy v kombinaci s radiojodovou terapií a doživotním dodáním inhibitorů thyreotropního hormonu¹⁰. Včasné určení diagnózy prodlužuje pacientům život až o 10 let. V pokročilých stádiích je již nádor obvykle neoperovatelný a nereaguje na chemoterapeutika. Poslední poznatky naznačují, že pozměnění v signálních drahách úzce souvisí s medulárním karcinomem štítné žlázy. Problémem nových léčiv, která inhibují signální dráhy, však bývá, že si karcinom po určité době vůči inhibitorům vytvoří rezistenci. Tím dojde ke vzniku nových signálních drah, které nejsou inhibovány léčivem. Kombinovaná léčba více tyrosinkinásových inhibitorů by tak mohla mít příznivější výsledky při inhibici karcinogeneze¹².

Primárním činitelem při medulárním karcinomu štítné žlázy jsou defektní tyrosinkinasy RET (receptor patřící do podrodiny neurotrofických faktorů odvozených od gliálních buněk). Tímto onkogenem kódovaná tyrosinkinasa se váže k GNDF (receptor neurotrofických faktorů odvozených od gliálních buněk, z angl. „glial cell line-derived neurotrophic factor“) proteinům. Kaskáda reakcí pak vede k aktivaci RAS/MAPK (kaskáda kináz, v každém kroku předcházející kináza aktivuje tu následující) a fosfatidylinositol-3'-kinasy (PI3K)/Akt signálních drah. Tyto dráhy jsou zásadní pro diferenciaci nádoru a buněčný růst. Toto prokazuje důležitost inhibice tyrosinkinasy RET. Při vývoji a progresi nádoru hrají roli i ostatní tyrosinkinasy, například tyrosinkinasa EGFR (receptor pro epidermální růstový faktor z angl. „epidermal growth factor receptor“), která je podobná RET a je zodpovědná za regulaci buněčného růstu, proliferaci nádoru a apoptózu. EGFR je často mnohonásobně exprimován v různých typech rakoviny štítné žlázy a hraje roli při vývoji rakoviny a jejím postupu. Další důležitou tyrosinkinasou je VEGFR (receptor pro

vaskulární endoteliální růstový faktor, z angl. „vascular endothelial growth factor receptor“). Proteiny, které jsou sekretovány nádorovými buňkami, se chovají jako ligandy pro VEGFR a upřednostňují signální dráhy, které stimulují buněčnou proliferaci, migraci a přežívání nádorových buněk¹².

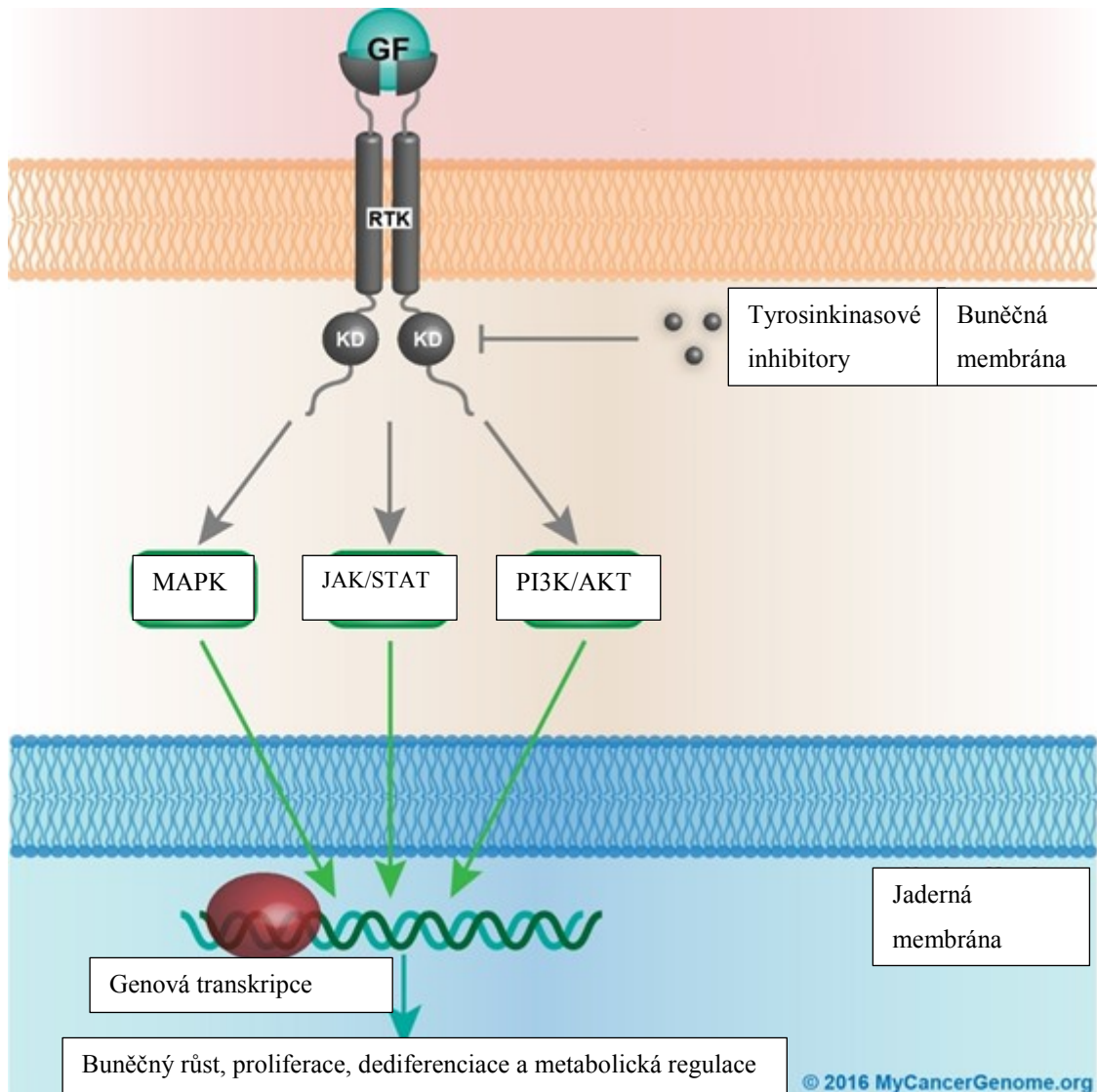
1.2. Proteinové tyrosinkinasy

Velká část nádorových onemocnění je způsobena chybnou regulací některých ze signálních drah buňky. Následkem takové poruchy může být abnormalita při buněčném dělení nebo inhibice apoptózy. Například může dojít k chybné regulaci proteinkinasy – tyrosinkinasy^{4,5}.

Proteinové tyrosinkinasy jsou enzymy, které katalyzují přenos fosfátu z ATP na tyrosinové zbytky v polypeptidech. Tyrosinkinasy jsou zodpovědné především za buněčnou dediferenciaci (ztráta schopnosti vyžrávat) a proliferaci (množení buněk). Proteinové tyrosinkinasy můžeme rozdělit do dvou hlavních skupin – receptorové a nereceptorové tyrosinkinasy¹³.

1.2.1. Receptorové tyrosinkinasy

Receptorové kinasy se vyznačují přítomností extracelulární domény, která může vázat ligand tohoto allosterického enzymu. Tato doména tedy reaguje na přítomnost ligandu a váže se prostřednictvím hydrofobní domény, která prochází buněčnou membránou, na intracelulární doménu. Katalytickou aktivitu tohoto enzymu má pouze intracelulární doména. Po navázání ligandu, což je nejčastěji nějaký specifický růstový faktor, dojde k aktivaci receptoru. Ligand, který je navázaný na extracelulární doméně, způsobí konformační změnu tyrosinkinasy, což může vést až k dimerizaci tyrosinkinasy. Pokud dojde k dimerizaci dvou tyrosinkinasy, dochází mezi nimi k vzájemné autofosforylaci. Následkem fosforylace tyrosinů dojde v intracelulární doméně ke vzniku nových vazebných míst, která umožňují navázání dalších intracelulárních proteinů s SH2 doménou, která váže fosforylovaný tyrosin, což spustí signální kaskádu. Příkladem proteinů, které využívají tuto signální dráhu jsou Ras-proteiny¹⁴. Na obrázku 1 na straně 15 jsou zobrazeny tyrosinkinasy a jejich signální dráhy.



Obrázek 1: Tyrosinkinasové receptory a jejich signální dráhy, převzato a upraveno z cit.¹⁵. GF – růstový faktor („growth factor“), RTK – receptorové tyrosinkinasy, KD – kinasové domény.

1.2.2. Nereceptorové tyrosinkinasy

Nereceptorové tyrosinkinasy nemají extracelulární ani transmembránovou doménu. Kinasová doména je sekvence přibližně 300 aminokyselin vyznačující se enzymovou aktivitou. Tato doména má stejnou sekvenci u všech nereceptorových tyrosinkin. Každá nereceptorová tyrosinkinasa obsahuje intracelulární podjednotky SH1, SH2 a SH3. Stejně jako u receptorových tyrosinkin, dochází ke spuštění signální kaskády při fosforylaci

tyrosinových zbytků. Příkladem takové tyrosinkinasy je pp 60^{c-src} (protoonkogen protein 60 c-src)¹⁴.

1.3. Regulace funkce tyrosinkinas

Za normálních podmínek se receptorové tyrosinkinasy vyskytují v buňce bez navázaného ligandu, nefosforylované a tedy neaktivní. K aktivaci dochází po vazbě ligandu a následné autofosforylaci a dimerizaci. V aktivační smyčce dochází k přeorientování aminokyselinových zbytků, což vede k zvýšení katalytické funkce enzymu a následkem tohoto může dojít k aktivaci mnoha signálních drah. Fosfatasa naopak inaktivuje tyrosinkinasy hydrolýzou fosforylovaného tyrosinu¹³.

Jedním z mechanismů spuštění nádorového bujení je fúze receptorových či nereceptorových tyrosinkinas s jejich partnerskými proteiny. Díky této fúzi dochází k oligomerizaci tyrosinkinas, i když není přítomný ligand. Tato oligomerizace spouští autofosforylaci a díky tomu dojde k aktivaci tyrosinkinas. Příkladem takového mechanismu je fúzní protein BCR-ABL, u kterého při chronické myeloidní leukémii dochází k tetramerizaci domén BCR, čímž dochází k autofosforylaci¹³.

1.4. Inhibitory tyrosinkinas

Pro léčbu nádorů se začalo využívat malých molekul, které mohou inhibovat celou signální dráhu. Mezi nejčastější patří právě inhibice tyrosinkinas^{4,5}.

Průlomem ve využívání inhibitorů tyrosinkinas jako protinádorových léčiv bylo použití léčiva imatinibu jako inhibitoru BCR-ABL-tyrosinkinas při léčbě chronické myeloidní leukémie. Tímto objevem se vývoj nových protinádorových léků zaměřil na inhibitory tyrosinkinas¹⁶.

1.4.1. Cíle inhibice tyrosinkinas

Při vývoji nových inhibitorů tyrosinkinas je snahou nalézt molekuly, které inaktivují cílenou kinasu s co nejmenšími vedlejšími účinky. Jednou z možností je využití molekul, které interferují s vazbou ATP nebo substrátu na enzym. Další možností je inaktivace tyrosinkinasy, čímž se zabrání její dimerizaci (například endocytosou receptoru s navázaným růstovým faktorem). Dále je také možné inhibovat tyrosinkinasy snížením stability Hsp90. Tím se naruší vazebné schopnosti proteinů BCR-ABL nebo Her-2, jejichž následkem dojde k degradaci daného enzymu. Dalším mechanismem inhibice tyrosinkinas je inhibice pomocí protilátek. Ty mohou neutralizovat ligandy nebo receptory tyrosinkinas¹³.

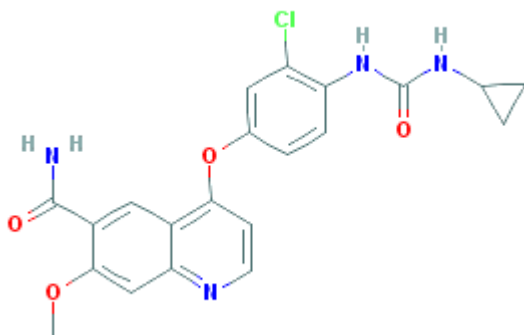
V rámci této diplomové práce se pracovalo se dvěma inhibitory tyrosinkinás – lenvatinibem a vandetanibem.

1.4.2. Lenvatinib

Lenvatinib (Lenvima[®], E7080, obrázek 2) je inhibitor tyrosinkinás s molekulovou hmotností 427 g/mol. Tento inhibitor tyrosinkinás cílí na receptory VEGFR1-3, FGFR1-4, RET a PDGFR (receptor pro růstový faktor odvozený od krevních destiček)^{6,8,17}. Lenvatinib je využíván především pro léčbu progresivního diferencčního nádoru štítné žlázy, který nereaguje na léčbu radioaktivním jodem. V kombinaci s everolimem, který je také inhibitorem tyrosinkinás, se používá pro léčbu pokročilého nádoru ledvin, který neodpovídá na léčbu zacílenou na VEGFR. Jako inhibitor tyrosinkinás může ovlivňovat endotheliální buňky, které mohou způsobit nežádoucí efekty jako trombózu, krvácení či hypertenzi^{18,19}.

Ve třetí fázi klinického testování bylo denně podáváno 261 pacientům 24 mg lenvatinibu a 131 pacientům stejné množství placeba. Na konci výzkumu bylo prokázáno, že pacienti, kterým byl podáván lék, měli prodlouženou dobu života o 15 měsíců oproti pacientům s placebem. Mezi vedlejší účinky lenvatinibu patřila hypertenze, průjem, únava a snížení váhy^{8,18}.

V únoru 2015 byl lenvatinib schválen FDA jako léčivo pro lokálně se opakující nebo metastatický progresivní diferencční nádor štítné žlázy po léčbě radioaktivním jodem¹⁷.

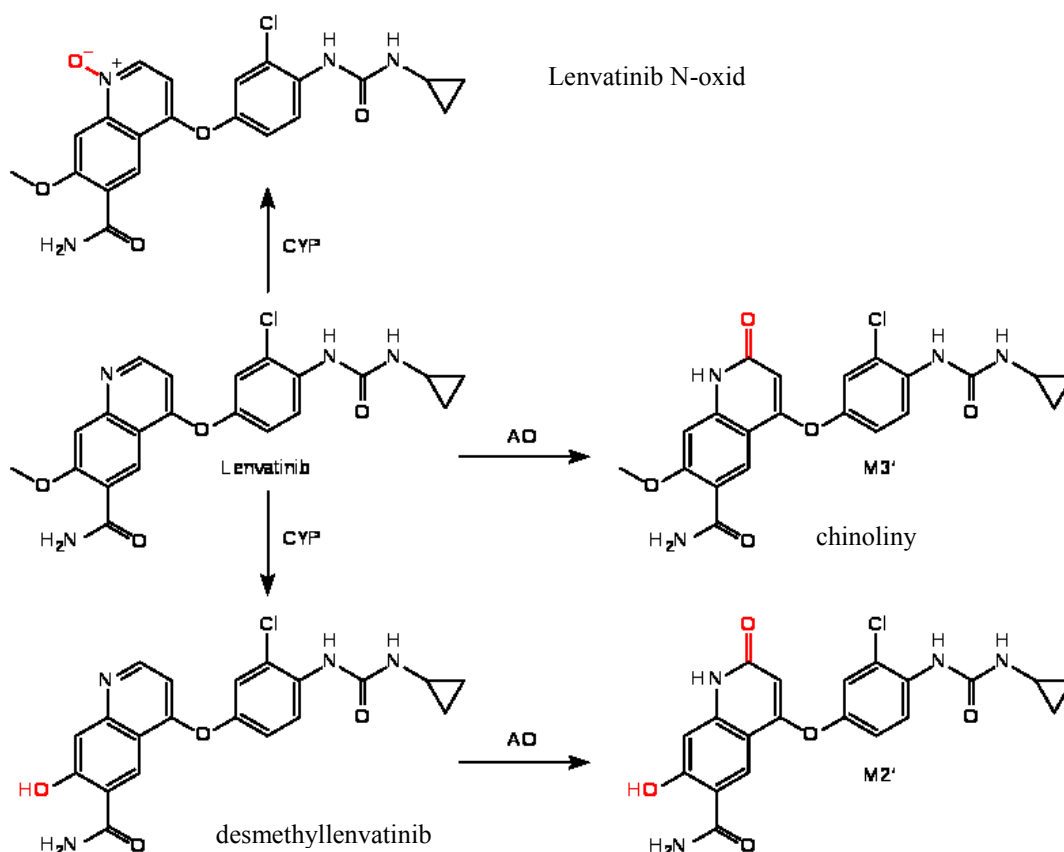


Obrázek 2: *Struktura lenvatinibu, převzato z cit.²⁰*

1.4.2.1. Metabolismus lenvatinibu

Metabolismus lenvatinibu (obrázek 3) byl prokázán jak u člověka, tak u zvířat. Lenvatinib je metabolizován cytochromem P450 (CYP) 3A4 na desmethyllevatinib a cytochromy P450 na lenvatinib N-oxid. Dále je lenvatinib metabolizován pomocí aldehydoxidas na metabolity chinolinony, které se vyskytují ve výkalech. Po konjugaci s glutathionem (GSH) dochází k hydrolýze GSH konjugátů na S-konjugáty. Ty se mohou dále přeměňovat a konjugovat s N-acetyltransferázami^{21,22}. Role cytochromů P450 v metabolismu lenvatinibu byla prokázána u lidí i u zvířat (potkan, pes, opice), zatímco metabolismus pomocí aldehydoxidas byl pozorován pouze u lidí a opic. Metabolismus lenvatinibu pomocí konjugace s glutathionem byl prokázán pouze u makaků²¹.

Poločas lenvatinibu je asi 28 hodin. Po podání se dvě třetiny vyloučí výkaly a jedna třetina močí.¹⁸



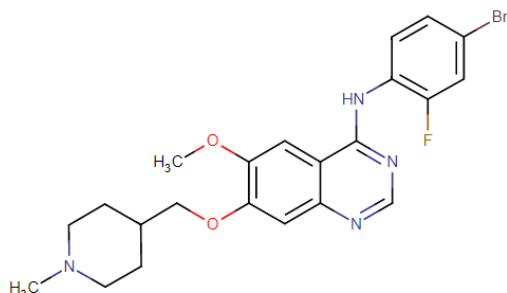
Obrázek 3: Metabolismus lenvatinibu, převzato z cit.²³. CYP – přeměna pomocí cytochromu P450, AO – aldehydoxidas, M3' a M2' – metabolity, které vznikají přeměnou pomocí aldehydoxidas a jsou vylučovány výkaly.

1.4.3. Vandetanib

Vandetanib (ZD6474, obrázek 4, str. 20) je orální léčivo o molekulové hmotnosti 475,36 g/mol. Vandetanib byl vynalezen firmou AstraZeneca. Jedná se o tyrosinkinasový inhibitor, který cílí na receptory RET, VEGFR2 a EGFR^{12,24,25}. Vandetanib se selektivně zaměřuje na signální dráhy, které jsou důležité pro růst nádoru a angiogenezi. Nemá přímý cytotoxický účinek na epitelální buňky, stejně jako ostatní inhibitory tyrosinkinas. Toto léčivo bylo vyrobeno pro léčbu některých druhů nádorů, hlavně pro medulární karcinom štítné žlázy (MTC). Většina mutantů RET onkoproteinů prokázala senzitivitu na vandetanib, pokud ale dojde k záměně valinu 804 za leucin či methionin (mnohočetná endokrinní neoplazie typu 2), stane se RET rezistentní vůči tomuto tyrosinkinásovému inhibitoru. Pokud je RET inhibován, dochází ke stimulaci EGFR, který kompenzuje RET, a to částečnou aktivací MAPK dráhy. Z toho vyplývá, že při léčbě vandetanibem je dobré využít duální inhibici RET a EGFR¹². Dochází také ke zvýšení exprese VEGFR, což je spojováno se zvýšeným růstem a invazivitou nádoru. Inhibitory VEGFR tak mohou mít protinádorovou aktivitu při MTC²⁶.

Úspěch vandetanibu byl zaznamenán již ve druhé fázi klinického testování při léčbě pokročilé a metastázované MTC. Pacientům bylo denně podáváno 300 mg vandetanibu. V této studii došlo ke stabilizaci nádoru u 73 % respondentů a k částečné odpovědi na léčbu vandetanibem u 20 % respondentů. Nejběžnější nežádoucí účinky byly průjem, vyrážka, únava a nevolnost²⁶.

Ve třetí fázi klinického testování vandetanibu byli testováni muži, kteří měli v pokročilém stádiu medulární karcinom štítné žlázy. V této studii bylo denně podáváno 231 pacientům 300 mg vandetanibu a 100 pacientům 300 mg placeba. V době ukončení klinické studie bylo období přežití u pacientů léčených vandetanibem 30,5 měsíce a u pacientů, kterým bylo podáváno placebo, 19,5 měsíce. Mezi časté nežádoucí účinky patřily průjem, vyrážka, nevolnost a hypertenze²⁷. V dubnu 2011 FDA, na bázi výsledků klinických studií, schválila vandetanib jako léčivo medulárního karcinomu štítné žlázy¹².

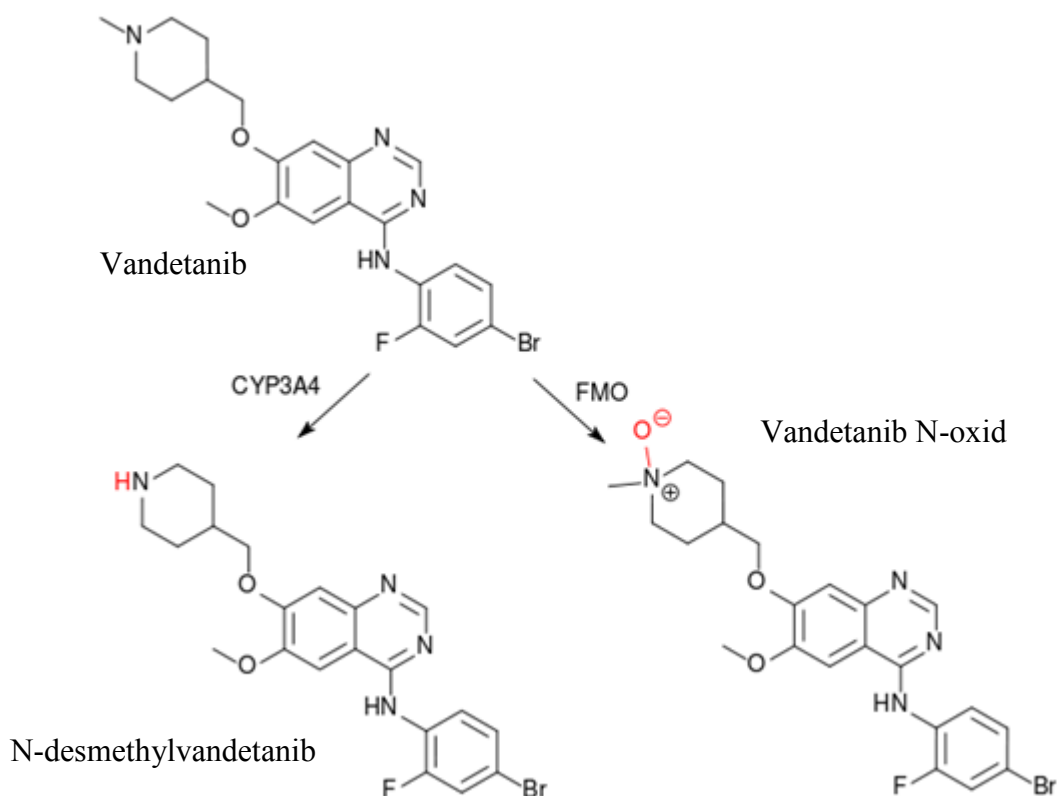


Obrázek 4: *Struktura vandetanibu, převzato z cit.*²⁸

1.4.3.1. Metabolismus vandetanibu

In vitro studie ukazují, že hlavním enzymem metabolismu vandetanibu je CYP3A4. Vandetanib je přeměňován CYP3A4 na N-desmethylvandetanib a flavinovými monooxygenasami v ledvinách (FMO1) a v játrech (FMO3) na vandetanib N-oxid (obrázek 5, str. 21). Pomocí radioaktivně značeného vandetanibu byla sledována přítomnost N-desmethylvandetanibu a vandetanibu N-oxidu v plasmě, moči a výkalech²⁵.

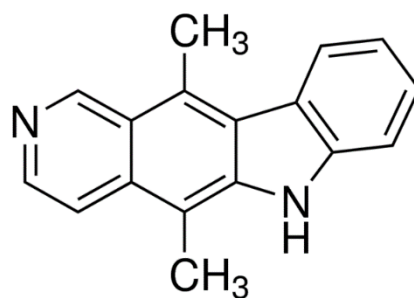
N-desmethylvandetanib má podobnou účinnost jako vandetanib, zatímco vandetanib N-oxid má oproti N-desmethylvandetanibu 50x nižší efektivitu a tím pádem i nižší terapeutickou účinnost. Protože je vandetanib metabolizován CYP3A4, je pro jeho metabolismus zásadní přítomnost látek, které mohou daný enzym inhibovat či indukovat. Tato indukce či inhibice by mohla mít zásadní dopad na léčbu pacienta a zmírnění vedlejších účinků²⁵.



Obrázek 5: Schéma metabolismu vandetanibu pomocí CYP3A4 a flavinových monooxygenas (FMO) na N-desmethylvandetanib a vandetanib N-oxid, převzato a upraveno z cit.²⁹

1.5. Ellipticin

V rámci této diplomové práce bylo vedle inhibitorů tyrosinkinasy studováno cytostatikum ellipticin. Ellipticin (obrázek 6, str. 22) je alkaloid, který je obsažen v rostlinách čeledi *Apocynaceae* (například *Ochrosia elliptica*)^{30–33}. Ellipticin a jeho deriváty vykazují protinádorové účinky na celou řadu nádorových onemocnění, jako je leukémie, lymfosarkom, melanom, rakovina plic, stěv, jater, prsu atd.^{30,33}. Cytotoxické působení ellipticinu způsobuje, že tato látka a její deriváty mohou interagovat s řadou regulačních molekul buněčného cyklu. Mohou interagovat s DNA a s některými kinasami, také indukují mitochondriální apoptickou cestu. Omezením ellipticinu v terapeutickém použití je jeho nízká rozpustnost a nežádoucí vedlejší účinky^{30,32}.



Obrázek 6: *Struktura ellipticinu, převzato z cit.*³⁴

Zastavení buněčného cyklu působením ellipticinu je způsobeno především poškozením DNA. Hlavní mechanismy způsobující poškození DNA jsou interkalace do DNA, inhibice topoisomerasy II, tvorba kovalentních sloučenin s DNA po enzymové aktivaci pomocí cytochromů P450 nebo peroxidas³⁰⁻³³. Ellipticin může iniciovat apoptosu mimo jiné tím, že způsobuje depolarizaci mitochondriální membrány, což vyvolá uvolnění cytochromu c a faktoru vyvolávajícího apoptózu. Ellipticin působí také jako odpráhovač oxidační fosforylace, čímž dochází k narušení energetické rovnováhy buňky³⁰⁻³³.

To, že se ellipticin tvarem molekuly podobá komplementárnímu páru bází purin-pyrimidin, umožňuje jeho snadnou interkalaci do dvoušroubovice DNA. Hydrofóbní a aromatický charakter molekuly ellipticinu vede k interakci s hydrofóbními oblastmi v molekule DNA. Vazba DNA-ellipticin způsobuje rozvolnění dvoušroubovice, což vede k narušení replikace a transkripce³⁰⁻³³. Interkalace ellipticinu do molekuly DNA je jedním z nejdůležitějších mechanismů protinádorového působení³⁰.

Ellipticin může také vytvářet zlomy v DNA, což je způsobeno inhibicí topoisomerasy II (enzym, který zodpovídá za správný průběh replikace a transkripce DNA)^{30,31,33}. Tvorba komplexu mezi topoisomerasou II, DNA a ellipticinem je klíčová pro poškození nukleových kyselin a buněčnou smrt. Právě topoisomerasa je cílovou molekulou ellipticinu³¹⁻³³. Zatím však nebyla potvrzena souvislost mezi inhibicí topoisomerasy II a cytotoxickým působením ellipticinu na nádorové buňky³⁰.

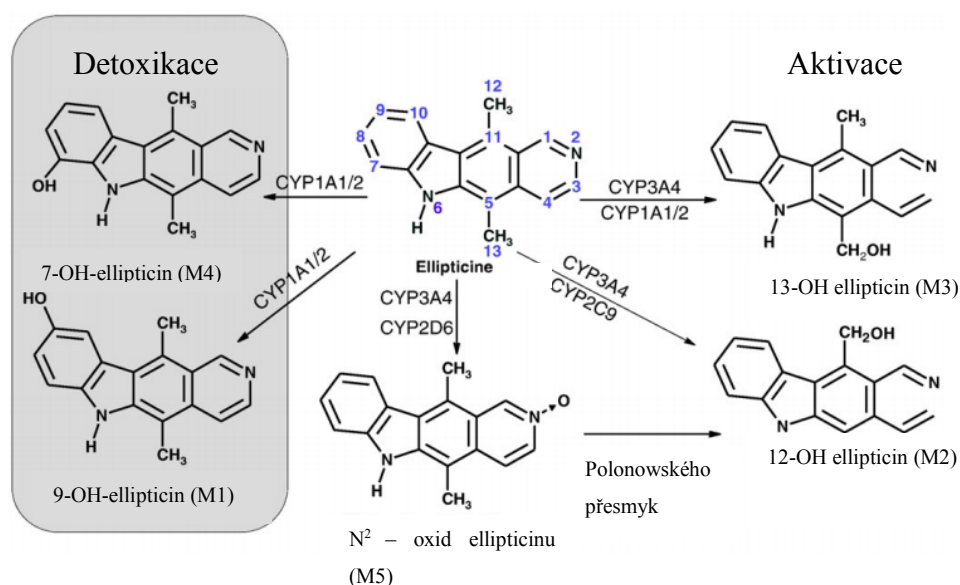
Předchozí dva mechanismy jsou založeny na nesespecifickém působení ellipticinu. Tyto mechanismy probíhají jen díky obecným chemickým vlastnostem a afinitě ellipticinu k molekule DNA a topoisomerasám II. Specifita ellipticinu vůči některým nádorovým onemocněním je způsobena tvorbou kovalentních aduktů s DNA po jeho metabolické aktivaci cytochromy P450 a peroxidasami³¹⁻³³.

Farmakologická účinnost ellipticinu je tedy závislá na jeho aktivaci pomocí cytochromů P450 a peroxidas v cílových tkáních.

1.5.1. Metabolismus ellipticinu

Metabolickou aktivací ellipticinu vznikají reaktivní formy, které mohou vytvářet kovalentní adukty s DNA. Jsou známy struktury všech metabolitů ellipticinu přeměňovaných cytochromy P450 (cit.³⁰).

Cytochromy P450 oxidují ellipticin na pět metabolitů – 7-hydroxyellipticin, 9-hydroxyellipticin, 12-hydroxyellipticin, 13-hydroxyellipticin a N²-oxid ellipticinu (obrázek 7). 7-hydroxy a 9-hydroxy jsou považovány za detoxikační metabolity, protože jsou z experimentálních zvířat vylučovány³⁰⁻³². 9-hydroxyellipticin je farmakologicky účinným metabolitem, protože je inhibítoem topoisomerasy II (cit.³⁰). 12-hydroxy, 13-hydroxy a N²-oxid jsou naopak aktivními metabolity, které vytváří adukty s DNA *in vivo* i *in vitro*^{30,31}.



Obrázek 7: Oxidace ellipticinu lidskými cytochromy P450, převzato a upraveno z cit.³²

1.6. Cytochromy P450

Cytochromy P450 jsou jedny z nejdůležitějších enzymů, které se účastní metabolismu xenobiotik. Řadí se mezi hemoproteiny. Katalyzují převážně oxidační, redukční a peroxidační reakce³⁵. Mohou také katalyzovat přeměnu endogenních látek a účastní se biosyntézy mastných kyselin, steroidních hormonů či vitamínu D a

prostaglandinů. Jsou součástí vícesložkového systému monooxygenas se smíšenou funkcí (MFO – „mixed function oxidases“), cytochromy P450 jsou konkrétně terminální oxidasou tohoto systému. Další složkou MFO je enzym NADPH:cytochrom P450 reduktasa^{35–37}.

V lidském těle se CYP nachází především v játrech, dále pak v plicích, ledvinách, kůži, mozku, nadledvinkách či v tenkém střevě. V buňkách jsou tyto enzymy lokalizovány zejména v membránách endoplasmatického retikula či v membránách mitochondrií^{35,36}. Cytochromy P450 se vyskytují ve všech organismech, bakteriích, rostlinách i živočiších^{38,39}.

Název cytochrom P450 je odvozený od toho, že redukovaný cytochrom v komplexu s oxidem uhelnatým má absorpční maximum při vlnové délce 450 nm⁴⁰.

1.6.1. Nomenklatura cytochromů P450

Cytochromy P450 se mohou vyskytovat v různých formách, které jsou řazeny do genetických rodin a podrodin, a to podle stupně homologie jejich primární struktury proteinových molekul. Pro zjednodušení se cytochromy P450 označují zkratkou CYP. Rodiny se označují arabskou číslicí, podrodiny se označují velkým písmenem a jednotlivé isoformy se značí arabskou číslicí za písmenem podrodiny. Například CYP1A1 je cytochrom P450, který je prvním členem v podrodině A, která patří do první rodiny. Abychom cytochromy zařadili do jedné rodiny, musí vykazovat alespoň 40% podobnost v sekvenci aminokyselin. Do podrodiny musí být tato podobnost v sekvenci aminokyselin 60 % (cit.³⁵).

1.6.2. Inducibilita cytochromů P450

Jednotlivé isoformy cytochromů P450 můžeme zařadit mezi konstitutivní nebo inducibilní enzymy. To, že je daný enzym inducibilní, znamená, že jeho koncentrace v organismu může extrémně narůst v závislosti na přítomnosti induktoru. Konstitutivní enzymy udržují svoji koncentraci stále konstantní, syntéza nezávisí na přítomnosti induktoru. Příkladem konstitutivního cytochromu P450 je CYP2A6. Příkladem inducibilních cytochromů P450 jsou CYP1A1, CYP1A2 (induktorem je například kouření), jejichž množství může vzrůst 40x – 100x³⁵.

K indukci cytochromů P450 dochází převážně pomocí aktivace transkripce, která vede ke zvýšenému množství mRNA a tím i ke zvýšení syntézy proteinu. Transkripční aktivace je zprostředkována pomocí jaderných receptorů PXR (pregnanový X receptor) a

CAR (konstitutivní adrostenový receptor) pro indukci CYP3A a CYP2B a přes cytosolární receptor AhR (aryl hydrocarbon receptor) pro indukci CYP1A1 a CYP1A2 (cit.^{41,42}).

Indukce CYP1A1 pomocí polycyklických aromatických uhlovodíků je zprostředkována právě AhR, který na sebe váže především aromatické uhlovodíky. CAR spolu s PXR funguje jako receptor pro xenobiotika, proto hrají hlavní roli při detoxikaci cizích látek. Indukci CYP2B6 fenobarbitalem (u lidí a myši) zprostředkovává CAR a indukci CYP3A4 pomocí rifampicinu (u lidí) PXR. U CYP3A, konkrétně u lidské izoformy CYP3A4, hraje hlavní roli PXR. Rozdíly v indukci podrodiny CYP3A u různých živočišných druhů jsou vysvětlovány rozdíly ve vázání xenobiotik na doménu PXR^{41,42}.

1.6.3. Vliv cytochromů P450 na metabolismus karcinogenů

Cytochromy P450 se mohou podílet na aktivačních nebo detoxikačních reakcích organismu⁴³. V případě detoxikace dochází k přeměně xenobiotik na polárnější produkty, které mohou být vyloučeny z těla, a nedochází k jejich bioakumulaci. Naopak může docházet k tomu, že se prekarcinogeny mohou aktivovat a vázat na endogenní látky, například nukleové kyseliny. To může vést ke změně jejich fyziologické funkce. Stěžejní cytochromy P450 pro aktivaci karcinogenních substrátů jsou CYP1A1, 1A2 a 3A4 (cit.^{35,37,43,44}).

1.6.4. Cytochromy P450 1A

Jsou známy dvě isoformy cytochromů P450 podrodiny 1A: CYP1A1 a CYP1A2 (cit.^{37,44}). Tato podrodina se významně podílí na I. fázi biotransformace xenobiotik, a to hlavně polycyklických aromatických uhlovodíků, heterocyklických a aromatických aminů či amidů. Přeměna xenobiotik cytochromy P450 1A může často vést k aktivaci jejich karcinogenních a mutagenních vlastností^{35,45}.

CYP1A1 a CYP1A2 jsou strukturně podobné enzymy a katalyzují i podobné reakce, liší se však výskytem v organismu^{35,37}. CYP1A1 je hlavním extrahepatálním enzymem. Nachází se zejména v plicích, ledvinách, kůži, dále se může vyskytovat v placentě, plodu či embryu. V malých koncentracích se také vyskytuje v játrech. CYP1A2 se naopak nejvíce vyskytuje v játrech, dále ho můžeme najít v nosním epitelu, plicích, ledvinách, mozku či prostatě^{35,46}. Typickými induktory těchto dvou isoforem jsou kouření a polycyklické aromatické uhlovodíky (například benzo[a]pyren)^{35,41}.

CYP1A1 je nejaktivnější enzym, který přeměňuje prekarcinogeny na vysoce aktivní meziprodukty^{35,47}. CYP1A2 hraje významnou roli v metabolismu kofeinu a léčiv, například lidokainu, teofylinu či melatoninu³⁵. Mezi významné induktory obou isoform CYP1A patří i studovaný ellipticin(cit.⁴⁸).

1.6.5. Cytochromy P450 3A

Do podrodiny cytochromů P450 3A exprimovaných potkany patří isoformy CYP3A1 a CYP3A2. Tyto dvě isoformy jsou produkovány játry⁴⁹. U potkanů jsou některé isoformy dominantní pouze pro jedno pohlaví, například CYP3A2 se vyskytuje pouze u samců⁴¹. Hlavními induktory těchto dvou isoform u potkanů jsou dexamethason a pregnenolon⁴¹. Nejdůležitější lidskou isoformou patřící do podrodiny 3A je CYP3A4, který je také produkován především játry, ale může se nacházet i v jiných tkáních. Tato isoforma se podílí na oxidaci karcinogenů (polycyklické aromatické uhlovodíky), léčiv (rifampicin) a endogenních látek (testosteron)³⁵.

2. Cíl práce

Cílem této diplomové práce je studium vlivu inhibitorů tyrosinkinasy vandetanibu a lenvatinibu a alkaloidu ellipticinu a jejich kombinací na expresi a aktivitu cytochromů P450 1A1, 1A2, 3A1 a 3A2 v modelovém organismu potkana *in vivo*.

Diplomová práce je součástí studie řešené v rámci grantového projektu (GAČR:18-10251S): „Komplexní pohled na mechanismus působení a metabolismus inhibitorů tyrosinkinasy a studium přístupů k potenciaci jejich protinádorové účinnosti“.

Hlavními úkoly práce bylo:

- Izolovat RNA a mikrosomy z jater potkanů nepremedikovaných a premedikovaných zkoumanými látkami
- Stanovit množství CYP1A1/2 a CYP3A1/2 v mikrosomální frakci z jater potkanů nepremedikovaných a premedikovaných vandetanibem, lenvatinibem, ellipticinem a jejich kombinacemi pomocí metody Western blot s následnou imunodetekcí
- Stanovit specifickou aktivitu CYP1A1/2 a CYP3A v mikrosomální frakci z jater potkanů nepremedikovaných a premedikovaných zkoumanými látkami
- Pomocí kvantitativního PCR porovnat relativní míru genové exprese CYP1A1/2 a CYP3A1/2 v játrech premedikovaných potkanů s potkany kontrolními
- Studovat vliv inhibitorů tyrosinkinasy vandetanibu a lenvatinibu a alkaloidu ellipticinu včetně jejich kombinací na metabolismus vandetanibu, lenvatinibu a ellipticinu jaterními mikrosomy potkanů kontrolních a premedikovaných studovanými látkami.

3. Materiály a metody

3.1. Použité materiály a chemikálie

Ambion, USA: Nuclease Free H₂O

BD Gentest™, USA: potkaní rekombinantní cytochrom P450 1A1, 1A2, 3A1 a 3A2 v Supersomech™

BDH Laboratory reagent, Dubaj: Sudan Yellow

BIO-RAD, USA: APS, TEMED

Cayman Chemical, USA: 6β-hydroxytestosteron

Daiichi Pure Chemicals, Japonsko: anti-CYP1A1 koží

Fluka, Švýcarsko: akrylamid, bisakrylamid, testosteron

Geneaid, Taiwan: GENEzol™

IDT, USA: IDT sondy pro CYP1A1 a CYP3A2

Invitrogen, UK: agarosa

J.T. Baker, USA: methanol (pro HPLC)

Laboratoř prof. RNDr. Petra hodka, CSc.: slepičí protilátky proti CYP1A2

LC-Laboratories, USA: lenvatinib, vandetanib

Lach: Ner, ČR: bromfenolová modř, dihydrogenfosforečnan draselný, dihydrogenfosforečnan sodný, dithioničitan sodný, etanol, ethylacetát, glycerol, glycin, hexahydrát chloridu hořečnatého, hydrogenfosforečnan draselný, hydrogenfosforečnan sodný, chlorid, draselný, chlorid sodný, chloroform, kyselina chlorovodíková, kyselina octová, methanol, octan amonný, uhličitan sodný

Laktino, ČR: sušené mléko

Linde, ČR: kapalný dusík, oxid uhelnatý

Loba-Chemie, Indie: Ponceau barva

New England BioLabs, USA: Gel Loading Dye (6x), RNA Loading DYE (2x), ss RNA Ladder

Promega Corporation, USA: BCIP, NBT

Roche, Švýcarsko: FastStart Essential DNA Probes Master,

Santa Cruz Biotechnology, USA: anti-CYP3A kozi

Serva, Německo: Coomassie brilliant blue R-250, Triton X-100 24

Sevapharma a.s., ČR: hovězí sérový albumin (BSA)

Sigma-Aldrich, USA: anti-GAPDH králičí, anti-rabbit s alkalickou fosfatase, anti-goat s alkalickou fosfatase, anti-chicken s alkalickou fosfatase, dimethylsulfoxid, ellipticin, fenacetin, glukosa-6-fosfát, glukosa-6-fosfátdehydrogenasa, heptansulfonát sodný, NADP⁺, NADPH, Precision Plus Protein Dual Color Standarts, resorufin, SDS, Tris-HCl, 7-ethoxyresorufin, 7-methoxyresorufin

Thermo Scientific, USA: High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Microplate BCA Protein Assay Kit, PVDF membrána, SYBR[™] green II, TaqMan sondy pro CYP 3A1, 1A2, β-aktin

3.2. Použité přístroje

Analytické váhy

40 SM-200 A

Pesa, Švýcarsko

Discovery DV215CD

OHAUS, USA

Aparatura pro agarosovou elektroforézu

Cleaver Scientific, UK

Aparatura pro metodu Western blot

Biometra, Německo

Aparatura pro SDS elektroforézu

Bio-Rad, USA

Automatické pipety

Automatické pipety

Biohit, Finsko

Automatické pipety

Eppendorf, Německo

Multipette M4

Eppendorf, Německo

Nichipet EX

America, Japonsko

Transferpette S Brand GMBH, Německo

Centrifugy

Allegra X-30R, úhlový rotor Beckman Coulter, USA

Centrifuge 5418, úhlový rotor Eppendorf, Německo

Centrifuge 5415, úhlový rotor Eppendorf, Německo

Centrifuga EBA 270, Hettich, výkyvný rotor Hettich, Německo

K-23, výkyvný rotor Janetzki, Německo

Spectrafuge™, Mini centrifuga Labnet, Japonsko

Ultracentrifuga LE-80 K, úhlový rotor, Ti 45, Ti 70 Beckman Coulter, USA

Inkubátory

Mini Dry Bath Incubator MIULAB, Čína

Termoblok LS1 VLM, Německo

Thermomixer Compact Eppendorf, Německo

Kolony

Chromolith Performance RP-18e, 100mM, zrnitost 4,6 mm Merck, USA

Nucleosil 100-5, C18, 205x 4 mm, 5µm Macherey-Nagel, Německo

ULTRASPHERE, ODS, C18, 4,6x 250 mm, 5µm Beckman Coulter, USA

Magnetická míchačka

C-MAG MS4 IKA, Německo

pH metr

ATI Orion 370 s kombinovanou elektrodou HANNA instruments, USA

Předvážky

KERN – 440, 35A Kern & Sohn GmbH, Německo

KERN EW 600-2M Kern & Sohn GmbH, Německo

Spektrofotometr

Specord M40	Analytik Jena, Německo
Spektrofotometr na mikrobjemy	DeNovix, USA
Tecan sunrise microplate reader	Tecan, Švýcarsko
Tecan Infinite M200 Pro, microplate reader	Tecan, Švýcarsko

Systém HPLC

Agilent 1200 Series s DAD detektorem	Agilent, USA
UltiMate3000	Thermo Scientific, USA
<ul style="list-style-type: none">• RS Pump, RS Autosampler, RS Fluorescent detector, RS Diode Array Detector, RS Column Compartment, RS Degasys	

Třepačka

MR-1 MiniRocker	Biosan, Litva
Třepačka	ČSAV vývojové dílny, ČR
WiseShake SHO-2D	Witeg, Německo
Yellow Line os basic	IKA, Německo

Vortex

GV Lab	GILSON, USA
MS2 minishaker	IKA, Německo
Vortex 3 genius	IKA, Německo
VX-200 Lab Vortexer	LABNET, USA

Zdroj napětí

Electrophoresis Power Supply – EPS 30	Amersham Pharmacia Biotech, USA
PowerPack™ Basic Power Supply	BIO RAD, USA

Další přístroje

CentriVap Benchtom, vakuum concentrator	LABONOCO, USA
Filtr MILLIPORE Expres Plus (0,22 μ m)	Merck, USA
Laminární box	Labox, ČR
PCR cykler Techgene	Techne, UK
Real-time PCR cykler, RotorGene 2000	Corbett Research, UK
Transiluminator, Dark Reader, DR-45M;	Clare chemical research, USA
Vodní lázeň BS-11	JEIO TECH, Korea

3.3. Experimentální postupy

3.3.1. Vystavení experimentálních zvířat zkoumaným látkám

Potkani kmene Wistar byli vystaveni jednorázovému účinku inhibitorů tyrosinkinas lenvatinibu a vandetanibu, které byly podávány gaváží přímo do žaludku, alkaloidu ellipticin, který byl podáván intraperitoneálně, a jejich kombinací dle tabulky 1 na str. 33. Lenvatinib a vandetanib byly rozpuštěny v 1% roztoku Tweenu. Ellipticin byl rozpuštěn ve vodě s takovým množstvím kyseliny octové, ve kterém bylo dosaženo úplného rozpuštění ellipticin (~ 1% roztok kyseliny octové). Kontrolní skupině potkanů byla podána použitá rozpouštědla – intraperitoneálně 1% roztok kyseliny octové a gaváží do žaludku 1% roztok Tweenu. V každé premedikační skupině byli čtyři potkani.

Tabulka 1: Schéma aplikace látek podávaných laboratorním potkanům

Označení skupiny	Dávkování
KON	rozpouštědla
VAN	30 mg vandetanibu/kg
LEN	30 mg lenvatinibu/kg
ELLI	10 mg ellipticinu/kg
V+E	(30 mg vandetanibu + 10 mg ellipticinu)/kg
L+E	(30 mg lenvatinibu + 10 mg ellipticinu)/kg

Druhý den po podání látek byla zvířata usmrcena a byly jim odebrány játra, ledviny a plíce, které byly zmrazeny v tekutém dusíku a dále uchovány při teplotě -80 °C.

Experimenty byly realizovány v souladu se Zákonem na ochranu zvířat proti týrání (č. 409/2008 Sb.) a vyhláškou O chovu a využití pokusných zvířat č.419/2012 Sb. v prostoru Státního zdravotnického úřadu (Šrobárova 49/48, Praha 10).

V rámci této diplomové práce byly prováděny experimenty pouze s jaterní tkání.

3.3.2. Izolace mikrosomů

Pufir P1: 150 mmol/l KCl, 50 mmol/l Tris, pH 7,4

Pufir P2: 100 mmol/l Na₂P₂O₇.10 H₂O, pH 7,2

Pufir P3: 150 mmol/l KCl, 50 mmol/l, Tris, 20 % glycerol, pH 7,4

Izolace mikrosomů byla prováděna v chlazené místnosti a podle postupu popsaného v práci Lindström-Seppä⁵⁰.

Pro izolaci mikrosomů byla játra potkanů patřících do jedné premedikační skupiny spojena. Zmražené orgány byly nejemno nastříhány do pufru P1. Tímto pufrem byla tkáň několikrát promyta a přefiltrována přes 4-krát složenou gázu. Následně byla tkáň homogenizována v těsném homogenizátoru s teflonovým pístem na motorový pohon s objemem roztoku P1 odpovídající čtyřnásobku hmotnosti jater. Homogenát byl následně

odstředěn na centrifuze Janetzki K-23 s výkyvným rotorem (4x70 ml, 3000 RPM) po dobu 10 minut při 600 g. Supernatant byl uchován na ledu a peleta byla rehomogenizována v ¼ původního objemu roztoku P1. Vzniklý homogenát byl zpracován za stejných podmínek, jak je uvedeno výše.

Spojené supernatanty byly odstředěny na centrifuze Beckmann Coulter (úhlový rotor T630, 26 200 RPM) po dobu 20 minut při 15 000 g. Supernatanty byly následovně odlity přes sediment bez kontaminace lehce usazenou vrstvou mitochondrií. Jejich centrifugací po dobu 65 minut při 100 000 g (Centrifuga Beckman, úhlový rotor 45 Ti 6x 70 ml, 45 000 RPM) z nich byla v supernatantu získána cytosolární frakce, která byla rozpipetována na alikvoty, zmrazena v kapalném dusíku a uchována v -80 °C. Peleta byla seškrábnuta špachtlí, resuspendována a homogenizována v roztoku pufru P2, jehož objem odpovídal dvojnásobku hmotnosti tkáně.

Tato suspenze byla opět odstředěna 65 minut při 100 000 g (centrifuga Beckman, 70 Ti 8x 28 ml, 60 000 RPM). Po odstranění supernatantu byla mikrosomální peleta seškrábnuta a homogenizována v pufru P3 s objemem odpovídajícím ¼ hmotnosti tkáně. Následně byla mikrosomální frakce rozpipetována na alikvoty, zmrazena v kapalném dusíku a uskladněna v hlubokomrazícím boxu (-80 °C).

3.3.3. Stanovení množství proteinů

Množství proteinů v mikrosomálních frakcích bylo stanoveno metodou využívající bicinchoninovou kyselinu (BCA) podle návodu komerčního setu Microplate BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, USA), který obsahoval dvě činidla – činidlo A (2% Na₂CO₃·H₂O, 0,95% NaHCO₃, 0,4% NaOH, 0,16% vínan sodno-draselný) a činidlo B (4% CuSO₄·5H₂O).

Bicinchoninová kyselina se v této metodě využívá pro vznik fialového komplexu, který vzniká reakcí v alkalickém prostředí při redukci Cu²⁺ na Cu⁺, což je jedna ze základních vlastností peptidové vazby. Tento fialový komplex je spektrofotometricky měřen při vlnové délce 562 nm. Získaná absorbance je pak přímo úměrná koncentraci proteinů^{51,52}.

Jaterní mikrosomy byly 50x ředěny vodou. Do mikrotitrační destičky bylo pipetováno 9 µl destilované vody jako slepý vzorek, standardů BSA o koncentracích 2, 1,5, 1, 0,75, 0,5, 0,25, 0,125 mg/ml a ředěných vzorků mikrosomů. Bylo přidáno 260 µl roztoku

činidla, které obsahovalo 50 dílů činidla A a 1 díl činidla B. Dále byly vzorky 1 minutu promíchávány na třepačce a inkubovány po dobu 30 minut při 37 °C. Po inkubaci byly vzorky ponechány 5 minut při laboratorní teplotě a následně byla proměřena absorbance při vlnové délce 562 nm na přístroji Tecan Sunrise. Koncentrace proteinů byly stanoveny ve třech paralelních vzorcích z jednotlivých mikrosomálních frakcí.

Z kalibrační křivky sestavené z hodnot absorbance standardů BSA byly vypočítány koncentrace proteinů v jaterních mikrosomálních frakcích.

3.3.4. Stanovení množství cytochromu P450

Pufr pro stanovení CYP: 0,1 mol/l $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$, 20 % glycerol, pH 7,4

Koncentrace cytochromu P450 v jaterních mikrosomálních preparátech byla stanovena pomocí absorpce komplexu cytochromu P450 v redukovaném stavu s CO při vlnové délce 450 nm (cit.⁴⁰). Mikrosomální frakce byla vhodně naředěna puftrem (40x) na celkový objem 2 ml. Následně byl přidán $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ na špičku špachtle, aby došlo k redukci cytochromu P450. Po pěti minutách stání při laboratorní teplotě byl vzorek rozdělen do dvou maskovaných semimikrokyvet o optické dráze 1 cm a byla změřena základní linie pomocí spektrofotometru Specord M40. Obsah vzorkové kyvety byl po dobu dvou minut probubláván oxidem uhelnatým a následně bylo měřeno spektrum v rozsahu 405-490 nm. Ze získaných spekter byla vypočítána koncentrace cytochromu P450 podle následujícího vzorce:

$$c_{CYP} = \frac{A_{450} - A_{490}}{\varepsilon \cdot l} \cdot \text{ředění} \quad [c] = \mu\text{M}$$

c_{CYP} : molární koncentrace cytochromu P450

$A_{450}; A_{490}$: absorbance cytochromu P450 při vlnových délkách 450 a 490 nm

l : optická dráha kyvety [cm]

ε : molární extinkční koeficient [$0,091 (\mu\text{mol/l})^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$]

3.3.5. SDS-PAGE elektroforéza

4x koncentrovaný vzorkový pufr: 0,063 mol/l Tris/HCl, 2 % SDS (w/v), 10 % glycerol, 0,003 % bromfenolová modř, 5 % 2-merkaptoethanol (pH 6,8)

Elektrodový pufr: 0,192 mol/l glycin, 0,025 mol/l Tris, 0,1 % SDS (pH 8,3)

Barvicí lázeň: 0,25 % Coomasie Brilliant Blue R-250 – CBBR (w/v), 46 % ethanol, 9,2 % kyselina octová

Odbarvovací lázeň: 10 % kyselina octová a 25 % ethanol

Spodní separační gel (10%) pro jeden gel – 1,9 ml destilovaná voda, 1,7 ml 30 % akrylamid (29 % akrylamid + 1 % bisakrylamid), 1,3 ml 1,5M Tris (pH 8,8), 50 μ l 10 % SDS, 2 μ l TEMED, 50 μ l 10 % APS

Vrchní zaostřovací gel (4%) pro jeden gel – 1,5 ml destilovaná voda, 267 μ l 30 % akrylamid (29 % akrylamid + 1 % bisakrylamid), 250 μ l 1,5M Tris (pH 6,8), 20 μ l 10 % SDS, 2 μ l TEMED, 20 μ l 10 % APS

Tato metoda byla prováděna podle postupu popsaneho v práci Leammliho⁵³.

Skla pro nalévání gelů byla umyta ethanolem. Pro každou sadu vzorků byly připraveny dva gely. Spodní separační gel, který byl převrstven destilovanou vodou, byl ponechán 30 minut za laboratorní teploty, aby ztuhl. Po ztuhnutí gelu byla voda odsáta pomocí filtračního papíru. Byl připraven vrchní zaostřovací gel, do kterého byl vložen hřeben s deseti jamkami. Tento gel byl opět ponechán ztuhnout po dobu 30 minut při laboratorní teplotě. Po ztuhnutí vrchního zaostřovacího gelu byl hřeben odebrán.

Dále byly připraveny vzorky pro elektroforézu. K mikrosomům, které byly naředěny destilovanou vodou tak, aby množství proteinu aplikovaného na jamku činilo 50 μ g, byl přidán 4x koncentrovaný vzorkový pufr. Vzorky byly následně promíchány a povařeny (100°C, 5 minut). Do každé jamky bylo aplikováno 20 μ l vzorků pomocí injekční stříkačky Hamilton s tupou jehlou.

Do aparatury na elektroforézu byl nalit elektrodový pufr a následně byly vloženy gely. Elektroforéza probíhala při napětí 200 V po dobu 70 minut, dokud čelo nedošlo ke spodnímu okraji gelu. Jeden z gelů byl po dobu 45 minut barven v barvicí lázni a poté byl přemístěn

do odbarvovací lázně, kde byl ponechán přes noc. Druhý gel byl použit pro přenos separovaných proteinů na membránu.

3.3.6. Metoda přenosu proteinů „Westernblotting“ a imunodetekce

Pufr PBS – Triton X100: 0,134 mol/l NaCl, 1 mmol/l NaHPO₄, 1,8 mmol/l Na₂HPO₄, 10 % Triton (pH 7,2)

Přenosový pufr obsahující 10 % methanolu: 0,192 mol/l glycin, 0,025 mol/l Tris, 10 % methanol (pH 8,3)

Roztok PONCEAU: 0,5 % PONCEAU červeně v 1% kyselině octové

Blokovací roztok: 5 % sušené odtučněné mléko + PBS Triton X100

Vyvíjecí pufr ALP: 100 mmol/l Tris/HCl, 150 mmol/l NaCl, 1 mmol/l MgCl₂.6H₂O (pH 9)

Po ukončení elektroforézy byl jeden gel namočen do přenosového pufru na dobu 25 minut. Mezitím byly nastříhány chromatografické papíry Whatman a PVDF membrána odpovídající velikosti gelu. PVDF membrána byla před blotováním máčena 30 s v methanolu, přibližně 1 minutu v destilované vodě a 5 minut v přenosovém pufru. Nastříhané chromatografické papíry Whatman byly namočeny do přenosového pufru. Následně byly do blotovacího zařízení umístěny tři Whatman papíry, na ně membrána, gel po inkubaci v přenosovém pufru s 10% methanolem a nakonec opět tři chromatografické papíry. Blotovací zařízení bylo na 30 minut připojeno k elektrickému proudu o velikosti 3 mA/1 cm² gelu.

Po blotování byla membrána pro kontrolu ponořena na 20 s do roztoku barvy PONCEAU. Poté byla membrána pro odstranění barviva důkladně promyta destilovanou vodou. Následně byla membrána na 1 hodinu vložena do 5% blokovacího roztoku. Po blokování byla membrána rozstřížena podle standardu molekulových hmotností (Precision Protein Plus™ Dual Color Standards) mezi hodnotou 37 kDa a 50 kDa tak, aby jedna část obsahovala CYP1A1, CYP1A2, CYP3A1 nebo CYP3A2, které mají molární hmotnost mezi 57 000 a 60 000 Da, a druhá část membrány obsahovala glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenasu (GAPDH) o molekulové hmotnosti 36 000 Da. Imunodetekce glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenasy, která je v organismu exprimovaná konstitutivně,

byla použita jako kontrola množství aplikovaných mikrosomálních proteinů. Dále byly membrány inkubovány v roztoku primární protilátky v blokovacím roztoku – kozí protilátka proti CYP1A1 (1:1000, Daiichii Pure Chemicals, 299124), slepičí protilátka proti CYP1A2 (1:1000, připravena v laboratoři prof. Hodka), kozí protilátka proti CYP3A (1:200, Santa Cruz Biotech., sc-30621) a králičí protilátka proti GAPDH (1:5000, Sigma Aldrich, G9545). Membrány byly ponechány v roztoku primární protilátky v chlazené místnosti přes noc na třepačce.

Druhý den byly membrány promyty 4x 5 minut v blokovacím roztoku. Poté byly inkubovány po dobu 1 hodiny v sekundární protilátce. Byla použita králičí protilátka proti kozímu IgG značená alkalickou fosfatásou (ředění 1:5000, Sigma Aldrich, A4187) pro detekci CYP1A1 a CYP3A, kozí protilátka proti králičímu IgG (ředění 1:10000, Sigma Aldrich, A3687) pro detekci GAPDH a králičí protilátka proti slepičímu IgG (ředění 1:1000, Sigma Aldrich, A9171) pro detekci CYP1A2. Po inkubaci v sekundární protilátce byly membrány promyty 2x 5 minut v blokovacím roztoku, 2x 5 minut v pufru PBS-Triton X100 a 5 minut v destilované vodě.

Na závěr byly membrány inkubovány ve vyvíjecím roztoku (5 ml pufru ALP, 33 μ l NBT, a 16,5 μ l BCIP), kde byly ponechány, dokud se neobjevily proužky detekovaných proteinů. Reakce byla zastavena vložením membrány do destilované vody.

3.3.7. Oxidace Sudanu I – stanovení aktivity CYP1A1

Stanovení specifické aktivity CYP1A1 bylo provedeno metodou oxidace Sudanu I. Sudan I slouží jako „markerový“ substrát tohoto enzymu⁵⁴. Pro toto stanovení byly použity jaterní mikrosomy z premedikovaných a kontrolních potkanů. Inkubační směsi o objemu 500 μ l byly připraveny ve třech paralelních vzorcích ve skleněných zkumavkách. Jako kontrolní vzorek byla použita směs bez mikrosomů, nebo bez přídavku NADPH.

Složení inkubační směsi:

- 50 mmol/l $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (pH 7,4)
- 1 mmol/l NADPH (zásobní roztok 10 mM)
- 0,1 mmol/l Sudan I (zásobní roztok 5 mM v methanolu)
- Jaterní mikrosomy o koncentraci proteinů 0,5 mg/ml

Reakce byla nastartována přidáním 50 μ l 10mM roztoku NADPH. Inkubace probíhala 30 minut při teplotě 37 °C za stálého třepání v otevřených zkumavkách. Reakce byla zastavena přidáním 1 ml ethylacetátu a intenzivním třepáním. Směs byla centrifugována 5 minut při 3000 RPM (EBA 270, Hettich). Vrchní organická část byla odebrána a zbytek byl opět extrahován ethylacetátem. Následně byly spojené organické fáze odpařeny ve vakuové odparce (37 °C, 50 minut). Vzorky byly před analýzou rozpuštěny v 60 μ l methanolu.

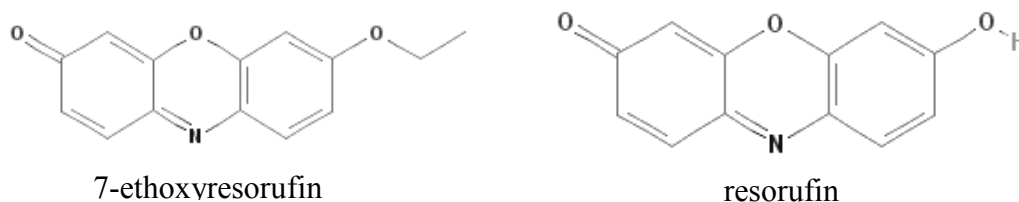
Metabolity byly separovány pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (Agilent 1200 Series s DAD detektorem) s UV/VIS detekcí. Nástřík na kolonu (Chromolith Performance RP-18e 100 mM, zrnitost 4,6 mm) činil 40 μ l. Jako mobilní fáze byl použit 75% methanol. Rychlost průtoku mobilní fáze kolonou byla 1,5 ml/min při teplotě 35 °C. Detekce metabolitů probíhala při vlnové délce 480 nm.

Množství C-hydroxylovaných produktů bylo z chromatogramů vyhodnoceno pomocí plochy píků jednotlivých metabolitů Sudanu I, které byly identifikovány porovnáním elučních časů s elučními časy standardů: eluční čas 6-OH Sudanu: 3,06 minut, eluční čas 4'-OH Sudanu: 4,06 minut a eluční čas Sudanu I: 8,04 minut.

3.3.8. O-deethylace 7-ethoxyresorufinu – stanovení aktivity CYP1A

O-deethylace 7-ethoxyresorufinu (EROD) byla použita jako „markerová“ reakce pro stanovení aktivity enzymů CYP1A1 a CYP1A2. Tyto dva enzymy, převážně však CYP1A1, katalyzují deethylaci 7-ethoxyresorufinu na fluorescenční produkt resorufin⁵⁵.

Struktura resorufinu a 7-ethoxyresorufinu je znázorněna na obrázku 8.



Obrázek 8: Struktura 7-ethoxyresorufinu a resorufinu, převzato a upraveno z cit.^{56,57}.

Složení inkubační směsi:

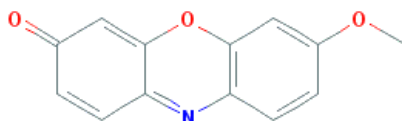
- 100 mmol/l $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ (pH 7,4)
- 2 $\mu\text{mol/l}$ 7-ethoxyresorufin (zásobní roztok 0,2 mM v DMSO)
- 0,5 mmol/l NADPH (zásobní roztok 5 mM)
- Vhodně naředěné mikrosomy

Mikrosomy byly naředěny pufrům tak, aby enzymová reakce probíhala kinetikou 0. řádu a nárůst fluorescence, který byl způsobený tvorbou produktu, byl lineární. Koncentrace proteinů kontrolních mikrosomů a mikrosomů premedikovaných vandetanibem a lenvatinibem v inkubační směsi odpovídala 0,5 mg/ml. Mikrosomální frakce z potkanů premedikovaných ellipticinem a kombinacemi vandetanib + ellipticin a lenvatinib + ellipticin musela být kvůli nelineárnímu nárůstu ředěna na koncentraci proteinu 0,00625 mg/ml. Z fosfátového pufru, vhodně naředěných mikrosomů a roztoku 7-ethoxyresorufinu byla připravena preinkubační směs, která byla po dobu 10 minut temperována při teplotě 37 °C. Následně byla preinkubační směs rozpipetována po 180 μl do čtyř jamek mikrotitrační destičky. Ke třem vzorkům bylo přidáno 20 μl 5mM NADPH. Do čtvrtého vzorku sloužícího jako kontrola byl místo NADPH přidán pufr. Ihned byla měřena fluorescence resorufinu (TECAN Infinite M200 Pro) po dobu 10 minut v jednodominutových intervalech při excitační vlnové délce 530 nm a emisní vlnové délce 585 nm. Množství resorufinu bylo odečteno z kalibrační křivky závislosti fluorescence na koncentraci resorufinu (koncentrace resorufinu 0, 2, 4, 8, 16, 24, 32, 40, 60, 80, 100, 120, 160 pmol/jamka). Kalibrační roztoky byly připraveny z 10 μM zásobního roztoku resorufinu v DMSO ředěním vzorkovým pufrům.

3.3.9. O-demethylace 7-methoxyresorufinu – stanovení aktivity CYP1A2

O-demethylace resorufinu byla použita při sledování aktivity CYP1A2. Tento enzym katalyzuje přeměnu 7-methoxyresorufinu na fluorescenční resorufin⁵⁸.

Struktura 7-methoxyresorufinu je znázorněna na obrázku 9 na straně 41.



Obrázek 9: *Struktura 7-methoxyresorufinu, převzato a upraveno z cit.⁵⁹.*

Složení inkubační směsi:

- 100 mmol/l $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ (pH 7,4)
- 2 $\mu\text{mol/l}$ 7-methoxyresorufin (zásobní roztok 0,2 mM v methanolu)
- 0,5 mmol/l NADPH (zásobní roztok 5 mM v pufru)
- Vhodně naředěné jaterní mikrosomy

Postup měření byl analogický k měření EROD (kapitola 3.3.8, str. 38), rozdíl byl pouze v použitém substrátu.

3.3.10. 6- β -hydroxylace testosteronu – stanovení aktivity CYP3A

Ke stanovení specifické aktivity CYP3A byla použita metoda 6 β -hydroxylace testosteronu jako „markerové“ reakce tohoto enzymu⁶⁰. Inkubační směsi o objemu 500 μl byly připraveny ve třech paralelních vzorcích v plastových mikrozkušnicích.

Složení inkubační směsi:

- 100 mmol/l $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ (pH 7,4)
- 50 μM testosteron (zásobní roztok 10mM v methanolu)
- 1mM NADPH generující systém (10 mM NADP^+ , 100 mM MgCl_2 , 100 mM glukosa-6-fosfát, 1 U/ml glukosa-6-fosfát dehydrogenasa)
- Jaterní mikrosomy o koncentraci proteinů 0,5 mg/ml

Před „nastartováním“ reakce byla směs pufru, mikrosomů a testosteronu po dobu 5 minut preinkubována za teploty 37 °C. Reakce byla zahájena přidáním 50 μl generujícího systému do každé směsi, následně byla směs inkubována po dobu 15 minut při 37 °C za třepání s otevřenými víčky. První kontrolní inkubační směs neobsahovala generující systém a druhá kontrolní směs neobsahovala mikrosomy. Místo generujícího systému a mikrosomů byl do kontroly přidán pufr. Poté byla reakce zastavena přidáním 100 μl roztoku

obsahujícího 1 M Na₂CO₃ a 2 M NaCl. Následně bylo do roztoku přidáno 5 µl 1mM fenacetinu, který sloužil jako vnitřní standard.

Ke směsi byl přidán 1 ml ethylacetátu a směs byla třepána po dobu 2 minut při 1400 RPM a následně centrifugována po dobu 3 minut při 13 000 RPM (Eppendorf 5418). Vrchní fáze byla odebrána, ke zbytku byl opět přidán ethylacetát a směs byla extrahována. Následně byly spojené ethylacetátové extrakty odpařeny ve vakuové odparce. Vzorky byly před analýzou HPLC rozpuštěny ve 25 µl methanolu a stočeny na mikrocentrifuze.

Metabolity byly separovány pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) a UV/VIS detekcí. Nástřik na kolonu činil 20 µl. Jako mobilní fáze byl použit 50% methanol. Rychlost průtoku mobilní fáze kolonou byla nastavena na 0,6 ml/min. Detekce píků pro fenacetin, testosteron a jeho metabolity probíhala při vlnové délce 240 nm.

Množství 6-β-hydroxylovaných produktů bylo z chromatogramů vyhodnoceno pomocí kalibrační křivky standardů 6-β-hydroxytestosteronu o koncentracích 10, 25, 50, 100, 250 a 500 µM.

3.3.11. Přeměna ellipticinu jaterními mikrosomy

Tato metoda byla prováděna podle postupu popsaneho v práci Stiborové⁶¹. Pro sledování metabolismu ellipticinu byly připraveny vzorky ve třech paralelních reakčních směsích o objemu 500 µl.

Složení inkubačních směsí

- 100 mmol/l KH₂PO₄/K₂HPO₄ (pH 7,4)
- 50 µM ellipticin (zásobní roztok 5mM ellipticin v DMSO)
- Jaterní mikrosomy o koncentraci proteinu 0,5 mg/ml
- 100 µM NADPH (zásobní roztok 1 mM NADPH)

Reakce byla startována přidáním 50 µl 1mM roztoku NADPH. Vzorky byly inkubovány při 37 °C a třepání 450 RPM po dobu 20 minut v otevřených mikrozkuvkách. Reakce byla ukončena přidáním 1 ml ethylacetátu a následným promícháním na vortexu. Do vzorků bylo přidáno 5 µl 1mM fenacetinu jako referenční látky. Vzorky byly extrahovány po dobu 2 minut při 1400 RPM a centrifugovány 5 minut při 13 000 RPM (5418 Eppendorf).

Z extraktu bylo odebráno 750 μ l vrchní organické části. Ke zbytku bylo opět přidáno 750 μ l ethylacetátu a byla opakována extrakce. Následně byly spojené organické fáze odpařeny pomocí vakuové odparky po dobu 45 minut při 37 °C.

Po odpaření byly vzorky rozpuštěny v 50 μ l methanolu a analyzovány pomocí HPLC na přístroji UltiMate3000 za použití izokratické eluce mobilní fází (64 % methanol, 5 mM heptansulfonát, 32 mM kyselina octová) při teplotě 37 °C. Nástřík na kolonu (ULTRASPHERE ODS, C18, 5 μ M, 4,6 x 250 mm, BECKMAN) byl 10 μ l. Průtok mobilní fáze byl nastaven na 0,7 ml/min. Detekce metabolitů ellipticinu i fenacetinu byla provedena při vlnové délce 296 nm. Plocha píků detekovaných metabolitů⁶² byla vztažena na plochu píku vnitřního standardu fenacetinu.

3.3.12. Přeměna lenvatinibu jaterními mikrosomy

Tato metoda byla optimalizována v rámci diplomové práce Bc. Kataríny Vavrové. V rámci této práce byly připraveny vzorky ve třech paralelních měřeních o objemu reakční směsi 500 μ l.

Složení inkubační směsi:

- 100 mmol/l $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ (pH 7,4)
- Jaterní mikrosomy o koncentraci proteinů 0,5 mg/ml
- 50 μ M lenvatinib (5mM zásobní roztok v DMSO)
- 1mM NADPH generující systém (10 mM NADP^+ , 100 mM MgCl_2 , 100 mM glukosa-6-fosfát, 1 U/ml glukosa-6-fosfát dehydrogenasa)

Přidáním generujícího systému byla startována reakce a otevřené zkumavky byly inkubovány při 37 °C po dobu 30 minut při 450 RPM. Po uplynutí inkubační doby byla reakce zastavena přidáním 1 ml ethylacetátu a byla provedena extrakce intenzivním dvouminutovým třepáním při 1400 RPM. Vzorky byly centrifugovány po dobu 5 minut při 13 000 RPM (5418 Eppendorf). Z extraktu bylo odebráno 750 μ l vrchní organické části. Ke vzorku bylo přidáno 750 μ l ethylacetátu a opět proběhla extrakce. Znovu byla odebrána vrchní organická fáze. Následně byly vzorky odpařeny při 37 °C po dobu 45 minut na vakuové odparce.

Po odpaření byly vzorky rozpuštěny v 50 μ l methanolu a analyzovány pomocí HPLC na přístroji UltiMate3000 za použití izokratické eluce mobilní fází (0,01M octan amonný:

methanol – 40:60, v/v) při teplotě 37 °C. Nástřík na kolonu (Nucleosil 100-5, C18, 250 x 4 mm, 5 µm, Macherey-Nagel) byl 10 µl. Průtok mobilní fáze byl nastaven na 0,6 ml/min. K detekci lenvatinibu a jeho metabolitů *O*-desmethyllenvatinibu a lenvatinibu *N*-oxidu bylo použito měření absorbance při vlnové délce 254 nm a měření fluorescence při excitační vlnové délce 312 nm a emisní vlnové délce 412 nm.

3.3.13. Přeměna vandetanibu jaterními mikrosomy

Tato metoda byla prováděna podle postupu v diplomové práci Hromka⁶³. Pro měření byly připraveny tři paralelní reakční směsi o objemu 500 µl.

Složení inkubační směsi:

- 100 mmol/l KH₂PO₄/K₂HPO₄ (pH 7,4)
- Jaterní mikrosomy o koncentraci proteinů 0,5 mg/ml
- 50 µM vandetanib (5mM zásobní roztok v DMSO)
- 1mM NADPH generující systém (10 mM NADP⁺, 100 mM MgCl₂, 100 mM glukosa-6-fosfát, 1 U/ml glukosa-6-fosfát dehydrogenasa)

Přidáním generujícího systému byla startována reakce a otevřené zkumavky byly inkubovány při 37°C po dobu 20 minut při 450 RPM. Po uplynutí inkubační doby byla reakce zastavena přidáním 1 ml dichlormethanu a byla provedena extrakce intenzivním dvouminutovým třepáním při 1400 RPM. Vzorky byly centrifugovány po dobu 5 minut při 13 000 RPM (5418 Eppendorf). Z extraktu bylo odebráno 750 µl spodní organické fáze. K původnímu vzorku bylo opět přidáno 750 µl dichlormethanu a opět proběhla extrakce. Znovu byla odebrána spodní organická fáze. Následně byly vzorky odpařeny při 37 °C po dobu 45 minut na vakuové odparce.

Po odpaření byly vzorky rozpuštěny v 50 µl methanolu a analyzovány pomocí HPLC na přístroji UltiMate3000 za použití izokratické eluce mobilní fází (acetonitril:0,5% triethylamin, 30:70, pH = 3). Nástřík na kolonu (Nucleosil 100-5, C18, 250 x 4 mm, 5 µm, Macherey-Nagel) byl 10 µl. Průtok mobilní fáze byl 0,6 ml/min při teplotě 37 °C. Detekce metabolitů byla provedena měřením absorbance při vlnové délce 341 nm.

3.3.14. Izolace RNA

Získání čisté a vysoce kvalitní RNA je náročné, protože se jedná o nestabilní nukleovou kyselinu, která může být jednoduše degradována ribonukleasami (RNAsami), které jsou přítomny všude kolem nás. Ribonukleasy nejdu jednoduše inaktivovat, proto se musí dbát ostražitosti před kontaminací vzorku s RNA⁶⁴. Pro izolaci RNA se využívá komerční činidlo GENEzol™ obsahující fenol, chloroform a guanidin isothiokyanát. Izolace RNA z jaterní tkáně byla provedena dle návodu pro použití činidla GENEzol™ (cit.⁶⁵).

Z důvodu možné degradace RNA bylo nutné pracovat sterilně a v rukavicích bez pudru. Třecí misky s tloučky, pinzety, špachtle byly omyty 10% peroxidem vodíku, zabaleny do alobalu a vloženy do sušárny o teplotě 180 °C na šest hodin. Pro izolaci RNA byly používány sterilní „RNase free“ špičky s filtry a plastové mikrozkušavky. Před zahájením izolace byl 10% peroxidem vodíku vyčistěn laminární box (Flow-box) a do něj byly vloženy veškeré potřebné nástroje. Pipety se stojanem, mikrocentrifuga a stojánky na mikrozkušavky byly ošetřeny 70% ethanolem a byly také vloženy do laminárního boxu, který byl následně po dobu 15 minut vysvícen UV světlem.

Játra potkanů z jednotlivých premedikačních skupin byla spojena a následně homogenizována v kapalném dusíku v třecí misce s tloučkem. Vzniklý homogenát byl převeden do 1 ml GENEzol™, promíchán na vortexu a inkubován 5 minut při laboratorní teplotě. Jelikož se jednalo o játra, bylo potřeba pro odstranění nerozpustných částic provést centrifugaci po dobu 10 minut při 15 800 g (5415 Eppendorf) před dalšími kroky izolace. Supernatant byl odebrán do čisté zkumavky.

Následně bylo přidáno 200 µl chloroformu a vzorek byl extrahován po dobu 20 sekund třepáním na vortexu. Následně byly vzorky ponechány 3 minuty při laboratorní teplotě a centrifugovány po dobu 15 minut při 15 800 g a teplotě 4 °C. Poté byla odebrána horní vodná fáze do nové mikrozkušavky tak, aby nedošlo ke kontaminaci mezifází obsahující DNA a proteiny.

Ke každému vzorku byl přidán isopropanol v množství odpovídajícím objemu odebrané vodné fáze. Vzorky byly promíchány několikerým otočením mikrozkušavky. Po desetiminutové inkubaci při laboratorní teplotě následovala centrifugace po dobu 5 minut při 15 800 g a teplotě 4 °C. Supernatant byl slit do odpadní kádinky a k peletám byl přidán 1 ml 75% ethanolu. Vzorky byly jemně promíchány na vortexu a po dobu 5 minut

centrifugovány při 15 800 g a teplotě 4 °C. Supernatant byl pomocí pipety odebrán a pelety byly sušeny v termobloku při teplotě 55 °C po dobu 10 minut do odpaření zbývajícího ethanolu.

Na závěr byly vzorky ředěny „RNase free“ vodou, promíchány na vortexu a inkubovány v termobloku po dobu 15 minut při 58 °C. Izolovaná RNA byla rozpipetována na alikvoty a uchována ve vysokomrazícím boxu při teplotě -80 °C.

3.3.15. Horizontální elektroforéza RNA na agarosovém gelu

Pufř 5x TBE: 445 mM Tris, 445 mM kyselina boritá, 10mM EDTA, pH 8 – 8,3

Elektroforéza je metoda, která slouží kromě separace proteinů také pro separaci nukleových kyselin podle velikosti, tedy podle délky v párech bází⁶⁶.

Erlenmayerova baňka a odměrné válce byly předem omyty 10% peroxidem vodíku, zabaleny do alobalu a vloženy do sušárny na dobu 6 hodin při teplotě 180 °C. Ze zásobního roztoku 5x TBE pufru byl ředěním připraven 0,5x TBE pufř, který byl použit pro přípravu 40 ml 1% agarosového gelu. Směs byla zahřívána v mikrovlnné troubě do úplného rozpuštění agarosy. Poté byla Erlenmayerova baňka se směsí ochlazena pod proudem tekoucí vody a roztok nalit do připravené formy na gel. Následně byly vloženy hřebeny pro vytvoření jamek v gelu a gel byl ponechán 30 minut stát pro ztuhnutí. Po ztuhnutí byly odebrány hřebeny a gel byl vložen do aparatury na elektroforézu, která byla naplněna 0,5x TBE pufřem.

2 µl izolované RNA byly naředěny 3 µl sterilní ultračisté destilované vody. K této směsi byl přidán 1 µl vzorkového pufru (6x Gel Loading dye). Marker (ss RNA Ladder) byl připraven dle protokolu výrobce (2 µl markeru + 8 µl pufru) a byl zahříván v termobloku při teplotě 90 °C po dobu 2 minut. Do jamek byl pipetován celý objem vzorku i markeru. Elektroforetická aparatura byla připojena ke zdroji napětí a elektroforéza probíhala po dobu 30 – 45 minut při napětí 110 V.

Po ukončení elektroforézy byl gel vložen do barvicí lázně obsahující barvivo 10 000x Syber Green II (50 ml 1x TBE + 5 µl Syber Green II). Gel byl v této lázni ponechán po dobu 30 minut na třepače a následně vizualizován v temné komoře pomocí Dark Readeru a vyfotografován.

3.3.16. Stanovení koncentrace a čistoty RNA

Pro stanovení čistoty a koncentrace RNA bylo třeba proměřit absorbanci při vlnové délce 260 nm, která odpovídá absorpčnímu maximu nukleových kyselin, 280 nm, při které absorbují nejvíce proteiny, a 320 nm, která sloužila jako pozadí. Výpočet čistoty RNA se získá z poměru absorbancí při vlnové délce 260 a 280 nm, od kterých odečteme absorbanci při vlnové délce 320 nm. Hodnota čistoty RNA by se měla pohybovat v rozmezí 1,8 – 2. Tuto hodnotu získáme z poměru:

$$\frac{A_{260} - A_{320}}{A_{280} - A_{320}}$$

Stanovení čistoty a koncentrace bylo určeno pomocí přístroje DeNovix DS-11, který obsahuje program pro měření čistoty a koncentrace RNA. 1,5 µl vzorku bylo na spektrofotometru proměřeno a byla stanovena čistota a koncentrace. RNA v kyvetě o optické dráze 1 cm má koncentraci $c = 40 \mu\text{g/ml}$, pokud se absorbance $A_{260} = 1$.

3.3.17. Reverzní transkripce – syntéza cDNA

Reverzní transkripce (RT) je metoda používaná pro přepis izolované RNA do cDNA (complementary DNA). Tato reakce je katalyzována reverzní transkriptasou, která se řadí mezi RNA-dependentní DNA polymerasy. Důležitým krokem této metody je nasednutí oligonukleotidu na RNA templát. Pro tento proces se používá oligo-dT řetězec nebo náhodné hexamery⁶⁷.

Reverzní transkripce byla provedena za použití kitu High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits od Applied Biosystems.

Tato metoda, stejně jako izolace RNA, vyžaduje sterilní prostředí, proto práce probíhala v laminárním boxu. Nejdříve byla pro všechny vzorky připravena reakční směs, která na jeden vzorek obsahovala:

- 4,2 µl „RNase free“ voda
- 2 µl 10x RT pufr
- 2 µl 10x RT Random Primers
- 0,8 µl 25x dNTP Mix (100mM)
- 1 µl RNase inhibitor

Množství 1 µg izolované RNA bylo naředěno RNase free vodou na objem 10 µl. K takto připraveným vzorkům bylo pipetováno 10 µl reakční směsi. Dále byly z každého vzorku odebrány 2 µl, které byly využity jako negativní kontrola bez reverzní transkriptasy. Do všech vzorků kromě negativních kontrol byl přidán 1 µl reverzní transkriptázy MultiScribe™ (50 U/µl). Vzorky byly po celou dobu práce uchovávány na ledu

Takto připravené vzorky byly vloženy do thermocykleru a byl spuštěn program pro reverzní transkripci (tabulka 2).

Tabulka 2: *Reakční nastavení thermocykleru pro reverzní transkripci:*

10 min	Nasednutí náhodných hexamerů	25 °C
120 min	Prodlužování řetězce cDNA	37 °C
5 min	Inaktivace reverzní transkriptázy	85 °C

Po ukončení celého programu došlo k ochlazení vzorků v thermocykleru na 4 °C . Po vyjmutí byly vzorky uchovány v mrazáku.

3.3.18. Kvantitativní PCR

PCR (polymerase chain reaction) se využívá jako metoda pro zkoumání DNA, má vysokou citlivost a je sekvenčně specifická. Pro použití je potřeba jednovláknového či dvouvláknového templátu DNA. Kvantitativní PCR se nejčastěji používá pro analýzu genové exprese či kvantifikaci mRNA^{68,69}.

Metoda kvantitativní PCR je založena na sběru dat během celého měření. Jedná se o detekci amplifikace v každém kroku, ke které je potřebné fluorescenční značení. Koncentrace produktu PCR odpovídá intenzitě fluorescence⁶⁹. V tomto případě bylo využito TaqMan sondy. TaqMan sonda je hydrolyzační sonda, která obsahuje na svém 5' konci fluorescenční značku a na 3' konci zhášedlo. Sonda je v průběhu syntézy nových řetězců DNA štěpena díky 5' nukleasové aktivitě DNA polymerasy. V průběhu reakce dochází ke zvyšování fluorescence, která je způsobena oddalováním fluorescenční značky a zhášedla⁷⁰.

Amplifikační křivka PCR se dělí do třech fází – lineární fáze, exponenciální fáze a fáze plató. V počátku exponenciální fáze dosáhne fluorescence své prahové hodnoty, kdy je

fluorescence vzorku větší než fluorescence pozadí. Tato hodnota se označuje jako C_T , odpovídá výchozímu množství vzorku a používá se při vyhodnocení⁶⁹.

Nejprve byly vzorky cDNA a negativní kontroly naředěny 10x „RNase free“ vodou. Následně bylo pipetováno 15 μ l připraveného „premixu“ do PCR mikrozkumavek.

Složení „premixu“ pro jeden vzorek:

- 10 μ l FastStart Essential DNA Probes Master (Master Mix)
- 1 μ l TaqMan Gene Expression Assay (β -aktin, CYP1A1, CYP1A2, CYP3A1 a CYP3A2)
- 4 μ l FastStart Essentials DNA Probes Master H₂O („PCR grade“)

K „premixu“ bylo přidáno 5 μ l 10x ředěné cDNA a jako slepý vzorek byla místo cDNA použita „RNase free“ voda. Pro každý vzorek byly připraveny dvě paralelní stanovení. Tyto vzorky byly následně vloženy do Real-time PCR cycleru Rotor Gene 2000 a pomocí programu Rotor Gene 5 byly nastaveny následující reakční podmínky.

Tabulka 3: *Reakční podmínky:*

10 minut	Aktivace DNA polymerasy	95 °C	
15 sekund	Denaturace řetězce DNA	95 °C	50 cyklů
60 sekund	Nasednutí primerů a sondy a syntéza řetězce DNA	60 °C	

K vyhodnocení výsledků byl použit také program Rotor Gene 5, pomocí kterého byly určeny hodnoty C_T . Ty značí číslo cyklu, ve kterém amplifikační křivka protíná „threshold“ se signifikantním nárůstem detekce signálu.

Kromě zkoumaných genů pro CYP1A1, CYP1A2, CYP3A1 a CYP3A2 byla zjišťována exprese genu pro β -aktin, který byl použit jako referenční gen s konstantní expresí. Z výsledků dvou paralelních měření cDNA byla zjištěna průměrná hodnota C_T . Porovnáním hodnot C_T zkoumaných genů a genu referenčního byla určena hodnota ΔC_T vyjadřující relativní zastoupení sledovaných genů ve vzorku podle vzorce:

$$\Delta C_T (\text{zkoumaného genu}) = C_T (\text{zkoumaného genu}) - C_T (\beta\text{-aktinu})$$

Míry změny exprese zkoumaných genů (*CYP1A1*, *CYP1A2*, *CYP3A1*, *CYP3A2*) ve vzorcích z izolovaných jater potkanů premedikovaných lenvatinibem, vandetanibem, ellipticinem a kombinacemi (premedikace) proti tkáni z nepremedikovaných potkanů (kontrola) je vyjádřena hodnotou $2^{-\Delta\Delta C_T}$ pomocí vzorce:

$$2^{-\Delta\Delta C_T} = 2^{-(\overline{\Delta C_T}(\text{premedikace}) - \overline{\Delta C_T}(\text{kontrola}))}$$

Statistické vyhodnocení bylo provedeno programem REST2009.

4. Výsledky

4.1. Charakterizace izolovaných mikrosomů

Mikrosomální frakce získané izolací z jater laboratorních potkanů kontrolních a premedikovaných lenvatinibem, vandetanibem, ellipticinem a jejich kombinacemi byly charakterizovány z hlediska koncentrace proteinů a obsahu cytochromu P450 (tabulka 4).

Tabulka 4: *Koncentrace proteinů, koncentrace cytochromu P450 a specifický obsah CYP v mikrosomálních frakcích z jater potkanů kontrolních (KON) a premedikovaných lenvatinibem (LEN), vandetanibem (VAN), ellipticinem (ELLI) a jejich kombinacemi (V+E, L+E).*

Premedikace	C _{prot.} [mg/ml]	c _{CYP} [μmol/l]	Specifický obsah CYP [nmol _{CYP} /mg _{prot.}]
KON	19,38	6,04	0,31
VAN	20,75	6,04	0,29
LEN	24,54	4,40	0,18
ELLI	28,46	7,14	0,25
V + E	18,55	6,04	0,33
L + E	31,84	6,59	0,21

C_{prot.}...koncentrace proteinů v mikrosomálních frakcích jater, c_{CYP}...koncentrace aktivní formy cytochromu P450

Při stanovení koncentrace cytochromu P450 v jaterních mikrosomech bylo pozorováno absorpční maximum při vlnové délce 450 nm, což odpovídá aktivní formě cytochromu P450. V rámci měření koncentrace cytochromů P450 byla detekována při vlnové délce 420 nm i neaktivní forma cytochromu P450, která vzniká strukturální změnou enzymu. Tato změna se projeví posunem absorpčního maxima komplexu redukovaného CYP s oxidem uhelnatým z vlnové délky 450 nm na 420 nm (cit.⁴⁰).

Hodnoty specifického obsahu CYP se mezi jednotlivými skupinami výrazně nelišily.

4.2. Charakterizace izolované RNA

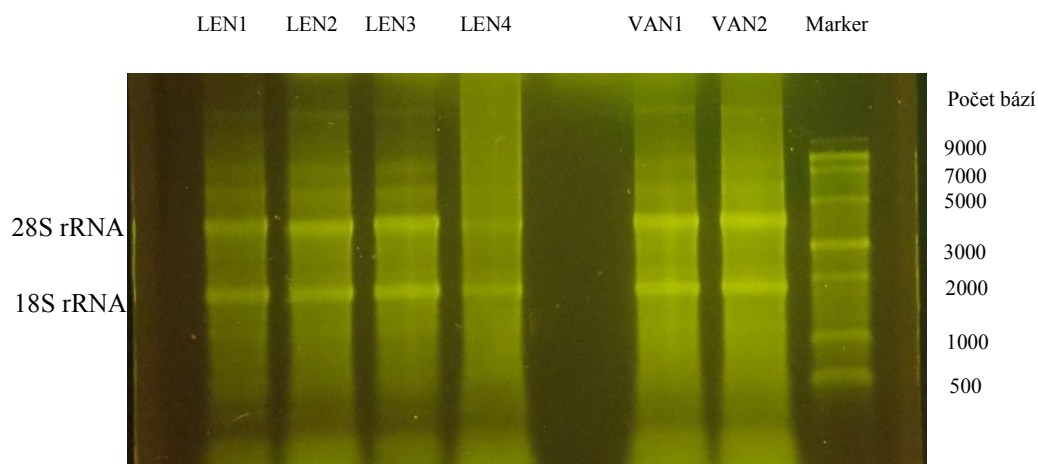
Pomocí spektrofotometrie byla stanovena koncentrace a čistota RNA, která byla izolována z jater potkanů nepremedikovaných a premedikovaných vandetanibem, lenvatinibem, ellipticinem a kombinacemi ellipticinu s vandetanibem nebo lenvatinibem.

Výsledné hodnoty jsou uvedeny v tabulce 5 na straně 53. Izolace RNA byla provedena ve čtyřech paralelních vzorcích z každé premedikační skupiny a všechny vzorky byly použity pro další experimenty.

Tabulka 5: *Koncentrace a čistota RNA izolované z mikrosomálních frakcí z jater potkanů kontrolních (KON) a premedikovaných vandetanibem (VAN), lenvatinibem (LEN), ellipticinem (ELLI) a jejich kombinacemi (V+E, L+E).*

premedikace	Číslo vzorku	c (µg/µl)	čistota
KON	1	0,92	2,12
	2	2,33	2,00
	3	2,24	2,03
	4	2,45	2,02
VAN	1	2,43	2,02
	2	2,39	1,97
	3	1,70	2,08
	4	1,99	2,05
LEN	1	2,50	2,05
	2	1,98	2,01
	3	1,46	2,06
	4	1,63	1,96
ELLI	1	1,92	2,00
	2	1,99	2,01
	3	1,26	2,06
	4	1,09	1,96
V+E	1	3,18	2,04
	2	2,82	2,03
	3	1,15	2,04
	4	1,56	2,03
L+E	1	3,17	1,99
	2	2,62	2,02
	3	3,33	2,03
	4	2,92	2,03

Použitím agarosové elektroforézy byla ve všech vzorcích potvrzena přítomnost nedegradované RNA, protože byly detekovány dva signály odpovídající 18S a 28S rRNA (obrázek 10).

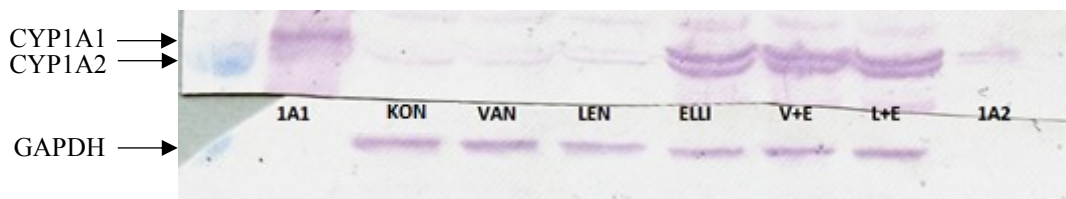


Obrázek 10: Ukázka agarosové elektroforézy s použitím barviva SYBR Green II pro vzorky RNA izolované z jater potkanů premedikovaných vandetanibem (VAN), lenvatinibem (LEN).

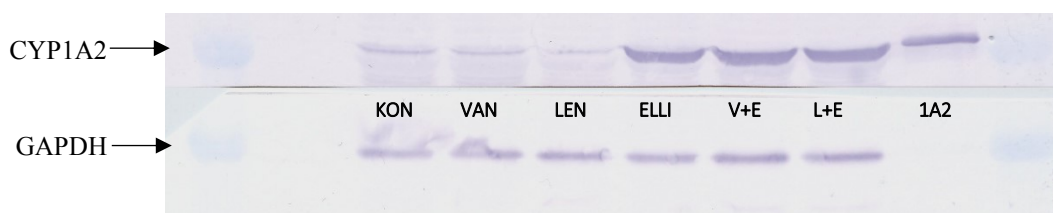
4.3. Vliv vandetanibu, lenvatinibu a ellipticinu na expresi cytochromů P450 podrodiny 1A

Proteiny z jaterních mikrosomálních frakcí potkanů kontrolních a premedikovaných námi zkoumanými látkami byly rozděleny v SDS-polyakrylamidovém gelu podle molekulových hmotností. Po přenosu proteinů na PVDF membránu metodou Western blot bylo následnou imunodetekcí zjištěno relativní zastoupení CYP1A1, CYP1A2. Podrodinu 1A cytochromu P450 jsme studovali, protože se jedná o hlavní biotransformační enzymy a účastní se metabolismu ellipticinu⁴⁸.

Jako kontrola nanášeného množství proteinů v mikrosomálních frakcích jater byla použita glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenasa (GAPDH), která je na rozdíl od CYP1A1 a CYP1A2 produkována konstitutivně. Na obrázcích 11 a 12 (str. 55) jsou zobrazeny ukázky vyvolaných membrán pro jednotlivé cytochromy P450 – CYP1A1, CYP1A2.



Obrázek 11: *Imunodetekce CYP1A1 a CYP1A2 v mikrosomálních frakcích jater z potkanů kontrolních (KON) a premedikovaných vandetanibem (VAN), lenvatinibem (LEN), ellipticinem (ELLI) a jejich kombinacemi (V+E, L+E). 1A1 – standard rekombinantního potkaního CYP1A1 v Supersomech™, 1A2 – standard rekombinantního potkaního CYP1A2 v Supersomech™.*

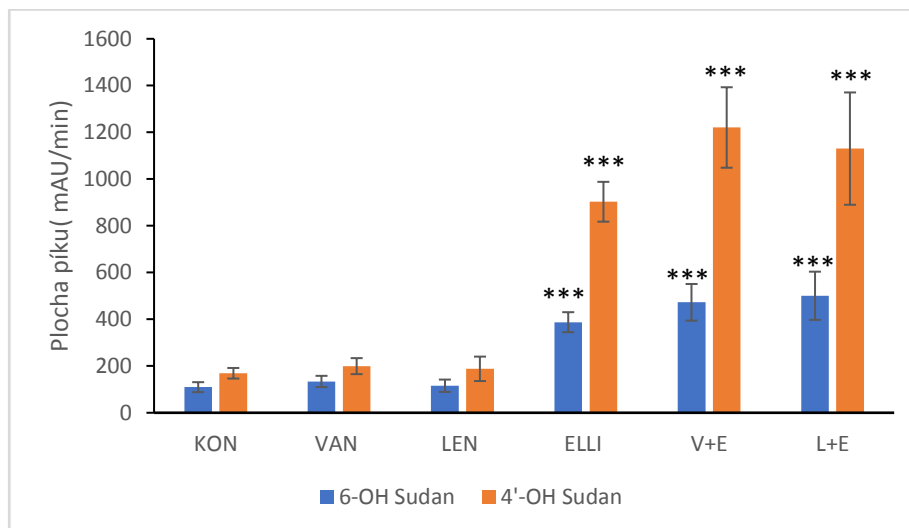


Obrázek 12: *Imunodetekce CYP1A2 v mikrosomálních frakcích jater z potkanů kontrolních (KON) a premedikovaných vandetanibem (VAN), lenvatinibem (LEN), ellipticinem (ELLI) a jejich kombinacemi (V+E, L+E). 1A2 – standard rekombinantního potkaního CYP1A2 v Supersomech™.*

Z obrázku 11 je patrné, že exprese CYP1A1 byla výrazně zvýšená v játrech potkanů premedikovaných ellipticinem a jeho kombinacemi s vandetanibem anebo lenvatinibem. Samostatně podávané inhibitory tyrosinkinas, vandetanib i lenvatinib, také mírně zvýšily množství CYP1A1 v játrech. V kontrolních mikrosomech byl detekován pouze velmi slabý proužek odpovídající CYP1A1. Zvýšená exprese CYP1A2 byla detekována u premedikací ellipticinem a jeho kombinacemi s inhibitory tyrosinkinas (obrázek 12). Vystavení potkanů samostatným inhibitorům tyrosinkinas nevedlo k detekovatelným změnám v proteinové expresi CYP1A2.

Pro sledování aktivity CYP1A1 v mikrosomálních frakcích jater potkanů kontrolních a premedikovaných vandetanibem, lenvatinibem, ellipticinem a kombinacemi ellipticinu s vandetanibem nebo lenvatinibem byla použita metoda oxidace Sudanu I (cit.⁵⁴).

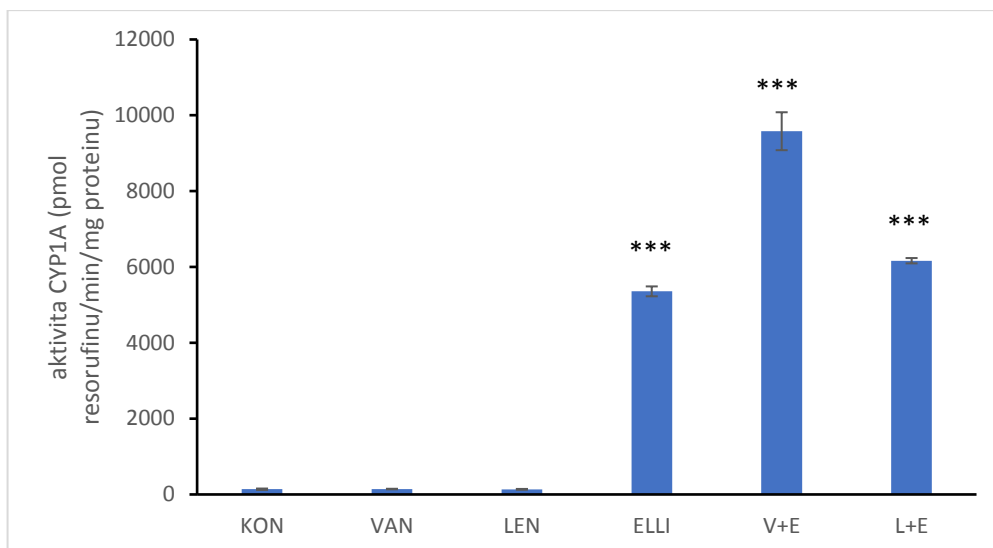
Na obrázku 13 jsou vyhodnoceny plochy píků odpovídající metabolitům Sudanu I: 6-OH Sudanu a 4'-OH Sudanu.



Obrázek 13: Metabolity Sudanu I po jeho oxidaci zprostředkované jaterními mikrosomy potkanů kontrolních (KON) a premedikovaných vandetanibem (VAN), lenvatinibem (LEN), ellipticinem (ELLI) a jejich kombinacemi (V+E a L+E). Statistická významnost byla vyhodnocena pomocí T-testu (tři paralelní měření). *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ a * $p < 0,05$.

Jak u premedikace samotným ellipticinem, tak u kombinované premedikace ellipticinu s vandetanibem nebo lenvatinibem došlo k signifikantnímu nárůstu množství hydroxylovaných metabolitů Sudanu I.

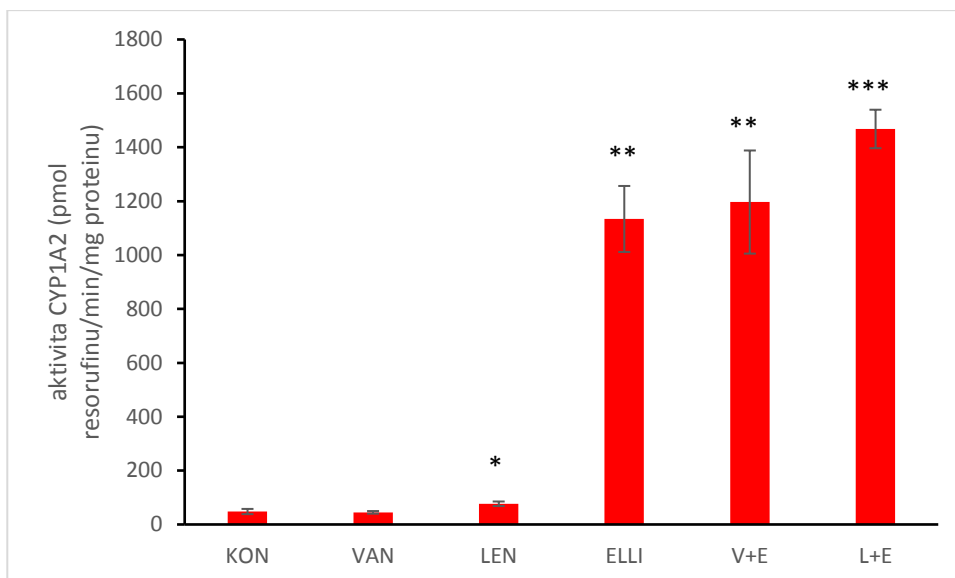
Ke stanovení aktivity cytochromů P450 podrodiny 1A (CYP1A1 a CYP1A2) v mikrosomálních frakcích z jater potkanů kontrolních a premedikovaných zkoumanými inhibitory tyrosinkinasy a ellipticinu byla použita „markerová“ reakce deethylace 7-ethoxyresorufinu na jeho fluorescenční produkt resorufin⁵⁵ (obrázek 14, str. 57).



Obrázek 14: *Specifická aktivita CYP1A1 a CYP1A2 v jaterních mikrosomech potkanů kontrolních (KON) a premedikovaných vandetanibem (VAN), lenvatinibem (LEN), ellipticinem (ELLI) a jejich kombinacemi (V+E a L+E) měřená metodou EROD. Statistická významnost byla vyhodnocena pomocí T-testu (tři paralelní měření). *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ a * $p < 0,05$.*

Ve srovnání s kontrolní skupinou byla *O*-deethylásová aktivita CYP1A1 a CYP1A2 signifikantně zvýšena v jaterních mikrosomech potkanů premedikovaných ellipticinem a kombinacemi ellipticinu s vandetanibem a lenvatinibem. K největšímu nárůstu aktivity CYP1A došlo při premedikaci ellipticinu s vandetanibem, což odpovídá aktivitám naměřeným pomocí oxidace Sudanu I. Samotné podání inhibitorů tyrosinkinasy nevedlo k žádnému zvýšení aktivity CYP1A.

Aktivita isoformy CYP1A2 v jaterních mikrosomech potkanů kontrolních a premedikovaných vandetanibem, lenvatinibem, ellipticinem a kombinací ellipticinu s vandetanibem nebo lenvatinibem byla stanovena *O*-demethylací 7-methoxyresorufinu (obrázek 15, str. 58). Právě tato isoforma cytochromu P450 přeměňuje 7-methoxyresorufin na resorufin⁵⁸.

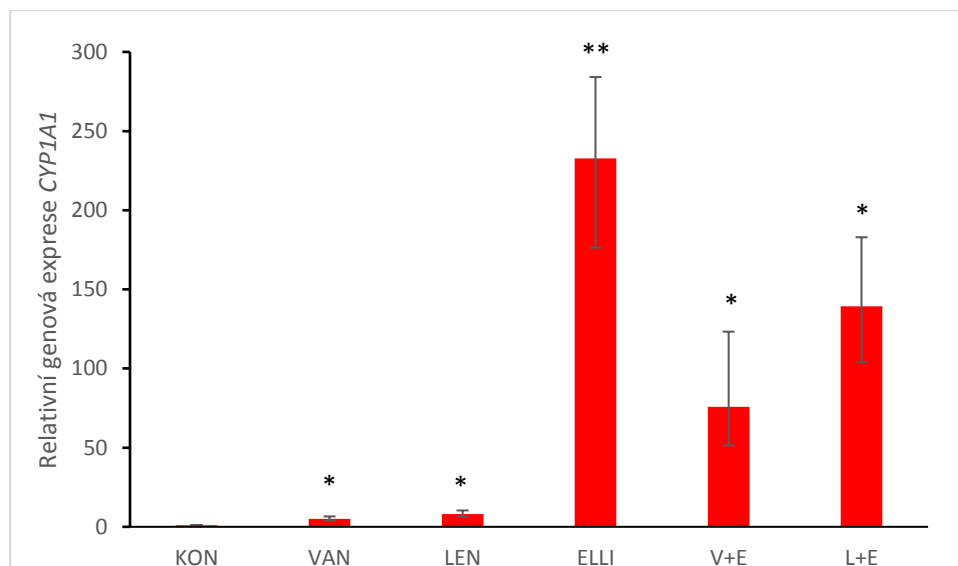


Obrázek 15: *Specifická aktivita CYP1A2 v jaterních mikrosomech potkanů kontrolních (KON) a premedikovaných vandetanibem (VAN), lenvatinibem (LEN), ellipticinem (ELLI) a jejich kombinacemi (V+E a L+E) měřená metodou MROD. Statistická významnost byla vyhodnocena pomocí T-testu (tři paralelní měření). *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ a * $p < 0,05$.*

Ve srovnání s kontrolou došlo k významnému nárůstu *O*-demethylásové aktivity CYP1A2 v jaterních mikrosomech potkanů premedikovaných ellipticinem a jeho kombinacemi s vandetanibem nebo lenvatinibem. K nejvyššímu signifikantnímu nárůstu došlo u premedikace ellipticinu s lenvatinibem. Samotné podání lenvatinibu vedlo také k mírnému (1,6-krát) nárůstu aktivity CYP1A2, zatímco vandetanib nezpůsobil žádnou změnu v aktivitě CYP1A2.

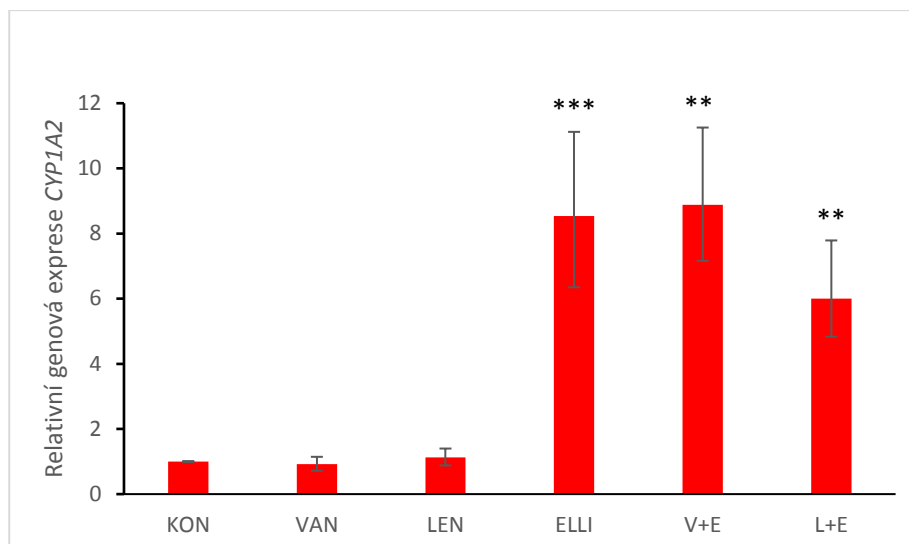
Dalším krokem byla analýza exprese mRNA pomocí kvantitativní PCR. Pro analýzu genové exprese CYP1A1/2 pomocí kvantitativní PCR byla použita připravená cDNA z jater potkanů kontrolních a premedikovaných vandetanibem, lenvatinibem, ellipticinem a kombinacemi ellipticinu s vandetanibem a lenvatinibem. Jako referenční gen, který by měl být ve všech buňkách exprimován stejně, byl použit β -aktin. Hodnoty C_T byly určeny z naměřených amplifikačních křivek.

Získaná data byla vyhodnocena a výsledky jsou uvedeny na obrázcích 16 a 17, na straně 59 a 60.



Obrázek 16: Relativní genová exprese CYP1A1 v játrech potkanů kontrolních (KON) a premedikovaných vandetanibem (VAN), lenvatinibem (LEN), ellipticinem (ELLI) a jejich kombinacemi (V+E a L+E). Standardní chyba měření a statistická významnost byla vyhodnocena pomocí programu REST 2009. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ a * $p < 0,05$.

Z obrázku 16 je zřejmé, že došlo ke signifikantnímu zvýšení genové exprese CYP1A1 v játrech potkanů působením všech zkoumaných protinádorových léčiv i jejich kombinací. Indukce genové exprese CYP1A1 byla nejvyšší u potkanů premedikovaných ellipticinem a kombinacemi ellipticinu s inhibitory tyrosinkinas.

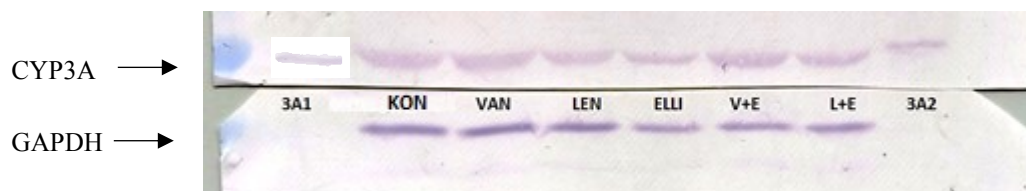


Obrázek 17: Relativní genová exprese CYP1A2 v játrech potkanů kontrolních (KON) a premedikovaných vandetanibem (VAN), lenvatinibem (LEN), ellipticinem (ELLI) a jejich kombinacemi (V+E a L+E). Standardní chyba měření a statistická významnost byla vyhodnocena pomocí programu REST 2009. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ a * $p < 0,05$.

V případě CYP1A2 došlo k signifikantnímu zvýšení genové exprese pouze po podání ellipticinu samotného či v kombinaci s vandetanibem nebo lenvatinibem. Potkani, kteří byli vystaveni samotnému vandetanibu a lenvatinibu, měli míru relativní exprese jaterního CYP1A2 podobnou jako potkani kontrolní.

4.4. Vliv vandetanibu, lenvatinibu a ellipticinu na expresi cytochromů P450 podrodiny 3A

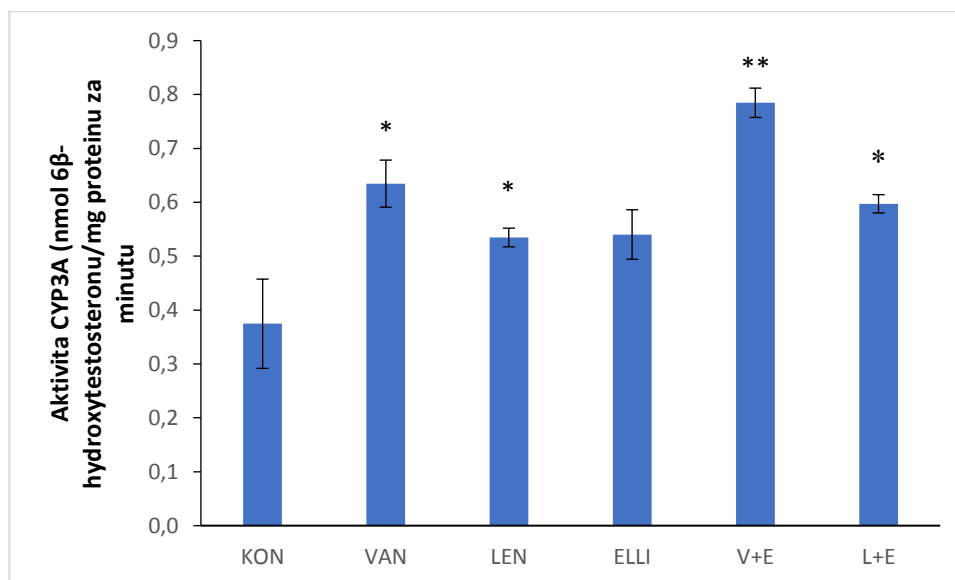
Dalším ze studovaných cytochromů P450 byla podrodina CYP3A, která se významně podílí na přeměně vandetanibu na N-desmethylvandetanib, lenvatinibu na desmethyllenvatinib a ellipticinu na 13-OH a 12-OH ellipticin^{21,22,30,71}. Na obrázku 18 (str. 61) je zobrazena ukázka vyvolané membrány pro cytochromy P450 – CYP3A1 a CYP3A2.



Obrázek 18: Imunodetekce CYP3A1/2 v mikrosomálních frakcích jater potkanů kontrolních (KON) a premedikovaných vandetanibem (VAN), lenvatinibem (LEN), ellipticinem (ELLI) a jejich kombinacemi (V+E, L+E). 3A1 – standard rekombinantního potkaního CYP3A1 v Supersomech™ a 3A2 – standard rekombinantního potkaního CYP3A2 v Supersomech™.

Působením studovaných látek nedošlo k prokazatelné změně proteinové exprese CYP3A v játrech premedikovaných potkanů.

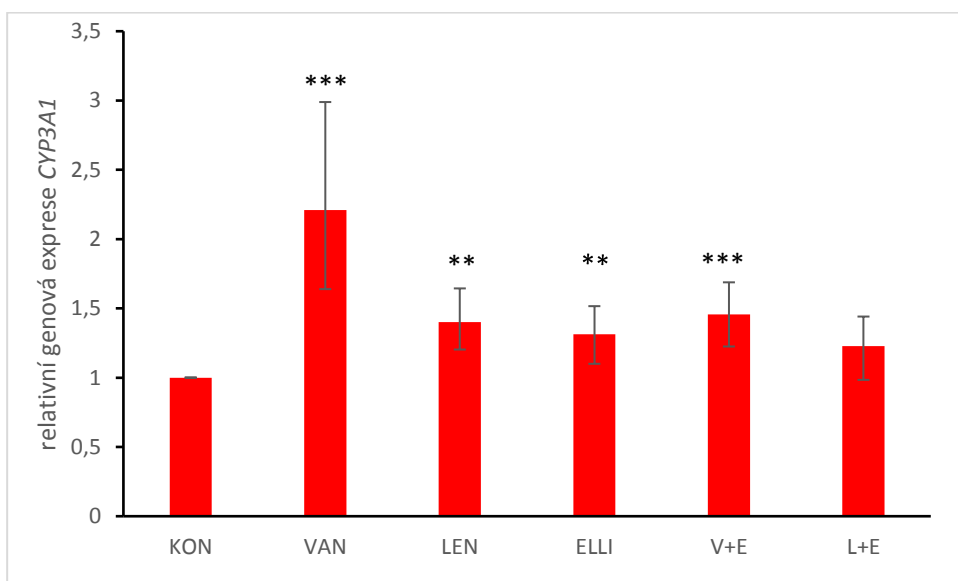
V mikrosomální frakci jater potkanů kontrolních a premedikovaných vandetanibem, lenvatinibem, ellipticinem a kombinacemi ellipticinu s vandetanibem a lenvatinibem byla stanovena specifická aktivita CYP3A. Jako „markerová“ reakce byla sledována 6- β -hydroxylace testosteronu⁶⁰ (obrázek 19).



Obrázek 19: Specifická aktivita CYP3A v jaterních mikrosomech potkanů kontrolních (KON) a premedikovaných vandetanibem (VAN), lenvatinibem (LEN), ellipticinem (ELLI) a jejich kombinacemi (V+E a L+E) byla stanovena pomocí 6- β -hydroxylace testosteronu. Statistická významnost byla vyhodnocena pomocí T-testu (tři paralelní měření). *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ a * $p < 0,05$.

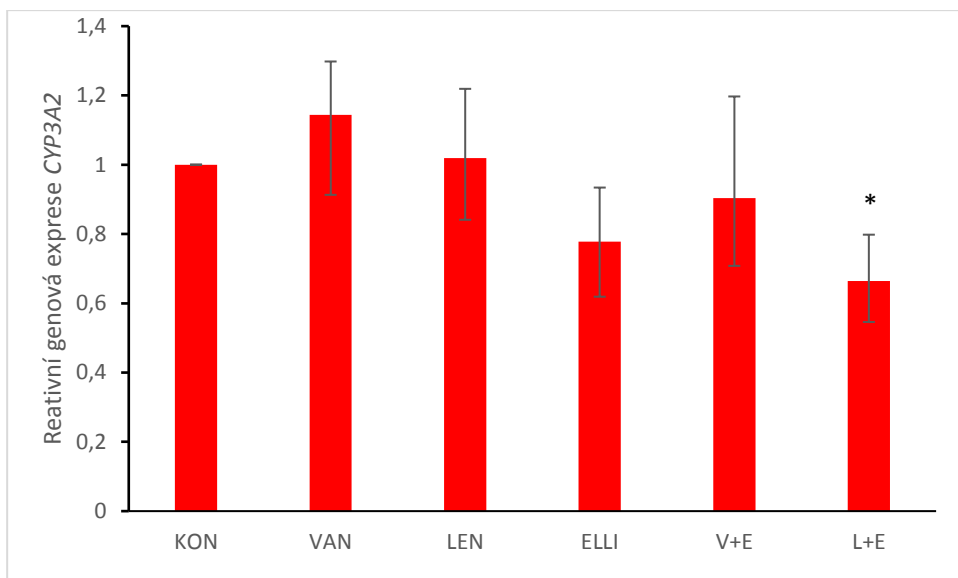
Všechny studované látky mírně zvýšily specifickou aktivitu CYP3A v jaterních mikrosomech. Nejvyšší nárůst aktivity CYP3A vyvolalo kombinované podání vandetanibu a ellipticinu, po kterém byla rychlost „markerové“ reakce 6 β -hydroxylace testosteronu dvakrát zvýšena.

Pro analýzu genové exprese CYP3A1/2 pomocí kvantitativního PCR byla použita připravená cDNA z jater potkanů kontrolních a premedikovaných vandetanibem, lenvatinibem, ellipticinem a kombinacemi ellipticinu s vandetanibem nebo lenvatinibem. Získaná data byla vyhodnocena a výsledky jsou uvedeny na obrázcích 20 a 21 (str. 63).



Obrázek 20: Relativní genová exprese CYP3A1 v játrech potkanů kontrolních (KON) a premedikovaných vandetanibem (VAN), lenvatinibem (LEN), ellipticinem (ELLI) a jejich kombinacemi (V+E a L+E). Standardní chyba měření a statistická významnost byla vyhodnocena pomocí programu REST 2009. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ a * $p < 0,05$.

V porovnání s kontrolními vzorky došlo u všech premedikací k mírnému nárůstu genové exprese CYP3A1, který nebyl statisticky významný pouze v játrech potkanů vystavených společnému působení ellipticinu a lenvatinibu. Hladina mRNA pro CYP3A1 byla nejvíce zvýšena v játrech potkanů, kterým byl podán vandetanib.



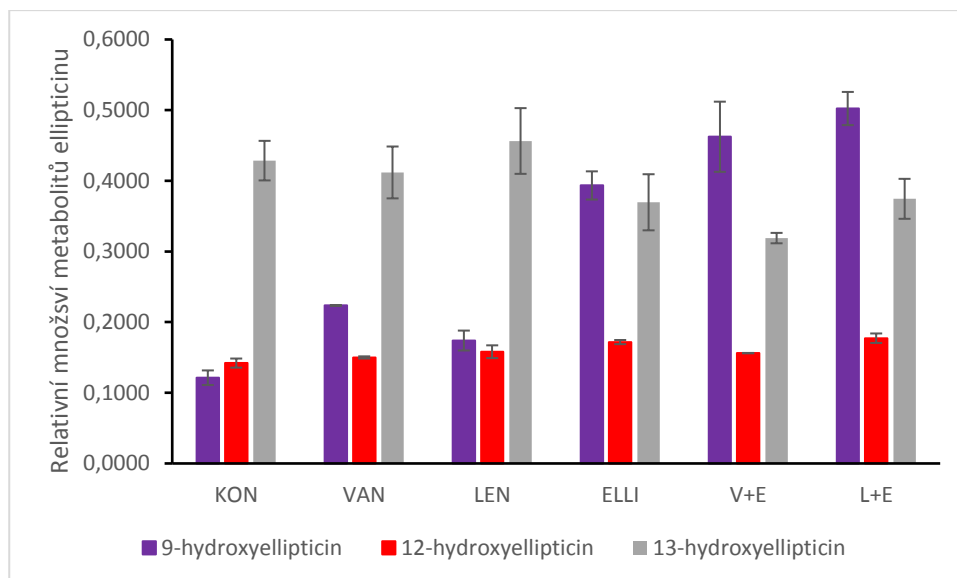
Obrázek 21: Relativní genová exprese CYP3A2 v játrech potkanů kontrolních (KON) a premedikovaných vandetanibem (VAN), lenvatinibem (LEN), ellipticinem (ELLI) a jejich kombinacemi (V+E a L+E). Standardní chyba měření a statistická významnost byla vyhodnocena pomocí programu REST 2009. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ a * $p < 0,05$.

Relativní genová exprese CYP3A2 po podání samostatných inhibitorů tyrosinkinasy je srovnatelná s kontrolní skupinou. Po společném podání ellipticinu a lenvatinibu došlo k mírnému, nicméně signifikantnímu, poklesu exprese CYP3A2. Celkově byl patrný vliv ellipticinu na snížení množství mRNA pro CYP3A2.

4.5. Studium přeměny vandetanibu, lenvatinibu a ellipticinu

V mikrosomální frakci jater potkanů byl sledován vliv zkoumaných látek na metabolismus ellipticinu, vandetanibu a lenvatinibu zprostředkovaných v přítomnosti NADPH cytochromy P450

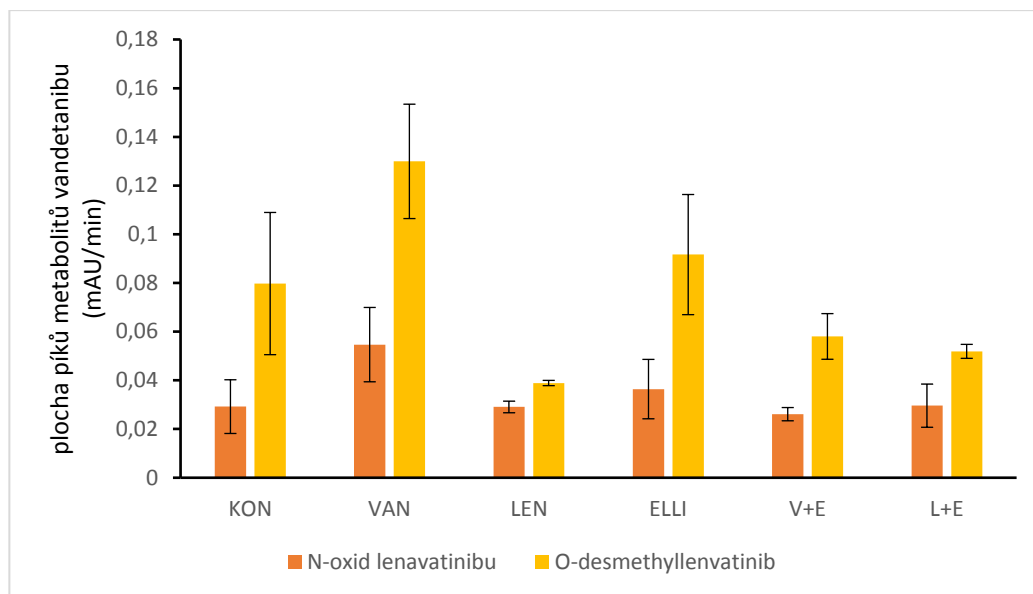
Pomocí HPLC bylo analyzováno množství metabolitů 9-hydroxyellipticinu, 12-hydroxyellipticinu a 13-hydroxyellipticinu po inkubaci ellipticinu s jaterními mikrosomy v přítomnosti NADPH (obrázek 22, str. 64)



Obrázek 22: Tvorba metabolitů ellipticinu mikrosomální frakcí z jater potkanů kontrolních (KON) a premedikovaných vandetanibem (VAN), lenvatinibem (LEN), ellipticinem (ELLI) a jejich kombinacemi (V+E, L+E).

Z obrázku 22 je patrné, že u potkanů premedikovaných ellipticinem a u potkanů premedikovaných kombinacemi ellipticinu s inhibitory tyrosinkinas byl nárůst tvorby metabolitu 9-hydroxyellipticinu nejvyšší. K nárůstu množství tohoto metabolitu došlo však i v jaterních mikrosomech potkanů, kterým byly podávány samotné inhibitory tyrosinkinas. Tvorba metabolitů 12-hydroxyellipticinu a 13-hydroxyellipticinu se mezi jednotlivými premedikačními skupinami zásadně nelišila. Kombinované podání ellipticinu s vandetanibem vedlo ke sníženému množství 13-hydroxyellipticinu po přeměně ellipticinu jaterními mikrosomy

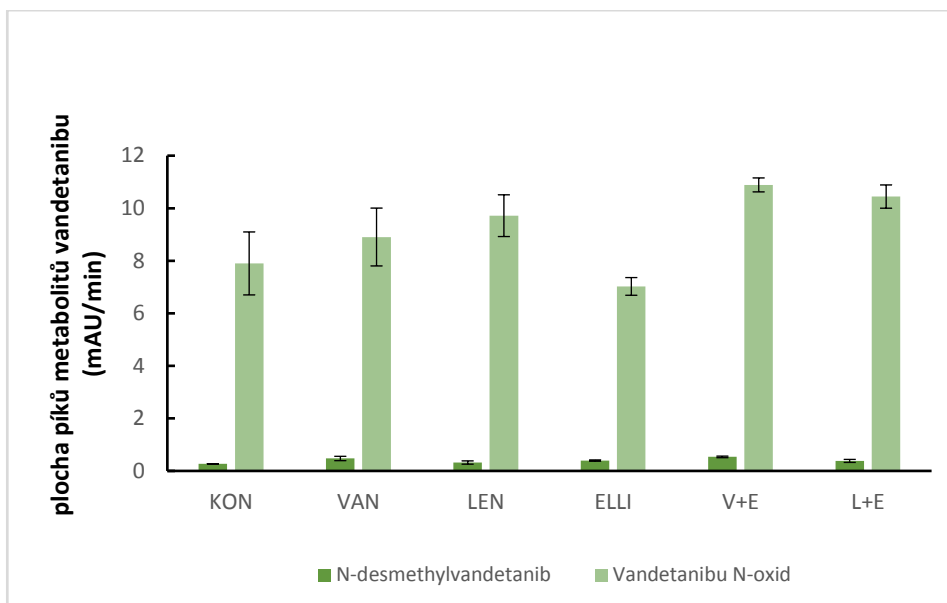
V mikrosomální frakci jater potkanů kontrolních a premedikovaných vandetanibem, lenvatinibem, ellipticinem a jejich kombinacemi byla také studována schopnost přeměny lenvatinibu. Bylo sledováno množství metabolitů *O*-desmethyllenvatinibu a lenvatinibu N-oxidu (obrázek 23, str. 65). Identifikace metabolitů byla provedena pomocí hmotnostní spektrometrie v rámci diplomové práce Bc. Kataríny Vávrové. Metabolity byly separovány pomocí HPLC (viz kapitola 3.3.12., str. 43).



Obrázek 23: Tvorba metabolitů lenvatinibu mikrosomální frakcí z jater potkanů kontrolních (KON) a premedikovaných vandetanibem (VAN), lenvatinibem (LEN), ellipticinem (ELLI) a jejich kombinacemi (V+E, L+E).

U jednotlivých premedikací potkanů jsme při tvorbě metabolitů lenvatinibu, lenvatinibu N-oxidu a *O*-desmethyllenvatinibu nesledovali žádné průkazné rozdíly. Jaterní mikrosomy z potkanů, kterým byl podán lenvatinib, kombinace ellipticinu s vandetanibem, nebo lenvatinibem vykazovali tendenci k poklesu tvorby *O*-desmethyllenvatinibu.

V mikrosomální frakci jater potkanů kontrolních a premedikovaných vandetanibem, lenvatinibem, ellipticinem a jejich kombinacemi byl studován i metabolismus vandetanibu. Bylo sledováno množství metabolitů N-desmethylvandetanibu a vandetanibu N-oxidu (obrázek 24, str. 66). Metabolity byly separovány pomocí HPLC (viz kapitola 3.3.13., str. 44).



Obrázek 24: *Tvorba metabolitů vandetanibu mikrosomální frakcí jater potkanů kontrolních (KON) a premedikovaných vandetanibem (VAN), lenvatinibem (LEN), ellipticinem (ELLI) a jejich kombinacemi (V+E, L+E).*

Vznik metabolitu vandetanib N-oxidu vzrostl u potkanů premedikovaných kombinacemi ellipticinu s vandetanibem nebo lenvatinibem. Podobně tomu bylo i u vzniku N-desmethylvandetanibu, kde u potkanů premedikovaných samotným ellipticinem a kombinací ellipticinu s vandetanibem došlo k mírnému nárůstu.

5. Diskuze

Pro léčbu nádorových onemocnění se čím dál více používá kombinované podání několika léků. Podání více léčiv může ovlivnit metabolismus ostatních léků či xenobiotik přítomných v organismu. Ovlivnění může nastat zejména změnami v expresi biotransformačních enzymů⁷². Tato diplomová práce je zaměřena na dva inhibitory tyrosinkinasy, vandetanib a lenvatinib, a cytostatikum ellipticin. Tyto látky byly podány laboratorním potkanům samostatně či v kombinaci, abychom mohli studovat jejich vzájemné působení v organismu.

Oba inhibitory tyrosinkinasy jsou v lidském těle metabolisovány CYP3A4 (cit.^{21,22,25}). Vandetanib je cytochromem P450 3A4 přeměňován na farmakologicky aktivní N-desmethylvandetanib. Dále je také přeměňován pomocí flavinových monooxygenas na detoxikační metabolit vandetanib N-oxid²⁵. Lenvatinib je cytochromem P450 3A4 přeměňován na desmethylenvatinib. Lenvatinib může být také přeměňován aldehydoxidázami na detoxikační metabolity chinolinony. U makaků byla prokázána konjugace s glutathionem^{21,22}. Cytochromy P450 oxidují ellipticin na 5 metabolitů. V rámci sledování metabolismu ellipticinu jaterními mikrosomy potkanů vystavených studovaným látkám byly detekovány 9-hydroxyellipticin, 12-hydroxyellipticin a 13-hydroxyellipticin. Tvorba detoxikačního metabolitu 9-hydroxyellipticinu je zprostředkována CYP1A1/2. 12-hydroxy a 13-hydroxyellipticin jsou aktivační metabolity, které vznikají přeměnou ellipticinu cytochromy P450 3A4 (cit.³⁰⁻³²). V této diplomové práci jsme se zaměřili zejména na CYP1A1/2, které hrají důležitou roli v metabolismu ellipticinu a jsou zodpovědné za přeměnu xenobiotik v I. fázi biotransformace, a CYP3A1/2, které jsou potkaními zastupci podrodiny 3A, která v lidském těle metabolisuje vandetanib a lenvatinib a také se podílí na přeměně jiných léčiv v organismu³⁵.

Studium vlivu vandetanibu a lenvatinibu na proteinovou a genovou expresi a aktivitu CYP1A1/2 a CYP3A1/2 v játrech potkanů nebylo dosud při výzkumu těchto léčiv prováděno. Doposud byl sledován pouze metabolismus těchto látek, a to zejména z moči a u lidí.

Na genové i proteinové úrovni byl pozorován nárůst exprese CYP1A1 po samostatně podávaném vandetanibu. Podobný výsledek byl získán i při stanovení aktivity CYP1A. Vystavení vandetanibu vedlo v játrech potkana ke zvýšení hladiny mRNA pro CYP3A1.

Ačkoliv na proteinové úrovni jsme podobnou změnu v množství CYP3A1 nezaznamenali. Aktivita byla po podání vandetanibu mírně zvýšena.

Lenvatinib byl v roce 2015 schválen FDA jako léčivo pro progresivní diferenční nádor štítné žlázy, který nereaguje na léčbu radioaktivním jodem¹⁷. Při sledování genové exprese bylo prokázáno, že exprese CYP1A1 oproti kontrole mírně vzrostla u podání samotného lenvatinibu. Po vystavení potkanů lenvatinibu došlo k mírnému zvýšení genové exprese CYP3A1, které odpovídal analogický nárůst enzymové aktivity tohoto enzymu. Při sledování proteinové exprese nebyly však tyto změny detekovány.

Ellipticin je alkaloid, který vykazuje protinádorové účinky, které jsou účinné na celou řadu nádorových onemocnění, například leukémie či rakovina plic, prsu apod.^{44,46}. Z mechanismu účinku ellipticinu víme, že ellipticin může indukovat množství cytochromů P450 (cit.³²). Ellipticin se váže na jaderný receptor AhR, který podmiňuje zvýšenou transkripci genů pro *CYP1A1/2* (cit.⁴⁸). Naše výsledky potvrzují indukční vliv ellipticinu na genovou expresi CYP1A1, která byla nejvíce zvýšena u potkanů premedikovaných samotným ellipticinem. Zvýšená genová exprese CYP1A1 byla také zaznamenána u potkanů premedikovaných kombinacemi ellipticinu s inhibitory tyrosinkinás. Indukce genové exprese CYP1A2 byla nejvyšší u kombinovaného podání ellipticinu s vandetanibem. Ke zvýšení exprese této isoformy došlo i u druhé kombinované premedikace, tak u samotného podání ellipticinu. Z hlediska proteinové exprese CYP1A1 byl nárůst u potkanů premedikovaných ellipticinem a kombinacemi nejvyšší, stejně tak proteinová exprese CYP1A2. Při stanovení aktivity CYP1A byl nejvyšší nárůst aktivity u potkanů premedikovaných ellipticinem a kombinacemi ellipticinu s vandetanibem a lenvatinibem. Zatímco při sledování genové exprese CYP1A1/2 vidíme velký nárůst oproti kontrole, při sledování genové exprese CYP3A1 můžeme sledovat pouze mírný nárůst. Genová exprese CYP3A2 se dokonce u potkanů premedikovaných kombinací ellipticinu s lenvatinibem snížila. U proteinové exprese CYP3A1/2 nedošlo k nárůstu u žádné premedikace. Zatímco při sledování aktivity CYP3A došlo k nejvyšším nárůstu aktivity u kombinovaných premedikací.

V diplomové práci byl dále studován možný vliv podávaných látek na jejich přeměnu jaterními cytochromy P450. Z tohoto důvodu byly vandetanib, lenvatinib i ellipticin inkubovány s jaterními mikrosomy premedikovaných i kontrolních potkanů v přítomnosti NADPH, koenzymu cytochromů P450.

Při studování metabolismu ellipticinu, byly detekovány všechny tři výše zmíněné metabolity – 9-hydroxyellipticin, 12-hydroxyellipticin a 13-hydroxyellipticin. Největší změny byly zaznamenány při detekci 9-hydroxyellipticinu, který vzniká z ellipticinu přeměnou CYP1A1/2 (cit.³⁰⁻³²). Nejvyšší množství tohoto metabolitu bylo detekováno u potkanů vystavených ellipticinu. Mírný nárůst tvorby 9-hydroxyellipticinu jsme sledovali také u potkanů premedikovaných samotným vandetanibem. Zvýšením tvorby 9-hydroxyellipticinu může být způsobeno prokázanou zvýšenou expresí CYP1A v příslušných mikrosomálních frakcích což potvrzuje majoritní roli CYP1A v této reakci přeměny ellipticinu

Při sledování metabolismu vandetanibu byly detekovány oba metabolity – vandetanib N-oxid a N-desmethylvandetanib. Vzhledem k pouze mírnému nárůstu tvorby detekovaných metabolitů vandetanibu jaterními mikrosomy se zvýšenou aktivitou CYP1A, vyvolané vystavením potkanů ellipticinu, je pravděpodobné, že se potkaní CYP1A neúčastní přeměny vandetanibu, jak bylo naznačeno v diplomové práci Vlastimila Hromka

Při sledování metabolismu lenvatinibu byly detekovány *O*-desmethyllenvatinib a lenvatinib N-oxid. Během měření metabolismu lenvatinibu jsme zaznamenali pouze malé píky jednotlivých metabolitů. Ve větší míře se vyskytoval *O*-desmethyllenvatinib. Při metabolismu lenvatinibu budou pravděpodobně hrát roli především aldehydoxidas a v menší míře CYP3A1/2. Při metabolismu lenvatinibu nebudou pravděpodobně CYP1A1/2 hrát žádnou roli, protože nedošlo k odpovídajícímu nárůstu tvorby metabolitů lenvatinibu použitím jaterních mikrosomů s významně zvýšenou aktivitou CYP1A.

Výsledky této diplomové práce potvrzují indukční vliv ellipticinu na genovou i proteinovou expresi CYP1A1/2 a ukazují, že je vandetanib pravděpodobným induktorem CYP1A1. Metabolismy inhibitorů tyrosinkinasy a ellipticinu jsme sledovali abychom zjistili, zda si navzájem neovlivňují metabolismus. Při studování metabolismu vandetanibu jsme zjistili, že při kombinovaném podání vandetanibu s ellipticinem, došlo k částečnému zvýšení tvorby obou metabolitů vandetanibu. To by mohlo znamenat, že ellipticin ovlivňuje metabolismus vandetanibu. Stejně tak u metabolismu ellipticinu vidíme nárůst detoxikačního metabolitu 9-hydroxyellipticinu jak u samotného podání vandetanibu, tak u kombinovaného podání ellipticinu s vandetanibem. To by opět značilo ovlivnění metabolismu tohoto cytostatika vandetanibem.

Studie inhibitorů tyrosinkinasy přináší velký pokrok pro léčbu různých rakovinných onemocnění. Proto je důležité studovat jejich metabolismus a enzymy, které daná léčiva biotransformují.

6. Závěr

V předkládané diplomové práci byl studován vliv inhibitorů tyrosinkinasy, vandetanibu a lenvatinibu, cytostatika ellipticinu a jejich kombinací na genovou a proteinovou expresi vybraných isoformů cytochromů P450 u potkanů *in vivo*.

Byl stanoven specifický obsah cytochromů P450 v mikrosomální frakci z jater potkanů kontrolních a premedikovaných zkoumanými látkami. Metodou Western blot s následnou imunodetekcí s použitím specifických protilátek byla sledována míra proteinové exprese CYP1A1/2 a CYP3A1/2 v mikrosomální frakci z jater. V mikrosomální frakci jater byla sledována aktivita CYP1A (pomocí *O*-deethylace 7-ethoxyresorufinu), CYP1A1 (oxidace Sudanu I), CYP1A2 (*O*-demethylace 7-methoxyresorufinu) a CYP3A (6 β -hydroxylace testosteronu). Dále byla izolována mRNA z jater potkanů a byla sledována míra genové exprese CYP1A1/2 a CYP3A1/2 pomocí kvantitativní PCR. Dále byl v mikrosomální frakci z jater potkanů kontrolních a premedikovaných vandetanibem, lenvatinibem, ellipticinem a jejich kombinacemi studován metabolismus jednotlivých zkoumaných látek.

Výsledky z předkládané diplomové práce lze shrnout následovně:

- RNA a mikrosomy byly úspěšně izolovány z jater potkanů kontrolních a premedikovaných zkoumanými látkami.
- Proteinová exprese CYP1A1 byla oproti potkanům kontrolním zvýšena u všech premedikací, zatímco u CYP1A2 došlo ke zvýšení proteinové exprese u potkanů premedikovaných samotným ellipticinem a kombinacemi ellipticinu s inhibitory tyrosinkinasy. Proteinová exprese CYP3A1/2 potkanů premedikovaných byla srovnatelná s proteinovou expresí potkanů kontrolních.
- Aktivita CYP1A byla zvýšená u všech premedikovaných potkanů. Zatímco aktivita CYP1A2 byla zvýšená pouze u potkanů premedikovaných ellipticinem, samotnými i v kombinaci s inhibitory tyrosinkinasy aktivita CYP1A1 byla opět oproti potkanům kontrolním zvýšena u všech ostatních premedikací. Aktivita CYP3A byla nejvíce zvýšena při samotném podání vandetanibu a u kombinovaného podání vandetanibu s ellipticinem.

- Nárůst genové exprese CYP1A1 odpovídá zvýšené proteinové expresi tohoto enzymu, stejně tak tomu je i u genové exprese CYP1A2. Došlo ke zvýšení genových expresí zejména u kombinovaných podání. Exprese CYP1A1 byla zvýšená i u premedikace samotnými zkoumanými látkami. K největšímu nárůstu genové exprese CYP3A1 v játrech potkana podání vandetanibu. Naopak ke snížení genové exprese CYP3A2 vedou premedikace ellipticinem.
- Premedikace potkanů ellipticinem a kombinacemi ellipticinu s vandetanibem nebo lenvatinibem vede ke zvýšení tvorby 9-hydroxyellipticinu.
- Kombinované premedikace potkanů vedou ke zvýšené tvorbě vandetanib N-oxidu.

7. Seznam použité literatury

1. „Česká republika a rakovina v číslech.“ (Online), dostupné z: <https://www.linkos.cz/narodni-onkologicky-program/co-musite-vedet/ceska-republika-a-rakovina-v-cislech/>. Přístup: 10. prosince 2017
2. „IARC-International Agency For Research on Cancer.“ (Online), dostupné z: <http://www.iarc.fr/>. Přístup: 1. dubna 2018
3. „SVOD“ (Online), dostupné z: <https://www.svod.cz/>. Přístup: 1. dubna 2018
4. Shchemelinin, I., Sevc, L., Necas, E. Protein kinase inhibitors. *Fol. Biol.*, **52**, 137-148 (2006)
5. Levitzki, A. Tyrosine kinase inhibitors: views of selectivity, sensitivity, and clinical performance. *Annu. Rev. Pharmacol Toxicol.* **53**, 161-185 (2013)
6. Frampton, J. E. Lenvatinib: A Review in Refractory Thyroid Cancer. *Target. Oncol.* **11**, 115-122 (2016)
7. Nix, P., Nicolaides, A., Coatesworth, A. P. Thyroid cancer review 1: presentation and investigation of thyroid cancer. *Int. J. Clin. Pract.* **59**, 1340-1344 (2005)
8. Lorusso, L., Newbold, K. Lenvatinib: a new option for the treatment of advanced iodine refractory differentiated thyroid cancer. *Future Oncol. Lond. Engl.* **11**, 1719-1727 (2015)
9. Límanová, Z. Nádory štítné žlázy – diagnostika a léčba, doporučené postupy. *Interní medicína pro praxi*, **5**, 308-314 (2005)
10. Nix, P.A., Nicolaides, A., Coatesworth, A.P. Thyroid cancer review 3: management of medullary and undifferentiated thyroid cancer. *Inter. J. Clin. Pract.* **60**, 80-84 (2005)
11. Bendlová, B., Dvoráková, S., Václavíková, E., Vlcek, P. Multiple endocrine neoplasia type 2 syndrome. *Klin. Onkol. Cas. Ceske Slov. Onkol. Spolecnosti.* **22**, 28-31 (2009)
12. Giunti, S., Antonelli, A., Amorosi, A., Santarpia, L. Cellular Signaling Pathway Alterations and Potential Targeted Therapies for Medullary Thyroid Carcinoma. *International Journal of Endocrinology.* **2013**, 1-17 (2013)
13. Krause, D.S., Van Etten, R. A. Tyrosine kinase as targets for cancer therapy. *N. Engl. J. Med.* **353**, 172-187 (2005)
14. Rosypal, S. *Úvod do molekulární biologie, druhý díl (molekulární biologie eukaryot). Třetí edice.* (Brno: Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, 1999)

15. „RTK-growth-factor-signaling. My Cancer Genome.“ (Online), dostupné z:
<https://www.mycancergenome.org/content/molecular-medicine/pathways/RTK-growth-factor-signaling>. Přístup 17. dubna 2018
16. Druker, B.J., Guilhot, F., O'Brian, S.G., Gathmann, I., Kantarjian, H., Gattermann, N., Deininger, M. W. N., Silver, R. T., Goldman, J. M., Stone, R. M., Cervantes, F., Hochhaus, A., Powell, B. L., Gabrilove, J. L., Rousselot, P., Reiffers, J., Cornelissen, J. J., Hughes, T., Agis, H., Fisher, T., Verhoef, G., Shepherd, J., Saglio, G., Gratwohl, A., Nielsen, J. L., Radich, J. P., Smonsson, B., Taylor, K., Baccarani, M., So, Ch., Letvak, L., Larson, R. A. Five year follow up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* **355**, 2408-2417 (2006)
17. Fala, L. Lenvima (Lenvatinib), a Multireceptor Tyrosine Kinase Inhibitor, Approved by the FDA for the Treatment of Patints with Differentiated Thyroid Cancer. *Am. Health Drug Benefits*, **8**, 175-179 (2015)
18. Australian Prescriber. Lenvatinib for thyroid and renal cell cancer. *Austr. Prescr.* **40**, 242-243 (2017)
19. Groden, P.J., Lee, T.C., Bhattacharyya, S., Connors, J. Lorch, J. lenvatinib-Associated Cervical Artery Dissections in a Patient with Radioiodine-Refractory Metastatic Papillary Thyroid Carcinoma. *Front. Med.* **4** (2018)
20. „Lenvatinib.“ (Online), dostupné z:
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/9823820>. Přístup: 1.dubna 2018
21. Dubbelman, A-C., Nijenhuis, C.M., Jansen, R.S., Rosing, H., Mizuo, H., Kawaguchi, S., Critchley, D., Shumaker, R., Schellens, J.H., Beijnen, J.H. Metabolite profiling of the multiple tyrosine kinase inhibitor lenvatinib: a cross-species comparsion. *Invest. New Drugs.* **34**, 300-318 (2016)
22. Inoue, K., Mizuo, H., Kawaguchi, S., Fukuda, K., Kusano, K., Yoshimura, T. Oxidative metabolic pathway of lenvatinib mediated by aldehyde oxidase. *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* **42**, 1326-1333 (2014)
23. „Lenvatinib. Wikipedia.“ (Online), dostupné z:
<https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Lenvatinib&oldid=806404180>. Přístup: 21. října 2017
24. Karras, S., Anagnostis, P., Krassas, G.E. Vandetanib for treatment of thyroid cancer: an update. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **10**, 469-481 (2014)

25. Martin, P., Oliver S., Robertson, J., Kennedy, S-J., Read, J., Duvauchelle, T. Pharmacokinetic Drug Interactions with Vandetanib during Coadministration with Rifampicin or Itraconazole. *Drugs R. D.*, **11**, 37-51 (2011)
26. Wells, S.A., Gosnell, J.E., Gagel, R.F., Moley, J., Pfister, D., Sosa, J.A., Skinner, M., Krebs, A., Vasselli, J., Schlumberger, M. Vandetanib for the Treatment of Patients With Locally Advanced or Metastatic Hereditary Medullary Thyroid Cancer. *J. Clin. Oncol.* **28**, 767-772 (2010)
27. Wells, S.A., Robinson, B.G., Gagel, R.F., Dralle, H., Fagin, J.A., Santoro, M., Baudin, E., Elisei, R., Jarzab, B., Vasselli, J.R., Read, J., Langmuir, P., Ryan, A.J., Schlumberger, M. Vandetanib in patients with locally advanced or metastatic medullary thyroid cancer: a randomized, double-blind phase III trial. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **30**, 134-141 (2012)
28. „Vandetanib.“ (Online), dostupné z: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB05294>.
Přístup: 18. března 2018)
29. „Vandetanib. *Wikipedia*.“ (Online), dostupné z:
<https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Vandetanib&oldid=822003660>. Přístup: 18. března 2018
30. Stiborová, M., Frei, E. Ellipticines as DNA-targeted chemotherapeutics. *Curr. Med. Chem.* **21**, 575-591 (2014)
31. Stiborová, M., Rupertová, M., Schmeiser, H.H., Frei, E. Molecular mechanisms of antineoplastic action of an anticancer drug ellipticine. *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech Repub.* **150**, 13-23 (2006)
32. Stiborová, M., Rupertová, M., Frei, E. Cytochrome P450 and peroxidase-mediated oxidation of anticancer alkaloid ellipticine dictates its anti-tumor efficiency. *Biochem. Biophys. Acta.* **1814**, 175-185 (2011)
33. Kizek, R., Adam, V., Hrabeta, J., Eckschlager, T., Smutny, S., Burda, J.V., Frei, E., Stiborová, M. Anthracclines and ellipticines as DNA-damaging anticancer drugs: Recent advances. *Pharmacol. Ther.* **133**, 26-39 (2012)
34. „Ellipticine E3380.“ (Online), dostupné z:
<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/e3380>. Přístup: 26.únor 2018

35. Stiborová, M., Hudeček, J., Hodek, P., Frei, E. Význam cytochromů P450 pro lidské zdraví. *Chem. Listy*, **93**, 229-237 (1999)
36. Knejzlík, Z., Káš, J., Ruml, T. Mechanismus vstupu xenobiotik do organismu a jejich detoxikace. *Chem. Listy*. **94**, 913-914 (2000)
37. Zanger, U.M., Schwab, M. Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacol. Ther.* **138**, 103-141 (2013)
38. Meunier, B., de Visser, S.P., Shaik, S. Mechanism of Oxidation Reactions Catalyzed by Cytochrome P450 Enzymes. *Chem. Rev.* **104**, 3947-3980 (2004)
39. Nebert, D.W., Russell, D.W. Clinical importance of the cytochromes P450. *The Lancet*. **360**, 1155-1162 (2002)
40. Omura, T., Sato, R. The Carbon Monoxide-binding Pigment of Liver Microsomes. *J. Biol. Chem.* **239**, 2379-2385 (1964)
41. Martignoni, M., Groothuis, G.M.M., de Kanter, R. Species differences between mouse, rat, dog, monkey and human CYP-mediated drug metabolism, inhibition and induction. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **2**, 875-894 (2006)
42. Dickins, M. Induction of Cytochromes P450. *Curr. Top. Med. Chem.* **4**, 1745-1766 (2004)
43. Rendic, S., Guengerich, F. P. Contributions of Human Enzymes in Carcinogen Metabolism. *Chem. Res. Toxicol.* **25**, 1316-1383 (2012)
44. Petersen, D.D., McKinney, C.E., Ikeya, K., Bale, A.E., McBride, O.W., Nebert, D.W. Human CYP1A1 gene: cosegregation of the enzyme inducibility, phenotype and an RFLP. *Am. J. Hum. Genet.* **48**, 720-725 (1991)
45. Lewis, D.F., Lake, B.G., George, S.G., Dickins, M., Eddershaw, P.J., Tarbit, M.H., Beresford, A.P., Goldfarb, P.S., Guengerich, F.P. Molecular modelling of CYP1 family enzymes CYP1A1, CYP1A2, CYP1A6 and CYP1B1 based on sequence homology with CYP102. *Toxicology*. **139**, 53-79 (1999)
46. Mercurio, M.G., Shiff, S.J., Galbraith, R.A., Sassa, S. Expression of Cytochrome P450 mRNAs in the Colon and the Rectum in Normal Human Subjects. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **210**, 350-355 (1995)
47. Meng, F., Ma, P., Sui, C., Tian, X., Jiang Y. Association between cytochrome P450 1A1 (*CYP1A1*) gene polymorphisms and the risk of renal cell carcinoma: a meta-analysis. *Sci. Rep.* **5**, 8108 (2015)

48. Aimová, D., Svobodová, L., Kotrbová, V., Mrázová, B., Hodek, P., Hudeček, J., Václavíková, R., Frei, E., Stiborová, M. The anticancer drug ellipticine is a potent inducer of rat cytochromes P450 1A1 and 1A2, thereby modulating its own metabolism. *Drug. Metab. Dispos.* **35**, 1926-1934 (2007)
49. Martin, S.D., Gabbia, D., Albertin, G., Sfriso, M.M., Mescoli, C., Albertoni, L., Paliuri, G., Bova, S., Palatini, P. Differential Effect of Liver Cirrhosis on the Pregnane X Receptor-Mediated Induction of CYP3A1 and CYP3A2 in the Rat. *Drug Metab. Dispos.* **42**, 1617-1626 (2014)
50. Lindström-Seppä, P., Koivusaari, U., Hänninen, O. Metabolism of foreign compounds in freshwater crayfish (*Astacus astacus* L.) tissues. *Aquat. Toxicol.* **3**, 35-46 (1983)
51. Wiechelman, K.J., Braun, R.D., Fitzpatrick, J.D. Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: identification of the groups responsible for color formation. *Anal. Biochem.* **175**, 230-231 (1988)
52. Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., Klenk, D.C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem. Anal. Biochem.* **150**, 76-85 (1985)
53. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**, 680-685 (1970)
54. Stiborová, M., Martínek, V., Rýdlová, H., Hodek, P., Frei, E. Sudan I is potential carcinogen for humans: evidence for its metabolic activation and detoxication by human recombinant cytochrome P450 1A1 and liver microsomes. *Cancer Res.* **62**, 5678-5684 (2002)
55. Burke, M.D., Mayer, R.T. Ethoxyresorufin: direct fluorimetric assay of a Microsomal O-Dealkylation Which Is Preferentially inducible by 3-Methylcholanthrene. *Drug Metab. Dispos.* **2**, 583-588 (1974)
56. „Pubchem, 7-Ethoxyresorufin.“ (Online), dostupné z:
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3294>. Přístup: 3. únor 2018
57. „Pubchem. Resorufin.“ (Online), dostupné z:
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/69462>. Přístup: 3. únor 2018)
58. Chen, J.J., Chen, G.S., Bunce Nigel, J. Inhibition of CYP1A2-dependent MROD activity in rat liver microsomes: An explanation of the hepatic sequestration of a limited subset of halogenated aromatic hydrocarbons. *Environ. Toxicol.* **18**, 115-119 (2003)

59. „Pubchem. 7-Methoxy-3H-phenoxazin-3-one.“ (Online), dostupné z:
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/119220>. Přístup: 3. únor 2018
60. Maezawa, K., Matsunaga, T., Takezawa, T., Kanai, M., Ohira, S., Ohmori, S. Cytochrome P450 3As Gene Expression and Testosterone 6 β -hydroxylase Activity in Human Fetal Membranes and Placenta at Full Term. *Biol. Pharm. Bull.* **33**, 249-254 (2010)
61. Stiborová, M., Sejbal, J. Bořek-Dohalská, L., Aimová, D., Poljaková, J., Forsterová, K., Rupertová, M., Wiesner, J., Hudeček, J., Wiessler, M., Frei, E. The anticancer drug ellipticine forms covalent DNA adducts, mediated by human cytochromes P450, through metabolism to 13-hydroxyellipticine and ellipticine N2-oxide. *Cancer Res.* **64**, 8374–8380 (2004)
62. Stiborová, M., Bořek-Dohalská, L., Aimová, D., Kotrbová, V., Kukacková, K., Janouchová, K., Rupertová, M., Ryšlavá, H., Hudeček, J., Frei, E. Oxidation pattern of the anticancer drug ellipticine by hepatic microsomes - similarity between human and rat systems. *Gen. Physiol. Biophys.* **25**, 245-261 (2006)
63. Hromek, V. *Diplomová práce* (2016)
64. Peirson, S.N., Butler, J.N. RNA extraction from mammalian tissues. *Methods Mol Biol* **362**, 315–316 (2007)
65. „Total RNA Purification, Geneaid.“ (Online), dostupné z:
<http://www.geneaid.com/products/rna-extraction/total-rna-purification>. Přístup: 14. duben 2018
66. „Protocol – How to Run an Agarose Gel.“ (Online), dostupné z:
<https://www.addgene.org/protocols/gel-electrophoresis/>. Přístup: 14. dubna 2018
67. „Syntéza cDNA, LabGuide.cz.“ (Online), dostupné z:
<http://labguide.cz/metody/synteza-cdna/>. Přístup: 9. prosinec 2017)
68. Kubista, M., Andrade, J.M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonák, J., Lind, K., Sindelka, R., Sjöback, R., Sjögreen, B., Strömbom, L., Ståhlberg, A., Zoric, N. The real-time polymerase chain reaction. *Mol. Aspects Med.* **27**, 95–125 (2006)
69. Wong, M. L., M., J. F. Real-time PCR for mRNA quantitation. *BioTechniques*, **39**, 75–85 (2005)

70. „Life Technologies: TaqMan® Gene Expression Master Mix Protocol“ (Online), dostupné z:
http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_support/documents/generaldocuments/cms_039284.pdf. Přístup: 14. dubna 2018
71. Sudhakar, A. History of Cancer, Ancient and Modern Treatment Methods. *J. Cancer Sci, Ther.* **1**, 1-4 (2009)

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovatelů.

Jméno a příjmení s adresou	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka