

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
KATEDRA BIOCHEMIE



Inhibitory tyrosinkinasy jako protinádorová léčiva nové generace

Inhibitors of tyrosine kinases as anticancer drugs of a new generation

Bakalářská práce

studijního oboru Biochemie

Vlastimil Hromek

Vedoucí závěrečné práce: Prof. RNDr. Marie Stiborová, DrSc.

Praha 2014

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne

Podpis:

Na tomto místě bych rád poděkoval paní prof. RNDr. Marii Stiborové, DrSc., za vynikající a trpělivý přístup, a hlavně odborné rady po celou dobu vypracovávání bakalářské práce.

Dále bych chtěl poděkovat Mgr. Radku Indrovi a dalším členům laboratoře za pomoc při základních laboratorních metodách a další odbornou pomoc. V neposlední řadě patří velký dík mé partnerce a rodině za podporu během celého mého studia.

OBSAH

ABSTRAKT.....	-7-
ABSTRACT.....	-8-
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	-9-
1. TEORETICKÝ ÚVOD.....	-12-
1.1. Rakovina.....	-12-
1.1.1 Třídění typů rakovin.....	-12-
1.1.2. Vznik nádorových procesů.....	-12-
1.1.3 Genové mutace vedoucí k rakovině.....	-13-
1.1.3.1 Onkogeny.....	-13-
1.1.3.1.1 Dědičné mutace v onkogenech.....	-13-
1.1.3.1.2 Získané mutace v onkogenech.....	-13-
1.1.4 Geny potlačující tvorbu nádorů.....	-14-
1.1.4.1 Zděděné mutace supresorových genů.....	-14-
1.1.4.2 Získané mutace supresorových genů.....	-14-
1.1.5 Úmrtnost na rakovinu.....	-14-
1.2 Léčba nádorových onemocnění.....	-15-
1.2.1 Využití operační léčby.....	-15-
1.2.2 Radioterapie v léčbě nádorových onemocnění.....	-15-
1.2.3 Chemoterapie.....	-16-
1.2.4 Imunoterapie.....	-16-
1.2.5 Hormonální terapie.....	-17-
1.3 Typy chemoterapie a chemoterapeutik.....	-17-
1.3.1 Alkylační činidla.....	-17-
1.3.2 Platinové sloučeniny.....	-19-
1.3.3 Antimetabolity.....	-19-
1.3.3.1 Antifoláty.....	-20-
1.3.3.2 Antiprimidiny.....	-20-
1.3.3.3 Antipuriny.....	-22-
1.3.4 Antracykliny a strukturně podobné sloučeniny.....	-23-
1.3.5 Inhibitory topoisomeras.....	-23-
1.3.6 Mitotické inhibitory („jedy“.....	-24-

1.3.7 Kortikosteroidy.....	-25-
1.3.8 „Zacílené“ terapie.....	-25-
1.3.8.1 Proteinové tyrosinkinasy.....	-25-
1.3.8.1.1 Receptorové tyrosinkinasy.....	-25-
1.3.8.1.2 Nereceptorové tyrosinkinasy (nRTK).....	-26-
1.3.8.2 Serin/Threonin proteinkinasy.....	-27-
1.3.8.3 Proteinkinasy aktivované mitogeny (MAP proteinkinasy=MAPK).....	-27-
1.4. Inhibitory tyrosinkinas jako protinádorová léčiva.....	-28-
1.4.1 Regulace funkce tyrosinkinas.....	-28-
1.4.2 Cíle inhibice tyrosinkinas.....	-30-
1.5. Nádory štítné žlázy.....	-30-
1.5.1 Incidence a mortalita	-30-
1.5.2 Diferenciované rakoviny štítné žlázy.....	-30-
1.5.3 Medulární karcinom štítné žlázy (MTC – Medullar Thyroid Cancer).....	-31-
1.5.3.1 Léčba medulárního karcinomu štítné žlázy.....	-32-
1.5.3.2 Signální cesta protoonkogenu RET („rearranged during transfection“).....	-32-
1.5.3.3 Signální dráhy kromě protoonkogenu RET („rearranged during transfection“).....	-33-
1.5.3.3.1 Signální dráha pro receptory epidermálního růstového faktoru (EGFR).....	-33-
1.5.3.3.2 Signální dráha receptorů cévního endoteliálního růstového faktoru (VEGFR)..	-34-
1.5.3.3.3 Signální dráha pro protoonkogen kódující receptory MET, FGFR, PDGFR.....	-35-
1.5.4 Hurtleho karcinom.....	-36-
1.5.5 Anaplatický nádor štítné žlázy.....	-36-
1.5.6 Thyroidní lymfom.....	-36-
1.5.7 Inhibitory tyrosinkinas při léčbě nádorů štítné žlázy.....	-37-
1.6. Druhy inhibitorů tyrosinkinas.....	-37-
1.6.1 Imatinib (Gleevec, STI571)	-37-
1.6.2 Vandetanib (ZD6474)	-39-
1.6.3 Cabozantinib (XL184)	-42-
1.6.4 Sorafenib (BAY 43-9006)	-42-
1.6.5 Sunitinib (SU011248)	-43-
1.6.6 Motesanib (AMG 706)	-44-
1.7. Metabolismus vandetanibu.....	-44-
1.7.1 Cytochrom P450.....	-45-

1.7.2 Závislost vandetanibu na cytochromu P450, izoenzym 3A4.....	-47-
2. CÍL BAKALÁŘSKÉ PRÁCE.....	-49-
3. MATERIÁL A METODY.....	-50-
3.1 POUŽITÝ MATERIÁL A CHEMIKÁLIE.....	-50-
3.2 PŘÍSTROJE.....	-52-
3.3 METODY.....	-53-
3.3.1. Izolace mikrosomální frakce z jater potkana.....	-53-
3.3.2. Solubilizace proteinů mikrosomální frakce.....	-53-
3.3.3 Chromatografie proteinů mikrosomální frakce na koloně DEAE-Sepharosy CL6B..	-54-
3.3.4 Chromatografie NADPH:cytochrom P450 reduktasy na koloně 2 „5‘-ADP-Sepharosy	
4B (pH 7.0).....	-55-
3.3.5 Chromatografie NADH:cytochrom b ₅ reduktasy na koloně DEAE-Sepharosy CL6B 2	
(pH 8.1)	-55-
3.3.6. Měření aktivity NADPH:cytochrom P450 reduktasy.....	-56-
3.3.7. Měření aktivity NADH:cytochrom b ₅ reduktasy.....	-56-
3.3.8. SDS-PAGE.....	-56-
4. VÝSLEDKY.....	-58-
4.1 IZOLACE MIKROSOMŮ Z JATER POTKANA.....	-58-
4.2 SOLUBILIZACE PROTEINŮ MIKROSOMÁLNÍ FRAKCE.....	-58-
4.3 CHROMATOGRRAFIE NADH:CYTOCHROM b ₅ REDUKTASY,CYTOCHROMU b ₅ a	
NADPH:CYTOCHROM P450 REDUKTASY NA SLOUPCI DEAE-SEPHAROSY	
CL6B.....	-58-
4.4 IZOLACE NADPH:CYTOCHROM P450 REDUKTASY AFINITNÍ	
CHROMATOGRTAFÍÍ NA 2‘,5‘-ADP-SEPHAROSE 4B.....	-60-
4.5 IZOLACE NADH:CYTOCHROM b ₅ REDUKTASY CHROMATOGRAFÍÍ NA	
KOLONĚ DEAE-SEPHAROSY CL6B2.....	-62-
4.6. SDS-PAGE.....	-66-
5. DISKUZE.....	-68-
6. ZÁVĚR.....	-70-
Seznam použité literatury.....	-71-

ABSTRAKT

V dnešní době se při léčbě různých typů nádorových onemocnění využívá různých druhů léčby. Mezi nejčastější způsoby léčby patří operativní vyjmutí nádoru, radioterapie, chemoterapie a imunoterapie. Při chemoterapii se využívá širokého spektra chemoterapeutik, jako jsou například alkylační činidla, platinové sloučeniny, antimetabolity, antracykliny a v poslední době velmi se rozvíjející inhibitory tyrosinkinasy. Tato bakalářská práce pojednává o inhibitech tyrosinkinasy a jejich využití v medicíně při léčbě nádorových onemocnění, z důvodu jejich vysoké specifity a následkem toho nízkých vedlejších účinků. Prvním průlomovým úspěchem inhibitorů tyrosinkinasy byla léčba pacientů s chronickou myeloidní leukémií (CML) pomocí imatinibu. Na tento úspěch se pokouší navázat i použití vandetanibu, při léčbě medulárního karcinomu štítné žlázy. U pacientů léčených vandetanibem však dochází k biotransformaci tohoto xenobiotika cytochromy P450, které jsou terminálními oxidasami monooxygenasového (MFO – „mixed function oxidases“) systému, přičemž dochází k přeměně vandetanibu na méně účinné metabolity. V praktické části bakalářské práce byly izolovány enzymy metabolizující xenobiotika, včetně vandetanibu. Z potkaních jater byly izolovány NADPH:cytochrom P450 reduktasa, kterou jsme získali jako homogenní preparát a NADH:cytochrom b₅ reduktasa, která bude vyžadovat ještě další purifikaci. Uvedené izolované enzymy dále využijeme v rekonstitučních experimentech s enzymy MFO systému (cytochromy P450), pro studium metabolismu inhibitoru tyrosinkinasy vandetanibu, a dalších xenobiotik.

Klíčová slova: inhibitory tyrosinkinasy, xenobiotika, vandetanib, cytochrom P450; NADPH:cytochrom P450 reduktasa; NADH:cytochrom b₅ reduktasa

ABSTRACT

At the present time many types of treatment are used for curing of different cancer diseases. Among the most common types of such treatment belong a surgery, radiotherapy, chemotherapy, and immunotherapy. In the case of chemotherapy, there is used a wide (broad) spectrum of chemotherapeutics such as alkylating agents, platinum compounds, antimetabolites, anthracyclines and, at the present time, also inhibitors of tyrosine kinases. The bachelor thesis describes different types of tyrosine kinase inhibitors and their use in treatment of several cancers. They become popular because of their high specificity and minimal side effects. The first successful use of a tyrosine kinase inhibitor was treatment of the patients suffering from chronic myelogenous leukemia (CML) with imatinib. Vandetanib is another inhibitor of tyrosine kinases that is now used for treatment of another cancer, the medullary thyroid cancer. During treatment, vandetanib is biotransformed with cytochromes P450, which are the terminal oxidases of a mixed function oxidase (MFO) system, into the less efficient metabolites. In the practical part of the bachelor thesis we isolated enzymes, which metabolize xenobiotics, including vandetanib. Rat liver tissue was used for isolation of NADPH:cytochrome P450 reductase, which was isolated as a homogeneous protein and NADH:cytochrom b₅ reductase, which however needs to be further purified to homogeneity. These isolated enzymes will be used in the reconstitution experiments with the enzymes of the MFO system (cytochromes P450) to study metabolism of tyrosine kinase inhibitor vandetanib as well as other xenobiotics.

Keywords: tyrosine kinase inhibitors, xenobiotics, vandetanib, cytochrome P450; NADPH:cytochrome P450 reductase; NADH:cytochrom b₅ reductase

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

06AT	06-alkylguanin-DNA transferasa
5-FU	5-fluorouracil
Akt	protein kinasa B
AMK	aminokyselina
APC	"adenomatous polyposis coli"
ARG	"ABL-related gene"
ATP	adenosintrifosfát
BC	buněčný cyklus
BCNU	karmustin
Blk	B lymfoidní tyrosinkinasa
BRC- ABL	"breakpoint cluster region protein - Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1"
BRCA1	"breast cancer 1, early onset"
BRCA2	"breast cancer 2, early onset"
CCNU	lomustin
CDHP, gimestat	5-chlor-2,4-dihydroxypyridin
CLL	chronická lymfopatická leukemie
CML	chronická myeloidní leukemie
CMML	chronická myelomonocytární leukémie
CPT-11	irinotecan
Csk	c-src tyrosinkinasa
CYP	cytochrom P450
DHFR	reduktasa kyseliny dihydrolistové
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dUMP	deoxyuridinmonofosfát
EGFR	epidermální receptorový růstový faktor
ERCC1	"excision repair enzyme"
FAP	familiární adenomatózní polypóza
FDA	"US Food and Drug Administration"
F-dUMP	fluorodeoxymonofosfát
Fgr	"Gardner-Rasheed feline sarcoma viral oncogene homolog"

FIP1FIP1L1-PDGFR	(gen pro faktor upravující 3'-konec pre-mRNA a receptory destičkového růstového faktoru)
FLT3	"fms-like tyrosine kinase 3"
FMO1	flavinový monoxygenasový systém 1
FMO3	flavinový monoxygenasový systém 3
FMTC	familiární medulární karcinom štítné žlázy
FUMP	fluorouridinmonofosfát
GDNF	"glial cell line-derived neurotrophic factor"
GIST	dědičný gastrointestinální stromální tumor
HER-2/neu	"human epidermal growth factor receptor-2"
Hsp90	"heat-shock protein 90"
IFN	interferon
KIT	"mast/stem cell growth factor receptor"
MAPK	mitogenem aktivovaná proteinkinasa
MAPKK=MEK	MAP-kinasakinasy
MAPKK	MAP-kinasakinasakinasy
MEN 2A	mnohočetná endokrinní neoplazie typu 2A
MEN 2B	mnohočetná endokrinní neoplazie typu 2B
MET gen	protoonogen kódující protein "hepatocyte growth factor receptor"
MFO systém	"mixed function oxidases" systém
NADH	redukovaný nikotinamidadeninukleotid
NADPH	redukovaný nikotinamidadeninukleotidfosfát
nRTK	nerceptorová tyrosinkinasa
NSCLC	"non small cell lung cancer"
ORR	míru objektivní odpovědi
OXO	otastat
DGF	"platelet-derived growth factor"
PI3K	fosfatidylinositol-3'-kinasa
PK	proteinkinasa
PKC	proteinkinasa C
PLC-γ	fosfoinositidfosfolipasa C- γ
pp^{60c-src}	proto-onkogen protein 60 c-src
Raf	serin/threonin proteinkinasa
RAI	radioaktivní jód

RB	rakovinné buňky
RB1	"retinoblastoma 1"
RET	"rearranged during transfection"
RTK	receptorová tyrosinkinasa
TC	rakovina štítné žlázy
TK	tyrosinkinasa
TKI	tyrosinkinasový inhibitor
TMA	tkáňový čip
TP53	tumor supresorový gen p53
TSH	hormon stimulující štítnou žlázu
Tyr-527	tyrosin 527
UFT	tegafur-uracil
VEGFR	receptor cévního endoteliálního růstového faktoru
VP-16	etoposid
v/v	objem/objem
w/v	hmotnost/objem

1. Teoretický úvod:

1.1 RAKOVINA

Rakovina je termín pro onemocnění, kterým se označuje nekontrolované dělení buněk, které jsou dále schopné napadat ostatní tkáně. Rakovinné buňky (RB) se mohou šířit do ostatních částí těla pomocí krevního a lymfatického systému. Rakovina není pouze jedna nemoc, ale mnoho onemocnění. Popsáno bylo již více než 100 různých druhů rakovin, většina z nich je pojmenována po orgánu nebo typu buněk, ve kterých nádorové procesy propukají. To znamená, že například rakovina tlustého střeva začíná v tlustém střevě, rakovina kůže (melanom) začíná v melanocytech. [1]

1.1.1 Třídění typů rakovin

Rakovinu lze rozdělit do mnoha kategorií, nejběžnější dělení je ale dle jejího vzniku:

- Karcinom (Carcinoma) – Rakovina začínající v kůži nebo v epitelové tkáni.
- Sarkom (Sarcoma)- Rakovina která se nejdříve vyvíjí v kostech, chrupavkách, tuku, svalech, krevních cévách či jiné spojovací nebo podpurné tkáni.
- Leukemie (Leukemia)- Tento typ je iniciován v krvetvorné tkáni jako je kostní dřev. Způsobuje produkci abnormálních krevních tělních tělísek, které pak vstupují do krve.
- Lymfom a myelom (Lymphoma and myeloma)- rakovina vyvíjející se nejdříve v buňkách imunitního systému
- Rakovina centrálního nervového systému- rakovina začínající v mozkové a míšní tkáni [1]

1.1.2. Vznik nádorových procesů

Dnes je již obecně přijímaná teorie, že každá rakovina začíná změnami v jedné nebo ve více buňkách. Většinou tato fáze začíná mnoho let před jakýmikoliv příznaky nebo zjištěností lékařskými testy. V této fázi se buňky začínají nekontrolovatelně dělit a množit. Tyto buňky, oproti normálním zdravým buňkám, ztratili mnoho kontrolních systémů. Tato skutečnost je způsobena tím, že některé geny v buňce byly poškozeny či ztraceny. Takový proces je označován jako mutace. [2]

1.1.3 Genové mutace vedoucí k rakovině

Ve vzniku rakoviny hrají roli zejména dva hlavní typy genů, jsou to zejména tzv. onkogeny a tumor supresorové geny (geny potlačující tvorbu nádorů) [3]

1.1.3.1 Onkogeny

Většina onkogenů vzniká mutací určitého normálního genu, který je označován jako protoonkogen. Protoonkogeny normálně kontrolují proliferaci buněk. V případě, že jsou protoonkogeny mutovány, mění se na onkogeny. Exprese onkogenů pak vede k nekontrolovanému růstu a proliferaci takto pozměněných buněk. Mutace v protoonkogenech na v onkogeny se dají zdědit nebo získat v průběhu života [3]

1.1.3.1.1 Dědičné mutace v onkogenech

Pouze několik druhů nádorových procesů je způsobeno zděděnými mutacemi protoonkogenů, které pak způsobí jejich aktivaci na onkogen. Patří sem například endokrinní neoplazie typu 2 (MEN), která je způsobena zděděnou mutací RET („rearranged during transfection“). U pacientů trpících tímto syndromem se často vyvíjí vzácná medulární rakovina štítné žlázy. Způsobuje však také vývoj dalších nádorů včetně feochromocytomu a nervových rakovin. Dalším zástupcem zděděných onkogenů jsou geny KIT („Mast/stem cell growth factor receptor“), které mohou způsobovat dědičné gastrointestinální stromální tumory (GISTs). Dále může mutace v genu MET (protoonogen kódující protein „hepatocyte growth factor receptor“) například způsobovat dědičný papilární karcinom ledvin. [3]

1.1.3.1.2 Získané mutace v onkogenech

Většina mutací způsobující rakovinu je však získaná, ne zděděná. Obecně jsou onkogeny aktivované přeskupeními na chromosomech, či genovými duplikacemi nebo mutacemi. Například přeskupení na chromosomech vede k tvorbě genů označovaných jako BCR-ABL („breakpoint cluster region protein - Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1“), které vedou k chronické myeloidní leukemii (CML). Získané mutace v genu KIT způsobují většinu případů vývoje GIST [3].

1.1.4 Geny potlačující tvorbu nádorů

Tumor supresorové geny jsou normální geny, které zpomalují buněčné dělení, opravují chyby v DNA, nebo způsobují apoptózu. Když nádorový supresor nefunguje, buňky mohou růst bez kontroly, což vede k vzniku rakoviny. V současnosti je již známo mnoho supresorů. Mezi nejznámější patří TP53 (p53), BRCA1 („breast cancer 1, early onset“), BRCA2 („breast cancer 2, early onset“), APC („Adenomatous polyposis coli“), a RB1 („retinoblastoma 1“). Rozdíl mezi onkogeny a supresory je v tom, že onkogeny způsobují rakovinu, když jsou aktivovány, oproti tomu supresory když jsou inaktivovány. [3]

1.1.4.1 Zděděné mutace supresorových genů

Zděděné abnormality supresorů nádorových buněk byly nalezeny v určitých druzích rakovin a jejich mutace vedou ke vzniku rakovinného bujení. Patří sem například poškozené geny APC způsobující familiární adenomatózní polypózu (FAP). To je stav, ve kterém se vyvíjí stovky až tisíce kolonií polypů, a obvykle se alespoň jeden polyp stane maligním. Výsledně se vyvíjí rakovina tlustého střeva. [3]

1.1.4.2 Získané mutace supresorových genů

Stejně jako u onkogenů, většina mutací tumorových supresorů je způsobena získanou mutací, ne mutacemi zděděnými. Sem například patří mutace genu TP53 (tumor supresorový gen 53), který kóduje protein p53. Mutace v tomto genu byla nalezena ve více než polovině lidských rakovin. Mutace TP53 se nachází v rakovině plic, tlustého střeva, prsu a mnoha dalších. Je to způsobeno zejména tím, že protein p53 se nachází v signální dráze apoptózy. Je-li tento protein poškozen, buňky s poškozenou DNA pokračují v růstu a dělení, což následně může vést k vývoji rakoviny. [3]

1.1.5 Úmrtnost na rakovinu

Skutečnost, že nádorová onemocnění tvoří závažný celosvětový problém dokazují studie prováděné Americkou společností pro rakovinu („American Cancer Society“). Uvedené studie popisují případy výskytu, délky života a úmrtnosti u pacientů trpících rakovinou. Za rok 2013 bylo v USA zaznamenáno celkem 1 660 290 nových případů rakoviny a 580 350 úmrtí způsobené touto chorobou. Je překvapivější, že počet úmrtí na toto

onemocnění se od roku 1991 do 2013 snížil přibližně o 20%, a to u všech čtyř nejčastějších typů nádorových onemocnění (nádorů plic, tlustého střeva, prsu a prostaty). Avšak největší úspěch zaznamenala léčba chronické myeloidní leukemie (CML), se snížením úmrtnosti asi o 8,4 % za rok. Celkový počet zachráněných pacientů se tedy odhaduje u mužů od roku 1990 a u žen od roku 1991 na 1,18 miliónů. [4]

1.2. LÉČBA NÁDOROVÝCH ONEMOCNĚNÍ

Léčba nádorových onemocnění je komplexní problém. Často se kombinují různé druhy léčby, aby se dosáhlo vyšší úspěšnosti léčby pacienta. [5]

1.2.1 Využití operační léčby

Tento druh léčby je lokální a lze jej využít při léčbě nádorů, které se ještě nerozšířily do okolních částí těla (nedošlo k jejich metastázi). S velkým úspěchem se obzvláště využívá odstranění nádorů v prvních fázích jejich vývoje. Operací se odstraňuje nádor a část zdravé tkáň v okolí nádoru. Často se odstraňují také lymfatické žlázy v blízkosti nádoru pro případ, kdyby náhodou obsahovaly nádorové buňky. Často je tato léčba dostačující, ale někdy se využívá kombinace této léčby s chemoterapií nebo radioterapií, aby se zabránilo opětovnému vzniku nádorových buněk. [6]

1.2.2 Radioterapie v léčbě nádorových onemocnění

Radioterapie využívá vysokoenergetického záření, které trvale poškozuje DNA nádorových buněk a způsobuje tak jejich zánik. Okolní zdravá tkáň je sice také poškozena, ale většinou je schopná opravit DNA poškození a pokračovat v růstu normálně. Tento typ terapie má vysokou účinnost při léčbě rakoviny, zvláště pak dochází-li k její kombinaci s operační léčbou nebo chemoterapií. V zásadě se využívá dvou způsobů provedení, prvním z nich je externí radioterapie. Tento typ radioterapie využívá k léčbě pacientů přístroj zvaný lineární akcelerátor, který soustředí vysokoenergetické rentgenové záření do oblasti výskytu nádorových buněk. [7]

Dalším typem radioterapie je brachyterapie, neboli interní radioterapie. Tento druh léčby zahrnuje vkládání radioaktivního materiálu dočasně do těla blízko oblastí s nádorovými buňkami, nebo orálně podávanou radioaktivní tekutinu, či injekční zavedení takového

roztoku. [8] Příkladem takového typu léčby je léčba rakoviny štítné žlázy pomocí radiojódové terapie. Když se radioaktivní jód (RAI), I-131 zavede do lidského těla kapslí nebo v tekuté formě, dojde k jeho absorpci štítnou žlázou. Radiace zničí buňky štítné žlázy včetně některých buněk nádorových. Tato léčba se využívá u pacientů s papilární nebo folikulární (diferenciovanou) formou rakoviny štítné žlázy. Bohužel tuto léčbu nelze využít pro léčbu anaplastického (nediferenciovaného) a medulárního karcinomu, protože tyto typy jódu neadsorbují. [7]

1.2.3 Chemoterapie

Termín chemoterapie znamená využití jakéhokoli léku pro léčbu jakéhokoli onemocnění, většinou se ale spojuje s požitím léků při léčbě rakoviny. Nazývá se také cytotoxická a antineoplastická terapie. Oproti radioterapii a operačnímu zásahu, je chemoterapie systémová léčba. To znamená, že léčí rakovinu v celém organismu. Jsou tu ale samozřejmě možnosti, jak omezit chemoterapii pouze na určitou oblast. V dnešní době se využívá více než 100 chemoterapeutik, používaných buď samostatně nebo v kombinaci s jinými léčivy či druhy léčby. Typy léčiv jsou velmi různorodé a jejich využitelnost závisí na druhu rakoviny a vedlejších efektech. [9]

1.2.4 Imunoterapie

Imunoterapie využívá určité části imunitního systému pro léčbu rakoviny. Využívá k tomu více postupů. Prvním je stimulace vlastního imunitního systému pacienta, aby se zvýšila jeho obranyschopnost. [10] Druhý způsob spočívá v dodávání uměle vytvořených protilátek „zacílujících“ přímo nádorové buňky, čímž zastaví jejich růst nebo způsobí jejich apoptózu. [11]

Princip imunoterapie využívá skutečnosti, že nádorové buňky mají na svém vnějším povrchu určité sloučeniny, které mohou fungovat jako antigeny. Tyto antigeny ale nejsou příliš dobře rozlišitelné imunitním systémem. Například oproti antigenům bakterií, virů a parazitů, které mají mnohem snáze rozlišitelné antigeny. Malá rozlišitelnost antigenů nádorových buněk vyvolává pouze malou, nebo dokonce nulovou, imunitní odpověď organismu. Navíc nádorové buňky uvolňují sloučeniny, které negativně ovlivňují imunitní systém. Aby došlo rozpoznání nádorových buněk, vytváří se sloučeniny, které zvýší imunitní odpověď organismu a zničí tedy nádorové buňky. [12]

Mezi základní druhy léčby patří využití monoklonálních protilátek, což jsou uměle připravené protilátky proti specifické části nádorových buněk. Mezi další postupy imunoterapií patří vakcinace proti rakovině. Tato vakcinace spustí imunitní odpověď proti dané rakovině. Tato léčba se využívá i jako prevence u zdravých jedinců. V neposlední řadě se využívá nespecifické imunoterapie. Tento druh terapie posiluje nespecificky imunitní systém. Mnoho typů imunoterapií se využívá k léčbě specifických nádorů, stále je ale mnoho nádorů, které na tuto léčbu vůbec nereagují. [11]

1.2.5 Hormonální terapie

Do této kategorie léků patří pohlavní hormony nebo léky na podobné bázi. Tyto léky se používají ke zpomalení růstu rakoviny prsu, prostaty a rakoviny děložního čípku, které normálně rostou v závislosti na přirozených hormonech v těle. Uvedený druh léčby nepatří do standardní chemoterapie, protože brání nádorovým buňkám ve využívání hormonů potřebných k jejich růstu nebo zabraňuje tělu ve tvorbě těchto hormonů. Do této skupiny léků patří například protiestrogenová léčiva, aromatázové inhibitory, progestiny, estrogeny, anti-androgeny atd. [13]

1.3 TYPY CHEMOTERAPIE A CHEMOTERAPEUTIK

Léky využívané při chemoterapii fungují pouze na buňky, které aktivně proliferují. Naopak na buňky, které se nachází v G_0 fázi buněčného cyklu (BC), tedy klidové fázi, vliv nemají. Některé léky specificky útočí na určité fáze buněčného cyklu, například na fázi M nebo S. Toho se využívá často při dávkování a kombinování různých léků. Chemoterapeutika ale nerozlišují rozdíl mezi dělením zdravých buněk, nahrazujících staré buňky a nádorovými buňkami. Z čehož vyplývá, že dochází k poškození i zdravých buněk jako vedlejší efekt používání chemoterapeutik. Je tedy nutné v co největší míře vyvažovat mezi poškozením nádorových buněk a šetřením zdravých buněk. [14]

1.3.1 Alkylační činidla

Alkylační činidla jsou elektrofilní sloučeniny reagující s nukleofilními centry v molekule DNA. Kovalentně modifikují DNA, což vyústí v řadu poškození struktury a funkce DNA, např. ve vznik jedno- nebo dvojitřetězových zlomů DNA. Následkem zlomu dojde

k „zesítní“ mezi řetězci a narušení schopnosti replikace. Mezi alkylační činidla patří následující podtřídy sloučenin. [15]

První podtřídou jsou sloučeniny odvozené od tris(2-chlorethyl)aminu, dusíkaté yperity. Typickým zástupcem této skupiny je mechlortethamin, který nejvíce připomíná původní sloučeninu (yperit), ze které byly odvozeny ostatní alkylační činidla. Těch se však v dnešní době již klinicky téměř neužívá. Dále tu je melphalan, který je odvozen od aminokyseliny fenylalaninu, jež se nejvíce využívá při léčbě mnohočetného myelomu. Poslední ze skupiny dusíkatých yperitů je chlorambucin, který je široce využíván při léčbě Hodgkinova lymfomu a chronické lymfopatické leukemie (CLL). [16]

Další podtřídou jsou deriváty nitrosomočoviny, které zahrnují např. karmustin (BCNU), lomustin (CCNU), semustin, fotemustin a streptozotocin. Ve vodném roztoku se deriváty nitrosomočoviny rychle rozkládají na chlorethyldiazoniové ionty, které alkylují DNA, a na isokyanátovou část, která může karbamoylovat proteiny. Obecně tato činidla alkylují guanin v pozici O6. Jelikož O6-alkylguanin-DNA transferasa (O6AT) je sebevražedný enzym rozpoznávající tyto adukty, může tyto adukty odstraňovat. Pacienti s maligními gliomy, u kterých byl gen pro O6-alkylguanin-DNA transferasa „umlčen“ metylací promotoru, mají zvýšenou odpověď na léky na bázi derivátů nitrosomočoviny než ti pacienti, kteří trpí jinými mutacemi. BCNU a CCNU se využívají pro léčbu nádorů mozku a streptozotocin, vytvořený na základě přirozeně se vyskytujících derivátů nitrosomočoviny bakterií *Streptomyces achromogenes*, se využívá pro léčbu nádorů „ostrůvkových“ buněk beta pankreatu. [16]

Třetí podtřídou jsou triazeny (triazanyleny). Tento druh léků uvolňuje reaktivní diazónový ion, který alkyluje DNA. Patří sem dakarbazín používající se k léčbě maligního melanomu, Hodgkinovy choroby a temozolomid, kterým se léčí maligní melanom a gliom. Rozdíl v těchto lécích tkví v tom, že derivát dakarbazinu temozolomid nepotřebuje metabolickou aktivaci jako dakarbazín, ale prochází samovolnou přeměnou na aktivní částici. Dalšími využívanými podskupinami jsou arizidiny, prokarbaziny a hexamethylmelaminy. [16]

1.3.2 Platinové sloučeniny

V dnešní době se k léčbě nádorů využívají tři typy činidel odvozených z kovů- cisplatina, carboplatina a oxaplatina (1,2-diaminocyklohexan platina). Reagují podobně jako alkylační činidla, protože uvnitř buňky vytváří reaktivní intermediáty, které tvoří kovalentní vazby s nukleotidy DNA a navzájem propojují vlákna DNA. [16]

Cisplatina byla objevena náhodou v roce 1969, během studie efektu elektrického proudu použitím platinových elektrod v roztoku chloridu amonného. V dnešní době se používá k léčbě mnoha zhoubných nádorů. DNA poškozená cisplatinou může být opravena ERCC1 („excision repair enzyme“), ale u pacientů s NSCLC („non small cell lung cancer“) často tento enzym není dostatečně syntetizován. Obvykle se tato terapie využívá s adjuvantní chirurgickou léčbou. Karboplatina je méně reaktivní než cisplatina, ale má také menší neuro- a nefrotoxické vedlejší účinky. Třetím analogem platinových léků je oxoplatina. Oproti předchozím typům má ale navíc 1,2-diaminocyklohexanový kruh, který zaplňuje „velký žlábek“ DNA, a tím zabraňuje opravě DNA v jakýchkoli opravných procesech. Výhodou oxoplatiny je tedy skutečnost, že je aktivní i v procesech, kde nemusí být poškozená DNA opravována. Tento mechanismus vysvětluje, proč na léčbu oxoplatinou reagují nádory, které na léčbu cisplatinou a karboplatinou neodpovídají. [16]

1.3.3 Antimetabolity

Antimetabolity jsou cytotoxická činidla, která připomínají přirozeně se vyskytující metabolity, např. puriny a pyrimidiny. Působí dvěma typy (mechanismy), inhibicí klíčových enzymů v syntéze DNA a včleněním se do DNA a RNA při jejich syntéze, a tím způsobují předčasné zakončení syntézy. Způsobují též zlomy těchto řetězců. Tento druh léčiv funguje v S fázi buněčného cyklu a je rychle vyplavován z krevní plazmy. Jelikož toxicita roste s délkou léčby, tak se podávají kontinuální intravenózní fúzí. [16]

1.3.3.1 Antifoláty

Nejběžnějším zástupcem antimetabolitů označovaných jako antifoláty je methotrexát, strukturně podobný kyselině listové. Jakmile je transportován do buňky, inhibuje reduktázu kyseliny dihydrolistové (DHFR), která je zodpovědná za regeneraci oxidovaných folátů následnou syntézou thymidinu. Inhibice DHFR vede k tvorbě redukovaných intracelulárních folátových shluků a snížené syntéze thymidinu. Navíc může být intracelulární methotrexát

metabolizován na polyglutamátové deriváty, které nejsou tak rychle vytlačeny z buňky jako mateřská látka. Intracelulární akumulace polyglutamátů může také inhibovat thymidylátovou syntézu a DHFR. Biochemická toxicita methotrexátu může být neutralizována oxidováním redukováných folátových shluků, běžně exogenním dodáním kyseliny folinové (5-formyl-5,6,7,8-tetrahydrolistová kyselina). Toho se využívá pro ochranu zdravé tkáně před toxickým efektem methotrexátu. [16]

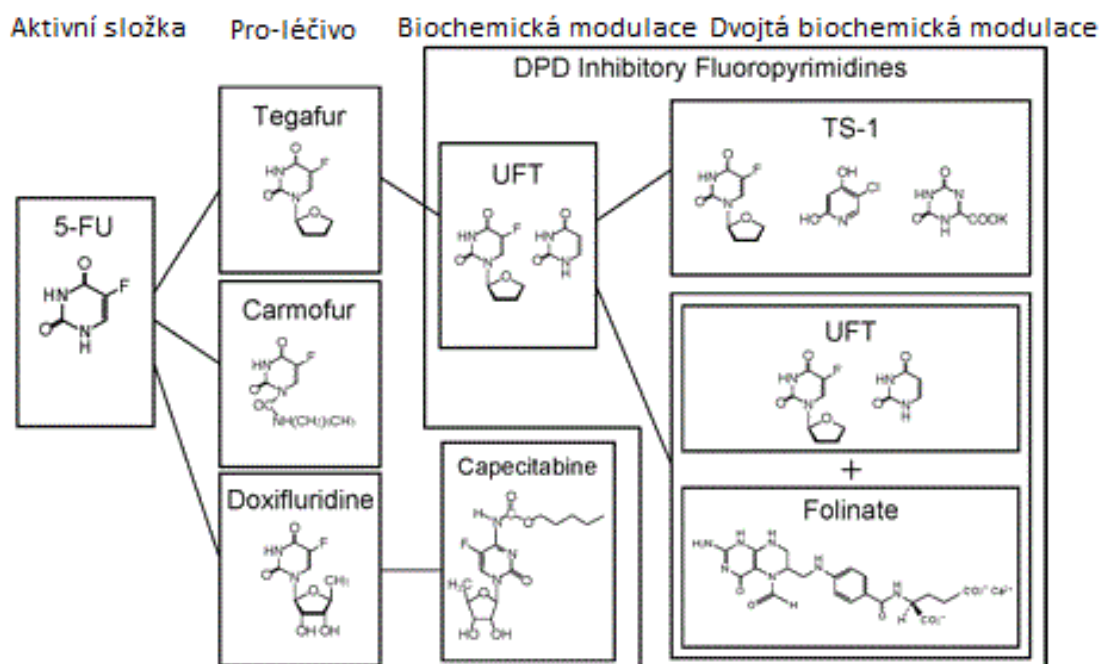
Dalším zástupcem antifolátů je pemetrexed. Tento antifolát je polyglutamátovaný a tedy inhibuje DHFR i thymidylátovou syntézu. Navíc jsou polyglutamáty pemetrexedu ještě inhibitory glycinamid-ribonukleotid-formyl-transferasy, která je esenciální pro syntézu purinů *de novo*. Výhodou takovéto sloučeniny je, že může být aktivní i v buňkách, které si vyvinuly rezistenci vůči antifolátům amplifikací „zacílených“ částic. Z předběžných testů vyplývá, že Pemetrex bude aktivní i proti NSCLC („non small cell lung cancer“) a rakovině plic. [16]

1.3.3.2 Antiprimidiny

Antiprimidinové léky jsou sloučeniny, které interferují se syntézou pyrimidinů. První podskupinou antiprimidinů jsou inhibitory thymidylátsynthasy. Nejtypičtějším zástupcem inhibitorů thymidylátsynthasy je 5-fluorouracil (5-FU). 5-fluorouracil (5-FU) je metabolizován vnitrobuněčně na fluorouridinmonofosfát (FUMP) a následně na fluoridintrifosfát (FUTP) a fluorodeoxymonofosfát (F-dUMP), (viz obrázek č. 1). Fluoridintrifosfát je začleňován do RNA a narušuje její funkci. Fluorodeoxymonofosfát se váže kovalentně na thymidylátsynthasu a jeho kofaktor 5,10-methyltetrahydrofolát, za tvorby ternárního komplexu, který inhibuje syntézu thymidinu *de novo* z deoxyuridinmonofosfátu (dUMP), a tedy i syntézu DNA. Přídavek kyseliny folinové (5-formyl-tetrahydrofolát) k terapii 5-fluorouracilu zvyšuje protinádorové účinky 5-fluorouracilu a dochází tedy při jejich klinickém použití k jejich vzájemné kombinaci. Potenciální problém 5-fluorouracilu představuje skutečnost, že zvýšené množství dUMP (deoxyuridinmonofosfát) může narušit inhibici thymidylátsynthasy pomocí fluorodeoxymonofosfátu. 5-fluorouracil má však bohužel špatnou biologickou dostupnost, tedy trvá delší dobu než začne působit. Kvůli tomu bylo vyvinuto několik prekurzorových léčiv. Prvním prekurzorem je kapecitabin, aktivovaný na 5-fluorouracil tříkrokovým procesem. Finální krok je katalyzován enzymem thymidinofosforylasou. Tento krok může vykazovat i zlepšenou regulaci jinými cytotoxickými činidly. Představuje tedy ideální možnost kombinované léčby. V klinických testech byl stejně

účinný jako 5-fluorouracil, ale způsoboval méně myelosuprese a stomatitidy než 5-fluorouracil. Dalším prekurzorovým lékem je UFT (Tegafur-uracil). Tento lék je směs ftorafuru a uracilu v molárním poměru 1:4. Ftorafur je pomalu metabolizován na 5-fluorouracil a uracil inhibuje katabolismus fluorouracilu. Umožňuje pak vyšší koncentraci léku v nádorových buňkách. Poslední modifikací 5-fluorouracilu je lék nazývaný „S-1“, který je kombinací ftorafuru, 5-chlor-2,4-dihydroxypyridinu (CDHP, gimestat) and oxonátu draselného (1,4,5,6-tetrahydro-4,6-dioxo-1,3,5-triazin-2-karboxylát draselný, OXO, otastat). Dihydropyrimidineaminasa je inhibována gimestatem (CDHP) a otastat (OXO) se akumuluje v gastrointestinálním traktu. Inhibuje tak konverzi 5-fluorouracilu na fluordeoxymonofosfát. Takto dochází ke zvýšení koncentrace aktivního metabolitu v nádorových buňkách a snižování toxicity ve zdravé tkáni. Druhou podskupinou jsou raltitrexedy. Jsou to antifoláty druhé generace a jsou přímými inhibitory thymidylátsynthasy. Vedlejšími účinky jsou ale průjemy a myelosuprese. [16]

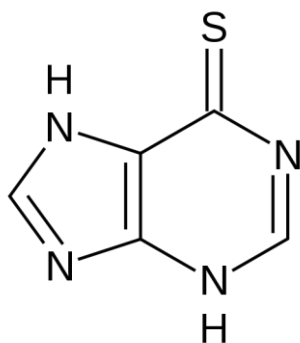
Další skupinou antipyrimidinových léků jsou arabinozidy. Cytosinarabinosid je derivován od sloučeniny produkované houbou *Cryptothethya crypta*. Buněčně je přeměněn na trifosfátovou formu, ve které inhibuje syntézu DNA, inhibicí DNA polymerasy a vmezeřením se do DNA. Využívá se hlavně k léčbě leukemie. Dalším zástupcem je gemcitabin. Je to difluorovaný analog cytosinarabinózy, s podobným metabolismem. Avšak trifosfátové deriváty gemcitabinu inhibují enzym deoxycytidineaminasu, která je zodpovědná za deaktivaci gemcitabinu. Pomocí tohoto mechanismu je možné prodloužit dobu působení gemcitabinu v buňkách, a tím i zvýšit jeho aktivitu. Posledním zástupcem této skupiny je fludarabin. Ten je přeměněn v nukleotidy, které interferují se syntézou DNA. [16].



Obrázek č. 1- Antipyrimidinové léky a jejich následné biochemické modulace [17]

1.3.3.3 Antipuriny

Klinicky se využívají dva antipuriny, 6-mercaptapurin (obrázek č. 2) a 6-thioguanin. Oba ochotně vstupují do buněk a jsou metabolizovány jejich intracelulární aktivní formy, kde purinovou syntézou *de novo* jsou začleněny do DNA. Tyto druhy léků jsou snadno absorbovány ze střev, a proto se podávají orálně. [16]

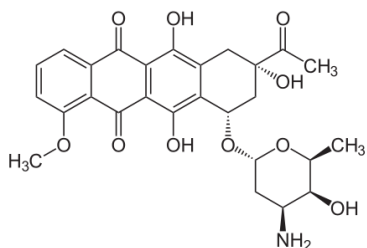


Obrázek č. 2-Strukturální vzorec 6-mercaptapurinu [18]

1.3.4 Antracykliny a strukturně podobné sloučeniny

Původními antracykliny byly antibiotika produkovaná mikroorganismy, například *Streptomyces spp.* Prvními antracykliny byly daunorubicin (obrázek č. 3) a doxorubicin. Tyto sloučeniny způsobují buněčnou smrt několika mechanismy. Za prvé dochází k jejich interkalaci do DNA, která resultuje ve vznik zlomů. Dále dochází k tvorbě volných radikálů, které způsobují oxidační poškození buněčných proteinů. Dochází také k inhibici topoisomerasy. [16]

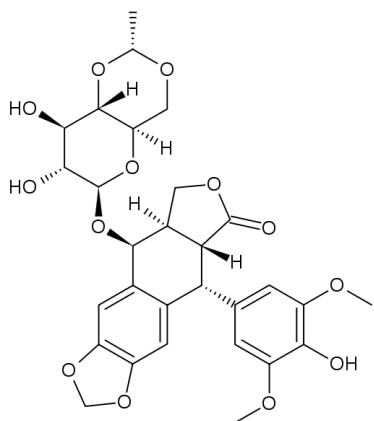
V poslední době dochází ke klinickému užívání liposomálních forem antracyklinů. Tyto sloučeniny jsou selektivně distribuovány v nádorech, zatímco do zdravých orgánů vstupují velmi málo v porovnání s konvenčními antracykliny. Využívají se k léčbě rakoviny prsu, vaječníků a Kaposiho sarkomu. [16]



Obrázek č. 3-Strukturní vzorec danorubicinu [19]

1.3.5 Inhibitory topoisomerasy

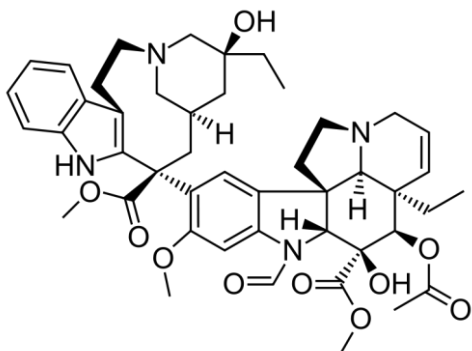
Tyto léky inhibují topoisomerasy a znemožňují oddělování vláken DNA při replikaci. Využívají se k léčbě určitých leukémií, rakovin plic, vaječníků, gastrointestinální rakoviny a jiných nádorových onemocnění. Mezi inhibitory topoisomerasy I patří například topotecan a irinotecan (CPT-11) a do inhibitorů topoisomerasy II patří například etoposid, jehož vzorec je uveden na obrázku č. 4 (VP-16) a teniposid. [13]



Obrázek č. 4-Strukturální vzorec etoposidu [20]

1.3.6 Mitotické inhibitory („jedy“)

Mitotické inhibitory jsou většinou rostlinné alkaloidy nebo sloučeniny odvozené od těchto přírodních produktů. Mohou zastavit mitózu nebo inhibovat enzymy tvořící proteiny potřebné pro buněčné množení. Tyto léky pracují hlavně během fáze M buněčného cyklu, ale mohou poškozovat buňky ve všech fázích. Využívají se například k léčbě rakoviny plic, prsu, myelomů a leukémií. Vedlejším účinkem těchto léků je možnost poškozovat periferní nervový systém. Patří sem například taxany, epothilony a vinca alkaloidy (obrázek č. 5). [16]



Obrázek č. 5 -Strukturální vzorec vincristinu (vinca alkaloid) [21]

1.3.7 Kortikosteroidy

Steroidy jsou přírodní hormony, a tedy i léky na bázi hormonů jsou užitečné při léčbě některých typů rakovin, jako je například lymfom, leukemie, mnohočetný myelom. Kortikosteroidy jsou také běžně používány jako léky proti zvracení a při prevenci nevolnosti způsobené chemoterapií. Dále se využívají před chemoterapií jako prevence proti hypersenzitivní reakci. [13]

1.3.8 „Zacílené“ terapie

V průběhu posledních dvaceti let se zjistilo, že většina chorob je zapříčiněna poruchou některé ze signálních drah. Jednou z nejčastějších příčin je špatné regulace tyrosinkinasy (TKs), která vede k pozměnění fosforylace. Následkem toho může být nekontrolované buněčné dělení, inhibice apoptózy a jiné abnormality, které vyúsťuje v rakovinné bujení. Inhibice proteinkinasy se tedy ukazuje jako slibná strategie při léčbě rakoviny. V dnešní době bylo připraveno a testováno mnoho inhibitorů proteinkinasy (PK). Jeden z nejvíce efektivních přístupů je produkce malé organické molekuly zaměřující se na specifické tyrosinkinasy (TK) v signální cestě nádorů, které mohou snadno penetrovat do těchto nádorových buněk. [22] Nejvíce slibná je inhibice tyrosinkinasy. [23]

1.3.8.1 Proteinové tyrosinkinasy

Jsou to enzymy, které katalyzují přenos fosfátu z ATP na tyrosylové zbytky v polypeptidech. Lidský genom obsahuje okolo 90 tyrosinkinasy a 43 tyrosinásám-podobných genů. Proteiny vzniklé transkripcí těchto genů regulují buněčnou proliferaci, přežití, diferenciaci, funkci a hybnost buňky. Tyrosinkinasy se rozdělují na dvě hlavní skupiny, první skupinu tvoří receptorové tyrosinkinasy (RTK) a druhou skupinou jsou tyrosinkinasy nereceptorové (nRTK). [24]

1.3.8.1.1 Receptorové tyrosinkinasy

Tyto enzymy se vyznačují enzymovou tyrosinásamovou aktivitou, která je regulována vazbou ligandů na jejich receptory. Tyto enzymy tedy mají „ligand-vázající“ extracelulární doménu a intracelulární katalytickou doménu (vyznačuje se katalytickou aktivitou), navzájem

propojené transmembránovou doménou, což je krátká hydrofobní část procházející přes buněčnou membránu. Celý receptor vázající ligand vykazuje allosterické vlastnosti. [25]

Receptor je aktivován ligandem (určitým růstovým faktorem) vázajícím se na vazebné místo v extracelulární části tyrosinkinasy. Po vazbě růstového faktoru dojde ke změně konformace tyrosinkinasy a následné dimerizaci dvou tyrosinkinasy. Následkem tohoto kroku dojde k autofosforylaci (vzájemné fosforylaci obou vazebných monomerních partnerů). Tento krok probíhá autokatalyticky uvnitř každého dimeru. Autofosforylací tyrosylových zbytků vznikne mnoho vazebných míst, které dále působí jako vazebná místa pro různé intracelulární signální proteiny obsahující SH-2 domény, a tím způsobují i aktivaci mnoha signálních cest. Tato fosforylace umožní signalizaci například pomocí Ras-proteinů [25].

1.3.8.1.2 Nereceptorové tyrosinkinasy (nRTK)

Tyto tyrosinkinasy nemají na rozdíl od receptorových tyrosinkinasy transmembránovou doménu, a tedy ani žádný receptor. Všechny nereceptorové tyrosinkinasy mají sekvenci zhruba 300 aminokyselin (AMK) označovanou jako kinasová doména, která podmiňuje jejich vlastní katalytickou aktivitu. Tato doména má stabilní sekvenci u všech tyrosinkinasy. [25]

První skupinou nereceptorových tyrosinkinasy je „Src-rodina“, kam patří například Blk (B lymfoidní tyrosinkinasy), Csk (c-src tyrosinkinasa), Fgr („Gardner-Rasheed feline sarcoma viral oncogene homolog“), Src, a jiné. Všechny obsahují domény SH2, SH3 a SH1. Prototypem této rodiny je nereceptorová tyrosinkinasa pp 60^{c-src} (proto-onkogen protein 60 c-src), kódovaná genem c-src. Tato tyrosinkinasa má doménu SH-1, která je katalytickou doménou. Dále obsahuje homologní oblasti Src2 a Src3, neboli SH2 a SH3. K tomu ještě obsahuje doménu SH4, což je konvenční sekvence na aminokyselinovém konci, kterou se váže na kyselinu myristovou, jež je připojena ke svému receptoru v membráně. Doména SH2 slouží jako vazebné místo pro specifické aminokyselinové sekvence, jež obsahují fosforylovaný tyrosin 527 (Tyr-527), který je součástí fosforylované kinasové domény. V případě, že se Tyr-527 domény SH-1 fosforyluje, dojde k vazbě této domény k doméně SH1 a následné blokaci aktivního místa kinasy a k její inaktivaci. Tato autoinhibice slouží ke zvýšení regulace fosforylace. V případě ale, že se na Tyr-527 naváže jiný protein doménou SH2 a zároveň je regulován nereceptorovou tyrosinkinásou, a doménou SH3 se váže k sos-proteinu, může dojít ke spuštění signální kaskády pomocí růstového faktoru. Molekuly tohoto druhu se nazývají adaptorové molekuly, neboli „Shc-molekuly“. [25]

Další skupinou jsou tyrosinkinasy z Janusovy rodiny, nebo-li „Jak-proteiny“. Patří sem Jak1, Jak2, Jak3 a Tyk2. Tyto tyrosinkinasy neobsahují doménu SH2 ani SH3, avšak jsou přímo aktivovány receptory pro interferon (IFN), a tyto receptory fosforylují, čímž se na ně mohou vázat „STAT-proteiny“ pomocí domény SH2. Kontaktem zbytků fosforylovaných tyrosinů dojde k homo-, nebo hetero- dimerizaci a následnému uvolnění „STAT-proteinů“ z receptoru, migraci do jádra a aktivaci transkripce. [25]

1.3.8.2 Serin/Threonin proteinkinasy

Tyto enzymy fosforylují v cílových proteinech zbytky serinu nebo treoninu. Do této skupiny patří cAMP-dependentní proteinkinasa (PKA), cGMP-dependentní proteinkinasa (PKG), proteinkinasy C (PKC) a mnoho jiných [25]. Bohužel je klinicky využívaný pouze jediný inhibitor proteinkinasy Ser/Thr inhibitor (Plx4032 inhibující proto-oncogene B-Raf V600E (BRAF^{V600E})). Je to pravděpodobně způsobeno vysokými nároky při produkci selektivních inhibitorů proti ATP-vazebné doméně, jelikož je 420 Ser/Thr proteinkinasy a 1500 neproteinových ATP-dependentních enzymů, musí být tyto inhibitory vysoce specifické [23].

1.3.8.3 Proteinkinasy aktivované mitogeny (MAP proteinkinasy=MAPK)

Označují se také jako proteinkinasy regulované extracelulárním signálem. Mitogenem je označován růstový fakt stimuluje buňku k dělení. MAPK fosforylují cílové proteiny na Ser/Thr nebo zároveň na treoninu a tyrosinu. Patří sem podskupina MAPKKK („MAP kinase kinase kinase“), typickým zástupcem je Raf-proteinkinasa, jež je aktivována Ras.GTP-proteinem fosforylací na Ser/Thr zbytcích. Další podskupinou jsou MAP-kinasakinasy (MAPKK), jež jsou aktivovány na zbytcích Ser nebo Thr pomocí MAPKKK (například MAP/ERK PK) a sami aktivují MAPK. MAP kinasy (MAPK) jsou další podskupinou a v sekvenci Thr-Glu-Tyr jsou aktivovány MAPKK na zbytcích Thr a Tyr. Po jejich fosforylaci se přesouvají k transkripčním faktorům s cílovými místy pro fosforylaci [25].

1.4. INHIBITORY TYROSINKINAS JAKO PROTINÁDOROVÁ LÉČIVA

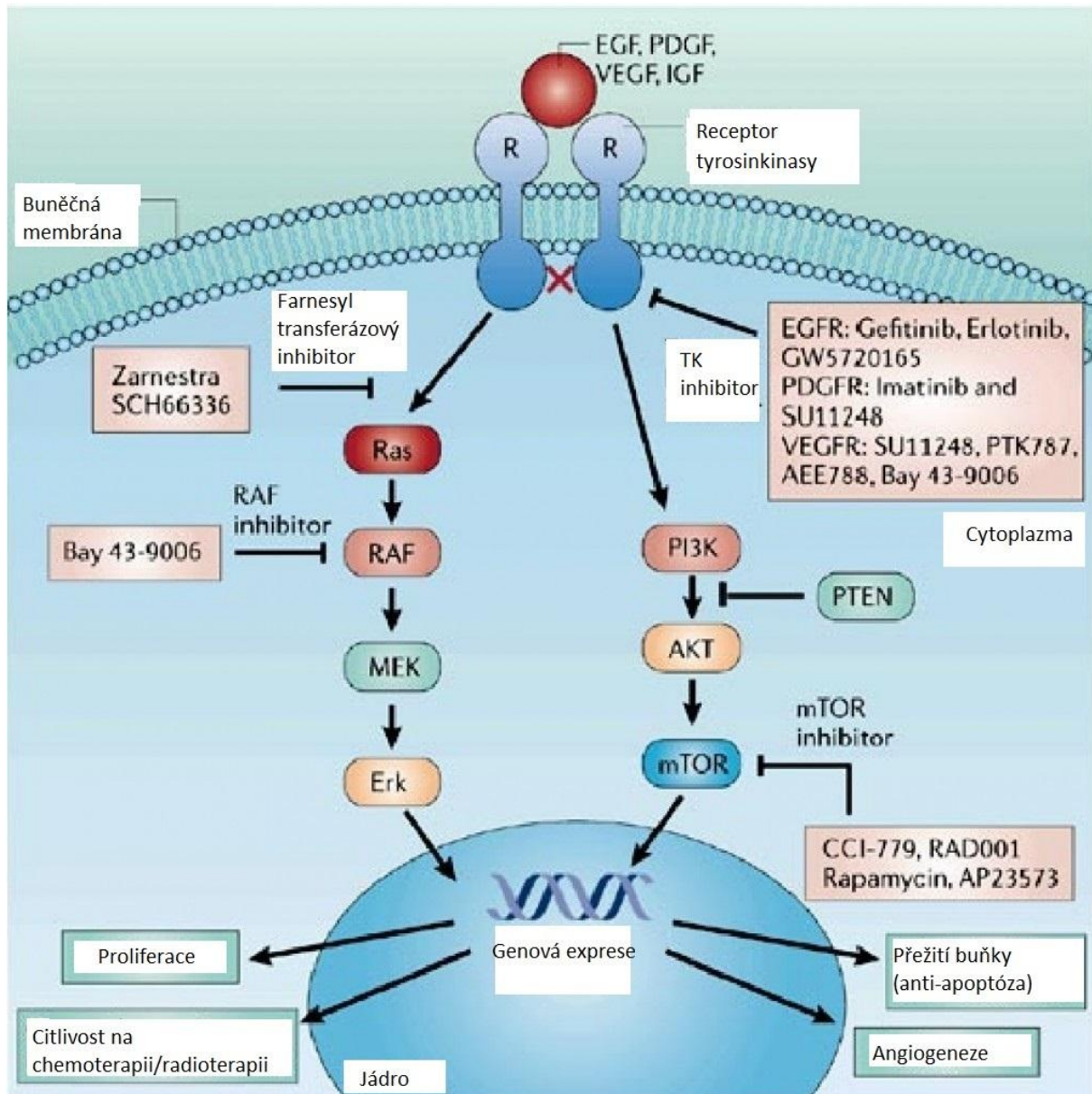
Využití tyrosinkinasových inhibitorů při léčbě rakoviny bylo dlouho dobu opomíjeno a velký průlom přinesl až úspěch léčiva imatinibu, inhibitoru („breakpoint cluster region protein- Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1“) BCR-ABL-tyrosinkinas při léčbě chronické myeloidní leukemie (CML). Tento průlom změnil názor na „zacílenou léčbu“ a vývoj nových tyrosinkinasových inhibitorů a jiných druhů zacílené léčby [24].

1.4.1 Regulace funkce tyrosinkinas

Běžně jsou receptorové tyrosinkinasy v nepřítomnosti ligandu nefosforylované, monomerní a tím pádem jsou inaktivní. Při vazbě ligandu (popis dráhy je uveden na obrázku č. 6) dojde k fosfosforylaci a následné oligomerizaci monomerů. Tím dojde k porušení autoinhibice a dále k autofosforylaci. Autofosforylací regulátorového tyrosinu v aktivační smyčce dochází k reorientaci důležitých aminokyselinových zbytků a zvýšení katalytické aktivity enzymu. Následkem toho dojde k aktivaci mnoha signálních cest. Tyrosinkinasová signalizace je ukončena pomocí fosfatasy, která hydrolyzuje fosforylovaný tyrosin a indukuje funkci inhibitorových molekul [24].

Obvyklým mechanismem ve „spouštění“ leukémie je fúze receptorových tyrosinkinas nebo nereceptorových tyrosinkinas s partnerskými proteiny. Následkem této fúze dojde ke konstitutivní oligomerizaci tyrosinkinas i v nepřítomnosti ligandu. Oligomerizace „spustí“ autofosforylaci a následkem toho dojde k aktivaci tyrosinkinas. Příkladem takového mechanismu je fúzní protein BCR-ABL („breakpoint cluster region protein- Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1“), v nereceptorových tyrosinkinasách v chronické myeloidní leukemii (CML), kde dochází k tetramerizaci domén BCR a tím překonává autoinhibici, čímž dojde k autofosforylaci. Dalším známým mechanismem je mutace narušující autoregulaci kinasové domény. Patří sem například mutace receptoru FLT3 („fms-like tyrosine kinase 3“) při AML (akutní myeloidní leukemii). Při této mutaci dojde k trvalé aktivaci receptoru i bez přítomnosti ligandu. Druhým příkladem mohou být malé nebo bodové mutace v kinasové doméně EGFR (epidermální receptorový růstový faktor) v jednom z typů NSCLC („non-small cell lung cancer“), které způsobují zvýšenou citlivost na přítomnost ligandu. Třetím mechanismem špatné tyrosinkinasové regulace je zvýšená nebo aberantní exprese receptoru, ligandu nebo obou. Příkladem je nadměrné exprese receptoru u

tyrosinkinas HER-2/neu („human epidermal growth factor receptor-2“), způsobující rakovinu prsu, nebo ligandu, mutantní formy PDGF („platelet-derived growth factor“), u některých forem „dermatofibrosarcoma protuberans“. Jako poslední příčinou zvýšené tyrosinkinasové aktivity může být snížené množství faktorů limitujících aktivitu tyrosinkinas, jako je snížená aktivita tyrosinfosfatas nebo snížená exprese tyrosinkinasových inhibitorů. Takovéto aberantní aktivace tyrosinkinas vedou k vzniku nádorových buněk. [24]



Obrázek č. 6- Tyrosinkinasové receptory a jejich signální dráhy [26]

1.4.2 Cíle inhibice tyrosinkinasy

Cílem tohoto druhu léčby je nalézt malé molekuly, které přímo inhibují katalytickou aktivitu kinasy interferencí s vazbou ATP nebo substrátu. Dalším možným přístupem je inhibovat aktivaci tyrosinkinasy zabráněním oligomerizace. Je také možné narušit signalizaci pomocí protilátek, které neutralizují ligandy, nebo ligand-vázací místa. V neposlední řadě je možno inhibovat tyrosinkinasy regulací stability Hsp90 („heat-shock protein 90“). Inhibitory Hsp90 mohou narušit vazebné schopnosti proteinů, jako jsou například BCR-ABL nebo Her-2 („human epidermal growth factor receptor-2 „) a tím způsobit jejich degradaci. [24]

1.5. NÁDORY ŠTÍTNÉ ŽLÁZY

Rakovina štítné žlázy (TC) je nejběžnější maligní endokrinní tumor, ale ze všech malignancí tvoří tento typ rakoviny pouze 1%. Přes 90% všech rakovin štítné žlázy jsou folikulární nebo papilární, často jsou označovány jako diferenciované rakoviny štítné žlázy. Mezi vzácné formy patří medulární karcinom, vznikající z parafolikulárních C-buněk, lymfom štítné žlázy, anaplastický karcinom, karcinom Hurtleho buněk, spinocelulární karcinom a velmi vzácný intrathyroidní sarkom [27].

1.5.1 Incidence a mortalita nádorů štítné žlázy

Roční výskyt rakoviny štítné žlázy vzrostl v USA mezi roky 1973-1997 asi o 50%. V Anglii a Walesu je incidence 0,5-10 nemocných na 100 000 obyvatel. V rámci studie u pacientů trpících folikulární nebo papilární rakovinou, 94% u folikulární a 84% u papilární rakoviny léčených žije déle než 40 let. Bohužel u pacientů s vzácnějšími formami rakoviny štítné žlázy je daleko nižší šance na uzdravení. Zhruba polovina úmrtí je následek nějaké respirační příčiny, buď kvůli metastázám v plicích nebo udušením způsobeným nedostatečným přísunem vzduchu kvůli malé průchodnosti dýchacích cest [27].

1.5.2 Diferenciované rakoviny štítné žlázy

Pacienti s málo rizikovými nádory jsou běžně léčeni lobektomií a dále je jim dodáván celoživotně supresor TSH (hormon stimulující štítnou žlázu) s thyroxinem. Vysoce rizikové nádory jsou léčeny totální thyreoidektomií a odstraněním všech mízních uzlin v krčních oblastech. Po chirurgickém zákroku následuje radiojodová terapie, pomocí I^{131} , kterou se

odstraní zbývající thyroideální tkáň. Dále pacient dostává celoživotně supresor TSH (hormon stimulujiící štítnou žlázu) s tyroxinem. [28]

Pomocí I^{131} se zničí mikroskopická ohniska nádorových buněk v pozůstatcích štítné žlázy nebo metastázovaných ložiscích. Následkem radiojodové terapie se sníží risk návratu rakoviny a tedy zvyšuje šance na přežití pacientů. [28]

1.5.3 Medulární karcinom štítné žlázy (MTC - Medullar Thyroid Cancer)

Medulární karcinom štítné žlázy vzniká z neuroendokrinních buněk C, neboli parafolikulárních buněk a hromadně vytváří hormony, obzvláště kalcitonin [29]. Je to vzácné onemocnění, tvoří pouze 3,2% ze všech rakovin štítné žlázy. Vyskytuje se nejčastěji ve sporadické formě (75%), méně častá je familiární forma (25%). Familiární forma se dědí pomocí autozomální dominance a má 3 varianty. První variantou je familiární medulární karcinom štítné žlázy (FMTC), druhou je mnohočetná endokrinní neoplazie typu 2A (MEN 2A) a poslední variantou je mnohočetná endokrinní neoplazie typu 2B (MEN 2B) [30].

Medulární karcinom štítné žlázy má většinou příznivou prognózu, jelikož 70%-80% pacientů se dožívá více než 10 let v případě včasné diagnózy, bohužel většina případů je diagnostikována s metastázemi v lymfatických žlázách a ve vzdálených orgánech, obzvláště plicích, játrech a kostech. S metastázovaným medulárním karcinomem štítné žlázy mají šanci na dožití více než 10 let 40% pacientů, a metastázy jsou také nejčastější příčinou úmrtí pacientů. Lokálně pokročilý a vzdáleně metastázovaný medulární karcinom štítné žlázy je neléčitelný a ani chirurgické odstranění či chemoterapie nejsou v tomto případě efektivní. Klinické testy různých chemoterapeutik bohužel nepřinesly uspokojivé výsledky. Avšak výzkumy za posledním pár let pomohly porozumět genetickým defektům a pozměněným drahám, které jsou spojeny s vývojem medulárního karcinomu štítné žlázy, což umožnilo vyvinutí mnoha slibných terapeutických agens. Tato agens zacílují tyto genetické alterace, a následně jsou schopné léčit i pacienty s pokročilým medulárním karcinomem štítné žlázy. Bylo zjištěno že, aktivační mutace tyrosinkinasových receptorů, způsobené RET („rearranged during transfection“) jsou primárními onkogenickými činiteli většiny případů medulárního karcinomu štítné žlázy. Tento objev vedl k vývoji nových léčiv jako jsou tyrosinkinasové inhibitory (TKIs), které zacílují RET („rearranged during transfection“). Několik tyrosinkinasových inhibitorů bylo testováno *in vitro*, a v předklinických a klinických studiích se slibnými výsledky. Bohužel tyto léky pravděpodobně permanentně nevyléčí nemoc, jelikož maximální trvání odpovědi na lék bylo zhruba 4 roky a udržení efektu léčiva vyžaduje další

terapeutickou léčbu, což se neobejde bez vedlejších účinků. Hlavním důvodem proč přestávají léky působit na medulární karcinom štítné žlázy je vyvinutí rezistence proti tyrosinkinasovým inhibitorům, které zacílují buněčné receptory a vznik nových signálních drah, které opět iniciují tumorogenezi, ale nejsou už přímo inhibovány těmito tyrosinkinasovými inhibitory. V posledních letech byly popsány mechanismy rezistence vůči tyrosinkinasovým inhibitorům, a že dochází k několika jiným „molekulárním událostem“ přispívajícím u medulárního karcinomu štítné žlázy k transformaci a následné metastázi. Dochází se tedy k závěru, že kombinovaná léčba by mohla mít vyšší účinky při inhibici růstu nádorů. Toto zjištění způsobilo pokrok ve vývoji léčiv blokuujících více signálních drah, které jsou důležité pro vývin medulárního karcinomu štítné žlázy. Další studie demonstrují potenciál pro imunoterapii v kombinaci s činidly „zacílujícími“ se na inhibici přenosu signálů, důležitých pro růst medulárního karcinomu štítné žlázy. Jelikož cílem těchto zacílených terapií je prodloužit život pacienta a zlepšit kvalitu jeho života, je velmi důležité limitovat toxicitu terapeutických agens. [31]

1.5.3.1 Léčba medulárního karcinomu štítné žlázy

Hlavním typem léčby je úplná thyreoidektomie, radioiodová terapie a doživotní dodávání supresorů thyreotropního hormonu. [29] Bohužel u 50-80% pacientů dochází k metastázím do lymfatických uzlin již během diagnózy. Úspěšnost léčby závisí tedy na včasné diagnóze, přítomnosti vzdálených metastáz, velikosti nádoru a věku pacienta. [30]

1.5.3.2 Signální cesta protoonkogenu RET („rearranged during transfection“)

Role protoonkogenu RET („rearranged during transfection“) onkogenu v tumorogenezi při medulárním karcinomu štítné žlázy je nesporná. Gen RET („rearranged during transfection“) kóduje transmembránovou tyrosinkinasu, která se váže ke GDNF („glial cell line-derived neurotrophic factor“) proteinům. RET signalizace vede k aktivaci RAS/MAPK a fosfatidylinositol-3'-kinasy (PI3K)/Akt signalizačních drah. Tyto dráhy jsou klíčové pro buněčný růst, diferenciaci a přežívání nádorů. Aktivační bodové mutace receptorových tyrosinkinas protoonkogenu RET („rearranged during transfection“) byly zaznamenány v téměř všech dědičných případech medulárního karcinomu štítné žlázy, některé z těchto mutací jsou v MEN2A, familiárním medulárním karcinomu štítné žlázy, nebo

v MEN2B syndromech, mezi kterými je genotypová/fenotypová korelace mezi mutací protoonkogenu RET ("rearranged during transfection") a klinické odpovědi. Mutace protoonkogenu RET ("rearranged during transfection") byly také nalezené v 30%-50% sporadických medulárních karcinomech štítné žlázy. Zárodečné mutace v protoonkogenu RET ("rearranged during transfection") jsou zodpovědné za dědičné medulární karcinomy štítné žlázy, zatímco somatické mutace protoonkogenu RET ("rearranged during transfection") jsou zodpovědné za nedědičné medulární karcinomy štítné žlázy. Tato data poskytují důvody proč zaměřovat na protoonkogen RET ("rearranged during transfection") v selektivní terapii. [31]

1.5.3.3 Signální dráhy kromě protoonkogenu RET ("rearranged during transfection")

Kromě protoonkogenu RET ("rearranged during transfection"), i ostatní receptorové tyrosinkinasy můžou hrát roli ve vývoji a postupu medulárního karcinomu štítné žlázy.

1.5.3.3.1 Signální dráha pro receptory epidermálního růstového faktoru (EGFR)

Receptor pro protoonkogen RET ("rearranged during transfection") je podobný receptoru epidermálního růstového faktoru. Receptor epidermálního růstového faktoru je receptorová tyrosinkinasa, která je spojena s regulací buněčného růstu, proliferací a apoptózou. Dimerizací těchto receptorových tyrosinkinaz vyústí v aktivaci několika signálních cest. Jak se ukazuje, receptor epidermálního růstového faktoru je často mnohonásobně exprimován v mnoha různých typech rakovin štítné žlázy, včetně medulárního karcinomu štítné žlázy, a hraje roli ve vývoji rakovin a jejich postupu. Naopak nedávné analýzy různých medulárních karcinomů štítné žlázy na tkáňovém čipu (TMA) ukázaly že pouze 20% případů má střední nebo silnou reakci s receptorem epidermálního růstového faktoru, zatímco většina měla slabou reakci. Jiná studie ukázala že aktivační mutace receptoru epidermálního růstového faktoru jsou při medulárních karcinomech štítné žlázy vzácné. S ohledem na počet genových kopií receptorů epidermálního růstového faktoru v medulárních karcinomech štítné žlázy, vědci nenašli amplifikaci v genu, ale polysomy v 15% zkoumaných nádorů. Navíc receptor epidermálního růstového faktoru byl aktivován v určité podskupině medulárních karcinomů štítné žlázy, je tedy šance, že by se dala blokáce receptoru epidermálního růstového faktoru využít při léčbě pacientů s medulárním

karcinomem štítné žlázy v této podskupině. Nedávné objevy ukázaly, že ligandem indukovaná aktivace receptoru epidermálního růstového faktoru může stimulovat aktivaci protoonkogenu RET ("rearranged during transfection") za hranici normální signalizace a růstové stimulace. Několik inhibitorů inhibujících růst buněčných linií „MTC TT“ a „MZ-CRC-2“ bylo fungujících. Protože aktivace protoonkogenu RET ("rearranged during transfection") vypadá že, je ovlivněna receptory epidermálního růstového faktoru, nedávné studie vyšetřovaly, jestli aktivace receptoru epidermálního růstového faktoru může být spojená s určitými mutacemi protoonkogenu RET ("rearranged during transfection") v medulárních karcinomech štítné žlázy. Bylo objeveno, že tumor, s nejagresivnější mutací protoonkogenu RET ("rearranged during transfection") je v kodónu 883/918 a vykazuje redukovanou expresi receptoru epidermálního růstového faktoru, v porovnání s ostatními mutacemi protoonkogenu RET ("rearranged during transfection"). Lze tedy spekulovat, že nejagresivnější mutace protoonkogenu RET ("rearranged during transfection") jsou méně závislé na aktivaci receptorů epidermálního růstového faktoru. Dle skutečností získaných z porovnávání buněčných linií s mutacemi protoonkogenu RET ("rearranged during transfection") na kodonech 634 a 918 efekt inhibice protoonkogenu RET ("rearranged during transfection") na kodonu 918 mutovaných buněčných linií byl redukován v souladu s předchozími daty. Protože aktivovaný stav receptoru epidermálního růstového faktoru vypadá, že je spojený s aktivací protoonkogenu RET ("rearranged during transfection"), aktivace receptoru epidermálního růstového faktoru byla zkoumána v nádorech s negativním protoonkogenem RET ("rearranged during transfection"). Avšak žádné rozdíly v aktivaci receptoru epidermálního růstového faktoru mezi protoonkogenem RET ("rearranged during transfection") – pozitivními (byl přítomna mutace v protoonkogen RET) a RET – negativními (nebyla přítomna mutace protoonkogenu RET) nádory nebyly nalezeny. Tato data ukazují, že stav receptoru epidermálního růstového faktoru v medulárních karcinomech štítné žlázy může být důležitý, ale každopádně potřebuje další prozkoumání. [31]

1.5.3.3.2 Signální dráha receptorů cévního endoteliálního růstového faktoru (VEGFR)

Další důležitou signální dráhou při patogenezi medulárního karcinomu štítné žlázy jsou receptory cévního endoteliálního růstového faktoru („vascular endothelial growth factor receptor- VEGFR“). Jsou tu tři transmembránové receptory, které přenáší angiogenní a lymfogenní efekt cévního endoteliálního růstového faktoru: receptory cévního endoteliálního růstového faktoru 1, receptory cévního endoteliálního růstového faktoru 2 a receptory cévního

endoteliálního růstového faktoru 3. Předpokládá se že receptory cévního endoteliálního růstového faktoru 2 jsou „zapletené“ hlavně do růstu a metastází. Zvýšená exprese VEGF a VEGFR-2 byla nalezena v MTC v porovnání se zdravou tkání štítné žlázy. Proteiny cévního endoteliálního růstového faktoru (VEGF-A, B, C, a D), které jsou sekretované nádorovými buňkami, se chovají jako ligandy pro receptory cévního endoteliálního růstového faktoru 2 endotheliálních buněk a propagují signál signální kaskádou přes různé signální dráhy, jako je PLC- γ (Fosfoinositid fosfolipasa C- γ)-PKC (Proteinkinasa C)-Raf (serin/threonin proteinkinasa)-MEK (Mitogenem aktivovaná proteinkinasa kinasy)-MAPK (Mitogenem aktivovaná proteinkinasa) a PI3K (Fosfoinositid 3-kinasa)-Akt (Protein Kinasa B - PKB), které stimulují buněčnou proliferaci, migraci a přežívání nádorových buněk, a indukují také neoangiogenezi. Angiogeneze je eseciální pro pozměnění buněčné fyziologie, která zvyšuje náchylnost na vývoj malignance a je fundamentální pro nádorový růst a metastázi. Podobně jako u receptorů epidermálního růstového faktoru, zvýšená exprese receptorů cévního endoteliálního růstového faktoru -2 v medulárních karcinomech štítné žlázy koreluje s metastázováním. [31]

1.5.3.3 Signální dráha pro protoonkogen kódující receptory pro hepatocytární růstový faktor (MET), receptory fibroblastového růstového faktoru (FGFR) a receptory destičkového růstového faktoru (PDGFR)

Vazbou na protoonkogen kódující receptory pro hepatocytární růstový faktor (HGF-MET), dojde k aktivaci signální dráhy, která zprostředkovává buněčnou adhezi a hybnost. Hyperaktivace receptorů hepatocytárního růstového faktoru koreluje s metastázovou schopností nádorových buněk. Receptory hepatocytárního růstového faktoru a koexprese hepatocytárního růstového faktoru byla pozorována v určité podskupině medulárních karcinomů štítné žlázy a je spojená s multifokalitou u medulárních karcinomů štítné žlázy, což dělá z této interakce potencionálně důležitý cíl. [31]

Receptory fibroblastového růstového faktoru 4 („fibroblast growth factor receptor 4“ - FGFR4) byly zaznamenány, se zvýšenou expresí v medulárních karcinomech štítné žlázy u určitých buněčných liniích. Inhibice fosforylace receptorů fibroblastového růstového faktoru malými molekulovými inhibitory receptorů fibroblastového růstového faktoru PD173074 vyústilo v zastavení buněčné proliferace a růstu nádorů. Navíc dvojitá inhibice proteinu protoonkogenu RET ("rearranged during transfection") a receptorů fibroblastového růstového faktoru tyrosinkinásovými inhibitory vyústila v lepší potlačení buněčné proliferace *in vivo* než

každé agens samotné. Tyto výsledky podtrhují možnosti těchto léčiv v terapeutickém využití. [31]

Dále se ukazuje, že receptory destičkového růstového faktoru („platelet-derived growth factor receptor“–PDGFR) hrají také roli v diferencované rakovině štítné žlázy, i když jejich role ještě nebyla plně objasněna. [31]

1.5.4 Hurtleho karcinom

Karcinom Hurtleho buněk (3% všech nádorů štítné žlázy) je běžně klasifikován mezi folikulární karcinomy, i když se jedná o úplně jiný druh nádoru. Nejčastějším druhem léčby je úplné odstranění štítné žlázy a následnou léčbu radiojódem. Bohužel léčba radiojódem nefunguje tak dobře u Hurtleho buněk jako u folikulárních buněk, jelikož dochází k menšímu přijímání radiojódu. [32]

1.5.5 Anaplastický nádor štítné žlázy

Anaplastický nádor štítné žlázy je vzácná a velmi agresivní forma rakoviny štítné žlázy. Celkově tvoří asi 1% ze všech nádorů štítné žlázy a z neznámé příčiny se vyskytuje většinou u pacientů starších šedesáti let. [33] Oproti ostatním formám rakoviny štítné žlázy je anaplastický nádor velmi agresivní a většina pacientů umírá do 6 měsíců od diagnózy. [29]

Bohužel na tento typ nádorů neexistuje žádná efektivní léčba, v dnešní době se lékaři snaží najít vhodné kombinace chemoterapií, jelikož operační léčba ani radioterapie nemají účinky. [29]

1.5.6 Thyroidní lymfom

Tento druh rakoviny štítné žlázy, většinou lymfom B-buněk je léčen pomocí chemoterapie, imunoterapie a externím ozařováním. [29]

1.5.7 Inhibitory tyrosinkinas při léčbě nádorů štítné žlázy

S rostoucími znalostmi molekulární patogeneze medulárního karcinomu štítné žlázy se začínají vyvíjet terapeutická agens, která zacílují specifické dráhy. Protože pozměnění proteinkinas a jejich signálních drah je jedna z hlavních příčin vývoje medulárního karcinomu štítné žlázy, několik inhibitorů tyrosinkinasových receptorů bylo testováno *in vitro*, v předklinických a klinických studiích. Receptory neurotrofických faktorů odvozených od gliálních buněk jsou atraktivní cíle, jelikož většinou nádorů vzniklých z parafolikulárních C-buněk jsou závislé na aktivitě receptorů neurotrofických faktorů odvozených od gliálních buněk. [25]

Pro léčbu medulárních karcinomů štítné žlázy, bylo vyvinuto několik tyrosinkinasových inhibitorů, ale žádný inhibitor tyrosinkinas není specifický pro receptory neurotrofických faktorů odvozených od gliálních buněk. Ačkoli několik specifitějších inhibitorů tyrosinkinas mělo výraznou aktivitu proti receptorům neurotrofických faktorů odvozených od gliálních buněk, patří sem například vandetanib, sorafenib, motesanib, imatinib, a sunitinib. Inhibice pouze jedné receptorové tyrosinkinasy může indukovat kompenzační aktivaci ostatních tyrosinkinas a následně rezistenci vůči léčbě inhibitory tyrosinkinas. Proto simultánní inhibice více tyrosinkinas může být nejlepší přístup k léčbě medulárních karcinomů štítné žlázy. [25]

1.6. DRUHY INHIBITORŮ TYROSINKINAS

Inhibitory tyrosinkinas využívané k léčbě v dnešní době se vážou do aktivního centra pro ATP (adenosintrifosfát) dané tyrosinkinasy. Struktury různých typů inhibitorů tyrosinkinas se ale od sebe navzájem velmi liší, což naznačuje, že může být využito ještě mnoho různých skeletů. Obzvláště pokud se zaměříme na inhibici jiného místa na tyrosinkinasách než pro ATP [23].

1.6.1 Imatinib (Gleevec, STI571)

2-Fenylaminopyrimidin (obrázek č. 13) byl původně byl navržen jako inhibitor Abl („Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1“) tyrosinkinas v Bcr-Abl onkoproteinu (breakpoint cluster region protein- Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1) a vedl ke zlepšení zdravotního stavu u pacientů s chronickou myeloidní leukémií [22]. Filadelfský chromozom (derivovaný chromozom 22) vede k fúzi Abl („Abelson murine

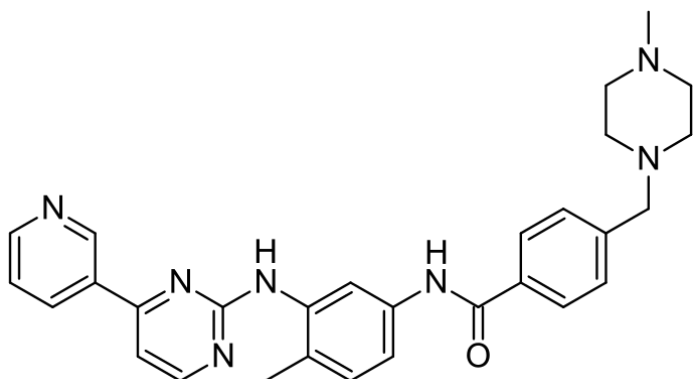
leukemia viral oncogene homolog 1“) s Bcr („breakpoint cluster region protein“) a touto fuzí vzniká konstitutivně aktivní tyrosinkinasa, jejíž aktivita je potlačována imatinibem. Každá z tyrosin kinas má vazebné místo pro ATP a pomocí enzymové aktivity tyrosin kinas přenáší fosfát z ATP na tyrosylový zbytek, což se označuje jako fosforylace tyrosinu. Imatinib se váže blízko vazebného místa BCR-ABL (\"breakpoint cluster region protein- Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1\") pro ATP a fixují ho v autoinhibované konformaci, čímž enzym inhibují. [24]

Imatinib je také specifickým inhibitorem pro tyrosin kinasu Kit („Mast/stem cell growth factor receptor“- c-KIT), ARG („ABL-related gene“) a receptory destičkového růstového faktoru („Platelet-derived growth factor receptor“-PDGFR). Dále by měl mít také schopnost inhibovat nádory způsobené špatnou regulací receptorů destičkového růstového faktoru a tyrosin kinasou Kit. Receptory destičkového růstového faktoru α (PDGFR α) jsou aktivovány „záhadným“ způsobem pomocí intersticiálního vmezeření 4 delecí do chromozomu. Toto vmezeření způsobuje fúzní gen pro FIP1FIP1L1-PDGFR α (gen pro faktor upravující 3'-konec pre-mRNA a receptory destičkového růstového faktoru), který se objevuje u některých pacientů s hypereosinofilním syndromem nebo systémovou mastocytózou, zatím co receptory destičkového růstového faktoru β jsou aktivovány u některých pacientů s chronickou myelomonocytární leukémií (CMML). Balancovaná translokace vede k fuzi receptorů destičkového růstového faktoru β s partnerským proteinem. Imatinib indukoval dramatickou klinickou i molekulární odpověď u obou onemocnění. Tyrosin kinasa Kit je aktivována bodovou mutací v mnoha případech systemické mastocytózy nebo u leukemie žírných buněk, vyjíměčně i u AML (akutní myeloidní leukemie) [24].

Většina gastrointestinálních nádorů (GIST) nese mutaci v tyrosin kinase Kit, která je spojována s konstitutivní aktivací a fosforylací. Navíc většina pacientů s gastrointestinálním nádorem, kteří nemají mutaci tyrosin kinasy Kit, mají mutace v receptorech destičkového růstového faktoru. Klinické testy imatinibu u pacientů s gastrointestinálním nádorem demonstrují alespoň částečnou odpověď více než u poloviny pacientů. Bohužel oproti pacientům v chronické fázi s chronickou myeloidní leukémií, kteří vykazovali úplnou odpověď na imatinib, tak pacienti s gastrointestinálním nádorem měli odpověď horší. Míra odpovědi závisela na typu mutace tyrosin kinasy Kit, z čehož vyplývá, že závislost mutace gastrointestinálního nádoru na signalizaci tyrosin kinasy Kit je nekompletní a složitější [24].

Bohužel i přes to, že imatinib inhibuje receptory neurotrofických faktorů odvozených od gliálních buněk, receptory destičkového růstový faktoru a tyrosin kinasu Kit tak ve fázi II klinických testů při léčbě medulárních karcinomů štítné žlázy měl neuspokojivé výsledky.

Pacienti nevykazovali žádnou objektivní odpověď, i když malá část pacientů dosáhla stabilizace medulárního karcinomu štítné žlázy. [25]



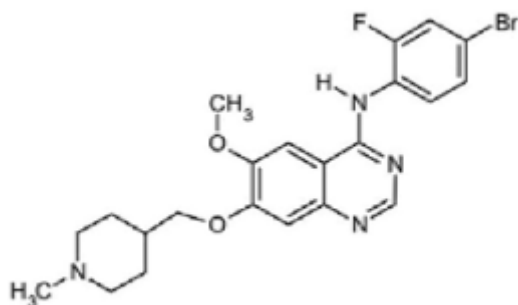
Obrázek č. 13-Strukturní vzorec imatinibu [34]

1.6.2 Vandetanib (ZD6474)

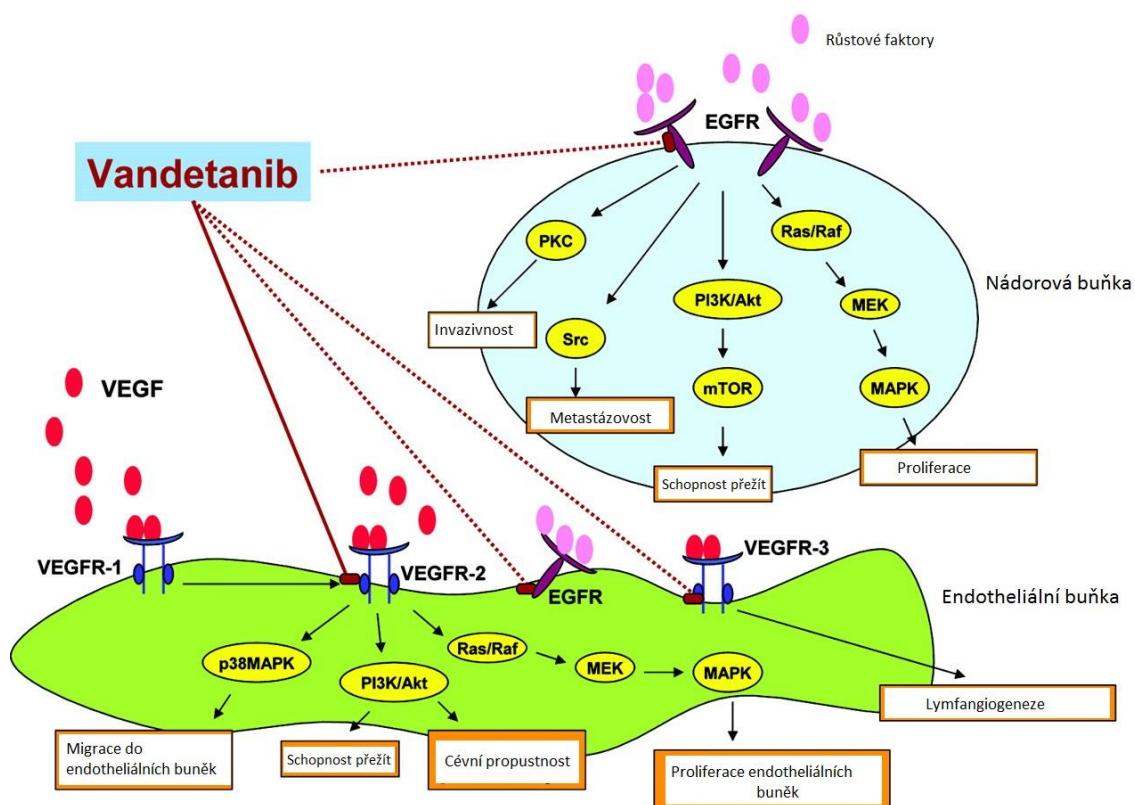
Je to orální tyrosinkinazový inhibitor, o molekulové hmotnosti 475,36 (viz. obrázek č. 7), který zacíluje receptory neurotrofických faktorů odvozených od gliálních buněk, receptorů cévního endoteliálního růstového faktoru 2 a 3 a ve vyšších koncentracích i receptory epidermálního růstového faktoru. Zjednodušené schéma jeho působení je uvedeno na obr. č. 8, kde je zobrazen vandetanib jako potenciální protinádorové činidlo v maligním mezoteliomu. Vandetanib selektivně inhibuje signální dráhy, které jsou důležité pro růst nádoru a angiogenezi bez přímého cytotoxického efektu na nádor nebo endoteliální buňky. Většina mutantních receptorů neurotrofických faktorů odvozených od gliálních buněk prokázala citlivost na vandetanib, zatímco mutace, ve kterých je valin 804 substituován buď leucinem nebo methioninem (pozorováno u některých případů MEN2A) vyvolává výraznou rezistenci vůči vandetanibu. Tato rezistence je způsobena sférickou zábranou, oproti tomu mutace Val804Gly zvýšila citlivost receptorů neurotrofických faktorů odvozených od gliálních buněk k vandetanibu. Když aktivita receptorů neurotrofických faktorů odvozených od gliálních buněk byla inhibována, docházelo vysokou stimulací receptorů epidermálního růstového faktoru k částečnému nahrazení za receptory neurotrofických faktorů odvozených od gliálních buněk, a to i přes částečnou aktivaci mitogenů aktivujících proteinkinasy (MAPK). Tyto informace podporují myšlenku, že duální inhibice receptorů neurotrofických faktorů odvozených od gliálních buněk a receptorů epidermálního růstového faktoru je důležitá, jelikož pouze inhibice receptorů neurotrofických faktorů odvozených od gliálních buněk může být překonána přes aktivaci pomocí receptorů epidermálního růstového faktoru.

Navíc bylo také dokázáno, že aktivita vandetanibu proti receptorům epidermálního růstového faktoru blokuje proliferaci a migraci endoteliálních buněk. Proto může aktivita proti receptorům epidermálního růstového faktoru vyústit v přímý antiangiogenní mechanismus (mechanismus zabraňující tvorbě nových cév, vyživujících nádory). Jedna fáze dvou klinických testů ukázala protinádorovou aktivitu vandetanibu (300 mg/den) u pacientů s dědičným medulárním karcinomem štítné žlázy. V této studii 20% pacientů vykázalo částečnou odpověď na vandetanib (s redukcí průměru nádoru více než 30%) a zbývajících 53% pacientů mělo po 24 týdnech stabilní nádor. Pouze u jednoho pacienta docházelo k postupu nemoci, i přes to že dostával toto agens. Zajímavé je, že tento pacient neměl ani jednu z mutací spojených se substitucí valinu 804, ale Y791F RET zárodečnou mutaci. Jiné klinické testy, ve kterých bylo vandetanibem léčeno 19 pacientů s dědičným medulárním karcinomem štítné žlázy (100 mg/den), prokázalo podobné výsledky. [25]

Vandetanib je jediný inhibitor tyrosinkinasy schválený pro léčbu symptomatického nebo progresivního medulárního karcinomu štítné žlázy u pacientů s neoperovatelnou lokálně pokročilou nebo metastázovanou rakovinou. Schválení vandetanibu v dubnu 2011 FDA (US Food and Drug Administration) bylo založeno na výsledcích z třetí fáze klinických testů, studie D4200C00058, ve které 331 pacientů s neoperovatelným lokálně pokročilým nebo metastázovaným medulárním karcinomem štítné žlázy dostávali buď vandetanib (231) nebo placebo (100). Tato studie ukázala průměrnou dobu prodloužení života pacientů o 11 měsíců delší, než kontrolní skupina, která dostávala placebo a míru objektivní odpovědi (ORR) mělo 45% pacientů. Běžné vedlejší efekty objevující se v porovnání s placebem byly průjem (56% versus 26%), vyrážka (45% versus 11%), nevolnost (33% versus 16%), zvýšený krevní tlak (32% versus 5%), a bolesti hlavy (26% versus 9%). Dopad na celkové přežití pacientů s medulárním karcinomem štítné žlázy léčených touto sloučeninou je doposud neznámý. [25]



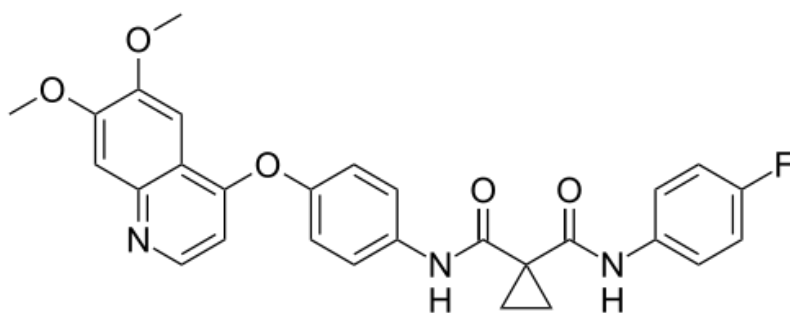
Obrázek č. 7- Vandetanib je chemicky N-(4-brom-2-fluorfenyl)-6-methoxy-7-[(1-methylpiperidin-4-yl) methoxy]quinazolin-4-amin. Jeho molekulová hmotnost je 475,36. Rozpustnost vandetanibu roste s nižším pH a je prakticky nerozpustný ve vodě při koncentraci vyšší než 0.008 mg/ml at 25°C. [35]



Obrázek č. 8- Vandetanib jako potenciální protinádorové činidlo v maligním mezoteliomu. Mnoho jednotlivých zacilujícíchch agens, (proti receptorům cévního endoteliálního růstového faktoru a proti receptorům epidermálního růstového faktoru) se ukázalo neúčinnými při léčbě mezoteliomu. Ačkoli stejná činidla mohou být efektivní v kombinaci s chemoterapií nebo na určitý typ pacientů. [36]

1.6.3 Cabozantinib (XL184)

Cabozantinib je orální je nízkomolekulární (viz obr. 9) selektivní inhibitor receptorů neurotrofických faktorů odvozených od gliálních buněk, receptorů hepatocytárního růstového faktoru, a receptorů cévního endoteliálního růstového faktoru 2. Receptory aktivující hepatocytární růstový faktor „spouští“ růst nádorů a angiogenezi. Fáze 1 klinických testů cabozantinibu prokázala pomoc pacientům s medulárním karcinomem štítné žlázy. Tyto výsledky vedly k zvětšení skupiny pacientů s medulárním karcinomem štítné žlázy. Fáze 1 klinických testů prokázala účinek cabozantinibu i u pacientů s „ukotvenou“ somatickou mutací receptorů hepatocytárního růstového faktoru a potenciálně vysokým rizikem postupu onemocnění a smrti. Klíčová fáze III klinickým testů stále probíhá (<http://www.ClinicalTrials.gov/> number NCT00704730). [31]

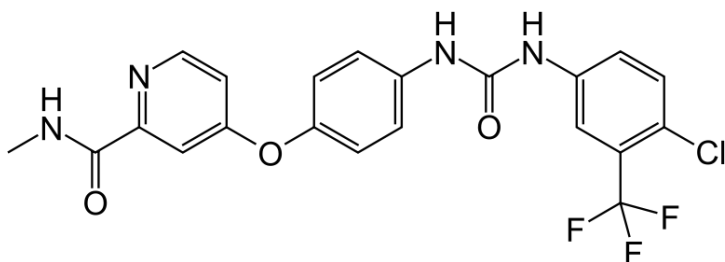


Obrázek č. 9-Strukturní vzorec cabozantinibu [37]

1.6.4 Sorafenib (BAY 43-9006)

Sorafenib (BAY 43-9006), je látkou se strukturním vzorcem uvedeným na obrázku č. 10. Je to multikinasový inhibitor zacílující serin/threonin-proteinkinasu B-Raf (BRAF), receptory cévního endoteliálního růstového faktoru 2, receptory cévního endoteliálního růstového faktoru 3, tyrosinkinasy Kit a receptory destičkového růstového faktoru. Tato látka silně inhibuje kinasovou aktivitu receptorů neurotrofických faktorů odvozených od gliálních buněk *in vitro*. Ve fázi II klinických testů byl sorafenib (400 mg/dvakrát denně) podáván 21 pacientům s metastázovaným medulárním karcinomem štítné žlázy. Pacienti se sporadickým medulárním karcinomem štítné žlázy dosáhli 87,5% stabilizace choroby a 6,3% prokazovalo částečnou odpověď. Střední doba prodloužení života pacienta byla 17,9 měsíců. Léčba byla předčasně zastavena u pacientů s dědičným medulárním karcinomem štítné žlázy, kvůli opětovnému nárůstu nádorů. V podobném testu, všech 5 pacientů léčených sorafenibem prokázalo částečnou odpověď. Nedávná studie u pacientů s pokročilým medulárním

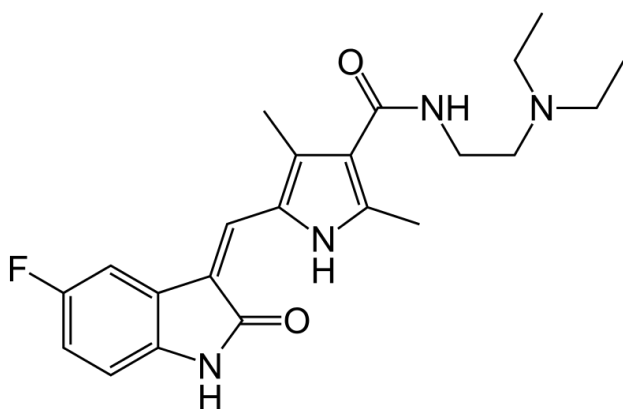
karcinomem štítné žlázy zaznamenala částečnou odpověď u 6 z 12 pacientů. Protože však byl testovaný malý počet pacientů účinek sorafenibu vyžaduje ještě další prozkoumání. [31]



Obrázek č. 10-Strukturní vzorec sorafenibu [38]

1.6.5 Sunitinib (SU011248)

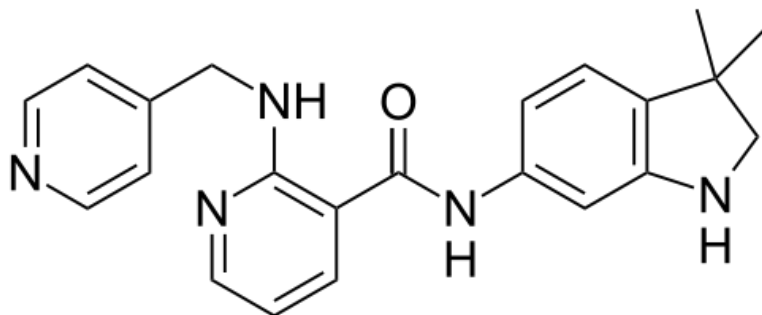
Sunitinib je malá molekula inhibitoru se strukturním vzorcem uvedeným na obrázku č. 11, která zacíljuje stejné proteinkiny jako sorafenib, včetně receptorů cévního endoteliálního růstového faktoru, receptorů destičkového růstového faktoru, tyrosinkinasu Kit, a receptorů neurotrofických faktorů odvozených od gliálních buněk. Ve fázi II klinických testů, 33 pacientů s diferenciovanými rakovinami štítné žlázy nebo medulárním karcinomem štítné žlázy bylo léčeno sunitinibem. U jednoho pacienta docházelo ke kompletní odpovědi, 28% pacientů mělo částečnou odpověď a u 46% pacientů se ukázala stabilizace choroby. Průběžné výsledky fáze II studie THYSU prokázaly účinky sunitinibu na pokročilý medulární karcinom štítné žlázy, ale konečné výsledky zatím ještě nejsou plně zveřejněny. [31]



Obrázek č. 11-Strukturní vzorec sunitinibu [39]

1.6.6 Motesanib (AMG 706)

Motesanib (AMG 706) je a multikinasový inhibitor, se strukturním vzorcem uvedeným na obrázku č. 12. Tento inhibitor cílí na receptory cévního endoteliálního růstového faktoru 1, 2, a 3, receptory destičkového růstového faktoru, tyrosinkinasu Kit a působí na angiogenezi, tedy přímo proti nádorům. Ve fázi II studie s 91 pacienty trpícími pokročilým, metastázovaným, progresivním nebo symptomatickým medulárním karcinomem štítné žlázy ukázali, že i přes nízkou míru objektivní odpovědi (ORR), 81% pacientů zaznamenala stabilizaci medulárního karcinomu štítné žlázy po dobu léčby motesanibem. Nedávné studie vyšetřující efekt motesanibu na „divoký“ typ a mutantní typ receptorů neurotrofických faktorů odvozených od gliálních buněk *in vitro*, a na nádory v myších modelech medulárního karcinomu štítné žlázy ukázaly inhibici růstu takovýchto nádorů, převážně přes inhibici angiogeneze a nebo přímou inhibicí receptorů cévního endoteliálního růstového faktoru 2 a receptorů neurotrofických faktorů odvozených od gliálních buněk, které byly exprimovány v testovaných nádorových buňkách. Tyto informace naznačují, že angiogeneze a signální dráha cévního endoteliálního růstového faktoru jsou významné pro vývoj medulárního karcinomu štítné žlázy. [31]



Obrázek č. 12-Strukturní vzorec motesanibu [40]

1.7. METABOLISMUS VANDETANIBU

Vzhledem k tomu, že v nedávných studiích metabolismu vandetanibu bylo zjištěno, že dochází ke změně jeho aktivity při přeměně na N-desmethylvandetanib enzymovým systémem cytochromů P450 a na vandetanib N-oxid flavinovým monooxygenasovým systémem, je důležité tomuto procesu porozumět. Bylo by tak možné zvýšit účinnost tohoto léku a zmírnit jeho vedlejší účinky. [41]

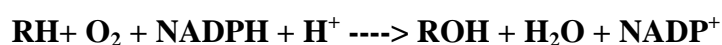
1.7.1 Cytochrom P450

Do skupiny cytochromů P450, patří téměř všechny enzymy, které se účastní I. fáze biotransformace xenobiotik (tedy i léčiv), kromě peroxidasy a dioxygenasy. Cytochromy P450 jsou terminální oxidasy monooxygenasového (MFO – „mixed function oxidases“) systému a nachází se v širokém spektru živočichů (od bakterií, kvasinek až po obratlovce). Tyto enzymy se také podílejí na metabolismu endogenních látek, např. na biosyntéze cholesterolu, steroidních hormonů, žlučových kyselin a oxidačním metabolismu mastných kyselin. Mezi další složky, které jsou součástí monooxygenasového enzymového systému, patří NADPH:cytochrom P450 reduktasa a membrána endoplazmatického retikula. Většina cytochromů P450 je lokalizována v membráně endoplazmatického retikula, mitochondriální membráně a také ve vnější jaderné membráně. Dále pak v peroxisomech, plazmatické membráně či v Golgiho aparátu. [42]

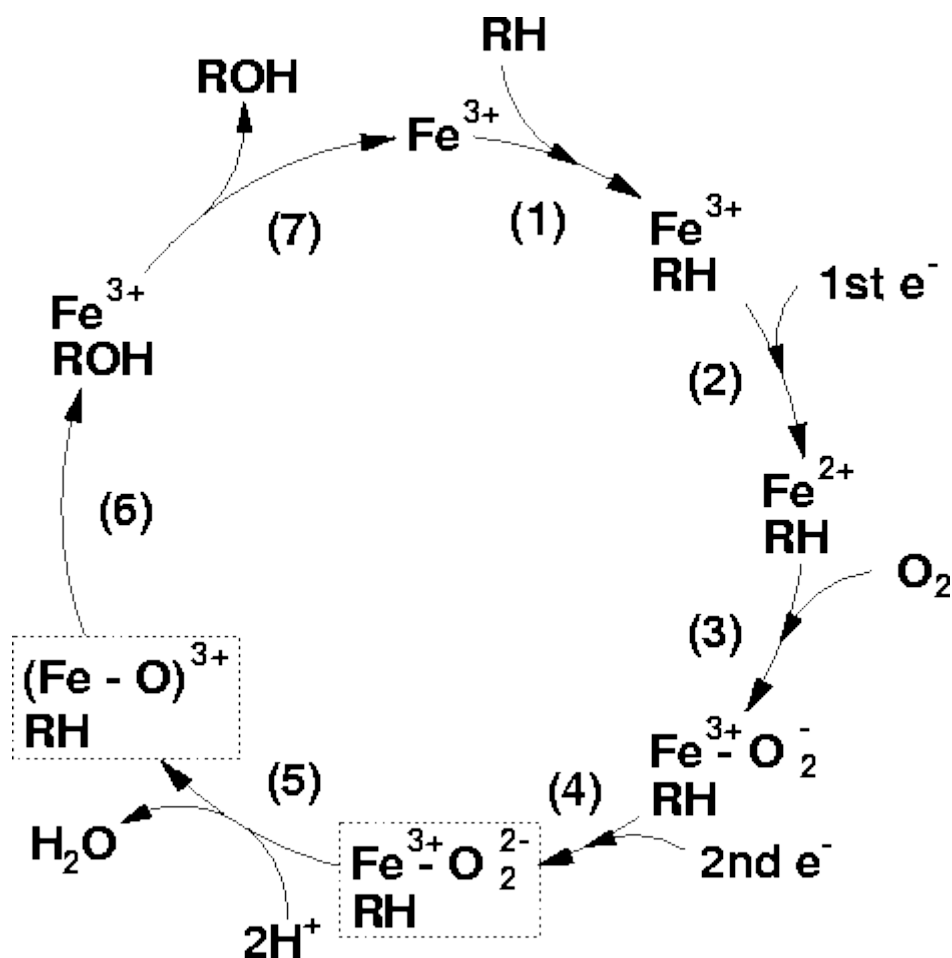
V aktivním centru má cytochrom P450 porfyrinový skelet (protoporfyrin IX), který je částečně stabilizován hydrofóbním efektem. Pátým ligandem železa je thiolátový anion, který je přítomný v aktivním centru z aminokyseliny cysteinu. Touto vazbou se cytochromy P450 liší od většiny ostatních hemoproteinů. Šestá koordinační vazba iontu Fe v aktivním centru je v klidovém stavu obsazena molekulou vody. V případě, že dojde k redukcí železa na Fe²⁺ porfyrinového skeletu, může se jako šestý ligand navázat molekula kyslíku. [42]

Přechodný charakter hemového železa umožňuje cytochromu P450 přechod mezi dvěma spinovými formami. Nízkospinová forma (spin 1/2), ve které je ion železa hexakoordinován, jelikož navíc interaguje s dalším ligandem (atom kyslíku z vody, hydroxylová skupina...) se Fe nachází v rovině protoporfirinového kruhu. Oproti tomu ve vysokospinové (spin 5/2), kde je ion Fe pentakoordinován, dochází k „vytlačení“ šestého ligandu a „vytahování“ iontu železa thiolátovou skupinou nad rovinu porfyrinového skeletu. [42]

Nejtypičtější reakcí katalyzovanou cytochromy P450 je monooxygenasová reakce, při níž dojde k aktivaci molekulárního kyslíku a zabudování jednoho kyslíkového atomu do molekuly substrátu. Druhý atom kyslíku je redukován na vodu. Tato reakce se dá vyjádřit sumární rovnicí



RH je v této reakci substrát a **ROH** je hydroxylovaný produkt reakce [42].



Obrázek č. 14 – Aktivace molekulárního kyslíky, zabudování kyslíkového atomu do molekuly substrátu a redukce druhého atomu kyslíku na vodu [43]

Tato reakce probíhá cyklicky a je složena z osmi kroků, uvedených na obr. 14. Prvním krokem (reakce 1) reakčního cyklu je vazba substrátu, který naruší rovnováhu spinového stavu cytochromu P450, a tím dojde k usnadnění příjmu prvního elektronu. Ve stabilní formě je ion železa ve ferri formě (Fe^{3+}) a je hexakoordinován. Při navázání substrátu RH , dojde ke konformační změně a „vytlačení“ šestého ligandu, čímž železo přejde do pentakoordinovaného stavu. Po té dojde k přenosu elektronu z NADPH pomocí NADPH :cytochrom P450 reduktasy (reakce 2) na cytochrom P450 a následkem toho dojde k redukci Fe^{3+} na Fe^{2+} . Ion železa se stále nachází v pentakoordinovaném stavu, což je jeho vysokospinový stav. Tato forma enzymu je schopná navázat molekulu kyslíku, za vzniku ternárního komplexu (reakce 3). V ternárním komplexu je ion železa hexakoordinován a v nízkospinové formě. Tento komplex přechází do tzv. ferri-superoxidového komplexu

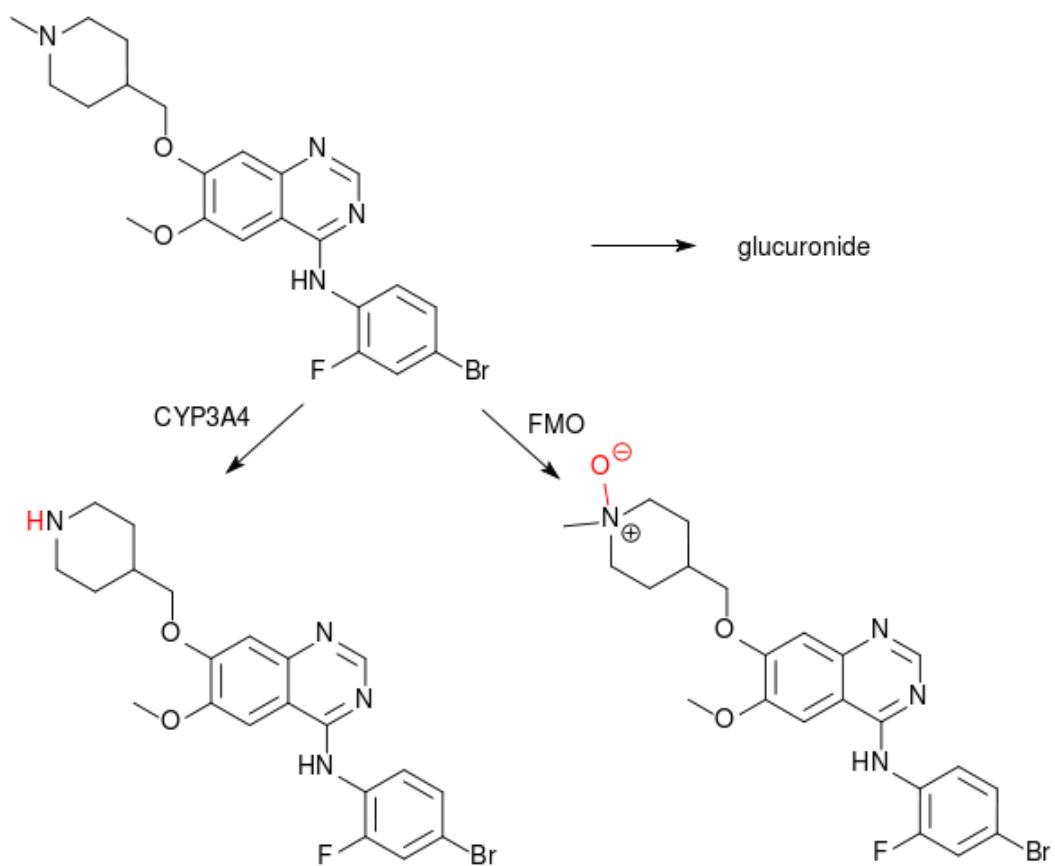
$[(RH)Fe^{3+}(O_2^-)]$, což je mezomerní stav, který je redukován druhým elektronem (reakce 4). Tato redukce je posledním krokem tzv. aktivační fáze reakčního cyklu cytochromu P450. Vazba mezi oběma kyslíky je pak labilizována a dochází ke štěpení této vazby. První atom kyslíku přijme dva protony a je uvolněn ve formě molekuly vody a druhý je navázán na iontu železa v hemu ve formě ferri-oxenového komplexu (reakce 5). Ke stabilizaci tohoto komplexu dochází mezomerním posunem elektronu z thiolátové síry na kyslík. Vzniklý radikál „vytrhne“ vodíkový atom z molekuly substrátu za vzniku radikálu z molekuly substrátu a hydroxylového aniontu vázaného na ion železa (reakce 6). Dalším mezomerním posunem elektronů (reakce 7), dochází ke vzniku formy s navázaným hydroxylovým a substrátovým radikálem a sírou, která se navrátila do původní thiolátové formy. Poslední reakcí (reakce 8), dojde k rekombinaci radikálů, čímž vznikne nativní forma cytochrom P450 a hydroxylovaný substrát. [42]

1.7.2 Metabolismus vandetanibu cytochromy P450

Nedávné studie *in vitro* naznačily, že cytochrom P450 (CYP) 3A4, může být hlavním cytochromem P450 zodpovědným za metabolismus vandetanibu. Vandetanib je cytochromem P450 3A4 přeměněn na N-desmethylvandetanib. Vedle toho je předpokládáno, že flavinovým monooxygenasovým systémem v ledvinách (FMO1) a játrech (FMO3) je vandetanib oxidován na vandetanib N-oxid (obrázek 15). Tato skutečnost byla prokázána ve studiích využívajících radioznačený vandetanib. N-desmethylvandetanib i vandetanib N-oxid byly nalezeny v plazmě, moči i výkalech. [41]

N-desmethylvandetanib má podobnou účinnost jako vandetanib, zatímco vandetanib N-oxid má více než 50krát menší efektivitu než vandetanib a tím jeho farmakologickou účinnost. Indukce nebo inhibice cytochromu P450 3A4 a flavinových monooxygenas by mohla ovlivnit metabolismus vandetanibu. Jelikož pacienti přijímají široké spektrum různých léčiv v jejich terapiích, je možné, že tyto látky ovlivňují i metabolickou aktivitu cytochromu P450 3A4, a tím i metabolismus vandetanibu. [41]

Vzhledem k tomu, že výše uvedený metabolismus vandetanibu byl naznačen pouze v předběžných experimentech, jeho detailní metabolismus vyžaduje další studie. Takové studie budou předmětem experimentů v laboratoři, kde byla předkládána bakalářská práce vypracovávána. Proto byla jedním z cílů bakalářské práce rovněž izolace mikrosomálního oxygenasového systému, a izolace některých jeho enzymových složek. Ty budou využity v metabolických studiích vandetanibu v dalších experimentech.



Obrázek č. 15 Přeměna vandetanibu pomocí cytochromu P450 na N-desmethylvandetanib a pomocí flavinové monoxygenasy na vandetanib N-oxid [44]

2. CÍL BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Cílem předkládané bakalářské práce bylo shromáždit dostupné literální údaje o inhibitech tyrosinkinás a jejich využití v protinádorové léčbě. Detailně byla v tomto směru práce zaměřena na využití chemoterapeutik při léčbě nádorů štítné žlázy a studiu jejich metabolismu. Cílem experimentální části bakalářské práce byla izolace mikrosomálních subcelulárních systémů z jater potkana a dvou enzymů tohoto systému: NADPH:cytochrom P450 reduktasy a NADH:cytochrom b₅ reduktasy. Izolované enzymy budou dále využity pro studium metabolismu některých zástupců studovaných inhibitorů tyrosinkinás.

3. Materiál a metody

3.1 POUŽITÝ MATERIÁL A CHEMIKÁLIE

Fluka, Švýcarsko

1,1,1-tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS), tokoferol (vitamin E), protaminsulfát, fenylmethylsulfonylfluorid (PMSF),

Lachema Brno, Česká republika

kyselina octová, methanol, ethanol, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 , $\text{Na}_2\text{P}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$, KCl, glycerol, ethylendiamintetraoctové (EDTANa_2), cholát sodný, Coomassie Brilliant Blue R-250, polymerační roztok A, 10% persíranu, polymeračního roztoku B, ferrikyanid draselný

Linde, Česká republika

Kapalný dusík

Merck, Německo

acetonitril

Penta, Česká republika

ethylacetát

Sigma, USA

glukosa-6-fosfát, NADPH, triethylamin (TEA), dimethylsulfoxid, DTT (Dithiothreitol),

RocheDiagnostics, SRN

Complete Protease Inhibitor

Serva Heidelberg, Německo

tetramethylethylendiimin (TEMED), triton-X-100

KaoChemicals, Japonsko

Emulgen E-911

Thermo Fisher Scientific, Litva

Pageruler prestained protein ladder

K izolaci mikrosomů z jater potkana byly použity následující pufrы:

Pufr PR1 – 153 mM KCl/KOH, 10 mM EDTANa₂, 0,5 mM PMSF, 50 μM vitamin E, pH 7,5

Pufr PR2 – 100 mM KCl/HCl, 100 mM Na₄P₂O₇ · 10 H₂O, 1 mM EDTANa₂, pH 7,5

Pufr PR3 – 0,25 mM sacharosa/NaOH, 10 mM EDTANa₂, 1 mM DTT, 250 μM vitamin E, 1 tableta proteasového Complete Inhibitoru/50 ml pufru, pH 7,5

Pufr PR4 – 100 mM Tris/acetát, 100 mM KCl, 20 % glycerol (v/v), 1 mM DTT, pH 7,5

Pufr PR5 (ekvilibrační pufr pro kolonu DEAE-Sepharosy CL-6B) – 5 mM Tris/acetát, 1 mM EDTANa₂, 20 % glycerol (v/v), 0,1 % Emulgen-911 (w/v), pH 7,5

Pufr PR6 (dialyzační pufr) – 5 mM KH₂PO₄/KOH, 1 mM EDTANa₂, 0,1 mM DTT, 10 % glycerol (v/v), 0,1 % Emulgen E-911 (w/v), pH 7,0

Pufr PR8 (triethylaminový dialyzační pufr) – 25 mM TEA/HCl, 1 mM DTT, 20 % glycerol, pH 7,4

Pufr AP1 (cyklizační pufr pro kolonu DEAE-Sepharosu CL-6B) – 1 M Tris/HCl, pH 7,5

Pufr AP2 („nalévací“ pufr pro přípravu kolony DEAE-Sepharosy CL-6B) – 5 mM Tris/acetát, 20 % glycerol (v/v), pH 7,5

Pufr CP1 (ekvilibrační pufr pro kolonu 2',5'-ADP-Sepharosy 4B) – 50 mM KH₂PO₄/KOH, 1 mM EDTANa₂, 0,1 mM DTT, 20 % glycerol (v/v), 0,2 % Emulgen E-911 (w/v), pH 7,0

Pufr CP2 (pufr CPR použitý pro eluci NADPH: CYP reduktasy z kolony 2',5'-ADP-Sepharosy 4B) – 50 mM KH₂PO₄/KOH, 0,2 M KCl, 1 mM EDTANa₂, 0,1 mM DTT, 20 % glycerol (v/v), 0,1 % Emulgen E-911 (w/v), těsně před použitím 0,5 mM NADPH, pH 7,5

Nalévací pufr (DP1; 1300 ml, pH 8,1) - 3 mM Tris/ acetat, 0.1 mM EDTANa₂, 20% glycerol (v/v)

Pufr DP2 – 15mM Tris/acetát, 20 % glycerol (v/v), 0,1 mM EDTANa₂, 0,5% TRITONX 100

Pufr na stanovení NADPH:cytochrom P450 reduktasy - 300 mM KH₂PO₄, 1 mM EDTANa₂

Vzorkový pufr (5x konc. 10 ml nH 6.8) - 250 mM Tris/ Cl, 500 mM DTT, 10% SDS (w/v), 0.5 % bromfenolová modř (w/v), 50% glycerol (v/v)

Separační gel (12%; 6 ml / sklo) - 2,4 ml polymeračního roztoku A, 3,6 ml pufru A, 6 μl TEMED 50 μl 10% persiranu (w/v)

Zaostřovací vrchní gel (3 %; 3.7 ml / sklo): 0,375 ml polymeračního roztoku B, 3,375 ml pufru B, 3,375 μl TEMED, 30 μl 10% persiranu (w/v)

Elektrodový pufr (2000 ml pH 8,5) - 28,83 g glycinu, 5,5 g Tris, 20 ml 10% SDS (w/v)

Barvíci lázeň Coomassie Brilliant Blue R-250 - 0,25 g Coomassie Brilliant Blue R-250, 45 ml ethanolu, 10 ml kyseliny octové, 45 ml vody

Odbarvovací lázeň - 1300 ml vody, 500 ml ethanolu, 200 ml kys. octové

3.2 PŘÍSTROJE

Automatické mikropipety

Nichiryo Nichipet EX (Japonsko)

Centrifugy

K-23, Janetzki, výkvyvný rotor (německo)

K-24, Janetzki, úhlový rotor (německo)

Optima LE-80K Ultracentrifuge Beckman Coulter, úhlový rotor Ti 45 (USA)

Centrifuge 5418, Eppendorf, úhlový rotor (německo)

Magnetická míchačka

Variomag, Monotherm (Německo)

pH metry

ATI Orion 370 s kombinovanou elektrodou (USA) – přístroj kalibrován pomocí standardů

Hamilton (Švýcarsko)

Spektrofotometry

Helios α , Thermo Spectrosonic (USA)

Specord M-40 (Analytik Jena)

Další využívané přístroje

analytické váhy PESA 40SM-200 A (švýcarsko)

homogenizátor IKA® RW 16 basic (USA)

Amicon PM-30, Millipore (Fisher Scientific)

Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad)

MS 2 minishaker schoeller Pharma Praha (Česká republika)

3.3 METODY

3.3.1. Izolace mikrosomální frakce z jater potkana

Veškeré izolační postupy byly prováděny v chlazené místnosti. Potkaní játra opláchnutá pufrem PR1 jsme nastříhali na malé kousky, přenesli do kádinky s pufrem PR1 a vložili do homogenizátoru s širším nástavcem nástavcem pro homogenizaci „na hrubo“ (10 cm³). Směs jsme dále homogenizovali ještě jednou v těsnějším homogenizátoru „na jemno“ (2 cm³), až byl připraven homogenát. Homogenát jsme filtrovali přes 3krát přeloženou gázu, abychom se zbavili větších nehomogenizovaných kousků jaterní tkáně. Homogenát jsme poté centrifugovali 10 minut při 600g na centrifuze Janetzki K-23. Supernatant jsme zachovali a sediment jsme rehomogenizovali s pufrem PR1 a znovu centrifugovali stejným způsobem. Oba dva vzniklé supernatanty jsme slili a odstředovali 20 min při 15000g na centrifuze Janetzki K-24. Supernatant jsme centrifugovali 65 min po 105000g na ultracentrifuze Beckman. Získaný sediment jsme rehomogenizovali v homogenizátoru pufrem PR2. Uvedený homogenát jsme odstředili za stejných podmínek na ultracentrifuze Beckman L07. Sediment jsme přenesli do homogenizátoru s pufrem PR3. Odebrali jsme 150 µl pro následné stanovení obsahu bílkovin, cytochromu P450 (CYP), NADPH:CYP reduktasy (RED), cytochromu b₅ (cyt b₅), NADH:cytochrom b₅ reduktasy a zmrazili na teplotu -80 °C . Tímto postupem jsme získali mikrosomální frakci.

3.3.2. Solubilizace proteinů mikrosomální frakce

Mikrosomální frakci jsme doplnili pufrem PR4 na objem 120 ml a znovu homogenizovali. Získanou suspenzi jsme míchali na ledu v Erlenmayerově baňce pod atmosférou dusíku a po kapkách jsme přidávali roztok obsahující tzv. „Complete“ inhibitor (4 tablety „Complete“ inhibitorů rozpuštěné ve 2 ml pufrem PR4) a protaminsulfát o koncentraci 15 mg/l. Hrdlo baňky jsme překryli parafilmem a prostrčili hadičku, kudy byl roztok probubláván dusíkem. Z dělicí nálevky jsme přikapávali roztok 10% cholátu sodného a 10% roztok Emulgenu E-911 do výsledné koncentrace odpovídající 1 mg cholátu sodného na 1 mg proteinu a 1 mg Emulgenu E-911 na 1 mg proteinu. Po přidání všech roztoků jsme směs míchali ještě 20 minut. Poté byla směs odstředována na centrifuze Beckman po dobu 60 min při 105000g. Ze supernatantu jsme odebrali 150 µl pro následné stanovení obsahu bílkovin, cytochromu P450 (CYP), NADPH:CYP reduktasy (RED), cytochromu b₅ (cyt b₅) a

NADH:cytochrom b_5 reduktasy a zmrazili na teplotu $-80\text{ }^\circ\text{C}$. Zbytek supernatantu byl použit pro izolaci mikrosomálních enzymů monooxygenasového systému.

3.3.3 Chromatografie proteinů mikrosomální frakce na koloně DEAE-Sepharosy CL6B

Jako nosič pro separaci mikrosomálních proteinů byla použita DEAE-Sepharosa skladovaná ve 20% ethanolu. Ten jsme odsáli a 3krát promyli 350 ml destilované vody. Po promytí jsme nosič promíchali ve 200 ml tzv. cyklizačního pufru AP1 a nechali při $4\text{ }^\circ\text{C}$ stát přes noc. Následující den jsme nosič 3krát promyli destilovanou vodou a jedenkrát puftrem AP2. Nosič jsme rozmíchali ve 150 ml pufru AP2, nalili na kolonu o rozměrech $15 \times 3\text{ cm}$ a promyli 500 ml pufru PR5. Na kolonu jsme nanесли supernatant mikrosomů po solubilizaci a chromatografovali. Sbírány byly frakce po 18 ml, ve kterých byla měřena absorbance při 417 nm. Kolonu jsme po nanesení vzorku promývali 500 ml pufru PR5 s přidavkem takového množství emulgátoru E-911, aby jeho finální koncentrace byla 0,4% (hmot.). Cytochromy P450 (CYP), které jsme v bakalářské práci neizolovali se za daných podmínek na nosič nenavázaly. Naopak NADPH:CYP reduktasa, cytochrom b_5 a NADH:cytochrom b_5 reduktasa byly na nosiči vázány. Proteinové frakce eluované puftrem PR5 jsme charakterizovali pomocí SDS- PAGE. Frakce obsahující cytochrom P450 (CYP), byly slity a zahuštěny na 70 ml za použití membrány Amicon PM-30, Millipore. Zahuštěnou frakci jsme přes noc dialyzovali proti 2x 1000 ml pufru PR5. Získaný cytochrom P450 jsme zmrazili na $-80\text{ }^\circ\text{C}$ pro využití v jiných experimentech.

V dalších krocích jsme izolovali NADPH:CYP reduktasu, cytochrom b_5 a NADH:cytochrom b_5 reduktasu. Tyto enzymy a proteiny mikrosomálního monooxygenasového systému byly z kolony eluovány za použití 2x 400 ml pufru PR5 za použití lineárního gradientu 0-0,4 M KCl. Sbírali jsme frakce o objemu 10 ml. Ve své bakalářské práci jsem se konkrétně zaměřil na izolaci NADH:cytochrom b_5 reduktasy a NADPH:cytochrom P450 reduktasy (RED). Eluci těchto proteinů jsme kontrolovali proměřováním absorbance při 413 nm. Spojili jsme frakce, které nebyly kontaminovány dalšími proteiny (zjistili jsme pomocí SDS-PAGE) a zahustili na 30 ml (pomocí Amicon PM-30, Millipore). Vzorky jsme dále dialyzovali přes noc proti 2x 1000 ml pufru PR6. Po dialýze jsme upravili pH roztoku pomocí KH_2PO_4 na pH 7,0 a roztok jsme nanесли na kolonu 2',5'-ADP-Sepharosy ekvilibrovanou puftrem CP1 (pH 7,0). Část roztoku jsme odebrali na

závěrečná stanovení aktivity a absorbance (vzorky jsou označovány jako vzorky z DEAE-Sepharosy).

3.3.4 Chromatografie NADPH:cytochrom P450 reduktasy na koloně 2',5'-ADP-Sepharosy 4B (pH 7.0)

Na kolonu 2',5'-ADP-Sepharosy 4B ekvilibrovanou pufrům CP1 jsme nanесли dialyzovaný vzorek proteinů s upraveným pH na hodnotu 7,0. Sbírali jsme eluované frakce o objemu asi 4 ml a měřili v nich absorbanci při 413 nm (A_{413}). Po nanesení vzorku na kolonu, jsme kolonu promývali 250 ml pufru CP1, k odstranění zbytků cytochromu b_5 . NADPH:cytochrom P450 reduktasu jsme elovali z kolony 30 ml pufru CP2 a následně měřili čistotu eluovaných proteinových frakcí pomocí SDS-PAGE. Frakce s nejvyšším obsahem NADPH:cytochrom P450 reduktasy jsme spojili. Získaný vzorek jsme zahustili na 10 ml (pomocí Amicon PM-30, Millipore) a dialyzovali 12 hodin při 4 °C proti 2000 ml pufru PR8. Následně jsme finální preparát opětovně zahustili na 2 ml. Finální preparát **NADPH:cytochrom P450 reduktasy** jsme zmrazili na teplotu -80°C, kde byl dále skladován.

3.3.5 Chromatografie NADH:cytochrom b_5 reduktasy na koloně DEAE-Sepharosy CL6B 2 (pH 8.1)

Na kolonu DEAE-Sepharosy CL6B 2 ekvilibrovanou pufrům DP2 jsme nanесли dialyzované frakce obsahující NADH:cytochrom b_5 reduktasu a promývali 100 ml pufru DP2. Po dokončení promývání jsme NADH:cytochrom b_5 reduktasu elovali pomocí gradientu 500 ml 75-150 mM KCl v pufru DP2. V eluovaných frakcích jsme měřili absorbanci při 413 nm, čímž jsme určili obsah proteinů v jednotlivých frakcích. Čistotu proteinů jsme následně analyzovali pomocí SDS-PAGE (12% hmot.). Čisté frakce NADH:cytochrom b_5 reduktasy jsme spojili a zahustili na 16 ml. Tímto postupem jsme získali finální preparát **NADH:cytochrom b_5 reduktasy**.

3.3.6. Měření aktivity NADPH:cytochrom P450 reductasy

Aktivitu NADPH:cytochrom P450 reductasy jsme stanovovali spektrofotometricky za užití spektrofotometru Specord M-40. Do kyvety jsme pipetovali 960 μ l pufru na stanovení NADPH:cytochrom P450 reductasy, 10 μ l cytochromu c (25 mg/ml) a měřili hodnotu absorbance při 550 nm. Tímto postupem jsme získali hodnotu „blankového“ vzorku. Pokračovali jsme přidáním 10 μ l vzorku obsahujícího NADPH:cytochrom P450 reductasu a 20 μ l 10 mM NADPH. Směs jsme promíchali a měřili změnu absorbance při 550 nm za 60 s.

3.3.7. Měření aktivity NADH:cytochrom b₅ reductasy

Aktivitu NADH:cytochrom b₅ reductasy jsme měřili rovněž spektrofotometricky za užití spektrofotometru Specord M-40. Do kyvety jsme pipetovali 20 μ l roztoku 1 mM ferrikyanidu, 1,94 ml 0,1M fosfátového pufru a proměřili absorbanci při 420 nm za použití spektrofotometru Specord M-40. Tímto postupem jsme získaly hodnoty absorbance „blankového“ vzorku. Do ostatních vzorků jsme dále přidali 20 μ l vzorku obsahujícího NADH:cytochrom b₅ reductasu a 20 μ l 10 mM NADH. Po promíchání směsi jsme měřili změnu absorbance při 420 nm za 60 s.

3.3.8. Diskontinuální elektroforéza na polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS-PAGE)

Pomocí SDS-PAGE (metodou dle Laemmliho [45]) jsme provedli analýzu proteinů jaterní potkaní mikrosomální frakce, solubilizátu mikrosomů, frakce NADPH:cytochrom P450 reductasy získané chromatografií na DEAE-Sepharose, finálního preparátu NADPH:cytochrom P450 reductasy po izolaci afinitní chromatografií na 2',5'-ADP-Sepharose 4B, finálního preparátu NADH:cytochrom b₅ reductasy získaného po izolaci na koloně DEAE-Sepharosy CL6B a frakce NADH:cytochrom b₅ reductasy získané re-chromatografií na DEAE-Sepharose CL6B 2. Během této metody dochází vzhledem k unifikaci náboje k dělení proteinů podle jejich molekulové hmotnosti. Používán je tzv. zaostřovací „vrchní“ gel 3 % (w/v), a 12 % (w/v) separační gel.

K 20 μ l vhodně ředěných proteinových frakcí, získaných v průběhu izolace mikrosomů a enzymů, jsme přidali 5 μ l vzorkového pufru. Upravené vzorky jsme 5 minut

povařili na vodní lázni a následně nanесли 20 μl tohoto roztoku Hamiltonovou stříkačkou do jamek připraveného gelu. Elektromigrace probíhala po dobu 60 minut při konstantním napětí 100 V.

Získané gely po elektroforéze jsme vložili do barvicí lázně (0,25% Coomasie Brilliant Blue R-250) a nechali barvit 45 minut. Následně jsme obarvený gel odbarvovali v odbarvovacím roztoku (25% ethanolu 10% ml kyselina octová, 65 % vody) 2x 60 minut.

4. VÝSLEDKY

Ke zjištění funkce NADPH:cytochrom P450 reduktasy a NADH:cytochrom b_5 reduktasy při I. fázi biotransformace jednoho z inhibitorů tyrosinkinas, vandetanibu, ale i dalších xenobiotik bylo potřeba získat tyto enzymy mikrosomálního systému v čistých formách. K izolaci mikrosomální frakce z jater potkana jsme využili postupu popsaného Doc. RNDr. Miroslavem Šulcem PhD. a Mgr. Kateřinou Pešlovou. [46]

4.1 IZOLACE MIKROSOMŮ Z JATER POTKANA

Izolace mikrosomů z jater potkana probíhala dle postupu popsaného v kapitole 3.3.1. Homogenizací potkaních jater a následnou ultracentrifugací bylo získáno 25 ml finální mikrosomální frakce. Koncentrace proteinů v této frakci byla 29,1 mg/ml (viz tabulka 1).

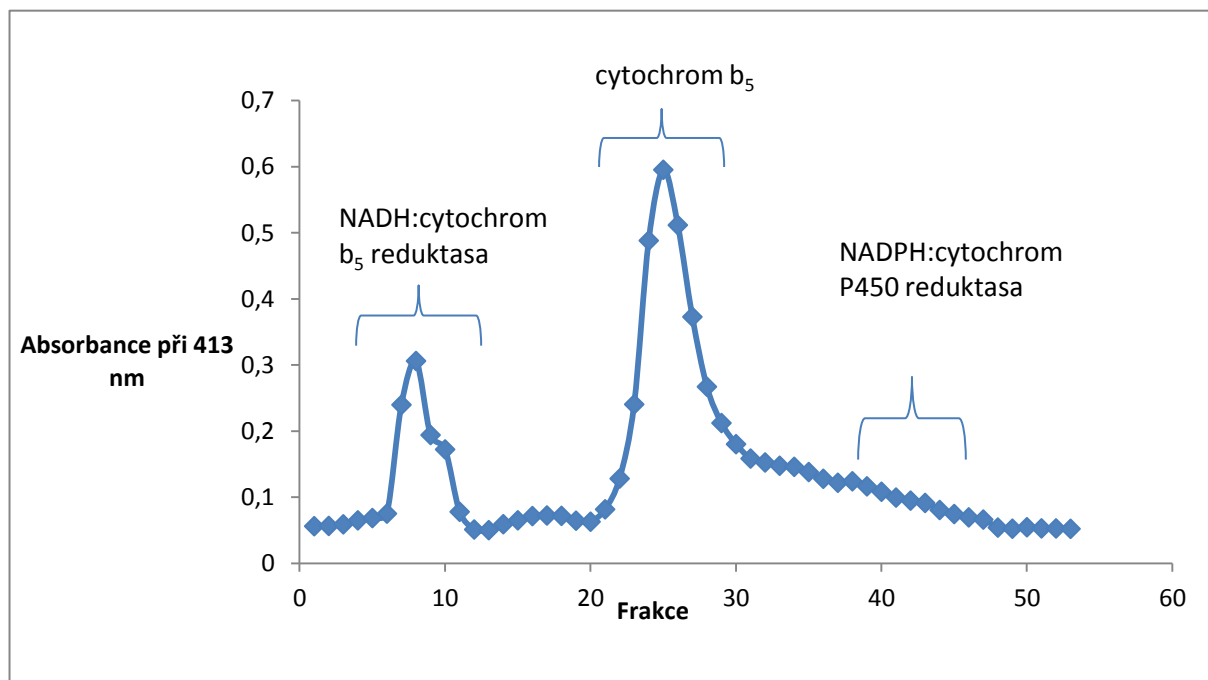
4.2 SOLUBILIZACE PROTEINŮ MIKROSOMÁLNÍ FRAKCE

V dalším kroku izolace enzymů jsme provedli solubilizaci proteinů mikrosomální frakce pomocí cholátu sodného a Emulgenu-911 dle postupu popsaného v kapitole 3.2.2. Těmito detergenty jsme solubilizovali membránově vázané enzymy cytochrom P450, NADPH:cytochrom P450 reduktasu a NADH:cytochrom b_5 reduktasu. Aby nedošlo k degradaci uvedených enzymů, inaktivovali jsme proteasy přítomné v mikrosomální frakci pomocí směsi inhibitorů proteas („Complete“ inhibitor, Sigma). Solubilizát o objemu 190 ml obsahoval 3,7 mg/ml proteinů.

4.3 CHROMATOGRRAFIE NADH:CYTOCHROM b_5 REDUKTASY, CYTOCHROMU b_5 a NADPH:CYTOCHROM P450 REDUKTASY NA SLOUPCI DEAE-SEPHAROSY CL6B

Izolace NADPH:cytochrom P450 reduktasy byla provedena dle postupu popsaného v kapitole 3.2.3. Kolonou DEAE-Sepharosy CL6B volně protekl cytochrom P450, zatímco NADPH:cytochrom P450 reduktasa, cytochrom b_5 a NADH:cytochrom b_5 reduktasa zůstaly zachycené (vázané) na koloně DEAE-Sepharosy CL6B. Následně jsme je eluovali lineárním gradientem 0-0,4 M KCl v pufru PR5 (obrázek č.16). Sbírali jsme frakce č. 6-13 obsahující

NADH:cytochrom b_5 reduktasu, č. 21-29 obsahující cytochrom b_5 , a frakce č. 38-45 obsahující NADPH:cytochrom P450 reduktasu. Měřením aktivit dle postupu popsaném v kapitole 3.3.6. v okolí 35. frakce jsme určili, které frakce obsahují NADPH:cytochrom P450 reduktasu.



Obrázek č. 16 – Chromatografie NADPH:cytochrom P450 reduktasy, cytochromu b_5 a NADH:cytochrom b_5 reduktasy na DEAE-Sepharose CL6B. Měřena byla absorbance při 413 nm. Sbírali jsme frakce č. 6-13 obsahující NADH:cytochrom b_5 reduktasu, frakce č. 21-29 obsahující cytochrom b_5 a frakce č. 38-45 obsahující NADPH:cytochrom P450 reduktasu.

4.4 IZOLACE NADPH:CYTOCHROM P450 REDUKTASY AFINITNÍ CHROMATOGRAFIE NA 2',5'-ADP-SEPHAROSE 4B

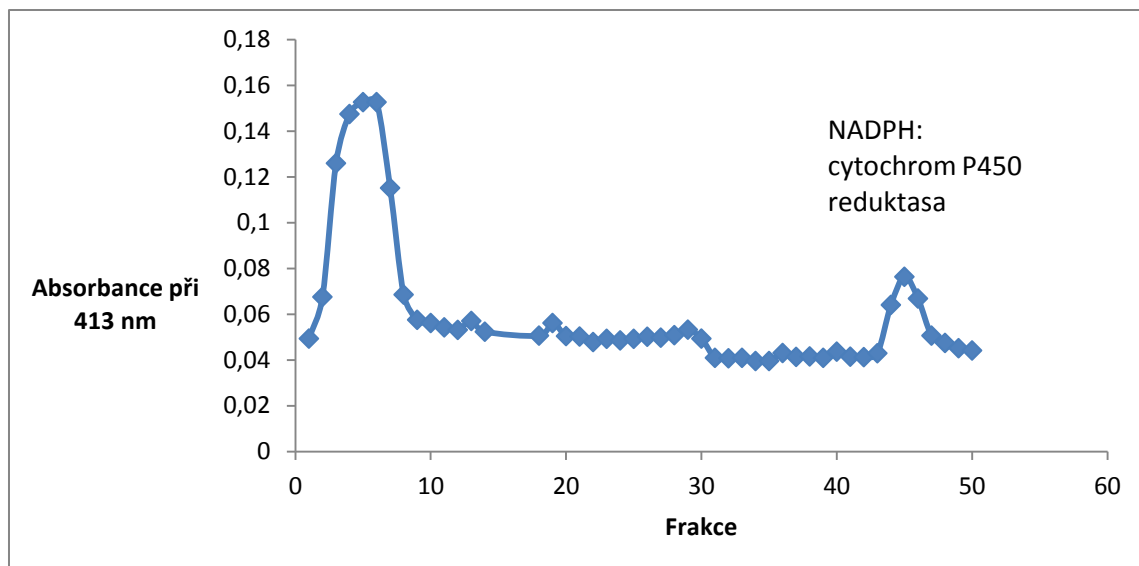
NADPH:cytochrom P450 reductasa byla dále purifikována pomocí afinitní chromatografie na sloupci 2', 5'-ADP-Sepharosy 4B (Obr. 17). Postupovali jsme dle metody popsané v kapitole 3.3.4. Vzhledem ke struktuře aktivní části nosiče (2', 5'-ADP), zůstala na nosiči zachycená pouze NADPH:cytochrom P450 reductasa. Ostatní proteiny volně protekly kolonou (frakce č. 2-8 na obr. 17). Pomocí pufru CP2 obsahujícího kofaktor enzymu NADPH (30 mM NADPH) jsme NADPH:cytochrom P450 reductasu z kolony eluovali. Sbírány byly frakce o objemu 4 ml. Frakce č. 43-47 obsahovaly NADPH:cytochrom P450 reductasu. Čistotu enzymu jsme kontrolovali pomocí SDS-PAGE. Frakce obsahující nejvyšší aktivitu NADPH:cytochrom P450 reductasy byly slity a zahuštěny na celkový objem 2 ml (viz. tabulka 1). Celkový průběh purifikace je zaznamenán v tabulce č.1.

Tabulka č.1 – Purifikace NADPH:cytochrom P450 reduktasy (RED)

	Objem [ml]	Konc. proteinů [mg/ml]	Množství proteinů [mg]	Aktivita enzymu [$\mu\text{mol cyt c}/(\text{min} \cdot \text{ml})$]	Specifická. aktivita enzymu [$\mu\text{mol cyt c}/(\text{min} \cdot \text{mg}_{\text{protein}})$]	Celková aktivita enzymu [$\mu\text{mol cyt c}/\text{min}$]	Zisk proteinů [%]
Mikrosomy	25	29,1	727	na hranici měřitelnosti*	na hranici měřitelnosti*	na hranici měřitelnosti*	100
Solubilizát	190	3,7	706,8	na hranici měřitelnosti*	na hranici měřitelnosti*	na hranici měřitelnosti*	97,2
Frakce po DEAE- Sephrose	33	2,8	91,1	0,4	0,1	9,1	12,5
Finální preparát **	2	8,3	16,6	2,3	0,3	5	2,3

* Nekvantifikováno vzhledem k tomu, že nízká koncentrace enzymu neumožnila přesně stanovit jeho aktivitu

** Finální preparát NADPH:cytochrom P450 reduktasy po chromatografii na 2',5'-ADP-Sephrose 4B



Obrázek č. 17 – Chromatografie jaterní potkaní NADPH:cytochrom P450 reduktasy na 2',5'-ADP-Sepharose 4B. Sbíraly jsme frakce č. 43-47, které obsahovaly NADPH:cytochrom P450 reduktasu.

4.5 IZOLACE NADH:CYTOCHROM b_5 REDUKTASY CHROMATOGRafiÍ NA KOLONĚ DEAE-SEPHAROSY CL6B 2

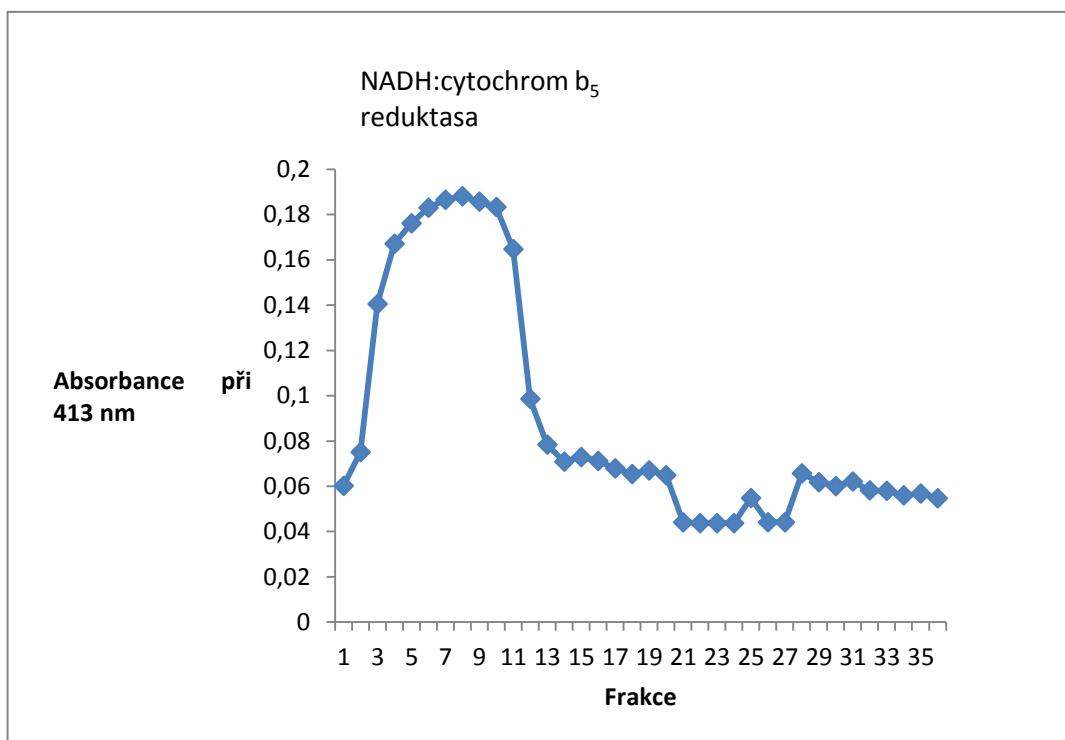
Finálním krokem izolace NADH:cytochrom b_5 reduktasy byla chromatografie na sloupci DEAE-Sepharosy CL6B 2 dle postupu popsáném v kapitole 3.3.5. NADH:cytochrom b_5 reduktasa byla aplikována na sloupec DEAE-Sepharosy CL6B 2 a kolona byla promývána pro odstranění balastních proteinů. Enzym byl eluován gradientem 75-150 mM KCl v 500 ml pufru DP2. Obsah hemoproteinů jsme v eluovaných frakcích měřili absorbancí při 413 nm (Obr.18) a aktivitu enzymu pomocí změny absorbance při 420 nm za 60 s (viz kapitola 3.3.7. Měření aktivity NADH:cytochrom b_5 reduktasy) (Obr. 19). Na základě získaných dat o aktivitě enzymu (viz obr. 18 a 19) jsme sbírali frakce s nejvyšší hodnotou aktivity enzymu (frakce č. 1-15). Čistotu preparátu v těchto frakcích jsme analyzovali pomocí SDS-PAGE. Frakce obsahující nejvyšší aktivitu enzymu jsme spojili a zahustili na objem 16 ml. Celkový průběh purifikace NADH:cytochrom b_5 reduktasy je charakterizován v tabulce č. 2.

Tabulka č.2 – Purifikace NADH:cytochrom b₅ reduktasy

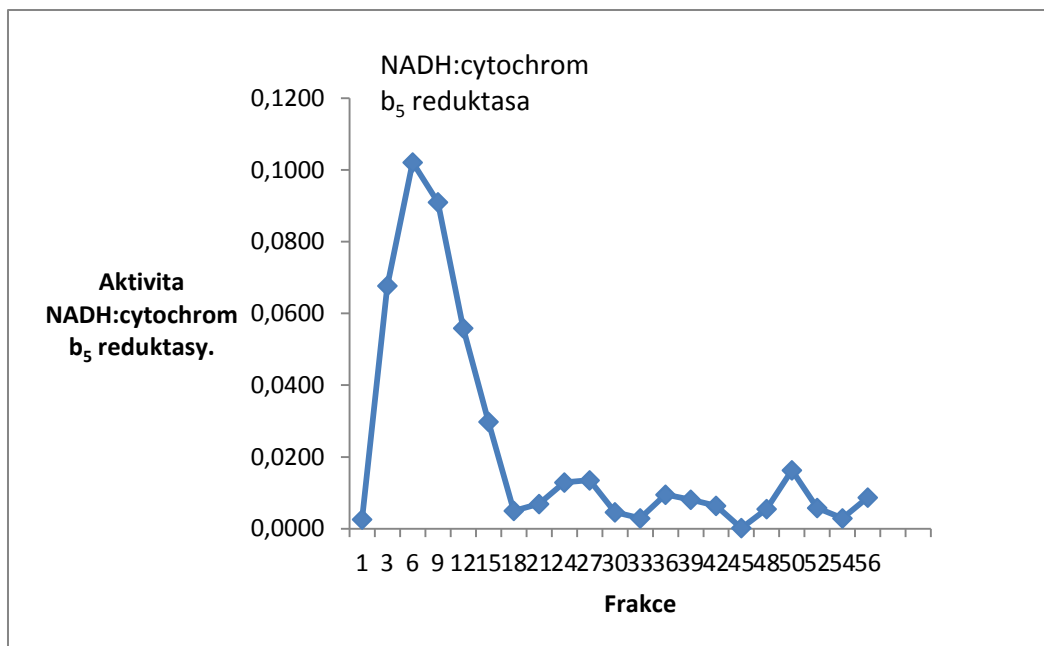
	Objem [ml]	Konc. proteinů [mg/ml]	Množství proteinů [mg]	Aktivita enzymu [μmol fer / (min . ml)]	Specifická aktivita enzymu [μmol fer / (min . mg _{protein})]	Celková aktivita enzymu [μmol fer /min]	Zisk proteiny [%]
Mikrosomy	25	29,1	727,5	na hranici měřitelnosti*	na hranici měřitelnosti*	na hranici měřitelnosti*	100,00
Solubilizát	190	3,7	703	na hranici měřitelnosti*	na hranici měřitelnosti*	na hranici měřitelnosti*	96,6
Frakce po DEAE-Sepharose	52	2,3	119,6	4,5	2	239,2	16,4
Finální preparát **	16	1	16	4,9	4,9	78,4	2,2

* Nekvantifikováno vzhledem k tomu, že nízká koncentrace enzymu neumožnila přesně stanovit jeho aktivitu

** Finální preparát NADH:cytochrom b₅ reduktasy po chromatografii na koloně DEAE-Sepharosy CL6B 2



Obrázek č. 18 - Chromatografie potkaní jaterní NADH:cytochrom b₅ reduktasy na sloupci DEAE-Sepharosy CL6B 2. Obsah enzymu byl měřen sledováním absorbance při 413 nm (Obr. 19). Frakce č. 1-15 byly slity a dále použity.



Obrázek č. 19 - Chromatografie potkaní jaterní NADH:cytochrom b₅ reduktasy na sloupci DEAE-Sepharosy CL6B 2. Měřena byla aktivita enzymu v jednotlivých frakcích, a to postupem popsaném v kapitole 3.3.7. Sbírány byly frakce č. 1-15. Aktivita enzymu byla měřena jako změna absorbance při 420 nm za 60 s.

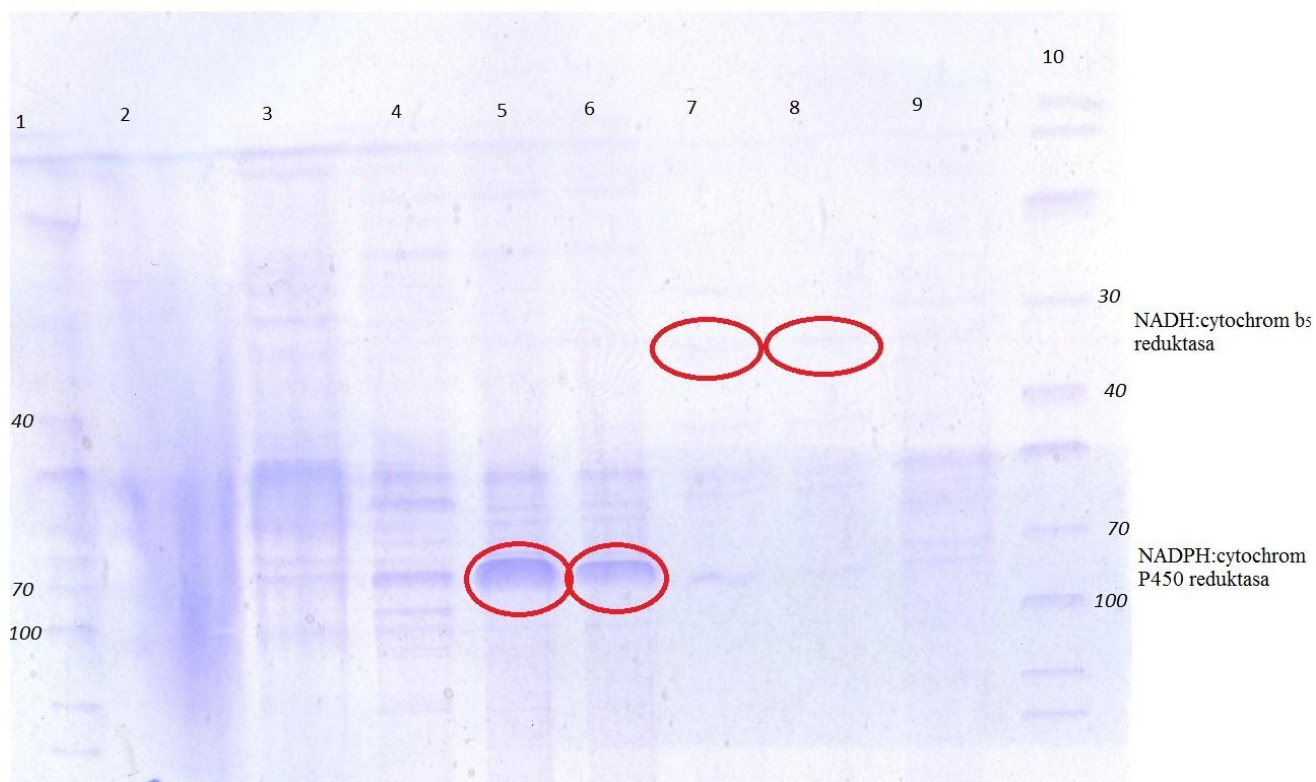
4.6 DISKONTINUÁLNÍ ELEKTROFORÉZA NA POLYAKRYLAMIDOVÉM GELU V PŘÍTOMNOSTI SDS

Jednotlivé frakce a enzymy získané v průběhu izolačního postupu byly analyzovány pomocí diskontinuální elektroforézy na polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS, a to dle postupu popsáném v kapitole 3.3.8. Tato analýza byla prováděna z důvodu sledování čistoty a množství získaných proteinů v získaných preparátech.

Použitou metodou jsme zjistili, že finální vzorek izolované NADPH:cytochrom P450 reduktasy obsahuje tento enzym jako majoritní protein. Molekulová hmotnost potkaní NADPH:cytochrom P450 reduktasy je 77 kDa, což souhlasí s námi zjištěnými hodnotami proteinu detekovaném na SDS-PAGE (viz. obr. č. 20). [46] V gelu se nachází „silný proužek proteinu“ mezi hmotnostmi proteinových markerů 70 kDa až 100 kDa, což souhlasí s molekulovou hmotností proteinu enzymu. [47]

Naopak v případě NADH:cytochrom b_5 reduktasy mající molekulovou hmotností 35 kD, nebyl protein o této hodnotě molekulové hmotnosti prakticky detekován. [48] Tato skutečnost mohla být způsobena nízkou koncentrací NADH:cytochrom b_5 reduktasy ve finálním preparátu. Vysokému ředění (nízké koncentraci) enzymu (1 mg/ml) by odpovídal i získá relativně velkého objemu (16 ml) preparátu NADH:cytochrom b_5 reduktasy oproti preparátu NADPH:cytochrom P450 reduktasy (2 ml), obsahujícímu vyšší koncentraci enzymu (8,3 mg/ml). Z elektroforeogramu je dále patrné, že získaný enzym NADH:cytochrom b_5 reduktasa obsahuje ještě jiné proteiny.

Z těchto skutečností je zřejmé, že finální preparát NADPH:cytochrom P450 reduktasy byl izolován (získán) ve velmi čisté formě. Oproti tomu získaný preparát NADH:cytochrom b_5 reduktasy bude vyžadovat ještě další přečištění.



Obrázek č. 20 – SDS-PAGE jaterní potkaní mikrosomální frakce (2), solubilizátu mikrosomů (3), frakce NADPH:cytochrom P450 reductasy po chromatografii na DEAE-Sepharose CL6B (4), finální preparát NADPH:cytochrom P450 reductasy po izolaci na 2',5'-ADP-Sepharose 4B (5,6), finální preparát NADH:cytochrom b₅ reductasy po izolaci na koloně DEAE-Sepharose CL6B 2 (7,8), frakce NADH:cytochrom b₅ reductasy po chromatografii na DEAE-Sepharose CL6B (9) a marker proteinů s definovanou molekulovou hmotností (1,10). Čísly vyjádřenými kurzívou jsou naznačeny molekulární hmotnosti proteinů v dané oblasti SDS-PAGE v kDa. Červeně je v sloupcích 5,6 označen sledovaný protein, NADPH:cytochrom P450 reductasa, a ve sloupcích 7,8 protein, NADH:cytochrom b₅ reductasa.

5. DISKUZE

Předkládaná bakalářská práce si kladla dva cíle. Shromáždit informace o inhibitech tyrosinkinas, jejich využití v protinádorové léčbě a o studiu jejich metabolismu. Dalším cílem práce byla izolace některých enzymů, které jsou součástí mikrosomálního oxygenasového systému biotransformujícího xenobiotika. Konkrétně NADPH:cytochrom P450 reduktasy a NADH:cytochrom b₅ reduktasy. V budoucnosti se totiž chceme zaměřit na detailní studium metabolismu některých inhibitorů tyrosinkinas a enzymy mikrosomálního systému budou pro tyto studie nezbytné.

Vzhledem k tomu, že teoretická část práce zabývající se údaji o protinádorové léčbě, včetně inhibitorů tyrosinkinas, je v úvodní části bakalářské práce detailně popsána, v diskuzní části práce se proto zaměřujeme pouze na výsledky druhého cíle bakalářské práce.

Vandetanib, na jehož metabolické studie se v budoucnu hodláme zaměřit, je využíván jako inhibitor tyrosinkinas při léčbě pokročilých stádií medulárního karcinomu štítné žlázy. Nedávné studie metabolismu vandetanibu zjistili, že v průběhu jeho metabolismu dochází k jeho přeměně pomocí monoxygenasového systému (MFO – „mixed function oxidases“) a flavinového monoxygenasového systému na metabolity, které mohou být méně účinné. Jeho metabolismus však nebyl studován detailně, proto je důležité ho dále studovat, a hledat cesty zvýšení účinnosti tohoto léku či zmírnění jeho vedlejších účinků [41].

V předkládané bakalářské práci jsme se proto, jak je uvedeno výše, zaměřili na přípravu některých enzymů MFO („mixed function oxidases“) systému, které budou pro takovéto studie dále využity. Jmenovitě jsme se zaměřili na izolaci NADPH:cytochrom P450 reduktasy a NADH:cytochrom b₅ reduktasy, jakožto klíčových enzymů monoxygenasového systému (MFO systému), jež jsou, společně s cytochromy P450, za metabolické přeměny vandetanibu zodpovědné. Tyto enzymy včetně cytochromů P450, které jsou v laboratoři, kde byla bakalářská práce vypracována již k dispozici, budou využity pro experimenty sledující metabolismus vandetanibu.

K získání enzymů monoxygenázového systému (MFO) jsme využili mikrosomální frakci potkaních jater. Pro izolaci enzymů MFO systému jsme využili chromatografii proteinů mikrosomální frakce na koloně DEAE-Sepharosy CL6B, kde jsme od sebe oddělili frakce obsahující cytochrom P450, NADPH:cytochrom P450 reduktasu, NADH:cytochrom b₅ reduktasu a cytochrom b₅.

Frakci obsahující NADPH:cytochrom P450 reduktasu jsme přečistili afinitní chromatografií na koloně 2',5'-ADP-Sepharosy 4B, následně dialyzovali a zahustili na

konečný objem 2 ml. Koncentrace proteinů v konečném preparátu byla 8,3 mg/ml, o celkové aktivitě NADPH:cytochrom P450 reductasy 5 μmol cyt c/min a s výtěžkem 2,3%. Čistotu získaného enzymového preparátu jsme ověřili pomocí SDS-PAGE, kde se tento enzym jevil jako „silný proužek proteinu“ putující v gelu okolo molekulární hmotnosti proteinového markeru 80 kDa. Ten odpovídá hodnotě molekulární hmotnosti enzymu, která je 77 kDa.

Frakce obsahující NADH:cytochrom b_5 reductasu jsme dále purifikovali chromatografií na koloně DEAE-Sepharosy CL6B 2. Následně byl preparát dialyzován a zahuštěn na objem 16 ml o konečné aktivitě NADH:cytochrom b_5 reductasy 78,4 μmol fer/min, a v celkovém výtěžku proteinů 2,2%.

NADH:cytochrom b_5 reductasa mající molekulovou hmotnost 35 kDa, nebyla při SDS-PAGE prakticky detekována. Tato skutečnost mohla být způsobena nízkou koncentrací NADH:cytochrom b_5 reductasy ve finálním preparátu, což je pro tuto relativně málo citlivou metodu obtížně detekovatelné množství. Této skutečnosti by odpovídal i objem (16 ml) preparátu NADH:cytochrom b_5 reductasy s nízkou koncentrací (1 mg/ml), oproti preparátu NADPH:cytochrom P450 reductasy, s daleko nižším objemem (2 ml) a výrazně vyšší koncentrací proteinů (8,3 mg/ml). Z elektroforeogramu je však dále patrné, že získaný enzym (NADH:cytochrom b_5 reductasa) obsahuje ještě jiné proteiny, a bude nutné ještě jeho další přečištění.

6. ZÁVĚR

Předkládaná bakalářská práce si stanovila dva cíle. Prvním cílem bylo shromáždit informace a detailně popsat způsoby léčby nádorových onemocnění, se zvláštním zřetelem na využití inhibitorů tyrosinkinás.

Druhým stanoveným cílem, byla izolace potkaní NADPH:cytochrom P450 reduktasy a NADH:cytochrom b₅ reduktasy, jež jsou součástí MFO („mixed function oxidases“) systému jaterních mikrosomů. Tyto enzymy budou v další práci využity pro sledování metabolismu vandetanibu enzymy MFO systému. Oba cíle práce se podařilo splnit.

Získaný preparát NADPH:cytochrom P450 reduktasy, jehož čistota byla ověřena pomocí SDS-PAGE, je připraven pro rekonstituční experimenty s cytochromem P450, pro studium metabolismu vandetanibu a dalších xenobiotik.

Preparát NADH:cytochrom b₅ reduktasy je však dosud v nehomogenním stavu, jelikož nebyl na elektroforeogramu jako homogenní preparát zobrazen. Dalšími metodami, včetně metod chromatografických, předpokládáme připravit homogenní preparát. Ten pak také využijeme pro rekonstituční experimenty s enzymy MFO systému (cytochromy P450) pro studium metabolismu xenobiotik, a to zejména pro studium metabolismu vandetanibu.

Seznam použité literatury

- [1] <http://www.cancer.gov/cancertopics/cancerlibrary/what-is-cancer> (přístup 2. Března 2014)
- [2] <http://www.cancerresearchuk.org/cancer-help/about-cancer/what-is-cancer/cells/how-cancer-starts> (přístup 2. Března 2014)
- [3] <http://www.cancer.org/cancer/cancercauses/geneticsandcancer/oncogenesandtumorsuppressorgenes/oncogenes-tumor-suppressor-genes-and-cancer-mutations-and-cancer> (přístup 2. Března 2014)
- [4] Siegel R., Naishadham D., Jemal A.: Cancer statistics, 2013. CA: A cancer journal for clinicians 63, 11-30 (2013)
- [5] <http://www.cancerresearchuk.org/cancer-info/cancerandresearch/all-about-cancer/what-is-cancer/treating-cancer/treatingcancer> (přístup 2. Března 2014)
- [6] <http://www.cancerresearchuk.org/cancer-help/about-cancer/treatment/surgery/surgery-to-treat-cancer> (přístup 2. Března 2014)
- [7] <http://www.cancer.org/cancer/thyroidcancer/detailedguide/thyroid-cancer-treating-radioactive-iodine> (přístup 2. Března 2014)
- [8] <http://www.nhs.uk/conditions/Radiotherapy/Pages/Introduction.aspx> (přístup 2. Března 2014)
- [9] <http://www.cancer.org/treatment/treatmentsandsideeffects/treatmenttypes/chemotherapy/chemotherapyprinciplesanin-depthdiscussionofthetechniquesanditsroleintreatment/chemotherapy-principles-what-is-chemo> (přístup 2. Března 2014)
- [10] <http://www.cancer.org/treatment/treatmentsandsideeffects/treatmenttypes/immunotherapy/immunotherapy-what-is-immunotherapy> (přístup 2. Března 2014)
- [11] <http://www.cancer.org/treatment/treatmentsandsideeffects/treatmenttypes/immunotherapy/immunotherapy-types> (přístup 2. Března 2014)
- [12] <http://www.cancer.org/treatment/treatmentsandsideeffects/treatmenttypes/immunotherapy/immunotherapy-immune-system> (přístup 2. Března 2014)
- [13] <http://www.cancer.org/treatment/treatmentsandsideeffects/treatmenttypes/chemotherapy/chemotherapyprinciplesanin-depthdiscussionofthetechniquesanditsroleintreatment/chemotherapy-principles-types-of-chemo-drugs> (přístup 2. Března 2014)

- [14] <http://www.cancer.org/treatment/treatmentsandsideeffects/treatmenttypes/chemotherapy/chemotherapyprinciplesanddiscussionofthetechniquesanditsroleintreatment/chemotherapy-principles-how-chemo-works> (přístup 2. března 2014)
- [15] Puyo S., Montaudon D., Pourquier P.: From old alkylating agents to new minor groove binders, *Critical reviews in oncology/hematology* 89, 43–61 (2014)
- [16] M J Lind: Principles of cytotoxic chemotherapy, *Medicine* 36, 19–23 (2008)
- [17] <http://theoncologist.alphamedpress.org/content/15/1/26/F1.expansion>, upraveno (1.4.2014)
- [18] <http://en.wikipedia.org/wiki/File:Mercaptopurine.svg> (přístup 1.4.2014)
- [19] <http://en.wikipedia.org/wiki/File:Daunorubicin.svg> (přístup 1.4.2014)
- [20] <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Etoposide.svg> (přístup 1.4.2014)
- [21] <http://en.wikipedia.org/wiki/File:Vincristine.svg> (přístup 1.4.2014)
- [22] Shchemelinin I., Šefc L., Nečas E.: Protein kinase inhibitors, *Folia biologica* 52, 137-148 (2006)
- [23] Levitzki A.: Tyrosine kinase inhibitors: views of selectivity, sensitivity, and clinical performance, *Annual review of pharmacology and toxicology* 53, 161-185 (2013)
- [24] Krause D. S., Van Etten A. R.: Tyrosine kinases as targets for cancer therapy, *The new England journal of medicine* 353, 172-187 (2005)
- [25] Stanislav S.: Úvod do molekulární biologie, druhý díl (molekulární biologie eukaryot), třetí inovované vydání, [Brno: Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta] (1999)
- [26] <http://compoundlibraries.com/index.php/2012/01/27/tyrosine-kinase-targeted-compound-libraries/>, upraveno (přístup 1.4.2014)
- [27] Nix P., Nicolaides A., Coatesworth A. P.: Thyroid cancer review 1: presentation and investigation of thyroid cancer, *International journal of clinical practice* 59, 1340–1344 (2005)
- [28] Nix P., Nicolaides A., Coatesworth A. P.: Thyroid cancer review 2: management of differentiated thyroid cancers, *International journal of clinical practice* 59, 1459–1463 (2005)
- [29] Nix P., Nicolaides A., Coatesworth A. P.: Thyroid cancer review 3: management of medullary and undifferentiated thyroid cancer, *International journal of clinical practice* 60, 80–84 (2006)
- [30] Bendlová B., Dvořáková Š., Václavíková E., Vlček P.: Mnohočetná endokrinní neoplazie typ 2 – syndrom MEN 2, *Klinická onkologie* 22, 28–31 (2009)

- [31] 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, 1-16 (2013)
- [32] <http://www.endocrineweb.com/conditions/thyroid-cancer/hurthle-cell-thyroid-tumor> (31.3.2014)
- [33] <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/article/000352.htm> (přístup 31.3.2014)
- [34] <http://en.wikipedia.org/wiki/File:Imatinib2DACS.svg> (přístup 1.4.2014)
- [35] <http://www.drugs.com/pro/vandetanib.html> (přístup 1.4.2014)
- [36] <http://imig.org/archives/tag/vandetanib> *upraveno* (přístup 1.4.2014)
- [37] <http://en.wikipedia.org/wiki/Cabozantinib> (přístup 1.4.2014)
- [38] <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Sorafenib.svg> (přístup 1.4.2014)
- [39] <http://en.wikipedia.org/wiki/Sunitinib> (přístup 1.4.2014)
- [40] <http://en.wikipedia.org/wiki/Motesanib> (přístup 1.4.2014)
- [41] Martin P., Oliver S., Robertson J., Kennedy S.-J., Read J., Duvauchelle J.: Pharmacokinetic drug interactions with vandetanib during coadministration with rifampicin or traconazole, *Drugs in R&D* 11, 37–51 (2011)
- [42] Levová K., Disertační práce (Molekulární mechanismus karcinogenity aristolochové kyseliny), PřF UK katedra biochemie (2013)
- [43] <http://www.tcm.phy.cam.ac.uk/~mds21/thesis/node49.html> *upraveno* (přístup 27.6.2014)
- [44] http://en.wikipedia.org/wiki/File:Vandetanib_metabolism.svg *upraveno* (přístup 27.6.2014)
- [45] Laemmli U. K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227, 680-685 (1970)
- [46] Šulc M., Pešlová K.: Izolace a charakterizace membránových proteinů CYP 2B4 a NADPH:CYP reduktasy a cytochromu b₅ z jaterní mikrosomální frakce *Oryctolagus cuniculus*, Návod pracovního postupu (M. Šulc, osobní sdělení)
- [47] <http://www.uniprot.org/uniprot/P00388> (přístup 25.7.2014)
- [48] <http://www.uniprot.org/uniprot/P20070> (přístup 25.7.2014)

