



UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI  
Přírodovědecká fakulta  
Laboratoř růstových regulátorů

Stanovení účinnosti 5-fluorouracilu na linii CCRF-CEM

## BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Jarmila Stanková
Studijní program:	B1501 Experimentální biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	<b>Mgr. Tomáš Oždian</b>
Termín odevzdání práce:	2014

## Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora:	Jarmila Stanková
Název práce:	Stanovení účinnosti 5-fluorouracilu na linii CCRF-CEM
Typ práce:	Bakalářská
Pracoviště:	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce:	Mgr. Tomáš Oždian
Rok obhajoby práce:	2014
Abstrakt:	<p>Předložená bakalářská práce se věnuje stanovení účinnosti 5-fluorouracilu na buněčné linii CCRF-CEM. V teoretické části byla vypracována literární rešerše na téma léčebné aplikace 5-fluorouracilu, mechanismus účinku 5-fluorouracilu, úprava účinku kombinovanou léčbou a rezistence na 5-fluorouracil. Jako součást literární rešerše byl vypracován i teoretický úvod k použité metodice. V experimentální části byla stanovena hodnota <math>IC_{50}</math> 5-fluorouracilu pro buněčnou linii CCRF-CEM pomocí MTT a XTT testů chemosenzitivity. Dalším experimentem bylo stanovení doby do apoptózy u buněčné linie CCRF-CEM ošetřené hodnotou <math>IC_{50}</math> či jejími násobky. Pro stanovení doby do apoptózy byl vybrán test detekce kaspasové aktivity pomocí syntetického substrátu v živých buňkách. V rámci experimentální části byla řešena také optimalizace FASP lyzačního protokolu s účelem stanovit optimální objem FASP lyzačního pufru. V této části byla stanovena celková koncentrace proteinů metodou Pierce 660 nm. Z celkové koncentrace proteinů byla poté vypočítána hmotnost proteinů v buněčných lyzátech. Objem FASP lyzačního pufru, při kterém bylo dosaženo největší celkové koncentrace proteinů a tím i největší hmotnosti proteinů by měl být optimální pro užití protokolu.</p>
Klíčová slova:	5-fluorouracil, biologický účinek, kombinovaná léčba, $IC_{50}$ , MTT test, XTT test, doba do apoptózy, lyzační protokol
Počet stran:	59
Počet příloh:	0
Jazyk:	Český

## Bibliographical identification

Author's first name and surname:	Jarmila Stanková
Title of thesis:	Determination of the efficiency of 5-fluorouracil on cell line CCRF-CEM
Type of thesis:	Bachelor
Department:	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor:	Mgr. Tomáš Oždian
The year of presentation:	2014
Abstract:	<p>The Bachelor's thesis focuses on the determination of the efficacy of 5-fluorouracil treatment on the Acute Lymphoblastic leukemia CCRF-CEM cell line. The theoretical section of the work includes a review of the literature on treatment applications of 5-Fluorouracil, the mechanism of 5-Fluorouracil, its efficacy in combination with other drugs and cellular resistance to treatment with 5-Fluorouracil. The experimental work primarily involved determination of the viability (<math>IC_{50}</math>) of the CCRF-CEM cell line treated with 5-Fluorouracil, using MTT and XTT chemosensitive assays. The time-to-apoptosis was determined by measuring cellular caspase activity. Work also focused on the Filter-aided sample preparation (FASP) protocol with an aim to determining the optimal volume of FASP cell-lysis buffer for cell-lysis. Protein concentration of individual samples upon lysis was measured using the Pierce 660 nm protein assay and the corresponding total protein content calculated. The optimal volume of buffer was the one with the highest protein concentration and the highest protein content.</p>
Keywords:	5-fluorouracil, biological effect, combined therapy, $IC_{50}$ , MTT test, XTT test, time to apoptosis, lysis protocol
Number of pages:	59
Number of appendices:	0
Language:	Czech

„Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracovala samostatně za použití citované literatury a odborných rad Mgr. Tomáše Oždiana.“

V Olomouci

Především děkuji Mgr. Tomáši Oždianovi za odborné vedení mé bakalářské práce, za trpělivost, za poskytnutí cenných rad a odborných konzultací potřebných k vypracování této práce. Dále bych chtěla poděkovat kolektivu pracoviště Ústavu molekulární a translační medicíny za ochotu pomoci při řešení experimentální části. Děkuji také všem, co mi projevily jakoukoliv podporu během celého bakalářského studia.

Infrastrukturální část projektu (Ústav molekulární a translační medicíny) byla podpořena Operačním programem Výzkum a vývoj pro inovace (projekt CZ.1.05/2.1.00/01.0030).

# Obsah

<b>1 Úvod a cíle práce</b> .....	<b>8</b>
<b>2 Teoretická část</b> .....	<b>9</b>
2.1 5-Fluorouracil a jeho léčebné aplikace .....	9
2.1.1 Léčebné aplikace 5-FU .....	9
2.1.2 Způsob podávání a dávkování 5-FU .....	10
2.1.3 Nežádoucí účinky 5-FU.....	11
2.2 Mechanismus účinku 5-FU .....	12
2.2.1. Metabolismus 5-FU .....	13
2.2.1.1 Aktivační dráha 5-FU .....	13
2.2.1.2 Odbourávání 5-FU .....	14
2.2.2 Účinek 5-FU na DNA.....	15
2.2.2.1 Inhibice TS .....	15
2.2.2.2 Inkorporace do DNA.....	16
2.2.3 Účinek 5-FU na RNA .....	16
2.2.3.1. Účinek 5-FU na rRNA.....	17
2.2.3.2 Účinek 5-FU na sestřih pre-mRNA.....	17
2.2.3.3. Účinek 5-FU na expresi a sestřih tRNA.....	18
2.3 Úprava účinku 5-FU - Kombinovaná léčba .....	18
2.3.1 Kombinovaná léčba s leucovorinem .....	19
2.3.2 Proléčiva a inhibitory DPD.....	19
2.3.3 Methotrexát .....	20
2.3.4 FOLFOX – spojení 5-FU/LV s oxaliplatinou .....	21
2.3.5 FOLFIRI – spojení 5-FU/LV s irinotekanem.....	21
2.3.6 FOLFOXIRI.....	22
2.3.7. Interferon .....	22
2.3.8 Nové léčebné kombinace.....	22
2.4 Rezistence na léčbu 5-FU .....	24
2.4.1 Exprese TS a její role v rezistenci na 5-FU .....	24
2.4.2 Exprese DPD a její role v rezistenci na 5-FU.....	24
2.4.3 Geny zapojené do MMR.....	25
2.4.4 Buněčný cyklus a geny kódující apoptózu.....	25
2.5 Teoretický úvod k experimentální části .....	27
2.5.1 Testy chemosenzitivity .....	28
2.5.1.1 MTT a XTT tetrazoliové soli .....	28
2.5.2 Metody detekce apoptózy .....	29

<b>3 Experimentální část.....</b>	<b>31</b>
3.1 Materiál.....	31
3.1.1 Použité chemikálie .....	31
3.1.2 Použité roztoky.....	31
3.1.3 Biologický materiál.....	32
3.1.4 Použité přístroje.....	32
3.1.5 Software .....	32
3.2 Metodika .....	33
3.2.1 Stanovení inhibiční konstanty IC <sub>50</sub> .....	33
3.2.1.1 Ovlivnění buněk 5-FU .....	33
3.2.1.2 XTT test.....	34
3.2.1.3 MTT test .....	34
3.2.2 Stanovení času do apoptózy .....	34
3.2.3 Příprava buněčných lyzátů pro FASP analýzu .....	34
3.2.4 Stanovení celkové koncentrace proteinů pomocí Pierce 660 nm Protein Assay.....	35
<b>4 Výsledky .....</b>	<b>36</b>
4.1 Výsledky stanovení IC <sub>50</sub> .....	36
4.1.1 Výsledky MTT testu .....	36
4.1.2 Výsledky XTT testu .....	40
4.2 Stanovení doby do apoptózy.....	44
4.3 Stanovení celkové koncentrace proteinů v buněčných lyzátech .....	45
<b>5 Diskuze .....</b>	<b>51</b>
<b>6 Závěr .....</b>	<b>52</b>
<b>Seznam literatury.....</b>	<b>53</b>
<b>Seznam zkratk.....</b>	<b>58</b>

# 1 Úvod a cíle práce

Tématem bakalářské práce bylo stanovit účinek 5-fluorouracilu na leukemickou buněčnou linii CCRF-CEM. Bakalářská práce je rozdělena na část teoretickou a část experimentální. Cílem teoretické části bylo vypracovat literární rešerši na téma biologický účinek 5-fluorouracilu a jeho klinické využití. Fluorouracil je pyrimidinový antagonist z skupiny látek antimetabolitů připravený v roce 1957 Charlesem Heidelbergerem. Předpokladem pro jeho přípravu byla skutečnost, že nádorové buňky ve své syntéze DNA upřednostňují uracil (Heidelberger a kolektiv, 1957). Pro jeho protinádorový účinek je často vyhledávaným cytostatikem s nezastupitelnou rolí v léčbě kolorektálních karcinomů. Klinický účinek samostatně užívaného 5-fluorouracilu je mírný a proto bývá zesílen kombinovanou léčbou. První kombinovanou léčbou bylo spojení 5-fluorouracilu s leukovorinem. Novější postupy spočívají v kombinaci léčebných režimů založených na 5-fluorouracilu s molekulárně cílenou léčbou (Chu, 2007).

Součástí teoretické části byl i úvod k proteomickým metodám použitým v části experimentální. Obecně se proteomika zabývá proteiny, jejich identifikací, lokalizací, modifikacemi proteinů, atd. Ke studiu proteinů využívá analýzy hmotností spektrometrií. Předpokladem pro úspěšnost analýzy je důkladná a správná příprava vzorků (Williams a kolektiv, 2014). Cílem experimentální části bylo optimalizovat nezbytná stanovení pro přípravu proteomických vzorků. V první části byl proveden experiment stanovení inhibiční konstanty  $IC_{50}$  pomocí MTT a XTT testů. MTT a XTT testy jsou kolorimetrická stanovení buněčné chemosenzitivity. V další části byl proveden experiment stanovení času do apoptózy pomocí detekce aktivity kaspázy 3 a 7. Poslední část spočívala v optimalizaci lyzačního protokolu pro FASP analýzu a stanovení celkové koncentrace bílkovin v těchto buněčných lyzátech.



# 2 Teoretická část

## 2.1 5-Fluorouracil a jeho léčebné aplikace

Protinádorový lék 5-fluorouracil (5-FU) byl poprvé syntetizován profesorem Charlesem Heidelbergerem v roce 1957, jako součást skupiny fluorovaných pyrimidinů. Do procesu syntézy se zapojil i Dr. Robert Duschinsky a jeho kolegové z firmy Hoffman-LaRoche (dnes jen Roche). Předpokladem pro syntézu byla biologická aktivita jiných sloučenin s vodíkem substituovaným fluorem, které byly používány k léčbě lidské a zvířecí rakoviny. Pozornost byla upřednostněna na pyrimidiny, protože uracil je přednostně využíván pro syntézu nukleových kyselin v tumorech. Testy byl prokázán účinek inhibice buněčného růstu a interference s methylací pyrimidinů. K určení účinku na biosyntézu pyrimidinů se Ch. Heidelberger soustředil na princip inkorporace značeného mravenčanu do methylových skupin thyminu. Z důvodů lokalizace fluoridového atomu v stejné pozici na pyrimidinovém kruhu jako methylová skupina na thyminu, se zdálo rozumné předpokládat, že tato látka blokuje biosyntézu pyrimidinů. Testy *in vitro* a *in vivo* byl prokázán tento účinek (Heidelberger a kolektiv, 1957).

### 2.1.1 Léčebné aplikace 5-FU

Využití 5-FU v chemoterapii je široké. Slouží k léčbě karcinomu gastrointestinálního traktu (GIT), zejména kolorektálního karcinomu, dále karcinomu žaludku a pankreatu. V kombinaci s dalšími cytostatiky se používá k léčbě karcinomu prsu, karcinomu ovaria a cervixu, karcinomu močového měchýře, karcinomu prostaty a bronchogenního karcinomu. Je možné ho aplikovat i intraarteriálně při léčbě primárních a sekundárních nádorů jater. U pacientů s nedostatkem dihydropyrimidindehydrogenasy (DPD) je zakázána léčba z důvodů zesílených nežádoucích účinků. Účinnost i toxicitu lze zvýšit kombinovanou léčbou s dalšími cytotoxickými léčivy (cyklofosamid, vinkristin, methotrexát, cisplatina, doxorubicin a další), interferonem  $\alpha$  a kyselinou folinovou (SÚKL, 2014).

Pro léčbu 5-FU jsou nejčastěji indikováni pacienti s karcinomy GIT, hlavně pokročilými kolorektálními karcinomy. Kolorektální karcinom je podle údajů z roku 2010 Národního onkologického registru jedno z nejčastějších onkologických onemocnění v České republice. Je to druhá nejčastější diagnóza po rakovině prostaty u mužů a rakovině prsu u žen. Celkově podle analýzy programu SVOD Epidemiologie zhoubných nádorů v České republice je Česká republika na 5. pořadí v celosvětovém srovnání počtu případů kolorektálních karcinomů na 100 tisíc obyvatel (Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR, 2010; Epidemiologie zhoubných nádorů v České republice, svod.cz; 2008). Role 5-FU v léčbě metastázujícího kolorektálního karcinomu (mCRC) je nezastupitelná. Před rokem 2000 byl intravenózně podávaný 5-FU kombinovaný s leukovorinem jediným možným léčebným postupem pro pacienty s tímto onemocněním. I dnes je jeho role v léčbě těchto onemocnění nenahraditelná (Davies a Goldberg, 2011; Chu, 2007).

Rakovina žaludku a gastroezofageální rakovina jsou další častou diagnózou malignit GIT. Brzká stádia těchto onemocnění jsou léčena chirurgicky s vysokým procentem pětiletého přežití. Nicméně většina pacientů je diagnostikována v pokročilých stádiích onemocnění. Adjuvantní terapií na základě působení 5-FU u těchto karcinomů se zabývá článek s meta-analýzou účinnosti chemoterapie (Ge a kolektiv, 2012).

Jeden z možných léčebných využití je i léčba dermatologických malignit. Hlavní účinek 5-FU v dermatologii byl prokázán na onemocněních, která jsou charakterizována aberacemi v proliferaci epidermálních buněk. V USA je 5-FU schválen pro léčbu aktinické keratózy a karcinomů povrchových bazálních buněk, když jsou tradiční léčebné postupy neproveditelné. Mezi další dermatologická onemocnění, která lze léčit 5-FU patří psoriáza a bradavice způsobené lidským papillomavirem. Zajímavý je účinek 5-FU na buňky poškozené slunečním zářením. Poškození buněk slunečním zářením, způsobuje stárnutí těchto buněk a je klíčovým faktorem pro rozvoj spinocelulárního karcinomu a bazaliomu (karcinom bazálních buněk kůže). Účinek 5-FU může způsobovat obnovu buněk poškozených světelným zářením (Ceilley, 2012).

Pro léčbu pokročilé spinocelulárního karcinomu hlavy a krku se jako jeden z léčebných postupů využívá 5-FU ve spojení s docetaxelem a cisplatinou. Více o této léčebné kombinaci u pacientů se spinocelulárním karcinomem hlavy a krku se lze dočíst v článku od lékaře Billana a jeho kolegů (Billan a kolektiv, 2013). Na spojení léčebného účinku 5-FU, cisplatinu a radioterapie v léčbě rakoviny hlavy a krku je zaměřen článek z roku 2013 od autorů Hsiehe a jeho kolegů (Hsieh a kolektiv, 2013).

Ze souhrnu údajů o přípravku 5-FU vyplývá, že jeho léčebné využití je obrovské. Další kapitoly této práce jsou pro jeho významnost v léčbě malignit GIT dávány do kontextu s těmito onemocněními a nejčastěji je to z důvodů vysoké epidemiologie onemocnění mCRC.

### **2.1.2 Způsob podávání a dávkování 5-FU**

Podle údajů vydaných Státním ústavem pro kontrolu léčiv je doporučeno zejména podávání 5-FU prostřednictvím intravenózní infuze či intravenózní bolusové injekce. Dále je 5-FU možné podávat intrarteriálně a intraperitoneálně. Při dosažení ústupu symptomů či remise se podává udržovací terapie (SÚKL, 2014).

V odborné literatuře se lze dočíst o srovnání účinku při infuzním podávání a injekčním podávání. Infuzní podávání je upřednostněno kvůli časově závislému účinku 5-FU jako antimetabolitu. Klinické studie dokázaly, že účinnost 5-FU v chemoterapeutických režimech při orálním podávání není menší ve srovnání se stejnými režimy s infuzně podávaným 5-FU. V některých léčebných režimech může být dokonce zcela nahrazeno orálním podáváním. Při orálním podáváním se lze vyhnout komplikacím spojeným s infuzním podáváním jako je pneumotorax, hemotorax, infekce katetru a trombózy. Z tohoto důvodu se orální podáváním 5-FU pravděpodobně stane více využívané v klinice (Miura a kolektiv, 2010). Přehled orálně podávaných přípravků se základem 5-FU je uveden v kapitole Úprava účinku – kombinovaná léčba.

U mCRC je velká pravděpodobnost vzniku metastáz v peritoneální dutině. Peritoneální karcinomy jsou spojovány s nízkou prognózou a časem přežití. U těchto typů rakoviny by mohlo být novým léčebným postupem chirurgické odstranění spojené s hypertermickou intraperitoneální chemoterapií. Peritoneální laváž v kombinaci s chirurgickým odstraněním makroskopických nádorů je spjata se zvýšením přežití a snížením rekurence. Byla prokázána účinnost 5-FU při intraperitoneální chemoterapii v brzké době po chirurgickém zákroku. Bohužel účinnost hypertermické chemoterapie 5-FU během operace nebyla zatím prokázána. Shimizu a kolektiv provedli studii, která se zabývala účinností hypertermické chemoterapie 5-FU a mytomycinu C během chirurgického zákroku u pacientů s mCRC. Tato studie byla provedena pomocí *in vitro* simulace. Závěrem studie bylo, že tento terapeutický postup je proveditelný, bezpečný a více předchází vzniku metastáz v peritoneální dutině (Shimizu a kolektiv, 2014).

Kromě způsobu podávání je pro dosažení nejlepšího účinku 5-FU nutné i jeho správné dávkování. Léčivou dávku 5-FU můžeme určit v podstatě dvěma přístupy. Tradiční přístup je dávkování podle velikosti tělesného povrchu (BSA – body-surface-area). Dávkování podle BSA má četné limitace, asi nejvíce významná je variabilita v koncentraci léčiva mezi pacienty a v samotném těle pacienta. Několik studií ukázalo, že při dávkování podle BSA pouze 20 – 30 % pacientů dostává vhodnou léčebnou dávku. Kolem 40 – 60 % pacientů je pod účinnou dávkou a asi 10 – 20 % pacientů je předávkovaných. Dnes už je jasné, že BSA dávkování není vhodné pro lidi s extrémní velikostí těla. Dalším faktorem je, že nepočítá s variabilitou v oblastech pohlaví, věku, lékových interakcí, apod. Z důvodů nesporné souvislosti mezi koncentrací 5-FU v plazmě a jeho biologickým účinkem a toxicitou je vhodné dávkování upravit podle farmakologického sledování pacientů. Tento přístup je vhodnější pro personalizovanou léčbu z důvodů nejpřesnějšího nastavení dávek. Dávkování podle farmakokinetiky spočívá ve sledování plazmatické koncentrace 5-FU a podle toho upravení dávek na míru každému pacientovi. První dávka se podává podle BSA dávkování, další úprava již probíhá podle farmakokinetických testů. Tento postup prokázal výhody zvýšením počtu odpovědí na léčbu spolu se snížením nežádoucích toxických účinků (Capitain a kolektiv, 2012; Goel a Lee, 2014). Ještě přesnější je sledování koncentrace léčiva v nádorové tkáni. K tomuto záměru slouží metoda mikrodialýzy. Mikrodialýza je minimálně invazivní metoda získávání vzorků, založená na výměně sloučenin z extracelulární tekutiny do perfuzátu, který protéká vloženým katetrem. Více o mikrodialýze sledování koncentrace 5-FU se lze dočíst v článku od autorů Koningse a kolektivu z roku 2011 (Konings a kolektiv, 2011).

V České republice dávkování určuje lékař podle tělesné hmotnosti či povrchu. Tuto vypočtenou dávku je nutno snížit u pacientů s porušenou funkcí kostní dřeně, u pacientů s poklesem jaterních a ledvinných funkcí, u pacientů ve špatném nutričním stavu a u pacientů po velkých chirurgických zákrocích. Při projevech velmi závažných nežádoucích účinků je nutné léčbu přerušit (SÚKL, 2014).

### **2.1.3 Nežádoucí účinky 5-FU**

Velmi časté a časté nežádoucí účinky projevující se poruchami krve a lymfatického systému jsou leukopenie, trombocytopenie, agranulocytóza, anémie a útlum kostní

dřeně. Další skupinou s velmi častými a častými nežádoucími účinky jsou poruchy GIT. Velmi častý je výskyt mukozitidy, například stomatitidy. Průjem, nauzea a zvracení jsou časté a lze je léčit symptomaticky. Kompletní seznam nežádoucích účinků je uveden v souhrnu údajů o přípravku, či příbalové informaci vydané Státním ústavem pro kontrolu léčiv (SÚKL, 2014).

Méně častým, ale o to vážnějším nežádoucím účinkem je kardiotoxicita. I když je kardiotoxicita spojena jen s velmi malými procenty výskytu, je velmi vážná z důvodů případného smrtelného účinku. Častěji ale dochází ke vzniku angíny pectoris, arytmie a infarktu myokardu. Podávání léku v podobě bolusových injekcí vykazuje menší riziko kardiotoxicity než podávání infuzí (3 % vs. 18 %). Nicméně mechanismus, kterým 5-FU způsobuje kardiotoxicitu je převážně stále neznámý. Nejčastější příčinou může být vznik koronárních spasmů vyvolaný podáváním 5-FU (Papanastasopoulos a Stebbing, 2014). Přechozí onemocnění srdce není prediktivním markerem pro vznik kardiotoxicity vyvolané 5-FU, protože v mnoha případech se vyskytuje i bez předchozích potíží. Další příčiny vzniku kardiotoxicity a léčebný postup u pacientů s toxicitou srdce vyvolanou podáváním 5-FU je možné najít v článku od autorů Deboevera a kolektivu (Deboever a kolektiv, 2013).

Jedním z klíčových faktorů vzniku nežádoucích účinků a toxicity je enzym zapojený do metabolismu 5-FU DPD. Více o působení toho enzymu je uvedeno v kapitole Mechanismus účinku a v podkapitole Metabolismus 5-FU. Gen kódující DPD má název DYPD gen, je umístěn na 22. chromosomu a bylo popsáno několik tisíc polymorfismů tohoto genu. Většina polymorfismů je avšak spojena s nekódujícími oblastmi genu. Pouze 3 z nich byly přímo spojeny s toxicitou 5-FU (Papanastasopoulos a Stebbing, 2014; Mounier-Boutoille a kolektiv, 2010).

## 2.2 Mechanismus účinku 5-FU

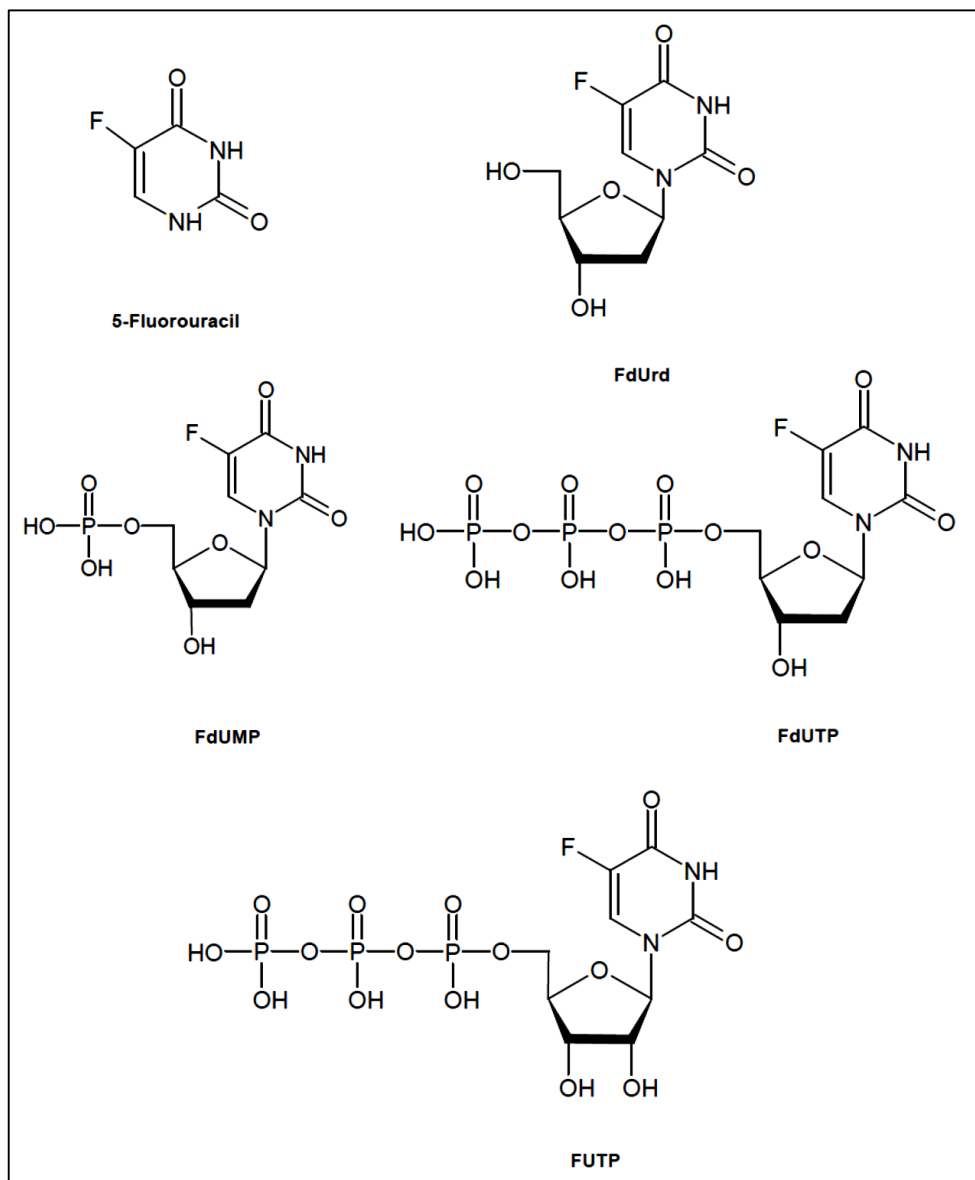
Mechanismus účinku 5-FU byl intenzivně zkoumán od jeho přípravy v roce 1957. S počátečním výzkumem jsou spjata jména Curreriho, A. R. a Ansfielda, F. J. (Curreri a kolektiv, 1958), kteří první poskytli na svou dobu detailní vyhodnocení klinických účinků. Charles Heidelberger se, kromě přípravy, podílel i na dalších studiích, které vedly k objasnění mechanismu účinku. První poznatky o mechanismu účinku 5-FU byly shrnuty do několika článků (Heidelberger a Ansfield, 1963; Heidelberger, 1970; Parker a Cheng, 1990).

Fluorouracil patří mezi antimetabolika účinkující jako inhibitory esenciálních biosyntetických drah. Fluorouracil se inkorporuje v podobě jeho metabolitů do DNA a RNA, čímž inhibuje jejich normální funkci. Samotný 5-FU nemá antineoplastickou aktivitu, ta vzniká až v těle po vzniku fosforylovaných metabolitů (SÚKL, 2014; Longley a kolektiv, 2003). Hlavní enzym, který podléhá inhibici 5-FU je thymidylátsynthasa (TS). Nejvýznamnějším derivátem 5-FU je 5-fluoro-2-deoxyuridin (FdUrd), který vykazuje

podobnou, či dokonce v některých buněčných liniích větší protinádorovou aktivitu ve srovnání s 5-FU. Chemická strukturu FdUrd je znázorněna na obr. 1 (Li a kolektiv, 2009).

### 2.2.1. Metabolismus 5-FU

Fluorouracil rychle vstupuje do buňky pomocí usnadněného transportního mechanismu podobně jako uracil. V buňce se přemění na několik aktivních metabolitů: fluoro-deoxy-uridinmonofosfát (FdUMP), fluoro-deoxy-uridintrifosfát (FdUTP) a fluoro-uridintrifosfát (FUTP). Chemická struktura 5-FU a jeho významných metabolitů je uvedena na obr. 1 (Longley a kolektiv, 2003).

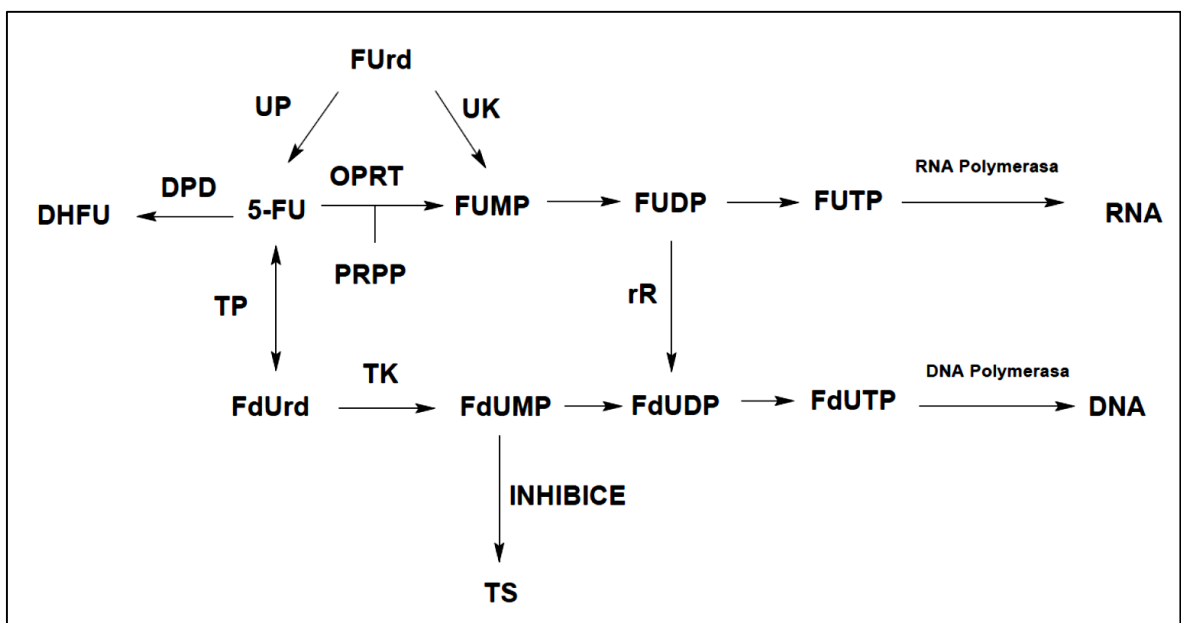


**Obr. 1:** Chemická struktura 5-fluorouracilu, jeho derivátu 5-fluoro-2deoxy-uridinu (FdUrd) a jeho významných metabolitů fluoro-deoxy-uridinmonofosfátu (FdUMP), fluoro-deoxy-uridintrifosfátu (FdUTP) a fluoro-uridintrifosfátu (FUTP).

#### 2.2.1.1 Aktivační dráha 5-FU

Fluorouridin (FUrd) je konvertován uridinofosforylasou (UP) na 5-FU, nebo uridinkinasou (UK) na metabolit 5-FU fluoro-uridinmonofosfát (FUMP). Dále je 5-FU enzymaticky

přeměňován ororátfosforibosyltransferasou (OPRT) na FUMP, do reakce vstupuje i fosforibosylpyrofosfát (PRPP) jako kofaktor. Fluoro-uridinmonofosfát je v dalším kroku fosforylován na fluoro-uridindifosfát (FUDP) a ten poté na aktivní metabolit FUTP. Fluoro-uridintrifosfát je substrátem RNA polymerasy, viz podkapitola Účinek 5-FU na RNA. Fluoro-uridindifosfát může být enzymaticky konvertován na fluoro-deoxy-uridindifosfát (FdUDP) ribonukleotidreduktasou (rR). Primární zdroj všech deoxyribonukleotidů *de novo* je rR, která katalyzuje všechny přeměny ribonukleotiddifosfátů na deoxyribonukleotiddifosfáty. Fluorouracil může být přeměněn na FdUrd působením thymidinfosforylasy (TP) za enzymatické spotřeby deoxyribosa-1-fosfátu jako kofaktoru. Tato reakce je zvrtná a TP může tedy i konvertovat FdUrd na 5-FU. Derivát FdUrd je přeměňován thymidinkinasou (TK) na FdUMP, který inhibuje funkce TS. Dalším využitím FdUMP je jeho přeměna na FdUDP a dále na FdUTP. Metabolit FdUTP představuje substrát pro  $\alpha$  a  $\beta$  DNA polymerasu. Schéma aktivační dráhy a základní účinek 5-FU jsou uvedeny na obr. 2 (Li a kolektiv, 2009; Miura a kolektiv, 2010 ).



**Obr. 2:** Schéma aktivační dráhy 5-fluorouracilu s jeho základním účinkem. Schéma je inspirováno Parkerem a Chengem, 1990, str. 383.

### 2.2.1.2 Odbourávání 5-FU

Více než 80 % podaného 5-FU je v těle degradováno DPD, která přeměňuje 5-FU na neúčinný 5,6-dihydro-5-fluorouracil (DHFU). Dihydropyrimidindehydrogenasa je nejvýznamnější enzym katabolických drah 5-FU, a proto nedostatek či úplná deficience DPD jsou spojeny s toxicitou 5-FU (Mournier-Boutoille a kolektiv, 2010). Aktivita DPD je největší v jednojaderných buňkách jater a nádorové tkáni. Účinek DPD představuje jednu z příčin rezistence vůči léčbě 5-FU (McLeod a kolektiv, 1998). Nízká exprese DPD byla pozorována u pacientů s kladnou odpovědí na léčbu 5-FU, avšak žádný genetický polymorfismus nebyl nalezen pro predikci DPD deficience. Nicméně některé jednonukleotidové polymorfismy v genu DPD byly navrženy ke klinickému užití, jako mechanismus vyhnutí se četným vedlejším účinkům 5-FU (Kline a El-Deiry, 2013). Metabolit DHFU je dále odbouráván na 3-[(aminocarbonyl)amino]-2-fluoro-propionovou

kyselinu a 2-fluoro-3-alanin. Testy kinetiky 5-FU a jeho metabolitů u pacientů, kterým byl podán 5-FU intravenózně, prokázaly, že 60 – 90 % 5-FU je vylučováno močí v podobě 2-fluoro-3-alaninu do 24 hodin od podání. Dalšími testy byla prokázána neurotoxicita a kardiotoxicita 2-fluoro-3-alaninu (Miura a kolektiv, 2010).

### 2.2.2 Účinek 5-FU na DNA

Lék 5-FU byl původně navržen jako inhibitor TS. K dalšímu významnému účinku patří různé způsoby inkorporace metabolitů 5-FU do DNA (Parker a Cheng, 1990). Rychle se dělící buňky mají vysoké požadavky na výskyt deoxy-thymidinmonofosfátu (dTMP) a dalších nukleotidů (Ceilley, 2012).

#### 2.2.2.1 Inhibice TS

Thymidylátsynthasa katalyzuje redukční metylaci deoxy-uridinmonofosfátu (dUMP) na dTMP, přičemž N5,N10-methylentetrahydrofolát (N5,N10-methylen-THF) slouží jako nositel methylové skupiny. Tato reakce představuje jediný zdroj thymidylátů *de novo*. Tvorba dTMP je nezbytná pro procesy replikace a opravy DNA. Thymidylátsynthasa tvoří dimer, kde obě podjednotky obsahují vazebné místo pro nukleotidy a vazebné místo pro N5,N10-methylen-THF (Longley a kolektiv, 2003).

Metabolit FdUMP se váže do vazebného místa pro nukleotidy a tvoří s enzymem TS inaktivní ternární komplex – spojení FdUMP, TS a N5,N10-methylen-THF. Tento komplex vzniká z důvodu neschopnosti TS štěpit silnou vazbu mezi uhlíkem a fluorem na FdUMP (Li a kolektiv, 2009). Zablokuje se vazebné místo TS pro dUMP a inhibuje se syntéza dTMP. Inhibitory s tímto účinkem jsou nazývány „mechanism-based inhibitors“ nebo „suicide substrates“ – sebevražedné substráty. Vyčerpáním dTMP se následně zamezí tvorbě deoxy-thymidintrifosfátu (dTTP), což způsobuje nevyrovnaný obsah dalších deoxyribonukleotidů, například deoxy-adenosintrifosfátu (dATP). Nevyrovnanost v obsahu deoxynukleotidů (zejména poměr dATP/dTTP) způsobuje narušení DNA syntézy. Navíc inhibice TS způsobuje akumulaci dUMP, která může vést k zvýšení hladiny deoxy-uridintrifosfátu (dUTP) (Longley a kolektiv, 2003). Jako další zdroj thymidylátů může sloužit TK. Dráha zahrnující enzym TK reprezentuje jednu z příčin rezistence (Miura a kolektiv, 2010).

Thymidylátsynthasa představuje klíčový enzym DNA syntézy a její kompetitivní inhibice 5-FU je základní protinádorový účinek 5-FU. Vysoká exprese TS je pozorována v 60 % případů kolorektálních karcinomů, především adenokarcinomů (Azzoni a kolektiv, 2014). Na základě poznatků o účinku 5-FU na TS byla vznesena hypotéza, že míra exprese TS může způsobovat senzitivitu nádorů na fluoropyrimidiny, jako je například 5-FU. V roce 2008 Showalter a kolektiv studovali spojení mezi expresí TS a 5-FU důkladným průzkumem literatury a nenašli žádné spojení mezi expresí TS a pacienty s kladnou odpovědí na léčbu 5-FU (Showalter a kolektiv, 2008). Na toto navázali svou studií Azzoni a kolektiv se zaměřením na hledání významu exprese TS u případů kolorektální rakoviny s fenotypem nestability mikrosatelitů. Nestabilita mikrosatelitů reprezentuje jednu ze dvou hlavních drah genetických nestabilit a je specifická svou zárodečnou mutací v genech proteinů s funkcí opravy chybného párování bází řízenou metylací (DNA

mismatch repair, MMR). Závěrem studie byla nepravděpodobnost spojení vysoké exprese TS a chování kolorektálních karcinomů s fenotypem nestability mikrosatelitů (Azzoni a kolektiv, 2014; Devaud a Gallinger, 2013).

#### **2.2.2.2 Inkorporace do DNA**

Jak dUTP, tak i metabolit FdUTP se mohou chybně inkorporovat do DNA v komplementárním páru s guanosem nebo adeninem. Nesprávně komplementární páry fluorouracil-guanosin jsou rozeznávány enzymy, jejichž funkce je MMR. Výsledkem působení MMR je stimulace checkpointů buněčného cyklu dvěma možnými způsoby, z nichž ten významnější je řízená signalizace přes aktivaci c-Abl/p73 $\alpha$ /GADD45 $\alpha$ , což zahrnuje oba checkpointy buněčného cyklu a apoptickou odpověď. Proces MMR výrazně ovlivňuje účinek léčby 5-FU a způsobuje, že pacienti s deficicientem MMR nemají prospěch z léčby 5-FU (viz kapitola Rezistence na léčbu 5-FU). Dalším mechanismem inkorporace uracilu do DNA je indukovaná aktivace cytosindeaminasy. Aktivace cytosindeaminasy může vést k přímé inkorporaci uracilu do DNA, ale za normálních okolností je to limitováno zralými B-lymfocyty. Deaminace cytosinu v DNA vede ke vzniku nesprávně komplementárních párů uracil-guanin, zatímco přímá inkorporace uracilu do DNA během syntézy vede k nesprávně komplementárním párům uracil-adenin. Páry uracil-adenin aktivují enzym uracil-DNA-glykosylasu, která spustí dráhu báze excizní opravy (BER) (Li a kolektiv, 2009). Pokusy o opravu DNA obsahující uracil nebo fluorouracil vedou jen k dalším chybným začleněním v důsledku vysoké hladiny (F)dUTP. Tyto marné cykly špatného začlenění, excize a oprav DNA vedou k zlomům v DNA a buněčné smrti. Poškození DNA kvůli začlenění dUTP je závislé na hladině deoxy-uridintrifosfátasy, která limituje intracelulární akumulaci dUTP. Thymidyláty mohou být zachráněny pomocí účinku TK, která katalyzuje fosforylaci thymidinu. Thymidinkinasa zmírní efekt nedostatku TS a představuje jeden z mechanismů rezistence na 5-FU (Longley a kolektiv, 2003).

#### **2.2.3 Účinek 5-FU na RNA**

Metabolit FUTP je intenzivně inkorporován do RNA, způsobuje přerušení normálních RNA procesů a funkcí. Významné korelace mezi inkorporací FUTP do RNA a ztrátou klonogenního potenciálu byly prokázány u lidských buněčných linií karcinomu tlustého střeva a prsu. Chybné začlenění FUTP do RNA inhibuje přeměnu pre-rRNA na rRNA, dále přerušuje posttranskripční modifikace tRNA a agregaci a aktivitu snRNA/proteinového komplexu, čímž inhibuje sestřih pre-mRNA. Navíc rRNA, tRNA a snRNA všechny obsahují modifikovanou bázi pseudouridin a 5-FU inhibuje posttranskripční přeměnu uridinu na pseudouridin v těchto typech RNA. Polyadenylace mRNA je inhibována poměrně nízkými koncentracemi 5-FU. Studie *in vitro* prokázaly, že špatné začlenění do RNA v důsledku působení 5-FU může porušit RNA procesy a mít hluboký efekt na buněčný metabolismus a životnost (Longley a kolektiv, 2003). Bohužel výskyt RNA není specifický jen pro nádorové buňky, ale na podobné hladině se vyskytuje i v buňkách normální tkáně. Proto účinek metabolitů 5-FU na úrovni RNA vede k cytotoxickým komplikacím (Li a kolektiv, 2009).

Zdá se jasné, že RNA dráhy přispívají k rozsahu cytotoxického účinku 5-FU. Toto je prokázáno testy s mutanty proteinů zapojených do RNA drah, u kterých došlo k zvýšení senzitivity na 5-FU. Proto dochází při kombinované léčbě ke spojení 5-FU a



protinádorových léčiv, která svým účinkem ovlivňují spliceasom. Cytotoxický účinek 5-FU zprostředkovaný RNA má významnou roli, ačkoliv i inhibice TS byla potvrzena četnými publikacemi. Testy na kmenech kvasinek s delecí enzymu analogického k lidské TS vykazují také senzitivitu na léčbu 5-FU. Z toho vyplývá, že je role RNA na účinku 5-FU významná (Mojardin a kolektiv, 2013). Studie Pettersena a kolektivu ukazují, že dominantní mechanismus cytotoxicity 5-FU je spojen s inkorporací do RNA. Mechanismus účinku zprostředkovaný TS inhibicí, BER a MMR spíše odpovídá FdUrd (Pettersen a kolektiv, 2011).

### **2.2.3.1. Účinek 5-FU na rRNA**

Fluoro-uridintrifosfát může být inkorporován do 45S a 32S pre-ribosomální RNA a inhibovat tak jejich přeměnu v 28S a 18S RNA jednotky ribozomu (Parker a Cheng, 1990). RNA exosom a exoribonukleolytický komplex hrají důležitou roli v RNA procesech, hlídání kvality RNA a degradaci RNA v jádře a cytoplasmě. Exoribonukleasa Rrp6p spolupracuje a funguje s exosomem v jádře, ale má i několik úloh odlišných od zbytku exosomu. Analýzy pomocí Microarrays a Northern blottingu dokázaly, že po léčbě 5-FU dochází k hromadění polyadenylované nekódující RNA, hlavně rRNA. Tento jev je zesílen při léčbě spojené s delecí RRP6P funkcí. Polyadenylace nekódující RNA odráží aktivitu systému kontroly kvality, ve kterém TRAMP komplex rozeznává aberantně zpracovanou nekódující RNA a tu potom polyadenyluje a tím zvýší její degradaci pomocí Rrp6p a jaderného exosomu. Z tohoto vyplývá, že 5-FU může způsobovat cytotoxicitu přerušením tvorby nekódující RNA (Hoskins a Butler, 2008).

Posttranskripční modifikace během dozrávání nekódující RNA a pseudouridilace jsou nejběžnější modifikace. Pseudouridilace je isomerace představující přeměnu báze uridin na pseudouridin. Účinek 5-FU na RNA zahrnuje inhibici pseudouridilace při isomerační reakci, díky pevné vazbě mezi pseudouridilací a jejím substrátem 5-FU. Všechny pseudouridilace rRNA a i některých snoRNA vyžadují aktivitu H/AGA snoRNP komplexu, složeného ze 4 proteinů a H/AGA boxu obsahující snoRNA určující komplementaritu k místu na RNA obsahující substrát komplexu uracil. Testy provedené na kvasinkách dokázaly, že CBF5 kóduje nezbytná komponenta H/AGA boxu. Studie z roku 2008 opět na kvasinkách dokázaly spojení mezi aktivitou cbf5p a účinkem 5-FU na RNA. V důsledku těchto výsledků je předpokládáno, že pseudouridilace RNA substituované 5-FU vede ke vzniku Cbf5p-RNA aduktů. Tyto adukty podléhají polyadenylaci TRAMP komplexem a následné degradaci Rrp6p a jaderným exosomem. Alternativou ke vzniku aduktů je myšlenka, že cbf5p katalyzuje vznik RNA produktů obsahujících 5-fluoropseudouracil a metabolismus těchto molekul může hrát významnou roli v cytotoxicitě 5-FU (Hoskins a Butler, 2008).

### **2.2.3.2 Účinek 5-FU na sestřih pre-mRNA**

Limitovaný počet genů byl analyzován v buňkách ošetřených 5-FU. Nejvýznamnější zástupce je pravděpodobně dihydrofolátreduktasa. Hladina pre-mRNA a mRNA dihydrofolátreduktasy se zvýší v kultivovaných buňkách vystavených 5-FU. Zvýšená hladina pre-mRNA dihydrofolátreduktasy dokazuje, že 5-FU skutečně inhibuje sestřih pre-mRNA dihydrofolátreduktasy (Zhao a Yu, 2007).

Buňky ošetřené 5-FU vykazují časově závislý celkový nárůst nesestříhaných transkriptů, zatímco hladina exonů se výrazně nemění. Toto vylučuje možnost, že tyto alterace jsou nepřímé důsledky zvýšení počtu transkripcí. Přímá inkorporace FUTP do prekursorů mRNA může pravděpodobně přispět k těmto alteracím, způsobeným preventivním účinkem rozpoznání místa sestřihu a/nebo štěpením. Nicméně několik studií dokázalo, že „splicing machinery“ účinně zpracovává i 5-FU substituované pre-mRNA. Tyto protiklady mohou být vysvětleny tím, že inkorporace 5-FU do RNA součástí „splicing machinery“ bude představovat hlavní příčinu vzniku defektů. Tato hypotéza je podpořena skutečností, že metabolit 5-FU se inkorporuje do snRNA, které jsou klíčovou složkou spliceasomu (Mojardin a kolektiv, 2013). Pre-mRNA sestřih je inhibován v důsledku vložení 5-FU do U2 snRNA spliceasomu. U2 snRNA podléhá nejvíce modifikacím a 5-FU inkorporovaný do U2 snRNA blokuje pseudouridilaci. Zhao a Yu testovali účinek 5-FU na U2 snRNA na buněčné linii HeLa a dokázali, že i při nízké koncentraci dochází k obstojné inkorporaci. K inkorporaci dochází v oblasti důležité na pseudouridilaci (Zhao a Yu, 2007).

### **2.2.3.3. Účinek 5-FU na expresi a sestřih tRNA**

V eukaryotických buňkách nepodléhají sestřihu jen produkty genů kódujících proteiny. I četné tRNA geny obsahují introny, které musí být odstraněny enzymatickou reakcí. Při této reakci dojde k vystřížení a opětovnému spojení tRNA, což vyžaduje heterotetramerický tRNA sestřihový endonukleasový komplex k vytvoření plně vyvinuté a funkční struktury (Mojardin a kolektiv, 2013).

Po ošetření kvasinek 5-FU bylo pozorováno zvýšení exprese tRNA. Studie prokázaly, že tRNA obsahující 5-FU je schopna tvořit stabilní komplex s tRNA pseudouridinsynthasou a tRNA 5-methyluridin-methyltransferasou, což způsobuje inhibici jejich enzymatických aktivit. Další sekvestrace tRNA molekul spolu se sníženým obsahem pseudouridinu a 5-methyluridinových modifikací mohou indukovat expresi tRNA genů. Z toho vyplývá, že kmeny kvasinek, kterým chybí geny pro pseudouridinsynthasu a methyltransferasu mají zvýšenou senzitivitu na 5-FU (Mojardin a kolektiv, 2013). Při zvýšené teplotě je tRNA více náchylná k destabilizacím, což vede ke zvyšování senzitivity na účinek 5-FU v podobě tRNA modifikací při 38 °C. Podle testů na kvasinkách, savčích buňkách, ale i jedné klinické studie hypertermie zvyšuje účinek 5-FU (Gustavsson a Ronne, 2008).

## **2.3 Úprava účinku 5-FU - Kombinovaná léčba**

Mnoho onkologických pacientů je léčeno kombinovanou léčbou. Vznik kombinované léčby často spočívá v přidání nového protinádorového léčiva k již existující léčebné strategii, z důvodů omezení vzniku rezistence na užívanou účinnou látku, zesílení účinku a snížení počtu selhání léčby. Obvykle je prospěch pacientů z nové kombinace zhodnocen ve fázích 1, 2 a posléze ve fázi 3 klinických studií. Cílem fáze 1 klinické studie je posoudit, zda pacienti mohou tolerovat novou kombinaci protinádorových léčiv. Do této fáze jsou

zapojeny analýzy farmakokinetiky s cílem stanovení koncentrace léčiva a jeho metabolitů v plazmě a posouzení vlivu koncentrace na účinek kombinovaných léčebných režimů. Ve fázi 2 je nová kombinace studována na specifických typech rakoviny. Pokud nová kombinace projde fází 2, vstupuje do fáze 3. Ve fázi 3 je účinek nové léčebné kombinace srovnáván s účinkem již standardní terapie. V tomto kontextu bohužel není posuzováno plánování dávek a celkové léčby, což je pro účinek kombinovaných léčebných režimů velmi podstatné (Van der Veldt a kolektiv, 2012).

Míra odezvy na působení 5-FU jako jediné účinné látky je u pokročilých kolorektálních karcinomů 11 %, proto bylo provedeno velké množství výzkumů s účelem zvýšení účinnosti 5-FU (Kline a El-Deiry, 2013). Během minulých let bylo vyvinuto několik strategií na zvýšení účinku protirakovinné aktivity 5-FU a k překonání jeho klinické rezistence. Ve výsledku zůstal 5-FU jako hlavní aktivní látka při léčbě pokročilých i raných stádií kolorektálního karcinomu (Longley a kolektiv, 2003).

### **2.3.1 Kombinovaná léčba s leucovorinem**

Vzhledem k tomu, že jeden z cílů léčby 5-FU je inhibice TS, byla projevna snaha zvýšit tento účinek (Kline a El-Deiry, 2013). Vysoká intracelulární hladina redukovaného folátu N<sup>5</sup>,N<sup>10</sup>-metylen-THF je nezbytná pro optimální vazbu FdUMP k TS. Leucovorin (LV, 5-formylterahydrofolát) je používán k zvýšení intracelulární koncentrace N<sup>5</sup>,N<sup>10</sup>-metylen-THF. Při použití LV byla prokázána zvýšená cytotoxicita 5-FU na mnoha buněčných liniích *in vitro* i testy *in vivo*. Leucovorin vstupuje do buňky prostřednictvím redukovaného folátového nosiče a je přeměněn na N<sup>5</sup>,N<sup>10</sup>-metylen-THF, který je potom polyglutamován pomocí folylglutamátsynthetasy. Polyglutamace zvyšuje buněčnou afinitu k N<sup>5</sup>,N<sup>10</sup>-metylen-THF a zlepšuje stabilizaci ternárního komplexu TS a FdUMP (Longley a kolektiv, 2003). Projekt meta-analýzy mCRC prokázal, že spojení 5-FU s LV vykazuje lepší odezvu ve srovnání s použitím samostatného 5-FU (23 % proti 11 %). Spojení podávání 5-FU s LV bylo první účinnou kombinací (Raftery a Goldberg, 2010; Hameed a Cassidy, 2011). V současné době je 5-FU podáván s LV v léčebných režimech, které se skládají z bolusové injekce a kontinuální intravenózní infuze (Kline, El-Deiry, 2013).

### **2.3.2 Proléčiva a inhibitory DPD**

Lék 5-FU vykazuje nízkou biologickou dostupnost kvůli katabolickému působení DPD (viz kapitola Mechanismus účinku). Bylo vyvinuto několik strategií na inhibici DPD, čímž se zabrání degradaci 5-FU (Longely a kolektiv, 2003). Biologická dostupnost je zvýšena orálním podáváním léčiv tegafur, UFT, S-1, kapecitabin a eniluracil (Miura a kolektiv, 2010). Podávání eniluracilu, který inhibuje odbourávání 5-FU inaktivací DPD v játrech, způsobuje zvýšení koncentrace uracilu a nemetabolizovaného 5-FU v plazmě, a tím zesílení koncentrace 5-FU a jeho metabolitů v nádorech. (Veld a kolektiv, 2012)

Tegafur (1-(2-tetrahydrofuryl)-5-fluorouracil, Ftorafur, FT a další) byl vyvinut jako prolék 5-FU v Sovětském svazu. Výhody užívání tegafuru zahrnují jeho skvělé vstřebávání GIT a nepatrnou přeměnu na 5-FU v GIT. Tegafur je postupně přeměňován na 5-FU cytochromem P450 v jaterních mikrosomech (Miura a kolektiv, 2010).

UFT (uracil/Ftorafur) kombinuje uracil a prolék 5-FU tegafur v poměru 4:1. Uracil je přirozený substrát a kompetitivní inhibitor DPD. Testy zjistili, že protinádorová aktivita tegafuru je zvýšena při současném orálním podání uracilu, deoxyuridinu nebo uridinu. Největšího zvýšení účinku bylo dosaženo při současném podávání tegafuru a uracilu. Působením UFT se zvýší biologická dostupnost 5-FU. Zkoumáním možné kombinace UFT a jiných protinádorových léčiv bylo zjištěno, že UFT/LV kombinace zvyšuje dostupnost redukováných folátů a tím stabilizuje vazbu FdUMP s TS (Miura a kolektiv, 2010). Bylo prokázáno, že UFT/LV poskytuje rovnocennou odezvu jako 5-FU/LV a představuje bezpečnější a vhodnější léčbu (Longley a kolektiv, 2003).

Po objevu UFT se Shirasaka a kolektiv zaměřili na vývoj nových orálně podávaných léčiv s fluoropyrimidinem jako účinnou látkou. Vynalezli léčivo nové generace, S-1, které má zesílený účinek 5-FU a zároveň redukuje jeho toxicitu v GIT. S-1 se skládá z tegafuru, 5-chloro-2,4-dihydroxypyridinu a 4,6-dioxo-1H-1,3,5-triazin-2-karboxylátu draselného v poměru 1:0,4:1. Účinek 5-chloro-2,4-dihydroxypyridinu spočívá v inhibici DPD a účinkem 4,6-dioxo-1H-1,3,5-triazin-2-karboxylátu draselného je inhibice OPRT. S-1 je nádorově selektivní léčivo. Může být bezpečně podáváno pacientům, kterým 5-FU způsobuje kardiotoxicitu (Miura a kolektiv, 2010). S-1 se stal hlavním podávaným lékem při léčbě metastatické rakoviny žaludku v Japonsku (Shinoda a kolektiv, 2012).

Jiný postup spočíval v navrhnutí proléku 5-FU, který by nepodléhal degradaci DPD v játrech. Kapecitabin je fluoropyrimidin podávaný ústně, který je absorbován nezměněn GIT a je přeměněn na 5-deoxy-5-fluorouridin v játrech pomocí karboxylesterasy a cytidindeaminasy. Metabolit 5-deoxy-5-fluorouridin je potom přeměněn na 5-FU TP a UP. Oba tyto enzymy jsou významně více aktivní v nádorové tkáni než v normální tkáni, proto je pozorována tumor selektivní aktivace kapecitabinu na 5-FU (Longley a kolektiv, 2003). Účinnost kapecitabinu je závislá na expresi a aktivitě DPD a TP, proto je podáván selektivně jen pacientům s vysokou aktivitou těchto enzymů (Miura a kolektiv, 2010). V klinických testech kapecitabin prokázal významně vyšší odezvu než 5-FU/LV (24,8 % proti 15,5 %), přesto čas progresu nemoci a počet přeživších byl pro oba pokusy podobný. Toxický profil kapecitabinu byl více příznivý z hlediska léčby závažných nežádoucích účinků a hospitalizací (Longley a kolektiv, 2003). Tři velké studie prokázaly, že užití kapecitabinu je terapeuticky rovnocenné užití bolusových injekcí 5-FU/LV pro první linii léčby mCRC a pro adjuvantní léčbu rakoviny střeva ve stádiu 3 (Raftery a Goldberg, 2010).

### **2.3.3 Methotrexát**

Methotrexát je antifolátový inhibitor dihydrofolátreduktasy, která katalyzuje přeměnu dihydrofolátu na tetrahydrofolát. Tetrahydrofolát je potřebný k purinové biosyntéze, jako prekurzor je také potřebný k syntéze dTMP. Methotrexát inhibuje purinovou i thyminovou syntézu a působí synergicky s 5-FU při podání před 5-FU. Inhibice purinové syntézy zvyšuje hladinu PRPP (funkce PRPP viz kapitola Mechanismus účinku, podkapitola Metabolismu 5-FU). Výzkumy prokázaly, že podávání methotrexátu před léčbou pomocí 5-FU zvyšuje účinek 5-FU. Toto je podloženo zvýšenou tvorbou 5-FU nukleotidů a zvýšenou inkorporací 5-FU do RNA (Longley a kolektiv, 2003).

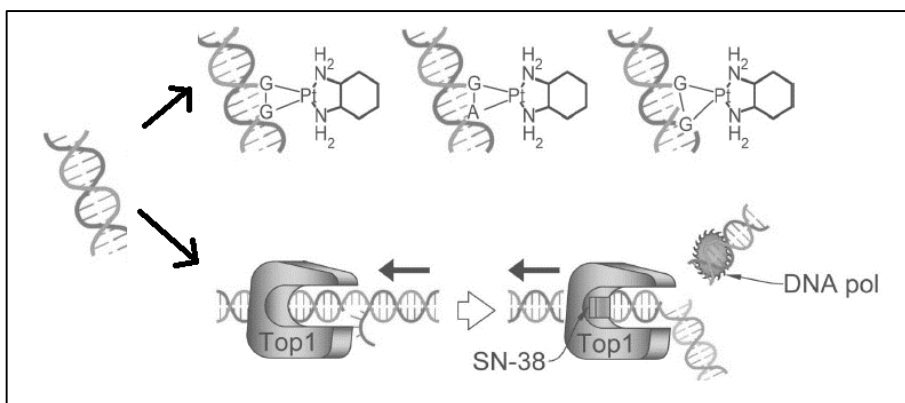
### **2.3.4 FOLFOX – spojení 5-FU/LV s oxaliplatinou**

Oxaliplatina zabraňuje replikaci a transkripci DNA „síťováním“ DNA řetězců. Účinek oxaliplatin je znázorněn na obr. 3. Cytotoxický účinek oxaliplatin není závislý na funkčním MMR systému. Oxaliplatina nemá léčebný účinek při samostatném podání pacientům s kolorektální rakovinou. Přidání oxaliplatin k 5-FU/LV v léčebném režimu FOLFOX má míru odpovědi 50 – 60 % a delší přežití bez progresu onemocnění. FOLFOX představuje standart adjuvantní terapie rakoviny tlustého střeva ve třetím stádiu. Nežádoucí účinky oxaliplatin jsou akutní neurotoxicita a chronická neuropatie. Sensorická periferní neuropatie a myelosuprese byly významné vedlejší účinky léčebné kombinace FOLFOX. Častěji pozorovatelné vedlejší účinky 5-FU na GIT nejsou při léčbě kombinací FOLFOX přítomny. Na základě výsledků MOSAIC studie (Multicenter International Study of Oxaliplatin/Ftouracil/Leucovorin in the Adjuvant Treatment of Colon Cancer) sledující účinnost podávání kombinace FOLFOX ve srovnání s již zavedenými léčebnými postupy u kolorektálního karcinomu americká organizace FDA schválila FOLFOX4 jako léčivo první linie pro léčbu mCRC. Číslo na konci názvu označuje modifikace FOLFOX režimu (Kline a El-Deiry, 2013; Raftery a Goldberg, 2010; Davies a Goldberg, 2011; Hameed a Cassidy, 2011).

### **2.3.5 FOLFIRI – spojení 5-FU/LV s irinotekanem**

Cílem působení irinotekanu je DNA topoisomerasa I (TopI), enzym zapojený v DNA metabolismu. Topoisomerasa I katalyzuje odvíjení DNA nezávislé na ATP, což je důležitý krok DNA replikace a transkripce. Topoisomerasa I štěpí jeden ze řetězců DNA, usnadňuje hladké otáčení komplementárního řetězce kolem prvního řetězce a znovu spojuje první řetězec. Působení irinotekanu na TopI je znázorněno na obr. 3. Metabolit irinotekanu SN38 váže DNA-TopI komplex, inhibuje ligaci přerušeno řetězce DNA a navozuje zlom ve dvoušroubovici DNA. Irinotekan se využívá v kombinaci s 5-FU/LV v režimu nazývaném FOLFIRI. Pacienti s kolorektální rakovinou léčení FOLFIRI mají míru odpovědi 49 %. Irinotekan způsobuje průjem u 16 – 24 % pacientů, dalšími nežádoucími účinky jsou neutropenie. Celkem 10 – 50 % bílé populace má polymorfismus, který zvyšuje citlivost na irinotekan a způsobuje tím toxicitu kostní dřeně (Kline a El-Deiry, 2013; Raftery a Goldberg, 2010).

K léčbě neresekovatelné rakoviny a mCRC lze použít i spojení cyklů FOLFOX a poté FOLFIRI, nebo v opačném pořadí. V podstatě pořadí nehraje významnou roli, nemá žádný význam na účinnost léčby. Více o různých přístupech k léčbě těchto nádorů a modifikací FOLFOX a FOLFIRI se lze dočíst v článku z roku 2013 od autorů Okiho a kolektivu (Oki a kolektiv, 2013).



**Obr. 3:** Schéma působení oxaliplatinu a irinotekanu na DNA. V horní části schématu je znázorněno „síťování“ DNA působením oxaliplatinu. Ve spodní části je znázorněn účinek irinotekanu na Topoisomerasu I (Top1). Převzato z Kline a El-Deiry, 2013, str.996 a 997.

### 2.3.6 FOLFOXIRI

Spojením 5-FU, LV, oxaliplatinu a irinotekanu byla vyvinuta léčebná kombinace FOLFOXIRI. Toto spojení vzniklo s úmyslem zlepšit výsledky léčby a zvýšit míru pacientů vystaveným oxaliplatině i irinotekanu. Podle klinických studií dosahuje FOLFOXIRI lepší výsledky léčby ve srovnání s FOLFIRI, ale výskyt nežádoucích účinků je naopak zvýšen (Montagnani a kolektiv, 2011).

### 2.3.7. Interferon

Interferony (INF) jsou pleotropické cytokiny, které fungují jako negativní regulátory růstu normálních a maligních buněk. Četné *in vitro* studie prokázaly, že 5-FU interagující s INF vykazuje vyšší cytotoxicitu v buněčných nádorových liniích (Longley a kolektiv, 2003). Interferon- $\alpha$  (INF- $\alpha$ ) má nezbytnou roli v antivirové odpovědi, proto byl užíván ke klinické léčbě virových infekcí. Samotně podávaný INF- $\alpha$  může zlepšit imunitní funkce těla a byl užíván k léčbě myeloproliferativních nemocí a dále k léčbě solidních tumorů, například rakovina ledvin, nebo melanom (Zhu a kolektiv, 2013). Bylo prokázáno, že INF- $\alpha$  zvyšuje zlomy v jednom nebo v obou řetězcích DNA zprostředkovaných působením 5-FU v buňkách karcinomu střeva (Longley a kolektiv, 2003). Dále bylo zjištěno, že INF- $\alpha$  zvyšuje perfuzi a vychytávání 5-FU v několika maligních nádorech (Veld a kolektiv, 2012). Pacienti s rakovinou tlustého střeva léčení 5-FU ve spojení s INF- $\alpha$  vykazují trend zlepšení přežití bez recidivy. Nicméně účinnost spojení INF- $\alpha$  a chemoterapie v léčbě rakoviny žaludku nebyla prokázána. Předchozí studie ukázaly, že INF- $\alpha$  zvyšuje protinádorový účinek kapecitabinu na hepatocelulární karcinom u laboratorně upravených myší (Zhu a kolektiv, 2013). Účinností kombinované léčby INF- $\alpha$  a 5-FU a využití této terapie u různých podskupin hepatocelulárního karcinomu se více zabývá Nagano a kolektiv (Nagano a kolektiv, 2013). Interferon- $\gamma$  zvyšuje aktivitu 5-FU pomocí zvýšení aktivity anabolických enzymů TP a UP (Longley a kolektiv, 2003).

### 2.3.8 Nové léčebné kombinace

Moderní přístup k nádorové terapii spočívá v použití chemických nebo biologických účinných látek s konkrétním molekulárním cílem, u něhož bylo prokázáno spojení

s růstem a progresí nádoru (Kline a El-Deiry, 2013). V méně než 20 letech se léčba mCRC výrazně rozšířila užitím a spojením tradiční chemoterapie a cílené léčby. Nové léčebné postupy jsou zaměřeny na podskupiny pacientů s příslušným prediktivním biomarkerem. Cílenou terapií je možná inhibice jedné nebo více specifických intracelulárních drah, což má za následek zastavení buněčného cyklu a buněčnou smrt. Mezi nově zavedené cílové terapie, které se stali součástí léčebného paradigma, patří bevacizumab, cetuzimab a panitumumab (Davies a Goldberg, 2011). První terapie pomocí monoklonálních protilátek byla zavedena v roce 2007. Evropské a americké směrnice navrhuji kombinovanou léčbu chemoterapií a monoklonálními protilátkami (mAb) jako první léčebnou linii pro mCRC a i druhou léčebnou linii, v závislosti na předchozí léčbě. Cetuximab nebo panitumumab jsou vhodnou léčebnou možností pro pacienty s chemorezistentní mCRC vykazující gen KRAS divokého typu 1 (Cheng a kolektiv, 2013).

Bevacizumab (Avastin) je humanizovaná mAb s funkcí inhibice angiogeneze. Angiogeneze představuje proces vzniku a růstu nových krevních kapilár a je nezbytná pro růst nádoru. Bevacizumab působí inhibičně na VEGF-A (Vascular endothelial growth factor) chemický signál, který zprostředkovává angiogenesi. Anti-VEGF-A mAb mohou vázat VEGF-A, tím blokovat jeho funkci, která je nezbytná v signální dráze spuštění angiogeneze. Bylo prokázáno, že bevacizumab má protinádorový účinek na různé typy nádorů, hlavně v kombinaci s tradiční chemoterapií se základní podávanou látkou 5-FU. Napřič jeho významnému vlivu na zlepšení úspěšnosti terapie u pacientů s mCRC, u mnoho pacientů dochází k nevyhnutelnému relapsu onemocnění z důvodů nově získané rezistence (Cheng a kolektiv, 2013; Davies a Goldberg, 2011). Výhody spojení bevacizumabu s kombinací FOLFIRI jsou shrnuty v analýze 29 publikovaných studií (Petrelli a kolektiv, 2013).

Cetuximab (Erbix) je chimerická mAb specifická proti EGFR (Epidermal growth factor receptor) extracelulární doméně. Cetuximab může vázat EGFR a blokovat tím jeho funkci. Cetuximab je schopný vyvolat několik proapoptických faktorů, například Bax, což vede k aktivaci kaspas a tím k apoptóze. Další funkcí cetuximabu je aktivace imunitních buněk v těle a tím vyvolání buněčné cytotoxicity závislé na protilátkách. Původně byl cetuximab užíván k paliativní léčbě rakoviny. V roce 2012 americká organizace FDA schválila jeho podávání v kombinaci s FOLFIRI jako možnost léčby první linie pro pacienty s negativní mutací nebo divokým typem KRAS genu a EGFR expresujícím typem mCRC. Nicméně i přes klinické výhody podávání cetuximabu, je často vyvinuta získaná i vlastní rezistence (Cheng a kolektiv, 2013; Davies a Goldberg, 2011). Článek od autorů Douillarda a kolektiv z roku 2014 publikuje výsledky fáze 2 klinické studie sledující účinnost léčby složené z FOLFOX4 a Cetuximabu ve srovnání s léčbou složenou z UFOX (UFT/LV) a Cetuximabu. Závěrem tohoto článku je vyšší účinnost spojení cetuximabu s kombinací FOLFOX (Douillard a kolektiv, 2014).

Panitumumab plně humánní mAb blokuje EGFR extracelulární doménu. Může být použit sám u pacientů neodpovídajících na chemoterapii, protože je plně humánní. Panitumumab je převážně určen k léčbě mCRC expresujících EGFR a s neúčinností chemoterapie fluoropyrimidiny, oxaliplatinou a irinotekanem. U pacientů s KRAS mutovaným genem na kodonech 12 nebo 13 se jeho užití nedoporučuje. K dosažení

lepších výsledků léčby lze kombinovat panitumumab s léčebnou kombinací FOLFOX4, nebo FOLFIRI (Cheng a kolektiv, 2013; Davies a Goldberg, 2011).

Kombinované léčebné režimy zmíněné v této kapitole představují jen základní výčet možností. Existuje nepřeberné množství různých kombinací chemoterapií, jejich modifikací a spojení s cílenou léčbou. Thomas H. Cartwright shrnuje ve svém článku z roku 2012 možnosti léčby po diagnóze mCRC (Cartwright, 2012).

## 2.4 Rezistence na léčbu 5-FU

Léková rezistence je hlavní problém, který limituje účinnost chemoterapie a vzniká v průběhu léčby. Nevýhodou vzniku lékové rezistence je, že tumor se nestane rezistentní jen na léčivo používané v chemoterapii, ale vznikají i křížové rezistence na jiná léčiva s odlišným mechanismem účinku. Vznik lékové rezistence může až v 90 % za selhání léčby u pacientů s mCRC. Navíc rezistentní mikrometastázy mohou také snížit účinnost adjuvantních léčebných postupů. Nádory mohou být také rezistentní na léčbu už před začátkem chemoterapie a to z důvodů mutací a genetických polymorfismů (Longley a Johnston, 2005).

Příčiny vzniku rezistence mohou být alterace v příjmu a výdeji léčiva, zesílení inaktivace léčiva, nebo mutace v molekulárním cíli léčiva. Vysoká exprese TS, zvýšená aktivita deoxyuridintrifosfatasy, methylace MLH1 genu a zvýšená exprese Bcl-2, Bcl-XL a Mcl-1 proteinů jsou společnými příčinami vzniku rezistence na 5-FU (Zhang a kolektiv, 2008).

### 2.4.1 Exprese TS a její role v rezistenci na 5-FU

Funkce TS byla popsána v kapitole Mechanismus účinku 5-FU. V této kapitole je i zmíněna role TK jako jednoho z možných mechanismů rezistence.

Zvýšená exprese TS je jedním z hlavních molekulárních faktorů získané rezistence na 5-FU. Stabilita ternárního komplexu je vysoce závislá na dostupnosti N<sup>5</sup>,N<sup>10</sup>-metylen-THF. V nepřítomnosti N<sup>5</sup>,N<sup>10</sup>-metylen-THF tvoří FdUMP s TS nestabilní binární komplex s malou účinností inhibice TS. Narušená tvorba N<sup>5</sup>,N<sup>10</sup>-metylen-THF a vysoká koncentrace TS před začátkem léčby vedou ke vzniku rezistence. Z toho vyplývá, že amplifikace nebo mutace v genu TS znamenají získání rezistence. Náhlý nárůst hladiny TS následovaný léčbou 5-FU je podle modelu autoregulace zpětnovazebných drah, kde TS protein reguluje jeho vlastní sílu translace, jeden z kritických momentů vzniku rezistence. Volná TS, tedy bez navázaného ligandu, váže vlastní mRNA a umlčuje její translaci (Zhang a kolektiv, 2008; Longley a Johnston, 2005).

### 2.4.2 Exprese DPD a její role v rezistenci na 5-FU

Odbourávání 5-FU a úloha DPD na odbourávání 5-FU bylo zmíněno v kapitole Mechanismus 5-FU a v podkapitole Metabolismus 5-FU.



Zvýšení aktivity DPD vede k většímu odbourávání 5-FU a tím k neúčinnosti jeho léčby. Studie prokázaly, že nízká exprese DPD může znamenat větší senzitivitu na účinek 5-FU. Bylo prokázáno, že exprese DPD u mCRC je spojena s neúčinností léčby 5-FU. Dihydropyrimidindehydrogenasa je kódovaná genem DYPD, u kterého bylo popsáno 39 různých alel (Zhang a kolektiv, 2008).

### 2.4.3 Geny zapojené do MMR

Možnosti nádorových buněk pro opravu poškozené DNA mohou být jednou z příčin vzniku rezistence na léčiva s účinkem vyvolávajícím poškození DNA. Jedním z účinků 5-FU je inkorporace do DNA a aktivace proteinů s funkcí MMR. Více o inkorporaci 5-FU do DNA a MMR v kapitole Mechanismus účinku 5-FU.

Produkt genu MLH1 je jeden z klíčových proteinů MMR. Buněčné linie s deficiencí genu MLH1 jsou prokazatelně více rezistentní na působení 5-FU. Toto bylo ověřeno i při ošetření buněčných linií deficitních na MLH1 gen 5-FU a pro srovnání Tomudexem, což je nepyrimidinový inhibitor TS. Při ošetření Tomudexem nedochází ke vzniku rezistence (Li a kolektiv, 2009). Jak již bylo zmíněno v kapitole Mechanismus účinku, jedním z nejčastějších fenotypů CRC je nestabilita mikrosatelitů s deficiencí MLH1 a dalších genů důležitých pro MMR. Na testech *in vitro* bylo prokázáno, že neúčinnost MLH1 je způsobena methylací promotoru toho genu. Toto bylo prokázáno použitím demethylačního činidla a tím dosažením opětovné aktivity MLH1 genu (Devaud a Gallinger, 2013). Podobný význam pro rezistenci má další z proteinů MMR kódovaný genem MSH2 (Longley a Johnston, 2005).

### 2.4.4 Buněčný cyklus a geny kódující apoptózu

Řízení buněčného cyklu a jeho narušení může být také součástí získané rezistence na 5-FU. Buněčný cyklus se může zpomalit, což poskytuje nádorovým buňkám dostatek času na opravu inkorporace FdUTP do DNA (Zhang a kolektiv, 2008).

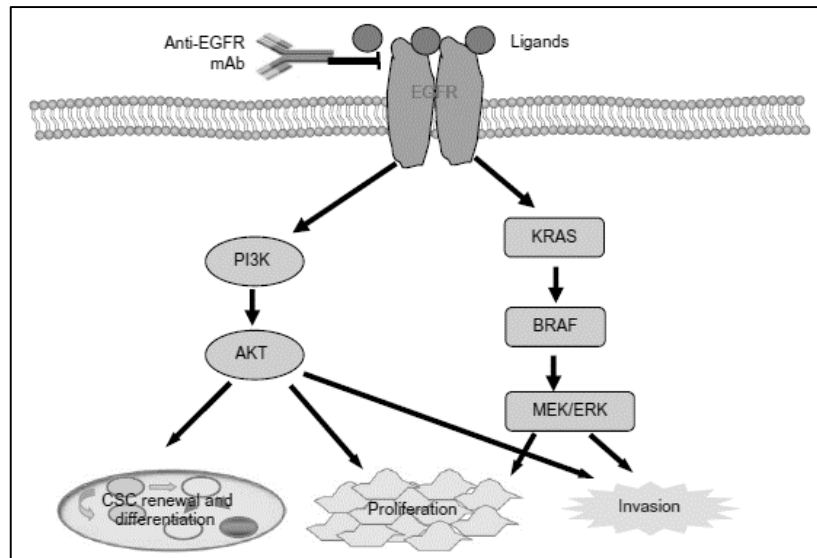
Předpokladem pro účinnost léčby 5-FU a jiných léků s protinádorovým účinkem je vyvolání apoptózy v maligních buňkách. Proto poruchy v regulaci apoptózy jsou významným faktorem rezistence vůči 5-FU. Mutace a jiné polymorfismy v genech regulujících apoptózu jsou příčinou vzniku rezistence na léčbu 5-FU už před jejím začátkem. Navíc proteiny, blokující apoptickou odpověď buněk na poškození vyvolané účinkem léčiva, mají často i proliferativní účinek.

Geny Bcl-2, Bcl-XL a Mcl-1 patří do skupiny genů s protiapoptickou funkcí v genové rodině Bcl-2, další skupinou genů v rodině Bcl-2 jsou geny navozující apoptózu BAX a BAK. Proteiny kódované geny Bcl-2, Bcl-XL a Mcl-1 jsou inhibitory apoptózy spuštěné vnitřní cestou. Při léčbě nádorů je nezbytné navodit v maligních buňkách apoptózu a proto byly vyvinuty látky, které inhibují funkci Bcl-2, Bcl-XL a Mcl-1 proteinů. Příkladem inhibitorů společných pro všechny 3 zmiňované geny a jejich produkty jsou například Antimycin A3 a Sabutolac. Kompletní seznam a postupy při vývoji inhibitorů lze najít v článku od Juin a kolektivu (Juin a kolektiv, 2013). Belt a kolektiv provedli studii exprese proteinů regulujících apoptózu u pacientů s rakovinou tlustého střeva ve stádiích II a III. Z jejich výsledků vyplývá, že z hlediska rekurence nemoci je nepříznivá nízká exprese genu Bcl-2.

Dalo by se předpokládat, že nízká exprese tohoto genu bude spojena s menší inhibicí apoptózy a tedy větší úmrtností nádorových buněk. Jejich studie však ukázala přesný opak. Tento jev vysvětlují dvěma možnými způsoby. První hypotéza předpokládá, že nízká exprese genu Bcl-2 je jen průvodním jevem, zatímco podstatná je ztráta funkce ostatních genů umístěných na stejném chromozomu jako Bcl-2 gen. Druhou možností je, že u Bcl-2 negativních nádorů může být proapoptická signalizace narušena účinnějšími mechanismy než je vysoká Bcl-2 exprese (Belt a kolektiv, 2014).

Proteiny tyrozinkinasy mají významnou roli v rezistenci na chemoterapii. Jejich funkcí je regulace antiapoptických transdukčních signálních drah. Zvýšená exprese a onkogenní mutace proteinů tyrozinkinasy byly popsány u četných případů rakoviny. Antiapoptická downstream signalizace je tedy aktivovaná receptory tyrozinkinasy. Do této skupiny signalizace patří fosfatidylinozitol-3-kináza (PI3K) s hlavním cílem protein kinasou Akt (protein kinasa B), což tvoří PI3K/Akt dráhu. Aktivace PI3K vede k tvorbě fosfatidylinozitol-3,4,5-trifosfátu (PIP3). Lipid PIP3 je druhý posel nezbytný pro přesunutí Akt do plazmatické membrány, kdy je Akt fosforylována a aktivována 3-fosfoinozimid-dependetní kinasou 1 (PDK-1). Aktivní Akt fosforyluje a reguluje funkci mnoha buněčných proteinů, například klíčový protein regulace apoptózy Bad. Bad negativně reguluje funkci Bcl-XL, při fosforylaci tohoto proteinu dochází k inhibici jeho účinku na Bcl-XL. Na regulaci Akt se účastní EGFR a PTEN, které jsou často amplifikované či mutované v maligně transformovaných buňkách. Z funkcí PI3K/Akt dráhy vyplývá, že její neregulovatelná aktivace zvyšuje chemorezistence. Studie *in vitro* prokázaly, že inhibice PI3K/Akt dráhy zvyšuje účinnost mnoha chemoterapeutických léčiv. Vazba PI3K/Akt dráhy na EGFR a její účinek je zjednodušeně vystihnout na obr. 4 (Longley a Johnston, 2005).

Ras (z anglického Rat sarcoma – sarkom potkanů) je rodina G-spřažených proteinů podílejících se na transdukci signálu uvnitř buňky. KRAS gen je jeden ze zástupců Ras genů, kódujících Ras proteiny. KRAS protein je součástí dráhy spojené s receptorem EGFR. Když dojde k vazbě ligandu na extracelulární doménu EGFR spustí se signalizační dráhy, které vedou k spuštění proliferace nádorových buněk, blokaci apoptózy a angiogenezi. Funkce KRAS proteinu a jeho spojení s EGFR je zjednodušeně vystižena na obr. 4 (Coutinho a kolektiv, 2013; Bhalla a kolektiv, 2013).



**Obr. 4:** Dráhy spjaté s EGFR. Převzato z Cheng a kolektiv, 2013, str. 1318.

Je jasné, že EGFR má významnou úlohu v signalizaci buněčných pochodů, které jsou zapojeny v procesu spuštění proliferace, a vzhledem k zaměření této kapitoly v důležitém procesu apoptózy. Proto spojení kombinované léčby na základě účinku 5-FU a inhibitorů EGFR (například Cetuximab, viz kapitola Úprava účinku 5-FU – Kombinovaná léčba) tvoří jeden z nových léčebných postupů u pacientů s mCRC a jinými typy rakoviny.

## 2.5 Teoretický úvod k experimentální části

Pojem proteom prvně použil Marc Wilkins v roce 1993. Proteom (PROTEin a genOM) je podle jeho definice veškerý soubor proteinů vzniklých expresí genomu. Nejdříve byl užíván jen v laboratoři, ve které byl Wilkins doktorandským studentem. Oficiálně byl použit v roce 1994 na konferenci v Sieně, ale nebyl hned přijat odbornou veřejností. Někteří vědci zabývající se genomikou upřednostňovali termín funkční genomika. Nicméně je důležité dodržovat rozdíl mezi informací (genomika) a funkcí, což zahrnuje proteiny (proteomika). Před 20 lety byla proteomika hlavně zaměřena na hledání proteinů a jejich identifikaci. Jen pár vědeckých skupin se zabývalo i modifikací a lokalizací proteinů a proteinovými interakcemi, které jsou součástí pochopení funkce proteinů. Součástí vývoje proteomiky byl i vývoj technologií a analytických postupů. Hlavním analytickým nástrojem se stala hmotnostní spektrometrie. Velice důležitým krokem a největší výzvou od začátku proteomiky je příprava vzorků pro analýzu (Williams a kolektiv, 2014).

Proteiny pro analýzu hmotnostní spektrometrií musí být rozštěpeny na peptidy. Pro štěpení proteinů jsou dva základní postupy. První z nich, digesce v gelu, představuje rozpuštění proteinů s detergenty, separaci proteinů SDS-PAGE elektroforézou a štěpení proteinů v gelu po skončení elektroforézy. Druhou možností je digesce v roztoku. Nevyžaduje použití detergentů, ale zahrnuje extrakci proteinů chaotropními činidly (například močovina), precipitaci a štěpení proteinů za denaturačních podmínek. Obě možnosti mají své výhody a nevýhody. Hlavní výhodou digesce v gelu je odolnost proti

nečistotám, které interferují se štěpením. Mezi nevýhody tohoto postupu patří nesnadná automatizace metody a tím její časová náročnost. Metoda digesce proteinů v roztoku může být snadno automatizována, ale proteiny mohou být neúplně rozpuštěny a štěpení může být narušeno interferujícími látkami. Kompromisem mezi těmito metodami může být použití přípravy vzorků filtrací (FASP – filter-aided sample preparation). Metoda FASP kombinuje výhody digesce v gelu s výhodami digesce v roztoku. Prvním krokem je lyzace v 4% SDS, poté je vzorek koncentrován na mikrolitrové objemy v ultrafiltračním zařízení. Ve filtračním zařízení dochází k odstranění detergentu, výměně pufrů, chemickým modifikacím a štěpení proteinů. Klíčovým prvkem této metody je schopnost filtru udržet vysokomolekulární látky (proteiny) a propouštět nízkomolekulární látky, tzn. nečistoty a později naštěpené peptidy (Wiśniewski a kolektiv, 2009).

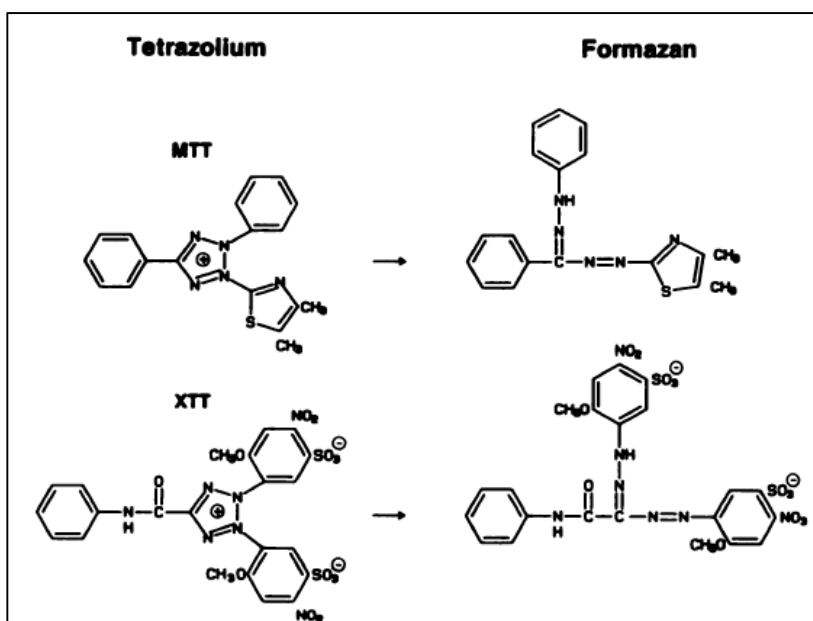
Pro proteomickou analýzu účinku léčiva na buněčnou linii je důležitá správná příprava vzorků. Správná příprava vzorků zahrnuje použití koncentrace léčiva, která byla stanovena testy chemosenzitivity. Dále je důležité nechat léčivo působit optimální čas. K tomu je potřeba stanovit dobu, za kterou léčivo indukuje u dané buněčné linie apoptózu. Tato doba je důležitá z toho důvodu, že v pozdějších fázích lze sledovat pouze apoptotické děje a v brzkých fázích je detekován pouze vstup léčiva do buňky.

### **2.5.1 Testy chemosenzitivity**

Testování chemosenzitivity *in vitro* znamená stanovení účinku protinádorového léčiva. Pro posuzování chemosenzitivity je dostupných mnoho rozdílných metod. Obecně všechny metody stanoví křivku závislosti účinku na dávce testované látky. Účinek bývá nejčastěji vyjádřen v procentuálním počtu mrtvých buněk. K porovnání chemosenzitivity různých látek můžeme použít konstantu  $IC_{50}$  (half maximal inhibitory concentration). Konstanta  $IC_{50}$  vyjadřuje koncentraci, která způsobuje 50% úbytek živých buněk. Pro stanovení  $IC_{50}$  můžeme použít testy buněčné viability pomocí MTT a XTT tetrazoliových solí (Blumental a Goldenberg, 2007).

#### **2.5.1.1 MTT a XTT tetrazoliové soli**

Tetrazoliové soli jsou široce používány pro detekci živých buněk kvůli jejich vlastnosti tvořit redukované deriváty formazány. Během redukce dochází k narušení tetrazolového kruhu a tím přechodu z bezbarvé nebo slabě barevné soli na barevný produkt formazán. Tyto soli můžeme rozdělit do dvou skupin podle náboje a pronikání do životaschopné buňky. Do první skupiny patří MTT sůl, která je kladně nabitá a lehce prostupuje do životaschopné eukaryotické buňky. Druhou skupinu tvoří XTT, MTS a WST-1 soli, které jsou záporně nabitě a nesnadno pronikají do buněk. Druhá skupina soli je používána s akceptorem elektronů, který zprostředkovává přenos elektronů z cytoplasmy a tím napomáhá redukci tetrazoliových solí na barevný formazán. Na obr. 5 je znázorněna chemická struktura MTT a XTT solí a jejich barevných derivátů formazánů (Riss a kolektiv, 2013; Berridge a kolektiv, 2005).



**Obr. 5:** Chemická struktura MTT a XTT solí a jejich barevných derivátů formazánů. Převzato z Scudiero a kolektiv, 1988, str 4828.

Kolorimetrický MTT test v mikrotitrační desce pro měření buněčné proliferace a cytotoxicity zavedl v roce 1983 Mosmann. K vývoji MTT testu vedl předpoklad, že monotetrazoliové soli (například MTT), které lehce vstupují do buňky, jsou redukovány NAD(P)H-závislými oxidoreduktasami a dehydrogenasami metabolicky aktivních buněk. Nevýhodou tohoto testu je nutnost rozpuštění vzniklých formazánů před spektrofotometrickým měřením a tím i větší časová náročnost. Proto byla vyvinuta druhá generace solí, do které patří XTT (Berridge a kolektiv, 2005).

Kolorimetrický XTT test prvně použili Scudiero a kolektiv v roce 1988. Průběh testu je velice podobný MTT testu. Rozdíly spočívají v nutnosti přidání Phenasin methyl sulfátu, či jiného akceptoru elektronů jak bylo popsáno výše. Výhodou tohoto testu je, že XTT tvoří rozpustné formazány a proto není potřeba rozpouštění před spektrofotometrickým měřením (Scudiero a kolektiv, 1988; Berridge a kolektiv, 2005).

## 2.5.2 Metody detekce apoptózy

Apoptóza je programovaná buněčná smrt, k níž dochází po spuštění regulačních drah. Tyto dráhy mají za následek tvorbu apoptických tělísek a jejich fagocytózu okolními buňkami. Doba do apoptózy je stanovována kvůli rozdílům v délce času tohoto děje. Rozdíly nastávají v důsledku užití různých induktorů buněčné smrti, různých metod detekce apoptózy a různých buněčných linií. Mezi metody detekce apoptózy patří analýzy fragmentace DNA, detekce asymetrie lipidové membrány a analýza změny mitochondriálního potencionálu. Jendou z možností stanovení doby do apoptózy je i detekce kaspázové aktivity. Kaspázy jsou cysteinové proteasy specificky štěpící proteinové substráty v místě kyseliny asparagové. Jejich úloha je klíčová pro přenos apoptického signálu. Aktivitu kaspáz můžeme detekovat pomocí jejich syntetických selektivních substrátů (Souček a Vaculová, 2014).

NucView 488 kaspasa-3 substrát je fluorescentní próba pro detekci aktivity kaspasy 3 a 7 v živých buňkách v reálném čase. Tento substrát vznikl spojením Ac-DEVD (obsahuje pro kaspasu 3 rozpoznávací místo) a NucView 488 (část způsobující zbarvení jádra). NucView 488, stejně jako jeho prekursor thiazolová oranž, nese silně pozitivní náboj a díky tomu se elektrostatickou interakcí váže k DNA. Ac-DEVD část je silně záporně nabitá a při spojení s NucView488 zabrání jeho vazbě k DNA. Interkalace je umožněna odštěpením NucView 488 aktivní kaspasou 3. Dokud nedojde k interkalaci NucView 488 do DNA není možné detekovat fluorescentní signál (Cen a kolektiv, 2008).

# 3 Experimentální část

## 3.1 Materiál

### 3.1.1 Použité chemikálie

- 2,3bis-[2-methoxy-4-nitro-5-sulfofenyl]-2H-tetrazolium-5-carboxy anilid (XTT) – Sigma Aldrich, USA
- 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyl-tetrazolium bromid (MTT) – Sigma Aldrich, USA
- 5-fluorouracil – Hospira UK Limited, Velká Británie
- Deionizovaná voda
- Dihydrogenfosforečnan draselný ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) – Lach-Ner, ČR
- Dithiothreitol (DTT) – Sigma Aldrich, USA
- Dodecylsulfát sodný (SDS) – Sigma Aldrich, USA
- Fenylmethylsulfonyl fluorid (PMSF) – Sigma Aldrich, USA
- Fluorid sodný (NaF) – Sigma Aldrich, USA
- Hovězí fetální sérum (FCS) – Biotek, USA
- Hydrogenfosforečnan sodný dodekahydrát ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ ) – Lach-Ner, ČR
- Chlorid Draselný (KCl) – Sigma Aldrich, USA
- Chlorid sodný (NaCl) – Sigma Aldrich, USA
- Ortovanadičnan sodný ( $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ) – Sigma Aldrich, USA
- Penicilin – Biotika, ČR
- Phenasin methyl sulfát – Sigma Aldrich, USA
- Pyrofosfát sodný ( $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ ) – Sigma Aldrich, USA
- RPMI 1640 médium – Sigma Aldrich, USA
- Sterilní deionizovaná voda
- Streptomycin – Sigma Aldrich, USA
- Tris(hydroxymethyl)aminomethan hydrochlorid (TRIS/HCl) – Sigma Aldrich, USA

### 3.1.2 Použité roztoky

- FASP lyzační pufr –

15,425 mg.ml<sup>-1</sup> DTT; 15,76 mg.ml<sup>-1</sup> TRIS/HCl; 40 mg.ml<sup>-1</sup> SDS; po rozpuštění se upraví pH na 7,6

- Kit pro stanovení času do apoptózy, NucView 488 Caspase-3 Assay Kit for Live Cells – Biotinum, USA
- Kit pro stanovení proteinů, Pierce 660nm Protein Assay Kit – Thermo Scientific, USA
- MTT roztok – příprava 25 ml roztoku

MTT sůl – koncentrace 5 mg.ml<sup>-1</sup>; 25 ml PBS

- PBS pufr –

80 mg.ml<sup>-1</sup> NaCl; 2 mg.ml<sup>-1</sup> KCl; 32,1 mg.ml<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12 H<sub>2</sub>O; 2 mg.ml<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

- PBS pufr s inhibitory – k základnímu PBS pufru se přidalo

1,330 mg.ml<sup>-1</sup> Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>; 0,184 mg.ml<sup>-1</sup> Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>; 0,210 mg.ml<sup>-1</sup> NaF; 0,174 mg.ml<sup>-1</sup> PMSF

- RPMI médium – k základnímu RMPI 1640 médiu se přidalo

Streptomycin – 5ml.l<sup>-1</sup>; penicilín – 500 µl.l<sup>-1</sup>; FCS – 100 ml.l<sup>-1</sup>

- XTT roztok – příprava 25 ml roztoku

XTT sůl – koncentrace 0,9 mg.ml<sup>-1</sup>; 25 ml RMPI média bez fenolové červeni

### 3.1.3 Biologický materiál

Ve všech experimentech byla použita buněčná linie CCRF-CEM. Tato linie je odvozena od akutní T-lymfoblastické leukémie. Buněčná linie byla získána od společnosti American Tissue Culture Colection. Mezi experimenty byly buňky kultivovány v inkubátoru při 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> v RPMI médiu.

### 3.1.4 Použité přístroje

- CellVoyager cv7000 – Yokogawa, Nizozemsko
- Centrifuga 5810 R – Eppendorf, Německo
- Centrifuga Rotina 420R – Hettich, Německo
- Inkubátor HERACELL 150i – Thermo Scientific, USA
- Microplate washer dispensor EL 406 – Biotek, USA
- Multidrop Combi – Thermo Scientific, USA
- Multilabel plate readers Envision – Perkin Elmer, USA
- pH metr – Denver instrument, USA
- Sonifikátor 102C – Branson, USA
- Termomixer Comfort – Eppendorf, Německo
- Třepačka Sunflower 3D - Biosan, Lotyšsko

### 3.1.5 Software

- Program R verze 3.03 s balíčkem ic50
- Program Statistica



## 3.2 Metodika

### 3.2.1 Stanovení inhibiční konstanty IC<sub>50</sub>

#### 3.2.1.1 Ovlivnění buněk 5-FU

Nejprve byla vytvořena koncentrační řada 5-FU rozpipetovaná na 96 jamkové desce. Nevyšší koncentrace 5-FU byla neředěný zásobní roztok, tedy 50 mg.ml<sup>-1</sup>. Celkem bylo vytvořeno 16 bodů řady s faktorem ředění 2. Všechny použité koncentrace jsou shrnuty v tabulce, viz tab. 1. Tato koncentrační řada byla přenesena v objemu 10 µl na zdrojovou 384 jamkovou desku pro pipetor ECHO. Do cílové 384 jamkové desky bylo napipetováno 30 µl média do prvního sloupce. První sloupec sloužil jako blank. Dále bylo pipetováno 30 µl média s buňkami s koncentrací 67 tisíc.ml<sup>-1</sup>, tedy 2000 buněk na jamku. Médium a buňky byly napipetovány na přístroji EL 406. Potom bylo nanášeno 75 nl léčiva ze zdrojové 384 jamkové desky na médium s buňkami v cílové 384 jamkové desce pomocí přístroje ECHO. Cílová 384 jamková deska byla uspořádána podle obr. 6. Buňky ošetřené 5-FU se kultivovaly 72 hodin v inkubátoru při 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>.

**Tab. 1 :** Koncentrační řada 5-FU. Koncentrace shrnuté v této tabulce tvořili koncentrační řadu, která byla nanášena na 384 jamkovou cílovou desku při stanovování inhibiční konstanty IC<sub>50</sub>.

Pořadí v koncentrační řadě	Koncentrace 5-FU (mg.ml <sup>-1</sup> )	Koncentrace 5-FU v jamce cílové desky (mg.ml <sup>-1</sup> )
1.	50	1,25·10 <sup>-1</sup>
2.	25	6,23·10 <sup>-2</sup>
3.	12,50	3,12·10 <sup>-2</sup>
4.	6,25	1,56·10 <sup>-2</sup>
5.	3,13	7,79·10 <sup>-3</sup>
6.	1,56	3,90·10 <sup>-3</sup>
7.	7,81·10 <sup>-1</sup>	1,95·10 <sup>-3</sup>
8.	3,91·10 <sup>-1</sup>	9,74·10 <sup>-4</sup>
9.	1,95·10 <sup>-1</sup>	4,87·10 <sup>-4</sup>
10.	9,77·10 <sup>-2</sup>	2,44·10 <sup>-4</sup>
11.	4,88·10 <sup>-2</sup>	1,22·10 <sup>-4</sup>
12.	2,44·10 <sup>-2</sup>	6,09·10 <sup>-5</sup>
13.	1,22·10 <sup>-2</sup>	3,04·10 <sup>-5</sup>
14.	6,10·10 <sup>-3</sup>	1,52·10 <sup>-5</sup>
15.	3,05·10 <sup>-3</sup>	7,61·10 <sup>-6</sup>
16.	1,53·10 <sup>-3</sup>	3,81·10 <sup>-6</sup>

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
A																								
B																								
C																								
D																								
E																								
F																								
G																								
H																								
I																								
J																								
K																								
L																								
M																								
O																								
P																								

**Obr. 6:** Schéma 384 jamkové cílové desky. Schéma znázorňuje uspořádání 384 jamkové cílové desky při stanovování inhibiční konstanty IC<sub>50</sub>. Červená barva znázorňuje samotné médium (blank). Žlutá barva znázorňuje neovlivněné buňky (kontrola) a modrá barva znázorňuje buňky ovlivněné 5-FU. Šedá pole byla využita pro další léčiva, u nichž se stanovovala inhibiční konstanta. Tyto léčiva nejsou součástí této bakalářské práce.

### 3.2.1.2 XTT test

Do připraveného roztoku XTT se přidá před použitím PMS v koncentraci 20  $\mu\text{l.ml}^{-1}$ . Po skončení inkubace ošetřených buněk, se k nim přidalo 15  $\mu\text{l}$  XTT roztoku s PMS. XTT roztok s PMS se pipetoval na přístroji Multidrop Combi. Po přidání XTT roztoku se buňky nechaly kultivovat 3 hodiny v inkubátoru při 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>. Po skončení inkubace se změřila absorbance při 490 nm na přístroji Envision.

### 3.2.1.3 MTT test

Po skončení inkubace ošetřených buněk se k nim přidalo 15  $\mu\text{l}$  MTT roztoku. MTT roztok se pipetoval pomocí přístroje Multidrop Combi. Ošetřené buňky s přidaným MTT roztokem se nechali inkubovat 3 hodiny při 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>. Po skončení inkubace se přidal 10% roztok SDS v objemu 10  $\mu\text{l}$ . Po přidání SDS roztoku necháme buňky kultivovat do druhého dne při 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>. Po uplynutí inkubace se změřila absorbance při 540 nm na přístroji Envision.

### 3.2.2 Stanovení času do apoptózy

Do 3 jamek na 96 jamkové desce s průhledným dnem bylo napipetováno 0,2 ml média s buňkami o koncentraci 10tisíc.ml<sup>-1</sup>. První jamka na desce slouží jako kontrola. Dále byly buňky ošetřeny 5,25  $\mu\text{l}$  10x IC<sub>50</sub> 5-FU, konečná koncentrace 5-FU v jamce byla 121,62  $\mu\text{g.ml}^{-1}$ . Další buňky byly ošetřeny 5,25  $\mu\text{l}$  1x IC<sub>50</sub> 5-FU, konečná koncentrace 5-FU v jamce byla 12,16  $\mu\text{g.ml}^{-1}$ . Po přidání 5-FU se nechaly buňky inkubovat 15 min při 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>. Poté se přidalo do každé jamky 5  $\mu\text{l}$  substrátu NucView 488. Substrát se přidával v zhasnutém flow-boxu a co nejvíce zatemněné místnosti. Po přidání substrátu se deska přikryla a přenesla do přístroje CellVoyager cv7000, kde docházelo 48 hodin k hodinovému snímkování a inkubaci mezi snímkováním.

### 3.2.3 Příprava buněčných lysátů pro FASP analýzu

Médium s buňkami s obsahem 20 milionů buněk bylo centrifugováno při 290x g, po dobu 5 minut a při pokojové teplotě. Po skončení centrifugace byly buňky 2x promyty

v 15 ml pufru PBS s inhibitory proteas, poté byly promyty v 15 ml PBS bez inhibitorů proteas. Mezi jednotlivými promytími byly buňky centrifugovány při 290× g, po dobu 5 minut a při pokojové teplotě a supernatant byl odlit. Po poslední centrifugaci byl přidán FASP lyzační pufr o objemů 150 μl. Experiment byl opakován i pro objemy 200 μl, 400 μl, 600 μl, 800 μl, 1000 μl, 1200 μl, 1400 μl, 1600 μl, 1800 μl a 2000 μl. Po přidání FASP lyzačního pufru se buňky inkubovaly při 95 °C po dobu 10 minut. Potom byly buněčné lyzáty sonifikovány 30 sec při 15% amplitudě a nastavení 0,5 sec ON a 0,5 sec OFF. Při sonifikaci byly lyzáty uchovány na ledu. Po sonifikaci byly buněčné lyzáty přeneseny do 2 ml mikrozkumavek a centrifugovány při 290× g po dobu 5 minut. Hotové buněčné lyzáty byly uchovány v mrazícím zařízení při -20 °C. Buněčné lyzáty byly připraveny ve dvojitěm opakování.

### 3.2.4 Stanovení celkové koncentrace proteinů pomocí Pierce 660 nm Protein Assay

Na 96 jamkovou desku bylo napipetováno 10 μl standardů z kitu pro stanovení celkové koncentrace proteinů, 10 μl blanku a 10 μl vzorku buněčných lyzátů připravených v předchozím kroku v trojitěm opakování. Schéma desky je znázorněno na obr. 7. Poté bylo přidáno do každé jamky 150 μl reagentu z kitu pro stanovení celkové koncentrace proteinů. Deska byla po dobu 1 minuty třepána při střední rychlosti a potom inkubována při pokojové teplotě po dobu 5 minut. Po ukončení inkubace byla změřena absorbance při 660 nm na přístroji Envision. Vzorky z druhého opakování byly před stanovením zahřáty po dobu 10 minut v termomixeru na 95 °C a poté centrifugovány při 290× g po dobu 5 minut.

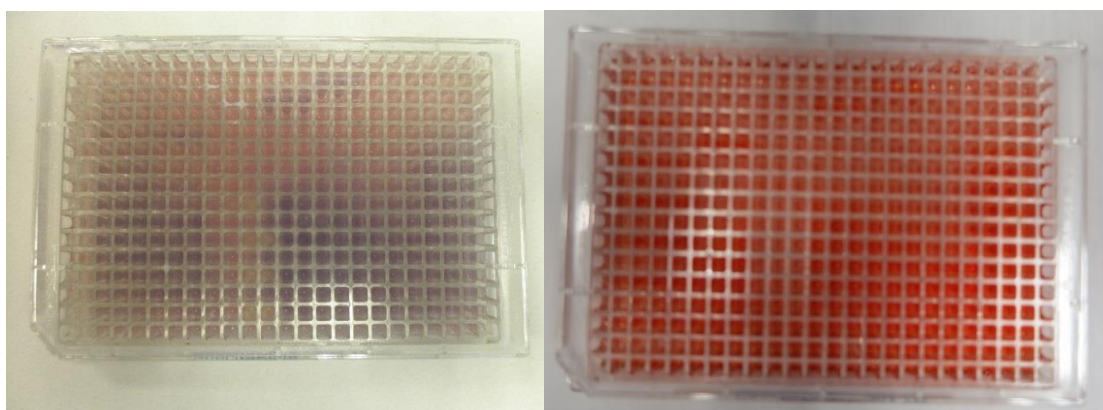
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blue	Blue	Blue	Grey	Grey	Grey	Red	Red	Red	Yellow	Yellow	Yellow
B	Green	Green	Green	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Yellow	Yellow	Yellow
C	Green	Green	Green	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Yellow	Yellow	Yellow
D	Green	Green	Green	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Yellow	Yellow	Yellow
E	Green	Green	Green	Red	Red	Red	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow
F	Green	Green	Green	Red	Red	Red	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow
G	Green	Green	Green	Red	Red	Red	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow
H	Green	Green	Green	Red	Red	Red	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow

**Obr. 7:** Schéma 96 jamkové desky. Schéma znázorňuje rozložení 96 jamkové desky při stanovení celkové koncentrace proteinů pomocí Pierce 660 nm Protein Assay. Modrá barva znázorňuje vodu, zelená barva sadu standardů, šedá barva blank, červená barva vzorky buněčných lyzátů z 1. opakování a žlutá barva vzorky buněčných lyzátů z 2. opakování. Bílá pole byla nevyužita.

# 4 Výsledky

## 4.1 Výsledky stanovení $IC_{50}$

Buněčná linie CCRF-CEM byla ošetřena různými koncentracemi 5-FU. Po ošetření buněk byly provedeny MTT a XTT testy chemosenzitivity. Těmito testy byla stanovena hodnota  $IC_{50}$ . Ošetření a testy MTT a XTT proběhly podle postupu uvedeného v kapitole Metodika. Na závěr testů můžeme pozorovat barevné změny na cílové 384 jamkové desce. Tyto barevné změny byly zaznamenány na obr. 8.



**Obr. 8:** Barevné změny pozorované na závěr testů MTT (vlevo) a XTT (vpravo).

### 4.1.1 Výsledky MTT testu

Hodnoty absorbancí získané na závěr testů jsou uvedeny v tab. 2-4. Vyhodnocením těchto absorbancí programem R 3.0.3. bylo získáno grafické znázornění. Grafické znázornění vyhodnocení testů je uvedeno na obr. 9 – 11 Grafické znázornění 1. MTT – 3. MTT testu. Součástí vyhodnocení je tabulka s hodnotami  $IC_{50}$  a směrodatnou odchylkou (SD). Hodnoty  $IC_{50}$  pro všechna provedená opakování MTT testů byly zaznamenány v tabulce, viz tab. 5.

**Tab. 2:** Hodnoty absorbancí získané v 1. MTT testu. V tabulce jsou uvedeny hodnoty absorbancí získaných pro blank (čisté médium), kontrolu (neošetřenou buněčnou linii) a buněčnou linii ošetřenou uvedenými koncentracemi 5-FU.

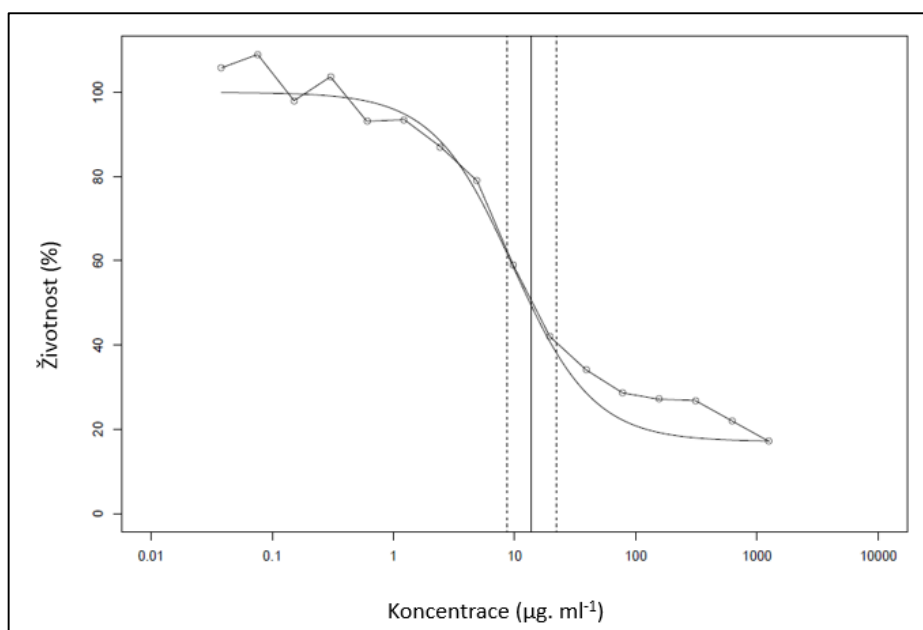
Koncentrace 5-FU v jamce (mg.ml <sup>-1</sup> )	Blank	Kontrola	5-FU		
1,25·10 <sup>-1</sup>	0,089	0,468	0,080	0,082	0,073
6,23·10 <sup>-2</sup>	0,085	0,428	0,099	0,110	0,094
3,12·10 <sup>-2</sup>	0,075	0,451	0,120	0,129	0,120
1,56·10 <sup>-2</sup>	0,073	0,466	0,121	0,127	0,125
7,79·10 <sup>-3</sup>	0,075	0,437	0,131	0,138	0,125
3,90·10 <sup>-3</sup>	0,072	0,446	0,154	0,154	0,161
1,95·10 <sup>-3</sup>	0,087	0,515	0,184	0,220	0,174
9,74·10 <sup>-4</sup>	0,078	0,422	0,270	0,300	0,240
4,87·10 <sup>-4</sup>	0,084	0,455	0,415	0,289	0,382
2,44·10 <sup>-4</sup>	0,078	0,396	0,386	0,367	0,444
1,22·10 <sup>-4</sup>	0,085	0,486	0,472	0,417	0,397
6,09·10 <sup>-5</sup>	0,083	0,436	0,425	0,415	0,441
3,04·10 <sup>-5</sup>	0,087	0,484	0,498	0,471	0,457
1,52·10 <sup>-5</sup>	0,091	0,490	0,465	0,436	0,447
7,61·10 <sup>-6</sup>	0,098	0,553	0,433	0,558	0,508
3,81·10 <sup>-6</sup>	0,125	0,402	0,517	0,510	0,428

**Tab. 3:** Hodnoty absorbancí získané ve 2. MTT testu. V tabulce jsou uvedeny hodnoty absorbancí získaných pro blank (čisté médium), kontrolu (neošetřenou buněčnou linii) a buněčnou linii ošetřenou uvedenými koncentracemi 5-FU.

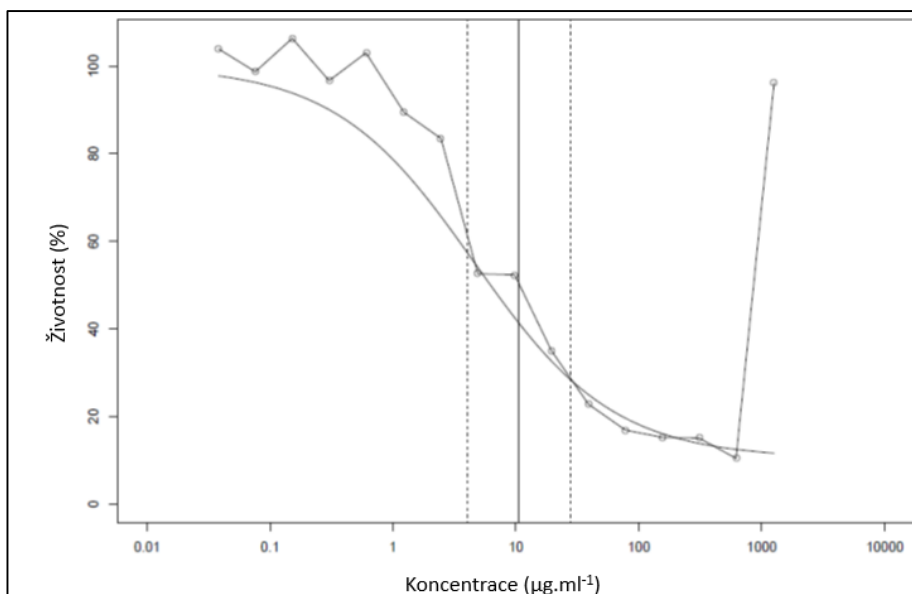
Koncentrace 5-FU v jamce (mg.ml <sup>-1</sup> )	Blank	Kontrola	5-FU		
1,25·10 <sup>-1</sup>	0,076	0,185	0,082	0,076	0,075
6,23·10 <sup>-2</sup>	0,071	0,178	0,083	0,082	0,083
3,12·10 <sup>-2</sup>	0,074	0,202	0,114	0,108	0,115
1,56·10 <sup>-2</sup>	0,073	0,170	0,135	0,141	0,145
7,79·10 <sup>-3</sup>	0,076	0,196	0,179	0,180	0,182
3,90·10 <sup>-3</sup>	0,076	0,179	0,187	0,178	0,182
1,95·10 <sup>-3</sup>	0,077	0,201	0,202	0,190	0,193
9,74·10 <sup>-4</sup>	0,076	0,195	0,185	0,191	0,189
4,87·10 <sup>-4</sup>	0,077	0,197	0,193	0,188	0,182
2,44·10 <sup>-4</sup>	0,076	0,167	0,174	0,172	0,185
1,22·10 <sup>-4</sup>	0,077	0,195	0,193	0,211	0,195
6,09·10 <sup>-5</sup>	0,077	0,188	0,189	0,183	0,184
3,04·10 <sup>-5</sup>	0,078	0,204	0,207	0,218	0,205
1,52·10 <sup>-5</sup>	0,081	0,199	0,197	0,215	0,195
7,61·10 <sup>-6</sup>	0,085	0,237	0,188	0,252	0,204
3,81·10 <sup>-6</sup>	0,092	0,178	0,217	0,207	0,211

**Tab. 4:** Hodnoty absorpací získané ve 3. MTT testu. V tabulce jsou uvedeny hodnoty absorpací získaných pro blank (čisté médium), kontrolu (neošetřenou buněčnou linii) a buněčnou linii ošetřenou uvedenými koncentracemi 5-FU.

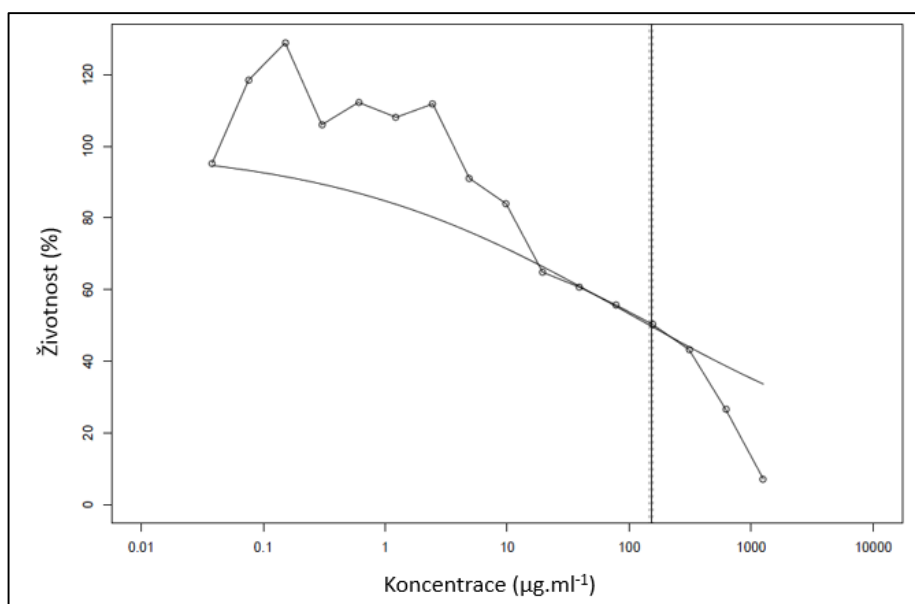
Koncentrace 5-FU v jamce (mg.ml <sup>-1</sup> )	Blank	Kontrola	5-FU		
1,25·10 <sup>-1</sup>	0,075	0,087	0,075	0,074	0,075
6,23·10 <sup>-2</sup>	0,071	0,136	0,090	0,093	0,088
3,12·10 <sup>-2</sup>	0,074	0,135	0,105	0,105	0,101
1,56·10 <sup>-2</sup>	0,073	0,150	0,105	0,111	0,112
7,79·10 <sup>-3</sup>	0,077	0,161	0,116	0,111	0,114
3,90·10 <sup>-3</sup>	0,076	0,144	0,115	0,120	0,118
1,95·10 <sup>-3</sup>	0,077	0,155	0,124	0,119	0,120
9,74·10 <sup>-4</sup>	0,075	0,155	0,137	0,138	0,134
4,87·10 <sup>-4</sup>	0,077	0,165	0,141	0,143	0,142
2,44·10 <sup>-4</sup>	0,076	0,165	0,160	0,154	0,162
1,22·10 <sup>-4</sup>	0,079	0,162	0,159	0,162	0,146
6,09·10 <sup>-5</sup>	0,075	0,159	0,157	0,160	0,160
3,04·10 <sup>-5</sup>	0,080	0,171	0,152	0,162	0,148
1,52·10 <sup>-5</sup>	0,081	0,151	0,173	0,162	0,182
7,61·10 <sup>-6</sup>	0,081	0,168	0,160	0,167	0,165
3,81·10 <sup>-6</sup>	0,086	0,123	0,108	0,157	0,171



**Obr. 9:** Grafické znázornění 1. MTT testu. Graf závislosti životnosti buněk na koncentraci 5-FU. Na ose X je zaznamenána koncentrace 5-FU, na ose Y je vynášena životnost buněk.



**Obr. 10:** Grafické znázornění 2. MTT testu. Graf závislosti životnosti buněk na koncentraci 5-FU. Na ose X je zaznamenána koncentrace 5-FU, na ose Y je vynášena životnost buněk.



**Obr. 11:** Grafické znázornění 3. MTT testu. Graf závislosti životnosti buněk na koncentraci 5-FU. Na ose X je zaznamenána koncentrace 5-FU, na ose Y je vynášena životnost buněk.

**Tab. 5:** Stanovení  $IC_{50}$  MTT testem. Hodnoty  $IC_{50}$  a směrodatná odchylka (SD) pro všechny 3 opakování MTT testů.

	$IC_{50}$ ( $\mu\text{g.ml}^{-1}$ )	SD ( $\mu\text{g.ml}^{-1}$ )
1. MTT	13,804	0,143
2. MTT	10,520	0,274
3. MTT	151,008	0,413

#### 4.1.2 Výsledky XTT testu

Hodnoty absorbance získané na závěr testů byly uvedeny v tab. 6 – 8. Program R 3.0.3 vyhodnotil hodnoty absorbance XTT testů grafickým znázorněním, viz obr. 12 – 14 Grafické znázornění 1. XTT – 3. XTT testu. Součástí vyhodnocení byla i tabulka s hodnotami IC<sub>50</sub> a směrodatnou odchylkou (SD). Hodnoty IC<sub>50</sub> pro všechny provedené opakování XTT testů byly zaznamenány v tabulce, viz tab. 9.

**Tab. 6:** Hodnoty absorbancí získané v 1. XTT testu. V tabulce jsou uvedeny hodnoty absorbancí získaných pro blank (čisté médium), kontrolu (neošetřenou buněčnou linii) a buněčnou linii ošetřenou uvedenými koncentracemi 5-FU.

Koncentrace 5-FU v jamce (mg.ml <sup>-1</sup> )	Blank	kontrola	5-FU		
1,25·10 <sup>-1</sup>	0,225	0,817	0,326	0,319	0,325
6,23·10 <sup>-2</sup>	0,245	0,894	0,355	0,351	0,349
3,12·10 <sup>-2</sup>	0,209	0,827	0,370	0,367	0,369
1,56·10 <sup>-2</sup>	0,208	0,780	0,383	0,363	0,360
7,79·10 <sup>-3</sup>	0,211	0,768	0,375	0,384	0,406
3,90·10 <sup>-3</sup>	0,208	0,759	0,433	0,416	0,445
1,95·10 <sup>-3</sup>	0,214	0,789	0,494	0,455	0,452
9,74·10 <sup>-4</sup>	0,232	0,761	0,581	0,513	0,592
4,87·10 <sup>-4</sup>	0,215	0,780	0,735	0,557	0,629
2,44·10 <sup>-4</sup>	0,211	0,862	0,672	0,831	0,646
1,22·10 <sup>-4</sup>	0,211	0,795	0,796	0,760	0,699
6,09·10 <sup>-5</sup>	0,208	0,803	0,756	0,772	0,751
3,04·10 <sup>-5</sup>	0,212	0,800	0,825	0,774	0,752
1,52·10 <sup>-5</sup>	0,211	0,804	0,811	0,760	0,786
7,61·10 <sup>-6</sup>	0,217	0,937	0,800	0,814	0,829
3,81·10 <sup>-6</sup>	0,232	0,895	0,799	0,907	0,792

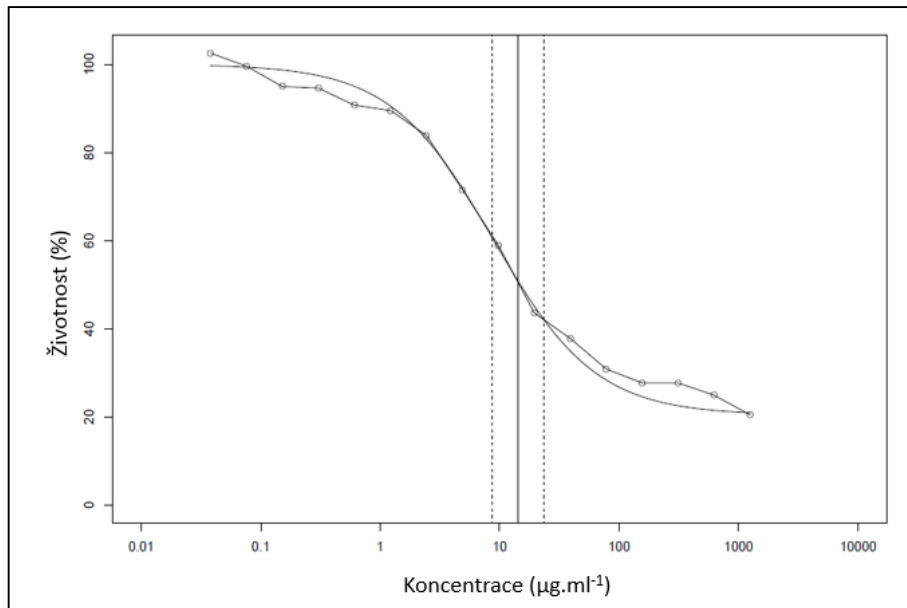


**Tab. 7:** Hodnoty absorbancí získané ve 2. XTT testu. V tabulce jsou uvedeny hodnoty absorbancí získaných pro blank (čisté médium), kontrolu (neošetřenou buněčnou linii) a buněčnou linii ošetřenou uvedenými koncentracemi 5-FU.

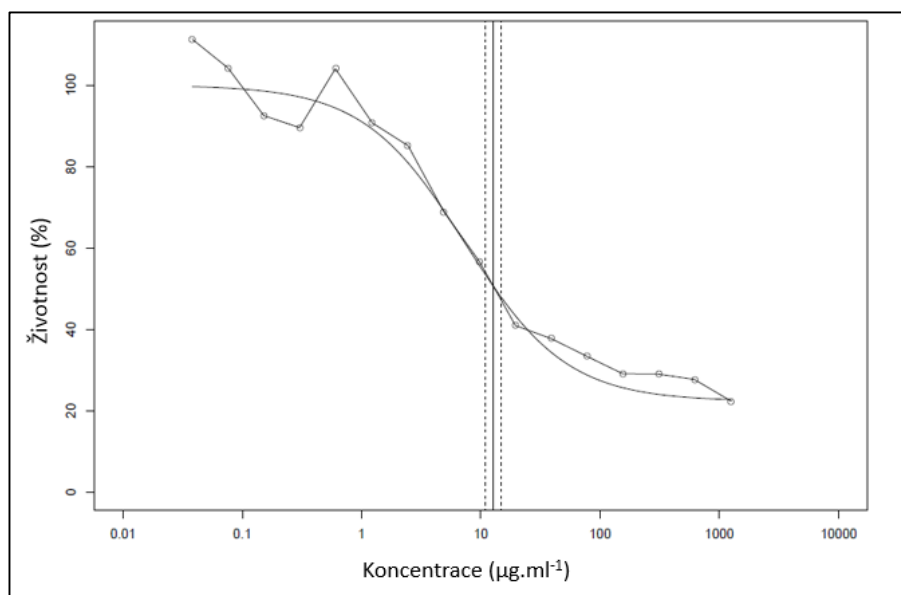
Koncentrace 5-FU v jamce (mg.ml <sup>-1</sup> )	Blank	Kontrola	5-FU		
1,25·10 <sup>-1</sup>	0,186	0,586	0,273	0,247	0,249
6,23·10 <sup>-2</sup>	0,210	0,701	0,274	0,290	0,270
3,12·10 <sup>-2</sup>	0,177	0,560	0,289	0,285	0,276
1,56·10 <sup>-2</sup>	0,176	0,538	0,279	0,295	0,277
7,79·10 <sup>-3</sup>	0,180	0,479	0,292	0,294	0,317
3,90·10 <sup>-3</sup>	0,174	0,513	0,304	0,320	0,332
1,95·10 <sup>-3</sup>	0,183	0,540	0,345	0,320	0,330
9,74·10 <sup>-4</sup>	0,202	0,491	0,400	0,393	0,392
4,87·10 <sup>-4</sup>	0,182	0,526	0,462	0,402	0,471
2,44·10 <sup>-4</sup>	0,177	0,607	0,445	0,604	0,483
1,22·10 <sup>-4</sup>	0,182	0,559	0,555	0,515	0,530
6,09·10 <sup>-5</sup>	0,178	0,542	0,594	0,612	0,556
3,04·10 <sup>-5</sup>	0,182	0,581	0,578	0,517	0,491
1,52·10 <sup>-5</sup>	0,181	0,569	0,577	0,518	0,527
7,61·10 <sup>-6</sup>	0,182	0,688	0,582	0,594	0,588
3,81·10 <sup>-6</sup>	0,195	0,655	0,588	0,659	0,603

**Tab. 8:** Hodnoty absorbancí získané ve 3. XTT testu. V tabulce jsou uvedeny hodnoty absorbancí získaných pro blank (čisté médium), kontrolu (neošetřenou buněčnou linii) a buněčnou linii ošetřenou uvedenými koncentracemi 5-FU.

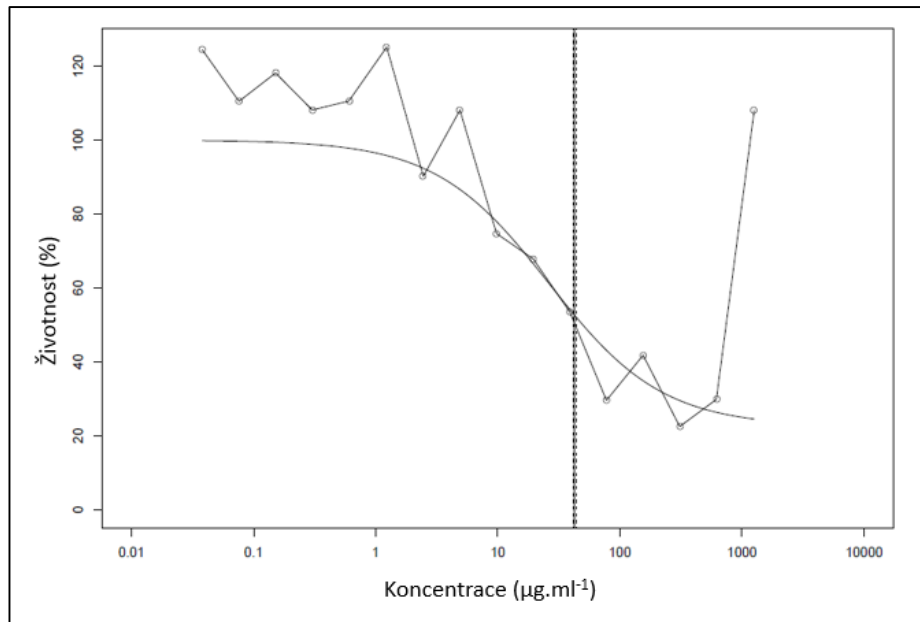
Koncentrace 5-FU v jamce (mg.ml <sup>-1</sup> )	Blank	Kontrola	5-FU		
1,25·10 <sup>-1</sup>	0,370	0,816	1,173	1,299	1,332
6,23·10 <sup>-2</sup>	0,430	1,534	0,556	0,563	0,552
3,12·10 <sup>-2</sup>	0,302	1,029	0,458	0,480	0,533
1,56·10 <sup>-2</sup>	0,397	1,175	0,643	0,681	0,673
7,79·10 <sup>-3</sup>	0,286	1,113	0,543	0,555	0,566
3,90·10 <sup>-3</sup>	0,379	1,309	0,770	0,770	0,776
1,95·10 <sup>-3</sup>	0,296	1,167	0,827	0,908	0,973
9,74·10 <sup>-4</sup>	0,394	1,205	0,980	0,949	0,966
4,87·10 <sup>-4</sup>	0,293	1,230	1,247	1,326	1,233
2,44·10 <sup>-4</sup>	0,400	1,122	1,052	1,134	1,132
1,22·10 <sup>-4</sup>	0,288	1,045	1,322	1,477	1,472
6,09·10 <sup>-5</sup>	0,386	1,267	1,312	1,253	1,308
3,04·10 <sup>-5</sup>	0,286	0,888	1,074	1,185	1,548
1,52·10 <sup>-5</sup>	0,407	1,398	1,378	1,367	1,335
7,61·10 <sup>-6</sup>	0,303	1,349	0,993	1,441	1,437
3,81·10 <sup>-6</sup>	0,462	1,477	1,376	1,601	1,274



**Obr. 12:** Grafické znázornění 1. XTT testu. Graf závislosti životnosti buněk na koncentraci 5-FU. Na ose X je zaznamenána koncentrace 5-FU, na ose Y je vynášena životnost buněk.



**Obr. 13:** Grafické znázornění 2. XTT testu. Graf závislosti životnosti buněk na koncentraci 5-FU. Na ose X je zaznamenána koncentrace 5-FU, na ose Y je vynášena životnost buněk.



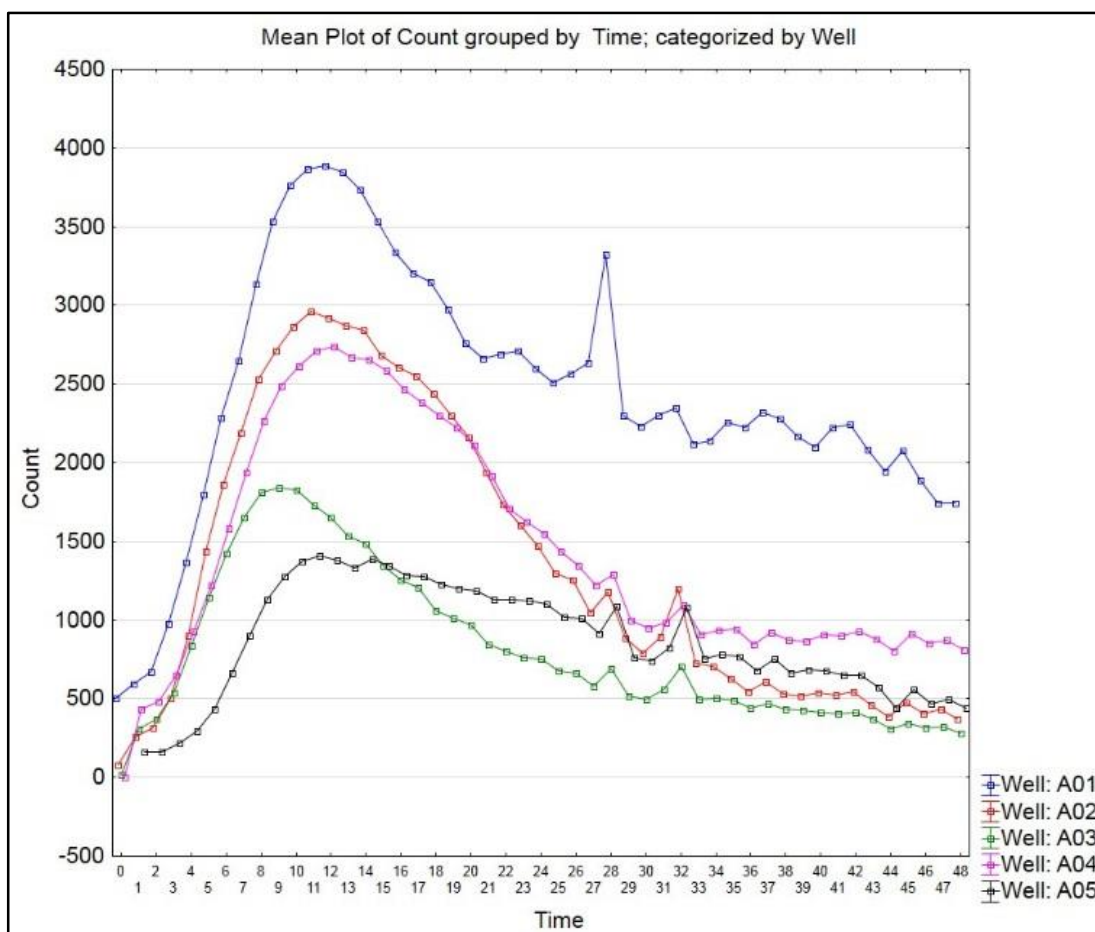
**Obr. 14:** Grafické znázornění 3. XTT testu. Graf závislosti životnosti buněk na koncentraci 5-FU. Na ose X je zaznamenána koncentrace 5-FU, na ose Y je vynášena životnost buněk.

**Tab. 9:** Stanovení IC<sub>50</sub> XTT testem. Hodnoty IC<sub>50</sub> a směrodatné odchylky (SD) pro všechny 3 opakování XTT testů.

	IC <sub>50</sub> (µg.ml <sup>-1</sup> )	SD(µg.ml <sup>-1</sup> )
1. XTT	14,256	0,162
2. XTT	12,794	0,205
3. XTT	42,462	0,283

## 4.2 Stanovení doby do apoptózy

Během 48 hodinové inkubace byla při hodinovém snímkování v přístroji CellVoyager cv700 získána data, které byla vyhodnocena programem Statistica. Výstupem tohoto programu je grafické znázornění uvedené na obr. 15.



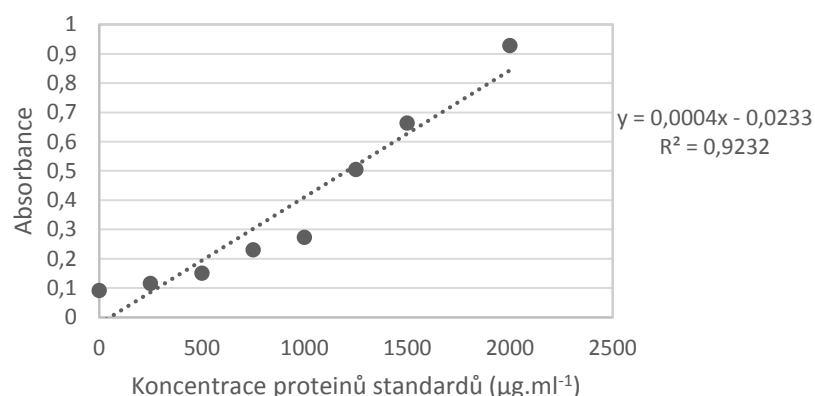
**Obr. 15:** Grafické znázornění stanovení doby do apoptózy. Modrá barva tedy jamka č. A01 znázorňuje kontrolu, tzn. neošetřené buňky. Červená a zelená barva, tedy jamky č. A02 a A03 byly buňky ošetřené cisplatinou a paclitaxelem, jejichž testování probíhalo zároveň s 5-FU. Růžová a černá barva, jamky č. A04 a A05 byly buňky ošetřené dvěma koncentracemi 5-FU. Růžová barva je 5-FU s konečnou koncentrací v jamce  $10 \times IC_{50}$   $121,62 \mu\text{g.ml}^{-1}$ , černá barva je 5-FU s konečnou koncentrací v jamce  $1 \times IC_{50}$   $12,16 \mu\text{g.ml}^{-1}$ .

### 4.3 Stanovení celkové koncentrace proteinů v buněčných lyzátech

Byla stanovena celková koncentrace proteinů odečtením hodnot absorbancí z kalibrační křivky. Hodnoty absorbancí lyzátů stanovených po lyzaci jsou zaznamenány v tab. 10. Kalibrační křivka pro toto stanovení je uvedena na obr. 16. Hodnoty absorbancí lyzátů stanovených po centrifugaci jsou zaznamenány v tab. 11. Kalibrační křivka pro toto stanovení je na obr. 17. Hodnoty koncentrací proteinů pro 1. opakování stanovené po lyzaci a po centrifugaci jsou v tab. 12. Hodnoty koncentrací proteinů pro 2. opakování stanovené po lyzaci a po centrifugaci jsou v tab. 13. Z hodnot celkové koncentrace proteinů byla vypočítána celková hmotnost proteinů. Hodnoty celkové hmotnosti proteinů u obou opakování lyzátů v závislosti na objemu lyzačního pufru jsou uvedeny v tab. 14. Pro lepší názornost byly k tabulkám vypracovány grafy. Graf srovnání celkové koncentrace proteinů u 1. opakování lyzátů před a po centrifugaci je na obr. 18. Graf srovnání celkové koncentrace proteinů u 2. opakování lyzátů před a po centrifugaci je na obr. 19. Graf srovnání celkové koncentrace proteinů u obou opakování lyzátů je na obr. 20. Graf závislosti celkové hmotnosti proteinů na objemu lyzačního pufru je na obr. 21.

**Tab. 10:** Tabulka absorbancí pro 1. a 2. opakování lyzátů stanovených po lyzaci. Vzorky jsou seřazeny podle použitého objemu lyzačního pufru.

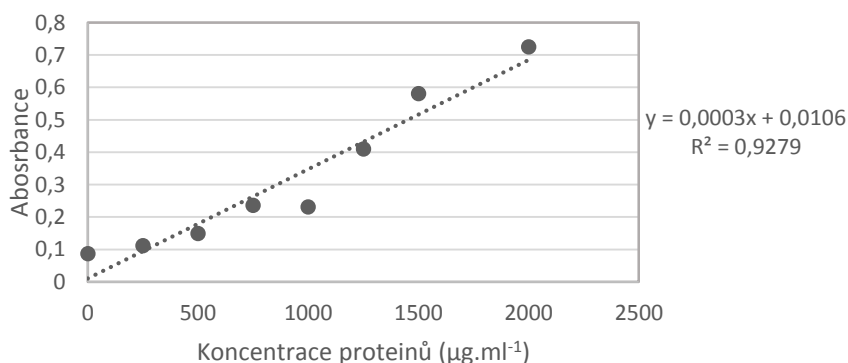
Objem lyzačního pufru ( $\mu$ l)	Absorbance 1. opakování			Absorbance 2. opakování		
150	0,541	0,600	0,639	0,792	0,769	0,724
200	0,292	0,533	0,318	0,652	0,683	0,577
400	0,286	0,296	0,278	0,352	0,347	0,302
600	0,592	0,271	0,610	0,372	0,348	0,333
800	0,412	0,219	0,672	0,376	0,335	0,363
1000	0,663	0,909	0,561	0,291	0,287	0,285
1200	0,296	0,387	0,263	0,247	0,249	0,241
1400	0,418	0,443	0,279	0,224	0,234	0,240
1600	0,282	0,275	0,261	0,222	0,203	0,230
1800	0,270	0,219	0,236	0,222	0,228	0,224
2000	0,244	0,228	0,225	0,224	0,218	0,223



**Obr. 16:** Kalibrační křivka pro stanovení celkové koncentrace proteinů po lyzaci. Na ose X je vynášena koncentrace proteinů u standardů ( $\mu\text{g.ml}^{-1}$ ) a na ose Y jsou vynášeny hodnoty absorbancí.

**Tab. 11:** Tabulka absorbancí pro 1. a 2. opakování lyzátů stanovených po centrifugaci. Vzorky jsou seřazeny podle použitého objemu lyzačního pufu.

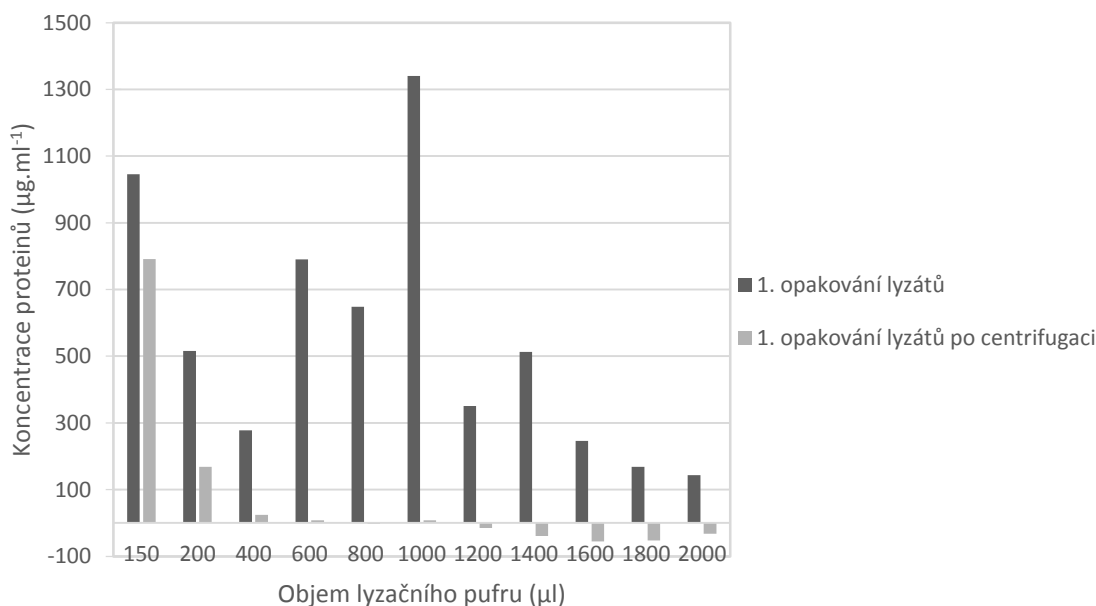
Objem lyzačního pufu ( $\mu\text{l}$ )	Absorbance 1. opakování			Absorbance 2. opakování		
150	0,372	0,532	0,417	0,244	0,272	0,216
200	0,263	0,248	0,249	0,240	0,223	0,215
400	0,206	0,211	0,212	0,204	0,203	0,190
600	0,199	0,206	0,211	0,200	0,197	0,192
800	0,202	0,204	0,200	0,194	0,209	0,198
1000	0,202	0,207	0,206	0,190	0,203	0,204
1200	0,201	0,193	0,199	0,186	0,195	0,194
1400	0,197	0,189	0,186	0,187	0,194	0,197
1600	0,197	0,183	0,178	0,184	0,196	0,197
1800	0,195	0,191	0,174	0,189	0,195	0,199
2000	0,197	0,194	0,187	0,193	0,190	0,196



**Obr. 17:** Kalibrační křivka pro stanovení celkové koncentrace proteinů po centrifugaci. Na ose X je vynášena koncentrace proteinů u standardů ( $\mu\text{g.ml}^{-1}$ ) a na ose Y jsou vynášeny hodnoty absorbancí.

**Tab. 12:** Stanovení celkové koncentrace proteinů u 1. opakování lyzátů před i po centrifugaci. Vzorky jsou seřazeny podle použitého objemu lyzačního pufru.

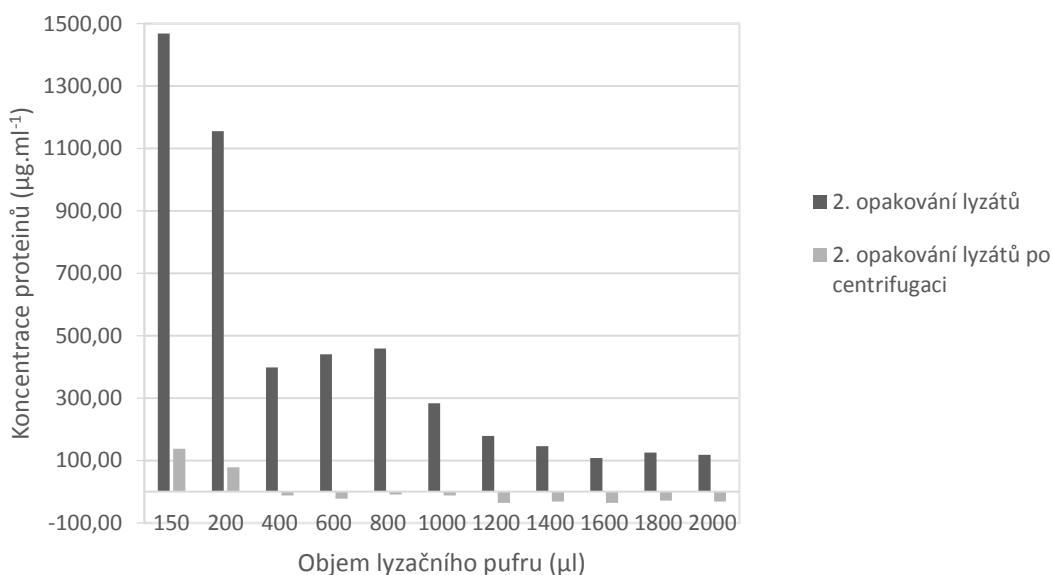
Objem lyzačního pufru ( $\mu\text{l}$ )	Koncentrace proteinů ( $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ )	SD ( $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ )	Koncentrace proteinů po centrifugaci ( $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ )	SD ( $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ )
150	1046,58	95,77	791,33	187,64
200	515,75	276,53	168,00	26,28
400	279,92	27,56	24,67	4,91
600	790,75	382,03	8,00	11,63
800	649,08	454,72	-2,00	6,24
1000	1340,75	373,71	8,00	2,36
1200	351,58	139,56	-15,33	16,72
1400	513,25	189,55	-38,67	17,37
1600	244,92	29,74	-55,33	25,42
1800	167,42	52,49	-52,00	12,10
2000	144,08	25,52	-32,00	10,80



**Obr. 18:** Graf srovnání stanovení celkové koncentrace proteinů metodou Pierce 660 nm u 1. opakování lyzátů před a po centrifugaci. Graf znázorňuje závislost koncentrace proteinů na objemu lyzačního pufru. Na ose X je vynášén objem lyzačního pufru ( $\mu\text{l}$ ), na ose Y je vynášena koncentrace proteinů ( $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ).

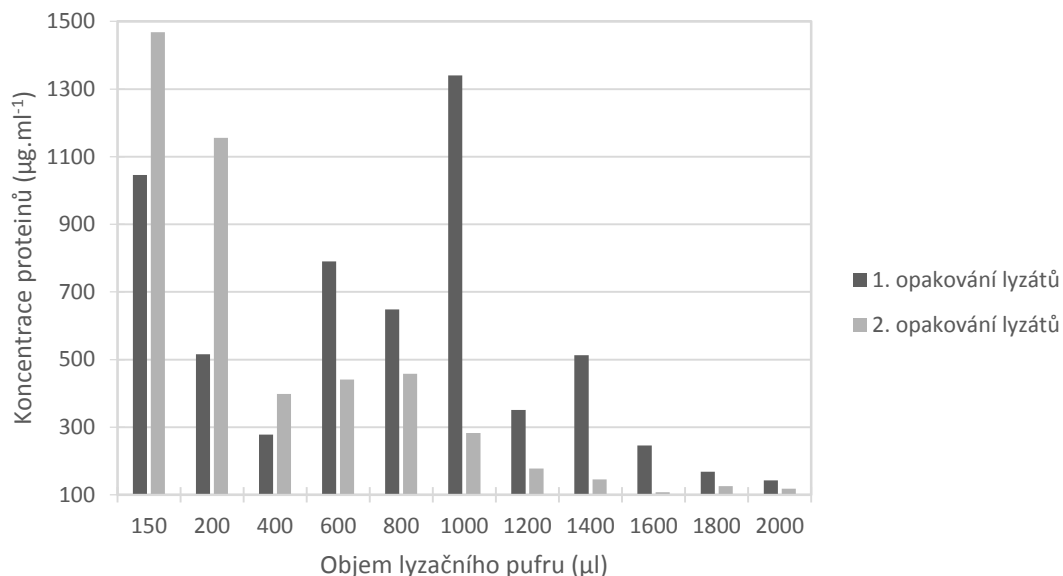
**Tab. 13:** Stanovení celkové koncentrace proteinů u 2. opakování lyzátů před i po centrifugaci. Vzorky jsou seřazeny podle použitého objemu lyzačního pufru.

Objem lyzačního pufru ( $\mu\text{l}$ )	Koncentrace proteinů ( $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ )	SD ( $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ )	Koncentrace proteinů po centrifugaci ( $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ )	SD ( $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ )
150	1467,44	78,15	138,00	72,47
200	1156,61	120,62	78,00	40,64
400	397,44	64,87	-12,00	23,25
600	440,78	45,97	-20,89	15,95
800	458,25	38,78	-7,56	13,43
1000	282,42	13,59	-12,00	15,15
1200	177,42	17,83	-36,44	6,85
1400	144,92	13,89	-33,11	10,30
1600	109,08	20,14	-34,22	13,70
1800	124,92	13,59	-27,56	11,00
2000	117,42	7,17	-32,00	14,14



**Obr. 19:** Graf srovnání stanovení celkové koncentrace proteinů metodou Pierce 660 nm u 2. opakování lyzátů před a po centrifugaci. Graf znázorňuje závislost koncentrace proteinů na objemu lyzačního pufru. Na ose X je vynášen objem lyzačního pufru ( $\mu\text{l}$ ), na ose Y je vynášena koncentrace proteinů ( $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ).

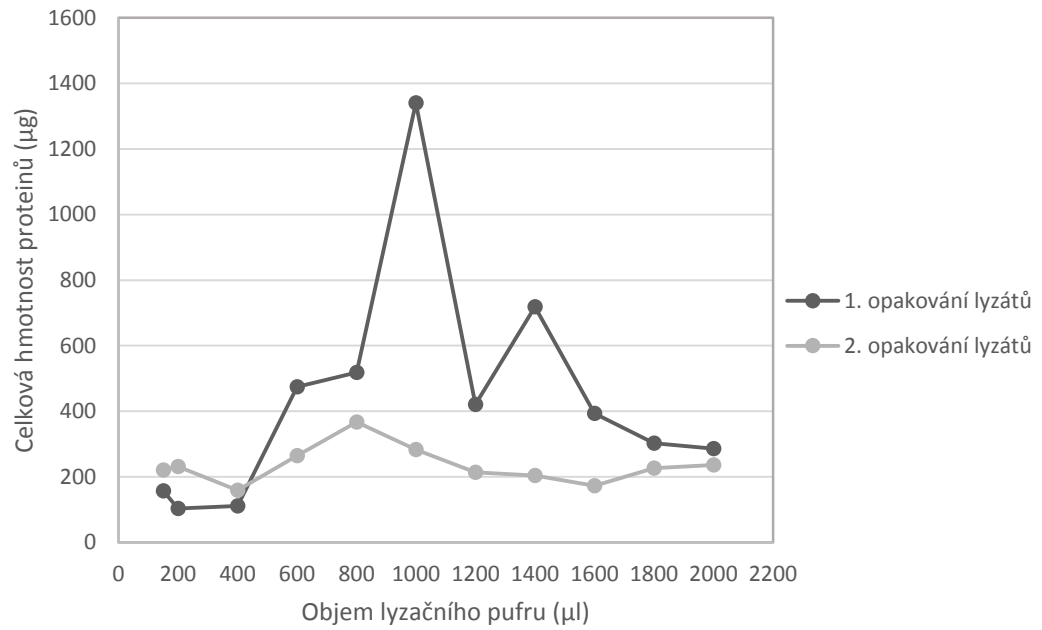




**Obr. 20:** Graf srovnání stanovení celkové koncentrace proteinů metodou Pierce 660 nm u 1. a 2. opakování lyzátů. Graf znázorňuje závislost koncentrace proteinů na objemu lyzačního pufu. Na ose X je vynášen objem lyzačního pufu (µl), na ose Y je vynášena koncentrace proteinů (µg.ml<sup>-1</sup>).

**Tab. 14:** Tabulka zjištěných celkových hmotností proteinů v 1. a 2. opakování lyzátů v závislosti na použitém objemu pufu.

Objem lyzačního pufu (µl)	Celková hmotnost proteinů (µg)			
	1. opakování lyzátů	SD (µg)	2. opakování lyzátů	SD (µg)
150	156,99	14,37	220,12	11,72
200	103,15	55,31	231,32	24,12
400	111,97	11,03	158,98	25,95
600	474,45	229,22	264,47	27,57
800	519,27	363,78	366,60	31,03
1000	1340,75	373,71	282,42	13,59
1200	421,90	167,47	212,90	21,40
1400	718,55	265,37	202,88	19,45
1600	391,87	47,59	174,53	32,22
1800	301,35	94,49	224,85	24,46
2000	288,17	51,04	234,83	14,34



**Obr. 21:** Graf závislosti celkové hmotnosti proteinů na objemu lyzačního pufru. Na ose X je vynášen objem lyzačního pufru (µl), na ose Y je vynášena celková hmotnost proteinů v lyzátech (µg).

## 5 Diskuze

Při stanovení  $IC_{50}$  bylo dosaženo konzistentních výsledků v 1. a 2. opakování. Výsledky 3. opakování jsou bohužel odlehlé a je proto nutné je vyloučit z analýzy. Odlehlost těchto výsledků pravděpodobně byla způsobena chybným pipetováním použitých přístrojů. Výsledky 1. a 2. opakování byly zprůměrovány a tím stanovena hodnota  $IC_{50}$  5-FU na buněčné linii CCRF-CEM. Při použití MTT testu byla stanovena  $IC_{50}$  12,162  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Použitím XTT testu byla stanovena  $IC_{50}$  13,525  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ .

Hodnota  $IC_{50}$  je v literatuře popisována jen pro jiné linie. Jako příklad je uvedena hodnota  $IC_{50}$  1,68  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  u buněčné linie SW480 (Wong a kolektiv, 2007). Stanovení hodnoty  $IC_{50}$  5-FU pro buněčnou linii CCRF-CEM bylo již dříve provedeno v rámci Laboratoře Experimentální medicíny. Na tom to pracovišti byla MTT testem stanovena hodnota  $IC_{50}$  158,70  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  a XTT testem 67,90  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  (Janošťáková, 2014). Rozdíly mezi hodnotami naměřenými v této práci a práci Janošťákové mohou být způsobeny odlišným experimentálním uspořádáním, kdy Janošťáková využila 96 jamkové desky s pouze 6 koncentracemi léčiva.

Při stanovování doby do apoptózy byl proveden jen pilotní experiment, který nebylo z časových a technických důvodů možné opakovat. Během řešení stanovení doby do apoptózy se vyskytly technické problémy s přístrojem CellVoyager cv7000. Z toho experimentu nelze získat konkrétní data, jelikož kontrolní vzorek (neošetřená buněčná linie CCRF-CEM) vykazuje nejvyšší apoptickou aktivitu. Toto mohlo nastat v důsledku snímkování výřezu z jamky, čímž nebyla zachycena chemotaxe buněčné linie. Pro získání výsledků je nutná další optimalizace, která je plánována na diplomovou práci.

V optimalizaci lyzačního protokolu byla využita metoda Pierce 660 nm, která jako jediná je schopna detekovat proteiny i v prostředí až 5% SDS. Před centrifugací byl stanoven obsah proteinů odpovídající předpokládaným koncentracím, stanovení bohužel interferovaly pevné částice v lyzátu. Centrifugací došlo k odstranění pevných částic, zároveň, ale také i k významnému snížení celkové koncentrace proteinů. V rámci diplomové práce budou zkoumány příčiny tohoto jevu, případně vyzkoušen vhodnější lyzační protokol.

## 6 Závěr

V teoretické části byla zpracována literární rešerše na téma biologický účinek 5-fluorouracilu a jeho klinické využití. Rešerše shrnuje publikované poznatky o léčebných aplikacích 5-fluorouracilu. Dále se zabývá jeho mechanismem účinku na DNA a RNA, úpravou účinku použitím kombinované léčby a rezistencí na 5-fluorouracil. Součástí rešerše je i teoretický úvod k metodám užitým v experimentální části. V tomto úvodu je vysvětlen význam přípravy vzorků pro proteomickou analýzu.

V experimentální části byla MTT a XTT testem stanovena hodnota  $IC_{50}$ . Tato stanovená hodnota byla použita při ošetření buněk a stanovení jejich doby do apoptózy. Z časových a technických důvodů bohužel v tomto experimentu nebyla získána data, ze kterých by bylo možné stanovit dobu do apoptózy. Posledním experimentem byla optimalizace FASP lyzačního protokolu. Po lyzaci byla stanovena celková koncentrace proteinů a z toho vypočítána celková hmotnost proteinů v buněčných lyzátech. Předpokladem bylo, že optimální objem buněčného pufru bude mít největší koncentraci proteinů a tím i jejich největší obsah. Stanovení koncentrace proteinů interferovali pevné částice ve vzorku, a proto nebylo možné spolehlivě určit optimální objem lyzačního pufru.

V diplomové práci je plánováno pokračovat ve stanovení doby do apoptózy. V tomto experimentu je nutno provést více opakování a vyřešit problém s chemotaxí ošetřených buněk. V rámci diplomové práce bude pokračováno i v optimalizaci lyzačního protokolu. Bude snaha stanovit optimální lyzační objem, či zavést vhodnější protokol. Vzorky připravené podle optimalizovaných podmínek budou užity pro proteomické profilování 5-fluorouracilem ošetřené buněčné linie CCRF-CEM.

## Seznam literatury

- AZZONI C, BOTTARELLI L, CECCHINI S, ZICCARELLI A, CAMPANINI N, BORDI C, SARLI L, SILINI EM. (2014) Role of topoisomerase I and thymidylate synthase expression in sporadic colorectal cancer: Associations with clinicopathological and molecular features. *Phatology – reaserch and practice*, 210, 111 – 117.
- BELT EJT, STOCKMANN HBAC, DELIS-VAN DIEMEN PM, BRIL H, TIJSSEN M, VAN ESSEN HF, HEYMANS MW, BELIEN JAM, CARVALHO B, CILESSSEN SAGM, MEIJER GA. (2014) Expression of apoptosis regulating proteins identifies stage II and III colon cancer patients with high risk of recurrence. *Journal of Surgical Oncology*, 109:3, 255 – 265.
- BERRIDGE MV, HERST PM, TAN AS. (2005) Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction. *Biotechnology annauel review*, 11, 127 – 152.
- BHALLA A, ZULFIGAR M, WEINDEL M, SHIDHAM VB. (2013) Molecular Diagnostics in Colorectal Carcinoma. *Clinics Laboratory Medicine*, 33:4, 835 – 859.
- BILLAN S, KAIDAR-PERSON O, ATRASH F, DOWECK I, HAIM N, KUTEN A, RONEN O. (2013) Toxicity of induction chemotherapy with docetaxel, cisplatin and 5-fluorouracil for advanced head and neck cancer. *Israel Medical Association Journal*, 15, 299 – 303.
- BLUMENTHAL RD, GOLDENBERG DV. (2007) Methods and Goals for the Use of In Vitro And In Vivo Chemosensitivity Testing. *Molecular biotechnology*, 35, 185 – 197.
- CAPITAIN O, ASEVOAIA A, BOISDRON-CELLE M, POIRIER AL, MOREL A, GAMELIN E. (2012) Individual fluorouracil dose adjustment in FOLFOX based on pharmacokinetic follow-up compared with conventional body-area-surface dosing: A phase II, proof-of-concept study. *Clinical colorectal cancer*, 11:4, 263 – 267.
- CARTWRIGHT TH. (2012) Treatment decisions after diagnosis of metastatic colorectal cancer. *Clinical colorectal cancer*, 11:3, 155 – 166.
- CEILLEY RI (2012) Mechanisms of action of topical 5-fluorouracil: review and implications for treatment of dermatological disorders. *Journal of dermatological treatment*, 23, 83 – 89.
- CEN H, MAO F, ARONCHIK I, FUENTES R, FIRESTONE GL. (2008) DEVD-NucView488: a novel class of enzyme substrates for real-time detection of caspase-3 activity in live cells. *The Faseb journal*, 22, 2243 – 2252.
- COUTINHO AK, PROLLA G, WESCHENFELDER R. (2013) BRAF, KRAS, and phosphatidylinositol 3-kinase in the management of metastatic colorectal cancer. *Curr Colorectal Cancer Rep*, 9, 57 – 67.
- CURRERI AR, ANSFIELD FJ, McIVER FA, WAISMAN HA, HEIDELBERGER C. (1958) Clinical studies with 5-fluorouracil. *Cancer Res*. 18 (4), 478 – 484.
- DAVIES JM, GOLDBERG RM. (2011) treatment of metastatic colorectal cancer. *Seminars in Oncology*, 38:4, 552 – 560.

- DEBOEVER G, HILTROP N, COOL M, LAMBRECHT G. (2013) Alternative treatment options in colorectal cancer patients with 5-fluorouracil- or capecitabine-induced cardiotoxicity. *Clinical colorectal cancer*, 12:1, 8 – 14.
- DEVAUD N, GALLINGER S. (2013) Chemotherapy of MMR-deficient colorectal cancer. *Familial Cancer*, 12:2, 301 – 306.
- DOUILLARD JY, ZEMELKA T, FOUNTZILAS G, BARONE C, SCHLICHTING M, HEIGWAY J, EGGLETON SP, SRIMUNINNIMIT V. (2014) FOLFOX4 with cetuximab vs. UFOX with cetuximab as first-line therapy in metastatic colorectal cancer: the randomized phase II future study. *Clinical colorectal cancer*, 13:1, 14 – 26.
- GE L, WANG HJ, YIN D, LEI C, ZHU JF, CAI XH, ZHANG GQ. (2012) Effectiveness of 5-fluorouracil-based neoadjuvant chemotherapy in locally-advanced gastric/gastroesophageal cancer: A meta-analysis. *World journal of gastroenterology*, 28, 7384 – 7393.
- GOEL G, LEE JJ. (2014) Pharmacokinetically guided dose adjustment of 5-FU – A critical element toward personalized medicine. *Clinical colorectal cancer*, 13, 1 – 2.
- GUSTAVSSON M, RONNE H. (2008) Evidence that tRNA modifying enzymes are important in vivo targets for 5-fluorouracil in yeast. *RNA* 14, 666 – 674.
- HAMEED H, CASSIDY J. (2011) Use of capecitabine in management of early colon cancer. *Cancer management and reaserch*, 3, 295 – 299.
- HEIDELBERGER C, ANSFLIED FJ. (1963) Experimental and clinical use of fluorinated pyrimidines in cancer chemotrapy. *Cancer res.* 23, 1226 – 1243.
- HEIDELBERGER C. (1970) Chemical carcinogenesis, chemotherapy: Cancer's continuing core challenges – G. H. A. Clowes memorial lecture. *Cancer res.* 30, 1549 – 1569
- HEIDELBERGER CH, CHAUDRI NK, DANNEBERG P, DOROTHY M, GRIESBACH L, DUSCHINSKY R, SCHNITZER RJ, PLEVEN E, SCHEINER J. (1957) Fluorinated pyrimidines, a new class of tumour-inhibitory compounds. *Nature*, 179:4561, 663 – 666.
- HOSKINS J, BUTLER JS. (2008) RNA-based 5-fluorouracil toxicity requires the pseudouridylation activity of Cbf5p. *Genetics* 179, 323 – 330.
- HSIEH CH, HOU ML, CHIANG MH, TAI HG, TIEN HJ, WANG LY, TSAI TH, CHEN YJ. (2013) Head and neck irradiation modulates pharmacokinetics of 5-fluorouracil and cisplatin. *Journal of translational medicine*, 11:213.
- CHENG YD, YANG H, CHEN GQ, ZHANG ZC. (2013) Molecularly targeted drugs for metastatic colorectal cancer. *Drug design, development and therapy*, 7, 1315 – 1322.
- CHU E. (2007) Clinical colorectal cancer: „Ode to 5-fluorouracil“. *Clinical colorectal cancer*, 6, 609.

Incidence zhoubných novotvarů v ČR v roce 2010 (vydané 18. 3. 2013). Ústav zdravotnických informací a statistiky České republiky. <http://www.uzis.cz/rychle-informace/zhoubne-nadory-roce-2010>; staženo 20. 7. 2014.

JANOŠŤÁKOVÁ A. (2014) Srovnání metod vhodných ke stanovení cytotoxického účinku na vybraných buněčných liniích. *Vysoká škola zdravotnictva a sociálnej práce sv. Alžbety*.

JUIN P, GENESTE O, GAUTIER F, DEPIL S, CAMPONE M. (2013) Decoding and unlocking the BCL-2 dependency of cancer cells. *Nature reviews cancer*,13, 455 – 465.

KLINE CLB, EL-DIERY WS. (2013) Personalizing colon cancer therapeutics: Targeting old and new mechanism of action. *Pharmaceuticals* 6, 988 – 1038.

KONINGS IRHM, SLEIJFER S, MATHIJSEN RHJ, DE BRUIJIN P, MOGHADDAM-HELMANTEL IMG, VAN DAM LM, WIEMER EAC, VERWEIJ J, LOOS WJ. (2011) Increasing tumoral 5-fluorouracil concentrations during a 5-day continuous infusion: a microdialysis study. *Cancer chemother pharmacol*, 67, 1055 – 1062.

LI LS, MORALES JC, VEIGEL M, SEDWICK D, GREER S, MEYERS M, WAGNER M, FISHEL R, BOOTHMAN DA. (2009) DNA mismatch repair (MMR)-dependent 5-fluorouracil cytotoxicity and the potential for new therapeutic targets. *British Journal of Pharmacology* 158, 679 – 692.

LONGLEY DB, HARKIN DP, JOHNSTON PG. (2003) 5-fluorouracil: Mechanisms of action and clinical strategies. *Nat. Rev. Cancer* 3, 330 – 338.

LONGLEY DB, JOHNSTON PG. (2005) Molecular mechanisms of drug resistance. *Journal of Pathology*, 205, 275 – 292.

MCLEOD HL, SLUDDEN J, HARDY SC, LOCK RE, HAWKSWORTH GM, CASSIDY J. (1998) Autoregulation of 5-fluorouracil metabolism. *Eur. J. Cancer* 34, 1623 – 1627.

MIURA K, KINOUCI M, ISHIDA K, FUJIBUCHI W, NAITOH T, OGAWA H, ANDO T, YAZAKI N, WATANABE K, HANEDA S, SHIBATA C, SASAKI I. (2010) 5-fluorouracil metabolism in cancer and orally-administrable 5-FU drugs. *Cancers* 2, 1717 – 1730.

MOJARDIN L, BOTET J, QUINTALES L, MORENO S, SALAS M. (2013) New insights into the RNA-based mechanism of action of the anticancer drug 5'-fluorouracil in eukaryotic cells. *PLoS One* 8(11), e78172.

MONTAGNANI F, CHIRIATTI A, TURRISI G, FRANCINI G, FIORENTINI G. (2011) A systematic review of FOLFOXIRI chemotherapy for the first-line treatment of metastatic colorectal cancer: improved efficacy at the cost of increased toxicity. *Colorectal diseases*, 13, 846 – 854.

MOURNIER-BOUTOILLE H, BOISDRON-CELLE M, CAUCHIN E, GALMICHE JP, MOREL A, GAMELIN E, MATYSIAK-BUDNIK T. (2010) Lethal outcome of 5-fluorouracil infusion in a patient with a total DPD deficiency and a double DPYD and UTG1A1 gene mutation. *British Journal of Clinical Pharmacology* 70, 280 – 283.

NAGANO H, KOBAYASHI S, MARUBASHI S, WADA H, EGUCHI H, TANEMURA M, TOMIMARU Y, UMESHITA K, DOKI Y, MORI M. (2013) Combined INF- $\alpha$  and 5-FU treatment as a postoperative adjuvant following surgery for hepatocellular carcinoma with portal venous tumor thrombus. *Experimental and therapeutic medicine*, 5, 3 – 10.

OKI E, EMI Y, AKAGI Y, TOKUNAGA S, SADANAGA N, TANAKA T, OGATA Y, SAEKI H, KAKEJI Y, BABA H, NISHIMAKI T, NATSUGOE S, SHIROUZU K, MAEHARA Y, KYUSHU STUDY GROUP OF CLINICAL CANCER. (2013) Phase II trial of alternating mFOLFOX6 and FOLFIRI regimens in the first-line treatment for unresectable or metastatic colorectal cancer (KSCC0701). *Oncology*, 84, 233 – 239.

PAPANASTASOPOULOS P, STEBBING J. (2014) Molecular Basis of 5-Fluorouracil-related Toxicity: Lessons from Clinical Practice. *Anticancer research*, 34, 1531 – 1536.

PARKER WB, CHENG YC. (1990) Metabolism and mechanism of action of 5-fluorouracil. *Pharmac. Ther.* 48, 381 – 395.

PETRELLI F, BORGONOVO K, CABIDDU M, GHILARDI M, LONATI V, MASPERO F, SAUTA MG, BERETTA GM, BARNI S. (2013) FOLFIRI-Bevacizumab as first-line chemotherapy in 3500 patients with advanced colorectal cancer: a pooled analysis of 29 published trials. *Clinical colorectal cancer*, 12:3, 145 – 151.

PETTERSEN HS, VISNES T, VAGBO CB, SVAASAND EK, DOSETH B, SLUPPHAUG G, KAVLI B, KROKAN H. (2011) UNG-initiated base excision repair is the major repair route for 5-fluorouracil in DNA, but 5-fluorouracil cytotoxicity depends mainly on RNA incorporation. *Nucleic Acids research*, 39(19), 8430 – 8444.

Prezentace Apoptóza: Metody detekce od autorů Součka a Vaculové. [https://clip.lf2.cuni.cz/userfiles/minikurz\\_apoptoza\\_08.pdf](https://clip.lf2.cuni.cz/userfiles/minikurz_apoptoza_08.pdf); staženo 25. 7. 2014.

RAFTERY L, GOLDBERG RM. (2010) Optimal delivery of cytotoxic chemotherapy for colon cancer. *The Cancer Journal*, 16:3, 214 – 219.

RISS TL, MORAVEC RA, NILES AL, BENINK HA, WORZELLA TJ, MINOR L. (2013) Cell Viability Assays. *Assay Guidance Manual*, 1 – 23.

SCUDIERO DA, SHOEMAKER RH, PAULL KD, MONKS A, TIERNEY S, NOFZINGER TH, CURRENS MJ, SENIFF D, BOYD MR. (1988) Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer research*, 48, 4827 – 4833.

SHIMIZU T, MURATA S, SONODA H, MEKATA E, OHTA H, TAKEBAYASHI K, MIYAKE T, TANI T. (2014) Hyperthermic intraperitoneal chemotherapy with mitomycin C and 5-fluorouracil in patients at high risk of peritoneal metastasis from colorectal cancer: A preliminary clinical study. *Molecular and clinical oncology*, 2, 399 – 404.



SHINODA M, ANDO T, EL-OMAR EM, TAKASHI H, SUZUKI T, MURAYAMA M, MORISE K, GOTO H. (2012) Programmed chemotherapy for patients with metastatic unresectable gastric cancer. *PLoS One*, 7:6, e38652.

SHOWALTER SL, SHOWALTER TN, WITKIEWICZ A, HAVENS R, KENNEDY EP, HUCL T, KERN SE, YEO CJ, BRODY JR. (2008) Evaluating the drug-target relationship between thymidylate synthase expression and tumor response to 5-fluorouracil: Is it time to move forward? *Cancer Biology and Therapy*, 7:7, 986 – 994.

Souhrn údajů o přípravku sp.zn.: sukls33281/2013 (vydané 18. 9. 2013). Státní ústav pro kontrolu léčiv.

<http://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?code=0056055&tab=texts>; staženo 20. 7. 2014.

Srovnání epidemiologie kolorektálního karcinomu v České republice se zahraničím.

Epidemiologie zhoubných nádorů v České republice.

[http://www.svod.cz/analysez.php?modul=zahranici&diag=C18\\_C21&zobrazeni=graf&vypocet=c&pohl=a](http://www.svod.cz/analysez.php?modul=zahranici&diag=C18_C21&zobrazeni=graf&vypocet=c&pohl=a); staženo 25. 7. 2014.

VAN DER VELDT AAM, LAMMERTSMA AA, SMIT EF. (2012) Scheduling of anticancer drug: Timing may be everything. *Cell cycle*, 11:23, 1 – 5.

WILLIAMS KL, GOOLEYB, AA, WILKINSC MR, PACKERD NH. (2014) A Sydney proteome story. *Journal of Proteomics*, 107, 13 – 23.

WIŚNIEWSKY JR, ZOUGMAN A, NAGARAJ N, MANN M. (2009) Universal sample preparation method for proteome analysis. *Natures methods*, 6:5, 359 – 363.

WONG CSCH, WONG VWK, CHAN CHML, MA BBY, HUI EP, WONG MCHK, LAM MYY, AU TCHCH, CHAN WH, CHEUK W, CHAN ATCH. (2008) Identification of 5-fluorouracil response proteins in colorectal carcinoma cell line SW480 by two-dimensional electrophoresis and MALDI-TOF mass spectrometry. *Oncology reports*, 20, 89 – 98.

ZHANG N, JIN Y, XU SJ, CHEN WS. (2008) 5-Fluorouracil: Mechanisms of Resistance and Reversal Strategies. *Molecules*, 13, 1551 – 1569.

ZHAO X, YU YT. (2007) Incorporation of 5-fluorouracil into U2 snRNA blocks pseudouridylation and pre-mRNA splicing in vivo. *Nucleic Acids research* 35(2), 350 – 358.

ZHU Y, XU L, FAN Y, LI C, ZHANG Y, ZHENG H, HOU K, QU X, LIU Y. (2013) Interferon- $\alpha$  enhances 5-deoxy-5-fluorouridine-induced apoptosis by ERK-dependant upregulation of thymidine phosphorylase. *BioMed reaserch international*, 13, 8 pages, article ID 132793.

## Seznam zkratek

5-FU	5-fluorouracil
BER	bázová exisní oprava
	body-surface-area, dávkování podle tělesného povrchu
BSA	
dATP	deoxy-adenosintrifosfát
DHFU	5,6-dihydro-5-fluorouracil
DPD	dihydropyrimidindehydrogenasa
dTMP	deoxy-thymidinmonofosfát
dTTP	deoxy-thymidintrifosfát
dUMP	deoxy-uridinmonofosfát
dUTP	deoxy-uridintrifosfát
FASP	filter-aided sample preparation
FdUDP	fluoro-deoxy-uridindifosfát
FdUMP	fluoro-deoxy-uridinmonofosfát
FdUrd	5-fluoro-2-deoxyuridin
FdUTP	fluoro-deoxy-uridintrifosfát
FUDP	fluoro-uridinfosfát
FUMP	fluoro-uridinmonofosfát
FUrd	fluorouridin
FUTP	fluoro-uridintrifosfát
GIT	gastrointestinální trakt
IC <sub>50</sub>	half maximal inhibitory concentration
INF	interferon
INF- $\alpha$	interferon $\alpha$
LV	leucovorin
mAb	monoklonální protilátka
mCRC	metastatický kolorektální karcinom
	Oprava chybného párování bází řízená methylací
MMR	
	3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difeny-
MTT	tetrazolium bromid
N5,N10-methylen-THF	N5,N10-methylentetrahydrofolát
OPRT	ororátfosforibosyltransferasa
PDK-1	3-fosfoinozimid-dependetní kinasa 1
PIK3	fosfatidylinozitol-3-kinasa
PIP3	fosfatidylinozitol-3,4,5-trifosfátu
PRPP	fosforibosylpyrofosfát
rR	ribonukleotidreduktasa
TK	thymidinkinasa
TopI	topoisomerasa I
TP	thymidinofosforylasa
TS	thymidylátsynthasa
UK	uridinkinasa
UP	uridinfosforylasa

VEFG-A

vascular endothelial growth factor  
2,3bis-[2-methoxy-4-nitro-5-sulfofenyl]-  
2H-tetrazolium-5-carboxy anilid

XTT