

UNIVERZITA KARLOVA

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

DIPLOMOVÁ PRÁCA

2020

Zuzana Miškovčiková

UNIVERZITA KARLOVA

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie



**STANOVENIE ORGÁNOVEJ TOXICITY BRAF INHIBÍTOROV
*IN VITRO***

Diplomová práca

Vedúci diplomovej práce: RNDr. Jana Maixnerová, PhD.

Hradec Králové 2020

Zuzana Miškovčíková

„Prehlasujem, že táto práca je mojím pôvodným autorským dielom. Všetka literatúra a ďalšie zdroje, z ktorých som pri spracovávaní čerpala, sú uvedené v zozname použitej literatúry a v práci sú riadne citované. Táto práca nebola použitá k získaniu iného či rovnakého titulu.“

Zuzana Miškovčíková

Na tomto mieste by som sa chcela poďakovať všetkým, vďaka ktorým mohla táto diplomová práca vzniknúť. V prvom rade ďakujem mojej školiteľke, RNDr. Jane Maixnerovej, PhD., za cenné rady, odbornú pomoc a ochotu, s ktorou sa mi venovala pri vypracovávaní tejto diplomovej práce.

Moje poďakovanie patrí aj rodine a priateľom za ich podporu počas celého štúdia.

V neposlednom rade ďakujem pedagogickým pracovníkom Farmaceutickej fakulty Univerzity Karlovej v Hradci Králové za vedomosti, ktoré som vďaka nim mohla nadobudnúť počas celého štúdia na univerzite.

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakológie a toxikológie

Študentka: Zuzana Miškovčíková

Školiteľ: RNDr. Jana Maixnerová, PhD.

Názov diplomovej práce: Stanovenie orgánovej toxicity BRAF inhibítorov *in vitro*.

Malígný melanóm je jedným z najzávažnejších kožných ochorení v dnešnej dobe. Liečba pokročilých štádií melanómu je náročná a často neúčinná. BRAF inhibítory (dabrafenib a vemurafenib) v posledných rokoch dramaticky zmenili výsledky liečby melanómu. Sú to jedny z najúčinnějších liečiv proti melanómu, ich klinická aplikácia je však do značnej miery obmedzená rezistenciou na liečivá. V prístupných klinických štúdiách sa objavuje nežiaduci nefrotoxický účinok BRAF inhibítorov, ale informácie o jeho mechanizme sú obmedzené. V publikovaných štúdiách sa naznačuje, že toxický účinok BRAF inhibítorov je primárne zameraný na podocyty lokalizované v glomerulárnej membráne. Preto bolo cieľom našej práce posúdiť cytotoxický účinok BRAF inhibítorov na vybrané modelové renálne bunky *in vitro* so zámerom potvrdiť renálny cieľ toxicity. Hlavným cieľom štúdie bolo analyzovať, či je nefrotoxický účinok BRAF inhibítorov špecificky obmedzený len na podocyty, alebo môže poškodiť aj iné renálne bunky. Pokusy prebiehali na ľudských bunkových líniiach, predstavujúcich rôzne typy obličkových buniek (PODO/TERT256, HK-2), a tiež aj na štandardnej pečenej bunkovej línii HepG2, ktorá slúžila ako komparátor. Ako porovnávacie toxíny boli použité amfotericín B a paracetamol. Na meranie metabolickej aktivity buniek bola použitá kolorimetrická metóda. Na porovnanie boli použité hodnoty IC_{50} stanovené analýzou inhibičných kriviek.

Zistené experimentálne dáta ukázali porovnateľný toxický účinok oboch testovaných BRAF inhibítorov na všetky tri použité bunkové línie. Vemurafenib však vykazoval podstatne vyššiu toxicitu v porovnaní s dabrafenibom. *In vitro* toxicita vemurafenibu v podocytoch bola dokonca silnejšia než toxicita známych renálnych toxínov amfotericínu B. Výsledky môžu naznačovať, že toxické poškodenie obličiek spôsobené liečbou BRAF inhibítormi zahŕňa nielen podocyty, ale aj iné druhy obličkových buniek, vrátane buniek renálnych tubulov.

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacology & Toxicology

Student: Zuzana Miškovčiková

Supervisor: RNDr. Jana Maixnerová, PhD.

Title of diploma thesis: Determination of organ toxicity of BRAF inhibitors *in vitro*.

Malignant melanoma is one of the most serious skin diseases today. Therapy of advanced melanoma is difficult and often ineffective. BRAF inhibitors (dabrafenib and vemurafenib) have dramatically changed the results of melanoma treatment in the last few years. BRAF inhibitors are one of the most effective drugs against melanoma, but their clinical application is largely limited by drug resistance. Available clinical studies have shown an adverse nephrotoxic effect of BRAF inhibitors, but information on its mechanism is limited. Published studies further suggest that the toxic effect of BRAF inhibitors is primarily directed to podocytes located in the glomerular membrane. Thus, the aim of our study was to assess the cytotoxic effect of BRAF inhibitors on selected model renal cells *in vitro* in order to confirm the renal target toxicity. The main objective of the study was to analyse whether the nephrotoxic effect of BRAF inhibitors is specifically limited to podocytes or whether it can damage other renal cells. The experiments were performed on human cell lines representing different types of kidney cells (PODO/TERT256, HK-2) as well as on the standard liver cell line HepG2, which served as a comparator. Amphotericin B and paracetamol were used as reference toxins. A colorimetric method was used to measure the metabolic activity of the cells. IC₅₀ values determined by analysis of inhibition curves were used for comparison.

The obtained experimental data showed a comparable toxic effect of the two BRAF inhibitors tested on all three cell lines used. However, vemurafenib showed significantly higher toxicity compared to dabrafenib. The *in vitro* toxicity of vemurafenib in podocytes was even stronger than that of the known renal toxins of amphotericin B. The results may suggest that toxic renal damage caused by treatment with BRAF inhibitors includes not only podocytes but also other kidney cell types, including renal tubule cells.

OBSAH

1. ZOZNAM SKRATIEK	1
2. ÚVOD.....	4
3. TEORETICKÁ ČASŤ.....	5
3.1. Rakovina kože	5
3.2. Melanín	5
3.3. Melanóm	6
3.4. Liečba malígneho melanómu	8
3.5. Inhibítory BRAF	10
3.5.1. Dabrafenib	10
3.5.2. Vemurafenib	12
3.6. Použité štandardy	13
3.6.1. Paracetamol (acetaminofén)	13
3.6.2. Amfotericín B	14
3.7. Testovanie cytotoxicity <i>in vitro</i>	15
3.7.1. CellTiter 96 [®] AQueous One Solution Cell Proliferation Assay	16
3.8. Bunkové línie	17
3.8.1. Bunková línia HepG2	18
3.8.2. Bunková línia HK-2	19
3.8.3. Bunková línia PODO/TERT256.....	20
4. CIELE PRÁCE	21
5. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	22
5.1 Použitý materiál	22
5.1.1. Prístroje a pomôcky	22
5.1.2. Chemikálie.....	23
5.1.3. Bunkové modely.....	24
5.1.4. Testované látky.....	25
5.2. Experimentálne procedúry	26
5.2.1. Príprava fosfátového pufru (PBS, pH = 7,4)	26
5.2.2. Príprava roztokov testovaných látok	26
5.2.3. Stanovenie cytotoxicity pomocou metódy CellTiter 96 [®] AQueous One Solution Cell Proliferation Assay	26

6. VÝSLEDKY	29
6.1 CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay	29
6.1.1. HepG2 bunková línia.....	29
6.1.2. HK-2 bunková línia	32
6.1.3. PODO/TERT256 bunková línia	35
7. DISKUSIA	38
8. ZÁVER	41
9. LITERATÚRA.....	42
ELEKTRONICKÉ ZDROJE	47
10. PRÍLOHY.....	49

1. ZOZNAM SKRATIEK

ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenozíntrifosfát
BRAF	Ľudský gén kódujúci B-raf proteín
c-KIT	Protoonkogén tyrozínovej proteínkinázy (tyrosine-protein kinase, KIT)
CTLA-4	Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4; cytotoxický, s T-lymfocytmi asociovaný antigén 4, kontrolný bod imunitného systému
COX	Cyklooxygenáza; enzým podieľajúci sa na metabolizme kyseliny arachidónovej
CYP450	Cytochróm P450
DCT	Dopachrómtautomeráza, známa aj ako tyrosinase-related protein 2 = TYRP2
DMEM	Dulbeccovo a Eaglovo modifikované médium
DMSO	Dimetylsulfoxid
DOPA	Dihydroxyfenylalanín
EMA	European Medicines Agency (EÚ); Európska lieková agentúra
ERK	Extracellular-signal-regulating kinase; kináza regulujúca extracelulárne signály
FDA	Food and Drug Administration (USA); Úrad pre kontrolu potravín a liečiv
hEGF	Human epidermal growth factor; ľudský epidermálny rastový faktor
HepG2	Human hepatoma cells, bunková línia ľudských pečenevých buniek

HEK-293	Human embryonic kidney cultures, bunková línia ľudských obličkových buniek
HK-2	Human kidney cultures, bunková línia ľudských obličkových buniek
IC₅₀	Inhibitory concentration 50; inhibičná koncentrácia 50, koncentrácia inhibujúca proces na 50 %
IgG	Imunoglobulín G
MAPK	Mitogénom aktivovaná proteínkinázová signálna dráha
MEK	MAPK/ERK kináza
MEM	Eaglovo minimálne esenciálne médium
MTS	[3-(4,5-dimetyltiazol-2-yl)-5-(3-karboxymetoxypheňyl)-2-(4-sulfophenyl)-2 <i>H</i> -tetrazolium], Owenovo činidlo
NADH	Nikotínamidadeníninukleotid
NADPH	Nikotínamidadeníninukleotidfosfát
NAPQI	<i>N</i> -acetyl- <i>p</i> -benzochinónimín
NSAIDs	Nonsteroidal anti-inflammatory drugs, nesteroidné protizápalové liečivá
PBS	Phosphate buffered saline, fosfátový pufor
PD-1 receptor	Programmed cell death receptor 1; receptor riadiaci bunkovú smrť, kontrolný bod imunitného systému
PES	Phenazine ethosulphate, fenazín etosulfát
PI3K/AKT	PI3K = Phosphatidylinositol 3-kinase; AKT = a serine/threonine proteinkinase, proteín kinase B (PKB); fosfatidylinozitol 3-kináza a serín/treonínová proteínkináza (proteínkináza B)
PODO/TERT256	Human renal podocytes, bunková línia ľudských podocytárnych buniek

Ras	Rat sarcoma; rodina proteínov, patrí do triedy proteínov »malých GTPáz«
Raf	Rapidly Accelerated Fibrosarcoma
TPP	Techno Plastic Products
UV žiarenie	Ultrafialové žiarenie

2. ÚVOD

Nádorové ochorenia sú spolu s ochoreniami obehovej, dýchacej a tráviacej sústavy dlhodobo najčastejším dôvodom úmrtia v Českej aj Slovenskej republike. Nádorové ochorenia sú rozsiahlou skupinou chorôb postihujúcich rozličné orgánové systémy človeka, na ktoré v dnešnej dobe neexistuje univerzálna liečba, každý druh si vyžaduje osobitný prístup. Svoje pomenovanie získavajú podľa miesta (orgán, tkanivo či bunka), v ktorom sa nádor začne vyvíjať. Samostatnú skupinu tvorí rakovina kože a jej podtypy: spinalióm, bazalióm a melanóm. (Murárová 2018) Malígný melanóm síce nie je najčastejším typom rakoviny kože, ale celkovo patrí medzi najzhubnejšie a najzákernejšie nádory vôbec, a to kvôli jeho schopnosti veľmi rýchlej tvorby metastáz. (Murárová a Borecká 2016) Jeho incidencia neustále narastá a podľa posledných štatistických údajov dosahuje v Českej republike 23,1 %, na Slovensku 16 %. (Anonym 2018) V liečbe malígneho melanómu okrem štandardnej chemoterapeutickej, chirurgickej a imunologickej liečby našla významné uplatnenie skupina BRAF inhibítorov (dabrafenib, vemurafenib), a to obzvlášť v pokročilých štádiách melanómu, kedy zlyhávajú ostatné spôsoby liečby. Ide o ciele protinádorové liečivá zo skupiny inhibítorov proteínkináz, ktoré svojím mechanizmom účinku – inhibíciou BRAF kinázy – bránia proliferácii nádorových buniek. Obe tieto liečivá sú selektívnymi inhibítormi pri nádoroch s mutovaným génom BRAF v pozícii V600. (Lakomý et al. 2015) Táto mutácia sa vyskytuje približne u 40 – 50 % kožných melanómov. (Wanchoo et al. 2016)

Liečba BRAF inhibítormi je zvyčajne dobre tolerovaná, hoci sa pri nej často objavujú nežiaduce účinky. Výsledky prvých analýz biopsií u pacientov liečených BRAF inhibítormi naznačujú, že počas liečby dochádza k poškodeniu renálnych tubulov, čo má vplyv predovšetkým na glomerulárnu filtráciu, ale aj výmenu elektrolytov. Spomedzi týchto dvoch liečiv má vyšší nefrotoxický potenciál vemurafenib. (Jhaveri et al. 2015, Wanchoo et al. 2016)

Táto diplomová práca sa zaoberá stanovením orgánovej toxicity BRAF inhibítorov dabrafenibu a vemurafenibu. Pokusy sa uskutočnili *in vitro* na troch morfológicky aj funkčne odlišných ľudských bunkových líniiach pochádzajúcich z obličiek (HK-2, PODO/TERT256) a pečene (HepG2). Pri stanovení cytotoxicity nám ako štandardy na porovnanie zistenej toxicity BRAF inhibítorov poslúžili už známe toxíny liečiv (paracetamol, amfotericín B).

3. TEORETICKÁ ČASŤ

3.1. Rakovina kože

V dnešnej dobe mnohí ľudia túžia po krásnej, opálenej pokožke, to však so sebou tiež nesie isté riziko, ktorým je možný vznik rakoviny kože. Pod pojmom rakovina kože sa ukrýva skupina nádorových ochorení postihujúcich kožu. Ide o jedno z najčastejšie sa vyskytujúcich malígnych nádorových ochorení u ľudí. Rozlišujeme 3 základné typy rakoviny kože:

1. **bazocelulárny karcinóm (bazalióm):** vzniká z buniek stratum basale (najspodnejšia vrstva pokožky (epidermis), označuje sa aj ako základná vrstva). Je najčastejšou, ale zároveň najlepšie liečiteľnou formou rakoviny kože;

2. **skvamocelulárny karcinóm (spinalióm):** vyvíja sa z vrstvy ostritých buniek (stratum spinosum, druhá najhlbšia vrstva pokožky);

3. **melanóm:** rakovina z pigmentotvorných buniek – melanocytov. Sú to špecializované bunky bazálnej vrstvy pokožky, ich výbežky zasahujú aj do ostatných vrstiev.

Prvé dva typy označujeme ako nemelanomatózne a hoci je ich výskyt častejší, sú menej závažné než melanóm. (Linares et al. 2015)

3.2. Melanín

Tento ľudský pigment je produkovaný melanozómami v melanocytoch (bunky bazálnej vrstvy epidermy) v procese nazývanom melanogenéza. Jeho syntéza je nasledovná: z aminokyseliny fenylalanín vzniká pôsobením pečenevej fenylalanínhydroxylázy tyrozín, z ktorého prostredníctvom tyrozinázy vzniká L-3,4-dihydroxyfenylalanín (L-DOPA). Tyrozináza sa podieľa aj na následnej oxidácii DOPA na dopachinón. (D'Mello et al. 2016)

Rozlišujeme 2 typy melanínu – eumelanín a feomelanín.

Eumelanín, ktorý je čierny až hnedý a prevláda u ľudí s tmavšou pleťou a vlasmi. Vzniká v neprítomnosti cysteínu alebo glutatiónu spontánnou oxidáciou dopachinónu, ktorej sa zúčastňuje dopachrómtautomeráza (DCT, tiež známa ako tyrosinase-related protein 2 = TYRP2). Feomelanín je červenohnedý a prevažuje u ľudí so svetlejšou pokožkou a vlasmi. Rovnako ako eumelanín vzniká z dopachinónu, avšak, v prítomnosti cysteínu. Výsledná farba pokožky, vlasov a očí závisí od pomeru eumelanínu a feomelanínu. (Rzepka et al. 2016)

Pri nedostatku melanínu vzniká ochorenia ako albinizmus, leukoderma či vitiligo. Najdôležitejšou funkciou, ktorú melanín má, je ochrana pred slnečným UV žiarením vďaka tieneniu fotoreceptorov. (Mačák et al. 2012)

3.3. Melanóm

Melanóm je zhubný nádor kože. Nádorovým bujnením sú zasiahnuté bunky produkujúce melanín v koži, menej často v oku a na slizniciach. Je schopný veľmi rýchlej tvorby metastáz, pričom tretina melanómov vzniká z pigmentových névov, 2/3 sa vyvíjajú na normálnej koži. (Borecká 2016)

Incidenca melanómu celosvetovo rastie, a to predovšetkým od šesťdesiatych rokov minulého storočia, kedy došlo k prudkému nárastu výskytu tohto ochorenia v kaukazskej rase. Melanóm je považovaný za jedno z najčastejšie sa vyskytujúcich rakovinových ochorení, a to predovšetkým u ľudí so svetlou pokožkou. Zástupcovia bielej rasy majú približne 10-násobne vyššie riziko vývoja kožného melanómu než zástupcovia čiernej rasy, ázijskej alebo hispánskej populácie. (Borecká 2016)

Narozdiel od stúpajúcej incidencie, mortalita sa až tak zásadne nezmenila, za čo vďačíme predovšetkým primárnej a sekundárnej prevencii, ktoré odhalia melanóm včas. Skorá iniciácia liečby sa spája s veľkou šancou na úspech, hlavne v období pred rozvojom metastáz. (Murárová a Borecká 2016)

Spomedzi všetkých rizikových faktorov má najväčší kancerogénny potenciál ultrafialové (UV) žiarenie, predovšetkým jeho UV-A a UV-B zložky, ktoré prechádzajú zemskou atmosférou. Uvádza sa, že UV žiarenie je zodpovedné zhruba za 60 – 90 % nových melanómov. V menšej miere sa na rozvoji melanómu podieľa genetika a typ pokožky. (Murárová a Borecká 2016)

Pri klinickej diagnostike sa používajú ABCDE pravidlá, ktoré pomáhajú odlišiť malígny melanóm od zdravého névu (viď Obr. 1):

- A: pigmentová škvrna je nesúmerná;
 - B: okraje škvryny sú nepravidelné, majú početné zárezy a výbežky alebo sú nejasne ohraničené;
 - C: neucelené sfarbenie, vykazuje rôzne odtiene farieb pokožky;
 - D: priemer väčší než 6 mm je pre melanóm charakteristický;
 - E: evolúcia, vývoj; zahŕňa prejavy ako krvácanie, ulcerácia a svrbenie.
- (Ward a Farma 2017)



Obr. 1 Porovnanie benígneho a malígneho névu.

Prevzaté z: <https://www.kupeledudince.sk/zdravy-zivotny-styl/kontrola-znamienok-na-tele-vyuzite-cas-v-kupeloch> (Anonym 2020)

Klasické klinické vyšetrenie býva doplnené dermatoskopickým vyšetrením, vďaka ktorému môžeme stanoviť diagnózu melanómu s vyššou presnosťou. (Murárová a Borecká 2016)

3.4. Liečba malígneho melanómu

Hoci je možné v prvých štádiách melanómu vykonať excíziu ložiska, musí sa uskutočniť ešte pred rozvojom metastáz. Ak sa však už metastázy vyskytujú, je potrebné zvoliť iný spôsob liečby. V minulosti sa využívala chemoterapia dakarbazínom, tá je ale neselektívna, preto ju nahradili novšie postupy. V súčasnosti majú pacienti s malígnym melanómom vyššiu šancu na prežitie, než v pomerne nedávnej minulosti, a to aj vďaka novým poznatkom z oblasti imunobiológie a molekulárnej biológie. Tieto poznatky sa týkajú lepšej znalosti pochodov v bunkách a potlačenia regulačných mechanizmov, ktoré vedú k prejavu sa malígneho fenotypu. Využitím týchto znalostí je možné docieľiť omnoho špecifickejšiu liečbu:

Imunoterapia

Keďže je melanóm považovaný za nádor s najväčšou imunogénnou odpoveďou, veľké uplatnenie v jeho liečbe nachádza imunoterapia. Nádorové bunky sú známe tým, že vyvolávajú imunosupresiu, vďaka čomu sa nádor stáva tolerovaný imunitným systémom. V imunoterapii melanómu sa používajú monoklonálne protilátky zamerané proti 2 typom receptorov: CTLA-4 (cytotoxický, s T-lymfocytmi asociovaný antigén 4) a PD-1 (receptor pre programovanú bunkovú smrť 1). Po blokáde týchto receptorov je obnovená činnosť T-lymfocytov vykonávajúcich imunitný dohľad. Na inhibíciu CTLA-4 receptoru sa používa ipilimumab (IgG1 monoklonálna protilátka), proti PD-1 receptoru pôsobia nivolumab a pembrolizumab (IgG4 monoklonálne protilátky). (Krajsová 2016)

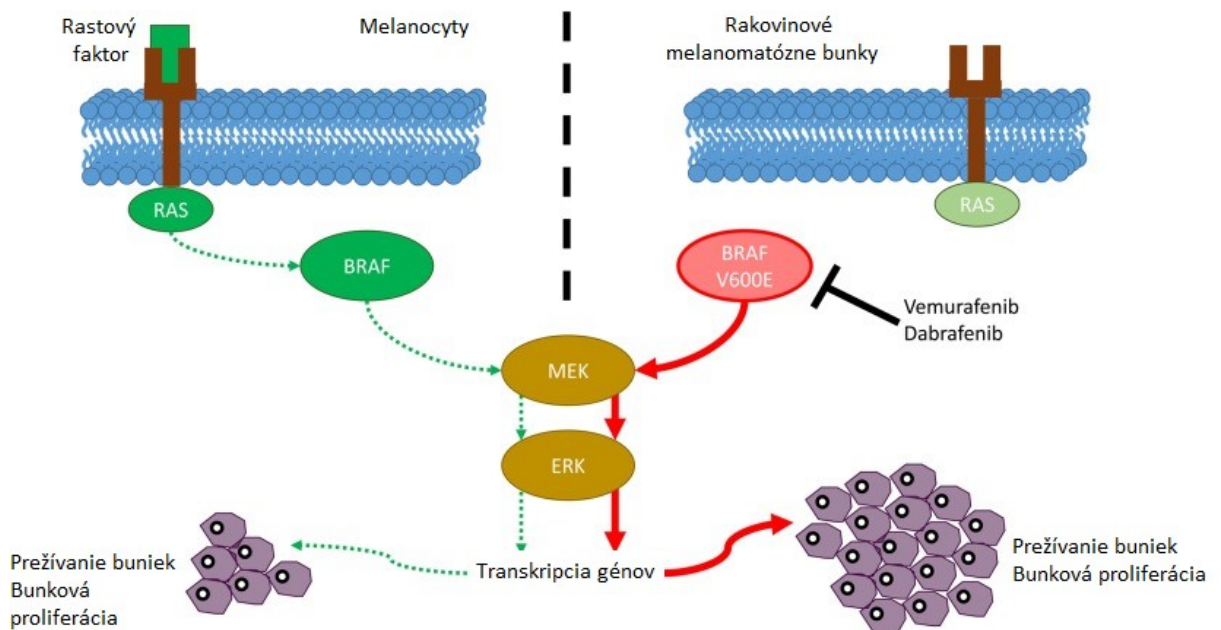
Výhodné je použitie kombinácie anti-CTLA-4 a anti-PD-1 protilátok, čím získame synergický účinok. Táto kombinácia je v súčasnosti najúčinnnejšou metódou liečby metastázujúceho melanómu, avšak s jednou výraznou, ale zvládnuteľnou nevýhodou – toxicitou, ktorá je významne vyššia než u monoterapie niektorou z týchto látok. (Lakomý et al. 2015)

BRAF inhibítory

BRAF je jedným z troch Raf proteínov prítomných u cicavcov (zvyšnými dvoma sú A-Raf a C-Raf). V patogenéze melanómu hrá dôležitú úlohu mutácia v BRAF géne spojená s následnou patologickou signalizáciou mitogénom aktivovanej proteínkinázovej signálnej dráhy (MAPK). BRAF je protoonkogénom približne polovice prípadov kožných melanómov, pričom najčastejšie ide o mutáciu BRAF V600E (substitúcia valínu

(V) kyselinou glutámovou (E)), menej časté sú mutácie V600K (K = lyzín) a V600D (D = kyselina asparágová). Mutácie v kodóne 600 vedú k aktivácii Ras/Raf/MEK/ERK (Ras = rat sarcoma; Raf = rapidly accelerated fibrosarcoma; MEK = MAPK/ERK kináza; ERK = extracellular-signal-regulating kinase), tiež známej ako mitogénom aktivovanej proteínkinázovej signálnej dráhy (viď Obr. 2). Aktivácia dráhy MAPK vedie k nepretržitej stimulácii bunkovej proliferácie a inhibuje programovanú bunkovú smrť. (Kainthla et al. 2014)

Medzi zástupcov BRAF inhibítorov patria dabrafenib a vemurafenib.



Obr. 2 MAPK signálna dráha so znázornením BRAF V600E mutácie a miestom účinku BRAF inhibítorov. Prevzaté z: Wanchoo et al. 2016

Hoci je účinnosť týchto liečiv veľmi vysoká, majú jednu značnú nevýhodu – medzi šiestym až dvanástym mesiacom od zahájenia liečby vzniká na ne z rôznych príčin rezistencia, ktorá vedie k opätovnej aktivácii signálnej dráhy MAPK spojenjej s obnovou proliferácie nádorových buniek. To sa dá oddialiť inhibíciou dvoch úrovní signálnej dráhy súčasne – konkrétne inhibíciou BRAF a MEK. Výhodou je aj to, že ich kombináciou nedochádza ku zvýšeniu toxicity, práve naopak – znižuje sa výskyt kožných keratoakantómov a skvamózných karcinómov. (Krajsová 2016)

Ďalšou možnou kombináciou umožňujúcou zníženie toxicity je spojenie imunoterapie s cieľenou liečbou. V súčasnej dobe prebiehajú štúdie venujúce sa tejto téme. (Krajsová 2016)

Pred začatím liečby BRAF-inhibítormi je nutné stanoviť, či je pacient pozitívny na BRAF-mutácie. (Lakomý et al. 2015)

Inhibítory c-KIT

Poslednou skupinou špecifických inhibítorov sú inhibítory c-KIT mutácie, ktorá býva prítomná pri slizničných melanómoch, akrolentiginózných melanómoch a melanómoch vznikajúcich v dôsledku chronického poškodenia UV žiarením. Do tejto skupiny patria imatinib a nilotinib, u ktorých prebieha klinický výskum. (Lakomý et al. 2015)

3.5. Inhibítory BRAF

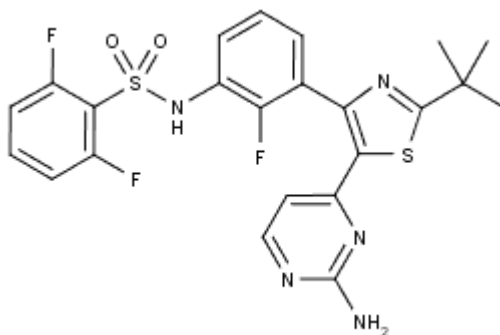
Selektívne BRAF inhibítory dabrafenib a vemurafenib nachádzajú uplatnenie v liečbe metastázujúceho melanómu. Tieto liečivá sú suspektnými induktormi poškodenia pečene a obličiek. (Jhaveri et al. 2015) Čo sa týka akútneho renálneho zlyhania, to bolo zatiaľ zaznamenané len pri liečbe vemurafenibom, ktorý sa považuje za nefrotoxickejší než dabrafenib. Obe tieto liečivá môžu poškodiť interstícium tubulov, v dôsledku čoho dochádza k hypokalémii a hyponatrémii. (Wanchoo et al. 2016) Takisto sa u oboch liečiv predpokladá možné riziko hepatotoxicity.

3.5.1. Dabrafenib

Toto liečivo je vysoko špecifickým reverzibilným inhibítorom BRAF-kinázy. Dabrafenib sa selektívne viaže na BRAF proteín a inhibuje jeho aktivitu, v dôsledku čoho dochádza k inhibícii proliferácie nádorových buniek obsahujúcich mutovaný gén BRAF v pozícii V600. Táto mutácia totiž spôsobuje vznik aktívnejšej konformácie, ktorá indukuje proliferáciu viacerých typov agresívnych nádorov (predovšetkým kožný melanóm, papilárny tyroidný karcinóm, kolorektálny karcinóm). (Kainthla 2014)

BRAF kináza patrí do skupiny serín/treonínových proteínkináz. Podieľa sa na regulácii MAPK/ERK signálnej dráhy, ktorá môže byť konštitutívne aktivovaná práve kvôli mutáciám génu BRAF. Aktivovaná BRAF kináza vedie ku zvýšenej produkcii imunopresívnych cytokínov, ktoré bránia telu prispievať k protinádorovej aktivite. (Savoia et al. 2019)

Dabrafenib bol systematicky vyvinutý z triazolového jadra po adícii sulfónamidu (viď Obr. 3). Ako ATP-kompetitívny reverzibilný inhibítor sa viaže na aktívnu formáciu BRAF kinázy a bráni šíreniu pro-rastových signálov, čo vedie k zastaveniu bunkového cyklu. (Bowyer et al. 2015).



Obr. 3 Štruktúrny vzorec dabrafenibu. Prevzaté z: Tseng 2013

Zistilo sa, že pri liečbe dabrafenibom dochádza po čase k rozvoju rezistencie. Tá vzniká pravdepodobne preto, lebo proliferácia nádorových buniek môže pokračovať vďaka aktivácii mutácií v iných proliferačných cestách. V prípade rozvoja rezistencie je teda vhodné monoterapiu dabrafenibom obohatiť o ďalšie liečivo, ktoré pôsobí v inej signálnej dráhe. Dabrafenib sa najčastejšie kombinuje s trametinibom (inhibítor MEK). (Bowyer et al. 2015)

Počas klinických štúdií dosahoval dabrafenib veľmi sľubné výsledky v porovnaní s dakarbazínom, teda s dovtedy najúčinnnejšou liečbou, u pacientov s BRAF V600E mutáciou. Dabrafenib dosiahol dlhší medián prežitia bez progresie (6,5 mesiaca pre dabrafenib; 2,7 mesiaca pre dakarbazín), odozva na liečbu bola taktiež výraznejšia než u dakarbazínu (50 % u dabrafenibu; 6 % pri liečbe dakarbazínom). Dabrafenib je celkovo veľmi dobre tolerovaný. Najbežnejšími pozorovanými nežiaducimi účinkami boli hyperkeratóza pokožky (39 %), bolesť hlavy (35 %), bolesť kĺbov (35 %) a pyrexia (32 %). Najzávažnejším vedľajším účinkom bol rozvoj kožného spinocelulárneho karcinómu (10 %). (Kainthla 2014)

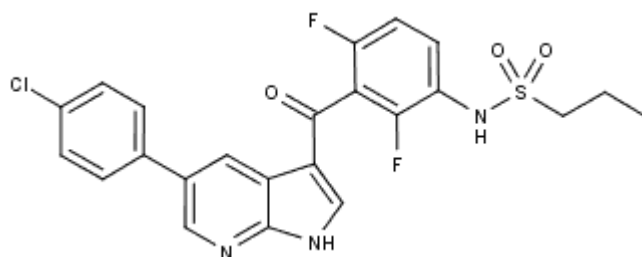
Pri kombinovanej terapii dabrafenibu s trametinibom bola najčastejším nežiaducim účinkom pyrexia – tá bola dokonca častejšia v kombinačnej terapii (71%), než v monoterapii (26 %). Kombináciou týchto dvoch liečiv sa znížil výskyt spinocelulárneho karcinómu z 19 % (samotný dabrafenib) na 7 %. Avšak, kombinácia dabrafenibu s trametinibom viedla k prejavu nežiaducich účinkov, ktoré pri monoterapii

neboli pozorované, a to zníženie ejekčnej frakcie (9 %) a chorioretinopatia (2 %). Závažnosť týchto prejavov nebola výrazná, preto sa vo všeobecnosti považuje kombinácia týchto dvoch liečiv za dobre tolerovanú. (Kainthla 2014)

3.5.2. Vemurafenib

Vemurafenib bol na liečbu neresekovateľného metastázujúceho melanómu schválený americkou Agentúrou pre bezpečnosť potravín a liekov (Food and Drug Administration Agency; FDA) v auguste 2011 a Európskou liekovou agentúrou (European Medicine Agency; EMA) vo februári 2012 na základe výsledkov 3. fázy klinického skúšania pri liečbe pacientov nesúcich BRAF V600 mutáciu. Miera odpovede pri liečbe vemurafenibom bola viditeľne vysoká (60 – 88 %). Celková doba prežitia sa z 9 mesiacov pri štandardnej chemoterapii dakarbazinom predĺžila až na 14 mesiacov. Liečivo sa považuje sa veľmi dobre tolerované. (Garbe et al. 2014)

Ide o nízkomolekulárnu molekulu (viď Obr. 4), ktorú možno podávať perorálne. Je novším vysoko špecifickým inhibítorom mutácie BRAF V600E. (Kim a Cohen 2017)



Obr. 4 Štruktúrny vzorec vemurafenibu. Prevzaté z: Tseng 2013

Vemurafenib je vo všeobecnosti dobre tolerovaný. Nežiaduce účinky zaznamenané počas klinických štúdií vemurafenibu sa vyvíjali úmerne s rastúcou dávkou a dobou expozície. Toxické účinky sa väčšinou spájali s pokožkou, kĺbmi, pečeňou a CNS – boli to predovšetkým artralgia, vyrážka, alopecia, únava, fotosenzitívne reakcie, nauzea, svrbenie a kožné papilómy vrátane kožného spinocelulárneho karcinómu. (Garbe et al. 2014)

Najväčšou klinickou výzvou, čo sa týka vemurafenibu, je boj proti rozvoju rezistencie, pri ktorej dochádza často k rapidnej progresii nádoru. Významné pokroky v priamej onkogénnej terapii melanómu a pochopenie mechanizmu rezistencie vemurafenibu viedli k vývoju novších prípravkov; obzvlášť kombinácia BRAF a MEK inhibítorov priniesla sľubné výsledky. Niektoré klinické štúdie sú zamerané na liečbu

rôznymi kombináciami látok z týchto skupín. Ostatné kinázové inhibítory, pravdepodobne zo signálnej dráhy PI3K-AKT (signálna dráha, v ktorej zohrávajú kľúčovú úlohu PI3K = fosfatidylinozinol 3-kináza a AKT = serín/treonínová proteínkináza, známa aj ako proteínkináza B (PKB)), budú tiež testované v kombinácii s vemurafenibom. (Garbe et al. 2014)

Z údajov získaných u melanomatózných pacientov podstupujúcich liečbu BRAF inhibítormi vyplýva, že tieto liečivá môžu vyvolať poškodenie obličiek zahŕňajúce poškodenie ako tubulov, tak aj interstícia, pričom k takýmto poškodeniam dochádza u vemurafenibu častejšie než u dabrafenibu. (Wanchoo et al. 2017) Zhoršenie renálnych funkcií sa prejavuje ako zníženie glomerulárnej filtrácie, proteinúria, akútna nekróza tubulov. (Launay-Vacher et al. 2014)

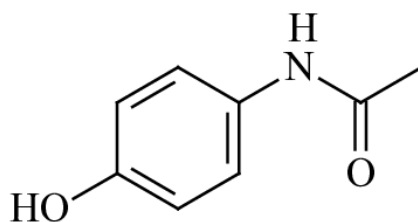
3.6. Použitie štandardy

3.6.1. Paracetamol (acetaminofén)

V dnešnej dobe patrí medzi jedno z najpoužívanějších analgetík a antipyretík. Čo sa týka fyzikálnych vlastností, ide o bielu kryštalickú látku, derivát fenacetínu, ktorá nachádza uplatnenie ako nesteroidné antiflogistikum, používané pri miernych až stredne silných bolestiach a zvýšenej telesnej teplote. Používa sa samostatne, ale aj vo fixných kombináciách, a to vo voľnopredajných liečivých prípravkoch, ako aj v liečivých prípravkoch viazaných na lekársky predpis. (Józwiak-Bębenista, Nowak 2014)

Mechanizmus účinku paracetamolu nebol dodnes ešte stále presne popísaný. Kvôli inhibícii cyklooxygenáz (COX) je zaraďovaný medzi nesteroidné protizápalové látky (NSAIDs – nonsteroidal anti-inflammatory drugs). Podľa jednej z teórií, paracetamol inhibovaním dvoch izoforiem, a to COX-1 a COX-2, ktoré sú zapojené do syntézy prostaglandínov, vedie k úľave od bolesti, pretože prostaglandíny sú zodpovedné za vyvolanie pocitov bolesti. Antipyretický účinok je spojený s priamym pôsobením paracetamolu na termoregulačné centrum v hypotalame. Dôsledkom tohto pôsobenia je periférna vazodilatácia, potenie a strata telesného tepla. (Lüllmann et al. 2012, Chandrasekharan 2002)

Narozdiel od väčšiny nesteroidných antiflogistík, paracetamol nenaruša tubulárnu sekréciu kyseliny močovej, neovplyvňuje hemostázu a nemá inhibičný účinok na agregáciu trombocytov. (Anonym 2012)



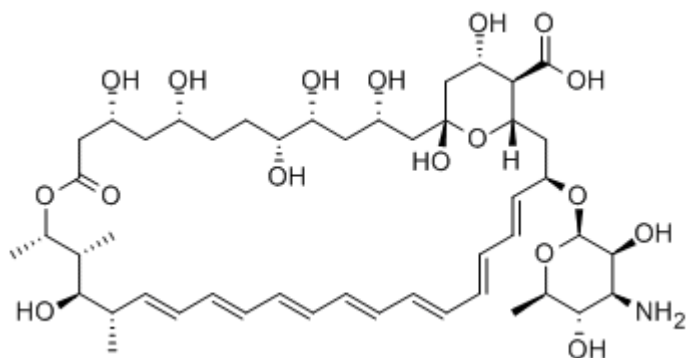
Obr. 5 Štruktúrny vzorec paracetamolu.

Prevzaté z: www.chemicalbook.com/ProductChemicalPropertiesCB1413658_EN.htm

Čo sa týka toxicity paracetamolu (vid' obr.5), tá úzko súvisí s jeho metabolizáciou, ktorá prebieha v pečeni kinetikou 1.rádu tromi možnými spôsobmi: glukuronidáciou, sulfatáciou a oxidáciou prostredníctvom cytochrómu P450, predovšetkým izoformou CYP2E1. Výsledkom tejto oxidácie je vznik reaktívneho metabolitu *N*-acetyl-*p*-benzochinónimínu (= NAPQI). Za bežných podmienok dochádza následne ku rýchlej konjugácii NAPQI s glutatiónom, pričom vznikajú konjugáty cysteínu a kyseliny merkaptúrovej, s ktorými si organizmus dokáže poradiť. Predávkovanie paracetamolom vedie k hepatálnej nekróze. Deplécia glutatiónu totiž umožňuje NAPQI viazať sa na dôležité zložky pečenných buniek a poškodzovať ich, čo môže viesť až ku vzniku hepatálnej nekrózy. Ak sa intoxikácia odhalí včas, je možné podať antidotum, ktorým je *N*-acetylcysteín, prípadne metionín – čiže sulfhydrylové zlúčeniny. (Jan et al. 2014)

3.6.2. Amfotericín B

Amfotericín (vid' Obr. 6) je širokospektrálne polyénové antimykotikum, produkované bakteriálnym kmeňom *Streptomyces nodosus*. V závislosti na koncentrácii pôsobí fungistaticky alebo fungicídne. Vďaka lipofilnej povahe je schopný viazať sa na fosfolipidy. Mechanizmus účinku spočíva v naviazaní sa na ergosterol bunkovej membrány plesne, čím dôjde k jej depolarizácii a následnej zmene permeability bunkovej membrány. V dôsledku tohto procesu najskôr bunkový obsah vyteká z bunky, a tá postupne odumiera. Amfotericín B má vyššiu afinitu ku ergosterolu v bunkových membránach plesní než ku cholesterolu, ktorý je stavebnou zložkou ľudských buniek. Amfotericín je svetložltý prášok. Jeho rozpustnosť v DMSO je 30 – 40 mg/ml, vo vode je prakticky nerozpustný. V humánnej medicíne sa podáva výlučne parenterálne kvôli nízkej biologickej dostupnosti po perorálnom podaní. (Hamill 2013, Adler-Moore et al. 2016)



Obr. 6 Štruktúrny vzorec amfotericínu B.

Prevzaté z: <https://www.chemicalbook.com/CAS/GIF/1397-89-3.gif>

Nefrotoxicita spájaná s intravenózne podávaným konvenčným amfotericínom B sa vyvíja viacerými mechanizmami. Jedným z nich je priamy vazokonstričný účinok na renálne arterioly, čím sa zníži prietok krvi cez glomerulus a renálne tubuly. Zároveň dochádza k lytickej reakcii na cholesterol bohatých lyzozomálnych membrán buniek renálnych tubulov. Čo sa týka nefrotoxicity, tá je aditívna. To znamená, že ostatné nefrotoxicke liečivá (aminoglykozidy, kapreomycín, kolistín, cisplatina, cyklosporín, metoxyflurán, pentamidín, polymyxín B a vankomycín) by mali byť počas liečby amfotericínom vysadené. (Adler-Moore 2016, SPC lieku Abelcet)

3.7. Testovanie cytotoxicity *in vitro*

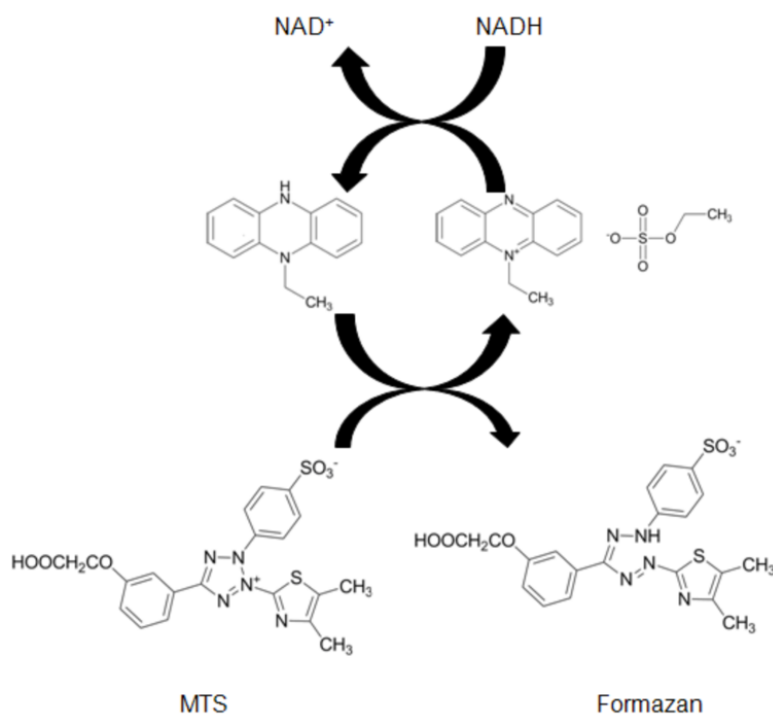
Stanovenie toxicity pri vývoji nových liečiv prešlo v posledných desaťročiach značným vývojom. Zatiaľ čo sa v minulosti stanovovala priamo na zvieratách, čiže *in vivo*, v súčasnosti sa cytotoxicita testuje *in vitro* (v skúmavke, v skle) na bunkách, tkanivách či orgánoch. Takýmto spôsobom sa vyhýbame testovaniu na zvieratách, odpadá riziko medzidruhovej variability a naraz môžeme testovať aj väčšie množstvo vzoriek s rýchlym získaním výsledkov, čo v konečnom dôsledku vedie k úspore nákladov. Okrem toho, testovanie na ľudských bunkách prináša relevantnejšie výsledky, než tomu bolo pri testovaní na zvieratách.

3.7.1. CellTiter 96[®] AQueous One Solution Cell Proliferation Assay

CellTiter 96[®] AQueous One Solution Cell Proliferation Assay je kolorimetrickou metódou, ktorou je možné zistiť počet životaschopných buniek (čiže viabilitu buniek) pri testoch proliferácie a cytotoxicity.

Činidlo CellTiter 96[®] AQueous One Solution je tvorené 2 zložkami. Prvou z nich je tetrazoliová zlúčenina [3-(4,5-dimetyltiazol-2-yl)-5-(3-karboxymetoxypheňyl)-2-(4-sulfophenyl)-2*H*-tetrazolium], označovaná tiež aj MTS. Ide o vnútornú soľ. Druhou zložkou je elektrón-kondenzačné činidlo fenazín etosulfát (PES), ktoré má zvýšenú chemickú stabilitu, čo umožňuje jeho kombináciu s MTS za vzniku stabilného roztoku. (Anonym 2012)

MTS zlúčenina (Owenovo činidlo) je redukovaná dehydrogenázovými enzýmami (predovšetkým NADPH a NADH) metabolicky aktívnych buniek na farebný formazanový produkt, ktorý je rozpustný v tkanivovom kultivačnom médiu (viď Obr. 7). Z toho vyplýva, že mŕtve alebo poškodené bunky tejto reakcie schopné nie sú, čo sa následne prejaví v hodnotách absorbancie získaných pomocou vhodného prístroja, akým je napríklad doštičkový analyzátor TECAN. (Anonym 2012)



Obr. 7 Redukcia MTS zlúčeniny na farebný formazan katalyzovaná dehydrogenázami. Prezaté z: www.creative-bioarray.com/support/comparison-of-different-methods-to-measure-cell-viability.htm (Anonym)

3.8. Bunkové línie

Keď hovoríme o bunkovej kultúre, ide o časť buniek získaných z rastlinného alebo živočíšneho organizmu, ktoré sú následne umiestnené a kultivované v priaznivom umelom prostredí – kultivačnom médiu. Pojmom primárna kultúra sa označujú bunky bezprostredne po odobratí z organizmu. Tie sú umiestnené do kultivačného média, kde proliferujú. Postupne obsadia všetok dostupný substrát – dosiahnu konfluenciu. V tejto fáze musia byť bunky subkultivované (pasážované) prenesením do novej kultivačnej nádoby s čerstvým rastovým médiom, aby mohli pokračovať v raste. Po prvej pasáži sa primárna kultúra označuje ako bunková línia. Bunkové línie odvodené od primárnych kultúr majú obmedzenú životnosť (sú konečné) a pri každom ďalšom pasážovaní prevládajú bunky s najvyššou rastovou kapacitou, čo vedie k určitému stupňu genotypovej a fenotypovej uniformity v populácii. Ak je subpopulácia bunkovej línie úspešne oddelená klonovaním alebo inou metódou, bunková línia sa stáva bunkovým kmeňom. (Hudu et al., 2016) Avšak, niektoré bunkové línie sa môžu stať nesmrteľnými prostredníctvom transformácie, ktorá môže nastať spontánne alebo môže byť vyvolaná vírusom či chemicky. Takéto bunkové línie označujeme ako kontinuálne. (Anonym 2016)

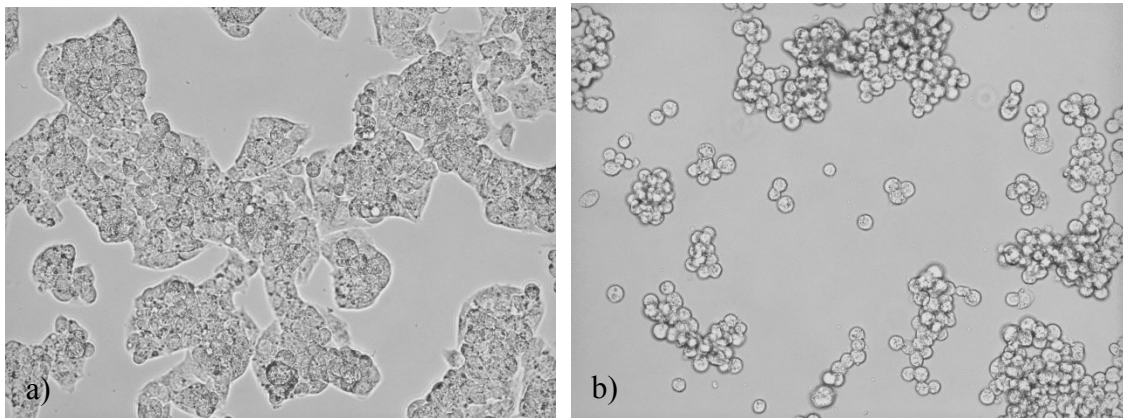
Bunkové kultúry sú jedným z najdôležitejších nástrojov používaných v bunkovej a molekulárnej biológii, kde slúžia ako výborný modelový systém na štúdium fyziológie a biochémie buniek (metabolické štúdie, starnutie,...), účinkov liečiv a toxických zlúčenín na bunky, stanovenie mutagenézy a karcinogenézy. Využitie nachádzajú aj pri tvorbe biologických produktov, akými sú napríklad vakcíny, terapeutické proteíny. Najväčšou výhodou pri použití bunkovej kultúry pre ktorúkoľvek z týchto aplikácií je možnosť vykonávať daný pokus opakovane. (Dumont et al. 2016)

Jednou z najdôležitejších zložiek kultivačného prostredia je kultivačné médium, pretože poskytuje nevyhnutné živiny, rastové faktory a hormóny pre bunkový rast a tiež reguluje pH a osmotický tlak kultúry. Rozlišujeme bazálne médiá, médiá s redukovaným sérom a médiá bez séra, ktoré sa líšia požiadavkami na doplnenie sérom. Sérum je životne dôležité ako zdroj rastových a adhezívnych faktorov, hormónov, lipidov a minerálov pre kultiváciu buniek v bazálnych médiách. Navyše, sérum reguluje permeabilitu bunkovej membrány a slúži ako nosič lipidov, enzýmov, mikronutrientov a stopových prvkov do buniek. Avšak, použitie séra v médiu má množstvo nevýhod, vrátane vyššej ceny, problematickej štandardizácie, špecifickosti, rôznorodosti a nežiaducich účinkov (stimulácia/inhibícia rastu, bunkovej funkcie). (Meenakshi 2013)

3.8.1. Bunková línia HepG2

V prípade HepG2 (liver hepatocellular carcinoma) bunkovej línie (adherentná) ide o epiteliálne bunky (viď Obr. 8) získané z ľudského hepatocelulárneho karcinómu. V *in vitro* štúdiách sa HepG2 bunková línia využíva z dôvodu jej vysokej proliferačnej kapacity a stabilného metabolizmu. HepG2 línia má uplatnenie nielen v štúdiách, ktoré sú zamerané na onkologický výskum a terapiu, ale aj na výskum metabolizmu liečiv a hepatotoxicity. (Knöspel et al. 2016, Kaur et al. 2018)

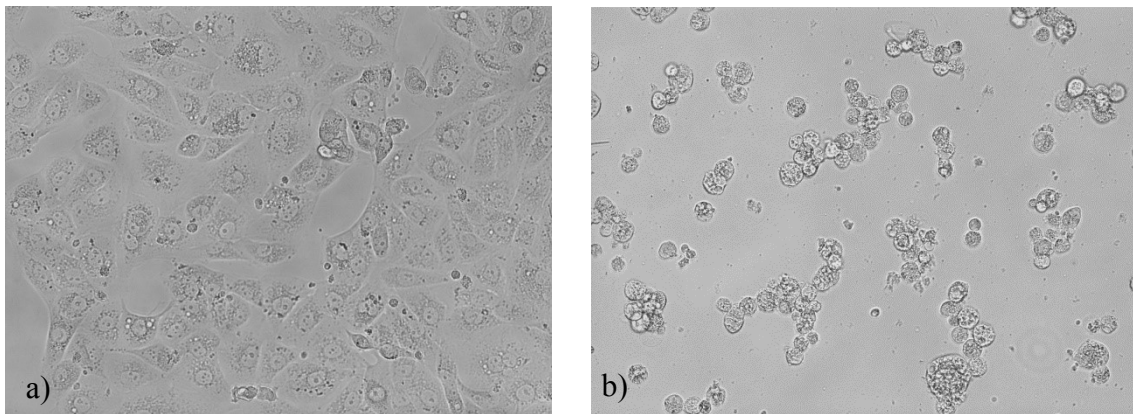
Bunky HepG2 línie majú niektoré morfológické charakteristiky zhodné s parenchymatickými pečeňovými bunkami. Svoje využitie preto nachádzajú aj pri štúdiu pečeňových ochorení. Keďže sa od primárnych pečeňových buniek líšia slabšou indukciou enzýmov CYP450 (cytochróm P450), je preto potrebné overiť výsledky *in vitro* štúdií aj v štúdiách *in vivo*. (Su et al. 2019)



Obr. 8 HepG2 bunky: a) pozitívna kontrola (bunky + kultivačné médium); b) negatívna kontrola (bunky + kultivačné médium + 10 % DMSO) (Autorka 2019)

3.8.2. Bunková línia HK-2

Bunky HK-2 línie pochádzajú z ľudských obličiek (preto označenie HK – human kidney), konkrétne z proximálnych tubulov (viď Obr. 9). Bunky proximálnych tubulov sa dostávajú do priameho kontaktu s odpadovými produktami, ktoré sa z tela vylučujú renálnou exkréciou. Medzi takéto produkty patria aj liečivá či ich metabolity, preto nachádzajú bunkové línie tvorené týmito typmi buniek uplatnenie v preklinických a klinických štúdiách liečiv, a to predovšetkým pri stanovení nefrotoxického potenciálu a renálnej clearance. (Weber et al. 2016)

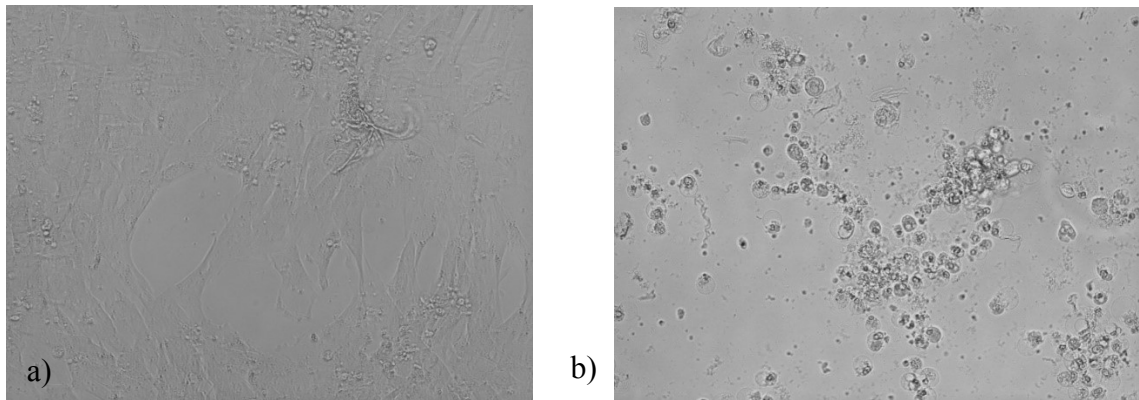


Obr. 9 HK-2 bunky: a) pozitívna kontrola (bunky + kultivačné médium); b) negatívna kontrola (bunky + kultivačné médium + 10 % DMSO) (Autorka 2019)

3.8.3. Bunková línia PODO/TERT256

Táto adherentná línia buniek je tvorená ľudskými podocytmí (viď Obr.10). Podocyty sú špecifické bunky nachádzajúce sa na povrchu glomerulárnych kapilár. Spolu s fenestrovaným endotelom a bazálnou glomerulárnou membránou zohrávajú významnú úlohu pri glomerulárnej filtrácii, kedy bránia prechodu makromolekúl (predovšetkým albumínu) do ultrafiltrátu. Akonáhle dôjde k poškodeniu podocytov, prejaví sa to zhoršením renálnych funkcií. Jedným z prvých varovných signálov poškodenia je proteinúria. (Anonym 2018)

Z uskutočnených štúdií sa podarilo zistiť, že podocyty sú hlavným cieľom rôznych rozpustných a bunkových produktov vrátane toxínov, voľných kyslíkatých radikálov a protilátok, preto sa stali veľmi dôležitým modelom pri stanovení nefrotoxicity rozličných xenobiotík. (Reiser a Altintas 2018)



Obr. 10 PODO/TERT256 bunky: a) pozitívna kontrola (bunky + kultivačné médium); b) negatívna kontrola (bunky + kultivačné médium + 10 % DMSO) (Autorka 2019)

4. CIELE PRÁCE

- Posúdiť cytotoxické pôsobenie dvoch liečiv zo skupiny BRAF inhibítorov (dabrafenib, vemurafenib) *in vitro* na troch morfológicky a funkčne odlišných typoch buniek.
- Porovnať zistené kvantitatívne parametre cytotoxicity skúmaných BRAF inhibítorov vzájomne a s porovnávacími liekovými štandardmi.

5. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

5.1 Použitý materiál

5.1.1. Prístroje a pomôcky

- Laminárny box: Micrological safety cabinet TOP-SAVE 1,8 (Bioair instruments, Taliansko)
- 96-jamkové mikrotitračné doštičky potiahnuté poly-D-lyzínom (CORNING, USA)
- Mikroskop OPTIKA Microscopes, XDS-1R (OPTIKA Microscopes, Taliansko)
- Inkubátor (Shel Lab, USA)
- Mikroskúmavky Eppendorf 0,5 ml; 1,5 ml; 2 ml (Eppendorf, Nemecko)
- Centrifúga 3K30H, Sigma (Laborentrifigen, Nemecko)
- Analytické váhy (Kern & Sohn GmbH, Nemecko)
- Pipetovací nástavec SWIFTPET (HTL, Poľsko)
- Automatické jednokanálové pipety Eppendorf Research® plus 5 – 50 µl, 10 – 100 µl, 100 – 1000 µl (Eppendorf, Nemecko))
- Automatická multikanálová pipeta Discovery Comfort 50 – 300 µl (HTL, Poľsko)
- Jednorazové plastové pipety 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml (Techno Plastic Products - TPP, Švajčiarsko)
- Kultivačné fľaše 25 cm², 75 cm² (TPP, Švajčiarsko)
- Vodný kúpeľ TW 12 water bath (Julabo, Nemecko)
- Špičky na pipety Eppendorf 0,1 – 20 µl, 20 – 200 µl (Eppendorf, Nemecko)
- Falconky 15 ml, 50 ml (TPP, Švajčiarsko)
- Orbitálna trepačka IKA® LabDancer (IKA-Werke GmbH & Co., Nemecko)
- Doštičkový analyzátor TECAN (Infinite M200, Švajčiarsko)
- FLoid™ Cell Imaging Station (ThermoFisher Scientific, Veľká Británia)

5.1.2. Chemikálie

- Bovine Brain Extract (výťažok z hovädzieho mozgu) (Lonza, Švajčiarsko)
- Fetal bovine serum (fetálne bovínne sérum) (Sigma-Aldrich, USA)
- Fosfátový pufor (Phosphate Buffered Saline; PBS, pH = 7,4) – chemikálie: NaCl, KCl, Na₂HPO₄, NaH₂PO₄) (PENTA, Česká republika)
- GlutaMAX-I (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Veľká Británia)
- hEGF (ľudský epidermálny rastový faktor) (Sigma-Aldrich, USA)
- Hydrokortizón (Sigma-Aldrich, USA)
- Kolagén (Bovine Collagen Coating Solution) (Sigma-Aldrich, USA)
- MEM (Eaglovo minimálne esenciálne médium) (Sigma-Aldrich, USA)
- DMEM (Dulbeccovo a Eaglovo modifikované médium (Sigma-Aldrich, USA)
- PodoUp3 (MCDB131 Basal Medium) (Pan Biotech, Nemecko)
- Trypsín 0,25 % (Trypsín-EDTA (etyléndiamíntetraoctová kyselina)) (Sigma-Aldrich, USA)
- Neesenciálne aminokyseliny (Sigma-Aldrich, USA)
- DMSO (dimetylsulfoxid pre molekulárnu biológiu; > 99,9 %) (Sigma-Aldrich, USA)
- CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega, USA)
- Dabrafenib (Selleckchem, USA)
- Vemurafenib (Selleckchem, USA)
- Amfotericín B (Sigma-Aldrich, USA)
- Paracetamol (Sigma-Aldrich, USA)

5.1.3. Bunkové modely

HepG2

Ľudské pečeneňové bunky (Human hepatocellular liver carcinoma cell line, HepG2), boli získané od spoločnosti ATCC (American Type Culture Collection; USA). Bunková línia (pasáž 14 – 18) bola kultivovaná v 75 cm² kultivačných nádobách, v bunkovom médiu DMEM (Dulbeccovo a Eaglovo modifikované médium) (Sigma-Aldrich, USA) s 1 % L-glutamínom (2 mM) (Sigma-Aldrich, USA), 1 % neesenciálnych aminokyselín (Sigma-Aldrich, USA) a 10 % fetálneho hovädzieho séra (PAA, Rakúsko.)

HK-2

Ľudské obličkové bunky (Human Kidney cell line, HK-2) boli získané od American Type Culture Collection (ATCC, USA). Bunková línia (pasáž 8 – 12) bola kultivovaná v 75 cm² kultivačných nádobách, v bunkovom médiu DMEM (Dulbeccovo a Eaglovo modifikované médium) (Sigma Aldrich, USA), 1 % neesenciálnych aminokyselín (Sigma-Aldrich, USA) a 10 % fetálneho hovädzieho séra (PAA, Rakúsko). Pre kultiváciu sa vyžaduje inkubácia pri 37 °C a 5 % atmosfére CO₂.

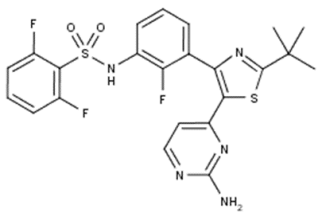
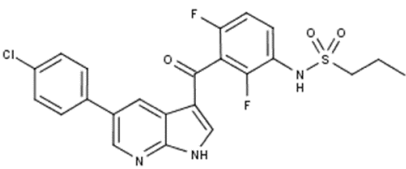
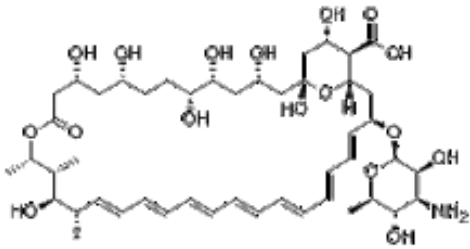
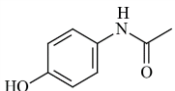
PODO/TERT256

Ľudské podocytyárne bunky (Human renal podocytes, PODO/TERT256) boli získané z EVERCYTE GmbH the pharmacocellomicsTM company (Viedeň, Rakúsko). Bunková línia (pasáž 3 – 6) bola kultivovaná v 75 cm² kultivačných nádobách potiahnutých kolagénom, v bunkovom médiu PodoUp3 (MCDB131 Basal Medium) (Pan Biotech, Nemecko), 1,6 mM GlutaMAX-I (Gibco, Thermo Fisher Scientific, UK), 9,6 µg/ml Bovine Brain Extract (Lonza, Švajčiarsko), 8 ng/ml hEGF (Sigma-Aldrich, USA), 20 ng/ml Hydrocortisone (Sigma-Aldrich, USA), 20 % fetal bovine serum (Sigma-Aldrich, USA) a 100 µg/ml G418 (InvivoGen, USA). Pre kultiváciu sa odporúča 37°C a zvlčená atmosféra s 5 % CO₂.

5.1.4. Testované látky

Štúdie sa uskutočnili s dvoma liečivami zo skupiny BRAF inhibítorov (dabrafenib, vemurafenib) a dvoma štandardami (amfotericín B, paracetamol). Ich štruktúry sú uvedené v tabuľke 1.

Tab.1 Chemické názvy, štruktúrne a sumárne vzorce testovaných látok. (Autorka 2020)

Názov látky	Štruktúrny vzorec	Sumárny vzorec
Dabrafenib		$C_{23}H_{20}F_3N_5O_2S_2$
Vemurafenib		$C_{23}H_{18}ClF_2N_3O_3S$
Amfotericín B		$C_{47}H_{73}NO_{17}$
Paracetamol		$C_8H_9NO_2$

5.2. Experimentálne procedúry

5.2.1. Príprava fosfátového pufru (PBS, pH = 7,4)

Jednotlivé suroviny sme navážili pomocou analytických váh a kvantitatívne previedli do kadičky, doplnili sme destilovanou vodou na požadovaný objem a pomocou miešadla a elektromagnetickej miešačky sme ich rozpustili. Na úpravu a dosiahnutie požadovaného pH sa používa hydroxid sodný (NaOH), ktorý sme pridávali postupne, za stáleho miešania a merania pH pomocou pH-metra až do dosiahnutia pH=7,4. Jednotlivé zložky fosfátového pufru sú znázornené v tabuľke 2.

Tab.2 Príprava fosfátového pufru (1000 ml). (Autorska 2020)

Zlúčenina	Molárna hmotnosť [g/mol]	Koncentrácia [g/l]
NaCl	58.44	16, 010
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	358.14	7, 160
Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O	177.99	3, 120
KCl	74.55	0, 420

5.2.2. Príprava roztokov testovaných látok

Na rozpustenie testovaných látok sme použili DMSO, a to z dôvodu ich zlej rozpustnosti vo vode. Rozpúšťadlo DMSO je už v nízkych koncentráciách cytotoxické, preto sme pri testovaných látkach nepoužili koncentráciu vyššiu ako 1 %.

5.2.3. Stanovenie cytotoxicity pomocou metódy CellTiter 96[®] AQueous One Solution Cell Proliferation Assay

Pokusy boli uskutočnené podľa komerčnej kolorimetrickej metódy CellTiter 96[®] AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega, USA).

Bunkovú líniu HK-2 sme pri pokuse nasadili v počte 15 000 buniek/100 µl (na jednu jamku). Pri bunkovej línii HepG2 sme bunky na pokus nasadili v počte 10 000 buniek/100 µl (na jednu jamku) a bunky na pokus pri bunkovej línii PODO/TERT256 sme nasadili v počte 20 000 buniek/100 µl (na jednu jamku). Inkubácia

všetkých bunkových línií pred pridaním testovaných látok prebiehala po dobu 24 hodín pri teplote 37 °C v 5 % atmosfére CO₂.

Testované látky sme nariedili vo ôsmich koncentráciách a napipetovali v triplikátoch pre každú koncentráciu do 96-jamkovej mikrotitračnej doštičky, ktorá bola potiahnutá poly-D-lyzínom (pre bunkovú líniu PODO/TERT256), pre zvyšné dve bunkové línie sme použili štandardné 96-jamkové doštičky. Pre každú koncentráciu sme taktiež v triplikátoch pripravili nebunkové kontroly (100 µl príslušného média + 1 µl testovanej látky). Ďalšími kontrolami boli: kontroly pre stanovenie celkovej viability (bunky + 100 µl kultivačného média), kontroly pre stanovenie 0 % viability (bunky + 100 µl kultivačného média + 10 % DMSO), kontroly 100 % viability (bunky + 100 µl kultivačného média + 1 µl DMSO) a nebunková kontrola príslušného kultivačného média (100 µl kultivačného média).

Po napipetovaní testovaných látok nasledovala 24-hodinová (príp. 48-hodinová) inkubácia pri teplote 37 °C v 5 % atmosfére CO₂. Potom sa do všetkých jamiek pridalo 20 µl MTS činidla a doštička sa uložila späť do inkubátora na dobu 90 minút. Inkubácia prebiehala pri teplote 37 °C v 5 % atmosfére CO₂. Po 90 minútach sa odmerala absorbancia pri vlnovej dĺžke $\lambda=490$ nm pomocou doštičkového analyzátora TECAN.

Výsledné hodnoty absorbancie vzoriek sme spracovávali v programoch Microsoft Excel 2016 a GraphPad Prism 8.02. V programe Microsoft Excel sme spriemerovali hodnoty absorbancie triplikátov buniek s rovnakou koncentráciou testovaných látok, určili sme ich smerodajnú odchýlku a relatívnu smerodajnú odchýlku. Rovnaký postup sme opakovali aj pri hodnotách absorbancie triplikátov nebunkových kontrol. Nakoniec sme z týchto číselných údajov získali percentá výslednej viability pre jednotlivé koncentrácie testovaných látok.

Výpočet výslednej viability pre jednotlivé koncentrácie testovaných látok prebiehal podľa nižšie uvedenej rovnice:

$$\% \textit{ viability} = \frac{(A_b - A_k) \cdot 100}{A_v100 - A_m}, \text{ kde:}$$

A_b = spriemerovaná hodnota absorbancie triplikátov buniek s rovnakou koncentráciou testovanej látky,

A_k = spriemerovaná hodnota absorbancie triplikátov nebunkovej kontroly s rovnakou koncentráciou testovanej látky,

A_m = spriemerovaná hodnota absorbancie triplikátov daného kultivačného média,

A_v100 = spriemerovaná hodnota absorbancie triplikátov kontroly 100 % viability.

(Anonym 2012)

Na záver sme v programe GraphPad Prism 8.02 za použitia modelu nelineárnej regresie určili toxikologický parameter IC_{50} testovaných látok.

IC_{50} (Inhibition Concentration 50) je hodnota udávajúca koncentráciu látky, pri pôsobení ktorej dochádza k inhibícii rastu buniek u polovice sledovanej populácie buniek. Čím nižšiu hodnotu IC_{50} získame, tým silnejším inhibítorom rastu buniek daná látka je.

6. VÝSLEDKY

6.1 CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay

6.1.1. HepG2 bunková línia

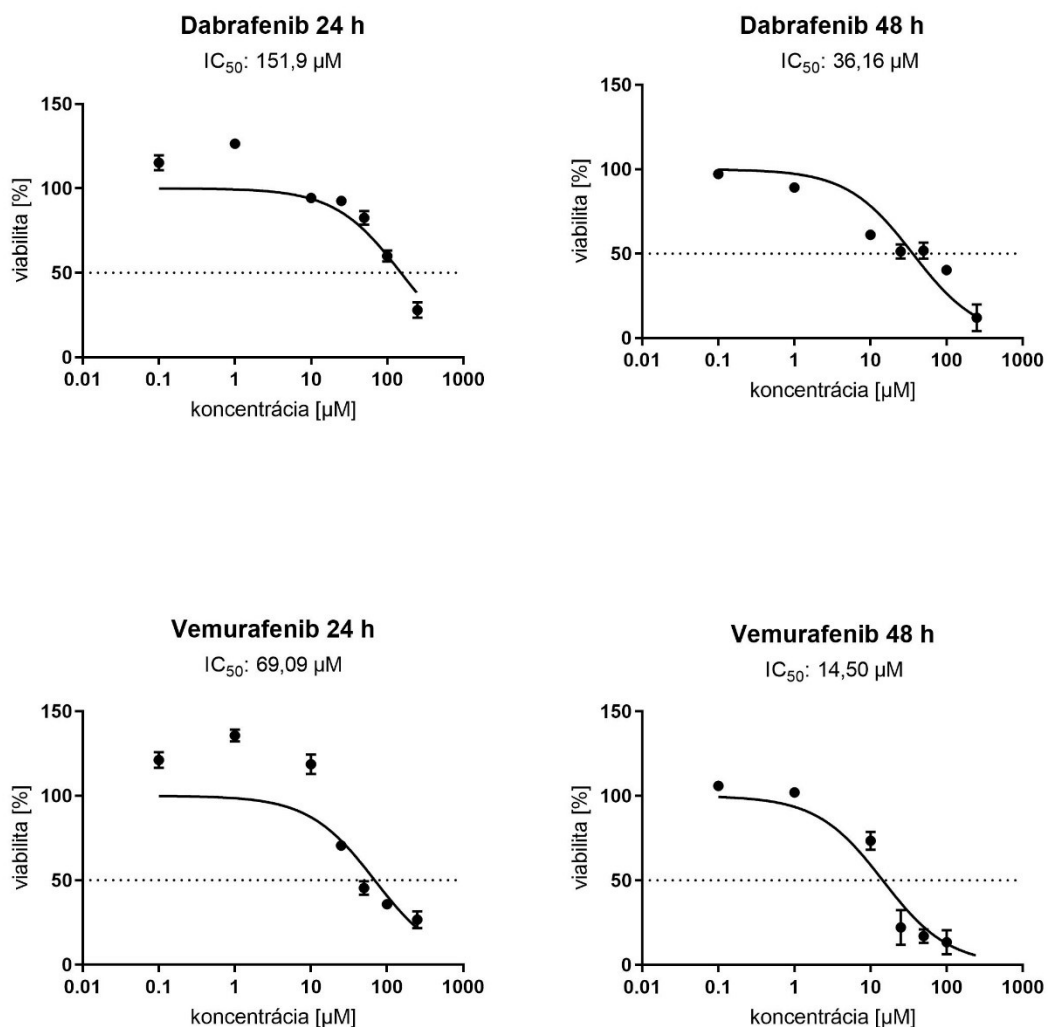
V nasledujúcej tabuľke 3 je celkový prehľad testovaných látok a štandardov a ich experimentálne zistené hodnoty IC_{50} pri použití bunkovej línie HepG2. Výsledky sú rozdelené podľa dĺžky inkubácie buniek s testovanými látkami, a to 24 hodín alebo 48 hodín. Látky sme testovali v koncentračnom rozmedzí 0,1 – 500 μ M.

Tab.3 Hodnoty IC_{50} testovaných látok a štandardných látok pre bunkovú líniu HepG2. (Autorka 2020)

Testovaná látka	IC_{50} po 24-hodinovej inkubácii [μ M]	IC_{50} po 48-hodinovej inkubácii [μ M]
Dabrafenib	151,9	36,16
Vemurafenib	69,09	14,50
Amfotericín B	> 500	> 500
Paracetamol	> 500	> 500

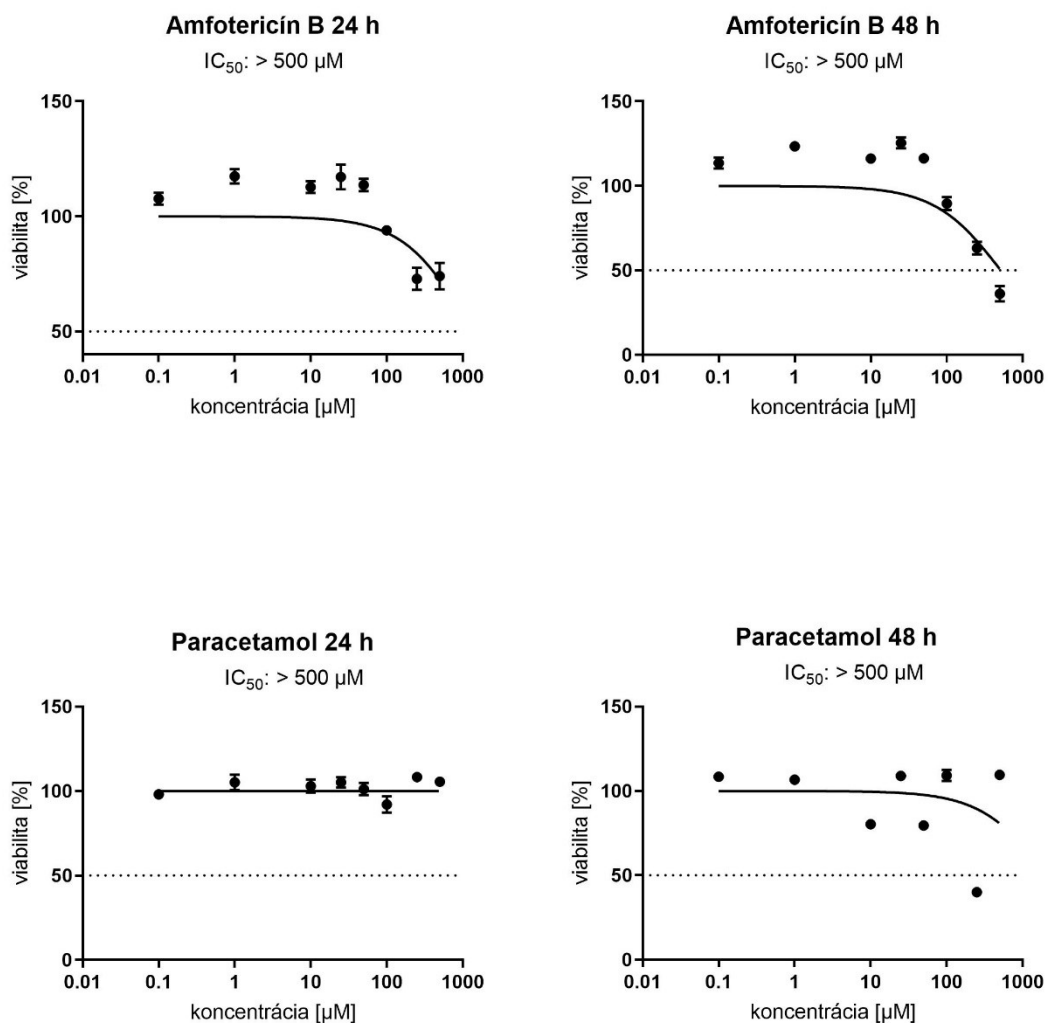
Experimentálne zistené hodnoty IC_{50} nám pomáhajú stanoviť cytotoxicitu látok, u ktorých ešte doteraz nebola zistená, a to porovnaním s látkami – štandardmi – ktorých cytotoxicita je známa. V tejto práci boli štandardmi amfotericín B a paracetamol.

HepG2 je pečňová bunková kultúra. Ako je známe, paracetamol má značný hepatotoxický potenciál, preto v testoch orgánovej toxicity uskutočnených v rámci tejto práce slúžil ako pozitívna hepatotoxická kontrola a negatívna nefrotoxická kontrola; v prípade amfotericínu, značne nefrotoxického liečiva, to bolo presne naopak.



Obr. 11 Cytotoxické pôsobenie testovaných BRAF inhibítorov dabrafenibu a vemurafenibu na bunkovú líniu HepG2 pri inkubácii 24 hodín a 48 hodín. (Autorka 2020)

Na obrázku 11 vidíme grafy pre bunky HepG2 línie, ktoré boli inkubované 24 hodín alebo 48 hodín s rôznymi koncentraciami testovaných BRAF inhibítorov (0,1 – 500 µM), a to v triplikátoch. Následne bola zistená viabilita buniek [%]. Vidíme, že dabrafenib má inhibičnú koncentráciu IC₅₀ po 24 hodinách 151,9 µM a po 48 hodinách 36,16 µM, teda 4-krát menšiu. IC₅₀ vemurafenibu po 24 hodinách je 69,09 µM, po 48 hodinách je takmer päťnásobne nižšia – 14,50 µM. Z grafov je teda vidieť, že vemurafenib je toxickejší než dabrafenib a toxicita oboch týchto látok rastie v čase.



Obr. 12 Cytotoxické pôsobenie štandardných látok amfotericínu B a paracetamolu na bunkovú líniu HepG2 pri inkubácii 24 hodín a 48 hodín. (Autorka 2020)

Z obrázku 12, na ktorom vidíme bunky HepG2 línie po 24- alebo 48-hodinovej inkubácii s látkami použitými ako štandardy (amfotericín B, paracetamol) vyplýva, že obe látky majú veľmi nízky hepatotoxický potenciál voči bunkám HepG2 línie. Aj keď je paracetamol známy ako hepatotoxické liečivo, pri tomto experimente sa jeho hepatotoxicita neprejavila, a to z dôvodu použitia takých koncentrácií paracetamolu, ktoré nie sú pre hepatálne bunky nebezpečné. Hodnota IC_{50} oboch štandard je vyššia než koncentračné rozmedzie použité pri tomto experimente (0,1 – 500 µM).

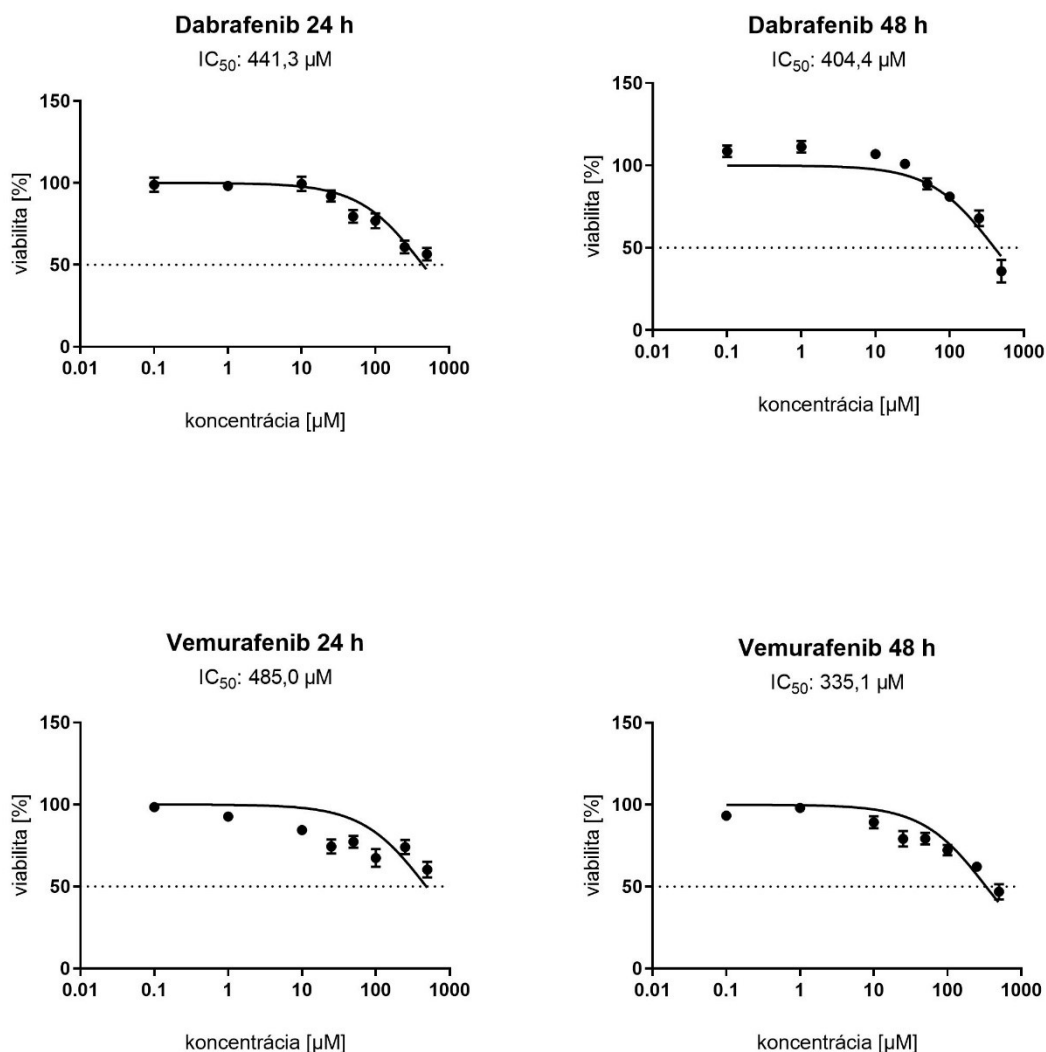
6.1.2. HK-2 bunková línia

V tabuľke 4 sú zaznamenané experimentálne zistené hodnoty IC_{50} pre testované a štandardné látky pri použití bunkovej línie HK-2. Inkubácia testovaných látok s bunkami prebiehala 24 hodín alebo 48 hodín, ich koncentrácia sa pohybovala v rozmedzí 0,1 – 500 μ M.

Tab.4 Hodnoty IC_{50} testovaných látok a štandardných látok pre bunkovú líniu HK-2. (Autorka 2020)

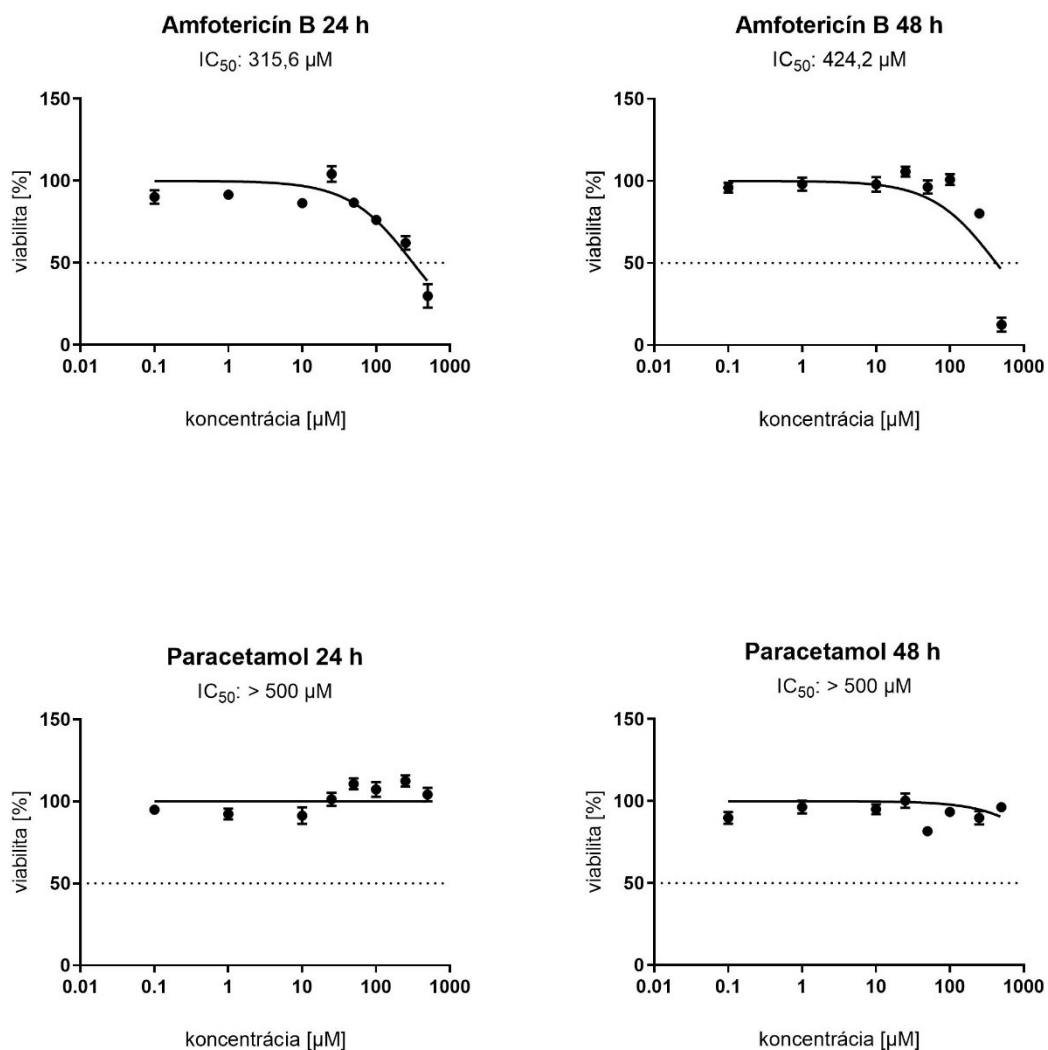
Testovaná látka	IC_{50} po 24-hodinovej inkubácii [μ M]	IC_{50} po 48-hodinovej inkubácii [μ M]
Dabrafenib	441,3	404,4
Vemurafenib	485,0	335,1
Amfotericín B	315,6	424,2
Paracetamol	> 500	> 500

Renálne bunky HK-2 línie sa v *in vitro* testoch orgánovej toxicity používajú na stanovenie nefrotoxického potenciálu látok. V tejto práci bol ako pozitívna nefrotoxická kontrola na stanovenie toxicity BRAF inhibítorov použitý amfotericín B. Ako negatívnu kontrolu sme použili paracetamol.



Obr. 13 Cytotoxické pôsobenie testovaných BRAF inhibítorov dabrafenibu a vemurafenibu na bunkovú líniu HK-2 pri inkubácii 24 hodín a 48 hodín. (Autorka 2020)

Na obrázku 13 vidíme grafy pre bunky HK-2 línie, ktoré boli inkubované s BRAF inhibítormi dabrafenibom a vemurafenibom (koncentračné rozmedzie 0,1 – 500 µM), a to v triplikátoch po dobu 24 hodín alebo 48 hodín. Následne bola stanovená viabilita buniek [%]. Inhibičná koncentrácia IC₅₀ dabrafenibu je 441,3 µM (24 h) a 404,4 µM (48 h). Oproti tomu je inhibičná koncentrácia IC₅₀ vemurafenibu po 24-hodinovej inkubácii 485,0 µM, po 48 hodinách dosahuje 335,1 µM. S časom narastá toxicita oboch BRAF inhibítorov, výraznejšie u vemurafenibu.



Obr. 14 Cytotoxické pôsobenie štandardných látok amfotericínu B a paracetamolu na bunkovú líniu HK-2 pri inkubácii 24 hodín a 48 hodín. (Autorka 2020)

Na obrázku 14 vidíme grafy patriace bunkovej línii HK-2, ktoré vyjadrujú viabilitu buniek [%] po 24-, resp. 48-hodinovej inkubácii buniek s látkami použitými ako štandardy. Hodnota IC₅₀ pre amfotericín B je 315,6 µM po 24-hodinovej inkubácii, po 48 hodinách to je 424,2 µM. Paracetamol v použitých koncentráciách (0,1 – 500 µM) nemá na renálne tubuly výrazne toxický vplyv, preto sa hodnoty IC₅₀ pohybujú nad použité koncentračné rozmedzie, a to pre oba časové intervaly.

6.1.3. PODO/TERT256 bunková línia

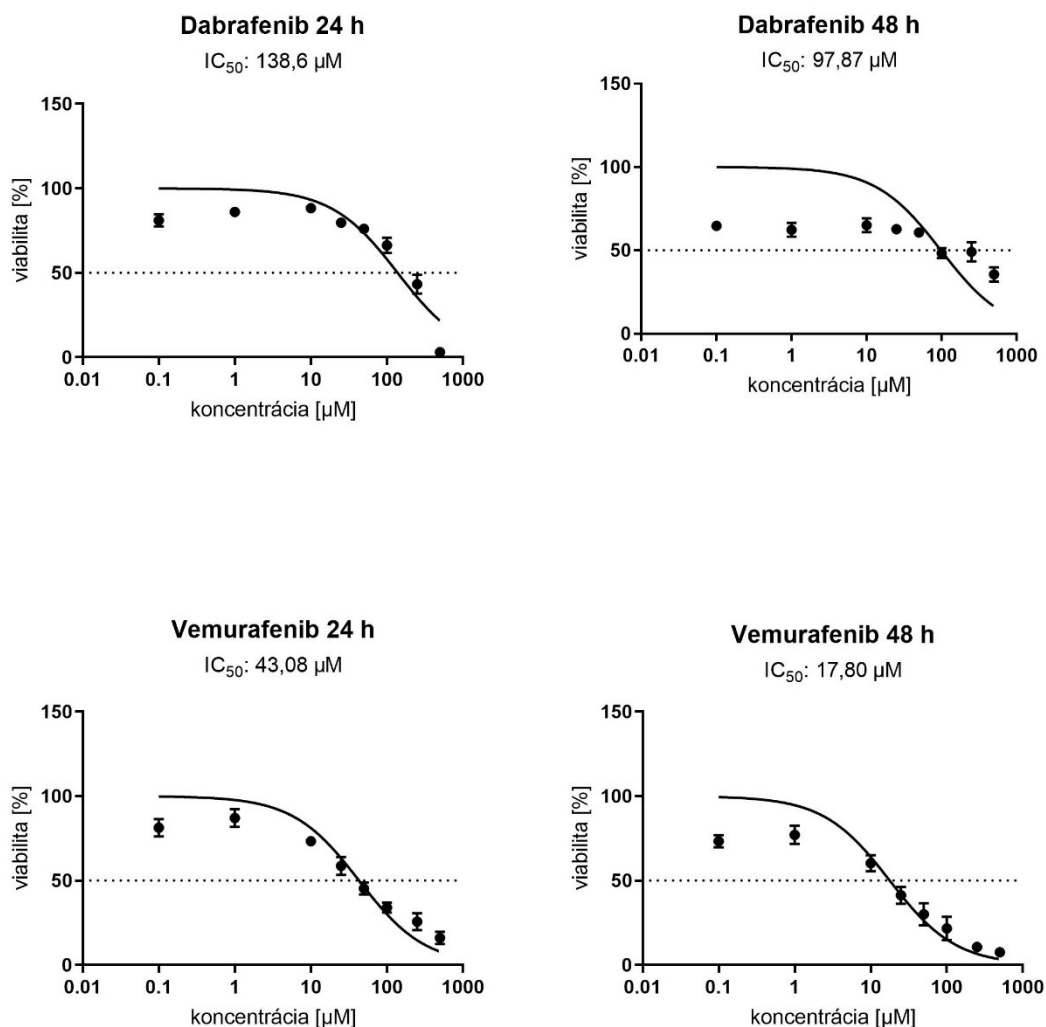
Nasledovná tabuľka 5 zobrazuje testované látky a štandardy, spolu s ich experimentálne zistenými hodnotami IC_{50} pri použití bunkovej línie HK-2. Bunky boli so testovanými látkami inkubované 24, resp. 48 hodín.

Tab.5 Hodnoty IC_{50} testovaných látok a štandardných látok pre bunkovú líniu PODO/TERT256. (Autorka 2020)

Testovaná látka	IC_{50} po 24-hodinovej inkubácii [μ M]	IC_{50} po 48-hodinovej inkubácii [μ M]
Dabrafenib	138,6	97,87
Vemurafenib	43,08	17,80
Amfotericín B	52,64	60,47
Paracetamol	> 500	497,3

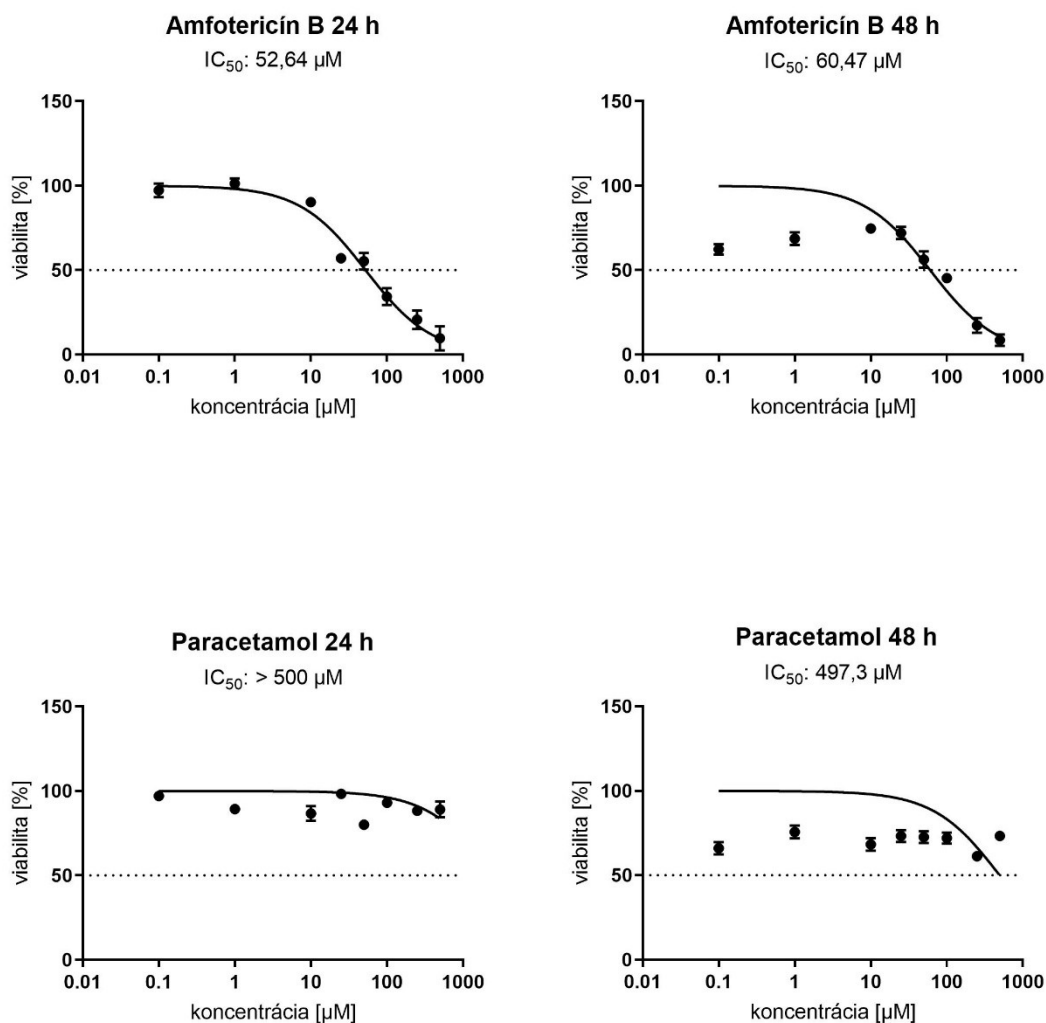
Bunková línia PODO/TERT256 je obličkovou bunkovou líniou tvorenou podocytmi. Paracetamol teda opäť slúži ako negatívna kontrola, keďže uňho nebola preukázaná nefrotoxicita. Na druhej strane, amfotericín B ako nefrotoxické liečivo nachádza v *in vitro* testoch orgánovej toxicity využitie ako pozitívna kontrola.

Pri experimente sme využili roztoky testovaných látok v koncentračnom rozmedzí 0,1 – 500 μ M.



Obr.15 Cytotoxické pôsobenie testovaných BRAF inhibítorov dabrafenibu a vemurafenibu na bunkovú líniu PODO/TERT256 pri inkubácii 24 hodín a 48 hodín. (Autorka 2020)

Na obrázku 15 vidíme grafy pre bunky PODO/TERT256 línie, ktoré boli v triplikátoch 24 alebo 48 hodín inkubované s rôznymi koncentráciami (0,1 – 500 µM) BRAF inhibítorov. Viabilita buniek je vyjadrená percentuálne [%]. Inhibičná koncentrácia IC₅₀ dabrafenibu bola po 24 hodinách 138,6 µM, po 48 hodinách 97,87 µM, teda zhruba 1,5-násobne nižšia. Hodnoty IC₅₀ vemurafenibu: 43,08 µM (24-hodinová inkubácia), 17,80 µM (48-hodinová inkubácia) – je teda 2,4-krát menšia. Z grafov opäť možné usúdiť, že vemurafenib je toxickejší než dabrafenib.



Obr. 16 Cytotoxické pôsobenie štandardných látok amfotericínu B a paracetamolu na bunkovú líniu PODO/TERT256 pri inkubácii 24 hodín a 48 hodín. (Autorka 2020)

Grafy na obrázku 16 znázorňujú percentuálne [%] vyjadrenú viabilitu buniek PODO/TERT256 línie, ktoré boli 24 alebo 48 hodín inkubované so štandardnými látkami. Pri 24-hodinovej inkubácii s amfotericínom B dosahuje hodnota inhibičnej koncentrácie IC₅₀ = 52,64 µM, po 48 hodinách 60,47 µM. Paracetamol je v použitých koncentráciách (0,1 – 500 µM) pre podocyty bezpečný, čo možné pozorovať predovšetkým na grafe zodpovedajúcom 24-hodinovej inkubácii, kedy je hodnota IC₅₀ nad spomenutým koncentračným rozmedzím. Po inkubácii 48 hodín je IC₅₀ = 497,3 µM. V oboch časových intervaloch sa potvrdil vyšší nefrotoxický potenciál amfotericínu B v porovnaní s paracetamolom.

7. DISKUSIA

Cieľom tejto diplomovej práce bolo *in vitro* stanovenie cytotoxicity dvoch liečiv zo skupiny BRAF-inhibítorov, a to na základe kvantitatívneho toxikologického parametra, ktorým bolo stanovenie inhibičnej koncentrácie IC_{50} pomocou komerčnej kolorimetrickej metódy CellTiter 96[®] A_{queous} One Solution Proliferation Assay. Ako štandardy boli použité dve liečivá, a to amfotericín B, o ktorom je známe, že je nefrotoxický a paracetamol, ktorý je hepatotoxický.

BRAF inhibítory sú pomerne novou skupinou cielených antineoplastických liečiv, ktoré nachádzajú svoje uplatnenie v liečbe metastázujúceho melanómu so špecifickou mutáciou génu BRAF v pozícii V600 jeho aminokyselinového reťazca. Prvými dvoma liečivami z tejto skupiny, registrovanými v indikácii liečby metastázujúceho melanómu, sa stali vemurafenib (FDA, 2011) a dabrafenib (FDA, 2013). Hoci ide o bezpečné liečivá, v priebehu liečby sa u niektorých pacientov podstupujúcich liečbu týmito látkami objavili prejavy nefrotoxicity. (Launay-Vacher et al. 2014) Tie sa týkali predovšetkým zmien glomerulárnej filtrácie, ale aj proteinúrie a výmeny elektrolytov. Z analýzy prípadov vyplynulo, že dôvodom týchto prejavov je pravdepodobne poškodenie renálnych tubulov. Nefrotoxicita sa prejavila pri oboch liečivách, výraznejšie však u vemurafenibu. (Jhaveri et al. 2015)

Na stanovenie a posúdenie toxicity BRAF inhibítorov bol použitý test, ktorého princípom je redukcia MTS zlúčeniny (známej aj ako Owenovo činidlo) na farebný formazanový produkt, u ktorého je možné zmerať absorbanciu. Množstvo vzniknutého produktu je závislé od počtu živých, metabolicky aktívnych buniek, pretože len tie sú schopné podieľať sa na produkcii endogénnej redukujúcej látky, ktorá je schopná tejto premeny. Čím sú bunky metabolicky aktívnejšie, tým intenzívnejšie sú výsledné produkty sfarbené. Podľa odporúčenia výrobcu použitého kitu CellTiter96 by mala byť inkubačná doba pre dostatočnú redukciu kolorimetrického činidla 1 – 4 hodiny. Na základe našich predbežných testov sme zvolili dobu inkubácie látok s činidlom po dobu 90 minút. Spracovaním údajov absorbancie sa vieme dostať ku hodnote viability, z ktorej pomocou nelineárnej regresie získame hodnotu IC_{50} .

Testovanie toxicity prebehlo na troch štandardných ľudských bunkových líniiach, líšiacich sa funkčne aj morfológicky. Išlo o bunkové línie tvorené hepatocytmi (HepG2),

bunkami proximálnych tubulov (HK-2) alebo podocytmí (PODO/TERT256). Cytotoxicitu, ktorou testované a štandardné látky pôsobili na bunky jednotlivých líní, sme porovnávali pomocou toxikologického parametru IC_{50} , a to nielen porovnaním dabrafenibu a vemurafenibu so štandardnými látkami, ale aj vzájomne medzi sebou.

Látky sme testovali v triplikátoch pre každú koncentráciu v širokom koncentračnom rozmedzí (0,1 – 500 μ M) a s rôznou dobou inkubácie (24 alebo 48 hodín). Na prípravu ich roztokov sme použili zmes kultivačného média zodpovedajúceho jednotlivým bunkovým líniam, ku ktorému sme pridali DMSO, a to z dôvodu nedostatočnej rozpustnosti testovaných látok v médiu. DMSO zlepšuje rozpustnosť týchto látok, vo vode sú totiž len veľmi ťažko rozpustné. Pre bunky je však DMSO toxický, preto sme ho používali do maximálne 1 % koncentrácie v médiu. (Galvao et al. 2014)

Prvotné analýzy prípadov nefrotoxicity súvisiacej s liečbou BRAF inhibítormi určili ako pravdepodobný cieľ nefrotoxického poškodenia proximálne tubuly. (Jhaveri et al. 2015) V tejto práci sme ako zdroj buniek proximálnych tubulov použili bunkovú líniu HK-2. Z výsledkov hodnotenia cytotoxického pôsobenia môžeme usúdiť, že BRAF inhibítory vyvolali poškodenie týchto buniek, pričom vemurafenib sa prejavil vyššou toxicitou než dabrafenib. Hoci sa vemurafenib po 24-hodinovej inkubácii zdal byť bezpečnejším z týchto dvoch liečiv, jeho toxicita počas ďalších 24 hodín významne vzrástla, u dabrafenibu bol nárast toxicity menší. Toxicita BRAF inhibítorov sa zvyšovala dĺžkou inkubácie; výnimkou boli len paracetamol a amfotericín B, ktorých hodnota IC_{50} bola po 48-hodinovej inkubácii vyššia, a teda ich toxicita bola nižšia.

Výsledky poukazujú aj na výrazný nefrotoxický účinok BRAF inhibítorov na podocyty. Dokonca môžeme konštatovať, že nefrotoxicita vemurafenibu je vyššia než u amfotericínu B, u ktorého je hodnota IC_{50} po 48 hodinách opäť nižšia než po 24-hodinovej inkubácii, ako tomu bolo aj pri HK-2 bunkovej línii. Znova sa potvrdilo, že spomedzi BRAF inhibítorov má na renálne bunky nepriaznivejší vplyv vemurafenib. Nefrotoxický potenciál na bunky PODO/TERT256, vyhodnotený podľa hodnôt IC_{50} , rastie nasledovne: paracetamol, dabrafenib, amfotericín B a vemurafenib.

Posledná z použitých líní, hepatálna HepG2 bunková línia, nachádza uplatnenie hlavne v testoch hepatotoxicity. V tejto práci slúžila predovšetkým na porovnanie s ostatnými bunkovými líniami, od ktorých sa výrazne líši, a to nielen pôvodom, ale aj

funkčne a morfológicky. Z výsledkov pôsobenia BRAF inhibítorov možno usúdiť, že dabrafenib a vemurafenib pôsobia toxicky aj na hepatálne bunky, pričom toxicita rastie v čase a je vyššia u vemurafenibu. Látky používané ako štandardy sú v použitých koncentráciách 0,1 – 500 μM bezpečné, čo nám potvrdili aj hodnoty IC_{50} získané v priebehu experimentu. Tie sa nachádzajú ako pre amfotericín B, tak aj pre paracetamol, nad uvedeným koncentračným rozmedzím.

Čím dlhšiu expozíciu liečivám bunky všetkých pri experimente použitých línií podstúpili, tým vyšší bol ich toxický potenciál. Výnimku predstavoval amfotericín B, a to len pri renálnych bunkových líniách, kedy sme po 48-hodinovej inkubácii mohli pozorovať pokles toxicity vo forme vyššej hodnoty IC_{50} oproti hodnote získanej po 24-hodinovej inkubácii. Dôvodom by mohla byť odlišná farmakokinetika amfotericínu B. Amfotericín B sa rýchlo distribuuje do tkanív, z ktorých sa v dôsledku vysokého distribučného objemu (pri lieku Abelcet bol stanovený $V_d = 2268 \text{ l/kg}$) pomaly eliminuje, ale presný mechanizmus redukcie toxicity ešte nebol presne popísaný.

8. ZÁVER

V tejto práci sme sa venovali stanoveniu orgánovej toxicity BRAF inhibítorov *in vitro*, zameranej predovšetkým na potvrdenie alebo vyvrátenie názoru, či tieto bunky pôsobia špecificky nefrotoxicky len na bunky proximálnych tubulov, ako naznačili prvotné analýzy prípadov, v ktorých sa prejavila nefrotoxicita počas liečby BRAF inhibítormi, alebo pôsobia toxicky aj na iné typy renálnych buniek. Pri pokusoch sme využili aj jednu hepatálnu bunkovú líniu, slúžila ako komparátor.

Cytotoxicitu oboch testovaných BRAF inhibítorov (dabrafenib, vemurafenib) sme stanovili a vzájomne porovnávali na základe toxikologického parametru IC_{50} s toxicitou amfotericínu B a paracetamolu, a to zvlášť pre každú bunkovú líniu.

BRAF inhibítory pôsobili toxicky na oba typy renálnych buniek, čiže na podocyty aj na bunky renálnych tubulov, s nárastom toxicity v čase. V prípade všetkých bunkových línií bol vemurafenib, v konečnom dôsledku, toxickejší oproti dabrafenibu, čo potvrdzuje výsledky predošlých analýz a zároveň napĺňa ciele tejto práce. V porovnaní s amfotericínom B, známym nefrotoxickým liečivom, bola toxicita vemurafenibu voči podocytárnym bunkám PODO/TERT256 línie dokonca vyššia. Paracetamol, ktorý je známy predovšetkým svojím hepatotoxickým potenciálom, bol pre renálne aj hepatálne bunky počas všetkých inkubačných intervalov relatívne bezpečný a netoxický.

9. LITERATÚRA

1. Adler-Moore, Jill P., Jean-Pierre Gangneux, Peter G. Pappas. Comparison between liposomal formulations of amphotericin B. *Medical Mycology* 2016; 54(3): 223 – 231. DOI: 10.1093/mmy/myv111
2. Anonym. CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (Technical Bulletin). Promega 2012; 13.
3. Borecká, Desana. Etiopatogenéza, klinická diagnostika melanómu. *Dermatológia pre prax* 2016; 10(2): 63 – 67.
4. Bowyer, Samantha, Rebecca Lee, Alberto Fusi, Paul Lorigan. Dabrafenib and Its Use in the Treatment of Metastatic Melanoma. *Melanoma Management* 2015; 2(3): 199 – 208. DOI: 10.2217/mmt.15.21
5. D’Mello, Stacey A.N., Graeme J. Finlay, Bruce C. Baguley, Marjan E. Askarian-Amiri. Signaling Pathways in Melanogenesis. *International Journal of Molecular Sciences* 2016; 17(7): 1144 – 1162. DOI: 10.3390/ijms17071144
6. Dumont, Jennifer, Don Eewart, Baisong Mei, Scott Estes, Rashmi Ksirsagar. Human Cell Lines for Biopharmaceutical Manufacturing: History, Status, and Future Perspectives. *Critical Reviews in Biotechnology* 2016; 36(6): 1110 – 1122. DOI: 10.3109/07388551.2015.1084266
7. Galvao, Joana, Benjamin Davis, Mark Tilley, Eduardo Normando, Michael R. Duchon, M. Francesca Cordeiro. Unexpected low-dose toxicity of the universal solvent DMSO. *The FASEB Journal* 2014; 25(3): 1317 – 1330. DOI: 10.1096/fj.13-235440

8. Garbe, Claus, Sail Abusaif, Thomas K. Eigentler. Vemurafenib. *Recent Results in Cancer Research* 2014; 201: 215 – 225. DOI: 10.1007/978-3-642-54490-3_13
9. Hamill, Richard J. Amphotericin B Formulations: A Comparative Review of Efficacy and Toxicity. *Drugs* 2013; 73(9): 919 – 934. DOI: <https://doi.org/10.1007/s40265-013-0069-4>
10. Hudu, Shuaibu Abdullahi, Ahmed Subeh Alshrari, Ahmad Syahida, Zamberi Sekawi. Cell Culture, Technology: Enhancing the Culture of Diagnosing Human Diseases. *Journal of Clinical and Diagnostics Research* 2016; 10(3): DE01 – DE05. DOI: 10.7860/JCDR/2016/15837.7460
11. Chandrasekharan N.V. et al.. COX-3, a cyclooxygenase-1 Variant Inhibited by Acetaminophen and Other Analgesic/ Antipyretic Drugs: Cloning, Structure, and Expression. *Proceedings of the National Academy of the Sciences of the United States of America* 2002; 99(21): 13926 – 13931. DOI: 10.1073/pnas.162468699
12. Jan, Yi-Hua, Diane E. Heck, Ana-Cristina Dragomir, Carol R. Gardner, Debra L. Laskin, Jeffrey D. Laskin. Acetaminophen Reactive Intermediates Target Hepatic Thioredoxin Reductase. *Chemical Research in Toxicology* 2014; 27(5): 882 – 894. DOI: 10.1021/tx5000443.
13. Jhaveri, D. Kenar; Vipulbhai Sakhiya, Steven Fishbane. Nephrotoxicity of the BRAF Inhibitors Vemurafenib and Dabrafenib. *JAMA Oncology* 2015; 1(8): 1133 – 1134. DOI: 10.1001/jamaoncol.2015.1713.
14. Józwiak-Bębenista, Marta, Jerzy Z. Nowak. Paracetamol: Mechanism of action, applications and safety concern. *Acta Poloniae Pharmaceutica – Drug research* 2014; 71(1): 11 – 23.
15. Krajsová, Ivana. Kdy a čím léčit metastazující melanom. *Remedia* 2016; 26(4): 320 – 324.

16. Kainthla, Radhika, Kevin B. Kim, Gerald S. Falchook. Dabrafenib. *Recent Results in Cancer Research* 2014; 201: 227 – 240. DOI: 10.1007/978-3-642-54490-3_14
17. Kaur Pardeep, Robin, Rajendra G. Mehta, Saroj Arora, Balbir Singh. Progression of Conventional Hepatic Cell Culture Models to Bioengineered HepG2 Cells for Evaluations of Herbal Bioactivities. *Biotechnology Letters* 2018; 40(6): 881 – 893. DOI: 10.1007/s10529-018-2547-y
18. Kim, Alex, Mark S. Cohen. The Discovery of Vemurafenib for the Treatment of BRAF-mutated Metastatic Melanoma. *Expert Opinion on Drug Discovery* 2016; 11(9): 907 – 916. DOI: 10.1080/17460441.2016.1201057
19. Knöspel, Fanny et al. *In vitro* Model for Hepatotoxicity Studies Based on Primary Human Hepatocyte Cultivation in a Perfused 3D Bioreactor System. *International Journal of Molecular Sciences* 2016; 17(4): 584 – 605. DOI: 10.3390/ijms17040584
20. Lakomý, Radek, Alexandr Poprach, Renata Koukalová. Maligní melanom – současné přístupy k léčbě. (Lakomý et al. 2015). *Remedia* 2015; 25(3): 192 – 196.
21. Launay-Vacher, Vincent et al.. Acute Renal Failure Associated With the New BRAF Inhibitor Vemurafenib: A Case Series of 8 Patients. *Cancer* 2014; 120(14): 2158 – 2163. DOI: 10.1002/cncr.28709
22. Linares, A. Miguel, Alan Zakaria, Parminder Nizran. Skin cancer. *Primary Care* 2015; 42(4): 645 – 659. DOI: 10.1016/j.pop.2015.07.006
23. Lüllmann Heinz, Klaus Mohr, Lutz Hein. Barevný atlas farmakologie - Překlad 4. anglického, zcela přepracovaného a rozšířeného vydání. Grada Publishing a.s. 2012. ISBN: 9788024739083. 366 strán.
24. Mačák, Jirka, Jana mačáková, Jana Dvořáčková. *Patologie: 2., doplněné vydání.* Grada Publishing a.s., 2012. ISBN: 9788024777702. 376 strán.

25. Murárová, Zuzana, Desana Borecká. Maligny melanóm – etiopatogenéza, klinický obraz, diagnostika a manažment pacienta. *Onkológia* 2016; 11(6): 342 – 347.
26. Murárová, Zuzana. Prevencia nemelanómovej rakoviny kože. *Dermatológia pre prax* 2018; 12(2): 64 – 68.
27. Reiser, Jochen, Mehmet M. Altintas. Podocytes. *F1000Research* 2016; 5:F1000 Faculty Rev-114. DOI: 10.12688/f1000research.7255.1
28. Rzepka, Zuzanna, Ewa Buszman, Artur Beberok, Dorota Wrześniok. From Tyrosine to Melanin: Signaling Pathways and Factors Regulating Melanogenesis. *Postepy Higieny i Medycyny Doświadczalnej (Online)* 2016; 70(0): 695 – 708. DOI: 10.5604/17322693.1208033
29. Savoia, Paola, Paolo Fava, Filippo Casoni, Ottavio Cremona. Targeting the ERK Signaling Pathway in Melanoma. *International Journal of Molecular Sciences* 2019; 20(6): 1483 – 1520. DOI: 10.3390/ijms20061483
30. Su, Robin C. et al.. Hyperglycemia Induces Key Genetic and Phenotypic Changes in Human Liver Epithelial HepG2 Cells Which Parallel the *Leprdb/J* Mouse Model of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD). *PLoS One* 2019; 14(12): e0225604. DOI: 10.1371/journal.pone.0225604
31. Tseng, Hsiang-Wen, Wen-Tai Li, Jung-Feng Hsieh. Targeted Agents for the Treatment of Melanoma: An Overview. *Recent Advances in the Biology, Therapy and Management of Melanoma*. InTech 2013. ISBN: 978-953-51-0976-1. 386 strán. DOI: <http://dx.doi.org/10.5772/54938>
32. Wanchoo, Rimda, Kenar D. Jhaveri, Gilbert Deray, Vincent Launay-Vacher. Renal effects of BRAF inhibitors: a systematic review by the Cancer and the Kidney International Network. *Clinical Kidney Journal* 2016; 9(2): 245 – 251. DOI: 10.1093/ckj/sfv149

33. Wanchoo, Rimda et al.. Renal Toxicities of Novel Agents Used for Treatment of Multiple Myeloma. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* 2017; 12(1): 176 – 189. DOI: 10.2215/CJN.06100616

34. Ward, William H., Jeffrey M. Farma. *Cutaneous melanoma – Etiology and Therapy*. Codon Publications 2017. ISBN: 978-0-9944381-4-0. 192 strán. DOI: <http://dx.doi.org/10.15586/codon.cutaneousmelanoma.2017>

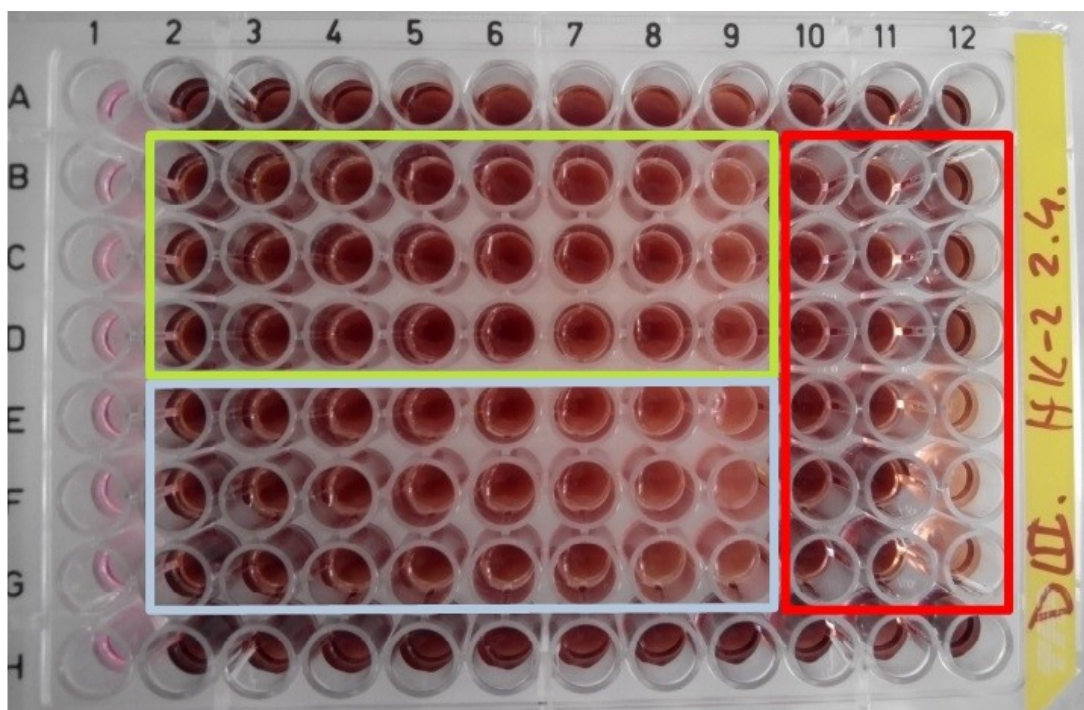
35. Weber, Elijah J. et al.. Development of a microphysiological model of human kidney proximal tubule function. *Kidney International* 2016; 90(3): 627 – 637. DOI: 10.1016/j.kint.2016.06.011

ELEKTRONICKÉ ZDROJE

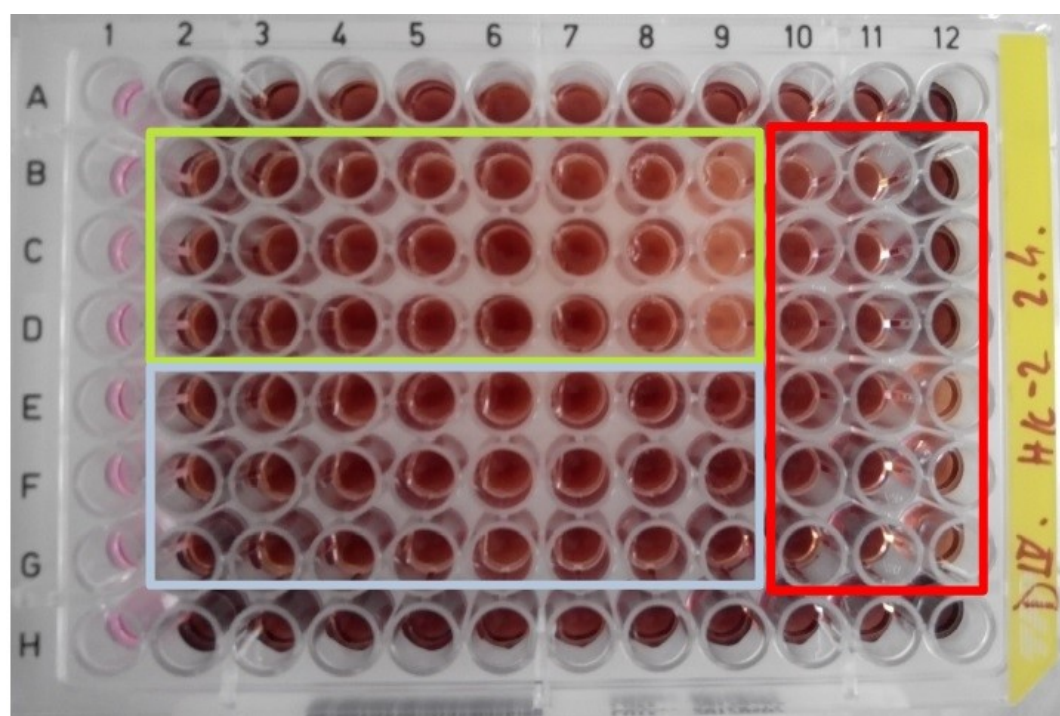
1. Anonym. Acetaminophen. In: PubMed. 28.1.2016. Dostupné na URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK548162/>. Prístup: 15.12.2019.
2. Anonym. Acetaminophen. In: ChemicalBook 2017. Dostupné na URL: www.chemicalbook.com/ProductChemicalPropertiesCB1413658_EN.htm. Prístup: 15.12.2019.
3. Anonym. Amphotericin B. In: ChemicalBook 2017. Dostupné na URL: <https://www.chemicalbook.com/CAS/GIF/1397-89-3.gif>. Prístup: 15.12.2019
4. Anonym. Cell Culture Basics Handbook. In: Thermo Fisher Scientific 2016. Dostupné na URL: <https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/Documents/PDFs/PG1563-PJT1267-COL31122-Gibco-Cell-Culture-Basics-Handbook-Global-FLR.pdf>. Prístup: 15.12.2019
5. Anonym. Comparison of Different Methods to Measure Cell Viability. In: Creative Bioarray. Dostupné na URL: <https://www.creative-bioarray.com/support/comparison-of-different-methods-to-measure-cell-viability.htm>. Prístup: 15.12.2019
6. Anonym. European Cancer Information System. In: European Commission. 21.9.2018. Dostupné na URL: [https://ecis.jrc.ec.europa.eu/explorer.php?\\$0-1](https://ecis.jrc.ec.europa.eu/explorer.php?$0-1). Prístup: 25.4.2020
7. Anonym. Kontrola znamienok na tele: využite čas v kúpeľoch! In: Kúpele Dudince. 14.1.2020. Dostupné na URL: <https://www.kupeledudince.sk/zdravy-zivotny-styl/kontrola-znamienok-na-tele>. Prístup: 21.3.2020
8. Anonym. PODO/TERT256. In: EVERCYTE. 5/2018. Dostupné na: <http://www.evercyte.com/medizin/cell-lines/immortalized-human-somatic-cells/podo-tert256.html> Prístup: 15.3.2020

9. Meenakshi, Arora. Cell Culture Media. In: Labome. 10.3.2020 Dostupné na: <https://www.labome.com/method/Cell-Culture-Media-A-Review.html>. Prístup: 26.4.2020. DOI: //dx.doi.org/10.13070/mm.en.3.175.
10. Súhrn charakteristických vlastností lieku Panadol Novum 500 mg. In: ŠÚKL alebo ADC. Dátum revízie textu: 11/2019. Dostupné na URL: https://www.sukl.sk/hlavna-stranka/slovenska-verzia/pomocne-stranky/detail-lieku?page_id=386&lie_id=7221C alebo <https://www.adc.sk/databazy/produkty/spc/panadol-novum-500-mg-853873.html>. Prístup: 15.12.2019
11. Súhrn charakteristických vlastností lieku Abelcet. In. ŠÚKL alebo ADC. Dátum revízie textu: 8/2019. Dostupné na URL: https://www.sukl.sk/hlavna-stranka/slovenska-verzia/pomocne-stranky/detail-lieku?page_id=386&lie_id=13444 alebo <https://www.adc.sk/databazy/produkty/spc/abelcet-563435.html>. Prístup: 15.12.2019

10. PRÍLOHY



Príloha 1 Dabrafenib, vemurafenib a príslušné kontroly; 24-hodinová inkubácia s HK-2 bunkami.



Príloha 2 Amfotericín B, paracetamol a príslušné kontroly; 24-hodinová inkubácia s HK-2 bunkami.