

UNIVERZITA KARLOVA

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie



**STANOVENÍ LEDVINNÉ TOXICITY
ANTINEOPLASTIK IN VITRO**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Jana Maixnerová, Ph.D.

Hradec Králové 2021

Bc. Marie Zádrapová

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Tato práce nebyla použita k získání jiného či stejného titulu“.

.....

Marie Zádrapová

Poděkování

Ráda bych na tomto místě poděkovala především vedoucí své práce RNDr. Janě Maixnerové, Ph.D., za rady a konstruktivní připomínky, za vstřícnost a ochotu při vypracovávání diplomové práce a odbornou konzultaci. Dále bych chtěla poděkovat rodině a všem, kdo mě podporovali.

Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

Studentka: Bc. Marie Zádrapová

Školitel: RNDr. Jana Maixnerová, Ph.D.

Název diplomové práce: Stanovení ledvinné toxicity antineoplastik *in vitro*

BRAF inhibitory patří mezi důležitá antineoplastika. Fungují na principu specifické inhibice určitých proteinkináz a ukázaly se jako velmi účinné při léčbě melanomu. Jejich nevýhodou je však relativně brzký nástup rezistence; je proto důležité hledat nové kombinace již zavedených léčiv nebo pracovat na vývoji nových struktur s podobnou inhibiční účinností na melanomové buňky. Velmi slibným léčivem ze skupiny BRAF inhibitorů se ukázal být encorafenib a jeho kombinace s binimetinibem, nicméně jeho terapeutickou limitací může být potenciální renální toxicita.

Tato práce se zaměřovala na stanovení *in vitro* cytotoxicity encorafenibu na různé typy ledvinných buněk ve třech časových intervalech a na jejím porovnání se dvěma lékovými standardy amfotericinem B a paracetamolem. K tomuto účelu byly využity tři druhy morfologicky a funkčně odlišných buněk ledvin (PODO/TERT256, HK-2 a HEK293). Cytotoxický potenciál byl měřen kolorimetrickou metodou CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay, která je založená na redukci činidla MTS a podle míry redukce se následně určila viabilita buněk. Získané výsledky jsou prezentovány formou hodnot IC_{50} , která byla stanovena analýzou inhibičních křivek. Míra toxicity léčiva rostla v pořadí HK2 < HEK293 < PODO/TERT256. Z toho vyplývá, že encorafenib působil nejvíce toxicky na buňky podocytů, což může souviset s faktem, že je BRAF hojně exprimován v glomerulárních podocytech. Jak je vidět ze získaných dat, encorafenib působí toxicky i na další zkoumané ledvinné linie. I přesto je však encorafenib slibným léčivem s dobrou účinností vůči několika maligním onemocněním.

Abstract

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacology and Toxicology

Student: Bc. Marie Zádrapová

Supervisor: RNDr. Jana Maixnerová, Ph.D.

Title of diploma thesis: Determination of renal toxicity of antineoplastics *in vitro*

BRAF inhibitors are important antineoplastics. They work on the principle of inhibition of certain types of protein kinases and turned out to be very efficient for the treatment of melanoma. One of their disadvantages is relatively early onset of resistance; thus, it is important to look for new combinations of drugs that are already in use or work on the development of new structures with similar inhibition efficacy on melanoma cells. Encorafenib and its combination with binimetinib have been shown to be very promising drugs from the group of BRAF inhibitors, however, potential renal toxicity may be a therapeutic limitation.

This thesis was focused on the determination of *in vitro* cytotoxicity of encorafenib on different types of renal cells in three time intervals and on its comparison with two drug standards - amphotericin B and paracetamol. Three types of morphologically and functionally different kidney cells (PODO/TERT256, HK-2 and HEK293) were used for this purpose. The cytotoxic potential was measured by colorimetric method CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay, which is based on reduction of MTS reagent and cell viability was subsequently determined by the reduction rate. The obtained results are presented as IC₅₀ values determined by analysis of the inhibition curves. The toxicity rate of the drug increased in the following order: HK2 < HEK293 < PODO/TERT256. This shows encorafenib to be the most toxic to podocyte cells, which may be related to the fact that BRAF is highly expressed in glomerular podocytes. As can be seen from the obtained data, encorafenib is also toxic to the other studied renal lines. Even so, encorafenib is a promising drug with good efficacy against several malignancies.

Obsah

| | | |
|-------|---------------------------------------|----|
| 1 | Seznam zkratk | 1 |
| 2 | Úvod | 3 |
| 3 | Teoretická část | 4 |
| 3.1 | Melanom | 4 |
| 3.1.1 | Rizikové faktory | 5 |
| 3.1.2 | Incidence | 5 |
| 3.1.3 | Maligní transformace | 5 |
| 3.1.4 | Typy melanomu | 7 |
| 3.1.5 | Diagnostika | 9 |
| 3.1.6 | Léčba | 10 |
| 3.2 | BRAF inhibitory | 10 |
| 3.2.1 | RAF signalizace a vznik rezistence | 11 |
| 3.2.2 | Encorafenib | 12 |
| 3.2.3 | Kombinace encorafenibu a binimetinibu | 14 |
| 3.2.4 | Vedlejší účinky kombinované léčby | 15 |
| 3.3 | Renální toxicita | 15 |
| 3.3.1 | Paracetamol | 16 |
| 3.3.2 | Amfotericin B | 17 |
| 3.4 | Buněčné linie | 18 |
| 3.4.1 | PODO/TERT256 | 19 |
| 3.4.2 | HK-2 | 19 |
| 3.4.3 | HEK293 | 20 |
| 3.5 | Metoda hodnocení cytotoxicity | 21 |
| 4 | Cíl práce | 23 |
| 5 | Experimentální část | 24 |
| 5.1 | Použitý materiál | 24 |

| | | |
|-------|---|----|
| 5.1.1 | Přístrojové vybavení a pomůcky..... | 24 |
| 5.1.2 | Chemikálie | 25 |
| 5.1.3 | Buněčné modely..... | 25 |
| 5.1.4 | Studované/testované látky..... | 26 |
| 5.2 | Vlastní experiment | 27 |
| 5.2.1 | Příprava fosfátového pufru..... | 27 |
| 5.2.2 | Příprava testovaných látek | 28 |
| 5.2.3 | Stanovení cytotoxicity..... | 28 |
| 6 | Výsledky..... | 30 |
| 6.1 | CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay | 30 |
| 6.1.1 | PODO/TERT256..... | 30 |
| 6.1.2 | HK-2..... | 34 |
| 6.1.3 | HEK293 | 38 |
| 7 | Diskuse | 42 |
| 8 | Závěr..... | 45 |
| 9 | Literatura | 46 |

1 Seznam zkratek

| | |
|------------------|---|
| AKI | Akutní selhání ledvin |
| ARAF | Gen kódující A-Raf protein/enzym |
| ATCC | Sbírka tkáňových a buněčných kultur (American Type Culture Collection) |
| BRAF | Lidský gen kódující B-Raf protein/enzym; B-Raf protoonkogen |
| BRAFi | Inhibitor BRAF proteinu |
| CRAF | Gen kódující C-Raf protein/enzym |
| CSC | Rakovinové kmenové buňky |
| DMEM | Dulbecovo a Eaglovo modifikované médium |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| EGF | Epidermální růstový faktor |
| EMA | Evropská léková agentura (European Medicines Agency) |
| ERK | Kináza regulující extracelulární signály |
| FDA | Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (USA) (Food and Drug Administration) |
| HEK293 | Buněčná linie lidských embryonálních ledvinných buněk |
| HK-2 | Buněčná linie lidských ledvinných buněk |
| hTERT | Lidská telomerázová reverzní transkriptáza |
| IC ₅₀ | Koncentrace látky snižující buněčnou viabilitu na 50 % |

| | |
|--------------|---|
| MAPK | Mitogenem aktivovaná proteinkináza; signální dráha |
| MEK | MAPK/ERK kináza |
| MEKi | Inhibitor MEK proteinu |
| MEM | Eaglovo minimální esenciální médium |
| MSH | Melanocyty stimulující hormon |
| MTS | [3-(4,5-dimetyltiazol-2-yl)-5-(3-karboxymetoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium] |
| NF1 | Neurofibromin 1 |
| NRAS | V-ras onkogenní homolog neuroblastomu |
| PBS | Fosfátový pufr |
| PES | Fenazin ethosulfát |
| PODO/TERT256 | Buněčná linie lidských podocytů |
| RAF | Typ proteinkinázy |

2 Úvod

Incidence kožního melanomu každým rokem vzrůstá v porovnání s jinými typy rakoviny. Vlivem slunečního záření a jeho genotoxického efektu na lidskou DNA může dojít v kožních buňkách k maligním změnám. Nejčastěji se setkáváme s mutacemi v klíčových genech zásadních buněčných procesů, jako je proliferace (*BRAF* – B-raf protoonkogen, *NRAS* – V-ras onkogenní homolog neuroblastomu, *NF1* – neurofibromin 1), diferenciace, růst a metabolismus či rezistence na apoptózu. (Leonardi et al. 2018)

Díky vhodnému umístění nádoru na kůži lze melanom relativně dobře diagnostikovat. Při včasném odhalení onemocnění lze nádor chirurgicky odstranit, avšak často je také potřebná léčba kinázovými inhibitory nebo inhibitory imunitní kontroly. BRAF inhibitory jsou protinádorová léčiva ze skupiny inhibitorů proteinkináz. Mechanismem jejich působení je tedy selektivní inhibice mutované BRAF kinázy u melanomových buněk. Tímto způsobem interferují s MAPK signalizační dráhou, která reguluje proliferaci a přežívání nádorových buněk. (Proietti et al 2020b)

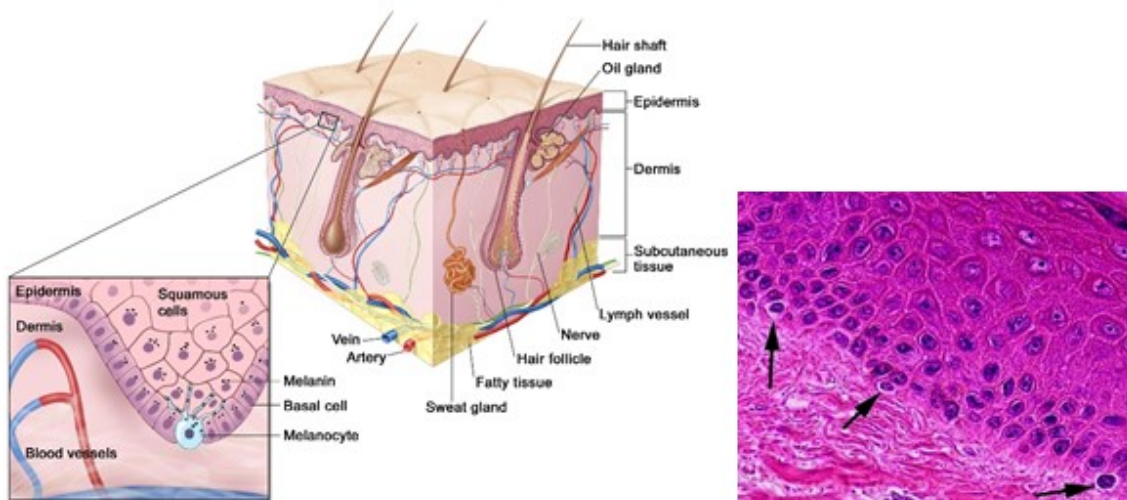
U cílené monoterapie BRAF inhibitory (dabrafenib, vemurafenib a encorafenib), však po několika měsících úspěšné léčby dochází ke vzniku získané rezistence. Doporučeným léčebným postupem v těchto případech je kombinovaná terapie BRAF inhibitoru spolu s MEK inhibitorem, díky které je možné rozvoj rezistence oddálit. V současné době jsou dostupné tři kombinace: dabrafenib a trametinib, vemurafenib a cobimetinib a encorafenib s binimetinibem. (Proietti et al. 2020a)

Předmětem této diplomové práce bylo stanovit renální cytotoxicitu BRAF inhibitoru encorafenibu na třech ledvinných buněčných liniích – HEK293, HK-2 a PODO/TERT256. Každá z linií představuje morfologicky a funkčně odlišné typy renálních buněk. Experimenty s těmito buňkami byly prováděny *in vitro* a jako standardy při samotném stanovení cytotoxicity byly použity potenciální lékové toxiny amfotericin B (nefrotoxický) a paracetamol (hepatotoxický).

3 Teoretická část

3.1 Melanom

Melanom je nádorové onemocnění vycházející z nadměrné proliferace melanocytů. Jako melanocyt se označuje buňka produkující melaninový pigment. Je přítomná v kůži ve vrstvě bazálních buněk v nejhlubší části epidermis, jak je možné vidět na obrázku 1. (Anonym 2021c) Samotná syntéza melaninu probíhá ve specifických buněčných organelách – tzv. melanosomech. Tyto váčky se vyvíjí z endosomů, nicméně mají jinou strukturu a funkci přizpůsobenou tvorbě pigmentu. Každý melanocyt v bazální vrstvě je propojen s přibližně 36 keratinocyty a jednou Langerhansovou buňkou; vytvořený melanin je pak v procesu pigmentace kůže přenášen dendrity do přilehlých keratinocytů. (Brenner a Hearing 2008) Melanocyty jsou mimo kůži dále přítomné ve vlasových folikulech, na slizničních površích, v mozkových plenách a choroidální vrstvě oka/uveálnímu traktu. (Leonardi et al. 2018)



Obr. 1 Znárodnění anatomie kůže a jejích 3 vrstev: epidermis, dermis a podkožního vaziva. Vpravo šipkami označeny melanocyty na histologickém řezu.

Modifikováno dle: Anonym 2021c a Setijanti et al. (2018).

3.1.1 Rizikové faktory

V současnosti je melanom považován za multifaktoriální onemocnění vznikající interakcí mezi genetickou náchylností a expozicí prostředí. Nejdůležitějším environmentálním rizikovým faktorem pro rozvoj maligního melanomu je délka expozice UV paprsků, které mají genotoxický efekt - zvyšují riziko poškození DNA a jejich působením dochází ke genetickým změnám. Existuje korelace mezi expozicí slunečního záření v dětství a rizikem melanomu v dospělosti. Pokud má jedinec v anamnéze závažné popáleniny od slunce, zejména tedy v dětském věku, je vystaven vyššímu riziku onemocnění melanomem. (Kozovska et al. 2016, Rastrelli et al. 2014) Naproti tomu chronická expozice slunce je spíše spojována s aktinickou keratózou a nemelanomovými kožními nádory. Riziko zvyšují i jisté fenotypové rysy; například zrzavé vlasy, světlá kůže, pihy, světlé oči, citlivost na slunce a neschopnost se opálit zvyšují riziko rozvoje melanomu zhruba o 50 %. Mezi další důležité faktory patří počet melanocytických névů (= benigní shluky melanocytů; atypické névy spojovány s vyšším rizikem), potvrzená diagnóza v rodinně a určitá genetická onemocnění (xeroderma pigmentosum, retinoblastom). (Rastrelli et al. 2014)

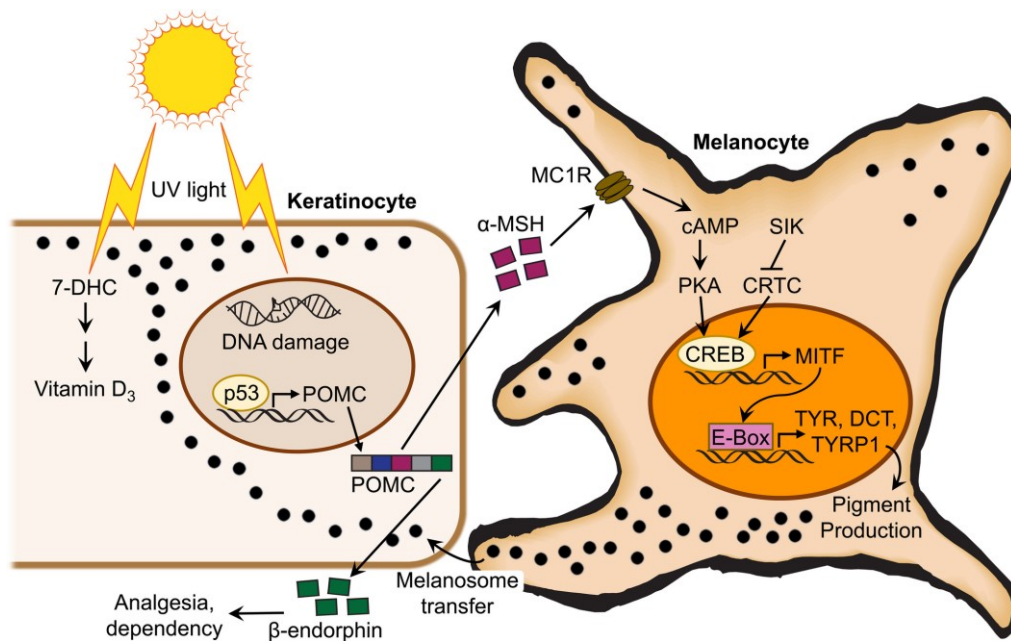
3.1.2 Incidence

Světová incidence kožního melanomu roste ročně mnohem více v porovnání s jinými typy rakoviny. Mezi jednotlivými státy se však může velmi lišit; tyto rozdíly v incidenci jsou dané přítomností různých kožních fenotypů v populaci a také rozdíly v expozici slunce. (Leonardi et al. 2018) Například v Evropě míra incidence melanomu narůstá od jižních zemí, kde mají lidé kůži více chráněnou před UV zářením zvýšenou pigmentací, směrem k severským státům. Melanom je v současnosti považován za nejčastější rakovinu u populací se světlou pletí. V USA je melanom veden jako 5. nejčastější rakovina u mužů a 6. u žen. Postihuje především mladé a osoby ve středním věku. Medián diagnózy je 57 let a bylo vyzorováno, že incidence melanomu se lineárně zvyšuje po 25. roku do 50 let, poté klesá (a to zejména u žen). (Rastrelli et al. 2014)

3.1.3 Maligní transformace

Kožní melanom je jeden z nejagresivnějších a nejvíce letálních forem rakoviny kůže. Nejedná se o homogenní onemocnění, ale je složen z biologicky odlišných subtypů.

Morfologickou (fenotypovou) variaci mezi jednotlivými typy řídí genetické alterace. Jako odpověď na poškození DNA vyvolané UV zářením produkují kožní keratinocyty MSH – melanocyty stimulující hormon. Tento hormon se váže na příslušné receptory na melanocytech, které pak produkují a uvolňují melanin. Melaninový pigment v konečném důsledku funguje jako štít proti UV záření, čímž zabraňuje dalším změnám DNA. Celý tento proces znázorňuje obrázek 2. Neopravené poškození DNA buněk vede ke tvorbě mutace, díky které může dojít k rozvoji rakovinného bujení. (Leonardi et al. 2018, Kozovska et al. 2016)



Obr. 2 Mechanismus poškození DNA UV zářením a následná produkce melaninu v reakci na toto poškození.

Převzato z: Nguyen a Fisher (2018).

Změny melanocyty do benigního névu zůstávají kontrolované a nejsou kancerogenní. Nicméně některé změny mohou vést k nadměrné aktivaci různých regulačních mechanismů; jedním z nich je MAPK signalizační dráha – cesta pro mitogenem aktivovanou proteinkinázu. Je klíčová pro přenos extracelulárních signálů do jádra a pro expresi daných genů, aby se udržela rovnováha růstu/proliferace a apoptózy uvnitř buňky. (Patel et al. 2020) Fyziologická zpětná vazba je prevencí perzistentní aktivace MAPK cesty v normálních buňkách, ale chybí u melanomových buněk s BRAF mutacemi, což vede k nepřetržité aktivaci MAPK cesty. (Kakadia et al. 2018) Somatické mutace u kožních melanomů jsou zodpovědné za dysregulaci buněčného cyklu a

nejčastěji se týkají genů kontrolujících centrální buněčné procesy, kam patří proliferace (*BRAF*, *NRAS*, *NF1*), růst a metabolismus (*PTEN* – gen pro homolog fosfatázy a tenzinu, *KIT* – gen pro tyrosinkinázový receptor), rezistence na apoptózu (*TP53* – gen pro protein p53, *CDKN2A* – gen pro cyklin dependentní kinázový inhibitor 2A) apod. (Leonardi et al. 2018)

37-50 % všech melanomů nese mutaci v *BRAF* genu. U kožních melanomů se obvykle jedná o missense mutace, které postihují kodon 600 exonu 15. Nejčastěji pozorované *BRAF* mutace jsou způsobeny jednoduchými nukleotidovými substitucemi kyseliny glutamové. 80-90 % mutací tvoří V600E (valin za kyselinu glutamovou), 5-12 % je V600K (valin za lysin, zde jsou zasaženy 2 nukleotidy), méně než 5 % pak připadá na V600D mutaci (valin za kyselinu aspartamovou) a V600R (valin za arginin). (Leonardi et al. 2018, Kozovska et al. 2016, Proietti et al. 2020a)

Zajímavým faktem je, že *BRAF* je mutován až v 80 % benigních znamének a přesto tato znaménka zůstávají indolentní po desetiletí, mimo jiné také díky imunitnímu dohledu. Samotný onkogenní *BRAF* tedy není dostačující pro rozvoj melanomu a vzácně se benigní znaménko dále do melanomu vyvine. (Leonardi et al. 2018) Melanom se tedy často rozvíjí až v době, kdy dojde k nějaké další doprovázející mutaci v tumor supresorových genech. (Patel et al. 2020) V šíření melanomu má pak klíčovou roli overexprese matrixových metaloproteináz, které vyvolávají degradaci komponent extracelulární matrix, čímž pomáhají infiltraci tumorových buněk a šíření krevním řečištěm. (Leonardi et al. 2018)

3.1.4 Typy melanomu

Melanom se může objevit kdekoliv na těle. Melanomy z chronicky exponované kůže se obvykle objevují u starších jedinců na hlavě, krku, oblasti zad a horních končetin. Hlavními genetickými faktory jsou *BRAF*, *NF1* a *NRAS* mutace. Naopak melanom spojený s přerušovaně exponovanou kůží slunci se vyskytuje u mladších jedinců (pod 55 let) a na částech těla, které nejsou tolik vystavené slunci, jako je například trup. Jsou obvykle asociované s *BRAF* V600E mutací. (Leonardi et al. 2018) Melanom s *BRAF* mutací má také vyšší pravděpodobnost metastáz do mozku spolu s kratší dobou přežití ve srovnání s melanomem nemutovaným na *BRAF*. (Patel et al. 2020)

Známe 4 hlavní typy melanomu; jde o rozdělení dle histologických subtypů a to na povrchově se šířící melanom, lentigo maligna melanom, akrolentiginózní melanom a nodulární melanom. Nejběžnějším typem je povrchově se šířící melanom (cca 70 % případů). (Kozovska et al. 2016) Může vzniknout jak de novo, tak v asociaci se znaménkem (névem). Obrys léze bývá často ostře lemován nepravidelnými výčnělky. Povrch je plochý, ale může mít hmatatelnou papulu nebo uzlík, který sahá několik milimetrů nad povrch kůže. (Rastrelli et al. 2014)

Tvorba melanomu lentigo maligna koreluje s dlouhodobou expozicí slunci a rostoucím věkem; je tedy typický pro starší populaci. Čítá 4-15 % kožních melanomů, může se vyvíjet desítky let; maligním se stává v momentě, kdy prorůstá do hlubších vrstev kůže a tvoří uzlíky. Má nepravidelné obrysy a nachází se především na krku a hlavě. (Kozovska et al. 2016, Rastrelli et al. 2014)

Akrolentiginózní melanom není příliš běžný, vyskytuje se pouze u 5 % bílé populace – je typičtější pro Asiaty, Hispánce a Afričany. Postihuje starší pacienty nejčastěji na dlaních a chodidlech a obvykle roste v nehtovém lůžku. (Kozovska et al. 2016, Rastrelli et al. 2014)

Nodulární melanom se řadí mezi vzácné melanomy (5 % případů, věková kategorie 50-60 let). Často je ulcerativní a má vyšší výskyt metastáz. Má pouze vertikální růstovou fázi, roste tedy směrem dolů hlouběji do kůže a pokud není odstraněn, velmi rychle dochází k jeho rozvoji. (Kozovska et al. 2016, Rastrelli et al. 2014) Za klinickou variantu nodulární formy melanomu se považuje i polypoidní melanom. Nutně nemusí být pigmentovaný, díky čemuž může být zaměňován za benigní léze. Vykazuje rychlý růst s aktivní vaskularizací, což vysvětluje jeho agresivitu a výskyt metastáz v rádech týdnů. Postihuje hlavně mladší věkovou kategorii (20-39 let). (Cabrera a Recule 2018)

Z hlediska diagnostiky je nejobtížnější určit tzv. nevoidní melanom (NeM), protože se podobá benignímu znaménku, ale chová se jako invazivní melanom, s lokálními recidivami a metastázemi. Hned po něm následuje tzv. hypo/amelanotický melanom, kde léze nejsou pigmentované, případně jen slabě. Mohou být zaměněny za benigní neoplazmata či dermatitidu, což vede k pozdní diagnóze a opožděné léčbě, prognóza je pak horší než u pigmentovaných melanomů. (Cabrera a Recule 2018)

BRAF mutace také mohou být predispozicí ke vzniku mozkových metastáz, neboť metastatický melanom má vysoké riziko šíření do CNS. Mezi všemi rakovinami je melanom třetí nejběžnější příčinou metastází do mozku, incidence se pohybovala od 43 do 75 %. 60 % pacientům s melanomem ve fázi IV se mohou rozvinout mozkové metastázy, což zřetelně zvyšuje morbiditu a snižuje celkovou prognózu. (Holbrook et al. 2019)

3.1.5 Diagnostika

Pro rozpoznání maligního melanomu (a jeho odlišení od benigního) v raném klinickém stádiu se v roce 1985 zavedly tzv. ABCD kritéria. Akronym je zkratkou pro:

| | |
|--------------------------------|---|
| A (Asymmetry) | tvář jedné poloviny neodpovídá druhé |
| B (Border irregularity) | hrany jsou zubaté nebo rozmazané, pigment se může šířit do okolní kůže |
| C (Color variegation) | mimo odstíny hnědé a černé můžeme vidět bílou, červenou, růžovou, modrou |
| D (Diameter) | změna velikosti nad 6 mm |

Později bylo přidáno písmeno **E** (Evolving), jež značí změnu tvaru a barvy znaménka, což je zvláště důležité pro diagnózu nodulárních melanomů. Mezi další klinické projevy patří nepravidelný, zvednutý povrch, měnící se vzhled, povrchové ulcerace, krvácení, zánět, svědění a bolest. (Kozovska et al. 2016, Rastrelli et al. 2014)

Brzká detekce maligního melanomu stále zůstává klíčem ke snížení mortality, přičemž prognóza je přímo úměrná hloubce neoplazmy. Oproti jiným malignitám je v případě kožního melanomu výhodné jeho umístění na kůži, což umožňuje včasnou detekci skrze neinvazivní přístupy. Velký potenciál má samovyšetření kůže jakožto jednoduchá metoda screeningu melanomu a prekancerózních lézí. Další neinvazivní diagnostickou technikou pro pozorování kůže *in vivo* je dermoskopie. Využívá optického zvětšování k umožnění vizualizace morfologických struktur, které nejsou viditelné pouhým okem. Pro diagnózu melanomu existují jistá dermoskopická kritéria, například atypická pigmentová síť, výskyt regresních struktur či zvláštního cévního obrazce. Další technikou, která umožňuje neinvazivní vyšetření nativní kůže v reálném čase při téměř histologickém rozlišení je odrazová konfokální mikroskopie. (Rastrelli et al. 2014)

3.1.6 Léčba

Melanom ve stádiu I a II lze obvykle chirurgicky odstranit. Melanom ve stádiu III a IV většinou vyžaduje větší systémový zásah kvůli agresivitě tumoru a zvýšenému nádorovému zatížení. Pokud je to možné, chirurgická resekce se provádí i v pozdějších stádiích, nicméně možnosti léčby u pacientů s metastatickým melanomem jsou omezené a pětiletá míra přežití byla před nástupem imunoterapie 15–20 %. (Patel et al. 2020) Imunoterapie a kinázové inhibitory jsou v současnosti kostrou systémové terapie, zatímco chemoterapie je až vedlejší volbou. Pro pacienty v pokročilém stádiu je stanovena léčba zahrnující RAF a MEK kinázové inhibitory a inhibitory imunitní kontroly (anti-CTLA4 – protilátka proti cytotoxickému T-lymfocytárním antigenu a anti-PD1 – protilátka proti receptoru programované buněčné smrti 1). (Leonardi et al. 2018) K vývoji této molekulárně cílené terapie přispěla identifikace somatických mutací BRAF V600. Léčba kinázovými inhibitory zlepšuje prognózu pacientů ve srovnání s chemoterapií, a také není tak agresivní. Dosahuje zmenšení nádoru a zmírňuje příznaky, ovšem cena této léčby je vysoká. Do budoucna se pracuje na vývoji nových terapeutických strategií, jejichž cílem bude eliminovat CSC (rakovinové kmenové buňky) cílením např. na CSC-specifickou molekulu CD44. Tomu pomáhá i tzv. CSC nika, což je prostředí, ve kterém tyto kmenové buňky rostou a má velký klinický potenciál pro vývoj nových terapeutických strategií. (Kozovska et al. 2016)

3.2 BRAF inhibitory

RAF je rodina onkogenních serinových-threoninových proteinkináz uvnitř MAPK cesty se třemi isoformami: ARAF, BRAF a CRAF. (Patel et al. 2020) BRAF protein je složen ze 766 aminokyselin. Obsahuje 3 domény: 2 mají regulační funkci a 1 je katalytická (odpovědná za fosforylaci MEK, navíc zajišťuje udržení proteinu v inaktivní konformaci skrze hydrofobní interakci mezi smyčkou bohatou na glycin a aktivačním segmentem – díky tomu je protein nepřístupný pro vazbu ATP. V případě mutací dochází k abnormálnímu otočení katalytické domény, což generuje neustálou aktivní konformaci s vyšší kinázovou aktivitou). (Leonardi et al. 2018)

BRAF inhibitory jsou malé molekuly, které blokují aktivitu mutované formy molekuly BRAF. (Anonym 2020b) Preferenčně inhibují izoformu V600E, ale i další izoformy jako V600K nebo V600D. Molekulární změny vyskytující se s progresí

onemocnění tedy slouží jako body pro terapeutickou interferenci. (Patel et al. 2020) Všechny BRAF inhibitory (BRAFi) se selektivně vážou a inhibují aktivní místo BRAF kinázy; většina BRAFi navíc sdílí určité strukturní motivy: vazba kruhu A v oblasti vázající nukleové báze, kruh B jako stericky významné pevné jádro, BC linker (solný můstek) pro iontové interakce a lipofilní kruh C. (Heppt et al. 2019) Léčiva jsou cílenou terapií – inhibují signální transdukcii a pomáhají zpomalovat či zastavovat růst a šíření melanomových buněk. (Anonym 2020b)

Prvním BRAF inhibitorem schváleným FDA (Food and Drug Administration) v roce 2011 byl vemurafenib, následovaný dabrafenibem v roce 2013. Nejnovější schválený BRAFi je encorafenib v roce 2018. Souběžně s objevem a použitím BRAF inhibitorů se otevřela cesta k vývoji MEK inhibitorů. První z nich, trametinib, byl schválen FDA v roce 2013; schválení cobimetinibu proběhlo v roce 2015, přičemž jako poslední se schválil binimetinib v roce 2016. (Patel et al. 2020)

Studie ukázaly, že uvedená léčiva je výhodnější používat v kombinaci, protože se dosahuje větší míry odpovědi organismu než u monoterapie BRAFi a zároveň byly pozorovány méně závažné nežádoucí účinky. (Anonym 2020b, Koelblinger et al. 2018) Současné účinné kombinace BRAFi/MEKi jsou dabrafenib/trametinib, vemurafenib/cobimetinib a encorafenib/binimetinib. Jsou považovány za standardní léčbu pacientů s pokročilým melanomem s mutací genu *BRAF*. (Hamid et al. 2019) Cílem kombinací je mimo jiné také oddálit vývoj rezistence. (Patel et al. 2020)

3.2.1 RAF signalizace a vznik rezistence

Více než polovina pacientů léčených monoterapií BRAFi vykazovala známky rekurence během 6-7 měsíců léčby. (Patel et al. 2020) Tato relativně krátce trvající odpověď je dána především tím, že po několika měsících dochází k vývoji získané rezistence. (Eroglu a Ribas 2016) Obecně existují dva typy rezistence – primární/vnitřní a sekundární/získaná. První typ odkazuje na ty pacienty, kteří neodpovídají na žádný typ terapie BRAF inhibitory (cca 15 % pacientů). Získaná se naopak týká pacientů, u kterých se po počáteční pozitivní odpovědi na léčbu objeví nádorová regrese a ta je často pozorována u většiny pacientů s melanomem. (Patel et al. 2020)

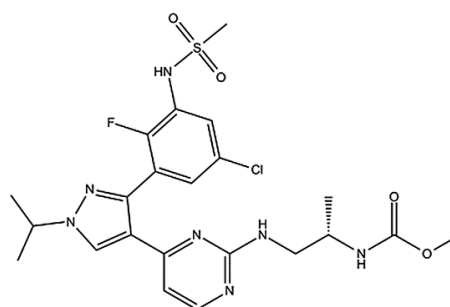
Bylo identifikováno několik mechanismů rezistence, ale nejběžnější je skrze reaktivaci MAPK cesty – tzv. paradoxní aktivace. Zatímco BRAF zůstává inhibován,

další RAF proteiny (CRAF a ARAF) mohou nahradit úlohu BRAF a pokračovat v MAPK hyperaktivaci. (Sun et al. 2018). Nejnižší paradoxní aktivaci MAPK má encorafenib (4 %) – oproti vemurafenibu (18-19 %) a dabrafenibu (6–10 %). (Koelblinger et al. 2018) Paradoxní indexy pak byly pro encorafenib 50, pro dabrafenib 10 a pro vemurafenib 5,5. Vyšší index zde znamená vyšší inhibici genu *BRAF* V600. Významně větší paradoxní index encorafenibu je připisován jeho extrémně dlouhé době disociace. (Sun et al. 2018) Typické specifické vedlejší účinky BRAFi jsou částečně vysvětleny právě touto paradoxní aktivací MAPK dráhy. Dalším známým mechanismem rezistence může být RAF dimerizace; dosud známé BRAF inhibitory totiž nejsou schopny inhibovat dimerizované izofomy RAF. (Koelblinger et al. 2018) Léčba BRAF inhibitory inhibuje pouze mutantní monomer v buňkách melanomu. (Patel et al. 2020)

Kombinací MEK a BRAF inhibitorů lze oddálit získanou rezistenci a prodloužit délku působení – v kombinaci s MEKi se doba prodlužuje až na 9.5 měsíce. Nicméně ve snaze překonat rezistenci jsou současně s kombinací BRAFi a MEKi testovány i další léčiva. Preklinické studie ukázaly, že HSP90 (heat shock protein 90) inhibitory, např. XL888 mohou nástup rezistence na BRAF inhibitory oddálit. Přestože je melanom považován za tumor odolný proti radiaci, některé případy ukazují vyšší odpověď organismu na kombinaci vemurafenibu a radiační terapie. (Eroglu a Ribas 2016, Kakadia et al. 2018)

3.2.2 Encorafenib

Jedná se o nejnovější RAF kinázový, ATP-kompetitivní inhibitor druhé generace. (Sun et al. 2018) Chemicky se řadí mezi fenylypyrazoly, jak je vidět na obrázku 3. (Anonym 2021a)



Obr. 3 Chemická struktura léčiva encorafenib.

Převzato z: Shirley (2018).

Encorafenib byl schválen pro léčbu pokročilého melanomu a vykazuje selektivní antiproliferativní účinky u V600E mutovaných buněk. (Koelblinger et al. 2018, Sun et al. 2018) Tuto mutaci je možné nalézt i u jiných typů rakovin – například u non-Hodkinova lymfomu, kolorektálního karcinomu, karcinomu štítné žlázy, nemalobuněčného karcinomu plic, adenokarcinomu plic či vlasatobuněčné leukémie. (Anonym 2021a)

Encorafenib je charakterizován odlišnými farmakologickými vlastnostmi ve srovnání s ostatními BRAFi; právě jeho farmakologické modifikace mohou vést ke zvýšení „on-target“ efektů (účinnosti) a ke snížení „off-target“ efektů (vedlejších účinků). Při perorálním podání má vysokou biologickou dostupnost (kolem 85 %). Je rychle absorbován a maximální koncentrace dosahuje za 2 hodiny po podání s následným 6-ti hodinovým poločasem. Příjem jídla sice absorpci oddaluje, ale na celkovou absorpci nemá vliv. Nejvíce signifikantní rozdíl mezi encorafenibem a jinými BRAFi je jeho výrazně delší poločas disociace (30 h) ve srovnání s dabrafenibem (2 h) a vemurafenibem (30 min). To znamená, že si encorafenib udrží svůj inhibiční efekt déle než ostatní BRAFi; dochází k prodloužené supresi cílové struktury a tím ke zvýšené účinnosti. (Koelblinger et al. 2018, Sun et al. 2018)

Encorafenib je metabolizován v játrech pomocí cytochromů P450 – 2C19, 2D6 a zejména 3A4. Kvůli možnosti lékových interakcí by se neměly užívat silné inhibitory CYP3A4, mezi které patří například clarithromycin a itraconazol. (Anonym 2019b) Dále je vhodné vyhnout se látkám, které indukují nebo inhibují aktivitu tohoto enzymu. (Anonym 2019a) U CYP3A se to týká hlavně grapefruitu a třezalky, kdy grapefruit enzym inhibuje (a zvyšuje sérovou koncentraci encorafenibu), zatímco třezalka ho indukuje (a snižuje sérovou koncentraci encorafenibu). (Anonym 2021a) Bylo identifikováno 20 různých metabolitů, které jsou vylučovány jak močí, tak exkremy. 2-5 % absorbovaného léku je vyloučeno nezměněno. (Sun et al. 2018)

Encorafenib podávaný samostatně je spojován s vyšším rizikem nežádoucích reakcí v porovnání s kombinovanou léčbou spolu s binimetinibem. (Anonym 2021a) Nejčastější vedlejší účinky spojované s monoterapeutickou léčbou encorafenibem zahrnují myalgií, nauzeu, artralgií, alopecii a hyperkeratózu. Přechodná Bellova obrna (porucha postihující jeden nerv asociovaná s paralýzou obličejového nervu) byla pozorována u 8 % pacientů, zatímco u ostatních BRAFi byla pozorována jen vzácně.

(Heinzerling et al. 2019) Monoterapie BRAFi také indukuje vznik neoplasmat. (Sun et al. 2018)

Závěrem se dá říci, že odlišné farmakologické vlastnosti encorafenibu přispívají jak ke zlepšení účinnosti (zvýšení účinku na cíl) a snížení vedlejších účinků vlivem vysoké specifčnosti léčiva, tak k lepší snášenlivosti v důsledku menší paradoxní aktivace MAPK cesty. (Koelblinger et al. 2018)

3.2.3 Kombinace encorafenibu a binimetinibu

Vědci zjistili, že blokovat molekulu BRAF i MEK současně je více efektivní než pouhá blokace BRAF. Kombinace obou léčiv interferuje s abnormálními BRAF signály, aby zpomalila či zastavila buněčný růst, který není pod kontrolou – encorafenib blokuje signalizační kaskádu mutované BRAF molekuly V600E, binimetinib blokuje signalizaci od mutovaných BRAF molekul V600E či V600K prostřednictvím MEK molekuly. (Anonym 2020b) V červnu 2018 byla tato kombinace schválena FDA. (Patel et al. 2020) V dubnu 2020 pak přijal Výbor Evropské agentury pro léčivé přípravky (EMA) doporučení na změnu podmínek registrace encorafenibu. Encorafenib byl indikován v kombinaci s binimetinibem pro léčbu dospělých pacientů s neresektovatelným nebo metastatickým melanomem s mutací BRAF V600. Nyní přibyla indikace v kombinaci s cetuximabem pro léčbu dospělých pacientů s metastatickým kolorektálním karcinomem s BRAF V600E mutací, kteří dostávali předchozí systémovou léčbu. (Anonym 2020a)

Tím, že je encorafenib metabolizován zejména přes CYP3A4 a binimetinib převážně přes UGT1A1 se zdá, že oba kinázové inhibitory se vzájemně při metabolismu neovlivňují. Tato kombinovaná léčba je často spojena s přechodným zvýšením hladin sérových aminotransferáz; v rozsáhlých klinických studiích se u 26 % pacientů objevily zvýšené hladiny ALT (alaninaminotransferázy). Aminotransferázové abnormality byly bezpříznakové a klinicky se neprojevovalo jaterní poškození (hepatotoxicita) – žloutenka apod. Doposud tato terapeutická kombinace nebyla spojena s klinickými případy akutního poškození jater. (Anonym 2019a) Vedlejší účinky, které byly častější u kombinace E+B oproti čistému encorafenibu zahrnovaly nauzeu, zvracení, průjem, svalové spasmy, hypertenzi, pozměněnou funkci jater a zvýšenou kreatinínázou. Ze závažných vedlejších účinků je vhodné zmínit krvácení, dysfunkci levé komory a oční toxicity jako je retinopatie. Je zde také riziko vzniku nových nádorů, jako je například

dlaždicobuněčný karcinom. Studie na zvířatech ukazují též fetální toxicitu, proto by kombinace neměla být užívána v těhotenství. (Anonym 2019b)

V klinických studiích byla kombinace E+B spojena se zlepšením celkového přežití u pacientů s mutovaným melanomem ve srovnání se standardní léčbou. Navíc se kombinace ukázala jako lépe snášenlivá, než jak byl samotný E. (Anonym 2019a) Nízká míra fotosenzitivity a pyrexie spojované s encorafenibem v monoterapii i kombinované terapii může přispět ke zlepšení jeho bezpečnostního profilu. Přidání MEKi snížilo výskyt nežádoucích účinků; to umožnilo vyšší dávkování BRAFi, čímž se přispělo k lepším odpovědím pacientů na léčbu. (Koelblinger et al. 2018)

3.2.4 Vedlejší účinky kombinované léčby

BRAFi a MEKi kombinace jsou vysoce účinné v terapii, nicméně vedlejší účinky se vyskytují téměř u všech pacientů léčených jakoukoliv jejich kombinací. Zatímco některé jsou vlastností celé třídy léčiv, jiné jsou specifické přímo pro danou substanci. Rozdíly v tolerabilitě léčiva mohou být částečně vysvětleny jejich individuální farmakokinetikou a farmakodynamikou. (Heinzerling et al. 2019) Rozdíly v profilech toxicity jednotlivých kombinací zahrnují např. častější pyrexii u dabrafenibu a trametinibu, častější fotosenzitivitu u vemurafenibu a cobimetinibu a zvýšení jaterních enzymů u encorafenibu a binimetinibu. (Eroglu a Ribas 2016) Vedlejší účinky spojené se všemi BRAFi zahrnují gastrointestinální potíže, zvýšení transamináz, artralgie, kožní toxicity spojené s tvorbou sekundárních neoplazmat. Časté jsou také kožní nežádoucí účinky, jako je dlaždicobuněčný karcinom, seborhoická keratóza a fotosenzitivita. Ty jsou však částečně redukovány supresí tzv. paradoxní aktivace MAPK. (Heinzerling et al. 2019, Heppt et al. 2019) Lze říci, že relativně vyšší výskyt vedlejších účinků byl při léčbě dabrafenibem/trametinibem nebo vemurafenibem/cobimetinibem ve srovnání s kombinací encorafenib/binimetinib. (Hamid et al. 2019)

3.3 Renální toxicita

Nefrotoxicita je důležitým vedlejším účinkem BRAF inhibitorů, přestože není příliš častá. 26 % pacientů dle autorů této studie prodělalo AKI (akutní selhání ledvin); s větším rizikem AKI bylo spojeno užívání diuretik a vyšší dávky encorafenibu. Pacientům bylo potřeba dávku upravit, případně léčbu úplně přerušit. Incidence AKI u

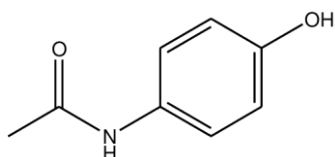
kombinace E+B však byla stejně nižší než u terapie jinými BRAFi. (Seethapathy et al. 2020) Se zvyšující se koncentrací obou léčiv roste také poškození jater. Při mírné poruše funkce jater se doporučuje snížení dávky encorafenibu a při větší poruše by se kombinace neměla vůbec používat. U pacientů s mírnou nebo středně závažnou poruchou funkce ledvin není nutné žádné snížení dávky, ovšem o úpravě dávkování u těžké poruchy ($< 30 \text{ ml/min/1,73 m}^2$) nejsou k dispozici klinické údaje k podávání encorafenibu. (Anonym 2019b) Přestože potenciální úpravu dávky nelze určit, u pacientů se závažnou poruchou funkce ledvin by měl být encorafenib užíván s opatrností. Zvýšení kreatininu bylo často hlášeno jak u encorafenibu v monoterapii, tak v kombinaci s binimetinibem nebo cetuximabem. Pozorované případy selhání ledvin včetně akutního poškození ledvin a poruchy funkce ledvin byly obecně spojeny se zvracením a dehydratací. Další přispívající faktory zahrnovaly diabetes a hypertenzi. (Anonym 2021d)

3.3.1 Paracetamol

Paracetamol/acetaminofen (viz obrázek 4) patří mezi hojně užívaná léčiva s analgetickým a antipyretickým účinkem. Tyto vlastnosti jsou podobné vlastnostem nesteroidních antiflogistik, nicméně oproti nim paracetamol nevykazuje žádnou protizánětlivou aktivitu. Je také lékem volby pro pacienty, které není možné nesteroidními antiflogistiky léčit; tato skupina zahrnuje například astmatiky, hemofiliky, těhotné či kojící ženy. Má velmi široké terapeutické použití a je organismem dobře tolerován, vyskytuje se u něj však i několik vedlejších účinků. Často jde o alergické kožní reakce nebo nežádoucí účinky v gastrointestinálním traktu, ale dochází i k závažnějším reakcím. (Józwiak-Bebenista a Nowak 2014)

Dlouhodobé užívání a nadužívání paracetamolu je spojeno s poruchou funkce ledvin, vysokým krevním tlakem a zejména hepatotoxicitou; dokonce i v terapeutických dávkách je pozorovatelná zvýšená aktivita aminotransferáz, vysoké dávky pak vedou k hepatické nekróze až k selhání jater. Od roku 2013 je paracetamol zařazen mezi přípravky, které podléhají zvláštnímu monitorování právě v souvislosti s vedlejšími účinky. (Józwiak-Bebenista a Nowak 2014, Mahadevan et al 2006) Paracetamol podléhá rychlé eliminaci. 90 % sloučeniny se metabolizuje játry, kde se přeměňuje na neaktivní metabolity vylučované močí. 5 % se eliminuje nezměněno ledvinami a 5 % podléhá N-hydroxylaci díky CYP2E1 za vzniku toxického N-acetyl-p-benzochinon iminu. Tato látka se kovalentně váže na hepatocyty, zejména při předávkování, kde naruší jak strukturu

jaterních buněk, tak i jejich enzymatické procesy. V pozdějším stádiu otravy může dojít až k nekróze renálních tubulů. (Józwiak-Bebenista a Nowak 2014) Otrava se léčí podáním antidota N-acetylcysteinu. (Mahadevan et al. 2006)

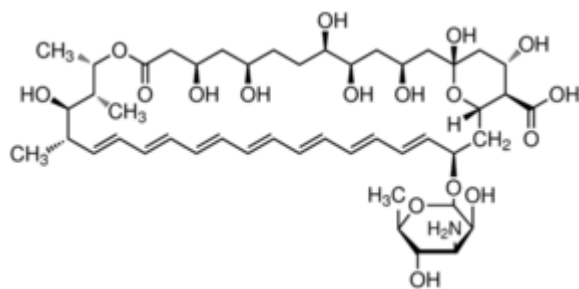


Obr. 4 Struktura paracetamolu (N-acetyl-para-aminofenolu).

Převzato z: Srabovic et al. (2017).

3.3.2 Amfotericin B

Amfotericin B patří do skupiny polyenových antibiotik (viz obrázek 5) a je určen k léčbě systémových mykotických infekcí. Je produkován plísní *Streptomyces nodosus*. Z gastrointestinálního traktu se špatně vstřebává, proto je k léčbě systémových infekcí podáván parenterálně. Je známo, že antifungální účinek spojený s tímto typem antibiotik je spojený s alterací membránové permeability buněk. Amfotericin B se nevratně váže na jednu z důležitých komponent buněčné membrány citlivé plísně – ergosterol. V důsledku následných procesů dochází ke tvorbě transmembránového kanálu a k úniku důležitých intracelulárních komponent, které jsou nezbytné pro přežití buňky. Problémem je, že se amfotericin B váže i na cholesterol v savčích buněčných membránách a také tam mění jejich permeabilitu (váže se ke sterolům například v erytrocytech nebo v určitých buňkách ledvin). Projevení nefrotoxicity je typickým vedlejším účinkem a jde o hlavní limitující faktor klinického využití amfotericinu B. Renální toxicita pravděpodobně zahrnuje několik mechanismů; jedním z nich je přímý vazokonstrikční účinek na ledvinné arterioly, redukce toku krve v glomerulech a ledvinných tubulech a lýza lyzozomálních membrán tubulárních buněk. Dalším důsledkem změny propustnosti buněčné membrány je také alterace tubulárního transportu. (Sawaya et al. 1995, Anonym 2021g)



Obr. 5 Struktura polyenového antibiotika amfotericinu B.

Převzato z: Anonym (2021h).

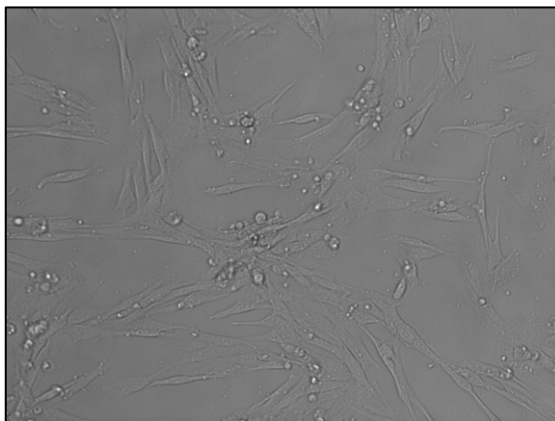
3.4 Buněčné linie

Buněčné kultury slouží ke studiu chování buněk v kontrolovaném prostředí. (Anonym 2021e) Buňky se odstraní ze zvířete, případně rostliny, a nechají se růst v příznivém umělém prostředí. Buňky mohou být přímo odstraněny z tkáně a enzymaticky nebo mechanicky rozděleny nebo mohou být odvozeny z buněčné linie nebo kmene, který už existuje. Kultivační podmínky se mohou u každého buněčného typu lišit, avšak bez výjimky musí obsahovat médium dodávající základní živiny (aminokyseliny, sacharidy, vitamíny, minerály), růstové faktory, hormony, kyslík, oxid uhličitý a mít regulované fyzikálně-chemické prostředí (pH, osmotický tlak, teplota). Většina buněk je přisedlá a musí být kultivována připojená k pevnému nebo polopevnému substrátu (→ přilnavá nebo jednovrstvá kultura), zatímco ostatní mohou být pěstovány volně v kultivačním médiu (→ suspenzní kultura). (Anonym 2021f)

Buněčné kultury jsou jedním z hlavních nástrojů užívaných v buněčné a molekulární biologii, poskytují vynikající modelový systém jak pro studium normální fyziologie buněk, tak pro studium účinku léků a toxických sloučenin na buňky. Používá se také při screeningu a vývoji léků a při výrobě biologických sloučenin ve velkém měřítku (např. vakcín, terapeutických proteinů). (Anonym 2021f) Různé typy buněk byly vyvinuty a uzpůsobeny speciálně pro účel výzkumu. Z důvodu zajištění optimálních podmínek je složení média pravidelně sledováno – kontrolují se například určité chemické sloučeniny či parametry. (Anonym 2021e)

3.4.1 PODO/TERT256

Podocyty jsou terminálně diferencované epiteliální buňky, které pokrývají kapiláry glomerulů na bazální membráně a podílejí se na filtraci krevní plazmy uvnitř Bowmanova pouzdra (obrázek 6). Filtrace je usnadněná schopností podocytů utvářet kolem glomerulárních kapilár fenestrovanou bariéru. Podocyty jsou velmi citlivé na poškození a působení toxických látek; úbytek funkčních buněk nakonec vede k onemocněním ledvin. Původní tkáň, ze které se linie odvodila, je kůra lidských ledvin. V podocytech také dochází k ektopické expresi hTERT (katalytická podjednotka telomerázy); linie má pak schopnost růst bez omezení a mít konstantní tempo růstu. Pokud jsou buňky souběžně kultivovány s endoteliálními buňkami, jsou schopné simulovat glomerulární kapilární stěnu. Jsou charakteristické typickou morfologií a expresí specifických markerů (např. nefrin, podocin a WT-1 (Wills tumor 1 protein). (Anonym 2018)



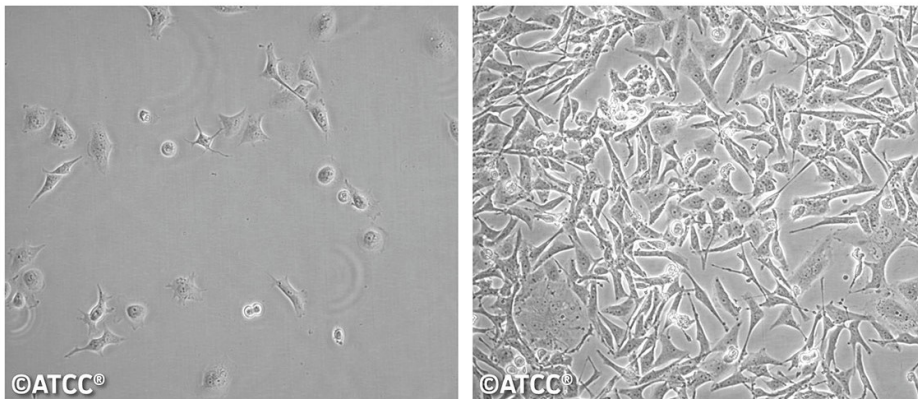
Obř. 6 Buňky linie PODO/TERT256.

Převzato od: Autorka (2020).

3.4.2 HK-2

HK-2 je linie buněk proximálních tubulů odvozená z normálních lidských ledvin (obrázek 7). Buňky jsou imortalizované díky transdukci s geny E6/E7 lidského papilomaviru 16 (HPV-16). Jde o buňky přisedlé, neschopné růstu v metylcelulóze, měkkém agaru či suspenzi. Buňky exprimují EGF (epidermální růstový faktor) a mnoho proteinů (alkalická fosfatáza, fibronectin, integriny...). HK-2 buňky si zachovávají funkční vlastnosti epitelu proximálního tubulu. Jsou schopné glukoneogeneze, jak je vidět

z jejich schopnosti vytvářet a ukládat glykogen. (Anonym 2016b) Tento typ buněk byl předmětem výzkumu již od roku 1984, kdy byla tato HK-2 linie poprvé izolována a kultivována. Zpočátku byla primární linie použita ke studiu buněčné fyziologie ledvin, neboť si zachovala mnohé ze svých *in vivo* charakteristik také *in vitro*. Vzhledem k tomu, že primární buněčné linie nelze udržet v dlouhodobé kultuře, vytvořila se transformovaná buněčná linie pomocí imortalizujícího viru – HPV. Transformované buňky též obsahují mnoho funkčních a morfologických vlastností jako buňky primární kultury. (Gildea et al. 2010) Tato buněčná linie se běžně používá pro studium proximální tubulární toxicity. (Handl et al. 2020)



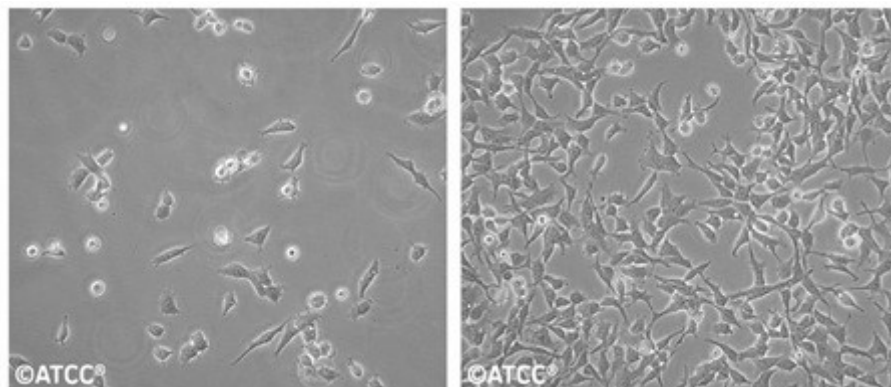
Obr. 7 Buněčná linie HK-2.

Převzato z: Anonym (2016b).

3.4.3 HEK293

Tento typ buněk roste snadno v suspenzi v buněčné kultuře, rychle se množí a produkuje velké množství proteinů. HEK293 je hypotriploidní buněčná linie s modálním chromozomem číslo 64, který se vyskytuje ve 30 % buněk; vykazují tak určitou cytogenetickou nestabilitu. Linie je odvozená z lidských embryonálních ledvinných buněk vypěstovaných v tkáňové kultuře (viz obrázek 8). Tato specifická linie byla iniciována transformací a kultivací normálních buněk HEK s DNA adenoviru typu 5. Transformace vedla k začlenění přibližně 4,5 kilobází z virového genomu do lidského chromozomu 19 buněk HEK. Linií kultivoval vědec Alex Van der Eb na počátku 70. let, samotnou transformaci provedl Frank Graham. Zdrojem buněk byl zdravý potracený plod neznámého původu. Dnes jsou buňky HEK293 hojně používány v buněčné biologii a

biotechnologii, hned po HeLa buňkách. Používají se v celé řadě experimentů, jako jsou studie transdukce signálu a proteinových interakcí, k rychlé produkci proteinů v malém měřítku a v biofarmaceutické výrobě. Vysoká účinnost transfekce buněk HEK293 navíc produkuje exogenní proteiny nebo viry pro účely farmaceutického a biomedicínského výzkumu. Díky transfekci jsou vhodnou kulturou pro výzkum rakoviny. (Anonym 2021b)



Obr. 8 Snímek buněk HEK293.

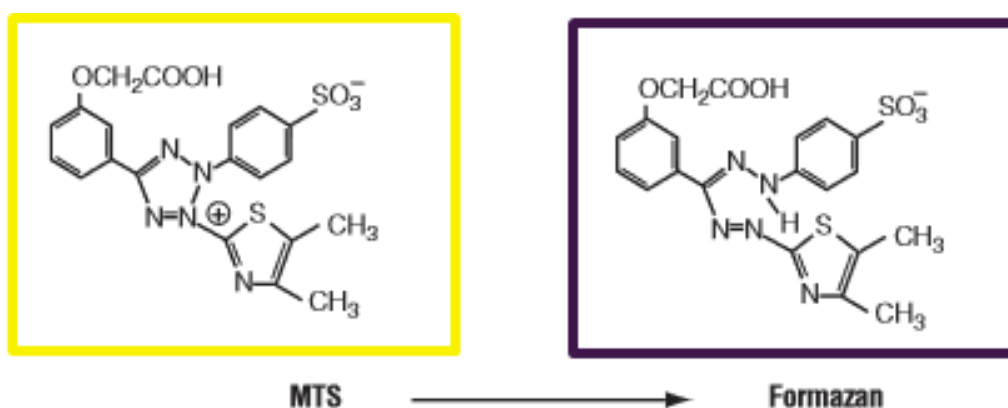
Převzato z: Xu et al. (2004).

3.5 Metoda hodnocení cytotoxicity

CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay je jednoduchou kolorimetrickou metodou pro zjištění počtu viabilních buněk během testování proliferace nebo cytotoxického potenciálu látek. Metoda vyžaduje inkubaci reagensů spolu s populací životaschopných buněk, které mění substrát na barevný produkt detekovatelný destičkovým analyzátozem.

K detekci životaschopných buněk se využívá mnoho sloučenin, v této metodě jde konkrétně o tetrazoliovou sloučeninu MTS se vzorcem [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium; jedná se o vnitřní sůl s negativním nábojem, díky kterému MTS nemůže přímo vstupovat do buněk. Tato sůl se běžně užívá v kombinaci s činidlem párujícím elektrony PES (fenazin ethosulfát). Tato látka má jednak za úkol zvyšovat chemickou stabilitu roztoku s MTS, jednak usnadňuje redukci tetrazoliové soli na formazanový produkt. PES totiž funguje jako akceptor elektronů – je schopen penetrovat životaschopné buňky, být redukován v jejich cytoplazmě nebo na buněčném povrchu (přenáší elektrony z cytoplazmy nebo plazmatické membrány) a následně buňku opustit, aby mohl konvertovat tetrazolium v

médiu na rozpustný formazanový produkt. Tato přeměna je zajištěna NADH/NADPH, které jsou tvořeny v metabolicky aktivních buňkách. Předpokládá se, že záporný náboj vzniklého formazanového produktu pomáhá jeho rozpustnosti v buněčném médiu. Za běžných kultivačních podmínek inkubace substrátu s buňkami vede k vytvoření barevného signálu, který je úměrný počtu přítomných viabilních buněk. Barevná změna je patrná z obrázku 9. Kvantita produktu je měřena pomocí absorbance a je přímo úměrná počtu žijících buněk v kultuře. Když buňky zemřou, rychle ztrácí schopnost měnit substrát na produkt, proto v jamkách s mrtvými buňkami nedochází k barevné změně. (Riss et al 2016a, Promega 2012)



Obr. 9 Přeměna tetrazoliové soli na formazanový produkt. Redukce se projeví změnou barvy ze světle žluté na tmavě vínovou.

Modifikováno dle: Promega (2012).

4 Cíl práce

- Posoudit cytotoxické působení inhibitoru BRAF léčiva encorafenibu *in vitro*, na modelech třech morfologicky a funkčně odlišných typů ledvinných buněk.
- Porovnat zjištěné kvantitativní parametry cytotoxicity encorafenibu se srovnávacími lékovými standardy (paracetamol a amfotericin B).

5 Experimentální část

5.1 Použitý materiál

5.1.1 Přístrojové vybavení a pomůcky

Laminární box: Micrological safety cabinet TOP – SAVE 1,8 (Bioair instruments, Itálie)

Inkubátor (Shel Lab, USA)

Vodní lázeň, TW 12 water bath (Julabo, Německo)

Destičkový analyzátor (TECAN, Infinite M200, Švýcarsko)

Mikroskop OPTIKA Microscopes, XDS – 1R (OPTIKA Microscopes, Itálie)

Analytické váhy Kern & Sohn GmbH (Kern & Sohn GmbH, Německo)

Centrifuga 3K30H, Sigma (Laborentrifigen, Německo)

Pipetovací nástavec SWIFTPET (HTL, Polsko)

Jednorázové plastové pipety 5, 10, 25 ml (TPP, Švýcarsko)

Automatická multikanálová pipeta Discovery Comfort 50–300 μ l (HTL, Polsko)

Automatické jednokanálové pipety Eppendorf Research® plus 5 – 50 μ l, 10 – 100 μ l, 100 – 1000 μ l (Eppendorf, Německo)

Kultivační láhve 25 cm² a 75 cm² (TPP, Švýcarsko)

Falkonky 50 ml (TPP, Švýcarsko)

Mikrozkumavky Eppendorf 0,5; 1,5; 2 ml (Eppendorf, Německo)

Špičky Eppendorf 0,1–20 μ l, 20–200 μ l (Eppendorf, Německo)

96-jamkové mikrotitrační destičky, číré (TPP, Švýcarsko)

96-jamkové mikrotitrační destičky potažené poly-D-lysinem (CORNING, USA)

Latexové rukavice, nesterilní (VWR, USA)

5.1.2 Chemikálie

Chemikálie pro fosfátový pufr (Phosphate Buffered Saline; PBS, pH = 7,4): NaCl, KCl, Na₂HPO₄, NaH₂PO₄ (PENTA, Česká republika)

DMSO (dimethylsulfoxid pro molekulární biologii > 99,9 %) (Sigma-Aldrich, USA)

Trypsin 0,25 % (Trypsin – EDTA Solution) (Sigma-Aldrich, USA)

Fetální bovinní sérum (Sigma-Aldrich, USA)

Kolagen (Bovine Collagen Coating Solution, Sigma-Aldrich, USA)

Neesenciální aminokyseliny (Sigma-Aldrich, USA)

GlutaMAX-I (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Velká Británie)

MEM (Eaglovo minimální esenciální médium) (Sigma-Aldrich, USA)

DMEM (Dulbeccovo a Eaglovo modifikované médium) (Sigma-Aldrich, USA)

PodoUp3 (MCDB131 Basal Medium) (Pan Biotech, Německo)

Hydrocortisone (Sigma-Aldrich, USA)

Extrakt z bovinního mozku (Lonza, Švýcarsko)

hEGF (Sigma-Aldrich, USA)

G418 (InvivoGen, USA)

Encorafenib (Selleckchem, USA)

Paracetamol (Sigma-Aldrich, USA)

Amfotericin B (Sigma-Aldrich, USA)

CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega, USA)

5.1.3 Buněčné modely

Před nasazením jednotlivých linií do 96-ti jamkových mikrotitračních destiček se vždy provedlo jejich pasážování a mikroskopická kontrola kvality a počtu buněk.

PODO/TERT256

První buněčnou linií využívanou k experimentálním postupům byla immortalizovaná buněčná linie PODO/TERT256 získaná od farmaceutické společnosti Evercyte GmbH (Viedeň, Rakousko). Kultivace probíhala při 37 °C ve zvýšené tenzi CO₂ (5 %) ve speciálních kultivačních lahvích (75 cm²) potažených vrstvou kolagenu. Buňky (pasáž 6-10) pak rostly v buněčném médiu PodoUp3 obohaceném o 1,6 mM GlutaMAX-I, 20% fetální bovinní sérum, 20 ng/ml hydrokortisonu, 9,6 µg/ml extraktu z bovinního mozku, 8 ng/ml hEGF a 100 µg/ml G418.

HK-2

Linie buněk HK-2 se získala z American Type Culture Collection (ATCC, USA). Buňky (pasáž 8-12) byly kultivovány v 75 cm² kultivačních lahvích v DMEM médiu, ke kterému bylo přidáno 1 % neesenciálních aminokyselin a 10 % fetálního bovinního séra. Inkubace probíhala při 37 °C v 5 % atmosféře CO₂.

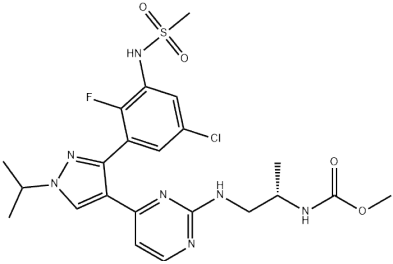
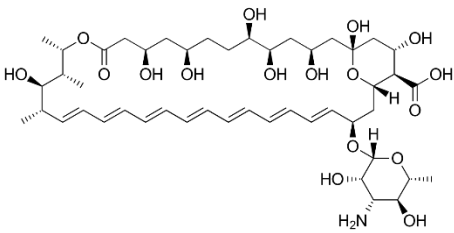
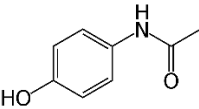
HEK293

Lidské embryonální ledvinné buňky byly též získané z ATCC (USA) a byly inkubovány v 5 % atmosféře CO₂ při teplotě 37 °C. Kultivace probíhala v 75 cm² kultivačních lahvích v buněčném médiu MEM s přidavkem 1 % L-glutaminu, 1 % neesenciálních aminokyselin, 1 % pyruvátu a 10 % fetálního bovinního séra. Použitá pasáž buněk byla 52-56.

5.1.4 Studované/testované látky

Pro experiment bylo zvoleno antineoplastické léčivo encorafenib, které se řadí mezi BRAF inhibitory. Jako standardy byly využity látky amfotericin B a paracetamol. Paracetamol sloužil jako negativní nefrotoxická kontrola, zatímco amfotericin B byl pozitivní nefrotoxickou kontrolou; cytotoxicita léčiva se pak stanovuje porovnáním s těmito standardy, jejichž cytotoxicita je známá. Struktura všech látek a jejich vzorce jsou uvedeny v tabulce 1.

Tab. 1 Struktura a vzorce testovaných látek

| Název | Struktura | Sumární vzorec |
|---------------|--|--------------------------------|
| Encorafenib |  The chemical structure of Encorafenib is a complex molecule. It features a central pyridine ring substituted with a 4-isopropyl-1H-1,2,4-triazol-5-yl group, a 2-chloro-5-fluoro-4-sulfamoylphenyl group, and a 2-((S)-1-methoxypropan-2-yl)amino group. | $C_{22}H_{27}Cl_1F_1N_7O_4S_1$ |
| Amfotericin B |  The chemical structure of Amfotericin B is a large, complex polyene macrolide. It consists of a long, unsaturated hydrocarbon chain with multiple double bonds, attached to a complex ring system containing several hydroxyl groups and a primary amine group. | $C_{47}H_{73}NO_{17}$ |
| Paracetamol |  The chemical structure of Paracetamol (Acetaminophen) is a benzene ring with a hydroxyl group (-OH) at the para position and an acetamido group (-NHCOCH ₃) at the other para position. | $C_8H_9NO_2$ |

5.2 Vlastní experiment

5.2.1 Příprava fosfátového pufru

Fosfátový pufr (PBS) se využívá během pasážování a slouží k oplachu buněk. Složení pufru včetně koncentrace jednotlivých složek je uvedeno v tabulce 2. Navážené látky se rozpustí a doplní destilovanou vodou do požadovaného objemu (1 l); následně je potřeba upravit hodnotu pH na 7,4, čehož se dosáhne přidáním hydroxidu sodného.

Tab. 2 Příprava fosfátového pufru

| Sloučenina | Molární hmotnost [g/mol] | Koncentrace [g/l] |
|--|--------------------------|-------------------|
| NaCl | 58,44 | 16,01 |
| KCl | 358,14 | 7,16 |
| Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O | 177,99 | 3,12 |
| NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O | 74,55 | 0,42 |

5.2.2 Příprava testovaných látek

Studované látky je potřeba naředit do požadované koncentrační řady, která se pro tento experiment pohybovala od 0,1 μ M do 500 μ M. Pro rozpuštění látek byl použit dimethylsulfoxid (DMSO). Toto rozpouštědlo bylo zvoleno z důvodu horší rozpustnosti testovaných sloučenin ve vodě. Nevýhodou je však cytotoxicita DMSO již při nízkých koncentracích, proto jeho koncentrace v kultivačním médiu nepřesáhla 1 %.

5.2.3 Stanovení cytotoxicity

Cytotoxicita se stanovila komerční metodou CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega, USA).

Jednotlivé buněčné linie byly nasazovány na destičku v různém množství na 100 μ l/ jamka. Buněčná linie PODO/TERT256 byla nasazena v počtu 20 000 buněk na jamku, HK-2 v počtu 15 000 buněk na jamku a HEK293 v počtu 50 000 buněk na jamku. Takto napipetované linie byly uloženy do inkubátoru na 24 h, při teplotě 37 °C v 5 % CO₂ a následně se přidávaly testované látky, které jsme si předtím nařídili do devíti koncentrací. Každá koncentrace byla aplikována do jamek v triplicátech a inkubována 24 h, 48 h nebo 72 h při teplotě 37 °C a v 5 % atmosféře CO₂. Pro buněčnou linii PODO/TERT256 byly použity 96-ti jamkové destičky potažené poly-D-lyzinem pro linii HK-2 a HEK293 se využívaly klasické 96-ti jamkové mikrotitrační destičky - číré.

Kromě testovaných látek bylo nezbytné připravit v triplicátech i několik kontrol; nebuněčnou kontrolu (100 μ l příslušného média s 1 μ l látky), kontrolu 0 % viability (buňky ve 100 μ l média s 10 % DMSO), kontrolu 100 % viability (buňky ve 100 μ l média s 1 μ l DMSO), kontrolu celkové viability (buňky se 100 μ l média) a nebuněčnou kontrolu kultivačního média (100 μ l čistého média).

Po uplynutí inkubační doby (24 h, 48 h, 72 h) v 5 % atmosféře CO₂ a teplotě 37 °C se destičky mikroskopicky zkontrolují, zda se v nich studované látky nevysrážely. Do každé z jamek pak pipetujeme 20 µl činidla MTS a necháme inkubovat za stejných podmínek dalších 90 minut. Poté změříme konkrétní absorbance látek na destičkovém analyzátoru TECAN při vlnové délce 490 nm.

Naměřená data je nejprve potřeba zpracovat v programu Microsoft Excel, kde se vypočítávají základní parametry jako je průměr z hodnot absorbancí pro jednotlivé koncentrace látek, směrodatné odchylky a relativní směrodatnou odchylku. V programu GraphPad Prism 8.02 se následně z příslušných dat sestrojí jednotlivé inhibiční křivky. Pomocí nelineární regrese jsme pak byli schopni určit základní toxikologický parametr IC₅₀ (taková koncentrace, která je nutná ke snížení viability buněk na polovinu maximální viability). Čím je hodnota vyšší, tím méně je daná látka toxická (případně je menším inhibitorem).

Výsledná viabilita pro všechny koncentrace se stanovala pomocí následující rovnice:

$$\% \text{ viability} = \frac{(Ab - Ak) \times 100}{Av100 - Am}$$

Ab = průměrná hodnota absorbance triplikátů buněk stejné koncentrace testované látky

Ak = průměrná hodnota absorbance triplikátu nebuněčné kontroly stejné koncentrace testované látky

Am = průměrná hodnota absorbance triplikátu kultivačního média

$Av100$ = průměrná hodnota absorbance triplikátu kontroly 100 % viability (Promega 2012)

6 Výsledky

6.1 CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay

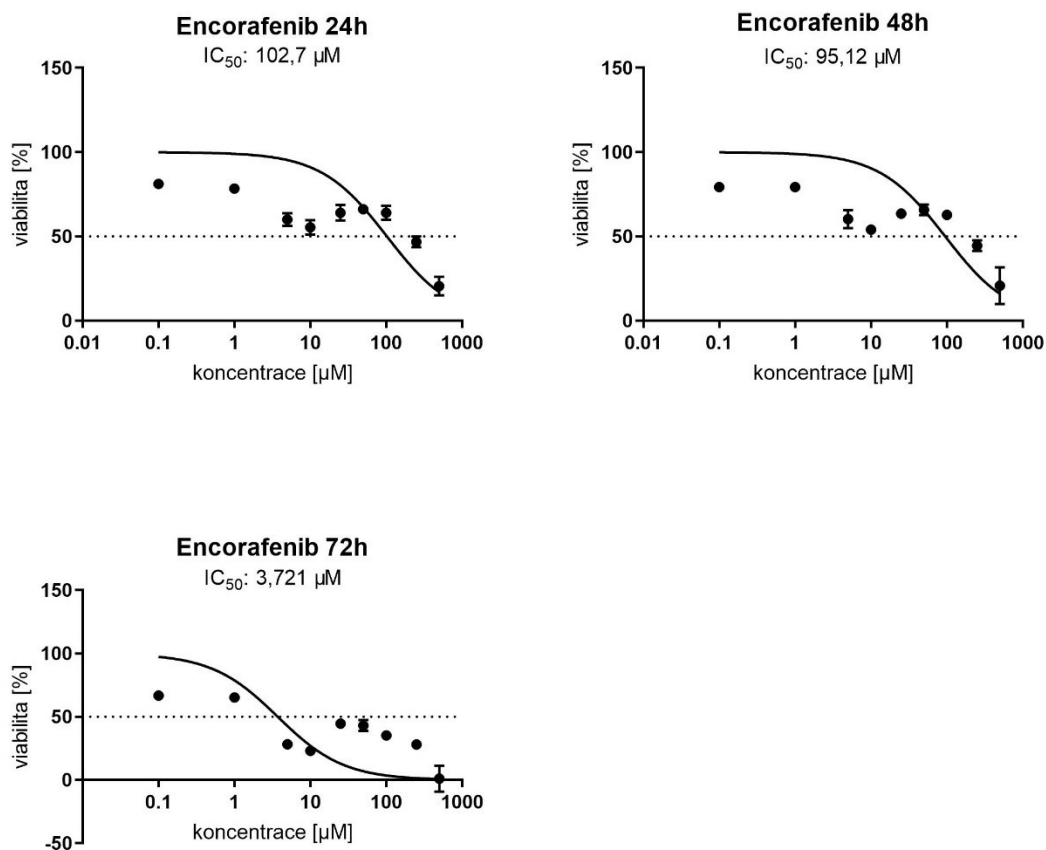
6.1.1 PODO/TERT256

Tabulka 3 představuje přehled experimentálně získaných hodnot IC_{50} testovaných látek na buněčné linii PODO/TERT256. Výsledky jsou rozděleny podle inkubační doby buněk s testovanými látkami. Koncentrační rozmezí bylo 0,1 – 500 μ M.

Tab.3 Hodnoty IC_{50} testovaných látek pro buněčnou linii PODO/TERT256 získané metodou CellTiter96.

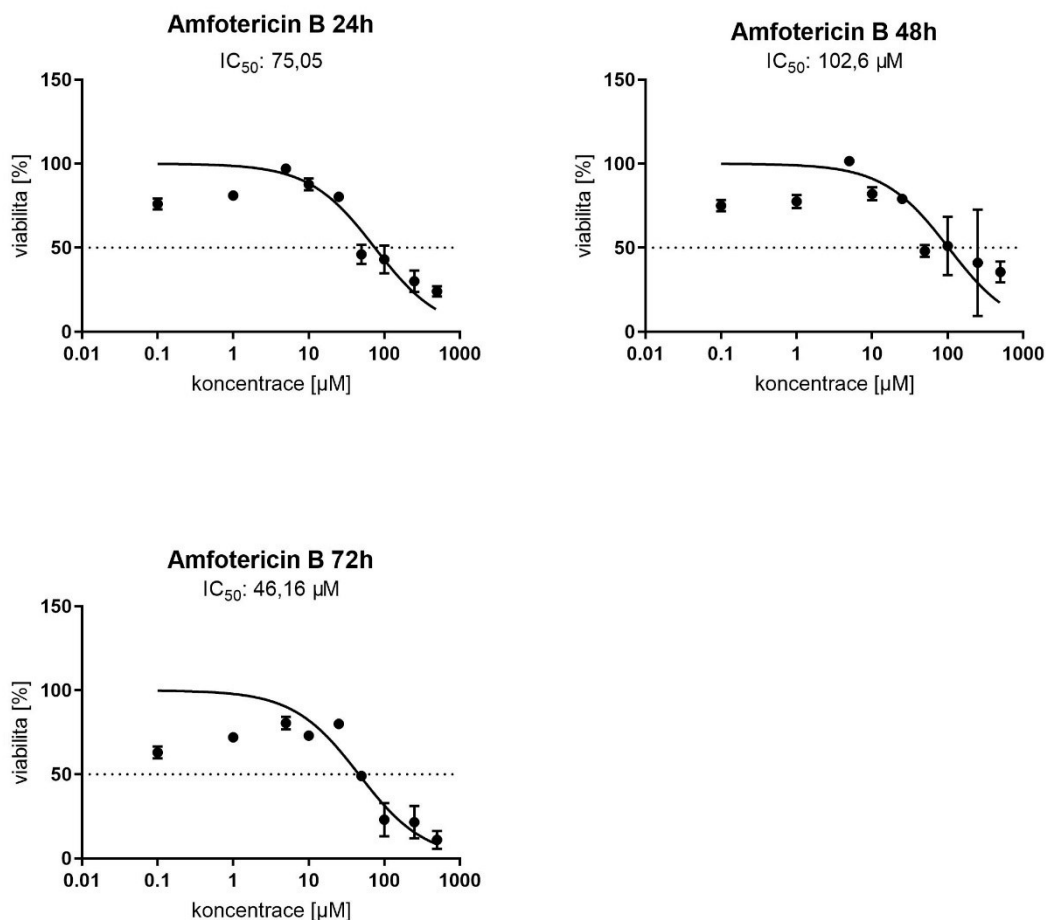
| Testovaná látka | IC_{50} [μ M] (24 h) | IC_{50} [μ M] (48 h) | IC_{50} [μ M] (72 h) |
|-----------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| Encorafenib | 102,7 | 95,12 | 3,721 |
| Amfotericin B | 75,05 | 102,6 | 46,16 |
| Paracetamol | > 500 | > 500 | > 500 |

Podocyty jsou buňkami velmi citlivými na jakékoliv poškození a zejména na působení toxických látek, proto se často využívají při testech cytotoxicity. Při tomto experimentu byl jako ukazatel cytotoxické aktivity zkoumaných látek použit parametr IC_{50} . Výsledná IC_{50} byla stanovena z % viability a průměrů \pm SD naměřených hodnot. Cytotoxický účinek encorafenibu, amfotericinu B a paracetamolu na tuto buněčnou linii je uveden na obrázcích 10, 11 a 12.



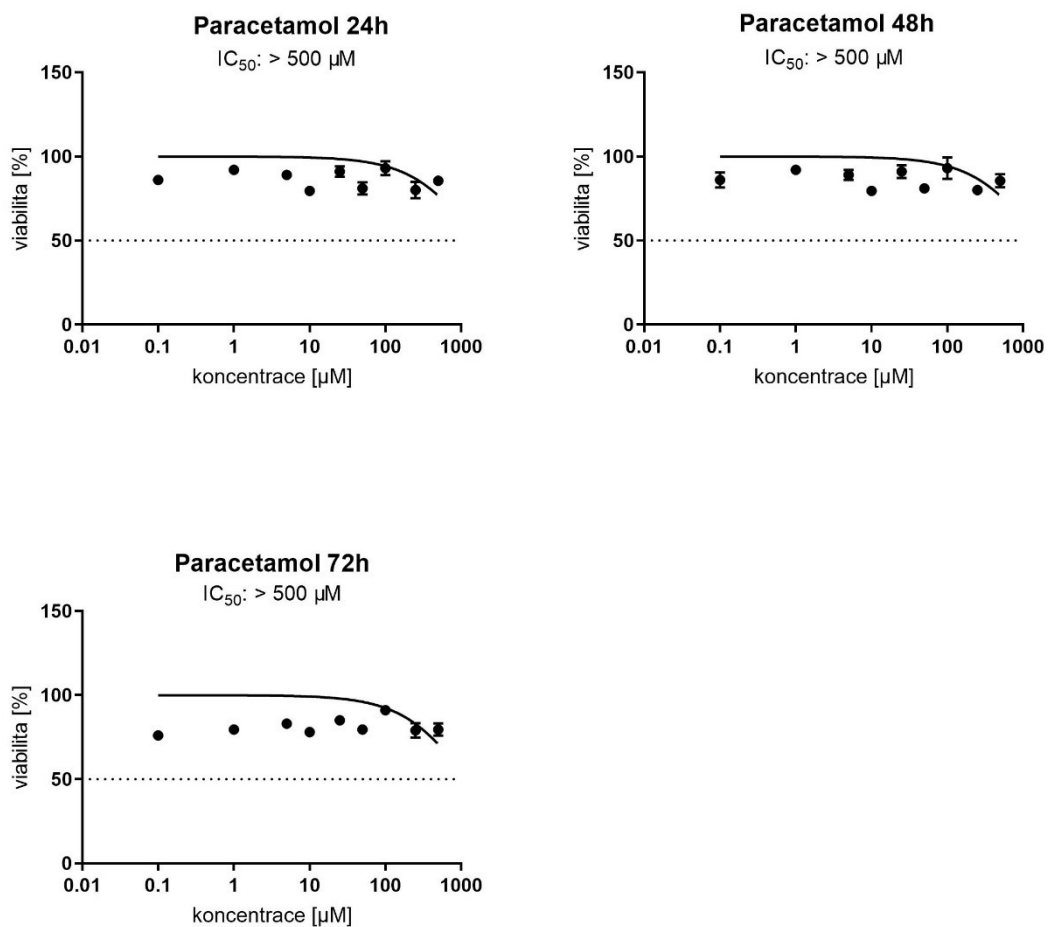
Obr. 10 Cytotoxické působení BRAF inhibitoru encorafenibu na renální buněčnou linii PODO/TERT256 po inkubaci 24 h, 48 h a 72 h.

Grafy na obrázku 10 zobrazují závislost buněčné viability na koncentraci encorafenibu, tedy míru cytotoxicity na vybranou buněčnou linii. Encorafenib byl inkubován v triplikátech v devíti různých koncentracích (0,1 – 500 µM) s buňkami PODO/TERT256 ve třech různých časových intervalech. Vidíme, že inhibiční koncentrace encorafenibu po 24h je 102,7 µM a po 48h 95,12 µM, zatímco po 72 h hodnota IC₅₀ výrazně klesla na 3,721 µM, což značí výraznou toxicitu závislou na čase. V porovnání s pozitivní kontrolou toxicity amfotericinem B vykazuje encorafenib po 24 h a 48 h podobné hodnoty jako amfotericin B ve stejných časových intervalech. Na grafech je vidět, že se cytotoxicita encorafenibu se výrazně zvyšuje v čase.



Obr. 11 Cytotoxické působení standardu amfotericinu B na buněčnou linii PODO/TERT256 v průběhu 24 h, 48 h a 72 h.

Na obrázku 11 vidíme cytotoxický potenciál amfotericinu B vůči ledvinné buněčné linii PODO/TERT256. Amfotericin B je známý svou nefrotoxicitou, proto byl v tomto experimentu použit jako pozitivní kontrola. Cytotoxicita této látky se projevuje již po 24 h, kdy je hodnota IC₅₀ 75,05 µM. Po 48 h je sice IC₅₀ mírně vyšší (102,6 µM), ale po 72 h opět klesla až na 46,16 µM. Můžeme říci, že s délkou inkubace se cytotoxicita amfotericinu B zvyšuje.



Obr. 12 Cytotoxické působení standardu paracetamolu na buněčnou linii PODO/TERT256 v průběhu 24 h, 48 h a 72 h.

Paracetamol jsme v tomto experimentu využívali jako negativní kontrolu kvůli jeho netoxickým vlastnostem vůči ledvinným buňkám. Jak je vidět na obrázku 12, paracetamol vykazoval v čase velmi vysoké IC₅₀ (vyšší než 500 µM), což značí, že v rozmezí testovaných koncentrací se cytotoxicita na buňky PODO/TERT256 neprojevila. Hodnota IC₅₀ tohoto standardu byla ve všech třech časech vyšší než koncentrační rozmezí použité v tomto experimentu.

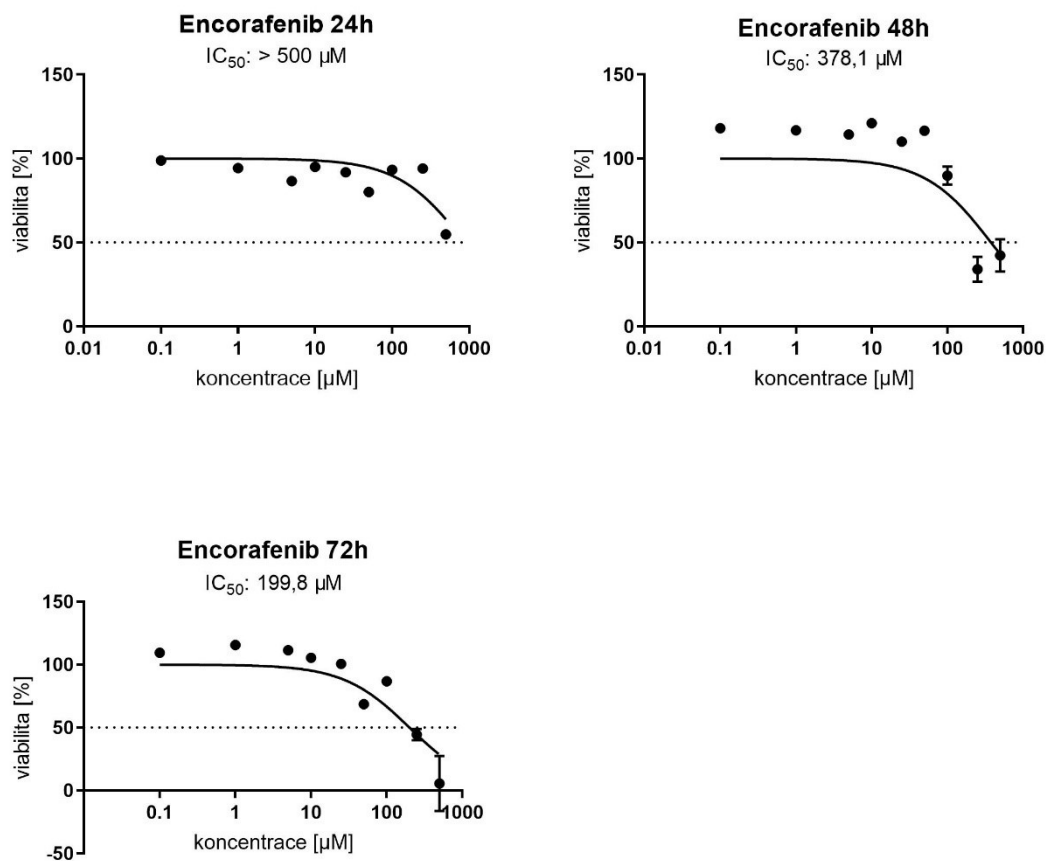
6.1.2 HK-2

V tabulce 4 jsou zaznamenány experimentálně získané hodnoty IC_{50} testovaných látek na buněčné linii HK-2. Výsledky jsou rozděleny podle inkubačního intervalu buněk s testovanými látkami. Koncentrační rozmezí bylo 0,1 – 500 μM .

Tab.4 Hodnoty IC_{50} testovaných látek pro buněčnou linii HK-2 získané metodou CellTiter96.

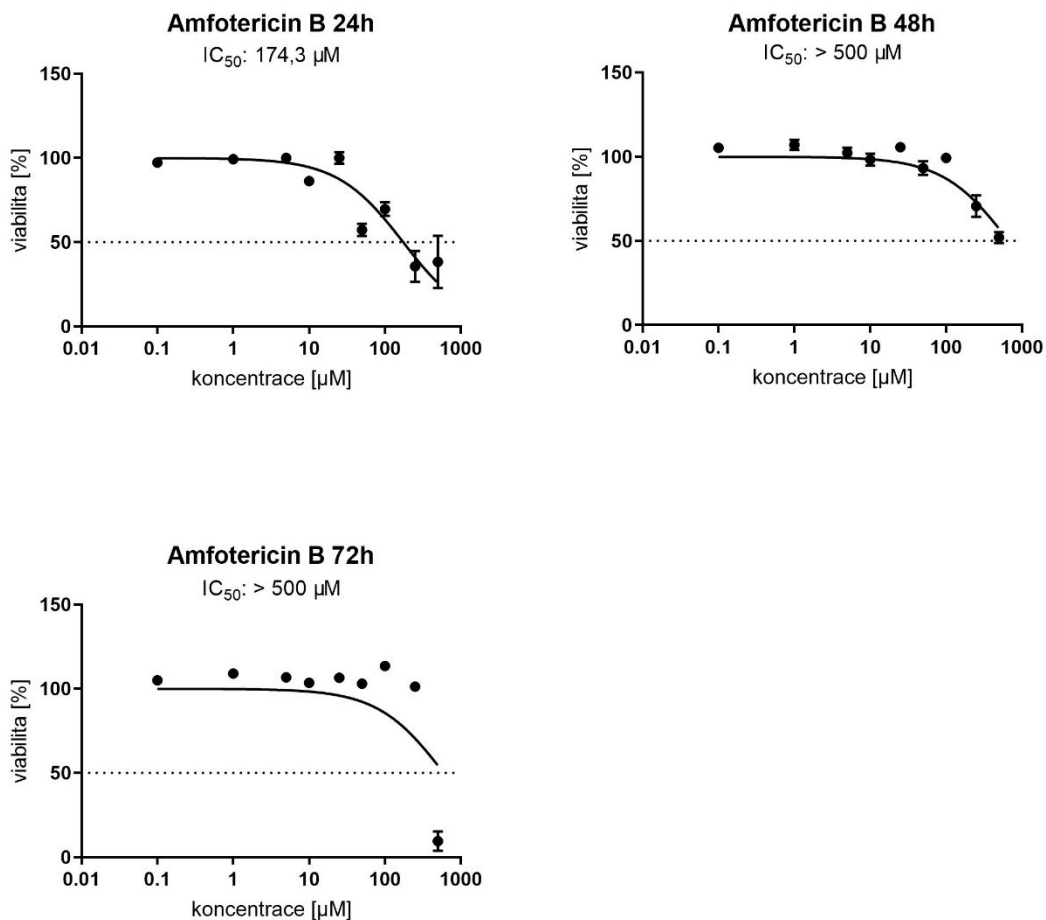
| Testovaná látka | IC_{50} [μM] (24 h) | IC_{50} [μM] (48 h) | IC_{50} [μM] (72 h) |
|-----------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| Encorafenib | > 500 | 378,1 | 199,8 |
| Amfotericin B | 174,3 | > 500 | > 500 |
| Paracetamol | > 500 | > 500 | > 500 |

Buněčná linie HK-2 je běžně používána pro studium proximální tubulární toxicity. Parametr IC_{50} byl použit jako ukazatel cytotoxické aktivity zkoumaných látek. Cytotoxický účinek encorafenibu a dvou kontrolních látek amfotericinu B a paracetamolu na tuto buněčnou linii je uveden na obrázcích 13, 14 a 15. Výsledná IC_{50} byla stanovena z % viability a průměrů \pm SD naměřených hodnot.



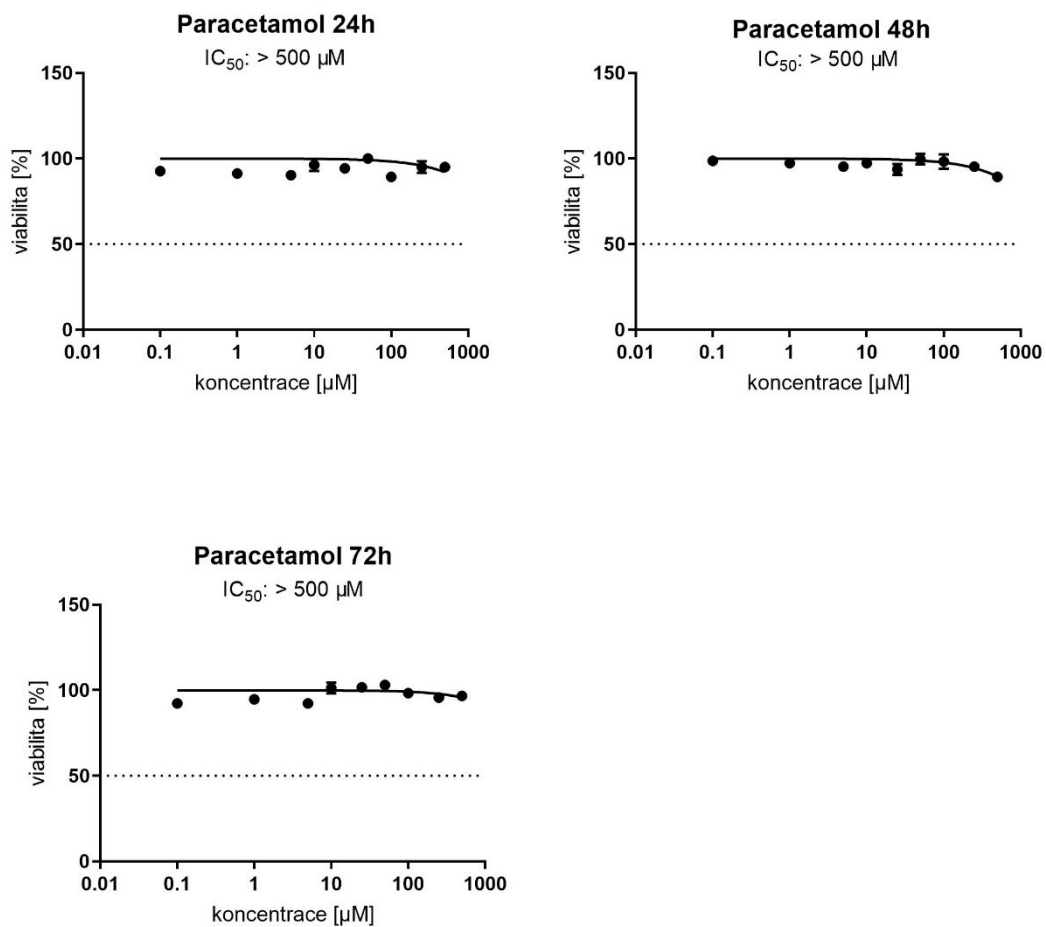
Obr. 13 Cytotoxické působení BRAF inhibitoru encorafenibu na renální buněčnou linii HK-2 po inkubaci 24 h, 48 h a 72 h.

Na obrázku 13 vidíme závislost buněčné viability na koncentraci encorafenibu a s tím spojenou cytotoxicitu. Hodnota IC₅₀ po 24 h je větší než testované koncentrační rozmezí (> 500 µM) a pro buněčnou linii HK-2 je tedy encorafenib v těchto koncentracích netoxický. Oproti tomu jeho hodnoty po 48 h (381,1 µM) a 72 h (199,8 µM) klesají, což naznačuje zvýšenou cytotoxicitu encorafenibu v závislosti na čase.



Obr. 14 Cytotoxické působení standardu amfotericinu B na buněčnou linii HK-2 v průběhu 24 h, 48 h a 72 h.

Grafy na obrázku 14 vyjadřují viabilitu ledvinných tubulárních buněk po inkubaci s amfotericinem B v různých časových intervalech. Hodnoty IC₅₀ naznačují, že na buněčnou linii HK-2 amfotericin B v testovaných koncentracích (0,1 – 500 µM) cytotoxicky prakticky nepůsobí. Hodnota IC₅₀ pro amfotericin B po 24 h je 174,3 µM, hodnoty po 48 h a 72 h jsou vyšší než použité koncentrační v experimentu (> 500 µM).



Obr. 15 Cytotoxické působení standardu paracetamolu na buněčnou linii HK-2 v průběhu 24 h, 48 h a 72 h.

Z těchto grafů je vidět, že paracetamol nevykazoval žádné cytotoxické účinky vůči buněčné linii HK-2; hodnoty IC₅₀ ve všech třech časových intervalech přesahovaly nejvyšší koncentraci použitou v experimentu (500 μM). Paracetamol tedy nepůsobí toxicky v rozmezí použitých koncentrací (0,1 – 500 μM).

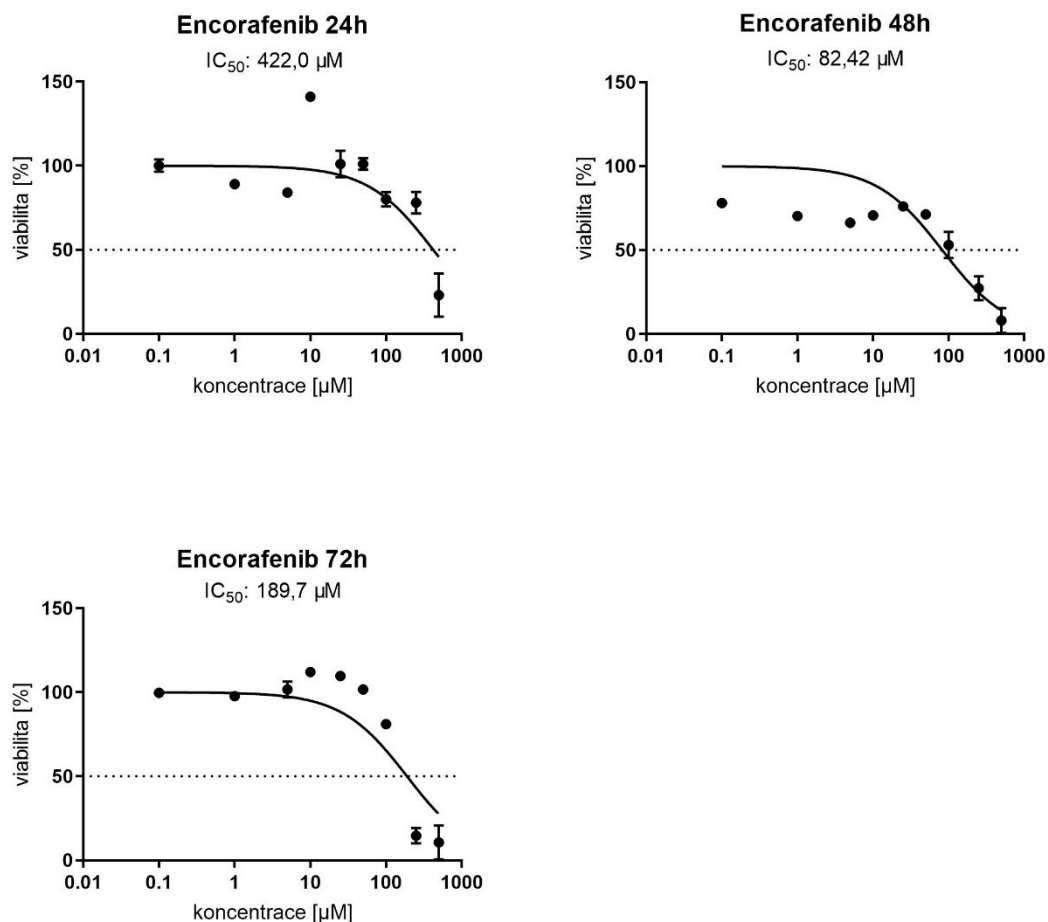
6.1.3 HEK293

Následující tabulka 5 shrnuje experimentálně získané hodnoty IC_{50} testovaných látek na buněčné linii HEK293. Výsledky jsou rozděleny podle inkubační doby buněk s testovanými látkami. Koncentrační rozmezí bylo 0,1 – 500 μM .

Tab.5 Hodnoty IC_{50} testovaných látek pro buněčnou linii HEK293 získané metodou CellTiter96.

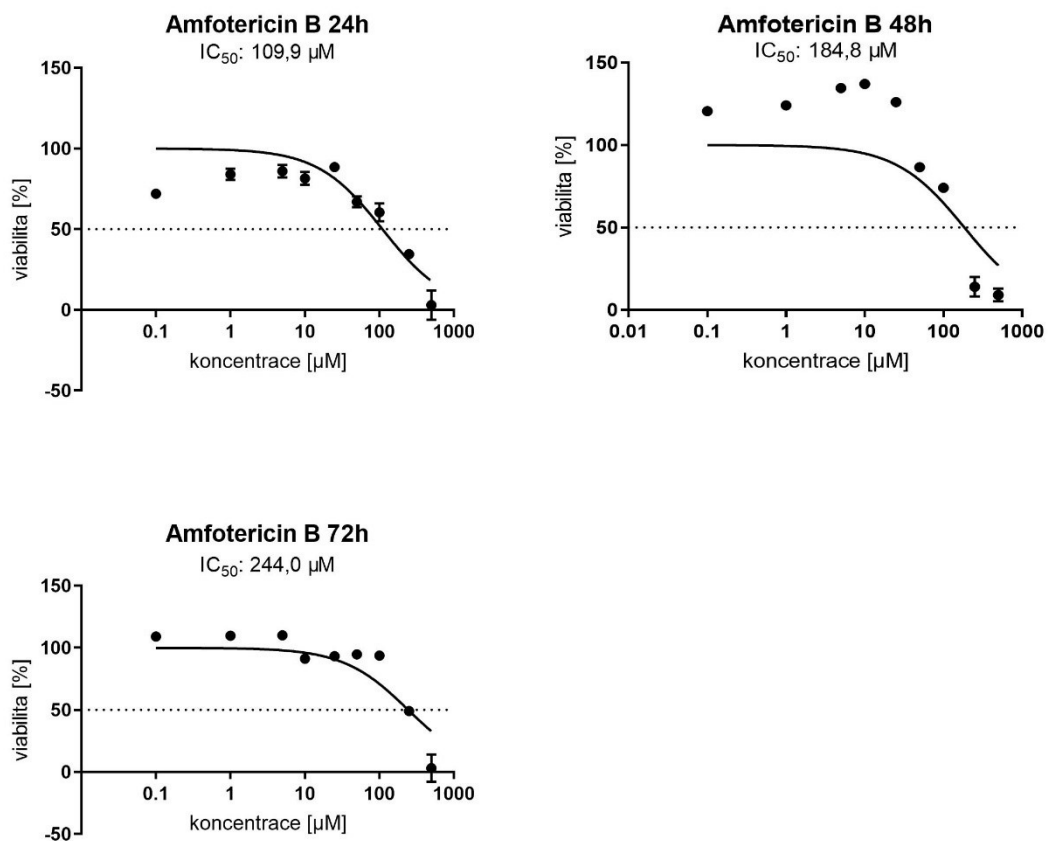
| Testovaná látka | IC_{50} [μM] | IC_{50} [μM] | IC_{50} [μM] |
|-----------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| | (24 h) | (48 h) | (72 h) |
| Encorafenib | 422,0 | 82,42 | 189,7 |
| Amfotericin B | 109,9 | 184,8 | 244,0 |
| Paracetamol | > 500 | 219,8 | > 500 |

HEK293 jsou hojně využívanou buněčnou linií, mimo jiné také ve výzkumu rakoviny. Ukazatelem cytotoxické aktivity testovaných látek byl toxikologický parametr IC_{50} . Cytotoxický účinek encorafenibu a dvou kontrolních látek amfotericinu B a paracetamolu na tuto buněčnou linií je uveden na obrázcích 16, 17 a 18. Výsledná IC_{50} se stanovila z % viability a průměrů \pm SD naměřených hodnot.



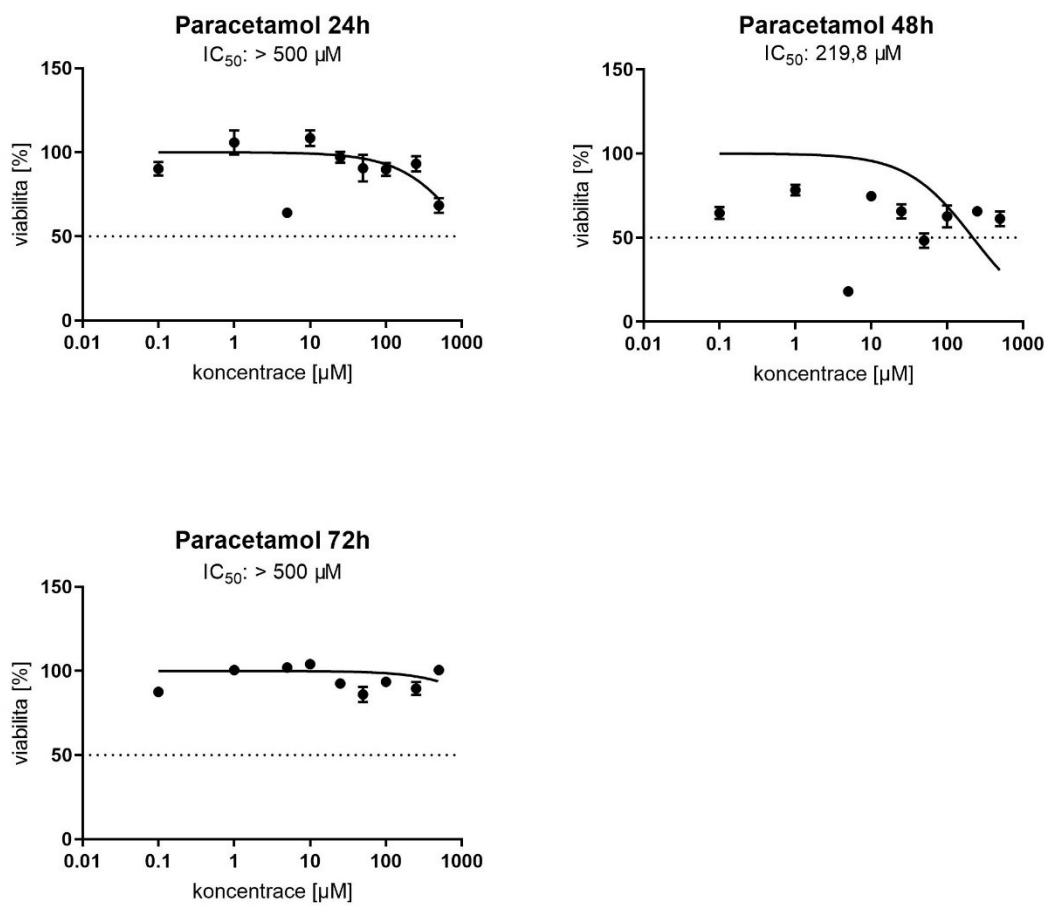
Obr. 16 Cytotoxické působení BRAF inhibitoru encorafenibu na renální buněčnou linii HEK293 po inkubaci 24 h, 48 h a 72 h.

Na obrázku 16 můžeme vidět míru cytotoxicity encorafenibu pro buněčnou linii HEK293. Inhibiční koncentrace jsou po 24 h 422,0 µM, po 48 h 82,42 µM, a po 72 h 189,7 µM. Podle hodnot můžeme předpokládat, že léčivo je pro tento typ ledvinných buněk do určité míry toxické a že se jeho toxicita s časem zvyšuje.



Obr. 17 Cytotoxické působení standardu amfotericinu B na buněčnou linii HEK293 v průběhu 24 h, 48 h a 72 h.

Z grafů na obrázku 17 je patrné, že amfotericin B je spojen s cytotoxicitou vůči buněčné linii HEK293. Nejnižší hodnota IC₅₀ byla po 24 h a odpovídala 109,9 µM. Hodnoty po 48 h a 72 h byly mírně vyšší, konkrétně po 48 h byla hodnota 184,8 µM a po 72 h 244,0 µM.



Obr. 18 Cytotoxické působení standardu paracetamolu na buněčnou linii HEK293 v průběhu 24 h, 48 h a 72 h.

Paracetamol byl v experimentu využíván jako negativní kontrola, protože nevykazuje toxicitu vůči ledvinným buňkám. Z obrázku 18 je patrné, že ani v prováděném experimentu paracetamol pro buňky HEK293 příliš toxický nebyl. Vyplývá to z hodnot IC₅₀, kdy po 24 h inkubaci byla hodnota > 500 µM, po 48 h 219,8 µM a po 72 h opět > 500 µM.

7 Diskuse

Účelem této diplomové práce bylo posoudit cytotoxický vliv BRAF inhibitoru encorafenibu na tři různé, funkčně odlišné typy ledvinných buněk. Jednou z použitých buněčných linií byla linie PODO/TERT256, která představuje lidské, terminálně diferencované podocytární buňky. Další linií byla HK-2, která je tvořena buňkami proximálních tubulů. Poslední využitou linií byla HEK293, která je formována lidskými embryonálními ledvinnými buňkami. Veškeré experimenty tedy probíhaly *in vitro*. Kromě samotného zkoumaného léčiva se zjišťovala cytotoxicita také u dvou lékových standardů paracetamolu a amfotericinu B. Tyto dvě sloučeniny sloužily jako srovnávací látky – amfotericin B byl v experimentu využit jako pozitivní kontrola cytotoxicity, neboť má potvrzený nefrotoxický účinek, zatímco paracetamol je sice známý svým hepatotoxickým účinkem, nicméně na renální buňky by v testovaných koncentracích mít vliv neměl, a proto sloužil jako negativní kontrola cytotoxicity.

Všechny tři zkoumané látky jsou velmi špatně rozpustné ve vodě, proto bylo nutné zvolit jiné rozpouštědlo. V případě těchto experimentů byl použit DMSO (dimethylsulfoxid), přestože má cytotoxické vlastnosti. Jeho množství proto nesmělo v médiu přesáhnout 1 %. Látky byly vždy aplikovány v triplicátech.

Cytotoxicita všech studovaných látek se stanovovala pouze jednou metodou, a to CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay. Jde o jednoduchou, kolorimetrickou, efektivní metodu. Dochází při ní k redukci tetrazoliové sloučeniny MTS (Owenovo činidlo), která je přítomná v médiu, na formazanový produkt. Během tohoto procesu současně dochází k barevné změně v jamkách – při přítomnosti životaschopných buněk se barva změní ze světle žluté na tmavě vínovou. Pokud jsou buňky v jamce mrtvé, k žádné barevné změně nedojde, protože přeměny činidla MTS jsou schopné pouze životaschopné buňky. Podle doporučení výrobce kitu CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay je inkubační doba činidla 1–4 hodiny; dle našich předběžných výsledků se doba inkubace stanovila na 90 minut. Reakce se měří spektrofotometricky. Toxikologickým parametrem, který byl využíván pro hodnocení cytotoxického potenciálu sloučenin, byl IC_{50} . Obecně platí, že čím je tato hodnota nižší, tím více je testovaná látka toxická, případně je větším inhibitorem.

Encorafenib je poměrně novým léčivem, byl schválen teprve v roce 2018 pro léčbu neresektovatelného nebo metastatického melanomu s mutací BRAF V600. Jeho schválení proběhlo na základě výsledků studie COLUMBUS, kde toto léčivo v kombinaci s binimetinibem prokázalo velmi dobrou snášenlivost s minimem vedlejších účinků. Do studie byli zařazeni pacienti s V600E/K mutovaným melanomem a byli náhodně rozděleni do 3 skupin podle inhibitoru, který jim byl podáván na: encorafenib + binimetinib, samotný encorafenib a samotný vemurafenib. Ukázalo se, že medián přežití bez známek progresu byl u skupiny s encorafenibem a binimetinibem 14,9 měsíců oproti 7,3 měsícům u skupiny s vemurafenibem. I při srovnání vedlejších účinků vycházela kombinovaná léčba v porovnání s monoterapiemi nejlépe, v důsledku čehož se předpokládá dobrý bezpečnostní profil této kombinace léčiv. (Dummer et al. 2018)

Studie *Seethapathy et al. (2020)* však ukázala, že jedním z nežádoucích účinků léčby kombinací encorafenib a binimetinib je nefrotoxicita. Až u 26 % pacientů se klinicky projevilo akutní selhání ledvin (AKI) a předpokládá se, že k němu došlo vlivem tubulární nefrotoxicity těchto léčiv. Pokud se podíváme na výsledky námi provedeného experimentu u buněčné linie HK-2, která je tvořena právě buňkami proximálních tubulů, můžeme pozorovat, že při použitím rozmezí koncentrací (0,1 - 500 μM) neměl encorafenib po 24 h na tyto buňky žádný toxický vliv. Nicméně v závislosti na čase se již určitá nefrotoxicita projevovala – po 48 h inkubace je hodnota IC_{50} 378,1 μM a po 72 h se ještě snižuje, a to na hodnotu 199,8 μM , což naznačuje zvyšující se toxicitu léčiva na tento typ renálních buněk. Podobné hodnoty vykazovaly také embryonální ledvinné buňky HEK293.

Nejvíce cytotoxicky se encorafenib projevilo na buněčné linii lidských podocytních buněk (PODO/TERT256). Po 24 h byla hodnota IC_{50} 102,7 μM , po 48 h 95,12 μM a po 72 h 3,721 μM . Tyto hodnoty naznačují, že encorafenib na podocyty působí toxicky již po první inkubační době a s časem se navíc jeho cytotoxicita výrazně zvyšuje. Možný důvod takto vysoké nefrotoxicity může být vysvětlen ve studii *Wanchoo et al (2016)* týkající se dalších dvou BRAFi vemurafenibu a dabrafenibu. Na myším modelu se ukázalo, že BRAF je exprimován a lokalizován ve vyvíjejících se i zralých glomerulárních podocytech. Proto když dojde k inhibici BRAF některým z inhibitorů, zároveň to ovlivní i podocytní buňky. Klinicky se však zdá, že inhibice BRAF cílí na tubulo-intersticiální kompartment.

Co se týká standardů, paracetamol nepůsobí v rozmezí testovaných koncentrací (0,1 - 500 μ M) na žádnou z použitých buněčných linií toxicky; naproti tomu amfotericin B projevil největší cytotoxický potenciál vůči buněčné linii PODO/TERT256, následovala linie HEK293, ovšem na buňky HK-2 toxicky téměř nepůsobil. Tyto rozdíly mohou být způsobeny rozdílným metabolismem dané látky v různých typech buněk.

Na základě získaných výsledků, které prokázaly cytotoxický potenciál encorafenibu, lze uvažovat o dalším studiu nefrotoxicity, zejména z hlediska její povahy. Z možností testování by se daly využít jiné metodiky, které se nezaměřují jen na viabilitu buněk, ale například na sledování apoptotického účinku této látky nebo na měření poškození buněčných membrán renálních buněk.

8 Závěr

V této práci se studoval cytotoxický potenciál protinádorového léčiva encorafenibu pomocí kolorimetrické metody CellTiter 96[®] AQueous One Solution Cell Proliferation Assay a porovnával se se dvěma standardy (paracetamol, amfotericin B). Testování látek probíhalo *in vitro* na vybraných experimentálních buněčných liniích ledvin (PODO/TERT256, HK-2 a HEK293).

Hodnoceným parametrem bylo IC₅₀, což odpovídá takové koncentraci látky, při které se sníží životaschopnost buněk na 50 % maximální viability. Z experimentálně zjištěných hodnot u BRAF inhibitoru encorafenibu vyplývá následující vzestupná řada seřazená podle rostoucí cytotoxicity na danou linii: HK-2 < HEK293 < PODO/TERT256. Nejvyšší cytotoxický účinek měl encorafenib na podocyty, na embryonální ledvinné buňky a buňky proximálních tubulů ledvin působil o poznání méně toxicky. Co se týká standardů, paracetamol byl dle předpokladů na všechny 3 testované linie v daném koncentračním rozmezí netoxický, naopak amfotericin B vzhledem ke své prokázané nefrotoxicitě vykazoval na buněčné linie v různé míře cytotoxické účinky.

V současné době je dostupných několik kombinací BRAF a MEK inhibitorů a zatím nelze s jistotou říci, která z nich je nejlepší volbou pro léčbu mutovaného melanomu. Prozatím je také málo dostupných dat k určení, zda by kombinace encorafenibu a binimetinibu byla efektivní i u pacientů, jejichž rakovina progradovala v průběhu léčby jiným BRAFi. (Anonym 2019b)

9 Literatura

1. Brenner M, Hearing VJ. The Protective Role of Melanin Against UV Damage in Human Skin. *Photochem. Photobiol.* 2008; 84(3): 539-549.
2. Cabrera R, Recule F. Unusual Clinical Presentations of Malignant Melanoma: A Review of Clinical and Histologic Features with Special Emphasis on Dermatoscopic Findings. *American Journal of Clinical Dermatology* 2018; 19(S1): 15-23.
3. Dummer R et al. Encorafenib plus binimetinib versus vemurafenib or encorafenib in patients with BRAF-mutant melanoma (COLUMBUS): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. *THE LANCET Oncology*; 2018; 19(5): 603-615.
4. Eroglu Z, Ribas A. Combination therapy with BRAF and MEK inhibitors for melanoma: latest evidence and place in therapy. *Therapeutic Advances in Medical Oncology* 2016; 8(1): 48-56.
5. Gildea JJ et al. The HK-2 human renal proximal tubule cell as a model for GRK4-mediated dopamine-1 receptor uncoupling. *Hypertension* 2010; 56(3): 505-511.
6. Hamid O, Cowey CL, Offner M, Faries M, Carvajal RD. Efficacy, Safety, and Tolerability of Approved Combination BRAF and MEK Inhibitor Regimens for BRAF-Mutant Melanoma. *Cancers (Basel)* 2019; 11(11):1642.
7. Handl J, Čapek J, Majtnerová P, Báčová J, Roušar T. The Effect of Repeated Passaging on the Susceptibility of Human Proximal Tubular HK-2 Cells to Toxic Compounds. *Physiol. Res.*; 2020; 69: 731–738.
8. Heinzerling L et al. Tolerability of BRAF/MEK inhibitor combinations: adverse event evaluation and management. *ESMO Open* 2019; 4(3).
9. Heppt MV et al. Comparative analysis of the phototoxicity induced by BRAF inhibitors and alleviation through antioxidants. *Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine* 2019; 36(2): 126-134.
10. Holbrook K et al. Intracranial antitumor activity with encorafenib plus binimetinib in patients with melanoma brain metastases: A case series. *Cancer* 2019; 126(3): 523-530.
11. Józwiak-Bebenista M, Nowak JZ. Paracetamol: mechanism of action, applications and safety concern. *Acta Pol Pharm*; 2014; 71(1): 11-23.

12. Kakadia S et al. Mechanisms of resistance to BRAF and MEK inhibitors and clinical update of US Food and Drug Administration-approved targeted therapy in advanced melanoma. *OncoTargets and Therapy* 2018; 11: 7095-7107.
13. Koelblinger P, Thuerigen O, Dummer R. Development of encorafenib for BRAF-mutated advanced melanoma. *Current Opinion in Oncology* 2018; 30(2): 125-133.
14. Kozovska Z, Gabrisova V, Kucerova L. Malignant melanoma: diagnosis, treatment and cancer stem cells. *Neoplasma* 2016; 63(04): 510-517.
15. Leonardi GC et al. Cutaneous melanoma: From pathogenesis to therapy (Review). *International Journal of Oncology* 2018; 52: 1071-1080.
16. Mahadevan SB, McKiernan PJ, Davies P, Kelly DA. Paracetamol induced hepatotoxicity. *Arch Dis Child*: 2006; 91(7): 598-603.
17. Nguyen NT, Fisher DE. MITF and UV responses in skin: From pigmentation to addiction. *Pigment Cell & Melanoma Research* 2018; 32(2): 224-236.
18. Patel H et al. Current Advances in the Treatment of BRAF-Mutant Melanoma. *Cancers* 2020; 12(2):482.
19. Proietti I et al. BRAF inhibitors: Molecular targetting and Immunomodulatory Actions. *Cancers (Basel)* 2020b; 12(7): 1823.
20. Proietti I et al. Mechanisms of Acquired BRAF Inhibitor Resistance in Melanoma: A Systematic Review. *Cancers* 2020a; 12(10): 2801.
21. Rastrelli M, Tropea S, Rossi CR, Alaibac M. Melanoma: Epidemiology, Risk Factors, Pathogenesis, Diagnosis and Classification. *In Vivo* 2014; 28(6): 1005-1011.
22. Sawaya BP, Briggs JP, Schnermann J. Amphotericin B Nephrotoxicity: The Adverse Consequences of Altered Membrane Properties. *J. Am. Soc. Nephrol.* 1995; 6(2):154-164.
23. Seethapathy H et al. Acute Kidney Injury Following Encorafenib and Binimetinib for Metastatic Melanoma. *Kidney Medicine* 2020; 2(3): 373-375.
24. Setijanti HB, Rusmawati E, Fitria R, Erlina T, Adriany R, Murtiningsih. Development the Technique for the Preparation and Characterization of Reconstructed Human Epidermis (RHE). *Alternatives of Animal Testing*; 2018; 20-32.
25. Shirley M. Encorafenib and Binimetinib: First Global Approvals. *Drugs*; 2018; 78: 1277–1284.

26. Srabovic M, Huremovic M, Catovic B, Kulic S, Taletovic A. Design synthesis and crystallization of acetaminophen. *Journal of Chemical, Biological and Physical Sciences* 2017; 7(1): 218-230.
27. Sun J, Zager JS, Eroglu Z. Encorafenib/binimetinib for the treatment of BRAF-mutant advanced, unresectable, or metastatic melanoma: design, development, and potential place in therapy. *OncoTargets and Therapy* 2018; 11: 9081-9089.
28. Wanchoo R, Jhaveri KD, Deray G, Launay-Vacher V. Renal effects of BRAF inhibitors: a systematic review by the Cancer and the Kidney International Network. *Clinical Kidney Journal*; 2016; 9(2): 245-251.
29. XU Q et al. Vascular development in the retina and inner ear: control by Norrin and Frizzled-4, a high-affinity ligand-receptor pair. *Cell* 2004; 116:883-895.

Internetové zdroje

1. Anonym. Amphotericin B solubilized. In: MERCK. 2021h. Dostupné na URL: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/a9528?lang=en®ion=CZ>. Přístup: 20.4.2021
2. Anonym. Braftovi. In: European Medicines Agency. 2021d. Dostupné na URL: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/braftovi-epar-product-information_en.pdf. Přístup 13.3.2021
3. Anonym. Cell Culture & Cell Culture Media Analysis. In: Shimadzu: Excellence in Science. 2021e. Dostupné na URL: <https://www.shimadzu.eu/cell-culture-analysis>. Přístup 25.4.2021
4. Anonym. CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay. In: *Promega*. 2012. Dostupné na URL: <https://www.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-bulletins/0/celltiter-96-aqueous-one-solution-cell-proliferation-assay-system-protocol.pdf>. Datum přístupu 10.5. 2021
5. Anonym. Compound Summary for CID 5280965, Amphotericin b. In: National Center for Biotechnology Information. 2021g. Dostupné na URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Amphotericine-B>. Přístup 20.4.2021
6. Anonym. EMA RECOMMENDS EXTENSION OF INDICATIONS FOR ENCORAFENIB. In: ESMO. 2020a. Dostupné na URL: <https://www.esmo.org/oncology-news/ema-recommends-extension-of-indications-for-encorafenib>. Přístup: 15.3.2021
7. Anonym. Encorafenib (Braftovi™) + Binimetinib (Mektovi®). In: Melanoma Research Alliance. 2020b. Dostupné na URL: <https://www.curemelanoma.org/patient-eng/melanoma-treatment/combination-therapy-for-melanoma/encorafenib-braftovi-binimetinib-mektovi/> Přístup: 15.3.2021
8. Anonym. Encorafenib. In: Drugbank. 2021a. Dostupné na URL: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB11718>. Přístup: 13.3.2021
9. Anonym. Encorafenib. In: NCBI. 2019a. Dostupné na URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK547988/>. Přístup 12.3.2021
10. Anonym. Genetics of Skin Cancer (PDQ®). In: NCBI. 2021c. Dostupné na URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK65895/>. Přístup: 2.5.2021

11. Anonym. HEK293 Protocols: Cell Culture, Transfection, Protein Production. In: HEK293 CELL LINE. 2021b. Dostupné na URL: <https://www.hek293.com/>. Přístup 25.4.2021
12. Anonym. HK-2 (ATCC® CRL-2190™). In: ATCC. 2016b. Dostupné na URL: https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CRL-2190.aspx?geo_country=cz#culturemethod. Přístup 25.4.2021
13. Anonym. Introduction to Cell Culture. In: ThermoFisher Scientific. 2021f. Dostupné na URL: <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/references/gibco-cell-culture-basics/introduction-to-cell-culture.html>. Přístup 25.4.2021
14. Anonym. New Drug: Binimetinib plus encorafenib for metastatic melanoma. Aust Prescr [serial online] 2019; 42:168-9. 13.9.2019b. Australian Prescriber. In: *NPS MEDICINEWISE*. Dostupné na URL: <https://www.nps.org.au/australian-prescriber/articles/binimetinib-plus-encorafenib-for-metastatic-melanoma>. Přístup 21.4.2021
15. Anonym. PODO/TERT256. In: EVERCYTE. 2018. Dostupné na URL: <http://www.evercyte.com/medizin/cell-lines/immortalized-human-somatic-cells/podo-tert256.html>. Přístup 25.4.2021
16. Riss TL et al. Assay Guidance Manual. In:NCBI. 2016a. Dostupné na URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/>. Přístup 18.3.2021