

UNIVERZITA KARLOVA

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie



**STUDIUM ROLE VYBRANÝCH IZOFOREM CYTOCHROMU P450
V CYTOSTATICKÉ REZISTENCI NA ÚROVNI APOPTÓZY**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Jakub Hofman, Ph.D.

Hradec Králové 2020

Magdalena Moriová

Prohlášení

„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.“

V Hradci Králové dne _____

Podpis studenta

Poděkování:

Tímto bych chtěla poděkovat RNDr. Jakubovi Hofmanovi, Ph.D. za ochotu, čas, trpělivost a cenné rady při vedení diplomové práce a také celému kolektivu Katedry farmakologie a toxikologie za podporu a pomoc při práci.

Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

Studentka: Magdalena Moriová

Školitel: RNDr. Jakub Hofman, Ph.D.

Název diplomové práce: **Studium role vybraných izoform cytochromu P450 v cytostatické rezistenci na úrovni apoptózy**

Cytostatická rezistence je jednou z nejzákladnějších terapeutických překážek v onkologické léčbě. Vedle mechanismů farmakodynamických hrají v lékové rezistenci důležitou roli též faktory farmakokinetické. Mezi takové mechanismy zřejmě patří i enzymatická transformace účinné látky na neaktivní metabolit v nádorových buňkách, důkazy o zapojení enzymů ve farmakokinetické rezistenci jsou však dosud veskrze pouze nepřímé nebo zatížené interferenčními elementy. Za využití komparativních experimentů v HepG2 liniích s/bez overexprese CYP3A4 jsme se zaměřili na zhodnocení role tohoto klinicky důležitého enzymu v rezistenci vůči docetaxelu. Metodicky se jednalo o stanovení indukce apoptózy (aktivace kaspáz 3/7, 8 a 9) pomocí komerčních luminiscenčních kitů. Naše výsledky poukazující na signifikantní zapojení enzymu CYP3A4 v omezení účinnosti docetaxelu v intervalu 48 h, přičemž v časnějším intervalech se tento závěr nepotvrdil. Tato zjištění výborně korelují s výsledky našich předchozích studií zaměřených na proliferační úroveň. Získané poznatky by v budoucnu mohly pomoci vylepšit kombinační protinádorovou terapii.

Abstract

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradci Králové

Department of Pharmacology & Toxicology

Student: Magdalena Moriová

Supervisor: RNDr. Jakub Hofman, Ph.D.

Title of diploma thesis: **Study on the role of selected cytochrome P450 isoforms in cytostatic resistance at apoptosis level**

Cytostatic resistance is one of the most problematic obstacles in oncological treatment. Beside pharmacodynamic mechanisms, pharmacokinetic factors play an important role in drug resistance as well. Enzymatic transformation of active substance to inactive metabolite in tumor cells probably belongs to these mechanisms, however, evidences concerning the relevance of this phenomenon are predominantly either indirect and/or affected by interference elements. Using comparative experiments with HepG2 cell lines with/without CYP3A4 overexpression, we focused on the evaluation of the role of this clinically important enzyme in the resistance against docetaxel. Methodologically, it was the assessment of apoptosis induction (activation of caspases 3/7, 8 and 9) using commercial luminescent kits. Our results suggest significant participation of CYP3A4 enzyme on the reduction of docetaxel anticancer efficacy after 48 h from treatment, whereas this effect was not recorded in earlier intervals. These findings perfectly correlate with the results from our previous studies focusing on the level of changes in proliferation. Obtained knowledge could be beneficial for improvement of combination chemotherapy in future.

Osnova:

1. Seznam zkratek	1
2. Úvod.....	2
3. Teoretická část.....	3
3.1. Cytochromy P450	3
3.1.1. Struktura, lokalizace a exprese cytochromů P450	4
3.1.2. Fyziologická funkce cytochromů P450	10
3.1.3. Účast cytochromů P450 na farmakokinetické lékové rezistenci.....	13
3.1.3.1. Základní mechanismy lékové rezistence	13
3.1.3.2. Mechanizmy farmakokinetické rezistence na systémové úrovni	16
3.1.3.3. Intratumorální exprese cytochromů 450	18
3.1.3.4. Role cytochromu P450 v lékové rezistenci na intratumorální úrovni	20
3.2. Apoptóza	22
3.2.1. Fyziologická funkce apoptózy	22
3.2.2. Aktivační dráhy apoptózy	25
3.2.3. Role proteinů regulujících apoptózu ve vzniku a vývoji nádorových onemocnění	26
3.2.4. Moderní terapeutické přístupy v protinádorové léčbě zaměřené na modulaci apoptotických drah.....	28
4. Cíle práce.....	31
5. Experimentální část.....	32
5.1. Materiály a metody	32
5.1.1. Chemikálie	32
5.1.2. Přístroje	32
5.1.3. Buněčné linie	33
5.1.4. Vystavení buněčných linií testovaným látkám a sběr vzorků	33
5.1.5. Stanovení aktivity kaspáz 3/7, 8 a 9.....	34
5.1.6. Stanovení celkového obsahu proteinů	34
5.1.7. Statistická analýza	35
5.2. Výsledky	36
5.2.1. Změny aktivity kaspáz 3/7 vyvolané docetaxelem v liniích HepG2-CYP3A4 a HepG2-EV	36
5.2.2. Změny aktivity kaspázy 8 vyvolané docetaxelem v liniích HepG2-CYP3A4 a HepG2-EV	38

5.2.3. Změny aktivity kaspázy 9 vyvolané docetaxelem v liniích HepG2-CYP3A4 a HepG2-EV	39
5.3. Diskuze.....	41
6. Závěr.....	44
7. Seznam literatury	45

1. Seznam zkratek

ABC	ATP-binding cassette
APAF1	Apoptotic protease activating factor 1
BCA	Bicinchoninic acid
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BCRP	Breast cancer resistance protein
CYP	Cytochrome P450
DISC	Death-inducing signaling complex
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
F	Biologická dostupnost
FBS	Fetální bovinní sérum
GIT	Gastrointestinální trakt
HER	Human epidermal growth factor receptor
IgG	Imunoglobulin G
MDR	Multidrug resistance (Mnohočetná léková rezistence)
MRP1	Multidrug resistance-associated protein 1
PBS	Fosfátový pufr
P-gp	P-glykoprotein
SRS	Substrate recognition sites (Substrát rozpoznávající místa)
PXR	Pregnane X receptor
qRT-PCR	Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
TNF	Tumor-nekrotizující faktor
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand

2. Úvod

Metabolismus léčiv zprostředkovaný enzymatickým systémem cytochromů P450 (CYP) je jedním z nejdůležitějších detoxikačních mechanismů. Je to jeden z obranných mechanismů, díky kterým organismus odolává negativnímu působení cizích látek na buněčné systémy. Nicméně, tyto pro organismus esenciální enzymy mohou být i zdrojem nežádoucího jevu, jakým je například předčasný a nadměrný metabolismus léčiva, což přispívá ke snížení jeho terapeutického účinku. Jedním z takových nežádoucích jevů je pravděpodobně biotransformace docetaxelu na jeho méně účinné metabolity.

Docetaxel se řadí mezi tzv. mitotické jedy. Jeho účinek spočívá v narušení funkce dělicího vřeténka a následném poškození chromozomů. Zastavuje se tak buněčný cyklus ve fázi mitózy. To znemožňuje dělení buněk, které následně indukují apoptózu a zanikají (Ringel & Horwitz, 1991). Je známo, že toto protinádorové léčivo má poměrně nízkou biologickou dostupnost (F) vlivem vysokého podílu enzymu CYP3A4 na jeho metabolismu (Valenzuela et al., 2011). Tento enzym se hojně vyskytuje v tenkém střevě, kde snižuje absorpci léčiva po perorálním podání, ale také v jaterní tkáni, kde podporuje systémovou clearance docetaxelu (Herwaarden et al., 2007). Tyto dva důležité procesy snížení F docetaxelu nejsou ale jedinou pravděpodobnou příčinou snížené účinnosti docetaxelu. Vysoký podíl CYP3A4 na metabolismu docetaxelu je předpokladem pro inaktivaci tohoto léčiva přímo v nádorové tkáni, kde se tento enzym relativně hojně vyskytuje (Miyoshi et al., 2002).

Náplní této diplomové práce je podání přímého důkazu týkajícího se ovlivnění účinnosti docetaxelu prostřednictvím enzymatického systému CYP3A4. Naším záměrem bylo kvantifikovat, do jaké míry ovlivňuje CYP3A4 proapoptotický účinek docetaxelu. Na základě literárních poznatků se domníváme, že tento enzym a jeho zvýšená exprese v nádorové tkáni mohou značnou měrou přispívat k lékové rezistenci a následně k neúspěšnosti chemoterapie. Dosud ale nebyly nalezeny přesvědčivé důkazy, že tomu tak skutečně je. Proto jsme se rozhodli pro provedení řady pokusů na geneticky upravených buněčných liniích HepG2, které nám pomohou tuto otázku definitivně vyřešit. Naše práce se opírá o poznatky z předchozí diplomové práce kolegyně Mgr. Adély Janouškové, která prováděla podobné pokusy na proliferační úrovni.

3. Teoretická část

3.1. Cytochromy P450

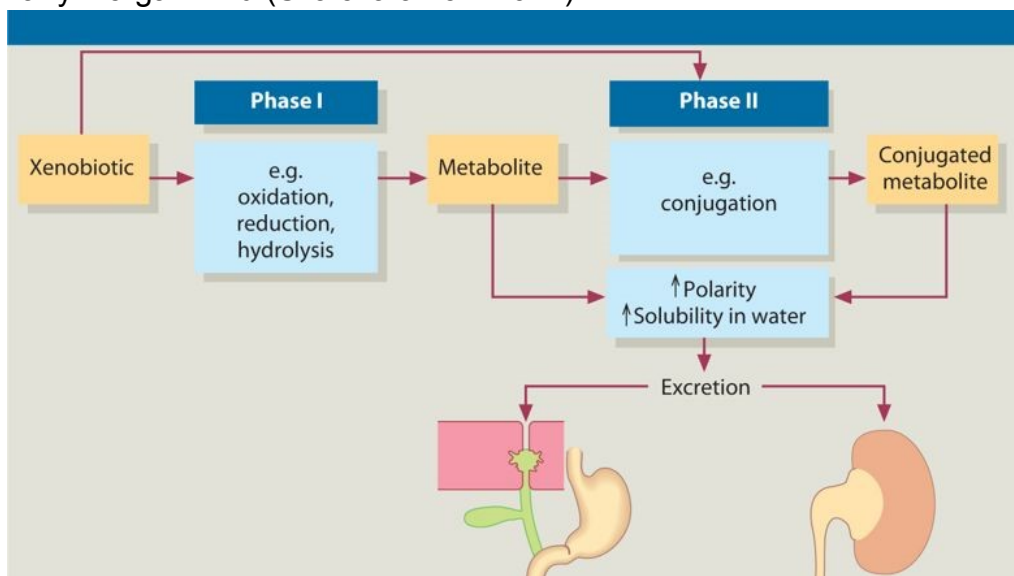
Biotransformační reakce, nazývané častěji jako metabolismus, představují soubor procesů, při nichž probíhá přeměna struktury látek prostřednictvím působení enzymů. Enzymy fungují v živých organizmech jako katalyzátory řady reakcí. Z toho důvodu jsou pro nás nezbytné. Bez enzymatických systémů by nebylo možné detoxikovat řadu pro organismus cizích látek, které přijímáme z vnějšího prostředí.

Obecně je metabolismus xenobiotik a endogenních látek chápán jako sled po sobě následujících reakcí, ve kterých dochází ke změně chemické struktury a vzniku metabolitů, které jsou snadněji vylučitelné z organismu. Biotransformační reakce lze rozdělit na první (nesyntetickou) fázi a druhou (syntetickou) fázi. V první fázi biotransformace dochází ke strukturální změně funkčních skupin molekul pomocí oxidačních, redukčních nebo hydrolytických reakcí. Vznikají tak meziprodukty, které dále reagují s endogenními látkami za vzniku hydrofilních konjugátů, které jsou z organismu snadno eliminovány, a to převážně játry nebo močí (obr. 1). Je pravdou, že obě tyto fáze metabolismu na sebe ve velkém procentu případů navazují, ale ne každá metabolizovaná látka prochází oběma těmito fázemi (Skálová a kol., 2017).

Jedním z nejvýznamnějších enzymatických systémů katalyzujících přeměnu mnoha xenobiotik včetně léčiv v první fázi biotransformace jsou CYP. Je to rozsáhlá nadrodina hemoproteinů vyskytující se v převážné většině prokaryotních a eukaryotních organismů ve velkém množství různých izoform. O jejich významnosti vypovídá více než 16 000 genů z více než 400 genových rodin kódujících tyto enzymy napříč celou biologickou říší. Jejich název byl odvozen podle absorpčního maxima v UV-VIS spektru při 450 nm, které vykazuje redukovaná forma CYP v komplexu s CO (Nebert & Russell, 2002). Pro zpřehlednění byla pro jednotlivé izoformy na základě pořadí aminokyselin v apoproteinu stanovena nomenklatura CYP. První číslice za zkratkou CYP označuje rodinu, po ní následuje velké písmeno vyjadřující podrodinu a poslední písmeno určuje konkrétní izoformu. Přestože bylo v lidském organismu nalezeno asi 44 různých podrodin CYP, v jaterním metabolismu xenobiotik jsou nejvíce aktivní rodiny 1-3, které jsou zodpovědné za biotransformaci 70-80 % všech

léčiv. Mezi nejvýznamnější izoformy cytochromů metabolizujících xenobiotika patří CYP3A4, 3A5, 2B1, 2D6, 2C8, 2C9, 1A2 a 2C19. Cytochromy patřící do ostatních podrodin se podílejí spíše na přeměně endogenních látek, jako jsou steroidní hormony, vitaminy, mastné kyseliny, prostaglandiny a další (Manikandan & Nagini, 2018; Nair et al., 2016).

Katalytická aktivita CYP spočívá zejména v oxidaci funkční skupiny, která je součástí molekuly substrátu. Vznikají tak metabolity, které mají většinou sníženou nebo nulovou biologickou aktivitu. Výjimečně aktivita změněna není nebo je naopak potencována (v případě proléčiv). Tyto metabolity mohou pak v druhé fázi biotransformace reagovat s endogenní molekulou a vzniklé konjugáty jsou následně eliminovány z organismu (Skálová a kol. 2017).

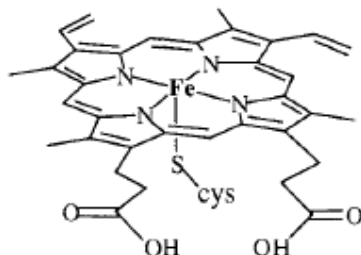


Obr. 1: Schéma biotransformačního a eliminačního procesu (Dancygier, 2010).

3.1.1. Struktura, lokalizace a exprese cytochromů P450

Jádrem CYP je hemová prostetická skupina tvořená z protoporphyrinového kruhu s centrálním atomem železa, které se zde vyskytuje ve dvou formách. V nízkospinové formě s maximálně spárovanými 3d elektrony a vysokospinové formě s maximálně nespárovanými 3d elektrony. V případě nízkospinové formy je atom železa stabilizován šestým ligandem, kterým je molekula vody. Jestliže dojde k navázání substrátu na enzym, dochází k odstranění molekuly vody a přeobsazení valenčních elektronů. Neaktivní nízkospinová forma Fe^{3+} s koordinačním číslem 6 se tak mění na

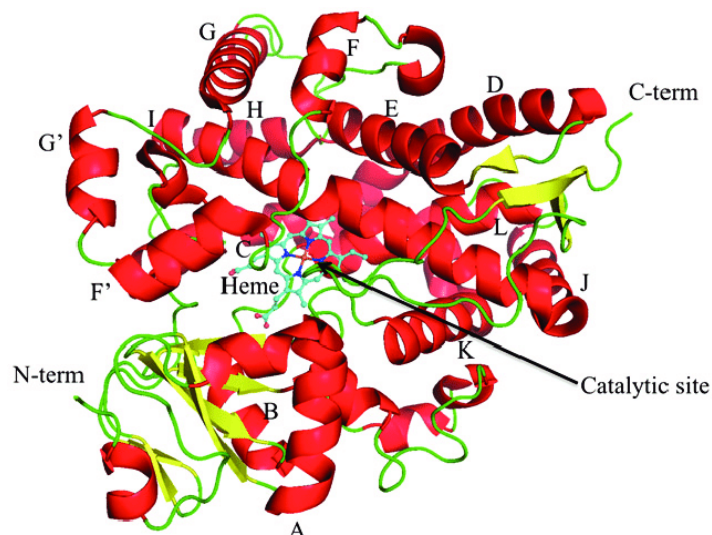
aktivní vysokospinovou formu s 5 ligandy (Skálová a kol., 2017). Strukturní vzorec prostetické skupiny CYP je znázorněn na obr. 2 níže.



Obr. 2: Protoporfyrinový kruh s železem jako centrálním atomem a axiálním ligandem tvořeným z cysteinu apoproteinu (převzato z: Montellano 2005).

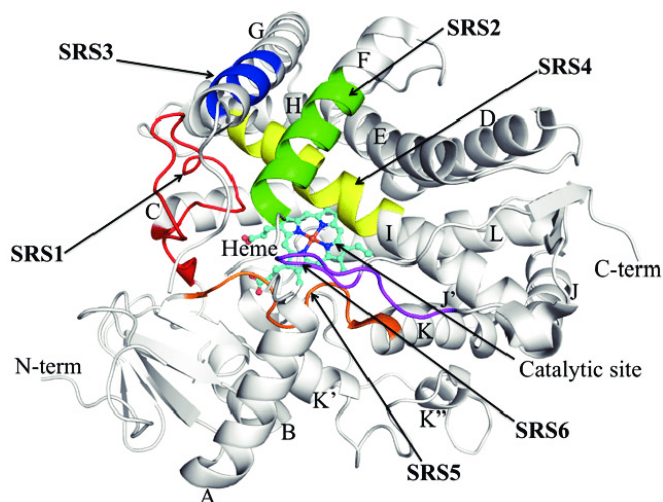
Na centrální atom je prostřednictvím thiolátového aniontu cysteinu vázána apoproteinová část skládající se z 400-500 aminokyselin. Různá sekvence aminokyselin odlišuje jednotlivé izoformy cytochromů P450 a určuje jejich substrátovou specifitu. V rámci jedné rodiny CYP je asi 40% shoda v sekvenci aminokyselin, přičemž příslušnost ke konkrétní podrodině je dána alespoň 60-70% shodou v pořadí aminokyselin. Z toho vyplývá, že sekvenční shoda mezi jednotlivými rodinami CYP činí méně než 40%. Přesto celkové sekundární uspořádání apoproteinu cytochromů vykazuje určité shodné rysy i mezi konkrétními rodinami. Všechny rodiny CYP obsahují 12 α -helixů pojmenovaných písmeny A-L a 4 β -skládané listy označené čísly 1-4. V některých případech obsahuje apoprotein ještě několik dalších helixů a skládaných listů označených symbolem sousedícího helixu opatřeného čarou v horním indexu. Například mnoho savčích cytochromů obsahuje F' a G' helixy mezi F a G helixy. Všechny tyto specifické struktury hrají svoji důležitou roli zejména pro rozpoznání substrátu enzymem a jeho následné navázání. Např. F a G helix, F-G a B-C smyčka mají významnou roli v přijetí substrátu do aktivního místa. B-C smyčka také díky široké variabilitě uspořádání v různých cytochromech významně určuje substrátovou selektivitu (Kirchmair, 2014).

Struktura hemu je umístěná mezi distálními a proximálními doménami globulárních podjednotek tvořících terciální strukturu a v jejím nejbližším okolí se nachází struktury helixů E, I, J, K, L a část β -listu 1. Proximální část apoproteinu má pozitivní náboj a je důležitá pro navázání NADPH-CYP-reduktázy ke struktuře hemu, zatímco k distální části se váže substrát. Pro lepší představu je struktura enzymu CYP vyobrazena na obr. 3 níže (Kirchmair, 2014).



Obr. 3: Struktura enzymu CYP3A4, uprostřed je zobrazena struktura hemu, na kterou je navázán apoprotein zobrazený formou sekundární struktury α -helixů (červeně) a β -skládaných listů (žlutě). Tyto struktury jsou propojeny pomocí smyček (zelená) (převzato z: Nair et al. 2016).

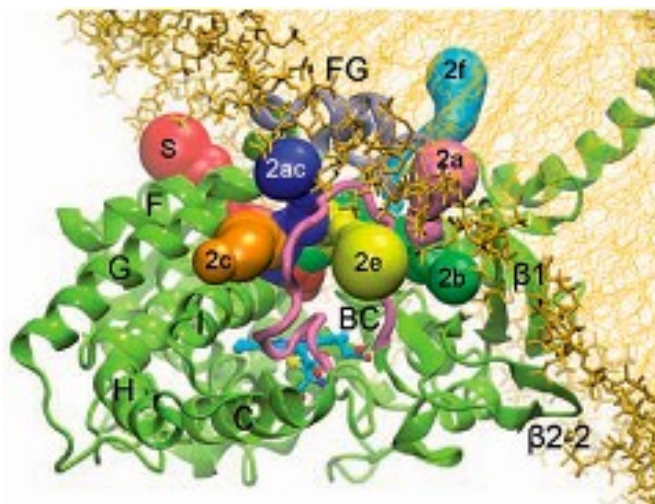
Dosud bylo popsáno šest míst rozpoznávajících substrát, která obklopují katalytickou doménu. Tato místa popsal Gotoh ve svém výzkumu a nazval je jako substrate recognition sites (SRSs), v překladu substrát rozpoznávající místa (Gotoh, 1992). Tato místa jsou vyznačena na následujícím obr. 4 znázorňujícím strukturu CYP2C9.



Obr. 4: Enzym CYP2C9 s barevně zakreslenými místy rozpoznávajícími substrát. SRS1 (červeně) je součástí B' helixu a přilehlých oblastí, SRS2 (zeleně) se nachází na C-konci F helixu, SRS3 (modře) na N-konci G helixu, SRS4 (žlutě) na N-konci I helixu, SRS5 (oranžově) se vyskytuje na smyčce mezi K helixem a vláknem β -skládaného listu 1 a SRS6 (fialově) je součástí ohybu β -skládaného listu 4. Ostatní struktury apoproteinu jsou zakresleny šedivou barvou (převzato z: Nair et al. 2016).

Pro zajištění přístupu substrátu k aktivnímu místu je potřeba, aby byl CYP správně orientován v prostoru. Studium vztahu mezi flexibilitou aktivního místa enzymu a substrátovou specifikou se zabýval např. Otyepka et al., který zkoumal konformační změny tří konkrétních cytochromů: CYP3A4, 2A6 a 2A9. Ve studii bylo vyzorováno, že proximální část proteinu a struktura jádra proteinu vázaného na hem je rigidní, zatímco distální část, ke které se váže substrát, je mnohem tvárnější. Nicméně byly nalezeny značné rozdíly ve flexibilitě struktury proteinu mezi jednotlivými izoformami CYP. Nejmenší flexibilitou se vyznačoval CYP2A9 s vysokou substrátovou specifikou. Naproti tomu struktura CYP3A4, o kterém je známo, že metabolizuje většinu léčiv, vykazovala největší flexibilitu ze všech tří zkoumaných enzymů. Tato zjištění dokazují, že cytochromy s flexibilnější strukturou apoproteinu (zejména jeho distální část) mají díky většímu množství možností orientace v prostoru širší substrátovou specifikou (Otyepka et al., 2007). Pokud je ale na enzym vázán ligand blokující aktivní místo, jeho struktura se stabilizuje. To bylo prokázáno v další studii, ve které byla porovnána struktura CYP2D6 bez ligandu a ve formě vázané s chinidinem, který působí jako kompetitivní inhibitor CYP2D6. V případě CYP2D6 s navázaným chinidinem došlo k významnému zvýšení stability, snížení flexibility aktivního místa enzymu a následně deaktivaci enzymu CYP2D6 (Berka et al., 2012).

Mikrozmální cytochromy jsou ukotveny v membráně endoplazmatického retikula pomocí hydrofobních aminokyselin, které jsou součástí α -helixu tvořícího N-konec apoproteinu. Tato rigidní struktura s 20-30 rezidui je také důležitá pro správné ukotvení enzymu v membráně endoplazmatického retikula. Větší část apoproteinu včetně katalytické domény je orientovaná směrem k cytoplazmě (obr. 5) (Kirchmair, 2014).



Obr. 5: Model struktury CYP2C9 zakotveného v lipidové dvojvrstvě membrány endoplazmatického retikula. Schematické zobrazení sekundární struktury apoproteinu je zakresleno zeleně, B-C smyčka růžovou a F-G smyčka fialovou barvou. Díky své flexibilitě se tyto struktury podílejí na strukturní variabilitě a ovlivňují substrátovou specifitu enzymu (převzato z: Kirchmair 2014).

Ze všech předchozích výzkumů zabývajících se strukturou CYP vyplývá, že mezi nejvíce stabilní struktury apoproteinu patří N-konec zakotvený v membráně endoplazmatického retikula, oblast vázaná na strukturu hem a proximální část apoproteinu, na kterou se váže NADPH-CYP-reduktáza. Sekvenční a strukturní variabilita je pozorována zejména v distální části apoproteinu obsahující B-C, F-G helixy a jejich spojovací smyčky. Ke strukturní variabilitě mezi cytochromy přispívá rozdílná velikost, tvar a polarita aktivního místa, který určuje substrátovou selektivitu. Aktivní místo CYP je obklopeno hlavně hydrofobními aminokyselinovými zbytky s výjimkou některých polárních nebo nabitých zbytků, které hrají významnou roli ve vazbě a orientaci substrátu a jsou důležité pro jeho specifikaci. V případě vazby substrátu na cytochrom dochází ke změně konformace enzymu do tzv. uzavřené konformace se sníženou flexibilitou v aktivním místě. Cytochromy s vysokou mírou flexibility v aktivním místě metabolizují řadu strukturně rozmanitých substrátů, zatímco cytochromy s méně tvárnou strukturou vykazují vyšší substrátovou specifitu. Příkladem enzymu s širokou substrátovou specifikou je CYP3A4, který se podílí na metabolismu okolo 50 % léčiv (Kirchmair, 2014).

Podle subcelulární lokalizace můžeme rozdělit cytochromy do několika základních kategorií. Mitochondriální cytochromy zodpovědné za metabolismus

steroidů, cytochromy rozpustné v cytozolu nacházející se zejména u prokaryot a mikrozomální cytochromy vázané na membránu endoplazmatického retikula, které hrají ústřední roli v metabolismu xenobiotik (Kirchmair, 2014). V menší míře se však cytochromy P450 vyskytují i v jiných buněčných organelách, jako jsou lysozomy nebo plazmatická membrána. Fyziologická funkce těchto cytochromů není však zcela úplně jasná (Neve & Ingelman-Sundberg, 2008).

Cytochromy P450 rodiny 1-3 jsou jako hlavní enzymy účastníci se metabolismu xenobiotik nejvíce exprimované v játrech. Významná hladina exprese těchto enzymů je však zaznamenána i v extrahepatálních tkáních, které jsou v přímém kontaktu s xenobiotiky a mají velký podíl zejména na absorpci, distribuci, metabolismu a eliminaci xenobiotik. Jedná se zejména o plíce, ledviny a gastrointestinální trakt (GIT). Větší podíl exprese CYP ale můžeme najít také v kůži, mozku, nadledvinkách, pohlavních orgánech, nazální a tracheální mukóze (Hrycay & Bandiera, 2007). Obsah CYP v jednotlivých tkáních je uveden v následující tabulce, kde je množství CYP vyjádřeno v jednotkách nmol/mg mikrozomálního proteinu (tab. 1).

TABLE 18.1 Total CYP Content in Various Human Organs

Organ	Human (nmol/mg microsomal protein)
Liver	0.30–0.60
Adrenal	0.23–0.54
Small intestine	0.03–0.21
Kidney	0.03
Lung	0.01
Brain	0.10
Testis	0.005
Skin	Not determined
Mammary	<0.001

Tab. 1: Celkový obsah CYP v různých lidských orgánech v jednotkách nmol/mg mikrozomálního proteinu (převzato z: Hrycay a Bandiera 2007).

V expresi cytochromů existují značné interindividuální rozdíly, jelikož je tato exprese závislá na kombinaci mnoha faktorů. Mezi tyto faktory patří pohlaví, věk, zdravotní stav organismu, regulace cytokiny a hormony. Míru exprese ovlivňuje také

řada přijímaných xenobiotik, které ji mohou indukovat i inhibovat. Mezi ně patří např. cigaretový kouř, alkohol, některá léčiva a potraviny, polutanty a další (Stiborová et al., 1999).

Jedním z nejčastěji diskutovaných příčin interindividuálních rozdílů v expresi je genetický polymorfismus definovaný jako geneticky podmíněná odlišnost projevující se alespoň u 2 % populace (Stiborová et al., 1999). Tyto genetické odchylky jsou často spojeny s určitou etnickou skupinou. Mezi typicky polymorfní enzymy patří cytochromy 2D6, 2C19, 2C9, 2B6, 3A5 a 2A6, jejichž odlišná polymorfní varianta může vykazovat sníženou nebo zvýšenou aktivitu, a vede tak k odlišnostem ve fenotypu. Podle schopnosti metabolizovat xenobiotika lze jednotlivé populace s polymorfními enzymy rozdělit na pomalé, střední, rychlé a ultrarychlé metabolizátory. Znalost genetických polymorfismů má velký význam pro predikci úspěšnosti a vedlejších účinků terapie. (Zanger & Schwab, 2013).

3.1.2. Fyziologická funkce cytochromů P450

Cytochromy P450 se řadí mezi monooxygenázy, které v první fázi biotransformace katalyzují oxidační přeměnu většiny přijímaných cizorodých látek (Stiborová et al., 1999). Jejich fyziologická funkce úzce souvisí s jejich lokalizací v orgánech, které mají svou důležitou úlohu při absorpci, distribuci a eliminaci cizích látek, zejména ve smyslu detoxikace a ochrany organismu. Pro svoji širokou substrátovou specifitu mají enzymy CYP v organismu svoji nezastupitelnou roli (Mak & Denisov, 2018). Spolu s ABC transportéry, které aktivně transportují molekuly přes buněčnou membránu, jsou nezbytným předpokladem pro detoxikaci a vyloučení nejen škodlivin, ale i léčiv. Bez nich by se tato léčiva kumulovala v organismu a znásobil by se tak jejich nežádoucí efekt, a to v podobě nadměrně vystupňovaného terapeutického nebo nepříznivého vedlejšího účinku. V případě některých léčiv je enzymatická přeměna základní podmínkou pro jejich účinek. Tato léčiva jsou přijímána ve formě tzv. proléčiv, které se až v organismu po enzymatické přeměně stávají aktivními (Ortiz de Montellano, 2013).

Na druhou stranu se může stát, že jsou tyto pro organismus esenciální enzymy zdrojem nežádoucích procesů. Jedním z těchto neblahých případů může být

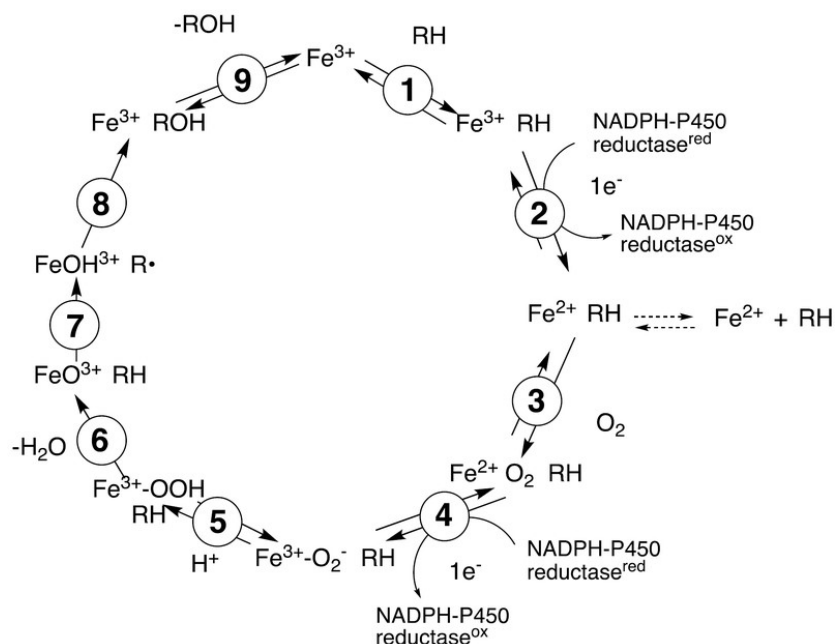
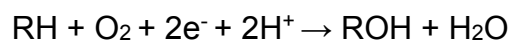
metabolická přeměna, při které vznikají toxicitější produkty než samotné původně přijímané xenobiotikum. Ty mohou být potenciálním nebo skutečným zdrojem poškození organismu. Konkrétně mohou CYP zprostředkovávat metabolismus prokarcinogenů na reaktivní karcinogeny, což může vést k rozvoji tumorigeneze (Fujita, 2006). Například bioaktivace benzo[a]pyrenu, arylaminů, nitroarenů, arylarenů a dalších prokarcinogenních látek pomocí enzymu CYP1 na reaktivní metabolity může být příčinou poškození buněčné DNA (Zanger & Schwab, 2013).

Jiným nepříznivým dopadem metabolismu CYP je snížení biologické dostupnosti přijímaných léčiv ještě dříve, než dosáhnou svého účinku. Tato nežádoucí biotransformace probíhá zejména v orgánech s eliminační a absorpční funkcí, ale diskutuje se také o vlivu CYP přímo v cílové tkáni. Proto je metabolismus zprostředkovaný CYP považován za jeden z možných mechanismů vzniku lékové rezistence (Fujita, 2006).

Další nežádoucí situací během biotransformace je interakce léčiv, kdy jedno léčivo působí inhibičně nebo aktivačně na enzymatickou přeměnu jiného léčiva, a tím ovlivňuje koncentraci aktivní formy léčiva v cílové tkáni. To ale neznamená, že tento jev musí být vždy nežádoucí, ba dokonce může být během terapie prospěšný. Takového efektu se využívá například v případě, kdy je potřeba potlačit degradaci některých nestabilních a snadno odbouratelných léčiv, aby se dosáhlo jejich vyšší F, a tedy i účinnosti.

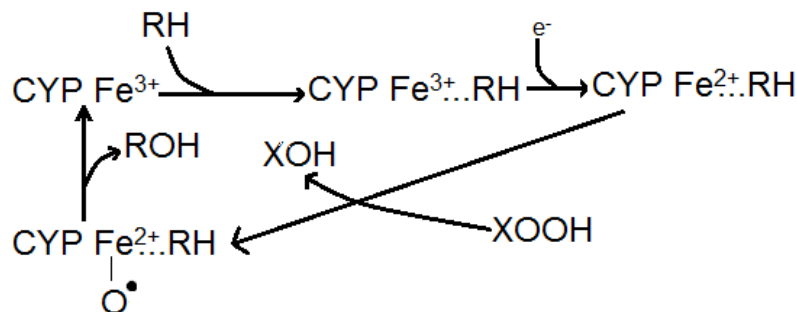
Mechanismus účinku CYP spočívá ve sledu po sobě následujících reakcích aktivovaných navázáním substrátu na cytochrom, kdy se hemová prostetická skupina mění na svojí aktivní vysokospinovou formu. V této formě je Fe^{3+} v centru porfyrinového kruhu schopen přijmout elektron z molekuly substrátu a redukuje se na dvojmocné železo. Poté CYP naváže vzdušný kyslík a po odštěpení kyslíkové vazby zabudovává jeden atom kyslíku do molekuly substrátu a druhý do molekuly vody (Manikandan & Nagini, 2018). Jako přenašeč elektronů se zde uplatňuje NADPH-CYP-reduktáza, jejíž afinita k CYP se znásobuje při navázání substrátu na polypeptidový řetězec cytochromu. V některých případech slouží jako přenašeč elektronů také cytochrom-b₅ a cytochrom-b₅-reduktáza (Manikandan & Nagini, 2018).

Zjednodušeně lze většinu oxidačních reakcí probíhajících prostřednictvím CYP souhrnně vyjádřit následující rovnicí a dále pak schématem, který znázorňuje jednotlivé kroky katalytického cyklu (obr. 6).



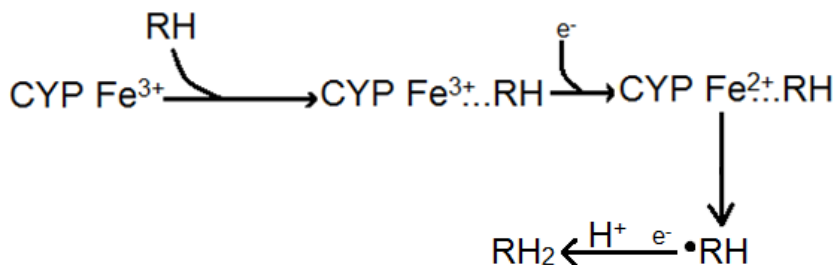
Obr. 6: Schéma katalytického cyklu CYP: monoxygenázová reakce, RH – substrát, ROH – monoxygenační produkt, Fe – atom hemového železa cytochromu (převzato z: Pallan et al. 2015).

Kromě kyslíku může CYP během oxidační reakce využít také organický hydroperoxid. V takovém případě celá reakce probíhá formou tzv. peroxidázové zkratky, kterou znázorňuje zjednodušené schéma na obr. 7:



Obr. 7: Peroxidázová zkratka: RH – substrát, ROH – produkt, XOOR – organický hydroperoxid (převzato z: Skálová a kol. 2017).

Mimo oxidaci mohou CYP uplatňovat také reduktázovou aktivitu, ve které metabolizovaný substrát navázaný na redukovaný CYP přijímá elektron namísto kyslíku. Tato reakce však probíhá zejména za anaerobních podmínek. Reduktázovou aktivitu popisuje obr. 8:



Obr. 8: Schéma reakce reduktázové aktivity CYP: RH – substrát, RH₂ – redukovaný metabolit (převzato z: Skálová a kol. 2017).

Reduktázová aktivita cytochromů může být příčinou vzniku reaktivních meziproduktů, např. volných radikálů, které jsou však zneškodněny v 2. fázi biotransformačního procesu. V případě, že tyto vysoce reaktivní metabolity uniknou detoxikaci v druhé fázi biotransformace, mohou reagovat s důležitými buněčnými strukturami a mohou tak být pro organismus zdrojem poškození.

Enzymy CYP jsou významné nejen z hlediska exogenního metabolismu, ale také již zmíněnou schopností katalyzovat přeměnu endogenních substancí. Isoformy CYP metabolizující tyto eobiotika se vyskytují na membráně endoplazmatického retikula i mitochondrií a prakticky se neúčastní metabolismu xenobiotik (Skálová a kol., 2017).

3.1.3. Účast cytochromů P450 na farmakokinetické lékové rezistenci

3.1.3.1. Základní mechanismy lékové rezistence

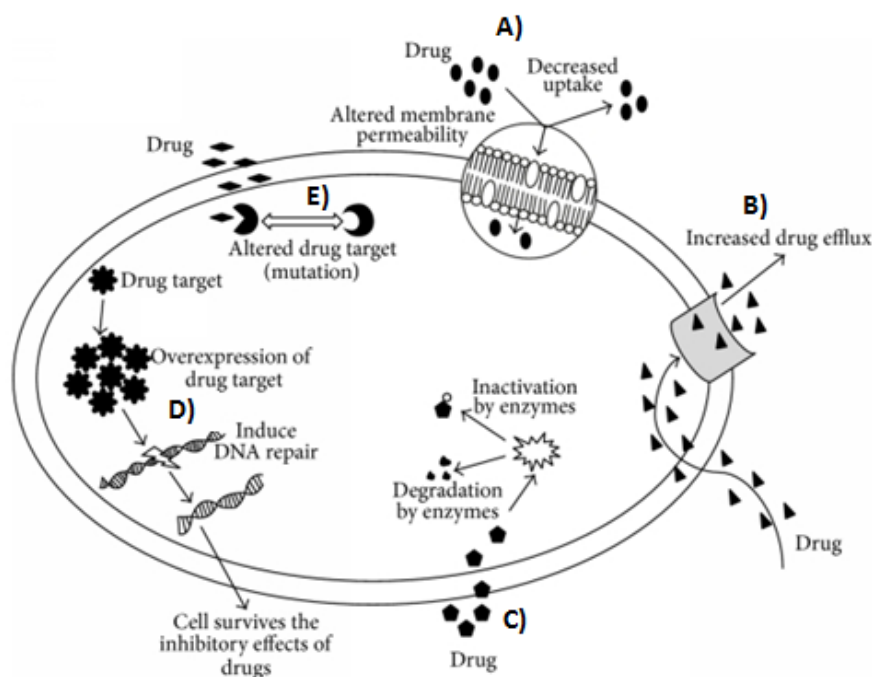
Obecně je léková rezistence chápána jako snížení účinnosti léku během terapie určitého onemocnění nebo patologického stavu (Loke & Hanafi, 2019). Tento nežádoucí jev může nastat u jakéhokoliv typu léčby, avšak nejvíce je tento pojem spojován s antimikrobiální a chemoterapeutickou léčbou. Obě tato odvětví medicíny

jsou značně zasažena tímto lékovým problémem, jehož důsledky mají velký dopad pro jednotlivce i pro celou společnost. V případě antimikrobiální léčby je nerespektování správné volby a dávkování léčiva důsledkem vzniku rezistentních mikrobiálních kmenů, které jsou zdrojem obtížně léčitelných infekčních onemocnění šířených v populaci. V chemoterapii je fenomén lékové rezistence poměrně častou příčinou selhání terapie a mívá tak fatální následky v léčbě onkologických pacientů.

V základním slova smyslu lze lékovou rezistenci rozdělit na primární a sekundární. Primární rezistence je dána přirozenou schopností buněk odolávat účinkům léčiva, a to již při prvním kontaktu. Sekundární rezistence oproti tomu vzniká až v průběhu nebo po ukončení první léčby. Pokud dochází ke vzniku rezistence na více léčiv s podobnou strukturou nebo mechanismem účinku, jedná se o tzv. zkříženou rezistenci. Tato klasifikace popisuje základní vlastnosti lékové rezistence, příčiny vzniku nádorové rezistence vůči cytostatikům jsou však komplexní a často přispívají k neúspěšnosti léčby nejednoho chemoterapeutického léčiva. Souhrn těchto mechanismů nazýváme mnohočetnou lékovou rezistencí (multidrug resistance, MDR) (Nosková et al., 2000).

V případě cytostatické rezistence lze na základě mechanismu lékové rezistence určit 3 různé způsoby jejího vzniku. Jedním z nich je změna ve farmakokinetice léčiva. V takovém případě dochází ke snížení absorpce nebo předčasné biotransformaci a eliminaci z organismu. V takto navozené snížené účinnosti léčiva hrají roli zejména orgány s absorpční a eliminační funkcí – zejména játra a GIT. Na subcelulární úrovni dochází v těchto místech k deaktivaci léčiva pomocí enzymů, případně k jeho efluxu prostřednictvím ABC membránových transportérů. Mimo systémovou úroveň jsou farmakokinetické mechanismy schopny ovlivňovat i intratumorální akumulaci cytostatik a ovlivňovat tak dále negativně jejich účinnost.

Dalším důležitým mechanismem vzniku lékové rezistence je změna cytokinety, při kterém nádorové buňky setrvávají v G_0 fázi, a jsou tak odolnější vůči chemoterapii. Tento typ rezistence je specifický pro nádorová onemocnění. Mechanizmy MDR jsou podrobněji popsány v následujícím obrázku (obr. 9).



Obr. 9: Mechanizmy MDR v nádorové tkáni (převzato z: Tanwar et al. 2014). A) změna permeability membrány – snížený uptake léčiva, B) zvýšený eflux, C) degradace/inaktivace enzymy, D) zintenzivnění oprav DNA, E) změna cílové struktury léčiva

Nejčastější příčinou vzniku lékové rezistence je však změna ve struktuře cíle léčiva (mutace, genová amplifikace) a zintenzivnění oprav DNA v nádorové tkáni (Nosková et al., 2000).

Pokud jde o mikrobiální lékovou rezistenci, situace je velmi podobná cytostatické rezistenci. I v tomto případě převažuje rezistence získaná, kdy mikroby vystavené přítomnosti léčiva se stávají odolnými díky získaným genovým mutacím, které jim propůjčují schopnost odolnosti vůči léčivům. Tyto geny se souhrnně nazývají rezistom (Loke & Hanafi, 2019).

V zásadě je velice obtížné předem odhadnout, do jaké míry bude chemoterapie nádorových onemocnění úspěšná a bezpečná, protože je zde mnoho faktorů, které ji ovlivňují. Jsou to především faktory závislé na věku, pohlaví, zdravotním stavu, funkci eliminačních orgánů, typu, lokalizaci, rozsahu nádoru, ale také genetický polymorfismus nebo vnější vlivy (např. stravování, současně užívaná léčiva, kouření, ovzduší, apod.) (Nosková et al., 2000). Většina těchto faktorů hraje roli ve farmakokinetice cytostatik a jsou častou příčinou interindividuálních rozdílů v účinnosti

a toxicitě cytostatik, a to i v případě, že jsou tato léčiva podána ve stejné dávce (Fujita, 2006). Tyto rozdíly se objevují i v souvislosti s léčbou běžných nezhoubných onemocnění, během chemoterapie jsou však i drobné odlišnosti ve farmakokinetickém profilu cytostatik vzhledem k jejich užšímu terapeutickému oknu zdrojem závažných klinických důsledků (Fujita, 2006).

3.1.3.2. Mechanizmy farmakokinetické rezistence na systémové úrovni

Rezistence zprostředkovaná prostřednictvím biotransformace na celosystémové úrovni je dána buď deaktivací cytostatika (čímž dojde k omezení F) a/nebo urychlením jeho exkrece. Cytochromy P450 hrají důležitou roli v metabolismu většiny léčiv a mají velký vliv i na farmakokinetický profil chemoterapeutik, potažmo rovněž na jejich účinek.

Mnoho studií potvrdilo, že metabolismus zprostředkovaný biotransformačními enzymy není jediným mechanismem systémové farmakokinetické rezistence vůči cytostatikům. Spolu s nimi se na snížení F a urychlení exkrece podílejí ABC efluxní transportéry. Jsou to membránové transportéry, jejichž přirozenou funkcí je podobně jako u cytochromů ochrana organismu vůči škodlivému působení cizorodých látek, v tomto případě se však jedná o aktivní efluxní transport léčiva z buněk (Linton, 2007). Tyto transportéry (zejména zástupci BCRP, MRP1 a P-gp) jsou vysoce exprimované ve střevech, játrech a ledvinách, kde podporují exkreci léčiv do žluči, moči nebo lumen střeva (Canaparo et al., 2007) a svou aktivitou jsou schopny navodit systémovou rezistenci vůči mnoha cytostatikům. Mimo fyziologickou tkáň jsou ve velké míře exprimovány též přímo v nádorových buňkách, kde snižují akumulaci cytostatik, a podílí se tak i na rezistenci na intratumorální úrovni (Szakács et al., 2006).

Zkoumáním role společného působení CYP3A a P-gp jako klíčového faktoru snížení F po p. o. podání cytostatik se ve své studii zabýval Schellens et al. V první části experimentů byl pěti pacientům perorálně podán samotný paklitaxel, zatímco devět dalších pacientů obdrželo stejnou dávku p. o. paklitaxelu společně s prokázaným inhibitorem P-gp a CYP3A4 cyklosporinem A. F samotného paklitaxelu byla méně než 5 %, u paklitaxelu podaného společně s cyklosporinem A se F zvýšila

na 50 %. Pacienti léčení p. o. podaným paklitaxelem navíc vykazovali lepší snášenlivost na léčbu než pacienti léčení i. v. podaným paklitaxelem. Ve druhé části výzkumu byly provedeny ty samé pokusy, ale tentokrát s p. o. podaným docetaxelem namísto paklitaxelu. F docetaxelu po p. o. podání vzrostla z pouhých 8 ± 6 % bez přítomnosti cyklosporinu A více než desetinásobně (88 ± 36 %) v kombinaci s cyklosporinem (Schellens et al., 2000). Závěrem studie je poznatek, že v případě potlačení aktivity CYP3A a P-gp inhibitorem je možné výrazně zvýšit perorální F paklitaxelu a docetaxelu, což by mohlo být využitelné pro zlepšení komfortu a adherence pacientů k léčbě těmito cytostatiky.

Některé *in vitro* studie hovoří o synergickém účinku CYP a efluxních transportérů ve snížení F léčiv. Existují dvě teorie vysvětlující mechanismus synergického působení mezi CYP3A a P-gp. První z nich popisuje možnou interakci těchto dvou detoxikačních systémů jako udržování plynule nižší koncentrace léčiva v enterocyту zprostředkované P-gp transportérem, léčivo pak může být účinněji metabolizováno enzymatickým systémem CYP3A, který za daných podmínek není saturován. Druhým možným vysvětlením synergismu je cyklicky se opakující eflux léčiva prostřednictvím P-gp a opětovný re-uptake přes buněčnou membránu, což umožňuje substrátu opakovaný, a proto prodloužený přístup k CYP3A (Waterschoot & Schinkel, 2011).

Interakcí mezi CYP a P-gp se zabývala Cummins et al., která prováděla *in vitro* experimenty na Caco-2 buňkách exprimujících geny pro CYP3A4 a P-gp. V pokusech byl použit inhibitor GG918 inhibující pouze samotný P-gp bez vlivu na CYP3A enzym. Záměrem pokusů bylo prozkoumat metabolismus K77, duálního substrátu pro P-gp a CYP3A, společně s felodipinem, který je také substrátem CYP3A, ale ne P-gp. V případě inhibice P-gp zprostředkovaného GG918 byl metabolismus K77 snížen z 33 % na 14 %. Na rozdíl od toho, metabolismus felodipinu nebyl inhibitorem P-gp nijak ovlivněn (Cummins et al., 2002). Výsledky studie naznačují, že ovlivnění samotného P-gp může mít vliv i na zvýšení metabolického účinku CYP.

Biologickou dostupností docetaxelu po p.o. podání se zabýval také Robert A. B. van Waterschoot et al. ve svých pokusech na myších s deficitem genů pro CYP3A a P-gp. Studie ukázala, že myši s absencí genů pro P-gp a CYP3A vykazovaly sedmdesátkrát vyšší systémovou expozici vůči docetaxelu v porovnání s typem myší

s normální expresí genů pro P-gp a CYP3A. Synergický efekt těchto dvou systémů však jednoznačně prokázán nebyl (Waterschoot et al., 2009).

Výše zmíněné studie zkoumají mechanismy rezistence probíhající na úrovni urychlení omezení absorpce či zrychlení eliminace léčiva v organismu, která probíhá zejména ve střevní a jaterní tkáni. Několik studií však potvrzuje, že enzymy CYP mají pravděpodobně podíl na rezistenci i lokálně. Jejich zvýšená intratumorální exprese může vést k deaktivaci a tím ke snížení účinku přímo v nádoru. Více informací o tomto fenoménu bude uvedeno v sekci 3.1.3.4.

3.1.3.3. Intratumorální exprese cytochromů 450

Dhaini et al. ve svém výzkumu stanovoval expresi CYP1A1/2, 1B1, 2B6, 2D6 a 3A4/5 z biopsie osteosarkomu 18 pacientů pomocí imunohistochemie. Úroveň exprese 1A1/2, 1B1 a 3A4/5 byla 83 %, 67 % a 83 %, přičemž exprese CYP3A4/5 u pacientů s plicními metastázemi byla signifikantně vyšší než u pacientů bez metastáz. Enzymy CYP2D6 a 2B6 nebyly detekovány. Na základě výsledků studie lze usoudit, že u pacientů s vyšší expresí intratumorálních CYP3A4/5 lze předvídat horší odpověď na terapii a vyšší riziko výskytu pozdějších metastáz (Dhaini et al., 2003).

Murray et al. ve své studii porovnával expresi CYP1A, 2E1 a 3A adenokarcinomu žaludku a zdravého žaludečního epitelu. Zvýšená exprese se projevila u CYP1A v 51 % případů a 3A v 21 % případů adenokarcinomu, zatímco ve zdravé žaludeční tkáni nebyl identifikován žádný z těchto CYP (G. I. Murray et al., 1998).

V případě kolorektálního karcinomu byl prováděn výzkum exprese několika izoform CYP. CYP1B1 a CYP3A5 byly přítomny v signifikantně vyšších hladinách v porovnání s normálním střevním epitelem. Některé izoformy byly přítomné také v metastázích lymfatických uzlin (Kumarakulasingham et al., 2005). V jiné studii byla porovnána exprese CYP1A a CYP3A rodin v buňkách kolorektálního adenomu, karcinomu a ve zdravé tkáni tlustého střeva. Ve všech vzorcích kolorektálního adenomu byly identifikovány obě rodiny, 75 % a 61 % vzorků karcinomu obsahovalo CYP1A a CYP3A enzymy. Vzorky zdravé tkáně nevykazovaly žádnou pozitivní

imunoreaktivitu na CYP1A a pouze 15 % bylo pozitivně imunoreaktivní k enzymu CYP3A (McKay et al., 1993).

Obdobná situace byla pozorována v buňkách prsního karcinomu, karcinomu prostaty a jícnu. Z 54 vzorků prsního karcinomu vykazovalo 12 vzorků zvýšenou expresi CYP3A a 21 vzorků zvýšenou expresi CYP1A (Graeme I. Murray, Weaver, et al., 1993). Karcinom prostaty byl zkoumán z hlediska CYP1A, CYP2C a CYP3A exprese, která byla prokázána u 63 %, 25 % a 61 % tumorů (Graeme I. Murray et al., 1995). Karcinom jícnu opět vykazoval přítomnost CYP1A a CYP3A, a to v 64 % a 72 % případů (G. I. Murray et al., 1994).

V oblasti výzkumu vývoje zhoubných novotvarů je věnována zvláštní pozornost enzymu CYP1B1. Bylo zjištěno, že tento enzym je nadměrně exprimován v široké škále nádorových onemocnění včetně rakoviny prsu, kolorektálního karcinomu, karcinomu plic, jícnu a mnoha dalších. Přítomnost CYP1B1 v mnoha typech nádorové tkáně by mohla naznačovat, že tento enzym má zásadní vliv na kancerogenezi, a kromě toho může také přispívat k lékové rezistenci. G. I. Murray et al. ve své práci popisuje, že CYP1B1 zprostředkovává konverzi 17 β -estradiol na kancerogenní 4-hydroxyestradiol, čímž se může podílet na zvýšeném riziku vzniku rakoviny prsu (Graeme I. Murray et al., 1997).

V některých případech experimenty nepotvrdily teorii zvýšené aktivity CYP v nádorové tkáni. Většina studií zabývajících se expresí CYP u hepatocelulárního karcinomu prokázala naopak nižší expresi v nádorové tkáni v porovnání se zdravými játry (el Mouelhi et al., 1987; Kirby et al., 1993; Kondoh et al., 1999). Murray et al. vyhodnotil expresi různých izoform CYP jako variabilní. CYP3A a CYP1A enzymy byly přítomny v 65 % a 42 % z 31 vzorků hepatocelulárního karcinomu (Graeme I. Murray, Paterson, et al., 1993). Studie exprese enzymů CYP1A1, 2E1 a 3A4 v nádorové prsní tkáni 33 pacientek zaznamenala také významně sníženou intratumorální expresi těchto enzymů v porovnání s nerakovinnou prsní tkání (El-Rayes et al., 2003).

Znalost aktivity a lokalizace různých izoform v nádorové tkáni jsou stále ještě nekompletní a zatížené interindividální variabilitou v expresi CYP, která se promítá i ve variabilitě v odpovědi pacientů na chemoterapii. Mnoho předešlých studií se zabývalo přítomností metabolizujících enzymů v tumorech, díky odlišným

vyhodnocovacím technikám a heterogenitě zkoumaných vzorků se však jejich data odlišují (Rodriguez-Antona & Ingelman-Sundberg, 2006). Přesto zde existuje několik společných znaků. Mezi ně patří zvýšená exprese zejména enzymů CYP1A, 3A a 1B1 detekovaná v různých typech nádorů.

3.1.3.4. Role cytochromu P450 v lékové rezistenci na intratumorální úrovni

Funkční exprese CYP v nádorové tkáni účinek cytostatik zpravidla snižuje, zároveň může mít naopak i podíl na aktivaci proléčiv. Toho se využívá např. u cyklofosfamidu, ifosfamidu a irinotekanu, u kterých dochází pomocí CYP2B6 a CYP3A4/5 k biotransformaci na účinnější metabolity (Gharavi & El-Kadi, 2004). Následující tabulka poskytuje přehled cytostatik aktivovaných/deaktivovaných cytostatiky (tab. 2).

Drug	Relative tumor activity	P450 inactivation	P450 activation	Drug	Relative tumor activity	P450 inactivation	P450 activation
Paclitaxel	Ovarian, breast, and non-small cell lung	CYP2C8, CYP3A		Teniposide	Small cell lung	CYP3A4/2C19	
Docetaxel	Breast and lung	CYP3A, CYP1B1		Irinotecan	Colorectal and cancers of upper gastrointestinal tract	CYP3A	
Vinblastine	Lymphoma and osteosarcoma	CYP3A		Topotecan	Metastatic ovarian and small cell lung	CYP3A	
Vincristine	Lymphoma	CYP3A		Dacarbazine	Metastatic melanoma	CYP1A1, CYP1A2, CYP2E1	
Vindesine	Advanced breast and non-small cell lung	CYP3A		Procarbazine	Metastatic melanoma	CYP1A, CYP2B	
Vinorelbine	Advanced breast and non-small cell lung	CYP3A		Mitoxantrone	Breast	CYP1B1, CYP3A4	
Ellipticine	Osteolytic breast cancer metastases	CYP3A4, CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, CYP2C9		Tamoxifen	Breast	CYP3A, CYP1B1	
Etoposide	Testicular small cell lung, lymphoma, and osteosarcoma	CYP3A4, CYP1A2, CYP2E1		Cyclophosphamide	Sarcoma, breast, and ovarian		CYP2B6, CYP3A4
				Ifosfamide	Sarcoma		CYP2B6, CYP3A4
				Doxorubicin	Sarcoma, breast, and ovarian		CYP3A4
				Thiotepa	Bladder		CYP2B6, CYP3A4
				Tegafur	Metastatic colorectal		CYP2A6

Tab. 2: Cytostatika metabolizovaná CYP (převzato z: McFadyen et al. 2004).

Zvýšená metabolická aktivita enzymů přímo v nádoru může být příčinou zrychlené deaktivace, a potažmo i rezistence k chemoterapii. To bývá problémem zejména u léčiv, na jejichž metabolismu má většinový podíl příslušná overexprimovaná izoforma CYP. Tuto domněnku potvrzuje studie věnující se vlivu overexprese CYP3A na účinek paklitaxelu, dasatinibu a erlotinibu v terapii adenokarcinomu pankreatu. Studie navíc popisuje substrátem zprostředkovanou indukci CYP3A5 řízenou PXR, ligandem aktivovaným jaderným receptorem, který slouží jako transkripční faktor regulující expresi klíčových genů kódujících detoxikační enzymy a transportéry (Noll et al., 2016).

Dalším typickým příkladem CYP3A řízené deaktivace je biotransformace vinkristinu. Vinka alkaloidy, vinkristin a vinblastin, se používají jako mitotické jedy především v terapii akutní lymfatické leukemie a zhoubných lymfomů (Moudi et al., 2013). Metabolismus těchto dvou příbuzných chemoterapeutik má však odlišný dopad na jejich aktivitu. Zatímco CYP3A5 zvyšuje clearance vinkristinu a snižuje jeho aktivitu, vinblastin je prostřednictvím CYP3A4 metabolizován na jeho účinnější metabolit (Chagas & Alisaraie, 2019; Dennison et al., 2007).

Testováním účinku biotransformačních enzymů na deaktivaci taxanů a vinkristinu se zabývala Mgr. Adéla Janoušková ve svých pokusech na HepG2 liniích transdukovaných lidskými CYP3A4 a CYP2C8 enzymy. U docetaxelu byl pozorován významný vliv CYP3A4 na rezistenci buněk. Zvýšenou odolnost buněk s overexpresí CYP3A4 vůči paklitaxelu a vinkristinu se však jednoznačně prokázat nepodařilo (Janoušková, 2019).

Cytochromy P450 jsou klíčové enzymy metabolizující většinu léčiv v první fázi biotransformace, čímž se značnou měrou podílí na inaktivaci mnoha léčiv. Z předchozích studií je patrné, že některá cytostatika jsou náchylnější k CYP-zprostředkované rezistenci na celosystémové a intratumorální úrovni. Pozorovanou předčasnou eliminaci lze zvrátit pomocí inhibitorů CYP. R. L. Oostendorp et al. prováděl studii na 12 pacientech se solidními tumory léčenými p. o. docetaxelem podaným spolu s inhibitorem CYP3A4 a P-gp ritonavirem. Výsledky ukázaly významně zvýšenou F p. o. docetaxelu podaného společně s ritonavirem, přičemž terapie kombinací těchto léčiv byla dobře snášena. Variabilita ve farmakokinetice kombinační terapie byla dvojnásobná oproti i. v. docetaxelu, což by mohl být důsledek

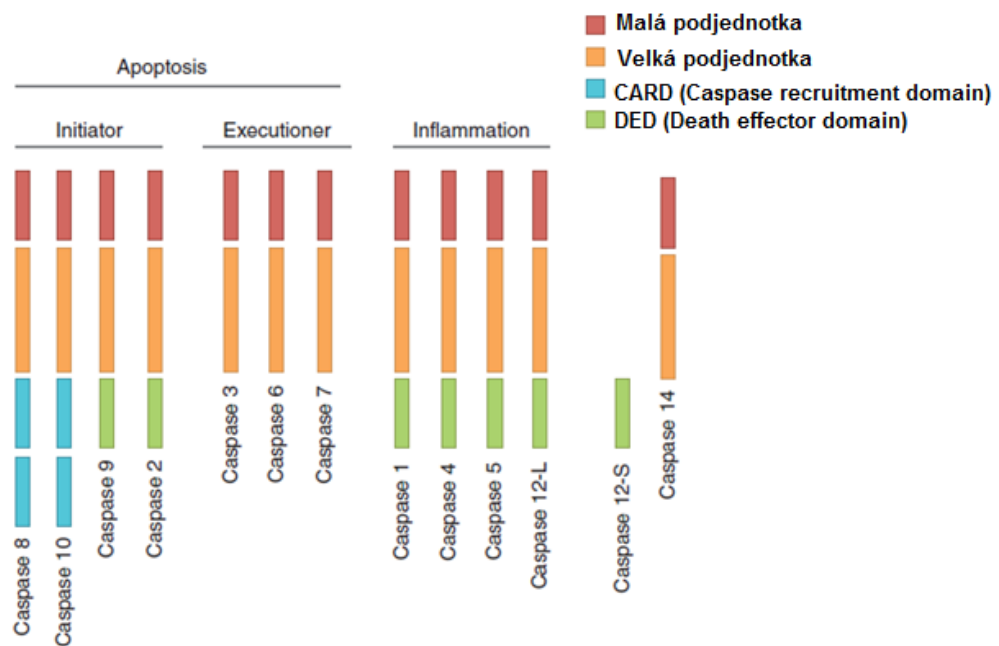
interindividuální variability v expresi CYP3A4 (Oostendorp et al., 2009). Výsledky studie naznačují, že potlačení aktivity CYP pomocí inhibitorů by mohlo být do budoucna vhodným terapeutickým postupem s řešením nedostatečné účinnosti cytostatik, které jsou obětí nádorové rezistence. Znalost individuální míry exprese CYP a jejich vliv na účinek léčiv by mohla přispět ke zvolení vhodné metody a zefektivnění léčby.

3.2. Apoptóza

3.2.1. Fyziologická funkce apoptózy

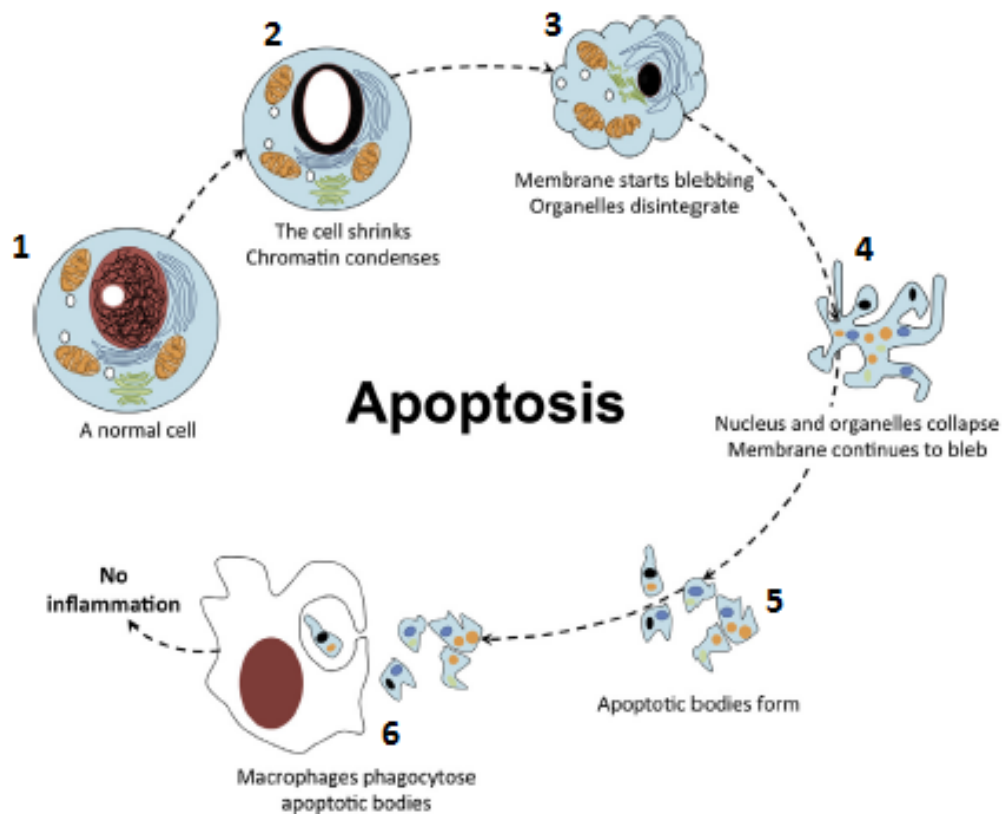
Apoptóza, neboli programovaná buněčná smrt, je přísně regulovaný proces, při kterém dochází k zániku buněk (Watters & Lavin, 2003). Je to fyziologický děj určený k zachování homeostázy vnitřního prostředí organismu, který se tak zbavuje poškozených nebo nadbytečných buněk (Dillon & Green, 2016).

Apoptóza může být iniciována z vnějšího nebo vnitřního prostředí buňky pomocí signálů, které spouštějí signalizační kaskádu vedoucí k započetí apoptotického procesu zprostředkovaného kaspázami. Tyto endoproteázy po své aktivaci specificky štěpí peptidové vazby aspartátových reziduí, čímž následně aktivují/inaktivují své substráty, které se účastní kontrolovaného zániku buňky. Podle funkce lze kaspázy účastnící se apoptózy rozdělit do dvou základních skupin. Iniciační kaspázy se aktivují dimerizací a následně štěpí efektorové kaspázy, které se v inaktivním stavu nachází ve formě dimeru. Toto štěpení umožňuje efektorovým kaspázám konformační změnu, která vede k jejich aktivaci. Aktivované efektorové kaspázy mohou aktivovat další efektorové kaspázy nebo jiné substráty (McIlwain et al., 2013). Aby mohly jednotlivé kaspázy interagovat s cílovými molekulami, obsahují specifické domény, které jim umožňují vytvářet komplexy s adaptorovými molekulami usnadňujícími vazbu s cílovými strukturami. Na následujícím obrázku jsou znázorněny jednotlivé skupiny kaspáz skládajících se z jednotlivých domén (obr. 10). Kromě kaspáz účastnících se apoptózy jsou zde vyobrazeny také zánětlivé kaspázy, které aktivují prozánětlivé cytokiny a iniciují tak imunitní děje probíhající v zánětu (McIlwain et al., 2013).



Obr. 10: Doménová struktura lidských kaspáz (převzato z: McIlwain et al. 2013)

Apoptóza se skládá z několika kroků probíhajících zároveň nebo bezprostředně po sobě. Nejprve dochází ke kondenzaci chromatinu, následuje fragmentace jaderného obalu a hydrolýza DNA. Fosfatidylserin, který je za normálních okolností lokalizován na cytozolické straně lipidové dvojvrstvy cytoplazmatické membrány, je translokován na vnější povrch buňky, a dává tak signál buňkám imunitního systému k fagocytóze. Plazmatická membrána vytváří váčkovité výrůstky, celá buňka se smršťuje a orgány se rozpadají. V konečné fázi dochází k rozpadu buněčného obsahu na tzv. apoptotická tělíčka, která jsou fagocytována makrofágy bez poškození okolního prostředí buňky. Díky tomu, že nedochází k uvolnění buněčného obsahu do okolí buňky, jako je tomu u nekrózy, celý děj probíhá bez spuštění zánětlivého procesu, a tím pádem i bez narušení vnějšího prostředí (Abou-Ghali & Stiban, 2015). Jednotlivé fáze apoptózy jsou názorně popsány na zjednodušeném obrázkovém schématu (obr. 11).



Obr. 11: Schéma apoptózy v několika krocích: 1. normální buňka, 2. počátek smršťování buňky a kondenzace chromatinu, 3. „blebbing“ membrány (tvorba váčkovitých výrůstků) a fragmentace organel, 4. počátek tvorby apoptotických tělísek, 5. vznik apoptotických tělísek, 6. fagocytóza apoptotických tělísek makrofágy (převzato z: Abou-Ghali a Stiban 2015).

Fyziologická apoptóza je jako přirozený děj probíhající v organismu již od početí nezbytnou součástí procesu kontroly buněčné proliferace během vývoje a stárnutí. Typickým příkladem fyziologické apoptózy je vývoj prstů během embryogeneze nebo proces utváření nervového systému, ve kterém se organismus zbavuje nadbytečných nefunkčně zapojených neuronů (Haanen & Vermes, 1996). Apoptóza však může být spuštěna i patologickým podnětem. Z tohoto hlediska ji chápeme jako obranný mechanismus organismu důležitý pro eliminaci nádorových, infekcí napadených nebo jinak poškozených buněk (Gulbins et al., 2000).

Jakékoliv narušení procesu apoptózy může vyústit v závažné klinické důsledky. Nadměrná apoptóza může způsobit vznik neurodegenerativních onemocnění, zatímco

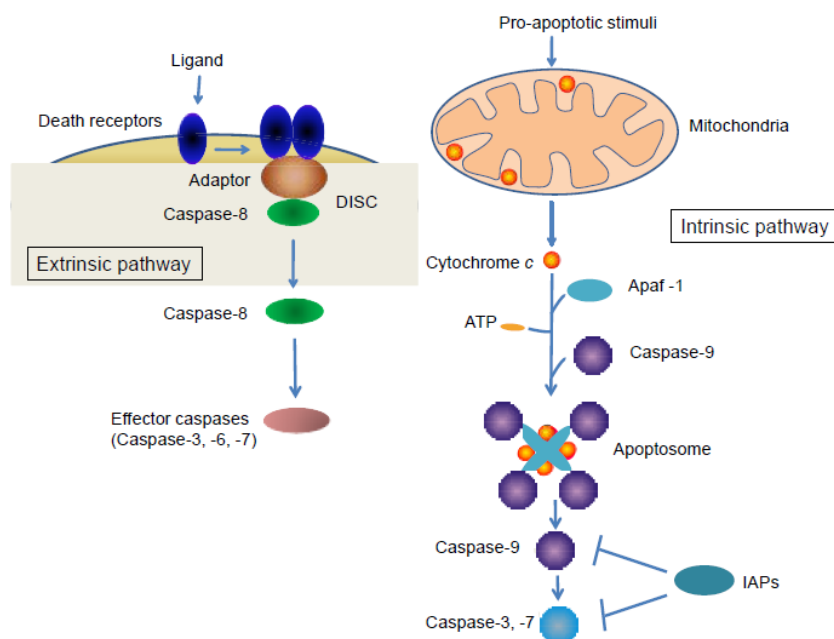
nedostatečná apoptóza může vést k nekontrolovatelné proliferaci buněk a vzniku nádoru (Watters & Lavin, 2003).

3.2.2. Aktivační dráhy apoptózy

Dochází-li k nevratnému poškození buňky, může dojít k nastartování proapoptotické signalizační kaskády zevnitř buňky. V takovém případě se jedná o vnitřní cestu aktivace apoptózy, která je nejčastěji spojována s permeabilizací vnější mitochondriální membrány a následnou aktivací kaspázy 9. Zjednodušeně lze říci, že vnitřní cestu aktivace zahajuje intracelulární signál (např. poškození DNA, působení oxidačního stresu, toxinů apod.), který dá podnět k aktivaci proapoptotických Bcl-2 proteinů. Ty zabudovávají póry do vnější mitochondriální membrány. Díky narušení integrity membrány dochází k uvolnění cytochromu c z mezimembránového prostoru, který se váže na APAF1 (Apoptotic protease activating factor 1) a vytváří se komplex zvaný apoptozóm. Tento komplex váže prokaspázu 9 a zprostředkovává její aktivaci na iniciační kaspázu 9, která pomocí štěpení aktivuje efektorovou kaspázu 3 (Dillon & Green, 2016). Ta následně aktivuje další kaspázy a spouští kaskádu vedoucí ke štěpení důležitých proteinů účastnících se apoptózy (Ghobrial et al., 2005). Vnitřní cesta aktivace apoptózy může být spuštěna jako reakce na různé stresové podněty, jako např. poškození DNA, aktivace onkogenů, nadbytek Ca^{2+} iontů v buňce, nedostatek růstových faktorů, oxidační stres a mnoho dalších. Aktivace apoptózy je také jedním z mechanismů účinku protinádorových léčiv. Jsou to zejména cytostatika zodpovědná za narušení funkce mikrotubulů během mitózy (taxany, vinka alkaloidy) (Baig et al., 2016).

Aktivace apoptózy vnější cestou je iniciována specifickými ligandy, které se vážou na povrchové receptory buněk nazývaných jako receptory smrti. Nejvýznamnějšími zástupci těchto receptorů patřících do nadrodiny TNFR jsou CD95 (Fas receptor), TRAILR1, TRAILR2 a TNFR. Naváže-li se příslušný ligand na receptor smrti (tzn. CD95L/Fas ligand na Fas receptor, TRAIL na TRAILR, TNF na TNFR), zprostředkovává tento receptor tvorbu komplexu DISC (Death-inducing signaling complex) skládajícího se z receptoru smrti, adaptorové molekuly a kaspázy 8, která se následně uvolňuje a aktivuje další kaspázy v kaskádě (Gregory, 2016). Tato cesta aktivace apoptózy se uplatňuje u některých typů imunitních reakcí. Například

cytotoxické T-lymfocyty mají na svém povrchu Fas ligand, kterým se vážou k Fas receptoru nádorových buněk nebo buněk napadených virem, a spouštějí tak jejich apoptózu. Vnější aktivace apoptózy je nezbytná nejen pro boj buněk imunitního systému proti nádorovým nebo infikovaným buňkám, ale i k odstranění autoreaktivních T-lymfocytů, které by mohly napadat tělu vlastní struktury, a proto musejí být během vývoje buněk imunitního systému vyselektovány (Ghobrial et al., 2005). Následující obrázek poskytuje zjednodušené schéma vnitřní a vnější cesty aktivace apoptózy (obr. 12).



Obr. 12: Schéma vnější a vnitřní cesty aktivace apoptózy (převzato z: Li a Sheng 2012).

3.2.3. Role proteinů regulujících apoptózu ve vzniku a vývoji nádorových onemocnění

Příčinou vzniku nekontrolovatelného množení buněk odolných vůči apoptóze je obvykle mutace genu, který se podílí na kontrole buněčného cyklu nebo buněčného dělení. Mezi tyto geny patří tzv. protoonkogeny, které kódují proteiny aktivující proliferaci buněk, např. růstové faktory, transkripční faktory či jiné signální molekuly. Nádorové formy těchto genů zvané onkogeny se vyznačují zvýšenou expresí, popř. konstitutivní aktivací, což vede k zesílení antiapoptotických a proliferačních signálů.

Opačným případem vedoucím k potlačení apoptózy a onkogenezi je inaktivace tumor-supresorových genů, jejichž normální funkcí je potlačování nadměrného dělení buněk (Bouck, 1990).

Příkladem onkogeneze zapříčiněné aktivací protoonkogenů na onkogeny je narušení exprese genů pro Bcl-2 rodinu proteinů. Z hlediska funkce se dělí proteiny Bcl-2 rodiny na proapoptotické, které iniciují proapoptotickou signalizační kaskádu, a antiapoptotické, které deaktivují proapoptotické proteiny. Ve zdravých tkáních jsou tyto dvě skupiny proteinů v rovnováze a udržují zdravý růst a vývoj buněk. Při nadměrné expresi genů pro antiapoptotické Bcl-2 proteiny dochází k narušení této rovnováhy, a dochází tak vlivem potlačení apoptózy k nekontrolovatelné proliferaci buněk. Overexprese onkogenu Bcl-2 je běžná v mnoha typech nádorů a je příčinou nejen onkogeneze, ale i rezistence vůči chemoterapii a radioterapii (Frenzel et al., 2009).

Další relativně častou příčinou vzniku nádorů je mutace protoonkogenu HER-2/neu, který kóduje transmembránový receptor HER2 (Human Epidermal growth factor Receptor) z rodiny receptorů pro epidermální růstový faktor (EGFR). Tento receptor je zodpovědný za kontrolu buněčné proliferace, diferenciaci a přežití buněk (Cwiertka et al., 2005). Jeho abnormální funkce způsobená overexpresí však může vést ke vzniku nádorového bujení. Nadměrná exprese HER2 receptoru byla identifikována ve významném procentu nádorů prsu (10-34 %) ve velkém počtu různých studií zahrnujících více než 15 000 pacientů. Velkým problémem je také vliv tohoto receptoru na vznik rezistence vůči chemoterapii. Několik studií potvrdilo horší prognózu pacientek s amplifikací genu HER2 (Ross & Fletcher, 1998).

Protein p53 je jeden z nejstudovanějších tumor-supresorových proteinů, který slouží jako transkripční faktor genu p21 pro detekci a reparaci poškozené DNA, případně navození apoptózy (Ghobrial et al., 2005). Mutace genu p53 se vyskytuje zhruba u 50 % všech tumorů jako příčina genové nestability a následné onkogeneze (Oijen & Slootweg, 2000). Výsledky jedné studie naznačují, že mutace genu p53 pravděpodobně aktivuje expresi genu MDR1 kódujícího P-gp, což by mohlo mít významný vliv z hlediska nádorové rezistence (Oka et al., 1997).

Dalším významným tumor-supresorovým proteinem účastnícím se oprav poškozené DNA je protein BRCA. Uvádí se, že ženy postižené dědičnou mutací genu pro BRCA1 nebo BRCA2 jsou vystaveny až 85% riziku vzniku prsního karcinomu do

věku 70 let. Nosiči mutací těchto genů jsou ovšem zatíženi také vyšší pravděpodobností rozvoje karcinomu vaječníků, prostaty nebo pankreatu (Tutt & Ashworth, 2002).

Výše popsané mutace genů pro regulační proteiny apoptózy mají významný podíl na vývoj nádorových onemocnění, existuje však celá řada genů, jejichž dysfunkce může způsobit dysregulaci apoptotického procesu. Tabulka uvedená níže popisuje nejznámější a nejlépe popsané tumor-supresorové geny/onkogeny, jejichž mutagenese představuje zvýšené riziko vzniku nádoru určitého typu tkáně (tab. 3).

Tumor Suppressor	Cancer	Oncogene	Cancer
p53	lung, colorectal, bladder, ovarian, head and neck, breast, prostate, gastric	p110 α	breast, prostate, endometrial, colorectal, cervical, head and neck, gastric, lung
PTEN	glioblastoma, melanoma, prostate, breast, endometrial, thyroid, lung, colorectal, AML, CLL	EGFR	lung, glioma, colorectal, ovarian, breast
p16 ^{INK4A}	melanoma, pancreatic, lung, bladder, head and neck, colorectal, breast	ERBB2 (HER)	breast, gastric, ovarian, bladder
p14 ^{ARF}	lung, bladder, head and neck, colorectal, breast	B-RAF	melanoma, thyroid, colorectal, ovarian
BRCA1	breast, ovarian	K-RAS	pancreatic, lung, colorectal, endometrial, ovarian
BRCA2	breast, ovarian	H-RAS	bladder
LKB1	lung, gastrointestinal, pancreatic, cervical, melanoma	N-RAS	melanoma, AML
VHL	kidney, adrenal, hemangioblastoma	MYC	lymphomas, colorectal, breast, prostate, melanoma, neuroblastoma, ovarian
APC	colorectal, gastric	BCR-ABL	CML, ALL, AML
FBXW7	ALL, bile duct, colorectal, gastric, endometrial, lung, pancreatic, prostate, ovarian	IDH1	glioblastoma, AML
Rb	retinoblastoma, lung, bladder, esophageal, osteosarcoma, glioma, liver, CML, prostate, breast	IDH2	glioblastoma, AML
NF1	neurofibroma, neuroblastoma, glioma, colorectal	JAK2	CML, ALL
NF2	meningioma, schwannoma, glioma	KIT	gastrointestinal stromal tumors, AML, melanoma
		MET	kidney, gastric, lung, head and neck, colorectal
		FLT-3	AML

Tab. 3: Přehled onkogenů a tumor-supresorové genů společně s tumory, se kterými jsou nejčastěji spojovány (převzato z: Dutt a Stambolic 2016).

3.2.4. Moderní terapeutické přístupy v protinádorové léčbě zaměřené na modulaci apoptotických drah

Zesílení antiapoptotických, případně zeslabení proapoptotických signálů v buňce jsou jedním z významných faktorů, které mohou vést ke vzniku rakovinného bujení. Proto je znalost jejich mechanismu klíčová a je předmětem mnoha výzkumů

věnujících se vývoji moderních terapeutických strategií protinádorové léčby. Nové přístupy v protinádorové farmakoterapii zahrnující modulaci apoptotických drah uvnitř tumoru jsou do budoucna jednou ze slibných léčebných metod.

Jedním z těchto moderních terapeutických přístupů zaměřených na apoptózu je inhibice antiapoptotických Bcl-2 proteinů. Příkladem léčiva působícího na úrovni inhibice exprese antiapoptotického Bcl-2 proteinu je antisense oligonukleotid oblimersen. (Baig et al., 2016). Jeho mechanismus účinku spočívá ve vazbě na mRNA a následné inhibici translace. V současnosti se oblimersen nachází ve fázi klinického testování (samostatně nebo v kombinační terapii s jinými protinádorovými léčivy) v terapii různých typů tumorů (chronická lymfatická leukemie, non-Hodgkinův lymfom, karcinom plic, prostaty atd.) (Baig et al., 2016). Do skupiny inhibitorů antiapoptotického Bcl-2 patří také již FDA schválený venetoclax. Toto léčivo napodobuje funkci BH3-only proteinů, ligandů Bcl-2, potlačujících jejich antiapoptotickou aktivitu (Anderson et al., 2016).

Další nadějná terapeutická strategie se zaměřuje na modulaci tumor-supresorových genů. Do této skupiny spadá celá řada klinicky testovaných léčiv inhibujících enzym histondeacetylázu, která deacetyluje histony, a tím inaktivuje důležité tumor-supresorové geny (například BRCA1, p53). Jejich inhibice vede k hyperacetylaci těchto genů, a tím k antiproliferativnímu efektu v nádorových buňkách. Zástupci této skupiny léčiv, vorinostat a romidepsin, byly schváleny FDA k léčbě kožního T-lymfomu a mnoho dalších je ve fázi klinického testování (Baig et al., 2016).

Nejen vnitřní aktivace buněčné smrti, ale také vnější aktivační apoptotická dráha přes receptor smrti má důležitou roli v protinádorové terapii. V této oblasti zkoumání se osvědčily zejména TRAIL receptory, jejichž zvýšená exprese v některých typech nádorů by mohla být užitečná pro indukci apoptózy nádorových buněk. Zde se uplatňují zejména monoklonální protilátky sloužící jako agonisté TRAIL receptorů dávající buňce extracelulární signál k apoptóze. Navzdory tomu je však bohužel poměrně častý výskyt nádorových buněk rezistentních vůči TRAIL indukované apoptóze, což limituje úspěšnost TRAIL cílené terapie (Baig et al., 2016).

Receptory HER2 podporující proliferaci buněk jsou jedním z biomarkerů pro detekci prsního karcinomu a některých typů karcinomu žaludku. U pacientů

s overexpresí tohoto významného protoonkogenu je často indikována léčba IgG monoklonální protilátkou trastuzumabem, zejména v kombinační terapii společně s dalšími chemoterapeutiky. Jako antagonist HER2 receptoru toto léčivo způsobuje potlačení aktivačního mechanismu vedoucího k proliferaci buněk (Baselga et al., 2001).

Klíčem k zachování zdravého růstu a vývoje organismu je schopnost odstraňovat poškozené a stářím opotřebované buňky, které samy v reakci na vnější nebo vnitřní signál zprostředkují sebedestrukci bez narušení jejich okolního prostoru. Na tomto principu a dále také díky znalosti faktu, že nádorová onemocnění vznikají často kvůli narušení tohoto homeostatického mechanismu, je postavena základní myšlenka pro navrhování protinádorových léčiv podporujících apoptózu. Velký prostor pro navrhování moderních terapeutických strategií dává značné množství genů a proteinů účastnících se pro a antiapoptotických buněčných mechanismů. Výše zmíněné terapeutické metody a přístupy jsou jen pouhým příkladem toho, jakým směrem se nové terapeutické přístupy ubírají. Je třeba zmínit, že do těchto nových léčebných strategií se řadí také genová terapie, která je založena na schopnosti vnášet genetickou informaci nebo opravovat poškozenou DNA přímo v buňkách za účelem léčby (Altaner, 1995). Přestože výzkum protinádorové terapie v průběhu posledních let významně pokročil, naráží na spoustu překážek vyplývajících z podstaty vzniku a vývoje nádorů, které jsou v drtivé většině multigenní. Existují zde značné interindividuální rozdíly a především se neustále překotně a neočekávatelně mění. Z toho důvodu je protinádorová terapie jednou z nejproblematictějších odvětví medicíny.

4. Cíle práce

Cílem této diplomové práce je zhodnocení možné role enzymu CYP3A4 v rezistenci vůči docetaxelu na úrovni apoptózy. Pro tento účel byla využita dvojice linií HepG2-EV a HepG2-3A4 a luminiscenční kity pro stanovení kaspáz 3/7, 8 a 9.

5. Experimentální část

5.1. Materiály a metody

5.1.1. Chemikálie

- Caspase-Glo® 3/7 Assay System, Promega Corporation (Fitchburg, Massachusetts, USA)
- Caspase-Glo® 8 Assay Systems, Promega Corporation (Fitchburg, Massachusetts, USA)
- Caspase-Glo® 9 Assay Systems, Promega Corporation (Fitchburg, Massachusetts, USA)
- Dimethylsulfoxid (DMSO), Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
- Docetaxel, Selleckchem (Houston, TX, USA)
- Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)
- Fetální bovinní serum (FBS), PAA Laboratories (Pasching, Rakousko)
- Fosfátový pufr (PBS), Lonza (Walkersville MD, USA)
- Cell Lysis Buffer 1067-400, BioVision (Milpitas, California, USA)
- Pierce™ Protein Assay Kit, ThermoFisher Scientific (Rockford, Illinois, USA)
- Trypsin, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)

5.1.2. Přístroje

- Inkubátor, SANYO MCO-18AC(UV), (Honmachi, Moriguchi City, Osaka)
- Laminární box Jouan (Saint-Herblain, Francie)
- Optický mikroskop, Optika XDS-2 (PonteraniCA, BG, Itálie)
- Tecan microplate reader, Infinite M200 (Salzburg, Rakousko)
- Tecan microplate reader, Infinite M200 Nanoquant (Salzburg, Rakousko)

5.1.3. Buněčné linie

K našemu výzkumu jsme využili nádorové buněčné linie HepG2 odvozené od hepatocelulárního karcinomu. Tyto buňky mají tu výhodu, že jsou snadno dostupné, je možné je dlouhodobě pasážovat a představují vhodný zjednodušený model nádorové tkáně. Pro naše účely jsme využili dva subtypy HepG2 buněčných linií: parentní linii transdukovanou prázdňým vektorem (HepG2-EV) a dále linii transdukovanou lidským CYP3A4 (HepG2-3A4), která vykazuje stabilní funkční expresi enzymu CYP3A4 (Xuan et al., 2016). Číslo pasáže buněk během pokusů se pohybovalo v rozmezí od 5 do 25 a každá pasáž probíhala ve třídenním nebo čtyřdenním intervalu. Vhodné prostředí s potřebnými živinami zajišťovalo médium DMEM obsahující 10 % FBS, ve kterém byly buňky kultivovány. Toto médium obsahuje důležité látky esenciální pro růst buněk, jako jsou minerály, vitamíny, aminokyseliny, glukóza, růstové faktory apod. Pro kultivaci buněk bylo nutné dodržovat vhodné a stálé podmínky, tzn. 37 °C, 5 % CO₂ a konstantní vlhkost. Toho jsme dosáhli uchováváním buněk v inkubátoru. Buňky byly pravidelně testovány na přítomnost mykoplazmatické infekce.

5.1.4. Vystavení buněčných linií testovaným látkám a sběr vzorků

Buňky se v počtu 80 000/jamka/0,1 ml média nasadí na transparentní 96-jamkové destičky a nechají se inkubovat po dobu 24 hodin. Po uplynutí této doby se z jamek odsaje médium a do každé jamky se přidá 100 µl roztoku docetaxelu o příslušné koncentraci v růstovém médiu. Každá koncentrace se testuje v triplicátu. Pro kontrolu 100% životaschopnosti buněk je potřeba nechat tři jamky pouze s médiem bez obsahu docetaxelu. Po přidání látek necháme buňky inkubovat v inkubátoru, a to ve třech časových intervalech (6, 24 a 48 h). Po uplynutí každého intervalu se z jamek příslušné destičky odsaje médium s látkami, do každé jamky se přidá 75 µl lyzačního pufru a buňky se nechají po dobu 15 minut lyzovat na ledu. Poté je na ledové desce kvantitativně odebrán (před odběrem se lyzát 5x propipetuje) obsah všech jamek, přičemž vzorky příslušných triplicátů jsou smíseny dohromady. Vzorky se ihned zmrazí při -80°C.

5.1.5. Stanovení aktivity kaspáz 3/7, 8 a 9

K tomu, abychom určili míru schopnosti buněk reagovat na účinky docetaxelu programovanou buněčnou smrtí, jsme využili metodiku stanovení aktivity kaspáz. Kaspázy jsou proteázy hrající stěžejní roli při regulaci apoptózy buněk prostřednictvím štěpení substrátů, které se účastní programované buněčné smrti. Pro stanovení aktivity kaspáz 3/7, 8 a 9 jsme využili komerčních kitů s luminometrickou detekcí. Tyto kity využívají bioluminiscenční reakce probíhající původně v živých organizmech schopných emitovat světlo, např. světluškách. Stručně řečeno, během tohoto děje dochází k chemické reakci mezi pigmentem luciferinem a enzymem luciferázou, která katalyzuje jeho oxidaci. Oxidovaný luciferin se dostává do excitovaného stavu a při přechodu do základního energetického stavu emituje záření (McCapra, 1976). Abychom mohli změřit luminiscenci, je potřeba toto záření vyvolat. K tomu jsme použili luminiscenční kit s obsahem enzymu luciferázy a jejího prosubstrátu obsahujícího peptidovou sekvenci. Tato sekvence je specificky rozpoznána a štěpena určitým typem kaspázy. Uvolní se samotný aminoluciferin, který reaguje s luciferázou za vzniku měřitelného světla. Intenzita emitovaného záření vyjádřená v RLU (relativní světelné jednotky) je přímo úměrná aktivitě kaspáz (Geiger & Miska, 1991).

Poté, co byly provedeny všechny buněčné pokusy a odebrány vzorky, jsme provedli stanovení apoptotické aktivity buněk. Zmražené vzorky se nechají rozmrazit na ledu. Aby byly vzorky homogenní, zvortexují se a stočí se na centrifuze. Následně se odebere potřebné množství příslušných detekčních reagentů (pro kaspázu 3/7, 8 a 9). Do reagentů pro kaspázu 8 a 9 se přidává inhibitor MG-132, který pomáhá snížit background a zvyšuje reproduibilitu měření. Reagenty se uloží na temné místo a pokračuje se pipetováním vzorků do bílé 384-jamkové destičky (12,5 μ l/jamka). Po aplikaci všech vzorků na destičku se ihned přidají reagenty pro detekci kaspázové aktivity. Destička se nechá inkubovat na temném místě po dobu 1 h a poté se změří luminiscence na Tecanu.

5.1.6. Stanovení celkového obsahu proteinů

Abychom minimalizovali nepřesnost danou nerovnoměrností růstu buněk a výkyvy v buněčné odpovědi na docetaxel, získaná luminiscenční data (RLU) musí být

normalizována na obsah proteinů. Pro měření obsahu proteinů jsme použili BCA analytickou metodu pojmenovanou podle obsaženého reagentu, kterým je sodná sůl kyseliny bicinchoninové. Metoda je založena na dvou po sobě následujících reakcích. V první reakci dochází k redukci měďnatých iontů, obsažených v pracovním roztoku, na ionty mědné. Jako redukční činidlo zde působí peptidové vazby proteinů zkoumaných vzorků, přičemž množství redukovaného Cu^{2+} je přímo úměrné množství proteinu v přítomném vzorku. V druhé reakci vytváří kyselina bicinchoninová s mědnými ionty chelátové vazby a vzniká tak fialový komplex, jehož intenzita zbarvení odpovídá množství proteinů ve vzorku (Walker, 2009). Poté už zbývá jen změřit na spektrofotometru absorbanci, která je přímo úměrná koncentraci proteinů ve vzorku. Pro vypočítání obsahu proteinu v mg/ml slouží hodnoty absorbance jednotlivých vzorků dosazené do rovnice lineární regrese sestavené z koncentrační řady roztoků standardů o známé koncentraci. Stanovení obsahu proteinů probíhalo za využití kitu Pierce BCA Protein Assay Kit.

Do transparentní 96-jamkové destičky se do jamek v triplicátu napipetuje 10 μl lyzačního pufru, roztoků standardů a vzorků. Poté se připraví potřebné množství pracovního roztoku BCA smícháním roztoku A a B v poměru 50:1. Do každé jamky se aplikuje 100 μl roztoku BCA a po 30 min inkubace v inkubátoru se změří absorbance na Tecanu při 562 nm. Za použití hodnot standardů byly vypočteny hodnoty obsahu proteinů ve vzorcích. Získaná data byla použita pro normalizaci aktivitních luminiscenčních dat.

5.1.7. Statistická analýza

Statistická analýza byla provedena pomocí programu GraphPad Prism verze 7.03 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). V prvním kroku byly hodnoty p vypočítány pomocí analýzy one-way ANOVA následovanou Dunnettovým post-testem (vzorky vystavené docetaxelu ve srovnání s neovlivněnou kontrolou v rámci jedné linie). V dalším kroku byly hodnoty získané po vystavení buněk docetaxelu srovnávány v rámci dvou linií mezi sebou za využití nepárového t -testu s Welschovou korekcí.

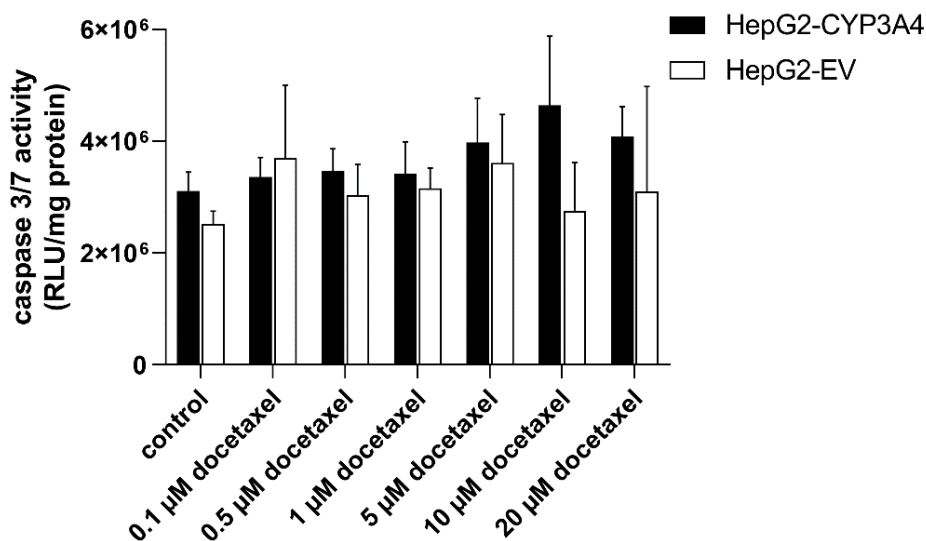
5.2. Výsledky

V této práci jsme se rozhodli potvrdit/vyvrátit roli enzymu CYP3A4 v rezistenci vůči docetaxelu. Experimentální práce volně navazuje na diplomovou práci Mgr. Adély Janouškové, jež se za pomoci MTT metody zaměřila na zhodnocení tohoto jevu na proliferační úrovni. V naší práci jsme se zaměřili na úroveň apoptózy. Aktivace apoptózy je obecně rychlejší proces než zástava proliferace, a proto jsme se zaměřili též na kratší časové intervaly.

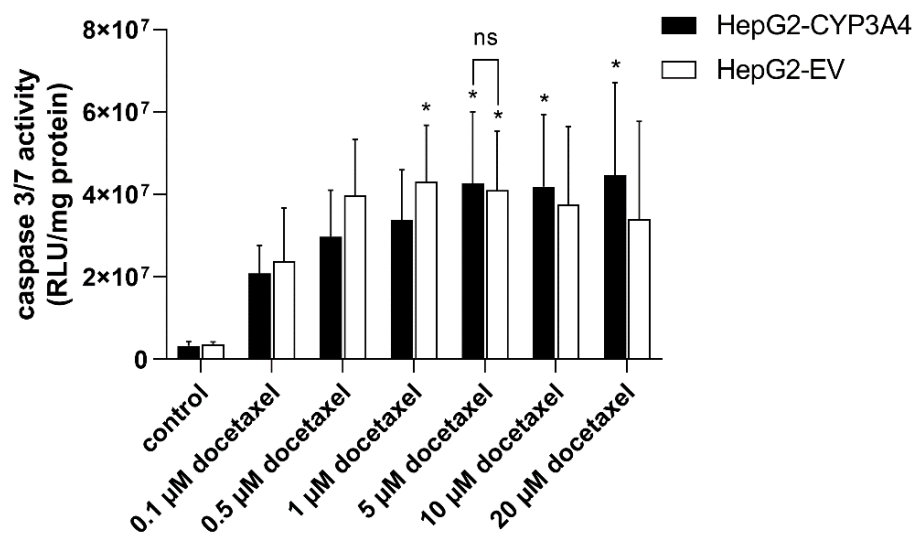
5.2.1. Změny aktivity kaspáz 3/7 vyvolané docetaxelem v liniích HepG2-CYP3A4 a HepG2-EV

Na obrázku č. 13 můžeme pozorovat závislost aktivity kaspáz 3/7 na zvyšující se koncentraci docetaxelu v čase. Po 6 h nebyla pozorována žádná signifikantní aktivace těchto exekutivních kaspáz (obr. 13A). V intervalu 24 h již bylo zaznamenáno statisticky významné zvýšení aktivity kaspáz 3/7 po vystavení buněk docetaxelu, avšak pouze v některých koncentracích, přičemž ve variantě, kde došlo k aktivaci kaspáz u obou linií (5 μM docetaxel), se hodnoty mezi sebou statisticky významně nelišily (obr. 13B). Po 48 h je aktivace kaspáz patrná téměř u všech testovaných koncentrací, je zřejmý též trend intenzivnější aktivace u parentní linie HepG2-EV ve srovnání s linií overexprimující CYP3A4, nicméně statisticky významný rozdíl byl prokázán pouze u 1 μM docetaxelu (obr. 13C).

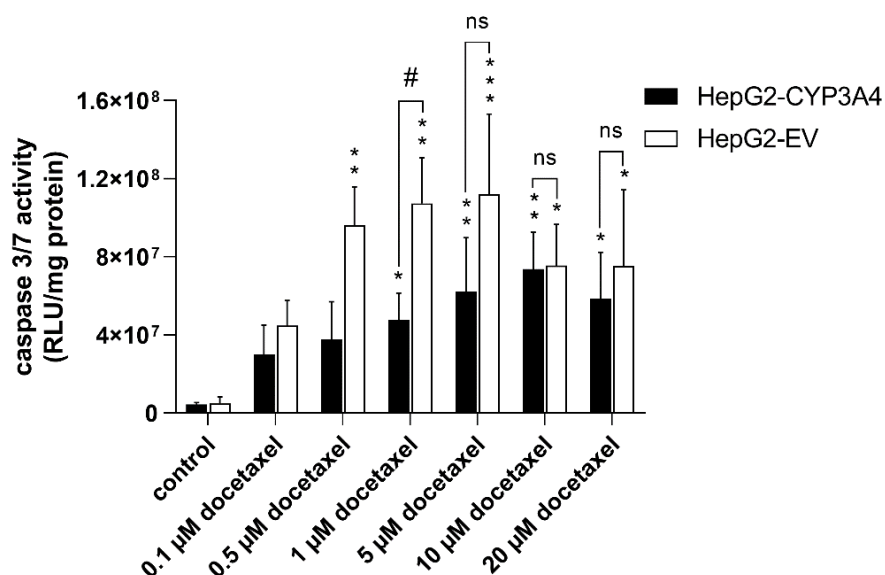
A)



B)



C)

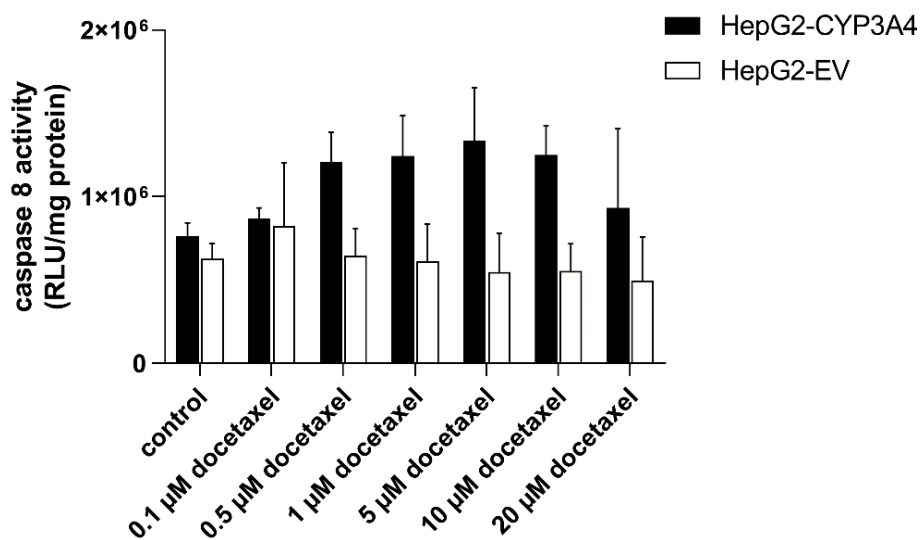


Obr. 13: Vliv docetaxelu na aktivitu kaspáz 3/7 u linií HepG2-CYP3A4 a HepG2-EV linií po 6 h (A), 24 h (B) a 48 h (C) inkubace. Buňky byly vystaveny docetaxelu po určenou dobu, inkubace byla zastavena přidáním lyzačního pufru a následně byla stanovena aktivita kaspáz v lyzátu pomocí komerčního kitu. Získané hodnoty luminiscence byly normalizovány na obsah proteinů. Prezentované výsledky jsou průměrem ± SD ze tří nezávislých měření.

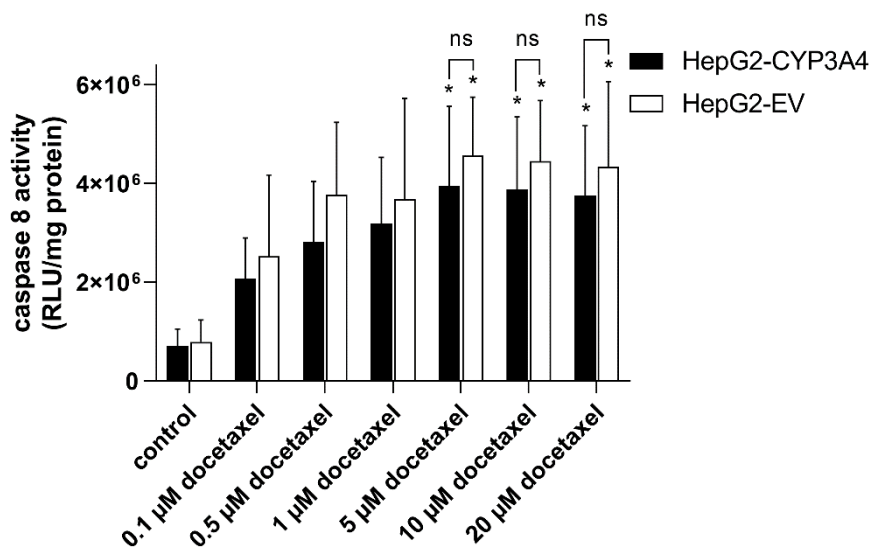
5.2.2. Změny aktivity kaspázy 8 vyvolané docetaxelem v liniích HepG2-CYP3A4 a HepG2-EV

Výsledky pro kaspázu 8 byly velmi podobné výsledkům dosaženým pro kaspázu 3/7. Ani v tomto případě nebyla pozorována aktivace apoptózy po 6 h (obr. 14A), první takový efekt nastal až po 24 h (5, 10 a 20 μM docetaxel), nicméně hodnoty pro jednotlivé linie se mezi sebou opět nelišily (obr. 14B). Po 48 h došlo k prohloubení aktivace kaspázy 8, přičemž statisticky významnější aktivace byla dosažena u linie HepG2-EV ve srovnání s linií HepG2-CYP3A4 u koncentrací docetaxelu 0,5 a 1 μM (obr. 14C).

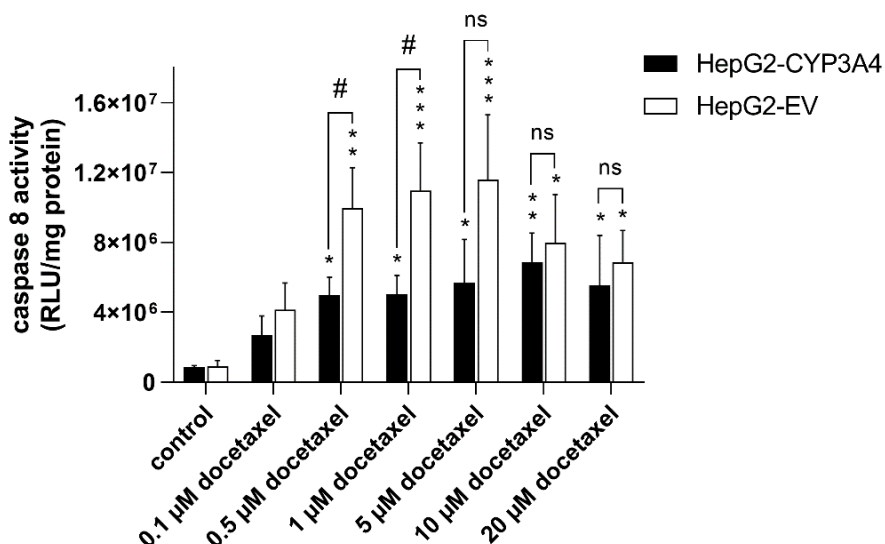
A)



B)



C)

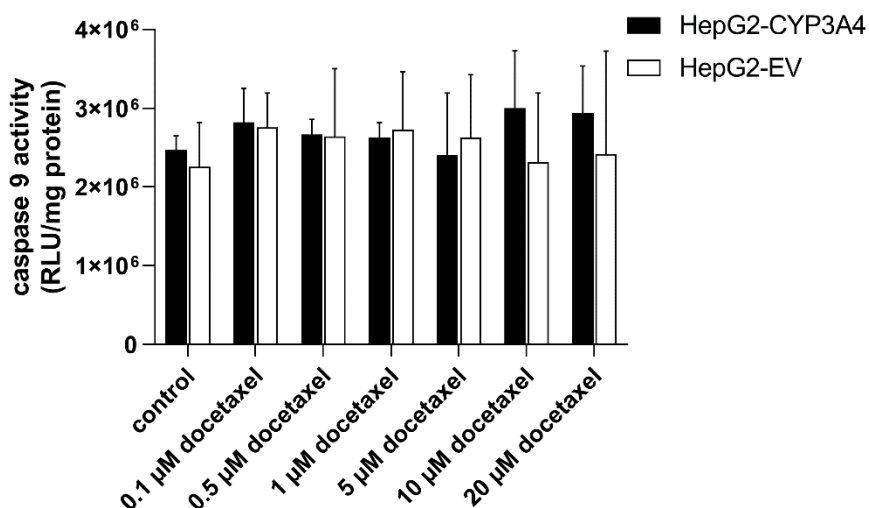


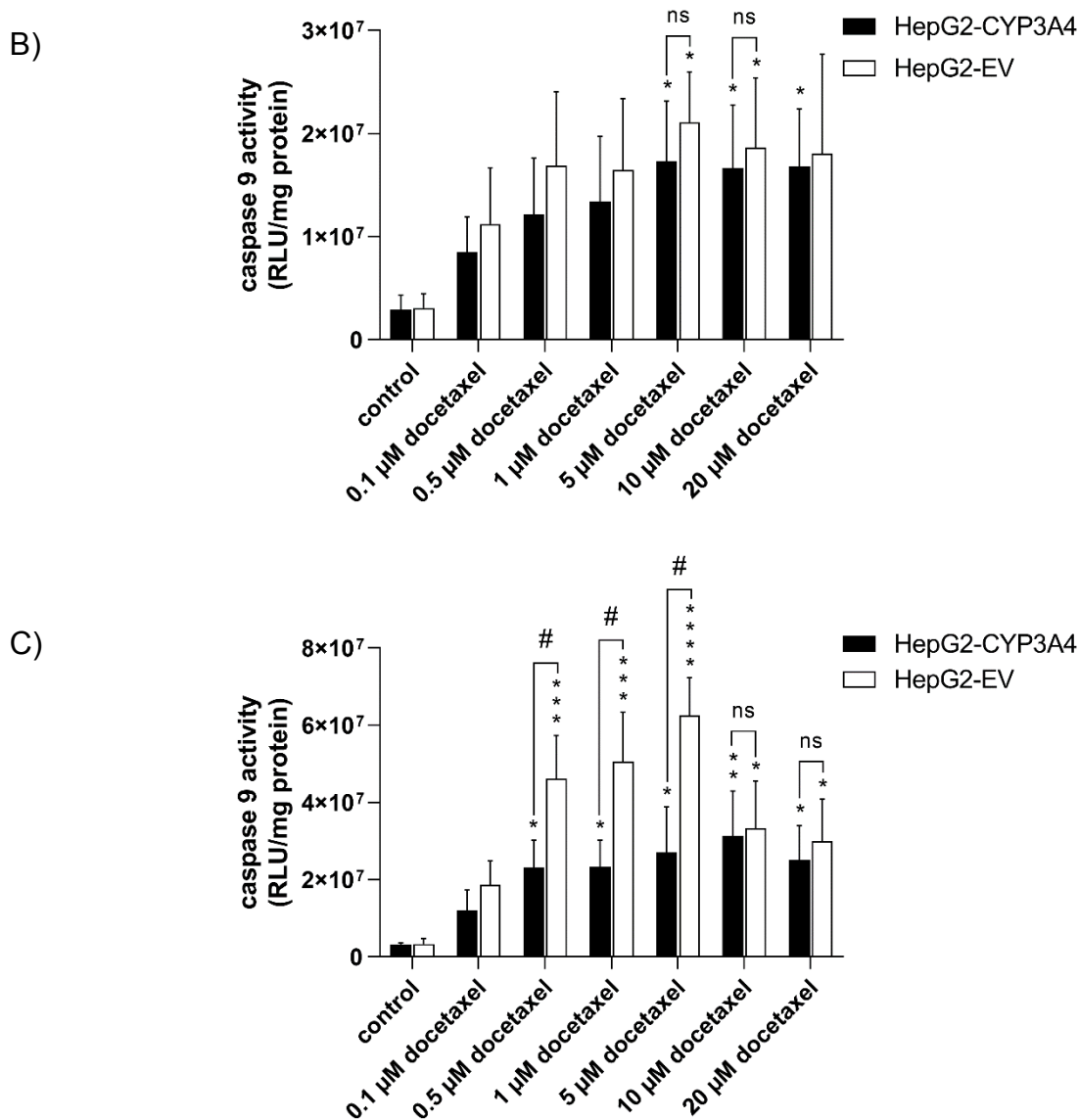
Obr. 14: Vliv docetaxelu na aktivitu kaspázy 8 u linií HepG2-CYP3A4 a HepG2-EV linií po 6 h (A), 24 h (B) a 48 h (C) inkubace. Buňky byly vystaveny docetaxelu po určenou dobu, inkubace byla zastavena přidáním lyzačního pufru a následně byla stanovena aktivita kaspáz v lyzátu pomocí komerčního kitu. Získané hodnoty luminiscence byly normalizovány na obsah proteinů. Prezentované výsledky jsou průměrem ± SD ze tří nezávislých měření.

5.2.3. Změny aktivity kaspázy 9 vyvolané docetaxelem v liniích HepG2-CYP3A4 a HepG2-EV

Trend výsledků u kaspázy 9 je až na drobné nuance shodný s trendem pozorovaným u kaspáz 3/7 a 8 (obr. 15). V tomto případě je rozdíl v hodnotách mezi liniemi po 48 h pozorovaný dokonce při třech koncentracích docetaxelu (0,5, 1 a 5 μM) (obr. 15C).

A)





Obr. 15: Vliv docetaxelu na aktivitu kaspázy 9 u linií HepG2-CYP3A4 a HepG2-EV linií po 6 h (A), 24 h (B) a 48 h (C) inkubace. Buňky byly vystaveny docetaxelu po určenou dobu, inkubace byla zastavena přidáním lyzačního pufru a následně byla stanovena aktivita kaspáz v lyzátu pomocí komerčního kitu. Získané hodnoty luminiscence byly normalizovány na obsah proteinů. Prezentované výsledky jsou průměrem \pm SD ze tří nezávislých měření.

5.3. Diskuze

Dosud bylo provedeno několik studií zabývajících se vlivem exprese CYP3A4 v nádorové tkáni na účinek léčiv. Jednu z nich prováděl Miyoshi et al. pomocí odběru prsní nádorové tkáně. Studie se zabývala vlivem CYP3A4 mRNA exprese v prsní nádorové tkáni na léčbu docetaxelem. Na základě biopsie karcinomu prsu u 38 pacientek byla qRT-PCR metodou stanovena exprese mRNA tohoto enzymu v nádorové tkáni. Poté pacientky podstoupily chemoterapii (23 pacientek bylo léčeno docetaxelem a 15 pacientek podstoupilo léčbu kombinací cyklofosfamidu s epirubicinem). Pacientky s nízkou úrovní mRNA exprese *CYP3A4* vykazovaly mnohem vyšší odpověď (míra odezvy 71 %) na léčbu docetaxelem, než pacientky s nízkou expresí genu pro *CYP3A4* (míra odezvy 11 %). U pacientek léčených kombinací cyklofosfamidu s epirubicinem nebyl vyzorován signifikantní vztah mezi *CYP3A4* expresí a odpovědí na léčbu. Závěr studie naznačuje, že stanovení intratumorální *CYP3A4* mRNA exprese může být užitečné jako ukazatel účinnosti terapie docetaxelem (Miyoshi et al., 2002).

Další studie věnující se vlivu CYP3A4 exprese v nádorové tkáni byla provedena na stejné univerzitě v Japonsku. Pokusů se účastnilo 31 pacientek s rakovinou prsu, exprese CYP3A4 byla tentokrát stanovena imunohistochemicky. Výzkum opět potvrdil, že pacientky s nižší hladinou CYP3A4 lépe reagovaly na léčbu (míra odezvy 67 %) než pacientky s vyšší hladinou CYP3A4 v nádorové tkáni (míra odezvy 16 %) (Miyoshi et al., 2005).

Podobný výzkum prováděl K. Sakurai et al. na 42 pacientkách s recidivujícím karcinomem prsu nebo metastázemi léčenými docetaxelem. Pomocí imunohistochemie byla stanovena míra exprese genu pro CYP3A4. Výsledek byl obdobný jako u předchozích studií, tzn. u pacientek s nádory s nižší mírou exprese CYP3A4 byla pozorována dokonce více než dvojnásobně vyšší míra odezvy na léčbu než u pacientek s vyšší expresí CYP3A4. Znalost míry exprese CYP3A4 v nádorové tkáni u pacientek s rekurencí již z předchozí léčby by tedy mohla být prospěšná při posouzení účinnosti terapie ještě před jejím zahájením (Sakurai et al., 2011).

Na univerzitě v Pittsburghu byly zkoumány lidské ovariální tumory z hlediska vztahu genové exprese cytochromů CYP3A4/5, CYP2C8 a terapie

docetaxelem/paklitaxelem. Pomocí qRT-PCR metody byla u 48 vzorků ovarálních tumorů stanovena exprese *CYP3A5*, *CYP2C8*, *CYP3A4* a *ABCB1*. *ABCB1* gen, který kóduje P-gp efluxní transportér, byl exprimován u všech vzorků ovarálních tumorů. *CYP3A5* a *CYP2C8* byly nalezeny u 89 % a 69 % tumorů. *CYP3A4* byl exprimován pouze u 8 % vzorků. Následující experimenty byly prováděny na buňkách získaných ze sedmi různých ovarálních tumorů kultivovaných *ex vivo* a exponovaných účinkům docetaxelu nebo paklitaxelu. Výsledky této analýzy ukázaly, že docetaxel kultivovaný s ovarálními nádorovými buňkami exprimujícími vyšší hladiny *CYP3A5* podléhal biodegradaci ve vyšší míře než u nádorů s nižší expresí *CYP3A5*. Mezi paklitaxelem a *CYP2C8* expresí podobná souvislost prokázána nebyla. Studie potvrdila také signifikantní vliv aktivity ABC efluxního transportéru na rakovinnou rezistenci. (DeLoia et al., 2008).

Další důkazy o tom, že docetaxel je významně metabolizován *CYP3A4* přímo v nádorové tkáni a může zde hrát roli v rezistenci, přinášejí studie zabývající se vlivem silných inhibitorů *CYP3A4* na protinádorovou efektivitu docetaxelu. Touto oblastí se mimo jiné zabývala i Mgr. Adéla Janoušková v druhé části své diplomové práce, ve které se snažila potlačit aktivitu *CYP3A4* silným inhibitorem ketokonazolem a následně stanovovala viabilitu buněk vystavených docetaxelu. U buněčných linií overexprimujících enzym *CYP3A4* byla po přidání ketokonazolu pozorována zvýšená citlivost vůči docetaxelu, přičemž u linie parentní tento trend přítomen nebyl (Janoušková, 2019).

Podobné jsou i závěry studií, které využily pro inhibici *CYP3A4* inhibitor HIV-proteázy ritonavir. První z nich se věnovala testování nádorových buněk prostaty kultivovaných *in vitro* a následně exponovaných účinku docetaxelu samostatně nebo v kombinaci s ritonavirem. Ukázalo se, že ritonavir zvýšil antiproliferativní efekt a proapoptotickou aktivitu docetaxelu u buněk vystavených kombinací obou léčiv v porovnání s buňkami kultivovanými se samotným docetaxelem. Navíc díky výsledkům získaným qRT-PCR metodou vyšlo najevo, že docetaxel indukoval expresi *CYP3A4*, avšak ritonavir tuto indukci kompletně potlačil (Ikezoe et al., 2004).

Druhá studie testovala účinky ritonaviru a docetaxelu na myších modelech s implantovanými prsními tumory. Těmto myším byl po dobu více než tří týdnů intravenózně podáván docetaxel, a to opět samostatně nebo v kombinaci s p. o. podávaným ritonavirem. Střední doba přežití u myší léčených samotným docetaxelem

byla 54 dní, zatímco u myši léčených docetaxelem společně s ritonavirem byla střední doba přežití prodloužena na 66 dní a průměrná velikost nádoru se podstatně zmenšila (Hendriks et al., 2016).

Výsledky kombinačních studií naznačují, že aktivita docetaxelu uvnitř nádorové tkáně je snížena v důsledku metabolismu zprostředkovaného enzymem CYP3A4. Pokud je ale tento metabolismus inhibován silným inhibitorem CYP3A4, účinek docetaxelu se významně zvyšuje.

Ačkoliv již řada studií prokázala možnou roli CYP3A4 v rezistenci vůči docetaxelu, prakticky všechny jsou zatíženy interferenčními elementy (interindividuální variabilita týkající se dalších možných mechanismů, které mohou ovlivnit odpověď na docetaxel, jako např. exprese lékových transportérů aj.). Proto jsme v naší studii využili dvojici linií, která se liší pouze v expresi CYP3A4, a tento rušící element tak eliminuje. Výsledky získané v našich experimentech velmi dobře korelují s předchozími daty získanými od Mgr. Adély Janouškové i s daty prezentovanými v dostupné literatuře. Kolegyně Janoušková se zabývala měřením proliferační kapacity HepG2-EV a HepG2-CYP3A4 buněk inkubovaných společně s různými koncentracemi docetaxelu v časových intervalech 24, 48 a 72 h. Rozdíly v životaschopnosti mezi oběma liniemi (vyšší citlivost parentní linie) byly patrné zejména při 0,5 a 1 μM koncentraci docetaxelu po 48 h, tedy za naprosto identických podmínek jako v našem případě. Ačkoliv je aktivace kaspáz ve většině případů rychlejší jev než měřitelné vyvolání zástavy proliferace, naše data pro dané podmínky toto nepotvrzují. Získané výsledky potvrzují roli CYP3A4 v rezistenci vůči docetaxelu a naznačují, že dějem, který stál za zástavou proliferace pozorované v práci Mgr. Janouškové, byla indukce apoptózy. Otázkou zůstává, proč se role enzymu CYP3A4 projevuje jen v omezeném rozsahu koncentrací. Odpověď na tuto otázku je zcela jistě složitá a komplexní a vyžadovala by podrobnější zkoumání. Důležitou skutečností nicméně je, že CYP3A4 indukuje rezistenci k docetaxelu za klinicky relevantních koncentrací ($C_{\text{max}} = 4,6 \mu\text{M}$) a lze tak očekávat, že tento fenomén může nastat i u pacientů (Bruno et al., 1998).

6. Závěr

Docetaxel je léčivo široce používané v protinádorové chemoterapii. Nejčastěji se používá samostatně nebo v kombinaci s dalšími chemoterapeutiky při léčbě karcinomu prsu, prostaty, plic, adenokarcinomu žaludku a také karcinomu hlavy a krku. Jeho nízká F po perorálním podání je však do značné míry zapříčiněna rychlým metabolismem a aktivitou efluxních transportérů ve střevech a játrech. Proto se pro zvýšení dostupnosti podává intravenózně infuzí, ačkoliv jaterní metabolismus snižuje účinek a délku působení i po tomto způsobu podání. Mimo tento systémový efekt bylo popsáno, že nejen jaterní metabolismus, ale i deaktivace docetaxelu přímo v nádorové tkáni by mohla přispívat k jeho snížené účinnosti.

V předchozích studiích zabývajících se účinností léčby docetaxelem byla zjištěna značná interindividuální variabilita z hlediska odpovědi na léčbu docetaxelem. Důvodem této proměnlivosti v účinku docetaxelu byla rozdílná exprese genu pro enzym CYP3A4 v nádorové tkáni pacientů. Pacienti s vyšší expresí vykazovali horší odpověď na terapii. V případě studií s inhibitory CYP3A4 bylo prokázáno, že potlačením aktivity CYP3A4 se účinnost docetaxelu významně zvyšuje. Tyto poznatky korelují s výsledky získanými v našich pokusech na HepG2 liniích s rozdílnou expresí CYP3A4, které potvrzují teorii o statisticky významném dopadu enzymu CYP3A4 na nádorovou rezistenci.

Všechna tato zjištění představují důležitou informaci, jež má potenciál zlepšit účinnost léčby docetaxelem. Znalost individuální nádorové exprese CYP3A4 by mohla sloužit jako podklad pro individualizaci léčby. Pokud by byly rezistentní nádory s vyšší expresí CYP3A4 předem odhaleny, bylo by možné se vyhnout nevhodné volbě léčiv, na které tato rezistence vzniká, případně by bylo možné lépe odhadnout jejich účinnou a bezpečnou dávku. Neméně významná je teoretická možnost využití specifických inhibitorů CYP3A4 v kombinaci s docetaxelem, která by mohla pomoci významně vylepšit terapeutický výstup u pacientů s nádorovou overexpresí CYP3A4.

7. Seznam literatury

- Abou-Ghali, M., & Stiban, J. (2015). Regulation of ceramide channel formation and disassembly: Insights on the initiation of apoptosis. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 22(6), 760–772. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2015.03.005>
- Altaner, C. (1995). Gene therapy for cancer (present status). *Neoplasma*, 42, 209–213.
- Anderson, M. A., Deng, J., Seymour, J. F., Tam, C., Kim, S. Y., Fein, J., Yu, L., Brown, J. R., Westerman, D., Si, E. G., Majewski, I. J., Segal, D., Heitner Enschede, S. L., Huang, D. C. S., Davids, M. S., Letai, A., & Roberts, A. W. (2016). The BCL2 selective inhibitor venetoclax induces rapid onset apoptosis of CLL cells in patients via a TP53-independent mechanism. *Blood*, 127(25), 3215–3224. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-01-688796>
- Baig, S., Seevasant, I., Mohamad, J., Mukheem, A., Huri, H. Z., & Kamarul, T. (2016). Potential of apoptotic pathway-targeted cancer therapeutic research: Where do we stand? *Cell Death & Disease*, 7(1), e2058. <https://doi.org/10.1038/cddis.2015.275>
- Baselga, J., Albanell, J., Molina, M. A., & Arribas, J. (2001). Mechanism of action of trastuzumab and scientific update. *Seminars in Oncology*, 28, 4–11. [https://doi.org/10.1016/S0093-7754\(01\)90276-3](https://doi.org/10.1016/S0093-7754(01)90276-3)
- Berka, K., Anzenbacherová, E., Hendrychová, T., Lange, R., Mašek, V., Anzenbacher, P., & Otyepka, M. (2012). Binding of quinidine radically increases the stability and decreases the flexibility of the cytochrome P450 2D6 active site. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 110, 46–50. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2012.02.010>

- Bouck, N. (1990). Tumor angiogenesis: the role of oncogenes and tumor suppressor genes. *Cancer Cells (Cold Spring Harbor, N.Y.: 1989)*, 2(6), 179–185.
- Bruno, R., Hille, D., Riva, A., Vivier, N., ten Bokkel Huinnink, W. W., van Oosterom, A. T., Kaye, S. B., Verweij, J., Fossella, F. V., Valero, V., Rigas, J. R., Seidman, A. D., Chevallier, B., Fumoleau, P., Burris, H. A., Ravdin, P. M., & Sheiner, L. B. (1998). Population pharmacokinetics/pharmacodynamics of docetaxel in phase II studies in patients with cancer. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 16(1), 187–196. <https://doi.org/10.1200/JCO.1998.16.1.187>
- Canaparo, R., Nordmark, A., Finnström, N., Lundgren, S., Seidegård, J., Jeppsson, B., Edwards, R. J., Boobis, A. R., & Rane, A. (2007). Expression of Cytochromes P450 3A and P-Glycoprotein in Human Large Intestine in Paired Tumour and Normal Samples. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 100(4), 240–248. <https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2006.00023.x>
- Chagas, C. M., & Alisaraie, L. (2019). Metabolites of Vinca Alkaloid Vinblastine: Tubulin Binding and Activation of Nausea-Associated Receptors. *ACS Omega*, 4(6), 9784–9799. <https://doi.org/10.1021/acsomega.9b00652>
- Cummins, C. L., Jacobsen, W., & Benet, L. Z. (2002). Unmasking the Dynamic Interplay between Intestinal P-Glycoprotein and CYP3A4. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 300(3), 1036–1045. <https://doi.org/10.1124/jpet.300.3.1036>
- Cwiertka, K., Hajdúch, M., Trojanec, R., & Špačková, K. (2005). Terapeutické monoklonální protilátky v onkologii. *Klinická Farmakologie a Farmacie*, 18(3), 165–170.

- Dancygier, H. (2010). Hepatic Biotransformation. In H. Dancygier (Ed.), *Clinical Hepatology: Principles and Practice of Hepatobiliary Diseases* (pp. 127–130). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-540-93842-2_8
- DeLoia, J. A., Zamboni, W. C., Jones, J. M., Strychor, S., Kelley, J. L., & Gallion, H. H. (2008). Expression and activity of taxane-metabolizing enzymes in ovarian tumors. *Gynecologic Oncology*, *108*(2), 355–360. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2007.10.029>
- Dennison, J. B., Jones, D. R., Renbarger, J. L., & Hall, S. D. (2007). Effect of CYP3A5 Expression on Vincristine Metabolism with Human Liver Microsomes. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *321*(2), 553–563. <https://doi.org/10.1124/jpet.106.118471>
- Dhaini, H. R., Thomas, D. G., Giordano, T. J., Johnson, T. D., Biermann, J. S., Leu, K., Hollenberg, P. F., & Baker, L. H. (2003). Cytochrome P450 CYP3A4/5 expression as a biomarker of outcome in osteosarcoma. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, *21*(13), 2481–2485. <https://doi.org/10.1200/JCO.2003.06.015>
- Dillon, C. P., & Green, D. R. (2016). Molecular Cell Biology of Apoptosis and Necroptosis in Cancer. In C. D. Gregory (Ed.), *Apoptosis in Cancer Pathogenesis and Anti-cancer Therapy: New Perspectives and Opportunities* (pp. 1–23). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-39406-0_1
- Dutt a Stambolic. (2016, December 26). Oncogenes and Tumor-Suppressor Genes. *Oncohemakey*. <https://oncohemakey.com/oncogenes-and-tumor-suppressor-genes/>

- el Mouelhi, M., Didolkar, M. S., Elias, E. G., Guengerich, F. P., & Kauffman, F. C. (1987). Hepatic drug-metabolizing enzymes in primary and secondary tumors of human liver. *Cancer Research*, *47*(2), 460–466.
- El-Rayes, B. F., Ali, S., Heilbrun, L. K., Lababidi, S., Bouwman, D., Visscher, D., & Philip, P. A. (2003). Cytochrome P450 and Glutathione Transferase Expression in Human Breast Cancer. *Clinical Cancer Research*, *9*(5), 1705–1709.
- Frenzel, A., Grespi, F., Chmielewskij, W., & Villunger, A. (2009). Bcl2 family proteins in carcinogenesis and the treatment of cancer. *Apoptosis: An International Journal on Programmed Cell Death*, *14*(4), 584–596.
<https://doi.org/10.1007/s10495-008-0300-z>
- Fujita, K. (2006). *Cytochrome P450 and Anticancer Drugs* [Text].
<https://doi.org/info:doi/10.2174/138920006774832587>
- Geiger, R., & Miska, W. (1991). *Aminoluciferin derivatives, processes for the production thereof and their application in the determination of enzyme activities* (United States Patent No. US5035999A).
<https://patents.google.com/patent/US5035999A/en>
- Gharavi, N., & El-Kadi, A. O. S. (2004). *Expression of Cytochrome P450 in Lung Tumor* [Text]. <https://doi.org/info:doi/10.2174/1389200043489045>
- Ghobrial, I. M., Witzig, T. E., & Adjei, A. A. (2005). Targeting Apoptosis Pathways in Cancer Therapy. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, *55*(3), 178–194.
<https://doi.org/10.3322/canjclin.55.3.178>
- Gotoh, O. (1992). Substrate recognition sites in cytochrome P450 family 2 (CYP2) proteins inferred from comparative analyses of amino acid and coding nucleotide sequences. *Journal of Biological Chemistry*, *267*(1), 83–90.

- Gregory, C. D. (Ed.). (2016). *Apoptosis in Cancer Pathogenesis and Anti-cancer Therapy: New Perspectives and Opportunities*. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-39406-0>
- Gulbins, E., Jekle, A., Ferlinz, K., Grassmé, H., & Lang, F. (2000). Physiology of apoptosis. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 279(4), F605–F615. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.2000.279.4.F605>
- Haanen, C., & Vermes, I. (1996). Apoptosis: Programmed cell death in fetal development. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 64(1), 129–133. [https://doi.org/10.1016/0301-2115\(95\)02261-9](https://doi.org/10.1016/0301-2115(95)02261-9)
- Hendriks, J. J. M. A., Lagas, J. S., Song, J.-Y., Rosing, H., Schellens, J. H. M., Beijnen, J. H., Rottenberg, S., & Schinkel, A. H. (2016). Ritonavir inhibits intratumoral docetaxel metabolism and enhances docetaxel antitumor activity in an immunocompetent mouse breast cancer model. *International Journal of Cancer*, 138(3), 758–769. <https://doi.org/10.1002/ijc.29812>
- Herwaarden, A. E. van, Wagenaar, E., Kruijssen, C. M. M. van der, Waterschoot, R. A. B. van, Smit, J. W., Song, J.-Y., Valk, M. A. van der, Tellingen, O. van, Hoorn, J. W. A. van der, Rosing, H., Beijnen, J. H., & Schinkel, A. H. (2007). Knockout of cytochrome P450 3A yields new mouse models for understanding xenobiotic metabolism. *The Journal of Clinical Investigation*, 117(11), 3583–3592. <https://doi.org/10.1172/JCI33435>
- Hrycay, E. G., & Bandiera, S. M. (2007). Cytochrome P450 Enzymes. In *Preclinical Development Handbook* (pp. 627–696). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9780470249031.ch18>
- Ikezoe, T., Hisatake, Y., Takeuchi, T., Ohtsuki, Y., Yang, Y., Said, J. W., Taguchi, H., & Koeffler, H. P. (2004). HIV-1 protease inhibitor, ritonavir: a potent inhibitor of

- CYP3A4, enhanced the anticancer effects of docetaxel in androgen-independent prostate cancer cells in vitro and in vivo. *Cancer Research*, 64(20), 7426–7431. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-03-2677>
- Janoušková, A. (2019). *Studium vlivu vybraných inhibitorů proteinkináz na lékovou rezistenci zprostředkovanou cytochromy P450*. <https://dspace.cuni.cz/handle/20.500.11956/107262>
- Kirby, G. M., Wolf, C. R., Neal, G. E., Judah, D. J., Henderson, C. J., Srivatanakul, P., & Wild, C. P. (1993). In vitro metabolism of aflatoxin B1 by normal and tumorous liver tissue from Thailand. *Carcinogenesis*, 14(12), 2613–2620. <https://doi.org/10.1093/carcin/14.12.2613>
- Kirchmair, J. (2014). *Drug Metabolism Prediction*. John Wiley & Sons.
- Kondoh, N., Wakatsuki, T., Ryo, A., Hada, A., Aihara, T., Horiuchi, S., Goseki, N., Matsubara, O., Takenaka, K., Shichita, M., Tanaka, K., Shuda, M., & Yamamoto, M. (1999). Identification and Characterization of Genes Associated with Human Hepatocellular Carcinogenesis. *Cancer Research*, 59(19), 4990–4996.
- Kumarakulasingham, M., Rooney, P. H., Dundas, S. R., Telfer, C., Melvin, W. T., Curran, S., & Murray, G. I. (2005). Cytochrome P450 Profile of Colorectal Cancer: Identification of Markers of Prognosis. *Clinical Cancer Research*, 11(10), 3758–3765. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-1848>
- Li, Z., & Sheng, M. (2012). Caspases in synaptic plasticity. *Molecular Brain*, 5, 15. <https://doi.org/10.1186/1756-6606-5-15>
- Linton, K. J. (2007). Structure and Function of ABC Transporters. *Physiology*, 22(2), 122–130. <https://doi.org/10.1152/physiol.00046.2006>

- Loke, M. F., & Hanafi, A. (2019). Molecular Mechanisms Responsible for Drug Resistance. In S. Ranganathan, M. Gribskov, K. Nakai, & C. Schönbach (Eds.), *Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology* (pp. 926–931). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.20467-6>
- Mak, P. J., & Denisov, I. G. (2018). Spectroscopic studies of the cytochrome P450 reaction mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1866(1), 178–204. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2017.06.021>
- Manikandan, P., & Nagini, S. (2018). *Cytochrome P450 Structure, Function and Clinical Significance: A Review* [Text].
<https://doi.org/info:doi/10.2174/1389450118666170125144557>
- McCrapra, F. (1976). Chemical mechanisms in bioluminescence. *Accounts of Chemical Research*, 9(6), 201–208. <https://doi.org/10.1021/ar50102a001>
- McFadyen, M. C. E., Melvin, W. T., & Murray, G. I. (2004). Cytochrome P450 enzymes: Novel options for cancer therapeutics. *Molecular Cancer Therapeutics*, 3(3), 363–371.
- McIlwain, D. R., Berger, T., & Mak, T. W. (2013). Caspase Functions in Cell Death and Disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(4), a008656.
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008656>
- McKay, J. A., Murray, G. I., Weaver, R. J., Ewen, S. W., Melvin, W. T., & Burke, M. D. (1993). Xenobiotic metabolising enzyme expression in colonic neoplasia. *Gut*, 34(9), 1234–1239. <https://doi.org/10.1136/gut.34.9.1234>
- Miyoshi, Y., Ando, A., Takamura, Y., Taguchi, T., Tamaki, Y., & Noguchi, S. (2002). Prediction of response to docetaxel by CYP3A4 mRNA expression in breast cancer tissues. *International Journal of Cancer*, 97(1), 129–132.
<https://doi.org/10.1002/ijc.1568>

- Miyoshi, Y., Taguchi, T., Kim, S., Tamaki, Y., & Noguchi, S. (2005). Miyoshi Y, Taguchi T, Kim SJ, Tamaki Y, Noguchi S Prediction of response to docetaxel by immunohistochemical analysis of CYP3A4 expression in human breast cancers. *Breast Cancer* 12(1): 11-15. *Breast Cancer (Tokyo, Japan)*, 12, 11–15. <https://doi.org/10.2325/jbcs.12.11>
- Montellano, P. R. O. de. (2005). *Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry*. Springer Science & Business Media.
- Moudi, M., Go, R., Yien, C. Y. S., & Nazre, Mohd. (2013). Vinca Alkaloids. *International Journal of Preventive Medicine*, 4(11), 1231–1235.
- Murray, G. I., Shaw, D., Weaver, R. J., McKay, J. A., Ewen, S. W., Melvin, W. T., & Burke, M. D. (1994). Cytochrome P450 expression in oesophageal cancer. *Gut*, 35(5), 599–603. <https://doi.org/10.1136/gut.35.5.599>
- Murray, G. I., Taylor, M. C., Burke, M. D., & Melvin, W. T. (1998). Enhanced expression of cytochrome P450 in stomach cancer. *British Journal of Cancer*, 77(7), 1040–1044. <https://doi.org/10.1038/bjc.1998.173>
- Murray, Graeme I., Paterson, P. J., Weaver, R. J., Ewen, S. W. B., Melvin, W. T., & Burke, M. D. (1993). The expression of cytochrome P-450, epoxide hydrolase, and glutathione s-transferase in hepatocellular carcinoma. *Cancer*, 71(1), 36–43. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(19930101\)71:1<36::AID-CNCR2820710107>3.0.CO;2-J](https://doi.org/10.1002/1097-0142(19930101)71:1<36::AID-CNCR2820710107>3.0.CO;2-J)
- Murray, Graeme I., Taylor, M. C., McFadyen, M. C. E., McKay, J. A., Greenlee, W. F., Burke, M. D., & Melvin, W. T. (1997). Tumor-specific Expression of Cytochrome P450 CYP1B1. *Cancer Research*, 57(14), 3026–3031.
- Murray, Graeme I., Taylor, V. E., McKay, J. A., Weaver, R. J., Ewen, S. W. B., Melvin, W. T., & Burke, M. D. (1995). The immunohistochemical localization of

- drug-metabolizing enzymes in prostate cancer. *The Journal of Pathology*, 177(2), 147–152. <https://doi.org/10.1002/path.1711770208>
- Murray, Graeme I., Weaver, R. J., Paterson, P. J., Ewen, S. W. B., Melvin, W. T., & Danny, M. B. (1993). Expression of xenobiotic metabolizing enzymes in breast cancer. *The Journal of Pathology*, 169(3), 347–353. <https://doi.org/10.1002/path.1711690312>
- Nair, P., McKinnon, R., & Miners, J. (2016). Cytochrome P450 structure–function: insights from molecular dynamics simulations. *Drug Metabolism Reviews*, 48, 1–19. <https://doi.org/10.1080/03602532.2016.1178771>
- Nebert, D. W., & Russell, D. W. (2002). Clinical importance of the cytochromes P450. *The Lancet*, 360(9340), 1155–1162. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(02\)11203-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(02)11203-7)
- Neve, E. P. A., & Ingelman-Sundberg, M. (2008). Intracellular transport and localization of microsomal cytochrome P450. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 392(6), 1075. <https://doi.org/10.1007/s00216-008-2200-z>
- Noll, E. M., Eisen, C., Stenzinger, A., Espinet, E., Muckenhuber, A., Klein, C., Vogel, V., Klaus, B., Nadler, W., Rösli, C., Lutz, C., Kulke, M., Engelhardt, J., Zickgraf, F. M., Espinosa, O., Schlesner, M., Jiang, X., Kopp-Schneider, A., Neuhaus, P., ... Sprick, M. R. (2016). CYP3A5 mediates basal and acquired therapy resistance in different subtypes of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Nature Medicine*, 22(3), 278–287. <https://doi.org/10.1038/nm.4038>
- Nosková et al. (2000). *Mechanizmy mnohočetné lékové rezistence a jejich význam pro klinickou praxi I.: Typická MDR* » Časopis Klinická onkologie » Linkos.cz. <https://www.linkos.cz/casopis-klinicka-onkologie/2000-12-30-special2->

2000/mechanizmy-mnohocetne-lekove-rezistence-a-jejich-vyznam-pro-
klinickou-praxi-i-ty/

Oijen, M. G. C. T. van, & Slootweg, P. J. (2000). Gain-of-Function Mutations in the Tumor Suppressor Gene p53. *Clinical Cancer Research*, 6(6), 2138–2145.

Oka, M., Kounoura, K., Narasaki, F., Sakamoto, A., Fukuda, M., Matsuo, I., Ikeda, K., Tsurutani, J., Ikuno, N., Omagari, K., Mizuta, Y., Soda, H., Gudas, J. M., & Kohno, S. (1997). P-Glycoprotein Is Positively Correlated with p53 Protein Accumulation in Human Colorectal Cancers. *Japanese Journal of Cancer Research*, 88(8), 738–742. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.1997.tb00445.x>

Oostendorp, R. L., Huitema, A., Rosing, H., Jansen, R. S., Ter Heine, R., Keessen, M., Beijnen, J. H., & Schellens, J. H. M. (2009). Coadministration of ritonavir strongly enhances the apparent oral bioavailability of docetaxel in patients with solid tumors. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 15(12), 4228–4233. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-2944>

Ortiz de Montellano, P. R. (2013). Cytochrome P450-activated prodrugs. *Future Medicinal Chemistry*, 5(2), 213–228. <https://doi.org/10.4155/fmc.12.197>

Otyepka, M., Skopalík, J., Anzenbacherová, E., & Anzenbacher, P. (2007). What common structural features and variations of mammalian P450s are known to date? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1770(3), 376–389. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2006.09.013>

Pallan, P. S., Wang, C., Lei, L., Yoshimoto, F. K., Auchus, R. J., Waterman, M. R., Guengerich, F. P., & Egli, M. (2015). Human Cytochrome P450 21A2, the Major Steroid 21-Hydroxylase: STRUCTURE OF THE

- ENZYME·PROGESTERONE SUBSTRATE COMPLEX AND RATE-LIMITING C-H BOND CLEAVAGE. *The Journal of Biological Chemistry*, 290(21), 13128–13143. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.646307>
- Ringel, I., & Horwitz, S. B. (1991). Studies with RP 56976 (taxotere): a semisynthetic analogue of taxol. *Journal of the National Cancer Institute*, 83(4), 288–291. <https://doi.org/10.1093/jnci/83.4.288>
- Rodriguez-Antona, C., & Ingelman-Sundberg, M. (2006). Cytochrome P450 pharmacogenetics and cancer. *Oncogene*, 25(11), 1679–1691. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209377>
- Ross, J. S., & Fletcher, J. A. (1998). The HER-2/neu oncogene in breast cancer: prognostic factor, predictive factor, and target for therapy. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 16(6), 413–428. <https://doi.org/10.1002/stem.160413>
- Sakurai, K., Enomoto, K., Matsuo, S., Amano, S., & Shiono, M. (2011). CYP3A4 expression to predict treatment response to docetaxel for metastasis and recurrence of primary breast cancer. *Surgery Today*, 41(5), 674–679. <https://doi.org/10.1007/s00595-009-4328-7>
- Schellens, J. H. M., Malingré, M. M., Kruijtzter, C. M. F., Bardelmeijer, H. A., van Tellingen, O., Schinkel, A. H., & Beijnen, J. H. (2000). Modulation of oral bioavailability of anticancer drugs: from mouse to man. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 12(2), 103–110. [https://doi.org/10.1016/S0928-0987\(00\)00153-6](https://doi.org/10.1016/S0928-0987(00)00153-6)
- Skálová a kol. (2017). *Metabolismus léčiv a jiných xenobiotik*. Charles University in Prague, Karolinum Press.
- Stiborová, M., Hudeček, J., Hodek, P., & Frei, E. (1999). Význam cytochromů P450 pro lidské zdraví. *Chemické Listy*, 93(4), 229–237.

- Szakács, G., Paterson, J. K., Ludwig, J. A., Booth-Genthe, C., & Gottesman, M. M. (2006). Targeting multidrug resistance in cancer. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 5(3), 219–234. <https://doi.org/10.1038/nrd1984>
- Tanwar, J., Das, S., Fatima, Z., & Hameed, S. (2014). *Multidrug Resistance: An Emerging Crisis* [Research article]. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*. <https://doi.org/10.1155/2014/541340>
- Tutt, A., & Ashworth, A. (2002). The relationship between the roles of BRCA genes in DNA repair and cancer predisposition. *Trends in Molecular Medicine*, 8(12), 571–576. [https://doi.org/10.1016/s1471-4914\(02\)02434-6](https://doi.org/10.1016/s1471-4914(02)02434-6)
- Valenzuela, B., Rebollo, J., Pérez, T., Brugarolas, A., & Pérez-Ruixo, J. J. (2011). Effect of grapefruit juice on the pharmacokinetics of docetaxel in cancer patients: a case report. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 72(6), 978–981. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.2011.04052.x>
- Walker, J. M. (2009). The Bicinchoninic Acid (BCA) Assay for Protein Quantitation. In J. M. Walker (Ed.), *The Protein Protocols Handbook* (pp. 11–15). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-198-7_3
- Waterschoot, R. A. B. van, Lagas, J. S., Wagenaar, E., Kruijssen, C. M. M. van der, Herwaarden, A. E. van, Song, J.-Y., Rooswinkel, R. W., Tellingén, O. van, Rosing, H., Beijnen, J. H., & Schinkel, A. H. (2009). Absence of Both Cytochrome P450 3A and P-glycoprotein Dramatically Increases Docetaxel Oral Bioavailability and Risk of Intestinal Toxicity. *Cancer Research*, 69(23), 8996–9002. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-2915>
- Waterschoot, R. A. B. van, & Schinkel, A. H. (2011). A Critical Analysis of the Interplay between Cytochrome P450 3A and P-Glycoprotein: Recent Insights

from Knockout and Transgenic Mice. *Pharmacological Reviews*, 63(2), 390–410. <https://doi.org/10.1124/pr.110.002584>

Watters, D., & Lavin, M. (2003). *Signalling Pathways in Apoptosis*. CRC Press.

Xuan, J., Chen, S., Ning, B., Tolleson, W. H., & Guo, L. (2016). Development of HepG2-derived cells expressing cytochrome P450s for assessing metabolism-associated drug-induced liver toxicity. *Chemico-Biological Interactions*, 255, 63–73. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2015.10.009>

Zanger, U. M., & Schwab, M. (2013). Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: Regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacology & Therapeutics*, 138(1), 103–141. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2012.12.007>