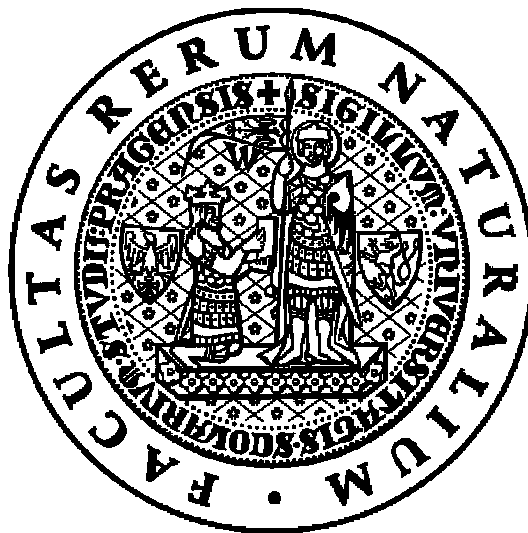


UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
FAKULTA PŘÍRODOVĚDECKÁ  
KATEDRA BIOCHEMIE



Bakalářská práce

**Studium potenciace farmakologického účinku ellipticinu**

Study on potentiation of pharmacological efficiencies of ellipticine

*Iveta Vranová*

Vedoucí práce: *prof. RNDr. Marie Stiborová, DrSc.*

24. května 2010

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně, pod vedením školitele prof. RNDr. Marie Stiborové, DrSc. a že jsem všechny použité prameny řádně citovala.

V Praze dne 24. 5. 2010

.....

## **Poděkování**

Na tomto místě bych ráda poděkovala prof. RNDr. Marii Stiborové, DrSc. za vedení bakalářské práce a také za její podporu, rady a věcné komentáře. Rovněž patří můj dík rodině za podporu při studiu a mému příteli za jeho velkou trpělivost a motivaci při psaní této práci.

Práce byla vypracována jako součást řešení grantu GAČR (P301/10/356) a MŠMT ČR (MSM 0021620808 a 1M0505).

## **Abstrakt**

Chemoterapie cytotoxických látek poskytuje prostředky pro klinickou léčbu nádorů. Do této skupiny chemoterapeutik patří také ellipticine. Ellipticin je alkaloid, který vykazuje značné protinádorové vlastnosti. Působí jako DNA interkalátor, inhibitor topoisomerázy II a tvoří kovalentní adukty s DNA prostřednictvím enzymové katalýzy cytochromy P450 a/nebo peroxidázami. Oxidace ellipticinu CYP (CYP3A4, CYP1A1/2, CYP2C9, CYP1B1) poskytuje několik metabolitů (7-hydroxyellipticin, 9-hydroxyellipticin, 12-hydroxyellipticin, 13-hydroxy-ellipticin, a  $N^2$ -oxid ellipticinu). 12-hydroxyellipticin a 13-hydroxyellipticin, které jsou tvořené především CYP3A4, jsou zodpovědné za tvorbu dvou hlavních aduktů s DNA. Dva karbéniové ionty, ellipticin-13-ylum a ellipticin-12-ylum byly navrženy jako reaktivní agens, které se váží na DNA. Hlavní metabolity tvořené peroxidázami jsou dimer ellipticinu a  $N^2$ -oxid ellipticinu, které generují stejné karbéniové ionty a adukty s DNA. Moderní přístupy v chemoterapii jsou založeny na cíleném směřování léčiv pro zvýšení selektivity vůči maligním buňkám a snížení cytotoxicity vůči normálním zdravým buňkám. Konjugáty ellipticinu a jeho derivátů (konjugáty ellipticinu s N-(2-hydroxypropyl)methakrylamidem, konjugáty ellipticinu s vazoaktivním střevním peptidem a konjugáty ellipticinu s lidským sérovým albuminem) a micely s konjugovaným epidermálním růstovým faktorem a ellipticinem uvnitř micely jsou dobré příklady pro cílené směřování a možnosti potenciace farmakologického účinku ellipticinu. Ellipticin také reguluje vlastní farmakologický a/nebo genotoxický potenciál indukci CYP1A1/2, která vede k zvýšené tvorbě aktivačních a detoxikačních metabolitů.

## **Klíčová slova**

Ellipticin, cytochrom P450, chemoterapie, cílená léčba, micelární transportní systémy

## **Abstract**

Cytotoxic chemotherapy offers tool for clinical treatment of neoplasia. One of the drugs suitable for chemotherapy is ellipticine. Ellipticine is an alkaloid, which has significant antineoplastic properties. It acts as a DNA intercalator, inhibitor of topoisomerase II and forms also covalent DNA adducts mediated by cytochrome P450 and/or peroxidases. Oxidation of ellipticine by CYP (CYP3A4, CYP1A1/2, CYP2C9, CYP1B1) provides several metabolites (7-hydroxyellipticine, 9-hydroxyellipticine, 12-hydroxyellipticine, 13-hydroxyellipticine, and ellipticine  $N^2$ -oxide). Metabolites 12-hydroxyellipticine and 13-hydroxyellipticine, formed by CYP3A4, are responsible for formation of two major DNA adducts. Two carbenium ions, ellipticine-13-ylum and ellipticine-12-ylum were proposed as a reactive species binding to DNA. The main metabolites generated by peroxidases are the ellipticine dimer and ellipticine  $N^2$ -oxide, which provide the same carbenium ions and same DNA adducts. Modern chemotherapy uses targeting for higher selectivity for malignant cells and lower cytotoxicity for normal cells. Ellipticine-conjugates and his derivates (N-(2-hydroxypropyl)methakrylamid-ellipticine conjugates, vasoactive intestinal peptide-ellipticine conjugates and human serum albumin-ellipticine conjugates) and epidermal growth factor-ellipticine conjugated micelles are good example for targeting and possibility of potentiation of pharmacological efficiency of ellipticine. Ellipticine also modulates its own pharmacological and/or genotoxic potential by inducing CYP1A1/2, which leads to an increase in formation of its activation and detoxication metabolites.

## **Key words**

Ellipticine, cytochrome P450, chemotherapy, targeted therapy, micellar delivery systems

# Obsah

1 Úvod .....	1
2 Cíl práce .....	2
3 Nádorové procesy a jejich léčení .....	3
3.1 Karcinogeneze .....	3
3.2 Fáze karcinogeneze .....	3
3.3 Faktory způsobující karcinogenezi .....	4
3.3.1 Vnější faktory .....	5
3.3.2 Vnitřní faktory .....	5
3.3.3 Zasažené geny .....	5
3.4 Léčba nádorových onemocnění .....	5
3.4.1 Včasné rozpoznání .....	5
3.4.2 Léčba rakoviny .....	6
3.4.3 Chemoterapie .....	6
3.4.4 Cílená léčba .....	7
3.5 Cytostatika .....	8
3.5.1 Mechanismus účinku cytostatik .....	8
3.5.2 Mechanismus účinku alkylačního činidla mechlorethaminu .....	9
3.5.3 Mechanismus rezistence na cytostatika .....	10
3.5.4 Farmakokinetika cytostatik .....	11
3.6 Biotransformace xenobiotik .....	12
3.6.1 První fáze biotransformace .....	13
3.6.2 Druhá fáze biotransformace .....	13
3.7 Cytochromy P450 .....	14
3.7.1 Struktura a funkce cytochromu P450 .....	14
3.7.2 Cytochromy P450 patřící na aktivaci léčiv .....	16
3.7.3 Cytochrom P450 3A4 jako nejdůležitější isoforma v metabolismu léčiv .....	17
3.8 „Drug delivery“ systém .....	18
3.8.1 Micelární transportní systémy .....	19
4 Ellipticin .....	21
4.1 Základní charakteristika ellipticinu .....	21
4.2 Biotransformace ellipticinu .....	21

4.3 Mechanismy protinádorového působení ellipticinu .....	22
4.4 Tvorba kovalentních aduktů aktivovaného ellipticinu s DNA .....	23
4.4.1 Mechanismus oxidace ellipticinu katalyzované cytochromy P450 .....	25
4.4.2 Mechanismus oxidace ellipticinu katalyzované peroxidázami.....	26
5 Možnosti potenciace protinádorového účinku ellipticinu .....	30
5.1 Indukce cytochromů P450 metabolizujících ellipticin .....	30
5.2 Cíleně směřované deriváty ellipticinu .....	31
5.3 Micely s inkorporovaným ellipticinem .....	34
6 Závěr.....	37
Literatura.....	38
Seznam zkratk.....	44

# 1 Úvod

Zatímco v první polovině minulého století byly hlavním problémem infekční choroby, v posledních 50 letech byl pozorován nárůst tzv. "civilizačních chorob". Tyto choroby jsou spojeny s rozvojem technologií, průmyslu, potravinářství apod. Strmý nárůst rovněž zaznamenal počet výskytu rakoviny. Zatímco před asi 100 lety onemocněl rakovinou přibližně každý 30. člověk, dnes je to každý 3. Rakovina je nejčastější příčinou úmrtí na celém světě. Podle světové zdravotnické organizace WHO představuje 7,4 milionů úmrtí (kolem 13% všech úmrtí) v roce 2004. Rakovina plic, žaludku, jater, tlustého střeva a prsu způsobuje největší počet úmrtí na rakovinu každý rok [1].

Podle posledních údajů Ústavu zdravotnických informací a statistiky z roku 2006 je rakovina v České republice ročně odhalena asi 70 000 pacientů, přibližně 30 000 pacientů se zhoubným nádorem na ni umírá. Z celkem téměř 72 000 nově nahlášených onemocnění rakovinou v roce 2006 se 37 000 týkalo mužů a 35 000 žen [2].

Rakovina je skupina chorob, která je charakterizována nekontrolovatelným růstem a proliferací abnormálních buněk. Rakovina není jedna choroba. Je to skupina více než 100 různých onemocnění. Většina případů rakoviny je pojmenována podle typu buněk nebo orgánu, ve kterém vznikla. Rakovinotvorné buňky mohou napadnout přilehlé části těla a rozšířit se do dalších orgánů [3].

Léčba nádorových onemocnění je komplikovaná, protože nedochází k ničení cizorodých buněk, ale tělu vlastních. Nádorové buňky se od normálních zdravých buněk liší buď minimálně, a proto nejsou rozeznávány imunitním systémem nebo využívají mechanismy, které paralyzují imunitní systém [4].

## 2 Cíl práce

Cílem této práce je souhrn informací (rešerše) o karcinogenezi, ellipticine jako léčiva s protinádorovým účinkem, který tvoří kovalentní adukty s DNA a možnosti potenciace jeho farmakologického účinku prostřednictvím indukce cytochromů P450 metabolizujících ellipticin a cíleně směřovaných derivátů.

# 3 Nádorové procesy a jejich léčení

## 3.1 Karcinogeneze

Karcinogeneze je mnohastupňový proces, při němž dochází k nahromadění poruch (mutací) určitých genů. Dochází k porušení normální funkce jimi kódovaných proteinů podílejících se zejména na regulaci dělení a diferenciaci buňky. Pro karcinogenezi jsou významné poruchy jen poměrně malého počtu genů. Jejich počet se odhaduje na několik set, což je méně než 0,1 % z celého genomu [5]. V procesu karcinogeneze se vytváří **nádor** (tumor, novotvar). Nádor je nově vytvořená abnormální tkáň, která se dělí nekontrolovatelným způsobem [4,5].

Důležité je rozlišení nádorů na nezhoubné – **benigní** (z lat. benignus – dobrotivý, vlídný) a zhoubné – **maligní** (z lat. malignus – zlý, špatný). Benigní nádory nejsou rakovinné. Mohou být odstraněny a ve většině případů se „nevracejí“. Buňky benigních nádorů se nešíří do jiných částí těla. Maligní nádor se na rozdíl od benigního vyznačuje velmi agresivním růstem s ničením okolní tkáně, zakládáním dceřiných ložisek (metastáz) a nakonec celkovým vyčerpáním organismu vedoucím k smrti. Buňky, které metastazují, jsou v podstatě stejné povahy jako buňky původního nádoru. Schopnost metastazovat je základní znak malignity nádorových onemocnění. Nejčastěji je úmrtí způsobeno právě vznikem metastáz [1,2,6].

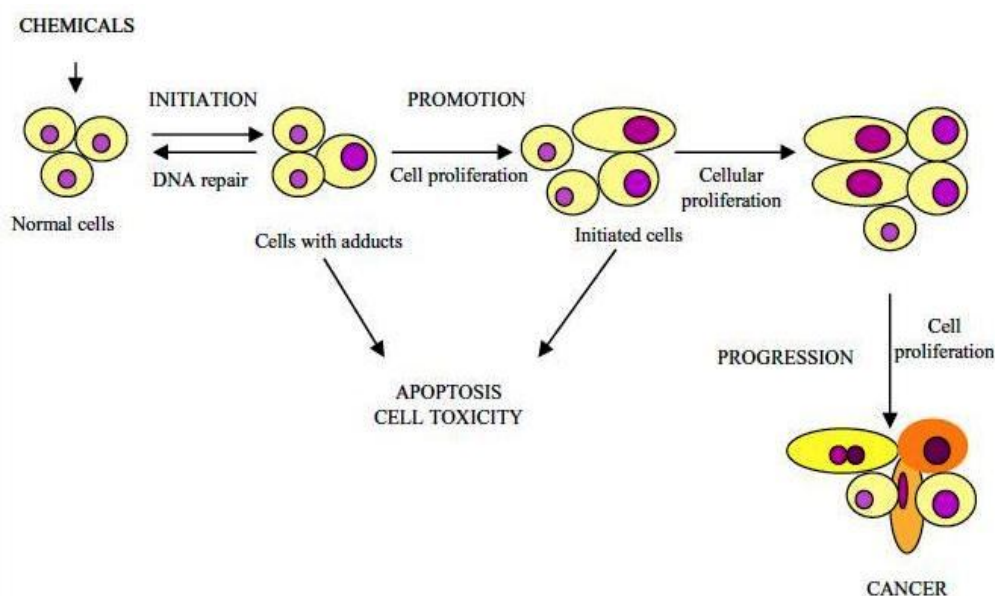
## 3.2 Fáze karcinogeneze

Proces karcinogeneze se dělí do 3 etap (*Obrázek 1*):

- **Iniciační** – dochází ke změně genetické informace normální buňky, co má za následek mutaci DNA. Mutace se mohou vyskytnout v protoonkogenech a tumor supresorových genech. Iniciovaná buňka není nádorová, ale po určitých změnách se jí může stát. Buňky, které proliferují mají méně času na opravu poškozené DNA a odstranění chemických látek, které vytvořili s DNA kovalentní adukty. V této fázi mohou zůstat buňky několik týdnů, měsíců nebo let. Iniciace může být spontánní (depurinace, deaminace DNA) nebo indukovaná.
- **Promoční** – dochází k zvýšení proliferace indukovaných buněk vlivem aktivovaných promotorů. Promotory také přispívají k upevnění mutace, způsobují

změny v regulaci buněčného cyklu a nepřímo poškozují DNA oxidací. Promoční fáze může zahrnovat aktivaci některých enzymů (proteinkinázy C, ornitindekarboxylázy), zvýšení transportu hexos, zvýšení produkce polyaminů a inhibice mezibuněčné komunikace [7]. Některé promotory jsou tkáňově specifické, jiné mohou působit současně v několika tkáních. Nastane-li úbytek aktivovaného promotoru, buňky se přestávají dělit a může dojít až k apoptóze.

- **Progresní** – poslední stádium karcinogeneze. Progrese je charakterizována irreversibilitou, rychlejším růstem buněk a změnami v metabolických a morfologických vlastnostech buněk. Dochází ke změně benigního nádoru na maligní, z něhož se mohou odštěpené buňky šířit krevním řečištěm do jiných tkání nebo orgánů, a vznikat metastáze [8].



Obrázek 1: Etapy chemické karcinogeneze [8]

### 3.3 Faktory způsobující karcinogenezi

Faktory způsobující karcinogenezi se mohou dělit podle různých kritérií. Rakovina je způsobena **vnějšími faktory** (tabák, infekční organismy, karcinogeny, radiace) a/nebo **vnitřními** (zděděné predispozice, imunitní podmínky a mutace metabolismu). Mezi **další faktory** patří stárnutí, protože výskyt rakoviny dramaticky stoupá s věkem. Ve vyspělých zemích patří mezi rizikové faktory užívání tabákových výrobků, alkoholu a nadváha nebo

obezita. Tyto faktory mohou působit společně nebo postupně a vést tak k iniciaci karcinogeneze. U lidí obvykle spolupůsobí více karcinogenních (i antikarcinogenních) faktorů v malých množstvích po dlouhou dobu (desítky let) a jejich účinek se vzájemně sčítá nebo násobí, jako např. při vlivu kouření a alkoholu. Mnohé druhy rakoviny lze předejít právě tím, že se zamezí působení rizikových faktorů [1,5].

### 3.3.1 Vnější faktory

Vnější faktory, které způsobují karcinogenezi, můžeme rozdělit do 3 kategorií:

- **fyzikální karcinogenní faktory** - ultrafialové a ionizující záření,
- **chemické karcinogeny** - složky tabákového kouře, aflatoxiny, arsen, azbest,
- **biologické karcinogenní faktory** - infekce z některých virů, bakterií a parazitů [1].

### 3.3.2 Vnitřní faktory

Všechny typy rakoviny zahrnují poruchy genů, které kontrolují buněčný růst a dělení. Nicméně, většina nádorů není výsledkem zděděných genů, ale jejich poškozením v průběhu života. Genetická poškození mohou vyplývat z vnitřních faktorů, jako jsou hormony nebo metabolismus buněk.

### 3.3.3 Zasažené geny

Základem deregulace buněčné proliferace, která vede k nekontrolovanému bujení, je mutace DNA. Při mutaci DNA dochází k změně funkčnosti zasažených genů. Geny důležité pro karcinogenezi se dělí do 2 skupin:

- **protoonkogeny** – jejich normální funkce je stimulace růstu, mutovaný gen je zvýšeně aktivní (Ras, hTERT, Src),
- **tumor supresorové geny** – jejich normální funkce je útlum růstu, mutovaný gen je neaktivní (p53, Rb, APC) [9].

## 3.4 Léčba nádorových onemocnění

### 3.4.1 Včasně rozpoznání

Jedna třetina onemocnění by mohla být snížena, pokud by byl proces karcinogeneze zjištěn včas. Cílem včasného rozpoznání je odhalit rakovinu, kde je lokalizována ještě předtím než dojde k metastázám. Existují dvě možnosti včasného detekování:

- vzdělávat lidi, rozpoznávat prvotní znaky – boule, vředy, krvácení z tělních otvorů,

- „screeningové“ programy - včasné zjištění rakoviny prsu, tlustého střeva, konečníku, děložního čípku, prostaty, ústní dutiny a kůže [1,10].

### 3.4.2 Léčba rakoviny

Léčba se zaměřuje na léčbu, prodloužení života a zlepšení kvality života pacientů. Hlavní metody léčby jsou:

- **chirurgická léčba** – chirurgický výkon, vyjme se postižená tkáň z těla, zabrání se tak dalšímu šíření rakoviny,
- **chemoterapie** – použití speciálních léků, které zabrání dalšímu šíření rakoviny,
- **radioterapie** – ozařování, užívá se před chirurgickým zákrokem, někdy po zákroku, mnohdy také v kombinaci s chemoterapií,
- **biologická léčba** – napomáhá organismu ničit rakovinnou tkáň, často bývá v kombinaci s chemoterapií.

Další metody jsou **cílená terapie** (inhibice receptorů pro růstové faktory, indukce apoptózy) a **hormonální terapie** [11,12].

### 3.4.3 Chemoterapie

Principem chemoterapie je podávání toxických látek – **cytostatik** (*kapitola 1.5*), které narušují buněčné dělení. Tato terapie svým zásahem do buněčného cyklu nádorové buňky brání dalšímu dělení. Nicméně tento postup není přesně zacílen, proto léčba cytostatiky postihuje i zdravé buňky. Při chemoterapii jde o hledání kompromisů mezi terapeutickým účinkem a poškozením organismu toxickými účinky cytostatik. Nádorová onemocnění jsou vůči různým cytostatikům různě citlivá. Některá jsou na chemoterapii necitlivá - **chemo-rezistentní**, jiná zase **chemosenzitivní**. Podle toho se chemoterapie dělí do 4 kategorií:

- **indukční (kurativní)** – co nejvíce snižuje objem nádoru a dosahuje klinické účinky od projevů úlevy až k vyléčení, v závislosti na typu nádoru,
- **adjuvativní** – doplňková metoda po radioterapii nebo chirurgickém zákroku, odstraňuje nádorové buňky, které mohly uniknout z primárního nádoru a mohly by znova začít metastazovat,
- **neoadjuvativní** – využívaná před operací, jejím cílem je dosáhnout lepší dlouhodobou kontrolu nádoru,
- **paliativní** – odstranění nebo zmírnění příznaků choroby, představuje možnost prodloužení života pacienta [13].

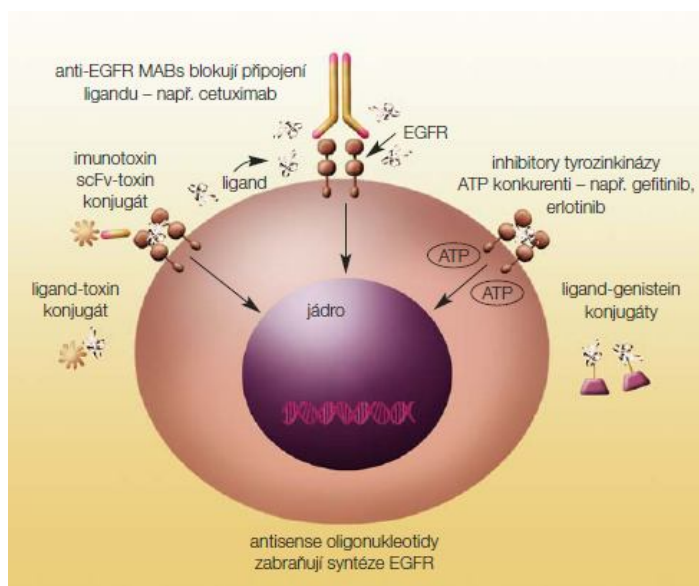
### 3.4.4 Cílená léčba

Cílená léčba (angl. „**targeted therapy**“), na rozdíl od klasické protinádorové chemoterapie, nezasahuje a nepoškozuje genetickou informaci buňky, ale zasahuje v oblasti proteinů s regulačními a signálními účinky [14]. Léky s cíleným účinkem zasahují přímo do maligních buněk, tedy přímo do kancerogenních mechanismů. Jejich úlohou je specificky zasáhnout do určitého buněčného procesu s cílem poškodit dominantní buňky nádoru (případně jeho mikroprostředí) pokud možno s minimálními nežádoucími vedlejšími účinky [14]. Na druhou stranu i tyto léky vyvolávají v těle určité nežádoucí účinky. Spektrum využití cílené léčby je široké. Patří sem inhibice růstových faktorů, inhibice membránových a cytoplazmatických receptorů, inhibice transdukční kaskády blokadou různých tyrosinkináz, inhibice regulačních proteinů buněčného cyklu, inhibice angiogeneze a metastazování, indukce apoptózy a diferenciací [15]. V současnosti se pro tento typ léčby nejvíc využívají **monoklonální protilátky** a **nízkomolekulární léčiva** (angl. small drugs).

Monoklonální protilátky jsou produkt jednoho klonu B lymfocytů. Mají přesně definované vlastnosti a specificky se váží na svůj substrát. V praxi se používají protilátky myší, chimerické, humanizované, čistě lidské nebo konjugované s radionuklidem či toxinem a ty pak slouží jako „nosič“ kancerostatické substance. Většina monoklonálních protilátek (Zanolimumab - HU-Max CD4, Lumiliximab, Alemtuzumab) se uplatňuje zejména v léčbě hematologických onemocnění [15]. Nízkomolekulární protilátky mají využití hlavně v inhibici tyrosinkináz. Tyto inhibitory blokují tyrosinkinázovou aktivitu receptorů pro epidermální růstové faktory – **EGFR** (angl. epidermal growth factor receptor). Inhibitory (Gefitinib, Erlotinib) jsou malé molekuly, které se váží na vazební místo pro ATP na receptoru, tím nedochází k jeho fosforylaci a přenosu signálu (*Obrázek 2*). Úlohou EGFR je udržovat homeostázi vnitřního prostředí v buňce. Změna funkce EGFR může vyústit až v nekontrolovatelnou proliferaci a karcinogenezi [14].

Cílená léčba je určitě velkým pokrokem v léčení nádorových onemocnění, zatím ale není možné pacienty léčit pouze touto metodou. Proto se často užívá v kombinaci s konvenčními cytostatiky. V současnosti se studují právě možnosti kombinace cílené léčby s konvenčními cytostatiky. Jedna z nedávných studií poukazuje na možnost využití tzv. **EGF-kopolymerních micel s ellipticinem** uvnitř micel (*kapitola 3.3*) [16]. EGF (angl. epidermal growth factor) je epidermální růstový faktor, který se váže na EGFR, akti-

vuje ho a spouští signální kaskádu. EGF spolu s ellipticinem působí synergicky a inhibují růst v prsních nádorových buňkách s nadměrnou expresí EGFR.



**Obrázek 2:** Schematický přehled možností ovlivnění EGFR. Jeho blokády je možné dosáhnout více způsoby: nativními monoklonálními protilátkami proti jeho struktuře, případně monoklonálními protilátkami konjugovanými s imunotoxiny, nebo na druhé straně malými molekulami blokujícími jeho enzymovou aktivitu (blokátory tyrozinkinázy) [14]

### 3.5 Cytostatika

Cytostatika jsou látky, které mají schopnost v některých případech odstranit nádor nebo alespoň snížit nádorovou zátěž, a tím snížit nádorové příznaky a možná i prodloužit život. Cytostatika jsou většinou podávány intravenózně, alternativou pro některé léky je perorální podání. Většinou jsou podávány v kombinacích s vícerymi léky, aby se dosáhlo zvýšení možnosti překonání buněčné rezistence vůči cytostatikům, a aby se zabránilo výrazné toxicitě. Cytostatika přednostně poškodí rychle se dělící maligní buňky. Zabrzdí se proliferace nádorových buněk a může dojít až k apoptóze, co je terapeuticky požadovaný účinek na maligní tumor. Cytostatika mají i nežádoucí účinky, protože působí i na některé zdravé, rychle se dělící tkáně.

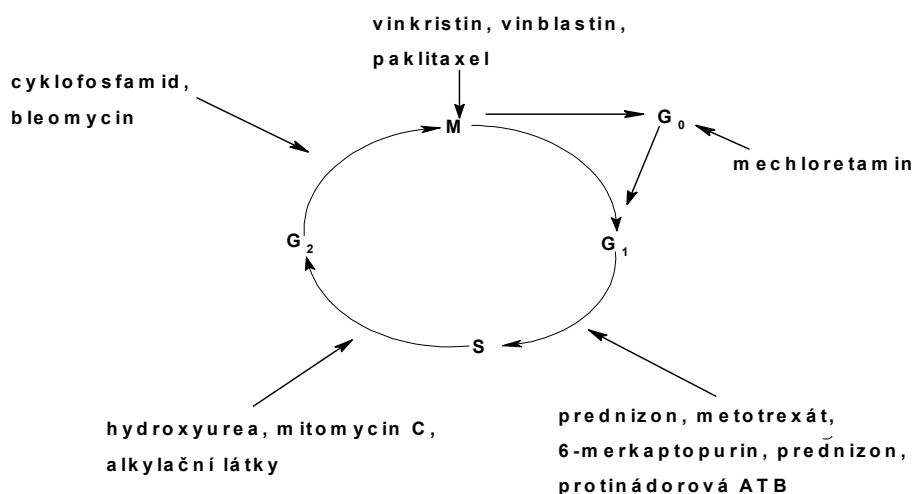
#### 3.5.1 Mechanismus účinku cytostatik

Cytostatika působí různými mechanismy účinku a zasahují do různých fází buněčného cyklu (Obrázek 3):

- **Poškození mitotického vřeténka** – inhibice polymerace tubulinových podjednotek na mikrotubuly, které mají funkci v metafázi v procesu buněčného dělení, patří sem

tzv. mitotické jedy (vinkristin, vinblastin), nebo inhibice destrukce mikrotubulů (paklitaxel, docetaxel).

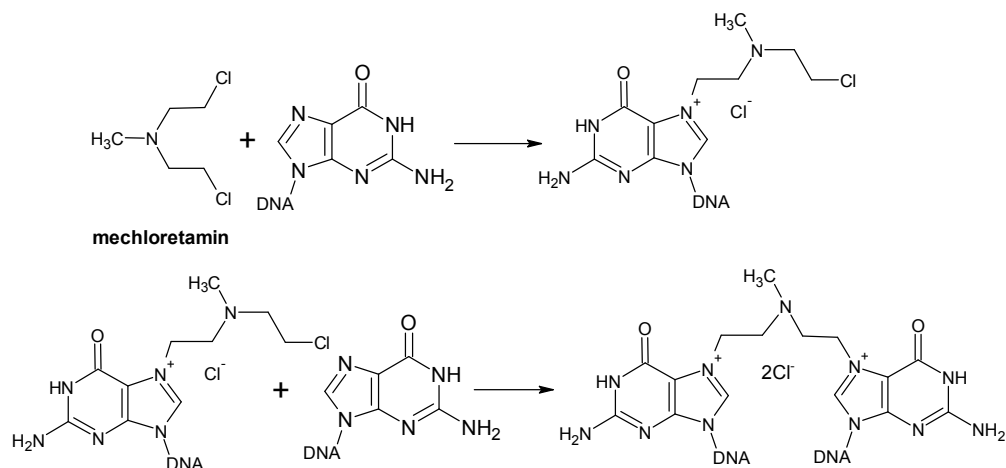
- **Poškození struktury a funkce nukleových kyselin** – prostřednictvím alkylace (mechloretoamin a jeho analog chlorambucil), interkalace (doxorubicin), štěpení DNA (epipodofylotoxiny) nebo inhibice topoisomeras (tekany), což má za následek nesprávné čtení genetické informace a z toho vyplývající nesprávná replikace a transkripce.
- **Porucha syntézy DNA a RNA inhibicí enzymů jejich metabolismu** – pomocí látek strukturně podobným metabolitům tzv. antimetabolity, dochází k inhibici syntézy DNA a RNA (analog kyseliny listové – methotrexát), anebo po svém zabudování do vlákna vznikají „falešné“ nukleové kyseliny.
- **Inhibice proteosyntézy** – působí pomocí enzymu L-asparaginázy štěpícího asparagin, nedostatek se projeví poruchami proteosyntézy.
- **poškození buněčné membrány** [4,7,9,17].



Obrázek 3: Místa zásahu cytostatik do buněčného cyklu (upraveno podle [9])

### 3.5.2 Mechanismus účinku alkylačního činidla mechloretoaminu

Pro bližší popis mechanismu účinku byl vybrán mechloretoamin, nazývaný též dusíkatý yperit. Jeho strukturní název je bis(2-chlorethyl)methanamin. Cytotoxické působení mechloretoaminu a jeho analogů (melfalan, chlorambucil, cyklofosfamid) je založeno na alkylování DNA nebo dokonce jednou molekulou mechloretoaminu mohou být propojena obě vlákna dvojšroubovice DNA. Takto modifikovaná DNA potom přestává fungovat a má za následek smrt buňky. Mechloretoamin působí následujícím mechanismem (Obrázek 4):



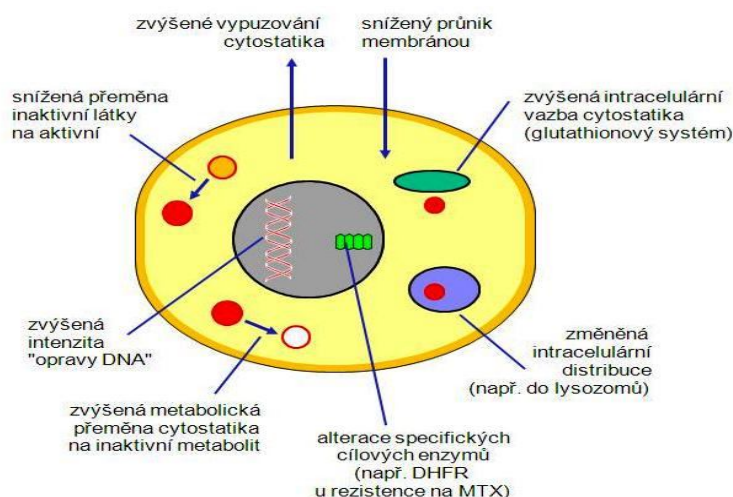
Obrázek 4: Mechanismus účinku mechlorethaminu (upraveno podle [18])

Mechlorethamin působí především na buňky rychle se dělící, a to jak maligní tak normální (kostní dřeň, trávicí trakt). Používá se pro léčbu Hodgkinova a „non-Hodgkinova“ lymfomu a kožního T-lymfomu. Mechlorethamin způsobuje vznik puchýřů, což může vést až k nekróze. [18,19].

### 3.5.3 Mechanismus rezistence na cytostatika

Častým jevem při léčbě nádorových onemocnění je rezistence organismu na podávaná cytostatika. Léková rezistence se může projevit již při prvním léčebném zásahu nebo vzniká během chemoterapie, vývojem buněčného mechanismu, který oslabí účinek cytostatik. Podle toho se rezistence dělí na **primární** (vrozenou) a **sekundární** (získanou). Znalost mechanismů rezistence na buněčné úrovni je proto důležitá pro pochopení selhání chemoterapie u pacientů. Existují různé mechanismy rezistence (Obrázek 5):

- **snížený vstup cytostatik do buňky** – snížení syntézy transportního proteinu pro cytostatikum,
- **zvýšený transport z buňky do extracelulárního prostoru** – prostřednictvím zvýšené syntézy ATP-dependentního P-glykoproteinu (tzv. „multidrug resistance“),
- **změna distribuce v buňce,**
- **změna aktivačního metabolismu** – snížená aktivace nebo zvýšená inaktivace pomocí enzymu konjugující léčivo s glutathionem,
- **zvýšená intenzita opravy DNA,**
- **inhibice apoptózy** – aktivace antiapoptotických buněčných mechanismů [12,13,20].

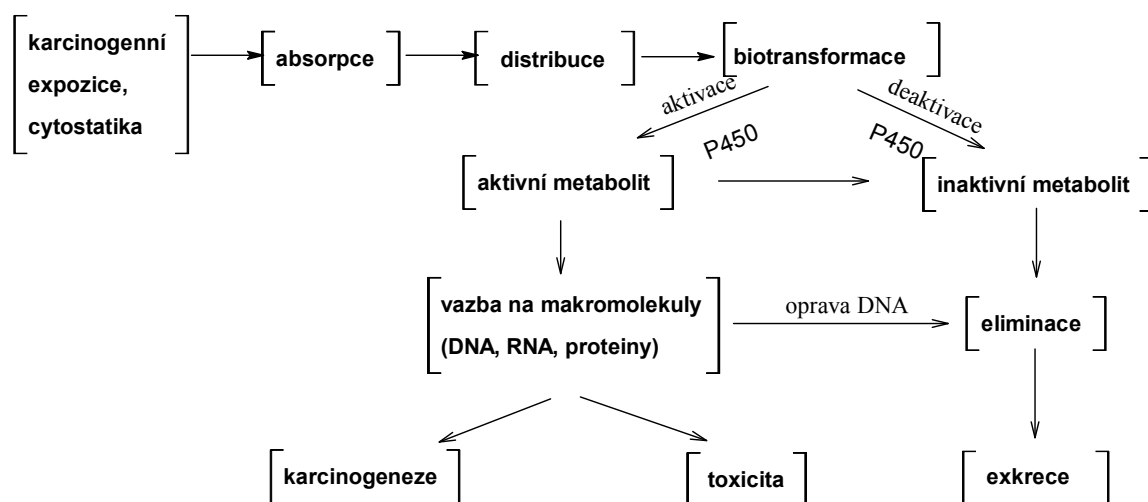


Obrázek 5: Mechanismus vzniku rezistence nádorových buněk vůči léčivám [12]

### 3.5.4 Farmakokinetika cytostatik

Farmakokinetika se zabývá osudem léčiva v organismu po jeho podání. Kvalitativně a kvantitativně popisuje farmakokinetické děje léčiva v organismu (Obrázek 6) [21]:

- **Resorpce (absorpce)** – přestup cytostatika z místa aplikace do krevního řečiště (s výjimkou intravenózního podání). Resorpce je závislá na fyzikálních pochodech difuze a distribuce, případně také na transportu některým transportním proteinem. Rychlost resorpce závisí na místě aplikace (subkutánní, sublinguální, transdermální, inhalační), na lékové formě a na fyzikálních vlastnostech farmaka.
- **Distribuce** – transport léčiva mezi krevním řečištěm a orgány. Koncentrace cytostatika v orgánech a v cílové tkáni závisí na prokrvení příslušné tkáně. Látka se rozpouští ve vodném prostředí (krevní plasma, intersticiální tekutina, intracelulární prostor) nebo se váže na různé struktury (plazmatické proteiny, receptory ve tkáních, na fosfolipidovou dvojvrstvu membrán), přičemž dochází k nerovnoměrné distribuci farmaka. Důležité je, že jenom volné cytostatikum je účinné.
- **Metabolismus (biotransformace)** – léčivo podléhá metabolickým přeměnám v metabolicky aktivních orgánech (játra, ledviny, plíce). Metabolity jsou polárnější a méně rozpustné v lipidech. Na biotransformaci se podílejí enzymy intermediálního metabolismu (kapitola 1.6).
- **Exkrece (vylučování)** – různými cestami (moč, stolice). Látky dobře rozpustné v tucích se špatně vylučují ledvinami, protože zpětně difundují v tubulech. Do stolice se dostanou látky vylučované žlučí nebo střevní sliznicí [8,21,22].



Obrázek 6: Metabolická aktivace a detoxikace cytostatik a karcinogenů po vstupu do organismu (upraveno podle [8])

### 3.6 Biotransformace xenobiotik

Xenobiotika (řec. xenos – cizí, bios – život) jsou látky, které se v organismu normálně nevyskytují a častokrát mají škodlivý účinek. Mezi xenobiotika patří látky přírodního původu nebo látky syntetické včetně léčiv. Xenobiotika po vstupu do organismu a jejich distribuci mohou být vyloučeny v nezměněné formě (vysoce polární látky) anebo podléhají biotransformaci.

V procesu biotransformace dochází k **deaktivaci** xenobiotika (biodegradaci) nebo k jeho **aktivaci** (bioaktivace). Biotransformace jsou metabolické přeměny, na kterých se podílí celá řada enzymů (cytochromy P450, peroxidázy, glutation S-transferáza, UDP-glukuronosyltransferáza, N-acetyltransferáza, sulfotransferáza, cysteintransferáza). Tyto enzymy se také podílejí na metabolismu endogenních látek. Primárním cílem biotransformace je přeměnit xenobiotikum na neúčinný metabolit hydrofilní povahy, který je lehce vylučitelný, což znamená, že je detoxifikován. Aktivace xenobiotik je častým jevem u léčiv, která jsou přijímána v podobě proléčiv, a až po jejich biotransformaci se stávají farmakologicky účinná. Takovým proléčivem, které je podáváno do organismu ve formě neúčinné mateřské látky, je například kodein nebo ellipticin. Kromě proléčiv dochází k bioaktivaci mnoha dalších látek (polutanty), čímž se zvyšuje jejich toxicita a mohou se tak tvořit karcinogeny, mutageny nebo teratogeny (Obrázek 6).

Místem biotransformace jsou hlavně játra, ale také ledviny, plíce a GIT. Metabolismus xenobiotik v buňkách probíhá v endoplazmatickém retikulu a méně často v cytosolu, mitochondriích a lysosomech. Biotransformace xenobiotik je dvoustupňový

proces: I. fáze biotransformace a II fáze biotransformace (*kapitola 1.6.1/2*). Charakter biotransformace může být ovlivněn věkem, pohlavím, genetickým vybavením, onemocněním a zdravotním stavem [23,24,25].

### 3.6.1 První fáze biotransformace

První fáze biotransformace (**derivatizační**) xenobiotik je děj, při kterém se do molekuly substrátu zavede polární skupina nebo se odkryje „skrytá“ funkční skupina -OH, -NH<sub>2</sub>, -SH. V tomto procesu dochází ke zvýšení polaritě xenobiotika a jeho rozpustnosti ve vodě. Je-li produkt první fáze dostatečně polární, může být vylučován přímo. Ostatní xenobiotika vstupují do druhé fáze biotransformace. Je paradoxní, že produkty těchto reakcí jsou často více toxické, karcinogenní a imunogenní. Nejčastější typy biotransformačních reakcí jsou znázorněny na obrázku 6:

- **oxidační reakce** – C-hydroxylace, N-hydroxylace, N-oxidace, S-oxidace, dealkylace, deaminace, epoxidace, oxidace alkoholů,
- **redukce** – nitro-redukce, azoredukce,
- **hydrolytické reakce** – hydrolýza esterů a amidů [24,26].

Mezi enzymy katalyzující reakce první fáze biotransformace patří systém **monooxygenáz se smíšenou funkcí – MFO** (z angl. mixed function oxidase), kterého hlavní složkou je **cytochrom P450** (*kapitola 1.7*). Mezi enzymy první fáze biotransformace se řadí dále flavínové mikrosomální monooxygenázy, **peroxidázy**, dehydrogenázy, reduktázy a hydrolytické enzymy. Metabolity první fáze biotransformace jsou vylučovány močí jako takové nebo vstupují do další fáze biotransformace [24, 26, 27].

### 3.6.2 Druhá fáze biotransformace

V druhé fáze biotransformace (**konjugační**) vstupují metabolity z první fáze do konjugačních reakcí. Funkční skupiny v metabolitech reagují s vysoce polárními endogenními sloučeninami, čímž vznikají ještě polárnější metabolity, které jsou z buňky transportovány a exkretovány z organismu v moči nebo žluči. Mezi nejčastější konjugační reakce patří:

- **S kyselinou glukuronovou** – jedna z nejčastějších konjugačních reakcí. Reakci katalyzuje enzym **UDP-glukuronosyltransferáza**.
- **S aktivním sulfátem** – sulfát vstupující do konjugační reakce s metabolitem první fáze ve formě aktivního sulfátu – 3-fosfoadenosin-5-fosfosulfát (PAPS), který je kofaktorem enzymu **sulfotransferázy**. S N-hydroxysloučeninami vytváří nestabilní

konjugát, který se rozpadá za vzniku nitréniového iontu. Tento ion jako elektrofilní činidlo může reagovat s DNA za vzniku mutací, což vede k nádorovému procesu.

- **S acetátem** – na reakci se podílí enzym **N-acetyltransferáza**. Kofaktorem enzymu je acetyl-CoA. Podobně jako se sulfátem vznikají s N-hydroxysloučeninami reaktivní ionty, v tomto případě nitréniové či karbeniové, které mohou vést k tvorbě mutací v DNA.
- **S glutathionem** – tripeptid  $\gamma$ -L-glutamyl-L-cysteinyglycin. Reakci katalyzuje enzym **glutathion-S-transferáza**. Konjugace s glutathionem je více stupňový proces a finálním produktem, který je odbouráván močí, je merkapturová kyselina.
- **S dalšími aminokyselinami** – s cysteinem, glycinem a taurinem.
- **Se sacharidy** – s glukosou, zejména u rostlin [23,24,26,27].

### 3.7 Cytochromy P450

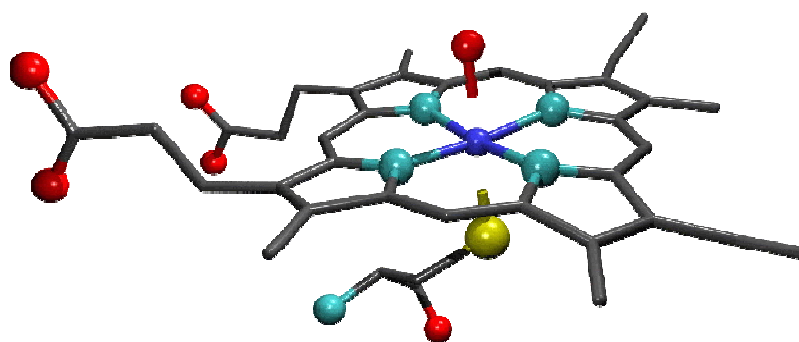
Cytochromy P450 (CYP) patří mezi klíčové enzymy metabolismu xenobiotik [28]. Jak bylo zmíněno v kapitole 1.6.1, jsou cytochromy P450 zodpovědné za reakce I. fáze biotransformace chemických látek (environmentální chemikálie, léčiva, přírodní látky a endogenní substráty – steroidy, žlučové kyseliny, mastné kyseliny, prostaglandiny, leukotrieny, biogenní amin) vedoucí k jejich detoxikaci nebo aktivaci. CYP jsou součástí systému **monooxygenáz se smíšenou funkcí – MFO**, kde fungují jako terminální oxidáza. CYP se nachází jak u prokaryot tak eukaryot. Počet forem enzymů u jednotlivých druhů je rozličný. Zatímco v bakteriích je to 20 forem CYP, v rostlinách je odhadováno 300 forem CYP a v organismu člověka bylo doposud identifikováno 57 forem [29,30]. Řada studií se zabývá sledováním účinnosti CYP v metabolismu léčiv a možností zvýšení farmakologické aktivity těchto enzymů. Právě aktivita CYP může determinovat celý osud léčiva a odpověď pacienta na podané léčivo. Cílem mnohých experimentů a studií je zjistit u každého pacienta formy CYP, aby podaná léčiva byla účinná a měla co nejmenší vedlejší účinky [28].

#### 3.7.1 Struktura a funkce cytochromu P450

Cytochromy P450 tvoří superrodinu hemthiolátových enzymů s nekovalentně vázaným protoporphyrinem IX prostřednictvím thiolátové síry sulfhydrylové skupiny cysteinu, přítomného v aktivním centru enzymu. Toto uspořádání odlišuje CYP od ostatních hemoproteinů [28]. Superrodina cytochromů P450 se dělí do rodin (CYP1, CYP2, CYP3), ve kterých je primární struktura alespoň ze 40 % identická a do podrodin

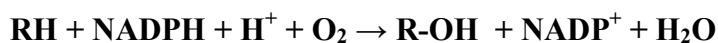
(označené A, B, C), ve kterých je alespoň 55 % identická sekvence proteinů. Nakonec jsou jednotlivým individuálním formám přiřazeny arabské číslice (1, 2 atd.). V lidském organismu bylo identifikovaných 18 rodin a 43 podrodin CYP [30,31]. Obecně je struktura všech cytochromů P450 podobná a evolučně zachovaná. Obsahují 400-500 aminokyselin a jednu hemovou prostetickou skupinu, která tvoří aktivní místo enzymu (*Obrázek 7*).

Cytochromy P450 se v lidském organismu nacházejí především v játrech, plicích, ledvinách, tenkém střevě, kůži, mozku a nadledvinkách. V buňkách jsou lokalizovány převážně v membránách hladkého endoplazmatického retikula, některé rovněž v membránách mitochondrií [28].

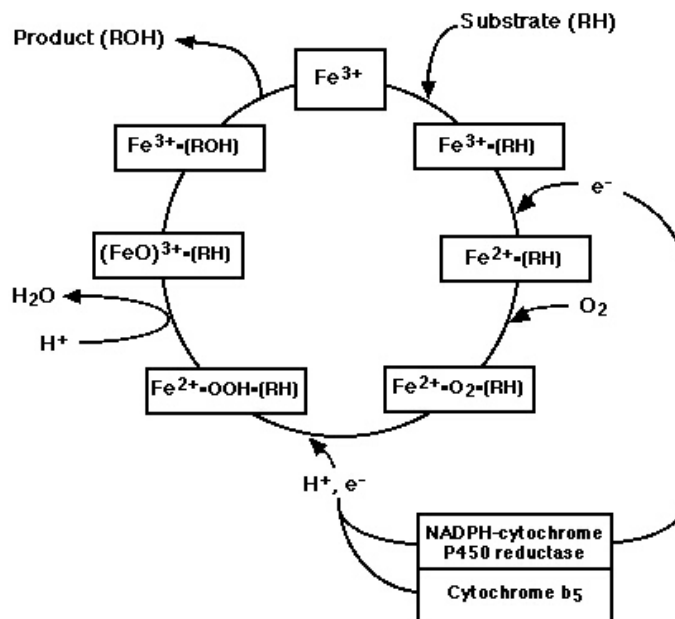


Obrázek 7: Aktivní místo CYP. Červené kuličky představují atomy kyslíku, modré dusíku, žluté síry a tmavě modré železa. Atomy uhlíku jsou znázorněny šedě [32]

Cytochrom P450 spolupůsobí s dalšími enzymy lokalizovanými v endoplazmatickém retikulu – **NADPH-cytochrom P450 reductázou**, **cytochromem b<sub>5</sub>**, **NADH-cytochrom b<sub>5</sub> reductázou** a vytváří systém monooxygenáz se smíšenou funkcí – MFO. Koenzymem systému je **NADPH**. Pro správné fungování MFO jsou nezbytné membránové lipidy. MFO vykazuje oxygenázovou a oxidázovou funkci. To znamená, že se oxiduje NADPH jako kofaktor tohoto systému a substrát (xenobiotikum) se oxygenuje.



Z rovnice je viditelné, že do molekuly substrátu se zabudoval jeden atom kyslíku a substrát se stal polárnějším. Druhý atom kyslíku je redukován na vodu (*Obrázek 8*) [33].



**Obrázek 8:** Reakční cyklus cytochromu P450. RH – substrát, ROH – monoxygenační produkt, Fe – atom hemového železa enzymu [34]

### 3.7.2 Cytochromy P450 patřící na aktivaci léčiv

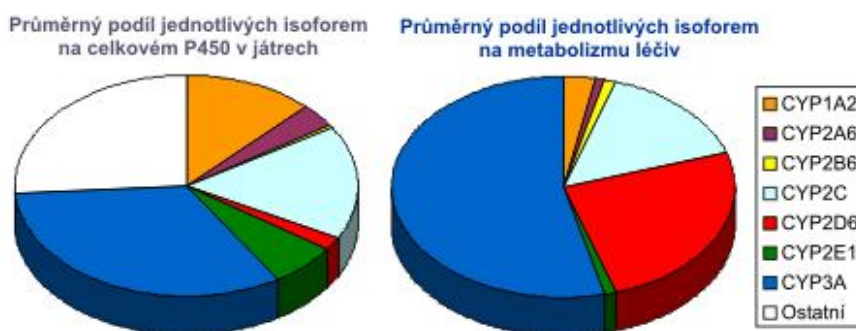
Cytochromy P450 se kromě detoxikace látek na polárnější metabolity, podílejí na aktivaci léčiv. Na druhé straně se také uplatňují při aktivaci protoxikantů a prokarcinogenů v procesu karcinogeneze (*Obrázek 6*). Množství CYP v jednotlivých tkáních je závislé na mnoha faktorech, jako je **genetický polymorfismus**, vliv vnějších podmínek nebo působení podávaných léčiv [28,31]. Genetický polymorfismus je definován jako geneticky podmíněná odlišnost postihující alespoň 2 % uvažované populace [28]. Tento jev způsobuje velké interindividuální rozdíly v účincích léčiv. Na základě genetického polymorfismu se organismy dělí do třech skupin:

- **EM** (extensive metabolizer) – normální metabolizátor,
- **PM** (poor metabolizer) – špatný metabolizátor, absence CYP, léčivo se kumuluje v tkáni
- **RM** (rapid metabolizer) – rychlý metabolizátor, zvýšená katalytická aktivita enzymu, rychlé odbourávání léčiva [26].

Další jev, který přispívá k změně aktivity enzymů, je indukce a inhibice. Většina z CYP je **inducibilní**, to znamená, že jejich koncentrace může být vlivem určitých podmínek (léčivo, potrava) zvýšená. Léčivo (induktor), které indukuje expresi genu daného enzymu, se váže na nukleární receptor (např. PXR receptor pro CYP3A4). Vytváří se komplex receptor-induktor, který je transportován do jádra, kde se váže na regulační

oblast genu (promotor). Tím se zvýší transkripce daného genu, tedy indukce [30]. Za určitých podmínek však může být hladina cytochromů v tkáni také snížena, a to prostřednictvím tzv. **inhibitorů**. To se projeví zpomalením metabolismu léčiva a jeho kumulací v organismu. Inhibice nastává v důsledku vazby inhibitoru (např. jiného léčiva) na stejný enzym. Dochází ke kompetitivní inhibici nebo se inhibitor naváže na jiné místo enzymu. Dojde tak ke konformační změně enzymu a znemožnění vazby substrátu do aktivního místa (nekompetitivní inhibice) [30,35].

Do skupiny cytochromů P450, které aktivují léčiva, patří zejména rodina CYP1, CYP2 a CYP3. Tyto tři rodiny cytochromů jsou lokalizovány hlavně v játrech. Kvantitativní zastoupení isoform v játrech a jejich podíl/důležitost v metabolismu léčiv znázorňuje obrázek 9. Z něj je patrné, že s ohledem na důležitost v metabolismu léčiv je pozornost věnována především CYP3A4, CYP2D6, CYP2C9 a CYP1A2 [30,31].



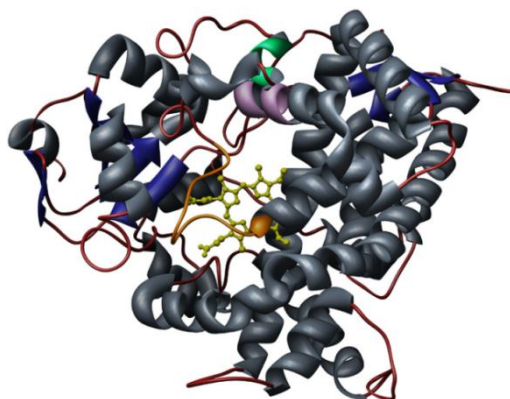
Obrázek 9: Průměrný podíl jednotlivých isoformů CYP v játrech a participace na metabolismu léčiv [30]

### 3.7.3 Cytochrom P450 3A4 jako nejdůležitější isoforma v metabolismu léčiv

Cytochrom P450 3A4 (*Obrázek 10*) je patrně nejdůležitější a také kvantitativně nejvíc zastoupený CYP v metabolismu léčiv v lidském organismu. Vyskytuje se hlavně v játrech (28 %), ve střevě a v menších množstvích v placentě a ledvinách [28,29]. Množství CYP3A4 může být indukováno a zvýšeno až na množství 60 % v játrech. Mezi induktory CYP3A4 patří rifampicin, dexamethason a barbituráty. Do skupiny inhibitorů této isoformy CYP patří azolová antimykotika, erytromycin, klaritromycin nebo látky obsažené v grapefruitové šťávě. Mezi jeho substráty nepatří jenom xenobiotika (blokátory Ca kanálů, cyklosporin, acetaminophen, taxol, nifedipin), ale i endogenní látky [29]. CYP3A4 se podílí z velké části na aktivaci karcinogenních xenobiotik jako například polycyklické aromatické uhlovodíky a aromatické aminy [28]. Cytochrom P450 3A4 se

významně podílí také na aktivaci ellipticinu na 13-hydroxyellipticin, který se dále váže na DNA za vzniku kovalentních aduktů (*kapitola 2.4*).

Z velké substrátové variability CYP3A4 a z mnoha studií zaměřených na vyřešení aktivního centra enzymu vyplývá, že CYP3A4 má pravděpodobně 2 nebo 3 vazební místa uvnitř aktivního centra [36].



Obrázek 10: Strukturá lidského cytochromu P450 3A4 [37]

### 3.8 „Drug delivery“ systém

Účinek mnoha léků je omezen nebo snížen v důsledku částečného rozkladu dříve než dosáhnou požadovaný cíl v organismu. Proto se v posledních letech klade důraz na vývoj systémů, které by byly schopné kontrolovat rychlost a dobu podávání léků a uvolnit lék v místě jeho působení. Tyto systémy mají anglický název „drug delivery systems“, který by se dal do češtiny volně přeložit jako **transportní systémy léčiv** [38]. Cílem všech těchto systémů je dopravit léčivo v neporušeném stavu do místa působení pomocí „médií“, které může kontrolovat uvolnění léku prostřednictvím fyzikálních nebo chemických podnětů. Jako vhodným médii se ukázaly být polymerní „mikrokuličky“ a micely, které umožňují efektivněji dosáhnout cíl působení (angl. targeting), a tím omezit nežádoucí účinky na zdravé tkáně, snížit toxicitu léčiva, zlepšit jeho absorpci a zabránit biodegradaci léku před tím než dosáhne svůj cíl. Vlastní účinná látka (farmakon) je zapouzdřená v polymerní „obálce“ nebo je součástí polymerní sítě. Další experimenty poukazují na slibné využití biologicky odbouratelných polymerů, dendrimerů a elektroaktivních polymerů [39,40].

V současné době se používají pro výrobu transportních systémů tzv. **blokové kopolymery**. Blokovaný kopolymer je vytvoření polymerací s různých monomerů. Jsou-li tyto supramolekulární sítě tvořené s hydrofilních a hydrofobních monomerů, nazývají se polymerní micely (*kapitola 1.8.1*) [39,40].

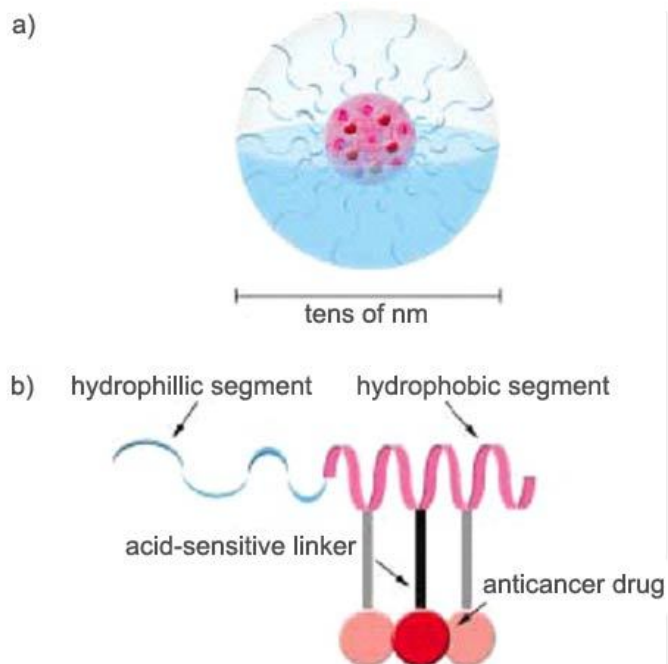
### 3.8.1 Micelární transportní systémy

Polymerní micely jsou tvořeny amfifilními polymery dispergovanými ve vodním prostředí. Tyto micely nejsou větší než 100 nm, a proto jsou ideální pro transport léčiv (*Obrázek 11*). Micely obsahují jádro, které představuje hydrofobní část a hydrofilní „obálku“, která ochraňuje jádro od vnějšího prostředí při transportu. Polymerní micely se používají pro transport slabě rozpustných (ve vodě) léčiv. Léčivo se inkorporuje do jádra, a tím se zvýší jeho dostupnost. Vysoce stabilní micely uchovávají rozpuštěné léčivo i po jeho podání do organismu, prodlužují jeho cirkulační čas a distribuci [41].

Specifická účinnost a cílení polymerních micel je závislé na vícerych faktorech:

- **EPR efekt** (angl. enhanced permeation and retention effect) – spontánní průnik a zvýšená propustnost micel s léčivem. Micely se hromadí v nádorové tkáni, protože kapiláry jsou více propustné pro větší molekuly oproti normální tkáni [41,42].
- **Teplota, pH** – některé patologické procesy jsou spojeny se změnami teploty nebo pH. Použitím micel, které jsou citlivé na tyto změny, může dojít k uvolnění léku z micely na požadovaném místě.
- **Specifické látky na povrchu** – micely mohou být cílené na místo účinku prostřednictvím specifických látek, které jsou navázané na jejich povrchu a jsou schopny v organismu rozeznat specifická místa (receptory) pro tyto látky. Mohou to být protilátky, peptidy, lektiny, sacharidy, hormony, nízkomolekulární látky [41].

Polymerní materiály používané k výrobě polymerních micel jsou nejčastěji sítě poly(ethylen oxid)-b-poly(propylen oxid)-b-poly(ethylen oxidu) nebo kombinace polyglykolové kyseliny – **PGA**, polymeru kyseliny mléčné – **PLA** a polykaprolaktonu – **PCL**. Poly(ethylen oxid) – **PEO** a poly(ethylenglykol) – **PEG** jsou vhodné pro hydrofilní část micely [43,44].

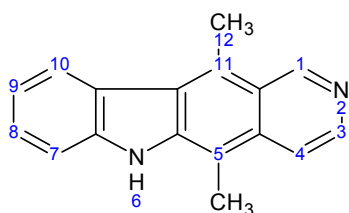


Obrázek 11: a) Polymerní micela připravená z blokových kopolymerů, b) jednotlivé části micely v roztoku  
 Modrou je označen hydrofilní segment micely, růžovou hydrofobní a červené kuličky představují transportované léčivo. Léčivo je navázané v hydrofobním jádře pomocí pH sensitive vazby. Při změně pH dojde k uvolnění léku z micely [45]

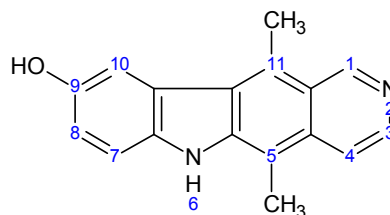
# 4 Ellipticin

## 4.1 Základní charakteristika ellipticinu

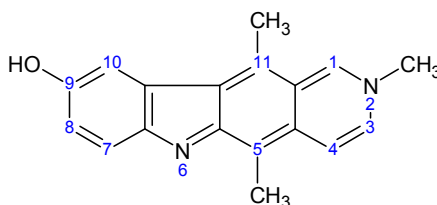
Ellipticin (5,11-dimethyl-6*H*-pyrido[4,3-*b*]kרבazol, *Obrázek 12*) a některé jeho deriváty (9-hydroxyellipticin, 2-methyl-9-hydroxy-ellipticin, (*Obrázek 13, 14*) jsou rostlinné alkaloidy čeledi Apocyanaceae.



Obrázek 12: Struktura ellipticinu



Obrázek 13: Struktura 9-hydroxyellipticinu



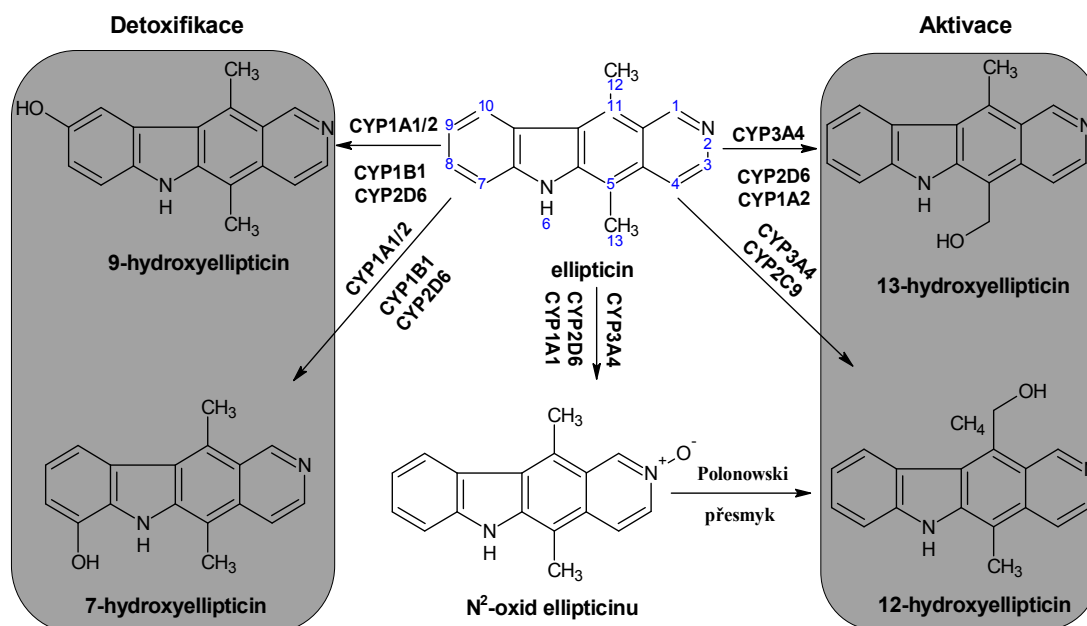
Obrázek 14: Struktura 2-methyl-9-hydroxyellipticinu

Ellipticin a jeho polárnější deriváty vykazují významnou protinádorovou aktivitu. Využívají se hlavně ve formě acetátů k léčení karcinomu prsu s kostními metastázemi, akutní myeloblastické leukémie, sarkomů ledvin a karcinomu štítné žlázy. Ellipticin vykazuje také anti-HIV aktivitu.

Hlavním důvodem zájmu o ellipticin a jeho deriváty pro klinické využití je jejich vysoká účinnost proti nádorovým onemocněním, relativně nízké vedlejší toxické účinky (nefrotoxicita) a nulová hematologická toxicita [46,47].

## 4.2 Biotransformace ellipticinu

V organismu se ellipticin biotransformuje až na 5 metabolitů (*Obrázek 15*). Vedle 9-hydroxyellipticinu byly identifikovány ještě další 4 metabolity: 12-hydroxyellipticin, 13-hydroxyellipticin, N<sup>2</sup>-oxid ellipticinu jako majoritní metabolity a 7-hydroxyellipticin jako minoritní produkt. Stejně metabolity jsou také tvořeny mikrosomy modelových organismů (potkan, králík) [47].



Obrázek 15: Metabolismus ellipticinu lidskými cytochromy P450 (upraveno podle 48)

Enzymy, které participují na tvorbě metabolitů ellipticinu, patří do rodiny cytochromů P450. Z obrázku 15 je patrné, že se na metabolické aktivaci podílí CYP3A4, 1A, 2D6, 2C9. Na oxidaci ellipticinu na detoxikační deriváty participují enzymy CYP1A, 1B1 a 2D6. Do skupiny enzymů, které se podílejí na metabolismu ellipticinu patří také peroxidázy. Detailním mechanismem oxidace ellipticinu na metabolity se zabývá kapitola 2.4.1/2.

### 4.3 Mechanismy protinádorového působení ellipticinu

Protinádorový účinek ellipticinu je vysvětlován několika mechanismy:

- **Interkalace do dvoušroubovicové molekuly DNA** - vyplývá z velikosti a tvaru molekuly ellipticinu. Interkalace je zprostředkována slabými reverzibilními hydrofobními interakcemi s bázemi DNA. Interakce mezi methylovou skupinou ellipticinu a thyminem je rozhodující pro interkalaci do molekuly DNA. Vzhledem k fluorescenčním vlastnostem se používá ellipticin jako modelová interkalační sloučenina [49,50].
- **Inhibice topoisomerázy II** – interakce s topoisomerázou II a DNA za vzniku ternárního komplexu, který vede k zlomům v řetězci DNA a následné smrti buňky. Mechanismus inhibice topoisomerázy II je předmětem výzkumu [47,49,50,51,52].

- **Selektivní inhibice fosforylace proteinu p53** – prostřednictvím inhibice cyklin-dependentní kinázy. Nahromadění defosforylovaného p53 může způsobit apoptózu [49,50,53].
- **Inhibice oxidační fosforylace** – akumulace ellipticinu v mitochondriích způsobuje narušení energetické rovnováhy v buňce (snížení obsahu ATP v buňce) [49,50, 54].
- **Inhibice telomerázy** [50].

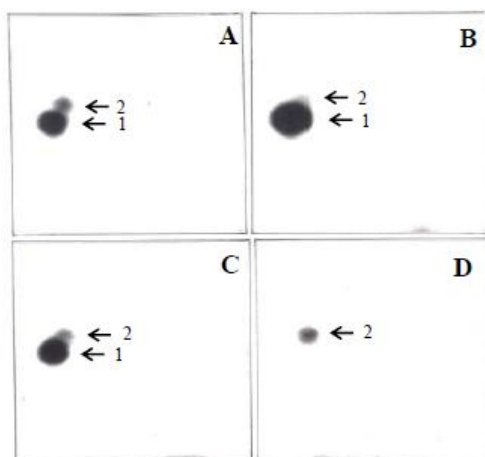
Výše popsané mechanismy účinku ellipticinu jsou založeny na nespecifickém působení. Nicméně tento poznatek je v rozporu s poměrně úzkou specifikou účinku ellipticinu vůči určitým typům neoplasie. Z toho vyplývá, že specifické působení ellipticinu musí být odvozené z jiných mechanismů působení ellipticinu. Možné vysvětlení lze hledat v enzymovém vybavení organismu. Enzymy podílející se na biotransformaci mohou produkovat účinnější metabolity léčiva, které poškozují nádor efektivněji. Právě do této kategorie „zapadá“ nedávno popsaný mechanismus účinku ellipticinu, kdy se **ellipticin** po aktivaci **kovalentně váže na DNA**, a vytváří tak **adukty s DNA** po enzymové aktivaci cytochromem P450 nebo peroxidázami. Cílem vazby derivátů (13-hydroxyellipticin a 12-hydroxyellipticin) je deoxyguanosin za tvorby aduktů s DNA. [47,48,55,56,57].

#### 4.4 Tvorba kovalentních aduktů aktivovaného ellipticinu s DNA

Ellipticin tvoří v procesu biotransformace aktivní metabolity, které se kovalentně váží na DNA, a vytvářejí adukty s DNA. Tato skutečnost byla navrhována již DeMarinim, který předpověděl, že jeden typ mnohonásobného genotoxického efektu ellipticinu by mohl být důsledek metabolicky vytvořené kovalentní vazby s DNA [14]. Tvorba kovalentních aduktů byla potvrzena 2 nezávislými metodami: metodou „<sup>32</sup>P-postlabeling“ a použitím [<sup>3</sup>H]ellipticinu [47]. Tvorba aduktů byla testována v některých tkáních potkana exponovaného ellipticinu, v plicních fibroblastických buňkách křečka (V-97) transfekovaných lidskými CYP (CYP3A4, 1A1 a 1A2), v lidských neuroblastomech, v nádorových buňkách prsního adenokarcinomu (MCF-7) a v lidských leukemických buňkách (HL-60 a CCRF-CEM) [48,55,56,57,58,59].

Ve všech testovaných systémech se prokázala tvorba aduktů aktivovaného ellipticinu s DNA. Testy prokázaly tvorbu minimálně 2 aduktů. Majoritní adukt (**adukt 1**), jehož vznik je závislý na přítomnosti aktivačních enzymů a minoritní adukt (**adukt 2**), který vznikal i bez jejich přítomnosti, pravděpodobně aktivací ellipticinu autooxidací

(Obrázek 16) [47]. Mimo tyto adukty, bylo detekováno (*in vivo* v některých tkáních potkana, v buňkách V-97, MCF-716 a HL-60) dalších 5 minoritních aduktů [33,60].

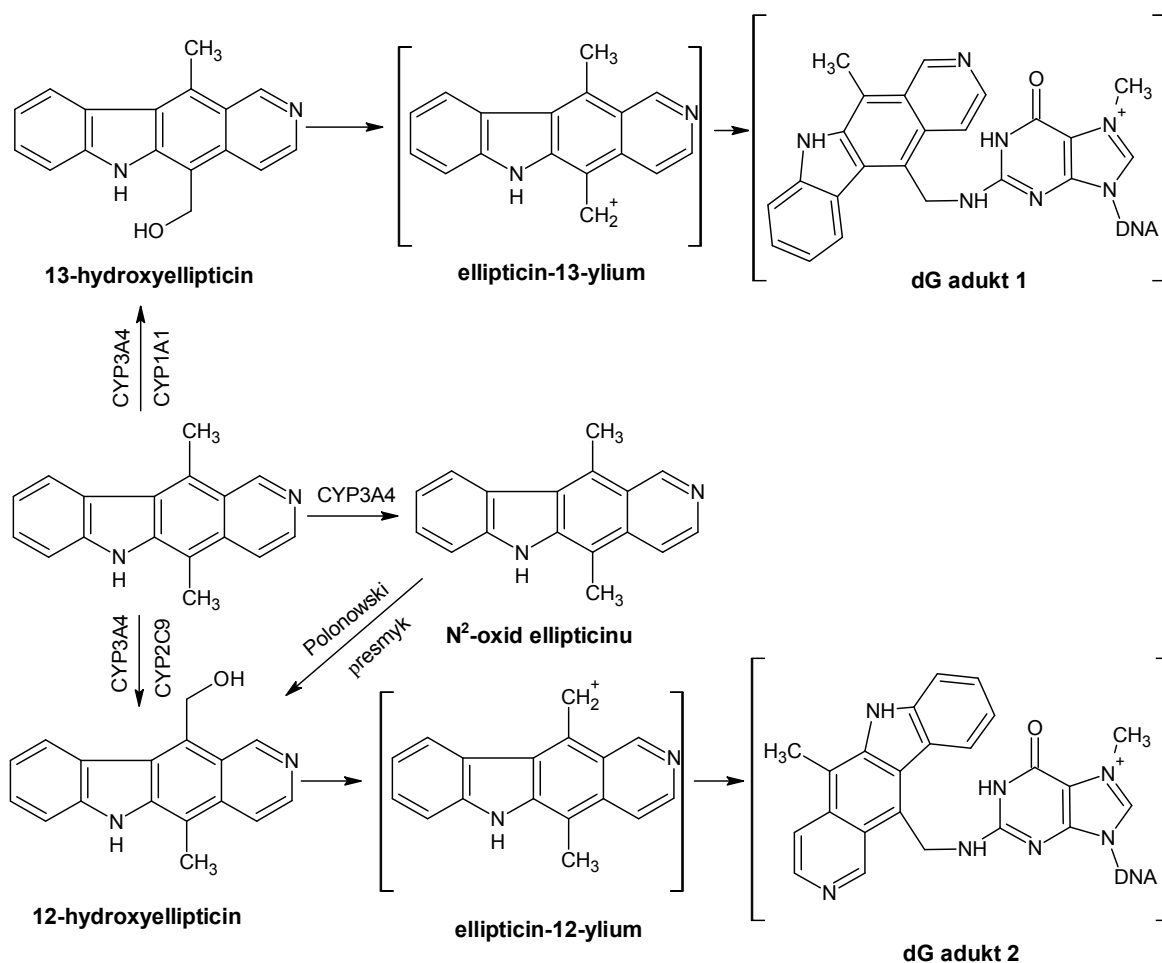


Obrázek 16: Autoradiografie aduktů 1, 2 ellipticinu s DNA detekované metodou „<sup>32</sup>P-postlabeling“. Adukty byly pozorovány po aktivaci cytochromy P450 u potkana (A), králíka (B) člověka (C) a bez enzymové aktivace (D) [61]

Metabolity, které tvoří adukty s DNA jsou 13-hydroxyellipticin a 12-hydroxyellipticin, případně N<sup>2</sup>-oxid ellipticinu, který podléhá Polonowskiho přesmyku za vzniku 12-hydroxyellipticinu. 13-hydroxyellipticin se váže na DNA prostřednictvím kovalentní vazby a vytváří adukt 1 (majoritní), zatímco 12-hydroxyellipticin vytváří adukt 2 (minoritní). Cílovým deoxynukleotidem v DNA je deoxyguanosen (Obrázek 17).

**Ellipticin-13-ylum** a **ellipticin-12-ylum** jsou předpokládanými reaktivními agens (kapitola 2.4.1), které jako reaktivní karbeniové ionty vytvářejí kovalentní vazbu s amino skupinou guaninu v DNA [48,59]. Enzymy, které se podílejí na aktivaci ellipticinu na metabolity, které později vytvářejí adukty s DNA, jsou cytochromy P450 a peroxidázy (kapitola 2.4.1/2).

Adukty ellipticinu s DNA byly detekovány jak v nádorových buňkách, tak v buňkách zdravých. To znamená, že by ellipticin mohl vykazovat ve zdravé tkáni genotoxický efekt. Proto bylo nutné zjistit, jak závisí genotoxický efekt na množství dávky ellipticinu, a jaká je perzistence aduktů ve zdravých buňkách. Experimenty byly provedeny za využití modelu laborantního potkana, který byl vystaven působení ellipticinu [33]. Jenom malé množství některých aduktů (adukt 1, 2, 4, 5) zůstávalo v necílových (zdravých) analyzovaných tkáních [33]. Zdravé tkáně mají tedy efektivní opravný systém, který eliminuje potenciální genotoxický účinek ellipticinu při léčbě ellipticinem.



Obrázek 17: Oxidace ellipticinu CYP na metabolity, které tvoří adukty s DNA. Sloučeniny v závorkách nebyly doposud experimentálně potvrzeny (upraveno podle 62)

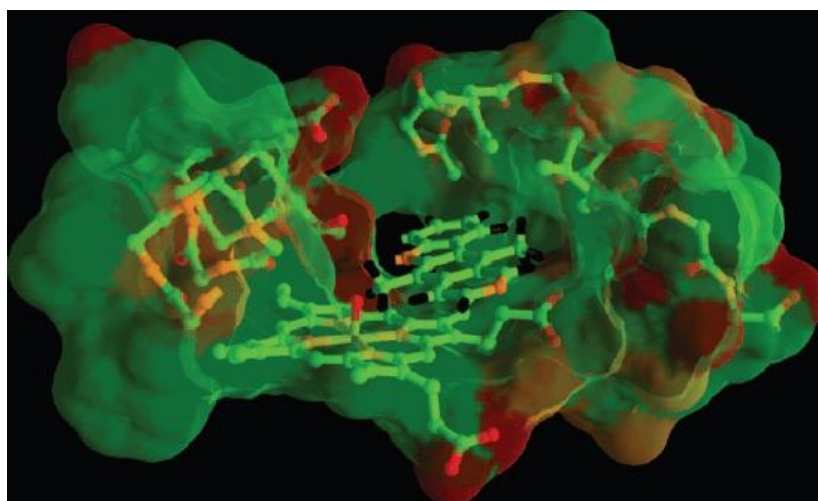
#### 4.4.1 Mechanismus oxidace ellipticinu katalyzované cytochromy P450

Na oxidaci ellipticinu na aktivační a detoxikační metabolity se podílí více isoformem CYP. K stanovení jednotlivých isoformem CYP, bylo použito více metod: selektivní inhibitory jednotlivých cytochromů P450, purifikované cytochromy P450 rekonstituované s NADPH:CYP reduktázou, korelace aktivity jednotlivých cytochromů P450 v lidských jaterních mikrosomech s množstvím vznikajících metabolitů [48,63]. Z lidských CYP se na detoxikaci ellipticinu podílí CYP1A1, 1A2, 1B1 a na aktivaci CYP3A4, 2C9, 2D6 a 1A2 (*kapitola 2.2*). V organismu člověka a potkana dochází k aktivaci orthologními formami CYP, přesněji CYP3A4, CYP3A1 a CYP1A1/2, v organismu králíka pak především CYP2C3 (králíčí CYP3A6 se na aktivaci podílí v minimální míře) [50,61]. Tyto výsledky potvrzuje, že laboratorní potkan je vhodným modelem pro sledování osudu tohoto léčiva v lidském organismu.

CYP3A4, který se vyskytuje hlavně v lidských jaterních buňkách, oxiduje ellipticin zejména na 13-hydroxyellipticin a N<sup>2</sup>-oxid ellipticinu. Důležitost CYP3A4 pro tvorbu těchto metabolitů byla potvrzena molekulovým modelováním (*Obrázek 18*) [48].

CYP1A1 a CYP1A2 oxidují ellipticin na 7-hydroxyellipticin a 9-hydroxyellipticin. Oxidují ellipticin také na 13-hydroxyellipticin a N<sup>2</sup>-oxid ellipticinu, ale v tomto případě jsou to minoritní produkty. V experimentech s lidskými jaterními mikrosomy a lidskými rekombinantními CYP se potvrdilo, že množství vytvořeného 12-hydroxyellipticinu rekombinantními CYP je nízké oproti jeho množství tvořeného v mikrosomech, které je srovnatelné s množstvím 9-hydroxyellipticinu. To potvrzuje, že je 12-hydroxyellipticin v lidských jaterních mikrosomech tvořen také neenzymaticky, a to z N<sup>2</sup>-oxidu ellipticinu Polonowskiho přesmykem (*Obrázek 15, str. 20*) [48].

Toxický efekt ellipticinu vůči nádorovým buňkám koreluje s množstvím DNA aduktů, jejich vznik je závislý na expresi CYP v těchto buňkách. Ellipticin je proto považován za „pro-léčivo“, jehož farmakologická účinnost závisí na enzymové aktivaci v cílové tkáni [48].



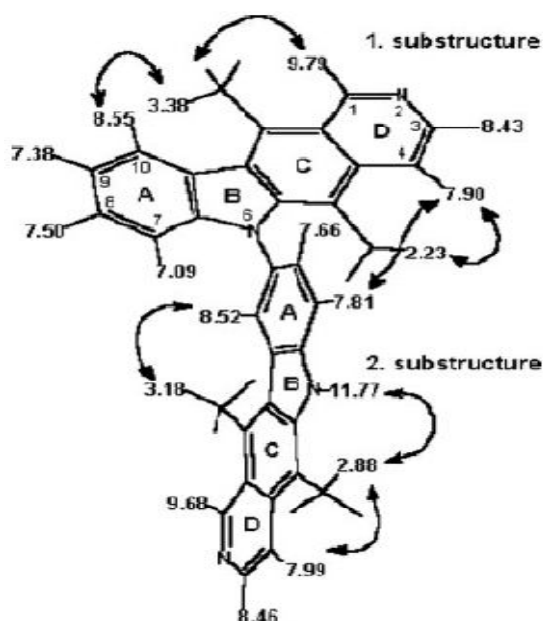
Obrázek 18: CYP3A4 s molekulou ellipticinu v aktivním centru. Vodík methylové skupiny C-13 ellipticinu je lokalizovaný v těsné blízkosti k Fe<sup>3+</sup>[48]

#### 4.4.2 Mechanismus oxidace ellipticinu katalyzované peroxidázami

Kromě oxidace ellipticinu cytochromy P450, bylo zjištěno, že ellipticin je oxidován peroxidázami. Zatímco CYP enzymy jsou exprimovány hlavně v prsních a ledvinných nádorových tkáních, v jiných nádorových buňkách je jejich množství řádově nižší.

Například pro leukemické buňky HL-60 je ellipticin cytotoxický, i když je množství CYP exprimované v těchto buňkách nízké. Tento fakt se dá vysvětlit právě přítomností peroxidáz (myeloperoxidáza - MPO), které jsou zodpovědné za oxidaci ellipticinu. Ellipticinu je oxidován řadou peroxidáz: lidskou cyclooxygenázou 2 (COX-2), ovčí COX-1, hovězí laktoperoxidázou LPO, lidskou myeloperoxidázou MPO a rostlinnou peroxidáza křenu selského (HRP) [58,60].

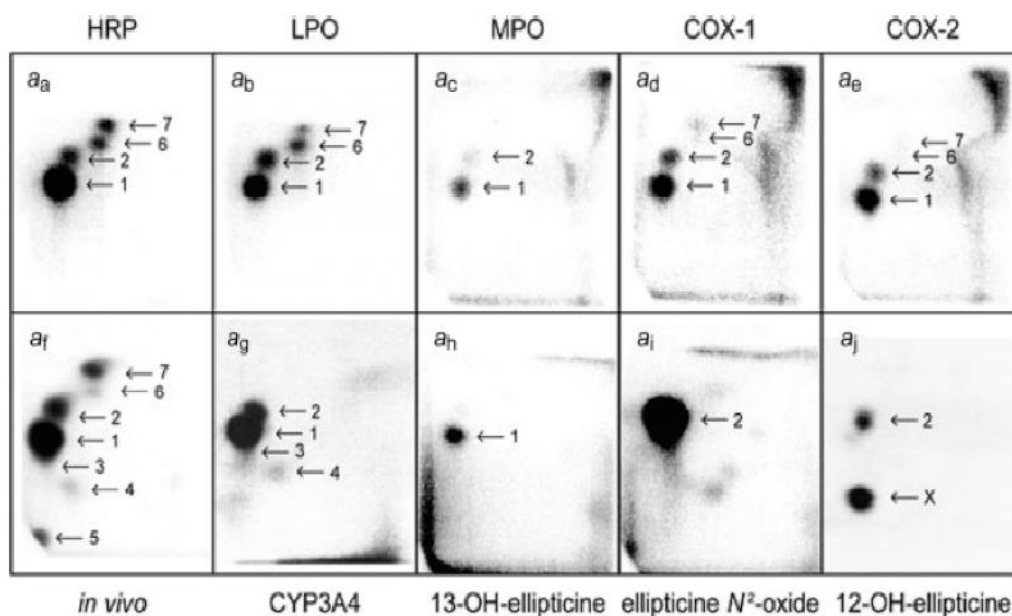
Ellipticin je peroxidázami oxidován radikálovým mechanismem za vzniku 2 metabolitů (Obrázek 21, str. 26). Tyto metabolity byly identifikovány za použití NMR spektroskopie. **Hlavní produkt** oxidace je dimer ellipticinu (Obrázek 19), ve kterém jsou 2 molekuly ellipticinu spojeny prostřednictvím N<sup>6</sup> pyrrolového kruhu jednoho skeletu ellipticinu a C9 druhého. **Minoritní produkt** je N<sup>2</sup>-oxid ellipticinu podobně jako produkt oxidace ellipticinu cytochromy P450. Metabolity ellipticinu tvořené po aktivaci peroxidázami se kovalentně váží na DNA. Adukt s DNA tvořené tímto způsobem jsou shodné s těmi, které jsou generovány z metabolitů (13-hydroxy- a 12-hydroxyellipticin) tvořených CYP (Obrázek 20) [60].



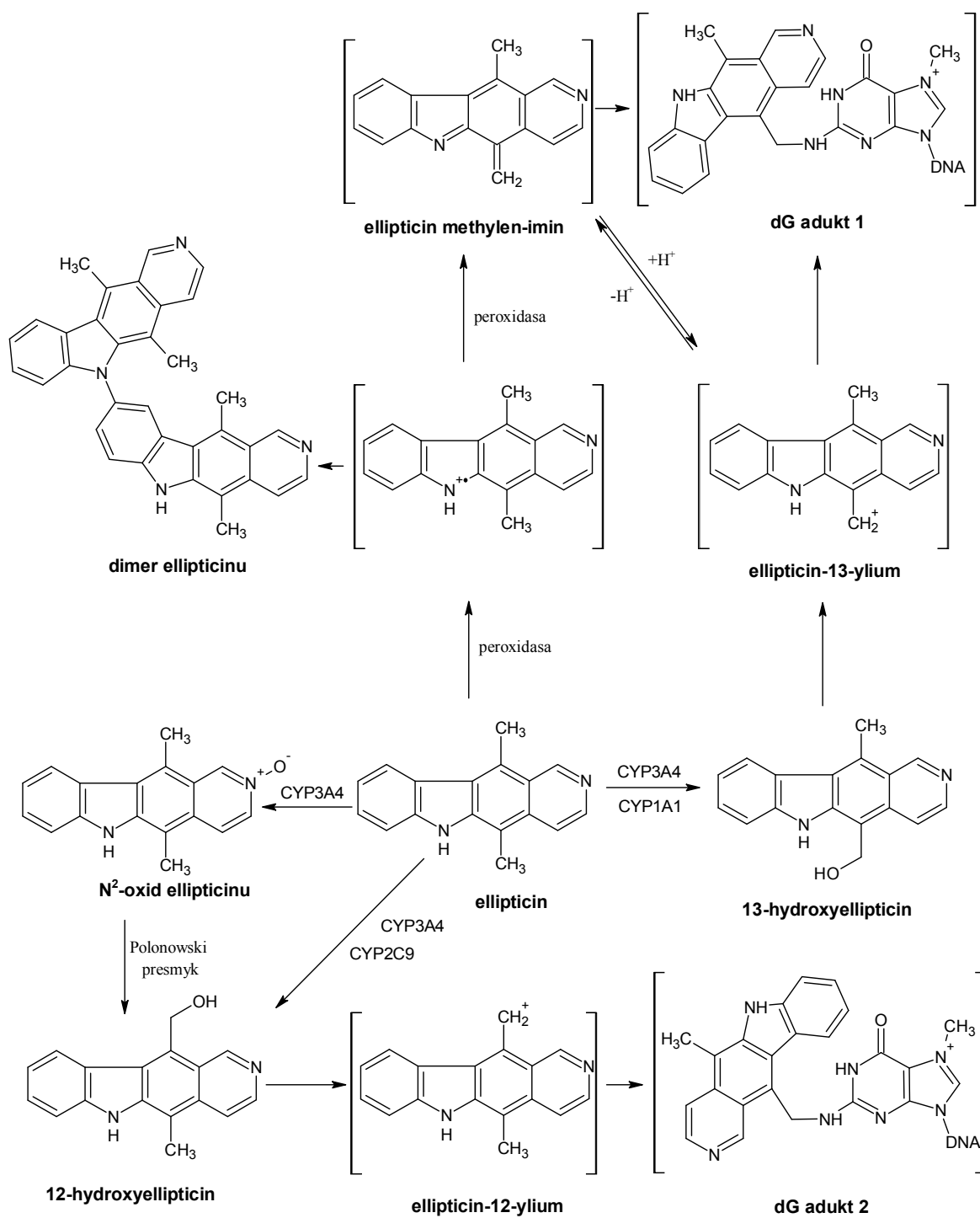
Obrázek 19: Struktura dimeru ellipticinu tvořeného peroxidázami [60]

Vedle 2 hlavních aduktů aktivovaného ellipticinu s DNA vznikají další 2 minoritní – adukty 6,7 (Obrázek 20). *In vivo* byly pozorovány také adukty 3-5, které ale nebyly detekovatelné v systémech peroxidáz.

Mechanismus tvorby aduktů ellipticinu aktivovaného peroxidázami je uveden na obrázku 21. I když metabolit methylen-imin, nebyl v experimentálních podmínkách prokázán, zdá se, že je právě tento metabolit zodpovědný za tvorbu aduktu 1. Tato skutečnost byla potvrzena i kinetickými studiemi na základě stechiometrie mezi ellipticinem a  $H_2O_2$ . Totožnost aduktu 1 generovaného z 13-hydroxyellipticinu enzymy CYP s aduktem 1 v reakci katalyzované peroxidázami umožňuje předpovědět strukturu metabolitu ellipticinu, který odpovídá methylen-iminu ellipticinu. Tímto reaktivním metabolitem je karbeniový ion **ellipticine-13-ylum**. Michaelovskou adicí potom vzniká z methylen-iminu ellipticinu adukt totožný s aduktem generovaným karbeniovým ionem. 13-hydroxyellipticin je tedy prekursorem tvorby methylen-iminu ellipticinu (Obrázek 21) [60].



Obrázek 20: Autoradiografie aduktů ellipticinu s DNA detekované metodou „ $^{32}P$ -postlabeling“. Adukty byly tvořeny s ellipticinem po aktivaci HRP (a), hovězí LPO (b), lidskou MPO (c), ovčí COX-1 (d), lidskou COX-2 (e), v jaterní DNA potkana vystaveného ellipticinu (f) a v DNA vystavené působení ellipticinu aktivovaného CYP3A4 (g), 13-hydroxyellipticinu (h),  $N^2$ -oxidu ellipticinu (i) a 12-hydroxyellipticinu (j) [60]



Obrázek 21: Oxidace ellipticinu peroxidázami a lidskými CYP na metabolity, které poskytují adukty s DNA. Sloučeniny v závorkách nebyli doposud experimentálně potvrzeny (upraveno podle 62)

# 5 Možnosti potenciace protinádorového účinku ellipticinu

Detailní poznání mechanismu účinku ellipticinu včetně enzymů participujících na metabolických přeměnách je důležité pro studium možností potenciace jeho farmakologického účinku a snížení jeho vedlejších účinků. Skutečnost, že ellipticin funguje jako „pro-léčivo“, jež je v cílové tkáni metabolicky aktivováno, poskytuje několik možností jak modulovat jeho účinek. První z nich vychází z participace cytochromů P450 a peroxidáz na metabolické aktivaci ellipticinu. Cytochromy P450 mohou být indukovány ellipticinem nebo jinými látkami, čímž dojde ke zvýšené genové exprese a tím ke zvýšené produkci CYP (*kapitola 3.1*) [64,65]. Druhá z možností je cílený transport ellipticinu a jeho účinnějších metabolitů do nádorových buněk ve formě konjugátů nebo cílených transportních vezikul – micel (*kapitola 3.2/3*).

## 5.1 Indukce cytochromů P450 metabolizujících ellipticin

Z kapitol 2.4.1/2, které se zabývají mechanismem tvorby kovalentních aduktů ellipticinu s DNA vyplývá, že exprese enzymů participujících na tomto procesu je klíčová pro protinádorový účinek ellipticinu. Enzymy, které se podílí na metabolické aktivaci ellipticinu v největší míře jsou CYP3A4 v lidských mikrosomech a orthologní CYP3A1 u potkanů (*Obrázek 15*) [48,57]. Nicméně v experimentech *in vivo* za použití potkana kmene Wistar bylo prokázáno, že vysoce účinný je i CYP1A, zatímco *in vitro* je mnohem méně aktivní [47,57,65]. Jeden z důvodů může být indukce CYP1A samotným ellipticinem [65]. Ellipticin se naváže do AhR (angl. aryl hydrocarbon receptor), dojde k jeho přesunu z cytosolu do jádra, kde se dimerizuje s ARNT (angl. aryl hydrocarbon nuclear translocator). Komplex AhR-ARNT, který funguje jako transkripční aktivátor, se naváže do regulační oblasti genů pro CYP1A, a tím se stimuluje jejich transkripce [64,65]. Indukce CYP1A ellipticinem vede k zvýšené transkripci mRNA a následnému zvýšení exprese proteinu [65]. Tím dochází ke zvýšené metabolické aktivitě CYP1A1 a produkci aktivních metabolitů 12-hydroxy- a 13-hydroxyellipticinu, ze kterých jsou tvořeny adukty s DNA.

Na druhé straně CYP1A kromě oxidace ellipticinu na aktivní metabolity, oxiduje tuto látku na 7-hydroxy a 9-hydroxyellipticin, které jsou detoxikačními metabolity ellipticinu, a které dál postupují do konjugačních reakcí a jsou z organismu vylučovány (*Obrázek 13*) [65]. Ellipticin může tímhle způsobem do určité míry modulovat jeho farmakologický a/nebo genotoxický potenciál [65].

## 5.2 Cíleně směřované deriváty ellipticinu

Ellipticin patří mezi léčiva, která jsou z těla organismu rychle vylučována a dlouhodobá expozice způsobuje nežádoucí účinky. Jedna z možností jak zvýšit účinek ellipticinu a alespoň částečně zamezit nežádoucím účinkům je jeho cílené směřování. Principy cílené terapie a její výhody jsou uvedené v kapitole 1.4.4. Navázáním ellipticinu na nosič, který obsahuje specifickou látku – determinantu – vzniká **konjugát**. Determinanta je molekula, která je schopná rozpoznat povrchový receptor nádorové buňky a zacílit konjugát k tomuto receptoru [46]. Na to, aby byl konjugát úspěšný a kancerostatikum (ellipticin) vyvolalo cílený účinek, musí tento komplex splňovat určité podmínky:

- **Množství receptoru** – receptor, ke kterému je konjugát směřován, musí být v cílové nádorové tkáni v dostatečném zastoupení a afinita determinanty musí být dostatečně vysoká k tomu receptoru.
- **Recyklovatelnost receptoru** – receptor pracuje jako pumpa. Po rozštěpení konjugátu se receptor musí vrátit na povrch buňky, kde je připraven pro navázání další molekuly konjugátu.
- **Stabilita konjugátu** – konjugát musí být stabilní, aby byl schopný transportu až do cílové tkáně, na druhé straně musí být lehko hydrolyzován pro uvolnění farmaka.
- **Toxicita** – účinná látka musí být dostatečně toxická v nádorové tkáni.
- **Neimunogenita** – konjugát nesmí vykazovat imunogenní vlastnosti [46].

Determinanty těchto konjugátů bývají hlavně růstové faktory, cytokiny, peptidové hormony nebo lektiny, pro které jsou receptory v nádorových tkáních hojně zastoupeny. Jako determinanty je možné využít nízko- i vysokomolekulární látky, které jsou nezbytné pro nádorové buňky (růst, proliferaci).

Aby byla účinnost konjugátů ještě vyšší, byla v řadě dříve realizovaných studií molekula ellipticinu derivatizována. Ellipticin má ve své molekule (*Obrázek 14*) dvě místa,

kam lze zavést funkční skupiny pro zvýšení hydrofilní povahy ellipticinu a zvýšení protinádorového účinku. Je to v poloze 9 na uhlíku a v poloze 2 na dusíku. Patří sem deriváty 9-methoxyellipticin, 9-chloroellipticin a 9-hydroxy-2-methylellipticinium acetát, 9-methoxy-2-methylellipticinium acetát a 9-chlor-2-methylellipticinium acetát. Zavedením methylové nebo hydroxy skupiny do druhé polohy vzniká na dusíku kladný náboj, proto se tyto deriváty využívají ve formě acetátů. K lepšímu transportu přes membránu přispívá, v tomto případě, také konjugace s hydrofobními aminokyselinami. Tyto konjugáty však vykazují nižší protirakovinnou účinnost [46].

Již několik konjugátů ellipticinu bylo připraveno a testováno v cílené terapii [46]. Některé z nich (konjugát ellipticinu a 9-hydroxy-ellipticinu s enkefaliny, a s estradiolem) však nesplnili podmínky pro konjugáty [46,66]. Proto se jimi v této kapitole nebudu podrobně zabývat. Jako terapeuticky nadějně se zdají být následující konjugáty ellipticinu:

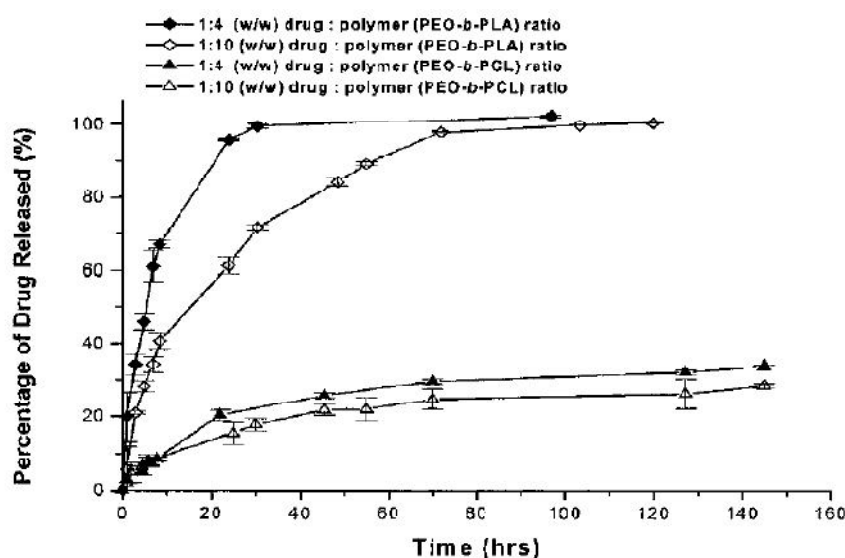
- **Konjugát ellipticinu s heptagstrinem** – konjugát C-terminálního heptapeptidu gastrinu (heptagastrin Ala-Tyz-Gly-Trp-Nile-Asp-Phe-HN<sub>2</sub>) a derivátu ellipticinu (1[3-[N-(3aminopropyl-N-methylamino)propyl]amino-(9-methoxyellipticin))).  
Hormon gastrin stimuluje růst některých gastrointestinálních nádorů. Receptor pro tento hormon je spojený s G proteinem. Pro vazbu gastrinu na receptor je nezbytný C-terminální tetrapeptid. Ellipticin je v konjugátu vázán v poloze 2 na dusík. Konjugát se váže na receptory v NHI/3T3 buňkách. Receptor je zpětně dobře recyklován. Ellipticin je uvolněný z konjugátu po rozštěpení lysosomálními enzymy [46].
- **Konjugát ellipticinu s lidským sérovým albuminem** – konjugát HSA-ellipticin. Sérový albumin je vysokomolekulární protein o molekulové hmotnosti 66 500 [46]. Velkou výhodou konjugátů s vysokou molekulovou hmotností je, že jejich koncentrace v nádorech je několikrát vyšší než volného léčiva. Jedná se o tzv. pasivní směřování – EPR efekt (*kapitola 1.8.1*). Konjugát ellipticinu s HSA však vykazuje i aktivní směřování. Jak bylo uvedeno, nádorové buňky vyžadují větší množství albuminu než buňky zdravé. Efektivně tedy transportuje i albuminový konjugát. Tento typ konjugátu splňuje i další podmínky potřebné pro to, aby byl efektivní (neimunogenicita, snadná degradace, snadno dostupný a stabilní). Konjugát byl použitý v leukemických buňkách (Nalm6), kde vykazoval vysokou selektivitu. V buňkách byl snadno hydrolyzován na volný ellipticin, který pak byl pro buňku cytotoxický [46].

- **Konjugát ellipticinu s vazoaktivním střevním peptidem (VIP)** – konjugát (VIP) s tetrapeptidem ellipticinu (LALA-ellipticin) nebo s pentapeptidem (ALALA). VIP je peptid, který funguje jako růstový faktor v centrálním nervovém systému. VIP se specificky váže na receptor VPAC<sub>1</sub> a VPAC<sub>2</sub>. Tyto receptory se nacházejí v plicních nádorových buňkách (NCI-H129). Navázáním VIP na receptor se spouští signální kaskáda, na konci které je zvýšena exprese onkogenů, zatímco navázáním konjugátu VIP-ellipticin na receptor se inhibuje proliferace nádorových buněk a dochází k snížení jejich životaschopnosti. Výhodou komplexu peptid-léčivo je, že výsledný konjugát je proléčivo. Konjugát je po vstupu do buňky rozštěpen proteázami a ellipticin může aktivně působit na nádorovou buňku [67].
- **Konjugát ellipticinu s N-(2-hydroxypropyl)methakrylamidem (HMPA)** – konjugát 6-(3-aminopropyl)-ellipticinu s HMPA. Navázáním derivátu ellipticinu na HMPA se značně zvýšila jeho rozpustnost. HMPA-ellipticin kopolymery byly v testech *in vitro* (v melanomu B16F10) 75 krát méně toxické než volné léčivo. Naproti tomu v testech *in vivo* (myši melanom B16F10) vykazovali konjugáty vyšší aktivitu než volný ellipticin [68].
- **Konjugát ellipticinu se sacharidy** – bylo prokázáno, že cukerná složka, která je vázána v poloze 2 na dusík, zvyšuje účinnost ellipticinu. Tyto konjugáty byly použity v leukemických buňkách (P388, L1210), kde vykazovaly vyšší účinnost než volný ellipticin. Mechanismus účinku a cílové receptory však nebyly doposud studovány [46].
- **Konjugát ellipticinu s lipoproteiny** – komplex lipoproteinu s nízkou hustotou-LDL a 9-hydroxy-2-methylellipticinu ve formě acetátu. Pro lepší inkorporaci ellipticinu do LDL byl připraven ester kyseliny olejové s hydroxylovou skupinou v poloze 9. LDL jsou nevyhnutné pro syntézu cholesterolu, který je potřebný pro tvorbu buněčných membrán v nádorových buňkách. Nádorové buňky obsahují receptory pro LDL, proto se jeví jako vhodné využít tento komplex. Komplex byl transportován do buněk (za využití myších melanomů B16) endocytosou a jeho cytotoxicita byla vyšší než u volného léčiva [46].

### 5.3 Micely s inkorporovaným ellipticinem

Blokové kopolymerní micely jsou supramolekulární transportní systémy, které byly navrženy pro transport zejména hydrofobních léků. Micely umožňují kontrolovat rychlost a množství uvolněného léčiva a zacílit léčivo do místa jeho působení. Hydrofobní micelární jádro slouží jako rezervoár pro inkorporované hydrofobní léčivo, zatímco hydrofilní obálka chrání a odděluje jádro od externího prostředí (*kapitola 1.8.1*). Tyto systémy byly studovány jako transportní systémy pro mnoho protinádorových léčiv (paklitaxel, doxorubicin, ellipticin) [69,70] a ukázalo se, že jsou vhodné nejen pro transport, ale po navázání specifických determinantů i pro jejich cílení do nádorových tkání. S ellipticinem byly studovány 4 micelární formy:

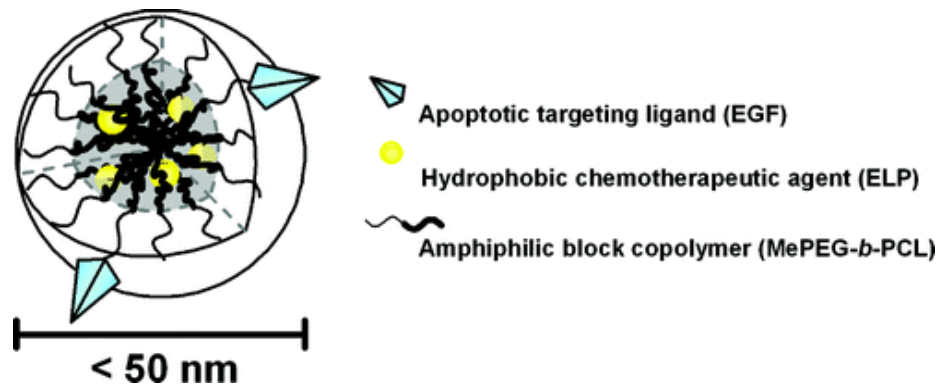
- **PEO<sub>5000</sub>-b-PCL<sub>4000</sub> micely** – polyethylen oxid-*b*-polykaprolaktonové micely byly vybrané na základě různých parametrů (stabilita, velikost, rozpustnost, účinnost, rentgenové analýsy) jako nevhodnější transportní systém pro ellipticin. PEO má hydrofobní charakter proto tvoří jádro micely a hydrofilní PCL vytváří „obálku“. Pro vyhodnocení účinnosti micel byly použity dva parametry: absorpční účinnost a množství uvolněného léčiva. V experimentech se potvrdil předpoklad, že čím vyšší je stupeň interakce mezi jádrem micely a léčivem, tím pomaleji a rovnoměrněji se léčivo uvolňuje do prostředí. Pro porovnání byly připraveny **PEO<sub>5000</sub>-b-PLA<sub>2000</sub> micely**, které uvolňovaly ellipticin 100 % již po několika hodinách (*Obrázek 22*). [70].



Obrázek 22: Uvolňování ellipticinu z PEO<sub>5000</sub>-b-PCL<sub>4000</sub> a PEO<sub>5000</sub>-b-PLA<sub>2000</sub> micel. Koncentrace kopolymerů pro všechny micely je 1.5% (w/w) [70]

- **MePEG-b-PBTMC micely** - (polyethyleneglykol)-*b*-poly(5-benzyloxy-trimethylene)karbonátové micely. Tyto micely byly navrženy pro transport ellipticinu. MePEG-b-PBTMC micely mají 95 % účinnost v absorpci ellipticinu do hydrofobního jádra micely. V experimentálních přístupech bylo zkoumáno, jaký vliv má sérový protein – BSA (hovězí sérový albumin) na MePEG-b-PBTMC micely, protože interakce mezi sérovým proteinem a micelami mohou ovlivnit jejich transport. Bylo potvrzeno, že protein jen velmi slabě a nepodstatně interaguje s micelami. Nicméně sérový protein působí na micely prostřednictvím interakcí protein-léčivo. Cytotoxický účinek MePEG-b-PBTMC micel s inkorporovaným ellipticinem byl testován v lidských nádorových buňkách SKOV-3 v přítomnosti a absenci BSA. V přítomnosti BSA se hodnota  $IC_{50}$  micel s ellipticinem snížila z 6,1  $\mu\text{M}$  bez BSA na 4,9  $\mu\text{M}$ . Zvýšená účinnost léku v přítomnosti BSA pravděpodobně vychází ze schopnosti proteinu urychlovat uvolňování ellipticinu z micelární formy. Po 24 hodinách je z micel bez přítomnosti BSA uvolněno 32% ellipticinu z celkového množství absorbovaného v micelách a v jeho přítomnosti takřka 60% [69].
- **EGF micely** – jsou vyrobeny z amfifilních blokových kopolymerů MePEG-*b*-PCL. Hydrofobní jádro je tvořeno PCL a hydrofilní obálka PEG (*Obrázek 23*). EGF micely byly použity ve dvou typech prsních nádorových buněk MDA-MB-468 ( $10^6$  EGFR na buňku) a MCF-7 ( $10^4$  EGFR na buňku). Fungují jako cílený transportní systém pro dvě terapeuticky účinné látky a působí apopticky na nádorové buňky se zvýšenou expresí EGFR. Tento efekt je připisován apoptické povaze EGF a byl pozorován také u micel bez obsahu ellipticinu. Volné micely zastavují buněčný cyklus nádorových buněk v  $G_1$  fázi a následně indukují apoptózu. V experimentálních podmínkách byl testován i samotný EGF, který vykazoval 13 krát menší účinnost než EGF-micely. Specificky cílené EGF micely nevykazují téměř žádnou toxicitu vůči normálním buňkám s nízkým obsahem EGFR. Ze získaných experimentálních výsledků je zřejmé, že micely s EGF jsou mnohem efektivnější v inhibici růstu nádorových buněk MB-468. Kombinace aktivně směřovaných micel s obsahem protinádorového léčiva vede ke snížení hodnoty  $IC_{50}$  (poloviční maximální inhibiční koncentrace), k prodloužené cirkulaci v cílové tkáni, poskytuje souvislé uvolňování léčiva a vede k synergické inhibici růstu v buňkách

se zvýšenou expresí EGFR. U EGF-micel byl pozorován tzv. „**bystander effect**“. Tento efekt způsobuje, že buňky v těsné blízkosti cílových buněk pro micely s EGF mají sníženou životaschopnost. Mechanismus tohoto efektu vychází z intercelulárních interakcí, buněčné komunikace a/nebo z uvolnění cytosinů do okolního média [16].



Obrázek 23: Blokovaná kopolimerní micela s elliptinem uvnitř hydrofobního jádra a navázaným apoptickým ligandem EGF na hydrofilním povrchu micely [16]

## 6 Závěr

Ellipticin je alkaloid, který vykazuje značné protinádorové účinky. Ellipticin funguje jako „pro-léčivo“, jehož protinádorová účinnost a/nebo vedlejší genotoxický efekt je závislý na enzymové aktivaci cytochromy P450 a peroxidázami. Ellipticin je oxidován na aktivní metabolity 12-hydroxy- a 13-hydroxyellipticin. Tyto metabolity se spontánně rozpadají na reaktivní karbéniové ionty, ellipticin-12-ylidium a ellipticin-13-ylidium, které se kovalentně vážou na deoxyguanosin v DNA. Tyto reaktivní ionty by tedy mohly být vhodné jako léčiva pro cílení do nádorových tkání [71].

Detailní poznání mechanismu účinku ellipticinu umožnilo studovat možnosti potenciace jeho farmakologického účinku a snížení vedlejších účinků. První z nich vychází z možnosti indukovat účinek cytochromů P450 a peroxidáz genovou expresí [71]. Samotný ellipticin se váže na nukleární receptor AhR, který podmiňuje zvýšení transkripce genů pro CYP1A1/2 [65]. Takovým způsobem může sám ellipticin modulovat svou farmakologickou účinnost a/nebo genotoxický efekt. Druhá z možností je cílený transport ellipticinu do nádorových buněk ve formě konjugátů, které mohou využít právě aktivní metabolity ellipticinu nebo využití cílených transportních vezikul – micel. Micela jako dávkovací forma systematického podávání ellipticinu umožňuje transport hydrofobního léčiva, prodlužuje jeho cirkulaci a hlavně je možné ji specificky zacílit do nádorové tkáně. Častokrát se v tomto případě využívá možnost kombinace dvou farmakologicky účinných látek. Hydrofobní léčivo (např. ellipticin) se naváže do hydrofobního jádra a na hydrofilní „obálku“ se připojí determinant (např. EGF), který zacílí micelu do specifické tkáně (např. se zvýšenou expresí EGFR) [16].

Cílená terapie přináší velký pokrok v možnostech léčby nejen rakovinných onemocnění. Proto je důležité ji dále studovat. Zejména je důležité zaměřit se na studium genové exprese enzymů participujících na metabolismu léčiv, na signální mechanismy vyvolané farmakologicky účinnými látkami a možnosti studia nových materiálů pro cílené transportní systémy [64].

# Literatura

- [1] World Health Organization [online]. 2009. Cancer. Dostupné z WWW: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/index.html>>. [cit. 2010-03-06].
- [2] Ústav zdravotnických informací a statistiky České republiky. Zhoubné nádory v roce 2006. ÚZIS ČR. 2009. s. 1-9. Dostupné z WWW: <<http://www.uzis.cz/download/file.php?file=3518>>. [cit. 2010-05-22].
- [3] MedicineNet [online]. 2010. Cancer. Dostupné z WWW: <<http://www.medicinenet.com/cancer/article.htm>>. [cit. 2010-03-07].
- [4] KOTRBOVÁ, V. Identifikace mikrosomálních cytochromů P450 jater potkana a králíka oxidujících ellipticin. Praha, 2005. Diplomová práce. Přírodovědecká fakulta. Univerzita Karlova.
- [5] STRATIL, P.; KUBÁŇ, V. Princip karcinogeneze a přírodní karcinogenní sloučeniny v potravinách. Chemické Listy. 2004, 98, s. 379–387.
- [6] MedicineNet [online]. 2010. Definition of cancer. Dostupné z WWW: <<http://www.medterms.com/script/main/art.asp?articlekey=2580>>. [cit. 2010-03-06].
- [7] Medscape [online]. 2007. Biology of aging and cancer: Multistage model of aging and carcinogenesis. Dostupné z WWW: <[http://www.medscape.com/viewarticle/553779\\_5](http://www.medscape.com/viewarticle/553779_5)>. [cit. 2010-03-21].
- [8] OLIVEIRA, P. A.; COLACO, A.; CHAVES, R.; GUEDES-PINTO, H.; DE-LA-CRUZ, P. F. L.; LOPES, C. Chemical carcinogenesis. Anais da Academia Brasileira de Ciências. 2007, 79, s. 593-616.
- [9] CHLÁDEK, J. Protinádorová chemoterapie. Přednáška. Dostupné z WWW: <[http://www.lfhk.cuni.cz/farmakol/predn/cz/2006/2006\\_2007-seminar-Chladek-protinadorova-chemoterapie.ppt](http://www.lfhk.cuni.cz/farmakol/predn/cz/2006/2006_2007-seminar-Chladek-protinadorova-chemoterapie.ppt)>. [cit. 2010-04-26].
- [10] JEMAL, A.; SIEGEL, R.; WARD M. E. Cancer facts & figures 2009. American Cancer Society. 2009, 1, s. 1-72.
- [11] Rakovina.aspone [online]. 2009. Rakovina. Dostupné z WWW: <<http://rakovina.aspone.cz/>>. [cit. 2010-03-07].
- [12] KLENER, P. Půl století protinádorové chemoterapie a její další perspektivy. Přednáška. Dostupné z WWW: <<http://uhkt.cz/files/svli/prezentace/01.ppt>>. [cit. 2010-03-21].
- [13] NYGREN, P. What is cancer chemotherapy?. Acta Oncologica. 2001, 40, s. 166–174.

- [14] ADAM, Z.; POUR, L.; VORLÍČEK, J.; HÁJEK, R.; KOPTÍKOVÁ, J.; ŠMARDOVÁ, J. Cílená léčba v onkologii. *Remedia*. 2005, 15, s. 390-404.
- [15] KLENER, P. Omezilo zavádění tzv. cílené léčby význam protinádorové chemoterapie?. *Onkologie*. 2008, 2, s. 33-37.
- [16] LEE, H.; HU, M.; REILLY, M. R.; ALLEN, Ch.. Apoptotic epidermal growth factor (EGF)-conjugated block copolymer micelles as a nanotechnology platform for targeted combination therapy. *Molecular Pharmaceutics*. 2007, 5, s. 769-781.
- [17] Protinádorová a podpůrná léčba. Přednáška. Dostupné z WWW: <<http://lf2.cuni.cz/info2lf/ustavy/fu/cytostat.pdf>>. [cit. 2010-03-21].
- [18] HAMPL, F.; PALEČEK, J. *Farmakochemie*. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2002.
- [19] THIRUMARAN R.; PRENDERGAST, C. G.; GILMAN, B. P. *Cancer Immunotherapy*. USA : Academic Press, 2007.
- [20] LULLMANN, H.; MOHR, K.; HEIN, L. *Barevný atlas farmakologie*. Praha: Grada, 2007.
- [21] MARTÍNKOVÁ, J.; CHLÁDEK, J.; MIČUDA, S.; CHLÁDKOVÁ, J. *Farmakologie pro studenty zdravotnických oborů*. Praha: Grada, 2007.
- [22] LULLMANN, H.; MOHR, K.; WEHLING, M. *Farmakologie a toxikologie*. překlad 15. zcela přepracovaného vydání. Grada: Praha, 2007.
- [23] KNEJZLÍK, Z.; KÁŠ, J.; RUML, T. Mechanismus vstupu xenobiotik do organismu a jejich detoxikace. *Chemické Listy*. 2000, 94, s. 913-918.
- [24] STIBOROVÁ, M. *Xenobiochemie*. Přednáška. 2010. Přírodovědecká fakulta. Univerzita Karlova.
- [25] HYNIE, S. *Xenobiochemie*. Přednáška. 2005. 1. lékařská fakulta. Univerzita Karlova. Dostupné z WWW: <<http://che1.lf1.cuni.cz/html/Xenobiochemie.pdf>>. [cit. 2010-04-26].
- [26] Biochemický ústav LF MU. Přednáška. 2006. Lékařská fakulta. Masarykova univerzita. Dostupné z WWW: <<http://is.muni.cz/el/1411/jaro2006/BVBC0322p/xenobiotika.06.ppt? fakulta=1411;obdobi =3282;kod=BVBC0322p>>. [cit. 2010-04-26].
- [27] Laboratoř biotransformace. *Xenobiochemie*. Přednáška. 2005. Olomouc. Dostupné z WWW: <[http://www.biomed.cas.cz/mbu/biotrans/vyuka\\_olomouc/xenobiochemie.doc](http://www.biomed.cas.cz/mbu/biotrans/vyuka_olomouc/xenobiochemie.doc)>. [cit. 2010-04-26].
- [28] STIBOROVÁ, M.; HUDEČEK, J.; HODEK, P.; FREI, E. Význam cytochromů P450 pro lidské zdraví. *Chemické Listy*. 1999, 93, s. 229-237.

- [29] ANZEBACHER, P.; ANZEBACHEROVÁ, E. Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2001, 58, s. 737–747.
- [30] Lékařská fakulta v Hradci Králové [online]. 2010. Cytochrom P450. Dostupné z WWW: <<http://www.lfhk.cuni.cz/farmakol/interakce/P450.htm>>. [cit. 2010-04-29].
- [31] GIRON, M. C.; PORTOLAN, S.; BIN, A.; MAZZI, U.; CUTLER C.S. Cytochrome P450 and radiopharmaceutical metabolism. *The Quarterly Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*. 2008, 3, s. 254-266.
- [32] Physical properties of P450 [online]. 1997. Theory of condensed matter. Dostupné z WWW: <<http://www.tcm.phy.cam.ac.uk/~mds21/thesis/node50.html>>. [cit. 2010-04-29].
- [33] STIBOROVÁ, M.; RUPERTOVIČ, M.; AIMOVÁ, D.; RYŠLAVÁ, H.; FREI, E. Formation and persistence of DNA adducts of anticancer drug ellipticine in rats. *Toxicology*. 2007, 236, s. 50–60.
- [34] Index of images [online]. 2002. Zoology. Dostupné z WWW: <[http://zoology.muohio.edu/oris/ZOO462/notes/images/03a\\_46203.jpg](http://zoology.muohio.edu/oris/ZOO462/notes/images/03a_46203.jpg)>. [cit.2010-04-29].
- [35] MATAJ, J.; ANZENBACHER, P.; OPAVSKÝ, J.. Možné interakce analgetik na úrovni jaterních mikrozomálních cytochromů P45. *Bolest*. 2009, 4, s. 193-201.
- [36] HOSEA, N. A.; MILLER, P. G.; GUENGERICH, P. F. Elucidation of distinct ligand binding sites for cytochrome P450 3A4. *Biochemistry*. 2000, 39, s. 5929-5939.
- [37] P450 [online]. 2001. Protein Gallery. Dostupné z WWW: <<http://www.p450.kvl.dk/gallery/CYP3A4.jpg>>. [cit. 2010-05-01].
- [38] MANHARTOVÁ, Z. Tvorba aduktů protinádorového léčiva ellipticinu s DNA v organizmu laboratorního potkana; srovnání volné a micelární formy léčiva. Praha, 2005. Diplomová práce. Přírodovědecká fakulta. Univerzita Karlova.
- [39] VOGELSON, C. T. Advances in drug delivery systems. *Modern Drug Discovery*. 2001, 4.
- [40] KARSA, D. R.; STEPHENSON, R. A. Chemical aspects of drug delivery systems . Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 1996.
- [41] LUKYANOV, A. N.; TORCHILIN, V. P. Micelles from lipid derivatives of water-soluble polymers as delivery systems for poorly soluble drugs. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2004, 56, s. 1273– 1289.
- [42] MATSUMURA, Y.; KATAOKA, K. Preclinical and clinical studies of anticancer agent-incorporating polymer micelles. *Cancer Science*. 2009, 4, s. 572–579.

- [43] KWON, G. S. Block copolymer micelles as drug delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2002, 54, s. 167.
- [44] JEONG, J.; CHOI, K. Y.; BAE, H. Y.; ZENTNER, G.; KIM, W. S. New biodegradable polymers for injectable drug delivery systems. *Journal of Controlled Release*. 1999, 62, s. 109–114.
- [45] Technologies [online]. 2010. WARF. Dostupné z WWW: <[www.warf.org/technologies.jsp?ipnumber=P07296US](http://www.warf.org/technologies.jsp?ipnumber=P07296US)>. [cit. 2010-05-03].
- [46] STIBOROVÁ, M.; FREI, E. Deriváty elipticinu s cíleným protinádorovým účinkem. *Chemické Listy*. 2001, 95, s. 549-555.
- [47] STIBOROVÁ, M.; BIELER, A. Ch.; WIESSLER, M.; FREI E. The anticancer agent ellipticine on activation by cytochrome P450 forms covalent DNA adducts. *Biochemical Pharmacology*. 2001, 62, s. 1675–1684.
- [48] STIBOROVÁ, M.; SEJBAL, J.; BOŘEK-DOHALSKÁ, L.; AIMOVÁ, D.; POLJAKOVÁ, J.; FORSTEROVÁ, K.; RUPERTOVÁ, M.; WIESNER, J.; HUDEČEK, J.; WIESSLER, M.; FREI, E. The anticancer drug ellipticine forms covalent DNA adducts, mediated by human cytochromes P450, through metabolism to 13-hydroxyellipticine and ellipticine  $N^2$ -oxide. *Cancer Research*. 2004, 64, s. 8374-8380.
- [49] STIBOROVÁ, M.; RUPERTOVÁ M.; SCHMEISER, H.; FREI, E. Molecular mechanisms of antineoplastic action of an anticancer drug ellipticine. *Biomedical Papers of the Medical Faculty of the University Palacký, Olomouc, Czechoslovakia*. 2006, 150, s. 13-23.
- [50] STIBOROVÁ, M.; BOŘEK-DOHALSKÁ, L.; AIMOVÁ, D.; KOTRBOVÁ, V.; KUKAČKOVÁ, K.; JANOUCHOVÁ, K.; RUPERTOVÁ, M.; RYŠLAVÁ, H.; HUDEČEK, J.; FREI, E. Oxidation pattern of the anticancer drug ellipticine by hepatic microsomes – similarity between human and rat systems. *General Physiology and Biophysics*. 2006, 25, 245-261.
- [51] TEWEY, K. M.; CHEN, L. G; NELSON, M. E.; LIU, F. L. Intercalative antitumor drugs interfere with the breakage-reunion reaction of mammalian DNA topoisomerase II. *The Journal of Biological Chemistry*. 1984, 259, s. 9182-9187.
- [52] MULTON, E.; RIOU, J.; LeFEVRE, D.; AHOMADEGBE, J.; RIOU, G. Topoisomerase II-mediated DNA cleavage activity induced by ellipticines on the human tumor cell line N417. *Biochemical Pharmacology*. 1989, 38, s. 2077-2086.

- [53] OHASHI, M.; SUGIKAWA, E.; Nakanishi, N. Inhibition of p53 protein phosphorylation by 9-hydroxyellipticin: A possible anticancer mechanism. *Japanese Journal of Cancer Research*. 1995, 86, s. 819-827.
- [54] SCHWALLER, M.; ALLARD, B.; LESCOT, E.; MOREAU, F. Protonophoric activity of ellipticine and isomers across the energy-transducing membrane of mitochondria. *The Journal of Biological Chemistry*. 1995, 270, s. 22709–22713.
- [55] FREI, E.; ARLT, M. V.; WIESSLER, M.; STIBOROVÁ, M. Covalent binding of the anticancer drug ellipticine to DNA in V79 cell transfected. *Biochemical Pharmacology*. 2002, 64, s. 289-295.
- [56] POLJAKOVÁ, J.; FREI, E.; GOMEZ, E. J.; AIMOVÁ, D.; ECKSCHLAGER, T.; HRABĚTA, J.; STIBOROVÁ, M. DNA adduct formation by the anticancer drug ellipticine in human leukemia HL-60 and CCRF-CEM cells. *Cancer Letters*. 2007, 252, s. 270–279.
- [57] STIBOROVÁ, M.; BREUER, A.; AIMOVÁ, D.; STIBOROVÁ-RUPERTOVÁ, M.; WIESSLER, M.; FREI, E. DNA adduct formation by the anticancer drug ellipticine in rats determined by <sup>32</sup>P poslabeling. *International Journal of Cancer*. 2003, 107, s. 885–890.
- [58] POLJAKOVÁ, J.; ŠULC, M.; FREI, E. STIBOROVÁ, M. Oxidation of an antitumor drug ellipticine by peroxidases. *Biomedical Papers of the Medical Faculty of the University Palacký, Olomouc, Czechoslovakia*. 2005, 149, s. 449-453.
- [59] POLJAKOVÁ, J.; ECKSCHLAGER, T.; HRABĚTA, J.; HŘEBAČKOVÁ, J.; SMUTNÝ, S.; FREI, E.; MARTÍNEK, V.; KIZEK, R.; STIBOROVÁ, M. The mechanism of cytotoxicity and DNA adduct formation by the anticancer drug ellipticine in human neuroblastoma cells. *Biochemical Pharmacology*. 2009, 77, s. 1466-1479.
- [60] STIBOROVÁ, M.; POLJAKOVÁ, J.; RYŠLAVÁ, H.; DRAČÍNSKÝ, M.; ECKSCHLAGER, T.; FREI, E. Mammalian peroxidases activate anticancer drug ellipticine to intermediates forming deoxyguanosine adducts in DNA identical to those found in vivo and generated from 12-hydroxyellipticine and 13-hydroxyellipticine. *International Journal of Cancer*. 2007, 120, s. 243–251.
- [61] STIBOROVÁ, M.; STIBOROVÁ-RUPERTOVÁ, M.; BOŘEK-DOHALSKÁ, L.; WIESSLER, M.; FREI, E. Rat microsomes activating the anticancer drug ellipticine to species covalently binding to deoxyguanosine in DNA are a suitable model mimicking ellipticine bioactivation in humans. *Chemical Research in Toxicology*. 2003, 16, 38-47.

- [62] STIBOROVÁ, M.; ARLT, M. V.; HENDERSON, J. C.; WOLF, R. C.; KOTRBOVÁ, V.; MOSEROVÁ, M.; HUDEČEK, J.; PHILLIPS, D.; FREI, E. Role of hepatic cytochromes P450 in bioactivation of the anticancer drug ellipticine: Studies with the hepatic NADPH: Cytochrome P450 reductase null mouse. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2008, 226, s. 318–327.
- [63] MOSEROVÁ, M. Studium molekulárního mechanismu protinádorového léčiva ellipticinu. Praha. 2007. Diplomová práce. Přírodovědecká fakulta. Univerzita Karlova.
- [64] RUSHMORE, T. H.; KONG, A. T. Pharmacogenomics, regulation and signaling pathways of phase I and II drug metabolizing enzymes. *Current Drug Metabolism*. 2002, 3, s. 481-490.
- [65] AIMOVÁ, D.; SVOBODOVÁ, L.; KOTRBOVÁ, V.; MRÁZOVÁ, B.; HODEK, P.; HUDEČEK, J.; VÁCLAVÍKOVÁ, R.; FREI, E.; STIBOROVÁ, M. The anticancer drug ellipticine is a potent inducer of rat cytochromes P450 1A1 and 1A2, thereby modulating its own metabolism. *Drug Metabolism and Disposition*. 2007, 10, s. 1926–1934.
- [66] DEVRAJ, R.; BARRETT, F. J.; FERNANDEZ, A. J.; KATZENELLENBORG, A. J.; CUSHMAN, M. Design, synthesis, and biological evaluation of ellipticine–estradiol conjugates. *Journal of Medicinal Chemistry*. 1996, 39, s. 3367-3374.
- [67] MOODY, T. W.; CZERWINSKI, G.; TARASOVA, I. N.; MOODY, L. D.; MICHEJDA, J. Ch. The development of VIP – ellipticine conjugates. *Regulatory Peptides*. 2004, 123, s. 187-192.
- [68] SEARLE, F.; GAC-BRETON, S.; KEANE, R.; DIMITRIJEVIC, S.; BROCCINI S.; SAUSVILLE, A. E; DUNCAN, R. N-(2-Hydroxypropyl)methacrylamide copolymer–6-(3-Aminopropyl)-ellipticine conjugates. Synthesis, in vitro, and preliminary in vivo evaluation. *Bioconjugate Chemistry*. 2001, 12, s. 711-718.
- [69] LIU, Jubo; ZENG, Faquan; ALLEN, Christine. Influence of serum protein on polycarbonate-based copolymer micelles as a delivery system for a hydrophobic anti-cancer agent. *Journal of Controlled Release*. 2005, 102, s. 481–497.
- [70] LIU, J.; XIAO, Y.; ALLEN, Ch. Polymer drug-compatibility: A guide to the development of delivery systems for the anticancer agent, ellipticine. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2004, 1, s. 132-143.
- [71] STIBOROVÁ, M.; RUPERTOVÁ, M.; FREI, E. Cytochrome P450- and peroxidase-mediated oxidation of anticancer alkaloid ellipticine dictates its anti-tumor efficiency. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2010, v tisku.

# Seznam zkratek

<b>A</b>	alanin
<b>AhR</b>	receptor pro aromatické uhlovodíky (aryl hydrocarbon receptor)
<b>ARNT</b>	jaderní translokátor pro aromatické uhlovodíky (aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator)
<b>ATP</b>	adenosintrifosfát
<b>BSA</b>	hovězí sérový albumin
<b>CoA</b>	koenzym A
<b>COX-1</b>	ovčí cyclooxygenáza
<b>COX-2</b>	lidská cyclooxygenáza
<b>CYP</b>	cytochrom P450
<b>DNA</b>	deoxyribonukleová kyselina
<b>EGF</b>	epidermální růstový faktor (epidermal growth factor)
<b>EGFR</b>	receptor pro epidermální růstový faktor (epidermal growth factor receptor)
<b>EPR</b>	efekt zvýšeného průniku a propustnosti (enhanced permeability and retention effect)
<b>GIT</b>	gastrointestinální trakt
<b>HMPA</b>	N-(2-hydroxypropyl)methakrylamid
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	peroxid vodíku
<b>HRP</b>	peroxidáza křenu selského (horseradish peroxidase)
<b>HSA</b>	lidský sérový albumin (human serum albumin)
<b>IC<sub>50</sub></b>	poloviční maximální inhibiční koncentrace
<b>L</b>	leucin
<b>LDL</b>	protein s nízkou hustotou (low density lipoprotein)
<b>LPO</b>	hovězí laktoperoxidáza
<b>MePEG-<i>b</i>-PBTMC</b>	methoxy(polyethyleneglykol)- <i>b</i> -poly(5-benzyloxy-trimethylene)karbonát
<b>MFO</b>	monooxygenázový systém se smíšenou funkcí (mixed function oxidase)
<b>MPO</b>	myeloperoxidáza
<b>mRNA</b>	mediátorová RNA (messenger RNA)

<b>NADH</b>	nikotinamid adenin dinukleotid redukovaná forma
<b>NADPH</b>	nikotinamid adenin dinukleotid fosfát redukovaná forma
<b>PAPS</b>	3'-fosfoadenosin-5'-fosfosulfát
<b>PCL</b>	polykaprolakton
<b>PEG</b>	poly(ethylen glykol)
<b>PEO</b>	poly(ethylen oxid)
<b>PGA</b>	polyglykolová kyselina
<b>PLA</b>	polymer kyseliny mléčné
<b>PXR</b>	pregnane X receptor
<b>RNA</b>	ribonukleová kyselina
<b>VIP</b>	vazoaktivní střevní peptid (vasoactive intestinal peptide)
<b>VPAC<sub>1/2</sub></b>	receptor pro vazoaktivní střevní peptid (receptor for vasoactive intestinal peptide)
<b>WHO</b>	Světová zdravotnická organizace (World Health Organization)

