

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

KATEDRA BIOCHEMIE



**Studium enzymů metabolizujících protinádorová léčiva a
jejich exprese jako nástroj cílené terapie**

Bakalářská práce

Markéta Göttlicherová

Školitelka: Prof. RNDr. Marie Stiborová, DrSc.

Praha 2008

Přírodovědecká fakulta UK
KNIHOVNA CHEMIE



3233218467

UNIVERZITA KARLOVA v Praze
Přirodovědecká fakulta
Oborová knihovna chemie
Albertov 6, 128 43 Praha 2
IČO: 00216208, DIČ: CZ00216208
UK 22

pr.č. 95b/08.stud
(biochemie)

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

V Praze dne 4. 6. 2008

.....*Göttlicherová Markéta*.....

Markéta Göttlicherová

Ráda bych poděkovala své školitelce Prof. RNDr. Marii Stiborové, DrSc. za zadání tématu, odborné vedení a cenné rady při vypracování této práce.

Dále bych pak chtěla poděkovat RNDr. Jitce Poljakové, Ph.D. za všestrannou pomoc nejen při práci v laboratoři.

Obsah

Seznam použitých symbolů a zkratk.....	6
1 Úvod.....	8
1.1 Systém oxidas (oxygenas) se smíšenou funkcí (MFO systém - „mixed function oxidative system“)	9
1.1.1 Cytochrom P450	9
1.1.1.1 Lidské cytochromy P450	12
1.1.1.1.1 Rodina CYP1	14
1.1.1.1.2 Rodina CYP2	16
1.1.1.1.3 Rodina CYP3	16
1.1.1.1.4 CYP19.....	17
1.2 Peroxidasy.....	18
1.2.1 Cyklooxygenasy.....	18
1.3 Lidské nádorové buněčné linie	19
1.3.1 Buněčné linie odvozené od neuroblastomu	19
1.3.2 Buněčná linie prsního adenokarcinomu.....	19
1.4 Protinádorová léčiva	20
1.4.1 Tamoxifen.....	20
1.4.1.1 Mechanismus působení tamoxifenu.....	21
1.4.1.2 Metabolická aktivace tamoxifenu.....	22
1.4.1.3 Analoga tamoxifenu.....	26
1.4.1.4 Indikace tamoxifenu	26
1.4.1.5 Vedlejší účinky tamoxifenu	27
1.4.2 Ellipticin.....	29
2 Cíl práce.....	32
3 Materiál a metody	33
3.1 Použité chemikálie.....	33
3.2 Použité metody	35
3.2.1 Extrakce proteinů z buněčných linií	35
3.2.2 Stanovení koncentrace proteinů.....	35
3.2.3 SDS-elektroforesa.....	36
3.2.4 Western blotting.....	36

4	Výsledky	38
4.1	Expresie enzymů metabolizujících ellipticin v nádorových buněčných liniích.....	38
4.1.1	Expresie enzymů metabolizujících ellipticin v neuroblastomových liniích .	38
4.1.2	Expresie enzymů metabolizujících ellipticin v nádorových buňkách lidského prsního adenokarcinomu (v MCF-7 buňkách).....	40
5	Diskuse.....	42
6	Závěr	44
	Seznam použité literatury	45

Seznam použitých symbolů a zkratek

ATP	adenosintrifosfát
BCA	4,4'-dikarboxy-2,2'-bicinchoninová kyselina
BCIP/NBT	5-bromo-4-chloro-3-indolylfosfát/nitro blue tetrazolium
BIS	<i>N,N'</i> -methylen-bis-akrylamid
BSA	hovězí sérový albumin
CO	oxid uhelnatý
COX-1	cyklooxygenasa-1
COX-2	cyklooxygenasa-2
CuSO ₄	síran měďnatý
CYP	cytochrom P450
DES	diethylstilbestrol
DNA	deoxyribonukleová kyselina
ELLI	ellipticin
FAD	flavinadenindinukleotid
FMN	flavinmononukleotid
Fe ²⁺	železnatý kation
Fe ³⁺	železitý kation
HCl	kyselina chlorovodíková
IgG	imunoglobulin třídy G
IgY	imunoglobulin třídy Y
H ⁺	kation vodíku
H ₂ O	voda
H ₂ O ₂	peroxid vodíku
IMR-32	lidská neuroblastomová buněčná linie
K _m	Michaelisova konstanta
Leu	aminokyselina leucin
MCF-7	buněčná linie odvozená od prsního adenokarcinomu („Breast Carcinoma Cell Line“)
MFO	systém oxidas (oxygenas) se smíšenou funkcí („mixed function oxidative system“)
NaCl	chlorid sodný

NADP ⁺	nikotinamidadeninukleotidfosfát oxidovaný
NADPH	nikotinamidadeninukleotidfosfát redukovaný
Na ₂ HPO ₄	hydrogenfosforečnan sodný
NaH ₂ PO ₄	dihydrogenfosforečnan sodný
Na ₂ CO ₃	uhličitan sodný
NaHCO ₃	hydrogenuhličitan sodný
NaOH	hydroxid sodný
NMHE	2-methyl-9-hydroxyellipticin
O ₂	molekula kyslíku
P450	pigment s maximem absorpance při 450 nm (cytochrom P450)
PBS	fyzilogický roztok fosfátového pufru („phosphate saline buffer“)
pH	záporný dekadický logaritmus koncentrace H ⁺ iontů
PVDF	polyvinylidendifluorid
RH	redukovaný substrát cytochromu P450
ROH	hydroxylovaný produkt
SDS	dodecylsulfát sodný
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -tetramethyl-ethylendiamin
TRIS	tris(hydroxymethyl)aminomethan
TRITON	t-oktylfluoxypolyetoxyethanol
UKF-NB-3	lidská neuroblastomová buněčná linie
UKF-NB-4	lidská neuroblastomová buněčná linie
UKF-NB-4 ^(cli)	lidská neuroblastomová buněčná linie rezistentní na ellipticin
Val	aminokyselina valin

1 Úvod

Do lidského organismu vstupují z vnějšího prostředí různé cizorodé látky, tzv. xenobiotika.^[1] Jsou to většinou látky lipofilního charakteru, které snadno pronikají buněčnými membránami, např. léky, konzervační látky, potravinářská barviva, umělá sladidla, kontaminanty půdy a vody, složky výfukových plynů a cigaretového kouře atd.^[2]

Xenobiotika jsou za katalýzy určitých enzymů biotransformována na hydrofilnější produkty, čímž jsou většinou detoxikována a je umožněna jejich eliminace z organismu. Enzymovými přeměnami mohou však také vzniknout produkty biologicky aktivnější až toxické.^[2]

Hlavním místem biotransformace většiny látek jsou játra, dále kůže, plíce, střeva a ledviny. Biotransformaci lze rozdělit do dvou fází označovaných I a II, přičemž není nezbytné, aby xenobiotikum prošlo oběma fázemi.^[1]

- (I) Reakce první fáze biotransformace vedou ke zvýšení polariry látky zaváděním nebo odkrytím substituentů za účasti enzymů katalyzujících reakce oxidační, redukční a hydrolytické.^[1,2]
- (II) Druhá, tzv. konjugační, fáze vede k další polarizaci modifikovaného xenobiotika a usnadnění jeho exkrece z těla. Funkční skupiny vzniklé z metabolismu první fáze reagují s molekulami endogenního původu, např. s aktivovanou kyselinou glukuronovou, za účasti konjugačních enzymů.^[1,2]

V procesu biotransformace se nejvíce uplatňují oxidační reakce, z nichž na prvním místě dominují hydroxylace. Tuto biotransformaci katalyzuje systém enzymů endoplazmatického retikula, který pracuje jako monooxygenasa čili oxidasa se smíšenou funkcí, a jehož nejvýznamnější složkou je cytochrom P450.^[1]

1.1 Systém oxidas (oxygenas) se smíšenou funkcí (MFO systém - „mixed function oxidative system“)

Cytochrom P450 je hemoprotein s prostetickou skupinou Fe-protoporfyrinu IX. Pátým ligandem železa je síra cysteinu a šesté místo obsazuje navázaný kyslík z molekuly vody. Písmeno P v jeho názvu znamená pigment a 450 je označení spektrálního maxima, které vykazuje cytochrom po redukci a vazbě s CO. Cytochrom P450 je velmi labilní, snadno se přeměňuje v inaktivní formu, která se projeví posunem absorpčního maxima komplexu redukované formy enzymu s CO ze 450 nm na 420 nm.^[2]

Pro enzymovou aktivitu je nutný nejen cytochrom P450, ale i další enzym NADPH-cytochrom P450 reduktasa a fosfolipidová funkce membrán. Uvedené tři součásti tvoří mikrosomální monooxygenasový systém a zatímco první dvě mají enzymovou aktivitu, membrána slouží k udržení jejich nativní konformace a usnadňuje jejich vzájemné interakce.^[2]

NADPH-cytochrom P450 reduktasa je flavoproteinový enzym, který slouží jako akceptor elektronů z NADPH, které pak přenáší na komplex substrát:P450(Fe^{3+}), kde redukuje centrální atom železa na Fe^{2+} . Obsahuje prostetické skupiny FAD a FMN. NADPH-cytochrom P450 reduktasa je lokalizována v membráně endoplazmatického retikula a je orientována k cytoplazmě.^[2]

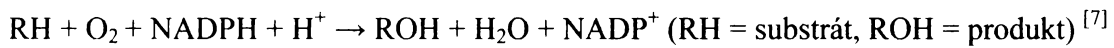
1.1.1 Cytochrom P450

V mikrosomální frakci potkaních jater byl v roce 1958 objeven do té doby neznámý enzymový systém, později pojmenovaný jako cytochrom P450. Jeho funkce byla objasněna v roce 1963. V dnešní době je popsáno více než 1200 různých forem cytochromu P450 (CYP), nacházejících se v nejrůznějších živočišných a rostlinných druzích. Kromě savců je popisován výskyt v organismech ptáků, ryb, plazů, hmyzu, měkkýšů, plžů, členovců, hub, rostlin a bakterií.^[3]

Cytochromy P450 se vyvinuly z dřívějších forem, které se účastnily metabolismu (biosyntézy a odbourávání) endogenních látek, jako jsou např. steroidní hormony. Evoluce těchto proteinů nastala kvůli stále se zvyšujícímu výskytu cizorodých látek v prostředí, kterým byly a jsou organismy neustále vystavovány. Proto cytochromy P450 rozšířily svou enzymovou specifitu, aby mohly metabolizovat, a tím usnadnit eliminaci, xenobiotika.^[4]

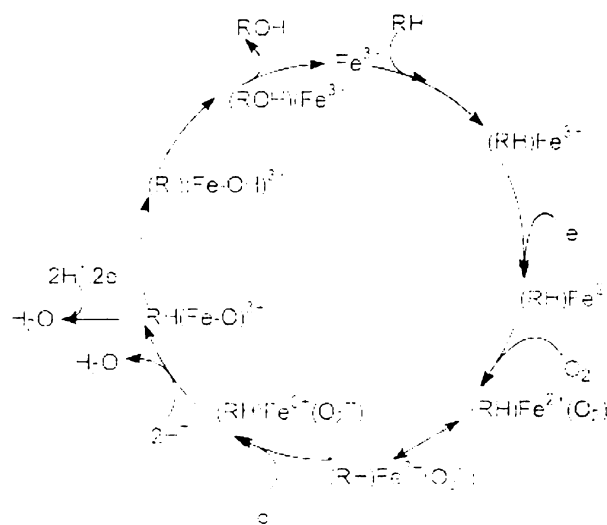
Cytochromy P450 jsou zodpovědné za většinu přeměn (odhaduje se asi 55%) cizorodých látek v organismu.^[5] V procesech bioaktivace jsou zahrnuty více než jiné enzymy, pravděpodobně proto, že mají širokou substrátovou specifitu, což jim umožňuje katalyzovat metabolismus velmi odlišných xenobiotik.^[4,6] Participují na I. fázi biotransformace^[4,7], kde se účastní oxidačních reakcí, ale mají také význam při oxidačním, peroxidačním i redukčním metabolismu jak xenobiotik, tak mnoha endogenních látek.^[7]

Enzymové reakce cytochromu P450 obecně vykazují stechiometrii oxidace se smíšenou funkcí.^[8] V přítomnosti O₂ a NADPH katalyzují inkorporaci jednoho atomu kyslíku do substrátu, zatímco druhý atom je redukován na vodu.^[4] Obecný průběh monoxygenasové reakce katalyzované cytochromem P450 lze vyjádřit rovnicí:



Reakční cyklus cytochromu P450 je znázorněn na *obrázku 1*. Substrát RH se váže na cytochrom (Fe³⁺) a vzniká komplex (RH)Fe³⁺. Dochází k redukcí železa za vzniku (RH)Fe²⁺, naváže se kyslík a vzniká ternární komplex (RH)Fe²⁺(O₂) ↔ (RH)Fe³⁺(O₂⁻), který je redukován dalším elektronem; následuje heterolýza vazby O-O, vzniká reaktivní oxidant a molekula vody. Dvouelektronovou oxidací substrátu vzniká produkt a regeneruje se nativní cytochrom P450.^[2]

Zdrojem kyslíku v monoxygenasové reakci mohou být i peroxidy, zvláště organické hydroperoxidy. Reakční mechanismus je pak odlišný.^[2]



Obrázek 1: Katalytický cyklus cytochromu P450 (převzato z 2)

U savců jsou všechny CYP vázány v membráně. Většina z nich se nachází v membráně endoplasmatického retikula, ale 5 z nich (specializované formy aktivní v metabolismu steroidů) je umístěno v mitochondriích.^[4,8] U bakterií se nachází v rozpustné formě v cytosolu.^[3]

Cytochromy P450 se vyskytují v každé tkáni, s výjimkou příčně pruhovaného svalstva a červených krvinek. Především se vyskytují v játrech, která jsou hlavním místem biotransformace xenobiotik.^[4] Dále v ledvinách, prostatě, kůži, nosním epitelu, srdečním svalu, nadledvinách, placentě, mozku, plicích, slezině, pankreatu, gastrointestinálním traktu (hlavně v tenkém střevě), vaječnicích a varlatech.^[3,5,7] Jejich množství v jednotlivých tkáních závisí na mnoha faktorech, např. na genetickém polymorfismu, vlivu vnějšího prostředí, výživě, věku, pohlaví, kouření, konzumaci alkoholu a působení podávaných léčivých přípravků. I když je tedy o určité isoformě cytochromu P450 známo, že je přítomna jen v malém množství, může se její koncentrace v příslušné tkáni či orgánu za určitých podmínek extrémně zvýšit, to tedy znamená, že cytochromy P450 jsou inducibilní.^[3]

Genetický polymorfismus byl dosud jistě objeven u isoform cytochromu P450 1A1, 2A6, 2C9, 2D6, 3A5, 2E1 a je pravděpodobný u isoform CYP1A2 a 2C9. Vrozené změny DNA vedou k tomu, že určitá isoforma CYP buď úplně chybí nebo není inducibilní či má změněnou katalytickou aktivitu. Polymorfismus je obvykle definován jako geneticky podmíněný rozdíl zasahující alespoň 2% uvažované populace.^[7]

Některá léčiva vyvolávají zvýšenou enzymovou aktivitu cytochromů P450, tzv. indukci, jiná léčiva naopak jejich metabolickou enzymovou aktivitu tlumí a enzym inhibují. Důsledkem enzymové indukce po opakovaném podání látky není jenom zrychlení metabolismu, ale i snížení plazmatických hladin a terapeutického účinku této látky. Naopak když mají metabolity větší účinek, resp. vyšší toxicitu než mateřská látka, může dojít k intoxikaci organismu. Jiné lékové substráty mohou biotransformační procesy inhibovat. Výsledkem inhibice biotransformačních procesů je většinou prodloužení farmakologického účinku inhibici vyvolávající látky i současně podávaných léčiv, která se vylučují stejnou biotransformační cestou jako látka vyvolávající inhibici.^[3]

1.1.1.1 Lidské cytochromy P450

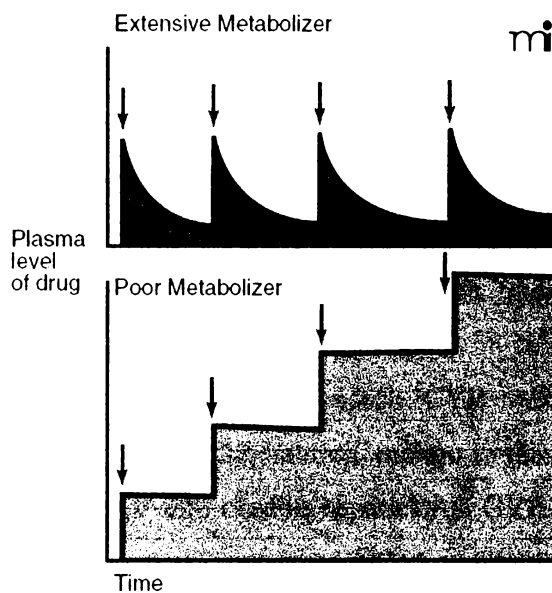
Lidský genom kóduje 57 proteinů cytochromu P450, lišících se strukturou i substrátovou specifitou.^[3,6,8,9] Většina z nich je zahrnuta v metabolismu steroidů, žlučových kyselin, mastných kyselin, eikosanoidů a v tukách rozpustných vitamínů. Téměř 15 jich je zahrnuto v metabolismu léčiv a jiných xenobiotických látek.^[6,8] Mnoho z těchto CYP, které metabolizují xenobiotika, také aktivuje karcinogeny.^[8]

Různé CYP mají odlišnou, i když překrývající se, substrátovou specifitu. Mohou také vykazovat regioselektivitu, poněvadž mohou metabolizovat stejné substráty, ale na jiných místech (např. potkaní CYP2A1 hydroxyluje testosteron na pozici 7- α , zatímco lidský CYP3A4 hydroxyluje na pozici 6- β). Více než jeden enzym cytochromu P450 může katalyzovat stejnou dráhu metabolismu substrátu, ale s odlišnou hodnotou K_m (např. u lidí jsou aminosloučeniny aktivovány přes *N*-hydroxylaci katalyzovanou hlavně CYP1A2 a v menším rozsahu CYP1A1).^[4]

Ve většině případů se metabolismu léčiv účastní více CYP^[9], proto při absenci některého z těchto enzymů nastává pouze malá, nebo žádná, změna fenotypu. Avšak mnoho z těchto enzymů se účastní zpracování steroidů nebo vitamínů, proto vrozené defekty mohou být pro organismus závažné.^[8]

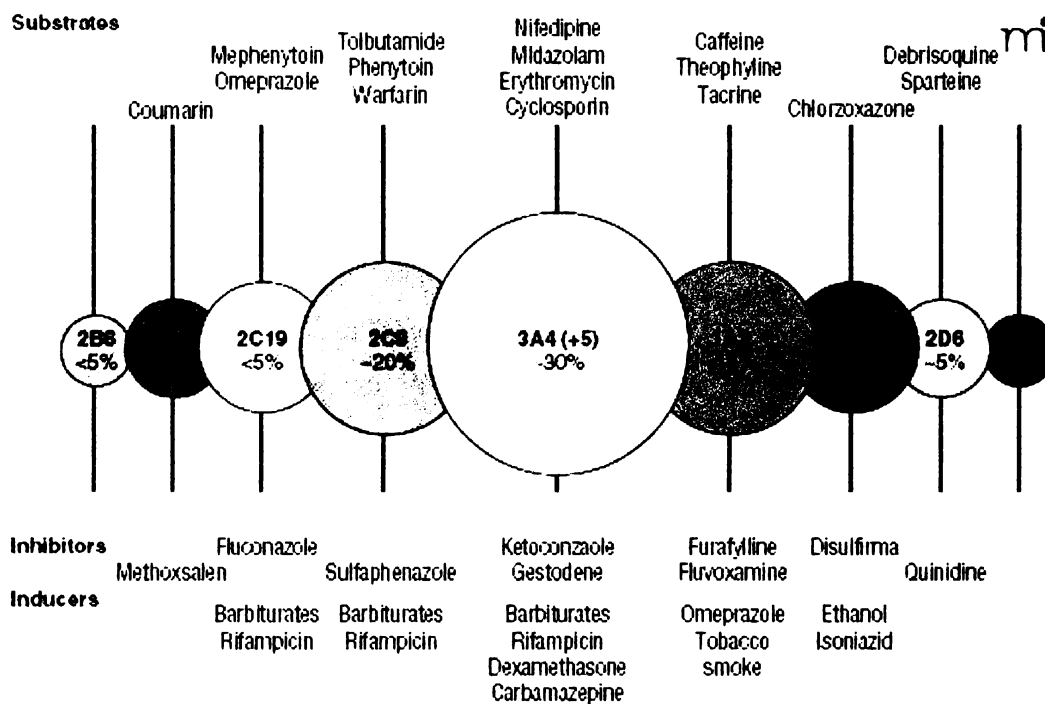
Jedince bílé rasy (tzv. kavkazská populace) můžeme podle metabolické aktivity rozdělit na pomalé, středně rychlé a rychlé metabolizátory.^[3] Většina populace se vyznačuje rychlým metabolismem, kdy hladina xenobiotika, např. léčiva, v plazmě se pohybuje kolem určitého průměru, zatímco u pomalého metabolismu následné dávky léčiva koncentraci v plazmě zvyšují (*obrázek 2, str. 13*). Tato skutečnost může být problematická u léčiv, které mají úzký terapeutický index.^[8]

Všechny popsané cytochromy P450 (CYP) tvoří tzv. superrodinu.^[3] Všechny CYP jsou rozděleny podle podobnosti aminokyselinové sekvence do rodin (podobnost nejméně 40%), označených arabskými číslicemi (např. CYP1), které jsou postupně dále děleny na podrodiny (podobnost nejméně 55%), označované velkými písmeny (např. CYP1A), které mohou obsahovat jeden nebo více jednotlivých enzymů (isoforem), označených arabskou číslicí (např. CYP1A1). Tato kritéria klasifikace jsou tedy striktně strukturální bez ohledu na jejich substrátovou specifitu.^[3,4,7]



Obrázek 2: Rozdíly v koncentracích léčiv v plazmě u pomalých a rychlých „metabolizátorů“ (převzato z 8)

Na biotransformaci přibližně 98% xenobiotik, u kterých je znám biotransformační proces, se podílí především 6 základních forem cytochromu P450: CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1 a CYP3A4.^[3] (obrázek 3)



Obrázek 3: Hlavní jaterní CYP zahrnuté v metabolismu léčiv (převzato z 8)

1.1.1.1 Rodina CYP1

Enzymy této rodiny jsou důležitými katalyzátory bioaktivačních reakcí karcinogenů (např. polycyklické aromatické uhlovodíky, aromatické a heterocyklické aminy), kterým jsou lidé neustále a nedobrovolně vystavováni. V bioaktivačních reakcích karcinogenů hraje tedy tato rodina nejdůležitější roli. Mnoho environmentálních a potravinových karcinogenů v přírodě jsou planární molekuly, které jsou vhodnými substráty rodiny CYP1.^[4,9]

Rodina CYP1 tvoří asi jen 10% obsahu všech CYP v lidských játrech. Účinná indukující činidla, jako je např. 3-methylcholantren, mohou zvyšovat expresi rodiny CYP1 tak, že může tvořit až 80% celkového obsahu hepatických CYP. Avšak kvůli její hlavní roli v aktivaci chemických karcinogenů jsou vysoké hladiny CYP1 nežádoucí.^[4]

Tato rodina je tvořena dvěma podrodinami, 1A a 1B.^[4]

- **Podrodina CYP1A**

CYP1A mohou aktivovat až 90% všech dosud známých karcinogenů.^[4,10] Zástupci podrodiny CYP1A jsou isoformy CYP1A1 a CYP1A2.^[3] Oba enzymy mají podobnou aminokyselinovou sekvenci (až 70% homologie), katalyzují podobné reakce, ale liší se lokalizací.^[3,10] CYP1A1 je dominantně extrahepatální enzym, zatímco CYP1A2 je převážně enzym jaterní tkáně.^[11]

- **CYP1A1**

CYP1A1 je ve velké míře exprimován v extrahepatických tkáních (plíce, centrální nervová soustava, gastrointestinální trakt, srdce, lymfocyty, mozek, kůže, ledviny a placenta).^[3,11] V játrech je exprimován ve velmi malých koncentracích, nicméně po indukci dochází snadno k jeho biosyntéze ve větší míře.^[4,10] Podílí se na bioaktivaci polycyklických aromatických uhlovodíků.^[4,12]

Je silně indukován v plicích kuřáků (jeho hladina je 4x vyšší u kuřáků než nekuřáků)^[10,12,13], což může být jednou z příčin vzniku rakoviny plic.^[10] Jeho genetický polymorfismus ovlivňuje také výskyt nádorů prsu a kůže.^[3,10] Z léčiv je jeho substrátem např. tamoxifen.^[10]

- **CYP1A2**

CYP1A2 je typický jaterní enzym (jediný z rodiny CYP1) vykazující velmi širokou substrátovou specifitu.^[9,10] V jiných tkáních nebyl detekován.^[13] Kvantitativně představuje přibližně 12% jaterního cytochromu P450 a podílí se na metabolismu cca 3% léčiv.^[11]

Substráty isoformy CYP1A2 jsou planární (poly)aromatické/heterocyklické aminy a amidy.^[3,10] Metabolické cesty těchto substrátů mohou vést k bioaktivaci prokarcinogenů na karcinogenně působící intermediáty, které přispívají ke vzniku nádorových onemocnění (kolorektální nádory, nádory močového měchýře nebo nádory plic).^[3,8,10,11] Kromě xenobiotik se podílí i na metabolismu léčiv a steroidů, např. kofeinu, teofylinu, fenacetinu a acetaminofenonu.^[10,13]

CYP1A2 vykazuje široké interindividuální rozdíly v aktivitě. Jeho expresi ovlivňuje stravování (heterocyklické aminy a polycyklické aromatické uhlovodíky přítomné v pyrolyzovaném jídle, zejména mase upraveném za vyšších teplot na dřevěném uhlí), kouření (toxické látky cigaretového kouře)^[3,8,9,10,11] a další exogenní faktory (věk, pohlaví, těhotenství, řada induktorů a inhibitorů).^[3]

- **CYP1B1**

CYP1B1 je exprimován v několika orgánech a tkáních (prsni tkáň, prostata, vaječníky, ledviny, mozek, slezina, kůže, děloha, plod, varlata, nadledvinky a nejméně v játrech).^[3,4,8,12] Tato isoforma byla detekována v různých lidských nádorech (nádory plic, mozku, varlat, prsu, ledvin a vaječníků). Zdá se, že CYP1B1 je nejvíce exprimovaný CYP1 u rakoviny prsu (metabolizuje 17 β -estradiol za tvorby 4-hydroxy metabolitu, který se účastní estrogen-indukované karcinogeneze).^[12]

Environmentální faktory, jako je cigaretový kouř, který obsahuje polycyklické aromatické uhlovodíky, může zvyšovat expresi CYP1B1 v játrech, a přispívat tak k variabilitě v hladinách tohoto CYP mezi jednotlivci. Lidská isoforma CYP1B1 katalyzuje oxidaci polycyklických aromatických uhlovodíků a heterocyklických aminů za tvorby elektrofilních intermediátů schopných tvořit kovalentní vazby s DNA, což je jeden z kroků nutných pro iniciaci karcinogeneze.^[12]

1.1.1.1.2 Rodina CYP2

- **Podrodina CYP2C**

Podrodina CYP2C hraje důležitou roli v metabolismu mnoha klinicky významných léčiv. Je zodpovědná např. za metabolismus ibuprofenu.^[13] V lidském organismu jsou zastoupeny isoformy CYP2C8, CYP2C9, CYP2C10, CYP2C18 a CYP2C19.^[3]

- **Podrodina CYP2D**

Úloha podrodiny CYP2D v chemické karcinogenezi je minimální.^[13] Z této podrodiny se u člověka vyskytuje isoforma CYP2D6. Vedle jater je tento enzym lokalizován v mozku, gastrointestinálním traktu a plicích. Substráty enzymu jsou bazické sloučeniny, nejčastěji s atomem dusíku ve své molekule.^[3]

- **Podrodina CYP2E**

U člověka se vyskytuje pouze jediná isoforma podrodiny CYP2E, a to CYP2E1. Je lokalizována v srdečních síních i komorách a větších cévách. Jejimi substráty jsou především neutrální sloučeniny s malou molekulovou hmotností.^[3]

CYP2E1 je indukovatelný ethanolem. Chronické užívání ethanolu tedy vede k jeho zvýšenému obratu v organismu. U vzorků z jaterních biopsií bylo prokázáno, že lidé, kteří pravidelně požívají alkohol, mají až trojnásobný obsah jaterní formy CYP2E1. Zvýšená aktivita této isoformy může vést ke zvýšení rizika vzniku rakoviny tlustého střeva, plic, nosohltanu a jater.^[3]

1.1.1.1.3 Rodina CYP3

Nejdůležitějším zástupcem této rodiny je CYP3A4. Tento cytochrom P450 je jeden z nejdůležitějších CYP v játrech člověka, kde tvoří až 30% celkového obsahu CYP.^[4,5] Ve vysokých koncentracích je také přítomen v tenkém střevě.^[4,8] Dále se vyskytuje v ledvinách, gastrointestinálním traktu, placentě, plodu, endotelu a lymfocytech.^[3]

Hlavní funkcí CYP3A4 je katalýza oxidačního metabolismu klinicky používaných léčiv a environmentálních chemikálií.^[14] Podílí se asi na 52% přeměn léčiv, které probíhají za účasti cytochromů P450.^[5] Má velmi širokou substrátovou specifitu.^[4] Typickými substráty jsou makrolidová antibiotika (erytromycin), azolová antimykotika (ketokonazol) a blokátory kalciových kanálů s dihydropyridinovou strukturou (např. nifedipin).^[5] Důležitými substráty z hlediska procesů karcinogeneze jsou karcinogenní xenobiotika,

např. polycyklické aromatické uhlovodíky, aromatické aminy a z endogenních látek steroidní sloučeniny 17- β -estradiol, testosteron, progesteron a kortisol.^[10]

Forma CYP3A7 je fetální formou CYP3A.^[3] CYP3A4 krátce před narozením nahrazuje CYP3A7, který je exprimován ve velkém množství v zárodku, kde představuje hlavní enzym CYP (asi 50% celkového obsahu CYP v játrech).^[4]

1.1.1.1.4 CYP19

Hlavním zástupcem rodiny CYP19 je isoforma CYP19A1, známá jako aromatas.^[8] Patří do skupiny cytochromů P450 metabolizujících primárně endogenní látky se steroidní strukturou.^[10] Aromatasa katalyzuje tříkrokovou oxidaci androgenů na estrogény.^[8] Tato reakce využívá 3 moly kyslíku a 3 moly NADPH na každý mol metabolizovaného steroidního substrátu. Tyto kyslíkové molekuly jsou spotřebovány na oxidaci methylové skupiny C19 na kyselinu mravenčí, která nastává zároveň s aromatizací kruhu A steranového skeletu za vzniku fenolického kruhu A charakteristického pro estrogény. Redukčním ekvivalentem této reakce je NADPH.^[15]

Několik tkání v lidském organismu exprimuje aromatasu, a proto v nich mohou být syntetizovány estrogény. Jsou to vaječníky a varlata, placenta, tukové tkáně, chondrocyty a osteoblasty kostí, vaskulární hladké svalstvo a několik míst v mozku (oblasti hypotalamu a mozkové kůry).^[15]

Reakce, které jsou katalyzovány CYP19A1, napomáhají udržovat optimální hladiny steroidních látek v organismu. Nevyváženost koncentrací některých steroidních hormonů může vést ke karcinogenním procesům. Např. aromatasou je ovlivněn vývoj nádorů prsu, jejichž růst je závislý na hladinách estrogenních hormonů. Pro stav buněk některých nádorů jsou důležité vyvážené hladiny steroidních látek, proto regulátory některých těchto cytochromů P450 jsou používány i v protinádorové terapii, např. inhibitory aromatas.^[10]

1.2 Peroxidasy

Peroxidasy jsou enzymy, které katalyzují oxidoredukční reakce. Redukují molekulu H_2O_2 a účastní se oxidace další sloučeniny, ať už endogenní či xenobiotika. Podílejí se tak na ochraně organismu před toxickým působením H_2O_2 a popř. reaktivních forem kyslíku.^[16,17] Mají širokou substrátovou specifitu, čímž se blíží MFO systému obsahujícímu cytochrom P450. Nejlépe přeměňují fenoly a aromatické aminy.^[17]

Peroxidasy se vyskytují v rostlinném i živočišném organismu. Příkladem rostlinné peroxidasy je např. křenová peroxidasa, příklady živočišných peroxidas jsou laktoperoxidasa, thyroid peroxidasa, myeloperoxidasa a cyklooxygenasa, které byly detekovány např. ve žlázách a žlázových sekretech savců.^[16,17]

1.2.1 Cyklooxygenasy

Prostaglandiny, prostacykliny, tromboxany a leukotrieny jsou metabolity dvacetihlíkatých nenasycených mastných kyselin. Syntetizují se téměř ve všech buňkách různých tkání těla z arachidonové kyseliny. Při cyklizaci arachidonátu na prostaglandiny je potřebný enzym cyklooxygenasa (prostaglandin H synthasa, prostaglandin endoperoxid synthasa).^[16] Enzym katalyzuje tvorbu prostaglandinu G₂, z něhož vzniká prostaglandin H₂. Z něho následně vznikají různé eikosanoidy.^[18]

Cyklooxygenasa (COX) byla poprvé identifikována před 30-ti lety. Byly popsány dvě formy označované jako COX-1 a COX-2. COX-1 enzym je exprimován především konstitutivně, zatímco COX-2 je enzym také inducibilní.^[18]

Cyklooxygenasová aktivita je inhibována nesteroidními protizánětlivými léčivy (např. aspirin). Několik studií detekovalo 40-50% pokles relativního rizika rakoviny konečníku u lidí, kteří pravidelně užívají aspirin nebo jiné nesteroidní protizánětlivé léčivo. Kolorektální nádory u člověka i zvířat exprimují vysoké hladiny COX-2.^[18] Exprese COX-2 byla také popsána v lidských nádorech prsu a plic.^[17]

COX-1 a COX-2 katalyzují analogické reakce a mají podobnou primární strukturu. Jejich geny jsou však regulovány dvěma nezávislými a docela odlišnými systémy.^[18]

1.3 Lidské nádorové buněčné linie

1.3.1 Buněčné linie odvozené od neuroblastomu

V experimentální části předkládané bakalářské práce jsme pracovali s buněčnými liniemi odvozenými od neuroblastomu, konkrétně linie IMR-32, UKF-NB-3 a UKF-NB-4.

Neuroblastom je nádor vycházející z tkáně sympatického nervového systému. Tvoří 8-10% všech dětských nádorových onemocnění a v průběhu prvního roku života je nejčastějším solidním nádorem. Většina neuroblastomů je diagnostikována do 4 let života. Nejčastěji se objevuje v nadledvinách (asi 40%), dále v nervových pleteních podél páteře a metastázuje do kostí, jater, kostní dřeně a lymfatických uzlin.^[19]

1.3.2 Buněčná linie prsního adenokarcinomu

Další buněčná linie, se kterou jsme při experimentech pracovali, je linie lidského prsního adenokarcinomu (buňky MCF-7). Tato linie byla v roce 1970 odvozena z pleurální efuze z 69-ti leté ženy s metastatickým karcinomem prsu léčené radioterapií a hormonální terapií. Morfologicky jsou buňky MCF-7 podobné buňkám epiteliálním a obsahují cytoplazmatické estrogenní receptory.^[20]

Karcinom prsu je v ČR nejčastějším nádorovým onemocněním žen. Uvádí se, že v ČR asi každá dvanáctá žena během svého života touto chorobou onemocní. Pravděpodobnost vzniku roste hlavně po ukončení pravidelné menstruace, tj. většinou po padesátém roce života. Jasná dědičnost nemoci nebyla nalezena, i když u pokrevních příbuzných je zvýšené riziko výskytu této choroby.^[21] Rodinný výskyt rakoviny prsu zvyšuje riziko vzniku nádoru až čtyřnásobně. Za rizikové faktory lze dále považovat obezitu, pozdní těhotenství, bezdětnost a opakované mastopatie.^[22]

Karcinom prsu je v současné době poměrně dobře léčitelné nádorové onemocnění, pokud je včas diagnostikováno.^[21]

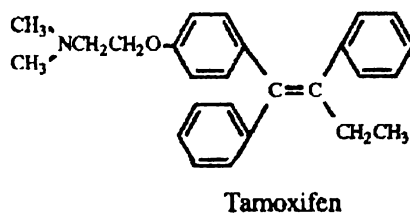
1.4 Protinádorová léčiva

Léčba nádorových onemocnění je velmi složitá a komplexní. Probíhá podle standardních protokolů pro jednotlivé typy neoplazie.

V předkládané bakalářské práci jsem se zaměřila na shromáždění informací o dvou látkách, které jsou účinné při léčbě prsního karcinomu. Jedná se o tamoxifen, který je v současné době používán při léčbě určitého typu hormonálně závislých nádorů.^[23] Dále pak o ellipticin, což je látka, která rovněž vykazuje protinádorovou aktivitu. Deriváty ellipticinu, 9-methoxyellipticin a 2-methyl-9-hydroxyellipticin ve formě acetátu (NMHE), se v sedmdesátých letech používaly ve Francii k léčbě prsního karcinomu s kostními metastázemi.^[17]

1.4.1 Tamoxifen

Tamoxifen (obrázek 4) je nesteroidní antiestrogenní léčivo, jehož systematický název je trans-(Z)-1-{4-[2-(dimethylamino)ethoxy]-fenyl}-1,2-difenyl-1-buten.^[24,25,26,27,28] Patří do skupiny trifenylethylenů, původně odvozených od uhlovodíku stilbenu.^[29,30]



Obrázek 4: Vzorec tamoxifenu (převzato z 34)

Tamoxifen je komerčně dostupný od poloviny 70. let minulého století. Byl poprvé připraven v roce 1966 v Imperial Chemical Industries ve Velké Británii, kde se pokoušeli syntetizovat činidlo, které by mohlo být použito jako antikoncepce. Pro tyto účely se však tamoxifen projevil s menším účinkem než mnoho jiných takových činidel. Jelikož bylo jeho působením také pozorováno blokování účinků estrogenů (antiestrogenní účinky), byl poté studován jako potenciální terapeutické činidlo rakoviny prsu.^[28]

Na počátku 60. let byla součástí léčby rakoviny prsu chemoterapie. Chemoterapeutická činidla jsou velmi efektivní, avšak mohou se projevit mnohé vedlejší účinky. Jsou aktivní proti rychle rostoucím buňkám, proto mohou být pro toto toxické léčivo cíleny i buňky jiné než rakovinné. Tato skutečnost si vyžádala hledání alternativy méně toxické terapie rakoviny prsu.^[28]

V 60. letech minulého století se zjistilo, že některé formy rakoviny prsu jsou závislé na růstových hormonech, přesněji na steroidních hormonech estrogenech. S vyjmutím vaječnicků – primární zdroj estrogenů v organismu žen – byla redukována hladina estrogenů, což způsobilo inhibici růstu buněk prsních nádorů. Činidla, která blokují účinky estrogenů, se prokázala být dostatečně efektivní v léčbě rakoviny prsu, která závisí na estrogenních receptorech.^[28]

Počátkem 70. let byly publikovány výsledky prvních experimentů s tamoxifenem při léčbě rakoviny prsu.^[28]

Několik studií porovnávalo u postmenopauzálních pacientek účinek tamoxifenu s dalšími hormonálními činidly. Porovnáním s diethylstilbestrolem (DES), který byl během 70. let považován za standardní v léčbě rakoviny prsu u postmenopauzálních pacientek, výsledky poukázaly na stejnou míru odpovědi tamoxifenu (31%) jako DES (33%). Frekvence a výskyt vedlejších účinků byl však u tamoxifenu mnohem nižší. Porovnáním s aminoglutethimidem, který působí na nadledvinky a redukuje množství syntetizovaných a sekretovaných sloučenin podobných estrogenům, bylo dosaženo podobných výsledků jako u DES. Porovnáním tamoxifenu vzhledem k alternativním chirurgickým procedurám na redukcii hladiny estrogenů, tamoxifen produkoval opět přibližně stejné míry odpovědi, ale bez nebezpečí spojených s chirurgickými formami terapie.^[28]

V současné době je tamoxifen celosvětově nejrozšířenější chemoterapeutické hormonální léčivo. Je široce používáno pro adjuvantní terapii rakoviny prsu.^[24] Kvůli nízkému výskytu vedlejších účinků, porovnáním s chemoterapií, se tamoxifen stal vyhovující alternativou cytotoxické chemoterapie, zejména u jedinců, kteří nemohou tolerovat její silné vedlejší účinky.^[28]

1.4.1.1 Mechanismus působení tamoxifenu

Tamoxifen patří mezi nesteroidní antiestrogeny, což jsou látky, které mají většinou duální aktivitu. Mohou působit nejen jako estrogenní antagonisté, ale také jako estrogenní agonisté.^[23,31] Tato léčiva se označují jako selektivní modulátory estrogenních receptorů (SERM = selective estrogen receptor modulators).^[30] Výsledný účinek závisí na poměru těchto dvou aktivit, na stupni interakce s estrogenním receptorem, na cílové tkáni a na délce podávání tamoxifenu.^[23,32] Tyto dvě protichůdné aktivity mohou mít za následek jak pozitivní, tak negativní účinky tohoto léčiva.^[33]

Jako antiestrogen má tamoxifen schopnost blokovat účinek estrogenů.^[23] Soutěží s nimi o vazbu na cytoplazmatický estrogení receptor.^[32] Vazbou antiestrogenního léčiva na estrogení receptor dochází k redukci počtu dostupných receptorů pro vazbu endogenního substrátu a k inhibici stimulace syntézy DNA indukované estrogenem.^[33] Růst buněk, které jsou závislé na estrogenech, se zpomalí nebo dočasně zastaví.^[28]

Ačkoli tamoxifen převážně působí jako antiestrogen, díky čemuž je široce využíván v léčbě a prevenci hormonálně závislých karcinomů^[30], může v některých cílových tkáních způsobit také estrogení stimulaci.^[32,33] Estrogenímu účinku jsou připisovány např. hyperproliferační změny děložní sliznice.^[29,33]

Výzkumy studující mechanismus karcinogenního působení tamoxifenu se zaměřily na určení metabolických drah, které vedou k tvorbě aduktů tamoxifenu s DNA a identifikace jejich struktury.^[24]

1.4.1.2 Metabolická aktivace tamoxifenu

Tamoxifen je proléčivo, které je v organismu převedeno na aktivnější metabolity (obrázek 5, str. 23).^[34] Studie jeho metabolismu ukázaly několik míst jeho molekuly, která jsou místy biotransformace.^[24]

Hlavní místa I. fáze metabolismu jsou:

- dusíkový atom postranního řetězce (*N-oxidace* a *N-demethylace*)
- 4-poloha (*hydroxylace*)
- α -poloha ethylového postranního řetězce (*hydroxylace*)^[24]

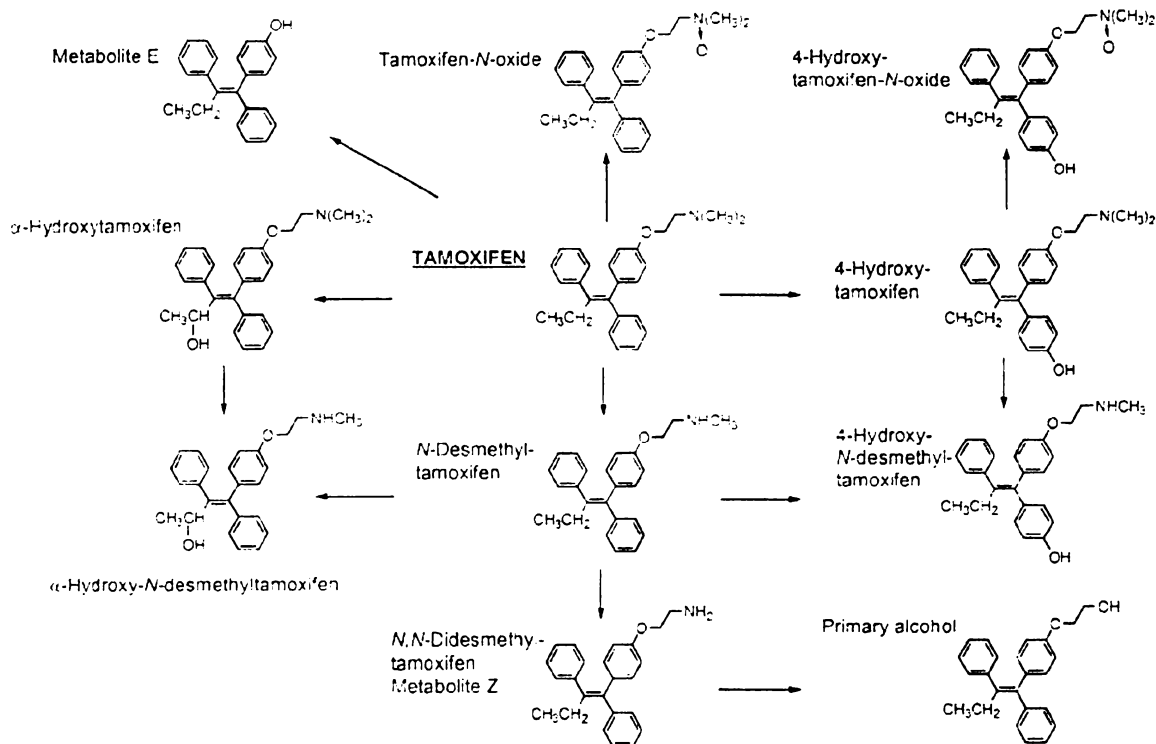
α -Hydroxylace:

α -Poloha postranního řetězce tamoxifenu je místem primární metabolické aktivace u potkanů. Oxidačním metabolismem na této pozici se vytvoří rezonančně stabilizovaný karbokation schopný elektrofilní ataku na nukleofilních centrech DNA, což vede k tvorbě stabilních kovalentních aduktů s DNA.^[24]

α -Hydroxytamoxifen:

Meziproduktem hydroxylace v α -poloze je α -hydroxytamoxifen, který byl detekován v játrech potkana *in vivo*. α -Hydroxytamoxifen má chirální uhlíkový atom, může tedy

existovat ve dvou enantiomerních formách. *R*(+)-isomer má větší potenciál k tvorbě aduktů s DNA v potkaních hepatocytech než *S*(-)-isomer.^[24]



Obrázek 5: Metabolismus tamoxifenu v I. fázi biotransformace (převzato z 24)

4-Hydroxytamoxifen:

Hydroxylací tamoxifenu v poloze 4 vzniká 4-hydroxytamoxifen. Tvorba aduktů tohoto metabolitu s DNA v potkaním organismu byla nalezena v jedné studii, ale v dalších studiích *in vivo* toto pozorováno nebylo, ačkoli metabolit může být enzymově aktivován na produkty, které vážou DNA v bezbuněčném nebo subcelulárním systému. Aktivace 4-hydroxytamoxifenu systémem peroxidázy s H_2O_2 *in vitro* vede ke vzniku aduktů s DNA v játrech potkanů léčených tamoxifenem. Jejich množství je však velmi malé.^[24]

4-Hydroxytamoxifen je hlavní metabolit tamoxifenu v lidském organismu. Je terapeuticky efektivnější než tamoxifen samotný, a zdá se, že je zodpovědný za většinu účinků tamoxifenu ve zpomalení růstu prsních rakovinných buněk.^[28]

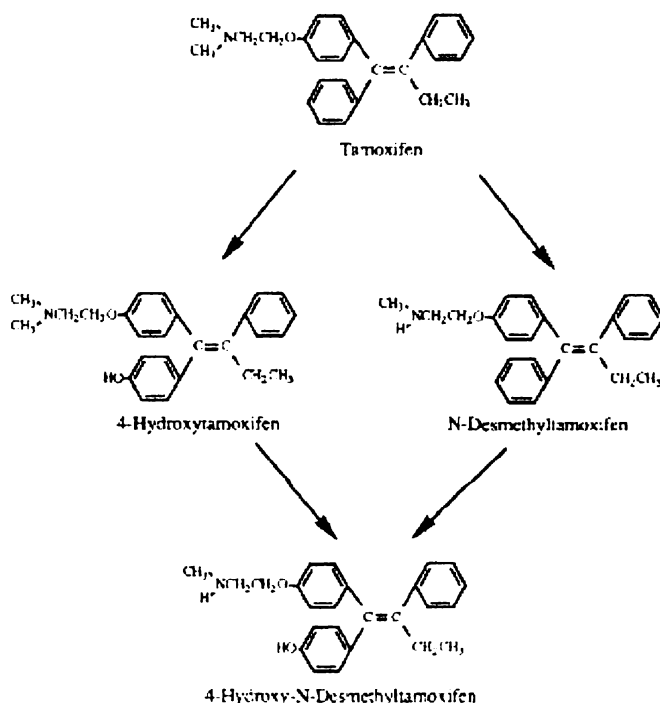
***N*-Demethylace, *N,N*-didemethylace:**

Paralelní dráhou tvorby aduktů tamoxifenu s DNA je, vedle α -hydroxylace, *N*-demethylace. *N*-demethylace může předcházet nebo následovat α -hydroxylaci v aktivační dráze. Menší, doplňkovou dráhou α -hydroxylace, je také *N,N*-didemethylace.^[24]

4-Hydroxy-N-desmethyltamoxifen:

Tento metabolit existuje jako směs *cis* (30%) a *trans* (70%) isomerů ve žluči. *Trans* isomer tamoxifenu je obecně estrogenový antagonist a *cis* isomer může konat jako agonista. Takovéto isomerace aktivních metabolitů mohou mít farmakodynamické důsledky.^[34]

Podobně jako v případě 4-hydroxytamoxifenu, byla také u 4-hydroxy-*N*-desmethyltamoxifenu pozorována vyšší afinita k estrogením receptorům *in vitro* než u tamoxifenu samotného. Možné cesty tvorby 4-hydroxy-*N*-desmethyltamoxifenu v lidském organismu jsou zobrazeny na obrázku 6. Tento metabolit je tvořen hydroxylací na 4-pozici *N*-desmethyltamoxifenu a/nebo *N*-demethylací 4-hydroxytamoxifenu.^[34]



Obrázek 6: Tvorba 4-hydroxy-*N*-desmethyltamoxifenu (převzato z 34)

N-Oxidace:

Další doprovázející dráhou metabolismu tamoxifenu je *N*-oxidace. Bylo však dokázáno, že *N*-oxid tamoxifenu nebo metabolity obsahující *N*-oxid nejsou důležité pro tvorbu aduktů s DNA *in vivo*.^[24]

N-Oxid tamoxifenu:

Jako hlavní metabolit tvořený při inkubaci tamoxifenu s potkaními jaterními mikrosomy byl nalezen *N*-oxid tamoxifenu. Na rozdíl od situace *in vivo*, *N*-oxid tamoxifenu a *N*-oxid α -hydroxytamoxifenu tvoří v játrech potkanů a v potkaních hepatocytech adukty s DNA, které jsou však chromatograficky nerozlišitelné od aduktů tvořených tamoxifenem a α -hydroxytamoxifenem. Zdá se, že ke ztrátě *N*-oxidu dochází dříve, než dojde k další metabolické aktivaci, nebo dříve, než se naváže k DNA.^[24]

V lidském organismu je tamoxifen metabolizován především cytochromy P450. *Tabulka 1* uvádí přehled cytochromů P450, které se na jeho metabolismu podílí.

Tabulka 1: Přehled participací jednotlivých CYP na biotransformaci tamoxifenu^[35]

REAKCE	KATALYZÁTORY
4-hydroxylace	<i>nižší koncentrace substrátu:</i> CYP2D6 s přispěním CYP2B6, 2C9, 3A4, 1A1, 1A2, 3A5 <i>vyšší koncentrace substrátu:</i> CYP2B6
4'-hydroxylace	CYP2D6, CYP2B6
<i>N</i> -demethylace	<i>nižší koncentrace substrátu:</i> CYP2D6, 1A1, 1A2, 3A4 <i>vyšší koncentrace substrátu:</i> CYP2D6, s přispěním CYP1A1, 1A2, 1B1, 2C9, 2C19, 3A4, 3A5
isomerace <i>trans</i> -4-hydroxytamoxifenu na <i>cis</i> -4-hydroxytamoxifen	<i>nižší koncentrace substrátu:</i> 1B1*, s přispěním CYP2B6 a CYP2C19 <i>vyšší koncentrace substrátu:</i> CYP1A1, 1B1, 2B6, 2D6, 3A4, 3A5
<i>N,N</i> -didemethylace	CYP1A2, CYP2D6

* Bylo popsáno několik odlišných alelických variant forem CYP1B1. Studie ukázaly rozdíl v aktivitě CYP1B1 varianty obsahující Leu resp. Val na pozici 432.^[35]

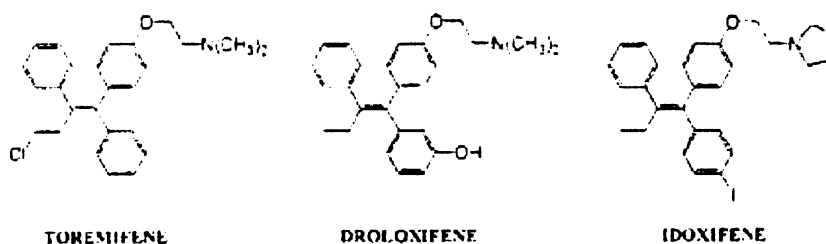
1.4.1.3 Analoga tamoxifenu

Je známo několik strukturálních analogů tamoxifenu.

Analog tamoxifenu **toremifen** (obrázek 7) má rovněž dvojí, antiestrogenní a estrogenní, aktivitu. Jeho antiestrogenní aktivita je dokonce silnější než aktivita tamoxifenu.^[36]

Droloxifen (obrázek 7) má srovnatelnou účinnost jako tamoxifen^[36], ale netvoří adukty s DNA v játrech potkana, podobně jako **idoxifen** (obrázek 7).^[24]

Trioxifen má pětinasobně vyšší afinitu k estrogenním receptorům, a narozdíl od tamoxifenu postrádá estrogenní aktivitu.^[36]



Obrázek 7: Vzorce toremifenu, droloxifenu a idoxifenu (převzato z 24)

1.4.1.4 Indikace tamoxifenu

Hlavní indikací tamoxifenu je karcinom prsu v pokročilém stádiu u postmenopauzálních žen s nádory závislými na hladinách hormonů, včetně adjuvantního podávání po chirurgickém odstranění nádoru.^[23,32]

Cílem adjuvantní hormonální léčby tamoxifenem je likvidace reziduálních nádorových buněk, zabránění recidivy onemocnění a vzniku duplicitního karcinomu v druhém prsu. Řada studií zjistila pozitivní efekt adjuvantně podávaného tamoxifenu vůči kontrolní skupině, která užívala placebo. Lepších výsledků bylo dosaženo při pětileté léčbě, porovnáním s léčbou v délce 1-2 let. Adjuvantní podávání u časných stádií rakoviny prsu po dobu 2-5 let snížilo počet relapsů o 16%, riziko úmrtí o 25% a úmrtnost o 8% za 10 let. Zavedení tamoxifenu do adjuvantní léčby znamená více než tisíce zachráněných životů ročně a jeden z největších úspěchů v léčbě nádorových onemocnění.^[31,32,37]

Účinnost tamoxifenu byla v adjuvantní hormonální léčbě prokázána jak u premenopauzálních, tak postmenopauzálních žen, pokud v nádorových buňkách dochází k tvorbě hormonálních receptorů.^[31] Při vysoké hladině estrogenních receptorů a jejich přítomnosti ve většině nádorových buněk lze tedy předpokládat dobrou odpověď na hormonální léčbu. Postmenopauzální pacientky mají častěji nádory, ve kterých jsou tyto hormonální receptory přítomné, proto je u nich léčba účinnější.^[32]

„Receptor-pozitivní buňka“ obsahuje stovky nebo tisíce těchto receptorů, které jsou umístěny v jádře a také v cytoplasmě. Jsou obsaženy v buňkách prsních rakovinných tkání, ale vyskytují se také v mnoha normálních buňkách včetně kostí, jater, endometria a normální prsní tkáni.^[28]

Tamoxifen je dále indikován u karcinomu prsu mužů, jako doplňková terapie maligního melanomu, hepatocelulárního karcinomu a adenokarcinomu ledviny.^[23]

1.4.1.5 Vedlejší účinky tamoxifenu

Tolerance vůči tamoxifenu je velmi dobrá. Vedlejší účinky se objevují jen v malé míře. Mohou se vyskytnout mírné zažívací obtíže, nevolnost a zvracení či návaly horka. Vzácně se může objevit vaginální krvácení, retence tekutin a otoky, přechodná trombocytopenie a tromboflebitida, cystické zduření ovarií. Při dlouhodobém podávání byly pozorovány poruchy zraku. U některých pacientek s kostními metastázemi byla po podání tamoxifenu popsána bolestivost kostí, zejména v počátku léčby. U žen před menopauzou se mohou objevit poruchy menstruačního cyklu.^[23]

Při léčbě kardiovaskulárních onemocnění tamoxifenem se objevuje zvýšená incidence plicních embolií. Prokoagulační působení tamoxifenu může být rovněž příčinou zvýšeného výskytu cévních mozkových příhod u žen léčených tímto přípravkem. K nejdůležitějším nežádoucím účinkům tamoxifenu však patří indukce endometriálního karcinomu.^[30] Na zvyšujícím se výskytu rakoviny endometria mezi ženami užívajícími tamoxifen se shodlo již mnoho studií. Avšak výhody užívání tamoxifenu pro pacientky s rakovinou prsu stále vysoce převažují rizika.^[24]

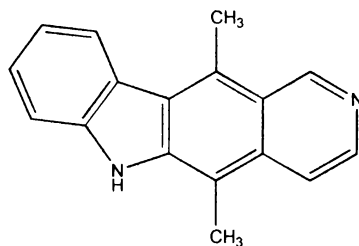
Výskyt nežádoucích účinků je možno v některých případech omezit snížením dávek bez ovlivnění terapeutického účinku.^[23]

Při užívání tamoxifenu se může časem objevit rezistence na jeho podávání. Rakovinné buňky jsou na léčivo zpočátku velmi citlivé, ale potom reagují stále méně. Pokud

tamoxifenová terapie selhává, jsou k léčbě užívány další hormonální činidla, např.: aminoglutethimid, halotestin, megestrol.^[28]

1.4.2 Ellipticin

Ellipticin (obrázek 8) je z chemického hlediska pyridokarbazol, jehož systematický název je 5,11-dimethyl-6H-pyrido[4,3-b]karbazol.^[38,39,40]



Obrázek 8: Vzorec ellipticinu (převzato z 40)

Ellipticin a jeho deriváty jsou používány jako protinádorová léčiva, zejména při pokročilém karcinomu prsu s kostními metastázemi, akutní myeloblastické leukémii, sarkomech ledvin a karcinomu štítné žlázy.^[38,39,40] Hlavním důvodem pro zájem ellipticinu je jeho vysoká efektivita proti několika typům rakoviny a jeho relativně nízké vedlejší účinky. Nicméně bylo zjištěno, že je silný mutagen.^[38,41]

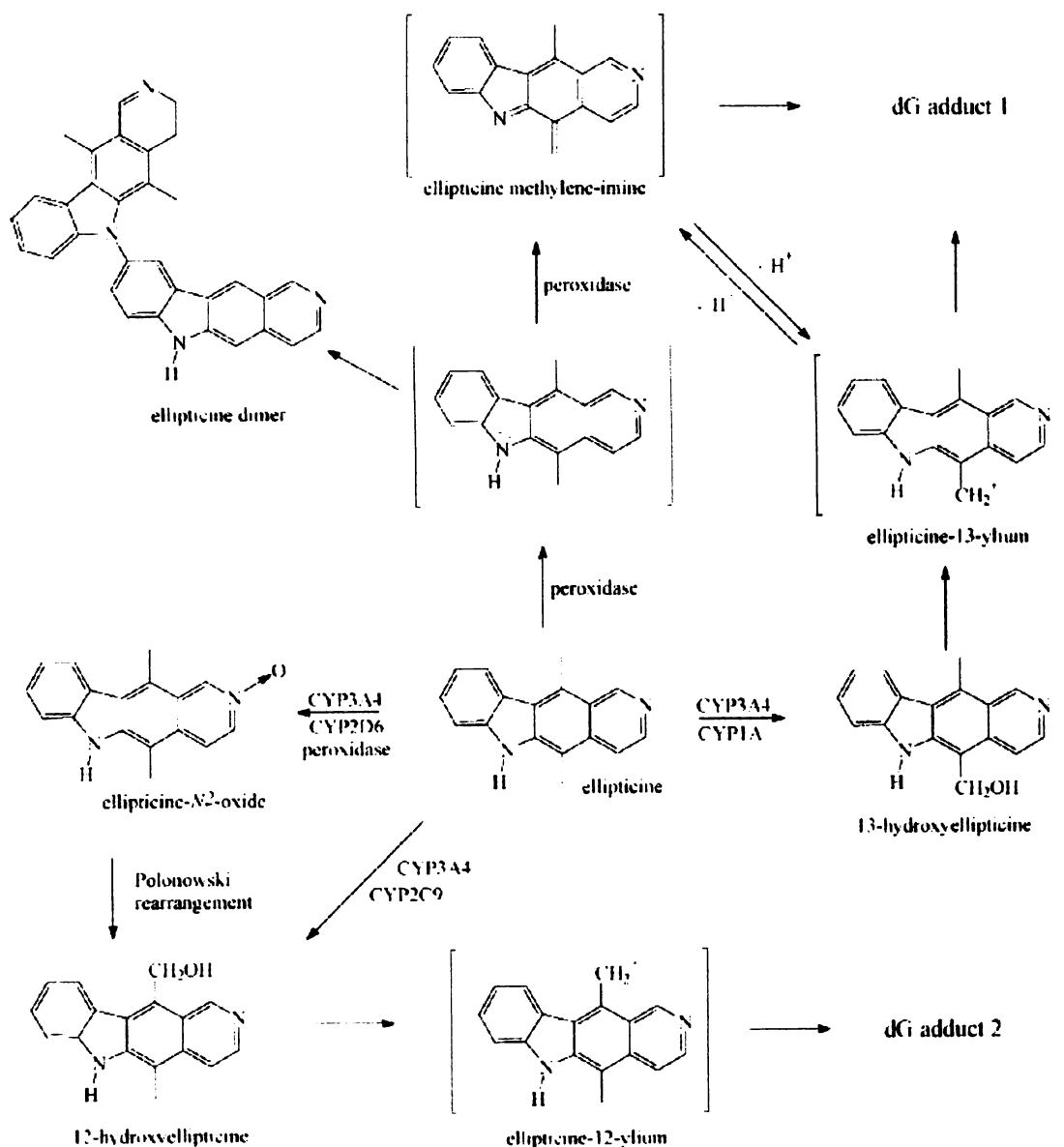
Modifikace ellipticinu vedly ke studiu přípravy cíleně směřovaného léčiva, které by mělo vyšší protinádorový účinek, vyšší selektivitu a specifitu vůči nádoru a vyšší hydrofobicitu pro zlepšení distribuce v lidském organismu.^[38,39]

Významným místem pro derivatizaci molekuly ellipticinu je uhlíkový atom v poloze 9, kdy vzniká 9-hydroxyellipticin (majoritní metabolit v lidském organismu), 9-methoxyellipticin a 9-chloroellipticin. Další místem modifikace je atom dusíku v poloze 2, kdy vzniká 9-hydroxy-2-methylellipticinium (ve formě acetátu), 9-methoxy-2-methylellipticinium-acetát a 9-chlor-2-methylellipticinium-acetát.^[38,39]

Stěžejními enzymy, které se podílí na biotransformaci ellipticinu, jsou cytochromy P450, z nichž nejefektivnější jsou isoformy CYP1A1 a CYP1A2. Samotný ellipticin působí jako induktor CYP1A1.^[38]

Ellipticiny patří do skupiny protinádorových léčiv, jejichž mechanismus účinku není ještě přesně rozluštěn. Předpokládá se, že mechanismem protinádorového účinku je interkalace do dvoušroubovicové struktury DNA, která vyplývá z velikosti a tvaru molekuly ellipticinu. Interkalace je způsobena slabými reverzibilními hydrofobními interakcemi mezi methylovou skupinou ellipticinu a thyminem DNA. Dalším mechanismem může být působení ellipticinu jako inhibitoru topoisomerasy II, kdy se

ellipticin váže s proteinem topoisomerasy II za tvorby ternárního komplexu, který je katalyticky neaktivní a vede ke stimulaci tvorby řetězových zlomů v DNA. Ellipticin a 9-hydroxyellipticin způsobují selektivní inhibici fosforylace produktu tumorového supresorového genu, proteinu p53. Inhibice fosforylace proteinu p53 je pravděpodobně způsobena inhibicí specifické cyklin-dependentní kinasy a nahromadění defosforylovaného proteinu p53 pak může vyústit v indukci apoptosy. Dále ellipticin inhibuje oxidační fosforylaci, která vede ke drastickému snížení obsahu ATP v buňkách, což rezultuje v jejich zánik. Je známé také působení ellipticinu jako inhibitoru telomerasy.^[38]



Obrázek 9: Metabolismus ellipticinu (převzato z 41)

Při terapii ellipticiny byla pozorována interindividuální variabilita v odpovědích pacientů na podané léčivo. Specifické působení ellipticinu pravděpodobně vychází z rozdílné enzymové výbavy lidského organismu. Za přítomnosti enzymů, které jsou důležité pro biotransformaci ellipticinu dochází k aktivaci léčiva na terapeuticky účinnější derivát, který pak buňky novotvaru poškozuje efektivněji.^[38]

13-hydroxyellipticin a 12-hydroxyellipticin jsou metabolity ellipticinu, které tvoří dva hlavní adukty s DNA (*obrázek 9, str. 30*) *in vitro* a *in vivo* v játrech, ledvinách, plicích, slezině, srdci a mozku potkanů léčených ellipticinem. Cílovou bází pro jejich vazbu k DNA je deoxyguanosin.^[41,42]

2 Cíl práce

Základními cíli předkládané bakalářské práce byly dva úkoly:

1. shromáždění informací o enzymech biotransformujících léčiva, a o dvou protinádorových léčivech, tamoxifenu a ellipticinu
2. sledovat expresi enzymů oxidujících ellipticin (cytochromy P450 a peroxidasy) v lidských neuroblastomových buněčných liniích a v buňkách lidského prsního adenokarcinomu MCF-7.

Vypracování bakalářské práce bylo podporováno granty GAČR (203/06/0329) a MŠMTČR (MSM0021620808).

3 Materiál a metody

3.1 Použité chemikálie

akrylamid – *Fluka (Švýcarsko)*

bromfenolová modř – *Lachema (ČR)*

5-bromo-4-chloro-3-indolylfosfát/nitro blue tetrazolium (BCIP/NBT) – *Sigma (USA)*

Complete – *Roche (Švýcarsko)*

cyklooxygenasa-1 (COX-1) – *Sigma (USA)*

cyklooxygenasa-2 (COX-2) – *Gentest Corp. (USA)*

dihydrogenfosforečnan sodný – *Lachema (ČR)*

4,4'-dikarboxy-2,2'-bicinchoninová kyselina (BCA) – *Sigma (USA)*

dodecylsulfát sodný (SDS) – *Fluka (Švýcarsko)*

ellipticin – *Sigma (USA)*

glycerol – *Penta (ČR)*

glycin – *Fluka (Švýcarsko)*

hydrogenfosforečnan sodný – *Lachema (ČR)*

hydrogenuhličitan sodný – *Lachema (ČR)*

hydroxid sodný – *Lachema (ČR)*

chlorid sodný – *Lachema (ČR)*

Igepal CA 630 – *Fluka (Švýcarsko)*

ImmobilonTM – P transfer membrana (PVDF) – *Milipore Corp. (USA)*

kyselina chlorovodíková – *Lachema (ČR)*

lidský rekombinantní CYP1A1 (SupersomyTM) – *Gentest Corp. (USA)*

lidský rekombinantní CYP1A2 (SupersomyTM) – *Gentest Corp. (USA)*

lidský rekombinantní CYP3A4 (SupersomyTM) – *Gentest Corp. (USA)*

lidský rekombinantní CYP1B1 (SupersomyTM) – *Gentest Corp. (USA)*

lidský rekombinantní CYP19A1 (SupersomyTM) – *Gentest Corp. (USA)*

2-merkptoethanol – *Fluka (Švýcarsko)*

methanol – *Lachema (ČR)*

Na deoxycholát – *Sigma (USA)*

N,N'-methylen-bis-akrylamid (BIS) – *Fluka (Švýcarsko)*

N,N,N',N'-tetramethyl-ethylendiamin (TEMED) – *Serva (Německo)*

persíran amonný – *Lachema (ČR)*

„primární protilátky“ proti cyklooxygenase-1 (COX-1) a cyklooxygenase-2 (COX-2) – *Gentest Corp. (USA)*

„primární protilátka“ proti CYP1B1 – *Abcam (UK)*

„primární protilátka“ proti CYP19 – *DPC Biermann (Německo)*

„sekundární protilátka“ (kozí IgG proti myší IgY značená alkalickou fosfatase) - *BIO-RAD (USA)*

„sekundární protilátka“ (králičí IgG proti kuřecí IgY značená alkalickou fosfatase) – *Sigma (USA)*

„sekundární protilátka“ (kozí IgG proti králičí IgY s navázanou křenovou peroxidase) – *Sigma (USA)*

síran měďnatý - *Lachema (ČR)*

tartarát sodný - *Lachema (ČR)*

tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS) – *Loba Feinchemie (Rakousko)*

Triton X-100 – *Serva (Německo)*

uhličitan sodný - *Lachema (ČR)*

Všechny chemikálie byly čistoty p.a. nebo vyšší.

„Primární protilátky“ proti CYP1A1 a CYP3A4 byly připraveny v naší laboratoři doc. RNDr. Petrem Hodkem, CSc.

Buňky prsního adenokarcinomu MCF-7 byly dodány z Oddělení molekulární toxikologie spolupracujícího pracoviště Německého centra výzkumu rakoviny v Heidelbergu.

Neuroblastomové buněčné linie UKF-NB-3, UKF-NB-4, UKF-NB-4^(elli), IMR-32 byly dodány Klinikou dětské hematologie a onkologie 2.LF UK v Praze Motole.

3.2 Použité metody

3.2.1 Extrakce proteinů z buněčných linií

Pelety jednotlivých buněčných linií byly resuspendovány v přibližně stejném objemu pufru (pH 8, 50 mM TRIS/HCl + 150 mM NaCl + 1% Igepal CA 630 + 0,5% Na deoxycholát + 0,1% SDS), ke kterému byl těsně před použitím přidán inhibitor proteas Complete (25x koncentrovaný). Vzorky byly inkubovány 60 minut na ledu. Dále centrifugovány 20 minut při 16 000 g a 4°C. Poté byl odebrán supernatan, ve kterém byly stanoveny proteiny, jak je uvedeno v kapitole 3.2.2.

3.2.2 Stanovení koncentrace proteinů

Stanovení koncentrace proteinů bylo provedeno metodou dle Wiechelmana a kol.^[43] Metoda je založena na tvorbě modře zbarveného komplexu, který vzniká reakcí postranních skupin některých aminokyselin s 4,4'-dikarboxy-2,2'-bicinchoninovou kyselinou (BCA). Během reakce jsou měďnaté ionty obsažené v činidle redukovány působením postranních aminokyselinových řetězců na měďné, což se projeví změnou zbarvení, jehož intenzita (A_{562}) je pak přímo úměrná koncentraci bílkoviny.^[43]

Činidlo na stanovení koncentrace proteinu bylo připraveno rozpuštěním 0,06 g BCA v 5,88 ml *roztoku A* (0,4 % NaOH, 0,95 % NaHCO₃, 2 % Na₂CO₃·H₂O, 0,16 % tartarát sodný, pH=11,25). Poté bylo přidáno 0,120 ml *roztoku B* (4 % CuSO₄·5 H₂O v destilované vodě).

K 20 μl vzorku bylo do vyžíhané zkumavky přidáno 980 μl činidla s BCA. Pro sestrojení kalibrační křivky bylo do zkumavek pipetováno 1, 2, 5, 10, 15, 20 μl standardu (hovězí sérový albumin BSA, 1,0 mg/ml), doplněno destilovanou vodou do 20 μl a přidáno 980 μl činidla s BCA. Srovnávací vzorek obsahoval 20 μl destilované vody a 980 μl činidla s BCA (blank). Po inkubaci při teplotě 60°C v délce jedné hodiny byla změřena absorbance standardů a vzorků při 562 nm proti srovnávacímu vzorku. Byla sestrojena kalibrační křivka a z ní určena koncentrace proteinu ve vzorku. Měření bylo prováděno na přístroji Hewlett Packard 8453 E v kyvetě o optické dráze 1 cm.

3.2.3 SDS-elektroforesa

Elektroforesa buněčných lyzátů (kapitola 3.2.1) v přítomnosti dodecylsulfátu sodného byla prováděna na polyakrylamidovém gelu v diskontinuálním prostředí za použití 7,5, 8, 10% separačního a 4% zaostřovacího gelu. Pro elektroforesu byla použita aparatura firmy Amersham Biosciences (USA). Po ztuhnutí gelů byly do jamek pipetovány vzorky a standardy o koncentraci 30 resp. 60 μg /jamka. Všechny standardy a vzorky byly smíchány se vzorkovým redukujícím pufrům (pH = 6,8; 0,063 M TRIS/HCl; 2% SDS, 10% glycerol, 5% 2-merkaptoethanol; 0,003% bromfenolová modř) v poměru 1:1. Krátce před nanesením do jamek byly všechny vzorky 5 minut povařeny. Elektroforesa probíhala cca 2 hodiny při konstantním proudu 20 mA/1 sklo.

3.2.4 Western blotting

Po ukončení elektroforesy byl gel opatrně vyjmut, označen a 20 minut inkubován v „transferovém“ pufru (pH = 8,3; 0,025 M TRIS/HCl; 0,192 M glycin, 10% methanol). Polyvinylidendifluoridová membrána (PVDF) byla krátce (1 s) ponořena do methanolu, 5 minut do destilované vody a 15 minut do „transferového“ pufru. 3 kusy chromatografického papíru Whatman byly přiloženy k sobě, ponořeny do „transferového“ pufru a položeny do aparatury pro „Western blotting“ (B-43 Biometra). Na ně byly postupně položeny: gel, PVDF membrána a další 3 kusy chromatografického papíru, které byly předtím také ponořeny do „transferového“ pufru. Elektropřenos probíhal 50 minut při 4 mA/cm^2 gelu. Membrána se sorbovanými proteiny byla přes noc blokována v blokovacím pufru (pH = 7,2; 5% sušené mléko Milli + 1,8 mM Na_2HPO_4 + 1 mM NaH_2PO_4 + 0,134 M NaCl + 0,3% Triton X-100). Inkubace se specifickou primární protilátkou („chicken anti“ CYP1A1, „chicken anti“ CYP3A4, „rabbit anti“ CYP1B1, „rabbit anti“ CYP19, „mouse anti“ COX-1, „mouse anti“ COX-2) probíhala 120 minut za míchání při laboratorní teplotě. Poté byla primární protilátka odmyta blokovacím roztokem (5 x 3 minuty). Membrána byla poté vložena do roztoku sekundární protilátky (pro protilátky proti CYP1A1 a CYP3A4 králičí IgG proti kuřecí IgY s navázanou alkalickou fosfatase, pro protilátky proti COX-1 a COX-2 kozí IgG proti myší IgY s navázanou alkalickou fosfatase, pro protilátky proti CYP1B1 a CYP19 kozí IgG proti králičí IgY s navázanou křenovou peroxidase), kde byla inkubována za shodných podmínek 60 minut. Po odmytí sekundární protilátky „blokovacím roztokem“ (4 x 2 minuty) a pufrům

TRIS-PBS (5 x 2 minuty) byla membrána vyvolána roztokem substrátu pro alkalickou fosfatasa (BCIP/NBT) připraveným podle pokynů výrobce.

4 Výsledky

4.1 Expresse enzymů metabolizujících ellipticin v nádorových buněčných liniích

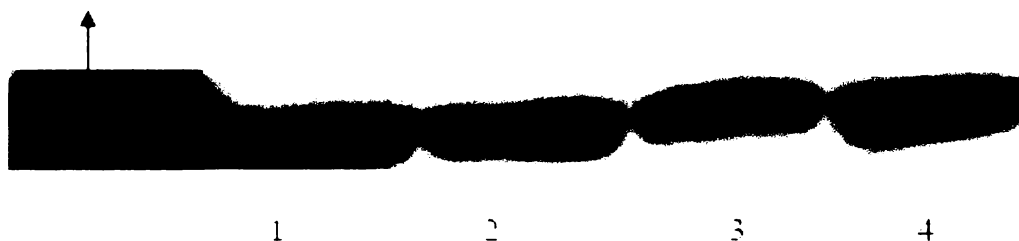
Sledovali jsme, zda jsou v neuroblastomových liniích zkoumaných v naší laboratoři (UKF-NB-3, UKF-NB-4, UKF-NB-4^{elli} (buněčná linie rezistentní na ellipticin) a IMR-32) a v nádorové linii prsního adenokarcinomu (MCF-7) exprimovány enzymy, které oxidačně aktivují ellipticin na metabolity schopné kovalentně modifikovat DNA.

4.1.1 Expresse enzymů metabolizujících ellipticin v neuroblastomových liniích

V neuroblastomových buněčných liniích jsme sledovali expresi cytochromů P450 1A1, 1A2, 1B1, 3A4, 19 a peroxidasy COX-1 a COX-2. Metodou „Western blot“ jsme zjistili, že studované buněčné nádorové linie exprimují CYP1A1, CYP1B1, CYP3A4 a CYP19 (obrázek 10 - 13), zatímco cytochrom CYP1A2 a peroxidasy COX-1 a COX-2 v neuroblastomových liniích detekovány nebyly (obrázek 14 - 15, výsledek COX-2 není uveden).



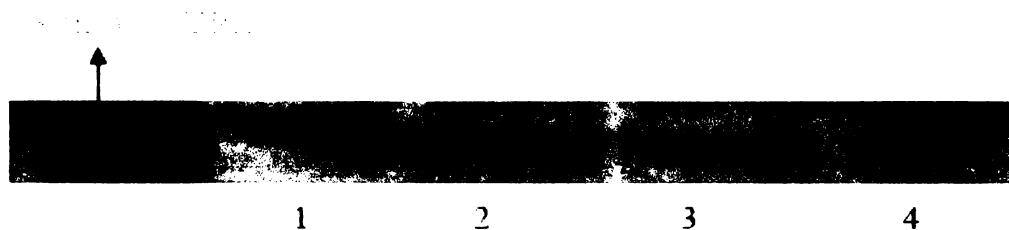
Obrázek 10: Western blot vzorků neuroblastomových buněčných linií sledující expresi CYP1A1. Zleva 1. UKF-NB-3, 2. UKF-NB-4, 3. UKF-NB-4^{elli}, 4. IMR-32.



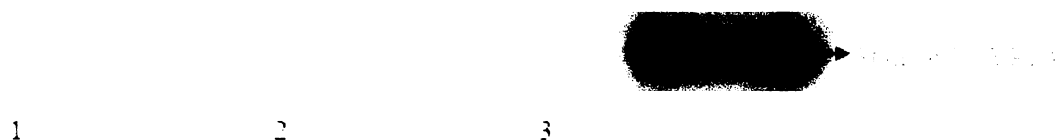
Obrázek 11: Western blot cytochromu P450 1B1 a vzorků neuroblastomových buněčných linií. Zleva 1. IMR-32, 2. UKF-NB-4, 3. UKF-NB-4^{elli}, 4. UKF-NB-3.



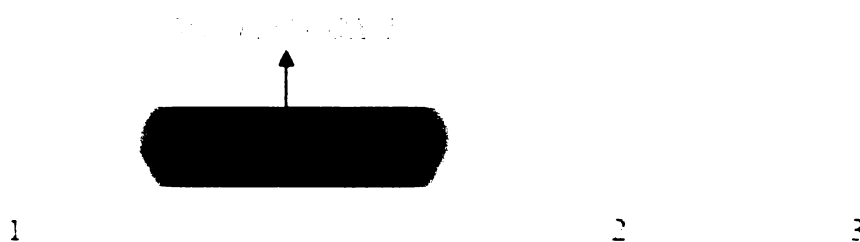
Obrázek 12: Western blot cytochromu P450 3A4 a vzorků neuroblastomových buněčných linií. Zleva 1. IMR-32, 2. UKF-NB-4^{elll}, 3. UKF-NB-4, 4. UKF-NB-3.



Obrázek 13: Western blot cytochromu P450 19 a vzorků neuroblastomových buněčných linií. Zleva 1. IMR-32, 2. UKF-NB-4^{elll}, 3. UKF-NB-4, 4. UKF-NB-3.



Obrázek 14: Western blot cytochromu P450 1A2 a vzorků neuroblastomových buněčných linií. Zleva 1. IMR-32, 2. UKF-NB-3, 3. UKF-NB-4.

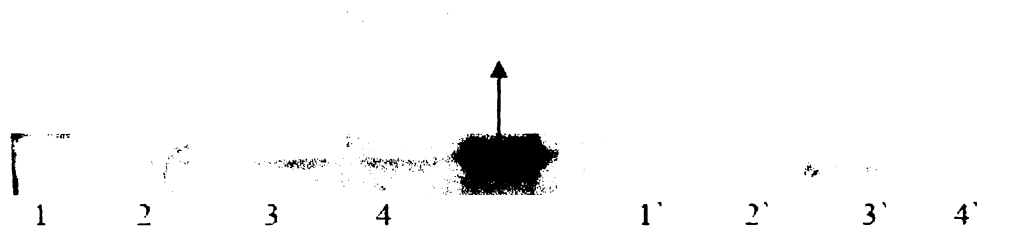


Obrázek 15: Western blot cyklooxygenasy-1 a vzorků neuroblastomových buněčných linií. Zleva 1. IMR-32, 2. UKF-NB-3, 3. UKF-NB-4.

4.1.2 Exprese enzymů metabolizujících ellipticin v nádorových buňkách lidského prsního adenokarcinomu (v MCF-7 buňkách)

Porovnávali jsme expresi enzymů biotransformujících ellipticin ve dvou typech buněk. V buňkách MCF-7 kontrolních, kultivovaných za běžných podmínek pro jejich růst, a v buňkách, které byly kultivovány po dobu 1 měsíce v 0,1 μM ellipticinu. Jak buňky kontrolní, tak ty, které byly premedikovány ellipticinem, byly poté vystaveny působení 0,5 μM ellipticinu po dobu 24 a 48 hodin. V těchto buněčných liniích jsme sledovali expresi cytochromů P450 1A1, 1B1, 3A4, 19 a peroxidasy COX-1 a COX-2.

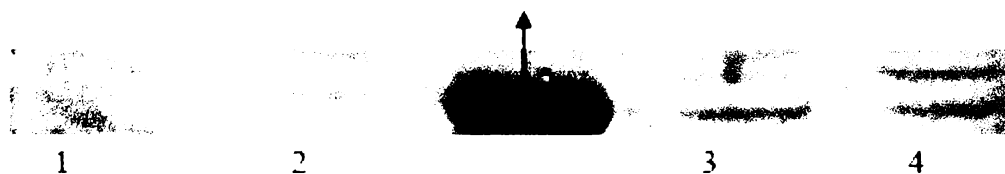
Metodou „Western blot“ jsme zjistili, že v buňkách MCF-7 jsou exprimovány CYP1A1, CYP1B1, CYP3A4 a CYP19 (obrázek 16 - 18, výsledek pro CYP19 není uveden). Byla pozorována zvýšená exprese cytochromů P450 1A1, 1B1 a 3A4 způsobena vystavením buněk 0,1 μM ellipticinu a působením 0,5 μM ellipticinu po dobu 24 a 48 hodin. Z toho lze usuzovat, že ellipticin může působit jako induktor těchto cytochromů P450 v nádorových buňkách. Peroxidasy COX-1 a COX-2 v těchto buněčných liniích detekovány nebyly (obrázek 19, výsledek pro COX-2 není uveden).



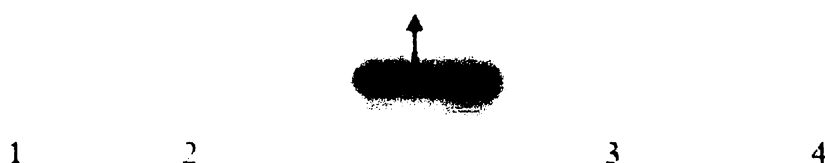
Obrázek 16: Western blot cytochromu P450 1A1 a vzorků buněk MCF-7. Zleva 1. buňky MCF-7 dlouhodobě preinkubované 0,1 μM ellipticinem a následně vystavené 0,5 μM ellipticinu po dobu 24 hodin, 2. buňky MCF-7 kontrolní, vystavené 0,5 μM ellipticinu po dobu 24 hodin (bez preinkubace ellipticinem), 3. buňky MCF-7 dlouhodobě preinkubované 0,1 μM ellipticinem a následně vystavené 0,5 μM ellipticinu po dobu 48 hodin, 4. buňky MCF-7 kontrolní, vystavené 0,5 μM ellipticinu po dobu 48 hodin (bez preinkubace ellipticinem). Vzorky 1', 2', 3', 4' jsou totožné se vzorky 1, 2, 3, 4, liší se pouze v koncentraci na jamku, ta je zde dvojnásobná (60 μg).



Obrázek 17: Western blot vzorků buněk MCF-7 sledující expresi CYP1B1. Zleva 1. buňky MCF-7 dlouhodobě preinkubované 0,1 μM ellipticinem a následně vystavené 0,5 μM ellipticinu po dobu 24 hodin, 2. buňky MCF-7 kontrolní, vystavené 0,5 μM ellipticinu po dobu 24 hodin (bez preinkubace ellipticinem), 3. buňky MCF-7 dlouhodobě preinkubované 0,1 μM ellipticinem a následně vystavené 0,5 μM ellipticinu po dobu 48 hodin, 4. buňky MCF-7 kontrolní, vystavené 0,5 μM ellipticinu po dobu 48 hodin (bez preinkubace ellipticinem).



Obrázek 18: Western blot cytochromu P450 3A4 a vzorků buněk MCF-7. Zleva 1. buňky MCF-7 dlouhodobě preinkubované 0,1 μM ellipticinem a následně vystavené 0,5 μM ellipticinu po dobu 24 hodin, 2. buňky MCF-7 kontrolní, vystavené 0,5 μM ellipticinu po dobu 24 hodin (bez preinkubace ellipticinem), 3. buňky MCF-7 dlouhodobě preinkubované 0,1 μM ellipticinem a následně vystavené 0,5 μM ellipticinu po dobu 48 hodin, 4. buňky MCF-7 kontrolní, vystavené 0,5 μM ellipticinu po dobu 48 hodin (bez preinkubace ellipticinem).



Obrázek 19: Western blot cyklooxygenasy-1 a vzorků buněk MCF-7. Zleva 1. buňky MCF-7 dlouhodobě preinkubované 0,1 μM ellipticinem a následně vystavené 0,5 μM ellipticinu po dobu 24 hodin, 2. buňky MCF-7 kontrolní, vystavené 0,5 μM ellipticinu po dobu 24 hodin (bez preinkubace ellipticinem), 3. buňky MCF-7 dlouhodobě preinkubované 0,1 μM ellipticinem a následně vystavené 0,5 μM ellipticinu po dobu 48 hodin, 4. buňky MCF-7 kontrolní, vystavené 0,5 μM ellipticinu po dobu 48 hodin (bez preinkubace ellipticinem).

5 Diskuse

Nádorová onemocnění jsou jedním z nejzávažnějších problémů klinické medicíny. Jejich výskyt neustále narůstá a postihuje stále nižší věkové ročníky, což je dáno zejména současným životním stylem (skladba potravy, stres, kontaminace životního prostředí).^[44] Jednou z možností léčby nádorových onemocnění je chemoterapie, tj. léčení chemickými prostředky. Pro chemoterapii zhoubných nádorů jsou používána cytostatika, což jsou léky, které zastavují růst buněk (buněčné dělení). Léčba cytostatiky je systémová léčba, působí tedy na celý organismus. Nepůsobí však výlučně selektivně, tj. pouze na buňky nádoru, ale působí také na různé množící se buňky v těle. Kromě nádorových buněk jsou poškozovány také buňky zdravé (velice citlivé jsou např. bílé krvinky), s čímž souvisí výskyt vedlejších účinků.^[45] Díky znalosti mechanismu působení protinádorových léčiv se optimalizuje používání daného léčiva, a navíc může vést k navržení jeho účinnějších derivátů s cíleným účinkem selektivním pro nádorové buňky.^[44]

Cílem bakalářské práce bylo shromáždit poznatky o dvou významných protinádorových léčivech, tamoxifenu a ellipticinu.

Ellipticin je alkaloid izolovaný z rostlin čeledi *Apocyanaceae*. Samotný ellipticin a některé jeho polárnější metabolity (9-hydroxyellipticin, 9-hydroxy-*N*²-methylellipticinium, 9-chloro-*N*²-methylellipticinium a 9-methoxy-*N*²-methylellipticinium) jsou vysoce efektivní vůči několika typům rakoviny (kostní metastáze rakoviny prsu, zhoubné nádory ledvin, nádory mozku a myeloblastická leukemie) a vykazují nízké toxické vedlejší účinky.

Mechanismus působení ellipticinu je založen hlavně na interkalaci do DNA a/nebo inhibici topoisomerasy II. V naší laboratoři bylo objeveno, že ellipticin se kovaletně váže k DNA po jeho enzymové aktivaci, což by mohlo vysvětlovat jeho specifickou protinádorovou aktivitu. Jako cílová báze vazby ellipticinových metabolitů (13-hydroxyellipticin a 12-hydroxyellipticin) byl identifikován deoxyguanosin.^[46]

Jelikož jsou mechanismy účinku ellipticinu v současné době středem zájmu mnoha laboratoří, nevyjímaje naší, bylo o něm publikováno již mnoho prací a článků. Proto jsem se podrobněji zaměřila na mechanismus působení a metabolickou aktivaci tamoxifenu.

Tamoxifen je nesteroidní antiestrogenní léčivo používané při léčbě nádorů, jejichž růst souvisí s přímým působením hormonů kolujících v těle, např. karcinom prsu.^[22,32] Hormonoterapie je většinou velmi šetrná, má dobrou naději na léčebný účinek a liší se u

žen, které ještě menstrují a u těch, které jsou již v menopauze.^[21] Tamoxifen může působit jako estrogenní antagonist, kdy zabraňuje proliferaci nádorových buněk, protože se váže na cytoplazmatické estrogenní receptory, a tak redukuje počet dostupných receptorů pro vazbu endogenního substrátu. Může však také působit jako estrogenní agonista. Příznivě působí tamoxifen na karcinom prsu, kardiovaskulární systém a kostní aparát.^[32] V lidském organismu je metabolizován cytochromy P450 na aktivnější metabolity, především *N*-desmethyltamoxifen a 4-hydroxytamoxifen.^[4,23]

Cílem další části bakalářské práce bylo zjistit, které z cytochromů P450 a peroxidasy jsou exprimovány v nádorových buněčných liniích studovaných v naší laboratoři, konkrétně v neuroblastomových liniích UKF-NB-3, UKF-NB-4, UKF-NB-4^{elli}, IMR-32 a v buňkách lidského prsního adenokarcinomu MCF-7. Důvod těchto studií byl zřejmý. Některé cytochromy P450 a peroxidasy jsou enzymy, které oxidují ellipticin a tamoxifen na účinnější metabolity.^[44] Ze získaných výsledků je zřejmé, že jak v neuroblastomových buněčných liniích, tak v buňkách lidského prsního adenokarcinomu, jsou exprimovány CYP1A1, CYP1B1, CYP3A4 a CYP19. Expres peroxidasy COX-1 a COX-2 nebyla detekována v žádné z těchto nádorových linií. Peroxidasy se tedy zdají být v tomto směru méně významné.

Zjistili jsme dále, že ellipticin může působit jako induktor některých cytochromů P450, jejichž exprese je ovlivněna Ah receptorem (např. CYP1A1 a CYP1B1). Vlastní aplikace léčiva tedy může stimulovat jeho farmakologické působení.^[44] Vedle zvýšené exprese cytochromů P450 1A1 a 1B1, zjistili jsme i zvýšenou expresi CYP3A4 způsobenou vystavením buněk jak dlouhodobě (1 měsíc) 0,1 μ M ellipticinu, tak i působením 0,5 μ M ellipticinu po dobu 24 a 48 hodin.

6 Závěr

Z výsledků experimentální části předkládané bakalářské práce je patrné, že se stanovené cíle podařilo splnit. V práci byly zjištěny následující poznatky:

- Neuroblastomové linie UKF-NB-3, UKF-NB-4, UKF-NB-4^{elli} a IMR-32 exprimují cytochromy P450 1A1, 1B1, 3A4 a 19. Expresse peroxidas COX-1 a COX-2 a cytochromu P450 1A2 v těchto liniích nebyla detekována.
- V buňkách lidského prsního adenokarcinomu MCF-7 byla zjištěna exprese cytochromu P450 1A1, 3A4, 1B1 a 19. Expresse peroxidas COX-1 a COX-2 v těchto buňkách nebyla detekována.

Výsledky signalizují, že oba typy nádorových buněčných linií jsou vybaveny enzymy, které aktivují ellipticin na metabolity s vyšší farmakologickou účinností.

Seznam použité literatury

1. Ledvina, M., Stoklasová, A., Cerman, J.: Biochemie pro studující medicíny II.díl. Univerzita Karlova, Karolinum, Praha (2004).
2. Kvasničková, E.: Xenobiochemie. Univerzita Karlova, Karolinum, Praha (1995).
3. Dostálek, M.: Enzymatický systém cytochromu P450. Postgraduální medicína 8, 46-54 (2006).
4. Wiseman, H., Goldfarb, P., Ridgway, T., Wiseman, A.: Biomolecular free radical toxicity: causes and prevention. John Wiley & Sons, Chichester, GB (2000).
5. Kousalová, L., Baranová, J., Anzenbacher, P.: Lékové interakce na úrovni cytochromů P450 – Část I. Interakce na úrovni CYP3A4. Klin. Farmakol. Farm. 17, 151-157 (2003).
6. Guengerich, F. P.: Cytochrome P450s and other enzymes in drug metabolism and toxicity. AAPS J. 8 (2006).
7. Hrubý, K., Anzenbacher, P.: Cytochrom P450 – význam v biotransformaci xenobiotik a mezidruhové srovnání. Čs. Fyziol. 46, 34-39 (1997).
8. Guengerich, F. P.: Cytochromes P450, drugs, and diseases. Mol. Interv. 3 (2003).
9. Zhou, H., Josephy, P. D., Kim, D., Gungerich, F. P.: Functional characterization of four allelic variants of human cytochrome P450 1A2. Arch. Biochem. Biophys. 422, 23-30 (2004).
10. Stiborová, M., Hudeček, J., Hodek, P., Frei, E.: Význam cytochromů P450 pro lidské zdraví. Chem. Listy 93, 229-237 (1999).
11. Slanař, O., Perlík, F.: Isoenzym cytochromu P450 – 1A2 a jeho fenotypizace. Klin. Farmakol. Farm. 16, 19-22 (2002).
12. Chang, T. K. H., Chen, J., Pillay, V., Ho, J. Y., Bandiera, S. M.: Real-time polymerase chain reaction analysis of CYP1B1 gene expression in human liver. Toxicol. Sci. 71, 11-19 (2003).
13. Schenkman, J. B., Greim, H.: Cytochrome P450. Springer, Berlin, DE (1993).
14. Quattrochi, L. C., Guzelian, P. S.: CYP3A regulation: from pharmacology to nuclear receptors. Drug Metab. Dispos. 29, 615-622 (2001).
15. Simpson, E. R., Clyne, C., Rubin, G., Boon W. Ch., Robertson, K., Britt, K., Speed, C., Jones, M.: Aromatase – A brief overview. Annu. Rev. Physiol. 64, 93-127 (2002).

16. Ledvina, M., Stoklasová, A., Cerman, J.: Biochemie pro studující medicíny I.díl. Univerzita Karlova, Karolinum, Praha (2004).
17. Poljaková, J.: Disertační práce, PŘF UK, katedra biochemie, Praha (2006).
18. Dubois, R. N., Abramson, S. B., Crofford, L.; Gupta, R. A., Simon, L. S., Putte, Van de L.B.A., Lipský, P. E.: Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB J.* 12, 1063-1073 (1998).
19. Neuroblastom, FN Brno, Klinika dětské onkologie (staženo z <http://www.detskaonkologie.cz/pages/neuroblastom.html>, 28.4.2008).
20. MCF-7, IST National Institute for Cancer Research (staženo z <http://www.biotech.ist.unige.it/cldb/cl3372.html>, 24.4.2008).
21. Konopásek, B., Javůrková, E.: Karcinom prsu. Makropulos, Praha (1998).
22. Dienstbier, Z.: Rakovina prsu u žen. Liga proti rakovině, Praha (1997).
23. Olejárová, M.: Tamoxifen. *Diagnóza* 3, 13 (2000).
24. Phillips, D. H.: Understanding the genotoxicity of tamoxifen? *Carcinogenesis* 22, 839-849 (2001).
25. Boocock, D. J., Maggs, J. L., Brown, K., White, I. N. H., Park, B. K.: Major inter-species differences in the rates of O-sulphonation and O-glucuronylation of α -hydroxytamoxifen *in vitro*: a metabolic disparity protecting human liver from the formation of tamoxifen-DNA adducts. *Carcinogenesis* 21, 1851-1858 (2000).
26. Beland, F. A., Churchwell, M. I., Doerge, D. R., Parkin, D. R., Malejka-Giganti, D., Hewer, A., Phillips, D. H., Carmichael, P. L., da Costa, G. G., Marques, M. M.: Elektrospray ionization-tandem mass spectrometry and ^{32}P -postlabeling analyses of tamoxifen-DNA adducts in humans. *J. Natl. Cancer I.* 96, 1099-1104 (2004).
27. Davis, W., Hewer, A., Rajkowski, K. M., Meinl, W., Glatt, H., Phillips, D. H.: Sex differences in the activation of tamoxifen to DNA binding species in rat liver *in vivo* and in rat hepatocytes *in vitro*: role of sulfotransferase induction. *Cancer Res.* 60, 2887-2891 (2000).
28. DeGregorio, M. W., Wiebe, V. J.: Tamoxifen and breast cancer. Yale University Press, London, GB (1996).
29. Rešlová, T.: Vliv estrogenů na patologickou transformaci endometria v klimakteriu. Galén, Praha (1999).
30. Grainger, D. J., Schofield, P. M.: Tamoxifen v prevenci infarktu myokardu u člověka: preklinické a časné klinické důkazy. *Circulation* 5, 10-15 (2006).

31. Příbylová, O., Petruželka, L., Honová, H., Fischer, J., Bustová, I., Šiffnerová, H., Kůta, M., Miller, V., Hacklová, M., Macháček, J., Kohoutek, M., Vodvářka, P., Kyselá, T., Tajblová, J., Šuk, J., Dorazilová, V., Vedralová, J., Bauer, J.: Tamoxifen nebo tamoxifen v kombinaci s chemoterapií v adjuvantní léčbě karcinomu prsu. Sborník lékařský 102, 65-76 (2001).
32. Vydra, J., Aschermannová, A., Šmakal, M., Petruželka, L.: Tamoxifen v léčbě karcinomu prsu – adjuvantní léčba a studie ATLAS. Diagnóza 3, 12 (2000).
33. Carmichael, P. L., Sardar, S., Crooks, N., Neven, P., Van Hoof, I., Ugwumadu, A., Bourne, T., Tomas, E., Hellberg, P., Hewer, A. J., Phillips, D. H.: Lack of evidence from HPLC ³²P-post-labelling for tamoxifen-DNA adducts in the human endometrium. Carcinogenesis 20, 339-342 (1999).
34. Lien, E. A., Solheim, E., Kvinnsland, S., Ueland, P. M.: Identification of 4-hydroxy-*N*-desmethyltamoxifen as a metabolite of tamoxifen in human bile. Cancer Res. 48, 2304-2308 (1988).
35. Crewe, H. K., Notley, L. M., Wunsch, R. M., Lennard, M. S., Gillam, E. M. J.: Metabolism of tamoxifen by recombinant human cytochrome P450 enzymes: formation of the 4-hydroxy, 4'-hydroxy a *N*-desmethyl metabolites and isomerization of *trans*-4-hydroxytamoxifen. Drug Metab. Dispos. 30, 869-874 (2002).
36. Klener, P.: Protinádorová chemoterapie. Galén, Praha (1996).
37. Petráková, K.: Studie ATAC (Arimidex, Tamoxifen, Alone or in Combination). Lancet Oncol. 4 (čes. vyd.), 8-9 (2005).
38. Stiborová, M., Frei, E.: Deriváty elipticinu s cíleným protinádorovým účinkem. Chem. Listy 95, 549 – 555 (2001).
39. Háčková, M.: Bakalářská práce, PřF UK, katedra biochemie, Praha (2006).
40. Dlouhá, T.: Diplomová práce, PřF UK, katedra biochemie, Praha (2003).
41. Stiborová, M., Rupertová, M., Aimová, D., Ryšlavá, H., Frei, E.: Formation and persistence of DNA adducts of anticancer drug ellipticine in rats. Toxicology 236, 50-60 (2007).
42. Stiborová, M., Rupertová, M., Schmeiser, H. H., Frei, E.: Molecular mechanisms of antineoplastic action of an anticancer drug ellipticine. Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech Repub. 150, 13-23 (2006).

43. Wiechelman, K. J., Braun, R. D., Fitzpatrick, J. D.: Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: identification of the groups responsible for color formation. *Anal. Biochem.* 175, 231-7 (1988).
44. Stiborová, M.: Studium enzymů biotransformujících xenobiotika jako nástroj k poznání mechanismu působení karcinogenů a konstrukce kancerostatik nové generace, Sborník z multioborového semináře „Otevřená věda“, Praha (2005).
45. Dostálová, O.: Jak vzdorovat rakovině. Grada, Praha (1993).
46. Poljaková, J., Forsterová, K., Šulc, M., Frei, E., Stiborová, M.: Oxidation of an antitumor drug ellipticine by peroxidases. *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech Repub.* 149, 449-53 (2005).

