

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Modulace aktivit a exprese enzymů
metabolisujících ellipticin inhibitorem
histondeacetylas trichostatinem A**

**Modulation of activities and expression of
enzymes metabolizing ellipticine by histone
deacetylase inhibitor trichostatin A**

Diplomová práce

Barbora Kopejtková

Školitelka: Prof. RNDr. Marie Stiborová, DrSc.

Praha 2010

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

V Praze dne

.....

Barbora Kopejtková

Chtěla bych vyjádřit poděkování své školitelce Prof. RNDr. Marii Stiborové, DrSc. za odborné vedení, námět k diplomové práci a laskavý přístup při vypracování této práce.

Velký dík také patří RNDr. Michaelae Moserové za pomoc v laboratoři, podnětné rady a cenné připomínky.

Dále děkuji celému kolektivu laboratoře za pomoc a potřebné rady.

Rovněž bych chtěla poděkovat rodičům za podporu při studiu.

Abstrakt

Inhibitor histondeacetylas trichostatin A (TSA) zvyšuje toxicitu protinádorového léčiva ellipticinu vůči lidským neuroblastomovým buněčným liniím. Mechanismus tohoto působení však není znám. Jedním z možných mechanismů je rozvolnění struktury chromatinu, a tím zpřístupnění DNA pro modifikaci. Cílem předkládané diplomové práce bylo studium dalšího z možných mechanismů vysvětlujícího tento dříve popsáný jev. Jedná se o odpověď na otázku, zda TSA neovlivňuje cytotoxicitu ellipticinu vůči neuroblastomům modulací aktivity a exprese cytochromů P450 a peroxidas. Tedy enzymů zodpovědných za míru cytotoxicity ellipticinu vůči nádorovým buňkám. Trichostatin A neovlivňuje oxidaci ellipticinu cytochromy P450 ve směru tvorby jak aktivačních, tak detoxikačních metabolitů tohoto protinádorového léčiva. Při oxidaci ellipticinu peroxidasami TSA zvyšuje tvorbu majoritního metabolitu ellipticinu, dimeru ellipticinu, který je metabolitem detoxikačním. TSA neovlivňuje aktivity CYP1A1, CYP1A2, CYP3A, které významně participují na oxidaci ellipticinu. Trichostatin A působí na expresi enzymů oxidujících ellipticin v neuroblastomových buněčných liniích. V kombinaci s ellipticinem v lidských neuroblastomových buněčných liniích UKF-NB-3 a UKF-NB-4 indukuje expresi CYP1A1 a CYP3A4 a naopak inhibuje expresi laktoperoxidasy.

Abstract

Histone deacetylase inhibitor trichostatin A (TSA) increases cytotoxicity of antineoplastic agent ellipticine to human neuroblastoma cells. Its mechanism of action has not yet been explained. One of the possible mode of action is conformational change in chromatin, which leads to changes in DNA that is more accessible to covalent modification and intercalation. The aim of this work is to study another mode of action, which can explain this phenomenon. The question is, if TSA can increase cytotoxicity of ellipticine to human neuroblastoma cells by modulation of activities and expression of cytochromes P450 and peroxidases. These enzymes are responsible for cytotoxicity of ellipticine to human neuroblastoma cells. TSA has no effect on oxidation of ellipticine mediated by cytochromes P450 leading to metabolites responsible for formation of ellipticine-DNA adducts and detoxication metabolites. TSA increases formation of ellipticine dimer, which is a detoxication metabolite, forming during its oxidation by peroxidases. TSA has no effect on activities of CYP1A1, CYP1A2, CYP3A, which significantly participate in oxidation of ellipticine. TSA modulates expression of enzymes oxidizing ellipticin in human neuroblastoma cells. TSA in the presence of ellipticine increases expression of CYP1A1 a CYP3A4 in UKF-NB-3 and UKF-NB-4 human neuroblastoma cells. On the contrary, TSA decreases expression levels of lactoperoxidase in these cells.

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AhR	receptor pro aromatické uhlovodíky (aryl hydrocarbon receptor)
CAR	constitutive androstane receptor
CYP	cytochrom P450
DMSO	dimethylsulfoxid
EC	číselný kód enzymu
Eli	ellipticin
FAD	flavinadeninukleotid (chinoidní forma)
FAD/FADH/FADH₂	chinoidní forma/semichinoidní radikál/hydrochinon
FMN	flavinadeninmononukleotid (chinoidní forma)
FMN/FMNH/FMNH₂	chinoidní forma/semichinoidní radikál/hydrochinon
Fuc	fukosa
GIT	gastrointestinální trakt
GlcNAc	N-acetylglukosamin
HATs	histonacetyltransferasy
HDACs	histondeacetylasy
HIV	human imunodeficiency virus
HRP	křenová peroxidasa (horseradish peroxidase)
LPO	laktoperoxidasa (lactoperoxidase)
Man	manosa
MFO	systém monooxygenas se smíšenou funkcí (mixed function oxygenases system)
MROD	7-methoxyresorufin <i>O</i> -demethylační aktivita
NAD⁺ (NADH)	nikotinamidadeninukleotid oxidovaný (redukovaný)
NADP⁺ (NADPH)	nikotinamidadeninukleotidfosfát oxidovaný (redukovaný)
NADPH-GS	NADPH-generující systém
NSCLC	nemalobuněčný typ karcinomu plic (non-small cell lung cancer)
PCN	pregnenolon-16 α -karbonitril
PPAR	peroxisome proliferator-activated receptor
PXR	pregnane X receptor

RH	substrát
P450	pigment s maximem absorbance při 450 nm (cytochrom P450)
ROH	hydroxylovaný produkt
RP-HPLC	vysokotlaká kapalinová chromatografie s reverzní fází (reversed phase high-pressure liquid chromatography)
RPM	otáčky za minutu (revolution per minute)
SAHA	suberoylanilid hydroxamová kyselina (suberoyl anilide hydroxamic acid)
SK-N-AS	lidské neuroblastomové buněčné linie
SXR	steroid xenobiotic receptor
TSA	trichostatin A
UKF-NB-3	lidské neuroblastomové buněčné linie
UKF-NB-4	lidské neuroblastomové buněčné linie
UV	ultrafialové záření
VPA	kyselina valproová
Xyl	xylulosa

1	Úvod	11
1.1	<i>Protinádorová léčiva</i>	11
1.1.1	Nádorová onemocnění	11
1.1.2	Etapy postupné maligní transformace	12
1.1.3	Kancerogenní faktory	12
1.1.4	Farmakokinetika cytostatik	13
1.1.5	Mechanismus účinku cytostatik	14
1.2	<i>Ellipticin</i>	16
1.2.1	Mechanismus působení ellipticinu	17
1.2.2	Farmakokinetika ellipticinu	19
1.2.3	Oxidace ellipticinu cytochromy P450	19
1.2.4	Oxidace ellipticinu peroxidasami	20
1.3	<i>Inhibitory histondeacetylas</i>	23
1.3.1	Inhibitory histondeacetylas jako doplňující léčebné agens v karcinogenesi	24
1.4	<i>Mikrosomální monooxygenasový systém (MFO systém)</i>	26
1.4.1	NADPH:cytochrom P450 reduktasa	27
1.4.2	Cytochromy P450	28
1.4.2.1	Nomenklatura cytochromů P450	29
1.4.2.2	Spinové formy cytochromů P450	30
1.4.2.3	Enzymové reakce cytochromu P450	31
1.4.2.4	Reakční mechanismus monooxygenasové reakce	31
1.4.2.5	Význam cytochromů P450 pro metabolismus xenobiotik	33
1.4.2.6	Význam regulace hladiny cytochromů P450	35
1.4.2.6.1	Mechanismus regulace exprese cytochromů P450	35
1.5	<i>Peroxidasy</i>	36
1.5.1	Klasifikace a charakterizace peroxidas	37
1.5.1.1	Křenová peroxidasa	38
1.5.1.2	Laktoperoxidasa	39
1.5.2	Reakční mechanismus peroxidas	40

1.6	<i>Neuroblastomy</i>	41
1.6.1	Cytotoxicita ellipticinu vůči neuroblastomům a její ovlivnění inhibitory histondeacetylas	42
1.6.2	Cytotoxicita inhibitorů histondeacetylas VPA a TSA vůči neuroblastomům	43
1.6.3	Modulace exprese CYP v neuroblastomech působením inhibitorů histondeacetylas VPA a TSA	44
2	Cíl diplomové práce	45
3	Materiál a metody	46
3.1	<i>Použité chemikálie</i>	46
3.2	<i>Použité přístroje</i>	48
3.3	<i>Metody</i>	50
3.3.1	Vliv TSA na oxidaci ellipticinu jaterními mikrosomálními systémy potkanů	50
3.3.1.1	Separace metabolitů ellipticinu tvořených jaterními mikrosomálními systémy potkanů pomocí HPLC	51
3.3.2	Vliv TSA na oxidaci ellipticinu peroxidasami	51
3.3.2.1	Detekce dimeru ellipticinu tvořeného peroxidasami pomocí HPLC	52
3.3.3	Vliv TSA na aktivitu CYP1A1	53
3.3.3.1	Separace metabolitů Sudanu I tvořených jaterním mikrosomálním systémem pomocí HPLC	54
3.3.4	Vliv TSA na aktivitu CYP podrodiny 3A	54
3.3.4.1	Separace metabolitů testosteronu tvořených jaterními mikrosomálními systémy pomocí HPLC	56
3.3.5	Vliv TSA na aktivitu CYP1A2	56
3.3.5.1	Fluorimetrické stanovení množství resorufinu	57
3.3.6	Expresa CYP1A1, CYP3A4 a laktoperoxidasy v neuroblastomových buněčných liniích	58
3.3.6.1	Vliv TSA na expresi CYP1A1, CYP3A4 a laktoperoxidasy v neuroblastomových buněčných liniích	59
3.3.7	Statistická analýza a zpracování dat	59
4	Výsledky	60

4.1	<i>Oxidace ellipticinu jaterními mikrosomálními systémy potkanů</i>	60
4.1.1	Porovnání efektivity oxidace ellipticinu použitými jaterními mikrosomálními systémy potkanů	60
4.2	<i>Vliv TSA na oxidaci ellipticinu jaterními mikrosomálními systémy potkanů</i>	64
4.2.1	Vliv TSA na oxidaci ellipticinu jaterním mikrosomálním systémem kontrolních (nepremedikovaných) potkanů	64
4.2.2	Vliv TSA na oxidaci ellipticinu jaterním mikrosomálním systémem potkanů premedikovaných Sudanem I	65
4.2.3	Vliv TSA na oxidaci ellipticinu jaterním mikrosomálním systémem potkanů premedikovaných pregnenolon-16 α -karbonitrem	66
4.3	<i>Vliv TSA na aktivity cytochromů P450 1A a 3A měřených se specifickými „markerovými“ substráty</i>	67
4.3.1	Vliv TSA na oxidaci Sudanu I katalyzovanou CYP1A1	67
4.3.2	Vliv TSA na O-demethylaci 7-methoxyresorufinu katalyzovanou CYP1A2	69
4.3.3	Vliv TSA na 6- β -hydroxylaci testosteronu katalyzovanou CYP podrodiny 3A za použití jaterního mikrosomálního systému potkanů premedikovaných PCN	70
4.3.4	Vliv TSA na 6- β -hydroxylaci testosteronu katalyzovanou CYP podrodiny 3A za použití jaterního mikrosomálního systému kontrolních (nepremedikovaných) potkanů	71
4.4	<i>Oxidace ellipticinu peroxidasami</i>	73
4.4.1	Vliv TSA na oxidaci ellipticinu laktoperoxidasou	73
4.4.2	Vliv TSA na oxidaci ellipticinu křenovou peroxidasou	75
4.5	<i>Expres CYP1A1, CYP3A4 a laktoperoxidasy v neuroblastomových buněčných liniích</i>	76
4.5.1	Vliv TSA v kombinaci s ellipticinem na expresi CYP1A1, CYP3A4 a laktoperoxidasy v neuroblastomových buněčných liniích	79
5	Diskuse	81
6	Závěr	84
7	Seznam literatury	85

1 Úvod

1.1 Protinádorová léčiva

Léčení onkologických onemocnění má dva základní postupy. Jednak léčení chemickými látkami, tj. chemoterapii, jednak léčení zářením, tj. radioterapii. Cílem léčby je ničit nádorové buňky a zabraňovat jejich dalšímu rozmnožování a přitom nepoškozovat buňky zdravých tkání. Při volbě chemoterapie jako hlavní léčebné metody je zásadní důležitost citlivost nádoru k chemoterapii. Ta je rozdílná u různých nádorových onemocnění^(1, 2).

V současné době existují tři hlavní zdroje látek s cytostatickým účinkem. Je to syntéza nových látek chemickou cestou, fermentace plísní s následnou izolací protinádorových antibiotik a extrakce látek přirozeného původu (z rostlin, z mořských hub apod.). Nejpočetnější jsou látky získané chemickou syntézou. Ta se zaměřuje jednak na získání derivátů osvědčených cytostatik, které by měly výhodnější fyzikální, chemické nebo biologické vlastnosti, jednak na syntézu takových látek, jejichž chemická struktura má teoretické předpoklady pro cytostatickou aktivitu látky^(1, 2).

1.1.1 Nádorová onemocnění

Nádorové onemocnění je charakterizováno jako neregulovaný růst buněk, který je spojený s poruchou kontrolních mechanismů a s poškozením buněčné diferenciaci. Tak vzniká masa nové tkáně, která se nazývá nádor^(1, 2).

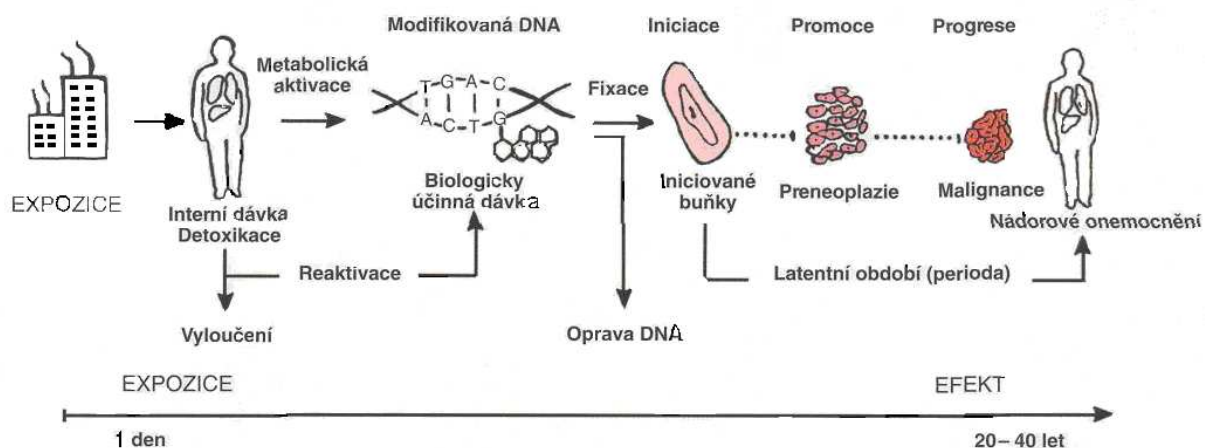
Nádory dělíme na nezhoubné (**benigní**) a zhoubné (**maligní**). U benigních nádorů je nejpodstatnější, že nepronikají do cév krevního nebo mízního řečiště a nezakládají druhotná ložiska – metastázy. Buňky, ze kterých jsou takové nádory složeny, se příliš neliší od těch, ze kterých vznikly. Benigní tumory jsou jen vzácně hrozbou ohrožení života. Maligní nádory rostou rychleji než nádory benigní, některé pronikají do okolních tkání, které ničí. Následuje narušení stěn cév a zhoubné buňky se tak šíří do organismu cévní a mízní soustavou. Tento proces se nazývá metastázování. Pokud jsou v daném místě příznivé podmínky pro další dělení nádorových buněk, vznikají metastázy^(1, 2, 3, 4, 5, 6).

Klíčovou úlohu při vzniku nádorového bujení mají specifické geny, které nazýváme protoonkogeny a tumor supresorové geny. Protoonkogeny se zapojují do regulace exprese genů v buňkách, tedy regulace transkripce, posttranskripčních úprav, translace,

posttranslačních úprav. Produkty protoonkogenů se nazývají protoonkoproteiny (růstové faktory, receptory, proteinkinasy, transkripční faktory) ⁽²⁾. Tumor supresorové geny prostřednictvím svých proteinových produktů omezují buněčnou transformaci a proliferaci ⁽¹⁾.

1.1.2 Etapy postupné maligní transformace

Kancerogeneze probíhá ve třech relativně dobře charakterizovaných etapách. Při zahájení procesu (**iniciace**) dochází ke vzniku genetické poruchy, která ale může zůstat bez funkčních důsledků po řadu let. Teprve spoluúčastí dalších podnětů dochází k dalšímu vývoji (**promoce**), při kterém se objevují poruchy diferenciací. Pokud proces pokračuje, transformované buňky ztrácejí schopnost odpovědi na regulační mechanismy a dochází k růstu nádoru (stadium **progrese**) ^(1, 2, 5, 7). Etapy procesu kancerogeneze jsou znázorněny na obrázku 1.



Obrázek 1

Schéma vícestupňového procesu kancerogeneze. Převzato z ⁽⁵⁾.

1.1.3 Kancerogenní faktory

K maligní transformaci buňky dochází v důsledku změny (mutace) v protoonkogenech a tumor supresorových genech ⁽⁵⁾. Mutace genu mohou vznikat i spontánně, ale jejich frekvence je velmi nízká (asi 10^{-6} na jedno buněčné dělení). Za vznik mutací jsou zodpovědné četné zevní faktory (mutageny) ⁽¹⁾.

Fyzikální faktory – radioaktivní, kosmické, UV a rentgenové záření, některé druhy velmi jemných pevných částic, např. azbestu nebo sloučenin berylia

Biologické faktory – genetické předpoklady a některé viry

Chemické faktory – různé látky zevního prostředí ^(1, 2, 5, 7)

Chemické karcinogeny lze podle mechanismu působení rozdělit do tří skupin:

Genotoxické karcinogeny – tvoří kovalentní adukty s DNA

Karcinogeny způsobující změny struktury DNA – způsobují jedno- a dvouřetězové zlomy DNA, propojení molekul („cross-linking“), a to „DNA-DNA cross-linking“ nebo „DNA-protein cross linking“

Epigenetické karcinogeny – modifikují DNA nekovalentními modifikacemi, jedná se o interkalátory, které se vmezežují do dvoušroubovicové struktury DNA ⁽⁷⁾.

1.1.4 Farmakokinetika cytostatik

Farmakokinetika cytostatik zahrnuje dílčí pochody, které na sebe vzájemně navazují. Je to resorpce, distribuce cytostatika v organismu, jeho biotransformace a vylučování ⁽¹⁾.

Resorpce je prvním dějem řetězu farmakokinetických interakcí. Rychlost a stupeň resorpce závisí na řadě faktorů, z nichž jsou nejvýznamnější aplikační cesty, aplikační formy, průnik cytostatik biologickými membránami. Pro většinu cytostatik je nejvýhodnější parenterální aplikace, která obchází nejistý děj vstřebávání v trávicím traktu. Aplikační formy mají vliv hlavně na rychlost resorpce. Rychlost vstupu látky do cirkulace závisí mimo jiné na rychlosti, s jakou se látka rozpouští. Průnik cytostatik membránou se může dít různým způsobem. Je to *filtrace membránovými póry*, která je možná pouze pro vodu a v ní rozpouštěné malé molekuly (s relativní molekulární hmotností menší než 200). Dále je to *pasivní difuze*, která závisí na rozpustnosti látky v tucích (difundují jen látky lipofilního charakteru), na disociační konstantě (difundují jen nedisociované látky) a na pH na obou stranách membrány. *Aktivní transport* je výjimečný a je vázán na existenci specifického přenašeče. Může probíhat proti koncentračnímu gradientu a je charakterizován omezenou kapacitou přenašeče. Pokud transport látky neprobíhá proti koncentračnímu spádu a je přenašečem pouze usnadněn, jedná se o *usnadněnou difuzi*. Pro velké molekuly se může v transportu uplatnit *pinocytosa* ^(1, 7).

Distribuce je proces, během kterého dochází k rozdělení léčiva z krevního řečiště do tělesných tkání a orgánů. Po proniknutí do krve je léčivo rozděleno do celého intravaskulárního prostoru během 2 minut. Rychlost distribuce léčiva z krve do tkání je determinována vazbou na plazmatické bílkoviny, difusí (rychlostí průniku léčiva z krevního řečiště do extravazální tekutiny) a perfusí (prokrvením tkáně, do které se léčivo distribuovalo)⁽⁶⁾.

Biotransformace zahrnuje metabolické přeměny cytostatika, kterých se účastní jednak enzymy intermediárního metabolismu, jednak enzymy přítomné v tzv. mikrosomální frakci buněk, která vzniká rozbitím buněk endoplazmatického retikula. Smyslem biotransformace je detoxikace látek, snížení nebo zvýšení účinku látky a zvýšení rozpustnosti látky k usnadnění exkrece.

Biotransformaci látek lze rozdělit do dvou fází. Klíčovým enzymovým systémem I. fáze biotransformace je mikrosomální **systém monooxygenas se smíšenou funkcí (MFO) s cytochromem P450 jako terminální oxidasou** (kapitola 1.4). V první fázi se látka stává polárnější, mění se její účinek a toxicita. Reakce charakteristické pro tuto fázi jsou hydroxylace, hydrolýza, redukce, oxidace, atd. Důsledkem druhé fáze je změna rozpustnosti látky, která je zajištěna konjugací s jinými sloučeninami. Látka prochází reakcemi jako je např. glukuronidace, esterifikace sulfátem, atd. Reakce I. fáze jsou katalyzovány enzymy v mikrosomech, konjugační reakce II. fáze většinou probíhají v cytosolu^(3,7).

Vylučování cytostatik je převážně zajišťováno ledvinami nebo játry. Močí se nejnáze vylučují polární metabolity, vylučování játry je časté u cytostatik s velkými molekulami. Důležitou charakteristikou každého cytostatika je poločas vylučování, což je doba, za kterou koncentrace sledované látky v plazmě klesne o 50 %⁽¹⁾.

1.1.5 Mechanismus účinku cytostatik

Cytotoxický účinek chemoterapeutik používaných v léčbě onkologické praxi lze vysvětlit několika hlavními mechanismy:

Inhibice syntesy nukleových kyselin. Mnoho cytostatik působí tak, že zasáhnou do normálních metabolických pochodů, hlavně inhibicí nebo poškozením syntesy DNA, případně RNA a proteinů. Cytostatika, kterým je vlastní tento mechanismus působení, se strukturálně podobají přirozeným metabolitům, proto se nazývají analoga nebo podle způsobu účinku antimetabolity. Mohou přímo inhibovat dílčí reakce intermediárního metabolismu nebo enzymy potřebné pro normální průběh metabolických a biosyntetických reakcí. Antimetabolity mohou však být nejprve metabolicky pozměněny, a tím se aktivují. Často jsou přeměněny na nukleotidy, a takto jsou pak zabudovány do nukleových kyselin. Do této skupiny patří purinová a pyrimidinová analoga ^(1, 2).

Poškození struktury a funkce nukleových kyselin, které má za následek poruchu jejich biologických funkcí. Z hlediska cytotoxického účinku má největší význam inhibice replikace a inhibice transkripce, méně často se uplatní inhibice translace. Mechanismy, kterými může dojít ke strukturálnímu poškození nukleových kyselin jsou:

Alkylace (arylace) – alkylační činidla přenášejí alkyl na nukleofilní centra v DNA, nejvíce náchylné k alkylacím je N⁷ guaninu a N³ adeninu ⁽¹⁾. V případě arylace pak dusík externí NH₂ skupiny guaninu a adeninu a C8 těchto purinových bází ⁽⁷⁾.

Interkalace – jedná se o nekovalentní vazbu cytostatika na DNA, které se zasune mezi dvoušroubovici DNA, kde se váže různými interakcemi, jako jsou vodíkové můstky a hydrofobní interakce ⁽³⁾.

Inhibice topoisomerasy – topoisomerasy mají zásadní význam pro hladký průběh replikace. Během replikace dvoušroubovice DNA prodělává torzi kolem vlastní osy, která by vedla k překroucení šroubovice a ke zlomu v řetězci. Topoisomerasa I se během replikace váže na jeden řetězec dvoušroubovice DNA, který se rozpojí, uvolní nadměrnou torzi a přerušovaný řetězec opět spojí. Dočasné přerušení řetězce umožní zahájení replikačního procesu. Topoisomerasa II se váže na oba řetězce dvoušroubovice, působí jejich přerušení a vzápětí opětné spojení a umožní separaci chromosomů při mitóze. Při blokadě funkce těchto enzymů nedojde k opětnému spojení rozštěpených řetězců a tyto zlomy v DNA mají pro další osud buňky letální účinek ⁽¹⁾.

Rozštěpení molekuly DNA – některá cytostatika působí zlomy v jednom, popřípadě v obou řetězcích DNA. Pro podobnost s účinkem záření se označují jako radiomimetika ⁽⁷⁾.

Poškození mikrotubulárního proteinu, které vede k abnormálnímu průběhu mitózy a její blokádě v metafázi. Mikrotubuly mají klíčovou úlohu pro správnou funkci dělicího vřeténka, které zajišťuje správnou migraci chromosomů při mitóze. Většina používaných cytostatik této skupiny omezuje syntesu tubulinu, tedy bílkoviny tvořící buněčné mikrotubuly ⁽¹⁾.

Inhibice proteosyntesy. Stejně jako pro růst zdravých buněk je pro růst nádorových buněk nezbytná syntesa bílkovin. Ačkoli byly odhaleny určité metabolické rozdíly mezi normální a nádorovou buňkou, farmakologické ovlivnění proteosyntesy není jednoduchou záležitostí. Nádorové buňky se např. liší od buněk normálních rozdílnou schopností v biosyntese neesenciálních aminokyselin, jako jsou L-asparagin, L-glutamin aj. Deplece aminokyseliny v extracelulárním prostoru, kterou nádorové buňky nejsou schopny syntetisovat vyvolá nutriční deficit a omezí proliferaci buňky ⁽¹⁾.

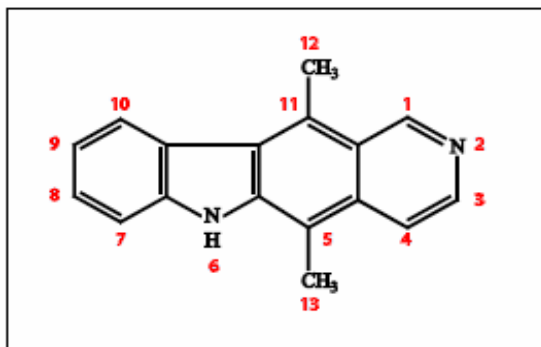
Kombinované účinky. Působení většiny cytostatik je mnohostranné, což dokazují např. cytostatika, která účinkují současně jako antimetabolit i jako alkylační činidlo nebo skutečnost, že většina interkalárních látek působí současně jako inhibitory topoisomerasy II ⁽¹⁾.

1.2 *Ellipticin*

Ellipticin (5, 11-dimethyl-6*H*-pyrido[4, 3-*b*] karbazol) a některé jeho deriváty jsou alkaloidy izolované z rostlin čeledi *Apocyanaceae* vykazující významnou protinádorovou a anti-HIV aktivitu ^(8, 9, 10, 11). Je jedním z nejjednodušších přirozeně se vyskytujících alkaloidů, který má planární strukturu ⁽¹²⁾. Poprvé byl izolován v roce 1959 z listů jehličnanu *Ochrosia elliptica*, který roste v Oceánii ⁽¹²⁾. Struktura ellipticinu je znázorněna na obrázku 2 (str. 17).

Ellipticin samotný a jeho více rozpustné deriváty vykazují slibné výsledky v léčbě pokročilého karcinomu prsu s kostními metastázemi, rakoviny ledvin, nádorů mozku, plic

a akutní myeloblastické leukemie ^(13, 14). Hlavním důvodem zájmu o ellipticin a jeho deriváty pro klinické účely je jejich vysoká účinnost proti mnoha typům rakoviny, poměrně nízké vedlejší toxické účinky a skutečnost, že kompletně postrádají hematologickou toxicitu ⁽¹³⁾.



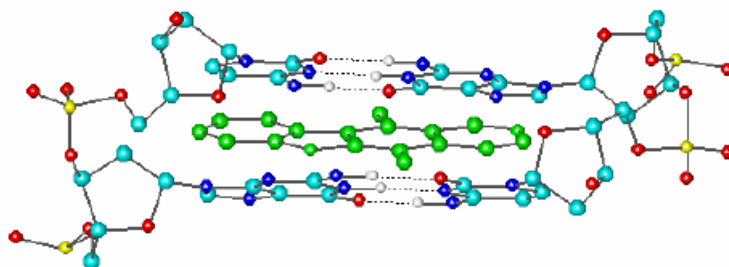
Obrázek 2

Struktura ellipticinu.

1.2.1 Mechanismus působení ellipticinu

Přesný mechanismus působení ellipticinu jako protinádorového léčiva nebyl dosud zcela objasněn. Předpokládá se, že převládající mechanismy účinku jsou:

Interkalace do DNA. Velikost a tvar ellipticinového chromoforu se velmi podobá komplementárnímu páru purin-pyrimidin, což poskytuje vhodné podmínky pro jeho interkalaci do dvoušroubovicové struktury DNA (obrázek 3). Polycyklický aromatický charakter molekuly umožňuje těsnou interakci s hydrofobní částí DNA, která je ve vhodné konformaci. Pro interkalaci je klíčová vazba mezi methylovou skupinou ellipticinu a thyminem DNA ^(15, 16).



Obrázek 3

Ellipticin interkalovaný v DNA. Převzato z ⁽⁴¹⁾.

Inhibice topoisomerasy II. Topoisomerasa II byla identifikována jako primární cíl ellipticinu. Pro tento mechanismus účinku je klíčová tvorba ternárního komplexu mezi topoisomerasou II, DNA a ellipticinem, který má za následek zlomy DNA a dále buněčnou smrt. Ellipticin vstupuje do ternárního komplexu po jeho předchozí asociaci buď s DNA nebo s enzymem a nevyžaduje přítomnost již vytvořeného komplexu topoisomerasy II s DNA ⁽²⁸⁾.

Inhibice fosforylace proteinu p53. Protein p53 je produktem tumor supresorového genu. Jeho fyziologickou funkcí je indukce apoptosy, ke které dochází po nahromadění defosforylované formy p53. Pokud dojde k mutaci tumor supresorového genu p53, je porušena inhibice proliferace a vzniká agresivní forma nádorového onemocnění ⁽⁴⁾. Ellipticin a 9-hydroxyellipticin inhibují specifickou cyklin-dependentní kinasu, což má za následek inhibici fosforylace proteinu p53, což vede k obnovení jeho fyziologické funkce ^(17, 18).

Inhibice oxidační fosforylace, což má za následek porušení energetické rovnováhy v buňkách ⁽¹⁹⁾.

Tvorba kovalentních aduktů s DNA. Kovalentní adukty s DNA tvoří deriváty ellipticinu, které vznikají reakcí katalyzovanou cytochromy P450 a peroxidasami. Na základě této skutečnosti může být ellipticin považován za léčivo, jehož farmakologická účinnost je závislá na jeho enzymové aktivaci v cílové tkáni ^(20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27).

Inhibice helikasy. Tento mechanismus působení byl však studován jen s rostlinnou jadernou a chloroplastovou DNA helikasou ^(29, 31).

Inhibice telomerasy. 9-hydroxyellipticin díky své téměř planární struktuře inhibuje enzym telomerasu. Tento mechanismus působení byl však zatím prokázán jen v buněčných kulturách, nikoli *in vivo* ⁽³⁰⁾.

1.2.2 Farmakokinetika ellipticinu

V sedmdesátých letech provedl Chadwick se spolupracovníky farmakokinetickou studii na animálních modelech. Z této studie vyplývá, že ellipticin je rychle, ale nerovnoměrně distribuován do různých orgánů včetně mozku. Hematoencefalickou bariéru překonává buď díky své hydrofobní struktuře pasivní difúzí⁽³²⁾ nebo využívá transportních procesů, které zatím nejsou objasněné⁽³³⁾.

Hlavním místem biotransformace ellipticinu jsou játra, kde je ellipticin přeměňován na majoritní metabolit 9-hydroxyellipticin, který je dále konjugován na glukosid uronát nebo sulfát a vyloučen žlučí⁽³⁴⁾.

Rychlost eliminace ellipticinu z krve, orgánová distribuce a exkrece je závislá na druhu organismu, kterému byl ellipticin podán. Ellipticin je slabá báze ($pK_a=5,8$). V kyselém pH gastrointestinálního traktu je tedy ionizován a nemůže být resorbován ze střeva. Takto je vyloučeno přibližně 15 % celkové dávky ellipticinu. Ellipticin je z těla vyloučen především fekálně⁽³²⁾.

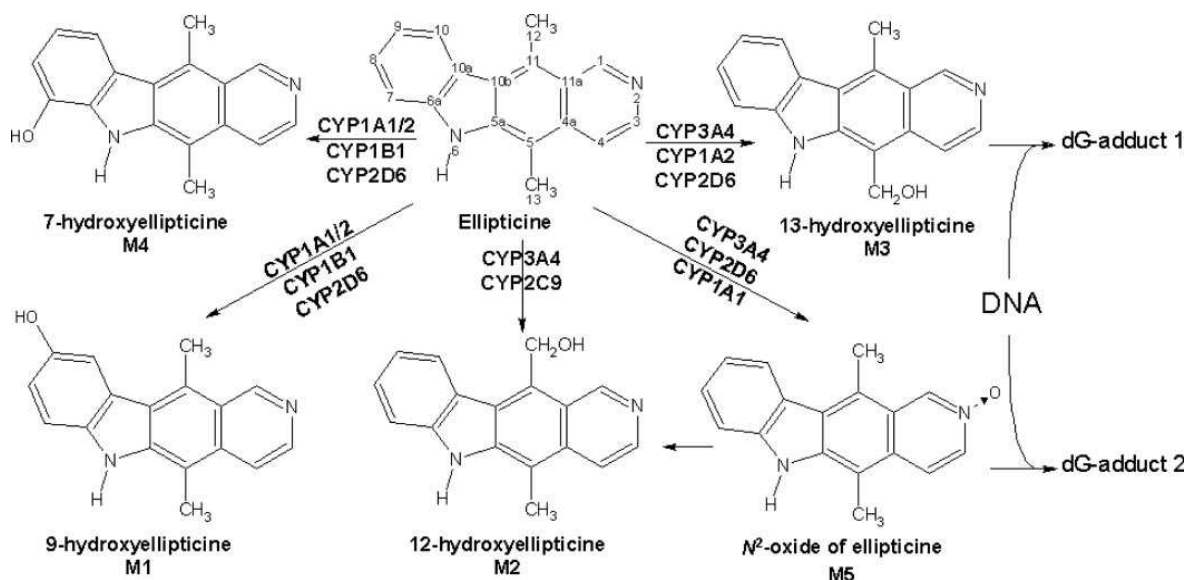
1.2.3 Oxidace ellipticinu cytochromy P450

Ellipticin je oxidován lidskými jaterními mikrosomy na 7-hydroxy-, 9-hydroxy-, 12-hydroxy-, 13-hydroxyellipticin a N^2 -oxid ellipticinu (obrázek 4, str. 20). Stejně metabolity vznikají také působením potkaních jaterních mikrosomů⁽²⁶⁾. 12-hydroxyellipticin je tvořen dvěma cestami, jedna je přímá oxidace a druhá Polonowského přesmykem z N^2 -oxidu ellipticinu⁽²⁷⁾. 9-hydroxyellipticin, který je u člověka ve formě konjugátu vylučován močí, a 7-hydroxyellipticin jsou detoxikačními metabolity, které netvoří adukty s DNA⁽²⁴⁾. Naopak u 13-hydroxy-, 12-hydroxyellipticinu a N^2 -oxidu ellipticinu bylo zjištěno, že tvoří dva majoritní adukty s deoxyguanosinem. Tyto adukty byly nalezeny v mnoha orgánech u potkanů, kterým byl ellipticin podáván, a také *in vitro* působením lidského mikrosomálního systému a tohoto systému experimentálních živočišných modelů^(26, 27).

Detoxikační metabolity ellipticinu (7-hydroxy- a 9-hydroxyellipticin) jsou jaterními enzymy tvořeny ve stejných hladinách v organismu člověka a potkana a jejich vznik je katalyzován cytochromy CYP1A1 a CYP1A2. Lidské a potkaní cytochromy CYP podrodiny 3A (u člověka CYP3A4 a u potkana CYP3A1) katalyzují vznik 13-hydroxyellipticinu, který je majoritním metabolitem (tvoří 50% z celkové hladiny

metabolitů), 12-hydroxyellipticin a N^2 -oxid ellipticinu. Bylo dokázáno, že lidský CYP3A4 a potkaní CYP3A1 jsou klíčové enzymy katalyzující vznik aduktů s DNA *in vitro*. Vzhledem k velké podobnosti mezi oxidací ellipticinu potkaním a lidským enzymovým systémem, je potkan vhodným modelem pro výzkum citlivosti člověka k ellipticinu ⁽²²⁾.

Metabolity zodpovědné za vznik aduktů s DNA se přednostně váží na deoxyguanosin DNA. 13-hydroxyellipticin se v závislosti na podmínkách prostředí samovolně rozpadá na reaktivní karbeniový ion, který reaguje s některým z nukleofilních center (mechanismem Michaelisovy adice) deoxyguanosinových zbytků na DNA (pravděpodobně s exocyklickou $-NH_2$ skupinou guaninu), a tvoří tak adukt 1. Adukt 2 je tvořen přeměnou 12-hydroxyellipticinu přes karbeniový ion ^(23, 24, 27). Popsané reakce jsou znázorněné na obrázku 6 (str. 22).



Obrázek 4

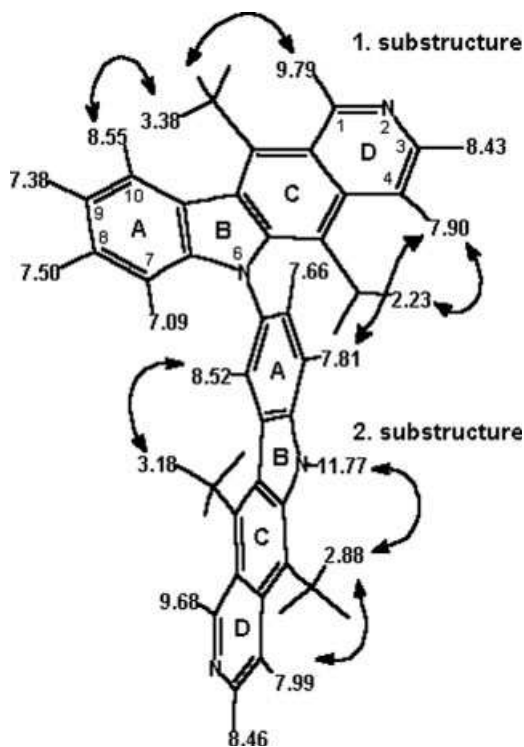
Oxidace ellipticinu cytochromy P450. Schéma znázorňuje příslušné CYP katalyzující vznik jednotlivých metabolitů. Některé z nich tvoří adukty s DNA. Převzato z ⁽²⁶⁾.

1.2.4 Oxidace ellipticinu peroxidasami

Kromě CYP je v některých nádorových tkáních citlivých na ellipticin exprimován další typ enzymů schopných metabolisovat ellipticin. Jedná se o peroxidasy, jejichž mechanismus oxidace ellipticinu byl objeven v naší laboratoři ^(25, 27).

Ellipticin je peroxidasami přeměňován na dva metabolity. Struktury obou metabolitů byly objasněny užitím nukleární magnetické rezonance ⁽²⁷⁾. Minoritním metabolitem je

N^2 -oxid ellipticinu, který také vzniká působením CYP a který je zodpovědný za tvorbu aduktů s DNA. Dále vzniká majoritní metabolit, dimer ellipticinu, jehož struktura je znázorněna na obrázku 5. Jedna molekula ellipticinu je spojena prostřednictvím dusíku N^6 pyrrolového kruhu s druhou molekulou prostřednictvím uhlíku C9^(24, 27).

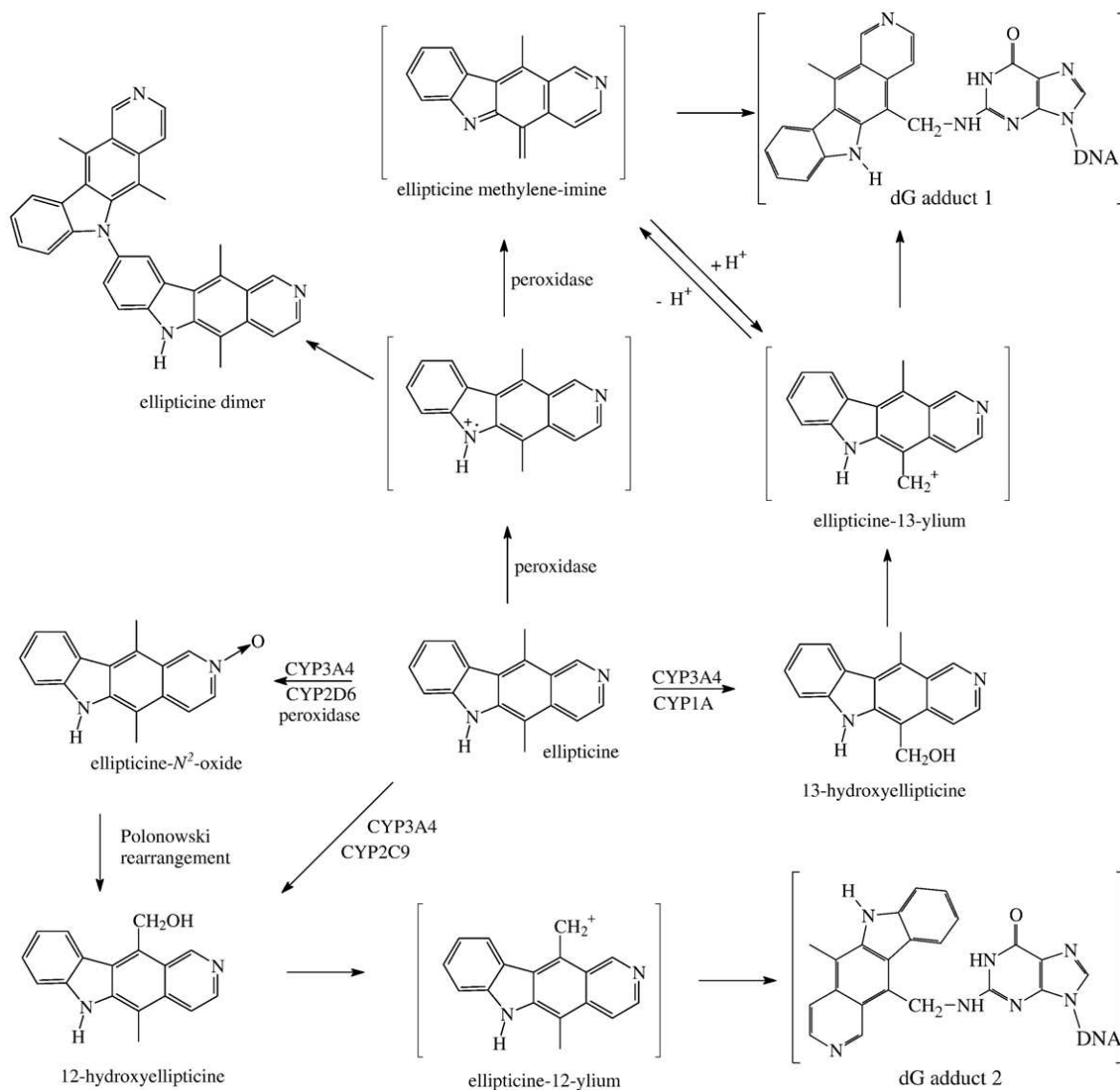


Obrázek 5

Struktura dimeru ellipticinu vznikajícího peroxidasovou reakcí ellipticinu. Převzato z⁽²⁷⁾.

Oxidace ellipticinu peroxidasami probíhá mechanismem jednoelektronové oxidace, při které vznikají volné radikály, které v závislosti na prostředí dávají vzniknout dimeru ellipticinu nebo aduktům s DNA. Dimer ellipticinu vzniká přednostně reakcí probíhající v kyselé oblasti pH (6,4)⁽⁴²⁾. Pokud je pH prostředí vyšší, množství dimeru ellipticinu je nižší na úkor aktivace ellipticinu pro tvorbu aduktů s DNA^(27, 42). Zvýšení tvorby aduktu s DNA 1, který je znázorněn na obrázku 6 (str. 22), koreluje se sníženou hladinou dimeru ellipticinu⁽²⁷⁾. Ačkoli v naší laboratoři nebyl potvrzen vznik aduktu 1 dvouelektronovou oxidací přes meziproduct methylen-imin, pravděpodobně reakce tímto způsobem probíhá. Tento předpoklad je podpořen faktem, že byl v naší laboratoři již nalezen stejný adukt, který vznikl po oxidaci cytochromy P450 z 13-hydroxyellipticinu, a že pro tuto reakci je potřebné stechiometrické množství ellipticinu a peroxidasy. Methylen-imin je velmi reaktivní a může se přeměnit na stejný karbeniový ion jako při působení CYP na ellipticin,

nebo může sám interagovat s DNA. Adukt 2 je tvořen stejně jak u aktivace elliptycinu cytochromy P450 přeměnou 12-hydroxyelliptycinu přes karbeniový ion. Jak již bylo zmíněno v kapitole 1.2.3, 12-hydroxyellipticin vzniká tzv. Polonowského přesmykem z N^2 -oxidu elliptycinu, který je společným produktem při peroxidasové reakci a reakci řízené cytochromy P450^(23, 24, 25, 26, 27) (obrázek 6).



Obrázek 6

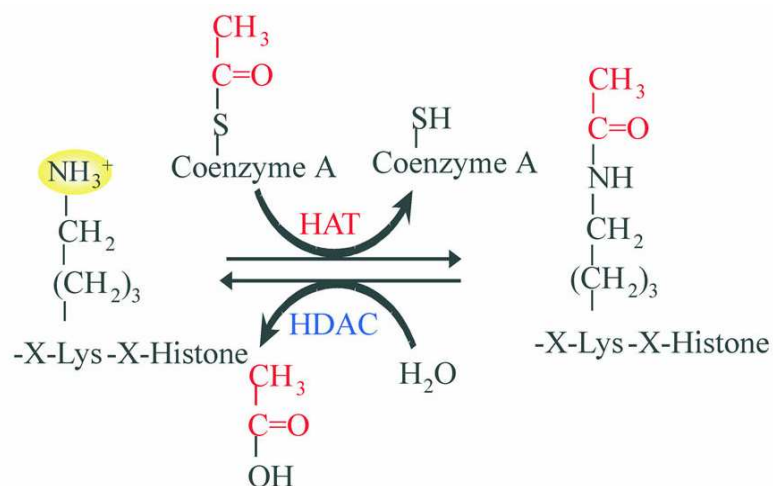
Schéma metabolické aktivace elliptycinu působením peroxidas a CYP, na kterém jsou znázorněny vznikající metabolity. Některé z nich tvoří adukty s deoxyguanosinem DNA. Převzato z⁽⁴³⁾.

1.3 *Inhibitory histone deacetylases*

Pro vysvětlení funkce inhibitorů histone deacetylase je nejprve stručně popsána struktura chromatinu eukaryotické buňky. DNA je v eukaryotické buňce uložena ve formě chromatinu, jehož základní stavební jednotkou je nukleosom. Nukleosom je tvořen proteinovým jádrem z osmi histonových proteinů (konkrétně dva od každého ze čtyř druhů: H2A, H2B, H3 a H4) a řetězcem DNA dlouhým 156 nukleotidů. Histony jsou malé proteiny s vysokým obsahem kladně nabitých aminokyselin (lysin a arginin). Tyto pozitivní náboje umožňují pevné navázání histonů na negativně nabitou DNA, která je obtočena kolem histonového jádra. Posttranslační modifikace histonů hraje významnou roli v regulaci transkripce genů⁽³⁵⁾.

Regulace transkripce genů je v buňce zajišťována různými mechanismy působení: (1) methylací DNA, (2) posttranslační modifikací histonů (primárně acetylací, ale také methylací, fosforylací, poly-ADP-ribosylací, ubiquitinilací, sumoylací, karboxylací a glykosylací) a (3) RNA interferencí^(47, 48). V epigenetické regulaci genů hraje acetylace nebo deacetylace histonů mezi těmito modifikacemi významnou roli. Pokud je chromatin acetylovaný, dochází k transkripci genů, zatímco málo acetylované histony jsou charakteristické pro inaktivní chromatin. Bylo zjištěno, že výskyt mnoha typů rakoviny je doprovázen rozsáhlou hypoacetylací histonů⁽⁴⁹⁾.

Acetylace chromatinu je regulována histonacetyltransferasami (HATs) a histone deacetylase (HDACs), které jsou ve zdravé buňce v rovnováze. HATs přenášejí acetylovou skupinu z acetyl-koenzymu A na ϵ -aminoskupinu lysinu aminokyselinových zbytků histonů (obrázek 7, str. 24)⁽⁵¹⁾. Acetylace neutralizuje pozitivní náboj na histonech, což vede ke ztrátě interakce s negativně nabitou DNA a k „otevření“ aktivní struktury chromatinu, která umožňuje vazbu transkripčních faktorů pro aktivaci genové transkripce^(44, 50). Citlivě řízená rovnováha mezi aktivitou HATs a HDACs je klíčová k udržení normálních buněčných funkcí a posun v této rovnováze může mít vážné vlivy na buněčný fenotyp⁽⁵²⁾.



Obrázek 7

Modifikace histonů histonacetyltransferasami (HATs) a histondeacetyltrasami (HDACs). Převzato z ⁽⁴⁶⁾.

Expres HDACs způsobuje inhibici transkripce genů klíčových pro karcinogenesi, což může být příčinou karcinogenese ⁽⁵⁷⁾. Deregulace genové exprese následně vede k rakovině nebo jiným nemocem. Inhibitory HDACs jsou schopné interagovat s katalytickou doménou HDACs a narušovat tak schopnost těchto enzymů rozpoznat substrát, což má za následek obnovení exprese relevantních genů pro karcinogenesi ⁽⁵⁸⁾. Hlavní biologické účinky inhibitorů HDACs jsou stimulace buněčné diferenciace, zastavení buněčného cyklu a indukce apoptosy nádorových buněk ^(44, 59).

1.3.1 Inhibitory histondeacetyltras jako doplňující léčebné agens v karcinogenesi

V posledních letech bylo zjištěno, že histondeacetyltrasy (HDACs) epigeneticky umlčují tumor supresorové geny, což hraje v karcinogenesi důležitou roli. Inhibitory HDACs blokují aktivitu specifických HDACs a obnovují tak expresi některých tumor supresorových genů. Inhibitory HDACs dále indukují buněčnou diferenciaci, zastavení růstu a apoptosu nádorových buněk. Kim se spolupracovníky ⁽⁹⁹⁾ zjistili, že pokud jsou inhibitory histondeacetyltras aplikovány před některým z cytostatik interagujícím s DNA, zvyšují jeho cytotoxicitu. Přidání inhibitorů histondeacetyltras až po protinádorovém léčivu však na cytotoxicitu nemá vliv ⁽⁹⁹⁾. Dalším, neméně důležitým zjištěním je, že tyto látky

zvyšují citlivost na radioterapii^(101, 102). Tyto látky jsou tedy studovány jako doplňující léčebné agens pro mnoho typů rakoviny^(45, 46).

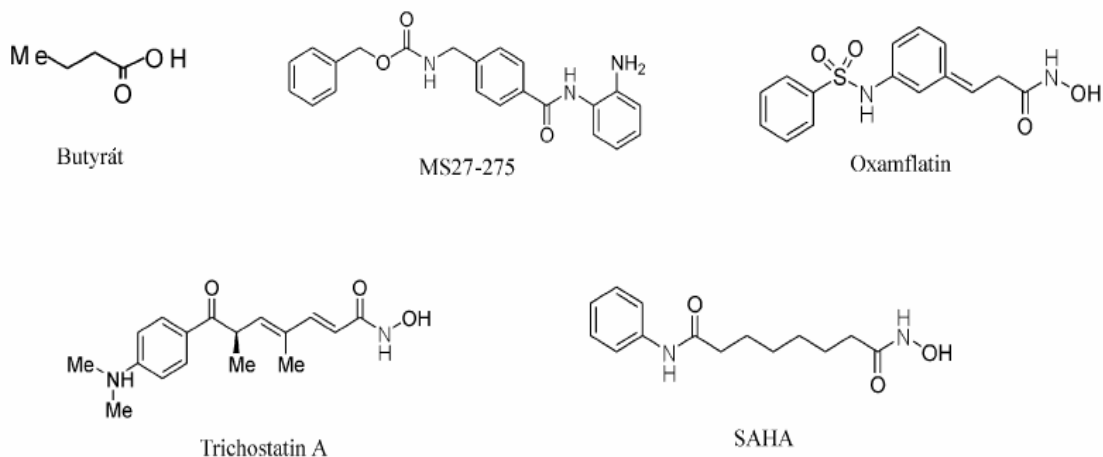
Inhibitory HDACs mohou být na základě jejich struktury rozděleny do čtyř skupin^(46, 53, 54). Struktura některých z nich je znázorněna na obrázku 8 (str. 26). První skupinu tvoří krátké mastné kyseliny, jako je butyrát a fenylbutyrát, které jsou již klinicky používané, a kyselina valproová⁽⁴⁶⁾. Nejsou však ideálními látkami pro klinické využití, neboť k inhibici HDACs je zapotřebí vysoká koncentrace těchto látek (mM)⁽⁴⁶⁾.

Další skupinou jsou alifatické sloučeniny, které mají strukturu hydroxamátů. Do této skupiny patří trichostatin A (TSA), suberoylanilid hydroxamová kyselina (SAHA) a oxamflatin^(45, 46). TSA je první objevenou přírodní sloučeninou, která působí jako inhibitor HDACs⁽⁵⁵⁾. Nízká koncentrace (nM) TSA a SAHA může indukovat buněčnou diferenciaci a inhibovat růst nádorů s velmi malými účinky na zdravé buňky⁽⁵⁶⁾. TSA inhibuje růst nemalobuněčného typu karcinomu plic (NSCLC)⁽⁶⁰⁾. U buněk NSCLC nebo buněk maligního melanomu TSA indukuje expresi protein p21, který zastavuje buněčný cyklus v G1-fázi, aby měla buňka čas na odstranění chyb v DNA^(60, 61). Dále bylo zjištěno, že TSA u nádorových buněk indukuje apoptosu, zatímco u normálních buněk převážně zastavuje průběh buněčného cyklu⁽⁶⁰⁾. Ačkoli má TSA velmi rozsáhlé protirakovinné účinky, nebyl zatím klinicky testován, pravděpodobně z důvodu jeho možných vedlejších účinků, které nebyly zatím popsány⁽⁴⁵⁾.

Velmi slibné vyhlídky v lékařské aplikaci má SAHA, u které bylo zjištěno, že inhibuje růst rakovinných buněk pankreatu⁽⁶²⁾. Ačkoli je SAHA slabším inhibitorem než TSA, vykazuje významný vliv na inhibici růstu nádorů jak *in vitro*, tak *in vivo* již v μM koncentracích⁽⁴⁵⁾.

Třetí skupinou jsou cyklické tetrapeptidové sloučeniny, které mají epoxy ketonovou nebo sulfohydroxylovou funkční skupinu. Do této skupiny patří trapoxin a FK228⁽⁴⁶⁾.

Poslední skupinou jsou benzamidy, jako je MS-27-275 (obrázek 8, str. 26), který je v první fázi klinického testování⁽⁴⁵⁾.



Obrázek 8

Struktury inhibitorů histondeacetylasy: butyrát, MS-27-275, oxamflatin, suberoylanilid hydroxamová kyselina (SAHA) a trichostatin A. Převzato z ⁽⁴⁶⁾.

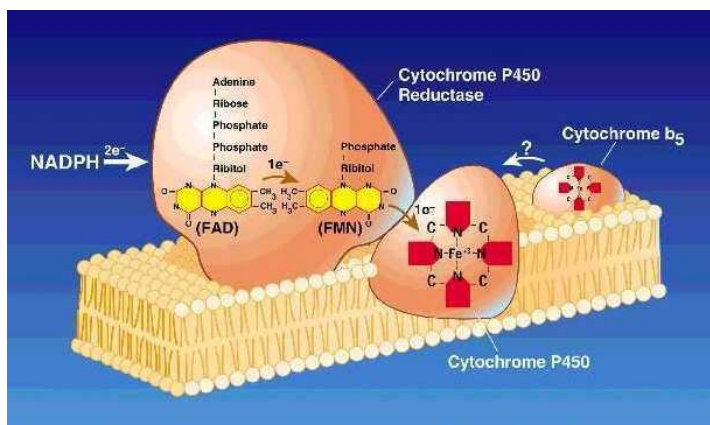
1.4 Mikrosomální monooxygenasový systém (MFO systém)

Důležitou roli v biotransformaci cizorodých látek, tedy i léčiv, hraje mikrosomální monooxygenasový systém (MFO systému). Je také nazýván systém oxidas (oxygenas) se smíšenou funkcí (mixed function oxidases system – MFO systém) a je lokalizovaný na vnější straně endoplasmatického retikula nebo mitochondrií (obrázek 9, str. 27). Tento systém katalyzuje celou řadu oxidačních, oxygenačních, popř. redukčních reakcí, přičemž využívá především molekulární kyslík ⁽⁶³⁾.

MFO systém je tvořen třemi základními složkami:

- flavoproteinový enzym **NADPH:cytochrom P450 reduktasa**, která funguje jako dělič elektronového páru
- hemthiolátový enzym **cytochrom P450** jako terminální oxidasa
- **membrána endoplazmatického retikula**

Fakultativně může MFO systém obsahovat také cytochrom b_5 a NADH:cytochrom b_5 reduktasu ⁽³⁾.



Obrázek 9

MFO systém, který je lokalizovaný v membráně endoplasmatického retikula.

V kůře nadledvin je MFO systém lokalizován na mitochondriální membráně, kde se podílí na metabolismu endogenních látek, jako jsou například steroidy a mastné kyseliny. Na vnější straně membrány hladkého i hrubého endoplasmatického retikula je lokalizován v orgánech vystavených látkám cizorodé povahy (játra, ledviny, plíce, GIT, kůže, mozek).

1.4.1 NADPH:cytochrom P450 reduktasa

Enzym NADPH:cytochrom P450 reduktasa (EC 1.6.2.4) je membránově vázaný protein, který katalyzuje přenos elektronů z NADPH na všechny známé formy cytochromu P450⁽⁶⁴⁾. Jedna forma NADPH:cytochrom P450 reduktasy je schopna v daném organismu spolupracovat s více formami cytochromu P450. NADPH:cytochrom P450 může být za určitých okolností zastoupena NADH:cytochrom b₅ reduktasou⁽³⁾, které jako donor vodíku slouží NADH.

NADPH:cytochrom P450 reduktasa má dvě funkční domény, hydrofobní N-terminální (6 kDa), díky které je zakotvena v membráně⁽⁶⁵⁾, a hydrofilní C-terminální katalytickou doménu (72 kDa)⁽⁶⁶⁾.

C-terminální funkční doména se skládá z FMN- a FAD- vazebné strukturní domény. FAD a FMN skupiny se vzájemně nepřekrývají, jsou v kontaktu prostřednictvím 7- a 8- methylových skupin isoalloxazinových kruhů, které leží těsně u sebe a svírají úhel zhruba 150°. Přenos elektronů mezi flaviny je tedy pravděpodobně přímý, není zprostředkovaný zbytkem aminokyseliny, a proto je tento přenos rychlý⁽⁶⁶⁾.

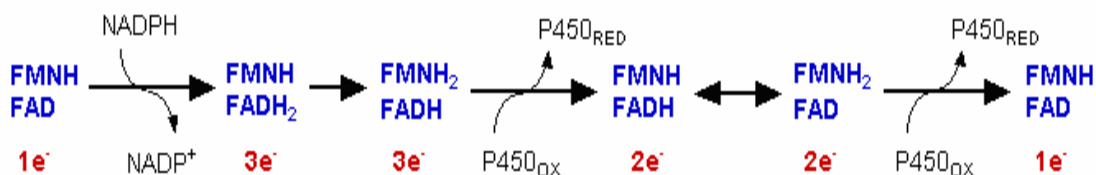
FAD-vazebná doména zprostředkovává (nekovalentní) vazbu NADPH: negativně nabitá fosfátová skupina v poloze 2' ribosy interaguje s pozitivně nabitými aminokyselinami (arginin, lysin).

FMN-vazebná doména je zodpovědná za přenos elektronů na akceptorovou molekulu cytochromu P450. Pyrimidinová strana isoalloxazinového kruhu FMN se nachází blízko povrchu enzymu a je tak pro akceptorovou molekulu snadno dostupná ⁽⁶⁷⁾.

Interakce mezi NADPH:cytochrom P450 reduktasou a cytochromem P450 jsou hlavně elektrostatické povahy, neboť kladně nabitý povrch cytochromu P450 (lysiny, argininy) interaguje se záporně nabitým povrchem NADPH:cytochrom P450 reduktasy (aspartát, glutamát). Dále se také uplatňují hydrofobní interakce mezi nepolárními aminokyselinami (leucin, tryptofan, valin) v oblasti membránových domén NADPH:cytochrom P450 reduktasy a cytochromu P450 ^(66, 69, 72).

Funkce NADPH:cytochrom P450 reduktasy jako děliče elektronového páru byla vysvětlena na základě rozdílných redoxních potenciálů obou flavinových prosthetických skupin ^(70, 71).

Za jednoelektronovou redukci cytochromu P450, který zde funguje jako akceptorová molekula, je v případě savčí NADPH:cytochrom P450 reduktasy zodpovědný zcela redukovaný hydrochinon FMNH₂ ^(7,68) (obrázek 10).



Obrázek 10

Mechanismus přenosu elektronů mezi flaviny NADPH:cytochrom P450 reduktasy ⁽⁶⁸⁾.

1.4.2 Cytochromy P450

Cytochromy P450 tvoří „superrodinu“ hemthiolátových enzymů, které se nachází ve všech žijících organismech s výjimkou enterobakterií (např. *Escherichia coli*). Původní název vznikl podle objevu v roce 1958, kdy Garfinkel s Klingenbergem objevili v jaterních mikrosomech pigment, který po redukcí vykazuje v komplexu s oxidem uhelnatým absorpční maximum při 450 nm ^(87, 88). Omura a Sato v roce 1964 dokázali, že tento pigment má hemoproteinový charakter a na základě podobnosti povahy vazby hemu

cytochromů b a podle netypického maxima Soretova pásu (úzký absorpční pás s maximem asi 405 nm charakteristický pro všechny porfyriny) ⁽⁸⁷⁾ jej nazvali cytochromem P450 ⁽⁸⁹⁾.

Cytochrom P450 je enzym (EC 1.14.14.1), který má funkci terminální oxidasy MFO systému. Zprostředkovává vazbu molekulárního kyslíku, jeho aktivaci a zabudování jednoho atomu kyslíku do molekuly substrátu ⁽⁷³⁾, přičemž druhý atom kyslíku je redukován na vodu. Elektrony pro redukci dostává NADPH:cytochrom P450 reduktasa, případně NADH:cytochrom b₅ reduktasa ⁽⁷⁴⁾.

Systém cytochromu P450 je v eukaryotických buňkách vázán v membráně hladkého endoplazmatického retikula nebo mitochondrií prostřednictvím transmembránového N-terminálního α -helixu ⁽⁹⁰⁾, zatímco bakteriální cytochromy P450 jsou rozpustné enzymy. Porfyrinový skelet (protoporfyrin IX) je v proteinové molekule enzymu vázán hydrofobními silami a zároveň prostřednictvím thiolátové síry sulfyhydroxylové skupiny cysteinu přítomné v aktivním centru enzymu. Thiolátová síra je pátým ligandem železa protoporfyrinu IX. Uvedené hemoproteiny tedy nejsou klasickými cytochromy (protoporfyrin IX vázán prostřednictvím imidazolového zbytku histidinu), ale hemthiolátovými proteiny. Toto uspořádání jim umožňuje výjimečné chování a odlišuje je od ostatních hemoproteinů. Šestým ligandem železa je atom kyslíku molekuly vody ⁽⁶⁷⁾.

Z hlediska evolučního vývoje je cytochrom P450 velmi starý hemoprotein, který byl objeven mnohem dříve než hemoglobin ^(91, 92). Cestou divergentní evoluce se z jediného genu cytochromu P450 archebakterií dosud vyvinulo ohromné množství odlišných genů kódujících cytochromy prokaryotních i eukaryotních organismů ⁽⁷⁶⁾.

1.4.2.1 Nomenklatura cytochromů P450

Současné názvosloví zavedené v roce 1996 Nerbertem a jeho spolupracovníky je založeno na podobnosti aminokyselinové sekvence apoproteinu ⁽⁹⁵⁾. Cytochromy P450 se vyskytují v různých formách (izoenzimech, izoformách), které jsou řazeny do genetických rodin a podrodin podle míry homologie jejich primární struktury ⁽⁹³⁾.

Všechny cytochromy jsou členy tzv. superrodiny. Příslušnost k superrodině se v zápise označuje zkratkou CYP, pak následuje arabská číslice označující rodinu, velké písmeno značící podrodinu a poslední je arabská číslice, která určuje jednotlivé isoenzymy. Pokud mají cytochromy P450 více než 40 % homologie aminokyselinové

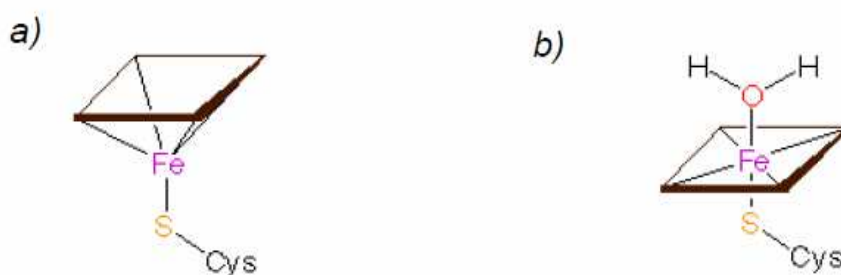
sekvence jejich proteinů, náleží do stejné rodiny. Pokud vykazují vyšší homologii než 55 %, patří do stejné podrodiny ⁽⁹⁴⁾.

1.4.2.2 Spinové formy cytochromů P450

Díky přechodnému stavu hemového železa se cytochromy P450 vyskytují ve dvou spinových formách ⁽⁸⁵⁾:

Vysokospinová forma vzniká pokud je ion železa v pentakoordinovaném stavu a všechny jeho valenční elektrony jsou nespárované (spin 5/2). Ion železa je u této formy nad rovinou porfyrinového skeletu, neboť je „vytahován“ thiolátovou skupinou. Maximum Soretova pásu této formy je pozorováno při 390 nm.

Pro **nízkospinovou formu** je charakteristický hexakoordinovaný ion železa. Hemové železo interaguje ještě s jedním ligandem, například s –OH, –COOH nebo –NH₂ skupinou postranních řetězců aminokyselin apoproteinu nebo s atomem kyslíku z molekuly vody ⁽⁸⁵⁾ a nachází se pak prakticky v rovině kruhu protoporfyrinu IX (obrázek 11). Absorpční maximum této formy je při 418 nm ⁽⁸⁶⁾.



Obrázek 11

Struktura hemu cytochromu P450 ⁽⁴⁰⁾.

a) vysokospinová forma

b) nízkospinová forma

Nízkospinová a vysokospinová forma jsou v klidovém stavu v rovnováze. Pokud se však substrát naváže do vazebného místa enzymu, dojde k nárůstu obsahu vysokospinové formy, neboť šestý ligand je substrátem vytlačen. Toto má za následek změnu v absorpčním spektru, kdy absorbance při 390 nm roste a při 418 nm klesá. Takové

spektrum nazýváme „substrátové“. Substrát se však na enzym může vázat jako šestý ligand železa, v tomto případě absorbance při 390 nm klesá a roste při 418 až 460 nm (dle heteroatomu). Šestým ligandem se může stát i nepřeměňovaná látka vázající se do aktivního centra enzymu. Toto spektrum je označované jako „ligandové“⁽⁸⁶⁾.

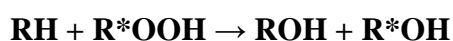
1.4.2.3 Enzymové reakce cytochromu P450

Oxidasová funkce – aktivace biatomické molekuly kyslíku pro klíčové reakce⁽³⁾.

Oxygenasová aktivita – zabudování kyslíku do molekuly málo reaktivního substrátu.

Redukční reakce – elektrony poskytnuté NADPH:cytochrom P450 reduktasou mohou redukovat přímo substrát a nejsou využity k aktivaci molekuly kyslíku. K této reakci dochází v případě, že hydrofobní substrát je zároveň dobrým ligandem železa porfyrinového skeletu a je tedy vázán jako šestý ligand místo kyslíku. Tento mechanismus je popsán *in vitro* a existují i nepřímé důkazy o jeho průběhu *in vivo*⁽⁷⁸⁾.

Peroxidasová aktivita – místo kyslíku je druhým substrátem organický peroxid (R*OH) nebo peroxid vodíku⁽⁸¹⁾. Pro průběh reakce není potřeba NADPH jako zdroje elektronů⁽⁸²⁾. Produktem reakce je stejně jako při klasickém mechanismu hydroxylovaný substrát (ROH):

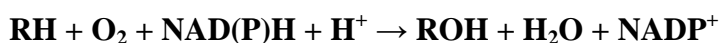


Produkce H₂O₂ a aktivních forem kyslíku – k tomuto jevu dochází tehdy, když MFO systém interaguje s látkou, která se obtížně hydroxyluje (je pouze hydrofobní, tvoří komplex s enzymem, ale těžko se do ní zabudovává kyslík). Molekula kyslíku se aktivuje oxidasovou fází funkce cytochromu P450, ale oxygenasová fáze už neproběhne. Aktivní forma kyslíku je z molekuly uvolněna do okolí, kde přijme protony nebo dismutuje, čímž vzniká peroxid⁽³⁾.

1.4.2.4 Reakční mechanismus monooxygenasové reakce

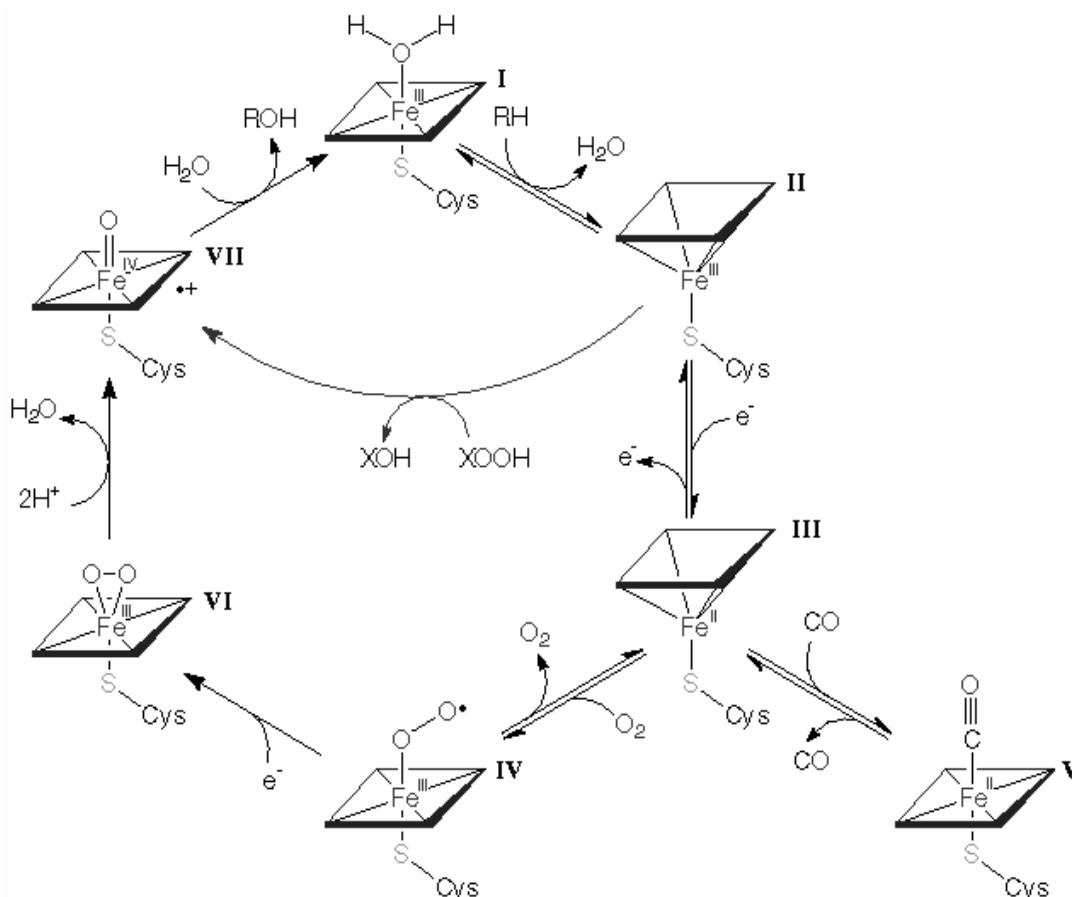
Nejtypičtějším reakcemi katalyzovanými cytochromy P450 je aktivace molekulárního kyslíku a zabudování jednoho atomu do molekuly substrátu. Tato reakce se

nazývá monooxygenasová a její obecný průběh je vyjádřen sumární rovnicí (kde RH je substrát a ROH hydroxylovaný produkt reakce):



Aktivace kyslíku je umožněna dvěma elektrony pocházejícími z NADPH:cytochrom P450 reduktasy, ale donorem druhého elektronu může být i NADH:cytochrom b₅ reduktasa. Druhý atom kyslíku je redukován na vodu.

Reakční cyklus cytochromu P450, který je uveden na obrázku 12 (str. 33), probíhá uspořádaným mechanismem a sestává alespoň z osmi kroků. V klidovém stavu je hemové železo ve ferri formě (tj. s oxidačním číslem III) a je hexakoordinováno (tedy v nízkospinovém stavu). Šestá valence je obsazena kyslíkem vody nebo interním (aminokyselinovým) ligandem. Po vazbě substrátu (RH) do aktivního místa dochází k vytlačení šestého ligandu železa, které zůstane pentakoordinované (vysokospinový stav) a zároveň se změní konformace molekuly enzymu. Vazbou substrátu je umožněna jednoelektronová redukce cytochromu P450 interakcí s NADPH:CYP reduktasou, čímž se hemové železo redukuje na Fe^{II} (ferro forma), přičemž stále zůstává pentakoordinováno. Tato forma enzymu je pak schopna vázat molekulární kyslík nebo jiné ligandy. Dále se vazbou kyslíku tvoří ternární ferri-superoxidový komplex, kde je železo opět hexakoordinované. Tento komplex je poté redukován NADPH:CYP reduktasou nebo NADH:cytochrom b₅ reduktasou, čímž je aktivován kyslík na peroxidový anion. Komplex cytochromu P450 s biatomickou molekulou kyslíku po druhé redukci je již zcela aktivovanou formou cytochromu P450, ve které dochází ke štěpení vazby O-O, přičemž jeden atom kyslíku je redukován, přijme dva protony a dojde k uvolnění vody. Druhý atom zůstane vázán na Fe hemu a vzniká ferrioxenový komplex, který je stabilizován mezomerním posunem elektronu z thiolátové síry na kyslík. Vzniklý reaktivní kyslíkový radikál je schopen vytrhnout vodíkový atom z molekuly vhodného substrátu za vzniku radikálu substrátu a hydroxylového radikálu vázaného na Fe hemu. Dochází k rekombinaci radikálů za vzniku nativní formy cytochromu P450 a hydroxyderivátu substrátu (ROH), který je z enzymu uvolněn ^(67, 76, 79, 83, 84).



Obrázek 12

Reakční cyklus cytochromu P450 ⁽⁶⁷⁾.

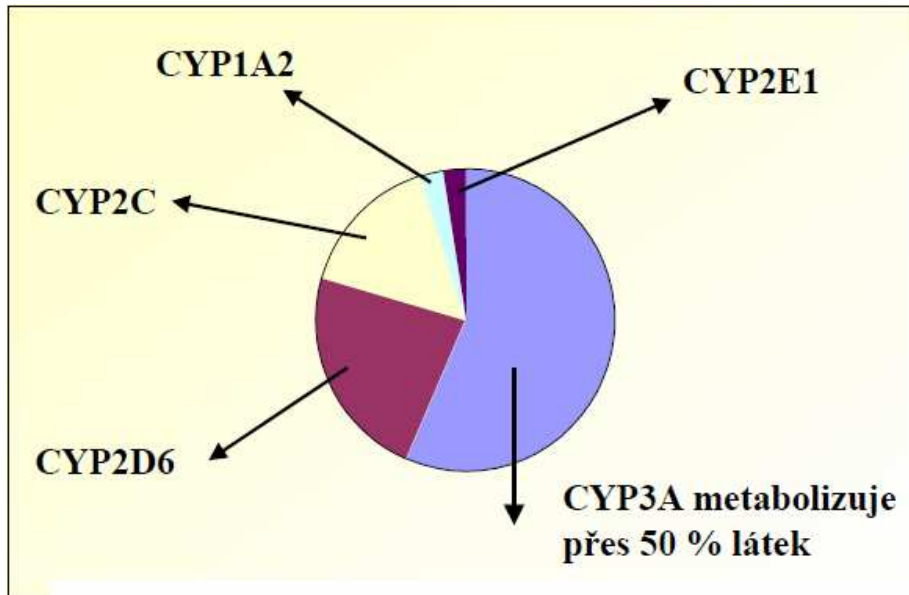
1.4.2.5 Význam cytochromů P450 pro metabolismus xenobiotik

Cytochromy P450 jsou v organismu zodpovědné především za reakce I. fáze biotransformace cizorodých látek, vedoucí k jejich detoxikaci. Značný počet studií, zabývajících se cytochromy P450, sleduje jejich účinnost v metabolismu léčiv. A to jak jejich podíl na tvorbě finálních metabolitů léčiv, které jsou snadno z lidského těla vylučovány, tak i na reakcích vedoucích ke zvýšení jejich farmakologické aktivity. Aktivita jednotlivých cytochromů P450 může determinovat reakce pacienta na podané léčivo. V mnoha případech je léčivo primárně metabolisováno na farmakologicky účinný produkt pouze některým z cytochromů P450. V případě deficience nebo naopak zvýšené koncentrace takového cytochromu P450 u různých pacientů je pak účinnost léčiva značně rozdílná. Znalost, které z lidských forem cytochromu P450 metabolisují jednotlivá léčiva a informace o jejich výskytu u různých jedinců je tedy z klinického hlediska nezbytná ⁽⁷⁶⁾.

Podíl jednotlivých forem cytochromů P450 na metabolismu xenobiotik je znázorněn na obrázku 13. CYP3A4 patří mezi CYP nejčastěji metabolisující léčiva. Metabolisuje téměř 50 % běžně dostupných léčiv⁽⁷⁷⁾. CYP3A4 je co do obsahu v lidských tkáních, i co do množství substrátů, které přeměňuje, rozhodně nejvýznamnějším cytochromem P450. Podrobnými studiemi bylo prokázáno, že se podílí na oxidaci velkého počtu karcinogenů, jako i léčiv a endogenních látek (steroidy)⁽⁷⁶⁾.

Cytochromy P450 1A1 a 1A2 jsou nejvýznamnější, bereme-li v úvahu jejich úlohu při aktivaci prokarcinogenů (environmentálních chemikálií, toxických látek, toxických léčiv). Mohou aktivovat až 90 % všech dosud známých karcinogenů. Oba enzymy si jsou značně podobné (vykazují až 70 % homologii v aminokyselinové sekvenci) a katalyzují i podobné reakce. Liší se však v lokalizaci, CYP1A1 je mizivých koncentracích přítomen v játrech, naopak je zastoupen v jiných tkáních. CYP1A2 je typickým jaterním enzymem⁽⁷⁶⁾.

Významnou úlohu v metabolismu cizorodých látek hraje CYP2D6, který metabolisuje přes 30 % běžných léčiv⁽⁷⁷⁾.



Obrázek 13

Proporce xenobiotik metabolisovaných hlavními cytochromy P450⁽⁷⁵⁾.

1.4.2.6 Význam regulace hladiny cytochromů P450

Řada cytochromů P450 jsou inducibilní enzymy. Indukce enzymů je definována jako nárůst exprese katalyticky aktivních forem enzymů. Jinak řečeno jako syntéza enzymů *de novo*, přičemž dochází ke zvýšení transkripce na základě stimulace chemickým signálem⁽³⁾.

Indukce cytochromů P450 je ochranným mechanismem v případě, že má za následek zvýšenou biotransformaci xenobiotika, která vede k jeho detoxifikaci a vyloučení z organismu. Indukce cytochromů P450 však nemá vždy v organismu z hlediska toxicity pozitivní účinky, neboť je známo, že některé cytochromy P450 mohou nereaktivní sloučeninu aktivovat na chemicky reaktivní intermediáty, které jsou toxické⁽⁷⁾.

U léčiv, která ke svému účinku nepotřebují být metabolicky aktivována, může indukce cytochromů P450 zvýšit jejich eliminaci a snížit farmakologický efekt. Pokud je například léčivo induktorem a zároveň substrátem některé izoformy cytochromu P450, může tak stimulovat svoji detoxifikaci. Tato skutečnost může mít za následek toleranci organismu pro dané léčivo. V případě „proléčiv“ (tj. látek, u kterých je potřebná metabolická aktivace, neboť je jejich účinek vyvolán až jejich metabolity) může indukce zvýšit jejich farmakologický účinek⁽⁸⁰⁾.

1.4.2.6.1 Mechanismus regulace exprese cytochromů P450

Regulace exprese cytochromů P450 je řízena několika systémy. Jedná se o regulaci na genové úrovni, která zahrnuje funkci specifických receptorů, rychlostí přepisu DNA do RNA nebo stabilizace syntetisované mRNA. Dalším způsobem je posttranslační regulace, která je založena především na stabilizaci syntetisované molekuly proteinu daného cytochromu P450⁽⁹⁷⁾.

Cytochromy P450 genových rodin 1-4 hrají nejdůležitější roli v metabolismu xenobiotik. Jejich geny jsou transkripčně aktivovány cizorodými látkami prostřednictvím intracelulárních receptorů. Jedním z těchto receptorů je cytosolární receptor označovaný jako AhR („aryl hydrocarbon receptor“), který způsobuje indukci CYP1A1, CYP1A2 a CYP1B1 a enzymů druhé fáze biotransformace. Cizorodé látky interagující s AhR jsou polycyklické aromatické uhlovodíky, složky tabákového kouře, β -naftoflavon a další⁽⁹⁸⁾.

Receptor označovaný jako CAR („constitutive androstane receptor“) patří mezi jaderné receptory regulující expresi cytochromu P450. Tento receptor indukuje CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9 a CYP2A6. Mezi xenobiotika interagující s tímto receptorem patří

například fenobarbital, rifampicin, cyklofosfamid a další. Dalším receptorem je PXR („pregnane X receptor“) pro živočišné systémy, nebo jeho lidský homolog SXR („steroid xenobiotic receptor“). Enzymy, které jsou indukované prostřednictvím tohoto receptoru, jsou CYP3A4 a CYP3A5. Látky, které s tímto receptorem interagují jsou například pregnenolon 16 α -karbonitril, rifampicin a fenobarbital. Indukce rodiny cytochromů P450 4A je zprostředkována receptorem PPAR („peroxisome proliferator-activated receptor“) ⁽¹²⁰⁾.

1.5 Peroxidas

Peroxidas (EC 1.11.1) jsou enzymy, které katalyzují oxidoredukční reakce. Redukují peroxid vodíku (nebo jiné peroxidy) za současné oxidace další sloučeniny (endogenní nebo xenobiotika). Funkcí společnou pro všechny peroxidas se schopnost detoxikovat H₂O₂, zatímco spektrum oxidovaných sloučenin je velmi široké. Mezi nejlepší substráty peroxidas lze však řadit fenoly a aromatické aminy. Svou širokou substrátovou specifitou se peroxidas blíží monooxygenasovému systému obsahujícímu cytochrom P450. Peroxidas jsou bohatě zastoupeny především v rostlinné říši a v nižších houbách, méně pak v tkáních živočichů a mikrobiálních buňkách ⁽⁶⁷⁾.

Typickým znakem peroxidas je schopnost katalyzovat velké množství různých typů reakcí:

- Klasické peroxidasové redoxní reakce (vedoucí k dehydrogenaci)
- Halogenace a dehalogenace
- Oxidace halogenidů
- Oxidační kondenzace aromatických aminů
- Oxidační polykondenzace fenolu a jeho derivátů
- Dekarboxylační reakce
- Oxidační štěpení azoskupiny (vznik diazoniového iontu)
- Disproporcionace peroxidu vodíku
- Oxygenace, hydroxylace
- N- a O-demethylace ⁽¹⁰⁸⁾

1.5.1 Klasifikace a charakterizace peroxidas

Názvosloví jednotlivých enzymů je tvořeno několika způsoby:

- **Podle zdroje, kde se vyskytují** (křenová peroxidasa, myeloperoxidasa, laktoperoxidasa)
- **Podle přeměňovaného substrátu** (halogenperoxidasa)
- **Podle vznikajícího produktu** (prostaglandin endoperoxid synthasa)

Peroxidasy se dělí do dvou základních superrodin:

- **Superrodina rostlinných peroxidas**
- **Superrodina živočišných peroxidas**

Superrodina rostlinných peroxidas je dále rozdělena podle sekvenční homologie do tří tříd. Třidu I tvoří intracelulární peroxidasy prokaryotického původu, třídu II intracelulární peroxidasy hub a zástupci třídy II jsou sekreční rostlinné peroxidasy^(72, 73).

Peroxidasy lze dále rozdělit podle jejich struktury. Peroxidasy jsou většinou hemoglykoproteiny, jejichž prosthetickou skupinu tvoří převážně ferriprotoporfyrin IX. Ion železa této skupiny je pentakoordinovaný, přičemž pátý ligand tvoří dusík histidylového zbytku proteinové části enzymu. Pofyrinový skelet však může v peroxidasách chybět nebo být pozměněn. Tyto peroxidasy mají ve své struktuře například ionty manganu (Mn^{2+}) nebo vanadu (V^{5+})^(106, 107). Právě podle charakteru aktivního místa jsou peroxidasy členěny do tří skupin na:

- **Hemové peroxidasy**
- **Vanadové peroxidasy**
- **Ostatní peroxidasy**

Nejpočetnější je skupina peroxidas, jejichž katalytické centrum obsahuje hem. Patří sem jak rostlinné peroxidasy, tak peroxidasy hub a živočišné peroxidasy. Sekvenční homologie hemových peroxidas je malá (menší než 20 %). V těchto sekvencích je však

zachováno „poskládání“ enzymu, organizace sekundární struktury, koordinace iontu železa a většina aminokyselinových zbytků v aktivním centru enzymu ⁽⁴²⁾.

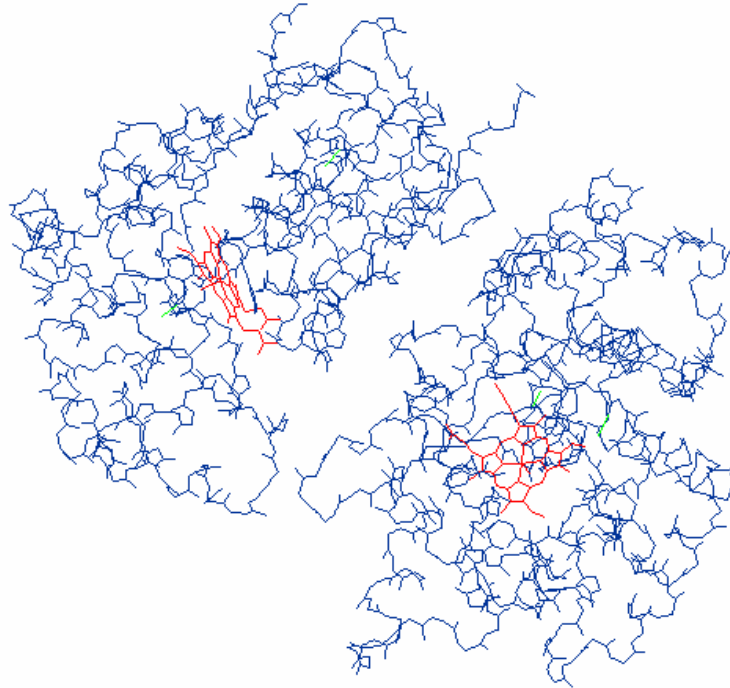
Obsah glykosidicky vázaných sacharidů se u jednotlivých peroxidas velmi liší a dosahuje až 30 % z celkové molekulové hmotnosti. Relativní molekulová hmotnost funkčních peroxidas se pohybuje v rozmezí 42 kDa – 158 kDa ⁽⁶⁷⁾.

1.5.1.1 Křenová peroxidasa

Křenová peroxidasa (HRP) je jednou z nejprostudovanějších peroxidas. O peroxidasach je obecně známo, že se vyskytují ve velkém množství forem (pravděpodobně izoenzymů). HRP se vyskytuje ve čtrnácti formách. Zatím bylo identifikováno 5 genů, které kódují HRP a byla u nich určena sekvenční homologie. HRP patří mezi hemové peroxidasy ^(42, 67).

Izoenzym, který převažuje svým množstvím mezi izoenzymy HRP izolované z křenu selského je izoenzym C. Izoenzym C křenové peroxidasy (HRP C) je tvořen 308 aminokyselinami se 4 disulfidickými můstky na jednoduchém polypeptidovém řetězci ⁽¹⁰⁹⁾. HRP C obsahuje heminovou prosthetickou skupinu, 2 ionty Ca^{2+} a sacharidovou složku, která tvoří asi 21 % molekulové hmotnosti (experimentálně určená molekulová hmotnost je v rozmezí 40 kDa – 45,9 kDa). Sacharidovou složku tvoří 8 N-glykosidicky vázaných oligosacharidových řetězců, z nichž každý obsahuje zbytky Fuc, Xyl, Man, GlcNac ^(110, 114).

HRP obsahuje 2 ionty Ca^{2+} . Ionty Ca^{2+} jsou nezbytné pro zachování proteinové struktury v okolí hemu a pro renaturaci denaturovaného proteinu in vitro ⁽¹¹¹⁾. Struktura HRP je uvedena na obrázku 14 (str. 39).



Obrázek 14

Struktura křenové peroxidasy. Červeně jsou vyznačeny hemy, zeleně ionty Ca^{2+} .

Převzato z ⁽⁴²⁾.

1.5.1.2 Laktoperoxidasa

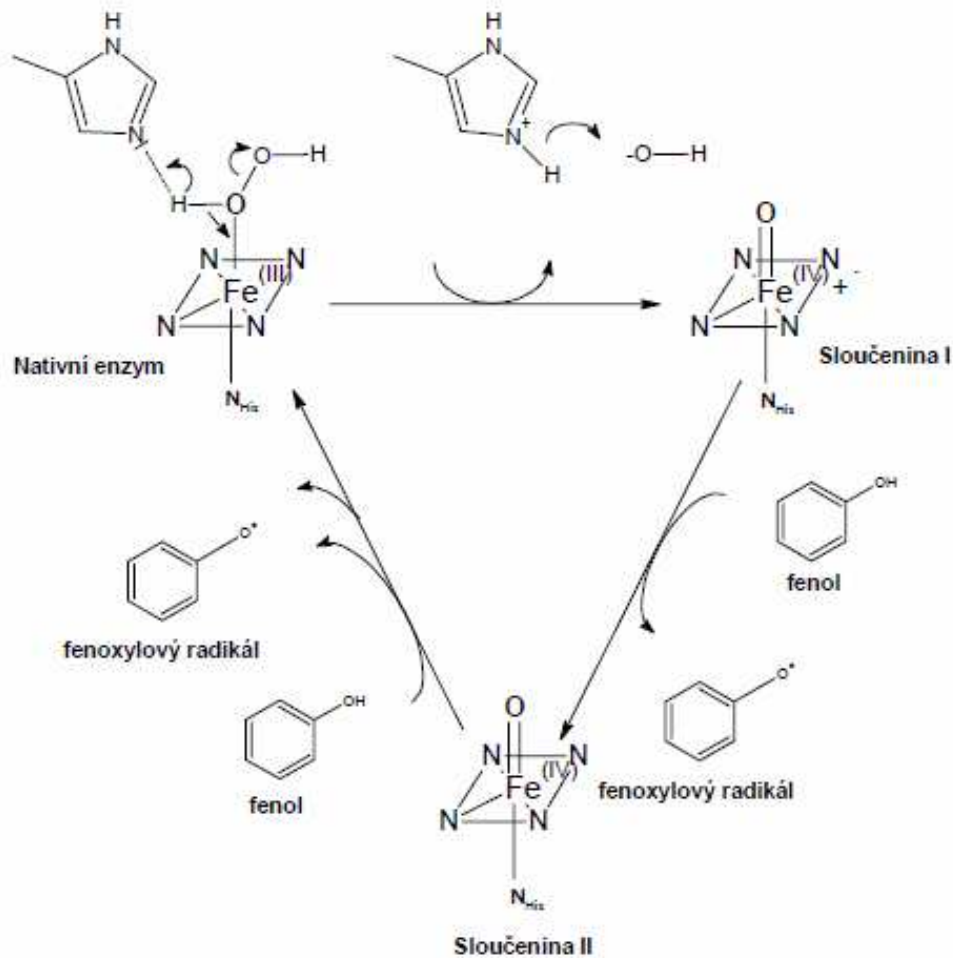
Laktoperoxidasa (LPO) je živočišný enzym, která je obsažen v mléčných a slinných žlázách. Laktoperoxidasa se vyskytuje v šesti až deseti formách. Laktoperoxidasa patří do skupiny halogenperoxidas. Tyto enzymy mají schopnost katalyzovat peroxidasovou oxidaci halogenidů a pseudohalogenidů (například thiokyanatan). Jejich význam vyplývá z antibakteriálních vlastností. Chrání některá vnitřní prostředí před mikroorganismy. LPO je schopna oxidovat Br^- , I^- a SCN^- . Hovězí LPO byla purifikována a charakterizována v roce 1943 ^(115, 42).

LPO obsahuje hem 1 ⁽¹¹⁴⁾, ion Ca^{2+} a je na čtyřech místech N-glykosylována ⁽¹¹²⁾. Přibližně 10 % molekulové hmotnosti celé molekuly (78 kDa) tvoří sacharidová složka ⁽¹¹⁶⁾.

1.5.2 Reakční mechanismus peroxidas

Katalytický cyklus peroxidas je zahájen vazbou H_2O_2 nebo jiného peroxidu (ROOH) na nativní peroxidasu, přičemž se enzym aktivuje. Vzniká Sloučenina I, která je o dva oxidační ekvivalenty nad nativním enzymem. Sloučenina I nese aktivovaný kyslík, který je kovalentně vázán jako šestý ligand hemového Fe s formálním oxidačním číslem IV a druhý oxidační ekvivalent je přítomen ve formě ferryIporfyrinového π -kation radikálu. Přítomnost reaktivního radikálu je pravděpodobně příčinou nestability Sloučeniny I a její krátké doby života v závislosti na druhu peroxidasy. Stabilita Sloučeniny I závisí také na koncentraci H_2O_2 . V nepřítomnosti redukčního substrátu je peroxidasa velkým množstvím peroxidu degradována ⁽⁶⁷⁾.

Reakcí Sloučeniny I se substrátem vzniká Sloučenina II ^(106, 107) a radikál substrátu. Elektronem, který byl vytržený z molekuly substrátu, se doplní deficit na porfyrinovém skeletu nebo na aminokyselinovém zbytku peroxidasy. Reakcí Sloučeniny II s další molekulou substrátu se cyklus uzavírá a peroxidasa se tak dostává do nativního stavu ⁽¹¹⁷⁾. Reakční cyklus peroxidas je znázorněn na obrázku 15 (str. 41).



Obrázek 15

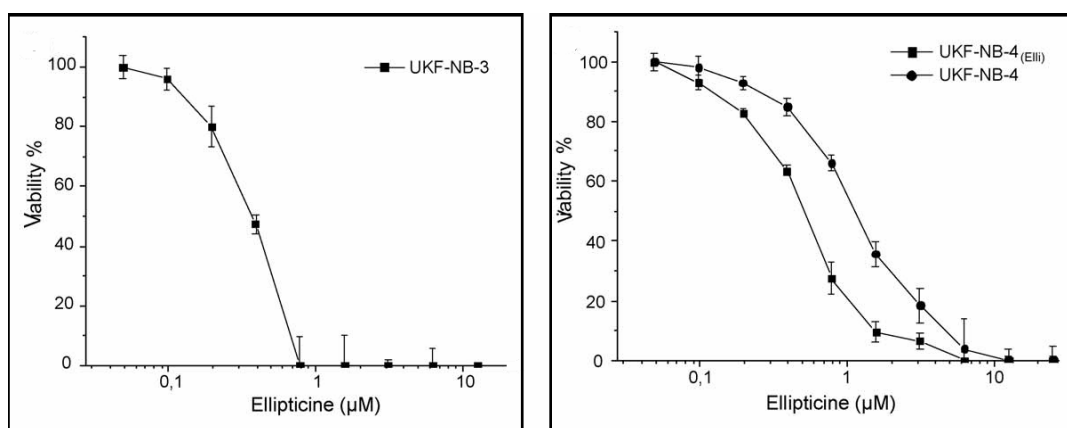
Reakční cyklus peroxidasy za účasti peroxidu vodíku. Převzato z. ⁽⁶⁷⁾.

1.6 Neuroblastomy

Neuroblastom je nádor periferního sympatického nervstva. Je nejčastějším solidním extrakraniálním nádorem vyskytujícím se v dětském věku ⁽¹¹⁸⁾. Prevalence neuroblastomu se udává 1:10 000 živě narozených dětí, průměrný věk v době stanovení diagnózy je 22 měsíců. Tyto nádory jsou biologicky heterogenní, s různým stupněm diferenciací. Zvláštností neuroblastomu je značná variabilita v biologickém chování, která je vyjádřena formami schopnými spontánní regrese, přes formy léčitelné až zcela rezistentní a prakticky neléčitelné ⁽¹⁾.

1.6.1 Cytotoxicita ellipticinu vůči neuroblastomům a její ovlivnění inhibitory histondeacetylas

Studiemi provedenými v naší laboratoři bylo zjištěno, že ellipticin působí cytotoxicky vůči lidským nádorovým neuroblastomovým liniím (obrázek 16), neboť vyvolává kovalentní modifikaci DNA těchto buněk. V neuroblastomových buněčných liniích byly detekovány dva majoritní adukty s DNA, které jsou generovány z 12-hydroxy- a 13-hydroxyellipticinu s guanosinem v DNA ^(21, 26).



Obrázek 16

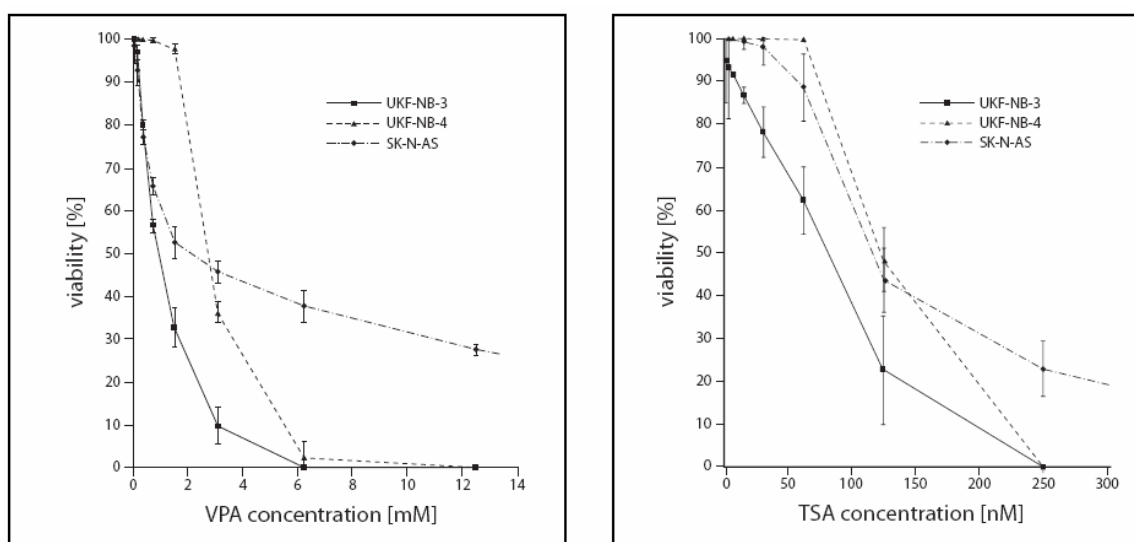
Cytotoxicita ellipticinu vůči lidským neuroblastomovým buněčným liniím UKF-NB-3, UKF-NB-4 a UKF-NB-4, které jsou rezistentní k ellipticinu (UKF-NB-4^(Elli)). Převzato z ⁽²¹⁾.

Cytotoxicita ellipticinu vůči neuroblastomovým buněčným liniím byla studována v přítomnosti dalších látek, u kterých se předpokládalo, že by mohly citlivost neuroblastomu na ellipticin ještě zvýšit. K tomuto studiu byly využity inhibitory histondeacetylas, látky schopné inhibovat deacetylaci histonové DNA, čímž zvyšují účinnost některých protinádorových léčiv. U dvou inhibitorů histondeacetylas, kyseliny valproové (VPA) a trichostatinu A (TSA), bylo zjištěno, že efektivně zvyšují toxicitu ellipticinu vůči neuroblastomovým buněčným liniím ⁽⁴¹⁾. VPA i TSA mohou zvyšovat cytotoxicitu ellipticinu i tím, že by ovlivňovaly aktivitu enzymů biotransformujících toto cytostatikum. Oba inhibitory HDAC mohou jak inhibovat, tak stimulovat aktivitu některých cytochromů P450 ^(100, 113, 121, 122). Kyselina valproová je účinné antiepileptikum a v současné době ve fázi klinického testování ⁽¹⁰³⁾. Trichostatin A je ve fázi preklinického testování ⁽⁴⁵⁾.

1.6.2 Cytotoxicita inhibitorů histondeacetylas VPA a TSA vůči neuroblastomům

Je známo, že inhibitory HDAC vykazují cytotoxicitu vůči mnohým neuroblastomovým buňkám, resultující v inhibici růstu těchto nádorových buněk ⁽¹⁰⁵⁾. V neoplastických buňkách, kde byla opakovaně odhalena exprese HDAC, bylo množství deacetylovaných histonů obvykle spojených s hypermetylací DNA a umlčováním genů ⁽¹¹⁹⁾. Podávání inhibitorů HDAC vyvolalo opětovnou aktivaci růstu regulačních genů a následně apoptosu těchto buněk. Jeden z inhibitorů HDAC, kyselina valproová (VPA), inhibuje růst a podporuje diferenciaci lidských neuroblastomových buněk UKF-NB-2 a UKF-NB-3 *in vitro* v koncentraci pohybující se od 0,5 mM do 2 mM, které bylo dosaženo u člověka bez výrazných vedlejších nežádoucích účinků ⁽¹⁰⁵⁾. Nicméně informace o vlivech VPA a jiných inhibitorů HDAC na další neuroblastomové buňky jsou omezené ⁽¹⁰⁴⁾.

Cytotoxicita inhibitorů histondeacetylas, kyseliny valproové a trichostatinu A (TSA), byla studována u dvou typů neuroblastomových buněk. Jedná se o invazivní buňky typu N (UKF-NB-3) a neinvazivní, méně agresivní buňky typu S (UKF-NB-4 a SK-N-AS). Tyto dva typy neuroblastomů byly použity proto, že heterogenita neuroblastomových buněk může ovlivnit jejich léčbu. Studované invazivní i neinvazivní neuroblastomové linie jsou citlivé na oba inhibitory histondeacetylas (obrázek 17) ⁽¹⁰⁴⁾.



Obrázek 17

Cytotoxicita kyseliny valproové a trichostatinu A vůči neuroblastomovým buněčným liniím UKF-NB-3, UKF-NB-4 a SK-N-AS. Převzato z ⁽¹⁰⁴⁾.

1.6.3 Modulace exprese CYP v neuroblastomech působením inhibitorů histondeacetylas VPA a TSA

V buňkách neuroblastomů je exprimováno mnoho typů cytochromů P450 zodpovědných za biotransformaci léčiv ⁽²¹⁾. Poznání, zda inhibitory histondeacetylas ovlivňují expresi těchto enzymů, by mohlo být užitečné v léčbě neuroblastomů.

Vliv kyseliny valproové (VPA) a trichostatinu A (TSA) na expresi cytochromů P450, konkrétně CYP1A1, 3A4 a 1B1 byl studován u dvou typů neuroblastomových buněk. Jedná se o buňky UKF-NB-3 (invazivní typu N), dále u buněčné linie UKF-NB-4 a SK-N-AS (neinvazivní a méně agresivní typu S) ⁽¹⁰⁴⁾. Vlivy VPA a TSA na expresi CYP1A1, 1B1 a 3A4 v jednotlivých neuroblastomových buňkách byly rozdílné. Exprese těchto CYP v buněčné linii SK-N-AS nebyla ovlivňována žádnou ze studovaných látek. Naopak v buněčné linii UKF-NB-4 VPA a TSA indukovaly expresi CYP1A1, snižovaly hladiny CYP1B1 a neměly žádný vliv na expresi CYP3A4. V buněčné linii UKF-NB-3 byla silně indukována exprese CYP1A1, zatímco exprese CYP1B1 snižována. VPA v těchto neuroblastomových buňkách indukoval expresi CYP3A4 ⁽¹⁰⁴⁾.

2 Cíl diplomové práce

Cílem předkládané diplomové práce bylo přispět k poznání mechanismu působení inhibitoru histondeacetylas trichostatinu A na oxidaci protinádorového léčiva ellipticinu cytochromy P450 a peroxidasami a vlivu této sloučeniny na expresi těchto enzymů v neuroblastomových buněčných liniích. Konkrétními cíly bylo:

- Poznání vlivu inhibitoru histondeacetylas trichostatinu A na oxidaci ellipticinu cytochromy P450 jaterního mikrosomálního systému laboratorního potkana a peroxidasami (laktoperoxidasa a křenová peroxidasa).
- Studium vlivu trichostatinu A na aktivity enzymů zodpovědných za oxidaci ellipticinu, konkrétně potkaních jaterních cytochromů P450 podrodiny 1A a 3A, měřených se specifickými „markerovými“ substráty.
- Poznání exprese enzymů oxidujících ellipticin (cytochromy P450 1A1, 3A4 a laktoperoxidasy) v lidských neuroblastomových buněčných liniích.
- Studium vlivu trichostatinu A na expresi cytochromů P450 1A1, 3A4 a laktoperoxidasy v lidských neuroblastomových buněčných liniích.

Diplomová práce byla vypracována jako součást řešení grantových projektů GAČR (P303/10/0356) a MŠMTČR (MSM0021620808 a 1M0505).

3 Materiál a metody

3.1 Použité chemikálie

❖ *AbCam, USA*

králičí „primární protilátka“ proti laktoperoxidase

❖ *Abd Serotec, USA*

králičí „primární protilátka“ proti CYP3A4

❖ *Bio-Rad, USA*

„sekundární protilátka“ (kozí IgG proti králičí IgY konjugovaná s křenovou peroxidasou),
Immun-Star HRP Substrate

❖ *British Drug Houses, Velká Británie*

Sudan I

❖ *Calbiochem, USA*

9-hydroxyellipticin

❖ *Fluka, Švýcarsko*

dichlormethan, akrylamid, dodecylsulfát sodný (SDS), 2-merkптоethanol, glycin,
N,N-methylen-bis-akrylamid (BIS)

❖ *Chemické závody Sokolov, ČR*

peroxid vodíku

❖ *KlinLab, ČR*

Iscove's modified Dolbecco's medium (IMDM)

❖ **Lachema, ČR**

chlorid hořečnatý, octan amonný, uhličitan sodný, hydrogenuhličitan amonný, bromfenolová modř, persíran amonný, dihydrogenfosforečnan draselný, hydroxid draselný, chlorid sodný, kyseliny chlorovodíková

❖ **Lach-Ner, ČR**

methanol, kyselina octová, hydroxid draselný, chlorid sodný, dihydrogenfosforečnan draselný

❖ **Loba Feinchemie, Rakousko**

tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS)

❖ **Merck, Německo**

acetonitril

❖ **Millipore Corp., USA**

králičí „primární protilátka“ proti CYP1A1 a gyceraldehyd-3- fosfát dehydrogenase

❖ **Penta, ČR**

glycerol, ethylester kyseliny octové

❖ **Serva, Německo**

Triton X-100, N,N,N',N'-tetramethyl-ethylendiamin (TEMED)

❖ **Sigma Aldrich, USA**

dimethylsulfoxid (DMSO), ellipticin, nikotinamidadeninindukleotidfosfát (NADP⁺), glukosa-6-fosfát, glukosa-6-fosfát dehydrogenasa, fenacetin, laktoperoxidasa (LPO), křenová peroxidasa (HRP), kyselina 1-heptansulfonová, testosteron, methoxyresorufin, resorufin, 6-β-hydroxy-testosteron, tetrasodná sůl redukováného β-nikotinamidadeninindukleotidfosfátu (NADPH), trichostatin A, deoxycholát sodný

❖ 13-hydroxyellipticin, ellipticin-N²-oxid – syntéza na pracovišti katedry biochemie, PřF UK

- ❖ jaterní mikrosomální systémy laboratorních potkanů kmene Wistar (kontrolních (nepremedikovaných) potkanů, potkanů premedikovaných Sudanem I a potkanů premedikovaných pregnenolon-16 α -karbonitrilem) – izolovány kolegy v laboratoři na pracovišti katedry biochemie PřF UK
- ❖ neuroblastomové buněčné linie (UKF-NB-3, UKF-NB-4) – pěstované RNDr. Jitkou Poljakovou, Ph.D., darované Prof. J. Cinatlem, Jr. (J. W. Goethe University, Frankfurt, Germany)

3.2 Použité přístroje

❖ Centrifugy:

Microcentaur MSE, Sanyo (úhlový rotor)

Centrifuga T 52,2 (výkyvný rotor)

❖ Váhy:

PESA 40SM-200A (analytické váhy)

KERN EW600-2M (předvážky)

❖ Systém HPLC:

pumpa: Dionex pump P580

ASI-100 Automated Sample Injector

UV/VIS Detector UVD 170S/340S

termobox pro kolonu: COLUMN OVEN LCO 101

Degasys DG-1210 Dionex

kolony: Ultrasphere, ODS, C18, 250 x 4,6 mm, 5 μ m (Beckman-Coulter)

Nucleosil[®] 100-5 C18, 5 μ m, 250 x 4 mm (Macherey-Nagel)

program: Chromeleon[™]6.11 build 490

❖ Další přístroje:

pH metr ATI Orion 370 s kombinovanou elektrodou

magnetická míchačka Variomag, Monotherm
sonikátor ELMAsonic E 30 H, P-Lab
Vortex MS 1 Minishaker
vodní lázeň Julabo TW 8
inkubátor Thermomixer compact, Eppendorf
inkubátor G24 Environmental Incubator Shaker
odparka Speed Vac DNA 110 (Savant), USA
automatické mikropipety
třepačka Microshaker ML-1
fluorimetr Luminiscence Spectrometer Perkin Elmer LS-55
aparatura pro „Western blotting“ „Fastblot“ B-32 Biometra
aparatura pro elektroforesu firmy Amersham Biosciences
automatické mikropipety: Biohit, Finsko
Nichiryo Nichipet EX, Japonsko

3.3 Metody

3.3.1 Vliv TSA na oxidaci ellipticinu jaterními mikrosomálními systémy potkanů

Vliv trichostatinu A (TSA) na oxidaci ellipticinu byl studován za použití jaterních mikrosomálních systémů jednak kontrolních (nepremedikovaných) potkanů, jednak potkanů premedikovaných Sudanem I a potkanů premedikovaných pregnenolon-16 α -karbonitrilem (PCN).

Tabulka 1

Koncentrace CYP v izolovaných mikrosomálních frakcích použitých pro experimenty.

typ potkanů použitých pro izolaci jaterní mikrosomální frakce	koncentrace CYP (mikrosomální frakce)
kontrolní (nepremedikovaní)	16,8 μ M
premedikovaní Sudanem I	44,34 μ M
premedikovaní PCN	65 μ M

Inkubační směsi byly vždy připraveny v tripletech o následujícím složení:

- 0,2 μ M CYP jaterní mikrosomální frakce (tabulka 1)
- 10 μ M ellipticin (5 mM zásobní roztok rozpuštěný v DMSO)
- 50 nM nebo 100 nM TSA (5 μ M nebo 10 μ M zásobní roztok v DMSO)
- NADPH generující systém - 10 mM MgCl₂, 10 mM glukosa-6-fosfát, 1 mM NADP⁺, 1 U/ml glukosa-6-fosfát dehydrogenasa
- fosfátový pufr (0,1 M KH₂PO₄, pH 7,4)

Jednotlivé složky byly přidávány v takovém množství, aby jejich koncentrace v inkubační směsi odpovídala výše uvedeným hodnotám. Pufr byl vždy doplněn tak, aby celkový objem směsi byl 0,5 ml. K inkubačním směsím byl připraven kontrolní vzorek, ve kterém byl TSA nahrazen DMSO.

Reakce byla startována přidáním NADPH generujícího systému. Směs byla inkubována 20 min při teplotě 37 °C při třepání 400 RPM (Thermomixer compact eppendorf). Poté bylo ke směsi přidáno 5 μ l fenacetinu v methanolu, který je interním standardem pro HPLC. Reakce byla zastavena přidáním 1 ml ethylacetátu. Dále byla

provedena extrakce ellipticinu a jeho metabolitů do organické fáze, která byla podpořena intenzivním třepáním po dobu 2 min na „vortexu“. Poté byly vzorky centrifugovány po dobu 3 min při 13000 RPM (Microcentaur MSE), aby se fáze lépe oddělily. Horní organická vrstva ethylacetátu byla odebrána a přenesena do 2 ml mikrozkušavek Eppendorf a vzorky byly opakovaně extrahovány stejným způsobem. Směs byla odpařena do sucha (30 min) na vakuové odparce „Speed Vac“ (DNA 110, firma Savant). Těsně před analýzou byly jednotlivé vzorky rozpuštěny ve 25 μ l methanolu.

3.3.1.1 Separace metabolitů ellipticinu tvořených jaterními mikrosomálními systémy potkanů pomocí HPLC

Pro separaci metabolitů ellipticinu a jejich kvantifikaci byla použita vysokotlaká (vysokoúčinná) kapalinová chromatografie s reverzní fází (RP-HPLC). Metoda je založená na dělení složek probíhající v separační koloně, do které je veden proud mobilní fáze se vzorkem pod velkým tlakem (až několik desítek MPa). U RP-HPLC je mobilní fáze polární a stacionární fáze nepolární, nepolární složky jsou tedy kolonou zadržovány a eluovány později než složky polární.

K separaci vzorků, jejichž postup přípravy je uveden v kapitole 3.3.1, docházelo izokratickou elucí mobilní fází o složení: 64 % methanol, 36 % destilovaná voda, 0,005 M 1-heptansulfonová kyselina a 0,032 M kyselina octová. Mobilní fáze byly skladovány ve skleněných lahvích a před použitím byl odstraněn vzduch sonikací. Separace metabolitů byla provedena na koloně Ultrasphere, ODS, C18, 250 x 4.6 mm, 5 μ m (Beckman-Coulter, USA) při teplotě 35 °C. Rychlost průtoku byla 0,6 ml/min. Vzorky byly aplikovány o objemu 20 μ l Hamiltonovým mikrodávčem. Detekce metabolitů ellipticinu byla provedena při vlnové délce 296 nm a pro jejich kvantifikaci byla plocha „píků“ vztažena k ploše „píku“ vnitřního standardu fenacetinu.

3.3.2 Vliv TSA na oxidaci ellipticinu peroxidasami

Vliv TSA na oxidaci ellipticinu byl studován za použití dvou typů peroxidas; křenevé peroxidasy a hovězí laktoperoxidasy.

Inkubační směsi byly připraveny vždy v tripletech o následujícím složení:

- peroxidasa – 1,25 µg/ml proteinů křenové peroxidasy (zásobní roztok rozpuštěný v destilované vodě o koncentraci 25 µg/ml)
5 µg/ml proteinů laktoperoxidasy (zásobní roztok rozpuštěný v destilované vodě o koncentraci 1 mg/ml)
- 10 µM ellipticin (5 mM zásobní roztok rozpuštěný v methanolu)
- 50 nM nebo 100 nM TSA (5 µM nebo 10 µM zásobní roztok v DMSO)
- 100 µM H₂O₂ (10 mM zásobní roztok)
- fosfátový pufr (0,1 M KH₂PO₄, pH 7,4)

Jednotlivé složky byly přidávány v takovém množství, aby jejich koncentrace v inkubační směsi odpovídala výše uvedeným hodnotám. Pufr byl vždy doplněn tak, aby celkový objem směsi byl 0,5 ml. K inkubačním směsím byl připraven kontrolní vzorek, ve kterém byl TSA nahrazen DMSO.

Reakce byla startována přidáním 5 µl 10 mM peroxidu vodíku. Směs byla inkubována 20 min při teplotě 37 °C při třepání 400 RPM (Thermomixer compact eppendorf). Reakce byla zastavena přidáním 1 ml ethylacetátu. Dále byla provedena extrakce ellipticinu a jeho metabolitů do organické fáze, která byla podpořena intenzivním třepáním po dobu 2 min na „vortexu“. Poté byly vzorky centrifugovány po dobu 3 min při 13000 RPM (Microcentaur MSE), aby se fáze lépe oddělily. Horní organická vrstva ethylacetátu byla odebrána a přenesena do 2 ml mikrokumavek Eppendorf a vzorky byly opakovaně extrahovány stejným způsobem. Směs byla odpařena do sucha (30 min) na vakuové odparce „Speed Vac“ (DNA 110, firma Savant). Těsně před analýzou byly jednotlivé vzorky rozpuštěny ve 25 µl methanolu.

3.3.2.1 Detekce dimeru ellipticinu tvořeného peroxidasami pomocí HPLC

Jednotlivé složky reakční směsi, jejichž postup přípravy je uveden v kapitole 3.3.2, byly separovány metodou RP-HPLC (princip uveden v kapitole 3.3.1.1). Dále byla provedena detekce a kvantifikace dimeru ellipticinu, který je majoritním metabolitem ellipticinu vznikajícím při jeho oxidaci peroxidasami. K separaci vzorků docházelo gradientovou elucí (tabulka 2, str. 53) za použití mobilních fází o složení:

A: 45 % methanol, 55 % pufr octanu amonného (100 mM, pH 2,8)

B: 90 % methanol, 10 % pufr octanu amonného (100 mM, pH 2,8)

Tabulka 2

Průběh gradientu použitý při separaci metabolitů ellipticinu tvořených peroxidasami

čas [s]	% B (mobilní fáze)
0	0
12,5	100
22,5	100
25	0
30	stop

Mobilní fáze byly skladovány ve skleněných lahvích a před použitím byl odstraněn vzduch sonikací. Separace metabolitů byla provedena na koloně Nucleosil®, C18, 250 x 4 mm, 100-5 µm (Macherey-Nagel, Německo) při teplotě 35 °C. Rychlost průtoku byla 0,8 ml/min. Vzorky byly aplikovány o objemu 20 µl Hamiltonovým mikrodávčem. Detekce metabolitů ellipticinu byla provedena při vlnové délce 296 nm.

3.3.3 Vliv TSA na aktivitu CYP1A1

Pro studium vlivu TSA na aktivitu CYP1A1 byla využita oxidace Sudanu I jaterním mikrosomálním systémem potkanů premedikovaných Sudanem I. Sudan I je znám jako silný induktor CYP podrodiny 1A a také jako „markerový“ substrát CYP1A1⁽³⁶⁾.

Inkubační směsi byly vždy připraveny v tripletech o následujícím složení:

- 0,2 µM CYP jaterní mikrosomální frakce (tabulka 1, str. 50)
- 50 nM nebo 100 nM TSA (5 µM nebo 10 µM zásobní roztok v DMSO)
- 1 mM NADPH (zásobní roztok 10 mM v destilované vodě)
- 50 mM Sudan I (5 mM zásobní roztok v methanolu)
- fosfátový pufr (0,1 M KH₂PO₄, pH 7,4)

Jednotlivé složky byly přidávány v takovém množství, aby jejich koncentrace v inkubační směsi odpovídala výše uvedeným hodnotám. Pufr byl vždy doplněn tak,

aby celkový objem směsi byl 0,5 ml. K inkubačním směsím byl připraven kontrolní vzorek, ve kterém byl TSA nahrazen DMSO. Inkubační směsi byly připraveny do skleněných zkumavek, neboť Sudan I je silně hydrofobní, což způsobuje jeho přilnavost na stěnu plastových zkumavek.

Před přidáním Sudanu I, kterým byla reakce startována, byla směs inkubována 2 min při teplotě 37 °C ve vodní lázni (Julabo TW8). Po přidání Sudanu I byla směs inkubována 20 min za stejných podmínek (Environmental incubator shaker G24). Reakce byla zastavena přidáním 1 ml ethylacetátu. Dále byla provedena extrakce Sudanu I a jeho metabolitů do organické fáze, která byla podpořena intenzivním třepáním po dobu 2 min na „vortexu“. Poté byly vzorky centrifugovány po dobu 3 min při 8000 RPM (centrifuga ZP 10351), aby se fáze lépe oddělily. Horní organická vrstva ethylacetátu byla odebrána do 2 ml mikrozkušavek Eppendorf a vzorky byly opakovaně extrahovány stejným způsobem. Směs byla odpařena do sucha (30 min) na vakuové odparce „Speed Vac“ (DNA 110, firma Savant). Těsně před analýzou byly jednotlivé vzorky rozpuštěny ve 25 µl methanolu.

3.3.3.1 Separace metabolitů Sudanu I tvořených jaterním mikrosomálním systémem pomocí HPLC

Separace metabolitů Sudanu I a jejich kvantifikace byla provedena metodou RP-HPLC (princip uveden v kapitole 3.3.1.1). Vzorky byly eluovány izokraticky mobilní fází o složení: 0,1 M NH_4HCO_3 (pH 8,5) a methanol v poměru 1:9. Mobilní fáze byly skladovány ve skleněných lahvích a před použitím byl odstraněn vzduch sonikací. Separace metabolitů byla provedena na koloně Nucleosil®, C18, 250 x 4 mm, 100-5 µm (Macherey-Nagel, Německo) při teplotě 35 °C. Rychlost průtoku byla 0,7 ml/min. Vzorky byly aplikovány o objemu 20 µl Hamiltonovým mikrodávčem. Detekce metabolitů Sudanu I byla provedena při vlnové délce 480 nm.

3.3.4 Vliv TSA na aktivitu CYP podrodiny 3A

Pro studium vlivu TSA na aktivitu CYP podrodiny 3A byla využita oxidace testosteronu na 6-β-hydroxy-testosteron jednak jaterním mikrosomálním systémem kontrolních (nepremedikovaných), jednak potkanů premedikovaných PCN. Testosteron

respektive jeho 6- β -hydroxylace byly použity jako „markerový“ substrát (reakce) CYP podrodiny 3A a PCN je znám jako induktor této podrodiny^(38, 39).

Inkubační směsi byly vždy připraveny v tripletech o následujícím složení:

- 0,4 mg/ml proteinů mikrosomální
- 0,05 mM testosteron (10 mM zásobní roztok rozpuštěný v methanolu)
- 50 nM nebo 100 nM TSA (5 μ M nebo 10 μ M zásobní roztok v DMSO)
- NADPH generující systém - 10 mM MgCl₂, 10 mM glukosa-6-fosfát, 1 mM NADP⁺, 1 U/ml glukosa-6-fosfát dehydrogenasa
- fosfátový pufr (0,1 M KH₂PO₄, pH 7,4)

Jednotlivé složky byly přidávány v takovém množství, aby jejich koncentrace v inkubační směsi odpovídala výše uvedeným hodnotám. Pufr byl vždy doplněn tak, aby celkový objem směsi byl 0,5 ml. K inkubačním směsím byl připraven kontrolní vzorek, ve kterém byl TSA nahrazen DMSO.

Před přidáním NADPH generujícího systému, který reakci startuje, byla směs inkubována 3 min při teplotě 37 °C při třepání 400 RPM (Thermomixer compact eppendorf). Po přidání NADPH generujícího systému byla směs byla inkubována 15 min za stejných podmínek. Poté byl ke směsi přidáno 5 μ l fenacetinu v methanolu, který je interním standardem pro HPLC. Reakce byla zastavena přidáním 100 μ l směsi 1 M Na₂CO₃/2 M NaCl. Dále byla provedena extrakce testosteronu a jeho metabolitů do organické fáze. Ke vzorkům byl přidán 1 ml dichlormethanu a extrakce byla podpořena intenzivním třepáním po dobu 2 min na „vortexu“. Dále byly vzorky centrifugovány po dobu 3 min při 13000 RPM (Microcentaur MSE), aby se fáze lépe oddělily. Dolní organická vrstva dichlormethanu byla odebrána a přenesena do 2 ml mikrokumavek Eppendorf a vzorky byly opakovaně extrahovány stejným způsobem. Směs byla odpařena do sucha (30 min) na vakuové odparce „Speed Vac“ (DNA 110, firma Savant). Těsně před analýzou byly jednotlivé vzorky rozpuštěny ve 25 μ l methanolu.

3.3.4.1 Separace metabolitů testosteronu tvořených jaterními mikrosomálními systémy pomocí HPLC

Pro studium vlivu TSA na aktivitu CYP podrodiny 3A byla využita oxidace testosteronu na 6- β -hydroxy-testosteron jednak jaterním mikrosomálním systémem kontrolních (nepremedikovaných), jednak potkanů premedikovaných PCN. Testosteron (jeho 6- β -hydroxylace) je „markerovým“ substrátem (reakcí) CYP podrodiny 3A a PCN je znám jako induktor této podrodiny^(38, 39). Separace metabolitů testosteronu a jejich kvantifikace byla provedena metodou RP-HPLC (princip uveden v kapitole 3.3.1.1). Vzorky byly eluovány izokraticky a jako mobilní fáze byl použit 75 % methanol.

Mobilní fáze byly skladovány ve skleněných lahvích a před použitím byl odstraněn vzduch sonikací. Separace metabolitů byla provedena na koloně Nucleosil®, C18, 250 x 4 mm, 100-5 μ m (Macherey-Nagel, Německo) při teplotě 35 °C. Rychlost průtoku byla 0,5 ml/min. Vzorky byly aplikovány o objemu 20 μ l Hamiltonovým mikrodávčem. Detekce metabolitů ellipticinu byla provedena při vlnové délce 254 nm.

3.3.5 Vliv TSA na aktivitu CYP1A2

Pro studium vlivu TSA na aktivitu CYP1A2 byla využita „markerová“ reakce tohoto CYP, 7-methoxyresorufin *O*-demethylační aktivita (MROD). Jako oxidační systém byl použit jaterní mikrosomální systém potkanů premedikovaných Sudanem I. Jak již bylo zmíněno v kapitole 3.3.4, Sudan I je znám jako induktor CYP podrodiny 1A a 7-methoxyresorufin je „markerovým“ substrátem CYP1A2^(36, 37).

Nejprve byla sestrojena kalibrační křivka. Jako standard byl použit resorufin, který je produktem demethylace 7-methoxyresorufinu. Z kalibrační křivky bylo dále vypočítáno množství resorufinu (pmol) vytvořeného ve vzorcích.

Poté byly připraveny inkubační směsi v quadrupletech o následujícím složení:

- 0,05 μ M CYP jaterní mikrosomální frakce (tabulka 1, str. 50)
- 2,2 μ M 7-methoxyresorufin (0,2 mM zásobní roztok rozpuštěný v DMSO)
- 50 nM nebo 100 nM TSA (5 μ M nebo 10 μ M zásobní roztok v DMSO)
- 0,5 mM NADPH (zásobní roztok 5 mM v destilované vodě)
- fosfátový pufr (0,1 M KH_2PO_4 , pH 7,4)

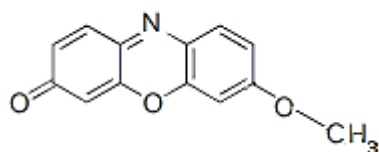
Jednotlivé složky byly přidávány v takovém množství, aby jejich koncentrace v inkubační směsi odpovídala výše uvedeným hodnotám.

Aby mohl být vyloučen vliv doby inkubace TSA s mikrosomálním systémem před přidáním 7-methoxyresorufinu a NADPH, byla směs TSA s mikrosomy inkubována při laboratorní teplotě 5 min při prvním měření a při druhém 10 min. Ze získaných výsledků bylo patrné, že tento vliv lze vyloučit.

Inkubační směs připravená do 2 ml mikrozkumavek Eppendorf tak, aby obsahovala všechny složky kromě 7-methoxyresorufinu a NADPH, byla po přidání 7-methoxyresorufinu inkubována 2 min za laboratorní teploty. Do jedné jamky bylo vždy odebráno 150 μ l inkubační směsi. Z jedné mikrozkumavky Eppendorf bylo vždy odebráno 3 x 150 μ l směsi do tří jamek mikrotitrační destičky. Ve dvou jamkách byla startována reakce přidáním 17 μ l NADPH, zatímco ke směsi ve třetí jamce, která sloužila jako „blank“, bylo přidáno stejné množství pufru. Množství vznikajícího resorufinu bylo stanoveno fluorimetricky (kapitola 3.3.5.1).

3.3.5.1 Fluorimetrické stanovení množství resorufinu

Fluorimetrie je metoda založená na měření fluorescenčního světla, jež vysílá látka, která je schopná fluorescence. Jelikož platí úměrnost mezi intenzitou fluorescenčního světla a koncentrací látky, která je schopná fluorescence, lze touto citlivou metodou stanovit množství vznikajícího silně fluorescenčního resorufinu. Resorufin vzniká demethylací 7-methoxyresorufinu, který je „markerovým“ substrátem CYP1A2 ⁽³⁷⁾. Struktura 7-methoxyresorufinu je znázorněna na obrázku 18.



Obrázek 18
Struktura 7-methoxyresorufinu.

V experimentech byla změřena fluorescence (Luminescence Spectrometer Perkin Elmer LS-55) vzniklého resorufinu v připravených inkubačních směsích a jejich

příslušných „blanků“. Inkubační směsi byly měřeny v quadrupletech vždy v 10 cyklech. Měření jednoho cyklu bylo nastaveno na dobu 100 s. Z výsledných hodnot bylo pro každou inkubační směs vypočítáno látkové množství (v jednotkách pmol) vznikajícího resorufinu za min na 1 pmol CYP jaterní mikrosomální frakce.

3.3.6 Expres CYP1A1, CYP3A4 a laktoperoxidasy v neuroblastomových buněčných liniích

V další části diplomové práce byla studována exprese enzymů oxidujících ellipticin a jejich ovlivnění TSA v neuroblastomových buněčných liniích metodou Western blotting. Western blotting je metoda, která umožňuje detekovat určitý protein ve směsi proteinů za využití specifických protilátek. Následuje po gelové elektroforese, během které je vzorek proteinů rozdělen na polyakrylamidovém gelu, který je dále přiložen na membránu v blotovacím zařízení. Působením elektrického proudu dojde k přenesení proteinů z gelu na membránu, která je na sebe naváže. Poté se membrána podrobí inkubaci se sérií dvou protilátek, z nichž první/primární se váže s vysokou specifitou na daný protein. Druhá/sekundární protilátka bývá značena enzymem. Vizualizace je založena na barevné reakci nebo chemiluminiscenci.

Buněčné kultury, které byly pěstovány RNDr. Jitkou Poljakovou, Ph.D. (Oddělení dětské hematologie, laboratoř Prof. Eckschlagera 2.LF UK), byly homogenizovány v pufru (25 mM Tris-HCl, pH 7,6, 150 mM NaCl, 1 % NP-40, 1 % deoxycholát sodný, 0,1 % SDS), který dále obsahoval „protease inhibitor cocktail tablet“ (Roche, Švýcarsko). Homogenát byl centrifugován po dobu 20 min při 14000 g. V odebraném supernatantu byla stanovena koncentrace proteinů Lowryho metodou ⁽⁹⁶⁾. Jako standard byl použit hovězí sérový albumin.

U buněk UKF-NB-3 a UKF-NB-4 byla studována exprese CYP1A1, CYP3A4 a laktoperoxidasy. Tyto proteiny byly (vzorky obsahovaly 10-45 g proteinů) rozděleny pomocí SDS-PAGE na 11 % polyakrylamidovém gelu a přeneseny na nitrocelulosovou membránu. Membrána byla dále blokována v 5 % odtučněném mléce a dále inkubována při teplotě 4 °C s příslušnou primární protilátkou přes noc.

Pro imunodetekci byly použity specifické králičí protilátky proti: CYP1A1 (1:1000, Millipore, MA, USA), CYP3A4 (1:5000, AbD Serotec, Oxford, UK) a LPO (2 µg/ml, AbCam, MA, USA). Po inkubaci s primárními protilátkami byla membrána promyta a

vložena do roztoku sekundární protilátky konjugované s křenovou peroxidasou (1:3000, Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Komplex antigenu s protilátkou byl vizualizován pomocí chemiluminiscenčního kitu (Immun-Star HRP Substrate, Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Expozice byly provedeny na rentgenové filmy (MEDIX XBU, Foma, ČR). Glycerinaldehyd-3-fosfát dehydrogenasa (GADPH) a protilátka proti tomuto proteinu (1:750, Millipore, MA, USA) byly použity jako pozitivní kontroly.

3.3.6.1 Vliv TSA na expresi CYP1A1, CYP3A4 a laktoperoxidasy v neuroblastomových buněčných liniích

Vliv TSA na expresi enzymů oxidujících ellipticin v neuroblastomových buněčných liniích UKF-NB-3 a UKF-NB-4 byl studován metodou Western blotting (princip uveden v kapitole 3.3.6).

Buňky UKF-NB-3 a UKF-NB-4, zpracované RNDr. Jitkou Poljakovou, Ph.D., byly premedikovány s TSA (roztok v DMSO) o koncentraci 100 nM a 200 nM 24 hodin před přidáním ellipticinu a dále inkubovány s ellipticinem. Dále byl sledován vliv TSA v kombinaci s ellipticinem na expresi studovaných enzymů.

3.3.7 Statistická analýza a zpracování dat

Výsledky měření byly vyhodnoceny statistickou výpočetní metodou Studentův t-test, kterým byla určena statistická významnost experimentálních dat. Symbol * poukazuje na výsledek prokázaný na hladině statistické významnosti $p < 0,1$; symbol ** označuje statistickou významnost na hladině $p < 0,05$ a symbol *** na hladině $p < 0,01$.

4 Výsledky

4.1 Oxidace elliptycinu jaterními mikrosomálními systémy potkanů

Předkládaná diplomová práce se zabývá studiem modulací enzymů metabolisujících ellipticin. Pro experimenty byly proto vybrány mikrosomální systémy, u nichž jsou indukovány podrodiny CYP klíčové právě pro metabolismus elliptycinu. Konkrétně se jedná se o CYP podrodiny 1A a 3A (mikrosomální systém potkanů premedikovaných Sudanem I nebo PCN) ^(36, 39). Nejprve byla sledována oxidace elliptycinu systémem, u kterého není indukován žádný z uvedených CYP (mikrosomální systém nepremedikovaných potkanů), a poté systémy s indukovanými CYP podrodiny 1A a dále 3A. Bylo sledováno, zda se projevil vliv „nabohacení“ mikrosomálního systému některých výše uvedených CYP.

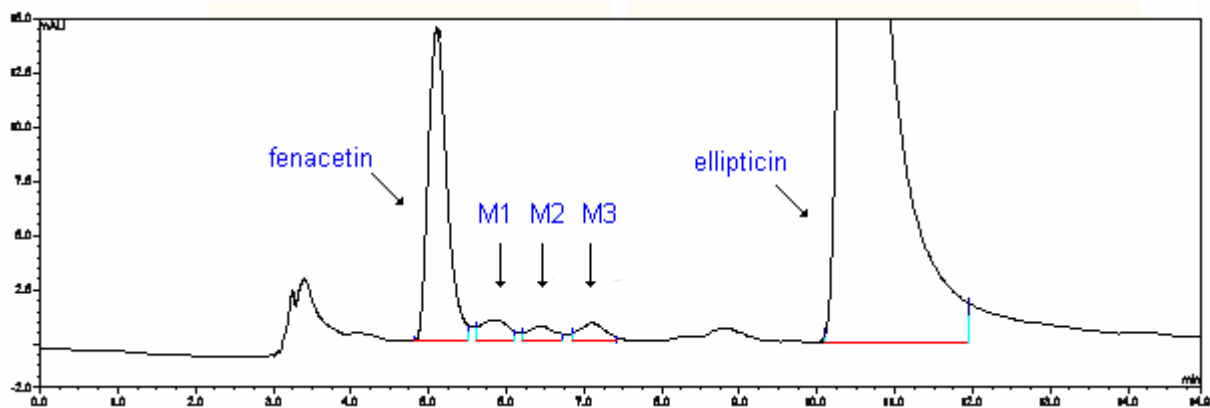
Zjistili jsme, že ellipticin je přeměňován všemi typy použitých mikrosomálních systémů. Účinnost oxidace elliptycinu jednotlivými mikrosomálními systémy se však výrazně liší. Vzniklé metabolity elliptycinu byly separovány metodou RP-HPLC (princip uveden v kapitole 3.3.1.1) a vyhodnoceny sledováním absorbance při vlnové délce 296 nm (obrázky 19, 20, 21, str. 61, 62). Z dřívějších prací naší laboratoře je známo, že ellipticin je oxidován cytochromy P450 až na pět metabolitů ^(22, 24, 26). Ty byly identifikovány jako:

- M1 - 9-hydroxyellipticin
- M2 - 12-hydroxyellipticin
- M3 - 13-hydroxyellipticin
- M4 - 7-hydroxyellipticin
- M5 - *N*²-oxid elliptycinu ^(22, 24, 26)

4.1.1 Porovnání efektivity oxidace elliptycinu použitými jaterními mikrosomálními systémy potkanů

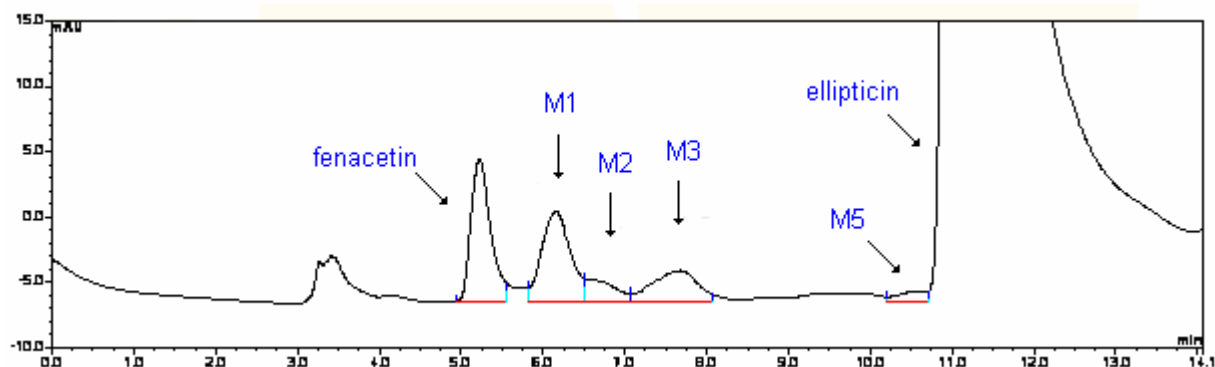
Použité mikrosomální systémy oxidují ellipticin na tři až čtyři metabolity. Vznik 9-hydroxyelliptycinu (M1), 12- (M2) a 13- hydroxyelliptycinu (M3) byl pozorován při oxidaci elliptycinu všemi použitými mikrosomálními systémy. 7-hydroxyellipticin (M4)

jako produkt oxidace ellipticinu nebyl detekován v žádném z použitých mikrosomálních systémů. Vznik N^2 -oxidu ellipticinu (M5) byl pozorován při oxidaci ellipticinu systémy, u kterých byly indukovány CYP podrodiny 1A a 3A (mikrosomální systém premedikovaný Sudanem I a PCN).



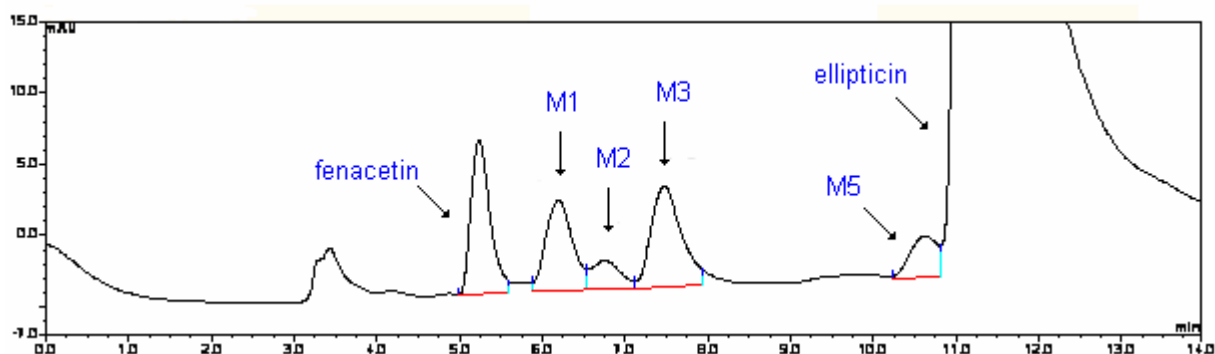
Obrázek 19

RP-HPLC metabolitů ellipticinu vznikajících jeho oxidací jaterním mikrosomálním systémem kontrolních (nepremedikovaných) potkanů. Detekce při vlnové délce 296 nm. Fenacetin byl použit jako vnitřní standard.



Obrázek 20

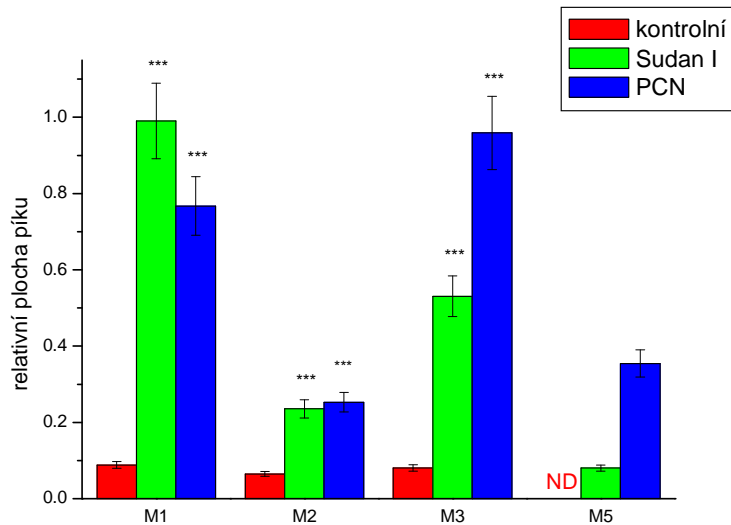
RP-HPLC metabolitů ellipticinu vznikajících jeho oxidací jaterním mikrosomálním systémem potkanů premedikovaných Sudanem I. Detekce při vlnové délce 296 nm. Fenacetin byl použit jako vnitřní standard.



Obrázek 21

RP-HPLC metabolitů ellipticinu vznikajících jeho oxidací jaterním mikrosomálním systémem potkanů premedikovaných pregnenolon-16 α -karbonitrilem. Detekce při vlnové délce 296 nm. Fenacetin byl použit jako vnitřní standard.

Jaterní mikrosomální systém potkanů premedikovaných Sudanem I a potkanů premedikovaných PCN přeměňovaly ellipticin podstatně efektivněji než jaterní mikrosomální systém kontrolních (nepremedikovaných) potkanů (obrázek 22, str. 63). Jaterní mikrosomální systém potkanů premedikovaných Sudanem I, který je induktorem CYP podrodiny 1A, výrazně stimuloval vznik 9-hydroxyellipticinu (M1), zatímco mikrosomální systém potkanů premedikovaných PCN, který je induktorem CYP podrodiny 3A, potencoval vznik 13-hydroxyellipticinu (M3) a N^2 -oxidu ellipticinu (M5). N^2 -oxid ellipticinu (M5) není tvořen mikrosomálním systémem kontrolních potkanů. Tento výsledek je v souladu s daty zjištěnými v dřívějších pracích z naší laboratoře ^(24, 26).



Obrázek 22

Porovnání oxidací ellipticinu (tvorby jednotlivých metabolitů) jaterními mikrosomálními systémy.

Kontrolníjaterní mikrosomální systém kontrolních (nepremedikovaných) potkanů

Sudan I.....jaterní mikrosomální systém potkanů premedikovaných Sudanem I

PCN.....jaterní mikrosomální systém potkanů premedikovaných pregnenolon-16 α -karbonitrilem

ND.....nedetekováno (not determined)

Složení inkubační směsi: 10 μ M ellipticin; 0,2 μ M CYP; 10 mM MgCl₂; 10 mM glukosa-6-fosfát; 1 mM NADP⁺; 1 U/ml glukosa-6-fosfát dehydrogenasa (NADPH-GS); 0,1 M KH₂PO₄ pufr pH 7,4.

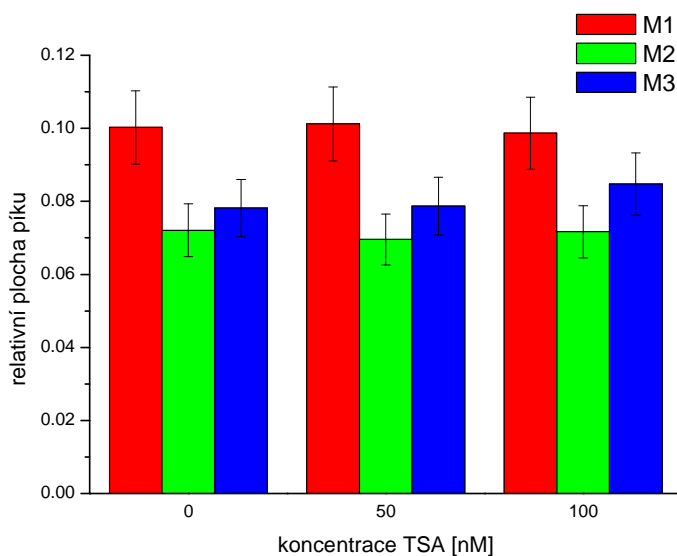
*Hodnoty jsou průměrem tří nezávislých měření, ***p<0,01. Studentův t-test.*

4.2 Vliv TSA na oxidaci ellipticinu jaterními mikrosomálními systémy potkanů

Ke studiu vlivu TSA na oxidaci ellipticinu byly použity stejné jaterní mikrosomální systémy, které jsou uvedeny v kapitole 4.1.

4.2.1 Vliv TSA na oxidaci ellipticinu jaterním mikrosomálním systémem kontrolních (nepremedikovaných) potkanů

Ellipticin je působením jaterního mikrosomálního systému kontrolních (nepremedikovaných) potkanů oxidován na tři metabolity: 9-hydroxyellipticin (M1), 12-hydroxyellipticin (M2) a 13-hydroxyellipticin (M3) (obrázek 19, str. 61). Množství těchto tvořených metabolitů ellipticinu se v přítomnosti TSA nezměnilo, a to žádnou z jeho použitých koncentrací (50 nM a 100 nM) (obrázek 23). Z výsledků vyplývá, že TSA tedy nemá žádný vliv na oxidaci ellipticinu uvedeným mikrosomálním systémem.



Obrázek 23

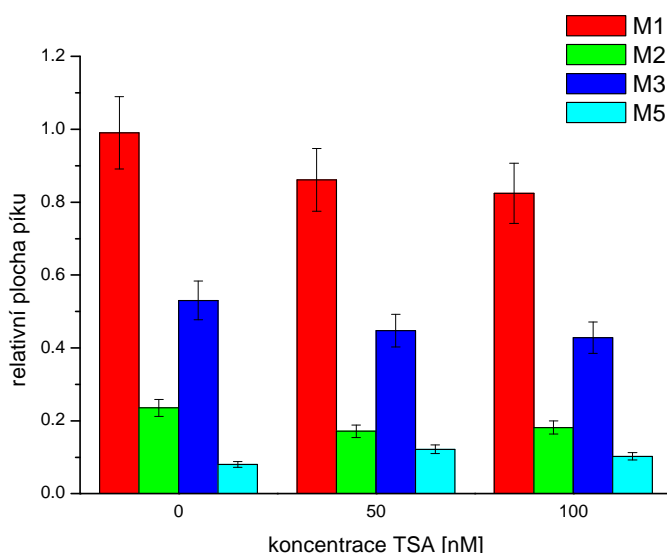
Vliv TSA na oxidaci ellipticinu jaterním mikrosomálním systémem kontrolních (nepremedikovaných) potkanů.

Složení inkubační směsi: 10 μ M ellipticin; 0,2 μ M CYP; 50 nM nebo 100 nM TSA; 10 mM $MgCl_2$; 10 mM glukosa-6-fosfát; 1 mM $NADP^+$; 1 U/ml glukosa-6-fosfát dehydrogenasa (NADPH-GS); 0,1 M KH_2PO_4 pufr pH 7,4.

Hodnoty jsou průměrem tří nezávislých měření.

4.2.2 Vliv TSA na oxidaci ellipticinu jaterním mikrosomálním systémem potkanů premedikovaných Sudanem I

V dalších experimentech byl studován vliv TSA na oxidaci ellipticinu cytochromy P450 podrodiny 1A, tedy enzymů, které se významně podílí na metabolismu ellipticinu, především na jeho přeměně na detoxikační metabolity, 9-hydroxyellipticin a 7-hydroxyellipticin⁽²⁴⁾. Pro tento experiment byl vybrán jaterní mikrosomální systém potkanů premedikovaných Sudanem I, neboť Sudan I je silným induktorem této podrodiny CYP⁽³⁶⁾. Ellipticin je tímto mikrosomálním systémem přeměňován na čtyři metabolity (obrázek 20, str. 61). Koncentrace TSA v inkubační směsi byly 50 nM a 100 nM. Z výsledků experimentů (obrázek 24) je patrné, že kromě N^2 -oxidu ellipticinu (M5) se množství všech detekovaných metabolitů ellipticinu v přítomnosti TSA snížilo. Tento pokles však nebyl prokázán jako statisticky signifikantní (Studentův t-test).



Obrázek 24

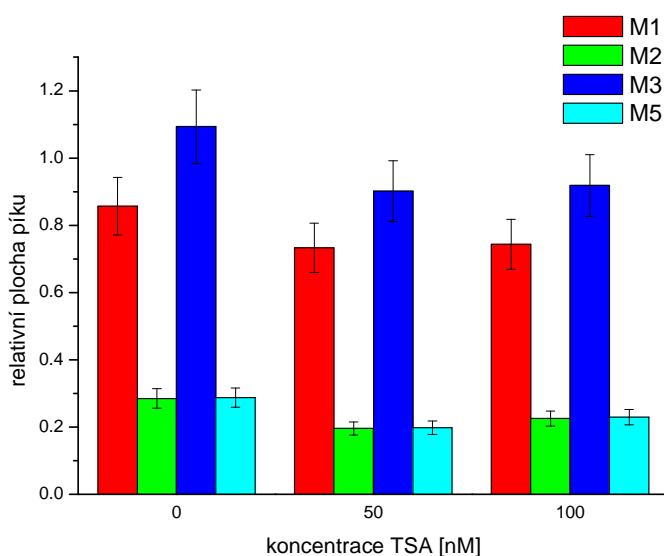
Vliv TSA na oxidaci ellipticinu jaterním mikrosomálním systémem potkanů premedikovaných Sudanem I.

Složení inkubační směsi: 10 μ M ellipticin; 0,2 μ M CYP; 50 nM nebo 100 nM TSA; 10 mM $MgCl_2$; 10 mM glukosa-6-fosfát; 1 mM $NADP^+$; 1 U/ml glukosa-6-fosfát dehydrogenasa (NADPH-GS); 0,1 M KH_2PO_4 pufr pH 7,4.

Hodnoty jsou průměrem tří nezávislých měření.

4.2.3 Vliv TSA na oxidaci ellipticinu jaterním mikrosomálním systémem potkanů premedikovaných pregnenolon-16 α -karbonitrilem

Jak již bylo uvedeno výše, kromě cytochromů P450 podrodiny 1A jsou do metabolismu ellipticinu významně zapojeny cytochromy P450 podrodiny 3A. Tyto cytochromy P450 oxidují ellipticin především na jeho aktivační metabolity 13-hydroxyellipticin a N^2 -oxid ellipticinu (ev. 12-hydroxyellipticin), které tvoří adukty s DNA (23, 24, 26). Jako induktor této podrodiny je znám pregnenolon-16 α -karbonitril (PCN) (39). Ke studiu vlivu TSA na oxidaci ellipticinu CYP podrodiny 3A byl proto použit jaterní mikrosomální systémem potkanů premedikovaných právě tímto induktorem.



Obrázek 25

Vliv TSA na oxidaci ellipticinu jaterním mikrosomálním systémem potkanů premedikovaných pregnenolon-16 α -karbonitrilem.

Složení inkubační směsi: 10 μ M ellipticin; 0,2 μ M CYP; 0,50 nM nebo 100 nM TSA; 10 mM $MgCl_2$; 10 mM glukosa-6-fosfát; 1 mM $NADP^+$; 1 U/ml glukosa-6-fosfát dehydrogenasa (NADPH-GS); 0,1 M KH_2PO_4 pufr pH 7,4.

Hodnoty jsou průměrem tří nezávislých měření.

Uvedený mikrosomální systém oxiduje ellipticin na čtyři metabolity (obrázek 21, str. 62). Z výsledků experimentů (obrázek 25) vyplývá, že množství jednotlivých

metabolitů ellipticinu se v přítomnosti TSA snížilo (50 a 100 nM). Tento pokles však nebyl prokázán jako statisticky významný (Studentův t-test).

Ze získaných výsledků je patrné, že oxidace ellipticinu cytochromy P450 1A a 3A přítomných v jaterních mikrosomálních systémech není TSA ovlivněna.

4.3 Vliv TSA na aktivity cytochromů P450 1A a 3A měřených se specifickými „markerovými“ substráty

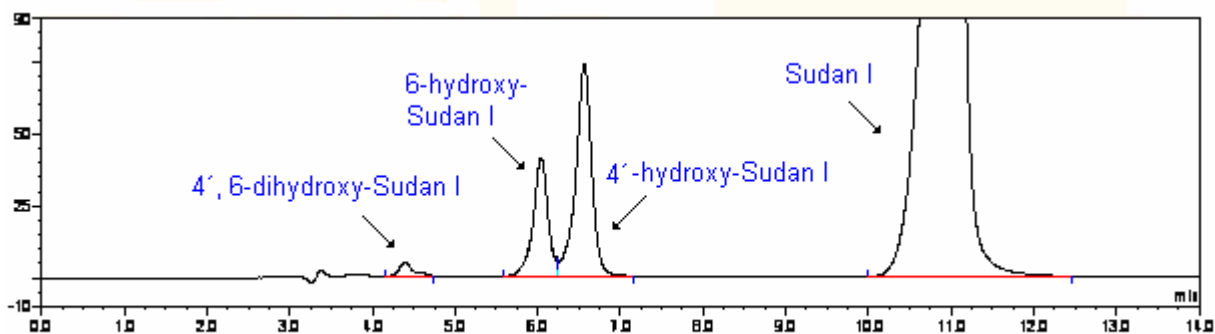
Vedle sledování vlivu TSA na aktivity CYP1A a 3A v oxidaci ellipticinu byl v dalších experimentech sledován i jeho vliv na oxidaci „markerových“ substrátů těchto enzymů. „Markerové“ substráty jsou substráty, které jsou určitým CYP oxidovány preferenčně⁽³⁾.

4.3.1 Vliv TSA na oxidaci Sudanu I katalyzovanou CYP1A1

Pro studium vlivu TSA na aktivitu CYP1A1 byl použit jaterní mikrosomální systém „nabohacený“ tímto CYP, jmenovitě jaterní mikrosomální systém potkanů premedikovaných Sudanem I. Sudan I je totiž silným induktorem CYP podrodiny 1A, a je také „markerovým“ substrátem jednoho z enzymů této podrodiny, konkrétně CYP1A1⁽³⁶⁾.

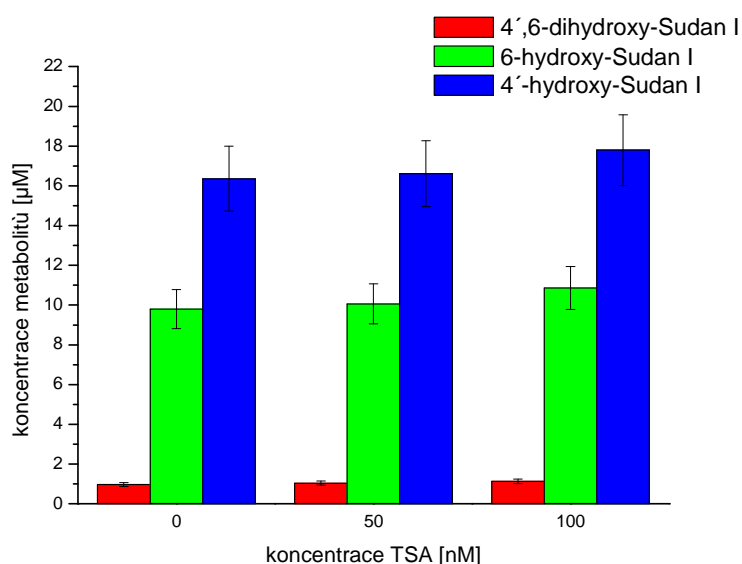
Koncentrace TSA v inkubačních směsích byla 50 nM a 100 nM. Metabolity Sudanu I byly separovány pomocí RP-HPLC (princip uveden v kapitole 3.3.1.1). Sudan I je uvedeným mikrosomálním systémem oxidován na tři metabolity, 6-hydroxy-Sudan I, 4'-hydroxy-Sudan I a na minoritní metabolit 4', 6-dihydroxy-Sudan I (obrázek 26, str. 68).

Množství jednotlivých metabolitů Sudanu I se v přítomnosti TSA, a to ani u jedné z použitých koncentrací, nezměnilo (obrázek 27, str.68). TSA tedy nemá vliv na aktivitu CYP1A1 měřenou oxidací jeho „markerového“ substrátu, Sudanu I.



Obrázek 26

RP-HPLC metabolitů Sudanu I vznikajících jeho oxidací jaterním mikrosomálním systémem potkanů premedikovaných Sudanem I. Detekce při vlnové délce 480 nm.



Obrázek 27

Vliv TSA na oxidaci Sudanu I jaterním mikrosomálním systémem potkanů premedikovaných Sudanem I.

Složení inkubační směsi: 5 mM Sudan I; 0,2 μM CYP; 0, 50 nebo 100 nM TSA; 1 mM NADPH; 0,1 M KH₂PO₄ pufr pH 7,4.

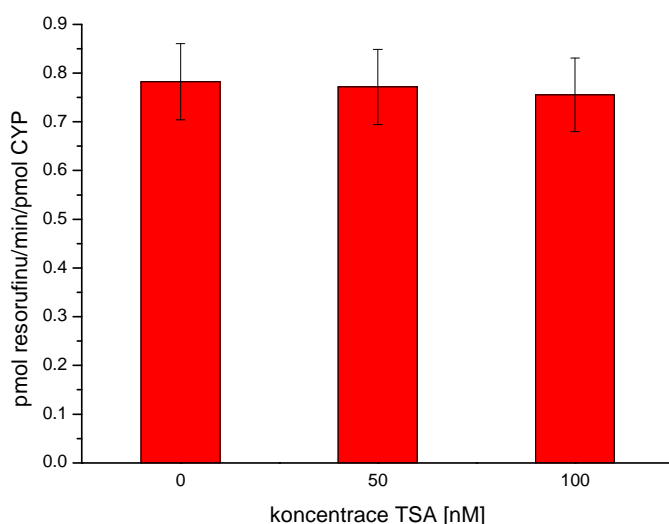
Hodnoty jsou průměrem tří nezávislých měření.

4.3.2 Vliv TSA na O-demethylaci 7-methoxyresorufinu katalyzovanou CYP1A2

Při studiu vlivu TSA na aktivitu CYP1A2 bylo sledováno ovlivnění O-demethylace 7-methoxyresorufinu („markerová“ aktivita CYP1A2) ⁽³⁷⁾. Jako oxidační systém byl opět použit jaterní mikrosomální systém potkanů premedikovaných Sudanem I. Jak již bylo zmíněno v kapitole 4.3.1, Sudan I je silný induktor CYP1A1 a 1A2 ⁽³⁶⁾.

7-methoxyresorufin byl enzymy použitého mikrosomálního systému demetylován na resorufin, jehož množství bylo stanoveno fluorimetricky.

Výsledky experimentu jsou uvedeny na obrázku 28. TSA nemá za použitých koncentrací na přeměnu 7-methoxyresorufinu žádný vliv. TSA tedy neovlivňuje aktivitu CYP1A2 měřenou s „markerovým“ substrátem, 7-methoxyresorufinem.



Obrázek 28

Vliv TSA na demethylaci 7-methoxyresorufinu katalyzovanou jaterním mikrosomálním systémem potkanů premedikovaných Sudanem I.

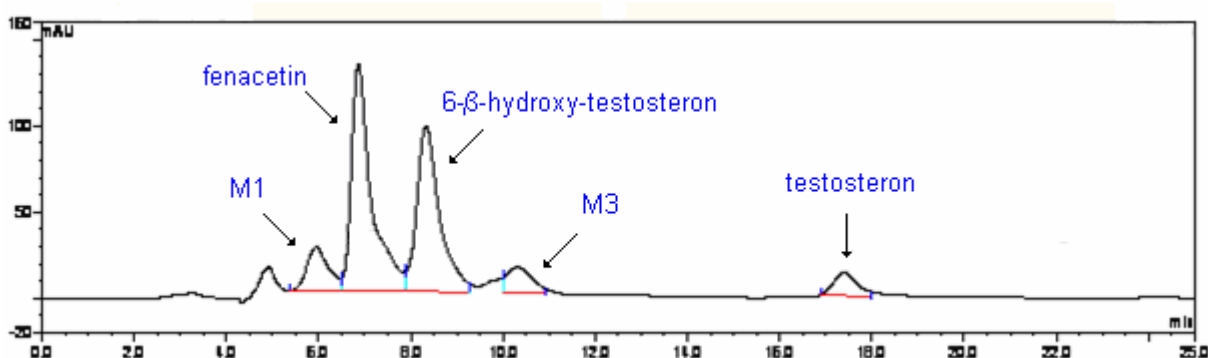
Složení inkubační směsi: 2,2 mM 7-methoxyresorufin; 0,05 μM CYP; 0, 50 nebo 100 nM TSA; 0,05 mM NADPH; 0,1 M KH₂PO₄ pufr pH 7,4.

Hodnoty jsou průměrem tří nezávislých měření.

4.3.3 Vliv TSA na 6- β -hydroxylaci testosteronu katalyzovanou CYP podrodiny 3A za použití jaterního mikrosomálního systému potkanů premedikovaných PCN

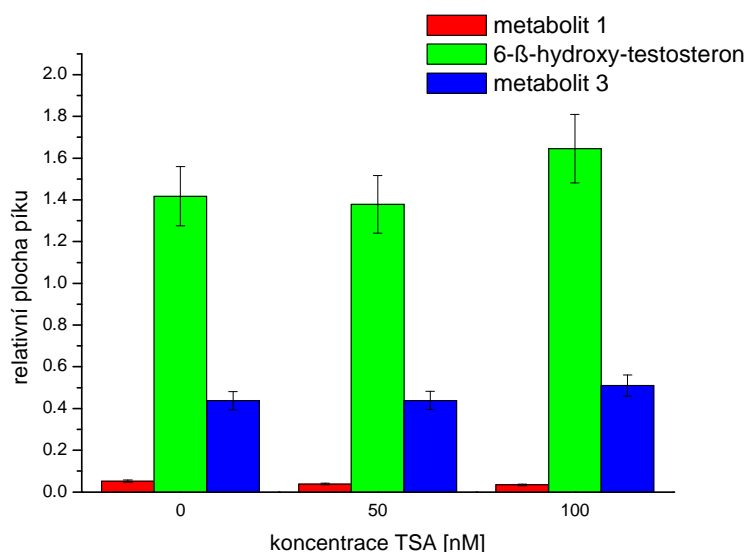
Pro studium vlivu TSA na aktivitu CYP podrodiny 3A byl jako „markerový“ substrát použit testosteron respektive jeho „markerová“ reakce, hydroxylace tohoto substrátu na 6- β -hydroxylovaný derivát⁽³⁸⁾. Tato aktivita byla sledována v mikrosomech „nabohacených“ CYP3A induktorem CYP podrodiny 3A, pregnenolon-16 α -karbonitrilem (PCN)⁽³⁹⁾. Metabolity testosteronu byly separovány metodou RP-HPLC (princip uveden v kapitole 3.3.1.1).

V chromatogramu extraktu inkubační směsi byla identifikována tvorba majoritního metabolitu testosteronu, 6- β -hydroxy-testosteronu, a dalších dvou minoritních metabolitů (obrázek 29). Jejich struktura nebyla dosud identifikována. Z výsledků experimentu uvedených na obrázku 30 (str. 71) je patrné, že TSA nemá vliv na oxidaci testosteronu na 6- β -hydroxy-testosteron tímto mikrosomálním systémem. Vzhledem ke skutečnosti, že byl sledován vliv TSA na „markerovou“ reakci katalyzovanou mikrosomálním systémem, u kterého byly indukovány CYP podrodiny 3A, lze říci, že TSA nemá žádný vliv na aktivitu této podrodiny cytochromů P450.



Obrázek 29

RP-HPLC metabolitů testosteronu vznikajících jeho oxidací jaterním mikrosomálním systémem potkanů premedikovaných pregnenolon-16 α -karbonitrilem. Detekce při vlnové délce 254 nm. Kromě majoritního metabolitu 6- β -hydroxy-testosteronu byly detekovány další dva metabolity (1, 3). Fenacetin byl použit jako vnitřní standard.



Obrázek 30

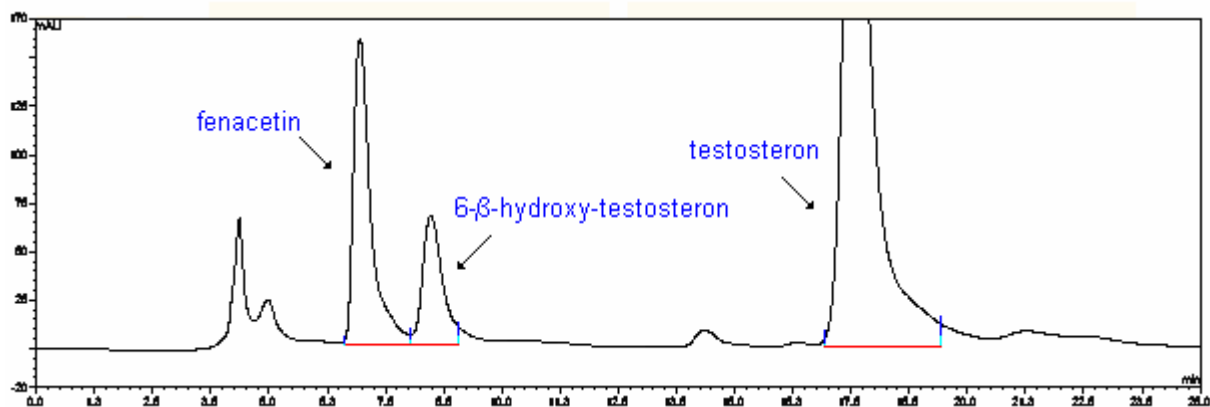
Vliv TSA na oxidaci testosteronu jaterním mikrosomálním systémem potkanů premedikovaných pregnenolon-16 α -karbonitrilem. Kromě majoritního metabolitu 6- β -hydroxy-testosteronu byly sledovány další dva minoritní metabolity. Jedná se o hydroxylované metabolity, jejichž přesnou strukturu nebylo možné z literatury určit, proto jsou podle pořadí v chromatogramu pracovně označeny metabolit 1 (M1) a metabolit 3 (M3).

Složení inkubační směsi: 0,05 mM testosteron; 0,4 mg/ml proteinů mikrosomální frakce; 0, 50 nebo 100 nM TSA; 10 mM MgCl₂; 10 mM glukosa-6-fosfát; 1 mM NADP⁺; 1 U/ml glukosa-6-fosfát dehydrogenasa (NADPH-GS); 0,1 M KH₂PO₄ pufr pH 7,4.

Hodnoty jsou průměrem tří nezávislých měření.

4.3.4 Vliv TSA na 6- β -hydroxylaci testosteronu katalyzovanou CYP podrodiny 3A za použití jaterního mikrosomálního systému kontrolních (nepremedikovaných) potkanů

Vzhledem k poměrně vysoké expresi CYP3A také v játrech potkanů kontrolních, nepremedikovaných žádným induktorem CYP, byla sledována 6- β -hydroxylace testosteronu i za použití těchto mikrosomů.

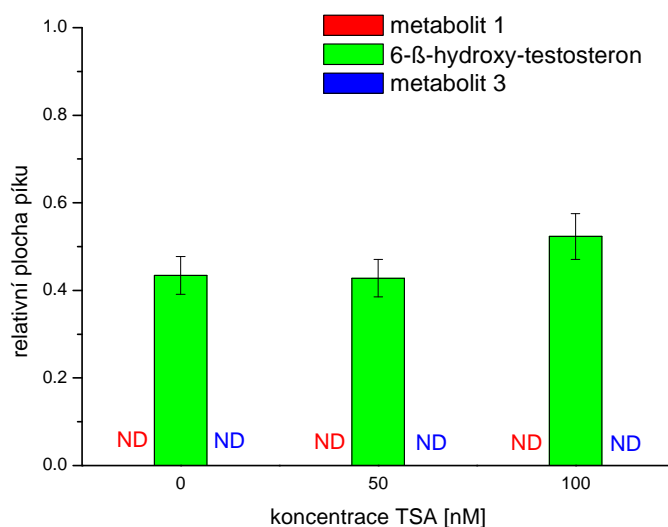


Obrázek 31

RP-HPLC metabolitů testosteronu vznikajících jeho oxidací jaterním mikrosomálním systémem kontrolních (nepremedikovaných) potkanů. Byl sledován majoritní metabolit 6-β-hydroxy-testosteron. Detekce při vlnové délce 254 nm. Fenacetin byl použit jako vnitřní standard.

Tento jaterní mikrosomální systém oxiduje testosteron pouze na 6-β-hydroxy-testosteron (obrázek 31).

Z výsledků uvedených na obrázku 32 (str. 73) je patrné, že TSA nemá ani na tvorbu 6-β-hydroxy-testosteronu katalyzovanou enzymy jaterního mikrosomálního systému kontrolních (nepremedikovaných) potkanů žádný vliv. Toto zjištění tedy potvrzuje výsledek získaný při použití jaterního mikrosomálního systému potkanů premedikovaných PCN.



Obrázek 32

Vliv TSA na oxidaci testosteronu jaterním mikrosomálním systémem kontrolních (nepremedikovaných) potkanů. Byl sledován majoritní metabolit 6-β-hydroxy-testosteron. Další hydroxylované metabolity, které při oxidaci testosteronu podrodinou CYP3A vznikají, nebylo možné v chromatogramu inkubační směsi detekovat. Jelikož byly detekovány za jaterního mikrosomálního systému potkanů premedikovaných PCN (obrázek 29, str. 70), jsou podle pořadí v chromatogramu pracovně označeny „metabolit 1“ a „metabolit 3“.

ND.....nedetkováno (not determined)

Složení inkubační směsi: 0,05 mM testosteron; 0,4 mg/ml proteinů mikrosomální frakce; 0, 50 nebo 100 nM TSA; 10 mM MgCl₂; 10 mM glukosa-6-fosfát; 1 mM NADP⁺; 1 U/ml glukosa-6-fosfát dehydrogenasa (NADPH-GS); 0,1 M KH₂PO₄ pufr pH 7,4.

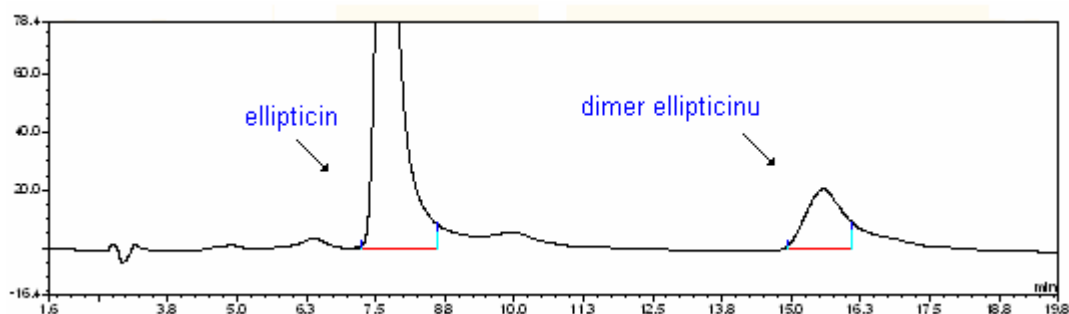
Hodnoty jsou průměrem tří nezávislých měření.

4.4 Oxidace ellipticinu peroxidasami

4.4.1 Vliv TSA na oxidaci ellipticinu laktoperoxidasou

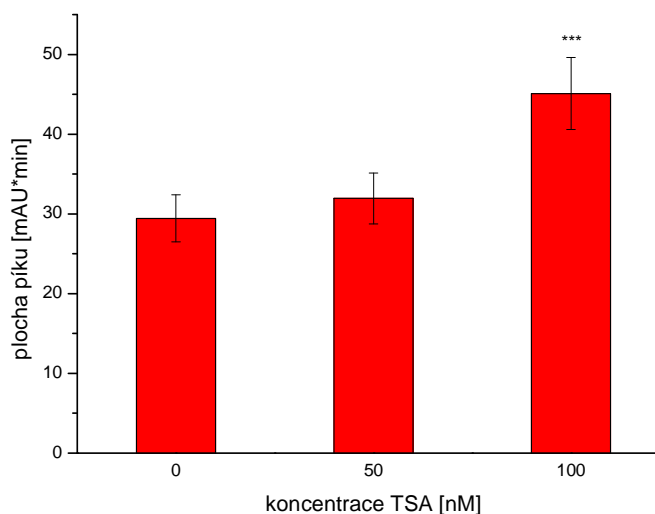
Pro studium vlivu TSA na oxidaci ellipticinu peroxidasami byla použita laktoperoxidasa, neboť je bohatě zastoupena v cílovém orgánu působení ellipticinu (nádoru prsu) ⁽²⁷⁾. Ellipticin je touto peroxidasou oxidován na jeden metabolit, dimer ellipticinu (obrázek 33, str. 74).

Výsledky experimentů sledujících vliv TSA na oxidaci ellipticinu laktoperoxidase jsou uvedeny na obrázku 34. Množství metabolitu, dimeru ellipticinu, působením TSA vzrostlo, a to 1,8 krát. Trichostatin A má tedy na oxidaci ellipticinu laktoperoxidase stimulační vliv.



Obrázek 33

RP-HPLC metabolitů ellipticinu vznikajících jeho oxidací hovězí laktoperoxidase. Detekce při vlnové délce 296 nm. Tvořeným metabolitem je dimer ellipticinu.



Obrázek 34

Vliv TSA na oxidaci ellipticinu hovězí laktoperoxidase.

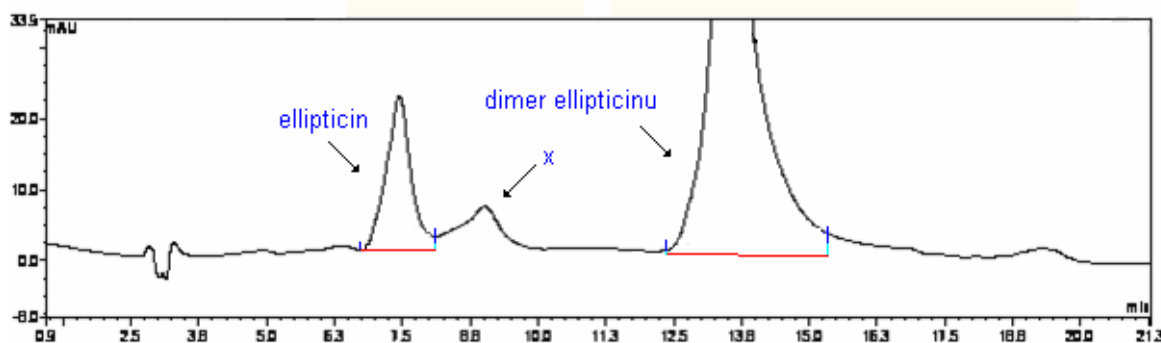
Složení inkubační směsi: 10 μ M ellipticin; 10 μ g/ml laktoperoxidasa; 0,50 nebo 100 nM TSA; 100 μ M H_2O_2 ; 0,1 M KH_2PO_4 pufr pH 7,4.

*Hodnoty jsou průměrem tří nezávislých měření, *** $p < 0,01$. Studentův t-test.*

4.4.2 Vliv TSA na oxidaci ellipticinu křenovou peroxidasou

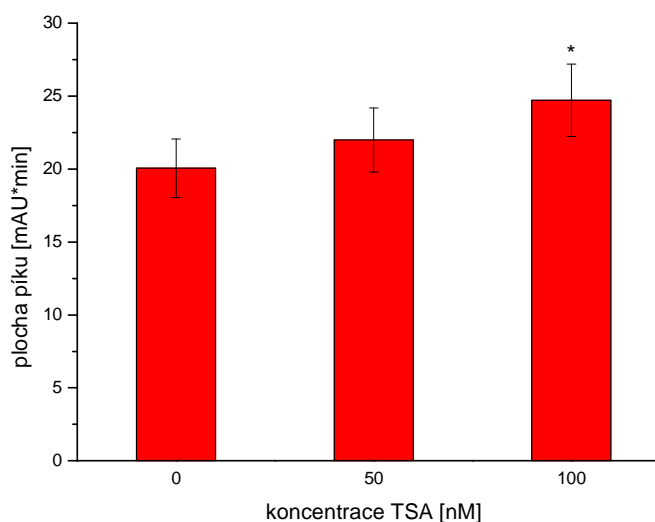
Kromě laktoperoxidasy byl ke studiu vlivu TSA na oxidaci ellipticinu peroxidasami použit jako další modelový enzym peroxidasa křenu selského. Experimenty provedenými v naší laboratoři bylo již dříve zjištěno, že ellipticin je křenovou peroxidasou velice efektivně přeměňován^(27, 42). Stejně jako v případě laktoperoxidasy je ellipticin oxidován na jeho dimer (obrázek 35). „Pík“ x detekovaný v chromatogramech (obrázek 35) není produktem oxidace ellipticinu, neboť je přítomen i v kontrolních inkubačních směsích bez ellipticinu.

Z výsledků uvedených na obrázku 36 (str. 76) je patrné, že TSA má na oxidaci ellipticinu křenovou peroxidasou stimulační vliv; množství dimeru vzrostlo 1,2 krát.



Obrázek 35

RP-HPLC metabolitů ellipticinu vznikajících jeho oxidací křenovou peroxidasou. Detekce při vlnové délce 296 nm. Tvořeným metabolitem je dimer ellipticinu.



Obrázek 36

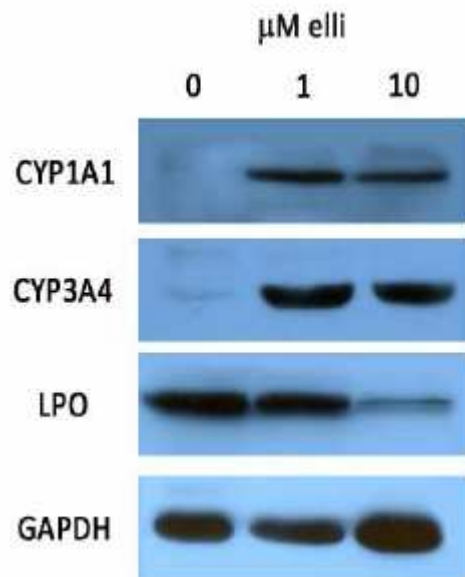
Vliv TSA na oxidaci ellipticinu křenovou peroxidasou.

Složení inkubační směsi: 10 μ M ellipticin; 1,25 μ g/ml křenová peroxidasa; 0,50 nebo 100 nM TSA; 100 μ M H_2O_2 ; 0,1 M KH_2PO_4 pufr pH 7,4.

*Hodnoty jsou průměrem tří nezávislých měření, * $p < 0,1$. Studentův t-test.*

4.5 Expresa CYP1A1, CYP3A4 a laktoperoxidasy v neuroblastomových buněčných liniích

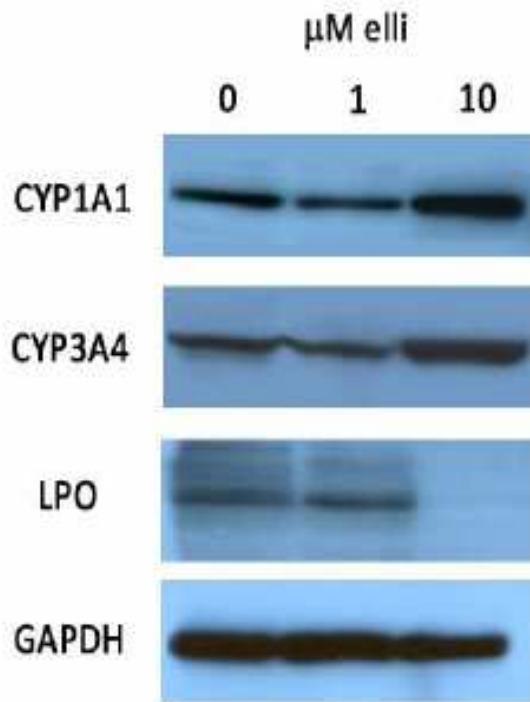
V další části diplomové práce bylo sledováno, zda je exprese enzymů, které jsou důležité pro metabolickou aktivaci i detoxikaci ellipticinu, a jejichž ovlivnění (jejich aktivity) působením TSA bylo studováno předchozích částech práce (kapitola 4.2, 4.3, 4.4), ovlivněna studovaným inhibitorem HDACs (TSA). Ovlivnění jejich exprese bylo sledováno za použití buněčných nádorových linií neuroblastomů, které jsou citlivé jak vůči ellipticinu⁽²¹⁾, tak i TSA⁽¹⁰⁴⁾. Pomocí metody Western blotting (princip uveden v kapitole 3.3.6) byla v neuroblastomových liniích UKF-NB-3 a UKF-NB-4 sledována exprese CYP1A1, CYP3A4 a laktoperoxidasy a jejich ovlivnění TSA.



Obrázek 37

Western blot CYP1A1, CYP3A4 a laktoperoxidasy (LPO) neuroblastomové buněčné linie UKF-NB-3. Zleva 0 – Buňky UKF-NB-3, které nebyly inkubované s ellipticinem, 1 – Buňky UKF-NB-3 inkubované s 1 μM ellipticinem, 10 – Buňky UKF-NB-3 inkubované s 10 μM ellipticinem. Glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenasa (GAPDH) byla použita jako pozitivní kontrola.

Výsledek experimentu sledující expresi CYP1A1, CYP3A4 a laktoperoxidasy v buňkách UKF-NB-3 je uveden na obrázku 37. Buňky UKF-NB-3, které nebyly vystaveny působení ellipticinu, exprimují všechny tři studované enzymy. V buňkách, které byly s ellipticinem inkubovány, je snížena exprese laktoperoxidasy, zejména pak v buňkách, které byly inkubovány s ellipticinem o vyšší koncentraci (10 μM). Naopak exprese CYP1A1 a CYP3A4 byla v buňkách UKF-NB-3 indukována. Ze získaných výsledků je patrné, že ellipticin působí jako inhibitor exprese laktoperoxidasy a induktor exprese CYP1A1 a 3A4 v těchto neuroblastomových buněčných liniích.



Obrázek 38

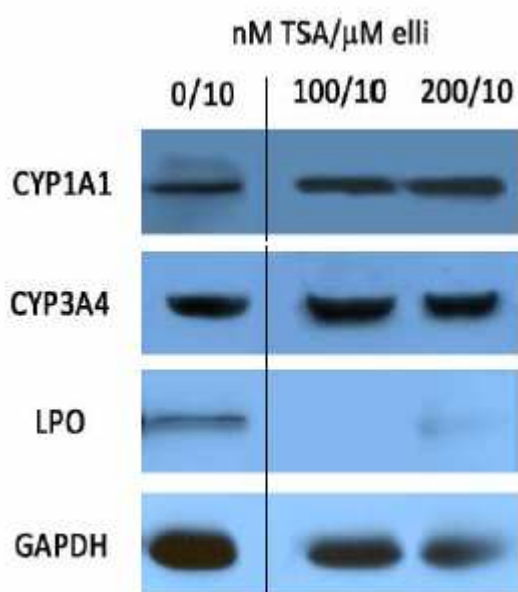
Western blot CYP1A1, CYP3A4 a laktoperoxidasy (LPO) neuroblastomové buněčné linie UKF-NB-4. Zleva 0 – Buňky UKF-NB-4, které nebyly inkubované s ellipticinem, 1 – Buňky UKF-NB-4 inkubované s 1 μM ellipticinem, 10 – Buňky UKF-NB-4 inkubované s 10 μM ellipticinem. Glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenasa (GAPDH) byla použita jako pozitivní kontrola.

Western blot ilustrující expresi CYP1A1, CYP3A4 a laktoperoxidasy v buňkách UKF-NB-4 je uveden na obrázku 38. Také buňky UKF-NB-4 exprimují všechny studované enzymy, které oxidují ellipticin. Obdobně jako v buňkách UKF-NB-3, exprese laktoperoxidasy je v buňkách UKF-NB-4, které byly inkubované s ellipticinem, snížena. V buňkách, které byly inkubovány s ellipticinem o vyšší koncentraci (10 μM), je exprese laktoperoxidasy dokonce potlačena úplně. Expresce CYP1A1 a CYP3A4 je v buňkách, které byly vystaveny působení ellipticinu, mírně zvýšena.

Vliv ellipticinu na expresi studovaných enzymů se v použitých neuroblastomových liniích tedy liší pouze v míře inhibice a indukce exprese enzymů. V buňkách UKF-NB-3 je indukce exprese CYP1A1 a CYP3A4 a inhibice exprese laktoperoxidasy výraznější než v buňkách UKF-NB-4.

4.5.1 Vliv TSA v kombinaci s ellipticinem na expresi CYP1A1, CYP3A4 a laktoperoxidasy v neuroblastomových buněčných liniích

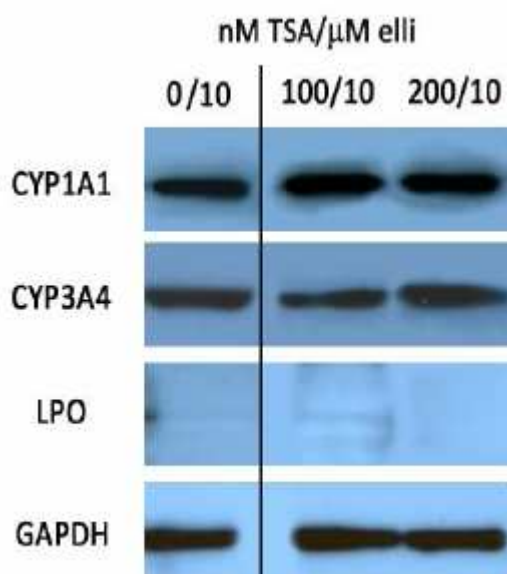
V diplomové práci byl již studován vliv TSA na aktivity enzymů schopných metabolisovat ellipticin. V další části práce byl dále studován vliv TSA za přítomnosti ellipticinu na expresi těchto enzymů. K tomuto experimentu byly využity stejné neuroblastomové buněčné linie UKF-NB-3 a UKF-NB-4 a exprese byla sledována pomocí metody Western blotting (princip uveden v kapitole 3.3.6). Buňky neuroblastomů byly premedikovány TSA o koncentraci 100 nM a 200 nM 24 hodin před přidáním ellipticinu.



Obrázek 39

Western blot CYP1A1, CYP3A4 a laktoperoxidasy (LPO) neuroblastomové buněčné linie UKF-NB-3. Buňky UKF-NB-3 byly inkubované s 10 μM ellipticinem a s TSA o koncentraci 100 nM a 200 nM. Glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenasa (GAPDH) byla použita jako pozitivní kontrola.

Výsledek experimentu sledující vliv TSA v kombinaci s ellipticinem na expresi CYP1A1, CYP3A4 a laktoperoxidasy v buňkách UKF-NB-4 je uveden na obrázku 39. TSA v obou použitých koncentracích slabě indukoval expresi CYP1A1 a CYP3A4. Exprese laktoperoxidasy byla TSA prakticky totálně potlačena.



Obrázek 40

Western blot CYP1A1, CYP3A4 a laktoperoxidasy (LPO) neuroblastomové buněčné linie UKF-NB-4. Buňky UKF-NB-4 byly inkubované s 10 μ M ellipticinem a s TSA o koncentraci 100 nM a 200 nM. Glycerinaldehyd-3-fosfát dehydrogenasa (GAPDH) byla použita jako pozitivní kontrola.

Z výsledků uvedených na obrázku 40 je patrné, že TSA v kombinaci s ellipticinem v buňkách UKF-NB-4 slabě stimuloval expresi CYP1A1 a 3A4. Stejný účinek byl pozorován i v buňkách UKF-NB-3. Jak již bylo zmíněno v kapitole 4.5, buňky inkubované s 10 μ M ellipticinem neexprimovaly laktoperoxidasu. Není tedy jasné, zda má samotný TSA na expresi tohoto enzymu inhibiční vliv.

TSA v kombinaci s ellipticinem tedy v obou použitých neuroblastomových buněčných liniích indukuje expresi CYP1A1 a CYP3A4 a dále inhibuje expresi laktoperoxidasy, která v přítomnosti TSA v kombinaci s ellipticinem nebyla detekována.

5 Diskuse

Ellipticin je protinádorové léčivo, jehož mechanismus účinku může vycházet z inhibice topoisomerasy II, jeho interkalace do DNA a především tvorby kovalentních aduktů s DNA. Vzhledem ke skutečnosti, že léčba nádorových onemocnění je v řadě případů založena na terapii kombinací různých léčiv, posílení protinádorového účinku ellipticinu působením dalších látek je intenzivně zkoumáno. Studium mechanismu působení jiných léčiv na metabolismus ellipticinu za účelem zvýšení jeho cytotoxicity vůči nádorovým onemocněním je též předmětem výzkumu laboratoře katedry biochemie Přírodovědecké fakulty UK, vedené Prof. RNDr. Marií Stiborovou, DrSc., kde byla také vypracována předkládaná diplomová práce.

Cílem diplomové práce bylo přispět k poznání mechanismu působení jednoho z inhibitorů histondeacetylas, trichostatinu A. Důvodem byly výsledky zjištěné v dřívějších pracích z naší laboratoře. Ty přinesly poznatky o tom, že inhibitory histondeacetylas, valproát a trichostatin A, stimulují cytotoxický účinek ellipticinu vůči neuroblastomům ⁽⁴¹⁾. Mechanismus tohoto působení však není znám.

Pro studium vlivu na protinádorové účinky ellipticinu byl vybrán jeden z těchto inhibitorů histondeacetylas, trichostatin A. Ten je schopný inhibovat deacetylaci histonových proteinů chromatinu a zvyšovat tak účinnost některých léčiv, konkrétně též ellipticinu, jak bylo zjištěno v naší laboratoři ⁽⁴¹⁾, ale i Kimem se spolupracovníky ⁽⁹⁹⁾.

Samotné inhibitory histondeacetylas jsou rovněž účinnými protinádorovými agens. Účinek inhibitorů histondeacetylas jako protinádorových agens lze vysvětlit tak, že jejich působením dochází k hyperacetylaci histonů a ke ztrátě záporného náboje na jejich koncích. Důsledkem toho je pak rozvolnění chromatinové struktury ^(45, 46, 47). DNA je pak snadněji přístupná pro interkalační či kovalentně modifikující činidla, mezi které patří i ellipticin. Tato skutečnost je také jednou z hypotes, která by mohla vysvětlit zvýšení cytotoxicity ellipticinu vůči neuroblastomovým buněčným liniím zjištěné v dřívějších studiích naší laboratoře ⁽⁴¹⁾ (kapitola 1.6.1). Ellipticin totiž poškozuje DNA neuroblastomových buněk, především tvorbou kovalentních aduktů s DNA ⁽²¹⁾. Změna struktury DNA rozvolněním struktury chromatinu působením trichostatinu A by tedy mohla usnadnit modifikaci DNA ellipticinem.

Tvorba kovalentních aduktů je závislá na enzymově katalyzované aktivaci ellipticinu ^(23, 24, 26). Enzymy, které jsou zodpovědné za aktivaci ellipticinu v organismu

jsou cytochromy P450 a peroxidasy (23, 24, 25, 26). Aktivační metabolity (12-hydroxyellipticin, 13-hydroxyellipticin a N^2 -oxid ellipticinu), které kovalentně modifikují DNA, vznikají oxidací ellipticinu cytochromy P450 podrodiny 3A. Naopak detoxikační metabolity (7-hydroxyellipticin a 9-hydroxyellipticin) jsou pak tvořeny oxidací ellipticinu katalyzovanou cytochromy P450 podrodiny 1A.

V nádorových tkáních jsou kromě cytochromů P450 exprimovány ještě další enzymy schopné metabolisovat ellipticin. Jedná se o peroxidasy. Také v průběhu oxidace ellipticinu peroxidasami dochází k tvorbě reaktivních intermediátů, tvořících adukty s DNA (obrázek 6, str. 22). Aktivity a hladiny exprese cytochromů P450 a peroxidas a jejich ovlivnění inhibitory histondeacetylas by tedy mohly být dalšími faktory ovlivňujícími cytotoxicitu ellipticinu a její zvýšení těmito látkami vůči neuroblastomovým nádorovým tkáním.

Předkládaná diplomová práce testuje tuto druhou hypotézu možného vysvětlení mechanismu působení inhibitorů histondeacetylas, konkrétně TSA, na zvýšení cytotoxicity ellipticinu.

Studován byl tedy vliv TSA na oxidaci ellipticinu cytochromy P450, které ellipticin jak aktivují na metabolity tvořící adukty s DNA, tak i detoxikují. Obdobně byl analyzován vliv TSA na katalytické aktivity peroxidas ve směru oxidace ellipticinu. Žádný z cytochromů P450, jejichž aktivita byla měřena ve směru oxidace ellipticinu a za použití selektivních („markerových“) substrátů, nebyly TSA ovlivněny. Zvýšení cytotoxicity ellipticinu v neuroblastomových buněčných liniích trichostatinem A tedy pravděpodobně nevyplývá ze zvýšení aktivačního metabolismu ellipticinu vedoucího k tvorbě aduktů s DNA.

V případě peroxidas (laktoperoxidasa a křenová peroxidasa) výsledky získané v předkládané diplomové práci ukázaly, že TSA stimuluje tvorbu dimeru ellipticinu, detoxikačního metabolitu této sloučeniny tvořeného peroxidasami. Z tohoto vyplývá, že mechanismus posílení cytotoxického účinku ellipticinu trichostatinem A rovněž nebude vycházet z ovlivnění oxidace ellipticinu peroxidasami vedoucí k tvorbě aduktů s DNA, jež determinují cytotoxicitu ellipticinu vůči těmto nádorovým buňkám.

V poslední části diplomové práce byl studován další možný mechanismus vlivu TSA na zvýšení cytotoxicity ellipticinu v neuroblastomových buněčných liniích (UKF-NB-3 a UKF-NB-4). Sledován byl vliv TSA za současného působení ellipticinu na exprese enzymů metabolisujících tuto sloučeninu. K tomuto experimentu byly využity lidské

neuroblastomové linie UKF-NB-3 a UKF-NB-4, které byly premedikovány s TSA a poté vystaveny působení ellipticinu. V obou typech neuroblastomových liniích TSA v kombinaci s ellipticinem stimuloval expresi CYP1A1 a CYP3A4 a inhiboval expresi laktoperoxidasy. Zdá se, že stimulace exprese CYP1A1 nemá na zvýšení cytotoxicity ellipticinu vůči neuroblastomům vliv, neboť tento enzym katalyzuje spíše vznik jeho detoxikačních metabolitů. Inhibice exprese laktoperoxidasy rovněž nevysvětluje zvýšení cytotoxicity ellipticinu v přítomnosti TSA vůči neuroblastomům. Stimulací exprese CYP3A4 však může být tato skutečnost částečně vysvětlena. Tento enzym totiž katalyzuje převážně tvorbu aktivačních metabolitů, zodpovědných za kovalentní modifikaci DNA.

Hypothesa, že TSA může ovlivňovat (stimulovat) cytotoxický účinek ellipticinu v neuroblastomech mechanismem změny dostupnosti nukleofilních částí molekuly DNA pro modifikaci ellipticinem jejím rozvolněním, však nemůžeme vyloučit. Tento mechanismus totiž nebyl v diplomové práci studován. Studium tohoto potenciálního mechanismu proto bude předmětem dalších studií naší laboratoře.

6 Závěr

Z výsledků získaných v předkládané diplomové práci vyplývá, že její cíle byly splněny. V práci bylo zjištěno, že:

- Trichostatin A neovlivňuje oxidaci ellipticinu cytochromy P450 jaterního mikrosomálního systému laboratorního potkana. Jmenovitě nedochází k žádnému ovlivnění tvorby aktivačních i detoxikačních metabolitů ellipticinu.
- Při oxidaci ellipticinu křenovou peroxidasou a hovězí laktoperoxidasou docházelo v přítomnosti TSA ke zvýšení tvorby dimeru ellipticinu. TSA tedy posouvá oxidaci ellipticinu peroxidasami ve směru jeho detoxikace na detoxikační metabolit, kterým dimer ellipticinu je.
- Aktivity CYP1A1 a CYP1A2 měřené s jejich specifickými („markerovými“) substráty, Sudanem I a 7-methoxyresorufinem, nejsou trichostatinem A ovlivněny.
- Ani aktivita dalšího cytochromu P450, CYP3A, měřená selektivní reakcí, 6- β -hydroxylací testosteronu, není signifikantně ovlivněna trichostatinem A.
- Lidské neuroblastomové buněčné linie UKF-NB-3 a UKF-NB-4 exprimují CYP3A4, CYP1A1 a laktoperoxidasu, tedy enzymy oxidující ellipticin. Ellipticin v těchto buňkách indukuje expresi CYP1A1 a CYP3A4 a inhibuje expresi laktoperoxidasy.
- Trichostatin A v kombinaci s ellipticinem v neuroblastomových nádorových liniích indukuje expresi CYP1A1 a CYP3A4 a dále prohlubuje inhibici exprese laktoperoxidasy.

7 Seznam literatury

1. Klener P.: *Klinická onkologie*. Galén, Praha, 2002
2. Klener P.: *Protinádorová chemoterapie*. Galén, Praha, 1997
3. Stiborová M.: *Xenobiochemie*. přednáška na PŘF UK, Praha, katedra biochemie, 2009
4. Hořejší V., Bartůňková J.: *Základy imunologie*, Triton, Praha, 1998
5. Stiborová M., Mikšanová M.: *Molekulární mechanismus karcinogenese*. Živa, 1999, 4:146-148
6. Martínková J.: *Farmakologie pro studenty zdravotnických oborů*. Grada Publishing, Praha, 2007
7. Stiborová M.: *Biochemie chemické kancerogenese*. přednáška na PŘF UK, Praha, katedra biochemie, 2009
8. Le Pecq J.B., Dat Xuong N., Gosse Ch., Paoletti C.: *A new antitumoral agent: 9-hydroxyellipticine. Possibility of a rational design of anticancerous drugs in the series of DNA intercalating drugs*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1974, 71:5078-5082
9. Rouësse J.G., Le Chevalier T., Caille P., Mondesir J.M., Sancho-Garnier H., May-Levin F., Spielmann M., De Jager R., Amiel J.L.: *Phase II study of elliptinium in advanced Breast cancer*. Cancer Treat. Rep., 1985, 69:707-708
10. Dalton L.K., Demerac S., Elmes B.C., Loder J.W., Stan J.M., Teitei T.: *Synthesis of the tumor-inhibitory alkaloids, ellipticine, 9-methoxyellipticine, and related pyrido-[4, 3-b]carbazoles*. Aust. J. Chem., 1967, 20:2715-2727
11. Mathé G., Triana K., Pontiggia P., Blanquet D., Hallard M., Morette C.: *Data of pre-clinical and early clinical trials of acriflavine and hydroxy-methyl-ellipticine reviewed, enriched by the experience of their use for 18 months to 6 years in combination with other HIVI virostatic*. Biomed. Pharmacother., 1998, 52:391-396
12. Goodwin S., Smith A.F., Horning E.C.: *Alkaloids of Ochrosia elliptica labill.* J. Am. Chem. Soc., 1959, 81:1903-1908
13. Caillé P., Mondesir J.M., Droz J.P., Kerbrat P., Goodman A., Ducret J.P., Theodore C., Spileman M., Rouësse J., Amiel J.L.: *Phase II trial elliptinium in advanced renal cell carcinoma*. Cancer Treat. Rep., 1985, 69:910-912
14. Auclair C.: *Multimodal action of antitumor agents on DNA: The ellipticine series*. Arch. Biochem. Biophys., 1987, 259:1-14

15. Singh M.P., Hill G.C., Peoc'h D., Rayner B., Inabach J.L., Lown J.W.: *High-field NMR and restrained molecular modeling studies on a DNA heteroduplex containing a modified apurinic abasic site in the form of covalently linked 9-aminoellipticine*. *Biochemistry*, 1994, 33:10271-10285
16. Chu Y., Hsu M.T.: *Ellipticine increases the superhelical density of intracellular SV40 DNA by intercalation*. *Nucleic Acids Res.*, 1992, 20:4033-4038
17. Peng Y., Li C., Chen L., Sebt S., Chen J.: *Rescue of mutant p53 transcription function of ellipticine*. *Oncogene*, 2003, 22:4478-4487
18. Ohashi M., Sugikawa E., Nakanishi N.: *Inhibition of p53 protein phosphorylation by 9-hydroxyellipticine: A possible anticancer mechanism*. *Jpn. J. Cancer Res.*, 1995, 86:819-829
19. Schwaller M.A., Allard B., Lescot E., Moreau F.: *Protonophoric activity of ellipticine and isomers across the energy-transducing membrane of mitochondria*. *J. Biol. Chem.*, 1995, 270:22709-22713
20. Stiborová M., Rupertová M., Aimová D., Ryšlavá H., Frei H.: *Formation and persistence of DNA adducts of anticancer drug ellipticine in rats*. *Toxicology*, 2007, 236:50-60
21. Poljaková J., Eckschlager T., Hraběta J., Hřebacková 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*. *Biochem. Pharmacol.*, 2009, 77:1466-1479
22. Stiborová M., Bořek-Dohalská L., Aimová D., Kotrbová V., Kukačková K., Janouchová K., Rupertová M., Ryšlavá H., Hudeček J., Frei H.: *Oxidation pattern of the anticancer drug ellipticine by hepatic microsomes – similarity between human and rat systems*. *Gen. Physiol. Biophys.*, 2006, 25:245-261
23. Stiborová M., Bieler Ch. A., Wiessler M., Frei E.: *The anticancer agent ellipticine on activation by cytochrome P450 forms covalent DNA adducts*. *Biochem. Pharmacol.*, 2001, 62:1675-1684
24. Stiborová M., Rupertova M., Schmeiser H., Fre E.: *Molecular mechanisms of antineoplastic action of an anticancer drug ellipticine*. *Biomed. Papers*, 2006, 150:13-23
25. Poljaková J., Forsterová K., Šulc M., Frei E., Stiborová M.: *Oxidation of an antitumor drug ellipticine by peroxidases*. *Biomed. Papers*, 2005, 149:449-453

26. 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 N²-oxide*. *Cancer Res.*, 2004, 64:8374-8380
27. 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*. *Int. J. Cancer*, 2007, 120:243-251
28. Froelich-Ammon S.J., Patchan M.W., Osheroff N., Thompson R.B.: *Topoisomerase II binds to ellipticine in the absence or presence of DNA. Characterization of enzyme-drug interactions by fluorescence spectroscopy*. *J. Biol. Chem.*, 1995, 270:14998-1504
29. Tuteja N.: *Plant DNA helicases: the long unwinding road*. *J. Exp. Bot.*, 2003, 54: 2201-2214
30. Perry P.J., Gowan S.M., Kelland L.R., Neidle S.: *Design, synthesis and evaluation of human telomerase inhibitors based upon a tetracyclic structural motif*. *Anticancer Drug Des.*, 1999, 14:373-82
31. Pham X.H., Tuteja N.: *Potent inhibition of DNA unwinding and ATPase activities of pea DNA helicase 45 by DNA-binding agents*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2002, 294:334-339
32. Chadwick M., Silveira D.M., Platz B.B., Hayes D.: *Comparative physiological disposition of ellipticine in several animal species after intravenous administration*. *Drug. Metab. Dispos.*, 1978, 6:528-541
33. Vistica D.T., Kenney S., Hursey M.L., Boyd M.R.: *Cellular uptake as a determinant of cytotoxicity of quaternized ellipticines to human brain tumor cells*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1994, 200:1762-1768
34. Branfman A.R., Bruni R.J., Reinhold V.N., Silveira D.M., Chadwick M., Yesair D.W.: *Characterization of the metabolites of ellipticine in rat bile*. *Drug. Metab. Dispos.*, 1978, 6:542-548
35. Rosypal S.: *Úvod do molekulární biologie*. Brno, 1997
36. Stiborová M., Martínek V., Rýdlová H., Hodek P., Frei E.: *Sudan I is a potential carcinogen for humans: Evidence for its metabolic activation and detoxication by human recombinant cytochrome*. *Cancer Res.*, 2002, 62:5678-5684

37. Hamm J.T., Ross D.G., Richardson V.M., Diliberto J.J., Birnbaum L.S.: *Methoxyresorufin: an inappropriate substrate for CYP1A2 in the mouse*. *Biochem. Pharm.*, 1998, 56:1657-1660
38. Maezawa K., Matsunaga T., Takezawa T., Kani M., Ohira S., Ohmori S.: *Cytochrome P450 3As gene expression and testosterone 6 β -hydroxylase activity in human fetal membranes and placenta at full term*. *Biol. Pharm. Bull.*, 2010, 33:249-254
39. Haag M., Fautrel A., Guillouzo A., Frossard N., Pons F.: *Expression of cytochromes P450 3A in mouse lung: effects of dexamethasone and pregnenolone 16 α -carbonitrile*. *Arch. Toxicol.*, 2003, 77:145-149
40. Moserová M.: *Diplomová práce*. PřF UK, 2007, Praha
41. Háčková M.: *Diplomová práce*. PřF UK, 2008, Praha
42. Poljaková J.: *Diplomová práce*. PřF UK, 2002, Praha
43. Stiborová M., Arlt V.M., Henderson C.J., Wolf R., 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*. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2008, 226:318-327
44. Smith K.T., Workman J.L.: *Histone deacetylase inhibitors: Anticancer compounds*. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2009, 41:21-25
45. Pan L., Jun L., Huang B.: *HDAC inhibitors: A potential new category of anti-tumor agents*. *Cell. Mol. Immunol.*, 2007, 4:337-343
46. Kim D.H., Kim M., Kwon H.J.: *Histone deacetylase in carcinogenesis and its inhibitors as anti-cancer agents*. *J. Biochem. Mol. Biol.*, 2003, 36:110-119
47. Glaser K.B.: *HDAC inhibitors: Clinical update and mechanism-based potential*. *Biochem. Pharm.*, 2007, 74:659-671
48. Smith L.T., Otterson G.A., Plass C.: *Unraveling the epigenetic code of cancer for therapy*. *Trends Genet.*, 2007, 23:449-456
49. Mählknecht U., Hoelzer D.: *Histone acetylation modifiers in the pathogenesis of malignant disease*. *Mol. Med.*, 2000, 6:623-644
50. Gregory P.D., Wagner K., Horz W.: *Histone acetylation and chromatin remodeling*. *Exp. Cell Res.*, 2001, 256:195-202
51. Tanner K.G., Trievel R.C., Kuo M.H., Howard R.M., Berger S.L., Allis C.D., Marmorstein R., Denu J.M.: *Catalytic mechanism and function of invariant glutamic acid*

- 173 from the histone acetyltransferase GCN5 transcriptional coactivator. *J. Biol. Chem.*, 1999, 274:18157-18160
52. Minucci S., Pelici P.G.: *Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer*. *Nat. Rev. Cancer*, 2006, 6:38-51
53. Miller T.A., Witter D.J., Belvedere S.: *Histone deacetylase inhibitors*. *J. Med. Chem.*, 2003, 46:5097-5116
54. Marks P.A., Richon V.M., Miller T., Kelly W.K.: *Histone deacetylase inhibitors*. *Adv. Cancer Res.*, 2004, 91:137-168
55. Yoshida M., Kijima M., Akita M., Beppu T.: *Potent and specific inhibition of mammalian histone deacetylase both in vivo and in vitro by trichostatin A*. *J. Biol. Chem.*, 1990, 265:17174-17179
56. Marks P.A., Dokmanovic M.: *Histone deacetylase inhibitors: discovery and development as anticancer agents*. *Expert Opin. Invest. Drugs*, 2005, 14:1497-1511
57. Schneider-Stock R., Ocker M.: *Epigenetic therapy in cancer: Molecular background and clinical development of histone deacetylase and DNA methyltransferase inhibitors*. *IDrugs*, 2007, 10:557-561
58. Finnin M.S., Donigian J.R., Cohen A., Richon V.M., Rifkind R.A., Breslow R., Pavletich N.P.: *Structures of a histone deacetylase homologue bound to the TSA and SAHA inhibitors*. *Nature*, 1999, 401:188-193
59. Kim Y.B., Ki S.W., Yoshida M., Horinouchi S.: *Mechanism of cell cycle arrest caused by histone deacetylase inhibitors in human carcinoma cells*. *J. Antibiot.*, 2000, 53:1191-1200
60. Mukhopadhyay N.K., Weisberg E., Gilchrist D., Bueno R., Sugarbaker D.J., Jaklitsch M.T.: *Effectiveness of trichostatin A as a potential candidate for anticancer therapy in non-small-cell lung cancer*. *Ann. Thorac. Surg.*, 2006, 81:1034-1042
61. Florenes V.A., Skrede M., Jorgensen K., Nesland J.M.: *Deacetylase inhibition in malignant melanomas: impact on cell cycle regulation and survival*. *Melanoma Res.*, 2004, 14:173-181
62. Kumagai T., Wakimoto N., Yin D., Gery S., Kawamata N., Takai N., Komatsu N., Chumakov A., Imai Y.: *Histone deacetylase inhibitor, suberoylanilide hydroxamic acid (Vorinostat, SAHA) profoundly inhibits the growth of human pancreatic cancer cells*. *Int. J. Cancer*, 2007, 121:656-665

63. Coon M.J.: *Oxygen activation in the metabolism of lipids, drugs and carcinogens*. Nutr. Rev., 1978, 36:319-128
64. Schacter B.A., Nelson E.B., Marver H.S., Masters B.S.: *Immunochemical evidence for an association of heme oxygenase with the microsomal electron transport system*. J. Biol. Chem., 1972, 247:3601-3607
65. Kasper C.B.: *Biochemical distinctions between the nuclear and microsomal membranes from rat hepatocytes*. J. Biol. Chem., 1971, 246:577-581
66. Wang M., Roberts D.L., Paschke R., Shea T.M., Masters B.S., Kim J.J.: *Three-dimensional structure of NADPH-cytochrome P450 reductase: prototype for FMN- and FAD-containing enzymes*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1997, 94:8411-8416
67. Stiborová M., Hudeček J., Páca J. Jr., Martínek V., Páca J.: *Enzymy metabolizující kontaminanty životního prostředí*. Chem. Listy, 2004, 98:876-890
68. www.uky.edu/pharmacy/ps/porter/CPR.html (staženo 15.3.2010)
69. Tanburini P.P., Schenkman J.B.: *Differences in the mechanism of functional interaction between NADPH-cytochrome P450 reductase and its redox partners*. Mol. Pharmacol., 1986, 30:178-185
70. Vernilion J.L., Ballou D.P., Massey V., Coon M.J.: *Separate roles for FMN and FAD in catalysis by liver microsomal NADPH-cytochrome P-450 reductase*. J. Biol. Chem., 1981, 256:266-277
71. Oprian D.D., Coon M.J.: *Oxidation-reduction states of FMN and FAD in NADPH-cytochrome P-450 reductase during reduction by NADPH*. J. Biol. Chem., 1982, 257:8935-8944
72. Nadler S.G., Strobel H.W.: *Role of electrostatic interactions in the reaction of NADPH-cytochrome P-450 reductase with cytochromes P-450*. Arch. Biochem. Biophys., 1988, 261:418-429
73. Reid T.M., Morton K.C., King C.M.: *Mutagenicity of azo dyes following metabolism by different reductive/oxidative systems*. Environ. Mutagen., 1984, 6:705-717
74. Taniguchi H., Imai Y., Sato R.: *Role of the electron transfer system in microsomal drug monooxygenase reaction catalyzed by cytochrom P-450*. Arch. Biochem. Biophys., 1984, 232:585-596
75. Hynie S.: *Xenobiochemie*. přednáška na 1.LF UK, Praha, 1. Ústav lékařské biochemie, 2005

76. Stiborová M., Hudeček J., Hodek P., Frei E.: *Význam cytochromů P450 pro lidské zdraví*. Chem. Listy, 2001, 93:229-237
77. Yan Z., Caldwell G.W.: *Metabolism profiling, and cytochrome P450 inhibition & induction in drug discovery*. Curr. Top. Med. Chem., 2001, 1:404-425
78. Aimová M.: *Diplomová práce*. PřF UK, 2001, Praha
79. Kotrbová V.: *Disertační práce*. PřF UK, 2008, Praha
80. Dlouhá T.: *Diplomová práce*. PřF UK, 2003, Praha
81. Anari M.R., Khan S., Jatoe S.D., O'Brien P.J.: *Cytochrome P450 dependent xenobiotic activation by physiological hydroperoxides in intact hepatocytes*. Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet., 1997, 22:305-310
82. Dahl A.R., Hadley X.M.: *Formaldehyde production promoted by rat nasal cytochrome P-450-dependent monooxygenases with nasal decongestants, essences, solvents, air pollutants, nicotine, and cocaine as substrates*. Toxicol. Appl. Pharmacol., 1983, 67:200-205
83. Guengerich F.P.: *Reactions and significance of cytochrome P-450 enzymes*. J. Biol. Chem., 1991, 266:10019-10022
84. Coon M.J., Ding X.X., Pernecky S.J., Vaz A.D.: *Cytochrome P450: progress and predictions*. FASEB J., 1992, 6:669-673
85. Felsted R.L., Chu A.E., Chaykin S.: *Purification and properties of the aldehyde oxidases from hog and rabbit livers*. J. Biol. Chem., 1973, 248:2580-2587
86. Hudeček J.: *Hemoproteiny a metaloproteiny*. přednáška a PřF UK, Praha, katedra biochemie, 2009
87. Garfinkel D.: *Studies on pig liver microsomes. I. Enzymic and pigment composition of different microsomal fractions*. Arch. Biochem. Biophys., 1958, 77:493-509
88. Klingenberg M.: *Pigments of rat liver microsomes*. Arch. Biochem. Biophys., 1958, 75:376-386
89. Williams P.A., Cosme J., Ward A., Angove H.C., Matak Vinkovic D., Jhoti H.: *Crystal structure of human cytochrome P450 2C9 with bound warfarin*. Nature, 2003, 424:464-468
90. Edwards R.J., Murray B.P., Singleton A.M., Boopis A.R.: *Orientation of cytochromes P450 in the endoplasmic reticulum*. Biochemistry, 1991, 30:71-76
91. Nebert D.W., Nelson D.R., Feyereisen R.: *Evolution of the cytochrome P450 genes*. Xenobiotica, 1989, 19:1149-1160

92. Nelson D.R., Koymans L., Kamataki T., Stegeman J.J., Feyereisen R., Waxman D.J., Waterman M.R., Gotoh O., Coon M.J., Estabrook R.W., Gunsalus I.C., Nebert D.W.: *P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature*. Pharmacogenetics, 1996, 6:1-42
93. Nelson D.R., Kamataki T., Waxman D.J., Guengerich F.P., Estabrook R.W., Feyereisen R., Gonzalez F.J., Coon M.J., Gunsalus I.C., Gotoh O.: *The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes, and nomenclature*. DNA Cell Biol., 1993, 12:1-51
94. Spatzenegger M., Jaeger W.: *Clinical importance of hepatic cytochrome P450 in drug metabolism*. Drug Metab. Rev., 1995, 27:397-417
95. Nebert D.W., Nelson D.R., Adesnik M., Coon M.J., Estabrook R.W., Gonzalez F.J., Guengerich F.P., Gunsalus I.C., Johnson E.F., Kemper B.: *The P450 superfamily: updated listing of all genes and recommended nomenclature for the chromosomal loci*. DNA, 1989, 8:1-13
96. Lowry O.H., Rosenbrough A., Farr L.A., Randall R.J.: *Protein measurement with the folin phenol reagent*. J. Biol. Chem., 1951, 193:265-275
97. Stiborová M.: *Kompartmentace biochemických dějů v buňce*. přednáška a PřF UK, Praha, katedra biochemie, 2009
98. Fuhr U.: *Induction of drug metabolising enzymes: pharmacokinetic and toxicological consequences in humans*. Clin. Pharmacokinet., 2000, 38:493-504
99. Kim M.S., Blake M., Baek H.J., Kohlhagen G., Pommier Y., Carrier F.: *Inhibition of histone deacetylase increases cytotoxicity to anticancer drugs targeting DNA*. Cancer Res., 2003, 63:7291-7300
100. Snykers S., Vanhaecke T., De Becker A., Papeleu P., Vinken M., Van Riet I., Rogiers V.: *Chromatin remodeling agent trichostatin A; a key-factor in the hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells derived of adult bone marrow*. BMC Dev. Biol., 2007, 7:24-39
101. Camphausen K., Tofilon P.J.: *Inhibition of histone deacetylation: A strategy for radiosensitization*. J. Clin. Oncol., 2007, 25:4051-4056
102. Cerna D., Camphausen K., Tofilon P.J.: *Histone deacetylation as target for radiosensitization*. Curr. Top. Dev. Biol., 2006, 73:173-204
103. Ohtsuka Y., Amano R., Mizukawa M., Oka E., Ohtahara S.: *Treatment of intractable childhood epilepsy with high-dose valproate*. Epilepsia, 1992, 33:158-164

104. Hřebačková J., Poljaková J., Eckschlager T., Hraběta J., Procházka P., Smutný S., Stiborová M.: *Histone deacetylase inhibitors valproate and trichostatin A are toxic to neuroblastoma cells and modulate cytochrome P450 1A1, 1B1 and 3A4 expression in these cells*. *Interdisc. Toxicol.*, 2009, 2:205-210
105. Cinatl J.Jr., Cinatl J., Scholz M., Driever P.H., Henrich D., Kabickova H., Vogel J.U., Doerr H.W., Kornhuber B.: *Antitumor activity of sodium valproate in cultures of human neuroblastoma cells*. *Anticancer Drugs*, 1996, 7:766-773
106. Smulevich G., Paoli M., Burke J.F., Sanders S.A., Thorneley R.N., Smith A.T.: *Characterization of recombinant horseradish peroxidase C and three site-directed mutants, F41V, F41W, a R38K, by resonance Raman spectroscopy*. *Biochemistry*, 1994, 33:7398-7407
107. Smulevich G., English A.M., Mantini A.R., Marzocchi M.P.: *Resonance Raman investigation of ferric iron in horseradish peroxidase and its aromatic donor complexes at room and low temperatures*. *Biochemistry*, 1991, 30:772-779
108. Chromá L., Macková M., Macek T., Martínek V., Stiborová M.: *Rostlinné cytochromy P450 a peroxidasy a jejich úloha při degradaci kontaminantů životního prostředí*. *Chem. Listy*, 2001, 95:212-222
109. Welinder K.G.: *Amino acid sequence studies of horseradish peroxidase. Amino and carboxyl termini, cyanogen bromide and tryptic fragments, the complete sequence, and some structural characteristics of horseradish peroxidase C*. *Eur. J. Biochem.*, 1979, 96:483-502
110. Shannon L.M., Kay E., Lew J.Y.: *Peroxidase isozymes from horseradish roots. I. Isolation and physical properties*. *J. Biol. Chem.*, 1966, 241:2166-2177
111. Ogawa S., Shiro Y., Morishima I.: *Calcium binding by horseradish peroxidase C and the heme environmental structure*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1979, 90:674-678
112. Booth K.S., Kimura S., Lee H.C., Ikeda-Saito M., Caughey W.S.: *Bovine myeloperoxidase and lactoperoxidase each contain a high affinity site for calcium*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1989, 160:897-902
113. Hooven L.A., Mahadevan B., Keshava C., Johns C., Pereira C., Desai D., Amin S., Weston A., Baird W.M.: *Effects of suberoylanilide hydroxamic acid and trichostatin A on induction of cytochrome P450 enzymes and benzo[a]pyrene DNA adduct formation in human cells*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2005, 15:1283-1287

114. Rae T.D., Goff H.M.: *The heme prosthetic group of lactoperoxidase. Structural characteristics of heme I and heme I-peptides.* J. Biol. Chem., 1998, 273:27968-27977
115. Boscolo B., Leal S.S., Ghibaudi E.M., Gornes C.M.: *Lactoperoxidase folding and catalysis relies on the stabilization of the alpha-helix rich core domain: a thermal unfolding study.* Biochim. Biophys. Acta., 2007, 1774:1164-1172
116. Singh A.K., Singh N., Sharma S., Singh S.B., Kaur P., Bhushan A., Srinivasan A., Singh Tej P.: *Crystal structure of lactoperoxidase at 2.4 Å resolution.* J. Mol. Biol., 2009, 374:1060-1075
117. Hayashi Y., Yamazaki I.: *The oxidation-reduction potentials of compound I/compound II and compound II/ferric couples of horseradish peroxidases A2 and C.* J. Biol. Chem., 1979, 254:8101-9106
118. Maris J.M., Matthay K.K.: *Molecular biology of neuroblastoma.* J. Clin. Oncol., 1999, 17:2264-2279
119. Santini V., Gozzini A., Ferrari G.: *Histone deacetylase inhibitors: molecular and biological activity as a premise to clinical application.* Curr. Drug. Metab., 8:383-393
120. Waxman DJ.: *P450 gene induction by structurally diverse xenochemicals: central role of nuclear receptor CAR, PXR, and PPAR.* Arch. Biochem. Biophys., 1999, 369:11-23
121. Červený L., Švecová L., Azenbacherová E., Vrzal R., Štaud F., Dvořák Z., Ulrichová J., Azenbacher P., Pávek P.: *Valproic acid induces CYP3A4 and MDR1 genes expression by activating of constitutive androstane receptor and pregnane X receptor pathways.* Drug. Metab. Dispos., 2007, 20:2715-2727
122. Wen X., Wang J.X., Kivisto K.T., Neuvonen P.J., Bacjman J.T.: *In vitro evaluation of valproic acid as an inhibitor of human cytochrome P40 isoforms: preferential inhibition of cytochrome P450 2C9 (CYP2C9).* Br. J. Clin. Pharmacol., 2001, 52:547-553

Svoluji k zapůjčení této diplomové práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovatelů a ti byli upozorněni na to, že musí pramen převzatých údajů řádně citovat.

Jméno a příjmení	Adresa	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka