

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

KATEDRA BIOCHEMIE



Mechanismus vzniku nádorových procesů a jejich ovlivnění ellipticinem

Mechanism of tumor development and its influencing by ellipticine

Bakalářská práce

Školitel: Prof. RNDr. Marie Stiborová, DrSc.

Praha 2010

Martina Parisová

P r o h l á š e n í

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

V Praze dne.....

podpis.....

.

Ráda bych poděkovala své školitelce Prof. RNDr. Marii Stiborové, DrSc. za zadání tématu bakalářské práce, odborné vedení a laskavý a trpělivý přístup při jejím vypracování.

Práce byla řešena jako součást grantových vědeckých projektů podporovaných GA ČR (P301/10/0356) a MŠMT ČR (MSM 0021620808 a 1M0505).

Obsah

Obsah	1
Seznam použitých zkratk	3
Abstrakt	5
Abstract	6
1. Úvod	7
2. Cíl práce	9
3. Nádorová onemocnění	10
3.1. <i>Kancerogenese a její mechanismus</i>	11
3.2. <i>Faktory způsobující nádorová onemocnění</i>	13
3.3. <i>Biotransformace xenobiotik</i>	14
3.3.1. <i>První fáze biotransformace</i>	15
3.3.2. <i>Druhá fáze biotransformace</i>	17
4. Protinádorová léčiva jako metoda léčení rakoviny	18
4.1. <i>Cyklus buněčného dělení</i>	19
4.2. <i>Rezistence nádorových buněk k cytostatikům</i>	21
4.2.1. <i>Mnohonásobná látková rezistence</i>	22
4.3. <i>Vývoj nových léčiv</i>	22
5. Skupina cytostatik, tříděná podle jejich mechanismu účinku	24
5.1. <i>Antimetabolity</i>	25
5.1.1. <i>Analogy kyseliny listové</i>	25
5.1.2. <i>Analogy purinů (antimetabolity purinů)</i>	26
5.1.3. <i>Analogy pyrimidinů</i>	26
5.1.4. <i>Inhibitory ribonukleotidreduktázy</i>	26
5.2. <i>Alkylační látky</i>	26
5.3. <i>Interkalační látky a inhibitory topoizomeráz</i>	27
5.3.1. <i>Skupiny látek s interkalačními účinky</i>	27
5.3.1.1. <i>Antracyklinová antibiotika</i>	27
5.3.1.2. <i>Deriváty antracendionu</i>	28
5.3.1.3. <i>Aktinomyciny</i>	28
5.3.2. <i>Inhibitory topoizomeráz</i>	28
5.3.2.1. <i>Inhibitory topoizomerázy I</i>	28

5.3.2.2. <i>Inhibitory topoizomerázy II</i>	28
5.4. <i>Radiomimetika</i>	28
5.5. <i>Inhibitory mitózy</i>	29
5.6. <i>Látky s různými mechanismy účinku</i>	29
5.6.1. <i>Inhibitory proteosyntézy</i>	29
5.6.2. <i>Imunomodulační léčiva</i>	29
5.7. <i>Hormony a jejich antagonisté</i>	30
6. Ellipticin a jeho působení	31
6.1. <i>Mechanismus nescifického účinku ellipticinu</i>	32
6.2. <i>Mechanismus specifického účinku ellipticinu</i>	33
6.2.1. <i>Mechanismus ellipticinu indukující apoptózu a zastavení buněčného cyklu MCF-7 buněk</i>	34
7. Metabolismus ellipticinu	39
7.1. <i>Metabolická aktivace ellipticinu vedoucí ke vzniku farmakologicky účinnějších metabolitů a tvorba aduktů ellipticinu s DNA</i>	40
8. Enzymy metabolizující ellipticin	44
8.1. <i>Cytochromy P450</i>	44
8.1.1. <i>Cytochromy P450 1A1 a P450 1A2</i>	46
8.1.2. <i>Cytochromy P450 2D6 a P450 2C9</i>	47
8.1.3. <i>Cytochrom P450 3A4</i>	47
8.2. <i>Peroxidasy</i>	47
9. Závěr	49
10. Literatura	50

Seznam použitých zkratk

Apaf-1	apoptická proteasa, aktivující faktor 1
ATP	adenosintrifosfát
Bcl-2	genová rodina genů Bcl (z anglického „B-cell lymphoma“) regulující propustnost vnější mitochondriální membrány
Cdc2	člen serin/threonin kinázové rodiny, zprostředkovávající fáze mitózy; známý také jako CDK1
CCRF-CEM	lidská akutní T lymfoblastová leukemie (z anglického „Human T cell lymphoblast-like cell line“)
COX	cyklooxygenáza, v organismu se vyskytuje ve dvou formách – COX-1 a COX-2
CYP	cytochrom P450
dATP	deoxyadenosintrifosfát
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DISC	smrt indukující signalizační komplex (z anglického „death-inducing signaling complex“)
dTMP	deoxythymidinmonofosfát
EGFR	receptor epidermálního růstového faktoru
FADD	Fas protein asociovaný se smrtelnou doménou (z anglického „Fas-Associated protein with Death Domain“)
Fas ligand	transmembránový protein superrodiny TNF označovaný také jako FasL, váže se na specifický receptor Fas (CD95, Apo-1)
FH₂	dihydrolistová kyselina
FH₄	tetrahydrolistová kyselina
HIV	virus lidské imunitní nedostatečnosti (z anglického „Human Immunodeficiency Virus“)
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie (z anglického „High performance liquid chromatography“)
HRP	křenuv peroxidasa (z anglického „horseradish peroxidase“)
KIP1/p27	inhibitor cyklin-dependentní kinasy 1B
LPO	laktoperoxidasa
MCF-7 buňky	buňky lidského prsního adenokarcinomu (z anglického „Michigan Cancer Foundation-7“)

MDR	mnohočetná léková rezistence (z anglického „multiple drug resistance“)
MFO	mikrosomální systém monooxygenas se smíšenou funkcí
MPO	myeloperoxidasa
NADPH	nikotinamid adenin dinukleotid fosfát, redukována forma
NOXA	proapoptický člen proteinové rodiny Bcl-2
p21waf1/cip1	protein kódující inhibitor cyklin-dependentní kinázy
RNA	ribonukleová kyselina
TNF	tumor nekrotizující faktor, hlavní mediátor apoptózy
TNF-R1	TNF receptor 1, interakcí s TNF je aktivována řada signálních drah
TRAIL	označovaný také jako Apo2L, patří k rodině tumorových nekrotizujících faktorů, aktivuje apoptózu v nádorových buňkách
UDP	uridindifosfát

Abstrakt

Ellipticin (5,11-dimethyl-6*H*-pyrido[4,3-*b*]karbazol) představuje silné protinádorové agens, vykazující vícenásobný mechanismus působení. V této bakalářské práci jsou popsány příčiny vzniku nádorových procesů a informují o mechanismech hlavních farmakologických a cytotoxických účinků ellipticinu spolu s výsledky naší laboratoře ukazující nový mechanismus působení ellipticinu. Cytotoxické a mutagenní působení ellipticinu je přisuzováno především jeho dvěma mechanismům, interkalaci ellipticinu do dvoušroubovicové struktury DNA a jeho působení jako inhibitoru topoisomerasy II. Ellipticin také vytváří kovalentní adukty s DNA, po jeho oxidaci cytochromy P450 a peroxidasami. Cytochromy P450 oxidují ellipticin na pět různých metabolitů, z nichž 13-hydroxyellipticin, 12-hydroxyellipticin a N(2)-oxid ellipticinu vedou ke vzniku dvou majoritních aduktů s DNA. V případě peroxidas je ellipticin oxidován na radikál, poskytující dimer ellipticinu a také na N(2)-oxid ellipticinu. Z důvodu vysoké účinnosti ellipticinu a jeho derivátů proti různým typům nádorových onemocnění stoupá zájem o toto protinádorové léčivo a jsou stále zkoumány nové směry vývoje a přípravy cíleně směřovaných léčiv na bázi ellipticinu.

Abstract

Ellipticine (5,11-dimethyl-6H-pyridate [4,3-b] carbazole) is a powerful anti-cancer agent, exhibiting multiple mechanisms of action. This work describes the causes of cancer processes and summarizes the main pharmacological mechanisms and cytotoxic effects of ellipticine together with the results found in our laboratory indicating, a new mechanism of ellipticine action. Cytotoxic and mutagenic activity of ellipticine is attributed to its two mechanisms of activity ellipticine intercalation into DNA and its effectivity to inhibit topoisomerase II. Ellipticine also forms covalent DNA adducts after its oxidation with cytochromes P450 and peroxidases. Cytochromes P450 oxidize ellipticine up to five metabolites, of which 13-hydroxyellipticin, 12-hydroxyellipticin and N(2)-oxide of ellipticine are responsible for formation of two major DNA adducts. In the case of peroxidases, ellipticine is oxidized to a radical producing the ellipticine dimer and a minor ellipticine metabolite, the N(2)-oxide of ellipticine. Because of the high efficiency of ellipticine and its derivatives against various types of cancer, this compound is studied in detail. Its utilization for drug targeting is a challenge for further study.

1. Úvod

Zhoubná nádorová onemocnění představují závažný celospolečenský problém. Lze říci, že jedna osoba ze tří během svého života onemocní nějakou formou nádorového onemocnění a bohužel většina postižených dříve nebo později této nemoci podlehnou. Rakovina je v současnosti druhou nejběžnější příčinou úmrtí v Evropě a každý rok je diagnostikována u 3,2 mil. Evropanů ^[1]. Tato civilizační choroba také stále více postihuje mladší věkovou skupinu, což je způsobeno především oproti minulosti rychlým a „hektickým“ životním stylem, způsobujícím stresy, ale také odlišným složením potravy, která obsahuje zvýšené množství tuků a cukrů či kontaminací složek životního prostředí látkami s kancerogenním účinkem. Všechny tyto faktory zvyšují riziko vzniku rakoviny tím, že způsobují tvorbu většího množství nádorových buněk, než je pro organismus přirozené. Imunitní systém organismu, oslabený stresem a polutanty, pak není schopen vypořádat se s touto situací ^[2].

Základní léčbu nádorů představuje chirurgická léčba, radioterapie a chemoterapie. V současné době se zkoumá další léčebná metoda označovaná jako imunoterapie, která představuje léčebný postup založený na indukci protinádorové imunity nebo na využití imunitních mechanismů k cílenému směřování léčiv do místa nádoru. Zatím je však imunoterapie nádorů stále ještě pokusnou metodou, ale existuje naděje, že postupné detailní poznání mechanismů protinádorové imunity povede k efektivním postupům^[3]. Pro zvýšení úspěchu léčby nádorového onemocnění se využívá vzájemné kombinace těchto základních metod, které se vhodně doplňují, ale to stále nestačí ke snížení výskytu rakoviny.

Chemoterapie je metodou nejmladší, ale v následujících desetiletích prodělala bouřlivý vývoj. Jsou do ní vkládány naděje pro zlepšení léčby nádorového onemocnění. A to i přesto, že mnohé z protinádorových léků poškozují také buňky tělu vlastní a mají výrazné a často nepříjemné vedlejší účinky. Terapeutický účinek cytostatik je tedy dosti omezený a dosáhnout selektivní toxicity je mnohem obtížnější, neboť buňky vyvolávající onemocnění jsou odvozeny od buněk tělu vlastních. V každém případě je ale nepostradatelnou metodou v léčbě nádorových onemocnění ^[4].

Jedna z nejčastějších forem rakoviny je rakovina prsu, která představuje 30 % úmrtí u žen, což je mnohem více než v případě rakoviny děložního čípku (3 %) nebo rakoviny tlustého střeva (13%) u mužů a žen. Ráda bych se proto této problematice věnovala a snažila se získat nové informace, které by vedly ke snížení výskytu této nemoci ^[1]. Slibné naděje, pro léčení pokročilého karcinomu prsu s kostními metastázami a akutní myeloblastické

leukémie, představuje ellipticin a některé jeho deriváty vykazující významnou protinádorovou aktivitu. Proto bude studium této látky předmětem předkládané bakalářské práce.

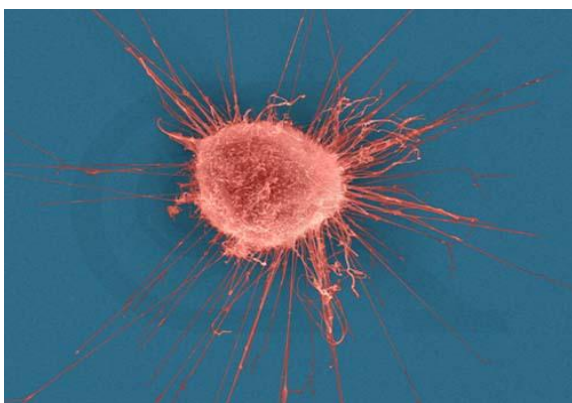
2. Cíl práce

Hlavním cílem předkládané bakalářské práce bylo získat co nejvíce znalostí o mechanismu působení protinádorového léčiva ellipticinu, což může vést k navržení jeho účinnějších derivátů a především selektivního cíleného účinku proti nádorovým buňkám. Cílem práce bylo rovněž zjistit z literárních údajů informace o nádorových procesech a způsobech léčby rakoviny se zvláštním zřetelem na chemoterapii.

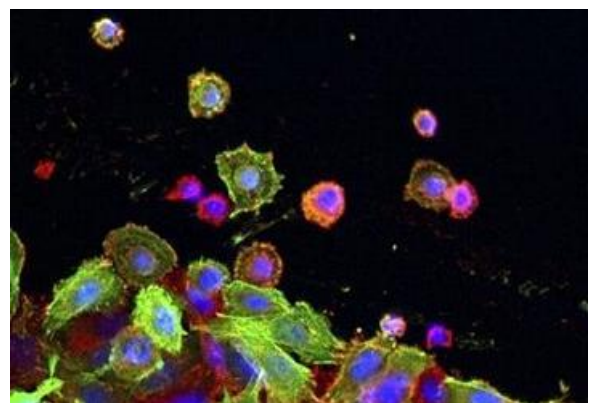
3. Nádorová onemocnění

Nádorová onemocnění představují různorodou skupinu chorob, při kterých dochází k nekontrolovanému růstu určité skupiny buněk. U většiny lidí jsou rychlost novotvorby a rychlost odumírání buněk v rovnováze. V některých případech se však celkový počet buněk zvýší v důsledku selhání kontrolních mechanismů. Tato porucha způsobuje, že se nové buňky tvoří rychleji, než staré odumírají, nebo buňky neodumírají normální rychlostí. Buňky jsou „naprogramovány“ pro určitou délku života, pro určitý počet buněčných dělení a teprve poté vede série biochemických reakcí k jejich odumření. Je-li porušen tento proces „buněčné sebevraždy“ (apoptózy) buňky neodumírají tehdy, kdy by měly, a toto narušení patrně vede ke vzniku mnohých nádorů. Jelikož se však zároveň nové buňky stále tvoří, celkový počet buněk se zvyšuje a vzniká nádor: postižený orgán nebo tkáň se mění v **tumor** (z řečtiny, *tumor* - zduření) nebo též neoplasma (novotvar). Buňky mohou při svém růstu tlačit na cévy a nervy, a tak působit bolest ^[5]. Ke vzniku nádoru může dojít v jakékoliv tkáni, nejčastěji však vzniká ve tkáních, kde se buňky nejvíce množí (dýchací soustava či trávicí soustava) nebo kde jsou buňky stimulovány hormony (prostata, prsy, vaječníky) ^[6].

Z lékařského hlediska se označuje rakovina jako **karcinom** pocházející z řeckého *karkinos* (krab, rak). Toto označení je odvozeno od „krabovitě“ struktury kořenů některých tumorů a od vzhledu naplněných žil kolem tumoru ^[5]. Některé typy karcinomů jsou znázorněny na **Obr. 1** a **2**.



Obr. 1 Buňka nádoru prsu
(pořízeno elektronovou mikroskopií) ^[74].



Obr. 2 Rakovinné buňky tlustého střeva
(pořízeno elektronovou mikroskopií) ^[17].

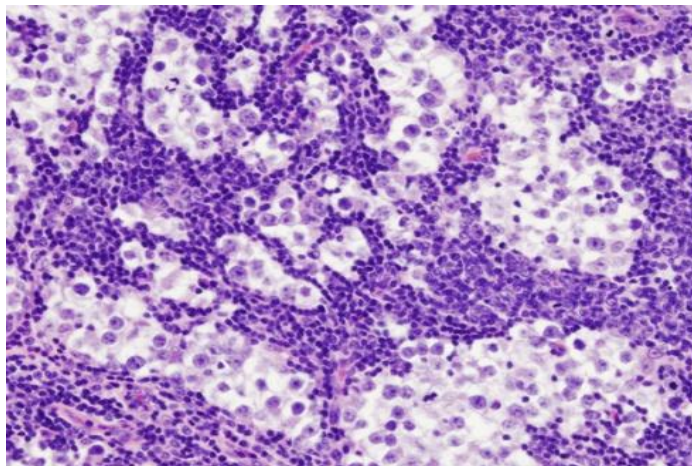
3.1. Kancerogenese a její mechanismus

Proces vzniku a vývoje nádorů se označuje jako **kancerogenese** (nebo karcinogenese). Základem vzniku nádorového onemocnění jsou především genetické změny v DNA. K přeměně normální zdravé buňky v buňku plně maligní nestačí mutace jediná, ale je třeba postupného hromadění několika mutací. Geny kódující proteiny, které se zapojují do regulace exprese genů v buňkách, tedy regulace transkripce (přepisu DNA do RNA), posttranskripčních úprav, translace (produkce proteinu dle informace obsažené v RNA) a posttranslačních úprav se nazývají **protoonkogeny** ^[2]. Protoonkogeny jsou součástí větší skupiny genů, které se účastní řízení růstu a vývoje buňky. Následkem určité mutace či nesprávné exprese vznikají z protoonkogenů **onkogeny** (řecky *onkos* = nádor). Onkogeny jsou geny kódující proteiny pozitivně regulující normální růst buňky, jejichž poruchy vedou ke ztrátě růstové kontroly a přeměně normální buňky v nádorovou. Onkogeny tedy urychlují buněčný cyklus, čímž podporují růst nebo zvětšování tkání v důsledku aktivního dělení, proliferaci, buněk. Podle funkce lze onkogeny dělit na *i*) geny pro růstové faktory, *ii*) geny pro receptory růstových faktorů a hormonů, *iii*) geny pro převaděče signálů a *iv*) geny pro transkripční faktory. Produkty onkogenů tedy zasahují do všech čtyř obecných funkcí kontroly buněčného růstu ^[8]. V normálních buňkách se na regulaci buněčného cyklu podílí také **tumor supresorové geny**. Rovnováha mezi těmito dvěma skupinami genů má pro počet buněk v dané tkáni rozhodující význam. Pokud tumor supresorový gen dobře nefunguje, pak se protoonkogen „vymaní“ z kontroly a může přimět buňky k růstu a k nadměrnému množení. Výsledkem je tumor, v němž se buňky tkáň nekontrolovaně dělí ^[5]. Zvýšená funkce protoonkogenů je tedy nebezpečná, protože vede k nadměrné buněčné proliferaci. Lze říci, že k maligní transformaci buňky dochází v důsledku mutace v protoonkogenech a tumor supresorových genech ^[2].

Polovina všech tumorů je způsobena defektem **tumorového supresorového genu p53**. Tento gen objevili v roce 1985 David Lane v Dundee ve Skotsku a Arnold Levine v Princetonu ve státě New Jersey ^[5]. Gen *p53* vede k buněčné „sebevraždě“, jestliže se buňky poškodí natolik, že poškození nelze opravit. Když je gen *p53* defektní, buňky neodumírají, ale pokračují v růstu a dělení. Tato porucha poté vede ke vzniku nádoru ^[5]. Buňka, ve které došlo k mutaci DNA vedoucí k aktivaci onkogenů a deaktivaci tumor supresorových genů a toto poškození DNA nebylo opraveno reparačními enzymy, je označována jako **buňka iniciovaná**. Pokud tuto buňku nezlikviduje imunitní systém, setrvává v organismu do doby, než se v důsledku expozice faktorům s promočním účinkem ještě více změní její genetická

informace. Dojde pak k proliferaci buněk s porušenou diferenciací a mezibuněčnou komunikací. Vzniká **benigní nádor**, který může být často úplně odstraněn chirurgicky. Nádor, jehož buňky mají schopnost napadat okolní tkáň se označuje jako **maligní**, který infiltruje i do sousedních tkání a likviduje je ^[2].

Uvolnění nádorové buňky či infekčního agens z maligního nádoru se mohou šířit krevními nebo lymfatickými cestami do jiných tkání nebo orgánů, kde se mohou „usadit“ a vytvářet dceřinné nádory (metastázy) znázorněné na **Obr. 3**.



Obr. 3 *Histologický řez metastázi v tkáni varlete* ^[9].

3.2. Faktory způsobující nádorová onemocnění

Kromě přirozených chyb vznikajících při replikaci může být DNA poškozena také působením vnějších faktorů. Nádorové onemocnění je tedy komplexní děj, na němž se podílejí faktory zevní (exogenní karcinogeny) a vnitřní (endogenní karcinogeny, dědičné mutace) ^[2]. Mezi hlavní faktory zvětšující pravděpodobnost vzniku nádorů patří:

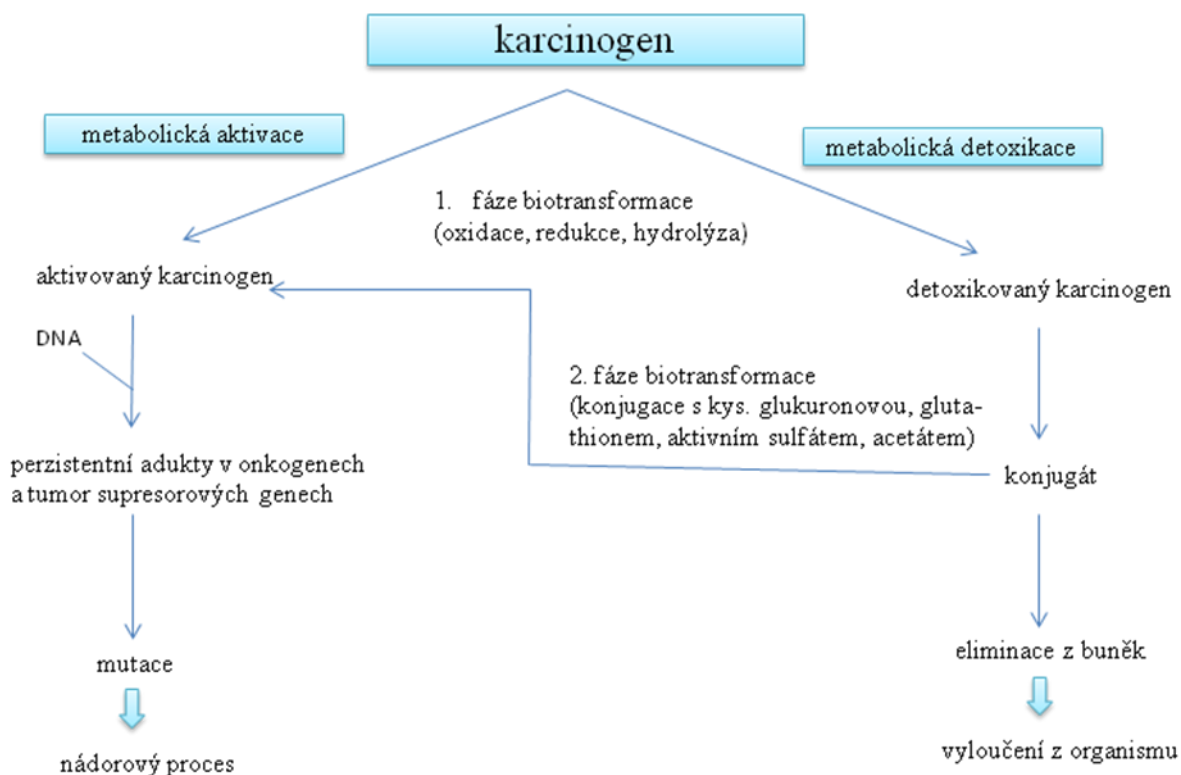
➤ **faktory fyzikální** (radioaktivní, kosmické, UV a Rentgenovo záření; některé druhy velmi jemných pevných částic, např. azbestu nebo sloučenin berylia) - vedou k mechanickému poškození buněk a při dlouhodobém účinku k pozměnění genetické informace a vzniku tumoru ^[10].

➤ **faktory biologické** (genetické předpoklady = imunitní systém organismu a některé viry) – je-li imunitní systém organismu vybudován tak, aby pomohl zničit rakovinné buňky, je mnohem větší pravděpodobnost úspěchu vyléčení rakoviny. Některé nádory jsou také vyvolávány viry, které patrně narušují citlivou kontrolu v buňkách, inaktivují tumor supresorové geny nebo aktivují onkogeny. Odhaduje se, že 15 až 20 % případů rakoviny je způsoben onkoviry ^[5, 2].

➤ **faktory chemické** (chemické kancerogeny) – do lidského organismu se látky syntetického či přírodního původu dostávají např. z pracovního a životního prostředí, jako součástí potravy nebo jako léčiva. Většina látek (99 %) musí být nejdříve aktivována biotransformací na reaktivní intermediáty či produkty. Takovéto látky se označují jako prokarcinogeny. Metabolismus prokarcinogenů vede ke vzniku toxičtějších metabolitů (proximální karcinogeny), které se mění na účinný karcinogen. Řada metabolitů, které jsou detoxikovány se také může aktivovat v sekundární fázi biotransformace (**Obr. 4**). Dochází tedy k jejich další aktivaci způsobující poškození DNA ^[10].

Chemické karcinogeny lze podle mechanismu působení rozdělit do tří základních skupin. První skupinu tvoří **genotoxické karcinogeny**, které se vážou na DNA kovalentní vazbou a tvoří tedy kovalentní adukty. Karcinogeny druhé skupiny poškozují struktury DNA za vzniku jedno- a dvou-řetězových zlomů (single and double-strand break) nebo křížového propojení molekul (cross-linking) v jedné molekule DNA (intramolekulární zesítnění), mezi dvěma molekulami DNA (intermolekulární zesítnění) i mezi DNA a proteinem. Třetí skupinu tvoří **epigenetické karcinogeny**, které modifikují molekuly DNA nekovalentními

interakcemi. Mezi epigenetické karcinogeny řadíme látky označované jako interkalátory, které jsou schopné vmezeřit se do dvoušroubovicovité struktury DNA ^[11].



Obr. 4 Schéma mechanismu působení chemických karcinogenů ^[8].

3.3. Biotransformace xenobiotik

Xenobiotika jsou cizorodé látky, které neslouží jako zdroj energie ani jako prekursory pro syntézu biologicky výhodných biomolekul. Organismus se proto snaží tyto látky odbourat pomocí řady mechanismů, které vedou k pozměnění jejich chemické struktury za vzniku produktů snadno vyloučitelných z organismu. Mezi xenobiotika řadíme léky, karcinogeny, toxikanty, nejrůznější druhy sloučenin z chemického a farmaceutického průmyslu. Xenobiotika jsou také součástí potravin (konzervační látky, potravinářská barviva, umělá sladidla atd.) ^[12].

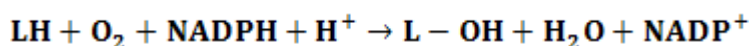
Metabolická přeměna xenobiotik vstupujících do organismu je určena jejich rozpustností ve vodě či tucích. Látky lipofilního charakteru, které snadno prochází membránami se v organismu mohou bioakumulovat. Takovéto látky nemohou být z těla vyloučeny přímo, ale musí být přeměněny na deriváty s vyšší polaritou. Vzniklé hydrofilnější

metabolity nemusí být jen netoxické, biologicky inertní látky, ale může se jednat o látky značného biologického významu. Tedy místo detoxikace dané látky může dojít k její aktivaci v závislosti na chemické struktuře daného xenobiotika a enzymovém systému, který ho přeměňuje. Tuto metabolickou aktivaci vyžaduje řada léčiv, ale tímto způsobem je aktivováno i velké množství karcinogenů.

Procesy detoxikační a aktivační od sebe nelze vzájemně oddělit, protože tentýž enzym může být použit v detoxikaci jedné chemické látky a přitom zvyšovat toxicitu látky jiné ^[12].

3.3.1. První fáze biotransformace

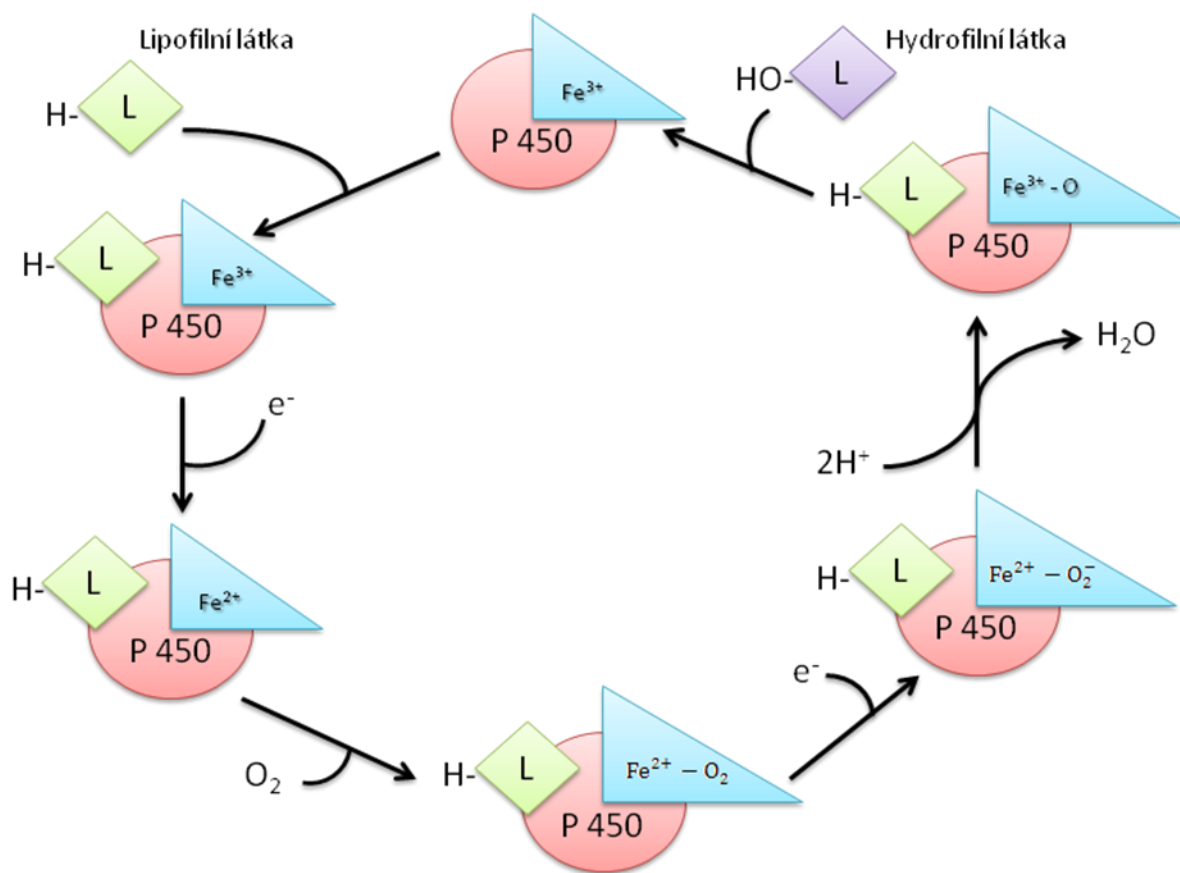
V první fázi biotransformace (derivatizační) dochází ke zvýšení polaritě xenobiotika. Hlavní enzymový systém, katalyzující derivatizační reakce xenobiotik, je mikrosomální systém monooxygenas se smíšenou funkcí (MFO systém) obsahující cytochrom P450. Hlavní funkcí tohoto enzymu je zabudovat atom kyslíku do substrátu molekuly lipofilního substrátu (L) a převést ho na polárnější sloučeninu, která je lépe rozpustná a schopná eliminace ^[12].



Oxidační reakce katalyzované tímto systémem vyžadují

- molekulární kyslík
- NADPH sloužící jako donor vodíku
- NADPH cytochrom P450 reduktázu dodávající elektrony k aktivaci kyslíku, jejichž zdrojem je NADPH
- cytochrom P450, hemoprotein, sloužící jako terminální oxidasa, jejíž funkcí je přeměna molekulárního kyslíku na reaktivní formy

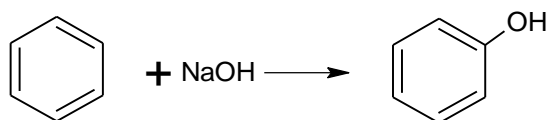
Oxidace xenobiotik systémem obsahujícím cytochrom P450 je mnohostupňový proces, jehož jednotlivé reakční kroky znázorňuje **Obr. 5**. V klidovém stavu je v hemu železo trojmocné a látka se naváže blízko hemu. Poté dochází k redukci železa na dvojmocné, které je schopno vázat O₂. Přenos druhého elektronu a změna valence železa redukuje navázaný kyslík na peroxidový anion. Hydroxylový ion je rozložen v intermediárním stavu, příjem protonu dá vznik H₂O a reaktivní formě kyslíku. Aktivované kyslíkové agens vstupuje do C-H vazby substrátu, a tím hydroxyluje substrát. Disociací produktu enzymové reakce se enzym vrací do původního stavu ^[13].



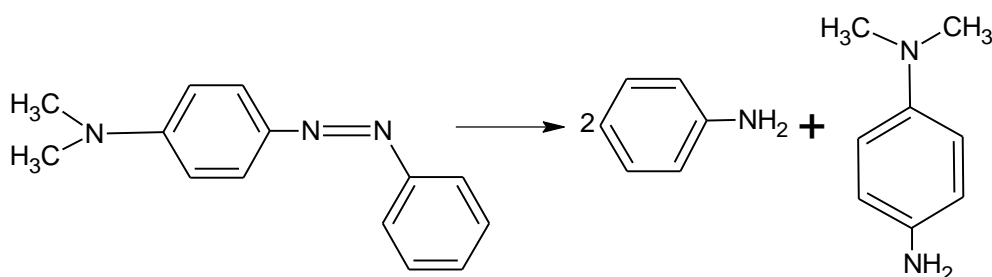
Obr. 5 Aktivace kyslíku cytochromem P450 a oxidace (hydroxylace) substrátu na polárnější produkt^[13].

Enzymy katalyzující derivatizační reakce xenobiotik (1. fáze biotransformace) lze rozdělit na enzymy ^[12]:

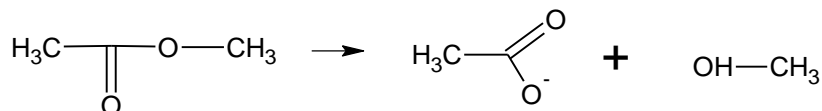
- **oxidační** (hydroxylační), které vnášejí do cizorodých látek polárnější hydroxylové skupiny



- **redukční**, které rovněž vedou k tvorbě hydrofilnějšího produktu



- **hydrolytické**, které xenobiotikum hydrolyzují, čímž demaskují polární skupiny



3.3.2. Druhá fáze biotransformace

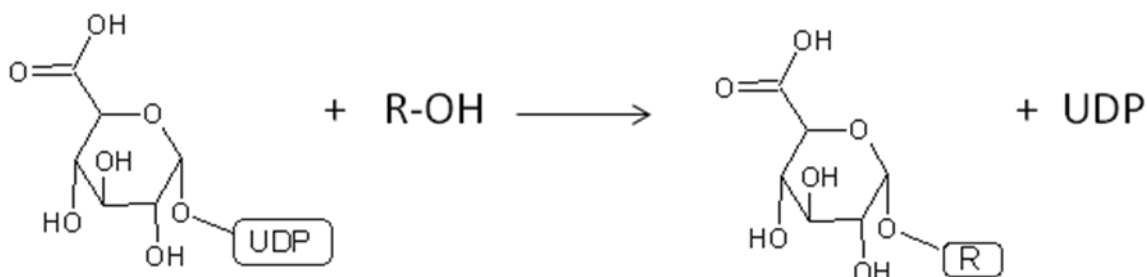
V druhé fázi biotransformace (konjugační) dochází ke konjugaci polárnějších molekul s endogenními látkami (kyselina glukuronová, glycin, aktivní sulfát atd.). Tedy na funkční skupiny utvořené v derivatizační fázi jsou vázány malé hydrofilní molekuly, které ještě více zvyšují polaritu původně hydrofobní molekuly a lépe tak usnadní její vyloučení z organismu ^[12].

Typy konjugačních reakcí:

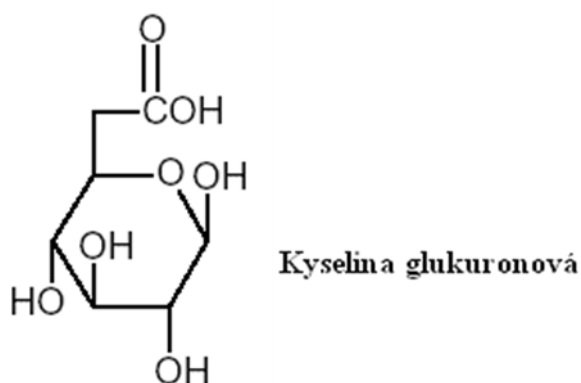
- glukuronidace
- konjugace s aktivním sulfátem
- konjugace s glutathionem
- konjugace s aminokyselinami
- acetylace

Reakce první fáze biotransformace probíhají enzymovými systémy v mikrozomech (částicích vzniklých degradací endoplazmatického retikula), konjugační reakce druhé fáze probíhají také v cytoplasmě ^[12]. Konjugační reakce xenobiotika s kyselinou UDP – glukuronovou je uvedena na **Obr. 6**.

UDP-glukuronová kyselina



Enzym: UDP-glukuronosyltransferáza



Obr. 6 Konjugace s kyselinou glukuronovou ^[13].

4. Protinádorová léčiva v nádorové chemoterapii

Látky, které se používají spolu s dalšími terapeutickými postupy (chirurgický zákrok, radioterapie) k léčbě nádorových onemocnění se označují jako protinádorová léčiva nebo také **cytostatika**. Cílem cytostatické léčby je zajistit optimální farmakoterapeutický účinek při minimální toxicitě vůči zdravé tkáni, vedoucí ke zpomalení nebo zastavení růstu nádorových buněk ^[14].

Cytostatika, získaná z přírodních zdrojů nebo připravená uměle, zasahují do jedné nebo více fází rozmnožování buněk, do tzv. buněčného cyklu. Znalost kinetiky buněčného dělení je základním předpokladem správného používání současně dostupných cytostatik, která působí

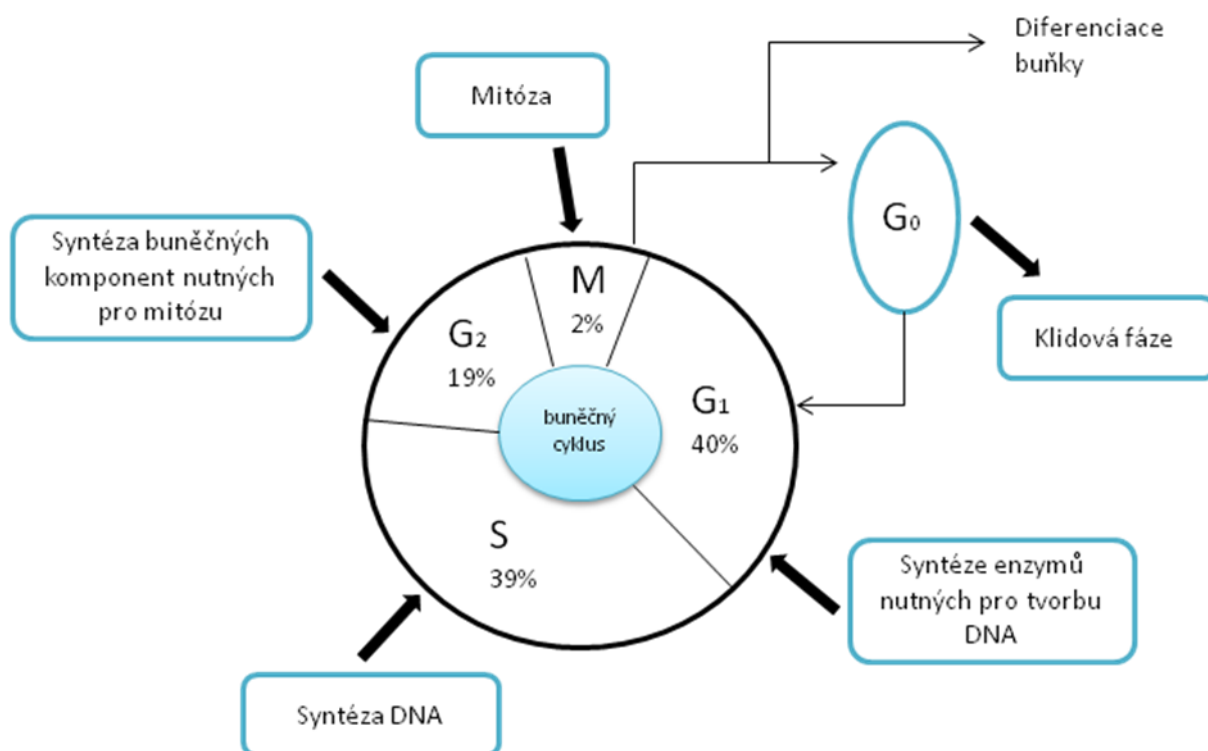
především na dělicí se buňky ^[4]. Proto cytotoxické látky dobře působí na buněčné dělení nádorových buněk, ale také na buňky tkání, ve kterých toto rychlé dělení probíhá. Příkladem takových tkání může být **kostní dřeň**, kde se tvoří nové krvinky, nahrazující buňky odumírající. Proto protinádorové léky často narušují tvorbu červených i bílých krvinek, a vyvolávají tak řadu vedlejších účinků (anémii, únavu, zvýšenou náchylnost vůči infekcím). Také **tkáň vlasových folikulů**, kde se buňky dělí velmi rychle a protinádorové léky mohou jejich dělení zastavit, dojde ke ztrátě vlasů. Růst vlasů se však obvykle po „vysazení“ léku obnoví ^[5].

Kromě poškození kostní dřene a tkáně vlasových folikulů se setkáváme i s jinými toxickými účinky cytostatik, jakými jsou např. poškození myokardu (kardiotoxické účinky) ^[15]. Dalšími častými nežádoucími účinky, které jsou společné pro většinu protinádorových látek, bývají zvracení, stomatitida, vzestup hladiny kyseliny močové a riziko ledviného selhání. Tyto příznaky jsou přechodné, zatímco poškození myokardu je trvalé. Ke zmírnění nežádoucích účinků se používají různé postupy, jako podávání antiemetik, antiuratik, antibiotik k zabránění infekce aj. K zotavení funkce kostní dřene se podávají růstové faktory nebo se před chemoterapií odejme část kostní dřene a po terapii se vrátí (po případné úpravě) ^[15]. Toto toxické působení cytostatik často omezuje jejich další použití.

4.1. Cyklus buněčného dělení

Všechny buňky, bez ohledu na jejich rychlost růstu mají podobné schéma buněčného dělení. Jedná se o soubor specifických, za sebou probíhajících dějů, jejichž vyvrcholením je rozdělení mateřské buňky na dvě buňky dceřinné. Nejdříve v buňce dochází k syntéze DNA a k reprodukci genomu – **S fáze** neboli syntetická fáze. Vlastní dělení buňky probíhá v mitotické fázi – **M fáze**. Mezi S a M fázemi se nacházejí vymezené fáze, kdy se buňka připravuje pro následující krok buněčného cyklu. **G₁ fáze** předchází fázi S a po ní následuje **fáze G₂**, která předchází fázi M. Po mitóze následuje fáze G₁ nebo fáze proliferačního klidu **G₀**, ze které může buňka přejít do fáze G₁. Například některé buňky mohou dlouhodobě setrvat ve fázi G₀, a teprve po relativně dlouhé době mohou opět vstoupit do cyklu buněčného dělení (**Obr. 7**).

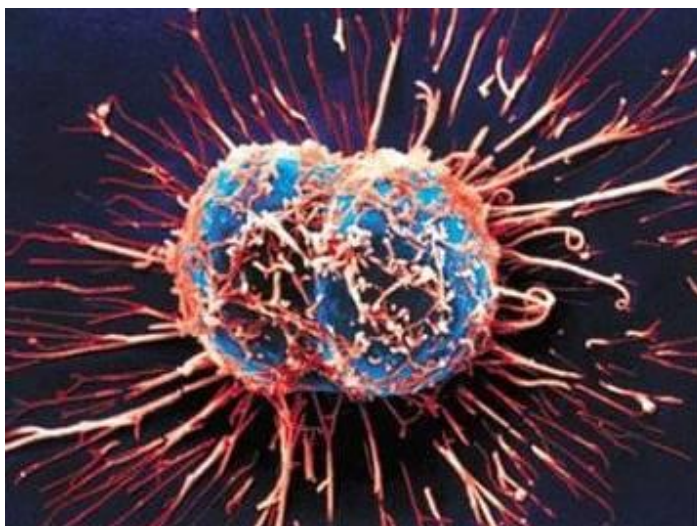
Na přechodu buňky z jedné fáze do druhé se podílejí různé buněčné komponenty, které jsou postupně aktivovány a inaktivovány ^[15].



Obr. 7 Stadia cyklu buněčného dělení ^[15].

Většina protinádorových chemoterapeutik specificky ovlivňuje procesy, jako jsou syntéza DNA nebo tvorba mitotického vřeténka, jeho stav a funkce. Cytostatika lze rozdělit na dvě skupiny podle toho, zda působí na buňky v určité specifické fázi buněčného dělení – **cytostatika účinná pouze v některé fázi buněčného cyklu**, jako jsou cytosin arabinosid nebo methotrexat, nebo na buňky v celém průběhu jejich buněčného dělení – **cytostatika účinná v průběhu celého cyklu**, jako jsou alkylační činidla. Tato druhá skupina látek je užitečná také u nádorů s velmi malým počtem dělících se buněk ^[15].

I přesto, že výběr protinádorových léčiv je velmi rozmanitý a bohatý v klinické praxi se nedaří těmito léky nádorové buňky zcela zničit. To je způsobeno tím, jak již je zmíněno výše, že cytostatika působí pouze na buňky proliferující, nikoliv na buňky klidové. V rostoucím nádoru, a ve značné míře v nádoru pokročilém, přibývá buněk ve fázi G₀, necitlivých k chemoterapii. A dále neselektivním účinkem cytostatik ^[4]. Dělení rakovinné buňky je znázorněno na **Obr. 8**.



Obr. 8 Dělení rakovinné buňky (snímek pořízen elektronovou mikroskopií) ^[7].

4.2. Rezistence nádorových buněk k cytostatikům

Protinádorové látky jsou toxiny, které představují nebezpečí pro všechny živé buňky. Není proto překvapující, že si buňky vytvořily obranné mechanismy vůči těmto látkám. V praxi rozlišujeme primární rezistenci, tedy nedostatečnou odpověď na první chemoterapeutickou léčbu, a sekundární rezistenci, získanou předchozí léčbou, která vyžaduje změnu léčebné strategie ^[14]. Mechanismus vzniku rezistence k různým cytostatikům zahrnuje expresi genů, které umožňují inaktivaci nebo eliminaci toxických látek z buňky. Kromě zvýšené eliminace látek se na vzniku rezistence mohou podílet i zvýšená koncentrace cílových enzymů, snížené požadavky specifických metabolických produktů, snížení počtu receptorů pro látky a ještě řada dalších dosud neobjasněných mechanismů. Mechanismy zodpovědné za vznik rezistence k cytostatikům se mohou podílet na ochraně normálních buněk před působením cytotoxických látek ^[15].

4.2.1. Mnohačetná látková rezistence

Překonání rezistence vůči chemoterapii je dnes v popředí zájmu klinického i experimentálního výzkumu. Nejvíce pozornosti se věnuje tzv. mnohačetné látkové rezistenci (MDR = multiple drug resistance). Jedná se o druh rezistence společné pro různá, strukturně odlišná cytostatika, jehož příčinou je nahromadění zvláštního fosfoglykoproteinu (P-glykoprotein) v buněčné membráně nádorových buněk. P-glykoprotein slouží jako membránový transportér pro mnoho látek, jehož funkce je závislá na ATP. Tento protein „odčerpává“ cytostatika z buňky, čímž snižuje jejich potřebnou koncentraci v nádorových buňkách a eliminuje tím jejich toxické působení. P-glykoprotein je produktem exprese zvláštního genu, který je lokalizován na 7. chromozomu (MDR-gen).

Působení tohoto fosfoglykoproteinu vyvolává nutnost zvýšení dávek cytostatik, čímž dochází k poškození i normálních tkání, které je nutné různými zásahy ochraňovat (transplantace kostní dřeně aj.)^[15,4].

4.3. Vývoj nových léčiv

K optimálnímu účinku cytostatik směřuje vývoj nové generace léčiv, která nepoškozují genetickou informaci buňky (DNA), ale zasahují do regulačních a signálních proteinů. Změna genomu, způsobená kancerogenesí, vede k produkci aberantních a fúzních molekul RNA a jimi kódovaných proteinů. Proto jsou vyvíjena léčiva jejichž úkolem je zasáhnout jeden určitý protein s cílem poškodit zásadním způsobem nádorové buňky a způsobit minimální nežádoucí účinky. Tento nový způsob léčby v kombinaci s klasickou chemoterapií, označovaný jako **cílená léčba rakoviny**, představuje velký pokrok v onkologické léčbě^[14].

První lék, umožňující cílovou léčbu, byl uveden do klinické praxe v roce 2000. Od té doby jich byla připravena celá řada. Ale i tato léčba má svá omezení, lze ji použít jen u pacientů, které mají takové genetické předpoklady, aby byla cílená léčba účinná. Úspěšnost cílené léčby tedy vyžaduje předběžné vyšetření různých molekulárních a genetických předpokladů pacienta. Také samotná léčba je finančně velmi náročná. Je-li u pacienta prokázána jako neúčinná, není lékaři doporučována. Aplikace cílené léčby je podobná léčbě s klasickými cytostatiky, aplikuje se buď nitrožilně nebo perorálně^[16].

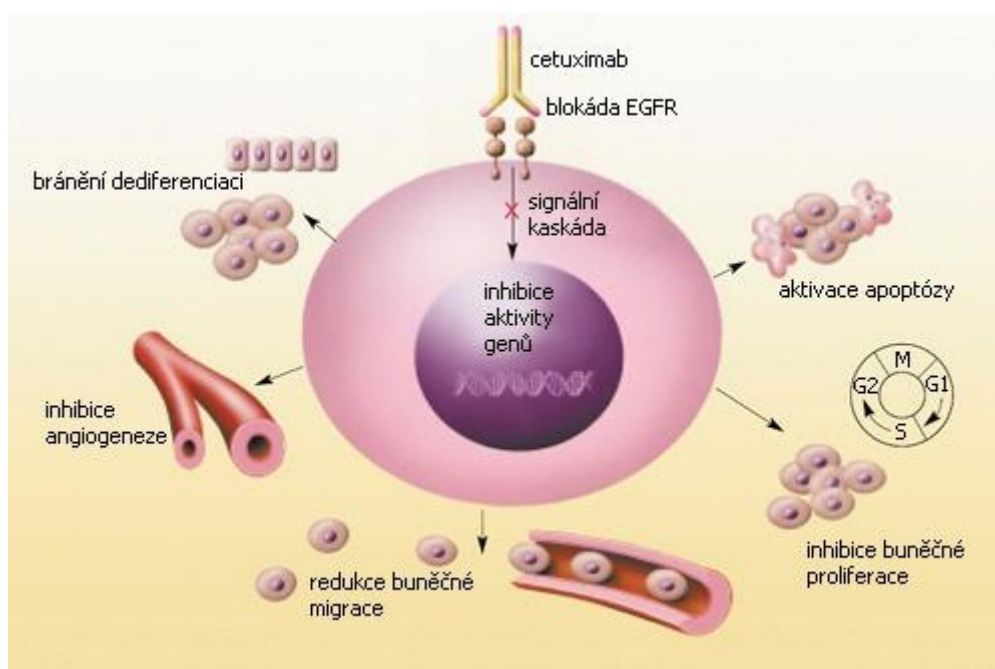
Velmi úspěšná je tato metoda zejména při léčbě rakoviny tlustého střeva, prsu, vaječníku, ledvin či u chronické myeloidní leukémie. Poměrně nejméně pokroků bylo získáno v léčbě karcinomu plic. Celková doba přežití nemocných se při léčbě sice prodloužila, ale

celkem bezvýznamně o několik týdnů, a řada pacientů je postižena takovými nežádoucími účinky, že velmi zhoršují kvalitu jejich života ^[16].

Velkou předností cílené léčby je její schopnost postihnout vedle nádorových buněk i buňky, které se mohou podílet na rozvoji a metastázování nádoru – fibroblasty, různé typy krvinek, cévy. V současnosti se pracuje na zdokonalení postupu cílené léčby a přípravě preparátu, který by byl účinný i u pacientů s genetickou poruchou ^[14,16].

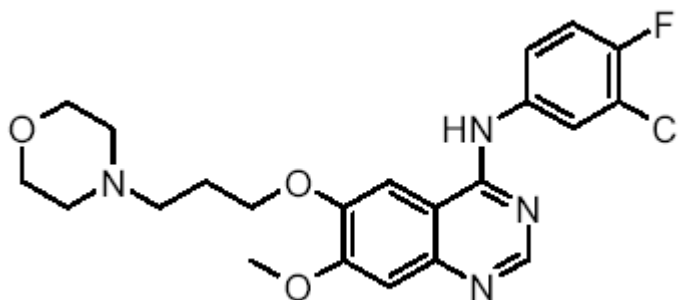
V současnosti se koncipují dvě skupiny těchto léčiv: **monoklonální protilátky** proti určitému proteinovému cíli a **léčiva o malé molekulové hmotnosti** („small drugs“), která jsou schopna „zablokovat“ aktivní centrum některého z regulačně důležitého enzymu ^[14].

Příkladem monoklonální protilátky je **cetuximab**, která se kompetitivně váže na extracelulární doménu receptoru EGFR a blokuje vazbu možných aktivátorů. Brání tím transdukcii signálu a odstartování kaskády dějů, které vedou k aktivaci onkogenu a následně způsobí růst nádoru (**Obr. 9**) ^[14].



Obr. 9 Působení monoklonální protilátky cetuximab na receptor EGFR ^[17].

Intracelulární doménu receptoru EGFR a její tyrozinkinázovou aktivitu lze „blokovat“ „malými molekulami“ látek, které se naváží na vazebné místo pro makroergický fosfát. „Blokáda“ fosforylace znamená „blokádu“ přenosu signálu ^[14]. Mezi blokátory tyrozinkinázy patří např. **gefitinib**, jehož struktura je znázorněna na **Obr. 10**.



Obr. 10 Strukturní vzorec léčiva gefitinibu ^[18].

5. Skupiny cytostatik, tříděné podle jejich mechanismu účinku

U látek s protinádorovými účinky bylo prokázáno, že většinou ovlivňují strukturu nebo funkci DNA. Protinádorová chemoterapeutika interakcí s DNA nebo jejich prekursory vede k inhibici syntézy nového genetického materiálu nebo k nenapravitelným změnám samotných DNA. V poslední době se zavádějí látky s dalšími mechanismy účinku, které např. ovlivňují diferenciaci nádorových buněk nebo stimulují imunologické procesy, které pomáhají usmrtit nádorové buňky. Pro praxi je velmi užitečná klasifikace cytostatik podle mechanismu jejich působení. Mezi základní mechanismy účinku protinádorových chemoterapeutik patří:

- A. inhibice biosyntézy prekurzorů a nukleových kyselin (skupina antimetabolitů),
- B. přímé poškození struktury již biosyntetizovaných nukleových kyselin (alkylace, interkalace, rozštěpení DNA),
- C. poškození mikrotubulárního proteinu, jež má za následek abnormální průběh mitózy a její blokádu v metafázi (antimitotika),
- D. látky s kombinovanými a dalšími účinky (stimulace diferenciacce buněk, apoptózy)

[15]

5.1. Antimetabolity

Jako antimetabolity se označují látky, které jsou strukturně podobné přirozeným substrátům pro tvorbu nukleosidů, nukleotidů a dalších buněčných komponent, jejichž včleněním do nukleových kyselin se vytvořené nukleové kyseliny stávají nefunkčními. Mají tedy inhibiční účinek na tvorbu těchto životně důležitých látek nebo blokují enzymy, které umožňují tvorbu základních stavebních kamenů nukleových kyselin. Jejich maximální cytotoxický účinek je v S-fázi buněčného cyklu. Antimetabolity nezpůsobují sekundární nádory, poškození myokardu a jiných orgánů a pro dlouhodobé užívání se jeví jako málo toxické a téměř ideální cytostatika ^[15].

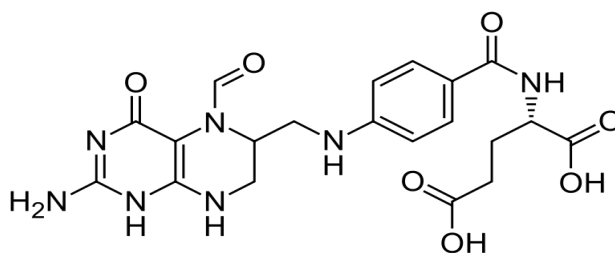
Antimetabolity se rozdělují na analogy kyseliny listové, analogy purinu, deriváty pyrimidinu, a nepřímo sem patří i inhibitory ribonukleotidraduktázy, které mají účinky podobné jako antimetabolity ^[15].

5.1.1. Analogy kyseliny listové (antifolika)

Fyziologický význam kyseliny listové je v její funkci jako „koenzymu F“ při přenášení jednouhlíkatých zbytků. Koenzymem se stává až po redukci ve dvoustupňové reakci pomocí enzymu folátreduktázy, kdy postupně vzniká kyselina dihydrolistová (FH₂) a z ní dále kyselina tetrahydrolistová (FH₄). Jejím důležitým funkčním derivátem je kyselina formyltetrahydrolistová, označována také jako **leukovorin** ^[15].

Inhibice folátreduktázy vede k toxicitě, která je způsobena úbytkem kofaktorů nutných k syntéze purinů a dTMP sloužící jako esenciální komponenta pro vznik DNA.

Hlavním představitelem antifolik je **metotrexat**, který blokuje folátreduktázu a brání tím vzniku FH₄, což se projeví poruchou syntézy kyseliny thymidylové, purinů, thyminu a dalšími metabolickými změnami ^[15].



Obr. 11 Strukturní vzorec leukovorinu (kyseliny folinové) ^[19].

5.1.2. Analogy purinů (antimetabolity purinů)

Hlavními představiteli této skupiny jsou **6-merkaptopurin** a **6-thioguanin**, které jsou analogy hypoxanthinu, resp. guaninu. Základem jejich účinku je inhibice tvorby nukleotidů a následně i nukleových kyselin. Analogy purinů se stávají účinnými až po metabolické přeměně na mononukleotidy, tedy jejich podáním probíhá tzv. letální syntéza účinných produktů, které slouží jako substráty pro vznik dalších metabolitů nebo mohou inhibovat některé důležité metabolické enzymy. Vytváří se nefunkční nukleové kyseliny, které neumožňují přepis a následně tvorbu funkčních proteinů ^[15].

5.1.3. Analogy pyrimidinů

Do této skupiny antimetabolitů patří mnoho různých látek, ale jako protinádorová chemoterapeutika našly uplatnění především fluoropyrimidiny a cytosinarabinosid. Mezi jejich zástupce patří **5-fluorouracil**, který blokuje syntézu kyseliny thymidylové, a tím i syntézu DNA. Podmínkou jeho účinku je jeho konverze na mononukleotid. Podobné účinky má i **5-fluorodeoxyuridin** ^[15].

5.1.4. Inhibitory ribonukleotidreduktázy

Látky řazené do této skupiny nepatří mezi antimetabolity, ale důsledky jejich působení jsou stejné jako u těchto látek, tedy snížení tvorby deoxyribonukleotidů. Hlavním zástupcem je **hydroxyurea**, která blokadou ribonukleotidreduktázy znemožňuje tvorbu deoxynukleotidů nutných k syntéze DNA. Působí v S-fázi buněčného cyklu a používá se k léčbě chronické myeloidní leukémie a v kombinaci s dalšími cytostatiky, při léčbě melanomu a dalších nádorů ^[15].

5.2. Alkylační látky

Alkylační látky patří k nejdéle používaným cytostatikům. Jedná se o látky s různou chemickou strukturou, ale stejným mechanismem účinku. V jejich molekule jsou skupiny, které se stávají metabolickou změnou vysoce reaktivní. Tyto skupiny pak reagují s nukleofilními centry molekul a vytvářejí s nimi kovalentní vazby. Vysoce účinné alkylační činidla modifikují DNA jak maligních, tak normálních buněk (kostní dřeň, trávicí trakt), což

vede k jejich poškození až jejich smrti. Nejdéle známou alkylační látkou je **dusíkatý yperit** (bis-beta-chlorethylamin) ^[15].

Alkylační činidla jsou dosti toxická a patří i mezi látky s teratogenními a kancerogenními účinky (mohou vést ke vzniku sekundárních nádorů).

Mezi nejčastěji užívané alkylační látky patří beta-chlorethylaminy, ethyleniminy, deriváty platiny, estery sulfonových kyselin, thiotepa, oxasafosforiny, alkylační deriváty močoviny a antibiotika s alkylačním účinkem ^[15].

5.3. Interkalační látky a inhibitory topoizomeráz

Tyto látky, které jsou látkami nekovalentně interagujícími s DNA. Interagují s DNA buď interkalací nebo inhibicí topoizomeráz a vedou k rozštěpení DNA řetězců. Jsou často přirozenými produkty a souhrně se označují jako antibiotika. Výsledkem interkalace, tedy „vmezeření“ se cytostatika mezi páry bazí DNA, je následná inhibice replikace a transkripce, které vedou k cytotoxickým účinkům. Některé z interkalačních látek také inhibují topoizomerázy, a tím přispívají k protinádorovému působení některých cytostatik. Existují však i látky, jejichž primárním účinkem je inhibice těchto enzymů ^[15].

5.3.1. Skupiny látek s interkalačními účinky

5.3.1.1. Antracyklinová antibiotika

Antracyklinová antibiotika patří mezi jedny z nejdůležitějších protinádorových látek. Cytotoxický účinek antracyklinů je dán jejich interkalací, a inhibicí topoizomerázy II. Dále pak tvorbou kyslíkových radikálů. Antracykliny obsahují ve své molekule hydroxychinon, který je chelátorem železa. Komplex látka-železo-DNA katalyzuje přenos elektronu z glutathionu na kyslík, což vede k vytvoření aktivních kyslíkových radikálů, které mají na buňky destruktivní účinky. Způsobují peroxidaci lipidů, poškozují myokard a podmiňují tak kardiotoxicitu. Typické jsou změny subcelulární struktury, pomalé ztrátě myofibril a vakuolizace buněk ^[15].

U solidních nádorů se především používá **doxorubicin** a při léčbě leukémií **daunorubicin**. Všechny tyto látky obsahují čtyřčlenné antracyklinové jádro, které je připojeno k molekule cukru.

5.3.1.2. Deriváty antracendionu

Tyto látky jsou analogy antracyklinů, ale neobsahují cukernou složku. Mají přesto schopnost interkalace, ale nevedou k tvorbě volných radikálů. To má za následek dobrý protinádorový účinek, ale s nižším poškozením myokardu než při použití antracyklinů. U akutní leukémie a některých solidních nádorů se používá **mitoxantron** ^[15].

5.3.1.3. Aktinomyciny

Jedná se o chromopeptidy, které se od sebe liší počtem a druhem aminokyselin. Jejich cytotoxické účinky jsou závislé na vazbě látek na dvoušroubovici DNA. Tím je zablokována transkripce DNA ^[15].

5.3.2. Inhibitory topoizomeráz

5.3.2.1. Inhibitory topoizomerázy I

Mezi inhibitory topoizomerázy I se řadí dvě léčiva, která jsou polosyntetickými hydrofilními deriváty kaptotecinu. **Topotekan** působí synergisticky s inhibitory topoizomerázy II a je silným inhibitorem topoizomerázy I a **irinotekan**, který se používá u sarkomů měkkých částí a maligního lymfomu ^[15].

5.3.2.2. Inhibitory topoizomerázy II

Mezi tuto skupinu látek patří polysyntetické deriváty epipodofylotoxinu, jejichž základní mechanismus protinádorového účinku spočívá v inhibici topoizomerázy II. Inhibice tohoto enzymu vede ke štěpení dvoušroubovice DNA na fragmenty, které se nespojují ve funkční DNA řetězce. Tyto látky, mezi než patří **etoposid** a **teniposid**, působí především v S a G₂ fázi buněčného cyklu ^[15].

5.4. Radiomimetika

Jako radiomimetika se označují antibiotika polypeptidové povahy, která, podobně jako ionizující záření, rozštěpují molekuly DNA. Inhibují především syntézu DNA, zatímco syntéza RNA a proteinů je ovlivněna podstatně méně. Působí v počátku G₂ fáze buněčného

cyklu. Mezi hlavní představitele těchto antibiotik patří **bleomycin**, který má dvě aktivní části molekuly. Jedna část se váže na DNA a druhá část na železo. Jeho působením vznikají toxické volné kyslíkové radikály.

Na rozdíl od jiných cytostatik vykazují radiomimetika jen nízkou toxicitu na kostní dřeň a používají se především k léčbě testikulárních nádorů a nádorů kůže ^[15].

5.5. Inhibitory mitózy

Porušení procesu mitózy je velmi důležitým mechanismem inhibice nádorového růstu. Mikrotubuly jsou proteinové polymery, které jsou zodpovědné nejen za tvar i pohyb buněk, ale i za funkci dělicího vřeténka, které při mitóze zajišťuje správný pohyb chromozomů k pólům dělicí se buňky. Látky s tímto mechanismem cytotoxického účinku se často označují jako mitotické jedy a působí v M-fázi buněčného cyklu ^[15].

Tímto mechanismem působí dva typy látek **vinca-alkaloidy** (vinblastin), které brání vytvoření dělicího vřeténka tím, že inhibují přeměnu tubulinu v mikrotubuly a **taxany** (docetaxel), které brání dezintegraci dělicího vřeténka na tubulin ^[15].

5.6. Látky s různými mechanismy účinku

5.6.1. Inhibitory proteosyntézy

Většina inhibitorů syntézy proteinů je natolik toxická, že je nelze terapeuticky využít. Jen několik látek má terapeutické uplatnění, mezi které patří **L-aspargináza**. Aspargináza způsobuje nedostatek aminokyseliny L-asparginu jeho přeměnou na kyselinu asparagovou a amoniak. Úbytek této aminokyseliny omezuje růst těch buněk, které jsou závislé na její přítomnosti. Aspargináza se používá především u akutních lymfoblastických leukémií a lymfomů lymfoblastického typu ^[15].

5.6.2. Imunomodulační léčiva

V poslední době se ukázalo, že některá léčiva ovlivňující imunitu pacientů, mohou mít příznivé účinky u některých nádorových onemocnění. Dobré účinky byly prokázány u **interferonů**, jejichž mechanismus účinku je velmi komplexní a kromě antivirového působení mohou interferony také přispívat ke vzniku virové rezistence, ale především k inhibici

proteosyntézy. Interferon α má antiproliferační a další účinky a jako protinádorový lék se používá u chronické myelodní leukémie ^[15].

Aldesleukin (interleukin 2) se také řadí mezi imunomodulační léčiva, jehož hlavním účinkem je zmnožení cytotoxických T-lymfocytů a stimulace tvorby některých cytokinů. Používá se u metastázujícího adenokarcinomu ledvin a u maligního melanomu ^[15].

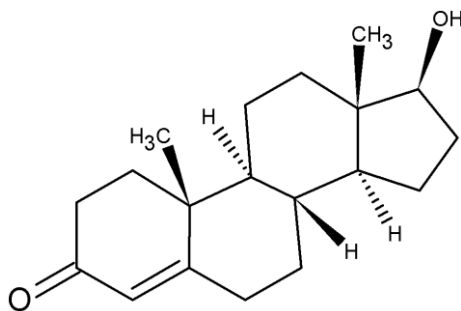
5.7. Hormony a jejich antagonisté

Růst některých nádorů je závislý na přítomnosti steroidních hormonů, které působí prostřednictvím cytoplasmatických receptorů. Steroidní hormony se vážou na receptorové proteiny v nádorových buňkách a míra odpovědi buňky na hormonální léčbu závisí na obsahu receptorů v buňce. V určitých typech nádorových buněk byly nalezeny receptory selektivní pro estrogény, gestageny, androgeny nebo kortikoidy ^[15].

U hormonálně dependentních nádorů, které mají příslušné receptory, lze podáním **agonistů** utlumit růst nádorů podmíněných nadbytkem jiných hormonů (např. útlum růstu karcinomu prostaty podáním estrogenů) nebo podáním **antagonistů** hormonů blokovat účinek toho hormonu, který je zodpovědný za nádorový růst.

Příkladem hormonů, které se používají při léčbě jak karcinomu prsu, tak karcinomu prostaty jsou **estrogeny** (diethylstilbestrol). Hormonálním antagonistou estrogenů jsou **antiestrogeny** (tamoxifen), látky nesteroidní povahy, které brání vazbě receptorů na specifické receptory ^[15].

Další skupinou hormonů, které se používají k terapii nádorů prsu patří **androgeny** (testosteron), ale k dlouhodobé terapii nejsou příliš vhodné. Antagonisté androgenů, **antiandrogeny**, brání vazbě mužských pohlavních hormonů na specifické cytoplasmatické receptory nebo jiným mechanismem ruší účinky androgenů. Podávají se jako alternativa místo estrogenů při léčbě karcinomu prostaty ^[15]. Strukturu androgenu, testosteronu, znázorňuje **Obr. 12**.



Obr. 12 *Strukturální vzorec testosteronu.* ^[20]

6. Ellipticin a jeho působení

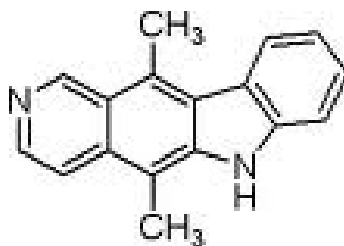
Ellipticin (5,11-dimethyl-6*H*-pyrido[4,3-*b*]karbazol), alkaloid izolovaný z rostlin čeledi *Apocyanaceae* (*Ochrosia borbonica*, *Excavatia coccinea*), a některé jeho deriváty vykazují významnou protinádorovou aktivitu. Účinně také působí proti viru HIV. Tato sloučenina je jednou z nejjednodušších přírodně působících alkaloidů mající planární strukturu. Poprvé byla izolována v roce 1959 z listů malého, tropického, stále zeleného stromu *Ochrosia elliptica* rostoucího v Austrálii, Madagascaru, Havaii, a dalších ostrovech v Tichém oceánu ^[21]. Biologické působení ellipticinu bylo objeveno až v roce 1967, kdy se podařilo ellipticin uměle syntetizovat ^[22].



Obr. 13 *Ochrosia eliiptica* (plody) ^[23].

Ellipticin a jeho polárnější deriváty (9-hydroxyellipticin, 9-hydroxy-*N*²-methylellipticin, 9-chloro-*N*²-methylellipticin a 9-metoxy-*N*²-methylellipticin) jsou užívány zejména k léčení pokročilého karcinomu prsu s kostními metastázami, akutní myeloblastické leukemie, sarkomů ledvin a nádorů štítné žlázy ^[21]. Důvody zájmu o klinické využití ellipticinu a jeho derivátů je jejich vysoká účinnost proti různým typům nádorových onemocnění (ellipticin je cytotoxický vůči nádorovým buňkám již v koncentracích řádově rovných 0,1-1mM), jejich relativně nízké vedlejší toxické účinky a prakticky nulová hematologická toxicita. Limitující toxicitou je xerostomie (suchost v ústech), která může vyvolávat další nežádoucí účinky (anorexie) a až na nefrotoxicitu, jsou vedlejší toxické účinky ellipticinu minimální. Ellipticin a jeho 9-hydroxyderivát jsou silnými mutageny vykazujícími mutagenní aktivitu vůči

kmenům *Salmonella typhimurium*, *Neurospora crassa*, *Escherichia coli* a jsou mutagenní i vůči savčím buňkám [2, 21].



Obr. 14 *Struktura ellipticinu.* [24].

6.1. Mechanismus nespécifického účinku ellipticinu

Ellipticiny patří do skupiny protinádorových léčiv, jejichž mechanismus účinku není ještě přesně znám. Předpokládá se, že hlavními mechanismy protinádorového účinku jsou:

- ✓ interkalace do dvoušroubovicové struktury DNA, která vyplývá z velikosti a tvaru molekuly ellipticinu
- ✓ jeho působení jako inhibitor topoisomerazy II
- ✓ inhibice fosforylace proteinu p53
- ✓ inhibice oxidační fosforylace v mitochondriích
- ✓ inhibice telomerazy
- ✓ inhibice DNA helikazy

Velikost a tvar molekuly ellipticinu se podobá komplementárnímu páru purinové a pyrimidové báze, což poskytuje příznivé podmínky pro jeho interkalaci do dvoušroubovicové struktury DNA. Interkalace ellipticinu je způsobena slabými reverzibilními hydrofobními interakcemi mezi spárovanými bázemi molekuly DNA. Interakce mezi methylovou skupinou ellipticinu a thyminem v interkalačním místě je určující pro orientaci této sloučeniny v DNA. Z tohoto důvodu slouží ellipticin, který má také fluorescenční vlastnosti, jako modelová sloučenina v řadě studií řešících obecné principy interkalace [25]. Působení ellipticinu jako inhibitoru topoisomerazy II je stále předmětem intenzivního výzkumu. Ellipticin, oproti jiným inhibitorům topoisomerazy II, interaguje buď s molekulou DNA nebo s proteinem topoisomerazy II za tvorby ternárního komplexu. Vzniklý ternární komplex, který je katalyticky inaktivní, pak vede ke stimulaci tvorby řetězových zlomů v DNA [25].

Dalšími mechanismy protinádorového působení elliptycinu mohou být inhibice oxidační fosforylace, která vede k drastickému snížení ATP v buňkách a následně k jejich zániku. Ellipticin a 9-hydroxyellipticin také způsobují selektivní inhibici fosforylace produktu tumor supresorového genu, proteinu p53. Inhibice fosforylace tohoto proteinu je pravděpodobně způsobena inhibicí specifické cyklin-dependentní kinazy. Nahromadění defosforylovaného proteinu p53 může vést k indukci apoptózy ^[25].

6.2. Mechanismus specifického účinku elliptycinu

Uvedené mechanismy protinádorové aktivity elliptycinů jsou založeny na nespecifickém působení. Tedy interkalují do DNA buněk nádorových i zdravých a inhibice topoisomerasy II rovněž probíhá ve všech buňkách bez ohledu na jejich zdravotní stav. Tato skutečnost však kontrastuje s poměrně úzkou specifitou účinku elliptycinů vůči nádorovým onemocněním. Jsou specifické pouze k určitým typům neoplasie a lze také pozorovat jejich individuální variabilitu v odpovědi pacientů na podané léčivo. Účinek elliptycinů je tedy specifický i pro individuální pacienty. Specifické působení elliptycinů s vysokou efektivitou proti nádorovým buňkám tedy napovídá, že ellipticin působí i jiným principem ^[25]. Tento předpoklad je potvrzen dalšími studiemi v laboratoři, kde byla vypracována předkládaná bakalářská práce.

Zvláštnost chemoterapeutického účinku elliptycinů a jejich selektivní odpovědi na podané léčivo může spočívat v odlišné enzymové výbavě lidského organismu. Takovéto enzymy, exprimované v cílových nádorových buňkách (nádory prsu a leukemické buňky), mohou být důležité pro biotransformaci elliptycinů, kdy mohou léčivo aktivovat na terapeuticky účinnější derivát, který pak nádorové buňky efektivněji poškozuje či úplně zlikviduje. V buňkách lidských prsních nádorů jsou exprimovány cytochromy P450 1A1, 2B6, 2E1 a 3A4, laktoperoxidasa a prostaglandin H syntetasa ^[25]. V leukemických buňkách je exprimována jiná peroxidasa, myeloperoxidasa. Prostaglandin H syntetasa je přítomna také v ledvinách a nádorech mozku (např. COX-2). Uvedené enzymy jsou ve vysoké míře exprimovány v nádorech citlivých na léčbu ellipticinem. Působením těchto enzymů je ellipticin aktivován na metabolity, které vytvářejí kovalentní adukty s DNA, a tím efektivněji poškozují nádorové buňky ^[2]. Na základě těchto faktů, může ellipticin představovat farmakologicky efektivní léčivo, jehož účinek záleží na cytochromu P450 a peroxidasami zprostředkované aktivaci v cílových tkáních ^[21].

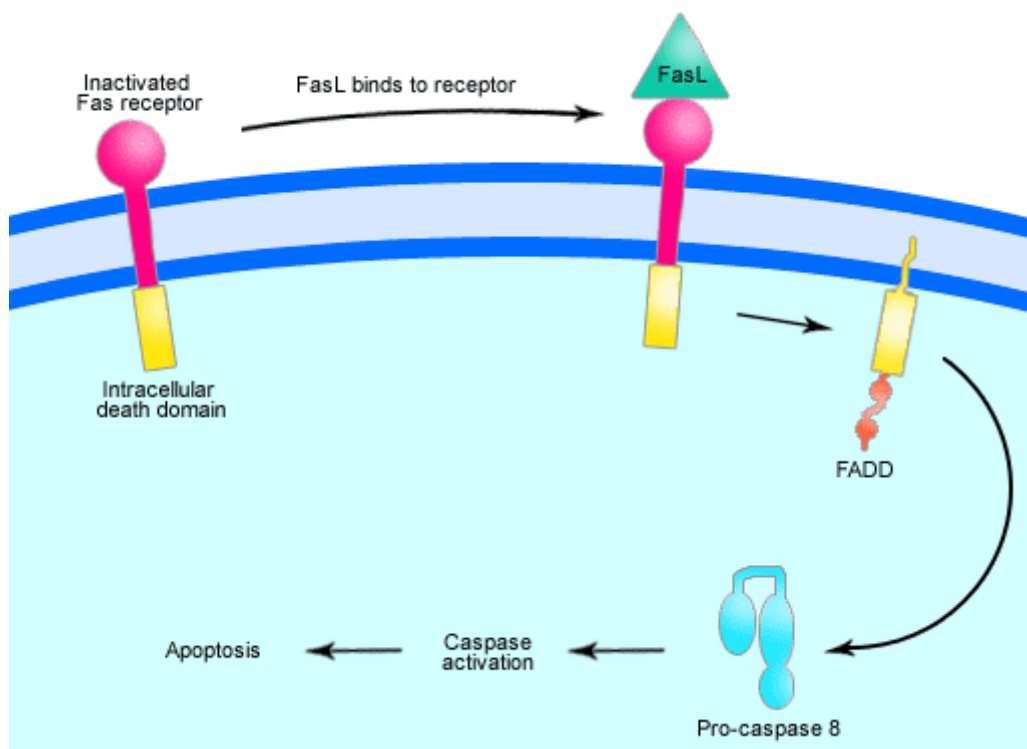
6.2.1. Mechanismus ellipticinu indukující apoptózu a zastavení buněčného cyklu MCF-7 buněk

Ellipticin zastavuje průběh buněčného cyklu regulací exprese cyklinu B1 a Cdc2 a fosforylací Cdc2, **navozuje apoptickou buněčnou smrt** vytvářením volných radikálů, aktivací Fas/Fas ligandového systému, regulací Bcl-2 proteinové rodiny zvýšením standardního typu p53, uvolněním aktivovaného mutovaného p53 a zahájením mitochondriální apoptické cesty ^[26]. Ellipticin také „vypíná“ mitochondriální oxidační fosforylaci, a tím narušuje energetickou rovnováhu buněk. Ellipticin a 9-hydroxyellipticin způsobují selektivní inhibici proteinu p53 fosforylací v několika lidských rakovinných buněčných liniích, což souvisí s jejich cytotoxickou aktivitou. Přesný molekulární mechanismus odpovědný za tyto efekty není ještě zcela vysvětlen ^[26].

Dnes jsou známy dvě cesty, které spouštějí apoptózu:

- **vnější cesta indukce apoptózy**
- **vnitřní cesta indukce apoptózy**

Vnější cesta (Obr. 15) nastává po navázání ligandu na membránový „receptor smrti“ (DR - Death Receptor) s následnou indukcí vzniku signalizačního komplexu (DISC) navozující buněčnou smrt. Ten dává vzniknout aktivním kaspázám -8, -10, které pak aktivují efektorové prokaspázy -3, -6, -7. Kaspáza -8 vede také ke štepení Bid proteinu, za vzniku tBid, který prostupuje do mitochondrie a spouští cestu mitochondriální smrti. Tímto způsobem se mitochondrie zapojují do regulace apoptózy jako její spouštěč ^[27].



Obr. 15 *Vnější cesta indukce apoptózy* ^[28].

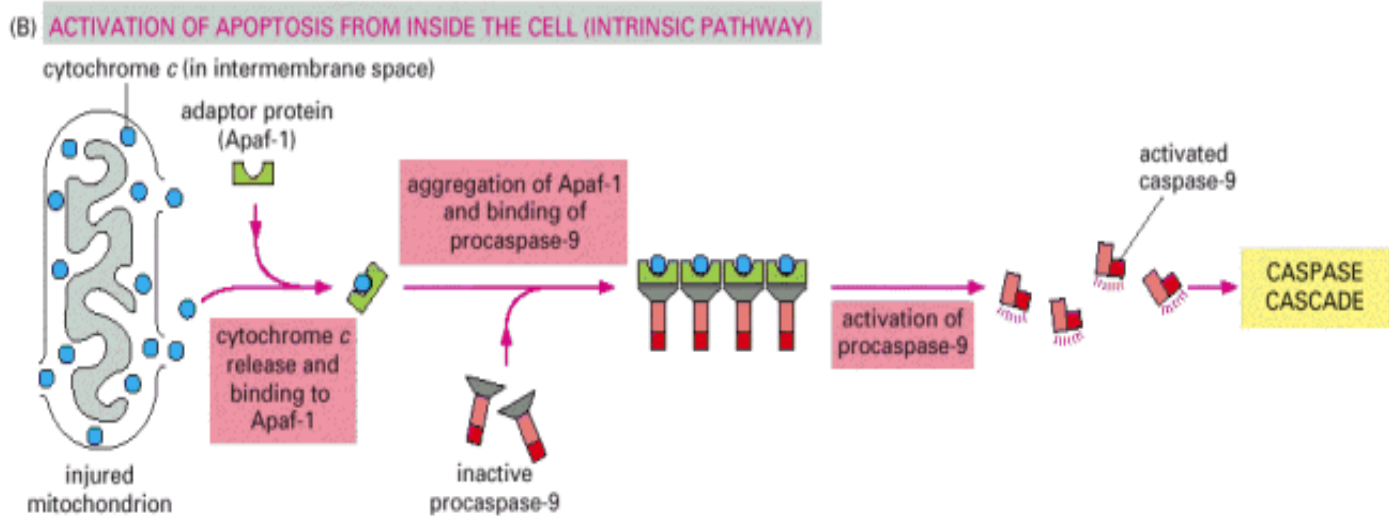
- (a) *Navázání ligandu na membránový receptor smrti.*
- (b) *Vazba FasL na receptor má za následek aktivaci kaspázy 8, přes prostředník FADD.*
- (c) *Fas receptor se po navázání na Fas ligand změni na DISC („death-inducing signaling complex“), který aktivuje kaspázu 8 a kaspázu 10.*
- (d) *Kaspáza 8 pak obvykle aktivuje další kaspázy, které nevratně směřují k smrti buňky.*

Na povrchu keratinocyту se nalézá několik typů „receptoru smrti“ (DR). Náleží k nim TNF-R1, Fas a TRAIL. UV záření zvyšuje expresi **Fas/FasL** na povrchu keratinocyту a tím zvetšuje jejich sensitivitu k Fas mediované apoptóze. Dalším efektem UV záření je na ligandu nezávislé seskupování Fas a TNF-R1 keratinocyту. Fas navozená apoptóza může pokračovat nezávisle na přítomnosti funkčního p53. Tato cesta tedy brání karcinogenezi eliminací buněk s p53 mutacemi ^[27].

Vnitřní cesta apoptózy (**Obr. 16**) je zaměřena na vnitřní prostředí buňky. To znamená, že při indukci apoptózy touto cestou nedochází k navazání ligandu na smrtící receptory, jako je tomu u vnější cesty indukce apoptózy. Vnitřní cesta indukce apoptózy je vázána na mitochondrie, kde probíhá buněčné dýchání. Aktivátory této cesty jsou signály z vnitřního prostředí buňky, což mohou být různé buněčné metabolické změny, nedostatek živin, volné radikály, UV záření, **působení cytostatik** nebo zvýšený obsah vápenatých iontů. Vnitřní cesta indukce apoptózy nastává, jestliže se buňka dostává do stresových podmínek třeba při zvýšené radiaci, teple či infekci virovými partikulami ^[29]. Buňka tak na základě vlastního rozhodnutí spustí mechanismus, který jí umožní provést apoptózu. Jakmile dojde k poškození vnější mitochondriální membrány uvolní se mitochondriální proteiny. Jedním z nich je cytochrom c, který v cytoplazmě spouští tvorbu apoptosomu – molekulární základny složené z Apaf-1 (Apoptosis proteases-activating factor 1), dATP, cytochromu c. Uvedené děje ústí v aktivaci kaspázy -9, která štepí a aktivuje efektorové prokaspázy. Vnitřní cesta apoptózy je regulována proapoptickými (Bax, Bak, Bad, Bid, Bim) a protiapoptickými (Bcl-2, Bcl-XL) geny z rodiny Bcl-2 ^[29].

Nejčastěji však na počátku **vnitřní cesty** stojí poškození DNA a následná aktivace proteinu p53. Jeho regulace je zajištěna dvěma mechanismy: transkripční cestou, anebo posttranslační modifikací (fosforylací, acetylací). Fosforylací je rozrušena vazba p53-MDM2 komplexu, aktivní p53 protein se přesouvá do jádra, kde zastaví buněčný cyklus nebo „navodí“ apoptózu transkripční aktivací p53 asociovaných genů, jako je p21waf1/cip1, NOXA, Bax. Prenašeči signálu o poškození DNA jsou ATR kinázy a FRAP (FKBP12 rapamycin-associated protein) - tyto sloučeniny přímo fosforylují p53 ^[29].

Tumorový supresorový gen p53 je spojován s apoptózou, protože genový produkt zastavuje proliferaci buňky a udržuje ji v G1 fázi buněčného cyklu, aby mohlo být eventuelní poškození genetického materiálu buňky při mutaci odstraněno. Nedojde-li k nápravě, nastoupí „sebevražedný“ program. Dalšími geny, jejichž alternace může spustit apoptózu, jsou gen Fas a onkogen Bcl-2 ^[29].

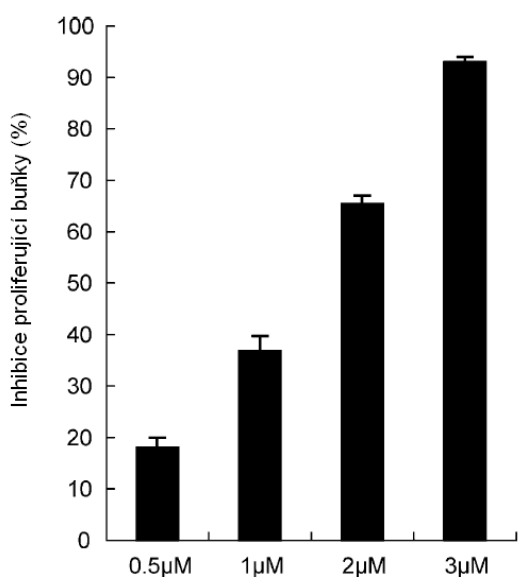


Obr. 16 Vnitřní cesta indukce apoptózy ^[30].

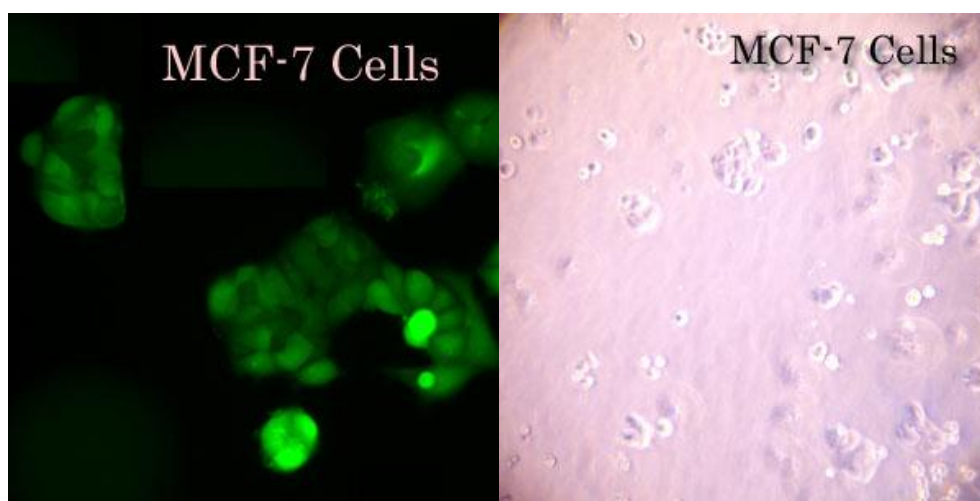
- (a) Rodina bílkovin Bcl-2 spouštějící smrt, včetně proteinů Bak a Bax, tvoří kanálky ve vnější mitochondriální membráně.
- (b) Buňka uvolňuje cytochrom c do cytoplazmy, který se pak váže na adaptorovou bílkovinu Apaf-1.
- (c) Adaptorová bílkovina Apaf-1 spouští hromadění a aktivaci prokaspázy 9.
- (d) Aktivovaný kaspázový enzym spouští kaskádu
- (e) Kaspázová kaskáda vede k apoptóze.

Současné studie ukazují ^[31], že ellipticin inhibuje růst buněk lidského prsního adenokarcinomu - MCF-7 buněk. Účinek inhibice ellipticinu na tyto buňky zobrazuje **Obr. 17**. Tato inhibice spočívá v zastavení buněčného cyklu v G2/M fázi a vyvolání apoptózy. Ellipticin zvyšuje expresi proteinu p53 a enzymu KIP1/p27, ale neovlivňuje expresi proteinu WAF1/p21, což může přispívat k blokujícímu účinku ellipticinu na G2/M fázi buněčného cyklu. Pro určení mechanismu apoptózy způsobené ellipticinem proti MCF-7 buňkám, bylo studováno zapojení Fas/Fas ligand smrtícího receptoru a mitochondriální cesty v tomto ději ^[31]. Bylo zjištěno, že Fas ligandy mFasL a sFasL zvyšují účinek ellipticinu na MCF-7 buňky, a že inhibici buněčného růstu a indukci apoptózy MCF-7 buněk, způsobené ellipticinem, snižuje inhibitor kaspázy 8 (kaspáza 8 spouští aktivace dalších kaspáz, které vyvolávají nenávratně smrt buňky). Na druhé straně, ellipticin zvyšuje expresi transkripčního faktoru Bax (stimulátor apoptózy) a snižuje expresi transkripčních faktorů Bcl-2 vázaný k Apaf-1 a Bcl-X_L v MCF-7 buňkách sloužících jako inhibitory apoptózy, následně indukuje uvolnění

cytochromu c z mitochondrie do cytoplasmy a aktivuje kaspázu 9, která aktivuje prokaspázu 3 štěpící proteiny. Uvolnění cytochromu c z mitochondrií způsobují adaptorové molekuly, přičemž dochází nejen k aktivaci kaspázové kaskády, ale také k aktivaci transkripčních faktorů. Kaspázová kaskáda navozuje štěpení cytoskeletárních proteinů a vyúsťuje v degradaci jaderného materiálu provázenou fragmentací DNA ^[31]. V této konečné fázi se objevují apoptózní tělíska, která mohou být zlikvidována makrofágy. Současné výsledky dokazují, že indukovaný p53, Fas/Fas ligand smrtící receptor a mitochondriální proapoptická cesta jsou zapletené do ellipticinem zprostředkované inhibice buněčného růstu v MCF-7 buňkách ^[31]. MCF-7 buňky jsou ukázány na **Obr. 18**.



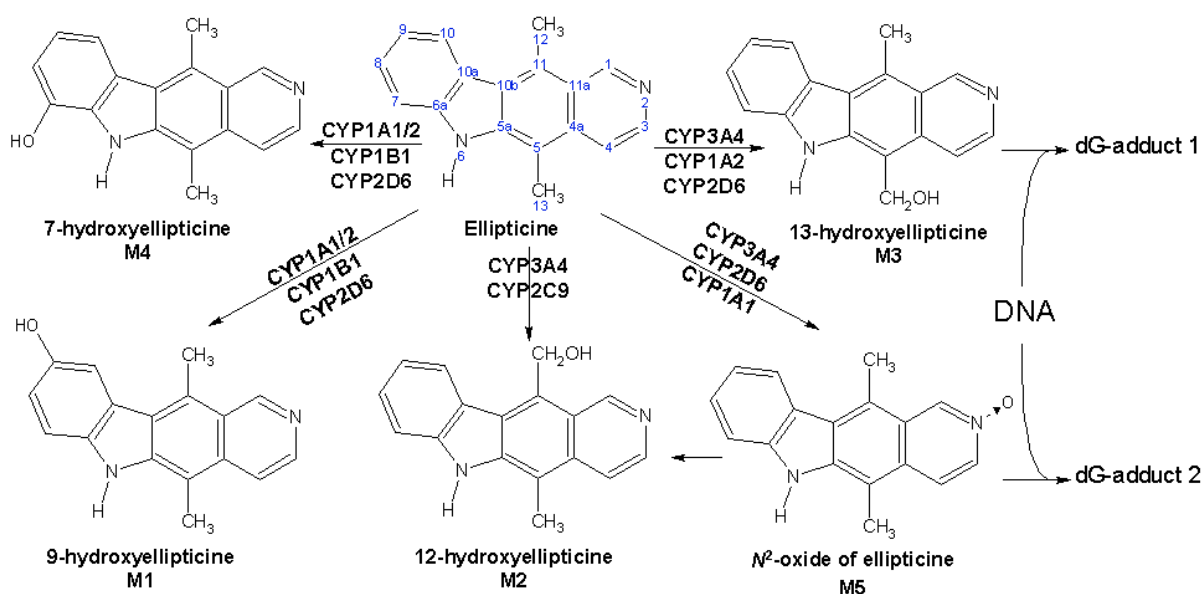
Obr. 17 Účinek inhibice ellipticinu na rostoucí MCF-7 buňky ^[31].



Obr. 18 Buňky lidského prsního adenokarcinomu – MCF-7 buňky ^[32].

7. Metabolismus elliptycinu

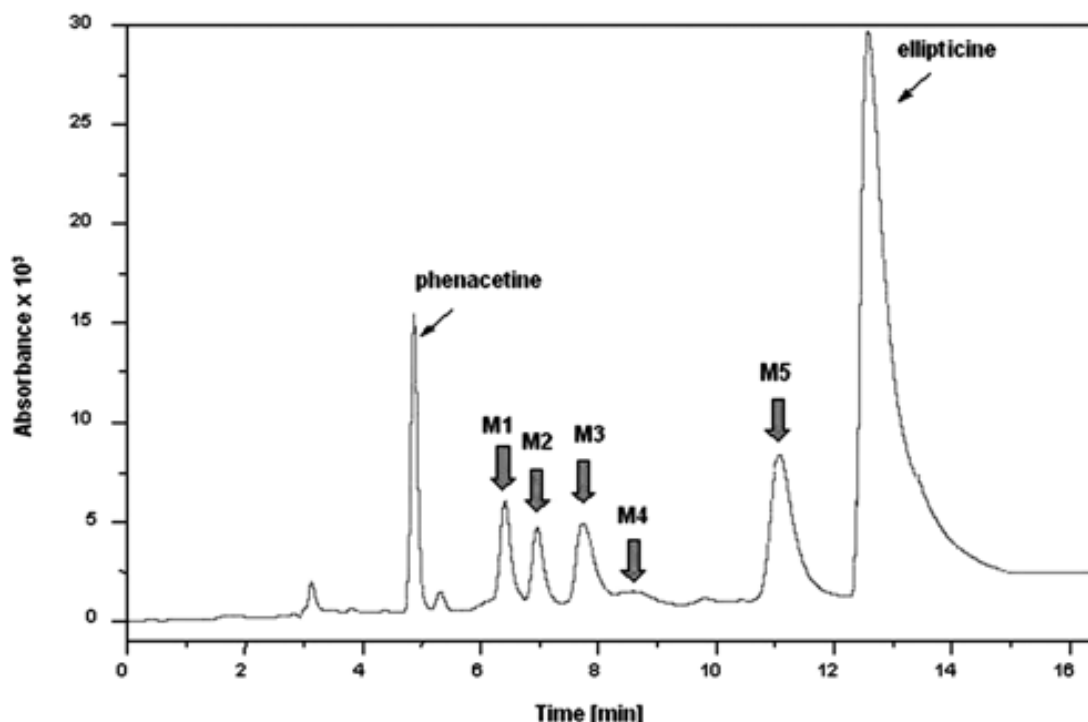
Cytochromy P450 (CYP) oxidují ellipticin až na pět různých metabolitů, které mají, až na 7-hydroxyellipticin, vyšší toxické účinky než samotná parentální molekula. Tvorba metabolitů elliptycinu je dána působením různých typů cytochromů P450 [22]. Cytochromy P4501A1/2, 1B1 a 3A1 člověka a potkana jsou převládajícími enzymy katalyzující oxidaci elliptycinu *in vitro* buď na metabolity, které jsou vylučovány (7-hydroxy- a 9-hydroxyellipticin) nebo na metabolity tvořící DNA adukty (12-hydroxy- a 13-hydroxyellipticin), jak znázorňuje **Obr. 19** [26].



Obr. 19 Oxidace elliptycinu cytochromy P450 za vzniku účinnějších metabolitů^[33].

Peroxidázy (cyklooxygenasa (COX) 1 a 2, laktoperoxidasa (LPO), myeloperoxidasa a křenová peroxidasa, (HRP)) také velmi efektivně oxidují deriváty elliptycinu poskytující adukty s DNA, které jsou totožné s adukty nalezenými po oxidaci elliptycinu cytochromy P450 [26].

Vhodná metoda pro separaci a studium jednotlivých metabolitů elliptycinů je vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC). Metabolity elliptycinu jsou označovány podle elučních profilů jako metabolity M1, M2, M3, M4 a M5. Jednotlivé metabolity elliptycinu, vzniklé působením cytochromů P450, separované vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií znázorňuje **Obr. 20** [22].



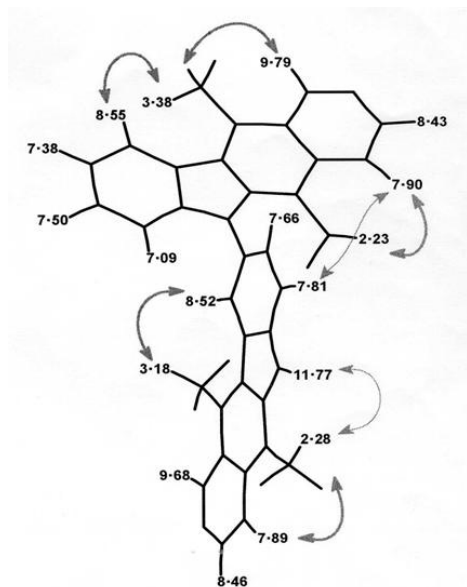
Obr. 20 HPLC chromatogram metabolitů ellipticinu vzniklých působením cytochromu P450. M1 = 9-hydroxyellipticin, M2 = 12-hydroxyellipticin, M3 = 13-hydroxyellipticin, M4 = 7-hydroxyellipticin, M5 = N²-oxid ellipticinu^[21].

7.1. Metabolická aktivace ellipticinu vedoucí ke vzniku farmakologicky účinnějších metabolitů a tvorba aduktů ellipticinu s DNA

Pro objasnění enzymové aktivace ellipticinu, byla studována jeho oxidace cytochromy P450 a peroxidasami. Jak již bylo uvedeno výše, ellipticin je oxidován cytochromy P450 až na pět metabolitů, jejichž struktura byla určena teprve nedávno. **7-hydroxyellipticin** nevykazuje žádnou cytotoxicitu, je proto detoxikačním metabolitem a spolu s **9-hydroxyellipticinem** je tvořen především CYP1A1,1A2 a 1B1. Minoritní metabolit **12-hydroxyellipticin** je tvořen CYP3A4 a 2C9. **13-hydroxyellipticin** a **N(2)-oxid ellipticinu** jsou generovány prostřednictvím CYP3A4 a metabolit **N(2)-oxid ellipticinu** je tvořen především CYP2D6^[33].

Oxidace ellipticinu peroxidasami probíhá odlišným mechanismem než oxidace substrátů cytochromy P450. Ellipticin při oxidaci peroxidasami tvoří majoritní produkty shodné s produkty oxidace ellipticinu cytochromy P450 (13-hydroxyellipticin a N(2)-oxid ellipticinu). Bylo zjištěno, že ellipticin je peroxidasami oxidován na **radikál**, který poskytuje dimer ellipticinu, z jehož struktury byla určena struktura i primárního radikálu. Peroxidasa

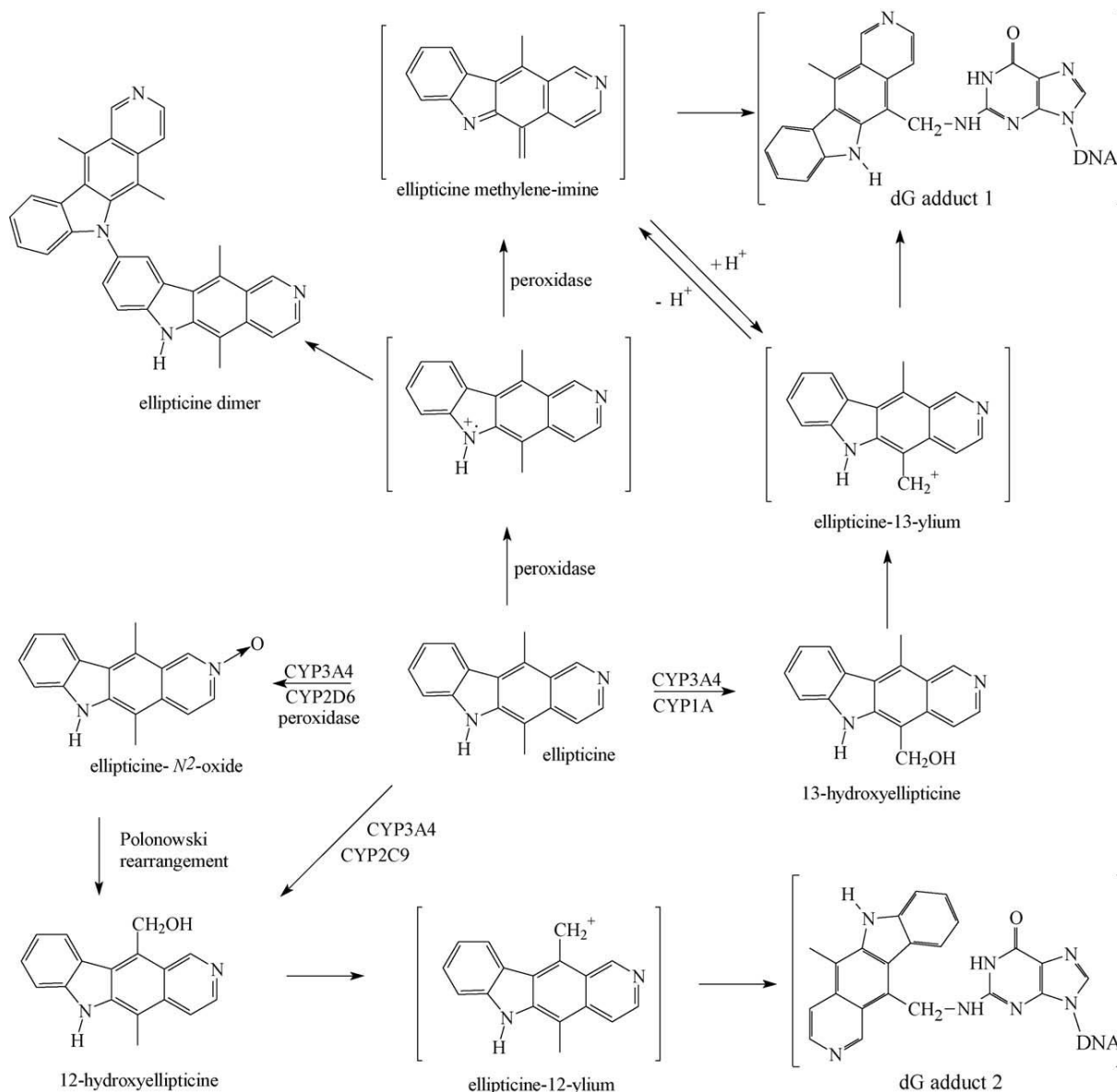
atakuje ellipticin na dusíku cyklického sekundárního aminu, pyrolového kruhu ellipticinového skeletu. Vzniklý radikál se pak váže na další molekulu ellipticinu v poloze 9 jeho molekuly. Druhým oxidačním metabolitem je **N(2)-oxid ellipticinu**, který je také produktem oxidace ellipticinu cytochromy P450 [34,2].



Obr. 21 Struktura dimeru ellipticinu [2].

Dva metabolity ellipticinu vytvořené lidskými CYP enzymy, 13-hydroxy- a 12-hydroxyellipticin, vzniklý také spontánně z N(2)-oxidu ellipticinu Polonowského přesmykem, jsou zodpovědné za vznik dvou hlavních DNA aduktů *in vitro* a *in vivo*. Vyřešení struktury reaktivních metabolitů ellipticinu, které tvoří přímo adukty s deoxyguanosinem v DNA a zvyšují tak efektivitu ellipticinu v protinádorové terapii, lze využít nových derivátů nádorově směřovaných léčiv na bázi ellipticinu [34]. V současné době jsou navrženy 13-hydroxy- a 12-hydroxyellipticin z nichž se tvoří nabitě **karbeniové ionty** (ellipticin-13-ylum a ellipticin-12-ylum) modifikující DNA. Stejný adukt jako je adukt tvořený 13-hydroxyellipticinem se tvoří také při oxidaci ellipticinu peroxidasami, pravděpodobně dvou-elektronovou oxidací ellipticinu na methylenimin [34]. Methylenimin je reaktivní a může tvořit stejný karbeniový ion jako 13-hydroxyellipticin. V obou případech vzniká adukt 1. Adukt 2 vzniká jednak přeměnou ellipticinu cytochromy P450 na 12-hydroxyellipticin přes karbeniový ion nebo oxidací ellipticinu peroxidasami na N2-oxid ellipticinu, ze kterého Polonowského přesmykem vzniká 12-hydroxyellipticin [34]. Popsané reakce znázorňuje **Obr. 22**.

Uvedené karbeniové ionty mohou tedy reagovat s nukleofilními centry deoxyguanosinových zbytků na DNA (např. exocyklická -NH₂ skupina) za vzniku aduktů 1, 2 a pak efektivně likvidovat nádorové buňky přímo [34].

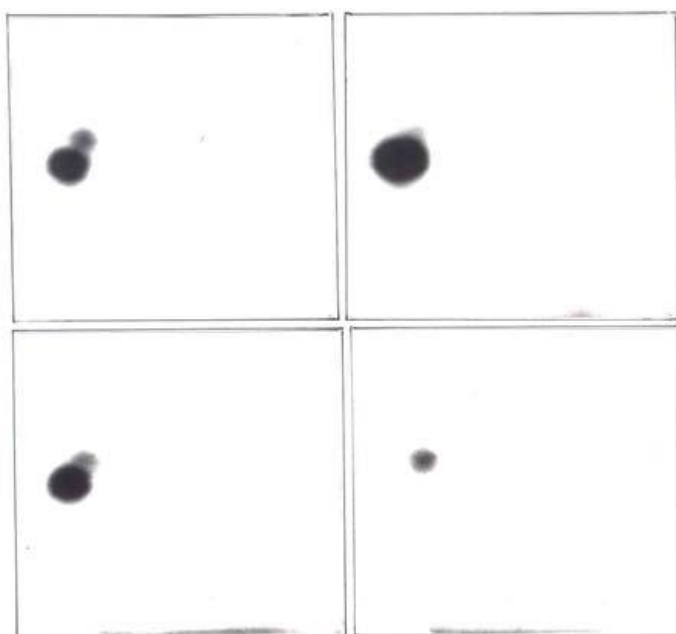


Obr. 22 Metabolická aktivace ellipticinu peroxidasami a lidskými CYP znázorňující vzniklé metabolity a metabolity tvořící adukty s DNA [26].

Kovalentní adukty ellipticinu s DNA vzniklé působením peroxidas a cytochromů P450 byly také detekovány *in vivo* v DNA izolované z různých tkání potkana a myši. Stejně adukty byly dále detekovány v DNA buňkách lidského prsního adenokarcinomu - MCF-7 buňky („breast carcinoma cell line“), v buňkách leukemických [HL-60 („human promyelocytic

leukemia cell line“)], CCRF-CEM buňkách („human T cell lymphoblast-like cell line“) a plicních fibroblastických buňkách křečka V79 [34].

Utváření kovalentní vazby metabolitů ellipticinu vzniklých působením cytochromů P450 a peroxidas s DNA bylo potvrzeno pomocí dvou nezávislých metod, za použití [³H]ellipticinu a pomocí metody „³²P postlabelingu“. Tyto metody ukázaly, že ellipticin po aktivaci cytochromy kovalentně váže DNA *in vitro* a *in vivo* (**Obr. 23**) [2].



Obr. 23 Autoradiografie majoritních aduktů ellipticinu tvořených *in vitro* s DNA po aktivaci cytochromy P450 člověka (A) králíka (B) potkana (C) a bez enzymové aktivace (D), detekované metodou „³²P postlabeling“ [2].

Metodou „³²P postlabeling“ analyzující DNA několika orgánů z potkanů kmene Wistar vystavených působením byly nalezeny adukty stejné jako adukty tvořené z reakcí *in vitro* [11].

8. Enzymy metabolizující ellipticin

Ellipticin je oxidován jednak velkou skupinou enzymů (superrodina), obsahující ve své skupině hem, označovanou jako cytochromy P450 (CYP). Druhou skupinu tvoří další oxidoreduktasy, které pomocí peroxidu vodíku oxidují různé substráty, označované jako peroxidasy. Obě skupiny enzymů metabolizují ellipticin na metabolity, které vytvářejí kovalentní adukty s DNA.

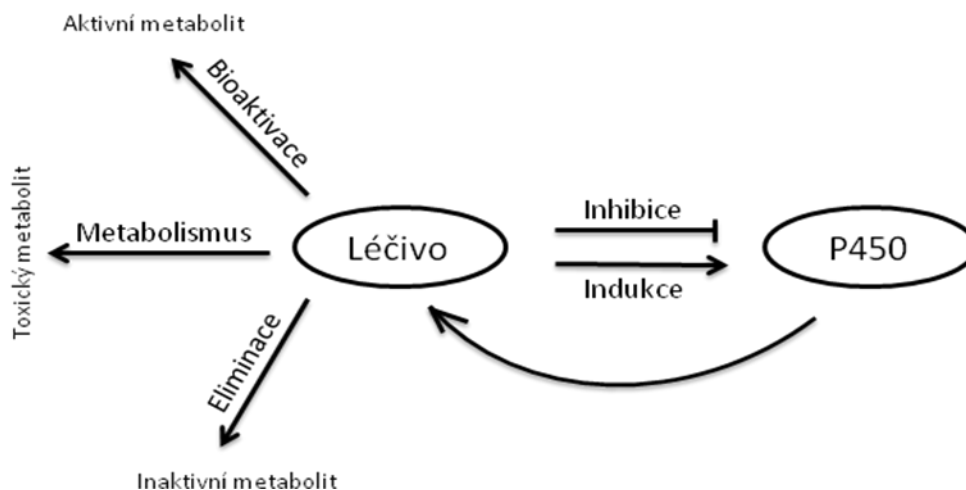
8.1. Cytochromy P450

Cytochromy P450 patří mezi hlavní enzymy metabolismu cizorodých látek (xenobiotik), nacházející se ve všech živých organismech s výjimkou enterobakterií. V lidském těle se nachází 57 funkčních genů, které kódují tyto enzymy. Cytochromy P450 se vyskytují v různých formách (izoenzymech), které jsou řazeny do genetických rodin a podrodin podle stupně homologie jejich primární struktury (pořadí aminokyselin) proteinových molekul. V současnosti bylo popsáno na 500 izoenzymů P450, které náleží do 74 rodin, 14 z nich jsou rodiny savčích cytochromů P450. Těchto 14 rodin obsahuje 26 podrodin, z nich 20 bylo nalezeno v lidském genomu ^[35]. Lidské cytochromy P450 můžeme rozdělit do tří hlavních skupin:

- První skupinu tvoří zástupci z rodin 1-3, které mají nižší afinitu k substrátu a vykazují významný genetický polymorfismus. Účastní se biotransformace xenobiotik a jsou zodpovědné za 70-80 % metabolických přeměn klinicky používaných léčiv.
- Do druhé skupiny patří 4. rodina, jejíž zástupci metabolizují deriváty mastných kyselin a některá xenobiotika.
- Třetí skupinu představují enzymy ze zbývajících rodin, které se vyznačují velkou afinitou k substrátu a evoluční stálostí. Zpracovávají endogenní látky jako jsou steroidy, prostaglandiny ^[36].

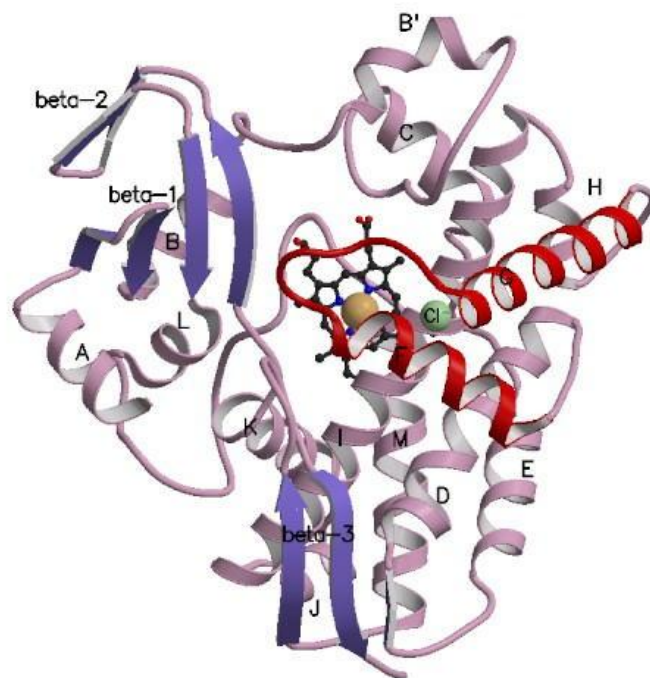
Cytochromy P450 jsou v organismu především zodpovědné za reakce I. fáze biotransformace chemických látek, vedoucí k jejich detoxikaci a po reakcích II. fáze biotransformace k jejich eliminaci z buňky a exkreci z organismu ^[35]. Interakce CYP s léčivem uvnitř lidského těla může vést k různým výsledkům, které jsou uvedené na **Obr. 24** ^[37]. Jsou to enzymy, které katalyzují oxidační, peroxidační a redukční reakce začleněné do metabolické transformace léčiv a látek přírodních či endogenních. Vyskytují se v lidském těle především v játrech, ale

významné jsou jejich hladiny také v plicích, ledvinách, tenkém střevě, kůži, mozku a nadledvinkách. V buňkách jsou lokalizovány v membráně hladkého endoplazmatického retikula a v membránách mitochondrií ^[35].



Obr. 24 Interakce CYP-léčivo: Vzniklé metabolity mohou mít buď zvýšenou účinnost (bioaktivaci) nebo jsou ve formě hydrofilních meziproduktů eliminovány z těla a nebo představují toxické meziprodukty. Léčivo může buď inhibovat nebo indukovat řízení cytochromů P450 při interakci léčivo-léčivo během vícenásobné lékové terapie ^[37].

Cytochromy P450 jsou hemoproteiny, v nichž je porfyrinový skelet, obsahující ion železa, částečně vázán hydrofobními silami a zároveň prostřednictvím thiolátové síry sulfhydrylové skupiny cysteinu přítomné v aktivním centru enzymu. Přestože se jedná o podobný hem b jako tomu je i u ostatních hemoproteinů, hemoglobinu a myoglobinu, zde se centrální atom váže silněji, což umožňuje zprostředkování přenosu elektronové hustoty na dvojnou vazbu v molekulárním kyslíku, a tedy i k aktivaci kyslíku, představující významnou vlastnost cytochromů P450 ^[35]. Struktura cytochromu P450 119, izolovaného z termofilní archeabakterie *Sulfolobus tokadaii*, je znázorněna na **Obr. 25**.



Obr. 25 Trojrozměrná struktura cytochromu P450 119 ^[38].

Významnost jednotlivých cytochromů P450 je posuzována z několika hledisek. Jedním z nejdůležitějších hledisek je podíl těchto enzymů na metabolismu cizorodých látek, které jsou ve většině případů toxické. Z jaterních cytochromů P450 jsou v procesu metabolismu cizorodých látek nejvýznamnější izoenzymy P450 **1A2**, **2A6**, **2D6**, **2C** (**2C8**, **2C9**, **2C18** a **2C19**), **2E1** a **3A4**. Z cytochromů P450 přítomných ve vyšších koncentracích v jiných tkáních (ledviny, plíce, kůže, tkáň gastrointestinálního traktu a močových cest) jsou v přeměně cizorodých látek efektivní cytochromy P450 **1A1**, **2B6**, **2E1** a **3A4** ^[35].

Jak je již dříve uvedeno ellipticin je metabolizován cytochromy P450 **1A1**, **1A2** a **3A4**. CYP **1B1**, **2D6** a **2C9** ^[35].

8.1.1 Cytochromy P450 1A1 a P450 1A2

Cytochromy P450 **1A1** a **1A2** jsou nejvýznamnějšími izoenzymy při aktivaci prokarcinogenů. Mohou aktivovat až 90 % všech dosud známých karcinogenů. Oba enzymy jsou si velice podobné (vykazují až 70 % homologii v aminokyselinové sekvenci), katalyzují i stejné reakce, ale liší se především v lokalizaci. Cytochrom P450 **1A1** je přítomen v nízkých koncentracích v játrech, naopak je zastoupen v jiných tkáních. Je silně indukován u kuřáků a předpokládá se, že rozsah inducibility tohoto enzymu představuje riziko vzniku rakoviny plic.

Teprve nedávno bylo zjištěno, že genetický polymorfismus cytochromu P450 1A1 ovlivňuje výskyt nádorů (počet i růst) plic, prsu a kůže. Cytochrom P450 1A2 je jaterní enzym, který má širokou substrátovou specifitu. Významnými substráty jsou aromatické a heterocyklické aminy, které vznikají jako pyrolytické produkty tepelné úpravy potravin. Nárůst těchto látek způsobený pravidelnou konzumací tepelně upravených potravin, obsahující vyšší koncentraci pyrolisátů, zvyšuje riziko tvorby nádorů [35].

8.1.2 Cytochromy P450 2D6 a P450 2C9

Cytochrom P450 2C9 patří do podrodiny 2C hojně zastoupené u člověka s širokou substrátovou specifitou. Vykazují genetický polymorfismus, který způsobuje, že u určitých skupin lidské populace je zcela zabráněno chemoterapeutickému účinku některých léčiv, které jsou na cytochomech P450 podrodiny 2C závislé. Genetický polymorfismus je zvláště charakteristický pro CYP 2C9, který aktivuje karcinogenní benzo[a]pyren. Lidský cytochrom P450 2D6 může být důležitý i pro patologické procesy chemické karcinogeneze a může ovlivňovat výskyt nádorů plic a močového měchýře [35].

8.1.3 Cytochrom P450 3A4

Cytochrom P450 3A4 patří mezi nejvýznamnější cytochromy P450. Tento enzym se podílí na oxidaci velkého počtu karcinogenů, léčiv a endogenních látek. Je přítomen v játrech a celé řadě dalších tkání. Z hlediska procesů karcinogeneze jsou důležitými substráty tohoto enzymu karcinogenní xenobiotika jako jsou přírodní produkty (aflatoxiny), polycyklické aromatické uhlovodíky, aromatické aminy a z endogenních látek steroidní sloučeniny [35].

8.2 Peroxidas

Ellipticin je také oxidován peroxidasami, které jsou hojně zastoupeny v několika cílových nádorových tkáních a svou substrátovou specifitou se blíží MFO systému obsahující cytochrom P450. Současné studie ukazují, že peroxidasy jako jsou hovězí laktoperoxidasa (LPO), lidská myeloperoxidasa (MPO) a rostlinná křenová peroxidasa (HRP) oxidují ellipticin radikálním mechanismem [39].

Laktoperoxidasa je glykoprotein s molekulovou hmotností přibližně 78kDa obsahující hemovou skupinu. Gen pro tento enzym je lokalizován na 17. chromosomu. Tento enzym

přítomný v mléce, je sekretovaný prsními kanálky epiteliálních buněk. Ellipticin, jako další lipofilní sloučeniny, se může akumulovat v tukových tkáních (např. prsní tkáň) ^[39,40].

Myeloperoxidasa je přítomna v několika lidských leukemických buňkách a je schopna metabolizovat řadu xenobiotik, včetně léčiv jako je ellipticin. Gen pro tento enzym je lokalizován na 17. chromosomu. Jedná se o tetramerní protein složený ze dvou stejných dimerů, z nichž každý obsahuje hemovou prostetickou skupinu^[39].

9. Závěr

Nádorová onemocnění jsou stále častějším projevem dnešní uspěchané doby a postihuje stále větší část populace. V současnosti ještě zdaleka není pokrok v léčení rakoviny tak velký, aby bylo možné toto onemocnění zcela vymýtit, ale i přesto je udržováno na nízké úrovni. Ellipticin může představovat velmi významné protinádorové léčivo, které je účinné s minimálními vedlejšími účinky. Může být využíván pro léčení různých nádorových onemocnění, jako je zejména pokročilý karcinom prsu, akutní myeloblastická leukémie a karcinomy štítné žlázy. Rozluštění mechanismu působení ellipticinu vede k navržení jeho účinnějších derivátů s cíleným účinkem selektivním pro nádorové buňky, což vede k snížení výskytu nádorových onemocnění. I přesto, že mechanismus účinku ellipticinu není ještě úplně přesně znám, je zájem o jeho klinické využití velký. Stále se zkoumají nové směry vývoje a přípravy derivátů ellipticinu včetně cíleně směřovaných léčiv na bázi ellipticinu.

10. Literatura

- [1]European pharmacists forum, číslo 16, 2009, *Datum poslední návštěvy stránky: 11.3.2010, Dostupné na:*
<http://www.europeanpharmacistsforum.com/inc/ForumIssue16CZ.pdf>
- [2]M. Stiborová: Studium enzymů biotransformujících xenobiotika jako nástroj k poznání mechanismů působení karcinogenů a konstrukce kancerostatik nové generace, *Sborník z multioborového semináře „Otevřená věda”, 2005, Dostupné na:*
<http://archiv.otevrena-veda.cz/users/Image/default/C2Seminare/MultiObSem/001.pdf>,
Datum poslední návštěvy stránky: 24.5.2010
- [3]V. Hořejší, J. Bartůňková: *Základy imunologie*, Triton, Praha, 1998
- [4]Klener P., *Vesmír* 73, 205, (1994/4), *Datum poslední návštěvy stránky: 25.4.2010, Dostupné na:* <http://www.vesmir.cz/clanek/uspesnost-lecby-nadorovych-onemocneni-cytostatiky>
- [5]T. Stone, G. Darlingtonová: *Léky, drogy, jedy*, Academia, Praha, 2003
- [6]<http://cs.wikipedia.org/wiki/Rakovina>, *Datum poslední návštěvy stránky: 11.3.2010*
- [7]<http://healthmad.com/women/beautiful-cancer-cells/>, *Datum poslední návštěvy stránky: 11.3.2010*
- [8]M. Stiborová: Aromatické nitrosloučeniny: Kontaminanty životního prostředí a potenciální karcinogeny, *Chem. Listy*, **96**, 784-791 (2002)
- [9]<http://cs.wikipedia.org/wiki/Metast%C3%A1za>, *Datum poslední návštěvy stránky: 11.3.2010*
- [10]M. Stiborová: *Biochemie jako teoretický základ biomedicíny, přednáška an PŘF UK, 2010*
- [11]M. Stiborová, A. Breuer, D. Aimová, M. Stiborová-Rupertová, M. Wiessler, E. Frei: DNA adduct formation by the anticancer drug ellipticine in rats determined by 32P postlabeling, *Int. J. Cancer*, **107**, 885-890 (2003)
- [12]M. Stiborová: *Biochemie II, přednáška na PŘF UK, 2010*
- [13]<http://che1.lf1.cuni.cz/html/Xenobiochemie.pdf>, *Datum poslední návštěvy stránky: 22.4.2010*
- [14]J. Martínková a kolektiv: *Farmakologie pro student zdravotnických oborů*, Grada, Praha, 2007
- [15]S. Hynie: *Speciální farmakologie - Díl VII*, Karolinum, Praha, 1999

[16]Rozhovor s Pavlem Klenerem (2009), *Datum poslední návštěvy stránky: 12.3.2010*,
Dostupné na: <http://www.ct24.cz/veda-a-technika/62202-cilena-lecba-rakoviny-ma-i-sva-uskali/>

[17]<http://www.erbitux.cz/nadory-oblasti-hlavy-a-krku-cetuximab-erbitux-c255.html>,
Datum poslední návštěvy stránky: 12.3.2010

[18]http://chem4513.pbworks.com/f/800px-Gefitinib_structure_svg.png, *Datum*
poslední návštěvy stránky: 22.4.2010

[19]M. Parisová: Leukovorin-derivát kyseliny listové a jeho voltametrické stanovení na pevné amalgámové elektrodě, Seminář studentů Ústav fyzikální chemie J. Heyrovského, *Sborník příspěvků ze studentské konference* konané 19. – 21. května 2009 v Konferenční centru AV ČR v Liblicích

[20]http://images.google.cz/images?hl=cs&q=testosteron+picture&lr=&oq=&um=1&ie=UTF-8&ei=CeOcS9KdLpqiQPXr meCw&sa=X&oi=image_result_group&ct=title&resnum=1&ved=0CA8QsAQwAA, *Datum poslední návštěvy stránky: 14.3.2010*

[21]M. Stiborová, M. Rupertová, H. H. Schmeiser, E. Frei: Molecular mechanism of antineoplastic action of an anticancer drug ellipticine, *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.*, **150(1)**, 13-23 (2006)

[22]M. Háčková: Metabolismus protinádorového léčiva ellipticinu v cílových tkáních jeho účinku, Diplomová práce, 2008, PřF UK, Praha

[23]http://www.google.cz/imgres?imgurl=http://farm4.static.flickr.com/3173/2665756287_4d12f190d4.jpg%3Fv%3D0&imgrefurl=http://flickr.com/photos/40295335%40N00/2665756287/&usq=3USmLyUws2slUSTkKJ64uqJ1RgA=&h=375&w=500&sz=132&hl=cs&start=19&um=1&itbs=1&tbnid=gW DkKbKDKkJjM:&tbnh=98&tbnw=130&prev=/images%3Fq%3Dochrosia%2Belliptica%2Bpicture%26um%3D1%26hl%3Dcs%26lr%3D%26sa%3DX%26tbs%3Disch:1, *Datum poslední návštěvy stránky: 22.4.2010*

[24]http://images.google.cz/imgres?imgurl=http://www.inspiralis.com/images/main/rte/ellipticine_2.jpg&imgrefurl=http://www.inspiralis.com/go/anti_cancer_agents.php&usq=wjWJPSN0Ufg9xy2E4I9RWCoSc7E=&h=278&w=370&sz=8&hl=cs&start=2&um=1&itbs=1&tbnid=U9RJkCxYHdAqzM:&tbnh=92&tbnw=122&prev=/images%3Fq%3Dellipticine%2Bpicture%26um%3D1%26hl%3Dcs%26lr%3D%26tbs%3Disch:1,
Datum poslední návštěvy stránky: 8.4.2010

[25]M. Stiborová, E. Frei: Deriváty elipticinu s cíleným protinádorovým účinkem, *Chem. Listy*, **95**, 549-555 (2001)

- [26]J. Poljaková, T. Eckschlager, J. Hraběta, J. Hřebačková, S. Smutný, E. Frei, V. Martínek, R. Kizek, M. Stiborová: The mechanism of cytotoxicity and DNA adduct formation by the anticancer drug ellipticine in human neuroblastoma cells, *Biochemical Pharmacology*, **77**, 1466-1479 (2009)
- [27]Vojenské zdravotnické listy, 2006, *Datum poslední návštěvy stránky: 11.4.2010*, Dostupné na: http://www.pmfhk.cz/VZL/VZL%201_2006/04-Rostova-T.pdf
- [28]<http://cs.wikipedia.org/wiki/Apopt%C3%B3za>, *Datum poslední návštěvy stránky: 22.4.2010*
- [29]Diagnostika in vitro, informační magazine číslo 14 (2010), *Datum poslední návštěvy stránky: 11.4.2010*, Dostupné na: http://www.immunotech.cz/pdf/IVD_14.pdf
- [30]www.zbio.gnotobio.cz/.../P1_Molbiol%20ZBio_2007_2008.ppt, *Datum poslední návštěvy stránky: 22.3.2010*
- [31]Po-Lin Kuo, Ya-Ling Hsu, Cheng-Hsiung Chang, Chun-Ching Lin: The mechanism of ellipticine – induced apoptosis and cell cycle arrest in human breast MCF-7 cancer cells, *Cancer Letters*, **223**, 293-301 (2005)
- [32]http://images.google.cz/imgres?imgurl=http://mcf7.com/MCF-7-2.jpg&imgrefurl=http://mcf7.com/&usq=__jc7gPZfXCsZ8HWreXNHvkyDKqBc=&h=300&w=300&sz=34&hl=cs&start=3&um=1&itbs=1&tbnid=MrXTBVNCA9CwIM:&tbnh=116&tbnw=116&prev=/images%3Fq%3DMCF-7%2Bpicture%26um%3D1%26hl%3Dcs%26lr%3D%26sa%3DX%26tbs%3Disch:1, *Datum poslední návštěvy stránky: 12.4.2010*
- [33]M. Stiborová, J. Sejbál, L. Bořek-Dohalská, D. Aimová, J. Poljaková, K. Forsterová, M. Rupertová, J. Wiesner, J. Hudeček, M. Wiessler, E. Frei: The anticancer drug ellipticine forms covalent DNA adducts, mediated by human cytochromes P450, through metabolism to 13-hydroxyellipticine and ellipticine N(2)-oxide, *Cancer research*, **64**, 8374-8380 (2004)
- [34]J. Poljaková, E. Frei, J. E. Gomez, D. Aimová, T. Eckschlager, J. Hraběta, M. Stiborová: DNA adduct formation by the anticancer drug ellipticine in human leukemia HL-60 and CCRF-CEM cells, *Cancer Letters*, **252**, 270-279 (2007)
- [35]M. Stiborová, J. Hudeček, P. Hodek, E. Frei: Význam cytochromů P450 pro lidské zdraví, *Chem. Listy*, **93**, 229-237 (1999)
- [36]R. Řemínek: Cytochromy P450, Bakalářská práce, 2006, PřF MU, Brno, *Datum poslední návštěvy stránky: 11.4.2010*, Dostupné na: http://is.muni.cz/th/106333/prif_b/Bakalarka.pdf

[37]K. Purnapatre, Sunil K. Khattar, Kulvinder Singh Saini: Cytochrome P450s in the development of target-based anticancer drugs, *Cancer Letters*, **259**, 1-15 (2008)

[38][http://www.google.cz/imgres?imgurl=http://www.kms.ac.jp/~xraylab/research/image15.jpg&imgrefurl=http://www.kms.ac.jp/~xraylab/research/structure table e.html&usq=__1fLh3K2DbNxzyTjwMJxhZnti5SE=&h=500&w=500&sz=39&hl=cs&start=7&um=1&itbs=1&tbnid=YQtWnYJg1kkjM:&tbnh=130&tbnw=130&prev=/images%3Fq%3Dcytochrome%2BP450%26um%3D1%26hl%3Dcs%26lr%3D%26sa%3DX%26tbs%3Disch:1](http://www.google.cz/imgres?imgurl=http://www.kms.ac.jp/~xraylab/research/image15.jpg&imgrefurl=http://www.kms.ac.jp/~xraylab/research/structure%20table%20e.html&usq=__1fLh3K2DbNxzyTjwMJxhZnti5SE=&h=500&w=500&sz=39&hl=cs&start=7&um=1&itbs=1&tbnid=YQtWnYJg1kkjM:&tbnh=130&tbnw=130&prev=/images%3Fq%3Dcytochrome%2BP450%26um%3D1%26hl%3Dcs%26lr%3D%26sa%3DX%26tbs%3Disch:1), Datum poslední návštěvy stránky: 22.4.2010

[39]J. Poljaková, K. Forsterová, M. Šulc, E. Frei, M. Stiborová: Oxidation of an antitumor drug ellipticine by peroxidases, *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.*, **149(2)**, 449-53 (2005)

[40]J. Poljaková: Mechanismus oxidace ellipticinu peroxidasami a jeho cytotoxicity k nádorovým buňkám, Disertační práce, 2006, PŘF UK, Praha

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovatelů.

Jméno a příjmení s adresou:	Číslo OP:	Datum vypůjčení:	Poznámka: