

DISERTAČNÍ PRÁCE

**Metabolismus, transport  
a protinádorové účinky  
klasických a nových taxanů**

**Mgr. Radka Václavíková**

Školitel: MUDr. Ivan Gut, DrSc.

Odborný konsultant: Doc. RNDr. Marie Stiborová, DrSc.

Katedra Biochemie

Přírodovědecká fakulta University Karlovy

Odborná Skupina Biotransformací

Státní zdravotní ústav Praha



Praha 2006

## PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych ráda vyjádřila svůj dík všem lidem, kteří přispěli k realizaci této práce. V první řadě bych ráda poděkovala mému školiteli MUDr. Ivanu Gutovi DrSc. za příležitost pracovat pod jeho laskavým vedením po celou dobu mého postgraduálního studia. Současně bych ráda poděkovala všem dalším členům laboratoří Odborné Skupiny Biotransformací SZÚ za jejich odbornou pomoc a vytvoření přátelského pracovního prostředí. Můj dík patří rovněž paní Doc. RNDr. Marii Stiborové DrSc. z Přírodovědecké fakulty University Karlovy za její odborné rady a neocenitelnou pomoc během mého studia.

Dále bych ráda poděkovala:

- Prof. Iwao Ojimovi (University of New York at Stony Brook, N.Y., USA) za syntézu a poskytnutí série SB-T taxanů, které jsou novými syntetickými analogy známých protinádorových léčiv taxanů.
- Ing. Marii Ehrlichové, Mgr. Jaroslavu Truksovi PhD. a Doc. Janu Kovářovi z laboratoře regulace buněčného růstu Ústavu Molekulární genetiky AV ČR v Praze Krči za jejich spolupráci při sledování cytotoxicity a transportu taxanů v sensitivních a resistantních buněčných liniích rakoviny prsu.
- Dr. Petru Šimkovi z Entomologického ústavu AV ČR v Českých Budějovicích za identifikaci všech metabolitů klasických a nových taxanů pomocí hmotnostní spektroskopie.
- Ahcenu Boumendjelovi PhD (Department de Pharmacochimie Moléculaire, Faculte de Pharmacie de Grenoble, Meylan, Francie) za syntézu a poskytnutí série derivátů flavonoidů pro sledování jejich vlivu na metabolismus a transport taxanů.
- mým rodičům a celé rodině za jejich podporu
- všem mým přátelům

Zvláštní dík pak patří mému příteli Petru Neuschlovi za jeho morální podporu a trpělivost během celého mého studia.

Tato práce byla podporována granty Ministerstva zdravotnictví České Republiky (NL/7567-3, NL-6517-3 a 1A/8248) a grantem Grantové agentury AV ČR (305/04/03).

## OBSAH

|  |           |
|--|-----------|
| Seznam použitých zkratk a symbolů.....   | 6         |
| <b>1. ÚVOD A PŘEHLED LITERATURY.....</b>   | <b>8</b>  |
| 1.1. Nádorová onemocnění a jejich terapie.....   | 9         |
| 1.1.1. Rozvoj a příčiny nádorových onemocnění.....   | 10        |
| 1.1.2. Klasifikace nádorových onemocnění.....  | 11        |
| 1.1.3. Možnosti terapie nádorových onemocnění.....   | 12        |
| 1.1.4. Využití cytostatik v chemoterapeutické léčbě.....   | 13        |
| 1.2. Taxany.....   | 14        |
| 1.2.1. Mechanismus účinku taxanů.....  | 15        |
| 1.2.2. Metabolismus taxanů za účasti cytochromů P450.....  | 16        |
| 1.2.2.1. Cytochromy P450.....  | 17        |
| 1.2.2.2. Funkce cytochromu P450 v MFO systému.....   | 18        |
| 1.2.2.3. Formy cytochromů P450.....  | 19        |
| 1.2.3. Metabolismus paclitaxelu.....   | 21        |
| 1.2.4. Metabolismus docetaxelu.....  | 22        |
| 1.2.5. Využití klasických taxanů v protinádorové terapii.....  | 24        |
| 1.2.6. Nové deriváty taxanů.....   | 25        |
| 1.3. Fenolické antioxidanty.....   | 28        |
| 1.3.1. Rozdělení a výskyt přírodních fenolických antioxidantů.....   | 28        |
| 1.3.2. Vlastnosti a účinky přírodních fenolických antioxidantů.....  | 31        |
| 1.3.3. Syntetické deriváty flavonoidů.....   | 32        |
| 1.4. Resistence nádorů.....  | 34        |
| 1.4.1. Studium resistance nádorů vůči chemoterapeutikům.....   | 34        |
| 1.4.2. Resistence nádorů vůči taxanům a možnosti jejího potlačení.....   | 38        |
| <b>2. CÍL DISERTAČNÍ PRÁCE.....</b>  | <b>41</b> |
| <b>3. MATERIÁL A METODY.....</b>   | <b>43</b> |
| 3.1. Příprava a charakterizace experimentálních preparátů.....   | 43        |
| 3.2. Studium metabolismu taxanů jednotlivými enzymovými preparáty.....   | 44        |
| 3.3. Studium vlivu fenolických antioxidantů na metabolismus klasických taxanů.....                                   | 45        |
| 3.4. Studium transportu taxanů v lidských buněčných liniích rakoviny prsu.....                                       | 46        |
| 3.5. Sledování účinků klasických taxanů <i>in vivo</i> v organismu potkana s implantovanými T-buněčnými lymfomy..... | 48        |

|   |           |
|---|-----------|
| 3.6. Zpracování výsledků.....   | 50        |
| <b>4. VÝSLEDKY A DISKUSE.....</b>   | <b>51</b> |
| 4.1. Studium metabolismu taxanů <i>in vitro</i> .....   | 51        |
| 4.1.1. Metabolismus paclitaxelu <i>in vitro</i> živočišnými cytochromy P450.....  | 51        |
| 4.1.2. Metabolismus docetaxelu <i>in vitro</i> živočišnými cytochromy P450.....   | 55        |
| 4.1.3. Metabolismus analogů taxanů <i>in vitro</i> živočišnými cytochromy P450.....   | 56        |
| 4.1.4. Enzymatická kinetika metabolismu klasických a nových taxanů <i>in vitro</i> ....   | 63        |
| 4.2. Vliv fenolických antioxidantů na metabolismus klasických taxanů.....   | 65        |
| 4.2.1. Vliv fenolických antioxidantů na metabolismus paclitaxelu<br>v lidských a potkaních jaterních mikrosomech .....  | 65        |
| 4.2.2. Vliv fenolických antioxidantů na metabolismus docetaxelu v lidských<br>jaterních mikrosomech.....  | 67        |
| 4.3. Studium transportu taxanů v lidských buněčných liniích rakoviny prsu.....  | 68        |
| 4.3.1. Cytotoxicita a transport klasických a nových taxanů v sensitivních<br>a resistantních buněčných liniích rakoviny prsu.....                                 | 69        |
| 4.3.2. Vliv Verapamilu a nových taxanů na transport [ <sup>14</sup> C]paclitaxelu v lidských<br>buněčných liniích rakoviny prsu.....                              | 72        |
| 4.3.3. Vliv fenolických antioxidantů a jejich syntetických derivátů na transport<br>[ <sup>14</sup> C]paclitaxelu v lidských buněčných liniích rakoviny prsu..... | 74        |
| 4.4. <i>In vivo</i> účinky klasických taxanů na T-buněčné lymfomy v modelovém organismu<br>potkana.....   | 77        |
| 4.4.1. Sledování hladiny taxanů a jejich metabolitů v krvi potkanů po i.p. podání<br>v organismu potkana.....   | 78        |
| 4.4.2. Studium vlivu taxanů na rozvoj T-buněčných lymfomů <i>in vivo</i> v modelovém<br>organismu potkana.....  | 79        |
| <b>4. ZÁVĚR.....</b>  | <b>82</b> |
| Seznam použité literatury.....  | 86        |
| <b>5. PŘÍLOHY – SEZNAM PUBLIKACÍ.....</b>   | <b>92</b> |

**PŘÍLOHY**

**Příloha I:** Václavíková R., Horský S., Šimek P. and Gut I.: Paclitaxel metabolism in rat and human liver microsomes is inhibited by phenolic antioxidants. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **368**: 200-209, 2003.

**Příloha II:** Václavíková R., Horský S. and Gut I.: New in vitro metabolites of paclitaxel in humans, rats, minipigs and regular pigs and CYP involved in their formation. In: *Cytochrome P450, Biochemistry, Biophysics and Drug Metabolism* (Anzenbacher P. and Hudeček J., eds.), pp. Monduzzi Editore, Bologna, 2003.

**Příloha III:** Václavíková R., Souček P., Svobodová L., Anzenbacher P., Šimek P., F.P. Guengerich and Gut I.: Different in vitro metabolism of paclitaxel and docetaxel in humans, rats, pigs and minipigs. *Drug Metab Dispos* **32**: 666-674, 2004.

**Příloha IV:** Ehrlichová M., Václavíková R., Ojima I., Pepe A., Kuznetsova LV., Chen J., Truksa J., Kovář J. and Gut I.: Transport and cytotoxicity of paclitaxel, docetaxel and novel taxanes in human breast cancer cells. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **372(1)**: 95-105, 2005.

**Příloha V:** Gut I., Ojima I., Václavíková R., Šimek P., Horský S., Linhart I., Souček P., Kondrová E.: Metabolism of new generation taxanes in human, pig, minipig and rat liver microsomes. Předloženo k recenzi v *Xenobiotica*.

**Publikace VI:** Václavíková R., Boumendjel A., Ehrlichová M., Kovář J. and Gut I.: Modulation of Paclitaxel Transport by Flavonoid Derivatives in Human Breast Cancer Cells. Is there a Correlation Between Binding Affinity to NBD of P-gp and Modulation of Transport? *Bioorg Med Chem* Mar 1: [Epub ahead of print], 2006.

**Příloha VII:** Otová B., Václavíková R., Ehrlichová M., Horský S., Souček P., Šimek P. and Gut I.: Antitumor Efficiency and Pharmacokinetics of Paclitaxel and Docetaxel upon Repeated Administration in Rats. Předloženo k recenzi v *Eur J Pharm Sci*.

**Příloha VIII:** Ehrlichová M, Koc M., Truksa J., Naďová Z., Václavíková R. and Kovář J.: Cell death induced by taxanes in breast cancer cells: cytochrome C is released in resistant but not in sensitive cells. *Anticancer Res* **25(6B)**: 4215-4224, 2005.

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

|                  |  |
|------------------|--|
| ABC              | transportní proteiny rodiny ABC vázající ATP (ATP binding cassette proteins)           |
| ACN              | acetonitril  |
| ATP              | adenosintrifosfát  |
| Bcl-2            | antiapoptotický gen  |
| C2-OHPCT         | C2-hydroxypaclitaxel   |
| C3'-OHPCT        | C3'-hydroxypaclitaxel  |
| cDNA             | komplementární DNA   |
| CSW              | Chromatography Station for Windows   |
| CYP              | cytochrom P450   |
| di-OHPCT         | dihydroxypaclitaxel  |
| DMSO             | dimethylsulfoxid   |
| DNA              | deoxyribonukleová kyselina   |
| ECL              | zvýšená chemiluminiscence (enhanced chemiluminiscence)                                 |
| EDTA             | kyselina ethylendiamintetraoctová  |
| ER               | endoplasmatické retikulum  |
| FBS              | fetální bovinní sérum (fetal bovine serum)   |
| GIT              | gastrointestinální trakt   |
| HPLC             | vysokotlaká kapalinová chromatografie (high-pressure liquid chromatography)            |
| IC <sub>50</sub> | koncentrace inhibitoru způsobující padesátiprocentní snížení aktivity                  |
| i.p.             | intraperitoneální aplikace   |
| i.v.             | intravenosní aplikace  |
| K <sub>i</sub>   | inhibiční konstanta  |
| K <sub>m</sub>   | Michaelisova konstanta   |
| LDL              | lipidy s nízkou hustotou   |
| LRP              | protein resistance plicní tkáně (lung resistance-related protein)                      |
| M                | mol/l  |
| M1 – M11         | metabolity SB-T-taxanů eluující při HPLC jako 1., 2. až 11. v pořadí                   |
| MDR              | mnohočetná léková resistance (multidrug resistance)                                    |
| MDR1             | gen mnohočetné lékové resistance kódující P-glykoprotein (multidrug resistance gene 1) |
| MFO              | monooxygenasový systém se smíšenou funkcí (mixed function oxidases)                    |
| Milli-Q          | voda prvního stupně kvality získaná přečištěním destilované vody                       |
| mRNA             | mediátorová RNA  |

|                           |  |
|---------------------------|--|
| MRP                       | protein mnohočetné lékové resistance (multidrug resistance protein)                  |
| MS                        | hmotnostní spektrometrie   |
| MTT                       | (3-4,5-dimethylazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium                                   |
| NAD <sup>+</sup> (NADH)   | nikotinamidadeninukleotid oxidovaný (redukovaný)                                     |
| NADP <sup>+</sup> (NADPH) | nikotinamidadeninukleotidfosfát oxidovaný (redukovaný)                               |
| NADPH-GS                  | NADPH – generující systém  |
| NBD2                      | nukleotid vázající doména 2 (nucleotide binding domain 2)                            |
| NS                        | nízkospinový stav  |
| OHDTX                     | hydroxydocetaxel   |
| OHPCT                     | hydroxypaclitaxel s neznámou polohou OH skupiny                                      |
| 6 $\alpha$ -OHPCT         | 6alfa-hydroxypaclitaxel  |
| ORL                       | otorhinolaryngologie   |
| p                         | hladiny významnosti statistického testu  |
| PAH                       | polycyklické aromatické uhlovodíky   |
| PBS                       | sodný fosfátový pufr s obsahem NaCl – izotonický roztok (Phosphate Buffer with Salt) |
| PCN                       | pregnenolon-16 $\alpha$ -karbonitril   |
| PCR                       | polymerázová řetězová reakce   |
| P-gp                      | P-glykoprotein   |
| RED                       | NADPH:CYP reductasa  |
| RH                        | substrát cytochromu P450   |
| RNA                       | ribonukleová kyselina  |
| ROH                       | hydroxylovaný produkt  |
| RPM                       | počet otáček za minutu   |
| rRNA                      | ribosomální RNA  |
| SB-T-taxany               | Stony-Brook-taxany (syntetické analogy klasických taxanů)                            |
| SDS                       | dodecylfosfát sodný  |
| SH                        | sulfhydrylová skupina  |
| SZÚ                       | Státní zdravotní ústav   |
| THF                       | tetrahydrofuran  |
| t <sub>R</sub>            | retenční čas   |
| TRIS                      | tris(hydroxymethyl)-aminomethan  |
| VS                        | vysokospinový stav   |
| v <sub>max</sub>          | maximální rychlost enzymové reakce   |
| XOOH                      | peroxosloučenina   |
| $\lambda$                 | vlnová délka   |

## 1. ÚVOD A PŘEHLED LITERATURY

**Nádorová onemocnění** patří v současné době mezi nejzávažnější onemocnění a časté příčiny úmrtí v lidské populaci. Většina případů vzniku rakoviny je dána kombinací faktorů genetických a faktorů životního prostředí jako je nevhodný životní styl, složení potravy a kontaminující složky životního prostředí. Všechny tyto faktory oslabují lidský imunitní systém, který pak není schopen dostatečně fungovat a dochází k rozvoji nádorových onemocnění.

**Léčba nádorových onemocnění** kombinuje chirurgické zákroky, radioterapii a chemoterapeutickou léčbu. Chemoterapie je založena na podávání cytostatik, tedy látek, které jsou schopny usmrtit nádorové buňky. Jejich použití je ale často v terapeuticky účinných dávkách doprovázeno řadou závažných nežádoucích účinků plynoucích z poškození zdravých lidských tkání a orgánů neboť chemoterapie poškozuje i normální buňky, zejména rychle se dělící jako jsou buňky kostní dřeně, sliznic apod. Stále častější překážkou úspěšné chemoterapie je navíc rozvoj resistance nádorů vůči konvenčním cytostatikům vedoucí k selhání léčby.

Proto je v současné době věnována velká pozornost hledání zcela nových léčiv nebo účinnějších derivátů známých cytostatik, které by měly vyšší farmakologickou účinnost, méně nežádoucích účinků a co nejširší spektrum terapeutického použití zejména v léčbě resistantních nádorů. Zároveň jsou hledány možnosti jak zvýšit účinnost konvenčních cytostatik ovlivněním procesů probíhajících po vstupu cytostatik do organismu jako je jejich distribuce a biotransformace.

Významnou skupinou vysoce účinných protinádorových léčiv jsou taxany, které jsou v klinické praxi hojně používány. Bohužel metabolismus taxanů vede k jejich farmakologické inaktivaci a proto detailní poznání tohoto procesu a možnosti zpomalení metabolických přeměn taxanů by mohly zvýšit jejich terapeutickou účinnost, snížit nežádoucí účinky a přispět tak k účinnější protinádorové léčbě všude tam, kde jsou taxany využívány. Jako další problém související s terapií taxanů se v nedávné době ukázal rozvoj resistance řady nádorů vůči těmto léčivům. Snížení resistance vůči klasickým taxanům nebo nalezení nových derivátů taxanů účinných v terapii resistantních nádorů by umožnilo úspěšně aplikovat chemoterapeutickou léčbu taxany i tam, kde dosud selhává.



## 1.1 Nádorová onemocnění a jejich terapie

Nádorové onemocnění lze charakterizovat jako neregulovaný růst buněk s autonomní povahou buněčné proliferace spojený s poruchou kontrolních mechanismů a s alterací buněčné diferenciaci. Nekontrolovaný růst vede u solidních nádorů ke zvětšení postižené tkáně, která může stlačovat okolní struktury nebo vést k postupné invazi do okolních struktur a k metastasování.<sup>[64]</sup> Česká republika drží evropské prvenství v počtu nemocných rakovinou konečníku a ledvin. Mezi nejčastější nádorová onemocnění v Evropě - patří rakovina kůže, prsu a plic. U žen je nejčastějším nádorovým onemocněním rakovina prsu. Tvoří 22% všech diagnostikovaných typů rakoviny v ženské populaci.<sup>[137]</sup> V ČR se vyskytne kolem 5000 nových případů ročně a toto onemocnění ročně připadne na 95 ze 100.000 žen.<sup>[94,149]</sup> V mužské populaci je pak nejčastějším typem nádorových onemocnění rakovina plic.

Dnes pohlížíme na zhoubné nádory jako na **genetické onemocnění**, které vzniká následkem patologických změn v molekule DNA. Od ostatních genetických chorob se liší tím, že mutace způsobující rakovinu jsou převážně somatické. V současné době se všeobecně přijímá teorie mechanismu buněčné transformace, kde rozhodující úlohu hraje aktivace onkogenů a inaktivace tumor supresorových genů na základě genetických změn.<sup>[3]</sup> Jako **onkogeny** označujeme geny, které prostřednictvím svých proteinových produktů působí transformaci normálního buněčného fenotypu v nádorový. Jde o patologicky alterované varianty normálních buněčných genů. Produkují proteiny, které si sice zachovávají svou základní funkci, ale buď jsou produkovány v nadměrném množství nebo jsou kvalitativně odlišné a mají zvýšenou aktivitu. Naopak geny potlačující nádor tzv. **tumor supresorové geny** prostřednictvím svých proteinových produktů omezují buněčnou transformaci a proliferaci. Mají tedy opačný účinek než onkogeny a ztráta jejich funkce, která je důsledkem mutací příslušného genu usnadňuje buněčnou transformaci. Bylo identifikováno přes 50 onkogenů např. geny Rb-1 (retinoblastoma 1), p53 (gen proteinu 53), WT-1 (Wilms' tumor suppressor gene), APC (adenomatous polyposis coli gene), BRCA-1/2 (breast cancer 1/2 genes), p16 (gen proteinu 16), VHL (Von Hippel-Lindau syndrome suppressor gene), DCC (tumor suppressor gene Deleted in Colorectal Cancer), PTEN (phosphatase and tensin homolog) či gen pro E-cadherin. Ve všech buňkách zároveň existují kontrolní mechanismy, kterými se opravují chyby vznikající v průběhu replikace. Systém opravných mechanismů je zajišťován produkty **reparačních genů** a jejich porucha usnadňuje maligní transformaci.<sup>[64]</sup>

Obvykle je ovšem potřeba pěti nebo šesti nezávislých mutací, které se musí odehrát v jediné buňce, aby získala karcinogenní genotyp. Mutace vedoucí ke vzniku nádorů se neobjevují najednou, ale postupně se hromadí v průběhu mnoha let. Někteří jedinci mají vrozenou zárodečnou mutaci v tumor supresorovém genu nebo protoonkogenu a množství dalších mutací potřebných pro rozvoj rakoviny je u nich menší, což souvisí s vyšší frekvencí a časnějším věkem možného vzniku nádorového onemocnění u takto postižených jedinců.<sup>[3]</sup>

#### 1.1.1. Rozvoj a příčiny nádorových onemocnění

Celý proces vzniku nádorů tedy kancerogeneze probíhá v několika relativně dobře charakterizovaných etapách. Zahájení procesu (*iniciace*) nastává účinkem zevních a vnitřních faktorů. Dojde sice ke genetické poruše, ale ta může zůstat bez funkčních důsledků po řadu let. Teprve spoluúčastí dalších podnětů dochází k následnému vývoji (*promoce*), při které se objevují poruchy diferenciací. V tomto období existuje ještě možnost zastavení tohoto abnormálního vývoje. V opačném případě proces pokračuje, mění se zásadním způsobem fenotyp buněk a vzniká maligní klon (*stadium konverse či transformace*). Transformované buňky ztrácejí schopnost odpovědi na regulační mechanismy, dochází k lokálnímu růstu nádoru (*stadium progresse*) a posléze k šíření nádoru mimo prvotní ložisko (*stadium metastasování*).

Spouštěcím mechanismem celého procesu mohou být nejrůznější kancerogenní faktory, jejichž společnou vlastností je působení genetických změn, na jejichž podkladě dochází k aktivaci onkogenů nebo inaktivaci antionkogenů. Faktory zevního prostředí, které se podílejí na vzniku nádorů lze dle jejich povahy rozdělit na *faktory fyzikální, chemické a biologické*. Za nejvýznamnější z fyzikálních faktorů se považuje záření (ionizující, ultrafialové, Rentgenovo záření). Z dalších fyzikálních faktorů prokázaly kancerogenní účinek působení azbestových vláken, lokální tepelné změny či chronické dráždění. Mezi prokázané chemické kancerogeny ze zevního prostředí patří těžké kovy (Cd, Be, Co, Ce, Ni, Co<sup>VI+</sup>), arsen, polycyklické aromatické uhlovodíky (benzo(a)pyren, methylcholaten aj.) obsažené v dehtu, tabákovém kouři nebo v průmyslových exhalacích. Z dalších chemických sloučenin řadíme do kancerogenů aromatické aminy (2-naftylamin, benzidin), nitrosaminy, benzen, chlorované uhlovodíky, hydraziny a triaziny, dále pak různé léky a některé přírodní látky jako aflatoxin B<sub>1</sub>, aktinomycin D či diestery forbolu. Většina chemických kancerogenů se přímo či svými metabolity váže na DNA a vytváří kovalentní adukty, méně častěji dochází k apurinaci

a apyrimidinaci DNA, příčnému propojení (cross-linking), vzniku cyklických aduktů, interkalátů nebo pyrimidinových dimerů. Vedle přímého genotoxického účinku mohou chemické kancerogeny poškodit genetický materiál také nepřímo (např. účinkem kyslíkových radikálů vznikajících jejich působením). Mezi biologické faktory kancerogeneze patří především RNA a DNA viry; herpesviry (virus Epsteina-Barrové), papilomaviry, hepadnaviry a v omezeném měřítku některé bakteriální a parazitární infekce. Od karcinogenů je třeba odlišit pomocné faktory (**kokarcinogeny, promotory**), které mají schopnost již existující genetické změny prohloubit, nikoli je samostatně vyvolat.<sup>[64]</sup>

### 1.1.2. Klasifikace nádorových onemocnění

Klasifikace nádorů vychází z jejich histologické skladby, anatomické lokalizace, biologické povahy a histogeneze. Z histologického hlediska rozlišujeme nádory na *diferencované, méně diferencované, popř. anaplastické*. Podle biologického chování se nádory dělí na *benigní (nezhoubné) a maligní (zhoubné)*. Nezhoubné nádory vyrůstají z děložní svaloviny, tukové či vazivové tkáně. Mohou se vyskytovat v různých místech těla, včetně ženských prsů (má je asi 50% žen), a různých velikostech. Nejsou-li krvácivé nebo příliš nenarůstají není nutné a ani vhodné je operovat (každý chirurgický zákrok snižuje imunitu a následná jizva vytváří hráz v lymfatickém systému). Nezhoubné nádory nevytváří metastasy (druhotné nádory v dalších částech těla) a nikdy se nemohou rozvinout v rakovinu. Typickým znakem zhoubnosti je tvoření druhotných nádorů – metastas v důležitých orgánech (játra, plíce, kosti, mozek). Postihují buď celé tělo (tzv. generalisace) – tyto jsou jen velmi těžko léčitelné, nebo jsou ojedinelé (např. v uzlinách nebo játrech). Konečně histogenetická klasifikace přihlíží k původu nádorů dle základních typů tkání. Tak rozeznáváme nádory **epitelové, mezenchymové, neuroektodermové, germinální a smíšené**. Epitelové nádory mohou být benigní (papilom, adenom) nebo maligní (karcinom). Mezenchymové nádory se třídí podle výchozí tkáně na benigní (fibrom, myxom, lipom, hemangion, leiomyom, rabdomyom, chondrom, osteom a synovialom). Maligní pojivové nádory nazýváme sarkomy. Nádorová onemocnění krvetvorné tkáně vycházejí z krevních buněk různých vývojových řad. Zjednodušeně je lze rozdělit na leukémie difúzně infiltrující orgány a na maligní leukémie. Do neuroektodermových nádorů řadíme jednak nádory centrálního nervového systému a periferních nervů, jednak nádory z névových buněk. Germinální nádory jsou nádory ze zárodečných buněk. Histologicky mohou být značně heterogenní (např. embryonální

karcinom, nádor ze žloutkového váčku, choriokarcinom a teratomy). Poslední skupinou jsou smíšené nádory, které se skládají z různých mezenchymových složek, epitelových a neuroektodermových tkání různé vyžralosti a biologické povahy vyskytující se v dané oblasti.<sup>[64]</sup>

### 1.1.3. Možnosti terapie nádorových onemocnění

Ve většině případů nestačí k léčbě nádorových onemocnění jen jediná léčebná metoda, ale je nutný komplexní přístup **kombinující chirurgickou léčbu s radioterapií a užíváním chemoterapeutik**. **Chirurgie** se využívá jednak k diagnostickým účelům a jednak je tzv. paliativní chirurgie důležitou součástí komplexní léčby. Jde o operační odstranění primárního nádoru, kterým se minimalizuje množství nádorových buněk, zabrání se komplikacím bezprostředně ohrožujícím život a dochází zpravidla ke zlepšení kvality života nemocného. Ve zvláštních případech se rovněž uskutečňuje chirurgická léčba metastas za předpokladu, že nejsou přítomny metastasy v různých dalších orgánech. Z moderních chirurgických přístupů se využívá působení laseru (např. u karcinomu jícnu, hrtanu, bronchogenního karcinomu) a kryochirurgie. **Radioterapie** využívá pro léčbu nádorů letálních účinků různých druhů ionizujícího záření. Je to záření korpuskulární (částicové) a elektromagnetické (fotonové), přičemž nejčastěji se používá elektromagnetické záření X (rentgenové, brzdné) o různém napětovém rozsahu. V časných stádiích má léčba zářením kurativní cíl, jehož záměrem je úplná eradikace nádoru, ovšem je také významnou metodou paliativní. Cílovou strukturou pro vznik radiačního poškození je DNA. Interakce záření s DNA probíhá jednak přímo působením fotonů záření poškozujícím řetězce DNA a jednak nepřímo prostřednictvím radikálů biomolekul. Účinek záření se přitom projevuje jak na úrovni molekulární, tak na úrovni buněčné zejména změnou proliferační aktivity a indukci programované smrti buňky (apoptosy). Ozářit však nelze celé tělo, tím by vznikla nemoc z ozáření a proto se ozařuje lokálně s přesně vymezenou dobou tak, aby neodumřel i přirozený organismus, ale i tak je nutné počítat s řadou nežádoucích účinků. **Chemoterapie** je metoda, která využívá k léčbě nádorových onemocnění účinek chemických sloučenin nazývaných cytostatika. Hlavním kritériem pro využití chemoterapie jako léčebné metody je citlivost nádorů k chemoterapeutikům. U zvláště sensitivních onemocnění má chemoterapie **úlohu primární** (léčebnou), dále může mít charakter **adjuvantní** (doplňkový k základní léčebné metodě – chirurgie, radioterapie) případně **neoadjuvantní** (zlepšuje operabilitu nádorů) či **paliativní** (doplňková, udržovací) terapie. U některých typů nádorů se uplatňuje také **imunoterapie**<sup>[53,64]</sup>

nebo **hormonální terapie**. K hormonální terapii se používají adrenokortikosteroidy, estrogeny, antiestrogeny, progesterony a androgeny. Tyto látky se používají v terapii nádorů, kde hormony a jejich exprese hraje důležitou roli v rozvoji nádoru např. tamoxifen je používán jako anti-estrogen v terapii rakoviny prsu, kde je prokázáným rizikovým faktorem prodloužená expozice estrogenům, které stimulují proliferaci prsních buněk a tím zvyšují pravděpodobnost, že se bude dělit buňka s potenciální nádorovou mutací.<sup>[57,88]</sup> Při chemoterapii chemickými cytostatiky však dochází nejen k ničení rychle se množících buněk nádorových, ale i k ničení přirozených rychle se množících buněk jako jsou buňky jaterní tkáně, bílé krvinky, červené krvinky, spermie, vajíčka. Pro organismus pacienta je léčba cytostatiky vždy toxická. Například deriváty platiny jsou těžce jedovaté pro ledviny, jiné působí toxicky na nervy, močový měchýř, srdce nebo plíce. Cytostatická léčba působí rovněž velmi nepříznivě na psychiku zejména mladších lidí a způsobuje i další problémy např. drastické snížení imunity.

#### 1.1.4. Využití cytostatik v chemoterapeutické léčbě

Cytostatika jsou základním kamenem chemoterapie nádorových onemocnění. Mezi hlavní zdroje cytostatik patří syntéza nových látek, fermentace plísní s následnou izolací protinádorových antibiotik a extrakce látek přirozeného původu – z rostlin, mořských hub apod. Farmakokinetika cytostatik zahrnuje řadu dílčích pochodů, které spolu velmi úzce souvisí a vzájemně na sebe navazují. Je to resorpce, distribuce cytostatika v organismu, jeho biotransformace a vylučování. Resorpce cytostatika závisí na aplikační cestě (nejúčinnější je parenterální aplikace), formě podání a průniku cytostatika membránami. Průnik cytostatika membránami se může dít různým způsobem: filtrace membránovými póry, pasivní difúze membránami nebo aktivní transport prostřednictvím specifického přenašeče. Ideální situace nastává, pokud je cytostatikum transportováno specificky pouze do transformovaných buněk, v kterých působí, ale v současné době není specifita používaných cytostatik ideální a selektivního účinku je často dosaženo díky rozdílné růstové kinetice normálních a nádorových buněk. V nekontrolovaně proliferující populaci nádorových buněk se počet buněk rychle zvětšuje, ale jejich regenerační čas je ve srovnání s normálními buňkami – v závislosti na pokročilosti onemocnění – prodloužen. Ke stimulaci dělení buněk dochází například po chirurgickém odstranění okolních buněk. Je pak nutné zvolit optimální kombinaci a načasování dávek cytostatik. Jako poměrně úspěšné se jeví použití vysokodávkové terapie, kterou bývají zasaženy i buňky v klidové fázi např. kombinace vysokých dávek cytostatik

s antidotem, následnou transplantací kostní dřeně nebo aplikací hematopoetických růstových faktorů mezi jednotlivými dávkami cytostatik.<sup>[63]</sup>

Jednotlivá cytostatika se liší částí buněčného cyklu, ve které působí a mechanismem účinku, který zasahuje nejrozličnější systémy a pochody v buňkách. V současné době je cytotoxický účinek chemoterapeutik vysvětlován několika základními mechanismy:<sup>[63]</sup>

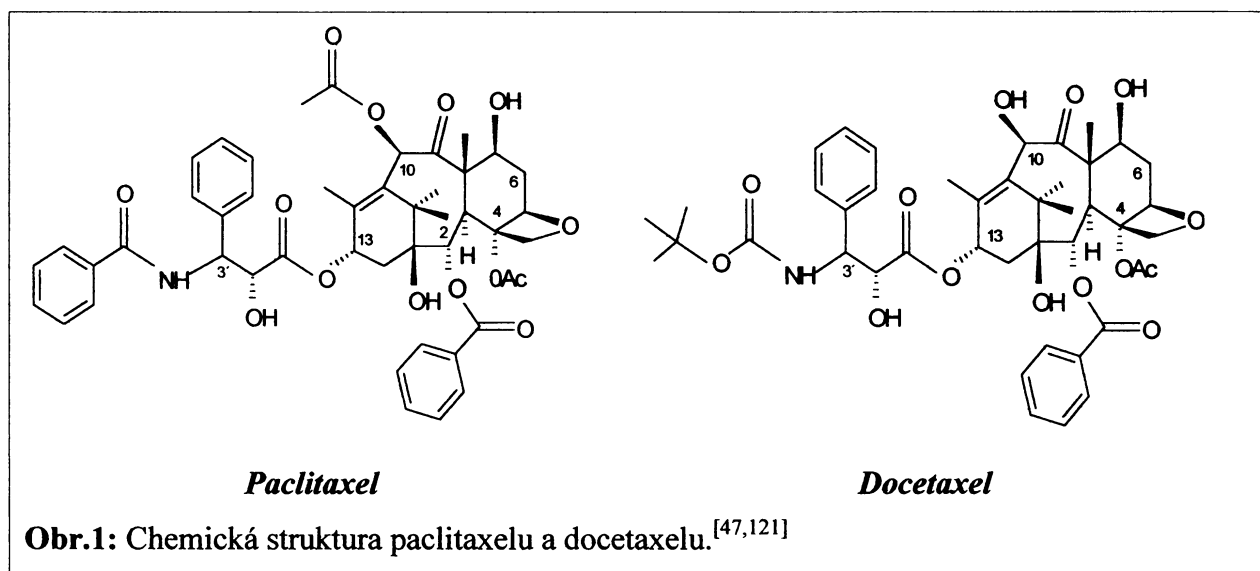
- **Přímé poškození nukleových kyselin** (např. alkylace, interkalace, inhibice topoisomeras, rozštěpení DNA), vedoucí k poruše jejich funkce a následné apoptose. Příklady alkylujících cytostatik jsou cyklofosamid, karmustin, lomustin. Látkami, které se rovněž vážou na DNA a zabraňují syntéze RNA jsou protinádorová antibiotika jako doxorubicin (adriamycin), mitomycin-C či bleomycin.
- **Inhibice klíčových enzymů metabolismu** vedoucí k poškození nukleových kyselin. Tímto způsobem působí tzv. antimetabolity. Léčiva této skupiny zasahují do S fáze buněčného cyklu. Jedná se o analoga metabolitů inhibující dílčí reakce biosyntézy nukleových kyselin (analoga kys. listové, methotrexát) nebo analoga nukleotidů, která jsou inkorporována do nukleových kyselin, což vede k jejich defektní funkci (6-merkaptopurin, 5-fluorouracil) či inhibitory topoisomeras např. camptotheciny (irinotecan, topotecan)<sup>[111]</sup>.
- **Alterace mikrotubulárního proteinu** vedoucí k zastavení mitosy buněčného cyklu inhibicí tvorby nebo depolymerisací mikrotubulů (vinka-alkaloidy) či naopak tvorbou abnormálních mikrotubulů a inhibicí jejich depolymerisace (taxany). V obou případech je narušena rovnováha mezi volným tubulinem a tubulinem vázaným v mikrotubulech.
- **Porucha syntézy proteinů** - méně často (aminoglykosidy, tetracykliny)
- **Poškození buněčné membrány** - méně často (peniciliny, cefalosporiny)

## 1.2. Taxany

Taxany představují jednu z nejvýznamnějších skupin protinádorových léčiv s širokým spektrem terapeutického využití. Jejím základem jsou dvě léčiva využívaná v terapeutické praxi *paclitaxel* a *docetaxel*.<sup>[20]</sup>

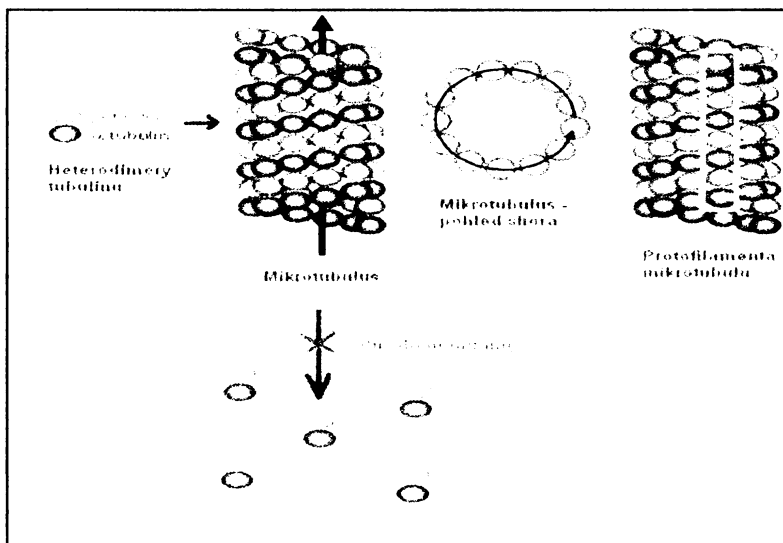
Paclitaxel (TAXOL<sup>®</sup>, *obr.1*) byl poprvé extrahován z kůry Pacifického tisu *Taxus brevifolia* během intenzivního výzkumu přírodních sloučenin jako antineoplasických látek na

konci šedesátých let.<sup>[144]</sup> Není produkován přímo tiselem, ale endofytickou houbou *Taxomyces andreanae* parazitující na tisu,<sup>[62]</sup> ovšem dnes je připravován semisyntetickou cestou. Docetaxel (TAXOTERE<sup>®</sup>, obr.1) je semisyntetickým analogem paclitaxelu, připravovaným z 10-deacetylbaccatinu III, inaktivního prekursoru izolovaného z jehličí Evropského tisu *Taxus baccata*.<sup>[9,144]</sup>

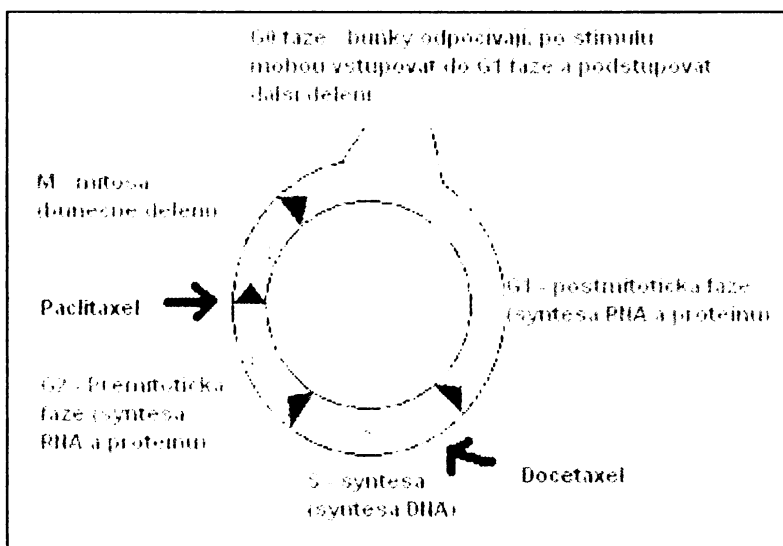


### 1.2.1. Mechanismus účinku taxanu

Paclitaxel a docetaxel jsou tzv. **mitotické jedy**, to znamená, že působí cytotoxicky v průběhu mitosy buněčného cyklu. Interferují se systémem mikrotubulů a tubulinu v eukaryotických buňkách. Tubulin je bílkovina tvořená podjednotkami  $\alpha$  a  $\beta$  a jejich střídavým řazením se formuje do protofilament. Třináct protofilament vytváří dutý válec, mikrotubulus o průměru 20nm. Mikrotubuly hrají klíčovou úlohu pro správnou migraci chromosomů při mitose, dále se podílejí na udržení tvaru buňky, sekreci hormonů, transportu granulí, buněčné motilitě a na přenosu signálů mezi povrchovými membránovými receptory a jádrem.<sup>[13,62]</sup> Za normálních podmínek existuje v buňce rovnováha mezi tubulinem volným a vázaným v mikrotubulech.<sup>[13]</sup> Taxany svou interakcí s mikrotubuly posouvají rovnováhu mezi tubulinem a mikrotubuly směrem k mikrotubulům.<sup>[9]</sup> Urychlují jejich tvorbu, stabilizují již vytvořené mikrotubuly a brání jejich depolymerizaci na volný tubulin čímž narušují rovnováhu mezi tubulinem volným a vázaným v mikrotubulech a tím i průběh mitosy.<sup>[113,131]</sup> Působení taxanů v buňkách je znázorněno na obr.2.



**Obr.2:** Účinek taxanů na mikrotubulární systém v eukaryotických buňkách.<sup>[152]</sup>



**Obr.3:** Jednotlivé fáze buněčného cyklu eukaryotických buněk a působení taxanů v konkrétních fázích buněčného cyklu.

Dalším mechanismem účinku taxanů je **indukce programované smrti buňky – apoptosy**. Tlumí totiž expresi onkogenu *bcl-2* a jeho fosforylací inhibují zároveň jeho funkci.<sup>[45,46]</sup> Funkcí genu *bcl-2* je kódování membránových proteinů, které inhibují apoptosu.<sup>[13,62]</sup> Inaktivace *bcl-2* tak vede k indukci procesu apoptosy.

### 1.2.2. Metabolismus taxanu za účasti cytochromu P450

Taxany jsou metabolisovány a vylučovány hlavně **hepatobiliární cestou** za účasti významné skupiny biotransformačních enzymů nazývaných **cytochromy P450**. Účinnosti cytochromů P450 v metabolismu léčiv se věnuje značná pozornost a to jak jejich podílu na



tvorbě finálních metabolitů léčiv, tak i na reakcích vedoucích ke zvýšení jejich farmakologické aktivity nebo vyvolávajících toxické účinky. Identifikace isoformů cytochromů P450 metabolizujících jednotlivá léčiva a informace o jejich výskytu u člověka a jiných živočišných druhů je z klinického hlediska nepostradatelná s ohledem na stanovení účinků a toxicity léčiv. Poznání metabolismu léčiv také potenciálně umožňuje zvyšovat nebo modulovat jejich účinek nebo naopak snižovat vedlejší účinky.<sup>[103,132]</sup> Rozdílné metabolické profily taxanů jsou dány mezidruhovými, pohlavními a rovněž individuálními rozdíly v expresi a obsahu jednotlivých cytochromů P450. Množství cytochromů v jednotlivých tkáních totiž nelze brát absolutně. Řada významných forem cytochromů P450, které metabolizují xenobiotika, patří k silně inducibilním enzymům tzn., že působením látek zvaných induktory CYP dochází ke zvýšení množství a aktivity enzymu.<sup>[106]</sup> Některé CYP lze u zvířat indukovat aplikací xenobiotik jako jsou *polycyklické aromatické uhlovodíky* (3-methylcholanthren,  $\beta$ -naftoflavon, 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin), *barbituráty* (fenobarbital), *steroidy* (pregnenolon 16 $\alpha$ -karbonitril, dexamethason), *jednoduché uhlovodíky s aromatickými řetězci* (ethanol, aceton), *hypolipidemická léčiva* (klofibrát) nebo *makrolidová antibiotika*. Indukovat CYP lze i *potravou, alkoholem, kouřením, hladověním* apod.<sup>[21,128]</sup> Regulace je velmi komplexní a zahrnuje zvýšení transkripce, stabilizaci mRNA, stabilizaci proteinu i ovlivnění jeho degradace.<sup>[21]</sup> Jiné látky se chovají jako ***inhibitory funkce P450*** a to buď *kompetitivní* (soutěží se substrátem o stejné aktivní místo) nebo *nekompetitivní* (váží se na jiné místo enzymu než substrát CYP). Některé látky *ireversibilně poškozují hem* (tzv. substráty sebevraždy = suicide substrates), nebo se ireversibilně váží na protein P450. Specifické inhibitory CYP lze využít ke studiu podílu určitého P450 na metabolismu různých substrátů či k inhibici jeho katalytické funkce.<sup>[41,90]</sup> Inhibicí cytochromů P450 lze ovlivnit rovněž metabolismus taxanů. Z tohoto hlediska jsou významné především selektivní inhibitory CYP3A ovlivňující metabolismus paclitaxelu a docetaxelu a selektivní inhibitory CYP2C8 mající vliv na přeměnu paclitaxelu. Známými inhibitory CYP3A jsou ketokonazol, troleandomycin,<sup>[145]</sup> naringenin,<sup>[39]</sup> gestogen,<sup>[38]</sup> mezi selektivní inhibitory CYP2C8 řadíme sulfafenazol,<sup>[103]</sup> kvercetin a kaempferol.<sup>[47]</sup>

### 1.2.2.1 Cytochromy P450

***Cytochromy P450 (EC 1.14.14.1)*** jsou považovány za nejdůležitější enzymy oxidace a redukce xenobiotik u živočichů a podílejí se také na metabolismu řady látek tělu vlastních jako steroidů, mastných kyselin či prostaglandinů. Obecně působí tyto hemoproteiny jako

koncové oxidoreduktasy v enzymatických komplexech *monooxygenas se smíšenou funkcí* (z angl. *mixed-function oxidases*, dále jen *MFO*) přítomných u živočichů i rostlin. V lidském těle se vyskytují především v játrech, nicméně významné jsou i jejich hladiny v plicích, ledvinách, tenkém střevě, kůži, mozku, nadledvinkách, nosní sliznici, varlatech a placentě. V buňkách jsou lokalizovány převážně v membránách hladkého i drsného endoplasmatického retikula (dále jen ER), některé rovněž v membránách mitochondrií jako nezbytné složky MFO systému.<sup>[41,135]</sup> Sloučeniny, které jsou substráty takových enzymů, jsou v organismu biotransformovány za vzniku polárnějších produktů, které pak mohou být vyloučeny a nedochází tak k bioakumulaci příslušných xenobiotik. Vedle detoxikace těchto sloučenin může docházet i ke vzniku takových derivátů, které jsou biologicky aktivnější; fyziologicky i farmakologicky působí příznivě, jiné mohou být toxické, mutagenní či karcinogenní.<sup>[41,103,132]</sup>

#### 1.2.2.2. Funkce cytochromu P450 v MFO systému

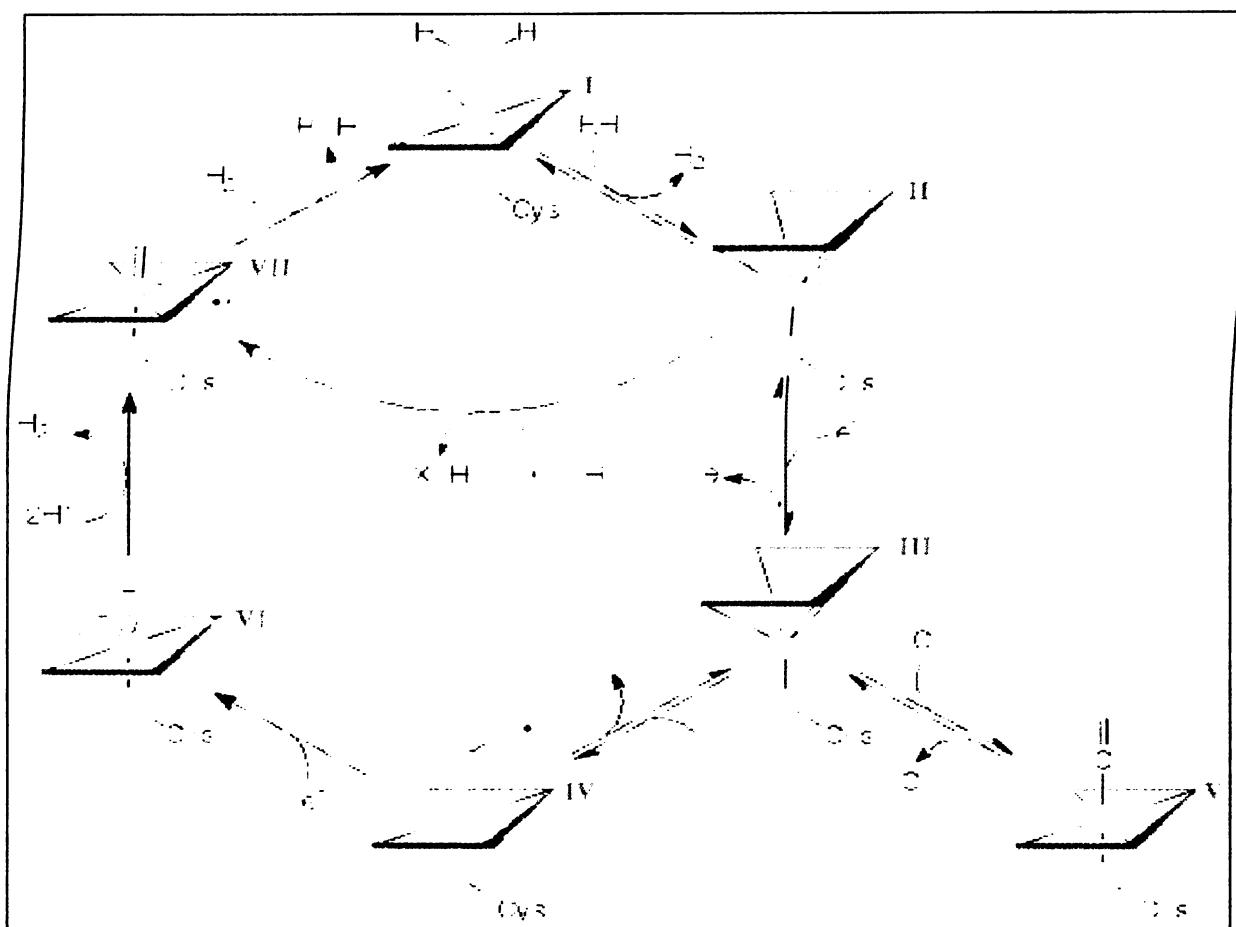
Cytochrom P450 plní jako základní složka enzymatických komplexů *monooxygenas se smíšenou funkcí* vlastní oxidasovou funkci MFO systému tím, že zprostředkovává vazbu molekulárního kyslíku, jeho aktivaci a zabudování jednoho atomu kyslíku do molekuly substrátu, přičemž druhý atom kyslíku je redukován na vodu. Obecný mechanismus *monooxygenasové* reakce lze shrnout Masonovou rovnicí :



Kde RH představuje substrát oxidovaný MFO systémem.<sup>[131]</sup>

Cytochrom P450 se skládá z apoproteinové složky a prostetické skupiny, kterou je hem typu b navázaný koordinačně kovalentní vazbou atomu železa (ve svém centru) na sulfhydrylovou skupinu (SH) aminokyseliny cysteinu v primární struktuře apoproteinu P450.<sup>[86]</sup> Dalšími složkami MFO systému jsou *NADPH-P450 reduktasa (EC 1.6.2.4.)* dodávající elektrony potřebné k redukci a frakce membránových lipidů. Fosfolipidy MFO, které nejsou nezbytně nutné pro vazbu substrátu interagují zčásti specificky s P450 (způsobují posun rovnováhy směrem k vysokospinové formě (VS) a konformační změny zvyšující afinitu P450 k substrátu). Zároveň stimulují tvorbu funkčně aktivního komplexu tím, že vytváří vesikulární útvary, které usnadňují interakce P450-reduktasy a jsou zásobárnou substrátů pro P450.<sup>[41]</sup> Fakultativními složkami jsou pak *cytochrom b<sub>5</sub> a cytochrom b<sub>5</sub> reduktasa (EC 1.6.2.2.)*.<sup>[133]</sup>

Ve schématu (obr.4) je shrnut obecný mechanismus reakčního cyklu cytochromu P450 v MFO systému.



**Obr. 4:** Reakční cyklus cytochromu P450 (RH – substrát, ROH – hydroxylovaný produkt, XOOH – peroxosloučenina)

### 1.2.2.3. Formy cytochromů P450

Cytochromy P450 tvoří tzv. superrodinu hemoproteinů typu b s identickou prostetickou skupinou i mechanismem katalýzy, ale různou strukturou apoproteinové části, která je zodpovědná za rozdíly v substrátové specifitě.<sup>[128]</sup> Tyto různé formy (isoformy) jsou řazeny na základě podobnosti aminokyselinové sekvence do genetických rodin (sekvenční homologie větší než 40%) a podrodin (homologie větší než 55%).<sup>[153]</sup> V současnosti bylo již popsáno na 500 isoenzymů 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. Rodiny cytochromů P450 jsou označovány prvním číslem za zkratkou P450. Následuje velké písmeno označující podrodinu. Jednotlivé isoenzymy jsou pak označeny číslem za písmenem podrodiny. Pro zjednodušení Nebert a spol.<sup>[89]</sup> navrhli označení forem P450 zkratkou **CYP**

(**cytochrom P450**), za níž pak následuje označení rodin a podrodin podle výše uvedených kritérií.<sup>[36,89,93,132]</sup> Jednotlivé isoformy P450 mohou být rozpoznány na základě jejich struktury, substrátové specifity nebo reakcemi s různými typy induktorů.<sup>[35]</sup> Mezi lidmi a jinými živočišnými druhy existují genetické a indukci vyvolané rozdíly jejich exprese. Například některé formy CYP potkanů používaných jako nejběžnějších experimentálních zvířat nejsou přítomny u člověka a naopak i ortologní (analogické) formy potkaních a lidských forem mají přes řadu katalytických podobností výrazné rozdíly.<sup>[90]</sup> Z tohoto pohledu jsou perspektivními experimentálními modely pro farmakologické a toxikologické studie bez potřeby indukce biotransformačních enzymů miniprasata a prasata,<sup>[68]</sup> jejichž enzymatická výbava je velmi podobná lidské. Např. pro nejvýznamnější lidský CYP3A4 byla nalezena ortologní forma CYP3A29 u prasat<sup>[60]</sup> i miniprasat.<sup>[5]</sup> Orgány a tkáně z transgenních jedinců obou zmiňovaných živočišných druhů jsou navíc potenciálními kandidáty pro využití v humánní terapii hlavně xenotransplantacích.<sup>[23]</sup> Z těchto důvodů je jejich využití jako experimentálního modelu studia metabolismu xenobiotik tolik aktuální. V předkládané práci byla věnována pozornost cytochromům P450 podílejícím se na metabolismu taxanů. Jedná se o podrodinu CYP 3A u lidí, potkanů, prasat i miniprasat a cytochrom P450 2C8, který je přítomen pouze u lidí a prokazatelně se účastní metabolismu paclitaxelu.

Členy podrodiny lidských **CYP3A** jsou **CYP3A4**, **CYP3A5** a **CYP3A7**. Celá podrodina je velmi důležitá v katalýze metabolismu různých léčiv, karcinogenů a endogenních substrátů. Jsou nejrozšířenějšími formami CYP (20 – 60%) v játrech a jsou i v jiných tkáních. Mezi substráty CYP 3A4 patří testosteron, progesteron a androstenedion.<sup>[148]</sup> Z léčiv to jsou quinidin, nifedipin, lidokain, erythromycin, troleandomycin, roxithromycin, cyklosporin, warfarin, triazolam, midazolam, diazepam atd. a dále mnoho prokarcinogenů např. aflatoxin B<sub>1</sub>.<sup>[8,35,103,106]</sup>

**CYP2C podrodiny** jsou u člověka hojně zastoupeny a mají širokou substrátovou specifitu. V metabolismu a účinnosti řady léčiv hrají velmi významnou roli. Je pro ně totiž typický výrazný genetický polymorfismus, který způsobuje, že u určitých skupin lidské populace je zcela zabráněno chemoterapeutickému účinku některých léčiv, které jsou na cytochomech P450 podrodiny 2C metabolicky závislé. U lidí byly identifikovány čtyři formy tohoto enzymu (**2C8**, **2C9**, **2C18** a **2C19**). Jsou exprimovány výlučně v játrech. O metabolické úloze samotného CYP2C8 je známo poměrně málo. Substrátem pro tento CYP je například paclitaxel a také tolbutamid a benzfetamin, které jsou substráty rovněž pro CYP2C9. CYP2C8 má také svou roli v metabolismu endogenních látek jako retinol a retinová kyselina.<sup>[40,147]</sup>

### 1.2.3. Metabolismus paclitaxelu

Metabolismus paclitaxelu probíhá **v játrech** a spočívá v oxidačních reakcích, původní léčivo a metabolity se vylučují žlučí a zažívacím traktem,<sup>[81]</sup> pro což svědčí i to, že paclitaxel byl objeven u pacientů v plasmě, moči a žluči, zatímco jeho metabolity pouze ve žluči.<sup>[41,42]</sup> Hlavními pozicemi molekuly paclitaxelu, kde probíhají metabolické přeměny **za účasti CYP** jsou *para*-pozice C-3'-fenylu, *meta*-pozice C-2 benzoátu, polohy C-6 a C-10.<sup>[98,99]</sup>

U lidí je v *in vitro* podmínkách s lidskými jaterními mikrosomy základní biotransformační reakcí oxidace v C6 pozici na taxanovém kruhu za vzniku hlavního lidského metabolitu **6 $\alpha$ -hydroxypaclitaxelu (6 $\alpha$ -OHPCT)**. Další metabolit odpovídá hydroxylaci v *para* pozici na C3' postranního řetězce, přičemž množství 6 $\alpha$ -hydroxypaclitaxelu výrazně převyšuje **C3'-hydroxypaclitaxel (C3'-OHPCT)**.<sup>[24,113]</sup> V *in vivo* podmínkách byly objeveny ve žluči pacientů oba monohydroxylované metabolity detegované *in vitro*, dále **dihydroxypaclitaxel**<sup>[81,82,84]</sup> a navíc 7 minoritních metabolitů, z nichž 3 byly identifikovány jako **10-deacetylpaclitaxel, 10-deacetylbaecatin III a baecatin III**. V pokusech s cDNA exprimovanými lidskými CYP<sup>[113]</sup> bylo zjištěno, že tvorbu C3'-hydroxypaclitaxelu katalyzuje **CYP3A4**, tvorbu 6 $\alpha$ -hydroxypaclitaxelu katalyzuje **CYP2C8**. Velké individuální rozdíly v metabolismu paclitaxelu u lidí jsou dány interindividuálními rozdíly v expresi CYP2C8 a CYP3A4 proteinů v játrech a rovněž genetickým polymorfismem CYP2C8.<sup>[134]</sup> Metabolismus paclitaxelu je zároveň jeho detoxikací a metabolity jsou mnohem méně cytotoxické než původní léčivo.<sup>[47,61]</sup>

Přeměna paclitaxelu se liší u lidí, potkanů a dalších živočišných druhů. U **potkanů** byly v *in vitro* podmínkách detegovány dvě fenolické sloučeniny odpovídající **C3'-OHPCT a C2'-hydroxypaclitaxelu (C2'-OHPCT)** a dvě neznámé fenolické sloučeniny.<sup>[56]</sup> V *in vivo* podmínkách bylo objeveno ve žluči potkanů kromě paclitaxelu 9 jeho metabolitů, z nichž byly identifikovány **C3'-OHPCT a C2'-OHPCT** a minoritní **baecatin III**. Tvorby metabolitů se účastní CYP3A1/2.<sup>[4]</sup> 6 $\alpha$ -OHPCT vznikající u lidí nebyl v krysí žluči vůbec nalezen.<sup>[84]</sup> U jiných experimentálních zvířat byl detegován vždy C3'-OHPCT, 6 $\alpha$ -OHPCT vznikal také u morčat, kde se tvořil navíc ještě jeden neznámý metabolit a u psů, kde vznikaly navíc dva metabolity s neznámou strukturou. Opice tvoří stejné metabolity jako člověk.<sup>[26]</sup>

#### 1.2.4. Metabolismus docetaxelu

Docetaxel se narozdíl od paclitaxelu přeměňuje stejným způsobem u lidí a jiných živočišných druhů (myš, potkan, králík, pes).<sup>[9,29,83]</sup> Metabolismus probíhá výlučně **v játrech** a metabolity jsou vylučovány přes žluč do výkalů, kde představují až 75% původního léčiva. Pouze méně než 10% bylo objeveno ve výkalech jako nezměněný docetaxel. Ačkoli je docetaxel strukturně velmi podobný paclitaxelu, metabolismus probíhá odlišným způsobem.<sup>[121,131]</sup> Hlavní metabolickou cestou jsou postupné oxidace terc-butyl esterové skupiny na postranním řetězci. Docetaxel je oxidován na primární alkohol **hydroxydocetaxel (OHDTX)** a následně oxidován přes nestálý aldehyd na dva diastereomerické **hydroxyoxazolidinony A a B**. Jinou oxidační cestou hydroxydocetaxel poskytuje přes odpovídající karboxylovou kyselinu **oxazolidindion**.<sup>[83,121,131]</sup>

Dalšími metabolickými cestami docetaxelu jsou **7-epimerizace** na diastereomer docetaxelu, který podléhá stejným metabolickým přeměnám jako docetaxel. V *in vitro* podmínkách s cDNA exprimovanými CYP 3A4 a lidskými jaterními mikrosomy Shou M. a kol.<sup>[121]</sup> detegoval čtyři metabolity, přičemž hydroxydocetaxel byl hlavním metabolitem, minoritními byly oxazolidinony. Vznikal také 7-epimer docetaxelu a to i pokud nebyl do inkubační směsi přidán NADPH generující systém. V *in vivo* podmínkách byly v lidských výkalech detegovány stejné metabolity jako *in vitro*, kromě 7-epimeru, zato oxazolidindion vznikl jako hlavní metabolit, hydroxydocetaxel a oxazolidinony byly pouze minoritními produkty.<sup>[131]</sup> Metabolismu docetaxelu se účastní cytochromy P450, z nichž nejaktivnější byly **CYP3A4 a 3A5** zejména zahrnuté v přeměně docetaxelu na hydroxydocetaxel, následné oxidace jsou katalyzovány především CYP3A4 a částečně 3A5. Epimer docetaxelu je také metabolizován oběma CYP podrodiny 3A. Modifikace postranního řetězce docetaxelu v C2, C4 a C13 pozicích významně redukuje cytotoxicitu docetaxelu. Na druhé straně průměrná účinnost 7-epimeru byla *in vitro* a *in vivo* srovnatelná s docetaxelem.<sup>[9,121,131]</sup>

Kompletní *in vitro* charakterizace metabolismu substrátů jakými jsou taxany zahrnuje určení kvalitativního profilu a kvantitativních parametrů. To představuje identifikaci cytochromů P450 účastnících se metabolických reakcí a detailní identifikaci produktů přeměny. **Kvantitativní parametry** všeobecně zahrnují stanovení **maximální rychlosti metabolismu ( $V_{max}$ )** a **Michaelisovy konstanty ( $K_m$ )**, jejichž znalost je důležitá pro odhad intracelulárních koncentrací substrátů a produktů. Z praktického hlediska slouží ke zjištění optimálních podmínek pro kvantitativní stanovení aktivity enzymů *in vitro* nebo k odhalení

mechanismu účinku mnohých léčiv.<sup>[74]</sup> V následující *tabulce 1* jsou uvedeny kinetické parametry přeměny paclitaxelu a docetaxelu cytochromy P450 tak, jak byly nalezeny v literatuře.

**Tabulka 1:** Kinetické parametry metabolismu taxanů u lidí v podmínkách *in vitro*.

| Preparát                       | Konc. CYP                   | Sledovaná tvorba metabolitu |                            |                |                  | Citace |
|--------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|----------------------------|----------------|------------------|--------|
|                                |                             | C3'-OHPCT                   |                            | 6α-OHPCT       |                  |        |
|                                |                             | K <sub>m</sub>              | V <sub>max</sub>           | K <sub>m</sub> | V <sub>max</sub> |        |
|                                |                             | μM                          | pmol/mgP/min               | μM             | pmol/mgP/min     |        |
| PACLITAXEL                     |                             |                             |                            |                |                  |        |
| Lidské<br>jaterní mikrosomy    | 0.3<br>nmol CYP/ml          | 15                          | 5.3 ± 1.4                  | 15             | 120 ± 30         | [24]   |
| Lidské<br>jaterní mikrosomy    | 1mg<br>proteinu/ml          |                             |                            | 16 – 21        | 830-930          | [47]   |
| Lidské<br>jaterní mikrosomy    | 0.18<br>nmol CYP/ml         |                             |                            | 4.0 ± 1.0      | 870 ± 60         |        |
| cDNA<br>exprimovaný<br>CYP 2C8 | 10<br>pmol CYP/<br>inkubaci |                             |                            | 5.4 ± 1,0      | 10.4             | [113]  |
| Lidské<br>jaterní mikrosomy    |                             |                             |                            | 18             | 19.3             | [65]   |
| Lidské<br>jaterní mikrosomy    | 1mg<br>proteinu/ml          | 3.3                         | 16.0                       | 12.1           | 32.0             | [134]  |
| DOCETAXEL                      |                             |                             |                            |                |                  |        |
|                                |                             | Hydroxydocetaxel            |                            |                |                  |        |
|                                |                             | K <sub>m</sub>              | V <sub>max</sub>           |                |                  |        |
|                                |                             | μM                          | pmol/mgP/min               |                |                  |        |
| Lidské<br>jaterní mikrosomy    | 20 – 100<br>pmol CYP/ml     | 0.91 ± 0.14                 | 1.17 ± 0.08<br>pro CYP 3A4 |                |                  | [121]  |
|                                |                             | 9.28 ± 1.86                 | 1.36 ± 0.17<br>pro CYP 3A5 |                |                  |        |
| Lidské<br>jaterní mikrosomy    |                             | 2.1 ± 0.3                   | 2.6 ± 0.6                  |                |                  | [117]  |
| Lidské<br>jaterní mikrosomy    |                             | 10                          | 80 - 120                   |                |                  | [18]   |
| Lidské<br>jaterní mikrosomy    |                             | 1.1                         | 9.2                        |                |                  | [75]   |

### 1.2.5. Využití klasických taxanu v protinádorové terapii

Paclitaxel byl poprvé použit v roce 1992 v léčbě rakoviny vaječníků.<sup>[6]</sup> V roce 1994 byl schválen pro využití v terapii rakoviny prsu a dnes je také využíván v terapii karcinomu plic a Kaposiho sarkomu.<sup>[47,62,113,155]</sup> Provéřuje se účinnost paclitaxelu u karcinomu esofagu a nádoru ORL oblasti, prostaty a krčku.<sup>[101]</sup> Paclitaxel je podáván intravenosní (i.v.) cestou v dávkách 135mg/m<sup>2</sup> v tříhodinové infúzi. Podávání paclitaxelu je spojeno s celou řadou nežádoucích účinků zejména **alopecie** (ztráta vlasů) nastupující po podání paclitaxelu u všech nemocných a **neutropenie** (snížení hladiny neutrofilních bílých krvinek v krevním obrazu). Dále to jsou **gastrointestinální potíže**, **myelosuprese**, která má za následek neutropenii a také vysoká **četnost hypersensitivních reakcí**, která byla během podávání paclitaxelu snížena změnou režimu, podáváním paclitaxelu v dlouhodobých infúzích a profylaktickým podáváním kortikoidů a blokátorů histaminových receptorů (H<sub>1</sub> a H<sub>2</sub>). Při dodržení doporučených postupů se četnost těchto nepříjemných hypersensitivních reakcí snížila na 5 – 10%. Vedlejší účinek **kardiovaskulární toxicita** se projevuje poruchami srdečního rytmu, **neurotoxicita** zase sensorickými poruchami, ale v dávkách pod 200mg/m<sup>2</sup> zpravidla neurotoxicita nebývá závažná. Tyto příznaky byly nejčastěji popsány při použití kombinace paclitaxelu s cisplatinou a u nemocných s diabetem. Jsou výraznější při konzumaci alkoholu.<sup>[62,144,155]</sup>

**Docetaxel** se používá v **terapii rakoviny prsu** i dalších nádorových onemocnění, kde se ukázal klinicky účinný např. **bronchogenní karcinom**, **karcinom ovaria** aj. Provéřována je jeho indikace u karcinomu pankreatu, žaludku, sarkomů měkkých tkání a maligního melanomu. Dávkování docetaxelu je obvykle 100mg/m<sup>2</sup> v jednod hodinové infúzi. Nežádoucími účinky jsou **alopecie a neutropenie**, **gastrointestinální toxicita**, **myelotoxicita**, která je závažným nežádoucím účinkem a **retence tekutin** projevující se periferními edémy nebo výpotky. Docetaxel však nezpůsobuje závažné hypersensitivní reakce tak často jako paclitaxel a lze jim zamezit premedikací dexamethasonem.<sup>[62,104,114,144]</sup>

Jak již bylo uvedeno, **taxany jsou často v terapiích kombinovány** s dalšími protinádorovými látkami a k prevenci nežádoucích účinků jsou současně podávány **kortikoidy a antihistaminika**.<sup>[62,121,140]</sup> Účinnost docetaxelu se mírně snižuje v kombinaci s cisplatinou a doxorubicinem, naopak stoupá v kombinacích s etoposidem, cyklofosfamidem, 5-fluorouracilem a methotrexátem. Premedikace dexamethasonem nemá vliv na účinky docetaxelu, stejně jako další léčiva mitomycin C, vinkristin a navelbin.<sup>[9]</sup> Pro snížení



neutropenie je podáván faktor G-CSF (granulocyte-colony stimulating factor) před samotnou léčbou i během ní.<sup>[10]</sup>

Účinnost taxanů může být významně ovlivněna současným působením *induktorů* či *inhibitorů enzymů* účastnících se metabolismu taxanů. Při současném podávání barbiturátů byla významně stimulována hydroxylace postranních řetězců paclitaxelu a docetaxelu.<sup>[81]</sup> Steroidy a benzodiazepiny stimulovaly tvorbu metabolitů C3'-hydroxypaclitaxelu, méně 6 $\alpha$ -hydroxypaclitaxelu.<sup>[24]</sup> Inhibitory tvorby obou metabolitů paclitaxelu v lidském organismu byly především ketokonazol, felodipin, gestoden,  $\alpha$ -naftoflavon, mikonazol, terfenadin a testosteron.<sup>[47,84]</sup> Selektivními inhibitory tvorby C3'-hydroxypaclitaxelu byly substráty CYP 3A jako je troleandomycin, orfenadrin, erythromycin a cyklosporin. Tvorbu 6 $\alpha$ -hydroxypaclitaxelu inhibovaly naringenin, kvercetin, kaempferol, diazepam, retinová kyselina a mírně tolbutamid.<sup>[24,47,113]</sup> Mefenytain, hexobarbital a sulfafenazol ovšem tvorbu 6 $\alpha$ -hydroxypaclitaxelu neovlivňují, ačkoli jsou běžnými inhibitory podrodiny CYP 2C.<sup>[113]</sup> Cimetidin, ranitidin, dexamethason a difenylhydramin metabolismus taxanů neovlivňují,<sup>[56]</sup> mírně inhibují vinka-alkaloidy a antracykliny.<sup>[24,85]</sup>

Jednou z nejvýznamnějších překážek v úspěšné terapii nádorových onemocnění, kde jsou využívány taxany je rozvoj rezistence nádorů vůči těmto léčivům obecně nazývaný *mnohočetná léková rezistence (multidrug resistance, MDR)*.<sup>[37,145]</sup> Proto je v současné době věnována velká pozornost vývoji nových látek na bázi taxanů, které by měli méně nežádoucích účinků, lepší farmakologické vlastnosti a zejména vyšší protinádorovou aktivitu zvláště u resistantních nádorů.

### 1.2.6 Nové deriváty taxanu

Na základě rozsáhlých strukturně-aktivitních studií byla syntetizována řada nových derivátů klasických taxanů paclitaxelu a docetaxelu. Některé z těchto derivátů jsou z hlediska biologické aktivity významně účinnější než klasické taxany v různých typech nádorových buněčných liniích a to zejména resistantních. Resistentní buněčné linie vykazují genotyp MDR daný zvýšenou expresí membránového transportéru P-glykoproteinu a některých dalších ABC transportních proteinů (více viz. kap. 1.4). Analogy klasických taxanů účinné v resistantních liniích se zdají být perspektivními pro další studium a jejich potenciální využití v terapii resistantních nádorů.

Významné skupiny nových taxanových analogů:

- **Taxany druhé generace** (deriváty syntetizované z prekursoru paclitaxelu 10-deacetylbaicatinu III): Tyto deriváty působí velmi silně cytotoxicky proti resistantním nádorovým buněčným liniím exprimujících genotyp MDR.<sup>[78]</sup>

**Zástupci:**

**SB-T-1103, SB-T-1214 a SB-T-1216** - velmi účinné v resistantních buněčných liniích rakoviny prsu.<sup>[96]</sup>

**SB-T-101187, SB-T-1213 a SB-T-1250** - působí cytotoxicky a zároveň inhibují P-glykoproteinovou effluxní pumpu.<sup>[32]</sup>

**Per-orálně dostupné taxany druhé generace:**

**SB-T-1213** - 135x aktivnější než paclitaxel v MCF-7-R resistantních buněčných liniích rakoviny prsu, inhibuje transportní funkci P-gp effluxní pumpy.<sup>[32,59]</sup>

**Ortaxel (IDN-5109, BAY 59-8862)** - v současné době ve druhé fázi klinického testování, významně účinnější než paclitaxel v inhibici růstu P-gp-exprimujících nádorů a buněčných liniích.<sup>[96,97]</sup> Ortaxel není na rozdíl od paclitaxelu substrátem P-gp a není jím tedy předčasně z nádorových buněk vylučován. Navíc tento derivát je schopný inhibovat nádorový růst po perorálním podání u myši na rozdíl od paclitaxelu, který perorálně není účinný vzhledem k tomu, že je vylučován díky expresi P-gp v tenkém střevě do střevního obsahu. Také vedlejší účinky jako neurotoxicita a další účinky jsou u ortaxelu redukovány.<sup>[110]</sup> Tento taxanový analog může být díky své aktivitě vhodnou alternativou pro terapii nádorů resistantních vůči paclitaxelu a může rozšířit spektrum využití taxanů např. v terapii nádorů střev.<sup>[141]</sup>

Ortaxel i SB-T-1213 indukují zvýšenou polymerizaci mikrotubulů a tvorbu neobvyklých mikrotubulů např. otevřených vláken mikrotubulů nebo mikrotubulů s protofilamenty navíc. Jejich působení na systém mikrotubulů je silnější než v případě paclitaxelu a pravděpodobně jde o jiný typ interakce s mikrotubuly než u paclitaxelu, protože dochází k jiným konfirmačním změnám mikrotubulů po vazbě těchto nových taxanů, ovšem mechanismus tohoto působení ještě není plně objasněn.<sup>[59]</sup>

- **Fluorotaxany:** syntetizovány jsou inkorporací fluoru do molekuly taxanu. Vznikají tak deriváty, kde jsou C-H vazby v místech podléhajících obvykle hydroxylaci při

metabolismu (*para*-poloha C-3' fenylu, *meta*-poloha C-2 benzoátu, C-6 methylen) nahrazeny vazbou C-F, která zabraňuje ataku CYP během metabolismu. Nedochozí tak k metabolické inaktivaci typické pro klasické taxany.

#### **Zástupci:**

**3'-(4-fluorophenyl)paclitaxel a 2-(3-fluorobenzoyl)paclitaxel** – nepodléhají hydroxylaci v poloze C-3' a jsou tak účinnější než paclitaxel

**2-(3-fluorobenzoyl)docetaxel** naopak podléhal obvyklé hydroxylaci během metabolismu.

**3'-CF<sub>3</sub>-taxany** - mnohonásobně účinnější než klasické taxany v resistantních nádorových liniích MCF-R, LCC6-MDR (buněčné linie rakoviny prsu) a H-460 (buněčná linie rakoviny vaječnicků).<sup>[101]</sup>

- **Imunokonjugáty taxanů;** Existence specifických antigenů na povrchu nádorových buněk nabízí možnost využití protilátek selektivně rozpoznávajících maligní tkáň od zdravé tkáně. Toto zjištění vedlo k syntéze konjugátů taxanů s monoklonálními protilátkami se silnou vazebnou afinitou k nádorově specifickým antigenům. Nicméně tyto deriváty nebyly v obvyklých dávkách taxanů účinné *in vivo*. V současné době jsou syntetizovány a sledovány konjugáty, které jsou vázány na protilátku přes disulfidový můstek. Celý konjugát se po vazbě protilátky k nádorovému antigenu dostává endocytosou do nitra buněk, kde je disulfid štěpen intracelulárním glutathionem a umožňuje uvolnění aktivní formy taxanu.<sup>[101]</sup>
- **Deriváty taxanů bez postranního C-13 řetězce:** Těmto derivátům byl odstraněn celý postranní řetězec v poloze C-13 taxanového kruhu a zůstala jen baccatinová základní struktura. Díky tomu deriváty sice nejsou cytotoxické, ale jsou schopné modulovat funkci P-gp.

#### **Zástupci:**

**tRA96023** – není cytotoxický, ale snižuje resistenci vůči chemoterapeutikům např. taxanům a antracyklinům způsobenou právě nadměrnou expresí P-gp.<sup>[79]</sup>

**tRA 98006** moduluje vylučování mitoxantronu z resistantních buněčných liniích exprimujících P-gp, MRP-1 a BCRP a rovněž není sám cytotoxickou látkou.<sup>[17]</sup>

Ne všechny deriváty klasických taxanů vedou ke zvýšení protinádorových účinků;

- **Cyklohexylové analogy** docetaxelu a paclitaxelu: Všechny cyklohexylové deriváty byly syntetizovány modifikací paclitaxelu a docetaxelu v polohách C-2 a C-3' postranního řetězce C-13 a to konkrétně zavedením fenylu nebo aromatického uhlovodíkového zbytku. Jelikož protinádorová aktivita těchto derivátů není větší než klasických taxanů, nejsou substituce ve zmíněných polohách nezbytné pro silnou vazbu taxanů na jejich tubulinový receptor.<sup>[95]</sup>

### 1.3 Fenolické antioxidanty

V přírodě se vyskytuje velké množství fenolických sloučenin. Na lidský organismus mají silné, často příznivé biologické účinky a proto stojí ve středu zájmu perspektivního využití ve výživě a farmakoterapii. Syntetizovány jsou v rostlinách z fenylyalaninu za účasti kondenzačních reakcí. V současné době je známo více než 8000 látek se strukturou flavonoidů.<sup>[109]</sup>

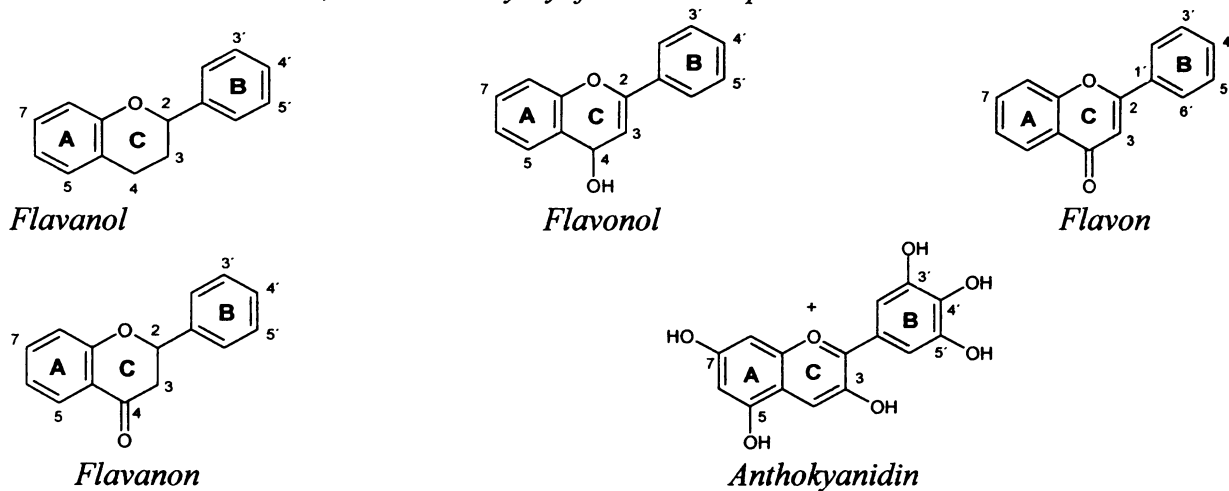
#### 1.3.1. Rozdělení a výskyt přírodních fenolických antioxidantů

Chemicky jsou fenolické antioxidanty aromatické sloučeniny s jednou či více hydroxyskupinami přímo na kruhové struktuře.<sup>[127]</sup> Dělíme je na flavonoidy a non-flavonoidy, kam patří dvě odlišné skupiny sloučenin trihydroxystilbeny a deriváty kyselin.<sup>[76,127]</sup> Přehled nejznámějších zástupců fenolických antioxidantů, jejich struktura a výskyt v přírodě jsou uvedeny v *tabulce 2A-B*.

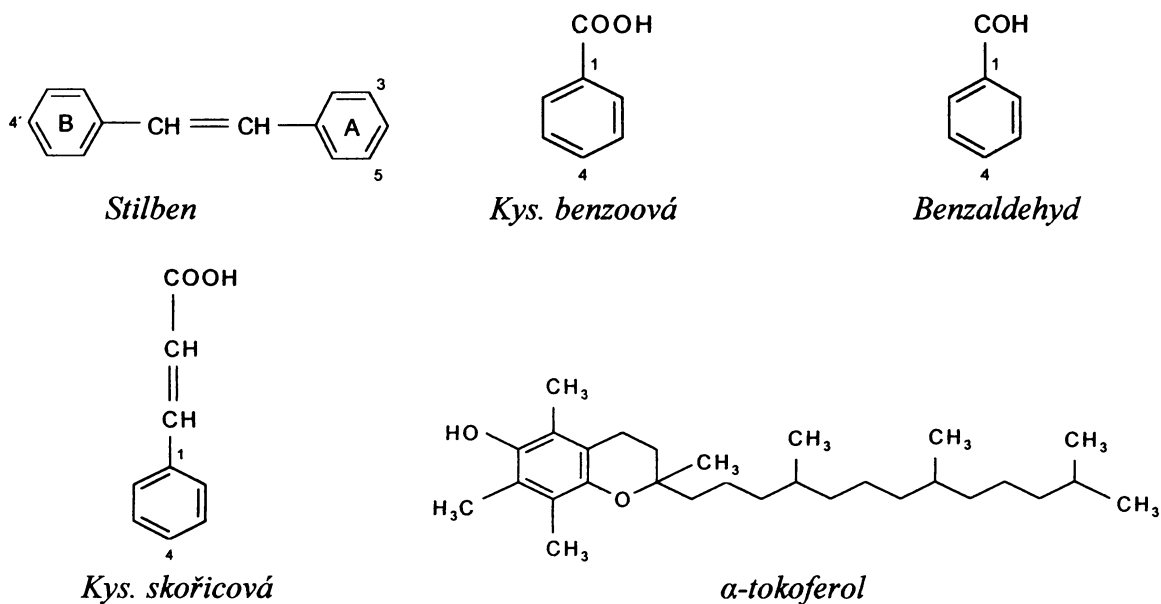
**Flavonoidy** jsou charakterizovány jako molekuly mající dva fenyls spojené pyranovou kruhovou strukturou. Existují volné či konjugované s dalšími flavonoidy, cukry (glykosidy), non-flavonoidy (acylderiváty) a kombinacemi těchto sloučenin.<sup>[127]</sup> Flavonoidy nalezneme v zelenině (např. česnek a cibule), dále v ovoci hlavně jablkách a nápojích jako je čaj, víno a pivo.<sup>[30,50,76]</sup> Celkový příjem flavonoidů dle Hertoga a kol<sup>[50]</sup> představuje 23 mg flavonoidů/den u dospělého člověka, přičemž převládajícím flavonoidem v potravě je kvercetin. Významným zdrojem veškerých fenolických antioxidantů je víno a to zejména červené, kde je koncentrace fenolických antioxidantů mnohem vyšší než ve víně bílém.<sup>[127]</sup> Výrazně nižší koncentrace v bílých vínech je důsledkem odstranění slupek a jader z moštu před fermentací bílých vín, minimalizující vstup fenolických a lipidických složek. Fenolické

antioxidanty mají ve víně vliv na vzhled, chuťové vjemy, vůni a antimikrobiální vlastnosti vín.<sup>[76]</sup> V červeném víně tvoří flavonoidy > 85% celkového obsahu fenolů  $\geq 1000$  mg/L.<sup>[1]</sup>

**Tabulka 2A: Rozdělení, struktura a výskyt flavonoidů v potravě.**<sup>[52,76,114]</sup>



| Třída                 | Zástupce             | Chemický název                                       | Výskyt v potravě   |
|-----------------------|----------------------|--|--|
| <b>flavonoly</b>      | Fisetin              | 3,7,3',4' - tetrahydroxyflavon                       | Brokolice, kapusta, křen, grapefruit, černý čaj, cibule, slupka jablek, olivy, červené víno, pórek, hlávkový salát, brusinky, fazole |
|                       | Galangin             | 3,5,7-trihydroxyflavon                               |  |
|                       | Kaempferol           | 3,5,7,4'-tetrahydroxyflavon                          |  |
|                       | Kvercetin            | 3,5,7,3',4'-pentahydroxyflavon                       |  |
|                       | Morin                | 3,5,7,2',4'-pentahydroxyflavon                       |  |
|                       | Myricetin            | 3,5,7,3',4',5'-hexahydroxyflavon                     |  |
|                       | Isorhamnetin         | 3,5,7,4'-tetrahydroxy-3'-methoxyflavon               |  |
|                       | Rhamnetin            | 3,5,3',4'-tetrahydroxy-7-methoxyflavon               |  |
|                       | Rutin                | 3,5,7,3',4'-pentahydroxyflavon-3-rutinosid           |  |
| <b>flavanony</b>      | Eriodictyol          | 5,7,3',4'-tetrahydroxyflavanon                       | Slupka a dužina citrusových plodů  |
|                       | Hesperetin           | 5,7,3'trihydroxy-4'-methoxyflavanon                  |  |
|                       | Hesperidin           | 5,7,3'trihydroxy-4'-methoxyflavanon-7-rhamnoglukosid |  |
|                       | Naringenin           | 5,7,4'-trihydroxyflavanon                            |  |
|                       | Naringin             | 5,7,4'-trihydroxyflavanon-7-rhamnoglukosid           |  |
| <b>flavony</b>        | Apigenin             | 5,7,4'-trihydroxyflavon                              | Celer, petržel, paprika, mrkev, slupky ovoce   |
|                       | Chrysin              | 5,7-dihydroxyflavon                                  |  |
|                       | Luteolin             | 5,7,3',4'-tetrahydroxyflavon                         |  |
|                       | Nobiletin            | 5,6,7,8,4',5'-hexamethoxyflavon                      |  |
|                       | Tangeretin           | 5,6,7,8,4'-pentamethoxyflavon                        |  |
| <b>flavanoly</b>      | Gallokatechin        | 3,5,7,3',4'-flavanpentol<br>cis-forma (+)-katechinu  | Zelený a černý čaj, červené víno, jablka   |
|                       | (+)-katechin         |  |  |
|                       | (-)-epikatechin      |  |  |
|                       | Taxifolin            |  |  |
|                       | Kondenzované tanniny |  |  |
| <b>anthokyanidiny</b> | Kyanidin             | 3'-anthokyanidin                                     | Grapefruit, víno, třešně, jahody, maliny a jiné červené ovoce  |

**Tabulka 2B: Rozdělení, struktura a výskyt non-flavonoidů v potravě.** [52,76,114]

| Třída                                | Zástupce               | Chemický název  | Výskyt v potravě  |
|--------------------------------------|------------------------|---|---|
| <b>NON-FLAVONOIDY</b>                |                        |   |   |
| <b>stilbeny</b>                      | Astringin              | 3,5,3',4'-tetrahydroxystilben-3-O- $\beta$ -glukopyranosid                          | Podzemnice olejná, některé druhy ovoce a zeleniny   |
|                                      | Piceid                 | 3,5,4'-trihydroxystilben-3-O- $\beta$ -glukopyranosid                               |   |
|                                      | Piceatannol            | 3,5,3',4'-tetrahydroxystilben   |   |
|                                      | Polydatin              | 4,3',5'-trihydroxystilben-3-O- $\beta$ -D-glukopyranosid                            |   |
|                                      | Pterostilben           | 3,5,-dimethoxy-4'-hydroxystilben  |   |
|                                      | Rhaptigenin            | 4'-methoxy-3,5,5'-trihydroxystilben   |   |
|                                      | Rhaptocin              | 4'-methoxy-3,5,5'-trihydroxystilben-5-O- $\beta$ -glukopyranosid                    |   |
| <b>deriváty kys. benzoové</b>        | Resveratrol            | 3,5,4'-trihydroxystilben  |   |
|                                      | Oxyresveratrol         | 3,5,2',4'-tetrahydroxystilben   |   |
|                                      | Resveratrolosid        | 3,5,4'-trihydroxystilben-4'-O- $\beta$ -glukopyranosid                              |   |
| <b>Deriváty kyselin</b>              |                        |   |   |
| <b>deriváty benzaldehydu</b>         | Gallová                | 3,4,5-trihydroxybenzoová kys.   | Obilí, rýže, rajčata, špenát, kapusta, bílé víno, olivy, káva, jablka, švestky, broskve, meruňky, borůvky, hrušky |
|                                      | Vanilková              | 4-hydroxy-3-methoxybenzoová kys.  |   |
|                                      | Gentisová              | 2,5-dihydroxybenzoová kys.  |   |
| <b>deriváty kys. skořicové</b>       | Vanilin                | 3-methoxy-4-hydroxybenzaldehyd  |   |
|                                      | Aldehyd kys. syringové | Aldehyd 3,5-dimethyletheru kys. gallové   |   |
| <b><math>\alpha</math>-tokoferol</b> | Kávová                 | 3,4-dihydroxyskořicová kys.   |   |
|                                      | <i>p</i> -kumarová     | 4-hydroxyskořicová kys.   |   |
|                                      | Ferulová               | 4-hydroxy-3-methoxyskořicová kys.   |   |
|                                      |                        | 3,4,-dihydroxy-2,5,7,8-tetramethyl-2-(4,8,12-trimethyldecyl)-2H-1-benzopyranol-6-ol |   |

*Non-flavonoidy* jsou strukturně jednodušší než flavonoidy a zahrnují stilbeny a deriváty kyselin. Jde o řadu sloučenin, které se liší množstvím a polohou hydroxylových skupin. Deriváty kys. skořicové jsou běžně esterifikovány cukry, organickými kyselinami nebo různými alkoholy. Nezbytným strukturním skeletem stilbenů jsou dva aromatické kruhy spojené methylenovým můstkem. Non-flavonoidy se stejně jako flavonoidy vyskytují ve víně, kde jsou primárně uloženy ve vakuolách hroznů a odtud pak snadno extrahovány jejich rozdrčením. Nejvýznamnějším non-flavonoidem je stilben resveratrol, který se nalézá ve formě *cis* a *trans* v některých druzích ovoce a zeleniny. Jedním z nejbohatších zdrojů je rdesno (*Polygonum cuspidatum*), vinná réva (*Vitis viniferum*) či podzemnice olejná (*Arachis hypogea*). Z kvetoucích rostlin pak můžeme resveratrol nalézt ve dvou druzích lilii (*Veratrum grandiflorum* a *Veratrum formosanum*) a některých dalších druzích rostlin.<sup>[126,127]</sup>

### 1.3.2. Vlastnosti a účinky přírodních fenolických antioxidantů

Jednotlivé fenolické antioxidanty se liší svými fyzikálními vlastnostmi zejména rozpustností, která je významným faktorem pro jejich využití. Obecně jsou fenolické antioxidanty špatně rozpustné ve vodě. Zpravidla je třeba vyšších teplot pro jejich úspěšné rozpuštění.

Fenolické antioxidanty hrají nezastupitelnou roli v lidské výživě. Nejuniverzálnější vlastností je jejich **antioxidační působení** projevující se vychytáváním volných radikálů a v blokování oxidace buněčných i nebuněčných složek jako jsou membrány a lipidy s nízkou hustotou (Low density lipoproteins, LDL).<sup>[127]</sup> Určité fenolické antioxidanty brání či snižují shlukování krevních destiček ovlivněním rovnováhy mezi syntézou tromboxanů a prostacyklinů, ovlivňují průtok krve arteriálním systémem, působí příznivě na progresi i regresi aterosklerosy a svými antioxidačními účinky působí proti dalším procesům souvisejícím s tvorbou reaktivních forem kyslíku a peroxidací lipidů v plasmě a membránách.<sup>[76,127]</sup> Antioxidační účinky fenolických antioxidantů řadí flavonoidy mezi látky důležité pro prevenci nemocí spojených s oxidativním poškozením membrán, proteinů a DNA.<sup>[31]</sup> K významným účinkům fenolických antioxidantů patří i jejich **protinádorové působení**, přičemž jejich vliv na rovnováhu aktivace a inaktivace karcinogenů se projevuje ve dvou směrech.<sup>[123]</sup> i) **inhibice CYP** (ovšem byla popsána i stimulace); ii) **indukce detoxikačních enzymů** (glutathiontransferasy, glukuronyltransferasy apod.) Inhibice některých enzymových aktivit zahrnutých v procesu aktivace karcinogenů či stimulace

dalších enzymů procesu detoxikace byla považována za důležitou v chemické prevenci rozvoje rakoviny. Tyto účinky se ale často liší ve studiích prováděných *in vitro* a *in vivo*.<sup>[124]</sup> Schopnost fenolických antioxidantů ovlivňovat enzymatickou aktivitu některých CYP je intenzivně sledována a byla využita v předkládané práci pro studium vlivu vybraných fenolických antioxidantů *in vitro* na aktivitu podrodiny lidských a potkaních CYP3A enzymů a CYP2C8 účastnících se metabolismu taxanů. V tabulce 3 je znázorněno inhibiční působení různých fenolických antioxidantů na CYP u potkanů a lidí v podmínkách *in vitro* tak, jak byly nalezeny v literatuře.

**Tabulka 3:** Příklady působení fenolických antioxidantů jako inhibitorů aktivity CYP v *in vitro* podmínkách v potkaním a lidském organismu.

| Fenolický antioxidant      | Inhibovaný CYP                                     | IC <sub>50</sub><br>(μM) | K <sub>i</sub><br>(μM) | Typ inhibice                   | Citace      |
|----------------------------|--|--------------------------|------------------------|--------------------------------|-------------|
| <b>Apigenin</b>            | Potkaní CYP1A1/2                                   | 6.0                      | 1.12                   | smíšený                        | [85]        |
| <b>Chrysin</b>             |  | 0.8                      | 0.17                   | smíšený                        |             |
| <b>Fisetin</b>             |  | 9.0                      | 1.15                   | smíšený                        |             |
| <b>Morin</b>               |  | 18.5                     | 4.5                    | smíšený                        |             |
| <b>Myricetin</b>           |  | 15.0                     | 2.0                    | smíšený                        |             |
| <b>Hesperetin</b>          |  | 68.0                     | 4.27                   | smíšený                        |             |
| <b>Kaempferol</b>          | Potkaní CYP1A1/2<br>Lidský CYP2C8                  | 4.0<br>9.0               | 1.8                    | smíšený                        | [47,85]     |
| <b>Kvercetin</b>           | Potkaní CYP1A1/2<br>Lidský CYP1A2<br>Lidský CYP2C8 | 15.0<br>9.0              | 2.0                    | smíšený                        | [47,85,136] |
| <b>Naringenin</b>          | Potkaní CYP1A1/2<br>Lidský CYP1A2<br>Lidský CYP2C8 | 58.0                     | 2.4<br>7-29            | smíšený<br>kompetitivní        | [34,47,85]  |
| <b>Xanthohumol</b>         | Lidský CYP1A1<br>Lidský CYP1B1                     |                          | 50 nM                  | nekompetitivní<br>kompetitivní | [49]        |
| <b>Resveratrol</b>         | Lidský CYP1A2                                      |                          |                        | smíšený                        | [49]        |
| <b>Flavon</b>              |  | CYP1A1<br>0.14           | CYP1A2<br>0.066        |                                |             |
| <b>3-hydroxyflavon</b>     | Potkaní CYP1A1/2                                   | < 0.1                    | < 0.3                  |                                | [150]       |
| <b>5-hydroxyflavon</b>     |  | < 0.1                    | < 0.3                  |                                |             |
| <b>7-hydroxyflavon</b>     |  | < 0.1                    | < 0.3                  |                                |             |
| <b>3,7-dihydroxyflavon</b> |  | < 0.1                    | < 0.3                  |                                |             |
| <b>Galangin</b>            |  |                          |                        |                                |             |

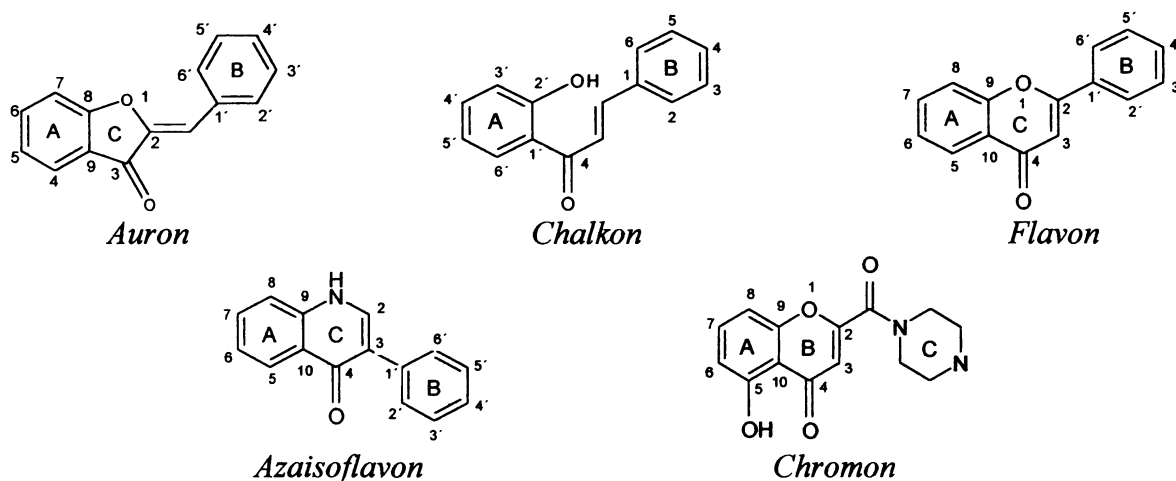
### 1.3.3. Syntetické deriváty flavonoidu

Díky pozitivnímu působení přírodních fenolických antioxidantů na lidské zdraví byla v poslední době syntetizována řada jejich derivátů vycházejících zejména z třídy flavonoidů. V předkládané práci byly zvoleny pro studium vlivu derivátů flavonoidů na transport taxanů v sensitivních a resistantních buněčných liniích rakoviny prsu syntetické deriváty odvozené od flavonů, chalkonů, auronů, chromonů a azaisoflavonů. Právě tyto deriváty flavonoidů byly vybrány, protože se jedná o slibné modulátory P-gp zprostředkovaného transportu léčiv.



Společná je pro všechny zástupce vazba k cytosolární NBD2 doméně P-gp, díky které jsou tyto látky schopné zvrátit resistenci nádorových buněk vůči cytostatikům.<sup>[11,14-16]</sup> Struktura sledovaných syntetických derivátů flavonoidů a jejich vazebná afinita k NBD2 doméně P-gp je uvedena v tabulce 4.

**Tabulka 4:** Struktura sledovaných derivátů flavonoidů a vazebná afinita k cytosolární NBD2 doméně P-gp.<sup>[11,14-16]</sup>



| Třída/název          | Substituenty   | $K_D$ ( $\mu\text{M}$ ) <sup>a</sup> |
|----------------------|--|--------------------------------------|
| <b>Aurony</b>        |  |                                      |
| CB-285               | 4,6-OMe; 4'-Cl   | 0.99 ± 0.2                           |
| CB-284               | 4,6-OMe; 4'-Br   | 0.82 ± 0.08                          |
| CB-287               | 4,6,3',4',6'-OMe   | 92 ± 43                              |
| ML-50                | 4-OH; 6-OMe  | 1.32 ± 0.33                          |
| ND-285               | 4-OH; 6-OMe; 4'-Cl   | 0.46 ± 0.08                          |
| ML-30                | 4-OH; 6-OMe; 4'-CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>                                    | 10 ± 0.15                            |
| A-55B                | 4-OH; 6-OMe; 7-I; 4'-CN  | ND                                   |
| <b>Chalkony</b>      |  |                                      |
| FBB-14               | 4-I; 2',4',6'-OH   | 0.25 ± 0.06                          |
| <b>Flavony</b>       |  |                                      |
| CB-436               | 3-OMe; 5,7-OH; 4'-Br   | > 100                                |
| <b>Flavonoly</b>     |  |                                      |
| Kaempferid           | 3,5,7-OH; 4'-OMe   | 5.0 ± 0.2                            |
| AB-2DE               | 3,5,7-OH; 4'-I   | 1.06 ± 0.08                          |
| <b>Chromony</b>      |  |                                      |
| MH-11 <sup>b</sup>   | 2-CO-N $\begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \end{array}$ -CH <sub>3</sub> ; 5-OH | > 100                                |
| <b>Azaisoflavony</b> |  |                                      |
| A-12 <sup>b</sup>    | 3-phenyl; 5,7-OH   | > 100                                |

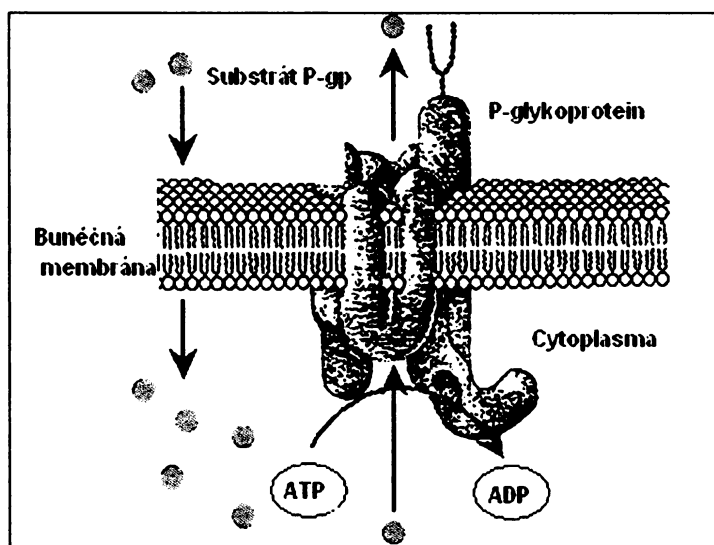
<sup>a</sup>Disociační konstanta vazby k P-gp; <sup>b</sup>MH-11 a A-12 (1  $\mu\text{M}$ ) zvyšovaly akumulaci rhodaminu-123 v K562R resistantních buněčných liniích 5-krát a 2-krát více než inhibitor P-gp první generace cyklosporin A.<sup>[44]</sup>

## 1.4 Resistance nádorů

### 1.4.1. Studium resistance nádoru vůči chemoterapeutikům

Resistance maligních nádorů vůči chemoterapeutikům je v současné době jedním ze zásadních problémů a překážek v úspěšné chemoterapii nádorových onemocnění.<sup>[37]</sup> Resistance přitom nevzniká jen na jedno léčivo, ale zpravidla na celou skupinu léčiv, které se liší strukturou i mechanismem účinku a díky tomu se tento fenomén nazývá **mnohočetná léková resistance neboli multidrug resistance (MDR)**.<sup>[145]</sup> Mezi léčiva, na která vzniká resistance patří antracyklíny (doxorubicin, daunomycin), vinka-alkaloidy, actinomycin D, valinomycin, gramicidin D, puromycin a také taxany (paclitaxel a docetaxel).<sup>[51]</sup> MDR genotyp maligních buněk může být vrozený nebo získaný po působení protinádorových léčiv.<sup>[125]</sup>

Jedním ze základních mechanismů vzniku MDR je transportní funkce některých transmembránových transportních proteinů ze skupiny tzv. **ABC-transportních proteinů (ATP binding cassette proteins)**. Tyto proteiny způsobují předčasné a velmi účinné vylučování (efflux) protinádorových léčiv z nádorových buněk, kde jich pak nejsou dostatečné koncentrace pro cytotoxický účinek.<sup>[69]</sup> V současné době je známo 49 lidských ABC-transportních proteinů, které jsou rozděleny na základě sekvenční homologie do sedmi podrodin; ABCA, ABCB, ABCC, ABCD, ABCE, ABCF a ABCG (až 80% sekvenční homologie mezi některými členy jednotlivých podrodin např. ABCB)<sup>[154]</sup>. Přehled všech podrodin lidských ABC transportních proteinů a jejich nejvýznamnějších zástupců je uveden



v tabulce 5. Pro rozvoj resistance jsou významné zejména **P-glykoprotein (P-gp)**, MRP protein (multidrug resistance associated protein) a cMOAT (canalicular multiple organic anion transporter). P-gp je transmembránový glykoprotein o velikosti 170kDa tvořený 1280 aminokyselinami. Jde o ATP-řízenou effluxní pumpu, která **Obr.5:**

Umístění P-glykoproteinu v buněčné membráně a jeho transportní funkce.

využívá pro svou transportní funkci energii z hydrolyzy ATP.<sup>[151]</sup> Transportní funkce P-gp je znázorněna na *obr. 5*. Je exprimován v játrech, ledvinách, střevech, mozku, děloze, varlately a placentě.<sup>[54,67]</sup> Z toho vyplývá i jeho fyziologická funkce, kterou je především řízení absorpce, distribuce a exkrece celé řady xenobiotik a klinicky významných léčiv. Brání také průniku xenobiotik do mozku či reprodukčních orgánů.<sup>[136,142]</sup> Vysoká exprese P-gp v nádorových buňkách např. nádorů prsu, slinivky, střev, jater, ledvin, vaječnicků, nemalobuněčného karcinomu plic či v leukemických buňkách ovšem vede k rozvoji rezistence nádorů díky předčasné a nadměrné exkreci léčiv do extracelulárního prostoru.<sup>[37,67]</sup> Mezi substráty P-gp řadíme tato protinádorová léčiva; vinka-alkaloidy (vincristin, vinblastin), antracyklíny (doxorubicin, daunorubicin), epipodophylotoxiny (etoposid, teniposid), taxany (paclitaxel, docetaxel), kolchicin a actinomycin D.<sup>[71,66,67]</sup>

Za další možné mechanismy přispívající k rozvoji MDR se považují inhibice apoptosy zvýšenou expresí Bcl-2 nebo Bcl-X<sub>L</sub> proteinů, mutace tumor-supresorového genu p53, změna v expresi a aktivitě topoisomerasy II, zvýšená hladina glutathionu, zvýšená aktivita glutathion-S-transferasy a změny v reparaci DNA.<sup>[12,55,111,116,119]</sup> Vývoj nových léčiv, na která by rezistence nevznikala či použití modulátorů ABC-transportních proteinů účastnících se vzniku MDR je v poslední době intenzivně studován.

Tabulka 5: Přehled lidských ABC membránových transportérů a jejich funkcí. [156]

| Symbol                    | Název   | Lokalizace   | Tkáňová exprese   | Biologická funkce  |
|---------------------------|---|--------------|---|--|
| ABC A (ABC1) podrodina    |   |              |   |  |
| ABCA1                     | ABCA1, TGD, HDLDT1, CERP                      | 9q22-q31     | většina tkání   | Regulace buněčného cholesterolu a homeostasa fosfolipidů   |
| ABCA2                     | ABCA2   | 9q34         | mozek, ledviny, plíce, srdce  |  |
| ABCA3                     | ABCA3, ABC-C                                  | 16p13.3      | plíce a další tkáně   |  |
| ABCA4                     | ABCR, RP19, ABC10, FFM, STGD1, STGD, RIM, RMP | 1p22         | retina, buňky fotoreceptorů   | Zprostředkování transportu molekul přes buněčnou membránu fotoreceptorů  |
| ABCA5                     | ABCA5   | 17q21-q24    | svaly, srdce, varlata   |  |
| ABCA6                     | ABCA6   | 17q21        | játra   |  |
| ABCA7                     | ABCA7, ABCX                                   | 19p13.3      | leukocyty, thymus, kostní dřeň  | Homeostasa lipidů v buňkách imunitního systému   |
| ABCA8                     | ABCA8   | 17q24        | vaječnky  |  |
| ABCA9                     | ABCA9   | 17q24        | srdce   |  |
| ABCA10                    | ABCA10  | 17q24        | svaly, srdce  |  |
| ABCA12                    | ABCA12  | 2q35         | žaludek   |  |
| ABCA13                    | ABCA13  | 7p11-q11     | trachea, varlata, kostní dřeň   | Účast v transportu cholesterolu  |
| ABC B (MDR/TP) podrodina  |   |              |   |  |
| ABCB1                     | MDR1, PGY1, P-GP, GPI70                       | 7q21         | většina tkání, zvláště ty s funkční bariérou jako játra, mozek, ledviny, stěva a placenta | Efluxní pumpa pro řadu xenobiotik, vysoká exprese zodpovědná za rozvoj resistance vůči cytostatikům  |
| ABCB2                     | TAP1, PSF1, RING4, ABC17, APT1, D6S114E       | 6p21.3       | většina tkání   | Transport peptidů  |
| ABCB3                     | TAP2, PSF2, RING11, D6S217E                   | 6p21.3       | většina tkání   | Transport peptidů  |
| ABCB4                     | MDR3, PGY3, PFIC-3, ABC21                     | 7q21         | hepatocyty  | Biliární sekrece fosfatidylcholinu z hepatocytů  |
| ABCB5                     | ABCB5   | 7p14         | mitochondrie buněk  | Účast na transportu železa   |
| ABCB6                     | ABCB6, ABC14, UMAT, MTABC3                    | 2q33-q36     | mitochondrie buněk  | Transport hemu z mitochondrií do cytosolu  |
| ABCB7                     | ABCB7, ATMIP, ASAT                            | Xq13.1-q13.3 | mitochondrie buněk  | transport hemu z mitochondrií do cytosolu, transport fosfolipidů v buňkách   |
| ABCB8                     | M-ABC1  | 7q35-q36     | mitochondrie buněk  |  |
| ABCB9                     | ABCB9, TAPL                                   | 12q24        | srdce, mozek, lysosomy  |  |
| ABCB10                    | ABCB10, M-ABC2, MTABC2                        | 1q42         | mitochondrie buněk  |  |
| ABCB11                    | BSEP, SPGP, PFIC2, PGY4, ABC16                | 2q24         | hepatocyty  | Aktivní transport žlučových solí   |
| ABC C (CFR/MRP) podrodina |   |              |   |  |
| ABCC1                     | MRP1, MRP, ABCC, GS-X, ABC29                  | 16p13.1      | mnoho tkání zejména plíce, varlata  | Multispecifický transportér, substráty jsou glutathion, cysteiny, leukotrieny, aflatoxin B1, glukuronidy, sulfátové konjugáty ster. hormonů a žlučových solí, některá léčiva |
| ABCC2                     | MRP2, cMOAT                                   | 10q24        | játra, stěva, ledviny   | Biliární transport xenobiotik např. vinblastin   |

| Symbol                  | Název                     | Lokalizace   | Ikáňová exprese<br>ABC C (CFTR/MRP) podrodina                       | Biologická funkce   |
|-------------------------|---------------------------|--------------|---|---|
| ABCC3                   | MRP3                      | 17q21.3      | játra, střeva, ledviny  | Biliární a střevní exkrece organických aniontů  |
| ABCC4                   | MRP4                      | 13q32        | většina tkání   | Transport cyklických nukleotidů, nuleosidových monofosfátových analogů a prostaglandinů                           |
| ABCC5                   | MRP5                      | 3q27         | většina tkání zejména játra   | Transport cyklických nukleotidů, nuleosidových monofosfátových analogů  |
| ABCC6                   | MRP6                      | 16p13.1      | ledviny, hepatocyty   | Transport peptidů a glutathionových konjugátů   |
| ABCC7                   | CFTR                      | 7q31.2       | plicе, střeva, cholangiocyty  | Chloridový kanál  |
| ABCC8                   | SUR1                      | 11p15.1      | slinivka  | Modulátor ATO sensitivních draselných kanálů  |
| ABCC9                   | SUR2                      | 12p12.1      | srdce a kosterní svalstvo, nízké hladiny ve všech ostatních tkáních | Draselný kanál  |
| ABCC10                  | ABCC10, MRP8              | 6p21         | nízké hladiny ve všech tkáních                                      | Transport estradiol(2)17-β-glukuronidu  |
| ABCC11                  | ABCC11, MRP8              | 16q12.1      | všechny tkáně hl. játra a prsní tkáň                                |   |
| ABCC12                  | ABCC12                    | 16q12        | nízké hladiny ve všech tkáních                                      |   |
| ABCC13                  | ABCC13                    | 21q11.2      | kostní dřev a periferní leukocyty, vysoká exprese v játrech plodu   |   |
| ABC D (ATD) podrodina   |                           |              |   |   |
| ABCD1                   | ALD, ALDP                 | Xq28         | peroxisomy  | Peroxisomální import mastných kyselin   |
| ABCD2                   | ALDL1, ALDR               | 12q11        | peroxisomy  | Peroxisomální import mastných kyselin   |
| ABCD3                   | PXMP1, PMP70              | 1p21-22      | peroxisomy  | Peroxisomální import mastných kyselin   |
| ABCD4                   | PXMP1L, P70R              | 14q24.3      | peroxisomy  | Peroxisomální import mastných kyselin   |
| ABC E (OABP) podrodina  |                           |              |   |   |
| ABCE1                   | OABP, RNASEL1             | 4q31         | vaječníky, varlata  | inhibitor RNas  |
| ABC F (GCN2) podrodina  |                           |              |   |   |
| ABCF1                   | ABC50                     | 6p21.33      | všechny tkáně   | Úloha ve zvýšení proteosyntézy při zánětlivých procesech  |
| ABCF2                   | ABCF2                     | 7q35-q36     | všechny tkáně   |   |
| ABCF3                   | ABCF3                     | 3q25.1-q25.2 | všechny tkáně   |   |
| ABC G, (bílá) podrodina |                           |              |   |   |
| ABCG1                   | Bílý, ABCG1, ABC8         | 21q22.3      | mozek, plíce  | Vylučování cholesterolu   |
| ABCG2                   | ABCG2, BCRP1, MXR1, ABCP  | 4q22         | placenta, srdce, játra, střeva                                      | Transport xenobiotik, steroidů, organických aniontů, úloha v rozvoji resistance vůči mitoxantronu a antracyklinům |
| ABCG3                   | ABCG3                     | 8p12         |   |   |
| ABCG4                   | ABCG4, Bílý 2             | 11q23.3      | makrofágy, mozek, oko   |   |
| ABCG5                   | ABCG5, bílý 3, Sterolim 1 | 2p21         | játra, tenké střevo   | Transport a exkrece steroidů  |
| ABCG8                   | ABCG8, bílý 4, Sterolim 2 | 2p21         | játra, tenké střevo   | Transport a exkrece steroidů  |

#### 1.4.2. Resistence nádorů vůči taxanům a možnosti jejího potlačení

Využití taxanů jako protinádorových léčiv je často limitováno rozvojem resistance nádorových buněk vůči těmto cytostatikům.<sup>[27]</sup> Nádorové buňky přitom získávají resistenci proti taxanům různými mechanismy; i) existence resistantních isomerů mikrotubulů či mutace  $\beta$ -tubulinové podjednotky mikrotubulů v blízkosti vazebného místa pro paclitaxel,<sup>[100,122]</sup> ii) vysoká exprese ABC membránových transportních proteinů zejména P-gp kódovaného genem MDR-1 a dále MRP-1 proteinu či BCRP proteinu.<sup>[72,107]</sup> Zvláště v terapii rakoviny prsu, kde jsou taxany a také vinblastin obvykle používány, dochází často k rozvoji resistance vůči těmto léčivům, které jsou substráty P-gp.<sup>[7]</sup> Také Mechetner a kol<sup>[77]</sup> našel významnou korelaci mezi zvýšenou expresí P-gp a resistencí vůči taxanům a doxorubicinu u pacientů s rakovinou prsu. K resistenci nádorů prsu přispívá ovšem také vysoká exprese proteinů BCRP, MXR, ABCP a ABCG2. BCRP neboli Breast Cancer Resistance Protein je také znám jako placentární ABC transportér, který způsobuje resistenci vůči flavopiridolu, mitoxantronu, daunorubicinu a inhibitorům topoisomerasy I.<sup>[80,87]</sup>

Látky ovlivňující transportní funkci P-gp lze terapeuticky využít pro zvýšení koncentrace léčiv v nádorech. V současné době byla popsána řada modulátorů P-gp a jejich množství stále roste. **Modulátory P-gp** rozdělujeme na modulátory I. a II. generace a ostatní modulátory (*Tabulka 6*). **Modulátory I. generace** účinně inhibují transportní funkci P-gp a jsou využívány v klinické praxi. Nejznámějšími modulátory P-gp I. generace jsou cyklosporin A a verapamil. Obě tyto látky jsou substráty P-gp a proto působí mechanismem kompetitivní inhibice. Bohužel použití těchto látek je často doprovázeno řadou závažných nežádoucích účinků v koncentracích, které jsou pro léčbu využívány.<sup>[70,108]</sup> Např. cyclosporin A má v dávkách potřebných pro potlačení resistance závažné imunosupresivní a neurotoxické účinky.<sup>[33]</sup> Na základě modulátorů I. generace jsou vyvíjeny **modulátory P-gp II. generace**, které mají větší vazebnou specifitu k P-gp a jsou tedy silnějšími inhibitory jeho funkce. Zároveň jsou u nich redukovány závažné nežádoucí účinky typické pro modulátory I. generace.<sup>[125]</sup> Typickým zástupcem inhibitorů P-gp II. generace je derivát cyclosporinu PSC-833, který je v druhé fázi klinických testů. Tato látka nemá nežádoucí imunosupresivní a neurotoxické účinky typické pro cyklosporin A. V kombinaci s paclitaxelem PSC-833 zvyšuje hladiny paclitaxelu i 6 $\alpha$ -OHPCT v plasmě. To je dáno pravděpodobně inhibicí CYP3A4 potlačující tvorbu C3'-OHPCT a zabraňující dalšímu metabolismu OHPCT. PSC-833 rovněž může snižovat vylučování do střevního obsahu a tím zvyšovat absorpci paclitaxelu a jeho metabolitů ze střeva prostřednictvím inhibice P-gp ve střevní sliznici při entero-hepatární

cirkulaci.<sup>[33,61]</sup> PSC 833 je asi 10x účinnější než cyklosporin A nebo verapamil a působí jiným mechanismem účinku. Není totiž substrátem P-gp a proto působí jako nekompetitivní inhibitor P-gp vazbou na jiné místo P-gp než transportovaný substrát. V současnosti probíhá III. fáze klinického testování využití tohoto inhibitoru v terapii akutní myeloidní leukémie, karcinomů vaječníků či myelomu. Dexniguldipin účinkuje velmi silně *in vitro*, ovšem zůstává zde nežádoucí účinek bradykardie. GF120918 je nyní v I. fázi klinických testů.<sup>[125]</sup>

**Vývoj dalších nových účinných modulátorů** transportní funkce je velmi aktuální. Některé přírodní flavonoidy a resveratrol díky svým účinkům lze považovat za vhodné potenciální modulátory P-gp. Tyto látky se vyskytují jako běžná složka potravy, váží se k P-gp a zároveň mají protinádorové účinky. Flavonoidy představují novou třídu tzv. bifunkčních modulátorů, které překrývají ATP-vazebné místo na P-gp a hydrofobní oblast interagující se steroidní částí substrátů v cytosolární doméně P-gp.<sup>[22]</sup> V literatuře byla nalezena řada údajů o působení flavonoidů na transportní funkci P-gp. Flavonoidy kaempferol, galangin, kvercetin a genistein modulují transport léčiv v MDR exprimujících nádorových buňkách, přičemž se váží k NBD2 cytosolární doméně P-gp. Pouze flavonoidy s touto vlastností jsou přitom schopné zvýšit akumulaci léčiv.<sup>[22,108]</sup> Kvercetin a jeho methoxylované deriváty např. inhibovaly vazbu k P-gp a vylučování P-gp substrátu rhodaminu-123 a zvyšovaly tak sensitivitu MCF-7 buněk rakoviny prsu vůči adriamycinu.<sup>[120]</sup> Z dalších antioxidantů, fenolické látky v zeleném čaji hlavně (-)-epigallokatechin gallát inhibovaly vazbu a vylučování dvou substrátů P-gp, rhodaminu 123 a [<sup>3</sup>H]-vinblastinu v CH<sup>R</sup>C5 resistantních buňkách vaječníků křečka a lidských Caco-2 buňkách.<sup>[58]</sup> Na druhé straně kvercetin, kaempferol a galangin zvyšovaly exkreci adriamycinu v HCT-15 střevních buňkách stimulací transportní funkce P-gp.<sup>[25]</sup> Na základě nalezených protichůdných výsledků působení přírodních fenolických antioxidantů jsou syntetizovány různé syntetické deriváty flavonoidů, které se váží silně k NBD2 doméně P-gp a jsou potenciálními modulátory P-gp s možným využitím v potlačení rozvoje resistance nádorů. V předkládané práci byl sledován vliv třinácti zástupců syntetických derivátů flavonoidů na transport [<sup>14</sup>C]-paclitaxelu v sensitivních a resistantních lidských buňkách rakoviny prsu.

Dalšími možnostmi jak ovlivnit funkci P-gp je využití **anti-P-gp protilátek**. Dnes je známa monoklonální protilátka MRK-16, která se váže k P-gp a působí jako jeho nekompetitivní inhibitor. Celosvětový výzkum se také zaměřuje přímo na ovlivnění exprese MDR1 genu a tím i následné exprese P-gp použitím **antisense MDR1 oligonukleotidů**. V *in vitro* studiích na myších 3T3 fibroblastech antisense MDR1 oligonukleotid snižoval expresi P-gp a zvyšoval

intracelulární akumulaci léčiva.<sup>[2]</sup> Modulátory P-gp ovšem nemusí ovlivňovat jen transport léčiv, ale rovněž jejich farmakokinetiku ovlivněním exkrece z jater, ledvin či střev, kde se vyskytuje P-gp a mohou také ovlivnit další transportéry léčiv nebo metabolické cesty možnou interakcí s enzymy metabolismu např. CYP3A4.<sup>[125]</sup> Specifitu konkrétních modulátorů k P-gp a možnosti jejich interakce s dalšími léčivy či enzymy metabolických drah je nutné při studiu nových potenciálně farmakologicky využitelných modulátorů P-gp brát v úvahu a detailně stanovit.

**Tabulka 6: Přehled modulátorů transportní funkce P-gp.<sup>[125]</sup>**

| Typ modulátoru               | Modulátory P-gp                                 |   |
|------------------------------|---|---|
|                              | Skupina   | Zástupci  |
| Modulátory P-gp I. generace  | <i>Blokátory kalciových kanálů</i>              | Verapamil<br>Nifedipin<br>Bepridil<br>Nicardipin  |
|                              | <i>Kardiovaskulární léčiva</i>                  | Amiodaron<br>Dipyridamol<br>Quinidin  |
|                              | <i>Antimalarika</i>                             | Chinin<br>Chinacrin<br>Cinchonin  |
|                              | <i>Antibiotika</i>                              | Cefoperazon<br>Cefriaxon<br>Erythromycin  |
|                              | <i>Cyklosporiny</i>                             | Cyklosporin A   |
|                              | <i>Fenothiaziny</i>                             | Trifluoperazin<br>Fluphenazin   |
|                              | <i>Hormony</i>                                  | Tamoxifen<br>Metabolity tamoxifenu:<br>N-desmethylramoxifen a 4-<br>hydroxytamoxifen <sup>a</sup><br>Toremifen<br>Progesteron |
|                              | <i>Ostatní</i>                                  | Terfenadin<br>Kremophor<br>Benzquinamid<br>Estramustin<br>FK 506<br>PSC 833   |
| Modulátory P-gp II. generace | <i>Deriváty cyklosporinu</i>                    | Dexniguldipin, Dexverapamil   |
|                              | <i>Blokátory kalciových kanálů</i>              | S9788, GF120918, SR33557,<br>Rapamycin  |
| Jiné modulátory              | <i>Ostatní</i>                                  | Kvercetin a jeho methoxylované deriváty<br>Kaempferol<br>Galangin<br>(-)-epigallokatechin gallát<br>Genistein                 |
|                              | <i>Fenolické antioxidanty a jejich deriváty</i> | Syntetické deriváty flavonoidů  |
|                              | <i>Protilátky</i>                               | Monoklonální protilátka MRK-16  |
|                              | <i>Oligonukleotidy</i>                          | Antisense MDR-1 oligonukleotidy   |



## 2. CÍL DISERTAČNÍ PRÁCE

Cílem této studie bylo rozšíření současných znalostí v oblasti metabolismu a transportu protinádorových léčiv ze skupiny taxanů paclitaxelu a docetaxelu. Dalším cílem bylo poznání metabolických cest a transportu nových syntetických analogů na bázi taxanů SB-T-1103, SB-T-1214 a SB-T-1216 jako potenciálních léčiv využitelných v terapii resistantních nádorů. Současně byly hledány možnosti ovlivnění sledovaných procesů metabolismu a transportu fenolickými antioxidanty s cílem zvýšit účinnost taxanů. Posledním cílem této práce bylo studium *in vivo* účinků taxanů na T-buněčné lymfomy v modelovém organismu potkana.

### **V rámci práce byly řešeny následující problematiky:**

#### ***a) Metabolismus taxanů in vitro***

- Detailní studium metabolismu klasických a nových taxanů jejich interakcemi s cytochromy P450 v rámci jaterních mikrosomálních frakcích. Znalost všech metabolických přeměn taxanů je velmi důležitá z hlediska jejich účinků neboť metabolismus taxanů vede k inaktivaci původních léčiv a jejich vyloučení z organismu.
- Studium metabolismu klasických i nových taxanů v sérii cDNA exprimovaných lidských CYP (CYP1A2, 1B1, 2A6, 2C9, 2E1 a 3A4) pro identifikaci konkrétních isoformů cytochromů P450 zodpovědných za biotransformaci taxanů.
- Stanovení mezidruhových rozdílů metabolismu klasických a nových taxanů v izolovaných jaterních mikrosomálních frakcích člověka, potkana, prasete a miniprasete. Účelem této části studie bylo zjistit, jaké jsou rozdíly v metabolismu taxanů v různých živočišných druzích s ohledem na výběr nejvhodnějšího experimentálního modelu zvláště prasečích a miniprasečích jaterních mikrosomálních frakcí díky jejich enzymatické výbavě, která je velice blízká lidem.
- Stanovení parametrů enzymatické kinetiky metabolismu klasických a nových taxanů v jaterních mikrosomálních frakcích – určení  $K_m$  a  $V_{max}$  oxidací taxanů

- Studium působení fenolických antioxidantů na metabolismus klasických taxanů v izolovaných jaterních mikrosomálních frakcích člověka a potkana z hlediska možné inhibice metabolismu taxanů, která by vedla ke zvýšení jejich účinků.

***b) Transport taxanů v lidských sensitivních a resistantních buněčných liniích rakoviny prsu***

- Studium transportu neradioaktivních forem klasických a nových taxanů a  $^{14}\text{C}$ -značeného paclitaxelu lidskými buněčnými liniemi rakoviny prsu. Účelem této části studie bylo stanovení rozdílu v transportu klasických a nových taxanů v sensitivních a v adriamycin-resistantních buněčných liniích rakoviny prsu.
- Stanovení vlivu verapamilu, syntetických analogů taxanů a dále vybraných přírodních a syntetických fenolických antioxidantů na transport  $^{14}\text{C}$ -značeného paclitaxelu v buněčných liniích rakoviny prsu s cílem modulovat transport  $^{14}\text{C}$ -značeného paclitaxelu zejména v resistantních nádorových buňkách.

***c) In vivo účinky paclitaxelu a docetaxelu na T-buněčné lymfomy v modelovém organismu potkana***

- Studium účinků různých dávkových schémat paclitaxelu, docetaxelu a jejich kombinací na rozvoj T-buněčných lymfomů v organismu laboratorního potkana. Cílem této studie bylo stanovení rozdílů v účinnosti paclitaxelu a docetaxelu na T-buněčné lymfomy a zjištění, zda kombinace obou léčiv nepovedou k indukci jejich cytotoxického působení.

### 3. MATERIÁL A METODY

Veškeré použité chemikálie, metody a postupy jsou detailně popsány v příložených publikacích a rukopisech.

#### 3.1 Příprava a charakterizace experimentálních preparátů

##### Experimentální preparáty použité ke studiu metabolismu taxanů:

Ke studiu metabolismu klasických a nových taxanů byly použity izolované jaterní mikrosomální frakce různých experimentálních druhů. Údaje o premedikaci zvířat, izolaci mikrosomálních frakcí a charakteru jednotlivých preparátů shrnuje *tabulka 7*.

**Tabulka 7:** Použité experimentální preparáty různých živočišných druhů, premedikace zvířat a charakteristika preparátů z hlediska specifického obsahu cytochromu P450.

| Experimentální preparát  | Zdroj preparátu   | Premedikace experimentálních zvířat   | Specifický obsah CYP <sup>a</sup>   |
|--|---|---|---|
| <b>Kontrolní potkaní mikrosomy (N<sup>c</sup> =5)</b>  | Potkaní kmene Wistar (váha 280-300g), aklimatizace 23 dní před zabitím ve zvěřinci SZÚ, strava a voda <i>ad libitum</i>   | Bez premedikace   | 0.39  |
| <b>Potkaní mikrosomy s indukcí CYP2E1(N = 5)</b>   |   | Benzen – inhalace benzenu (4mg/ml) 20 hodin denně po dobu 3 dnů v inhalační aparatuře. Usmrcení ihned.  |   |
| <b>Potkaní mikrosomy s indukcí CYP3A1/2 (N =5)</b>   |   | Pregnenolon-16 $\alpha$ -karbonitril (PCN) – aplikace <i>per os</i> sondou do žaludku v DMSO (25 mg PCN/2.5 ml DMSO/kg) po dobu 3 dnů v 12ti hodinových intervalech. Usmrcení 16hod po poslední aplikaci. | 0.95-1.16   |
| <b>Miniprasečí mikrosomy (N = 2)</b>   | Samci bílé varianty Goettingen miniprasat, stáří 6 měsíců, váha 22 – 31 kg  | Bez premedikace   | 0.23  |
| <b>Prasečí mikrosomy (N = 3)</b>   | Samci prasat  | Bez premedikace   | 0.36-0.50   |
| <b>Lidské mikrosomy (N = 10)</b>   | Náhodní dárci   | Bez premedikace   | 0.13-0.31   |
| <b>cDNA exprimované bicistronické systémy CYP-NPR<sup>d</sup>: CYP1A2, 1B1, 2A6, 2C9, 2E1, 3A4</b> | Membrány izolované z <i>E.coli</i> transformovaných expresními vektory CYP-NPR <sup>d</sup> získaných od prof. P.F. Guengeriche (Vanderbilt University School of Medicine, Nashville, Tennessee, USA) | Bez premedikace   | <sup>b</sup> CYP1A2: 6.83<br>CYP1B1: 3.71<br>CYP2C9: 3.45<br>CYP2A6: 2.12<br>CYP2E1: 9.56<br>CYP3A4: 3.08 |

<sup>a</sup>Poměr koncentrace CYP a bílkoviny v daném preparátu; nmol CYP/mg proteinu. <sup>b</sup>nmol CYP/ml, <sup>c</sup>N = počet jedinců daného experimentálního druhu, <sup>d</sup>NPR =NADPH-CYP reduktasa

K izolaci mikrosomálních frakcí byli použiti; **samci potkanů** kmene WISTAR SPF - zakoupení od firmy VELAZ (Praha, ČR) a držení před zabitím ve zvířetníku SZÚ Praha. **Lidské vzorky jater** pocházeli od náhodných dárců. Jednalo se o vzorky získané od 10 mužů ve věku 16 – 42 let, kteří zemřeli na následky dopravních nehod či střelných poranění. **Játra miniprasat** byla získána darem prof. RNDr. Pavla Anzenbachera, DrSc. (Palackého Universita, Olomouc). **Játra prasat** byla získána z jatek (Český brod, ČR) a z Výzkumného ústavu živočišné výroby (Praha – Uhřetěves, ČR). Mikrosomální frakce byly připraveny z jater všech použitých druhů metodou diferenciální centrifugace.<sup>[41-43, 91]</sup> Izolované mikrosomální frakce i jednotlivé exprimované CYP byly uskladněny v 0.5 – 1.0 ml alikvotech při -80°C. Koncentrace mikrosomálního proteinu byla měřena podle Lowryho<sup>[73]</sup> s hovězím sérovým albuminem jako standardem. Koncentrace cytochromu P450 byla měřena spektrofotometricky podle Omury a Sata<sup>[102]</sup> s použitím molárního absorpčního koeficientu 0.091 cm<sup>-1</sup>.μmol<sup>-1</sup>.l<sup>-1</sup>.

### 3.2 Studium metabolismu taxanů jednotlivými enzymovými preparáty

#### **Inkubace:**

*Složení inkubačních směsí (1ml):* 150mM KCl/50mM Tris-HCl pufr (pH = 7.4), *enzymový preparát* o koncentraci 1mg/ml mikrosomálního proteinu nebo 150 pmol/ml cDNA exprimovaného CYP (CYP1A2, 1B1, 2A6, 2E1, 2C9 a 3A4) s NADPH-CYP reduktasou, *substrát* paclitaxel (2.5 – 25μM), docetaxel (2 - 25μM) nebo nové taxany SB-T-1214, SB-T-1216 a SB-T-1103 (2.5-50μM). Reakce byla započata přidáním 100μL NADPH-generujícího systému (1mM NADP<sup>+</sup>, 10mM glukosa-6-fosfát, 10mM MgCl<sub>2</sub> a 0.5 U/ml glukosa-6-fosfát dehydrogenasa) a probíhala za třepání 30 min při 37°C. Roztoky taxanů byly přidávány do inkubační směsi ve formě 10mM roztoku taxanu v methanolu. Maximální koncentrace organického rozpouštědla ve finální inkubační směsi byla ≤ 0.5%, v/v, která neovlivňovala přeměnu substrátu. Kontrolní vzorky neobsahovaly NADPH-generující systém. Inkubace byla ukončena zchlazením a okamžitou extrakcí organické fáze 2 x 3.5 ml ethylacetátu. Ethylacetátové extrakty byly odpařeny pod proudem dusíku a uloženy při -80°C do analýzy HPLC.

#### **HPLC analýza:**

Odparky ethylacetátových extraktů byly rozpuštěny v 200μl mobilní fáze a analyzovány za isokratických podmínek pomocí HPLC na přístroji Agilent Serie 1100 s automatickým

dávkovačem. Podmínky HPLC použité pro analýzu a detekci metabolitů jednotlivých taxanů jsou shrnuty v *tabulce 8*.

**Tabulka 8: Podmínky HPLC analýzy metabolitů taxanů**

| Taxan  | Kolona  | Mobilní fáze  | Průtok a detekce     | Standardy  |
|--|---|---|----------------------|--|
| <b>Paclitaxel</b>                                | Macherey-Nagel<br>Nucleosil 100-5 C18<br>(5 μm, 4x250 mm) | Methanol:H <sub>2</sub> O<br>(65:35, v/v)                                 | 1.2 ml/min<br>232 nm | C3'-hydroxypaclitaxel<br>6α-hydroxypaclitaxel  |
| <b>Docetaxel</b>                                 | Macherey-Nagel<br>Nucleosil 100-5 C18<br>(5 μm, 4x250 mm) | Acetonitril:Methanol:<br>Tetrahydrofuran:H <sub>2</sub> O<br>(21:35:2:42) | 1.0 ml/min<br>230 nm | Hydroxydocetaxel<br>2stereomerní<br>hydroxyoxazolidinony<br>oxazolidindion<br>7-epidocetaxel |
| <b>Nové taxany(SBT-1103, SBT-1214, SBT-1216)</b> | Macherey-Nagel<br>Nucleosil 100-5 C18<br>(5 μm, 4x250 mm) | Methanol:H <sub>2</sub> O<br>(70:30, v/v)                                 | 1.0 ml/min<br>230 nm | *  |

\*Standardy metabolitů nových taxanů nejsou dostupné vzhledem k tomu, že metabolismus těchto taxanových analogů dosud nebyl nikde sledován. Proto byla tvorba metabolitů kvantifikována s využitím samotných nových taxanů jako standardů díky jejich podobnému absorpčnímu koeficientu při 230nm. Stejného postupu bylo využito pro kvantifikaci minoritních a nových metabolitů detekovaných při studiu metabolismu klasických taxanů.

Data byla analyzována s využitím CSW softwaru (Chromatography Station for Windows verze 1.7, DataApex, ČR). Metabolity byly identifikovány a kvantifikovány na základě hmotnostní spektroskopie a porovnáním s autentickými standardy.

**Identifikace metabolitů MS/MS analýzou** (měřeno na pracovišti RNDr. Petra Šimka v Entomologickém ústavu AV ČR v Českých Budějovicích):

Definované HPLC frakce metabolitů paclitaxelu, docetaxelu, SB-T-1103, SB-T-1214 a SB-T-1216 byly sbírány a vysušeny pod proudem dusíku. Vzorby byly před MS analýzou rozpuštěny ve 125μl směsi 10mM mravenčanu amonného a methanolu (1:1). Podmínky MS analýzy byly následující: kolona Synergi Hydro-RP, 85x2mm, 4μm, teplota kolony 35°C, mobilní fáze methanol:H<sub>2</sub>O (70:30) s 10mM mravenčanem amonným, průtoková rychlost 200μl/min na LCQ hmotnostním spektrometru (ThermoFinnigan, USA).

### 3.3 Studium vlivu fenolických antioxidantů na metabolismus klasických taxanu

Byl sledován *vliv devíti přírodních fenolických antioxidantů na metabolismus paclitaxelu a docetaxelu* v PCN-indukovaných mikrosomech potkana a v lidských jaterních

mikrosomech. Konkrétní sledované fenolické antioxidanty a jejich koncentrace jsou shrnuty v *tabulce 9*. Byly měřeny vznikající množství metabolitů taxanů dle postupů uvedených v kapitole 3.2, bez a s přidavkem fenolických antioxidantů v inkubačních směsích (5 – 40 $\mu$ M). Koncentrace fenolických antioxidantů byly voleny s ohledem na jejich rozpustnost, farmakologicky dosažitelnou hladinu a jejich účinnost. Tam, kde se ukázala významná inhibice metabolismu 10 $\mu$ M paclitaxelu a docetaxelu, byly dále stanoveny IC<sub>50</sub> pro jednotlivé fenolické antioxidanty a sledována enzymatická kinetika této inhibice určením inhibičních konstant (K<sub>i</sub>) a typu inhibice při stoupající koncentraci taxanů (2.5 - 20 $\mu$ M) i fenolických antioxidantů (5 – 40 $\mu$ M). K inhibičním experimentům byl použit rovněž známý specifický inhibitor CYP3A podrodiny troleandomycin, který byl stejně jako fenolické antioxidanty přidáván do inkubačních směsí v koncentracích 30, 60 a 100 $\mu$ M.

**Tabulka 9:** Přehled sledovaných fenolických antioxidantů na metabolismus paclitaxelu a docetaxelu v PCN-indukovaných jaterních mikrosomech potkana a v lidských jaterních mikrosomech.

| Třída fenolických antioxidantů    | Testovaný zástupce | Systematický název                | Použité koncentrace fenolických antioxidantů ( $\mu$ M) |
|-----------------------------------|--------------------|-----------------------------------|---|
| FLAVONOIDY                        |                    |                                   |   |
| <b>Flavanoly</b>                  | (+)-katechin       | 3,5,7,3',4'-flavanpentol          | 30 <sup>a</sup>   |
|                                   | (-)-epikatechin    | cis-3,5,7,3',4'-flavanpentol      | 30 <sup>a</sup>   |
| <b>Flavonoly</b>                  | fisetin            | 3,7,3',4'-tetrahydroxyflavon      | 10,20,40  |
|                                   | morin              | 3,5,7,2',4'-pentahydroxyflavon    | 5, 15, 20   |
|                                   | myricetin          | 3,5,7,3',4',5'-hexahydroxyflavon  | 5, 10, 20, 30   |
|                                   | kvercetin          | 3,5,7,3',4'-pentahydroxyflavon    | 5, 10, 20, 30   |
| <b>Flavanony</b>                  | naringenin         | 5,7,4'-trihydroxyflavon           | 10, 20, 30, 40  |
| NON-FLAVONOIDY                    |                    |                                   |   |
| <b>Stilbeny</b>                   | resveratrol        | 3,5,4'-trihydroxystilben          | 5, 15, 20, 30   |
| <b>Deriváty kyseliny benzoové</b> | kyselina gallová   | 3,4,5-trihydroxybenzoová kyselina | 30 <sup>a</sup>   |

<sup>a</sup>fenolické antioxidanty, jejichž účinek se neprojevil ani v 30 $\mu$ M koncentraci a proto nebyl dále jejich vliv sledován

### 3.4 Studium transportu taxanu v lidských buněčných liniích rakoviny prsu

Transport klasických i nových taxanů byl sledován na pracovišti Laboratoře regulace buněčného růstu (ÚMG AV ČR, Praha-Krč) v lidské sensitivní (MDA-MB-435) buněčné linii rakoviny prsu a linii (NCI/ADR-RES) resistantní vůči doxorubicinu (adriamycinu), která

vykazovala resistenci rovněž vůči taxanům. Tyto buněčné linie se liší expresí některých ABC transportních proteinů zejména P-gp, která byla stanovena na úrovni mRNA na pracovišti Laboratoře regulace buněčného růstu ÚMG AV ČR metodou RT-PCR tedy kvantitativní PCR po reversní transkripci. Imunohistochemicky byla na úrovni proteinu sledována exprese P-gp metodou Western blot s následnou chemiluminiscenční detekcí P-gp pomocí Pierce ECL Western Blotting Chemiluminescence Substrate (Genetica, ČR).

#### ***Inkubace taxanů s lidskými buněčnými liniemi rakoviny prsu***

Buněčné linie byly inkubovány v intervalech 15 – 240 min s RPMI médiem obsahujícím paclitaxel (1-5 $\mu$ M), docetaxel (1-4 $\mu$ M), SB-T-taxany (1-5 $\mu$ M) nebo radioaktivně značený [ $^{14}$ C]paclitaxel (0.02 – 0.5 $\mu$ M). Taxany byly rozpuštěny v DMSO (maximální koncentrace organického rozpouštědla v inkubační směsi byla 0.1%, v/v). Po inkubaci bylo medium odebráno, buňky promyty ledovým PBS a uvolněny 2x400 ml trypsinu a EDTA. K uvolněným buňkám byl přidán před měřením 10% SDS pro lýzu buněk a k uvolnění léčiva.

#### ***Sledování akumulace taxanů pomocí HPLC***

Taxany byly extrahovány z dvakrát promytých a pak uvolněných buněk 2x3.5 ml ethylacetátu, extrakty byly odpařeny do sucha pod proudem dusíku a jejich akumulace byla analyzována za stejných podmínek HPLC jako při sledování metabolismu taxanů (*viz. tabulka 8*). Jako standardy byly použity vzorky taxanů (1 $\mu$ M) v RPMI médiu s 10% FBS.

#### ***Sledování transportu [ $^{14}$ C]paclitaxelu buněčnými liniemi rakoviny prsu***

K měření transportu v buněčných liniích rakoviny prsu byl použit paclitaxel v radioaktivně značené formě jako [ $^{14}$ C]paclitaxel. Při stanovení množství akumulovaného paclitaxelu byl k uvolněným buňkám po jejich inkubaci s [ $^{14}$ C]paclitaxelem a následném promytí přidán kapalný scintilátor Bray a následně byla měřena kapalná scintilace. V případě sledování vylučování [ $^{14}$ C]paclitaxelu ze sensitivních i resistantních buněk byl nejprve [ $^{14}$ C]paclitaxel inkubován 120min s buňkami, poté odebrán a nahrazen čerstvým médiem. Buňky byly promyty a uvolněny po 10 – 90min intervalu trvání effluxu stejným způsobem jako v případě sledování akumulace léčiva.

#### ***Sledování vlivu vybraných přírodních fenolických antioxidantů a syntetických derivátů flavonoidů na transport [ $^{14}$ C]paclitaxelu buněčnými liniemi rakoviny prsu***

Dva vybrané přírodní antioxidanty a 13 syntetických derivátů antioxidantů zvolených na základě jejich schopnosti modulovat P-gp zprostředkovaný transport bylo použito ke studiu

jejich vlivu na transport [<sup>14</sup>C]paclitaxelu v lidských sensitivních (MDA-MB-435) a resistantních (NCI/ADR-RES) buňkách rakoviny prsu. Vliv antioxidantů byl sledován dle postupů uvedených v kapitole 3.4 bez a s přidavkem fenolických antioxidantů v inkubačních směsích (5 – 40 μM). Jako zástupci přírodních fenolických antioxidantů byly vybrány **kvercetin a resveratrol**, které účinně *in vitro* inhibují metabolismus paclitaxelu. Série syntetických derivátů flavonoidů použitá ke sledování ovlivnění transportu [<sup>14</sup>C]paclitaxelu buněčnými liniemi byla získána darem Ahcena Boumendjela PhD. (Department de Pharmacochimie Moléculaire, Faculte de Pharmacie de Grenoble (Meylan, France));

- **Deriváty auronu:** CB-284 (4'-bromo-4,6-dimethoxyauron), CB-285 (4'-chloro-4,6-dimethoxyauron), CB-287 (4,6,3',4',6'-pentamethoxyauron), ND-285 (4'-chloro-4-hydroxy-6-methoxyauron), ML-30 (4'-ethyl-4-hydroxy-6-methoxyauron), ML-50 (4-hydroxy-6-methoxyauron), A-55B (4'-kyano-7-iodo-4-hydroxy-6-methoxyauron)
- **Deriváty chalkonu:** FBB-14 (4-iodo-2',4',6'-trihydroxychalkon)
- **Deriváty flavonu:** CB-436 (4'-bromo-3-methoxy-5,7-dihydroxyflavon)
- **Deriváty flavonolu:** kaempferid (4'-methoxy-3,5,7-trihydroxyflavon), AB-2DE (4'-iodo-3,5,7-trihydroxyflavon)
- **Deriváty chromonu:** MH-11 (5-hydroxy-2-karbopyrazol-methyl-chromon)
- **Deriváty azaisoflavonu:** A-12 (3-phenyl-5,7-hydroxy-4-chinolon)

Pro všechny sledované fenolické antioxidanty (10 μM) byla stanovena cytotoxicita v MDA-MB-435 i NCI/ADR-RES buněčných liniích MTT metodou na pracovišti Laboratoře regulace buněčného růstu (ÚMG AV ČR, Praha-Krč).

### 3.5. Sledování účinku klasických taxanů *in vivo* v organismu potkana s implantovanými T-buněčnými lymfomy

Jako modelový organismus pro sledování nových aplikací cytostatik taxanů byly použity **samice potkanů Sprague-Dawley/Cub s transplantovanými T-buněčnými lymfomy**. Suspenze buněk lymfomů v množství 10<sup>6</sup> buněk/potkana byly aplikovány subkutánně na pracovišti doc. RNDr. Berty Otové CSc. (Ústav biologie a lékařské genetiky, 1.LF a VFN UK, Praha, ČR). Dále byly **aplikovány taxany paclitaxel a docetaxel v různých dávkových**



*schématech a kombinacích* a sledovány jejich hladiny v krvi a změny parametrů T-buněčných lymfomů po aplikaci taxanů, jak popisuje *tabulka 10*.

**Tabulka 10:** *Dávkové schéma taxanů, odběr krve a vzorků pro sledování účinků paclitaxelu a docetaxelu na T-buněčné lymfomy v organismu experimentálního potkana.*

| Sledovaná skupina a počet jedinců ve skupině   | Dávkové schéma taxanů  | Odběr vzorků a časové intervaly odběru   |
|--|--|--|
| Sledování hladin paclitaxelu a docetaxelu v krvi potkanu v různých dávkových schématech                                    |  |  |
| I.skupina (N = 4)  | Paclitaxel 20mg/kg tělesné váhy i.p.   | Odběr 200 $\mu$ L krve pod narkosou z ocasu v intervalech: 0, 10, 20, 30, 60, 120, 180, 240, 300 a 360min <sup>a</sup> |
| II.skupina (N = 4)   | Docetaxel 20mg/kg tělesné váhy i.p.  | Odběr 200 $\mu$ L krve pod narkosou z ocasu v intervalech: 0, 10, 20, 30, 60, 120, 180, 240, 300 a 360min <sup>a</sup> |
| III.skupina (N = 4)  | Paclitaxel 3x týdně 6mg/kg následováno dávkou 20mg/kg  | Odběr 200 $\mu$ L krve pod narkosou z ocasu v intervalech: 0, 10, 20, 30, 60, 120, 180, 240, 300 a 360min <sup>a</sup> |
| IV.skupina (N = 4)   | Docetaxel 3x týdně 6mg/kg následováno dávkou 20mg/kg   | Odběr 200 $\mu$ L krve pod narkosou z ocasu v intervalech: 0, 10, 20, 30, 60, 120, 180, 240, 300 a 360min <sup>a</sup> |
| Vliv opakovaného podání paclitaxelu a docetaxelu na tělesnou váhu, velikost a váhu lymfomu                                 |  |  |
| I.skupina (N = 5)  | Kontrolní skupina  | Ve stejný den jako premedikované skupiny byli potkani zváženi a zabiti   |
| II.skupina (N = 5)   | Paclitaxel i.p. 4 dávky 10, 6, 6 a 6mg/kg v týdenních intervalech  | 17 dní po poslední aplikaci byli potkani zváženi, zabiti a zvážené lymfomy byly zmraženy při -80°C                     |
| III.skupina (N = 5)  | Docetaxel i.p. 4 dávky 10, 6, 6 a 6mg/kg v týdenních intervalech   | 17 dní po poslední aplikaci byli potkani zváženi, zabiti a zvážené lymfomy byly zmraženy při -80°C                     |
| IV.skupina (N = 5)   | Kombinace dvě dávky docetaxelu 10 a 6mg/kg v týdenním intervalu následováno dvěma dávkami paclitaxelu po 6ti mg/kg | 17 dní po poslední aplikaci byli potkani zváženi, zabiti a zvážené lymfomy byly zmraženy při -80°C                     |
| V.skupina (N = 5)  | Kombinace dvě dávky paclitaxelu 10 a 6mg/kg v týdenním intervalu následováno dvěma dávkami docetaxelu po 6ti mg/kg | 17 dní po poslední aplikaci byli potkani zváženi, zabiti a zvážené lymfomy byly zmraženy při -80°C                     |
| Vliv opakovaného podání paclitaxelu a docetaxelu na tělesnou váhu, velikost a váhu lymfomu v pěti dávkovém schématu taxanu |  |  |
| I.skupina (N = 6)  | Kontrolní skupina  | Ve stejný den jako premedikované skupiny byli potkani zváženi a zabiti   |
| II.skupina (N = 6)   | Paclitaxel i.p. 5 dávek 10, 6, 6, 6 a 6mg/kg v týdenních intervalech   | 1 den po poslední aplikaci byli potkani zváženi, zabiti a zvážené lymfomy byly zmraženy při -80°C                      |
| III.skupina (N = 6)  | Docetaxel i.p. 5 dávek 10, 6, 6, 6 a 6mg/kg v týdenních intervalech  | 1 den po poslední aplikaci byli potkani zváženi, zabiti a zvážené lymfomy byly zmraženy při -80°C                      |

<sup>a</sup>K odebrané krvi bylo přidáno 0.5 ml Milli-Q H<sub>2</sub>O a 3.5 ml ethylacetátu.

Kromě těchto sledovaných skupin potkanů byli použity další dvě zcela odlišné skupiny potkanů s T-buněčnými lymfomy, kde nebyl aplikován *in vivo* žádný z taxanů. Jednalo se o kontrolní skupinu bez premedikace a skupinu premedikovanou PCN (induktor CYP3A1/2) i.g. v dávce 25 mg/kg v olivovém oleji v 12ti hodinových intervalech během 3dnů. Z těchto zvířat byla po usmrcení izolována játra a připraveny jaterní mikrosomální frakce. Ty byly využity ke studiu metabolismu taxanů *in vitro* dle postupů popsanych v kap.3.2. Dále byly získány nádory a střeva těchto potkanů, ze kterých byly izolovány post-mitochondriální frakce s obsahem plasmatických membrán. V post-mitochondriálních frakcích byla stanovena koncentrace proteinu dle Omura a Sato<sup>[102]</sup> a 30μg proteinu/15μL frakce bylo použito pro stanovení exprese P-gp na úrovni proteinu dle postupu uvedeného v kapitole 3.4.

### 3.6. Zpracování výsledku

**Získané výsledky byly statisticky hodnoceny.** Veškerá data jsou prezentována jako průměry ± SD (směrodatné odchylky) stanovení. Signifikantní rozdíly vlivu fenolických antioxidantů na metabolismus a transport taxanů byly hodnoceny s využitím oboustranného Studentova t-testu. Za statisticky významné byly považovány výsledky s hodnotou  $P < 0.05$  a  $P < 0.01$ . **Při sledování metabolismu paclitaxelu, docetaxelu a nových taxanů *in vitro*** byly z lineárních závislostí sestrojených metodou lineární regrese z reciprokových Lineweaver-Burkových výnosů rychlosti tvorby metabolitů vypočítány kinetické parametry metabolismu paclitaxelu tedy Michaelisovy konstanty ( $K_m$ ) a maximální rychlosti reakce ( $V_{max}$ ) z průsečíků s osami. **Při sledování vlivu fenolických antioxidantů a troleandomycinu na metabolismus taxanů *in vitro*** byly počítány  $IC_{50}$  účinně inhibujících antioxidantů a troleandomycinu z poklesu tvorby metabolitů (v % zbývající aktivity) s rostoucí koncentrací antioxidantů a troleandomycinu. Inhibiční konstanta  $K_i$  a typ inhibice byly určovány z Dixonových výnosů,<sup>[28]</sup> kde se vynáší převrácené hodnoty rychlosti metabolické reakce proti koncentraci inhibitoru a z Lineweaver-Burkových výnosů, kde se vynáší převrácené hodnoty rychlosti metabolické reakce proti převráceným hodnotám koncentrací substrátu.<sup>[139]</sup> **Cytotoxicita klasických a nových taxanů v lidských sensitivních a resistantních buněčných liniích rakoviny prsu** byla hodnocena na základě stanovení  $IC_{50}$  po 96hod vystavení buněk působení taxanů.

## 4. VÝSLEDKY A DISKUSE

### 4.1. Studium metabolismu taxanů *in vitro*

K testování interakcí klasických taxanů (paclitaxel, docetaxel) i nových taxanových analogů (SB-T-1103, SB-T-1214 a SB-T-1216) s cytochromy P450 byly připraveny subcelulární systémy mikrosomů jaterních buněk lidí, miniprasat, prasat a potkanů. V případě potkanů se jednalo o skupinu nepremedikovaných zvířat a skupiny potkanů premedikovaných známými induktory konkrétních isoform cytochromu P450. K indukci CYP3A1/2 byl použit pregnenolon 16 $\alpha$ -karbonitril (PCN), k indukci CYP2E1 benzen. Mikrosomální frakce byly charakterizovány z hlediska koncentrace mikrosomálního proteinu a cytochromu P450. Zvýšení obsahu majoritně indukovaných forem bylo ověřeno pomocí specifických aktivit cytochromů P450 a zvýšením hladin jejich apoproteinů pomocí imunodetekce.<sup>[92]</sup>

#### 4.1.1. Metabolismus paclitaxelu *in vitro* živočišnými cytochromy P450

Z literatury jsou známy především mezidruhové rozdíly metabolismu paclitaxelu u lidí a potkanů. Proto byla sledována přeměna paclitaxelu živočišnými cytochromy P450 v podmínkách *in vitro* za použití mikrosomálních frakcí izolovaných z jater člověka, potkana, miniprasete a prasete a cDNA exprimovaných lidských cytochromů P450 (CYP1A2, 1B1, 2A6, 2C9, 2E1 a 3A4). Bylo sledováno, jaké metabolity vznikají po inkubaci paclitaxelu s jaterními mikrosomy a cDNA exprimovanými CYP a které z nich jsou hlavní a které minoritní produkty přeměny paclitaxelu. Vznikající metabolity byly detekovány pomocí HPLC. Všechny významné vznikající metabolity byly identifikovány pomocí hmotnostní spektrometrie měřené v Entomologickém ústavu AV ČR v Českých Budějovicích RNDr. Petrem Šimkem. Vzhledem k tomu, že hlavní metabolity taxanů *in vitro* a *in vivo* se shodují, podmínky *in vitro* adekvátně reprezentují situaci v živém organismu.

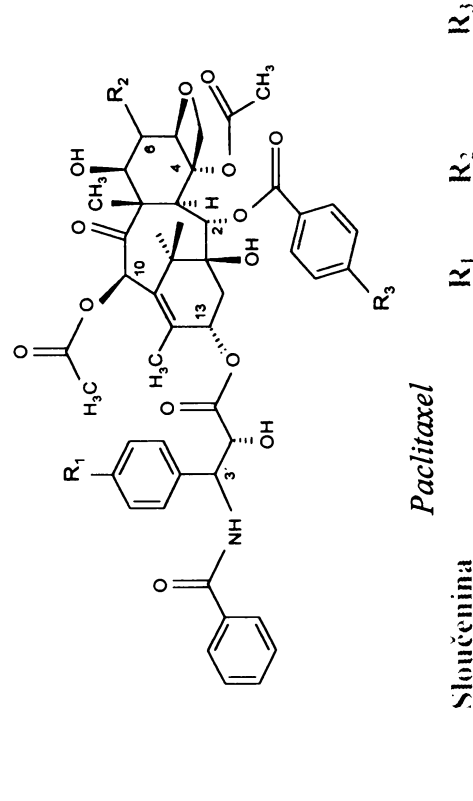
V nepremedikovaných *potkaních mikrosomech* byl jako hlavní metabolit detekován ***C3'-hydroxypaclitaxel (C3'-OHPCT)***, dále ***C2-hydroxypaclitaxel*** a obtížně detekovatelný minoritní metabolit ***di-hydroxypaclitaxel (di-OHPCT)***. C3'-OHPCT byl identifikován porovnáním s autentickým standardem a hmotnostní spektroskopií. C2-OHPCT a di-OHPCT byly identifikovány rovněž MS analýzou a také porovnáním retenčních časů

s literaturou.<sup>[4,143]</sup> Kromě těchto metabolitů byl identifikován nový minoritní metabolit charakterizovaný HPLC-MS jako **hydroxypaclitaxel (OHPCT)**. Tento metabolit má velmi podobný, nicméně odlišný eluční retenční čas ( $t_R = 80.40 \pm 0.15\%$  eluce paclitaxelu) jako lidský 6 $\alpha$ -hydroxypaclitaxel ( $t_R = 79.55 \pm 0.15\%$  eluce paclitaxelu). Metabolity nevznikaly, pokud nebyl přidán do inkubační směsi NADPH generující systém nezbytný pro funkci CYP systému. **Indukce CYP2E1 benzenem** nezvýšila rychlost metabolismu paclitaxelu v mikrosomech potkana, což vylučuje účast CYP2E1 na metabolismu této látky. **Indukce CYP3A1/2 pomocí PCN** naopak významně zvyšovala rychlost metabolismu paclitaxelu v mikrosomech potkana, čímž se potvrdila účast CYP3A podrodiny na jeho přeměně. Tvorba hlavního C3'-OHPCT byla v PCN-indukovaných mikrosomech navýšena 7 – 30x více v různých experimentech, minoritních metabolitů vznikalo rovněž více a to C2-OHPCT 11-45x více, neznámého OHPCT 5-15x více a di-OHPCT 2-13x více než v kontrolních mikrosomech potkana. Charakteristika všech nalezených metabolitů paclitaxelu v jaterních mikrosomech sledovaných experimentálních druhů je uvedena v *tabulce 11*.

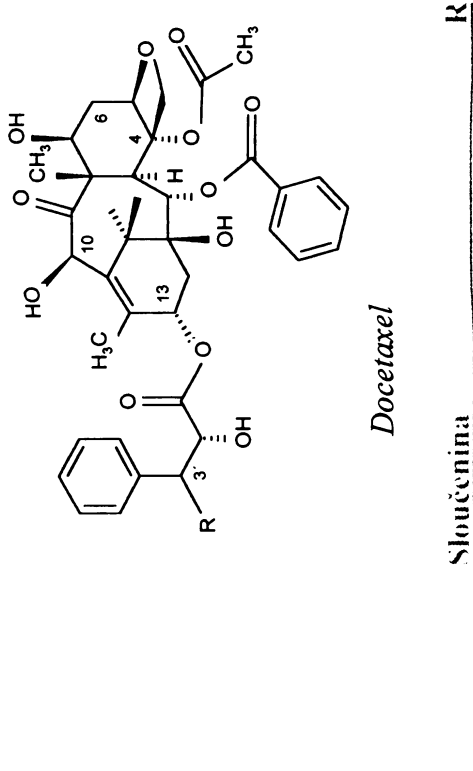
Profil metabolismu paclitaxelu v **jaterních mikrosomech prasat a miniprasat** byl stejný, ale lišil se v poměru tvorby jednotlivých metabolitů. V obou typech mikrosomů byl hlavním metabolitem **neznámý OHPCT** čítající 95% z celkového množství metabolitů paclitaxelu. **C3'-OHPCT** byl minoritním metabolitem stejně jako **C2-OHPCT**, který vznikal v jaterních mikrosomech miniprasat, ale ne konvenčních prasat (*Tabulka 11*).

V lidských jaterních mikrosomech byl hlavním metabolitem **6 $\alpha$ -hydroxypaclitaxel (6 $\alpha$ -OHPCT)**, který byl unikátním lidským metabolitem a nevznikal v žádném jiném sledovaném živočišném druhu. Byl identifikován na základě porovnání s autentickým standardem a pomocí hmotnostní spektroskopie. Minoritními metabolity v lidských mikrosomech byly **C3'-OHPCT** a **C2-OHPCT** charakterizované pomocí HPLC-MS (*Tabulka 11*). Chemická struktura všech metabolitů paclitaxelu nalezených v jednotlivých jaterních mikrosomálních frakcích potkanů, miniprasat, prasat a lidí je znázorněna v *obr. 6*.

Pro identifikaci cytochromů P450 účastnících se metabolismu paclitaxelu byla sledována přeměna paclitaxelu v sérii lidských cDNA exprimovaných **cytochromů P450 (CYP1A2, 1B1, 2A6, 2C9, 2E1 a 3A4)**. Z celé použité série cytochromů P450 byl aktivní pouze CYP3A4, který metabolisoval paclitaxel na C3'-OHPCT ( $1.38 \pm 0.2$  pmol/min/nmol CYP) a C2-OHPCT ( $0.15 \pm 0.1$  pmol/min/nmol CYP). Tento výsledek potvrdil významnou úlohu CYP3A4 na metabolismu paclitaxelu v lidském organismu.



**Obr.6:** Chemická struktura **paclitaxelu** a jeho metabolitů.  
 ND = přesná pozice hydroxylové skupiny nelze určit pomocí MS analýzy



**Obr.7:** Chemická struktura **docetaxelu** a jeho metabolitů.  
 ND = přesná pozice hydroxylové skupiny nelze určit pomocí MS analýzy

**Tabulka 11: Metabolity paclitaxelu a docetaxelu v jaterních mikrosomech různých živočišných druhů. Rychlost tvorby metabolitů je vyjádřena v pmol/mg proteinu/min. Uvedená data jsou průměrné hodnoty ± SD (n ≥ 2).**

| Metabolit                | Charakteristika metabolitů        |  |       | Tvorba a množství metabolitů v jaterních mikrosomech                 |                             |                                  |                             |                             |                             |                              |
|--------------------------|-----------------------------------|--|-------|--|-----------------------------|----------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|------------------------------|
|                          | <sup>b</sup> t <sub>R</sub> , min | <sup>b</sup> t <sub>R</sub> , % paclitaxel | MM    | Popis metabolitů <sup>c</sup>  | Potkaní mikrosomy           | PCN-indukované mikrosomy potkana | Prasečí mikrosomy<br>Samci  | Prasečí mikrosomy<br>Samice | Miniprasečí mikrosomy       | Lidské mikrosomy             |
| <b>PACLITAXEL</b>        | di-OHPCT                          | 6.15                                       | 41    | 886.3  | dihydroxypaclitaxel         | 1.0±0.5                          | 1.9±0.1                     | -                           | -                           | -                            |
|                          | C3'-OHPCT                         | 7.76                                       | 51.7  | 870.3  | C3'-hydroxypaclitaxel       | <u>3.16±1.5<sup>a</sup></u>      | <u>81.5±2.7<sup>a</sup></u> | 0.5±0.1                     | 0.3±0.0                     | 0.4±0.2                      |
|                          | C2-OHPCT                          | 9.42                                       | 62.8  | 870.3  | p-C2-hydroxypaclitaxel      | 0.5±0.2                          | 18.5±0.3                    | -                           | -                           | 0.3±0.1                      |
|                          | 6α-OHPCT                          | 12.06                                      | 79.55 | 870.3  | 6α-hydroxypaclitaxel        | -                                | -                           | -                           | -                           | <u>81.8±21.2<sup>a</sup></u> |
| Neznámý OHPCT            | 12.06                             | 80.4                                       | 870.3 | Hydroxypaclitaxel, poloha OH skupiny neurčena                        | 1.0±0.2                     | 14.4±0.8                         | <u>5.9±1.2<sup>a</sup></u>  | <u>5.8±0.1<sup>a</sup></u>  | <u>13.8±2.5<sup>a</sup></u> | -                            |
| <b>DOCETAXEL</b>         |                                   |  |       | Popis metabolitů <sup>c</sup>  | Potkaní mikrosomy           | PCN-indukované mikrosomy potkana | Prasečí mikrosomy<br>Samci  | Prasečí mikrosomy<br>Samice | Miniprasečí mikrosomy       | Lidské mikrosomy             |
|                          | OHDTX                             | 10.12                                      | 44.1  | MM <sup>d</sup>  | <u>32.0±1.0<sup>a</sup></u> | -                                | <u>12.0±2.0<sup>a</sup></u> | <u>10.0±0.0<sup>a</sup></u> | <u>21.0±4.0<sup>a</sup></u> | <u>3.5±1.5<sup>a</sup></u>   |
| Hydroxyoxazolidinon<br>A | 8.97                              | 39.08                                      |       | Hydroxydocetaxel – poloha C3' postranního C13 řetězce docetaxelu     | 0.9±0.02                    | 213.3±8.2                        | -                           | -                           | -                           | 0.7±0.6                      |
| Hydroxyoxazolidinon<br>B | 9.65                              | 42.05                                      |       | Aldehyd vzniklý oxidací OHDTX<br>Stereoisomer Hydroxyoxazolidinonu B | -                           | <u>258.7±13.6<sup>a</sup></u>    | -                           | -                           | -                           | 0.7±0.1                      |

<sup>a</sup>Hlavní metabolit, <sup>b</sup>t<sub>R</sub> = retenční čas (min), <sup>c</sup>struktury metabolitů jsou znázorněny v metabolických schématech na obr.6 (paclitaxel) a obr.7 (docetaxel), <sup>d</sup>MS analýza neprováděna, metabolity byly identifikovány porovnáním s příslušnými standardy metabolitů

Ke konečnému potvrzení účasti konkrétních cytochromů P450 v metabolismu paclitaxelu u všech sledovaných experimentálních druhů byl sledován vliv *troleandomycinu* (30, 60 a 100 $\mu$ M, specifický inhibitor CYP3A) a *fisetinu* (30 $\mu$ M, inhibitor CYP2C8) na metabolismus paclitaxelu. Fisetin jednoznačně inhiboval tvorbu  $\alpha$ -OHPCT v lidských jaterních mikrosomech, čímž se potvrdila účast CYP2C8 na metabolismu paclitaxelu v lidském organismu. Troleandomycin inhiboval *in vitro* tvorbu C3'-OHPCT a C2-OHPCT u potkanů, prasat, miniprasat i lidí (Příloha č.III). Dále inhiboval také tvorbu di-OHPCT u potkanů a neznámého OHPCT u potkanů, prasat a miniprasat. Tyto výsledky jsou jasným důkazem účasti CYP3A podrodiny na metabolismu paclitaxelu u všech sledovaných živočišných druhů. Velké mezidruhové rozdíly nalezené ve sledovaných experimentálních druzích plynou zejména z významu CYP2C8 v biotransformaci paclitaxelu. Tento cytochrom P450 je významným lidským enzymem, který nemá ortologní formu u žádného ze sledovaných živočišných druhů. Nepřítomnost CYP2C8 je významná zejména u miniprasat a prasat, jejichž enzymatická výbava je jinak velmi blízká člověku a jsou dokonce považovány za potenciální dárce transplantátů pro člověka. Ovšem fakt, že nemají odpovídající formu lidského CYP2C8 může mít zásadní význam pro biotransformaci všech látek, kterých se lidský CYP2C8 účastní.

#### 4.1.2. Metabolismus docetaxelu *in vitro* živočišnými cytochromy P450

Byla sledována přeměna docetaxelu živočišnými cytochromy P450 v podmínkách *in vitro* za použití mikrosomálních frakcí izolovaných z jater člověka, potkana, miniprasete a prasete a cDNA exprimovaných lidských cytochromů P450 (CYP1A2, 1B1, 2A6, 2C9, 2E1 a 3A4). Opět bylo sledováno, jaké metabolity jsou hlavními a jaké minoritními produkty přeměny docetaxelu. Vznikající metabolity byly detekovány pomocí HPLC a charakterizovány pomocí hmotnostní spektrometrie.

Oproti paclitaxelu byl profil metabolismu docetaxelu shodný ve všech sledovaných živočišných druzích. Hlavním metabolitem byl *hydroxydocetaxel (OHDTX)* následovaný dvěma minoritními metabolity odpovídajícími strukturou *diastereoisomerním hydroxyoxazolidinonům A a B*. Tyto dva minoritní metabolity byly ovšem v mikrosomech potkana, miniprasete a prasete obtížně detekovatelné. Jediný mezidruhový rozdíl v metabolismu docetaxelu byl nalezen v PCN-indukovaných mikrosomech potkana. V těchto mikrosomech byly dominantní oba *diastereoisomerní hydroxyoxazolidinony A a B*. Tento rozdíl lze přičíst indukci CYP3A1/2, který se podílí na metabolismu docetaxelu a ve

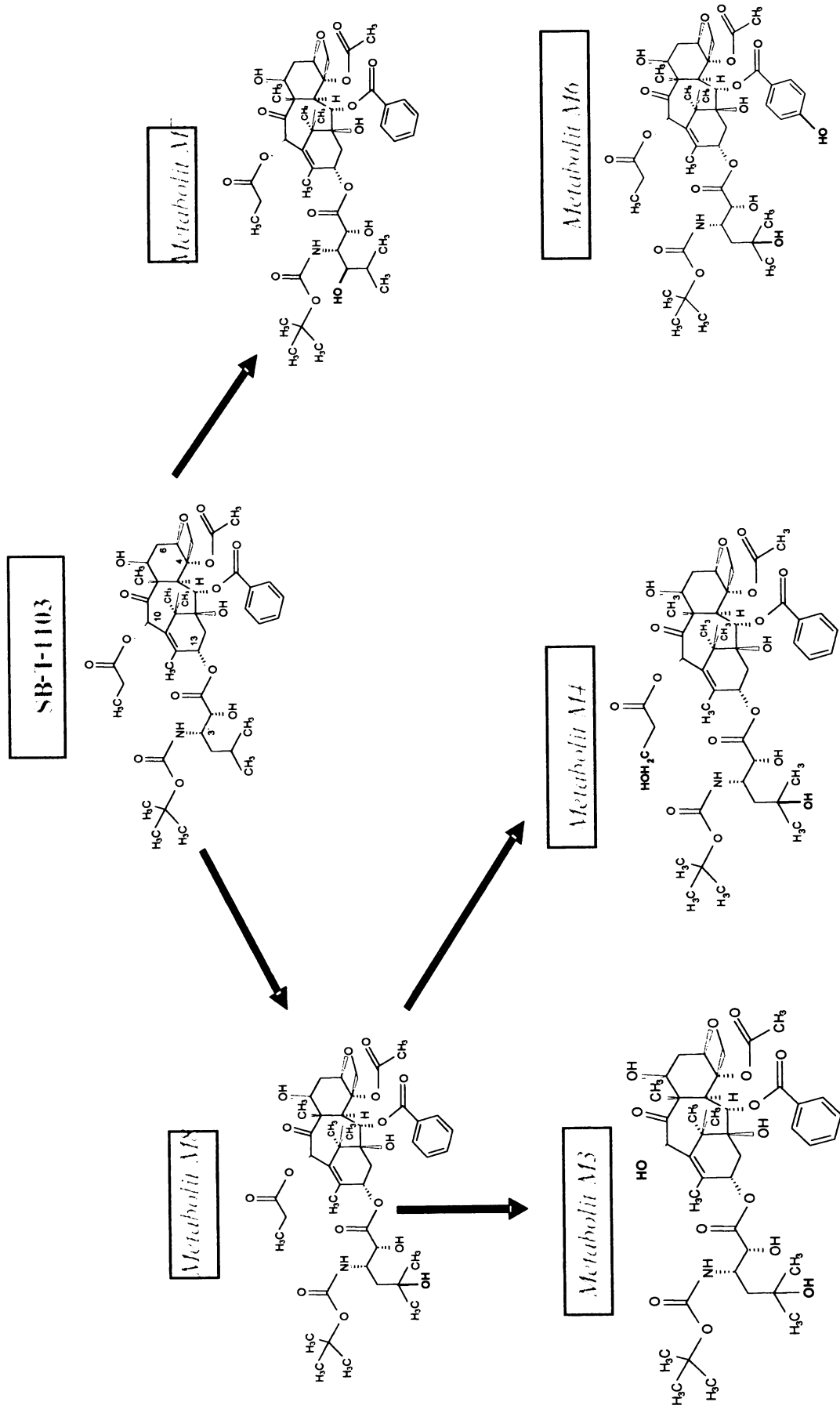
velkém množství indukuje rychlejší oxidaci hydroxydocetaxelu na hydroxyoxazolidinony. Protože metabolity byly efektivně tvořeny mikrosomy PCN-premedikovaných potkanů s indukcí CYP3A1/2 a z literatury je známo, že se ho účastní CYP3A podrodina,<sup>[13]</sup> nebylo třeba provádět další identifikace konkrétních forem CYP účastnících se metabolismu docetaxelu. Charakteristika všech nalezených metabolitů docetaxelu v jaterních mikrosomech sledovaných experimentálních druhů je uvedena v *tabulce 11*. Chemická struktura metabolitů docetaxelu nalezených v jednotlivých jaterních mikrosomálních frakcích potkanů, miniprasat, prasat a lidí je znázorněna v *obr.7*. Vzhledem k tomu, že metabolismus docetaxelu se mezi jednotlivými druhy nelišil, lze říci, že prasata a miniprasata jsou vhodným experimentálním modelem pro studium metabolismu docetaxelu.

#### 4.1.3. Metabolismus analogu taxanu *in vitro* živočišnými cytochromy P450

Rovněž u nových taxanových analogů SB-T-1103, SB-T-1214 a SB-T-1216, které jsme měli k dispozici, byla sledována přeměna živočišnými cytochromy P450 v podmínkách *in vitro* za použití mikrosomálních frakcí izolovaných z jater člověka, potkana, miniprasete a prasete a cDNA exprimovaných lidských cytochromů P450 (CYP1A2, 1B1, 2A6, 2C9, 2E1 a 3A4). Jelikož metabolismus těchto látek i mezidruhové rozdíly metabolismu byly dosud zcela neznámé, byly všechny metabolity detekované pomocí HPLC vznikající v dostatečném množství charakterizovány pomocí MS analýzy.

***SB-T-1103 byl metabolisován na 11 produktů označovaných M1-M11, SB-T-1214 na 9 metabolitů označovaných M1-M9 a SB-T-1216 tvořil 8 metabolitů M1-M8*** dle jejich rostoucích retenčních časů. MS analýzou metabolitu M1 taxanu SB-T-1214 byl odhalen jako příměs tohoto metabolitu další velmi minoritní metabolit (M10), takže konečné množství metabolitů SB-T-1214 je deset. Následující metabolická schémata znázorňují celý proces přeměny včetně reanalýz metabolitů SB-T-1103 (*obr.8A*), SB-T-1214 (*obr.8B*) a SB-T-1216 (*obr.8C*) v jednotlivých jaterních mikrosomálních frakcích potkanů, miniprasat, prasat a lidí. Hlavními polohami, kde probíhala oxidace byly C-13 postranní řetězec, C-2 aromatická část a poloha C-10 na taxanovém kruhu. Detailní charakteristiky všech nalezených metabolitů SB-T-1103, SB-T-1214 a SB-T-1216 v jaterních mikrosomech sledovaných experimentálních druhů jsou uvedeny v *tabulkách 12,13 a 14*.



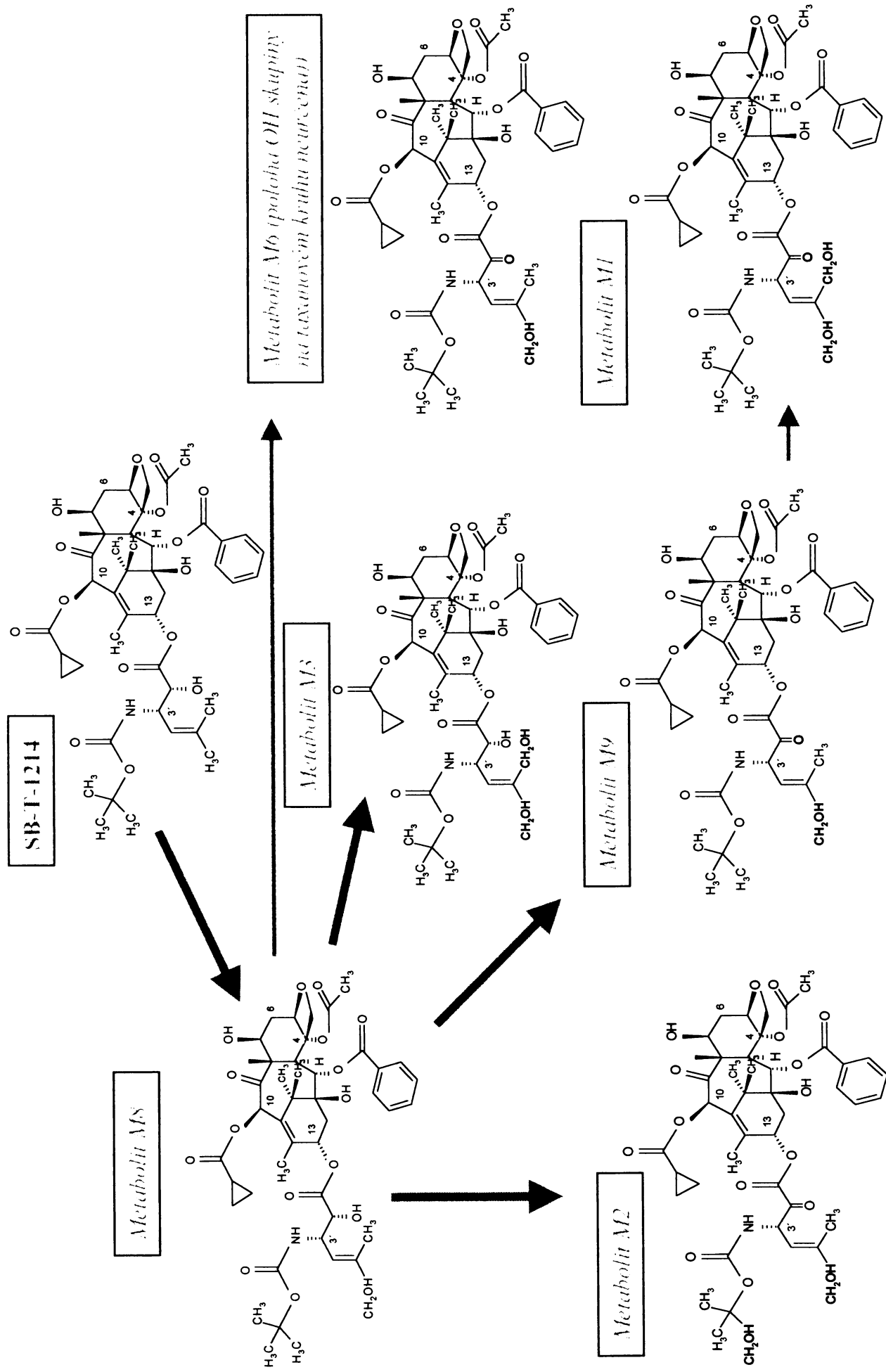


**Obr.8A:** Strukturální schéma *in vitro* metabolických přeměn syntetického taxanového analogu SB-T-1103.

**Tabulka 12: Metabolity SB-T-1103 (MW 843.95) v jaterních mikrosomech různých živočišných druhů. Rychlost tvorby metabolitů je vyjádřena v pmol/mg proteinu/min. Uvedená data jsou průměrné hodnoty ± SD (n = 3).**

| Metabolit  | Charakteristika metabolitů        |                                     |         |   | Tvorba a množství metabolitů v jaterních mikrosomech |                                  |                             |                             |                             |  |  |
|------------|-----------------------------------|-------------------------------------|---------|---|--|----------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|--|--|
|            | <sup>b</sup> t <sub>R</sub> , min | <sup>b</sup> t <sub>R</sub> , % SBT | MM      | Popis metabolitů <sup>c</sup><br>NA = nevýznamné metabolity neanalyzované MS  | Potkaní mikrosomy                                    | PCN-indukované mikrosomy potkana | Prasečí mikrosomy           | Miniprasečí mikrosomy       | Lidské mikrosomy            |  |  |
| <b>M1</b>  | 4.5                               | 21                                  | -       | NA  | 3.2±0.8  | -                                | 2.9±1.6                     | -                           | -                           |  |  |
| <b>M2</b>  | 5.0                               | 23                                  | -       | di-hydroxy-SBT – hydroxylace 2-methylpropanu v poloze C3' na C13 postranním řetězci taxanu, druhá hydroxylace rovněž na C-13 v neznámé poloze | -  | 52.6±13.7                        | -                           | -                           | -                           |  |  |
| <b>M3</b>  | 5.3                               | 25                                  | 803/819 | Depropionace v poloze C-10 na taxanovém kruhu + hydroxylace 2-methylpropanu v poloze C3' na C13 postranním řetězci SB-T-1103                  | -  | 25.9±8.0                         | -                           | -                           | -                           |  |  |
| <b>M4</b>  | 6.9                               | 29                                  | 875     | hydroxylace 2-methylpropanu v poloze C3' na C13 postranním řetězci SB-T-1103 + hydroxylace propionátu v poloze C-10 taxanového kruhu          | 1.7±0.0  | 18.9±1.1                         | 2.0±0.0                     | 4.1±0.7                     | -                           |  |  |
| <b>M5</b>  | 7.0                               | 33                                  | 859/875 | NA  | 6.7±0.0  | -                                | 1.6±0.5                     | 1.9±0.2                     | 1.0±0.1                     |  |  |
| <b>M6</b>  | 7.6                               | 36                                  | 875     | hydroxylace 2-methylpropanu v poloze C3' na C13 postranním řetězci SB-T-1103 + hydroxylace v <i>para</i> -poloze C-2 benzylu                  | 0.8±0.1  | 5.3±0.3                          | 0.8±0.0                     | 3.2±0.2                     | 0.8±0.0                     |  |  |
| <b>M7</b>  | 8.0                               | 39                                  | 859     | hydroxylace 2-methylpropanu v poloze C3' na C13 postranním řetězci SB-T-1103  | 21.7±0.3   | 2.3±1.4                          | 3.1±0.31                    | -                           | -                           |  |  |
| <b>M8</b>  | 9.0                               | 42                                  | 859     | hydroxylace 2-methylpropanu v poloze C3' na C13 postranním řetězci SB-T-1103  | <u>93.9±2.5<sup>a</sup></u>                          | <u>101.7±1.4<sup>a</sup></u>     | <u>26.3±0.1<sup>a</sup></u> | <u>46.2±3.4<sup>a</sup></u> | <u>19.7±0.1<sup>a</sup></u> |  |  |
| <b>M9</b>  | 10.0                              | 48                                  | 859     | Oxiace na taxanovém kruhu, přesná poloha neurčena   | 6.8±0.0  | -                                | -                           | 1.1±0.1                     | 3.5±0.1                     |  |  |
| <b>M10</b> | 13.6                              | 66                                  | -       | NA  | 2.1±0.1  | -                                | -                           | -                           | -                           |  |  |
| <b>M11</b> | 14.5                              | 68                                  | -       | NA  | 2.8±0.2  | -                                | 2.5±0.0                     | 7.3±0.0                     | 2.1±0.3                     |  |  |

<sup>a</sup>Hlavní metabolit, <sup>b</sup>t<sub>R</sub> = retenční čas (min), <sup>c</sup>struktury metabolitů jsou znázorněny v metabolickém schématu na obr.8A

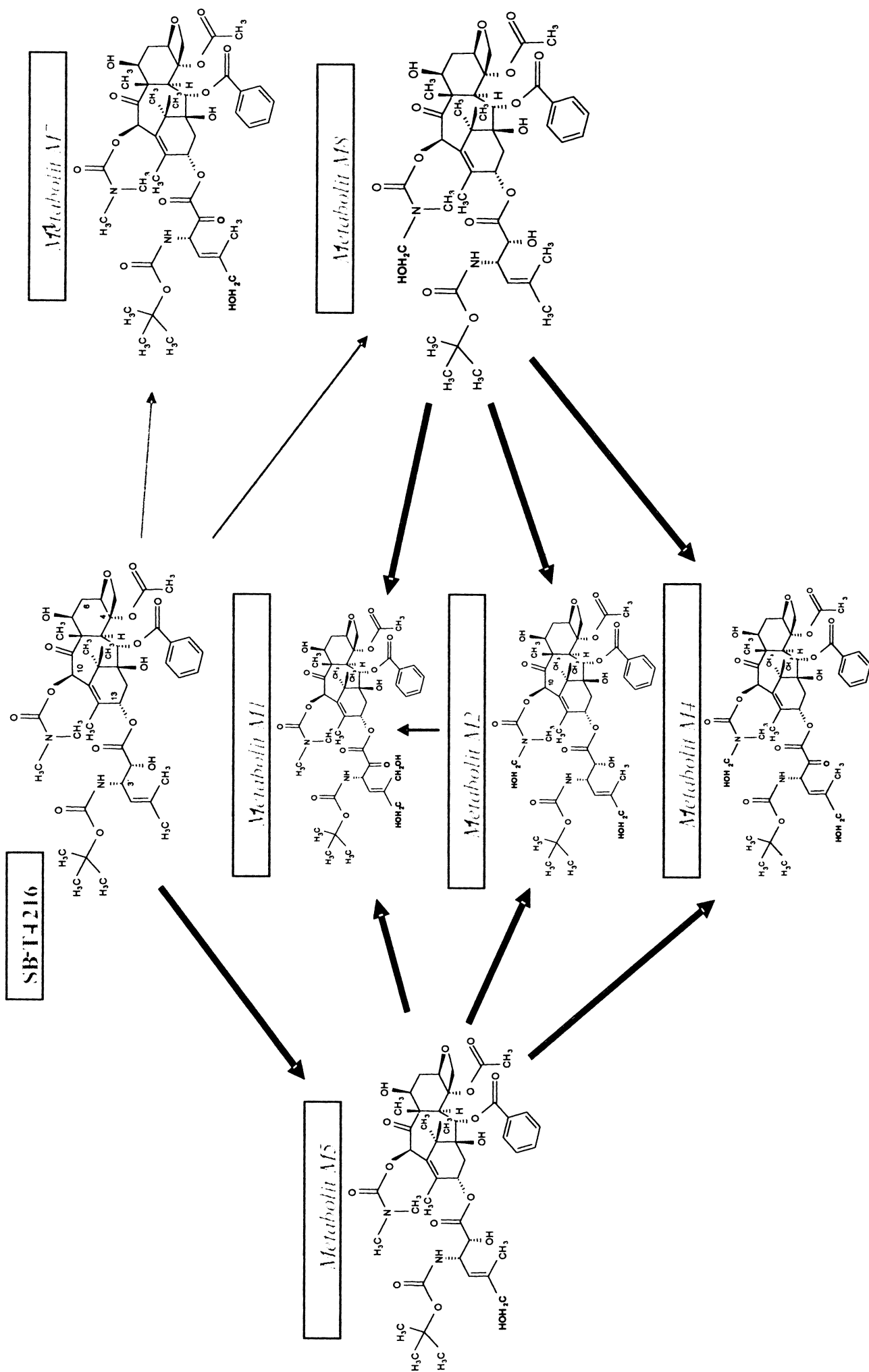


**Obr.8B:** Strukturální schéma *in vitro* metabolických přeměn syntetického taxanového analogu SB-T-1214.

**Tabulka 13:** Metabolity SB-T-1214 (MW 853.95) v jaterních mikrosomech různých živočišných druhů. Rychlost tvorby metabolitů je vyjádřena v pmol/mg proteinu/min. Uvedená data jsou průměrné hodnoty ± SD (n = 3).

| Charakteristika metabolitu |                                   |                                     |     | Tvorba a množství metabolitů v jaterních mikrosomech   |                                  |                                  |                                 |                                 |                                   |
|----------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|-----|--|----------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|-----------------------------------|
| Metabolit                  | t <sub>R</sub> <sup>b</sup> , min | t <sub>R</sub> <sup>b</sup> , % SBT | MM  | Popis metabolitů <sup>c</sup><br>NA = nevýznamné metabolity neanalyzované MS   | Potkaní mikrosomy                | PCN-indukované mikrosomy potkana | Prasečí mikrosomy               | Miniprasečí mikrosomy           | Lidské mikrosomy                  |
| <b>M1</b>                  | 3.6                               | 25                                  | 883 | Aldehyd vzniklý dihydroxylací na 2-methylpropanu v poloze C3' na C13 postranním řetězci SB-T-1214 s dvojnou vazbou kyslíku v C2' poloze<br>Pík M1 obsahuje jako kontaminant další velmi minoritní metabolit hydroxylovaný na taxanovém kruhu (M10) | 32.0±2.7                         | <del>352.2±4.4<sup>a</sup></del> | 1.7±0.4                         | 2.6±0.6                         | 8.2±1.6                           |
| <b>M2</b>                  | 4.5                               | 30                                  | 883 | Isomer metabolitu M1   | -                                | 6.7±0.6                          | 6.0±2.2                         | 7.7±2.5                         | -                                 |
| <b>M3</b>                  | 5.0                               | 34                                  | 885 | Dihydroxylace na 2-methylpropanu v poloze C3' na C13 postranním řetězci SB-T-1214  | -                                | 11.5±0.1                         | -                               | -                               | -                                 |
| <b>M4</b>                  | 5.4                               | 36.5                                | -   | NA   | 1.1±0.3                          | 1.2±0.1                          | -                               | -                               | -                                 |
| <b>M5</b>                  | 5.7                               | 40                                  | -   | NA   | 1.6±0.1                          | -                                | -                               | -                               | -                                 |
| <b>M6</b>                  | 6.3                               | 43                                  | 883 | hydroxylace 2-methylpropanu v poloze C3' na C13 postranním řetězci SB-T-1214 s dvojnou vazbou kyslíku v C2' poloze + hydroxylace na taxanovém kruhu, poloha neurčena   | -                                | 12.6±0.3                         | -                               | -                               | -                                 |
| <b>M7</b>                  | 6.7                               | 45                                  | -   | NA   | -                                | -                                | 4.1±0.7                         | 5.6±0.4                         | 3.7±0.7                           |
| <b>M8</b>                  | 7.7                               | 52                                  | 869 | hydroxylace 2-methylpropanu v poloze C3' na C13 postranním řetězci SB-T-1214   | <del>256.0±8.5<sup>a</sup></del> | 57.4±2.8                         | <del>44.7±0.9<sup>a</sup></del> | <del>82.9±3.5<sup>a</sup></del> | <del>224.1±11.5<sup>a</sup></del> |
| <b>M9</b>                  | 9.5                               | 63.5                                | 867 | hydroxylace 2-methylpropanu v poloze C3' na C13 postranním řetězci SB-T-1214 s dvojnou vazbou kyslíku v C2' poloze   | 40.1±3.0                         | 77.9±1.1                         | 0.5±0.3                         | 1.9±0.1                         | 20.6±0.8                          |

<sup>a</sup>Hlavní metabolit, <sup>b</sup>t<sub>R</sub> = retenční čas (min), <sup>c</sup>struktury metabolitů jsou znázorněny v metabolickém schématu na obr.8B



Obr.8C: Strukturí schéma *in vitro* metabolických přeměn syntetického taxanového analogu SB-T-1216.

**Tabulka 14: Metabolity SB-T-1216 (MW 857) v jaterních mikrosomech různých živočišných druhů. Rychlost tvorby metabolitů je vyjádřena v pmol/mg proteinu/min. Uvedená data jsou průměrné hodnoty ± SD (n = 3).**

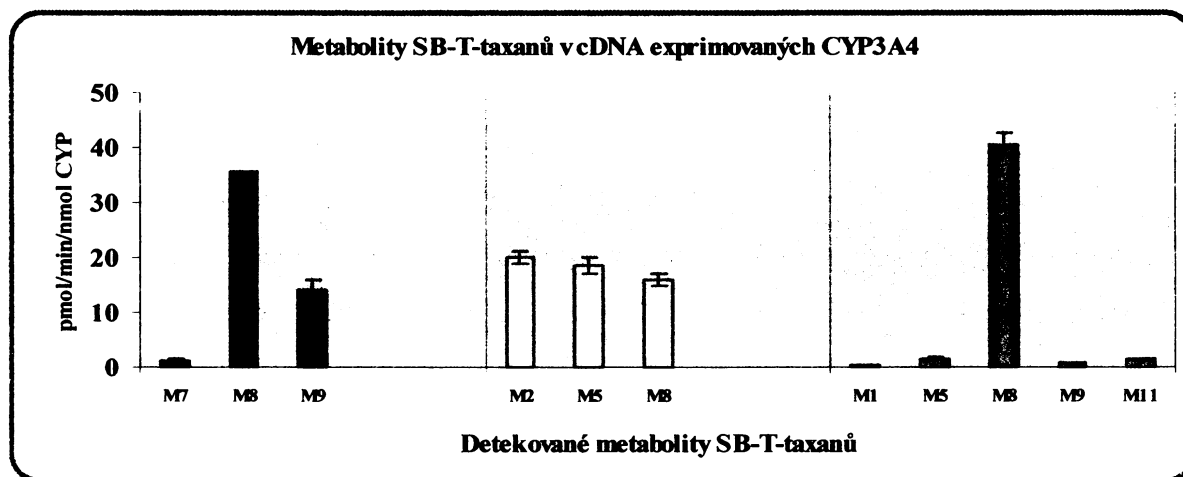
| Metabolit | Charakteristika metabolitu |                 |     | Tvorba a množství metabolitů v jaterních mikrosomech  |                              |                                  |                             |                             |                             |  |  |
|-----------|----------------------------|-----------------|-----|---|------------------------------|----------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|--|--|
|           | $t_R^b$ , min              | $t_R^b$ , % SBT | MM  | Popis metabolitů <sup>c</sup><br>NA = nevýznamné metabolity neanalyzované MS  | Potkání mikrosomy            | PCN-indukované mikrosomy potkana | Prasečí mikrosomy           | Miniprasečí mikrosomy       | Lidské mikrosomy            |  |  |
| <b>M1</b> | 3.2                        | 24              | 903 | Aldehyd vzniklý dihydroxylací na 2-methylpropanu v poloze C3' na C13 postranním řetězci SB-T-1216 s dvojnou vazbou kyslíku v C2' poloze + hydroxylace methylu v dimethylaminoskupině v poloze C-10 na taxanovém kruhu | 20.8±3.9                     | <u>142.1±7.7<sup>a</sup></u>     | 3.5±0.3                     | 2.6±0.1                     | 4.9±3.2                     |  |  |
| <b>M2</b> | 5.1                        | 39              | 887 | Hydroxylace 2-methylpropanu v poloze C3' na C13 postranním řetězci SB-T-1216 + hydroxylace methylu v dimethylaminoskupině v poloze C-10 na taxanovém kruhu  | 59.4±2.3                     | 6.2±0.1                          | 0.8±0.2                     | 1.9±0.4                     | 7.5±0.4                     |  |  |
| <b>M3</b> | 5.35                       | 41              | -   | NA  | -                            | 2.6±0.4                          | -                           | -                           | -                           |  |  |
| <b>M4</b> | 6.15                       | 48              | 885 | Hydroxylace na 2-methylpropanu v poloze C3' na C13 postranním řetězci SB-T-1216 s dvojnou vazbou kyslíku v C2' poloze + hydroxylace methylu v dimethylaminoskupině v poloze C-10 na taxanovém kruhu                   | -                            | 55.0±0.6                         | -                           | -                           | -                           |  |  |
| <b>M5</b> | 6.7                        | 51              | 872 | Hydroxylace 2-methylpropanu v poloze C3' na C13 postranním řetězci SB-T-1216  | <u>166.3±1.7<sup>a</sup></u> | -                                | 22.4±0.7                    | 26.9±0.3                    | <u>64.8±1.7<sup>a</sup></u> |  |  |
| <b>M6</b> | 7.5                        | 58              | -   | NA  | -                            | 19.0±0.8                         | -                           | -                           | -                           |  |  |
| <b>M7</b> | 8.25                       | 64              | 870 | Hydroxylace na 2-methylpropanu v poloze C3' na C13 postranním řetězci SB-T-1216 s dvojnou vazbou kyslíku v C2' poloze   | 39.7±2.0                     | 4.1±0.4                          | -                           | 0.8±0.1                     | 6.4±0.9                     |  |  |
| <b>M8</b> | 9.8                        | 76              | 872 | hydroxylace methylu v dimethylaminoskupině v poloze C-10 na taxanovém kruhu   | 43.4±1.0                     | -                                | <u>68.0±1.8<sup>a</sup></u> | <u>83.7±0.8<sup>a</sup></u> | 20.2±1.4                    |  |  |

<sup>a</sup>Hlavní metabolit, <sup>b</sup> $t_R$  = retenční čas (min), <sup>c</sup>struktury metabolitů jsou znázorněny v metabolickém schématu na obr.8C

Jak je z tabulek č.12-14 patrné, metabolický profil všech tří nových taxanů se lišil od ostatních druhů v PCN-indukovaných mikrosomech potkana. Díky zvýšenému množství a aktivitě CYP3A1/2 ve zmíněných potkaních mikrosomech zde vůbec nevznikaly některé minoritní metabolity a na druhé straně obvyklé majoritní metabolity byly v těchto mikrosomech dále oxidovány. Tyto výsledky svědčí o roli CYP3A podrodiny v metabolismu SB-T-1103, SB-T-1214 a SB-T-1216.

V sérii cDNA exprimovaných lidských CYP1A2, 1B1, 2A6, 2C9, 2E1 a 3A4 se pouze **CYP3A4** účastnil metabolismu nových taxanů (obr.9). Těmito experimenty bylo potvrzeno, že CYP3A4 je významným cytochromem P450 podílejícím se na metabolické přeměně taxanových analogů SB-T-1103, SB-T-1214 a SB-T-1216.

**Obr. 9:** Tvorba metabolitů SB-T-taxanů cDNA exprimovaným CYP3A4. Výsledky jsou uvedeny jako průměrné hodnoty  $\pm$  SD ( $n = 3$ ).



#### 4.1.4. Enzymatická kinetika metabolismu klasických a nových taxanů *in vitro*

Ze sledované přeměny paclitaxelu a docetaxelu byla odhadnuta afinita taxanů k cytochromu P450 stanovením  $K_m$  a také určením maximální rychlosti enzymové reakce  $V_{max}$  pro hlavní metabolické přeměny paclitaxelu a docetaxelu v jaterních mikrosomálních frakcích potkana, prasete, miniprasete a člověka (Tabulka 15).  $K_m$  a  $V_{max}$  byly určeny z odpovídajících Lineweaver-Burkových výnosů závislosti převrácených hodnot rychlosti tvorby metabolitů na převrácených hodnotách koncentrace taxanu.

**Tabulka 15:** Kinetické konstanty majoritních oxidačních reakcí v jaterních mikrosomech člověka, potkana, prasete a miniprasete. Koncentrace paclitaxelu 2.5 – 25  $\mu$ M, docetaxelu 2.0 – 25  $\mu$ M. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměrné hodnoty  $\pm$  SD ( $n \geq 2$ ).

| Mikrosomy              | Oxidační reakce            | CYP <sup>a</sup> | K <sub>m</sub> (μM) | V <sub>max</sub> (pmol/min/mg proteinu) | V <sub>max</sub> /K <sub>m</sub> |
|------------------------|----------------------------|------------------|---------------------|---|----------------------------------|
| PACLITAXEL             |                            |                  |                     |   |                                  |
| Potkaní                | C3'-hydroxylace            | CYP3A1/2         | 16.1± 2.4           | 19.7± 11.7                              | 1.2                              |
| Potkaní PCN-indukované | C3'-hydroxylace            | CYP3A1/2         | 24.5± 4.3           | 184.5± 11.1                             | 7.5                              |
| Miniprasečí            | Hydroxylace neznámá poloha | CYP3A29          | 15.0± 2.0           | 29.0 ± 4.0                              | 1.9                              |
| Prasečí                | Hydroxylace neznámá poloha | CYP3A29          | 17.0± 3.0           | 14.0 ± 3.0                              | 0.8                              |
| Lidské                 | 6α-hydroxylace             | CYP2C8           | 9.3±4.7             | 60.9± 39.7                              | 6.5                              |
| DOCETAXEL <sup>b</sup> |                            |                  |                     |   |                                  |
| Potkaní                | Hydroxylace docetaxelu     | CYP3A1/2         | 5.6                 | 52                                      | 9.1                              |
| Miniprasečí            | Hydroxylace docetaxelu     | CYP3A29          | 8.1                 | 23                                      | 2.9                              |
| Prasečí                | Hydroxylace docetaxelu     | CYP3A29          | 5.1                 | 21                                      | 4.0                              |
| Lidské                 | Hydroxylace docetaxelu     | CYP3A3/4         | 5.4                 | 17.4                                    | 3.2                              |

<sup>a</sup>Cytochromy P450 odpovědné za oxidační reakci, <sup>b</sup>Výsledky jsou vyjádřeny jako průměry dvou nezávislých duplicitních měření

Pro všechny tři nové taxanové analogy SB-T-1103, SB-T-1214 a SB-T-1216 byly stanoveny kinetické parametry v lidských jaterních mikrosomálních frakcích. Kinetické parametry byly určeny metodou nelineární regrese s využitím programu GraphPad Prism verze 4.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) a porovnány s klasicky určenými konstantami K<sub>m</sub> a V<sub>max</sub> z lineárních transformací (*Tabulka 16*). Výsledky ukazují dobrou shodu stanovených parametrů, ale parametry stanovené lineární regresí jsou zatíženy větší chybou, protože v Lineweaver-Burkově transformaci dat má největší význam oblast nejnižších koncentrací a tak nepřesnosti vyskytující se v nízkých koncentracích mohou značně ovlivnit konečné hodnoty kinetických konstant. Proto se také v současnosti od použití těchto transformací ustupuje a do popředí se dostávají metody stanovení kinetických parametrů nelineární regresí s využitím moderních počítačových softwarů.

**Tabulka 16:** Kinetické konstanty majoritních oxidačních reakcí SB-T-taxanů v lidských jaterních mikrosomech. Koncentrace nových taxanů 2.5 – 50 μM. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměry dvou nezávislých měření.

| Taxan     | Oxidační reakce      | CYP    | K <sub>m</sub> (μM) |              | V <sub>max</sub> (pmol/min/mg proteinu) |              | V <sub>max</sub> /K <sub>m</sub> |              |
|-----------|----------------------|--------|---------------------|--------------|---|--------------|----------------------------------|--------------|
|           |                      |        | Nelin. regrese      | Lin. regrese | Nelin. regrese                          | Lin. regrese | Nelin. regrese                   | Lin. regrese |
| SB-T-1103 | Tvorba metabolitu M8 | CYP3A4 | 7.71                | 12.15        | 36.36                                   | 54.55        | 4.72                             | 4.49         |
| SB-T-1214 | Tvorba metabolitu M8 | CYP3A4 | 7.11                | 10.12        | 85.62                                   | 105.14       | 12.04                            | 10.39        |
| SB-T-1216 | Tvorba metabolitu M5 | CYP3A4 | 22.85               | 26.90        | 165.20                                  | 178.57       | 7.23                             | 6.64         |



## 4.2 Vliv fenolických antioxidantů na metabolismus klasických taxanů

### 4.2.1. Vliv fenolických antioxidantů na metabolismus paclitaxelu v lidských a potkaních jaterních mikrosomech

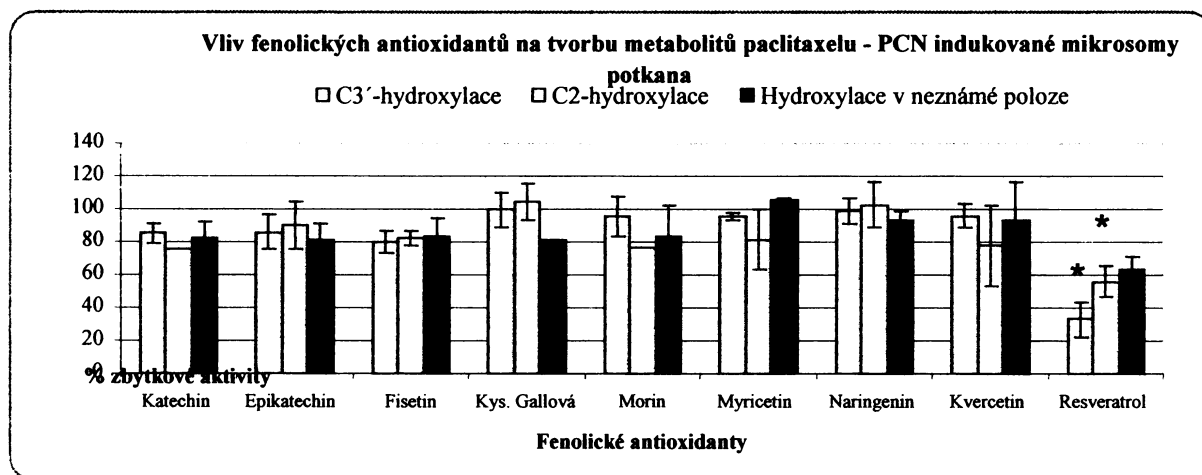
Metabolická přeměna paclitaxelu v živém organismu vede k inaktivaci tohoto léčiva.<sup>[47,81]</sup> Proto jsou hledány inhibitory metabolismu paclitaxelu, které by snižovaly tvorbu inaktivních metabolitů a tím zvyšovaly cytotoxické působení paclitaxelu. V předkládané práci byl studován vliv devíti fenolických antioxidantů (**fisetin, katechin, epikatechin, kvercetin, kys. gallová, morin, myricetin, naringenin a resveratrol**) na tvorbu metabolitů paclitaxelu v jaterních mikrosomech potkana indukovaných PCN a v lidských jaterních mikrosomech. Jednotlivé fenolické antioxidanty byly přidávány do inkubačních směsí a pomocí HPLC bylo sledováno, zda ovlivňují tvorbu metabolitů paclitaxelu. Mezi jednotlivými sledovanými antioxidanty byly nalezeny značné rozdíly v jejich působení na metabolismus paclitaxelu v lidských a potkaních jaterních mikrosomech. **V potkaních mikrosomech**, kde se účastní metabolismu paclitaxelu pouze CYP3A1/2 podrodina, byl významným inhibitorem metabolismu paclitaxelu **resveratrol**. **Fisetin** také účinně inhiboval tvorbu metabolitů ovšem až ve vyšších a farmakologicky obtížně dosažitelných hladinách (*obr. 10A*).

**V lidských jaterních mikrosomech** katalyzují tvorbu metabolitů dva cytochromy P450; CYP3A4 a CYP2C8. Právě CYP2C8 je zde důležitý, protože se podílí na hlavní metabolické cestě paclitaxelu 6 $\alpha$ -hydroxylaci. V literatuře byly nalezeny údaje o působení fenolických antioxidantů na aktivitu tohoto lidského enzymu<sup>[85,137]</sup> a také v této práci byl zjištěn silný účinek některých fenolických antioxidantů na aktivitu CYP2C8. **Fisetin, morin, kvercetin a resveratrol** byly účinnými **inhibitory tvorby 6 $\alpha$ -hydroxypaclitaxelu** katalyzované právě CYP2C8. Mírným inhibitorem byl naringenin. **Tvorbu C3'-hydroxypaclitaxelu**, který je druhým lidským hlavním metabolitem, jehož vzniku se účastní CYP3A4, **inhiboval resveratrol následovaný morinem** (*obr. 10B*). Fisetin opět účinkoval až ve vyšší 40 $\mu$ M koncentraci.

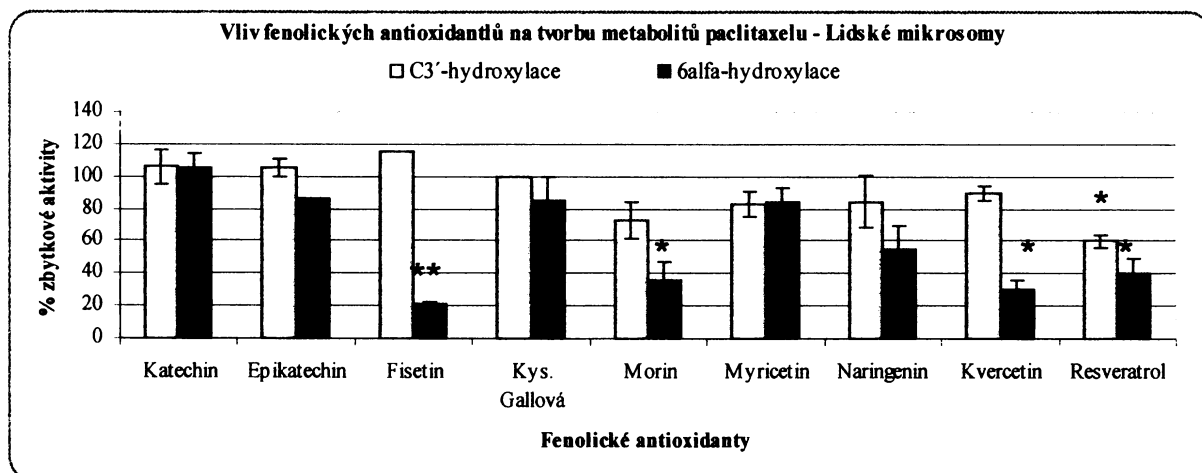
Účinné fenolické antioxidanty byly charakterizovány stanovením **IC<sub>50</sub>** z poklesu tvorby metabolitů paclitaxelu při rostoucí koncentraci inhibitoru, dále byla určena **inhibiční konstanta (K<sub>i</sub>) a typ inhibice** (Tabulka 17).

**Obr.10:** Vliv fenolických antioxidantů na tvorbu metabolitů paclitaxelu v PCN indukovaných mikrosomech potkana (A) a v lidských jaterních mikrosomech (B). Konc. paclitaxelu 10 $\mu$ M, konc. fenolických antioxidantů 30 $\mu$ M. Data jsou vyjádřena jako průměrné hodnoty  $\pm$  SD ( $n \geq 2$ ). Jako statisticky významné jsou dle oboustranného Studentova  $t$  testu hodnoceny výsledky s hodnotami \* $p < 0.05$  a \*\* $p < 0.01$ .

A



B



Uvedené výsledky ukazují silné inhibiční účinky některých fenolických antioxidantů na metabolismus paclitaxelu zejména na tvorbu jeho hlavního metabolitu v lidském organismu 6 $\alpha$ -hydroxypaclitaxelu. Zvláště v případě fisetinu silně inhibujícího aktivitu lidského CYP2C8 jde o dříve neuveřejněné působení fisetinu, které může mít velký význam z hlediska možného ovlivnění metabolismu substrátů tohoto důležitého lidského cytochromu P450. Účinky fenolických antioxidantů na metabolismus paclitaxelu je třeba v budoucnu ověřit ve studiích *in vivo*. V případě potvrzení nalezených *in vitro* aktivit fenolických antioxidantů, by mohly být tyto látky podávány současně s paclitaxelem a vést k potenciaci jeho účinků zamezením ztráty biologické účinnosti paclitaxelu způsobené jeho metabolickou inaktivací.

**Tabulka 17:** Charakteristiky inhibice metabolismu paclitaxelu fenolickými antioxidanty v lidských a v potkaních PCN-indukovaných jaterních mikrosomech. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměrné hodnoty  $\pm$  SD ( $n \geq 2$ ). Použité koncentrace fenolických antioxidantů; 0 – 40  $\mu$ M, paclitaxelu 0 – 15  $\mu$ M.

| Inhibitor          | Mikrosomy              | Inhibovaná reakce paclitaxelu | Typ inhibice         | IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M) | K <sub>i</sub> ( $\mu$ M) |
|--------------------|------------------------|-------------------------------|----------------------|-----------------------------|---------------------------|
| <b>Fisetin</b>     | Lidské                 | 6 $\alpha$ -hydroxylace       | Smíšený              | 10.8 $\pm$ 2.2              | 1.3 – 6.0                 |
| <b>Morin</b>       | Lidské                 | 6 $\alpha$ -hydroxylace       | Smíšený              | 17.3 $\pm$ 2.4              | 7.3 – 12.3                |
| <b>Kvercetin</b>   | Lidské                 | 6 $\alpha$ -hydroxylace       | Smíšený              | 15.9 $\pm$ 1.3              | 4.0 – 13.0                |
| <b>Resveratrol</b> | Potkaní PCN-indukované | C3'-hydroxylace               | Smíšený              | 18.7 $\pm$ 2.8              | 12.2 – 16.3               |
|                    |                        | C2-hydroxylace                | Nekompetitivní       | 26.3 $\pm$ 6.5              |                           |
|                    | Lidské                 | Hydroxylace, neznámá poloha   | Smíšený              | 27.2 $\pm$ 2.1              | 9.8 – 15.7                |
|                    | Lidské                 | 6 $\alpha$ -hydroxylace       | Smíšený <sup>a</sup> | 26.5 $\pm$ 2.0              | 16.5 – 20.7               |
|                    |                        | C3'-hydroxylace               |                      | 28.5 $\pm$ 4.6              | <sup>a</sup>              |

<sup>a</sup> Vzhledem k slabé inhibici nebyly K<sub>i</sub> a typ inhibice určovány

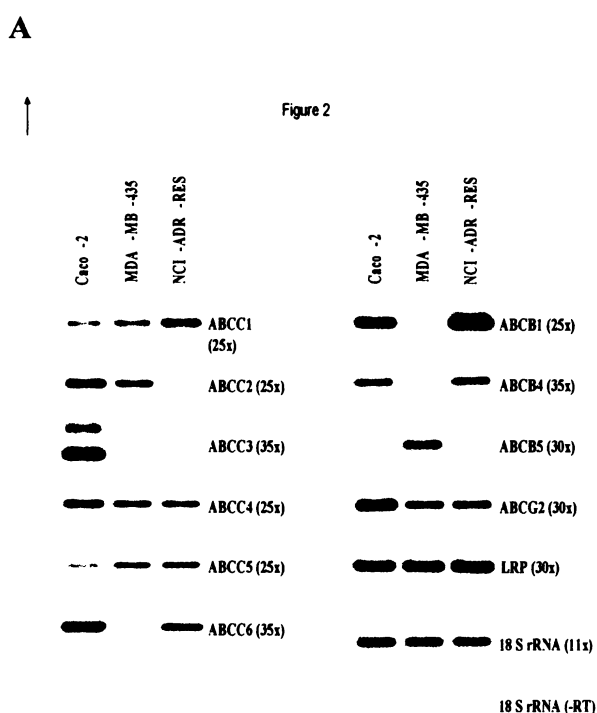
#### 4.2.2. Vliv fenolických antioxidantů na metabolismus docetaxelu v lidských jaterních mikrosomech

Byl sledován vliv dvou přírodních fenolických antioxidantů na metabolismus docetaxelu a to **kvercetin** a **resveratrol** v lidských jaterních mikrosomech. Vzhledem k tomu, že docetaxel nevykazuje mezidruhové rozdíly metabolismu (Příloha č.III), byl rovněž vliv fenolických antioxidantů sledován pouze v lidských jaterních mikrosomech. Resveratrol byl vybrán na základě jeho výše uvedeného působení na aktivitu CYP3A4, který se účastní metabolismu docetaxelu. Kvercetin byl pak vybrán na základě jeho významu jako fenolického antioxidantu nejběžněji se vyskytujícího jako složka lidské stravy. Resveratrol účinně inhibující tvorbu C3'-hydroxypaclitaxelu metabolismus docetaxelu neovlivňoval, což naznačuje jeho velkou selektivitu vůči jednotlivým substrátům lidského CYP3A4, protože i strukturně velmi podobné látky jako jsou paclitaxel a docetaxel jsou resveratrolem po metabolické stránce odlišně ovlivňovány. Kvercetin inhiboval pouze tvorbu hlavního lidského metabolitu docetaxelu **hydroxydocetaxelu** a to až ve 30  $\mu$ M koncentraci. Ani v této koncentraci ale nedosahoval 50% inhibice. Docházelo k inhibici tvorby hydroxydocetaxelu pouze ze 41%. Sledované fenolické antioxidanty účinně inhibují zejména tvorbu lidského CYP2C8 (viz. výše), zatímco aktivita lidského CYP3A4 je ovlivňována mnohem méně, jak je potvrzeno touto studií působení resveratrolu a kvercetin na metabolismus docetaxelu v lidských jaterních mikrosomech.

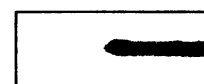
### 4.3. Studium transportu taxanů v lidských buněčných liniích rakoviny prsu

V úvodní části bylo zmíněno, že častým problémem úspěšnosti terapie taxany je rozvoj **mnohočetné lékové resistance nádorů (multidrug resistance, MDR)**. V této studii byl sledován transport klasických a nových taxanů lidskou sensitivní buněčnou linií rakoviny prsu (MDA-MB-435) a linií resistantní vůči adriamycinu (NCI/ADR-RES). Tyto buněčné linie se liší expresí některých ABC transportních membránových proteinů zejména P-gp, který hraje významnou roli v transportu antracyklinů, taxanů a dalších xenobiotik. Proto se dalo očekávat, že použitá buněčná linie bude resistantní kromě adriamycinu také vůči taxanům. Rozdílná **exprese 11 ABC transportérů na úrovni mRNA** byla sledována metodou semikvantitativní RT-PCR v Laboratoři regulace buněčného růstu (ÚMG AV ČR, Praha-Krč).

Hlavní rozdíl byl nalezen v expresi MDR1 genu kódujícího tvorbu P-gp, který byl exprimován ve vysokých hladinách v resistantních buňkách, zatímco v sensitivních nebyl vůbec detekován. Z dalších ABC transportních proteinů byl nalezen rozdíl v expresi ABCB4 a ABCC6 mRNA, které byly detekovány pouze v resistantních buňkách, naopak ABCB5 a ABCC2 mRNA byly exprimovány v sensitivních buňkách (*obr.11A*). Produkty těchto genů by rovněž mohly mít vliv na vznik resistance nádorových buněk vůči cytostatikům. Nejvýznamnější rozdíl pozorovaný v expresi MDR1 genu byl potvrzen **imunodetekcí P-gp také na úrovni proteinu** pomocí Western blotu s následnou chemiluminiscenční detekcí P-gp (*obr.11B*).



**B** MDA-MB-435 NCI/ADR-RES



**Obr.11:** (A) Expresa mRNA různých ABC transportérů, LRP a kontrolního genu 18S rRNA. Čísla v závorkách znamenají počet cyklů při PCR reakci. (B) Expresa proteinu P-gp chemiluminiscenční detekcí. Expresa byla stanovena v MDA-MB-435 a NCI/ADR-RES buněčných liniích rakoviny prsu. Jako pozitivní kontrola exprese ABC transportérů byly použity lidské střevní buňky adenokarcinomu (CaCo-2).

#### 4.3.1. Cytotoxicita a transport klasických a nových taxanů v sensitivních a resistantních buněčných liniích rakoviny prsu

Byla sledována *cytotoxicita klasických a nových taxanů v sensitivní (MDA-MB-435) a resistantní (NCI/ADR-RES) buněčné linii rakoviny prsu* určením dávek  $IC_{50}$  nutných k dosažení 50% toxického účinku taxanů. Cytotoxicita byla stanovována v Laboratoři regulace buněčného růstu (ÚMG AV ČR, Praha-Krč) Ing. Marií Ehrlichovou.  $IC_{50}$  paclitaxelu a docetaxelu byly 1000x a 600x vyšší v resistantních liniích než v sensitivních buněčných liniích. Naopak hodnoty  $IC_{50}$  nových taxanů byly srovnatelné v sensitivních liniích s docetaxelem, ovšem v resistantních liniích byly mnohonásobně nižší než v případě obou klasických taxanů (Tabulka 18). Resistentní nádorové buňky jsou tedy mnohem citlivější vůči novým taxanům, což poukazuje na jejich potenciální využití zejména při rozvoji resistance nádorů.

**Tabulka 18:** Stanovení cytotoxických dávek  $IC_{50}$  (nM) klasických a nových taxanů v sensitivní (MDA-MB-435) a resistantní (NCI/ADR-RES) lidské buněčné linii rakoviny prsu. Hodnoty  $IC_{50}$  byly stanoveny po 96hod vystavení buněk taxanům nebo samotnému mediu s hovězím sérum albuminem jako kontrolou. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr osmi nezávislých stanovení.

| Taxany          | Buněčné linie  |   |                |   |
|-----------------|----------------|---|----------------|---|
|                 | MDA-MB-435     |   | NCI/ADR-RES    |   |
| Klasické taxany | $IC_{50}$ (nM) | Sledovaný koncentrační rozsah taxanu (nM) | $IC_{50}$ (nM) | Sledovaný koncentrační rozsah taxanu (nM) |
| Paclitaxel      | 1.0            | 0.1 - 1000                                | 1000           | 0.1 - 1000                                |
| Docetaxel       | 0.5            | 0.1 - 1000                                | 300            | 0.1 - 1000                                |
| Nové taxany     |                |   |                |   |
| SB-T-1103       | 0.5            | 0.01 - 10                                 | 1.0            | 0.03 - 30                                 |
| SB-T-1214       | 0.3            | 0.003 - 3                                 | 5.0            | 0.03 - 30                                 |
| SB-T-1216       | 0.2            | 0.003 - 3                                 | 3.0            | 0.1 - 100                                 |

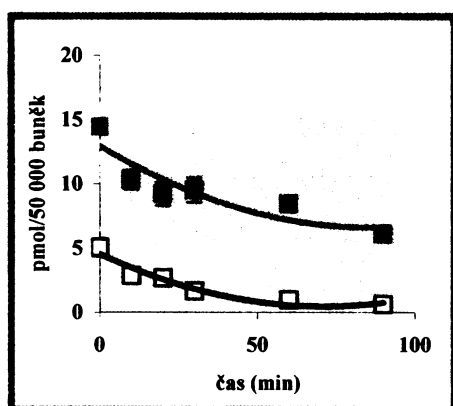
Dále byla sledována akumulace klasických i nových taxanů v obou typech buněčných linií. Paclitaxel byl použit jednak v neradioaktivní formě a jednak jako radioaktivně značená forma [ $^{14}C$ ]paclitaxel. Akumulace léčiv, která nebyla radioaktivně značena, bylo měřeno po promytí buněk, jejich sklizení a následné extrakci taxanů ethylacetátem pomocí HPLC (viz. kap.3.4). Množství [ $^{14}C$ ]paclitaxelu akumulovaného buněčnými linemi byla měřeno po inkubaci buněk se [ $^{14}C$ ]paclitaxelem v promytých a sklizených buňkách metodou kapalně scintilace (viz. kap.3.4). V tabulce 19 jsou uvedena množství akumulovaných léčiv v obou typech sledovaných buněčných liniích. Z výsledků je patrné, že akumulace klasických taxanů se mezi oběma typy buněčných linií výrazně liší.

Resistentní linie absorbuje až 6.8x méně docetaxelu, 3.9x méně paclitaxelu a dokonce 9.7x méně [ $^{14}\text{C}$ ]paclitaxelu. Rozdíl mezi neradioaktivním a radioaktivním paclitaxelem je dán tím, že použití [ $^{14}\text{C}$ ]paclitaxelu umožnilo sledování při nižších koncentracích, kdy je rozdíl mezi sledovanými liniemi větší. Využití radioaktivním forem léčiv pro sledování transportu je velmi citlivé, časově nenáročné a umožňuje jak bylo ukázáno, použití velmi nízkých koncentrací léčiv s velkou přesností. Proto v případech, kde je k dispozici radioaktivně značená forma léčiva, je tato forma přednostně používána ke sledování transportu léčiv. Z tohoto důvodu byla také k dalším studiím týkajících se ovlivnění transportu paclitaxelu používána právě jeho radioaktivně značená forma. Nové taxany jsou na rozdíl od klasických taxanů absorbovány ve zhruba stejné míře resistentními i sensitivními buňkami, což potvrzuje citlivost resistentních nádorových buněk rakoviny prsu NCI/ADR-RES vůči těmto potenciálním léčivům.

**Tabulka 19:** Porovnání množství taxanů absorbovaných sensitivními (MDA-MB-435) a resistentními (NCI/ADR-RES) buňkami rakoviny prsu po 60, 120 a 240min inkubaci. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr a odchylka dvou nezávislých měření.

| Taxan                         | Koncentrace<br>( $\mu\text{M}$ ) | % absorbovaného léčiva<br>v MDA-MB-435/ NCI/ADR-RES buňkách |                              |                                    |
|-------------------------------|----------------------------------|---|------------------------------|------------------------------------|
|                               |                                  | 60 min inkubace   | 120 min inkubace             | 240 min inkubace                   |
| Paclitaxel                    | 1                                | 6.3 $\pm$ 0.8/1.6 $\pm$ 0.2                                 | 5.7 $\pm$ 1.1/1.6 $\pm$ 0.2  | 4.5 $\pm$ 0.3/1.6 $\pm$ 0.1        |
| [ $^{14}\text{C}$ ]paclitaxel | 0.1                              | 9.3 $\pm$ 0.4/1.9 $\pm$ 0.1                                 | 14.4 $\pm$ 3.5/2.2 $\pm$ 0.1 | 18.4 $\pm$ 1.1 $\pm$ 1.9 $\pm$ 0.1 |
| Docetaxel                     | 1                                | 5.6 $\pm$ 0.1/1.4 $\pm$ 1.4                                 | 5.4 $\pm$ 0.7/0.8 $\pm$ 0.1  | -                                  |
| SB-T-1103                     | 1                                | 4.0 $\pm$ 0.1/6.1 $\pm$ 0.5                                 | 5.2 $\pm$ 1.3/6.7 $\pm$ 0.6  | -                                  |
| SB-T-1214                     | 1                                | 5.7 $\pm$ 0.1/6.2 $\pm$ 0.1                                 | 4.0 $\pm$ 0.2/5.5 $\pm$ 0.1  | -                                  |
| SB-T-1216                     | 1                                | 7.6 $\pm$ 0.1/4.5 $\pm$ 0.2                                 | 6.1 $\pm$ 0.4/2.8 $\pm$ 0.4  | -                                  |

V sensitivních i resistentních buňkách rakoviny prsu byl sledován rovněž vylučování [ $^{14}\text{C}$ ]paclitaxelu po jeho předcházejícím 120min akumulaci v buňkách. Z resistentních



MDA-MB-435 buňky  
□ NCI/ADR-RES buňky

NCI/ADR-RES buněk byl [ $^{14}\text{C}$ ]paclitaxel vylučován z 50% již po 25min, zatímco ze sensitivních MDA-MB-435 buněk až po 90min (obr.12).

**Obr.12:** Vylučování [ $^{14}\text{C}$ ]paclitaxelu z NCI/ADR-RES a MDA-MB-435 buněk měřený v intervalech 10, 20, 30, 60 a 90min po předcházející 120min akumulaci a při 200nM koncentraci [ $^{14}\text{C}$ ]paclitaxelu. Data jsou prezentována jako průměrné hodnoty a rozptyl ze dvou nezávislých měření a vyjádřena v pmol [ $^{14}\text{C}$ ]paclitaxelu/500000 buněk.

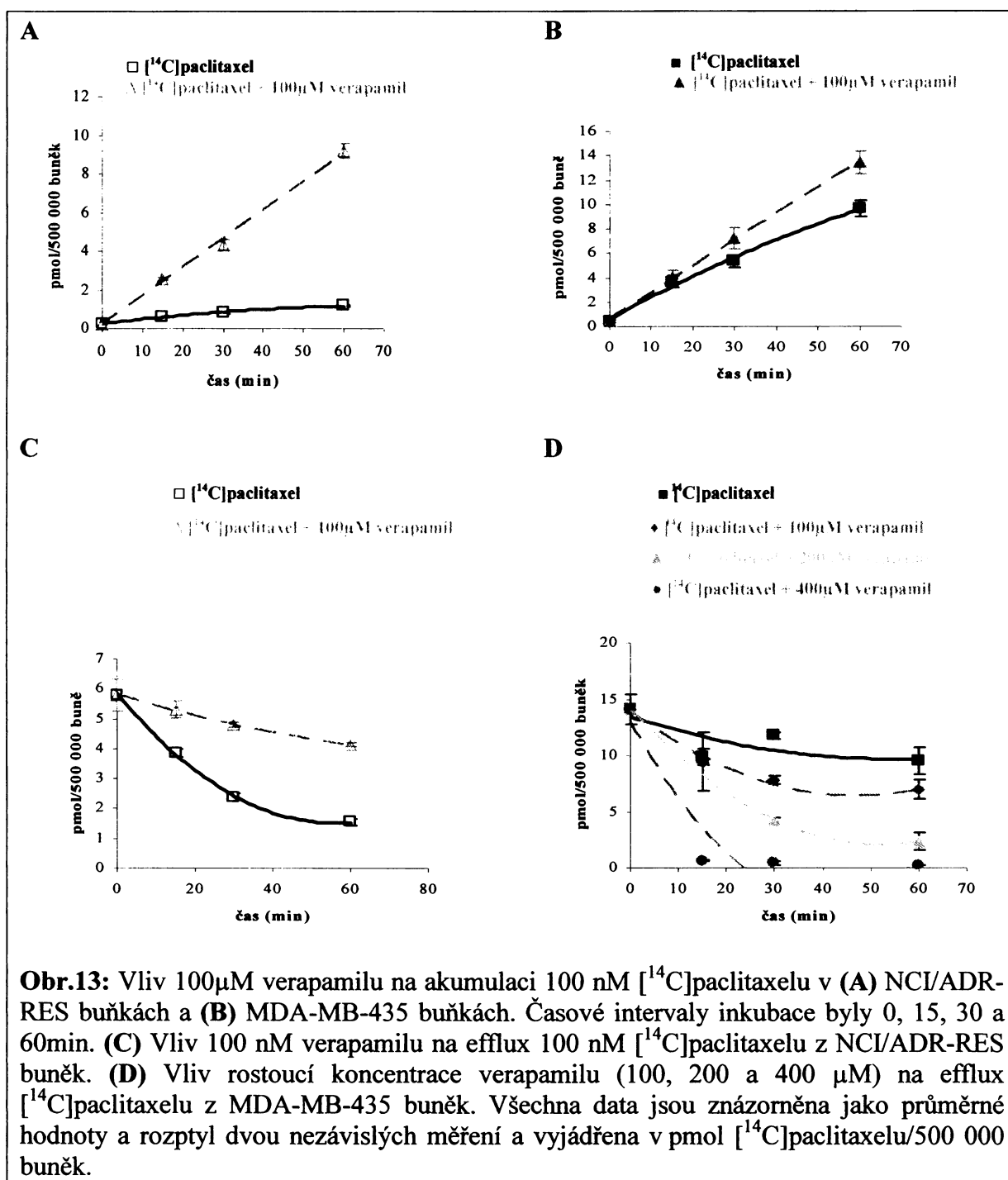
Se studiem transportu souvisí rovněž studium mechanismu působení taxanů po jejich vstupu do intracelulárního prostoru. O taxanech je velmi dobře známo, jakým mechanismem účinku působí na systém buněčných mikrotubulů.<sup>[9,63,113,131]</sup> Kromě toho taxany také vedou k indukci apoptosy zřejmě přes aktivaci Bcl-2 genu, ovšem jaké buněčné procesy probíhají při indukci programované smrti buňky působením taxanů není zcela známo. Proto byly kromě transportu taxanů sledovány také buněčné procesy indukce apoptosy vyvolané působením taxanů a případné rozdíly v působení taxanů mezi sensitivními a resistantními buněčnými liniemi rakoviny prsu. Byla sledována řada buněčných charakteristik typických pro *průběh apoptosy* jako *vyplavování cytochromu c z mitochondrií, aktivita kaspas-3 a 9, změna exprese proteinů p53 a p21 a fragmentace DNA*. Vyplavování cytochromu c z mitochondrií po původním působení proapoptotických faktorů vede k aktivaci kaspasy-9. Kaspasy-9 se za účasti dalších kaspas podílí na aktivaci kaspasy-3, která vstupuje do buněčného jádra. Dochází k aktivaci DNAas, fragmentaci DNA a apoptose.<sup>[157, Příloha č.VIII]</sup> Kromě této mitochondriální indukce apoptosy se na aktivaci buněčné smrti podílí i tumor supresorový protein p53, které po aktivaci, způsobené např. působením chemoterapeutik spouští řadu buněčných drah a procesů vedoucích k apoptose. K inhibici buněčného cyklu dochází po stimulaci exprese p21 účinkem aktivovaného p53.<sup>[158]</sup> Studie mechanismu indukce apoptosy působením taxanů v sensitivních (MDA-MB-435) a resistantních (NCI/ADR-RES) lidských buňkách rakoviny prsu byly prováděny v Laboratoři regulace buněčného růstu (ÚMG AV ČR, Praha – Krč), kde mají dlouholeté zkušenosti se studiem buněčné apoptosy a jejích mechanismů. Detailní popis použitých metod pro studium apoptosy i souhrn všech dosažených výsledků je obsahem *Přílohy č.VIII*. Hlavními výsledky bylo zjištění, že taxany svým působením uvnitř buněk aktivují kaspasy-9 a -3, což je pro apoptosu typické, ovšem není pozorována oligonukleosomální fragmentace DNA a navíc se liší mechanismus indukce buněčné smrti u sensitivní a resistantní buněčné linie. Zatímco resistantní buňky vyplavují cytochrom c z mitochondrií klasickým způsobem, v sensitivních liniích zůstává cytochrom c v mitochondriích, což je důkazem odlišného mechanismu indukce buněčné smrti vyvolané taxany v těchto typech nádorových buněk. Hladiny p53 a p21 se působením taxanů nemění v sensitivních ani resistantních buňkách a nejsou tedy taxany nijak ovlivňovány. Studium mechanismu indukce smrti působením taxanů a rozdíly působení taxanů v resistantní a sensitivní buněčné linii vyžadují další podrobné studium. Stejným způsobem je žádoucí sledovat mechanismus indukce apoptosy

vyvolané novými taxanovými analogy, které se mohou díky odlišné struktuře a transportu podílet na indukci programované smrti buňky jiným způsobem než klasické taxany.

#### 4.3.2. Vliv Verapamilu a nových taxanů na transport [<sup>14</sup>C]paclitaxelu v lidských buněčných liniích rakoviny prsu

Pro potvrzení významu P-gp v transportu taxanů, byl sledován vliv specifického inhibitoru P-gp první generace verapamilu na transport radioaktivně značeného [<sup>14</sup>C]paclitaxelu v sensitivních MDA-MB-435 i resistantních NCI/ADR-RES buňkách rakoviny prsu. Verapamil je známým inhibitorem transportní funkce P-gp používaným v klinické praxi.<sup>[70,108]</sup> V této studii byl přidáván do roztoků [<sup>14</sup>C]paclitaxelu a media přidávaných k buňkám a transport byl sledován za podmínek popsanych v kap.3.4. Přítomnost 100μM Verapamilu zvyšovala intracelulární koncentraci [<sup>14</sup>C]paclitaxelu v NCI/ADR-RES buněčné linii s vysokou expresí P-gp až 8x a vyrovnávala tak intracelulární hladiny [<sup>14</sup>C]paclitaxelu detekované v sensitivních MDA-MB-435 buňkách, kde se přítomnost verapamilu výrazně neprojevila, docházelo k nárůstu akumulace [<sup>14</sup>C]paclitaxelu pouze 1.4x oproti vzorkům bez verapamilu (*obr.13A-B*). Jak se dalo očekávat, 100μM verapamil rovněž inhiboval efflux [<sup>14</sup>C]paclitaxelu z resistantních NCI/ADR-RES buněk (*obr.13C*). Naproti tomu, vylučování [<sup>14</sup>C]paclitaxelu ze sensitivních MDA-MB-435 buněk inhibováno nebylo, ba naopak vlivem verapamilu docházelo ke stimulaci vylučování [<sup>14</sup>C]paclitaxelu z těchto buněk a to v závislosti na vzrůstající koncentraci verapamilu (*obr.13D*). Nalezené výsledky ukazují, že verapamil je účinným inhibitorem resistance vůči paclitaxelu v prsních nádorových buňkách, ale v sensitivních buňkách nádorů může naopak zvyšovat vylučování paclitaxelu a tím právě v tomto typu buněk snižovat účinek paclitaxelu. Tato data jsou prvním zveřejněným výsledkem rozdílného působení verapamilu na transport paclitaxelu sensitivními a resistantními nádorovými buňkami, které může mít významný vliv na úspěšnost chemoterapie v kombinaci s tímto cytostatikem. Zároveň je nutné brát v úvahu poměrně závažné nežádoucí účinky, které verapamil má a všechna tato kritéria zohlednit v případech terapeutického využití verapamilu v kombinované terapii s cytostatiky.





Obdobně jako verapamil i některé deriváty klasických taxanů účinně modulovaly transportní funkci P-gp (viz. Kap.1.2.6). Proto byla sledována schopnost nových taxanů SB-T-1103, SB-T-1214 a SB-T-1216 modulovat transport  $[^{14}\text{C}]$ paclitaxelu v sensitivních i resistantních buňkách rakoviny prsu. Přítomnost nových taxanů ovšem neovlivňovala akumulaci paclitaxelu v resistantních a sensitivních buňkách, SB-T-1214 dokonce snižoval akumulaci  $[^{14}\text{C}]$ paclitaxelu v obou typech linií a stimuloval vylučování ze sensitivních buněk, což nasvědčuje, že sledované nové taxany, jež nejsou substráty P-gp nejsou ani

modulátory jeho transportní funkce a nemají pravděpodobně využití v kombinovaném podání s klasickými taxany, či jinými léčivými, které jsou substráty P-gp. Nové taxany nejspíš ztěžují vstup klasických taxanů do buněk. Ovšem silné účinky samotných nových taxanových analogů v resistantních nádorových buňkách je upřednostňují jako potenciální alternativu v terapii resistantních nádorů namísto klasických taxanů.

#### 4.3.3. Vliv fenolických antioxidantů a jejich syntetických derivátů na transport [<sup>14</sup>C]paclitaxelu v lidských buněčných liniích rakoviny prsu

V současné době jsou intenzivně sledovány možnosti ovlivnění transportu řady látek prostřednictvím P-gp. Hledají se nejvhodnější **modulátory P-gp**, které by byly ve farmakologických indikacích účinné a zároveň nebyly zatíženy řadou vážných nežádoucích účinků, tak jako modulátory I. generace. V předkládané práci byl sledován vliv 2 přírodních fenolických antioxidantů a 13 syntetických derivátů flavonoidů z hlediska možné modulace transportu [<sup>14</sup>C]paclitaxelu v resistantní (NCI/ADR-RES) ale i citlivé (MDA-MB-435) lidské buněčné linii rakoviny prsu. Z přírodních fenolických antioxidantů byly vybrány dva zástupci; **resveratrol** - úspěšně inhibující metabolismus paclitaxelu *in vitro* (viz.kap.4.2) a **kvercetin**, u kterého byly již popsány účinky na transportní funkci P-gp.<sup>[22,25,118,120]</sup> Jako zástupci syntetických fenolických antioxidantů byly vybrány látky, které se váží k cytosolární doméně P-gp a byla u nich nalezena schopnost modulovat P-gp zprostředkovaný transport.<sup>[11,14-16]</sup> Šlo o tyto látky;

**Deriváty auronu:** CB-284 (4'-bromo-4,6-dimethoxyauron), CB-285 (4'-chloro-4,6-dimethoxyauron), CB-287 (4,6,3',4',6'-pentamethoxyauron), ND-285 (4'-chloro-4-hydroxy-6-methoxyauron), ML-30 (4'-ethyl-4-hydroxy-6-methoxyauron), ML-50 (4-hydroxy-6-methoxyauron), A-55B (4'-kyano-7-iodo-4-hydroxy-6-methoxyauron)

**Deriváty chalkonu:** FBB-14 (4-iodo-2',4',6'-trihydroxychalkon)

**Deriváty flavonu:** CB-436 (4'-bromo-3-methoxy-5,7-dihydroxyflavon)

**Deriváty flavonolu:** kaempferid (4'-methoxy-3,5,7-trihydroxyflavon), AB-2DE (4'-iodo-3,5,7-trihydroxyflavon)

**Deriváty chromonu:** MH-11 (5-hydroxy-2-CO-pyrazol-methyl-chromon)

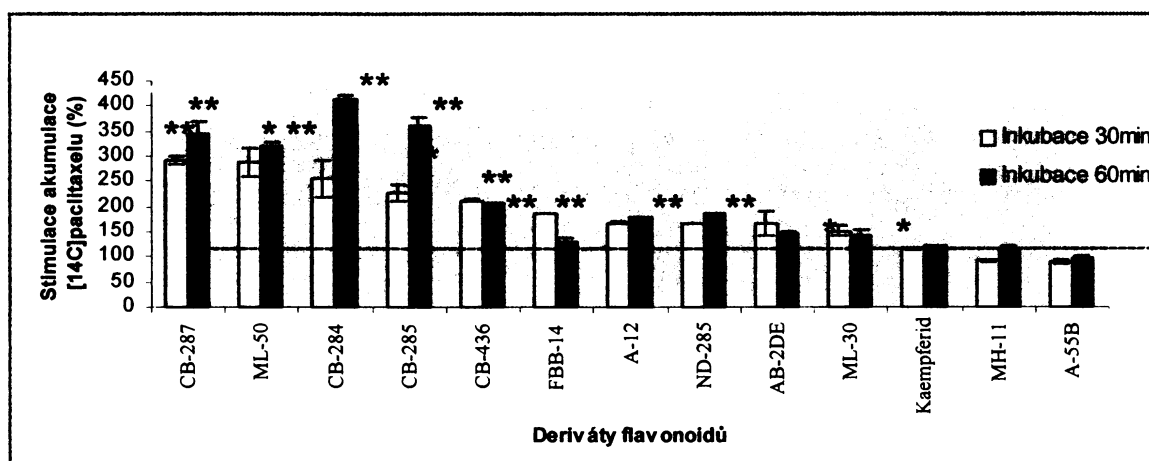
**Deriváty azaisoflavonu:** A-12 (3-phenyl-5,7-dihydroxy-4-chinolon)

Množství absorbovaného [ $^{14}\text{C}$ ]paclitaxelu v buněčných liniích a jeho vyplavování ze sensitivních i resistantních buněk byly měřeny bez a s přidavkem antioxidantů do inkubačních směsí dle postupů popsaných v kap.3.4.

**Přírodní fenolické antioxidanty až do 25 $\mu\text{M}$  koncentrace** neměly na transport [ $^{14}\text{C}$ ]paclitaxelu **žádný účinek** v sensitivní ani resistantní buněčné linii. Jejich vliv se projevil až ve vysokých (100 $\mu\text{M}$ ) farmakologicky ztěží dosažitelných hladinách. Kvercetin v této koncentraci mírně zvyšoval akumulaci [ $^{14}\text{C}$ ]paclitaxelu v NCI/ADR-RES buňkách i MDA-MB-435 buňkách, resveratrol ani v této vysoké koncentraci v NCI/ADR-RES buňkách nepůsobil, ale v MDA-MB-435 buňkách akumulaci [ $^{14}\text{C}$ ]paclitaxelu z 30% inhiboval pravděpodobně inhibicí aktivního transportu [ $^{14}\text{C}$ ]paclitaxelu dovnitř buněk. Nicméně ve farmakologicky dostupných koncentracích tyto přírodní antioxidanty transportní funkci P-gp nijak neovlivňují a jejich vliv na P-gp v *in vivo* podmínkách je nepravděpodobný.

V sérii syntetických derivátů flavonoidů celkem **šest derivátů silně zvyšovalo akumulaci [ $^{14}\text{C}$ ]paclitaxelu v resistantních NCI/ADR-RES buňkách rakoviny prsu** již po 30 min inkubaci a v 10 $\mu\text{M}$  koncentraci a to v tomto pořadí: CB-287  $\geq$  ML-50 > CB-284  $\geq$  CB-285 > CB-436. Azaisoflavin A-12, chalcon FBB-14, flavonol AB-2DE, auron ND-285 a ML-30 působily mírné zvýšení akumulace, chromon MH-11, auron A-55B a kaempferid akumulaci paclitaxelu v resistantních buňkách neovlivňovaly (*obr. 14*).

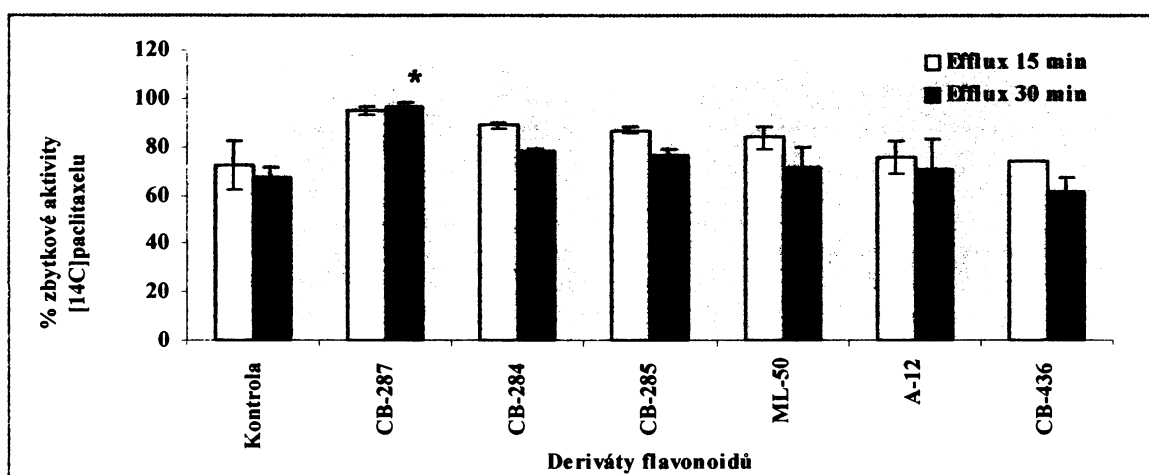
**Obr.14:** Vliv derivátů flavonoidů na akumulaci [ $^{14}\text{C}$ ]paclitaxelu v NCI/ADR-RES lidských buněčných liniích rakoviny prsu. NCI/ADR-RES byly inkubovány se [ $^{14}\text{C}$ ]paclitaxelem 30 a 60 min v přítomnosti derivátů flavonoidů (10  $\mu\text{M}$ ) nebo DMSO (0.1%) jako kontrolou. Data jsou znázorněna jako průměrné hodnoty a rozptyl ( $n = 2$ ) a vyjádřena v procentech stimulované akumulace. Za statisticky významné jsou považovány podle oboustranného Studentova  $t$  testu výsledky s hodnotami \* $p < 0.05$  a \*\* $p < 0.01$ .



Šest účinných derivátů flavonoidů bylo sledováno z hlediska možné inhibice effluxu [ $^{14}\text{C}$ ]paclitaxelu v *NCI/ADR-RES* resistantní buněčné linii. **Flavonoidy CB-287, CB-284, CB-285 a ML-50 mírně inhibovaly efflux [ $^{14}\text{C}$ ]paclitaxelu**, látky A-12 a CB-436 neměly na efflux žádný vliv (obr.15).

### Obr.15:

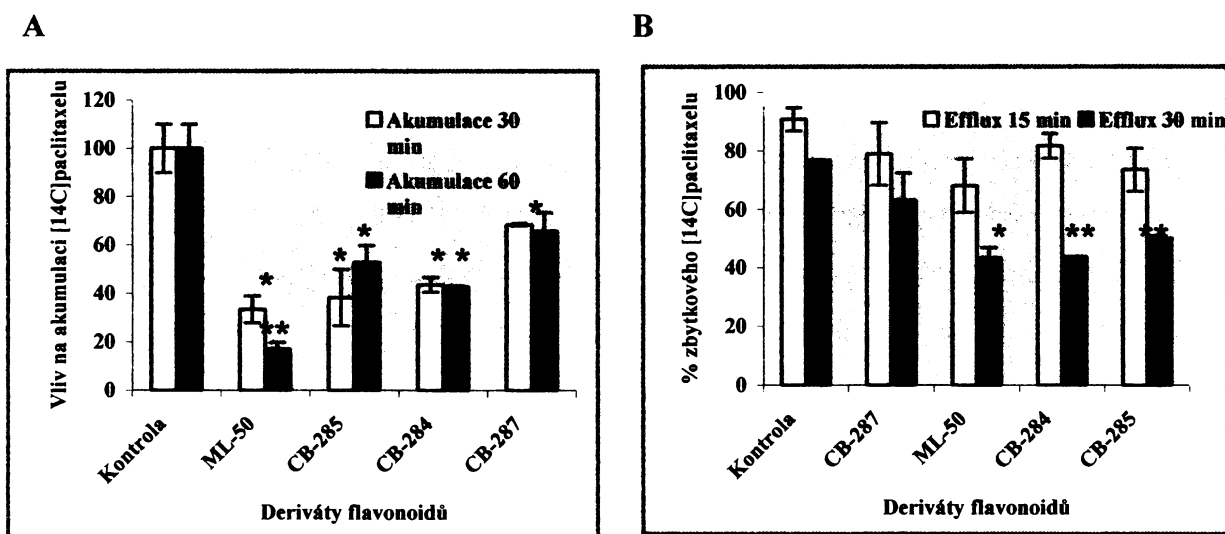
Vliv vybraných syntetických derivátů flavonoidů na efflux [ $^{14}\text{C}$ ]paclitaxelu z *NCI/ADR-RES* buněk. Buňky byly inkubovány se [ $^{14}\text{C}$ ]paclitaxelem 120min a následně byl sledován efflux po 15 a 30min v přítomnosti derivátů flavonoidů (10 $\mu\text{M}$ ) nebo DMSO (0.1%) jako kontrolou. Výsledky jsou prezentovány jako průměrné hodnoty a rozptyl ( $n = 2$ ) a vyjádřeny v % zbytkové aktivity [ $^{14}\text{C}$ ]paclitaxelu ve sledovaných intervalech effluxu. Za statisticky významné jsou považovány výsledky s hodnotami rozdílu od 100% akumulace \* $p < 0.05$  a \*\*\* $p < 0.01$  s využitím Studentova  $t$  testu.



Čtyři nejvhodnější modulatory P-gp CB-287, CB-284, CB-285 a ML-50 byly také sledovány z hlediska jejich vlivu na transport [ $^{14}\text{C}$ ]paclitaxelu MDA-MB-435 sensitivními buňkami. Na rozdíl od *NCI/ADR-RES* buněk, zde docházelo ke snížení akumulace [ $^{14}\text{C}$ ]paclitaxelu a naopak stimulaci jeho effluxu těmito látkami, jak je znázorněno na obr.16A-B. Nalezený protichůdný výsledek působení syntetických derivátů flavonoidů může znamenat jejich působení na různé transportní proteiny podílející se na transportu paclitaxelu v obou typech buněčných linií. Zároveň se tak ukazuje, jak velký význam má stanovení exprese genů, zvláště těch, které přispívají k rozvoji resistance, protože určení jejich exprese v nádorových buňkách napomůže ve výběru nejvhodnějších léčiv a použití vhodných modulatorů membránových transportérů podle individuální exprese genů. Rozdílné chování derivátů flavonoidů podporují rovněž výsledky stanovení cytotoxicity samotných derivátů v obou typech buněčných linií. Zatímco v *NCI/ADR-RES* buněčných liniích nepůsobí samy o sobě flavonoidy cytotoxicky, v MDA-MB-435 jsou všechny

s výjimkou ND-285 se signifikancí  $p < 0.05$  cytotoxické. Z hlediska chemické struktury jsou všechny účinné deriváty flavonoidů velmi hydrofobní methoxyaurony. Právě tyto látky se zdají být nejvhodnějšími modulátory transportní funkce P-gp s potenciálním využitím při výskytu rezistence nádorových buněk způsobené nadměrnou expresí P-gp.

**Obr.16:** Vliv derivátů flavonoidů na akumulaci (A) a efflux  $[^{14}\text{C}]$ paclitaxelu (B) v MDA-MB-435 lidských sensitivních buněk rakoviny prsu. Buňky byly inkubovány v přítomnosti derivátů flavonoidů ( $10\mu\text{M}$ ) nebo DMSO (0.1%) jako kontrolou. Výsledky jsou prezentovány jako průměrné hodnoty a rozptyl ( $n = 2$ ). Za statisticky významné jsou považovány výsledky s hodnotami rozdílu od kontroly  $*p < 0.05$  a  $***p < 0.01$  s využitím Studentova  $t$  testu.



#### 4.4. *In vivo* účinky klasických taxanů na T-buněčné lymfomy v modelovém organismu potkana

Paclitaxel a docetaxel jsou v terapii využívány především u karcinomů prsu, vaječníků a bronchogenních karcinomů. Vzhledem k jejich unikátnímu mechanismu účinku a silné protinádorové aktivitě jsou ovšem sledovány i další možné aplikace těchto léčiv. V předkládané práci byl sledován účinek taxanů a jejich kombinací na T-buněčné lymfomy v organismu laboratorního Sprague-Dawley/Cub potkana použitého jako zvířecí model tohoto typu hematologických nádorů. T-buněčných lymfomy jsou ve své podstatě maligní expansí klonů atypických T-lymfocytů projevující se jako akutní lymfocytární maligní leukémie.<sup>[104,159]</sup> V předkládané studii byly sledovány hladiny taxanů v krvi potkanů, jejich vliv na tělesnou váhu, přežití a dva hlavní parametry nádorů velikost a váhu. Oba sledované klasické taxany mají stejný mechanismus účinku, ale působí každý v jiné fázi buněčného cyklu. Paclitaxel ovlivňuje buňky v G2/M interfázi, zatímco docetaxel působí

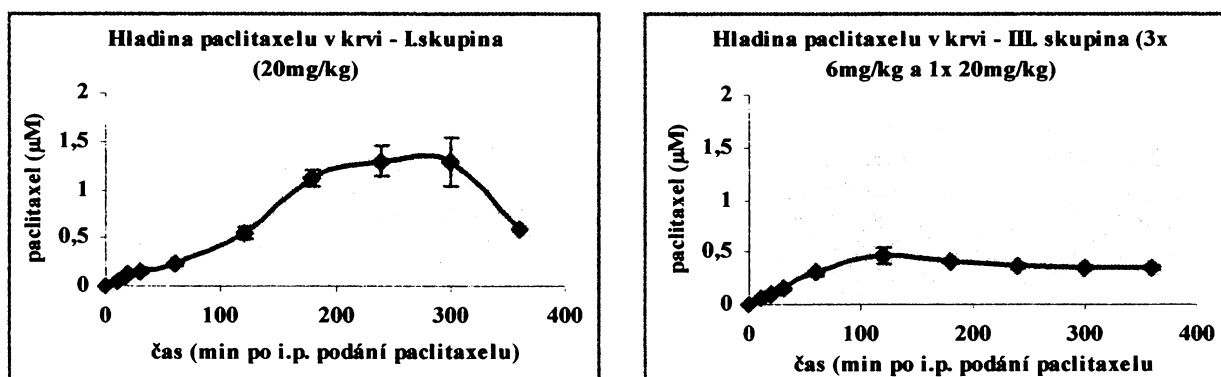
v S fázi.<sup>[29]</sup> Na základě tohoto působení v různých fázích buněčného cyklu bylo sledováno, zda je kombinace obou léčiv účinnější na T-buněčné lymfomy než podání jednoho taxanu a tím potenciálně využitelná v protinádorové terapii T-buněčných lymfomů.

#### 4.4.1. Sledování hladiny taxanu a jejich metabolitu v krvi potkanu po i.p. podání v organismu potkana

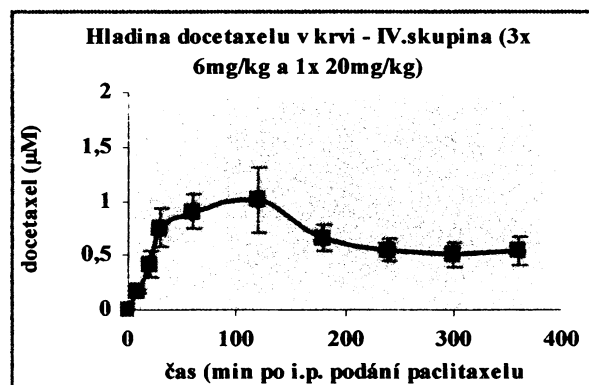
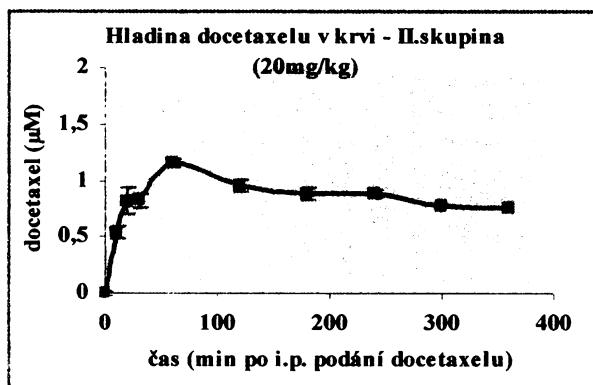
Hladiny paclitaxelu a docetaxelu byly sledovány pomocí HPLC ze vzorků krve (200 $\mu$ L) odebraných v časových intervalech 0, 10, 20, 30, 60, 120, 180, 240, 300 a 360min po i.p. aplikaci taxanu. Potkani byli rozděleni do čtyř skupin po čtyřech potkanech podle způsobu dávkování taxanů (viz.kap.3.5); I.sk. (i.p. paclitaxel 20mg/kg), II.sk. (i.p. docetaxel 20mg/kg), III.sk. (i.p. paclitaxel 3x týdně 6mg/kg + 1x 20mg/kg) a IV.sk. (i.p. docetaxel 3x týdně 6mg/kg + 1x 20mg/kg). Zjištěné hladiny taxanů v krvi potkanů jednotlivých skupin ( $\mu$ M) v průběhu času jsou znázorněny na *obr.17A,B*. Ve skupinách I. a II., kde byla použita pouze jedna dávka taxanů byly dosažené hladiny pro paclitaxel i docetaxel podobné a dosahovaly 1.3 $\mu$ M koncentrace, ovšem v případě podání docetaxelu bylo takto vysokých hladin dosaženo dříve. Opakované dávkování paclitaxelu (skupina III.) vedlo ke snížení hladin paclitaxelu v krvi potkanů, zatímco opakované dávkování docetaxelu nemělo na jeho dosažené hladiny v krvi vliv. Kromě samotných taxanů byly pomocí HPLC detekovány po i.p. podání paclitaxelu také velmi minoritní píky (plocha 0.1% plochy taxanu) odpovídající třem metabolitům, z nichž dva byly identifikovány HPLC-MS jako C3'-hydroxy paclitaxel a deacetyl paclitaxel. Po i.p. podání docetaxelu byly HPLC detekovány tři hydroxyderiváty docetaxelu vznikající opět ve velmi malých množstvích.

**Obr.17:** Hladiny paclitaxelu a docetaxelu v krvi podávaných i.p. v různých dávkových schématech čtyřem skupinám potkanů s T-buněčnými lymfomy. **(A)** I.skupina (i.p. paclitaxel 20mg/kg) a III.skupina (i.p. paclitaxel 3x týdně 6mg/kg + 1x 20mg/kg). **(B)** II.skupina (i.p. docetaxel 20mg/kg), a IV.skupina (i.p. docetaxel 3x týdně 6mg/kg + 1x 20mg/kg). Data jsou vyjádřena jako průměrné hodnoty  $\pm$  SD ze čtyř nezávislých měření.

A



B



#### 4.4.2. Studium vlivu taxanu a jejich kombinací na rozvoj T-buněčných lymfomu *in vivo* v modelovém organismu potkana

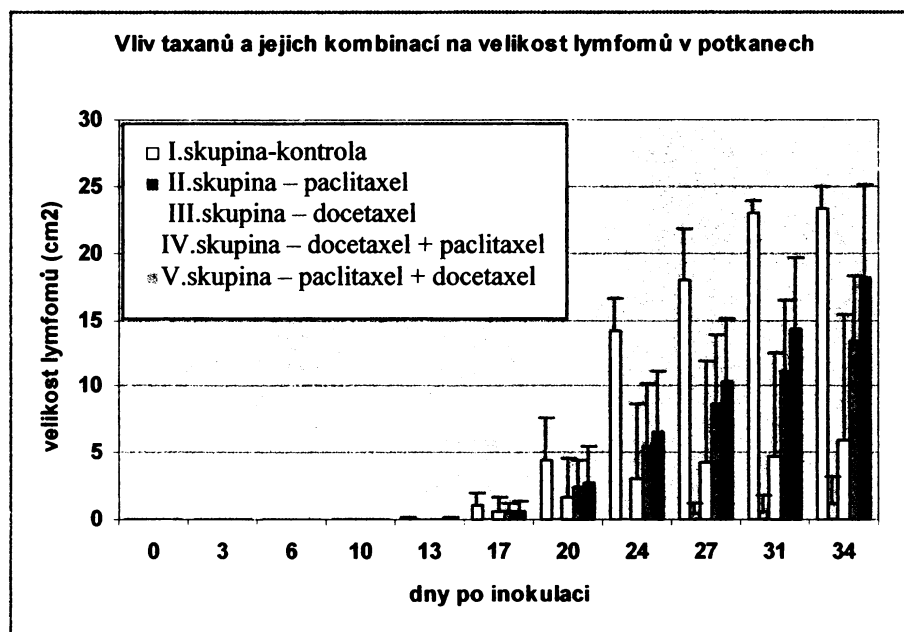
Po i.p. aplikaci taxanů a jejich kombinací v různých dávkových schématech byly sledovány parametry týkající se lymfomů jako je jejich velikost a váha a také byla sledována doba přežití potkanů. Potkani byli rozděleni do pěti skupin po pěti potkanech podle způsobu dávkování taxanů (viz.kap.3.5); I.skupina (kontrolní), II. Skupina ( i.p. paclitaxel 1x týdně dávky 10, 6, 6 a 6mg/kg), III.skupina (i.p. docetaxel 1x týdně dávky 10, 6, 6 a 6mg/kg), IV.skupina (kombinace: i.p. docetaxel 10 a 6mg/kg a následně i.p. paclitaxel 2 x 6mg/kg) a V.skupina (kombinace: i.p. paclitaxel 10 a 6mg/kg a následně i.p. docetaxel 2 x 6mg/kg).

#### Sledované parametry;

- **Velikost lymfomů:** Subkutánní lymfomy se objevily u potkanů nejpozději 17 den po inokulaci a rostly až do 34. dne, kdy dosáhly průměrné velikosti v kontrolní skupině 23cm<sup>2</sup>. Ve skupinách potkanů, kde byly podány taxany, došlo k redukci velikosti lymfomů (*obr.18*). Nejmenší byly lymfomy ve III.skupině potkanů, kde byl použit samotný docetaxel, který je tak jasně účinnějším cytostatikem pro T-buněčné lymfomy než paclitaxel.

**Obr.18:**

Vliv paclitaxelu, docetaxelu a jejich kombinací na velikost T-buněčných lymfomů v pěti skupinách potkanů po pěti potkanech v každé skupině. I.skupina (kontrolní), II. skupina ( i.p. paclitaxel 1x týdně dávky 10, 6, 6 a 6mg/kg), III.skupina (i.p. docetaxel 1x týdně dávky 10, 6, 6 a 6mg/kg), IV.skupina (kombinace: i.p. docetaxel 10 a 6mg/kg + i.p. paclitaxel 2 x 6mg/kg) a V.skupina (kombinace: i.p. paclitaxel 10 a 6mg/kg + i.p. docetaxel 2 x 6mg/kg). Uvedené hodnoty jsou vyjádřeny jako průměrná velikost lymfomu ± SD z pěti potkanů v jedné skupině.



- **Váha lymfomů:** váha lymfomů byla signifikantně nižší mezi 24. a 34. dnem po inokulaci lymfomů pouze ve dvou skupinách potkanů. Šlo o III.skupinu, kde byl aplikován pouze docetaxel a o IV.skupinu, kde byla aplikovány kombinace dvou dávek docetaxelu následované dvěma dávkami paclitaxelu. V těchto dvou skupinách došlo také k významné redukci velikosti nádorů oproti kontrolní skupině.
- **Vliv taxanů na přežití potkanů:** všechna zvířata v kontrolní skupině žila ještě 20 den po inokulaci lymfomů a poslední z potkanů uhynul 48 den po inokulaci. Všechny ostatní skupiny potkanů, kde byly použity taxany přežívaly déle než kontrolní skupina (Tabulka 20), přičemž potkani III.skupiny, kde byl aplikován pouze docetaxel přežívali nejdéle.

**Tabulka 20:** Přežití pěti různých skupin potkanů s inokulovanými T-buněčnými lymfomy; I.skupina (kontrolní), II. skupina ( i.p. paclitaxel 1x týdně dávky 10, 6, 6 a 6mg/kg), III.skupina (i.p. docetaxel 1x týdně dávky 10, 6, 6 a 6mg/kg), IV.skupina (kombinace: i.p. docetaxel 10 a 6mg/kg + i.p. paclitaxel 2 x 6mg/kg) a V.skupina (kombinace: i.p. paclitaxel 10 a 6mg/kg + i.p. docetaxel 2 x 6mg/kg).



| Skupina potkanů (dle aplikace taxanů) | Množství sledovaných potkanů | Uhynutí posledního potkana (dny)                        | Průměrný počet dní přežití potkanů oproti kontrolní skupině | Statisticky významné rozdíly v přežití potkanů jednotlivých sledovaných skupin vůči kontrolní skupině <sup>a</sup> |
|---------------------------------------|------------------------------|---|---|--|
| <b>I.Kontrolní</b>                    | 20                           | 48  | -   | -  |
| <b>II.Paclitaxel</b>                  | 41                           | 66  | 21  | p=0.05   |
| <b>III.Docetaxel</b>                  | 55                           | 91 – dva potkani,<br>180 <sup>b</sup> – poslední potkan | 35  | p=0.01   |
| <b>IV.Docetaxel+ Paclitaxel</b>       | 45                           | 91 – dva potkani,<br>180 <sup>b</sup> – poslední potkan | 25  | p=0.05   |
| <b>V.Paclitaxel+ Docetaxel</b>        | 41                           | 77  | 21  | p=0.06   |

<sup>a</sup>statistická významnost rozdílů přežití potkanů jednotlivých skupin vůči kontrolní skupině byla zjišťována oboustranným Studentovým t-testem. <sup>b</sup>tyto potkani byli stále zdraví a bez výskytu lymfomu

Jako další možné dávkové schéma byla použita opakovaná pětidávková i.p. aplikace paclitaxelu nebo docetaxelu. Opět byli potkani rozděleni do skupin po šesti potkanech podle způsobu dávkování taxanů (viz.kap.3.5); I.skupina (kontrolní), II.skupina (i.p. paclitaxel 10, 6, 6, 6 a 6mg/kg), III.skupina (i.p. docetaxel 10, 6, 6, 6 a 6mg/kg). V kontrolní skupině se objevily lymfomy po 17 dnech po inokulaci buněk lymfomů, v průběhu 17 – 20 dne se objevily lymfomy v II.skupině, kde byl aplikován paclitaxel. Ve III.skupině, kde byl aplikován docetaxel se vyvinuly lymfomy pouze u dvou ze šesti potkanů. Váha lymfomů byla po 32 dnech po inokulaci v kontrolní skupině  $10.3 \pm 2.1g$ , ve II.skupině (i.p. paclitaxel) byla váha jednoznačně nižší  $4.7 \pm 2.2g$  se signifikancí oproti kontrolní skupině  $p < 0.05$ . Nejnižší váha lymfomů byla nalezena ve třetí skupině (i.p. docetaxel) pouze  $3.2 \pm 2.4$  se signifikancí oproti kontrolní skupině  $p < 0.05$ . Fakt, že u 2/3 sledovaných potkanů se po i.p. aplikaci docetaxelu vůbec lymfomy nevyvinuly ukazuje větší účinnost docetaxelu na tento typ nádorů a jeho potenciální využití v terapii T-buněčných lymfomů. Při posuzování kombinované terapie oběma taxany bylo zjištěno, že účinky samotného docetaxelu jsou větší než při použití v kombinaci s paclitaxelem. Kombinace taxanů působících v různých fázích buněčného cyklu tedy nevedou k zesílení vzájemných účinků taxanů na T-buněčné lymfomy.

## 5. ZÁVĚR

Poznatky získané v rámci předkládané disertační práce přispívají k rozšíření znalostí v oblasti metabolismu a transportu taxanů a možných ovlivnění těchto procesů. Přináší zároveň informace o metabolických přeměnách a transportu nových syntetických analogů klasických taxanů jako potenciálních protinádorových léčiv.

- ***Detailní studium metabolismu klasických taxanů, stanovení mezidruhových rozdílů metabolismu a detekce nového metabolitu paclitaxelu***

Byla sledována *in vitro* přeměna paclitaxelu a docetaxelu jaterními mikrosomálními frakcemi potkana, prasete, miniprasete a člověka. Přeměna paclitaxelu byla ve sledovaných živočišných druzích kvalitativně i kvantitativně velmi odlišná. V mikrosomálních systémech potkanů byly nalezeny a identifikovány čtyři metabolity: hlavní C3'-hydroxypaclitaxel, minoritní C2-hydroxypaclitaxel, dihydroxypaclitaxel a nově objevený neznámý hydroxypaclitaxel, který dosud nebyl v literatuře popsán. V jaterních mikrosomálních systémech prasat a miniprasat neznámý OHPCT představoval 95% z celkového množství metabolitů paclitaxelu. C3'-hydroxypaclitaxel byl minoritním metabolitem stejně jako C2-hydroxypaclitaxel, který vznikal pouze v jaterních mikrosomech miniprasat. V lidských jaterních mikrosomech byly při sledování metabolismu paclitaxelu nalezeny tři metabolity: hlavní lidský metabolit 6 $\alpha$ -OHPCT, jenž nebyl detekován v žádném jiném sledovaném živočišném druhu. Nejvhodnějším *in vitro* experimentálním modelem pro studium metabolismu paclitaxelu jsou tedy pouze jaterní mikrosomy člověka.

Metabolický profil docetaxelu byl na rozdíl od paclitaxelu ve všech sledovaných živočišných druzích shodný. Hlavním metabolitem byl hydroxydocetaxel následovaný dvěma minoritními metabolity odpovídajícími strukturou diastereoisomerním hydroxyoxazolidinonům A a B.

- ***Identifikace forem cytochromu P450 zodpovědných za tvorbu jednotlivých metabolitů paclitaxelu a docetaxelu***

Při studiu živočišných forem interagujících s paclitaxelem a docetaxelem byly jako modelové enzymové systémy použity mikrosomální frakce potkanů premedikovaných známými induktory jednotlivých forem cytochromu P450 a v dalším přiblížení též lidské rekombinantní cytochromy P450 v rámci rekonstituovaného systému a specifické inhibitory konkrétních isoform cytochromu P450. Z potkaních mikrosomálních preparátů tvořily

všechny identifikované metabolity paclitaxelu a docetaxelu nejvyšší rychlostí mikrosomy potkanů premedikovaných PCN (induktor CYP3A1/2), což dokázalo účast podrodiny CYP3A1/2 na metabolismu paclitaxelu *in vitro* mikrosomy potkana. Účast CYP3A podrodiny na metabolismu paclitaxelu u všech sledovaných živočišných druhů potvrdila inhibice metabolismu paclitaxelu v jaterních mikrosomech potkanů, prasat, miniprasat a člověka troleandomycinem jako specifickým inhibítozem CYP3A podrodiny cytochromů P450. V neposlední řadě, v sérii lidských cDNA exprimovaných cytochromů P450 (CYP1A2, 1B1, 2A6, 2C9, 2E1 a 3A4) byl aktivní pouze CYP3A4, který metabolisoval paclitaxel na C3'-OHPCT a C2-OHPCT, což potvrdilo významnou úlohu CYP3A4 na metabolismu paclitaxelu v lidském organismu. V lidských jaterních mikrosomech byla navíc prokázána významná role CYP2C8 na tvorbě hlavního lidského metabolitu 6 $\alpha$ -OHPCT, která byla významně inhibována silným inhibítozem tohoto lidského enzymu fisetinem.

- ***Detailní studium metabolismu nových syntetických analogů klasických taxanů: SB-T-1103, SB-T-1214 a SB-T-1216, určení mezidruhových rozdílů metabolismu a identifikace forem cytochromu P450 účastnících se metabolismu nových taxanů***

Byla sledována dosud zcela neznámá *in vitro* přeměna třech nových taxanových analogů jaterními mikrosomálními frakcemi nepremedikovaného potkana, PCN-indukovaného potkana, prasete, miniprasete, člověka a rovněž sérií lidských cDNA exprimovaných cytochromů P450 v rámci rekonstituovaného systému. SB-T-1103 byl metabolisován na 11 produktů označovaných M1-M11, SB-T-1214 na 9 metabolitů označovaných M1-M9 a SB-T-1216 tvořil 8 metabolitů M1-M8. Metabolický profil všech tří nových taxanů vykazoval značné odlišnosti v PCN-indukovaných mikrosomech potkana, kde díky zvýšenému množství CYP3A1/2 vůbec nevznikaly některé minoritní metabolity a na druhé straně obvyklé majoritní metabolity byly dále oxidovány. Tyto výsledky potvrdily roli CYP3A podrodiny v metabolismu SB-T-1103, SB-T-1214 a SB-T-1216. Ze série lidských cDNA exprimovaných CYP1A2, 1B1, 2A6, 2C9, 2E1 a 3A4 se účastnil metabolismu nových taxanů pouze CYP3A4, který se podílel na vzniku všech majoritních metabolitů nových taxanů a je tak významným cytochromem P450 účastnícím se metabolismu taxanových analogů SB-T-1103, SB-T-1214 a SB-T-1216.

- ***Stanovení fenolických antioxidantů jako inhibitorů metabolismu klasických taxanů paclitaxelu a docetaxelu***

Pomocí inhibičních experimentů bylo prokázáno, že některé fenolické antioxidanty přírodního původu ovlivňují metabolismus paclitaxelu *in vitro* mikrosomálními systémy potkana a člověka. U takto účinných látek byly stanoveny jejich IC<sub>50</sub> a pro nejvíce účinné také inhibiční konstanta a typ inhibice. Nejúčinnějšími látkami inhibujícími metabolismus paclitaxelu v mikrosomálních systémech potkana a člověka byly resveratrol a fisetin. Z dalších fenolických antioxidantů inhibovaly především tvorbu hlavního lidského metabolitu 6 $\alpha$ -OHPCT katalyzovanou CYP2C8 morin, kvercetin a mírně působící naringenin. V případě docetaxelu byla v lidských jaterních mikrosomech inhibována tvorba hlavního metabolitu docetaxelu hydroxydocetaxelu kvercetinem, ovšem jen mírně. Sledované fenolické antioxidanty tedy účinně inhibují především enzymatickou aktivitu lidského CYP2C8, zatímco aktivita lidského CYP3A4 je ovlivňována mnohem méně.

- ***Stanovení cytotoxicity a transportu klasických taxanů v lidské sensitivní buněčné linii rakoviny prsu a linii resistantní vůči adriamycinu***

Vzhledem k častému rozvoji rezistence nádorových buněk vůči taxanům byl sledován transport a cytotoxicita klasických taxanů v lidské buněčné linii rakoviny prsu MDA-MB-435, která je sensitivní vůči cytostatikům a NCI/ADR-RES linii resistantní vůči adriamycinu. Tyto dvě linie se liší expresí některých membránových ABC transportních proteinů zejména expresí P-glykoproteinu, který je v nadměrné míře exprimován v resistantních liniích, zatímco úplně chybí v sensitivních buňkách. Klasické taxany paclitaxel a docetaxel byly 1000x respektive 600x cytotoxičtější v sensitivních nádorových buňkách. Značně rozdílný byl také transport obou sledovaných klasických taxanů. Akumulace paclitaxelu a docetaxelu byla řádově vyšší sensitivními buňkami rakoviny prsu a naopak docházelo k významně rychlejšímu vyplavování paclitaxelu z resistantních buněk. Použitá buněčná linie s prokázanou resistencí vůči adriamycinu je tedy značně resistantní rovněž vůči klasickým taxanům. Také buněčné procesy indukce apoptosy vyvolané působením taxanů se lišily v sensitivní a resistantní buněčné linii rakoviny prsu. Taxany v obou liniích aktivovaly kaspasy-9 a -3, ale pouze resistantní buňky vyplavovaly cytochrom c z mitochondrií jako při klasické mitochondriální indukci apoptosy. Tento výsledek naznačuje odlišný mechanismus indukce buněčné smrti vyvolané taxany ve sledovaných typech nádorových buněk

- ***Studium cytotoxicity a transportu nových taxanových analogů v lidské sensitivní buněčné linii rakoviny prsu a linii resistantní vůči adriamycinu***

Cytotoxicita a transport byly sledovány stejně jako v případě klasických taxanů v lidských sensitivních (MDA-MB-435) a resistantních (NCI/ADR-RES) buňkách rakoviny prsu. Na rozdíl od paclitaxelu a docetaxelu byla ovšem cytotoxicita i akumulace všech třech sledovaných derivátů taxanů (SB-T-1103, SB-T-1214 a SB-T-1216) stejná v sensitivních i resistantních buňkách, čímž byla dokázána citlivost resistantních nádorových buněk rakoviny prsu vůči těmto potenciálním léčivům, které by se tak mohly stát vhodnou léčebnou alternativou v případech rozvoje rezistence nádorů prsu vůči klasickým taxanům dané vysokou expresí P-glykoproteinu.

- ***Verapamil a některé syntetické deriváty flavonoidů účinně ovlivňují transport paclitaxelu v lidské sensitivní a resistantní buněčné linii rakoviny prsu***

Byl sledován vliv verapamilu a série třinácti syntetických derivátů flavonoidů s velkou vazebnou afinitou k P-glykoproteinu jako možných modulátorů transportní funkce P-glykoproteinu zodpovědné za resistenci. Verapamil byl účinným inhibitorem transportu zodpovědného za resistenci vůči paclitaxelu v prsních nádorových buňkách. Na druhou stranu, v sensitivní buněčné linii zvyšoval vyplavování paclitaxelu a tím by mohl právě v tomto typu buněk snižovat účinek zmíněného cytostatika. Ze syntetických derivátů flavonoidů celkem šest derivátů silně zvyšovalo akumulaci [<sup>14</sup>C]paclitaxelu v resistantních buňkách rakoviny prsu v tomto pořadí: CB-287 ≥ ML-50 > CB-284 ≥ CB-285 > CB-436 > A-12. Flavonoidy CB-287, CB-284, CB-285 a ML-50 inhibovaly zároveň i vylučování [<sup>14</sup>C]paclitaxelu z resistantních buněk. V sensitivní buněčné linii byl účinek těchto flavonoidů opačný, což představuje zajímavý výsledek z hlediska mechanismu transportu.

- ***In vivo účinky taxanů na T-buněčné lymfomy v modelovém organismu laboratorního potkana***

Byly sledovány aplikace paclitaxelu, docetaxelu a jejich kombinací v různých dávkových schématech na T-buněčné lymfomy implantované laboratornímu potkanu. Ze všech sledovaných dávkových schémat nejúčinněji působil opakovaně podávaný docetaxel, který byl účinnější než paclitaxel nebo jejich vzájemná kombinace. Docetaxel je tak vhodným potenciálním léčivem v terapii T-buněčných lymfomů. Kombinace taxanů působících v různých fázích buněčného cyklu naopak nevedou k zesílení vzájemných účinků taxanů na T-buněčné lymfomy.

## SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] van Acker SA, van der Berg DJ, Tromp MNLJ, Griffioen DH, van der Wright WJF, Bast A: *Free Radic Biol Med* **20**; 331-342, 1998.
- [2] Alahari SK, Dean NM, Fisher MH, DeLong R, Manoharan M, Tivel KL, Juliano RL.: *Mol Pharmacol* **50(4)**; 808-819, 1996.
- [3] Alberts B, Bray D, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P.: *Úvod do molekulární biologie buňky*. Espero Publishing, Ústí nad Labem, 1998.
- [4] Anderson CD, Wang J, Kumar GN, McMillan JM, Walle UK, Walle T: *Drug Metab Dispos* **23(11)**; 1286-1290, 1995.
- [5] Anzenbacher P, Soucek P, Anzenbacherova E, Gut I, Hruby K, Svoboda Z, Kvetina J. *Drug Metab Dispos* **26(1)**; 56-59, 1998.
- [6] Arbuck SG, Christian MC, Fisherman JS, Cazenave LA, Sarosy G, Suffness M, Adams J, Canetta R, Cole KE, Friedman MA: *J Natl Cancer Inst Monogr* **15**; 11-24, 1993.
- [7] Arnal M, Franco N, Fargeot P, Riedinger JM, Brunet-Lecomte P, Lizard-Nacol S: *Breast Cancer Res Treat* **61(1)**; 13-20, 2000.
- [8] Bar-Nun S, Kreibich G, Adesnik M, Alterman L, Negishi M, Sabatini DD. *Proc Natl Acad Sci USA* **77(2)**; 965-969, 1980.
- [9] Bissery MC, Nohynek G, Sanderink GJ, Lavelle F.: *Anticancer Drugs* **6**; 339-368, 1995.
- [10] Boehnke-Michaud L, Valero V, Hortobagyi G: *Drug Saf.* **23**; 401-428, 2000.
- [11] Bois, F.; Beney, C.; Boumendjel, A.; Mariotte, A.-M.; Conseil, G.; Di Pietro, A. *J. Med. Chem* **41**, 4161-4164, 1998.
- [12] Boise LH, Gonzalez-Garcia M, Postema CE, Ding L, Lindsten T, Turka LA, Mao X, Nunez G, Thompson CB.: *Cell* **74(4)**; 597-608, 1993.
- [13] Bořek-Dohalská L, Stiborová M.: *Chem Listy* **94**; 226-229, 2000.
- [14] Boumendjel A, Bois F, Beney C, Mariotte A.-M, Conseil G, Di Pietro A: *Bioorg Med Chem Lett* **11**, 75-77, 2001.
- [15] Boumendjel A, Beney C, Deka N, Mariotte A-M, Lawson MA, Trompier D, Baubichon-Cortay H, Di Pietro A: *Chem Pharm Bull* **50**; 854-856, 2002a.
- [16] Boumendjel A, Di Pietro A, Dumontet C, Barron D: *Med Res Rev* **22**, 512-529, 2002b.
- [17] Brooks TA, Minderman H, O'Loughlin KL, Pera P, Ojima I, Baer MR, Bernacki RJ: *Mol Cancer Ther* **2(11)**; 1195-1205, 2003. Erratum in: *Mol Cancer Ther* **3(1)**; 101, 2004.
- [18] Bruno R, Sanderink GJ: *Cancer Surv* **17**; 305-113, 1993.
- [19] Cachoux F, Isarno T, Wartmann M, Altmann KH: *Chembiochem.* **7(1)**; 54-57, 2006.
- [20] Commercoon A, Bourzat JD, Bézard D, Vuilhorgne M.: *Tetrahedron* **50**; 10289-10298, 1994.
- [21] Conney A.: *Life Sciences* **39**; 2493-2518, 1986.
- [22] Conseil G, Baubichon-Cortay H, Dayan G, Jault JM, Barron D, Di Pietro A: *Proc Natl Acad Sci USA* **95(17)**; 9831-9836, 1998.
- [23] Cooper DK, Gollackner B, Sachs DH. *Annu Rev Med* **53**; 133-147, 2002.
- [24] Cresteil T, Monsarrat B, Alvinerie P, Treluyer JM, Vieira I, Wright M: *Cancer Res* **54(2)**; 386-392, 1994.
- [25] Critchfield JW, Welsh CJ, Phang JM, Yeh GC: *Biochem Pharmacol* **48(7)**; 1437-1445, 1994.
- [26] Desai P, Zhou Y, Duan J, Kouzi S: *ISSX Proceedings 10, 7<sup>th</sup> North American ISSX Meeting*, San Diego, California, USA, 1996.

- [27] Ding S, Chamberlain M, McLaren A, Goh L, Duncan I, Wolf CR.: *Br J Cancer* **85(8)**; 1175-1184, 2001.
- [28] Dixon M: *J Biochem* **55**; 170-171, 1953.
- [29] Dorr RT: *Pharmacotherapy* **17**; 96S-104S, 1997.
- [30] Edenharder R, Rauscher R, Platt KL: *Mutat Res* **379(1)**; 21-32, 1997.
- [31] Ferguson LR: *Mutat Res* **475(1-2)**; 89-111, 2001.
- [32] Ferlini C, Distefano M, Pignatelli F, Lin S, Riva A, Bombardelli E, Mancuso S, Ojima I, Scambia G. *Br J Cancer* **83(12)**; 1762-1768, 2000.
- [33] Fischer V, Rodriguez-Gascon A, Heitz F, Tynes R, Hauck C, Cohen D, Vickers AE: *Drug Metab Dispos* **26(8)**; 802-811, 1998.
- [34] Fuhr U, Klittich K, Staib AH: *Br J Clin Pharmacol* **35(4)**; 431-6, 1993.
- [35] Ghosal A, Satoh H, Thomas PE, Bush E, Moore D.: *Drug Metab Dispos* **24(9)**; 940-947, 1996.
- [36] Gonzalez FJ, Korzekwa KR: *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **35**; 369-390, 1995.
- [37] Gottesman MM, Pastan I: *Annu Rev Biochem* **62**; 385-427, 1993.
- [38] Guengerich FP.: *Chem Res Toxicol* **3**; 363-371, 1990.
- [39] Guengerich FP, Kim DH.: *Carcinogenesis* **11**; 2275-2279, 1990.
- [40] Guengerich FP: v *knize Cytochrome P450- Structure, Mechanism and Biochemistry* (Ortiz de Montellano PR), 2 vyd, Plenum Press, NY, 473, 1995.
- [41] Gut I, Souček P, Hodek P.: *Prac Lékařství* **45**; 15-20, 1993a.
- [42] Gut I, Terelius Y, Frantik E, Linhart I, Soucek P, Filipcova B, Kluckova H. *Arch Toxicol* **67(4)**; 237-243, 1993b.
- [43] Gut I, Danielova V, Holubova J, Soucek P, Kluckova H: *Arch Toxicol* **74(8)**; 437-446, 2000.
- [44] Hadjeri M, Barbier M, Ronot X, Mariotte A.-M, Boumendjel A, Boutonnat J: *J Med Chem* **46**; 2125-2131, 2003.
- [45] Haldar S, Jena N, Croce CM: *Proc Natl Acad Sci U S A* **92(10)**; 4507-4511, 1995.
- [46] Haldar S, Chintapalli J, Croce CM: *Cancer Res* **56(6)**; 1253-1255, 1996.
- [47] Harris JW, Katki A, Anderson LW, Chmurny GN, Paukstelis JV, Collins JM: *J Med Chem* **37(5)**; 706-709, 1994.
- [48] He L, Orr GA, Horwitz SB: *Drug Discov Today* **6(22)**; 1153-1164, 2001.
- [49] Henderson MC, Miranda CL, Stevens JF, Deinzer ML, Buhler DR: *Xenobiotica* **30(3)**; 235-51, 2000.
- [50] Hertog MG, Hollman PC, Katan MB, Kromhout D: *Nutr Cancer* **20(1)**; 21-29, 1993.
- [51] Higgins CF, Gottesman MM: *Trends Biochem Sci* **17(1)**; 18-21, 1992.
- [52] Hollman PCH, Katan MB: *Arch Toxicol* **20**; 237-248, 1998.
- [53] Hořejší V a Bartůňková J: *Základy imunologie*, Triton Praha, 1998.
- [54] Hugger ED, Novak BL, Burton PS, Audus KL, Borchardt RT: *J Pharm Sci* **91(9)**; 1991-2002, 2002.
- [55] Chao CC, Huang YT, Ma CM, Chou WY, Lin-Chao S.: *Mol Pharmacol* **41(1)**; 69-75, 1992.
- [56] Jamis-Dow CA, Klecker RW, Sarosy G, Reed E, Collins JM. *Cancer Chemother Pharmacol* **33(1)**; 48-52, 1993.
- [57] Jefcoate CR, Liehr JG, Santen RJ, Sutter TR, Yager JD, Yue W, Santner SJ, Tekmal R, Demers L, Pauley R, Naftolin F, Mor G, Berstein L.: *J Natl Cancer Inst Monogr* **27**; 95-112, 2000.
- [58] Jodoin J, Demeule M, Beliveau R: *Biochim Biophys Acta* **1542(1-3)**; 149-159, 2002.
- [59] Jordan MA, Ojima I, Rosas F, Distefano M, Wilson L, Scambia G, Ferlini C: *Chem Biol.* **9(1)**; 93-101, 2002.

- [60] Jurima-Romet M, Casley WL, Leblanc CA, Nowakowska M. *Toxicol In Vitro* **14(3)**; 253-263, 2000.
- [61] Kang MH, Figg WD, Ando Y, Blagosklonny MV, Liewehr D, Fojo T, Bates SE. *Clin Cancer Res* **7(6)**; 1610-1617, 2001.
- [62] Klener P: *Remedia* **5**; 154-159, 1995.
- [63] Klener P: *Protinádorová chemoterapie*, Galén Praha 1996.
- [64] Klener P: *Klinická onkologie*. Galén a Karolinum, Praha, 2002.
- [65] Kumar GN, Walle UK, Walle T: *J Pharmacol Exp Ther.* **268(3)**;1160-1165, 1994.
- [66] Kusunoki N, Takara K, Tanigawara Y, Yamauchi A, Ueda K, Komada F, Ku Y, Kuroda Y, Saitoh Y, Okumura K: *Jpn J Cancer Res* **89(11)**; 1220 – 1228, 1998.
- [67] Kuwano M, Uchiumi T, Hayakawa H, Ono M, Wada M, Izumi H, Kohno K.: *Cancer Sci* **94(1)**; 9-14, 2003.
- [68] Kvetina J, Svoboda Z, Nobilis M, Pastera J, Anzenbacher P.: *Gen Physiol Biophys.* **18**; 80-85, 1999.
- [69] Leonessa F, Clarke R: *Endocr Relat Cancer* **10(1)**; 43-73, 2003.
- [70] Leveille-Webster CR, Arias IM: *J Membr Biol* **43(2)**; 89-102, 1995.
- [71] Ling V: *Cancer Chemother Pharmacol* **40**; S3-8, 1997.
- [72] Litman T, Druley TE, Stein WD, Bates SE: *Cell Mol Life Sci* **58**; 931-959, 2001.
- [73] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ: *J Biol Chem* **193**; 265-275, 1951.
- [74] Macholán L. , Barthová J. , Kučera I. , Zelinka J: v *Enzymologie*, Státní pedagogické nakladatelství Praha, 1983.
- [75] Marre F, Sanderink GJ, de Sousa G, Gaillard C, Martinet M, Rahmani R: *Cancer Res* **56(6)**;1296-1302, 1996.
- [76] Matějková Š, Gut I: *Remedia* **10**; 272-281, 2000.
- [77] Mechetner E, Kyshtoobayeva A, Zonis S, Kim H, Stroup R, Garcia R, Parker RJ, Fruehauf JP: *Clin Cancer Res* **4(2)**; 389-398, 1998.
- [78] Miller ML, Ojima I: *Chem Rec* **1(3)**; 195-211, 2001.
- [79] Minderman H, Brooks TA, O'Loughlin KL, Ojima I, Bernacki RJ, Baer MR: *Cancer Chemother Pharmacol* **53(5)**; 363-369, 2004.
- [80] Miyake K, Mickley L, Litman T, Zhan Z, Robey R, Cristensen B, Brangi M, Greenberger L, Dean M, Fojo T, Bates SE: *Cancer Res* **59(1)**; 8-13, 1999.
- [81] Monsarrat B, Mariel E, Cros S, Gares M, Guenard D, Gueritte-Voegelein F, Wright M. *Drug Metab Dispos* **18(6)**; 895-901, 1990.
- [82] Monsarrat B, Alvinerie P, Wright M, Dubois J, Gueritte-Voegelein F, Guenard D, Donehower RC, Rowinsky EK: *J Natl Cancer Inst Monogr* **15**; 39-46, 1993.
- [83] Monsarrat, B, Royer, I, Wright, M, Cresteil, T: *Bull Cancer* **84**; 125-133, 1997.
- [84] Monsarrat B, Chatelut E, Royer I, Alvinerie P, Dubois J, Dezeuse A, Roche H, Cros S, Wright M, Canal P: *Drug Metab Dispos* **26(3)**; 229-233, 1998.
- [85] Moon JY, Lee DW, Park KH: *Xenobiotica* **28(2)**; 117-126, 1998.
- [86] Murakami K, Mason HS: *J Biol Chem* **242**; 1102-1110, 1967.
- [87] Nakanishi T, Karp JE, Tan M, Doyle LA, Peters T, Yang W, Wei D, Ross DD.: *Clin Cancer Res* **9(9)**; 3320-3328, 2003.
- [88] Nandi S, Guzman RC, Yang J: *Proc Natl Acad Sci USA* **92**; 3650-3657, 1995.
- [89] Nebert DW, Nelson DR, Adesnik M, Coon MJ, Estabrook RW, Gonzalez FJ, Guengerich FP, Gunsalus IC, Johnson EF, Kemper B, Levin W, Phillips JR, Sato R, Waterman MR: *DNA* **8(1)**; 1-13, 1989.
- [90] Nedelcheva V, Gut I: *Prac Lékařství* **46**; 58-67, 1994.
- [91] Nedelcheva V, Gut I, Soucek P, Frantik E: *Chem Biol Interact* **115(1)**; 53-70, 1998.



- [92] Nedelcheva V, Gut I, Soucek P, Tichavska B, Tynkova L, Mraz J, Guengerich FP, Ingelman-Sundberg M: *Arch Toxicol* **73(1)**; 33-40, 1999.
- [93] Nelson DR, Kamataki T, Waxman DJ, Guengerich FP, Estabrook RW, Feyereisen R, Gonzalez FJ, Coon MJ, Gunsalus IC, Gotoh O, Okada K, Nebert DW: *DNA Cell Biol* **12(1)**; 1-51, 1993.
- [94] *Novotvary 1999* ČR. Zdravotnická statistika. ÚZIS, NOR ČR, Praha, 1999.
- [95] Ojima I, Duclos O, Zucco M, Bissery MC, Combeau C, Vrignaud P, Riou JF, Lavelle F: *J Med Chem* **37(16)**; 2602-2608, 1994.
- [96] Ojima I, Slater JC, Michaud E, Kuduk SD, Bounaud PY, Vrignaud P, Bissery MC, Veith JM, Pera P, Bernacki RJ: *J Med Chem* **39(20)**; 3889-3896, 1996.
- [97] Ojima I, Bounaud PY, Takeuchi C, Pera P, Bernacki RJ: *Bioorg Med Chem Lett* **8(2)**; 189-194, 1998.
- [98] Ojima I, Inoue T, Chakravarty S: *J Fluorine Chem* **97**; 3, 1999a.
- [99] Ojima I, Inoue T, Slater S, Lin S, Kuduk S, Chakravarty S, Walsh JJ, Gilchrist L, McDermott AE, Cresteil T, Monsarrat B, Pera p, Bernacki RJ: v *Asymmetric Fluoroorganic Chemistry: Synthesis, application and Future Directions*, American Chemical Society, Washington DC, Chapter 12, 1999b.
- [100] Ojima I, Ferlini C: *Chem Biol* **10(7)**; 583-584, 2003.
- [101] Ojima I: *Chembiochem* **5(5)**; 628-635, 2004.
- [102] Omura T, Sato R: *J Biol Chem* **239**; 2370-2378, 1964.
- [103] Ono S, Hatanaka T, Hotta H, Satoh T, Gonzalez FJ, Tsutsui M: *Xenobiotica* **26**; 681-693, 1996.
- [104] Otova B, Sladka M, Damoiseaux J, Panczak A, Mandys V, Marinov I.: *Folia Biol (Praha)* **48(6)**; 213-226, 2002.
- [105] van Oosterom AT, Schrijvers D, Schriivers D [corrected to Schrijvers D: *Anticancer Drugs* **6(3)**; 356-68, 1995. Review. Erratum in: *Anticancer Drugs* **6(4)**; 618, 1995.
- [106] Pelkonen O, Maenpaal J, Taavitsainen P, Rautio A, Raunio H: *Xenobiotica* **28**; 1203-1253, 1998.
- [107] Penson RT, Oliva E, Skates SJ, Glyptis T, Fuller AF Jr, Goodman A, Seiden MV: *Gynecol Oncol* **93**; 98-106, 2004.
- [108] Perez-Victoria JM, Chiquero MJ, Conseil G, Dayan G, Di Pietro A, Barron D, Castanys S, Gamarro F: *Biochemistry* **38(6)**; 1736-1743, 1999.
- [109] Pietta PG: Flavonoids and antioxidants. *J Natl Prod* **63**; 1035-1042, 2000.
- [110] Polizzi D, Pratesi G, Tortoreto M, Supino R, Riva A, Bombardelli E, Zunino F: *Cancer Res* **59(5)**; 1036-1040, 1999.
- [111] Potmesil M, Hsiang YH, Liu LF, Bank B, Grossberg H, Kirschenbaum S, Forlenza TJ, Penziner A, Kanganis D: *Cancer Res* **48(17)**; 3537-3543, 1988.
- [112] Potmesil M and Pinedo H.: v *Camptothecins: New Anticancer Agents*, CRC Press, London, UK, p. 113, 1994.
- [113] Rahman A, Korzekwa KR, Grogan J, Gonzalez FJ, Harris JW: *Cancer Res* **54**; 5543-5546, 1994.
- [114] Ravdin PM: *Semin Oncol* **22(6 Suppl 13)**; 29-34, 1995.
- [115] Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G: *Free Radic Biol Med* **20(7)**; 933-956, 1996. Erratum in: *Free Radic Biol Med* **21(3)**:417, 1996.
- [116] Ritke MK, Roberts D, Allan WP, Raymond J, Bergoltz VV, Yalowich JC: *Br J Cancer* **69(4)**; 687-697, 1994.
- [117] Royer I, Monsarrat B, Sonnier M, Wright M, Cresteil T: *Cancer Res* **56(1)**; 58-65, 1996.

- [118] Scambia G, Ranelletti FO, Panici PB, De Vincenzo R, Bonanno G, Ferrandina G, Piantelli M, Bussa S, Rumi C, Cianfriglia M, Manucuso S: *Cancer Chemother Pharmacol* **34(6)**; 459-464, 1994.
- [119] Selvakumaran M, Lin HK, Miyashita T, Wang HG, Krajewski S, Reed JC, Hoffman B, Liebermann D: *Oncogene* **9(6)**; 1791-1798, 1994.
- [120] Shapiro AB, Ling V: *Biochem Pharmacol* **53(4)**; 587-596, 1997.
- [121] Shou, M, Martinet, M, Korzekwa, KR, Krausz, KW, Gonzalez, FJ, Gelboin, HV: *Pharmacogenetics* **8**; 391-401, 1998.
- [122] Schibler M, Cabral F: *J Cell Biol* **102**; 1522-1531, 1986.
- [123] Siess MH, Guillermic M, Le Bon AM, Suschetet M: *Xenobiotica* **19(12)**; 1379-1386, 1989.
- [124] Siess MH, Mas JP, Canivenc-Lavier MC, Suschetet M: *J Toxicol Environ Health* **49(5)**; 481-496, 1996.
- [125] Sikic BI, Fisher GA, Lum BL, Halsey J, Beketic-Oreskovic L, Chen G.: *Cancer Chemother Pharmacol* **40**; S13-19, 1997.
- [126] Soleas GJ, Diamandis EP, Goldberg DM: *Clin Biochem.* **30(2)**; 91-113, 1997a.
- [127] Soleas GJ, Diamandis EP, Goldberg DM: *J Clin Lab Anal* **11(5)**; 287-313, 1997b.
- [128] Souček P, Gut I: *Xenobiotica* **22**; 83-103, 1992.
- [129] Souček P, Gut I: *Čas Lék Čes* **132**; 353-358, 1993.
- [130] De Souza MV: *ScientificWorldJournal* **4(11)**; 415-436, 2004.
- [131] Sparreboom A, Tellingen O, Scherrenburg EJ, Boesen JJB, Huizing MT, Nooijen WJ, Versluis C, Beijnen JH: *Drug Metab Dispos* **24**; 655-658, 1996.
- [132] Stiborová M, Hudeček J, Hodek P, Frei E: *Chem Listy* **93**; 229-237, 1999.
- [133] Taniguchi H, Imai Y, Sato R: *Arch Biochem Biophys* **232(2)**; 585-596, 1984.
- [134] Taniguchi R, Kumai T, Matsumoto N, Watanabe M, Kamio K, Suzuki S, Kobayashi SJ: *Pharmacol Sci* **97(1)**; 83-90, 2005.
- [135] Topham JC.: *Biochem Pharmacol* **19**; 1695-1701, 1970.
- [136] Troutman MD, Luo G, Gan LS, Thakker DR: v *Drug-Drug Interactions* (Rodrigues AD ed), Marcel Dekker, NY, USA, pp 295-357, 2002.
- [137] Tsyrllov IB, Mikhailenko VM, Gelboin HV: *Biochim Biophys Acta* **1205(2)**; 325-335, 1994.
- [138] Vainio H a Bianchini F.: *IARC Handbooks of Cancer Prevention, vol 7, Breast Cancer Screening*. IARC Press Lyon, France, 2002.
- [139] Vodrážka Z: *Biochemie I*, Academia Praha, ČR, 1992.
- [140] Vorlíček J: v *Klinická onkologie (Obecná část)*, Masarykova Universita. Brno, ISBN 80-210-1256-0, 1995.
- [141] Vredenburg MR, Ojima I, Veith J, Pera P, Kee K, Cabral F, Sharma A, Kanter P, Greco WR, Bernacki RJ: *J Natl Cancer Inst* **93(16)**; 1234-1245, 2001.
- [142] Wang Y, Cao J, Zeng S: *World J Gastroenterol* **10(9)**; 1365-1368, 2004.
- [143] Walle T, Kumar GN, McMillan JM, Thornburg KR, Walle UK: *Biochem Pharmacol* **46(9)**; 1661-1664, 1993.
- [144] Wani MC, Taylor HL, Wall ME, Coggon P, McPhail AT: *Am Chem Soc* **93**; 2325-2327, 1971.
- [145] Wei D, Mei Y, Liu J: *Biotechnol Lett* **25(4)**; 291-294, 2003.
- [146] Wrighton P, Brian WR, Sari MA, Iwasaki M, Guengerich FP, Ranay JL, Molowa DJ, Branden V: *Mol Pharmacol* **38**; 207-213, 1990.
- [147] Wrighton SA, Schuetz EG, Watkins PB, Maurel P, Barwick J, Bailey BS, Hartle HT, Young B, Guzelian P: *Mol Pharmacol* **28(3)**; 312-321, 1985.
- [148] Yamazaki H, Shimada T: *Drug Metab Dispos* **26(11)**; 1053-1057, 1998.

- [149] *Zdravotnická ročenka České republiky 2002*. ÚZIS ČR, Praha, 2003.
- [150] Zhai S, Dai R, Friedman FK, Vestal RE: *Drug Metab Dispos* **26(10)**; 989-992, 1998.
- [151] Zhang JT: *Mol Membr Biol* **18**; 145-152, 2001.
- [152] <http://wine1.sb.fsu.edu/BCH4053/Lecture30/Lecture30.htm>
- [153] <http://drnelson.utmem.edu/CytochromeP450.html>
- [154] <http://cmgm.stanford.edu/biochem218/Projects%201998/Chen,%20Kevin.pdf>
- [155] <http://www.fda.gov/cder/foi/label/1998/20262s24lbl.pdf>
- [156] <http://nutrigene.4tcom/humanabc.htm>.
- [157] <http://www.genomicobject.net/member3/GONET/apoptosis.html>
- [158] <http://afallahi.com/myresearch/gipson2.htm>
- [159] [http://www.linkos.cz/vzdelavani/2\\_00/01.php](http://www.linkos.cz/vzdelavani/2_00/01.php)