

## 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, jež 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 cytochromu 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 sérii 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 inhibítozů 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  $IC_{50}$  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 linií 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 linií 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 apoptozy 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 apoptozy. 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 linií 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 rezistenci. Verapamil byl účinným inhibitorem transportu zodpovědného za rezistenci 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.