

5. ZÁVĚR

Předkládaná disertační práce přispívá k rozšíření znalostí v oblasti mechanismu působení protinádorového léčiva ellipticinu. Nejdůležitější poznatky zjištěné v disertační práci lze shrnout následovně:

Ellipticin je metabolicky aktivován peroxidasami - hovězí laktoperoxidasou (LPO), lidskou myeloperoxidasou (MPO), ovčím cyklooxygenasou-1 (COX-1), lidskou cyklooxygenasou-2 (COX-2) a rostlinnou (křenovou) peroxidasou (HRP). Peroxidasy (MPO, LPO a HRP) oxidují ellipticin na dva metabolity. Izolace majoritního metabolitu ellipticinu pomocí HPLC umožnila určení jeho struktury pomocí hmotnostní spektrometrie a NMR analýzy. Jedná se o dimer ellipticinu, kde jsou obě ellipticinové substruktury vázány vazbou mezi atomem dusíku 6 jednoho ellipticinového skeletu a atomem uhlíku C9 druhého skeletu. Minoritní metabolit byl identifikován jako N^2 -oxid ellipticinu. N^2 -oxid ellipticinu je také tvořen po metabolické aktivaci ellipticinu cytochromy P450.

Ellipticin aktivovaný peroxidasami kovalentně modifikuje DNA. Byly detekovány čtyři adukty s DNA. Dva majoritní adukty, označované jako adukt 1 a 2, se tvoří ve všech případech aktivace ellipticinu peroxidasami (LPO, MPO, HRP, lidskou COX-1 a COX-2), další dva minoritní adukty, označované jako adukty 6 a 7 byly detekovány při aktivaci ellipticinu všemi peroxidasami, kromě myeloperoxidasy.

Majoritní adukty 1 a 2 s DNA detekované po metabolické aktivaci ellipticinu peroxidasami i cytochromy P450 jsou totožné. Adukt 1 je tvořený z 13-hydroxyellipticinu a adukt 2 z 12-hydroxyellipticinu eventuelně N^2 -oxidu ellipticinu, který na 12-hydroxyellipticin spontánně přesmykuje (viz Schéma 1).

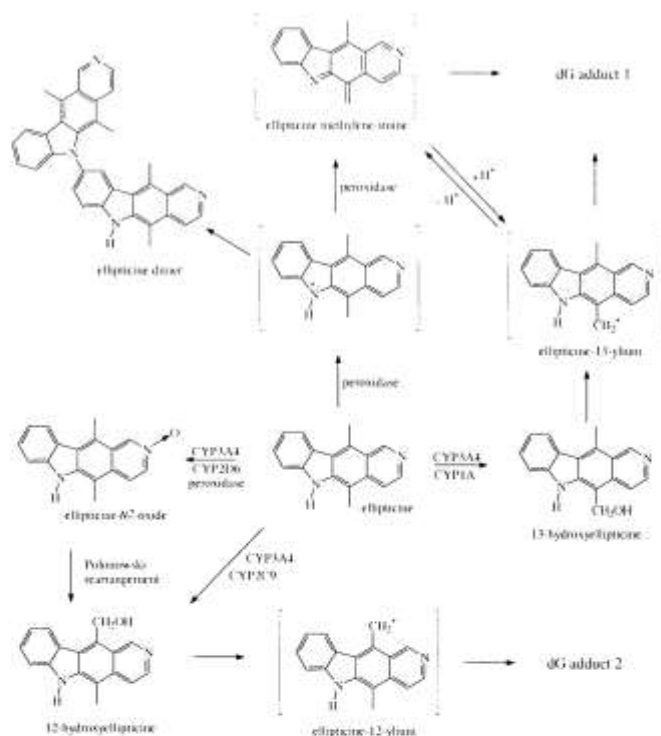


Schéma 1

Reakční schéma metabolismu ellipticinu peroxidasami a lidskými cytochromy P450 ukazuje charakterizované metabolity a tvorbu aduktů s DNA. Struktury předpokládaných meziproduktů uvedené v závorkách nebyly při užitých experimentálních podmínkách detekovány.

Ellipticin je cytotoxický pro lidské leukemické linie HL-60 a CCRF-CEM. Lidská leukemická linie HL-60 je k ellipticinu mnohem citlivější ($IC_{50} = 0,68 \mu M$) než linie CCRF-CEM ($IC_{50} = 4,70 \mu M$). Tvorba kovalentních aduktů s DNA koreluje s jejich cytotoxicitou vůči ellipticinu. V HL-60 buňkách byla detekována téměř o řád vyšší hladina aduktů s DNA než v CCRF-CEM linii. Lidská leukemická linie HL-60 na rozdíl od CCRF-CEM linie exprimuje myeloperoxidasu a cyklooxygenasu-1.

Ellipticin je cytotoxický pro lidské neuroblastomové linie IMR-32, UKF-NB-3 a UKF-NB-4, včetně linií rezistentních k doxorubicinu (IMR-32^(DOXO), UKF-NB-3^(DOXO) a UKF-NB-4^(DOXO)), vinkristinu (UKF-NB-3^(VCR) a UKF-NB-4^(VCR)) a cis-platině (UKF-NB-3^(DDP) a UKF-NB-4^(DDP)). Všechny testované linie byly na ellipticin citlivé. Porovnáním s citlivostí buněčných liniích k doxorubicinu, běžně podávanému cytostatiku při léčbě neuroblastomu *in vitro* je doxorubicin pro neuroblastomové linie cytotoxičtější, kromě

neuroblastomových linií rezistentních na doxorubicin IMR-32^(DOXO), UKF-NB-3^(DOXO) a UKF-NB-4^(DOXO). Tyto neuroblastomové linie jsou stále citlivé na ellipticin, a to srovnatelně s parentálními liniemi. To je podstatný výsledek, neboť u jiných nádorových linií rezistentních k doxorubicinu (např. odvozených od karcinomu prsu) byla zkřížená rezistence popsána (Chorna *et al.*, 2004).

Inhibitory histondeacetylasy (kyselina valproová a trichostatin A) ovlivňují cytotoxicitu ellipticinu vůči lidským neuroblastomovým liniím UKF-NB-3 a UKF-NB-4. Trichostatin A a kyselina valproová zvyšují cytotoxicitu ellipticinu k buněčným liniím UKF-NB-3 rezistentní na doxorubicin a UKF-NB-4. 24 hodinová preinkubace buněk s trichostatinem A také potencuje tvorbu kovalentních aduktů s DNA v neuroblastomových liniích UKF-NB-3 a UKF-NB-4. Preinkubace buněk s kyselinou valproovou zvýšila tvorbu aduktů s DNA v UKF-NB-3 linii, na neuroblastomovou linii UKF-NB-4 však takový efekt na tvorbu aduktů v DNA nevykazuje.

Nížší citlivost k ellipticinu u neuroblastomové linie UKF-NB-4, která je dosud pouze „pre-rezistentní“ k ellipticinu není způsobena vyšší expresí membránového P-glykoproteinu, jak je tomu u této linie rezistentní na doxorubicin. Na rezistenci se patrně podílí snížení exprese „aktivačních“ enzymů.