

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie
Studijní obor: Biochemie



Lucie Vejvodová

Studium mechanismu účinku protinádorového léčiva ellipticinu a jeho metabolismu

Study of mechanism of action of anticancer drug ellipticine and its metabolism

Bakalářská práce

Vedoucí závěrečné práce: *Prof. RNDr. Marie Stiborová, DrSc.*

Praha, 2011

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 24.05.2011

Podpis.....

Poděkování

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

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

Obsah

Seznam použitých zkratk	3
Abstrakt	5
Abstract	6
1 Úvod	7
2 Cíl práce	8
3 Protinádorová léčiva	9
3.1 Vedlejší účinky cytostatik	10
3.2 Mechanismus účinku cytostatik	10
3.3 Rezistence na cytostatika	13
3.3.1 Mechanismus vzniku rezistence vůči cytostatikům	13
3.3.2 Možnosti omezení rezistence vůči cytostatikům	14
3.4 Farmakokinetika cytostatik	15
4 Biotransformace xenobiotik	17
4.1 Enzymy I. fáze biotransformace	18
4.1.1 Cytochromy P450	19
4.1.2 NADPH:cytochrom P450 reductasa	23
4.1.3 Cytochrom b ₅	25
4.1.4 Peroxidasy	27
4.2 II. fáze biotransformace	28
4.2.1 Konjugační reakce a enzymy II. fáze biotransformace	28
5 Protinádorové léčivo ellipticin	31
5.1 Původ ellipticinu	31
5.2 Vedlejší účinky ellipticinu a jeho derivátů	32
5.3 Biotransformace ellipticinu	33
5.4 Mechanismus účinku protinádorového léčiva ellipticinu	34

5.4.1	Tvorba aduktů ellipticinu s DNA	36
5.4.2	Mechanismus oxidace ellipticinu katalyzované cytochromy P450	38
5.4.3	Mechanismus oxidace ellipticinu katalyzované peroxidasami.....	39
5.5	Indukční potenciál ellipticinu na enzymy biotransformující léčiva.....	43
5.5.1	Indukce cytochromů P450 aktivujících ellipticin <i>in vitro</i> a <i>in vivo</i>	43
5.5.2	Vliv cytochromu b ₅ na aktivaci ellipticinu CYP1A1/2	44
6	Závěr.....	45
7	Seznam použité literatury	46

Seznam použitých zkratek

AhR	receptor pro aromatické uhlovodíky (z angl. aryl hydrocarbon receptor)
ARNT	jaderní translokátor pro aromatické uhlovodíky (z angl. aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator)
ATP	adenosintrifosfát
CoA	koenzym A
COX-1	ovčí cyclooxygenasa
COX-2	lidská cyclooxygenasa
CPR	NADPH:cytochrom P450 reduktasa
CYP	cytochrom P450
DNA	deoxyribonukleová kyselina
FAD	flavinadenindinukleotid
FMN	flavinmononukleotid
FMNH•	flavinmononucleotid redukována forma (první stupeň)
FMNH₂	flavinmononucleotid redukována forma (druhý stupeň)
FNR	ferredoxin-NADP ⁺ reduktasa
GIT	gastrointestinální trakt
HRP	peroxidasa křenu selského (z angl. horseradish peroxidase)
LPO	hovězí laktoperoxidasa
MFO	monooxygenázový systém se smíšenou funkcí (z angl. mixed function oxidase)
MPO	myeloperoxidasa
NADH	nikotinamid adenin dinukleotid redukována forma
NADPH	nikotinamid adenin dinukleotid fosfát redukována forma
PAPS	3'-fosfoadenosin 5'-fosfosulfát
PHS	prostaglandin H synthasa

RNA	ribonukleová kyselina
UDP	uridindifosfát
WHO	Světová zdravotnická organizace (z angl. World Health Organization)

Abstrakt

Tato bakalářská práce se zabývá studiem protinádorových léčiv a to především jejich mechanismem účinku, vedlejšími účinky, rezistencí a farmakokinetikou. Jako modelové cytostatikum byl pro tuto práci vybrán protinádorový alkaloid ellipticin. Bakalářská práce popisuje metabolismus této látky v organismu a jeho indukční potenciál na enzymy biotransformující léčiva.

Protinádorový alkaloid ellipticin představuje léčivo, jehož mechanismus účinku je založen na interkalaci do DNA, inhibici topoisomerasy II a na tvorbě kovalentních aduktů s DNA prostřednictvím enzymové aktivace cytochromy P450 a/nebo peroxidasami v cílových tkáních. Ellipticin je oxidován cytochromy P450 na několik metabolitů (7-hydroxyellipticin, 9-hydroxyellipticin, 12-hydroxyellipticin, 13-hydroxyellipticin a N^2 -oxid ellipticinu). Z těchto metabolitů jsou 9-hydroxy- a 7-hydroxyellipticin považovány za detoxikační metabolity, zatímco 12-hydroxyellipticin, 13-hydroxyellipticin a N^2 -oxid ellipticinu za aktivační metabolity, které vytvářejí dva hlavní deoxyguanosinové adukty v DNA. Tyto adukty byly nalezeny jak *in vitro* v leukemických buňkách (HL-60), v buněčných liniích lidského prsního adenokarcinomu (MCF-7), v neuroblastomových buňkách (IMR-32, UKF-NB-3 a UKF-NB-4) a v buňkách glioblastomu (U87MG), tak i *in vivo* v prsním karcinomu potkanů. Dva karbeniové ionty, ellipticin-13-ylum a ellipticin 12-ylum, vznikající spontánním štěpením 13-hydroxyellipticinu a 12-hydroxyellipticinu jsou reaktivní agens, která se váží na DNA. Ellipticin je oxidován kromě cytochromy P450 také peroxidasami. Peroxidasami je ellipticin oxidován na dimer ellipticinu a na N^2 -oxid ellipticinu. Studované léčivo také indukuje CYP1A, 1B1 a 3A4 enzymy v rakovinných buňkách a/nebo *in vivo* v potkanech, kterým byl ellipticin podáván. Díky vysoké účinnosti ellipticinu a jeho derivátů proti různým nádorovým onemocněním roste zájem o toto protinádorové léčivo a jsou tak stále vyvíjeny nové postupy cíleně směřovaných léčiv na bázi ellipticinu.

Klíčová slova

Protinádorová léčiva, biotransformace xenobiotik, protinádorové léčivo ellipticin, mechanismus působení, cytochromy P450, peroxidasy, adukty DNA v cílových tkáních.

Abstract

This bachelor thesis is aimed to study the mechanisms of action of anticancer drugs, their side effects, their resistance and pharmacokinetics. Anticancer alkaloid ellipticine was chosen as a model for this work. Bachelor thesis describes the metabolism of this substance in organisms and its potential to induce of drug metabolizing enzymes.

An antineoplastic alkaloid ellipticine is a prodrug, whose mode of action is based mainly on DNA intercalation, inhibition of topoisomerase II, and formation of covalent DNA adducts mediated by cytochromes P450 and/or peroxidases in target tissues. A variety of cytochromes P450 oxidize ellipticine forming up to five metabolites (7-hydroxyellipticine, 9-hydroxyellipticine, 12-hydroxyellipticine, 13-hydroxyellipticine and ellipticine N²-oxide). 7-hydroxy- and 9-hydroxyellipticine metabolites are considered to be mainly the detoxication products of ellipticine, while 12-hydroxyellipticine, 13-hydroxyellipticine and ellipticine N²-oxide are considered to be mainly the activation products of ellipticine. The major ellipticine-derived DNA adducts are generated from these activation metabolites. These adducts were found in cancer cells in culture, such as human breast adenocarcinoma MCF-7 cells, neuroblastoma IMR-32, UKF-NB-3, and UKF-NB-4 cells and glioblastoma U87MG cells *in vitro*. Both mainly DNA adducts were also detected in DNA of rat breast adenocarcinoma *in vivo*. The reactive carbenium ions, ellipticine-12-ylium and ellipticine-13-ylium, are generated by spontaneous cleavage of 12-hydroxyellipticine and 13-hydroxyellipticine, without participation of cytochromes P450. Deoxyguanosine was identified as target base to which reactive carbenium ions of ellipticine metabolites generated by cytochromes P450 are bound. Peroxidases oxidize ellipticine to species binding to DNA. The ellipticine oxidation products formed by peroxidases are the ellipticine dimer and ellipticine N²-oxide. This drug was found to induce CYP1A, 1B1 and 3A4 in cancer cell line and/or *in vivo* in rats exposed to ellipticine. Because of the high efficiency of ellipticine and its derivatives against various types of cancer, this compound is suitable to prepare its derivatives useful for tumor targeting.

Key words:

Anticancer drugs, biotransformation of drugs, antitumor alkaloid ellipticine, cytochrome P450, peroxidase, DNA adducts in target tumor.

1 Úvod

Nádorová onemocnění jsou druhou nejčastější příčinou úmrtí u nás i ve světě. Každý rok podlehe nádorovému onemocnění více než 7 milionů lidí a ročně je diagnostikováno téměř 11 milionů nových případů [1]. V České republice každý třetí obyvatel onemocní nádorovým onemocněním a každý čtvrtý nemocný na něj umírá [2]. Světová zdravotnická organizace (WHO) uvádí, že celosvětově jsou nejčastějšími nádorovými onemocněními nádory plic, prsu a tlustého střeva a nejčastější nádorová onemocnění končící smrtí jsou pak nádory plic, žaludku a jater [3]. U většiny nádorových onemocnění je patrný vliv prostředí a životního stylu. Nádorová onemocnění postihují stále nižší věkové ročníky. Statistiky navíc ukazují, že 43 % případům nádorových onemocnění se dá předejít zdravým životním stylem osvojeným již v dětství [1]. Nevhodná strava a karcinogeny přítomné ve vodě, ovzduší a v potravě způsobují narůstající počet jednotlivých nádorových buněk, než je pro organismus přirozené. Imunitní systém, který může být oslaben stresem či polutanty, pak není schopen efektivně tuto situaci řešit [4].

Léčba nádorových onemocnění byla v minulosti velice drastická s minimálním efektem. Dnes existuje řada kvalitních léčebných metod, které postiženým dokážou nejen prodloužit život, ale také je zachránit. Základní a nejvyužívanější metodou v léčbě nádorových onemocnění je chemoterapie, radioterapie, chirurgická léčba [5].

Protinádorová chemoterapie, které se v této bakalářské práci věnovala pozornost, je nejmladší z těchto metod, neboť se v širším měřítku začala uplatňovat teprve v průběhu šedesátých let. V následujících desetiletích prodělala bouřlivý rozvoj, kdy z původně doplňkové metody se stala metodou základní. [6]. Použití chemoterapie jako jediné hlavní metody je však omezeno řadou faktorů, jako je rozsah nádoru, dávkování cytostatika, načasování chemoterapie a rezistence na cytostatika [7], která je probírána v kapitole 3.3. V každém případě je protinádorová chemoterapie nepostradatelnou metodou v léčbě nádorových onemocnění.

2 Cíl práce

Cílem předkládané bakalářské práce bylo získat co nejvíce znalostí o protinádorových léčivech, jejich mechanismu účinku a o enzymech, které se účastní jejich biotransformace. Jako modelové protinádorové léčivo byl pro tuto bakalářskou práci vybrán ellipticin.

3 Protinádorová léčiva

Nádorová onemocnění jsou po kardiovaskulárních onemocněních druhou nejčastější příčinou úmrtí v technicky vyspělých oblastech světa [8].

Nádory (novotvary) vznikají nadměrným a neregulovaným bujením tkáně, což bývá doprovázeno inaktivací genů odpovědných za potlačení nádoru a aktivací onkogenů. Ačkoli vznikají z buněk těla vlastních, rostou trvale a bez ohledu k potřebám organismu a vyznačují se tvarovými i funkčními odlišnostmi od normální tkáně [9]. Nádory se dělí do dvou skupin:

- **maligní** (zhoubné) – rostoucí rychle, metastazují a prorůstáním do okolní tkáně způsobují její destrukci,
- **benigní** (nezhoubné) – rostoucí pomalu, bývají přesně ohraničené od normální tkáně a netvoří metastázy (sekundární nádory).

Termín zhoubné bujení (neoplastická onemocnění, rakovina) zahrnuje širokou řadu onemocnění od leukémie až po celistvé nádory různých tkání a orgánů. Ve své podstatě je zhoubné bujení onemocněním buněk, spočívajícím ve ztrátě kontroly nad jejich proliferací, růstem, diferenciací a jejich apoptózou [9].

Protinádorová léčiva (**cytostatika**, z řeckého kytos = buňka a statikos = stavící) jsou látky, které různými mechanismy zastavují růst a dělení nádorových buněk, a spolu s dalšími terapeutickými postupy (chirurgické odstranění a ozáření nádoru) se užívají k léčbě nádorových onemocnění. Různé typy nádorů jsou různě citlivé k chemoterapii (léčba cytostatiky, onkologická léčba) nebo léčbě ozářením [10]. Cílem onkologické léčby je zabezpečit optimální farmakologický účinek při minimální toxicitě za současné prevence vývoje rezistence. Chemoterapie je vždy komplexní a musí být řízena specializovaným lékařem-onkologem [8]. Pro dosažení optimálního výsledku při léčbě se různé terapeutické postupy kombinují [11]. Chemoterapii lze dělit na léčebnou, která prodlužuje dobu přežití, a paliativní, která pouze zmírňuje symptomy [8].

3.1 Vedlejší účinky cytostatik

Nežádoucí účinky cytostatik jsou poměrně časté a závažné. Tyto účinky vyplývají z antiproliferačního působení cytostatik, což má za následek, že cytostatika zabijí všechny rychle se množící buňky [8]. Tím působí negativně zejména na kostní dřeň, vlasové folikuly, sliznici gastrointestinálního traktu (GIT), vyvíjející se plod, často jsou hepato-a nefrotoxická. Cytostatika tedy způsobují vypadávání vlasů a ochlupení, nevolnosti a zvracení, mukositivity dutiny ústní, hyperurikemii, útlum produkce leukocytů, erytrocytů i trombocytů a tromboembolické komplikace. Mají teratogenní účinky, a protože poškozují strukturu DNA, vykazují i účinky mutagenní a karcinogenní [8].

Při chemoterapii se vedle účinných cytostatik podávají pomocné látky (adjuvantní terapie), které některé z těchto nežádoucích účinků zmírňují. Velmi často jsou na utlumení nevolnosti indikována antiemetika, která tak umožňují podávání vyšších dávek cytostatik, či látky stimulující krvetvorbu, vitamíny apod. Doplnková a podpůrná léčba zahrnuje i prevenci infekčních komplikací, zlepšení výživy pacientů, útlum bolesti a péči o psychický stav pacienta [8, 10].

Některá cytostatika (např. používaná u nádorového bujení krvetvorné tkáně) lze také užít jako imunosupresiva při terapii autoimunních onemocnění či jako prevenci rejekce tkání po transplantaci orgánů [11].

3.2 Mechanismus účinku cytostatik

Cytostatika se nejčastěji rozdělují podle svého mechanismu účinku. Základními mechanismy účinku cytostatik jsou:

- *Inhibice klíčových enzymů metabolismu, jež má za následek poruchu biosyntézy nukleových kyselin s následnou inhibicí buněčného dělení.*

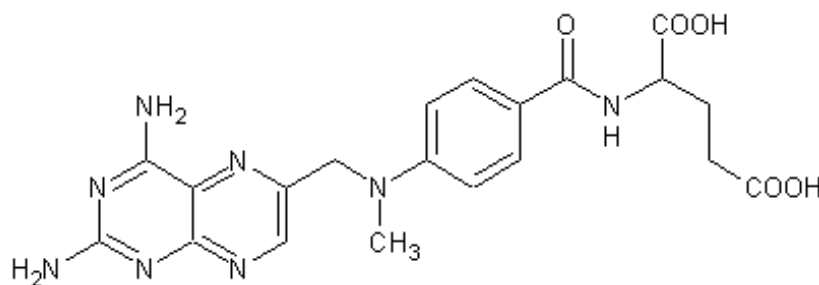
Cytostatika, která působí tímto mechanismem, se strukturně podobají přirozeným metabolitům a nazývají se **analoga** metabolitů nebo podle způsobu účinku **antimetabolity** [7]. Antimetabolity mohou mít:

1. Přímý inhibiční účinek na dílčí reakce intermediálního metabolismu nebo na enzymy, které jsou nutné pro tento metabolismus.
2. Častěji jsou však nejdříve samy metabolicky aktivovány a v této formě jsou inkorporovány do nukleových kyselin.
3. Jindy působí mechanismem zpětné vazby.

Inhibice syntézy DNA a RNA působí jak na buňky nádorové, tak i na buňky zdravé a v závislosti na velikosti dávky a trvání účinku cytostatika je příčinou smrti buňky. U zhoubných nádorových onemocnění jsou cytostatika nejúčinnější na buňky nacházející se v buněčném cyklu (tedy u buněk, které proliferují) [7].

Antimetabolity jsou tříděny podle substrátů, na jejichž úrovni dochází k inhibici (purinová a pyrimidinová analoga) nebo podle cílového enzymu, který je antimetabolitem blokován. Většinou je ale třídění antimetabolit obtížné, neboť je jejich zásah mnohostranný [7]. V chemoterapii se používají antimetabolity několika typů:

Analoga kyseliny listové (antifolika), která blokují působení kyseliny listové mající funkci tetrahydrofolátu (koenzym F) při přenášení jedno-uhlíkových fragmentů při syntéze buněčných komponent. Mezi antifolika patří např. metotrexát (Obrázek č. 1) [7, 11].



Obrázek č. 1: Metotrexát [12].

Analoga purinů, která se stávají účinná až po metabolické přeměně na nukleotidy. Do této skupiny patří např. 6-merkaptopurin a 6-thioguanin, které se inkorporují do DNA a tím vytvářejí nefunkční DNA [11].

Analoga pyrimidinů, která blokují tvorbu DNA inhibicí syntézy deoxytimidintrifosfátu (kyseliny thymidylové), a tím narušují syntézu DNA. Mezi analoga pyrimidinů patří např. 5-fluouracil a cytarabin [7].

Inhibitory ribonukleotidreduktasy jsou cytostatika, která se nepodobají přirozeným prekurzorům, ale blokují biosyntetické reakce inhibicí klíčových enzymů (př. hydroxymočovina) [7, 11].

- *Přímé poškození struktury již vytvořených nukleových kyselin, jež vede k poruše jejich funkce, a tím dochází k inhibici proliferace buněk*

Poškození struktury a funkce nukleových kyselin vede k alteraci jejich biologických funkcí. Největší význam z hlediska cytostatického účinku má inhibice replikace a inhibice transkripce, méně inhibice translace [7]. Ke strukturnímu poškození nukleových kyselin přispívá:

Alkylace (arylace) – Alkylační látky se kovalentně vážou na DNA a způsobují tak její poškození. Do této skupiny cytostatik patří např. deriváty yperitu (cyklofosfamid), deriváty nitrosomočoviny (karmustin) a deriváty platiny (cisplatina) [11].

Interkalace (vmezeření) – Cytostatikum se nekovalentně váže na DNA. Molekula cytostatika se zasune mezi dvoušroubovicovou molekulu DNA, kde se váže např. vodíkovými můstky, hydrofobními a iontovými vazbami. Tím způsobí inhibici replikace a transkripce. Tímto mechanismem působí antracyklinová antibiotika aktinomycin D, deriváty antrachinonu, deriváty akridinu a ellipticin [7].

Inhibice topoisomeras – Topoisomerasy I. a II. jsou enzymy nutné pro replikaci DNA. Obě topoisomerasy zajišťují správnou „topologii“ DNA (zabraňují „překroucení“ šroubovice DNA, zlomu v řetězci DNA a ztrátě funkce DNA). Mezi cytostatika působící tímto mechanismem patří např. etopozid.

Rozštěpení molekuly DNA – Některá antibiotika polypeptidové povahy podobně jako ionizující záření rozštěpují molekulu DNA [11].

- *Alterace mikrotubulárního proteinu, jež vede k abnormálnímu průběhu mitózy a její blokádou v metafázi*

Přípravky poškozující strukturu a funkci mikrotubulů se někdy označují jako „mitotické jedy“, jelikož jsou cytotoxické převážně v průběhu mitózy. Alterace mikrotubulů poškodí funkci dělicího vřeténka, které je nutné pro správnou migraci chromozómů k pólům dělicí se buňky. Porušení procesu mitózy je důležitý mechanismus inhibice nádorového růstu. Tímto mechanismem působí např. Vinca-alkaloidy (zabraňují tvorbě dělicího vřeténka) a taxany (zabraňují desintegraci dělicího vřeténka) [7, 11].

- *Porucha proteosyntézy*

Proteosyntéza je jedním z metabolických procesů podmiňujících růst zdravých a nádorových buněk. Enzym L-aspariginasa způsobuje nedostatek L-asparaginu, tím omezuje růst buněk, které jsou na přítomnosti této aminokyseliny závislé [7].

- *Poškození buněčné membrány*

Změny fluidity, permeability, poškození membránových receptorů a porušení integrity membrány může vést až ke smrti buňky. Mezi cytostatika poškozující buněčnou membránu patří např. antracyklyny [7].

- *Kombinované účinky*

3.3 Rezistence na cytostatika

Cytostatika jsou toxické látky představující nebezpečí pro všechny živé buňky. Z tohoto důvodu si buňky vytvořily obranný mechanismus vůči uvedeným látkám. Těmito obrannými mechanismy je rezistence vůči cytostatikům, která může bránit účinné léčbě nádorů [11]. Zhooubné buněčné populace mohou být rezistentní vůči chemoterapii již při první léčbě (přirozená rezistence). V průběhu léčby může vznikat získaná (sekundární) rezistence, kdy se původně citlivé buňky stávají rezistentní na podávané cytostatikum, a účinnost léčby se snižuje. Zkřížená rezistence (cross-rezistence) je stav, kdy při ztrátě citlivosti k jednomu přípravku vzniká souběžně rezistence na jiné, strukturně podobné cytostatikum. Lokální rezistence vzniká z místních příčin [7].

3.3.1 Mechanismus vzniku rezistence vůči cytostatikům

Mechanismus vzniku rezistence (Obrázek č. 2) bývá nejčastěji vázán na:

- **Změny farmakokinetiky** – např. snížená resorpce cytostatika, urychlený rozklad cytostatika, rychlejší inaktivace cytostatika, urychlené vylučování cytostatika.
- **Změny cytokinetiky léčiva** – z heterogenní populace buněk v nádorech mohou vznikat rezistentní linie buněk.

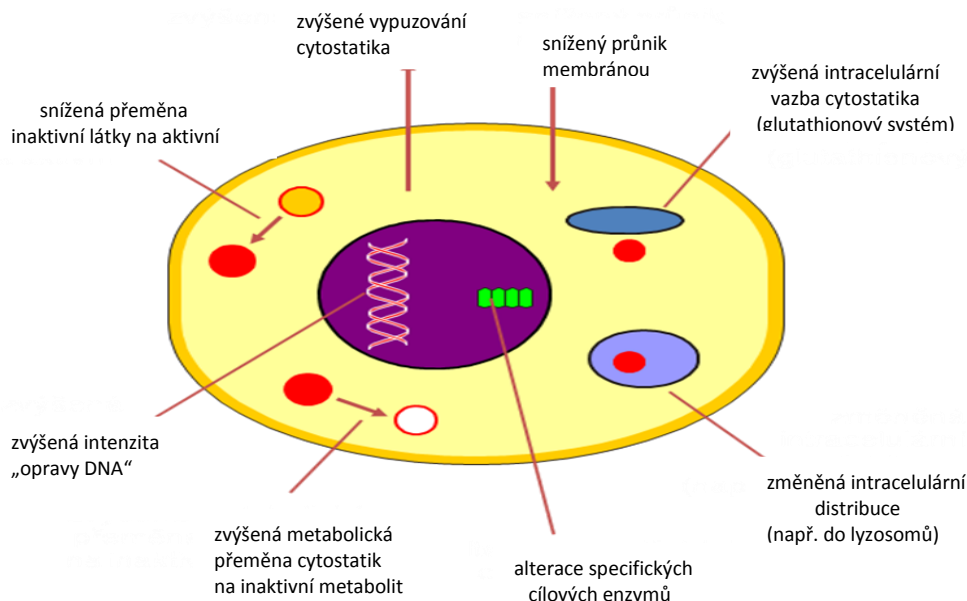
- **Strukturální nebo funkční změny buňky**

- snížená koncentrace či aktivita enzymů nutných pro přeměnu cytostatika na účinnou látku,
- zvýšená koncentrace enzymů (např. zvýšená koncentrace glutathionu v buňce, který na sebe váže cytostatika, má často za následek inaktivaci cytostatika),
- změna intracelulární distribuce cytostatika (např. vazbou na lysozom),
- omezení průniku cytostatika buněčnou membránou,
- zvýšena intenzita opravy DNA [7].

3.3.2 Možnosti omezení rezistence vůči cytostatikům

K úspěšnému překonání rezistence je zejména nutné:

- Zajistit účinnou koncentraci cytostatika v cílové tkáni (podáváním vysokých dávek cytostatika).
- Zahájit léčbu co nejdříve.
- Dodržovat intervaly podávání cytostatik tak, aby léčba neposkytovala prostor pro vznik mutací.
- Podávat současně odlišná cytostatika s rozdílným mechanismem účinku.
- Změnit při sníženém účinku léčby co nejdříve kombinaci cytostatik, či střídat kombinace cytostatik [7, 11].



Obrázek č. 2: Mechanismy vzniku rezistence nádorových buněk vůči cytostatikům (upraveno podle [7]).

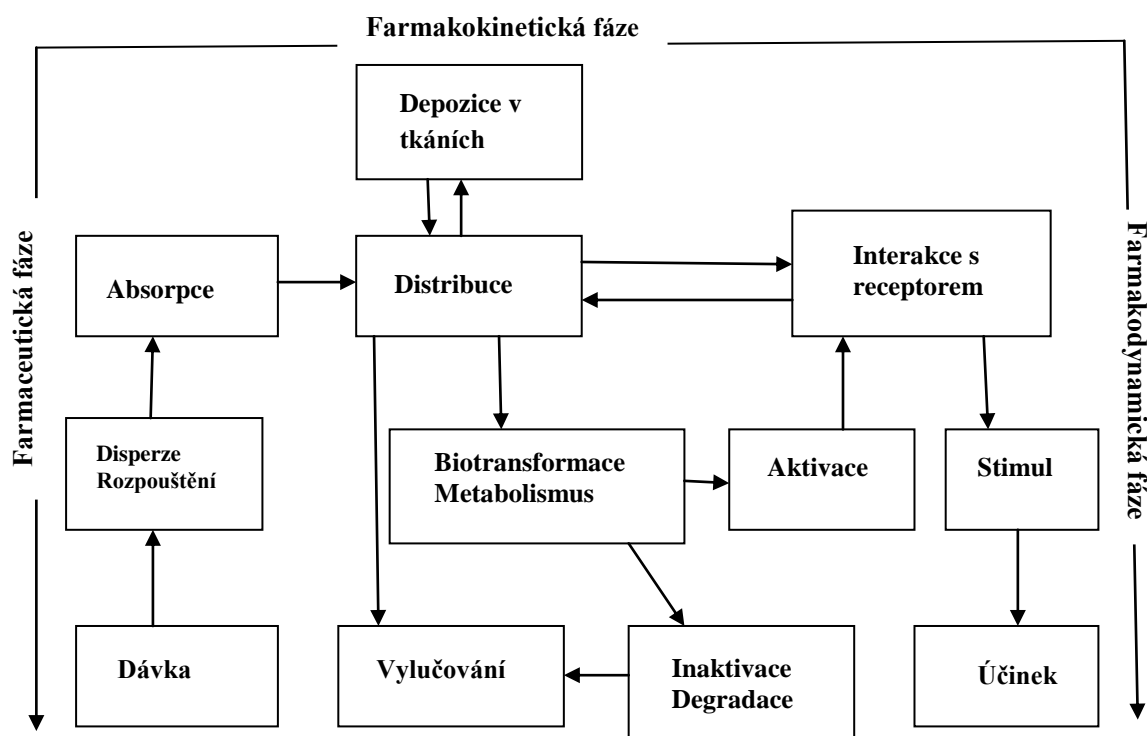
3.4 Farmakokinetika cytostatik

Farmakokinetika je odvětví farmakologie zabývající se osudem cytostatika v organismu (tj. působení organismu na podané léčivo, které znázorňuje obrázek č. 3). Předmětem jejího studia jsou především procesy ovlivňující koncentraci cytostatika v místě jeho zásahu a závislost této koncentrace na čase [9]. Farmakokinetika cytostatik se skládá z řady dílčích pochodů, které spolu velmi úzce souvisejí a vzájemně na sebe navazují [7]. Tyto dílčí pochody jsou:

- **Resorpce (absorpce) cytostatika** – je proces pohybu cytostatika z místa jeho podání do krevního a lymfatického oběhu [9]. Rychlost a stupeň resorpce závisí na mnoha faktorech, z nichž jsou nejvýznamnější aplikační cesty, aplikační formy a průnik cytostatik biologickými membránami [7]. Do krve se cytostatika dostávají třemi hlavními cestami a to trávicím traktem (žaludek, střeva), dýchacím systémem (plíce, průdušky, nosní sliznice) a pokožkou. Resorpce se uplatňuje u všech cest podání s výjimkou intraarteriálního a intravenózního (zde se podává přímo do krevního oběhu) [13].
- **Distribuce cytostatika v organismu** – je proces transportu cytostatika mezi krevním řečištěm a orgány. Distribuce cytostatika je podmíněna velikostí molekuly a rychlostí průniku do jednotlivých oddílů (kompartmentů). V intravaskulárním prostoru jsou buď cytostatika rozpuštěná ve vodném prostředí, nebo dochází k vazbě cytostatika (většinou se jedná o vazbu nespecifickou) na krevní elementy nebo na bílkoviny krevní plazmy (např. albumín). Koncentrace cytostatika v jednotlivých orgánech i v cílových tkáních také dále závisí na jejich prokrvení [7]. Absorbované léčivo se většinou v organismu rozděluje nerovnoměrně do různých kompartmentů. Hlavními tělovými kompartmenty, kam se podané cytostatika rozdělují, jsou plazma (ev. krev), extracelulární a intracelulární prostor. Jednotlivé kompartmenty jsou od sebe odděleny bariérami, které jsou rozdílně propustné pro různé látky [11].
- **Biotransformace cytostatika (metabolismus) v organismu** – metabolické přeměny cytostatika v metabolicky aktivních orgánech (játra, ledviny, plíce). Cílem těchto přeměn je vznik lépe rozpustných látek ve vodě, které jsou tak snadněji vyloučeny z organismu [11]. Souhrn těchto změn, na kterých se účastní jednak enzymy intermediálního metabolismu, jednak enzymy přítomné v mikrosomální frakci buněk

označujeme jako biotransformaci [7]. Detailně jsou tyto procesy popsány v kapitole 4.

- **Eliminace cytostatika či jeho metabolitů z organismu-** je souhrn procesů, které vedou k vyloučení aktivní látky z organismu [11]. Na vylučování cytostatik se převážně podílí ledviny, zažívací trakt a plíce. Vzácně může docházet k vyloučení cytostatika jinými cestami (potem, slinami, mlékem). Snadněji jsou vylučovány polární látky [7, 8].



Obrázek č. 3: Osud cytostatika v organismu (upraveno podle [9]).

Léčiva patří mezi skupinu látek, které jsou pro organismus látkami cizorodými. Takové látky označujeme za xenobiotika. V dalších kapitolách je pojednáno o jejich metabolismu (biotransformaci).

4 Biotransformace xenobiotik

Xenobiotika (řec. *xenos* – cizí, *bios* – živý) jsou látky, které se v organismu normálně nevyskytují. Tyto cizorodé látky jsou v organismu buď předmětem biochemických přeměn katalyzovaných enzymy (metabolická přeměna), nebo podléhají samovolným změnám za podmínek panujících v organismu (např. pH), případně reagují s některými endogenními a exogenními sloučeninami. Některá xenobiotika se však v organismu nemění a jsou buď v nezměněné formě vyloučena z organismu (např. éter), nebo jsou v organismu kumulována [14].

Většina xenobiotik se biotransformuje pomocí membránově vázaných nespecifických enzymů lokalizovaných v endoplasmatickém retikulu buněk. Při biotransformaci dochází ke změně struktury xenobiotik, což vede ke změně biologické účinnosti. Ve většině případů se jedná o inaktivaci tj. snížení toxicity xenobiotika (**inaktivace, detoxikace**). V některých případech vznikají biotransformačním procesem látky toxičtější, než je látka původní (**aktivace**). Touto cestou vzniká většina látek genotoxických (karcinogenních, mutagenních, teratogenních), ale i látek farmakologicky účinnějších, než bylo původní xenobiotikum (tzv. aktivace proléčiva). V průběhu biotransformace dochází k přeměně xenobiotika (zpravidla lipofilního) na látku, která je zpravidla látkou polárnější, jejíž molekulová hmotnost se obvykle výrazně zvyšuje (důsledek konjugační fáze). Zvýšená rozpustnost ve vodě usnadňuje vylučování močí a výkaly [14]. Jen výjimečně nedochází v organismu k biotransformaci látek (syntetické sladidlo sacharin prochází organismem, aniž by byl metabolizován) [9]. Biotransformace je většinou dvoustupňový proces sestávající z:

- I. fáze biotransformace a
- II. fáze biotransformace.

Aktivita enzymů metabolizujících xenobiotika je závislá na řadě faktorů. Je to např. rozdílnost pohlaví, věk, životní styl, příjem léků, genetické vybavení, zdravotní stav. Tyto faktory mohou být příčinou nepředvídatelné nenormální reakce na některé škodliviny, ale hlavně na léky, kde jsou dosud největší poznatky [14].

4.1 Enzymy I. fáze biotransformace

V první fázi biotransformace xenobiotik je do molekuly substrátu zavedena polární skupina, nebo se odkryje „skrytá“ funkční skupina (-OH, -NH₂, -SH, =CO, -COOH). Vzniklý biotransformační produkt, pokud je dostatečně polární, je vylučován přímo z organismu nebo dále reaguje v II. fázi biotransformace s konjugačním agens za vzniku konjugačního produktu (konjugátu) [14, 15]. Produkty těchto reakcí jsou látky polárnější a mnohem lépe rozpustné ve vodě. Díky tomu jsou snadněji vyloučeny z organismu a nedochází tak k jejich bioakumulaci v organismu. Paradoxem je, že vedle detoxikace těchto sloučenin může docházet ke vzniku biologicky aktivnějších derivátů, jak již bylo uvedeno výše, které jsou často více toxické, karcinogenní či mutagenní (několik interakcí léčiva s cytochromy P450 je zobrazeno na obrázku č. 4) [14]. Mezi nejčastější biotransformační reakce xenobiotik patří:

- **oxidační reakce** – C-hydroxylace, N-dealkylace, O-dealkylace, alifatická hydroxylace, N-oxidace, S-oxidace, deaminace, oxidace alkoholů a aldehydů, alkylace,
- **redukce** – redukce nitrosloučenin, redukce azosloučenin, redukce sulfoxidů, redukční dehalogenace,
- **hydrolytické reakce** – hydrolýza esterů a amidů [15].

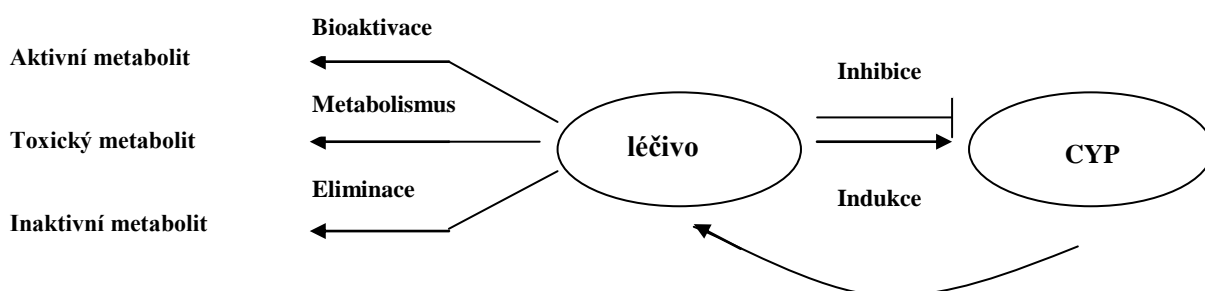
Do skupiny nejdůležitějších enzymů I. fáze metabolizující xenobiotika se řadí systém monooxygenas se smíšenou funkcí (MFO systém), jehož součástí je cytochrom P450. Dalšími enzymy, které se v menší míře podílejí na I. fázi biotransformace jsou flavinové mikrosomální monooxygenasy (Zieglerův enzym), hemové peroxidasy, dehydrogenasy, reduktasy a hydrolytické enzymy [4, 16].

4.1.1 Cytochromy P450

Cytochromy P450 (CYP) tvoří superrodinu hemthiolátových enzymů, které hrají klíčovou roli v metabolismu xenobiotik. Cytochromy P450 jsou součástí **mikrosomálního monooxygenasového systému**, kde fungují jako terminální oxidasy. V organismu cytochromy P450 katalyzují oxidační, peroxidační a redukční reakce při biotransformaci léčiv, environmentálních chemikálií či látek přírodních i endogenních [16]. Některá proléčiva, která byla cytochromy P450 metabolizována, se stala ještě biologicky aktivnější (například tamoxifen) [17].

Z evolučního hlediska jsou cytochromy P450 velice staré hemoproteiny, které jsou evolučně ještě starší než např. hemoglobin [16]. S cytochromy P450 se setkáváme jak u eukaryot, tak i u prokaryot. U bakterií bylo dodnes identifikováno 20 isoformů cytochromu P450 a u rostlin se na základě studií genomu druhu *Arabidopsis thaliana* odhaduje tento počet až na více než 300 isoformů cytochromu P450. Tento vysoký počet je dán dvěma důvody-potřebou rostlin syntetizovat pigmenty a růstové hormony-syntézou rostlinných toxinů, které jsou důležité pro obranu rostliny [18]. V lidském organismu je přítomno 57 isoformů cytochromů P450 (a 58 pseudogenů cytochromů P450, což jsou nefunkční kopie). Geny pro cytochromy P450 jsou umístěny ve všech lidských chromosomech (mimo chromosomu Y) [4].

Lidské cytochromy P450 jsou klasifikovány do 17 rodin, z kterých jsou pouze tři zapojeny do metabolismu xenobiotik: CYP1, CYP2 a CYP3 (v menší míře také rodina CYP4). Ostatní rodiny se účastní biosyntézy steroidů, cholesterolu či žlučových kyselin, na metabolismu mastných kyselin, kyseliny arachidonové apod. [4].

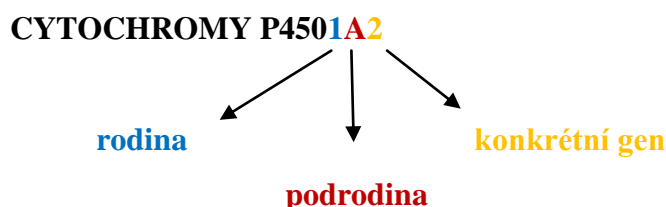


Obrázek č. 4: Cytochromy P450 mohou léčivo metabolizovat na biologicky účinnější metabolit (bioaktivace), nebo na hydrofilnější metabolit, který je tak snadněji vyloučen z organismu (eliminace) či na toxický metabolit. Léčivo může inhibovat či indukovat cytochromy P450 během léčebné terapie (převzato z [19]).

4.1.1.1 Názvosloví cytochromů P450

Písmeno P v názvu cytochromu P450 označuje pigment a číslice 450 označuje spektrální maximum, které vykazuje cytochrom P450 po redukci a vazbě s CO [15]. Dnes je známo přes 1000 isoformů cytochromu P450, které jsou na základě podobnosti aminokyselinové sekvence rozděleny do rodin (cytochromy P450, které mají sekvenční identičnost větší než 40%) a podrodin (cytochromy P450, které jsou identické více než z 60%) [4].

Pro cytochromy P450 byla zavedena zkratka **CYP**. První číslo, které pak následuje za zkratkou CYP, označuje rodinu, následuje velké písmeno pro podrodinu a poslední číslo označuje konkrétní cytochrom P450 (gen), (Obrázek č. 5) [4].

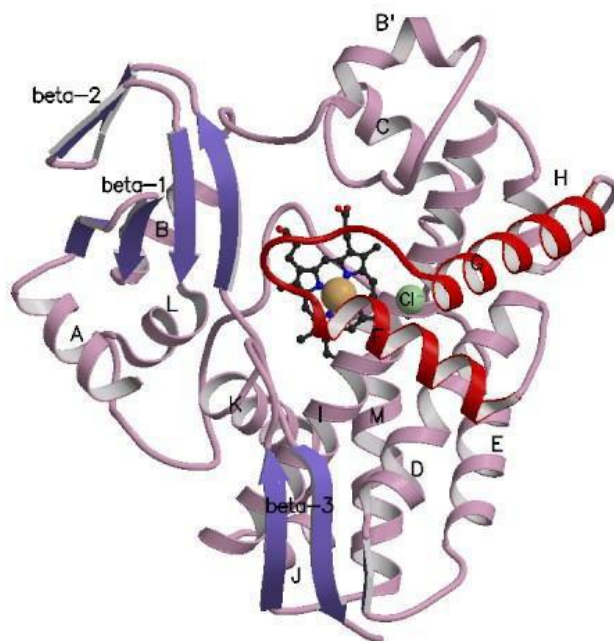


Obrázek č. 5: Současná nomenklatura cytochromů P450 zavedená v roce 1996 Nebertem a spolupracovníky [4].

4.1.1.2 Struktura, výskyt a funkce cytochromů P450

Jak bylo výše uvedeno, cytochromy P450 tvoří superrodinu hemových enzymů. Tyto enzymy mají ve své molekule nekovalentně navázan protoporfyrin IX. V porfyrinovém kruhu je ion železa vázán čtyřmi ligandy. Pátým ligandem F_e je thiolátová síra pocházející ze sulfhydrylové skupiny cysteinu, který je součástí molekuly enzymu. Šestým ligandem cytochromu P450 v klidovém stavu může být také kyslík molekuly vody. Díky tomuto uspořádání získává cytochrom P450 výjimečné vlastnosti, a tím se odlišuje jiných hemoproteinů (3D struktura cytochromu P450 119 zobrazena na obrázku č. 6) [16].

V lidském těle se cytochromy P450 nacházejí především v játrech, v menší míře i v plicích, ledvinách, tenkém střevě, kůži, mozku a v nadledvinkách. V buňkách jsou cytochromy P450 především lokalizované v membránách endoplasmatického retikula a některé v membránách mitochondrií [16].

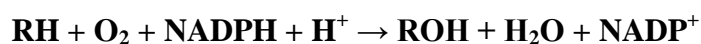


Obrázek č. 6: 3D struktura cytochrom P450 119 [20].

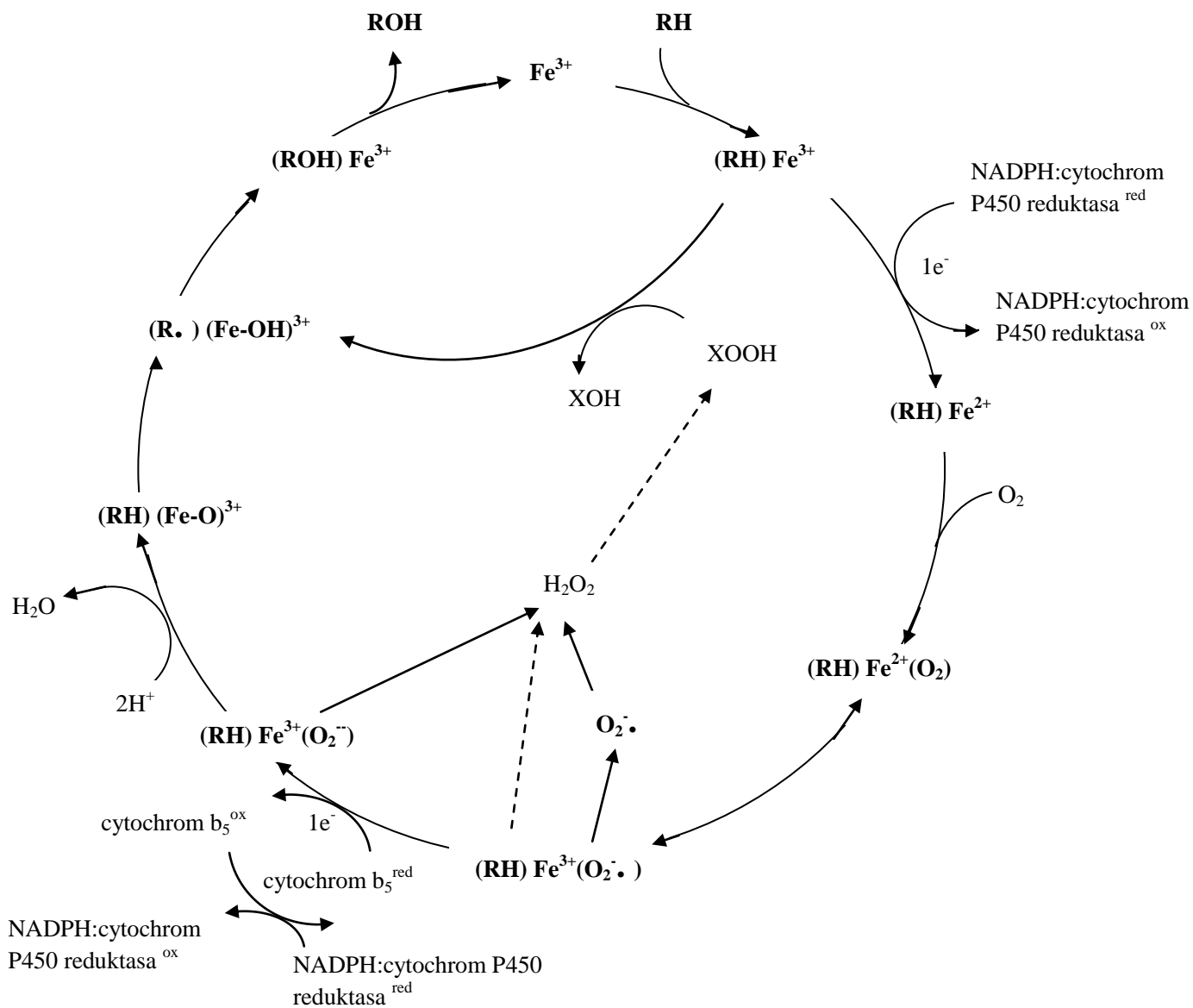
Cytochromy P450 působí v endoplasmatickém retikulu společně s **NADPH:cytochrom P450 reduktasou**, a ev. s **cytochromem b₅** a s **NADH-cytochrom b₅ reduktasou**. Dohromady tak vytváří systém monooxygenas se smíšenou funkcí. Cytochromy P450 také působí v mitochondriích společně s jinými enzymy. Většina reakcí začíná přenosem elektronů z NADPH:

- a) na NADPH:P450 reduktasu v endoplasmatickém retikulu nebo
 - b) na ferredoxin reduktasu a nehemový Fe-S protein v mitochondriích
- a dále na vlastní cytochromy P450 [16].

Většinu reakcí katalyzovaných MFO systémem lze vyjádřit rovnicí:



Redukovaný cytochrom P450 dále aktivuje molekulu kyslíku, z které je jeden atom zabudován do molekuly substrátu a druhý do molekuly vody. Pro oxidační reakce může cytochrom P450 využívat vedle molekuly kyslíku i peroxidy a peroxykyseliny, které se tak stávají donorem atomu kyslíku [16]. Sled jednotlivých reakcí katalytického cyklu MFO systému je uveden na obrázku č. 7.



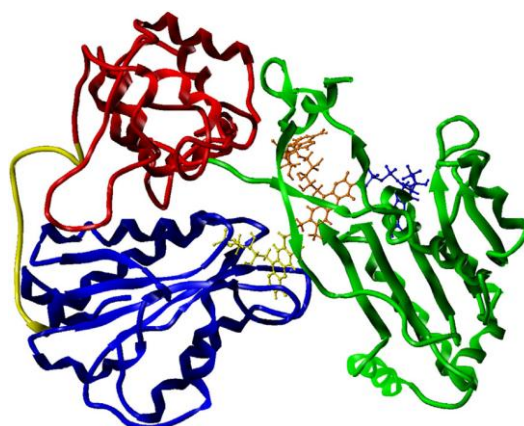
Obrázek č. 7: Reakční cyklus cytochromu P450 (upraveno podle [15, 16, 21]). RH-substrát, ROH monooxygenační produkt, Fe-atom hemového železa enzymu, XOOH-peroxykyselina (alternativní donor kyslíku).

4.1.2 NADPH:cytochrom P450 reduktasa

NADPH:cytochrom P450 reduktasa (CPR) je integrální membránový flavoprotein, který je umístěn na povrchu endoplasmatického retikula [22]. Spolu se synthasou oxidu dusnatého (NOS) se jedná o enzymy vyskytující se u savců obsahující oba FAD i FMN kofaktory. NADPH:cytochrom P450 reduktasa se vyvinula spojením dvou původních genů kódujících proteiny, které souvisely s ferredoxin-NADP⁺ reduktasou (FNR) a flavodoxinem [Iyanagu 2005]. Jak naznačuje její název, NADPH:cytochrom P450 reduktasa je hlavní redoxní partner pro cytochromy P450 *in vivo*, ale je také schopná přenášet elektrony na jiné redoxní proteiny jako je cytochrom *c*, cytochrom *b₅*, hemové oxygenasy či na elongační systém mastných kyselin [22].

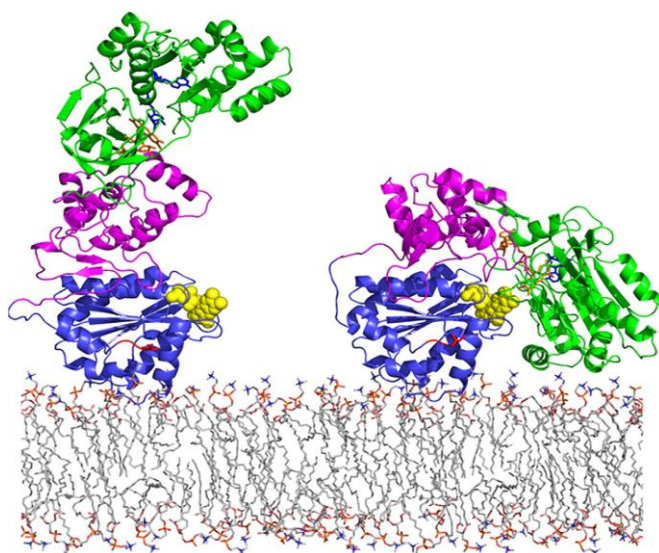
4.1.2.1 Struktura a funkce NADPH:cytochrom P450 reduktasy

Molekula NADPH:cytochrom P450 reduktasy se skládá ze 4 strukturních domén: z domény vázající FMN, spojovací domény, domény vázající FAD a domény vázající NADPH. Doména vázající FMN je strukturně podobná flavodoxinu, zatímco dvě domény C-terminálně vázající dinukleotid jsou podobné struktuře ferredoxin-NADP⁺ reduktasy. Doména vázající FMN je propojena se spojovací doménou přes dlouhý „závěs“ 15 aminokyselin. Spojovací doména je lokalizována v blízkosti propletené domény vázající FAD a NADPH. Na rozhraní mezi doménou FMN a spojující doménou jsou především hydrofilní aminokyselinové zbytky, které představují elektrostatické interakce [22]. Struktura potkaního NADPH:cytochrom P450 reduktasa je zobrazena na obrázku č. 8.



Obrázek č. 8: 3D struktura potkaní NADPH:cytochrom P450 reduktasy [22].

Mikrosomální elektronový transportní systém je založen na dvou složkách a to NADPH:cytochrom P450 reduktase a cytochromech P450. Flavin s nízkým potenciálem, FAD, přijímá dva redukční ekvivalenty z NADPH, zatímco flavin s vysokým potenciálem, FMN, působí jako jednoelektronový přenašeč z NADPH na ion železa v prosthetické hemové skupině cytochromu P450, ve kterém $\text{FMNH}\cdot/\text{FMNH}_2$ pár předá elektrony cytochromu P450 za stálého oxido-redukčního potenciálu [23]. V průběhu těchto přenosů elektronů podstoupí NADPH:cytochrom P450 reduktasa rozsáhlé změny konformace. Nedávné studie poskytly přímý experimentální důkaz, že NADPH:cytochrom P450 reduktasa existuje v rovnováze mezi dvěma konformacemi, které byly označeny jako „otevřená“ a „uzavřená“ (Obrázek č. 9). Otevřená struktura je kompatibilní s „FMN-hemovým“ elektronovým transportem, zatímco uzavřená struktura je optimální pro „FAD-FMN“ elektronový přenos.



Obrázek č. 9: Model NADPH:cytochrom P450 reduktasy v otevřené (vlevo) a uzavřené (vpravo) konformaci v lipidové dvojvrstvě. Doména vázající FMN je značena modře, spojující doména fialově, domény vázající FAD a NADPH zeleně, FMN koenzym žlutě, FAD koenzym oranžově a NADPH koenzym modře [22].

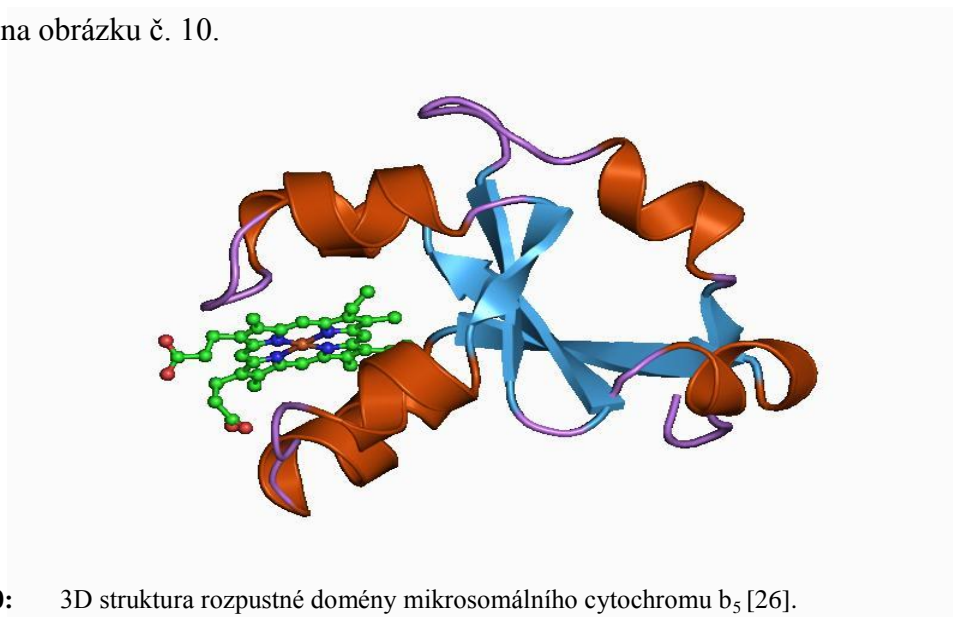
4.1.3 Cytochrom b₅

Cytochrom b₅ je hemový protein s molekulovou hmotností 17 000 Da, který je schopný přijímat a přenášet jeden elektron. S evolučního hlediska se jedná o velmi starý protein, který se nalézá jak v živočišné a rostlinné říši, tak i v houbách. Rozdílné savčí druhy vykazují přes 80% homologie v sekvenci cytosolické domény zodpovědné za vazbu hemu, zatímco C-terminální konec vykazuje mnohem větší heterogenitu [24].

Cytochrom b₅ se u savců vyskytuje ve třech isoformách lokalizovaných v endoplasmatickém retikulu, mitochondriích a v cytoplazmě zralých erytrocytů. Cytochrom b₅ přítomný v erythrocytech je rozpustný protein, který pravděpodobně vzniká posttranslační proteolýzou v endoplasmatickém retikulu [24].

4.1.3.1 Struktura a funkce cytochromu b₅

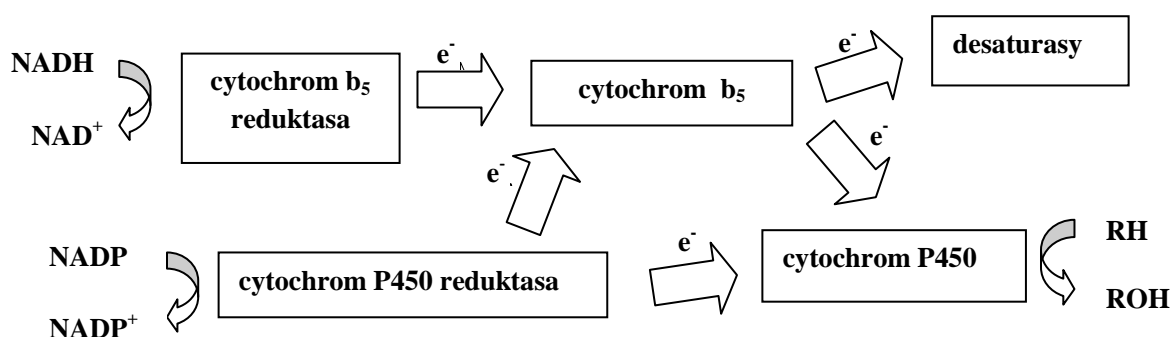
Cytochrom b₅ je malý, cylindrický membránový protein skládající se z 6 helixů a 5 β -skládaných listů [25]. Protein tvoří dvě domény, větší rozpustné hydrofilní N-terminální hemově vázané jádro a menší hydrofobní C-terminální konec, který zachycuje protein k membráně. Hemové železo je umístěno mezi dva histidylové zbytky, které chrání železo před přímou interakcí s molekulárním kyslíkem. Domény jsou vzájemně spojeny flexibilními 15 aminokyselinami, které poskytují hemové doméně dostatečnou pohyblivost k vazbě s redoxními partnery, zatímco protein je dále pevně poután k membráně. Struktura celého proteinu není dodnes rozluštěna, jelikož hydrofobní část proteinu se stala překážkou pro krystalizaci a rentgenovou difrakci [24]. Struktura rozpustné domény cytochromu b₅ je znázorněna na obrázku č. 10.



Obrázek č. 10: 3D struktura rozpustné domény mikrosomálního cytochromu b₅ [26].

Interakce cytochromu b_5 s cytochromy P450 a jejich reduktasou je řízena elektrostatickou interakcí mezi skupinami z nabitých aminokyselinových zbytků, které se vyskytují na povrchu cytochromu b_5 v okolí hemu.

Cytochrom b_5 se zapojuje jako elektronový přenašeč elektronů v řadě oxidačních reakcí v biologických tkáních [25]. Účastní se desaturace mastných kyselin, biosyntézy cholesterolu a řady dalších hydroxylačných reakcí katalyzovaných MFO systémem (Obrázek č. 11). Cytochrom b_5 může přijímat elektron buď z NADH:cytochrom b_5 reduktasy či z NADPH:cytochrom P450 reduktasy, který dále přenáší k cytochromům P450 a k dalším enzymům [24].



Obrázek č. 11: Schematické zobrazení elektronového přenosu mezi cytochromy P450, cytochromem b_5 a jejich reduktasami [24].

V řadě studií bylo prokázáno, že je cytochrom b_5 schopen stimulovat, inhibovat či nijak neovlivňovat cytochromy P450 zprostředkované reakce v závislosti na jednotlivých isoformách cytochromů P450, jejich substrátech či experimentálních podmínkách [24]. Vliv cytochromu b_5 na reakce zprostředkované cytochromy P450 se snaží vysvětlit několik hypotéz. Jedna z hypotéz vysvětluje roli cytochromu b_5 jako poskytovatele elektronu pro monooxygenasový katalytický cyklus. V monooxygenasové reakci cytochromu P450 se považuje přijetí druhého elektronu za rychlost limitující krok. Tento druhý elektron je potřebný k tvorbě aktivovaného molekulárního kyslíku navázaného na cytochrom P450. Pokud není druhý elektron přijat dostatečně rychle, dochází k rozpadu komplexu a místo oxidovaného substrátu se uvolňuje anionradikál.

Další hypotéza je založena na tvorbě komplexu mezi cytochromem P450 a cytochromem b_5 , který může přijímat v jednom kroku dva elektrony z NADPH:cytochromu P450 reduktasy. Jeden elektron je použit pro redukci cytochromu P450 a druhý pro

cytochrom b_5 . Zatímco cytochrom P450 bez cytochromu b_5 musí projít dvěma oddělenými interakcemi s NADPH:cytochrom P450 reduktasou pro dokončení jednoho katalytického cyklu, v případě přítomnosti b_5 je interakce cytochromu P450 a cytochromu b_5 s NADPH:cytochrom P450 reduktasou jednokroková. Druhý elektron je přiváděn k cytochromu P450 ihned po vazbě kyslíku. Interakce cytochromu b_5 s cytochromy P450 také vyvolává konformační změnu v cytochromu P450, která vede k rozkladu oxidovaného hemoproteinového komplexu se substrátem na produkt [24].

4.1.4 Peroxidasy

Peroxidasy patří do skupiny enzymů katalyzujících detoxikaci peroxidu vodíku (či organických peroxidů) a současně oxidují jiné látky. Oxidovanými substráty mohou být jak látky organické (fenoly či aromatické aminy), tak i látky anorganické (halogenidy). Ve většině případů jsou peroxidasy hemoglykoproteiny, jejichž prosthetickou skupinu tvoří obvykle ferriprotoporfyrin IX. Pátým ligandem hemového železa v peroxidasach je dusík histidylového zbytku proteinové části enzymu [4, 27].

4.1.4.1 Výskyt a reakce peroxidas:

Peroxidasy katalyzují velké množství různých reakcí. Podle charakteru aktivního místa rozdělujeme peroxidasy do tří skupin – hemové peroxidasy, vanadové peroxidasy a ostatní peroxidasy [27]. Hemové peroxidasy rozdělujeme na základě sekvenční homologie do dvou superrodin a to na hemové peroxidasy bakterií, hub a rostlin a živočišné peroxidasy. Živočišné peroxidasy jsou obsaženy především v kostní dřeni, mozku a myelinových pochvách nervů (myeloperoxidasa), v buňkách štítné žlázy (jodoperoxidasa účastníci se biosyntézy hormonů), v močovém měchýři a semenných váčcích [prostaglandin H synthasa (PHS)]. V buňce se peroxidasy vyskytují zejména v cytoplazmě, ale aktivita peroxidas byla zaznamenána i v endoplasmatickém retikulu a Golgiho aparátu [4].

Mezi typické reakce katalyzované peroxidasami patří jednoelektronové oxidace. Radikály vznikající v průběhu oxidace substrátů často dále reagují s dalšími látkami, které jsou přítomné v roztoku (např. s molekulárním kyslíkem či s dalšími nízkomolekulárními látkami). Některé peroxidasy ochotně atakují nukleofilní centra biologických makromolekul (především proteinů a nukleových kyselin) [4].

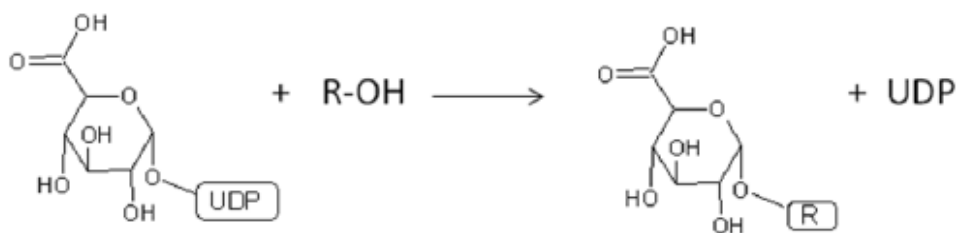
4.2 II. fáze biotransformace

Úkolem druhé fáze biotransformace jsou reakce konjugační. V této druhé fázi biotransformace xenobiotik dochází k interakci biotransformačního meziproductu vzniklého v první fázi s endogenními konjugačními látkami, kterými jsou produkty metabolismu buňky. Výsledkem této reakce je konjugát, který je zpravidla biologicky méně aktivní a rozpustnější ve vodě než je původní látka takto nepozměněná [14]. Sloučenina vstupující do konjugační reakce musí mít ve své molekule skupinu vhodnou pro reakci s konjugačními látkami za vzniku stabilního produktu. Tuto skupinu buď mají xenobiotika obsaženou ve své vlastní molekule, nebo si ji vytvoří v první fázi biotransformace [13].

4.2.1 Konjugační reakce a enzymy II. fáze biotransformace

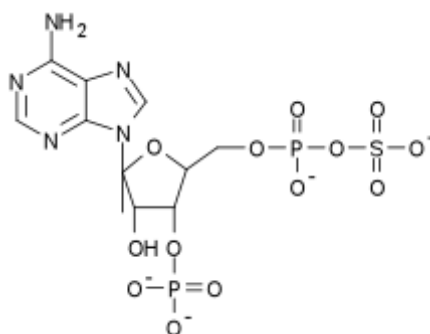
Mezi nejdůležitější konjugační reakce patří:

- *Glukuronidace* – Konjugace s kyselinou glukuronovou (schéma konjugace zobrazeno na obrázku č. 12) za tvorby glukuronosidů je považována za nejčastější konjugační reakci. Enzymem této reakce je **UDP-glukuronyltransferasa** a donorem glukuronátu je UDP-glukuronová kyselina. Více než 90% celkové aktivity UDP je lokalizováno na membránách endoplasmatického retikula.



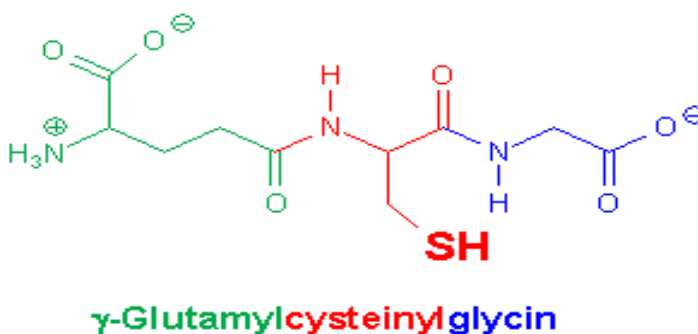
Obrázek č. 12: Schéma konjugace s UDP-glukuronovou kyselinou [28].

- *S aktivním sulfátem* – Sulfátová konjugace slouží k metabolismu hlavně alkoholů, fenolů, hydroxylaminů, alicyklických steroidů a arylaminů. Konjugačním agens je 3'-fosfoadenosin 5'-fosfosulfát (PAPS, Obrázek č. 13), který je kofaktorem enzymů **sulfottransferas**.



Obrázek č. 13: PAPS [29].

- *Konjugace s glutathionem* – Sloučeninou účastnící se těchto reakcí je tripeptid glutathion, γ -L-glutamylcysteinylglycin (Obrázek č. 14), který je silným nukleofilem. Konjugaci glutathionu s látkami obsahujícími elektrofilní atom katalyzuje **glutathion-S-transferasa**. Komplex reakcí pak vede k urychlení vyloučení toxických látek ledvinami. Na rozdíl od jiných konjugací je konjugace s glutathionem více stupňovitý proces, který je zahájen navázáním xenobiotika na SH-skupinu cysteinu v glutathionu. Dále dochází k odštěpení γ -L-glutamynové kyseliny a glycinu a poté následuje acetylace NH_2 -skupiny cysteinu, čímž dojde k její neutralizaci. Vzniklý produkt konjugační fáze se nazývá merkapturová kyselina, která je vylučována močí [13, 15, 30].

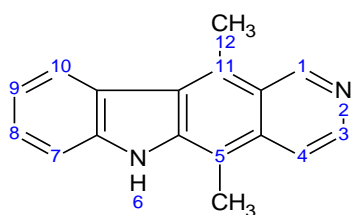


Obrázek č. 14: Glutathion [31].

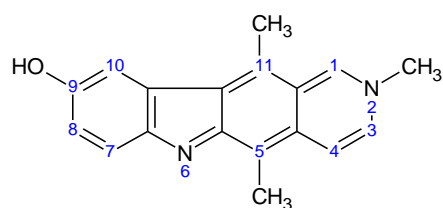
- *Acetylace* – Enzymem katalyzující acetylace je **N-acetyltransferasa** a aktivní konjugační látkou je acetyl-CoA. Acetylační reakce probíhají ve dvou krocích. V prvním kroku se přenáší acetyl z acetyl-CoA na enzym, který je tak acetylován. V druhém kroku pak dochází k acetylaci substrátu (látky obsahující aminoskupinu) a regeneraci enzymu [13, 15].
- *Konjugace s dalšími aminokyselinami* – U savců je této konjugace využito při tvorbě konjugátů žlučových kyselin, nebo u xenobiotik obsahujících karboxylovou skupinu a to za účasti taurinu a glycinu [13].
- *Konjugace s cukry* – Nejčastěji probíhá konjugace s glukosou za vzniku β - glukosidu [13].
- *N-, O-, S-methylace* – Tyto konjugace katalyzují enzymy **N-, O-, S-methyltransferasy**, jejichž koenzymem je S-adenosylmethionin. N- a O-methylace jsou důležité pro metabolismus endogenních aminů, které se tímto způsobem inaktivují [13, 15].

5 Protinádorové léčivo ellipticin

Ellipticin (5,11-dimethyl-6H-pyridol[4,3-b]karbazol, Obrázek č. 15) a některé jeho polárnější deriváty (9-hydroxyellipticin, 9-hydroxy-N²-methylellipticinium, 9-chloro-N²-methylellipticinium, 9-methoxy-N²-methylellipticinium a 9-dimethyl-amino-ethoxy-ellipticin) patří mezi alkaloidy vykazující výraznou protinádorovou aktivitu a aktivitu proti HIV. Jejich účinnost se prokázala proti rakovinným leukemickým buněčným liniím (L1210, P388, HL-60 a CCRF), lymfosarkomu, B16 melanomu, rakovině tlustého střeva (SW480), Lewisovu plicnímu karcinomu, hepatocelulárnímu karcinomu (HepG2), glioblastomu (U87MG a U373), osteosarkomu, prsnímu adenokarcinomu (MCF-7) a neuroblastomu (IMR-32, UKF-NB-3 a UKF-NB-4). Pro tyto nádorové linie je ellipticin a jeho deriváty cytotoxický již v koncentracích řádově rovných 10⁻¹⁰-10⁻⁶ [17, 32, 33]. Derivát ellipticinu 9-hydroxy-N²-methylellipticin (Obrázek č. 16) je užíván k léčbě pokročilého karcinomu prsu s kostními metastázami [4, 17, 32, 34, 35, 36].



Obrázek č. 15: Struktura ellipticinu



Obrázek č. 16: Struktura 2-methyl-9-hydroxyellipticinu

5.1 Původ ellipticinu

Ellipticin, alkaloid z rostlin čeledi *Apocynaceae* (tj. *Ochrosia borbonica*, *Excavatia coccinea*), byl poprvé izolován v r. 1958 z listů malého, stále zeleného, tropického stromu *Ochrosia borbonica* (Obrázek č. 17), který se vyskytuje v Austrálii, Madagaskaru, Havaii a na mnoha dalších ostrovech v Tichém oceánu [17, 35, 36, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44]. Byl jedním z prvních objevených přírodních alkaloidů mající planární strukturu [37].



Obrázek č. 17: *Ochrosia borbonica* (květ) [45].

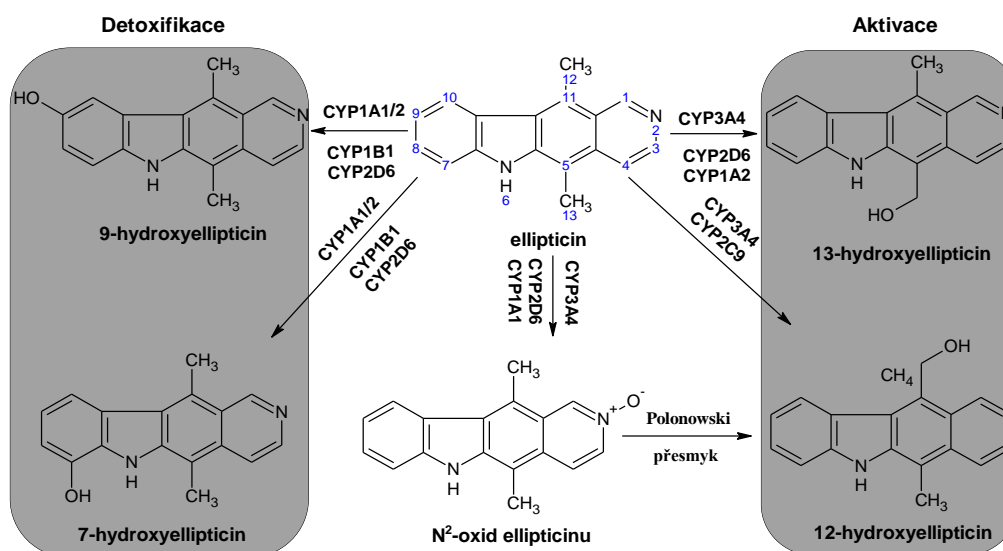
5.2 Vedlejší účinky ellipticinu a jeho derivátů

Hlavními důvody zájmu o klinické využití ellipticinu a jeho derivátů jsou jejich vysoká účinnost proti nádorovým onemocněním, relativně nízké vedlejší účinky a prakticky nulová hematologická a hepatologická toxicita. U pacientů, kteří byli léčeni perfuzí 80 mg/m² 9-hydroxy-N²-methylellypticinem se během prvního roku neobjevily žádné renální potíže, ale u 2 pacientů se vyskytla během 15-18 měsíce léčby ledvinná nedostatečnost, ta nakonec vedla k úmrtí pacientů. Nejčastějšími vedlejšími účinky při léčbě ellipticiny byly zažívací potíže (nevolnost a zvracení se objevilo u 1/3 pacientů), ale jen zřídka vedly k zastavení léčby (pouze 4 pacienti ze 100), hypertenze (u méně než 10% pacientů), svalové křeče (1/3 pacientů), únava (u většiny pacientů po 3 měsících léčby), sucho v ústech a mykózy jazyka a jícnu (u méně než 20% pacientů) [17, 46].

Nutné je i zmínit skutečnost, že ellipticin je i mutagen. Nejvíce je ellipticin mutagenní ke kmenům *Salmonella typhimurium*, bakteriofágům T4, dále ke kmenům *Neurospora crassa*, k savčím buňkám a indukuje profága lambda v *Escherchia coli* [17, 32, 33, 35].

5.3 Biotransformace ellipticinu

Ellipticin je v organismu biotransformován především v játrech a to na pět metabolitů: **7-hydroxyellipticin**, **9-hydroxyellipticin**, **12-hydroxyellipticin**, **13-hydroxyellipticin** a **N²-oxid ellipticinu** (Obrázek č. 18). Z těchto metabolitů jsou 7-hydroxyellipticin a 9-hydroxyellipticin považovány za detoxikační produkty oxidace ellipticinu, neboť jsou vylučovány z organismu, zatímco 12-hydroxyellipticin a 13-hydroxyellipticin jsou aktivační produkty oxidace ellipticinu [17, 32]. Jak je patrné z obrázku č. 15, další metabolit ellipticinu 12-hydroxyellipticin vzniká za přítomnosti biotransformujících enzymů, ale také vzniká i neenzymově z N²-oxidu ellipticinu. Ten totiž podléhá Polonowského přesmyku, při němž se tvoří právě 12-hydroxyellipticin [17, 32, 33].



Obrázek č. 18: Metabolismus ellipticinu lidskými cytochromy P450 (upraveno podle [17]).

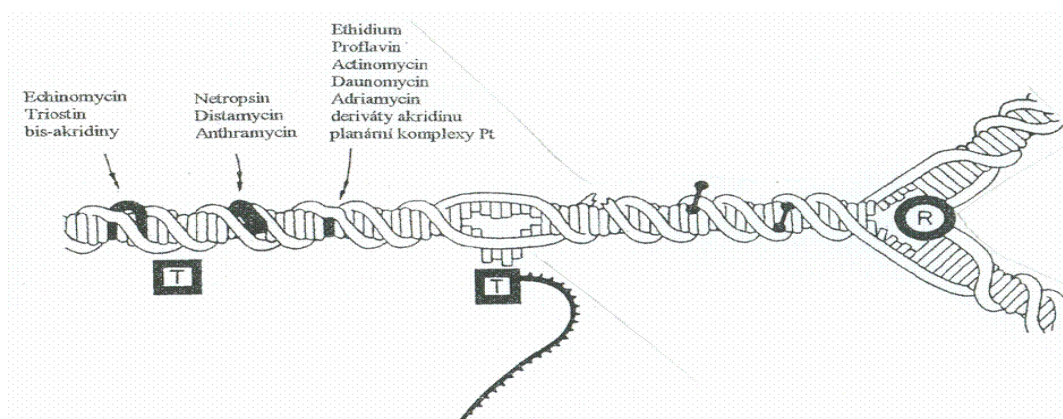
Ellipticin je v organismu oxidován především cytochromy P450. Z obrázku č. 15 je patrné, že mezi enzymy oxidující ellipticin na aktivační metabolity ellipticinu patří CYP3A4, 1A, 2C9 a 2D6, zatímco na detoxikaci participují enzymy CYP1A, 1B1 a 2D6 [17].

Ellipticin je také velmi efektivně oxidován peroxidasami, které ho aktivují za tvorby aduktů s DNA totožnými s adukty nalezenými při oxidaci ellipticinu cytochromy P450 [17, 32, 33]. O reakci ellipticinu s peroxidasami pojednává kapitola 5.4.3.

5.4 Mechanismus účinku protinádorového léčiva ellipticinu

Ellipticin a jeho polárnější deriváty působí jako silné protinádorové látky, které prostřednictvím kombinovaného mechanismu zástavy buněčného cyklu navozují apoptózu buňky [17, 32, 40, 42]. Přesný mechanismus účinku ellipticinu není však zcela přesně znám. Předpokládá se, že převládající mechanismy účinku jsou založeny na:

- **interkalaci ellipticinu do dvoušroubovicové struktury DNA** – Planární aromatická molekula ellipticinu se díky podobné velikosti a tvaru „vmezeří“ mezi purinové-pyrimidinové komplementární báze molekuly DNA, přičemž dochází k její stabilizaci, zpevnění konformace, prodloužení a částečnému rozvinutí. Vlastní interkalace ellipticinu je způsobena slabými reverzibilními hydrofobními interakcemi mezi bázemi molekuly DNA. Interakce (typy interakcí některých látek s DNA jsou zobrazeny na obrázku č. 19) mezi methylovou skupinou ellipticinu a thyminem v interkalačním místě se jeví jako zásadní pro orientaci interkalace této sloučeniny. V řadě studií řešících obecné principy interkalace slouží ellipticin díky svým fluorescenčním vlastnostem jako modelová sloučenina [17, 32, 35, 47].



Obrázek č. 19: Typy interakcí některých látek (antibiotik) s molekulou DNA – schematicky [47].

- **působení ellipticinu jako inhibitoru topoisomerasy II** – Ellipticin interaguje buď s proteinem topoisomerasy II nebo s molekulou DNA za vzniku ternárního komplexu. Vytvořený katalyticky inaktivní ternární komplex pak dále vede ke stimulaci tvorby řetězových zlomů v DNA a následně k smrti buňky. Topoisomerasa II je považována za primární buněčný cíl léčiva. Mechanismus účinku ellipticinu jako inhibitoru topoisomerasy II je však stále předmětem výzkumu [17, 32,35].

- **selektivní inhibici fosforylace protein p53** – Zajímavým zjištěním, které může vést k vysvětlení mechanismu protinádorového účinku ellipticinu, byl poznatek o zapojení tumor supresorového proteinu p53. Ellipticin a 9-hydroxyellipticin způsobují selektivní inhibici fosforylace proteinu p53, inhibicí specifické cyklin-dependentní kinasy. Nahromadění defosforylovaného mutantního proteinu p53 pak může mít za následek indukci apoptózy. [17, 32, 35, 42].
- **inhibici oxidační fosforylace** – Ellipticin inhibuje mitochondriální oxidační fosforylaci, čímž se narušuje energetická rovnováha v buňkách (snížení obsahu ATP v buňkách), což vede v jejich zániku. Studie mechanismu cytotoxické a protinádorové aktivity naznačují, že tyto aktivity by mohly být založeny na indukci stresu endoplasmatického retikula [4, 17, 32, 35].
- **inhibici telomeras** – Ellipticin působí také jako inhibitor telomeras [17, 35].

Všechny uvedené mechanismy účinku ellipticinu jsou založeny zejména na nespecifickém působení. Interkalace ellipticinu do struktury DNA a inhibice topoisomerasy II se objevují ve všech typech buněk bez ohledu na jejich metabolické schopnosti. Tato skutečnost je ale v rozporu s poměrně úzkou specifitou účinku ellipticinu proti nádorovým onemocněním. Ellipticin je specifický pouze k určitým typům neoplasie. Specifické působení ellipticinu musí tedy vycházet ještě z jiných mechanismů účinku, dosud neodhalených. Jedním s vysvětlením může být rozdílná lidská genetická výbava enzymy, které jsou zásadní pro biotransformaci tohoto léčiva [4, 17, 32, 48]. Příslušné enzymy mohou aktivovat ellipticin na účinnější polárnější deriváty, které pak nádorové buňky poškozují efektivněji. Nedávné studie tento nový mechanismus účinku ellipticinu potvrdily:

- **tvorbu kovalentních aduktů metabolitů ellipticinu s DNA** – Ellipticin se po enzymové aktivaci cytochromy P450 a/nebo peroxidasami kovalentně váže na DNA *in vitro* a *in vivo* a vytváří tak adukty s DNA [4, 17, 32, 49].

5.4.1 Tvorba aduktů ellipticinu s DNA

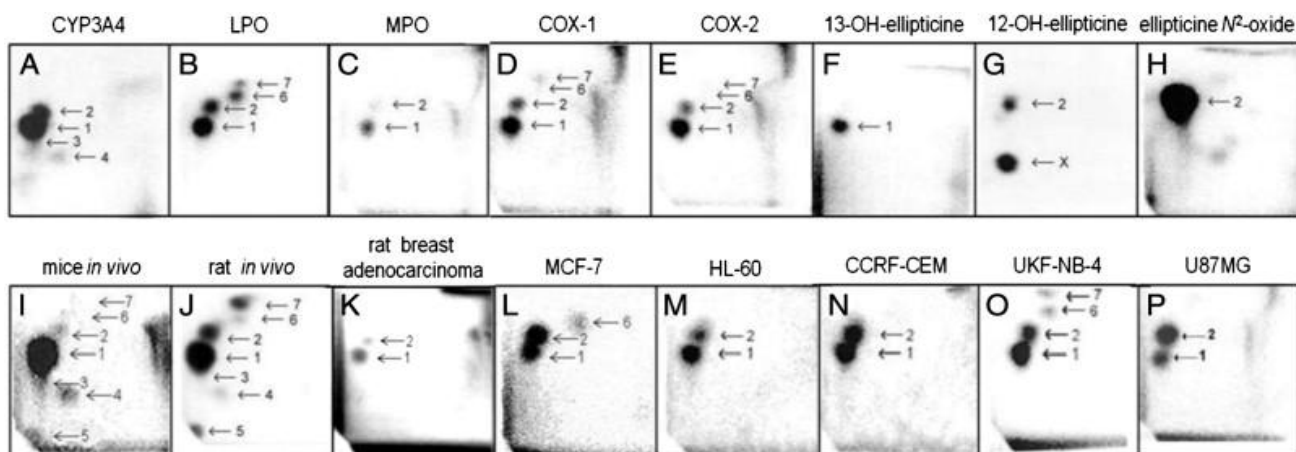
V průběhu biotransformace ellipticinu vznikají aktivní metabolity, které se kovalentně váží na DNA a vytvářejí tak adukty s DNA. Tato skutečnost byla potvrzena pomocí dvou nezávislých metod a to metodou „³²P-postlabeling“ a použitím [³H] ellipticinu [32, 39]. Tvorba kovalentních aduktů ellipticinu s DNA byla detekovaná *in vitro* [32, 33, 39], ale i *in vivo* v DNA izolované v různých tkáních potkana [32] a myši [49].

Tyto adukty byly dále detekovány v leukemických buňkách (HL-60, Obrázek č. 20M), v buněčných liniích lidského prsního adenokarcinomu (MCF-7, Obrázek č. 20L), v neuroblastomech (IMR-32, UKF-NB-3 a UKF-NB-4, Obrázek č. 20O), v buňkách glioblastomu (U87MG, Obrázek č. 20P) [17, 48].

Ve všech testovaných systémech byla zjištěna tvorba minimálně dvou aduktů ellipticinu s DNA a to majoritního aduktu a minoritního aduktu. Vznik majoritního aduktu (**adukt 1**, skvrna 1 na obrázku č. 20) je závislý na přítomnosti aktivačních enzymů, zatímco minoritní adukt (**adukt 2**, skvrna 2 na obrázku č. 20) vzniká i bez jejich přítomnosti, pravděpodobně aktivací ellipticinu autooxidací. Metabolity ellipticinu zodpovědné za tvorbu těchto aduktů s DNA jsou 13-hydroxyellipticin a 12-hydroxyellipticin. Majoritní adukt 1 je tvořen vazbou 13-hydroxyellipticinu na DNA, zatímco 12-hydroxyellipticin vazbou na DNA vytváří adukt 2. Metabolit 12-hydroxyellipticin, jak bylo uvedeno výše, vzniká dvěma cestami, jednak přímo oxidací ellipticinu a jednak Polonowského přesmykem z N²-oxidu ellipticinu. [17, 32, 48].

O struktuře těchto dvou aduktů je zatím známo pouze to, že jsou tvořeny výše zmíněnými metabolity ellipticinu, respektive dvěma reaktivními karbeniovými ionty, **ellipticin-13-ylia** a **ellipticin-12-ylia** (Obrázek č. 23), které vznikají spontánním štěpením 13-hydroxyellipticinu a 12-hydroxyellipticinu [17, 32]. Cílovým deoxynukleotidem pro vazbu reaktivních metabolitů na DNA je deoxyguanosin. Jelikož tyto reaktivní metabolity jsou generovány cytochromy P450, lze předpokládat, že se také mohou vázat na aktivní místo cytochromů P450, a tím inaktivovat cytochromy P450 [17]. Tato skutečnost však není prokázána experimentálně.

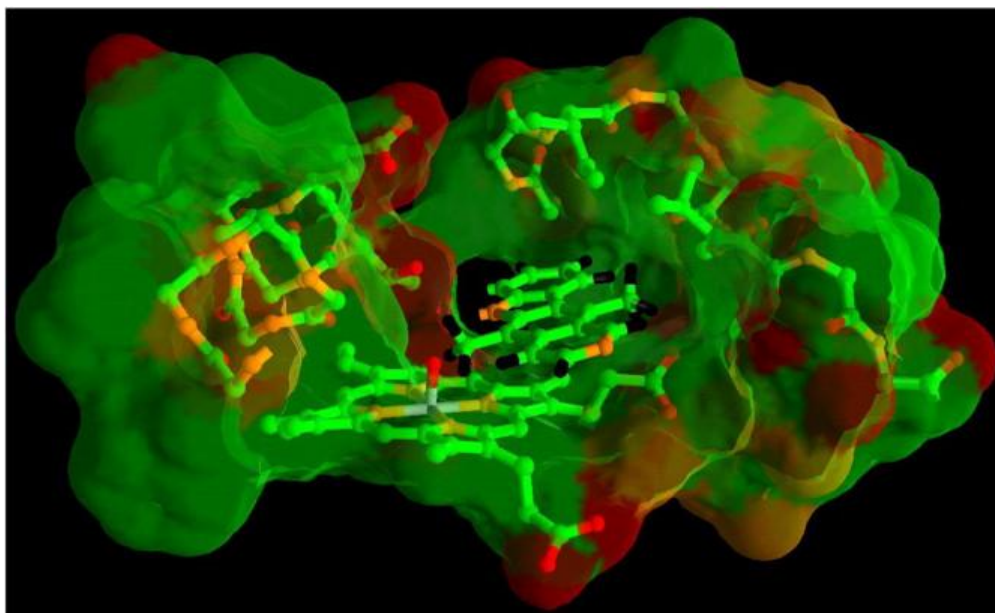
Adukty ellipticinu s DNA byly detekovány v nádorových buňkách, ale i v buňkách zdravých. Pokud jde o tvorbu aduktů ellipticinu s DNA ve zdravých buňkách, z experimentálních modelů *in vivo* vyplývá, že ellipticin aktivovaný cytochromy P450 může v těchto buňkách vykazovat vedlejší genotoxický efekt. Proto bylo nutné zjistit perzistenci těchto aduktů ve zdravých tkáních. Experimentálně se sledovalo množství aduktů ellipticinu s DNA, respektive jejich perzistence v necílových (zdravých) tkáních (játra, plíce, ledviny, slezina, srdce a mozek) na zvířecím modelu (potkan), kterému byl podáván ellipticin. Pozitivní je skutečnost, že pouze malá množství některých aduktů ellipticinu s DNA (pouze adukty 1, 2, 4 a 5, znázorněny na obrázku č. 20) bylo detekováno v těchto studovaných necílových tkáních. Tato skutečnost demonstruje, že zdravé tkáně potkana jsou schopné během určité doby po podání ellipticinu na základě vlastního efektivního opravného systému odstranit některé léze vyvolané ellipticinem v DNA, a tím eliminovat potenciální vedlejší genotoxický účinek ellipticinu během léčby [17, 32, 48].



Obrázek č. 20: Autoradiografie aduktů tvořených aktivovaným ellipticinem s DNA detekovaných metodou „³²P-postlabeling“. DNA inkubována s ellipticinem a s CYP3A4 (A), s hovězí LPO (B), s lidskou MPO (C), s ovčí COX-1 (D), s lidskou COX-2 (E). Dále jsou na obrázku ukázány adukty vzniklé z 13-hydroxyellipticinu (F), z 12-hydroxyellipticinu (G), z N²-oxidu ellipticinu (H), adukty v DNA jater myší (I), v DNA jater Wistar potkanů (J), v DNA buněk prsního adenokarcinomu potkanů Wistar (K), v DNA MCF-7 buněk prsního adenokarcinomu (L), v DNA leukemických buněk HL-60 (M), v DNA CCRF-CEM buněk (N), v DNA UKF-NB-4 buněk neuroblastomu (O) a v DNA U87MG buněk glioblastomu (P), [17].

5.4.2 Mechanismus oxidace ellipticinu katalyzované cytochromy P450

Jak bylo pojednáno výše, ellipticin je cytochromy P450 oxidován na pět metabolitů, 7-hydroxyellipticin, 9-hydroxyellipticin, 12-hydroxyellipticin, 13-hydroxyellipticin a N²-oxid ellipticinu (Obrázek č. 18). Tvorba jednotlivých metabolitů je katalyzována různými isoformami cytochromů P450. Z lidských cytochromů P450 jsou CYP1A1, 1A2 a 1B1 zodpovědné za tvorbu 7-hydroxyellipticinu a 9-hydroxyellipticinu, CYP3A4 a 2C9 pak za tvorbu metabolitu 12-hydroxyellipticinu. Hlavním enzymem oxidujícím ellipticin na metabolit 13-hydroxyellipticin je CYP3A4, následován CYP1A2, 2D6 a 2C9. N²-oxid ellipticinu je tvořen především prostřednictvím CYP2D6, v menší míře stejně jako 13-hydroxyellipticin CYP3A4 [4, 17, 32,]. CYP3A4 se převážně vyskytuje v lidských jaterních mikrosomech (~30%). Důležitost CYP3A4 pro tvorbu 13-hydroxyellipticinu byla potvrzena počítačovým modelováním (Obrázek č. 21). Při experimentech s lidskými jaterními mikrosomy a lidskými rekombinantními cytochromy P450 bylo zjištěno, že množství 12-hydroxyellipticinu vytvořeného lidskými rekombinantními cytochromy P450 je nízké, oproti jeho množství vytvořeného lidskými jaterními mikrosomy, a je srovnatelné s množstvím tvořeného 9-hydroxyellipticinu. Toto zjištění potvrzuje, že 12-hydroxyellipticin je v lidských jaterních mikrosomech také tvořen neenzymově a to prostřednictvím Polonowského přesmyku N²-oxidu ellipticinu [17, 32].



Obrázek č. 21 : Lidský CYP3A4 se zakotvenou molekulou ellipticinu v aktivním centru enzymu [17].

Analogie v cytochomech P450 zapojených do tvorby metabolitů ellipticinu v lidském a potkaním jaterním mikrosomálním systému prokazují, že potkan může být vhodným modelem pro sledování osudu ellipticinu v lidském organismu *in vivo* [17, 32, 48].

Toxický efekt ellipticinu vůči nádorovým buňkám souvisí s množstvím aduktů tvořených ellipticinem s DNA, a je závislý na expresi CYP1A1, 1B1 s 3A4 v těchto buňkách. Díky tomuto zjištění lze ellipticin považovat za „proléčivo“, jehož farmakologický účinek je závislý na jeho enzymové aktivaci v cílových tkáních [17, 36, 41].

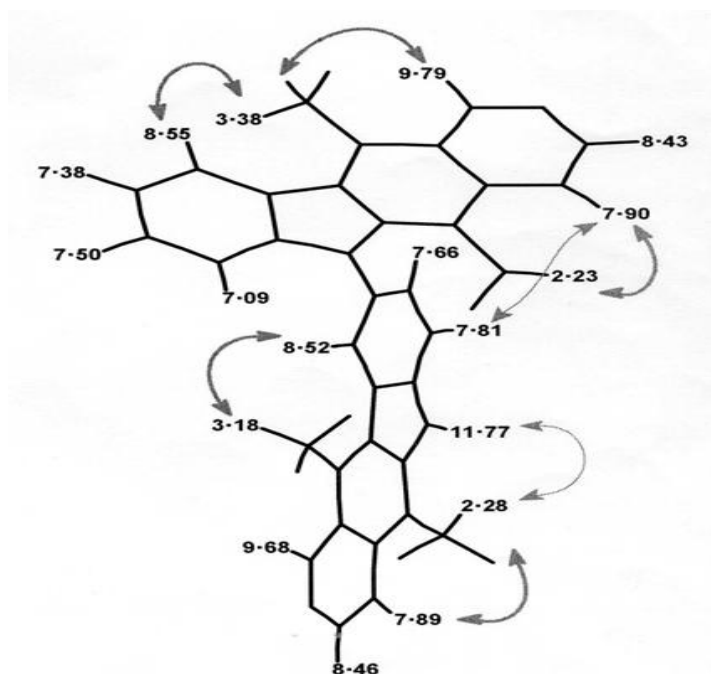
5.4.3 Mechanismus oxidace ellipticinu katalyzované peroxidasami

Ellipticin, jak bylo zmíněno výše, je oxidován kromě cytochromy P450 také peroxidasami [17, 33]. Zatímco cytochromy P450 jsou exprimovány především v buňkách prsních nádorů *in vivo*, v jiných tkáních citlivých vůči ellipticinu je jejich množství mnohem nižší. Například ellipticin je cytotoxický vůči leukemickým buňkám HL-60 (adukty ellipticinu s DNA jsou znázorněny na obrázku č. 20M) a pro leukemické T-buňky CCRF-CEM (adukty ellipticinu s DNA jsou znázorněny na obrázku č. 20N), ačkoliv množství cytochromů P450 exprimovaných v těchto buňkách je nízké. Citlivost vůči ellipticinu se dá vysvětlit přítomností dalších enzymů zapojených do oxidace ellipticinu a to peroxidas, které jsou exprimovány v těchto maligních tkáních [17, 32, 33].

Mezi peroxidasy, které oxidují ellipticin *in vitro* patří hovězí laktoperoxidasa (LPO), lidská myeloperoxidasa (MPO), ovčí cyklooxygenasa (COX-1), lidská cyklooxygenasa (COX-2) a křenová peroxidasa (HPR). Tyto peroxidasy oxidují ellipticin na reaktivní metabolity, které se váží na DNA [17, 32, 33, 41].

Ellipticin je *in vitro* peroxidasami oxidován na dva metabolity, které byly identifikovány za použití NMR spektroskopie. Majoritní produkt oxidace ellipticinu peroxidasami je **dimer ellipticinu** (Obrázek č. 22). Dimer ellipticinu vzniká ze dvou molekul ellipticinu, které jsou spojeny prostřednictvím atomu dusíku N⁶ pyrrolového kruhu jedné molekuly ellipticinu a atomu uhlíku C9 druhé molekuly ellipticinu [17, 32, 33]. Minoritním metabolitem oxidace ellipticinu je **N²-oxid ellipticinu** [17, 33]. Metabolity ellipticinu aktivované peroxidasami se kovalentně váží na DNA a dávají vzniknout aduktům s DNA, které jsou shodné s těmi, které jsou generované z metabolitů (12-hydroxy a 13-hydroxyellipticin) tvořených cytochromy P450 [4, 17, 32, 33, 41].

Peroxidasa metabolizuje ellipticin jednoelektronovou oxidací, při které vznikají volné radikály, které v závislosti na prostředí tvoří buď ellipticinové dimery, nebo, jak bylo výše uvedeno, adukty s DNA. [4, 17, 32, 33].

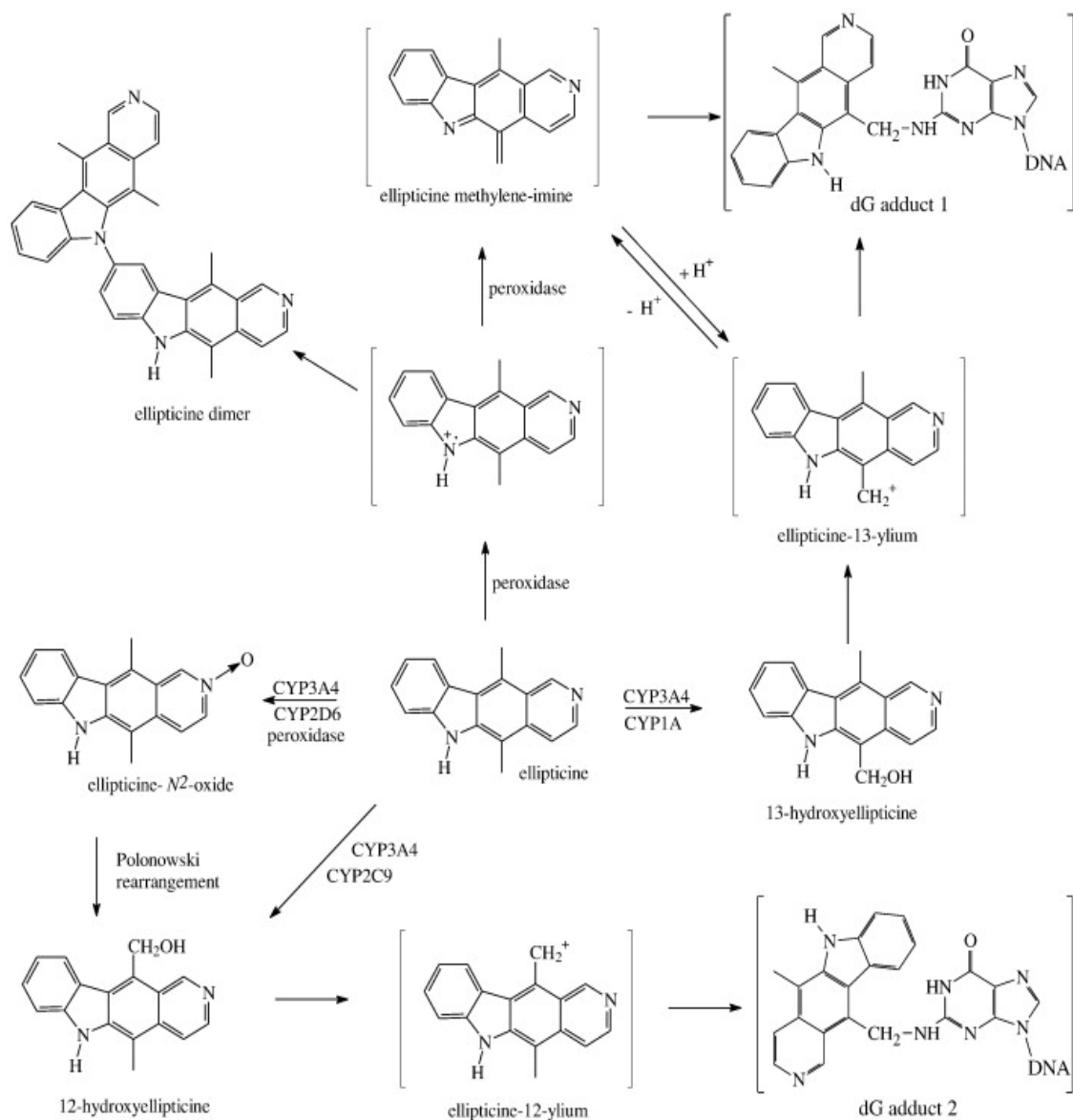


Obrázek č. 22: Struktura dimeru ellipticin tvořeného peroxidasami [4].

Mechanismus tvorby obou metabolitů ellipticinu vzniklých peroxidasami je uveden na obrázku č. 23. Ačkoli produkt dvouelektronové oxidace, **methylen-imin ellipticinu** (Obrázek č. 23), nebyl dosud za experimentálních podmínek prokázán, je zřejmé, že právě tento metabolit je zodpovědný za tvorbu hlavního aduktu s DNA (adukt 1). Toto tvrzení bylo potvrzeno studiemi, které se zabývaly stechiometrií reakce oxidace ellipticinu peroxidem vodíku [17, 33]. Jak je patrné z obrázku č. 23, adukt 1 je stejný jako adukt generovaný z karbeniového iontu ellipticin-13-ylia, který vzniká z 13-hydroxyellipticinu generovaného při oxidaci ellipticinu cytochromy P450. Právě identita struktury aduktu 1 generovaného z 13-hydroxyellipticinu tvořeného při oxidaci ellipticinu peroxidasami umožňuje předpovědět strukturu metabolitu ellipticinu, který odpovídá methylen-iminu ellipticinu. Takový reaktivní metabolit, který by generoval shodné karbeniové ionty jako 13-hydroxyellipticin, je ellipticin-13-ylum. 13-hydroxyellipticin působí tedy jako prekurzor tvorby methylen-iminu ellipticinu. Michaelovskou adicí dále vzniká z methylen-iminu

ellipticinu adukt, který je identický s aduktem generovaným karbeniovým iontem [4, 17, 32, 33, 41]. Druhý adukt s DNA (adukt 2) vzniká obdobně přeměnou 12-hydroxyellipticinu přes karbeniový ion jako u aktivace ellipticinu cytochromy P450, tak při peroxidasové aktivaci. Jak již bylo zmíněno výše, 12-hydroxyellipticin vzniká také Polonowského přesmykem z N²-oxidu ellipticinu. N²-oxid ellipticinu je tedy společným metabolitem peroxidasové reakce a reakce řízené cytochromy P450. Obě tyto metabolické cesty poskytují stejný produkt-adukt 2 [17, 32, 33].

Vedle dvou hlavních aduktů tvořených aktivovaným elipticinem s DNA vznikají ještě dva další adukty, které byly nalezeny jako adukty tvořené inkubací ellipticinu s lidskými jaterními a ledvinnými mikrosomy a v DNA několika tkáních potkanů a myší vystavených ellipticinu. Dalšími adukty pozorovanými *in vivo* byly adukty 3-5, které ale nebyly zjištěny v systémech peroxidas [17, 33]. Mechanismus vzniku a struktura těchto minoritních aduktů je dosud předmětem výzkumu.



Obrázek č. 23: Oxidace ellipticinu lidskými cytochromy P450 a peroxidasami na metabolity, které tvoří adukty s DNA. Sloučeniny v závorkách nebyli doposud experimentálně zjištěni [17].

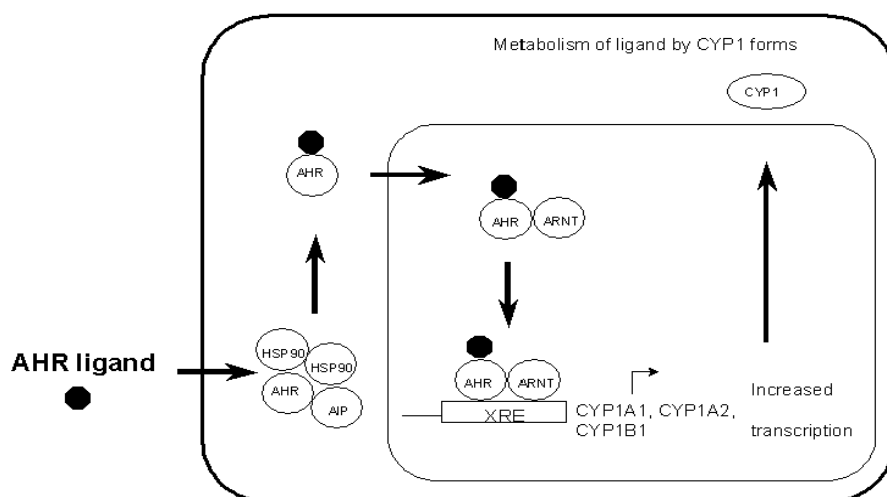
5.5 Indukční potenciál ellipticinu na enzymy biotransformující léčiva

Indukce enzymů hraje významnou roli ve vývoji a diferenciaci buněk, v regulaci klíčových enzymů metabolických dějů, zasahuje do mechanismu účinku řady hormonů a je také adaptivní odpovědí organismu na některá xenobiotika. Takovou reakcí se organismus snaží bránit před jejich kumulací a toxicitou [15].

5.5.1 Indukce cytochromů P450 aktivujících ellipticin *in vitro* a *in vivo*

Nejúčinnějšími enzymy z cytochromů P450 aktivujících ellipticin *in vitro* na majoritní adukt ellipticinu s DNA jsou lidský CYP3A4 a potkaní CYP3A1. Experimenty *in vivo* však prokázaly, že do metabolické aktivace ellipticinu se také zapojují i další významné enzymy a to cytochromy P450 podrodiny 1A. Tyto enzymy jsou ovšem v rekonstituovaném systému *in vitro* mnohem méně aktivní než CYP3A1. Naopak se zapojují zejména do tvorby detoxikačních produktů ellipticinu, 9-hydroxy- a 7-hydroxyellipticinu. Jedno z vysvětlení tohoto rozporu může být fakt, že ellipticin je schopen indukovat CYP1A. Indukce CYP1A1 a CYP1A2 v játrech, v plicích a v ledvinách vede k potenciaci tvorby jednotlivých metabolitů a tím i tvorby aduktů s DNA. Tímto způsobem je ellipticin schopný do určité míry ovlivňovat vlastní biologickou aktivitu [17, 33, 48, 50].

Možným vysvětlením mechanismu působení ellipticinu jako induktora CYP1A *in vitro* a *in vivo* může být fakt, že se ellipticin váže na receptor pro polyaromatické uhlovodíky (AhR). Po vazbě ellipticinu na AhR dochází k přemístění AhR z cytosolu do jádra, kde dimerizuje s AhR jaderným translokátorem (ARNT). Komplex AhR-ARNT funguje jako transkripční aktivátor vázající se do regulační oblasti genu pro cytochromy P450 a dochází tak ke stimulaci jejich transkripce [17, 32, 33, 50]. Schéma indukce CYP1A zprostředkované navázáním xenobiotika na komplex AhR-ARNT zobrazuje obrázek č. 24.



Obrázek č. 24: Schéma indukce CYP1 zprostředkované vazbou xenobiotika na komplex AhR-ARNT. AhR-aryl uhlovodíkový receptor, HSP90 (heat shock protein 90)-chaperon, ARNT-jaderný translokátor, XRE-xenobiotikum [51].

5.5.2 Vliv cytochromu b₅ na aktivaci ellipticinu CYP1A1/2

Jiným možným vysvětlením různého podílu jednotlivých cytochromů P450 na oxidační aktivaci ellipticinu *in vitro* a *in vivo* může být přítomnost dalších proteinů v membráně endoplasmatického retikula a jejich vliv na aktivaci ellipticinu cytochromy P450 *in vivo*. Jedním z takových proteinů může být cytochrom b₅. Z výsledků provedených v laboratoři, kde byla tato bakalářská práce vypracována, bylo zjištěno, že zvyšující se množství cytochromu b₅ v systémech cytochromů P450 podrodiny 1A1 a 1A2 má za následek významnou změnu v podílu tvorby jednotlivých metabolitů ellipticinu. Jmenovitě se v případě CYP1A snížil vznik detoxikačních metabolitů (7-hydroxyellipticin, 9-hydroxyellipticin), zatímco tvorba 12-hydroxyellipticinu, 13-hydroxyellipticinu a N²-oxidu ellipticinu se naopak zvýšila, což vedlo k zvýšení tvorby kovalentních aduktů ellipticinu s DNA. Cytochrom b₅ výrazně stimuluje oxidaci ellipticinu cytochromy P450 1A1/2 na metabolity vázající se na DNA a způsobuje tedy zvýšení farmakologického účinku ellipticinu. Efekt cytochromu b₅ je patrnější v podmínkách *in vivo*, protože ellipticin indukuje i expresi cytochromu b₅, a tím dochází ke zvýšení jeho hladiny [30, 48].

6 Závěr

Nádorová onemocnění představují závažný celospolečenský problém. Celosvětové statistiky neúprosně vykazují stále narůstající trend v počtu nádorových onemocnění. Česká republika patří v této neradostné statistice na jedno z předních míst. V současnosti, i přes významné pokroky v oblasti léčby, není pokrok v protinádorové terapii zcela uspokojivý. Je to způsobeno především povahou nádorového onemocnění. Nádorové onemocnění vykazují vysokou heterogenitu, což zamezuje nalézt účinné univerzální léčivo vůči všem typům nádorů. V nádorové chemoterapii se využívá několik léčebných metod, z nichž tři lze považovat za metody hlavní. Je to chirurgická léčba, radioterapie a chemoterapie. Chemoterapie je dnes nepostradatelnou metodou léčby nádorových onemocnění a u některých typů nádorových onemocnění si udržuje prioritní postavení.

Protinádorový alkaloid ellipticin může představovat velmi významné proléčivo, jehož protinádorová účinnost a/nebo genotoxický efekt je závislý na enzymové aktivaci cytochromy P450 a peroxidasami. Tyto aktivační enzymy oxidují ellipticin na aktivní metabolity 12-hydroxy- a 13-hydroxyellipticin, které se spontánně rozpadají na reaktivní karbeniové ionty, ellipticin-12-ylum a ellipticin-13-ylum, vážící se kovalentně na deoxyguanosin v DNA. Oba tyto reaktivní ionty se zdají být výbornými kandidáty pro cílenou terapii do nádorových tkání. I přes to, že mechanismus působení ellipticinu nebyl dosud zcela rozluštěn, je zájem o klinické využití ellipticinu značný a jsou tak stále vyvíjeny nové postupy cíleně směřovaných léčiv na bázi ellipticinu.

7 Seznam použité literatury

- [1] *Zdravě.cz* [online]. [cit. 2011-05-04]. Světový den boje proti rakovině. Dostupné z WWW: <http://rakovina-nador.zdrave.cz/svetovy-den-boje-proti-rakovine/>.
- [2] *Česká onkologická společnost* [online]. [cit. 2011-05-04]. Co musíte vědět o onkologických onemocněních. Dostupné z WWW: http://www.linkos.cz/pacienti/co_vedet.php.
- [3] *NICM* [online]. [cit. 2011-05-04]. Nádorová onemocnění. Dostupné z WWW: <http://www.icm.cz/nadorova-onemocneni>.
- [4] STIBOROVÁ, M. *Studium enzymů biotransformujících xenobiotika jako nástroj k poznání mechanismu působení karcinogenů a konstrukce kancerostatik nové generace* [online]. [cit. 2011-01-16]. Dostupné z WWW: <http://archiv.otevrena-veda.cz/users/Image/default/C2Seminare/MultiObSem/001.pdf>.
- [5] *Zdravě.cz* [online]. [cit. 2011-05-04]. Rakovina - zákeřné a obávané onemocnění. Dostupné z WWW: <http://rakovina-nador.zdrave.cz/rakovina-zakerne-a-obavane-onemocneni/>.
- [6] *Vesmír* [online]. [cit. 2011-05-04]. Úspěšnost léčby nádorových onemocnění cytostatiky. Dostupné z WWW: <http://www.vesmir.cz/clanek/uspesnost-lecby-nadorovych-onemocneni-cytostatiky>.
- [7] KLENER, P. *Protinádorová chemoterapie*. Praha : Galén, 1996.
- [8] SLÍVA, J.; VOTAVA, M. *Farmakologie*. Praha : Triton, 2010.
- [9] HAMPL, F.; RÁDL, S.; PALEČEK, J. *Farmakologie*. Praha : VŠCHT Praha, 2007.
- [10] HYNIE, S. *Farmakologie v kostce*. Praha : Triton, 2001.
- [11] HYNIE, S. *Speciální farmakologie*. Praha : Karolinum, 2003.
- [12] *Die Johannes Gutenberg-Universität Mainz* [online]. [cit. 2011-05-20]. Arzneistoffe - 8. Semester Pharmazie Universität Mainz. Dostupné z WWW: <http://www.google.cz/imgres?imgurl=http://www.pharmazie.uni->

[mainz.de/Fachschafft/8sem/Arzneistoffe/Methotrexat.gif&imgrefurl=http://www.pharmazie.uni-mainz.de/Fachschafft/8sem/Arzneistoffe.html&usq=__OuSye_li9eDvv60YRVnYs7dJqe4=&h=138&w=401&sz=3&hl=cs&start=0&sig2=BqpgZPufE5OHgdElcQec4A&zoom=1&tbnid=UZTbCEQZyWYG4M:&tbnh=75&tbnw=217&ei=C3DWTdjaEMPRtAaJkum5Bw&prev=/search%3Fq%3DMethotrex%25C3%25A1t%26hl%3Dcs%26client%3Dfirefox-a%26hs%3DGtQ%26sa%3DX%26rls%3Dorg.mozilla:cs:official%26biw%3D1264%26bih%3D522%26tbnid%3Ddisch%26prmd%3Ddivns&itbs=1&iact=rc&dur=647&sqi=2&page=1&ndsp=12&ved=1t:429,r:4,s:0&tx=118&ty=32](http://www.pharmazie.uni-mainz.de/Fachschafft/8sem/Arzneistoffe/Methotrexat.gif&imgrefurl=http://www.pharmazie.uni-mainz.de/Fachschafft/8sem/Arzneistoffe.html&usq=__OuSye_li9eDvv60YRVnYs7dJqe4=&h=138&w=401&sz=3&hl=cs&start=0&sig2=BqpgZPufE5OHgdElcQec4A&zoom=1&tbnid=UZTbCEQZyWYG4M:&tbnh=75&tbnw=217&ei=C3DWTdjaEMPRtAaJkum5Bw&prev=/search%3Fq%3DMethotrex%25C3%25A1t%26hl%3Dcs%26client%3Dfirefox-a%26hs%3DGtQ%26sa%3DX%26rls%3Dorg.mozilla:cs:official%26biw%3D1264%26bih%3D522%26tbnid%3Ddisch%26prmd%3Ddivns&itbs=1&iact=rc&dur=647&sqi=2&page=1&ndsp=12&ved=1t:429,r:4,s:0&tx=118&ty=32) >.

- [13] KNEJZLÍK, Z.; KÁŠ, J.; RUML, T. Mechanismus vstupu xenobiotik do organismu a jejich detoxikace. *Chemické listy*. 2000, 94, 913-918.
- [14] RUSEK, V. *Základy toxikologie a úvod do problematiky hygieny a bezpečnosti práce v chemické laboratoře* [online]. Pardubice : Univerzita Pardubice, 2001 [cit. 2011-02-17]. Dostupné z WWW: <http://webak.upce.cz/~uozp/skripta/uozp-skripta-tox-rusek.pdf>.
- [15] KVASNIČKOVÁ, E. *Xenobiochemie*. Praha : Karolinum, 1995.
- [16] STIBOROVÁ, M.; HUDEČEK, J.; HODEK, P.; FREI, E. Význam cytochromů P450 pro lidské zdraví. *Chemické listy*. 1999, 93, 229-237.
- [17] STIBOROVÁ, M.; RUPERTO VÁ, M.; FREI, E. Cytochrome P450- and peroxidase-mediated oxidation of anticancer alkaloid ellipticine dictates its anti-tumor efficiency. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2011, 1, 175-185.
- [18] ANZENBACHER, P.; ANZENBACHEROVÁ, E. Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics. *Cellular and molecular life sciences*. 2001, 58, 737-747.
- [19] PURNAPATRE, K.; KHATTAR, S. K.; SINGH SAINI, K. S. Cytochrome P450s in the development of target-based anticancer drugs. *Cancer letters*. 2008, 259, 1-15.
- [20] *Kagawa university* [online]. [cit. 2011-04-20]. Dostupné z WWW: <http://www.google.cz/imgres?imgurl=http://www.wikiskripta.eu/images/f/f3/Metot>

http://www.wikiskripta.eu/index.php/Metotrexat&usg=__HHYPqMLCt_RAVf9dACBEdAYj-Bs=&h=139&w=287&sz=3&hl=cs&start=0&zoom=1&tbnid=Ie_pIEY634VQxM:&tbnh=85&tbnw=176&ei=3rvCTYbRGsv14Qa55vmGBQ&prev=/search%3Fq%3DMetotrex%25C3%25A1t%26hl%3Dcs%26client%3Dfirefox-a%26hs%3DWw0%26sa%3DX%26rls%3Dorg.mozilla:cs:official%26biw%3D1280%26bih%3D538%26tbnid%3Disch%26prmd%3Divns&itbs=1&iact=hc&vpx=453&vpy=105&dur=1778&hovh=111&hovw=229&tx=76&ty=50&page=1&ndsp=15&ved=1t:429,r:1,s:0.

- [21] ŘEMÍNEK, R. *Cytochromy P450*. Brno, 2006. Bakalářská práce. Masarykova univerzita.
- [22] LAURSEN, T.; JENSEN, K.; MØLLER, B. L. Conformational changes of the NADPH-dependent cytochrome P450 reductase in the course of electron transfer to cytochromes P450. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2011, 1814, 132-138.
- [23] IYANAGI, T. Structure and function of NADPH-cytochrome P450 reductase and nitric oxide synthase reductase domain. *Biochemical and biophysical research communications*. 2005, 338, 520-528.
- [24] KOTRBOVÁ, V.; AIOMOVÁ, D.; INGR, M.; BOŘEK-DOHANSKÁ, L.; MARTÍNEK, V.; STIBOROVÁ, M. Preparation of a biologically active apo-cytochrome b5 via heterologous expression in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*. 2009, 66, 203-209.
- [25] SCHENKMAN, J. B.; JANSSON, I. The many roles of cytochrome b5. *Pharmacology&Therapeutics*. 2003, 97, 139-152.
- [26] *Wikipedia* [online]. 2009 [cit. 2011-02-02]. Cytochrome b5. Dostupné z WWW: http://en.wikipedia.org/wiki/File:PDB_1cyo_EBI.jpg.
- [27] CHROMÁ, L.; MACKOVÁ, M.; MACEK, T.; MARTÍNEK, V.; STIBOROVÁ, M. Rostlinné cytochromy P450 a peroxidasy a jejich úloha při degradaci kontaminantů životního prostředí. *Chemické listy*. 2001, 95, 212-222.

- [28] *Ústav lékařské biochemie* [online]. 2005 [cit. 2011-02-22]. Xenobiochemie-přednáška pro mediky. Dostupné z WWW: <http://che1.lf1.cuni.cz/html/Xenobiochemie.pdf>.
- [29] *Wikipedia* [online]. 2006 [cit. 2011-02-18]. 3'-Phosphoadenosine-5'-phosphosulfate. Dostupné z WWW: <http://en.wikipedia.org/wiki/File:PAPS.png>.
- [30] STIBOROVÁ, M. Ústní sdělení.
- [31] *ChemgaPedia* [online]. [cit. 2011-05-04]. Die Peroxidase-Reaktion – vom PGG2 zum PGH2. Dostupné z WWW: http://www.google.cz/imgres?imgurl=http://www.chemgapedia.de/vsengine/media/vsc/de/ch/12/thr/wirkstoffe/aspirin/a4_41_pox_mechanismus/glutathion.gif&imgrefurl=http://www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/de/ch/12/thr/vlu_thr/aspirin.vlu/Page/vsc/de/ch/12/thr/wirkstoffe/aspirin/a4_41_pox_mechanismus/pox_mechanismus.vscml.html&usq= bBGhk6qXZZ1oDycYJVJoRpB_3W0=&h=217&w=305&sz=3&hl=cs&start=15&zoom=1&tbnid=AzNmznPFP7oogM:&tbnh=111&tbnw=159&ei=JGDBTfymGqOc4Ab7sMTMBA&prev=/search%3Fq%3DGlutathion%26hl%3Dcs%26client%3Dfirefox-a%26hs%3Ds7I%26sa%3DX%26rls%3Dorg.mozilla:cs:official%26biw%3D1064%26bih%3D538%26tbnid%3Dsch0%2C342&itbs=1&iact=rc&dur=305&page=2&ndsp=18&ved=1t:429,r:6,s:15&tx=93&ty=40&biw=1064&bih=538.
- [32] STIBOROVÁ, M.; RUPERTO VÁ, M.; SCHMEISER H. H.; FREI, E. Molecular mechanisms of antineoplastic action of an anticancer drug ellipticine. *Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czech Republic*. 2006, 1, 13-23.
- [33] STIBOROVÁ, M., POLJAKOVÁ, J.; RYŠLAVÁ, H.; DRAČINSKÝ, M.; ECKSCHLAGER, T.; FREI, E. Mammalian peroxidases activate anticancer drug ellipticine to intermediates forming deoxyguanosine adducts in DNA identical to those found in vivo and generated from 12-hydroxyellipticine and 13-hydroxyellipticine. *International journal of cancer*. 2007, 2, 243-251.

- [34] PAOLETTI, C.; LE PECQ, J. B.; DAT-XONG, N.; JURET, P.; GARNIER, H.; AMIEL, J. L.; ROUESSE, J. Antitumor activity, pharmacology, and toxicity of ellipticines, ellipticinium, and 9-hydroxy derivatives: preliminary clinical trials of 2-methyl-9-hydroxy ellipticinium (NSC 264-137). *Recent results in cancer research*. 1980, 74, 107-123.
- [35] STIBOROVÁ, M.; FREI, E. Deriváty ellipticinu s cíleným protinádorovým účinkem. *Chemické listy*. 2001, 95, 549-555.
- [36] AIMOVÁ, D.; STIBOROVÁ, M. Antitumor drug ellipticine inhibits the activities of rat hepatic cytochrome P450. *Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czechoslovakia*. 2005, 2, 437-440.
- [37] ISHIKURA, M.; HINO, A.; YAGINUMA, T.; AGATA, I.; KATAGIRI, N. A Novel Entry to Pyrido[4,3-b]carbazoles: An Efficient Synthesis of Ellipticine. *Tetrahedron*. 7 January 2000, 56, 193-207 .
- [38] GOODWIN, S.; SMITH, A. F.; HORNING, E. C. Alkaloids of *Ochrosia elliptica* Labill. 1. *J. Am. Chem. Soc.* 1959, 81, 1903-1908.
- [39] STIBOROVÁ, M.; BIELER, CH. A.; WIESSLER, M., FREI, E. The anticancer agent ellipticine on activation by cytochrome P450 forms covalent DNA adducts. *Biochemical Pharmacology*. 2001, 62, 1675-1684.
- [40] KUO, PL.; HSU YL.; CHANG, CHL.; LIN CHCH. The mechanism of ellipticine-induced apoptosis and cell cycle arrest in human breast MCF-7 cancer cells. *Cancer letters*. 2005, 2, 293-301.
- [41] POLJAKOVÁ, J.; FORSTEROVÁ, K.; ŠULC, M.; FREI, E.; STIBOROVÁ, M. Oxidation of an antitumor drug ellipticine by peroxidases. *Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czech Republic*. 2005, 2, 449-453.
- [42] KUO, YC.; KUO, PL.; HSU, YL.; CHO, CY.; LIN, CC. Ellipticine induces apoptosis through p53-dependent pathway in human hepatocellular carcinoma HepG2 cells. *Life Sciences*. 2006, 22, 2550-2557.

- [43] AIMOVÁ, D.; POLJAKOVÁ, J.; KOTRBOVÁ, V.; MOSEROVÁ, M.; FREI, E.; ARLT, W.M.; STIBOROVÁ, M. Ellipticine and benzo(a)pyrene increase their own metabolic activation via modulation of expression and enzymatic activity of cytochromes P450 1A1 and 1A2. *Interdisciplinary toxicology*. 2008, 2, 160-168.
- [44] POLJAKOVÁ, J.; ECKSCHLARGER, T.; HRABĚTA, J.; HŘEBAČKOVÁ, J.; SMUTNÝ, S.; FREI, E.; MARTÍNEK, V.; KIZEK, R.; STIBOROVÁ, M. The mechanism of cytotoxicity and DNA adduct formation by the anticancer drug ellipticine in human neuroblastoma cells. *Biochemical Pharmacology*. 2009, 77, 1466-1479.
- [45] *Wikipedia* [online]. [cit. 2011-02-16]. *Ochrosia borbonica*. Dostupné z WWW: <http://en.wikipedia.org/wiki/Ochrosia_borbonica>.
- [46] JURET, P.; TANGUY, A.; GIRARD, A.; LE TALAER, J. Y.; ABBATUCCI, J. S.; DAT-YUONG; LE PECQ, J. B.; PAOLETTI, C. Hydroxy 9-methyl 2-ellipticinium acetate (NSC 264-137). Toxicologic study and therapeutic effect in 100 cancers. *Nouv. Presse Med.* 1979, 8, 1495-1498.
- [47] STIBOR, I. *Interkalace planárních molekul s nukleovými kyselinami-interkalace* [online]. 2009 [cit. 2011-02-01]. Dostupné z WWW: <http://www.uochb.cas.cz/Zpravy/PostGrad2005/7_Stibor.pdf>.
- [48] KOTRBOVÁ, V. *Studium aktivačního a detoxikačního metabolismu protinádorového léčiva ellipticinu systémem cytochromů P450 in vitro a in vivo*. Praha, 2008. Dizertační práce. Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta.
- [49] STIBOROVÁ, M.; ARLT, V.M.; HENDERSON, C.J.; WOLF, C.R.; KOTRBOVÁ, V.; MOSEROVÁ, M.; HUDEČEK, J.; PHILLIPS, D.H.; FREI, E. Role of hepatic cytochromes P450 in bioactivation of the anticancer drug ellipticine: studies with the hepatic NADPH: cytochrome P450 reductase null mouse. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2008, 226, 318-327.
- [50] AIMOVÁ, D.; SVOBODOVÁ, L.; KOTRBOVÁ, V.; MRÁZOVÁ, B.; HODEK, P.; HUDEČEK, J.; VÁCLAVÍKOVÁ, R.; FREI, E.; STIBOROVÁ, M. The anticancer drug ellipticine is a potent inducer of rat cytochromes P450 1A1 and 1A2,

thereby modulating its own metabolism. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*. 2007, 10, 1926-1934.

- [51] *Oulun yliopisto* [online]. [cit. 2011-04-27]. Xenobiotic-metabolizing cytochrome P450 enzymes in human lung. Dostupné z WWW: http://www.google.cz/imgres?imgurl=http://herkules.oulu.fi/isbn9514258649/html/graphic11.png&imgrefurl=http://herkules.oulu.fi/isbn9514258649/html/x579.html&usq=FYMhUidnTjpROHTJr2Qm30kZpGk=&h=592&w=890&sz=7&hl=cs&start=0&zoom=1&tbnid=dzNacrHMJi27oM:&tbnh=125&tbnw=216&ei=KH-4Tf6BG4jXsgb_p5nrAw&prev=/search%3Fq%3Daryl%2Bhydrocarbon%2Breceptor%26hl%3Dcs%26sa%3DG%26biw%3D1280%26bih%3D538%26gbv%3D2%26tbs%3Disch&itbs=1&iact=rc&dur=351&page=1&ndsp=20&ved=1t:429,r:7,s:0&tx=95&ty=45.

