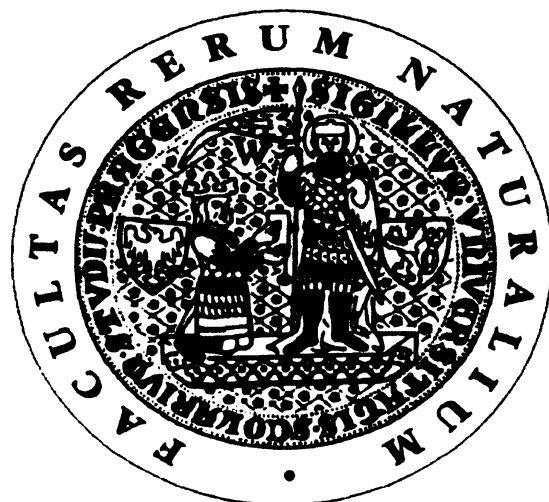


PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
UNIVERZITY KARLOVY V PRAZE
KATEDRA BIOCHEMIE



Metabolismus protinádorového léčiva ellipticinu
v cílových tkáních jeho účinku

Diplomová práce

Markéta Háčková

Školitel: Prof. RNDr. Marie Stiborová, DrSc.

Praha 2008

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod odborným vedením Prof. RNDr. Marie Stiborové, DrSc. a všechny prameny jsem řádně citovala.

V Praze dne 5. 5. 08

Markéta Háčková



Ráda bych poděkovala své školitelce Prof. RNDr. Marii Stiborové, DrSc. za zadání tématu, odborné vedení a všestrannou pomoc při vypracování této práce. Zároveň také děkuji kolektivu katedry biochemie Univerzity Karlovy za ochotnou pomoc při práci v laboratoři.

OBSAH

1.	Úvod a přehled literatury	9
1.1.	Etiologie a patogenese nádorového procesu	9
1.2.	Kancerogeneze	10
1.3.	Neuroblastom	13
1.4.	Leukemie	13
1.5.	Nádory prsu	14
1.6.	Léčebné principy nádorových onemocnění	15
1.6.1.	Protinádorová chemoterapie	15
1.6.1.1.	Chemoterapeutická rezistence	16
1.6.1.2.	Komplikace v chemoterapii	16
1.7.	Protinádorová chemoterapeutika	17
1.7.1.	Zdroje chemoterapeutických látek	17
1.7.2.	Mechanismus účinku chemoterapeutických látek	18
1.7.2.1.	Mechanismus protinádorového účinku konvenčních cytostatik	18
1.7.2.2.	Mechanismus protinádorového účinku hormonů	20
1.7.2.3.	Posílení účinku cytostatik inhibitory histondeacetylasy	21
1.7.3.	Farmakokinetika protinádorových léčiv	23
1.7.4.	Význam cytochromů P450 při metabolismu léčiv	25
1.7.5.	Spektrální charakteristiky cytochromů P450	26
1.7.6.	Aromatasa (CYP19)	26
1.8.	Ellipticin a možnosti jeho využití pro cílenou terapii	27
1.8.1.	Základní charakteristiky ellipticinu	27
1.8.2.	Deriváty ellipticinu	30
1.8.2.1.	Cíleně směřované deriváty ellipticinů	32
1.8.3.	Farmakokinetika ellipticinu	33
1.8.3.1.	Biotransformace ellipticinu	34
1.8.4.	Protinádorové působení ellipticinu	36
1.8.4.1.	Mechanismus nespecifického účinku ellipticinu:	36
1.8.4.2.	Mechanismus specifického působení ellipticinu	38
1.8.5.	Klinické využití ellipticinu a jeho derivátů	43
2.	Cíl diplomové práce	45

3.	Materiál a metody	46
3.1.	Použité chemikálie	46
3.2.	Použité přístroje	48
3.3.	Metody	49
3.3.1.	Stanovení koncentrace proteinu	49
3.3.2.	Stanovení obsahu cytochromu P450.....	49
3.3.3.	Stanovení aktivity NADPH:cytochrom P450 reductasy	50
3.3.4.	Diferenční spektroskopie cytochromu P450 1A1 s ellipticinem	51
3.3.5.	Exprese cytochromů P450 a cyklooxygenas v buněčných liniích.....	51
3.3.6.	Testování cytotoxicity ellipticinu na neuroblastomové buněčné linie.....	53
3.3.7.	Vliv trichostatinu A a valproátu na cytotoxicitu ellipticinu na neuroblastomové linie.....	55
3.3.8.	Vliv valproátu a trichostatinu A na oxidaci ellipticinu <i>in vitro</i>	55
3.3.8.1.	Oxidace ellipticinu mikrosomy	55
3.3.8.2.	Oxidace ellipticinu peroxidasou	58
3.3.9.	Vliv valproátu a trichostatinu A na tvorbu aduktů ellipticinu s DNA <i>in vitro</i> (v neuroblastomových buněčných liniích).....	60
3.4.	Vliv valproátu a trichostatinu A na oxidační aktivaci ellipticinu vedoucí k tvorbě aduktů ellipticinu s DNA <i>in vitro</i>	61
3.4.1.	Oxidační aktivace ellipticinu lidskými jaterními mikrosomy.....	61
3.4.2.	Oxidační aktivace ellipticinu peroxidasami.....	61
3.5.	Oxidace ellipticinu aromatasou (CYP19)	62
3.5.1.	Oxidace ellipticinu aromatasou (CYP19).....	62
3.5.2.	Vliv cytochromu b ₅ na oxidaci ellipticinu aromatasou (CYP19)	63
3.6.	Tvorba aduktů s ellipticinu s DNA po aktivaci aromatasou (CYP19).....	64
4.	Výsledky	65
4.1.	Vliv ellipticinu na buněčné linie lidských neuroblastomů.....	65
4.2.	Vliv valproátu (VPA) a trichostatinu A (TSA) na cytotoxicitu ellipticinu vůči neuroblastomovým buněčným liniím	65
4.3.	Vliv valproátu a trichostatinu A na tvorbu aduktů ellipticinu s DNA <i>in vitro</i>	67
4.4.	Vliv valproátu a trichostatinu A na oxidaci ellipticinu <i>in vitro</i>	70
4.4.1.	Vliv valproátu (VPA) a trichostatinu A (TSA) na oxidaci ellipticinu cytochromy P450 v jaterních mikrosomech potkana.....	70

4.4.2. Vliv valproátu (VPA) a trichostatinu A (TSA) na oxidaci ellipticinu peroxidasami	74
4.5. Vliv inhibitorů histondeacetylas, valproátu (VPA) a trichostatinu A (TSA), na oxidační aktivaci ellipticinu vedoucí k tvorbě aduktů s DNA	76
4.5.1. Vliv valproátu a trichostatinu A na oxidační aktivaci ellipticinu cytochromy P450 v lidských mikrosomech	76
4.5.2. Vliv valproátu a trichostatinu A na oxidační aktivaci ellipticinu peroxidasami	77
4.6. Oxidace ellipticinu aromatasou (CYP19)	78
4.7. Tvorba aduktů ellipticinu s DNA po aktivaci aromatasou (CYP19) a modulace jeho účinnosti cytochromem b ₅	78
4.8. Expres enzymů metabolisujících ellipticin v nádorových buněčných liniích	80
4.8.1. Expres enzymů metabolisujících ellipticin v neuroblastomových liniích	80
4.8.2. Expres enzymů metabolisujících ellipticin v nádorových buňkách lidského prsního adenokarcinomu (v MCF-7 buňkách).....	82
4.8.3. Interakce ellipticinu s cytochromem P450 1A1 sledovaná diferenční spektroskopií.....	84
5. Diskuse.....	87
6. Závěr	93
7. Seznam literatury	95

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A ZNAČEK

Ah receptor	„aryl hydrocarbon receptor“
AIDS syndrom)	syndrom získané imunodeficiency (acquired immune deficiency)
AML	akutní myeloidní leukémie („acute myeloid leukemia“)
APN	aminopeptidasa N
ATP	adenosintrifosfát
BCA	4,4'-dikarboxy-2,2'-bicinchoninová kyselina
BRCA	„Breast cancer growth suppressor protein“
BSA	hovězí sérový albumin
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
cGMP	cyklický guanosinmonofosfát
CCRF-CEM	buněčné linie („Human T cell lymphoblast-like cell line“)
CLL	chronická lymfatická leukémie („chronic lymphatic leukemia“)
CML	chronická myeloidní leukémie („chronic myeloid leukemia“)
COX-1	cyklooxygenasa-1
COX-2	cyklooxygenasa-
CYP	cytochrom P450
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
ELLI	ellipticin
FDA	„Food and Drug Association“
FMN	flavinmononukleotid
GSH	glutathion
GTP	guanosintrifosfát
HATs	histonacetyltransferasy
HDACs	histondeacetylasy
HER-2	tyrosinkinasový receptor
HL-60	leukemické buněčné linie („human promyelocytic leukemia cell line“)
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie
HRP	křenová peroxidasa („horseradish peroxidase“)
HSA	lidský sérový albumin
HSP90	protein indukovaný tepelným šokem („heat shock protein 90“)

IARC	Mezinárodní institut pro výzkum rakoviny („International Institute for Research on Cancer“)
IC₅₀	koncentrace cytostatika způsobující 50% úmrtnost buněk
IMDM	„Iscove's Modified Dulbecco's Medium“(medium pro rychle rostoucí buňky)
LASER	„light amplification by stimulated emission of radiation“
LDL	„low density lipoprotein“
LPO	laktoperoxidasa („lactoperoxidase“)
MCF-7	buněčné linie („Breast Carcinoma Cell Line“)
MDR 1	gen pro mnohočetnou lékovou rezistenci („multidrug resistance gene“)
MFO	systém monooxygenas se smíšenou funkcí
MPO	myeloperoxidasa („myeloperoxidase“)
NAD⁺ (NADH)	nikotinamidadeninukleotid oxidovaný (redukovaný)
NADP⁺ (NADPH)	nikotinamidadeninukleotidfosfát oxidovaný (redukovaný)
NCI	„National Cancer Institute“
P450	pigment s maximem absorbance při 450 nm (cytochrom P450)
PBS	sodný fosfátový pufr s obsahem NaCl - izotonický roztok („Phosphate Buffer with Salt“)
pH	záporný dekadický logaritmus koncentrace H ⁺ iontů
PVDF	polyvinylidendifluorid
RAL	podíl modifikovaných nukleotidů z celkového počtu nukleotidů („relative adduct labeling“)
RPM	počet otáček za minutu
SDS	dodecylsulfát sodný
SDS-ELFO	elektroforesa na polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS
SAHA	„suberoyl anilide hydroxamic acid“
TGF-β	transformující růstový faktor β
Triton	t-oktylfluoxypolyetoxyetanol
TSA	trichostatin A
UV	ultrafialové záření
VPA	kyselina valproová

1. Úvod a přehled literatury

Nádorovému bujení, které je jedním z největších problémů lidského zdraví, byla v posledních desetiletích věnována z hlediska biologie i medicíny významná pozornost. Dnes je u lidí známo asi 100 různých typů nádorových onemocnění^[50, 53]. Podařilo se vyvinout diagnostické i léčebné metody rakovinného onemocnění a také epidemiologie této choroby byla charakterizována. Výzkumem bylo získáno mnoho poznatků o maligním bujení, které přispěly k pochopení základních mechanismů vzniku nádorové buňky.

1.1. Etiologie a patogenese nádorového procesu

Pro vznik normálně fungujícího organismu je nutné, aby se buňky během embryogeneze diferencovaly, proliferovaly a dokonce i zanikaly podle přesného prostorového a časového řádu. Regulace genové exprese se realizuje na úrovni transkripce, posttranskripčních úprav, translace a posttranslačních úprav^[8].

Na regulačních procesech se podílí celá řada proteinů^[8]:

- Signální molekuly (hormony, růstové faktory, neurotransmitery)
- Specifické receptory signálních molekul
- Receptorové či nereceptorové proteinkinasy
- Transkripční faktory
- Cykliny (cyklin-dependentní kinasy)

Nádorové buňky se od těchto „zdravých“ buněk v mnohém odlišují. Nejzřetelnějším a nejnápadnějším znakem nádorových buněk je jejich neregulovatelná proliferace. Když buňky ztratí regulační mechanismy vývoje, začnou nadměrně proliferovat a tímto procesem tak vzniknou dva typy nádorů.

Benigní (nezhoubné) nádory – např. bradavice, mateřská znaménka. Málokdy ohrozí život jedince, nebezpečné jsou pouze v případě, kdy se nacházejí v uzavřeném prostoru (mozek), nebo když produkují velké množství hormonů^[3, 66, 68].

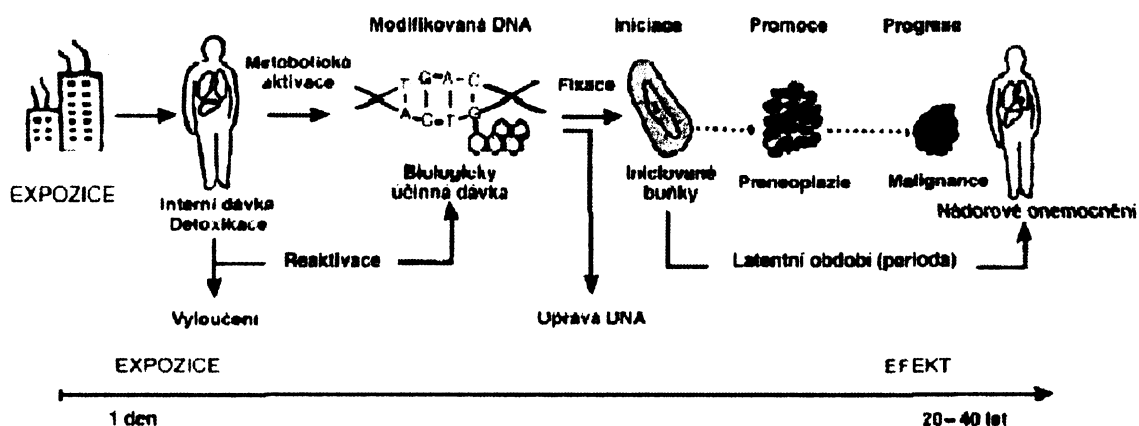
Maligní (zhoubné) nádory rostou invazivním způsobem a roztrušují své buňky, které se pak v procesu zvaném metastase usídlují v jiných částech těla. Všechny ohrožují postiženého jedince na životě^[3, 66, 68].

Metastasa je sekundární maligní tumor vznikající v důsledku šíření nádorových buněk z primárního ložiska (např.: metastasy v játrech mohou být důsledkem šíření nádoru vzniklého původně v tračníku apod.). Tímto pojmem může být též označen vlastní proces šíření nádoru. Stupeň malignity tumoru závisí do jisté míry i na jeho schopnosti pronikat okolní normální tkání a vysílat metastasy do jiných částí organismu [3, 66, 68].

Charakteristickým rysem nádorových buněk je jejich „nesmrtelnost“ (počet jejich dělení není nijak omezen). Normální zdravé buňky tkáně se nemohou dělit neomezeně - kapacita jejich reprodukce je omezena jednak tzv. procesem kontaktní inhibice (mezibuněčné kontakty), ale navíc i typem a stářím buňky [148]. Buňky se v kultuře dokáží rozdělit dvacetkrát až šedesátkrát, poté vždy nastane fáze jejich stárnutí a následná smrt [148]. Takto se již vědcům podařilo některé linie nádorových buněk udržet v kultuře při životě několik desetiletí (mnohatisícové buněčné dělení). Je ale nutné zdůraznit, že všechny „nesmrtelné“ buňky nemusí být maligní (pouze v případě, když je tento děj spojen s neregulovatelným růstem a šířením, se jedná o buňky nádorové) [148].

1.2. Kancerogenese

Proces kancerogenese (zhoubné bujení) může být rozdělen na tři fáze. První fáze je v podstatě transformace nenádorové buňky v buňku tzv. iniciovanou. Za druhou fází pak je považována přeměna buňky iniciované (tedy buňky ještě podléhající určitým regulačním mechanismům) v buňku nádorovou - tj. promoce, která přechází v závěrečnou fázi - v progresi nádorového růstu [132]. (Někdy může být promoční fáze úplně vynechána). Schematické znázornění procesu kancerogenese ukazuje *Obrázek 1*.



Obrázek 1

Schéma vícestupňového procesu kancerogeneze (Převzato z [132])

Iniciovaná buňka je buňka, ve které došlo k mutaci DNA vedoucí k aktivaci onkogenů a deaktivaci tumor supresorových genů, a toto poškození DNA nebylo opraveno reparačními enzymy [95, 132, 3, 66, 68]. Pokud takováto buňka není zlikvidována imunitním systémem, přetrvává v organismu do doby, než se v důsledku expozice faktorům s promočním a progresivním účinkem ještě více změní její genetická informace a dojde k proliferaci buněk s porušenou diferenciací a mezibuněčnou komunikací [95, 132, 3, 66, 68].

Iniciace zahrnuje procesy vedoucí ke změně genomu, ale které samy o sobě nevedou k maligní transformaci [132].

Po iniciaci následují promoční reakce stimulující zahájení buněčného cyklu a vedoucí k maligní transformaci, která je finalizována až v progresní fázi. Zvýšená proliferace pozměněných buněk při promoční fázi závisí na aktivitě a regulaci proteinkinas a fosfatas, ovlivňují ji produkty onkogenů. Promoční fáze produkuje buňky benigního tumoru [132].

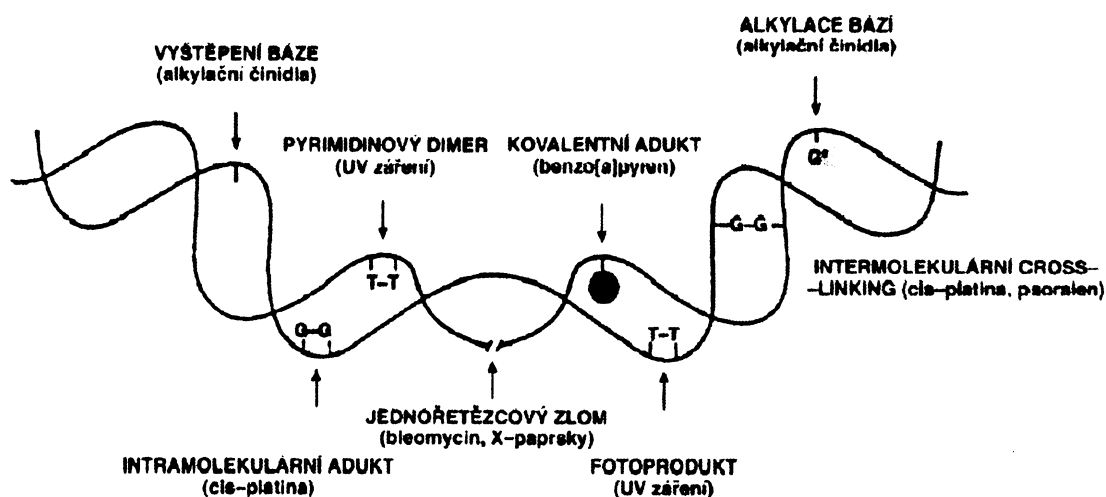
V důsledku působení progresoru se tento zatím částečně kontrolovatelný buněčný růst změní v nekontrolovatelný a tím vzniká nádor maligní, který je charakteristický svým zhoubným působením na sousední tkáň, do níž infiltruje [132]. Buňky odštěpené z maligního nádoru se mohou dostat krevními nebo lymfatickými cestami do jiných tkání nebo orgánů, kde se mohou usadit a vytvářet metastasy (tzv dceřinné nádory) [3, 66, 68], o kterých již bylo pojednáno dříve.

Význam mutagenese pro indukci nádorového bujení lze ukázat na chorobě zvané *Xeroderma pigmentosum*. Jedná se o vzácné onemocnění vyvolané defektem genu kódujícího DNA-reparující enzym UV-specifickou endonukleasu [8, 20]. Lidé trpící touto chorobou nemají

schopnost opravovat mutace DNA (thyminové dimery) vyvolané UV zářením, a proto se u nich velmi progresivně rozvíjí nádorové onemocnění kůže ^[120, 20].

Podle působení exogenních (i endogenních) faktorů lze kancerogenesi rozdělit na tři skupiny. Kancerogenesi chemickou, fyzikální a virovou (popř. biologickou - endogenní faktory) ^[132].

Podle mechanismu působení kancerogeny dělíme na **kancerogeny genotoxické** (tvoří kovalentní adukty s DNA či ji jiným způsobem kovalentně modifikují) – většinou mají charakter prokarcinogenů, **kancerogeny epigenetické** (působí na molekuly DNA nekovalentními interakcemi - př.: interkalátory). Do **třetí skupiny karcinogenů** se řadí karcinogeny, které způsobují změny struktur molekul DNA jako jsou jedno a dvouřetězové zlomy („single - and double – strand break“), dále pak změny vyvolávané bifunkčními činidly způsobujícími tzv. „cross-linking“ (intra i intermolekulární) či „DNA- protein cross-linking“ ^[132]. Různé typy poškození DNA ukazuje *Obrázek 2*.



Obrázek 2

Příklady mechanismů poškození DNA různými vnějšími faktory (Převzato z ^[132])

Z 90% je proces karcinogeneze vyvolán kovalentní vazbou karcinogenů (nebo jejich metabolitů) na báze či deoxyribosu DNA, méně často dochází k apurinaci či apyrimidaci DNA, „cross-linking“, vznik hydroxyderivátů bází (vyvolávají je volné radikály kyslíku), vznik cyklických aduktů, interkalátů nebo pyrimidinových dimerů. Většina modifikací DNA je eliminována reparačními mechanismy, přesto může dojít k vytvoření perzistentních aduktů, které mohou způsobit permanentní mutace v regulačních genech kontrolujících růst, což vede v aberantní buněčný vývoj a ke karcinogenním procesům ^[132].

Lze shrnout, že pro iniciaci karcinogenese jsou esenciální mutace v onkogenech a tumor supresorových genech (tj. antionkogenech). Modifikace DNA jsou klíčovým bodem celého chorobného procesu, a proto není divu, že jsou neustále hledány postupy, jak těmto defektům zabránit, a jak je spolehlivě a rychle detekovat ^[132].

1.3. Neuroblastom

Neuroblastom je embryonální nádor vycházející z buněk primitivní neurální lišty (sympatogonií), které v průběhu embryogenese osídlují dřeň nadledvin, sympatická ganglia a paraganglia ^[65]. Příčina jeho vzniku není známa. Je to nejčastější extrakrinální nádor dětského věku s incidencí udávanou v rozmezí 7-10% ^[146]. Pravděpodobnost výskytu nádoru je 1:10 000 živě narozených dětí, průměrný věk v době onemocnění je 22 měsíců ^[65]. V patogenesi se uvažuje o vlivu chemických faktorů (souvislost s užíváním hydantoinátů, fenobarbitalu, alkoholu v průběhu gravidity) a faktorů genetických (až u 80% vysoce rizikových neuroblastomů byla prokázána ztráta heterozygosity na 1. chromozomu) ^[65].

1.4. Leukemie

Leukémie je nádorové onemocnění krvetvorby vyznačující se zmnožením bílých krvinek, které jsou nezralé a neplní svou normální funkci. Jedná se o maligní nádory odvozené od hematopoetických buněk. Leukemie a lymfomy tvoří heterogenní skupinu onemocnění, která mají odlišné epidemiologické, histologické, cytologické, imunologické a genetické charakteristiky. Liší se tedy jak svými projevy, tak i stupněm malignity a odpovědí na léčbu. Patologický proces je zahájen transformací jedné, nejvýše několika hemopoetických kmenových buněk. V leukemickém organismu pak vedle sebe existují dvě populace buněk. Jedna vychází z normální zdravé kmenové buňky, druhá z leukemické ^[65].

V současné době se prakticky na celém světě používá francouzsko-americko-britská klasifikace (FAB) podle které se leukemie dělí do několika skupin. Podle nejjednoduššího rozdělení je to akutní lymfoblastická leukemie, akutní myeloidní leukemie a chronická leukemie.

1.5. Nádory prsu

Karcinom prsu je nejčastějším nádorem u žen. Incidence se každoročně zvyšuje v mnoha zemích o 1-2%. Před dvacátým rokem života je výskyt karcinomu prsu vzácný, poté jeho incidence narůstá s věkem. Zdvojuje se každých deset let až do menopausy a následně se dramaticky zvyšuje. Nejprudší vzestup je po padesátém roce věku ^[60, 65].

Karcinom prsu patří mezi hormonálně závislé nádory. Kancerogenní účinky se přisuzují především estrogenům. Estrogeny indukují zvýšení exprese některých růstových faktorů a onkogenů (např. myc, ras, HER-2/neu atd.), jejichž produkty významně ovlivňují proliferační aktivitu buněk. Za fyziologických podmínek jsou tyto účinky v rovnováze s různými antiproliferačními působky (např. TGF- β apod.). Rovnováhu může porušit dlouhotrvající estrogení stimulace nebo účinky dalších karcinogenních faktorů ^[119, 65].

Estrogeny se uplatňují nejen v patogenezi karcinomu, ale také hrají důležitou roli v remodelaci kostí. Stimulují osteoblasty, indukují jejich proliferaci, zvyšují absorpci kalcia ze střeva a sekreci kalcitoninu. Nedostatek estrogenů vede k apoptose osteoblastů a ke vzniku osteoporosy ^[119, 65].

U 10-15% žen vzniká karcinom prsu jako důsledek genetických dědičných změn. Jedná se o tzv. hereditární formy karcinomu (dědí se autosomálně dominantně). Je pro ně charakteristické, že se objevují v poměrně mladém věku a často postihují oba prsy. Hereditární karcinom má poněkud odlišné diagnostické projevy. Ženy z těchto rodin mají až 80 % celoživotní riziko vývoje rakoviny prsu. V rodinách s kumulací nádorů prsu a ovaria byly objeveny a klonovány dva typy genů- BRCA 1 a BRCA 2, jejichž mutace je spojena s vysokým rizikem vývoje karcinomu prsu a ovaria ^[67]. Tyto geny patří mezi antiproliferační, nebo tzv. tumor-supresorové geny, které vyžadují ke své inaktivaci kompletní ztrátu obou alel ^[67]. Klonování genů BRCA 1 a 2 potvrdilo Knudsonovu teorii dvou zásahů (různými mutageny, kancerogeny, ionizujícím zářením), které vyřadí obě alely, a tím tumor-supresorovou funkci genu. V současné době byl již identifikován i gen BRCA 3 a předpokládá se existence genu BRCA 4 ^[89]. Tyto geny tedy kódují příslušné proteiny, které mají antiproliferační účinky a hrají důležitou roli v procesu opravy poškozené DNA ^[89]. U mužů, kteří jsou nositeli těchto genů je zvýšené riziko karcinomu prostaty nebo kolorekta ^[10, 33, 35, 86, 60, 65].

Na vzniku karcinomu prsu se velkou měrou podílí kombinace faktorů, mezi které patří především dlouhá expozice estrogenům, jiná prodělaná onemocnění prsu, účinky ionizujícího záření, obezita, nedostatek fyzické aktivity, zvýšený příjem tuků. Poslední tři zmíněné souvisí

zřejmě s enzymem aromatasou (cytochrom P450 19, CYP19), který je ve zvýšené míře produkován v nádorové tkáni, a který je za normálních okolností zodpovědný za přeměnu nadledvinových androgenů z tukové tkáně na estrogeny^[119, 65] (kapitola 1.7.6).

1.6. Léčebné principy nádorových onemocnění

Léčba nádorových onemocnění vyžaduje komplexní a individuální přístup k pacientovi, který kombinuje základní terapeutické metody: chirurgickou léčbu, radioterapii, chemoterapii (včetně terapie hormonální), fototerapii, fotochemoterapii, termoterapii,^[65] v blízké budoucnosti snad i genovou terapii^[66]. Je to zejména postupná aplikace chemogenomického přístupu k léčbě nádorových onemocnění, která se zdá být v současnosti velmi progresivní a slibnou metodou^[104, 65].

1.6.1. Protinádorová chemoterapie

Chemoterapie je léčebná metoda, využívající schopnosti určitých chemických látek omezit či úplně zastavit růst a proliferaci nádorových buněk^[66]. Chemoterapie (ať už jako základní nebo doplňková metoda) je v dnešní době ve většině případů nezbytnou součástí léčby rakoviny. Chirurgická léčba je schopna vyléčit pouze lokalizované nádorové procesy, navíc jen do určitého stadia jejich vývoje nebo velikosti^[65]. V některých případech jako je nádor kostní dřene či rozsáhlý nádor v břišní dutině (který prorůstá důležité orgány) nebo nádorové mikrometastasy, se nelze bez chemoterapie obejít^[66]. U zvláště senzitivních onemocnění je chemoterapeutická léčba primární (základní léčebná), někdy může mít charakter adjuvantní tedy doplňovat základní léčebnou metodu chirurgickou či ozařovací, popř. má charakter neoadjuvantní, tj. zlepšuje operabilitu nádoru či se využívá jako doplňková, udržující terapie – tzv. paliativní charakter chemoterapeutické léčby^[65]. Cytostatická léčba může současně omezit jinak nezbytný chirurgický zákrok. Použití chemoterapie je však omezeno citlivostí nádoru k danému chemoterapeutiku^[74, 65].

Většina cytostatik je vázána pouze na určitou část buněčného cyklu a působí dominantně na proliferující buňky. Ke stimulaci dělení buněk dochází například po chirurgickém odstranění okolních buněk^[66]. Je proto nutné zvolit optimální načasování dávek a vhodnou kombinaci chemoterapeutik^[66]. Na počátku nádorového onemocnění se většina buněk rychle dělí a počet buněk roste exponenciálně^[66]. U pokročilého nádoru je většina buněk v G₀ fázi a tyto jsou pak

k chemoterapeutikům poměrně rezistentní. Proto je principem chemoterapie opakované podávání cytostatik ^[66]. Léčivo musí být podáváno v takových intervalech, aby mezi dávkami cytostatika nedošlo k výraznému růstu počtu maligních buněk a zároveň se cyklus od cyklu počet nádorových buněk snižoval ^[65]. Poměrně úspěšná je též vysokodávková terapie, která zasahuje i buňky v klidové fázi ^[65]. Příkladem této terapie je podání abnormálně vysoké dávky chemoterapeutika spolu s antidotem, vysokodávkové kombinace různých cytostatik s následnou transplatací kostní dřeně či aplikací hemopoetických růstových faktorů mezi jednotlivými dávkami cytostatik ^[69, 74].

1.6.1.1. Chemoterapeutická rezistence

„Rezistenci lze definovat jako primární necitlivost nebo druhotnou ztrátu citlivosti nádorových buněk k cytostatiku“^[65].

Rezistence tumorových buněk má komplexní příčiny vycházející z navzájem se ovlivňujících metabolických dějů. K rezistenci vede např. znásobená exprese některých ochranných proteinů, jako jsou produkty genu pro mnohočetnou lékovou rezistenci (MDR1), glutathiontransferasy apod. Aktivace antiapoptotických cest významně snižuje citlivost tumorů k léčbě. Důležitou roli hraje též podávané chemoterapeutikum, psychický a fyzický stav pacienta ^[65]. Rezistence na cisplatinu může být způsobena významnou expresí metalothioneinů. Rezistence na topoisomerasové inhibitory je často zapříčiněna znásobenou expresí cílových enzymů, ke které došlo v důsledku amplifikace příslušných genů ^[120, 65]. Komplexním procesem je rezistence na 5'-fluorouracil. Rezistence závisí jak na konkrétních vlastnostech tumoru, tak na genetické výbavě pacienta.

1.6.1.2. Komplikace v chemoterapii

Pro mnohá nádorová onemocnění v pokročilých stádiích je typická změna v genomu spojená se zvýšenými počty chromosomálních poruch, amplifikacemi genů, deregulací genové exprese ^[65]. Tyto mechanismy nejen že využívá nádorová buňka ke své progresi, ale též jich může užít k vymanění se z účinku chemoterapie. Cíl cytostatika může být modifikován mutacemi, nebo může být jeho citlivost na cytostatikum snížena v důsledku amplifikace jemu odpovídajícímu genu apod. Pokročilá nádorová onemocnění jsou tvořena z geneticky heterogenního „materiálu“, mohou se tedy teprve v během léčby vytvořit na daný způsob terapie rezistentní klony, které vytvoří další nádorová ložiska ^[120]. Ve většině případů jsou k cytostatikům více citlivé maligní

buňky než buňky zdravé. Indukce apoptozy či zastavení růstu v populacích maligních buněk může vést k odhalení dalších frakcí nádorových buněk. Jako příklad lze uvést tzv. „číhající buňky“ v rakovině prostaty a prsu, které jsou zodpovědné za znovu se objevující rakovinu po antihormonální terapii ^[120].

Vážné komplikace v chemoterapeutické léčbě nastávají v případech, kdy tato terapie vyvolává poškození genomu, aniž by ireversibilně zastavila růst nádorových buněk, či způsobila jejich zánik ^[65, 118]. Chemoterapeutika pak mají účinky obdobné mutagenům a indukují rezistentní klony. Nevhodná chemoterapeutická léčba zvyšuje rychlost progresu nádorového bujení ^[65, 120].

Jako komplikace v chemoterapii lze též chápat i nežádoucí působení chemoterapeutik na zdravé buňky ^[66]. Nežádoucí účinky jsou se projevují zejména zvracením a průjmem, někdy mohou být natolik vážné, že pacient musí být hospitalizován ^[66]. Dále mohou ovlivnit rychlost růstu a dělení nenádorových buněk. To může způsobit až tzv. alopecii (ztrátu vlasů) a snížení počtu krevních buněk produkovaných kostní dření, což vede k anémii, zvýšené náchylnosti k infekcím či poruše krvácivosti ^[66]. Proto je při tomto typu léčby nezbytné pravidelné kontrolování krve ^[65]. K omezení nežádoucích účinků se tyto látky užívají opakovaně v krátkých léčebných kúrách ^[66].

1.7. Protinádorová chemoterapeutika

Většina protinádorových léčiv má cytotoxické účinky. Ostatní jsou syntetickou formou pohlavních hormonů a látek jim příbuzných (androgenů, estrogenů, progesteronů) či antibiotik. Léky se často předepisují v kombinacích, aby se tak maximalizoval jejich účinek. Jejich výběr spočívá na celkovém zdravotním stavu pacienta, formě, typu a fázi rozvoje onemocnění ^[29, 65].

Protinádorová chemoterapeutika jsou zvláště cenná v terapii lymfomů, leukémií a rakoviny vaječnicků či varlat. Užití těchto léčiv je možné také po chirurgickém odstranění tumoru, nebo rovněž po radioterapii ^[29, 65].

1.7.1. Zdroje chemoterapeutických látek

Většina chemoterapeuticky významných látek byla objevena mezi lety 1950 a 1970 ^[66]. Od té doby je množství nově objevených látek nízké. Mezi takto nově zjištěné látky patří např. taxoly. Současné zdroje cytostatik jsou většinou přírodní. Nalezené při provádění rozsáhlých „screeningových“ testů. Z látek přírodního původu se cytostatika získávají extrakcí, častá je též

fermentace plísní, ze kterých se posléze izolují protinádorová antibiotika, dále pak v současnosti méně rozšířená syntéza nových látek (spíše se využívá chemické modifikace látek známých) [17, 23, 24, 66]. Velké množství účinných chemoterapeutik se získalo chemickou modifikací tzv. tradičních léčiv. Cílem modifikačních reakcí je získat více účinné a méně toxické látky než byly původní substráty [21].

1.7.2. Mechanismus účinku chemoterapeutických látek

Mechanismus působení většiny chemoterapeutik není, i přes dlouhou dobu klinického použití, dosud detailně prozkoumán. Výzkum je značně komplikovaný, protože každá takováto látka může vstupovat do různých metabolických pochodů, ovlivňovat enzymové i patologické pochody v buňce, či být jimi sama ovlivňována. Je tedy zřejmé, že každá z těchto látek může působit i více mechanismy najednou [65].

Mechanismus účinku chemoterapeuticky účinných látek se liší v závislosti na jejich chemické povaze. Při popisu jednotlivých mechanismů se budu soustředit především na popis mechanismu účinku tzv. konvenčních cytostatik, mezi která lze zařadit i v naší laboratoři zkoumané protinádorové léčivo ellipticin.

1.7.2.1. *Mechanismus protinádorového účinku konvenčních cytostatik*

Mechanismus cytotoxického účinku konvenčních cytostatik nejčastěji spočívá v tom, že tyto látky brání nádorovým buňkám v růstu a v dělení. Některé z nich poškozují buněčnou DNA, ostatní blokují chemické procesy, které jsou uvnitř buňky nezbytné pro její růst [9].

Mechanismy cytotoxického účinku [66]:

- Inhibice klíčových enzymů metabolismu vedoucí k poruše biosyntézy nukleových kyselin s následnou inhibicí buněčného dělení.
- Přímé poškození struktury již hotových nukleových kyselin vedoucí k poruše funkce nukleových kyselin, jejímž výsledkem je omezení buněčné proliferace.
- Alterace mikrotubulárního proteinu, jež má za následek abnormální průběh mitózy a její blokádu v metafázi.
- Porucha syntézy proteinů.
- Kombinované účinky (účinky zmíněné v bodech 1 - 4 a některé speciální).

- Poškození buněčné membrány.

Inhibice biosyntézy nukleových kyselin

Látky působící tímto mechanismem se označují jako analoga či antimetabolity vzhledem ke strukturální podobnosti s přirozenými metabolity. Působí buď přímo na dílčí reakce intermediárního metabolismu, nebo na enzymy, na nichž tyto reakce závisí. Dalším typem účinku antimetabolitů je inhibice metabolických reakcí mechanismem zpětné vazby. Častěji však dochází k metabolickému pozměnění antimetabolitů, především jejich přeměnou na nukleotidy. Inkorporace chybného metabolitu způsobuje vznik defektní nukleové kyseliny.

Do této skupiny se řadí analoga kyseliny listové (antifolika - metotrexát) ^[65, 66, 74, 120, 148], purinová analoga (analoga guaninu a hypoxantinu - N6 je nahrazen sírou, adeninu - adeninarabinosid), pyrimidinová analoga (5'- fluorouracil) ^[65, 66, 74, 120, 148], inhibitory ribonukleotid reduktasy (hydroxyurea), ^[65, 66, 74, 120, 148], analoga aminokyselin (analoga L -asparagové kyseliny, L - glutaminu) ^[65, 66, 74, 120, 148].

Poškození struktury a funkce nukleových kyselin

K poškození struktury nukleových kyselin může dojít v důsledku alkylace (ifosfamid, busulfan, komplexy platiny, mitomycin C, ellipticin) ^[65, 66, 74, 120, 148], interkalace (antracyklinová antibiotika - aktinomycin D, doxorubicin, polypeptidová antibiotika - bleomycin, deriváty antrachinonu, deriváty akridinu a ellipticiny) ^[65, 66], inhibice topoisomerasy (topoisomerasa I - kamptotecin a jeho deriváty - topotekan a irinotekan; topoisomerasy II - tenipozid, etopozid, ellipticin a většina interkalačních látek) ^[65, 66], rozštěpení molekuly DNA (protinádorová antibiotika polypeptidové povahy - neokarcinostatin, bleomycin) ^[65, 66]. Vzhledem k cytotoxickému účinku jsou nejzávažnější poškození vedoucí k inhibici replikace a transkripce, méně často translace ^[65, 66].

Alterace mikrotubulárního proteinu

Látky poškozující strukturu a funkci mikrotubulů svůj cytotoxický účinek uplatňují zejména v průběhu mitózy a proto jsou často označovány jako tzv. „mitotické jedy“ ^[66]. Většina z nich ovlivňuje především syntézu tubulinu, proteinu, z něž jsou tvořeny mikrotubuly. Inhibice polymerace tubulinů (kolchicin a alkaloidy z *Vinca rosea* - vinkristin, vinblastin, vindesin, vinorelbin) ^[66] či depolymerace tubulinů (taxany - paclitaxel, docetaxel) ^[66] narušuje průběh mitózy. Alterace mikrotubulů tedy vede k defektní funkci dělicího vřeténka a následně k chybné migraci chromosomů k pólům dělicí se buňky ^[66].

Inhibice proteosyntézy

Nádorové buňky nemají schopnost syntézy některých neesenciálních aminokyselin (L-asparagin, L-glutamin etc.) a tyto musí získávat z extracelulárního prostředí. Nedostatek těchto aminokyselin v extracelulárním prostoru vyvolá u nádorových buněk nutriční deficit, naruší proteosyntézu a omezí proliferaci buňky ^[66]. V praxi se užívá L-asparaginasa. L-asparaginasa je enzym, který vyvolává nedostatek L-asparaginu (přeměňuje ho na kyselinu asparagovou a amoniak). Ovlivnění syntézy bílkovin může být i nepřímé - tj. inhibicí translace (poškození ribozómů - anguidin, degradace polyribosomů - homoharingtonin) ^[66].

Kombinované účinky

Cytostatikum může působit i několika mechanismy zároveň. Často se objevuje alkylační působení ve spojení s antimetabolickým charakterem látky (dakarbazin), interkalační látky působí současně inhibici topoizomerasy (ellipticin) apod. ^[66].

Poškození buněčné membrány

Buňka pro svoji existenci potřebuje neporušenou buněčnou membránu. Veškeré změny ve struktuře buněčné membrány mají letální účinky ^[66]. Některá protinádorová léčiva poškozují buněčnou membránu nádorových buněk (anthracykliny, alkyl-lysofosfolipidy, polyelektrolyty) ^[65, 66].

1.7.2.2. Mechanismus protinádorového účinku hormonů

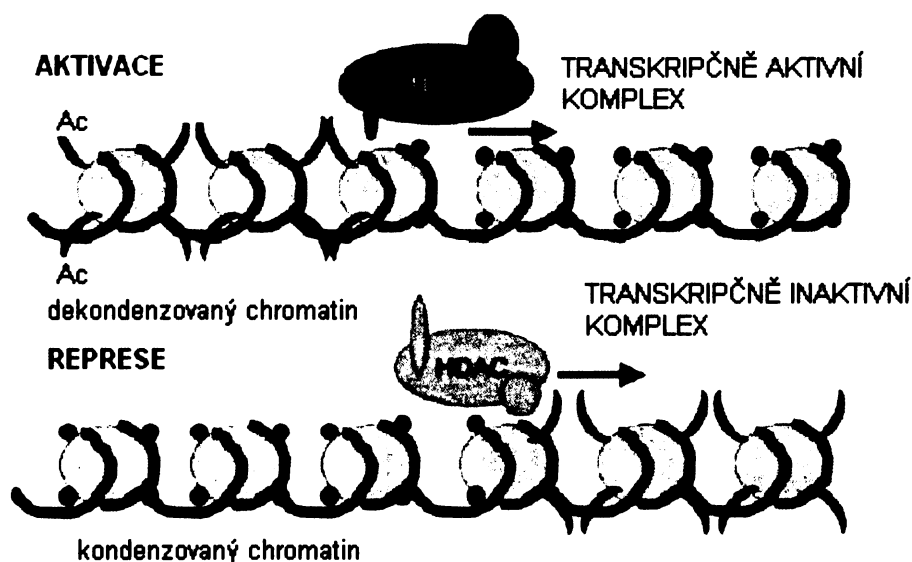
Růst některých nádorových onemocnění je hormonálně závislý. Možnost ovlivnění růstu nádoru hormonem závisí na přítomnosti specifického buněčného receptoru pro hormon v nádorové buňce ^[65].

Pohlavní hormony stimulují růst určitých nádorů (např. estrogen podporuje růst určitých typů rakoviny prsu), a některé látky jim příbuzné proto mohou zablokováním jejich stimulačního působení tento proces zastavit. Růst jiných typů nádorů lze přerušit podáním vysokých dávek synteticky vyrobeného hormonu (např. rakovinu prostaty lze léčit estrogenovým lékem stílbestrolem) ^[9]. V onkologické praxi se užívají především steroidní pohlavní hormony, jejich strukturální analoga, inhibitory enzymů důležitých pro biosyntézu hormonů (androgeny, estrogeny, gestageny, glukokortikoidy, antiandrogeny, antiprolaktiny, inhibitory aromatasy, analoga gonadoliberinu aj.) ^[65, 66].

1.7.2.3. Posílení účinku cytostatik inhibitory histondeacetylas

Histondeacetylasy (HDACs) a histonacetylasy (HATs)

Modifikace histonů (methylace, acetylace, fosforylace, ubiquitinace) v chromosomové struktuře je významná pro regulaci genové exprese. Zejména acetylace histonů úzce souvisí s procesem nádorového bujení. Histonacetyltransferasy (HATs) a histondeacetylasy (HDACs) participují na kontrole stupně acetylace, ovlivňují fyziologické funkce buňky (transkripce, buněčný cyklus, diferenciaci, replikaci DNA), ale též i rozvoj rakoviny [76, 104]. Substrátem obou typů enzymů jsou ε-aminoskupiny lisylových zbytků lokalizované na N-koncích histonů. HATs a HDACs jsou součástí velkých enzymových komplexů (ATP-dependenční chromatin modulující komplexy apod.), které regulují transkripční aktivitu genů [82]. Zjednodušený mechanismus ovlivňování transkripce histonacetyltransferasami a histondeacetylasy ukazuje *Obrázek 3*.



Obrázek 3

Regulace transkripce na základě modifikace histonů (Převzato z [28])

V normálních buňkách existuje rovnováha mezi HATs a HDACs. V nádorových buňkách je rovnováha porušena ve prospěch HDACs, a to vede k zablokování exprese anti-onkogenů (p21, p27, Rb genu). Inhibice HDACs je tedy potenciálním způsobem léčby rakoviny [82].

Inhibitory HDACs

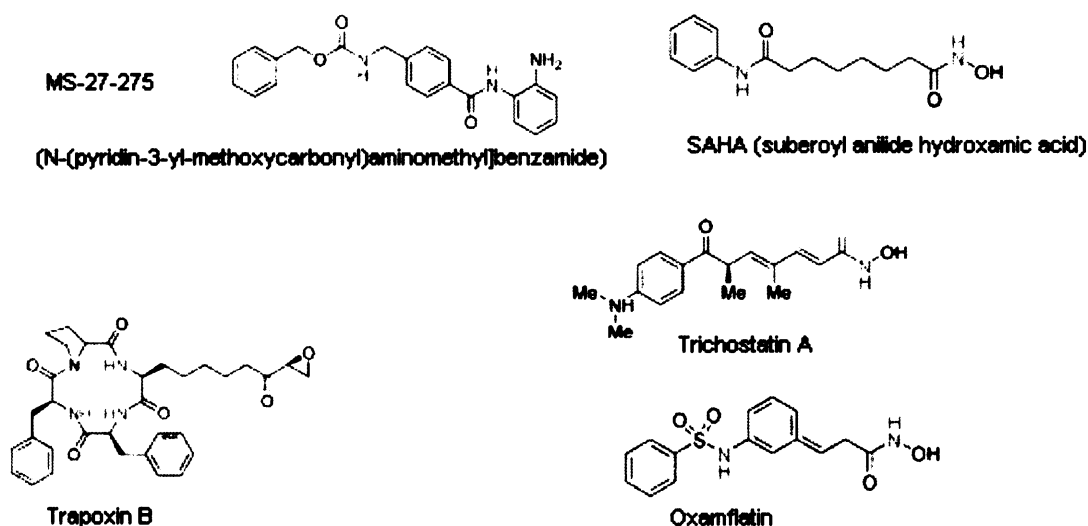
Vlivem inhibitorů histondeacetylasy je chromatin hyperacetylovaný (histony jsou permanentně acetylovány, a to vede k jejich hyperacetylaci a ke ztrátě záporného náboje na jejich koncích). Dochází k otevření chromatinové struktury, což koreluje se zvýšenou citlivostí DNA vůči DNase

I^[52]. Rozvolnění chromatinové struktury způsobené inhibicí histondeacetylas zvyšuje účinnost protinádorových léčiv cílených na DNA nebo na enzymy interagující s DNA pokud jsou aplikovány před cytostatiky. Přidání inhibitorů HDACs až po protinádorovém léčivu nemá synergický vliv na cytotoxicitu^[63].

Inhibitory histondeacetylas jsou v současné době zkoumány jako potenciální protinádorová léčiva a řada z nich je již v klinickém výzkumu. Mezi klinicky (vyjímkou jsou preklinicky testované trichostatin A a oxamflatin) zkoumané inhibitory histondeacetylas lze zařadit **krátké mastné kyseliny** [4-fenylbutyrát, kyselina valproová -VPA-lék původně používaný při farmakoterapii epilepsie), **hydroxamové kyseliny** (TSA (trichostatin A), SAHA (suberoylanilid hydroxamové kyseliny), oxamflatin), **cyklické tetrapeptidy** (trapoxin B), **benzamid** (*N*-(2-aminofenyl)-4-[*N*-(pyridin-3-yl-methoxykarbonyl)aminomethyl]benzamid (MS-27-275)), **elektrofilní deriváty ketonů**.

Nejperspektivnější z uvedených se zatím jeví být SAHA (I/II fáze klinického testování). SAHA je dobře snášen, inhibuje biologický cíl *in vivo* a má protinádorové účinky v pevných a hematologických nádorech^[104].

Příklady některých struktur klinicky zkoumaných histondeacetylasových inhibitorů ukazuje **Obrázek 4**.



Obrázek 4

Příklady struktur histondeacetylasových inhibitorů v klinickém a preklinickém výzkumu (Převzato z^[62])

V diplomové práci jsme studovali účinky kyseliny valproové a trichostatinu A. Obě sloučeniny jsou potenciální protinádorová léčiva^[62]. Valproát je v současné době ve fázi klinického

testování, zatímco trichostatin A ve fázi preklinického testování^[62]. Valproát je léčivo užívané k farmakoterapii epilepsie^[37, 47, 73, 92].

1.7.3. Farmakokinetika protinádorových léčiv

Osud cytostatik v organismu je ovlivňován působením několika faktorů, které spolu úzce souvisejí a vzájemně na sebe navazují. Osud léčiva vychází z jeho chemického charakteru. Celý proces má čtyři základní etapy^[66]:

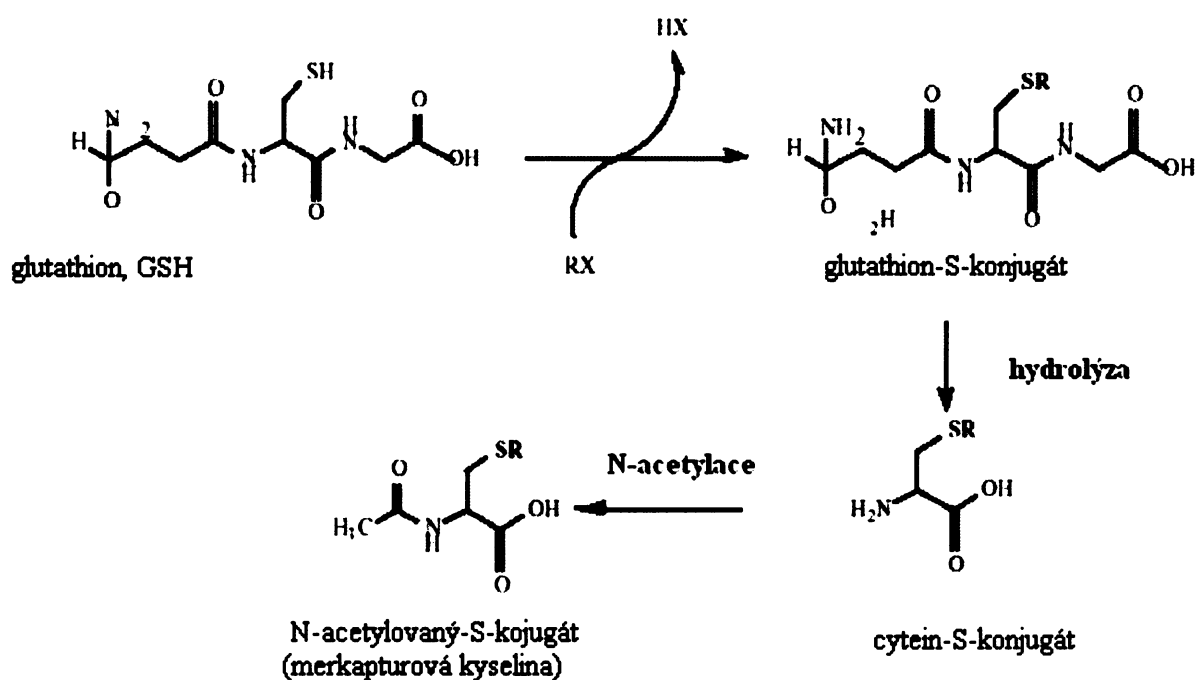
- Resorpce
- Distribuce
- Biotransformace
- Vylučování

Rychlost a stupeň *resorpce* závisí na způsobu aplikace léčiva, na jeho formě a průniku membránami (dáno jeho rozpustností - difúze pasivní či usnadněná, aktivní transport, filtrace membránovými póry, pinocytóza...) ^[66].

Distribuce léčiva též vychází ze způsobu jeho aplikace. Nejčastěji je v těchto případech léčivo transportováno krevním řečištěm, kde se může vázat na krevní elementy či na bílkoviny. Z plazmy jsou látky obvykle distribuovány do extracelulární tekutiny. Po průniku membránou buňky se účinná látka může vázat na intracelulární bílkoviny a lipidy. Během transportu může léčivo na základě svých chemických vlastností intereagovat s celou řadou látek ^[66]. Tomuto lze předcházet využíváním tzv. „drug delivery“ systémů, o kterých bude pojednáno v následující kapitole.

K *biotransformaci* léčiv (xenobiotik) dochází ve dvou fázích. Na úvod je nutné podotknout, že biotransformace xenobiotik u různých organismů není totožná, z čehož vycházejí komplikace při klinickém výzkumu nového léčebného preparátu. Cílem první fáze nazývané *derivatizační* je zvýšení polaritý biotransformované látky ^[154]. Děje se tak reakcemi, při kterých jsou do látky začleňovány polárnější skupiny či jsou „odkrývány“ polární části daného léčiva ^[154]. Vznikající metabolity jsou pak méně rozpustné v lipidech a mohou být terapeuticky významnější než samotné původní léčivo (analogicky tento proces může z tzv. prokarcinogenů - tj. potenciálních karcinogenů vytvořit karcinogeny) ^[131]. V důsledku metabolických reakcí se mění účinnost a fyzikální vlastnosti léčiva ^[65]. Pro některá léčiva je nezbytná enzymová transformace, aby se jejich léčebný účinek mohl projevit. Mezi enzymy katalyzující derivatizační reakce xenobiotik

patří enzymy mikrosomální frakce (tj. subcelulární systém získaný destrukcí endoplasmatického retikula při homogenizaci buněk) a cytosolu (tj. roztok cytoplasmy a isolačního pufru) ^[131]. Enzymy mající klíčový význam v první fázi biotransformace, cytochromy P450 (CYP), jsou přítomné v mikrosomální frakci buněk (systém monooxygenas se smíšenou funkcí - MFO) ^[66, 131]. Druhou fází nazývanou *konjugační* charakterizují reakce léčiv (jejich funkčních skupin) s endogenními látkami organismu (glutathion, kyselina glukuronová, glycin, taurin, aktivní sulfát, cystein, aktivní acetát...), které ještě více zvyšují polaritu léčiva, a tím vysokou měrou usnadňují jeho *vylučování* z organismu ^[66]. Endogenní látky jsou z chemického hlediska relativně malé a hydrofilní molekuly. Významnou roli v deaktivaci karcinogenů hraje tripeptid (γ -glu-cys-gly, GSH) glutathion ^[34, 152]. Mechanismus deaktivace reaktivního metabolitu ukazuje *Obrázek 5*.



Obrázek 5

Schema deaktivace reaktivního elektrofilního metabolitu konjugací s nukleofilním centrem glutathionu (atom S cysteinu). Reakce probíhá buď spontánně či za účasti enzymu glutathion-S-transferasy. Vzniklý konjugát je dále přeměňován až na N-acetyl-L-cysteinový konjugát, který se vylučuje močí. (Převzato z ^[154]).

Konjugáty látek fenolické povahy se sulfátem nebo konjugáty karboxylových kyselin s glycinem či taurinem jsou vylučovány výkaly ^[65, 154]. Finálním produktem degradace endogenních steroidních látek je kyselina cholová, která je též odstraňována z organismu tímto způsobem ^[148].

Léčivo je ve většině případů exkretováno hepatobiliární cestou (játra - žluč), popř. ledvinami (moč) [74, 154].

1.7.4. Význam cytochromů P450 při metabolismu léčiv

Cytochromy P450 (CYP) jsou enzymy zodpovědné v organismu za reakce první fáze biotransformace. Cytochromy P450 se v lidském těle vyskytují především v játrech, ale i v ledvinách, tenkém střevě, kůži, mozku, nadledvinkách [154]. Aktivita jednotlivých forem CYP může determinovat reakci pacienta na podané léčivo. V řadě případů je léčivo preferenčně metabolizováno na farmakologicky účinný produkt pouze některým z CYP. V případě deficiencie či naopak zvýšené koncentrace takového cytochromu P450 u různých pacientů je pak účinnost léčiva značně rozdílná [131]. Z klinického hlediska je znalost, která z lidských forem CYP metabolizuje dané léčivo nezbytná [131].

Mezi CYP nejčastěji metabolizující léčiva patří CYP2D6 (metabolizuje přes 30% běžných léčiv) a zejména CYP3A4 (metabolizuje téměř 50% běžně dostupných léčiv) [154]. Dále lze do této skupiny zařadit CYP s vyhraněnou substrátovou specifitou - např. CYP19 (aromatasa). Tento enzym ovlivňuje vznik nádorů (např.: prsu), jejichž růst je závislý na hladinách estrogenních hormonů. Látky, které regulují aktivitu aromatasy se používají jako protinádorová terapeutika [131, 154].

Dnes je známa celá řada neinvazivních testů ke stanovení aktivity hlavních forem CYP u člověka (fenotypování CYP), které se používají při studiu metabolismu léčiv na dobrovolnících. Jedním z nich je použití specifických substrátů *in vivo* [131]. Nejčastěji jsou v takových studiích používány kofein, kumarin, debrisochin, dextromethorfan, chlorzoxazon, nifepidin [131]. Na základě metabolické aktivity jsou sledovaní jedinci zařazeni do dvou nebo tří kategorií pomalého, středního, rychlého metabolizátora [131]. V rámci farmakogenomiky se zkoumá též exprese cytochromů P450. K určení exprese cytochromů P450 se využívá sledování exprese mRNA a proteinů příslušných cytochromů P450 (genotypování CYP). Je velmi pravděpodobné, že v nejbližší době bude před návrhem chemoterapie u každého pacienta proveden „screening“ jeho cytochromů P450 (genotypování a fenotypování CYP), aby podaná léčiva byla účinná a měla co nejmenší vedlejší účinky [131, 154].

1.7.5. Spektrální charakteristiky cytochromů P450

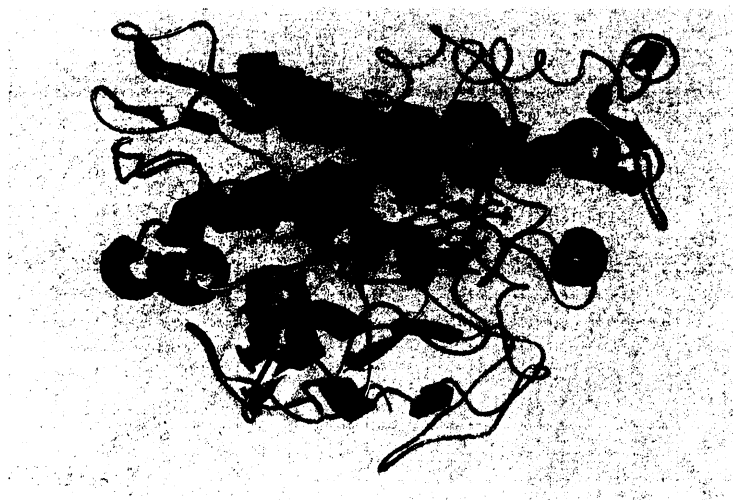
Cytochromy P450 díky přechodnému charakteru hemového železa existují ve dvou spinových formách^[55]. Nízkospinová forma (spin 1/2) a vysokospinová forma (spin 5/2). Nízkospinová forma je charakteristická maximem absorpce při 418 nm (Soretův pás). Ion železa je hexakoordinován a nachází se prakticky v rovině kruhu protoporfyrinu IX. Hemové železo tedy interaguje ještě s dalším ligandem (např. s –OH, –COOH, –NH₂ skupinou postranních řetězců aminokyselin či atomem kyslíku z molekuly vody)^[55]. Vysokospinová forma vykazuje maximum při 390 nm. Ion železa je pentakoordinovaný, je “vytahován” nad rovinu porfyrinového skeletu thiolátovou sírou a všechny jeho valenční elektrony jsou nespárované^[55].

Oba spinové stavy jsou v klidovém stavu v rovnováze. Při vazbě substrátu do vazebného místa enzymu dochází k vytlačení šestého ligandu a nárůstu vysokospinové formy. V tomto případě pak pozorujeme tzv. substrátové spektrum, pro které je typický nárůst absorpance při 390 nm a pokles při 418 nm. Pokud se šestým ligandem stane heteroatom s volným elektronovým párem z molekuly substrátu či nějaká nepřeměňovaná látka vázající se do aktivního centra enzymu, dochází k poklesu absorpance při 390 nm a nárůstu (dle heteroatomu) při 418–460 nm, a enzym vykazuje tzv. ligandové spektrum. Vzácně může též dojít ke kombinaci těchto jevů (jako ligand je vázán kyslík), což se ve spektru projeví poklesem absorpance při 390 nm a nárůstem při 418 nm, pak se jedná o tzv. reverzní substrátové spektrum^[5,55].

Na základě hodnot získaných z diferenčních spekter lze sestavit graf závislosti recipročných hodnot přírůstku vysoko- či nízkospinové formy (rozdíl absorbancí v maximu a v minimu) na reciproké koncentraci přidávané sloučeniny, a ze směrnice tak získat hodnotu zdánlivé spektrální disociační konstanty vyjadřující míru afinity cytochromu P450 pro daný substrát (čím vyšší je hodnota zdánlivé spektrální disociační konstanty, tím je látka horším substrátem)^[5,55].

1.7.6. Aromatasa (CYP19)

Aromatasa (CYP 19) (*Obrázek 6*) je enzym, který hraje důležitou roli v metabolismu endogenních steroidních látek. Podílí se na přeměně androgenů na estrogény. Vzácněji metabolizuje rovněž látky cizorodé. Reakce katalyzované steroidogenními enzymy probíhají primárně v kůře nadledvinek, pohlavních žlázách a v placentě^[131]. Aromatasa se dále vyskytuje např. v tukové tkáni či mozku^[9,75,95,148].



Obrázek 6

Homologní model aromatasy (Převzato z ^[75])

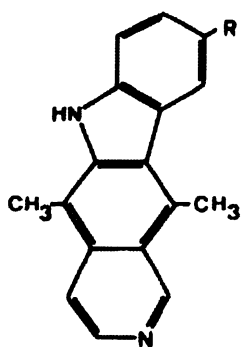
Aromatasa je exprimována v normální i nádorové tkáni mléčné žlázy a moduluje zde koncentraci estrogenů. Zvýšená koncentrace estrogenů může potencovat proliferaci buněk, estrogeny tak působí jako promotory, které přispívají k rozvoji nádorového procesu. Zvýšený obsah aromatasy byl nalezen v buňkách tzv. „hormon-dependentních nádorů“, tj. nádorů závislých na hladině hormonů, např. prsu, prostaty, ovaria ^[111]. V případě karcinomu prsu se právě estrogenům přisuzuje majoritní podíl v diferenciaci a proliferaci nádorově modifikovaných buněk, neboť mohou aktivovat různé stimulační faktory. Klíčovým estrogenem je zde estradiol, který vzniká přímo v ovariu nebo v epiteliálních buňkách prsní žlázy. Cílem hormonální léčby je potlačení účinku estrogenů. Proto jsou při terapii adenokarcinomu mléčné žlázy používány látky inhibující aktivitu aromatasy ^[75].

1.8. Ellipticin a možnosti jeho využití pro cílenou terapii

1.8.1. Základní charakteristiky ellipticinu

Struktura ellipticinu

Ellipticin je z chemického hlediska pyridokarbazol (strukturu znázorňuje *Obrázek 7*), jehož systematický název je **5,11-dimethyl-6H-pyrido [4,3-*b*] karbazol**.

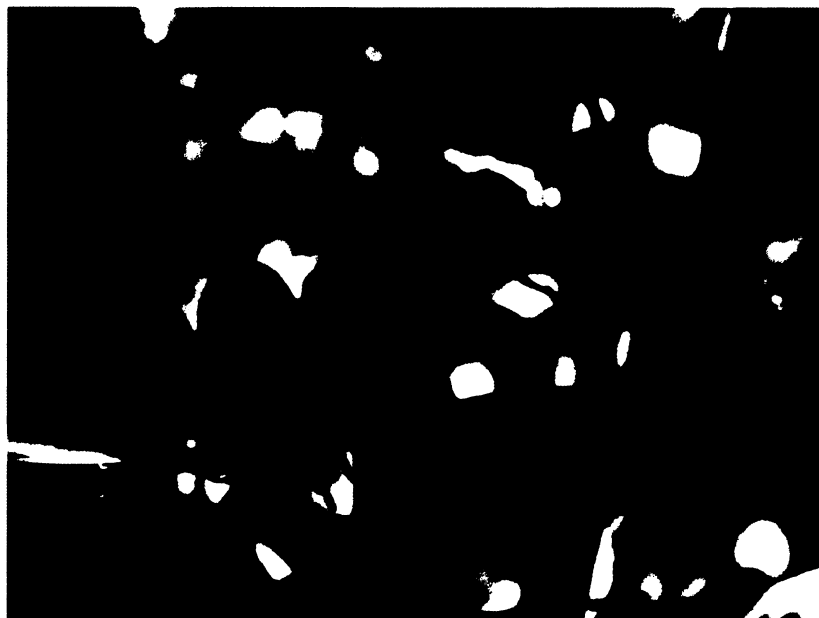


Obrázek 7

Struktura ellipticinu (Převzato z ^[78])

Původ ellipticinu

Ellipticin a jeho deriváty jsou alkaloidy vykazující výraznou protinádorovou aktivitu. Jedná se o látky přírodního původu, které lze izolovat z rostlin čeledi *Apocyanaceae* (*Ochrosia elliptica*, *Ochrosia borbonica* = *Ochrosia maculata*, *Excavatia coccinea* etc.) ^[46, 88]. *Ochrosia elliptica* je malý, tropický, stále zelený strom rostoucí v Austrálii, Madagascaru, Hawaii, a na dalších ostrovech v Tichém oceánu ^[46] viz *Obrázek 8*, *Obrázek 9*.



Obrázek 8

Ochrosia elliptica (plody). (Převzato z ^[156])

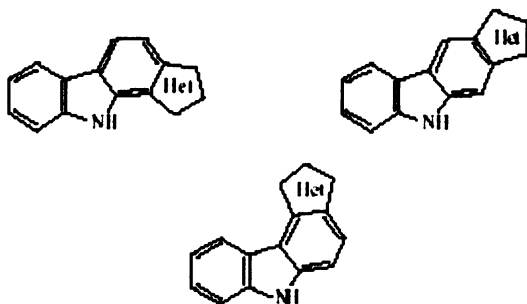


Obrázek 9

Ochrosia elliptica (strom). (Převzato z ^[156])

Ellipticin byl poprvé izolován v roce 1959 z listů rostliny *Ochrosia elliptica* Labill ^[46], ale jeho biologické působení (a některých jeho derivátů) bylo objeveno až v roce 1967, kdy se podařilo ellipticin uměle syntetizovat ^[27]. Struktura ellipticinu byla potvrzena jeho syntézou a chemickými metodami (především rentgenostrukturální analýzou krystalů) ^[22]. Na přelomu šedesátých a sedmdesátých let byl intenzivně zkoumán ellipticin samotný, ale poté, co byla během preklinického testování objevena jeho kardiovaskulární toxicita a skutečnost, že způsobuje hemolýzu, se vědecký zájem orientoval především na jeho strukturální deriváty v poloze 9 - (9-hydroxyellipticin, 9-methoxyellipticin a elliptinium (celiptium)) a posléze i jiná strukturální analoga ^[116].

Výzkum heterocyklických sloučenin se soustředí především na strukturální analoga karbazolů (zejména ellipticinu a jeho derivátů) ^[57, 64]. Příklady zkoumaných karbazolových analogů uvádí *Obrázek 10*.



Obrázek 10

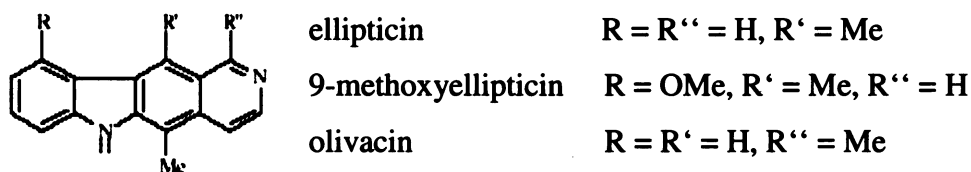
Strukturální modifikace zkoumaných karbazolových analogů - heterocyklus může být pěti či šestičlenný (pyrrol, furan, thiophen, selenophen, oxazol, diazol, thiazol). (Převzato z [64])

1.8.2. Deriváty ellipticinu

Přírodní deriváty ellipticinu

V přírodě se vyskytující deriváty ellipticinu jsou **9-methoxyellipticin** a **olivacin**, jejich strukturu znázorňuje *Obrázek 11*. Oba vykazují, podobně jako ellipticin, protinádorové účinky [84].

9-methoxyellipticin byl izolován z rostliny *Ochrosia elliptica* (Apocyanaceae), olivacin z *Aspidosperma olivaceum* (Apocyanaceae) [88].

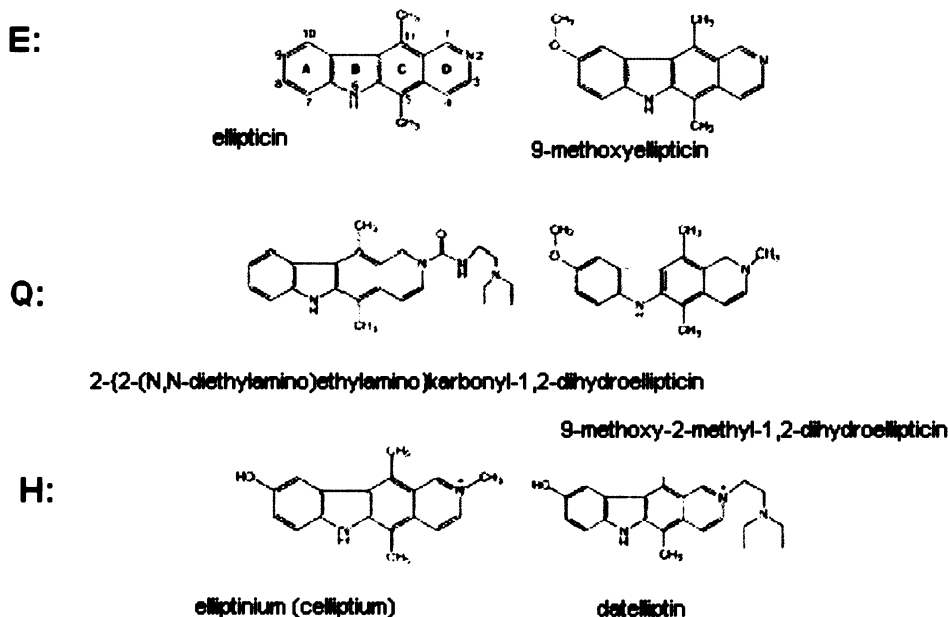


Obrázek 11

Schema struktury ellipticinu a jeho přírodních derivátů. (Převzato z [84])

Syntetické deriváty ellipticinu

Příklady některých synteticky připravených derivátů ellipticinu, které jsou klasifikovány do tříd E, Q, H podle NCI („National Cancer Institute“) [116] ukazuje *Obrázek 12*.



Obrázek 12

Třídy E, Q, H ellipticinových analogů podle NCI („National Cancer Institute“). E: ellipticiny, Q: N²-substituované ellipticiny, H: 1,2- dihydrogenované ellipticiny (Převzato z [116])

V řadě laboratoří byla molekula ellipticinu synteticky modifikována za účelem přípravy „cíleně směřovaného léčiva na bázi ellipticinu“ [130].

Syntetické modifikace ellipticinu umožňují [130]:

- Zvýšení protinádorového (cytotoxického) účinku.
- Modulaci hydrofobicity (biodostupnost - poměr mezi hydrofobními a hydrofilními vlastnostmi léčiva).
- Zvýšení selektivity a specifity ellipticinu vůči nádoru.

Místa modifikací v molekule ellipticinu [130]:

Atom uhlíku v poloze 9, např.: **9-hydroxyellipticin** (tj. majoritní metabolit ellipticinu v řadě organismů [56, 65, 74]), **9-methoxyellipticin**, **9-chlorellipticin**.

Atom dusíku v poloze 2, např.: **9-hydroxy-2-methylellipticinium** (ve formě acetátu- je terapeuticky nejúčinnějším derivátem ellipticinu, používá se při léčbě nádorů prsu s kostními metastázemi, leukemií [26, 61, 65]) **9-methoxy-2-methylellipticinium-acetát** (mozkové nádory, neúčinný vůči pevným nádorům *in vivo*), **9-chlor-2-methylellipticinium-acetát** (účinný vůči pevným nádorům).

Biochemické vlastnosti derivátů ellipticinu:

Ellipticin je přes buněčnou membránu transportován snadno pasivní difuzí, díky svému hydrofobnímu charakteru. Hydrofobní charakter ellipticinu však znesnadňuje jeho distribuci v organismu. Derivatizace v poloze 2 na atomu dusíku způsobí vznik náboje na molekule ellipticinu. Deriváty se proto užívají ve formě solí. Tedy vede ke zvýšení hydrofilních vlastností ellipticinu. To sice vede k významnější distribuci derivátu v organismu, ale naopak i ke zhoršení jeho transportu přes buněčné membrány ^[130].

Optimálním řešením je využití již dříve zmíněných transportních systémů („drug delivery systémů“), které zaručí transport účinné látky do cílového místa, aniž by snižovaly jeho protinádorovou účinnost (naopak v ideálním případě se cytotoxicita léčiva zvyšuje), umožní zvýšení distribuce léčiva a omezí jeho vedlejší nežádoucí účinky na zdravé buňky ^[130].

1.8.2.1. Cíleně směřované deriváty ellipticinů

Ellipticin a jeho některé deriváty mají vlastnosti vhodné (výrazná hydrofobicita, nádorová cytotoxicita a nízké vedlejší účinky) pro jejich užití v komplexu s neselektivně selektivními popř. neselektivními nosiči („drug delivery systémy“) ^[130].

Nejvýznamnější z dosud testovaných konjugátů ellipticinu jsou komplexy esterů ellipticinů s lipoproteiny a konjugát ellipticinu s lidským sérovým albuminem (HSA) ^[130].

Komplexy esterů ellipticinů s lipoproteiny

Nádorové buňky potřebují velké množství cholesterolu pro syntézu buněčné membrány nově syntetizovaných buněk ^[42]. Cholesterol mohou získávat buď syntézou *de novo* či degradací LDL částic („low density lipoprotein“) ^[42]. Nádorové buňky exprimují receptory pro LDL částice a také LDL částice metabolizují je daleko rychleji a ve větším množství než buňky zdravé ^[42]. Toho lze využít při konstrukci tzv. selektivních „drug delivery systémů“, kde LDL částice fungují jako specifický nosič pro protinádorové léčivo (ellipticin) ^[43, 72, 130]. Léčivo je do komplexu s LDL částicemi inkorporováno na základě hydrofobních interakcí ^[43, 72, 130]. Vzniká tak velmi stabilní komplex ^[43, 72, 130].

Nejvyšší účinnosti a zvýšení cytotoxických účinků oproti volnému léčivu bylo dosaženo vytvořením komplexu LDL částic s 9-hydroxy-2-methylellipticinium-acetátem, jehož výrazná polarita byla snížena esterifikací kyselinou olejovou (vznikl ester s hydroxylovou skupinou v poloze 9 ellipticinového skeletu) ^[114].

Konjugát ellipticinu s lidským sérovým albuminem

Lidský sérový albumin (HSA) je transportní protein o vysoké molekulové relativní hmotnosti ($M_r = 66\,500$) [148]. Využití této látky jako selektivního „drug delivery systému“ je vysoce pravděpodobné vzhledem k vlastnostem, které vykazuje vůči maligně transformovaným buňkám [128]. Vysoká relativní molekulová hmotnost HSA usnadňuje transport léčiva k nádoru díky tzv. EPR efektu („enhanced permeability and retention effect“), který vyvolává tzv. pasivní směřování („passive tumor targeting“) [50, 65, 120, 148]. Afinita HSA je však mnohonásobně zvýšena ve prospěch nádorových buněk, které ho specificky pohlcují a degradují [122]. V organismu je HSA biologicky stabilní, je snadno dostupný a pro lidský organismus netoxický a neimunogenní [122].

1.8.3. Farmakokinetika ellipticinu

Chadwick se spolupracovníky v sedmdesátých letech provedl rozsáhlou farmakokinetickou studií ellipticinu s využitím jako modelových organismů myší, potkanů, psů a opic [56]. Ellipticin byl zvířatům podáván intravenózně v dávce 6 mg na 1 kg hmotnosti experimentálního zvířete (vyjímkou byly opice: 3 mg /kg) [56].

Touto studií bylo zjištěno, že ellipticin je rychle, ale nerovnoměrně distribuován do různých orgánů včetně mozku (hematoencefalickou bariéru překonává buď díky své hydrofobicitě na základě pasivní difúze, či využívá dosud neznámých aktivních transportních procesů) [56].

Rychlost eliminace ellipticinu z krve, orgánová distribuce i exkrece jsou závislé na druhu organismu, kterému byl ellipticin podán [56].

Ellipticin užívaný v klinické praxi je pacientům podáván intravenózně (nejčastější denní dávka: 80 mg/m², tj. asi 2,13 mg/kg - po dobu tří dní) [56, 65]. Poločas ellipticinu v organismu se pohybuje v rozmezí 8 - 51 hodin v závislosti na pacientovi (inter-individuální variabilita) [56].

Z těla je ellipticin eliminován zejména hepatobiliární cestou (feces) a z 16 % cestou renální filtrace [56]. Ellipticin je slabá báze ($pK = 5,8$), v kyselém pH gastrointestinálního traktu je ionizován a může být resorbován buňkami střevní sliznice (takto se vyloučí přibližně 15% z celkové dávky léčiva) [56]. Biotransformace ellipticinu probíhá především v játrech (majoritní produkt je v řadě organismů 9-hydroxyellipticin, který je rovněž majoritním metabolitem, který je z těla vylučován.) [56, 65, 74].

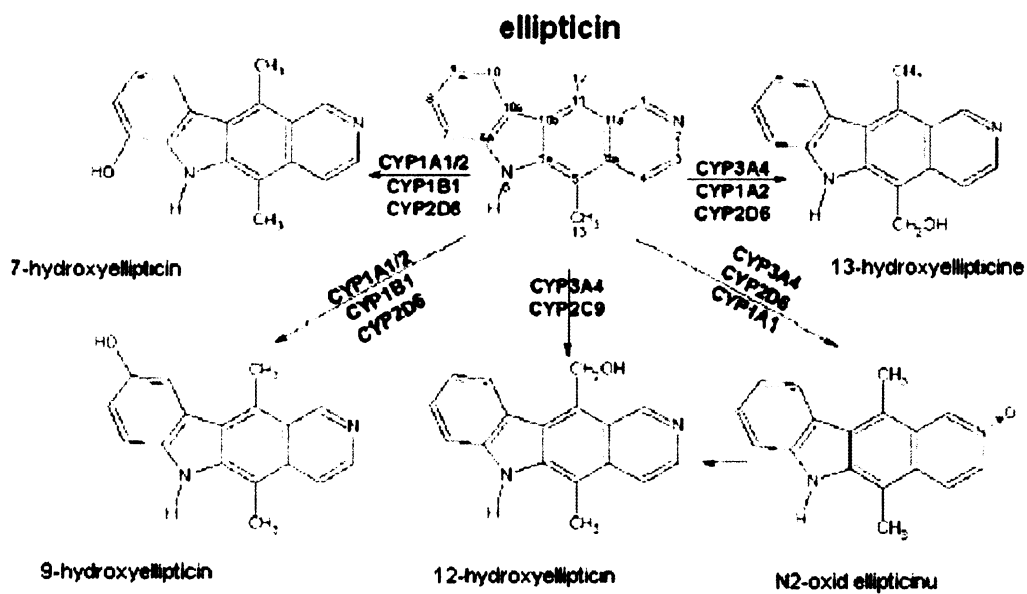
1.8.3.1. *Biotransformace ellipticinu*

Hlavním místem biotransformace ellipticinu jsou játra ^[56, 65]. V játrech laboratorního potkana je ellipticin majoritně přeměňován na 9-hydroxyellipticin, který je dále konjugován na glukuronát nebo sulfát a vyloučen z organismu ^[65]. Hydroxylace v poloze 9 probíhá přibližně 3x intenzivněji u zvířat premedikovaných methylcholanthrenem (induktor podrodiny CYP1A a formy CYP1B1), zatímco u zvířat premedikovaných fenobarbitalem pouze 2x intenzivněji (induktor CYP2B) ^[56].

Po 24 hodinách dochází k prakticky úplnému vyloučení ellipticinu z organismu (platí pro sledované modelové organismy) a ve tkáních se vyskytují jen metabolity v nízké koncentraci ^[56]. Výskyt v subcelulárních frakcích je ovlivněn zejména interakcí ellipticinu s DNA, RNA, proteiny a lipidy ^[31, 32, 45, 56, 65, 78, 80, 92, 138].

Ve tkáních, krvi, žluči se ellipticin vyskytuje částečně v ellipticin-lipidovém komplexu, který jeho farmakokinetiku s největší pravděpodobností neovlivňuje ^[56]. Transport ellipticinu v organismu je umožněn vazbou ellipticinu na transportní protein β -laktoglobulin ^[31]. Bylo zjištěno, že hormon insulin má vliv na zvýšení transportu tohoto léčiva ^[94].

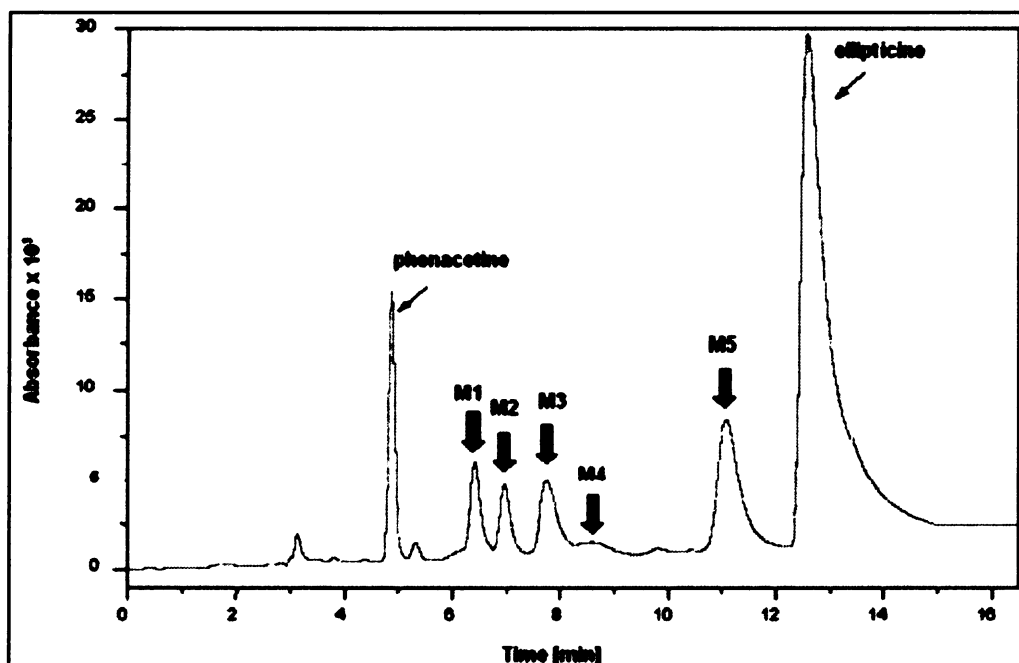
Cytochromy P450 oxidují ellipticin na pět různých metabolitů. Kromě 7-hydroxyellipticinu mají všechny metabolity ellipticinu vyšší cytotoxické účinky než samotná parentální molekula. Majoritní enzymy metabolisující ellipticin jsou lidské CYP3A4 a CYP1A1/2 ^[137]. Tvorba metabolitů ellipticinu je dána působením různých forem cytochromu P450, jak dokládá *Obrázek 13*. Vedle cytochromů P450 je ellipticin oxidován též peroxidasami.



Obrázek 13

Schema metabolismu ellipticinu lidskými cytochromy P450 (Převzato z ^[137])

Ke studiu metabolismu ellipticinu a separaci jeho metabolitů se používá vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC). Metabolity jsou ellipticinu jsou pracovně označovány podle elučních profilů jako metabolity M1, M2, M3, M4 a M5. Jednotlivé metabolity ellipticinu vzniklé působením cytochromů P450, separované vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií, a jejich označení ukazuje *Obrázek 14*.



Obrázek 14

HPLC metabolitů ellipticinu, které vznikly působením cytochromů P450 na ellipticin. M1= 9-hydroxyellipticin, M2= 12-hydroxyellipticin, M3= 13-hydroxyellipticin, M4= 7-hydroxyellipticin, M5= N²-oxid ellipticinu. (Převzato z [127]).

1.8.4. Protinádorové působení ellipticinu

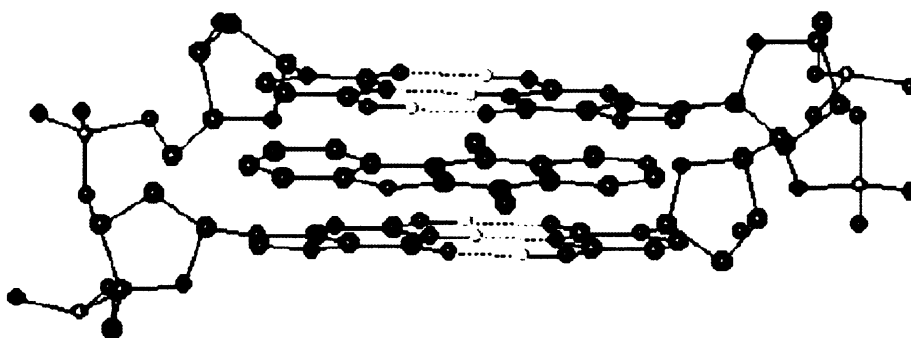
1.8.4.1. Mechanismus nespécifického účinku ellipticinu:

Ellipticin a jeho deriváty jsou protinádorová léčiva, jejichž mechanismus působení není dosud jednoznačně rozluštěn. Bylo zjištěno, že ellipticin může působit několika způsoby:

- Interkalace do dvojšroubovicové struktury DNA
- Inhibice topoisomerasy II
- Inhibice fosforylace proteinu p53
- Inhibice oxidační fosforylace v mitochondriích
- Inhibice telomerasy
- Inhibice DNA helikasy

Interkalace ellipticinů do struktury DNA vychází z velikosti a tvaru jejich molekul a je umožněna slabými reverzibilními hydrofobními interakcemi s bázemi DNA [58, 77] (Obrázek 15). První interkalační model popsal Lermann [71] a tento model, založený na inserci planárních aromatických molekul mezi páry bazí DNA, vyhovuje interkalačním modelům s látkami typu

anthracyklinů, aktinomycinů, akridinů včetně ellipticinu ^[71]. Určující pro orientaci molekuly ellipticinu je interakce mezi jeho methylovou skupinou a thyminem v interkalačním místě ^[121].



Obrázek 15

Ellipticin interkalovaný v DNA (Převzato z ^[1])

Ellipticin ovlivňuje katalytickou funkci *topoisomerasy II*. Topoisomerasa II je nukleární enzym, který zabraňuje „překroucení“ DNA v průběhu replikace, a tedy vzniku zlomů v řetězci DNA. Mechanismus účinku topoisomerasy II spočívá v navázání se na DNA (na oba řetězce dvoušroubovice DNA), rozštěpení řetězců a jejich následnou ligaci. Ellipticin intereaguje s topoisomerasou II, vytvořením katalyticky inaktivního komplexu blokuje ligaci rozštěpených řetězců DNA. Tím podporuje štěpení DNA na kratší úseky. Ellipticin může ovlivňovat funkci topoisomerasy II i přímou reakcí s DNA. V obou případech vznikající zlomy v DNA jsou pro buňku letální ^[11, 36, 40, 41, 81, 149].

Ellipticin působí též na funkci *proteinu p53*. Protein p53 je produktem tumor supresorového genu. Pokud je aktivován, stimuluje transkripci genu kódujícího Cdk-inhibiční protein označovaný jako p21. Tak se zvyšuje koncentrace proteinu p21, který se naváže na komplex cyklinů S-fáze s Cdk. Tento komplex je zodpovědný za přechod do S-fáze, a p21 tak blokuje jeho funkci. Zastavení buněčného cyklu v G₁ – fázi poskytuje buňce čas na opravu DNA dříve, než dojde k její replikaci. Pokud protein p53 chybí, či je defektní, replikace postižené DNA vede ke vzniku vysokého počtu mutací a zvýšené pravděpodobnosti vzniku nádorového bujení ^[8]. Bylo zjištěno, že 9-hydroxyellipticin indukuje apoptózu v G₁ – fázi buněčného cyklu v mutantních buňkách transfekovaných proteinem p53 (tzv. Saos-2 buňky), zatímco v identických, ale proteinem p53 netransfekovaných buňkách, k indukci apoptózy nedochází ^[139].

Ellipticiny jsou schopny obnovit původní funkci proteinu p53, buď mechanismem inhibice specifické cyklin-dependentní kinas ^[91], kdy akumulace defosforylovaného mutantního proteinu

p53 může též indukovat apoptózu^[91], nebo aktivaci transkripce mutantního tumor supresorového genu *p53*^[12, 14, 51, 90, 117, 150, 155].

Interakce ellipticinu a některých jeho derivátů s vnitřní mitochondriální membránou vede k *inhibici* elektronového transportu (na úrovni cytochrom c oxidasy) a k porušení *oxidační fosforylace*^[32, 49]. Výsledkem je snížení koncentrace ATP v buňkách vedoucí k jejich zániku^[32].

Molekula 9-hydroxyellipticinu inhibuje v důsledku své téměř planární aromatické struktury enzym *telomerasu*. Inhibice telomerasy byla však zatím prokázána pouze v buněčných kulturách, nikoli *in vivo*^[96].

Inhibice DNA helikasy ellipticinem byla zjištěna pouze v případě chloroplastové DNA^[145].

1.8.4.2. *Mechanismus specifického působení ellipticinu*

Ellipticin a jeho deriváty vykazují specifitu pouze vůči určitým typům neoplasie, což je v rozporu s jejich nespecifickým metabolickým působením^[16, 38, 102, 130, 133, 137].

Popsané mechanismy účinku ellipticinu jsou nespecifické a odpovídají působení mnoha slabších protinádorových látek než je ellipticin. Specifita a vysoká účinnost ellipticinu tedy musí být způsobena mechanismem jiným, než jsou mechanismy výše uvedené. Skutečně, nedávno bylo objeveno, že specifita ellipticinu vůči nádorovým buňkám může být způsobena rozdílnou enzymovou výbavou lidského organismu^[4, 16, 38, 39, 102, 126, 128, 130, 138]. Bylo totiž zjištěno, že ellipticin působí jako „pro-léčivo“, které je metabolicky aktivováno enzymy vyskytujícími se též v cílových nádorových tkáních (CYP, peroxidasy) na biologicky účinnější deriváty. Cytochromy P450 1A1, 1B1, 2B6, 2E1 a 3A4^[34] jsou spolu s peroxidasami, laktoperoxidasami a prostaglandin H syntetasami exprimovány v buňkách lidských nádorů prsu^[152]. V případě některých leukémií je exprimována myeloperoxidasa^[152]. Prostaglandin H syntetasy jsou přítomny též v ledvinách a nádorech mozku (např. COX-2)^[133]. Jmenované enzymy jsou ve vysoké míře exprimovány v nádorech citlivých na léčbu ellipticinem. Metabolity vzniklé působením těchto enzymů generují kovalentní adukty s DNA, a tím efektivněji poškozují nádorové buňky^[5, 16, 38, 39, 102, 126, 128, 136, 137].

Jak již bylo uvedeno výše, bylo prokázáno, že za aktivaci ellipticinu jsou odpovědné především cytochromy P450 a peroxidasy, o kterých je podrobně pojednáno v kapitole 1.8.4.2. Cytochromy P450 zodpovědné za aktivaci ellipticinu jsou uvedeny v *Tabulce 1*.

Tabulka 1

Cytochromy P450 zodpovědné za aktivaci ellipticinu v lidském organismu a v organismu laboratorního potkana (Převzato z [137])

cytochrom P450	člověk	potkan
CYP3A1	ne	ano
CYP3A4	ano	ne
CYP1A1/2	ano	ano
CYP1B1	ano	ano

Ellipticin je působením cytochromů P450 přeměňován na pět metabolitů, z nichž pro tvorbu aduktů s DNA jsou významné 12-hydroxyellipticin (resp. N²-oxid ellipticinu) a 13-hydroxyellipticin [133, 136, 137].

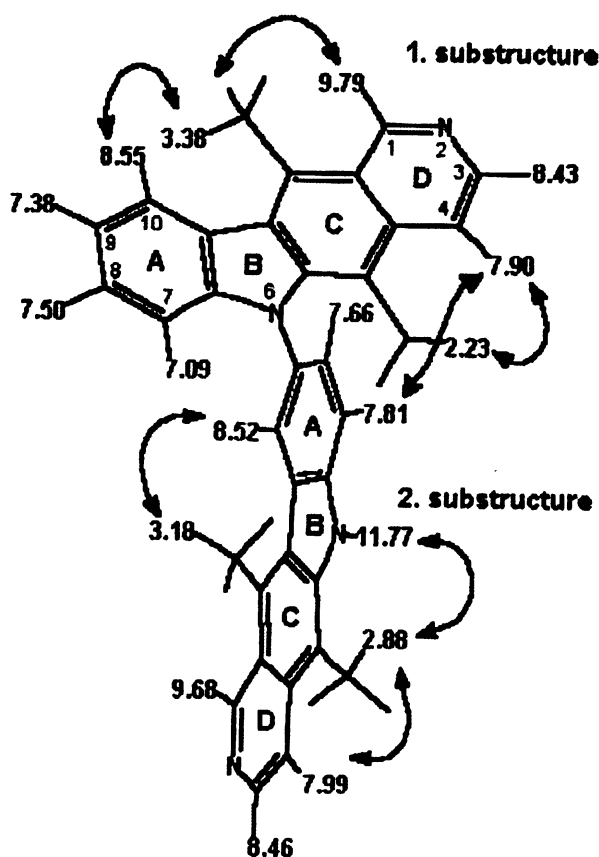
Oxidace ellipticinu peroxidasami (lidská myeloperoxidasa (MPO), hovězí laktoperoxidasa (LPO), ovčí COX-1, lidská COX-2 a křenová peroxidasa (HRP)) poskytuje tytéž adukty s DNA jako ty, které byly nalezeny po jeho oxidaci cytochromy P450 [133, 136].

Ellipticin je nejúčinněji oxidován křenovou peroxidasou (HRP), ve srovnání s lidskou myeloperoxidasou (MPO), hovězí laktoperoxidasou (LPO). Reakce, při které vzniká přednostně dimer ellipticinu, probíhá nejlépe v kyselé oblasti pH (pH 6,4), zatímco v oblasti vyššího pH je množství vznikajícího dimeru ellipticinu nižší na úkor aktivace ellipticinu pro tvorbu kovalentních aduktů s DNA [99].

Vznik identických aduktů ellipticinu s DNA působením peroxidas [133, 136] a také působením CYP [126, 138] byl prokázán *in vitro* dvěma na sobě nezávislými metodami, „³²P-postlabellingu“ a metodou vazby radioaktivně značeného ³H-ellipticinu [133].

Mechanismus oxidace ellipticinu cytochromy P450 a peroxidasami byl objeven v naší laboratoři [136].

Peroxidasová oxidace ellipticinu probíhá jako jednoelektronová oxidace, při které vznikají volné radikály, které v závislosti na prostředí dávají vzniknout ellipticinovému dimeru či aduktům s DNA. Majoritním produktem je dimer ellipticinu (strukturu ukazuje *Obrázek 16*). Dvě molekuly ellipticinu se váží prostřednictvím atomu N⁶ pyrrolového kruhu a C9 atomu druhé ellipticinové struktury [100, 133]. Dimer ellipticinu je hlavním produktem oxidace ellipticinu v experimentálních podmínkách *in vitro* [100, 133].



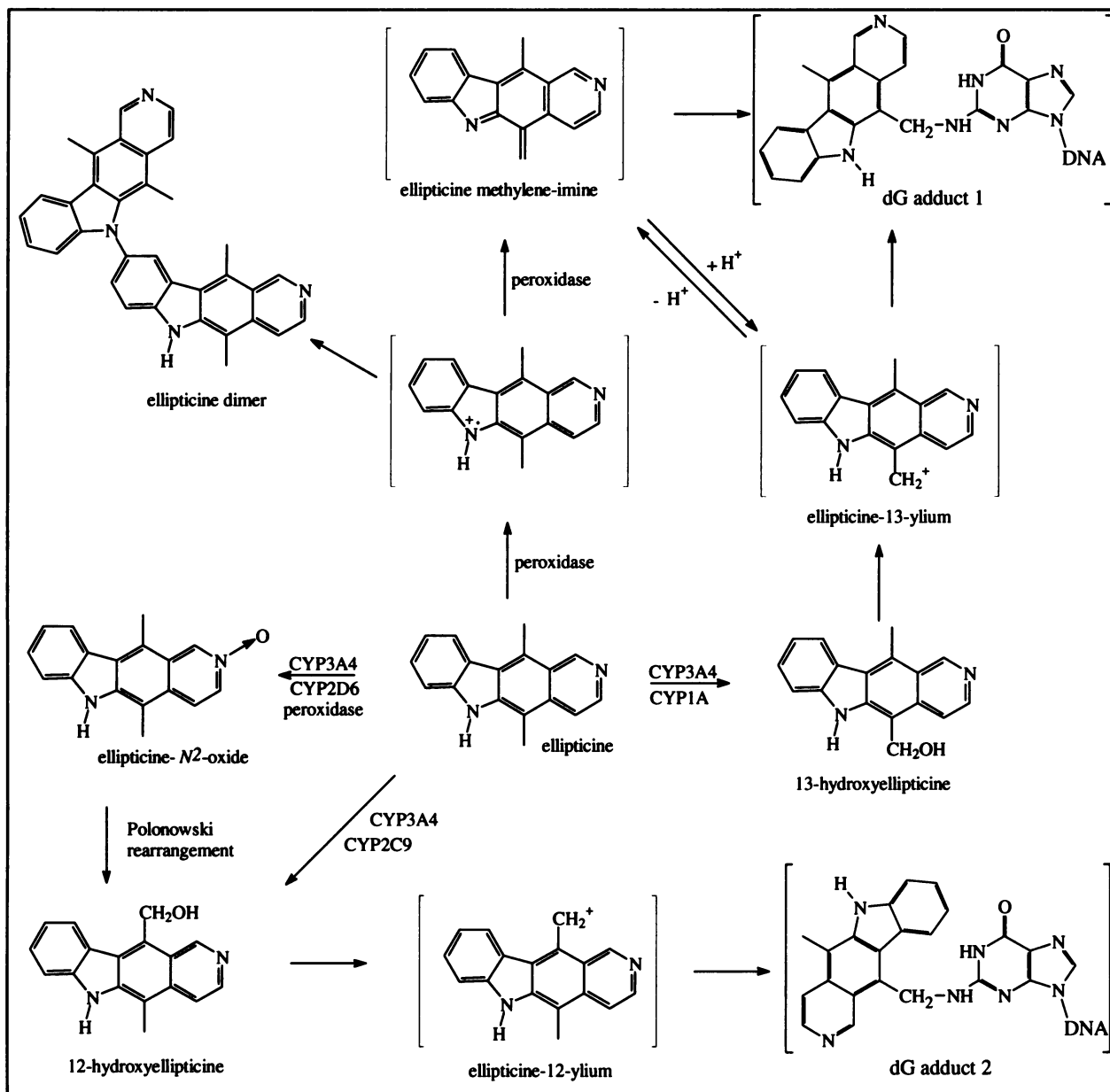
Obrázek 16

Struktura dimeru ellipticinu (Převzato z ^[133])

Minoritním produktem oxidace je ellipticin-N²-oxid ^[100, 133]. Obě struktury byly identifikovány užitím nukleární magnetické rezonance (NMR) ^[133]. Tvorba aduktu č.1 ellipticinu s DNA působením peroxidasy koreluje se sníženou hladinou dimeru ellipticinu ^[133]. Přestože v experimentech provedených v naší laboratoři nebyla prokázána peroxidasová reakce, která by probíhala mechanismem dvou elektronové oxidace (meziproductem by byl methylen-imin) (Obrázek 17), je pravděpodobné, že k tomuto ději dochází ^[100, 133]. Tento předpoklad podporuje zjištění, že adukty s DNA, které vznikají peroxidasovou reakcí, jsou totožné s adukty vznikajícími po aktivaci ellipticinu cytochromy P450, (Obrázek 17), a dále, že pro tuto reakci jsou nutná stechiometrická množství ellipticinu a peroxidasy.

Metabolity ellipticinu vzniklé působením peroxidasy a CYP se přednostně váží na deoxyguanosin DNA. 13-hydroxyellipticin, vzniklý metabolickou aktivací ellipticinu působením cytochromů P450, se v závislosti na podmínkách prostředí samovolně rozpadá na reaktivní karbeniový ion, který reaguje s některým z nukleofilních center (mechanismem nukleofilní Michaelisovy adice) deoxyguanosinových zbytků na DNA (nejspíše s exocyklickou -NH₂ skupinou guaninu), a tvoří

tak DNA adukt 1 (*Obrázek 17*). Stejný adukt se tvoří i při působení peroxidasy na ellipticin, nejspíše právě již zmíněnou dvou-elektronovou oxidací metabolitu ellipticinu na methylen-imin. Methylen-imin je velmi reaktivní a může se přeměnit na stejný karbeniový ion jako při působení cytochromů P450 na ellipticin, popř. může sám interagovat s DNA. V obou případech tedy vzniká stejný adukt s DNA, adukt 1. Adukt 2 je tvořen obdobně přeměnou 12-hydroxyellipticinu přes karbeniový ion jak u aktivace ellipticinu cytochromy P450, tak při peroxidasové aktivaci. 12-hydroxyellipticin vzniká tzv. Polonowského přesmykem z N²-oxidu ellipticinu. N²-oxid ellipticinu je společným produktem při peroxidasové reakci a reakci řízené cytochromy P450. Obě tyto metabolické cesty poskytují tedy opět stejný adukt s DNA, adukt 2 [128, 133, 136, 137, 138]. Popsané reakce ukazuje *Obrázek 17*.



Obrázek 17

Schema metabolické aktivace ellipticinu (působením CYP a peroxidas) znázorňující vzniklé metabolity, a ty z nich, které tvoří adukty s DNA (Převzato od Prof. RNDr. Marie Stiborové, DrSc. z citace ^[125])

Kovalentní adukty ellipticinu s DNA byly detekovány *in vitro* po inkubaci DNA s ellipticinem, ale i *in vivo* v DNA izolované z různých tkání potkana ^[39] a myši ^[125].

Adukty byly dále detekovány v DNA lidských nádorových linií buňky prsního adenokarcinomu: MCF-7 („breast carcinoma cell line“) ^[16], leukemické buňky HL-60 („human promyelocytic leukemia cell line“) ^[101] a CCRF-CEM („human T cell lymphoblast-like cell line“) ^[101].

Aktivity cytochromů P450 a peroxidas v lidských nádorových liniích jsou v úzkém vztahu s cytotoxicitou ellipticinu ^[136].

Chování elliptycinu jako alkylačního (arylačního) činidla nutně musí vést k otázce, zda takováto modifikace DNA nemá vedlejší genotoxické účinky (v procesu karcinogeneze je působení takovýchto látek prvním krokem ke vzniku iniciované buňky), a zda jsou vznikající adukty ve zdravých buňkách reparovány či nikoli ^[134].

Na modelovém organismu laboratorního potkana bylo v naší laboratoři zjištěno, že po ukončení aplikace elliptycinu k opravě poškozené DNA ve zdravých buňkách skutečně dochází. Vzniklé adukty tedy nejsou perzistentní ^[127, 134]. Zda totéž lze předpokládat i pro člověka, je však stále diskutabilní ^[127, 134].

Expresce cytochromů P450 je ovlivněna řadou faktorů, např.: Ah receptorem ^[13, 59] významná je však možnost zvýšení exprese CYP působením elliptycinu ^[6]. Ukázalo se, že ellipticin působí jako induktor cytochromů P450 v organismu laboratorního potkana ^[4, 6] a některých dalších enzymů jako je např. DT-diaforasa ^[129].

Je tedy možné, že sama aplikace elliptycinu může stimulovat jeho farmakologické působení jako léčiva ^[6].

1.8.5. Klinické využití elliptycinu a jeho derivátů

Pro klinické využití elliptycinu a jeho derivátů má největší význam vysoká účinnost těchto látek proti nádorovým onemocněním a slabé vedlejší toxické účinky ^[66].

Vedlejší účinky se projevují jako nevolnost, zvracení, xerostomie (suchost v ústech) ^[61, 113]. Závažnější následky má při dlouhodobém užívání projevující se hematologickou toxicitou ^[113]. Bylo zjištěno, že hematologická toxicita je nejspíše imunoalergického původu ^[7]. Nefrotoxicita je nejzávažnějším toxickým účinkem elliptycinu ^[66]. Vědecké studie však poukazují na výskyt těchto nežádoucích účinků jako na poměrně vzácný ^[65]. Nefrotoxicita elliptycinu se svým mechanismem vzniku podobá nefrotoxicitě *cis*-platiny (v mírnější formě) ^[61, 66, 105, 106, 143, 144].

Kontraindikací pro užívání elliptycinů je renální insuficience a také těhotenství (při pokusech na myších a králících byly prokázány jejich teratogenní účinky) ^[25, 65]. Byla též zjištěna mutagenita elliptycinu a 9-hydroxyelliptycinu vůči savčím buňkám (ale i vůči bakteriálním kmenům *Salmonella typhimurium*, *Neurospora crassa*, *Escherichia coli*) ^[27].

V klinické praxi jsou od 70. let především ve Francii podávány **9-methoxyellipticin** a **2-methyl-9-hydroxyellipticin** ve formě acetátu ^[26, 61, 65, 70].

Léčba pokročilého karcinomu prsu s kostními metastázemi, akutní myeloblastické leukémie, sarkomů ledvin, karcinomů štítné žlázy v současnosti využívá ellipticinu a jeho polárnějších derivátů: **9-hydroxyellipticin, 2N-methyl-9-hydroxyellipticinium, 2N-methyl-9-hydroxyellipticinium, 2N-methyl-9-methoxyellipticinium** ^[2, 113, 157]. Avšak i nadále jsou zkoumány další potenciální účinky ellipticinu a jeho derivátů nejen na různé typy nádorových onemocnění, ale také na některé virové choroby - zejména AIDS (schopnost ellipticinu inhibovat retrovirovou integrasu, reversní transkriptasu) ^[79, 85, 115].

2. Cíl diplomové práce

Cílem předkládané diplomové práce bylo přispět k dalšímu osvětlení mechanismu působení protinádorového léčiva ellipticinu. Konkrétně cíle byly následující:

- Poznání cytotoxicity ellipticinu vůči nádorovým buněčným liniím lidského neuroblastomu a poznání mechanismu působení tohoto léčiva na neuroblastomy.
- Poznání vlivu inhibitorů histondeacetylas valproátu a trichostatinu A na působení ellipticinu na neuroblastomové buňky.
- Poznání vlivu inhibitorů histondeacetylas na oxidaci a oxidační aktivaci ellipticinu vedoucí k tvorbě aduktů s DNA působením cytochromů P450 a peroxidas.
- Studium oxidace a oxidační aktivace ellipticinu vedoucí k tvorbě aduktů s DNA aromatasou (cytochromem P450 19) a vlivu cytochromu b₅ na uvedené reakce.
- Poznání exprese enzymů oxidujících ellipticin (cytochromy P450 a peroxidasy) v lidských neuroblastomových buněčných liniích a v buňkách lidského prsního adenokarcinomu MCF-7.
- Studium interakce ellipticinu s cytochromem P450 1A1.

Vypracování diplomové práce bylo podporováno grantem GAČR 203/06/0329.

3. Materiál a metody

3.1. Použité chemikálie

Abcam (Velká Británie):

primární protilátka králičí-proti CYP1B1

BIO-RAD (USA):

sekundární protilátka IgG kozí-proti myši značená alkalickou fosfatasou, IgG kozí-proti králičí značená křenovou peroxidasou (substrátový kit Immun Star HRP 170-5040)

Calbiochem (USA):

9- hydroxyellipticin

DPC Biermann (Německo):

primární protilátka králičí-proti CYP19

Fluka (Švýcarsko):

akrylamid, dimethylsulfoxid (DMSO), dodecylsírán sodný (SDS), 1,2-didodecanoyl-sn-glycero-3- phosphocholin (DLPC), 2-merkptoethanol, N,N-methylen-bis-akrylamid (BIS), methanol, ethylacetát

Gentest Corp. (USA):

cyklooxygenasa-2 (COX-2), primární protilátky myší-proti cyklooxygenase-1 (COX-1) a myší-proti cyklooxygenase-2 (COX-2), lidské jaterní mikrosomy, lidské rekombinantní CYP19 (SupersomyTM)

Koch-light lab.(Velká Británie):

2- merkptoethanol

Kulich (ČR):

fenobarbital

Lachema (ČR):

bromfenolová modř, dekahydrát uhličitanu sodného, dihydrát dihydrogen fosforečnanu sodného, (di)hydrogenfosforečnan draselný, dihydrogenfosforečnan sodný, dithioničitan sodný, ethylester kyseliny octové, ethylendiamintetraoctová kyselina ve formě dvojsodné soli (EDTA, chelaton 3), ethanol, hydrogenuhličitan sodný, hydroxid draselný, hydroxid sodný, chlorid hořečnatý, chlorid sodný, kyselina chlorovodíková, kyselina fosforečná, kyselina octová, methanol, octan amonný, kyselina octová, pentahydrát síranu měďnatého, persíran amonný, síran měďnatý, tartarát sodný, uhličitan sodný.

Linde (ČR):

dusík (g), kapalný dusík, oxid uhelnatý (g)

Merck, (Německo):

ethylester kyseliny octové

Millipore Corp. (USA):

Immobilon™- P transfer membrana (PVDF)

Penta (ČR):

glycerin

Roche (Německo):

NADH

Serva (Německo):

N,N'-metylen-bis-akrylamid (BIS), Triton X-100, N,N,N',N'-tetramethyl-ethylendiamin (TEMED), Coomassie Brilliant Blue R-250, cytochrom c.

Sigma (USA):

4,4'-dikarboxy-2,2'-bicinchoninová kyselina (BCA), 5-bromo-4-chloro-3 indolylfosfát/nitro blue tetrazolium (BCIP/NBT), cyklooxygenasa-1 (COX-1), dimethylformamid, dimethylsulfoxid (DMSO), ellipticin (ELLI), fenacetin, glukosa 6-fosfát, křenová peroxidasa (HRP), kyselina 1-heptansulfonová, NADP⁺, NADPH, dodecylsíran sodný (SDS), salicylamid, "sekundární protilátka" (králičí IgG proti kuřecí IgY značená alkalickou fosfataseou, kozí IgG proti králičí IgY

s navázanou křenovou peroxidasou), standardy pro SDS-elektroforezu „Wide range“, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyltetrazolium bromide (MTT), 1,2-didodecanoyl-sn-glycero-3-phosphocholin (DLPC), DNA z telecího brzlíku.

Chemické závody Sokolov (ČR):

H₂O₂

Připravené kolegy v laboratoři:

- jaterní mikrosomy laboratorního potkana (kontrolní z nepremedikovaných laboratorních potkanů, z laboratorních potkanů premedikovaných Sudanem I) kmene WISTAR, CYP1A1, NADPH:cytochrom P450 reduktasa a cytochrom b5 z izolací prováděných kolektivem biochemické laboratoře PŘF UK
- primární slepičí protilátky proti lidskému CYP3A4 a potkanímu CYP1A1 připravené doc. RNDr. Petrem Hodkem, CSc.
- N²-oxid ellipticinu byl syntetizován J. Kučkou na katedře organické chemie PŘF UK
- buňky MCF-7 získané z Oddělení molekulární toxikologie spolupracujícího pracoviště Německého centra výzkumu rakoviny v Heidelbergu Prof. RNDr. Marií Stiborovou, DrSc.
- neuroblastomové buněčné linie (IMR-32, UKF-NB-3, UKF-NB-4) poskytnuté Oddělením dětské hematologie při 2. LF UK RNDr. Jitkou Poljakovou, PhD.

3.2. Použité přístroje

Centrifugy: Sanyo Microcentaur MSE (úhlový rotor)

Váhy: PESA 40SM-200A (analytické váhy), KERN EW600-2M (předvážky)

HPLC: DIONEX PUMP P580, COLUMN OVEN LCO 101

Další: pH metr ATI Orion 370 s kombinovanou elektrodou (přístroj byl kalibrován standardy dodanými výrobcem), sonikátor Tesla TESON1, inkubátor 624 Environmental Incubator Shaker New Brunswick Scientific Co. Inc. Edison, odparka Savant DNA Speed Vac DNA 110, Specord M40, aparatura pro „Western blotting“ („Fastblot“ B-32 Biometra), aparatura pro elektroforézu firmy Amersham Biosciences.

3.3. Metody

3.3.1. Stanovení koncentrace proteinu

Princip:

Koncentrace proteinu byla zjišťována metodou dle Wiechelmana a kol.^[152]. Metoda je založena na tvorbě modře zabarveného komplexu, který vzniká reakcí postranních skupin některých aminokyselin s 4,4'-dikarboxy-2,2'-bicinchoninová kyselina (BCA). Během reakce jsou měďnaté ionty obsažené v činidle redukovány působením postranních aminokyselinových řetězců na mědné, což se projeví změnou zabarvení, jehož intenzita je pak přímo úměrná (A_{562}) koncentraci bílkoviny^[152].

Použité chemikálie:

Činidlo na stanovení koncentrace proteinu bylo připraveno rozpuštěním 0,06 g BCA v 5,88 ml roztoku A (0,4 % NaOH, 0,95 % NaHCO₃, 2 % Na₂CO₃·H₂O, 0,16 % tartarát sodný, pH=11,25). Poté bylo přidáno 0,120 ml roztoku B (4 % CuSO₄·5H₂O v destilované vodě).

Postup:

K 20 μl vzorku bylo do vyříhané zkumavky přidáno 980 μl činidla s BCA. Pro sestrojení kalibrační křivky bylo do zkumavek pipetováno 1, 2, 5, 10, 15, 20 μl standardu (hovězí sérový albumin (BSA, 1,0 mg/ml), doplněno destilovanou vodou do 20 μl a přidáno 980 μl činidla s BCA. Srovnávací vzorek obsahoval 20 μl destilované vody a 980 μl činidla s BCA (blank). Po inkubaci při teplotě 60°C v délce jedné hodiny byla změřena absorbance standardů a vzorků při 562 nm proti srovnávacímu vzorku. Byla sestrojena kalibrační křivka a z ní určena koncentrace proteinu ve vzorku. Měření bylo prováděno na přístroji Hewlett Packard 8453 E v kyvetě o optické dráze 1 cm.

3.3.2. Stanovení obsahu cytochromu P450

Princip:

Metoda je založena stanovení charakteristické absorpce komplexu hemthiolátových proteinů v redukováném stavu s oxidem uhelnatým při 450 nm^[93].

Postup:

Do zkumavky bylo pipetováno 1960 μl pufru (0,1 M KH_2PO_4 , 2 % glycerol, $\text{pH}=7,5$) a přidáno 40 μl mikrozomů. Cytochrom P450 byl redukován ditihiocítanem sodným (přibližně 1mg). Vzorek byl rozdělen do dvou kyvet o optické dráze 1 cm a na dvoupaprskovém přístroji Specord M40 (Carl Zeiss Jena, Německo) byla proměřena základní linie v rozmezí 400 až 500 nm. Poté byl vzorek přibližně minutu probubláván oxidem uhelnatým a bylo změřeno diferenční spektrum. Koncentrace cytochromu P450 byla vypočtena z Lambert-Beerova zákona.

Vyhodnocení:

$$C_{\text{P450}} = (\Delta A / (\epsilon \cdot l)) \cdot \text{\u0177ed\u011bn\u00ed}$$

ΔAzm\u011bna absorbance [$A_{450}-A_{490}$], pop\u0159. [$A_{420}-A_{490}$]²

ϵmol\u00e1rn\u00ed absorp\u010dn\u00ed koeficient; 0,126 $\text{cm}^{-1} \cdot \mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{dm}^3$

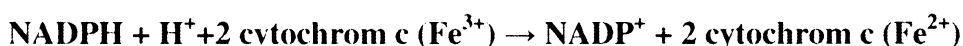
C_{P450}koncentrace CYP [$\mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$]

loptick\u00e1 dr\u00e1ha kyvety [cm]

3.3.3. Stanoven\u00ed aktivity NADPH:cytochrom P450 reduktasy

Princip:

Ke stanoven\u00ed se využív\u00e1 p\u0159irozen\u00fd substr\u00e1t enzymu, cytochrom c, jeho\u017e redukovan\u00e1 forma absorbuje p\u0159i 550 nm. P\u0159i stanoven\u00ed doch\u00e1z\u00ed k reakci:

**Postup:**

Do kyvety o optick\u00e9 dr\u00e1ze 0,5 cm bylo pipetov\u00e1no 980 μl reak\u010dn\u00ed sm\u011b\u0161i (pufru s cytochromem c: 0,3 M KH_2PO_4 , 0,5 mg/ml cytochromu c, 1 mM EDTA, $\text{pH}=7,5$) a 10 μl vzorku. Obsah kyvety byl d\u00falkladn\u011b prom\u00edch\u00e1n a na dvoupaprskovém p\u0159\u00edstroji Specord M40 (Carl Zeiss Jena, N\u011bmecko) byl zm\u011b\u0159en vzorek proti "blanku". Reakce byla startov\u00e1na p\u0159id\u00e1n\u00edm 10 μl NADPH (10 mM). Vzorek byl prom\u011b\u0159ov\u00e1n, dokud nebyla z\u00edsk\u00e1na line\u00e1rn\u00ed sm\u011b\u0159nice z\u00e1vislosti absorbance p\u0159i 550 nm na \u010das\u011b, ze kter\u00e9 se n\u00e1sledn\u011b ur\u010dila specifick\u00e1 aktivita NADPH:cytochrom P450 reduktasy jako zm\u011bna absorbance za minutu na mg cytosol\u00e1rn\u00edho proteinu.

3.3.4. Diferenční spektroskopie cytochromu P450 1A1 s ellipticinem

Princip:

Uvedený v kapitole 1.7.5.

Postup:

Pro měření byly použity tyto substance: cytochrom P450 1A1 o celkové stanovené koncentraci 147 μM (2 μl do 500 μl na jednu křemennou kyvetu), cytochrom b₅ o celkové stanovené koncentraci 77 μM (v poměru cytochrom b₅: CYP1A1 3:1), 1,2-didodecanoyl-sn-glycero-3-phosphocholin (DLPC) o celkové koncentraci 5 mg/ml (1 mg/ml v 500 μl na jednu křemennou kyvetu), NADPH:cytochrom P450 reduktasa o aktivitě rovné 2 $\mu\text{mol.cyt c/ min}$ (v poměru 1:1 na enzym), ellipticin o celkové koncentraci 0,1 mM a 0,5 mM, fosfátový pufr (0,1 M KH_2PO_4 , pH= 7,4).

Na přístroji Specord M40 byla změřena základní linie v oblasti vlnových délek 350 až 500 nm. Do vzorkové kyvety byly přidávány malé dávky (0,1 až 0,5 μl) 0,1mM roztoku ellipticinu (v případě nepřítomnosti NADPH:cytochrom P450 reduktasy) či dávky po 10 μl 0,5 mM ellipticinu (v přítomnosti NADPH:cytochrom P450 reduktasy) a současně ekvivalentní množství rozpouštědla do kyvety referentní (methanol). Po promíchání obou kyvet bylo změřeno diferenční spektrum v rozsahu 350 až 500 nm. Ze spekter byl odečten rozdíl absorbancí v extrémech pro příslušné koncentrace ellipticinu v kyvetě. Zdánlivá disociační konstanta byla určena ze směrnice grafu závislosti recipročných hodnot absorbance na recipročných hodnotách koncentrace ellipticinu.

3.3.5. Expresse cytochromů P450 a cyklooxygenas v buněčných liniích

Princip:

Elektroforesa a Western blot podle postupu uvedeného v ^[87].

Postup:

Pelety buněk byly rozsuspendovány přibližně stejným množstvím PBS a sonikovány 2 hodiny v sonikátoru (Teson1, Tesla). Poté byla v buněčných lyzátech stanovena koncentrace proteinů

dle postupu uvedeného v kapitole 3.3.1. Následně byla provedena elektroforesa buněčných lyzátů v přítomnosti dodecylsulfátu sodného na polyakrylamidovém gelu v diskontinuálním uspořádání za použití 7,5; 8; 10 % separačního a 4 % zaostřovacího gelu. Pro elektroforesu byla použita aparatura firmy Amersham Biosciences (USA). Elektromigrace probíhala ve vertikálním uspořádání pH 8,3 a konstantním napětí 150 V. Gel byl po skončení elektroforesy 20 minut inkubován v transferovém pufru (0,025 M TRIS, 0,192 M glycin, pH 8,3).

Do aparatury pro „Western blotting“ („Fastblot“ B-32 Biometra) byly postupně navrstveny 3 ks chromatografického papíru Whatman 3, PVDF membrána (Milipore), gel a další 3 ks chromatografického papíru. Membrány byly „smočený“ nejprve 10 s v methanolu, dále 5 min v destilované vodě a nakonec 15 min za stálého míchání v upraveném transferovém pufru (transferový pufr obsahující 5 % methanol). V upraveném transferovém pufru byly krátce „smočený“ i kusy chromatografického papíru. Elektropřenos byl prováděn nejprve 30 minut při 4 mA/cm² gelu. Membrána se sorbovanými proteiny byla přes noc blokována v blokovacím roztoku (5 % sušené mléko Milli v PBS (1,8 mM Na₂HPO₄, 1 mM NaH₂PO₄, 0,134 M NaCl; pH 7,2), 0,3 % Triton X-100).

Inkubace se specifickou primární protilátkou probíhala 120 min za míchání při laboratorní teplotě. Přesná množství použitých protilátek ukazuje *Tabulka 2*.

Tabulka 2

Přesná množství a druh použitých protilátek k detekci enzymů v buněčných liniích

Protilátka	Objem protilátky [μl]	Objem blokovacího roztoku [ml]
chicken		
CYP1A1	10	10
chicken		
CYP3A4	10	10
rabbit		
CYP1B1	10	5
rabbit		
CYP19	16,67	5
mouse		
COX-1	4	10
mouse		
COX-2	4	10

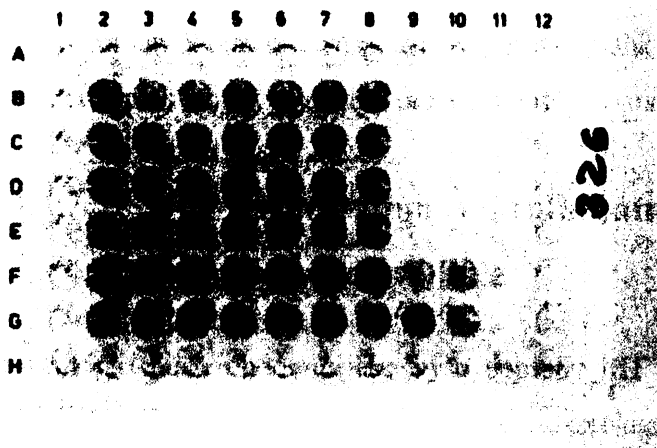
Po promytí „blokovacím“ roztokem (5 x 2 min) byla membrána vložena do roztoku sekundární protilátky: pro protilátky proti cytochromu P450 1A1, 3A4 IgG králičí-proti kuřecí s navázanou alkalickou fosfatasou v koncentraci 5 µl/10 ml blokovacího roztoku, pro protilátky proti cyklooxygenase 1 a 2 IgG kozi-proti myší s navázanou alkalickou fosfatasou v koncentraci 3,34 µl/10 ml „blokovacího“ roztoku, pro protilátky proti cytochromu P450 1B1 a 19 IgG kozi- proti králičí s navázanou křenovou peroxidasou v koncentraci 3,34 µl/10 ml „blokovacího“ roztoku. Inkubace byla prováděna za shodných podmínek 60 minut. Po promytí v „blokovacím“ roztoku (4 x 2 minuty) a 0,3 % -ním Tritonu v PBS (4 x 2 minuty) byla membrána vyvolána roztokem substrátu pro alkalickou fosfatasu (BCIP/NBT), připraveným dle pokynů výrobce (jedna tableta rozpuštěná v 10 ml destilované vody). Na membráně inkubované v roztoku specifické protilátky vznikly přibližně po pěti minutách vyvolávání fialové zóny v místech, kde došlo k navázání protilátky na enzymy. Reakce byla zastavena vložením membrány do destilované vody. V případě použití sekundární protilátky značené HRP byla vizualizace provedena použitím specifického substrátového kitu obsahující diaminobenzidin. Vznikající luminiscenční produkt byl detekován pomocí citlivého filmu.

3.3.6. Testování cytotoxicity ellipticinu na neuroblastomové buněčné linie

Viabilita buněk byla testována pomocí MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyl tetrazolium bromidu) testu na Oddělení dětské hematologie v laboratoři Prof. Eckschlagera 2. LF UK.

Princip:

Samotnému testu předchází izolace nádorových buněk z dodaného materiálu, a to obvykle mechanickou či enzymovou fragmentací a purifikací primárních nádorových buněk technikou centrifugace v hustotním gradientu. Buňky se poté inkubují v 96-ti jamkových panelech s různými cytostatiky (každé cytostatikum má svou koncentrační řadu), jak ukazuje *Obrázek 18*.



Obrázek 18

Uspořádání reakce při MTT testu. Tmavé jamky představují živé buňky, které redukovaly formazan

Tato metoda je založena na redukci žlutého solubilního 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyl tetrazolium bromidu (MTT) na nerozpustný formazan (modré krystaly hvězdčovitěho tvaru). Reakce probíhá na mitochondriální membráně živých buněk. Formazan se rozpustí přidáním silného detergentu a zabarvení se vyhodnocovalo spektrofotometricky při vlnové délce 570 nm. Hodnota absorbance roztoku odpovídá množství živých buněk (čím tmavší barva a tedy vyšší absorbance, tím vyšší procento živých buněk).

Postup:

Do 1. sloupce 96- ti jamkové mikrotitrační destičky bylo pipetováno 100 μ l „Iscove’s modified Dulbecco’s media“ (IMDM). Do 2. až 12. sloupce bylo pipetováno 50 μ l media. Do 3. sloupce bylo přidáno 50 μ l media s určitou koncentrací cytostatika (20 -200 μ M). Výsledná koncentrace DMSO v mediu nepřesáhla 0,02 %. Výsledná koncentrace cytostatika ve třetím sloupci byla poloviční (tedy 10 – 100 μ M). Ředěním tzv. „dvojkovou řadou“ bylo cytostatikum pipetováno do všech dalších sloupců destičky. Dále bylo do 2. až 12. sloupce pipetováno 50 μ l buněk o koncentraci přibližně 4×10^5 /ml. Destička byla inkubována 7 dní v inkubátoru firmy Jouan TGO 150 při 37°C, 5 % CO₂ a 95 % vlhkosti vzduchu. Poslední 4 hodiny byla destička inkubována s 50 μ l MTT (2 mg/ml). Nakonec bylo přidáno 100 μ l 50 % (v/v) N,N-dimethylformamidu, 10 % SDS, pH 4,7 bylo upraveno CH₃COOH. Po rozpuštění sraženiny formazanu byla absorbance měřena „čtečkou“ mikrodestiček VERSA max při vlnové délce 570 nm a vyhodnocena softwarovým programem SOFT max PRO. Vynesením naměřených hodnot do grafu byly určeny IC₅₀ pro daná cytostatika.

Mikroskopicky byla viabilita hodnocena barvením trypanovou modří (0,4 %). Po přidání trypanové modří k buněčné suspenzi byly mrtvé buňky spočítány v Burkerově komůrce v 5 velkých čtvercích a bylo vyjádřeno procento mrtvých (modře obarvených) buněk.

3.3.7. Vliv trichostatinu A a valproátu na cytotoxicitu ellipticinu na neuroblastomové linie

Testování probíhalo obdobně jako výše popsany MTT test ve spolupráci s pracovištěm na oddělení dětské hematologie v laboratoři Prof. Eckschlagera 2. LF UK.

Princip:

Princip byl totožný s principem popsáným v kapitole 3.3.6.

Postup:

Buňky byly premedikovány inhibitory histondeacetylas, trichostatinem A a valproátem. TSA (50; 100; 200 nM), VPA (0,5; 1; 1,5, 2 mM). Buňky (1×10^5 /ml) a VPA, 1 - 2 mM či TSA, 100 – 200 nM byly současně inkubovány 24 hodin před přidáním ellipticinu (25 μ M v první jamce, dále ředěn dvojkovou řadou do deseti jamek) v inkubátoru firmy Jouan TGO 150 při 37°C, 5 % CO₂ a 95 % vlhkosti vzduchu v 75 cm² kultivačních lahvičkách o celkovém objemu 20 ml IMDM media. Dále byly zpracovány, jak je uvedeno výše v kapitole 3.3.6.

3.3.8. Vliv valproátu a trichostatinu A na oxidaci ellipticinu *in vitro*

3.3.8.1. *Oxidace ellipticinu mikrosomy*

Princip:

Principem vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) je opakované ustavování rozdělovacích rovnováh vzorku mezi dvěma fázemi, tzv. mobilní a stacionární fází. Stacionární fáze se vyznačuje vysokou homogenitou, a tedy i velkým hydrodynamickým odporem. Pro dosažení dostatečného průtoku mobilní fáze je nutné aplikovat přetlak jednotek až desítek MPa.

Postup:

Jednotlivé reakční směsi dále separované vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC) byly připraveny následovně. Reakční směs o objemu 0,5 ml obsahovala kontrolní mikrosomy

(izolované z nepremedikovaných laboratorních potkanů), ellipticin, inhibitor histonacetylasy-VPA či TSA a fosfátový pufr (0,1 M KH_2PO_4 , pH 7,4), kterým byl doplněn objem reakční směsi na 0,5 ml. Přesné složení jednotlivých inkubovaných vzorků uvádí *Tabulka 3* a *Tabulka 4*.

Tabulka 3

Složení inkubovaných vzorků v přítomnosti TSA

mikrosomy [μM]	TSA [nM]	ellipticin [μM]	NADPH generující systém[mM]	pufr (KH_2PO_4 , pH 7,4) 0,1 M
0,2	50	5	0,1	doplnit do 500 μl
0,2	100	5	0,1	doplnit do 500 μl
0,2	200	5	0,1	doplnit do 500 μl
0,2	50	10	0,1	doplnit do 500 μl
0,2	100	10	0,1	doplnit do 500 μl
0,2	200	10	0,1	doplnit do 500 μl
0,4	50	5	0,1	doplnit do 500 μl
0,4	100	5	0,1	doplnit do 500 μl
0,4	200	5	0,1	doplnit do 500 μl
0,4	50	10	0,1	doplnit do 500 μl
0,4	100	10	0,1	doplnit do 500 μl
0,4	200	10	0,1	doplnit do 500 μl

Tabulka 4

Složení inkubovaných vzorků v přítomnosti VPA

mikrosomy [μM]	VPA [mM]	ellipticin [μM]	NADPH generující systém [mM]	pufř (KH ₂ PO ₄ , pH 7,4) [M]
0,2	0,5	5	0,1	doplnit do 500 μl
0,2	1	5	0,1	doplnit do 500 μl
0,2	2	5	0,1	doplnit do 500 μl
0,2	0,5	10	0,1	doplnit do 500 μl
0,2	1	10	0,1	doplnit do 500 μl
0,2	2	10	0,1	doplnit do 500 μl
0,4	0,5	5	0,1	doplnit do 500 μl
0,4	1	5	0,1	doplnit do 500 μl
0,4	2	5	0,1	doplnit do 500 μl
0,4	0,5	10	0,1	doplnit do 500 μl
0,4	1	10	0,1	doplnit do 500 μl
0,4	2	10	0,1	doplnit do 500 μl

Reakce byla startována přidáním 50 μl 1 mM NADPH-generujícího systému (GS: 10 mM MgCl₂, 10 mM glukosa 6 -fosfát, 1 mM NADP⁺, 1 U/ml glukosa 6-fosfát dehydrogenasa). Vedle těchto reakčních směsí byly připravovány kontrolní vzorky stejného složení bez jedné reakční komponenty, která byla nahrazena fosfátovým pufřem. Vzorky byly dokonale promíchány. Inkubace reakční směsi probíhala 15 min při teplotě 37°C při třepání 400 RPM (Thermomixer compact eppendorf). Dále byl k reakční směsi přidán vnitřní standard fenacetin 5 μl 1mM roztoku a poté pro ukončení reakce 1 ml ethylesteru kyseliny octové. Reakční směs byla extrahována 60 s na „vortexu“ a centrifugována 3 min při 13000 RPM (MSE, Micro Centaur). Z reakční směsi byla do 2 ml zkumavek (eppendorf) odebrána organická fáze s extrahovanými produkty a extrakce ještě jednou zopakována přidáním 0,5 ml ethylesteru kyseliny octové k zbylé vodné fázi. Celkový objem odebrané organické fáze s extrahovanými produkty byl 1,5 ml. Směs byla odpařena na vakuové odparce „Speed Vac“ (DNA 110, firma Savant) do sucha (60 min). Těsně před analýzou byl vzorek rozpuštěn v 35 μl methanolu.

K separaci látek obsažených v jednotlivých testovaných vzorcích byla použita metoda HPLC. Seprace byla prováděna na přístroji Dionex (P580 pump, ASI-100 Automated Sample Injector, UV/VIS Detector UVD 170S/340S).

Separace metabolitů byla prováděna na koloně C18, 250 x 4.6 mm, 5 µm (Ultrasphere ODS, Beckman Coulter) při teplotě 35°C. K eluci docházelo izokraticky při rychlosti průtoku mobilní fáze kolonou 0,8 ml/min, působením mobilní fáze o složení: 64 % methanolu, 36 % destilované vody a 0,005 M heptansulfonová kyselina, 0,032 M kyselina octová. (Na celkový objem směsi 0,5 l je 320 ml methanolu, 180 ml destilované vody, 0,55 g heptansulfonové kyseliny a 915 µl kyseliny octové). Mobilní fáze byly před použitím sonikovány, aby v roztoku nezůstal vzduch a nemohlo dojít k jeho zanesení na kolonu. K detekci jednotlivých složek vzorkové směsi byly použity vlnové délky 254, 296, 307 a 313 nm. Vzorky byly aplikovány do smyčky o objemu 20 µl Hamiltonovým mikrodávčem.

3.3.8.2. *Oxidace ellipticinu peroxidasou*

Princip:

Totožný s principem uvedeným v podkapitole 3.3.8.1

Postup:

Jednotlivé reakční směsi dále separované vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC) byly připraveny následovně. Reakční směs o objemu 0,5 ml obsahovala křenovou peroxidasu (HRP), ellipticin, inhibitor histondeacetylasy- VPA či TSA. Přesné složení jednotlivých inkubovaných vzorků uvádí *Tabulka 5 a Tabulka 6*.

Tabulka 5

Složení inkubovaných vzorků. Ve vzorcích je přítomen TSA

peroxidasa [µg/ml]	TSA [nM]	ellipticin [µM]	H ₂ O ₂ [mM]	pufr (NaH ₂ PO ₄ , pH 6,4) [M]
2,5	50	10	0,25	doplnit do 500 µl
2,5	100	10	0,25	doplnit do 500 µl
2,5	200	10	0,25	doplnit do 500 µl
5.0	50	10	0,25	doplnit do 500 µl
5.0	100	10	0,25	doplnit do 500 µl
5.0	200	10	0,25	doplnit do 500 µl

Tabulka 6

Složení inkubovaných vzorků v přítomnosti VPA

peroxidasa [$\mu\text{g/ml}$]	VPA [mM]	ellipticin [μM]	H_2O_2 [mM]	pufř (NaH ₂ PO ₄ , pH 6,4) 0,1 M
2,5	0,5	10	0,25	doplnit do 500 μl
2,5	1	10	0,25	doplnit do 500 μl
2,5	2	10	0,25	doplnit do 500 μl
5.0	0,5	10	0,25	doplnit do 500 μl
5.0	1	10	0,25	doplnit do 500 μl
5.0	2	10	0,25	doplnit do 500 μl
5.0	0,5	5	0,25	doplnit do 500 μl
5.0	1	5	0,25	doplnit do 500 μl
5.0	2	5	0,25	doplnit do 500 μl

Reakce byla startována přidavkem 25 μl 0,5 mM H_2O_2 . Objem byl doplněn do 0,5 ml Na-fosfátovým pufřem (0,1 M, pH 6,4; směs 0,1 M Na₂HPO₄.12 H₂O a 0,1 M NaH₂PO₄.2 H₂O). Vedle těchto reakčních směsí byly připravovány kontrolní vzorky stejného složení bez jedné reakční komponenty, která byla nahrazena Na-fosfátovým pufřem. Vzorky byly dokonale promíchány. Inkubace reakční směsi probíhala 15 min při laboratorní teplotě při třepání 400 RPM (Thermomixer compact eppendorf). Dále byl k reakční směsi přidán 1 ml ethylesteru kyseliny octové¹. Reakční směs byla extrahována 60 s na „vortexu“ a centrifugována 3 min při 13000 RPM (MSE, Micro Centaur) Z reakční směsi byla do 2 ml zkumavek (eppendorf) odebrána organická fáze s extrahovanými produkty a extrakce ještě jednou zopakována přidáním 0,5 ml ethylesteru kyseliny octové k zbylé vodné fázi. Celkový objem odebrané organické fáze s extrahovanými produkty byl 1,5 ml. Směs byla odpařena na vakuové odparce „Speed Vac“ (DNA 110, firma Savant) do sucha (60 min). Těsně před analýzou byl vzorek rozpuštěn v 35 μl methanolu.

K separaci látek obsažených v jednotlivých testovaných vzorcích byla použita metoda HPLC. Seprace byla prováděna na přístroji Dionex (P580 pump, ASI-100 Automated Sample Injector, UV/VIS Detector UVD 170S/340S). Separace metabolitů byla prováděna na koloně C18, 250 x

¹ původně byl přidáván ještě vnitřní standard salicylamid (10 μl 1mM roztoku), ale posléze bylo zjištěno, že salicylamid intereaguje s valproátem a nelze jej tedy využít ke stanovení (obdobně pro fenacetin). Proto bylo vyhodnocování prováděno bez vnitřního standardu.

4 mm, 100-5 μm (Trennsäule prepacked HPLC column Macherey-Nagel) při teplotě 35°C. Složení mobilní fáze odpovídalo 45% methanolu a 55% pufru octanu amonného (10 mM, pH 2,8) nebo 90% methanolu a 10% pufru octanu amonného (10 mM, pH 2,8). Mobilní fáze byly před použitím sonikovány, aby v roztoku nezůstal vzduch a nemohlo dojít k jeho zanesení na kolonu. K eluci produktů oxidace ellipticinu byl využit gradient. K separaci docházelo do 12,5 min mobilní soustavou složenou ze 45 % methanolu a 55% pufru octanu amonného, od 12,5 do 22,5 min gradientem do 90 % methanolu a 10 % pufru octanu amonného a od 22,5 do 30 min z 90% methanolu a 10% pufru octanu amonného při rychlosti průtoku mobilní fáze kolonou 0,8 ml/min. K detekci jednotlivých složek vzorkové směsi byly použity vlnové délky 254, 296, 307 a 313 nm. Vzorky byly aplikovány do smyčky o objemu 20 μl Hamiltonovým mikrodávčem.

3.3.9. Vliv valproátu a trichostatinu A na tvorbu aduktů ellipticinu s DNA *in vitro* (v neuroblastomových buněčných liniích)

Detekce a kvantifikace aduktů tvořených ellipticinem v DNA v přítomnosti inhibitorů histondeacetylasy *in vitro* byla prováděna metodou „³²P-postlabelling“ na spolupracujícím pracovišti Oddělení molekulární toxikologie Německého centra výzkumu rakoviny v Heidelbergu Prof. RNDr. Marií Stiborovou, DrSc.

Princip:

Princip metody „³²P-postlabelling“: Neradioaktivním karcinogenem modifikovaná DNA je enzymově hydrolyzována na deoxyribonukleosid-3'-monofosáty, které jsou v dalším kroku foyforylovány ³²P značeným fosfátem na volné 5'-OH skupině (inkubace při pH=9,5 s [γ -³²P] ATP za katalýzy T4-polynukleotidkinázou). Poté následuje chromatografická separace aduktů od normálních deoxyribonukleotidů a detekce pomocí filmu citlivého na X-paprsky (autoradiografie) [15, 97, 98, 118, 123, 124, 135].

Postup:

Jednotlivé buněčné linie byly vystaveny 1 a 10 μM ellipticinu po dobu 48 hodin 24 hodin po aplikaci trichostatinu A (0,1 mM) a valproátu (0,5, 1, 1,5 a 2 mM). Adukty ellipticinu s DNA byly detekovány a jejich množství kvantifikováno pomocí metody „³²P-postlabelling“ [48, 107, 108, 109, 110], postupem popsaným v dřívějších pracech [135].

3.4. Vliv valproátu a trichostatinu A na oxidační aktivaci

ellipticinu vedoucí k tvorbě aduktů ellipticinu s DNA *in vitro*

Detekce a kvantifikace aduktů tvořených ellipticinem v DNA v přítomnosti inhibitorů histondeacetylasy *in vitro* byla prováděna metodou „³²P-postlabelling“ na spolupracujícím pracovišti Oddělení molekulární toxikologie Německého centra výzkumu rakoviny v Heidelbergu Prof. RNDr. Marií Stiborovou, DrSc.

3.4.1. Oxidační aktivace ellipticinu lidskými jaterními mikrosomy

Princip:

Totožný s principem uvedeným v kapitole 3.3.9.

Postup:

Inkubační směs o celkovém objemu 0,75 µl 0,1 M fosfátového pufru pH 7,4 obsahovala 1 mM NADPH, 0,5 mg DNA telecího brzlíku, lidské jaterní mikrosomy obsahující 0,5 mg proteinu a 100 µM ellipticin rozpuštěný v 7,5 µl ethanolu. Do některých vzorků byl přidán VPA nebo TSA v koncentracích 0,1 nM a 1 mM a 100 nM TSA. Směs byla inkubována 30 min při 37°C, poté zastavena přidáním 0,75 ml ethylesteru kyseliny octové a vodná fáze získána centrifugací (2 min při 14 000 g) DNA byla izolována a vodné fáze extrakcí fenol/ chloroformem a analyzována z hlediska tvorby aduktů ellipticinu s DNA postupem jak je uvedeno v kapitole 3.3.9.

3.4.2. Oxidační aktivace ellipticinu peroxidasami

Princip:

Totožný s principem uvedeným v kapitole 3.3.9.

Postup:

Inkubační směs o celkovém objemu 0,75 µl 0,1 M fosfátového pufru pH 7,4, 100 µM H₂O₂, 0,5 mg DNA telecího brzlíku, křenuvou peroxidasu (HRP) obsahující 1 µg proteinu či laktoperoxidasu (LPO) obsahující 10 µg proteinu či myeloperoxidasu (MPO) obsahující 10 µg proteinu, 100 µM ellipticin rozpuštěný v 7,5 µl ethanolu. Dále byl postup ve shodě s postupem popsaným v 3.4.1.

3.5. Oxidace ellipticinu aromatasou (CYP19)

3.5.1. Oxidace ellipticinu aromatasou (CYP19)

Princip:

Totožný s principem uvedeným v podkapitole 3.3.8.1.

Postup:

Jednotlivé reakční směsi dále analyzované vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC) byly připraveny následovně. Reakční směs o objemu 0,5 ml obsahovala SupersomyTM obsahující rekombinantní CYP19, různé koncentrace ellipticinu a fosfátový pufr (0,1 M KH_2PO_4 , pH 7,4), kterým byl doplněn objem reakční směsi na 0,5 ml. Přesné složení inkubovaných vzorků ukazuje *Tabulka 7*.

Tabulka 7

Složení inkubovaných vzorků

Supersomy TM [nM]	ellipticin [μM]	NADPH- generující systém [mM]	pufr (KH_2PO_4 , pH 7,4) 0,1 M
50	10	0,1	doplnit do 500 μl
100	10	0,1	doplnit do 500 μl
200	10	0,1	doplnit do 500 μl

Reakce byla startována přidáním 50 μl 1 mM NADPH-generujícího systému (10 mM MgCl_2 , 10 mM glukosa 6-fosfát, 1 mM NADP^+ , 1 U/ml glukosa 6-fosfát dehydrogenasa). Vedle všech těchto reakčních směsí byly připravovány kontrolní vzorky stejného složení bez jedné reakční komponenty, která byla nahrazena fosfátovým pufrem. Vzorky byly dokonale promíchány. Inkubace reakční směsi probíhala 15 min při teplotě 37°C při 400 RPM (Thermomixer compact eppendorf). Dále byl k reakční směsi přidán vnitřní standard fenacetin 5 μl 1mM roztoku a poté pro ukončení reakce 1 ml ethylesteru kyseliny octové. Reakční směs byla extrahována 60 s na „vortexu“ a centrifugována 3 min při 13000 RPM (MSE, Micro Centaur). Z reakční směsi byla do 2 ml zkumavek (eppendorf) odebrána organická fáze s extrahovanými produkty a extrakce ještě jednou zopakována přidáním 0,5 ml ethylesteru kyseliny octové k zbylé vodné fázi. Celkový objem odebrané organické fáze s extrahovanými produkty byl 1,5 ml. Směs byla

odpařena na vakuové odparce do sucha (60 min). Těsně před analýzou byl vzorek rozpuštěn v 35 μl methanolu.

3.5.2. Vliv cytochromu b_5 na oxidaci ellipticinu aromatasou (CYP19)

Princip:

Totožný s principem uvedeným v podkapitole 3.3.8.1.

Postup:

Totožný s postupem uvedeným v podkapitole 3.5.1, pouze s tím rozdílem, že do reakční směsi byl přidáván i cytochrom b_5 . Přesné složení inkubovaných vzorků ukazuje *Tabulka 8*.

Tabulka 8

Složení inkubovaných vzorků

Supersomy TM [nM]	cytochrom b_5 [μM]	ellipticin [μM]	NADPH-generující systém [mM]	puf. (KH_2PO_4 , pH 7,4) 0,1M
50	0.154	10	0,1	doplnit do 500 μl
100	0.308	10	0,1	doplnit do 500 μl
200	0.5852	10	0,1	doplnit do 500 μl

Nejprve bylo nutné docílit inkorporaci cytochromu b_5 do SuperzomůTM. K tomu byla využita inkubace SuperzomůTM pouze s cytochromem b_5 za laboratorní teploty 25°C 10 min při třepání 400 RPM (Thermomixer compact eppendorf). Poté byly přidány ostatní komponenty v pořadí ellipticin a NADPH-generující systém, kterým byla reakce startována. Reakce dále probíhala v souladu s postupem popsáním v podkapitole 3.5.1.

Separace metabolitů byla prováděna stejnou metodikou, která byla popsána v kapitole 3.3.8.1. (oxidace ellipticinu mikrosomy).

3.6. Tvorba aduktů s ellipticinem s DNA po aktivaci aromatasou (CYP19)

Detekce a kvantifikace aduktů tvořených po aktivaci ellipticinem aromatasou (CYP19) v DNA byla prováděna metodou „³²P-postlabelling“ na spolupracujícím pracovišti, Oddělení molekulární toxikologie Německého centra výzkumu rakoviny v Heidelbergu Prof. RNDr. Marií Stiborovou, DrSc.

Princip:

Totožný s principem uvedeným v kapitole 3.3.9.

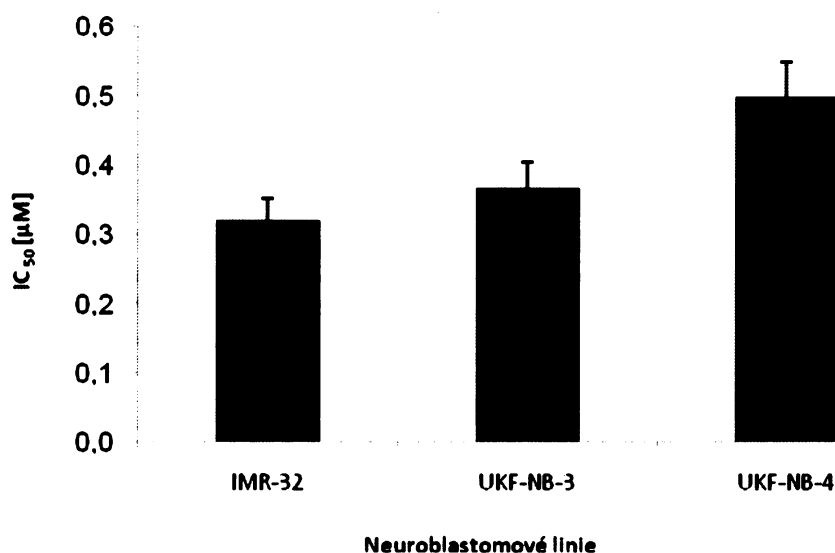
Postup:

Inkubační směs obsahovala o celkovém objemu 0,75 ml 0,1 M fosfátového pufru, pH 7,4, 1 mM NADPH, 0,5 mg DNA telecího brzlíku, 35 pmol cytochromu P450 19 (CYP19) v SuperzomechTM a 100 μM ellipticinem (rozpuštěný v 7,5 μl ethanolu). Do některých vzorků byl přidán potkanní cytochrom b₅ v takovém množství, aby byl celkový poměr cytochromu P450 19: cytochromu b₅ 1:2,5; 1:5 a 1:10. Směs byla inkubována 30 min při 37°C, poté zastavena přidáním 0,75 ml ethylesteru kyseliny octové a vodná fáze získána centrifugací (2 min při 14 000 g) DNA byla izolována a vodné fáze extrakcí fenol/ chloroformem a analyzována z hlediska tvorby aduktů ellipticinem s DNA postupem jak je uvedeno v kapitole 3.4.

4. Výsledky

4.1. Vliv ellipticinu na buněčné linie lidských neuroblastomů

Vliv ellipticinu na cytotoxicitu neuroblastomových buněk byl zjišťován pomocí MTT testu (viz. kapitola 3.3.6.). K měření byly použity komerční lidská neuroblastomová linie IMR-32, a lidské neuroblastomové linie UKF-NB-3 a UKF-NB-4. Působení ellipticinu byly buňky vystaveny 96 hodin. MTT test ukázal, že ellipticin působí cytotoxicky na sledované neuroblastomové linie. Nejvyšší cytotoxicitu vykazoval ellipticin vůči linii IMR-32 ($IC_{50} = 0,32 \pm 0,03 \mu M$), viz *Obrázek 19*.



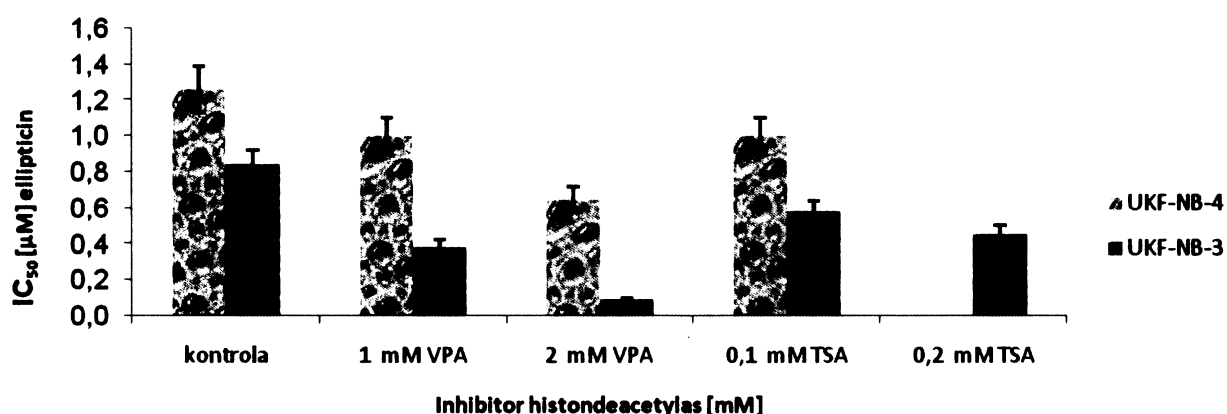
Obrázek 19

Cytotoxicita ellipticinu na studované neuroblastomové linie. Buňky byly inkubovány s ellipticinem 96 hodin za podmínek uvedených v kapitole 3.3.6

4.2. Vliv valproátu (VPA) a trichostatinu A (TSA) na cytotoxicitu ellipticinu vůči neuroblastomovým buněčným liniím

Ke studiu ovlivnění cytotoxicity ellipticinu vůči neuroblastomovým liniím jsme použili jako zástupce inhibitorů histondeacetylasy, VPA a TSA. Studovali jsme jejich působení na dvě lidské neuroblastomové buněčné linie vystavené ellipticinu 24 hodin, a to linie UKF-NB-3 a UKF-NB-

4 v přítomnosti elliptycinu. Pomocí MTT testu jsme zjišťovali viabilitu těchto linií (viz. kapitola 3.3.7.). Výsledky MTT testu ukázaly, že inhibitory histondeacetylas VPA a TSA, efektivně zvyšují toxicitu elliptycinu vůči těmto liniím. *Obrázek 20* a *Tabulka 9* uvádějí hodnoty IC_{50} elliptycinu pro testované neuroblastomové linie vystavené 24 hodin před přidáním cytostatika buď VPA, nebo TSA. Dalších 24 hodin pak byly tyto buňky vystaveny působení elliptycinu ($25\mu\text{M}$ v první jamce, dále ředěn dvojkovou řadou do deseti jamek).



Obrázek 20

Vliv inhibitorů histondeacetylas na cytotoxicitu elliptycinu vzhledem k neuroblastomovým liniím UKF-NB-3 a UKF-NB-4. Neuroblastomové linie byly vystavené VPA a TSA 24 hodin před podáním cytostatika. Buňky byly inkubovány po expozici VPA a TSA 24 hodin s ellipticinem za podmínek uvedených v kapitole 3.3.7

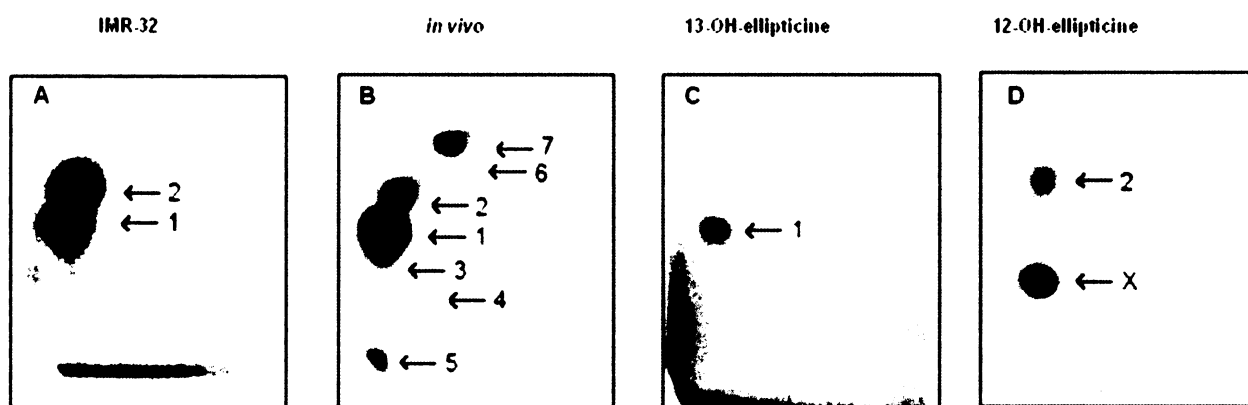
Tabulka 9

Vliv inhibitorů histondeacetylas na cytotoxicitu elliptycinu vzhledem k neuroblastomovým liniím UKF-NB-3 a UKF-NB-4. Buňky byly inkubovány po expozici VPA a TSA 24 hodin s ellipticinem za podmínek uvedených v kapitole 3.3.7

Buněčné linie	Inhibitor histondeacetylas	Koncentrace [mM]	IC_{50} [μM]
UKF-NB-3	bez inhibitoru	0	0,84± 0,08
	VPA	1	0,38± 0,04
	VPA	2	0,09± 0,01
	TSA	0,1	0,58± 0,06
	TSA	0,2	0,45± 0,05
UKF-NB-4	bez inhibitoru	0	1,26± 0,13
	VPA	1	1,00± 0,10
	VPA	2	0,65± 0,07
	TSA	0,1	1,00± 0,10
	TSA	0,2	neodečteno

4.3. Vliv valproátu a trichostatinu A na tvorbu aduktů ellipticinu s DNA *in vitro*

Vedle vlivu VPA a TSA na cytotoxicitu ellipticinu jsme sledovali, zda je v buňkách neuroblastomů je vyvolána tvorba aduktů s DNA, a jak je tato tvorba ovlivněna oběma inhibitory histondeacetylasy. V DNA studovaných neuroblastomových linií jsme detekovali dva majoritní adukty s DNA (adukty 1 a 2), v *Obrázcích 17 a 21*. Pro jejich analýzu byla užitá metoda „³²P-postlabelling“ (kapitola 3.3.9.). Pro ilustraci tvorby aduktů ellipticinu s DNA jsou na *Obrázku 21* uvedeny i autoradiografické snímky aduktů tvořených z ellipticinu v DNA *in vivo* a adukty tvořené v DNA z 13-hydroxyellipticinu a 12-hydroxyellipticinu (*Obrázek 21*).



Obrázek 21

Autoradiografické snímky aduktů ellipticinu tvořených v DNA. Pro analýzu aduktů byla užitá metoda ³²P-postlabelling. V DNA izolované z neuroblastomové linie IMR-32 vystavené 10 μM ellipticinu (A), *in vivo* v DNA z jater potkanů, kterým byl ellipticin podán intraperitoneálně v dávce 40 mg/hmotnost zvířete (B), v DNA z telecího brzlíku inkubované s 13-hydroxyellipticinem (C) a 12-hydroxyellipticinem (D). (Převzato z ^[103])

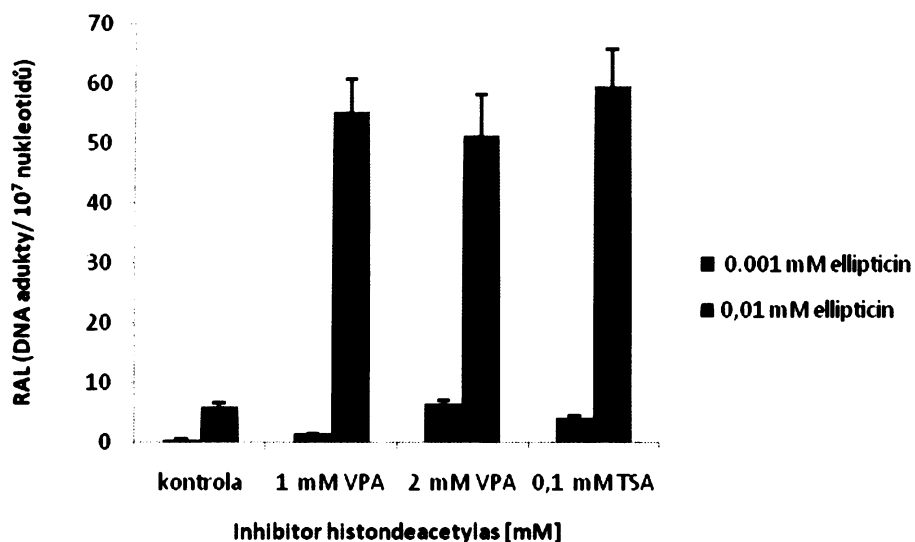
Působení VPA a TSA zvyšovalo tvorbu aduktů ellipticinu s DNA, *Tabulka 10*. Zvýšená tvorba aduktů s DNA po aplikaci inhibitorů histondeacetylasy prakticky odpovídala zvýšené cytotoxicitě ellipticinu, *Tabulka 10*.

Tabulka 10

Tvorba aduktů v DNA lidských neuroblastomových liniích preinkubovaných 24 hodin s kyselinou valproovou a trichostatinem A. Následně byly buněčné kultury kultivovány s ellipticinem 48 hodin. V tabulce jsou uvedeny průměrné hodnoty \pm standardní odchylky ze tří paralelních měření. Množství detekovaných aduktů v neuroblastomových liniích UKF-NB-3 a UKF-NB-4.

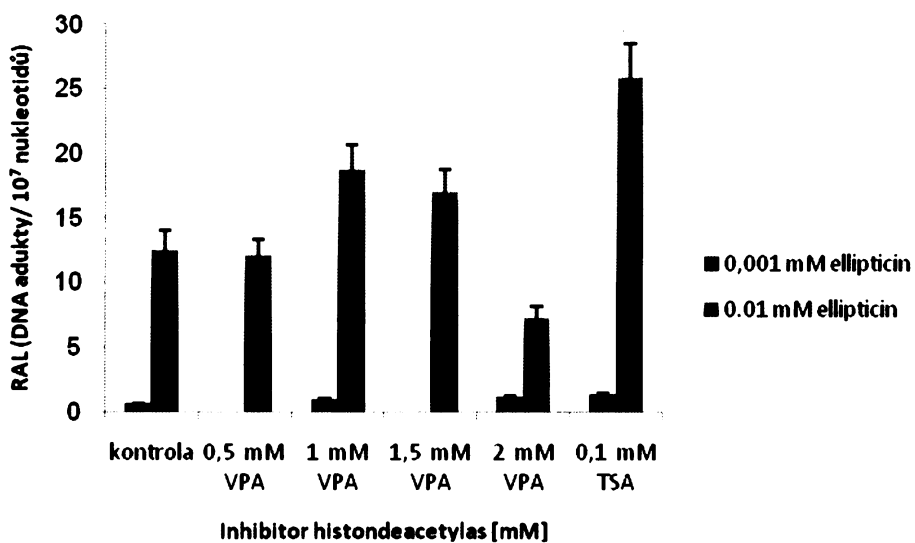
Buněčná linie	Ellipticin [μM]	Inhibitor histondeacetylas [mM]	Množství DNA aduktů [$\text{RAL} \cdot 10^{-7}$]
UKF-NB-3	1	0	$0,35 \pm 0,04$
		1 mM VPA	$1,27 \pm 0,10$
		2 mM VPA	$6,36 \pm 0,65$
		0,1 mM TSA	$3,99 \pm 0,40$
	10	0	$5,90 \pm 0,68$
		1 mM VPA	$55,31 \pm 5,50$
		2 mM VPA	$51,51 \pm 6,70$
		0,1 mM TSA	$59,65 \pm 6,20$
UKF-NB-4	1	0	$0,58 \pm 0,06$
		1 mM VPA	$0,96 \pm 0,10$
		2 mM VPA	$1,09 \pm 0,10$
		0,1 mM TSA	$1,28 \pm 0,12$
	10	0	$12,54 \pm 1,51$
		0,5 mM VPA	$12,09 \pm 1,24$
		1 mM VPA	$18,72 \pm 1,95$
		1,5 mM VPA	$16,97 \pm 1,78$
		2 mM VPA	$7,29 \pm 0,89$
		0,1 mM TSA	$25,85 \pm 2,60$

Množství detekovaných aduktů v DNA jednotlivých buněčných liniích uvádí též *Obrázek 22 a 23*.



Obrázek 22

Množství aduktů v DNA neuroblastomové linie UKF-NB-3 vzniklých působením 1 μ M ellipticinu a 10 μ M ellipticinu, inhibitorů histondeacetylas (valproátu 1-2 mM; trichostatinu A 0,1 mM).



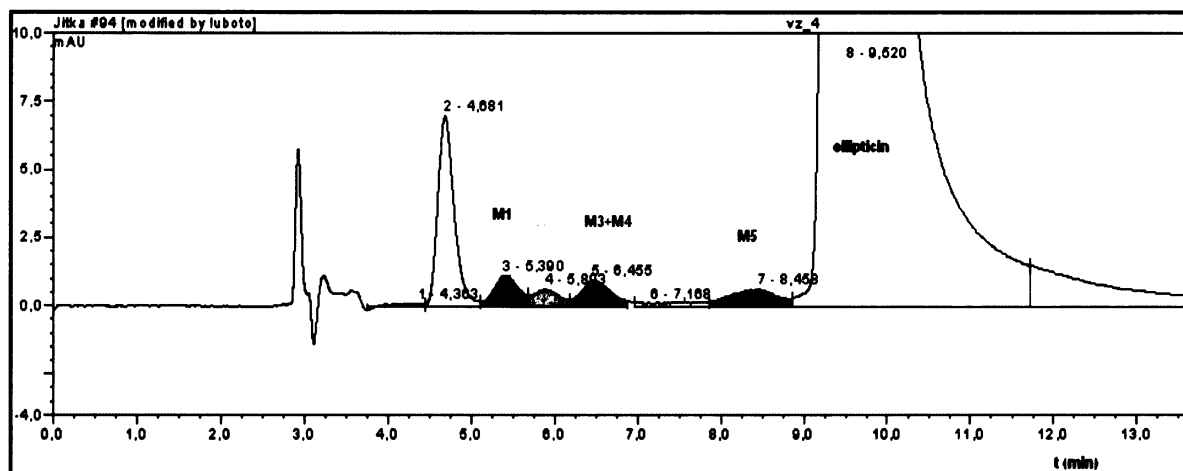
Obrázek 23

Množství aduktů v DNA neuroblastomové linie UKF-NB-4 vzniklých působením 1 μ M ellipticinu a 10 μ M ellipticinu, inhibitorů histondeacetylas (valproátu 0,5-2 mM; trichostatinu A 0,1 mM).

4.4. Vliv valproátu a trichostatinu A na oxidaci ellipticinu *in vitro*

4.4.1. Vliv valproátu (VPA) a trichostatinu A (TSA) na oxidaci ellipticinu cytochromy P450 v jaterních mikrosomech potkana

Vzorky byly připraveny dle postupu uvedeného v podkapitole 3.3.8.1. a metabolity ellipticinu separovány vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií. Jednotlivé metabolity byly eluovány izokraticky působením mobilní fáze (popsané v podkapitole 3.3.8.1.). Pomocí HPLC bylo separováno, a při vlnové délce 296 nm detekováno, 5 metabolitů ellipticinu. Jejich struktura byla již dříve objasněna studii realizovanými v naší laboratoři [135]. Jedná se o metabolity: M1 – 9-hydroxyellipticin, M2 – 12-hydroxyellipticin, M3 – 13-hydroxyellipticin, M4 – 7-hydroxyellipticin, M5 – N²-oxid ellipticinu. Plochy píků jednotlivých metabolitů ellipticinu byly vždy vztaženy k ploše píku vnitřního standardu fenacetinu. Ukázka separovaných metabolitů ellipticinu tvořených jaterními potkaními mikrosomy je uvedena na *Obrázku 24*, který představuje HPLC metabolitů ellipticinu v přítomnosti TSA.



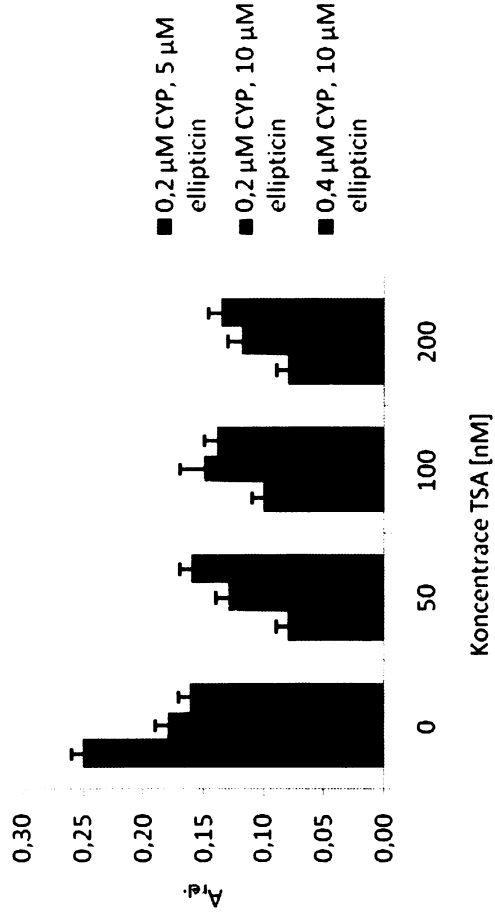
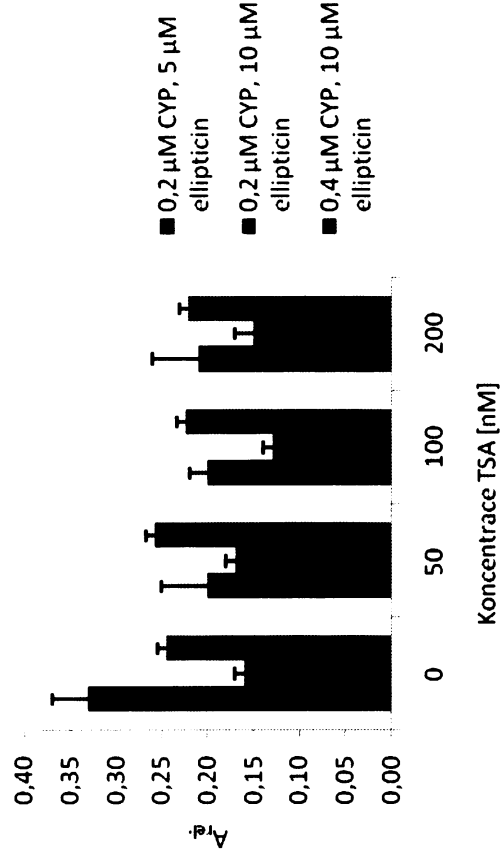
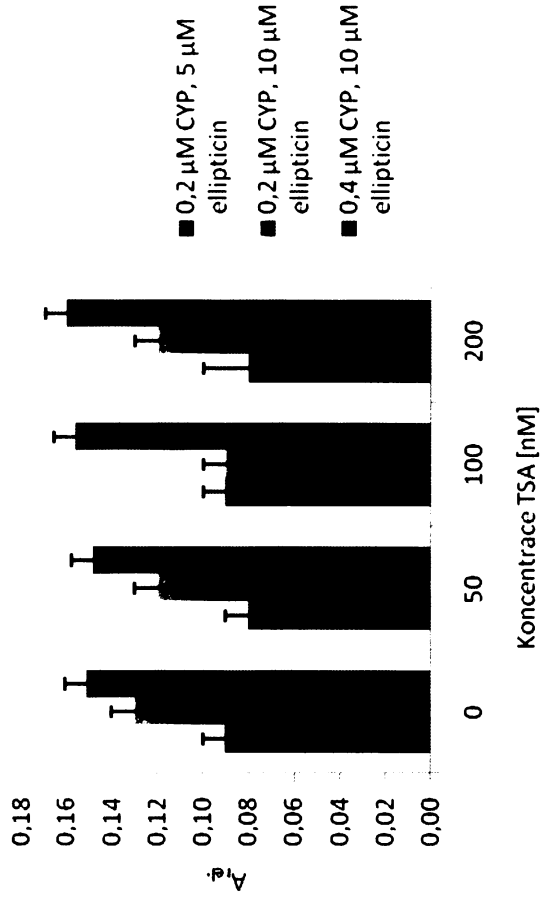
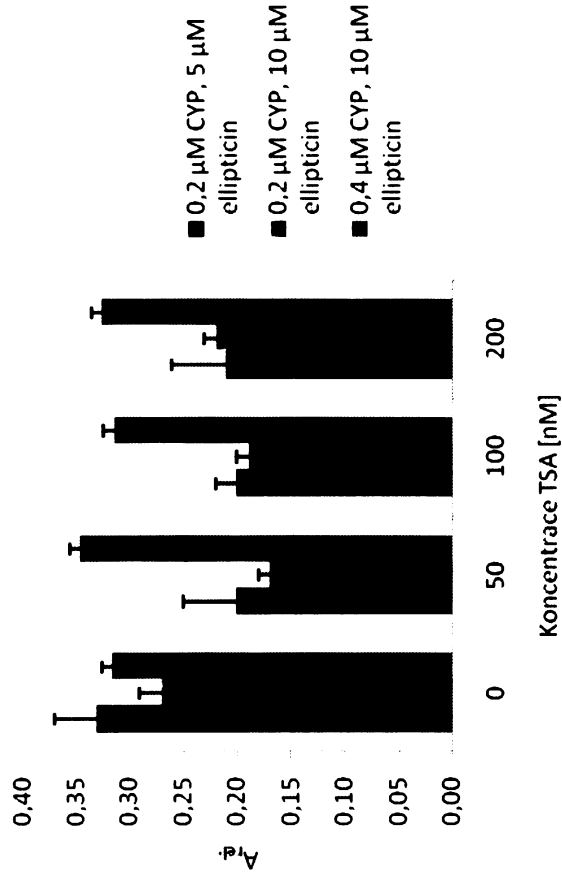
Obrázek 24

Eluční profil metabolitů ellipticinu oxidovaného cytochromy P450 v přítomnosti TSA.

Jak je uvedeno v *Obrázcích 25 a 26* TSA, a stejně tak i VPA prakticky neovlivňovaly oxidaci ellipticinu mikrosomálními cytochromy P450 z jater laboratorního potkana. Zjištěné výsledky jsou statisticky zpracovaná data z deseti měření. *Obrázky 25 a 26* shrnují výsledky vlivu TSA a

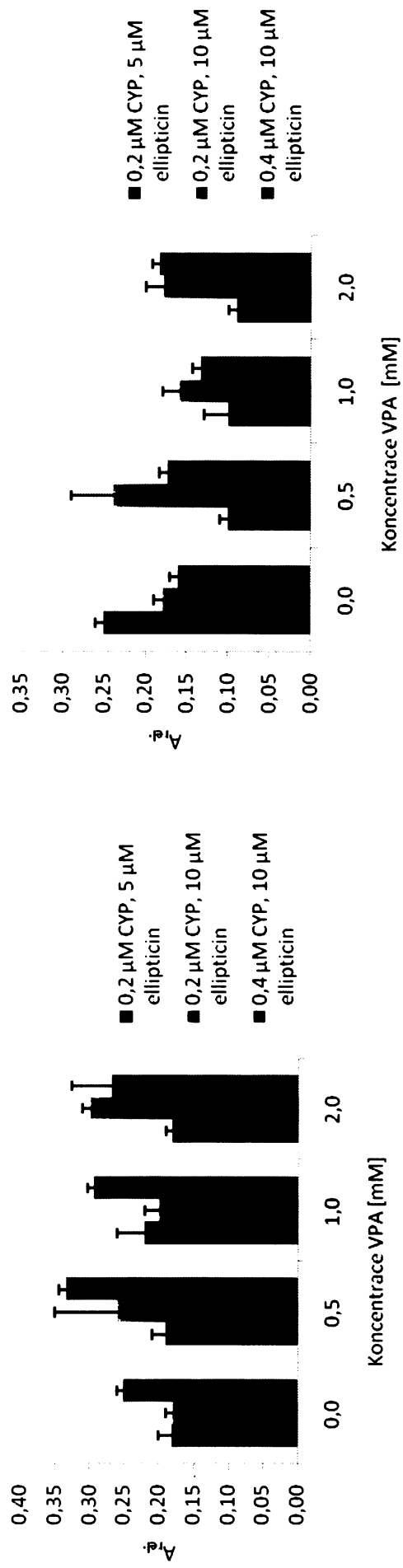
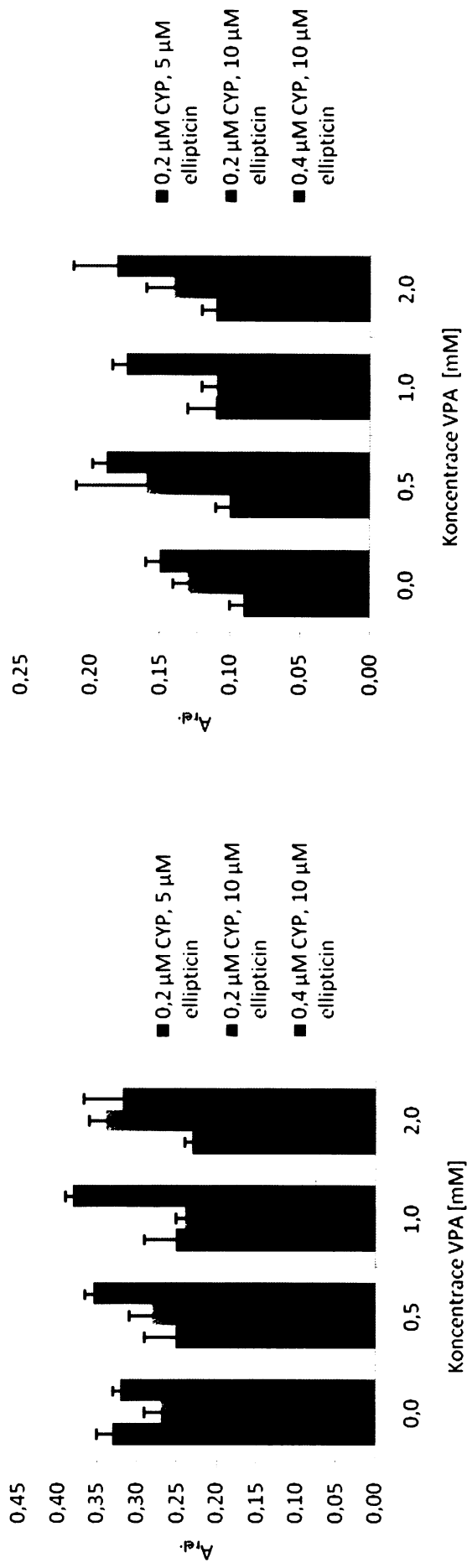
VPA na vznik jednotlivých metabolitů ellipticinu působením cytochromů P450. Z obrázků je patrné, že na rozdíl od zvýšené tvorby aduktů ellipticinu s DNA v neuroblastomových buňkách vlivem inhibitorů histondeacetylas (Obrázky 22 a 23), je tvorba jednotlivých metabolitů ellipticinu cytochromy P450 buď prakticky neovlivněna nebo dokonce snížena (Obrázky 25 a 26).

Ze získaných výsledků je patrné, že přítomnost inhibitorů histondeacetylas, TSA a VPA, zkoumaná *in vitro* v jaterních mikrosomech potkana, nemá signifikantní stimulační vliv na oxidaci ellipticinu cytochromy P450 na jeho metabolity.



Obrázek 25

Vliv TSA na oxidaci ellipticinu jaterními potkanními mikrosomy. Zleva 9-hydroxyellipticin (M1), 12-hydroxyellipticin (M2), 13-hydroxy a 7-hydroxyellipticin (M3+M4) a N2-oxid ellipticinu (M5). [A_{rel} je relativní plocha píku]



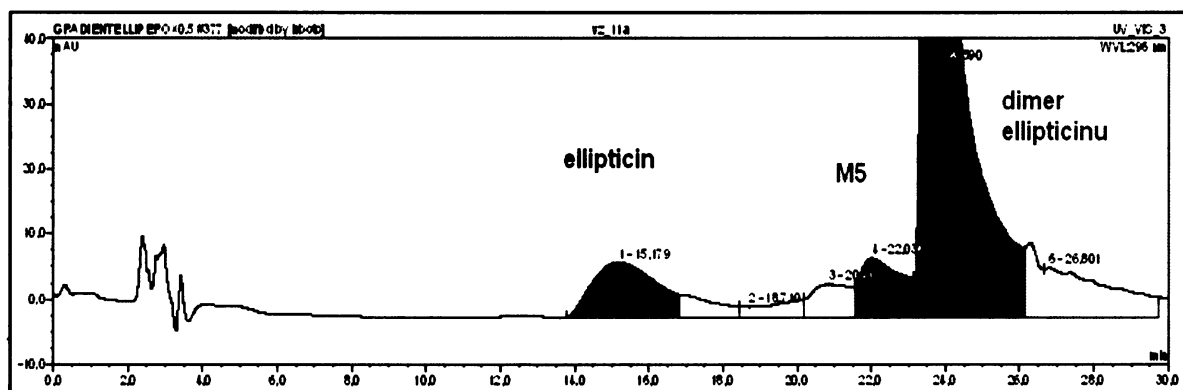
Obrázek 26

Vliv VPA na oxidaci ellipticinu jaterními potkanními mikrosomy. Zleva 9- hydroxyellipticin (M1), 12-hydroxyellipticin (M2), 13-hydroxy a 7-hydroxyellipticin (M3+M4) a N2-oxid ellipticinu (M5) [A_{rel} je relativní plocha píku]

4.4.2. Vliv valproátu (VPA) a trichostatinu A (TSA) na oxidaci ellipticinu peroxidasami

Protože je ellipticin metabolizován nejen cytochromy P450, ale i peroxidasami, bylo nutné ověřit *in vitro* i působení inhibitorů histondeacetylas, konkrétně opět kyseliny valproové a trichostatinu A, na metabolismus ellipticinu peroxidasami.

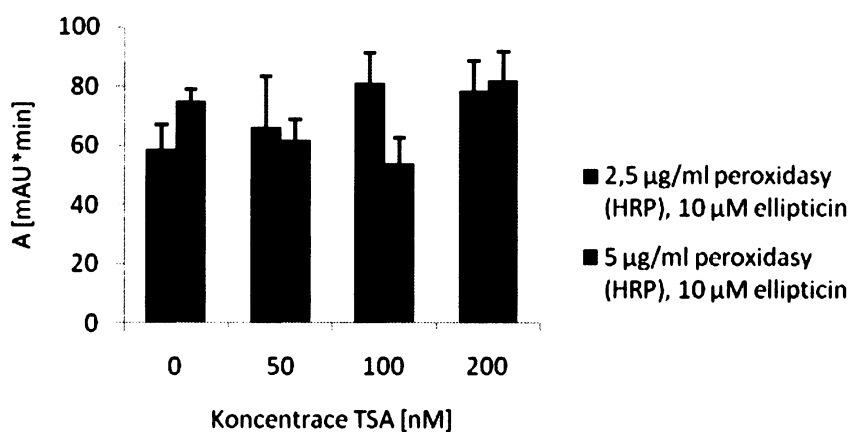
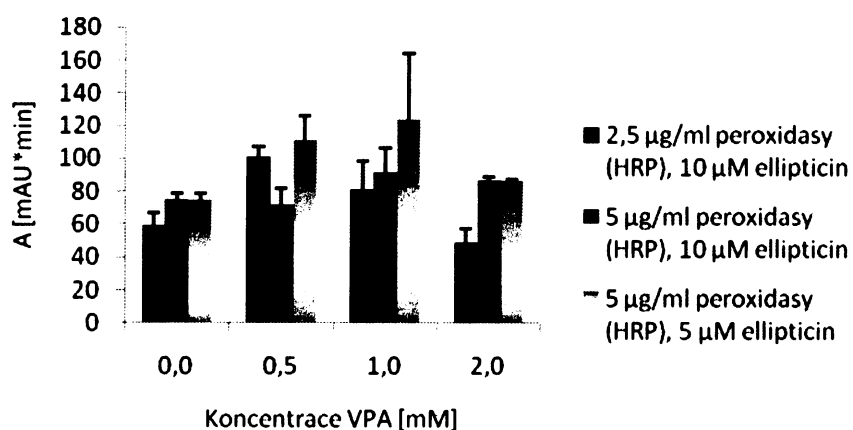
Vzorky byly připraveny dle postupu uvedeného v kapitole 3.3.8.2. Separací pomocí metody HPLC jsme detekovali majoritní (dimer ellipticinu) i minoritní produkty (N^2 -oxid ellipticinu, tj. metabolit M5) oxidace ellipticinu peroxidasami. V tomto uspořádání byl hlavním sledovaným metabolitem majoritní produkt oxidace ellipticinu peroxidasami, dimer ellipticinu. Jeho struktura byla určena v naší laboratoři ^[133] a je uvedena v kapitole 1.8.4.2. *Obrázek 27* ukazuje HPLC s elučním píkem dimeru ellipticinu (také píku ellipticinu a N^2 -oxidu ellipticinu- metabolitu M5) v přítomnosti inhibitoru histondeacetylas, VPA.



Obrázek 27

Eluční profil metabolitů získaných oxidací ellipticinu křenovou peroxidasou (HRP) v přítomnosti VPA

Obrázek 28 shrnuje výsledky vlivu TSA a VPA na vznik jednotlivých metabolitů ellipticinu působením peroxidas. Všechny zde uvedené výsledky jsou statisticky zpracovaná data z patnácti měření.



Obrázek 28

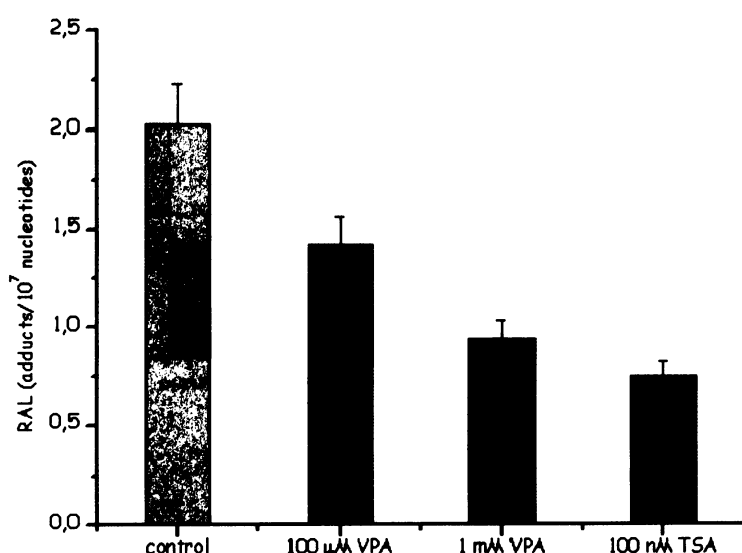
Vliv VPA a TSA na oxidaci ellipticinu křenovou peroxidasou (HRP). Sledovaným metabolitem byl dimer ellipticinu, majoritní produkt oxidace ellipticinu peroxidasami [A je plocha píku v jednotkách mAU*min]

Ze získaných výsledků není patrné signifikantní ovlivnění metabolické oxidace ellipticinu peroxidasou působením inhibitorů histondeacetylas, TSA a VPA.

4.5. Vliv inhibitorů histondeacetylas, valproátu (VPA) a trichostatinu A (TSA), na oxidační aktivaci ellipticinu vedoucí k tvorbě aduktů s DNA

4.5.1. Vliv valproátu a trichostatinu A na oxidační aktivaci ellipticinu cytochromy P450 v lidských mikrosomech

Pro analýzu vlivu VPA a TSA na oxidační aktivaci ellipticinu působením cytochromů P450 v lidských jaterních mikrosomech a vedoucí ke vzniku aduktů s DNA byla užitá metoda „³²P-postlabelling“ (popsaná v kapitole 3.3.9.). Aduktů byly kvantifikovány a jejich množství je vyjádřeno v jednotkách RAL („relative adduct labeling“), (Obrázek 29). RAL vyjadřuje množství tvořených aduktů v DNA na množství normálních (nemodifikovaných) deoxynukleotidů. Výsledky ukazují, že přítomnost inhibitorů histondeacetylas vede ke snížení tvorby aduktů metabolitů ellipticinu s DNA (Obrázek 29), přičemž 100 nM TSA vykazuje výrazný inhibiční vliv. Valproát rovněž inhibuje tvorbu aduktů ellipticinu s DNA, i když méně než TSA. Inhibice tvorby aduktů stoupá s rostoucí koncentrací VPA (100 μM a 1 mM VPA).

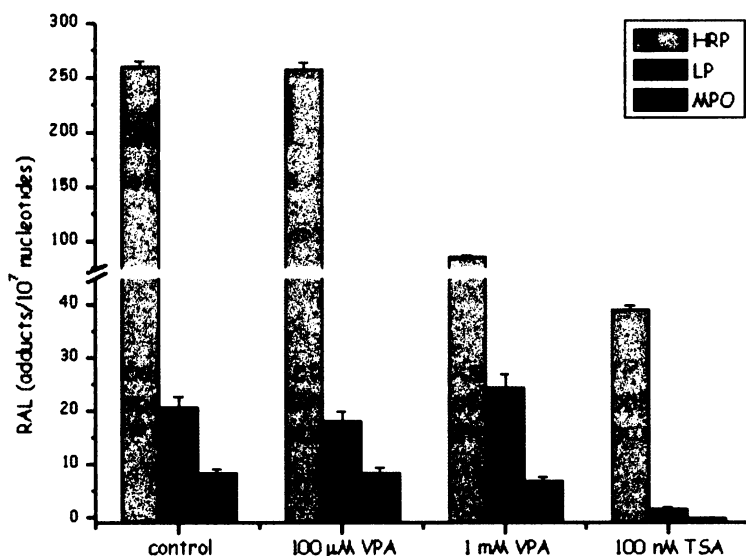


Obrázek 29

Tvorba aduktů ellipticinu s DNA v přítomnosti inhibitorů histondeacetylas (VPA, TSA). Ellipticin byl oxidačně aktivován cytochromy P450 přítomnými v lidských mikrosomech

4.5.2. Vliv valproátu a trichostatinu A na oxidační aktivaci ellipticinu peroxidasy

Pro analýzu vlivu VPA a TSA na oxidační aktivaci ellipticinu působením peroxidasy a vedoucí ke vzniku aduktů s DNA byla rovněž užitá metoda „³²P-postlabelling“ (kapitola 3.3.9.). Pro měření byly použity tři typy peroxidasy, lidská myeloperoxidasa (MPO), hovězí laktoperoxidasa (LPO) a křenová peroxidasa (HRP). Bez inhibitorů histondeacetylasy je ellipticin nejúčinněji aktivován křenovou peroxidasou (HRP). V přítomnosti inhibitorů histondeacetylasy signifikantní změny v počtu vznikajících aduktů DNA s ellipticinem vykazují pouze ty, které byly aktivovány HRP. O signifikantní inhibici tvorby aduktů lze v případě MPO a LPO hovořit pouze v případě přítomnosti 100 nM TSA (viz. *Obrázek 30*). TSA je tedy velmi účinným inhibitorem vzniku aduktů metabolitů ellipticinu s DNA působením peroxidasy, na rozdíl od VPA, který má výraznější inhibiční účinky až při vyšších koncentracích (stejně jako v případě lidských mikrosomálních preparátů).



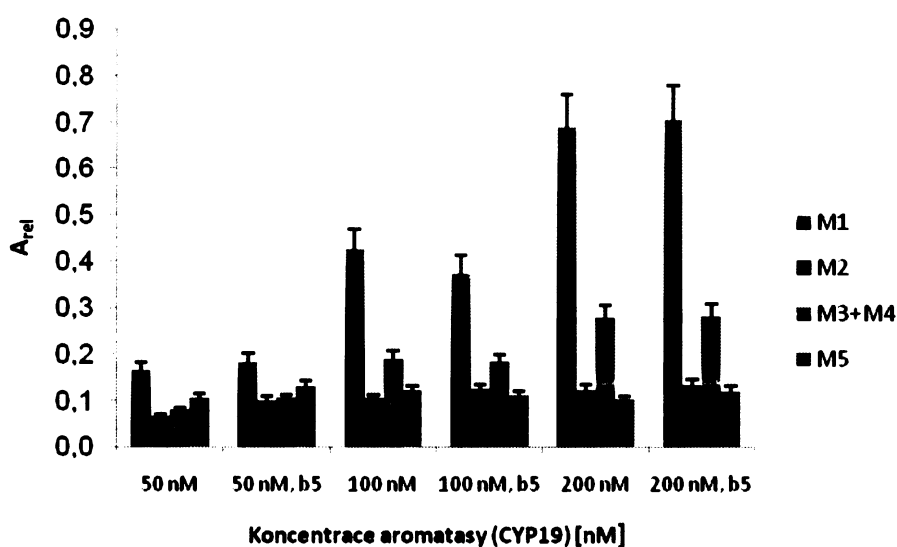
Obrázek 30

Tvorba aduktů ellipticinu s DNA v přítomnosti inhibitorů histondeacetylasy (VPA, TSA). Ellipticin byl oxidačně aktivován různými druhy peroxidasy: křenové peroxidasy (HRP), lidské myeloperoxidasy (MPO) a hovězí laktoperoxidasy (LPO).

4.6. Oxidace ellipticinu aromatasou (CYP19)

V této části práce jsme zjišťovali, zda je ellipticin metabolizován aromatasou (CYP19), a jaký vliv na jeho oxidaci tímto enzymem má cytochrom b_5 .

Obrázek 31 shrnuje získané výsledky. Ukazuje, že ellipticin je v přítomnosti cytochromu P450 19 (CYP19) oxidován na pět metabolitů, stejně jako cytochromy P450 1A1 či 3A4 a dalších cytochromů P450 [133, 136, 137]. Z výsledků je též zřejmé, že přítomnost cytochromu b_5 [poměr cytochrom P450 19: cytochrom b_5 (1: 3)] nemá signifikantní vliv na tvorbu metabolitů ellipticinu působením aromatasou (CYP19).



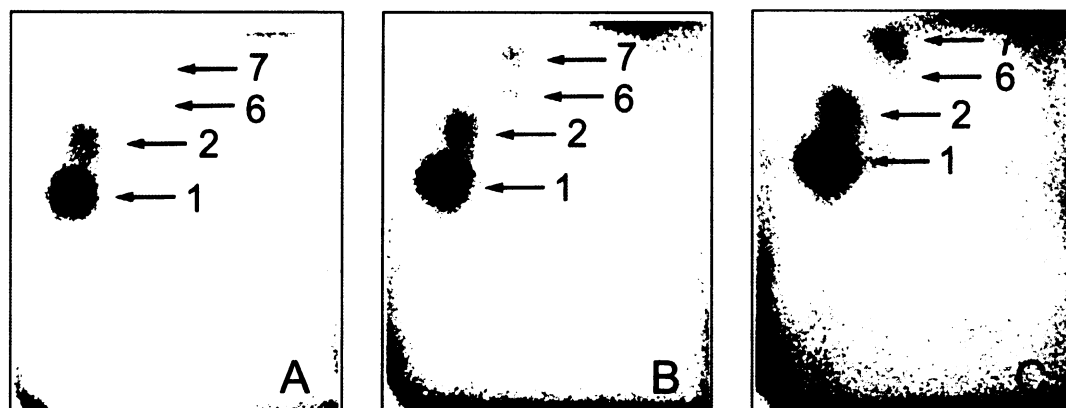
Obrázek 31

Produkty oxidace ellipticinu katalyzované působením CYP19, separované vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií. Množství jednotlivých metabolitů jsou znázorněna v závislosti na koncentraci CYP19 a přítomnosti či nepřítomnosti cytochromu b_5 , [A_{rel} je relativní plocha píku].

4.7. Tvorba aduktů ellipticinu s DNA po aktivaci aromatasou (CYP19) a modulace jeho účinnosti cytochromem b_5

Lidský CYP19 byl rovněž testován z hlediska jeho schopnosti aktivovat ellipticin za tvorby aduktů s DNA. Z experimentů analyzujících ellipticin tímto enzymem (viz kapitola 4.6) je zřejmé, že metabolity schopné generovat dva majoritní adukty (13-hydroxyellipticin a 12-hydroxyellipticin), jsou CYP19 tvořeny (Obrázek 31). Adukty ellipticinu s DNA by tímto enzymem tedy měly být tvořeny. Skutečně v experimentech sledujících tvorbu aduktů ellipticinu

s DNA po jeho oxidační aktivaci CYP19 jsme oba majoritní adukty ellipticinu s DNA detekovali (adukty 1 a 2 na *Obrázku 32*). Vedle těchto aduktů jsou systémem CYP19 tvořeny ještě dva adukty minoritní (označeny jako adukty 6 a 7 na *Obrázku 32*).



Obrázek 32

Tvorba aduktů ellipticinu s DNA aktivací CYP19 (A), za přítomnosti cytochromu b_5 v poměru CYP19: cytochromu b_5 (1: 2,5) (B), za přítomnosti cytochromu b_5 v poměru CYP19 : cytochromu b_5 (1: 10) (C).

V dalších experimentech jsme sledovali, zda oxidační aktivaci ellipticinu CYP19 ovlivňuje interakce tohoto enzymu s cytochromem b_5 . Vzhledem k tomu, že přidáním cytochromu b_5 k CYP19 v poměru CYP19: cytochrom b_5 (1: 3) nevedla k statisticky zvýšené tvorbě metabolitů ellipticinu (*Obrázek 31*), použili jsme v dalších experimentech i zvýšená množství cytochromu b_5 . Cytochrom b_5 stimuloval tvorbu aduktů ellipticinu s DNA při jeho aktivaci CYP19 (*Tabulka 11*). Statisticky signifikantní stimulace však byla pozorována až za zvýšených koncentrací tohoto proteinu, jmenovitě byl-li přítomen v množství cytochrom P450 19 : cytochromu b_5 (1: 5 a 1: 10) (viz *Tabulka 11*). V desetinásobně vyšší koncentraci oproti CYP19 stimuloval aktivaci ellipticinu za tvorby aduktů s DNA více než třikrát.

Tabulka 11

Tvorba aduktů DNA s ellipticinem aktivovaným lidským cytochromem P450 19 (aromasou) v přítomnosti či nepřítomnosti cytochromu b_5

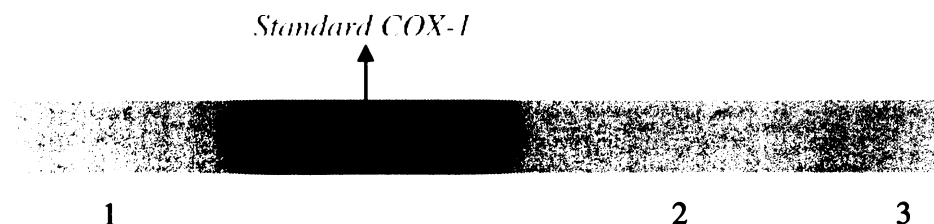
	adukt 1	adukt 2	adukt 6	adukt 7	celkové množství DNA aduktů
	5,75 ± 0,32	1,58 ± 0,09	0,24 ± 0,02	0,20 ± 0,01	7,77 ± 0,35
	6,67 ± 0,36	1,40 ± 0,08	0,27 ± 0,02	0,35 ± 0,02	8,69 ± 0,41
	8,17 ± 0,42	1,75 ± 0,09	0,49 ± 0,03	0,47 ± 0,03	10,88 ± 0,52
	21,70 ± 1,27	3,93 ± 0,28	0,48 ± 0,03	1,55 ± 0,07	27,66 ± 1,68

4.8. Exprese enzymů metabolisujících ellipticin v nádorových buněčných liniích

V další části diplomové práce jsme sledovali, zda jsou ve zkoumaných neuroblastomových buněčných liniích exprimovány enzymy, které oxidačně aktivují ellipticin na metabolity schopné kovalentně modifikovat DNA. Vedle těchto nádorových buněčných linií byla exprese sledována i v další nádorové linii, jmenovitě v buňkách prsního adenokarcinomu (MCF-7). Exprese enzymů metabolisujících ellipticin byla studována metodou Western blot (viz kapitola 3.3.5.).

4.8.1. Exprese enzymů metabolisujících ellipticin v neuroblastomových liniích

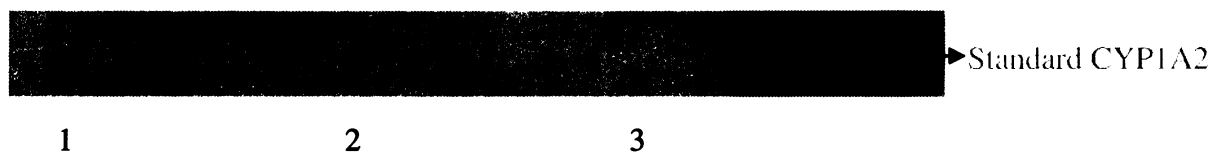
V neuroblastomových buněčných liniích (IMR-32, UKF-NB-3 a UKF-NB-4) jsme sledovali expresi cytochromů P450 a peroxidas, jmenovitě: CYP1A1, CYP1A2, CYP3A4 a cyklooxygenasy-1, cyklooxygenasy-2. Pomocí metody Western blot, jsme zjistili, že žádná ze studovaných buněčných nádorových linií neexprimuje cyklooxygenasu-1 (*Obrázek 33*) a cyklooxygenasu-2 (výsledky nejsou uvedeny). Výsledek sledování exprese cyklooxygenasy-1 (SDS-elektroforesou a „Western blotem“) uvádí *Obrázek 33*. Cyklooxygenasa-1 nebyla v těchto buňkách za daných experimentálních podmínek detekována.



Obrázek 33

Western blot cyklooxygenasy-1 a vzorků s neuroblastomovými buněčnými liniemi. Zleva 1-IMR-32, 2-UKF-NB-3 a 3-UKF-NB-4

Ze sledovaných cytochromů P450 byly v neuroblastomových liniích detekovány CYP1A1, CYP1B1, CYP3A4 a CYP19, zatímco exprese cytochromu CYP1A2 nebyla prokázána (*Obrázek 34-38*).



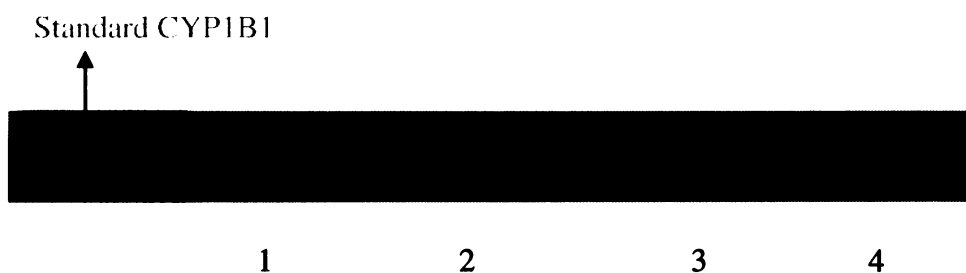
Obrázek 34

Western blot cytochromu P450 1A2 a vzorků neuroblastomových buněčných linií. Zleva 1-IMR-32, 2-UKF-NB-3 a 3-UKF-NB-4



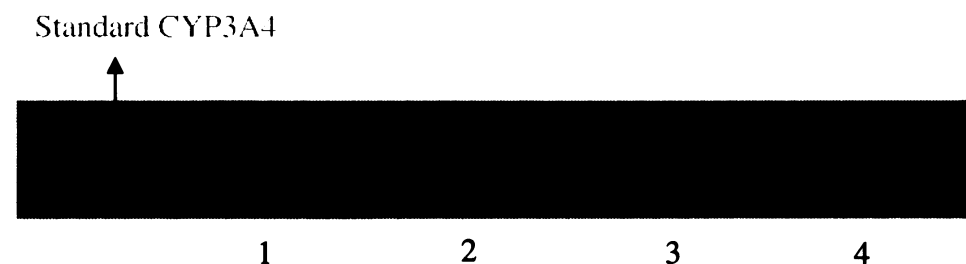
Obrázek 35

Western blot vzorků neuroblastomových buněčných linií sledující expresi CYP1A1. Zleva 1-UKF-NB-3, 2-UKF-NB-4, 3-UKF-NB-4 (buněčná linie UKF-NB-4 rezistentní k ellipticinu) a 4-IMR-32



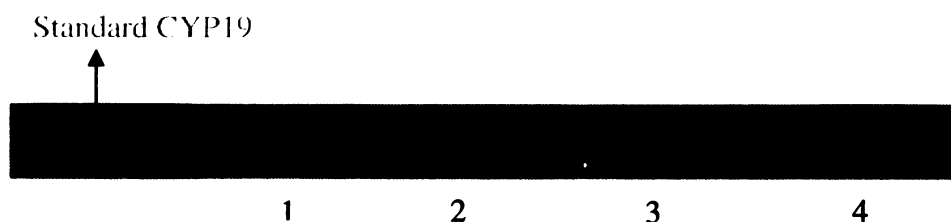
Obrázek 36

Western blot cytochromu P450 1B1 a vzorků neuroblastomových buněčných linií. Zleva 1-IMR-32, 2-UKF-NB-4, 3-UKF-NB-4 (buněčná linie UKF-NB-4 rezistentní k ellipticinu), 4-UKF-NB-3



Obrázek 37

Western blot cytochromu P450 3A4 a vzorků neuroblastomových buněčných linií. Zleva 1-IMR-32, 2-UKF-NB-4 (buněčná linie UKF-NB-4 rezistentní k ellipticinu), 3-UKF-NB-4, 4-UKF-NB-3

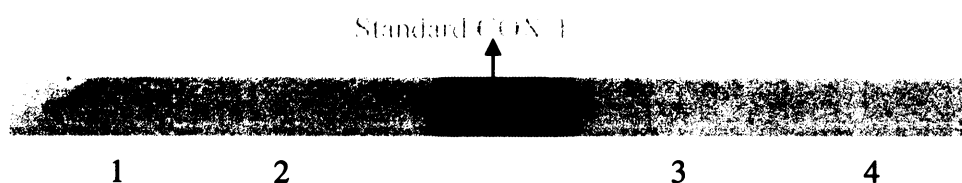


Obrázek 38

Western blot cytochromu P450 19 a vzorků neuroblastomových buňkových linií. Zleva 1-IMR-32, 2-UKF-NB-4 (buněčná linie UKF-NB-4 rezistentní k ellipticinu), 3-UKF-NB-4, 4-UKF-NB-3

4.8.2. Expresse enzymů metabolisujících ellipticin v nádorových buňkách lidského prsního adenokarcinomu (v MCF-7 buňkách)

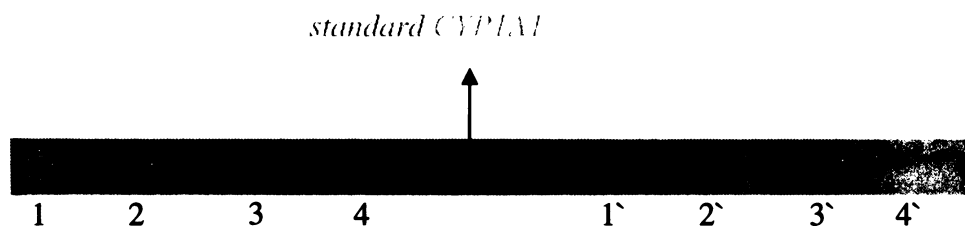
Vedle buněčných linií neuroblastomu byla pro studium exprese biotransformačních enzymů studována i buněčná linie lidského prsního adenokarcinomu MCF-7. U těchto nádorových buněk byla již dříve zjištěna cytotoxicita ellipticinu daná jeho enzymovou aktivací za tvorby aduktů s DNA (Stiborová, ústní sdělení). Porovnávána byla exprese enzymů biotransformujících ellipticin ve dvou typech buněk. V buňkách MCF-7 kontrolních a v buňkách, které byly kultivovány po dobu 1 měsíce v 0,1 μM ellipticinu. Jak buňky kontrolní, tak ty, které byly premedikovány s ellipticinem byly poté vystaveny působení 0,5 μM ellipticinu po dobu 24 a 48 hodin. Sledovali jsme expresi cytochromů P450, CYP1A1, CYP1A2, CYP3A4 a CYP19 (aromatasy); a peroxidas: cyklooxygenasy-1 a cyklooxygenasy-2. Zjistili jsme, že nejsou v těchto buňkách exprimovány, jak cyklooxygenasa-1 (*Obrázek 39*), tak i cyklooxygenasa-2 (výsledky nejsou uvedeny), nejsou v těchto buňkách exprimovány. Výsledek stanovení cyklooxygenasy-1 specifickou protilátkou proti tomuto enzymu (SDS elektroforesa, Western blot), ukazuje *Obrázek 39*.



Obrázek 39

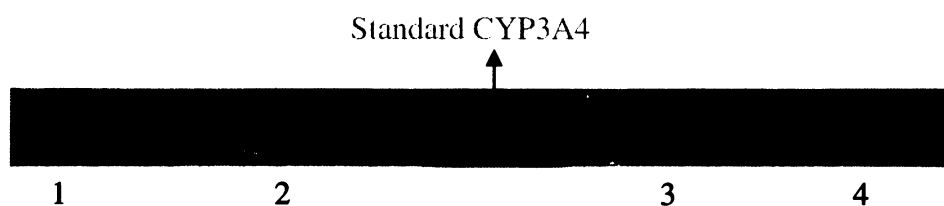
Western blot cyklooxygenasy-1 a vzorků buněk MCF-7. Zleva 1- Buňky MCF-7 dlouhodobě premedikované s 0,1 μM ellipticinem a dále vystavené 0,5 μM ellipticinu po dobu 24 hodin, 2- buňky MCF-7 kontrolní, inkubované 24 hodin s 0,5 μM ellipticinu, 3- buňky MCF-7 dlouhodobě premedikované s 0,1 μM ellipticinem a dále vystavené 0,5 μM ellipticinu po dobu 48 hodin, 4- buňky MCF-7 kontrolní, inkubované 48 hodin s 0,5 μM ellipticinem.

Z výsledků zjištěných z experimentů sledujících expresi cytochromů P450, je patrné, že buňky MCF-7 exprimují CYP1A1, CYP1B1, CYP3A4 a CYP19. Navíc bylo zjištěno, že ellipticin může působit jako induktor cytochromů P450 v těchto nádorových buňkách. Zvýšená exprese cytochromů P450 1A1, 1B1 a 3A4 byla způsobena jak dlouhodobým vystavením buněk 0,1 μM ellipticinu, tak i působením 0,5 μM ellipticinu 24 nebo 48 hodin (Obrázky 40-42).



Obrázek 40

Western blot cytochromu P450 1A1 a vzorků buněk MCF-7. Zleva 1- Buňky MCF-7 dlouhodobě premedikované s 0,1 μM ellipticinem a dále vystavené 0,5 μM ellipticinu po dobu 24 hodin, 2- buňky MCF-7 kontrolní, inkubované 24 hodin s 0,5 μM ellipticinu, 3- buňky MCF-7 dlouhodobě premedikované s 0,1 μM ellipticinem a dále vystavené 0,5 μM ellipticinu po dobu 48 hodin, 4- buňky MCF-7 kontrolní, inkubované 48 hodin s 0,5 μM ellipticinu. Vzorky 1', 2', 3', 4' jsou totožné se vzorky 1, 2, 3, 4, liší se pouze v koncentraci na jamku, ta je zde dvojnásobná (60 μg).



Obrázek 41

Western blot cytochromu P450 3A4 a vzorků buněk MCF-7. Zleva 1- Buňky MCF-7 dlouhodobě premedikované s 0,1 μM ellipticinem a dále vystavené 0,5 μM ellipticinu po dobu 24 hodin, 2- buňky MCF-7 kontrolní, inkubované 24 hodin s 0,5 μM ellipticinem, 3- buňky MCF-7 dlouhodobě premedikované s 0,1 μM ellipticinem a dále vystavené 0,5 μM ellipticinu po dobu 48 hodin, 4- buňky MCF-7 kontrolní, inkubované 48 hodin s 0,5 μM ellipticinem.



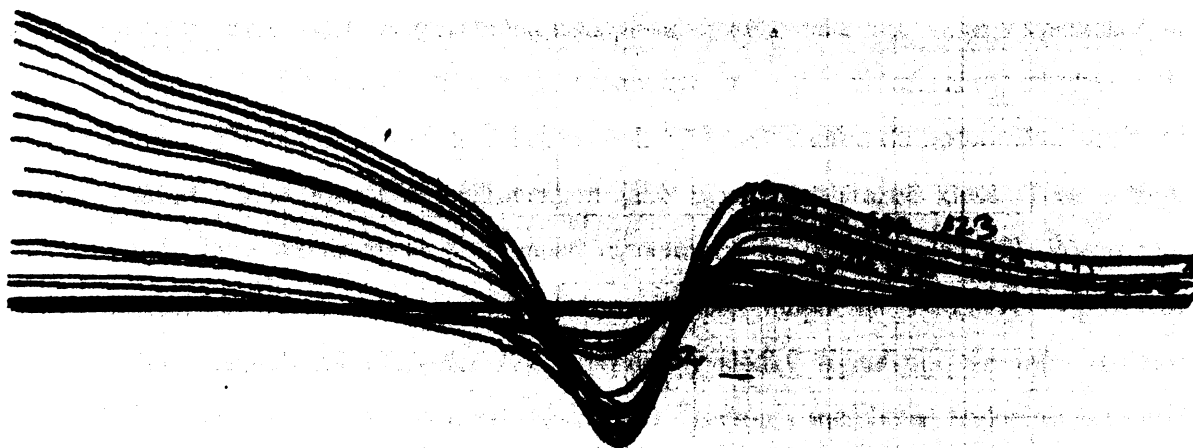
Obrázek 42

Western blot vzorků buněk MCF-7 sledující expresi CYP1B1. Zleva 1- Buňky MCF-7 dlouhodobě premedikované s 0,1 μM ellipticinem a dále vystavené 0,5 μM ellipticinu po dobu 24 hodin, 2- buňky MCF-7 kontrolní, inkubované 24 hodin s 0,5 μM ellipticinem, 3- buňky MCF-7 dlouhodobě premedikované s 0,1 μM ellipticinem a dále vystavené 0,5 μM ellipticinu po dobu 48 hodin, 4- buňky MCF-7 kontrolní, inkubované 48 hodin s 0,5 μM ellipticinem.

Zkoumané buňky MCF-7 také exprimují CYP19 (aromatasu), avšak ve velmi malých množstvích CYP19 zjištěné metodou Western blot. Proto v práci výsledky exprese neuvádíme.

4.8.3. Interakce ellipticinu s cytochromem P450 1A1 sledovaná diferenční spektroskopií

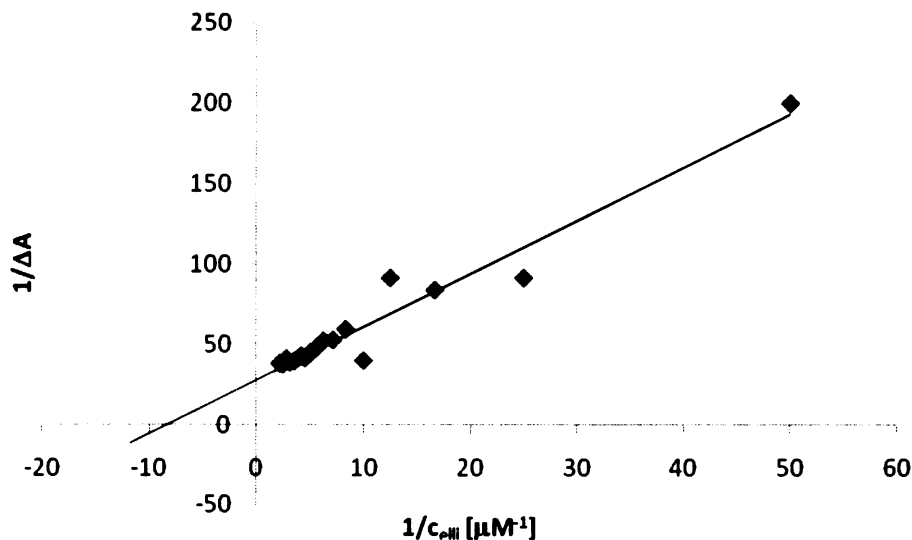
Dalším cílem diplomové práce bylo sledovat jak ellipticin interaguje s proteinem cytochromu P450 1A1, a jak je tato interakce ovlivněna enzymy, či dalšími složkami mikrosomálního MFO systému, které jsou důležité pro jeho aktivitu. Ve studii byl použit potkanní rekombinační CYP1A1. Vazba je ligandového typu. To znamená, že je ellipticin za daných experimentálních podmínek vázán na ion železa porfyrinového skeletu. Míra interakce byla charakterizována hodnotou zdánlivé disociační konstanty komplexu CYP1A1- ellipticin (K_s). Příklad diferenčního spektra ukazuje *Obrázek 43*.



Obrázek 43

Diferenční spektrum interakce ellipticinu s cytochromem P450 1A1 v přítomnosti cytochromu b5.

Určení této konstanty z diferenciálního spektra ukazuje *Obrázek 44*.



Obrázek 44

Určení zdánlivé spektrální disociační konstanty (K_s) pro interakci ellipticinu s mikrosomálním cytochromem P450 1A1.

Vazba ellipticinu na CYP1A1 je ovlivněna jednotlivými složkami MFO systému (viz *Tabulka 12*). Je-li CYP 1A1 v komplexu s jeho reduktasou (NADPH:cytochrom P450 reduktasa), je vazba ellipticinu významně zvýšena. Oproti tomu interakcí s další proteinovou složkou, cytochromem b₅, je vazba ellipticinu jako ligandu železa v CYP1A1 znesnadněna. Hodnota disociační konstanty komplexu CYP1A1 a cytochromu b₅ s ellipticinem vzrostla téměř 6 krát. Přítomnost NADPH:cytochrom P450 reduktasy v systému CYP1A1, cytochromu b₅ a ellipticinu pak vyrovnala vazebný deficit způsobený cytochromem b₅. Další složkou MFO systému je

biologická membrána (většinou membrána endoplasmatického retikula). Ta je v systémech *in vitro* simulována přítomností liposomů tvořených z 1,2- didodecanoyl-sn-glycero-3-phosphocholinu (DLPC) či dalších fosfolipidů. Je-li CYP1A1 vnořen do liposomální struktury tvořené z DLPC, jeho interakce s ellipticinem jako ligandem výrazně klesá. Toto snížení interakce bylo ještě prohloubeno přítomností cytochromu b₅ (viz *Tabulka 12*). Pouze vliv NADPH:cytochrom P450 reductasy ligandovou interakci ellipticinu s CYP1A1 v prostředí liposomů opět usnadňoval (*Tabulka 12*). Uvedené výsledky signalizují, že míra oxidace ellipticinu CYP1A1 závisí na celkovém stavu MFO systému v membráně endoplasmatického retikula. To koresponduje s výsledky, které byly získány v experimentech sledujících oxidaci ellipticinu s NADPH:cytochrom P450 reductasou, cytochromem b₅ a liposomy. ^[83, 141].

Tabulka 12

Hodnoty zdánlivých spektrálních disociačních konstant K_s pro interakci CYP1A1 s ellipticinem. Vliv složek systému oxidas se smíšenou funkcí (MFO systému) na tuto interakci (DLPC je 1,2-didodecanoyl-sn-glycero-3-phosphocholin)

Studovaný systém	Spektrální konstanta K _s [μM]	Typ spektra	Vlnová délka minima absorbance [nm]	Vlnová délka maxima absorbance [nm]
CYP1A1	0,12	ligandové	413	430
CYP1A1, NADPH:cytochrom P450 reductasa	0,04	ligandové	413	430
CYP1A1, cytochrom b ₅	0,69	ligandové	413	430
CYP1A1, cytochrom b ₅ , NADPH:cytochrom P450 reductasa	0,10	ligandové	413	430
CYP1A1, DLPC	0,70	ligandové	413	430
CYP1A1, DLPC, NADPH:cytochrom P450 reductasa	0,67	ligandové	413	430
CYP1A1, cytochrom b ₅ , DLPC	6,00	ligandové	413	430
CYP1A1, cytochrom b ₅ , NADPH:cytochrom P450 reductasa, DLPC	0,60	ligandové	413	430

5. Diskuse

Ellipticin je rostlinný alkaloid, který vykazuje výraznou protinádorovou aktivitu a je již od 70. let využíván k léčbě některých pokročilých nádorových onemocnění ^[66]. Vzhledem k tomu, že ellipticin je slibným protinádorovým léčivem, je předmětem intenzivního výzkumu. Také laboratoř katedry biochemie Přírodovědecké fakulty UK, vedená Prof. RNDr. Marií Stiborovou, DrSc., je jedním z center studia protinádorových účinků ellipticinu. Výzkum se soustředí na metabolismus ellipticinu a jeho interakce s biotransformačními enzymy, dále na návrh jeho účinnějších forem řadou modifikací nejen jeho parentální molekuly, ale i enzymů metabolisujících toto léčivo a cílových molekul, např.: DNA. Tento trend vychází z principu, že při léčbě nádorových onemocnění se převážně přistupuje k terapii kombinací různých léčiv, jejichž účinky se mohou vzájemně ovlivňovat.

Hlavní mechanismy působení ellipticinu jsou úzce spjaty s DNA, přičemž jde o inhibici topoisomerasy II, jeho interkalaci do DNA a především u nás v laboratoři objevenou a intenzivně studovanou tvorbu kovalentních aduktů s DNA (kapitola 1.8.4.2). Jak již bylo uvedeno v úvodu diplomové práce farmakologická účinnost (popř. i vedlejší genotoxické účinky) protinádorového léčiva ellipticinu zřejmě závisí na jeho enzymové aktivaci v cílových tkáních. Enzymy zodpovědné za aktivaci ellipticinu (viz kapitola 1.8.4.2) jsou peroxidasy a cytochromy P450 (nejdůležitější isoformy jsou CYP3A4 a CYP1A1/2).

Tyto enzymy (viz kapitola 1.8.4.2) se nacházejí také v cílových nádorových tkáních, a jsou zodpovědné za metabolickou aktivaci ellipticinu *in situ* na biologicky účinnější deriváty, což vede ke zvýšení citlivosti ellipticinu na tyto typy nádorových buněk ^[34]. Cytochromy CYP1A1, CYP1B1, CYP2B6, CYP2E1 a CYP3A4 ^[34] jsou spolu s peroxidasami, laktoperoxidasou a prostaglandin H syntetasami exprimovány v buňkách lidských nádorů prsu ^[153]. V případě některých leukémií je exprimována též myeloperoxidasa ^[153]. Jedna z prostaglandin H syntetas je přítomna též v ledvinách a nádorech mozku (COX-2) ^[133]. Metabolity vzniklé působením uvedených enzymů generují kovalentní adukty s DNA, a tím efektivněji poškozují nádorové buňky ^[5, 16, 38, 39, 102, 126, 128, 137]. Toto již bylo prokázáno dřívějšími studiemi v naší laboratoři, ^[16, 103, 125, 126, 128, 130, 133, 134, 136, 137, 138] a nejen zde. Rekha a Sladek ^[112] prokázali, že cytotoxicita ellipticinu na buněčnou linii MCF-7 (buňky lidského prsního adenokarcinomu) závisí na hladině enzymů zodpovědných za metabolickou aktivaci ellipticinu na metabolity schopné kovalentní modifikace DNA. Autoři dále ukázali, že pokud jsou MCF-7 buňky vystaveny 3-methylcholanthrenu (induktor CYP1A), cytotoxické působení ellipticinu vzhledem k této

buněčné linii se přechodně zvyšuje. Lze tedy usuzovat, že aktivity a hladiny exprese cytochromů P450 a peroxidas mohou být důležité faktory ovlivňující specifitu a cytotoxicitu ellipticinu pro leukemie a prsní nádory.

V naší laboratoři bylo již dříve zjištěno, že v lidských leukemických liniích (HL-60, CCRF-CEM) cytotoxicita ellipticinu koreluje s tvorbou jeho aduktů s DNA^[101]. Vyšší hladina aduktů a zároveň vyšší cytotoxicita ellipticinu byla prokázána u linie HL-60 oproti CCRF-CEM^[101]. Tato skutečnost může být způsobena tím, že buněčná linie HL-60, na rozdíl od CCRF-CEM linie, exprimuje myeloperoxidasu a COX-1, které aktivují ellipticin na metabolity, tvořící kovalentní adukty s DNA^[101, 103].

V rámci této diplomové práce bylo pokračováno v těchto studiích se zaměřením se na sledování cytotoxicity ellipticinu vůči lidským neuroblastomovým liniím. Bylo zjištěno, že ellipticin je pro všechny studované linie (IMR-32, UKF-NB-3 a UKF-NB-4) toxický. I když je působení ellipticinu na tyto nádorové buňky podobné, nejvyšší citlivost vůči ellipticinu vykazovaly IMR-32 buňky ($IC_{50} = 0,32 \pm 0,03 \mu M$), následované liniemi UKF-NB-3 ($IC_{50} = 0,37 \pm 0,04 \mu M$) a UKF-NB-4 ($IC_{50} = 0,5 \pm 0,05 \mu M$). V předběžných studiích v naší laboratoři bylo zjištěno, že ellipticin vyvolává kovalentní modifikaci DNA neuroblastomových buněk^[103]. Tato skutečnost byla v této diplomové práci plně potvrzena. Tvoří dva majoritní adukty, které jsou generovány z 12-hydroxy a 13-hydroxyellipticinu s guanosem v DNA^[128, 133, 136, 137, 138].

Zásadními experimenty první části diplomové práce bylo studium cytotoxicity ellipticinu na neuroblastomové linie, a její ovlivnění inhibitory histondeacetylas v souvislosti s tvorbou kovalentních aduktů metabolitů ellipticinu s DNA. Podle dostupných publikovaných prací^[62, 63] bylo totiž zjištěno, že existují ještě další látky, jejichž přítomnost by mohla cytotoxicitu ellipticinu zvýšit. Kromě induktorů enzymů zodpovědných za metabolickou aktivaci ellipticinu jsou to inhibitory histondeacetylas. Jedná se o látky schopné inhibovat deacetylaci histonové DNA, které zvyšují účinnost některých protinádorových léčiv. Jedná se o léčiva jejichž mechanismus účinku je založený na interakci s DNA nebo na interakci s enzymy interagujícími s DNA^[63, 147]. Bylo zjištěno, že tyto látky zvyšují též citlivost nádorových buněk na radioterapii^[18, 19]. Kim a spolupracovníci objevili^[63], že pokud jsou inhibitory histondeacetylas aplikovány před cytostatikem interagujícím s DNA, zvyšují jeho cytotoxicitu. Přidání inhibitorů histondeacetylas až po protinádorovém léčivu však na cytotoxicitu^[63] nemá synergický vliv.

Ke studiu cytotoxicity ellipticinu vůči neuroblastomovým liniím jsme použili dva zástupce inhibitorů histondeacetylas, kyselinu valproovou (VPA) a trichostatin A (TSA). Jde o potenciální

protinádorová léčiva v současné době ve fázi klinického testování (VPA) a preklinického testování (TSA). Valproát je účinné antiepileptikum ^[37, 47, 73, 92].

Ovlivnění cytotoxicity ellipticinu vůči lidským neuroblastomovým liniím bylo studováno premedikací buněk 24 hodin před aplikací ellipticinu kyselinou valproovou a trichostatinem A. Z tohoto hlediska byly testovány dvě lidské neuroblastomové buněčné linie, UKF-NB-3 a UKF-NB-4. Testování ukázalo, že inhibitory histondeacetylas, VPA a TSA, efektivně zvyšují toxicitu ellipticinu vůči těmto liniím. Lze tedy říci, že vliv obou inhibitorů histondeacetylas na cytotoxicitu protinádorového léčiva ellipticinu vůči neuroblastomovým buněčným liniím je v souladu s poznatky zjištěnými Kimem a spolupracovníky ^[62, 63].

Vliv inhibitorů histondeacetylas na metabolismus ellipticinu v neuroblastomových buněčných liniích byl dále zkoumán z hlediska tvorby kovalentních aduktů s DNA. Jak již bylo uvedeno výše v DNA studovaných neuroblastomových linií byly detekovány dva majoritní adukty s DNA, tedy adukty totožné s adukty znázorněnými na *Obrázku 17* a *21*. Pro jejich analýzu byla užita metoda „³²P-postlabeling“. Zvýšená cytotoxicita ellipticinu korelovala se zvýšenou tvorbou aduktů s DNA po aplikaci inhibitorů histondeacetylas. Výsledky tedy prokázaly, že inhibitory histondeacetylas výrazně zvyšují cytotoxicitu ellipticinu na lidské neuroblastomové linie.

Vliv inhibitorů histondeacetylas lze vysvětlit tak, že jejich působením dochází k hyperacetylaci histonů a ke ztrátě záporného náboje na jejich koncích. Důsledkem toho je pak rozvolnění chromatinové struktury. DNA je pak snadněji přístupná pro interkalační či kovalentně modifikující činidla ^[63], mezi které patří i ellipticin.

Některé z inhibitorů histondeacetylas však mohou ovlivňovat cytotoxicitu ellipticinu i tím, že ovlivňují aktivitu enzymů biotransformujících tato cytostatika. VPA i TSA mohou jak inhibovat, tak stimulovat aktivitu některých cytochromů P450 ^[26, 151]

Abychom zjistili, zda studované inhibitory histondeacetylas nepůsobí jako modulátory (aktivátory, inhibitory) enzymů zodpovědných za metabolickou aktivaci ellipticinu, a nezvyšují-li tak jeho cytotoxicitu (tvorbu aduktů) zvýšenou aktivitou těchto enzymů, zkoumali jsme vliv VPA a TSA na oxidaci ellipticinu v experimentech *in vitro*. Protože ellipticin je metabolisován cytochromy P450 a peroxidasami, sledovali jsme tedy vliv VPA a TSA na oxidaci ellipticinu těmito enzymy. V případech obou inhibitorů histondeacetylas nebylo zjištěno signifikantní ovlivnění metabolismu ellipticinu jak trichostatinem A tak, i valproátem. Jmenovitě nedocházelo ke zvýšení tvorby metabolitů ellipticinu tvořících adukty s DNA. Naopak jejich tvorba byla v některých případech VPA či TSA snížena. Proto lze předpokládat, že inhibitory

histondeacetylas zvyšují hladinu aduktů metabolitů ellipticinu s DNA nikoli ovlivněním aktivity enzymů metabolisujících ellipticin, ale nejspíše rozvolněním struktury cílové molekuly DNA, která je pak lépe přístupná kovalentní modifikaci či interkalaci.

Pro odhalení detailnějšího mechanismu působení inhibitorů histondeacetylas byla sledována i tvorba kovalentních aduktů *in vitro*. Ellipticin byl v tomto uspořádání rovněž oxidován buď lidskými mikrosomálními enzymy (obsahujícími cytochromy P450) či peroxidasami (HRP, LPO, MPO). V obou případech se tvorba aduktů s DNA snížila v přítomnosti inhibitorů histondeacetylas (především v přítomnosti TSA) oproti kontrolním vzorkům. Tyto výsledky opět potvrdily, že zvýšená tvorba aduktů ellipticinu s DNA neuroblastomových buněk inhibitory histondeacetylas není způsobena jejich stimulačním vlivem na enzymy aktivující ellipticin, ale spíše rozvolněním struktury chromatinu a tím zpřístupněním DNA pro modifikaci. Otázkou stále zůstává, zda-li se projevil větší vliv inhibitorů histondeacetylas na kovalentní modifikaci DNA či interkalaci ellipticinu do DNA.

Citlivost neuroblastomových buněk na ellipticin po premedikaci trichostatinem A či valproátem může však být zvýšena i v důsledku jiného jevu. TSA indukuje CYP1A1^[54], zatímco VPA je induktorem CYP3A4^[26]. VPA i TSA tedy mohou zvyšovat hladinu enzymů, které efektivně aktivují ellipticin za tvorby aduktů s DNA^[130]. Studium, zda takto VPA a TSA působí i v neuroblastomových buňkách bude předmětem dalších experimentů v naší laboratoři.

Dalším krokem při objasňování vlivu metabolismu ellipticinu na jeho cytotoxicitu vůči neuroblastomovým buněčným liniím, a také prsním nádorovým buňkám, bylo sledování exprese enzymů metabolisujících ellipticin. Na oxidaci ellipticinu v lidském organismu se významnou měrou podílí především enzymy CYP1A, CYP1B1, CYP3A4, COX-1, COX-2. Expese těchto enzymů byla tedy proto v nádorových buněčných liniích studována. Současně byla sledována i expese CYP19 (aromatasy), enzymu vyskytujícího se často ve zvýšených množstvích v hormonálně-dependentních nádorových tkáních^[75, 111]. V předkládané práci bylo navíc zjištěno, že CYP19 ellipticin oxidačně aktivuje za vzniku aduktů s DNA. Působí tedy obdobně jako další cytochromy P450. Zjistili jsme, že ve studovaných neuroblastomových liniích (IMR-32, UKF-NB-3 a UKF-NB-4) jsou exprimovány cytochromy P450 1A1, 1B1, 3A4 a 19, zatímco expese cyklooxygenasy a CYP1A2 nebyla potvrzena.

V buňkách MCF-7 byla zjištěna expese cytochromů P450 1A1, 1B1, 3A4 a 19. Expese cyklooxygenasy-1 a 2 však nebyla detekována. Výsledky sice nebyly kvantifikovány, ale přesto lze konstatovat, že ve všech případech byla patrná zvýšená expese cytochromů P450

u těch buněk MCF-7, které byly dlouhodobě preinkubovány s nízkými koncentracemi elliptycinu (0,1 μM). Navíc se ukázalo, že exprese studovaných cytochromů P450 se zvyšuje i expozicí buněk 0,5 μM koncentrací elliptycinu 24 a 48 hodin. Tento jev byl nejvýraznější v případě CYP1B1, který tyto buňky exprimovaly také v nejvyšším množství. Nabízí se proto vysvětlení, že ellipticin je v buňkách MCF-7 induktorem CYP1B1. Detailnější studium exprese cytochromů P450 a peroxidas v různých buněčných nádorových liniích bude předmětem ještě dalšího výzkumu v naší laboratoři.

Z výsledků zjištěných v diplomové práci vyplývá, že ellipticin by mohl být vhodným kandidátem pro léčbu neuroblastomů a rakoviny prsu, a to právě díky přítomnosti enzymů schopných jeho aktivace přímo v nádorové tkáni. Jeho cytotoxicita vůči neuroblastomovým nádorovým buňkám koreluje s množstvím a aktivitou těchto enzymů (Stiborová ústní sdělení).

Jak již bylo uvedeno výše, diplomová práce se rovněž věnuje studiu metabolismu elliptycinu aromatasou (CYP19), enzymem, který je exprimován v prsní nádorové tkáni [75, 111]. Dále se soustředila i na možné ovlivnění metabolismu elliptycinu přítomností cytochromu b_5 , který zatím ne zcela známým mechanismem v určitých případech moduluje aktivitu některých cytochromů P450 [83,141].

CYP19 oxiduje ellipticin na pět základních metabolitů a je schopný i generovat adukty ellipticinových derivátů s DNA. Cytochrom b_5 stimuluje oxidační aktivaci elliptycinu za tvorby aduktů s DNA, ale pouze je-li přítomen v reakční směsi až v množství větším než pětinasobném k CYP19. Mechanismus, který je zodpovědný za zvýšenou aktivitu CYP19 vyvolanou interakcí s cytochromem b_5 , není dosud znám, a je tedy předmětem intenzivního výzkumu naší laboratoře.

V další části diplomové práce jsme se zabývali sledováním interakce elliptycinu s cytochromem P450 1A1, tedy jedním z enzymů, který jak aktivuje ellipticin za tvorby aduktů s DNA, tak i detoxikuje ellipticin na méně aktivní metabolit (7-hydroxyellipticin). Cílem těchto měření bylo zjistit vliv jednotlivých složek MFO systému na interakci elliptycinu s CYP1A1. Tento enzym byl použit též proto, že byl v naší laboratoři dostupný v izolované formě, a bylo tedy možné postupně rekonstituovat celý MFO systém. Interakce elliptycinu s CYP1A1 v přítomnosti různých složek MFO systému byla sledována diferenční spektroskopií. Bylo zjištěno, že složky MFO systému ovlivňují afinitu elliptycinu k CYP1A1. Ellipticin interaguje s CYP1A1 jako ligand iontu železa nezávisle na přítomnosti jednotlivých složek MFO systému. To by znamenalo, že je ellipticin špatným substrátem tohoto enzymu. Tato skutečnost však neodpovídá experimentálním výsledkům, které ilustrují, že CYP1A1 je jedním z výtečných enzymů

oxidujících ellipticin. Výsledky získané s postupnou rekonstitucí MFO systému CYP1A1 přinesly vysvětlení tohoto rozdílu. Zjistili jsme, že interakcí CYP1A1 s cytochromem b₅ se ztrácí vysoká afinita ellipticinu jako ligandu CYP1A1. Dochází tedy nejméně ke změně vazby molekuly ellipticinu v aktivním centru enzymu, které je pozměněno jeho interakcí s cytochromem b₅. Vzhledem k tomu, že cytochrom b₅ vyvolává stimulaci oxidace ellipticinu cytochromem P450 1A1^[83, 142], vazba ellipticinu k aktivnímu centru CYP1A1 změněnému interakcí s cytochromem b₅, musí tedy být modifikována v tom smyslu, že se ellipticin lépe váže jako substrát enzymu. Tuto změnu však nemůžeme pozorovat diferenčními spektry. Stále sice převažuje ligandový typ spektra, ale je téměř šestinásobně sniženo. Podobně působí i zanoření molekuly CYP1A1 do membrány liposomů, uměle vytvořených z fosfolipidu (DLPC). Ligandový typ spektra se snížil až padesátkrát. I když interakce CYP1A1 s NADPH:cytochrom P450 reduktasou částečně ruší jevy pozorovatelné po interakci CYP1A1 s cytochromem b₅ a liposomy, lze konstatovat, že se interakce ellipticinu jako ligandu CYP1A1 v celém rekonstituovaném MFO systému snižuje. Umožňuje se tak rotace ellipticinu v aktivním centru enzymu a zvětšuje se míra jeho oxidace. Skutečně, tyto výsledky také byly pozorovány v experimentech sledujících oxidaci ellipticinu CYP1A1 v rekonstituovaném systému s NADPH:cytochrom P450 reduktasou a cytochromem b₅ v dřívějších experimentech prováděných v naší laboratoři^[83,142].

Z výše uvedených výsledků vyplývá, že oxidace ellipticinu cytochromy P450 silně závisí na stavu systému enzymů endoplasmatického retikula (MFO systému). Interakce jednotlivých složek tohoto systému ovlivňující jeho potenciál oxidovat ellipticin, ale i další substráty, je tedy předmětem intenzivního dalšího výzkumu naší laboratoře.

6. Závěr

Z výsledků získaných v předkládané diplomové práci vyplývá, že její cíle byly splněny. V práci bylo dále zjištěno, že:

- Ellipticin působí cytotoxicky vůči lidským nádorovým neuroblastomovým liniím (IMR-32, UKF-NB-3 a UKF-NB-4). Nejcitlivěji na ellipticin reagují buňky IMR-32. V přítomnosti inhibitorů histondeacetylas, valproátu (VPA) či trichostatinu A (TSA), se cytotoxicita ellipticinu vůči těmto liniím zvyšuje. Zvýšená cytotoxicita ellipticinu koreluje se zvýšenou tvorbou aduktů s DNA po aplikaci inhibitorů histondeacetylas (VPA či TSA).
- Oxidace a oxidační aktivace ellipticinu *in vitro* cytochromy P450 a peroxidasami není signifikantně ovlivněna trichostatinem A (TSA), ani valproátem (VPA). Jmenovitě nedochází ke zvýšení tvorby těch metabolitů ellipticinu, které tvoří adukty s DNA. Naopak jejich tvorba byla v některých případech snížena (především v přítomnosti TSA).
- Studované neuroblastomové linie exprimují cytochromy P450 1A1, 1B1, 3A4 a 19. Expres cyklooxygenas v těchto liniích nebyla potvrzena. V buňkách MCF-7 byla zjištěna exprese cytochromu P450 1A1, 3A4, 1B1 a 19, a exprese cyklooxygenasy-1 a 2 nebyla detekována. Výsledky sice nebyly kvantifikovány, ale přesto lze konstatovat, že ve všech případech byla patrná zvýšená exprese cytochromů P450 u těch buněk MCF-7, které byly dlouhodobě preinkubovány s nízkými koncentracemi ellipticinu (0,1 μ M). Navíc se ukázalo, že exprese studovaných cytochromů P450 se zvyšuje i expozicí buněk 0,5 μ M koncentrací ellipticinu 24 a 48 hodin. Tento jev byl nejvýraznější v případě CYP1B1.
- Cytochrom P450 19 oxidačně aktivuje ellipticin za vzniku aduktů s DNA. Cytochrom b_5 stimuluje oxidační aktivaci ellipticinu CYP19 za tvorby aduktů s DNA, ale pouze je-li přítomen v reakční směsi až v množství větším než pětinasobném k CYP19.
- Interakce CYP1A1 s cytochromem b_5 snižuje afinitu ellipticinu jako ligandu CYP1A1. Stále sice převažuje ligandový typ spektra, ale je téměř šestinasobně snižen. Podobně působí i zanoření molekuly CYP1A1 do membrány liposomů,

uměle vytvořených z fosfolipidu (DLPC). Ligandový typ spektra se snížil až padesátkrát. I když interakce CYP1A1 s NADPH:cytochrom P450 reduktasou částečně ruší jevy pozorovatelné po interakci CYP1A1 s cytochromem b₅ a liposomy, lze konstatovat, že se interakce ellipticinu jako ligandu CYP1A1 v celém rekonstituovaném MFO systému snižuje. Oxidace ellipticinu cytochromy P450 tedy silně závisí na stavu systému enzymů endoplasmatického retikula (MFO systému).

7. Seznam literatury

1. Abbasoğlu, R., Yılmaz, S., S.: The quantum chemical investigation of antitumor ellipticine alkaloid and its derivatives, Proceedings of ICNP-2002 – Trabzon / TÜRKİYE, 286-289
2. Acton, E., M., Narayanan, V., L., Risbood, P., A., Shoemaker, R., H., Vistica, D., T., Boyd, M., R.: Anticancer specificity of some ellipticinium salts against human brain tumors *in vitro*, J. Med. Chem. 1994, 37: 2185-2189
3. Adam, Z., Vorlíček, J., Koptíková, J.: Obecná onkologie a podpůrná léčba, Grada, 2003, Praha
4. Aimová, D., Dlouhá, T., Frei, E, Stiborová, M.: Anticancer drug ellipticine acts as an inducer of CYP1A1/2 and potentiates its own pharmacological efficiency, Cytochrome P450, Biochemistry, Biophysic and drug metabolism, Monduzzi Editore, 2003, 133-138
5. Aimová, D., Stiborová, M.: Antitumor drug ellipticine inhibits the activities of rat hepatic cytochromes P450, Biomed. Papers, 2005, 149: 437-440
6. Aimová, D., Svobodová, L., Kotrbová, V., Mrázová, M., 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, 2007, Drug. Metab. Dispos., 35: 1926-1934
7. Alberici, G., F., Bidart, J-M., Miongeon, P., Paillet, S., Mondesir, J-M., Goodman, A., Bohuon, C.: Ellipticine derivatives interact with muscarinic receptors, Biochem. Pharmacol., 1985, 34: 1701-1704
8. Alberts, B., Bray, D., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P.: Essencial cell biology, Garland Publishing, 1998, USA
9. Alison, Malcolm R.: The Cancer Handbook, 1. Edition, John Wiley & Sons, 2002, USA
10. Anderson, D. E.: Familial versus sporadic breast cancer. Cancer., 1992, 70: 1740-1746
11. Bakshi, R., P., Galande, S., Muniyappa, K.: Functional and regulatory characteristic of eukaryotic type II DNA topoisomerase, Critical Rew. Bioch. Mol. Biol., 2001, 36: 1-37

12. Baroni, T., E., Wang, T., Qian, H., Dearth, L., R., Truong, L., N., Zeng, J., Denes, A., E., Chen, S., W., Brachmann, R., K.: A global supresor motif for p53 cancer mutants, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2004, 101: 4930-4935
13. Bergander, L.: Formation and metabolism of the tryptophan-derived 6-formylindolo[3,2*b*]carbazole - a light-induced Ah-receptor ligand, Doctoral Thesis, Department of Genetics, Microbiology and Toxicology, Stockholm University, 2005, Sweden
14. Berkson, R., G., Hollick, J. J., Westwood, N., J., Woods, J., A., Lane, D., P., Lain, S.: Pilot screening programme for small molecule activators of p53, *Int. J. Cancer*, 2005, 115: 701-710
15. Bieler, C-A., Stiborová, M., Wiessler, M., Cosyns, J- P., Van Ypersele de Strihou, C., Schmeiser, H. H: ³²P-postlabelling analysis of DNA adducts formed by aristolochic acid in tissues from patients with Chinese herbs nephropathy, *Carcinogenesis*, 1997, 18:1063
16. Bořek-Dohalská, L., Frei, E., Stiborová, M.: DNA adduct formation by the anticancer drug ellipticine and its hydroxy derivatives in human breast adenocarcinoma MCF-7 cells, *Collect. Czech. Chem. Commun*, 2004, 69: 603-615
17. Bros, P., F., Kane, R., Farrel, A., T., Abraham, S., Benson, K., Brower, M., Bradley, S., Gobburu, J., V., Goheer, A., Lee, S-L., Leighton, J., Liang, Ch., Y., Lostritto, R., McGuinn, W., D., Morse, D., E., Rahman, A., Rosario, L., A., Verbois, S., L., Williams, G., Wang, Y-Ch, Pazdur, R.: Approval summary for bortezomib for injection in the treatment of multiple myeloma, *Clin. Cancer. Res.*, 2004, 10: 3954-3964
18. Camphausen, K., Tofilon, P. J.: Inhibition of histone deacetylation: A strategy for tumor radiosensitization, *J. Clin. Oncol.*, 2007, 25: 4051-4056
19. Cerna, D., Camphausen, K., Tofilon, P. J.; Histone deacetylation as target for radiosentization, *Molecular radiation therapeutic branch, Current topics in developmental biology*, Schatten, G., 2006, Academic Press, USA
20. Cleaver, J., E.: Xeroderma Pigmentosum: A human disease in which an initial stage of DNA repair is defective, *Biochemistry*, 1969, 63: 428-435

21. Cline, S., D., Macdonald, T., L., Osheroff, N.: Azatoxin is a mechanistic hybrid of the topoisomerase II - targeted anticancer drugs etoposide and ellipticine, *Biochemistry*, 1997, 36: 13095-13101
22. Coureseille, P. C., Busetta, B., Hospital, M., *Acta Cryst. B.*, 1974, 30: 2628; převzato z Mukherjee, A., K., Basu, S., Sarkar, N., Ghosh, A., C.: Advances in cancer therapy with plant based natural products, *Curr. Med. Chem.*, 2001, 8: 1467-1486
23. Cragg, G., M., Boyd, M., R., Cardelina II, Newman, D., J., Sander, K., M., Mc Cloud, T., G.: In ethnobotany and the search for new drugs, Ciba foundation symposium, 1995, 185: 178-196 ; převzato z: Cragg, G., M., Boyd, M., R., Khanna, R., Kneller, R., Mazs, T., D., Mayan, K., D., Newman, D., J., Sausville, E., A.: International collaboration in drug discovery and development: the NCI experience, *Pure Appl. Chem*, 1999, 71: 1619-1633
24. Cragg, G., M., Boyd, M., R., Khanna, R., Kneller, R., Mazs, T., D., Mayan, K., D., Newman, D., J., Sausville, E., A.: International collaboration in drug discovery and development: the NCI experience, *Pure Appl. Chem*, 1999, 71: 1619-1633
25. Cros, S., Raynaud, A.: Teratogenic effects of 9 -hydroxy-ellipticine in mouse embryo, *C. R. Seances Acad. Sci. III.*, 1982, 295: 465-70
26. Červený, L., Švecová, L., Azenbacherová, E., Vrzal, R., Štaud, F., Dvořák, Z., Ulrichová, J., Azenbacher, P., Pávek, P.: Valproic acid induces CYP3A4 and MDR1 genes expression by activating of constitutive androstane receptor and pregnane X receptor pathways, *Drug. Metab. Dispos.*, 2007, 35: 1032-1041
27. Dalton, L., K., Demerac, S., Elmes, B., C., Lord, J., V., Swan, J., M., Teitel, T.: Synthesis of the tumor-inhibitory alkaloids, ellipticine, 9 -methoxyellipticine, and related pyrido[4.3-*b*]carbazoles, *Aust. J. Chem.*, 1967, 20: 2715-2727
28. De Marini, D., M., Abu-Shakra, A., Gupta, R., Hendee, L., J., Levine, J., G.: Molecular analysis of mutations induced by the intercalating agent ellipticine at the hisD3052 allele of *Salmonella typhimurium* TA98, *Environ. Mol. Mutagen.*, 20: 12-18
29. De Ruiter A., J., M., van Gennip, H., A., Caron, H., N., Kemp, S., van Kuilenburg, A., B., P.: Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family, *Biochem. J.*, 2003, 370: 737 - 749

30. Denny, W., A.: Prodrug strategies in cancer therapy, *Eur. J. Med. Chem.*, 2001, 36: 577-595
31. Dicenzo R., Peterson, D., Cruttenden, K., Morse, G., Riggs, G., Gelbard, H., Schiffito, G.: Effect of valproic acid coadministration on plasma efivarenc and lopinavir concentrations in human immunodeficiency virus-infected adults, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2004, 48: 4328-4331
32. Dodin, G., Andrieux, M., Al Kabbani, H.: Binding of ellipticine to P-lactoglobulin, *Eur. J. Biochem.*, 1990, 193: 697-700
33. Dupont, J., Schwaller, M., A., Dodin, G.: Short term inhibitory interaction of ditercalinium with electron transport in isolated mammalian mitochondria, *Cancer Res.*, 1990, 50: 7966-7972
34. Easton D. F., Ford D., Bishop D. T.: Breast cancer Linkage Consortium. Breast and ovarian cancer incidence in BRCA1-mutation carriers. *Am. J. Hum. Genet.*, 1995, 56:265 - 271
35. El- Rayes, B., F., Ali, S., Heilbrun, L., K., Lababidi, S., Bouwman, D., Visscher, D., Philip, P., A.: Cytochrome P450 and glutathione transferase expression in human breast cancer, *Clin. Cancer Res.*, 2003, 9: 1705-1709
36. Ford D., Easton D. F., Bishop D. T.: Risks of cancer in BRCA1-mutation carriers. *Lancet*, 1994, 343: 692 – 695
37. Fossé, P., René, B., Le Bret, M., Paoletti, C., Saucier, J-M.: Sequence requirements for mammalian topoisomerase II mediated DNA cleavage stimulated by an ellipticine derivative, *Nucleic Acid Res.*, 1991, 19: 2861-2868
38. Franceschetti, S., Hamon, B., Heinemann, U.; The action of valproate on spontaneous epileptiform activity in the absence of synaptic transmission and on evoked changes in $[Ca^{2+}]_0$ and $[K^{+}]_0$ in the hippocampal slice, *Brain Res.*, 1986, 386: 1-11
39. Frei, E., Bieler, C., A., Arlt, V., M., Wiessler, M., Stiborova, M.: Covalent binding of the anticancer drug ellipticine to DNA in V79 cells transfected with human cytochrome P450 enzymes, *Biochem. Pharmacol.*, 2002, 64: 285-295.
40. Frei, E., Bieler, C., Klokow, K., A., Wiessler, M., Stiborová, M.: *J Cancer Res. Clin. Oncol.*, 2001, 126: 46; převzato z Manhartová, Z.: Diplomová práce, 2005, PFF UK, Praha

41. Froelich-Ammon, S., Patchan, M., W., Osheroff, N., Thompson, R., B.: Topoisomerase II binds to ellipticine in the absence or presence of DNA, Characterization of enzymes - drug interactions by fluorescence spectroscopy, *J. Biol. Chem.*, 1995, 270: 14998-15004
42. Froelich-Ammon, S., Osheroff, N.: Topoisomerase poisons: Harnessing the dark side of enzyme mechanism, *J. Biol. Chem.*, 1995, 270: 21429-21432
43. Gal, D., MacDonald, P., C., Porter, J., C., Simpson, E., R.: Cholesterol metabolism in cancer cells in monolayer culture. III. Low-density lipoprotein metabolism, *Int. J. Cancer*, 1981, 28: 315-319
44. Gal, D., Ohashi, M., MacDonald, P., C., Buchsbaum, H., J., Simpson, E., R.: Low-density lipoprotein as a potential vehicle for chemotherapeutic agents and radionucleotides in the management of gynecologic neoplasms, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 1981, 139: 877-885
45. Garbett, N., C., Graves, D., E.: Extending nature's leads: The anticancer agent ellipticine, *Curr. Med. Chem.*, 2004, 4: 149-172
46. Goodwin, S., Smith, A., F., Horning, E., C.: Alkaloids of *Ochrosia elliptica* Labill, *J. Am. Chem. Soc.*, 1959, 81: 1903-1908
47. Grangen, N., Convers, P., Beauchet, O., Imler, D., Viallon, A., Laurent, B., Michel, D.: Première crise d'épilepsie chez le sujet de plus de 60 ans : données électrocliniques et étiologiques : À propos d'une série de 341 cas = First epileptic seizure in the elderly: electro-clinical and etiological data in 341 patients, *Rev. Neurol.*, 2002, 158: 1088-1095
48. Gupta, R. C, Early, K.; ³²P-Postlabeling of DNA: A Sensitive method for assessing environmentally induced genotoxicity, *Carcinogenesis*, 1988, 9:1687
49. Hagg, M., Berndtsson, M., Mandic, A., Zhou, R., Shoshan, M. C., Linder, S.: Induction of endoplasmic reticulum stress by ellipticine plant alkaloids, *Mol. Cancer Ther.*, 2004, 3: 489-497
50. Hanahan, D., Weinberg, R.: The hallmarks of cancer, *Cell*, 2000, 10: 57-70
51. Harris, C., C.: p53 tumor suppressor gene: from the basic research laboratory to the clinic- an abridged historical perspective, *Carcinogenesis*, 1996, 17: 1187-1198
52. Hebbes, T. R., Clayton, A. L., Thorne, A. W., Crane-Robinson, C.: Core histone hyperacetylation co-maps with generalized DNase I sensitivity in the chicken β -globin chromosomal domain. *EMBO J*, 1994, 13:1823-30

53. Herbst, R. S., Bajorin, D. F., Bleiberg, H., Blum, D., Hao, D., Johnson, B.E., Ozols, R.F., Demetri, G.D., Ganz, P.A., Kris, M.G., Levin, B., Markman, M., Raghavan, D., Reaman, G.H., Sawaya, R., Schuchter, L.M., Sweetenham, J.W., Vahdat, L.T., Vokes, E.E., Winn, R.J., Mayer, R.J. : Clinical cancer advances 2005 : Major research advances in cancer treatment, prevention and screening- a report from the American Society of Clinical Oncology, *J. Clin. Oncol.*, 2006, 24: 190-205
54. Hooven, L. A., Mahadevan, B., Keshava, C., Johns, C., Pereira, C., Desai, D., Amin, S., Weston, A., Baird, W. M.: Effects of suberoylanilide hydroxamic acid and trichostatin A on induction of cytochrome P450 enzymes and benzo[a]pyrene DNA adduct formation in human cells, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2005, 15:1283-1287
55. Hudeček, J.: Hemoproteiny, přednáška na PřF UK, Praha, 2007
56. Chadwick, M., Silveira, D., M., Platz, B., B., Hayes, D.: Comparative physiological disposition of ellipticine in several animal species after intravenous administration, *Drug. Metab. Dispos.*, 1978, 6: 528-541
57. Chakraborty, D., P., Barman, B., K., Bose, P. K.: *Sci Cult*, 1964, 30: 445; Omura, S., Iway, Y., Hirano, A., Nakagawa, A., Awaya, J., Tsuchia, M., Takahashi, Y., Masuma, R.: *J. Antibiot.*, 1977, 30: 275 ; převzato z Kirsch, G., H.: Heterocyclic analogues of carbazole alkaloids, *Curr. Org. Chem.*, 2001, 5: 507-518
58. Chu, Y., Hsu, M., T.: Ellipticine increases the superhelical density of intracellular SV40 DNA by intercalation, *Nucleic Acids Res.*, 1992, 20 : 4033-4038
59. Chung, J-Y., Kim, J. Y., Kim, W.R., Lee, S.G., Kim, Y-J., Park, J-E., Hong, Y-P., Chun, Y-J., Park, Y.Ch., Oh, S., Yoo, K.S., Yoo, Y.H., Kim, J-M.: Abundance of aryl hydrocarbon receptor potentiates benzo[a]pyrene induced apoptosis in Hepal1c7 cells via CYP1A1 activation, 2007, *Toxicology*, 235: 62-72
60. Jordan, C., V. : Tamoxifen (ICI46,74) as a targeted therapy to treat and prevent breast cancer, *Br. J Pharmacol.*, 2006, 147: 269-276
61. 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 (author's transl), *Nouv. Presse Med.*, 1979, 21: 1495-1498
62. Kim, D., H., Kim, M., Kwon, H., J.: Histone deacetylase in carcinogenesis and its inhibitors as anti-cancers agents, *J. Biochem. Mol. Biol.*, 2002, 36: 110-119

63. Kim, M. S., Blake, M., Baek, J. H., Kohlhagen, G., Pommier, Y., Carrier, F.: Inhibition of histone deacetylase increases cytotoxicity to anticancer drugs targeting DNA. *Cancer Res.*; 2003, 63: 7291-300
64. Kirsch, G., H.: Heterocyclic analogues of carbazole alkaloids, *Curr. Org. Chem.*, 2001, 5: 507-518
65. Klener, P.: *Klinická onkologie, Galén a KU*, 2002, Praha
66. Klener, P.: *Protinádorová chemoterapie, Galén*, 1996, Praha
67. Knudson, A. G., Mutation and cancer: Statistical study of retinoblastoma. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1971, 68: 820 – 823
68. Koutecký, J., *Klinická onkologie, Riopress*, 2004, Praha
69. Kučka, J.: *Diplomová práce*, 2002, PŘF UK, Praha
70. Le Pecq, J., B., Gosse, C., Dat Xuong, N., Paoletti, C.: *C. R. Acad. Sci. Hebd. Seances Acad. Sci. D.*, 1975, 281: 1365-1367 ; převzato z Kučka, J.: *Diplomová práce*, 2002, PŘF UK, Praha
71. Lermann, L., S.: Structural considerations on the interaction of DNA and acridines, *J. Mol. Biol.*, 1961, 3:18-24
72. Lestavel-Delatre, S., Martin-Nizard, F., Clavey, V., Testard, P., Favre, G., Doualin, G., Houssaini, H., S., Bard, J., M., Duriez, P., Delbart, C.: Low-density lipoprotein for delivery of an acrylophenone antineoplastic molecule into malignant cells, *Cancer Res.*, 1992, 52: 3629-3635
73. Loiseau, P., Cohadon, S., Jogeix., M., Legroux, M., Dartigues, J. F.; Efficacité du valproate de sodium dans les épilepsies partielles = Sodium valproate efficacy in partial epilepsies. A cross-over study of valproate vs. carbamazepine, *Rev. Neurol.*, 1984, 140: 434-437
74. Manhartová, Z.: *Diplomová práce*, 2005, PŘF UK, Praha
75. Manni, A.: *Endocrinology of breast cancer, Humana Press*, 1999,
76. Marks, P. A., Richon, V. M., Miller, T., Kelly, W., K.: Histone deacetylase inhibitors, *Advances in Cancer Res.*, 2004, 91: 1-32
77. Martinez, R., Chacón-García, L.: The search of DNA – intercalators as antitumoral drugs: What it worked and what did not work, *Curr. Med. Chem.*, 2005, 12: 127-151

78. Mashak, El-S., M., Tocanne, J-F.: Interactions between ellipticine and phospholipids. Effect of ellipticine and 9- methoxyellipticine on the phase behaviour of phosphatidylglycerols, *Eur. J. Biochem.*, 1980, 105: 593-601
79. Mathé, G., Morette, Ch., Hallard, M., Pontiggia, P., Blanquet, D., Hage, F.: Viral and immunologic follow up of 4 to 9 years of AIDS treatments by quadruple combinations of virostatic including integrase inhibitors applied in short sequences differing by drug rotation, *Acta Pharmacol. Sin.*, 2002, 23: 1-15
80. McKenzie, R. J., Azzone, G., F., Conover, T., E.: Bulk phase proton fluxes during the generation of membrane potential in rat liver mitochondria, *J. Biol. Chem.*, 1991, 266: 803-809
81. Monnot, M., Mauffret, O., Simon, V., Lescot, E., Psaume, B., Saucier, J-M., Charra, M., Belehradek, J., Femandjian, S.: DNA-drug recognition and effects on topoisomerase II- mediated cytotoxicity, a three- mode binding model for ellipticine derivatives, *J. Biol. Chem.*, 1991, 266: 1820-1829
82. Moradei, O., Maroun, Ch. R., Paquin, I., Waisburg, A., Histone deacetylase inhibitors: Latest developments, trends and prospects, *Curr. Med. Chem.*, 2005, 5: 529-537
83. Mrázová, B., Diplomová práce, 2006, PFF UK
84. Mukherjee, A., K., Basu, S., Sarkar, N., Ghosh, A., C.: Advances in cancer therapy with plant based natural products, *Curr. Med. Chem.*, 2001, 8: 1467-1486
85. Nair, V, HIV integrase as a target for antiviral chemotherapy, *Rev. Med. Virol.*, 2002, 12: 179-193
86. Narod, S. A.: Familial breast-ovarian cancer locus on chromosome 17q-12q23. *Lancet*, 1991, 338:82-83
87. Nedelcheva, V., Gut, I.; P450 in the rat and man: Methods of investigation, substrate specificities and relevance to cancer, *Xenobiotica*, 1994, 24:1151-1175
88. Neuss, N.: Indole and biogenetically related alkaloids, Academic Press, London, 1980, 306-309
89. Nichols K. E., Heath, J.A., Friedman D., Biegel J.A., ; Ganguly A., Mauch P., Diller L.: P53, BRCA1, and BRCA2 tumor suppressor genes are not commonly mutated in survivors of Hodgkin's disease with second primary neoplasms, *J. Clin. Oncol.*, 2003, 21: 4505- 4509

90. O'Connor, P. M., Jackman, J., Bae, I., Myers, T. G., Fan, S., Mutoh, M., Scudiero, D. A., Monks, A., Sausville, E. A., Weinstein, J. N., Friend, S., Fornance, J., A. J., Kohn, K. W.: Characterization of the p53 - tumor suppressor pathway in cell lines of the National Cancer Institute anticancer drug screen and correlations with the growth inhibitory potency of 123 anticancer agents, *Cancer Res.*, 1997, 57: 4285-4300
91. Ohashi, M., Sugikawa, E., A., Nakanishi, N.: Inhibition of p53 protein phosphorylation by 9 -hydroxyellipticine: a possible anticancer mechanism, *Jpn. J. Cancer Res.*, 1995, 86: 819-827
92. Ohtsuka, Y., Amano, R., Mizukawa, M., Oka, E., Ohtahara, S.: Treatment of intractable childhood epilepsy with high-dose valproate, *Epilepsia*, 1992, 33: 158-164
93. Omura, T., Sato, R.: The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature, *J. Biol. Chem.*, 1964, 239: 2370-2385
94. Oster, J., B., Creasey, W., A.: Enhancement of cellular uptake of ellipticine by insulin preincubation, *Eur. J. Cancer. Clin. Oncol.*, 1981, 17: 1097-1103
95. Panno, J.: *Cancer: The role of genes, lifestyle and environment*, Facts on file science library, 2005, USA
96. Perry, P., Gowan, S., Read, M., Kelland, L., Neidle, S.: Design, synthesis and evaluation of human telomerase inhibitors based upon a tetracyclic structural motif, *Anti- Cancer Drug Design*, 1999, 14: 373-382
97. Pfau, W., Schmeiser, H. H., Wiessler, M.: Aristolochic acid binds covalently to the exocyclic amino group of purine nucleotides in DNA, *Carcinogenesis*, 1990, 11:313
98. Pfau, W., Schmeiser, H. H., Wiessler, M.: N6-Adenyl arylation of DNA by aristolochic acid II and a synthetic model for the putative proximate carcinogen, *Chem. Res. Toxicol.*, 1991, 4:581
99. Poljaková, J.: *Disertační práce*, 2006, PFF UK, Praha
100. Poljaková, J., Dračínský M., Frei, E., Hudeček, J., Stiborová, M.: The effect of pH on peroxidase mediated oxidation of and DNA adduct formativ by ellipticine, *Collect. Czech. Chem. Commun*, 2006, 71: 1169-1185
101. Poljaková, J., Forsterová, K., Šulc, M., Frei, E., Stiborová, M.: Oxidation of an antitumor drug ellipticine by peroxidases, *Biomed. Papers*, 2005, 149 : 449-453

102. Poljaková, J., Frei, E., Gomez, J. E., Aimová, D., Eckschlager, T., Hraběta, J., Stiborová, M.: DNA adduct formation by the anticancer drug ellipticine in human leukemia HL-60 and CCRF-CEM cells, *Cancer Lett.*, 2007, 252: 270-279
103. Poljaková, J., Stiborová, M.: Peroxidase-mediated ellipticine– DNA adduct formation explains the selective efficiency of this anticancer drug against breast cancer and leukemia, *Chem. Listy*, 2004, 98: 298
104. Qianbin, L., Wenfang, X.: Novel anticancer targets and drug discovery in post genomics age, *Curr. Med. Chem.*, 2005, 5: 53-63
105. Raguenez-Viotte, G., Dieber- Rotheneder, M., Dadoun, C., Fillastre, J., P Esterbauer, H.: Evidence for 4- hydroxyalkenals in rat renal cortex peroxidized by N2-methyl-9-hydroxyellipticinium acetate or celiptium, *Biochim. Biophys. Acta*, 1990, 1046: 294-300
106. Raguenez-Viotte, G., Thomas, N., Fillastre, J., P.: Subcellular localization of celiptium-induced peroxidative damage in rat renal cortex, *Arch. Toxicol.*, 1991, 61: 244-251
107. Randerath, K., Randerath, E., Agrawal, H. P., Gupta, R.C, Schurdak, M.E., Reddy, M.V.: Postlabeling methods for carcinogen-DNA adduct analysis, *Environ. Health Pers.*, 1985, 62: 57-65
108. Randerath, K., Reddy, M. V., Gupta.,R. C.: ³²P-postlabeling test for DNA damage, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1981, 78:6126
109. Reddy, M. V., Randerath, K. Gupta, R. C: ³²P-base analysis of DNA, *Anal. Biochem.*, 1981, 117:271-9
110. Reddy, M. V., Randerath,K.: Nuclease P1-mediated enhancement of sensitivity of ³²P-Postlabeling test for structurally diverse DNA adducts , *Carcinogenesis*, 1986, 7:1543
111. Reed, M., J.: The role of aromatase in breast tumors, *Breast Cancer Res. Treat.*, 1994, 30: 7-17
112. Rekha, G. K., Sladek, N.E.,Multienzyme- mediated stable and transient multidrug rezistance and collateral sensitivity induced by xenobiotics, *Cancer Chemother. Pharmacol.*,1997, 40: 215-24
113. Rouesse, J., Huertas, D., Sancho-Garnier, H., Le Chevalier, T., Amile, J-L., Brule, G., Tursz, T., Mondesir, J-M.: 2,N-methyl-9-hydroxyellipticine in treatment of metastatic breast cancers (author's transl), *Bull. Cancer*, 1981, 68: 437-441

114. Samadi-Baboli, M., Favre, G., Bernadou, J., Berg, D., Soula, G.: *Biochem. Pharmacol.*, 1980, 40: 203; převzato z Stiborová, M., Frei, E.: Deriváty elipticinu s cíleným protinádorovým účinkem, *Chem. Listy*, 2001, 95: 549-555
115. Sharples, D., Hajós, D., Riedl, Z., Csányi, D., Molnár, J., Szabó, D.: Ellipticine analogues and related compounds as inhibitors of reverse transcriptase and as inhibitors of the efflux pump, *Arch. Phar. Med. Chem.*, 2001, 334: 269-274
116. Shi, L., M., Fan, Y., Myers, T., G., O'Connor, P., M., Paull, K., D., Friend, S., H., Weinstein, J., N.: Mining the National Cancer Institute anticancer drug discovery databases: genetic function approximation for the QSAR study of anticancer ellipticine analogues, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, 1998, 38:189-199
117. Shi, M., L., Myers, T., G., Fan, Y., O'Connor, P., M., Paull, K., D., Friend, S., H., Weinstein, J., N.: Mining the National Cancer Institute anticancer drug discovery database: Cluster Analysis of Ellipticine Analogs with p53-Inverse and Central Nervous System-Selective Patterns of Activity, *Mol. Pharm.*, 1998, 53: 241-251
118. Schmeiser, H. H., Frei, E., Wiessler, M., Stiborová, M.: Comparison of DNA adduct formation by aristolochic acids in various in vitro activation systems by ³²P-post-labelling: evidence for reductive activation by peroxidases, *Carcinogenesis*, 1997, 18:1055
119. Schneider, B., P., Miller, K., D.: Angiogenesis of breast cancer. *J. Clin. Oncol.* 2005, 23 : 1782-1790
120. Schulz, W. A.: *Molecular Biology of Human Cancers*, Springer, 2005, USA
121. Singh, M., P., Hill, G., C., Peoc'h, D., Rayner, B., Imbach, J., L., Lown, J., W.: High-field NMR and restrained molecular modeling studies on a DNA heteroduplex containing a modified apurinic abasic site in the form of covalently linked 9-aminoellipticine, *Biochemistry*, 1994, 33: 10271-10285
122. Sinn, H., Schrenk, H., H., Friedrich, E., A., Schilling, U., Maier-Borst, W.: Design of compounds having an enhanced tumour uptake, using serum albumin as a carrier, *Int. J. Rad. Appl. Instrum. B.*, 1990, 17: 819-827
123. Stiborová M, Fernando, R. C., Schmeiser, H. H., Frei, E., Pfau, W., Wiessler, M.: Characterization of DNA adducts formed by aristolochic acids in the target organ (forestomach) of rats by ³²P-postlabelling analysis using different chromatographic procedures, *Carcinogenesis*, 1994, 15:1187

124. Stiborová M., Frei, E., Schmeister, H. H: Aristolochové kyseliny a ledvinové onemocnění 'Chinese herbs nephropathy', Chem. Listy, 2000, 94:186
125. Stiborová, M., Arlt, V. M., Henderson, C. J., Wolf, R., Kotrbová, V., Moserová, M., Hudeček, J., Phillips, D., Frei, E.: Role of hepatic cytochromes P450 in bioactivation of the anticancer drug ellipticine: Studies with the hepatic NADPH:cytochrome P450 reductase null mouse, Tox. Appl. Pharm., 2008, 226: 318-327
126. Stiborová, M., Bieler, Ch., A., Wiessler, M., Frei, E.: The anticancer ellipticine on activation by cytochrome P450 forms covalent DNA adducts, Biochem. Pharmacol., 2001, 62: 1675 – 1684
127. Stiborová, M., Božek-Dohalská, L., Aimová, D., Kotrbová, V., Kukačková, K., Janouchová, K., Rupertová, M., Ryšlavá, H., Hudeček, J., frei, E.: Oxidation pattern of the anticancer drug ellipticine by hepatic microsomes- similarity between human and rat systém, Gen. Physiol. Biophys., 2006, 25: 245-261
128. Stiborova, M., Breurer, A., Aimová, D., Stiborová-Rupertová, M., Wiessler, M., Frei, E.: DNA adduct formations by the anticancer drug ellipticine in rats determined by ³²P-postlabelling, Int. J. Cancer, 2003, 107: 885-890
129. Stiborová, M., Dračínská, H., Aimová, D., Hodek, P., Hudeček, J., Ryšlavá, H., Schmeiser, H. H., Frei, E.: The anticancer drug ellipticine is an inducer of rat NAD(P)H: quinone oxidoreductase, Collect. Czech Commun., 2007, 72: 1350-1364
130. Stiborová, M., Frei, E.: Deriváty elipticinu s cíleným protinádorovým účinkem, Chem. Listy, 2001, 95: 549-555
131. Stiborová, M., Hudeček, J., Hodek, P., Frei, E.: Význam cytochromů P450 pro lidské zdraví, Chem. Listy, 1999, 93: 229-237
132. Stiborová, M., Mikšanová, M.: Molekulární mechanismus kancerogeneze, Živa, 1999, 4:146
133. Stiborová, M., Poljaková, J., Ryšlavá, H., Dračínský, M., Eckschlager, Frei, E.: Mammalian peroxidases activate anticancer drug ellipticine to intermediates forming deoxyguanosine adduct in DNA identical to those found *in vivo* and generated from 12- hydroxyellipticine and 13- hydroxyellipticine, Int. J. Cancer, 2007, 120: 243-251

134. Stiborová, M., Rupertová, M., Aimová, D., Ryšlavá, H., Frei, E.; Formation and persistence of DNA adduct of anticancer drug ellipticine in rats, *Toxicology*, 2007, 236: 50-60
135. Stiborová, M., Rupertová, M., Hodek, P., Frei, E., Schmeiser, H. H.: Evaluation of ³²P-postlabelling as a suitable detection technique for biomonitoring of human DNA adduct, *Proc. Indian. Natn. Sci. Acad.*, 2003, 4: 539-556
136. Stiborová, M., Rupertová, M., Schmeiser, H. H., Frei, E.: Molecular mechanisms of antineoplastic action of an anticancer drug ellipticine, *Biomed Papers*, 2006, 150: 13-23
137. Stiborová, M., Sejbál, J., Bořek-Dohalská, L., Aimová, A., Poljaková, J., Forsterová K., Rupertová, M., Wiesner, J., Hudeček, J., Wiessler, M., Frei, E.: The anticancer drug ellipticine forms covalent DNA adducts, mediated by human cytochromes P450, through metabolism to 13- hydroxyellipticine and ellipticine N²-oxide, *Cancer Res.*, 2004, 64 : 8374-8380
138. Stiborová, M., Stiborová- Rupertová, M., Bořek-Dohalská, L., Wiessler, M., Frei, E.: Rat microsomes activating the anticancer drug ellipticine to species covalently binding to deoxyguanosine in DNA are a suitable model mimicking ellipticine bioactivation in humans, *Chem. Res. Toxicol.*, 2003, 107: 885-890
139. Sugikawa, E., Hosoi, T., Yazaki, N., Gamanuma N., Nakanishi, N., Ohashi, M.: Mutant p53 mediated induction of cell cycle arrest and apoptosis at G1 phase by 9-hydroxyellipticine, *Anticancer. Res.*, 1999, 19: 3099-3108
140. Sureau, F., Moreau, F., Millot, J-M., Manfait, M., Allard, B., Aubard, J., Schwaller, M-A.: Microspectrofluorometry of the protonation state of ellipticine, an antitumor alkaloid, in single cells; *Biophys. J.*, 1993, 65: 1767-1774
141. Tanaka, E.: Clinically significant pharmacokinetics drug interactions between antiepileptic drugs; *J Clin. Pharm. Ther.*, 1999, 24: 87-92
142. Svobodová, J., Diplomová práce, 2006, PŘF UK
143. Thomas, N., Moulin, B., Raguenez-Viotte, G., Fillastre, J., P.: Nephrotoxicity of an ellipticine derivative (N²-methyl-9-hydroxyellipticinium acetate) in rat: a defect of urinary concentrating ability, *Ren. Fail*, 1991, 13: 243-251
144. Thomas, N., Raguenez-Viotte, G., Dieber- Rotheneder, M., Esterbauer, H., Fillastre, J., P.: Time course study of lipid peroxidation induced by N²-methyl-9-

- hydroxyellipticinium acetate or celiptium in rat renal cortex, *Pharmacol. Toxicol.*, 1991, 69: 112-116
145. Tuteja, N., Plant DNA helicases: the long unwinding road, *J. Exp. Bot.*, 2003, 54: 2201-2214
146. Vícha, A, Eckschlager, V.: Molekulární biologie neuroblastomu, *Klinická onkologie*, 2005, 18: 159-165.
147. Villar-Garea, A., Esteller, M.; Histone deacetylase inhibitors: Understanding a new wave of anticancer agents, *Int. J. Cancer*, 2004, 112: 171-178
148. Voet, J., Voet, J. G.: *Biochemistry*, Wiley international edition, 2004, USA
149. Watt, P., M., Hickson, D.: Structure and functions of type II DNA topoisomerases, *Biochem. J.*, 1994, 303: 681-695
150. Weinstein, J. N., Myers, T. G., O'Connor, P. M., Friend, S. H., Fornace, A. J., Jr., Kohn, K. W., Fojo, T., Bates, S. E.; Rubinstein, L. V., Anderson, N. L., Buolamwini, J. K., van Osdol, W. W., Monks, A. P., Scudiero, D. A., Sausville, E. A., Zaharevitz, D. W., Bunow, B., Viswanadhan, V. N., Johnson, G. S., Wittes, R. E.; Paull, K. D.: An information - intensive approach to the molecular pharmacology of Cancer, *Science*, 1997, 275: 343-349
151. Wen, X., Wang, J. X., Kivisto, K. T., Neuvonen, P. J., Bacjman, J. T.: In vitro evaluation of valproic acid as an inhibitor of human cytochrome P450 isoforms: preferential inhibition of cytochrome P450 2C9 (CYP2C9), *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 2001, 52: 547-553]
152. Wiechelman, K. L., Braun, L. D., Fritzpatrick, J. D.; *Analyt. Biochem.*, 1988: 175:231
153. Williams, J., A., Phillips, D., H.: Mammary expression of xenobiotic metabolizing enzymes and their potential role in breast cancer, *Cancer Res.*, 2000, 60: 4667-4677
154. Yan, Z., Caldwell, G., W.: Metabolism profiling, and cytochrome P450 inhibition & induction in drug discovery, *Curr. Topic Med. Chem.*, 2001, 1: 403-425
155. Zurer, I., Hofseth, L., J., Cohen, Y., Xu-Welliver, M., hussain, S., P., Harris, C. C., Rotter, V.: The role of p53 in base excision repair following genotoxic stress, *Carcinogenesis*, 2004, 25: 11-19

156. <http://www.newbotany.com/TropickérastlinyTropicalplants/O/Ochrosiaelliptica/tbta/419/Default.aspx>, staženo listopad 2008
157. Food and Drugs Administration, Cancer oncology news, 2006, Medical news web site, www.medicalnewstoday.com, staženo listopad 2008

Souhlasím se zapůjčením své diplomové práce pro studijní účely a prosím, aby byla vedena evidence vypůjčovatelů a ti byli upozorněni na to, že musí pramen převzatých údajů řádně citovat.

Jméno a příjmení	Adresa	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka
-----------------------------	---------------	-----------------	----------------------------	-----------------
