

Politechnika Gdańska
Wydział Chemiczny
Katedra Technologii Leków i Biochemii

ROZPRAWA DOKTORSKA

**SPECYFICZNY METABOLIZM I WPŁYW NA AKTYWNOŚĆ RECEPTORA
JĄDROWEGO PXR, JAKO NOWY ELEMENT MECHANIZMU DZIAŁANIA
PRZECIWNOWOTWOROWYCH POCHODNYCH AKRYDYN**

mgr inż. Magdalena Niemira

Promotor: **dr hab. inż. Zofia Mazerska, prof. nadzw. PG**

Gdańsk 2012

Moim Kochanym Rodzicom

Pragnę serdecznie podziękować:

Mojemu Promotorowi, Pani Doktor Zofii Mazerskiej, za opiekę naukową i merytoryczną nad doktoratem, za przekazaną wiedzę i otwartość umysłu na nowe pomysły naukowe. Dziękuję też za wsparcie i rozmowy, które pozwoliły pokonywać problemy spoza obszaru pracy naukowej.

Ani Skwarskiej, za wiele dyskusji w trakcie realizacji doświadczeń, wszystkie „nadgodziny” spędzone w laboratorium, przekazany zapał do pracy naukowej i za nieustanne wsparcie duchowe.

Pani Doktor Ewie Augustin, Basi Fedejko-Kap, Monice Pawłowskiej, Basi Borowej-Mazgaj oraz pozostałym osobom z zespołu, również Dorocie Nowak-Ziatyk, Agnieszce Potędze i Asi Polewskiej – za wspólnie spędzony czas w ciągu wszystkich lat realizacji mojej pracy doktorskiej, serdeczność, miłą atmosferę w pracy, szczególnie podczas naszych przerw na „herbatę i ciastka”.

Dziękuję za niezłomną wiarę we mnie moim Kochanym Rodzicom, za bezgraniczną miłość, za liczne rozmowy, które dodawały mi nowych sił do pracy. To dzięki waszemu wysiłkowi osiągnęłam tak wiele.

Dziękuję mojej najbliższej rodzinie za podtrzymywanie wiary w osiągnięcie zamierzonego celu, szczególnie siostrze Ani, Tomkowi i Dominice, za wszystkie chwile wspólnego śmiechu, niezliczone telefony i zastrzyki energii, które pomogły mi podczas tego wymagającego okresu czasu.

Szczególne podziękowania kieruję do mojego męża – Konrada, który podczas wszystkich dni mojej pracy udzielał mi wielkiego i bezcennego wsparcia i wielokrotnie przejmował na siebie ciężar prowadzenia domu i opieki nad córeczką. Dziękuję za wszystko i jeszcze więcej...

Dziękuję mojej Córeczce Zuzannie za to, że jest... Po prostu...

WYKAZ WAŻNIEJSZYCH SKRÓTÓW I OZNACZEŃ

A549	<i>human non-small cell lung cell line</i> , linia komórkowa ludzkiego niedrobnokomórkowego raka płuc
ADR	<i>adverse drug reactions</i> , niekorzystne interakcje lek-lek
Afl B1	aflatoksyna B1
C-1305	5-dimetyloaminoetyloamino-8-hydroksytriazoloakrydon
C-1748	9-(2'-hydroksyetyloamino)-4-metylo-1-nitroakrydyna
C-857	9-(2'-hydroksyetyloamino)-1-nitroakrydyna
CAR	konstytutywny receptor androstanu
CPR	<i>cytochrome P450 reductase</i> , NADPH-reduktaza cytochromu P450 (NADPH-zależna reduktaza cytochromu P450)
CYP	izoenzym cytochromu P450
DME	<i>drug metabolizing enzymes</i> , enzymy metabolizujące leki
EC₅₀	<i>half maximal effective concentration</i> , stężenie związku hamujące proliferację komórek w 50%
ESI-MS	electrospray ionization-mass spektrometry, spektrometria masowa z jonizacją elektrorozpraszającą
FMO	flavin monooxygenase, monooksygenaza flawinowa
GFP	<i>green fluorescent protein</i> , białko zielonej fluorescencji
HCT116	<i>human colorectal carcinoma cell line</i> , linia komórkowa ludzkiego nowotworu jelita grubego
Hep3A4	linia komórkowa ludzkiego nowotworu wątroby z nadekspresją genu izoenzymu cytochromu P450
HepG2	<i>human hepatocellular carcinoma cell line</i> , linia komórkowa ludzkiego nowotworu wątroby
HT29	<i>human colorectal adenocarcinoma cell line</i> , linia komórkowa ludzkiego gruczorakolaka jelita grubego
KT	ketokonazol
M	oznaczenie produktu C-1748
M*	oznaczenie produktu C-857
MDR1	<i>multidrug resistane transporter</i> , białko oporności wielolekowej
MS	<i>mass spectrum</i> , widmo masowe
NADPH	<i>nicotinamide adeninedinucleotide phosphate</i> , fosforan di nukleotydu nikotynoamidoadeninowego
P	oznaczenie produktu C-1305
P450	cytochrom P450
P-gp	glikoproteina p
PXR	receptor pregnanu X
Rif	rifampicyna

RP-HPLC-DAD	<i>reversed-phase-high performance liquid chromatography-photodiode array detector</i> , wysokociśnieniowa chromatografia w układzie faz odwróconych z udziałem detektora wielodiodowego
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> , elektroforeza w żelu poliakrylamidowym w obecności dodecylosiarczanu sodu
SMRT	<i>silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptor</i> , mediator receptora kwasu retinowego i receptora hormone tyroidowego
SRC-1	białko koaktywatorowe
UDPGA	uridine diphosphate glucuronic acid, kwas urydyno-5'-difosfo-D-glukuronowy
UGT	<i>UDP-glucuronosyltransferase</i> , UDG-glukuronylotransferaza, transferaza glukuronianowa

SPIS TREŚCI

I. WPROWADZENIE.....	1
I.1. C-1305 i C-1748 – pochodne akrydyny jako związki przeciwnowotworowe.....	3
I.2. Aktywność biologiczna pochodnych triazoloakrydonu i 9-amino-1-nitroakrydyny.....	5
I.3. Przemiany metaboliczne pochodnych akrydyny.....	6
II. CZĘŚĆ TEORETYCZNA.....	8
II.1. Metabolizm leków w komórce nowotworowej – charakter i znaczenie w terapii.....	8
II.1.1. Cytochromy P450 w rozwoju terapii przeciwnowotworowych.....	11
II.1.1.1. Charakterystyka poziomu izoenzymów cytochromu P450 w wybranych typach nowotworów.....	12
II.1.1.1.1. <i>Nowotwory piersi</i>	12
II.1.1.1.2. <i>Nowotwory przewodu pokarmowego</i>	14
II.1.1.1.3. <i>Nowotwory płuc</i>	15
II.1.1.1.4. <i>Nowotwory prostaty</i>	16
II.1.1.2. Znaczenie polimorfizmów genowych wybranych cytochromów P450 w chemioterapii.....	17
II.1.1.2.1. Leki przeciwnowotworowe metabolizowane przez izoenzymy P450.....	19
II.1.1.3. Cytochromy P450 w eksperymentalnych terapiach przeciwnowotworowych....	25
II.2. Regulacja ekspresji izoenzymów cytochromu P450.....	29
II.2.1. Charakterystyka wybranych receptorów jądrowych.....	30
II.2.1.1. Receptor pregnanu X (PXR).....	33
II.2.1.2. Konstytutywny receptor androstanu (CAR).....	36
II.2.2. Modulacja aktywności receptorów jądrowych przez leki przeciwnowotworowe.....	38
II.2.2.1. Indukcja receptorów PXR i CAR.....	38
II.2.2.2. Inhibicja receptorów PXR i CAR.....	41
III. ZAŁOŻENIA I CEL PRACY.....	44
IV. OMÓWIENIE WYNIKÓW.....	50
IV.1. Przemiany metaboliczne pochodnych 9-amino-1-nitroakrydyny i triazoloakrydonu w komórkach nowotworowych pochodzenia ludzkiego.....	50

IV.1.1. Ogólne wiadomości o poziomie izoenzymów cytochromu P450 w wybranych do badań liniach komórkowych.....	50
IV.1.2. Opracowanie warunków badania przemian metabolicznych w komórkach.....	52
IV.1.3. Charakterystyka przemian metabolicznych C-1748, C-857 i C-1305 w komórkach nowotworu wątroby HepG2.....	52
IV.1.3.1. Wyniki badań metabolizmu C-1748 – identyfikacja struktur chemicznych produktów.....	52
IV.1.3.2. Wyniki badań metabolizmu C-857 – identyfikacja struktur chemicznych produktów.....	59
IV.1.3.3. Porównanie przemian metabolicznych C-1748 i C-857 w HepG2.....	65
IV.1.3.4. Wyniki badań metabolizmu C-1305 – identyfikacja struktur chemicznych produktów	67
IV.1.4. Charakterystyka przemian metabolicznych C-1748, C-857 i C-1305 w komórkach nowotworu jelita grubego HT29 i HCT116.	70
IV.1.4.1. Wyniki badań metabolizmu C-1748 i C-857	70
IV.1.4.1.1. <i>Identyfikacja struktury chemicznej produktów M_{HT29} i M^*_{HT29}</i>	71
IV.1.4.1.2. <i>Badanie przemian metabolicznych C-1748 i C-857 wobec enzymów frakcji mikrosomalnej wątroby szczura oraz UDPGA jako kofaktora UGT</i>	72
IV.1.4.2. Wyniki badań metabolizmu C-1305 oraz identyfikacja struktury chemicznej produktu	75
IV.1.5. Charakterystyka przemian metabolicznych C-1748, C-857 i C-1305 w komórkach nowotworu płuc, A549	77
IV.1.5.1. Wyniki badań metabolizmu C-1748 i C-857	77
IV.1.5.2. Wyniki badań metabolizmu C-1305.....	78
IV.1.6. Wpływ poziomu ekspresji <i>CYP3A4</i> na metabolizm C-1748, C-857 i C-1305 – charakterystyka przemian metabolicznych w komórkach Hep3A4	79
IV.1.6.1. Wyniki badań metabolizmu C-1748 i C-857	80
IV.1.6.2. Wyniki badań metabolizmu C-1305.....	82
IV.1.6.3. Zależność efektu cytotoksycznego pochodnych C-1748, C-857 i C-1305 od różnego poziomu ekspresji <i>CYP3A4</i> w komórkach Hep3A4 i HepC34.....	83
IV.1.7. Wpływ hypoksji na metabolizm C-1748, C-857 i C-1305 w komórkach HepG2.....	86
IV.1.7.1. Wyniki badań metabolizmu C-1748 i C-857.....	87
IV.1.7.2. Wyniki badań metabolizmu C-1305.....	89

IV.1.7.3. Efekt cytotoksyczny pochodnych C-1748, C-857 i C-1305 wobec komórek HepG2 w warunkach normalnych i ograniczonego dostępu tlenu.....	89
IV.1.8. Wpływ poziomu reduktazy NADPH:cytochrom P450 (CPR) na metabolizm C-1748, C-857 i C-1305 – charakterystyka przemian metabolicznych w komórkach HepG2 transfekowanych plazmidem <i>cpr</i>	92
IV.1.9. Podsumowanie wyników badań opisanych w punkcie IV.1	95
IV.2. Modulacja poziomu ekspresji i aktywności katalitycznej wybranych enzymów metabolizujących przez pochodne akrydyny w komórkach nowotworowych	96
IV.2.1. Opracowanie warunków eksperymentalnych	96
IV.2.2. Badanie wpływu związków C-1748, C-857 i C-1305 na aktywność katalityczną izoenzymów CYP3A4 i CYP2C9 w komórkach HepG2	97
IV.2.2.1. Wyniki badań wpływu pochodnej C-1748 i C-857 na aktywność katalityczną izoenzymów CYP3A4 i CYP2C9	98
IV.2.1.3. Wyniki badań wpływu pochodnej C-1305 na aktywność katalityczną izoenzymów CYP3A4 i CYP2C9	100
IV.2.3. Badanie wpływu związków C-1748, C-857 i C-1305 na poziom ekspresji genów izoenzymów CYP3A4 i CYP2C9 w komórkach HepG2.....	101
IV.2.3.1. Wyniki badań wpływu pochodnej C-1748 i C-857 na poziom ekspresji <i>CYP3A4 i CYP2C9</i>	102
IV.2.3.2. Wyniki badań wpływu pochodnej C-1305 na poziom ekspresji <i>CYP3A4 i CYP2C9</i>	106
IV.2.3.3. Wyniki modulacji poziomu ekspresji CYP3A4 i CYP2C9 w komórkach HepG2 w warunkach hypoksji.....	107
IV.2.4. Receptor jądrowy PXR – jego rola w indukcji ekspresji CYP3A4 i CYP2C9 z udziałem związków C-1748, C-857 i C-1305	110
IV.2.4.1. Określenie udziału receptora PXR w indukcji ekspresji <i>CYP3A4</i> z zastosowaniem linii <i>nhrtox-hepg2</i>	110
IV.2.4.2. Wpływ pochodnych C-1748, C-857 i C-1305 na poziom ekspresji <i>CYP3A4 i CYP2C9</i> po wyciszeniu genów <i>PXR</i> przy pomocy siRNA	112
IV.2.4.3. Badanie wpływu związków C-1748, C-857 i C-1305 na poziom ekspresji innych genów regulowanej przez receptor PXR.....	113
IV.2.4.3.1. <i>Akumulacja doksorubicyny w komórkach HepG2 jako efekt działania pochodnej C-1305</i>	115

IV.2.4.4. Badanie wpływu związków C-1748, C-857 i C-1305 na poziom ekspresji CYP3A4 w skojarzeniu z rifampicyną i ketokonazolem	116
IV.2.4.5. Podsumowanie wyników badań opisanych w punkcie IV.2.....	118
V. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA.....	119
V.1. Materiały	119
V.1.1. Badane związki przeciwnowotworowe	119
V.1.2. Związki chemiczne i zestawy	119
V.1.3. Składniki roztworów.....	119
V.1.4. Odczynniki chemiczne do przygotowywania faz ruchomych do analizy HPLC.....	120
V.1.5. Enzymy.....	120
V.1.6. Przeciwciała.....	120
V.1.7. Oligonukleotydy (startery) do reakcji Real-time PCR.....	121
V.1.8. Linie komórkowe oraz materiały stosowane do prowadzenia hodowli komórkowej...	121
V.2. Aparatura i sprzęt laboratoryjny.....	122
V.3. Warunki analizy chromatograficznej.....	123
V.4. Metody i techniki doświadczalne.....	124
V.4.1. Przemiany metaboliczne C-1748, C-857 i C-1305 wobec różnych form enzymów metabolizujących.....	124
V.4.1.1. Stężenia wyjściowe stosowanych roztworów związków i enzymów.....	124
V.4.1.2. Roztwory buforowe.....	124
V.4.1.3. Skład mieszanin reakcyjnych.....	125
V.4.1.4. Przebieg doświadczeń.....	125
V.4.1.4.1. <i>Metabolizm wobec rekombinantowych ludzkich izoenzymów CYP.....</i>	<i>125</i>
V.4.1.4.2. <i>Metabolizm wobec enzymów UGT zawartych we frakcji mikrosomalnej komórek wątroby.....</i>	<i>125</i>
V.4.2. Pochodne akrydyny w ludzkich komórkach nowotworowych.....	126
V.4.2.1. Hodowla komórek nowotworowych.....	126
V.4.2.2. Izolacja metabolitów z komórek nowotworowych traktowanych C-1748, C-857 i C-1305.....	126
V.4.2.3. Oznaczanie aktywności cytotoksycznej C-1748, C-857 i C-1305 wobec komórek nowotworowych.....	127
V.4.2.3.1. <i>Oznaczenie aktywności doksorubicyny w komórkach HepG2</i>	<i>128</i>

V.4.2.4. Badania wpływu pochodnych C-1748, C-857 i C-1305 na aktywność katalityczną izoenzymów CYP3A4 i CYP2C9.....	128
V.4.2.4.1. <i>Metoda luminescencyjna</i>	128
V.4.2.4.2. <i>Metoda chromatograficzna</i>	129
V.4.2.5. Badanie poziomu ekspresji genów metodą Real-time PCR.....	130
V.4.2.5.1. <i>Izolacja RNA</i>	130
V.4.2.5.1. <i>Synteza cDNA</i>	130
V.4.2.5.3. <i>Real-time PCR – określenie względnego poziomu ekspresji badanych genów</i>	131
V.4.2.6. Wyciszenie genu <i>PXR</i> przy użyciu siRNA.....	132
V.4.2.7. Transfekcja komórek HepG2 plazmidem <i>cpr</i>	133
V.4.2.8. Metoda luminescencyjna z zastosowaniem linii reporterowej <i>nhrtox-hepg2</i> ...	133
V.4.2.8.1. <i>Roztwory buforowe</i>	133
V.4.2.8.2. <i>Przebieg doświadczenia</i>	133
V.4.2.9. Immunodetekcja białek metodą Western blotting.....	134
V.4.2.9.1. <i>Odczynniki i roztwory buforowe</i>	134
V.4.2.9.2. <i>Izolacja frakcji mikrosomalnej</i>	135
V.4.2.9.3. <i>Elektroforeza SDS-PAGE</i>	135
V.4.2.9.4. <i>Immunobarwienie (immunoblotting)</i>	136
V.5. Analiza statystyczna wyników	136
VI. Dyskusja wyników i wnioski.....	138
VII. Streszczenie.....	150
VIII. Literatura	155

I. WPROWADZENIE

Wykrycie raka nie jest wyrokiem śmierci. Najlepsze rokowania dotyczą wczesnych stadiów choroby. Ale współczesna medycyna coraz częściej radzi sobie z zaawansowanym procesem nowotworowym. Obecnie w Polsce rocznie choroba nowotworowa rozpoznana zostaje u około 140 tysięcy ludzi i aż 90 tysięcy z nich umiera. Podobne trendy obserwuje się na całym świecie¹. Dane te bardzo wyraźnie obrazują skalę problemu oraz wskazują na konieczność opracowania skutecznego, nowoczesnego leczenia.

Poszukiwanie związków, które mogłyby skutecznie i selektywnie eliminować komórki nowotworowe w organizmie pacjenta, nie niszcząc zdrowych tkanek, jest celem wielu badań eksperymentalnych. Jednakże, pomimo znacznego postępu, jaki dokonał się podczas ostatnich kilku dekad w zakresie podstaw molekularnych procesu kancerogenezy, nowych metod diagnostycznych oraz profilaktyki, obecnie stosowane leczenie schorzeń nowotworowych jest nadal mało specyficzne i efektywne. Ważne miejsce w leczeniu nowotworów zajmują leki cytostatyczne i antyproliferacyjne, czyli tak zwane chemoterapeutyki przeciwnowotworowe. Niestety, mimo uzasadnionej pozycji tych leków w schematach terapeutycznych, obecne możliwości ich zastosowania powoli wyczerpują się. Jest to związane z narastającą opornością komórek nowotworowych na konwencjonalne, szeroko stosowane leki cytotoksyczne, które tracąc na swej skuteczności muszą być wycofywane z terapii. Ponadto wciąż dużą wadą są liczne działania niepożądane wynikające z małej selektywności „klasycznych” leków cytostatycznych. Dużym problemem jest również konieczność stosowania wielu cytostatyków w długotrwałych, sekwencyjnych schematach wielolekowych [Dobrek i wsp., 2008].

Wielkim osiągnięciem współczesnej onkologii są bez wątpienia terapie celowane (ang. *directed therapy*), które wybiórczo atakują i blokują mechanizmy krytyczne dla proliferacji komórek raka umożliwiające rozwój choroby nowotworowej, tworzenie przerzutów i niszczenie organizmu. Należy tutaj wyróżnić takie grupy związków jak: inhibitory cytokin, stymulujących proliferację komórek, blokery receptorów cytokin, inhibitory wewnątrzkomórkowych kinaz białkowych przekazujących sygnał od receptora błonowego do jądra komórkowego, inhibitory czynników transkrypcyjnych, inhibitory białek cyklu komórkowego, inhibitory cząstek adhezyjnych istotnych w procesach implantacji guza pierwotnego i przerzutach nowotworowych oraz inhibitory proteosomów komórek nowotworowych i procesu trawienia wewnątrzkomórkowego białek [Jędrzejczak, 2003].

Jednym z pierwszych sukcesów terapii celowanej jest STI571 (**s**ignal **t**ransduction inhibitor **571**), znany jako Gleevec®, bądź imatinib. Swoiście blokuje on aktywność wszystkich postaci kinazy tyrozynowej Abl w białku fuzyjnym Bcr – Abl oraz aktywność

¹ Dane epidemiologiczne Polskiej Unii Onkologii – Instytutu w Warszawie, oparte na raportach WHO.

dwóch receptorowych kinaz tyrozynowych c – Kit oraz PDGFR. Badano możliwość zastosowania STI571 w leczeniu pacjentów z nowotworami, które charakteryzuje zmieniona aktywność kinaz wrażliwych na działanie tego związku. Należą do nich białaczki, w których występuje podwyższona aktywność kinazy Abl, a więc przewlekła białaczka szpikowa (CML), ostra białaczka limfoblastyczna (ALL), ostra białaczka szpikowa (AML) oraz nowotwory, w których obserwuje się zmienioną aktywność receptorowej kinazy tyrozynowej c-Kit, np. nowotwór przewodu pokarmowego, niedrobnokomórkowy rak płuc, guzy piersi, szyjki macicy i jajników, czerniak [Deininger i wsp., 2005].

Obecnie, coraz więcej wyników badań wskazuje, że istotne skutki terapeutyczne można uzyskać, nie tylko niszcząc bezpośrednio komórki nowotworowe, ale także wpływając na otoczenie nowotworu tak zwaną macierz zewnątrzkomórkową lub zmniejszając skutki metaboliczne obecności nowotworu w organizmie. Są to możliwości terapeutyczne, które najkrócej określa się jako „*Not only tumor is the target*”. Można wyróżnić tutaj strategie badawcze oparte na oddziaływaniu na:

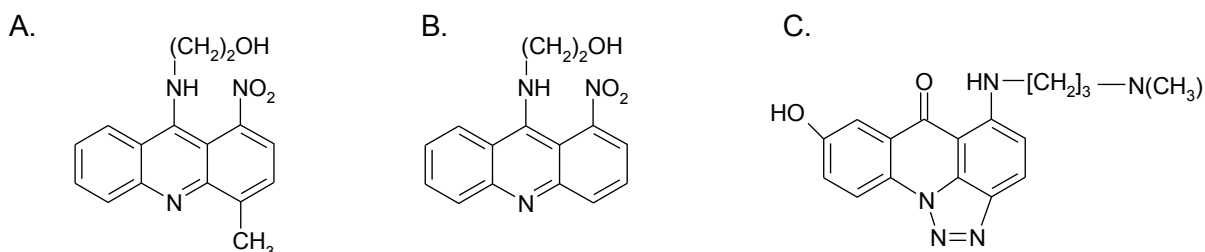
- unaczynienie guza, czyli proces angiogenezy
- podścielisko guza
- substraty niezbędne nowotworowi do wzrostu

Neoangiogeneza jest skomplikowanym, wielostopniowym procesem tworzenia nowych naczyń w obrębie zmiany nowotworowej. Grupą nowych leków, z którymi obecnie wiąże się bardzo duże nadzieje to inhibitory angiogenezy, do których można zaliczyć blokery licznych czynników angiopoetycznych i ich receptorów, takie jak: inhibitor zasadowego czynnika wzrostu fibroblastów (β FGF) – talidomid, przeciwciało przeciwko waskularnemu czynnikowi wzrostowemu VEGF lub inhibitory receptora dla VEGF. Badania nad patofizjologią procesu nowotworzenia naczyń nowotworu i jego supresji wskazują również na kolejny punkt uchwytu jakim jest blokowanie integryn – białek przylegania międzykomórkowego i białek adhezyjnych śródbłonna włóściczek oraz hamowanie proliferacji i migracji komórek śródbłonna [Zhong i Bowen, 2006].

Podsumowując, doszło do wielkiego progresu w poszukiwaniach nowych substancji przeciwnowotworowych. Klasyczna chemoterapia, oparta na nieswoistych cytostatykach, wykazujących agresywne działanie i liczne poważne działania niepożądane, jest stopniowo zastępowana metodami chemoterapii celowanej o znacznie mniejszej toksyczności. Nowe chemoterapeutyki przeciwnowotworowe działają precyzyjnie w obrębie mechanizmów, których zaburzenia leżą u podłoża transformacji nowotworowej. Pojawia się coraz więcej koncepcji terapeutycznych, które podważają i kwestionują panujące od lat utarte standardy leczenia. Dzięki postępowi jaki obecnie się dokonuje, leczenie farmakologiczne chorób nowotworowych zyskuje na coraz większym znaczeniu, stawiając w perspektywie bliskiej przyszłości chemoterapeutyki przeciwnowotworowe w roli głównej w leczeniu tych schorzeń.

I.1. C-1305 i C-1748 – pochodne akrydyny jako potencjalne związki p/nowotworowe.

W Katedrze Technologii Leków i Biochemii Politechniki Gdańskiej od wielu lat prowadzone są prace nad syntezą i badaniem mechanizmów działania związków przeciwnowotworowych z grupy pochodnych akrydyny. Z uwagi na centralną rolę DNA w kontroli struktury i funkcji komórki, szczególnie cenną grupę leków stanowią związki zakłócające jego prawidłowe funkcjonowanie. Związki te, mogą oddziaływać z DNA na drodze interkalacji, niekowalencyjnego wiązania się w bruzdach oraz tworzenia wiązań kowalencyjnych mono- lub bifunkcyjnych [Pawlak, 1979]. Systematyczne poszukiwania doprowadziły do wyłonienia m.in. dwóch interesujących grup związków, pochodnych posiadających pierścień triazolu w podstawowej strukturze trójcyklicznej akrydonu (rys.1A) oraz pochodnych posiadających grupę nitrową w pierścieniu benzenowym akrydyny (rys.1B,C).



Rys. 1. Wzór strukturalny związków: A – C-1748, B – C-857, C – C-1305.

Czołowym przedstawicielem pochodnych 1-nitroakrydyny zsyntetyzowanych w naszym zespole, który znalazł kliniczne zastosowanie w terapii nowotworów, był pierwszy oryginalny lek przeciwnowotworowy – ledakrin (Nitracrine®) [Ledóchowski, 1976, Radzikowski, 1976]. Związek ten wykazywał silne działanie przeciwnowotworowe wobec nowotworów litych [Bratkowska-Seniow i wsp., 1976], został jednak wycofany z lecznictwa ze względu na uciążliwe, choć nieostre efekty uboczne. Jednakże unikalne właściwości biologiczne i chemiczne pochodnych 1-nitroakrydyny, stały się powodem poszukiwań nowych analogów ledakrinu, które zachowałyby cenne właściwości przeciwnowotworowe, natomiast ich toksyczność ogólna uległaby obniżeniu. Obecnie w projektowaniu chemoterapeutyków funkcjonuje trend modyfikacji struktur leków stosowanych dawniej, lecz wycofanych z lecznictwa, co ma na celu wyeliminowanie powodowanych przez nie efektów ubocznych, polepszeniem ich właściwości farmakologicznych i farmakokinetycznych, z jednoczesnym zachowaniem ich aktywności. Zsyntetyzowano więc nową generację pochodnych 9-amino-1-nitroakrydyny o zmienionej strukturze łańcucha bocznego, bez

sprotonowanej grupy aminowej, a przykładem takiego związku jest pochodna C-857. Co więcej, kolejna pochodna, związek C-1748, zawierała w swej strukturze pierścienia akrydyny grupę metylową. Taka modyfikacja spowodowała, że wykazał on w porównaniu z pochodną niepodstawioną w pozycji 4, 10-krotnie obniżoną toksyczność wykazaną na zwierzętach, co wykazały przeprowadzone badania przedkliniczne [Narayanan i wsp., 2005, Ashok i wsp., 2006, Ashok i wsp., 2007].

Kolejną grupę zsyntetyzowanych pochodnych akrydyny stanowiły triazoloakrydony [Chołody i wsp., 1990]. Związki te, podobnie jak imidazoakrydony [Chołody* i wsp., 1990], zostały otrzymane w oparciu o wyniki badań nad mechanizmem działania leku przeciwnowotworowego z grupy antracenodionów – mitoksantronu. Wykazano bowiem, że w komórkach nowotworowych, ugrupowanie diaminoalkilowe obecne w strukturze mitoksantronu jest kluczowe dla tworzenia międzylańcuchowych wiązań sieciujących DNA [Konopa, 1990, Składanowski, 1994]. Kolejne modyfikacje struktury 1-diaminoalkiloakrydonu dotyczyły rozszerzenia heterocyklicznego układu akrydonu poprzez wprowadzenie dodatkowego pięciocłonowego pierścienia zawierającego w swej strukturze atom azotu. Pierścień ten zwiększa gęstość π elektronową w pierścieniu triazoloakrydonu, co poprawia zdolności interkalujące związku [Chołody i wsp., 1990]. W przypadku pochodnej C-1305, posiadającej najsilniejszą spośród triazoloakrydonów aktywność przeciwnowotworową istotna jest optymalna długość łańcucha aminoalkilowego, jak również obecność grupy hydroksylowej w pierścieniu w pozycji 8. Wykazano, że wymiana tej grupy na grupę metylową, nitrową bądź inną powoduje całkowitą utratę aktywności biologicznej związku. Te elementy struktury C-1305 umożliwiają odpowiednie ułożenie płaskiego pierścienia chromoforu interkalującego do DNA, co indukuje zmiany w drugorzędowej strukturze DNA. Pochodna C-1305 wykazuje szczególnie wysokie powinowactwo do sekwencji GGG, powodując zmiany geometryczne dużego rowka DNA. Cecha ta wyróżnia ten związek spośród innych interkalatorów DNA. Opierając się na badaniach modelowania molekularnego stwierdzono, że C-1305 interkaluje pomiędzy pierwszą lub ostatnią resztą guaniny tripletu prowadząc do lokalnego rozplecenia DNA i poszerzenia małego i dużego rowka DNA. Wywołane zaburzenia strukturalne związane są ze zmianami konformacji wiązania fosforanowego i pozycji reszt guaninowych w triplecie. Częsteczką C-1305 tworzącą kompleks z DNA silnie wysuwa atom azotu N-7 środkowej guaniny tripletu w stronę rozpuszczalnika [Lemke i wsp., 2005]. Do regionów bogatych w triplety guanin zalicza się m.in. sekwencje telomerowe, z powtarzającymi się sekwencjami TTAAGGG. Postuluje się, że kompleksy TF1/2 – telomerowe DNA mogą być celem dla terapii pochodną C-1305, a związane jest to z efektem przyspieszonego skracania telomerów, co ogranicza liczbę podziałów niektórych komórek nowotworowych. W konsekwencji, efekt ten indukuje przyspieszone starzenie komórek, bądź śmierć komórek na drodze apoptozy. Atrakcyjnym

obiektem w szerszych badaniach nad mechanizmem oddziaływań C-1305 z telomerowym DNA wydają się być również kompleksy chroniące końce chromosomów (ang. shelterin complex) [Bidzińska i wsp., 2012].

I.2. Aktywność biologiczna pochodnych triazoloakrydonu i 9-amino-1-nitroakrydyny.

Szeroko zakrojone badania przedkliniczne potwierdziły znaczącą aktywność cytotoksyczną *in vitro* związku C-1748 wobec wielu linii komórek nowotworowych oraz wysoką aktywność przeciwnowotworową w stosunku do kilku ksenoprzeszczepów u nagich myszy ludzkich raków prostaty: LnCap, JCA, PC-3 i TSU, ludzkiego raka jelita grubego HCT8, raka płuc, jajnika, nerki oraz czerniaka [Chen i wsp., 2002]. Bardzo ważną i charakterystyczną cechą związku C-1748 jest jego unikalny mechanizm działania. W odróżnieniu od innych akrydyn, struktura trójpierścieniowego układu 1-nitroakrydyny nie jest płaska, przez co trudniej interkaluje ona do DNA. Jednakże, ze względu na szczególną strukturę chemiczną układu 1-nitro-9-amino, związek ten łatwo ulega przemianom metabolicznym, prowadzącym do utworzenia reaktywnych metabolitów [Gorlewska i wsp., 2001], zdolnych do kowalencyjnego wiązania się do DNA [Konopa i wsp., 2003] oraz do indukcji sieciowania DNA [Konopa i wsp., 1983, Pawlak i wsp., 1984, Szostek i wsp., 2002]. Wykazano również, że pochodna C-1748 wyraźnie obniża aktywność receptora androgenowego, indukuje zaś działanie receptora estrogenowego w komórkach LnCaP [Tadi i wsp., 2007]. Ostatnie badania wyjaśniły zaś molekularny mechanizm działania C-1748 w komórkach ludzkiego nowotworu jelita grubego, HCT8 i HT29 [Augustin i wsp., 2010]. Udowodniono, że badany związek indukuje przejściowy blok cyklu życiowego w fazie G2 i G2/M w komórkach HCT8. W konsekwencji, traktowanie komórek HCT8 pochodną powodowało śmierć komórek na drodze apoptozy, która przebiegała według klasycznej, mitochondrialnej aktywacji kaspazy i obejmowała: spadek mitochondrialnego potencjału błonowego, aktywację kaspazy-3, translokację fosfatidyloseryny do zewnętrznej błony plazmatycznej oraz fragmentację DNA do poziomych nukleosomów. Ponadto wykazano, że wydłużony czas inkubacji komórek ludzkiego nowotworu jelita grubego z pochodną 9-amino-1-nitroakrydyny prowadził do przyspieszonego starzenia komórkowego wynikającego z działania związku, a nie z limitu Hayflicka. O procesie tym świadczyła obecność zwiększonej aktywności, charakterystycznej wyłącznie dla starzejących się komórek, kwaśnej SA- β -galaktozydazy. Obserwacja ta, okazała się niezwykle istotna, gdyż wskazuje, że w przypadku komórek, które nie uległy apoptozie, ich proliferacja została nieodwracalnie zahamowana, co skutkuje podobnym efektem terapeutycznym – eliminacją komórek nowotworowych.

Związek C-1305, przedstawiciel triazoloakrydonów, wykazuje wyraźnie zróżnicowaną aktywność cytotoksyczną wobec 64 ludzkich linii komórek nowotworowych w hodowli in vitro (w systemie screeningowym National Cancer Institute, Bethesda, USA). Najbardziej wrażliwymi na działanie C-1305 okazały się być komórki ludzkiej białaczki limfoblastycznej, MOLT4 oraz promieloblastycznej, HL60. W badaniach mechanizmu działania C-1305 na poziomie komórkowym wykazano, że związek ten powoduje zatrzymanie komórek na granicy faz G2/M cyklu komórkowego, co ostatecznie prowadzi do programowanej śmierci komórek, czyli apoptozy. Zaobserwowano obecność frakcji komórek w fazie sub-G1, uważanej za populację komórek apoptotycznych, jak również fragmentację DNA, aktywację kaspazy-3, cięcie białka PARP, translokację fosfatydyloseryny oraz spadek mitochondrialnego potencjału błonowego [Augustin i wsp., 2006]. Interesującym jest fakt, że związek C-1305 w bardzo silny sposób hamuje proliferację komórek z uszkodzonym genem PARP-1 [Węsierska-Gądek i wsp., 2004]. Jest to cecha odróżniająca ten związek od leków przeciwnowotworowych, takich jak amsakryna, które nie działają na tego typu komórki. Poli(ADP-rybozo) polimeraza 1 jest odpowiedzialna za detekcję uszkodzeń DNA i jego naprawę, a także odgrywa rolę czynnika promującego śmierć komórek. Wykazano, że traktowanie komórek HeLa kombinacją związków C1305/NU1025 prowadzi do synergistycznego efektu cytotoksycznego, co wydaje się być ważne w terapii wielolekowej: inhibitor topoizomerazy II / inhibitor PARP-1 [Sabisz i wsp., 2010]. „Sztandarową” cechą związku C-1305 jest jego zdolność do nieodwracalnej stabilizacji kompleksu rozszczepialnego DNA-topoizomeraza II. Pozwoliła ona na wprowadzenie cięć do DNA, dając odcinki 50-200 kpz, które odpowiadają wielkością fragmentom pętli DNA. Trwałe zahamowanie ponownego połączenia przeciętych nici, kierując komórkę na drogę apoptozy [Lemke i wsp., 2002].

1.3. Przemiany metaboliczne pochodnych akrydyny.

Metabolizm chemoterapeutyków może z jednej strony przekształcać lek do jego formy farmakologicznie czynnej, z drugiej zaś, może nastąpić efekt wręcz przeciwny, gdy przemiana metaboliczna prowadzi do obniżenia aktywności lub całkowitej dezaktywacji.

Przeprowadzone dotychczas badania przemian związku C-1748 w układach modelowych z zastosowaniem nukleofilowego czynnika redukcyjnego, didtrotreitolu (DTT), pozwoliły poznać możliwe kierunki przemian aktywacyjnych [Wiśniewska i wsp., 2012]. Otrzymane produkty metabolizmu stały się związkami wzorcowymi w dalszych pracach, opartych na poznaniu metabolicznych przemian C-1748 w obecności różnych frakcji enzymów mikrosomalnych pochodzących z komórek wątroby szczura i człowieka. Porównanie odpowiednich widm UV-VIS i ESI-MS produktów reakcji związku z DTT

z otrzymanymi dla produktów obserwowanych po inkubacji z enzymami mikrosomalnymi pozwoliło stwierdzić, że w badanych warunkach powstawały: metabolit z dodatkowym pierścieniem pomiędzy atomami azotu 1 i 9, metabolit ze zredukowaną grupą nitrową do aminowej oraz produkt o strukturze 1-amino-4-metyloakrydonu. Postawiono więc hipotezę, że obniżona reaktywność jak i podatność na atak nukleofilowy ściśle wiąże się z niższą toksycznością ogólną tego związku. W ramach weryfikacji tej hipotezy wykazano, że C-1748 był słabiej metabolizowany przez wybrane izoenzymy cytochromu P450, w tym CYP3A4 i CYP2C9, niż zastosowany w celach porównawczych związek C-857 [Wiśniewska i wsp., 2012].

Badania nad mechanizmem działania pochodnych triazoloakrydonów, w tym C-1305, realizowane przez nasz zespół wyłoniły hipotezę, iż metaboliczna aktywacja może być wstępnym etapem ich biochemicznego działania na poziomie komórkowym. Przypuszczenie to nasunął fakt, że wyjątkowa zdolność do kowalencyjnego międzyłańcuchowego sieciowania DNA w komórkach nowotworowych przez C-1305 i jego aktywnych analogów była ściśle związana z obecnością enzymów wewnątrzkomórkowych [Koba i Konopa, 2007], co może być spowodowane powstawaniem reaktywnych metabolitów związku. Aby poznać i porównać kierunek transformacji pochodnej triazoloakrydonu, związku C-1305, przeprowadzono badania metabolizmu tego związku w obecności frakcji enzymów mikrosomalnych i rekombinantowych izoenzymów cytochromu P450. Stwierdzono, że monooksygenazy flawinowe- FMO, a nie enzymy cytochromu P450 (CYPs) są głównymi enzymami frakcji mikrosomalnej, odpowiedzialnymi za metabolizm tej pochodnej [Fedejko-Kap i wsp., 2011].

II. CZĘŚĆ TEORETYCZNA

Pierwsza część poniższego opracowania stanowi przegląd literatury na temat metabolizmu leków w komórce nowotworowej z udziałem izoenzymów cytochromu P450, druga zaś dotyczy mechanizmów regulacji i kontroli ekspresji enzymów P450 oraz znaczenia wpływu stosowanych klinicznie leków na tę regulację w aspekcie terapii wielolekowych oraz interakcji lek – lek. Głównym celem tej części pracy jest spojrzenie na izoenzymy cytochromu P450 przez pryzmat ich roli w rozwoju terapii przeciwnowotworowej, jako nowego celu terapeutycznego.

II.1. METABOLIZM LEKÓW W KOMÓRCIE NOWOTWOROWEJ – CHARAKTER I ZNACZENIE W TERAPII.

Nieustanne poszukiwania skutecznych leków przeciwnowotworowych, jak również rozwój takich dziedzin jak farmakokinetyka i farmakodynamika, w której kręgu zainteresowań znajdują się procesy jakim lek podlega w organizmie, to ciągle dążenia do zaprojektowania takiego związku, który jako potencjalny lek byłby skuteczny i bezpieczny. Jednakże, efektywność terapii przeciwnowotworowych jest wciąż często trudna do przewidzenia, ze względu na tzw. wąskie „okno terapeutyczne”, co oznacza, że różnica między dawką leczniczą, a toksyczną dla pacjenta jest niewielka. Dodatkowym utrudnieniem są zróżnicowane mechanizmy oporności komórek nowotworowych na stosowane chemoterapeutyki, jak również wysoką zmienność farmakokinetyki i farmakodynamiki u tego samego pacjenta [Undevia i Gomez-Abuin, 2005].

Przemiany stosowanych klinicznie leków przeciwnowotworowych, można podzielić na reakcje I, II i III fazy, które prowadzą do zmiany struktury i właściwości ksenobiotyku. Biorą w nich udział określone enzymy, które wyszczególniono poniżej w Tabeli 1.

Tabela 1. Enzymy metabolizujące leki p/nowotworowe i inne ksenobiotyki [Gonzalez i Tukey, 2006]

<i>Enzymy</i>	<i>Reakcje</i>
Faza I	
Cytochrom P450	C- i O- oksydacja, dealkilacja, redukcja, hydroliza
Monooksygenazy flawinowe (FMO)	N-, S- i P-oksydacja
Hydrolazy epoksydowe (mEH, sEH)	Hydroliza epoksydów
Faza II	
UDP-glukuronylotransferazy (UGT)	Przyłączenie kwasu glukuronowego
Sulfotransferazy (SULT)	Przyłączenie siarczanu
Glutatio-S-transferazy (GST)	Przyłączenie glutationu
N-acetylotransferazy (NAT)	Dodanie grupy acetylowej
Metylotransferazy (MT)	Dodanie grupy metylowej

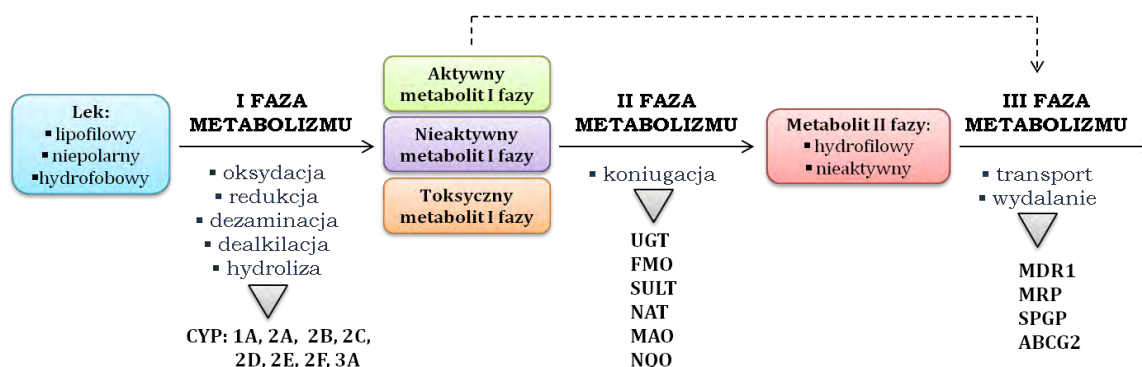
Inne enzymy	
Dehydrogenaza alkoholowa	Redukcja alkoholi
Dehydrogenaza aldehydowa	Redukcja aldehydów
Oksydoreduktaza NADPH-chinonu (NQO)	Redukcja chinonów
Faza III	
Nadrodzina białek ABC:	
Podrodzina ABCB: np. ABCB1 / P-gp / MDR1	Transport poprzez wiązanie ATP, wpływ na absorpcję i eliminację leków
Podrodzina ABCC: np. ABCC1,2,3 / MRP1,2,3	Transport koniugatów leków z glutationem i inne aniony organiczne
Podrodzina ABCG: np. ABCG2	Wątrobowa eliminacja ksenobiotyków Oporność lekowa raka piersi (BCRP)

mEH – mikrosomalna hydrolaza epoksydowa; sEH – rozpuszczalna hydrolaza epoksydowa; UDP – dwufosforan urydyny; NADPH – zredukowany fosforan dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego; ABCB1/P-gp/ – glikoproteina P inaczej MDR1 – białko oporności wielolekowej; MRP1/2/3 – białko oporności wielolekowej

Reakcje I fazy to najczęściej procesy oksydacji, redukcji, deaminacji, dealkilacji lub hydrolizy. W ich wyniku powstają farmakologicznie nieaktywne metabolity, ale w niektórych przypadkach, podczas hydrolizy wiązań estrowych bądź amidowych, mogą tworzyć się związki o wysokiej aktywności biologicznej. W katalizie tego etapu metabolizmu uczestniczą głównie enzymy mikrosomalne wątroby cytochromu P450, jak również monooksygenazy flawinowe i hydrolazy epoksydowe. W drugiej fazie biotransformacji leków przeprowadzane są natomiast reakcje acetylacji, metylacji, sprzęgania z aminokwasami, resztą kwasu glukuronowego, octowego lub siarkowego, które prowadzą do powstania zazwyczaj związków nieaktywnych, lepiej rozpuszczalnych w wodzie, o większej masie cząsteczkowej, przygotowanych do wydalenia z moczem i żółcią. Przemiany te zachodzą przy udziale transferaz, m.in. UDP-glukuronylotransferazy (UGT), S-transferazy glutationowej (GST), sulfotransferazy (SULT), metylotransferazy (MT) i N-acetylotransferazy (NAT), przy czym skuteczna biotransformacja leków związana jest ze skoordynowanym działaniem enzymów uczestniczących w każdej fazie metabolizmu [Herman, 2006]. W III fazie, metabolizowany ksenobiotyk transportowany jest do jego miejsca działania biologicznego lub na drogę wydalania. Najlepiej poznanym w tej roli białkiem transportującym jest glikoproteina P (P-gp lub MDR1). Białko to nazywane jest transporterem „0” fazy metabolizmu, gdyż wyrzuca z enterocytów leki, które nie zostały jeszcze poddane przemianie enzymatycznej. P-gp usuwa wchłonięte leki, ale przede wszystkim metabolity leków po reakcjach sprzęgania, katalizowanych przez enzymy II fazy metabolizmu, stąd nazwa transporterzy III fazy metabolizmu [Dietrich i wsp., 2003].

Reakcje I i II fazy prawie zawsze zachodzą w wątrobie, a enzymy metabolizujące leki znajdują się głównie wewnątrz siateczki endoplazmatycznej hepatocytów. Mikrosomy wątroby mają zdolność do metabolizowania zarówno związków endogennych (np.

cholesterol, hormony steroidowe, kwasy tłuszczowe), jak i egzogennych (leki, prokancerogeny, składniki diety). Przez błonę hepatocytów przenikają głównie cząsteczki niespolaryzowane, leki spolaryzowane wydalone są najczęściej z moczem w postaci niezmienionej. Wszystkie przemiany biotransformacji mają jeden, główny kierunek, wzrost polarności i rozpuszczalności, a co za tym idzie ułatwienie wydalania oraz obniżoną toksyczność stosowanego leku [Gonzalez i Tukey, 2006]. Na rysunku 2 przedstawiono graficznie kolejne fazy metabolizmu leków.



Rys. 2. Fazy metabolizmu leku. Schemat obejmuje poszczególne etapy przemian stosowanych leków z uwzględnieniem udziału enzymów w poszczególnych fazach.

Na skuteczność terapii przeciwnowotworowej składa się wiele aspektów. Należy pamiętać, że prowadzi się ją zwykle w schematach wielolekowych. Zastosowaną kombinację cytostatyków reprezentują różne grupy leków o odmiennych mechanizmach działania. Oprócz efektu terapeutycznego leki te wywierają także toksyczny wpływ na zdrowe tkanki organizmu². Aby osiągnąć możliwie najlepszy efekt leczenia, dąży się do opracowania „indywidualnej terapii”, specyficznej dla każdego pacjenta. Kliniczne znaczenie w tej kwestii ma poznanie przemian metabolicznych konkretnego leku, jego indeksu terapeutycznego, uwarunkowanych genetycznie i środowiskowo różnic międzysobniczych, stanu ogólnego i hormonalnego organizmu oraz wpływu podawanych jednocześnie innych leków.

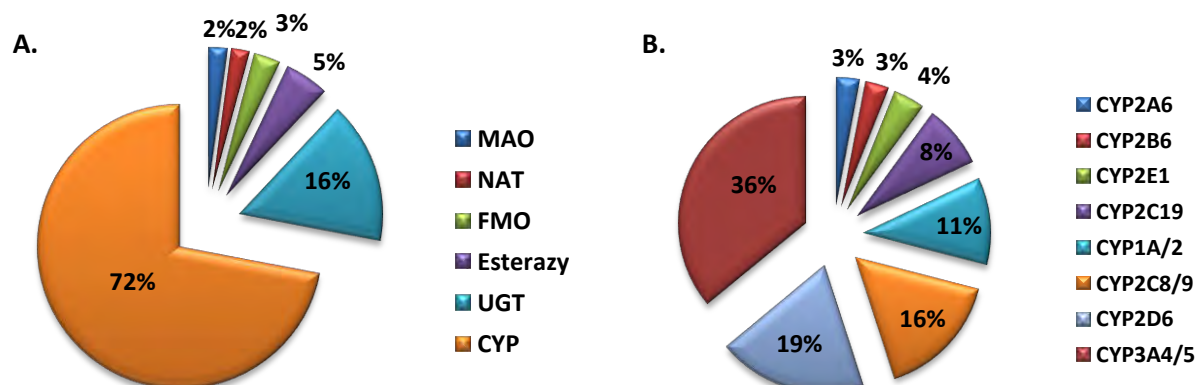
Dla dokładnego poznania farmakokinetyki interakcji pomiędzy lekami stosowanymi w terapii przeciwnowotworowej najważniejsze są więc dwa główne aspekty: 1) rola enzymów metabolizujących leki i ich transporterów, 2) mechanizm wpływu stosowanych leków na

² Istotny jest fakt, że niektóre enzymy mogą przekształcać niektóre leki przeciwnowotworowe w wysoko reaktywne związki o działaniu toksycznym. Ciekawym przykładem może być redukcyjny metabolizm doksorubicyny, który poprzez działanie reduktazy NADPH:cytochromu P450 (P450R) prowadzi do szybkiego tworzenia wolnych rodników. Mechanizm ten jest odpowiedzialny za kardiotoxycznosc antracyklin [Gewirtz, 1999; Niitsu i wsp., 2000]. Wytwarzane w nadmiarze wolne rodniki uszkadzają białka i kwasy nukleinowe potęgując zmiany zachodzące w mitochondriach. Zmiany te doprowadzają do uwolnienia z przestrzeni międzybłonowej cytochromu c, białka AIF (ang. *apoptosis inducing factor*) i wewnątrzmitochondrialnych kaspaz. Końcowym efektem tych przemian jest apoptoza kardiomiocytów [Solary i wsp., 2003].

aktywność i ekspresję białek enzymatycznych zaangażowanych w metabolizm. [Riddic i wsp., 2005].

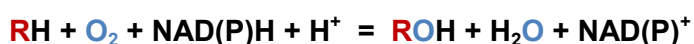
II.1.1. Cytochromy P450 w rozwoju terapii przeciwnowotworowych.

Cytochromy P450 stanowią główny układ enzymatyczny przemiany I fazy. W jego skład wchodzi enzymy biorące udział w 70 – 80% metabolizmu większości ważnych klinicznie leków. Układ cytochromu P450 składa się z całej rodziny pokrewnych enzymów, będących hemoproteinami o właściwościach oksydoredukcyjnych, różniących się budową, specyfiką substratową, wrażliwością na indukcję i hamowanie. Kodujące je geny zostały podzielone na kilkanaście rodzin, jednak tylko rodziny 1 – 3 odgrywają istotną rolę w metabolizmie leków w organizmie człowieka, podczas gdy pozostałe są odpowiedzialne za metabolizm substancji endogennych. U ludzi zidentyfikowano dotąd 58 aktywnych enzymów CYP, które ulegają ekspresji głównie w wątrobie, jelitach, płucach, mózgu i nerkach. Z punktu widzenia farmakokinetyki, szczególnie istotne są podrodziny: CYP2C (2C9, 2C19), CYP2D (2D6), CYP3A (3A4, 3A5), CYP2E (2E1), CYP1A (1A2) (Rys. 3) [Guengerich, 2008].



Rys. 3. A: udział poszczególnych enzymów I i II fazy w metabolizmie leków stosowanych klinicznie: P450 – izoenzymy cytochromu P450, FMO – monooksygenaza flawinowa, UGT – UDP-glukuronylotransferaza, NAT – N-acetylotransferaza, MAO – oksydaza monoaminowa; B: udział poszczególnych izoenzymów cytochromu P450 w metabolizmie leków [Guengerich, 2008].

Zasadniczą funkcją enzymów z nadrodziny cytochromów P450 jest kataliza reakcji utleniania związków endo- i egzogennych na drodze monooksygenacji, w której jeden z dwóch atomów cząsteczki tlenu wbudowany jest do cząsteczki substratu, co możemy przedstawić równaniem sumarycznym:



gdzie: RH – substrat; ROH – produkt

W reakcji tej izoenzymy cytochromu P450 przejmują elektron z NADPH lub z NADH i poprzez inne przenośniki elektronów przenoszą go na cząsteczkę tlenu [Gerber i Silgar, 1992].

II. 1.1.1. Charakterystyka poziomu izoenzymów cytochromu P450 w wybranych typach nowotworów.

Wiele spośród stosowanych klinicznie chemoterapeutyków jest metabolizowana przez izoenzymy cytochromu P450. Białka te należą do tzw. enzymów metabolizujących leki (ang. *drug metabolizing enzymes*, DME). Występują one nie tylko w tkankach zdrowych, ale również w guzach, a ich lokalna ekspresja w różnych typach ludzkich nowotworów, głównie litych, skłania do ciągłych badań szlaków metabolicznych stosowanych leków oraz odpowiedzi organizmu na ich stosowanie. Szczegółowa charakterystyka poziomu izoenzymów cytochromu P450 w poszczególnych typach nowotworów wydaje się więc potencjalnym środkiem do osiągnięcia optymalnej terapii. Pozwoli ona na skuteczniejsze projektowanie pro leków, a co za tym idzie osiągnięcia zamierzonego efektu terapeutycznego w leczeniu indywidualnym. Z drugiej strony umożliwi to przewidywanie występowania mechanizmów oporności nowotworów na stosowane w terapii leki, poprzez określenie zachodzącej inaktywacji chemoterapeutyków z udziałem enzymów I i II fazy.

Poniżej opisana została ekspresja poszczególnych klas enzymów I fazy w różnych typach nowotworów. Wyjątkowo dokładnie została ona zbadana w nowotworach piersi, jelita grubego i płuc. Wykorzystano przy tym techniki immunocytochemiczne i immunoblottingu, real-time PCR, metodę określającą obecność mRNA w czasie rzeczywistym, jak również metody oceniające poziom aktywności katalitycznej poszczególnych enzymów.

II. 1.1.1.1. Nowotwory piersi.

Zdecydowana większość raków piersi u kobiet pojawia się w okresie postmenopauzalnym, a więc po wygaśnięciu hormonalnej czynności jajnika. Dlaczego zatem proces wyraźnie estrogenozależny pojawia się najczęściej przy braku estrogenów w krążeniu. Okazuje się, że to głównie lokalne procesy zaangażowane w powstawanie estrogenów w samym guzie odgrywają kluczową rolę w rozwoju i postępie choroby nowotworowej piersi. Estrogeny syntetyzowane miejscowo w tkance wykazują biologiczną aktywność prawdopodobnie tylko w miejscu ich powstania, a ich biosyntezę katalizuje mikrosomalny enzym aromataza P450 [Simpson, 2000]. Aromataza P450 należy do grupy 480 białek – cytochromów P450. Enzymy cytochromu sklasyfikowano w 74 rodzinach. Aromataza należy do rodziny 19, w skład której wchodzi jeden przedstawiciel [Nelson

i wsp., 1996). Gen aromatazy oznaczony jest symbolem CYP19. Cytochrom P450 aromatazy wiąże androgenne steroidy C19 i katalizuje serię reakcji, prowadzących do powstania w pierścieniu A steroidu pierścienia fenolowego, charakterystycznego dla estrogenów C18 [Simpson i wsp., 1994]. Złożoność ekspresji aromatazy polega m.in. na włączaniu i wyłączaniu promotorów w odpowiedzi na syntetyzowane w komórce czynniki. Przełączanie ekspresji z jednego promotora na inny wyjaśnia częściowo tkankowo-specyficzną regulację ekspresji aromatazy, a także odgrywa zasadniczą rolę w zmienionej ekspresji aromatazy podczas rozwoju i wzrostu guza nowotworowego, prowadząc często do lokalnej nadprodukcji aromatazy i wzrostu biosyntezy estrogenów *in situ*. Metodami biochemicznymi wykryto aktywność aromatazy w ok. 60-70% guzów i aktywność ta była dużo wyższa w porównaniu do aktywności w tkance tłuszczowej, czy zdrowej tkance gruczołowej otaczającej guz. Również fibroblasty pochodzące z guza w hodowli *in vitro* charakteryzują się wyższą aktywnością w porównaniu do fibroblastów pochodzących ze zdrowej tkanki. Wyniki te potwierdzono technikami biologii molekularnej, tj. techniką RT-PCR, stwierdzając w tkance guza znacznie wyższą zawartość transkryptów mRNA aromatazy w porównaniu do tkanki zdrowej. Obserwacje te tłumaczą, dlaczego stężenia estradiolu w guzie nowotworowym osiągają wartości 30 – 100 krotnie wyższe niż w surowicy krwi. Guzy nowotworowe, wykazujące ekspresję aromatazy stają się samowystarczalne w wytwarzaniu sygnałów proliferacyjnych, a lokalnie wytworzone estrogeny na drodze autokrynej stymulują namnażanie się zmienionych genetycznie komórek nowotworowych. Dodatkowo wysokie stężenie estradiolu może predysponować do lokalnego powstawania katecholoestrogenów działających genotoksycznie i powodujących zwiększenie liczby mutacji i zwiększenie inwazyjności. Udowodniono, że ekspresja aromatazy w rakach sutka ER(+) jest ważnym mechanizmem autokrynej regulacji wzrostu guza. Dane te wskazują, że wzrost aktywności lub/i ekspresji aromatazy jest związany z nowotworowym fenotypem guza sutka [Jarząbek i Wołczyński, 2003].

W przemianę estradiolu mogą być również zaangażowane enzymy I fazy metabolizmu. Przykładem jest izoenzym CYP1B1, który katalizuje przemianę 17β -estradiolu do kancerogennego hydroksyestradiolu, co może limitować rozwój nowotworów hormonozależnych [Hayes i wsp., 1996]. Poziom CYP1B1 jest znacznie podwyższony w raku piersi [Murray i wsp., 1997]. Odgrywa ważną rolę w rozwoju tego typu nowotworu na różnych jego etapach i z tego powodu może być uważany jako potencjalny marker zmian nowotworowych oraz cel oddziaływania czynników chemoprewencyjnych³, o czym świadczą

³ Pod pojęciem **chemoprewencji** rozumiane jest postępowanie polegające na zastosowaniu naturalnych lub syntetycznych substancji w celu zahamowania lub odwrócenia procesu kancerogenezy [Sporn, 2000]. Jednym z mechanizmów ich działania jest hamowanie metabolicznej aktywacji promutagenów, czyli hamowanie enzymów cytochromu P450, w tym przypadku izoenzymu CYP1B1 oraz wzmacnianie detoksykacji mutagenów przez indukcję enzymów II fazy.

trwające prace nad metodami łatwego wykrywania nadekspresji tego białka w komórkach [Ware, 2009].

Do innych izoenzymów cytochromu P450 wykrytych w raku piersi i sutka, o podwyższonej ekspresji w komórkach nowotworowych w porównaniu do zdrowych komórek, zaliczyć można: CYP1A1 w 40% raków piersi [El-Raye i wsp., 2003], CYP3A4 w 22% raków piersi [Goth-Goldstein i wsp., 2000], CYP2C [Yokose, 1999] i CYP2E1 [Kapacuoglu i wsp., 2003].

II. 1.1.1.2. Nowotwory przewodu pokarmowego.

Nowotwory przewodu pokarmowego, czyli rak żołądka, dwunastnicy, wątroby, jelita grubego, odbytnicy i trzustki, plasują się na pierwszym miejscu wśród zachorowań na nowotwory złośliwe. Najwięcej zachorowań odnotowuje się między 50 a 70 rokiem życia. Najczęściej występującym nowotworem przewodu pokarmowego jest rak jelita grubego, który zajmuje w Polsce drugie miejsce (odpowiednio 15/100 tysięcy/rok w przypadku kobiet oraz 25/100 tysięcy/rok odnośnie do mężczyzn) jako przyczyna zgonów z powodu nowotworów. Przyczyny jego powstawania są złożone. Uważa się, że duże znaczenie ma zarówno dieta i zawarte w pożywieniu kancerogeny, tryb życia jak i czynniki genetyczne, w tym polimorfizm izoenzymów cytochromu P450. Jednakże, niewiele jest doniesień o poziomie izoenzymów w tkankach nowotworowych jelita grubego w odniesieniu do tkanek zdrowych. Najbardziej kluczowym w patogenezie tego rodzaju raka wydaje się być enzym CYP1A1, który występuje w 75% nowotworów jelita grubego. W szczegółowych badaniach immunohistochemicznych jego ekspresję wykryto również w innych typach nowotworów: piersi (40%), płuc (60%) oraz nerki (100%) [Patterson i Murray, 2002]. Istotne jest to, że jest to enzym indukowany, w szczególności przez policykliczne węglowodory aromatyczne (PWA), zawarte np. w dymie papierosowym i grillowanym mięsie. Związki aromatyczne przekształca on w kancerogeny, co jest udowodnionym mechanizmem nowotworzenia w płucach i jelicie grubym. Wykazano, że większa aktywność CYP1A1 w tych narządach wiąże się z częstszym występowaniem nowotworów tych okolic [Sivaraman, 1994]. W komórkach raka jelita grubego wykryto również obecność izoenzymu CYP3A4. Jego zwiększona ekspresja jest odpowiedzialna za skuteczniejszą aktywację stosowanych leków przeciwnowotworowych takich jak: cyklofosfamid i ifosfamid, ale również za oporność na chemioterapię, ponieważ izoenzym CYP3A4 inaktywuje niektóre chemioterapeutyki np. taksany, paklitaksel i docetaksel czy alkaloidy Vinca. Obecność izoenzymu CYP3A4 w komórkach raka jelita grubego określa więc poziom wrażliwości na stosowaną terapię [Gervasini i wsp., 2007].

W nowotworach wątroby wykryto większość enzymów z grupy cytochromu P450. Badania wykazały, że w ich komórkach poziom ekspresji enzymów z podrodziny CYP2C, CYP2E i CYP2D jest zwiększony. W szczególności obecność izoenzymów CYP2E1 i CYP2D6 warunkuje złośliwość i zdolność tego nowotworu do przerzutów [Gungerich i Turvy, 1991; Hirose i wsp. 2002]. Powodem tego jest zdolność enzymu CYP2E1 do aktywacji kancerogenów. Pozostałe izoenzymy takie jak: CYP3A, CYP1A1, CYP1A2, CYP4A1 w komórkach nowotworu wątroby ulegają słabszej ekspresji w porównaniu do tkanek zdrowych. Jednakże, najnowsze badania *in vitro* dowiodły, że potencjalne kancerogeny indukujące proces nowotworzenia, np. 3-metylocholanren (MC) trwale indukują ekspresję CYP1A1 w komórkach raka wątroby HepG2 (ang. *human hepatoma cells*). Zaobserwowano 8-20-ktorny wzrost ekspresji mRNA *CYP1A1* w porównaniu z komórkami kontrolnymi, utrzymujący się na stałym poziomie przez 120h [Fazili i wsp. 2010].

II. 1.1.1.3. Nowotwory płuc.

Pierwotny rak płuca jest najczęściej występującym nowotworem złośliwym w Polsce. W ostatnich kilku latach rak płuca jest rozpoznawany u około 15 000 mężczyzn i około 5 500 kobiet (standaryzowane współczynniki zachorowalności – odpowiednio, około 52 i 15 na 100 000 osób)⁴ [Wojciechowska i wsp., 2010]. Opracowania Krajowego Rejestru Nowotworów wskazują, że rak płuca jest przyczyną największej liczby zgonów kobiet i mężczyzn z powodu nowotworów złośliwych. Ryzyko zachorowania na ten typ nowotworu zależy przede wszystkim od czynnego lub biernego narażenia na działanie rakotwórczych składników dymu tytoniowego (około 90% wszystkich zachorowań), w tym wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (WWA lub inaczej PAH – ang. *polycyclic aromatic hydrocarbons*). Ponieważ płuca są łatwą drogą przedostania się WWA do organizmu, ważne jest aby wyjaśnić rolę enzymów metabolizujących CYP w procesie kancerogenezy z ich udziałem. Prowadzone w tym celu badania skupiły się w szczególności na izoenzymie CYP1A1, który jest głównym enzymem biorącym udział w metabolizmie PAH i może być bezpośrednio związany z rozwojem raka płuc. Cheng i wsp. wykazali, że poziom ekspresji *CYP1A1* był wyższy w tkankach nowotworowych płuc w porównaniu z tkankami zdrowymi. Jednocześnie zaobserwowano wysoki poziom hydrofobowych adduktów PAH z DNA. Obie obserwacje powiązano ze zwiększonym ryzykiem zachorowania na raka płuc [Cheng i wsp. 2000]. Dalsze badania potwierdziły obecność izoenzymu CYP1A1 w 23% (10/43) niedrobnokomórkowych raków płuc, w tym aż w 44% gruczolakoraków [Oyama i wsp., 2007]. Indukcję ekspresji CYP1A1 powodują właśnie węglowodorowy aromatyczne

⁴ Dane wg Centrum Onkologii z 2008r.

występujące w dymie papierosowym, poprzez wiązanie się jako ligandy z receptorem AhR (ang. aryl hydrocarbon receptor), odpowiedzialnym za regulację tej ekspresji.

Izoenzym CYP1B1, podobnie jak CYP1A1 metabolizuje prokancerogeny, a dodatkowo bierze udział w hydroksylacji estrogenów. Korzystając z technik immunoblottingu oraz RT-PCR stwierdzono obecność tego enzymu w 100% badanych nowotworów płuc, co pozwoliło na postawienie hipotezy, że CYP1B1 jest istotnym czynnikiem warunkującym powstawanie zmienionych nowotworowo tkanek [Spivack i wsp., 2001].

CYP2E1 bierze udział w aktywowaniu związków prokancerogennych o budowie nitrozamin występujących w dymie papierosowym do kancerogenów [Kushida i wsp., 2000]. Jego ekspresję potwierdzono w 46% niedrobnokomórkowych raków płuc oraz w 40% gruczolakoraków. Jednakże, poziom tych białek jest podobna w tkankach zdrowych [Oyama i wsp., 2007]. W komórkach nowotworowych płuc obecne są również takie izoenzymy jak: CYP2A6, w 40% gruczolakoraków, CYP2B7, CYP4B1 oraz CYP3A4 i CYP3A5 [Oyama i wsp., 2008]. Aktywność enzymatyczna tych ostatnich jest odpowiedzialna za aktywację proleków, cyklofosfamidu i ifosfamidu, stosowanych w chemioterapii nowotworów płuc.

II. 1.1.1.4. Nowotwory prostaty.

W 2005 roku w Polsce zarejestrowano 7095 nowych zachorowań na raka prostaty, co określa standaryzowany współczynnik zachorowalności - 27,3/100 tys. Z powodu raka prostaty w 2005 roku zmarło 3592 osób, standaryzowany współczynnik umieralności - 12,9/100 tys⁵. Zasadniczą metodą postępowania zachowawczego w przypadku choroby zaawansowanej, obok chirurgii, jest leczenie hormonalne, polegające na eliminowaniu androgenów endogennych. Podstawą tego leczenia jest więc androgenozależność. Zależność między stężeniem androgenów i rakiem prostaty jest dobrze znana⁶. Z wyższym stężeniem testosteronu w surowicy, jak również z jego substytucją wiąże się zwiększenie ryzyka jego rozwoju. Interesujące są więc doniesienia o poziomie ekspresji w tym typie nowotworu izoenzymu CYP3A5, który bierze udział w hydroksylacji testosteronu. Leskelä

⁵ Dane wg Centrum Onkologii z 2005r.

⁶ **Teoria o negatywnym wpływie testosteronu (t) na komórki prostaty** powstała w 1961 roku, kiedy Huggins i Hodges udowodnili, że rak prostaty (rp) jest nowotworem androgenozależnym. Dowiedli znaczenie obniżenia stężenia t dla zwolnienia progresji raka stercza. W przełomowej pracy, za którą otrzymali Nagrodę Nobla, stwierdzili, że kastracja powoduje regresję rp, natomiast t jego progresję [Huggins i Hodges, 1941]. Obecne obserwacje pacjentów potwierdzają poprawność **konceptji saturacji**. Wyjaśnia ona dlaczego wzrost stężenia t u pacjentów leczonych tym hormonem nie powoduje progresji choroby. Konceptcja zakłada, że już endogenne relatywnie niskie stężenia t są wystarczające do maksymalnej stymulacji rozwoju rp. Po osiągnięciu pewnego stężenia t (nazwanego punktem saturacji), progresja RS jest obserwowana mimo obniżania stężenia t w wyniku zastosowania ablacji androgenowej. Oznacza to, że po przekroczeniu punktu saturacji późniejsze leczenie, obniża ablację androgenową. Oznacza to, że po przekroczeniu punktu saturacji późniejsze leczenie, obniżające stężenia t, nie zapobiega rozwojowi rp [Fowler i Whitmore, 1981].

i wsp. dowiedli metodami: immunocytochemiczną i RT-PCR, obecność izoenzymu CYP3A5 w zdrowych komórkach prostaty, natomiast jego brak w komórkach nowotworowych. Potwierdziło to zaangażowanie tego białka w metabolizm endogennych androgenów, a co więcej obserwacja ta pozwoliła stwierdzić, że za złośliwość tego nowotworu oraz zwiększone ryzyko zachorowania odpowiada obniżona zdolność do przemiany metabolicznej testosteronu, występująca w samym guzie, jak również polimorfizm genetyczny izoenzymu CYP3A5 [Leskelä i wsp, 2007].

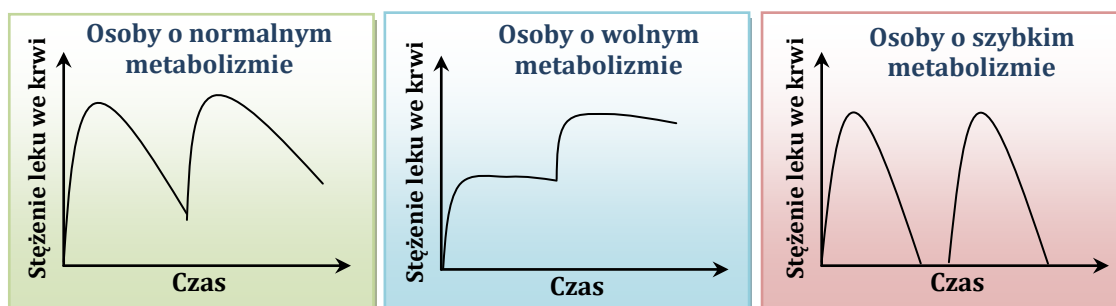
Dodatkowe badania opierające się na technice RT-PCR dowiodły obecność w komórkach prostaty następujących izoenzymów: CYP1A2, CYP1B1, CYP4B11, CYP2C19 i CYP2D6 [Finnstrom i wsp., 2001].

II.1.1.2. Znaczenie polimorfizmów genowych wybranych cytochromów P450 w chemioterapii.

Powodem odmienności działania farmakologicznego tego samego leku u poszczególnych osób podczas terapii przeciwnowotworowej są zmiany genotypu pacjenta, w szczególności wtedy, gdy izoenzym P450 jest kodowany przez pojedynczy gen, w którego *locus* mogą występować dwa różne allele. Zjawisko takie nazywa się polimorfizmem genetycznym. Stwierdzono, że wszystkie kluczowe dla biotransformacji leków izoenzymy cytochromu P450, w tym enzymy rodzin CYP3A, CYP2C, CYP2B oraz CYP1A, występują w kilku odmianach polimorficznych [Rodriguez-Antona i Ingelman-Sundberg, 2006]. W praktyce, u większości pacjentów dana dawka leku jest skuteczna, u niektórych mniej, a u jeszcze innych wywołuje niebezpieczne objawy niepożądane. Różnorodność metabolizmu leków tłumaczy fakt, dlaczego u niektórych pacjentów rozwija się toksyczność po podaniu leku wraz z lekami wchodzącymi z nim w interakcje, natomiast u innych pacjentów brak jest objawów toksyczności. Polimorfizm związany z biotransformacją leków jest klinicznie istotny nie tylko ze względu na skuteczność i bezpieczeństwo farmakoterapii, ale również z powodu zwiększonego ryzyka wystąpienia niektórych chorób. Stwierdzono bowiem statystycznie znaczącą zależność pomiędzy obecnością niektórych alleli danego genu, a ujawnieniem się pewnych chorób, zwłaszcza niektórych typów nowotworów [Ingelman-Sundberg, 2002].

Za tworzenie nowych wariantów genu odpowiedzialne są mutacje. Kryterium odróżniającym zmianę polimorficzną od mutacji jest częstość jej występowania (> 1-2% w populacji określa się jako zmianę polimorficzną). Polimorfizm genetyczny może być wynikiem dużych zmian strukturalnych takich jak delecja, duplikacja, translokacja, ale znacznie częściej jest to polimorfizm pojedynczego nukleotydu (SNP – ang. *single nucleotide polymorphism*), prowadzący do powstania różnych alleli danego genu i w konsekwencji zróżnicowanej aktywności enzymu [Wang i wsp., 2009].

Rezultatem wystąpienia mutacji jest osobnicza zmienność aktywności metabolicznej izoenzymów, przejawiająca się całkowitym brakiem, zmniejszeniem bądź zwiększeniem aktywności enzymu. Na tej podstawie, w zależności od szybkości metabolizmu, populację ludzką podzielono na różne grupy: osoby szybko metabolizujące (EM – ang. *extensive metabolizers*), nadmiernie szybko metabolizujące (UM – ang. *ultrarapid metabolizers*), osoby o pośrednim metabolizmie (IM – ang. *intermediate metabolizers*) oraz osoby, u których metabolizm przebiega wolniej (PM – ang. *poor metabolizers*) [Chowbay i wsp., 2005]. Do nasilonego działania leku może dochodzić u osób słabo lub w ogóle nie metabolizujących leku (PM) do postaci nieaktywnej. Z tym faktem wiąże się zwiększone ryzyko działań niepożądanych na skutek kumulacji leku. U osób z genotypem PM należy podawać dawki leku dużo mniejsze od standardowych, aby uniknąć toksyczności chemoterapeutyków, które charakteryzują się niskim indeksem terapeutycznym⁷. Z drugiej strony u osób z genotypem PM w przypadku, gdy enzym odpowiada za przemianę proleku do jego formy aktywnej, należy spodziewać się zmniejszonego lub wręcz braku efektu terapeutycznego. Podobnie wzmocniona biotransformacja leku (genotyp UM), prowadzi do jego szybkiej eliminacji, a zatem krótszego czasu działania czyli potencjalnie niższej skuteczności i potrzeby zwiększenia ilości dawek. U osób z prawidłowym metabolizmem (genotyp EM) standardowe dawki leków będą prawidłowo tolerowane [Zhou i wsp., 2008].



Rys. 4. Zmiana stężenia leku we krwi pacjentów z różnym poziomem enzymów metabolizujących po dwóch dawkach leku [Chowbay i wsp., 2005].

W dostępnej literaturze nie można znaleźć jednoznacznej odpowiedzi, który z genotypów: EM czy PM jest w większym stopniu powiązany ze zwiększonym ryzykiem zachorowania na raka. Większość badaczy skłania się ku stwierdzeniu, że osoby będące nosicielami genotypu odpowiedzialnego za zwiększoną aktywność enzymów cytochromu

⁷ Indeks terapeutyczny (IT) jest miarą bezpieczeństwa stosowania danego leku. Jest to stosunek dawki leku wywołującej objawy toksyczne do dawki wywołującej efekt terapeutyczny dla 50% populacji. Im większy IT tym lek jest bezpieczniejszy. Leki cytostatyczne, ze względu na fakt, że ich zadaniem jest niszczenie żywych komórek organizmu, a dodatkowo są one w wysokim stopniu podatne na metabolizm, mają bardzo wąski (wynoszący ok. 0,25) zakres terapeutyczny [Brus i wsp., 1996].

P450 są bardziej narażone na chorobę nowotworową niż osoby o genotypie PM [Boccia i wsp., 2007; Gervasini i wsp., 2007].

W terapiach przeciwnowotworowych coraz wyraźniej podkreślane są korzyści wynikające z określania profilu farmakogenetycznego, takie jak: redukcja niekorzystnego działania leku w związku z obecnością określonych wariantów genetycznych, eliminacja subterapeutycznego stężenia leku po zastosowaniu standardowych dawek, możliwość monitorowania stężenia leku oraz zastosowania terapii indywidualnej. Ostatnie badania i systematyka wiedzy o polimorfizmie genów potwierdziły również jego udział w niekorzystnych interakcjach lek – lek (ADR – ang. *adverse drug reactions*). Wiedza o genotypie pacjenta i znajomość jego profilu polimorficznego może być główną możliwością uniknięcia niekorzystnych interakcji.

II. 1.1.2.1. Leki przeciwnowotworowe metabolizowane przez izoenzymy P450.

Bardzo wiele spośród klinicznie stosowanych chemoterapeutyków jest metabolizowana przez izoenzymy cytochromu P450. Lokalna ekspresja specyficznych izoenzymów P450 w różnych typach ludzkich nowotworów, głównie litych, skłania się do ciągłych badań szlaków metabolicznych stosowanych leków oraz polimorfizmów genów enzymów biorących udział w ich metabolizmie.

INHIBITORY MITOZY - TAKSANY

Enzymy rodziny CYP3A, zarówno w wątrobie jak i w jelicie cienkim są najliczniejszymi enzymami cytochromu P450 i metabolizują 40 – 60% obecnie stosowanych leków. Stężenie i aktywność CYP3A charakteryzuje duża zmienność międzysobnicza, uwarunkowana zarówno genetycznie, jak i stanem zdrowia, stanem hormonalnym organizmu oraz czynnikami środowiskowymi, w tym dietą [Michael i Doherty, 2007]. Obecnie znanych jest ok. 40 różnych odmian allelu genu kodującego izoenzym CYP3A4. Najbardziej rozpowszechnioną wśród ludzi odmianą polimorficzną tego białka jest *CYP3A4*1B* występujący u ponad połowy populacji rasy czarnej i tylko 5% rasy białej, natomiast nie występujący u rasy żółtej. Pozostałe odmiany polimorficzne izoenzymu CYP3A4, mimo iż jest ich stosunkowo dużo występują znacznie rzadziej bo tylko u 2-3% ogólnej populacji [Nebert i Russel, 2002].

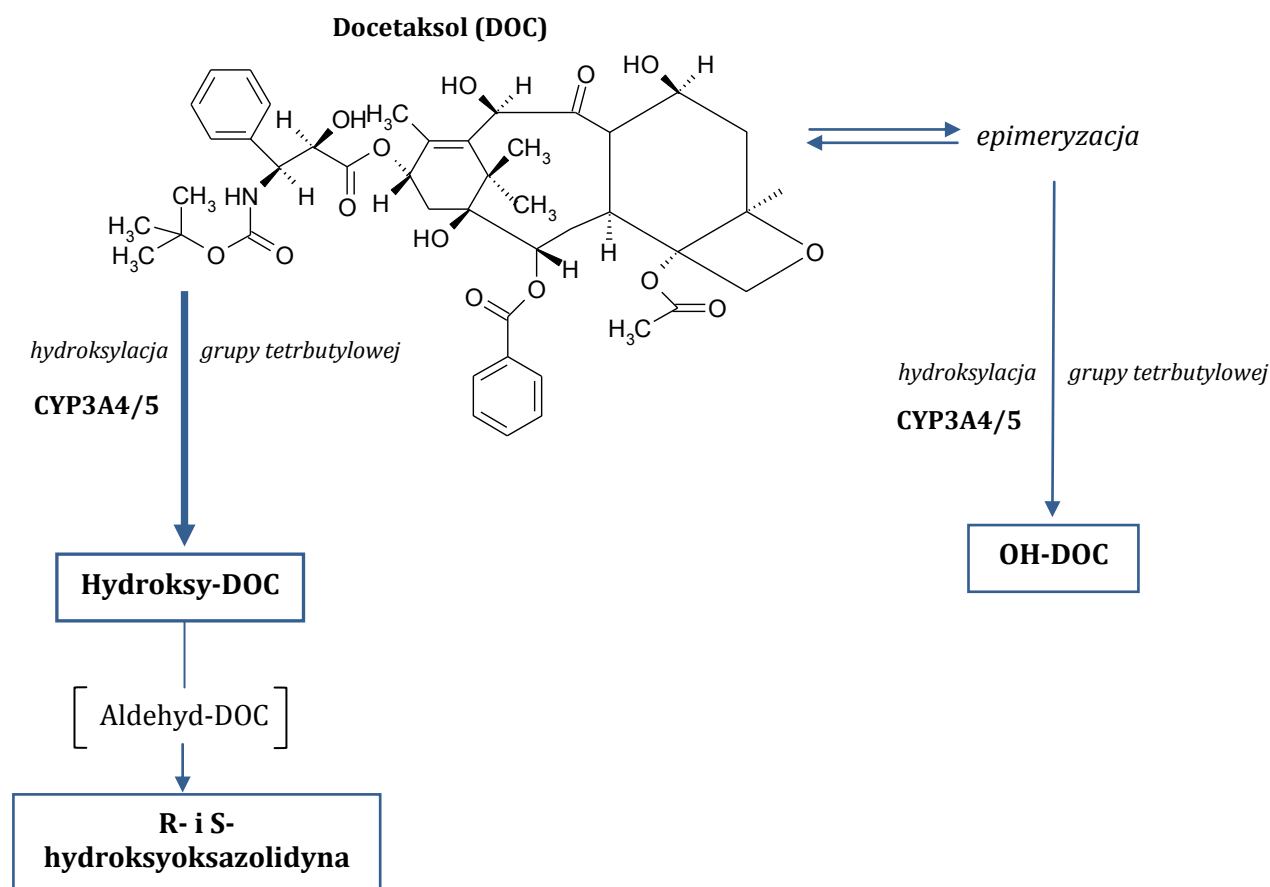
W tabeli poniżej przedstawiono zestawienie leków stosowanych w chemioterapii, rodzaj nowotworu oraz izoenzymy P450 metabolizujące dany lek, w tym izoenzymy CYP3A. W poniższym zestawieniu widoczne jest, iż enzymy z podrodziny CYP3A są zaangażowane w metabolizm wielu leków przeciwnowotworowych, w tym: alkaloidów Vinca, imatinibu, gefitinibu czy też taksanów.

Tabela 2. Leki przeciwnowotworowe i izoenzymy cytochromu P450 biorące udział w ich przemianach metabolicznych [Rodriguez-Antona i Ingelman-Sundberg, 2006].

Leki	P450	Nowotwory	Proleki	P450	Nowotwory
Docetaksel	CYP3A CYP1B1	piersi; NSCLC; prostaty	Cyklofosfamid	CYP2B6 CYP2C19	białaczki, chłoniaki
Etopozyd	CYP3A4, CYP2E1, 1A2	SCLC; jądra	Dakarbazyna	CYP3A4 CYP1A1 CYP1A2	czerniak złośliwy
Eksemestan	CYP3A	piersi	Ifosfamid	CYP2B6 CYP3A	szyjki macicy
Flutamid	CYP1A2	prostaty	Prokarbazyna	CYP2B6 CYP1A	ziarnica złośliwa
Fulvestrant	CYP3A	piersi	Tegufar	CYP2A6 CYP2C8	jelita grubego żołądka
Gefitinib	CYP3A CYP2D6	NSCLC	Tiotepa	CYP1A2 CYP2B6 CYP3A	piersi piersi NHL jajnika
Idarubicin	CYP2D6 CYP2C9	AML, ANLL			
Imatinib	CYP3A	CML, GIST			
Irinotekan	CYP3A	jelita grubego odbytnicy			
Letrozol	CYP3A CYP2A6	piersi			
Mitoksantron	CYP1B1 CYP3A	piersi, AML, ANLL, NHL			
Paklitaksol	CYP2C8 CYP3A	piersi, jajnika, NSCLC, mięsak Kaposiego			
Tamiksifen	CYP3A CYP2D6 CYP2C9 CYP2C19 CYP1B1	piersi			
Teniposyd	CYP3A	ALL, NHL			
Topotekan	CYP3A	jajnika, SCLC			
Toremifen	CYP3A	piersi			
Winblastyna	CYP3A	piersi, ziarnica złośliwa			
Winkrystyna	CYP3A	NHL, neuroblastoma, miesak Kaposiego	NSCLC – niedrobnokomórkowy rak płuc; SCLC – drobnokomórkowy rak płuc; AML – ostra białaczka szpikowa; ANLL – ostra białaczka nielimfoblastyczna; CML – przewlekła białaczka szpikowa; ALL – ostra białaczka limfo blastyczna; NHL – chłoniak nieziarniczny; GIST – nowotwory przewodu pokarmowego		
Windezyna	CYP3A	ALL, NSCLC			
Winorelbina	CYP3A	NSCLC, piersi			

Taksany są bardzo ważnymi lekami, wprowadzonymi do lecznictwa w latach 90, o ugruntowanej pozycji w leczeniu nowotworów złośliwych, szczególnie aktywnymi w chemioterapii raka jajnika, raka piersi, niedrobnokomórkowego raka płuc, nowotworach głowy i szyi. Mechanizm ich działania przeciwnowotworowego wynika z wpływu na mikrotubule poprzez zwiększenie polimeryzacji tubuliny i hamowanie depolimeryzacji mikrotubuli. Ponadto, w postulowanych mechanizmach opisywane jest oddziaływanie taksanów na białka towarzyszące mikrotubulom (MAPs) oraz białka cyklu komórkowego

[O'Brien i wsp., 1999, Huisman i wsp., 2000]. Badania *in vitro* na mikrosomach wątroby ludzkiej wykazały, że docetaksol metabolizowany jest głównie w wątrobie z udziałem izoenzymów CYP3A4/5 do 6 α -hydroksypaklitaksolu poprzez oksydację grupy tetr-butylowej estru w pozycji 13. Następnie pochodna hydroksy-DOC przekształcana jest do dwóch stereozomerów hydroksyoksazolidinonu z niestabilnym produktem pośrednim – aldehydem (rys. 5), [Engels i wsp., 2004].



Rys. 5. Główne szlaki biotransformacji docetaksolu. Docetaksol jest inaktywowany w wątrobie przez izoenzymy CYP3A4/5, które katalizują proces hydroksylacji grupy tetr-butylowej estru w pozycji 13 [Engels i wsp., 2004].

Paklitaksol metabolizowany jest głównie do 6 α -hydroksy-paklitaksolu. Wykryto też dwa metabolity o niższych stężeniach: 3'-p-hydroksy-paklitaksol i 6 α -3'-p-dihydroksy-paklitaksol. Tworzenie tych hydroksylowych pochodnych metabolitów jest katalizowana odpowiednio: przez CYP2C8 i CYP3A4 [Rahman i wsp., 1994]. Na skuteczność obu cytostatyków wpływa występowanie aż kilkudziesięciu odmian polimorficznych genu *CYP3A4*, spośród których najczęściej spotykanym jest allel *CYP3A4*1B*. Wstępnie

wykazano, że chorzy z tym allelem mają podwyższony klirens⁸ paklitaksolu i docetaksołu, co powoduje zmniejszenie efektu terapeutycznego [Trans i wsp., 2006]. Allele *CYP3A4*4*, **5* i **6* kodują enzymy o zmniejszonym działaniu katalitycznym, zaś ekspresja *CYP3A4*18* prowadzi do otrzymania aktywniejszego białka [Hirth i wsp., 2000].

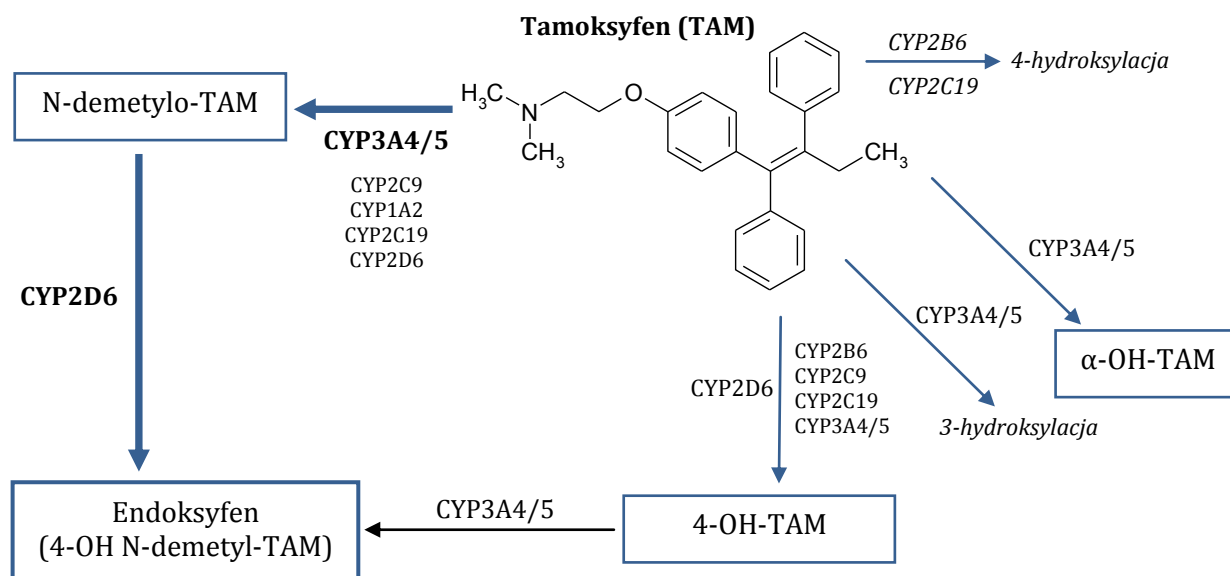
TAMOKSYFEN

Enzym CYP2D6, zwany hydroksylazą debryzochiny, jest jednym z najlepiej poznanych izoenzymów cytochromu P450, wykazujących zmienność genetyczną. Z klinicznego punktu widzenia polimorfizm tego izoenzymu jest niezmiernie istotny. CYP2D6 katalizuje bowiem reakcje utleniania około 25 - 30% wszystkich stosowanych obecnie leków, w tym β -blokerów, leków antydepresyjnych, neuroleptyków, leków antyarytmicznych, jak również leków przeciwnowotworowych [Mathijssen i Shaik, 2006]. Znanych jest około 100 alleli *CYP2D6*, spośród których ponad 20 znacząco zmienia metabolizm leków będących substratami tego enzymu. W populacji kaukaskiej najczęściej występuje allel dziki *CYP2D6*1*, warunkujący prawidłową aktywność enzymu. Spośród alleli odpowiedzialnych za defekt enzymatyczny CYP2D6 w tej populacji największe znaczenie kliniczne mają: *CYP2D6*3*, *CYP2D6*4* i *CYP2D6*5*. Pozostałe allele warunkujące obniżoną aktywność enzymu CYP2D6, charakterystyczne dla innych populacji, to: *CYP2D6*10* i *CYP2D6*17* [Yo i wsp., 2002]. Kliniczne konsekwencje wynikające z genetycznego defektu utleniania na drodze CYP2D6 dotyczą również terapii przeciwnowotworowych. Jednym z chemioterapeutyków metabolizowanych przez ten enzym jest tamoksyfen. Jest to pierwszy niesteroidowy antyestrogen należący do I generacji selektywnych modulatorów receptorów estrogenowych. Hamuje on podjednostkę AF-2 receptora estrogenowego, blokując w ten sposób wiązanie estrogenu i uniemożliwiając jego działanie. Właściwości te kwalifikują go do stosowania

w leczeniu raka piersi, jak również w jego zapobieganiu [Cuzick i wsp., 2007]. Metabolizm tamoksyfenu jest złożony. Lek podlega reakcji enzymatycznej I i II fazy. Przechodzi oksydację do N-demetylotamoksyfenu i 4-hydroksy-tamoksyfenu katalizowaną kolejno przez CYP3A4/5 i CYP2D6. Oba pierwotne metabolity są następnie przekształcone do endoksyfenu. Reakcja wytworzenia endoksyfenu z N-demetylotamoksyfenu jest katalizowana przez CYP2D6, natomiast z 4-hydroksy-tamoksyfenu przez CYP3A4/5. Antyestrogenowa aktywność endoksyfenu i 4-hydroksytamoksyfenu jest znacznie wyższa niż tamoksyfenu. Endoksyfen ma 5 – 10 krotnie wyższe stężenie w osoczu w porównaniu

⁸ **Klirens leku** określany jest jako objętość dystrybucji V_d (czyli hipotetyczną objętość płynów organizmu, w których lek, w stanie stacjonarnym miałby podobne stężenie jak we krwi) oczyszczona z leku w jednostce czasu, ze znaną stałą szybkością eliminacji. Określenie klirensu leku jest alternatywną metodą oceny szybkości eliminacji leku z organizmu (niezależną od modelu farmakokinetycznego) [Szałek i wsp., 2007].

z 4-hydroksytamoksyfenem, co sugeruje, że jest on odpowiedzialny za aktywność tamoksyfenu [Stearns i wsp., 2003].

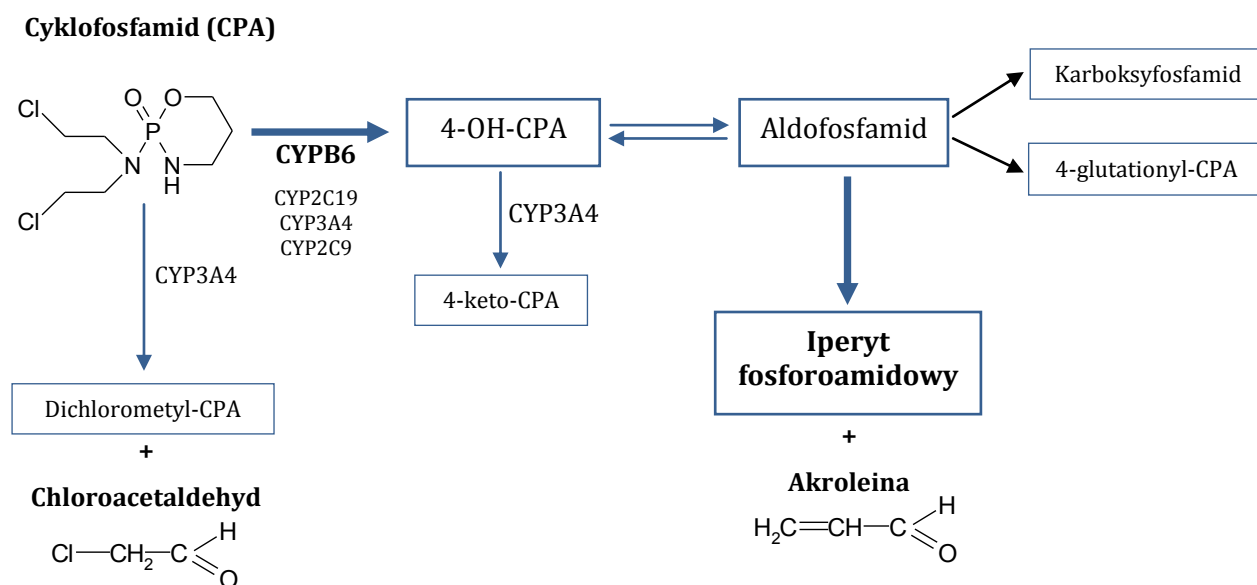


Rys. 6. Główne szlaki biotransformacji tamoksyfenu. Kluczową rolę w przemianach odgrywają izoenzymy CYP2D6 i CYP3A4. Pozostałe, CYP2C19, CYP2C9, CYP2B6 i CYP1A2 w niewielkim stopniu metabolizują związek [Stearns i wsp., 2003].

U chorych, ze słabą aktywnością izoenzymu CYP2D6 (genotyp PM/PM), wykazano niższe stężenie endoksyfenu w osoczu niż u pacjentów z prawidłowym metabolizmem CYP2D6. Potwierdziło to rolę CYP2D6 w powstawaniu endoksyfenu. W badaniu przeprowadzonym przez *North Central Cancer Treatment Group* (NCCTG) analizowano wpływ genotypu CYP2D6 na wynik leczenia uzupełniającego tamoksyfenem. Badaniem objęto chore na raka piersi po menopauzie, z dodatnimi receptorami ER. U pacjentek z genotypem PM/PM wykazano krótszy czas wolny od nawrotu [Goetz i wsp., 2005]. Kolejne retrospektywne badanie również dotyczyło chorych z pierwotnym, inwazyjnym rakiem piersi otrzymujących adjuwantową monoterapię tamoksyfenem. Analizowano wielkość guza i status węzłów chłonnych. U pacjentek z obniżoną aktywnością CYP2D6 (PM/PM; IM/IM; IM/PM; EM/PM) stwierdzono krótszy czas do nawrotu choroby w porównaniu z chorymi prawidłowo metabolizującymi (IM/EM; EM/EM). Zależności takiej nie odnotowano w stosunku do całkowitego czasu przeżycia [Schroth i wsp.] W innej grupie chorych z genotypem PM/PM zaobserwowano wyższy odsetek zgonów z powodu raka piersi w porównaniu z pacjentkami z genotypem EM/EM [Bijl i wsp., 2009]. Powyższe badania potwierdzają rolę, jaką odgrywa CYP2D6 w aktywacji tamoksyfenu. Chore z obniżonym metabolizmem CYP2D6 z powodu czynników genetycznych i/lub środowiskowych są mniej wrażliwe na zastosowane leczenie w porównaniu z pacjentkami, u których metabolizm ten jest prawidłowy.

CYTOSTATYKI ALKILUJĄCE - CYKLOFOSFAMID I ISOFOSFAMID

Jednym z głównych izoenzymów aktywujących proleki jest CYP2B6. Ujawniono obecność kilku zmutowanych alleli genu *CYP2B6*, spośród których *5, *6 i *7 warunkują upośledzoną czynność enzymu. Przy udziale tego izoenzymu metabolizowanych jest wiele stosowanych leków do ich aktywnej formy, w tym: cyklofosfamid, ifosfamid, tiotepa i prokarbazyna (tabela 2). Do aktywacji cyklofosfamidu dochodzi w wątrobie, gdzie CYP2B6, CYP2C19, CYP3A4 i CYP2C9 katalizują powstanie aktywnego metabolitu pośredniego 4-hydroksy-cyklofosfamidu, będącego w równowadze tautomerycznej z aldofosfamidem. Podlega on dalszym reakcjom, z wytworzeniem aktywnych i nieaktywnych form leku. Nieaktywne formy cyklofosfamidu to 4-ketocyklofosfamid, karboksyfosfamid, 4-glutationylfosfamid. Aktywnymi metabolitami cyklofosfamidu są iperyt fosforoamidowy, który tworzy za pomocą grupy alkilowej wiązanie kowalencyjne w obrębie nici DNA oraz akroleina, która uszkadza błonę śluzową pęcherza moczowego. Alternatywną drogą przemiany cyklofosfamidu jest oksydacja łańcucha bocznego prowadząca do uwolnienia chloroacetaldehydu (CAA), który zmniejsza wewnątrzkomórkowe stężenie glutationu, którego nadmiar powoduje oporność nowotworu na leczenie [Chang i wsp., 2007].



Rys. 7. Główne szlaki biotransformacji cyklofosfamidu. Kluczową rolę w przemianach odgrywają izoenzymy CYP2B6, mniejszą CYP3A4, CYP2C19 i CYP2C9 [Chang i wsp., 2007].

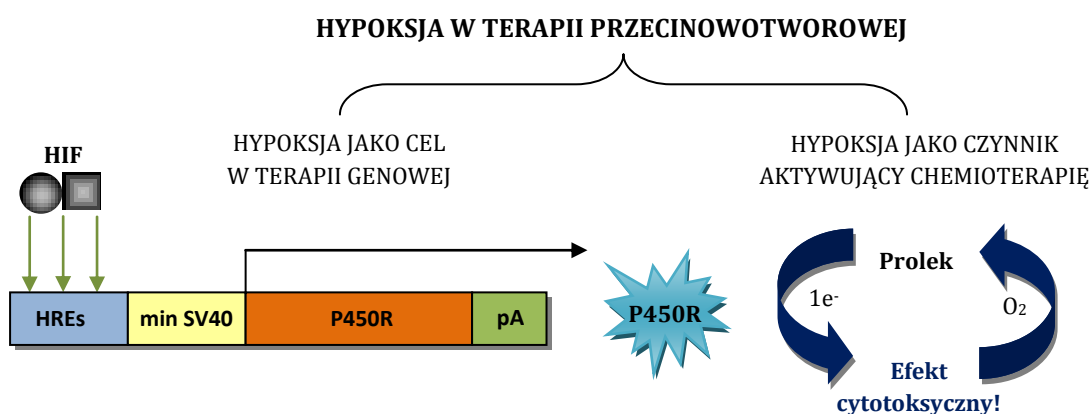
Czynniki wpływające na zmianę ekspresji genów izoenzymów cytochromu P450 zaburzają równowagę pomiędzy przemianami prowadzącymi do aktywnych metabolitów, a powstawaniem nieaktywnych, toksycznych produktów. U pacjentów PM metabolizm cyklofosfamidu do jego aktywnej pochodnej hydroksylowej jest zahamowany, co wywołuje osłabiony efekt terapeutyczny przy danej dawce. Zwrócono uwagę na związek pomiędzy

*CYP2B6**6 a wysokim klirensiem i krótszym okresem półtrwania cyklofosfamidu. Przeprowadzone badania wykazały również wpływ polimorfizmu *CYP2C9*, *CYP2C19* oraz *CYP3A4* na przemianę cyklofosfamidu do jego aktywnych hydroksy-metabolitów. W badaniu zastosowano dwie linie komórkowe: limfoblasty pozbawione prawidłowego genu *CYP2C9* oraz komórki zawierające izoenzym o prawidłowej aktywności enzymatycznej. Efekt cytotoksyczny leku alkilującego oceniany był poprzez poddaniu działaniu cyklofosfamidu, dwóch linii komórkowych. Komórki z prawidłową aktywnością białka były bardziej wrażliwe na jego działanie w stosunku do komórek pozbawionych prawidłowego genu. Badania potwierdziły, że dla biotransformacji leku z proleku do formy wykazującej aktywność przeciwnowotworową niezbędny jest prawidłowy gen *CYP2C9*, czyli u osób z fenotypem PM większość leku pozostanie w formie niedostępnej [Zhou i wsp., 2000].

II.1.1.3. Cytochromy P450 w eksperymentalnych terapiach przeciwnowotworowych

Bioredukcyjne leki to związki, które do aktywności cytotoksycznej wymagają aktywacji na skutek działania określonych czynników takich jak, zmiana pH, reakcji enzymatycznej itp. W połączeniu z chemoterapią lub radioterapią mogą skutecznie hamować rozwój guza. W ich aktywacji bowiem często biorą udział izoenzymy cytochromu P450. Biorąc pod uwagę fakt, że występują one również w komórkach nowotworowych (patrz podrozdz. II.2.1), gdzie powinna następować aktywacja proleku, enzymy P450 stały się nowym celem terapeutycznym. Zyskały one znaczenie w subpopulacji komórek nowotworowych będących czasowo lub stale niedotlenione [Lee i Wilson, 2000]. Regiony niedotlenione stanowią bowiem poważny problem w przypadku prób leczenia nowotworu za pomocą radio- bądź chemoterapii, gdyż komórki te schowane we wnętrzu guza nie są wrażliwe na tego typu zabiegi. Można jednak wykorzystać tę cechę guza w walce z nim. By tego dokonać zaczęto szukać substancji, które mogłaby być podawane choremu i które hamowałaby wzrost lub niszczyłaby komórki niedotlenione guza. Będą to związki, które pozostają nieczynne w komórkach dobrze dotlenionych, natomiast aktywnie działają w komórkach cierpiących na deficyt tlenu. Idealnym rozwiązaniem byłoby, gdyby wiązały się z DNA na tyle silnie by być toksyczne dla komórki, a jednocześnie na tyle słabo by móc dyfundować do sąsiednich komórek guza, tzw. *bystander effect* – substancja o działaniu cytotoksycznym działa nie tylko na komórki, w których się znajduje, ale i na te przyległe do nich. Jednym z kandydatów spełniających powyższe założenia okazał się AQ4N (di-N-tlenek 1,4-bis[(2-dimetyloaminoetylo)-amino] 5,8-dihydroksyantraceno-9,10-dionu). Związek ten posiada bardzo słabe powinowactwo do DNA i jest w zasadzie nietoksyczny dla organizmu. Jednakże w warunkach niedotlenienia komórki ulega on enzymatycznej redukcji przechodząc do AQ4. AQ4 bardzo silnie wiąże się z DNA, a ponadto jest silnym inhibitorem

topoizomerazy [Paterson i McKeown, 2000]. Wykazano, że AQ4N ulega aktywacji do AQ4 przez endogenne enzymy komórki, a dokładnie przy udziale izoenzymu CYP1A1 oraz 2B6 wraz z reduktazą NADPH:cytochrom P450 [Yakkundi i wsp., 2006]. Wiedza ta umożliwia zaprojektowanie celowanej terapii genowej w warunkach ograniczonego dostępu tlenu. Po pierwsze celem może tu być konkretny prolek który ulega szybszej redukcji w warunkach hypoksji (ang. *hypoxia-selective cytotoxic prodrug*), po drugie ograniczony dostęp tlenu może indukować ekspresję enzymów metabolizujących poprzez wprowadzenie odpowiednio skonstruowanych plazmidów z regionem promotorowym regulowanym hypoksją (ang. *hypoxia-targeted gene therapy*) [Cowen i wsp., 2004; Binley i wsp., 2003].



Rys. 8. Schemat prezentujący dwa sposoby zastosowania warunków hypoksji w terapii celowanej. W pierwszym z nich do komórki wprowadzany jest wektor kodujący reduktazę cytochromu P450 pod kontrolą promotora specyficznego dla czynnika transkrypcyjnego HIF (ang. *hypoxia induced factor*). Białko to w warunkach niedoboru tlenu pobudza ekspresję P450R. Hypoksja jest również czynnikiem warunkującym właściwy efekt cytotoksyczny w przypadku zastosowania w terapii proleku, który ulega szybszej redukcji w warunkach ograniczonego dostępu tlenu.

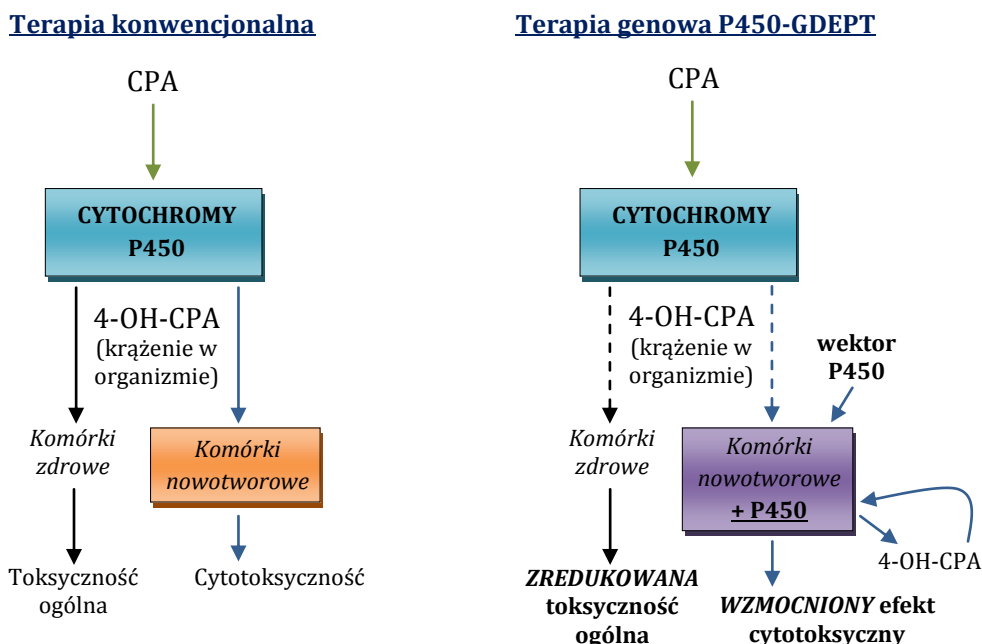
HRE - sekwencja genomowa ang. *hypoxia response element*; minSV40 – sekwencja promotora pochodząca z wirusa SV40; P450R – reduktaza NADPH:cytochrom P450; pA – fragment poliadenylowy lub inaczej poli-A

AQ4N podawany jako środek mający wspomagać chemoterapię daje znakomite wyniki terapeutyczne. W widoczny sposób wzmacnia działanie takich cytostatyków jak cyklofosfamid, cisplatyna czy tiotepa. Zastosowanie takiej kombinacji leków pozwala zmniejszyć dawkę kliniczną cyklofosfamidu o 50% aby otrzymać te same efekty w walce z guzem [Paterson i wsp., 2000]. Podobny efekt terapeutyczny uzyskuje się stosując AQ4N razem z promieniowaniem jonizującym. Również tego typu kombinacja w widoczny sposób hamuje wzrost guza (ponad 40% wyższe zahamowanie niż samo promieniowanie). Raz zredukowany AQ4N przez CYP1A1 będzie istniał w komórkach niedotlenionych i będzie powodował śmierć każdej takiej komórki wchodzącej w cykl podziałowy spowodowany zniszczeniem komórek dotlenionych. Sam AQ4 jest na tyle stabilny, że będzie aktywnie wiązał się do DNA komórki, w której powstał, tak długo jak długo pozostaje ona żywa. Kiedy w końcu AQ4 doprowadzi do śmierci komórki lub też, gdy występuje w komórce zbyt duże

jego stężenie, może on przemieszczać się do sąsiednich komórek wiążąc się silnie do ich DNA [Paterson i McKeown, 2000].

Jak już wcześniej wspomniano, toksyczność towarzysząca konwencjonalnej chemioterapii przeciwnowotworowej jest spowodowana przede wszystkim brakiem wybiórczości działania cytostatyków wobec komórek docelowych. Pożądaną selektywność można osiągnąć przez zastosowanie terapii genowej. Jedną z metod będących taką formą eksperymentalnej terapii przeciwnowotworowej jest enzymatyczna aktywacja proleku w genowo zmienionych komórkach rakowych, tzw. koncepcja z ang. „**Gene-Directed Enzyme Prodrug Therapy**” (GDEPT) [Springer i Niculescu-Duvaz, 1996]. Polega ona na tym by do komórek nowotworowych wprowadzić geny enzymów aktywujących metabolizm, co prowadziłoby do aktywnych produktów. Nadekspresja genów enzymów prowadzi z kolei do aktywacji podawanych nieczynnych proleków do aktywnych substancji cytotoksycznych, które powinny doprowadzić do śmierci komórki.

Ostatnie intensywnie badana wykazały możliwość zastosowania w terapii genowej GDEPT cyklofosfamidu i ifosfamidu oraz aktywujących je cytochromów P450 (w tzw. P450-based Enzyme Prodrug Therapy) (rys.8). Badania te prowadzone głównie w Stanach Zjednoczonych zostały podsumowane w kilku pracach [Chen i Waxman, 2002; Kan i wsp., 2002; Patterson i wsp., 2003]. Terapia cyklofosfamidu i ifosfamidu oraz wykorzystanie retrowirusowego nośnika plazmidów kodujących izoenzymy CYP2B6 i CYP3A4 znajduje się w II fazie badań klinicznych.



Rys. 8. Porównanie terapii konwencjonalnej oraz strategii genowo ukierunkowanej terapii GDEPT z wykorzystaniem cyklofosfamidu [Riddick i wsp., 2005].

Wykazały one, że wrażliwość transferowanych izoenzymem komórek nowotworowych na działanie obu związków była zdecydowanie wyższa od linii z tzw. wektorem „zerowym”. Należy pamiętać, że w terapii konwencjonalnej dodatkowym niekorzystnym czynnikiem jest występowanie działania toksycznego cytostatyku na inne, zdrowe komórki. W terapii GDEPT toksyczny efekt jest wyraźnie zredukowany, a jednocześnie wzmożony efekt cytotoksyczny dzięki wyższemu stężeniu aktywnego metabolitu 4-OH-CPA. Dodatkowo wykazano, że aktywacja cyklofosfamidu wynikająca ze zwiększonej ekspresji *CYP2B6* i wzrost stężenia w komórce nowotworowej aktywnych metabolitów 4-OH-CPA, powoduje spadek mitochondrialnego potencjału błonowego, dalej, uwolnienie cytochromu c i nieodwracalną śmierć komórek. Standardowy mechanizm działania cyklofosfamidu w komórkach jest blokowany w niektórych typach nowotworów, w których występuje podwyższona ekspresją czynnika antyapoptotycznego, białka Bcl-2, hamującego proces uwolnienia z mitochondriów cytochromu c. Nowotwory te stają się odporne na terapię cytostatykami alkilującymi, w tym cyklofosfamidem. Wyższe stężenie aktywnych metabolitów uzyskane w terapii P450-GDEPT z użyciem cyklofosfamidu, w porównaniu do terapii konwencjonalnej, którego skutkiem jest wyższy poziom uwolnionego z mitochondriów cytochromu c, umożliwia silniejszą aktywację kaspazy-9 i innych białek proapoptotycznych, a tym samym skierowanie komórki na drogę apoptozy [Shwartz i wsp., 2002].

Doskonałym czynnikiem selektywnie dostarczającym prolek do komórek nowotworowych, nie uszkadzającym komórek zdrowych, są wirusy. Idealny wektor wirusowy powinien być zdolny do replikacji w komórce docelowej, co umożliwiłoby przenoszenie efektu terapeutycznego na sąsiednie komórki guza. Do tworzenia takich wektorów próbuje się wykorzystać m.in. adenowirusy. Przykładem jest zastosowanie wektora **Adeno-P450**, który jest nosicielem proleku - cyklofosfamidu oraz genów *CYP2B6* i reduktazy P450. Razem z nim do komórek wprowadzany jest wektor pomocniczy, pomagający w replikacji obu wektorów w komórkach nowotworowych, ponieważ wektor z prolekiem nie jest zdolny do powielania materiału genetycznego. Wektorem „pomocnikiem” jest wektor ONYX-O17, który skonstruowany został wykorzystując fakt, że ponad 50% ludzkich nowotworów ma zmutowaną i niefunkcjonalną formę białka p53. Zmodyfikowany wirus-vektor ONYX nie jest zdolny do powielania się w komórkach prawidłowych z aktywnym p53, natomiast powiela się w komórkach z niefunkcjonalnym białkiem p53. Jego intensywne namnażanie się prowadzi do lizy komórki nowotworowej, a uwolnione potomne cząstki wirusowe zakażają sąsiednie komórki nowotworowe, prowadząc do ich zniszczenia [Jounaidi i Waxman, 2004].

Wektory herpeswirusowe, podobnie jak adenowirusowe, także mogą być nosicielami proleków. Przykładem takiego wektora jest **rRp450**, w który wprowadzono dużą delecję genu *UL39* oraz insercję transgenu szczurzego *CYP2B1*. Wektor ten jest również nośnikiem cyklofosfamidu. Enzym kodowany przez gen *CYP2B1* umożliwia aktywację proleku CPA,

natomiast delecja *UL39* zapewnia zdolność replikacji rRp450 w komórkach nowotworowych. W odróżnieniu od wektorów adenowirusowych, wektory herpeswirusowe mają endogenny gen HSV-TK, kodujący enzym odpowiedzialny za aktywację proleku – gancyklowiru. Synergizm tych dwóch proleków zapewnia lepszy efekt terapeutyczny. Onkologiczną aktywność wektora rRp450 zaobserwowano w komórkach raka okrężnicy [Pawlik i wsp., 2002; Aghi i wsp., 1999].

Podsumowując, genowo ukierunkowana terapia enzym – prolek, mająca na celu zwiększenie ekspresji genów kodujących izoenzymy cytochromu P450, zwiększając tym samym efektywność przemian prolek – lek, prezentuje kilka ważnych i praktycznych zalet, które mogą udoskonalić dotychczasowe schematy leczenia raka. Terapia GDEPT może być stosowana jako terapia uzupełniająca, traktowana jako „dodatek” szczególnie w terapiach nowotworów opornych na leczenie konwencjonalne. Komórki transfekowane plazmidami zawierającymi geny izoenzymów P450 stają się wówczas swoistą fabryką „aktywnych metabolitów”, które mogą dyfundować do komórek przylegających.

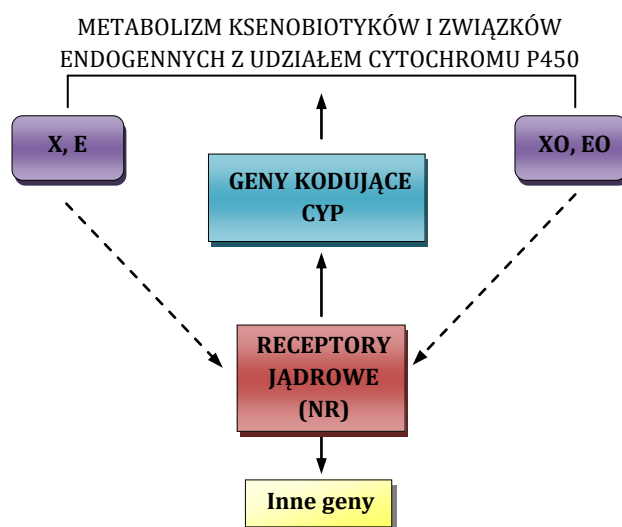
II. 2. REGULACJA EKSPRESJI ISOENZYMÓW CYTOCHROMU P450.

Jak wspomniano, aktywność katalityczna i poziom izoenzymów cytochromu P450 w różnorodnych tkankach zależy nie tylko od profilu genetycznego pacjenta, ale również od wpływu czynników zewnętrznych, w tym kontaktu z ksenobiotykami [Hewitt, 2007]. Obecność ksenobiotyków w organizmie może mieć wpływ na indukcję ekspresji określonych izoenzymów cytochromu P450 i wpływać, podobnie jak polimorfizm ich genów, na zróżnicowany metabolizm leków. Fakty te mają konsekwencje w efektach terapeutycznych, szczególnie w przypadku leków przeciwnowotworowych, których stosowanie, jak opisano wcześniej, charakteryzuje się wąskim przedziałem indeksu terapeutycznego.

Prace wielu autorów wskazują, że zmiana ekspresji genów cytochromu P450 ma wpływ na odpowiedź biologiczną indukowaną w komórkach nowotworowych przez ksenobiotyki, w tym prokancerogeny oraz cytostatyki. Wyniki badań dotyczą głównie wpływu tych czynników na procesy apoptozy, przy czym wykazano, że nadekspresja cytochromu P450 może zarówno hamować jak i wzmacniać efekt apoptozy indukowany przez te związki. Stwierdzono na przykład, że hamowanie aktywności cytochromu P450 przez proadifen (SKF525A) wywołuje m.in. zwiększoną przeżywalność komórek i chroni przed apoptozą indukowaną przez kwas all-trans retinoidowy w komórkach białaczki mieloblastycznej HL-60 [Hoffmanowa i wsp., 2000]. Z drugiej strony, efekt apoptozy wywołany przez terfenedynę, która jest silnym antagonistą receptora histaminowego H1, nie był wrażliwy na szlak sygnałowy receptora histaminowego, natomiast został wzmocniony przez silny inhibitor cytochromu P450, ketokonazol, w komórkach nowotworowych HepG2 i COLO205 [Wang

i wsp., 2002]. Są również doniesienia o wpływie nadekspresji CYP1A1/1A2 na efekt apoptozy wywołanej przez związki toksyczne. Wykazano, że indukcja CYP1A1 przez 4-chlorobifenyl w komórkach nowotworu piersi MCF-7, silnie wzmacniała efekt apoptozy hamowany przez estradiol [Ptak i wsp., 2010].

Rolę modulatorów transkrypcji genów izoenzymów cytochromu P450 pełnią receptory jądrowe, PXR, CAR i PPAR oraz czynnik transkrypcyjny AhR, zwane ogólnie receptorami ksenobiotyków. Geny kodujące izoenzymy CYP wraz z receptorami jądrowymi mogą tworzyć siatkę powiązań i zależności, w których enzymy metabolizując specyficzne ligandy receptorów, wpływają na ich odpowiedź prowadzącą do indukcji ekspresji genów kodujących te enzymy. Zależność ta ma zatem charakter regulacji typu sprzężenia zwrotnego, co przedstawia rys. 9. Ligandami receptorów jądrowych są bowiem nie tylko związki egzogenne, bądź endogenne, ale również ich aktywne farmakologicznie metabolity.



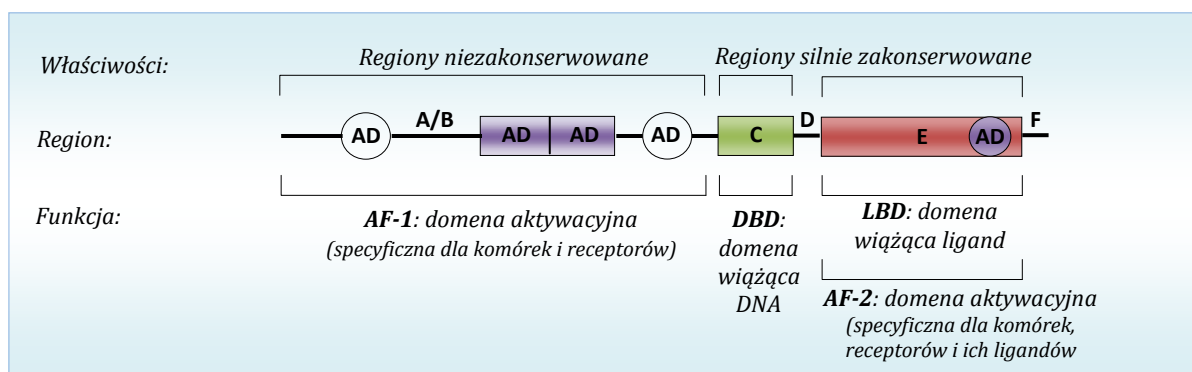
Rys. 9. Wzajemne zależności pomiędzy receptorami jądrowymi (NR), ich ligandami, a izoenzymami cytochromu P450, gdzie: X – ksenobiotyk, E – związek endogenny, XO, EO – produkty metabolicznej aktywacji [Honkakoski i Negishi, 2000].

II. 2.1. Charakterystyka wybranych receptorów jądrowych.

Wśród czynników transkrypcyjnych wyodrębniono białka z rodziny bHLH-PAS i receptory jądrowe, do których należą: hormonalne receptory jądrowe (NHR – ang. *Nuclear Hormone Receptor*). Przedstawicielem bHLH-PAS jest czynnik AhR (ang. *aryl hydrocarbon receptor*) aktywowany przez wielopierścieniowe związki organiczne, w tym dioksyny i ich pochodne [Vanden Heuvel, 2002]. Hormonalne receptory jądrowe tworzą rodzinę białek, w obrębie której wyróżniono trzy główne klasy. Klasę I reprezentują receptory steroidowe, do których należą receptory: progesteronowy (PR), estrogenowy (ER), glukokortykoidowy (GR), androgenowy (AR) i mineralokortykoidowy (MR). Receptory tyroidowe stanowią II klasę, w skład której wchodzi receptor tyroidowy (TR), receptor witaminy D (VDR) i receptor kwasu

retinolowego (RAR) [Bain i wsp., 2007]. Klasę III tworzą tzw. receptory „sierocę” (ang. *orphan receptors*), do których należą: receptor pregnanu X (PXR), konstytutywny receptor androstanu (CAR), receptor aktywowany przez proliferatory peroksyosomów (PPAR), wątrobowy receptor X (LXR), receptor kwasów żółciowych (FXR) i receptor retinoidowy X (RXR) [Synold i wsp., 2001]. Wszystkie wymienione czynniki transkrypcyjne określono mianem receptorów ksenobiotyków (XR), ponieważ aktywność biologiczna związków egzogennych zależy bezpośrednio od tych receptorów [Vanden Heuvel, 2002].

Receptory jądrowe wykazują w obrębie całej rodziny podobieństwa strukturalne i funkcjonalne. W ich strukturze wyróżnia się w rejonie N-końcowym domenę A/B, następnie D i F, które wykazują różnorodność w zależności od rodzaju receptora. Domeny silnie zakonserwowane, o sekwencji zachowanej w ewolucji to domena wiążąca ligand (LBD), położona centralnie domena wiążąca DNA (DBD) (rys. 10).

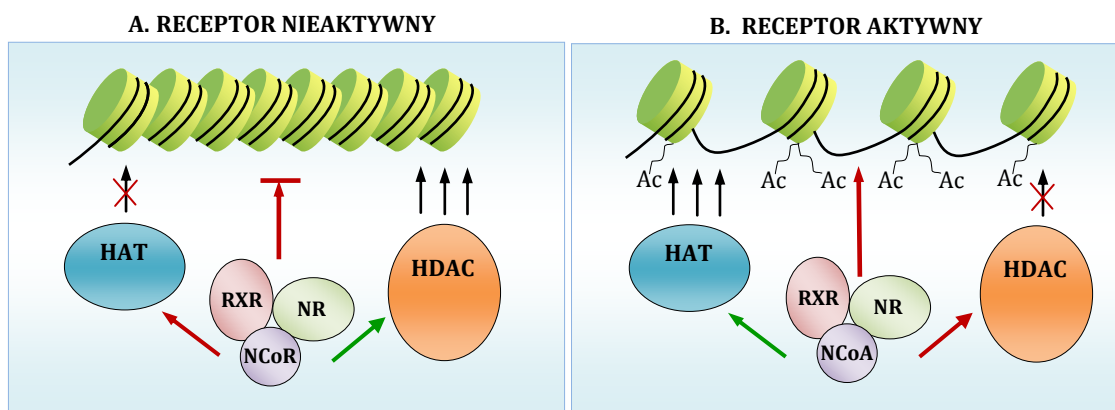


Rys. 10. Schemat ilustrujący strukturalną budowę receptorów jądrowych oraz funkcje każdej z domen. Silnie zakonserwowanymi ewolucyjnie regionami są domeny: DBD – wiążąca DNA oraz LBD – wiążąca ligand (odpowiednio kolor zielony i czerwony). Regiony zróżnicowane ewolucyjnie to domeny A/B, D i E. Domeny AD to domeny aktywacyjne [Gronemeyer i wsp., 2004].

Domena DBD składa się z dwóch palców cynkowych, stanowiących motyw umożliwiający rozpoznanie sekwencji i związanie się białka do dużego rowka DNA w miejscu regulatorowym genu docelowego. Domena ta wiąże się z sekwencją zawierającą powtórzenia AGAACA lub AGGTCA. Powtórzenia tworzą sekwencje zgodne, które mogą być proste (DR), odwrócone (IR) lub naprzeciwległe (ER). Domena LBD składa się z α -helis osłaniających hydrofobowy rdzeń będący miejscem wiązania z ligandem. Zawiera również sygnał kierujący do jądra komórkowego oraz motyw odpowiedzialny za zmianę konformacji receptora pod wpływem związania z ligandem lub agonistą. Na C-końcu LBD znajduje się motyw AF-2, o sekwencji Leu-X-X-X-X-Leu, którego rolą jest aktywacja transkrypcji. Podobną rolę pełni AF-1. W regionach domen AF znajdują się też sekwencje wiązania specyficznych koaktywatorów oraz sekwencje warunkujące powinowactwo receptora do określonych promotorów. Pomiędzy domeną DBD i LBD znajduje się region zawiasowy,

który pozwala na zmienność konformacji białka pod wpływem wiązania z ligandem. Jest miejscem wiązania się korepresorów transkrypcji i zawiera też sygnał translokacji do jądra [Williams i wsp., 2005].

Przed związaniem do sekwencji regulatorowej w DNA etapem wstępnym mechanizmu działania receptorów jądrowych jest modyfikacja struktury chromatyny, prowadząca do jej rozluźnienia. W sytuacji, gdy receptor nie jest aktywny, chromatyna występuje w formie skondensowanej (rys. 11A), gdyż reszty lizyn w histonach nie są zacetylowane i dostęp do DNA jest utrudniony. W takim wypadku hetero dimer receptora NR i RXR może wiązać specyficzne korepresory, NCoR1/2 lub SMRT, oddziałujące z deacetylazami histonowymi (HDAC). Konsekwencją tego stanu jest zahamowanie transkrypcji [Xu i wsp., 1999].



Rys. 11. Schemat działania receptorów jądrowych (na podstawie [Monostory i Pascucci, 2008; Raun i wsp., 2005]). A: nieaktywny heterodimer receptorów NR i RXR, przylega białka korepresorowe (NCoR), które oddziałują z deacetylazą histonową, HDAC, uniemożliwiając rozluźnienie chromatyny; B: aktywny receptor indukuje zmiany konformacyjne tak, że w miejsce korepresora przylega się koaktywator (CoA). Koaktywator aktywuje acetylotransferazę histonową, HAT i białka histonowe ulegają acetylacji, co powoduje zmniejszenie ich powinowactwa do DNA, rozluźnienie struktury chromatyny, a przez to udostępnienie rejonów genu dla czynników transkrypcyjnych.

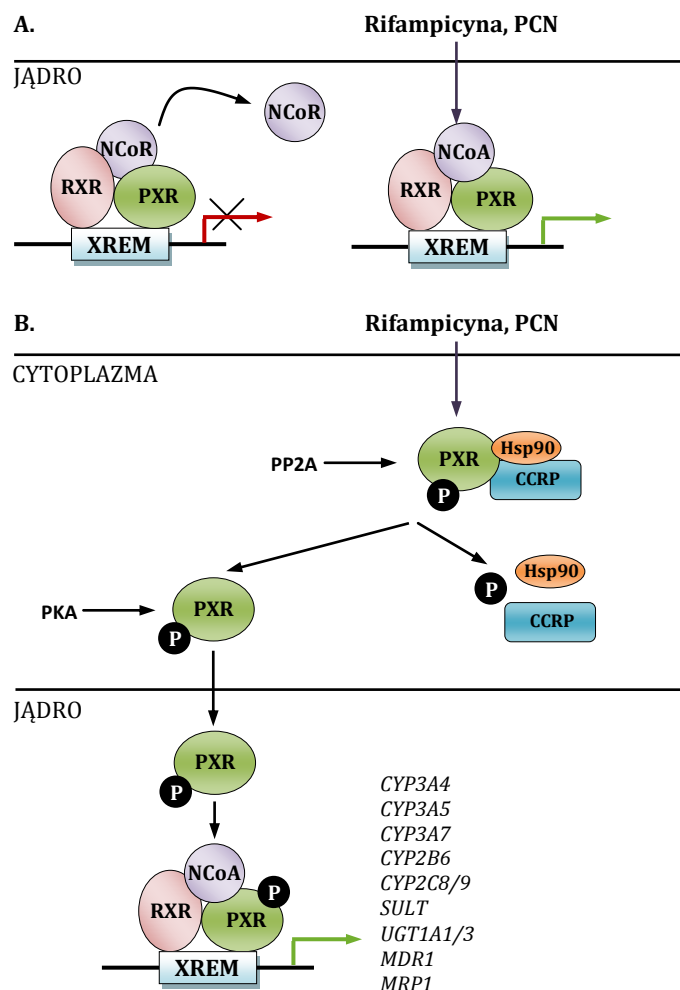
W odpowiedzi na aktywację receptora, np. poprzez wiązanie z ligandem lub poprzez fosforylację, znacząco zmienia się struktura domeny wiążącej ligand, prowadząc do zmiany położenia domeny aktywacyjnej AF-2 (rys. 11B). Następuje wówczas dysocjacja korepresora, którego zastępuje koaktywator, np. SRC-1/3 lub p300/CBP. Koaktywator aktywuje acetylotransferazę histonową (HAT) i białka histonowe zostają zacetylowane, co powoduje zmniejszenie ich powinowactwa w stosunku do DNA. W konsekwencji obserwuje się rozluźnienie struktury chromatyny, dzięki czemu odpowiednie rejon genów stają się dostępne. W ten sposób lub poprzez inne działanie koaktywatora aktywowane są kolejne białka i kompleks transkrypcyjny przechodzi do stanu aktywnego, co umożliwia przyłączenie polimerazy RNA II [Ruan XZ i wsp., 2005]. Należy zwrócić uwagę, że wpływ NR na ekspresję genów docelowych jest przedmiotem regulacji na etapie wyboru miejsca wiązania z DNA,

selektywnej dimeryzacji, wiązania ligandów i koaktywatorów. Niektóre czynniki transkrypcyjne mogą konkurować o te same koaktywatory lub hamować transkrypcję genów przez oddziaływanie z innymi czynnikami transkrypcyjnymi. Badania donoszą, że niektóre NR występują zwykle w cytoplazmie i ulegają translokacji do jądra wyłącznie po związaniu liganda.

II. 2.1.1. Receptor pregnanu X (PXR).

Pierwsze doniesienia na temat receptora pregnanu X (PXR) pojawiły się w 1998 roku [Kliewer i wsp., 1998]. Zidentyfikowano wówczas naturalne ligandy PXR, pregnany, od których receptor wzięł swoją nazwę. Receptor PXR jest receptorem „sierocym”, który uczestniczy w indukcji CYP3A, CYP2B i wybranych transporterów (MDR1, MRP1) oraz enzymów II fazy metabolizmu leków (SULT, UGT). Bierze udział w transkrypcji CYP3A4 [Bertlison i wsp., 1998; Blumberg i wsp., 1998] i CYP3A7 [Pascussi i wsp., 1999], jak również w regulacji ludzkich karboksylesteraz hCE-1 i hCE-2 [Xu i wsp., 2009]. Rezultaty ostatnich prac wskazują, że PXR uczestniczy także w transkrypcji lizoform CYP2C9 i CYP2C8 [Pscussi i wsp., 2000]. Receptor PXR występuje przede wszystkim w wątrobie, w jelicie cienkim, w jelicie grubym i w nerkach, gdzie mają miejsce procesy detoksykacji. Ligandami tego receptora są zróżnicowane strukturalnie egzogenne i endogenne związki chemiczne, takie jak: hormony steroidowe i metabolity steroidów (progesteron, estrogen, kortykosteron, 5 β -pregnan i androstanol) [Moore i wsp., 2000].

W nieobecności liganda w cytoplazmie receptor tworzy kompleks z białkami Hsp90 i CCRP (rys. 12). Istnienie kompleksu PXR:Hsp90:CCRP zostało potwierdzone eksperymentalnie. Stwierdzono bowiem, że w wyniku nadekspresji genów kodujących białko CCRP, ilość cząsteczek receptora PXR w cytoplazmie wzrasta [Squires i wsp., 2004]. Przyłączenie liganda aktywuje receptor, co prowadzi do dysocjacji kompleksu z białkami opiekuńczymi i umożliwia transport receptora do jądra. Aktywowany receptor tworzy heterodimer z receptorem α retinoidu X (RXR α), który wiąże się z sekwencją DNA genu CYP3A4 zawierającą odwrócone powtórzenie – ER6 w proksymalnej części promotora oraz z modułem wzmocnionej odpowiedzi na ksenobiotyk (XREM – ang. xenobiotic-repsponsive enhancer module) regulując transkrypcję. Moduł XREM obecny w części dystalnej promotora zawiera wiele charakterystycznych sekwencji wiążących receptor jądrowy, w szczególności motyw obejmujący proste powtórzenie DR3. Zarówno sekwencja DR3 jak ER6 są wymagane dla maksymalnej indukcji ekspresji CYP3A4 poprzez receptor pregnanu X [Svecova i wsp., 2008; Timsit i Negishi, 2007].



Rys. 12. Schemat szlaku przenoszenia sygnału z udziałem receptora pregnanu X (na podstawie [Masi i wsp., 2009]). A: niezwiązany receptor z ligandem może wyciszać ekspresję genów poprzez związanie się kompleksu receptora z białkami Hsp90, CCRP oraz korepresorem (NCoR). B: przyłączenie liganda (np. rifampicyny, PCN) prowadzi do dysocjacji kompleksu z białkami opiekuńczymi i umożliwia transport receptora do jądra, gdzie tworzy heterodimer z RXR. Jednocześnie następuje związanie koaktywatora (NCoA) i dimer PXR/RXR wiąże się do motywu XREM sekwencji DNA, co indukuje transkrypcję mRNA. PXR może być w postaci ufosforylowanej na skutek działania kinazy białkowej A (PKA) co wzmacnia interakcję receptora z koaktywatorem, ale może również występować w formie niefosforylowanej w wyniku aktywności fosfatazy białkowej PP2A, co przyspiesza proces translokacji receptora do jądra komórki.

Warto zaznaczyć, że wiązanie PXR/RXR z regionem DNA zawierającym motyw ER6 i DR3 następuje poprzez przyłączenie białek koaktywatorów tj. SRC-1/3, PBP, PRMT1. Do korepresorów PXR należą: NCoR1, NCoR2- α i NCoR2- τ [Johnson i wsp., 2006; Li i wsp., 2009]. Według ostatnich doniesień czynnikiem limitującym aktywność receptora PXR jest jego fosforylacja. W procesie tym biorą udział kinazy białkowe A, C, Cdk2 oraz p70 S6K, Cdk1, GSK-3 [Pondugula i wsp., 2009]. To czy proces fosforylacji będzie aktywował czy hamował działanie receptora zależy od specyficznego miejsca fosforylacji. Reakcja fosforylacji przeprowadzona przez kinazę białkową A (PKA) wzmacnia efektywność wiązania

się receptora z koaktywatorem. Jednakże, fosforylacja Ser³² receptora RXR hamuje dimeryzację z PXR [Matic i wsp., 2007]. Potranslacyjna modyfikacja NR nie zawsze więc zatrzymuje lub aktywuje proces transkrypcji, ale zmienia powinowactwo receptora do sekwencji promotorowej, o czym świadczy fosforylacja Ser⁶²⁵ receptora RXR. [Timsit i Negishi, 2007].

Zaskakujące były również badania zespołu Greueta z 1997 roku które wykazały, że poziom izoenzymów P450 jest wyraźnie niższy w szybko proliferujących komórkach nowotworu wątroby niż w wyizolowanych hepatocytach płodowych [Greuet i wsp., 1997]. Mechanizm odpowiedzialny za tę inhibicję nie był znany aż do czasu przedstawienia wyników badań przez zespół Lina [Lin i wsp., 2008]. Przedstawiono w nich białkowe inhibitory kinaz Cdk jako aktywatory zależnej od PXR ekspresji CYP w komórkach ludzkiego nowotworu wątroby HepG2. Wykazano, że fosforylacja Ser³⁵⁰ PXR, reszty aminokwasowej znajdującej się w domenie wiążącej DNA (DBD) prowadzi to inhibicji regulowanej przez PXR ekspresji CYP3A4. Cdk2 należy do rodziny kinaz cyklino-zależnych, które są obecne w komórkach dzielących się podczas całego cyklu. Ponieważ jej aktywność jest najwyższa w fazie S cyklu, aktywność receptora PXR jest najniższa w tej fazie. Wynik ten wyjaśnił obserwację niskiej ekspresji izoenzymów P450 w proliferujących komórkach HepG2.

Sugeruje się również, że czynnik transkrypcyjny NF- κ B, który odgrywa kluczową rolę w odpowiedzi immunologicznej na infekcję, hamuje ekspresję *CYP3A4* poprzez zaburzenie interakcji w kompleksie PXR:RXR. NF- κ B przyłącza się do domeny DBD receptora RXR, przez co zaburza proces wiązania się kompleksu do DNA [Gu i wsp., 2006]. Leki przeciwzapalne będą więc hamować ekspresję izoenzymów P450 zależną od receptora PXR. Wykazano, że wyższa aktywność interleukin prozapalnych IL-1, IL-6 oraz TNF- α występująca podczas stanu zapalnego wątroby hamuje ekspresję CYP regulowaną PXR. Dzieje się tak, ponieważ lipopolisacharydy bakteryjne oraz interleukiny IL-1 i TNF- α aktywują działanie czynnika NF- κ B.

PXR jest receptorem o dość szerokiej specyficzności i słabym powinowactwie do ligandów. Na podstawie struktury krystalicznej domeny wiążącej ligand stwierdzono, że hydrofobowa kieszeń, jako miejsce wiązania liganda jest większa niż w większości receptorów jądrowych. W pobliżu kieszeni znajduje się dodatkowa pętla, co prawdopodobnie daje możliwość wiązania się do niej zarówno większych jak i mniejszych ligandów. Co więcej, analiza struktury krystalicznej LBD z wybranym ligandem pozwoliła stwierdzić, że ligand może być umieszczony w niszy domeny w trzech różnych położeniach [Williams i wsp., 2005]. Tak więc PXR odmiennie od innych receptorów jądrowych jest dość „wszechstronnym” receptorem, zdolnym do oddziaływania z wieloma ligandami. Jest też zaangażowany w metabolizm kwasów żółciowych. Z jednej strony może być indukowany

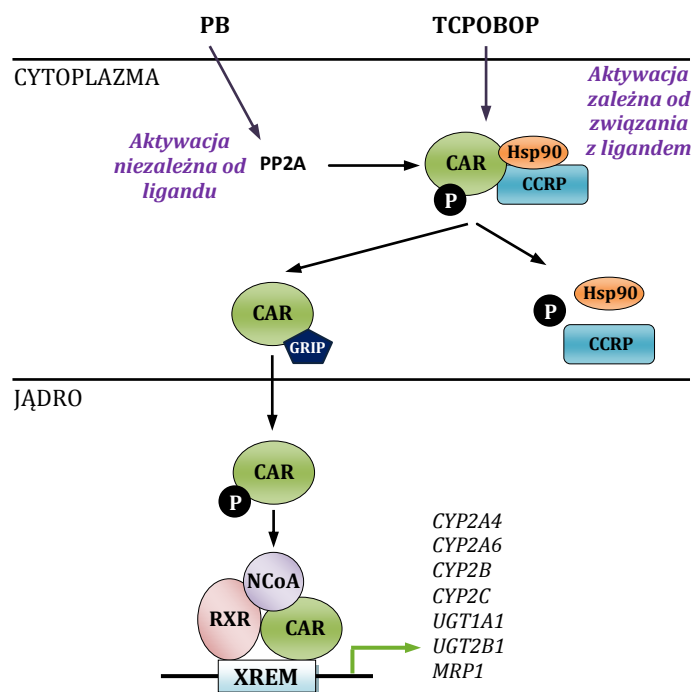
przez kwasy żółciowe, z drugiej strony jest zaangażowany w hamowanie ekspresji genu izoenzymu CYP7A1, katalizującego reakcję biosyntezy kwasów żółciowych z cholesterolu. Dodatkowo, PXR bierze udział w indukcji ekspresji genów białek transformujących kwasy żółciowe do ich nietoksycznych metabolitów oraz genów kodujących białka transportujące te metabolity poza komórkę [Vandel Heuvel, 2002].

II. 2.1.2. Konstytutywny receptor androstanu (CAR).

Receptor CAR występuje głównie w wątrobie, a w mniejszej ilości w jelicie cienkim, żołądku, mózgu, nerkach i płucach [Swales i Negishi, 2004]. W odróżnieniu od większości receptorów jądrowych, które składają się z pięciu domen, CAR posiada trzy: domenę wiążącą DNA, region zawiasowy i domenę wiążącą ligand [Squires i wsp., 2004]. Został początkowo zidentyfikowany jako receptor konstytutywny niewymagający do aktywacji związania z ligandem. Wykazano, że standardowy aktywator CAR, fenobarbital (PB), indukuje ekspresję genów kilku rodzin izoenzymów P450, szczególnie *CYP2B*, jednak nie wiąże się do receptora jako jego ligand. Znalaziono natomiast region regulatorowy genu *CYP2B*, na którego aktywację miał wpływ PB. Region ten nazwany PBREM [Trottier i wsp., 1995; Moore i wsp., 2000] wzbudził nadzieję na identyfikację receptora PB. Jednocześnie, w trakcie niezależnie prowadzonych badań odkryto jądrowy receptor sierocy, tworzący heterodimer z RXR i wiążący się z sekwencją RE DNA. Drugie białko dimeru zidentyfikowano wówczas jako CAR, opierając się na fakcie, że może on aktywować transkrypcję z modułu RE, bez konieczności przyłączenia egzogenego liganda. W wyniku dalszych badań udało się wykazać, że CAR wykryty w kompleksie RXR wiążącym się do sekwencji RE jest tym samym receptorem, który miał wpływ na ekspresję genu *CYP2B* poprzez oddziaływanie z regionem PBREM. Okazało się zatem, że CAR może regulować indukcję z *CYP2B* z udziałem PB. Wykazano też, że w hepatocytach w nieobecności liganda, CAR, podobnie jak PXR, jest zlokalizowany w cytozolu, a jego transport do jądra jest zależny od PB lub od związków o podobnych właściwościach mimo, że są ligandami tego receptora [Williams i wsp., 2005].

Wyniki innych badań udowodniły, że ligandem CAR u myszy jest metabolit testosteronu, androstan, będący odwrotnym agonistą tego receptora. Odwrotnymi agonistami CAR człowieka są oprócz androstanu także polichlorowane węglowodory aromatyczne, chlorowane pestycydy (np. DDT i metoksychlor), lek przeciwgrzybiczny klotrimazol [Moore i wsp., 2000]. Zidentyfikowano też związek o właściwościach selektywnego agonisty CAR, pochodną imidazotiazolu – CITCO [Maglish i wsp., 2003]. W świetle powyższych faktów wydaje się, że działanie receptora CAR może przebiegać co

najmniej dwiema drogami, poprzez jego ligandy będące odwrotnymi agonistami oraz poprzez działanie fenobarbitalu, którego struktura odbiega od agonistów.



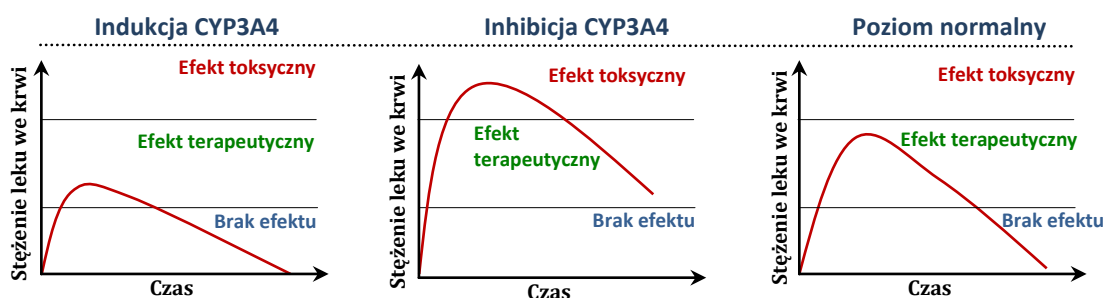
Rys. 13. Schemat szlaku przesyłania sygnału z udziałem receptorów jądrowych CAR (na podstawie [Masi i wsp., 2009]). W nieobecności liganda, w cytoplazmie receptor CAR tworzy kompleks z białkami Hsp90 i CCRP. Po przyłączeniu liganda (TCPOBOP) fosfataza PP2A katalizuje defosforylację Ser²⁰², co prowadzi do translokacji receptora do jądra. W aktywacji szlaku niezależnej od związania liganda z receptorem, fenobarbital (PB) indukuje fosfatazę PP2A, która katalizuje reakcję defosforylacji umożliwiając jego transport do jądra. Tam następują dimeryzacja CAR z RXR. Dimer rozpoznaje specyficzne sekwencje PBREM, aktywując polimerazę RNAII.

Obie drogi prowadzą jednak do umiejscowienia receptora CAR w jądrze komórkowym i wiązania z tą samą sekwencją DNA. Fenobarbital indukuje fosfatazę PP2A, która katalizuje reakcję defosforylacji Ser202 receptora, umożliwiając w ten sposób jego transport do jądra, gdzie być może zachodzi ponowna fosforylacja. W translokacji CAR do jądra mogą uczestniczyć również inne białka, w tym jako przykład receptor GRIP1 (ang. *p160 transcription factor GR-interacting protein 1*) [Xia i Kemper, 2005]. W jądrze receptor CAR oddziałuje z koaktywatorami tj. SRC-1, SMRT, ASC-1, GRIP/TIF2, PGC-1, SMC-1, po czym podobnie jak w przypadku PXR, tworzy się hetero dimer CAR/RXR. W formie dimeru receptor rozpoznaje specyficzną sekwencję PBREM, która jest zachowana w ewolucji u różnych gatunków i zawiera motywy DR3, DR5 i ER6. W następstwie rozpoznania sekwencji następuje oddziaływanie z białkami odpowiedzialnymi za transkrypcję [Maglich i wsp., 2003; Wei i wsp., 2000].

Podsumowując, indukcja ekspresji genów z udziałem PXR i CAR ma wiele punktów styecznych. Oba receptory mogą indukować te same geny poprzez te same sekwencje rozpoznawcze, chociaż rola typowych induktorów rifampicyny i fenobarbitalu w ekspresji tych genów jest odmienna [lhunnah i wsp., 2011]. Stworzono model transgenicznymy myszy, stosując plazmidy ekspresyjne VP-PXR i VP-CAR, aby potwierdzić wzajemną relację pomiędzy receptorami. Wykazano, że aktywacja PXR prowadzi do ciągłej indukcji CYP3A oraz CYP2B [Xie i wsp., 2000] (rys.14). U myszy VP-CAR następowała ekspresja tylko izoenzymów CYP2B, ekspresja CYP3A była jednak indukowana przez fenobarbital [Saini i wsp., 2004]. Zaproponowany model działania PB, nie będącego ligandem CAR, może wskazywać, że mechanizm kowalencyjnej modyfikacji aktywności białka przez fosforylację może być istotny również w przypadku innych receptorów jądrowych.

II. 2.2. Modulacja aktywności receptorów jądrowych przez leki przeciwnowotworowe.

Prace wielu autorów wskazują, że niektóre substancje, w tym stosowane klinicznie leki mogą modulować aktywność izoenzymów cytochromu P450 na poziomie genu. Chociaż indukcja ta jest odpowiedzią adaptacyjną jako ochrona przeciwko działaniu ksenobiotyków, jednakże odpowiedź ta stanowi jednocześnie źródło oddziaływań lek – lek. Analizując geny docelowe dla poszczególnych receptorów jądrowych można zauważyć, że receptory PXR i CAR pośredniczą w regulacji największej liczby enzymów i białek transportujących uczestniczących w biotransformacji leków. Aktywacja tych receptorów wiąże się, z ważnymi z klinicznego punktu widzenia, oddziaływaniami pomiędzy stosowanymi farmaceutykami. Aktywacja PXR i CAR powoduje obniżenie stężenia innych ksenobiotyków i leków, które są przekształcane przez ulegające jednoczesnej indukcji izoenzymy CYP3A i CYP2B. Inhibicja prowadzi do zaś do zwiększenia stężenia toksycznych dla organizmu aktywnych metabolitów (rys. 14.).

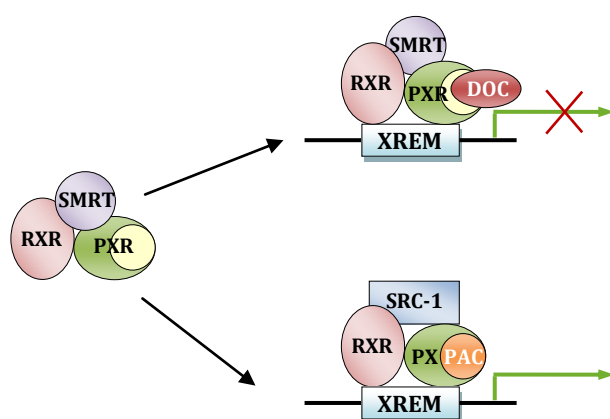


Rys. 14. Pole pod krzywą stężeń (AUC – ang. area under curve) przedstawiające zależność od czasu stężenia leku, metabolizowanego przez izoenzym CYP3A4, jaka dociera do krążenia ogólnego w postaci nie zmienionej, po indukcji bądź inhibicji ekspresji tego izoenzymu [Moreau i Vilarem, 2008].

II. 2.2.1. Indukcja receptorów PXR i CAR.

Klasycznymi induktorami receptorów PXR i CAR są takie związki jak rifampicyna, prednizolan, karbamazepina, fenytoina, klotrimazol, cyklosporyna, hyperforyna. Choć nie są to leki przeciwnowotworowe, często stosowane są jako leki wspomagające w terapii przeciwnowotworowej. Przykładem jest zastosowanie rifampicyny, jako półsyntetycznego antybiotyku stosowanego w przypadku zapalenia szpiku i kości, u dzieci z przewlekłą białaczką szpikową (CLM) po przeszczepie szpiku kostnego. Wykazano, że znacząco zmniejsza się efektywność działania cyklosporyny, metabolizowanej przez CYP3A4 i stosowanej w tego typu białaczkach, w kombinacji z rifampicyną. Udowodniono, że stosowanie RF powoduje wzrost stężenia mRNA kodującego CYP3A4, glikoproteinę P i MRP2, co prowadzi do wzrostu tempa metabolizmu cyklosporyny, redukując jej stężenie jakie dociera do krążenia ogólnego [Zelunka, 2002; Chen i wsp. 2006]. Podobne rezultaty otrzymano w przypadku zastosowania imatinibu (Gleevec, STI571) wraz z rifampicyną. Zaobserwowano znaczący spadek, bo o 54%, wartości najwyższego stężenia imatinibu we krwi natychmiast po dożylnym podaniu (C_{max}) oraz spadek o 68% wartości AUC [Bolton i wsp., 2004]. Również stężenie chloroacetaldehydu (CAA), metabolitu ifosfamidu, którego powstawanie katalizuje izoenzym CYP3A4, odpowiedzialnego za usuwanie wewnątrzkomórkowego glutationu [Cheng i wsp., 2007], spada wskutek terapii rifampicyną, co w konsekwencji podnosi oporność komórek nowotworowych na leczenie [Kerbusch i wsp., 2001]. Intensywne prace mające na celu wyjaśnienie mechanizmu indukcji PXR przez rifampicynę pozwoliły stwierdzić, że rifampicyna wiążąc się do receptora ułatwia przyłączenie do niego koaktywatorów: SRC-1 i PGC-1 wraz z czynnikiem transkrypcyjnym, HNF4 α [Li i Chiang, 2006].

Ciekawym przykładem leków mających różny wpływ na receptor PXR, są przeciwnowotworowe leki antymitotyczne, paklitaksol (PAC) i docetaksol (DOC). Oba związki są podobne strukturalnie, jednak działają odmiennie na receptor PXR (rys. 15.).



Rys. 15. Mechanizm oddziaływania leków przeciwnowotworowych, paklitaksolu (PAC) i docetaksolu (DOC) z receptorem PXR (na podstawie [Nallani i wsp., 2003, Nallani i wsp, 2004]. PAC wiąże się z PXR indukując dysocjację korepresora SRC-1, co pozwala na oddziaływanie z kompleksem transkrypcyjnym i ekspresję genów CYP3A4. DOC powoduje zmianę konformacji w obrębie domeny receptora wiążącej ligand, co uniemożliwia dysocjację kompleksu z korepresorem SMRT, a więc uniemożliwia wiązanie z koaktywatorem i indukcja ekspresji CYP3A4 nie zachodzi.

Paklitaksol zachowuje się jak typowy agonista tego receptora. Wiąże się z nim indukując dysocjację korepresora SMRT, a następnie przyłączenie koaktywatora SRC-1, co pozwala na oddziaływanie z kompleksem transkrypcyjnym i ekspresję genów kodujących izoformy CYP3A4. Badania *in vitro* potwierdziły indukcję syntezy izoenzymu CYP3A4 w wyniku traktowania paklitaksolem. Docetaksol nie wykazuje takiej zdolności. Okazało się, że powoduje on taką zmianę konformacji w obrębie domeny receptora wiążącej ligand (LBD), która uniemożliwia dysocjację kompleksu z korepresorem SMRT, a więc uniemożliwia związanie z koaktywatorem i w konsekwencji nie obserwuje się indukcji ekspresji genu CYP3A4 [Nallani i wsp., 2003; Nallani i wsp., 2004]. Tak więc podczas terapii wielolekowej z paklitaksolem podwyższonej metabolicznej aktywacji będą ulegały leki metabolizowane przez CYP3A4, co nie nastąpi w przypadku docetaksołu.

Kolejnymi przedstawicielami modulatorów receptora PXR wśród leków przeciwnowotworowych są tamoksyfen oraz cyklofosfamid. Tamoksyfen ulega intensywnym przemianom metabolicznym z udziałem izoenzymu cytochromu P450 3A4 (podrozdz. 1.1.2.1., rys.6.), jednocześnie powodując jego indukcję. Badania *in vitro* w komórkach HepG2 potwierdziły udział receptora PXR w tej modulacji. Przeprowadzone w tym celu wyciszenie genu *PXR* metodą siRNA, spowodowało, że tamoksifen i jego metabolit, 4-hydroksytamoksyfen, nie indukował już ekspresji CYP3A4. Zaobserwowano nawet ścisłą zależność, mianowicie 50% wyciszenia genów kodujących PXR, dawało 50% spadek indukcji izoenzymu. Mechanizm interakcji tamoksyfenu z receptorem PXR zachodzi prawdopodobnie na drodze związania się leku w tym samym miejscu co estradiol, jego endogenny substrat. Związek jednak nie mieści się w kieszeni wiążącej ligand i indukuje takie zmiany konformacyjne białka, które powodują zablokowanie ekspresji odpowiednich genów [Sane i wsp., 2008]. Cyklofosfamid z kolei, jest metabolizowany przez CYP3A4 i CYP2B6 (podrozdz. 1.1.2.1., rys.7.) do cytotoksycznego 4-hydroksycyklofosfamidu. Stosowany łącznie z typowymi agonistami receptorów PXR i CAR, fenobarbitalem, deksametazonem i rifampicyną, prowadzi do wysokiego stężenia toksycznego metabolitu [Lindley i wsp., 2002].

Opierając się na doniesieniach dotyczących opisanych powyżej aktywatorów receptora PXR, Harmsen i jego zespół przeprowadzili badania przesiewowe 18 szeroko stosowanych leków przeciwnowotworowych w kontekście ich potencjalnych zdolności modulacji aktywności PXR. Potwierdzono udział w indukcji ekspresji izoenzymu CYP3A4 jako genu reporterowego, poprzez wiązanie z receptorem PXR, na poziomie zbliżonym do rifmampicyny, takich chemoterapeutyków jak: winkrystyna, winblastyna, cyklofosfamid, ifosfamid, docetaksol, flutamid, erlotinib i tamoksifen [Harmsen i wsp., 2009]. Dodatkowo wykazano, że leki te indukują również transkrypcję genów kodujących białko transportowe, P-gp, która również regulowana jest przez receptor PXR, w komórkach raka jelita grubego

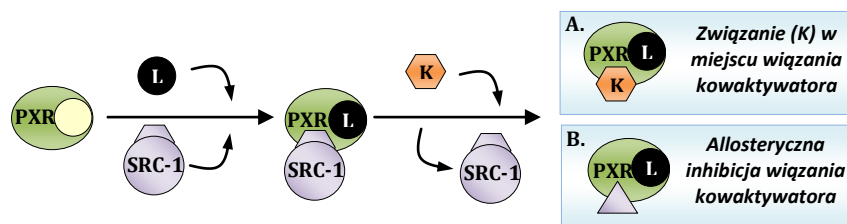
[Harmsen i wsp., 2010]. Fakt ten, może wskazywać na zwiększenie oporności komórek nowotworowych na stosowane wybrane chemoterapeutyki, które są substratami dla glikoproteiny P-gp. Wzrost ekspresji genów samego białka PXR również prowadził do zwiększonej oporności komórek HEC-1 na działanie paklitaksolu i cisplatyny [Chen, 2010]. W terapii kostniakomięsaka, złośliwego nowotworu kości, aktywacja receptora PXR osłabiała efektywność leczenia etopozydem, a dodatkowo kombinacja z agonistami tego receptora przyspieszała usuwanie z komórek kwasu całkowicie *trans*-retinowego (ATRA), który odgrywa istotną rolę w regulacji procesów wzrostu i różnicowania komórek zdrowych i zmienionych nowotworowo. Mechanizm ten również skutkował opornością na leczenie wspomagające ATRA w przypadku ostrej białaczki promielocytowej (APL) [Wang i wsp., 2008].

Aktualne doniesienia wykazały, że CAR również bierze udział w indukcji ekspresji białek transportowych, MDR1, MRP2 i BCRP [Wang i wsp., 2010]. Induktory tego receptora mogą więc podwyższać poziom tych białek w komórce nowotworowej, a tym samym zwiększać jej oporność. Jednakże, inne badania wykazały, że agonista tego receptora, CITCO, hamuje proliferację komórek poprzez zahamowanie cyklu komórkowego oraz indukcję apoptozy komórek glejaka mózgu. Co ciekawe, wyższa ekspresja CAR blokuje ekspansję komórek macierzystych glejaka. Wynik ten stał się podstawą do dalszych badań receptora CAR jako nowego celu terapeutycznego w leczeniu glejaków [Chakraborty i wsp., 2011].

II. 2.2.2. Inhibicja receptorów PXR i CAR.

W ostatnich latach kilka grup badawczych zainteresowało się antagonistami receptora PXR jako potencjalnymi lekami znoszącymi efekt oporności komórek nowotworowych na wybrane cytostatyki [Biswas i wsp., 2009; Harmsen i wsp., 2010]. Standardowym przykładem związku hamującego aktywność obu receptorów, PXR i CAR, jest ketokonazol, lek przeciwgrzybiczy. Dzięki temu, że okazał się on antagonistą receptorów, znalazł on zastosowanie w leczeniu hormonozależnych nowotworów, w tym raka prostaty [Takeshita i wsp., 2002]. Hamuje on bowiem metabolizm testosteronu katalizowany przez CYP3A4, tym samym uniemożliwiając wzrost komórek tego nowotworu. W przeprowadzonych badaniach na liniach ludzkiego nowotworu wątroby, HepG2 i raka jelita grubego, LS174T, wykazano, że ketokonazol hamuje, indukowaną wcześniej rifampicyną, ekspresję CYP3A4 nawet 10-krotnie. Opracowano dwa możliwe modele oddziaływania ketokonazolu (K) z receptorem, w obecności leku (L). W obu przypadkach ketokonazol uniemożliwia wiązanie się koaktywatora SRC-1 z receptorem, w pierwszym poprzez wiązanie się z nim i allosteryczną zmianę konformacji receptora, w drugim poprzez

związanie się w miejscu wiązania się koaktywatora. Oba procesy prowadzą do zakłócenia dimeryzacji receptora PXR z RXR i zahamowania transkrypcji [Huang i wsp., 2006; Dvorak, 2011] (rys. 16.).



Rys. 16. Dwa modele mechanizmu inhibicji receptora PXR przez ketokonazol; K – ketokonazol, L – lek będący ligandem dla PXR [Huang i wsp., 2006; Dvorak, 2011].

Ketokonazol, ze względu na zdolność inhibicji izoenzymu CYP3A4 często wchodzi w interakcje z lekami będącymi substratami tego białka. Stosowany łącznie z docetaksolem powoduje zahamowanie detoksykacyjnej biotransformacji docetaksolu prowadząc do efektów toksycznych, takich jak neutropenia czyli silny stan niedoboru granulocytów [Engels i wsp., 2004].

Obecnie dość obiecującym antagonistą receptora PXR, jest nowa pochodna azolowa, FB-12, o niższej hepatotoksyczności niż ketokonazol [Venkatesh i wsp., 2011]. Analog ten bardzo szybko znosił oporność komórek raka jelita grubego na działanie irinotekanu (SN-38), spowodowaną indukcją aktywności receptora PXR. Koncepcja zastosowania inhibitorów PXR jako związków zapobiegających oporności komórek nowotworowych na leczenie związanym z ekspresją białka błonowego, P-gp, produktu ekspresji genu *MDR1*, spotkało się z szerokim zainteresowaniem. Przykładem są badania, oporności na paklitaksol i winblastynę, linii komórkowej ludzkiego raka prostaty traktowanej wcześniej agonistą PXR, związkiem SR12813. Przeprowadzenie nokautu genowego *PXR* przywróciło wrażliwość komórek nowotworowych na paklitaksol i winblastynę, co sugeruje, że skuteczność terapii w nowotworach PXR-dodatnich może być osiągnięta poprzez wyłączenie genu *PXR*. Podobny efekt osiągnięto wyciszając gen *PXR* w komórkach nowotworów endometrium HEC-1, co skutkowało zmniejszeniem poziomu ekspresji *MDR1* oraz skutecznym działaniem paklitaksolu i cisplatyny [Masuyama i wsp., 2003; Masuyama i wsp., 2007]. Ekspresja receptora PXR, a tym bardziej jego aktywacja, prowadzi również do oporności komórek jelita grubego na terapię irinotekaniem (SN-38) poprzez wzrost ekspresji genów enzymu UGT1A1, glukuronidacji, a więc szybszej przemiany związku do nieaktywnych glukuronidów. Wyciszenie genu *PXR* hamowało ten proces i prowadziło do wyższej skuteczności terapii irinotekaniem [Raynal i wsp., 2010].

Antagonistą receptora PXR jest również stosowany w leczeniu mięsaków tkanek miękkich, związek ET-743 (Yondelis®). Stosowanie jego łącznie z dokсорubicyną podwyższa jej stężenie w komórce, co w rezultacie daje lepszy efekt terapii przeciwnowotworowej [Kanzaki i wsp., 2002]. Dzieje się tak poprzez zniesienie efektu oporności na leki wywołaną obecnością białka MDR1, którego funkcją jest usuwanie z komórki związków hydrofobowych, w tym większości leków przeciwnowotworowych, co znacznie obniża ich efektywne stężenie prowadząc do oporności.

III. ZAŁOŻENIA I CEL PRACY

Badania nad poznaniem molekularnego mechanizmu przemian metabolicznych pochodnych triazoloakrydonu i 9-amino-1-nitroakrydyny rozpoczęto w naszym zespole od badań ich transformacji w układach modelowych, początkowo z udziałem czynnika redukcyjnego, ditiotreitolu, DTT, w przypadku pochodnych 1-nitroakrydyn [Gorlewska i wsp., 2001], później stosując enzymy frakcji mikrosomalnej wyizolowanej z wątroby szczura i człowieka, a w końcu w obecności rekombinantowych enzymów I i II fazy metabolizmu [Wiśniewska, 2008; Potęga, 2010]. Zaobserwowano znaczące różnice w przemianach metabolicznych pomiędzy związkami należącymi do obu grup pochodnych akrydyny. W przypadku związku C-1748, jak i stosowanego do celów porównawczych 4-niepodstawionego analogu 1-nitroakrydyny, związku C-857, zaobserwowano kilka produktów metabolizmu o różnej intensywności, natomiast C-1305 transformował tylko do jednego metabolitu. W oparciu o analizę spektroskopową produktów stwierdzono, że procesy biotransformacji C-1305 nie obejmują pierścienia heterocyklicznego, w odróżnieniu od pochodnych 1-nitroakrydyny, gdzie otrzymano produkty ze zmienioną strukturą pierścienia akrydyny. Stwierdzono również wyraźne różnice w reaktywności związków C-1748 i C-857. Okazało się, że pochodna C-1748 jest mniej podatna od innych 9-amino-1-nitroakrydyn na przemiany metaboliczne. Postawiono więc hipotezę, że obniżona reaktywność jak i podatność na atak nukleofilowy ściśle wiążą się z niższą toksycznością ogólną tego związku [Wiśniewska, 2008].

Wykazane różnice w metabolizmie obu grup pochodnych akrydyny, w zastosowanych układach modelowych, skłoniły mnie do przeprowadzenia, w ramach niniejszej pracy, badań biotransformacji w miejscu ich oczekiwanego działania w terapii, czyli w komórkach nowotworowych. Podjęcie badań metabolizmu w komórkach wynikało również z coraz szerszych doniesień innych autorów, na temat lokalnych różnic w ekspresji genów specyficznych enzymów I i II fazy metabolizmu, nazywanych enzymami metabolizującymi leki (DME, and. *Drug Metabolism Enzymes*) oraz istotnego znaczenia ekspresji enzymów metabolizujących w planowaniu indywidualnej terapii wybranymi cytostatykami. Szczególnie istotna wydaje się być wiedza na temat ekspresji izoenzymów cytochromu P450 w poszczególnych typach nowotworów, bowiem biorą one udział w metabolizmie większości leków stosowanych klinicznie [Guengerich, 2006]. Wiadomo, że niektóre leki zostają przekształcane do ich formy biologicznie czynnej dopiero po transformacji przez te enzymy. Przykładem są proleki należące do związków, które ulegają redukcji. Z drugiej strony pod wpływem enzymów cytochromu P450 może nastąpić zmniejszenie aktywności lub całkowita dezaktywacja związku. Zdarza się także, że powstające reaktywne metabolity są toksyczne dla organizmu. Wobec przedstawionych faktów, podjęcie badań transformacji wybranych

pochodnych akrydyny w liniach komórkowych o różnej ekspresji enzymów metabolizujących, szczególnie izoenzymów P450 jest wysoce uzasadniona.

I. CELEM PIERWSZEGO ETAPU NINIEJSZEJ ROZPRAWY BYŁO POZNANIE PRZEMIAN METABOLICZNYCH W WYBRANYCH LUDZKICH LINIACH KOMÓREK NOWOTWOROWYCH, ZWIĄZKÓW: C-1748, C-857 ORAZ C-1305, POCHODNYCH AKRYDINY NALEŻĄCYCH DO DWÓCH RÓŻNYCH GRUP.

Realizacja postawionego celu obejmowała następujące zadania badawcze:

1) Zbadanie i porównanie kinetyki przemian metabolicznych pochodnych akrydyny w różnych ludzkich liniach komórek nowotworowych.

Do badań wybrałam 4 linie komórkowe o różnym poziomie ekspresji enzymów metabolizujących leki. Były to następujące linie: HepG2 – nowotwór wątrobowokomórkowy (ang. *hepatocellular carcinoma*), HCT116 – nowotwór jelita grubego (ang. *colorectal carcinoma*), HT29 – gruczorakolak jelita grubego (ang. *colorectal adenocarcinoma*), A549 – niedrobnokomórkowy rak płuc (ang. *non-small cell lung cancer*). Przeprowadzone badania przemian metabolicznych badanych pochodnych dążyły do poznania możliwych kierunków przemian aktywacyjnych i/lub detoksykacyjnych jakimi związki, jako potencjalne leki, będą ulegały w komórce nowotworowej. Zastosowanie różnych linii komórkowych, wywodzących się z nowotworów różnych narządów, miało na celu porównanie stopnia transformacji w komórkach o zróżnicowanej ekspresji enzymów metabolizujących, a w późniejszym etapie skorelowania tych wyników z aktywnością cytotoksyczną pochodnych akrydyny w stosunku do tych linii.

2) Określenie struktur chemicznych głównych produktów metabolizmu związków w komórkach nowotworowych.

Na tym etapie badań przeprowadziłam analizę struktur chemicznych otrzymanych metabolitów. Możliwe to było na podstawie wyników analizy spektroskopowej oraz porównania tych struktur z określonymi wcześniej w obecności enzymów mikrosomalnych oraz izoenzymów rekombinantowych [Wiśniewska, 2008]. Scharakteryzowano w ten sposób przemiany metaboliczne zachodzące w miejscu docelowego działania badanych związków, mianowicie w komórkach nowotworowych. Było to szczególnie istotne w przypadku pochodnych 9-amino-1-nitroakrydyny, dla określenia wpływu grupy metylowej w pozycji 4, na metabolizm związków C-1748 i C-857 w komórkach, a w końcowym etapie na ich aktywność cytotoksyczną.

3) Określenie podatności związków C-1748, C-857 i C-1305 na transformacje metaboliczne w komórkach z nadekspresją izoenzymu CYP3A4, Hep3A4.

Izoenzym CYP3A4 jest jednym z kluczowych izoenzymów cytochromu P450 i uczestniczy w metabolizmie wielu różnych związków zarówno endogennych takich jak kortyzol, testosteron, estradiol i progesteron oraz ok. 50% leków stosowanych klinicznie. (rys.3) [van Shaik, 2005]. Wśród nich są również leki przeciwnowotworowe m.in. tamoxifen, imatinib, ketokonazol stosowany w leczeniu nowotworów hormonozależnych, ifosfamid, paklitaxel. CYP3A4 stanowi ok. 30-40% wszystkich izoenzymów obecnych w wątrobie i jelicie cienkim. Ponadto występuje także w niektórych nowotworach takich jak, rak jelita grubego, żołądka, prostaty, nerek i wątroby [Michael i Doherty, 2007].

Ponieważ zaobserwowano, że izoenzym CYP3A4, obok izoenzymów CYP2C19, CYP1A2 bierze również udział w metabolizmie dwóch pochodnych C-1748 oraz C-857 [Wiśniewska, 2008], przeprowadziłam badania metabolizmu tych związków oraz pochodnej C1305, w linii Hep3A4, charakteryzującej się podwyższoną ekspresją tego izoenzymu [Fereiman i wsp., 2002]. Zastosowanie tej linii miało na celu określenie udziału izoenzymu CYP3A4 w metabolizmie pochodnych akrydyny zachodzących w komórkach nowotworowych.

4) Zbadanie i porównanie kinetyki przemian metabolicznych pochodnych akrydyny w komórkach nowotworowych w warunkach ograniczonego dostępu tlenu.

Zjawisko niedotlenienia komórek nowotworowych dotychczas kojarzone było ze wzrostem oporności guza na radio- i chemoterapię. Jednakże, ostatnie lata i rozwój nowoczesnych eksperymentalnych terapii przeciwnowotworowych pozwoliły wykorzystać tą cechę guza jako cel terapeutyczny. Zaczęto szukać takich związków, które ulegając redukcji w warunkach ograniczonego dostępu tlenu, metabolizują do reaktywnych metabolitów i stają się bardziej toksyczne w warunkach hypoksji, niż w warunkach tlenowych. Zastosowanie warunków niedotlenienia w eksperymentach prowadzonych w ramach niniejszej pracy wynikały również z faktu, że podobnie jak inne aromatyczne związki nitrowe, czego przykładem są związki przeciwnowotworowe takie jak pochodne nitroimidazolu oraz pyrazoloakrydyny [McClelland i wsp., 1984; Raleigh i Liu, 1984], również pochodne 9-amino-1-nitroakrydyny ulegają metabolizmowi redukcyjnemu [Gorlewska i wsp., 2001; Wiśniewska, 2008]. Wychwycenie różnic w intensywności metabolizmu pomiędzy warunkami normalnymi, a warunkami z ograniczonym dostępem tlenu pozwoli również w kolejnym etapie doświadczeń określić wpływ hypoksji na aktywność cytotoksyczną badanych związków.

W celu określenia funkcjonalnych dla terapii cech farmakokinetyki interakcji lek-lek, należy scharakteryzować dwa najważniejsze aspekty: 1) rolę enzymów metabolizujących i transporterów, 2) mechanizm wpływu stosowanych leków na aktywność i ekspresję tychże białek enzymatycznych [Riddic i wsp., 2005]. Wobec powyższego:

II. CELEM DRUGIEGO ETAPU NINIEJSZEJ ROZPRAWY DOKTORSKIEJ BYŁO ZBADANIE MECHANIZMU WPŁYWU POCHODNYCH: C-1748, C-857 I C-1305, NA AKTYWNOŚĆ KATALITYCZNĄ I EKSPRESJĘ GENÓW WYBRANYCH ENZYMÓW METABOLIZUJĄCYCH.

Realizacja postawionego celu obejmowała następujące zadania badawcze:

1) Określenie wpływu związków C-1748, C-857 i C-1305 na aktywność katalityczną i poziom ekspresji genów izoenzymów CYP3A4 i CYP2C9 w komórkach nowotworu wątroby, HepG2.

Wyniki uzyskane w tym etapie badań są o tyle cenne, że pozwalają scharakteryzować potencjalne chemoterapeutyki, jakimi są badane pochodne akrydyny, na poziomie stosowania ich w nowoczesnej wielolekowej terapii przeciwnowotworowej, ukierunkowanej na poszczególnych pacjentów. W myśl tego, określiłam wpływ związków C-1748, C-857 i C-1305 na poziom białek i ekspresję genów izoenzymów CYP3A4 i CYP2C9. Wybór enzymów uzasadniłam faktem, że białka te w najwyższym stopniu biorą udział w metabolizmie stosowanych klinicznie leków, a więc potencjalna modulacja tych białek będzie miała duży udział w interakcjach lek-lek. Jako model eksperymentalny posłużyły mi komórki ludzkiego nowotworu wątroby, HepG2, w których według doniesień literaturowych, jest dość wysoki poziom izoenzymów P450.

2) Określenie udziału badanych pochodnych akrydyny w indukcji bądź inhibicji aktywności receptora X pregnanu (PXR).

Zainteresowanie receptorem PXR wynika z faktu jego udziału w regulacji ekspresji białek enzymatycznych biorących udział w metabolizmie leków. Zaliczyć do nich można izoenzym CYP3A4, CYP2C9, czy też UGT1A1. Nowy trend mający na celu zidentyfikowanie induktorów lub inhibitorów receptora PXR poparty jest coraz większą liczbą doniesień literaturowych [Harmsen i wsp., 2009; Harmsen i wsp., 2010]. Dzięki określeniu nowych induktorów bądź inhibitorów receptora PXR, otwierają się nowe możliwości ich zastosowania w terapii kombinowanej, co więcej, są to możliwości uniknięcia niepożądanych efektów w postaci braku efektywności terapii lub toksyczności stosowanych leków.

IV. OMÓWIENIE WYNIKÓW

WSTĘP – metabolizm pochodnych 9-amino-1-nitroakrydyny oraz triazoloakrydonu wobec ludzkich rekombinantowych izoenzymów cytochromu P450.

Przeprowadzone dotychczas badania enzymatycznej transformacji pochodnych 9-amino-1-nitroakrydyny oraz triazoloakrydonu opierały się na zastosowaniu układów modelowych tj. frakcji enzymów mikrosomalnych wyizolowanych z komórek wątroby szczurów i ludzi, wybranych ludzkich izoenzymów cytochromu P450 otrzymanych na drodze rekombinacji u bakterii *E.coli* oraz współpracującej z nimi reduktazy NADPH:cytochrom P450. Pozwoliły one m.in. poznać produkty metabolizmu związków C-1748, C-857 oraz C-1305 oraz scharakteryzować reaktywność każdego ze związków.

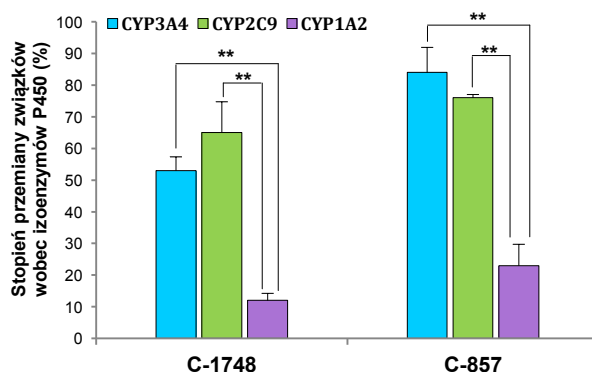
Kontynuując te badania porównałam transformację enzymatyczną tych związków w obecności ludzkich rekombinantowych izoenzymów cytochromu P450: CYP3A4, CYP2C9 oraz CYP1A2. Dla porównania ich reaktywności wyznaczyłam stopień przemiany każdego ze związków (y), na podstawie pola powierzchni pod jego pikiem i zilustrowałam za pomocą wykresu słupkowego. Korzystałam z następującej zależności:

$$y = 100 \cdot (1 - a/b) [\%] \quad (\text{wzór 1})$$

gdzie:

a – pole powierzchni pod pikiem substratu po odpowiednim czasie trwania reakcji [$\mu\text{V}\cdot\text{s}$],

b – pole powierzchni pod pikiem substratu na starcie reakcji [$\mu\text{V}\cdot\text{s}$].



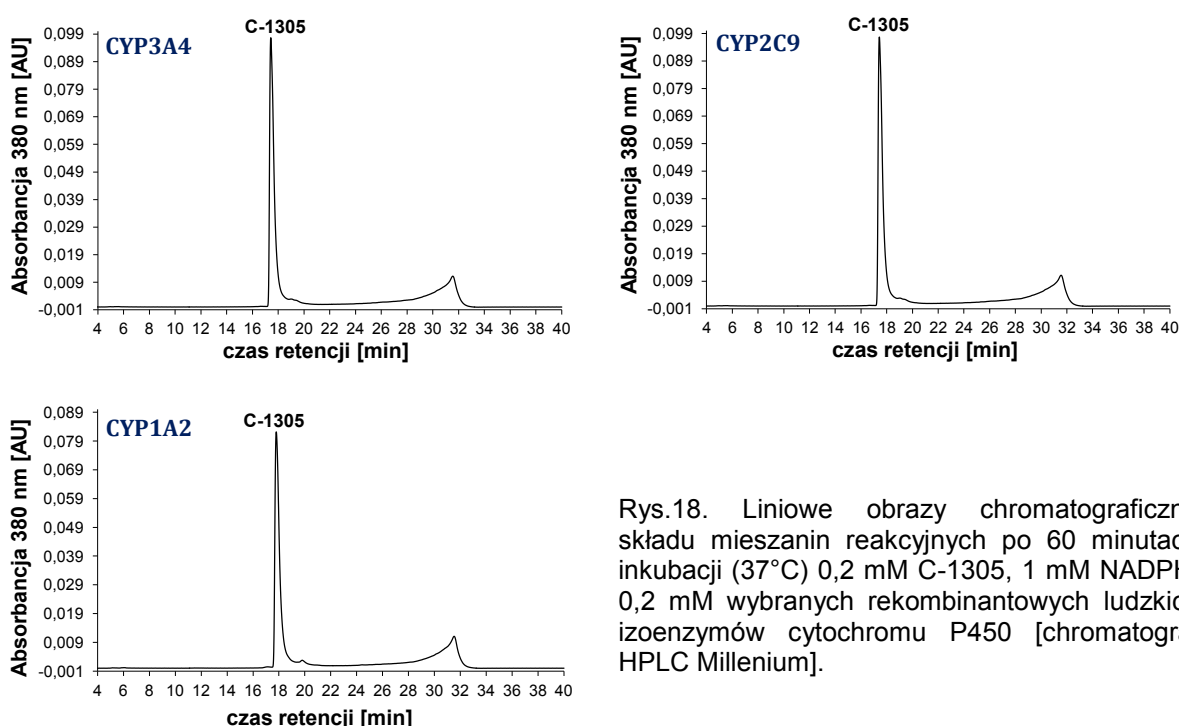
Rys. 17. Porównanie stopnia przemiany związków C-1748 i C-857 po 60 minutach inkubacji związków w obecności izoenzymów cytochromu P450: CYP3A4, CYP2C9 i CYP1A2. Prezentowane wyniki są średnią z dwóch niezależnych doświadczeń wraz z odchyleniami standardowymi. Dla określenia poziomu istotności przeprowadzono test Studenta, gdzie * $p < 0,05$ – wartości istotnie statystycznie.

Przedstawione powyżej wyniki wyraźnie wskazują na udział w metabolizmie pochodnych 9-amino-1-nitroakrydyn, dwóch izoenzymów: CYP3A4 oraz CYP2C9. Izoenzym

CYP1A2 najłabiej metabolizował oba związki. Pochodna C-1748 wykazała niższą, w porównaniu z C-857, podatność na przemiany enzymatyczne w obecności izoenzymów P450, przy czym selektywność tych związków była bardzo zbliżona. Izoenzym CYP3A4 najsilniej metabolizował związek C-857, w przypadku pochodnej C-1748 to CYP2C9 odgrywał najistotniejszą rolę w przemianach tego związku.

Następnie przeprowadziłam analogiczne doświadczenie dla pochodnej triazoloakrydonu, C-1305. Zaskakującym był jednak wynik, gdzie nie zaobserwowano istotnej reaktywności tego związku wobec żadnego z zastosowanych izoenzymów cytochromu P450 (rys. 18).

C-1305: 60 minut inkubacji, 0,2 μ M enzymu



Rys.18. Liniowe obrazy chromatograficzne składu mieszanin reakcyjnych po 60 minutach inkubacji (37°C) 0,2 mM C-1305, 1 mM NADPH, 0,2 mM wybranych rekombinowanych ludzkich izoenzymów cytochromu P450 [chromatograf HPLC Millenium].

Biorąc pod uwagę przedstawioną powyżej reaktywność pochodnych 9-amino-1-nitroakrydyny wobec izoenzymów cytochromu P450 oraz jej brak dla związku C-1305, można było przypuszczać, że:

- szlaki przemian metabolicznych różniących się strukturalnie związków będą również, podobnie jak to miało miejsce w układach modelowych, odmienne w komórkach nowotworowych,
- różna intensywność metabolizmu koreluje z różną wrażliwością badanych linii komórkowych na związki C-1748, C-857 oraz C-1305,
- uchwycenie różnic w szlakach metabolicznych badanych pochodnych może być decydujące w przewidywaniu końcowego efektu ich działania.

Wobec powyższego postanowiłam zbadać i porównać kinetykę przemian metabolicznych trzech pochodnych akrydyny w różnych liniach komórek nowotworowych, które różnią się między sobą odmienną ekspresją genów izoenzymów cytochromu P450. Przedstawione założenia zweryfikowałam w trakcie badań przeprowadzonych w ramach niniejszej pracy, zmierzających do:

- określenia i porównania przemian metabolicznych,
- określenia wpływu poziomu przemian metabolicznych na cytotoksyczność badanych związków.

IV.1. PRZEMIANY METABOLICZNE POCHODNYCH C-1748, C-857 I C-1305 W KOMÓRKACH NOWOTWOROWYCH POCHODZENIA LUDZKIEGO.

IV.1.1. Ogólne wiadomości o poziomie izoenzymów P450 w wybranych do badań liniach komórkowych.

W metabolizmie wielu leków i ksenobiotyków biorą udział enzymy mikrosomalne, w szczególności izoenzymy cytochromu P450. Poziom tych izoenzymów jest nie tylko cechą indywidualną każdego człowieka, ale także różni się w komórkach zdrowych i nowotworowych. Co więcej, wykazano zróżnicowaną lokalną ekspresję białek cytochromu P450 w różnych typach ludzkich nowotworów, głównie litych [Michael i Doherty, 2007; Michael i Doherty, 2005]. Skłania to do ciągłych badań szlaków metabolicznych stosowanych leków w komórce nowotworowej. Ich znajomość w poszczególnych rodzajach nowotworów umożliwia lepsze projektowanie struktur potencjalnych chemoterapeutyków oraz skuteczniejsze projektowanie terapii w leczeniu indywidualnym.

Do badań metabolizmu pochodnych 9-amino-1-nitroakrydyny oraz triazoloakrydonu wybrałam następujące linie komórkowe:

- HepG2: nowotwór wątroby (ang. *hepatocellular carcinoma*)
- HCT116: nowotwór jelita grubego (ang. *colorectal carcinoma*)
- HT29: gruczorakolak jelita grubego (ang. *colorectal adenocarcinoma*)
- A549: niedrobnokomórkowy rak płuc (ang. *non-small cell lung cancer*)

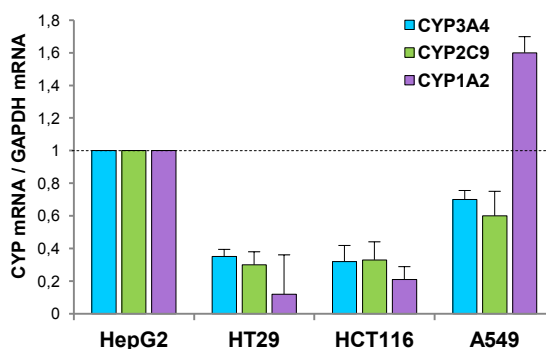
Wymienione powyżej linie komórkowe zostały przeze mnie wybrane na podstawie dostępnych danych literaturowych o ekspresji, ważnych dla metabolizmu badanych związków, izoenzymów P450. We wszystkich wybranych liniach komórkowych wykazano obecność izoenzymów z podrodzin: CYP1A, CYP2C, CYP2D, CYP3A, CYP2E [Oyama i wsp., 2004]. Jednakże, jak potwierdziły doniesienia literaturowe, poziom ekspresji genów tych enzymów oraz ich aktywność katalityczna były zróżnicowane w poszczególnych 60 liniach komórek nowotworowych pochodzących z NCI. (ang. *National Cancer Institute*)

[Yu i wsp., 2001] Poniżej przedstawiłam zestawienie otrzymanych wartości przemian standardowych substratów dla 4 linii wybranych do badań w niniejszej pracy.

Tabela 3. Aktywność izoenzymów CYP3A4, CYP2C9 i CYP1A2 w liniach komórkowych ludzkich nowotworów wybranych do badań [według, Yu i wsp., 2001].

	CYP3A4 nmol/min/mg	CYP2C9 nmol/min/mg	CYP1A2 nmol/min/mg
HepG2	> 250	> 250	40-70
HT29	75-125	75-125	5-40
HCT116	75-125	75-125	40-70
A549	> 250	> 250	75-125

Według przedstawionych w tabeli 3 wyników, linie HepG2 oraz A549 cechuje najwyższa aktywność izoenzymów CYP3A4 oraz CYP2C9. Inne doniesienia literaturowe również potwierdzają wysoki poziom tych enzymów w komórkach nowotworu wątroby oraz płuc, z czego najwyższą ekspresję genów *CYP3A4* i *CYP2C9* zaobserwowano w linii HepG2 [Michael i Doherty, 2007]. Odnosząc się do danych literaturowych przeprowadziłam relatywną kwantyfikację transkryptów *CYP3A4* mRNA, *CYP2C9* mRNA oraz *CYP1A2* mRNA w liniach komórkowych: HT29, HCT116 oraz A549 względem poziomu ich ekspresji w linii HepG2. Ze względu na fakt, iż to w komórkach HepG2 według literatury, jest najwyższy poziom ekspresji genów badanych izoenzymów, ustalono ją jako kalibrator. Poziom analizowanych transkryptów standaryzowano względem genu referencyjnego – GAPDH (dehydrogenaza gliceroaldehydrofosforanowa), należącego do *housekeeping gene*, którego poziom ekspresji jest stały w warunkach eksperymentu. Dzięki temu, że wydajność amplifikacji badanych genów i genu referencyjnego była w przybliżeniu taka sama w zakresie badanych ilości DNA, zastosowałam obliczenia względnej ilości produktu PCR z użyciem porównywalnej metody $2^{-\Delta\Delta Ct}$ [Livak i Schmittgen, 2001]. Poniżej, na rys. 19, przedstawiono wyniki przeprowadzonego doświadczenia.



Rys. 19. Wykres przedstawiający poziom ekspresji *CYP3A4*, *CYP2C9* oraz *CYP1A2* w komórkach 4 wybranych linii komórkowych względem poziomu ekspresji genów tych izoenzymów w komórkach HepG2 (kalibrator) [wyniki własne].

Otrzymane wyniki korelowały z przedstawionymi w literaturze [Oyama i wsp., 2004; Rodriguez-Antona i Ingelman-Sundberg, 2006; Michael i Doherty, 2007]. Poziom ekspresji genów izoenzymów CYP3A4 oraz CYP1A2 okazał się niższy od poziomu w linii HepG2, we wszystkich pozostałych liniach. Najbardziej zbliżony był w linii niedrobnokomórkowego raka płuc, A549. W komórkach tych, ekspresja genów izoenzymu CYP1A2 była wyższa od występującej w nowotworze wątroby, HepG2.

Efekt przeprowadzonych badań potwierdził celowość prowadzenia dalszych prac badawczych nad kinetyką przemian metabolicznych trzech pochodnych akrydyny w powyższych liniach komórkowych.

IV.1.2. Opracowanie warunków badań przemian metabolicznych w komórkach.

Badanie przemian metabolicznych związków w komórkach nowotworowych wymagały określenia warunków prowadzenia reakcji, czyli doboru: ilości komórek, stężenia związków oraz czasu inkubacji komórek ze związkami. Opierając się na danych literaturowych innych autorów [Hernandez-Santiago i wsp., 2002; Gomez-Silva i wsp., 2005, Wiśniewska, 2008], izolację metabolitów do dalszej analizy HPLC przeprowadziłam stosując metodę ekstrakcji do 60% zimnego metanolu. Po kilku próbach wstępnych, gdzie okazało się, że zastosowanie zbyt niskich stężeń związków (0,1; 1; 5 μM) nie przynosiło oczekiwanych rezultatów przyjąłam następujące warunki prowadzenia reakcji:

- 2 mln komórek hodowanych na płycie Petriego
- 0,1 mM stężenie związków
- czasy inkubacji: 3, 6, 12, 24, 72h

Analizę przebiegu reakcji metabolicznej biotransformacji badanych związków prowadziłam techniką wysokosprawnej chromatografii cieczowej w układzie faz odwróconych z udziałem detektora wielodiodowego (RP-HPLC-DAD). W celu określenia struktur chemicznych produktów metabolizmu badanych związków powstających w poszczególnych liniach komórkowych zastosowałam sprzężenie chromatografu cieczowego ze spektrometrem mas (HPLC/ESI/MS).

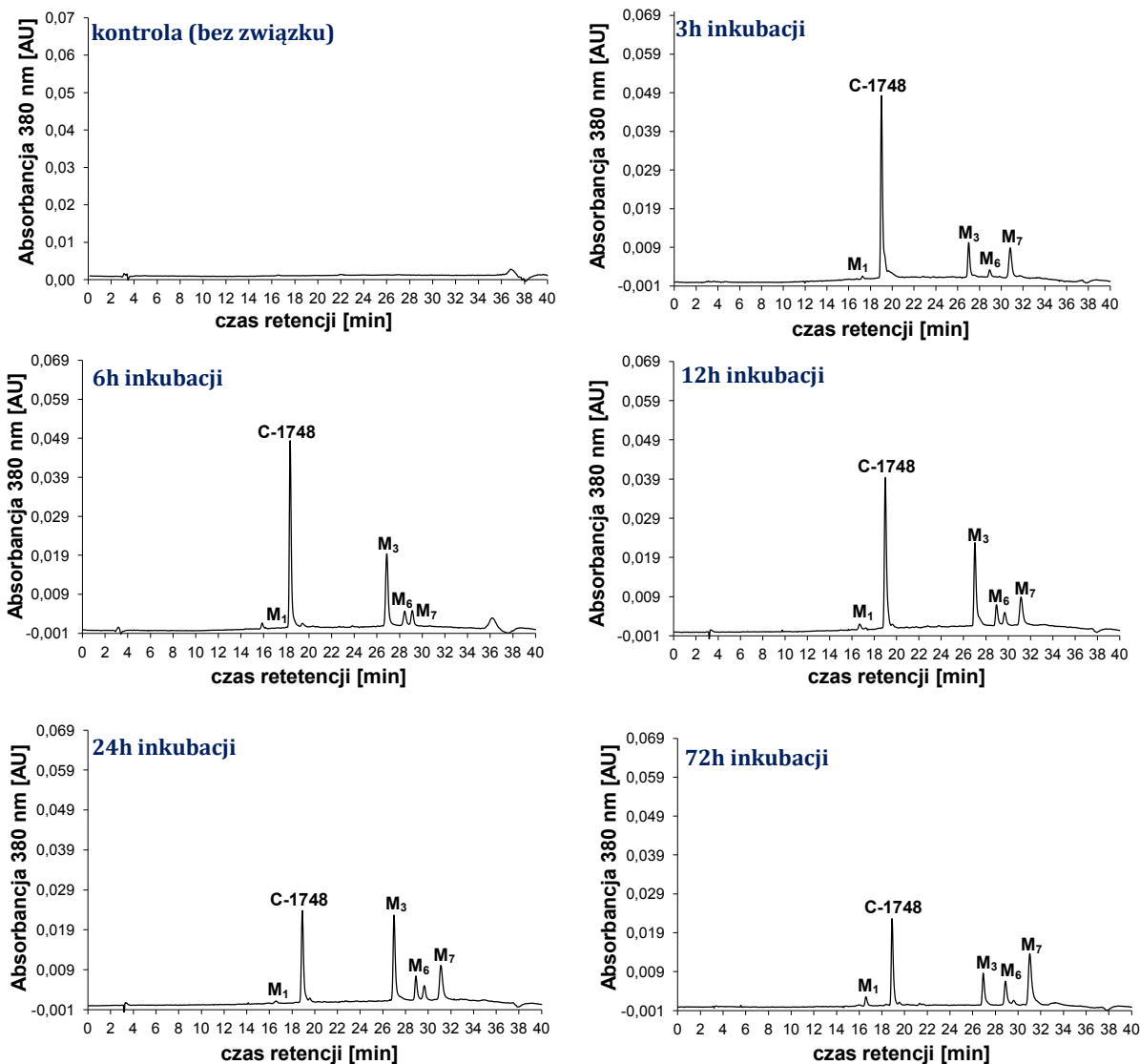
IV.1.3. Charakterystyka przemian metabolicznych C-1748, C-857 i C-1305 w komórkach nowotworu wątroby, HepG2.

IV.1.3.1. Wyniki badań metabolizmu pochodnych C-1748 – identyfikacja struktur chemicznych produktów.

Poniżej (rys. 20), przedstawiłam chromatograficzny obraz przemian metabolicznych dla związku C-1748. Pochodna ulegała przemianie metabolicznej w komórkach HepG2 do

4 głównych produktów, M_1 , M_3 , M_6 i M_7 . Już po 3h traktowania komórek związkiem w metanolowym ekstrakcie zaobserwowałam metabolity, których najwyższe stężenie widoczne jest po 12h inkubacji.

C-1748: HepG2; 0,1 μ M związku



Rys. 20. Chromatograficzny obraz przemian metabolicznych związku C-1748 w komórkach HepG2 po różnych czasach inkubacji komórek ze związkiem; 0,1 mM C-1748, 2 mln komórek, [chromatograf HPLC Waters Breeze].

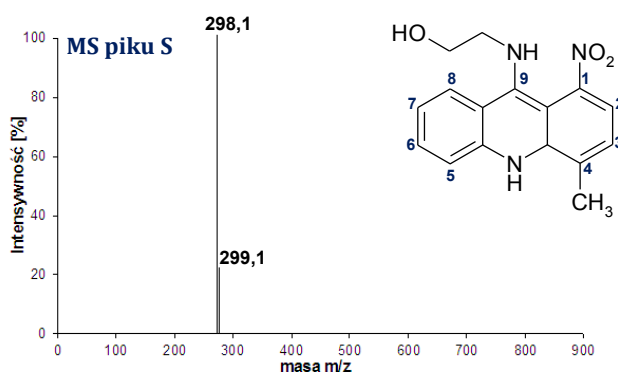
! Ze względu na fakt konieczności ujednoczenia oznakowania produktów związków C-1748 i C-857 zastosowano takie same symbole dla metabolitów o tych samych strukturach w przypadku obu pochodnych. Z tego powodu nie zachowano w przypadku C-1748 kolejności numerowania.

Analizując powyższe chromatogramy, wynioskowałam, iż stopień przemiany pochodnej C-1748 rośnie proporcjonalnie do czasu inkubacji komórek ze związkiem. Po 72h zaobserwowałam najniższe stężenie substratu, a jednocześnie obniżenie stężenia produktu oznaczonego symbolem M_3 oraz wzrost stężenia produktu M_7 .

IDENTYFIKACJA STRUKTUR CHEMICZNYCH PRODUKTÓW METABOLIZMU C-1748.

W kolejnym etapie pracy podjęłam próbę określenia struktur chemicznych produktów metabolicznej transformacji C-1748, powstających w komórkach linii nowotworu wątroby, HepG2. W tym celu zarejestrowałam widmo masowe (MS) pików produktów powstających podczas podziału metodą HPLC-ES-MS. Badania produktów reakcji zostały przeprowadzone w Laboratorium Chromatografii Cieczowej Katedry Chemii Analitycznej Politechniki Gdańskiej pod kierunkiem dr hab. inż. Agaty Kot-Wasik. Dodatkową, silną podstawą do identyfikacji produktów było porównanie ze strukturami powstającymi w wyniku inkubacji pochodnych 9-amino-1-nitroakrydyny z enzymami frakcji mikrosomalnej oraz rekombinantowymi izoenzymami cytochromu P450 [Wiśniewska, 2008]. W badaniach tych oprócz techniki HPLC-ES-MS zastosowano MS/MS oraz spektroskopię MS o wysokiej rozdzielczości „High Resolution” HR-MS.

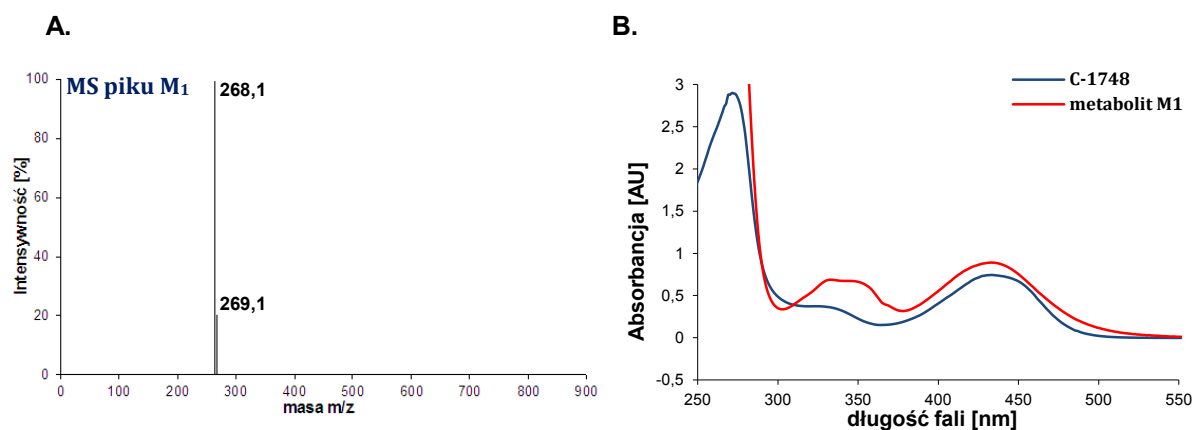
W wyniku analizy ESI-MS otrzymałam jony masowe o ładunku dodatnim $m/z = M+1$ oraz $m/z = M+2$. Porównałam je z widmami UV-Vis. Widmo ESI-MS pików odpowiadającego substratowi (S) wykazało obecność dwóch głównych jonów masowych o wartościach m/z : 298,1 i 299,1 (rys. 21) charakterystycznych dla struktury C-1748 ($[M_s + 1]$ i $[M_s + 2]$).



Rys. 21. Widmo masowe pików substratu C-1748 (czas retencji ok.18 minut, rys. 21).

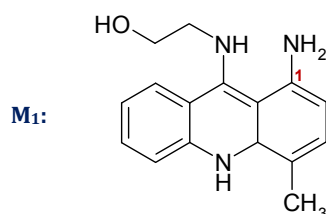
❖ Analiza struktury pików M_1 .

Widmo ESI-MS pików M_1 zawiera intensywny jon masowy $m/z = 268,1$ (rys. 22A). Wartość tego jonu jest niższa od wartości m/z substratu o 30 jednostek. Zależność ta pozwala sądzić, że mamy do czynienia z cząsteczką o masie: $[M_s - 30 + 1] = [M_s - (2 \cdot M_O + 2 \cdot M_H) + 1]$. Widmo UV-Vis jest zmienione do widma substratu, co wskazuje na zmianę układu chromoforu w metabolicie (rys. 22B).



Rys. 22. A: widmo masowe piku produktu M_1 (czas retencji ok. 16 minut, rys. 21); B: porównanie widm UV-Vis związku C-1748 oraz produktu M_1 powstającego w komórkach HepG2.

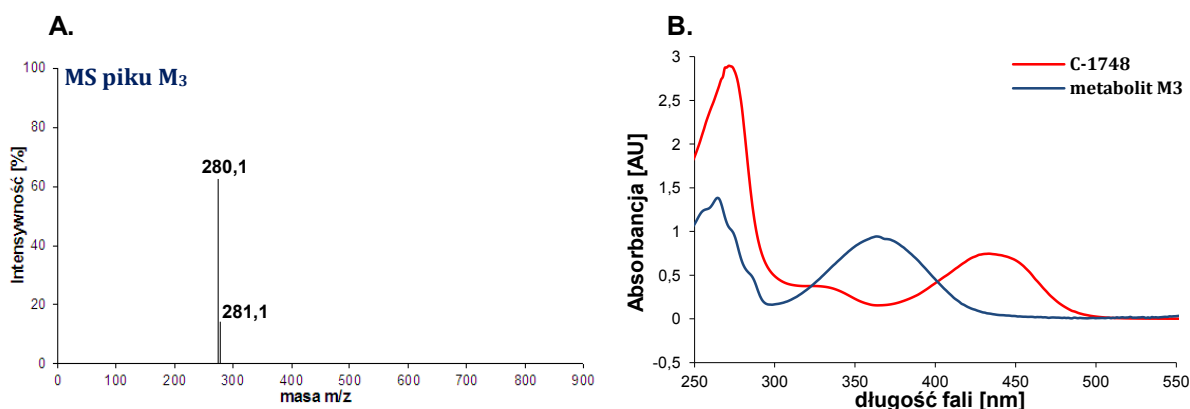
Porównanie widm ESI-MS i UV-Vis z widmami produktu otrzymanego w wyniku redukcji z DTT (Wiśniewska, 2008) pozwala stwierdzić, że identyczny metabolit otrzymałam w komórkach HepG2. Widmo fragmentacyjne wykazało bowiem wówczas obecność jonu masowego o wartości $m/z=225$, co świadczyło o parzystej liczbie atomów azotu. Wskazywało to na fragmentację w łańcuchu hydroksyloaminowym z odejściem fragmentu zawierającego atom azotu, a nie tlenu. Jon ten powstawał w wyniku rozpadu wiązania między atomem węgla i grupą hydroksylową.



Rys. 23. Proponowana struktura chemiczna produktu M_1 , $m/z = 268,1$.

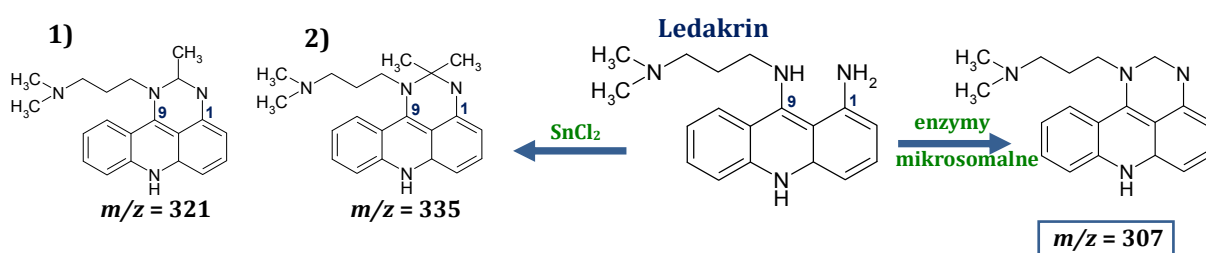
❖ Analiza struktury piku M_3 .

Analiza widma masowego piku M_3 wykazała obecność jonu masowego $m/z = 280,1$ (rys. 24A). Wartość ta jest o 18 jednostek niższa od jonu masowego substratu. Zależność tę można zapisać jako: $[M_s - 18 + 1]$. Zmienione widmo UV-Vis tego produktu w stosunku do substratu odpowiada zmianom w pierścieniu akrydyny (rys. 24B).



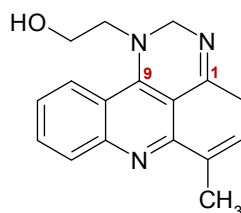
Rys. 24. A: widmo masowe piku produktu M₃ (czas retencji ok. 27 minut, rys. 21); B: porównanie widm UV-Vis związku C-1748 oraz produktu M₃ powstającego w komórkach HepG2.

Powyższe dane sugerują, że na drodze transformacji metabolicznej mogło dojść do odszczepienia cząsteczki wody w łańcuchu bocznym, stąd wartość m/z o 18 jednostek niższa. Przypuszczenia te oparłam na wynikach określających struktury produktów z czynnikiem redukcyjnym DTT [Wiśniewska, 2008]. Przeprowadzono w nich szeroką analizę struktur określonych wcześniej dla ledakrinu [Gorlewska i wsp., 2001]. Kilka z nich zawierało zamknięty pierścień pomiędzy atomami azotu w pozycji 1 i 9 pierścienia akrydyny (rys. 25).



Rys. 25. Struktury chemiczne produktów redukcji Ledakrinu z udziałem SnCl_2 oraz enzymów mikrosomalnych (według [Gorlewska K i wsp., 2001]).

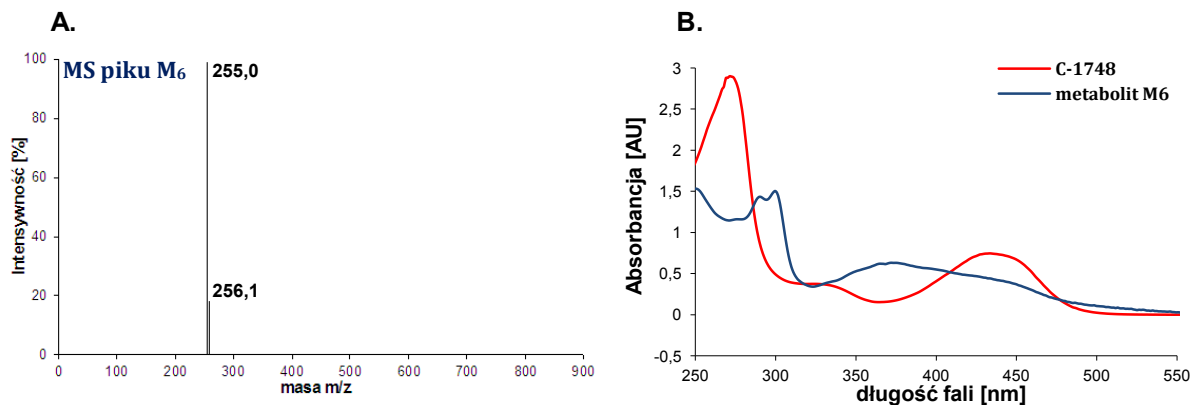
Biorąc pod uwagę powyższe dane przyjąłam, że struktura produktu M₃ posiada dodatkowy analogiczny pierścień. Wartość $m/z = 280,1$ odpowiada po uwzględnieniu różnic strukturalnych (łańcuch boczny i grupa CH_3) produktowi Ledakrinu o $m/z = 307$. Proponowaną strukturę przedstawiłam na rys. 26.



Rys. 26. Proponowana struktura chemiczna produktu M₃, $m/z = 280,1$.

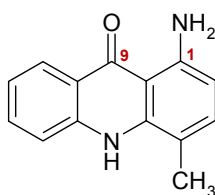
❖ Analiza struktury piku M_6 .

Kolejnym pikiem poddanym analizie HPLC-MS był produkt M_6 o czasie retencji ok. 29 minut. Widmo MS tego piku wykazało obecność charakterystycznego jonu masowego $m/z = 255$, $[M_s - 43]$ (rys. 27A).



Rys. 27. A: widmo masowe piku produktu M_6 (czas retencji ok. 29 minut, rys. 20); B: porównanie widm UV-Vis związku C-1748 oraz produktu M_6 powstającego w komórkach HepG2.

Na podstawie otrzymanych wyników oraz wcześniejszych doniesień na temat redukcji Ledakrinu [Wiśniewska, 2008] postawiłam wniosek, że produkt M_6 to cząsteczka 1-nitroakrydonu, powstała na drodze całkowitej redukcji grupy nitrowej w pozycji 1 pierścienia akrydyny do grupy aminowej i odszczepieniu aminoalkilowego łańcucha bocznego. Z wcześniejszych badań ledakrinu wynika, że atom tlenu w pozycji 9 pierścienia pochodzi z grupy nitrowej znajdującej się w pozycji 1 pierścienia, a nie z cząsteczki wody [Konieczny i Konopa, 1980]. Wskazuje na to wpływ oddziaływań pomiędzy podstawnikami w pozycji 1 i 9 na przebieg transformacji tych związków. Poniżej na rys. 28 przedstawiono proponowaną strukturę chemiczną produktu M_6 .

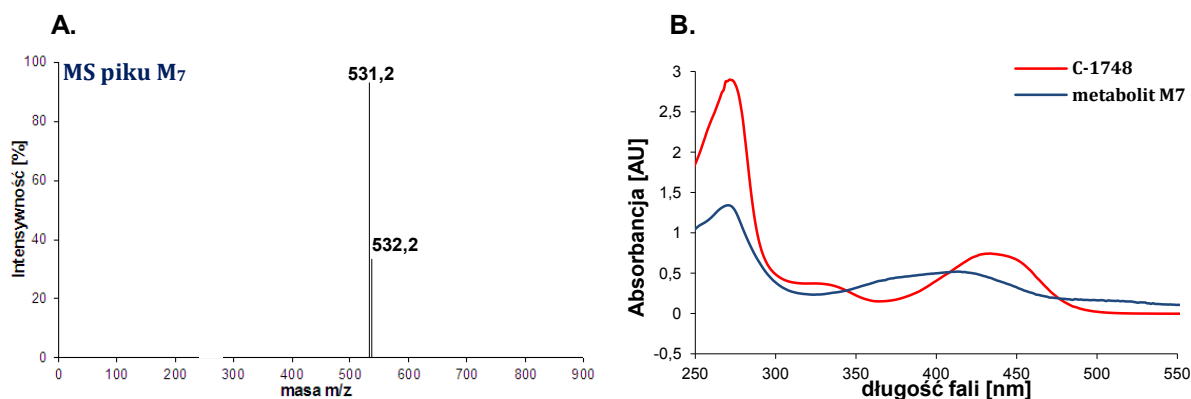


Rys. 28. Proponowana struktura chemiczna produktu M_6 , $m/z = 225,0$.

❖ Analiza struktury piku M_7 .

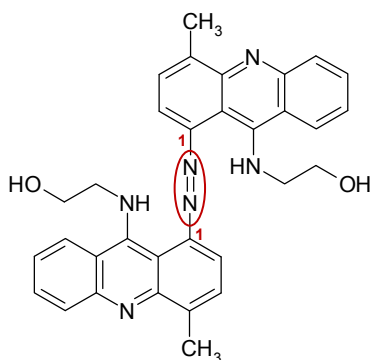
Produkt M_7 powstający podczas przemian metabolicznych związku C-1748 w komórkach HepG2, o czasie retencji ok. 31 minut, wykazał maksimum absorbancji widma UV-Vis przy

długości fali 420 nm (rys. 29B). Wynik ten wskazuje na zmiany w układzie chromoforowym cząsteczki substratu.



Rys. 29. A: widmo masowe pików produktu M₇ (czas retencji ok. 31 minut, rys. 20); B: porównanie widm UV-Vis związku C-1748 oraz produktu M₇ powstającego w komórkach HepG2.

Widmo MS produktu M₇ wykazało obecność jonu masowego o ładunku dodatnim $m/z = 531,2$ (rys. 29A). Podwyższenie masy cząsteczkowej substratu o 233 jednostki wskazuje, że produkt ten jest prawdopodobnie dimerem. Zależność tę można zapisać jako: $2(M - 2) + 1$, gdzie M oznacza wartość jonu masowego cząsteczki substratu z całkowicie zredukowaną grupą nitrową do aminowej (produktu M1). W konsekwencji zaproponowaną strukturą chemiczną produktu M₇ jest dimer aza-akrydyny, powstający podczas reakcji sprzęgania dwóch atomów azotu w pozycji 1 pierścienia aromatycznego (rys. 30). Metabolit M₇ jest prawdopodobnie wynikiem reakcji redukcji pochodnych akrydyny.



Rys. 30. Proponowana struktura chemiczna produktu M₇, $m/z = 531,2$.

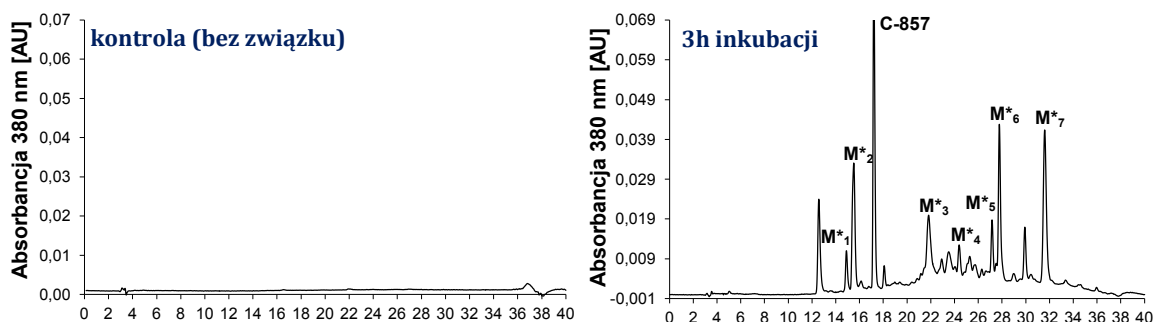
Podsumowując, pochodna C-1748 metabolizuje w komórkach nowotworu wątroby, HepG2 do 4 głównych metabolitów: produktu ze zredukowaną grupą nitrową, produktu z dodatkowym pierścieniem pomiędzy atomami azotu w pozycji 1 i 9 pierścienia akrydyny,

produktu ze zredukowaną grupą nitrową oraz odszczepionym łańcuchem alifatycznym oraz dimeru dwóch cząsteczek związku z wiązaniem –N=N- pomiędzy atomami azotu w pozycji 1 pierścienia. Produkt M1 występuje w najniższym stężeniu. Metabolit M3 osiąga najwyższe stężenie w porównaniu do innych produktów, a najwyższy jego pik można zaobserwować na chromatogramie po 12h inkubacji. Stężenie produktu M₇ rośnie wraz z wydłużającym się czasem traktowania komórek badana pochodną.

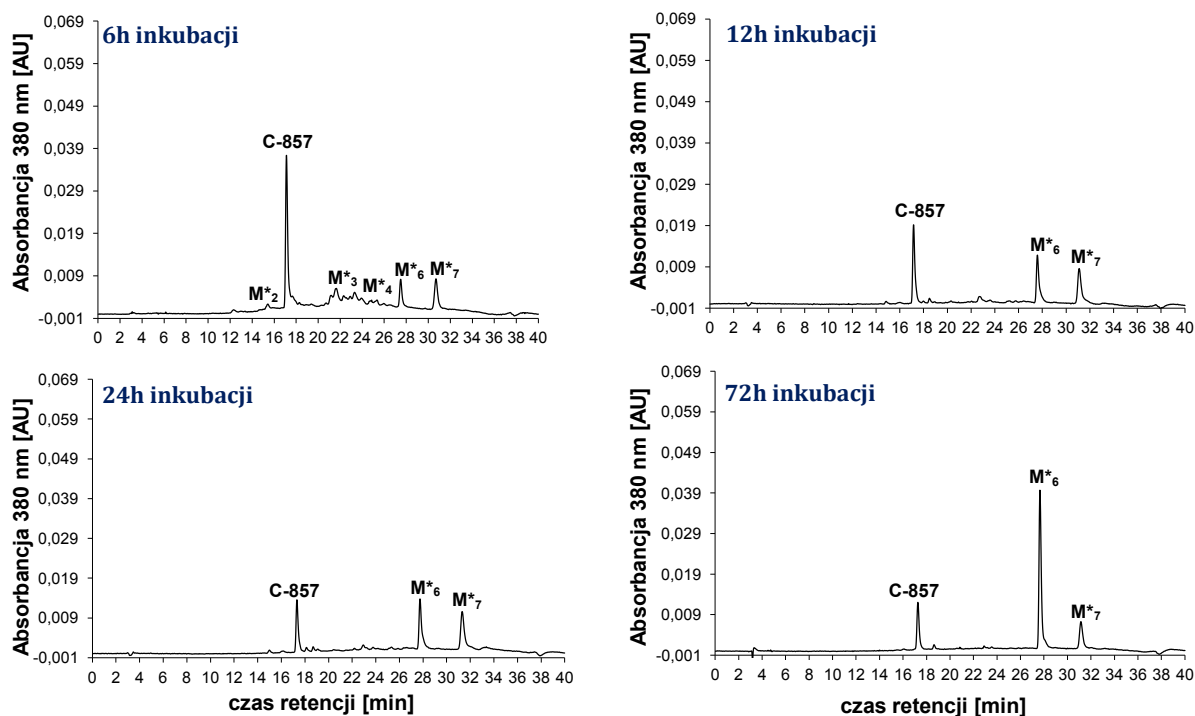
IV.1.3.2. Wyniki badań metabolizmu C-857 – identyfikacja struktur chemicznych produktów.

W celu porównania przemian metabolicznych w komórkach nowotworowych dwóch pochodnych różniących się reaktywnością przeprowadziłam analogiczne badania jak dla związku C-1748, pochodnej C-857⁸. Obraz chromatograficzny przemian C-857 w linii komórkowej nowotworu wątroby, HepG2, wyraźnie wskazuje na jego wyższą podatność na transformacje z udziałem enzymów metabolizujących (rys. 31). Jego stopień przemiany po kolejnych czasach inkubacji był znacznie wyższy w porównaniu do C-1748. Można również zaobserwować wyższą liczbę metabolitów. Wyróżnić można 7 głównych produktów. Stopień przemiany związku rośnie wraz z wydłużaniem czasu jego inkubacji, co więcej intensywność przemian jest szczególnie widoczna po krótkich czasach. Po dłuższych czasach inkubacji, 12h, 24h i 72h widoczne są tylko dwa metabolity, M₆ i M₇.

C-857: HepG2; 0,1 μM związku



⁸ Związek C-857 w badaniach *in vitro* wykazywał wyższą reaktywność w obecności frakcji enzymów mikrosomalnych, ale niestety mimo zadowalającej aktywności przeciwnowotworowej w stosunku do raka prostaty Duning przeszczepialnego na wsobnych szczurach rasy Copenhagen, uznawanego za podstawowy nowotwór doświadczalny, wykazywał zbyt wysoką toksyczość ogólną [Ashok i wsp., 2007]. W przeprowadzonych pracach badawczych pochodna ta służy jako związek wyjściowy do syntezy analogu z podstawnikiem metylovym. Substytucja ta prowadzi do zmniejszenia podatności związku na redukcję, co najprawdopodobniej jest przyczyną obniżenia toksycznego działania C-1748.

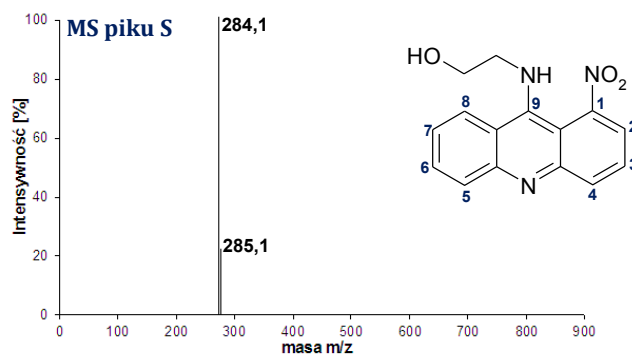


Rys. 31. Chromatograficzny obraz przemian metabolicznych związku C-857 w komórkach HepG2 po różnych czasach inkubacji komórek ze związkiem; 0,1 mM C-857, 2 mln komórek, [chromatograf HPLC Waters Breeze].

IDENTYFIKACJA STRUKTUR CHEMICZNYCH PRODUKTÓW METABOLIZMU C-857.

W dalszym etapie badań podjęłam próbę określenia struktur chemicznych produktów przemiany metabolicznej pochodnej C-857, pozbawionej w strukturze pierścienia akrydyny grupy metylowej. Ze względu na fakt bardzo dużej reaktywności związku, a co za tym idzie powstawania metabolitów niestabilnych, struktury nie wszystkich produktów udało się zidentyfikować. Jednakże przeprowadzone badania umożliwiły wyłonić, podobnie jak w przypadku analogu C-1748, 4 główne produkty biotransformacji.

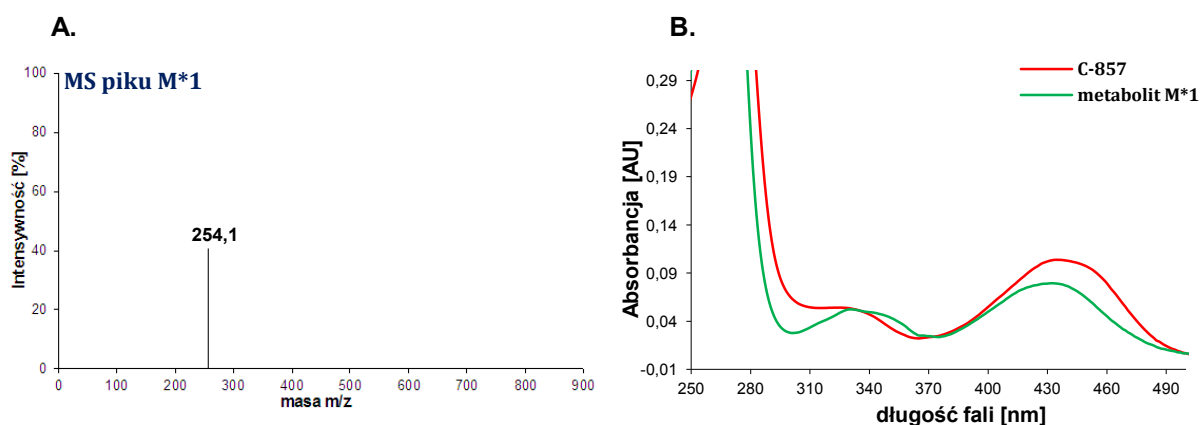
Widmo MS pików odpowiadającego substratowi (S) wykazało obecność dwóch głównych jonów masowych o wartościach m/z : 284,1 i 285,1 (rys. 32) charakterystycznych dla struktury C-857 ($[M_s + 1]$ i $[M_s + 2]$).



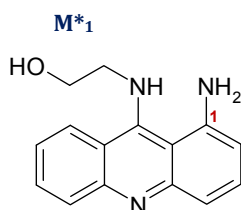
Rys. 32. Widmo masowe pików substratu C-857 (czas retencji ok. 17 minut, rys. 31).

❖ Analiza struktury piku M^*_1 .

Widmo MS piku M^*_1 zawiera intensywny jon masowy $m/z = 254,1$ (rys. 33A). Wartość tego jonu, podobnie jak jonu masowego produktu M_1 pochodnej C-1748, jest niższa od wartości m/z substratu o 30 jednostek, podobnie jak określono dla produktu reakcji z DTT. Zależność ta pozwala sądzić, że mamy do czynienia z cząsteczką o masie: $[M_s - 30 + 1] = [M_s - (2*M_O + 2*M_H) + 1]$. Widmo UV-Vis jest różne od widma substratu, a identyczne z widmem produktu z DTT (rys. 33B). Na podstawie tych porównań, strukturę metabolitu M^*_1 powstającego w komórce określiłam jako 1-amino-9-hydroksyaminoakrydyna (rys. 34).



Rys. 33. A: widmo masowe piku produktu M^*_1 (czas retencji ok. 15 minut, rys. 21); B: porównanie widm UV-Vis związku C-857 oraz produktu M^*_1 powstającego w komórkach HepG2.

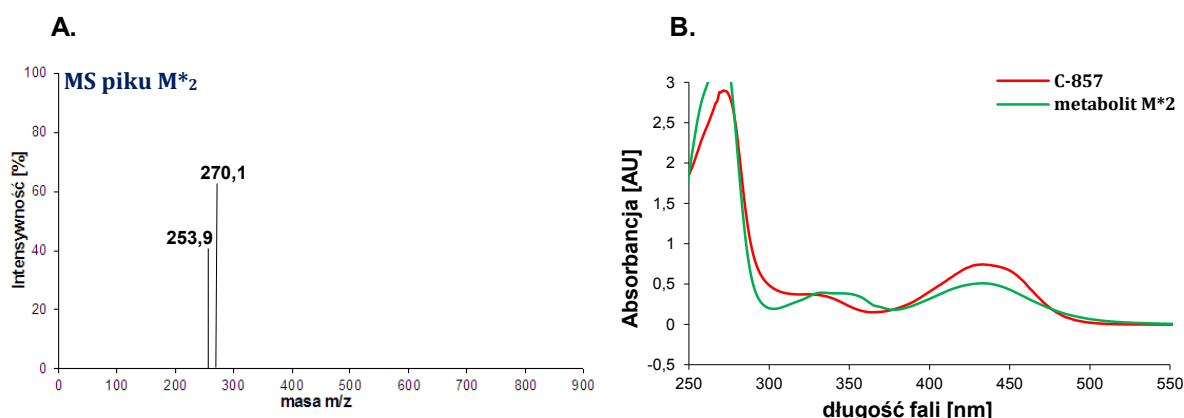


Rys. 34. Proponowana struktura chemiczna produktu M^*_1 , $m/z = 254,1$.

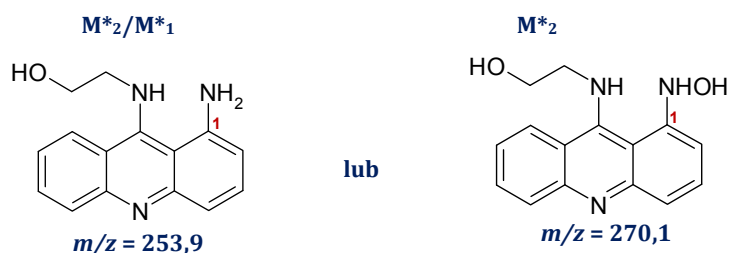
❖ Analiza struktury piku M^*_2 .

Kolejnym produktem poddanym analizie ESI-MS był metabolit o symbolu M^*_2 . Jego widmo masowe wykazało obecność dwóch jonów masowych $m/z = 270,1$ oraz $m/z = 254,1$ (rys. 35A), co odpowiada wartości odpowiednio o 14 oraz o 30 jednostek niższą od wartości m/z substratu. Badania z czynnikiem redukcyjnym DTT [Wiśniewska, 2008] wykazały obecność analogicznych produktów. Zidentyfikowano je wówczas jako produkty pozbawione jednego albo dwóch atomów tlenu (produkt M^*_1) z dodatkowymi atomami wodoru: $[M_s - 14 + 1] = -(M_O + 2*M_H) + 1$ lub $[M_s - 30 + 1] = [M_s - (2*M_O + 2*M_H) + 1]$, a więc

cząsteczek o zredukowanej grupie nitrowej odpowiednio do NHOH^9 i NH_2 jak przedstawiono na rys. 36.



Rys. 35. A: widmo masowe piku produktu M^*_2 (czas retencji ok. 16 minut, rys. 22); B: porównanie widm UV-Vis związku C-857 oraz produktu M^*_2 powstającego w komórkach HepG2.

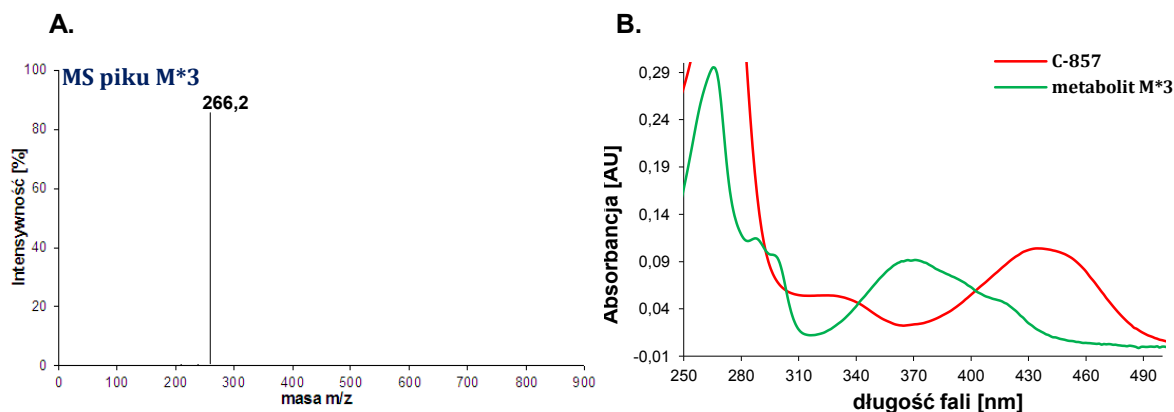


Rys. 36. Proponowane struktury chemiczne produktu M^*_2 , $m/z = 254,1$ $m/z = 270,1$.

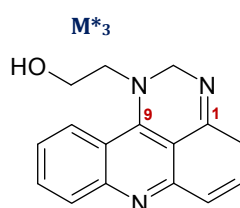
❖ Analiza struktury piku M^*_3 .

Analiza widma masowego piku M^*_3 wykazała obecność jonu masowego $m/z = 266,2$ (rys. 37A). Jest on tożsamy z jonem masowym $m/z = 280$ produktu M_3 związku C-1748, ponieważ w obu przypadkach różnica pomiędzy substratem a produktem wyniosła 18, co zapisać można jako $[\text{M}_s - 18 + 1]$. Opierając się na wcześniejszych wynikach dotyczących metabolizmu z DTT [Wiśniewska, 2008], w których analizowano metabolizm Ledakrinu [Gorlewska i wsp., 2001], przyjmuję że metabolit M^*_3 posiada strukturę z dodatkowym pierścieniem pomiędzy atomami azotu w pozycjach 1 i 9 pierścienia akrydyny (rys. 38).

⁹ Niektóre izoenzymy cytochromu P450 są zdolne do katalizowania reakcji redukcji aromatycznych i alifatycznych związków nitrowych. Jest to możliwe dzięki obecności jonu żelaza (II) w cyklu katalitycznym. Ta zredukowana forma enzymu jest dobrym przenośnikiem elektronów. Atom azotu w grupie nitrowej jest obdarzony cząstkowym ładunkiem dodatnim i wykazuje właściwości elektrofilowe, co powoduje, że łatwo ulega redukcji. Jednym z produktów pośrednich tej reakcji jest hydroksyloamina RNHOH . Końcowym produktem reakcji jest grupa aminowa, która jest trwała w środowisku reakcyjnym. Wszystkie produkty pośrednie tej reakcji są reaktywne i mogą oddziaływać z makromolekułami komórkowymi tj. z DNA czy białkami dając efekty toksyczne, kancerogenne i mutagenne [Noguera i Freedman, 1996].



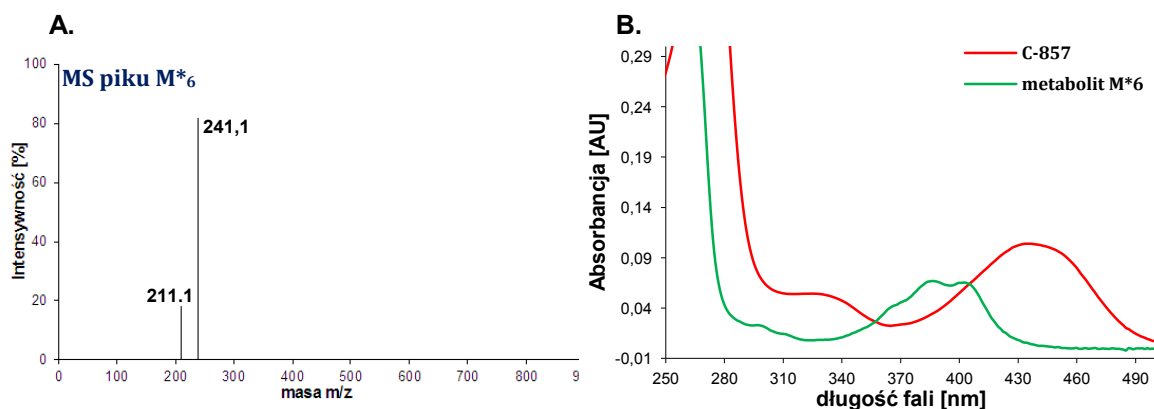
Rys. 37. A: widmo masowe pikiu produktu M^*_3 (czas retencji ok. 22 minut, rys. 22); B: porównanie widm UV-Vis związku C-857 oraz produktu M^*_3 powstającego w komórkach HepG2.



Rys. 38. Proponowana struktura chemiczna produktu M^*_3 , $m/z = 266,2$.

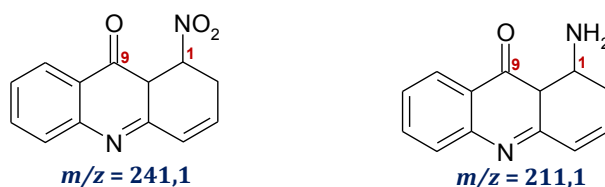
❖ Analiza struktury pików M^*_6 .

W widmie MS zebranych dla pikiu produktu M^*_6 zaobserwowałam obecność dwóch jonów masowych, bardziej intensywnego $m/z = 241$ oraz mniej o wartości $m/z = 211,1$ (rys. 39A).



Rys. 39. A: widmo masowe pikiu produktu M^*_6 (czas retencji ok. 28 minut, rys. 22); B: porównanie widm UV-Vis związku C-857 oraz produktu M^*_6 powstającego w komórkach HepG2.

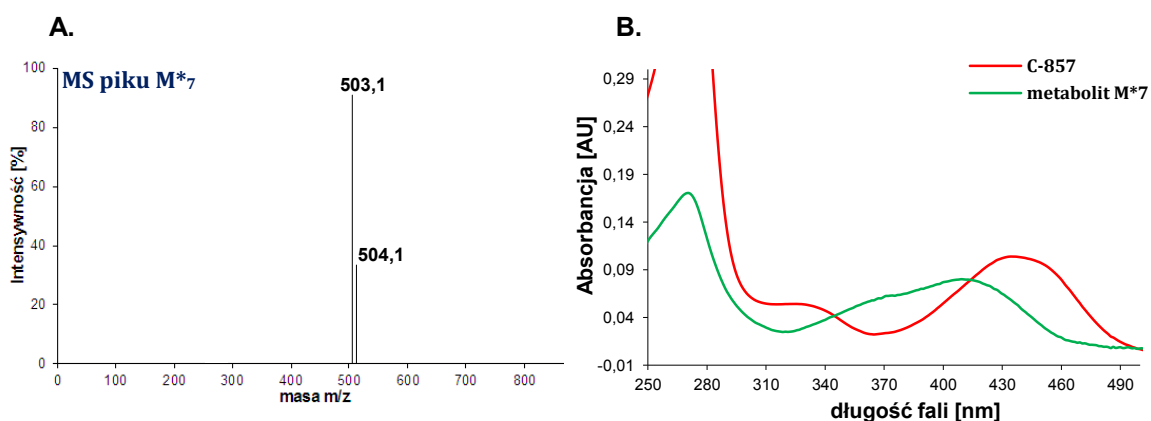
Wskazuje to na obecność dwóch metabolitów, które ze względu na bardzo zbliżone czasy retencji nie rozdzieliły się podczas analizy HPLC. Wartości zaobserwowanych jonów masowych odpowiadają strukturom: 1 – nitroakrydonu ($m/z = 241,1$) oraz 1 – aminoakrydonu ($m/z = 211,1$) (rys. 40), które udowodniono wcześniej z użyciem techniki NMR i HR-MS [Wiśniewska, 2008].



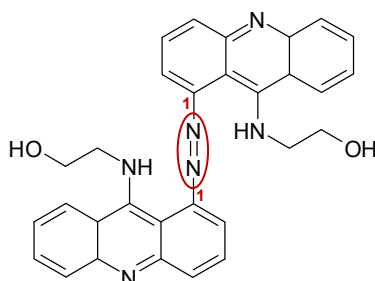
Rys. 40. Proponowane struktury chemiczne produktu M^*_6 , $m/z = 241,1$ i $m/z = 211,1$.

❖ Analiza struktury pików M^*_7 .

Widmo MS produktu M^*_7 , nie zaobserwowanego wcześniej w badaniach z DTT i enzymami mikrosomalnymi, zawierało główny jon masowy o wartości $m/z = 503,1$ (rys. 41A). Wskazuje to na podwyższenie masy cząsteczkowej substratu o 233 jednostek. Maksimum absorpcji na widmie UV-Vis widoczne było przy długości fali 420 nm (rys. 41B). Podobny rezultat otrzymano w wyniku analizy ESI-MS produktu M_7 pochodnej C-1748. Opierając się na tych wynikach, zaproponowaną strukturą chemiczną produktu M^*_7 jest dimer aza-akrydyny, który powstaje podczas reakcji redukcji grupy nitrowej na skutek sprzęgania dwóch atomów azotu w pozycji 1 pierścienia akrydyny (rys. 42). Metabolit ten jest analogiczny do metabolitu M_7 pochodnej C-1748.



Rys. 41. A: widmo masowe pików produktu M^*_7 (czas retencji ok. 32 minut, rys. 22); B: porównanie widm UV-Vis związku C-857 oraz produktu M^*_7 powstającego w komórkach HepG2.



Rys. 42. Proponowane struktury chemiczne produktu M^*_7 , $m/z = 503,1$.

IV.1.3.3. Porównanie przemian metabolicznych C-1748 i C-857 w HepG2.

Podsumowując ten etap badań można stwierdzić, że oba związki wnikają do komórek HepG2 i ulegają w nich przemianom metabolicznym. Istotnym podobieństwem pomiędzy obiema pochodnymi jest fakt, że ich metabolizm jest procesem szybkim. W obu przypadkach już po 3 godzinach od dodania związku do pożywki hodowlanej, widoczne są w ekstrakcie komórkowym wszystkie powstające metabolity. Ich stężenie zmienia się w zależności od wydłużającego czasu inkubacji. Wspólną cechą jest też to, że ich liczba maleje po długich czasach inkubacji. Wskazuje to na nietrwałość metabolitów związanych z ich reaktywnością, co prowadzi do wiązania się do biomolekuł, takich jak białka czy DNA.

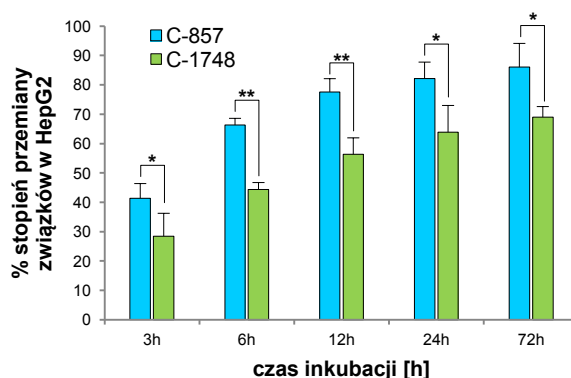
Dla porównania reaktywności związków wyznaczyłam stopień przemiany (y) każdego z nich, na podstawie pola powierzchni pod pikiem i zilustrowałam za pomocą wykresu słupkowego. Stosowano następującą zależność:

$$y = 100 \cdot (1 - a/b) [\%]$$

gdzie:

a – pole powierzchni pod pikiem substratu po odpowiednim czasie trwania reakcji [$\mu\text{V}\cdot\text{s}$],

b – pole powierzchni pod pikiem substratu na starcie reakcji [$\mu\text{V}\cdot\text{s}$], w tym przypadku za start reakcji uznano minimalny czas (30 min) inkubacji, który wystarczył na wniknięcie związku do komórek.



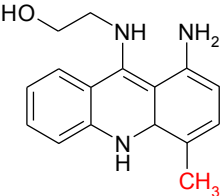
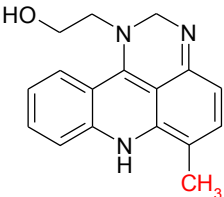
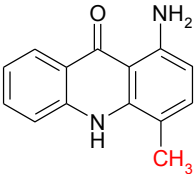
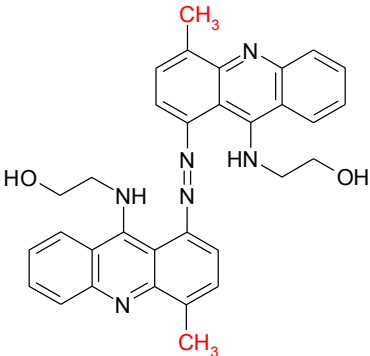
Rys. 43. Porównanie stopnia przereagowania związków C-1748 i C-857, będących pochodnymi 9-amino-1-nitroakrydyny, w komórkach ludzkiego nowotworu wątroby, HepG2, w zależności od czasu inkubacji. Prezentowane wyniki są średnią z dwóch niezależnych doświadczeń wraz z odchyleniami standardowymi. Dla określenia poziomu istotności przeprowadzono test Studenta, gdzie $*p < 0,05$ – wartości istotne statystycznie.

Na ustalonym poziomie istotności $p=0,05$, otrzymane % stopnie przemiany związków w komórkach HepG2 dwóch pochodnych 9-amino-1-nitroakrydyny różnią się między sobą w znaczącym stopniu. Zauważyć można, że pochodna C-857, szybciej ulega przemianom metabolicznym, bo już po 3 godzinach, a po dłuższych czasach inkubacji ilość metabolitów spada, ze względu na ich niską stabilność. W przypadku pochodnej C-1748, najwyższe

stężenie produktów występuje po 12 godzinach inkubacji i są one widoczne aż do 72 godzin inkubacji. Postawiona wcześniej hipoteza o różnym przebiegu szlaków metabolicznych w komórkach nowotworowych została potwierdzona, a różna reaktywność pochodnych 9-amino-1-nitroakrydyny jest wyraźnie widoczna na przedstawionych chromatografach (rys. 20 i 31) oraz histogramie (rys. 43).

Wyniki opisanych powyżej badań analizy ESI-MS powstałych produktów dostarczyły informacji, że 4 główne produkty obu związków mają taką samą strukturę chemiczną. Tabela 4 zawiera zestawienie struktur tych metabolitów wraz z ich wartością m/z oraz symbolami stosowanymi w niniejszej pracy.

Tabela 4. Struktury metabolitów pochodnych C-1748 i C-857 powstałych w komórkach HepG2.

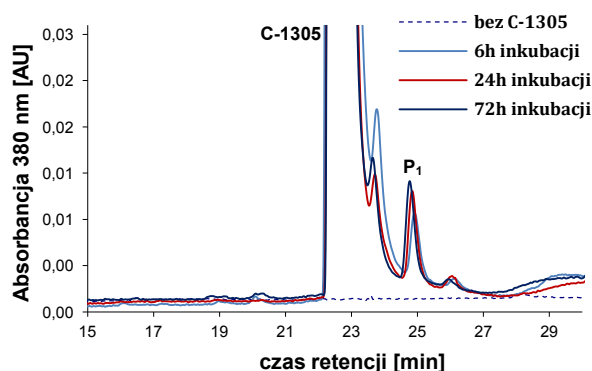
C-1748	m/z	Struktura	m/z	C-857
M₁	268,1		254,1	M*₁
M₃	280,1		266,2	M*₃
M₆	255,0		211,1	M*₆
M₇	531,2		503,1	M*₇

IV.1.3.4. Wyniki badań metabolizmu C-1305 – identyfikacja struktur chemicznych produktów.

Związek C-1305 należy do grupy pochodnych triazoloakrydonu, który posiada dodatkowy pięciocząłowy pierścień triazolu sprzężony ze strukturą akrydonu. Te różnice w strukturze pomiędzy pochodnymi 9-amino-1-nitroakrydyny (C-1748 i C-857) oraz triazoloakrydonu (C-1305) wskazywały, że ich całościowe przemiany metaboliczne w komórkach nowotworowych mogą być odmienne. Założenie to potwierdziłam w przeprowadzonych wcześniej badaniach w układach modelowych w obecności frakcji enzymów mikrosomalnych i rekombinantowych izoenzymów cytochromu P450. Wykazałam, że rekombinantowe izoenzymy P450 takie jak: CYP3A4, CYP2C9 i CYP1A2 nie wykazują aktywności wobec pochodnej C-1305 (rys. 18), metabolizują zaś związki C-1748 i C-857 (rys. 17).

Kontynuując badania, kolejnym etapem było poznanie przemian metabolicznych w komórkach nowotworowych w związku C-1305. Zastosowałam ustalone wcześniej warunki prowadzenia doświadczeń, tj. 0,1 μM stężenie C-1305, 2 mln komórek HepG2 oraz następujące czasu inkubacji komórek ze związkiem: 3, 6, 12, 24, 72 godziny. Poniżej na rys. 44, przedstawiłam chromatogramy obrazujące przemianę związku C-1305 po 3 wybranych czasach inkubacji. Otrzymane wyniki przeprowadzonych badań pozwoliły stwierdzić, że pochodna triazoloakrydonu metabolizuje tylko do jednego produktu P1, o czasie retencji o 2 minuty dłuższym niż czas retencji pików substratu, którego stężenie tylko nieznacznie zwiększało się wraz z wydłużającym się czasem inkubacji komórek ze związkiem.

C-1305: HepG2; 0,1 μM związku



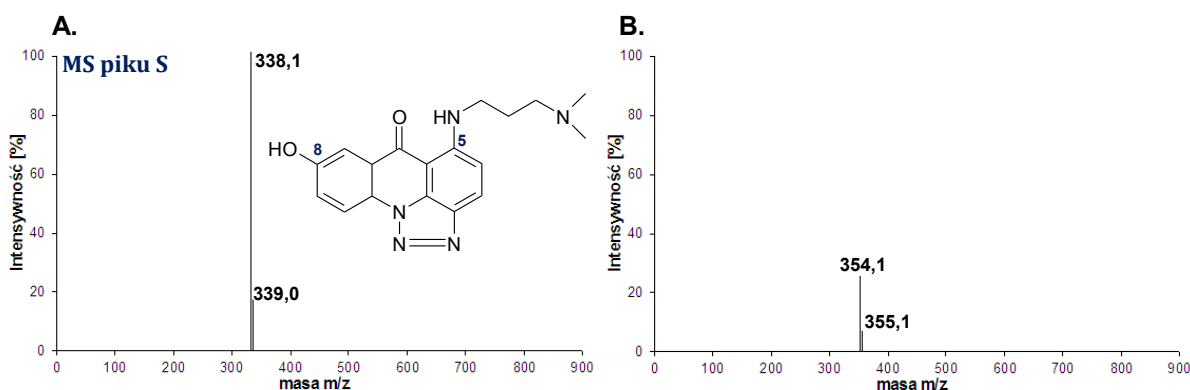
Rys. 44. Chromatograficzny obraz przemian metabolicznych związku C-1305 w komórkach HepG2 po 6h, 24h i 72h inkubacji komórek ze związkiem; 0,1 μM C-1305, 2 mln komórek, [chromatograf HPLC Waters Breeze].

Na przedstawionych chromatografach widoczny jest również drugi metabolit, o czasie retencji bardzo zbliżonym do czasu retencji substratu. Niestety mimo zmiany warunków analizy chromatograficznej nie udało się rozdzielić pików tego produktu od pików substratu.

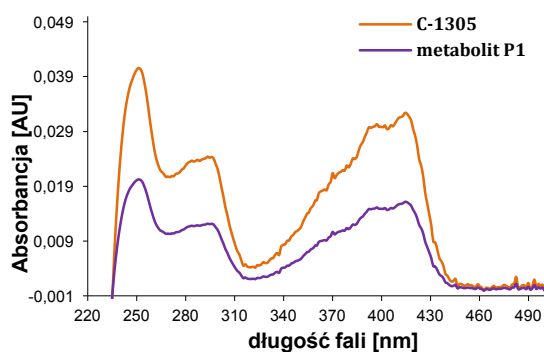
IDENTYFIKACJA STRUKTURY CHEMICZNEJ PRODUKTU METABOLIZMU C-1305.

W kolejnym etapie pracy określiłam strukturę chemiczną produktu metabolicznej transformacji badanej pochodnej, C-1305. W tym celu zarejestrowałam widmo masowe (MS) głównego pików produktu (P₁) powstającego podczas podziału metodą chromatografii cieczowej metanolowych ekstraktów komórkowych stosując technikę ESI-MS. Analizę rozpocząłam od pików odpowiadającego substratowi.

Widmo MS pików odpowiadającego substratowi (S) wykazało obecność dwóch głównych jonów masowych o wartościach $m/z = 338,1$ i $339,0$ (rys. 45A), charakterystycznych dla struktury C-1305 ($[M_S + 1]$ i $[M_S + 2]$). W widmie MS pików produktu powstałego w komórkach HepG2 jon masowy o najwyższej intensywności posiada wartość $m/z = 354,1$ (rys. 45B). Wynik pozwolił mi sądzić, że prawdopodobnie mam do czynienia z cząsteczką o masie: $[M_S + 16 + 1] = [M_S + M_O + 1]$, wskazującą na obecność dodatkowego atomu tlenu.

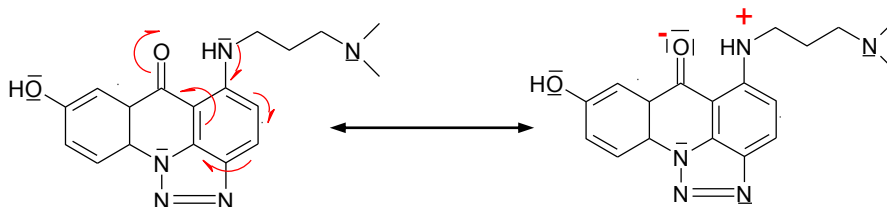


Rys. 45. Widma masowe: A – pików substratu, C-1305 (czas retencji ok. 23 minut, rys. 44) i B – pików produktu P₁ (czas retencji ok. 25 minut, rys. 45).



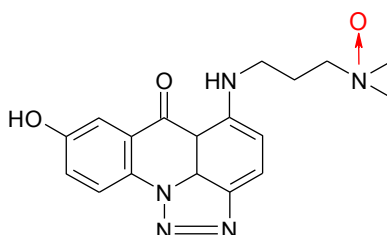
Rys. 46. Porównanie widm UV-Vis związku C-1305 i produktu P₁ jego przemian metabolicznych w komórkach HepG2.

Szczególną cechą produktu P₁ jest niemal identyczne z substratem widmo UV-Vis, co wskazuje na to, iż metabolit zawiera w swojej strukturze zachowany układ chromoforowy wyjściowego związku (rys. 46). Sugeruje to, że przyłączenie dodatkowego atomu tlenu cząsteczki C-1305 musiało nastąpić w reszcie diaminoalkilowej. Założono, że utlenianie najprawdopodobniej zaszło na heteroatomach, dlatego możliwymi miejscami takiej modyfikacji mogą być dwa atomy azotu łańcucha bocznego. Każdy z nich posiada wolną parę elektronową i teoretycznie może wiązaniem koordynacyjnym przyłączyć atom tlenu. Jednakże atomy te nie są równocenne. Atom połączony bezpośrednio z układem pierścieniowym cząsteczki C-1305, może stabilizować swoją parę elektronów poprzez struktury rezonansowe. W związku z tym bardziej podatny na procesy utleniania jest drugi atom azotu łańcucha bocznego, który nie ma możliwości stabilizacji swojej wolnej pary elektronowej na drodze rezonansu z elektronami pierścienia heterocyklicznego (rys.47).



Rys. 47. Schemat ilustrujący stabilizację rezonansową wolnej pary elektronowej na atomie azotu sąsiadującym z układem pierścieniowym cząsteczki C-1305 [Potęga, 2010].

Biorąc pod uwagę powyższe rozważania zaproponowaną strukturą chemiczną produktu P₁ jest N-tlenek w łańcuchu bocznym, która przedstawiona została na rys. 48.



Rys. 48. Proponowana struktura produktu P₁, m/z = 354,1.

Opierając się na przesłankach literaturowych [Krueger i wsp., 2006] oraz innych badaniach będących przedmiotem rozprawy doktorskiej Potęgi dotyczącej związku C-1311¹⁰ [Potęga, 2010], stwierdziłam, że w przemianie enzymatycznej C-1305 do N-tlenku bierze

¹⁰ Według autorki, pochodna imidazoakrydonu, C-1311, która podobnie jak C-1305 nie jest metabolizowana przez izoenzymy P450, przekształcana jest do N-tlenku z udziałem FMO. Badania te obejmowały reakcje z udziałem rekombinantowych enzymów FMO1/3/5 oraz identyfikację ESI-MS otrzymanych produktów. Analizy te potwierdziły powstawanie w tych reakcjach N-tlenku, o strukturze analogicznej do zaproponowanej struktury produktu P₁ otrzymanego w komórkach HepG2.

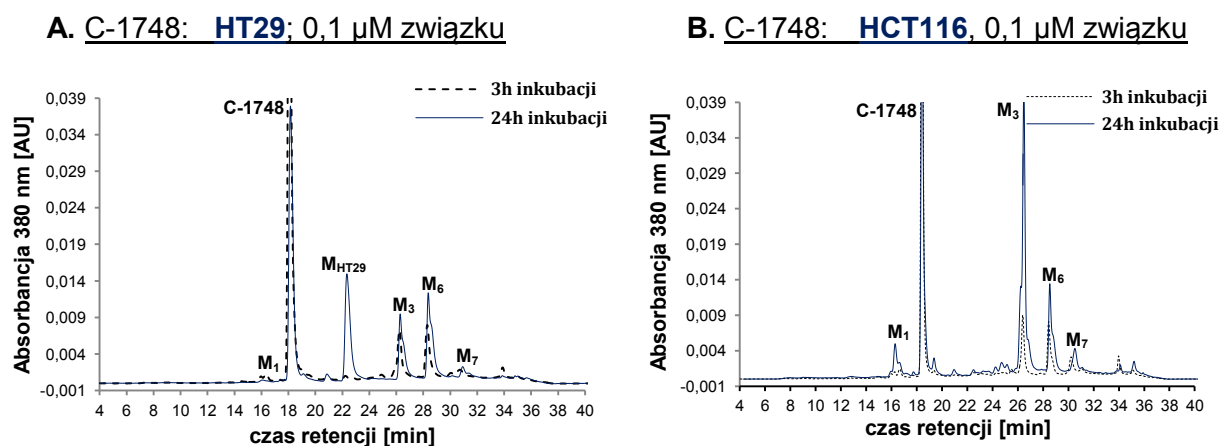
udział monoooksygenaza flawinowa, FMO. Enzymy te bowiem, utleniają nukleofilowe związki zawierające w swojej strukturze heteroatom, głównie atom azotu i siarki.

IV.1.4. Charakterystyka przemian metabolicznych C-1748, C-857 i C-1305 w komórkach nowotworu jelita HT29 i HCT116.

Poziom ekspresji genów izoenzymów cytochromu P450 oraz ich aktywność katalityczna w liniach nowotworu jelita grubego, HT29 i HCT116, są blisko o połowę niższe od tych w komórkach HepG2 (rys. 19, tabela 3). Wobec tego spodziewać się można, że stopień przemiany badanych pochodnych będzie inny niż w linii HepG2.

IV.1.4.1. Wyniki badań metabolizmu C-1748 i C-857.

Stosując identyczne warunki prowadzenia reakcji i układ chromatograficzny, jak dla badań pochodnych akrydyny w komórkach nowotworu wątroby, otrzymałam obrazy chromatograficzne, przedstawiające obraz przemian metabolicznych związku C-1748 dwóch wybranych czasach inkubacji komórek HT29 i HCT116 ze związkiem.

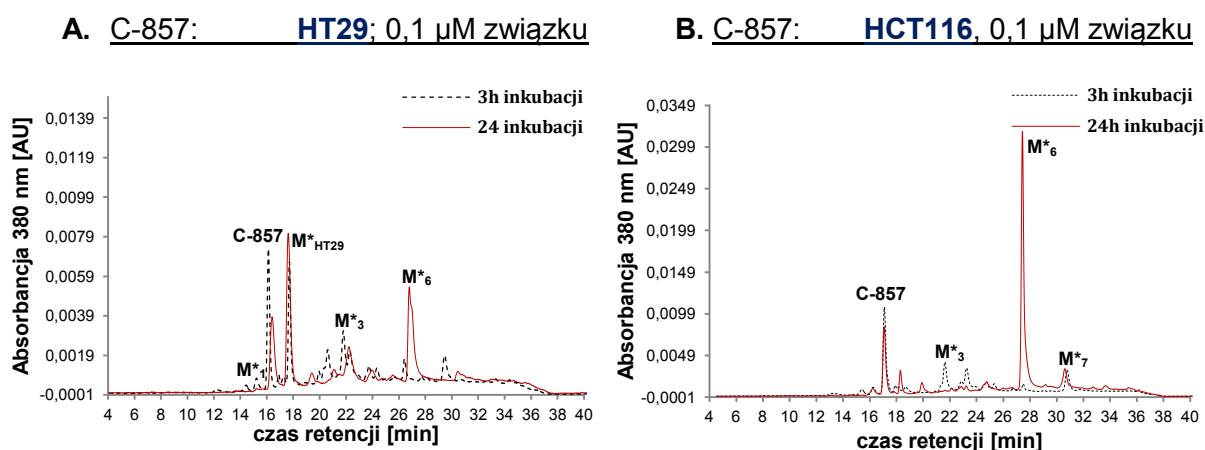


Rys. 49. Chromatograficzny obraz przemian metabolicznych związku C-1748 w komórkach A: HT29 oraz B: HCT116 po 3h i 24h inkubacji komórek ze związkiem; 0,1 μ M C-1748, 2 mln komórek, [chromatograf HPLC Waters Breeze].

Biorąc pod uwagę fakt, że związek C-1748 jest metabolizowany przez izoenzymy cytochromu P450 oraz to, że poziom tych enzymów jest ok. 2-rotnie niższy w komórkach raka jelita grubego niż w nowotworze wątroby, stopień przemiany C-1748 okazał się również mniej intensywny w liniach HT29 oraz HCT116. Podczas transformacji, co potwierdziła przeprowadzona analiza ESI-MS, powstały trzy metabolity obserwowane również w komórkach HepG2, jednakże w niższym stężeniu. Są to: produkt M_1 ze zredukowaną grupą nitrową, produkt M_3 z dodatkowym pierścieniem pomiędzy atomami azotu w pozycji

1 i 9 pierścienia akrydyny oraz produkt M_6 ze zredukowaną grupą nitrową oraz odszczepionym łańcuchem alifatycznym.

Poniżej przedstawiłam chromatograficzny obraz przemiany metabolicznej pochodnej C-857 (rys. 50). Tutaj również widoczny jest niższy stopień transformacji związku w porównaniu do komórek HepG2, co potwierdza mniejsza ilość powstałych produktów oraz ich niższe stężenie.



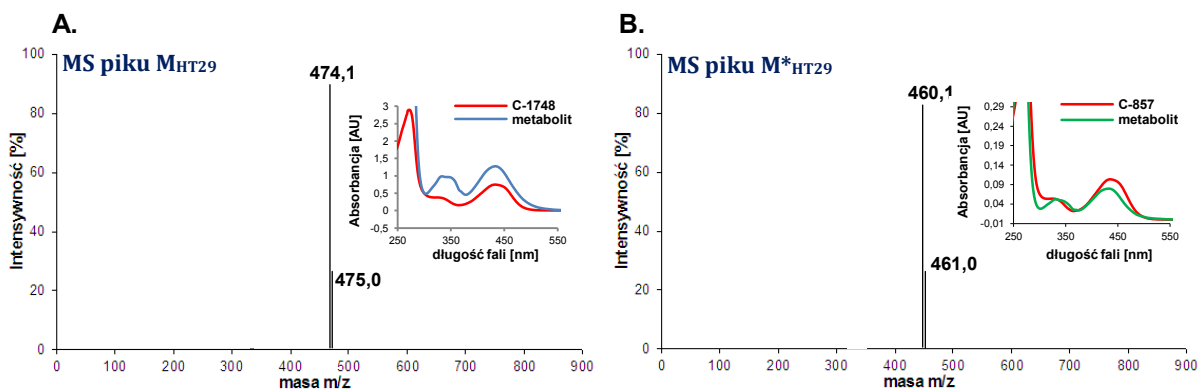
Rys. 50. Chromatograficzny obraz przemian metabolicznych związku C-857 w komórkach A: HT29 oraz B: HCT116 po 3h i 24h inkubacji komórek ze związkiem; 0,1 μ M C-1748, 2 mln komórek, [chromatograf HPLC Waters Breeze].

Zaskakującym wynikiem obu doświadczeń było pojawienie się w komórkach HT29 metabolitu o czasie retencji ok. 22 minuty (M_{HT29} , rys. 49) dla C-1748 oraz 18 minut (M^*_{HT29} , rys. 50) dla C-857. Nie zauważyłam jego obecności w komórkach HepG2, jak również w HCT116. Na tym etapie koniecznym było ustalenie struktury chemicznej tego produktu, co przeprowadziłam poniżej.

IV.1.4.1.1. Identyfikacja struktury chemicznej produktów M_{HT29} i M^*_{HT29} .

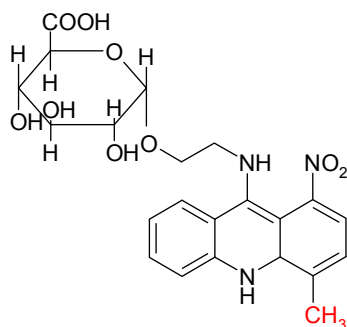
W celu zaproponowania struktur chemicznych produktów powstałych w komórkach HT29, metanolowe ekstrakty komórkowe poddałam analizie HPCL-ESI-MS. Poniżej przedstawiłam widma masowe uzyskane dla dwóch pików oznaczonych jako M_{HT29} oraz M^*_{HT29} .

Widmo MS pików produktu M_{HT29} zawierało główny jon masowy o wartości $m/z = 474,1$ (rys. 51A), natomiast metabolitu M^*_{HT29} , $m/z = 460,1$ (rys. 51B). W obu przypadkach otrzymane jony masowe odpowiadają masie cząsteczkowej związków powiększonej o 176 jednostek, co odpowiada $[M_s + 176 + 1]$. Po analizie doniesień literaturowych stwierdziłam, że wartość ta jest charakterystyczna dla masy molowej reszty kwasu glukuronowego [Gu i wsp., 1999].



Rys. 51. Widma masowe: A – pikę produktu M_{HT29} (czas retencji ok. 22 minut, rys. 49) i B – pikę produktu M^*_{HT29} (czas retencji ok. 18 minut, rys. 50).

Podczas reakcji glukuronidacji, kwas glukuronowy, w postaci aktywnej – kwasu urydyno-5'-difosfo-D-glukuronowego (UDPGA) – sprzęgany jest z grupą funkcyjną ksenobiotyku, zazwyczaj grupą hydroksylową, karboksylową, aminową bądź tiolową, co prowadzi do utworzenia O-, N- lub S-glukuronidów [Bourcier i wsp., 2010]. Na tej podstawie można wnioskować, że najbardziej prawdopodobne jest sprzęganie z grupą hydroksylową łańcucha bocznego. Rys. 52 przedstawia proponowaną strukturę produktów M_{HT29} i M^*_{HT29} .



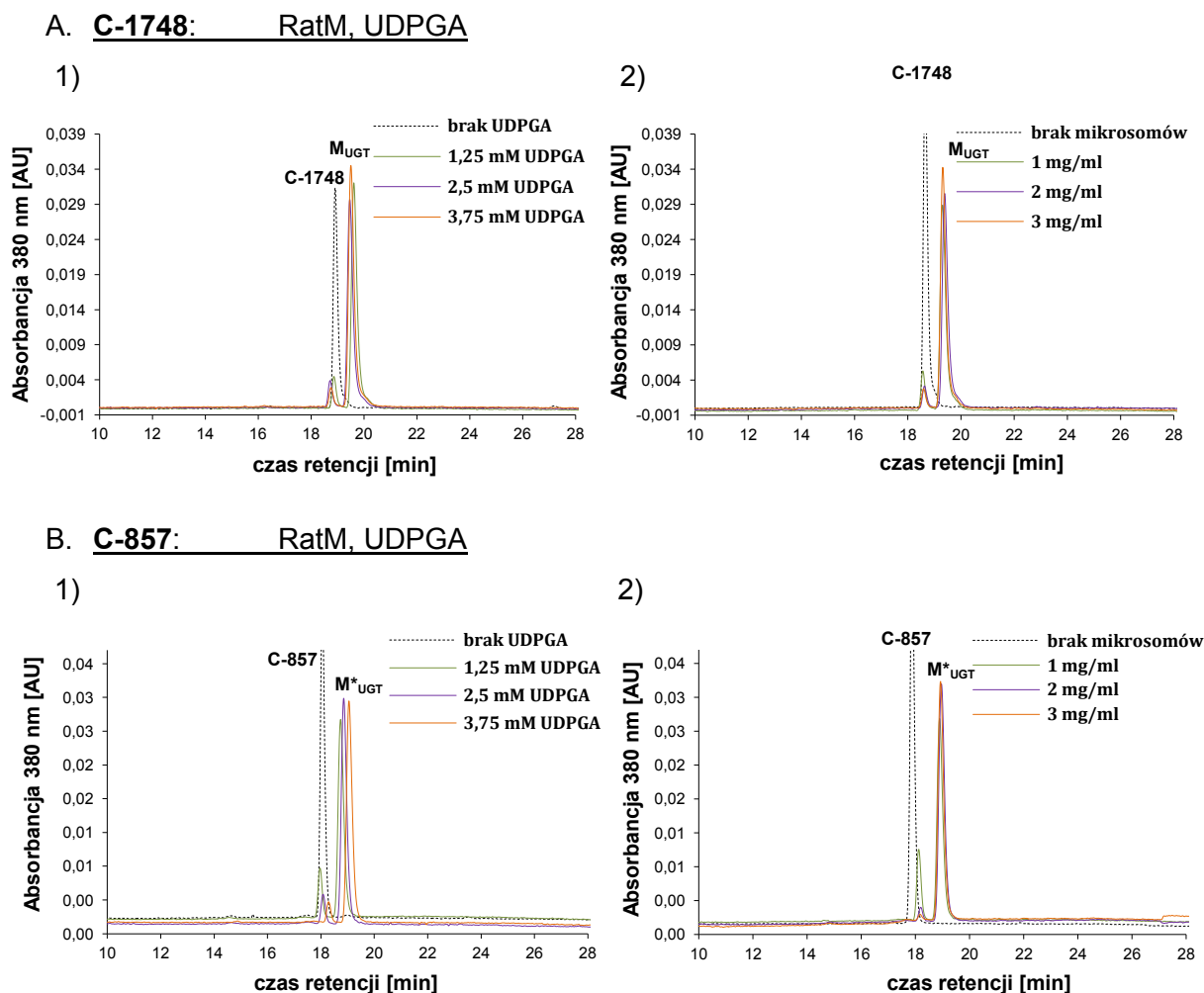
Rys. 52. Proponowana struktura chemiczna produktu M_{HT29} (z dodatkowym podstawnikiem metylowym – kolor czerwony) oraz M^*_{HT29} .

IV.1.4.1.2. Badanie przemian metabolicznych C-1748 i C-857 wobec enzymów frakcji mikrosomalnej wątroby szczura oraz UDPGA jako kofaktora UGT.

Dla potwierdzenia, że otrzymany produkt jest glukuronidem przeprowadziłam badania podatności C-1748 i C-857 na transformacje metaboliczne wobec enzymów UGT. Dokonałam analizy chromatograficznej składu mieszanin reakcyjnych zawierających frakcję mikrosomalną szczurzych komórek wątroby i badany związek w buforze o pH~7,5 z dodatkiem bezwodnego chlorku magnezu i alametycyny¹¹, do których po wstępnej

¹¹ Wg producenta (BD Gentest, USA) chlorek magnezu aktywuje enzymy metabolizujące zawarte we frakcji mikrosomalnej komórek wątroby, zaś alametycyna jest grzybowym antybiotykiem peptydowym o właściwościach jonoforowych, który zwiększa przepuszczalność błony retikulum endoplazmatycznego pęcherzyków mikrosomalnych dla UDPGA.

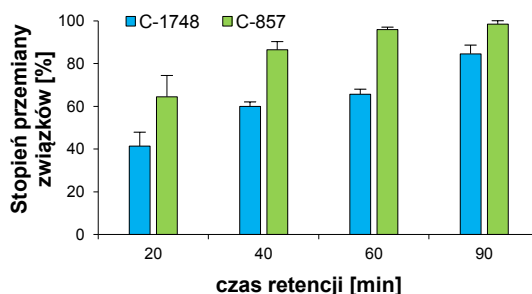
preinkubacji dodałam UDPGA, będący kosubstratem dla enzymów UGT. W celu ustalenia optymalnych warunków doświadczenia przeprowadziłam inkubacje obydwu pochodnych 9-amino-1-nitroakrydyny w warunkach ze zmieniającym się stężeniem kofaktora UDPGA (0; 1,25; 2,5, 3,75 mM) lub enzymów frakcji mikrosomalnej (0; 1; 2 i 3 mg/ml) (rys. 53).



Rys. 53. Liniowe obrazy chromatograficzne składu mieszanin reakcyjnych po 60 minutach inkubacji (37°C) A: 0,2 mM C-1748 i B: 0,2 mM C-857; 1) 2 mg/ml enzymów frakcji mikrosomalnej komórek wątroby szczura (przy zmieniającym się stężeniu UDPGA) i 2) 2mM UDPGA (przy zmieniającym się stężeniu mikrosomów szczurzych) [chromatograf HPLC Millenium].

Uzyskane obrazy chromatograficzne wskazały, iż w wyniku przemian C-1748 i C-857 przez enzymy UGT zawarte w pęcherzykach mikrosomalnych szczurzych komórek wątroby powstaje jeden produkt, o czasie retencji nieznacznie dłuższym od czasu retencji substratu. Stopień przemiany badanych pochodnych zależał zarówno od stężenia UDPGA, jak i stężenia białek frakcji mikrosomalnej. Kolejnym krokiem było zbadanie zależności stopnia przereagowania związków od czasu inkubacji. Zoptymalizowane końcowe stężenia składników mieszaniny reakcyjnej wynosiły: 0,1 mM C1748 lub C-857, 2 mg/ml białek

mikrosomalnych, 2,5 mM UDPGA. Jak wynika z wykresu przedstawionego poniżej na rys. 54, stężenie produktów obu związków wzrastało liniowo wraz z postępem reakcji.

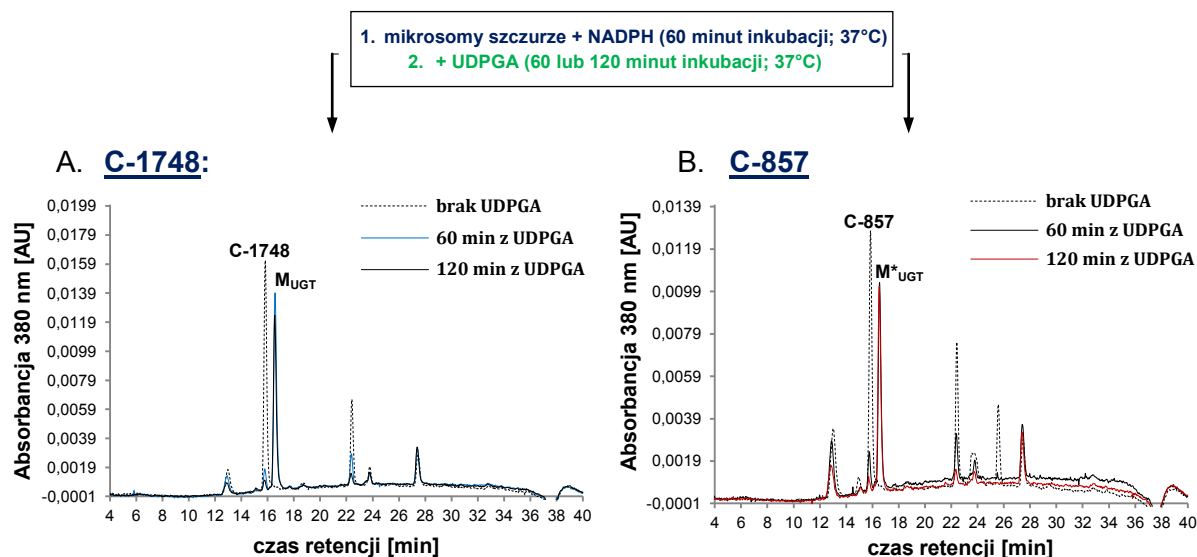


Rys. 54. Zależność stopnia przereagowania związków C-1748 i C-857 w obecności enzymów frakcji mikrosomalnej komórek wątroby szczura i UDPGA od czasu inkubacji. Prezentowane wyniki są średnią z dwóch niezależnych doświadczeń wraz z odchyleniami standardowymi.

Przeprowadzone doświadczenia wraz z analizą struktury chemicznej techniką HPLC/ESI-MS i UV-Vis produktów reakcji z udziałem enzymów mikrosomalnych i UDPGA, pozwoliły potwierdzić udział enzymów UGT w przemianach metabolicznych. Jony masowe metabolitów okazały się takie same jak metabolitów, które powstały w komórkach HT29.

Postawiłam sobie jednak jeszcze jedno pytanie, czy UDP-glukuronyltransferazy wykazują aktywność w kierunku reakcji glukuronidacji nie tylko wobec związku macierzystego, ale również wobec powstających metabolitów I fazy. Aby wyjaśnić to zagadnienie przeprowadziłam badanie, składające się z dwóch etapów. W pierwszym, przygotowałam odpowiednie mieszaniny reakcyjne niezbędne do zajścia reakcji I fazy. Obok związku, zawierały one NADPH, jako kofaktor enzymów I fazy. W drugim etapie, po 30 minutach inkubacji z NADPH, dodałam kofaktor dla enzymów UGT, czyli UDPGA. Poniżej przedstawiłam chromatogramy przedstawiające przemianę związków C-1748 i C-857 wobec enzymów mikrosomalnych przed i po dodaniu UDPGA (rys. 55A i B). Dla obu związków, widoczny jest jeden dodatkowy pik produktu, który nie jest obecny w mieszaninie reakcyjnej przed dodaniem UDPGA. Jednocześnie zaobserwowałam stopniowe zanikanie stężenia metabolitów po 120 minutach inkubacji. Jednakże stwierdziłam, że jest to skutkiem ich silnej reaktywności, a nie reakcji z UDPGA.

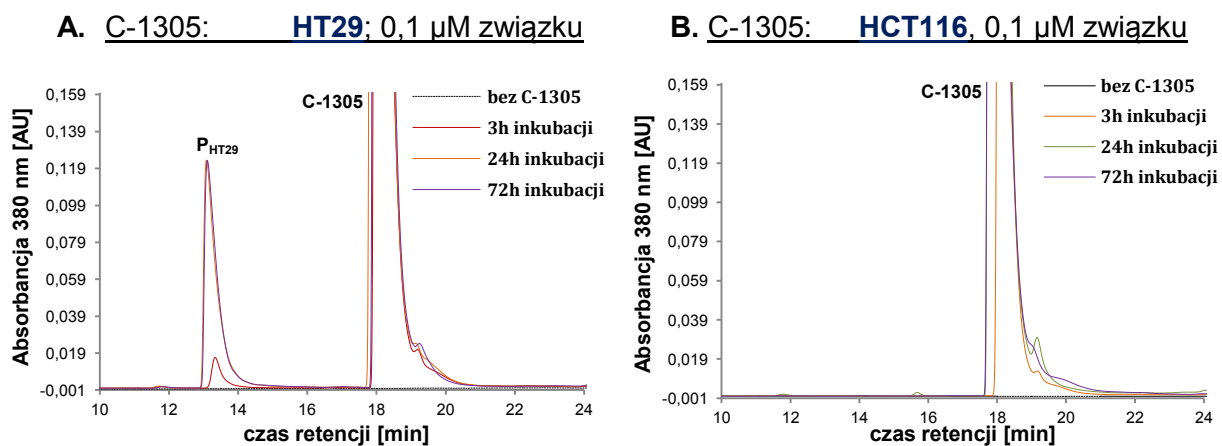
Analiza struktury dodatkowego produktu wykazała, że jest on tożsamy z produktami związków C-1748 i C-857, które powstały w komórkach HT29 oraz w obecności frakcji mikrosomalnej i UDPGA. Można więc przypuszczać, że sprzęganiu z kwasem glukuronowym podlegają tylko związki macierzyste.



Rys. 55. Liniowe obrazy chromatograficzne składu mieszanin reakcyjnych przemian metabolicznych 0,2 mM A: C-1748 i B: C-857 wobec 2 mg/ml enzymów frakcji mikrosomalnej komórek wątroby szczura, 1 mM NADPH, 2,5 mM UDPGA [chromatograf HPLC Millenium].

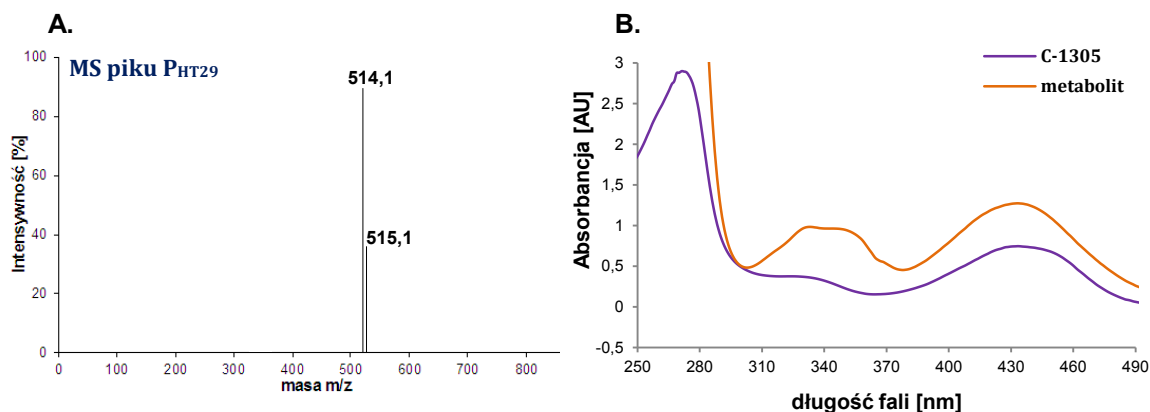
IV.1.4.2. Wyniki badań metabolizmu C-1305 oraz identyfikacja struktury chemicznej produktu.

Kolejny etap pracy polegał na przeprowadzeniu analogicznych doświadczeń jak dla pochodnych 9-amino-1-nitroakrydyny w komórkach HT29 i HCT116, ale komórki traktowano związkiem C-1305. Poniżej, na rys. 56, przedstawiłam otrzymane obrazy chromatograficzne.



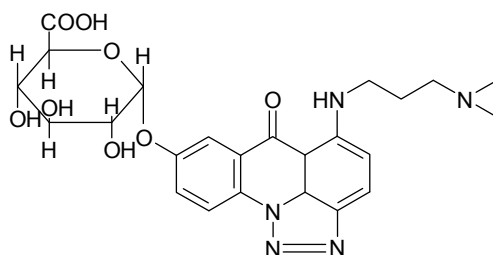
Rys. 56. Chromatograficzny obraz przemian metabolicznych związku C-1305 w komórkach A: HT29 oraz B: HCT116 po 3h, 24h i 72h inkubacji komórek ze związkiem; 0,1 μM C-1748, 2 mln komórek, [chromatograf HPLC Waters Millenium].

Wyniki przemian metabolicznych C-1305 pozwoliły zaobserwować powstanie produktu oznaczonego symbolem P_{HT29} , który nie występował w liniach HepG2 i HCT116. Widmo MS piku tego produktu zawierało główny jon masowy o wartości $m/z = 514,1$ (rys. 57A).



Rys. 57. A: widmo masowe piku produktu P_{HT29} (czas retencji ok. 13 minut, rys. 56); B: porównanie widm UV-Vis związku C-1305 oraz produktu P_{HT29} powstającego w komórkach HT29.

Odejmując wartość jonu masowego substratu można stwierdzić, że masa produktu P_{HT29} jest podwyższona o 176 jednostek. Wskazuje to, że produkt P_{HT29} jest połączeniem cząsteczki C-1305 z resztą kwasu glukuronowego, prawdopodobnie na atomie tlenu w pozycji 8 pierścienia imidzoakrydonu, zatem jest to O-glukuronid. Za wskazaniem miejsca sprzężenia przemawiają wyniki badań przemian metabolicznych pochodnej C-1311, o analogicznej strukturze do związku C-1305 (związki różnią się odmienną długością łańcuchów alifatycznych związanych z atomem azotu w pozycji 5 pierścienia akrydyny) oraz jej analogu, C-1330, z zablokowaną grupą hydroksylową. Próby uzyskania koniugatu pochodnej C-1330 z resztą kwasu glukuronowego zakończyły się niepowodzeniem. Ponadto, widmo UV-Vis analizowanego produktu metabolizmu wykazuje odmienny przebieg od widma UV-Vis substratu (rys. 57B) w związku z tym można sądzić, że zmiana nastąpiła w podstawniku bezpośrednio związanym z układem chromoforowym cząsteczki C-1305, czyli jak przedstawiono na rys. 58, na atomie tlenu grupy hydroksylowej.



Rys. 58. Proponowana struktura chemiczna produktu P_{HT29} .

Podsumowując wyniki przemian metabolicznych związków C-1748, C-857 i C-1305 w liniach komórkowych ludzkiego nowotworu jelita grubego nasuwają się dwie najważniejsze obserwacje:

- obniżona intensywność metabolizmu badanych związków w liniach HT29 i HCT116 w porównaniu do linii HepG2,
- pojawienie się dodatkowego metabolitu w linii HT29, którego strukturę określono jako O-glukuronid, czyli jest to pochodna sprzężania z resztą kwasu glukuronowego.

IV.1.5. Charakterystyka przemian metabolicznych C-1748, C-857 i C-1305 w komórkach niedrobnokomórkowego raka płuc, A-549.

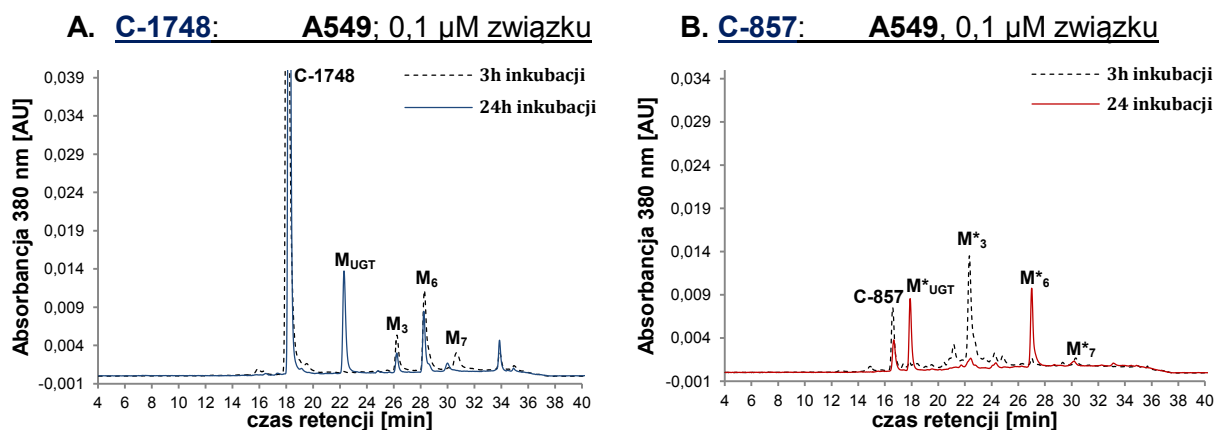
Poziom ekspresji genów izoenzymów cytochromu P450, takich jak CYP3A4 i CYP2C9 oraz ich aktywność katalityczna w linii A549 są nieznacznie niższe od komórek HepG2. Jedynie izoenzym CYP1A2 wykazuje wyższą aktywność katalityczną jak i ekspresję genów w tym typie nowotworu (rys. 19). Wiadomym jest, że poziom tego enzymu jest wyższy w tkankach nowotworowych płuc w porównaniu z tkankami zdrowymi, co jest związane z jego bezpośrednim udziałem w rozwoju raka płuc poprzez zdolność do przemiany PAH [patrz podrozdz. III.1.1.1.3). Wykazałam wcześniej, że izoenzym ten nie bierze udziału w przemianach enzymatycznych pochodnych akrydyny, C-1748, C-857 i C-1305. Obecność w komórkach nowotworu płuc izoenzymów CYP3A4 oraz CYP2C9 związania jest przede wszystkim z aktywacją stosowanych proleków takich jak, cyklofosfamid i ifosfamid, stosowanych w chemioterapii płuc. Dodatkowo stwierdzonym jest również fakt, że izoenzym UGT1A10, biorący udział w glukuronidacji pochodnych akrydyny występuje w linii komórkowej A549, jednak na niższym poziomie niż w komórkach HT29¹².

Wobec powyższego przeprowadziłam badania podatności na transformacje metaboliczne w komórkach A549 związków C-1748, C-857 i C-1305.

IV.1.5.1. Wyniki badań metabolizmu C-1748 i C-857.

Stosując analogiczne warunki prowadzenia reakcji i układ chromatograficzny, jak dla badań pochodnych akrydyny w komórkach nowotworu wątroby oraz jelita grubego otrzymałam obraz chromatograficzny zachodzących przemian związków C-1748 i C-857 w komórkach A549 (rys. 59A i B).

¹² Wg danych The Institute of Cancer Research UK, najwyższa ekspresja genów izoenzymów UGT1A10 jest w linii HT29. W komórkach HCT116 oraz HepG2 nie wykryto ekspresji genów tych enzymów. Linia A549 wykazywała pośredni poziom ekspresji *UGT1A10*. Badania te opierały się na metodzie RT-PCR, Western blotting oraz na określeniu poziomu aktywności tych enzymów. Wyniki stanowiły średnią z ok. 10 prób z linii różnego pochodzenia.

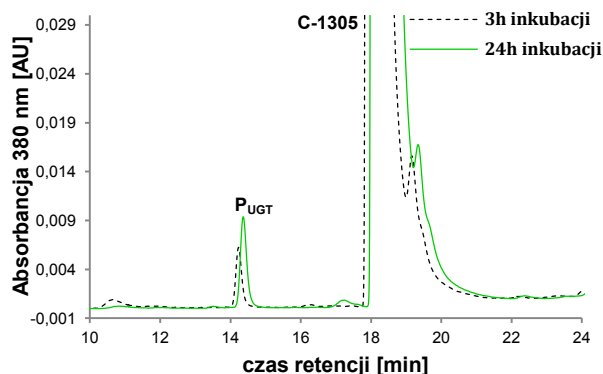


Rys. 59. Chromatograficzny obraz przemian metabolicznych związku A: C-1748 oraz B: C-857 w komórkach A549, po 3h i 24h inkubacji komórek ze związkiem; 0,1 μM związek, 2 mln komórek, [chromatograf HPLC Waters Breeze].

Przedstawione powyżej wyniki wskazują na istnienie 4 głównych produktów metabolizmu związku C-1748, jak i C-857. W obu przypadkach powstał metabolit zidentyfikowany wcześniej jako O-glukuronid. Potwierdziła to również analiza ESI-MS. Dodatkowo, jako wynik redukcji enzymatycznej powstały metabolity z dodatkowym pierścieniem pomiędzy atomami azotu w pozycji 1 i 9 pierścienia akrydyny (M_3 i M^*_3) oraz produkt ze zredukowaną grupą nitrową oraz odszczepionym łańcuchem alifatycznym. Wszystkie wymienione metabolity obu związków były obecne również w komórkach HT29 i HCT116, jednakże ich stężenie było niższe niż w komórkach A549. Jedynie pik produktu oznaczonego symbolem M^*_3 w przypadku pochodnej C-857 był intensywniejszy w komórkach HCT116.

IV.1.5.2. Wyniki badań metabolizmu C-1305.

Jak wynika z kolejnych chromatogramów (rys. 60) pochodna triazoloakrydonu o symbolu C-1305 również okazała się wrażliwa na biotransformację w obecności enzymów znajdujących się w komórkach A549. Stosując identyczne warunki inkubacji komórek A549 ze związkiem i układ chromatograficzny, jak dla badań metabolizmu związków C-1748 i C-857, zaobserwowałam dla związku C-1305 powstanie jednego produktu o bardzo niskim stężeniu.



Rys. 60. Chromatograficzny obraz przemian metabolicznych związku C-1305 w komórkach A549, po 3h i 24h inkubacji komórek ze związkiem; 0,1 μ M związek, 2 mln komórek, [chromatograf HPLC Waters Breeze].

Pik produktu P_{UGT} posiadał czas retencji taki sam jak produkt oznaczony symbolem P_{HT29} , zaobserwowany również w komórkach HT29, zidentyfikowany jako O-glukuronid. Warto zwrócić uwagę, że pole powierzchni pod pikiem metabolitu P_{HT29} było ok. 10-krotnie większe niż pole powierzchni pod pikiem P_{UGT} . Opierając się na powyższych obserwacjach można stwierdzić, że pochodna C-1305 jest transformowana z udziałem enzymów UDP-glukuronylotransferazy, prawdopodobnie izoenzymu UGT1A10, a stopień przemiany C-1305 do O-glukuronidu zależy od poziomu ekspresji genów izoenzymu UGT1A10 w komórkach nowotworowych.

IV.1.6. Wpływ poziomu ekspresji *CYP3A4* na metabolizm C-1748, C-857 i C-1305 – charakterystyka przemian metabolicznych w komórkach Hep3A4.

Wkład enzymu CYP3A4 w metabolizm pochodnych akrydyny został przedstawiony na rys. 17 i 18. Wykazałam wówczas, że pochodne 9-amino-1-nitroakrydyny, C-1748 i C-857, ulegają przemianie wobec CYP3A4, a ich stopień przemiany osiągał 70-80%. CYP3A4 nie metabolizował związku C-1305, podobnie jak inne izoenzymy z rodziny cytochromów P450. Poszukując odpowiedzi na pytanie, czy wyższa ekspresja genów tego enzymu w komórkach nowotworowych przekłada się na intensywniejszy metabolizm pochodnych 9-amino-1-nitroakrydyny oraz czy ma to wpływ na aktywność cytotoksyczną badanych związków wobec komórek z wyższą ekspresją *CYP3A4*, przeprowadziłam badania przemian metabolicznych C-1748 i C-857 w komórkach Hep3A4. Linia ta powstała poprzez transfekcję komórek HepG2 plazmidem pCL-neo z promotorem wirusa cytomegalii. Zawiera on w swojej sekwencji wektor z genem kodującym enzym CYP3A4 oraz gen oporności na genetycyne, który zastosowano jako czynnik selekcyjny do izolacji rekombinantowych komórek [Feierman i wsp., 2002; Wu i wsp., 2008; Wu i wsp., 2010]. Dla linii Hep3A4 opracowano również linię odnośnikową z tzw. wektorem zerowym – komórki C34, gdzie do komórek HepG2

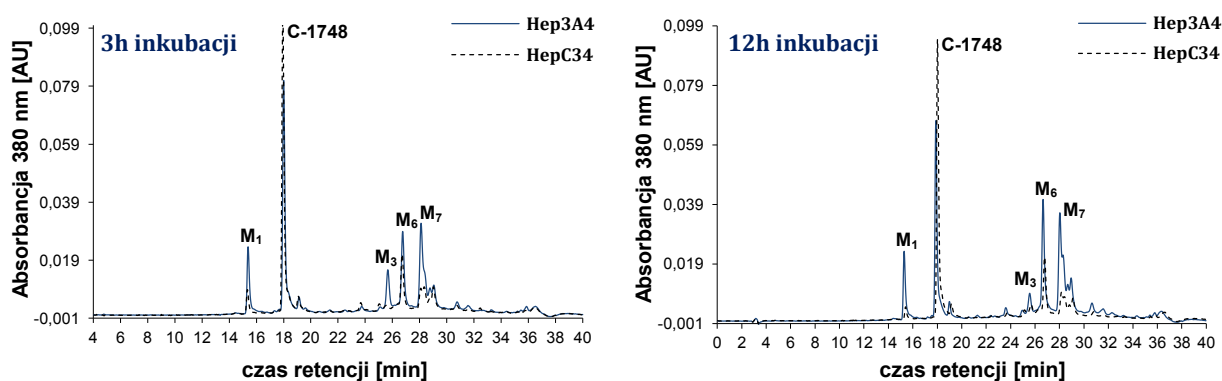
wprowadzono wektor pozbawiony jakiegokolwiek białka. Dzięki temu przy porównaniu wyników toksyczności eliminowano wpływ samego procesu transfekcji.

Badanie przemian metabolicznych związków C-1748, C-857 i C-1305 w komórkach linii Hep3A4 oraz HepC34 przeprowadziłam stosując początkowo ustalone warunki dla wszystkich pozostałych linii (patrz podrozdz. IV.1.2.).

IV.1.6.1. Wyniki badań metabolizmu C-1748 i C-857.

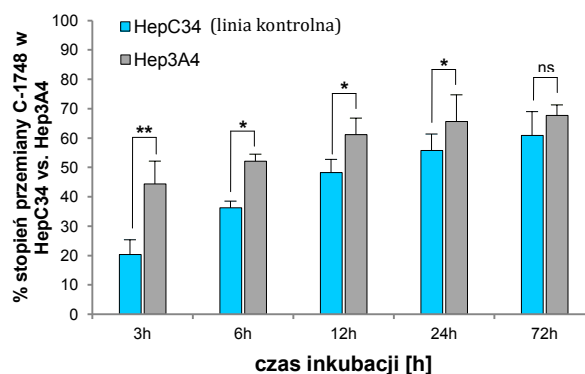
Analiza chromatograficzna ekstraktów metanolowych wyizolowanych z komórek Hep3A4 i HepC34 wskazała na obecność 4 głównych produktów metabolizmu związku C-1748 (rys. 61A i B). Jednakże stwierdzić można, że stężenia poszczególnych produktów były wyraźnie wyższe w linii z nadekspresją *CYP3A4*. W obu liniach, po najdłuższym czasie traktowania komórek związkami, metabolity stopniowo zanikały, co mogło być spowodowane ich nietrwałością lub śmiercią komórek poddanych działaniu wysokiego stężenia C-1748.

C-1748: Hep3A4 / HepC34; 0,1 mM związku



Rys. 61. Chromatograficzny obraz przemian metabolicznych związku C-1748 w komórkach Hep3A4 i HepC34, po 3h i 12h inkubacji komórek ze związkiem; 0,1 μ M związek, 2 mln komórek, [chromatograf HPLC Waters Breeze].

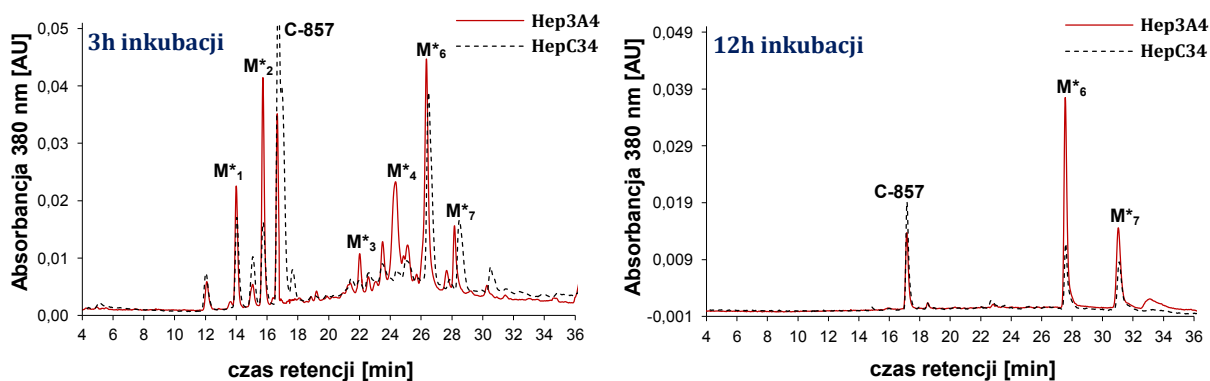
Na poniższym histogramie (rys. 62) porównałam % stopnia przemiany pochodnej C-1748 w linii z wektorem zawierającym w swojej sekwencji *CYP3A4* oraz linii z wektorem zerowym. Wyraźnie wyższy % stopnia przemiany w linii Hep3A4 świadczy o udziale izoenzymu *CYP3A4* w metabolizmie pochodnej C-1748.



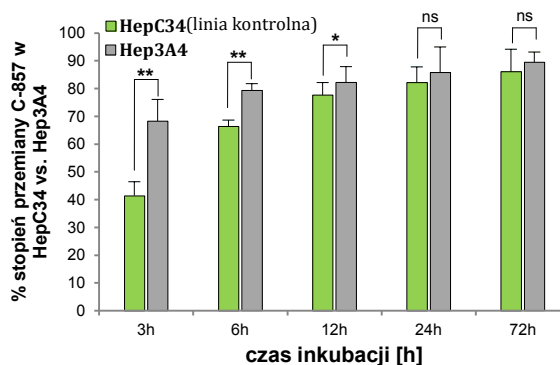
Rys. 62. Porównanie stopnia przereagowania związku C-1748 w komórkach linii Hep3A4 oraz HepC34 w zależności od czasu inkubacji. Linia HepC34 stanowi linię odnośnikową dla Hep3A4. Prezentowane wyniki są średnią z dwóch niezależnych doświadczeń wraz z odchyleniami standardowymi. Dla określenia poziomu istotności przeprowadzono test Studenta, gdzie * $p < 0,05$ – wartości istotne statystycznie.

Podobne rezultaty otrzymano dla pochodnej C-857. Chromatograficzne obrazy otrzymane po analizie metanolowego ekstraktu, podobnie jak dla C-1748, wykazały obecność produktów o wyższym stężeniu w linii Hep3A4 (rys. 63). Nie zauważyłam różnic w trwałości tych metabolitów pomiędzy obiema liniami. Do 72 godzin inkubacji piki produktów stopniowo zanikały.

C-857: Hep3A4 / HepC34; 0,1 mM związku



Rys. 63. Chromatograficzny obraz przemian metabolicznych związku C-857 w komórkach Hep3A4 i HepC34, po 3h i 12h inkubacji komórek ze związkiem; 0,1 μM związek, 2 mln komórek, [chromatograf HPLC Waters Breeze].

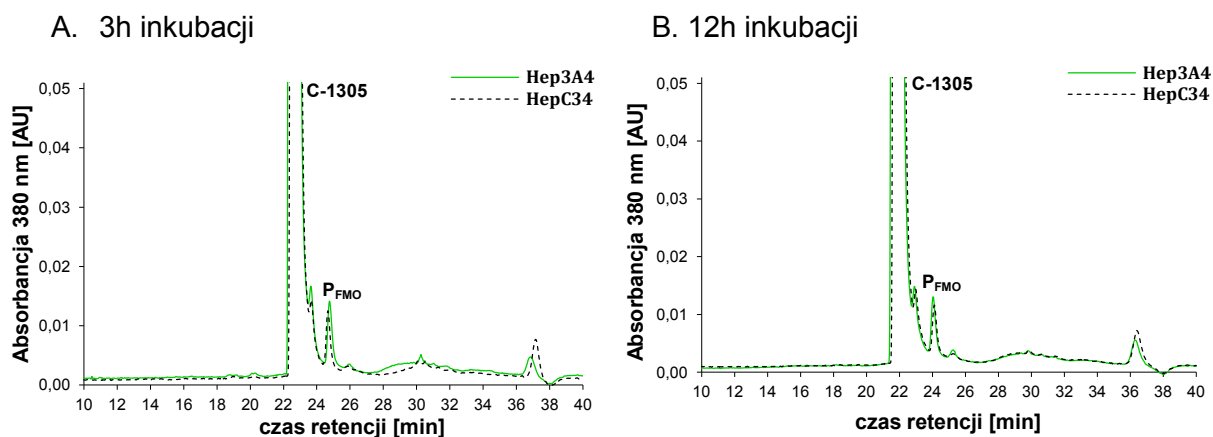


Rys. 64. Porównanie stopnia przereagowania związku C-857 w komórkach linii Hep3A4 oraz HepC34 w zależności od czasu inkubacji. Linia HepC34 stanowi linię odnośnikową dla Hep3A4. Prezentowane wyniki są średnią z dwóch niezależnych doświadczeń wraz z odchyleniami standardowymi. Dla określenia poziomu istotności przeprowadzono test Studenta, gdzie * $p < 0,05$ – wartości istotne statystycznie.

Jak wynika z przedstawionego powyżej histogramu (rys. 64), określenie istotności różnic w wartościach stopnia przemiany C-857 w dwóch liniach, Hep3A4 i HepC34, pozwoliło stwierdzić, iż tylko po krótkich czasach inkubacji różnice w poziomie izoenzymu CYP3A4 miały największe znaczenie w metabolizmie C-857. Również podczas badań C-1748 można zaobserwować taką tendencję. Wynika z tego, że enzym metabolizujący związki, jakim jest CYP3A4 przyspiesza metabolizm czyniąc go bardziej dynamicznym. Analizując struktury chemiczne powstających metabolitów można stwierdzić, że wyraźnie wyższym stężeniem odznaczają się produkty ze zredukowaną grupą nitrową oraz odszczepionym łańcuchem alifatycznym, czyli metabolit M_6 oraz M_6^* .

IV.1.6.2. Wyniki badań metabolizmu C-1305.

Jak wynika z wcześniejszych badań (rys. 18) pochodna C-1305 nie jest metabolizowana przez izoenzymy cytochromu P450. Potwierdziły to dotychczasowe prace, które wykazały, że w komórkach linii HepG2, HT29, HCT116 oraz A549, związek ulega przemianom metabolicznym z udziałem monoooksygenaz flawinowych, enzymów I fazy oraz UDP-glukuronylotransferaz, enzymów II fazy. Spodziewać się więc można, że mimo zwiększenia poziomu izoenzymu CYP3A4, nadal nie zaobserwujemy przemiany tego związku. Przypuszczenie to potwierdził obraz chromatograficzny przemian C-1305 w komórkach Hep3A4 oraz HepC34 (rys. 65). Zarówno w komórkach Hep3A4, jak i w linii kontrolnej HepC34, związek transformował do jednego produktu P1, a jego stężenie było na takim samym poziomie w obu liniach. Zaproponowaną wcześniej strukturą tego metabolitu jest N-tlenek w łańcuchu bocznym.

C-1305: Hep3A4 / HepC34; 0,1 mM związku

Rys. 65. Chromatograficzny obraz przemian metabolicznych związku C-1305 w komórkach Hep3A4 i HepC34, po 3h i 12h inkubacji komórek ze związkiem; 0,1 μ M związek, 2 mln komórek, [chromatograf HPLC Waters Breeze]

IV.1.6.3. Zależność efektu cytotoksycznego pochodnych C-1748, C-857 i C-1305 od różnego poziomu ekspresji *CYP3A4* w komórkach Hep3A4 i HepC34.

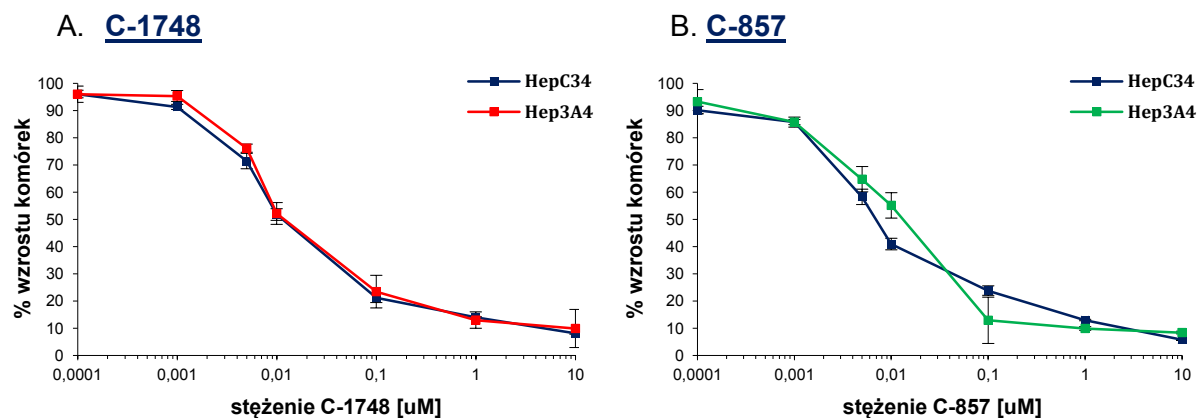
Określenie cytotoksycznego działania związków C-1748, C-857 i C-1305 w stosunku do linii Hep3A4 i HepC34 miało na celu ustalenie zakresu biologicznie istotnych stężeń trzech pochodnych. Uchwycenie wyraźnych różnic w metabolizmie pomiędzy liniami Hep3A4 oraz HepC34 pochodnych 1-nitroakrydyny pozwala postawić hipotezę, że zróżnicowane przemiany metaboliczne mają odzwierciedlenie w różnej aktywności cytotoksycznej związków w liniach Hep3A4 i HepC34. Celem tego etapu pracy będzie zweryfikowanie tej hipotezy.

Oznaczenia cytotoksyczności przeprowadzono przy użyciu testu MTT (Carmichael i wsp., 1987). Test ten polega na pomiarze aktywności oksydoredukcyjnej mitochondriów z wykorzystaniem barwnika MTT, który w żywych komórkach ulega redukcji do nierozpuszczalnego w wodzie formazanu, w reakcji katalizowanej przez dehydrogenazy komórkowe. Ilość powstałego formazanu jest skorelowana z aktywnością redukcyjną mitochondriów, co świadczy o liczbie żywych komórek. Szczegółowy opis metody zamieszczono w Części Doświadczalnej.

Ciągłą inkubację komórek ze związkami prowadziłam przez okres 72 godzin (72 godziny inkubacji zapewnia komórkom co najmniej trzy rundy replikacyjne). Na podstawie uzyskanych wyników absorbancji sporządziłam wykresy zależności zahamowania wzrostu komórek (jako % kontroli, nie traktowanej związkiem) od logarytmu stężenia pochodnych, co przedstawiłam na rys. 66. Za miarę aktywności cytotoksycznej wszystkich pochodnych przyjąłam wartość EC_{50} . Jest to stężenie związku powodujące 50% zahamowanie proliferacji

komórek w stosunku do komórek kontrolnych czyli nie traktowanych związkiem, tzw. miara cytotoksyczności.

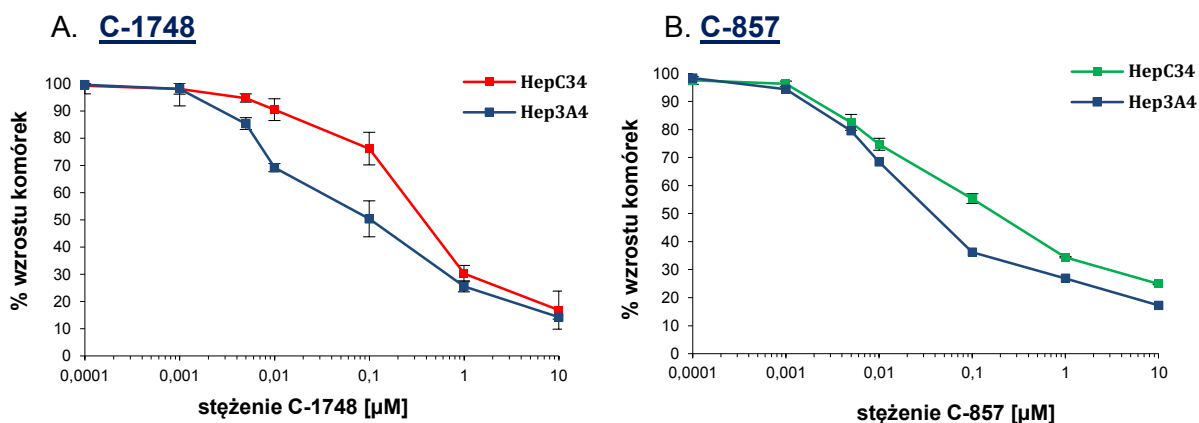
Uzyskane wyniki pokazują, że związek C-1748 hamuje proliferację komórek Hep3A4 i HepC34 w sposób zależny od stężenia (rys. 66A).



Rys. 66. Zależny od dawki wpływ pochodnej A: C-1748 i B: C-857 na proliferację komórek Hep3A4 i HepC34 po 72h inkubacji komórek ze związkiem, wyrażony jako % wzrostu komórek traktowanych związkiem w stosunku do komórek kontrolnych, nie traktowanych związkiem. Wyniki są średnią z trzech niezależnych doświadczeń.

Wyznaczone krzywe wzrostu przebiegają niemal w identyczny sposób dla obu linii. Potwierdziła to analiza statystyczna przeprowadzona z użyciem testu Studenta, wskazując, że różnice w wartościach stężeń EC_{50} nie są istotnie statystycznie ($P > 0,05$) (tabela 5). Stosując takie same warunki reakcji, przeprowadziłam badania aktywności cytotoksycznej dla pochodnej C-857. Tutaj również otrzymane wartości EC_{50} były bardzo zbliżone dla obu linii (rys. 66B).

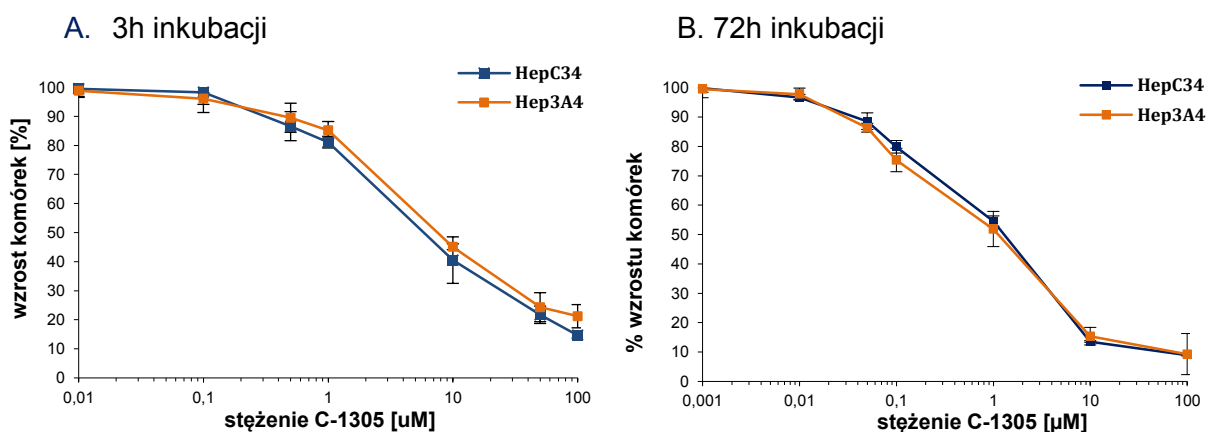
Mając na uwadze różnice w metabolizmie tych związków w obu liniach, wyznaczyłam zależność zahamowania wzrostu komórek od stężenia badanych związków również dla krótkiego czasu inkubacji, czyli 3h. Komórki inkubowałam przez 3 godziny ze związkiem, po czym po zmianie pożywki na świeżą, przeprowadziłam postinkubację do 72h. W tym miejscu należy zaznaczyć, że po 3h inkubacji zauważalny był najintensywniejszy metabolizm 1-nitroakrydyn oraz najbardziej istotne różnice w ich stopniu przemiany w dwóch liniach (rys. 20 i 31). Otrzymane wyniki przedstawiono na rys. 67A i B. Jak wynika z analizy krzywych zahamowania wzrostu oraz wyznaczonych wartości EC_{50} , obie pochodne wykazywały wyższą aktywność cytotoksyczną po 3h inkubacji ze związkiem w komórkach Hep3A4 niż w HepC34. W komórkach HepC34 wartość EC_{50} dla obu związków była ok. 5-krotnie wyższa niż dla komórek z nadekspresją *CYP3A4*. Stąd można wnioskować, że poziom w komórkach enzymu metabolizującego związek do aktywnych metabolitów ma znaczenie w hamowaniu wzrostu komórek nowotworowych po ekspozycji na ten związek.



Rys. 67. Zależny od dawki wpływ pochodnej A: C-1748 i B: C-857 na proliferację komórek Hep3A4 i HepC34 po 3h inkubacji komórek ze związkiem oraz postinkubacji do 72h, wyrażony jako % wzrostu komórek traktowanych związkiem w stosunku do komórek kontrolnych, nie traktowanych związkiem. Wyniki są średnią z trzech niezależnych doświadczeń.

Ciekawym okazał się fakt braku różnic w aktywności cytotoksycznej związku C-1305 wobec komórek Hep3A4 i HepC34 dla dwóch skrajnych czasów inkubacji, tzn. 3 i 72 godzin. Miało to przełożenie w niemal identycznym przebiegu krzywych wzrostu komórek obu linii traktowanych pochodną C-1305, co przedstawia rys. 68A i B. Pochodna ta nie wykazywała również różnic w przemianach metabolicznych w obu liniach, co wynikało z braku zaangażowania izoenzymu CYP3A4 w metabolizm C-1305.

C-1305



Rys. 68. Zależny od dawki wpływ pochodnej C-1305 na proliferację komórek Hep3A4 i HepC34 po A: 3h oraz B: 72h inkubacji komórek ze związkiem, wyrażony jako % wzrostu komórek traktowanych związkiem w stosunku do komórek kontrolnych, nie traktowanych związkiem. Wyniki są średnią z trzech niezależnych doświadczeń.

Poniżej w tabeli 5 przedstawiłam zestawienie wartości stężeń EC_{50} pochodnych 9-amino-1-nitroakrydyny oraz triazoloakrydonu hamujących proliferację komórek linii Hep3A4 oraz HepC34.

Tabela 5. Wartości EC_{50} dla związków C-1748, C-857 i C-1305 wyznaczone na podstawie wykresów zależności stężenia badanego związku od zahamowania wzrostu traktowanych komórek linii Hep3A4 i HepC34. Podane wartości są średnią z trzech niezależnych eksperymentów \pm SD. Analizę statystyczną prowadzono z użyciem testu t-Studenta, gdzie * - $P < 0,05$ wartości istotne statystycznie, ns – wartości nieistotne statystycznie.

związek	czas [h]	EC_{50} [μ M]		test Studenta
		HepC34	Hep3A4	
C-1748	3	0,59 \pm 0,002	0,11 \pm 0,001	P=0,0025**
	72	0,01 \pm 0,005	0,012 \pm 0,005	P=0,051 ^{ns}
C-857	3	0,27 \pm 0,005	0,064 \pm 0,002	P=0,0007***
	72	0,008 \pm 0,002	0,01 \pm 0,002	P=0,155 ^{ns}
C-1305	3	6,86 \pm 0,005	8,76 \pm 0,005	P=0,255 ^{ns}
	72	1,6 \pm 0,001	1,41 \pm 0,002	P=0,101 ^{ns}

Podsumowując, można stwierdzić, że tylko pochodne 9-amino-1-nitroakrydyny wykazują wyraźnie różną aktywność wobec dwóch linii (test Studenta $P < 0,005$). Dodatkowo można zauważyć wyższą reaktywność pochodnej C-857. Zaznaczyć trzeba jednak, że fakt ten ma znaczenie w przypadku związków C-1748 i C-857 tylko po krótkich czasach inkubacji. Po długich przedziałach czasu inkubacji wartości EC_{50} wyrównują się. Wrażliwość komórek wobec związku C-1305 jest bardzo podobna w obu liniach ($P > 0,005$).

IV.1.7. Wpływ hypoksji na metabolizm C-1748, C-857 i C-1305 w komórkach HepG2.

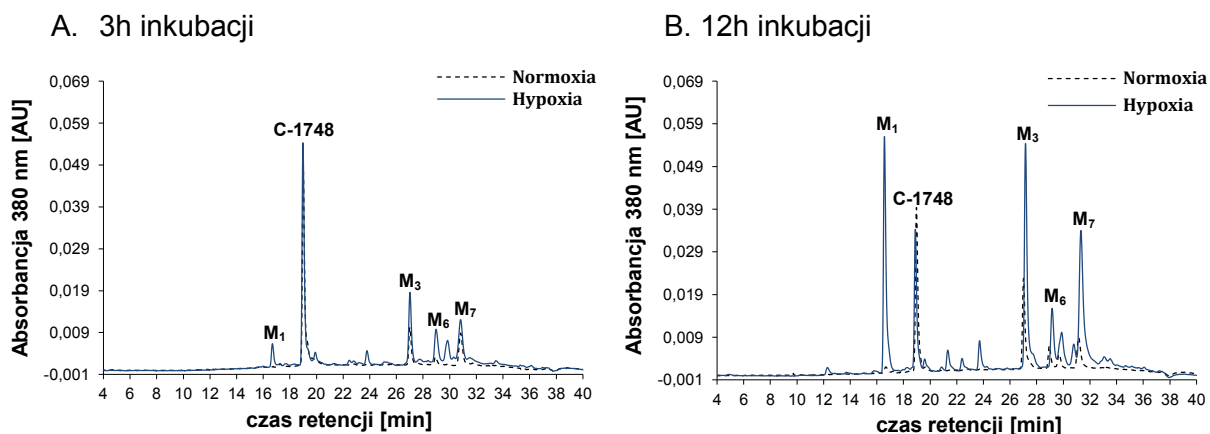
Dotychczasowe badania szlaku przemian metabolicznych pochodnych akrydyny przedstawione w niniejszej pracy wykazały, że związki C-1748 i C-857 należące do 9-amino-1-nitroakrydyny ulegają redukcji, z udziałem izoenzymów cytochromu P450. Zaliczyć więc je można do proleków, czyli chemoterapeutyków, które wymagają etapu aktywacji w komórkach, aby uzyskać zdolności cytotoksyczne. W kolejnym etapie prac przeprowadziłam badania przemian metabolicznych pochodnych 9-amino-1-nitroakrydyny i triazoloakrydonu w komórkach nowotworu wątroby HepG2, będących w warunkach ograniczonego dostępu tlenu¹³. Następnie komórki były inkubowane przez określone we wcześniejszych ustaleniach okresy czasów (3h, 6h, 12h, 24h, 72h), po czym przeprowadzono analizę HPLC wyizolowanych ekstraktów metanolowych.

¹³ Ostatnie trendy w leczeniu nowotworów kierują uwagę na zjawisko hypoksji w guzie nowotworowym. Choć od wielu lat wiadomo, że obniżone ciśnienie parcjale komórek nowotworowych prowadzi do oporności na leczenie oraz zwiększa ryzyko powstawania przerzutów [Bristow i Hill, 2008], jednak warunki niedotlenienia powodują zwiększenie redukcji proleków do aktywnych metabolitów wiążących się z DNA [Yakkundi i wsp., 2006].

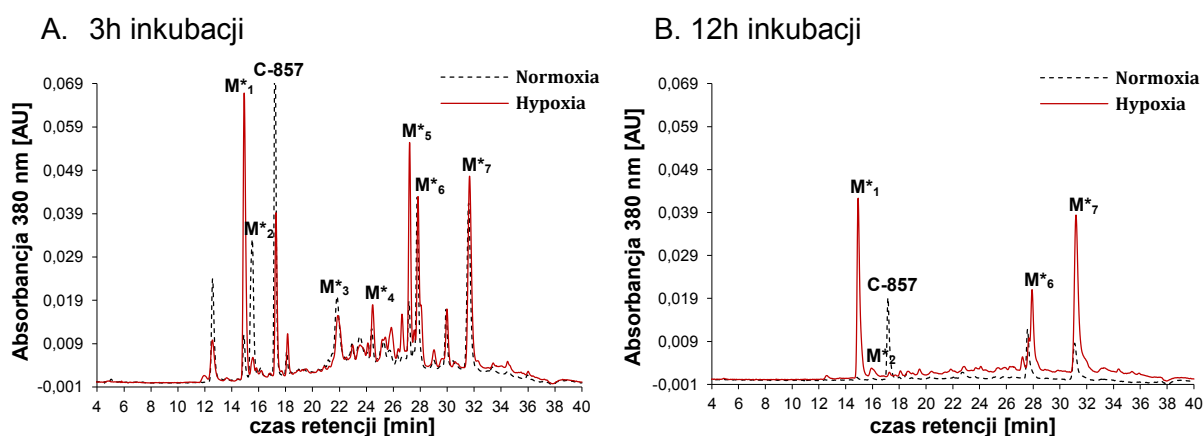
IV.1.7.1. Wyniki badań metabolizmu C-1748 i C-857.

Poniżej na rys. 69 przedstawiłam obrazy chromatograficzne przemian metabolicznych pochodnych C-1748 i C-857 w komórkach HepG2 w warunkach normalnych i ograniczonego dostępu tlenu dla dwóch wybranych czasów inkubacji.

C-1748



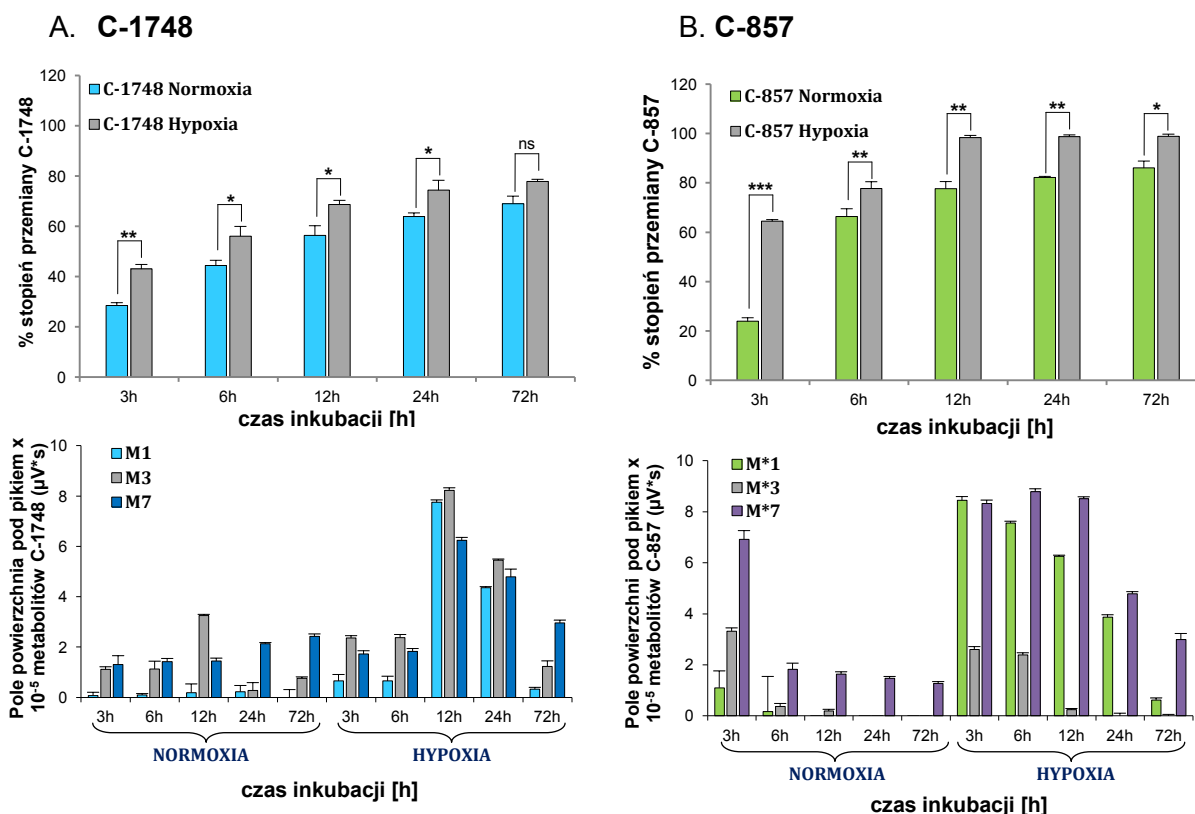
C-857



Rys. 69. Chromatograficzny obraz przemian metabolicznych pochodnych C-1748 i C-857 w komórkach HepG2 po 3h i 12h inkubacji komórek ze związku w warunkach hypoksji; 0,1 μ M związek, 2 mln komórek, [chromatograf HPLC Waters Breeze].

Z przedstawionych chromatogramów wynika, że stopień przemiany obu związków jest wyraźnie wyższy w warunkach hypoksji. Zauważyć można, że stężenie metabolitu o symbolu M₁/M^{*}₁ ze zredukowaną grupą nitrową jest szczególnie wysokie. W warunkach tlenowych metabolit ten był nietrwały, a jego ilość po długich czasach inkubacji była niemal śladowa. Podobnie produkty M₆/M^{*}₆ oraz M₇/M^{*}₇ odpowiednio ze zredukowaną grupą nitrową i odszczepionym łańcuchem alifatycznym oraz dimery produktów M₁/M^{*}₁, okazały się stabilne w warunkach redukcyjnych. W przypadku związku C-1748 również produkt M₃ z dodatkowym pierścieniem pomiędzy atomami azotu był w wyższym stężeniu przy

ograniczonym dostępie tlenu. Poniżej, na rys. 70, przedstawiłam w postaci histogramów porównanie stopnia przemiany pochodnych C-1748 i C-857 oraz powierzchni pod pikami głównych metabolitów, M₁, M₃ i M₇.



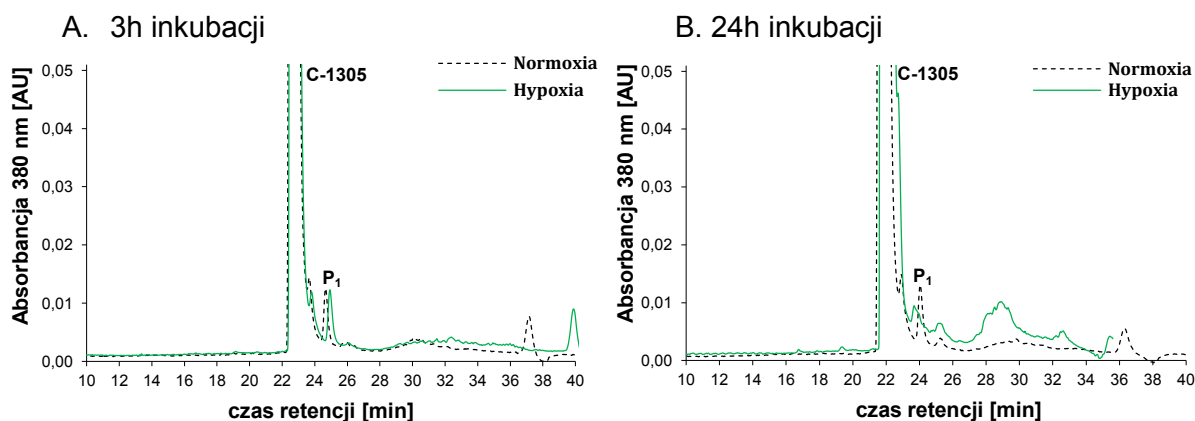
Rys. 70. Porównanie % stopnia przemiany związków A: C-1748 i B: C-857 oraz pola powierzchni pod pikami ich trzech głównych metabolitów w komórkach HepG2 w warunkach normalnych i w warunkach hipoksji. Prezentowane wyniki są średnią z dwóch niezależnych doświadczeń wraz z odchyleniami standardowymi. Dla określenia poziomu istotności przeprowadzono test Studenta, gdzie $p < 0,05$ – wartości istotne statystycznie.

Przedstawione powyżej porównanie nie tyle przedstawia wyższą reaktywność pochodnych 9-amino-1-nitroakrydyny w warunkach hipoksji, ile pokazuje wysoką stabilność powstających metabolitów w warunkach ograniczonego dostępu tlenu. Obserwacja ta jest interesująca z uwagi na fakt, że w komórkach Hep3A4 mimo osiągnięcia po krótkich czasach inkubacji wyższego stężenia metabolitów, ich stężenie po długich czasach spadało. Miało to przełożenie na brak różnic w aktywności cytotoksycznej obu związków wobec linii z normalną i podwyższoną ekspresją *CYP3A4* po 72 godzinach. Z tego względu, w kolejnym etapie pracy porównałam wartości EC_{50} dla C-1748 i C-857 w stosunku do linii HepG2 w warunkach normalnych i hipoksji (patrz podrozdz. IV.1.7.3.).

IV.1.7.2. Wyniki metabolizmu C-1305.

Przemiany metaboliczne pochodnej C-1305 w komórkach HepG2 będących w warunkach hypoksji zbadałam analogicznie jak w przypadku C-1748 i C-857. Poniżej na rys. 71 przedstawiono chromatogramy ekstraktów metanolowych wyizolowanych z komórek po dwóch wybranych czasach inkubacji ze związkiem.

C-1305



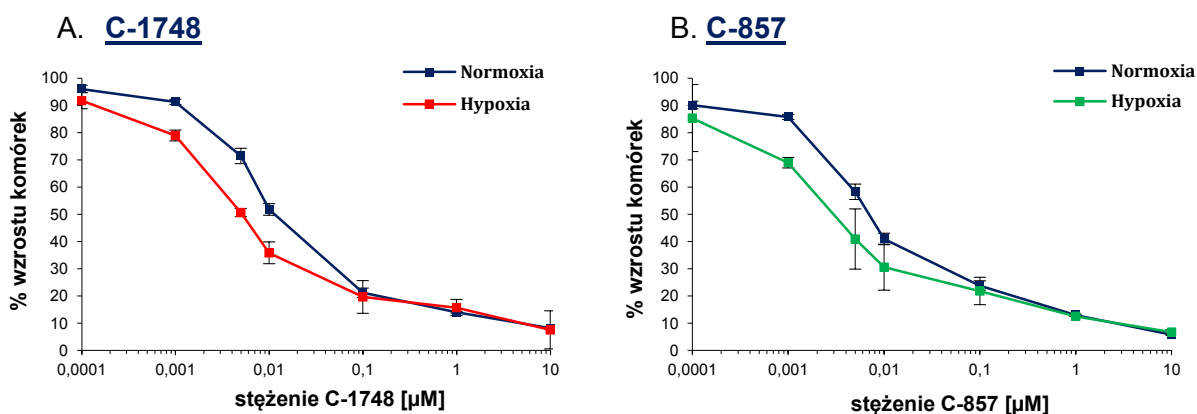
Rys. 71. Chromatograficzny obraz przemian metabolicznych pochodnej C-1305 w komórkach HepG2 po A: 3h i B: 24h inkubacji komórek ze związkiem w warunkach normalnych i hypoksji; 0,1 μM związek, 2 mln komórek, [chromatograf HPLC Waters Breeze].

Na przedstawionych wykresach, po 3 godzinach inkubacji nie widać różnic w % stopnia przemiany metabolicznej pochodnej C-1305 w komórkach w różnych warunkach dostępu tlenu. Jednakże, po 24 godzinach widoczny jest zanik produktu P_1 .

IV.1.7.3. Efekt cytotoksyczny pochodnych C-1748, C-857 i C-1305 wobec komórek HepG2 w warunkach normalnych i ograniczonego dostępu tlenu.

Oznaczenie aktywności cytotoksycznej związków wobec linii HepG2 przeprowadziłam stosując test MTT, inkubując komórki ze związkami o stężeniach 0,0001 – 10 μM . Badanie to było analogiczne do przeprowadzonego w komórkach HepC34 i Hep3A4 w warunkach normalnych, z tą różnicą, że komórki bezpośrednio po dodaniu związków były inkubowane przez 24 godziny w warunkach hypoksji. Następnie przez kolejne 48 godzin hodowla była prowadzona w warunkach tlenowych. Łącznie okres inkubacji komórek HepG2 ze związkami wynosił 72 godziny. Modyfikacja zastosowanych wcześniej warunków prowadzenia reakcji była konieczna, ponieważ ciągła inkubacja komórek w warunkach hypoksji przez 72 godziny powodowała śmierć 90% populacji komórek nawet nie traktowanych żadnym ze związków. Na podstawie uzyskanych wyników absorbancji sporządziłam wykresy zależności

zahamowania wzrostu komórek (jako % kontroli, nie traktowanej związkiem) od logarytmu stężenia pochodnych, co przedstawiłam na rys. 72 dla pochodnych 9-amino-1-nitroakrydyny.

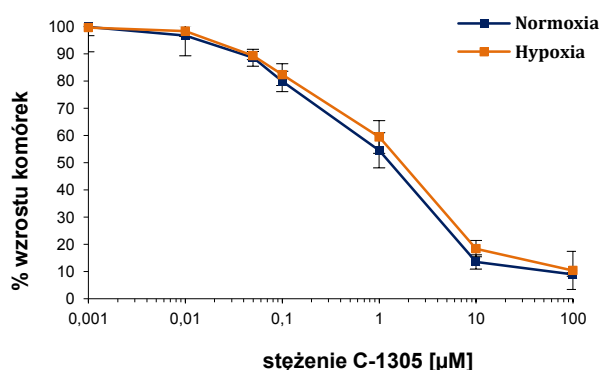


Rys. 72. Zależny od dawki wpływ pochodnej A: C-1748 i B: C-857 na proliferację komórek HepG2 po 24 godzinnej inkubacji w warunkach hipoksji oraz 48 postinkubacji w warunkach normalnych, wyrażony jako % wzrostu komórek traktowanych związkiem w stosunku do komórek kontrolnych, nie traktowanych związkiem. Wyniki są średnią z trzech niezależnych doświadczeń.

Jak wynika z analizy krzywych zahamowania wzrostu, komórki w warunkach hipoksji okazały się bardziej wrażliwe na działanie pochodnych C-1748 i C-857. Co ciekawe, efekt ten jest widoczny po 72 godzinach inkubacji. W przypadku komórek Hep3A4 tylko po 3 godzinach inkubacji związki były bardziej aktywne wobec linii Hep3A4 w porównaniu do komórek HepC34. Wniosek z tego, że warunki ograniczonego dostępu tlenu wpływają na zwiększenie stabilności produktów 9-amino-1-nitroakrydyny i są bardziej cytotoksyczne wobec komórek hipoksycznych, przystosowanych do życia w hipoksji¹⁴.

W odróżnieniu od powyższych rezultatów, nie ulegająca metabolicznej redukcji pochodna C-1305 w warunkach ograniczonego dostępu tlenu wykazywała obniżoną aktywność cytotoksyczną w stosunku do komórek z pełnym dostępem tlenu, co przedstawia rys. 73.

¹⁴ Subpopulacja komórek zaadaptowanych do życia w hipoksji ma największe znaczenie kliniczne, ponieważ jest to wyselekcjonowana grupa komórek ze zmienionym metabolizmem, charakteryzująca się trwałymi zmianami genetycznymi [Vaupel i Harrison, 2004; Axelson i wsp., 2005]. Należy do nich mutacja genu *GLUT1*, która zapewnia komórkom transport glukozy i oddychanie beztlenowe. Umożliwia to progresję w cyklu komórkowym, a także brak wrażliwości na apoptozę, zdolność do różnicowania się i wzrost potencjału angiogenego, co w konsekwencji prowadzi do wzrostu oporności na leczenie i progresję nowotworu. Wydaje się więc zasadne poszukiwanie nowych związków aktywnych wobec tego typu komórek nowotworowych.



Rys. 73. Zależny od dawki wpływ pochodnej C-1305 na proliferację komórek HepG2 po 24 godzinnej inkubacji w warunkach hipoksji oraz 48 godzinnej postinkubacji w warunkach normalnych, wyrażony jako % wzrostu komórek traktowanych związkiem w stosunku do komórek kontrolnych, nie traktowanych związkiem. Wyniki są średnią z trzech niezależnych doświadczeń.

Dla podsumowania otrzymanych wyników przedstawiono tabelę wartości EC_{50} wyznaczonych dla wszystkich badanych związków dla komórek HepG2 w warunkach normalnych i hipoksji.

Tabela 6. Wartości EC_{50} dla związków C-1748, C-857 i C-1305 wyznaczone na podstawie wykresów zależności stężenia badanego związku od zahamowania wzrostu traktowanych komórek linii HepG2 w warunkach normalnych i hipoksji. Podane wartości są średnią z trzech niezależnych eksperymentów \pm SD. Analizę statystyczną prowadzono z użyciem testu t-Studenta, gdzie * - $P < 0,05$ wartości istotne statystycznie.

związek	czas [h]	EC_{50} [μM]		test Studenta
		Normoxia	Hypoxia	
C-1748	72	$0,01 \pm 0,002$	$0,0046 \pm 0,001$	$P=0,042^*$
C-857	72	$0,008 \pm 0,002$	$0,003 \pm 0,005$	$P=0,0082^{**}$
C-1305	72	$1,6 \pm 0,001$	$1,9 \pm 0,002$	$P=0,011^*$

W przypadku obu pochodnych 9-amino-1-nitroakrydyny wyznaczone wartości EC_{50} są istotnie niższe w komórkach inkubowanych przez 24 godziny w warunkach ograniczonego dostępu tlenu. Różnica pomiędzy EC_{50} w komórkach normalnych i hipoksycznych jest wyraźniejsza dla pochodnej bardziej reaktywnej, C-857. Wiąże się to z wyższym stężeniem aktywnych metabolitów, które w warunkach hipoksji są stabilne.

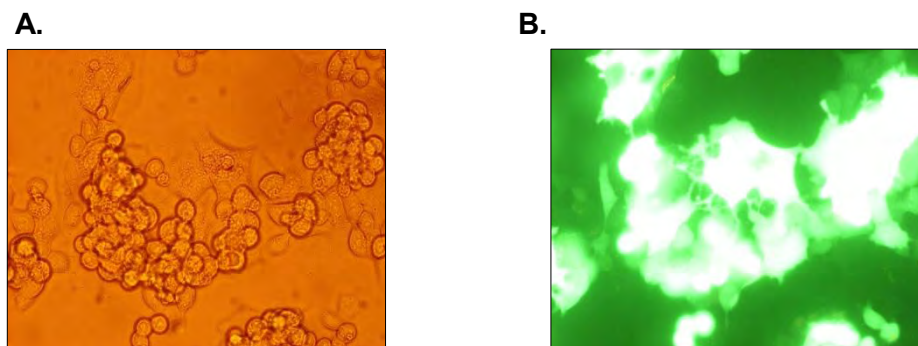
IV.1.8. Wpływ poziomu reduktazy NADPH:cytochrom (CPR) na metabolizm C-1748, C-857 – charakterystyka przemian metabolicznych w komórkach HepG2 transfekowanych plazmidem *cpr*.

Dla kontynuacji badań metabolizmu przeciwnowotworowych pochodnych 9-amino-1-nitroakrydyny oraz triazoloakrydonu w komórkach nowotworowych w kolejnym etapie pracy podjęłam próbę wyjaśnienia jaką rolę w tych transformacjach odgrywa NADPH-zależna reduktaza cytochromu P450 (CPR), obecna w komórkach nowotworu wątroby wraz z izoenzymami cytochromu P450.

Reduktaza CPR katalizuje reakcje 1-elektronowej redukcji, pełniąc ważną funkcję w komórkach, jako niezbędny u ssaków element kompleksu monooksygenazy cytochromów P450 odpowiedzialny za transport elektronów z NADPH do centrum aktywnego enzymu. Pomimo, że całkowita zawartość reduktazy w mikrosomach komórek zwierzęcych w stosunku do zawartości izoenzymów cytochromu P450 wynosi od 1:10 do 1:20, badania sposobu oddziaływań między obydwoma białkami wykazały, że tworzą one kompleks w stosunku 1:1 [Backes i Kelly, 2003]. Poza tym, reduktaza CPR pracując samodzielnie, bez udziału cytochromu P450, katalizuje metabolizm redukcyjny proleków, głównie chinonów, aldehydów i pochodnych związków nitrowych, w wyniku czego powstają bardzo reaktywne produkty pośrednie, które mogą oddziaływać z makromolekułami. Wśród bezpośrednich substratów CPR, znajdują się leki przeciwnowotworowe np. mitomycyna C, porfiryne C, adriamycyna, tirapazamina [Munro i wsp., 2007; Rooseboom i wsp., 2004]. W wynikach przedstawionych w rozprawie doktorskiej Wiśniewskiej [Wiśniewska, 2008], w których zastosowano rekombinantową reduktazę cytochromu P450 oraz frakcje enzymów mikrosomalnych, wykazano, że wszystkie produkty powstające w przemianie związku C-857 są identyczne w obu układach enzymatycznych. W przypadku związku C-1748 dwa metabolity z trzech powstające w obecności reduktazy P450, były identyczne, jak w obecności enzymów mikrosomalnych. Na podstawie powyższych wyników oraz dodatkowych doświadczeń, w szczególności z enzymami mikrosomalnymi wyizolowanymi z komórek wątroby myszy dzikiego typu i z nokautem genu kodującego reduktazę P450, postawiono wniosek, że w metabolizmie związków C-1748 i C-857 reduktaza nie tylko pełni rolę pomocniczą, ale jest również kluczowa dla ich metabolizmu [Wiśniewska i wsp., 2012].

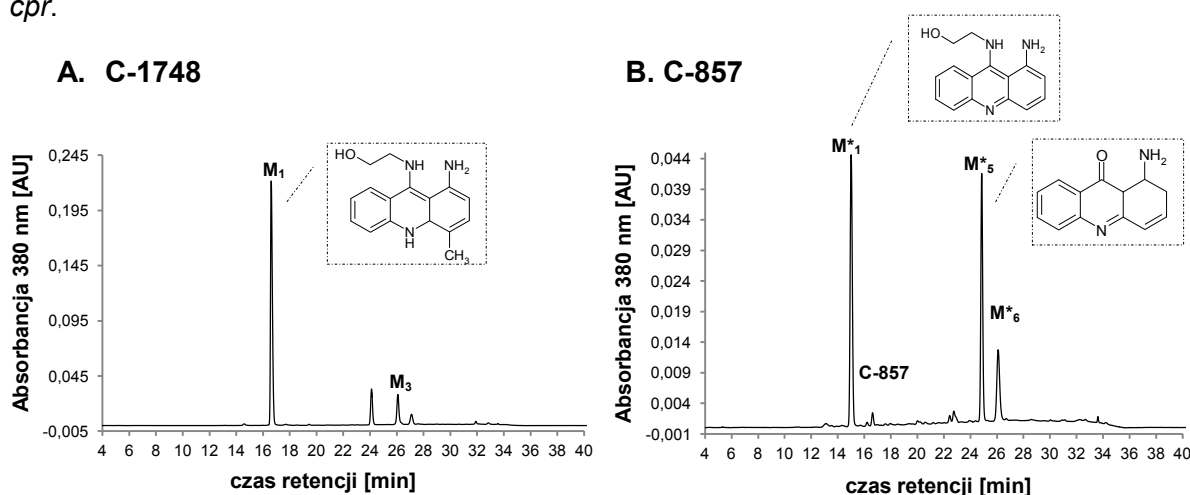
W celu określenia roli reduktazy cytochromu P450 w przemianach metabolicznych pochodnych C-1748, C-857 i C-1305 w komórkach nowotworowych HepG2, stransfekowałam komórki wektorem plazmidowym z sekwencją kodującą CPR. Wydajność transfekcji, z zastosowaniem techniki elektroporacji, określiłam z użyciem wektora z genem *gfp* [ang. *green fluorescent protein*], którego produktem ekspresji jest świecąca na zielono białko GFP. Białko GFP świeci w świetle UV (rys. 74), bez potrzeby stosowania dodatkowych

substratów. Po przeprowadzeniu wstępnych reakcji ustaliłam następujące warunki transfekcji: 12 mln komórek, 12 µg plazmidu, natężenie równe 130V oraz czas równy 20 msec.



Rys. 74. Ekspresja genu *gfp* w 48 godzinnej hodowli komórek HepG2. Dokumentację fotograficzną wykonano w mikroskopie fluorescencyjnym, powiększenie x 200. A: w świetle widzialnym, obrazujące całkowitą ilość komórek HepG2, bez filtra dla *gfp*; B: w świetle UV, obrazujące komórki transfekowane wektorem z sekwencją *gfp*.

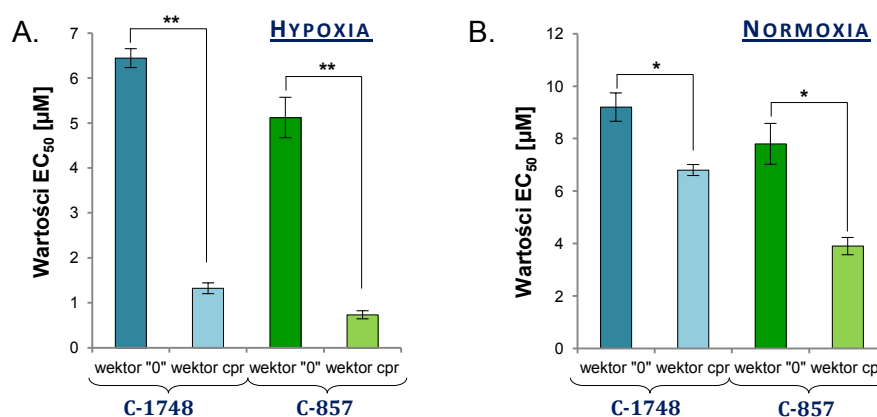
Na podstawie przedstawionych powyżej zdjęć obliczyłam wydajność transfekcji, która wynosiła ok. 90%. W kolejnym etapie zastosowałam właściwy wektor plazmidowy z sekwencją reduktazy cytochromu P450. Po transfekcji komórki poddałam ekspozycji na działanie związków, C-1748, C-857 oraz C-1305. Dodatkowo, 24 godziną inkubację prowadziłam w warunkach hypoksji. Wiadomo bowiem, że reduktaza cytochromu P450 działa efektywniej w warunkach redukcyjnych, z ograniczeniem dostępu tlenu [Rooseboom i wsp., 2004]. Poniżej, na rys. 75, przedstawiłam obraz chromatograficzny przemian dwóch pochodnych 9-amino-1-nitroakrydyny, C-1748 i C-857 w komórkach z wektorem z sekwencją *cpr*.



Rys. 75. Chromatograficzny obraz przemian metabolicznych związku A: C-1748 i B: C-857 w komórkach HepG2 transfekowanych wektorem z sekwencją reduktazy cytochromu P450, po 24 godzinnej inkubacji w warunkach hypoksji; 0,1 µM związek, 2 mln komórek, [chromatograf HPLC Breeze Waters].

Podczas przemian metabolicznych obu pochodnych 9-amino-1-nitroakrydyny w komórkach HepG2 z wektorem plazmidowym z sekwencją *cpr*, w warunkach hypoksji, powstają w najwyższym stężeniu produkty o symbolu M_1 i M^*_1 . Na podstawie porównania czasu retencji tych metabolitów oraz ich widma UV-Vis ze zidentyfikowanymi wcześniej produktami (patrz rozdz. IV.1.) uznałam, że są to metabolity ze zredukowaną grupą nitrową. Dodatkowo, w przypadku związku C-857, zauważyć można metabolit ze zredukowaną grupą nitrową oraz odszczepionym łańcuchem alifatycznym. Otrzymane wyniki wskazują, że reduktaza cytochromu P450 odgrywa ważną rolę w metabolizmie związków C-1748 i C-857, a w parze z hypoksją czyni ten metabolizm silnie selekcyjnym. Wyniki przemian metabolicznych związku C-1305 (wyniki nieprzedstawione) nie wykazały różnic w transformacji związku niezależnie od poziomu ekspresji genów reduktazy CPR oraz warunków hypoksji.

Równoległe z metabolizmem związków sprawdziłam wpływ poziomu CPR, z jednoczesnym wpływem poziomu tlenu w środowisku, na cytotoksyczność pochodnych C-1748 i C-857 w stosunku do komórek HepG2. Otrzymane wartości EC_{50} , po 24 godzinnej inkubacji, porównałam z wyznaczonymi wartościami EC_{50} dla komórek HepG2 transfekowanych wektorem zerowym. Poniżej, na rys. 76, przedstawiłam otrzymaną zależność, która silnie wskazuje na wyraźne różnice we wrażliwości komórek na związki C-1748 i C-857. Linia HepG2 transfekowana wektorem *cpr* jest ok. 5-krotnie bardziej wrażliwa po ekspozycji na pochodne C-1748 i C-857 (rys. 76A). Nie zaobserwowałam tak istotnych różnic w przypadku prowadzenia hodowli w warunkach normalnych (rys. 76B).



Rys. 76. Wartości EC_{50} dla związków C-1748 i C-857 wyznaczone na podstawie krzywych zahamowania wzrostu komórek HepG2 transfekowanych wektorem „0” oraz *cpr* inkubowanych z badanymi związkami przez 24 godziny, A: w warunkach hipoksji, B: w warunkach normalnych. Podane wartości są średnią z dwóch niezależnych doświadczeń. Dla określenia poziomu istotności przeprowadzono test Studenta, gdzie * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ – wartości istotne statystycznie.

IV.1.9. Podsumowanie wyników badań opisanych w punkcie IV.1.

Zestawiając wyniki badań zrealizowanych w ramach pierwszego etapu prezentowanej pracy wykazano, że:

- Wszystkie trzy badane pochodne były metabolizowane w zastosowanych liniach komórek nowotworowych pochodzenia ludzkiego, a ich stopień przemian metabolicznych był uzależniony od obecności enzymów metabolizujących I i II fazy metabolizmu
- Pochodne 9-amino-1-nitroakrydyny, C-1748 i C-857, metabolizowały do 4 głównych produktów: ze zredukowaną grupą nitrową, z dodatkowym pierścieniem pomiędzy atomami azotu w pozycji 1 i 9 pierścienia akrydyny, ze zredukowaną grupą nitrową oraz odszczepionym łańcuchem alifatycznym oraz dimeru aza-akrydyny. Najwyższe stężenia metabolitów były w linii HepG2, o najwyższym poziomie izoenzymów cytochromu P450. W linii HT29 oraz A549 widoczny był również metabolit II fazy, związek z przyłączoną resztą kwasu glukuronowego. Może to wskazywać, że w jego powstawaniu uczestniczy izoenzym UGT1A10, który jest obecny tylko w linii HT29 oraz A549, a niewykrywalny w pozostałych liniach.
- Pochodna C-1305 metabolizowała do N-tlenku na terminalnym atomie azotu w łańcuchu bocznym w liniach HepG2 oraz HCT116. W liniach HT29 powstawał w bardzo wysokim stężeniu glukuronid związku C-1305, który w niższym stopniu widoczny był również w linii A549.
- Poziom ekspresji genów izoenzymu CYP3A4, biorącego udział w metabolizmie pochodnych C-1748 i C-857, wpływał na wzrost stopnia przemiany obu związków. Stężenia powstających metabolitów były istotnie wyższe w komórkach Hep3A4 w porównaniu do linii kontrolnej, HepC34. Podwyższona szybkość metabolizmu, a jednocześnie niestabilność produktów, wpływała na wyższą aktywność cytotoksyczną obu związków tylko po krótkim czasie inkubacji.
- Hypoksja, czyli ograniczony dostęp tlenu, wpływała na wzrost stopnia przemiany pochodnych 9-amino-1-nitroakrydyny, do metabolitów ze zredukowaną grupą nitrową. Okazały się one stabilne w tych warunkach, wpływając tym samym na zwiększenie aktywności cytotoksycznej pochodnych nawet po długim czasie inkubacji komórek ze związkiem.
- Reduktaza cytochromu P450 (CPR) odgrywała kluczową rolę w przemianach metabolicznych pochodnych C-1748 i C-857, ale nie C-1305, w komórkach nowotworowych HepG2, w warunkach hypoksji. W konsekwencji, cytotoksyczność obu związków w tych warunkach wyraźnie wzrastała.

IV.2. MODULACJA AKTYWNOŚCI KATALITYCZNEJ I POZIOMU EKSPRESJI GENÓW WYBRANYCH ENZYMÓW METABOLIZUJĄCYCH PRZEZ POCHODNE AKRYDINY W KOMÓRKACH NOWOTWOROWYCH.

Jednym z podstawowych zadań farmakokinetyki klinicznej jest opracowanie schematu dawkowania leku. Możliwe jest to poprzez wyznaczenie parametrów farmakokinetycznych, takich jak biologiczny okres półtrwania ($T_{0,5}$), stała szybkości eliminacji (K_{el}), objętość dystrybucji (V_d), klirens leku (C_l) [Herman, 2002]. Na wartości powyższych parametrów rzutują czynniki, do których zaliczyć można: polimorfizm genetyczny, wiek, płeć, stan czynnościowy organizmu oraz interakcje z innymi lekami [Petros i wsp., 2005; Calsteren i wsp., 2010]. Te ostatnie kryją za sobą hamowanie bądź indukcję enzymów mikrosomalnych przez stosowane leki. Obecność w organizmie ksenobiotyków wpływających na indukcję, bądź obniżenie poziomu ekspresji wybranych enzymów metabolizujących może jednocześnie wpływać na metabolizm stosowanych równocześnie innych leków, tym samym obniżając ich skuteczność [Yasuda i wsp., 2008]. Z tego powodu, niezwykle istotnym jest, podczas badań przedklinicznych potencjalnego chemoterapeutyku, nie tylko możliwie szerokie określenie dokładnej farmakokinetyki i farmakodynamiki związku, ale również poznanie jego wpływu na aktywność katalityczną enzymów metabolizujących oraz poziom ekspresji ich genów. Na tej podstawie, w **drugiej części prezentowanej pracy, przeprowadziłam badania wpływu związków 9-amino-1-nitroakrydiny oraz triazoloakrydonu na aktywność katalityczną i poziom genów izoenzymów CYP3A4 oraz CYP2C9**. Wybór izoenzymów wynikał z faktu, że białka te mają najwyższy udział w metabolizmie leków, w tym przeciwnowotworowych, a więc potencjalna modulacja aktywności i poziomu ekspresji genów tych białek będzie miała duży udział w interakcjach lek-lek.

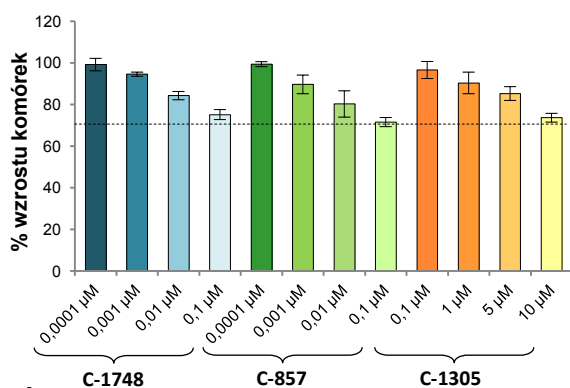
Jak wynika z dotychczas przeprowadzonych przeze mnie badań, występujące różnice strukturalne pomiędzy pochodnymi 9-amino-1-nitroakrydiny, C-1748 i C-857 oraz triazoloakrydonu, C-1305, mają odzwierciedlenie w różnych szlakach ich przemian metabolicznych w komórkach nowotworowych. Ta obserwacja pozwala przypuszczać, że związki te w różny sposób mogą modulować aktywność czy nawet poziom ekspresji enzymów zaangażowanych w ich metabolizm. Celem przeprowadzonych prac było zweryfikowanie tej hipotezy.

IV.2.1. Opracowanie warunków eksperymentalnych.

Zarówno dla określenia wpływu związków na poziom aktywności katalitycznej badanych izoenzymów, jak również na ekspresję ich genów, zastosowałam dwa warianty inkubacji komórek ze związkami:

- inkubacja komórek z pochodnymi akrydny w różnym stężeniu, przez 24 godziny (zależność od stężenia),
- inkubacja komórek przez różne czasy ze związkiem w jednym stężeniu (zależność od czasu)

W celu określenia czy wpływ badanych związków na ekspresję genów miał charakter funkcjonalny wynikający z aktywnego mechanizmu działania leku, a nie był spowodowany efektem toksycznym, dalsze eksperymenty prowadziłam przy stężeniach związku mniejszych bądź równych EC_{30} (po 24 godzinach inkubacji). W celu wyznaczenia wartości EC_{30} przeprowadziłam oznaczenie aktywności cytotoksycznej zależnej od stężenia. Poniżej na rys. 77 przedstawiłam wartości zahamowania wzrostu komórek HepG2, po 24 godzinach inkubacji komórek ze związkami o stężeniach równych bądź niższych od EC_{30} oraz zestawienie warunków wybranych do dalszych badań (tabela 7).



Rys. 77. Zahamowanie wzrostu komórek ludzkiego nowotworu wątroby, HepG2, przy wybranych do dalszych badań stężeniach związków, C-1748, C-857 i C-1305.

I WARIANT		
	C-1748 / C-857	C-1305
Stężenie [µM]	0,0001; 0,001; 0,01; 0,1	0,1; 1; 5; 10
Czas [h]	24	
II WARIANT		
Czas [h]	3; 6; 12; 24; 48	3; 6; 12; 24; 48
Stężenie [µM]	0,001	10

Tabela 7. Zestawienie warunków eksperymentalnych badań wpływu pochodnych akrydny na poziom ekspresji genów CYP3A4 i CYP2C9 oraz poziom białka.

IV.2.2. Badanie wpływu związków C-1748, C-857 i C-1305 na aktywność katalityczną izoenzymów CYP3A4 i CYP2C9 w komórkach HepG2.

Modulacja aktywności katalitycznej, w większości przypadków prowadzi do modyfikacji farmakokinetyki stosowanych leków w terapii łączonej, jak również ma wpływ na metabolizm wielu endogennych substratów tych enzymów [Chibueze i wsp., 2011; Dvorak, 2011]. W myśl tego, w kolejnym etapie sprawdziłam, jak zmienia się aktywność izoenzymów CYP3A4 i CYP2C9 zaangażowanych w metabolizm większości stosowanych klinicznie leków, w wyniku działania pochodnych C-1748, C-857 i C-1305. W celu pomiaru aktywności cytochromów P450 zastosowałam metodę luminescencyjną. Polegała ona na dodaniu do komórek, kontrolnych oraz traktowanych związkami, specyficznego substratu dla CYP3A4

i CYP2C9 związanego z prolucyferyną¹³. Reakcja enzymatyczna prowadziła do jej konwersji do lucyferyny, a pomiar luminescencji był proporcjonalny do aktywności enzymatycznej cytochromów P450.

Dodatkowo, zbadalam i porównalam przemianę typowego substratu izoenzymu CYP3A4, testosteronu, z zastosowaniem techniki HPLC, w dwóch wariantach: przy braku i w obecności pochodnych akrydyny w komórkach HepG2¹⁴. Testosteron to endogenny steroid, produkowany przez komórki śródmiąższowe Leydiga w jądrach, korę nadnerczy, jajniki i łożysko. Przemianę testosteronu do 6β-hydroksyttestosteronu w organizmie człowieka katalizuje izoenzym CYP3A4 [Krauser i Guengerich, 2005]. W oparciu o dane literaturowe [Sane i wsp., 2008; Yasuda i wsp., 2008] oraz wstępne doświadczenia przyjąłam optymalne stężenie testosteronu jako 50 μM. Testosteron był dodany do komórek na 24 godziny po ich wcześniejszej inkubacji ze związkami w różnym stężeniu. Medium po ekstrakcji acetonitrylem zostało poddane analizie chromatograficznej (RP-HPLC). Następnie porównując ilość głównego metabolitu testosteronu, uzyskaną w komórkach bez i z udziałem pochodnych akrydyny, określiłam procentową aktywność enzymu korzystając ze wzoru:

$$Y = (100 \cdot a) / b \text{ [%]} \quad (\text{wzór 2})$$

gdzie:

a – pole powierzchni pod pikiem metabolitu po odpowiednim czasie trwania inkubacji z badanym związkiem w różnym stężeniu [μV*s]

b – pole powierzchni pod pikiem metabolitu po odpowiednim czasie trwania inkubacji bez udziału badanego związku [μV*s]

Wszystkie analizy chromatograficzne przeprowadziłam co najmniej dwukrotnie, zatem prezentowane wyniki są wartością średnią z wykonanych niezależnie doświadczeń wraz z odchyleniami standardowymi.

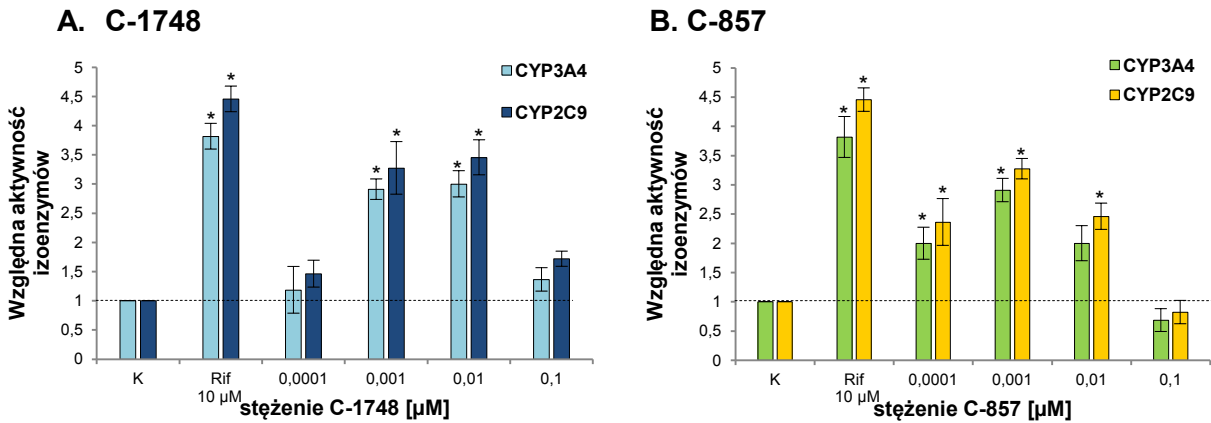
IV.2.2.1. Wyniki badań wpływu pochodnej C-1748 i C-857 na aktywność katalityczną izoenzymów CYP3A4 i CYP2C9.

Na podstawie wykresów względnego poziomu aktywności (rys. 78) można stwierdzić, że pochodne C-1748 i C-857 indukowały aktywność obu izoenzymów. Zauważyć można wyższy poziom izoenzymu CYP2C9 po traktowaniu komórek związkami. Różnice te nie są

¹³ Specyficzne substraty izoenzymów CYP3A4 i CYP2C9 to związki chemiczne zsyntetyzowane przez producenta (Promega), których struktury chemiczne umieściłam w Części Doświadczalnej.

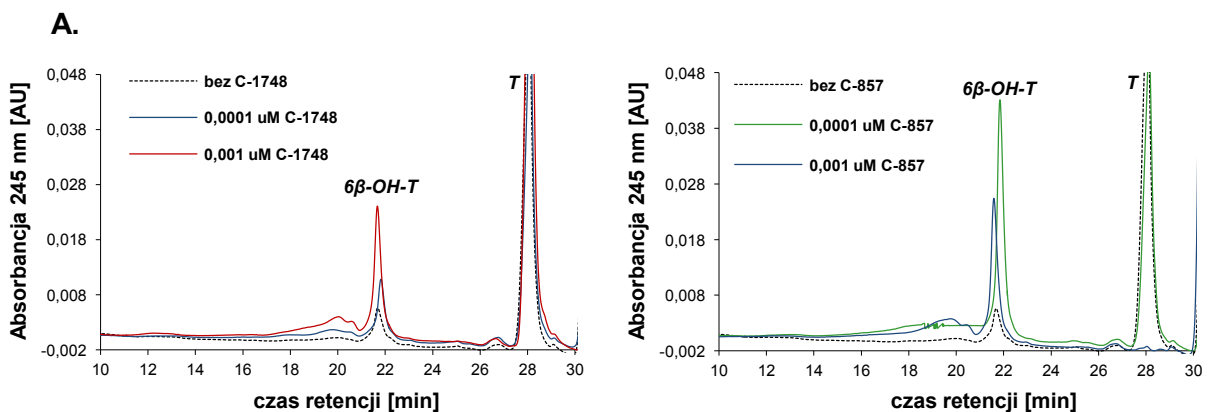
¹⁴ Z uwagi na trudność w identyfikacji metabolitów warfaryny w komórkach HepG2, która jest standardowym substratem izoenzymu CYP2C9, dodatkowe badanie aktywności enzymów z wykorzystaniem metody HPLC przeprowadziłam tylko dla izoenzymu CYP3A4.

jednak na tyle istotne, żeby stwierdzić specyficzną indukcję CYP2C9. Analizując przedstawione poniżej wykresy stwierdziłam, że ekspozycja komórek na związek C-857 w najniższym stężeniu skutkuje prawie trzykrotnym wzrostem aktywności enzymatycznej obu białek, gdzie C-1748 w tym samym stężeniu indukuje dwukrotny wzrost poziomu aktywności tych izoenzymów. Po zastosowaniu wyższego stężenia C-857 następuje spadek aktywności do poziomu niższego niż w komórkach nie traktowanych związkiem.

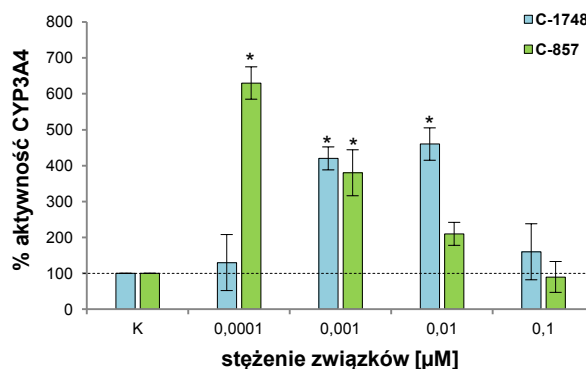


Rys. 78. Analiza względnej poziomu aktywności katalitycznej (% kontroli) izoenzymów CYP3A4 i CYP2C9 w komórkach HepG2, traktowanych pochodnymi A: C-1748 i B: C-857, przez 24 godziny, wyznaczona metodą luminescencyjną. Podane wartości są średnią z dwóch niezależnych doświadczeń. Dla określenia poziomu istotności względem próby kontrolnej przeprowadziłam test ANOVA (Dunnet test), gdzie $p < 0,05$ – wartości istotne statystycznie.

Dodatkowym testem potwierdzającym modulację aktywności izoenzymu CYP3A4 przez badane pochodne była analiza HPLC przemian testosteronu. Wykazała ona wyraźny wzrost piku 6β -hydroksyttestosteronu w komórkach inkubowanych z C-1748 i C-857 przez 24 godziny w stężeniach równych $0,0001 \mu\text{M}$ i $0,001 \mu\text{M}$ (rys. 79A). Co ciekawe, szczególnie C-857 okazał się skuteczny w indukcji aktywności CYP3A4. Zastosowanie wyższych stężeń obu pochodnych doprowadziło do spadku aktywności enzymatycznej CYP3A4 wraz ze wzrastającym stężeniem, do poziomu bliskiego w próbie kontrolnej (bez związku). Podobny profil zmian zaobserwowałam w badaniu aktywności metodą luminescencyjną. Maksymalny przyrost stężenia 6β -hydroksyttestosteronu zauważyć można po dodaniu do komórek $0,01 \mu\text{M}$ C-1748 oraz $0,001 \mu\text{M}$ C-857.



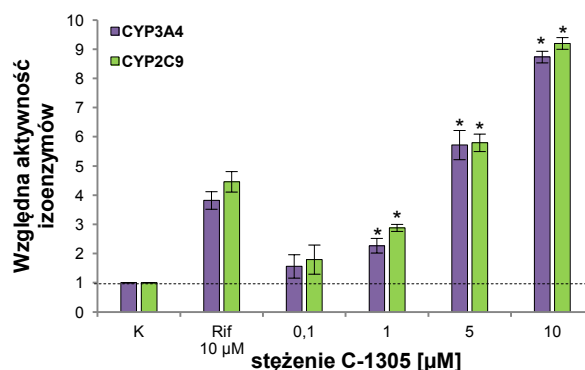
B.



Rys. 79. A: Chromatograficzny obraz przemiany testosteronu do 6β-hydroksyttestosteronu katalizowanej przez izoenzym CYP3A4, bez i w obecności, przez 24 godziny, pochodnych C-1748 i C-857, w komórkach HepG2, [chromatograf HPLC Waters Breeze]; B: Porównanie % aktywności enzymatycznej izoenzymu CYP3A4 w komórkach HepG2 traktowanych związkami C-1748 i C-857. Podane wartości są średnią z dwóch niezależnych doświadczeń. Dla określenia poziomu istotności względem próby kontrolnej przeprowadziłam test ANOVA (Dunnet test), gdzie * $p < 0,05$ – wartości istotne statystycznie.

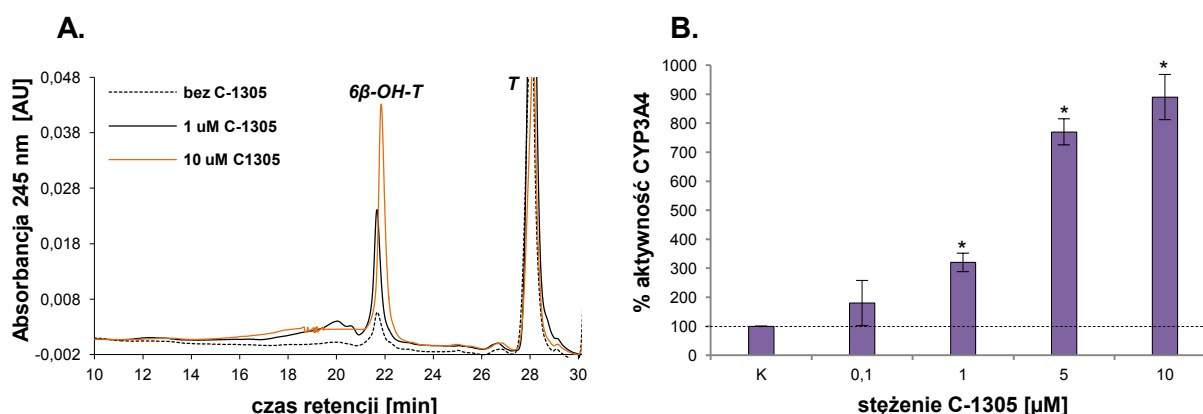
IV.2.2.2. Wyniki badań wpływu pochodnej C-1305 na aktywność katalityczną CYP3A4 i CYP2C9.

Badania zmian poziomu aktywności izoenzymów CYP3A4 i CYP2C9 w wyniku działania pochodnej C-1305, przeprowadziłam w analogiczny sposób, jak w przypadku związków C-1748 i C-857. Pomiar luminescencji w komórkach HepG2 przeprowadziłam po 24 godzinach inkubacji z C-1305 w stężeniach: 0,1, 1, 5, 10 µM. Stanowił on odzwierciedlenie poziomu aktywności enzymatycznej obu białek. Stwierdziłam, że obecność w komórkach pochodnej akrydyny powodowała wyraźny, bo aż dziewięciokrotny, wzrost aktywności CYP2C9 i CYP3A4 (rys. 80).



Rys. 80. Analiza względna poziomu aktywności katalitycznej (% kontroli) izoenzymów CYP3A4 i CYP2C9 w komórkach HepG2, traktowanych pochodną C-1305, przez 24 godziny, wyznaczona metodą luminescencyjną. Podane wartości są średnią z dwóch niezależnych doświadczeń. Dla określenia poziomu istotności względem próby kontrolnej przeprowadziłam test ANOVA (Dunnet test), gdzie $p < 0,05$ – wartości istotne statystycznie.

Znając obraz przemian metabolicznych testosteronu z izoenzymem CYP3A4, w obecności dwóch pochodnych 9-amino-1-nitroakrydyny, zbadalam także wpływ pochodnej triazoloakrydonu, C-1305, na wydajność reakcji katalizowanej przez ten enzym. Zamierzając sprawdzić wpływ C-1305 na przebieg reakcji 6 β -hydroksylacji testosteronu przeprowadziłam analizę chromatograficzną składu pożywki hodowlanej, do której przed testosteronem, dodałam różne stężenia C-1305. Porównanie ilości głównego metabolitu uzyskanego bez i z udziałem C-1305, pozwoliło mi dostrzec wyraźnie wyższy stopień przemiany substratu oraz zdecydowanie wyższe stężenie 6 β -hydroksytestosteronu (rys. 81A). Ilość powstającego metabolitu rosła równomiernie ze wzrostem stężenia C-1305.



Rys. 81. A: Chromatograficzny obraz przemiany testosteronu do 6 β -hydroksytestosteronu katalizowanej przez izoenzym CYP3A4, bez i w obecności, przez 24 godziny, pochodnej C-1305, w komórkach HepG2, [chromatograf HPLC Waters Breeze]; B: % aktywność enzymatyczna izoenzymu CYP3A4 w komórkach HepG2 traktowanych związkiem C-1305. Podane wartości są średnią z dwóch niezależnych doświadczeń. Dla określenia poziomu istotności względem próby kontrolnej przeprowadziłam test ANOVA (Dunnet test), gdzie * $p < 0,05$ – wartości istotne statystycznie.

Analizując reaktywność testosteronu wobec CYP3A4 w zależności od stężenia C-1305 mogłam stwierdzić, że przy stężeniach 5 μ M i 10 μ M aktywność enzymu podniosła się ok. dziewięć razy, w stosunku do wartości obserwowanej przy braku C-1305. Wobec powyższych wyników ustaliłam, że C-1305 posiada wysoce istotną zdolność indukcji aktywności katalitycznej izoenzymu CYP3A4.

IV.2.3. Badanie wpływu związków C-1748, C-857 i C-1305 na poziom ekspresji genów izoenzymów CYP3A4 i CYP2C9 w komórkach HepG2.

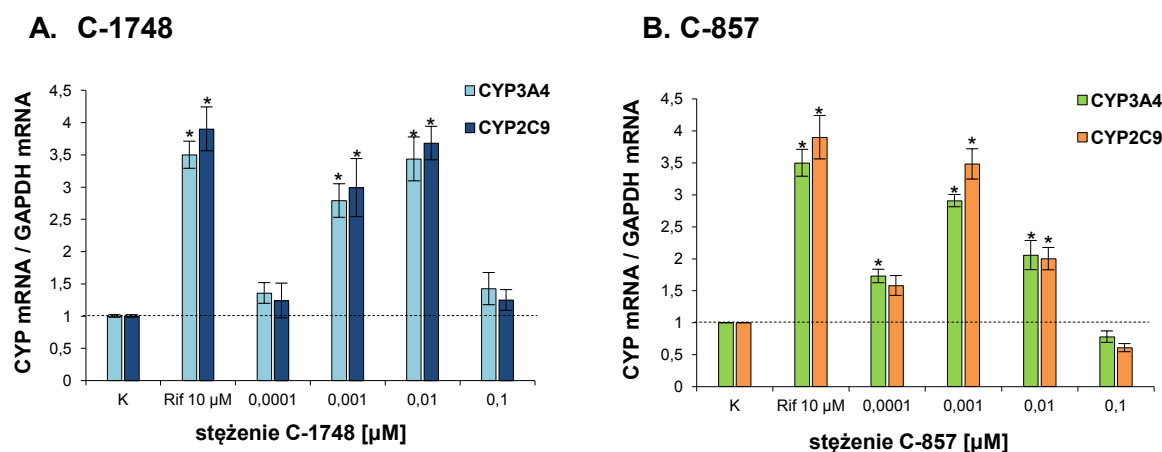
Do określenia wpływu pochodnych na poziom ekspresji genów CYP3A4 i CYP2C9 posłużyłam się techniką Real-time PCR, która opiera się na analizie przyrostu ilości produktu reakcji PCR w czasie rzeczywistym poprzez zmiany fluorescencji w każdym cyklu. Substancją fluorescencyjną był wiążący się do dsDNA, barwnik interkalujący Sybr®Green.

Poziom analizowanych transkryptów standaryzowałam względem genu referencyjnego – GAPDH (dehydrogenazy glicerolaldehidofosforanowa), należącego do *housekeeping gene*, którego poziom ekspresji jest stały w warunkach eksperymentu. Dzięki temu, że wydajność amplifikacji badanych genów i genu referencyjnego była w przybliżeniu taka sama w zakresie badanych ilości DNA, poziom ekspresji genów wyznaczyłam stosując analizę względną z użyciem porównywalnej metody $2^{-\Delta\Delta Ct}$ [Livak i Schmittgen, 2001].

W określeniu poziomu enzymów w komórkach HepG2 przed i po traktowaniu pochodnymi akrydyny posłużyłam się metodą detekcji białek, Western blotting, z użyciem specyficznych przeciwciał dla CYP3A4 i CYP2C9.

IV.2.3.1. Wyniki badań wpływu pochodnej C-1748 i C-857 na poziom oraz ekspresję CYP3A4 i CYP2C9.

Poniżej, na rys. 82, zaprezentowałam wyniki analizy Real-time PCR poziomu ekspresji mRNA CYP3A4 i CYP2C9, wyizolowanego z komórek HepG2 traktowanych przez 24 godziny związkami C-1748 i C-857 w stężeniach: 0,0001, 0,001, 0,01, 0,1 μM .

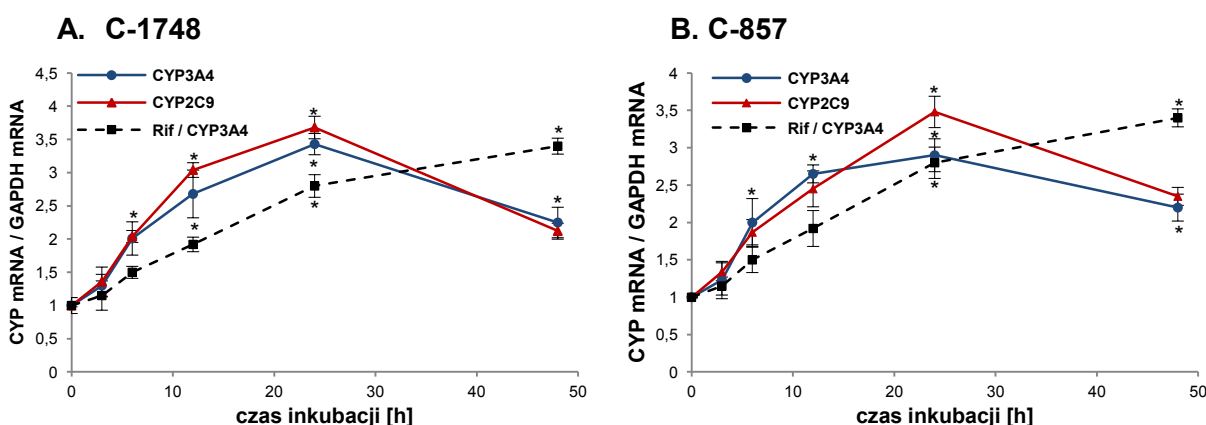


Rys. 82. Analiza względna poziomu ekspresji genów CYP3A4 i CYP2C9, znormalizowana względem genu referencyjnego GAPDH, w komórkach HepG2 traktowanych pochodną A: C-1748 i B: C-857 przez 24 godziny inkubacji. Komórki traktowane rifampicyną stanowią kontrolę dodatnią. Podane wartości są średnią z dwóch niezależnych doświadczeń. Dla określenia poziomu istotności względem próby kontrolnej przeprowadziłam test ANOVA (Dunnet test), gdzie $*p < 0,05$ – wartości istotne statystycznie.

Zależność poziomu ekspresji CYP3A4 i CYP2C9 od stężenia obu pochodnych, C-1748 i C-857, wykazała widoczną indukcję ekspresji obu genów przy stężeniu 0,001 μM . Zastosowanie najwyższego stężenia, 0,1 μM , w przypadku obu związków spowodowało dość gwałtowne obniżenie poziomu ekspresji CYP3A4 i CYP2C9. Stężenie te było wyższe od wyznaczonego EC_{20} , dlatego można przypuszczać, że przeważał tu efekt toksyczny. Dodatkowe doświadczenie (wyniki nieprzedstawione) z zastosowaniem wysokich stężeń pochodnych 1-nitro (wielokrotność EC_{50}) wykazało dalszy, szybki i gwałtowny, spadek

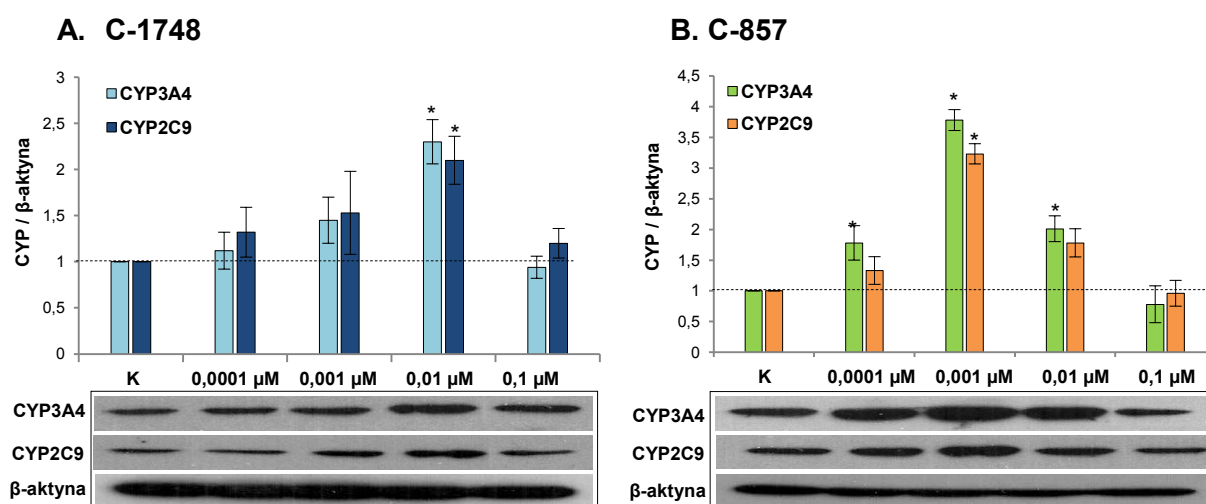
poziomu ekspresji obu genów. Warto zwrócić uwagę na fakt, że przy stężeniu 0,01 μM związku bardziej reaktywnego, C-857, poziom ekspresji wyraźnie obniżył się. Pochodna C-1748 przy takim samym stężeniu nadal indukowała zmiany w ekspresji genów obu izoenzymów.

W celu poszerzenia wyników badań dotyczących zmian poziomu ekspresji genów *CYP3A4* i *CYP2C9* pod wpływem działania związków C-1748 i C-857, zbadalam kinetykę tych zmian, w zależności od czasu inkubacji komórek HepG2 ze związkami o stężeniu: 0,01 μM C-1748 oraz 0,001 μM C-857 (II wariant, patrz tabela 7). Otrzymane wyniki, przedstawione na rys. 83, wskazały, że poziom mRNA *CYP3A4* i *CYP2C9* rośnie liniowo dla obu związków do 24 godzin. Wydłużenie czasu inkubacji do 48 godzin spowodowało spadek poziomu ekspresji. Zauważyć można, że kinetyka zachodzących zmian jest szybsza od kinetyki rifampicyny, zastosowanej jako kontrola dodatnia. Rifampicyna jest standardowym induktorem ekspresji genów *CYP3A4* i *CYP2C9*, często stosowanym w badaniach farmakokinetycznych *in vitro* [Gerbal-Chaoin i wsp., 2002; Svecova i wsp., 2008].



Rys. 83. Analiza względna poziomu ekspresji genów *CYP3A4* i *CYP2C9*, znormalizowana względem genu referencyjnego GAPDH, w komórkach traktowanych pochodnymi A: 0,001 μM C-1748 i B: 0,001 μM C-857, przez różne czasy inkubacji. Komórki traktowane rifampicyną stanowią kontrolę dodatnią. Podane wartości są średnią z dwóch niezależnych doświadczeń. Dla określenia poziomu istotności względem próby kontrolnej przeprowadziłam test ANOVA (Dunnet test), gdzie $p < 0,05$ – wartości istotne statystycznie.

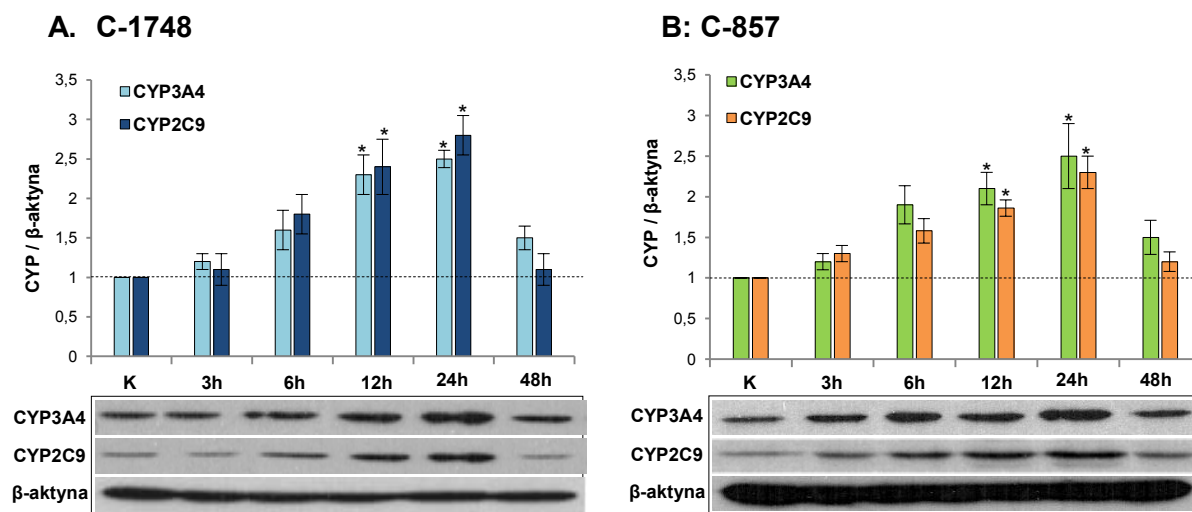
W kolejnym etapie zbadalam wpływ pochodnych C-1748 i C-857 na poziom białek *CYP3A4* i *CYP2C9*. W tym celu zastosowałam metodę Western blotting. Przeprowadzone doświadczenia zależności od stężenia i czasu przeprowadziłam opierając się na wcześniej ustalonych warunkach (tabela 7). Poniżej przedstawiłam otrzymane wyniki analizy Western blotting łącznie z analizą densytometryczną przeprowadzoną w programie *ImageJ*.



Rys. 84. Poziom izoenzymów CYP3A4 i CYP2C9 w komórkach HepG2, kontrolnych i traktowanych pochodną A: C-1748 i B: C-857 w różnych stężeniach. Wyniki analizy densytometrycznej są średnią z dwóch niezależnych doświadczeń. Analiza Western blotting przedstawiona poniżej wykresu stanowi jeden obraz z dwóch przeprowadzonych doświadczeń. Jako kontrolę równomiernego napełnienia studzienek zastosowano β-aktynę. Dla określenia poziomu istotności względem próby kontrolnej przeprowadziłam test ANOVA (*Dunnet test*), gdzie $p < 0,05$ – wartości istotne statystycznie.

Jak wskazuje rys. 84, poziom izoenzymów CYP3A4 i CYP2C9, w porównaniu z komórkami kontrolnymi, znacząco wzrósł po ekspozycji komórek na pochodną C-1748 i C-857 w stężeniu równym 0,001 μM. Zastosowanie najniższego stężenia obu związków skutkowało mało znaczącym wzrostem poziomu obu białek, zaś najwyższe stężenie powodowało jego wyraźne obniżenie. Stwierdziłam, że charakter modulowanych zmian jest niemal identyczny ze zmianami jakie były indukowane w poziomie ekspresji genów obu izoenzymów (rys. 82).

Analizę kinetyki indukcji poziomu obu izoenzymów metodą Western blotting przedstawiłam na rys. 85. Uzyskane rezultaty wskazują, że wzrost poziomu izoenzymów pod wpływem działania obu pochodnych był liniowy. Najwyższe stężenie białek zaobserwowałam po 24 godzinach inkubacji komórek HepG2 ze związkami. Wydłużenie czasu inkubacji do 48 godzin, spowodowało wyraźny zahamowanie indukcji i spadek poziomu białek.



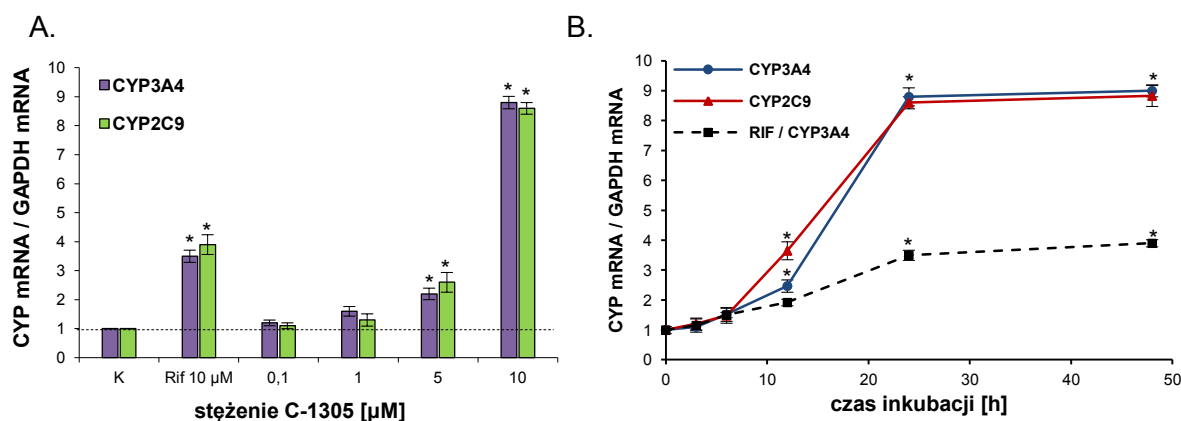
Rys. 85. Poziom izoenzymów CYP3A4 i CYP2C9 w komórkach HepG2, kontrolnych i traktowanych pochodną A: 0,001 μ M C-1748 oraz B: 0,001 μ M C-857 przez 5 wybranych czasów inkubacji. Wyniki analizy densytometrycznej są średnią z dwóch niezależnych doświadczeń. Analiza Western blotting przedstawiona poniżej wykresu stanowi jeden obraz z dwóch przeprowadzonych doświadczeń. Jako kontrolę równomiernego napełnienia studzienek zastosowano β -aktynę. Dla określenia poziomu istotności względem próby kontrolnej przeprowadziłam test ANOVA (*Dunnet test*), gdzie $p < 0,05$ – wartości istotne statystycznie.

Uzyskane wyniki w połączeniu z analizą poziomu ekspresji genów *CYP3A4* i *CYP2C9*, dają obraz zmian jakie indukują pochodne akrydyny. Zastosowane obie metody potwierdziły indukcję ekspresji genów i poziomu obu izoenzymów przez związki C-1748 i C-857, przy stosunkowo niskich stężeniach ($< EC_{20}$) w porównaniu do innych znanych induktorów tych białek, co wskazuje szereg danych literaturowych [Harmsen i wsp., 2009; Ratajewski i wsp., 2011]. Co ważne, krótki czas inkubacji ze związkami (szybka kinetyka) wymagany do zaobserwowania istotnych zmian w modulacji poziomu genów i białek oraz stopniowy zanik tej indukcji po wydłużającym się czasie inkubacji, sugerują, że na indukcję poziomu i ekspresji *CYP3A4* i *CYP2C9* mają wpływ same związki C-1748 i C-857, a nie ich metabolity¹⁵.

¹⁵ Mając na uwadze trudności w ścisłym wyjaśnieniu tego, czy to związki czy ich metabolity biorą udział w modulacji poziomu CYP3A4 i CYP2C9 i ekspresji ich genów kontynuowałam inkubację komórek HepG2 z C-1748 i C-857 aż do 144h inkubacji. Uzyskane wyniki analizy Real-time PCR i Western blotting wykazały stopniowy, lecz systematyczny spadek poziomu obu białek poniżej poziomu w próbie kontrolnej. W interpretacji tego rezultatu należy mieć na uwadze wszystkie zmiany zachodzące w komórce po tak długiej ekspozycji komórek na działanie związku, w tym toksyczne działanie aktywnych metabolitów i uruchomienie procesów destrukcyjnych. W dalszym etapie kontynuowałam próbę wyjaśnienia tego problemu badawczego (patrz podrozdz. IV.2.1.4.)

IV.2.3.2. Wyniki badań wpływu pochodnej C-1305 na poziom ekspresji *CYP3A4* i *CYP2C9*.

Badanie wpływu pochodnej C-1305 na poziom ekspresji *CYP3A4* i *CYP2C9* przeprowadziłam, podobnie jak dla C-1748 i C-857, w komórkach HepG2 w zależności od stężenia C-1305 oraz czasu inkubacji. Uzyskane wyniki analizy Real-time PCR przedstawiłam na rys. 86.

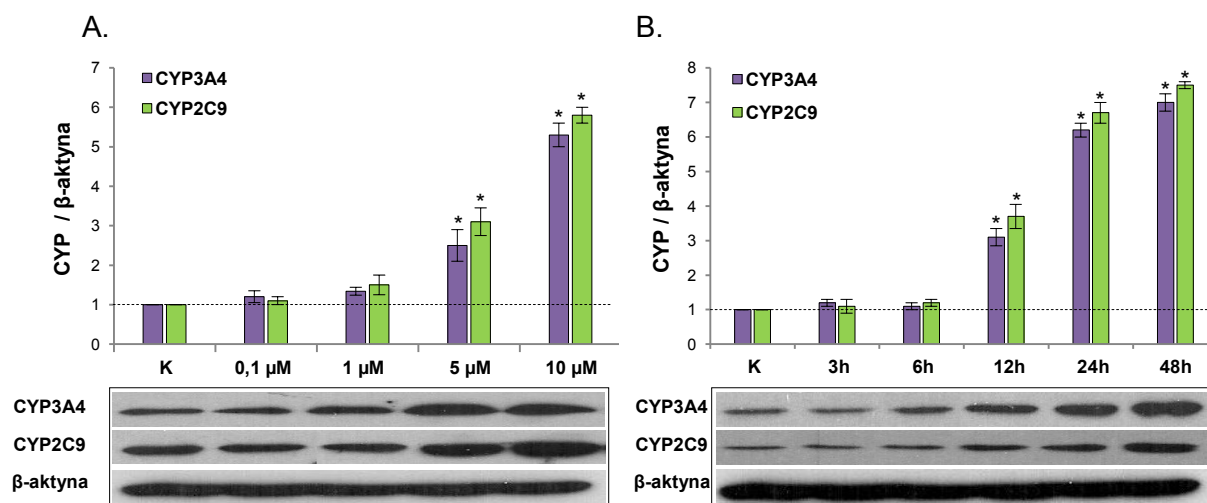


Rys. 86. Analiza względnej poziomu ekspresji genów *CYP3A4* i *CYP2C9*, znormalizowana względem genu referencyjnego GAPDH, w komórkach HepG2 traktowanych pochodną C-1305 w zależności od A: stężenia i B: czasu inkubacji. Komórki traktowane rifampicyną stanowią kontrolę dodatnią. Podane wartości są średnią z dwóch niezależnych doświadczeń. Dla określenia poziomu istotności względem próby kontrolnej przeprowadziłam test ANOVA (Dunnet test), gdzie $p < 0,05$ – wartości istotne statystycznie.

Jak wynika z analizy powyższych wykresów, poziom ekspresji *CYP3A4* i *CYP2C9* wzrósł po 24 godzinach ekspozycji komórek na związek C-1305 o stężeniu 10 μ M ok. dziewięć razy. Porównując uzyskany wynik z wynikiem indukcji w wyniku działania rifampicyny, standardowego induktora ekspresji *CYP3A4* i *CYP2C9*, mogę jednoznacznie stwierdzić, że C-1305 jest silnym induktorem ekspresji genów izoenzymów *CYP3A4* i *CYP2C9*, prawie 3-krotnie silniejszym od rifampicyny, stosowanej w tym samym stężeniu co C-1305 [Li i Chiang, 2006; Vrzal i wsp., 2010; Raynal i wsp., 2010].

Dalsza ocena działania pochodnej C-1305 wykazała, że kinetyka indukcji ekspresji była liniowa, podobna do kinetyki działania rifampicyny. Interesująca jest obserwacja wskazująca, że związek C-1305, w odróżnieniu od pochodnych C-1748 i C-857, po 48 godzinach nadal przyczynia się do wzrostu ekspresji obu genów. Dla przypomnienia należy dodać, że w komórkach traktowanych C-1748 i C-857 przez identyczny okres czasu, poziom ekspresji obniżył się i był porównywalny do kontrolnego (rys. 79).

Równolegle do przeprowadzonych analiz na poziomie transkrypcji, oceniłam poziom białek *CYP3A4* i *CYP2C9* w komórkach HepG2 po ekspozycji na działanie C-1305 metodą Western blotting (rys. 87).

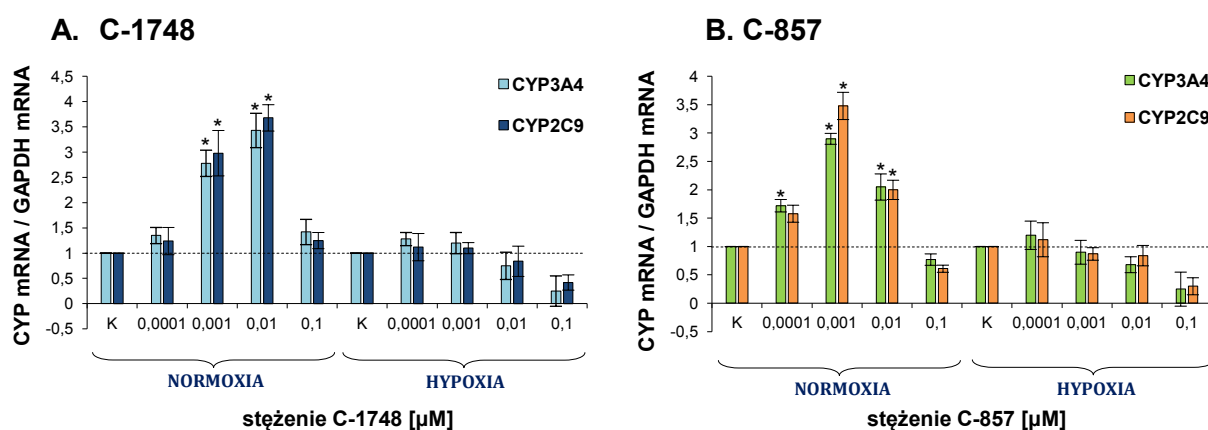


Rys. 87. Poziom izoenzymów CYP3A4 i CYP2C9 w komórkach HepG2, kontrolnych i traktowanych pochodną C-1305 A: w różnych stężeniach (24h) oraz B: przez 5 wybranych czasów inkubacji (10 μM). Wyniki analizy densytometrycznej są średnią z dwóch niezależnych doświadczeń. Analiza Western blotting przedstawiona poniżej wykresu stanowi jeden obraz z dwóch przeprowadzonych doświadczeń. Jako kontrolę równomiernego napełnienia studzienek zastosowano β-aktynę. Dla określenia poziomu istotności względem próby kontrolnej przeprowadziłam test ANOVA (*Dunnet test*), gdzie $p < 0,05$ – wartości istotne statystycznie.

Poziom białek CYP3A4 i CYP2C9, w porównaniu z komórkami kontrolnymi, znacząco wzrósł po zastosowaniu najwyższego stężenia C-1305 i był wprost proporcjonalny do wydłużającego się czasu inkubacji. Po 24 i 48 godzinach ekspozycji na związek, poziom CYP3A4 i CYP2C9 był ok. 7-8 razy wyższy od kontrolnego. Uzyskane wyniki potwierdziły poprzednie, otrzymane podczas analizy poziomu transkrypcji. Kinetyka modulowanych zmian również pozwala przypuszczać, jak w przypadku pochodnych C-1748 i C-857, że na indukcję CYP3A4 i CYP2C9 wpływa sam związek, a nie jego metabolit.

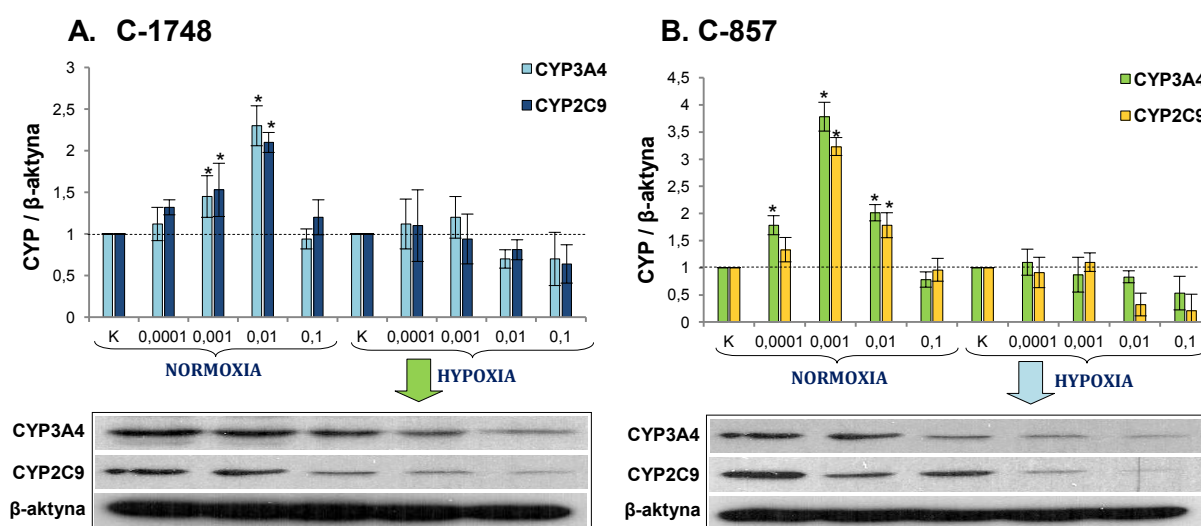
IV.2.3.3. Wyniki modulacji poziomu ekspresji CYP3A4 i CYP2C9 w komórkach HepG2 w warunkach hypoksji.

Badanie przemian metabolicznych pochodnych 9-amino-1-nitroakrydyny i triazoloakrydonu w warunkach ograniczonego dostępu tlenu, wskazało na przyspieszoną kinetykę oraz wzrost stopnia przemiany związków C-1748 i C-857 w warunkach hypoksji, w opozycji do pochodnej C-1305, której metabolizm był podobny w warunkach normalnych i w warunkach hypoksji (patrz podrozdz. IV.1.7). Mając na uwadze powyższe wyniki, w celu uzyskania pełniejszego wyjaśnienia czy to pochodne C-1748 i C-857 czy też ich metabolity biorą udział w indukcji poziomu ekspresji CYP3A4 i CYP2C9, przeprowadziłam ocenę poziomu transkrypcji genów obu izoenzymów w warunkach ograniczonego dostępu tlenu. Otrzymane wyniki wpływu związków w zależności od stężenia przedstawiłam poniżej, na rys. 88.



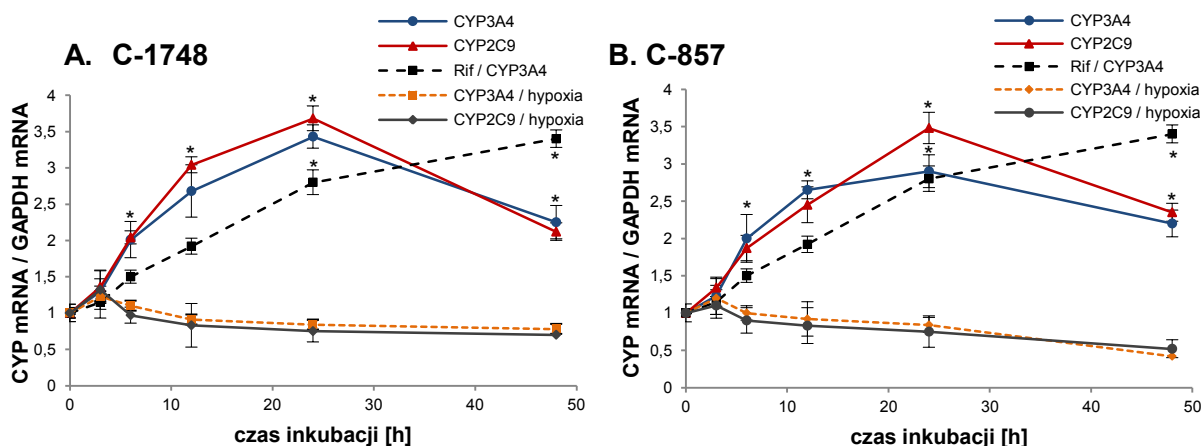
Rys. 88. Analiza względnej poziomu ekspresji genów *CYP3A4* i *CYP2C9*, znormalizowana względem genu referencyjnego GAPDH, w komórkach HepG2 traktowanych pochodną A: C-1748 i B: C-857 w różnych stężeniach przez 24h. Podane wartości są średnią z dwóch niezależnych doświadczeń. Dla określenia poziomu istotności względem próby kontrolnej przeprowadziłam test ANOVA (Dunnet test), gdzie $p < 0,05$ – wartości istotne statystycznie.

Połączona ocena zmian w poziomie ekspresji w warunkach normalnych i ograniczonego dostępu tlenu wykazała, że intensywniejszy metabolizm związków w warunkach redukcyjnych przyczynia się do braku istotnych różnic w poziomie ekspresji obu białek, *CYP3A4* i *CYP2C9*. Co więcej, poziom ten obniżał się po ekspozycji komórek na związek C-1748 w stężeniu 0,01 μM, a C-857 nawet w stężeniu 0,001 μM. Powyższe obserwacje można podsumować tym, że związki C-857 i C-1748 w warunkach hypoksji nie indukują ekspresji genów *CYP3A4* i *CYP2C9*. Przeprowadzona dodatkowo analiza Western blotting również wskazała na brak wzrostu poziomu enzymatycznych białek w warunkach hypoksji po ekspozycji komórek na związki C-1748 i C-857 (rys. 89).



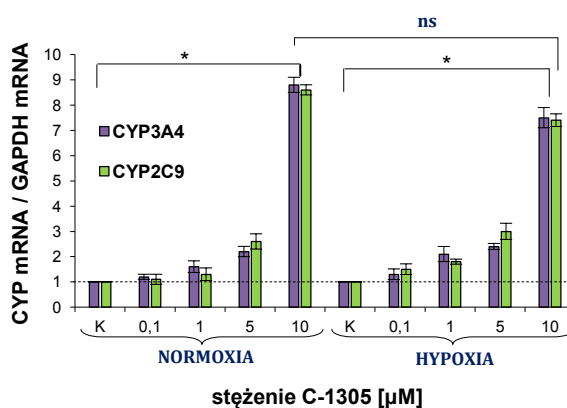
Rys. 89. Poziom izoenzymów *CYP3A4* i *CYP2C9* w komórkach HepG2, kontrolnych i traktowanych pochodną A: C-1748 oraz B: C-857, w warunkach hipoksji. Wyniki analizy densytometrycznej są średnią z dwóch niezależnych doświadczeń. Analiza Western blotting przedstawiona poniżej wykresu stanowi jeden obraz z dwóch przeprowadzonych doświadczeń. Jako kontrolę równomiernego napełnienia studzienek zastosowano β-aktynę. Dla określenia poziomu istotności względem próby kontrolnej przeprowadziłam test ANOVA (Dunnet test), gdzie $p < 0,05$ – wartości istotne statystycznie.

Zastosowanie jednego stężenia związków przez różne czasy inkubacji wykazało w analizie Real-time PCR postępujący, do 48 godzin, spadek poziomu ekspresji genów *CYP3A4* i *CYP2C9* (rys. 90). Podsumowując, warunki hypoksji ograniczają zdolność pochodnych C-1748 i C-857 do indukcji ekspresji badanych genów.



Rys. 90. Analiza względna poziomu ekspresji genów *CYP3A4* i *CYP2C9*, znormalizowana względem genu referencyjnego GAPDH, w komórkach traktowanych pochodnymi A: 0,001 μM C-1748 i B: 0,001 μM C-857, przez różne czasy inkubacji, w warunkach hypoksji. Komórki traktowane rifampicyną stanowią kontrolę dodatnią. Podane wartości są średnią z dwóch niezależnych doświadczeń. Dla określenia poziomu istotności względem próby kontrolnej przeprowadziłam test ANOVA (Dunnet test), gdzie $p < 0,05$ – wartości istotne statystycznie.

Wobec powyższych wyników, zasadne było sprawdzenie czy warunki hypoksji wpływają również na indukcję mRNA *CYP3A4* i *CYP2C9* w wyniku działania pochodnej C-1305. Dla przypomnienia należy dodać, że warunki redukcyjne nie zmieniały intensywności przemian metabolicznych C-1305 (patrz podrozdz. IV.1.7.2.).



Rys. 91. Analiza względna poziomu ekspresji genów *CYP3A4* i *CYP2C9*, znormalizowana względem genu referencyjnego GAPDH, w komórkach HepG2 traktowanych pochodną C-1305 w zależności od A: stężenia i B: czasu inkubacji. Komórki traktowane rifampicyną stanowią kontrolę dodatnią. Podane wartości są średnią z dwóch niezależnych doświadczeń. Dla określenia poziomu istotności względem próby kontrolnej przeprowadziłam test ANOVA (Dunnet test), zaś dla określenia poziomu istotności pomiędzy próbkami niezależnymi zastosowałam test Studenta, gdzie $*p < 0,05$ – wartości istotne statystycznie.

Jak przedstawia rys. 91, indukowany przez pochodną C-1305 poziom ekspresji genów CYP3A4 i CYP2C9 jest również widoczny podczas prowadzenia hodowli w warunkach hypoksji. Nieznaczny spadek ekspresji w wyniku traktowania komórek C-1305 w najwyższym stężeniu w hypoksji, według testu Studenta, jest nieistotny.

IV.2.4. Receptor jądrowy PXR – jego rola w indukcji ekspresji CYP3A4 i CYP2C9 z udziałem związków C-1748, C-857 i C-1305.

Mając na uwadze wykazane w poprzednich podrozdziałach zdolności pochodnych akrydyny do indukcji aktywności enzymatycznej CYP3A4 i CYP2C9, a w konsekwencji do indukcji poziomu ekspresji genów tych izoenzymów, podjęłam próbę wyjaśnienia, czy zachodzące modulacje wynikają z interakcji badanych związków z receptorem PXR. Receptor ten reguluje bowiem ekspresję wielu genów w tym: CYP3A4, CYP2C9, CYP2C19 [Ma, 2008; Mackenzie i wsp., 2010], UGT1A1, GST, SULT [Fang i wsp., 2007; Naspinski i wsp., 2008] oraz MDR1, OATP2 [Frank i wsp., 2005; Cerveny i wsp., 2007].

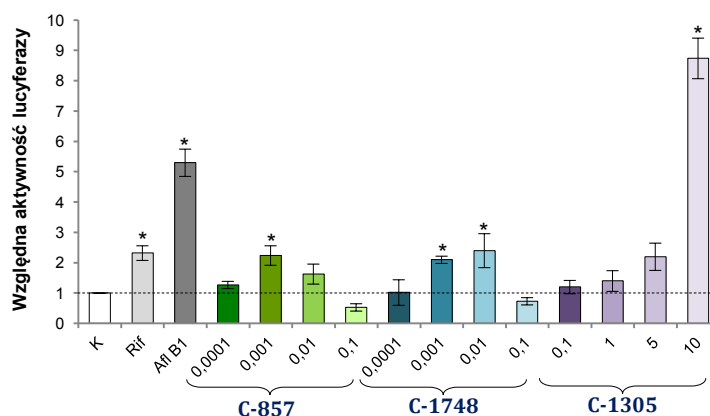
IV.2.4.1. Określenie udziału receptora PXR w indukcji ekspresji CYP3A4 z zastosowaniem linii nhrtox-hepg2.

W tej części pracy posłużyłam się linią reporterową nhrtox-hepg2. Została ona stabilnie transfekowana plazmidem reporterowym (ER6)9-SV40-Luc. Plazmid ten został zsyntetyzowany poprzez wklonowanie do wektora pGL4.14 (Promega) 9 kopii chemicznie zsyntetyzowanego fragmentu CYP3A4 ER6 PXRE pod kontrolą promotora SV40. Charakterystyczna sekwencja ER6 PXRE jest miejscem wiązania domeny DBD wiążącej DNA receptora PXR. Genem markerowym, znajdującym się pod kontrolą indukowalnego promotora CYP3A4, był gen eukariotycznej lucyferazy. Dodatkowo plazmid zawierał gen oporności na hygromycynę-B, co umożliwiała właściwą selekcję stransfekowanych komórek HepG2 [Ratajewski i wsp., 2011]. Linię reporterową nhrtox-hepg2 zastosowałam dzięki uprzejmości prof. Jarosława Dastych z Instytutu Biologii Medycznej PAN w Łodzi i badania z jej zastosowaniem przeprowadziłam w tamtejszym laboratorium.

Analizę zmian aktywności lucyferazy, przeprowadziłam inkubując komórki nhrtox-hepg2 przez 24 godziny ze związkami w następujących zakresach stężeń: 0,001 – 0,1 μM C-1748 i C-857 oraz 0,01 – 10 μM C-1305. Dla potwierdzenia braku efektu toksycznego związków w wymienionych wyżej zakresach stężeń, przeprowadziłam analizę zahamowania wzrostu komórek nhrtox-hepg2 metodą MTT. Potwierdziła ona fakt, że jakiegokolwiek zachodzące modulacje aktywności lucyferazy będą miały wyłącznie charakter funkcjonalny. Dodatkowo, po wyznaczeniu stężenia indukującego najbardziej istotne zmiany aktywności lucyferazy, przeprowadziłam analizę zależności tych zmian od czasu inkubacji komórek ze

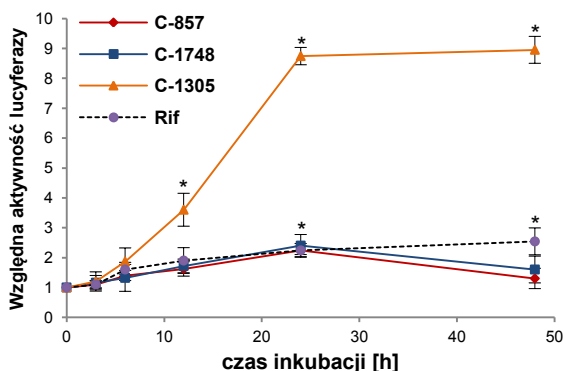
związkami. Kontrolę pozytywną stanowiła rifampicyna [Svecova i wsp., 2008] oraz aflatoksyna B1 [Ratajewski i wsp., 2011].

Poniżej, na rys. 92, przedstawiłam względny poziom aktywności lucyferazy w komórkach nhrtox-hepg2 traktowanych trzema badanymi w niniejszej pracy pochodnymi akrydyny oraz rifampicyną i aflatoksyną B1, w stosunku do kontroli, komórek nie traktowanych żadnym ze związków. Otrzymane wyniki wskazują na indukcję poziomu ekspresji genów *CYP3A4* regulowanej przez receptor PXR, w wyniku działania wszystkich trzech pochodnych akrydyny. Związki C-1748 i C-857 powodowały ok. dwukrotny wzrost poziomu aktywności lucyferazy, podobnie jak rifampicyna, w stężeniu odpowiednio 0,01 μM oraz 0,001 μM . Pochodna C-1305, w stężeniu 10 μM indukowała aż dziewięciokrotny wzrost poziomu aktywności lucyferazy, co daje wynik wyższy nawet od wartości indukcji efektywnego induktora receptora PXR, jakim jest aflatoksyna B1.



Rys. 92. Względna aktywność lucyferazy (określająca poziom ekspresji *CYP3A4*) w komórkach nhrtox-hepg2 traktowanych przez 24 godziny związkami C-857, C-1748 i C-1305 w różnych stężeniach. Kontrolę pozytywną stanowią Rif – rifampicyna (10 μM) oraz Afl B1 – aflatoksyna B1 (10 μM). Podane wartości są średnią z dwóch niezależnych doświadczeń. Dla określenia poziomu istotności względem próby kontrolnej przeprowadziłam test ANOVA (Dunnet test), gdzie $p < 0,05$ – wartości istotne statystycznie.

Ponieważ stwierdziłam, że charakter modulacji poziomu aktywności lucyferazy, a co za tym idzie poziomu ekspresji *CYP3A4* jest podobny do wcześniejszych wyników z zastosowaniem techniki Real-time PCR oraz Western blotting, w kolejnym kroku sprawdziłam zależność zachodzących zmian od czasu inkubacji komórek ze związkami. Otrzymane wyniki (rys. 93) wskazały, że indukcja aktywności lucyferazy rośnie liniowo w przypadku związku C-1305 oraz rifampicyny. Obie pochodne 9-amino-1-nitroakrydyny indukowały aktywność lucyferazy do 24 godzin ekspozycji, jednakże po 48 godzinach, aktywność enzymu spadła do poziomu w próbie kontrolnej. Podobny profil zmian otrzymałam podczas badań modulacji poziomu ekspresji *CYP3A4* i *CYP2C9* w wyniku działania obu pochodnych C-1748 i C-857 (patrz podrozdz. IV.2.3.1).

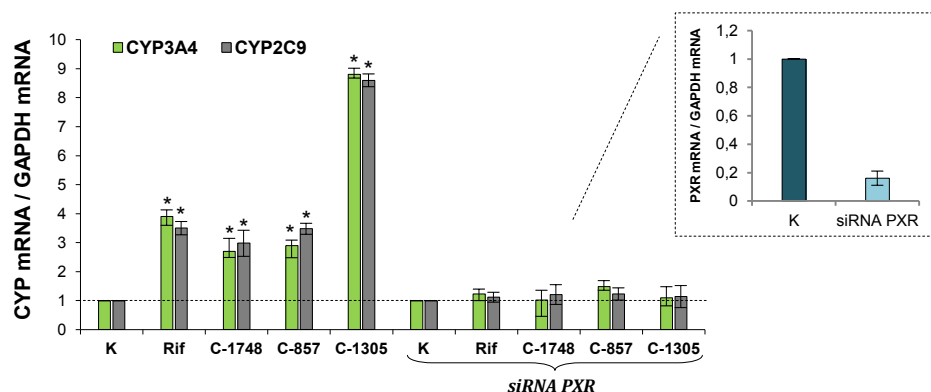


Rys. 93. Względna aktywność lucyferazy w komórkach nhrtox-hepg2 traktowanych pochodnymi, C-857 (0,001 μM) C-1748 (0,001 μM), C-1305 (10 μM) oraz rifampicyną (10 μM), przez różne czasy inkubacji. Podane wartości są średnią z dwóch niezależnych doświadczeń. Dla określenia poziomu istotności względem próby kontrolnej przeprowadziłam test ANOVA (Dunnet test), gdzie $p < 0,05$ – wartości istotne statystycznie.

IV.2.4.2. Wpływ pochodnych C-1748, C-857 i C-1305 na poziom ekspresji *CYP3A4* i *CYP2C9* po wyciszeniu genów *PXR* przy pomocy siRNA.

Przedstawiona poprzednio analiza wpływu pochodnych akrydyny na poziom aktywności lucyferazy, będącej markerem w badaniach z zastosowaniem linii nhrtox-hepg2, świadczącym o poziomie ekspresji genów *CYP3A4* regulowanej przez receptor jądrowy PXR, wykazała, że zachodząca indukcja ekspresji *CYP3A4* pod wpływem związków C-1748, C-857 i C-1305 prawdopodobnie zachodzi na drodze interakcji z receptorem PXR. W celu potwierdzenia uzyskanych wyników, zastosowałam technikę wyciszenia genów kodujących receptor PXR w komórkach HepG2. SiRNA (Applied Biosystems, USA) skierowany był przeciwko specyficznym nukleotydom sekwencji genów NR1/2. Transfekcję przeprowadziłam przy pomocy LipofectamineTMRNAiMAX (Invitrogen). Ocenę hamowania ekspresji *PXR* po 24 godzinach inkubacji komórek HepG2 z siRNA, przez oznaczenie poziomu mRNA, wykonałam przy pomocy Real-time PCR. Analiza względna poziomu ekspresji *PXR* w komórkach transferowanych siRNA w porównaniu do komórek kontrolnych wykazała 80% wyciszenie genów *PXR*.

Po przeprowadzonej interferencji RNA, komórki HepG2 traktowałam przez kolejne 24 godziny związkami: C-1748 (0,001 μM), C-857 (0,001 μM) oraz C-1305 (10 μM). Następnie określiłam poziom ekspresji *CYP3A4* oraz *CYP2C9*. Otrzymane wyniki przedstawiłam na rys. 94.

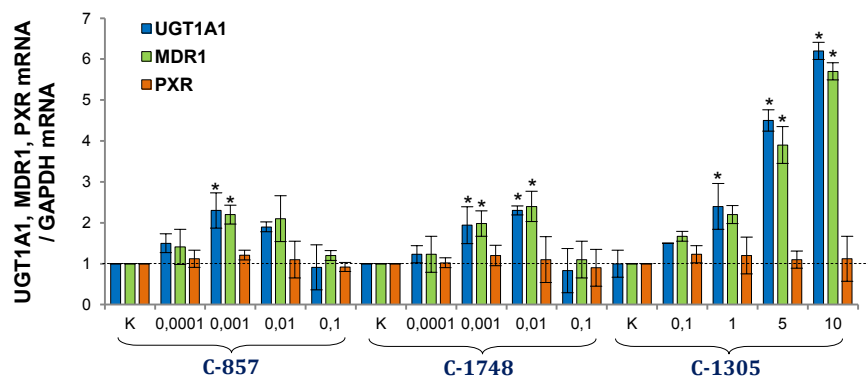


Rys. 94. Wpływ wyciszenia genów *PXR* na poziom ekspresji genów *CYP3A4* i *CYP2C9*, w komórkach HepG2 traktowanych pochodnymi: C-1748 (0,001 μ M), C-857 (0,001 μ M), C-1305 (10 μ M) oraz rifampicyną (10 μ M). Podane wartości są średnią z dwóch niezależnych doświadczeń. Dla określenia poziomu istotności względem próby kontrolnej przeprowadziłam test ANOVA (Dunnet test), gdzie $p < 0,05$ – wartości istotne statystycznie.

Jak wynika z analizy powyższego wykresu, wyciszenie genów *PXR* prawie całkowicie zablokowało indukcję ekspresji genów *CYP3A4* i *CYP2C9* w przypadku wszystkich pochodnych akrydyny.

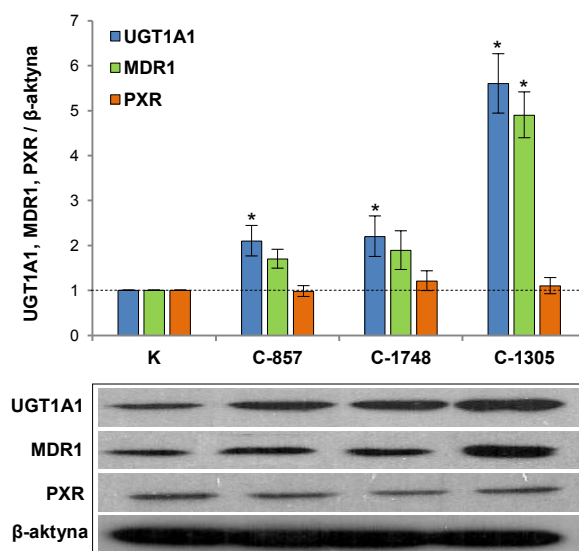
IV.2.4.3. Badanie wpływu związków C-1748, C-857 i C-1305 na poziom ekspresji innych genów, regulowanej przez receptor *PXR*.

Jak wspomniałam wcześniej, receptor jądrowy *PXR* reguluje ekspresję wielu genów, w tym *CYP3A4*, *CYP2C9*, *CYP2C19* [Ma, 2008; Mackenzie i wsp., 2010], *UGT1A1*, *GST*, *SULT* [Fang i wsp., 2007; Naspinski i wsp., 2008] oraz *MDR1*, *OATP2* [Frank i wsp., 2005; Cerveny i wsp., 2007]. W celu uściślenia udziału *PXR* w indukcji ekspresji *CYP3A4* i *CYP2C9* w wyniku działania związków C-1748, C-857 i C-1305, przeprowadziłam analizę poziomu ekspresji dodatkowo dwóch genów *UGT1A1* oraz *MDR1*, regulowanych przez *PXR*. Modelem do tego doświadczenia były, podobnie jako poprzednio, komórki ludzkiego nowotworu wątroby, HepG2. Warunki prowadzenia inkubacji komórek ze związkami były analogiczne do wcześniejszych doświadczeń. Dodatkowo, określiłam również wpływ badanych związków na poziom ekspresji genów samego receptora *PXR*. Otrzymane wyniki przedstawiłam na rys. 95.



Rys. 95. Analiza względna poziomu ekspresji genów *UGT1A1* i *MDR1*, znormalizowana względem genu referencyjnego *GAPDH*, w komórkach HepG2 traktowanych przez 24 godziny pochodnymi C-857, C-1748 i C-1305. Podane wartości są średnią z dwóch niezależnych doświadczeń. Dla określenia poziomu istotności względem próby kontrolnej przeprowadziłam test ANOVA (Dunnet test), gdzie $p < 0,05$ – wartości istotne statystycznie.

Jak wynika z powyższego wykresu, pochodne C-1748, C-857 i C-1305 indukowały ekspresję genów *UGT1A1* i *MDR1*. Wzrost poziomu ekspresji był nieznacznie niższy od indukcji ekspresji *CYP3A4* i *CYP2C9*. Najbardziej istotne zmiany były widoczne po ekspozycji komórek HepG2 na związki w następujących stężeniach: 0,001 μM C-1748, 0,001 μM C-857 oraz 10 μM C-1305. Co ciekawe, nie zaobserwowałam różnic w poziomie ekspresji *PXR*.

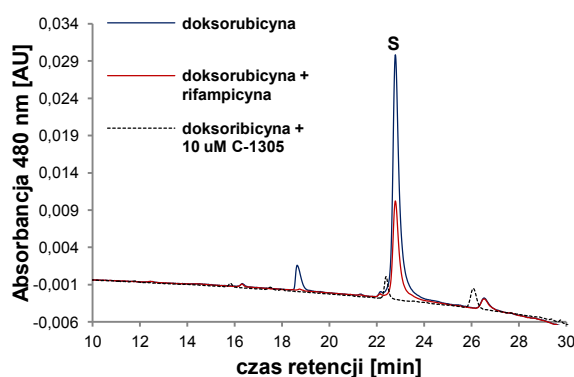


Rys. 96. Poziom białek *UGT1A1*, *MDR1* i *PXR* w komórkach HepG2, kontrolnych i traktowanych pochodnymi w stężeniach: 0,001 μM C-857, 0,001 μM C-1748 i 10 μM C-1305. Wyniki analizy densytometrycznej są średnią z dwóch niezależnych doświadczeń. Analiza Western blotting przedstawiona poniżej wykresu stanowi jeden obraz z dwóch przeprowadzonych doświadczeń. Jako kontrolę równomiernego napełnienia studzienek zastosowano β-aktynę. Dla określenia istotności względem próby kontrolnej przeprowadzono test ANOVA (Dunnet test), gdzie $p < 0,05$ – wartości istotne statystycznie.

Dodatkowo, dla wybranych stężeń związków przeprowadziłam analizę poziomu białek metodą Western blotting. Potwierdziła ona istotny wzrost poziomu izoenzymu UGT1A1, w wyniku działania trzech badanych pochodnych akrydyny oraz brak różnic w poziomie białka PXR (rys. 96). Poziom białka P-gp (MDR1) podwyższył się istotnie tylko wobec działania pochodnej C-1305.

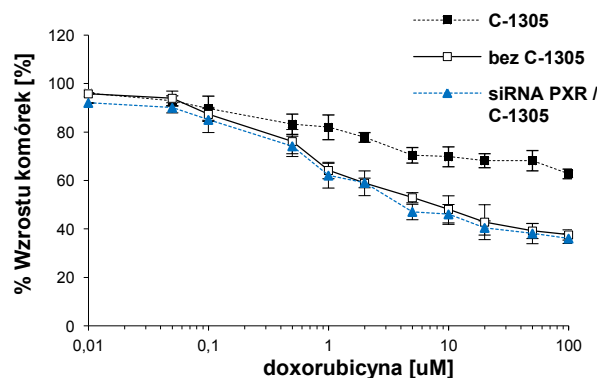
IV.2.4.3.1. Akumulacja doksorubicyny w komórkach HepG2 jako efekt działania pochodnej C-1305.

Glikoproteina P (P-gp) kodowana przez gen *MDR1*, jest błonowym transporterem ksenobiotyków należącym do nadrodziny ABC (ang. *ATP-binding cassette*). P-gp odgrywa kluczową rolę w zjawisku oporności wielolekowej nowotworów. Działanie P-gp jako mechanizm oporności wielolekowej polega na transporcie cytostatyków na zewnątrz komórki nowotworowej. Powoduje to obniżenie ich stężenia w jądrze komórkowych do wartości nieefektywnych cytotoksycznie [Shitara i wsp., 2006; Klassen i Aleksunes, 2010]. Do bardzo szerokiego spektrum substratów P-gp należą cząsteczki o różnej budowie chemicznej, w tym szereg struktur ważnych cytostatyków. Bazując na wynikach potwierdzających udział pochodnych akrydyny w indukcji genów *MDR1*, w kolejnym etapie badań określiłam konsekwencję tej indukcji w zmianach transportu standardowego substratu P-gp, jakim jest doksorubicyna, należąca do grupy antracyklin [Schinkel i Jonker, 2003]. Początkowo określiłam stopień akumulacji doksorubicyny w komórkach HepG2 po ekspozycji komórek na działanie C-1305. W tym celu analizowałam metanolowe ekstrakty komórkowe z zastosowaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej (RP-HPLC). Poniżej, na rys. 97, przedstawiłam uzyskane wyniki.



Rys. 97. Chromatograficzny obraz doksorubicyny po 90 minutach inkubacji w komórkach HepG2, traktowanych wcześniej, przez 48 godzin, 10 μ M rifampicyną i 10 μ M C-1305 [chromatograf HPLC Waters Breeze].

Widoczny na przedstawionym powyżej chromatogramie, szybki spadek stężenia dokсорubicyny w komórkach HeG2, po uprzednim traktowaniu ich rifampicyną oraz pochodną C-1305 skłoniła mnie do przeprowadzenia kolejnego doświadczenia. Zastosowana przeze mnie metoda, polegała na określeniu cytotoksyczności dokсорubicyny (0,01 – 100 μM) wobec komórek HepG2, bez i z jednoczesnym udziałem pochodnej C-1305¹⁶.



Rys. 98. Zależny od dawki wpływ dokсорubicyny na proliferację komórek HepG2, po 48 godzinnej inkubacji komórek ze związkami, w trzech wariantach: bez preinkubacji z C-1305, z 24 godzinną preinkubacją z C-1305 oraz z 24 godzinną preinkubacją z C-1305, po wcześniejszym wyciszeniu genów *PXR*. Wyniki są średnią z dwóch niezależnych doświadczeń.

Uzyskane wyniki pokazują (rys. 98), że cytotoksyczność dokсорubicyny obniżyła się w wyniku wcześniejszej 24 godzinnej inkubacji komórek HepG2 ze związkiem C-1305. Efektu tego nie można zaobserwować po wyciszeniu genów *PXR*. Skutkowało ono brakiem zmian w cytotoksyczności dokсорubicyny mimo skojarzenia z C-1305.

IV.2.4.4. Badanie wpływu związków C-1748, C-857 i C-1305 na poziom ekspresji *CYP3A4* w skojarzeniu z rifampicyną i ketokonazolem.

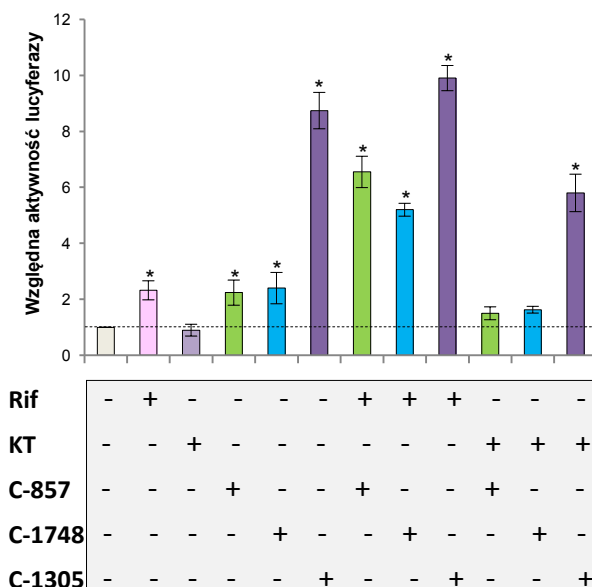
Rifampicyna, półsyntetyczny antybiotyk makrolidowy o działaniu bakteriobójczym, jest standardowym induktorem aktywności *PXR*, często stosowanym w badaniach farmakokinetycznych *in vitro*. Wykazano, że po związaniu z receptorem ułatwia przyłączenie do niego koaktywatora SRC-1, a jest to najbardziej krytyczny etap w szlaku przekazywania sygnału z udziałem *PXR* [Gerbal-Chaoin i wsp., 2002]. Wykazano, że stosowanie rifampicyny, już po 8 dniach powoduje istotny wzrost stężenia mRNA *CYP3A4*, *CYP2C9* i *MDR1*, co prowadzi do wzrostu tempa metabolizmu innych leków [Svecova i wsp., 2008]. Ketokonazol, lek przeciwgrzybiczny, jest przykładem związku hamującego aktywność receptora *PXR*. Dzięki tej zdolności został on zastosowany w leczeniu hormonozależnych

¹⁶ Ze względu na fakt niskiej indukcji ekspresji *MDR1* w wyniku działania pochodnych C-1748 i C-857, w przeprowadzonym doświadczeniu zastosowałam tylko pochodną C-1305, która indukowała około pięciokrotny wzrost ekspresji *MDR1*.

nowotworów, w tym raka prostaty. Uniemożliwia on związanie się koaktywatora SRC-1 do receptora, zakłócając proces dimeryzacji PXR i RXR [Engels i wsp., 2004; Huang i wsp., 2006].

Przeprowadzone przeze mnie badania wpływu pochodnych akrydyny w skojarzeniu z rifampicyną i ketokonazolem, miały na celu określenie charakteru interakcji pomiędzy pochodnymi akrydyny, induktorami aktywności receptora PXR, a innym induktorem bądź inhibitorem tego receptora. Poznanie profilu zachodzących modulacji pozwala na stworzenie schematu kojarzenia związków, C-1748, C-857 i C-1305, z innymi lekami, w potencjalnej terapii wielolekowej.

W badaniach określiłam zachodzące zmiany w aktywności lucyferazy, markera poziomu ekspresji *CYP3A4*, w komórkach nhrtox-hepg2 po ekspozycji komórek na związki w różnej kombinacji (z rifampicyną lub ketokonazolem). Poniżej, na rys. 98, przedstawiłam otrzymane wyniki badań aktywności lucyferazy w komórkach nhrtox-hepg2.



Rys. 99. Względna aktywność lucyferazy w komórkach nhrtox-hepg2 traktowanych przez 24 godziny związkami: 0,001 μ M C-857, 0,001 μ M C-1748, 10 μ M C-1305, 10 μ M rifampicyna, 10 μ M ketokonazol. Podane wartości są średnią z dwóch niezależnych doświadczeń. Dla określenia poziomu istotności względem próby kontrolnej przeprowadziłam test ANOVA (Dunnet test), gdzie $p < 0,05$ – wartości istotne statystycznie.

Uzyskane wyniki pokazują, że jednoczesne zastosowanie dwóch induktorów receptora PXR, pochodnych akrydyny i rifampicyny, skutkuje wyższym poziomem aktywności lucyferazy, a więc podwyższonym poziomem ekspresji *CYP3A4* zależnej od PXR, w stosunku do prób z samą rifampicyną lub samym związkiem C-1748, C-857 lub C-1305. Skojarzenie pochodnych akrydyny z ketokonazolem powoduje prawie 2-krotne obniżenie poziomu ekspresji *CYP3A4* w porównaniu do komórek traktowanych tylko

związkami C-1748, C-857 lub C-1305. Wynik ten wskazuje na współzawodnictwo dwóch ligandów tego samego receptora o miejsce wiązania. Jest to kolejną przesłanką do stwierdzenia, że pochodne akrydyny indukują ekspresję genów *CYP3A4* na drodze wiązania się z PXR.

IV.2.4.5. Podsumowanie wyników badań opisanych w punkcie IV.2.

Zestawiając wyniki badań zrealizowanych w ramach drugiego etapu prezentowanej pracy wykazano, że:

- Pochodna C-1305 indukowała aktywność katalityczną izoenzymów *CYP3A4* i *CYP2C9* wprost proporcjonalnie do stężenia oraz czasu inkubacji komórek ze związkami. Podobny efekt obserwowano w przypadku badań poziomu ekspresji genów *CYP3A4* i *CYP2C9*, po traktowaniu komórek HepG2 C-1305.
- Pochodne C-1748 i C-857 indukowały poziom ekspresji genów *CYP3A4* i *CYP2C9* w najniższych stosowanych stężeniach. Zastosowanie stężenia wyższego obu związków skutkowało przewagą efektu toksycznego nad aktywnym mechanizmem działania związków. Wzrost poziomu ekspresji widoczny był do 24 godzin inkubacji komórek z obiema pochodnymi. Podobny efekt obserwowany był w przypadku badań poziomu aktywności obu białek po traktowaniu komórek związkami.
- W warunkach hypoksji pochodne C-1748 i C-857 nie indukowały ekspresji genów *CYP3A4* i *CYP2C9*, natomiast C-1305 indukował na tym samym poziomie do w warunkach normalnych
- Badania z zastosowaniem linii nhrtox-hepg wskazywały na zaangażowanie receptora PXR w indukcję poziomu ekspresji *CYP3A4* z udziałem związków C-1305, C-1748 i C-857.
- Wyciszenie genu *PXR* przy pomocy siRNA skutkowało brakiem zdolności związków C-1305, C-1748 i C-857 do indukcji ekspresji *CYP3A4* i *CYP2C9*.
- Badane pochodne indukowały ekspresję genów *UGT1A1*, *MDR1*, regulowaną przez receptor PXR, ale nie wpływały na poziom ekspresji *PXR*.
- Zastosowanie induktora i inhibitora aktywności PXR łącznie z pochodnymi akrydyny prowadziło do wzrostu poziomu indukcji ekspresji *CYP3A4* w przypadku zastosowania dwóch induktorów, bądź jej obniżenia w skojarzeniu pochodnych akrydyny z ketokonazolem.

V. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

V.1. MATERIAŁY

V.1.1. Badane związki przeciwnowotworowe.

Pochodne 9-amino-1-nitroakrydyny: 9-(2'-hydroksyetyloamino)-4-metylo-1-nitroakrydyna, C1748 [Konopa i wsp., 1981], 9-(2'-hydroksyetyloamino)-1-nitroakrydyna, C-857 [Pawlak i Konopa, 1979] w postaci monochlorowodoru oraz pochodna triazoloakrydonu: 5-dimetyloaminoetyloamino-8-hydroksytriazoloakrydon C-1305 [Chołody i wsp., 1990] w postaci dichlorowodoru, zostały zsyntetyzowane i oczyszczone w zespole naukowym Profesora Jerzego Konopy w Katedrze Technologii Leków i Biochemii Politechniki Gdańskiej.

V.1.2. Związki chemiczne i zestawy.

- Akrylamid, bromek 3-[4,5-dimetylo-1-ilo]-2,5-difenylo-1-tetrazolu (MTT), β -merkaptotanol, BSA (surowicza albumina wołowa), ketokonazol, N,N'-metylenobisakrylamid, monolaurynian polioksoetyleno(20)sorbitanu (Tween 20), β -merkaptotanol, nadsiarczan amonu (APS), N,N,N',N'-tetraetylenodiamina (TEMED), rifampicyna, testosteron, triton X-100 – Sigma-Aldrich Co., USA.
- β -fosforan dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (β -NADPH), sól czterosodowa – Merc Sp. z o.o., Polska.
- bufor Laemmli, wzorzec wielkości białek Precision Plus Protein™ Standards, zestaw do oznaczania stężenia białka Bio-Rad Bradford Protein Assay Kit – Bio-Rad Laboratories, Inc., USA.
- High Pure Isolation Kit – zestaw do izolacji RNA z komórek zwierzęcych, Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit – zestaw do syntezy cDNA, Light Cycler FastStart DNA Master SYBRGreen – zestaw do reakcji Real-time PCR – Roche Diagnostics Sp. z o.o., Szwajcaria.
- Lipofectamine™RNAiMAX – Invitrogen, USA.
- P450-Glo™ CYP2C9 Assay, P450-Glo™ CYP3A4 Assay – Promega GMBH, USA.
- Zestaw utrwalacza i wywołacza błony nitrocelulozowej SuperSignal West PICO Chemiluminescent Substrate – Fisher Scientific, Wielka Brytania.

V.1.3. Składniki roztworów.

- 99,8% alkohol metylowy (CH₃OH), 2-propanol (C₃H₇OH), wodorotlenek potasu (KOH) – Firma Chempur, Polska.

- 96% alkohol etylowy (C₂H₅OH) – PPH „Stanlab” s.j., Polska.
- Chlorek sodu (NaCl), sulfotlenek dimetylu (DMSO), wodorofosforan (V) sodu dwuwodny (Na₂HPO₄ x 2H₂O), wodorotlenek sodu (NaOH) – POCH S.A., Polska.
- Adenozyno-5'-trifosforan (ATP), chlorek magnezu sześciowodny (MgCl₂ x 6H₂O), chlorek potasu (KCl), dodecylosiarczan sodu (SDS), DTT (1,4-ditiotreitol), dwuwodorofosforan (V) potasu (KH₂PO₄), glicyna do elektroforezy, glicyna-glicyna (Gly-Gly), sól sodowa kwasu etylenodiaminotetraoctowego (EDTA), sól sodowa kwasu etylenoglikol-O-O-bis(2-aminoetylo)-N,N,N',N'-tetraoctowego (EGTA), kwas solny stężony (HCl), tri-(hydroksymetylo)aminometan (tris-zasada, Tris-base) oraz jego chlorowodrek (Tris-HCl), fosforan tri-(hydroksymetylo)aminometanu (Tris-fosforan), sacharoza (C₁₂H₂₂O₁₁), siarczan magnezu (MgSO₄), wodorofosforan (V) potasu (K₂HPO₄) – Sigma-Aldrich Co., USA.
- Lucyferyna – BD Biosciences, USA.
- Roztwór A i B – BD Gentest, USA.
- 99,5% lodowaty kwas octowy (CH₃COOH) – Przedsiębiorstwo Chemiczne ODCZYNNIKI Sp. z o.o., Polska.
- Woda redestylowana (R > 18 MΩ·cm) – Milipore Co., USA.

V.1.4. Odczynniki chemiczne do przygotowywania faz ruchomych do analizy RP-HPLC.

Alkohol metylowy (CH₃OH), acetonitryl (C₂H₃N) – Merc Sp. z o.o., Polska.

- Dwuwodorofosforan (V) sodu (NaH₂PO₄), kwas mrówkowy (HCOOH) – Sigma-Aldrich Co., USA.
- Kwas fosforowy (V) (H₃PO₄) – Sigma-Aldrich Co., USA.
- Mrówczan amonu (HCOONH₄) – Fisher Scientific, Wielka Brytania.

V.1.5. Enzymy.

- Frakcje mikrosomalne komórek wątroby szczura, rekombinantowe ludzkie izoenzymy cytochromu P450 o podwyższonej aktywności NADPH-reduktazy cytochromu P450: CYP1A2, CYP2C9 i CYP3A4, otrzymane w komórkach *Escherichia coli* – XenoTech, USA, za pośrednictwem Tebu-bio, Francja.

V.1.6. Przeciwciała.

- Mysie poliklonalne przeciwciało pierwszorzędowe anty-CYP3A4, królicze anty-mysie przeciwciało skoniugowane z HRP – Sigma-Aldrich Co., USA.

- Królicze poliklonalne przeciwciało pierwszorzędowe anti-CYP2C9, kozie anti-królicze przeciwciało skoniugowane z HRP – Sigma-Aldrich Co., USA.
- Królicze poliklonalne przeciwciało pierwszorzędowe anti-UGT1A1, kozie anti-królicze przeciwciało skoniugowane z HRP – Sigma-Aldrich Co., USA.
- Mysie monoklonalne przeciwciało pierwszorzędowe anti-P-gp, królicze anti-mysie przeciwciało skoniugowane z HRP – Sigma-Aldrich Co., USA.
- Kozie poliklonalne przeciwciało pierwszorzędowe anti-PXR/NR1/2, królicze anti-kozie przeciwciało skoniugowane z HRP – Sigma-Aldrich Co., USA.

V.1.7. Oligonukleotydy (startery) do reakcji Real-time PCR:

- **CYP3A4for:** 5'AAGAACTGAGTCCCACAAAGC3'
- CYP3A4rev:** 5'ACACTGCTCGTGGTTTCACA3'
- **CYP2C9for:** 5'GGACAGAGACGACAAGCACA3'
- CYP2C9rev:** 5'AATGGACATGAACAACCCTCA3'
- **UGT1A1for:** 5'TGACGCCTCGTTGTACATCAG3'
- UGT1A1rev:** 5'CCTCCCTTTGGAATGGCAC3'
- **MDR1for:** 5'AGGAAGACATGACCAGGTATG3'
- MDR1rev:** 5'CCAACATCGTGACATCAAAC3'
- **PXRfor:** 5'CCAGGACATACCCCCTTTG3'
- PXRrev:** 5'CTACCTGTGATGCCGAACAA3'
- **GAPDHfor:** 5'TGCACCACCAACTGCTTAGC3'
- GAPDHrev:** 5'GGCATGGACTGTGGTCATGAG3'

V.1.8. Linie komórkowe oraz materiały stosowane do prowadzenia hodowli komórkowej.

Linie komórkowe:

- **HepG2** – nowotwór wątroby pochodzenia ludzkiego
- **Hep3A4** – subklon linii HepG2 transfekowanej stabilnie wektorem plazmidowym z sekwencją genów izoenzymu CYP3A4.
- **HepC34** – subklon linii HepG2 transfekowanej stabilnie wektorem pustym.

Linie komórkowe, Hep3A4 oraz HepC34, zastosowano dzięki uprzejmości prof. DE. Feiermana z Department of Pharmacology and Biological Chemistry, The Mount Sinai Medical Center (New York, USA), natomiast HepG2, dzięki uprzejmości dr hab. Adama Hołowni z Zakładu Farmakologii Klinicznej Akademii Medycznej w Białymstoku

- **HT29** – gruczolakorak jelita grubego pochodzenia ludzkiego, ATCC.
- **HCT116** – nowotwór jelita grubego pochodzenia ludzkiego.

Linie HCT116 zastosowano dzięki uprzejmości dr B. Vogelsteina (John Hopkins Medical University, Baltimore, Maryland)

- **A549** – niedrobnokomórkowy rak płuc pochodzenia ludzkiego, ATCC.

Linie A549 zastosowano dzięki uprzejmości Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu.

- **nhrtox-hepg2** (CL5) – subklon linii HepG2 transfekowanej stabilnie wektorem plazmidowym (ER6)9-SV-luc.

Linie nhrtox-hepg2 zastosowano dzięki uprzejmości prof. Jarosława Dastycha z Instytutu Biologii Medycznej PAN w Łodzi.

Materiały używane do prowadzenia hodowli komórkowej:

- Pożywka MEM (ang. *Minimum Essentiale Medium*) – Sigma-Aldrich Co., USA.
- Pożywka DMEM-high glucose (ang. *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) – Sigma-Aldrich Co., USA.
- Pożywka Mc'Coy 5A – Sigma-Aldrich Co., USA.
- Pożywka F-12K – Sigma-Aldrich Co., USA.
- Pożywka Opi-MEM® I – GIBCO, Wielka Brytania.
- Płodowa surowica bydlęca (ang. Fetal Bovine Serum, FBS) inaktywowana termicznie – GIBCO, Wielka Brytania.
- Trypsyna-EDTA – GIBCO, Wielka Brytania.
- Wodorowęglan sodowy (NaHCO₃) – Sigma-Aldrich Co., USA.
- Antybiotyki: penicylina, streptomycyna, genetycyna, hygromycyna B – Sigma-Aldrich Co., USA.

V.2. APARATURA I SPRZĘT LABORATORYJNY.

- Aparat do transferu białek – SCIE PLAS, Wielka Brytania.
- Chromatograf HPLC Agilent sprzężony ze spektrometrem mas LC/MSD (seria 1100) – Agilent Technologies, USA.
- Chromatograf HPLC Waters – Waters Co., USA.
 - Typ Breeze: inżektor (Rheodyne 7725i), binary HPLC Pump (Waters 1525), dual λ Absorbance Detector (Waters 2487), 717 plus Autosampler.
 - Typ Millennium: inżektor (Rheodyne 7725i), detektor wielodiodowy (Waters 2996), system kontrolny 600E.
- Czytnik płytek Multilabel Counter Victor3™ – PerkinElmer, USA.
- Elektroporator BTX T 820.
- Homogenizator ręczny – Wheaton Science Products, USA.

- Inkubator z atmosferą CO₂ do hodowli komórkowych – NuAire, Inc., USA.
- Kolumny chromatograficzne, typu RP – SUPELCO, USA.
 - kolumna analityczna – Supelx pKb-100, 25 cm x 4,6 mM, 5 µm.
 - prekolumna – Supelx pKb-100, 2 cm.
- Licznik komórek Z1 Coulter Particle Counter – Beckman Coulter, USA.
- LightCycler 1.5 – Roche Diagnostics Sp. z o.o., Szwajcaria.
- Luminometry model: EnVision® oraz Wallac 1450 MicroBeta - PerkinElmen, USA.
- Łaźnia ultradźwiękowa Bandelin Sonorex, RK52 – Beckman Coulter, USA.
- Łaźnia wodna Fisherbrand, typ PRL TA14 – Fisher Scientific, Wielka Brytania.
- Mikroskop fluorescencyjny Olympus BX60 – Olympus America Inc., USA
- pH-metr ORION, model 710A.
- Spektrofotometr UV-Vis – NanoDrop, USA.
- Spektrometr GENESYS 20 – Thermo Spectronic, USA.
- System do oczyszczania wody MiliQ Integral3 – Milipore Co., USA.
- Termoblok Grant – Grant Instruments Ltd., Wielka Brytania.
- Ultrawirówka XL-70 Ultracentrifuge, rotor NVTi65 – Beckman Instruments, USA.
- Waga analityczna KERN EG220-3NM – Kern&Sohn GmbH, Niemcy.
- Wirówki: MiniSpin, Centrifuge 5810R, Centrifuge 5417R – Eppendorf, Niemcy.
- Worteks, model TTS2 – IKA Works Inc., USA.
- Wyciąg lamiarny Nuair Biological Safety Cobinets – NuAire, Inc., USA.
- Zestaw do elektroforezy Mini-PROTEAN Tetra Electrophoresis System – BioRad Laboratories, Inc., USA.

V.3. WARUNKI ANALIZY CHROMATOGRAFICZNEJ.

Skład otrzymywanych mieszanin reakcyjnych analizowałam metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej w układzie faz odwróconych, RP-HPLC, z udziałem detektora absorpcji w układzie wielodiodowym (DAD, chromatograf HPLC Waters Millenium), z detekcją punktową (chromatograf HPLC Waters Breeze) lub w stężeniu ze spektrometrem masowym, LC/MSD (chromatograf HPLC Agilent). Rozpatrywałam czasy retencji pików i substratów reakcji, ich widma absorpcyjne UV-Vis oraz jony masowe. Kontrolę dodatkowych składników mieszaniny reakcyjnej prowadziłam na podstawie chromatogramów w formie poziomicowej. Każdą analizę przeprowadzałam co najmniej dwukrotnie.

Tabela 8. Zmiany składu fazy ruchomej zastosowane w analizach chromatograficznych.

Czas (min)	Przepływ (ml/min)	Skład fazy ruchomej (%)		Krzywa zmian
		A	B	
-	1	85	15	-
25	1	20	80	6
28	1	0	100	6
30	1	85	15	6

Fazę ruchomą stanowiły:

A: bufor mrówczanowy o stężeniu 0,05 M, pH~3,4 (3,15 g HCOONH₄ / 1 l H₂O, pH stabilizowano 88 – 91% kwasem mrówkowym) z 5% dodatkiem alkoholu metylowego o czystości HPLC.

B: alkohol metylowy o czystości HPLC z 5% dodatkiem H₂O.

V.4. METODY I TECHNIKI DOŚWIADCZALNE.

V.4.1. Przemiany metaboliczne C-1748, C-857 i C-1305 wobec różnych form enzymów metabolizujących.

V.4.1.1. Stężenia wyjściowe stosowanych roztworów związków i enzymów.

- 0,002 M roztwór C-1748 w buforze reakcyjnym (0,066 mg/0,1 ml buforu).
 - 0,002 M roztwór C-857 w buforze reakcyjnym (0,064 mg/0,1 ml buforu).
 - 0,002 M roztwór C-1305 w buforze reakcyjnym (0,074 mg/0,1 ml buforu).
 - 0,02 M roztwór NADPH w buforze reakcyjnym (1,67 mg/0,1 ml buforu).
 - 0,025 M roztwór UDPGA w H₂O (roztwór A).
 - Frakcja mikrosomalna komórek wątroby szczura i człowieka – 20 mg/ml.
 - Rekombinantowe ludzkie izoenzymy cytochromu P450 o podwyższonej (H) aktywności NADPH-reduktazy cytochromu P450.
 - **CYP3A4 (H):** stężenie - 7,2 μM.
 - **CYP2C9 (H):** stężenie - 5,6 μM.
 - **CYP1A2 (H):** stężenie – 10,5 μM.
- } Przed użyciem do reakcji roztwór enzymu rozcieńczałam pięciokrotnie buforem przeznaczonym do przechowywania rekombinantowych ludzkich izoenzymów cytochromu P450.

V.4.1.2. Roztwory buforowe.

- **Bufor fosforanowy potasowy** o stężeniu 0,1 M, pH~7,4 (0,1 M roztwór KH₂PO₄ zmieszano z 0,1M roztworem K₂HPO₄ w stosunku 1:1, pH stabilizowano 1 N roztworem KOH):
 - KH₂PO₄ o stężeniu 0,1 M (1,36 g KH₂PO₄/100 ml H₂O).
 - K₂HPO₄ o stężeniu 0,1 M (1,74 g K₂HPO₄/100 ml H₂O).

- **Roztwór B** (250 mM Tris HCl, 40 mM MgCl₂, 0,125 mg/ml alametycyny w H₂O).
- **Bufor do przechowywania rekombinantowych ludzkich izoenzymów cytochromu P450**, pH~7,4 – w 50 ml H₂O rozpuszczono 0,303 g Tris-zasady (50 mM), 0,00448 g Na₂EDTA (0,25 mM) i 4,279 g sacharozy (250 mM), pH stabilizowano 99,5% lodowatym CH₃COOH.

V.4.1.3. Skład mieszanin reakcyjnych.

Tabela 9. Zestawienie stężeń końcowych poszczególnych składników mieszanin reakcyjnych.

C-857 / C-1748 / C-1305 (mM)	Rodzaj enzymu	Kofaktor (mM)	Bufor reakcyjny
0,2	CYP: 0,2 μM	NADPH: 2	0,1 M bufor fosforanowy potasowy
0,2	mikrosomy szczurze: 1 / 2/ 3 mg/ml	NADPH: 2 UDPGA: 1,25 / 2,5 / 3,75	Roztwór B w H ₂ O

V.4.1.4. Przebieg doświadczeń.

V.4.1.4.1. Metabolizm wobec rekombinantowych ludzkich izoenzymów CYP.

Inkubację C-1748, C-857 lub C-1305 z rekombinantowymi ludzkimi izoenzymami CYP prowadziłam w buforze fosforanowym potasowym. Po 5 minutach wstępnej preinkubacji w łaźni wodnej (37°C) do mieszaniny związków i enzymu dodawałam kofaktor reakcji enzymatycznej – NADPH. Otrzymaną mieszaninę reakcyjną poddawałam dalszej inkubacji w tej samej temperaturze przez 60 minut. Po ich upływie uzyskany roztwór chłodziłam w łaźni lodowej, a następnie dodawałam równoważną ilość schłodzonego alkoholu metylowego w celu zatrzymania reakcji. Uzyskaną mieszaninę chłodziłam ponownie przez 10 minut, po czym wirowałam (5 – 10 minut, 1000 rpm). Powstały supernatant nosiłam na kolumnę chromatograficzną i analizowałam metodą RP-HPLC z detekcją UV-Vis. W celu określenia istotności zmian pomiędzy próbami niezależnymi przeprowadziłam test Studenta.

V.4.1.4.2. Metabolizm wobec enzymów UGT zawartych we frakcji mikrosomalnej komórek wątroby.

Po wstępnej 5 minutach wstępnej preinkubacji w łaźni wodnej (37°C) do mieszaniny C-1748, C-857 lub C-1305 i frakcji mikrosomalnej komórek wątroby szczura dodawałam roztwór NADPH i UDPGA. Otrzymaną mieszaninę reakcyjną poddawałam dalszej inkubacji w tej samej temperaturze przez 60 minut inkubacji.

Przemiany metaboliczne pochodnych akrydyny wobec enzymów frakcji mikrosomalnej komórek wątroby szczura oraz NADPH i UDPGA, jako ko faktorów FMO

i UGT, badałam stosując dwustopniową inkubację. Mieszaninę 0,2 mM związku, 2 mg/ml frakcji mikrosomalnej komórek wątroby szczura i 1 mM NADPH inkubowałam 60 minut (37°C). Następnie dodawałam 2,5 mM UDPGA i inkubowałam kolejne 60 i 120 minut. Po upływie wskazanych czasów inkubacji postępowałam wg instrukcji przedstawionej w punkcie V.4.1.4.1.

V.4.2. Pochodne akrydyny w ludzkich komórkach nowotworowych.

V.4.2.1. Hodowla komórek nowotworowych.

Komórki HepG2 i Hep3A4 hodowałam w pożywce MEM, komórki HT29 i HCT113 w pożywce Mc'Coy 5A, komórki A549 w pożywce F-12K, komórki CL5 w pożywce DMEM 4,5 g/l. Wszystkie stosowane pożywki zawierały 10% płodowej surowicy bydlęcej oraz (z wyjątkiem DMEM 4,5 g/l) antybiotyki (streptomycyna – 100 µg/ml, penicylina G – 100 j/ml. Jako antybiotyki selekcyjne, w hodowlach komórek transferowanych Hep3A4 oraz CL5, stosowane były odpowiednio genetycyna (200 µg/ml) oraz hygromycyna B (100 µg/ml). Hodowla prowadzona była w atmosferze 5% CO₂ i temperaturze 37°C. Wszystkie komórki rosły w postaci monowarstwy. Podczas pasaży oraz w trakcie prowadzonych eksperymentów, do odklejenia komórek z powierzchni naczynia hodowlanego używałam 0,25% roztworu trypsyny-EDTA. W doświadczeniach prowadzonych na liniach komórkowych stosowałam związki w postaci roztworów przygotowywanych w 50% (v/v) alkoholu etylowym (końcowe stężenie alkoholu etylowego w zawiesinie komórek traktowanych związkiem nie przekraczało 0,05% (v/v)).

Hodowlę komórek w warunkach hypoksji prowadziłam w komorze, do której wcześniej, przed ustalonymi okresami inkubacji, przez 20 minut, wtłaczana była mieszanina gazów o składzie: 1% O₂, 5% CO₂ i 94% N₂.

Podczas pasażowania oraz przeprowadzanych innych eksperymentów stosowałam **buforowaną sól fizjologiczną x 5, PBS** (ang. *phosphate buffered saline*), pH~7,2 (685 mM NaCl, 7 mM KH₂PO₄, 40 mM Na₂PO₄, 13 mM KCl, pH stabilizowano 1 N roztworem HCl).

V.4.2.2. Izolacja metabolitów z komórek nowotworowych traktowanych C-1748, C-857 i C-1305.

Do izolacji powstających w komórkach nowotworowych metabolitów pochodnych akrydyny zastosowałam, zmodyfikowaną w naszym laboratorium, metodę ekstrakcji 60% roztworem alkoholu metylowego w połączeniu z sonifikacją w łaźni ultradźwiękowej [Hernandez-Santiago i wsp., 2002; Gomez-Silva i wsp., 2005; Wiśniewska, 2008].

Po uzyskaniu wzrostu konfluentnego, komórki wysiewałam w ilości $2 \times 10^6/\text{cm}^2$ na 60 mm płytki Petriego, na 24 godziny przed dodaniem związku. Następnie dodawałam 50 μl związku o stężeniu 10mM (dla uzyskania końcowego stężenia 0,1 mM). Inkubację prowadziłam przez: 3, 6, 12, 24, 72 godziny. Kontrolę stanowiły komórki po dodaniu analogicznej ilości 50% alkoholu etylowego. Po zakończeniu inkubacji komórki były zebrane z płytek „scrapperem” w obecności 60% zimnego roztworu alkoholu metylowego. Otrzymaną zawiesinę komórek poddałam sonifikacji (150W, 15 minut), a po 1 godzinie inkubacji w lodzie otrzymaną zawiesinę wirowałam przez 20 minut, 14000 rpm, 4°C, a otrzymany supernatant odparowałam z nadmiaru alkoholu etylowego w strumieniu powietrza atmosferycznego. Supernatant nanosiłam na kolumnę chromatograficzną i analizowałam metodą RP-HPLC z detekcją UV-Vis i ESI-MS.

V.4.2.3. Oznaczanie aktywności cytotoksycznej C-1748, C-857 i C-1305 wobec komórek nowotworowych.

Test MTT polega na pomiarze kolorymetrycznym aktywności oksydoredukcyjnej mitochondriów z użyciem barwnika MTT (bromku 3-[4,5-dimetylo-2-ilo]-2,5-difenylo-tetrazolu], który w żywych komórkach ulega redukcji do nierozpuszczalnego w wodzie formazanu (wytrącającego się w postaci fioletowych kryształów) w reakcji katalizowanej przez dehydrogenazy komórkowe. Ilość powstającego formazanu jest skorelowana z aktywnością redukcji mitochondriów, co świadczy o liczbie żywych komórek.

Oznaczanie aktywności cytotoksycznej pochodnych 9-amino-1-nitroakrydyny i triazoloakrydonu w zakresie stężeń końcowych: 0,0001 – 10 μM (pochodne C-1748 i C-857) oraz 0,01 – 100 μM (pochodna C-1305), w stosunku do komórek nowotworowych prowadziłam w następujących układach:

- przez 72 godziny ciągłej inkubacji komórek HepG2 i Hep3A4 w warunkach normalnych oraz hypoksji (patrz podrozdz. IV.1.6.3. i IV.1.7.3.)
- przez 3 godziny preinkubacji komórek HepG2 i Hep3A4 ze związkami, po czym po zmianie pożywki na świeżą kontynuowano inkubację do 72 godzin (patrz podrozdz. IV.1.6.3.)
- przez 24 godziny ciągłej inkubacji komórek HepG2 (patrz podrozdz. IV.2.1.1.), HepG2 transfekowanych wektorem *cpr* (patrz podrozdz. IV.1.8.) oraz komórek CL5 (nhrtox-hepg2) (IV.2.3.1.).

Komórki wysiewałam w ilości $2 \times 10^4/2\text{ml}$ pożywki na studzienkę do płytek 24-studzienkowych na 24 godziny przed podaniem związku, w celu przyklejenia komórek do podłoża. Do każdej studzienki dodałam 20 μl roztworu badanego związku o odpowiednim stężeniu. Do komórek kontrolnych dodałam równoważną ilość 50% alkoholu etylowego.

Po zakończonej inkubacji komórek ze związkami do każdej studzienki dodałam 200 μ l roztworu MTT (4 mg/ml). Po 4 godzinach inkubacji zebrałam supernatant z nadkryształów formazanu i dodałam po 200 μ l DMSO. Płytkę łagodnie wytrząsałam przez 30 minut w temperaturze pokojowej na wytrząsarce orbitalnej, w celu rozpuszczenia kryształów formazanu. Następnie 200 μ l roztworu z każdej studzienki przeniosłam do nowej studzienki na płytce 96-studzienkowej. Absorbancję roztworów w studzienkach mierzyłam spektrofotometrycznie przy długości fali 540 nm przy użyciu aparatu Multilabel Counter Victor3™ (PerkinElmer, USA). Na podstawie uzyskanych wyników absorbancji wyliczyłam procent zahamowania wzrostu komórek w obecności związku, przyjmując absorbancję roztworu uzyskaną dla komórek kontrolnych za 100%. Korzystając z równań fragmentów prostoliniowych krzywych zahamowania wzrostu komórek w zależności od logarytmu stężenia związku, wyznaczyłam wartości EC_{30} i EC_{50} . W celu określenia istotności różnic pomiędzy wyznaczonymi wartościami w próbach niezależnych zastosowałam test Studenta.

V.4.2.3.1. Oznaczenie aktywności dokсорubicyny w komórkach HepG2.

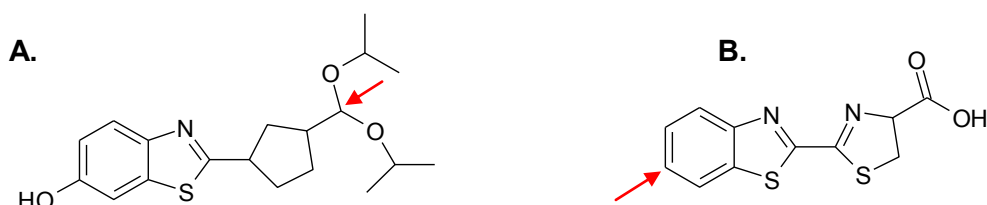
Oznaczenie aktywności dokсорubicyny wobec komórek HepG2 prowadziłam według metody opisanej powyżej w punkcie V.4.2.3. Jednakże stosowałam inny schemat inkubacji komórek ze związkami. W pierwszym etapie inkubowałam wszystkie komórki ze związkiem C-1305 w stężeniu równym 10 μ M przez 24 godziny. Następnie, po upływie tego czasu, przemywałam PBS-em, a do świeżej pożywki dodawałam w pierwszym układzie: dokсорubicynę w zakresie stężeń końcowych 0,01 – 100 μ M, w drugim układzie dokсорubicynę + związek C-1305 (5 μ M). Inkubację prowadziłam przez kolejne 24 godziny. Po upływie założonego czasu oznaczyłam aktywność cytotoksyczną dokсорubicyny z zastosowaniem testu MTT.

V.4.2.4. Badania wpływu pochodnych C-1748, C-857 i C-1305 na aktywność katalityczną izoenzymów CYP3A4 i CYP2C9.

V.4.2.4.1. Metoda luminescencyjna.

Komórki HepG2 wysiewałam na 96-studzienkowe płytki białe w ilości 8×10^3 /0,2 ml pożywki. Po 24 godzinach, do komórek dodałam badane związki w zakresie stężeń końcowych: 0,0001 – 0,1 μ M (C-1748 i C-857), 0,1 – 10 μ M (C-1305) oraz 10 μ M rifampicyny (kontrola dodatnia indukcji aktywności izoenzymów). Inkubację komórek ze związkami prowadziłam przez 24 godziny. Następnie, po zakończonej ekspozycji komórek na związki oraz usunięciu pożywki i przepłukaniu komórek PBS-em, dodałam do każdej studzienki po 50 μ l świeżej pożywki oraz substrat dla izoenzymów: CYP3A4 – 3 μ M (stężenie

końcowe) Luciferin-IPA oraz CYP2C9 – 100 μM (stężenie końcowe) Luciferin – H. Oba substraty były związane z prolucyferyną i pochodziły z zestawów: P450-Glo™ CYP3A4 Assay, P450-Glo™ CYP2C9 Assay (rys. 99). W celu określenia tła luminescencji, substraty izoenzymów dodałam również do studzienek, do których nie dodawałam wcześniej związków.



Rys. 100. Struktury substratów izoenzymów A: CYP3A4 (Luciferin-IPA) i B: CYP2C9 (Luciferin-H) połączone z prolucyferyną.

Podczas reakcji substratów z izoenzymami, zostaje uwolniona lucyferyna. Po inkubacji, 60 minut dla substratu CYP3A4 oraz 3 godziny dla substratu CYP2C9, do komórek dodawałam bufor Luciferin Detection Reagent, znajdujący się w zestawie, który zawierał m.in. lucyferazę. Płytkę w celu lizy komórek, zamroziłam w temperaturze -80°C (15 minut), a następnie rozmroziłam doprowadzając do temperatury pokojowej (15 minut). Aktywność lucyferazy mierzyłam z zastosowaniem luminometru. Na podstawie uzyskanych wyników określiłam poziom względny aktywności izoenzymów CYP3A4 i CYP2C9 w stosunku do kontroli (komórki nie traktowane związkiem). W celu określenia istotności różnic pomiędzy względnymi wartościami aktywności izoenzymów w stosunku do kontroli zastosowałam test ANOVA.

V.4.2.4.2. Metoda chromatograficzna.

Aktywność izoenzymu CYP3A4 mierzyłam na podstawie przemian typowego substratu dla tego izoenzymu, jakim jest testosteron: przy braku i w obecności badanych związków.

Komórki HepG2, w ilości 2×10^6 komórek/ cm^2 , wysiewałam na 60 mm płytce Petriego, na 24 godziny (37°C) przed dodaniem związku, w celu przyklejenia do podłoża, po czym dodałam związki: C-1748 i C857 w zakresie końcowych stężeń: 0,0001 – 0,1 μM oraz C-1305 w zakresie: 0,1 – 10 μM . Po 24 godzinach inkubacji komórek ze związkami oraz zmianie pożywki dodałam 50 μM testosteron. Po upływie kolejnych 24 godzin, pożywkę poddałam ekstrakcji acetonitrylem w stosunku 1:1 (v/v), po czym przeprowadziłam analizę chromatograficzną metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej w układzie faz odwróconych RP-HPLC z detekcją UV-Vis.

V.4.2.5. Badanie poziomu ekspresji genów metodą Real-time PCR.

V.4.2.5.1. Izolacja RNA.

Pierwszym etapem podczas całościowej analizy Real-time PCR jest wyizolowanie całkowitego RNA. W tym celu wysiewałam komórki HepG2 na 100 mm płytki Petriego w ilości 2×10^6 komórek/cm², na 24 godziny przed dodaniem związku. W kolejnym kroku dodawałam poszczególne związki w następującym zakresie stężeń końcowych: 0,0001 – 0,1 μ M (C-1748 i C-857) oraz 0,1 – 10 μ M. Komórki, po zakończonej inkubacji (w warunkach normalnych lub hypoksji), przemywałam dwukrotnie zimnym PBS-em (1000 rpm, 5 minut, 4°C). Izolację przeprowadziłam według instrukcji producenta zawartej w zestawie High Pure Isolation Kit (Roche Diagnostics Polska Sp. z o.o.). Komórki zawiesiłam w 200 μ l buforu PBS, a następnie lizowałam w buforze lizującym (Lysis Buffer) znajdującym się w zestawie. Tak przygotowane lizaty komórkowe nanosiłam na kolumny i wirowałam 15 s, 8000 g. Następnie na kolumny nanosiłam roztwór DNazy i inkubowałam przez 15 minut w temperaturze pokojowej. W kolejnych etapach płukałam kolumnę roztworami Wash Buffer I i II oraz trzykrotnie wirowałam (2 x 15s, 8 000g; 1 x 2 minuty, 13 000 g). Ostatnim krokiem była elucja RNA, poprzez dodanie na złoże w kolumnie 50 μ M buforu do elucji, Elution Buffer. Ilość wyizolowanego RNA oraz jego czystość określiłam z zastosowaniem spektrofotometru UV-Vis firmy NanoDrop, dzięki uprzejmości prof. J. Kur, w Katedrze Mikrobiologii Wydziału Chemicznego Politechniki Gdańskiej.

V.4.2.5.2. Synteza cDNA.

Syntezę cDNA przeprowadziłam na matrycy otrzymanego RNA. Całą procedurę wykonałam pod komorą laminarną, na lodzie, według procedury dołączonej do zestawu Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit (Roche Diagnostics Polska Sp. z o.o.). W pierwszym etapie reakcji, do 1 μ g RNA rozpuszczonego w wodzie wolnej od RNaz (objętość wody stanowiła uzupełnienie do 13 μ l) dodałam 1 μ l oligo(dT)18 (stężenie wyjściowe 50 pmol/ μ l). Zawartość próbki inkubowałam w termobloku przez 10 minut, w temperaturze 65°C. Następnie próbka była przeniesiona do lodu na 1 min, wirowana, ponownie umieszczona w lodzi. Dodano do niej następujące składniki:

- 4 μ l buforu zawierającego 40 mM MgCl₂, Transcriptor Reverse Transcriptase Reaction Buffer 5 x
- 0,5 μ l inhibitora rybonukleaz RNase, Protector RNase Inhibitor zawierający 8 mM DTT (stężenie wyjściowe 40 U/ μ l)
- 2 μ l mieszaniny deoksyrybonukleotydów, Deoxynucleotide Mix (stężenie wyjściowe 10 mM)

- 0,5 µl odwrotnej transkryptazy, Transcriptor Reverse Transcriptase (stężenie wyjściowe 20 U/µl)

Probówkę delikatnie wytrząsałam i umieściłam w termobloku. Syntezę cDNA prowadziłam w czasie 30 minut w temperaturze 55°C. Po zakończeniu syntezy próbki poddałam działaniu temperatury 85°C przez 5 minut w celu zatrzymania reakcji. Po zakończeniu reakcji próbki z cDNA przechowywałam w 4°C. W ten sposób uzyskany cDNA wykorzystywałam jako matryca do reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym (ang. *Real-time PCR*).

V.4.2.5.3. Real-time PCR – określenie względnego poziomu ekspresji badanych genów.

Dla oszacowania zmian w poziomie ekspresji badanych genów zastosowałam reakcję łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym z użyciem specyficznych par starterów (Genomed, Polska) (patrz podrozdz. V.1.7.) komplementarnych do fragmentu kodującego, pozwalających na uzyskanie specyficznego produktu reakcji wyłącznie z cDNA.

Reakcję PCR prowadziłam w czasie rzeczywistym w szklanych kapilarach z wykorzystaniem cDNA pozyskanego w reakcji odwrotnej transkrypcji oraz zestawu FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche Diagnostics Polska Sp. z o.o.). Do amplifikacji wykorzystałam aparat LightCycler 1.5 (Roche Diagnostics Polska Sp. z o.o.), dzięki uprzejmości prof. Kur z Katedry Mikrobiologii Wydziału Chemicznego Politechniki Gdańskiej. Dołączone do niego oprogramowanie pozwoliło na analizowanie uzyskanych wyników oraz porównanie względnych różnic ilości początkowej matrycy. Poziom analizowanych transkryptów standaryzowano względem genu referencyjnego – GAPDH (dehydrogenaza gliceroaldehydofosforanowa), należącego do rodziny *housekeeping gene*, którego poziom ekspresji jest stały w warunkach eksperymentu. Reakcję dla badanych genów prowadzono w warunkach określonych poniżej.

Skład mieszaniny reakcyjnej na pojedynczą próbę w celu amplifikacji transkryptów genów *CYP3A4*, *CYP2C9*, *UGT1A1*, *MDR1*, *PXR*:

- 2 µl cDNA
- 0,8 µl MgCl₂
- 0,2 µl starter Forward (stężenie końcowe 0,2 µM)
- 0,2 µl starter Reverse (stężenie końcowe 0,2 µM)
- 2 µl LightCycler® FastStart DNA Master SYBR Green I 10 x
- H₂O wolna od RNaz – objętość stanowi uzupełnienie mieszaniny reakcyjnej do 20 µl.

Dla wszystkich genów reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym obejmowała kilka następujących po sobie etapów i przebiegała w określonych poniżej warunkach (tabela 10).

Tabela 10. Warunki reakcji PCR w czasie rzeczywistym.

Liczba cykli	Temperatura		Czas
DENATURACJA WSTĘPNA			
1	95°C		10 min
AMPLIFIKACJA			
45	Denaturacja	95°C	10 s
	Wiązanie starterów	59°C	15 s
	Synteza	72°C	20 s
CHŁODZENIE			
1	40°C		30 s

Uzyskane wyniki pochodzące z dwóch niezależnych doświadczeń standaryzowałam wobec genu referencyjnego GAPDH, po czym przedstawiłam jako wartość względną w odniesieniu do grupy niepoddanej traktowaniu związkami. Dzięki temu, że wydajność amplifikacji badanych genów i genu referencyjnego była w przybliżeniu taka sama w zakresie badanych ilości DNA, zastosowałam obliczenia względnej ilości produktu PCR z użyciem porównywalnej metody $2^{-\Delta\Delta Ct}$ [Livak i Schmittgen, 2001]. Z zastosowaniem jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA wykonałam obliczenia poziomu istotności.

V.4.2.6. Wyciszenie genu *PXR* przy użyciu siRNA.

Celem oceny swoistości efektu działania *PXR* wykonałam czasowe wyciszenie genu (ang. gene silencing) dla *PXR* przy użyciu siRNA. Komórki HepG2 w ilości $2,5 \times 10^4/\text{cm}^2$ zaszczepliłam na płytce 24-studzienkowej. Przygotowane przeze mnie medium transfekcyjne zastosowane do wyciszenia genu *PXR* zawierało 6 pmol siRNA *PXR* (Applied Biosystems, USA), 100 μl pożywki Opi-MEM® I (bez antybiotyków) oraz 1 μl Lipofectamine™RNAiMAX. Tak przygotowaną mieszaninę inkubowałam w temperaturze pokojowej przez 10 – 20 minut. Następnie dodałam 500 μl świeżej pożywki do komórek oraz 100 μl medium transfekcyjnego. Całkowita objętość pożywki wynosiła 600 μl , gdzie końcowe stężenie siRNA wynosiło 10 nM. Po transfekcji komórki były hodowane w inkubatorze w 37°C i 5% stężeniu CO₂ przez następne 24 godziny. Celem oceny wydajności transfekcji przeprowadziłam reakcję Real-time *PXR* ze starterami komplementarnymi do sekwencji *PXR* w komórkach bez siRNA oraz po wyciszeniu siRNA *PXR*. Następnie oceniłam poziom ekspresji genów CYP3A4, CYP2C9 oraz aktywność cytotoksyczną doksorubicyny w powyższych komórkach.

V.4.2.7. Transfekcja komórek HepG2 plazmidem *cpr*.

We wstępnych badaniach z zastosowaniem techniki elektroporacji oraz z użyciem wektora *gfp*, którego produktem ekspresji jest świecące na zielono białko GFP ustaliłam, że najwyższa wydajność przeprowadzonej transfekcji jest przy użyciu 12 mln komórek HepG2 oraz następujących warunków: 12 µg plazmidu *cpr*, 130 V, 20 msec. Plazmid *cpr* (Qiagen, USA), posiadał sekwencję charakterystyczną dla reduktazy cytochromu P450. Po przeprowadzonej elektroporacji w wymienionych powyżej warunkach, komórki zostały zaszczipione na 60 mm płytki Petriego ($1 \times 10^6/\text{cm}^2$) oraz płytki 24-studzienkowe (10 tys./ cm^2). Po upływie 48 h od elektroporacji do płytek dodałam pochodne C-1748 i C-857: do płytek 60 mm 0,1 mM stężenie związku oraz do płytek 24-studzienkowych związki w zakresie stężeń: 0,0001 – 50 µM. Po upływie 24 godzin przeprowadziłam analizę HPLC wyizolowanych metabolitów według metody opisanej w punkcie V.4.2.2. oraz oznaczyłam aktywność cytotoksyczną według metody opisanej w punkcie V.4.2.3.

V.4.2.8. Metoda luminescencyjna z zastosowaniem linii reporterowej *nhrtox-hepg2*.

V.4.2.8.1. Roztwory buforowe.

- **Bufor lizujący (Reporter Lysis Buffer):** 25 mM Tris-fosforan o pH~7,8 (3,18 g/l H₂O), 4 mM EGTA (1,52 g/l H₂O), 1% Triton X-100, 15 mM MgSO₄ (3,7 g/l H₂O), 2 mM DTT (0,308 g/l H₂O).
- **Bufor X:** 160 mM Gly-Gly (2,12 g/100 ml H₂O), 2mM EGTA (76,08 mg/100 ml H₂O), 40 mM MgSO₄ (0,98 g/100 ml H₂O), DTT (0,616 g/100 ml H₂O), 4 mM ATP (0,222 g/100 ml H₂O); pH~7,4.
- **Bufor Y:** 1,2 mM lucyferyna (38,2 mg/100 ml H₂O), 1,2 mM koenzym A (98,5 mg/100 ml H₂O).

V.4.2.8.2. Przebieg doświadczenia.

Linia reporterowa, *nhrtox-hepg2*, to stabilnie transferowana linia HepG2, z zastosowaniem 2µg plazmidu reporterowego (ER6)-SV40-Luc przy użyciu zestawu FuGene (Roche Diagnostics). Plazmid ten został otrzymany poprzez wklonowanie do wektora pGL4.14 (Promega, Niemcy) 9 kopii chemicznie zsyntetyzowanego fragmentu CYP3A4 ER6 PXRE pod kontrolą promotora SV40. Charakterystyczna sekwencja ER6 PXRE jest miejscem wiązania domeny DBD receptora PXR. Genem markerowym, znajdującym się pod kontrolą indukowalnego promotora CYP3A4, był gen eukariotycznej lucyferazy. Dodatkowo plazmid ten zawierał gen oporności na hygromycynę B, co

umożliwiało właściwą selekcję stransfekowanych komórek HepG2 [Ratajewki i wsp., 2011]. Linie reporterową nhrtox-hepg2 zastosowałam dzięki uprzejmości prof. Jarosława Dastycha z Instytutu Biologii Medycznej PAN w Łodzi. Badania z zastosowaniem tej linii przeprowadziłam w Jego laboratorium.

Komórki nhrtox-hepg2 zaszczepiłam w ilości 8×10^3 /0,2 ml pożywki na białe płytki 96-studzienkowe, na 24 godziny w celu przyklejenia do podłoża. Po upływie tego czasu do komórek dodałam następujące związki: 0,0001 – 0,1 μ M C-1748 i C-857, 0,1 – 10 μ M C-1305, 10 μ M rifampicyny oraz 10 μ M aflatoksyny B1. Inkubowałam komórki przez 24 godziny lub przez różne czasy: 3, 6, 12, 24 i 48 godzin. Następnie usunęłam pożywkę, przepłukałam komórki PBS-em oraz dodałam 50 μ l buforu lizującego (Reporter Lysis Buffer). Płytkę umieściłam w -80°C na 15 minut. Następnie doprowadziłam płytkę do temperatury pokojowej, po czym do każdej studzienki dodałam 25 μ l buforu X. Odczyt poziomu luminescencji przeprowadziłam w luminometrze EnVision® (PerkinElmer, USA). Bufor Y z dodatkiem wody dejonizowanej służył do napełnienia urządzenia oraz przepłukania dyspensera. Po tym kroku umieściłam płytkę w aparacie i odczytałam poziom luminescencji. Wyniki przedstawiłam jako poziom względny w stosunku do kontroli (komórek nie traktowanych związkami). Stosując jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA wykonałam obliczenia poziomu istotności. Wartość $p < 0,05$ przyjąłam jako statystycznie istotną.

V.4.2.9. Immunodetekcja białek metodą Western blotting.

V.4.2.9.1. Odczynniki i roztwory buforowe.

- **Bufor do izolacji frakcji mikrosomalnej (KCI-KPB):** 10 mM KHPO_4 , pH~7,4, 150 mM KCl, 0,1 mM Na_2EDTA .
- **Bufor do przechowywania frakcji mikrosomalnej:** 250 mM roztwór sacharozy w KCI-KPB.
- **30% akrylamid :** 14,6 g akrylamidu do elektroforezy i 0,4 g N,N'-metylenobisakrylamidu rozpuszczono w 40 ml H_2O , wymieszano i uzupełniono H_2O do objętości 50 ml.
- **0,5 M Tris-HCl:** pH~6,8; 3 g Tris-zasady rozpuszczono w 40 ml H_2O , pH stabilizowano 1 N roztworem HCl, całość uzupełniono H_2O do objętości 50 ml.
- **1,5 M Tris-HCl:** pH~8,8; 9,07 g Tris-zasady rozpuszczono w 40 ml H_2O , pH stabilizowano 1 N roztworem HCl, całość uzupełniono H_2O do objętości 50 ml.
- **10% SDS:** 1 g SDS/10ml H_2O .
- **10% APS:** 0,1 gAPS/ml H_2O .

- **Bufor obciążający do elektroforezy:** bufor Laemmli (62,5 mM Tris-HCl pH~6,8, 25% glicerol, 2% SDS, 0,01% błękit bromofenolowy) i β -merkaptoetanol zmieszano w stosunku 19:1.
- **Bufor do elektroforezy:** 25 mM Tris-zasada pH~8,3, 192 mM glicyna, 0,1% SDS.
- **Bufor do transferu:** 25 mM Tris-zasada pH~8,3, 192 mM glicyna, 20% (v/v) alkohol metylowy.
- **Bufor blokujący:** 20 mM Tris-zasada pH~7,4, 150 mM NaCl, 10% (w/v) odtłuszczone mleko w proszku.
- **Bufor płuczący (TBST):** 10 mM Tris-zasada pH~7,4, 150 mM NaCl, 0,05% (v/v) Tween-20.

V.4.2.9.2. Izolacja frakcji mikrosomalnej.

Komórki HepG2 zaszczerpiłam ilością równą 3×10^6 na 100 mm płytki Petriego na 24 godziny. Następnie dodałam do komórek badane związki w różnym stężeniu: 0,0001 – 0,1 C-1748 i C857 oraz 0,1 – 10 C-1305 na 24 godziny oraz w jednym stężeniu: 0,001 μ M C-1748 i C-857 oraz 10 μ M C-1305 na 3, 6, 12, 24, 48 godzin. Po zakończonej inkubacji, komórki zbierałam przez trypsynowanie, dwukrotnie płukałam PBS-em (1000 rpm, 4°C, 5 minut). Otrzymany osad zawiesiłam w buforze KCl-KPB (0,5 – 1ml). Próbki przechowywałam w lodzie. Lizę komórek przeprowadziłam w ręcznym homogenizatorze (3 minuty). Otrzymaną zawiesinę wirowałam (12000 rpm, 4°C, 20 minut). Supernatant przenosiłam do próbki ultra wirówkowej (16 x 38 mm) i poddawałam ultrawirowaniu (45000 rpm, 4°C, 90 minut). Uzyskany pellet zawiesiłam w buforze do przechowywania frakcji mikrosomalnej i przechowywałam w temperaturze -80°C, do czasu przeprowadzenia eksperymentu. Stężenie białka całkowitego we frakcji mikrosomalnej oznaczałam metodą Bradford [Bradford, 1976], przy użyciu zestawu Bio-Rad Bradford Protein Assay Kit2 (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA).

V.4.2.9.3. Elektroforeza SDS-PAGE.

Próbki zawierające 30 μ g białka łączyłam z równą objętością buforu obciążającego, denaturowałam przez 5 minut w temperaturze 100°C i poddawałam elektroforezie w żelu poliakrylamidowym (5% żel zagęszczający, 12% żel rozdzielający). Elektroforezę prowadziłam przez 10 minut przy 90 V, a następnie przez 90 minut przy 120 V w buforze do elektroforezy.

V.4.2.9.4. Immunobarwienie (immunoblotting).

Po zakończonej elektroforezie, przeprowadziłam transfer białek z żelu poliakrylamidowego na membranę nitrocelulozową stosując metodę tzw. elektrotransferu półsuchego. Transfer białek, po uprzednim nasączeniu żelu, membrany oraz bibuły Whatman 3 mm w buforze do transferu, prowadziłam przez 1 godzinę przy stałym natężeniu prądu 40mA. Po skończonym transferze, blokowałam potencjalne miejsca niespecyficznego wiązania przeciwciał, poprzez umieszczenie membrany w buforze blokującym na 2 godziny w temperaturze pokojowej. Następnie, membranę płukałam trzykrotnie po 15 minut w buforze TBST i inkubowałam odpowiednim przeciwciałem pierwszego rzędu w buforze TBST z dodatkiem 0,5% (w/v) BSA lub 0,5% (w/v) odtłuszczonego mleka w proszku, przez noc w 4°C. Po kolejnym trzykrotnym płukaniu w buforze TBST, membranę inkubowałam w buforze TBST z dodatkiem 0,5% (w/v) odtłuszczonego mleka w proszku, zawierającym odpowiednie przeciwciała drugorzędowe skoniugowane z peroksydazą chrzanową. Inkubacje prowadziłam przez 2 godziny w temperaturze pokojowej, łagodnie wytrząsając. Lokalizację białek na błonie przeprowadziłam stosując substrat luminescencyjny dla peroksydazy chrzanowej (zestaw ECL) z detekcją sygnału po odpowiednim czasie ekspozycji kliszy fotograficznej ECL Hyperfilm (Kodak, Polska). W celu weryfikacji równego napełnienia studzienek podczas elektroforezy, oznaczyłam poziom aktywności. W tym celu, po zakończonej detekcji ECL, membranę trzykrotnie płukałam w buforze TBST przez 15 minut. Tak przygotowaną membranę, inkubowałam z odpowiednimi przeciwciałami specyficznymi dla β -aktywności. Przeciwciała pierwszorzędowe zostały użyte w następujących rozcieńczeniach:

- anty-CYP3A4 – 1:500
- anty-CYP2C9 – 1:4000
- anty-UGT1A1 – 1:1000
- anty-MDR1 – 1: 1000
- anty-PXR – 1:500
- przeciwciała drugorzędowe – 1:10000.

V.5. Analiza statystyczna wyników.

Wyniki badań zostały ocenione metodami statystycznymi celem porównania wyników w próbach niezależnych oraz w wyników w próbach badanych z próbami kontrolnymi. Wyniki podsumowano przy użyciu statystyki opisowej: średnia i odchylenia standardowe (SD). Dane dla poszczególnych parametrów poddano analizie statystycznej przy użyciu programu GraphPad Prism 4 (GraphPad Software, San Diego, USA). Dla oceny różnic pomiędzy dwiema próbami niezależnymi zastosowano test Studenta. Analiza statystyczna dla

większych niż dwuparametrowych zmiennych była wykonana przy użyciu testu zmienności ANOVA. Przyjęto istotną różnicę statystyczną przy wartościach: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

VI. Dyskusja wyników i wnioski

Zrealizowana przeze mnie praca jest kontynuacją badań nad mechanizmem działania związków o wysokiej i selektywnej aktywności cytotoksycznej wobec komórek nowotworowych, pochodnych 9-amino-1-nitroakrydyny, związków C-1748 i C-857 oraz pochodnej triazoloakrydonu, związku C-1305. Zsyntetyzowano je w zespole naukowym Katedry Technologii Leków i Biochemii Politechniki Gdańskiej, a po szerokich badaniach biologicznych w układach *in vitro* oraz na zwierzętach jeden z nich, związek C-1748, wyselekcjonowany został do badań klinicznych.

Badania nad poznaniem molekularnego mechanizmu przemian metabolicznych obu grup pochodnych rozpoczęto wcześniej od badań ich transformacji w układach modelowych, początkowo z udziałem czynnika redukcyjnego, ditiotreitolu, DTT, jak w przypadku pochodnych 1-nitroakrydyny [Gorlewska i wsp., 2001], później, dla wszystkich związków, stosując enzymy frakcji mikrosomalnej wyizolowanej z wątroby szczura i człowieka, a w końcu w obecności rekombinantowych enzymów I i II fazy metabolizmu [Wiśniewska, 2008; Fedejko-Kap, 2011]. Zaobserwowano znaczące różnice w przemianach metabolicznych pomiędzy związkami należącymi do obu grup pochodnych akrydyny. W przypadku związku C-1748, jak i stosowanego do celów porównawczych 4-niepodstawionego analogu 1-nitroakrydyny, związku C-857, zaobserwowano kilka produktów metabolizmu o różnej intensywności, natomiast C-1305 transformował tylko do jednego metabolitu. W oparciu o analizę spektroskopową produktów stwierdzono, że procesy biotransformacji C-1305 nie obejmują pierścienia heterocyklicznego, w odróżnieniu od pochodnych 1-nitroakrydyny, gdzie otrzymano produkty ze zmienioną strukturą pierścienia akrydyny. Wykazano również wyraźne różnice w reaktywności związków C-1748 i C-857. Okazało się, że pochodna C-1748 jest mniej podatna od innych 9-amino-1-nitroakrydyn na przemiany metaboliczne. Postawiono więc hipotezę, że obniżona reaktywność, jak i podatność na atak nukleofilowy ściśle wiąże się z niższą toksycznością ogólną tego związku.

Wykazane różnice w metabolizmie obu grup pochodnych akrydyny, w zastosowanych układach modelowych, skłoniły mnie do przeprowadzenia, w ramach niniejszej pracy, badań biotransformacji w miejscu ich oczekiwanego działania w terapii, czyli w komórkach nowotworowych. Podjęcie badań metabolizmu w komórkach nowotworowych wynikało również z coraz szerszych doniesień innych autorów na temat lokalnie różnej ekspresji specyficznych enzymów I i II fazy metabolizmu, nazywanych enzymami metabolizującymi leki. Szczególnie istotna wydaje się być wiedza na temat ekspresji izoenzymów cytochromu P450 w poszczególnych typach nowotworów, biorą bowiem one udział w metabolizmie

większości leków stosowanych klinicznie [Guengerich, 2006]. Wiedzę tę można wykorzystać w planowaniu terapii ukierunkowanej i projektowaniu struktur nowych pochodnych o korzystnych właściwościach farmakologicznych. Drugim, obok roli enzymów metabolizujących w przemianach leków, funkcjonalnym aspektem dla farmakokinetyki związków przeciwnowotworowych oraz ich przydatności terapeutycznej, jest scharakteryzowanie ich udziału w interakcjach lek-lek. W tym celu, istotnie ważnym jest określenie wpływu potencjalnych leków na ekspresję genów i aktywność katalityczną białek enzymatycznych [Riddic i wsp., 2005]. Wobec powyższego, kontynuowanie badań przemian metabolicznych zsyntetyzowanych w zespole Profesora Konopy przeciwnowotworowych pochodnych 9-amino-1-nitroakrydyny i triazoloakrydonu oraz ich potencjalnego wpływu na białka enzymatyczne było szczególnie uzasadnione.

Badania będące przedmiotem niniejszej rozprawy doktorskiej zmierzały w dwóch głównych kierunkach:

Po pierwsze, miały określić charakter całokształtu przemian metabolicznych, tzn. aktywacji i detoksykacji, jakim związki C-1748, C-857 i C-1305, jako potencjalne leki, będą ulegały w organizmie pacjenta, a ściślej w komórkach nowotworowych.

Po drugie, miały na celu poznanie wpływu badanych związków na ekspresję genów oraz aktywność katalityczną wybranych enzymów metabolizujących, głównie z rodziny cytochromów P450. Biorąc pod uwagę fakt, iż chemoterapia nowotworów jest zwykle terapią wielolekową wyniki tych badań określiłyby potencjalne interakcje związków z innymi lekami w organizmie pacjenta. Co więcej, umożliwiłyby ukierunkowanie sposobu łączenia pochodnych akrydyny z innymi lekami, w celu osiągnięcia jak najlepszych efektów terapeutycznych w nowoczesnej terapii, ukierunkowanej na pacjentów.

We wstępnych badaniach, określiłam udział rekombinantowych izoenzymów cytochromu P450, CYP3A4, CYP2C9 oraz CYP1A2 w metabolizmie pochodnych akrydyny. Stwierdziłam, że obie pochodne 9-amino-1-nitroakrydyny były wrażliwe wobec trzech izoenzymów, chociaż ich zdolność do transformacji była zróżnicowana zarówno pomiędzy związkami, jak i białkami enzymatycznymi. Wykazałam, że w przemianach pochodnej C-1748 najistotniejszą rolę odgrywał CYP2C9, nieco mniejszą CYP3A4. W przypadku pochodnej C-857 to CYP3A4 metabolizował najsilniej. Izoenzym CYP1A2 najsłabiej metabolizował oba związki. O ile obie pochodne 9-amino-1-nitroakrydyny ulegały przemianom metabolicznym w obecności wszystkich trzech izoenzymów, to nie zaobserwowałam reaktywności C-1305 wobec żadnego z zastosowanych rekombinantowych ludzkich białek P450.

Ten nieoczekiwany rezultat pozwolił na postawienie hipotezy o różnym przebiegu szlaków metabolicznych związków C-1748, C-857 i C-1305 w komórkach nowotworowych.

Hipoteza ta wydawała się szczególnie atrakcyjna ze względu na to, iż uchwycenie różnic w metabolizmie badanych związków w miejscu ich oczekiwanego działania w terapii, może być decydujące w przewidywaniu skuteczności końcowego efektu.

W pierwszej części swojej pracy skupiłam się na scharakteryzowaniu przemian metabolicznych związków C-1748, C-857 i C-1305 w różnych nowotworowych liniach komórkowych pochodzenia ludzkiego, HepG2, HT29, HCT116 oraz A549. Odnosząc się do danych literaturowych [Oyama i wsp., 2004; Rodriguez-Antona i Ingelman-Sundberg, 2006; Michael i Doherty, 2007], badania rozpocząłam od przeprowadzenia relatywnej kwantyfikacji transkryptów CYP3A4 mRNA, CYP2C9 mRNA oraz CYP1A2 mRNA w wybranych liniach. Wykazałam, iż najwyższy poziom ekspresji genów CYP3A4 i CYP2C9 był w linii nowotworu wątroby, HepG2. W pozostałych liniach był blisko o połowę niższy. Co ciekawe, jedynie w linii niedrobnokomórkowego nowotworu płuc, A549, ekspresja CYP1A2 była najwyższa. Jednakże wynik ten nie był zaskakujący. Liczne grupy badawcze wykazały bowiem podwyższenie poziomu ekspresji CYP1A2 w komórkach nowotworu płuc [Osawa i wsp., 2007; Singh i wsp., 2011]. Następowало to poprzez z indukcję receptora AhR, regulującego ekspresję genów izoenzymów z podrodziny CYP1A, indukowaną przez kancerogenne węglowodory aromatyczne występujące [Misaki i wsp., 2007].

W kolejnym etapie badań wykazałam, że wszystkie badane związki, pochodne 9-amino-1-nitroakrydyny oraz pochodna triazoloakrydonu, wnikają do komórek nowotworowych i ulegają w nich przemianom metabolicznym, zróżnicowanym pod względem intensywności. Związki C-1748 i C-857 metabolizowały odpowiednio, do 4 i 7 głównych produktów w komórkach HepG2. Określenie zależności metabolizmu od czasu inkubacji komórek HepG2 ze związkami C-1748 i C-857, pozwolił stwierdzić, że po 72 godzinach stopień przemiany wynosił odpowiednio, 69% i 86%. Co ciekawe, najwięcej produktów o dość wysokim stężeniu pochodnej C-857 zaobserwować można było tylko po 3 godzinach inkubacji. Wydłużanie czasu inkubacji skutkowało drastycznym obniżeniem ilości oraz stężenia metabolitów C-857, a więc mimo, że pochodna C-857 metabolizowała do wielu produktów o wyższym stężeniu, okazały się one bardzo nietrwałe. Stwierdziłam natomiast, że pochodna z podstawnikiem metylowym była mniej podatna na przemiany metaboliczne od 4-niepodstawionego analogu. Wynik był zgodny z otrzymanymi wcześniej w układach modelowych wskazującymi na obecność grupy metylowej jako powód niższej reaktywności C-1748 [Wiśniewska, 2008].

Na podstawie wiedzy o metabolitach związków C-1748 i C-857, powstających w warunkach chemicznej redukcji oraz własnej analizy spektroskopowej, widm ESI-MS i UV-Vis, zaproponowałam struktury 4 głównych metabolitów obu pochodnych, powstających w komórkach HepG2. Trzy z nich to: produkt z całkowicie zredukowaną grupą nitrową (M_1 i M^*_1), metabolit z dodatkowym pierścieniem pomiędzy atomami azotu w pozycji 1 i 9

pierścienia akrydyny (M_3 i M^*_3) oraz cząsteczka 1-nitroakrydonu, powstała na drodze całkowitej redukcji grupy nitrowej i odszczepieniu aminoalkilowego łańcucha bocznego (M_6 i M^*_6). Powstanie dwóch metabolitów: z dodatkowym pierścieniem sześciocłonowym oraz 1-nitroakrydonu, jest wynikiem oddziaływania metabolizowanych atomów azotu w pozycji 1 i 9 pierścienia, co wykazały wcześniejsze badania ledakrinu. [Konieczny i Konopa, 1980]. Zaobserwowano w nich, że atom tlenu w pozycji 9 pierścienia 1-nitroakrydonu pochodzi z grupy nitrowej znajdującej się w pozycji 1 pierścienia, a nie z cząsteczki wody. Podobny charakter przemian metabolicznych można zauważyć u azotowych pochodnych gazu musztardowego. Przykładem jest prolek o symbolu PR-104A (metanosulfonian 2-((2-bromoetylo-)-2[(hydroksyetylo)amino]karbonyl]-4,6-dinitroanilino]-etylu), który na drodze redukcji grupy aminowej w pozycji *orto* benzenu, transformuje do produktu z dodatkowym pierścieniem. Redukcja grupy nitrowej w pozycji *para* pochodnej PR-104A prowadzi zaś do powstania hydroksyloaminy oraz całkowicie zredukowanego produktu z grupą aminową [Patterson i wsp., 2007; Helsby i wsp., 2008]. Nieoczekiwanym wynikiem moich badań było pojawienie się metabolitu M_7/M^*_7 , nie obserwowanego wcześniej w enzymatycznych układach bezkomórkowych. Po analizie widma masowego oraz widma UV-Vis zaproponowaną przeze mnie strukturą tego produktu był dimer aza-akrydyny, który powstawał, na skutek sprzęgania dwóch atomów azotu w pozycji 1 pierścienia aromatycznego. Można przypuszczać, że w reakcji tej biorą udział reaktywne formy pośrednie redukcji grupy nitrowej, ponieważ analiza wartości jonu masowego tego produktu wykazała, że sprzężeniu uległy cząsteczki produktu M_1/M^*_1 , charakteryzującego się zredukowaną grupą nitrową do aminowej. Redukcja grupy nitrowej prowadzi do powstawania amin aromatycznych, jako ostatecznych produktów metabolizmu, ale również do zredukowanych produktów pośrednich: nitrozoaminy i hydroksyloaminy. Reakcje takie zachodzą również m.in. podczas redukcji związków przeciwnowotworowych, takich jak pochodne: nitrozoimidazolu czy pyrazoloakrydyny [Raleigh i Liu, 1984; Palomino i wsp., 1996].

W odróżnieniu od związków C-857 i C-1748, pochodna triazoloakrydonu, C-1305, metabolizowała tylko do jednego produktu, którego stężenie tylko nieznacznie zwiększało się wraz z wydłużaniem czasu inkubacji. Analiza obrazów chromatograficznych składu komórkowych ekstraktów metanolowych, widm absorpcyjnych UV-Vis oraz widm masowych pików chromatograficznego uzyskanego metabolitu, pozwoliła zaproponować strukturę produktu C-1305 otrzymanego w komórkach HepG2 jako N-tlenku na terminalnym atomie azotu w łańcuchu bocznym badanego związku. Opierając się na przesłankach literaturowych dotyczących przemian tamoksyfenu [Krueger i wsp., 2006] oraz dodatkowych badaniach: Fedejko-Kap i wsp. określających udział rekombinantowych monooksygenaz flawinowych FMO w metabolizmie C-1305 [Fedejko-Kap i wsp., 2011] oraz Potęgi i wsp. dotyczących

przemian metabolicznych związku C-1311 [Potęga i wsp., 2011], uznałam, że w przemianie enzymatycznej C-1305 do N-tlenku w komórkach HepG2 biorą udział monooksygenazy flawinowe, FMO. Są to enzymy I fazy metabolizmu, pełniące zasadniczą funkcję detoksykacyjną, wykazujące aktywność utleniającą w stosunku do heteroatomów swoich substratów [Cashman, 2005].

Zastosowanie trzech dodatkowych linii komórkowych, HT29, HCT116 oraz A549, dało przekonanie o zróżnicowaniu przemian metabolicznych pochodnych akrydyny w różnych typach nowotworów. Ogólny wniosek był taki, że intensywność przemian związków w tych liniach była niższa niż w komórkach HepG2. Różnice te były szczególnie widoczne w metabolizmie związku najbardziej reaktywnego, C-857, gdzie ilość produktów oraz ich stężenie było wyraźnie niższe w liniach nowotworu jelita grubego oraz płuc w porównaniu do nowotworu wątroby. Za wynik ten może odpowiadać, wykazany powyżej, niższy poziom ekspresji genów izoenzymów P450 biorących udział w przemianach metabolicznych tego związku. Dodatkowym rezultatem przeprowadzonych badań z udziałem różnych linii komórkowych było zaobserwowanie jednego nowego produktu metabolizmu, występującego w wysokim stężeniu w przypadku wszystkich związków, w szczególności C-1305, w linii HT29 oraz w mniejszym, w linii A549. Był to metabolit o zmienionym w stosunku do substratu widmie UV-vis (M_{HT29} , M^*_{HT29} , P_{HT29}). Na podstawie analizy widm MS przyjąłam, że jest on wynikiem sprzężenia cząsteczki akrydyny z resztą kwasu glukuronowego. Podczas reakcji glukuronidacji, kwas glukuronowy, w postaci aktywnej sprzęgany jest z grupą funkcyjną ksenobiotyku, zazwyczaj hydroksylową, karboksylową, aminową bądź tiolową, co prowadzi do utworzenia O-, N- lub S-glukuronidów [Bourcier i wsp., 2010]. Na tej podstawie można wnioskować, że najbardziej prawdopodobne w przypadku C-1748 i C-857 jest sprzężenie z grupą hydroksylową łańcucha bocznego. Dla potwierdzenia, że otrzymany produkt C-1748 i C-857 jest glukuronidem, przeprowadziłam też transformację metaboliczną tych związków wobec enzymów mikrosomalnych w obecności UDPGA, będącego kosubstratem dla enzymów UGT. Otrzymane wyniki wskazały na aktywność zawartych w pęcherzykach mikrosomalnych enzymów UGT w stosunku do obu pochodnych 9-amino-1-nitroakrydyny.

Kontynuując wątek metabolizmu detoksykacyjnego zbadałam możliwość powstawania produktów sprzęgania z UDPGA metabolitów C-1748 i C-857, powstających po inkubacji z mieszaniną enzymów mikrosomalnych. Wykazałam, iż jedynymi zidentyfikowanymi glukuronidami okazały się produkty sprzęgania ze związkami macierzystymi. To daje przesłankę do przypuszczeń, że warunkiem powstania O- glukuronidów pochodnych 9-amino-1-nitroakrydyny, jest konieczność występowania enzymów UGT w komórce, ale również mniej intensywny metabolizm związków, wykluczający szybkie powstawanie reaktywnych metabolitów.

Poszukując odpowiedzi na pytanie, czy wyższa ekspresja genów metabolizujących związek przeciwnowotworowy, przenosi się na wyższą aktywność cytotoksyczną leku, przeprowadziłam badania przemian metabolicznych w komórkach HepG2 transfekowanych wektorem z sekwencją genów izoenzymu CYP3A4. Wykazałam, że przemiany pochodnych C-1748 i C-857 były intensywniejsze w komórkach linii Hep3A4 w porównaniu do linii kontrolnej (HepC34), czego nie stwierdziłam w przypadku związku C-1305. Świadczy to o udziale izoenzymu CYP3A4 w metabolizmie pochodnych 1-nitro i brak jego udziału w przemianach C-1305. Mając powyższe na uwadze, sprawdziłam czy nasilony metabolizm C-1748 i C-857 w linii Hep3A4, ma swoje odbicie w aktywności cytotoksycznej związków wobec tych komórek. Wykazałam, że po 72 godzinnej ekspozycji komórek na związki, nie było istotnych różnic w hamowaniu proliferacji komórek pomiędzy linią Hep3A4, a linią kontrolną. Przypuszczałam, że wynika to z silnej reaktywności produktów, a w konsekwencji z braku różnic pomiędzy liniami w przemianie związków, obserwowanej po długim czasie ekspozycji. Potwierdzeniem był wynik po skróceniu czasu inkubacji komórek ze związkami do 3 godzin. Otrzymałam w tych warunkach pięciokrotny wzrost aktywności cytotoksycznej związków w linii z nadekspresją CYP3A4. Wykazałam więc, zależność hamowania wzrostu komórek nowotworowych od poziomu enzymów metabolizujących potencjalne leki przeciwnowotworowe, C-1748 i C-857. Wskazał na to również fakt, że pochodna C-1305, nie metabolizowana przez CYP3A4, nie przejawiała różnic w aktywności cytotoksycznej wobec linii Hep3A4 i HepC34, niezależnie od czasu inkubacji.

Z uwagi na stwierdzenie redukcyjnego charakteru przemian metabolicznych związków C-1748 i C-857, w kolejnym etapie pracy sprawdziłam czy i w jaki sposób na metabolizm tych związków wpływa ograniczenie dostępu tlenu w prowadzonej hodowli komórek HepG2 traktowanej pochodnymi akrydyny. Istotny kierunek terapii nowotworów uwzględnia bowiem zjawisko hypoksji w guzie nowotworowym. Od wielu lat wiadomo, że obniżone ciśnienie parcjalne tlenu w komórkach nowotworowych prowadzi do oporności na leczenie w wyniku uruchomienia różnych mechanizmów [Tredan i wsp., 2007; Wouters i wsp., 2007; Cosse i Michiels, 2008]. Przykładem takich mechanizmów jest indukcja ekspresji genów oporności wielolekowej (*MDR1*, *MRP1*) odpowiedzialna za oporność komórek HepG2 na 5-fluorouracyl [Comerford i wsp., 2002; Zhu i wsp., 2005], obniżenie ekspresji fosfatazy 2 o podwójnej specyficzności (*DUSP2*) co jak stwierdzono skutkuje opornością komórek HeLa i HCT116 na terapię cisplatyną i paklitaselem [Lin i wsp., 2011] oraz obniżenie utleniających właściwości izoenzymów cytochromu P450 koniecznych do aktywacji niektórych leków przeciwnowotworowych [Legendre i wsp., 2009]. Otrzymane w niniejszej pracy wyniki, dały odmienny obraz skutków hypoksji. Wykazałam, że w warunkach ograniczonego dostępu tlenu, stopień przemiany związków C-1748 i C-857 był wyraźnie wyższy niż w warunkach normalnych. Co więcej, powstające metabolity charakteryzowały się, w odróżnieniu od

warunków tlenowych, wysoką stabilnością. Zidentyfikowałam je jako produkt ze zredukowaną grupą nitrową do aminowej (M_1 i M^*_1), z dodatkowym pierścieniem pomiędzy atomami azotu (M_3 i M^*_3) oraz metabolit ze zredukowaną grupą nitrową i odszczepionym łańcuchem alifatycznym (M_6 i M^*_6). Otrzymane wyniki są na tyle ciekawe, że zaobserwowałam w nich nie tylko wzrost stężenia zredukowanych metabolitów w warunkach hypoksji, ale również wyższą stabilność tych metabolitów, od 24 do 72 godzin. Zwraca to szczególną uwagę ze względu na fakt, że dotyczy też komórek z nadekspresją enzymu Hep3A4, w których mimo osiągnięcia po 3 godzinach inkubacji wyższego stężenia produktów, stężenie to stopniowo spadało do 72 godzin.

Otrzymany wynik wpływu hypoksji na metabolizm tłumaczy obserwowany brak różnic w aktywności cytotoksycznej C-1748 i C-857 wobec linii z normalną i podwyższoną ekspresją *CYP3A4* oraz fakt, że aktywność cytotoksyczna obu związków w hypoksji była istotnie wyższa po 72 godzinach ekspozycji niż w warunkach normalnych. Powyższe wyniki są solidną podstawą do stwierdzenia, że pochodne 9-amino-1-nitroakrydyny mogą być nowym typem związków bioredukcyjnych, których aktywność cytotoksyczna jest regulowana przez naturalne środowisko występujące wewnątrz guza. W normalnie natlenionym środowisku prolek będzie ulegał redukcyjnej aktywacji, po czym warunki utleniające powodują degradację otrzymanych metabolitów. W środowisku niedotlenienia degradacja zredukowanych metabolitów jest powolna i produktem pozostaje aktywowany lek. Taki mechanizm zapewnia selektywność działania w hypoksonicznych warunkach nowotworu litego. Obecnie związki wykazujące wyższą aktywność cytotoksyczną w stosunku do subpopulacji komórek zaadaptowanych do życia w hypoksji, są szeroko poszukiwane [McKeown i wsp., 2007]. Stwierdzona obecność w nowotworze litym komórek ze zmienionym metabolizmem przystosowanym do warunków beztlenowych, stanowi poważny problem kliniczny [Vaupel i Harrison, 2004; Axelson i wsp., 2005]. Przykładem leków aktywnych w hypoksji są mitomycyna C [Kennedy i wsp., 1980], tirazapamina [Rischin i wsp., 2005], AQ4N [Patterson and McKeown, 2000]. Związkiem o podobnym metabolizmie do pochodnych C-1748 i C-857 jest PR-104A, który selektywnie transformuje do produktów ze zredukowaną grupą nitrową (PR-104M) w warunkach hypoksji [Helsby i wsp., 2008], przez co wykazuje wyższą aktywność cytotoksyczną wobec niedotlenionych komórek nowotworowych [Patterson i wsp., 2007; Gu i wsp., 2009].

Uzupełnieniem badań metabolizmu redukcyjnego przeciwnowotworowych pochodnych C-1748 i C-857 stała się próba wyjaśnienia roli w transformacjach metabolicznych NADPH-zależnej reduktazy cytochromu P450 (CPR). W wynikach przedstawionych w rozprawie doktorskiej Wiśniewska [Wiśniewska, 2008] wykazała, że produkty powstające w przemianie związków C-1748 i C-857 z rekombinantową reduktazą cytochromu P450 są identyczne z tymi, które powstawały z enzymami mikrosomalnymi. Fakt

ten oraz to, że warunki hypoksji podnoszą aktywność reduktazy CPR [Rooseboom i wsp., 2004], skłoniły mnie do połączenia czynnika środowiskowego (hypoksji) oraz genetycznego (nadekspresja *CPR*) i zbadania przemian metabolicznych związków C-1748 i C-857 w komórkach HepG2 transfekowanych wektorem plazmidowym z sekwencją *cpr*, w warunkach niedotlenienia. Uzyskane wyniki pokazały, że po 24 godzinnej ekspozycji komórek na badane związki, nastąpiła prawie 100% konwersja pochodnych macierzystych do produktów ze zredukowaną grupą nitrową do aminowej (M_1 i M^*_1). Można sądzić, że CPR pracując samodzielnie, bez udziału cytochromu P450, katalizowała metabolizm redukcyjny badanych związków. Dodatkowo, określenie aktywności cytotoksycznej związków C-1748 i C-857 wobec komórek transfekowanych wektorem *cpr*, wykazało około pięciokrotny wzrost aktywności w warunkach hypoksji, w porównaniu z warunkami tlenowymi. Podsumowując, połączenie warunków niedotlenienia z podwyższoną aktywnością reduktazy CPR, dobitnie dowodzi o selektywnym działaniu C-1748 i C-857 w warunkach redukcyjnych. Prawdopodobnie raz zredukowany związek C-1748 i C-857 w warunkach hypoksji będzie, wykazując względną stabilność, pozostawał w tkankach niedotlenionych i będzie indukował śmierć każdej komórki wchodzącej w cykl podziałowy. Gdy w komórce będzie zbyt duże stężenie metabolitów, mogą się one przemieszczać do sąsiednich komórek wiążąc się do ich DNA. Nazwano to „efektem sąsiedztwa” (ang. *bystander effect*) [Dachs i wsp., 2009].

Znaczącym utrudnieniem w przypadku terapii z udziałem pochodnych 9-amino-1-nitroakrydyny jest sposób ich selektywnego skierowania tylko do komórek wewnątrz guza. Jedną z rozważanych skutecznych strategii może być w tym przypadku wykorzystanie przenośników leków takich jak: liposomy, nanocząsteczki czy przeciwciała. Przenośniki pozwalają na zwiększenie wewnątrzkomórkowego stężenia leków w komórkach nowotworowych oraz na ograniczenie ich toksyczności ogólnej oraz oporności wielolekowej. Interesującym rozwiązaniem jest również bardziej złożony system dostarczania leków, terapia ADEPT (ang. *Antibody Directed Enzyme Prodrug Therapy*) lub GDEPT (ang. *Gene Directed Enzyme Prodrug Therapy*). Ich założeniem jest dostarczanie do komórek nowotworowych odpowiednio przeciwciał lub wektorów, połączonych ze specyficznym enzymem bądź jego sekwencją genową, którego zadaniem jest przekształcanie proleku w jego aktywną postać [Binley i wsp., 2003; Cowen i wsp., 2004]. Transportowany w taki sposób związek C-1748, z sekwencją genów reduktazy cytochromu P450 z regionem promotorowym regulowanym hypoksją, metabolizowałby w wewnętrznych komórkach guza, do aktywnych przeciwnowotworowo produktów, unikając w ten sposób toksycznego działania na komórki zdrowe. Obiecujące wyniki otrzymano dla proleku AQ4N, wprowadzając go do komórek wraz z wektorem z sekwencją genów izoenzymów CYP3A4 i CYP2B6, biorących udział w jego transformacji w warunkach hypoksji [Yakkundi i wsp., 2006].

Analiza przemian metabolicznych pochodnej C-1305, w komórkach HepG2 w warunkach hypoksji oraz w warunkach normalnych, dała odmienny obraz od C-1748 i C-857. Metabolizm C-1305 nie zmieniał się po krótszych czasach inkubacji. Po 24 godzinach, widoczne było nawet zmniejszenie stężenia metabolitu P₁, zidentyfikowanego jako N-tlenek. Wy tłumaczyć to można tym, że N-tlenek C-1305 w warunkach redukcyjnych ulega konwersji do związku macierzystego [Fedejko-Kap i wsp., 2011], podobnie jak N-tlenek tamaksyfenu [Parte i Kupfer, 2005]. Ma to swoje odbicie, w niższej aktywności cytotoksycznej w komórkach niedotlenionych.

W drugiej części pracy podjęłam badania zmierzające do poznania wpływu pochodnych C-1748, C-857 i C-1305 na aktywność katalityczną oraz poziom ekspresji genów, dwóch izoenzymów CYP3A4 i CYP2C9. Biorą one w najwyższym stopniu udział w transformacji ksenobiotyków, a więc potencjalna modulacja poziomu aktywności tych białek będzie miała duży udział w interakcjach lek-lek. Podjęte badania wynikają z konieczności ograniczenia interakcji pomiędzy lekami w późniejszej terapii potencjalnymi chemoterapeutykami. Z drugiej strony uwzględniłam fakt, że aktywność katalityczna i poziom ekspresji genów izoenzymów P450 zależy nie tylko od profilu genetycznego pacjenta, ale również od czynników zewnętrznych, w tym kontaktu z ksenobiotykami [Hewitt, 2007]. W myśl tych przesłanek, w pierwszym etapie określiłam wpływ badanych związków na aktywność katalityczną izoenzymów CYP3A4 i CYP2C9. W celu określenia czy miał on charakter funkcjonalny, wynikający z aktywnego mechanizmu działania leku, a nie był spowodowany efektem cytotoksycznym, eksperymenty prowadziłam przy stężeniach związków niższych bądź równych EC₃₀. Uzyskane przeze mnie wyniki wskazały, że:

- Zarówno związki C-1748 i C-857, jak i C-1305, indukowały aktywność obu izoenzymów, CYP3A4 i CYP2C9.
- Pochodne 9-amino-1-nitroakrydyny wpływały na aktywność enzymatyczną obu białek przy niskich stężeniach, wzrost ich stężenia powodował zahamowanie indukcji.
- Pochodna C-1305 w zależności liniowej od stężenia indukowała aktywność CYP3A4 i CYP2C9.

W ten sposób stwierdziłam udział badanych związków w modulacji aktywności katalitycznej, bardzo ważnych z klinicznego punktu widzenia, izoenzymów cytochromu P450. W kolejnym kroku sprawdziłam, czy modulacja ta zachodzi poprzez zmiany w poziomie ekspresji genów obu izoenzymów. Uzyskane rezultaty wskazały na udział wszystkich trzech pochodnych akrydyny w modulacji poziomu ekspresji CYP3A4 i CYP2C9. Związki C-1748 i C-857 indukowały ekspresję przy niskich stężeniach, pochodna bardziej reaktywna C-857, przy stężeniu 0,001 μM, pochodna C-1748, przy stężeniach 0,001 μM i 0,01 μM. Pod wpływem wyższego stężenia obu związków poziom ekspresji był porównywalny bądź niższy

niż w komórkach kontrolnych. Zauważyłam, że kinetyka zachodzących zmian była szybka i zależna liniowo do 24 godzin. Po 48 godzinach poziom ekspresji *CYP3A4* i *CYP2C9* wrócił do poziomu kontrolnego. Analogiczne rezultaty otrzymałam w badaniu poziomu białka metodą Western blotting. Stwierdziłam, że krótki czas inkubacji ze związkami (szybka kinetyka) wymagany do zaobserwowania istotnych zmian w modulacji poziomu ekspresji genów i poziomu białek oraz stopniowy zanik tej indukcji po wydłużającym się czasie inkubacji sugerują, że na indukcję poziomu i ekspresji *CYP3A4* i *CYP2C9* mają wpływ same związki macierzyste, a nie ich metabolity. Sytuację odwrotną można zaobserwować w przypadku zastosowania induktora ekspresji *CYP3A4*, jakim jest aflatoksyna B1 [Ratajewski i wsp., 2011]. Wykazano bowiem, że kinetyka działania aflatoksyny jest wolniejsza od obserwowanej u rifampicyny, standardowego induktora ekspresji *CYP3A4*, co może sugerować, że to metabolity aflatoksyny B1, a nie sama aflatoksyna B1, są odpowiedzialne za efekt indukcji ekspresji *CYP3A4*. Moje przypuszczenie, że natywne formy związków, a nie ich metabolity, biorą udział w indukcji ekspresji izoenzymów, potwierdziły badania poziomu ekspresji *CYP3A4* i *CYP2C9* w komórkach HepG2, po ekspozycji na związki C-1748 i C-857, w warunkach hypoksji. Okazało się, że niedotlenienie, w których pochodne nitro wykazywały wysoki stopień przemiany, znosiło efekt indukcji ekspresji genów obu izoenzymów. W tym wypadku, warunki hypoksji, również okazały się bardzo atrakcyjne w aspekcie oddziaływań lek-lek.

Nieco innego charakter miał wpływ pochodnej C-1305 na indukcję ekspresji *CYP3A4* i *CYP2C9*. Związek ten okazał się silnym induktorem, prawie trzykrotnie silniejszym od rifampicyny stosowanej w tym samym stężeniu co C-1305 [Li i Chiang, 2006; Wrzał i wsp., 2010; Raynal i wsp., 2010]. Dalsza ocena działania pochodnej C-1305 wykazała, że kinetyka indukcji ekspresji była liniowa, podobna do kinetyki działania rifampicyny. Związek C-1305, w odróżnieniu od C-1748 i C-857, po 48 godzinach nadal przyczyniał się do wzrostu ekspresji obu genów. Analiza porównawcza powyższych rezultatów pozwoliła stwierdzić, że w przeciwieństwie do C-1305, w przypadku C-1748 i C-857 następuje autoindukcja metabolizmu obu związków. Podobny mechanizm zaobserwowano dla ifosfamidu [Kerbusch i wsp., 2001; Harmsen i wsp., 2009]. Związek poprzez indukcję aktywności katalitycznej i ekspresji genów enzymów biorących udział w jego metabolizmie, przyczynia się do wzrostu stopnia przemiany tego związku.

Mając na uwadze wykazane zdolności pochodnych akrydyny do indukcji aktywności katalitycznej oraz poziomu ekspresji genów izoenzymów *CYP3A4* i *CYP2C9*, podjęłam próbę wyjaśnienia, czy zachodzące modulacje wynikają z interakcji badanych związków z receptorem PXR. Receptor ten reguluje bowiem ekspresję wielu genów w tym: *CYP3A4*, *CYP2C9*, *CYP2C19* [Ma, 2008; Mackenzie i wsp., 2010], *UGT1A1*, *GST*, *SULT* [Fang i wsp.,

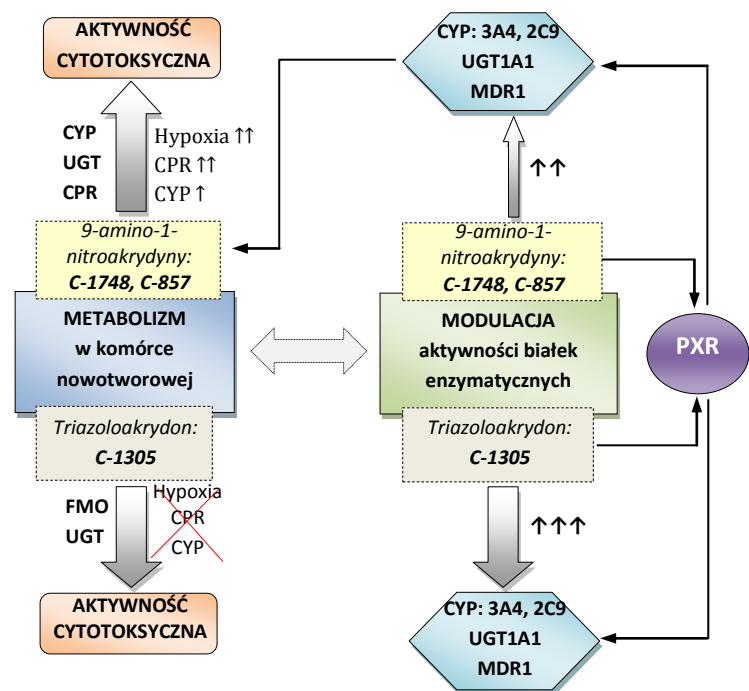
2007, Naspinski i wsp., 2008] oraz *MDR1*, *OATP2* [Frank i wsp., 2005; Cerveny i wsp., 2007]. Badania przeprowadziłam w kilku etapach.

W pierwszym kroku wykazałam udział receptora PXR w indukcji ekspresji genów *CYP3A4* poprzez zastosowanie reporterowej linii, *nhrtox-hepg2*. Jest to stabilnie stransfekowana linia HepG2, wektorem z sekwencją *CYP3A4* ER6 PXRE oraz genem markerowym eukariotycznej lucyferazy. Uzyskane wyniki wskazały, że indukcja poziomu ekspresji genów *CYP3A4* przez trzy badane pochodne, regulowana jest przez PXR. Związki, C-1748 i C-857, powodowały około trzykrotny wzrost poziomu ekspresji *CYP3A4*, podobnie jak rifampicyna. Pochodna C-1305 indukowała aż dziewięciokrotny wzrost ekspresji *CYP3A4*, co dało wynik wyższy od wartości indukcji efektywnego agonisty receptora PXR, jakim jest aflatoksyna B1.

Następnie, po wyciszeniu genów *PXR* przy pomocy siRNA, przekonałam się, że prawie całkowicie została zablokowana indukcja ekspresji *CYP3A4* i *CYP2C9* w przypadku wszystkich trzech pochodnych akrydyny.

Potwierdziłam również udział pochodnych akrydyny w indukcji ekspresji innych genów, regulowanej przez receptor PXR, takich jak: *UGT1A1* i *MDR1*. Co ważne, nie zaobserwowałam różnic w poziomie ekspresji *PXR*.

Wynik ten dodatkowo przekonuje o udziale PXR w wykazanych modulacjach ekspresji genów *CYP3A4*, *CYP2C9*, *UGT1A1* oraz *MDR1*. Dodatkowo wykazałam, że sześciokrotna indukcja ekspresji *MDR1* poprzez pochodną C-1305, skutkowałą szybkim usuwaniem z komórek HepG2 dokсорubicyny, będącej substratem dla białka P-gp. Efekt ten spowodował istotne obniżenie aktywności cytotoksycznej dokсорubicyny wobec HepG2. Wyniki te odnajdują silne poparcie w badaniach zespołów pod kierunkiem Chen [Chen i wsp., 2007; Chen i wsp., 2010] oraz Gupta [Gupta i wsp., 2008], które indukcję aktywności PXR uważają za jeden z głównych powodów występowania oporności na niektóre leki przeciwnowotworowe. Indukcja ekspresji *UGT1A1*, ma również inny istotny aspekt w zakresie farmakokinetyki stosowanych leków przeciwnowotworowych, metabolizowanych przez ten izoenzym. Wykazano bowiem, że irinotekan, którego produktem glukuronidacji jest SN-38, ma wpływ na wzrost ekspresji *UGT1A1* poprzez indukcję aktywności PXR



i przyczynia się w ten sposób do indukcji oporności, wielu linii nowotworowych pochodzących z jelita grubego, na terapię irinotekanem [Raynal i wsp., 2010].

W końcowym etapie określiłam wpływ na indukcję ekspresji *CYP3A4* pochodnych akrydyny w skojarzeniu ze standardowym induktorem PXR, rifampicyną oraz inhibitorem, ketokonazolem, ponieważ poznanie profilu zachodzących modulacji umożliwia tworzenie właściwego schematu łączenia związków C-1748, C-857 i C-1305, z innymi lekami, w potencjalnej terapii wielolekowej. Uzyskane wyniki wskazały, że efekty indukcji i inhibicji nakładały się na siebie, czyli następowało współzawodnictwo ligandów receptora PXR o miejsce wiązania. Jest to kolejna przesłanka do stwierdzenia, że pochodne akrydyny indukują ekspresję genów *CYP3A4* na drodze wiązania się z PXR.

Za najciekawsze wyniki przedstawione w niniejszej rozprawie doktorskiej uważam, po pierwsze scharakteryzowanie selektywnego metabolizmu pochodnych 9-amino-1-nitroakrydyny w warunkach hypoksji, co poszerza wiedzę na temat związków o metabolizmie redukcyjnych, również stosowanych w chemoterapii. Ważnym aspektem było również stwierdzenie braku udziału izoenzymów cytochromu P450 w metabolizmie pochodnej C-1305 w komórkach nowotworowych. Dało to nowe spojrzenie na charakter zmian metabolicznych tego związku oraz jego skuteczności w stosunku do różnych linii nowotworowych.

Kolejnym atrakcyjnym wynikiem było wykazanie nowego, dla pochodnych akrydyny, mechanizmu działania, poprzez modulację aktywności PXR. Uważam, za wysoce cenne otrzymane przez mnie wyniki, które wskazują, że pochodne C-1748, C-857 i C-1305 są silnymi agonistami receptora PXR. Związek C-1305 okazał się efektywniejszym induktorem od rifampicyny, standardowo stosowanej w badaniach. Nowe spojrzenie na indukcję aktywności enzymów metabolizujących przez badane związki pozwoli na uniknięcie interakcji $\text{lek}_{\text{induktor PXR}} - \text{lek}$ przy projektowaniu terapii wielolekowych. Umożliwi właściwe łączenie chemoterapeutyków, aby wykorzystać zdolność pochodnej akrydyny do indukcji PXR, w przypadku leków, których efektywne działanie zależy od poziomu aktywności enzymów regulowanych przez ten receptor. Co więcej, ponieważ aktywność PXR jest związana [z opornością wielolekową, wiedza na temat jego indukcji pozwala na świadome dobieranie terapii dla każdego pacjenta [Chen, 2010].

VII. STRESZCZENIE

Przedmiotem badań przedstawionych w niniejszej pracy były pochodne 9-amino-1-nitroakrydyny, C-1748 i C-857 oraz pochodna triazoloakrydonu, C-1305, zsyntetyzowane w zespole Profesora Jerzego Konopy w Katedrze Technologii Leków i Biochemii.

Dotychczasowe badania nad poznaniem molekularnego mechanizmu przemian metabolicznych obu grup pochodnych, przeprowadzone w układach modelowych, z udziałem czynnika redukcyjnego, ditiotreitolu, DTT oraz enzymów frakcji mikrosomalnej, wykazały znaczące różnice w metabolizmie pomiędzy pochodnymi. W przypadku związku C-1748, jak i stosowanego do celów porównawczych 4-niepodstawionego analogu 1-nitroakrydyny, związku C-857, zaobserwowano kilka produktów metabolizmu o różnej intensywności, natomiast C-1305 transformował tylko do jednego metabolitu. Wykazano również, że pochodna C-1748 jest mniej podatna od innych pochodnych 9-amino-1-nitroakrydyny na przemiany metaboliczne, co pozwoliło przypuszczać, że obniżona reaktywność, jak i podatność na atak nukleofilowy ściśle wiążą się z niższą toksycznością ogólna tego związku. Wobec powyższego szczególnie uzasadnione było kontynuowanie badań przemian metabolicznych pochodnych akrydyny w modelowym układzie ich miejsca działania, komórkach nowotworowych.

Badania będące przedmiotem niniejszej rozprawy doktorskiej zmierzały w dwóch głównych kierunkach. Pierwszym celem było określenie całokształtu przemian metabolicznych, tzn. aktywacji i detoksykacji, jakim związki C-1748, C-857 i C-1305, jako potencjalne leki przeciwnowotworowe będą ulegały w komórkach nowotworowych pacjenta. Podjęte badania wynikały również z coraz szerszych doniesień innych autorów na temat lokalnej ekspresji specyficznych enzymów I i II fazy metabolizmu w komórkach nowotworowych. Drugim celem było poznanie mechanizmu wpływu badanych związków na aktywność katalityczną oraz ekspresję genów wybranych enzymów metabolizujących, z rodziny cytochromu P450. Biorąc pod uwagę fakt, że chemoterapia nowotworów jest zwykle terapią wielolekową, wyniki tych badań miały określić potencjalne interakcje związków z innymi lekami w organizmie przyszłych pacjentów oraz ukierunkować optymalne schematy łączenia pochodnych akrydyny z innymi lekami, w celu osiągnięcia jak najlepszych efektów terapeutycznych w nowoczesnej terapii, ukierunkowanej indywidualnie na pacjenta.

Dla realizacji powyższych celów badawczych stosowałam różne metody i techniki doświadczalne. Poszukując selektywności w metabolizmie badanych pochodnych akrydyny zastosowałam cztery nowotworowe linie komórkowe pochodzenia ludzkiego: HepG2, HT29, HCT116 oraz A549. Metoda obserwacji powstających metabolitów opierała się na analizie

chromatograficznej RP-HPLC, z detekcją absorpcji UV-Vis. W celu określenia struktur chemicznych produktów metabolizmu badanych związków zastosowałam sprzężenie chromatografii cieczowej ze spektrometrem masowym HPLC/ESI-MS. Poszukując odpowiedzi na pytanie, czy wyższa ekspresja genów enzymu CYP3A4, biorącego udział w metabolizmie ok. 50% leków stosowanych klinicznie, przekłada się na intensywniejszy metabolizm pochodnych akrydyny oraz czy ma to wpływ na aktywność cytotoksyczną związków, przeprowadziłam badania przemian metabolicznych C-1748, C-857 i C-1305 w komórkach Hep3A4. Linia ta jest stabilnie transfekowana wektorem plazmidowym z sekwencją genów *CYP3A4*. Dodatkowo, zastosowałam warunki hypoksji, czyli niedotlenienia, w celu określenia zależności przemian metabolicznych badanych pochodnych od zawartości tlenu w środowisku komórek nowotworowych, co odpowiada warunkom transformacji związków w niedotlenionym wnętrzu guza. Dla pełnego obrazu przemian metabolicznych związków C-1748 i C-857 w warunkach redukcyjnych, określiłam również stopień przemiany związków oraz zidentyfikowałam powstające produkty w komórkach HepG2, stransfekowanych przejściowo wektorem plazmidowym z sekwencją genów reduktazy cytochromu P450. W dalszym etapie przeprowadzonych prac, aby określić wpływ pochodnych akrydyny na aktywność katalityczną izoenzymów CYP3A4 i CYP2C9 (metodą luminescencyjną oraz techniką HPLC), zanalizowałam przemianę typowego substratu izoenzymu CYP3A4, testosteronu, w dwóch wariantach: przy braku i w obecności badanych związków. Stwierdzenie indukcji aktywności katalitycznej CYP3A4 i CYP2C9, w wyniku działania pochodnych akrydyny, było wskazaniem do przeprowadzenia badań modulacji przez te związki, poziomu ekspresji genów *CYP3A4* i *CYP2C9*. W tym celu zastosowałam reakcję łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym. Dla poznania roli receptora PXR w zaobserwowanych zmianach w aktywności katalitycznej oraz poziomie ekspresji genów izoenzymów CYP3A4 i CYP2C9 indukowanych przez związki C-1748, C-857 i C-1305, zastosowałam linię reporterową nhrtox-hepg2. Następnie określiłam czy zachodzące zmiany są widoczne po wyciszeniu genów *PXR* przy użyciu siRNA. Uzupełnieniem badań była obserwacja indukowanej przez związki modulacji poziomu ekspresji genów *UGT1A1* i *MDR1*, również regulowanej przez receptor PXR oraz określenie wyniku skojarzenia pochodnych akrydyny z rifampicyną i ketokonazolem, które są odpowiednio standardowym induktorem i inhibitorem aktywności PXR.

Otrzymane wyniki pozwoliły stwierdzić, że wszystkie trzy badane pochodne były metabolizowane w zastosowanych liniach komórek nowotworowych pochodzenia ludzkiego, a ich stopień przemiany metabolicznej był uzależniony od obecności enzymów metabolizujących I i II fazy. Ponadto, wykazałam, że pochodne 9-amino-1-nitroakrydyny, C-1748 i C-857, metabolizowały do czterech głównych produktów: ze zredukowaną grupą

nitrową, z dodatkowym pierścieniem pomiędzy atomami azotu w pozycji 1 i 9 pierścienia akrydyny, ze zredukowaną grupą nitrową i odszczepionym łańcuchem alifatycznym oraz dimeru aza-akrydyny. Najwyższe stężenie metabolitów występowało w linii HepG2. W linii HT29 oraz A549 widoczny był również metabolit II fazy, związek z przyłączoną resztą kwasu glukuronowego, co potwierdziły badania w układzie z enzymami frakcji mikrosomalnej i kofaktorem reakcji glukuronidacji, UDPGA. Badając metabolizm pochodnej C-1305 stwierdziłam, że transformuje ona do N-tlenku na terminalnym atomie azotu w łańcuchu bocznym w liniach HepG2 i HCT116. W linii HT29 powstawał w bardzo wysokim stężeniu glukuronid związku C-1305, który w niższym stężeniu był widoczny również w linii A549.

Następnie wykazałam, że poziom ekspresji genów izoenzymu CYP3A4, biorącego udział w metabolizmie pochodnych C-1748 i C-857, wpływał na wzrost stopnia przemiany obu związków, a nie miał znaczenia w przypadku ekspozycji komórek Hep3A4 na pochodną C-1305. Podwyższona szybkość przemiany, a jednocześnie niestabilność powstających produktów, miały wpływ na podwyższenie aktywności cytotoksycznej pochodnych C-1748 i C-857, ale tylko po krótkim czasie inkubacji. W toku dalszych badań wykazałam, że warunki hypoksji, czyli ograniczonego dostępu tlenu w środowisku, istotnie podwyższały stopień przemiany pochodnych 9-amino-1-nitroakrydyny. Pochodne transformowały do metabolitów ze zredukowaną grupą nitrową. Produkty te występowały w wysokim stężeniu, wpływając na zwiększenie aktywności cytotoksycznej pochodnych nawet po długim czasie inkubacji. Poza tym, połączenie warunków hypoksji oraz podwyższonej ekspresji genów reduktazy cytochromu P450, miało kluczowe znaczenie w przemianach metabolicznych pochodnych C-1748 i C-857. W konsekwencji, cytotoksyczność obu związków w tych warunkach wyraźnie wzrastała.

W toku dalszych badań wykazałam, że wszystkie trzy zastosowane pochodne akrydyny indukowały aktywność katalityczną izoenzymów CYP3A4 i CYP2C9. Pochodne 9-amino-1-nitroakrydyny wpływały na aktywność obu białek przy najniższych stosowanych stężeniach. Wzrost stężenia związku powodował zahamowanie tej indukcji. Pochodna C-1305 indukowała aktywność obu białek w zależności liniowej od stężenia. W kolejnym kroku sprawdziłam, czy modulacja aktywności enzymatycznej zachodzi poprzez zmiany w poziomie ekspresji genów. Uzyskane rezultaty wskazały, że wszystkie trzy pochodne mają wpływ na poziom ekspresji CYP3A4 i CYP2C9, a profil indukowanych zmian był podobny do zmian w aktywności katalitycznej białek. Najsilniejszym induktorem była pochodna C-1305, która indukowała ekspresję genów blisko dziewięciokrotnie, podczas gdy związki C-1748 i C-857 około czterokrotnie. Mając na uwadze uzyskane rezultaty, kontynuując podjęte badania, określiłam udział białka regulatorowego, receptora jądrowego PXR, w zmianach indukowanych przez związki. Receptor ten jest odpowiedzialny za regulację ekspresji genów CYP3A4 i CYP2C9. Uzyskane przeze mnie wyniki z zastosowaniem linii reporterowej

potwierdziły udział PXR w modulacji poziomu ekspresji genu *CYP3A4* przez badane pochodne akrydyny. Dodatkowym uwierzytelnieniem uzyskanego rezultatu był brak różnic w ekspresji genów obu izoenzymów, w wyniku działania pochodnych akrydyny, po wyciszeniu genów *PXR* w komórkach. Co ciekawe, związki posiadały również zdolność zmian w ekspresji genów *UGT1A1* i *MDR1*, co nie zaskoczyło, bo ona również regulowana jest przez receptor PXR. Co ciekawe, żaden z badanych związków nie powodował podwyższenia ekspresji genów *PXR*. Poza tym, zastosowanie rifampicyny, standardowego induktora aktywności PXR oraz ketokonazolu, standardowego inhibitora aktywności PXR, wraz z pochodnymi akrydyny, wskazało na nakładanie się efektów indukcji i inhibicji, co pozwoliło sądzić, że występuje współzawodnictwo, badanych znanych ligandów PXR oraz pochodnych akrydyny o miejsce wiązania z receptorem.

Podsumowując, wyniki badań zrealizowanych w ramach prezentowanej pracy, poszerzyły aktualną wiedzę na temat metabolizmu pochodnych C-1748, C-857 i C-1305, który może zachodzić w organizmie pacjenta. Pozwoliły one uchwycić różnice w szlakach metabolicznych pochodnych akrydyny należących do dwóch różnych grup pochodnych, zależnie od pochodzenia komórek nowotworowych. Uzyskane dane eksperymentalne pozwoliły na sformułowanie następujących wniosków końcowych:

- Przemiany metaboliczne pochodnych 9-amino-1-nitroakrydyny i triazoloakrydonu są odmienne w różnych typach komórek nowotworowych, prowadząc do produktów metabolizmu I fazy w wyniku redukcji pochodnych 9-amino-1-nitroakrydyny i utleniania triazoloakrydonu oraz metabolizmu II fazy – reakcji glukuronidacji obu grup związków. Warunki niedotlenienia i nadekspresji reduktazy mają silny wpływ na zakres tych przemian dla pochodnych 9-amino-1-nitroakrydyny.
- Wszystkie trzy badane pochodne akrydyny są induktorami aktywności receptora PXR, choć przy różnych stężeniach, co wykazano poprzez ich wpływ na indukcję aktywności katalitycznej izoenzymów *CYP3A4* i *CYP2C9*, poziom ekspresji genów *CYP3A4*, *CYP2C9*, *UGT1A1* i *MDR1* oraz brak indukowanych zmian po wyciszeniu genów *PXR*.

Otrzymane wyniki mają istotne znaczenie, gdyż nie tylko scharakteryzowały szlaki przemian metabolicznych, ale wskazały też nowy mechanizm działania związków przeciwnowotworowych z grupy pochodnych akrydyny. Mechanizm ten, polegający na modulacji aktywności czynników transkrypcyjnych, których przedstawicielem jest receptor jądrowy PXR, ujawnił nowe możliwości „projektowania” terapii przeciwnowotworowej.

W aspekcie farmakologicznym, określenie przemian metabolicznych potencjalnych leków przeciwnowotworowych w komórce nowotworowej, stwarza perspektywy dla planowania

skutecznej terapii ukierunkowanej i określania nowych struktur leków o korzystnych właściwościach farmakologicznych. Z drugiej strony, określenie wpływu potencjalnych chemoterapeutyków na aktywność receptora PXR, regulującego ekspresję genów enzymów I i II fazy oraz innych ważnych funkcjonalnie białek, umożliwi opracowanie optymalnej terapii wielolekowej indywidualnej dla każdego pacjenta, pozbawionej niepożądanych oddziaływań lek-lek.

VIII. LITERATURA

Aghi M, Chou TC, Suling K, Breakefield XO, Chiocca EA. (1999) Multimodal cancer treatment mediated by replicating oncolytic virus that delivers the oxazaphosphorine/rat cytochrome P450 2B1 and ganciclovir/herpes simplex virus thymidine kinase gene therapies. *Cancer Research*, 59: 3861- 3865.

Ashok BT, Tadi K, Banerjee D, Konopa J, Iatropoulos M, Tiwari RK. (2006) Pre-clinical toxicology and pathology of 9-(2'-hydroxyethylamino)-4-methyl-1-nitroacridine (C1748), a novel anti-cancer agent in male Beagle dogs. *Life Science*, 79: 1334-1342.

Ashok BT, Tadi K, Garikaputy VP, Chen Y, Huang Q, Banerjee D, Konopa J, Tiwari RK. (2007) Preclinical toxicological examination of putative prostate cancer specific 4-methyl-1-nitroacridine derivative in rodents. *Anti-Cancer Drugs*, 18: 87-94.

Augustin E, Moś-Rompa A, Nowak-Ziatyk D, Konopa J. (2010) Antitumor 1-nitroacridine derivative C-1748, induces apoptosis, necrosis or senescence in human colon carcinoma HCT8 and Ht29 cells. *Biochemical Pharmacology*, 79: 1231-1241.

Augustin E, Moś-Rompa A, Skwarska A, Witkowski JM, Konopa J. (2006) Induction of G2/M phase arrest and apoptosis of human leukemia cells by potent antitumor triazoloacridinone C-1305. *Biochemical Pharmacology*, 72: 1668-1679.

Axelsson H, Fredlund E, Ovenberger M. (2005) Hypoxia-induced dedifferentiation of tumor cells – a mechanism behind heterogeneity and aggressiveness of solid tumors. *Seminars in cell & developmental biology*, 16: 554-563.

Backez WL, Kelley RW. (2003) Organization of multiple cytochrome P450s with NADPH-cytochrome P450 reductase in membranes. *Pharmacology & Therapeutics*, 98: 221-233.

Bain DL, Heneghan AF, Connaghan-Jones KD, Miura MT. (2007) Nuclear receptor structure: implication for function. *Annual Review of Physiology*, 69: 201-220.

Bertliss G, Heidrich J, Svensson K, Åsman M, Jendeberg L, Sydow-Bäckman M, Ohlsson R, Postlind H, Blomquist P, Berkenstam A. (1998) Identification of a human receptor defines a new signaling pathway for CYP3A induction. *Proceeding of the National Academy of Sciences*, 95: 12208-12213.

Bidzińska J, Cimino-Reale G, Zaffaroni N, Składanowski A. (2012) Triazoloacridone C-1305 targets Shelterin-DNA complexes and induced tumor cells growth arrest/apoptosis depending on the type of telomere maintenance mechanism. 33rd EORTC-PAMM Group Winter Meeting, Puerto de la Cruz, Tenerife.

Bijl MJ, van Schaik RH, Lammers LA. (2009) The CYP2D6*4 polymorphisms affects breast cancer survival in tamoxifen users. *Breast Cancer Research*, 118: 125-130.

Binley K, Ashkam Z, Martin L, Spearman H, Day D, Kingsman S, Naylor S. (2003) Hypoxia-mediated tumor targeting. *Gene Therapy*, 10: 540-549.

- Biswas A**, Mani S, Redinbo MR, Krasowski MD, Li H, Ekins S. (2009) Elucidating the 'Jekyll and Hyde' nature of PXR: the case for discovering antagonists or allosteric antagonists. *Pharmaceutical Research*, 26: 1807-1815.
- Blumberg B**, Sabbagh W, Juguilon H, Bolado J, van Mater CM, Ong ES, Evans RM. (1998) SXR, novel steroid and xenobiotic-sensing nuclear receptor. *Genes & Development*, 12: 3195-3205.
- Boccia S**, Sayed-Tabatabaei F, Persiani R. (2007) Polymorphism in metabolic genes, their combination and interaction with tobacco smoke and alcohol consumption and risk of gastric cancer: a case-control study in an Italian population. *BMC Cancer*, 7: 206-213.
- Bolton AE**, Peng B, Hubert M, Krebs-Brown A, Capdeville R, Keller U. (2004) Effect of rifampicin on the pharmacokinetics of imatinib mesylate (Gleevec, STI571) in healthy subjects. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 53: 102-106.
- Bourcier K**, Hyland R, Kempshall S, Jones R, Maximilien J, Irvine N, Jones B. (2010) Investigation into UDP-glucuronosyltransferase (UGT) enzyme kinetics of imidazole- and triazole- containing antifungal drugs in human liver microsomes and recombinant UGT. *Drug Metabolism and Disposition*, 38: 923-929.
- Bratkowska-Seniow B**, Oleszkiewicz L, Kozak E, Krizar T. (1976) Ledacrin in the treatment of colon carcinoma. *Materia Medica Polona* (Eng. Ed.), 8: 323-330.
- Bristow RG**, Hill RP. (2008) Hypoxia, DNA repair and genetic instability. *Nature Reviews*, 8: 180-192.
- Brus R**, Danysz A, Kleinrok Z. (1996) Podstawy farmakologii dla lekarzy, farmaceutów i studentów medycyny. *Wydawnictwo Volumed*, Wrocław, ISBN 83-85564-26-8.
- Cashman JR**. (2005) Some distinctions between flavin-containing and cytochrome P450 monooxygenases. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 338: 599-604.
- Cervený L**, Svecova L, Anzenbacherova E, Vrzal R, Staud F, Dvorak Z, Urlichova J, Anzenbacher P, Pavek P. (2007) Valproic acid induces CYP3A4 and MDR1 gene expression by activation of constitutive androstane receptor and pregnane X receptor pathway. *Drug Metabolism and Disposition*, 35: 1032-1041.
- Chakraborty S**, Kanakasabai S, Bright JJ. (2011) Constitutive androstane receptor agonist CITCO inhibits growth and expansion of brain tumor stem cells. *British Journal of Cancer*, 104: 448-459.
- Chang TK**, Weber GF, Crespi CL, Waxman DJ. (2007) Differential activation of cyclophosphamide and ifosfamide by cytochromes P450 2B and 3A in human liver microsomes. *Cancer Research*, 57: 1946-1954.
- Chen J**, Raymond K. (2006) Roles of rifampicin in drug-drug interactions: underlying molecular mechanisms involving the nuclear pregnane X receptor. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 5: 3.
- Chen L**, Waxman DJ. (2002) Cytochrome P450 gene-directed enzyme prodrug therapy (GDEPT) for cancer. *Current Pharmaceutical Design*, 8: 1405-1416.

- Chen T.** (2010) Overcoming drug resistance by regulating nuclear receptor. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 62: 1257-1264.
- Chen Y, Badithe AT, Garikapaty VPS, Liu X, Szostek A, Wysocka-Skrzela B, Banerjee D, Konopa J, Miller D, Tiwari RT.** (2002) Pre-clinical studies of 1-nitroacridine derivatives: effective anti-tumor agents for prostate cancer. *93rd Annual AACR Meeting*, Washington, USA, abs. no. 390, p.77.
- Chen Y, Tang Y, Wang MT, Zeng S, Nie D.** (2007) Human pregnane X receptor and resistance to chemotherapy in prostate cancer. *Cancer Research*, 67: 10361-10367.
- Cholody WM, Martelli S, Paradziej-Łukowicz J, Konopa J.** (1990) 8-substituted-5-[(aminoalkyl)amino]triazolo[4,5,1-de]acridin-6-ones as a potentials antineoplastic agents. Synthesis and biological activity. *Journal of Medicinal Chemistry*, 33: 2852-56.
- Cholody* WM, Martelli S, Paradziej-Lukowicz J, Konopa J.** (1990) 5-[(Aminoalkyl)amino]imidazo[4,5-de]acridin-6-ones as a novel class of antineoplastic agents. Synthesis and biological activity. *Journal of Medicinal Chemistry*, 33: 49-52.
- Chowbay B, Zhou S, Lee E.** (2005) An interethnic comparison of polymorphisms of the genes encoding drug-metabolizing enzymes and drug transporters. *Drug Metabolism Reviews*, 37: 327-378.
- Cosse JP, Michiels C.** (2008) Tumour hypoxia affects the responsiveness of cancer cells to chemotherapy and promotes cancer progression. *Anticancer Agents in Medicinal Chemistry*, 8: 790-797.
- Cowen RL, Williams KJ, Chinje EC, Jaffar M, Sheppard FCD, Telfer BA, Wind NS, Stratford IJ.** (2004) Hypoxia targeted gene therapy to increase the efficacy of triapazamine as an adjuvant to radiotherapy: reversing tumor radioresistance and effecting cure. *Cancer Research*, 64: 1396-1402.
- Cummings J, Ethell BT, Jardine L, Boyd G, Macpherson JS, Burchell B, Smyth JF, Jodrell DI.** (2003) Glucuronidation as a mechanism of intrinsic drug resistance in human colon cancer. *Cancer Research*, 63: 8443-8450.
- Cuzick J, Forbes JF, Sestak I, Cawthorn S, Hamed H, Holli K, Howell A.** (2007) International Breast Cancer Intervention Study I Investigators Related Articles, Long-term results of tamoxifen prophylaxis for breast cancer – 96 – month follow-up of the randomized IBIS-I trial. *Journal of National Cancer Institute*, 99: 272-282.
- Dachs GU, Hunt MA, Syddall S, Singleton DC, Patterson AV.** (2009) Bystander or no bystander for gene directed enzyme prodrug therapy. *Molecules*, 14: 4517-4545.
- David SR, Lee Ch, Ramji S, Chinje EC, Cowen RL, Williams KJ, Patterson AV, Stratford IJ, Morrow CS, Townsend AJ, Jounaidi Y, Chen CS, Su T, Lu H, Schwartz PS, Waxman DJ.** (2005) Cancer chemotherapy and drug metabolism. *Drug Metabolism and Disposition*, 33: 1083-1096.
- Deininger M, Buchdunger E, Druker BJ.** (2005) The development of imatinib as a therapeutic agent for chronic myeloid leukemia. *Blood*, 105: 2640-2653.

- Detrich** CG, Geier A, Oude Elferink RP. (2003) ABC of oral bioavailability: transporters a gatekeepers in the gut. *Gut*, 52: 1788-1795.
- Dobrek** Ł, Szcześniak P, Thor P, Orszulak-Michalak D. (2008) Aktualne kierunki w poszukiwaniu nowych leków przeciwnowotworowych. *Geriatrics*, 2: 37 – 46.
- Dvorak** Z. (2011) Drug-drug interactions by azole antifungals: Beyond a dogma of CYP3A4 enzyme activity inhibition. *Toxicology Letters*, 202: 129-132.
- El-Rayes** BF, Ali S, Heilbrun LK, Lababidi D, Visscher BD, Philip PA. (2003) Cytochrome p450 and glutathione transferase expression in human breast cancer. *Clinical Cancer Research*, 9: 1705-1709.
- Engels** FK, Ten AJ, Baker SD, Lee CK, Loos WJ, Vulto AG. (2004) Effect of cytochrome P450 3A4 inhibition on the pharmacokinetics of docetaxel. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 75: 448-454.
- Engels** FK, Ten Tije AJ, Baker SD, Lee CK, Loos WJ, Vulto AG, Verweij J, Sparreboom A. (2004) Effect of cytochrome P450 3A4 inhibition on the pharmacokinetics of docetaxel. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 75: 448-454.
- Eswaramoorthy** S, Bonanzo JB, Burley SK, Swaminathan S (2006) Mechanism of action of a flavin-containing monooxygenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 26: 9832 – 9837.
- Fang** HL, Strom SC, Ellis E, Duanmu Z, Fu J, Duniec-Dmuchowski Z, Falany CN, Falany JL, Kocarek TA, Runge-Morris M. (2007) Positive and negative regulation of human hepatic hydroxysteroid sulfotransferase (SULT2A1) gene transcription by rifampicin: roles of hepatocyte nuclear receptor 4alpha and pregnane X receptor. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapy*, 323: 586-598.
- Fazili** LS, Jiang W, Wang L, Felix EA, Khatlani T, Coumoul X, Barouki R, Moothry B. (2010) Persistent induction of cytochrome P4501A1 in human hepatoma cells by 3-methylcholanthrene: Evidence for sustained transcriptional activation of CYP1A1 promoter. *Journal Pharmacology and Experimental Therapy*, 333: 99-109.
- Fedejko-Kap** B, Niemira M, Radomska-Pandya A, Mazerska Z. (2011) Flavin-monooxygenases, FMO1 and FMO3, not cytochrome P450 isoenzymes, contribute to metabolism of antitumor triazoloacridinone, C-1305, in liver microsomes and HepG2 cells. *Xenobiotica*, 41(12): 1044-55.
- Feierman** DE, Melnikov Z, Zhang J. (2002) The paradoxical effect of acetaminophen on CYP3A4 activity and content in transfected HepG2 cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 398: 109-117.
- Feierman** DE, Melnikov Z, Zhang J. (2002) The paradoxical effect of acetaminophen on CYP3A4 activity and content in transfected HepG2 cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 398: 109-117.
- Finnstrom** N, Bjelfman C, Soderstrom TG, Smith G, Egevad I, Norlen BJ, Wolf CR, Rane A. (2001) Detection of cytochrome P450 mRNA transcripts in prostate samples by RT-PCR. *European Journal of Clinical Investigation*, 31: 880-886.

- Fowler** JE, Whitmore WF. (1981) The response of metastatic adenocarcinoma of the prostate to exogenous testosterone. *Journal of Urology*, 126: 372-375.
- Frank** C, Makkonen H, Dunlop TW, Matilainen M, Vaisanen S, Carlberg C. (2005) Identification of pregnane X receptor binding sites in the regulatory regions of genes involved in bile acid homeostasis. *Journal of Molecular Biology*, 346: 505-519.
- Gerbal-Chaoin** S, Daujat M, Pascussi JM, Pichard-Garcia L, Vilarem MJ, Maurel P. (2002) Transcriptional regulation of CYP2C9 gene. Role of glucocorticoid receptor and constitutive androstane receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 277: 209-217.
- Gerber** NC, Silgar SG. (1992) Catalytic mechanism of cytochrome P450: evidence for distal charge relay. *Journal of the American Chemical Society*, 114: 8742-8743.
- Gervasini** G, Garcia-Martin E, Ladero J. (2007) Genetic variability in CYP3A4 and CYP3A5 in primary liver, gastric and colorectal cancer patients. *Cancer*, 7: 118-124.
- Gervasini** G, Garcia-Martin E, Ladero J. (2007) Genetic variability in CYP3A4 and CYP3A5 in primary liver, gastric and colorectal cancer patients. *BMC Cancer*, 7: 118-124.
- Gewirtz** DA. (1999) A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics: andriamycin and daunorubicin. *Biochemical Pharmacology*, 57: 727-741.
- Goetz** MP, Rae JM, Suman VJ. (2005) Pharmacogenetics of tamoxifen biotransformation is associated with clinical outcomes of efficacy and hot flashes. *Journal of Clinical Oncology*, 36: 9312-9318.
- Gomez-Silva** M, Garza-Ocañas L, Waksman N, Rivas V, Piñeyro-Lopez A. (2005) In vitro metabolism and toxicity assessment of toxin T-514 (Peroxisomicine A1) of *Karwinskia humboldtiana* in microsomes and primary cultured hepatocytes. *Toxicology In Vitro*, 19: 47-53.
- Gonzalez** FJ, Tukey RH. (2006) Drug Metabolism: how humans cope with exposure to xenobiotics. *Goodman and Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics*. 11th ed. New York, NY: McGraw-Hill, chap.3.
- Gorlewska** K, Mazerska Z, Sowiński P, Konopa J. (2001) Product of metabolic activation of the antitumor drug ledacrin (Nitracrine) in vitro. *Chemical Research of Toxicology*, 14: 1-10.
- Goth-Goldstein** R, Stampfer MR, Erdmann CA, Russell M. (2000) Interindividual variation in CYP1A1 expression in breast tissue and the role of genetic polymorphism. *Carcinogenesis*, 21: 2119-2122.
- Gregory** PA, Lewinsky RH, Gardner-Stephen DA, Mackenzie PI. (2004) Regulation of UDP-glucuronosyltransferases in gastrointestinal tract. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 199: 354-363.
- Greuet** J, Pichard L, Ourlin JC. (1997) Effect of cell density and epidermal growth factor on the inducible expression of CYP3A and CYP1A genes in human hepatocytes in primary culture. *Hepatology*, 25: 1166-1175.

- Gronemeyer H, Gustafsson JA, Laudet V.** (2004) Principles for modulation of the nuclear receptor superfamily. *Nature Reviews*, 3: 950-964.
- Gu J, Zhong D, Chen X.** (1999) Analysis of O-glucuronide conjugates in urine by elektrospray ion trap mass spectrometry. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 365: 553-558.
- Gu X, Ke S, Liu D, Sheng T, Thomas PE, Rabson AB, Gallo MA, Xie W, Tian Y.** (2006) Role of NF- κ B in regulation of PXR-mediated gene expression: a mechanism for the suppression of cytochrome P450 3A4 by proinflammatory agenst. *The Journal of Biological Chemistry*, 281: 17882-17889.
- Gu Y, Patterson AV, Atwell GJ.** (2009) Roles of DNA repair and reductase activity in the cytotoxicity of the hypoxia-activated dinitrobenzamide mustard PR-104A. *Molecular Cancer Therapy*, 8: 1714-1723.
- Guengerich FP, Turvy CG.** (1991) Comparison of levels of several human microsomal cytochrome P450 enzymes and epoxide hydrolase in normal and disease states using immunochemical analysis of surgical liver samples. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapy*, 256: 1189-1194.
- Guengerich FP.** (2008) Cytochrome P450 and chemical toxicology. *Chemical Research of Toxicology*, 21: 70-83.
- Hankakoski P, Negishi M.** (2000) Regulation of cytochrome P450 (CYP) genes by nuclear receptors. *Biochemical Journal*, 347: 321-337.
- Harmsen S, Meijerman I, Beijnen JH, Schellens JHM.** (2009) Nuclear receptor mediated induction of cytochrome P450 3A4 by anticancer drugs: a key role for the pregnane X receptor. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 64: 35-43.
- Harmsen S, Meijerman I, Febus CL, Mass-Bakker RF, Beijnen JH, Schellens JHM.** (2010) PXR-mediated induction of P-glycoprotein by anticancer drugs in a human colon adenocarcinoma-derived cell line. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 66: 765-771.
- Hayes CL, Spink DC, Spink BC, Cao JQ, Walker NJ, Sutter TR.** (1996) 17 β -estradiol hydroxylation catalyzed by human cytochrome P450 1B1. *Proceedings of the National Academy of Science*, 93: 9776-9781.
- Helsby NA, Goldthorpe MA, Tang MHY, Atwell GJ, Smith EM, Wilson WR, Tingle MD.** (2008) Influence of mustard group structure on pathways of in vitro metabolism of anticancer N-(2-hydroxyethyl)-3,5-dinitrobenzamide 2-mustard prodrug. *Drug Metabolism and Disposition*, 36: 353-360.
- Herman TW.** (2002) Farmakokinetyka. Teoria i praktyka. *Wydawnictwo Lekarskie PZWL*, ISBN: 9788320025781, Warszawa.
- Herman ZS.** (2006) Podstawy farmakologii ogólnej. *Wydawnictwo Lekarskie PZWL*, ISBN: 8320031524, Warszawa.
- Hernandez-Santiago B, Placidi L, Cretton-Scot E, Faraj A, Bridges EG, Bryant ML, Rodriguez-Orengo J, Imbach JL, Gosselin G, Pierra C, Dukhan D, Sommadossi JP.** (2002)

Pharmacology of β -L-Thymidine and β -L-2'-Deozycytidine in HepG2 cells and primary human hepatocytes: relevance to chemotherapeutic efficacy against Hepatitis B Virus. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46: 1728-1733.

Hewitt NJ. (2007) Primary hepatocytes: current understanding of the regulation of metabolic enzymes, transporter proteins and pharmaceutical practice for the use of hepatocytes in metabolism, enzyme induction, transporter clearance and hepatotoxicity studies. *Drug Metabolism Reviews*, 39: 159-234.

Hirose Y, Naito Z, Kato S, Onda M, Sugisaki Y. (2002) Immunohistochemical study of CYP2E1 in hepatocellular carcinoma carcinogenesis: examination with newly prepared anti-human CYP2E1 antibody. *Journal of Nippon Medical School*. 69: 243-251.

Hirth J, Watkins PB, Strawderman M. (2000) The effect of an individual's cytochrome CYP3A4 activity on docetaxel clearance. *Clinical Cancer Research*, 6: 1255-1258.

Hofmanowa J, Soucek K, Neticova J, Kozubik A. (2000) Inhibition of the cytochrome P450 modulates all-trans retinoid acid – induced differentiation and apoptosis of HL-60 cells. *Cancer Detection and Prevention*, 24: 325-342.

Huang H, Wang H, Sinz M, Zoeckler M, Staudinger J, Redinbo MR, Teotico DG, Locker J, Kalpana GV, Mani S. (2006) Inhibition of drug metabolism by blocking the activation of nuclear receptors by ketokonazole. *Oncogene*, 1-11.

Huggins C, Hodges CV. (1941) Studies on prostatic cancer: the effect of castration, of estrogen and of androgen injection on serum phosphatases in metastatic carcinoma of the prostate. *Cancer Research*, 1: 293-297.

Huisman C, Smit EF, Giaccone G, Postmus PE. (2000) Second-line chemotherapy in relapsing or refractory Non-Small-Cell Lung Cancer: a review. *Journal of Clinical Oncology*, 18: 3722-3730.

Ihunnah CA, Jiang M, Xie W. (2011) Nuclear receptor PXR, transcriptional circuits and metabolic relevance. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1812: 956-963.

Ingelman-Sundberg M. (2002) Polymorphism of cytochrome P450 and xenobiotic toxicity. *Toxicology*, 181: 447-452.

Jarząbek K, Wołczyński S. (2003) Rola aromatazy w raku sutka. *Przegląd Menopauzalny*, 5: 12-16.

Jędrzejczak WW. (2003) Poszukiwanie postępu w chemioterapii nowotworów. *Współczesna Onkologia*, 7(1): 6-10.

Johnson DR, Li CW, Chen LY. (2006) Regulation and binding of pregnane X receptor by nuclear receptor corepressor silencing mediator of retinoid and thyroid hormone receptors (SMRT). *Molecular Pharmacology*, 69: 99-108.

Jounaidi Y, Waxman DJ. (2004) Use of replication-conditional adenovirus as a helper system to enhance delivery of P450 prodrug-activation genes for cancer therapy. *Cancer Research*, 64: 292-303.

- Kan O**, Kingsman S, Naylor S. (2002) Cytochrome P450-based cancer gene therapy. Current Status. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 2: 857-868.
- Kanzaki A**, Takebayashi Y, Ren XQ, Miyashita H, Mori S, Akiyama S. (2002) Overcoming multidrug resistance in P-glycoprotein/MDR1 – overexpressing cell lines by ecteinascidin. *Molecular Cancer & Therapy*, 1: 1327-1334.
- Kapucuoglu N**, Coban T, Raunio H, Pelkonen R, Edwards J, Boobis AR, Iscan M. (2003) Immunohistochemical demonstration of the expression of CYP2E1 in human breast tumor and non-tumor tissues. *Cancer Letters*, 196: 153-159.
- Kerbusch T**, Jansen RL, Mathot RA, Huitema AD, Jansen M, van Rijswijk RE. (2001) Modulation of the cytochrome P450-mediated metabolism of ifosfamide by ketokonazole and rifampin. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 70: 132-141.
- Klaassen CD**, Aleksunes LM. (2010) Xenobiotic, bile acid and cholesterol transporters: function and regulation. *Pharmacological Reviews*, 62: 1-96.
- Kliwer SA**, Moore JT, Wade L. (1998) An orphan nuclear activated by pregnanes defines a novel steroid signaling pathway. *Cell*, 92: 73-82.
- Koba M**, Konopa J. (2007) Interactions of antitumor triazoloacridinones with DNA. *Acta Biochimica Polonica*, 54: 297-306.
- Konieczny MT**, Konopa J. (1980) Nucleophilic substitution of hydrogen atom in 1-nitroacridine derivatives. Part II: mechanism of 1-nitro-9-piperidinoacridine reaction with piperidine. Intramolecular transfer of oxygen atom from the nitro to acridine ring. *Polish Journal of Chemistry*, 54: 2233-2237.
- Konopa J**, Pawlak J, Pawlak K. (1983) The mode of action of cytotoxic and antitumor 1-nitroacridines. III. In vivo interstrand crosslinking of DNA of mammalian or bacterial cells by 1-nitroacridines. *Chemico-Biological Interactions*, 43: 175-97.
- Konopa J**, Wysocka-Skrzela B, Szostek A, Tiwari R. (2003) Potent antitumor 4-substituted-1-nitroacridines DNA crosslinking agents. In: *Proc EORTC-NCI-AACR*, p.66.
- Konopa J**. (1990) Interstrand DNA crosslinking in tumor cells by 1-nitroacridines, anthracyclines and aminoanthraquinones. *Pharmacology & Therapeutics* Suppl. 1, 83-94.
- Krueger SK**, Vandyke JE, Williams DE. (2006) The role of flavin-containing monooxygenase (FMO) in the metabolism of tamoxifen and other tertiary amines. *Drug Metabolism Review*, 38: 139 – 147.
- Kushida H**, Fujita K, Suzuki A, Yamada M, Endo T, Nohmi T, Kamataki T. (2000) Metabolic activation of N-alkylnitrosamines in genetically engineered *Salmonella typhimurium* expressing CYP2E1 or CYP2A6 together with human NADPH-cytochrome P450 reductase. *Carcinogenesis*, 21: 1227-1232.
- Ledóchowski A**. (1976) Ledakrin – a new Polish anticancerous medicine 1-nitro-9-(3-dimethylaminopropylamino)-acridine-2HCl-H₂O. *Materia Medica Polona*, 8: 237-251.

Lee AE, Wilson WR. (2000) Hypoxia-dependent retinal toxicity of bioreductive anticancer prodrugs in mice. *British Journal of Cancer*, 83: 1589-1593.

Legendre C, Hori T, Loyer P, Aninat C, Ishida S, Glaise D, Lucas-Clerc C, Boudjema K, Guguen-Guillouzo C, Corlu A, Morel F. (2009) Drug-metabolising enzymes are down-regulated by hypoxia in differentiated human hepatoma HepaRG cells: HIF-1 α involvement in CYP3A4 repression. *European Journal of Cancer*, 45: 2882-2892.

Lemke K, Larsen AK, Składanowski A. (2002) Specific inhibition of the growth-associated alpha isoform of topoisomerase II by novel anticancer triazoloacridone. *European Journal of Cancer*, 38: 45.

Lemke K, Wojciechowski M, Laine W, Baily C, Colson P, Bagiński M, Larsen AK, Składanowski A. (2005) Induction of unique structural changes in guanine-rich DNA regions by the triazoloacridone C-1305, a topoisomerase II inhibitor with antitumor activities. *Nucleic Acides Research*, 33: 6034-47.

Leskelä S, Honrado E, Montero-Conde C, Landa I, Casco'n, Leto'n R, Talavera P, Co'zar JM, Concha A, Robledo M, Rodri'guez-Antona C. (2007) Cytochrome P450 3A5 is highly expressed in normal prostate cells but absent in prostate cancer. *Endocrino – Related Cancer*, 14: 645-654.

Li CW, Dinh GK, Chen JD. (2009) Preferential physical and functional interaction of pregnane X receptor with the SMRTalpha isoform. *Molecular Pharmacology*, 75: 363-373.

Li T, Chiang JYL. (2006) Rifampicin induction of CYP3A4 requires PXR crosstalk with HNF4 α and co-activators, and suppression of SHP gene expression. *Drug Metabolism and Disposition*, 34: 756-764.

Lin SC, Chien CW, Lee JC, Yeh YC, Hsu KF, Lai YY, Tsai SJ. (2011) Suppression of dual-specificity phosphatase-2 by hypoxia increases chemoresistance and malignancy in human cancer cells. *Journal of Clinical Investigation*, 121: 1905-1916.

Lin W, Wu J, Dong H. (2008) Cyclin-dependent kinase 2 negatively regulates human pregnane X receptor-mediated CYP3A4 gene expression in HepG2 liver carcinoma cells. *Journal of Biological Chemistry*, 283: 30650-30657.

Lindley C, Hamilton G, McCune JS, Faucette S, Shord SS, Hawke RL. (2002) The effect of cyclofosphamide with and without dexamethasone on cytochrome P450 3A4 and 2B6 in human hepatocytes. *Drug Metabolism and Disposition*, 30: 814-822.

Livak KJ, Schmittgen TD. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ Ct method. *Methods*, 25: 402-408.

Ma Q. (2008) Xenobiotic-activated receptors: from transcription to drug metabolism to disease. *Chemical Research of Toxicology*, 21: 1651-1671.

Mackenzie PI, Gregory PA, Gardner-Stephen DA, Lewinsky RH, Jorgensen BR, Nishiyama T, Xie W, Radominska-Pandya A. (2003) Regulation of UDP glucuronosyltransferase genes. *Current Drug Metabolism*, 4: 249-257.

- Maglish** JM, Parks DJ, Moore LB, Collins JL, Goodwin B, Billin AN. (2003) Identification of a novel human constitutive androstane receptor (CAR) agonist and its use in the identification of CAR target genes. *Journal of Biological Chemistry*, 278: 17277-17283.
- Masi** A, Marinis E, Ascenzi P, Marino M. (2009) Nuclear receptors CAR and PXR: Molecular, functional and biomedical aspects. *Molecular Aspects of Medicine*, 30: 297-343.
- Masuyama** H, Hiramatsu Y, Kodama J, Kudo T. (2003) Expression and potential roles of pregnane X receptor in endometrial cancer. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 9: 4446-4454.
- Masuyama** H, Nakatsukasa H, Takamoto N, Hiramatsu Y. (2007) Down-regulation of pregnane X receptor contributes to cell growth inhibition and apoptosis by anticancer agents in endometrial cancer cells. *Molecular Pharmacology*, 72: 1045-1053.
- Matic** M, Mahns A, Tsoi M, Corradin A, Polly P, Robertson GR. (2007) Pregnane X receptor: promiscuous regulator of detoxification pathways. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39: 478-483.
- McClelland** RA, Fuller JR, Seaman NE, Rauth AM, Battistella R. (1984) 2-hydroxyaminoimidazoles-unstable intermediates in reduction of 2-nitroimidazoles. *Biochemical Pharmacology*, 33: 303-309.
- Michael** M, Doherty MM. (2005) Tumoral drug metabolism: overview and its implication for cancer therapy. *Journal of Clinical Oncology*, 23: 205-229.
- Michael** M, Doherty MM. (2007) Drug metabolism by tumor: its nature, relevance and therapeutic implications. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 3: 783-803.
- Misaki** K, Matsui S, Matsuda T. (2007) Metabolic enzyme induction by HepG2 cells exposed to oxygenated and nonoxygenated polycyclic aromatic hydrocarbons. *Chemical Research in Toxicology*, 20: 277-283.
- Monostory** K, Pascussi JM. (2008) Regulation of drug – metabolizing human cytochrome P450s. *Acta Chimica Slovenica*, 55: 20-37.
- Moore** LB, Parks DJ, Jones SA, Bledsoe RK, Consler TG, Stimmel JB, Goodwin B, Liddle C, Blanchard SG, Wilson TM, Coolins JL, Kliewer SA. (2000) Orphan nuclear receptors constitutive androstane receptor and pregnane X receptor share xenobiotic and steroid ligands. *The Journal of Biological Chemistry*, 275: 15122-15127.
- Moore** LB, Parks DJ, Jones SA, Bledsoe RK, Consler TG, Stimmel JB. (2000) Orphan nuclear receptors, constitutive androstane receptor and pregnane X receptor share xenobiotic and steroid ligands. *Journal of Biological Chemistry*, 275: 15122-15127.
- Moreau** A, Vilarem MJ. (2008) Xenoreceptors CAR and PXR activation and consequences on lipid metabolism, glucose homeostasis and inflammatory response. *Molecular Pharmacology*, 5: 35-41.
- Munro** AW, Girvan HM, McLean KJ. (2007) Cytochrome P450-redox partner fusion enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1770: 345-359.

- Murray** GI, Taylor MC, McFadyen MCE, McKay JA, Greenlee WF, Burke MD, Melvin WT. (1997) Tumor-specific expression of cytochrome P450 CYP1B1. *Cancer Research*, 57: 3026-3031.
- Nallani** SC, Goodwin B, Buckley AR, Buckley DJ, Desai PB. (2004) Differences in the induction of cytochrome P450 3A by taxane anticancer drugs, docetaxel and paclitaxel, assessed employing primary human hepatocytes. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 54: 219-229.
- Nallani** SC, Goodwin B, Maglich JM, Buckley DJ, Buckley AR, Desai PB. (2003) Induction of cytochrome P450 3A by paclitaxel in mice: pivotal role of the nuclear xenobiotic receptor, pregnane X receptor. *Drug Metabolism and Disposition*, 31: 681-684.
- Narayanan** R, Tiwari P, Inoa D, Ashok BT. (2005) Comparative analysis of mutagenic potency of 1-nitro-acridine derivatives. *Life Science*, 77: 2312-2323.
- Naspinski** C, Gu X, Zhou GD, Mertens-Talcott SU, Donnelly KC, Tian Y. (2008) Pregnane X receptor protects HepG2 cells from BaP-induced DNA damage. *The Journal of Toxicological Sciences*, 104: 67-73.
- Nelson** DR, Koymans L, Kamataki T. (1996) P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession number and nomenclature. *Pharmacogenetics*, 6: 1-42.
- Niitsu** N, Kasukabe T, Yokoyama A, Okabe-Kado J, Yamamoto-Yamaguchi Y, Umeda M, Honma Y. (2000) Anticancer derivative of butyric acid (pivalyloxymethyl butyrate) specifically potentiates the cytotoxicity of doxorubicin and daunorubicin through the suppression of microsomal glycosidic activity. *Molecular Pharmacology*, 58: 27-36.
- Noguera** DR, Freedman DL. (1996) Reduction and acetylation of 2,4-dinitrotoluen by a *Pseudomonas aureginosa* strain. *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 2257-2263.
- O'Brien** MER, Leonard RC, Barrett-Lee PJ. (1999) Docetaxel in the community setting: An analysis of 377 breast cancer patients treated with docetaxel (Tazotere) in the UK. *Annals of Oncology*, 10: 205-210.
- Osawa** Y, Osawa KK, Miyaishi A, Hiquchi M, Tsutou A, Matsumura S, Tabuchi Y, Tsubota N, Takahashi J. (2007) NAT2 and CYP1A2 polymorphisms and lung cancer risk in relation to smoking status. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 8: 103-108.
- Oyama** T, Sugio K, Uramoto H, Kawamoto T, Kagawa N, Nadaf S, Carbone D, Yasumoto K. (2007) Cytochrome P450 expression (CYP) in non-small cell lung cancer. *Frontiers in Bioscience*, 12: 2299-22308.
- Oyama** T, SugioK, Isse T, Matsumoto A, Nose N, Uramoto H, Nozoe T, Morita M, Kagawa N, Osaki T, Muto M, Yasumoto K, Kawamoto T. (2008) Expression of cytochrome P450 in non-small cell lung cancer. *Frontiers in Bioscience*, 13: 5787-5793.
- Palomino** E, Foster B, Kempff M, Corbett T, Wiegand R, Hortwitz J, Baker L. (1996) Identification of tumor activity of a reduction product in murine metabolism of pyrazoloacridine (NSC-366140). *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 38: 453-458.

- Parte P**, Kupfer D. (2005) Oxidation of tamoxifen by human flavin-containing monooxygenase FMO 1 and FMO 3 to tamoxifen-N-oxide and its novel reduction back to tamoxifen by human cytochromes P450 and hemoglobin. *Drug Metabolism and Disposition*, 33: 1446-1452.
- Paterson LH**, McKeown. (2000) AQ4N: a new approach to hypoxia-activated cancer chemotherapy. *British Journal of Cancer*, 83: 1589-1593.
- Patterson AV**, Ferry DM, Edmunds SJ, Gu Y, Singleton RS, Patel K, Pullen SM, Hicks KO, Syddall SP, Atwell GJ, Yang S, Denny WA, Wilson WR. (2007) Mechanism of action and preclinical antitumor activity of the novel hypoxia-activated DNA cross-linking agent PR-104. *Clinical Cancer Research*, 13: 3922.
- Patterson AV**, Saunders MP, Greco O. (2003) Prodrugs in genetic chemoradiotherapy. *Current Pharmaceutical Design*. 9: 2131-2154.
- Patterson LH**, Murray GI. (2002) Tumor cytochrome P450 and drug activation. *Current Pharmaceutical Design*, 8: 1335-1347.
- Pawlak JW**, Konopa J. (1979) In vitro binding of metabolically activated [14C]-ledakrin, or 1-nitro-9-14C-(3'-dimethyl-amino-N-propylamino)acridine, a new antitumor and DNA crosslinking agent, to macromolecules of subcellular fractions isolated from rat liver and HeLa cells. *Biochemical Pharmacology*, 28: 3391-3402.
- Pawlak K**, Pawlak J, Konopa J. (1984) Cytotoxic and antitumor activity of 1-nitroacridines as an aftereffect of their interstrand DNA cross-linking. *Cancer Research*, 44: 4289-96.
- Pawlik TM**, Nakamura H, Mullen JT. (2002) Prodrug bioactivation and oncolysis of diffuse liver metastases by a herpes simplex virus 1 mutant that expresses the CYP2B1 transgene. *Cancer*, 95: 1171-1181.
- Petros WP**, Hopkins PJ, Spruill S, Broadwater G, Vredenburgh JJ, Colvin OM, Peters WP, Jones RB, Hall J, Marks JR. (2005) Associations between drug metabolism genotype, chemotherapy pharmacokinetics, and overall survival in patients with breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 23: 6117-6125.
- Pondugula SR**, Brimerline C, Wu J. (2009) A phosphomimetic mutation at threonine-57 abolishes transactivation activity and alters nuclear localization pattern of human pregnane X receptor. *Drug Metabolism and Disposition*, 37: 719-730.
- Potęga A**, Dąbrowska E, Niemira M, Kot-Wasik A, Ronseaux S, Henderson CJ, Wolf R, Mazerska Z. (2011) The imidazoacridinone antitumor drug, C-1311, is metabolized by flavin monooxygenases but not by cytochrome P450s. *Drug Metabolism and Disposition*, 39: 1423-1432.
- Potęga A**. (2010) Przemiany metaboliczne in vitro przeciwnowotworowej pochodnej imidazoakrydonu, C-1311, i jej wpływ na aktywność wybranych izoenzymów cytochromu P450. *Rozprawa doktorska*, Katedra Technologii Leków i Biochemii, Wydział Chemiczny Politechniki Gdańskiej.
- Ptak A**, Ludewig G, Rak A, Nadolna W, Bochenek M, Gregoraszczyk EL. (2010) Induction of cytochrome P450 1A1 in MCF-7 human breast cancer cells by 4-chlorobiphenyl (PCB3) and

the effect of its hydroxylated metabolites on cellular apoptosis. *Environmental International*, 36: 935-941.

Radzikowki C. (1976) Ledakrin – a new polish antitumor drug. *Materia Medica Polona*, 8: 56-57.

Rahman A, Korzewa KR, Grogan J. (1994) Selective biotransformation of taxol to 6 α -hydroxytaxol by human cytochrome P450 2C8. *Cancer Research*, 54: 5543-5546.

Raleigh JA, Liu SF. (1984) Reductive fragmentation of 2-nitroimidazole, amines and aldehydes. *International Journal of Radiation Oncology*Biology*Physics*, 10: 1337-1340.

Raleigh JA, Liu SF. (1984) Reductive fragmentation of 2-nitroimidazole, amines and aldehydes. *International Journal of Radiation Oncology*, 10: 1337-1340.

Raynal CR, Pascussi JM, Leguelinel G, Breuker C, Kantar J, Lallemand B, Poujol S, Bonnans C, Joubert D, Hollande F, Lumbroso S, Brouillet JP, Evrard A. (2010) Pregnane X receptor (PXR) expression in colorectal cancer cells restricts irinotecan chemosensitivity through enhanced SN-38 glucuronidation. *Molecular Cancer*, 9: 46-58.

Rendic S. (2002) Summary of information on human CYP enzymes: human P450 metabolism data. *Drug Metabolism Reviews*, 34: 83-448.

Riddick DS, Lee C, Ramji S, Chinje EC, Cowen RL, Williams KJ, Patterson AV, Stratford IJ, Morrow CS, Townsend AJ, Jounaidi Y, Chen CS, Su T, Lu H, Schwartz PS, Waxman DJ. (2005) Cancer chemotherapy and drug metabolism. *Drug Metabolism and Disposition*, 33: 1083-1096.

Rischin D, Peters L, Fisher R. (2005) Tirazapamine, cisplatin and radiation versus fluorouracil, cisplatin and radiation in patients with locally advanced head and neck cancer. A randomized phase II trial of the Trans-Tasman Radiation Oncology Group (TROG 98.02). *Journal of Clinical Oncology*, 23: 79-87.

Rodriguez-Antona C, Ingelman-Sundberg M. (2006) Cytochrome P450 pharmacogenetics and cancer. *Oncogene*, 13: 1679-1691.

Ron H, Schaik N. (2008) CYP450 pharmacogenetics for personalized cancer therapy. *Drug Resistance Updates*, 11: 77-98.

Rooseboom M, Commandeur JNM, Vermeulen NPE. (2004) Enzyme-catalyzed activation of anticancer prodrugs. *Pharmacological Reviews*, 56: 53-102.

Ruan XZ, Varghese Z, Powis SH, Moorhead JF. (2005) Nuclear receptors and their coregulators in kidney. *Kidney International*, 68: 2444-2461.

Sabisz M, Węsierska-Gądek J, Składanowski A. (2010) Increased cytotoxicity of an unusual DNA topoisomerase II inhibitor compound C-1305 toward HeLa cells with downregulated PARP-1 activity results from re-activation of the p53 pathway and modulation of mitotic checkpoints. *Biochemical Pharmacology*, 79: 1387-1397.

- Saini** SP, Sonoda J, Xu L, Toma D, Uppal H, Mu Y, Ren S, Moore DD, Evans RM, Xie W. (2004) A novel CAR-mediated and CYP3A-independent pathway of bile acid detoxification. *Molecular Pharmacology*, 65: 292-300.
- Sane** RS, Buckley DJ, Buckley AR, Nallani SC, Desai PB. (2008) Role of human pregnane X receptor in tamoxifen and 4-hydroxytamoxifen – mediated CYP3A4 induction in primary human hepatocytes and LS174T. *Drug Metabolism and Disposition*, 36: 946-954.
- Schinkel** AH, Jonker JW. (2003) Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 55: 3-29.
- Schroth** W, Antoniadou L, Fritz P. (2007) Breast cancer treatment outcome with adjuvant tamoxifen relative to patient CYP2D6 and CYP2C19 genotypes. *Journal of Clinical Oncology*, 33: 5187-5193.
- Schwartz** PS, Chen CS, Waxman DJ. (2002) Enhanced bystander cytotoxicity of P450 gene-directed enzyme prodrug therapy by expression of the antiapoptotic factor p35. *Cancer Research*, 62: 6928-6937.
- Shitara** Y, Horie T, Sugiyama Y. (2006) Transporters as a determinant of drug clearance and tissue distribution. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 27: 425-446.
- Simpson** ER, Mahendroo MS, Means GD. (1994) Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. *Endocrinology Reviews*, 15: 342-355.
- Simpson** ES. (2000) Role of aromatase in sex steroid action. *Journal of Molecular Endocrinology*, 25: 149-156.
- Singh** AP, Pant MC, Ruwali M, Shan PP, Prasad R, Mathur N, Parmar D. (2011) Polymorphism in cytochrome P450 CYP1A2 and their interaction with risk factors in determination risk of squamous cell lung carcinoma in men. *Cancer Biomarkers*, 8: 351-359.
- Sivaraman** L, Leatham MP, Yee J, Wilkens LR, Lau AF, Le Marchand L. (1994) CYP1A1 genetic polymorphisms and in situ colorectal cancer. *Cancer Research*, 54: 3692-3695.
- Składanowski** A, Konopa J. (1994) Interstrand DNA crosslinking induced by anthracyclines in tumor cells. *Biochemical Pharmacology* 47: 2269-2278.
- Solary** E, Bettaieb A, Dubrez-Dalos L, Corcos L. (2003) Mitochondria as a target for inducing death of malignant hematopoietic cells. *Leukemia Lymphoma*, 44: 563-574.
- Spivack** SD, Hurteau GJ, Reilly AA, Aldous KM, Ding X, Kaminsky LS. (2001) CYP1B1 expression in human lung. *Drug Metabolism and Disposition*, 29: 916-922.
- Sporn** MB, Suh N. (2000) Chemoprevention of cancer. *Carcinogenesis*, 21: 525-530.
- Springer** CJ, Niculescu-Duvaz I. (1996) Gene-directed enzyme prodrug therapy (GDEPT): choice of prodrugs. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 22: 351-364.
- Squires** EJ, Sueyoshi T, Negishi M. (2004) Cytoplasmic localization of pregnane X receptor and ligand independent nuclear translocation in mouse liver. *Journal of Biological Chemistry*, 279: 49307-49314.

- Stearns V**, Jahson MD, Rae JM. (2003) Active tamoxifen metabolite plasma concentrations after coadministration of tamoxifen and the selective serotonin reuptake inhibitor paroxetine. *Journal of the National Cancer Institute*, 23: 1758-1764.
- Svecova L**, Vrzal R, Burysek L, Anzebacherova E, Cerveny L, Grim J, Tretnar F, Kunes J, Pour M, Staud F, Anzebacher P. (2008) Azole antimycotics differentially affect rifampicin-induced pregnane X receptor-mediated CYP3A4 gene expression. *Drug Metabolism and Disposition*, 36: 339-348.
- Swales K**, Negishi. (2004) CAR, driving into the future. *Molecular Endocrinology*, 18: 1589-1598.
- Synold TW**, Dussalt I, Forman BM. (2001) The orphan nuclear receptor SXR coordinately regulates drug metabolism and efflux. *Nature Medicine*, 7: 584-590.
- Szałek E**, Smuszkiewicz P, Grześkowiak E. (2007) Farmakokinetyka leków stosowanych w anestezjologii. *Anestezjologia i ratownictwo*, 3: 156-164.
- Szostek A**, Wysocka-Skrzela B, Tiwari RK, Konopa J. (2002) Interstrand crosslinking of DNA in tumor cells by a new group of antitumor 1-nitroacridines. *International Journal of Cancer*, 13: 441.
- Tadi K**, Ashok BT, Chen Y, Banerjee D, Wysocka-Skrzela B, Konopa J. (2007) Preclinical evaluation of 1-nitroacridine derived chemotherapeutic agent that has preferential cytotoxic activity towards prostate cancer. *Cancer Biology & Therapy*, 6: 1632-7.
- Takeshita A**, Taguchi M, Koibuchi N, Ozawa Y. (2002) Putative role of orphan nuclear receptor SXR (steroid and xenobiotic receptor) in the mechanism of CYP3A4 inhibition by xenobiotics. *Journal of Biological Chemistry*, 277: 32453-32458.
- Timsit Y**, Negishi M. (2007) CAR and PXR: The xenobiotic-sensing receptors. *Steroids*, 72: 231-246.
- Trans A**, Jullien V, Alexandre J. (2006) Pharmacokinetics and toxicity of docetaxel: role of CYP3A, MDR1 and GST polymorphism. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 79: 570-580.
- Tredan O**, Galmarini CM, Patel K, Tannock IF. (2007) Drug resistance and the solid tumor microenvironment. *Journal of the National Cancer Institute*, 99: 1441-1454.
- Trottier E**, Belzil A, Stoltz C, Anderson A. (1995) Localization of a phenobarbital-responsive element (PBRE) in the 5'-flanking region of the rat CYP2B2 gene. *Gene*, 156: 263-268.
- Undevia SD**, Gomez-Abuin G. (2005) Pharmacokinetic variability of anticancer drugs. *Nature Reviews Cancer*, 5: 447 – 458.
- Van Calsteren K**, Verbesselt R, Ottevanger N, Halaska M, Heyns L, van Bree R, Bruijn E, Chai D, Delforge M, Noens L, Renard V, Witteveen E, Rob L, Hoon J, Amant F. (2010) Pharmacokinetics of chemotherapy agents in pregnancy: a preclinical and clinical study. *Acta Obstetrica et Gynecologica*, 89: 1338-1345.
- Van Shaik RHN**. (2005) Cancer treatment and pharmacogenetics of cytochrome P450 enzymes. *Investigational New Drugs*, 23: 513-522.

- Vanden Heuvel JP.** (2002) Xenobiotic receptor systems: Introduction and Overview. Cellular and molecular toxicology. The Netherlands: *Elsevier Science*, p. 81-117.
- Vaupel P, Harrison L.** (2004) Tumor hypoxia: causative factors, compensatory mechanisms and cellular response. *Oncologist*, 9: 4-9.
- Venkatesh M, Wang H, Cayer J, Leroux M, Salvail D, Das B, Wrobel JE, Mani S.** (2011) In vivo and in vitro characterization of a first-in-class novel azole analog that targets pregnane X receptor activation. *Molecular Pharmacology*, 80: 124-135.
- Wang LL, Li Y, Zhou SF.** (2009) A bioinformatics approach for the phenotype prediction of nonsynonymous single-nucleotide polymorphism in human cytochrome P450s. *Drug Metabolism and Disposition*, 37: 977-991.
- Wang T, Ma X, Krausz KW, Idle JR, Gonzalez FJ.** (2008) Role of pregnane X receptor in control of all-trans retinoic acid (ATRA) metabolism and its potential contribution to ATRA resistance. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 324: 674-684.
- Wang X, Sykes DB, Miller DS.** (2010) Constitutive androstane receptor-mediated up-regulation of ATP-driven xenobiotic efflux transporters at the blood-brain barrier. *Molecular Pharmacology*, 78: 376-383.
- Wang YJ, Yo CF, Chen LC, Chen CH, Lin JK.** (2002) Ketokonazole potentiates terfenadine – induced apoptosis in human HepG2 cells through inhibition of cytochrome P450 3A4 activity. *Journal of Cellular Biochemistry*, 87: 147-159.
- Ware WR.** (2009) P450 CYP1B1 mediated fluorescent tumor markers: a potentially useful approach for photodynamic therapy, diagnosis and establishing surgical margins. *Medical Hypotheses*, 72: 67-70.
- Wei P, Zhang J, Egan-Hafley M, Liang S, Moore DD.** (2000) The orphan receptor CAR mediates specific xenobiotic induction of drug metabolism. *Nature*, 407: 920-923.
- Węsierska-Gądek J, Schloffer D, Gueorguieva M, Uhl M, Składanowski A.** (2004) Increased susceptibility of PARP-1 KO cells to antitumor triazoloacridone C-1305 is associated with permanent G2 cell cycle arrest. *Cancer Research*, 64: 4487-4497.
- Williams SN, Dunham E, Bradfield CA.** (2005) Cytochrome P450: structure, mechanism and biochemistry. New York, USA; *Kluwer Academic Publisher*, p. 323-346.
- Wilkinso GR.** (2005) Drug metabolism and variability among patients in drug response. *The New England Journal of Medicine*, 2211-2221.
- Wiśniewska A, Niemira M, Jagiełło K, Potęga A, Świst M, Henderson C, Skwarska A, Augustin E, Konopa J, Mazerska Z.** (2012) Diminished toxicity of C-1748, 4-methyl 9-hydroxyethylamino-1-nitroacridine, compared with its demethyl analog, C-857, in HepG2 cells, correspond to its resistance to metabolism. *Biochemical Pharmacology*, 4:
- Wiśniewska A.** (2008) Metaboliczna transformacja in vitro przeciwnowotworowych pochodnych 9-amino-1-nitroakrydyny w aspekcie ich działania przeciwnowotworowego i toksyczności ogólnej. *Rozprawa doktorska*, Katedra Technologii Leków i Biochemii, Wydział Chemiczny Politechniki Gdańskiej.

- Wojciechowska U, Didkowska J, Zatoński W.** (2010) Nowotwory złośliwe w Polsce w 2008 roku. *Centrum Onkologii – Instytut, Warszawa.*
- Wouters A, Pauwels B, Lardon F, Vermorken JB.** (2007) Reviews: implications of in vitro research on the effect of radiotherapy and chemotherapy under hypoxic conditions. *Oncologist*, 12: 690-712.
- Wu D, Cederbaum AI.** (2008) Development and properties of HepG2 cells that constitutively express CYP2E1. *Methods in Molecular Biology*, 447: 137-150.
- Wu D, Wang Z, Zhou R, Cederbaum A.** (2010) CYP2E1 enhances ethanol-induced lipid accumulation but impairs autophagy in HepG2 E47 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 402: 116-122.
- Xia J, Kemper B.** (2005) Structural determinants of constitutive androstane receptor required for its glucocorticoid receptor interacting protein-1-mediated nuclear accumulation. *Journal of Biological Chemistry*, 280: 7285-7293.
- Xie W.** (2000) Humanized xenobiotic response in mice expressing nuclear receptor SXR. *Nature*, 406: 435-439.
- Xu Ch, Wang X, Staudinger JL.** (2009) Regulation of tissue-specific carboxylesterase expression by pregnane X receptor and constitutive androstane receptor. *Drug Metabolism and Disposition*, 37: 1539-1547.
- Xu L, Glass CK, Rosenfeld MG.** (1999) Coactivator and corepressor complex in nuclear receptor function. *Current Opinion in Genetic and Development*, 9: 147-149.
- Yakkundi A, McErlane V, Murray M, McCarthy HO, Ward C, Huges CM, Patterson LH, Hirst DG, McKeown SR, Robson T.** (2006) Tumor-selective drug activation: a GDEPT approach utilizing cytochrome P450 1A1 and AQ4N. *Cancer Gene Therapy*, 13: 598-605.
- Yasuda K, Ranade A, Venkataramanan R, Strom C, Chupka J, Ekins S, Schuetz E, Bachmann K.** (2008) A comprehensive in vitro and in silico analysis of antibiotics that activate pregnane X receptor and induce CYP3A4 in liver and intestine. *Drug Metabolism and Disposition*, 36: 1689-1697.
- Yo A, Kneller BM, Rettie AE, Haining RL.** (2002) Expression, purification, biochemical characterization and comparative function of human cytochrome P450 2D6*1, 2D6*2, 2D6*10, 2D6*17 allelic isoforms. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 303: 1291-1300.
- Yokose T, Doy M, Taniguchi T, Shimada T, Kakiki M, Horie T, Matsuzuki Y, Mukai K.** (1999) Immunohistochemical study of cytochrome P450 2C and 3A in human non-neoplastic and neoplastic tissues. *Virchows Archiv*, 434: 401-411.
- Zelunka EJ.** (2002) Intravenous cyclosporine-rifampin interaction in a pediatric bone marrow transplant recipient. *Pharmacotherapy*, 22: 387-390.
- Zhong H, Bowen JP.** (2006) Antiangiogenesis drug design: Multiple pathway targeting tumor vasculature. *Current Medical Chemistry*, 13: 849 – 62.

Zhou D, Yi L, Steiner SM, Dalton JT. (2000) Cytochrome P450 2C9 sensitizes human prostate tumor cells to cyclophosphamide via a bystander effect. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44: 2659-2663.

Zhu H, Chen XP, Luo SF, Guan J, Zhang WG, Zhang BX. (2005) Involvement of hypoxia-inducible factor-1-alpha in multidrug resistance induced by hypoxia in HepG2 cells. *Journal of Experimental Clinical Cancer Resistance*, 24: 565-574.