

CYTOTOXICKÁ AKTIVITA BOHEMINU IN VITRO NA PRIMÁRNÍCH NÁDOROVÝCH BUŇKÁCH

Libuše Stýskalová¹, Karel Cwierka², Věra Nosková¹, Anna Janošťáková¹, Lenka Radová¹,
Vladimír Mihál³, Marián Hajdúch^{1,3}

¹Laboratoř experimentální medicíny, Dětská klinika LF UP a FN, Olomouc

²Onkologická klinika LF UP a FN Olomouc

³Dětská klinika LF UP a FN Olomouc

Úvod: Komplexy cyklin-dependentních kináz (CDK) s cyklinem spouští různá stadia buněčného cyklu eukaryotické buňky tím, že fosforylují specifické cílové proteiny. Syntetické inhibitory cyklin-dependentních kináz (CDKI) jako je olomoucín (OC), bohemín (BOH), R-roscovitín (ROSC, seliciclib, CYC202) atd., jsou typickými představiteli léčiv, které můžeme využít ke kontrole buněčné proliferace a ke klinické léčbě nádorů.

Účel studie: Záměrem studie bylo stanovit cytotoxickou aktivitu syntetického CDKI bohemínu na lidských primárních nádorových buňkách a porovnat ji s klasickými protinádorovými léčivy.

Metody: Nádorové buňky byly získány gradientovou centrifugací po mechanickém rozmělnění vzorku tumoru a natrávení enzymy. Nádorová populace byla inkubována se vzestupnou koncentrací BOH a tradičních protinádorových léčiv s cílem zjistit koncentraci cytostatika, jež usmrtí 50 % nádorové populace (TCS_{50}). Hodnoty TCS_{50} byly vzájemně korelovány pro zjištění podobnosti/rozdílů v mechanismu účinku a/nebo lékové rezistence.

Výsledky: V průběhu studie bylo úspěšně vyšetřeno 112 nádorů různého histogenetického původu. Naše studie naznačuje tendenci vyšší senzitivity maligních ve srovnání s benigními tumory ($20.94/51.57 \mu M$, $p = 0.162$). Hodnota mediánu TCS_{50} pro BOH u hematologických/solidních nádorů ($16.7/23.05 \mu M$) poukazuje na vyšší senzitivitu hematologických malignit ($p = 0.0159$).

Závěr: Pouze 20 pacientů se ukázalo rezistentních vůči BOH ve srovnání s tradičními protinádorovými léčivy. Porovnání mechanismu účinku/rezistence s ostatními cytostatiky prokázalo: 1. asociaci in vitro účinnosti BOH s účinností antimetabolitů pravděpodobně v důsledku společného mechanismu rezistence s ohledem na jejich strukturální podobnost, 2. korelaci efektivity BOH s látkami vyvolávající DNA poškození (topotekan, cisplatina, daunorubicin, mitoxantron) a/nebo inhibitory RNA transkripce (aktinomycin D), která zjevně souvisí s inhibicí DNA reparace a aktivací fosforylace RNA polymerázy II cyklin-dependentními kinázami 7 a 9, které jsou BOH přímo inhibovány.

Klíčová slova: syntetické inhibitory cyklin-dependentních kináz, bohemín, lidské primární nádorové buňky.

BOHEMINE IN VITRO CYTOTOXIC ACTIVITY IN PRIMARY TUMOUR CELLS

Background: Cyclin dependent kinases complexed with cyclins trigger eukaryotic cell cycle proliferation by phosphorylation of specific target protein. Synthetic inhibitors of cyclin dependent kinases (CDKIs) as olomoucine (OC), bohemine (BOH), R-roscovitine (ROSC, seliciclib, CYC202) etc., are typical representatives of drugs, which can be used for control of cellular proliferation and clinical treatment of tumours.

Aim: The purpose of this study was to assess the cytotoxic activity of the synthetic CDKI, bohemine, on human primary tumour cells and compare its potency with classic anti-cancer drugs.

Methods: Malignant cells were isolated, after mechanical and enzymatic digestion of tumour tissues, by gradient centrifugation. The cells were then incubated with ascendant concentrations of BOH or classical anti-cancer drugs in order to determine the concentrations lethal to 50 % of tumour cells (TCS_{50}). TCS_{50} values were then mutually correlated in order to determine similarities/dissimilarities in the mechanism of action and/or drug resistance.

Results: In the course of study we have successfully analyzed 112 primary tumour samples for drug sensitivity to BOH. Our study showed a tendency for a higher sensitivity of the malignant versus the benignant tumours ($20.94/51.57 \mu M$, $p = 0.162$). The median value of BOH TCS_{50} in haematological/solid tumours ($16.7/23.05 \mu M$) indicates higher sensitivity of haematological malignancies ($p = 0.0159$).

Conclusion: There were only 20 BOH resistant patients compared to the resistance of classical anti-cancer drugs. Comparison of mechanism of action/resistance with other anti-cancer drugs revealed: 1. an association of BOH activity with antimetabolites, probably signifying common mechanisms of resistance due to their structural similarity, 2. a correlation of efficiency of BOH with drugs targeting RNA transcription (actinomycin D) and/or compounds causing DNA damage (topotecan, cisplatin, daunorubicin, mitoxantrone), which is evidently connected with BOH mediated inhibition of DNA repair and/or activating fosforylation of RNA polymerase II mediated by CDK7 and CDK9.

Key words: synthetic inhibitors of cyclin dependent kinases, bohemine, primary human tumour cells.

Klin Farmakol Farm 2006; 20: 197–201

Úvod

Podle poznatků z posledních let odpovídají za regulaci buněčného cyklu a za organizované přechody z jedné jeho fáze do druhé speciální proteinové komplexy složené minimálně ze dvou druhů podjednotek: cyklinů a cyklin-dependentních kináz

(1). Somatické buňky postupně procházejí při své reprodukci čtyřmi fázemi: obdobím syntézy DNA, tj. S-fází, obdobím buněčného dělení, tj. M-fází, různě dlouhým mezidobím mezi fází M a S, tj. G_1 -fází a mezidobím mezi fází S a M, tj. G_2 -fází. V G_1 -fázi buněčného cyklu působí především cykliny D tvořící

funkční komplexy s CDK4 a CDK6 a dále cyklin C interagující s CDK8. Na stimulaci přechodu G_1/S buněčného cyklu se rovněž podílí cyklin E ve spojení s CDK2. Průběh S-fáze je pak kontrolován cyklinem A, vytvářejícím komplex s CDK2, která je uvolněna ze vzájemné interakce s cyklinem E po G_1/S pře-

chodu. Mezi mitotické cykliny patří především cykliny A a B působící v komplexu s CDK1 (poznámka: starší označení cdc2). Takto vytvořené komplexy se podílejí na fosforylaci celé řady proteinů nezbytných pro G_2/M přechod včetně strukturních proteinů potřebných k výstavbě mitotického aparátu (2, 3).

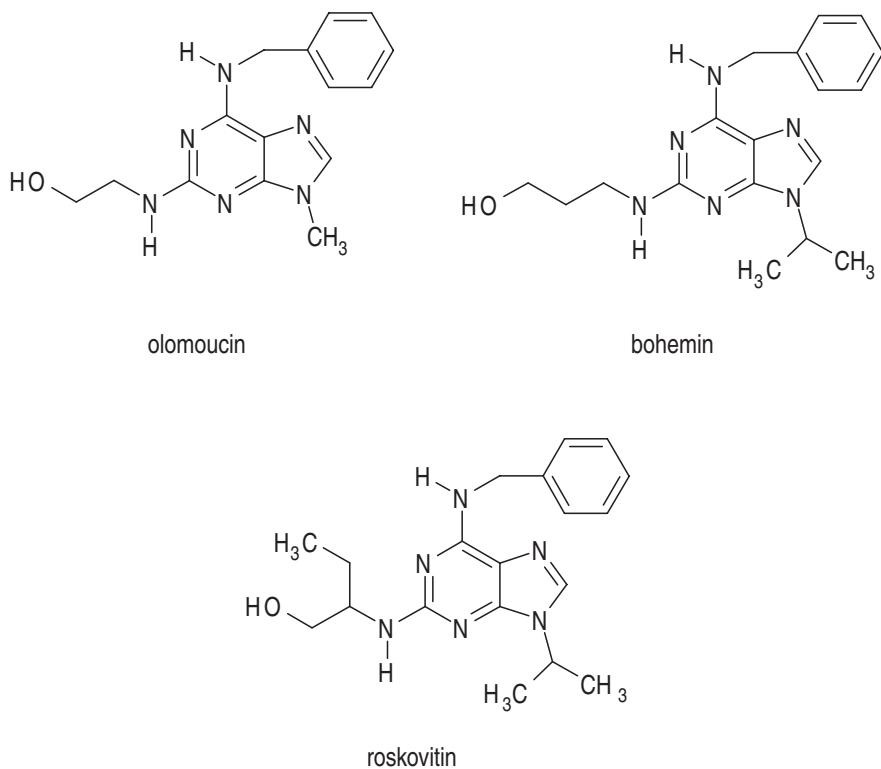
Na regulaci CDK se významně podílí skupina proteinů nazývaných jako inhibitory CDK (zkratka CDKI), které mají schopnost inaktivovat cyklin/CDK komplexy a navodit zastavení buněčného cyklu v G_1/S nebo G_2/M kontrolním bodě. Tyto CDKI hrají klíčovou úlohu nejen v regulaci buněčného cyklu, ale i v mnoha dalších procesech v buňce, jako je diferenciace, stárnutí nebo apoptóza. Většina lidských nádorů má inaktivované některé z přirozených CDKI a díky tomu mají vysokou CDK aktivitu, zvýšenou proliferaci a sníženou proapoptotickou aktivitu. Inhibitory jsou rozdělovány do dvou skupin podle jejich aminokyselinové sekvence a biochemických mechanismů účinku: do první, tzv. INK4 rodiny CDKI jsou zařazovány proteiny p16^{Ink4a}, p15^{Ink4b}, p18^{Ink4c} a p19^{Ink4d}, do druhé, tzv. Cip/Kip rodiny CDKI patří protein p21^{WAF1/CIP1} a s ním příbuzné proteiny p27^{Kip1} a p57^{Kip2} (2, 4).

Mezi adeninovými deriváty cytokininů byla objevena látka 6-(benzylamino)-2-[(2-hydroxyethyl)amino]-9-methylpurin, u které se prokázala specifická inhibice některých cyklin-dependentních kináz v mikromolární koncentraci. Tato sloučenina byla pojmenována olomoucín (OC). Pouze 5 z 35 testovaných protein kináz bylo signifikantně inhibováno OC, konkrétně se jedná o CDK2/cyklin A, CDK2/cyklin E, CDK1/cyklin B, CDK5 a MAP kinázu. Je zajímavou skutečností, že strukturálně méně podobné CDK4 a CDK6 kinázy v komplexu cyklinů D nejsou OC inhibovány (6, 7).

Bylo prokázáno, že OC in vitro inhibuje M-fázový komplex, interfázni DNA syntézu vajíček *Xenopus* a přechod G_2/M u vaječných zárodečných buněk hvězdice (6, 13). V souladu s inhibičním efektem na interfázni a mitotické kinázy, OC zastavuje buněčný cyklus jak na G_1/S tak G_2/M rozhraní a spouští apoptózu v nádorových buňkách (6, 13, 15, 18). Na druhé straně, OC inhibuje apoptózu v diferencovaných nervových buňkách po odstranění nervového růstového faktoru a naznačuje tak rozdílnou aktivitu na diferencované verus maligní tkáni (16). Ačkoliv je OC relativně slabý CDK inhibitor, byla prokázána dostatečná účinnost tohoto léčiva na indukci apoptózy (8, 12, 14) a dále regresi tumoru po jeho in vivo aplikaci v případě spontánního maligního melanomu psa (12).

Naprostý nedostatek inhibičního efektu OC na hlavní buněčné kinázy jako je cAMP- a cGMP- dependentní kináza, protein kináza C atd. naznačuje, že OC může být užitečným nástrojem pro studium buněčného cyklu (6). Struktura a inhibiční aktivita

Obrázek 1. Chemická struktura syntetických inhibitorů CDK: olomoucínu, boheminu a roskovitinu



OC byla dále zdokonalena modifikací substituentů v poloze 2,6 a 9, které kontrolují vazbu k CDKs. To vedlo k objevu nových specifických CDK inhibitorů, např. bohemin (BOH), 2-(3-hydroxypropylamino)-6-benzylamino-9-isopropylpurin a roskovitín (ROSC), 2-(R)-(1-ethyl-2-hydroxyethylamino)-6-benzylamino-9-isopropylpurine (CYC 202, seliciclib) (obrázek 1) (5, 6).

U boheminu se prokázala silná cytotoxicita k mnoha nádorovým buněčným liniím in vitro a rovněž byl účinný za in vivo podmínek. Ačkoli toto léčivo nebylo úspěšné in vitro ve snížení CDK4 aktivity, CDK4 byla inhibována za in vivo podmínek prostřednictvím přímé blokády CDK7 (20). CDK7 totiž zajišťuje na CDKs aktivační fosforylaci na T160/161 (9). Jelikož CDK7 a CDK9 jsou kinázy aktivující RNA transkripci přes fosforylaci COOH-konce RNA-polymerázy II, lze očekávat účinnost CDK inhibitorů na nádorech preferenčně vnímavých k inhibici RNA-syntézy.

Cílem této studie byla analýza in vitro sensitivity BOH na primárních nádorových buňkách a to ve vztahu k (ne)účinnosti standardních protinádorových léčiv.

Metodická část

Primární nádory

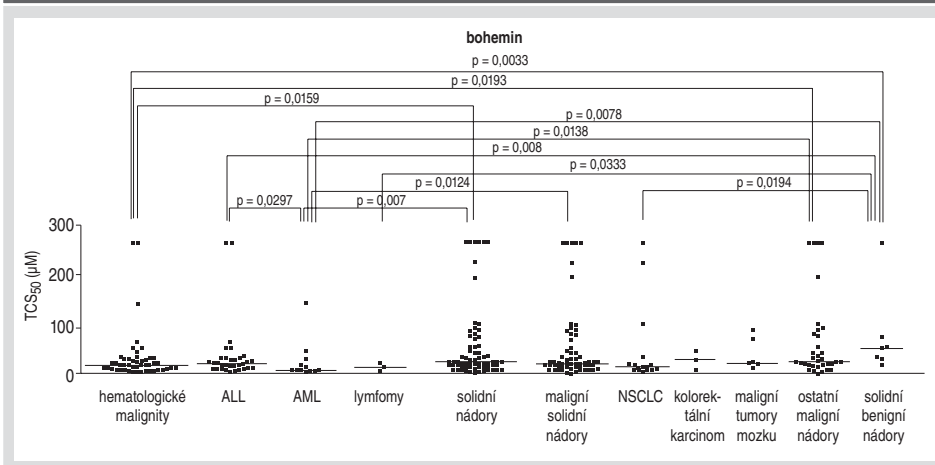
Vzorky resekovaných primárních nádorů byly získány od pacientů během obvyklých chirurgických zákroků na základě informovaného souhlasu. Po jejich odebrání byly okamžitě umístěny do transport-

ního média (RPMI-1640, 2 mM glutamin, 100 µg/ml streptomycin, 20 U/ml heparin, 15% fetální telecí sérum a hydrogenuhličitan sodný). Takto zabezpečený vzorek byl doručen do laboratoře během 8 hodin od operace.

Primární nádorové buňky byly vyizolovány z tkáně za použití mechanické i enzymatické disociace. Nádory byly rozmělněny na malé kousky (přibližně 1–2 mm) a protlačeny přes 0,5 mm sítko. Suspenze nádorových agregátů byla vystavena enzymatickému štěpení kolagenázou (20 U/ml) a DNA-ázou I (10 U/ml) při 37 °C až do uvolnění nádorových buněk. Vitální nádorové buňky byly izolovány pomocí hustotní centrifugace na sterilním Ficoll-Metrizoátovém gradientu (hustota 1,077 g/ml; Pharmacia, Švédsko) a následně dvakrát promyty v RPMI-1640 s 2 mM glutaminem, hydrogenuhličitanem sodným, penicilínem (100 U/ml) a streptomycinem (100 µg/ml). Pokud není uvedeno jinak, všechny chemikálie byly získány z Sigma-Aldrich Co. (Praha, Česká republika).

Cytotoxický MTT test

Pro stanovení senzitivity nádorových buněk na protinádorová léčiva in vitro byl použit třídenní MTT test. Nádorové buňky byly suspendovány v kultivačním médiu (RPMI-1640, 2 mM glutamin, hydrogenuhličitan sodný, penicilín (100 U/ml), streptomycin (100 µg/ml), 15% fetální telecí sérum (Biocom, s. r. o., Česká republika), 5 µg/ml inzulin, 5 µg/ml transferin) na výslednou koncentraci $0,5\text{--}0,8 \times 10^6$ buněk/ml. Alikvotní část (80 µl) buněčné suspenze byla přidána

Obrázek 2. Protinádorová účinnost boheminu na rozdílných typech nádorových onemocnění – statistické srovnání mediánových hodnot

do 96jamkového mikrokultivačního panelu ke 20 µl roztoku léčiva. Protinádorová léčiva byla získána z lékárny, bohemin byl syntetizován z 2,6-dichlorpurinu, jak bylo popsáno dříve (5). Každé vyšetřované protinádorové léčivo bylo zředěno do 6 koncentrací vždy v dubletu. V kontrolních jamkách byly kultivovány nádorové buňky bez přítomnosti léčiva. Panely byly ponechány v termostatu při 37 °C po dobu 3 dnů. Na závěr třídní kultivace bylo do každé jamky napipetováno 10 µl roztoku MTT (5 mg/ml) a panely byly inkubovány dalších 6 hodin. Živé buňky redukovaly žlutou tetrazóliovou sůl MTT na tmavě modré krystaly formazánu. Krystaly byly rozpuštěny 100 µl 10% dodecyl sulfátem sodným (SDS; pH=5,0) při 37 °C během 12 hodin. Optická hustota se měřila při 540 nm za pomoci fotometru iEMS Reader MF (LabSystem, UK). Přežití nádorových buněk (tumor cell survival, TCS) bylo vypočteno podle vzorce: $TCS = (OD \text{ jamek s léčivem} / \text{průměrná OD kontrolních jamek}) \times 100 \%$. Hodnota TCS_{50} je koncentrace léčiva, která smrtí 50% nádorové populace, byla spočítána z křivek dávkové závislosti.

Statistická analýza

Ke statistickému vyhodnocení byly použity Mann-Whitneyho test a Pearsonova korelační ana-

lýza. Mann-Whitneyho testem byla ověřována přednostní senzitivita nádorů různého histogenetického původu k boheminu. Pearsonovou korelační analýzou (Statistica, verze 7.0, StatSoft CR, Praha, Česká republika) byla provedena korelační analýza aktivity boheminu a dalších 23 standardních protinádorových léčiv in vitro.

Výsledky

Vzorky primárních tumorů byly vyšetřeny na vnímavost k BOH a dalším cytostatikům dle odpovídající diagnózy. V průběhu studie bylo úspěšně vyšetřeno 112 nádorových vzorků rozdílných histopatologických diagnóz. Vzorky lidských nádorů, získaných od žijících pacientů byly rozděleny na solidní tumory maligní nebo benigní (65 solidních tumorů, 58%) a dále na hematologické malignity (47 nádorových vzorků, 42%). Hematologické malignity zahrnovaly akutní lymfoblastickou leukémii (ALL – dospělá i dětská) s počtem 32 vzorků (28,6%), dále akutní myeloidní leukémii (AML – dospělá i dětská) s počtem 12 vzorků (10,7%) a Hodgkinův i non-Hodgkinův lymfom (dospělí i děti) zahrnující 3 vzorky (2,7%). Soubor solidních nádorů zahrnoval primární nemalobuněčné karcinomy plic (NSCLC) čítající 16 vzorků (14,3%), kolorektální karcinomy (3; 2,7%), zhoubné

nádory mozku (glioblastoma multiforme, astrocytomy/gliomy stadia III–IV; 6 vzorků, 5,4%), ostatní maligní nádory (karcinomy prsu, ovária, sarkomy, melanom, neuroblastom, histiocytom, atd.) zahrnující 33 vzorků (29,5%) a benigní nádory (adenom, adipom, karcinoid atd.) čítající 7 vzorků (6,3%).

Každá skupina byla charakterizována základními parametry deskriptivní statistiky, především pak mediánovou hodnotou souboru (tabulka 1). Hodnoty TCS_{50} byly vzájemně korelovány pro zjištění podobnosti/rozdílu v mechanismu účinnosti či lékové rezistence. Naše studie naznačuje tendenci k vyšší senzitivě hematologických malignit k BOH ve srovnání se solidními tumory. Hodnota TCS_{50} pro BOH u hematologických/solidních nádorů se pohybovala v rozpětí od 2,95/2,38 do 266,7/266,7 µM s mediánovou hodnotou 16,7/23,05 µM ($p=0,0159$) (obrázek 2, tabulka 1). Naše studie také prokázala preferenční aktivitu BOH k maligním verus benigním tumorům. Hodnota TCS_{50} pro maligní solidní tumory byla přibližně 2,5× nižší než pro benigní solidní nádory, tento rozdíl však nebyl signifikantní (tabulka 1).

Dále jsme zjišťovali statisticky významné rozdíly v odpovědi na bohemin napříč histologickými diagnózami. Ve čtyřech případech jsme našli vysoce významné rozdíly. Například, hematologické malignity jsou vnímavější na BOH než solidní benigní nádory ($p=0,0033$). Signifikantní rozdíly mezi jednotlivými nádorovými diagnózami ve vnímavosti na bohemin jsou znázorněny na obrázku 2.

Rovněž jsme provedli Pearsonovu korelační analýzu cytotoxické aktivity BOH in vitro a 23 tradičních protinádorových léčiv (tabulka 2). Nalezli jsme 11 statisticky významných korelací. Z korelační analýzy vyplývá signifikantní pozitivní korelace účinnosti BOH s 6-thioguaninem (6-TG; $r=0,5584$; $p<10^{-4}$), aktinomycinem D (ACT-D; $r=0,5469$; $p<10^{-4}$), cytosinarabinsidem (ARA-C; $r=0,4790$; $p<10^{-4}$), cisplatinou (DDP; $r=0,4464$; $p<10^{-4}$), daunorubicinem (DNR; $r=0,3424$; $p<10^{-4}$), fludarabinem (FLUD; $r=0,4089$; $p=0,025$), gemcitabinem (GMC; $r=0,4271$; $p=0,006$), mitoxantronem

Tabulka 1. Vnímavost jednotlivých skupin nádorů dle diagnóz k boheminu v in vitro podmínkách – deskriptivní statistika (kvantilová hranice 25% a 75%)

BOH	Hematologické malignity	ALL	AML	Lymfomy	Solidní nádory	Maligní solidní tumory
n	47	32	12	3	67	60
medián	16,700	20,535	5,700	12,680	23,050	20,940
25%	7,270	10,700	4,855	4,630	14,160	13,200
75%	29,060	29,870	22,960	20,210	69,420	60,995
BOH	NSCLC	Kolorektální karcinom	Maligní tumory mozku	Ostatní maligní nádory	Solidní benigní nádory	
n	16	3	6	34	7	
medián	13,835	28,330	20,940	23,880	51,570	
25%	8,375	7,440	19,020	16,810	30,760	
75%	26,415	46,350	69,420	80,990	74,810	

n – počet měření

Tabulka 2. Přehled korelačních koeficientů cytotoxické aktivity mezi boheminem a jednotlivými protinádorovými léčivy v primárních nádorových buňkách in vitro

		5-FU	6-TG	ACT-D	ARA-C	BLEO	CBDCA	DDP	DTIC	DNR	DEX	DOXO	FLUD
	r	0,2945	0,5584	0,5469	0,4790	0,0041	0,2804	0,4464	0,2564	0,342	0,115	-0,0933	0,4089
BOH	n	24	58	54	52	26	48	84	30	102	51	28	30
	p	0,162	$p < 10^{-4}$	$p < 10^{-4}$	$p < 10^{-4}$	0,984	0,054	$p < 10^{-4}$	0,171	$p < 10^{-4}$	0,418	0,637	0,025
		GMC	LEU	MIT-C	MIX	PRED	TAX	TOPO	TXR	VCR	VP	NVB	
	r	0,4271	0,1357	0,1577	0,3465	-0,0472	0,0182	0,5140	0,1864	0,122	0,2785	0,4719	
BOH	n	40	29	44	42	51	59	48	29	101	101	29	
	p	0,006	0,483	0,307	0,025	0,742	0,891	$p < 10^{-4}$	0,333	0,224	0,005	0,010	

r - korelační koeficient, n – počet měření, p – hladina statistické významnosti

(MIX; $r=0,3465$; $p=0,025$), topotekanem (TOPO; $r=0,5140$; $p < 10^{-4}$), etopozidem (VP; $r=0,2785$; $p=0,005$) a vinorelbinem (NVB; $r=0,4719$; $p=0,01$). Asociace boheminu s účinností antimetabolitů 6-thioguaninu, gemcitabinu, cytosinarabinosidu a fludarabinu pravděpodobně svědčí pro společný mechanismus lékové rezistence v souvislosti se strukturální podobností.

Diskuze

Neuspokojivé výsledky léčby maligních nádorových onemocnění nás stále motivují k hledání nových protinádorových léčiv. Tato léčiva jsou obvykle namířena proti novým cílům, o kterých se domníváme, že hrají významnou roli v maligní transformaci somatické buňky. Cyklin-dependentní kinázy jsou typickými představiteli takovýchto cílů, neboť u většiny nádorových buněk dochází k jejich patologické aktivaci. Syntetické inhibitory cyklin-dependentních kináz jsou považovány za potenciální protinádorová léčiva a svoji účinnost již prokázaly v klinických zkouškách. Roku 1994 byl popsán olomoucín jako první syntetický CDK inhibitor ze skupiny trisubstituovaných purinů. Od něj bylo dále odvozeno a nasynetizováno velké množství dalších derivátů včetně roskovitinu (6, 13) a boheminu (6, 9).

Výsledky získané z naší in vitro cytotoxické studie naznačují přednostní vnímavost boheminu k hematologickým malignitám ve srovnání se solidními tumory (obrázek 2). Koncentrace cytostatika, která usmrtí 50 % nádorové populace, byla vyhodnocena u hematologických malignit/všech solidních tumorů v rozmezí od 2.95/2.38 do 266.7/266.7 μM s mediánovou hodnotou 16.7/23.05 μM .

Pátrání po specifické aktivitě boheminu svědčí pro preferenční cytotoxicitu u hematologických malignit (tabulka 1; obrázek 2), která je nicméně typická pro většinu léčiv vzhledem k vysoké přirozené chemosenzitivitě těchto nádorů. Pro srovnání, mediánová hodnota TCS_{50} pro daunorubicin u akutní dětské lymfoblastické leukémie, karcinomu prsu, koloarektu, jícnu a žaludku je 0.12, 1.40, 1.90, 0.52 μM , pro vinkristin pak 2.8, 7.9, 50.0 a 25.4 μM (23, 24). Z uvedeného srovnání je zřejmé, že řada protinádorových

léčiv vykazuje vyšší účinnost u hematologických malignit. Naše pozorování také svědčí pro vyšší specifitu boheminu vůči maligní tkáni (tabulka 1; obrázek 2), jelikož mediánová hodnota vnímavosti benigních verzus maligních nádorů k boheminu (tabulka 1) byla u našeho souboru 51.57/20.94 μM , tento rozdíl však nebyl signifikantní. Tendence vyšší senzitivity boheminu k maligním proti benigním nádorům v podstatě odpovídá preferenční citlivosti nádorových buněk k syntetickým CDK inhibitorům ve srovnání s nenádorovou populací a také příznivému toxikologickému profilu těchto látek (10, 11, 17).

Naše výsledky vybízejí ke srovnání s prací Raynauda a spol., kteří provedli testování boheminu na celé škále lidských nádorových buněčných linií. Průměrná hodnota IC_{50} pro bohemín napříč panelem činila 27 μM (20). Naproti tomu v našich výsledcích činila mediánová hodnota IC_{50} pro bohemín u 65 solidních tumorů 23,05 μM a bez zahrnutí 7 benigních solidních tumorů byla hodnota IC_{50} 20,9 μM . Vyšší účinnost preparátu na primárních nádorech než na buněčných liniích podtrhuje význam tohoto přístupu v rámci preklinického vývoje protinádorových léčiv.

Signifikantní asociace boheminu s účinností antimetabolitů 6-thioguaninem, fludarabinem, gemcitabinem a cytosinarabinosidem (tabulka 2) v in vitro testech pravděpodobně svědčí pro společný mechanismus lékové rezistence, což zřejmě souvisí i se strukturální podobností těchto molekul.

Antimetabolity třídíme podle substrátů, na jejichž úrovni jsou biosyntetické reakce inhibovány na purinová (6-thioguanin, fludarabin) nebo pyrimidinová analoga (gemcitabin, cytosinarabinosid), případně podle cílového enzymu, který je antimetabolitem blokován (dihydrofolátreduktáza, tymidylátsyntetáza). Je potřeba zdůraznit, že dělení má jen orientační a didaktický význam, ve skutečnosti je účinek každého antimetabolitu mnohostranný, na různých úrovních biosyntézy nukleových kyselin. Například, ve formě nukleotidmonofosfátu inhibují purinová analoga mechanismem zpětné vazby syntézu purinů „de novo“, ve formě nukleotidtrifosfátu jsou inkorporovány do DNA jako takzvané „falešné prekurzory“.

Pozorovali jsme také signifikantní korelaci cytotoxicity boheminu a cisplatiny, která se mechanismem účinku podobá alkylačním látkám. Cisplatina (DDP) vytváří vazbu s dusíkem purinových a pyrimidinovýchází v molekule DNA. Podobnost účinku s alkylačními látkami vyplývá i ze zkřížené rezistence s těmito cytostatiky. Alkylace má kromě cytotoxického účinku též účinek mutagenní, s nímž nepochybně souvisí též účinek kancerogenní. Alkylace DNA je jedním z nejčastějších mechanismů účinku cytostatik.

Dále jsme našli pozitivní korelaci boheminu s inhibitorem topoizomerázy I topotekanem a inhibitorem topoizomerázy II etopozidem (tabulka 2). Topoizomerázy jsou nukleární enzymy objevené počátkem 70. let, které mají zásadní význam pro hladký průběh replikace. Obě topoizomerázy ovlivňují tzv. topologii DNA. Při bloádě jejich funkce nedojde k opětovnému spojení rozštěpených řetězců a tyto zlomy v DNA mají pro další osud buňky letální účinek. Topotekan má synergní účinek s etopozidem, což je fázově specifické cytostatikum s maximálním účinkem ve fázi G_2 .

Významné je také zjištění signifikantní korelace aktivity boheminu s vinorelbinem (tabulka 2). Jeho mechanismem protinádorového účinku je inhibice mitózy v metafázi. Blokáda mitózy v metafázi působená vinca alkaloidy (vinorelbin) je důsledkem blokády polymerizace tubulinu.

Další nalezená pozitivní korelace boheminu byla s interkalačními látkami daunorubicinem, aktinomycinem D a mitoxantronem (tabulka 2). Bylo zjištěno, že antracyklinová antibiotika (daunorubicin, mitoxantron) mohou omezovat buněčnou proliferaci, kromě interkalace, též svým inhibičním účinkem na topoizomerázy II (tvorba zlomů v DNA) a dále tvorbou volných semichinonových radikálů. Tyto radikály vytvářejí s kyslíkem reaktivní peroxidy, které poškozují buněčné membrány a jsou odpovědné též za kardiotoxické účinky antracyklinů. Mitoxantron patří mezi nespecifická cytostatika, s určitou převahou inhibice ve fázi G_2 . Na rozdíl od ostatních antracyklinů nepůsobí tvorbu kyslíkových radikálů.

Společným jmenovatelem pro protinádorová léčiva vykazující pozitivní korelaci účinnosti s boheminem je skutečnost, že tyto látky indukují v nádorech DNA poškození ať už přímou alkyací DNA, inhibicí topoizomeráz, DNA interkalací, či inhibicí mitózy. Syntetické inhibitory CDK vykazují také významný radiosenzibilizující a chemosenzibilizující účinek a zvyšují biologickou účinnost ionizujícího záření i některých cytostatik (21, 22, 25). Bylo rovněž popsáno, že ROSC je účinným inhibitorem DNA repa- race (10), což pravděpodobně vysvětluje významný radiosenzibilizující i chemosenzibilizující účinek CDK inhibitorů a také jejich korelaci s účinkem klasických cytostatik indukujících DNA poškození. Dále byla prokázána inhibiční aktivita olomoucínu, roscovitinu a boheminu na kinázy CDK7 a CDK9, které zprostředkovávají aktivační fosforylaci RNA polymerázy II (20) a kontrolují účinnost RNA transkripce. Vysoce signifikantní korelace cytotoxické aktivity aktinomycinu D s boheminem pozorovaná v naší studii (tabulka 2) je v naprostém souladu s tímto pozorováním.

Klíčovým indikátorem účinnosti CDK inhibitorů na nádorových buňkách bude zřejmě kontrola G₁/S přechodu a stav RB proteinu. Olomoucín, bohemín a R-roscovitin redukuje RB fosforylaci ve farmakologicky významných koncentracích, což inhibuje buněčný růst ve tkáňové kultuře (20). Ačkoliv funkční RB protein není potřebný pro antiproliferační efekt, přesto byla RB fosforylace cenným indikátorem CDK aktivity v buňce a může být prospěšná pro monitorování míry inhibice cyklin-dependentních kináz v klinických studiích.

Rozdíly v CDK inhibičním potenciálu mezi třemi purinovými analogy se odrážejí do jejich inhibiční aktivity nádorových buněk. R-roscovitin (CYC202) je mírně účinnější než bohemín, který je o řád účinnější než olomoucín. R-roscovitin má však výhodnější farmakologický profil a prochází úspěšně klinickým zkoušením fáze IIb v nádorových i nenádorových indikacích.

Závěr

Provedená studie potvrdila, že bohemín vykazuje významnou in vitro cytotoxickou aktivitu na buňkách získaných z lidských primárních nádorů (19). Výsledky získané z naší in vitro cytotoxické studie naznačují přednostní vnímavost boheminu k hematologickým malignitám ve srovnání se solidními tumory. Koncentrace cytostatika, která usmrtí 50 % nádorové populace, byla vyhodnocena u hematologických malignit/všech solidních tumorů v rozmezí od 2,95/2,38 do 266,7/266,7 μM s mediánovou hodnotou 16,7/23,05 μM (p=0,0159). Pouze malá

část pacientů vykazovala rezistenci k boheminu ve srovnání s rezistencí na klasická protinádorová léčiva. Srovnání s dalšími protinádorovými léčivy naznačuje:

1. asociaci aktivity BOH s antimetabolity 6-thioguaninem, fludarabinem, gemcitabinem a cytosinarabiosidem, která pravděpodobně svědčí pro společný mechanismus lékové rezistence v souvislosti se strukturální podobností
2. signifikantní pozitivní korelaci BOH s cytostatiky vinorelbinem, cisplatinou, topotekanem, vepe- sidem a daunorubicinem, která způsobují DNA poškození a
3. asociaci cytotoxicity BOH s inhibitorem RNA transkripce, aktinomycinem D. Naše výsledky

poskytují racionální podklad pro další klinické studie trisubstituovaných purinových CDK inhi- bitorů.

Poděkování: Autoři děkují ing. Sergeyi Kuzminovi za cennou technickou spolupráci. Podpořeno výzkumným záměrem MŠM 6198959216, projektem GAČR 301/05/0418 a MVTS Bil ČR/SR/UK/06.

doc. MUDr. Marián Hajdúch, PhD.

Laboratoř experimentální medicíny, Dětská a Onkologická klinika FN a LF UP Olomouc
Puškinova 6, 775 20 Olomouc
e-mail: hajduchm@atlas.cz

Literatura

1. Pastell RG, Albanese C, Reutens AT et al. The cyclins and cyclin-dependent kinase inhibitors in hormonal regulation of proliferation and differentiation. *Endocr Rev* 1999; 20: 501–534.
2. Sherr CJ. The Pezcoller lecture: Cancer cell cycles revisited. *Cancer Res* 2000; 60: 3689–3695.
3. Bártek J, Bárteková J, Lukas J. The retinoblastoma protein pathway and the restriction point. *Curr Opin Cell Biol* 1996; 8: 805–814.
4. Sherr CJ, Roberts JM. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* 1999; 13: 1501–1512.
5. Havlíček L, Hanuš J, Veselý J et al. Cytokinin-derived cyclin-dependent kinase inhibitors: synthesis and cdc2 inhibitory activity of olomoucine and related compounds. *J Med Chem* 1997; 40: 408–412.
6. Veselý J, Havlíček L, Strnad M et al. Inhibition of cyclin-dependent kinases by purine analogues. *Eur J Biochem* 1994; 224: 771–786.
7. Meyerson M, Harlow E. Identification of G1 kinase activity for cdk6, a novel cyclin D partner. *Mol Cell Biol* 1994; 14: 2077–2086.
8. Hajdúch M, Nosková V, Havlíček L et al. Olomoucine-derived synthetic cdk inhibitors: the mechanism of apoptotic death of tumor cells and in vivo antitumor activity. In: *Cell Cycle Therapeutics. The Conference held on November 6–7, 1997, Washington, DC, USA. Book of Abstracts. Published by International Business Communications (225 Turnpike Road, Southborough, MA 01772-1749, USA).*
9. Hajdúch M, Havlíček L, Veselý J, Novotný R, Mihal V, Strnad M. Synthetic cyclin dependent kinase inhibitors. New generation of potent anti-cancer drugs. *Adv Exp Med Biol* 1999; 457: 341–353.
10. Crescenzi E, Palumbo G, Brady HJ. Roscovitine modulates DNA repair and senescence: implications for combination chemotherapy. *Clin Cancer Res* 2005; 11(22): 8158–71.
11. Wesierska-Gadek J, Gueorguieva M, Wojciechowski J et al. Cell cycle arrest induced in human breast cancer cells by cyclin-dependent kinase inhibitors: a comparison of the effects exerted by roscovitine and olomoucine. *Pol J Pharmacol* 2004; 56 (5): 635–641.
12. Hajdúch M, Kolář Z, Novotný R et al. Induction of apoptosis and regression of spontaneous dog melanoma following in vivo application of synthetic cyclin-dependent kinase inhibitor olomoucine. *Anti-Cancer Drugs* 1997; 8: 1007–1013.
13. Meijer L, Borgne A, Mulner O et al. Biochemical and cellular effects of roscovitine, a potent and selective inhibitor of the cyclin-dependent kinases cdc2, cdk2 and cdk5. *Eur J Biochem* 1997; 243: 527–536.
14. Schutte B, Nieland L, van Engeland M, Henfling MER, Meijer L, Ramaekers FCS. The effect of the cyclin-dependent kinase inhibitor olomoucine on cell cycle kinetics. *Exp Cell Res* 1997; 236: 4–15.
15. Alessi F, Quarta S, Savio M et al. The cyclin-dependent kinase inhibitors olomoucine and roscovitine arrest human fibroblasts in G1 phase by specific inhibition of CDK2 kinase activity. *Exper Cell Research* 1998; 245: 8–18.
16. Markus MA, Kahle PJ, Winkler A, Hortsmann S, Anneser JM, Borasio GD. Survival-promoting activity of inhibitors of cyclin-dependent kinases on primary neurons correlates with inhibition of c-Jun kinase-1. *Neurobiol Dis* 1997; 4: 122–133.
17. McClue SJ, Blake D, Clarke R et al. In vitro and in vivo antitumor properties of the cyclin dependent kinase inhibitor CYC202 (R-roscovitine). *Int J Cancer* 2002; 102(5): 463–468.
18. Glab N, Labidi B, Qin LX, Trehan Ch, Bergounioux C, Meijer L. Olomoucine, an inhibitor of the cdc2/cdk2 kinases activity, blocks plant cells at the G1 to S and G2 to M cell cycle transitions. *FEBS Letters* 1994; 353: 207–211.
19. Mihal V, Nosková V, Gojová L, Strnad M, Janošková A, Hajdúch M. Cytotoxic activity of the cyclin dependent kinase inhibitor, Bohemine, in primary tumour cells. *Blood* 2001; 98(11) Abstract# 4414.
20. Raynaud FI, Whittaker SR, Fischer PM et al. In vitro and in vivo pharmacokinetic-pharmacodynamic relationships for the trisubstituted aminopurine cyclin-dependent kinase inhibitors olomoucine, bohemine and CYC202. *Clin Cancer Res* 2005; 11(13): 4875–4887.
21. Maggiorola L, Deutsch E, Frascogna V et al. Enhancement of radiation response by roscovitine in human breast carcinoma in vitro and in vivo. *Cancer Res* 2003; 63(10): 2513–2517.
22. Raju U, Nakata E, Mason KA et al. Flavopiridol, a cyclin-dependent kinase inhibitor, enhances radiosensitivity of ovarian carcinoma cells. *Cancer Res* 2003; 63(12): 3263–3267.
23. Pieters R, Loonen AH, Huismans DR et al. In vitro drug sensitivity of cells from children with leukemia using the MTT assay with improved culture conditions. *Blood* 1990; 76(11): 2327–2336.
24. Král V, Hajdúch M, Neoral Č et al. Significance and possibilities of cytostatic treatment of malignant tumors: testing the effects of cytostatics. *Rozhl Chir* 2000; 79(3): 134–138.
25. Alvi AJ, Austen B, Weston VJ et al. A novel CDK inhibitor, CYC202 (R-roscovitine), overcomes the defect in p53-dependent apoptosis in B-CLL by down-regulation of genes involved in transcription regulation and survival. *Blood* 2005; 105(11): 4484–4491.