

Doxorubicin: pomoc i hrozba v léčbě rakoviny

Romana Konečná^a, Markéta Vaculovičová^{a,b}, Vojtěch Adam^{a,b}, René Kizek^{a,b}

^a Department of Chemistry and Biochemistry, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemedelska 1, CZ-613 00 Brno, Czech Republic, European Union

^b Central European Institute of Technology, Brno University of Technology, Technicka 3058/10, CZ-616 00 Brno, Czech Republic, European Union

Doxorubicin: help and threat in cancer therapy

This article is focused on reviewing the benefit and limitations of utilization of doxorubicin, which is one of the most widely used anticancer drug even though it causes severe side effects. The mechanism of action of common cytostatic drugs is described and special attention is paid to doxorubicin. Its pathway through the body is highlighted and its toxicity is emphasized. Finally, strategy of elimination of the negative effects induced by doxorubicin therapy is mentioned and the most widely approach – the use of liposomes – is summarized.

Přijato k publikování: 2. 6. 2014

Klíčová slova: doxorubicin; enkapsulace; liposomy; rakovina

Úvod

Rakovina patří celosvětově mezi jednu z nejzávažnějších chorob 21. století. Většina úmrtí je zapříčiněna rakovinou plic, jater, žaludku, tlustého střeva a prsu. Vznik onemocnění je způsoben širokou škálou vnějších a vnitřních podmínek a významnou roli tu hrají genetické predispozice, především u rakoviny prostaty (13,94%), prsu (7,46%) a kolorekta (6,78%)¹. I přesto, že této chorobě ročně podlehnou více než 8 milionu lidí a předpokládá se v roce 2030 narůst až na 13,1 milionů, vznik a mechanismus této zákeřné nemoci není stále zcela objasněn a mechanismy působení různých druhů cytostatik jsou stále předmětem zkoumání. Vzhledem k závažné toxicitě cytostatik je snaha vyvinout specifické systémy podávání léků, které jsou schopny omezit toxicitu léčiva a cíleně dopravit léčivo do místa nádoru².

Rakovina

Rakovina zahrnuje širokou skupinu onemocnění, jejichž společným rysem je nekontrolovaný růst vlastních buněk, ačkoli za normálních okolností jsou buňky schopny svou mutaci detekovat a opravit, nebo v jiném případě buňku donutit k apoptóze. Hlavním úkolem každého mnohobuněčného organismu je zajistit normální průběh buněčného cyklu. Při poškození správného fungování buněčného cyklu dochá-

zí k nekontrolované proliferaci buněk, což je jedním z hlavních charakteristických znaků rakoviny³. Buněčný cyklus je řízen několika kontrolními body, tzv. mechanismy zajišťujícími bezchybné dělení eukaryotické buňky. Nejdůležitější funkcí kontrolních bodů je dohled nad poškozením DNA, které detekují senzorové mechanismy, a pomocí signálních mechanismů je buněčný cyklus zastaven do doby opravy. V případě že nelze provést opravu dochází ke spuštění programované buněčné smrti (apoptózy). Buněčný cyklus je v kontrolních bodech řízen pomocí cyklinů (A, B, D, E) a jejich příbuznými cyklin-dependentními kinázami (CDK). Specifické přechody v buněčném cyklu jsou řízeny specifickými CDK. Je-li tato specifčnost udržována v nádorových buňkách, selektivní inhibice těchto kináz představuje potenciální možnost léčby nádorů⁴.

Cytostatická léčiva a jejich působení na lidský organismus

Chemoterapie patří k základním léčebným postupům mnoha druhů nádorů. Klinická užitečnost protinádorových léčiv je do značné míry omezena vývojem nežádoucích účinků a získáním rezistence protinádorových buněk na tyto léky. Mechanismus toxicity protinádorových léčiv není stále zcela objasněn⁵. Obecně je popsáno několik základ-

ních mechanismů působení: 1) interkalace do DNA, což má za následek inhibici syntézy makromolekul, 2) vznik volných radikálů, což vede k poškození DNA nebo peroxidaci lipidů, 3) alkylace DNA, 4) DNA cross-linking, 5) interakce s membránovými proteiny, což vede k redukci DOX a tvorbě ROS, 6) poškození DNA vlivem inhibice topoisomerázy II, 7) indukce apoptózy v závislosti na inhibici topoisomerázy II^{6,7}. Dále je důležité se zmínit o tzv. tumor supresorovém proteinu p53, který je jedním z nejdůležitějších ovladačů buněčného cyklu u normální i rakovinové buňky. V případě výskytu nebezpečí zahajuje různé kaskády apoptózy a tím dochází k odumření poškozené buňky⁸. Asi 60 % nádorů obsahuje mutovaný typ p53, což způsobuje jeho zvýšenou stabilitu nebo ztrátu aktivity. Ztráta aktivity normálního typu p53 je hlavním prediktorem absence odpovědi na radioterapii a chemoterapii u různých typů nádorů^{9,10}. Preneoplastické buňky mají silnou tendenci eliminovat funkčnost proteinu p53, což naznačuje, že nádorové buňky mohou eliminovat apoptickou smrt buňky¹¹. Další třídou genů ovlivňující potenciální vznik rakoviny jsou onkogeny stimulující buněčný růst¹². Veškeré výše popsané změny na genetické úrovni mohou vyústit až v nádorové bujení a jsou výsledkem nahromadění chyb během mitózy. Je velmi důležité si uvědomit, že jediná genetická změna nestačí k podpoře maligního nádoru¹³.

K nejběžnějším cytostatikům patří dvě skupiny léčiv, jedna skupina zahrnuje léčiva na bázi platiny, jejichž nejvýznamnějšími zástupci jsou cisplatina, oxaliplatina a karboplatina. Hlavním cílovým místem působení těchto léčiv je DNA. Druhou velmi významnou skupinu tvoří antracyklinová antibiotika. Existuje více než 2000 derivátů antracyklinů, ale i přesto je stále nepoužívanějším léčivem z této skupiny doxorubicin (DOX). Hlavním mechanismem působení DOX je interkalace do DNA. Strukturální modifikace způsobené interkalací mohou vést k funkčním změnám, např. inhibice transkripce, replikace a opravných mechanismů DNA^{14,15}. DOX má vysokou schopnost proniknout do tkání a zároveň zůstat v jádře buňky a to jak díky svým lipofilním vlastnostem a DNA interkalaci. Je zajímavé, že i přes vysokou

penetrační schopnost nemůže DOX přecházet přes hematoencefalitickou bariéru do mozku. Byla provedena řada studií, které se zaměřují na využití DOX jak samostatně, tak v kombinaci s dalšími terapiemi. Většina těchto studií popisuje distribuční poločas DOX v rozsahu 3 – 5 minut, naopak terminální poločas se pohybuje kolem 24 – 36 hodin. Hodnoty stabilní distribuce jsou v rozmezí 500 až 800 l/m²¹⁶. Jako většina léků, DOX vstupuje do buňky pasivní difuzí a obvykle se hromadí v intracelulárním prostoru v koncentraci 10 – 500 x vyšší než v extracelulárním prostoru. V jádře se nachází asi 50x více DOX než v cytoplasmě (340 μM), nebo-li jedna molekula je interkalována mezi každou pátou bázi na řetězci DNA^{17,18}. Volný intracelulární DOX (2% z celkového podaného léku) je stejnoměrně distribuován mezi ostatní orgány (Golgiho aparát, lysosomy a mitochondrie)¹⁹. Většina studií se přiklání k faktu, že se DOX nejvíce hromadí v játrech v důsledku biotransformace, nelze však opomenout vysokou koncentraci v kostní dřeni a bílých krvinkách, kde je na hladina stále 200 – 500x vyšší než v plasmě. Plasmová clearance zprostředkovaná játry se pohybuje v rozmezí 324 – 809 ml/min/m². Polovina léčiva je vylučována žlučí obvykle 5 – 7 dní od počátku léčby. Pouze 2 – 15 % léčiva je vyloučeno močí po delší časové periodě, z toho cca 3 % v moči tvoří doxorubicinol. Do 24 hodin je 10 – 20% vyloučeno stolicí a 50 % do 150 hodin.

Toxicita doxorubicinu (DOX)

Používání antracyklinů je zatíženo celou řadou vedlejších účinků jako je nevolnost, zažívací potíže, ztráta vlasů a poruchy na neurologickém systému²⁰. Bohužel DOX není specificky zaměřen jen na nádorovou tkáň, ale ovlivňuje růst i jiných typů buněk v těle, což má za následek porušení správného fungování imunitního systému²¹. Nejvyšší riziko představuje kardiotoxicita, která je hlavním důvodem omezení podávané dávky DOX. DOX je odpovědný za strukturální změny kardiomyocytů v srdci. Geny za to odpovědné nesou označení BNP a ANP. Při zvýšené expresi těchto genů dochází k srdeční hypertrofii. Molekulární mechanismus této akce zvyšuje tvorbu vol-

ných radikálů. Literatura popisuje nejčastější 4 mechanismy vzniku reaktivních kyslíkových radikálů (ROS): 1) vznikem semichinonu, 2) aktivace NAD(P)H oxidoreduktázy, 3) neenzymatické mechanismy, 4) produkty metabolismu DOX. Blíží-li se životní akumulace DOX 500 mg/m² plochy těla je riziko kardiomyopatie výrazně zvýšeno a k akutnímu selhání srdce dochází až u 20 % pacientů²².

Až u 40 % pacientů se v průběhu léčby projeví poruchy jater. Vlivem metabolické a detoxifikační aktivity jater dochází k akumulaci DOX v játrech. Při vyšších dávkách DOX je vlivem metabolismu v játrech zvýšena produkce ROS způsobujících poškození DNA, peroxidaci lipidů, snížení vitamínu E a pokles redukovaného glutathionu. Dále může docházet k aktivaci IKB kinázy, která fosforyluje inhibitory IKK a tím aktivuje jaderný faktor κ B, který způsobí uvolnění prozánětlivých cyklinů spouštějících apoptózu. Toxicita DOX je dále odpovědná za snižování hladiny anorganického fosfátu (ADP, ATP, AMP), které může vyústit až k patologickým stavům v hepatocytech. Tento proces je jednou z hlavních příčin neustálé svalové a psychické únavy. DOX působí toxicky také na ledviny, kde způsobuje tzv. nefrotoxicitu a proteinurii, vlivem porušení glomerulárních podocytů²³. K nefropatii dochází při narušení normálního fungování mitochondrií. To způsobí, že hladina triglyceridů, superoxidáz a syntéza citrátu je zvýšena, zatímco je sníženo množství vitamínu E a antioxidantů. Následkem je opět změna struktury nefronů. Na rozdíl od jater, schopnost regenerace ledvin je výrazně nižší, pokud již došlo k poškození glomerulů. Poškození glomerulů způsobuje glomerulární léze, zánět, tubulární dilataci a také ovlivňuje kapilární propustnost²⁰. U některých pacientů, v těžkých případech, může docházet k závažné infekci v tlustém a slepém střevě, které mohou být fatální.

Liposomy jako nanotransportéry pro přenos doxorubicinu

Vzhledem k závažné toxicitě cytostatik je snaha vyvinout specifické systémy podávání léků, které jsou schopny omezit toxicitu léčiva a cíleně dopravit léčivo do místa nádoru. Použití

těchto systémů se stále testuje a zlepšuje, aby se zvýšila selektivita a celkový účinek léků. Největší pozornost je dnes věnována polymerním nosičům, jako jsou liposomy, hydrogely a nanočástice. Počáteční vývoj liposomálního doxorubicinu ukázal velikou naději v nové éře moderní léčby, ale také některé kritické nedostatky. Liposomy vykazovaly rychlé odbourávání z oběhového systému prostřednictvím retikuloendoteliálního systému²⁴. První studie vysvětlují krátký oběhový čas složením a velikostí částic. Postupem času byly liposomy formulovány tak, aby bylo léčivo lépe zapouzdřeno a setrvalo déle v oběhovém systému a tím se zvýšila jeho účinnost²⁵. Povrch liposomu se proto brzy potáhl polyethylenglykolem (PEG) a tím se výrazně prodloužil čas cirkulace léčiva v těle. Liposom potažený PEG se nakonec stal známý jako „stealth“, z nichž jedna skupina byla na trh uváděna s doxorubicinem²⁶. Doxorubicin je zapouzdřený ve vnitřním prostoru, v gelové fázi obsahující 10000 až 15000 pevně balených molekul. Průměr těchto liposomů musí být dostatečně malý, aby byl zajištěn jejich vstup přes stěnu krevních cév v nádoru²⁷. Studie na zvířecích modelech zkoumající farmakologické vlastnosti liposomů potažených PEG ukázaly na inhibici růstu nádorů, zlepšení celkového stavu organismu a zlepšení kvality života ve srovnání s pravidelnou léčbou volným DOX. Jednou z hlavních farmakologických schopností léku je potlačení antiapoptických cest a zesílení apoptické aktivity. Distribuční objem je 3l, což je hodnota srovnatelná s hodnotou objemu plasmy. Rychlost clearance je 33,6 ml/l, na rozdíl od volného DOX, který vykazuje hodnotu v rozsahu 24 – 73 l/hod/m²²⁸. Liposomy bez PEG mají hydrofilní povrch a ten výrazně snižuje vazbu liposomu na složky plazmy. Je důležité si uvědomit, že 95 % DOX nacházejícího se v plazmě je stále uzavřeno v liposomu, což znamená, že není biologicky dostupný. DOX zapouzdřený v liposomu s PEG má díky své malé velikosti (100 nm) velký potenciál být velmi selektivní k nádoru. Zapouzdřený DOX v liposomu se hromadí v místě nádoru více než samotný DOX. Některé studie však poukazují na 4 – 48× vyšší vstup do jater a kůže po počáteční injekci, proto tyto částice nejsou ještě stále ideální.

V jiné práci byly provedeny experimenty na potkanech, s implantovaným sarkomem, které ukazují že liposomální DOX s PEG důkladně pronikl do mozku a zároveň byl šetrný k okolní mozkové tkáni, což je důkazem podstatné výhody nad použitím volného DOX ²⁹.

Závěr

Doxorubicin je široce využívané cytostatické léčivo aplikované pro širokou škálu nádorových onemocnění. I přesto, že se toto léčivo v klinické praxi využívá již déle než 30 let, příčiny jeho negativního efektu podléajícího se na vzniku kardiotoxicity nebyly stále zcela objasněny. Z tohoto důvodu je důležité vyvinout specifické systémy podávání léků, které by byly schopny omezit toxicitu léčiva a popřípadě cíleně dopravit léčivo do místa nádoru. Jako nejslibnější nanotransportér pro přenos léčiv se prozatím jeví liposom. Mezi další látky využité pro podobné účely můžeme řadit různé nanočástice a hydrogely.

Tato práce byla financována ze zdrojů PGS24_2013.

The authors declare they have no potential conflicts of interests concerning drugs, products, services or another research outputs in this study.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE „uniform requirements“ for biomedical papers.

Literatura

1. Frank C., Fallah M., Ji J. G., Sundquist J., Hemminki K.: *International Journal of Cancer*, 134, 1899 (2014).
2. Liu Y. Z., Guo M. Q.: *Proteomics*, 14, 399 (2014).
3. Urrego D., Tomczak A. P., Zahed F., Stuhmer W., Pardo L. A.: *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences*, 369, (2014).
4. Aarts M., Linardopoulos S., Turner N. C.: *Current Opinion in Pharmacology*, 13, 529 (2013).
5. Takahashi T.: *Yakugaku Zasshi-Journal of the Pharmaceutical Society of Japan*, 131, 355 (2011).
6. Minotti G., Menna P., Salvatorelli E., Cairo G., Gianni L.: *Pharmacological Reviews*, 56, 185 (2004).
7. Sinha B. K., Mimnaugh E. G.: *Free Radical Biology and Medicine*, 8, 567 (1990).
8. Hahn W. C., Weinberg R. A.: *New England Journal of Medicine*, 347, 1593 (2002).
9. Zhang Y., Zhang Y. J., Zhao H. Y., Zhai Q. L., Shen Y. F.: *Biochimie*, 99C, 215 (2014).
10. Kiyosaki K., Nakada C., Hijiya N., Tsukamoto Y., Matsuura K., Nakatsuka K., Daa T., Yokoyama S., Imaizumi M., Moriyama M.: *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 51, 7 (2010).
11. Benchimol S.: *Cell Death and Differentiation*, 8, 1049 (2001).
12. Zhang Z., Li M., Rayburn E. R., Hill D. L., Zhang R. W., Wang H.: *American Journal of Pharmacogenomics*, 5, 247 (2005).
13. Croce C. M.: *New England Journal of Medicine*, 358, 502 (2008).
14. Liu H.-K., Sadler P. J.: *Accounts of Chemical Research*, 44, 349 (2011).
15. Xu X. X., Persson H. L., Richardson D. R.: *Molecular Pharmacology*, 68, 261 (2005).
16. Zheng Z., Pavlidis P., Chua S., D'Agati V. D., Gharavi A. G.: *Journal of the American Society of Nephrology*, 17, 1796 (2006).
17. Wang Y., Wang Y. P., Tay Y. C., Harris D. C. H.: *Kidney International*, 58, 1797 (2000).
18. Rook M., Lely A. T., Kramer A. B., van Goor H., Navis G.: *Nephrology Dialysis Transplantation*, 20, 59 (2005).
19. Lal S., Mahajan A., Chen W. N., Chowbay B.: *Current Drug Metabolism*, 11, 115 (2010).
20. Carvalho C., Santos R. X., Cardoso S., Correia S., Oliveira P. J., Santos M. S., Moreira P. I.: *Current Medicinal Chemistry*, 16, 3267 (2009).
21. Chatterjee K., Zhang J., Honbo N., Karliner J. S.: *Cardiology*, 115, 155 (2010).
22. Sakata Y., Dong J.-W., Vallejo J. G., Huang C.-H., Baker J. S., Tracey K. J., Tacheuchi O., Akira S., Mann D. L.: *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 292, H503 (2007).
23. Wang J. X., Yuan Z. X.: *Cell Biochemistry and Biophysics*, 67, 199 (2013).
24. Anders C. K., Adamo B., Karginova O., Deal A. M., Rawal S., Darr D., Schorzman A., Santos C., Bash R., Kafri T., Carey L., Miller C. R., Perou C. M., Sharpless N., Zamboni W. C.: *Plos One*, 8, (2013).
25. Gabizon A., Shmeeda H., Barenholz Y.: *Clinical Pharmacokinetics*, 42, 419 (2003).
26. Nogueira E., Loureiro A., Nogueira P., Freitas J., Almeida C. R., Harmark J., Hebert H., Moreira A., Carmo A. M., Preto A., Gomes A. C., Cavaco-Paulo A.: *Faraday Discussions*, 166, 417 (2013).
27. Hashizume H., Baluk P., Morikawa S., McLean J. W., Thurston G., Roberge S., Jain R. K., McDonald D. M.: *American Journal of Pathology*, 156, 1363 (2000).
28. von Mehren M., Schilder R. J., Cheng J. D., Temmer E., Cardoso T. M., Renshaw F. G., Bayever E., Zannikos P., Yuan Z., Cohen R. B.: *Annals of Oncology*, 19, 1802 (2008).
29. Orditura M., Quaglia F., Morgillo F., Martinelli E., Lieto E., De Rosa G., Comunale D., Diadema M. R., Ciardiello F., Catalano G., De Vita F.: *Oncology Reports*, 12, 549 (2004).



Článek je volně šiřitelný pod licencí Creative Commons (BY-NC-ND). Musí však být uveden autor a dokument nelze měnit a používat pro komerční účely.