

CHOROBA NOWOTWOROWA PIERSI I NOWE ZWIĄZKI O AKTYWNOŚCI PRZECIWNOWOTWOROWEJ

Paweł Żero, Maria Niemyjska, Magdalena Rasztawicka, Dorota Maciejewska*

Katedra i Zakład Chemii Organicznej, Wydział Farmaceutyczny Akademii Medycznej w Warszawie
ul. Banacha 1, 02-097 Warszawa

*autorka korespondująca, tel./faks (22)5720 643, e-mail: domac@farm.amwaw.edu.pl

Otrzymany 7.03.2005; zaakceptowany 22.04.2005; zamieszczony 25.05.2005

STRESZCZENIE

Rak piersi jest najczęstszym nowotworem złośliwym u kobiet. Przyczyn jego powstawania jest wiele: genetyczne, środowiskowe, hormonalne. Chemioterapia obejmuje kilkadziesiąt leków, które mają jednak wiele niebezpiecznych działań niepożądanych, i między innymi dlatego celowe jest poszukiwanie nowych substancji leczniczych. Jednym ze związków, którego aktywność przeciwnowotworowa jest analizowana, jest 3,3'-diindolilometan (DIM), powstający w organizmie człowieka po spożyciu roślin krzyżowych takich jak kapusta, brukselka lub kalafior. Obecnie w Katedrze i Zakładzie Chemii Organicznej są prowadzone prace nad otrzymaniem analogów DIM-u, mogących znaleźć zastosowanie w leczeniu.

SŁOWA KLUCZOWE: nowotwór, rak piersi, chemioterapia, 3,3'-diindolilometan

ABSTRACT

BREAST CANCER DISEASE AND NEW COMPOUNDS WITH ANTICANCER ACTIVITY

Breast cancer is the most common women's malignant tumour. Many drugs used in chemotherapy are hazardous because of side-effects, therefore, the search for new active compounds is advisable. 3,3'-diindolilomethane (DIM) is known to inhibit DNA synthesis and cell proliferation in human breast cancer cells. It is a natural product produced during the autolytic breakdown of glucobrassicin, that occurs in *Cruciferae* (cabbage, Brussels sprouts, cauliflower). At present, in the Department of Organic Chemistry derivatives of DIM are synthesised, which could be considered as potential chemotherapeutics.

KEYWORDS: tumour, breast cancer, chemical therapy, 3,3'-diindolylmethane

1. Wstęp

Choroby nowotworowe u ludzi mają długą historię: pierwsze wzmianki o raku piersi pochodzą ze starożytnego Egiptu. Chorobę tę opisał także w V wieku p.n.e. Hipokrates. Jednakże dopiero w ciągu ostatnich kilkudziesięciu lat nastąpił szybki wzrost liczby zachorowań i nowotwory zaczęły stanowić poważny problem. W Polsce już od dłuższego czasu nowotwory złośliwe jako przyczyny zgonów zajmują drugie miejsce po chorobach układu krążenia i ich udział stale rośnie [1]. Szczególnie niebezpieczny jest rak piersi, który jest najczęstszym nowotworem złośliwym u kobiet. W 2000 roku w Polsce zmarło z jego powodu 4700 chorych i wykryto 11000 nowych przypadków [2]. Stanowi to ponad 10% zachorowań na wszystkie nowotwory. Związki mogące służyć do leczenia raka piersi stanowią jeden z przedmiotów badań w naszym zespole.

Chociaż obecnie w leczeniu dostępnych jest kilkadziesiąt leków przeciwnowotworowych, poszukuje się nowych związków działających bardziej selektywnie i nie mających działań ubocznych. W profilaktyce zaczęto zwracać także uwagę na styl życia, a w szczególności na dietę, jako na czynnik wpływający na ryzyko wystąpienia choroby nowotworowej. Poszukuje się produktów spożywczych, które mogą mieć znaczenie w profilaktyce. Do nich należą m.in. brokuły i brukselka, ponieważ związki w nich zawarte wykazują w badaniach na zwierzętach aktywność przeciw rakowi piersi. Wyizolowano z nich związek czynny, 3-

indolokarbinol, i teraz trwają prace naszego zespołu nad otrzymaniem jego bardziej aktywnych pochodnych, które mogłyby mieć znaczenie w terapii nowotworów.

2. Proces nowotworzenia

2.1. Powstawanie nowotworu

W przypadku komórek nowotworowych dochodzi do zaburzenia naturalnego tego cyklu rozwojowego. Komórki te dzielą się i rosną w sposób niekontrolowany i nie ulegają różnicowaniu lub też ulegają nieprawidłowemu różnicowaniu. Zmiany nowotworowe ogólnie dzieli się na łagodne i złośliwe. Nowotwory złośliwe powstałe w tkance nabłonkowej nazywamy rakami. Zalicza się do nich rak piersi, który jest nowotworem złośliwym gruczołu sutkowego.

Zmiany nowotworowe są warunkowane przez mutacje dwóch zasadniczych grup genów [3]. Pierwszą grupę stanowią protoonkogeny. Są to geny naturalnie występujące w genomie człowieka, które w wyniku nieprawidłowych przemian mogą wywoływać proces nowotworowy. Protoonkogeny (*c-onc*) w wyniku mutacji punktowych i aberracji chromosomowych ulegają aktywacji i stają się onkogenami. Są one genami dominującymi, czyli wystarczy mutacja w jednym allelu chromosomu, aby ujawnił się wpływ mutacji. Transkrypcja tych genów daje zmienione produkty białkowe, które nadmiernie stymulują komórkę do wzrostu i podziałów lub też dają prawidłowe białka, ale w zwiększo-

nej ilości, co wywołuje ten sam efekt. Białka te działają na drodze trzech mechanizmów. Stymulacja może zachodzić pod wpływem białek będących czynnikami wzrostu lub receptorami tych czynników. Może ona być wynikiem ułatwienia i przyspieszenia transmisji sygnałów aktywujących transkrypcję od receptora błonowego do jądra komórkowego. Wreszcie białka te mogą bezpośrednio aktywować transkrypcję. Zatem taka przekształcona komórka dzieli się i rośnie znacznie szybciej niż prawidłowe, otaczające ją komórki. W zależności od tego, w którym miejscu zaszła mutacja punktowa, możemy się spodziewać różnych rodzajów nowotworów.

Drugą grupę modyfikowanych genów stanowią supresory transformacji nowotworowej. Nazywane są także antyonkogenami lub recesywnymi onkogenami [4], ponieważ ujawnienie efektu nowotworowego wymaga unieczynienia obu kopii genu, czyli obu alleli chromosomu. Mutacja jednej kopii może być przekazana potomstwu, co jest przyczyną rodzinnych skłonności do zapadania na dany nowotwór. Geny te działają według dwóch głównych mechanizmów. Pierwszy polega na wpływie na transkrypcję - wytworzone produkty białkowe zatrzymują rozwój i podział komórki w przypadku wystąpienia jakiegokolwiek uszkodzenia genomu, więc jest czas na naprawę uszkodzenia. Gdy już naprawa zostanie zakończona, transkrypcja tych genów maleje i komórka może się dalej rozwijać. Natomiast geny działające według drugiego mechanizmu są bezpośrednio odpowiedzialne za naprawę uszkodzonego DNA, są to zatem geny przeciwdziałające zmianom nowotworowym komórki. Jeśli geny supresorowe ulegną mutacji lub delecji, to następuje ich dezaktywacja i nie mogą spełniać swoich funkcji. Komórka jest wtedy pozbawiona mechanizmów naprawczych lub ułatwiających naprawę uszkodzonego genomu. Prowadzi to do szybkiego nagromadzenia dalszych mutacji, a w efekcie do transformacji nowotworowej komórki.

W przypadkach, gdy zachodzi mutacja tylko w jednym genie, protoonkogenie albo supresorze, powstaje łagodna zmiana nowotworowa. Natomiast złośliwa zmiana jest skutkiem kilku mutacji obejmujących obie grupy genów.

2.2. Etapy rozwoju nowotworu

Powstawanie zmian nowotworowych trwa zwykle wiele lat i jest procesem wieloetapowym. Możemy podzielić go na trzy fazy: inicjację, promocję i progresję [5]. Fazy te przechodzą w siebie płynnie i trudno jest jednoznacznie określić granice między nimi.

Pierwszą fazą rozwoju nowotworu jest inicjacja. Zachodzą podczas niej nieodwracalne zmiany w obrębie komórki pod wpływem działania jakiegoś czynnika inicjującego będącego mutagenem. Zmiany te polegają na powstawaniu mutacji w genach, w wyniku których komórka zaczyna się dzielić w sposób niekontrolowany oraz dochodzi do zaburzenia programu różnicowania. Powstałe mutacje są przekazywane następnym pokoleniom komórek. Po inicjacji komórka przechodzi w stan uśpienia i może tak trwać przez dłuższy czas. Oczywiście proces inicjacji może zająć jednocześnie w wielu komórkach.

Jeśli nowotwór zatrzyma się na tym etapie, to mamy do czynienia z łagodną zmianą nowotworową. Jego komórki mogą namnażać się nadmiernie tworząc niewielkie guzy,

które mogą uciskać sąsiednie tkanki i powodować pewne komplikacje zdrowotne. Zazwyczaj jednak nie zagrażają one w poważny sposób życiu ani zdrowiu.

Aby wejść w następną fazę, promocję, komórka musi być poddana działaniu kolejnego czynnika nazywanego promotorem. Często czynnik inicjujący jest jednocześnie promotorem, czyli promotor jest także mutagenem. Ale nie jest to konieczne, może on równie dobrze być tylko czynnikiem pobudzającym wzrost i zmieniającym ekspresję genów, jak np. hormony steroidowe. Promotor pobudza zainicjowaną komórkę do podziałów, czyli przyspiesza wzrost guza. Pojawiają się także pierwsze oznaki "zezłościwienia" komórki: zwiększona ruchliwość, utrata prawidłowego oddziaływania z sąsiednimi komórkami, inwazyjność (naciekanie najbliższych tkanek) i utrata swoistych funkcji enzymatycznych. W tej fazie niektóre cechy mogą jeszcze zostać odwrócone.

Następną fazą jest progresja. Komórka traci tu całkowicie zdolność reagowania na zewnętrzne czynniki kontrolujące jej wzrost i żyje samodzielnie. Zaczyna wydzielać czynniki wzrostu, które jeszcze bardziej przyspieszają jej namnażanie. Niektóre nowotwory zaczynają wytwarzać czynniki angiogenne, które powodują unaczynienie guza, czyli powstanie w nim sieci naczyń krwionośnych. Jest to niezbędne, aby komórki guza miały wystarczającą ilość substancji odżywczych i tlenu, których potrzebują bardzo dużo ze względu na intensywny wzrost i namnażanie. Komórki nowotworu wydzielają też czynniki peptydowe, które pobudzają sąsiadujące z nimi prawidłowe komórki do wydzielania swoistych peptydów, które z kolei zwiększają jeszcze ruchliwość i inwazyjność komórek nowotworu. Zaczynają również wytwarzać enzymy proteolityczne. W tej fazie dochodzi do kolejnych mutacji i aberracji chromosomalnych i dalszego rozchwiania genomu komórki.

W zaawansowanej fazie progresji dochodzi do tworzenia przerzutów, które są ostatnim stadium procesu nowotworzenia złośliwego. Komórki nowotworowe odrywają się od guza pierwotnego i dostają się do naczyń krwionośnych lub limfatycznych. Następnie wędrują nimi do innych tkanek i tam tworzą wtórne ogniska nowotworowe. Zazwyczaj pierwsze zostają zaatakowane węzły chłonne i wątroba, które zatrzymują komórki stransformowane jako obce i próbują je zniszczyć. Przy obniżonej odporności organizmu nie są jednak w stanie zniszczyć wszystkich komórek inwazyjnych i same stają się wtórnym siedliskiem nowotworu. Procesy tworzenia przerzutów są ułatwione ze względu na swoiste cechy komórek nowotworowych, takie jak zmniejszona adhezja oraz wydzielanie enzymów proteolitycznych.

2.3. Mutacje genowe w raku piersi

Ostatnio zidentyfikowano wiele genów biorących udział w procesie nowotworowym lub ułatwiających go [6]. W przypadku raka piersi chodzi głównie o wspomniane już geny: BRCA1, BRCA2, P53, ATM i HER2. Większość z nich stanowią supresory transformacji nowotworowej, a tylko HER2 jest protoonkogenem.

Najlepiej poznany został gen P53. Wynika to z faktu, że jego mutacje są bardzo pospolite w różnych rodzajach nowotworów. Zlokalizowany jest on na krótkim ramieniu chromosomu 17 (17p13). Jego produkt białkowy (p53) jest fosfoproteina i znajduje się w jądrze. Białko p53 posiada zdolność wiązania określonych białek wirusowych tworząc z

nimi nieaktywne kompleksy. Może działać jako aktywator transkrypcji regulując pewne geny uczestniczące w podziale komórkowym, a także przeciwdziała powielaniu uszkodzonego DNA. Jeśli dochodzi do znacznego uszkodzenia DNA, aktywność p53 wzrasta, co zatrzymuje cykl komórkowy w fazie G₁ i daje czas do naprawy uszkodzeń. Ze względu na te właściwości jest nazywane strażnikiem genomu. Białko to pełni jeszcze jedną funkcję, a mianowicie bierze udział w inicjacji apoptozy, czyli programowanej śmierci komórki. Ma ona na celu wyeliminowanie komórek uszkodzonych, które np. po transformacji nowotworowej mogą stać się groźne dla organizmu. Gen P53 może być mutowany na różne sposoby, poznano już ponad 100 odmiennych mutacji, przy czym rodzaj mutacji jest różny dla różnych nowotworów. Wszystkie mutacje prowadzą do dezaktywacji produktu białkowego p53. Wiele z tych mutacji jest dominujących negatywnych, co oznacza, że produkt tak zmutowanego genu jest nieaktywny i dodatkowo dezaktywuje aktywne formy, które jeszcze pozostały w komórce. Skutkiem tego procesu jest niekontrolowany przebieg cyklu komórkowego, co skutkuje powielaniem uszkodzonego, nieprawidłowego DNA i prowadzi do szybkiego nagromadzenia kolejnych mutacji i zmniejszenia stabilności genetycznej komórki.

Podobne funkcje spełnia inny gen - Rb. Jego mutacje powodują głównie rozwój nowotworu siatkówki oka (siatkówczaka), ale są także często obserwowane w innych nowotworach, m.in. w raku sutka [7]. Gen ten znajduje się na 13 chromosomie (13q14). Jego produkt białkowy, pRb, ma tak samo jak p53 zdolność do wiązania pewnych białek wirusów onkogennych i dezaktywuje je tworząc z nimi kompleksy, a także bierze udział w regulacji podziałów komórkowych. Białko pRb jest fosfoproteiną i znajduje się w jądrze komórkowym. Przy wejściu w fazę S jest ono fosforylowane, a ulega defosforylacji podczas mitozy i wejścia w fazę G₁. Postać defosforylowana przez wiązanie z kompleksem transkrypcyjnym uniemożliwia transkrypcję genów, których produkty białkowe są niezbędne do replikacji DNA, i w ten sposób hamuje podział komórki. Przy wyłączeniu przez mutację lub delecję genu Rb dochodzi do niekontrolowanych podziałów komórkowych.

Innymi genami supresorowymi transformacji nowotworowej są geny BRCA1 i BRCA2, ułożone na chromosomach odpowiednio 17q21 i 13q12.3. Są one genami związanymi z dziedzicznym rakiem sutka [8]. Oba geny kodują białka będące czynnikami transkrypcji, a ich mutacje prowadzą do utraty funkcji. Mutacje te mogą być dziedziczne, a dziecko otrzymuje od rodziców mutacje w jednym allelu któregoś z tych genów. Do powstania raka konieczne jest uszkodzenie już tylko drugiego allelu. Dlatego też kobiety mające mutacje jednego z tych genów należą do grupy o wysokim ryzyku zachorowania na raka sutka. Mutacje genu BRCA1 warunkują powstawanie także innych rodzajów raka, m.in. jajnika. Nowotwory złośliwe piersi wywołane mutacją genu BRCA1 stanowią 60% wszystkich dziedzicznych raków sutka, zaś w przypadku genu BRCA2 ten udział wynosi 35%. Mutacje genu BRCA1 są dość częste; szacuje się, że występują u 1 osoby na 200-500.

Kolejnym genem będącym supresorem transformacji nowotworowej i mającym związek z rakiem sutka jest gen ATM. Jego produkt białkowy uczestniczy w wykrywaniu uszkodzeń DNA i ich naprawie [9]. Zmiany w tym genie

prowadzą do rozwoju ataksji teleangiectazji. Objawia się ona wieloma nieprawidłowościami fizjologicznymi i genetycznymi, a także zwiększonym ryzykiem zachorowania na różne nowotwory, w tym na raka sutka. Mutacje ATM występują dość rzadko - u 1 osoby na 40 000.

Ostatnio poznano jeszcze jeden gen, którego mutacje mogą wywoływać rozwój raka sutka. Jest nim protoonkogen HER-2/*neu* [10], zwany także c-erbB-2. Zlokalizowany został na chromosomie 17 (17q21), czyli znajduje się blisko genu BRCA1. Jego produktem jest białko HER-2, które jest powierzchniowym receptorem czynnika wzrostu z wewnętrzną aktywnością kinazy tyrozynowej. Jest on homologiczny do receptora naskórkowego czynnika wzrostu, ale nie identyczny. Amplifikacja onkogenu HER-2/*neu*, lub nadprodukcja HER-2, jest obserwowana w 25-30% przypadków wszystkich raków piersi. Skutkiem jest zwiększona ilość receptorów i nadmierne pobudzenie komórki przez czynniki wzrostu. Pod wpływem aktywacji receptora czynnikiem wzrostu dochodzi do jego autofosforylacji. Kinaza tyrozynowa fosforyluje reszty tyrozynowe w podblonowej części receptora. Rola onkogenu HER-2/*neu* w nasilaniu raka piersi nie jest dokładnie wyjaśniona, jednakże sugeruje się, że nasila on proliferację, formowanie naczyń krwionośnych, a także inwazyjność [11].

3. Terapia raka piersi

W walce z chorobami nowotworowymi bardzo istotne jest wczesne wykrycie choroby i wdrożenie terapii. Mamy do dyspozycji kilka metod leczenia. W przypadku raka piersi [12] można podzielić je na kilka podstawowych klas: leczenie chirurgiczne, radioterapia, chemioterapia, hormonoterapia, terapia biologiczna. Bliżej rozważone będą chemioterapia, hormonoterapia i terapia biologiczna.

3.1. Chemioterapia

Chemioterapia [13,14] to leczenie z zastosowaniem leków cytostatycznych. Niszczą one komórki szybko dzielące się, czyli głównie komórki nowotworowe. Działają na wiele sposobów, zakłócając rozwój lub podziały komórek, co w konsekwencji prowadzi do ich śmierci. Niedawno stwierdzono, że mechanizm działania tych leków polega na indukcji apoptozy w komórkach nowotworowych. Jest to proces odwrotny do procesu nowotworzenia. Zachodzi tu zatem supresja protoonkogenów lub indukcja supresorów transformacji nowotworowej.

Leki cytostatyczne są przenoszone przez krew i docierają do wszystkich komórek organizmu. Stąd też wynikają ich działania niepożądane, ponieważ komórki szybko dzielące się występują naturalnie w ustroju i są warunkiem szybkiej odbudowy tkanek. Cytostatyki uszkadzają je wywołując często efekt mieloszyniczny, neuropatię obwodową, wtłuszczenie skóry głowy oraz nudności i wymioty.

Chemioterapia jest stosowana pomocniczo, jako metoda zmniejszająca guz przed zabiegiem chirurgicznym, lub uzupełniająco po tym zabiegu, w celu zapobieżenia powstawaniu nawrotów choroby w miejscu pierwotnym oraz przerzutów w nowych siedliskach. Takie zastosowanie cytostatyków wydłuża czas przeżycia całkowitego chorych. Chemioterapia stosowana jest też jako leczenie podstawowe zaawansowanych raków piersi, zwłaszcza przy ich dynamicznym wzroście lub jeśli wystąpiły przerzuty, a także w przypadkach, gdy komórki raka nie mają receptorów

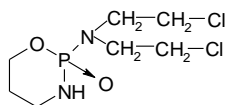
hormonowych lub gdy je posiadają, ale leczenie hormonalne nie przyniosło oczekiwanych wyników.

W terapii przeciwrakowej stosowanych jest ponad czterdzieści substancji czynnych, ale przy leczeniu raka piersi wykorzystuje się około dwudziestu. Klasyfikuje się je według ich mechanizmu działania [13,14].

Pochodne iperytu azotowego

Leki z tej grupy mają wiele działań ubocznych. Mogą powodować supresję szpiku: głównie leukopenię, a także trombocytopenię i niedokrwistość; nudności, wymioty, owrzodzenia błon śluzowych, wytyśnienie, krwotoczne zapalenie pęcherza moczowego, zaburzenia czynności gruczołów płciowych, a nawet wtórne nowotwory.

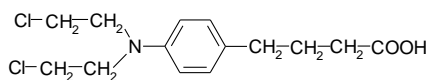
Cyklofosfamid (w Polsce wchodzi w skład preparatu o nazwie Endoxan):



2-tlenek2-[bis-(2-chloroetylo)amino]tetrahydro-2H-1,3,2-oksazafosforyny

Jeden z najczęściej stosowanych cytostatyków. Ma bardzo szeroki zakres działania przeciwnowotworowego. Jest niespecyficzny dla fazy, choć najsilniej działa w fazie S, gdy zachodzi intensywna synteza DNA.

Chlorambucil (Leukeran):



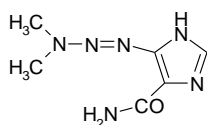
Kwas 4-{4-[bis-(2-chloroetylo)amino]fenylo}masłowy

Tworzy połączenia krzyżowe między dwoma łańcuchami DNA, czego skutkiem są zaburzenia replikacji. Ma też działanie immunosupresyjne.

Triazeny

Do działań niepożądanych tych terapeutyków zaliczamy: nudności, wymioty oraz uszkodzenie szpiku i wątroby, a także zakażenia grypopodobne.

Dakarbazyne (Dacarbazine):



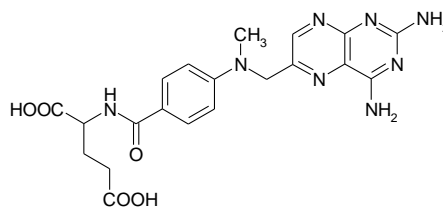
5-(3,3-dimetylo-1-triazeno)imidazolo-4-karboksamid

Wykazuje działanie alkilujące i antymetaboliczne. Powoduje zahamowanie syntezy puryn. Oddziałuje również z grupami SH. Wymaga aktywacji przez enzymy mikrosomalne wątroby.

Antagoniści kwasu foliowego

Są to leki bardzo toksyczne. Podobnie jak antagoniści pirymidyn, mogą one uszkadzać szpik, błonę śluzową przewodu pokarmowego i powodować stany zapalne, nadżerki, nudności, wymioty, biegunkę oraz wypadanie włosów, marskość wątroby, a także działać nefro- i neurotoksycznie.

Metotreksat (Methotrexat, Trexan):

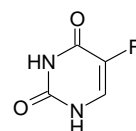


Kwas N-{p-[N-(2,4-diamino-6-pteridynylo)metylo]metyloamino]benzoilo}glutaminowy

Jest on inhibitorem dehydrogenazy tetrahydrofoliowej, enzymu, który redukuje kwas foliowy (dihydrofoliowy) do kwasu folinowego (tetrahydrofoliowego), aktywnej formy tej witaminy. Hamuje w ten sposób syntezę DNA i RNA, co prowadzi do zaburzenia funkcji życiowych komórki i jej śmierci. Wywiera także działanie immunosupresyjne.

Antagoniści pirymidyn

Fluorouracyl (Fluoro - uracyl):



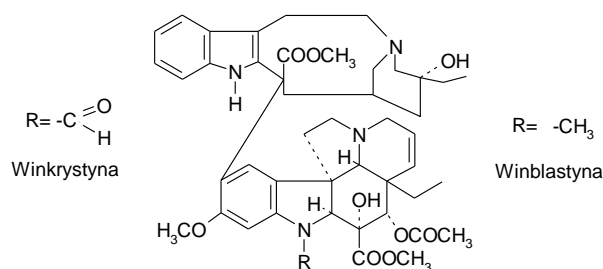
5- fluorouracyl

Wewnątrz komórki ulega on przekształceniu w postać czynną - fosfodeoksyrybonukleotyd (5-dUMP) i trifosforan fluorouracydyny (FUTP). 5-dUMP blokuje syntezę tymidylową, enzym syntetyzujący kwas tymidylowy. Hamuje tworzenie nowego DNA i prowadzi do śmierci komórki. Natomiast FUTP wbudowuje się do kwasu rybonukleinowego i blokuje fosfatazę uracylową, czego efektem jest powstawanie nieprawidłowego RNA i zaburzenia syntezy białek.

Alkaloidy *Vinca rosea* i ich analogi

Są swoiste fazowo, bo działają na fazę M. Mają więc właściwości antymitotyczne. Ich działania niepożądane manifestują się uszkodzeniem szpiku: granulocytopenią, niedokrwistością i małopłytkowością oraz zaburzeniami funkcji przewodu pokarmowego. Mogą wystąpić także objawy neurologiczne i zapalenie żył.

Winblastyna (Vinblastin, Velbe):

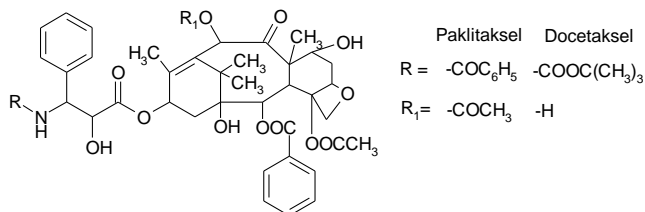


Te związki działają na wrzeciono podziałowe wiążąc się z tubuliną i hamując tworzenie mikrotubul, przez co prowadzą do zatrzymania podziału komórki w stadium metafazy. Zaburzają także produkcję energii potrzebnej do mitozy.

Taksoidy

Leki z tej grupy mogą powodować mielosupresję (uszkodzenia szpiku), reakcje nadwrażliwości na lek z obrzękiem naczynioruchowym i zaburzeniami oddychania oraz obrzęki i wysięki, bóle stawów i mięśni oraz wyłysienie. Działają także kardiotoksycznie i neurotoksycznie.

Paklitaksel (Taxol):

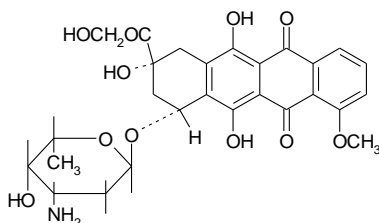


Interkaluje z mikrotubulami ułatwiając ich tworzenie z dimerów tubuliny [15]. Powstające niefunkcjonalne mikrotubule są dodatkowo stabilizowane, co uniemożliwia ich depolimeryzację. Powoduje to zahamowanie reorganizacji siatki mikrotubul niezbędnej do przebiegu podziału mitotycznego.

Antracykliny i związki pochodne

Również wywołują bardzo wiele działań ubocznych. Są przyczyną wyłysienia, nudności, wymiotów, zapaleń i nadżerek błon śluzowych. Mają kardiotoksyczne działanie różnej mocy: od zaburzeń rytmu po ostrą niewydolność lewokomorową i kardiomiopatię z zastoinową niewydolnością krążenia oraz działanie mielotoksyczne, jak leukopenia.

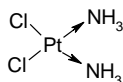
Doksorubicyna (Adriblastina, Biorubina, Doxolem, Rastocin):



Jest to antybiotyk swoisty dla cyklu komórkowego. Mechanizm działania polega na interkalacji z spiralą DNA, co powoduje miejscowe rozerwanie łańcucha, czego wynikiem jest szybkie zatrzymanie mitozy i syntezy kwasów nukleinowych. Działa w fazie S replikacji komórki, wywołując powstawanie aberracji chromosomowych.

Inne

Cisplatyna (Blastolem, Platamine, Platidium):



Jest to nieorganiczny kompleks platyny o mechanizmie działania zbliżonym do innych związków alkilujących. Cisplatyna jest swoista dla cyklu komórkowego, ale niespecyficzna fazowo, bardzo często powoduje nudności i wymioty, działa też oto- i nefrotoksycznie.

Przedstawione tu leki mogą być stosowane pojedynczo w monoterapii, np. paklitaksel lub docetaksel, jednak

zazwyczaj stosowane są różne programy leczenia, polegające na jednoczesnym podawaniu kilku leków, co daje lepsze efekty.

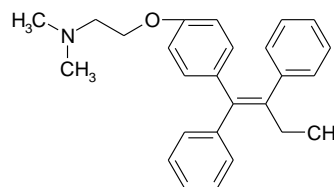
3.2. Hormonoterapia

Hormony, takie jak estrogeny, pobudzają stransformowane komórki do wzrostu, a tym samym przyczyniają się do rozwoju nowotworu. Podjęto więc próby hamowania rozwoju raka przez zapobieganie działaniu estrogenów w leczeniu hormonalnym, które jest skuteczne u około 30% ogółu chorych. Warunkiem skuteczności jest wrażliwość nowotworu na hormony, czyli obecność w jego komórkach receptorów estrogenowych i progesteronowych. Leczenie hormonalne prowadzi się różnymi metodami [16]:

- usunięcie źródła estrogenów w wyniku kastracji chirurgicznej, radiologicznej lub farmakologicznej;
- blokowanie receptora estrogenowego za pomocą anty-estrogenów, które zapobiegają połączeniu się estrogenu z receptorem i uniemożliwiają jego działanie.

Do antyestrogenów należą np.: tamoksyfen, toremifen, raloksyfen. Najczęściej stosowanym lekiem hormonalnym przy leczeniu raka piersi jest tamoksyfen.

Tamoksyfen (Nolvadex, Tamofen, Tamoxifen, Zitazonium):



(Z)-2-[p-(1,2-difenylo-1-butenylo)fenoksy]-N,N-dimetyloetyloamina

Działa on antagonistycznie do receptorów estrogenowych w komórkach raka piersi, przez co uniemożliwia przyłączenie się do nich estrogenu. Lek ten działa nie tylko na komórki raka, ale i na wszystkie inne, które posiadają receptory estrogenowe. Ma zatem korzystny wpływ na układ krążenia oraz w okresie pomenopauzalnym zapobiega obniżeniu się gęstości mineralnej kości. Jest to efektem jego częściowego działania agonistycznego na receptor estrogenowy w innych komórkach. Stosowany jest profilaktycznie u chorych z grupy wysokiego ryzyka, uzupełniając po zabiegu chirurgicznym oraz w leczeniu zaawansowanego raka piersi. We wszystkich przypadkach wykazuje dość dużą skuteczność, ale ma również działania niepożądane, zwłaszcza przy długotrwałej terapii. Należą do nich zwiększone ryzyko zatorów zakrzepowych i raka trzonu macicy [17].

3.3. Terapia biologiczna

Termin ten w przypadku raka piersi obejmuje immunoterapię: leczenie przeciwciałami monoklonalnymi i swoistą immunoterapię szczepionkami nowotworowymi oraz terapię genową [18]. Polegają one na stosowaniu związków naturalnie występujących w naszym organizmie. Metody te są dopiero na etapie badań klinicznych, ale wiąże się z nimi duże nadzieje.

Stosowanym już w lecznictwie przeciwciałem monoklonalnym jest trastuzumab [19] (Herceptin). Atakuje on zewnątrzkomórkową część białka HER-2, wiąże się z nim i je blokuje. HER-2 jest receptorem czynnika wzrostu, więc

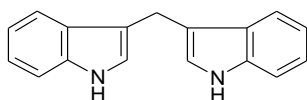
jego blokowanie zapobiega pobudzeniu komórki do wzrostu. Niestety lek ten jest skuteczny tylko wobec raka, który wykazuje nadprodukcję tego receptora, co ma miejsce w 25-30% przypadków. Może być stosowany sam, jak też w połączeniu z chemo- lub hormonoterapią, zwiększając ich skuteczność, a czasem występuje efekt synergistyczny [20]. Jest przy tym mało toksyczny.

Nadal trwają badania nad nowymi lekami, do których należą swoiste szczepionki nowotworowe. Jedną z nich jest Theratope, która stymuluje odpowiedź immunologiczną przeciw rakowemu antygenowi STn, inna zaś ma pobudzać reakcję przeciw komórkom z nadprodukcją receptora HER-2. Do nowości należą także preparaty genowe wprowadzające do komórki raka gen, który został w niej unieczynniony, a normalnie kontroluje cykl komórkowy i apoptozę, np. P53.

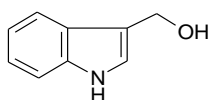
4. Poszukiwanie nowych związków przeciwnowotworowych

4.1. Występowanie i właściwości niektórych naturalnych pochodnych indolu

Znajdowanie w roślinach związków, które mogłyby posłużyć jako struktury wiodące w poszukiwaniu nowych chemioterapeutyków jest znaną strategią badawczą. Jednym z takich związków jest 3,3'-diindolilometan (DIM), który wykazuje działanie antyproliferacyjne w stosunku do komórek rakowych *in vitro*. Powstaje on w środowisku kwaśnym żołądka jako główny produkt kondensacji indolo-3-karbinolu (I3C) [21], który z kolei jest związkiem naturalnie tworzącym się w roślinach z rodziny *Cruciferae*, głównie z rodzaju *Brassica*. Został on znaleziony m.in. w kabaczkach, brokułach, brukselce i kalafiorze [22,23].



3,3'-diindolilometan (DIM)



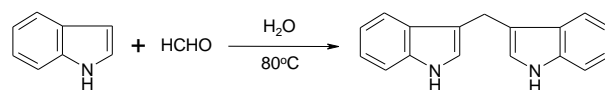
indolo-3-karbinol (I3C)

Aktywność DIM-u badano na modelu zwierzęcym i związek ten wykazał skuteczność przeciw nowotworom sutka [24], macicy [25,26], prostaty [27] i okrężnicy [28]. Najdokładniej zostało poznane działanie przeciwko rakowi piersi. DIM zmniejsza ryzyko powstania samorzutnych jak i indukowanych przez DMBA raków piersi [24], hamuje ich wzrost i prowadzi do apoptozy. Działa na komórki nowotworów zarówno zależnych od estrogeny jak i niezależnych. Obniża poziom protoonkogenu Bcl-2 jak i mRNA, z którego ten powstaje, a także podwyższa poziom białka Bax [29]. Białko Bcl-2 hamuje mechanizm apoptozy, natomiast Bax inicjuje śmierć komórek. Białka te łączą się ze sobą, przez co hamowane jest działanie białka Bax. DIM powoduje wystąpienie w przewodzie inicjatora apoptozy (Bax) nad jego inhibitorem (Bcl-2). Prowadzi to do zapoczątkowania apoptozy i ostatecznie śmierci komórki. Stwierdzono także, że DIM wywołuje zatrzymanie komórek w fazie G₁. Spowodowane jest to znaczną redukcją aktywności enzymatycznej cyklino-zależnej kinazy (CDK) 2 poprzez podwyższenie poziomu jej inhibitora, p21^{WAF1/CIP1} [30]. Wykazano także, że DIM wiąże się słabo z receptorem węglowodórów aromatycznych (Ah) i pobudza go, przez co indukuje ekspresję genu cytochromu P450 *CYP1A1*, co

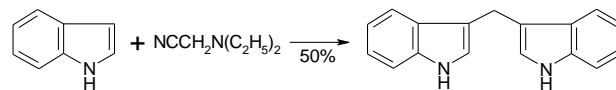
powoduje zwiększony metabolizm estrogeny i obniżenie jego poziomu we krwi, a to hamuje wzrost estrogeno-zależnych nowotworów [31]. Ma to jednak małe znaczenie, ponieważ pobudzenie syntezy cytochromu P450 pojawia się przy znacznie wyższych dawkach niż działanie przeciwestrogenowe, a co za tym idzie również przeciwnowotworowe [32]. Skuteczność działania 3,3'-diindolilometanu zainspirowała nas do wybrania go jako związku modelowego. W Katedrze i Zakładzie Chemii Organicznej Wydziału Farmaceutycznego rozpoczęto prace nad jego pochodnymi w celu znalezienia związków, które mogłyby być zastosowane jako leki przeciwnowotworowe.

4.2. Metody syntezy

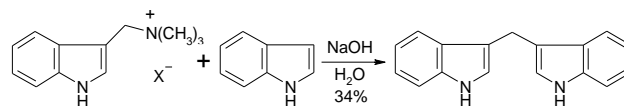
Podstawową metodą otrzymywania pochodnych 3,3'-diindolilometanu jest kondensacja odpowiednio podstawionego indolu. W piśmiennictwie naukowym zostało przedstawionych kilka metod przeprowadzenia takiej reakcji. W większości doniesienia pochodzą z lat 50-tych. Chronologicznie pierwszą metodą była kondensacja indolu z formaldehydem prowadzona bez dostępu światła, którą opisał Thesing [33]. Powstawał produkt z najlepszą jak do tej pory wydajnością równą 95,5%.



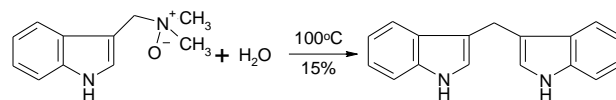
Następną była metoda z zastosowaniem *N,N*-dietyloaminoacetonitrylu, podczas której najpierw powstaje dietyloaminoskatol, a następnie zachodzi właściwa kondensacja [34].



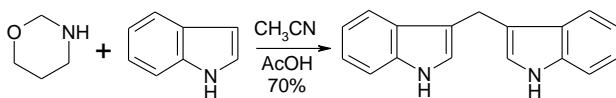
Sprężano także czwartorzędowe sole amoniowe skatolu z indolem w środowisku alkalicznym [35].



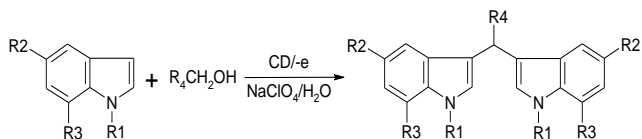
W następnej metodzie zastosowano *N*-tlenek graminy, który poddano działaniu wrzącej wody [36].



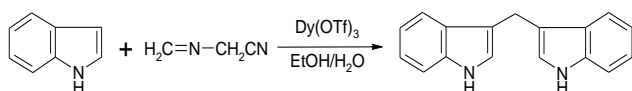
DIM można otrzymać również poprzez reakcję indolu z 1,3-oksazyną we wrzącym acetonitrylu z dodatkiem kwasu octowego [37].



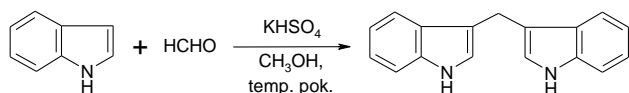
Pochodne DIM-u powstają także w wyniku anodowej oksydacji podstawionego indolu i alkoholu w obecności cyklodekstryn. DIM został otrzymany tą metodą z dobrą wydajnością 74% [38].



W ostatnich latach pojawiły się doniesienia o wykorzystaniu różnych katalizatorów, w celu polepszenia wyników kondensacji. W pierwszych próbach zastosowano triplat dysprozu jako katalizator i uzyskano DIM z niską wydajnością wynoszącą 18%. Lepsze wydajności otrzymano dla jego pochodnych [39].



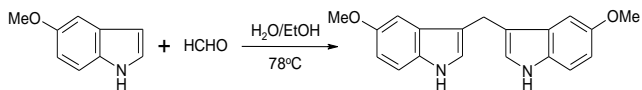
Następnym zastosowanym katalizatorem był wodorosiarczan potasu. W tym przypadku otrzymano znacznie lepsze wyniki, wydajność była wysoka (83%) [40].



4.3. Część doświadczalna

4.3.1. Otrzymywanie pochodnych 3,3'-diindolilometanu

W naszych pracach zajmowaliśmy się zarówno syntezą pierścienia indolu podstawionego w pozycji C5, metodą cyklizacji redukcijnej pochodnej styrenowej, jak i kondensacją pochodnych indolu metodą Thesinga. Pierwszym otrzymanym związkiem był 5,5'-dimetoksy-3,3'-diindolilometan [41].



Następnie otrzymano pochodne dinitrową [42] i dicyjanową według zmodyfikowanej metody Thesinga. Przy potwierdzaniu struktur związków metodą NMR w roztworach przypisanie sygnałów rezonansowych było możliwe dzięki wykorzystaniu korelacyjnych widm heterojądrowych ^1H / ^{13}C NMR. Przykładowe widmo HMBC 5,5'-dicyjano-3,3'-diindolilometanu pokazano niżej (Rys. 1). Przypisano sygnały atomów C6, C6', C4, C4' oraz C2, C2'.

4.3.2. Mechanizm reakcji kondensacji

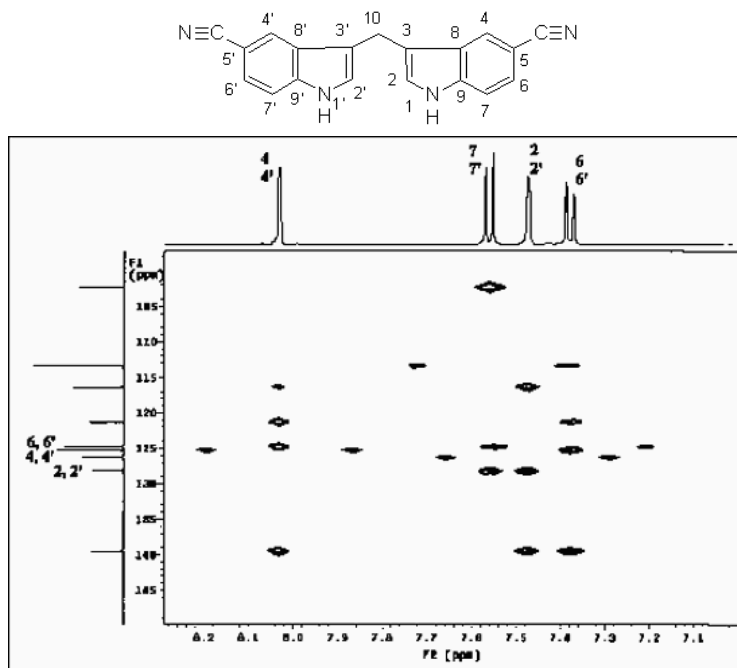
Mechanizm reakcji kondensacji indolu nie został dokładnie ustalony i powinien być przedmiotem dodatkowych badań. Możemy zaproponować [42] następującą kolejność przekształceń reagentów - Rys 2.

4.4. Aktywność biologiczna

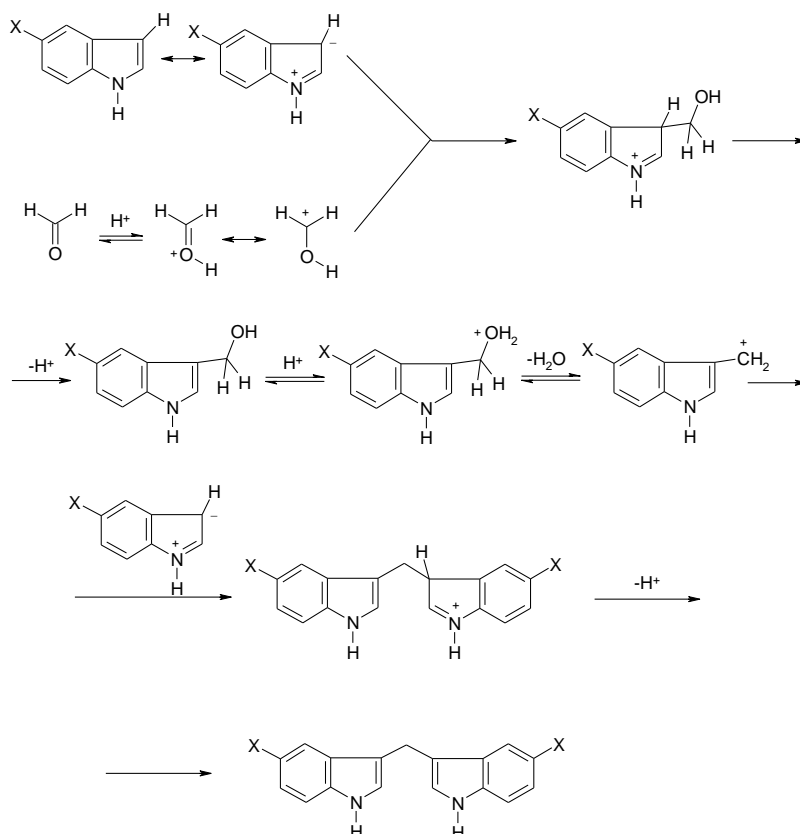
Pierwszą otrzymaną przez nas pochodną, 5,5'-dimetoksy-3,3'-diindolilometan, przekazano na badania przesiewowe do National Cancer Institute w Bethesda (USA). Próby przeprowadzono na trzech liniach komórek nowotworowych: MCF7 (nowotwór piersi), NCI-H460 (nowotwór płuc), SF-268 (nowotwór centralnego układu nerwowego, CUN). Związek okazał się bardzo skuteczny przeciw rakowi płuc, a nieco mniej przeciw nowotworom piersi i centralnego układu nerwowego [41]. Obecnie związek jest przedmiotem rozszerzonych badań na 60 liniach komórek nowotworowych.

4.5. Badania rentgenostrukturalne

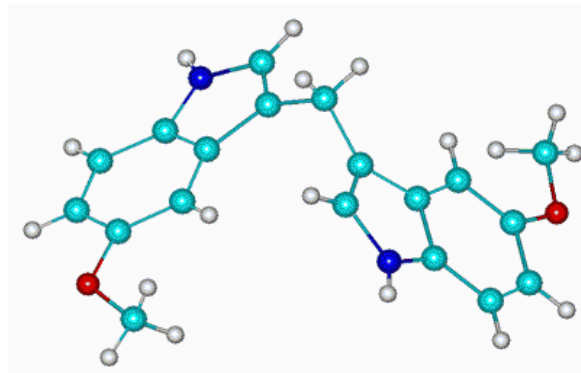
Przeprowadzono także badania krystalograficzne 5,5'-dimetoksy-3,3'-diindolilometanu. Poniższy rysunek (Rys. 3) jest prezentacją struktury krystalograficznej.



Rys. 1. Przykładowe widmo HMBC 5,5'-dicyjano-3,3'-diindolilometanu.



Rys 2. Proponowana kolejność przekształceń reagentów reakcji kondensacji indolu.



Rys. 3. Projekcja struktury krystalograficznej 5,5'-dimetoksy-3,3'-diindolilometanu.

Badania krystalograficzne ujawniły występowanie interesujących oddziaływań typu $\pi \cdots \pi$, mogących mieć znaczenie w interpretacji aktywności biologicznej pochodnych dim-u. Wyniki tych badań będą opublikowane osobno.

5. Podsumowanie

Wyniki badań biologicznych otrzymane w NCI (USA) dla 5,5'-dimetoksy-3,3'-diindolilometanu sugerują, że pochodne 3,3'-diindolilometanu, a w szczególności symetryczne 5,5'-dipodstawione pochodne wykazują oczekiwaną aktywność i powinny być poddane dalszym badaniom w celu sprawdzenia ich przydatności w terapii przeciwnowotworowej. W Katedrze prowadzone są syntezy dalszych związków o analogicznej strukturze oraz prace związane z optymalizacją metody cyklizacji redukcyjnej, prowadzącej do utworzenia pierścienia indolu zawierającego pożądane podstawniki.

WYKAZ SKRÓTÓW

DIM	3,3'-diindolilometan
<i>c-onc</i>	protoonkogen
DNA	kwas deokserybonukleinowy
BRCA1	gen dziedzicznego raka sutka 1
BRCA2	gen dziedzicznego raka sutka 2
P53	gen, jeden z supresorów transformacji nowotworowej
p53	produkt białkowy genu P53
Rb	gen, jeden z supresorów transformacji nowotworowej
pRb	produkt białkowy genu Rb
ATM	gen, jeden z supresorów transformacji nowotworowej
HER-2/ <i>neu</i> (c-erbB-2)	protoonkogen związany z rakiem sutka
HER-2	białkowy produkt genu HER-2/ <i>neu</i>

RNA	kwas rybonukleinowy
5-dUMP	fosfodeoksyrybonukleotyd
FUTP	trifosforan fluorourydyny
STn	jeden z rakowych antygenów
I3C	indolo-3-karbinol
DMBA	5,10-dimetylo-1,2-benzoantracen
Bcl-2	protoonkogen, inhibitor apoptozy
Bax	białko inicjujące apoptozę
mRNA	matrycowy kwas rybonukleinowy
CDK	cyklino-zależna kinaza
p21 ^{WAF1/CIP1}	inhibitor cyklino-zależnej kinazy
Ah	receptor węglowodorów aromatycznych
CYP1A1	gen cytochromu P450 podrodziny 1A1
MCF7	linia komórek nowotworu piersi
NCI-H460	linia komórek nowotworu płuc
SF-268	linia komórek nowotworu centralnego układu nerwowego
CUN	centralny układ nerwowy
NCI	National Cancer Institute

BIBLIOGRAFIA

- Podstawowe informacje o rozwoju demograficznym Polski w 2001 roku, www.stat.gov.pl
- Pietrzyk G., Młynarczyk Sz.: Leki współczesnej terapii w Polsce, 2004, 6, 50.
- Nebert D.W.: Toxicology, 2002, 181-182, 131.
- Levine A.J.: Ann. Rev. Biochem., 1993 62, 623.
- Pitot H.C.: Cancer, 1982, 49(6), 1206.
- Hollstein M., Sidransky D., Vogelstein B., Harris C.C.: Science, 1991, 253(5015), 49.
- Lee E.Y., To H., Shew J.Y., Bookstein R., Scully P., Lee W.H.: Science, 1988, 241(4862), 218.
- Yoshida K., Miki Y.: Cancer Sci., 2004 95(11), 866.
- Bretsky P. et al.: Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 2003, 12, 733.
- Chazin V.R., Kaleko M., Miller A.D., Slamon D.J.: Oncogene, 1992, 7, 1859.
- Menard S., Pupa S.M., Campiglio M., Tagliabue E.: Oncogene, 2003, 22, 6570.
- Pieńkowski T., Jaśkiewicz J., Wronkowski Zb., Zwierko M., Zatućki W.: Służba Zdrowia, 2000, 24-26, 2917.
- Pharminde 2003, MediMedia International Sp. z o. o.
- Janiec W., Krupińska J.: 1999, "Farmakodynamika" PZWL, Warszawa.
- Zając M., Pawełczyk E.: 2000, "Chemia leków" Akademia Medyczna im. Karola Marcinkowskiego, Poznań.
- Senkus-Konefka E.: Nowa Med., 2000, 10, 34.
- Pieńkowski T., Jagiełło-Gruszfeld Ag.: Nowa Med., 2001, 5/6, 13.
- Nawrocki S., Mackiewicz An.: Nowa Med., 2000, 10, 39.
- Untch M., Ditsch N., Hermelink K.: Expert Rev. Anticancer Ther., 2003, 3, 403.
- Pietras R.J., Fendly B.M., Chazin V.R., Pegram M.D., Howell S.B., Slamon D.J.: Oncogene, 1994, 9, 1829.
- Grose K.R., Bjeldanes L.F.: Chem. Res. Toxicol., 1992, 5, 188.
- McDanell R., McLean A., Hanley A., Heaney R., Fenwick G.: Food Chem. Toxicol., 1988, 26, 59.
- Loub W.D., Wattenberg L.W., Davis D.W.: J. Natl. Cancer Inst., 1975, 54, 985.
- Wattenberg L.W., Loub W.D.: Cancer Res., 1978, 38, 1410.
- Leong H., Firestone G.L., Bjeldanes L.F.: Carcinogenesis, 2001, 22, 1809.
- Chen D.Z., Qi M., Auborn K.J., Carter T.H.: J. Nutr., 2001, 131, 3294.
- Le H.T., Schaldach Ch.M., Firestone G.L., Bjeldanes L.F.: J. Biol. Chem., 2003, 278, 21136.
- Bonnesen Ch., Eggleston I.M., Hayes J.D.: Cancer Res., 2001, 61, 6120.
- Hong C., Firestone G.L., Bjeldanes L.F.: Biochem. Pharmacol., 2002, 63, 1085.
- Hong C., Kim H.A., Firestone G.L., Bjeldanes L.F.: Carcinogenesis, 2002, 23, 1297.
- Cover C.M., Hsieh S.J., Tran S.H., Hallden G., Kim G.S., Bjeldanes L.F., Firestone G.L.: J Biol Chem., 1998, 273, 3838.
- Chen I., McDougal A., Wang F., Safe S.: Carcinogenesis, 1998, 19, 1631.
- Thesing J.: Chem. Ber., 1954, 87, 692.
- Hellmann H., Lingens F.: Chem. Ber., 1954, 87, 940.
- Thesing J., Klüssendorf S., Ballach P., Mayer H.: Chem. Ber., 1955, 88, 1295.
- Henry D.W., Leete E.: J. Am. Chem. Soc., 1957, 79, 5254.
- Singh H., Singh K.: Tetrahedron, 1988, 44, 5897.
- Suda K., Takanami T.: Chem. Lett., 1994, 10, 1915.
- Xie W., Bloomfield K.M., Jin Y., Dolney N.Y., Wang P.G.: Syn. Lett., 1999, 4, 498.
- Nagarajan R., Perumal P.T.: Chem. Lett., 2004, 33, 288.
- Maciejewska D., Niemyjska M., Wolska I., Włostowski M., Rasztawicka M.: Z. Naturforsch., 2004, 56b, 1.
- Földeák S., Czombos J., Matkovics B., Pórszász J.: Acta Phys. Chem., 1965, 11, 115.