

Mikrotubule – cel terapii przeciwnowotworowej

Mariusz Szczepański, Alina Grzanka, Magdalena Izdebska

Leki stosowane w terapii przeciwnowotworowej hamują podziały patologicznych komórek oraz wprowadzają je na drogę apoptozy. Jedną z metod terapeutycznych jest ograniczenie proliferacji komórek nowotworowych poprzez wpływ na mikrotubule, które są m.in. elementem składowym wrzeciona kariokinetycznego. Zaburzenia w funkcjonowaniu tej struktury uniemożliwiają prawidłowy przebieg mitozy, przyczyniając się do zahamowania rozwoju nowotworu. Związki antymikrotubulinowe wpływają na masę polimeru, a także na stabilność i dynamikę mikrotubul. Biorąc pod uwagę ww. działania wyróżnia się dwie klasyfikacje czynników chemicznych oddziałujących z mikrotubulami. Jedną z nich jest ujęty w pracy podział utworzony w oparciu o lokalizację oddziaływań związków z mikrotubulami. Wyróżnia się Vinca alkaloidowe, paklitakselowe oraz kolchicynowe miejsca wiązania. Ograniczeniem klinicznego wykorzystania potencjału związków skierowanych przeciwko mikrotubulom jest oporność komórek nowotworowych.

Microtubules – a target in anticancer therapy

Drugs used in anticancer therapy repress divisions of pathologically changed cells and lead to apoptotic cell death. One of the available therapeutic methods is the inhibition of neoplastic cell proliferation through influence on the microtubules, which function as the component of the mitotic spindle. Disorders in the functioning of this cytoskeletal structure make the proper course of mitosis impossible, thus leading to the inhibition of tumor development. Antimicrotubulin agents alter polymer mass and cause changes in microtubule stability and dynamics. According to that, two classifications of microtubule interfering agents are distinguished. In our we describe one of these, that which bases on the localization of the interaction between antimicrotubulin agents with microtubules. The appropriate drugs include the Vinca alkaloid, paclitaxel and colchicine binding sites in the microtubule. The resistance of cancer cells to agents directed against the microtubules limits their use in therapy.

Słowa kluczowe: mikrotubule, nowotwory, Vinca alkaloidowe miejsca wiązania, paklitakselowe miejsca wiązania, kolchicynowe miejsca wiązania, oporność komórek nowotworowych

Key words: microtubules, cancer diseases, Vinca alkaloid binding site, paclitaxel binding site, colchicine binding site, cancer cell resistance

Wstęp

Komórki nowotworowe charakteryzują się nieograniczoną możliwością podziałów, a co się z tym wiąże, upośledzonym mechanizmem apoptozy. Apoptoza jest procesem fizjologicznym, który wymaga ekspresji wielu genów oraz aktywacji licznych procesów biochemicznych. Poza tym ten rodzaj śmierci w zależności od rodzaju komórki oraz czynnika indukującego może przebiegać w różny sposób i angażować liczne organella komórkowe, m.in. szlak zewnętrzny związany jest z receptorami błony komórkowej, wewnętrzny z mitochondrium, a indukowany stresem z siateczką śródplazmatyczną [1-3].

Leki stosowane w terapii przeciwnowotworowej opierają się głównie na ograniczeniu podziałów komórek patologicznych oraz wywołaniu apoptozy [4]. Obecnie stosowane cytostatyki przeciwnowotworowe najczęściej indukują programowaną śmierć komórki, uszkadzając jej DNA. Przykładem leków działających w taki sposób są inhibitory topoizomeraz DNA, które indukują jedno- oraz dwuniciowe pęknięcia DNA. Irinotekan – inhibitor topoizomerazy I DNA, czy też Etopozyd – inhibitor topoizomerazy II DNA, poprzez zaburzenia procesów transkrypcji i replikacji DNA znalazły zastosowanie w terapii m. in. ostrych białaczek, raka pęcherza moczowego, jelita grubego, drobnokomórkowego raka płuc oraz raka szyjki macicy [4-8]. Inną metodą wywołania apoptozy jest zahamowanie ekspresji genów, których produkty białkowe hamują apoptozę. Wysoki poziom antyapoptotycznych białek Bcl-2 zaobserwowano w białaczkach, raku prostaty oraz szpiczaku mnogim [9]. Wprowadzenie antysenso-

wych nukleotydów Bcl-2 (*Genasense*[®]) wpływa na zablokowanie mRNA białek antyapoptotycznych i umożliwia inicjację śmierci komórek [10]. Z drugiej strony możliwe jest także zwiększenie ekspresji białek proapoptotycznych, m.in. Bax, Bad i Bak (rak wątroby, szpiczak mnogi) [11, 12]. Liczne badania sugerują również zastosowanie terapii nowotworowej, związanej z aktywacją apoptozy poprzez receptory błonowe typu CD95 (białaczki, guzy mózgu) lub też indukcję kompleksu cytochrom c/Apaf1/kaspaza9 charakterystycznego dla mitochondrialnej ścieżki apoptozy (guzy mózgu) [9, 13-15]. Oprócz wyżej wymienionych leków przeciwnowotworowych, w celu indukcji apoptozy często stosuje się również inne cytostatyki hamujące cykl komórkowy. Do tej grupy należą m. in. taksany, które wpływają destrukcyjnie na wrzeciono podziałowe, umożliwiając indukcję apoptozy [16, 17]. Ze względu na dużą ilość związków chemicznych stosowanych w terapiach przeciwnowotworowych praca obejmuje tylko wąski ich zakres. Skupia się wyłącznie na wybranych terapeutykach skierowanych przeciwko mikrotubulom, które zaburzając działanie wrzeciona kariokinetycznego uniemożliwiają tym samym podział komórek.

Mikrotubule – struktura, dynamika i funkcje

Mikrotubule (przekrój ok. 25 nm) to kluczowe polimery białkowe cytoszkieletu, obecne we wszystkich komórkach *Eucaryota*. Zbudowane są z heterodimerów α - i β -tubuliny (o rozmiarach 4 nm x 5 nm x 8 nm i masie właściwej dimeru ok. 100 kDa), które gromadząc się tandemowo („głowa do ogona”) tworzą protofilamenty. Proces polimeryzacji wymaga dostarczenia energii z hydrolizy GTP i jest odwracalny. W wyniku asocjacji najczęściej 13 protofilamentów powstaje mikrotubula o kształcie „pustej rury”, której długość dochodzi do kilku mikrometrów. Rezultatem takiego typu polimeryzacji jest występowanie w „tubach” dwóch biegunów różniących się kinetyką przyłączania i usuwania heterodimerów z poszczególnych końców. W tak zwanym końcu „plus” kinetyka polimeryzacji i depolimeryzacji jest szybsza, niż na końcu „minus” [18, 19].

Te wysoce dynamiczne polimery podlegają ścisłej regulacji. Funkcjonalna różnorodność mikrotubul użytkowana jest poprzez wiązanie białek regulatorowych do rozpuszczonej tubuliny, jak również do powierzchni oraz poszczególnych końców mikrotubul. Białka związane z mikrotubulami czyli tzw. MAP (ang. *matrix associated proteins*) to m.in. MAP 1, MAP 2, surwiwina, statmina i dynaktyna 1. Ponadto tubulina ulega bardzo częstym modyfikacjom posttranslacyjnym (np. fosforylacja, poliglutamylacja czy acetylacja), które wpływają na funkcje mikrotubul. Wykazano również zmienny poziom ekspresji tubuliny w zależności od rodzaju komórki i tkanki. W przypadku tubuliny ludzkiej wyróżnia się kilka izotypów posiadających odmienne funkcje (6 form α -tubuliny oraz 7 form β -tubuliny) [18, 20, 21].

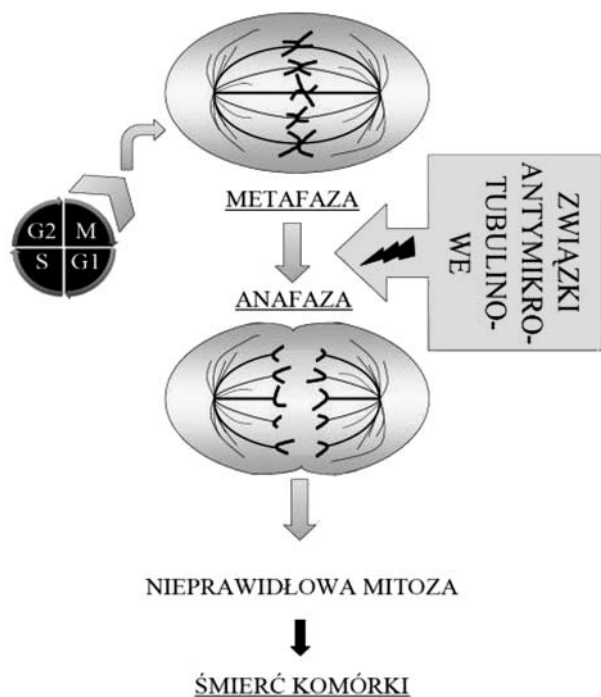
Szczególne własności mikrotubul opisują dwa procesy: „niestabilność dynamiczna” i *treadmilling*. Pierwszy

z nich (fluktuacja pomiędzy fazami elongacji i skracania) jest procesem, w którym polimery mikrotubulinowe podlegają wydłużonemu okresowi gromadzenia, po którym następuje gwałtowny okres demontażu tych struktur. Z kolei *treadmilling* polega na włączaniu dimerów tubulinowych na końcu „plus” i równoczesnym uwalnianiu ich z końca „minus”. Długość polimeru pozostaje niezmienna podczas przebiegu procesu, równocześnie utrzymując ciągle przepływ dimerów tubulinowych z końca „plus” do końca „minus” [18, 21, 22].

Mikrotubule (dzięki powyższym właściwościom) odpowiedzialne są za szereg istotnych procesów komórkowych. Opiswane struktury cytoszkieletu utrzymują kształt komórki oraz przestrzenną organizację jej cytoplazmy. Warunkują również transport wewnątrzkomórkowy wody i innych metabolitów oraz ze względu na tubularną budowę wici i rzęsek struktury te wpływają także na ruch całej komórki. Wszystkie wymienione procesy są istotne dla prawidłowego funkcjonowania komórki, jednakże ze strony fizjologicznej i terapeutycznej najistotniejszy jest dynamiczny udział mikrotubul w poprawnym działaniu wrzeciona podziałowego na wszystkich etapach podziału mitotycznego. W prometafazie uczestniczą w prawidłowym przyłączaniu chromosomów poprzez ich kinetochory do włókien wrzeciona kariokinetycznego. Podczas metafazy mikrotubule biorą udział w prawidłowym, szeregowym pozycjonowaniu chromosomów – tworzy się tzw. „płytko metafazowa”. Po przejściu punktu kontrolnego, zlokalizowanego na granicy metafazy i anafazy, mikrotubule uczestniczą w synchronicznym rozdzielaniu chromatyd podczas anafazy i telofazy. Dlatego więc zaburzenie funkcjonowania mikrotubul podczas mitozy wydaje się być najistotniejszym celem cytostatyków wykorzystywanych w terapii przeciwnowotworowej. Nieprawidłowy przebieg mitozy prowadzi do zatrzymania cyklu komórkowego (na granicy metafazy i anafazy) i ostatecznie komórka może zostać skierowana na drogę śmierci (apoptoza, katastrofa mitotyczna). Zasadność używania „trucizn mitotycznych” potwierdza fakt podwyższonej częstości podziałów większości komórek nowotworowych, w porównaniu z komórkami zdrowymi, który przekłada się na zwiększoną wrażliwość na te związki [18, 23, 24] (Ryc. 1).

Związki skierowane przeciwko mikrotubulom

Różnorodne związki chemiczne mają zdolność wiązania się z rozpuszczoną formą tubuliny i/lub z tubuliną bezpośrednio wchodzącą w skład cytoszkieletu. Większość tych związków posiada antymitotyczne właściwości oraz hamuje proliferację komórek poprzez wpływ na dynamikę polimeryzacji mikrotubul tworzących wrzeciono podziałowe. Efekt działania poszczególnych związków antymikrotubulinowych w kontekście zmian masy polimeru, stabilności oraz dynamiki mikrotubul jest bardzo złożony. Dlatego też wyróżnia się dwie ogólne klasyfikacje substancji chemicznych oddziałujących z mikrotubulami. Jedna z nich została utworzona w oparciu o miejsce wiązania danego związku do określonego regionu heterodimeru



Ryc. 1. Antymitotyczne działanie związków skierowanych przeciwko mikrotubulom. Pod wpływem ich działania dochodzi do zatrzymania podziału mitotycznego na granicy metafazy oraz anafazy, w wyniku czego komórka zostaje wprowadzona na drogę śmierci komórkowej

tubulinowego. Biorąc pod uwagę ten podział wyróżnia się *Vinca* alkaloidowe, paklitakselowe, kolchicynowe miejsca wiązania oraz jak dotąd niescharakteryzowane domeny. Druga grupa substancji antymikrotubulinowych powstała na podstawie efektu działania danego związku w kontekście zmiany dynamiki mikrotubul. W podziale tym wyróżnia się związki stabilizujące i destabilizujące mikrotubule, które odpowiednio wzmacniają lub też hamują ich polimeryzację [19, 25].

Vinca alkaloidowe miejsca wiązania

Naturalnie występujące *Vinca* alkaloidy, winkrystynę oraz winblastynę, po raz pierwszy odkryto w barwinku *Vinca rosea* Linn. (*Cathartus roseus* G. Don.). Liście tej rośliny wykorzystywane były już w siedemnastym wieku, jednakże dopiero pod koniec lat pięćdziesiątych ubiegłego stulecia, odkryto antymitotyczne właściwości oraz chemioterapeutyczny potencjał substancji występujących w tej roślinie [26, 27]. Sukces terapeutyczny naturalnych *Vinca* alkaloidów w leczeniu pacjentów chorych na nowotwory hematologiczne (głównie białaczki dziecięce) doprowadził do odkrycia ich różnorodnych półsyntetycznych analogów, m.in. windezyny, winorelbiny oraz winfluniny, jednakże jak większość przeciwnowotworowych leków, także i ta grupa związków wykazuje efekty uboczne (neuropatie obwodowe oraz mielosupresje odwracalne) [28]. Obecnie obszernym badaniom klinicznym (II faza) poddawana jest winflunina, która znalazła zastosowanie w zwalczaniu m.in. raka piersi, niedrobnokomórkowego raka płuc oraz raka pęcherza moczowego [29-31]. Alkaloidy *Vinca* działają na mikrotubule, wywołując depolime-

ryzację tych struktur. Stosowane w wysokich stężeniach (10-100 nM w komórkach linii HeLa) prowadzą do całkowitego zniszczenia struktury wrzeciona podziałowego, przez co w dzielących się komórkach nowotworowych dochodzi do zatrzymania mitozy [32]. W niskim, aczkolwiek istotnym klinicznie stężeniu ($IC_{50} = 0,8$ nM w komórek linii HeLa), winblastyna nie depolimeryzuje mikrotubul wrzeciona. Dochodzi jednak do zatrzymania komórek nowotworowych na etapie mitozy, a następnie śmierci apoptotycznej, która spowodowana jest prawdopodobnie supresją dynamiki mikrotubul, a nie ich depolimeryzacją [33]. Winblastyna przyłącza się do β -podjednostki dimerów tubulinowych, w określonym – *Vinca* alkaloidowym miejscu wiązania [34]. Alkaloidy wiążą się z wysokim powinowactwem do skrajnych krawędzi mikrotubul, natomiast z niskim do tubuliny tworzącej cytoskielet.

Zdolność wiązania do domeny alkaloidów *Vinca* posiadają również inne związki, m.in. dolastatyny, kryptoficyny, czy też halichondryny. Pierwsze z nich to oligopeptydy, izolowane z mięczaków morskich *Dolabella auricularia*. Początkowe badania ujawniły, że te antymitotyczne związki posiadają miejsce wiązania bardzo podobne z domeną *Vinca* alkaloidów, jednakże od czasu odkrycia faktu, iż dolastatyny nie są kompetycyjnymi inhibitorami winblastyny jest bardziej prawdopodobne, że miejsca wiązania do mikrotubul nie są identyczne, lecz nakładają się [34]. Dolastatyna-10 oraz dolastatyna-15 są najbardziej obiecującymi związkami o właściwościach antyproliferacyjnych spośród naturalnie występujących dolastatyn, dlatego są poddawane intensywnym próbom klinicznym. Niestety w monoterapii dolastatyna-10 nie wykazuje znaczącej aktywności przeciwnowotworowej u pacjentów z guzami litymi. Ciekawym przykładem jest jednak półsyntetyczna pochodna dolastatyny-10, TZT-1027, wykazująca zbliżoną, a nawet większą aktywność przeciwnowotworową od alkaloidów *Vinca* [35]. TZT-1027 poddany został badaniom klinicznym (I faza) w kombinacji z karboplatiną u pacjentów z guzami litymi, jednakże wywołał u chorych neutropenię, niedokrwistość oraz wymioty [36].

Kryptoficyna 1 wyizolowana została z cyjanobakterii *Nostoc*. Z mikrotubulami łączy się w *Vinca* alkaloidowym miejscu wiązania, a zatrzymanie na granicy faz G_2/M oraz apoptozę indukuje w bardzo małych dawkach (50 pM) [37]. Syntetyczne pochodne kryptoficyny 1 wykazują aktywność antynowotworową w eksponujących oporność wielolekową MDR (*multi drug resistance*) komórkach raka piersi oraz jajnika. Kryptoficyny w ww. nowotworach wykazały skuteczność terapii kombinowanej z 5 fluorouracylem, doksorubicyną, a także paklitaksellem. Przykładem opisywanych związków jest analog – LY355703, stosowany obecnie w badaniach klinicznych fazy II u pacjentek z opornym na związki platyny rakiem jajnika [38].

Halichondryn B jest makrolidem wyizolowanym z gąbek morskich rodzaju *Halichondria* i *Axinella*. Brak powszechnej dostępności naturalnego związku wymógł na naukowcach stworzenie sztucznego halichondrynu oraz jego analogów. Zachowujące właściwości zbliżone do produktu naturalnego związku chemiczne zaliczane

są do niekompetycyjnych inhibitorów *Vinca* alkaloidów, ponieważ ich miejsce wiązania do mikrotubul nie jest identyczne z ww. domeną. Przykładem prostego analogu halichondrynu B jest związek E7389, poddawany obiecującym badaniom klinicznym fazy II u pacjentek z opernym rakiem piersi [39, 40].

Paklitakselowe miejsce wiązania

Związki łączące się z paklitakselowym miejscem wiązania stabilizują dynamikę mikrotubul [41]. Po raz pierwszy w 1967 r. grupa naukowców wyizolowała z kory cisu zachodniego (*Taxus brevifolia*) zaliczany do taksanów paklitaksel [42]. Po otrzymaniu tego związku okazało się, że podobnie jak *Vinca* alkaloidy ma on właściwości przeciwnowotworowe, jednakże w przeciwieństwie do nich stymuluje polimeryzację mikrotubul [43]. Jak wykazały dalsze badania paklitaksel wiąże się z β -tubuliną po wewnętrznej stronie mikrotubul, przybierając strukturę o kształcie litery T [44, 45]. Obecnie paklitaksel wytwarzany jest na drodze półsyntetycznej, poprzez modyfikację 10-deacetylobakatyiny III, pochodzącej z cisu europejskiego *Taxus baccata* [46]. Ponadto z tego samego związku, jednakże na drodze innych przemian, produkowany jest drugi powszechnie stosowany taksan, półsyntetyczny analog paklitakselu – docetaksel [47]. Docetaksel w porównaniu z paklitakselom wykazuje dwa razy większą aktywność jako stabilizator mikrotubul oraz jako promotor gromadzenia się tubuliny [48]. Wyżej wymienione taksany są szeroko wykorzystywane w chemioterapii raka piersi, raka jajnika, raka pęcherza moczowego, niedrobnokomórkowego raka płuc, nowotworach głowy i szyi [48-54]. Jednakże mimo tak szerokiego zastosowania zarówno paklitaksel, jak i docetaksel charakteryzują się dużą neurotoksycznością, mielosupresją, słabą rozpuszczalnością w wodzie, a także występowaniem oporności wielolekowej MDR w traktowanych liniach nowotworowych. Obecnie uwaga naukowców skoncentrowana jest na przełamaniu ww. ograniczeń terapeutycznych. Kilka nowych półsyntetycznych taksanów, takich jak DJ-927, XRP6258 czy XRP9881, wykazujących większą aktywność przeciwnowotworową, niższą toksyczność, zwiększoną penetrację bariery krew-mózg oraz lepszą rozpuszczalność w wodzie, poddawanych jest badaniom klinicznym (I/II faza), m.in. u pacjentów z rakiem piersi, żołądka oraz niedrobnokomórkowym rakiem płuc [55-57].

Sukces kliniczny taksanów doprowadził do odkrycia innych związków wzmacniających polimeryzację mikrotubul. Zaliczamy do nich epotilony, diskodermolid, eleuterobin oraz laulimalid. Pierwsze trzy wymienione związki współzawodniczą z paklitakselom o miejsce wiązania do mikrotubul, bądź łączą się w pobliżu tej powierzchni, natomiast laulimalid posiada najprawdopodobniej unikalne miejsce wiązania.

Epotilon A oraz epotilon B zostały wyizolowane z ekstraktów miksobakterii *Sorangium cellulosum*, i jako pierwsze z nowo odkrywanych klas związków antymikrotubulinowych wykazały taksanowy mechanizm działania [58]. Dane określające zależności pomie-

dzy strukturą a aktywnością enzymatyczną oraz fakt współzawodnictwa o miejsce wiązania do mikrotubul sugerują występowanie powszechnego farmakoforu dla epotilonów i taksanów [59]. Jednakże istnieją również dowody, iż paklitaksel oraz epotilon A wiążą się do tubuliny w odmienny, unikatowy sposób [60]. Epotilony, w przeciwieństwie do paklitakselu, kilkadziesiąt razy lepiej rozpuszczają się w wodzie i nie są substratem dla P-glikoproteiny. Ich potencjał wykorzystywany jest w hamowaniu wzrostu linii komórkowych wykazujących oporność wielolekową MDR [61]. Epotilonowe analogi poddawane są obecnie zaawansowanym badaniom klinicznym, m.in. u pacjentów z rakiem piersi, jajnika, odbytu, prostaty, trzustki, czy też z niedrobnokomórkowym rakiem płuc. Przykładem półsyntetycznego analogu epitelonu B jest BMS-247550, który poddawany jest próbom klinicznym w fazach II i III [62].

Diskodermolid, wyizolowany z gąbki morskiej *Discodermia dissoluta*, to kolejny związek, który wiąże się do mikrotubul z większym powinowactwem niż paklitaksel. Podobnie jak epotilony, diskodermolid hamuje wzrost linii komórkowych posiadających fenotyp MDR [61]. W komórkach niedrobnokomórkowego raka płuc kombinacja synergistycznie działających diskodermolidu oraz paklitakselu wzmacnia efekt terapeutyczny [63]. Podobnie jak opisywany powyżej związek, także laulimalid izoluje się z gąbki morskiej *Cacospongia mycofijiensis*. Jest to związek stabilizujący mikrotubule o działaniu podobnym do paklitakselu. Hamuje proliferację komórkową przy IC_{50} wynoszącym kilka nanomoli, jak również jest słabym substratem dla P-glikoproteiny [64]. Badania Pryor'a i wsp. [65] wykazały, iż związek ten nie współzawodniczy z paklitakselom o miejsce przyłączania do mikrotubul, ponieważ posiada odmienną powierzchnię wiązania.

Kolchicynowe miejsce wiązania

Kolchicyna 1, alkaloid wyizolowany z szafranu *Colechicum autumnale*, jest klasycznym związkiem wiążącym tubulinę. Hamuje on asocjację heterodimerów tego białka oraz dynamikę mikrotubul. Wiązanie kolchicyna-tubulina jest powolnym procesem, silnie temperaturo-zależnym oraz praktycznie nieodwracalnym [66]. Kolchicyna może łączyć się z tubuliną w powierzchni α - β dimeryzacji, pierścieniem aromatycznym B z α podjednostką, a także pierścieniami A i C z β podjednostką tubuliny [67]. Wykazano, iż kolchicyna w mikromolarnym stężeniu może indukować apoptozę, działając tym samym jako czynnik przeciwnowotworowy [68]. Klinicznie od wielu lat wykorzystywana jest w leczeniu podagry, jednakże wykazując dużą toksyczność oraz niską aktywność w liniach komórkowych MDR nie jest wykorzystywana w terapii przeciwnowotworowej. Tak jak i w przypadku wyżej opisywanych związków naukowcy, chcąc ograniczyć szkodliwy wpływ kolchicyny, odkryli jej pochodne, m.in. ZD6126 oraz 2-metoksy-5-(2', 3', 4'-trimetoksyfenyl)-2,4,6-cykloheptatrien-1-on (MTC). ZD6126 jest rozpuszczalnym w wodzie analogiem kolchicyny. Pierwsze próby kliniczne przyniosły bezobjawową toksyczność sercową, bóle jamy

brzuszej oraz symptomy jelitowo-żołądkowe, które stały się powodem wstrzymania badań nad tym związkiem [69]. Obecnie lek ten stosuje się w terapii łączonej z gefitinibem dla wzmocnienia efektu antyangiogenego [70].

Kolejnym związkiem wiążącym się z kolchicynową domeną mikrotubul jest fosforan kombretastatyny-A4 (CA4P), wyizolowany z afrykańskiej rośliny *Combretum caffrum*. Hamuje on polimeryzację mikrotubul, jest toksyczny dla proliferujących komórek endotelialnych *in vivo* oraz wykazuje przeciwnacyniowy mechanizm działania [71]. Wczesne próby kliniczne (I faza) wykazały, że CA4P może wpływać na czynność potencjału repolaryzacyjnego oraz przepływ jonów K^+ w komorach mięśnia sercowego [72]. W innym przypadku podawanie tego leku wywołało zatrzymanie pracy serca, hipotensję, ataksję, duszność sercową, bóle głowy i neuropatię czuciową [73].

Duża toksyczność stosowanych w monoterapiach trucizn mikrotubulinowych, wiążących się do miejsca kolchicynowego, jak dotąd nie przyniosła oczekiwanych sukcesów klinicznych. Przyszłością staje się wykorzystanie terapii kojarzonych. Obiecujące staje się również rozwijanie nowych leków, łączących w sobie najlepsze cechy istniejących dotychczas klas związków antymikrotubulinowych. Powstają takie związki jak kolchitaksel, które być może skutecznią terapię przeciwnowotworową [74].

Problem lekooporności związany z chemoterapeutykami skierowanymi przeciwko mikrotubulom

Jednym z głównych ograniczeń pomyślnego leczenia nowotworów ludzkich jest oporność na terapię przeciwnowotworową. Nabyta niewrażliwość na leki oddziałujące z mikrotubulami zmniejsza ich skuteczność działania.

Wyróżnia się cztery podstawowe mechanizmy, poprzez które komórki nowotworowe nabywają oporność. Pierwszy związany jest ze wzmożoną ekspresją białka MDR, która wpływa na zwiększenie emanacji leku, zapobiegając w ten sposób jego akumulacji w komórce. Białko MDR jest 170 kDa transmembranową pompą,

która usuwa hydrofobowe związki z komórki i jest główną przyczyną chemooporności na różnorodne leki, także i te skierowane przeciwko mikrotubulom. Drugi mechanizm oporności oparty jest na możliwości wystąpienia mutacji genów kodujących podjednostki α i β -tubuliny, które zapobiegają wiązaniu się chemoterapeutyków do mikrotubul. Kolejny z mechanizmów uwarunkowany jest występowaniem różnych izotypów α i β -tubuliny, które ulegając ekspresji na zmiennym poziomie, w zależności od tkanki, mogą wpływać na zaistnienie oporności na leki oddziałujące ze strukturami cytoszkieletu. Ostatni z opisywanych mechanizmów związany jest z manipulacją ekspresji genów kodujących białka MAP. Zmiany w obrębie białek związanych z mikrotubulami mogą zaburzać ich funkcje, a także mieć wpływ na pojawienie się oporności na związki skierowane przeciwko tym strukturalom [75, 76]. Mechanizmy oporności wraz z wybranymi przykładami przedstawia Tabela I.

Podsumowanie

Obecnie w fazie przedklinicznej oraz na etapie klinicznych badań ocenianych jest kilkadziesiąt związków wiążących się z tubuliną. W skład tej grupy substancji, które oddziałują w różnych miejscach wiązania do mikrotubul, odnaleźć możemy zarówno produkty naturalne, ich półsyntetyczne pochodne, jak również całkowicie sztuczne. Pierwsze związki antymikrotubulinowe były badane klinicznie już ponad czterdzieści lat temu i nadal są stosowane w terapii przeciwnowotworowej. W przyszłości szerszy zakres badań nad lekami skierowanymi przeciwko mikrotubulom skupiony będzie głównie na zwiększeniu efektywności klinicznej, poprzez rozwijanie terapii łączonych działających synergistycznie związków antymikrotubulinowych oraz łączenie ich w terapii ze związkami zaburzającymi inne procesy komórkowe. Kolejne aspekty doświadczeń to projektowanie nowych związków łączących się do końca „plus” mikrotubul; tworzenie analogów obecnie znanych substancji posiadających lepsze właściwości terapeutyczne, a także rozwój

Tab. I. Mechanizmy oporności komórek nowotworowych wraz z wybranymi przykładami

Rodzaj oporności	Mechanizm działania	Przykład
Oporność wielolekowa (MDR)	Produkt genu <i>Mdr1</i> , P-glikoproteina, jest transmembranową pompą odpowiedzialną za emanację i oporność na chemoterapeutyki, komórki bogate w P-glikoproteinę posiadają zmniejszoną wrażliwość na te leki	Ekspresja cDNA ludzkiego genu <i>MDR1</i> , w embrionalnych fibroblastach mysich linii NIH 3T3 oraz nowotworowych komórkach pochodzenia skórno linii ludzkiej KB, nadaje fenotyp wielolekowej oporności na: kolchicynę, dokсорubicynę oraz winblastynę [77]
Oporność związana z mutacjami tubuliny	Mutacje punktowe β -tubuliny ograniczają wiązanie leku do mikrotubul, wpływając na obniżenie ich skuteczności	Mutacje tubuliny związane są z opornością komórek limfoblastycznych linii białaczkowych poddanych działaniu dezoksypotilonu B (dEpoB) [78]
Oporność związana z występowaniem izotypów tubuliny	Różnorodny poziom ekspresji izotypów tubuliny może mieć wpływ na obniżenie efektywności związków chemoterapeutycznych	Zwiększenie ekspresji klas III i IVa β -tubuliny wywołuje oporność w komórkach epitelialnych raka jajnika poddanych działaniu taksolu [79]
Oporność związana z zaburzeniami ekspresji białek MAP	Manipulacje ekspresji białek MAP mogą wpływać na zmianę dynamiki mikrotubul oraz być związane z pojawieniem się lekooporności na związki skierowane przeciwko tym strukturalom	Nadekspresja statminy związana jest z obniżeniem poziomu polimeryzacji mikrotubul oraz ze zmniejszoną wrażliwością na paklitaksel w komórkach raka piersi [80]

czynników wpływających na białka MAP, pośrednio zaburzających funkcjonowanie mikrotubul. Każda z ww. dróg badawczych może istotnie zwiększyć skuteczność obecnie stosowanych klinicznie terapii przeciwnowotworowych. Wszystko na to wskazuje, że mikrotubule jeszcze długo pozostaną w kręgu zainteresowań naukowego świata walczącego z rakiem.

Mgr Mariusz Szczepański

Katedra i Zakład Histologii i Embriologii
Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy
UMK w Toruniu
ul. Karłowicza 24 85-092 Bydgoszcz
e-mail: mariusz.szczepanski@cm.umk.pl

Piśmiennictwo

- Cywińska A, Baś M, Krzyżowska M i wsp. Apoptoza – programowana śmierć komórki. Część I. Mechanizmy apoptozy. *Życie Weterynaryjne* 2004; 10: 552-8.
- Baś M, Cywińska A, Sokółowska J i wsp. Apoptoza – programowana śmierć komórki. Część III. Rola apoptozy w procesach fizjologicznych i patologicznych. *Życie Weterynaryjne* 2004; 12: 671-5.
- Krzyżowska M, Sokółowska J, Baś M i wsp. Apoptoza – programowana śmierć komórki. Część IV. Apoptoza w nowotworach – mechanizmy regulacji i możliwości terapeutyczne. *Życie Weterynaryjne* 2005; 1: 24-8.
- Abend M. Reasons to reconsider the significance of apoptosis for cancer therapy. *Int J Radiat Biol* 2003; 79: 927-41.
- Deptała A, Omyła-Staszewska J. Inhibitory topoizomerazy. I-unikalna grupa leków przeciwnowotworowych. *Współczesna Onkologia* 2003; 7: 45-53.
- Hars ES, Lyu YL, Lin CP i wsp. Role of apoptotic nuclease caspase-activated DNase in etoposide-induced treatment-related acute myelogenous leukemia. *Cancer Res* 2006; 66: 8975-9.
- Davis MP, Murthy MS, Simon J i wsp. Successful management of small cell carcinoma of the bladder with cisplatin and etoposide. *J Urol* 1989; 142: 817.
- Ohe Y. Chemoradiotherapy for lung cancer. *Expert Opin Pharmacother* 2005; 6: 2793-2804.
- Debatin KM. Apoptosis pathways in cancer and cancer therapy. *Cancer Immunol Immunother* 2004; 53: 153-9.
- Kim R, Emi M, Matsuura K i wsp. Antisense and nonantisense effects of antisense Bcl-2 on multiple roles of Bcl-2 as a chemosensitizer in cancer therapy. *Cancer Gene Ther* 2007; 14: 1-11.
- Spets H, Stromberg T, Georgii-Hemming P i wsp. Expression of the bcl-2 family of pro- and anti-apoptotic genes in multiple myeloma and normal plasma cells: regulation during interleukin-6(IL-6)-induced growth and survival. *Eur J Haematol* 2002; 69: 76-89.
- Wang QF, Chen JC, Hsieh SJ i wsp. Regulation of Bcl-2 family molecules and activation of caspase cascade involved in gypenosides-induced apoptosis in human hepatoma cells. *Cancer Lett* 2002; 183: 169-78.
- Friesen C, Fulda S, Debatin KM. Cytotoxic drugs and the CD95 pathway. *Leukemia* 1999; 13: 1854-8.
- Fulda S, Scaffidi C, Pietsch T i wsp. Activation of the CD95 (APO-1/Fas) pathway in drug- and gamma-irradiation-induced apoptosis of brain tumor cells. *Cell Death Differ* 1998; 5: 884-93.
- Yoshida H, Kong YY, Yoshida R i wsp. Apaf1 is required for mitochondrial pathways of apoptosis and brain development. *Cell* 1998; 94: 739-50.
- Hadfield JA, Ducki S, Hirst N i wsp. Tubulin and microtubules as targets for anticancer drugs. *Prog Cell Cycle Res* 2003; 5: 309-25.
- Pawlicki M, Wiczyńska B. New anticancer drugs-future directions. *Nowotwory J Oncol* 2001; 51: 507-14.
- Nogales E. Structural insights into microtubule function. *Annu Rev Biochem* 2000; 69: 277-302.
- Mollinedo F, Gajate C. Microtubules, microtubule-interfering agents and apoptosis. *Apoptosis* 2003; 8: 413-50.
- Valiron O, Caudron N, Job D. Microtubule dynamics. *Cell Mol Life Sci* 2001; 58: 2069-84.
- Desai A, Mitchison TJ. Microtubule Polymerization Dynamics. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1997; 13: 83-117.
- Waterman-Storer CM, Salmon ED. Microtubule dynamics: Treadmilling comes around again. *Curr Biol* 1997; 7: 369-72.
- Gadde S, Heald R. Mechanisms and molecules of the mitotic spindle. *Curr Biol* 2004; 14: 797-805.
- Ricci MS, Zong WX. Chemotherapeutic approaches for targeting cell death pathways. *Oncologist* 2006; 11: 342-57.
- Chechci PM, Nettles JH, Zhou J i wsp. Microtubule-interacting drugs for cancer treatment. *Trends Pharmacol Sci* 2003; 24: 361-5.
- Johnson IS, Wright HF, Svoboda GH. Experimental basis for clinical evaluation of anti-tumor principles derived from *Vinca rosea* Linn. *J Lab Clin Med* 1959; 54: 830-7.
- Noble RL, Beer CT, Cutts JH. Further biological activities of vincalcalbin: an alkaloid isolated from *Vinca rosea* (L.). *Biochem Pharmacol* 1958; 1: 347-8.
- Gidding CE, Kellie SJ, Kamps WA i wsp. Vincristine revisited. *Crit Rev Oncol Hematol* 1999; 29: 267-87.
- Campone M, Cortes-Funes H, Vorobiof D i wsp. Vinflunine: a new active drug for second-line treatment of advanced breast cancer. Results of a phase II and pharmacokinetic study in patients progressing after first-line anthracycline/taxane-based chemotherapy. *Br J Cancer* 2006; 95: 1161-6.
- Bennouna J, Breton JL, Tourani JM i wsp. Vinflunine – an active chemotherapy for treatment of advanced non-small-cell lung cancer previously treated with a platinum-based regimen: results of a phase II study. *Br J Cancer* 2006; 94: 1383-8.
- Culine S, Theodore C, De Santis M i wsp. A phase II study of vinflunine in bladder cancer patients progressing after first-line platinum-containing regimen. *Br J Cancer* 2006; 94: 1395-1401.
- Jordan MA, Thrower D, Wilson L. Mechanism of inhibition of cell proliferation by *Vinca* alkaloids. *Cancer Res* 1991; 51: 2212-22.
- Jordan MA. Mechanism of action of antitumor drugs that interact with microtubules and tubulin. *Curr Med Chem Anti-Canc Agents* 2002; 2: 1-17.
- Bai RB, Pettit GR, Hamel E. Binding of dolastatin 10 to tubulin at a distinct site for peptide antimetabolic agents near the exchangeable nucleotide and *Vinca* alkaloid sites. *J Biol Chem* 1990; 265: 17141-9.
- Otani M, Natsume T, Watanabe JI i wsp. TZZT-1027, an antimicrotubule agent, attacks tumor vasculature and induces tumor cell death. *Jpn J Cancer Res* 2000; 91: 837-44.
- Greystoke A, Blagden S, Thomas AL. A phase I study of intravenous TZZT-1027 administered on day 1 and day 8 of a three-weekly cycle in combination with carboplatin given on day 1 alone in patients with advanced solid tumours. *Ann Oncol* 2006; 17: 1313-9.
- Shih C, Teicher BA. Cryptophycins: A novel class of potent antimetabolic antitumor depsipeptides. *Curr Pharm Des* 2001; 7: 1259-76.
- D'Agostino G, del Campo J, Mellado B i wsp. A multicenter phase II study of the cryptophycin analog LY355703 in patients with platinum-resistant ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer* 2006; 16: 71-6.
- Towle MJ, Salvato KA, Budrow J i wsp. In vitro and in vivo anticancer activities of synthetic macrocyclic ketone analogues of halichondrin B. *Cancer Res* 2006; 61: 1013-21.
- Blum L, Forero J, Heiskala MK, Meneses N i wsp. E7389, a novel anti-tubulin, in patients with refractory breast cancer. *J Clin Oncol* 2006; 24: 653.
- Altmann KH. Microtubule-stabilizing agents: a growing class of important anticancer drugs. *Curr Opin Chem Biol* 2001; 5: 424-31.
- Wani MC, Taylor HL, Wall ME i wsp. Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *J Am Chem Soc* 1971; 93: 2325-7.
- Schiff PB, Fant J, Horwitz SB. Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol. *Nature* 1979; 277: 665-7.
- Nogales E, Wolf SG, Khan IA i wsp. Structure of tubulin at 6.5 Å and location of the taxol-binding site. *Nature* 1995; 375: 424-7.
- Snyder JP, Nettles JH, Cornett B i wsp. The binding conformation of Taxol in beta-tubulin: a model based on electron crystallographic density. *PNAS* 2001; 98: 5312-6.
- Rowinsky EK, Cazenave LA, Donehower RC. Taxol: A novel investigational antimicrotubule agent. *J Natl Cancer Inst* 1990; 82: 1247-59.
- Horwitz SB. How to make taxol from scratch. *Nature* 1994; 367: 593-4.
- Ringel I, Horwitz SB. Studies with RP 56976 (Taxotere): a semisynthetic analogue of taxol. *J Natl Cancer Inst* 1991; 83: 288-91.
- O'Brien ME, Leonard RC, Barrett-Lee PJ i wsp. Docetaxel in the community setting: An analysis of 377 breast cancer patients treated with docetaxel (Taxotere) in the UK. *Ann Oncol* 1999; 10: 205-10.

50. McGuire WP, Hoskins WJ, Brady MF i wsp. Cyclophosphamide and cisplatin compared with paclitaxel and cisplatin in patients with stage III and stage IV ovarian cancer. *N Engl J Med* 1996; 334: 1-6.
51. Huisman C, Smit EF, Giaccone G i wsp. Second-line chemotherapy in relapsing or refractory Non-Small-Cell Lung Cancer: a review. *J Clin Oncol* 2000; 18: 3722-30.
52. Forastiere AA, Shank D, Neuberg D i wsp. Final report of a phase II evaluation of paclitaxel in patients with advanced squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer* 1998; 82: 2270.
53. Krasieńska L, Jassem J. Rola taksanów w leczeniu zaawansowanego raka piersi. *Nowotwory J Oncol* 2003; 53: 176-84.
54. Gliński B, Urabński J, Mitus M. Leczenie chorych na miejscowo zaawansowanego i rozlanego raka pęcherza moczowego. *Nowotwory J Oncol* 2005; 55: 324-8.
55. Engels FK, Sparreboom A, Mathot RAA i wsp. Potential for improvement of docetaxel-based chemotherapy: a pharmacological review. *Br J Cancer* 2005; 93: 173-7.
56. Evans T, Dobrila R, Berardi R i wsp. A phase II study of DJ-927 as second-line therapy in patients (pts) with advanced gastric cancer (GC) who have failed a 5-FU non taxane based regimen. *J Clin Oncol* 2006; 24: 4081.
57. Sessa C, Cuvier C, Caldiera S i wsp. Phase I clinical and pharmacokinetic studies of the taxoid derivative RPR 109881A administered as a 1-h or a 3-h infusion in patients with advanced solid tumors. *Ann Oncol* 2002; 13: 1140-50.
58. Bollag DM, McQueney PA, Zhu J i wsp. Epothilones, a new class of microtubule-stabilizing agents with a taxol-like mechanism of action. *Cancer Res* 1995; 55: 2325-33.
59. He L, Jagtap PG, Kingston DG i wsp. A common pharmacophore for Taxol and the epothilones based on the biological activity of a taxane molecule lacking a C-13 side chain. *Biochemistry* 2000; 39: 3972-8.
60. Nettles JH, Li H, Cornett B i wsp. The binding mode of epothilone A on alpha, beta-tubulin by electron crystallography. *Science* 2004; 30: 866-9.
61. Kowalski RJ, Giannakakou P, Hamel E. Activities of the microtubule-stabilizing agents epothilones A and B with purified tubulin and in cells resistant to paclitaxel (Taxol(R)). *J Biol Chem* 1997; 272: 2534-41.
62. Low JA, Wedam SB, Lee JJ i wsp. Phase II clinical trial of ixabepilone (BMS-247550), an epothilone B analog, in metastatic and locally advanced breast cancer. *J Clin Oncol* 2005; 23: 2726-34.
63. Honore S, Kamath K, Braguer D i wsp. Synergistic suppression of microtubule dynamics by discodermolide and paclitaxel in non-small cell lung carcinoma cells. *Cancer Res* 2004; 64: 4957-64.
64. Mooberry SL, Tien G, Hernandez AH i wsp. Laulimalide and isolaulimalide, new paclitaxellike microtubule-stabilizing agents. *Cancer Res* 1999; 59: 653-60.
65. Pryor DE, O'Brate A, Bilcer G i wsp. The microtubule stabilizing agent laulimalide does not bind in the taxoid site, kills cells resistant to paclitaxel and epothilones, and may not require its epoxide moiety for activity. *Biochemistry* 2002; 41: 9109-15.
66. Hastie SB. Interactions of colchicine with tubulin. *Pharmacol Ther* 199; 51: 377-401.
67. Chaudhuri AR, Seetharamalu P, Schwarz PM i wsp. The interaction of the B-ring of colchicine with alpha-tubulin: A novel footprinting approach. *J Mol Biol* 2000; 303: 679-92.
68. De Vincenzo R, Scambia G, Ferlini C i wsp. Antiproliferative activity of colchicine analogues on MDR-positive and MDRnegative human cancer cell lines. *Anticancer Drug Des* 1998; 13: 19-33.
69. Lorusso PM, Gadgeel S, Wozniak A i wsp. A phase I dose escalation trial of ZD6126, a novel vascular targeting agent, in patients with cancer refractory to other treatments. *Clin Cancer Res* 2001; 7: supl. abstract 36.
70. Bozec A, Lassalle S, Gugenheim J i wsp. Enhanced tumour antiangiogenic effects when combining gefitinib with the antivascular agent ZD6126. *Br J Cancer* 2006; 95: 722-8.
71. Holwell SE, Cooper PA, Thompson MJ i wsp. Anti-tumor and anti-vascular effects of the novel tubulin-binding agent combretastatin 1 phosphate. *Anticancer Res* 2002; 22: 3933-40.
72. Cooney MM, Radivoyevitch T, Dowlati A i wsp. Cardiovascular safety profile of combretastatin – A4-phosphate in a single-dose phase I study in patients with advanced cancer. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 96-100.
73. Stevenson JP, Rosen M, Sun W i wsp. Phase I trial of the antivascular agent combretastatin A4 phosphate on a 5-day schedule to patients with cancer: magnetic resonance imaging evidence for altered tumor blood flow. *J Clin Oncol* 2003; 21: 4428-38.
74. Bombuwala K, Kinstle T, Popik V i wsp. Colchitaxel, a coupled compound made from microtubule inhibitors colchicine and paclitaxel. *Beilstein Journal of Organic Chemistry* 2006; 2: 1-9.
75. Drukman S, Kavallaris M. Microtubule alterations and resistance to tubulin-binding agents. *Int J Oncol* 2002; 21: 621-28.
76. Verrills NM, Kavallaris M. Improving the targeting of tubulin-binding agents: lessons from drug resistance studies. *Curr Pharm Des* 2005; 11: 1719-33.
77. Ueda K, Cardarelli C, Gottesman MM i wsp. Expression of a full-length cDNA for the human "MDR1" gene confers resistance to colchicine, doxorubicin, and vinblastine. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 3004-8.
78. Verrills NM, Flemming CL, Liu M i wsp. Microtubule alterations and mutations induced by desoxyepothilone B: implications for drug-target interactions. *Chem Biol* 2003; 10: 597-607.
79. Kavallaris M, Kuo DY, Burkhart CA i wsp. Taxol-resistant epithelial ovarian tumors are associated with altered expression of specific beta-tubulin isotypes. *J Clin Invest* 1997; 100: 1282-93.
80. Ali E, Bash-Babula J, Yang JM i wsp. Effect of stathmin on the sensitivity to antimicrotubule drugs in human breast cancer. *Cancer Res* 2002; 62: 6864-9.

Otrzymano: 29 stycznia 2007 r.

Przyjęto do druku: 24 kwietnia 2007 r.