

Charakterystyka farmakologiczna i molekularna amifostyny

Ewa Gloc, Janusz Błasiak

Amifostyna (WR2721; kwas S-2-[3-aminopropylamino]-etylofosfotiolowy) jest analogiem cystaminy, stosowanym w terapii przeciwnowotworowej w celu ochrony prawidłowych komórek przed niepożądanymi działaniami chemioterapii. Amifostyna zmniejsza objawy nefro-, neuro-, kardio-, mielo- i ototoksyczne działania leków przeciwnowotworowych. Mechanizm działania amifostyny jest związany z jej właściwościami antyoksydacyjnymi, zdolnością do stabilizowania cząsteczki DNA i inaktywacji związków elektrofilowych, udziałem w procesach naprawy DNA oraz w procesach apoptozy. Amifostyna jest defosforylowana podczas transportu do komórki do formy aktywnej WR1065, z udziałem błonowej fosfatazy alkalicznej. Obserwowany niższy poziom WR1065 w komórkach nowotworowych, w porównaniu z komórkami prawidłowymi, jest związany z mniejszą aktywnością fosfatazy alkalicznej w tych komórkach. Również selektywny transport WR1065 do komórek wpływa na różny mechanizm działania amifostyny w komórkach prawidłowych i nowotworowych.

Pharmacological and molecular characterization of amifostine

Amifostine (WR2721; S-2-(3-aminopropylamino)-ethylphosphorothioic acid) is an analog of cystamine used in cancer therapy to reduce the adverse effects of oncolytic drugs in normal cells. It can diminish the nephro-, neuro-, cardio-, myelo- and ototoxic effects of therapy. The mechanisms of the cytoprotective effects of amifostine include: scavenging of free radicals, stabilizing and protecting the DNA by binding to it, participating in DNA repair, forming conjugates with electrophiles and reducing cell death. Amifostine is dephosphorylated to its active form WR1065 by membrane-bound alkaline phosphatase. The issuing selective uptake of WR1065 results from the lower concentration of this enzyme in malignant tissues, as compared to their healthy counterparts. The different uptake of amifostine by health and cancer cells may also contribute to the diversity of the action of this drug.

Słowa kluczowe: amifostyna, chemioterapia, działania niepożądane, białaczki

Key words: amifostine, chemotherapy, adverse effects, leukaemias

Wprowadzenie

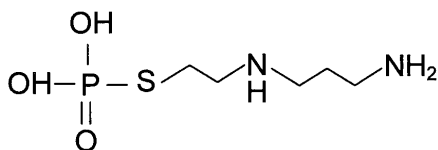
Jednym z głównych problemów współczesnej chemioterapii są działania niepożądane, czyli negatywny wpływ stosowanych leków na komórki prawidłowe. Leki przeciwnowotworowe powodują występowanie uszkodzeń szpiku, mięśnia sercowego, nerek, układu nerwowego, błon śluzowych, a często indukują wtórne nowotwory. Toksyczność chemioterapeutyków w stosunku do tkanek prawidłowych może ograniczać ich zastosowanie. Aby zapobiec szkodliwemu działaniu leków stosuje się równolegle z terapią przeciwnowotworową związki o charakterze ochronnym w stosunku do komórek prawidłowych. Związkami takimi są witaminy, mające zdolność do usuwania wolnych rodników, wytwarzanych podczas działania leków przeciwnowotworowych, jak również związki tiolowe, wśród których największe znaczenie mają glutation

(GSH), amifostyna, mesna (2-merkaptotanosulfonian sodu) i kardioksan.

Amifostyna (WR2721; ethiophos; Ethiol®) jest jednym z ponad 4000 związków, zsyntetyzowanych przez *Walter Reed Army Institute of Research* w okresie „zimnej wojny” w celu ochrony przeciwko skutkom promieniowania jonizującego. Badania nad związkami ochronnymi pozwoliły stworzyć profil substancji zabezpieczającej przed działaniem promieniowania. Miała to być pochodna tiolowa, posiadająca dodatkowo naładowaną grupę aminową oraz wolną grupę –SH; największa skuteczność działania związku była osiągnięta, gdy był on podawany przed ekspozycją na promieniowanie, jak również w czasie ekspozycji; ochronne działanie było proporcjonalne do dawki leku. Takim związkiem okazała się amifostyna, która w roku 1995 została zaakceptowana przez *US Food and Drug Administration* jako lek stosowany w terapii przeciwnowotworowej w celu ochrony prawidłowych komórek przed działaniami niepożądanymi chemio- i radioterapii.

Metabolizm

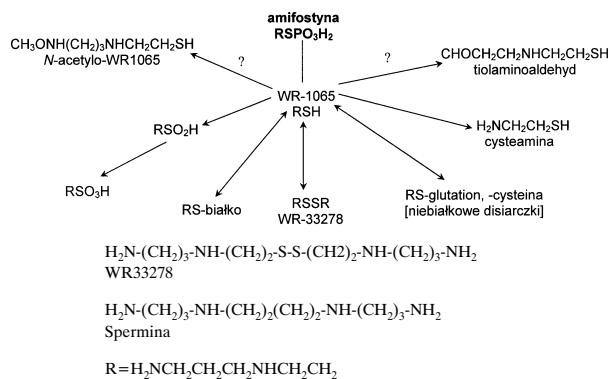
Amifostyna (kwas S-2-[3-aminopropylamino]-etylofosforolowy; Ryc. 1) jest fosforylowanym prekursorem formy aktywnej WR1065, zawierającej wolną grupę tiolową. Defosforylacja amifostyny odbywa się na drodze hydrolizy przebiegającej spontanicznie w warunkach niskiego pH lub z udziałem fosfatazy zasadowej. Nieenzymatyczna hydroliza amifostyny była analizowana z zastosowaniem spektroskopii rezonansu magnetycznego, chromatografii cieczowej z elektrochemiczną detekcją specyficzną dla tioli oraz metodą spektrofotometryczną. Wyniki tych badań wskazują, że przebieg hydrolizy obejmuje przeniesienie protonu na atom siarki i powstanie formy WR1065



Ryc. 1. Amifostyna
Figure 1. Amifostine

oraz metafosforanu (PO_3). Reakcja ta zachodzi wyłącznie w $\text{pH} \leq 4$, dlatego amifostyna jest hydrolizowana szybko w niskim pH soku żołądkowego, gdzie jej okres półtrwania w fizjologicznej temperaturze wynosi 30,5 min [1]. Hydroliza enzymatyczna amifostyny zachodzi wyłącznie z udziałem fosfatazy zasadowej [2]. Ludzka i mysia izoforma fosfatazy zasadowej ma optimum działania w pH 8-9 w przypadku, gdy substratem jest amifostyna. Fosfataza zasadowa jest zlokalizowana na powierzchni błony cytoplazmatycznej, szczególnie w dużych ilościach w komórkach śródbłonna tętnic, komórkach nabłonkowych kanałków proksymalnych nerek i w mikrokosmkach jelitowych [2]. Aktywność fosfatazy w normalnych komórkach płuc jest 275 razy większa niż w komórkach nowotworowych tego narządu [3]. W aktywacji amifostyny ma znaczenie również neutralne pH komórek prawidłowych, w którym aktywność fosfatazy alkalicznej jest wyższa niż w kwaśnym środowisku guzów [4]. Aktywacja amifostyny zależy także od temperatury – przy temperaturze 0°C zachodzi konwersja 0,6% cząsteczek amifostyny na godzinę, natomiast w temperaturze pokojowej reakcja ta zachodzi 74 razy szybciej [1].

Metabolit amifostyny WR-1065 po hydrolizie jest transportowany do komórki przez dyfuzję prostą [4]. Szlaki przemian amifostyny przedstawiono na Ryc. 2. Oprócz głównego metabolitu amifostyny WR1065 pojawiają się inne związki: disiarczek WR33278, mieszane disiarczki WR1065-cysteina i WR1065-glutation oraz cysteamina. Głównymi metabolitami są WR1065, a także WR33278 oraz w mniejszym stopniu niebiałkowe disiarczki, których rola w ochronnym działaniu amifostyny nie została określona, ale prawdopodobnie wspomagają działanie i transport WR1065. Cysteamina jest metabolitem wykrywanym we krwi w bardzo małych ilościach u osób zdrowych, natomiast u pacjentów z nowotworami nie zanotowano obec-



Ryc. 2. Metabolizm amifostyny [56]

Figure 2. Metabolism of amifostine

ności tego metabolitu. Pochodne kwasu siarkawego i siarkowego są farmakologicznie nieaktywnymi metabolitami WR1065. Oprócz szlaków przedstawionych na rycinie, WR-1065 może być także substratem dla oksydazy diaminowej i w wyniku reakcji mogą powstać: akroleina, nadtlenuk wodoru i amoniak [5].

Farmakokinetyka

Amifostyna jest stosunkowo szybko metabolizowana w krwi i tkankach. Czasy połowicznego rozpadu w surowicy wynoszą $T_{1/2\alpha} < 1$ min, $T_{1/2\beta}$ 8,8 min, a 90% leku jest usuwane z surowicy w czasie 6 min. Badania nad tempem metabolizmu amifostyny u myszy BALB/c wykazały, że stężenie amifostyny 30 min po podaniu jest 10-krotnie mniejsze w porównaniu ze stężeniem maksymalnym, obserwowanym 5 min po podaniu. Metabolit WR1065 może być z różną efektywnością transportowany do komórek prawidłowych tkanek. Maksymalne stężenie wolnego tiolu w wątrobie i nerkach 10 min po podaniu amifostyny w dawce wynoszącej 365 mg/kg, równe jest odpowiednio 965 i 2,195 $\mu\text{mol}/\text{kg}$, podczas, gdy w sercu i jelicie w 30 min po podaniu wartości te wynoszą odpowiednio 739 i 410 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ [6]. Badania nad farmakokinetyką amifostyny przy jednorazowym, dożylnym podaniu pacjentom leku w dawce 150 mg/m^2 w bolusie wskazują na szybkie usuwanie amifostyny z krwiobiegu, a średni klirens dla surowicy równy jest 2,17 L/min. Mniej niż 10% podanego leku pozostaje w surowicy 6 min po podaniu, natomiast średnie usuwanie amifostyny, WR1065, WR33278 z moczem wynosi odpowiednio 0,69, 2,64 i 2,22% w stosunku do ilości podanego leku [1]. Wyniki te potwierdzają, że amifostyna jest szybko defosforylowana przez fosfatazę zasadową komórek śródbłonna tętnic i komórek nabłonkowych kanałków proksymalnych nerek. Szybki metabolizm amifostyny jest związany prawdopodobnie z tym, że nie łączy się ona z białkami surowicy, co ułatwia wychwytywanie przez fosfatazę zasadową. Badania nad farmakokinetyką amifostyny u pacjentów, u których podawano lek w 15-min wlewie w dawce 740 lub 910 mg/m^2 potwierdzają szybki klirens amifostyny, przy czym maksymalne stężenie leku we krwi było osiągnięte pod koniec infuzji. Natomiast stężenie WR1065 we krwi osiągało

maksymalną wartość po zakończeniu infuzji, i spadało 8-krotnie po 30 min od zakończenia podawania leku. Stwierdzono również różną dystrybucję leku do tkanek. Stężenie mierzone 15 min po podaniu dożylnym było najwyższe w śliniankach i nerkach, następnie niższe w płucach, wątrobie, sercu, osoczu i śledzionie. Amifostyna nie ulegała natomiast dystrybucji do mózgu i rdzenia kręgowego [7]. Czas utrzymania się metabolitu WR1065 był również różny – najszybciej był on eliminowany z płuc i skóry, dalej z wątroby, a w gruczołach ślinowych wysokie stężenie utrzymywało się przez 3 godz. Wykazano również, że amifostyna ma zdolność przekraczania bariery łożyska [8].

Badania *in vivo* i *in vitro* oraz zastosowanie kliniczne

W badaniach *in vitro* mających na celu określenie mechanizmu działania amifostyny wymagane jest dodawa-

nie do hodowli komórkowych fosfatazy alkalicznej lub 10-20% nieinaktywowanej surowicy w celu aktywacji metabolicznej leku. W takich warunkach WR1065 może być substratem dla oksydazy diaminowej, znajdującej się w surowicy. W wyniku tej reakcji powstają toksyczne związki: akroleina, nadtlenek wodoru i amoniak, pojedynczo lub w kombinacjach, które mogą wprowadzać artefakty w wynikach badań. Wykazano, że w warunkach *in vitro* najkorzystniejsza jest ekspozycja komórek na amifostynę 15 min przed zastosowaniem związku toksycznego, co w pełni odzwierciedla skuteczność podawania amifostyny podczas stosowania w praktyce klinicznej [9].

Badania *in vitro* na zwierzętach wykazały ochronny efekt amifostyny w przypadku wielu typów nowotworów i terapii (Tab. I i II). Jednakże badania na myszach, które mają zróżnicowaną czułość na amifostynę, związane jest z pewnymi problemami. Jest to widoczne w szerokim zakresie parametru LD₅₀ oznaczonym dla tych zwierząt

Tab. I. Działanie ochronne amifostyny przed nefrotoksycznością cisplatyny u szczurów i myszy, a także radiotoksycznością u myszy [55]
Table I. Protective action of amifostine against nephrotoxic effects in rats and mice as well as radioprotective effect of amifostine in mice [55]

Gatunek/Tkanka	Metoda oznaczenia	Dawka amifostyny (mg/kg)	DMF
Szczur		100	1,3
		200	1,7
Mysz		100	1,2
		200	1,5

Mysz/ Układ immunologiczny			1,8-3,4
Wątroba			2,0-2,7
Mięśnie			1,5-2,0
Pęcherz moczowy			1,3-1,5
Szpicik kostny	Żywotność komórek macierzystych	200	2,3
	LD ₅₀	200	1,8
Pluca	LD ₅₀	400	1,4
	Uszkodzenia komórek II typu	400	1,2
	Uszkodzenia komórek śródblonka	400	1,2
Nerka	Uszkodzenia tkanki lub masa narządu	400	1,3
Ślinianki	Badanie przepływu śliny	400	2,9
Przetyk	LD ₅₀ (uszkodzenia ostre)	400	1,6
	LD ₅₀ (uszkodzenia przewlekłe)	400	1,5
Jelito czcze	Ilość zregenerowanych krypt	400	1,6-1,8
Okreźnica	Żywotność komórek nabłonkowych	400	1,4-1,6
Prostnica	Uszkodzenia stwierdzone histologicznie	400	1,3-1,4
Skóra	Uszkodzenia tkanki	200-500	1,2-1,6
Włosy	Utrata włosów u 50% zwierząt	400	1,3

DMF *dose modification factor*; czynnik ochronny, oznacza stosunek dawki cytostatyku lub promieniowania stosowanego z amifostyną do dawki bez amifostyny, który wywołuje oczekiwany efekt u 50% badanych zwierząt w określonym czasie. DMF > 1 oznacza działanie protekcyjne

Tab. II. Zahamowanie wzrostu guzów u szczurów leczonych cisplatyną i amifostyną (dni ± SD) [57]
Table II. Inhibition of tumor growth in rats administrated with amifostine [57]

Guzy	Cisplatyna (5 mg/kg)	Amifostyna (200 mg/kg)	
		Cisplatyna (5 mg/kg)	Cisplatyna (7,5 mg/kg)
3M2N (rak łuskowaty)	6,0±0,52	6,1±0,81	10,0±1,10
13762 (gruczolakorak)	8,3±0,37	7,9±0,66	12,6±0,91
R3230AC (gruczolakorak)	2,4±0,36	3,2±0,71	5,0±0,18

i który wynosi od 550 do 1140 mg/kg [10]. Drugi problem dotyczy zmian w układzie krążenia pod wpływem amifostyny. Lek ten powoduje rozszerzenie naczyń, w szczególności narządów brzusznych i powiększenie śledziony, które jest proporcjonalne do dawki podawanego leku. Maksymalne, dwukrotne powiększenie jest obserwowane 1 godz. po podaniu amifostyny, podczas gdy śledziona powraca do normalnych rozmiarów 2-3 godz. później [11]. Amifostyna może także wywoływać hipotermię u myszy. Temperatura ciała zwierzęcia spada 5°C i 10°C w godzinę po podaniu dawki amifostyny odpowiednio 200 i 525 mg/kg. Hipotermia może powodować oporność komórek nowotworowych na leki, takie jak cisplatyna, cyklofosfamid, których działanie jest związane z efektywnym metabolizmem, obniżonym w warunkach hipotermii. Natomiast zwężenie naczyń krwionośnych hamuje transport leku do wszystkich obszarów guza. W związku z tym badania *in vivo* na modelu mysim mogą dostarczać wielu artefaktów i nie wyjaśniać w pełni działania amifostyny.

Badania kliniczne, badania na zwierzętach oraz badania *in vitro* pozwalają jednakże stwierdzić selektywne ochronne działanie amifostyny w stosunku do prawidłowych komórek szpiku kostnego [12], systemu odpornościowego [13], skóry [14], jelit [15], ślinianek [16], wątroby, nerek, mięśni, płuc [7] i pęcherza moczowego [14], natomiast nie wykazuje działania ochronnego w stosunku do komórek mózgu, rdzenia kręgowego, jąder, przełyku i śluzówki jamy ustnej (Tab. I i III). Jest ona stosowana w przypadku leczenia nowotworów głowy i szyi [17], płuca [18], jajnika [19], szyjki macicy [20], piersi [21], prostaty, pęcherza moczowego, czerniaka [22], chłoniaków, syndromu mielodysplastycznego i białaczek [23, 24], a także w przypadku AIDS [25]. Amifostyna chroni przeciwko takim działaniom niepożądanym chemioterapii jak: neurotoksyczność, zaburzenia słuchu, uszkodzenia nerek [26], zapalenie błony śluzowej, pleśnica [27], uszkodzenia ukła-

du mięsno-szkieletowego, zapalenie jelita, kardiotoxyczność [28] i mutagenność [29]. Stwierdzenie ochronnego działania amifostyny w badaniach *in vitro* i na zwierzętach nie zawsze ma odzwierciedlenie w praktyce klinicznej. Dyskutowana jest skuteczność amifostyny podczas stosowania idarubicyny i innych antracyklin, alkaloidów *Vinca*, a także taksoidów, a w szczególności paklitakselu, który może mieć działanie antagonistyczne do amifostyny [23, 30]. Praktyczne stosowanie amifostyny jest również ograniczone, głównie w zakresie nefrotoksyczności, powodowanej związkami platyny i mielotoksyczności, powstałej po działaniu związków alkilujących.

Amifostyna może również stymulować prawidłowe komórki szpiku kostnego: mieloidalne komórki macierzyste granulocytów, erytrocytów, makrofagów i megakariocytów (CFU-GEMM; *colony forming unit-granulocyte, erythrocyte, macrophage, megakaryocyte*) oraz komórki macierzyste erytrocytów (BFU-E; *burst forming unit-erythrocyte*). Należy jednak podkreślić, że amifostyna nie ma wpływu na wczesne prawidłowe komórki hematopoetyczne [31]. Ochronny wpływ amifostyny na komórki prekursorowe szpiku znalazł zastosowanie w oczyszczaniu szpiku kostnego do przeszczepów autologicznych. Również stosowanie amifostyny po autologicznym przeszczepie szpiku u chorych z guzami litymi znacznie zmniejsza czas podawania płytek i antybiotyków oraz obniża temperaturę [32]. Lek ten zmniejsza 10-krotnie wrażliwość komórek prekursorowych szeregu granulocytarno-makrofagowego (CFU-GM) na działanie pochodnych cyklofosfamidu. Wyniki badań klinicznych wskazują również, że amifostyna może stymulować erytro- mielo- i trombopoezę u pacjentów z zespołem mielodysplastycznym (MDS) [33].

Amifostyna jest na ogół dobrze tolerowana przez organizm, ale pojawiają się skutki uboczne, takie jak: nudności, wymioty, drgawki, senność, spadek ciśnienia tętniczego krwi i zawroty głowy, z czego nudności i wymio-

Tab. III. Amifostyna w badaniach przedklinicznych – wykorzystane komórki i leki [58]

Table III. Cells and drugs used in amifostine preclinical studies [58]

Komórki	Lek
Linie komórkowe: nowotwory jajników (PA-1, BG-1, A2780, 2780/S, 2780-CP79, OVCAR 3, OVCAR 10) ostra białaczka limfoblastyczna (REH CEM-CCRF/MOLT4) ostra białaczka szpikowa nowotwory piersi (CAMA) włókniakomięsak glejak czerniak (SK-MEL, PA01) drobnokomórkowy rak płuca (ATCC, HTB-110, HTB-120)	Bleomycyna Karboplatyna Cisplatyna Cytarabina Doksorubicyna Etopozyd 5-Fluorouracyl 4-Hydroperoksycyklofosfamid
Heteroprzeszczepy: nowotwory piersi (MDA-MR-435) nowotwory płuca nowotwory jajnika czerniak	Idarubicyna Mafosfamid Melfalen Metylprednizolon + etopozyd + ilmofozsin
Komórki macierzyste: nowotwory piersi nowotwory trzustki nowotwory pęcherza moczowego nowotwory płuca	Mitomycyna C Mitoksantron Iperyt azotowy Promieniowanie Paklitaksel Docetaksel Winblastyna Winkrystyna

ty są bardzo częste i nasilone, w związku z tym amifostyna uważana jest za silny lek emetogenny [34]. Objawy uboczne częściej obserwowane są u kobiet, niż u mężczyzn. Natomiast najlepszą tolerancję na lek obserwowano u dzieci, w wypadku których stosuje się dawki amifostyny wynoszące nawet 2100 mg/m². Jednym ze skutków ubocznych działania amifostyny jest również hipokalcemia. Znaczne obniżenie wapnia w osoczu obserwowano około 4 godz. po podaniu leku, podczas gdy powrót do stanu wyjściowego następował po tygodniu. Amifostyna może hamować uwalnianie parathormonu, i na tej drodze prawdopodobnie powodować hipokalcemie [35]. Mimo licznych możliwości występowania skutków ubocznych po zastosowaniu amifostyny do tej pory nie obserwowano powikłań śmiertelnych.

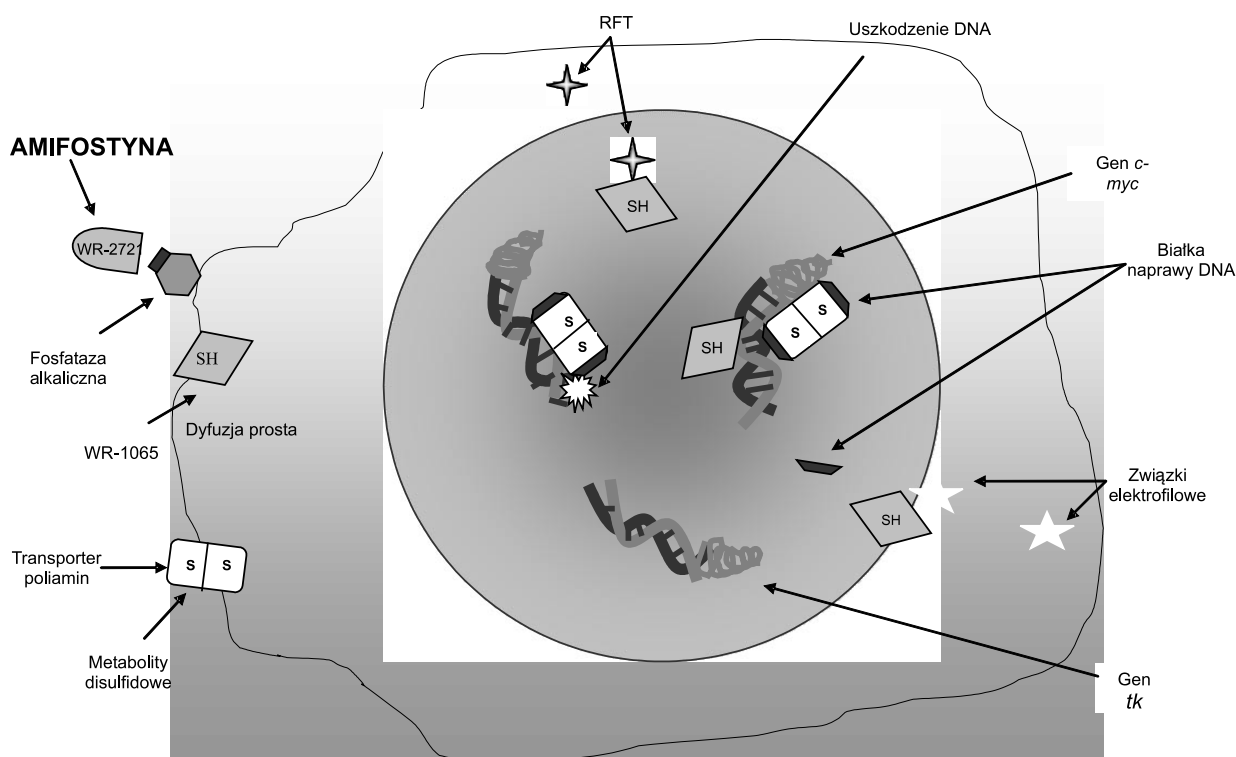
Mechanizm działania

Mechanizm działania amifostyny jest związany z obecnością grupy tiolowej, która stanowi miejsce aktywne cząsteczki i działa jako czynnik usuwający lub przekształcający w stabilne cząsteczki wolne rodniki powstające w komórce w wyniku działania leków przeciwnowotworowych lub promieniowania (Ryc. 3) [36, 37]. Metabolit amifostyny, WR-1065 jako tiol z wolną grupą –SH, wykazuje właściwości redukcyjne szczególnie w stosunku do rodnika hydroksylowego [38]. Amifostyna powoduje zwiększenia aktywności dysmutazy ponadtlenkowej, jak również wpływa na aktywność reduktazy i peroksydazy glutationowej oraz katalazy w wątrobie szczurów, którym podawano cyklofosfamid. Może również wpływać na poziom nieenzy-

matycznych antyoksydantów oraz na zmniejszenie peroksydacji lipidów [39].

Podobnie jak naturalne poliaminy amifostyna ze względu na obecność dodatnio naładowanej grupy aminowej (+2 w formie tiolowej, +4 w formie disiarczkowej) może łączyć się z ujemnie naładowanymi obszarami DNA jądrowego i mitochondrialnego, co może skutecznie bronić go przed uszkodzeniami wolnorodnikowymi [40]. Poza tym przyłączenie amifostyny stabilizuje fragmenty helisy DNA, nie związanej z histonami, co może przyczynić się do efektywniejszej naprawy uszkodzeń DNA. Charakter nukleofilowy amifostyny umożliwia także jej preferencyjne wiązanie się z lekami i ich metabolitami o charakterze elektrofilowym [41]. Zarówno *in vivo* jak i *in vitro* amifostyna reaguje ze związkami platyny, tworząc z nimi kompleksy po utracie grupy fosforanowej.

Tiole o charakterze antyoksydacyjnym, jak np. metabolit WR1065, biorą udział w prawidłowych procesach w komórce, takich jak reakcje redoks, modulowanie ekspresji genów białek, związanych z prawidłowym potencjałem oksydo-redukcyjnym, synteza innych tioli i aktywność enzymów. Ekspozycja komórek śródbłonkowych na WR1065 przez 30 min powoduje aktywację czynnika transkrypcyjnego NFκB, jak również aktywację i kumulację białka p53, czemu towarzyszy zwiększona ekspresja cyklicznego inhibitora p21^{waf-1} [42, 43]. Ekspresja genu kinazy tymidynowej zwiększa się 3,5 razy w komórkach CHO, ekspozycjach przez 4 godz. na WR1065 o stężeniu 40 μM [44]. Z drugiej strony amifostyna i jej metabolity są represorami genu *c-myc* [45]. Ponadto amifostyna podawana wraz z cytostatykami może powodować



Ryc. 3. Mechanizmy działania amifostyny w komórce prawidłowej
RFT – reaktywne formy tlenu; tk – kinaza tymidynowa [55]

Figure 3. Mechanisms of amifostine action in normal cells.
RFT – reactive oxygen species, tk – thymidine kinase

wać redukcję apoptozy w prawidłowych limfocytach krwi obwodowej pacjentów oraz w szpiku kostnym [46], gdyż może być inhibitorem kaspazy 3, jednego z białek związanych ze szlakiem apoptotycznym. Amifostyna może zmniejszać aktywność kaspazy 3 nawet o 45% [47]. Hamowanie apoptozy przez amifostynę i zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G1 jest związane z aktywnym białkiem p53 [43].

Ponadto amifostyna, podobnie jak inne tiole stosowane w praktyce klinicznej (*N*-acetylocysteina, kaptopril, cystamina), ma zdolność do chelatowania metali, takich jak wapń, chrom, kobalt, magnez, cynk, ołów i bor. Tiole te działają również na enzymy zawierające metale i mogą powodować zmiany ich aktywności. Enzymami tej grupy są metaloproteazy 2 i 9 zawierające cynk – enzymy odgrywające dużą rolę w procesie metastazy. Amifostyna może również wpływać na procesy związane z angiogenezą: zmniejsza ilość naczyń, poziom mRNA czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego VEGF, ekspresję metaloproteazy 2 oraz zwiększa ekspresję plazminy [48].

Również formy disulfidowe tioli biorą udział w procesach komórkowych, ze względu na budowę podobną do poliamin. Amifostyna jest inhibitorem transportu putrescyny w komórkach płuc szczurów i jest substratem dla oksydazy poliaminowej [49]. Formy disiarczkiowe są transportowane do komórki aktywnie z udziałem transporterów poliamin, w przeciwieństwie do formy WR1065, która jest transportowana na drodze dyfuzji prostej [50]. Disiarczek WR33278 jako analog spermidyny powoduje zahamowanie transportu tej poliaminy do komórki. Metabolity amifostyny mogą również wpływać na aktywność enzymów związanych z syntezą i naprawą DNA. WR1065 jest inhibitorem egzonukleazy, a także topoizomerazy II α . Ekspozycja komórek na WR1065 o stężeniu 4 μ M przez 30 min powodowała 50% zahamowanie aktywności tego enzymu, które było skorelowane ze zmniejszoną fosforylacją topoizomerazy [51]. Metabolity amifostyny biorą udział w procesach naprawy poprzez łączenie się bezpośrednio z miejscem uszkodzenia, jak i z białkami jądrowymi. Poza tym wpływ amifostyny na aktywność topoizomerazy II, białka p21^{waf-1} oraz represje genu *c-myc* może w konsekwencji powodować zatrzymanie cyklu komórkowego w celu efektywniejszej naprawy uszkodzeń DNA, zanim komórka rozpocznie mitozę. Podsumowując, amifostyna jest zaangażowana w wiele procesów wewnątrz- i zewnątrzkomórkowych, takich jak procesy redoks, transdukcja sygnałów, ekspresja genów, stabilność genomu, aktywność enzymów, synteza i naprawa DNA oraz cykl komórkowy. W połączeniu z jej zdolnością do zmiatania wolnych rodników oraz udziałem w naprawie DNA w chemicznym procesie oddawania atomu wodoru ($\text{DNA} + \text{R-SH} = \text{DNA} + \text{RS}\cdot$) czyni to amifostynę związkami ochronnym i zapobiegającym zachodzeniu wielu szkodliwych procesów chemicznych.

Wpływ amifostyny na komórki białaczkowe

Selektywne działanie amifostyny na komórki prawidłowe jest związane z wieloma czynnikami. Pierwszy z nich to

niska aktywność enzymu aktywującego – fosfatazy alkalicznej, w komórkach nowotworowych [2]. Komórki niektórych typów białaczek są praktycznie całkowicie pozbawione tego enzymu. Poza tym w warunkach kwaśnego pH guzów fosfataza zasadowa jest nieaktywna. Wyniki niektórych badań *in vitro* wskazują, że amifostyna może sama lub w połączeniu z lekami przeciwnowotworowymi wykazywać działanie cytotoksyczne w komórkach białaczkowych [52, 53]. Efekt ten może być związany z transportem metabolitów amifostyny do komórek nowotworowych. Pochodna amifostyny disiarczki WR-33278 to homolog sperminy (Ryc. 2), który może być aktywnie przenoszony do komórek prawidłowych przez transportery poliamin [54]. Poliaminy i ich pochodne, w tym związki tiolowe, wpływają na aktywację niektórych genów, związanych z utrzymywaniem stabilności komórki, chroniąc przed uszkodzeniami oksydacyjnymi. Natomiast komórki białaczkowe wykazują wysoki poziom poliamin, przez co następuje zachwianie równowagi między aktywnym transportem WR-33278 i bierną dyfuzją WR-1065. Wyższy poziom WR-1065 powoduje aktywację enzymów rozkładających poliaminy, a w konsekwencji obniżenie progu apoptozy, gdyż w normalnych warunkach poliaminy zapobiegają powstawaniu stresu oksydacyjnego.

W badaniach *in vitro* nad genotoksycznością amifostyny i idarubicyny stwierdzono, że wpływ amifostyny na komórki białaczkowe jest zależny od zmian genetycznych, warunkujących ich fenotyp białaczkowy. Preinkubacja mysich komórek linii BaF3, transfekowanych genami kodującymi onkogenne kinazy tyrozynowe z amifostyną, powodowała zwiększenie poziomu uszkodzeń DNA w tych komórkach, w porównaniu z komórkami poddanymi działaniu samej idarubicyny. Onkogenne kinazy tyrozynowe są to białka fuzyjne, związane z rozwojem różnych typów białaczek, a kodujące je geny powstają w wyniku translokacji fragmentów genów kinaz tyrozynowych oraz innych genów. Wśród onkogennych kinaz tyrozynowych najczęściej występującą w białaczkach jest białko BCR/ABL. Natomiast w przypadku komórek ludzkiej białaczki promielocytarnej linii HL-60, które charakteryzują się brakiem aktywności białka p53, nie obserwowano wpływu amifostyny na poziom uszkodzeń DNA indukowanych idarubicyną, nawet po zastosowaniu fosfatazy zasadowej w środowisku reakcji. W przypadku prawidłowych limfocytów oraz komórek kontrolnych, nietransfekowanych BaF3 obserwowano obniżenie poziomu uszkodzeń DNA pod wpływem amifostyny [36].

Amifostyna, jak już wcześniej wspomniano, ma zastosowanie kliniczne w leczeniu różnych typów białaczek i syndromu mielodysplastycznego, choć dyskusyjna jest sprawa jej skuteczności w przypadku stosowania antracyklin, które zajmują czołowe miejsce w chemioterapii białaczek [23]. Z drugiej strony opisano przypadek skutecznego zastosowania samej amifostyny w leczeniu ostrej białaczki mieloblastycznej [24]. Również duże znaczenie w terapii białaczek ma stosowanie amifostyny w oczyszczaniu szpiku kostnego i jej wpływ na komórki prekursorowe.

Podsumowanie

Liczne wyniki badań klinicznych, na zwierzętach i *in vitro*, wskazują na szerokie spektrum działania amifostyny, przy stosunkowo dużej tolerancji na lek. Szczególnie interesujące wydają się wyniki badań wskazujące na złożony mechanizm działania tego leku. Kontynuacja badań może w przyszłości potwierdzić wysoką skuteczność amifostyny jako związku ochronnego w stosunku do komórek prawidłowych przeciwko niepożądanym działaniom chemio- i radioterapii, co może umożliwić zwiększenie dawek stosowanych chemioterapeutyków. Lek ten być może znajdzie również zastosowanie w zwiększaniu skuteczności działania cytostatyków, a tym samym przyczyni się do skuteczności terapii przeciwnowotworowej.

Prof. dr hab. Janusz Błasiak
Katedra Genetyki Molekularnej
Uniwersytet Łódzki
ul. Banacha 12/16
90-237 Łódź
e-mail: januszb@biol.uni.lodz.pl

Piśmiennictwo

- Shaw LM, Bonner HS, Turriss AL. Measurement of s-2-(3-aminopropylamino)ethanethiol (WR-1065) in blood and tissue. *J Liquid Chromatogr* 1986; 9: 845-9.
- Giatromanolaki A, Sivridis E, Maltezos E i wsp. Down-regulation of intestinal-type alkaline phosphatase in the tumor vasculature and stroma provides a strong basis for explaining amifostine selectivity. *Semin Oncol* 2002; 29: 14-21.
- Johnson PW, Muers MF, Peake MD i wsp. A randomized trial of amifostine as a cytoprotective agent in patients receiving chemotherapy for small cell lung cancer. *Br J Cancer* 2001; 84: 19-24.
- Calabro-Jones PM, Aguilera JA, Ward JF i wsp. Uptake of WR-2721 derivatives by cells in culture: identification of the transported form of the drug. *Cancer Res* 1988; 48: 3634-40.
- Meier T, Issels RD. Degradation of 2-(3-aminopropyl-amino)-ethanethiol (WR-1065) by Cu-dependent amine oxidases and influence on glutathion status of Chinese hamster ovary cells. *Biochem Pharmacol* 1995; 50: 489-96.
- Shaw LM, Bonner HS, Brown DQ. Metabolic pathways of WR-2721 (ethylol, amifostine) in the BALB/c mouse. *Drug Metab Dispos* 1994; 22: 895-902.
- Levi M, Knol JA, Ensminger WD i wsp. Regional pharmacokinetics of amifostine in anesthetized dogs: role of the liver, gastrointestinal tract, lungs, and kidneys. *Drug Metab Dispos* 2002; 30: 1425-30.
- Davis ME, Conger AD, Sodicoff M. Transplacental uptake of WR 2721 by the rat embryo. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1987; 13: 575-8.
- Korst AE, van der Sterre ML, Gall HE i wsp. Influence of amifostine on the pharmacokinetics of cisplatin in cancer patients. *Clin Cancer Res* 1998; 4: 331-6.
- Kumar P, Vijayaraghavan R, Kulkarni AS i wsp. In vivo protection by amifostine and DRDE-07 against sulphur mustard toxicity. *Hum Exp Toxicol* 2002; 21: 371-6.
- Penhaligon M. Radioprotection of mouse skin vasculature and the RIF-1 fibrosarcoma by WR-2721. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1984; 10: 1541-4.
- Renner S, Krumpelmann S, Bruchelt G i wsp. Effect of amifostine on neuroblastoma during high dose chemotherapy: *in vivo* and *in vitro* investigations. *Anticancer Res* 2000; 20: 4531-8.
- Koukourakis MI, Ktenidou-Kartali S, Bourikas G i wsp. Amifostine protects lymphocytes during radiotherapy and stimulates expansion of the CD95/Fas and CD31 expressing T-cells, in breast cancer patients. *Cancer Immunol Immunother* 2003; 52:127-31.
- Koukourakis MI, Kyrias G, Kakolyris S i wsp. Subcutaneous administration of amifostine during fractionated radiotherapy: a randomized phase II study. *J Clin Oncol* 2000; 18: 2226-33.
- Ito H, Komaki R, Milas L. Protection by WR-2721 against radiation plus cis-diamminedichloroplatinum II caused injury to colonic epithelium in mice. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1994; 28: 899-903.
- Bohuslavizki KH, Klutmann S, Jenicke L i wsp. Salivary gland protection by S-2-(3-aminopropylamino)-ethylphosphorothioic acid (amifostine) in high-dose radioiodine treatment: results obtained in a rabbit animal model and in a double-blind multi-arm trial. *Cancer Biother Radiopharm* 1999; 14: 337-47.
- Anne PR. Phase II trial of subcutaneous amifostine in patients undergoing radiation therapy for head and neck cancer. *Semin Oncol* 2002; 29: 80-3.
- Leong SS, Tan EH, Fong KW i wsp. Randomized double-blind trial of combined modality treatment with or without amifostine in unresectable stage III non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2003; 21: 1767-74.
- Calhoun EA, Bennett CL. Pharmacoeconomics of amifostine in ovarian cancer. *Semin Oncol* 1999; 26: 102-7.
- Gallardo D, Mohar A, Calderillo G i wsp. Cisplatin, radiation, and amifostine in carcinoma of the uterine cervix. *Int J Gynecol Cancer* 1999; 9: 225-30.
- Catino A, Crucitta E, Latorre A i wsp. Amifostine as chemoprotectant in metastatic breast cancer patients treated with doxorubicin. *Oncol Rep* 2003; 10: 163-7.
- Merlin JL, Marchal S, Ramacci C i wsp. Enhancement of fotemustine (Muphoran) cytotoxicity by amifostine in malignant melanoma cell lines. *Anticancer Drugs* 2002; 13: 141-7.
- Garcia-Manero G, Faderl S, Giles F i wsp. A phase I study of idarubicin dose escalation with amifostine and high-dose cytarabine in patients with relapsed acute myelogenous leukemia and myelodysplastic syndromes. *Haematologica* 2002; 87: 804-7.
- Ozturk A, Orhan B, Turken O i wsp. Acute myeloblastic leukemia achieving complete remission with amifostine alone. *Leuk Lymphoma* 2002; 43: 451-3.
- Kalebic T, Schein PS. Organic thiophosphate WR-151327 suppresses expression of HIV in chronically infected cells. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1994; 10: 727-33.
- Gradishar WJ, Stephenson P, Glover DJ i wsp. A Phase II trial of cisplatin plus WR-2721 (amifostine) for metastatic breast carcinoma: an Eastern Cooperative Oncology Group Study (E8188). *Cancer* 2001; 92: 2517-22.
- Nicolatou-Galitis O, Sotiropoulou-Lontou A, Velegraiki A i wsp. Oral candidiasis in head and neck cancer patients receiving radiotherapy with amifostine cytoprotection. *Oral Oncol* 2003; 39: 397-401.
- Nazeyrollas P, Frances C, Prevost A i wsp. Efficiency of amifostine as a protection against doxorubicin toxicity in rats during a 12-day treatment. *Anticancer Res* 2003; 23: 405-9.
- Grdina DJ, Murley JS, Kataoka Y i wsp. Relationships between cytoprotection and mutation prevention by WR-1065. *Mil Med* 2002; 167: 51-3.
- Freyer G, Hennebert P, Awada A i wsp. Influence of amifostine on the toxicity and pharmacokinetics of docetaxel in metastatic breast cancer patients: a pilot study. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 95-102.
- Ramdas J, Warrier RP, Scher C i wsp. Effects of amifostine on clonogenic mesenchymal progenitors and hematopoietic progenitors exposed to radiation. *J Pediatr Hematol Oncol* 2003; 25: 19-26.
- Phillips GL. The potential of amifostine in high-dose chemotherapy and autologous hematopoietic stem cell transplantation. *Semin Oncol* 2002; 29: 53-6.
- Delforge M, Raets V, Van Duppen V i wsp. Amifostine does not preferentially stimulate the growth of residual polyclonal progenitor cells in myelodysplastic syndromes. *Leuk Res* 2003; 27: 593-8.
- Kemp G, Rose P, Lurain J i wsp. Amifostine pretreatment for protection against cyclophosphamide-induced and cisplatin-induced toxicities: results of a randomized control trial in patients with advanced ovarian cancer. *J Clin Oncol* 1996; 14: 2101-12.
- Wadler S, Haynes H, Beitler JJ i wsp. Management of hypocalcemic effects of WR2721 administered on a daily times five schedule with cisplatin and radiation therapy. The New York Gynecologic Oncology Group. *J Clin Oncol* 1993; 11: 1517-22.
- Błasiak J, Gloc E, Młynarski W i wsp. Amifostine differentially modulates DNA damage evoked by idarubicin in normal and leukemic cells. *Leuk Res* 2002; 26: 1093-6.
- Błasiak J, Gloc E, Drzewoski J i wsp. Free radical scavengers can differentially modulate the genotoxicity of amsacrine in normal and cancer cells. *Mutat Res* 2003; 535: 25-34.
- Marzatico F, Porta C, Moroni M i wsp. In vitro antioxidant properties of amifostine (WR-2721, Ethylol). *Cancer Chemother Pharmacol* 2000; 45: 172-6.

39. Stankiewicz A, Skrzydlewska E, Makiela M. Effects of amifostine on liver oxidative stress caused by cyclophosphamide administration to rats. *Drug Metabol Drug Interact* 2002; 19: 67-82.
40. Newton GL, Aguilera JA, Ward JF i wsp. Binding of radioprotective thiols and disulfides in Chinese hamster V79 cell nuclei. *Radiat Res* 1996; 146: 298-305.
41. Milligan JR, Aguilera JA, Wu CC i wsp. Effect of hydroxyl radical scavenging capacity on clustering of DNA damage. *Radiat Res* 1997; 148: 325-9.
42. North S, El-Ghissassi F, Pluquet O i wsp. The cytoprotective aminothiol WR1065 activates p21waf-1 and down regulates cell cycle progression through a p53-dependent pathway. *Oncogene* 2000; 19: 1206-14.
43. Lee EJ, Gerhold M, Palmer MW i wsp. p53 protein regulates the effects of amifostine on apoptosis, cell cycle progression, and cytoprotection. *Br J Cancer* 2003; 88: 754-9.
44. Woloschak GE, Paunesku T, Chang-Liu CM i wsp. Expression of thymidine kinase messenger RNA and a related transcript is modulated by radioprotector WR1065. *Cancer Res* 1995; 55: 4788-92.
45. Liu SC, Murley JS, Woloschak G i wsp. Repression of c-myc gene expression by the thiol and disulfide forms of the cytoprotector amifostine. *Carcinogenesis* 1997; 18: 2457-9.
46. Mazur L, Augustynek A, Deptala A i wsp. Effects of WR-2721 and cyclophosphamide on the cell cycle phase specificity of apoptosis in mouse bone marrow. *Anticancer Drugs* 2002; 13: 751-8.
47. Rutella S, Pierelli L, Rumi C i wsp. T-cell apoptosis induced by granulocyte colony-stimulating factor is associated with retinoblastoma protein phosphorylation and reduced expression of cyclin-dependent kinase inhibitors. *Exp Hematol* 2001; 29: 401-15.
48. Giannopoulou E, Katsoris P, Kardamakis D i wsp. Amifostine inhibits angiogenesis in vivo. *J Pharmacol Exp Ther* 2003; 304: 729-37.
49. Wyatt I, Moore RB, Smith LL. Competition for polyamine uptake into rat lung slices by WR2721 and analogues. *Int J Radiat Biol* 1989; 55: 463-72.
50. Quinones HI, List AF, Gerner EW. Selective exclusion by the polyamine transporter as a mechanism for differential radioprotection of amifostine derivatives. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 1295-300.
51. Murley JS, Constantinou A, Kamath NS i wsp. WR-1065, an active metabolite of the cytoprotector amifostine, affects phosphorylation of topoisomerase II alpha leading to changes in enzyme activity and cell cycle progression in CHO AA8 cells. *Cell Prolif* 1997; 30: 283-94.
52. Ribizzi I, Darnowski JW, Goulette FA i wsp. Amifostine cytotoxicity and induction of apoptosis in a human myelodysplastic cell line. *Leuk Res* 2000; 24: 519-25.
53. Gloc E, Warszawski M, Mlynarski W i wsp. TEL/JAK2 tyrosine kinase inhibits DNA repair in the presence of amifostine. *Acta Biochim Pol* 2002; 49: 121-8.
54. List AF. Use of amifostine in hematologic malignancies, myelodysplastic syndrome, and acute leukemia. *Semin Oncol* 1999; 26: 61-5.
55. Grdina DJ, Kataoka Y, Murley JS. Amifostine: mechanism of action underlying cytoprotection and chemoprevention. *Drug Metabol Drug Interact* 2000; 16: 237-79.
56. Shaw LM, Turrisi AT, Glover DJ i wsp. Human pharmacokinetics of WR-2721. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1986; 12: 1501-4.
57. Yuhas JM, Culo F. Selective inhibition of the nephrotoxicity of cis-dichlorodiammineplatinum(II) by WR-2721 without altering its antitumor properties. *Cancer Treat Rep* 1980; 64: 57-64.
58. Capizzi R. Amifostine: the preclinical basis for broad-spectrum selective cytoprotection of normal tissues from cytotoxic therapies. *Semin Oncol* 1996; 23: 2-17.

Otrzymano: 17 lipca 2003 r.

Przyjęto do druku: 25 sierpnia 2003 r.