

# INNE ZAGADNIENIA

Marcin Jałosiński<sup>1,2</sup>, Kamil Karolczak<sup>1</sup>, Andrzej Głąbiński<sup>1,2</sup>

Received: 09.04.2008

Accepted: 17.04.2008

Published: 30.04.2008

## Mechanizmy działania cytostatyków stosowanych w neurologii

### Mechanism of action of cytostatic drugs used in neurology

<sup>1</sup> Zakład Neurologii Doświadczalnej i Klinicznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

<sup>2</sup> Klinika Neurologii i Epileptologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

Adres do korespondencji: Klinika Neurologii i Epileptologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, ul. Żeromskiego 113, 90-549 Łódź, tel.: 042 639 35 91

Praca finansowana z grantu Polpharmy (nr 15/IV/2005)

#### Streszczenie

Celem niniejszej pracy jest przedstawienie molekularnych mechanizmów działania cytostatyków stosowanych w próbach terapii niektórych chorób neurologicznych, głównie stwardnienia rozsianego (SM). Od wielu lat w terapii tego schorzenia próbuje się wykorzystywać takie cytostatyki, jak mitoksantron, cyklofosfamid, metotreksat i kladrybina. W chwili obecnej jedynym lekiem z tej grupy zatwierdzonym przez FDA do leczenia postępującego SM jest mitoksantron. Pozostałe cytostatyki wciąż poddawane są badaniom, a główny problem we wprowadzeniu ich do terapii neurologicznej stanowią liczne efekty uboczne. Leki te wykorzystywane są głównie w onkologii i hematologii, gdzie stosowanie tego typu leków jest bardziej uzasadnione. W chwili obecnej prowadzone są liczne badania zmierzające do lepszego poznania mechanizmów działania cytostatyków na poziomach komórkowym i subkomórkowym. Przyjmuje się, że mitoksantron indukuje apoptozę, co zmniejsza pulę komórek zapalnych zdolnych do wywoływania demielinizacji w obrębie ośrodkowego układu nerwowego (OUN). Na poziomie molekularnym mechanizm jego działania polega na uszkodzeniu genomu tych komórek poprzez hamowanie aktywności topoizomeryzy II (TOPII) lub bezpośrednie wbudowywanie się w strukturę ich DNA. Cyklofosfamid jest cytostatykiem działającym w głównej mierze na komórki dzielące się, w których alkiluje on DNA, co indukuje zaburzenia replikacji oraz apoptozę tych komórek. Działanie lecznicze metotreksatu wynika ze zdolności do hamowania aktywności reduktazy dehydrofolianowej. W ten sposób zaburzony zostaje metabolizm zasad azotowych prowadzący do zaburzeń replikacji i bloku fazy S cyklu komórkowego leukocytów. Kladrybina działa jako antagonist procesu transkrypcji. Dokładne poznanie mechanizmów działania prezentowanych leków może doprowadzić do zmniejszenia nasilenia ich efektów ubocznych oraz do zwiększenia ich potencjału leczniczego, również w terapii neurologicznej.

**SŁOWA KLUCZOWE:** cytostatyki, mitoksantron, cyklofosfamid, metotreksat, kladrybina, stwardnienie rozsiane

#### Summary

The aim of this review is the presentation of molecular mechanisms of action of cytostatic drugs used in the therapy of neurological disorders, mostly of multiple sclerosis (MS). From many years cytostatics like mitoxantrone, cyclophosphamide, cladribine and methotrexate were used in the MS clinical trials. So far only mitoxantrone has been approved by FDA for the treatment of progressive MS. The other cytostatics are still studied in clinical trials, the main problem with their approval for human therapy are their numerous side effects. So far those drugs are mostly used in oncology and haematology where the usage of this type of drugs is better justified. Now there are many studies leading to better understanding of mechanisms of action of cytostatics at the cellular and subcellular level. Mitoxantrone induces apoptosis and reduce the population of inflammatory

cells capable to initiate demyelination in the central nervous system (CNS). At the molecular level mitoxantrone damages genome of inflammatory cells by inhibition of activity of topoisomerase II (TOP II) or direct interaction with DNA structure. Cyclophosphamide is a cytostatic acting mainly on dividing cells, in which it alkylates DNA and interferes with replication and cell apoptosis. Methotrexate inhibits activity of dehydrofolate reductase what leads to disturbance of replication and blocks phase S of the cell cycle in leukocytes. Cladribine is an antagonist of transcription. The detailed analysis of these mechanisms may lead to diminishing of the level of their side effects and to increase of their therapeutic potential, also in neurological therapy.

**KEY WORDS:** cytostatics, mitoxantrone, cyclophosphamide, methotrexate, cladribine, multiple sclerosis

## MITOKSANTRON

W latach 60. wyizolowano z grzybn *Streptomyces peucetius* pierwsze antybiotyki antracyklinowe: dokсорubicynę i daunorubicynę<sup>(1)</sup>. Obecnie leki z tej grupy z dużym powodzeniem stosowane są w terapii wielu typów nowotworów. Syntetyczną pochodną antracyklin jest mitoksantron (MTX) będący efektem poszukiwań, jakie prowadzono w celu uzyskania środka również skutecznego cytostatycznie co klasyczne antracykliny, ale charakteryzującego się mniejszą kardiotoxycznością. Mitoksantron stał się szczególnie przydatny w terapii różnego typu białaczek. Od pewnego czasu jego wpływ na leukocyty znajduje zastosowanie w immunomodulującym leczeniu stwardnienia rozsianego<sup>(2)</sup>.

Działanie MTX sprowadza się do indukcji apoptozy (*programmed cell death*, PCD) limfocytów, co zmniejsza pulę autoreaktywnych komórek zdolnych do wywoływania demielinizacji w obrębie ośrodkowego układu nerwowego (OUN). Jednak podobnie jak w przypadku innych związków antracyklinowych dokładny molekularny mechanizm prowadzący do efektu terapeutycznego nie jest do końca wyjaśniony. Uważa się, że MTX powoduje uszkodzenia genomu poprzez hamowanie aktywności topoisomerazy II (TOPII) lub bezpośrednie wbudowywanie się w strukturę DNA. Mówi się również o możliwości zaburzania równowagi redox i generowaniu reaktywnych form tlenu w komórce.

Najczęściej za główny mechanizm proapoptyczny MTX uznaje się indukcję podwójnych pęknięć (DSB) DNA w wyniku zablokowania TOPII. Enzym ten występuje w komórkach eukariotycznych w dwóch izoformach:  $\alpha$  (wykrywanej głównie na terenie macierzy jądrowej) i  $\beta$  (o lokalizacji jądrowej). Pierwsza z izoform bierze udział w procesach transkrypcji, ulega podwyższonej ekspresji podczas podziału mitotycznego i uważana jest za marker proliferacji. Druga izoforma TOPII uczestniczy głównie w transkrypcji rRNA, a podczas mitozy jest eliminowana z jądra do cytozolu. Jej podwyższoną ekspresję obserwuje się w komórkach stransformowanych nowotworowo. Według najbardziej rozpowszechnionych koncepcji MTX wykorzystuje naturalną cechę topoisomerazy do generowania przejściowych DSB koniecznych dla utrzymania prawidłowej topologii DNA

podczas licznych procesów wymagających jego przestrzennej reorganizacji. MTX zapobiega religacji nici polinukleotydowych, prowadząc do ich pęknięć. Uszkodzenia te okazują się w zdecydowanej większości na tyle rozległe, że komórka włącza szlak apoptozy<sup>(3)</sup>. Specyficznym markerem obecności podwójnych pęknięć nici DNA jest histon H2AX fosforylowany na Ser139 przez kinazę ATM. W komórkach traktowanych MTX obserwuje się w fazie G1 cyklu komórkowego pik fosforylacji histonu H2AX. Aktywacja H2AX poprzedza aktywację kaspazy 3 i zanika w miarę postępu procesu apoptozy<sup>(4)</sup>. Wydaje się, że ważniejszą rolę w generowaniu DSB przez MTX odgrywa topoisomeraza II  $\beta$ . Wyciszenie ekspresji topoisomerazy II  $\beta$  techniką siRNA znosi apoptozę indukowaną MTX. Podobnego efektu nie uzyskuje się po zniesieniu ekspresji topoisomerazy II  $\alpha$ <sup>(5)</sup>.

W wielu pracach MTX opiswany jest jako klasyczny czynnik interkalujący, który tworzy addukty z cząsteczkami DNA. Efektywność formowania adduktów wzrasta wraz ze zwiększającym się stężeniem MTX. Czynnikiem niezbędnym dla stabilizacji oddziaływań MTX – DNA, a tym samym mogącym poprawiać efektywność MTX jako cytostatyka, okazuje się być formaldehyd. W warunkach *in vitro* ani sam MTX, ani też sam formaldehyd nie są w stanie indukować wewnątrznicowych skrzyżowań DNA<sup>(6)</sup>. Powstające addukty są związane z N-7 guaniny i charakteryzują się pewną labilnością. Badania spektrometryczne sugerują, że wiązanie następuje tylko z jedną nicią DNA i jest ono mniej stabilne termicznie niż analogiczne addukty dokсорubicyna – DNA<sup>(7)</sup>.

Oddziaływanie DNA i MTX zmienia przestrzenną organizację łańcuchów polinukleotydowych, doprowadzając do bloku transkrypcji (uniemożliwione jest przesuwanie się polimerazy RNA, a także egzonukleazy  $\lambda$ ). Blok ten jest zależny od stężeń MTX i formaldehydu i wywołany głównie w sekwencjach CpG i CpA<sup>(8)</sup>. Ta pewna preferencja do wywoływania bloku transkrypcyjnego w regionach bogatych w cytozynę nasunęła hipotezę o powiązaniu działania MTX z metylacją DNA. Okazało się, że zmetylowanie cytozyny CG w sekwencji CCGG (CC\*GG) prowadzi do zwiększenia zahamowania transkrypcji w porównaniu z sekwencją niezmetylowanych. Blok nie był indukowany, gdy metylowany DNA poddawano działaniu samego MTX. Konieczny był egzo-

genny aktywator w postaci formaldehydu. Również sama metylacja nie była w stanie zatrzymać polimerazy RNA. Na intensywność zatrzymania reakcji transkrypcji oraz na intensywność formowania adduktów MTX – DNA nie miała natomiast wpływu metylacja cytozyny CC w sekwencji CCGG (C\*CGG). Tak więc jedynie bardzo specyficzna metylacja cytozyn w DNA prowadzi do wzmocnienia tworzenia nowych wiązań między DNA a MTX zaktywowanym przez formaldehyd. Biorąc pod uwagę, że stopień metylacji DNA może podlegać fluktuacjom w komórkach w pewnych stanach patologicznych, nie bez znaczenia pozostaje związek między cytostaticznym działaniem MTX a chemicznymi modyfikacjami zasad azotowych<sup>(9)</sup>. Warto przy okazji wspomnieć o możliwości stosowania innych kombinacji związków chemicznych mogących podnosić efektywność trucizn TOPII. Ostatnie badania dowiodły, że połączenie inkubacji komórek linii HCT116 w inhibitorze TOPII (etopozydzie) i blokerze białek Hsp90 (geldanamycynie) nasila liczbę uszkodzeń DNA oraz zwiększa odsetek komórek z symptomami apoptozy w porównaniu z komórkami traktowanymi pojedynczymi inhibitorami. Dzieje się tak, ponieważ geldanamycyna uwalnia TOPII z kompleksów z Hsp90, przyczyniając się do zwiększenia liczby aktywnych kompleksów TOPII – DNA. Przy jednoczesnej obecności etopozydu lub innego inhibitora TOPII można indukować większą liczbę DSB i PCD<sup>(10)</sup>. Inne z kolei czynniki są w stanie obniżyć cytotoxycywność MTX, ale bez oddziaływania na poziom uszkodzeń DNA, co sugeruje, że za procesy prowadzące do śmierci komórki odpowiadają czynniki położone *downstream* w stosunku do formowania kompleksów TOPII – DNA. Niejasne wciąż pozostaje, czy indukowana MTX apoptoza jest prostą konsekwencją zablokowania enzymu TOPII, czy też takie wydarzenia, jak blok p34cdc2 lub niewłaściwa rekombinacja DNA będące raczej wtórnymi efektami działania MTX, stają się przyczyną inicjacji szlaku PCD.

Prawdopodobnie również wtórnym efektem jest aktywacja czynnika NF-κB przez MTX. Aktywacja taka jest zależna od stężenia dawki MTX i wymaga obecności funkcjonalnego enzymu TOPII (brak aktywacji NF-κB w linii mutantów pozbawionych TOPII). Również jedynie w linii dzikiej MTX powoduje degradację kaspazy 3. Co ciekawe, czynnik NF-κB podlega aktywacji zarówno w komórkach dzikich, jak i zmutowanych (pod względem struktury i funkcji TOPII) po stymulacji cytokiną TNF-α. Okazuje się, że uszkodzenia DNA generowane przez TOPII po inkubacji w MTX są bezpośrednio powiązane z aktywacją NF-κB, czego dowodzą badania z zastosowaniem ICRF-187 – inhibitora TOPII niewprowadzającego DSB. ICRF-187 znacznie słabiej aktywuje NF-κB i nie indukuje apoptozy, a preinkubacja komórek w ICRF-187, poprzedzająca inkubację w MTX, znosi proapoptotyczny i aktywujący NF-κB efekt MTX. Wydaje się, że ICRF-187 chroni degradację IκB, nie po-

zwalając na oddysocjowanie NF-κB. Nie wiadomo jednak, która z izoform TOPII jest zaangażowana w opisane tutaj procesy aktywacji NF-κB i w jaki sposób sygnał o uszkodzeniu DNA (sygnał „mitoksantronowy”) zaczyna współdziałać ze szlakiem NF-κB<sup>(9)</sup>. Campbell w swojej pracy<sup>(11)</sup> podkreśla rolę MTX jako czynnika nie tyle hamującego aktywność TOPII, ile bezpośrednio wbudowującego się w strukturę DNA. A zdolność klinicznie stosowanych inhibitorów TOPII do włączania się w cząsteczkę DNA ma według niego korelować z indukcją takich czynników, jak np. NF-κB. Proces wiązania NF-κB z DNA może spowalniać obecność reaktywnych form tlenu. W komórkach białaczkowych (HL60) działanie MTX prowadzi do intranukleosomalnej fragmentacji DNA i apoptozy. Towarzyszy temu wzmocniona ekspresja genu *c-jun*, dodatkowo stymulowana estrami forbolu (aktywatory kinazy białkowej C), ale niehamowana staurosporyną (inhibitor PKC). Niezgodność ta sugeruje, że *c-jun* oraz PKC nie są jedynymi i bezpośrednimi regulatorami intranukleosomalnej fragmentacji DNA i apoptozy indukowanej MTX<sup>(12)</sup>. Co więcej, w pewnych przypadkach śmierć komórki inicjowana chemioterapeutykami – w tym MTX – może się odbywać bez zaangażowania *c-jun*<sup>(13)</sup>. Procesom tym towarzyszy również spadek aktywności białek Bcl-2 i c-Myc<sup>(12)</sup>. Badania mające na celu określenie, czy komórki znajdujące się w konkretnej fazie cyklu komórkowego są bardziej podatne na działanie MTX, dowiodły, że najbardziej wrażliwą jest subpopulacja komórek replikujących w fazie S<sup>(14)</sup>.

Nie bez znaczenia dla pro- lub antyapoptotycznego działania MTX pozostaje typ badanej linii komórkowej oraz obecność specyficznych izoform kinazy białkowej C. W komórkach U937 nadekspresja PKC podnosi stopień przeżywalności komórek po inkubacji w MTX. Nie zmienia się przy tym poziom TOPII, ale znacznie spada jej aktywność katalityczna, co objawia się w postaci zmniejszonej ilości DSB. Zahamowanie TOPII jest wynikiem jej hiperfosforylacji przez ulegającą nadekspresji PKC. Reakcja ta jest charakterystyczna dla TOPII β. Tak więc nie można wykluczyć, że nadekspresja pewnych specyficznych izoform PKC może wyciszać proapoptotyczny sygnał generowany po uszkodzeniu genomu lekami cytotoxycywnymi, przyczyniając się w ten sposób do wzmocnienia odporności komórek na cytostatyki<sup>(15)</sup>. Na komórkach innej linii białaczkowej wykazano, że inicjacja apoptozy przez MTX jest poprzedzona zmianami konformacyjnymi białka mitochondrialnego Bax. Po inkubacji komórek w MTX białko Bax wbudowuje się w błonę mitochondrialną i staje się jej integralnym elementem. Ponieważ podanie inhibitora kaspaz nie wpływało na omawiane zmiany struktury białka Bax, wydaje się, że reakcje te są niezależne od kaspaz lub poprzedzają w czasie ich aktywację. Podobnie do Bax po zadziałaniu MTX zachowuje się inne białko proapoptotyczne – Bak. Konformacyjne przemiany Bax i Bak prawdopodobnie mają wpływ na modulowanie oddzia-

ływań białko – białko istotnych dla integracji sygnału o uszkodzeniu genomu i uruchomieniu apoptozy. Opisanie wyżej procesy są niezależne od białka p53<sup>(16)</sup>.

Wykryto pewne procesy komórkowe czy cechy komórek mogące znacznie zmniejszać efektywność cytostatycznego działania MTX. Jedną z takich cech jest obecność cytokeratyny w komórkach. Okazuje się, że cytokeratyna jest cząsteczką (prawdopodobnie jedną z wielu) pełniącą rolę cytoprotekcyjną względem komórek narażonych na MTX<sup>(17)</sup>. Również adhezja komórek linii U937 do fibronektyny za pośrednictwem integryny  $\beta$  hamuje inicjację DSB przez MTX. Wiąże się to z jednoczesnym spadkiem aktywności enzymatycznej TOPII oraz ze zmniejszeniem ilości enzymu ekstrahowanego z komórek roztworami soli. Za ubytek w liczbie DSB zależnych od MTX odpowiadać może zmiana w lokalizacji gromadzenia leku w komórce, a także zaburzenia w jego wiązaniu się z DNA<sup>(18)</sup>.

MTX wpływa także na wzajemny stosunek w komórce mediatorów proapoptotycznych – ceramidu i antyapoptotycznych – diacyloglicerolu. MTX indukuje produkcję ceramidu prawdopodobnie na poziomie enzymu sfingomielinazy (podobnie jak to robi daunorubicyna). Jednocześnie MTX może uruchamiać syntezę DAG. Obie reakcje obserwuje się przy stężeniach MTX stosowanych klinicznie. Preinkubacja komórek w inhibitorze fosfolipazy C – D609 – prowadzi do spadku w poziomie DAG i wzrostu stężenia ceramidu. Co ciekawe, wspomniana preinkubacja zwiększa liczbę cząsteczek ceramidu i efektywnie indukuje śmierć komórki, gdy stosuje się następnie stężenia MTX nieefektywne klinicznie. Rola DAG jako negatywnego regulatora w apoptozie indukowanej chemioterapeutykami pozostaje nadal niejasna. Opisane wyniki wydają się wskazywać na rolę pewnej równowagi między cząsteczkami życia (DAG) a cząsteczkami śmierci (ceramid) w śmierci komórki, a więc i w efektywności działania cytostatyków.

Mitoksantron podajemy pacjentom we wlewach kroplowych w ilości 12 mg/m<sup>2</sup> powierzchni ciała, aż do osiągnięcia dawki życiowej 140 mg. Ze względu na dużą kardiotoksyczność konieczne jest monitorowanie funkcji serca (ECHO serca, EKG). Spadek frakcji wyrzutowej o 10% w stosunku do wyjściowej stanowi przeciwwskazanie do podawania mitoksantronu.

## CYKLOFOSFAMID

Leukopenia jest jednym z charakterystycznych objawów obserwowanych po podaniu cyklofosfamidu (CTX). Podskórna iniekcja CTX powoduje 80-90% spadek liczby leukocytów. Największy spadek liczby leukocytów obserwowano w 4 i 11 dniu stosowania tego leku<sup>(19)</sup>. Pomimo istnienia znacznych różnic w liczbie białych krwinek pomiędzy osobnikami kontrolnymi a leczonymi CTX trudno jest dopatrzeć się zróżnicowania w składzie cytokin prozapalnych wydzielanych w obu tych grupach.

Sugestia taka wynika z badań prowadzonych na myszach, u których badano wpływ CTX na przebieg infekcji *S. pneumoniae*. Zarówno u myszy z normalną liczbą leukocytów, jak i u myszy z leukopenią zaobserwowano podobne poziomy wydzielania IL-1 $\beta$ , IL-6, MIP-2, MIP-1 $\alpha$  i MCP-1 (stężenia chemokin badano w homogenatach płuc). Jednocześnie w tych eksperymentach udało się wykazać brak wpływu CTX na strukturę i przepuszczalność śródbłonna naczyń krwionośnych i znaczny spadek produkcji tlenu azotu u myszy z leukopenią. Jednak najważniejszą konkluzją prezentowanych doświadczeń jest silna redukcja liczby leukocytów, a co za tym idzie możliwość narażenia organizmu na większe ryzyko infekcji podczas terapii CTX. Autorzy dobitnie wykazali to w obrazach histopatologicznych płuc myszy, którym przed infekcją bakteryjną podawano CTX, i u myszy infekowanych *S. pneumoniae* bez uprzedniego podania CTX. U tych pierwszych występowały znaczne zwłóknienia tkanki, uszkodzenie epitelium, destrukcja pęcherzyków płucnych, a także zahamowanie wydzielania surfaktantu<sup>(20)</sup>. W pierwszej kolejności swe działanie immunosupresyjne CTX kieruje na granulocyty, a następnie na limfocyty. Maksimum neutropenii (spadek liczby neutrofilii o ok. 80%) obserwowano w 4. dniu eksperymentu<sup>(21)</sup>. Po podaniu CTX występuje także obniżenie stężenia nitrotyrozyny, tlenków azotu i aktywności makrofagowej mieloperoksydazy oraz spadek liczby samych makrofagów. Wspomniane procesy zaobserwowano po zastosowaniu CTX u myszy wyposażonych w sprawny enzym syntetazę tlenu azotu (NOS). U zwierząt zmutowanych i pozbawionych syntetazy NO zaobserwowano jedynie redukcję poziomu nitrotyrozyny. Sugeruje to, że CTX może bezpośrednio uszkadzać syntetazę NO lub jeden z jej kofaktorów. Poważną tego konsekwencją było zahamowanie zabijania *Mycoplasma* u myszy NOS<sup>+/+</sup><sup>(22)</sup>. Powyższe dane dowodzą, że immunosupresja wywołwana przez CTX może jednocześnie prowadzić do narażenia organizmu na infekcje bakteryjne. Te okresowe leukopenie zwiększające ryzyko zakażeń oportunistycznych są poważnym skutkiem ubocznym stosowania CTX. Interesujące w tym aspekcie są badania np. polisacharydów izolowanych z korzeni *Angelica sinensis*, które wywierają efekt immunostymulujący i przyspieszający wyjście ze stanu leukopenii, pozwalając na skrócenie okresów przerw w podawaniu leku i zwiększenie efektywności chemioterapii. Wielocukry *A. sinensis* oddziałują na komórki antagonistycznie do CTX: zwiększają liczbę proliferujących komórek, wzmagają angiogenezę (oba procesy zależne od dawki). Jednocześnie następuje wyjście z CTX-zależnej leukopenii o dwa dni szybciej niż w grupie kontrolnej. Polisacharydy *A. sinensis* nie wywierają żadnego wpływu na ekspresję genów c-Myc, DOC i EGF, podczas gdy CTX ją obniża. Spośród genów, których ekspresja jest blokowana przez CTX, jedynie na gen VEGF polisacharydy *A. sinensis* działają indukująco w sposób dość silny<sup>(19)</sup>.



CTX jest cytostatykiem działającym w głównej mierze na komórki dzielące się. Po 24-godz. inkubacji obserwuje się znaczny spadek odsetka komórek dzielących się w różnych liniach komórkowych hodowanych *in vitro*<sup>(23)</sup>. Prowadząc do alkilacji, DNA indukuje zaburzenia replikacji oraz apoptozę. W sposób dobitny wykazano efekt proapoptotyczny CTX podczas badań teratogenezy na zarodkach mysich. Konsekwencją zastosowania CTX były znaczne zaburzenia w rozwoju czaszki. Na poziomie molekularnym działanie CTX na komórki mózgu sprowadzało się do indukcji licznych apoptoz, zaburzeń wiązania czynnika NF-κB z DNA oraz uaktywnienia kaspazy 3 i 8. W wątrobie CTX również inicjował apoptozę, ale jedynie w sposób przejściowy, a kaspazy wątrobowe nie osiągały tak wysokiego poziomu aktywności, jak kaspazy mózgowe. Nie obserwowano również nieprawidłowości w morfogenezie wątroby oraz zaburzeń oddziaływania NF-κB z DNA. W obu badanych organach zarodkowych wzrastał odsetek komórek wykazujących objawy apoptozy po traktowaniu CTX poprzedzonym podaniem salicylanu sodu – inhibitora wiązania NF-κB z DNA. Przytoczone dane sugerują, że NF-κB może być negatywnym regulatorem śmierci komórki i kontrolować teratogenezę indukowaną CTX<sup>(24)</sup>. Przy okazji działania teratogennego CTX warto wspomnieć, że cytostatyk ten oprócz działania terapeutycznego może również w pewnych warunkach wykazywać działanie kancerogenne i przyczyniać się do powstawania raka pęcherza moczowego i białaczki. Wiąże się to z wpływem akroleiny (metabolit cyklofosfamidu – patrz niżej) na materiał genetyczny komórek, a czynnikiem chroniącym tkanki przed tak wywołaną transformacją nowotworową jest enzym alkilotransferaza<sup>(25)</sup>.

Sam CTX nie powoduje bezpośrednio efektu leczniczego, kancerogennego ani immunosupresyjnego, lecz jest substancją prekursorową, metabolizowaną w organizmie do właściwych związków cytostatycznych. Hydroksylacja węgla w pierścieniu CTX prowadzi do powstania 4-hydroksycyklofosfamidu pozostającego w równowadze ze swoją formą tautomeryczną – aldofosfamidem. Spontaniczna reakcja prowadzi następnie do uwolnienia z aldofosfamidu akroleiny, która ma zdolność alkilowania DNA. Poszczególne metabolity szlaku mogą być przekształcane przez odpowiednie enzymy do związków nieaktywnych biologicznie (np. aldofosfamid może być zredukowany do nieaktywnego alkoholu przez reduktazę aldehydową). CFX ulega biotransformacji w organizmie w dwóch szlakach metabolicznych. Produktami pierwszego szlaku są akroleina i kwas musztardowy, natomiast produktami drugiego szlaku są 3-dechloroetylocyklofosfamid (nieaktywny biologicznie), chloroacetoaldehyd (który może być odpowiedzialny za neuro-, kardio- i urotoksyczność CFX) oraz oksazofozoryny<sup>(26)</sup>. Drugi z tych szlaków stanowi jedynie 10% metabolizmu CFX<sup>(27)</sup>. Obecnie dysponujemy licznymi danymi dotyczącymi przemian w organizmie samego CTX.

Słabo poznane są natomiast szlaki biochemicznych transformacji jego metabolitów. Oprócz akroleiny i kwasu musztardowego istnieje szereg innych związków będących pochodnymi CTX. Jednak są one stosunkowo mało stabilne. Ogólnie przyjęty pogląd, udokumentowany danymi eksperymentalnymi, głosi, że w 24 godziny po podaniu CTX jego metabolity są całkowicie usuwane z organizmu z moczem<sup>(26)</sup>.

Głównym miejscem biotransformacji CTX jest wątroba. U myszy HRN pozbawionych aktywności wątrobowego cytochromu P-450 obserwowano wzrost stężenia CTX w osoczu. Zaburzona była również synteza jego pierwszorzędowych pochodnych. Przy dawkach CTX przekraczających 100 mg/kg nie obserwowano różnic w poziomie indukowanej CTX granulocytopenii u myszy dzikich i mutantów HRN. Przy niższych stężeniach (poniżej 70 mg/kg) występowała 45% granulocytopenia w szpiku myszy z funkcjonalnym cytochromem P-450<sup>(27)</sup>. Wśród izoform cytochromu P-450 odpowiedzialnych za pierwsze etapy wątrobowego metabolizmu CTX (4-hydroksylacja) wymienia się CYP2C9 i CYP3A4<sup>(28,29)</sup>, a także CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8<sup>(29)</sup>. Wydaje się, że włączenie poszczególnych izoform cytochromu może być zależne od stężenia podanego CTX<sup>(28)</sup>. Jednak wcześniejsze eksperymenty zdają się sugerować możliwość aktywowania CTX przez enzymy niepochodzące z hepatocytów. W liniach komórek niewywodzących się z wątroby (m.in. komórki HeLa) obserwowano spadek liczby mitoz, a w linii BSC-1 zmiany morfologii komórek (powiększone, niekiedy pyknotyczne jądra, zmiany w cytoplazmie). Autorzy tych badań nie wykluczyli również możliwości obecności w mediach hodowlanych pewnych kofaktorów enzymatycznych mogących wpływać na metabolizm CTX<sup>(23)</sup>.

Jeżeli chodzi o wpływ CTX na komórki układu immunologicznego, to oprócz postępującej leukopenii obserwuje się spadek produkcji czynnika zahamowania migracji makrofagów (MIF) przez limfocyty, które zdołały jeszcze pozostać w krążeniu. Znacznie spada również tempo proliferacji limfocytów w odpowiedzi na mitogeny. Ponadto silniejszej redukcji ulegały podziały limfocytów w odpowiedzi na antygeny. Ten ostatni efekt obserwowano również w śledzionie i węzłach limfatycznych<sup>(30)</sup>. Podobne zjawiska, takie jak indukowana przez CTX leukopenia i spadek liczby komórek proliferujących w odpowiedzi na mitogeny, obserwowano w populacji limfocytów B. We krwi obwodowej pacjentów leczonych przez długi czas niskimi dawkami CTX znajdowano większy odsetek limfocytów B o zwiększonych rozmiarach w porównaniu do pacjentów nie poddawanych takiej chemioterapii. Te stosunkowo duże komórki nie powiększały już więcej swojej objętości po aktywacji. Nie następowała również ekspresja powierzchniowych markerów aktywacji. Być może tego typu zmiana morfologiczna jest specyficznym objawem reakcji na działanie czynnika alkilującego. Na podstawie tych wy-

ników można uznać CTX za czynnik hamujący proliferację i aktywację limfocytów B. Ponadto CTX ma również właściwość blokowania ich różnicowania, czego dowodzi supresja produkcji Ig po otrzymaniu sygnału różnicowania od limfocytów T<sup>(31)</sup>.

## METOTREKSAT

Metotreksat wprowadzono w latach 40. XX wieku do terapii ostrych białaczek dziecięcych. Jego działanie lecznicze wiąże się z efektem antyproliferacyjnym względem leukocytów, który wynika z kolei ze zdolności do hamowania aktywności reduktazy dehydrofolianowej. W ten sposób zaburzony zostaje metabolizm zasad azotowych, prowadzący do zaburzeń replikacji i bloku fazy S cyklu komórkowego. Obecnie metotreksat z powodzeniem bywa stosowany w leczeniu łuszczycy, łuszczykowego zapalenia stawów, zespołu przeszczep przeciwko gospodarzowi, choroby Crohna, reumatoidalnego zapalenia stawów i innych chorób o podłożu autoimmunologicznym. Podstawą do tego jest nie tylko jego efekt cytostatyczny, ale również zdolność do ingerowania bezpośrednio w procesy zapalne<sup>(32)</sup>. Na przykładzie linii komórek Jurkat (a także innych linii komórkowych) zbadano wpływ metotreksatu na aktywację NF-κB indukowaną TNF. Zaobserwowano blok degradacji i inhibicję fosforylacji cząsteczek IκBα, co prowadziło do zniesienia aktywności kinazowej tego białka. Konsekwencją tego było hamowanie aktywacji NF-κB (stymulowanej TNF i innymi molekułami prozapalnymi) oraz zależnych od NF-κB genów. Prawdopodobnie czynnikiem odpowiedzialnym za uruchomienie powyższych procesów jest adenozyne, której wzmożone wydzielanie przez komórki obserwuje się po podaniu metotreksatu<sup>(33)</sup>. Dwudniowa inkubacja fibroblastów i komórek endotelium z metotreksatem prowadzi do wzrostu udziału adenozyne w puli uwalnianych z tych komórek zasad azotowych – dla fibroblastów jest to wzrost z 24 do 42%, dla nabłonka z 4 do 31%. Interesująca jest obserwacja dramatycznego spadku adherencji aktywowanych neutrofilów do fibroblastów charakteryzujących się wzmożoną sekrecją adenozyne stymulowaną metotreksatem, co może tłumaczyć przeciwwzajemne działanie omawianego terapeutycznego<sup>(34)</sup>. Uwalnianie adenozyne przez synowocyty i komórki nabłonka traktowane metotreksatem odpowiada również za hamowanie ekspresji receptora NURR1, odgrywającego istotną rolę w integracji szlaków biochemicznych odpowiedzialnych za wzbudzenie odpowiedzi zapalnej<sup>(32)</sup>.

U chorych na reumatoidalne zapalenie stawów leczonych metotreksatem obserwowano spadek liczby limfocytów CD4<sup>+</sup> produkujących TNF-α, wzrost odsetka komórek produkujących IL-10, nieznaczne podniesienie produkcji IL-4 i brak zmian w syntezie IFN-γ w porównaniu z komórkami kontrolnymi<sup>(35)</sup>. O słabym wpływie metotreksatu na wydzielanie IFN-γ świadczy

również praca Hildnera i wsp.<sup>(36)</sup> Jej autorzy również potwierdzają, że jedną z głównych podstaw terapeutycznego działania metotreksatu w chorobach autoimmunologicznych jest inhibicja wydzielania TNF, a końcowy efekt przeciwwzajemny zależy od fazy aktywacji limfocytów wystawionych na działanie metotreksatu.

Na zwierzęcym modelu reumatoidalnego zapalenia stawów wykazano selektywne niszczenie przez metotreksat limfocytów CD8<sup>+</sup> i hamowanie aktywacji makrofagów. W łuszczycy natomiast zauważono zniesienie właściwości chemotaktycznych neutrofilów<sup>(37)</sup>. W badaniach *ex vivo* i *in vitro* z użyciem metotreksatu opisano wzmożoną produkcję TIMP-1 (*tissue inhibitor of metalloproteinases-1*) i Il-6 przez jednojądrowe leukocyty pobrane od chorych na reumatoidalne zapalenie stawów i od zdrowych ochotników<sup>(38)</sup>.

## KLADRYBINA

Działanie terapeutyczne kladrybiny (2-chlorodeoksyadenozyna) zależy od wewnątrzkomórkowych przemian biochemicznych do odpowiednich fosforanów (CldAMP, CldATP). Produktem pierwszej reakcji na drodze aktywacji kladrybiny jest adenozyne monofosforan Cda (CldAMP), a za katalizator tej reakcji służy kinaza deoksyguanozyny (enzym mitochondrialny). Wykazano, iż cząsteczka ta (CldAMP) znajduje się w komórkach eukariotycznych w sekwencji promotorowej i obniża transkrypcyjną syntezę RNA przez polimerazę II (pol II). Połączenie czynnika transkrypcyjnego II D (TFIID) z regionem TATA hamuje aktywność transkrypcyjną pol II. Aktywność regulatorowa TFIID wymaga obecności innych białek regulatorowych, takich jak: TFIIA, TFIIB, TBIIF i TBIIIH. Tworzą one wspólnie kompleks, który jest rozpoznawany przez RNA pol II. TFIID zawiera białko wiążące TATA-box (TBP) oraz czynniki związane z TBP (TAFs). Kolejnymi pochodnymi są 5'-difosforan Cda i adenozyne trifosforan Cda (CldATP)<sup>(39)</sup>. Jedną z prac sugeruje, że kladrybina działa jako antagonist procesu transkrypcji. Wynika to z wbudowywania się cząsteczek Cda w strukturę DNA, zwłaszcza w regionach promotorów genów. Takie zmiany struktury pierwszorzędowej DNA prowadzą do obniżenia zdolności wiązania z DNA białek TBP (*TATA binding proteins*). Efektem tego jest niemożność rozpoznania przez TBP promotorów genów i uniemożliwienie oddysocjowania oraz związania z normalnymi sekwencjami TATA. Każda z tych możliwości prowadzi do redukcji poziomu mRNA, co jest szczególnie szkodliwe dla białek o krótkim czasie życia, niezbędnych dla prawidłowego funkcjonowania komórki<sup>(40)</sup>. Kladrybina znalazła zastosowanie w hematologii w leczeniu białaczki włochatokomórkowej oraz w reumatologii w leczeniu reumatoidalnego zapalenia stawów. W neurologii próbuje się ją wykorzystywać w leczeniu stwardnienia rozsianego.

## PIŚMIENICTWO:

## BIBLIOGRAPHY:

1. Minotti G., Menna P., Salvatorelli E. i wsp.: Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacol. Rev.* 2004; 56: 185-229.
2. Goodin D.S., Arnason B.G., Coyle P.K. i wsp.: Therapeutics and Technology Assessment Subcommittee of the American Academy of Neurology: The use of mitoxantrone (Novantrone) for the treatment of multiple sclerosis: report of the Therapeutics and Technology Assessment Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology* 2003; 61: 1332-1338.
3. Boland M.P., Fitzgerald K.A., O'Neill L.A.: Topoisomerase II is required for mitoxantrone to signal nuclear factor  $\kappa$ B activation in HL60 cells. *J. Biol. Chem.* 2000; 275: 25231-25238.
4. Halicka H.D., Smolewski P., Darzynkiewicz Z. i wsp.: Arsenic trioxide arrests cells early in mitosis leading to apoptosis. *Cell Cycle* 2002; 1: 201-209.
5. Chikamori M., Fukushima K.: A new hexose transporter from *Cryptococcus neoformans*: molecular cloning and structural and functional characterization. *Fungal Genet. Biol.* 2005; 42: 646-655.
6. Parker B.S., Cullinane C., Phillips D.R.: Formation of DNA adducts by formaldehyde-activated mitoxantrone. *Nucleic Acids Res.* 1999; 27: 2918-2923.
7. Parker B.S., Buley T., Evison B.J. i wsp.: A molecular understanding of mitoxantrone-DNA adduct formation: effect of cytosine methylation and flanking sequences. *J. Biol. Chem.* 2004; 279: 18814-18823.
8. Parker B.S., Cutts S.M., Cullinane C., Phillips D.R.: Formaldehyde activation of mitoxantrone yields CpG and CpA specific DNA adducts. *Nucleic Acids Res.* 2000; 28: 982-990.
9. Parker B.S., Cutts S.M., Phillips D.R.: Cytosine methylation enhances mitoxantrone-DNA adduct formation at CpG dinucleotides. *J. Biol. Chem.* 2001; 276: 15953-15960.
10. Barker C.R., Hamlett J., Pennington S.R. i wsp.: The topoisomerase II-Hsp90 complex: a new chemotherapeutic target? *Int. J. Cancer* 2006; 118: 2685-2693.
11. Campbell K.J., O'Shea J.M., Perkins N.D.: Differential regulation of NF- $\kappa$ B activation and function by topoisomerase II inhibitors. *BMC Cancer* 2006; 6: 101.
12. Bhalla K., Ibrado A.M., Tourkina E. i wsp.: High-dose mitoxantrone induces programmed cell death or apoptosis in human myeloid leukemia cells. *Blood* 1993; 82: 3133-3140.
13. Bullock G., Ray S., Reed J. i wsp.: Evidence against a direct role for the induction of c-jun expression in the mediation of drug-induced apoptosis in human acute leukemia cells. *Clin. Cancer Res.* 1995; 1: 559-564.
14. Gorczyca W., Gong J., Ardel B. i wsp.: The cell cycle related differences in susceptibility of HL-60 cells to apoptosis induced by various antitumor agents. *Cancer Res.* 1993; 53: 3186-3192.
15. Plo I., Hernandez H., Kohlhaagen G. i wsp.: Overexpression of the atypical protein kinase C reduces topoisomerase II catalytic activity, cleavable complexes formation, and drug-induced cytotoxicity in monocytic U937 leukemia cells. *J. Biol. Chem.* 2002; 277: 31407-31415.
16. Bellosillo B., Villamor N., López-Guillermo A. i wsp.: Spontaneous and drug-induced apoptosis is mediated by conformational changes of Bax and Bak in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2002; 100: 1810-1816.
17. Anderson J.M., Heindl L.M., Bauman P.A. i wsp.: Cytokeratin expression results in a drug-resistant phenotype to six different chemotherapeutic agents. *Clin. Cancer Res.* 1996; 2: 97-105.
18. Hazlehurst L.A., Valkov N., Wisner L. i wsp.: Reduction in drug-induced DNA double-strand breaks associated with  $\beta$ 1 integrin-mediated adhesion correlates with drug resistance in U937 cells. *Blood* 2001; 98: 1897-1903.
19. Hui M.K., Wu W.K., Shin V.Y. i wsp.: Polysaccharides from the root of *Angelica sinensis* protect bone marrow and gastrointestinal tissues against the cytotoxicity of cyclophosphamide in mice. *Int. J. Med. Sci.* 2006; 3: 1-6.
20. Wang E., Simard M., Ouellet N. i wsp.: Pathogenesis of pneumococcal pneumonia in cyclophosphamide-induced leukopenia in mice. *Infect. Immun.* 2002; 70: 4226-4238.
21. Zuluaga A.F., Salazar B.E., Rodriguez C.A. i wsp.: Neutropenia induced in outbred mice by a simplified low-dose cyclophosphamide regimen: characterization and applicability to diverse experimental models of infectious diseases. *BMC Infect. Dis.* 2006; 6: 55.
22. Hickman-Davis J.M., Lindsey J.R., Matalon S.: Cyclophosphamide decreases nitrotyrosine formation and inhibits nitric oxide production by alveolar macrophages in mycoplasmosis. *Infect. Immun.* 2001; 69: 6401-6410.
23. Ginsberg A.H., Monte W.T., Johnson K.P.: Effect of cyclophosphamide *in vitro* and on vaccinia virus replication in tissue culture. *J. Virol.* 1977; 21: 277-283.
24. Torchinsky A., Lishanski L., Wolstein O. i wsp.: NF- $\kappa$ B DNA-binding activity in embryos responding to a teratogen, cyclophosphamide. *BMC Dev. Biol.* 2002; 2: 2.
25. Cai Y., Wu M.H., Ludeman S.M. i wsp.: Role of O<sup>6</sup>-alkylguanine-DNA alkyltransferase in protecting against cyclophosphamide-induced toxicity and mutagenicity. *Cancer Res.* 1999; 59: 3059-3063.
26. Joqueviel C., Gilard V., Martino R. i wsp.: Urinary stability of carboxycyclophosphamide and carboxyifosfamide, two major metabolites of the anticancer drugs cyclophosphamide and ifosfamide. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 1997; 40: 391-399.
27. Pass G.J., Carrie D., Boylan M. i wsp.: Role of hepatic cytochrome p450s in the pharmacokinetics and toxicity of cyclophosphamide: studies with the hepatic cytochrome p450 reductase null mouse. *Cancer Res.* 2005; 65: 4211-4217.
28. Ren S., Yang J.S., Kalthorn T.F., Slattery J.T.: Oxidation of cyclophosphamide to 4-hydroxycyclophosphamide and deschloroethylcyclophosphamide in human liver microsomes. *Cancer Res.* 1997; 57: 4229-4235.
29. Chang T.K., Weber G.F., Crespi C.L., Waxman D.J.: Differential activation of cyclophosphamide and ifosfamide by cytochromes P-450 2B and 3A in human liver microsomes. *Cancer Res.* 1993; 53: 5629-5637.
30. Balow J.E., Hurley D.L., Fauci A.S.: Cyclophosphamide suppression of established cell-mediated immunity. Quantitative vs. qualitative changes in lymphocyte populations. *J. Clin. Invest.* 1975; 56: 65-70.
31. Zhu L.P., Cupps T.R., Whalen G., Fauci A.S.: Selective effects of cyclophosphamide therapy on activation, proliferation, and differentiation of human B cells. *J. Clin. Invest.* 1987; 79: 1082-1090.
32. Ralph J.A., McEvoy A.N., Kane D. i wsp.: Modulation of orphan nuclear receptor NURR1 expression by methotrexate in human inflammatory joint disease involves adenosine A2A receptor-mediated responses. *J. Immunol.* 2005; 175: 555-565.
33. Majumdar S., Aggarwal B.B.: Methotrexate suppresses NF- $\kappa$ B activation through inhibition of I $\kappa$ B $\alpha$  phosphorylation and degradation. *J. Immunol.* 2001; 167: 2911-2920.
34. Cronstein B.N., Eberle M.A., Gruber H.E., Levin R.I.: Methotrexate inhibits neutrophil function by stimulating

- adenosine release from connective tissue cells. Proc. Natl Acad. Sci. USA 1991; 88: 2441-2445.
35. Rudwaleit M., Yin Z., Siegert S. i wsp.: Response to methotrexate in early rheumatoid arthritis is associated with a decrease of T cell derived tumour necrosis factor  $\alpha$ , increase of interleukin 10, and predicted by the initial concentration of interleukin 4. Ann. Rheum. Dis. 2000; 59: 311-314.
  36. Hildner K., Finotto S., Becker C. i wsp.: Tumour necrosis factor (TNF) production by T cell receptor-primed T lymphocytes is a target for low dose methotrexate in rheumatoid arthritis. Clin. Exp. Immunol. 1999; 118: 137-146.
  37. Weinstein G.D., Jeffes E., McCullough J.L.: Cytotoxic and immunologic effects of methotrexate in psoriasis. J. Invest. Dermatol. 1990; 95 (5 supl.): 49S-52S.
  38. Seitz M., Dayer J.M.: Enhanced production of tissue inhibitor of metalloproteinases by peripheral blood mononuclear cells of rheumatoid arthritis patients responding to methotrexate treatment. Rheumatology (Oxford) 2000; 39: 637-645.
  39. Albertioni F., Lindemalm S., Eriksson S. i wsp.: Relationship between cladribine (CdA) plasma, intracellular CdA-5'-triphosphate (CdATP) concentration, deoxycytidine kinase (dCK), and chemotherapeutic activity in chronic lymphocytic leukemia (CLL). Adv. Exp. Med. Biol. 1998; 431: 693-697.
  40. Hartman W.R., Hentosh P.: The antileukemia drug 2-chloro-2'-deoxyadenosine: an intrinsic transcriptional antagonist. Mol. Pharmacol. 2004; 65: 227-234.

## Informacja dla autorów!

Chcąc zapewnić naszemu czasopismu „Aktualności Neurologiczne” wyższą indeksację MNiSW i Index Copernicus, zwracamy się do autorów o dopełnienie poniższych warunków podczas przygotowywania pracy do publikacji:

– Publikację należy opatrzyć afiliacją z podaną nazwą ośrodka i jego pełnym adresem oraz numerem telefonu.

– Praca oryginalna powinna być poprzedzona **streszczeniem** zawierającym **od 200 do 250 słów**, a poglądowa i kazuistyczna – **150-200**. Streszczeniu pracy oryginalnej należy nadać budowę strukturalną: wstęp, materiał i metoda, wyniki, wnioski.

– Liczba **słów kluczowych** nie może być mniejsza niż **5**. Słowa kluczowe nie powinny być powtórzeniem tytułu. Najlepiej stosować słowa kluczowe z katalogu MeSH.

– **Praca oryginalna** winna zawierać elementy: wstęp, materiał i metoda, wyniki, omówienie, wnioski, piśmiennictwo.

– **Piśmiennictwo** powinno być ułożone w **kolejności cytowania**.

Pełny Regulamin ogłaszania prac znajduje się na stronie 216.