

PRÍRODNÉ LÁTKY RASTLINNÉHO PÔVODU A ICH VYUŽITIE V TERAPII ONKOLOGICKÝCH OCHORENÍ

PETRA CIBÍKOVÁ, MÁRIA ŠTURDÍKOVÁ
a MICHAL MARUNA

Oddelenie biochemickej technológie, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie, Slovenská technická univerzita, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovensko
petracibik@yahoo.com

Došlo 27.3.08, prepracované 5.11.08, prijaté 9.11.08.

Kľúčové slová: rastlinné protirakovinové látky, inhibítory tubulínu, topoizomerázy

Obsah

1. Úvod
2. Zlúčeniny v protirakovinovej terapii izolované z rastlín
 - 2.1. Používané protirakovinové liečivá získané z rastlinných zdrojov
 - 2.1.1. Vinca alkaloidy
 - 2.1.2. Epipodofylotoxíny
 - 2.1.3. Combretastatíny a kolchicín
 - 2.1.4. Kamptotecíny
 - 2.1.5. Taxány
 - 2.2. Nové zlúčeniny izolované z rastlín aktuálne v klinických štúdiách
 - 2.2.1. Protirakovinové inhibítory topoizomerázy I
 - 2.2.2. Protinádorové inhibítory topoizomerázy II rastlinného pôvodu
 - 2.2.3. Rastlinné protirakovinové tubulínové inhibítory
 - 2.2.4. Protirakovinové zlúčeniny a deriváty s iným mechanizmom účinku
3. Záver

1. Úvod

Malígne nádory predstavujú druhú najčastejšiu príčinu smrti, hneď za srdcovo-cievnyimi ochoreniami. Hlavnou prekážkou v boji proti rakovine je nešpecifický účinok používaných chemoterapeutík. V minulosti bránilo možnosti cielene útočiť voči rakovinovým bunkám neúplné poznanie rozdielov medzi nimi a normálnymi bunkami, keďže sú v mnohých ohľadoch veľmi podobné. Koncom 80. rokov výskum v oblasti molekulovej biológie a genetiky odhalil rozdiely v signálnych dráhach regulujúcich bunkovú proliferáciu a odštartoval systémovú evolúciu boja proti rakovine. V 90. rokoch sa výrazne transformoval prístup k vyvíjaniu protirakovinových liečiv, začala

sa „éra cielej terapie“, a hľadania liečiv selektívne účinných na kľúčové proteíny¹. Príroda je atraktívnym zdrojom terapeutických zlúčenín, ktoré sú vhodné pre dnešný molekulovo orientovaný prístup k vývoju liečiv ako aj ich vzájomnému kombinovaniu, nakoľko vyvolávajú menej nepriaznivých vedľajších účinkov a pôsobia ako tonikum. Dnes je viac ako 50 % využívaných liečiv prírodného pôvodu a takmer polovica z 25 svetovo najpredávanejších farmaceutických produktov je odvodená z prírodných látok².

2. Zlúčeniny v protirakovinovej terapii izolované z rastlín

Rastliny používané pre etnofarmakologické účely sa stali primárnymi zdrojmi pre vyhľadávanie prírodných liečiv v medicíne. Výskum liečiv z rastlín je dnes založený hlavne na izolácii a štúdiu bioaktivity na základe ich pôsobenia. Ďalším krokom je charakterizácia spojená s modifikáciami, úpravami liečiva s cieľom zvýšiť jeho aktivitu a potlačiť toxické vplyvy, zlepšenie farmakologického profilu ako aj syntéza analógov. Modifikácia štruktúry prebieha za pomoci štyroch typov štúdií³:

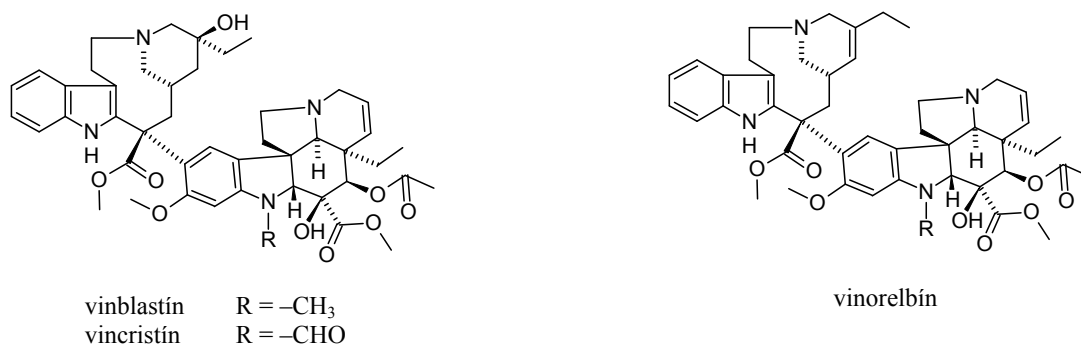
- vzťah štruktúra – aktivita (SAR), zahŕňa kvalitatívnu a kvantitatívnu analýzu,
- mechanizmus účinku, vzťah liek – receptor a špecifické enzýmové inhibície,
- štúdie metabolizmu liečiv vrátane identifikácie bioaktívnych metabolitov a blokovanie metabolickej inaktívácie,
- modelové molekulové štúdie a stanovenie trojrozmerných farmakofórov.

2.1. Používané protirakovinové liečivá získané z rastlinných zdrojov

Pri liečbe rakoviny je v súčasnosti úspešne používaných viacero zlúčenín získaných z rastlín.

2.1.1. Vinca alkaloidy

K jedným z najvýznamnejších protirakovinových liečiv v klinickej praxi patrí skupina vinca alkaloidov, izolovaných z rastlín zimozelene (*Catharanthus roseus*), ktoré rastú v pralesoch Madagaskaru, a *Vinca sp.* vyskytujúcej sa v Európe. Vincristín, jeho chemické analógy vinblastín a vinorelbín patria k mitotickým inhibítorm (obr. 1). Sú schopné naviazať sa na tubulínové diméry, vytvoriť stočené špirálovité agregáty a zabrániť formovaniu mikrotubulínovej štruktúry. To vedie k zastaveniu mitózy v metafáze, čo má vplyv najmä na rapídne sa deliace rakovinové bunky, avšak aj intestinálny epitel a kostnú dreň. Rozsah špiralizujúceho potenciálu u jednotlivých

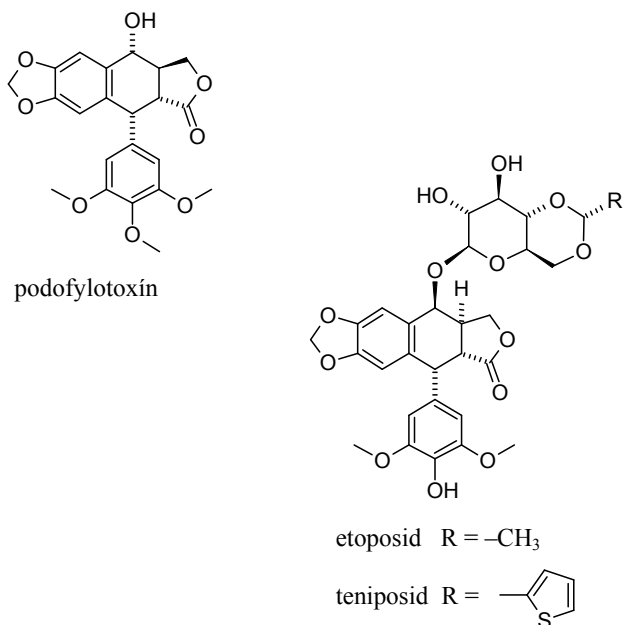


Obr. 1. Štruktúra najznámejších vinca alkaloidov

derivátov je: vincristín > vinblastín > vinorelbín > vinflunín, čo zodpovedá klinickým dávkam, kde platí vincristín < vinblastín < vinorelbín⁴. Používajú sa hlavne v kombinácii s ostatnými chemoterapeutikami na liečbu leukémie, lymfómov, Kaposiho sarkómu, nemalobunkového karcinómu pľúc a rakoviny prsníka. Zavedenie vinca alkaloidov vincristínu a vinblastínu do klinickej praxe zvýšilo počet vyliečených pacientov Hodgkinsovej choroby a používajú sa aj pri niektorých formách leukémie⁵.

2.1.2. Epipodofylotoxíny

Biologicky aktívna zložka podofylotoxín a jeho známe lignany sa prejavujú veľkou gastrointestinálnou toxicitou a preto iba glykozidy⁶ etoposid a tienfosid, ktoré majú zníženú toxicitu, sa klinicky využívajú na liečbu lymfómov, rakoviny dýchacích ciest, testi-



Obr. 2. Štruktúra hlavných zástupcov skupiny epipodofylotoxínov

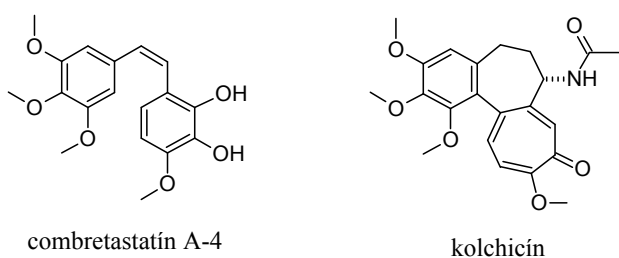
kulárnej rakoviny (obr. 2). Prírodný podofylotoxín je používaný ako prekursor pre chemickú syntézu protirakovinových biologicky aktívnych látok etoposidu a tienfosidu. Etoposid významne zvýšil úspešnosť liečenia testikulárnej rakoviny pri použití s bleomycínom (taktiež odvodený z prírodného produktu) a cisplatinou. Etoposid a prírodný produkt podofylotoxín (PPT), bioaktívny komponent *Podophyllum peltatum*, *Podophyllum emodi* a *Podophyllum pleianthum*, sú štruktúrne veľmi podobné s tromi významnými rozdielmi:

- opačná stereochemia na C-4 (β v etoposide a α v PPT),
- rozdielny substituent na C-4 (glykozyľ na etoposide, OH na PPT),
- na C-4' má etoposid OH, na rozdiel od PPT, ktorý má naviazaný OCH₃.

Tieto dve zlúčeniny majú tiež rozdielny mechanizmus účinku. Podofylotoxín sa reverzibilne viaže na tubulín a inhibuje tvorbu mitotického vretienka. Etoposid inhibuje DNA topoizomerázu II a následne stimuluje DNA štiepenie. Biooxidácia etoposidu na *E*-kruhu orto-chinónu spôsobuje kovalentné viazanie na proteíny a hydroxylované radikály tvorené metal-etoposidovými komplexami s následným metal- a fotoindukovaným štiepením DNA³.

2.1.3. Combretastatíny a kolchicín

Combretastatín A-4 (obr. 3) bol prvýkrát izolovaný z juhoafrickej vřby *Combretum caffrum*⁷. Combretastatíny, deriváty stilbenu s esenciálnym trimetoxylarýlovým postranným reťazcom, predstavujú novú skupinu terapeutických vaskulárne cielených zlúčenín. Tieto látky sa využívajú pri ochoreniach a patologických rakovinových stavoch, kde abnormálny rast krvných ciev je nevyhnutný pre progresiu choroby. Účinne pôsobia na mikrotubuly, ktoré formujú cytoskelet endotelových buniek tak, aby sa podporilo prekrvenie nádora. Keď sa tubulínová štruktúra naruší, zmenia svoj tvar z plochého na okrúhle, čím dochádza k zastaveniu prítoku krvi cez kapiláry s následným vyhľadovaním nádora a zničením. Combretastatín A-4 pôsobí primárne na nádory, pretože tam sa formujú nové cievy. Aktín, proteín, ktorý chráni tubulín, je prítomný iba v dospelých bunkách, nie však v nových. Napriek svojmu



Obr. 3. Predstaviteľ nových vaskulárne cieleňých zlúčenín a kolchicín

protirakovinovému potenciálu má combretastatín postranné účinky v normálnych tkanivách. Tento problém môže byť čiastočne eliminovaný namierením liečiva špecificky na nádorové bunky. Určité adhezívne molekuly bunky ako $\alpha v \beta 3$ integrín-receptory sú nadmerne exprimované na aktívnom proliferujúcom endotele nádora. Tieto povrchové markery rozlišujú nádorové endotelové bunky od normálnych, a preto sa môžu používať ako cieľ pre protivaskulárne liečivo. Peptidy s aminosekvenciou Arg-Gly-Asp (RGD) viazanou na cyklickom skelete sa viažu na $\alpha v \beta 3$ integrín-receptory, čo sa využilo pre vytvorenie lipozómu s cyklickými RGD peptidmi ako ligandu pre prenos combretastatínu A-4. Tento nosič zvýšil protinádorovú aktivitu liečiva a potenciálne zlepšil terapeutický benefit v porovnaní s dávkovaním v roztoku alebo bez lipozómu⁷.

Vo vode rozpustný alkaloid kolchicín (obr. 3) bol pôvodne izolovaný z *Colchicum autumnale* (jesenný krokus) a je jedným z najdlhšie používaných liečiv (dnes lieči dnu a mediteránsku horúčku). Jeho potenciálna protirakovinová aktivita voči P388 a L1210 leukémii myši je pripísaná jeho silnému antimitotickému efektu. Kolchicín naviazaním inhibuje polymerizáciu tubulínu a proces mitózy, ktorý je nevyhnutný pre delenie bunky. Avšak nízke hodnoty terapeutického indexu limitujú jeho využitie ako protirakovinového liečiva⁸.

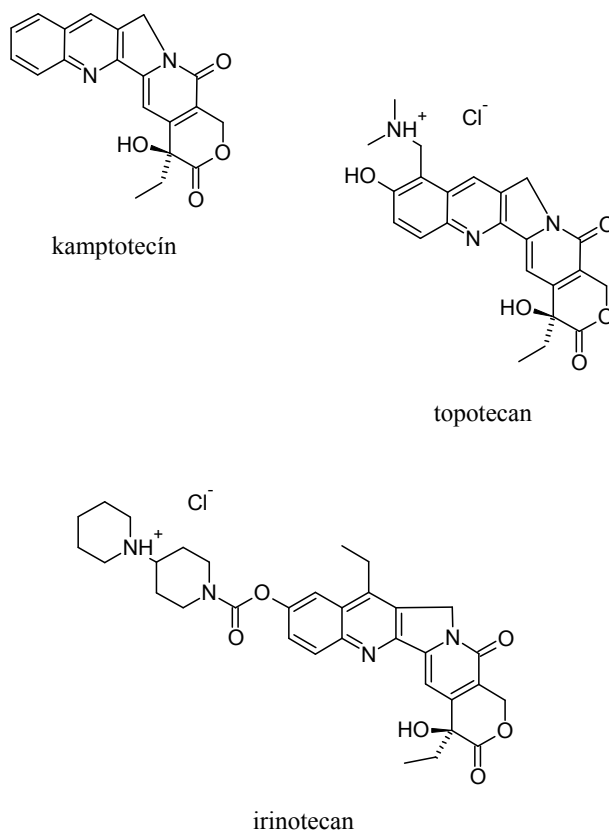
2.1.4. Kamptotecíny

Medzi dôležité protirakovinové lieky patrí skupina klinicky používaných aktívnych zlúčenín odvodených od kamptotecínu, ktorý bol izolovaný na juhu Číny z okrasného stromu *Kamptotheca acuminata* (Decne) (obr. 4). Ako bohatý zdroj tejto zlúčeniny bol objavený aj indický vždyzelený strom *Nothapodytes foetida* (Wight) (predtým *Mapiia foetida*)⁹. Kamptotecín patrí do skupiny chinolínových alkaloidov, pozostáva z pentacyclickej štruktúry, ktorá zahŕňa pyrolovú skupinu a jedno asymetrické centrum s α -hydroxy laktónovým kruhom. Je to sekundárny rastlinný metabolit používaný ako protirakovinové liečivo. Ovplyvňuje aktivitu topoizomérázy I, ktorá štiepi, odtáča a znovu liguje DNA¹⁰. Po naviazaní kamptotecínu na topoizomérázu I dôjde k štiepeniu, avšak nie ligácii DNA, čo spôsobí jednoduché zlomy DNA vlákna. Kamptotecín bol uvedený do skúšobných klinických testov NCI (National Cancer

Institute, USA) v sedemdesiatych rokoch dvadsiateho storočia ako inhibítor DNA topoizomérázy I, ale bol stiahnutý pre vysokú toxicitu. Intenzívnym výskumom sa došlo k objaveniu efektívnejších vo vode rozpustných, menej toxických derivátov topotecanu a irinotecanu (obr. 4).

Topotecan sa používa na liečbu rakoviny pľúc ak zlyhá chemoterapia prvej línie a liečbu rakoviny vaječníkov po zlyhaní prvotnej cisplatinovo-taxánovej chemoterapie u ľudí senzitivných a rezistentných na cisplatinu¹¹, alebo následnej chemoterapii, ďalej pri ne-Hodgkinovom lymfóme, myelodysplastickom syndróme, leukémii a vybraných pediatrických typoch rakoviny. Topotecan prechádza bariéry medzi krvným riečišťom a mozgom¹², vykazuje dobré výsledky ako monoterapeutikum u pacientov s metastázami mozgu a je schopný zvyšovať účinok ožarovania.

Irinotecan spolu s inými liekmi v chemoterapii lieči rakovinu kolorekta, kde je považovaný za jedno z najdôležitejších liečiv. Na základe výsledkov fázy III experimentov sa napriek stále vysokej mortalite a toxicite predpokladá významná úloha irinotecanu pri liečbe pacientov s rakovinou gastrointestinálneho traktu¹³.



Obr. 4. Kamptotecíny – liečivá s protirakovinovým účinkom

2.1.5. Taxány

Taxány sú diterpenoidy izolované z rastlinného materiálu, ktorým sa v poslednej dobe venuje veľa pozornosti, pretože sa považujú za účinné protinádorové a antileukemické látky. Dnes sa už aplikujú liečivé preparáty, ktoré obsahujú taxol alebo docetaxel (taxotere) na liečbu rakoviny prsníka a vaječníkov¹⁴. Výskumy naznačujú, že ich biologická aktivita sa prejavuje i na bunkách rakoviny hrdla¹⁵ (regresia tumoru 20–40 %), žalúdka a kože. Okrem známej chemoterapeutickej aktivity taxánov sú známe aj antiproliferačné, antiangiogénne a protizápalové vlastnosti¹⁶. Taxol sa skúma ako potenciálne liečivo voči skleróze multiplex a reumatoidnej artritíde. Hlavný zástupca tejto skupiny látok taxol (paclitaxel) bol pôvodne izolovaný z kôry pacifického tisu *Taxus brevifolia*, ako súčasť náhodnej zbierky programu pre NCI. Zlá rozpustnosť ($0,25 \mu\text{g ml}^{-1}$) vyžaduje koinjektáž v nosiči zloženom z Cremophoru EL[®], ktorý spôsobuje hypersenzitívne reakcie a pacienti liečení týmto prípravkom vyžadujú premedikáciu. Na vyriešenie tohto problému sa vytvorili nové systémy nosičov ako emulzie, lipozómy, polymérne mikro/nanočastice (vodorozpustné prodrugs), ktoré však bývajú často fagocytované alebo vylúčené z bunky membránovými transportérmi a tiež nízko toxické polymérne micely s hydrofóbnymi liečivami uzavretými v jadre. Polymérne micely obsahujúce paclitaxel sa hromadia v nádore s vyššou permeabilitou a postupne ho uvoľňujú v závislosti od pH bez straty aktivity¹⁷. Taxol sa používa na liečbu Kaposiho sarkómu, rakoviny prsníkov, pľúc, vaječníkov, kde indukuje apoptózu rakovinových buniek. Skúmaním rakovinových buniek vaječníkov SKOV3 sa zistilo, že účinok taxolu spočíva vo fosforylácii Bcl-2 (B-cell lymfóm-2) a v mitochondriálnej depolymerizácii¹⁸. Taxol stabilizuje mikrotubuly a inhibuje ich depolymerizáciu späť na tubulín. Tak vznikajú nefunkčné, abnormálne proteinové štruktúry, ktoré zastavia bunkový

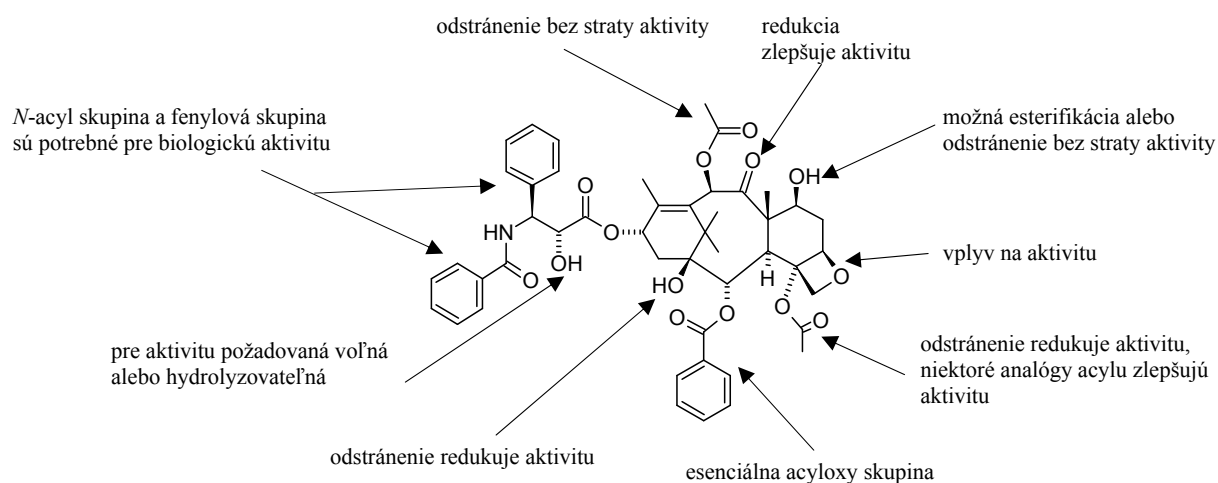
cyklus v G₂/M fáze, a tým i rast nádorových buniek¹⁹. Taxány sú jednými z mála zlúčenín, ktoré sa vyznačujú takýmto cytotoxickým účinkom. Paclitaxel má na bunky protimigrujúcu aktivitu. Môže selektívne inhibovať pohybovú aktivitu rakovinových buniek hrubého čreva a tiež buniek rakoviny vaječníkov²⁰.

Keďže paclitaxel zohráva významnú úlohu v boji proti rakovine, intenzívne štúdium vzťahu štruktúra – aktivita (SAR) viedlo k niektorým zovšeobecneniam (obr. 5). Jedno z najdôležitejších poukazuje na tri kľúčové postranné reťazce v južnej hemisfére molekuly: C-13 *N*-benzoyl fenylyzoserín, C-2 benzoát a C-4 acetát. Všetky sú po stránke konštitúcie atómov a molekulovej konformácie kritické pre naviazanie taxánu na tubulín a ich cytotoxicitu. SAR štúdie C-2 pozície poukázali, že stereochemia 2-benzoyl-skupiny v taxole zásadne determinuje jeho aktivitu. Na druhej strane, veľa taxolových analógov s aroyl- alebo alkylovou esterovou skupinou na C-2 pozícii sa vyznačuje ešte vyššou cytotoxicitou²¹. Oxetánový kruh a postranný reťazec na C-13 sú tiež nevyhnutné pre zabezpečenie cytotoxicity.

Docetaxel je semisyntetický člen taxánových zlúčenín, efektívne pôsobí pri liečbe pacientov s pokročilou (lokálnou i metastázovou) rakovinou prsníkov s účinnosťou 54–69 % v prvej línii monoterapie a v dávkach 100 mg m^{-2} povrchu tela²². Pozitívne sa prejavilo jeho použitie pri liečbe ďalších ochorení, napr. pokročilého štádia rakoviny žalúdka, rakoviny hrubého čreva (HCT 116) alebo rakoviny močových ciest²³.

2.2. Nové zlúčeniny izolované z rastlín aktuálne v klinických štúdiách

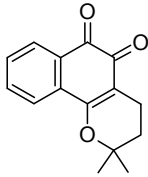
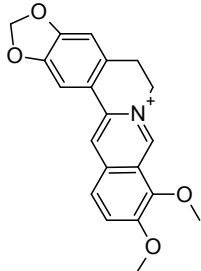
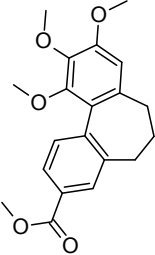
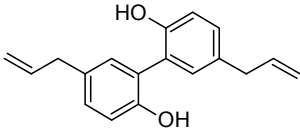
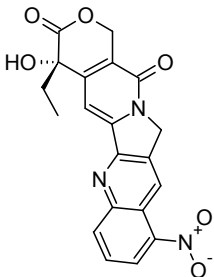
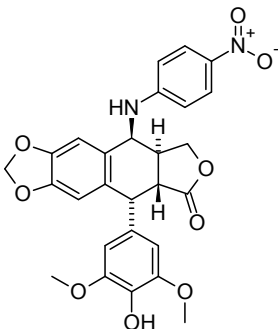
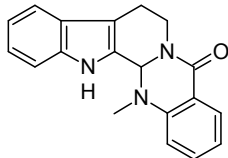
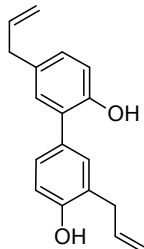
Objavujú sa nové technológie, pomocou ktorých sa zlúčeniny vylúčené z klinických štúdií pre vysokú toxicitu v predchádzajúcich obdobiach dostávajú opäť do záujmu



Obr. 5. Taxol a jeho vzťah medzi štruktúrou a biologickou aktivitou²¹

Tabuľka I

Štruktúry rastlinných protirakovinových derivátov aktuálne v klinických štúdiách

Zlúčeniny izolované z rastlín s inhibičným účinkom na:			
topoizomerázu I	topoizomerázu II	tubulín	iný mechanizmus
			
β -lapachon	berberín	allokolchicin	magnolol
			
rubitecan	GL331	evodiamín	honokiol

vedcov (tab. I). Možnosť technologicky pripojiť rôzne molekuly k vhodným „nosičom“ ich umožňuje priviesť špecificky priamo k nádorom. Takéto efektívne značenie vysoko cytotoxických prírodných látok je výhodné hlavne z hľadiska neškodnosti pre zdravé bunky organizmu, čím sa rieši problém toxicity a problém nízkej rozpustnosti vo vodných roztokoch⁶.

2.2.1. Protirakovinové inhibítory topoizomerázy I

Základná látka kamptotecín má limitujúcu dostupnosť z prírody a je zle rozpustná vo vode, preto štruktúrne modifikácie smerujú na vytvorenie užitočnejších chemoterapeutík. Prírodné a syntetické deriváty kamptotecínu ako 9-amino- a 10-hydroxykamptotecín patria k potenciálnym protirakovinovým agensom inhibujúcim DNA topoizomerázu I (Topo I). Rubitecan, orálne podávaný kamptotecínový analóg a výrazný inhibítor Topo I, preukázal klinickú aktivitu v gemcitabin-senzitívnych nádoroch, ako sú nádory pankreasu, prsníkov, vaječníkov a gemcitabin-rezistentných druhoch rakoviny. Synergický účinok medzi inhibítormi topoizomerázy I a gemcitabínom (nukleozidový analóg) zistený v preklinickom výskume, ako aj žiad-

ne pokrývajúce sa toxicity, umožnili zavedenie do klinických štúdií pre rakovinu pankreasu a žľezníka, kde bola predbežne pozorovaná výrazná aktivita²⁴. CT-2106 je nový kamptotecínový (CPT) konjugát, inhibítor topoizomerázy I novej generácie, vytvorený na dodanie vyšších, efektívnejších dávok chemoterapeutika do nádorového tkaniva s nižšou toxicitou k normálnym bunkám. Zložený je z kamptotecínu kovalentne naviazaného cez hydroxylovú skupinu k biodegradovateľnému vodorozpustnému poly-L-glutamátglycínovému polyméru, ktorý zabraňuje otvoreniu laktónového kruhu a následnému naviazaniu CPT na albumín. CPT-polymérové spojenie zabezpečuje väčšiu stabilitu CPT v cirkulácii, zvýšenú permeabilitu a zadržanie v nádorových bunkách. CT-2106 demonštroval signifikantnú protinádorovú aktivitu vo viacerých ľudských nádorových líniách a bol počas klinickej štúdie dobre tolerovaný s miernymi vedľajšími účinkami. Bol vo fáze I/II ako samostatné liečivo a plánovali sa kombinačné experimenty²⁵. Ďalším klinicky študovaným rastlinným derivátom s inhibičným účinkom na DNA topoizomerázu I je β -lapachon, 1,2-naftochinón izolovaný z kôry stromu *Tabebuia avellanedae*. Cytotoxický účinok β -

lapachonu súvisí s NAD(P)H-chinón-oxidoreduktázou 1 (NQO1), flavoproteínom nadmerne exprimovaným (až 20×) v bunkách rakoviny vaječníkov, hrubého čreva, pľúc, rakoviny prostaty a prsníkov²⁶. NQO1 indukuje nepatrné zmeny v štruktúre β -lapachonu, zlúčenina cyklizuje medzi jej hydrochinónom, semichinónom a chinónovou formou, uvoľňuje pritom NAD(P)H a vedie k vzniku hydroxylových radikálov poškodzujúcich DNA. Liečba β -lapachonom vedie k NQO1-dependentnému zvýšeniu cytosolového Ca^{2+} , čo má za následok stratu mitochondriálneho membránového potenciálu, vyčerpanie ATP, proteolýzu substrátu, DNA fragmentáciu a apoptózu bunky²⁷. NQO1 je vďaka hlavnej úlohe v β -lapachonom sprostredkovej smrti využitelný cieľ pre liečbu rakovinových buniek, ktoré nadmerne exprimujú tento enzým. Nešpecifická distribúcia a polycyklický charakter, zodpovedný za vysokú hydrofobicitu, prekážajú konvenčnému intravenóznemu použitiu na preklinické a klinické využitie. Možnosť, ako zlepšiť vodorozpustnosť β -lapachonu, je cez jeho naviazanie s hydroxypropyl- β -cyclodextrínom. Rýchla disociácia β -lapachonu a cyclodextrínu robí liečivo prístupné agregácii a rapídne spotrebovaniu. Využitie nanoterapeutického nosiča zaručuje efektívne rozpustenie liečiva a jeho dopravenie do pevného nádora²⁷. Indenoizochinolíny sú novou triedou nekamptotecínových inhibítorov topoizomerázy I, ktorých mechanizmus účinku zahŕňa uväznenie kovalentného komplexu utvoreného medzi DNA a Topo I počas bunkových procesov. Nie všetky deriváty indenoizochinolínu majú rovnaký spôsob účinku ako protirakovinové agens. Napríklad, dihydro-zlúčeniny sú všeobecne slabšími inhibítormi Topo I, avšak majú výraznú cytotoxickú aktivitu na viaceré bunkové línie. Ich kryštalová štruktúra v komplexe s DNA a Topo I indikuje stérické zábrany interkalácie neplanárných dihydroindenoizochinolínov s DNA na zlomovej strane. Je potrebné najskôr metabolizovať dihydro-deriváty *in vivo* pomocou dvojelektrónovej oxidácie, čím sa získajú planárne indenoizochinolíny, ktoré môžu stéricky interkalovať medzi párami DNA báz²⁸. Pred niekoľkými rokmi bola NSC 314622 (1) zlúčenina implikovaná ako inhibítor Topo I a jej cytotoxický profil bol obdobný ako u známych inhibítorov Topo I, kamptotecínu, irinotecanu a topotecanu. Použitie NSC 314622 (1) ako protirakovinového liečiva je limitované jeho miernym cytotoxickým účinkom a inhibičným účinkom voči Topo I, syntetizujú sa ďalšie indenoizochinolíny s vyššou cytotoxicitou voči rakovinovým bunkám a inhibíciou Topo I.

2.2.2. Protinádorové inhibítory topoizomerázy II rastlinného pôvodu

Berberín, prírodný izochinolínový alkaloid izolovaný z koreňov a kôry medicínsky dôležitých rastlín ako sú *Berberis vulgaris*, *Berberis aquifolium*, *Berberis aristata*, a *Tinospora cordifolia*, bol od nepamäti používaný ako potenciálne liečivo v indiánskej a čínskej medicíne. Berberín sa vyznačuje protizápalovou aktivitou a má protinádorový účinok *in vitro*. Inhibuje aktivačný proteín 1, kľúčový transkripčný faktor zápalov a karcinogenézy v ľudských

nádorových bunkách a účinne inhibuje transkripčnú aktivitu cyklooxygenázy-2 v bunkách rakoviny hrubého čreva u ľudí. Berberín inhibuje DNA topoizomerázu II (Topo II) a proliferáciu buniek rakoviny prostaty v závislosti od koncentrácie ($10\text{--}100\ \mu\text{mol l}^{-1}$) a času podávania (24 až 72 h). Inhibícia proliferácie súvisí s blokovaním G1-fázy bunkového cyklu, čo je spôsobené inhibíciou exprese cyklínov D1, D2, E a cyklín-dependentných kináz. Berberín výrazne zvyšuje apoptózu rakovinových buniek prostaty (DU145 a LNCaP) narušením membránového potenciálu mitochondrií a aktiváciou kaspázy-9, kaspázy-3 a poly(ADP-riboza) polymerázy²⁹. Derivát GL331 s *p*-nitroanilínovou skupinou na 4 β -pozícii etoposidu sa javí byť výborným kandidátom na liečenie rakoviny. Inhibítor Topo II GL331 spôsobuje štiepenie dvojvláknovej DNA a zastavenie bunkového cyklu v G2 fáze. Indukuje apoptózu bunky inhibíciou proteín-tyrozinázovej aktivity, stimuláciou proteín-tyrozinofosfatázovej aktivity a formovaním apoptickej DNA. GL331-indukované DNA zlomy nadmerne spúšťajú poly(ADP-riboza) polymerázu (PARP) a spôsobujú rozsiahlu poly(ADP-ribozyl)áciu nukleových proteínov. GL331, napriek podobnej štruktúre a biochemickým vlastnostiam ako etoposid, je účinný na rakovinové bunky rezistentné na liečbu etoposidom³⁰. Zjavná je účinnosť voči štyrom typom nádorov, nemalobunkovému a malobunkovému pľúcnemu karcinómu, nádoru hlavy a krku, aj karcinómu hrubého čreva s minimálnymi vedľajšími účinkami. Izosteviol (kyselina *ent*-16-ketobeyeran-19-ová) je produkt hydrolýzy steviosidu, prírodného sladidla produkovaného v listoch *Stevia rebaudiana* (Bertoni), pripravený mikrobiálnymi transformáciami a chemickou konverziou. Je potenciálnym inhibítorom polymeráz cicavcov a ľudskej DNA topoizomerázy II. Izosteviol inhibíciou buniek MOLT-4 (ľudská akútna lymfocytová leukémia) *in vitro* potláča rast BALL-1 ľudských buniek akútnej lymfoblastickej leukémie, línie žľúdočných nádorových buniek a TPA (12-tetradekanoylforbol-13-acetátom)-indukovaných zápalov. Inhibícia rastu buniek je závislá od inhibície enzýmov, najmä replikačnej polymerázy α . Keďže izosteviol blokuje taktiež bunky v S fáze, predpokladá sa, že sa distribuuje do jadra³¹. Ellipticin, karbazolový alkaloid, bol identifikovaný v roku 1959 ako obsahová látka listov austrálskeho stromu *Ochrosia elliptica* (Labil) a môžeme ho získať aj z *Bleekeria vitensis*. Vyznačuje sa protinádorovou a antineoplastickou aktivitou, ktoré môžu súvisieť s vyvolaním stresu v endoplazmatickom retikule³². Za jeho hlavný mechanizmus účinku je považovaná DNA interkalácia a inhibičné pôsobenie na topoizomerázu II (cit.³³). Najnovšie štúdie poukazujú na schopnosť ellipticinu tvoriť DNA adukty sprostredkované cytochrómom P450 (cit.³⁴). Cytotoxická aktivita ellipticinu tiež súvisí s nádorovým supresorom p35. Ellipticin a 9-hydroxyellipticin selektívne inhibujú fosforyláciu proteínu p35 pomocou inhibície kináz u rakoviny pľúc a ľudskej bunkovej línie SW480 rakoviny hrubého čreva. Navyše, akumulácia defosforylovaného mutantného inhibítora kaspáz p35 môže indukovať apoptózu. Ellipticin a jeho deriváty sú schopné zastaviť mitochon-

driálnu oxidatívnu fosforyláciu a narušiť energetickú rovnováhu buniek³². Avšak, slabá rozpustnosť vo vode ako aj jeho systémová toxicita bráni zavedeniu elliptínu medzi terapeutické liečivá. Jeho semisyntetický derivát elliptínium sa v súčasnosti v Európe používa na liečenie pokročilého štádia rakoviny prsníkov.

2.2.3. Rastlinné protirakovinové tubulinové inhibitory

Allokolchicín je prírodný štruktúrny izomér kolchicínu nachádzajúci sa v *Colchicum cornigerum* a *Colchicum autumnale*. Najaktívnejšie allokolchicinoidy (allo-ke-ton a 7S allo-alkohol) boli hodnotené ako cytotoxické látky voči ľudským rakovinovým bunkám. Oboje zlúčeniny boli 2,5 až 4× účinnejšie ako kolchicín voči viacerým líniam nádorových buniek³. Evodiamín je hlavná bioaktívna látka izolovaná a purifikovaná z tradičnej čínskej rastliny *Evodia fructus*. Vyznačuje sa protizápalovými, antiobezitnými, antinociceptívnymi vlastnosťami ako aj inhibičným účinkom na proliferáciu nádorových buniek a bunkovú migráciu spojenú s inváziou a metastázovaním pľúc. Silnejšie inhibuje migráciu nádorových buniek než ich proliferáciu, pri 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ spôsobuje 70% supresiu migrácie a iba 30% inhibíciu proliferácie³⁴. Efekt inhibície migrácie spočíva pravdepodobne v potlačení aktivity Ca^{2+} kanálov, ktorých funkcia je nevyhnutná pre bunkovú migráciu. Evodiamín má inhibičnú aktivitu voči ľudským multimedikamentozne rezistentným NCI/ADR-RES bunkám nádorov prsníkov. Pomocou imunocytochemických a *in vivo* tubulin-polymerizačných analýz sa zistilo, že evodiamín zvyšuje polymerizáciu mikrotubúl a formáciu mikrotubulového vretienka v NCI/ADR-RES bunkách³⁵. Táto zlúčenina spôsobuje značnú apoptózu pri množstve 1 mM a po 12 h pôsobenia vyvoláva zastavenie v G2/M fáze bunkového cyklu. Evodiamín reprezentuje sľubné liečivo na liečbu ľudských multimedikamentozne rezistentných rakovinových buniek.

2.2.4. Protirakovinové zlúčeniny a deriváty s iným mechanizmom účinku

Protirakovinový účinok neolignánov magnololu a honokiolu, izolovaných z rastlín čelade *Magnoliaceae* bol testovaný na rôznych rakovinových bunkových líniah, napr. proti A bunkám 459 (ľudská rakovina pľúc), SK-MEL-2 (ľudský melanóm), SK-OV-3 (rakovina vaječníkov), XF-498 (CNS bunky), HCT-15 (rakovina hrubého čreva) a Hep-G2 bunkám (rakovina pečene), lymfoidnej leukémii, rakovine kože, pľúc, hrubého čreva³⁶. Honokiol indukuje apoptózu inhibíciou Akt a MAPK fosforylácie (proteín kináza B, mitogén aktivovaná proteín kináza). Pri použití magnololu sa v priebehu apoptózy zvýšila intracelulárna koncentrácia vápnika, prebehla translokácia cytochrómu c z mitochondrií do cytozolu, aktivácia kaspázy 3, kaspázy 8 a kaspázy 9 a znížila sa regulácia bcl-2 proteínu³⁷. Rovnaký mechanizmus priebehu apoptózy bol pozorovaný aj v bunkovej línii chronickej lymfocytovej leukémie v prítomnosti honokiolu. Z tohto poznatku vyplýva možnosť odskúšania klinickej aplikácie honokiolu samostatne alebo v kombinácii s inými terapeutikami,

pretože bunková chronická lymfocytová leukémia je jedným z neliečiteľných rakovinových ochorení. Honokiol v závislosti od času a koncentrácie indukuje apoptózu buniek RKO kolorektálneho nádora. U pokusných myší s inkubovaným nádorom, honokiol potlačal rast nádora a predlžoval životnosť myší. Podávanie honokiolu indukovalo apoptózu cez aktiváciu kaspázovej kaskády p53 independentným mechanizmom. Honokiol vykazuje nízku toxicitu voči zdravým bunkám a vysokú protirakovinovú aktivitu *in vitro* a *in vivo*, preto je potenciálnym chemoterapeutickým liečivom aj pri liečbe rakoviny ľudského konečníka³⁸. Magnolol a honokiol sa preukázali aj ako potenciálne vhodné terapeutiká pri akútnej myeloidnej leukémii. V tomto prípade je do mechanizmu účinku neolignánov zapojená MEK/Map kinázová (mitogén aktivovaná kináza, mitogén aktivovaný proteín) signálna dráha. Magnolol navyše inhibuje nádor nekrotizujúci faktor α indukovaný aktiváciou NF- κ B v ľudských endotelových bunkách. Ishitsuka a spol.³⁹ dokázali, že v bunkovej línii izolovanej z ľudského myelómu honokiol aktivuje apoptózu prostredníctvom kaspáz, no zároveň aj mechanizmom nezávislým na kaspázach. Okrem toho honokiol inhibuje novotvorbu ciev v mikroprostredí kostnej drene. Do regulácie angiogenézy, metastázovania a celkového prežívania bunky je zapojený aj jadrový faktor NF- κ B. Honokiol je schopný potlačiť aktiváciu NF- κ B a expresiu génov regulovaných NF- κ B inhibíciou I κ B-kinázy. V nádorových tkanivách sa výrazne zvyšuje enzýmová aktivita matrixovej metaloproteinázy-9 (MMP-9). Magnolol a honokiol sú inhibítormi MMP-9, ktorá sčasti zodpovedá za invazívny charakter rakovinového ochorenia. MMP-9 degraduje kolagén typu IV, dôležitý komponent základnej štruktúry bunkovej membrány. Seo a spol.⁴⁰ pozorovali vysokú (90%) inhibičnú aktivitu voči MMP-9 v butanolových frakciách *Magnolia obovata* a *Magnolia officinalis* var. *biloba* pri koncentrácii 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Xu a spol.⁴¹ dokázali, že honokiol znižuje expresiu P-glykoproteínu v bunkových líniah MCF-7/ADR rezistentných na adriamycín ľudskej rakoviny prsníka. Aplikáciou honokiolu sa obnovuje akumulácia podávaného chemoterapeutika ako aj senzitivita na adriamycín.

Konjugáciou dvoch protinádorových liečiv s rôznym mechanizmom účinku môžeme dosiahnuť zlepšenie potenciálu oboch zlúčenín. Boli opísané unikátne protinádorové aktivity konjugátov taxol (TXL)-kamptotecín (CPT), TXL-epipodofylotoxín (EP), CPT-EP, TXL-kolchicín (COL). Potvrdila sa cytotoxická aktivita voči replikácii viacerých línii ľudských nádorových buniek, ľudskému karcinómu vaječníkov, pľúc, rakovine prsníkov, ľudskému karcinómu prostaty a iným. Hoci viaceré konjugáty nevýkázali vyššiu aktivitu ako taxol samotný, TXL-CPT konjugát sa vyznačoval jedinečným mechanizmom pôsobenia na línii nádorových buniek prostaty a menším účinkom na normálne bunky, než TXL samotný¹⁴. Ingenol-3-O-angelat (PEP005), analóg polyhydroxyditerpenoidu ingenolu z *Euphorbia peplus* je potenciálne chemoterapeutické liečivo rakoviny kože. Aktiváciou viacerých proteín-kinázových C izoforiem signálnych enzýmov sa indukuje

apoptóza niektorých rakovinových buniek vrátane myeloidnej leukémie, melanómu a bazálneho bunkového karcinómu⁴². Protopanaxadiol je derivát triterpénového aglykónu viacerých saponínov z *Panax ginseng* a vyznačuje sa apoptickým účinkom na nádorové bunky pôsobením na ich signálne dráhy. Je opísaný cytotoxický účinok protopanaxadiolu voči nádorom vykazujúcim mnohopočetnú liekovú rezistenciu⁴². Hlavný diterpenoid izolovaný z *Andrographis paniculata*, andrographolid, má cytotoxickú aktivitu voči ľudskému karcinómu epidermu a bunkám lymfocytovej leukémie, inhibuje proliferáciu rakovinových buniek. Môže slúžiť ako východisková štruktúra na syntézu nových, netoxických protirakovinových alebo imunomodulačných molekúl⁴³. Phenoxodiol je syntetický analóg známeho izoflavónu sóje (*Glycin max*) genisteinu (4',7-dihydroxyizoflavón), ktorý bol využitý na terapiu rakoviny krčka maternice, vaječníkov, prostaty, vaginálnej rakoviny. Indukuje apoptózu cez inhibíciu anti-apoptických proteínov. Bunky rakoviny vaječníkov, rezistentné voči konvenčnej chemoterapii, po použití phenoxodiolu podstúpia apoptózu. Tento efekt je dependentný na aktivácii systému kaspáz, na inhibičnom účinku XIAP, inhibítora apoptózy, narušení FLICE expresie inhibičného proteínu (FLIP) cez Akt signálnu transdukčnú dráhu, čo sú kľúčové faktory regulácie prežitia rakovinej bunky⁴⁴. Homoharringtonin, cefalotaxusový alkaloid z rastliny *Cephalotaxus harringtonia* rastúcej v Číne je inhibítor syntézy proteínov a bunkového cyklu. Je aktívny voči hematologickým zhubným nádorom⁴². Flavopiridol reprezentuje prvý inhibítor cyklín-dependentnej kinázy (CDK), ktorý je v poslednom štádiu klinických skúšok. Je to semisyntetický flavón derivovaný z rastlinného alkaloidu rohitukínu izolovaného z listov *Amoora rohituka* a z *Dysoxylum binectariferum* (Maliaceae). Bol identifikovaný ako potenciálne protirakovinové liečivo, keďže priamo inhibuje CDK 1, 2 a 4 ako kompetitívny ATP antagonist. Rápidne indukuje programovanú smrť buniek a inhibuje angiogénu. Mechanizmus účinku flavopiridolu zahŕňa interferenciu s fosforyláciou CDK, bránenie ich aktivácii a blokovanie bunkového cyklu v G1 alebo G2 fáze. Klinické testovanie preukázalo, že sa môže bezpečne použiť u ľudí pri liečbe ne-Hodgkinovho lymfómu, karcinómu prostaty, hrubého čreva a žalúdka, nemalobunkovej rakoviny pľúc a chronickej leukocytovej leukémii. Nakoľko sa *in vitro* prejavil synergický účinok s niektorými konvenčnými cytotoxickými liečivami, kombinácie s paclitaxelom a cisplatinou boli v roku 2000 v prvej fáze klinických pokusov⁴⁵.

3. Záver

Prirodzeným dôsledkom narastajúceho výskytu nádorových, srdcovo-cievnych ochorení, ale aj počtu multi-rezistentných mikroorganizmov je nevyhnutnou potrebou ľudskej medicíny disponovať novými a účinnejšími terapeutikami. Prehľad popisuje mnoho dôležitých biologicky aktívnych liečiv pochádzajúcich z rastlinných zdro-

jov, nakoľko skúsenosti s používaním rastlín ako terapeutických nástrojov z histórie pomohli zaviesť jednoduché chemické entity aj do modernej medicíny.

Táto práca je podporovaná Agentúrou na podporu výskumu a vývoja SR na základe zmluvy č. APVV-20-014105.

LITERATÚRA

- Chabner B. A., Roberts T. G.: Nat. Rev. Cancer 5, 65 (2005).
- Srivastava V., Negi A. S., Kumar J. K., Gupta M. M., Khanuja S. P. S.: Bioorg. Med. Chem. 13, 5892 (2005).
- Lee K. H.: J. Biomed. Sci. 6, 236 (1999).
- Loberst S., Ingram J. W., Correia J. J.: Biophys. Chem. 126, 50 (2007).
- Brody J., Advani S.: Crit. Rev. Oncol./Hematol. 58, 257 (2006).
- Cragg G. M., Newman D. J.: J. Ethnopharmacol. 100, 72 (2005).
- Nallamothe R., Wood G. C., Pattillo C. B., Scott R. C., Kiani M. F., Moore B. M., Thoma L. A.: AAPS Pharm. Sci. Tech. 7, E1 (2006).
- Muzaffar A., Brossi A., Lin C. M., Hamel E.: J. Med. Chem. 33, 567 (1990).
- Ravishankar R. V.: Plant 38, 347 (2002).
- Capranico G., Ferri F., Fogli M. V., Russo A., Lotito L., Baranello L.: Biochimie 89, 482 (2007).
- Colombo N., Gore M.: Crit. Rev. Oncol./Hematol. 64, 129 (2007).
- Zamboni W. C., Luftner D. I., Egorin M. J.: Ann. Oncol. 12, 119 (2001).
- Rivera F., Vega-Villegas M. E., López-Brea M. F.: Cancer Treatment Rev. 33, 315 (2007).
- Nakagawa-Goto K., Nakamura S., Bastow K. F., Nyarko A., Peng C. Y., Lee F. Y., Leec F. C., Lee K. H.: Bioorg. Med. Chem. Lett. 17, 2894 (2007).
- Schrijvers D., Vermorken J. B.: Oncology 5, 199 (2000).
- Ehrlich A., Booher S., Becerra Y., Borris D. L., Figg W. D., Turner M. L., Blauvelt A.: J. Am. Acad. Dermatol. 50, 533 (2004).
- Xie Z., Guan H., Chen H., Lu C., Chen L., Hu X., Shi Q., Jing X.: J. Controlled Release 117, 210 (2007).
- Ahn H. J., Kim Y. S., Kim J. U., Han S. M., Shin J. W., Yang H. O.: J. Cell Biochem. 91, 1043 (2004).
- Bhat N., Perera P. Y., Carboni J. M., Blanco J., Gollenblock D. T., Mayadas T. N., Vogel S. N.: J. Immunol. 162, 7335 (1999).
- Broker L. E., Huisman C., Span S. W., Rodriguez J. A., Krut F. A., Giaccone G.: Cancer Res. 64, 27 (2004).
- Wang L., Alcaraz A. A., Matesanz R., Yang C. G., Barasoain I., Díaz J. F., Li Y. Z., Snyder J. P., Fanga W. S.: Bioorg. Med. Chem. Lett. 17, 3191 (2007).

22. Figgitt D. P., Wiseman L. R.: *Drugs* 59, 621 (2000).
23. Bajorin D. F.: *Oncology* 14, 43 (2000).
24. Calvo E., Rowinsky E. K., Tolcher A. W., Chu Q. S., Beeram M., Forero L., Mettinger K. L., Eastham E., Goetz A. D., Patnaik A.: *J. Clin. Oncol.* 22, 2099 (2004).
25. Springett G. M., Takimoto C., McNamara M., Doroshow J. H., Syed S., Eastham E., Spriggs D., Pezzulli S., Michelson G., Dupont J.: *J. Clin. Oncol.* 22, 3127 (2004).
26. Planchon S. M., Pink J. J., Tagliarino C., Bornmann W. G., Varnes M. E., Boothman D. A.: *Exp. Cell Res.* 267, 95 (2001).
27. Blanco E., Bey E. A., Dong Y., Weinberg B. D., Sutton D. M., Boothman D. A., Gao J.: *J. Controlled Release* 122, 365 (2007).
28. Morrell A., Jayaraman M., Nagarajan M., Fox B. M., Meckley M. R., Ioanoviciu A., Pommier Y., Antony S., Hollingshead M., Cushman M.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 16, 4395 (2006).
29. Mantena S. K., Sharma S. D., Katiyar S. K.: *Mol. Cancer Ther.* 5, 296 (2006).
30. Chang H., Shyu K. G., Lee C. C., Tsai S. C., Wang B. W., Lee Y. H., Lin S.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 302, 95 (2003).
31. Mizushima Y., Akihisa T. T., Ukiyama M., Hamasaki Y., Murakami-Nakaia C., Kuriyama I., Takeuchi T., Sugawara F., Yoshida H.: *Life Sci.* 77, 2127 (2005).
32. Stiborova M., Rupertova M., Schmeiser H., Frei E.: *Biomed. Pap.* 150, 13 (2006).
33. Moody D. L., Dyba M., Kosakowska-Cholody T., Tarasova N. I., Michejda C. J.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 17, 2380 (2007).
34. Stiborová M., Sejbál J., Bořek-Dohalská L., Aimová D., Poljaková J., Forsterová K., Rupertová M., Wiesner J., Hudeček J., Wiessler M., Frei E.: *Cancer Res.* 64, 8374 (2004).
35. Ogasawara M., Matsubara T., Suzuki H.: *Biol. Pharm. Bull.* 24, 720 (2001).
36. Liao C. H., Pan S. L., Guh J. H., Chang Y. L., Pai H. C., Lin C. H., Teng C. M.: *Carcinogenesis* 26, 968 (2005).
37. Lin S. Y., Liu J. D., Chang H. C., Yeh S. D., Lin C. H., Lee W. S.: *J. Cell Biochem.* 84, 532 (2002).
38. Kong Z. L., Tzeng S. C., Liu Y. C.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 15, 63 (2005).
39. Wang T., Chen F., Chen Z., Wu Y. F., Xu X. L., Zheng S., Hu X.: *World J. Gastroenterol.* 10, 2205 (2004).
40. Ishitsuka K., Hideshima T., Hamasaki M., Raju N., Kumar S., Hideshima H., Shiraishi N., Yasui H., Roccaro A. M., Richardson P., Podar K., Le Gouill S., Chauhan D., Tamura K., Arbisser J., Anderson K. C.: *Blood* 106, 1794 (2005).
41. Seo U. K., Lee Y. J., Kim J. K., Cha B. Y., Kim D. W., Nam K. S., Kim C. H.: *J. Ethnopharmacol.* 97, 101 (2005).
42. Xu D., Lu Q., Hu X.: *Cancer Lett.* 243, 274 (2006).
43. Chin Y. W., Balunas M. J., Chai H. B., Kinghorn A. D.: *AAPS J.* 8, 239 (2006).
44. Kumar R. G., Sridevi K., Kumar V., Nanduri S., Rajagopal S.: *J. Ethnopharmacol.* 92, 291 (2004).
45. Kamsteeg M., Rutherford T., Sapi E., Hanczaruk B., Shahabi S., Flick M., Brown D., Mor G.: *Oncogene* 22, 2611 (2003).
46. Mans D. R. A., Da Rocha A. B., Schwartzmann G.: *Oncologist* 5, 185 (2000).

P. Cibíková, M. Šturdíková, and M. Maruna
(Department of Biochemical Technology, Slovak University of Technology, Bratislava, Slovak Republic): **Natural Compounds of Plant Origin and Their Application in Therapy of Oncological Diseases**

As a consequence of increasing occurrence of malign and cardiovascular diseases, but also of multiresistant microorganisms, it is necessary to dispose of new and more effective therapeutics, which are easier to biosynthesize, isolate and modify. At present natural compounds attract increasing attention fuelled by the well-documented limits and adverse effects of current chemical drugs as well as by the ongoing search for better methods of fighting the diseases. The review summarizes the important bioactive plant compounds currently used as anticancer agents and their mode of action. The cytotoxic plant drugs can be categorized into five main classes: vinca alkaloids, epipodophyllotoxins, combretastatins, camptothecins and diterpenoid taxanes. Some new secondary metabolites isolated from plants and derivatives of the known antitumour drugs currently undergo clinical tests.