

DRVO ŽIVOTA

PRIRODNI SPOJEVI U LIJEČENJU TUMORA SU "IN": KURKUMIN, LOVASTATIN, KOMBRETASTATIN

Sanjica Rak, Tamara Čimbora Zovko, Tihana De Zan

Laboratorij za genotoksične agense, Institut Ruđer Bošković



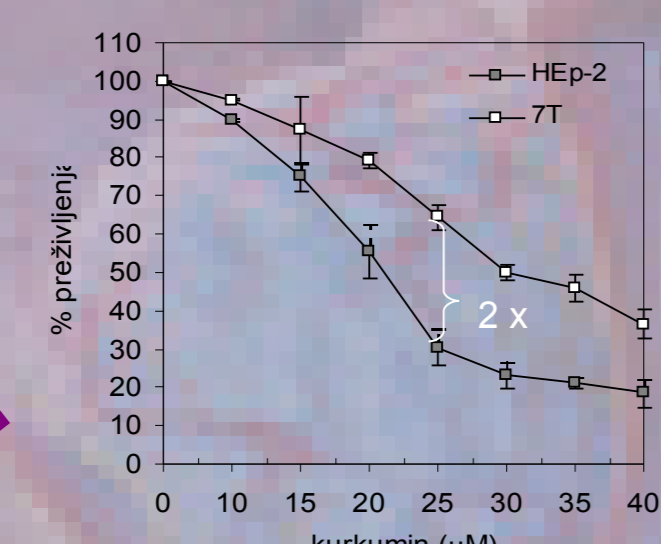
Zadnjih godina broj oboljelih od raka dostiže alarmantne brojke stvarajući veliki zdravstveni i ekonomski problem. Tražeći uspješniji način liječenja oboljelih, istraživači koriste različite strategije. Jedna od suvremenijih temelji se na kreiranju tzv. „pametnih“ lijekova koji ciljano utječu na molekule ključne u nastanku i razvoju tumora. No, pokazalo se da je taj „ciljani“ pristup dosta skup, dugotrajan, izaziva neželjene nuspojave, te ne daje uvijek željene rezultate. Stoga je u zadnje vrijeme porastao interes za prirodnim spojevima koji uglavnom imaju širok spektar djelovanja što je važno u liječenju tumora kao heterogenih tvorbi s velikim brojem genetskih i epigenetskih promjena.

Kurkumin

- polifenol izoliran iz korijena biljke *Curcuma longa*, koji se osim kao dodatak hrani upotrebljava i u tradicionalnoj indijskoj i kineskoj medicini.
- u novije vrijeme provedena su istraživanja prema kojima bi se kurkumin mogao koristiti u prevenciji i terapiji tumora.
- unatoč mnogih znanja o kompleksnoj mreži staničnog odgovora na kurkumin ne postoji mnogo podataka o otpornosti stanica na taj spoj. Ta bi saznanja mogla biti naročito korisna u budućoj primjeni kurkumina kao antitumorskog lijeka.
- u našem laboratoriju tretmanom stanične linije HEP-2 ljudskog karcinoma grkljana sa karboplatinom dobivena je 7T sublinija otporna na karboplatinu. Ta je linija pokazala i križnu otpornost na kurkumin, te smo je zbog toga koristili kao modelni sustav za ispitivanje mehanizama citotoksičnosti, kao i stanične otpornosti na kurkumin.



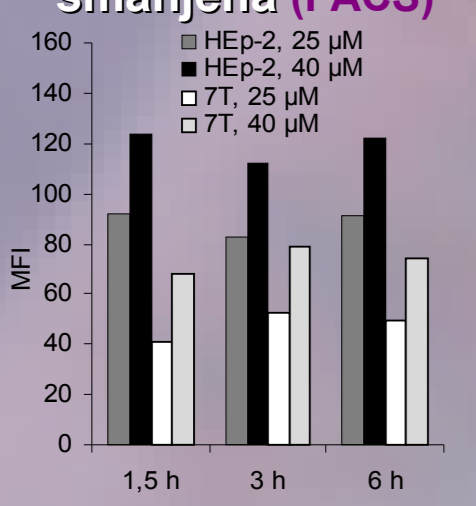
CITOTOKSIČNOST KURKUMINA u 7T stanicama je skoro 2x manja u odnosu na HEP-2 roditeljsku liniju (MTT test)



Kurkumin je lipofilan i akumulira u membranima, te tamno fluorescira...

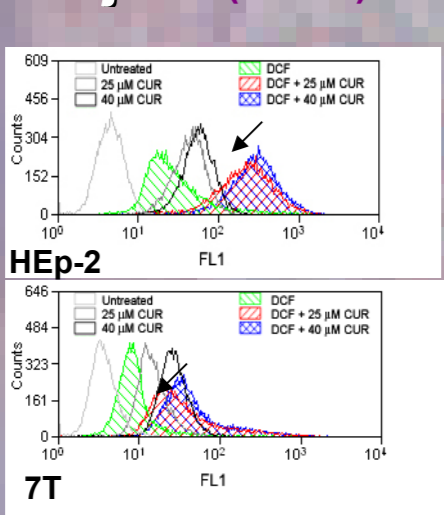
Citotoksičnost kurkumina često je posljedica indukcije ROS-a...

AKUMULACIJA KURKUMINA u 7T stanicama je smanjena (FACS)



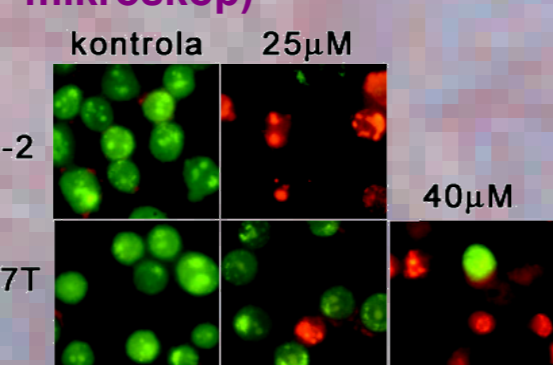
Moguću uzrok smanjene akumulacije kurkumina - promjene u sastavu membrane kod 7T stanica?

INDUKCIJA ROS-a u 7T stanicama je smanjena (FACS)

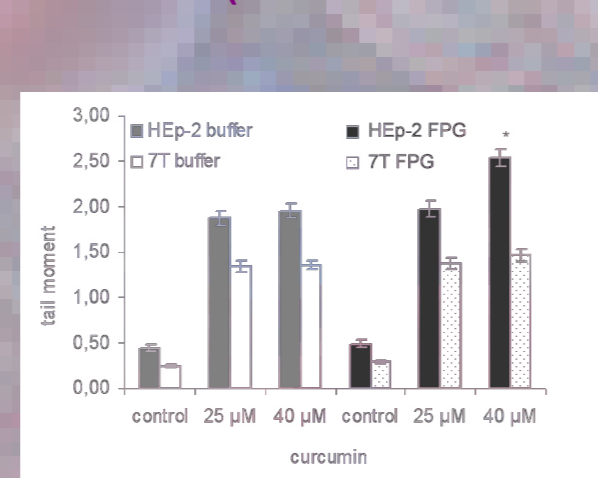


ROS može uzrokovati DNA oštećenja, lipidnu peroksidaciju, apoptozu...

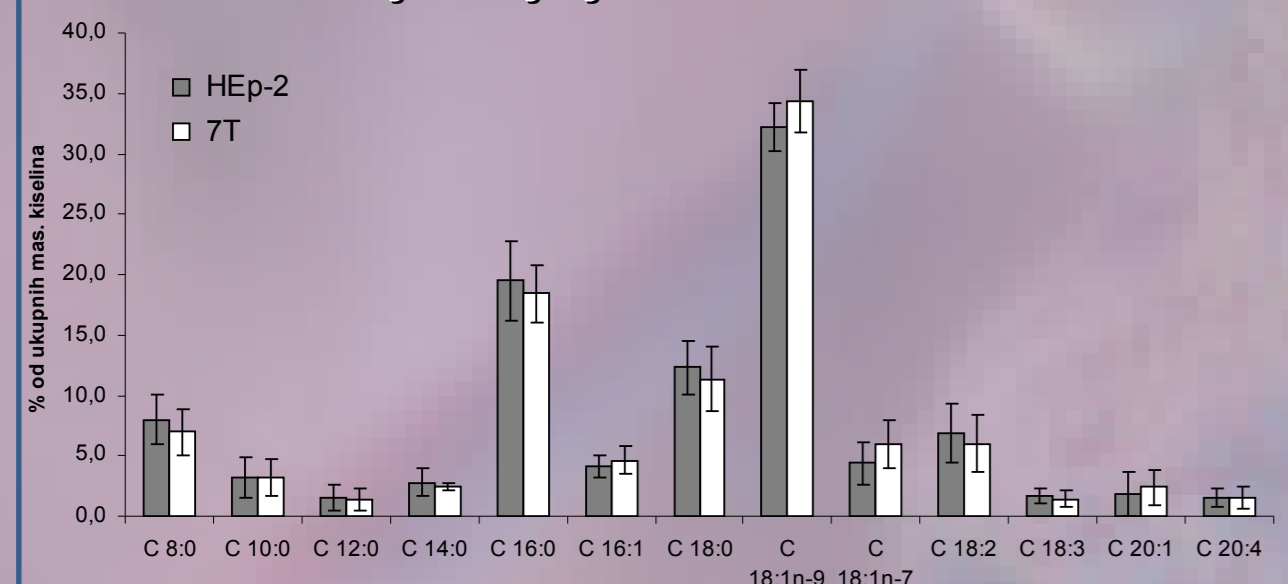
INDUKCIJA APOPTOZE u 7T stanicama je smanjena. (Epifluorescencijski mikroskop)



DNA OŠTEĆENJA smanjena su kod 7T stanica (alkalni i FPG komet)

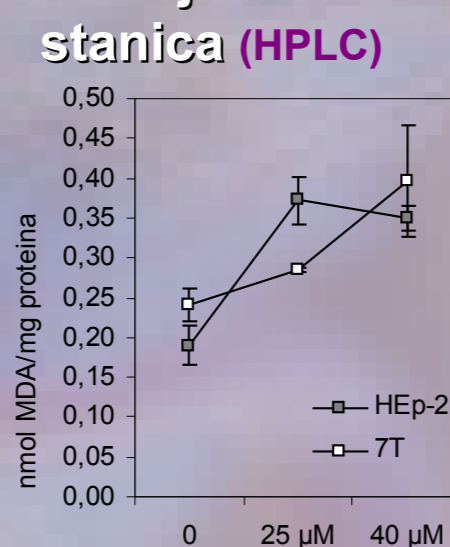


SASTAV MEMBRANA tj. sastav maslinih kiselina u obje linije je isti (Plinska kromatografija)



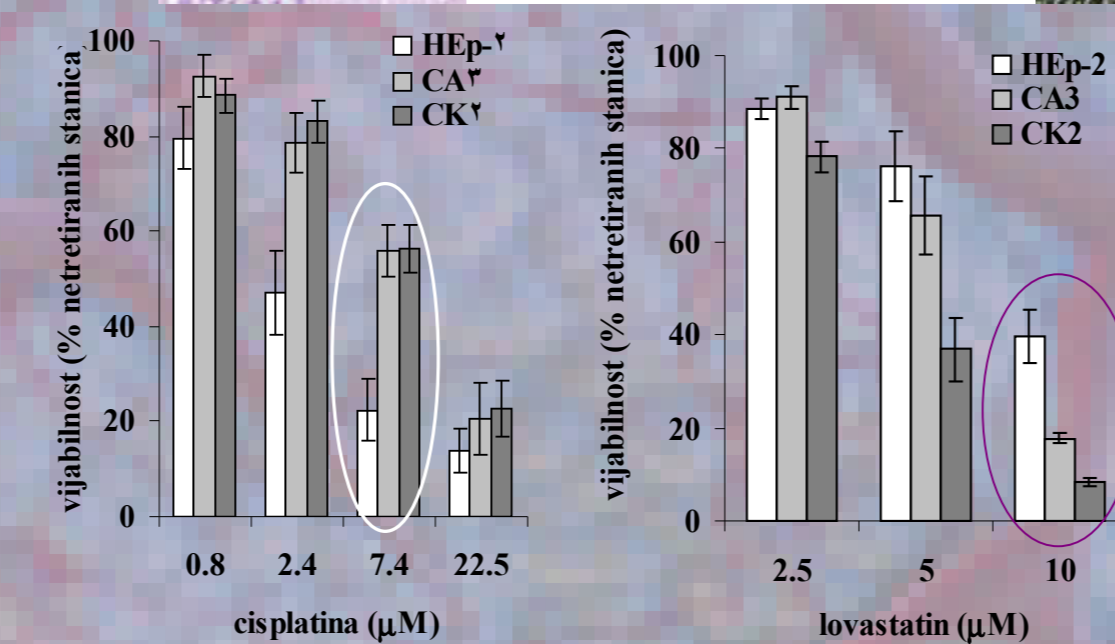
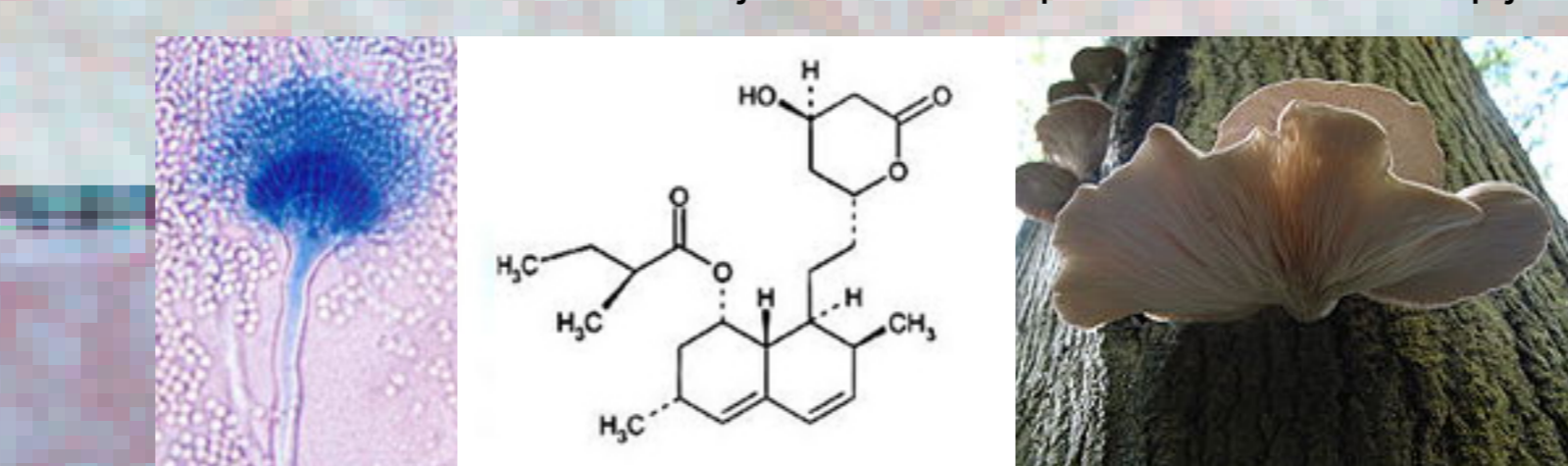
Smanjena osjetljivost na kurkumin kod 7T stanica u odnosu na roditeljsku HEP-2 liniju posljedica je smanjene akumulacije kurkumina u tim stanicama te nije posljedica promjene u sastavu membranskih lipida.

LIPIDNA PEROKSIDACIJA je smanjena kod 7T stanica (HPLC)



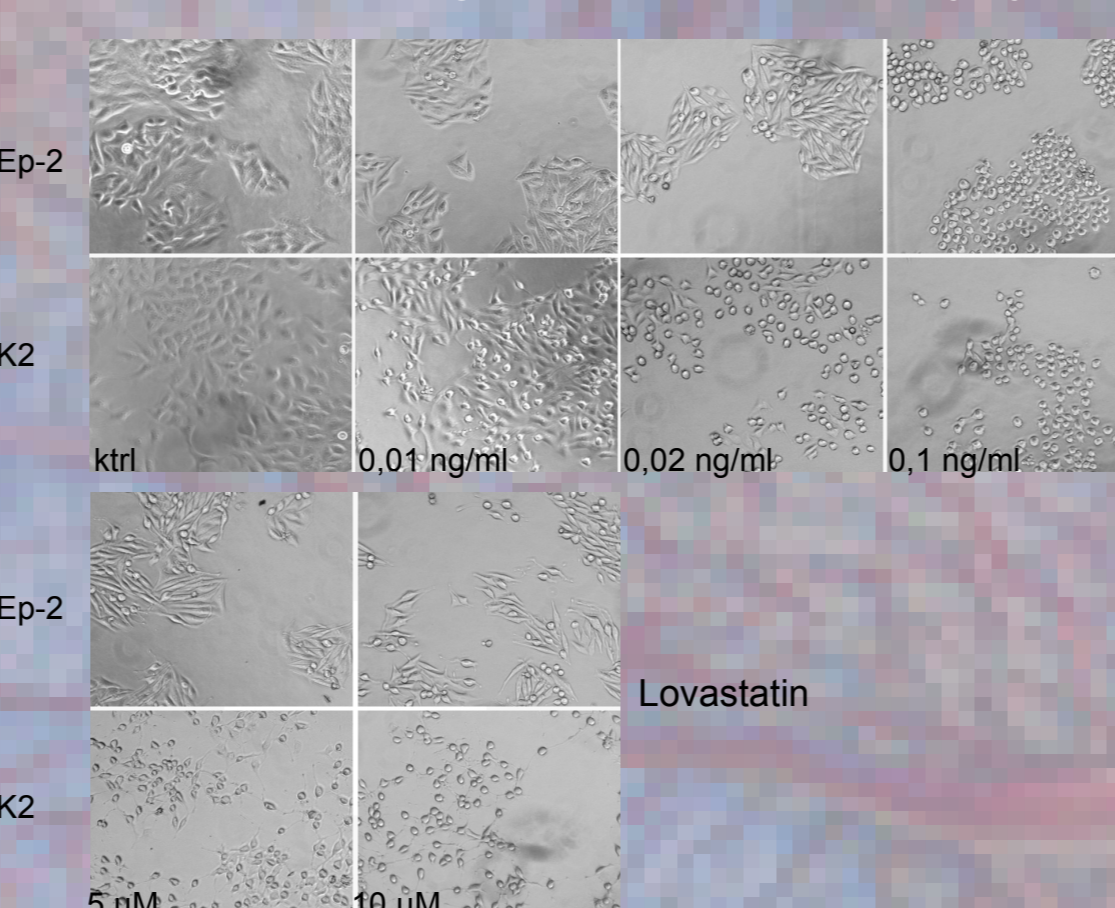
Lovastatin

- poliketid izoliran iz gljivice *Aspergillus terreus*
- zbog inhibitorynog djelovanja na HMG-CoA reduktazu, u zadnjih 20ak godina uspješno se koristi za snižavanje razine kolesterola u krvi, pri čemu smanjuje rizik od srčanog i moždanog udara
- blage nuspojave, preventivno djeluje na incidenciju tumora
- kliničke studije pokazuju pozitivni učinak na pacijente s uznapredovalom malignom bolesti
- antitumorsko djelovanje temelji se na blokiranju izoprenilacije proteina, prvenstveno malih GTPaza, za čiju aktivnost je neophodno usidrenje u membranu
- inducira zastoj u staničnom ciklusu, te staničnu smrt apoptozom, uz negativni učinak na invazivnost, metastaziranje i angiogenezu
- u većini slučajeva povećava citotoksičnost konvencionalnih antitumorskih lijekova i ionizirajućeg zračenja *in vitro*, no malo je podataka o učinku lovastatina na tumorske stanice koje su razvile otpornost na kemoterapiju

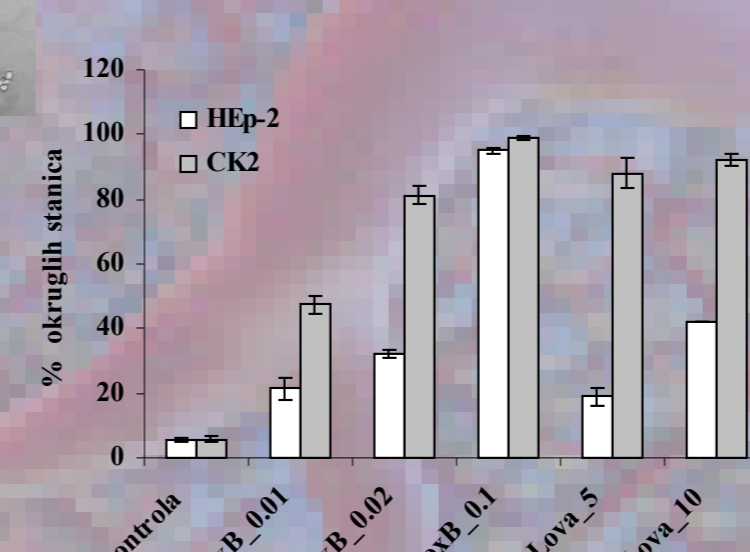


Sublinije otporne na cisplatinu CA3_{ST} i CK2 osjetljivije su na lovastatin od svoje roditeljske linije humanog karcinoma larinksa HEP-2.

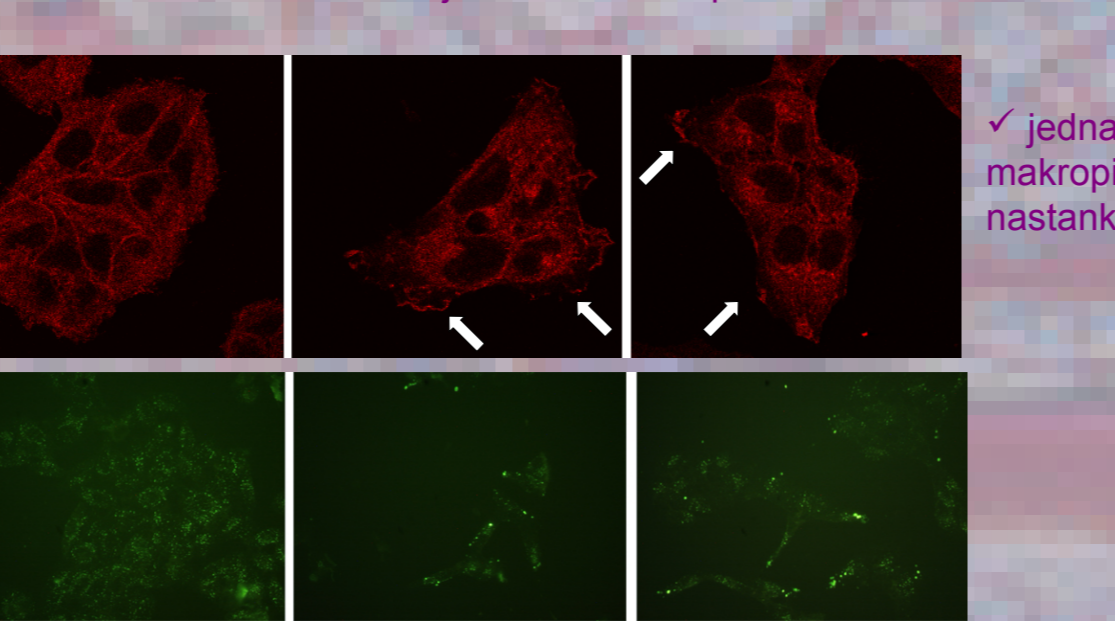
Povećana osjetljivost na lovastatin nije posljedica povećanog nakupljanja lovastatina u stanicama (LC-MS/MS), kao ni drugih do sada objavljenih mehanizama odgovornih za razliku u osjetljivosti tumorskih stanica na lovastatin



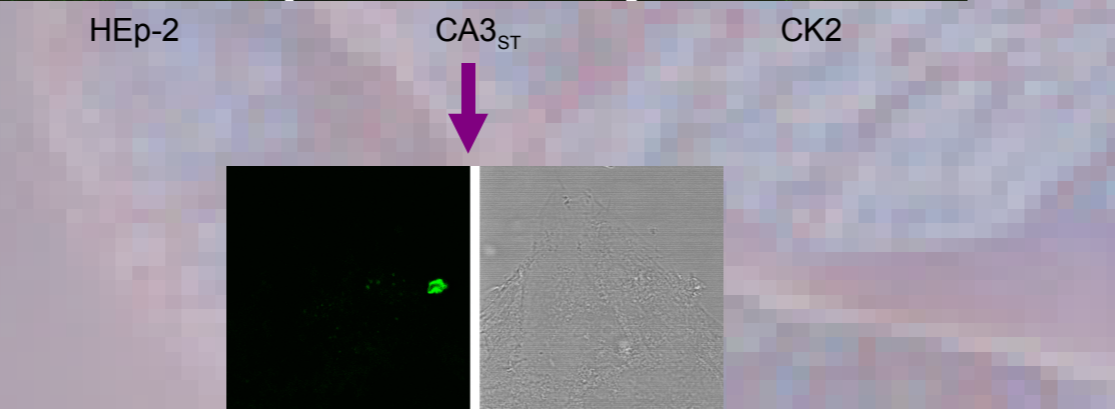
✓ toksin B iz bakterije *Clostridium difficile* je ireverzibilni inhibitor Rho GTPaza (RhoA/B/C, Rac1 i Cdc42) koje reguliraju stanični citoskelet, endocitozu i unutarstanični transport, te brojne procese uključene u staničnu proliferaciju i apoptozu



✓ zbog smanjene ekspresije RhoB kod CA3_{ST} i CK2 stanica ispitani su učinak utišavanja RhoB kod HEP-2 stanica na citotoksičnost lovastatina



✓ jedna od prvih opisanih funkcija Rac1 je stimulacija makropinocitoze - neselektivne endocitoze koja rezultira nastankom velikih vezikula (0,2-5 µm u promjeru)

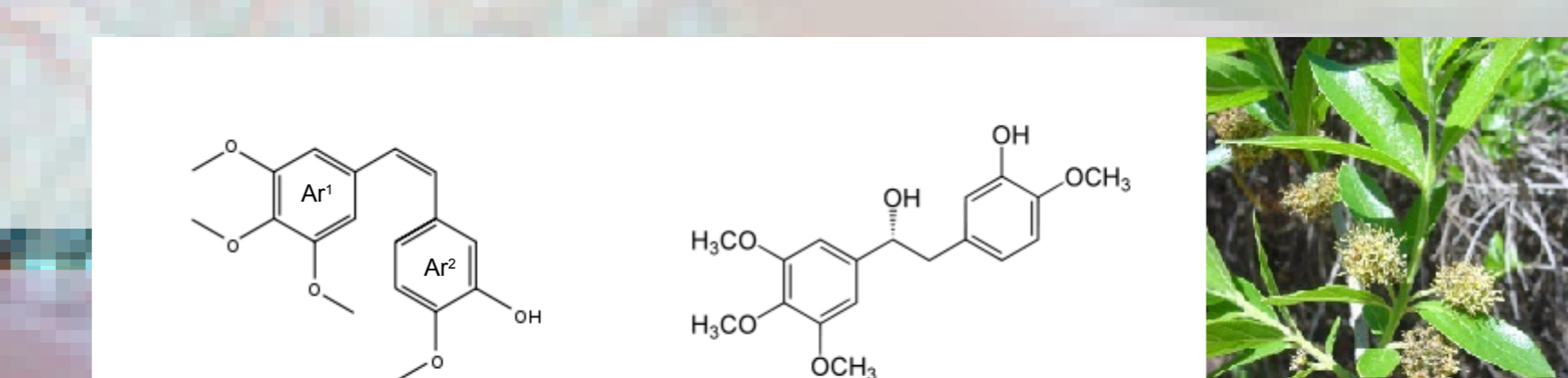


Unos fluorokromom-obilježenog dekstrana u CA3_{ST} stanice putem makropinocitoze snimljen pod konfokalnim mikroskopom

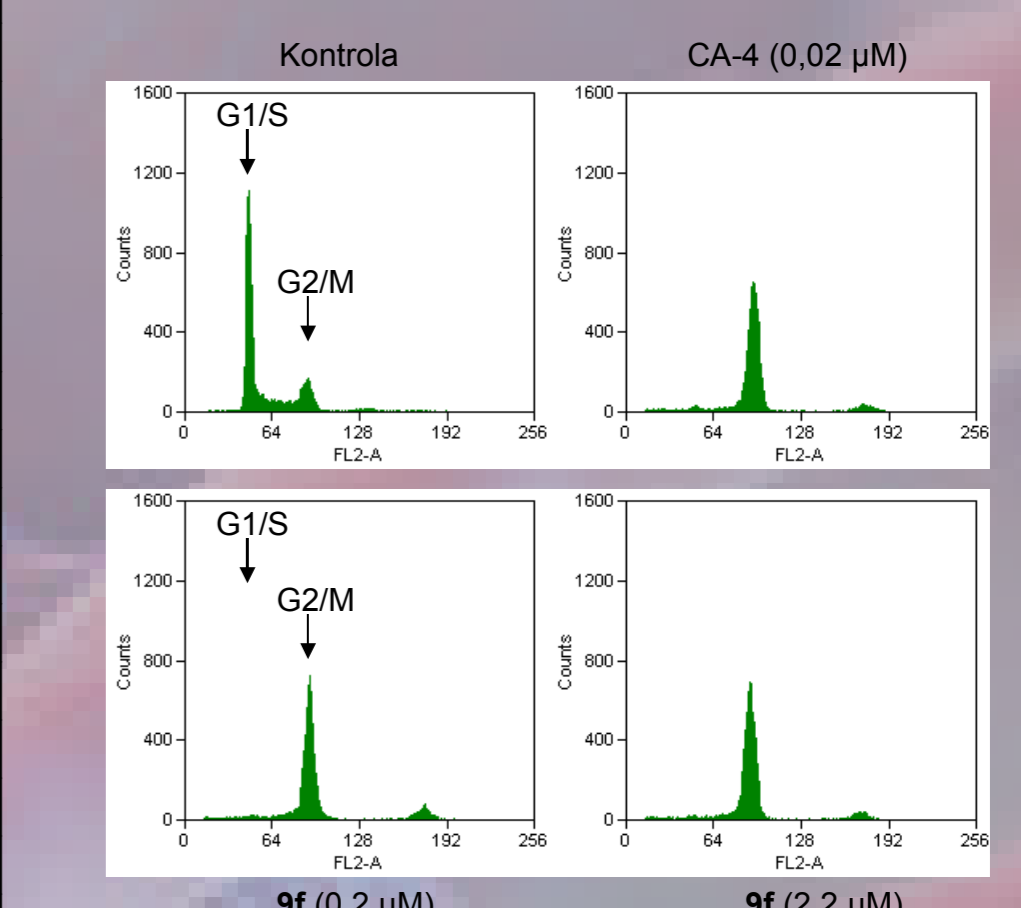
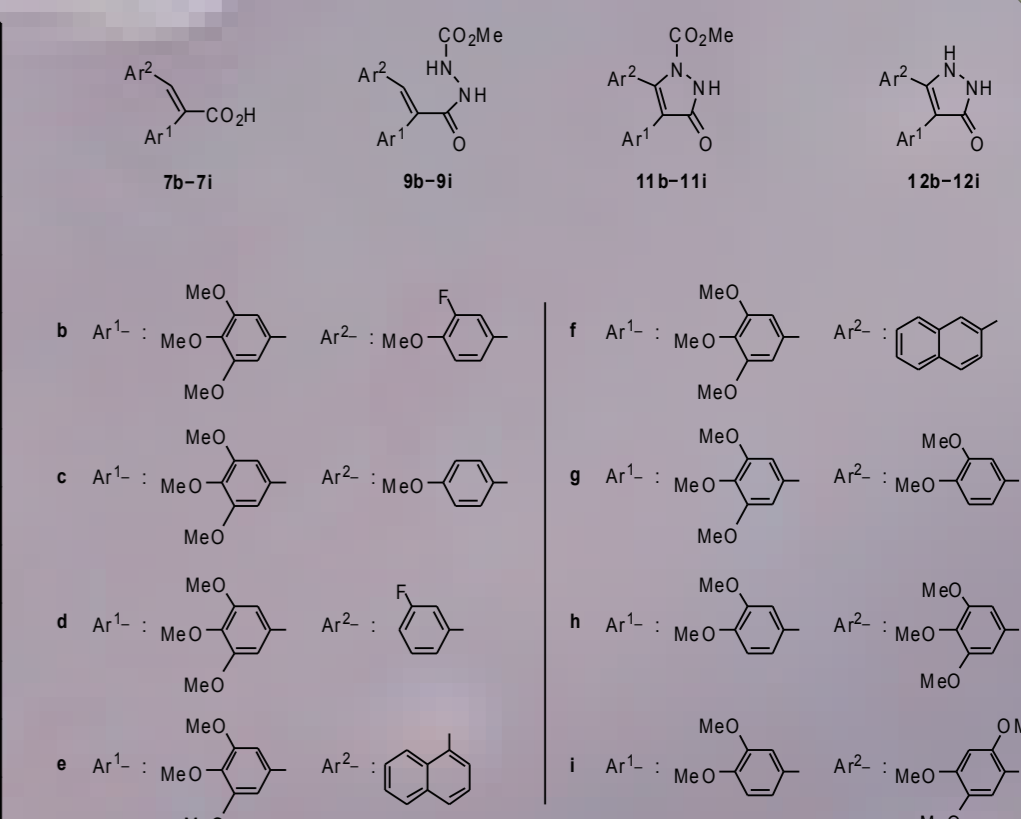
Povećana osjetljivost na lovastatin kod stanica otpornih na cisplatinu posljedica je promijenjene lokalizacije (razmještaj u dijelove nabora plazmatske membrane) i/ili aktivnosti Rac1 GTPaze

Kombretastatin

- stilbenoid izoliran iz afričke vrbe *Combretum cafrum*
- selektivno uništava novostvorene tumorske krvne žile depolimerizacijom mikrotubula
- zbog slabe topljivosti i biodostupnosti intenzivno se razvijaju i istražuju njegovi derivati
- novosintetizirani derivati kombretastatina (CA-4) "zaključani" su u cis položaju uvođenjem pirazolonskog prstena, te su varirani broj i položaj metoksi skupina na aromatskim prstenima, prisustvo atoma fluora, te izmjena Ar¹ i Ar² funkcionalnih grupa
- odrediti citotoksičnost novih derivata CA-4 na tumorskim staničnim linijama u kulturi, inhibiciju polimerizacije tubulina *in vitro*, te *in silico* analizom odrediti SAR (structure activity relationship)

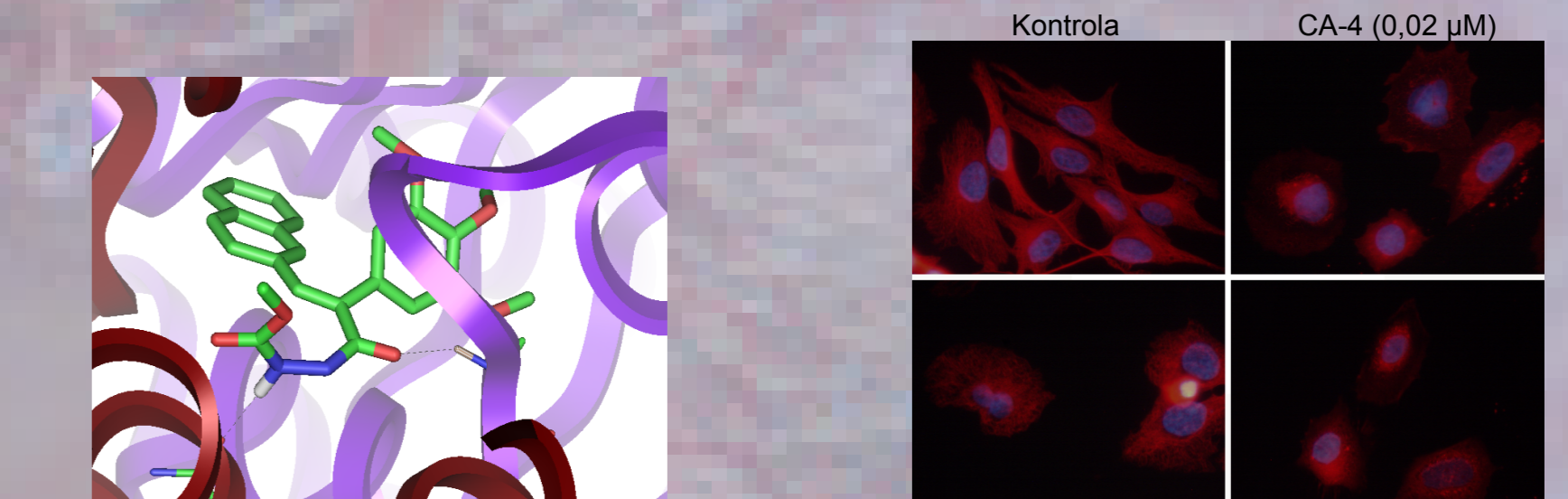


Spoj	IC ₅₀ (µM) određen MTT testom na HeLa stanicama	%inhibicije polimerizacije tubulina pri konc. 20 µM
9a	0.498 ± 0.006	25
9b	0.667 ± 0.072	66
9c	1.31 ± 0.19	26
9d	> 50	10
9e	1.30 ± 0.15	55
9f	0.048 ± 0.001	97
9g	> 50	0
9h	> 50	0
9i	NA	0
11a	0.337 ± 0.107	0
11b	1.72 ± 0.59	9
11c	0.959 ± 0.151	0
11d	NA	1
11e	> 50	7
11f	0.523 ± 0.036	3
11g	36.3 ± 2.2	3
11h	NA	0
11i	NA	2
12a	0.176 ± 0.011	99
12b	0.158 ± 0.024	100
12c	0.152 ± 0.020	100
12d	> 50	0
12e	> 50	0
12f	0.114 ± 0.006	98
12g	5.27 ± 1.53	31
12h	> 50	4
12i	> 50	0
CA-4	0.002 ± 0.0001	89



Udio stanica u pojedinoj fazi staničnog ciklusa određen na protokom citometru.

Spoj/ Stanična linija	9f	12a	12b	12c	CA-4
HeLa	0.048 ± 0.001	0.176 ± 0.011	0.158 ± 0.024	0.152 ± 0.020	0.002 ± 0.0001
HEP-2	0.054 ± 0.001	1.142 ± 0.138	1.179 ± 0.236	0.529 ± 0.081	0.0055 ± 0.0017
CK2	0.051 ± 0.001	0.709 ± 0.120	0.684 ± 0.238	0.615 ± 0.277	0.0052 ± 0.0011
RT-112	0.1961 ± 0.0934	2.063 ± 0.074	3.319 ± 1.932	1.888 ± 1.166	0.0216 ± 0.00381
T-4	0.1848 ± 0.061	0.619 ± 0.075	1.154 ± 0.589	1.156 ± 0.662	0.0087 ± 0.0006
MIA PaCa-2	0.127 ± 0.072	0.462 ± 0.078	0.556 ± 0.059	0.575 ± 0.025	0.0072 ± 0.0011
SW620	0.0743 ± 0.0032	0.543 ± 0.175	0.487 ± 0.188	0.455 ± 0.176	0.023 ± 0.0005



Na staničnoj liniji tumora vrata maternice HeLa spoj 9f poput CA-4 inducira zastoj u G2/M fazi staničnog ciklusa te depolimerizaciju mikrotubula. Prema modeliranju *in silico*, spoj 9f veže se na tubulin na mjestu na kojem se veže i CA-4. Smanjena citotoksičnost nekih derivata CA-4 najvjerojatnije je posljedica njihove smanjene lipofilnosti u odnosu na CA-4.

Spoj	LogP	LogS
9f	3.28	-5.73
11a	2.20	-4.59
11f	3.31	-5.09
11g	2.58	-4.20
12a	1.49	-3.35
12b	1.57	-3.85
12c	2.23	-4.14
12f	3.25	-4.89
CA-4	3.32	-4.51

Lipofilnost (LogP) i solubilnost (LogS) određeni pomoću ALOGPS2.1

Zahvala

Maja Osmak Stanični odgovor na citotoksične spojeve i razvoj otpornosti

Goran Gajski, Verica Garaj-Vrhovac
Klara Dubravčić, Drago Batinić
Ana-Marija Domijan, Jasna Sorić
Ivančica Delaš

Gerhard Fritz
Igor Bratoš
Marija Ljubojević, Ivan Sabolić

Sanja Tomić
Bojan Burja, Marijan Kočevar, Slovenko Polanc

