

Received: 2005.10.13
Accepted: 2006.01.17
Published: 2006.02.13

Molekularne mechanizmy działania antracyklin*

Molecular mechanisms of anthracyclines action

Agata Szuławska, Małgorzata Czyż

Zakład Biologii Molekularnej Nowotworów Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

Streszczenie

Antracykliny są stosowane w leczeniu chorób nowotworowych od prawie czterdziestu lat. W tym okresie zsyntetyzowano i poddano ocenie setki analogów pierwszych antybiotyków antracyklinowych, doksorubicyny i daunorubicyny. Zaproponowano wiele molekularnych mechanizmów tłumaczących działanie cytostatyczne i cytotoksyczne wywoływane przez antracykliny. Znany jest udział antracyklin w generowaniu wolnych rodników, peroksydacji lipidów i zmian w strukturze błon komórkowych. Jednakże do najlepiej scharakteryzowanych działań należą: wpływ na aktywność topoizomerazy II oraz interakcje z DNA poprzez kompleksy interkalacyjne i wiązania kowalencyjne oraz modyfikacje zasad azotowych. Prowadzi to do zaburzeń w takich procesach, jak replikacja czy transkrypcja, uruchomienia mechanizmów naprawy DNA lub apoptozy. Istnieją dowody na to, że w małych stężeniach antracykliny mogą uczestniczyć również w zmianie programu realizowanego przez komórkę prowadząc do różnicowania. Poszukiwany jest związek między strukturą antracyklin, efektem obserwowanym w badaniach *in vitro* oraz ich skutecznością kliniczną. W badaniach tych istotne jest stężenie leków, gdyż wydaje się, że nie wszystkie mechanizmy działania antracyklin obserwowane *in vitro* mogą być odpowiedzialne za efekty kliniczne tych leków. Na efekty kliniczne składa się wiele, a nie jeden sposób działania antracyklin. Z powodu kardiotoxyczności antracyklin wiele uwagi poświęca się selektywnym sposobom dostarczania tych związków do komórek nowotworowych. W przeglądzie przedstawiamy współczesne poglądy na temat molekularnych mechanizmów działania antracyklin oraz nowe kierunki poszukiwań, które mają na celu poprawę ich indeksu terapeutycznego.

Słowa kluczowe:

antracykliny • interkalacja • wirtualne wiązania • oddziaływanie z DNA • apoptoza • różnicowanie • wolne rodniki • topoizomeraza II

Summary

Anthracyclines have been in use for almost 40 years for the treatment of many malignancies. During this period, hundreds of analogs of the first two anthracycline antibiotics, doxorubicin and daunorubicine, have been synthesized and evaluated. Multiple mechanisms have been proposed to explain the cytostatic and cytotoxic actions of anthracyclines. These include free radical formation, lipid peroxidation, and direct membrane effects. The best characterized, however, are interactions with the DNA-topoisomerase II complex or DNA itself via intercalation or covalent binding formation and base modification, which in turn are responsible for disturbances in DNA replication and transcription, and then the induction of DNA repair or apoptotic cell death. There is evidence that at low concentrations, anthracyclines can induce a differentiation program in proliferating cells. The search for the relationship between the structure of anthracyclines and their mode of action *in vitro* or their clinical effectiveness is continuing. The concentrations of the drugs is important in these studies since not all the mechanisms of action observed *in vitro* seem to be responsible for clinical effects and, on the other hand, the drug action

* Praca finansowana przez Ministerstwo Nauki i Informatyzacji (numer projektu: 2 P05A 093 29)

associated with their clinical utilization is very complex. Because of anthracycline-induced cardiotoxicity, an important part of the research is focused on new methods of drug delivery to cancer cells. We review recent progress in understanding the molecular mechanisms of anthracycline action and the new approaches which are being undertaken to improve their therapeutic index.

Key words: anthracyclines • intercalation • virtual crosslinks • interaction with DNA • apoptosis • differentiation • free radicals • topoisomerase II

Full-text PDF: http://www.phmd.pl/pub/phmd/vol_60/8745.pdf

Word count: 8290

Tables: 1

Figures: 8

References: 167

Adres autorki: Dr hab. Małgorzata Czyż, Zakład Biologii Molekularnej Nowotworów, Uniwersytet Medyczny w Łodzi, ul. Mazowiecka 6/8; 92-215 Łódź; e-mail: mczyk@csk.umed.lodz.pl

Wykaz skrótów: **ACLA** – akłacynomycyna; **Akt** – kinaza serynowo-treoninowa; **AP-1** – czynnik transkrypcyjny (activator protein 1); **apo-IRP1** – białko trans-regulatorowe pozbawione centrum katalitycznego; **Ara-C** – arabinozyd cytozynowy; **Bax, Bak, Bcl-2** – białka apoptotyczne należące do rodziny białek Bcl; **CHF** – przewlekła niewydolność serca (congestive heart failure); **CH₂O** – formaldehyd; **CL** – kardiolipina; **CMA** – cyjanomorfolinowa pochodna doksorubicyny; **COX** – oksydaza cytochromu c; **DCT** – docektaksel; **DOX** – doksorubicyna (adriamycyna); **DOXF, DRBF, EDOXF** – koniugaty antracyklin z formaldehydem; **dG** – deoksyguanozyna; **DOXM** – amidynowa pochodna doksorubicyny z pierścieniem morfolinowym; **DTT** – ditriotreitol; **DRB** – daunorubicyna; **DRBM** – amidynowa pochodna daunorubicyny z pierścieniem morfolinowym; **EDOX** – epidoksorubicyna; **Epo-R** – receptor erytropoetyny (erythropoietin receptor); **FapyGua** – 2,6-diamino-4-hydroksy-5-formamidopirymidyna; **HL-60** – linia ludzkich komórek białaczki promielocytowej (human promyelocytic leukemia); **HO[•]** – rodnik hydroksylowy; **H₂O₂** – nadtlenek wodoru; **IDA** – idarubicyna; **JNK** – kinaza fosforylująca N-terminalną część białka Jun (Jun N-terminal kinase); **K562** – linia ludzkich komórek białaczki szpikowej; **MDA** – dialdehyd malonowy (malondialdehyde); **MDR** – oporność wielolekowa (multidrug resistance); **M1dG** – addukt pirymidopurynonu; **ML-1** – linia ludzkich komórek białaczki szpikowej (human myeloblastic leukemia); **NF-κB** – czynnik transkrypcyjny κB (nuclear factor κB); **NMR** – spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (nuclear magnetic resonance); **O₂^{•-}** – anionorodnik ponadtlenkowy; **PBGD** – deaminaza porfobilinogenu (porphobilinogen deaminase); **PI3K** – kinaza 3-fosfatydyloinozytolu (phosphatidylinositol 3 kinase); **PLD** – oplaśczonea polietylenoglikolem liposomowa doksorubicyna; **PTX** – paklitaksel; **ROS** – reaktywne formy tlenu (reactive oxygen species); **Sp1** – czynnik transkrypcyjny; **TfR** – receptor transferyny.

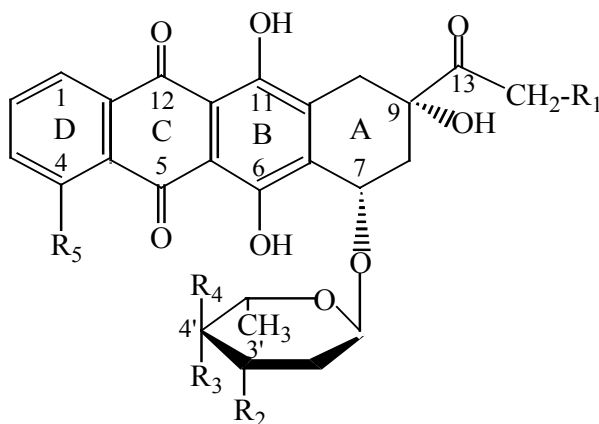
WPROWADZENIE

Możliwości syntezy bibliotek związków i szybkiej oceny ich działania na poziomie komórki, a także dokładne definiowanie molekularnych celów dla nowo syntetyzowanych związków projektowanych w oparciu o relacje strukturalne między badanym związkiem a celem jego oddziaływania stworzyły nowe ramy w poszukiwaniu skutecznych leków. Rozwój nowych technologii w zakresie projektowania, syntezy i oceny działania pozwala również na udoskonalanie istniejących leków tak, aby były skuteczniejsze, bardziej selektywne i wywoływały mniej działań niepożądanych. Szczególnie istotne jest to w przypadku leków przeciwnowotworowych, których celem jest całkowita eliminacja komórek ze zmienionym fenotypem bez wywoływania uszkodzeń w tkankach prawidłowych.

Antybiotyki antracyklinowe są jednymi z najbardziej efektywnych leków przeciwnowotworowych. Pierwsze antracykliny, doksorubicyna (DOX) i daunorubicyna (DRB),

wyizolowano na początku lat sześćdziesiątych XX w. z wytwarzającego czerwony barwnik *Streptomyces pneucetius* (ryc. 1).

W strukturze antracyklin wyróżniamy aglikon i resztę cukrową. Aglikon składa się z czterech pierścieni (ryc. 1, pierścienie A, B, C, D). Pierścień B ma strukturę hydrochinonu, natomiast pierścień C układ chinonu. W pozycji C-4 pierścienia D znajduje się grupa metoksylova, w pozycji C-9 pierścienia A łańcuch boczny z grupą karbonylową. Aminocukier (daunozamina) jest połączony wiązaniem glikozydowym z C-7 pierścienia A i składa się z reszty 3-amino-2,3,6-trideoksy-L-fukozy. Grupa karbonylowa, hydroksylova oraz aminowa są odpowiedzialne za oddziaływanie z makrocząsteczkami w komórce. DOX różni się od DRB jedynie zakończeniem łańcucha bocznego w pozycji C-9, który w przypadku DOX jest pierwszorzędową grupą alkoholową, natomiast w DRB jest to grupa metylowa. Ta niewielka różnica ma duże znaczenie w efektach terapeutycznych uzyskiwanych dla DOX i DRB. DOX jest stoso-



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
Daunorubicyna (DRB)	H	NH ₂	OH	H	OCH ₃
Idarubicyna (IDA)	H	NH ₂	OH	H	H
Doksorubicyna (DOX)	OH	NH ₂	OH	H	OCH ₃
Epidoksorubicyna (EDOX)	OH	NH ₂	H	OH	OCH ₃
Pirarubicyna	OH	NH ₂		H	OCH ₃
Morfolinowa pochodna DOX (MRA)	OH		OH	H	OCH ₃
Metoksymorfolinowa pochodna DOX (MMRA)	OH		OH	H	OCH ₃
Cyjanomorfolinowa pochodna DOX (CMA)	OH		OH	H	OCH ₃
Disacharydowa pochodna DOX (MEN 10755)	OH	OH		H	H
Alkilowa pochodna IDA (PNU-159548)	H		OSO ₂ CH ₃	H	H
N-trifluorodoksorubicyno-14-walerian (AD 32)		-NH-CO-CF ₃	OH	H	OCH ₃
N-benzylodoksorubicyno-14-walerian (AD 198)			OH	H	OCH ₃

Ryc. 1. Chemiczna struktura antracyklin. Poszukiwanie skutecznych analogów antracyklin doprowadziło do powstania ponad 2000 pochodnych. W przeględzie omawiamy tylko te, które stosowane są w klinikach lub wykazują w badaniach *in vitro* szczególne właściwości różniące je od związków wyjściowych, doksorubicyny (DOX) i daunorubicyny (DRB)

wana w leczeniu nowotworów piersi, guzów litych u dzieci, mięsaków tkanek miękkich i agresywnych chłoniaków. Natomiast DRB wykazuje aktywność w przypadku ostrych białaczek limfoblastycznych i mieloblastycznych. Pomimo dużej skuteczności w leczeniu różnych typów nowotworów podawanie zarówno DOX jak i DRB jest ograniczone przede wszystkim z powodu rozwoju oporności w komórkach nowotworowych oraz kardiotoksyczności. W ciągu ostatnich dwudziestu lat wiele wysiłku włożono w poszukiwanie nowych pochodnych antracyklin, które okazałyby się lepsze w działaniu oraz mniej kardiotoksyczne [159]. Wprowadzenie modyfikacji do czteropierścieniowego aglikonu lub aminocukru zaowocowało syntezą wielu analogów. Dotąd tylko kilka pochodnych uzyskało status leków, m.in. epidokсорubicyna (EDOX; obecna w literaturze również jako EPI) i idarubicyna (IDA). EDOX jest pochodną DOX otrzymaną w wyniku epimeryzacji grupy hydroksylowej przy C-4' daunozaminy. Ta zmiana pozycji z jednej strony ma niewielki wpływ na sposób działania i zakres aktywności w porównaniu z DOX, z drugiej jednak strony wywołuje zmiany metaboliczne i farmakokinetyczne, które umożliwiają stosowanie EDOX w dawkach skumulowanych, prawie dwukrotnie wyższych niż DOX bez zwiększenia kardiotoksyczności [117]. IDA jest analogiem otrzymanym z DRB przez usunięcie grupy 4-metoksylowej z pierścienia D. Stosowana jest w przypadku ostrych białaczek szpikowych (AML), szpiczaków mnogich, chłoniaków niezaiarnicznych (NHL) i raka piersi [14]. Również kilka innych antracyklin, takich jak np. pirarubicyna czy aklarynomicyna (aklarubicyna, ACLA) (ryc. 7) uzyskała zgodę na zastosowanie kliniczne.

W poszukiwaniu nowych antracyklin dużo uwagi poświęcono modyfikacjom w reszcie aminocukrowej. Nowa generacja analogów była projektowana z myślą o wyjaśnieniu wpływu aminocukru na farmakologiczne właściwości antracyklin. Wśród obiecujących związków znalazły się antracykliny z morfolinowymi lub alkilowymi podstawnikami przy grupie aminowej w pozycji C-3'. Morfolinowa pochodna daunorubicyny (MX2), oraz pochodne DOX: morfolinowa (MRA), metoksymorfolinowa (MMRA) lub cyjanomorfolinowa (CMA), wiążą się z DNA po otwarciu pierścienia morfolinowego. Badania wykazały, że wprowadzenie morfolinowej lub metoksymorfolinowej grupy w pozycji 3' reszty cukrowej zmniejsza oporność komórek na leki *in vitro* i *in vivo*, podczas gdy przyłączeniu reszty morfolinowej w pozycji C-4' towarzyszy utrata aktywności związku *in vivo* [115]. Z tych obserwacji wynika, że pozycja 3' reszty cukrowej odgrywa główną rolę w przewidywaniu oporności na leki. Otrzymano również analogi, które w pozycji C-3' aminocukru mają podstawniki alkilujące. Należy do nich m.in. analog IDA (PNU-159548) zawierający grupę hydroksylową w pozycji C-4' estryfikowaną grupą metylosulfonową oraz resztę azyrydynową w pozycji C-3' grupy aminowej (ryc. 1). Wykazano, że alkilujące pochodne antracyklin nie oddziałują z układem topozomerazy II/DNA w stosowanych stężeniach, ale mogą tworzyć interkalacyjne wiązania z DNA oraz kowalencyjne wiązania z guaniną w pozycji N-7 i adeniną w pozycji N-3 przez reaktywne grupy alkilujące cukru [48].

Wiedząc, że aminocukier (daunozamina) jest niezbędny w działaniu antracyklin monosacharydowych zsyntetyzowano disacharydowe pochodne, w których daunozami-

na została oddzielona od aglikonu drugą resztą cukrową. Okazało się, że nie tylko obecność, ale również położenie tej reszty wpływało na biologiczne i biochemiczne właściwości tych analogów [3]. Wśród disacharydowych pochodnych antracyklin pozbawionych grupy $-OCH_3$ przy C-4 w aglikonie otrzymano analog MEN 10755 (znany obecnie pod nazwą sabarubicyna). Związek ten jest 4-de-metoksydoksorubicyną z 2,6-dideoksy-L-fukozą wprowadzoną pomiędzy aglikonem i daunozaminą.

Inną grupę pochodnych antracyklin stanowią związki otrzymane przez połączenie dwóch modyfikacji: estryfikacji kwasem walerianowym grupy hydroksylowej w pozycji C-14 i modyfikacji w pozycji C-3' grupy aminowej przez dołączenie reszty trifluoroacetylowej (kwas N-trifluorodoksorubicyno-14 walerianowy; AD 32; walarubicyna) lub benzylowej (kwas N-benzylodoksorubicyno-14 walerianowy; AD 198) (ryc. 1). Reszta kwasu walerianowego prowadzi do zwiększenia lipofilności związku oraz bardzo szybkiej penetracji komórek. Poza tym estryfikacja kwasem walerianowym zmienia lokalizację antracyklin w komórce. AD 198 i AD 32 występują raczej w okołojądrowej cytoplazmie niż jądrze komórkowym [79].

Poszukując bardziej skutecznych pochodnych antracyklin zwrócono również uwagę na możliwość modyfikacji antracyklin w pierścieniu D. Zaowocowało to syntezą nogalomycyny, związku o bardziej złożonej budowie niż DOX, czy DRB. W przeciwieństwie do DOX czy DRB, w których cukier połączony jest tylko z jednym pierścieniem aglikonu, w nogalomycynie podstawniki cukrowe występują na obu jego końcach (ryc. 2). W rezultacie cząsteczka przypomina kształtem hantle. Na jednym końcu nogalomycyny znajdują się estry metylowe cukru nogalozy, a na drugim, dicykliczny aminocukier w pozycji 1 i 2 pierścienia D nogalomycyny [161]. Otrzymano również związki będące dimerami naturalnych antybiotyków antracyklinowych [15]. W dimerze WP631 (ryc. 2) dwie cząsteczki daunorubicyny są związane łącznikiem p-ksylenowym.

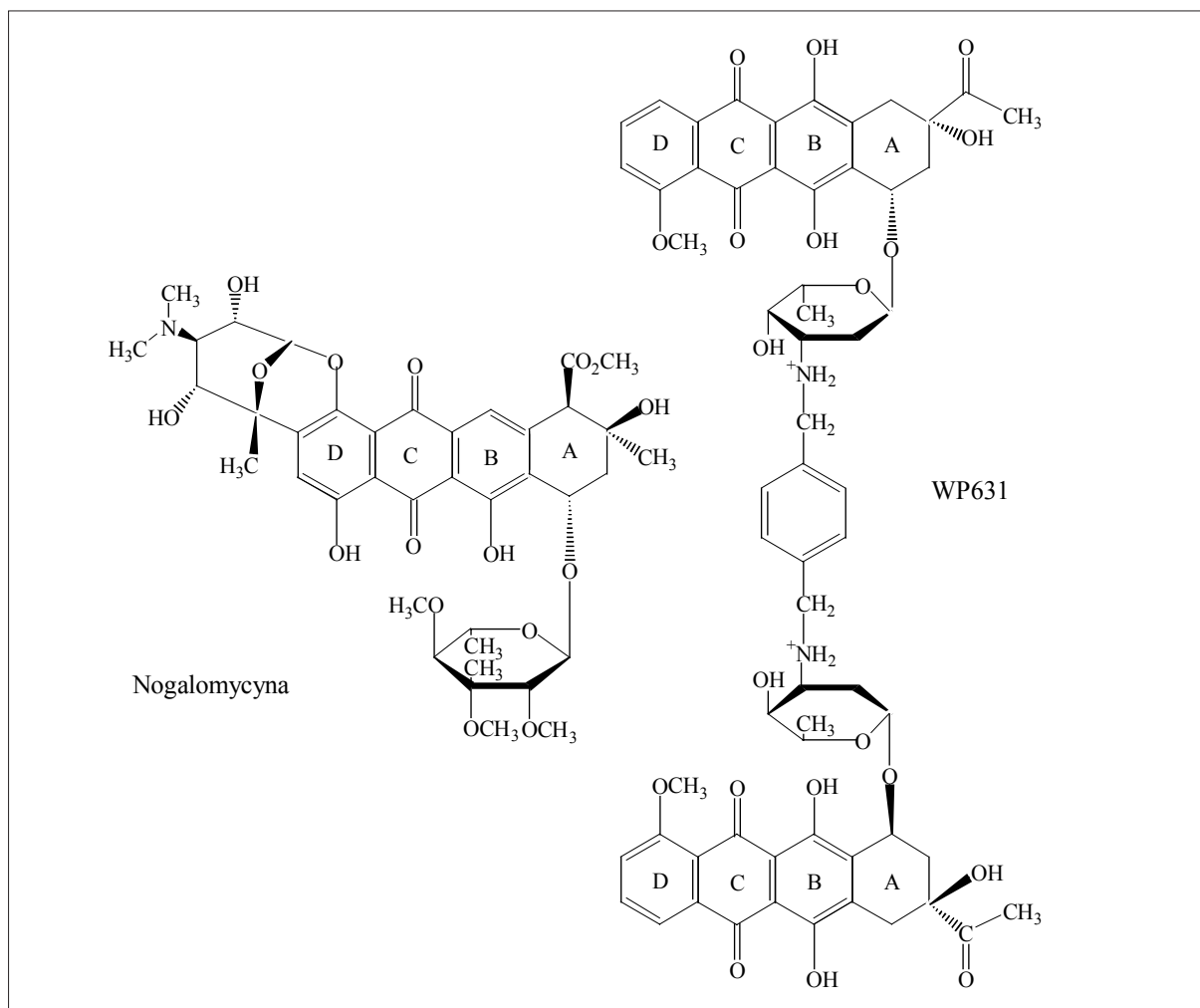
W większości komórek antracykliny ulegają transformacji enzymatycznej. Podczas tych reakcji cząsteczki antracyklin są przekształcane w nieaktywne metabolity, ale także w związki, które są silnymi inhibitorami enzymów i są bardziej toksyczne niż wyjściowe antracykliny. W przeglądzie przedstawiamy molekularne mechanizmy działania antracyklin oraz produktów ich biotransformacji.

MODYFIKACJE DNA SPowodowane PRZEZ ANTRACYKLINY

Antracykliny modyfikują strukturę DNA poprzez kompleksy interkalacyjne, wiązania kowalencyjne, ale także przez wprowadzanie zmian w strukturze zasad azotowych. Te ostatnie, będące oksydacyjnymi modyfikacjami zasad są wynikiem oddziaływania reaktywnych form tlenu powstających w reakcjach redoks z udziałem antracyklin.

Powstawanie kompleksów interkalacyjnych

Antracykliny mają zdolność do odwracalnego wiązania się z DNA. Badania krystalograficzne wykazały, że daunorubicyna (DRB) i doksorubicyna (DOX) (ryc. 1) tworzą interkalacyjne kompleksy z DNA, a miejscem oddziaływania są sekwencje 5'-GC-3', 5'-CG-3' [19]. Proces interkalacji pole-



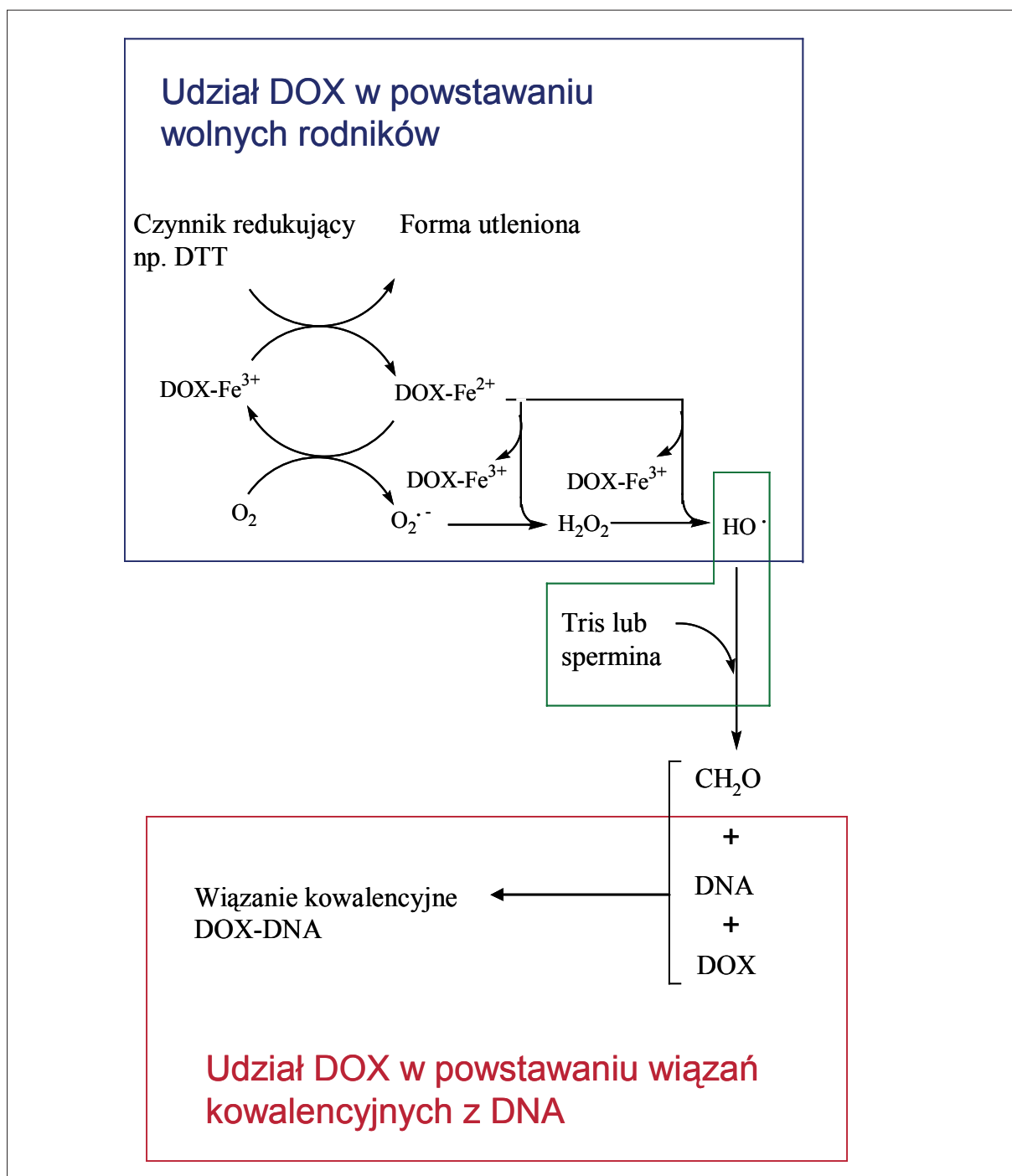
Ryc. 2. Chemiczna struktura nogalomycyny i dimeru daunorubicyny WP631

ga na „wejściu” płaskiego układu aromatycznego cząsteczki antracykliny między pary zasad DNA z aminocukrem położonym w mniejszym rowku DNA [113]. Wykazano, że interkalacja powoduje wydłużanie heliksu DNA oraz zmniejszenie jego elastyczności. Odległość między parami zasad zwiększa się z 3,4 Å do 6,8 Å [114]. Skręcenie w stosunku do siebie warstw utworzonych przez płaszczyzny sąsiadujących zasad, które średnio w strukturze B DNA wynosi 36°, w przypadku utworzenia interkalacyjnego kompleksu z DRB ulega zmniejszeniu o 11° [44]. Wszystkie te zmiany prowadzą do relaksacji DNA i zniekształcenia struktury heliksu. Ważną rolę w stabilizowaniu kompleksów interkalacyjnych antracyklin z DNA odgrywają oddziaływania warstwowe pomiędzy zasadami azotowymi i chromoforami antracyklin. Istotne są również wiązania wodorowe z zasadami azotowymi, w których uczestniczą cząsteczki wody. Antracykliny, które nie mają grupy OH w pozycji C-9, a tym samym nie są zdolne do tworzenia wiązań wodorowych z udziałem tej grupy, pozabawione są aktywności przeciwnowotworowej. W stabilizowaniu kompleksów interkalacyjnych biorą udział również siły van der Waalsa oraz wiązania jonowe możliwe dzięki obecności ładunku dodatniego w daunozaminie [55].

Wykazano, że zmiany w strukturze chemicznej antracyklin mogą wpływać na ich zdolność do oddziaływania z ma-

kroczątkami ważnymi biologicznie. Zastąpienie atomu wodoru w pozycji C-14 (DRB) grupą hydroksylową (DOX) [42] powodowało powstawanie dodatkowego wiązania wodorowego z udziałem wody. Kiedy do badań włączono cząsteczki sperminy (poliaminy), obserwowano wyraźne zmiany w interakcji sperminy z DNA między kompleksami z DOX i kompleksami z DRB. Niewielkie różnice chemiczne między tymi antybiotykami, potęgowane przez zmiany w strukturze trójskładnikowych kompleksów (DOX/DNA/spermina, DRB/DNA/spermina), mogą być odpowiedzialne za różnice w działaniu klinicznym tych związków.

Na uwagę zasługują również związki będące dimerami naturalnych antybiotyków antracyklinowych, które tworzą bisinterkalacyjne kompleksy z DNA [15]. Jednym z takich związków jest WP631, który jest dimerem DRB, wiążącym sekwencję 5'-GCTAGC-3'. W tym przypadku dwa chromofory interkalują pomiędzy GC oddzielone czterema parami zasad, a ksylenowy łącznik znajduje się w mniejszym rowku DNA [76]. Stała wiązania takiego dimeru jest kilka rzędów wielkości większa ($K_a=3 \times 10^{11}$) od stałej wiązania monomeru ($K_a=2 \times 10^5$) [17]. W badaniach procesu interkalacji z wykorzystaniem promieni X [132] i spektroskopii NMR [126] stosowano również nogalomycinę (ryc. 2). Wykazano, że związek ten oddziałuje w mniejszym i w większym rowku DNA.



Ryc. 3. Reakcje redoks prowadzące do powstania formaldehydu i wiązań kowalencyjnych antrycyklin z DNA. W pierwszym etapie cząsteczka DOX tworzy bardzo aktywny kompleks z jonami żelaza (DOX-Fe^{3+}), który może ulegać redukcji zarówno chemicznej np. z udziałem DTT, jak i enzymatycznej. Powstający kompleks DOX-Fe^{2+} redukuje tlen do anionorodnika ponadtlenkowego ($\text{O}_2^{\cdot-}$) oraz nadtlenu wodoru (H_2O_2). DOX-Fe^{2+} może również reagować z H_2O_2 prowadząc do powstania rodnika hydroksylowego (HO^\bullet) (reakcja Fentona; $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightleftharpoons \text{Fe}^{3+} + \text{HO}^\bullet + \text{OH}^-$). W następnym etapie, w reakcji HO^\bullet z Tris lub sperminą powstaje formaldehyd, który uczestniczy w powstawaniu wiązań kowalencyjnych DOX-DNA [ryc. przygotowano na podstawie prac 143,146]

Do zrozumienia procesu interkalacji antrycyklin z DNA były niezbędne również badania termodynamiczne i kinetyczne [139]. Oznaczono zmianę energii swobodnej towarzyszącej wiązaniu antrycyklin z DNA. W doświadczeniach wykorzystano pochodne antrycyklin różniące się jednym podstawnikiem od DOX i DRB. Wyniki ujawniły korzystny

wpływ (2 kcal/mol) obecności reszty daunozyminy wiążącej się w mniejszym rowku DNA, przy czym istotną rolę w konfiguracji wiązania glikozydowego. Energia swobodna wiązania z DNA β -anomeru DOX była mniejsza o 3 kcal w porównaniu z DOX. Wykazano również, że usunięciu grup hydroksylowych w pozycji C-9 i C-14, któ-

re tworzą wiązania wodorowe z DNA, towarzyszyło obniżenie energii swobodnej o 1 kcal/mol, natomiast zamiana grupy aminowej w pozycji 3' na grupę hydroksylową powoduje obniżenie energii swobodnej wiązania o 0,7 kcal/mol [20]. Wyniki te pozwoliły zrozumieć, w jakim stopniu poszczególne podstawniki antracyklin uczestniczą w powstawaniu wiązań z DNA i stały się pomocne w projektowaniu nowych związków wiążących się z DNA.

Powstawanie wiązań kowalencyjnych antracyklin z DNA z udziałem formaldehydu

W powstawaniu wiązań kowalencyjnych z DNA uczestniczy formaldehyd (CH_2O) [142]. W doświadczeniach *in vitro* źródłem formaldehydu jest Tris, który jest utleniany do CH_2O przez rodniki hydroksylowe (HO^\bullet) powstające z udziałem Fe^{2+} w reakcji redukcji H_2O_2 (reakcja Fentona) (ryc. 3) [143]. Z użyciem spektroskopii NMR wykazano, że struktura wiązania kowalencyjnego DOX z DNA, powstającego w warunkach reakcji Fentona z udziałem Tris, jest strukturalnie taka sama, jak wiązań otrzymanych bezpośrednio w reakcji z formaldehydem [164]. Wykazano również, że DOX kowalencyjnie związana tylko z jednym z łańcuchów dupletu 5'-TAATAAGCATAAAT-3' nadaje temu kompleksowi niezwyklej stabilności. Obserwowano 162-krotną redukcję tempa wymiany łańcuchów DNA w kompleksach, w których występowało takie wiązanie [164]. Badania wpływu różnych czynników na tworzenie się wiązań kowalencyjnych *in vitro* pozwoliły na określenie optymalnych warunków reakcji. Maksymalną liczbę adduktów obserwowano w pH 7,0, zmiana pH na 6,0 czy 8,0 powodowała redukcję adduktów odpowiednio o 60 i 35%. Optymalna temperatura wynosiła 37°C, a stężenie DOX 10 μM . Na ilość powstających wiązań kowalencyjnych miało wpływ również stężenie Fe^{3+} , stężenie DNA oraz czynnika redukującego [23].

Tris jest związkiem, który nie występuje w komórce, a więc nie może być źródłem formaldehydu. W powstawaniu CH_2O w warunkach *in vivo* brane są pod uwagę następujące mechanizmy: autokatalityczna oksydacja w pozycji C-13 DOX z udziałem H_2O_2 (reakcja Bayera-Villigera) [144] oraz utlenianie przez rodniki hydroksylowe, związanych z DNA poliamin np. sperminy [145]. Każdy z tych mechanizmów zależy od zdolności DOX do wiązania Fe^{3+} i od komórkowego potencjału redukcyjnego, wymaganego w reakcjach redoks prowadzących do powstania reaktywnych form tlenu [143].

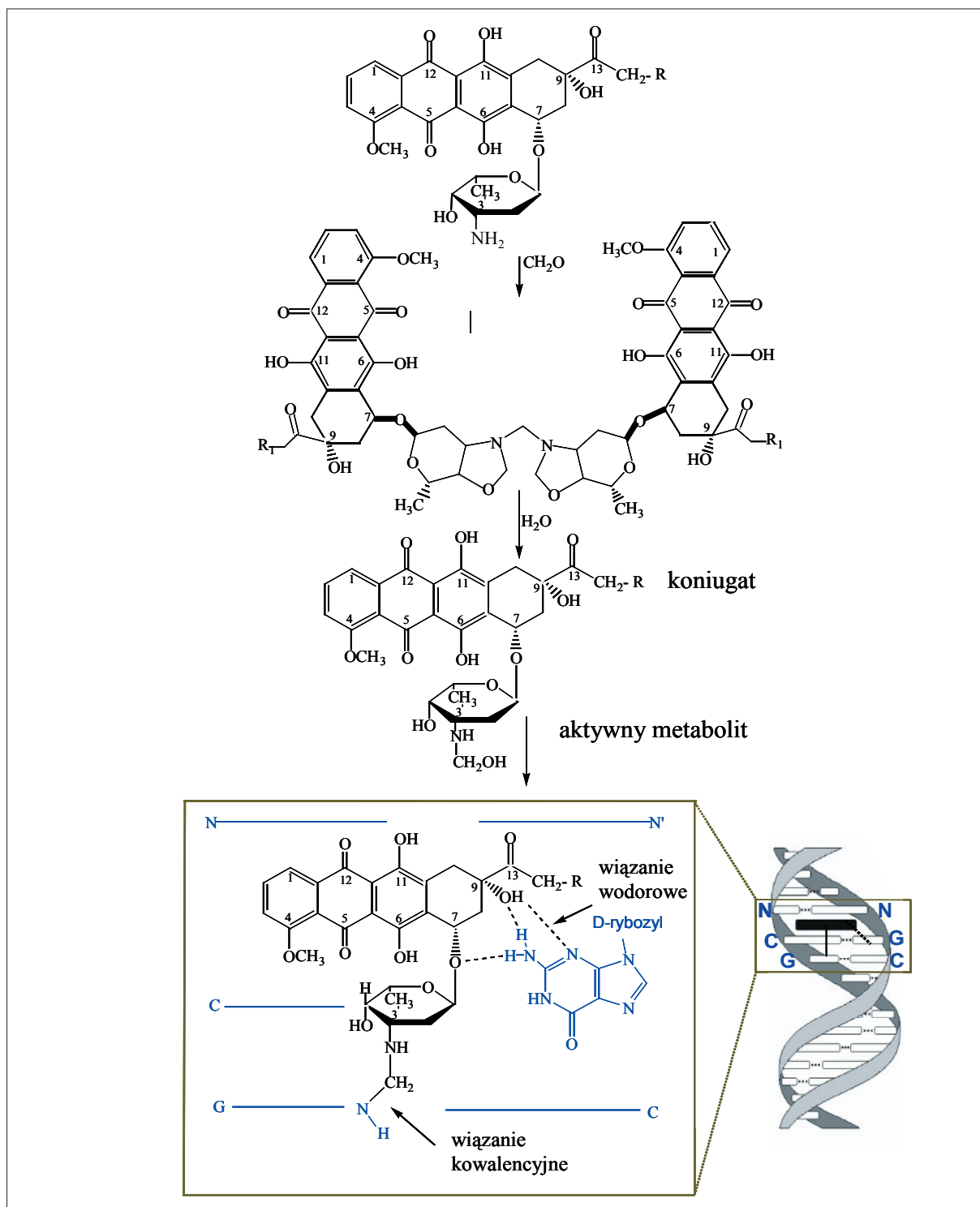
Udział CH_2O w powstawaniu wiązań kowalencyjnych między antracyklinami i DNA zrodził pomysł syntezy koniugatów antracyklin z formaldehydem (DOXF, DRBF, EDOXF) i oceny ich działania jako leków [39]. Zakładano, że koniugaty wyeliminują potrzebę wytwarzania CH_2O , stwarzając w ten sposób możliwość skutecznego działania antracyklin zarówno w komórkach z obniżonym poziomem enzymów aktywujących reakcje redoks, jak również ze zwiększonym poziomem „zmiataczy” ROS [146]. Liczne doświadczenia wykazały, że DOXF, EDOXF czy DRBF są toksyczne dla komórek nowotworowych, również tych opornych na antracykliny. Istniała korelacja między wzrostem ilości koniugatów w jądrze, akumulacją w DNA, wydłużoną komórkową retencją i zmniejszonym uwalnianiem antracyklin z komórki [142]. Koniugaty mają struk-

turem dimeryczną. Ich synteza polega na połączeniu dwóch cząsteczek antracyklin z trzema cząsteczkami formaldehydu. Formaldehyd jest w tej reakcji źródłem grup metylenowych, z których dwie tworzą pierścień oksazolidynowy przez połączenie grupy aminowej daunozaminy z grupą hydroksylową, a trzecia wiąże te pierścienie poprzez azot. Tak otrzymany koniugat hydrolizując daje aktywne monomeryczne metabolity, w których węgiel pochodzący z CH_2O jest związany z grupą 3'- NH_2 daunozaminy. Po interkalacji antracykliny do DNA tworzy się wiązanie kowalencyjne z grupą 2'- NH_2 guaniny. Jeśli interkalacja wystąpi w sekwencji 5'-NGC-3', wtedy lek interkaluje pomiędzy dowolny nukleotyd (N) i guaninę (G) tworząc kowalencyjne wiązanie z G w jednej nici DNA, oraz bardzo silne wiązania wodorowe z guaniną w drugiej nici DNA. Takie niezwykle połączenie interkalacji, wiązania kowalencyjnego i wiązania wodorowego jest nazywane „wirtualnym” wiązaniem międzynciowym (virtualny crosslink) (ryc. 4) [143,146].

Jednak nie wszystkie antracykliny mają zdolność do tworzenia wiązań kowalencyjnych. Wykazano, że hydroksyrubicyna, 3'-deamino-4'-demetoksy-4'-deoksy-4'-epiaminodaunorubicyna, 3'-deamino-4'-demetoksy-4'-deoksy-4'-epiamino-3'-hydroksydaunorubicyna, oraz inne pochodne niezawierające grupy NH_2 , nie tworzą kowalencyjnych wiązań z DNA [23,26]. Zbadano również wpływ położenia grupy NH_2 w reszcie cukrowej antracyklin oraz jej stereochemii na zdolność tworzenia wiązań kowalencyjnych. Wykazano, że pochodna DRB (4'-amino-3'-deamino-4'-deoksy-3'-hydroksydaunorubicyna), której grupa aminowa zmieniła położenie z pozycji C-3' na C-4' również nie wykazuje zdolności do tworzenia wiązań kowalencyjnych z DNA, natomiast epimerizacja grupy aminowej w pozycji C-3' prowadząca do powstania 3'-epidaunorubicyny (WP711) nie zmieniała zdolności tworzenia wiązań kowalencyjnych [77]. Wyniki te sugerują, że reakcje powstawania wiązań kowalencyjnych nie zależą od stereochemii grupy aminowej w pozycji 3', natomiast wymagają obecności grupy aminowej w tej pozycji. Zbadanych zostało również kilka naturalnych i syntetycznych pochodnych antracyklin, które w swojej strukturze mają przejściowo zablokowaną grupę aldehydową w postaci podstawnika będącego modyfikacją grupy aminowej daunozaminy. Wykazano, że związki te nie wymagają metabolicznej aktywacji do utworzenia wiązań kowalencyjnych z DNA. Należą do nich m.in.: cyjanomorfolinodoksorubicyna (CMA) [25], barminomycyna [109] pyrrolinodoksorubicyna [96] oraz N-(5,5-diacetylopentyl)-doksorubicyna [167]. Badania strukturalne CMA wykazały, że jej pierścień morfolinowy ulega przekształceniom. Grupa CN zostaje usunięta z pierścienia i pierścień morfolinowy otwiera się. Właściwym związkiem wiążącym się kowalencyjnie z DNA jest w tym przypadku N-2-hydroksyetylodoksorubicyna [36]. Wykazano, że wiązania kowalencyjne utworzone przez antracykliny mające na stałe dołączoną grupę aldehydową są bardziej stabilne niż wiązania tworzone przez antracykliny wymagające obecności formaldehydu [156,145].

Swoistość wiązania antracyklin z DNA

Określenie swoistości wiązania antracyklin z DNA było istotne dla zrozumienia mechanizmów działania tych związków. Liczne badania krystalograficzne trójwymiarowej struktury



Ryc. 4. Powstawanie „wirtualnych” wiązań międzyniciowych. W wyniku reakcji antrycyklin z formaldehydem powstają związki o strukturze dimerycznej (koniugat), w której dwie cząsteczki antrycyklin wiążą się przez trzy grupy metylenowe, dwie z nich tworzą pierścienie oksazolidynowe poprzez połączenie grupy aminowej daunosaminy z grupą hydroksylową, a trzecia wiąże te pierścienie poprzez azot. W wyniku hydrolizy koniugatu powstają aktywne metabolity, w których węgiel pochodzący z CH₂O jest związany z grupą 3'-NH₂ daunosaminy. Jeśli interkalacja antrycyklin wystąpi w sekwencji 5'-NGC-3', wtedy lek interkaluje pomiędzy dowolny nukleotyd (N) i guaninę (G) tworząc, z udziałem CH₂O, kowalencyjne wiązanie z G w jednej nici DNA, oraz wiązania wodorowe z guaniną w drugiej nici DNA. Dla przejrzystości zasady azotowe zaznaczono kolorem niebieskim [ryc. przygotowano na podstawie prac 142,143,145,146]

kompleksów antrycyklin z DNA oraz badania wykorzystujące metodę „footprint” i analizę restrykcyjną pozwoliły na

określenie swoistych miejsc interkalacji oraz kowalencyjnych wiązań antrycyklin z DNA.

Badania struktury kompleksu DRB/DNA wykazały, że dwuniciowy fragment DNA, zawierający sekwencję 5'-CGTACG-3' wiąże dwie cząsteczki DRB i 80 cząsteczek wody [113]. Analiza restrykcyjna wykazała, że DRB lepiej chroni sekwencję 5'-CGATCG-3' przed cięciem enzymem PvuI niż sekwencję 5'-GAATTC-3' rozpoznawaną przez EcoRI [18]. Potwierdzono to w doświadczeniach z wykorzystaniem metody footprint, w których miejscem najczęściej chronionym przez antracykliny przed cięciem DN-azą I była sekwencja 5'-GC-3' [19, 141]. Wykazano również, że na wiązanie antracyklin z DNA mają wpływ sekwencje sąsiadujące z miejscem interkalacji, gdyż wpływają one na ułożenie aminocukru w mniejszym rowku DNA. Zbadano krystaliczną strukturę kompleksów DOX i DRB z sekwencją 5'-CGATCG-3'. W tych kompleksach chromofory antracyklin interkalowały w miejscu CpG na obu końcach fragmentu DNA, podczas gdy aminocukier położony był w mniejszym rowku. Badania struktury tego kompleksu stworzyły możliwości porównania z innym wcześniej badanym kompleksem DRB z 5'-CGTACG-3'. Mimo że te dwa kompleksy były bardzo podobne wykazano interesującą zależność: DRB była mocniej związana z sekwencją 5'-CGATCG-3' niż 5'-CGTACG-3', wskazując, że sekwencja 5'-AT-3', a nie 5'-TA-3' była sekwencją preferowaną przez aminocukier [42]. Zmiana środkowej sekwencji 5'-AT-3' na 5'-TA-3' powoduje, że aminocukier, aby móc dopasować się do położenia w mniejszym rowku DNA ulega wyraźnemu przesunięciu. Zmienia się kąt wiązania między C-7 pierścienia A i połączonym z nim atomem tlenu (O-7), a także kąt wiązania pomiędzy O-7 i C-1' reszty cukrowej, co ma wpływ na kontakt pomiędzy DNA a resztą cukrową [74].

Stosując analizę footprinting poszukiwano odpowiedzi na pytanie, które grupy funkcyjne zasad azotowych są odpowiedzialne za wiązanie antracyklin. Zastosowano fragmenty DNA o długości 160 par zasad, natywne lub zmodyfikowane w taki sposób, aby określić rolę grupy aminowej w pozycji 2 guaniny, jeżeli znajdowała się w mniejszym rowku. Analiza footprinting wykazała, że DRB preferencyjnie wiązała tripletowe sekwencje 5'-(A/T)GC-3' i 5'-(A/T)CG-3' w natywnej cząsteczce DNA. Zastąpienie guanozyny inozyną, czemu towarzyszyła utrata atomu azotu w pozycji 2, osłabiała zdolność wiązania, ale nie zmieniło znacząco preferencji w stosunku do sekwencji wiązania DRB. Natomiast podwójna zamiana: guanozyny inozyną, a adeniny diaminopuryną powodowała zmianę preferencji sekwencyjnej DRB [7]. Wskazywało to również na rolę reszty daunoazaminy i grupy -OH w pozycji 9 DRB w określeniu miejsc wiązania antracyklin z DNA. Również inne zmiany w strukturze antracyklin wpływały na swoistość ich wiązania. Dotyczy to modyfikacji reszty daunoazaminy. Atom bromu podstawiony w pozycji C-2' 4'-epi-daunorubicyny powodował, że daunoazamina przyjmowała inną konformację niż w DRB. Pochodna ta, w obecności formaldehydu, częściej tworzyła kowalencyjne wiązania z 5'-CGGCCG-3' niż z sekwencją 5'-CGCGCG-3', preferowaną przez DRB [46]. W badaniach krystalograficznych kompleksu cyjanomorfolinowej pochodnej doksorubicyny (CMA) z sekwencją 5'-CGATCG-3' wykazano, że chociaż struktura tego kompleksu była podobna do poprzednio badanych, nie stwierdzono obecności wiązań kowalencyjnych. Związek interkalował w miejscu CpG tworząc wyłącznie wiązania wodorowe z resztą guaniny [36]. W przypadku

CMA niezbędna do wytworzenia wiązań kowalencyjnych była obecność sekwencji 5'-CG-3' w sąsiedztwie miejsc interkalacji. Przeprowadzono również badania amidynowych pochodnych antracyklin [141]. W analizie footprinting wykazano, że zarówno DOX, DRB, jak i ich pochodne amidynowe z pierścieniem morfolinowym (DOXM, DRBM) wykazywały bardzo wyraźne preferencje do sekwencji 5'-GC-3', 5'-CG-3' oraz 5'-TC-3'. W przypadku DOXM, DRBM obserwowany był nieznaczny wzrost ochrony sekwencji 5'-TC-3' w porównaniu z sekwencjami 5'-GC-3' i 5'-CG-3', co potwierdziła analiza restrykcyjna, w której największą ochronę obserwowano w miejscu cięcia Sac I (T/C). Badania te pozwoliły również zaobserwować, że DRB ma szerszy zakres chronionych sekwencji, w porównaniu z DOX i EDOX, które wykazywały większą swoistość [141].

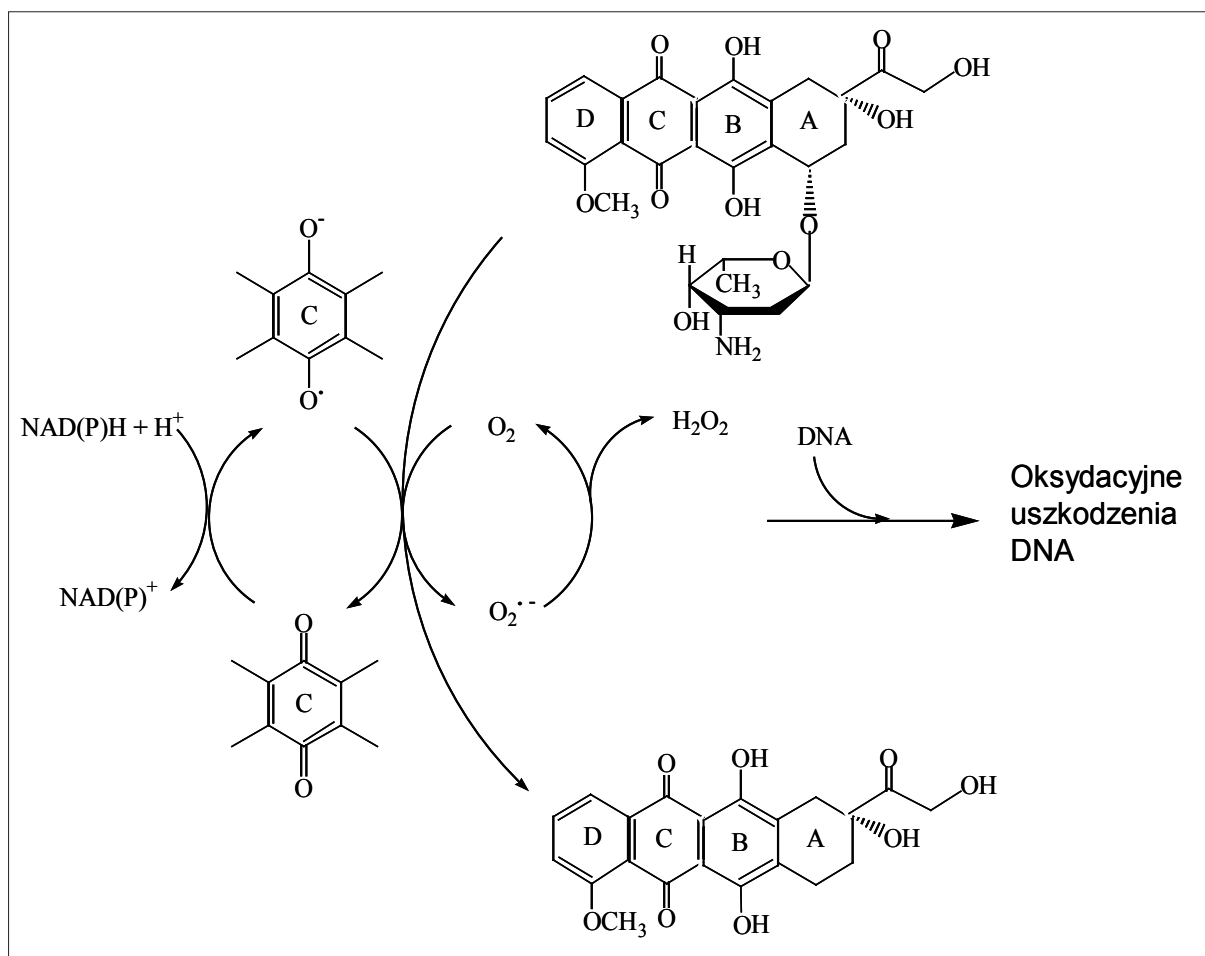
Uszkodzenia DNA spowodowane działaniem reaktywnych form tlenu

Istnieje wiele uszkodzeń DNA, które nie wynikają z wiązania antracyklin z DNA, lecz powstają w wyniku działania na DNA reaktywnych form tlenu (ROS) indukowanych w reakcjach redoks antracyklin.

W wyniku przeniesienia elektronu z NADH lub NADPH na układ chinonu DOX (pierścień C), lub innych antracyklin, tworzy się semichinon. Szybkiej regeneracji semichinonu do macierzystego chinonu towarzyszy redukcja tlenu i powstawanie reaktywnych form tlenu (ROS) o różnej toksyczności: anionorodnika ponadtlenkowego ($O_2^{\cdot-}$), nadtlenku wodoru (H_2O_2), czy szczególnie toksycznego rodnika hydroksylowego (HO^{\cdot}). W reakcji mogą uczestniczyć różne enzymy oksydoredukcyjne np.: cytochrom P450, reduktazy b5, mitochondrialna dehydrogenaza NADH, dehydrogenaza ksantynowa itd. [157] (ryc. 5). W tym cyklu semichinon może również utleniać i rozrywać wiązania glikozydowe pomiędzy pierścieniem A, a daunoazaminą i w rezultacie uczestniczyć w powstaniu 7-deoksyaglikononu. Aglikony wnikać do błon uwalniają jeszcze większe ilości reaktywnych form tlenu [51,78].

Ze względu na bardzo dużą reaktywność, ROS mogą oddziaływać ze wszystkimi makrocząsteczkami komórkowymi (białka, lipidy, węglowodany, kwasy nukleinowe). Szczególnie niebezpieczne dla organizmu są oddziaływania ROS z DNA, które mogą powodować jedno- i dwuniciowe pęknięcia DNA oraz oksydacyjne modyfikacje zasad azotowych [102,163]. Niektóre z tych modyfikacji mają ustalony potencjał mutageny [102,163]. Badania wykazały, że po podaniu DOX [32] oraz EDOX [101] liczba oksydacyjnie zmodyfikowanych zasad azotowych wzrastała w stosunku do kontroli. W chromatynie izolowanej z limfocytów pacjentów otrzymujących EDOX zidentyfikowano zmodyfikowane formy zasad, tj. 8-hydroksyguaninę, 8-hydroksyadeninę, 2-hydroksyadeninę, 5-hydroksyuracyl, 5-hydroksycytozynę, glikol tyminowy [101], charakterystyczne dla działania rodnika hydroksylowego. Po 24 godzinach od podania leku poziom większości z nich wracał do poziomu kontroli.

Wolne rodniki mogą również pośrednio modyfikować zasady azotowe w DNA, poprzez peroksydację lipidów. Dialdehyd malonowy (malondialdehyde – MDA) jest jed-



Ryc. 5. Powstawanie reaktywnych form tlenu w jednoelektrodowej reakcji redukcji antracyklin. Dodanie jednego elektronu do reszty chinonu w pierścieniu C DOX prowadzi do powstania semichinonu. W wyniku przemiany semichinonu do chinonu następuje redukcja tlenu i powstawanie $O_2^{\cdot-}$, a następnie nadtlenu wodoru (H_2O_2). Semichinon utlenia również wiązania glikozydowe między pierścieniem A a daunoazaminą w wyniku czego powstaje 7-deoksyaglikon. Wnika on do błon komórkowych sprzyjając powstawaniu jeszcze większej ilości ROS [ryc. na podstawie 86]

nym z końcowych produktów procesu peroksydacji wielonienasyconych kwasów tłuszczowych w komórkach. MDA może reagować z grupami aminowymi znajdującymi się na zewnątrz pierścienia deoksyguanozyny (dG), deoksyadenozyny (dA), deoksytydyny (dC) i tworzyć egzocykliczne addukty pięciocłonowe (etenoaddukty) [82]. Najłatwiej jednak MDA reaguje z dG w wyniku czego pojawia się struktura pirymidopurynonu (M_1dG) (ryc. 6) [110]. Analiza sekwencyjna wykazała, że MDA w większości indukuje mutacje występujące w parach GC powodując powstawanie dużych insercji i delecji [98].

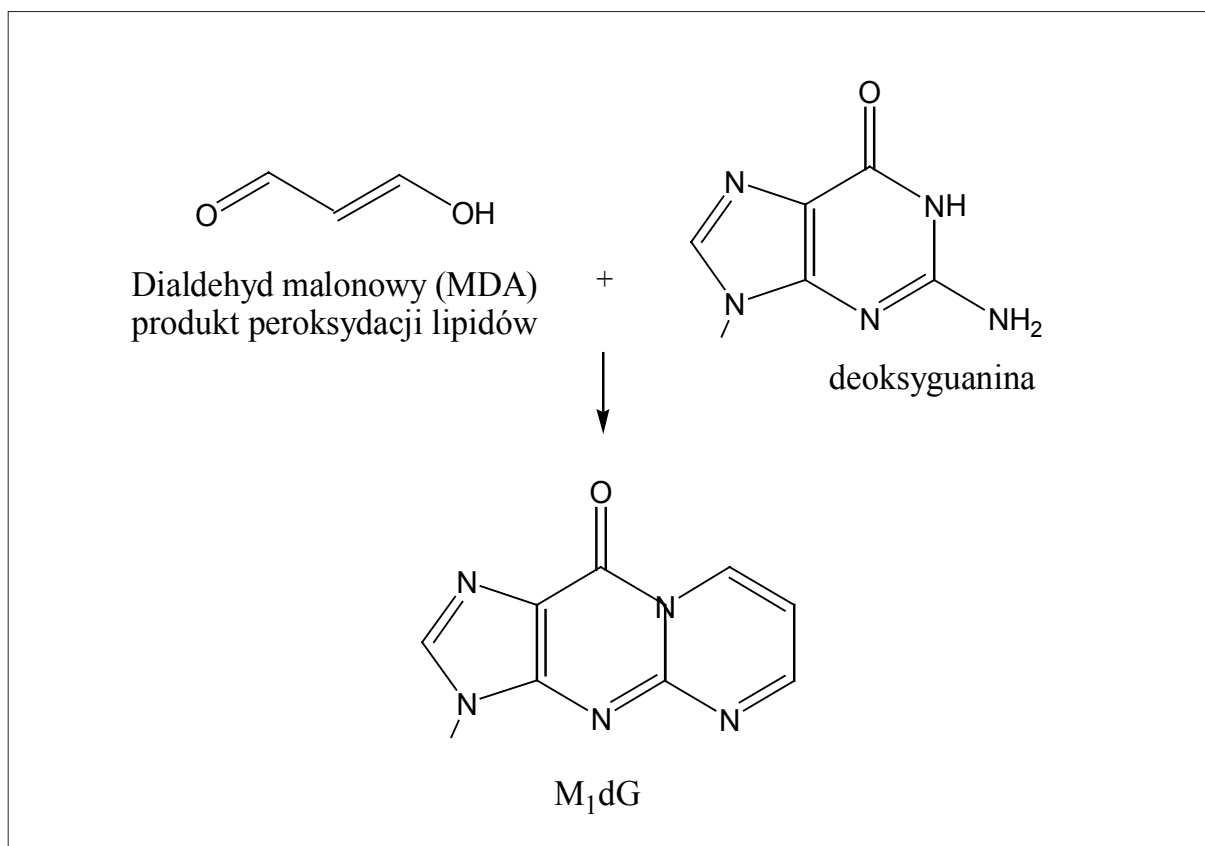
Antracykliny wpływają na tworzenie M_1dG nie tylko przez zwiększanie poziomu MDA, ale również sprzyjając przenoszeniu grup oksopropenylowych z MDA na DNA. Wykazano, że DOX i DRB zwiększają wielokrotnie zależną od MDA reakcję przenoszenia oksopropenylu [110]. Zatem, zarówno powstawanie MDA wywołane stresem oksydacyjnym, jak i oksopropenylicacja DNA przyczyniają się do wzrostu poziomu komórkowego M_1dG . Reakcje te zakładają istnienie zależności między generowaniem ROS przez antracykliny, indukcją peroksydacji lipidów a interkalacją i uszkodzeniami DNA.

WPLYW ANTRACYKLIN NA REPLIKACJĘ I EKSPRESJĘ GENÓW

Powstawanie kompleksów interkalacyjnych, wiązań kowalencyjnych oraz modyfikacje oksydacyjne zasad azotowych z udziałem antracyklin lub produktów ich biotransformacji prowadzą do zaburzeń w strukturze DNA. Zmiany te wpływają na aktywność enzymów oraz czynników transkrypcyjnych bezpośrednio oddziałujących z DNA, a więc mają znaczenie w procesach decydujących o zdolności komórki do proliferacji.

Hamowanie syntezy DNA i RNA

Wiele jest doniesień opisujących wpływ antracyklin na hamowanie replikacji DNA [49]. Hamowanie aktywności polimerazy DNA wynika ze zdolności antybiotyków antracyklinowych do tworzenia kompleksów interkalacyjnych z DNA [147]. Jednakże zgromadzone dane, w szczególności dotyczące zakresu stężeń stosowanych przy hamowaniu syntezy DNA, są dość rozbieżne. W komórkach raka piersi oraz szczyrczych komórkach raka wątroby, hamowanie syntezy DNA z udziałem antracyklin obserwowane było w stężeniach 0,1–5 μM [40,94]. Część wyników wskazy-



Ryc. 6. Powstawanie M₁dG, z udziałem MDA, indukowane antracyklinami [ryc. przygotowane na podstawie 86]

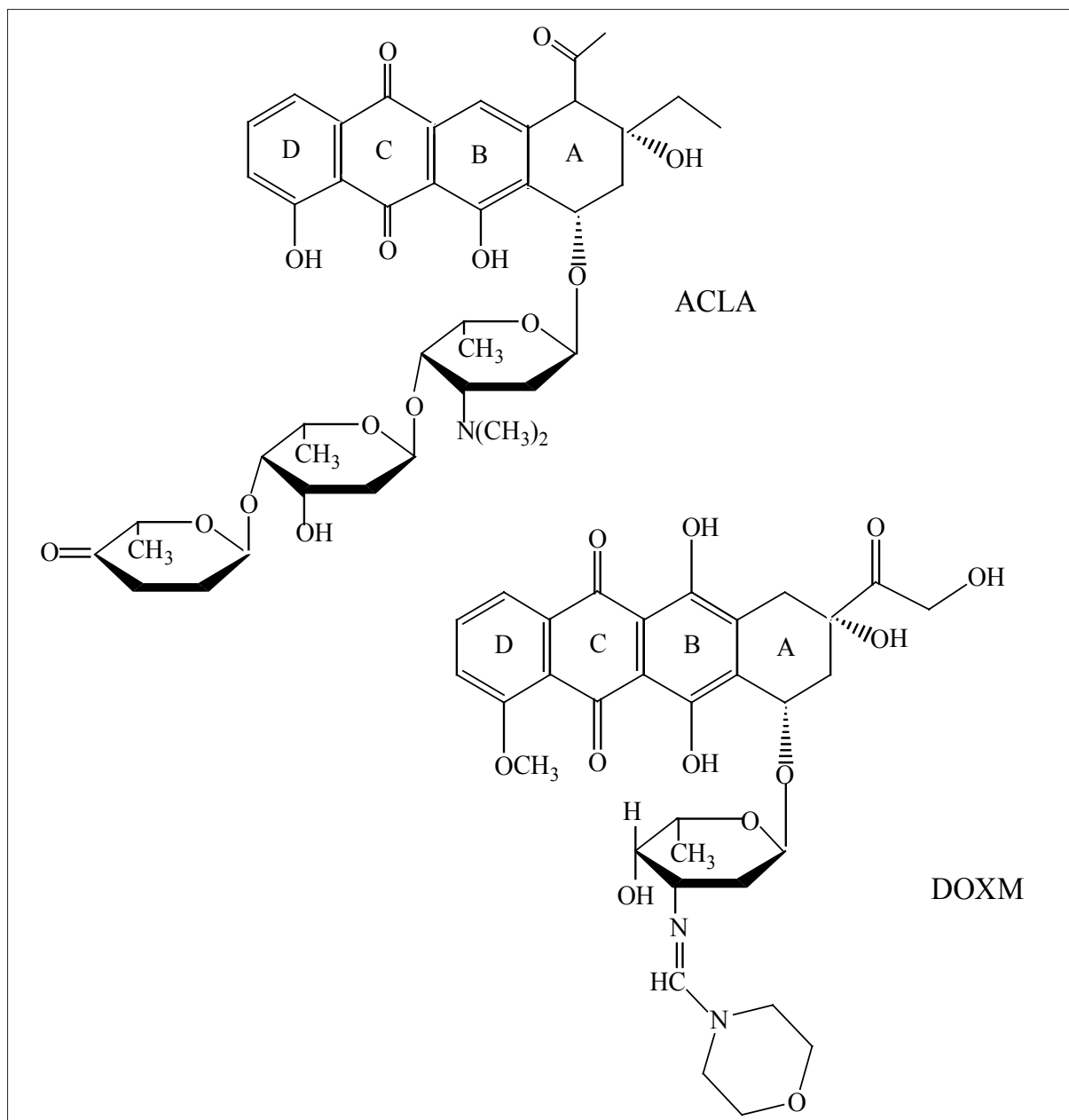
wała na zależność między hamowaniem syntezy DNA, a hamowaniem proliferacji komórek [40,94], podczas gdy w innych badaniach wykazano, że zaburzenia w syntezie DNA w komórkach poddanych działaniu antracyklin odgrywają niewielką rolę w hamowaniu wzrostu hodowli [125,129]. Takie wyniki sugerują, że zahamowanie proliferacji komórek indukowane antracyklinami to wynik nie tylko hamowania syntezy DNA. Jest prawdopodobne, że hamowanie syntezy DNA może być wczesnym, przejściowym etapem, prowadzącym do zahamowania wzrostu komórek, związanym z funkcją p53 [68]. Aktywacja p53, do której może dojść w odpowiedzi na działanie DOX prowadzi do zwiększenia aktywności białka p21^{waf/cip1} silnego inhibitora kinaz zależnych od cyklin [128]. Zwiększona ilość p21^{waf/cip1} może hamować syntezę DNA przez wiązanie tych białek z jądrowym antygenem proliferujących komórek (proliferating cell nuclear antigen – PCNA) [69], a także przez obniżoną aktywność czynnika transkrypcyjnego E2F [31], białka wiążącego sekwencje w regionach promotorowych genów np. kinazy tymidynowej, syntetazy tymidylanowej oraz polimerazy α DNA [37]. Indukowane przez antracykliny hamowanie syntezy DNA z udziałem polimerazy DNA może się wiązać z przejściowym, cytostatycznym działaniem tych związków, natomiast bardziej toksyczny wpływ jest związany z hamowaniem aktywności topoiizomerazy II.

Enzymy zaangażowane w proces transkrypcji (polimerazy RNA), w przeciwieństwie do polimeraz DNA, nie mają aktywności nukleazowej 3'-5'. Brak tej aktywności czyni polimerazę RNA lepszym narzędziem w badaniu kowa-

lencyjnie zmodyfikowanych matrycy [131]. Również zdolność polimerazy RNA do inicjacji syntezy łańcucha RNA w ściśle określonym miejscu stwarza możliwość śledzenia poszczególnych etapów tej reakcji. Wykorzystując analizę transkrypcyjną *in vitro* wykazano, że antracykliny tworząc kowalencyjne wiązania z DNA blokują proces transkrypcji. Wykazano, że kowalencyjne wiązanie DOX z DNA wyraźnie wpływa na zahamowanie elongacji łańcucha RNA [24]. Polimeraza RNA zatrzymuje się na zmienionym nukleotydzie i przerywa syntezę [53]. Badając wpływ antracyklin na syntezę RNA porównano działanie DOX i DRB z ich pochodnymi DOXM i DRBM (ryc. 7).

Pochodne te hamowały syntezę RNA w stężeniach wyższych niż związki macierzyste. Dla DOX stężenie leku hamujące syntezę RNA w 50% (IC₅₀) wynosiło 10 μ M, natomiast dla DOXM 15 μ M. W przypadku DRB IC₅₀ wynosiło 15 μ M, podczas gdy dla DRBM aż 37 μ M [138]. Wykazano również, że DOX tworząca wiązanie niekowalencyjne szybko dysocjuje z kompleksu z DNA, nie zatrzymując elongacji łańcucha RNA [160]. Związki niekowalencyjne oddziałujące z DNA wpływają głównie na wczesne etapy syntezy RNA, takie jak wiązanie polimerazy RNA z DNA lub inicjację transkrypcji, czego wynikiem jest mniejsza liczba powstających transkryptów [55].

Modyfikacje DNA z udziałem antracyklin nie tylko hamują wydłużanie łańcucha RNA czy wiązanie polimerazy z DNA, ale również mogą wpływać na regulację ekspresji genów przez oddziaływanie na wiązanie czynników transkrypcyjnych ze swoistymi sekwencjami DNA. Wykazano,



Ryc. 7. Struktura chemiczna ACLA oraz DOXM

że leki przeciwnowotworowe modyfikujące strukturę DNA lub współzawodniczące z białkami o sekwencji regulatorowej w DNA mogą zaburzać oddziaływanie pomiędzy czynnikami transkrypcyjnymi a rozpoznawanymi przez nie sekwencjami [54]. Leki wiążące się kowalencyjnie z DNA wywierają większy wpływ na oddziaływanie czynników transkrypcyjnych niż związki oddziałujące niekowalencyjnie. Powstawanie wiązań kowalencyjnych antrycyklin z DNA z sekwencją GpC wpływało na wiązanie czynnika transkrypcyjnego Sp1, który rozpoznaje sekwencje bogate w pary G·C. Potwierdziły to badania, w których zastosowano technikę Mobility Shift Assay (EMSA) oraz oligonukleotydy o sekwencjach wiążących czynniki transkrypcyjne Sp1 i AP-1. Wykazano, że antrycykliny wywoływały większe zmiany w powinowactwie czynnika Sp1 niż AP-1 do rozpoznawanych sekwencji [141]. Selektywność an-

trycyklin w tym przypadku wynikała z braku w oligonukleotydzie wiążącym AP-1 sekwencji 5'-GC-3'. W innych badaniach wykazano, że również DRB i bisinterkalująca antrycyklina WP631 hamują wiązanie czynnika transkrypcyjnego Sp1 z rozpoznawanymi sekwencjami [81,111]. Antybiotyki antrycyklinowe hamowały także wiązanie czynników E2F1 i E2F4 rozpoznających sekwencje charakteryzujące się nagromadzeniem występujących obok siebie par A·T oraz G·C [54].

Wpływ antrycyklin na aktywność topoizomerazy II

Topoizomerazy są odpowiedzialne za relaksację superheliksu DNA, która jest konieczna w czasie replikacji, transkrypcji, rekombinacji czy naprawy DNA. Topoizomeraza I wprowadza przecięcia do jednego łańcucha polinukleo-

tydowego tworząc kompleks rozcinalny (cleavable complex), w którym C-3' reszty deoksyrybozylowej jest połączony wiązaniem fosfodiesterowym z resztą tyrozyny enzymu. Komplementarny łańcuch przeciska się przez utworzoną przerwę, a następnie końce przeciętego łańcucha ulegają ligacji. Topoizomeraza II natomiast przecina jednocześnie oba łańcuchy, wiążąc końce 5'-fosfodeoksyrybozylowe z podjednostkami enzymu. W ten sposób podjednostki wiążące końce tworzą „bramkę”, przez którą zostaje przecięty cały sąsiedni segment podwójnej helisy. Działanie to stanowi o bardzo ważnej roli topoizomerazy, ponieważ struktura superheliksu jest regulowana zgodnie z fazami cyklu komórkowego i aktywnością transkrypcyjną [10].

Hamowanie aktywności topoizomerazy II jest jednym z głównych mechanizmów toksycznego działania antracyklin na komórki. Antracykliny wiążą się z kompleksem rozcinanym, a więc w chwili, gdy przecięty DNA jest związany kowalencyjnie z topoizomerazą II. Przeszkadza to w ponownym połączeniu nici DNA. Powstawanie i stabilność kompleksów antracykliny-DNA- topoizomeraza II zależy od struktury związków. Układ płaskich pierścieni antracyklin jest ważny dla interkalacji do DNA, natomiast zewnętrzne podstawniki, które nie biorą udziału w interkalacji (reszta cukrowa, pierścień A) odgrywają ważną rolę w powstawaniu i stabilizowaniu kompleksów antracykliny-DNA-topoizomeraza II. W szczególności podstawnik cukrowy umiejscowiony w bruzdzie mniejszej jest krytycznym czynnikiem, decydującym o oddziaływaniu antracyklin z topoizomerazą II. Wykazano, że hamowanie topoizomerazy II wzrasta po usunięciu grupy NH_2 przy C-3' w reszcie cukrowej lub grupy metoksylowej przy C-4 w pierścieniu D. Ponadto charakter podstawników w pozycji 3' w dużym stopniu wpływa na swoistość sekwencyjną cięcia DNA [10,12]. Wykazano, że DOX, IDA i ich analogi z drugą resztą daunosaminy przyłączonej do grupy OH w pozycji C-4' wydajnie hamują aktywność topoizomerazy II [58]. Zaobserwowano jednak różnice w efektywności działania tych analogów. Pochodne zawierające drugą resztę daunosaminy w pozycji aksjalnej w stosunku do pierwszego cukru były bardziej aktywne niż pochodne z cukrem w pozycji ekwatorialnej. Wynika z tego, że pozycja aksjalna strukturalnie determinowała hamujący wpływ na topoizomerażę II. Wykazano również różnice w stężeniach antracyklin stosowanych w hamowaniu aktywności topoizomerazy I i II. Zakres stężeń, przy którym obserwowano hamowanie aktywności topoizomerazy I wynosił 10–100 μM . Dużo niższe były stężenia antracyklin wpływające na aktywność topoizomerazy II. Efektywnym stężeniem dla DOX, IDA oraz pochodnej IDA z aksjalną pozycją drugiego cukru było stężenie 0,1 μM , natomiast dla disacharydowej pochodnej DOX 1 μM [58]. Blokowanie aktywności topoizomerazy powoduje fragmentację DNA i nagromadzenie się wiązań kowalencyjnych DNA-białko w kompleksach topoizomerazy z przeciętym DNA, co w konsekwencji prowadzi do śmierci komórki [11].

Wpływ antracyklin na aktywność helikazy

Helikaza katalizuje rozplatanie dwuniciowej cząsteczki kwasu deoksyrybonukleinowego przez rozerwanie wiązań wodorowych między komplementarnymi zasadami. Antracykliny hamując działanie tego enzymu, mogą

wpływać na replikację, transkrypcję, czy rekombinację. Wykazano, że DOX w małych stężeniach uniemożliwiało rozplatanie nici DNA w komórkach raka piersi MCF-7 [41]. Wyniki te mogły sugerować, że jest to spowodowane powstawaniem kowalencyjnych wiązań antracyklin z DNA, gdyby nie stężenia, które były dużo niższe niż te wymagane do utworzenia tych wiązań. Wydaje się, że raczej interkalacja antracyklin do DNA, a nie tworzenie wiązań kowalencyjnych jest przyczyną stabilizacji drugorzędowej struktury DNA uniemożliwiającej rozplatanie nici z udziałem helikazy. Efektywne stężenie hamujące w 50% aktywność helikazy wynosiło dla DRB i DOX 0,4 μM , idarubicyny 1,8 μM , 4'-epidoksorubicyny 2 μM oraz ACLA 4 μM . Najniższe stężenie konieczne do zahamowania helikazy w 50% odnotowano w przypadku nogalomicyny – 0,2 μM [6]. Natomiast klinicznie nieaktywne 3'-N-acetyloantracykliny nie hamowały aktywności helikaz [5]. Dalsze badania tego samego zespołu wykazały, że blokada działania helikazy wskazuje na inhibicję niekompetycyjną oraz tworzenie przez antracykliny, DNA i helikazy nieodwracalnych, trójskładnikowych kompleksów. Również inne badania potwierdziły hamujący wpływ DRB zarówno na rozplatanie nici DNA, jak i na aktywności ATP-azową oczyszczonej ludzkiej helikazy II. Wiązanie leku z DNA nie wpływa natomiast na zdolność helikazy do wiązania się z DNA [155]. Helikazy wydają się ważnym i godnym większej uwagi celem działania antracyklin, gdyż stężenia antracyklin wykorzystywane do hamowania ich aktywności znajdują się w zakresie stężeń istotnych klinicznie.

Wpływ antracyklin na aktywność innych enzymów

Badano wpływ antracyklin na aktywność różnych enzymów, chociaż jak dotąd najlepiej poznano mechanizmy hamowania aktywności enzymów opisanych powyżej: polimerazy RNA, topoizomerazy II i helikazy. Jeśli jednak weźmiemy pod uwagę stężenie antracyklin, przy którym następuje hamowanie aktywności enzymu w 50% oraz to, że stężenie w osoczu może wynosić 0,1–5 μM [49,93], to należy uwzględnić jeszcze wiele enzymów uczestniczących w reakcjach redoks oraz w transporcie przez błonę. Wnikanie antracyklin do dwuwarstwy lipidowej zaburza organizację błony, która jest istotna dla aktywności katalizacyjnej niektórych enzymów. Jednym z typowych przykładów jest oksydaza cytochromu c (COX). Jest to bardzo złożone białko, w skład którego wchodzi 13 podjednostek, dwie grupy hemowe oraz dwa atomy miedzi połączone z białkiem koordynacyjnie. Enzym znajduje się w wewnętrznej błonie mitochondrialnej i jest końcowym ogniwem w łańcuchu oddechowym katalizującym czteroelektronową redukcję tlenu cząsteczkowego. Właśnie oddziaływanie DOX (IC_{50} = 3–5 μM) z COX jest uważane za jedną z przyczyn kardiotoxyczności antracyklin [130]. Poziom ATP w hodowlach miocytów jest obniżony w obecności DOX. Podobne zjawisko obserwowano w sercach szczurów traktowanych DOX [97]. Aktywność COX zależy od fosfolipidowego otoczenia, które utrzymuje enzym w aktywnym stanie. Szczególnie istotny jest naładowany ujemnie fosfolipid kardiolipina (CL), której 2–4 cząsteczki są włączone w strukturę enzymu [118]. Wykazano, że DOX wiąże się z CL za pośrednictwem oddziaływań elektrostatycznych (K_d = 0,6 μM) i wpływa hamująco na aktywność COX. Inne przykłady wpływu antracyklin na aktywność białek opisujemy w następnych rozdziałach.

Indukowanie apoptozy z udziałem antracyklin

W walce z nowotworami istotne jest poznanie mechanizmów prowadzących do śmierci komórek. Uważa się, że miarą skuteczności leków przeciwnowotworowych, oprócz hamowania proliferacji komórek nowotworowych, jest zdolność do indukowania procesu apoptozy. Mechanizm cytotoksycznego działania antybiotyków antracyklinowych na komórki nowotworowe jest przedmiotem zainteresowania wielu badaczy.

Istnieje wiele kontrowersyjnych doniesień na temat roli białka p53 w cytotoksycznym działaniu antracyklin [9,47,108,121]. Niejasności dotyczące związku między p53 i apoptozą indukowaną przez antracykliny mogą być spowodowane istnieniem alternatywnych dróg apoptozy, które nie są związane ani z hamowaniem aktywności topoisomeryzy II, ani z obecnością funkcjonalnego p53. Na przykład klinicznie stężenia antracyklin uruchamiają hydrofilizę sfingomielin i tworzenie ceramidu, który z kolei aktywuje drogi prowadzące do śmierci komórek, niewymagające kontroli ze strony p53. Można wymienić tu stymulację kinaz JNK i aktywację c-Jun/AP-1 [75], a także degradację serynowo-treoninowej kinazy Akt i zaburzenia regulacji drogi „przeżycia” komórek z udziałem Akt/B [83]. Liczba mediatorów komórkowych łączących antracykliny z apoptozą stale wzrasta. Wykazano, że DOX indukuje apoptozę przez aktywację kinazy białkowej p38 aktywowanej mitogenami (MAPK) [67]. Natomiast w komórkach mięśnia sercowego (HL-1) oraz w wyizolowanych miocytach szczura apoptozie indukowanej DOX i DRB towarzyszy obniżenie aktywności czynnika transkrypcyjnego GATA-4 [70]. Antracykliny mogą również bezpośrednio uwalniać cytochrom c z mitochondriów, tym samym indukując apoptozę bez uszkodzenia DNA [22,57]. Opierając się na tym, że białka z rodziny Bcl-2 odgrywają ważną rolę w regulowaniu uwalniania cytochromu c, zbadano wpływ antracyklin na aktywację proapoptotycznych białek Bax, Bak i białek BOPs (BH3-only proteins) Bid i Bik. Wykazano, że DOX, w stężeniu klinicznie istotnym, aktywowała białka Bak i Bax. Dodatkowo wykazano, że aktywacja białka Bak była wcześniej niż aktywacja Bax, co zasugerowało, że DOX w różny sposób wpływa na regulację tych dwóch białek. Komórki traktowane DOX wykazywały podwyższony poziom białka Bik, nie obserwowano natomiast udziału białka Bid w apoptozie indukowanej DOX [105].

Najważniejszą rolę w kontrolowaniu wrażliwości komórek na sygnały proapoptotyczne odgrywa szlak kinazy fosfatydyloinozytolu PI3K/Akt. Jednym z mechanizmów antyapoptotycznego działania PI3K i aktywowanej przez nią Akt jest hamowanie białka Bad [165] oraz czynników transkrypcyjnych FKHD (forkhead transcription factor), które indukują ekspresję białek proapoptotycznych z rodziny Bcl-2 [133]. Wykazano, że hamowanie aktywności PI3K/Akt uwrażliwiało komórki na apoptozę indukowaną DOX. Zwiększona wrażliwość na apoptozę korelowała ze zmniejszoną aktywnością białek Bak i Bax [105]. Możliwość regulowania drogi sygnałowej PI3K może zmieniać wrażliwość komórek na apoptozę indukowaną przez DOX, co również ma uzasadnienie kliniczne, gdyż wiele typów nowotworów wykazuje nadmierną ekspresję PI3K. Odnosząc się do drogi apoptozy z udziałem receptorów śmierci, wykazano, że DOX zwiększa apoptozę indukowaną przez

ligand Fas (rFasL) w noworodkowych kardiomiocytach szczura [162].

Podwójną rolę NF- κ B (antyapoptotyczną w komórkach nowotworowych i proapoptotyczną w kardiomiocytach) uwidoczniły badania, w których SN50, peptyd blokujący jądrową translokację NF- κ B, zwiększał apoptozę indukowaną przez DOX w ludzkich komórkach nerwiaka niedojrzałego [112], natomiast hamował apoptozę indukowaną przez DOX w kardiomiocytach szczura [158]. W komórkach nowotworowych hamowaniu NF- κ B zależnemu od SN50, i w konsekwencji nasileniu apoptozy, towarzyszyła zwiększona aktywność Bax i obniżona aktywność Bcl-2 [112]. W innych doświadczeniach DOX i jej analogi (WP631, WP744) aktywowały NF- κ B w komórkach mieloidalnych (KBM-5) i limfoidalnych (Jurkat), a aktywacja ta była związana z degradacją podjednostki inhibitorowej I κ B α [4]. W jaki sposób DOX aktywuje NF- κ B nie jest wyjaśnione. Wykazano natomiast, że aktywacja NF- κ B indukowana DOX wymaga obecności RIP (receptor-interacting protein) [4].

Omawiając różne mechanizmy prowadzące do indukowanej antracyklinami apoptotycznej śmierci komórek warto również wspomnieć o roli zaburzeń w homeostazie żelaza. Jony żelaza w postaci związanej z białkami są niezbędne do funkcjonowania podstawowych procesów życiowych. Utrzymanie homeostazy żelaza w komórce zależy od wspólnego działania dwóch białek ferrytyny i receptora transferyny (TfR). Pierwsze odpowiedzialne jest za przechowywanie żelaza w dostępnej i nieszkodliwej postaci [61], a drugie za wychwytywanie żelaza z płynów zewnątrzkomórkowych [148]. Wykazano, że DOX nie wpływa na proces pobierania żelaza i gromadzenia w ferrytynie, natomiast hamuje uwalnianie żelaza związanego z ferrytyną. W procesie tym przypuszczalnie biorą udział wolne rodniki powstające w reakcjach redoks antracyklin, które indukują potranslacyjne modyfikacje ferrytyny zmniejszając jej zdolność do uwalniania jonów żelaza [72]. Inna możliwość jest taka, że antracykliny biorą udział w lizosomalnej lub proteasomowej degradacji białek ferrytyny [73].

Skoro w powstawaniu wolnych rodników wywołujących apoptozę istotną rolę odgrywają jony żelaza występujące w komórce w nadmiarze, wydaje się, że zatrzymywanie żelaza w ferrytynie indukowane przez DOX nie powinno indukować apoptozy, ale przeciwnie przez zapobieganie powstawaniu wolnych rodników ograniczać apoptozę. Okazuje się jednak, że DOX hamując uwalnianie żelaza z ferrytyny może jednocześnie indukować jego uwalnianie z białek innych niż ferrytyna. Jedno takie miejsce zostało zidentyfikowane w cytoplazmatycznej akonitazie, która jest odpowiednikiem enzymu mitochondrialnego, odwracalnie izomeryzującego cytrynian do izocytrynianu z udziałem [4Fe-4S] [134]. Czwartym atomem żelaza w [4Fe-4S] – istotny dla aktywności akonitazy i który oznaczany jest jako Fea, może być łatwo usunięty przez produkty reakcji redoks z udziałem DOX, np. O₂^{•-} lub H₂O₂. Powoduje to powstanie nieaktywnej akonitazy z grupą [3Fe-4S]. Inne reakcje są obserwowane, jeżeli DOX lub inne antracykliny, ulegają dwuelektronowej redukcji w grupie aldehydowej przy C-13. Reakcja ta katalizowana przez zależne od NADPH reduktazy prowadzi do powstania alkoholi drugorzędowych np. doksorubicynolu (DOXol) [91]. Alkohole dru-

gorzędowe powstające z antracyklin są bardziej reaktywne niż O_2^- lub H_2O_2 w stosunku do ugrupowania [4Fe-4S] cytoplazmatycznej akonitazy i uwalniają zarówno Fe_3 , jak i pozostałe atomy żelaza [87]. Tak więc, cytoplazmatyczna akonitaza może uwalniać jeden lub cztery atomy żelaza w zależności od tego, który związek, antracyklina czy jej pochodna reaguje z grupą [4Fe-4S]. Wydaje się, że [4Fe-4S] jest głównym źródłem żelaza w kardiomiocytach traktowanych DOX. Konsekwencje uwalniania żelaza stają się bardziej złożone, jeżeli weźmiemy pod uwagę, że rola cytoplazmatycznej akonitazy nie ogranicza się do katalizowania reakcji izomeryzacji, ale dotyczy również regulacji poziomu ekspresji TfR i ferrytyny. Uwolnienie grupy [4Fe-4S] przekształca akonitazę w białko IRP-1, które wiąże się z dużym powinowactwem do sekwencji odpowiedzi na żelazo (iron regulatory protein) w regionach nieulegających translacji mRNA ferrytyny i TfR. Powoduje to zwiększenie stabilności mRNA TfR i przeciwnie zahamowanie translacji mRNA ferrytyny [134]. Przekształcenie akonitazy w IRP-1 zwiększa zatem pobieranie żelaza przez komórkę i zmniejsza jego przechowywanie, powodując wzrost puli komórkowej wolnego żelaza. Taki proces zachodzi spontanicznie w komórkach z niedoborem żelaza i służy jako mechanizm adaptacyjny zapewniający odpowiedni poziom żelaza. Proces ten jest bardzo toksyczny, jeżeli komórki zawierające wystarczającą ilość żelaza do celów metabolicznych, otrzymują dodatkowo żelazo w wyniku przekształcania akonitazy w IRP-1 na skutek działania DOX [87]. Zrozumienie różnych funkcji akonitazy i IRP-1 zmieniło nasze spojrzenie na apoptozę indukowaną przez DOX. Z punktu widzenia relacji struktura-aktywność, stało się pewne, że DOXol może być bardziej toksyczny niż DOX, ponieważ DOXol uwalnia więcej żelaza z [4Fe-4S]. Ponadto, uwolnienie żelaza z [4Fe-4S] do cytoplazmy połączone z przewagą pobierania żelaza nad jego gromadzeniem uzasadniło rolę chelatorów i przeciwciał przeciwko TfR w zapobieganiu apoptozie indukowanej przez DOX.

Związek między aktywacją IRP-1, powstawaniem ROS z udziałem żelaza i apoptozą, został wykazany w kardiomiocytach H9c2 oraz w komórkach śródbłonka z aorty wołu traktowanych DOX [87]. Stało się to podstawą nowej hipotezy, która wyjaśnia rolę metabolitów DOX, ROS oraz żelaza w apoptozie kardiomiocytów, a także ochronną rolę antyoksydantów i przeciwciał przeciwko TfR i chelatorów komórkowych. W tej hipotezie, żelazo uwalniane z [4Fe-4S] lub w zbyt dużej ilości pobierane z płynów zewnątrzkomórkowych wskutek nadekspresji TfR zależnej od IRP-1, reaguje z O_2^- oraz H_2O_2 , co prowadzi do apoptozy przez mechanizm wolnych rodników, które aktywują NF- κ B lub wywołują dysfunkcję mitochondriów.

W najnowszych pracach wykazano, że stres oksydacyjny indukowany przez kompleksy żelaza z antracyklinami powoduje nieodwracalne uszkodzenia białka IRP1, dodatkowo zakłócając maszynę regulującą homeostazę żelaza [86].

Różnicowanie komórek nowotworowych pod wpływem antracyklin

Wiele nowotworów wykazuje odwracalne zaburzenia w procesie różnicowania komórek. Sugeruje się, że zastosowanie

odpowiedniego induktora tego procesu może przeprogramować komórki tak, aby utraciły zdolność do proliferacji, a uzyskały możliwość różnicowania. Wśród wielu związków zbadanych pod kątem ich zdolności do indukowania procesu różnicowania znalazły się również antracykliny. Wykazano, że stosowane w małych stężeniach mają selektywny wpływ na ekspresję genów, a do efektów fenotypowych tego mechanizmu należą różnicowanie komórek nowotworowych [63] oraz ograniczenie ich zdolności do tworzenia przerzutów [1]. Również oddziaływanie z błoną komórkową może być odpowiedzialne za stymulujący różnicowanie wpływ antracyklin na komórki nowotworowe [64]. Badania prowadzone na zwierzętach i nowotworach ludzkich potwierdziły, że antracykliny indukują proces różnicowania zarówno w komórkach białaczkowych jak i guzach litych (tab. 1).

Wykazano, że w zależności od rodzaju komórek hamowaniu proliferacji może, ale nie musi, towarzyszyć proces różnicowania. DOX stosowana w stężeniu hamującym wzrost hodowli indukowała różnicowanie komórek K562 oraz WEHI-3B D+ [45], ale nie komórek HL-60, które z kolei różnicowały w obecności aklacynomycyny [92]. Opisano wiele czynników istotnych dla procesu różnicowania komórek indukowanego przez antracykliny. Na przykład brak surowicy uniemożliwiał różnicowanie komórek ML-1 [13] pod wpływem antracyklin, ale nie przeszkadzał w ich cytotatycznym działaniu. Wykazano również, że hamowanie syntezy glikoprotein pod wpływem ACLA czy pyrromycyny może odgrywać ważną rolę w różnicowaniu komórek HL-60 [92] oraz Friend [122]. Obserwano również obniżenie poziomu mRNA c-myc i c-myb, które towarzyszyło procesowi różnicowania komórek K562 i Friend pod wpływem ACLA i DOX [123, 150] oraz procesowi różnicowania komórek HL-60 w kierunku granulocytów pod wpływem ACLA [136].

W badaniach procesu różnicowania *in vitro* często wykorzystywanym modelem jest linia komórkowa K562 [27]. Są to komórki erytroleukemiczne, które w zależności od stosowanego induktora mogą różnicować w kierunku erytrocytów, megakariocytów i w mniejszym stopniu w kierunku monocytów. Wyizolowane zostały od pacjentki z przewlekłą białaczką pochodzenia szpikowego w fazie zaostrezenia blastycznego [80].

Badania wykazały, że antracykliny indukują proces różnicowania komórek K562 w kierunku erytrocytów. Nawet niewielkie zmiany w strukturze antracyklin powodowały, że mechanizm indukcji procesu różnicowania był różny. Zarówno ACLA jak i DOX, w stężeniach niższych od cytotoksycznych, indukowały wzrost poziomu mRNA γ -globiny i deaminazy porfobilinogenu (PBGD), co skutkowało syntezą globiny i hemu. Po stymulacji ACLA, 67% a w przypadku DOX, 50% komórek wytwarzało hemoglobinę. Pojawiała się hemoglobina embrionalna – Gower2 (ϵ_2 , α_2) i X (ϵ_2 , γ_2), Portland (γ_2 , ζ_2) oraz hemoglobina płodowa F(α_2 , γ_2) [63]. Jednak w przeciwieństwie do DOX, różnicowanie komórek z udziałem ACLA nie wymagało całkowitego zahamowania wzrostu hodowli [100]. W hodowlach prowadzonych w obecności ACLA w stężeniu 20 nM, odnotowano wzrost ekspresji genów charakterystycznych dla komórek erytroidalnych, tj. czynnika transkrypcyjnego GATA-1 [52], NF-E2 oraz receptora erytro-

Tabela 1. Różnicowanie komórek nowotworowych pod wpływem antracyklin

Linie komórkowe	Antracykliny	Fenotyp	Piśmiennictwo
Białaczki			
Mysie komórki erytroleukemiczne Friend (F4-6) (murine erythroleukemia)	aklacynomycyna	erytrocyty	123
Ludzkie komórki białaczki promielocytowej HL-60 (human promyelocytic leukemia)	aklacynomycyna marcellomycyna	granulocyty	92, 136
Ludzkie komórki przewlekłej białaczki szpikowej K562 (human chronic myelogenous leukemia)	aklacynomycyna doksorubicyna daunorubicyna	erytrocyty	63, 90, 100, 152
Ludzkie komórki białaczki szpikowej ML-1 (human myeloblastic leukemia)	daunorubicyna	monocyty	13
Mysie komórki białaczki mielomonocytowej WEHI-3B D ⁺ (murine myelomonocytic leukemia)	klacynomycyna doksorubicyna N-trifluoroacetylo doksorubicyna	granulocyty	45
Guzy lite			
Ludzkie linie komórek nerwiaka: SK-N-MC; SK-N-SH; SJ-N-KP; TS12; AF8	epirubicyna	komórki nerwowe	119, 120
Mysie komórki nerwiaka C1300 (murine neuroblastoma)	doksorubicyna	komórki nerwowe	124
Mysie komórki czerniaka B16 (murine melanoma)	doksorubicyna	melanocyty	140

poetyny (EpoR) [63,153]. Wzrastała również aktywność wiążąca DNA czynników transkrypcyjnych GATA-1 i NF-E2. W przypadku zastosowania 40 nM DOX nie obserwowano wzrostu ekspresji tych genów. Jak wynika z przeanalizowanych danych DOX i ACLA mogą różnicować komórki K562 wykorzystując różne mechanizmy molekularne. DOX, zwiększając stabilność mRNA GATA-1, NF-E2 i PBGD, może działać na poziomie potranskrypcyjnym. Natomiast ACLA przez oddziaływanie z regionami regulatorowymi genów erytroidalnych działa na poziomie transkrypcyjnym [90,63].

W innych badaniach wykazano, że DOXM (ryc. 7) wydajniej różnicowała komórki K562 niż macierzysta DOX. Po stymulacji DOXM, w 3 dniu hodowli, 40% komórek wytwarzało hemoglobinę, a w przypadku DOX tylko 20%. DOXM również wydajnie hamowała proliferację komórek K562, co potwierdziły badania poziomu ekspresji markera proliferacji Ki67 [28]. W badaniach procesu różnicowania komórek K562 stosowano również daunorubicynę (DRB). W czasie 24 godzin hodowli w obecności DRB obserwowano spadek ekspresji c-myc natomiast poziom ekspresji γ -globiny nie ulegał zmianie. Po 48 godzinach wzrastał poziom mRNA γ -globiny, a ekspresja c-myc wróciła do poziomu wyjściowego [152].

Badając udział stresu oksydacyjnego w indukowanym antracyklinami procesie różnicowania wykazano, że dodanie przeciwutleniaczy do hodowli komórek zmniejszało liczbę zróżnicowanych komórek. Użycie 20 nM ACLA spowodowało obniżenie ekspresji genów kodujących czynni-

ki transkrypcyjne GATA-1 i NF-E2. Analizując markery stresu oksydacyjnego wykazano, że DOX i ACLA w różnym stopniu obniżają poziom zredukowanego glutationu oraz aktywność enzymów antyoksydacyjnych (peroksydazy glutationowej, dysmutazy ponadtlenkowej, katalazy, reduktazy glutationowej). Wyniki badań sugerują, że generowanie wolnych rodników przez antracykliny, może wpływać na początkowe etapy procesu różnicowania komórek za pośrednictwem czynników transkrypcyjnych GATA-1 i NF-E2 w przypadku ACLA, a także za pośrednictwem innych czynników zdolnych do indukowania syntezy γ -globiny w przypadku DOX [21]. Na przykładzie antracyklin widoczne jest, że mechanizm indukcji procesu różnicowania i syntezy hemoglobiny przez strukturalnie pokrewne związki może być różny.

Badania *in vitro* wykazały, że antracykliny indukują również różnicowanie komórek nerwiaka oraz czerniaka (tab. 1). Procesowi różnicowania mysich komórek nerwiaka towarzyszyły zmiany morfologiczne i biochemiczne. Po dodaniu DOX do hodowli obserwowano wzrost wielkości komórek. Odnotowano również wzrost aktywności esterazy acetylocholinowej [124], enzymu występującego w synapsach, katalizującego reakcję rozpadu neuroprzekaznika, acetylocholinę. Podobne procesy towarzyszyły różnicowaniu ludzkich linii komórek nerwiaka stymulowanych EDOX [120] oraz inną pochodną DOX, 4'-jodo-4'-deoksydoksorubicyną (IDX) [119]. DOX stosowana w stężeniach hamujących wzrost hodowli indukowała różnicowanie komórek czerniaka w kierunku melanocytów. Procesowi różnicowania towarzyszyła akumulacja komórek w fazie

G₂/M. Obserwowano zmiany morfologiczne oraz zwiększenie zawartości melaniny [140]. Indukowane antracyklinami zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G₂/M, poprzedzające proces różnicowania, stwierdzono również w linii komórek K562 [28].

Niektóre kliniczne aspekty stosowania antracyklin

Podobnie jak w przypadku innych leków przeciwnowotworowych, kliniczne zastosowanie antracyklin jest ograniczone z powodu problemów związanych z rozwojem oporności w komórkach nowotworowych lub ich cytotoksycznym działaniem na zdrowe tkanki. Wykazano, że zwykle w ciągu roku po zakończeniu terapii antracyklinami rozwija się rozstrzeniowa kardiomiopatia oraz przewlekła niewydolność serca (CHF) [135]. Czasami wkrótce po rozpoczęciu podawania antracyklin (w przeciągu tygodnia) może wystąpić ostra kardiotoxyczność, na którą składa się: arytmia, hipotensja, upośledzenie kurczliwości serca. Ostra kardiotoxyczność występuje u około jednego procenta pacjentów i jest zwykle odwracalna [166]. Cechy indukowanej antracyklinami kardiomiopatii, obejmują utratę miofibrili, rozszerzenie retikulum sarkoplazmatycznego, wakuolizację cytoplazmy, pęcznienie mitochondriów i zwiększenie liczby lizosomów. Istnieje ścisły związek między podaną dawką antracyklin, dawką akumulowaną w sercu i rozwojem kardiomiopatii. Maksymalna rekomendowana dawka skumulowana dla DRB wynosi 500 mg/m² a dla DOX 450–600 mg/m². Również użycie analogów drugiej generacji (EDOX i EPI), mających lepszy indeks terapeutyczny nie eliminuje ryzyka rozwoju kardiotoxyczności. DOX podawana była również w połączeniu z nowymi zatwierdzonymi związkami, takimi jak: taksany [paklitaksel (PTX) i docetaksel (DCT)] lub trastuzumab w celu poprawy skuteczności leczenia chorób nowotworowych. PTX i DCT są mikrotubulowymi inhibitorami, które indukują apoptozę w komórkach raka piersi i hamują angiogenezę [56]. Skojarzenie DOX z PTX lub DCT [95] stanowiło kolejny krok w leczeniu raka piersi w fazie metastazy. Niestety DOX w terapii skojarzonej indukowała kardiotoxyczność już w mniejszych dawkach.

Uważa się, że antracykliny indukują kardiotoxyczność za pośrednictwem innych mechanizmów niż te, które są odpowiedzialne za ich aktywność przeciwnowotworową. Poznanie tych mechanizmów pozwoliłoby na rozwój nowych strategii ograniczających działania niepożądane nie zmniejszając odpowiedzi nowotworu. Wśród procesów odpowiedzialnych za rozwój kardiotoxyczności wymienia się np.: zwiększenie peroksydacji lipidów [62], zaburzenia w gospodarce wapniowej [103], hamowanie ekspresji swoich genów [2,65], enzymatyczną aktywację mitochondrialnych kinaz kreatynowych (MtCK) [151] oraz indukcję syntazy tlenu azotu [104]. Ciągłe podawanie antracyklin zmniejsza poziom Ca²⁺-ATP-azy w retikulum sarkoplazmatycznym [16].

Kolejnym bardzo ważnym czynnikiem ograniczającym możliwości chemioterapii jest oporność komórek nowotworowych na antracykliny. Oporność nowotworu może być pierwotną cechą genetyczną komórek lub też nabytą, wytworzoną w reakcji na podany lek. Intensywne badania prowadzone w ciągu ostatnich kilkunastu lat pozwoliły na identyfikację genów, których nieprawidłowości wiążą się

z opornością na leki. Wykazano, że dużym problemem wywołującym oporność nowotworów na antracykliny jest nadekspresja genu MDR1 (multidrug resistance gene). Trwają poszukiwania nietoksycznych substancji, które hamowałyby aktywność produktów genów oporności. Istotny wydaje się również rozwój nowych strategii w walce z nowotworami, takich jak np. liposomowe formuły antracyklin czy synteza proleków.

Duże nadzieje wiąże się z terapią celowaną, gdyż „uderza” ona prosto w nieprawidłowo funkcjonujące komórki, oszczędzając zdrowe tkanki i minimalizując działania niepożądane. Możemy wyróżnić dwie główne strategie farmakologiczne terapii celowanej z udziałem antracyklin. Jedną z nich obejmuje rozwój „przenośników” pozwalających na dotarcie antracyklin do nowotworu bez uszkodzenia zdrowych tkanek. Drugą natomiast polega na łączeniu antracyklin z nośnikami swoiście rozpoznającymi komórki nowotworowe. Najlepszym przykładem pierwszej strategii są formuły liposomowe. Zamknięcie leków w liposomach ma na celu zwiększenie ich przyswajalności przez organizm, poprawę stabilności oraz zmniejszenie toksyczności w stosunku do zdrowych komórek, przy zachowaniu takich samych właściwości cytotoxycznych w stosunku do komórek nowotworowych, jakie ma wolny lek. Charakterystyczne dla antracyklin zamkniętych w liposomach jest: ograniczenie wydajności eliminacji leku (CL), wydłużony czas połowicznego rozpadu, akumulacja w obszarze nowotworu, ograniczona akumulacja w zdrowych tkankach, wydłużony czas uwalniania leku wewnątrz nowotworu oraz częściowe przezwyciężenie oporności nowotworu na lek [33]. Lepsze właściwości farmakokinetyczne liposomowych antracyklin pozwalają dostarczyć do komórek nowotworowych większą ilość leku w dawce tolerowanej przez organizm. Mechanizmy pozwalające na uwolnienie antracyklin z liposomów w obszarze nowotworu nie są całkowicie znane. Sugeruje się, że mikrośrodowisko nowotworu może wpływać na destabilizację lipidowych transporterów np. przez działanie niskiego pH płynów śródmiąższowych otaczających nowotwór, uwalnianie lipazy z rozpadających się komórek nowotworowych oraz uwolnienie enzymów i czynników utleniających z komórek zapalnych infiltrujących guz [84]. Ponadto, komórki fagocytarne znajdujące się w obszarze nowotworu mogą metabolizować liposomy i uwalniać antracykliny [137]. Możemy wyróżnić trzy główne formuły pozwalające na zamknięcie antracyklin w liposomach:

- sterycznie stabilizowaną, opłaszczoną polietylenoglikolem DOX (Doxil w USA; Caelyx w Europie),
- z udziałem cytrynianu powodującego wzrost wydajności opłaszczania DOX,
- liposomową DRB (DaunoXome).

Formuły liposomowe oceniane na modelach doświadczalnych oraz w badaniach klinicznych wykazują większą skuteczność oraz są lepiej tolerowane niż DOX. Badania wykazały, że opłaszczona polietylenoglikolem liposomowa DOX (nazywana PLD) ma dużo lepsze właściwości farmakokinetyczne w porównaniu z wolną DOX, ponieważ jest chroniona przed mononuklearnym systemem fagocytarnym, co zwiększa czas cyrkulacji w krwiobiegu [43], a ponadto zmniejsza działania niepożądane stosowania antracyklin: mdłości, wymioty, łysienie czy zapalenie jamy ustnej [60]. Wykazano, że PLD działa u pacjentów z ra-

0 – 0,25 μM	0,25 – 1 μM	1 – 5 μM	> 5 μM	stężenie
Maksymalne początkowe stężenie przy jednorazowej dużej dawce				5 μM
Przeciętne początkowe stężenie przy jednorazowej dawce				1-2 μM
Stężenie 1 h po dawce jednorazowej lub przy wlewie ciągłym				0,025 – 0,25 μM
Różnicowanie				0,04 – 0,2 μM
Apoptoza				0,05 – 1 μM
Hamowanie syntezy DNA i RNA				0,1 – 5 μM
Dwuniciowe pęknięcia w DNA				0,4 – 5 μM
Generowanie wolnych rodników i peroksydacja lipidów				1 – 100 μM
Wiązania kowalencyjne z DNA				50 μM – 1 mM
Aktywność helikazy				0,2 – 0,4 μM
Aktywność topoizomerazy II				0,1 – 1 μM
Wiązania kowalencyjne z DNA; hamowanie syntezy RNA				10 – 50 μM
Aktywność topoizomerazy I				10 – 100 μM
Generowanie wolnych rodników				10 – 200 μM
Stężenie w osoczu		Stężenie zewnątrzkomórkowe w hodowli		Stężenie w mieszaninie reakcyjnej

Ryc. 8. Wpływ stężenia antrycyklin na procesy obserwowane *in vitro* w relacji do stężeń uzyskiwanych w organizmie pacjenta (schemat).

W przygotowaniu schematu wykorzystano jedynie dane otrzymane dla DOX. Kolorem pomarańczowym zaznaczono zakres stężeń uzyskiwany w osoczu pacjentów, którym podawano jednorazową dawkę DOX w iniekcji dożylniej lub we wlewie ciągłym [49,93]. Kolor zielony przedstawia wyniki uzyskane w hodowlach komórkowych, przy czym stężenie DOX jest początkowym stężeniem w medium. Na szarym tle znajdują się zakresy stężeń, które były stosowane w badaniach bezkomórkowych. Zarówno w badaniach prowadzonych na hodowlach komórkowych, jak i w układach bezkomórkowych należy uwzględnić, że zakres stosowanych stężeń był często podyktowany możliwościami detekcji zmian w badanych procesach, co oznacza, że efektywne stężenie *in vivo* mogłoby być mniejsze

kiem jajnika, którzy nie zareagowali na cisplatynę i PTX [66], u pacjentów z glejakami oraz wtórnymi guzami mózgu [71]. Wykazuje dobrą skuteczność w leczeniu mięsaka Kaposiego towarzyszącego AIDS [99]. Brak lub niewielką aktywność PLD stwierdzono u pacjentów z opornym na antrycykliny rakiem piersi [116], zaawansowanym rakiem macicy [35], zaawansowanym rakiem żołądka [149] oraz trzustki [59]. Liposomową DOX zawierającą cytrynian charakteryzują nieco gorsze parametry farmakokinetyczne niż PLD, jednak są one zdecydowanie lepsze w porównaniu z podawaniem wolnej DOX [33]. U pacjentów z przerzutowym rakiem piersi formuła ta dawała taką samą odpowiedź, co tradycyjna DOX, ale była mniej kardiotoxyczna [8,60]. Badania wykazały, że również DRB zamknięta w liposomach (DaunoXom) ma dużo lepsze parametry farmakokinetyczne w porównaniu z wolną DRB [50]. Zaproponowano użycie DaunoXome w leczeniu mięsaka Kaposiego u pacjentów z AIDS. DaunoXome podawany zarówno sam, jak i w połączeniu z Ara-C, wykazywał dużą aktywność i był dobrze tolerowany również przez pacjentów z ostrą białaczką mieloblastyczną [38]. DaunoXome badany był także w połączeniu z deksametazonem [89] oraz cyklofosfamidem, winkrystyną czy prednizolonem [85].

Kolejną strategią terapii celowanej, stanowiącą alternatywę dla formuł liposomowych, jest synteza proleków. Są to związki, które działają na komórki nowotworowe po proteolitycznej aktywacji przez enzymy wydzielane przez te komórki. Jednym z przykładów takich proleków

jest związek L-377,202, powstający przez kowalencyjne połączenie DOX z N-glutarylo[4-hydroksypropylo]-Ala-Ser-cykloheksaglicylo-Glu-Ser-Leu. W wyniku działania enzymu wydzielanego przez komórki raka gruczołu krokowego dochodzi do hydrolizy tego związku i uwolnienia DOX lub DOX-Leu. Badania wykazały, że L-377,202 jest kilkakrotnie bardziej skuteczny w hamowaniu wzrostu ludzkich komórek raka prostaty niż DOX [29]. Innym związkiem należącym do rodziny proleków DOX jest tetrapeptydowa pochodna DOX, CIP-0004Na (N-succynylo- β -Ala-L-Leu-L-Ala-L-Leu-DOX). Nie ulega ona hydrolizie we krwi i jest aktywowana przez nowotworową peptydazę, która hydrolizując wiązanie amidowe powoduje powstanie N-(L-Leu-DOX). Badania wykazały, że CIP-0004Na ma znacznie większą aktywność przeciwnowotworową niż DOX [34] oraz w mniejszym stopniu jest akumulowany w sercu i w zdrowych tkankach [154]. Zbadano również inne związki będące prolekami DOX. Jednym z nich jest peptyd RGD-4C, który wybiórczo wiąże się z podjednostką αv integryny $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ i $\alpha\text{v}\beta\text{5}$ ulegających nadekspresji w nowotworowych komórkach śródbłonna. Inna pochodna DOX-D-ALA-Phe-Lys jest peptydem rozpoznawanym przez obecną w komórkach plazminową proteazę [30].

Interesującą strategią terapii celowanej jest łączenie antrycyklin z polimerami rozpoznawanymi przez receptory ulegające ekspresji w guzach. Takim przykładem jest związek PK2, który powstał przez połączenie DOX z N-(2-hydroksypropylo)metaakrylamidowym kopolimerem, zawierającym

resztę galaktozaminy rozpoznawaną przez niektóre receptory wątrobowe [127]. Badania wykazały selektywną akumulację PK2 w wątrobie oraz dużo mniejszą kardiotoksyczność w porównaniu z odpowiednią dawką wolnej DOX.

Immunoliposomy są nową generacją liposomów, będącą połączeniem swoistych przeciwciał monoklonalnych lub fragmentów Fab' z liposomowymi antracyklinami. Jednym z celów jest tzw. HER2 – ludzki nabłonkowy czynnik wzrostu 2 (human epidermal growth factor 2). Białko to odpowiada za prawidłowy wzrost i podziały komórek. AntyHER/neu liposomowa DOX wybiórczo wiąże komórki HER2/neu pozytywne [33]. Wykazano, że AntiHER2/neu PLD charakteryzuje większa skuteczność przeciwnowotworowa oraz zredukowana toksyczność w porównaniu z DOX [106]. Zbadano również inne immunoliposomy np. liposomową DOX połączoną z przeciwciałami skierowanymi przeciwko mucynie1 [88]. Interesujące wyniki otrzymano badając myszy z przeszczepionymi ludzkimi komórkami nerwiaka. W tych doświadczeniach DOX opłaszczona polietylenoglikolem związana była z fragmentem Fab' przeciwciał skierowanych przeciwko GD2 (disialogangliozyd), który ulega nadekspresji w tych komórkach [107]. Zaobserwowano antyangiogeny wpływ oraz uszkodzenie naczyń krwionośnych, głównie przez indukcję programu

apoptotycznego w komórkach śródbłonna w obszarze objętym zmianami nowotworowymi.

Antracykliny stosowane w terapii przeciwnowotworowej od prawie 40 lat ciągle pozostają w obszarze zainteresowań naukowych. Rozwój nowych technologii zarówno w dziedzinie chemii medycznej, jak i biologii molekularnej i biologii komórki stworzył nowe perspektywy w poszukiwaniu bardziej skutecznych pochodnych antracyklin i poznawaniu molekularnych mechanizmów ich działania *in vitro* i w organizmie pacjenta. W badaniach tych istotne jest stężenie leków, gdyż oprócz struktury związków również ich stężenie uzyskiwane w obrębie działania leku ma wpływ na jego skuteczność (ryc. 8). Poszukiwanie nowych analogów oraz rozwój przeciwnowotworowych terapii celowanych należą do głównych kierunków badań mających na celu poprawę skuteczności oraz zmniejszenie działań niepożądanych, co w przypadku antracyklin oznacza przede wszystkim zmniejszenie kardiotoksyczności.

PODZIĘKOWANIA

Składamy serdeczne podziękowania Prof. Markowi Gniazdowskiemu za krytyczne uwagi oraz Justynie Arkusińskiej za interesującą dyskusję.

PIŚMIENICTWO

- [1] Addadi-Rebbah S., Poitevin S., Fourre N., Polette M., Garnotel R., Jeannesson P.: Assessment of the antiinvasive potential of anthracycline aclacinomycin (Aclarubicin®) in human fibrosarcoma cell line. *Int. J. Oncol.*, 2004; 24: 1607–1615
- [2] Arai M., Tomaru K., Takizawa T., Sekiguchi K., Yokoyama T., Suzuki T., Nagai R.: Sarcoplasmic reticulum genes are selectively down-regulated in cardiomyopathy produced by doxorubicin in rabbits. *J. Mol. Cell Cardiol.*, 1998; 30: 243–254
- [3] Arcamone F., Animati F., Bigioni M., Capranico G., Caserini C., Cipollone A., De Cesare M., Ettore A., Guano F., Manzini S., Monteagudo E., Pratesi G., Salvatore C., Supino R., Zunino F.: Configurational requirements of the sugar moiety for the pharmacological activity of anthracycline disaccharides. *Biochem. Pharmacol.*, 1999; 57: 1133–1139
- [4] Ashikawa K., Shishodia S., Fokt I., Priebe W., Aggarwal B.B.: Evidence that activation of nuclear factor-kappaB is essential for the cytotoxic effects of doxorubicin and its analogues. *Biochem. Pharmacol.*, 2004; 67: 353–364
- [5] Bachur N.R., Lun L., Sun P.M., Trubey C.M., Elliott E.E., Egorin M.J., Malkas L., Hickey R.: Anthracycline antibiotic blockade of SV40 T antigen helicase action. *Biochem. Pharmacol.*, 1998; 55: 1025–1034
- [6] Bachur N.R., Yu F., Johnson R., Hickey R., Wu Y., Malkas L.: Helicase inhibition by anthracycline anticancer agents. *Mol. Pharmacol.*, 1992; 41: 993–998
- [7] Bailly C., Suh D., Waring M.J., Chaires J.B.: Binding of daunomycin to diaminopurine- and/or inosine-substituted DNA. *Biochemistry*, 1998; 37: 1033–1045
- [8] Batist G., Ramakrishnan G., Rao C.S., Chandrasekharan A., Guthrie J., Guthrie T., Shah P., Khojasteh A., Nair M.K., Hoelzer K., Tkaczuk K., Park Y.C., Lee L.W.: Reduced cardiotoxicity and preserved anti-tumor efficacy of liposome-encapsulated doxorubicin and cyclophosphamide compared with conventional doxorubicin and cyclophosphamide in a randomized, multicenter trial of metastatic breast cancer. *J. Clin. Oncol.*, 2001; 19: 1444–1454
- [9] Bertheau P., Plassa F., Espie M., Turpin E., de Roquancourt A., Marty M., Lerebours F., Beuzard Y., Janin A., de The H.: Effect of mutated TP53 on response of advanced breast cancers to high-dose chemotherapy. *Lancet*, 2002; 360: 852–854
- [10] Binaschi M., Bigioni M., Cipollone A., Rossi C., Goso C., Maggi C.A., Capranico G., Animati F.: Anthracyclines: selected new developments. *Curr. Med. Chem. Anticancer Agents*, 2001; 1: 113–130
- [11] Binaschi M., Capranico G., Dal Bo L., Zunino F.: Relationship between lethal effects and topoisomerase II-mediated double-stranded DNA breaks produced by anthracyclines with different sequence specificity. *Mol. Pharmacol.*, 1997; 51: 1053–1059
- [12] Binaschi M., Farinosi R., Borgnetto M.E., Capranico G.: *In vivo* site specificity and human isoenzyme selectivity of two topoisomerase II-poisoning anthracyclines. *Cancer Res.*, 2000; 60: 3770–3776
- [13] Bloch A.: Dynamics of interaction between DNA-specific antitumor agents and serum-contained cytokines in the initiation of ML-1 human myeloblastic leukemia cell differentiation. *Leukemia*, 1993; 7: 1219–1224
- [14] Borchmann P., Hubel K., Schnell R., Engert A.: Idarubicin: a brief overview on pharmacology and clinical use. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.*, 1997; 35: 80–83
- [15] Brana M.F., Cacho M., Gradillas A., de Pascual-Teresa B., Ramos A.: Intercalators as anticancer drugs. *Curr. Pharm. Des.*, 2001; 7: 1745–1780
- [16] Burke B.E., Olson R.D., Cusack B.J., Gambliel H.A., Dillmann W.H.: Anthracycline cardiotoxicity in transgenic mice overexpressing SR Ca²⁺-ATPase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2003; 303: 504–507
- [17] Chaires J.B.: Energetics of drug-DNA interactions. *Biopolymers*, 1997; 44: 201–215
- [18] Chaires J.B., Fox K.R., Herrera J.E., Britt M., Waring M.J.: Site and sequence specificity of the daunomycin-DNA interaction. *Biochemistry*, 1987; 26: 8227–8236
- [19] Chaires J.B., Herrera J.E., Waring M.J.: Preferential binding of daunomycin to 5'ATCG and 5'ATGC sequences revealed by footprinting titration experiments. *Biochemistry*, 1990; 29: 6145–6153
- [20] Chaires J.B., Satyanarayana S., Suh D., Fokt I., Przewloka T., Priebe W.: Parsing the free energy of anthracycline antibiotic binding to DNA. *Biochemistry*, 1996; 35: 2047–2053
- [21] Chenais B., Andriollo M., Guiraud P., Belhoussine R., Jeannesson P.: Oxidative stress involvement in chemically induced differentiation of K562 cells. *Free Radic. Biol. Med.*, 2000; 28: 18–27
- [22] Clementi M.E., Giardina B., Di Stasio E., Mordente A., Misiti F.: Doxorubicin-derived metabolites induce release of cytochrome C and inhibition of respiration on cardiac isolated mitochondria. *Anticancer Res.*, 2003; 23: 2445–2450
- [23] Cullinane C., Cutts S.M., van Rosmalen A., Phillips D.R.: Formation of adriamycin-DNA adducts *in vitro*. *Nucleic Acids Res.*, 1994; 22: 2296–2303

- [24] Cullinane C., Phillips D.R.: Induction of stable transcriptional blockage sites by adriamycin: GpC specificity of apparent adriamycin-DNA adducts and dependence on iron(III) ions. *Biochemistry*, 1990; 29: 5638–5646
- [25] Cullinane C., Phillips D.R.: Thermal stability of DNA adducts induced by cyanomorpholinoadriamycin *in vitro*. *Nucleic Acids Res.*, 1993; 21: 1857–1862
- [26] Cutts S.M., Swift L.P., Rephaeli A., Nudelman A., Phillips D.R.: Sequence specificity of adriamycin-DNA adducts in human tumor cells. *Mol. Cancer Ther.*, 2003; 2: 661–670
- [27] Czyż M., Szulawska A.: Indukowane różnicowanie komórek białaczkowych linii K562. *Post. Hig. Med. Dośw.*, 2005; 59: 82–97
- [28] Czyż M., Szulawska A., Bednarek A.K., Duchler M.: Effects of anthracycline derivatives on human leukemia K562 cell growth and differentiation. *Biochem. Pharmacol.*, 2005; 70: 1431–1442
- [29] DeFeo-Jones D., Garsky V.M., Wong B.K., Feng D.M., Bolyar T., Haskell K., Kiefer D.M., Leander K., McAvoy E., Lumma P., Wai J., Senderak E.T., Motzel S.L., Keenan K., Van Zwieten M., Lin J.H., Freidinger R., Huff J., Oliff A., Jones R.E.: A peptide-doxorubicin 'prodrug' activated by prostate-specific antigen selectively kills prostate tumor cells positive for prostate-specific antigen *in vivo*. *Nat. Med.*, 2000; 6: 1248–1252
- [30] de Groot F.M., Broxterman H.J., Adams H.P., van Vliet A., Tesser G.I., Elderkamp Y.W., Schraa A.J., Kok R.J., Molema G., Pinedo H.M., Scheeren H.W.: Design, synthesis, and biological evaluation of a dual tumor-specific motif containing integrin-targeted plasmin-cleavable doxorubicin prodrug. *Mol. Cancer Ther.*, 2002; 1: 901–911
- [31] Dimri G.P., Nakanishi M., Desprez P.Y., Smith J.R., Campisi J.: Inhibition of E2F activity by the cyclin-dependent protein kinase inhibitor p21 in cells expressing or lacking a functional retinoblastoma protein. *Mol. Cell Biol.*, 1996; 16: 2987–2997
- [32] Doroshov J.H., Synold T.W., Somlo G., Akman S.A., Gajewski E.: Oxidative DNA base modifications in peripheral blood mononuclear cells of patients treated with high-dose infusional doxorubicin. *Blood*, 2001; 97: 2839–2845
- [33] Drummond D.C., Meyer O., Hong K., Kirpotin D.B., Papahadjopoulos D.: Optimizing liposomes for delivery of chemotherapeutic agents to solid tumors. *Pharmacol. Rev.*, 1999; 51: 691–743
- [34] Dubois V., Dasnois L., Lebtahi K., Collet F., Heylen N., Havaux N., Fernandez A.M., Lobl T.J., Olyai C., Nieder M., Shochat D., Yarranton G.T., Trouet A.: CPI-0004Na, a new extracellularly tumor-activated prodrug of doxorubicin: *in vivo* toxicity, activity, and tissue distribution confirm tumor cell selectivity. *Cancer Res.*, 2002; 62: 2327–2331
- [35] Escobar P.F., Markman M., Zanotti K., Webster K., Belinson J.: Phase 2 trial of pegylated liposomal doxorubicin in advanced endometrial cancer. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 2003; 129: 651–654
- [36] Ettorre A., Cirilli M., Ughetto G.: Degradation of the morpholino ring in the crystal structure of cyanomorpholinodoxorubicin complexed with d(CGATCG). *Eur. J. Biochem.*, 1998; 258: 350–354
- [37] Farnham P.J., Slansky J.E., Kollmar R.: The role of E2F in the mammalian cell cycle. *Biochim. Biophys. Acta*, 1993; 1155: 125–131
- [38] Fassas A., Anagnostopoulos A.: The use of liposomal daunorubicin (DaunoXome) in acute myeloid leukemia. *Leuk. Lymphoma*, 2005; 46: 795–802
- [39] Fenick D.J., Taatjes D.J., Koch T.H.: Doxoform and Daunoform: anthracycline-formaldehyde conjugates toxic to resistant tumor cells. *J. Med. Chem.*, 1997; 40: 2452–2461
- [40] Fornari F.A. Jr, Jarvis D.W., Grant S., Orr M.S., Randolph J.K., White F.K., Gewirtz D.A.: Growth arrest and non-apoptotic cell death associated with the suppression of c-myc expression in MCF-7 breast tumor cells following acute exposure to doxorubicin. *Biochem. Pharmacol.*, 1996; 51: 931–940
- [41] Fornari F.A., Randolph J.K., Yalowich J.C., Ritke M.K., Gewirtz D.A.: Interference by doxorubicin with DNA unwinding in MCF-7 breast tumor cells. *Mol. Pharmacol.*, 1994; 45: 649–656
- [42] Frederick C.A., Williams L.D., Ughetto G., van der Marel G.A., van Boom J.H., Rich A., Wang A.H.: Structural comparison of anticancer drug-DNA complexes: adriamycin and daunomycin. *Biochemistry*, 1990; 29: 2538–2549
- [43] Gabizon A., Shmeeda H., Barenholz Y.: Pharmacokinetics of pegylated liposomal Doxorubicin: review of animal and human studies. *Clin. Pharmacokinet.*, 2003; 42: 419–436
- [44] Gale E.F., Cundliffe E., Reynolds P.E., Richmond M.H., Waring M.J.: The molecular basis of antibiotic action. Wiley, New York 1981, 258–401
- [45] Gamba-Vitalo C., Blair O.C., Tritton T.R., Lane P.A., Carbone R., Sartorelli A.C.: Cytotoxicity and differentiating actions of adriamycin in WEHI-3B D+ leukemia cells. *Leukemia*, 1987; 1: 188–197
- [46] Gao Y.G., Priebe W., Wang A.H.: Substitutions at C2' of daunosamine in the anticancer drug daunorubicin alter its DNA-binding sequence specificity. *Eur. J. Biochem.*, 1996; 240: 331–335
- [47] Gariboldi M.B., Ravizza R., Riganti L., Meschini S., Calcabrini A., Marra M., Arancia G., Dolfini E., Monti E.: Molecular determinants of intrinsic resistance to doxorubicin in human cancer cell lines. *Int. J. Oncol.*, 2003; 22: 1057–1064
- [48] Geroni C., Ripamonti M., Arrigoni C., Fiorentini F., Capolongo L., Moneta D., Marchini S., Della Torre P., Albanese C., Lamparelli M.G., Ciomei M., Rossi R., Caruso M.: Pharmacological and toxicological aspects of 4-demethoxy-3'-deamino-3'-aziridinyl-4'-methylsulphonyl-daunorubicin (PNU-159548): a novel antineoplastic agent. *Cancer Res.*, 2001; 61: 1983–1990
- [49] Gewirtz D.A.: A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. *Biochem. Pharmacol.*, 1999; 57: 727–741; oraz artykuły cytowane w tym przeglądzie
- [50] Gill P.S., Espina B.M., Muggia F., Cabriaes S., Tulpule A., Esplin J.A., Liebman H.A., Forssen E., Ross M.E., Levine A.M.: Phase I/II clinical and pharmacokinetic evaluation of liposomal daunorubicin. *J. Clin. Oncol.*, 1995; 13: 996–1003
- [51] Gille L., Nohl H.: Analyses of the molecular mechanism of adriamycin-induced cardiotoxicity. *Free Radic. Biol. Med.*, 1997; 23: 775–782
- [52] Gillet R., Bobichon H., Trentesaux C.: Nuclear transcription factor GATA-1 is activated during acylacetynomycin-induced erythroid differentiation. *Biol. Cell*, 2002; 94: 267–273
- [53] Gniazdowski M., Cera C.: The effects of DNA covalent adducts on *in vitro* transcription. *Chem. Rev.*, 1996; 96: 619–634
- [54] Gniazdowski M., Denny W.A., Nelson S.M., Czyż M.: Transcription factors as targets for DNA-interacting drugs. *Curr. Med. Chem.*, 2003; 10: 909–924
- [55] Gniazdowski M., Szmigiero L.: Molekularne mechanizmy oddziaływania związków przeciwnowotworowych na DNA. *Na Pograniczu Chemii i Biologii*, 2003; 7: 45–73
- [56] Grant D.S., Williams T.L., Zahaczewsky M., Dicker A.P.: Comparison of antiangiogenic activities using paclitaxel (taxol) and docetaxel (taxotere). *Int. J. Cancer*, 2003; 104: 121–129
- [57] Green P.S., Leeuwenburgh C.: Mitochondrial dysfunction is an early indicator of doxorubicin-induced apoptosis. *Biochim. Biophys. Acta*, 2002; 1588: 94–101
- [58] Guano F., Pourquier P., Tinelli S., Binaschi M., Bigioni M., Animati F., Manzini S., Zunino F., Kohlhaagen G., Pommier Y., Capranico G.: Topoisomerase poisoning activity of novel disaccharide anthracyclines. *Mol. Pharmacol.*, 1999; 56: 77–84
- [59] Halford S., Yip D., Karapetis C.S., Strickland A.H., Steger A., Khawaja H.T., Harper P.G.: A phase II study evaluating the tolerability and efficacy of CAELYX (liposomal doxorubicin, Doxil) in the treatment of unresectable pancreatic carcinoma. *Ann. Oncol.*, 2001; 12: 1399–1402
- [60] Harris L., Batist G., Belt R., Rovira D., Navari R., Azarnia N., Welles L., Winer E.: TLC D-99 Study Group. Liposome-encapsulated doxorubicin compared with conventional doxorubicin in a randomized multicenter trial as first-line therapy of metastatic breast carcinoma. *Cancer*, 2002; 94: 25–36
- [61] Harrison P.M., Arosio P.: The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation. *Biochim. Biophys. Acta*, 1996; 1275: 161–203
- [62] Iliskovic N., Singal P.K.: Lipid lowering: an important factor in preventing adriamycin-induced heart failure. *Am. J. Pathol.*, 1997; 150: 727–734
- [63] Jeannesson P., Lahlil R., Chenais B., Devy L., Gillet R., Aries A., Morceau F., Trentesaux C.: Anthracycline as tumor cell differentiating agents: effects on the regulation of erythroid gene expression. *Leuk. Lymphoma*, 1997; 26: 575–587
- [64] Jeannesson P., Trentesaux C., Gerard B., Jardillier J.C., Ross K.L., Tokes Z.A.: Induction of erythroid differentiation in human leukemic K562 cells by membrane-directed action of adriamycin covalently bound to microspheres. *Cancer Res.*, 1990; 50: 1231–1236
- [65] Jeyaseelan R., Poizat C., Baker R.K., Abdishov S., Isterabadi L.B., Lyons G.E., Kedes L.: A novel cardiac-restricted target for doxorubicin. CARP, a nuclear modulator of gene expression in cardiac progenitor cells and cardiomyocytes. *J. Biol. Chem.*, 1997; 272: 22800–22808
- [66] Johnston S.R., Gore M.E.: Caelyx: phase II studies in ovarian cancer. *Eur. J. Cancer*, 2001; 37(Suppl.9): S8–S14

- [67] Kang Y.J., Zhou Z.X., Wang G.W., Buridi A., Klein J.B.: Suppression by metallothionein of doxorubicin-induced cardiomyocyte apoptosis through inhibition of p38 mitogen-activated protein kinases. *J. Biol. Chem.*, 2000; 275: 13690–13698
- [68] Kastan M.B., Onyekwere O., Sidransky D., Vogelstein B., Craig R.W.: Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res.*, 1991; 51: 6304–6311
- [69] Kelman Z.: PCNA: structure, functions and interactions. *Oncogene*, 1997; 14: 629–640
- [70] Kim Y., Ma A.G., Kitta K., Fitch S.N., Ikeda T., Ihara Y., Simon A.R., Evans T., Suzuki Y.J.: Anthracycline-induced suppression of GATA-4 transcription factor: implication in the regulation of cardiac myocyte apoptosis. *Mol. Pharmacol.*, 2003; 63: 368–377
- [71] Koukourakis M.I., Koukouraki S., Fezoulidis I., Kelekis N., Kyrias G., Archimandritis S., Karkavitsas N.: High intratumoural accumulation of stealth liposomal doxorubicin (Caelyx) in glioblastomas and in metastatic brain tumours. *Br. J. Cancer*, 2000; 83: 1281–1286
- [72] Kwok J.C., Richardson D.R.: Anthracyclines induce accumulation of iron in ferritin in myocardial and neoplastic cells: inhibition of the ferritin iron mobilization pathway. *Mol. Pharmacol.*, 2003; 63: 849–861
- [73] Kwok J.C., Richardson D.R.: Examination of the mechanism(s) involved in doxorubicin-mediated iron accumulation in ferritin: studies using metabolic inhibitors, protein synthesis inhibitors, and lysosomotropic agents. *Mol. Pharmacol.*, 2004; 65: 181–195
- [74] Langlois d' Estaintot B., Gallois B., Brown T., Hunter W.N.: The molecular structure of a 4'-epiadriramycin complex with d(TGATCA) at 1.7Å resolution: comparison with the structure of 4'-epiadriramycin d(TGTACA) and d(CGATCG) complexes. *Nucleic Acids Res.*, 1992; 20: 3561–3566
- [75] Laurent G., Jaffrezou J.P.: Signaling pathways activated by daunorubicin. *Blood*, 2001; 98: 913–924
- [76] Leng F., Priebe W., Chaires J.B.: Ultra-tight DNA binding of a new bisintercalating anthracycline antibiotic. *Biochemistry*, 1998; 37: 1743–1753
- [77] Leng F., Savkur R., Fokt I., Przewłoka T., Priebe W., Chaires J.B.: Base Specific and Regioselective Chemical cross-linking of daunorubicin to DNA. *J. American Chem. Soci.*, 1996; 118: 4731–4739
- [78] Licata S., Saponiero A., Mordente A., Minotti G.: Doxorubicin metabolism and toxicity in human myocardium: role of cytoplasmic deglycosidation and carbonyl reduction. *Chem. Res. Toxicol.*, 2000; 13: 414–420
- [79] Lothstein L., Israel M., Sweatman T.W.: Anthracycline drug targeting: cytoplasmic versus nuclear – a fork in the road. *Drug Resist. Updat.*, 2001; 4: 169–177
- [80] Luzzio C.B., Luzzio B.B.: Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia-chromosome. *Blood*, 1975; 45: 321–334
- [81] Mansilla S., Priebe W., Portugal J.: Sp1-targeted inhibition of gene transcription by WP631 in transfected lymphocytes. *Biochemistry*, 2004; 43: 7584–7592
- [82] Marnett L.J.: Oxy radicals, lipid peroxidation and DNA damage. *Toxicology*, 2002; 181–182: 219–222
- [83] Martin D., Salinas M., Fujita N., Tsuruo T., Cuadrado A.: Ceramide and reactive oxygen species generated by H₂O₂ induce caspase-3-independent degradation of Akt/protein kinase B. *J. Biol. Chem.*, 2002; 277: 42943–42952
- [84] Martin F.J.: Clinical pharmacology and antitumor efficacy of DOXIL (pegylated liposomal doxorubicin), in *Medical Applications of Liposomes*. Elsevier Science Inc., New York 1998, 635–688
- [85] McBride N.C., Cavenagh J.D., Ward M.C., Grant I., Schey S., Gray A., Hughes A., Mills M.J., Cervi P., Newland A.C., Kelsey S.M.: Liposomal daunorubicin (DaunoXome) in combination with cyclophosphamide, vincristine and prednisolone (COP-X) as salvage therapy in poor-prognosis non-Hodgkins lymphoma. *Leuk. Lymphoma*, 2001; 42: 89–98
- [86] Minotti G., Menna P., Salvatorelli E., Cairo G., Gianni L.: Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacol. Rev.*, 2004; 56: 185–229
- [87] Minotti G., Ronchi R., Salvatorelli E., Menna P., Cairo G.: Doxorubicin irreversibly inactivates iron regulatory proteins 1 and 2 in cardiomyocytes: evidence for distinct metabolic pathways and implications for iron-mediated cardiotoxicity of antitumor therapy. *Cancer Res.*, 2001; 61: 8422–8428
- [88] Moase E.H., Qi W., Ishida T., Gabos Z., Longenecker B.M., Zimmermann G.L., Ding L., Krantz M., Allen T.M.: Anti-MUC-1 immunoliposomal doxorubicin in the treatment of murine models of metastatic breast cancer. *Biochim. Biophys. Acta*, 2001; 1510: 43–55
- [89] Mohrbacher A.F., Gregory S.A., Gabriel D.A., Rusk J.M., Giles F.J.: Liposomal daunorubicin (DaunoXome) plus dexamethasone for patients with multiple myeloma. A phase II International Oncology Study Group study. *Cancer*, 2002; 94: 2645–2652
- [90] Morceau F., Chenais B., Gillet R., Jardillier J.C., Jeannesson P., Trentesaux C.: Transcriptional and posttranscriptional regulation of erythroid gene expression in anthracycline-induced differentiation of human erythroleukemic cells. *Cell Growth Differ.*, 1996; 7: 1023–1029
- [91] Mordente A., Minotti G., Martorana G.E., Silvestrini A., Giardina B., Meucci E.: Anthracycline secondary alcohol metabolite formation in human or rabbit heart: biochemical aspects and pharmacologic implications. *Biochem. Pharmacol.*, 2003; 66: 989–998
- [92] Morin M.J., Sartorelli A.C.: Inhibition of glycoprotein biosynthesis by the inducers of HL-60 cell differentiation, aclacinomycin A and marcellomycin. *Cancer Res.*, 1984; 44: 2807–2812
- [93] Muller C., Chatelut E., Gualano V., De Forni M., Huguet F., Attal M., Canal P., Laurent G.: Cellular pharmacokinetics of doxorubicin in patients with chronic lymphocytic leukemia: comparison of bolus administration and continuous infusion. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 1993; 32: 379–384
- [94] Munger C., Ellis A., Woods K., Randolph J., Yanovich S., Gewirtz D.: Evidence for inhibition of growth related to compromised DNA synthesis in the interaction of daunorubicin with H-35 rat hepatoma. *Cancer Res.*, 1988; 48: 2404–2411
- [95] Nabholz J.M., Falkson C., Campos D., Szanto J., Martin M., Chan S., Pienkowski T., Zaluski J., Pinter T., Krzakowski M., Vorobiof D., Leonard R., Kennedy I., Azli N., Murawsky M., Riva A., Pouillart P.: TAX 306 Study Group. Docetaxel and doxorubicin compared with doxorubicin and cyclophosphamide as first-line chemotherapy for metastatic breast cancer: results of a randomized, multicenter, phase III trial. *J. Clin. Oncol.*, 2003; 21: 968–975
- [96] Nagy A., Armatis P., Schally A.V.: High yield conversion of doxorubicin to 2-pyrrolinodoxorubicin, an analog 500-1000 times more potent: structure-activity relationship of daunosamine-modified derivatives of doxorubicin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996; 93: 2464–2469
- [97] Neri G. C., Bandinelli M., Neri B.: Free-radical production and nucleotide loss in anthracycline-induced cardiac damage. *Med. Sci. Res.*, 1993; 21: 905–907
- [98] Niedernhofer L.J., Daniels J.S., Rouzer C.A., Greene R.E., Marnett L.J.: Malondialdehyde, a product of lipid peroxidation, is mutagenic in human cells. *J. Biol. Chem.*, 2003; 278: 31426–31433
- [99] Nunez M., Saballs P., Valencia M.E., Santos J., Ferrer E., Santos I., Berrocal A., Galindo M.J., Podzameczer D., Gonzalez-Lahoz J.: Caelyx/KS Spanish Study Group. Response to liposomal doxorubicin and clinical outcome of HIV-1-infected patients with Kaposi's sarcoma receiving highly active antiretroviral therapy. *HIV Clin. Trials*, 2001; 2: 429–437
- [100] Nyoung M.N., Trentesaux C., Aries A., Carpentier Y., Jardillier J.C., Gorisse M.C., Jeannesson P.: Effect of aclacinomycin-doxorubicin association on differentiation and growth of human erythroleukemic K562 cells. *Anticancer Res.*, 1994; 14: 1203–1208
- [101] Oliński R., Jaruga P., Foksinski M., Bialkowski K., Tujakowski J.: Epirubicin-induced oxidative DNA damage and evidence for its repair in lymphocytes of cancer patients who are undergoing chemotherapy. *Mol. Pharmacol.*, 1997; 52: 882–885
- [102] Oliński R., Jurgowiak M.: Rola reaktywnych form tlenu w procesach mutagenozy i karcynogenezy. *Post. Biochem.*, 1999; 45: 50–58
- [103] Olson R.D., Li X., Palade P., Shadle S.E., Mushlin P.S., Gambliel H.A., Fill M., Boucek R.J. Jr, Cusack B.J.: Sarcoplasmic reticulum calcium release is stimulated and inhibited by daunorubicin and daunorubicinol. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2000; 169: 168–176
- [104] Pacher P., Liaudet L., Bai P., Mabley J.G., Kaminski P.M., Virag L., Deb A., Szabo E., Ungvari Z., Wolin M.S., Groves J.T., Szabo C.: Potent metalloporphyrin peroxynitrite decomposition catalyst protects against the development of doxorubicin-induced cardiac dysfunction. *Circulation*, 2003; 107: 896–904
- [105] Panaretakis T., Pokrovskaja K., Shoshan M.C., Grander D.: Activation of Bak, Bax, and BH3-only proteins in the apoptotic response to doxorubicin. *J. Biol. Chem.*, 2002; 277: 44317–44326
- [106] Park J.W., Hong K., Kirpotin D.B., Colbern G., Shalaby R., Baselga J., Shao Y., Nielsen U.B., Marks J.D., Moore D., Papahadjopoulos D., Benz C.C.: Anti-HER2 immunoliposomes: enhanced efficacy attributable to targeted delivery. *Clin. Cancer Res.*, 2002; 8: 1172–1181
- [107] Pastorino F., Brignole C., Marimpietri D., Cilli M., Gambini C., Ribatti D., Longhi R., Allen T.M., Corti A., Ponzoni M.: Vascular damage and anti-angiogenic effects of tumor vessel-targeted liposomal chemotherapy. *Cancer Res.*, 2003; 63: 7400–7409

- [108] Penault-Llorca F., Cayre A., Bouchet Mishellany F., Amat S., Feille V., Le Bouedec G., Ferriere J.P., De Latour M., Chollet P.: Induction chemotherapy for breast carcinoma: predictive markers and relation with outcome. *Int. J. Oncol.*, 2003; 22: 1319–1325
- [109] Perrin L.C., Cullinane C., Kimura K., Phillips D.R.: Barminomycin forms GC-specific adducts and virtual interstrand crosslinks with DNA. *Nucleic Acids Res.*, 1999; 27: 1781–1787
- [110] Plastaras J.P., Dedon P.C., Marnett L.J.: Effects of DNA structure on oxopropenylation by the endogenous mutagens malondialdehyde and base propenal. *Biochemistry*, 2002; 41: 5033–5042
- [111] Portugal J., Martin B., Vaquero A., Ferrer N., Villamarin S., Priebe W.: Analysis of the effects of daunorubicin and WP631 on transcription. *Curr. Med. Chem.*, 2001; 8: 1–8
- [112] Poulaki V., Mitsiades C.S., Jousseaume A.M., Lappas A., Kirchhof B., Mitsiades N.: Constitutive nuclear factor-kappaB activity is crucial for human retinoblastoma cell viability. *Am. J. Pathol.*, 2002; 161: 2229–2240
- [113] Quigley G.J., Wang A.H., Ughetto G., van der Marel G., van Boom J.H., Rich A.: Molecular structure of an anticancer drug-DNA complex: daunomycin plus d(CpGpTpApCpG). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1980; 77: 7204–7208
- [114] Reinert K.E.: Anthracycline-binding induced DNA stiffening, bending and elongation; stereochemical implications from viscometric investigations. *Nucleic Acids Res.*, 1983; 11: 3411–3430
- [115] Ripamonti M., Capolongo L., Melegaro G., Gornati C., Bargiotti A., Caruso M., Grandi M., Suarato A.: Morpholinylanthracyclines: cytotoxicity and antitumor activity of differently modified derivatives. *Invest. New Drugs*, 1996; 14: 139–146
- [116] Rivera E., Valero V., Esteve F.J., Syrewicz L., Cristofanilli M., Rahman Z., Booser D.J., Hortobagyi G.N.: Lack of activity of stealth liposomal doxorubicin in the treatment of patients with anthracycline-resistant breast cancer. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 2002; 49: 299–302
- [117] Robert J.: Epirubicin. *Clinical pharmacology and dose-effect relationship. Drugs*, 1993; 45(Suppl.2): 20–30
- [118] Robinson N.C.: Functional binding of cardiolipin to cytochrome c oxidase. *J. Bioenerg. Biomembr.*, 1993; 25: 153–163
- [119] Rocchi P., Ferreri A.M., Simone G., Bagnara G.P., Paolucci G.: Neuronal cell differentiation of human neuroblastoma cells by inducing agents in combination. *Anticancer Res.*, 1991; 11: 1885–1889
- [120] Rocchi P., Ferreri A.M., Simone G., Prodi G.: Epirubicin-induced differentiation of human neuroblastoma cells *in vitro*. *Anticancer Res.*, 1987; 7: 247–250
- [121] Ruiz-Ruiz C., Robledo G., Cano E., Redondo J.M., Lopez-Rivas A.: Characterization of p53-mediated up-regulation of CD95 gene expression upon genotoxic treatment in human breast tumor cells. *J. Biol. Chem.*, 2003; 278: 31667–31675
- [122] Schaefer A., Dahle M., Radenz G., Steinheider G., Marquardt H.: Structure-activity relationship between anthracycline-induced differentiation and inhibition of glycoprotein synthesis in Friend erythroleukemia cells. *Leukemia*, 1991; 5: 95–100
- [123] Schaefer A., Dressel A., Lingelbach K., Schmidt C.A., Steinheider G., Marquardt H.: Induction of differentiation in Friend-erythroleukemia cells by aclacinomycin A: early transient decrease in c-myc and c-myc mRNA levels. *Leukemia*, 1992; 6: 828–833
- [124] Schengrund C.L., Sheffler B.A.: Biochemical and morphological study of adriamycin-induced changes in murine neuroblastoma cells. *Oncology*, 1982; 39: 185–190
- [125] Schott B., Robert J.: Comparative cytotoxicity, DNA synthesis inhibition and drug incorporation of eight anthracyclines in a model of doxorubicin-sensitive and -resistant rat glioblastoma cells. *Biochem. Pharmacol.*, 1989; 38: 167–172
- [126] Searle M.S., Hall J.G., Denny W.A., Wakelin L.P.: NMR studies of the interaction of the antibiotic nogalamycin with the hexadeoxyribonucleotide duplex d(5'-GCATGC)2. *Biochemistry*, 1988; 27: 4340–4349
- [127] Seymour L.W., Ferry D.R., Anderson D., Hesslewood S., Julian P.J., Poyner R., Doran J., Young A.M., Burtles S., Kerr D.J., Cancer Research Campaign Phase I/II Clinical Trials Committee: Hepatic drug targeting: phase I evaluation of polymer-bound doxorubicin. *J. Clin. Oncol.*, 2002; 20: 1668–1676
- [128] Sheikh M.S., Li X.S., Chen J.C., Shao Z.M., Ordóñez J.V., Fontana J.A.: Mechanisms of regulation of WAF1/Cip1 gene expression in human breast carcinoma: role of p53-dependent and independent signal transduction pathways. *Oncogene*, 1994; 9: 3407–3415
- [129] Siegfried J.M., Sartorelli A.C., Tritton T.R.: Evidence for the lack of relationship between inhibition of nucleic acid synthesis and cytotoxicity of adriamycin. *Cancer Biochem. Biophys.*, 1983; 6: 137–142
- [130] Singal P.K., Deally C.M., Weinberg L.E.: Subcellular effects of adriamycin in the heart: a concise review. *J. Mol. Cell Cardiol.*, 1987; 19: 817–828
- [131] Singer B.: Fidelity in transcription assessed by DNA-dependent RNA polymerases. *Biochimie*, 1982; 64: 599–601
- [132] Smith C.K., Davies G.J., Dodson E.J., Moore M.H.: DNA-nogalamycin interactions: the crystal structure of d(TGATCA) complexed with nogalamycin. *Biochemistry*, 1995; 34: 415–425
- [133] Stahl M., Dijkers P.F., Kops G.J., Lens S.M., Coffey P.J., Burgering B.M., Medema R.H.: The forkhead transcription factor FoxO regulates transcription of p27Kip1 and Bim in response to IL-2. *J. Immunol.*, 2002; 168: 5024–5031
- [134] Starzyński R.R., Lipiński P.: IRP1, białko kontrolujące homeostazę żelaza w komórkach ssaków: regulacja jego aktywności przez jony żelaza i tlenek azotu. *Post. Biol. Kom.*, 2003; 30: 497–514
- [135] Steinherz L.J., Steinherz P.G., Tan C.T., Heller G., Murphy M.L.: Cardiac toxicity 4 to 20 years after completing anthracycline therapy. *J.A.M.A.*, 1991; 266: 1672–1677
- [136] Stocker U., Schaefer A., Marquardt H.: DMSO-like rapid decrease in c-myc and c-myc mRNA levels and induction of differentiation in HL-60 cells by the anthracycline antitumor antibiotic aclarubicin. *Leukemia*, 1995; 9: 146–154
- [137] Storm G., Steerenberg P.A., Emmen F., van Borssum Waalkes M., Crommelin D.J.: Release of doxorubicin from peritoneal macrophages exposed *in vivo* to doxorubicin-containing liposomes. *Biochim. Biophys. Acta*, 1988; 965: 136–145
- [138] Studzian K., Wasowska M., Piestrzeniewicz M.K., Wilmanska D., Szmigiero L., Oszczapowicz I., Gniazdowski M.: Inhibition of RNA synthesis *in vitro* and cell growth by anthracycline antibiotics. *Neoplasma*, 2001; 48: 412–418
- [139] Suh D., Oh Y.K., Hur M.W., Ahn B., Chaires J.B.: Daunomycin binding to deoxypolynucleotides with alternating sequences: complete thermodynamic profiles of heterogeneous binding sites. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, 2002; 21: 637–649
- [140] Supino R., Mariani M., Colombo A., Prosperi E., Croce A.C., Bottiroli G.: Comparative studies on the effects of doxorubicin and differentiation inducing agents on B16 melanoma cells. *Eur. J. Cancer*, 1992; 28A: 778–783
- [141] Szulawska A., Gniazdowski M., Czyż M.: Sequence specificity of formaldehyde-mediated covalent binding of anthracycline derivatives to DNA. *Biochem. Pharmacol.*, 2005; 69: 7–18
- [142] Taatjes D.J., Fenick D.J., Koch T.H.: Nuclear targeting and nuclear retention of anthracycline-formaldehyde conjugates implicates DNA covalent bonding in the cytotoxic mechanism of anthracyclines. *Chem. Res. Toxicol.*, 1999; 12: 588–596
- [143] Taatjes D.J., Gaudiano G., Koch T.H.: Production of formaldehyde and DNA-adriamycin or DNA-daunomycin adducts, initiated through redox chemistry of dithiothreitol/iron, xanthine oxidase/NADH/iron, or glutathione/iron. *Chem. Res. Toxicol.*, 1997; 10: 953–961
- [144] Taatjes D.J., Gaudiano G., Resing K., Koch T.H.: Alkylation of DNA by the anthracycline, antitumor drugs adriamycin and daunomycin. *J. Med. Chem.*, 1996; 39: 4135–4138
- [145] Taatjes D.J., Gaudiano G., Resing K., Koch T.H.: Redox pathway leading to the alkylation of DNA by the anthracycline, antitumor drugs adriamycin and daunomycin. *J. Med. Chem.*, 1997; 40: 1276–1286
- [146] Taatjes D.J., Koch T.H.: Nuclear targeting and retention of anthracycline antitumor drugs in sensitive and resistant tumor cells. *Curr. Med. Chem.*, 2001; 8: 15–29
- [147] Tanaka M., Yoshida S.: Mechanism of the inhibition of calf thymus DNA polymerases alpha and beta by daunomycin and adriamycin. *J. Biochem.*, 1980; 87: 911–918
- [148] Testa U., Pelosi E., Peschle C.: The transferrin receptor. *Cit. Rev. Oncol.*, 1993; 4: 241–276
- [149] Thomas A.L., O'Byrne K., Furber L., Jeffery K., Steward W.P.: A phase II study of caelyx, liposomal doxorubicin: lack of activity in patients with advanced gastric cancer. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 2001; 48: 266–268
- [150] Toffoli G., Viel A., Bevilacqua C., Maestro R., Tumiottio L., Boiocchi M.: In K562 leukemia cells treated with doxorubicin and hemin, a decrease in c-myc mRNA expression correlates with loss of self-renewal capability but not with erythroid differentiation. *Leuk. Res.*, 1989; 13: 279–287

- [151] Tokarska-Schlattner M., Wallimann T., Schlattner U.: Multiple interference of anthracyclines with mitochondrial creatine kinases: preferential damage of the cardiac isoenzyme and its implications for drug cardiotoxicity. *Mol. Pharmacol.*, 2002; 61: 516–523
- [152] Tonini G.P., Radzioch A., Gronberg A., Clayton M., Blasi E., Benetton G., Varesio L.: Erythroid differentiation and modulation of c-myc expression induced by antineoplastic drugs in the human leukemic cell line K562. *Cancer Res.*, 1987; 47: 4544–4547
- [153] Trentesaux C., Nyoung M.N., Aries A., Morceau F., Ronchi A., Ottolenghi S., Jardillier J.C., Jeannesson P.: Increased expression of GATA-1 and NFE-2 erythroid-specific transcription factor during acalynomycin-mediated differentiation of human erythroleukemic cells. *Leukemia*, 1993; 7: 452–457
- [154] Trouet A., Passiukov A., Van derpoorten K., Fernandez A.M., Abarca-Quinones J., Baurain R., Lobl T.J., Oliyai C., Shochat D., Dubois V.: Extracellularly tumor-activated prodrugs for the selective chemotherapy of cancer: application to doxorubicin and preliminary *in vitro* and *in vivo* studies. *Cancer Res.*, 2001; 61: 2843–2846
- [155] Tuteja N., Phan T.N., Tuteja R., Ochem A., Falaschi A.: Inhibition of DNA unwinding and ATPase activities of human DNA helicase II by chemotherapeutic agents. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1997; 236: 636–640
- [156] van Rosmalen A., Cullinane C., Cutts S.M., Phillips D.R.: Stability of adriamycin-induced DNA adducts and interstrand crosslinks. *Nucleic Acids Res.*, 1995; 23: 42–50
- [157] Vasquez-Vivar J., Martasek P., Hogg N., Masters B.S., Pritchard K.A. Jr, Kalyanaram B.: Endothelial nitric oxide synthase-dependent superoxide generation from adriamycin. *Biochemistry*, 1997; 36: 11293–11297
- [158] Wang S., Kotamraju S., Konorev E., Kalivendi S., Joseph J., Kalyanaram B.: Activation of nuclear factor-kappaB during doxorubicin-induced apoptosis in endothelial cells and myocytes is proapoptotic: the role of hydrogen peroxide. *Biochem. J.*, 2002; 367: 729–740
- [159] Weiss R.B.: The anthracyclines: will we ever find a better doxorubicin? *Semin. Oncol.*, 1992; 19: 670–686
- [160] White R.J., Phillips D.R.: Sequence-dependent termination of bacteriophage T7 transcription *in vitro* by DNA-binding drugs. *Biochemistry*, 1989; 28: 4277–4283
- [161] Williams L.D., Egli M., Qi G., Bash P., van der Marel G.A., van Boom J.H., Rich A., Frederick C.A.: Structure of nogalamycin bound to a DNA hexamer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1990; 87: 2225–2229
- [162] Yamaoka M., Yamaguchi S., Suzuki T., Okuyama M., Nitobe J., Nakamura N., Mitsui Y., Tomoike H.: Apoptosis in rat cardiac myocytes induced by Fas ligand: priming for Fas-mediated apoptosis with doxorubicin. *J. Mol. Cell Cardiol.*, 2000; 32: 881–889
- [163] Zastawny T.H.: Oksydacyjne uszkodzenia DNA – wolnorodnikowe modyfikacje zasad i deoksyrybozy. *Post. Biochem.*, 1997; 43: 238–250
- [164] Zeman S.M., Phillips D.R., Crothers D.M.: Characterization of covalent adriamycin-DNA adducts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998; 95: 11561–11565
- [165] Zha J., Harada H., Yang E., Jockel J., Korsmeyer S.J.: Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L). *Cell*, 1996; 87: 619–628
- [166] Zucchi R., Danesi R.: Cardiac toxicity of antineoplastic anthracyclines. *Curr. Med. Chem. Anticancer Agents*, 2003; 3: 151–171
- [167] Zwelling L.A., Altschuler E., Cherif A., Farquhar D.: N-(5,5-diacetoxypentyl)doxorubicin: a novel anthracycline producing DNA interstrand cross-linking and rapid endonucleolytic cleavage in human leukemia cells. *Cancer Res.*, 1991; 51: 6704–6707