

Received: 2013.11.13
Accepted: 2014.12.19
Published: 2015.05.04

Inhibitory polimeryzacji mikrotubul – nowe związki pochodzenia naturalnego jako potencjalne leki przeciwnowotworowe

Inhibitors of microtubule polymerization- new natural compounds as potential anti-cancer drugs

Aneta Rogalska, Klaudia Miśkiewicz, Agnieszka Marczak

Katedra Termobiologii, Instytut Biofizyki, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki

Streszczenie

Inhibitory polimeryzacji mikrotubul to związki, które przez wiązanie się do dimeru tubuliny uniemożliwiają prawidłowy przebieg podziału komórki i wprowadzają ją na drogę śmierci komórkowej. Powodują hamowanie mitozy, oddziałują na cytoszkielet oraz zaburzają proces angiogenezy. Do inhibitorów polimeryzacji mikrotubul należą substancje naturalne, syntetyczne i półsyntetyczne analogi. Obejmują grupy związków mających zdolność wiązania do vinca alkaloidowej i kolchicynowej domeny na tubulinie β . Wyróżnia się wśród nich alkaloidy vinca, dolastatyny i halichondryny łączące się z domeną vinca alkaloidową oraz kombretastatyny wiążące domenę kolchicynową białka. Komórki guza wykazując się większą proliferacją są jednocześnie bardziej wrażliwe na uszkodzenia mikrotubul przez inhibitory, dzięki czemu znalazły szerokie zastosowanie w leczeniu nowotworów.

Słowa kluczowe:

leki przeciwnowotworowe • chemioterapia • inhibitory polimeryzacji mikrotubul • alkaloidy vinca • dolastatyny • halichondryny • kombretastatyny

Summary

Inhibitors of microtubule polymerization are compounds which, by binding to the tubulin dimer, prevent the normal course of cell division and lead to cell death. They cause inhibition of mitosis, affect the cytoskeleton and disrupt the process of angiogenesis. Inhibitors of microtubule polymerization include natural substances, synthetic and semi-synthetic analogs. They contain a group of compounds having the ability to bind to the vinca alkaloid and colchicine domain of β -tubulin. Among them are vinca alkaloids, dolastatins and halichondrins, which connect to the vinca alkaloids domain, and combretastatins binding the colchicine site of protein. Tumor cells have greater capacity for cell proliferation and are also more susceptible to damage by microtubule inhibitors. Their action has been widely used in cancer therapy.

Key words:

anticancer drugs • chemotherapy • inhibitors of microtubule polymerization • vinca alkaloids • dolastatins • halichondrins • combretastatins

Full-text PDF: <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1151293>

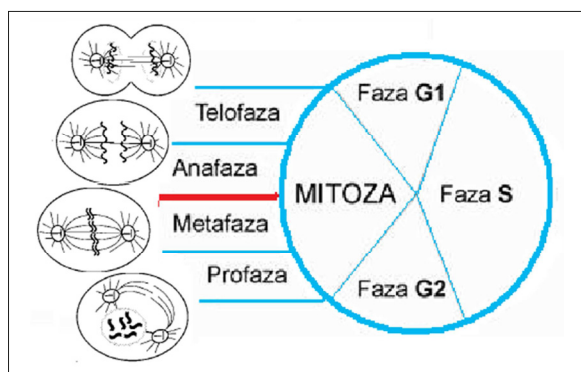
Word count: 4925
Tables: 2
Figures: 26
References: 81

Adres autorki: dr Aneta Rogalska, Katedra Termobiologii, Instytut Biofizyki, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki, Pomorska 141/143, 90-236 Łódź; e-mail: zychan@biol.uni.lodz.pl

WSTĘP

Mikrotubule są zbudowane z białek tubuliny α i β , które połączone w dimer wiążą cząsteczkę guanozynotrifosforanu (GTP, guanosine triphosphate). Polimeryzacja mikrotubul jest procesem odwracalnym i zachodzi z wykorzystaniem energii pochodzącej z hydrolizy GTP [15,24,60,71]. Powstałe w ten sposób podjednostki są dołączane do tworzonej mikrotubuli [9].

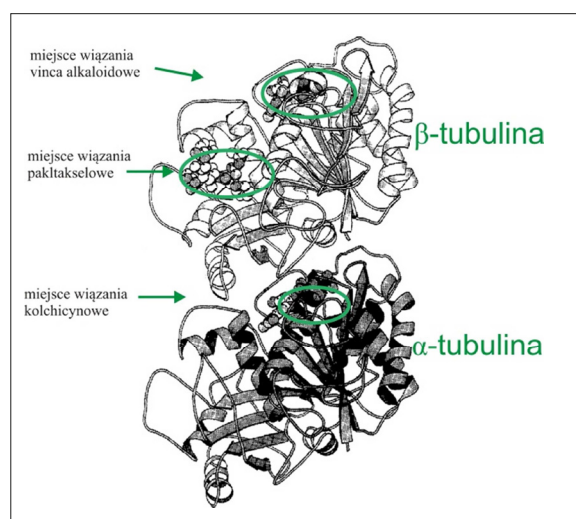
Mikrotubule pełnią różnorodne funkcje. Tworzą cytoskielet komórki, umożliwiają wewnętrzny transport, ruchliwość, a także budują wrzeciono podziałowe nadając komórce odpowiednią elastyczność niezbędną do podziału. W czasie podziału mitotycznego szybkość tych procesów wzrasta nawet stukrotnie. Podczas mitozy ulegają stale polimeryzacji i depolimeryzacji umożliwiając rozdział chromosomów metafazowych (ryc.1). Jeśli dynamika mikrotubul zostanie zaburzona, następuje zatrzymanie komórek w fazie mitozy na granicy metafazy i anafazy, co prowadzi do śmierci komórki w wyniku m.in. apoptozy lub katastrofy mitotycznej.



Ryc.1. Schemat podziału komórki (wg [42], zmodyfikowano)

Na dimerach mikrotubul można wyróżnić trzy charakterystyczne miejsca wiązania związków, które hamują aktywność mikrotubul. Są to: domena vinca alkaloidowa, znajdująca się w pobliżu miejsca wiązania GTP na β -tubulinie, domena kolchicynowa, tworzona w miejscu łączenia się podjednostek heretodimerów α i β tubuliny oraz występująca w rejonie interfilamentarnym β -tubuliny, domena paklitakselowa (ryc. 2). Różne związki chemiczne mają zdolność wiązania do określonego regionu tubuliny i w za-

leżności od swojej natury mogą w dwojaki sposób oddziaływać na mikrotubule. Pierwszą grupę stanowią substancje stabilizujące mikrotubule. Zalicza się do nich m.in. związki wiążące się do domeny paklitakselowej: taksany, epotilony i diskodermolidy. Związki destabilizujące strukturę tworzą drugą grupę, do której należy wiele alkaloidów vinca oraz związków wiążących się z domeną kolchicynową.



Ryc. 2. Schemat dimeru tubuliny z zaznaczonymi miejscami wiązania związków (wg [14], zmodyfikowano)

Zarówno aktywatory, jak i inhibitory polimeryzacji mikrotubul, już w niewielkich stężeniach wpływają na dynamikę i stabilność opisanych struktur [69,71]. Zaburzenie działania mikrotubul powoduje nieprawidłowości w funkcjonowaniu komórek. Ze względu na to, że komórki nowotworowe charakteryzują się częstszymi, w porównaniu do komórek prawidłowych podziałami są również bardziej wrażliwe na substancje zaburzające ten proces [69]. Dlatego też związki będące inhibitorami aktywności mikrotubul są traktowane jak potencjalne leki, które mogą się okazać skuteczne w zwalczaniu nowotworów.

W pracy przedstawiono informacje o odkrytych w ostatnich latach związkach pochodzenia naturalnego, których działanie polega na hamowaniu polimeryzacji mikrotubul - wiążących domenę vinca oraz kolchicynową.

Tabela 1. Leki wiążące domenę vinca alkaloidową (na podstawie [37,69])

Lek	Status kliniczny	Nazwy handlowe leków	Pochodzenie	Źródło
ALKALOIDY VINCA				
Winblastyna	W praktyce klinicznej	Velban	Rośliny	<i>Catharanthus roseus</i> (<i>Vinca rosea</i>)
Winkrystyna	W praktyce klinicznej	Oncovin		
Winorelbina	W praktyce klinicznej	Navelbine		
Winflunina	Faza III	Javlor		
Windezyna	Faza III	Eldisine		
Anhydrowinblastyna (bezwodna Winblastyna)	Faza I	Hydravin		
DOLASTATYNY				
Dolastatyna 10	Faza II	-	Morskie zwierzęta	<i>Dolabella auricularia</i> (zając morski)
TZT- 1027	Faza I-II	Auristatin PE, Soblidotin		
Tasidotin analog dolastatyny 15	Faza II	ILX-651		
HALICHONDRYNY				
Halichondryn B			Morskie zwierzęta	<i>Halichondria okadae</i> <i>Axcinella sp.</i>
Eribulin	Faza II-III	Halaven, E7389		

LEKI WIĄŻĄCE DOMENĘ VINCA ALKALOIDOWĄ

Alkaloidy vinca w szybki i odwracalny sposób tworzą połączenia z β -tubuliną, między 175 i 213 aminokwasem w pobliżu miejsca wiązania GTP (guanosine triphosphate) [35]. Wykazują silne powinowactwo do skrajnych krawędzi mikrotubul, tzw. „end poisons”, natomiast niskie do tubuliny tworzącej cytoszkielet (wzdłuż ścian mikrotubul). Pojawiły się również doniesienia, że domena *Vinca* składa się zarówno z tzw. miejsca wiązania vinca, jak i miejsca peptydowego [4,57]. Początkowe badania ujawniły, że antymitotyczne związki, takie jak dolastatyny oraz halichondryny mają miejsce wiązania bardzo podobne do domeny *Vinca* alkaloidów (tab.1). Od czasu odkrycia, iż dolastatyny nie są kompetycyjnymi inhibitorami winblastyny, typowego związku wiążącego się do domeny vinca, jest bardziej prawdopodobne, że miejsca wiązania do mikrotubul nie są identyczne, lecz nakładają się.

Alkaloidy vinca

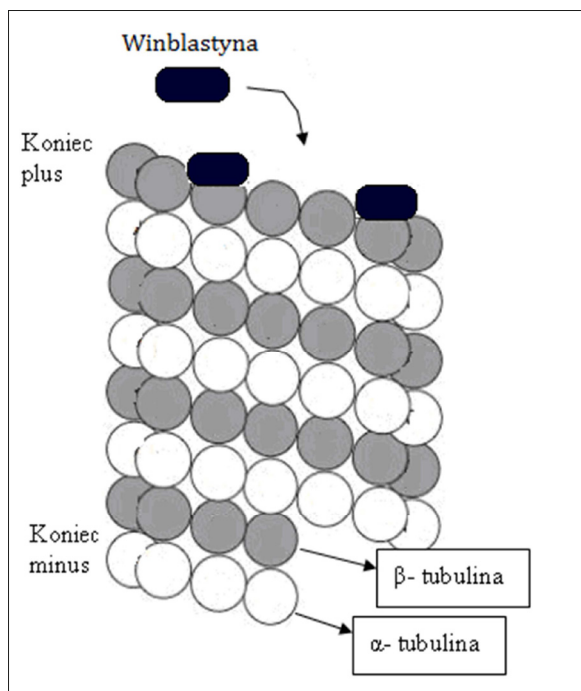
Alkaloidy vinca to grupa związków wyizolowanych w końcu lat pięćdziesiątych i początku sześćdziesiątych ub.w. z rośliny o właściwościach leczniczych endemicznie występującej na Madagaskarze - barwinka różowego (*Catharanthus roseus*). Robert Noble i Beer Charles z Uniwersytetu Western Ontario szukając substancji, które mogą wpływać na stężenie glukozy we krwi odkryli przeciwbiałaczkowe działanie barwinka. Pozwoliło to wyizolować i opisać strukturę pierwszego alkaloidu vinca - winblasty-

ny (vinblastine) [37]. Inny alkaloid - winkrystyna (vincristine) wyizolowali z barwinka różowego Svoboda i wsp., z amerykańskiej firmy farmaceutycznej Eli Lilly [18].

Alkaloidy vinca, już w niewielkich stężeniach mogą się wiązać na końcu plus mikrotubuli, przez co utrudnione jest przyłączanie innych podjednostek tubuliny (ryc. 3). Winblastyna w zakresie 0,2-1 μ M hamuje polimeryzację oraz czas wzrostu i skracania mikrotubul. Prowadzi to do hamowania mitozy przez kinetyczną stabilizację dynamiki polimeryzacji mikrotubul wrzeczona kariokinetycznego. Ze względu na takie działanie związki te nazywane bywają „truciznami końca” [69,74]

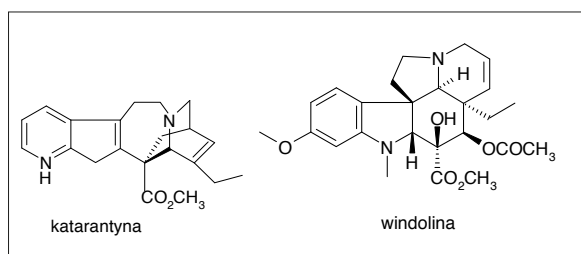
Alkaloidy vinca w komórkach nowotworowych wywołują apoptozę. Charakteryzują się małym powinowactwem do tubuliny tworzącej cytoszkielet i zakłócają wzajemne oddziaływanie tubulin wzdłuż powierzchni struktury, co powoduje ich całkowitą destabilizację [57].

Dotąd wyizolowano ponad 130 związków z barwinka różowego, jednak tylko dwa naturalne alkaloidy vinca odkryte jako pierwsze: winblastyna i winkrystyna, są stosowane w praktyce klinicznej [35]. Duże nadzieje wiąże się z półsyntetycznymi alkaloidami. Należy podkreślić, że już niewielkie zmiany w strukturze związków mają istotny wpływ na ich toksyczność [78]. Spośród takich zmodyfikowanych związków uwagę zwracają m.in. winorelbina, która już jest stosowana w klinikach oraz winflunina i windezyna, które są w fazie badań klinicznych [35].



Ryc. 3. Wiązanie winblastyny do tubuliny-β na końcu plus mikrotubuli (wg [57], zmodyfikowano)

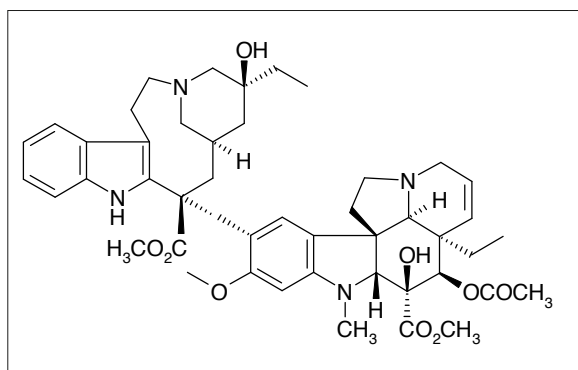
Wszystkie alkaloidy vinca blokują powstawanie mikrotubul i tworzenie wrzecion kariokinetycznych, w wyniku czego następuje zahamowanie mitozy w metafazie bądź śmierć komórki. Mają jednak różne zakresy działania; strukturalnie są podobnymi ligandami, składającymi się z dwóch monoindoli: windoliny (vindoline) i katarantyny (catharanthine) [59]. Windolina i katarantyna są alkaloidami barwinka różowego (ryc. 4). Dimery tych alkaloidów w roślinie występują w niewielkich stężeniach, w wyniku przestrzennego oddalenia wytwarzania monoindolów. Dokładny mechanizm powstawania połączeń między tymi alkaloidami w barwinku różowym jest wciąż niewyjaśniony [59].



Ryc. 4. Wzory strukturalne cząsteczek windoliny i katarantyny (wg [27])

Winblastyna

Winblastyna (VLB, vinblastine) naturalnie występuje w barwinku różowym w małych ilościach (ryc. 5). Ze względu na jej niewielką dostępność podjęto wiele starań by otrzymać VLB przez całkowitą syntezę bądź półsyntetycznie, z naturalnie występujących alkaloidów windoliny i katarantyny. Udańne sprzężenie tych związków daje nowe możliwości wpro-



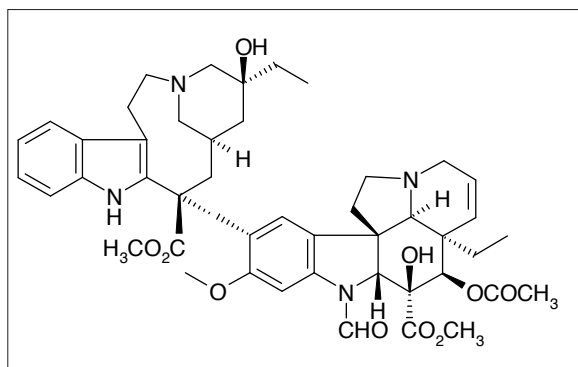
Ryc. 5. Wzór strukturalny winblastyny (wg [78])

wadzenia podstawników i opracowania zarówno sposobów syntezy winblastyny, jak i jej analogów [27,31].

Udowodniono, że winblastyna stosowana w małych ilościach ma znaczący wpływ na hamowanie angiogenezy i regresję nowotworów [32]. Winblastyna jest lekiem stosowanym od kilkadziesiąt lat w monoterapii oraz w skojarzeniu z innymi lekami [68] m.in. w leczeniu raka pęcherza moczowego i raka piersi [37]. Lek jest zatwierdzony również w terapii chłoniaka złośliwego, mięsaka Kaposiego, raka kosmówki, ziarniniaka, chorobie Abta-Letterera-Siwego i złośliwej histiocytozie [68]. Zalecana jest u chorych na raka komórek zarodkowych jąder i w zaawansowanej chorobie Hodgkina. Dawka winblastyny, którą można podać pacjentowi ograniczona jest z powodu działań niepożądanych. Związek jest odpowiedzialny bowiem za hamowanie czynności szpiku kostnego [29,78].

Winkrystyna

Winkrystyna (VCR, vincristine) jest trudniejsza do pozyskania z barwinka różowego niż winblastyna ze względu na bardzo małą zawartość w roślinie (0,0003% wydajności z *C. roseus*) (ryc. 6). Nie powiodła się również w pełni próba syntezy tego związku, jest więc uzyskiwana za pośrednictwem derywatyzacji z winblastyny, przez utlenianie grupy *N*-metylowej lub przez formylowanie [38].



Ryc. 6. Wzór strukturalny winkrystyny (wg [78])

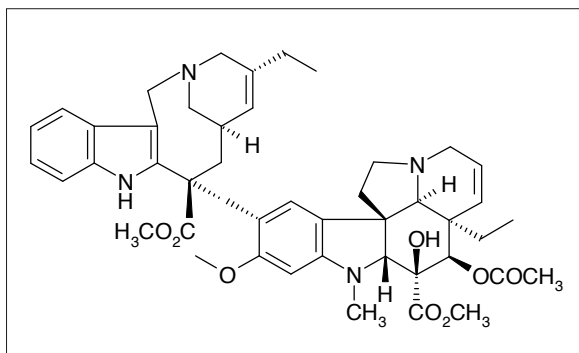
Winkrystyna wykazuje dużo większy zakres działania niż winblastyna, jest więc substancją bardziej pożądaną

w medycynie [38]. Alkaloid jest stosowany w chemioterapii w leczeniu białaczek limfoblastycznych i szpikowych w tym także u dzieci, chłoniaków, mięsaków, w czerniaku złośliwym, w nowotworach OUN (ośrodkowego układu nerwowego) oraz w raku piersi [44,57,78].

Działaniem niepożądanym stosowania winkrystyny jest odwracalna neuropatia obwodowa, neuropatia autonomicznego układu nerwowego i czaszkowa. Rozwój neuropatii zależy od podawanej dawki leku. Rzadko są to powikłania śmiertelne [72,21].

Winorelbina

Winorelbina (VNO, vinorelbine) jest półsyntetyczną pochodną winblastyny (ryc. 7). W przeciwieństwie do innych alkaloidów pochodzących z barwinka, miejscem strukturalnych modyfikacji VNO jest jednostka katarantyny [19]. W strukturze winblastyny usunięto cząsteczkę wody z pierścienia piperydyny, a połączenie pierścienia indolu z atomem azotu skrócono o jeden atom węgla [37].



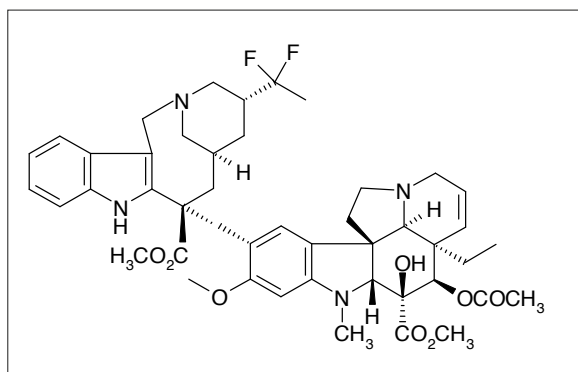
Ryc. 7. Wzór strukturalny winorelbiny (wg [78])

Winorelbina przeszła badania kliniczne i jest stosowana w medycynie. Może być podawana zarówno dożylnie (*i.v.*, łac. *intra vene*), jak i w postaci preparatów doustnych [37]. Wykazuje większą skuteczność i mniejszą toksyczność ogólnoustrojową od wcześniej wprowadzonych na rynek alkaloidów. VNO jest skuteczna w monoterapii raka piersi, jak również w terapiach skojarzeniowych [17]. Winorelbina jest powszechnie stosowana w leczeniu raka jajnika, chłoniaków, raka przełyku i stercza [46,77]. Jest także jednym z leków w terapii niedrobnokomórkowego raka płuca (NSCLC, non-small-cell lung carcinoma). Działaniami niepożądanymi leczenia są: neutropenia, anemia, nudności i wymioty [17].

Winflunina

W 1998 r. po raz pierwszy przeprowadzono reakcję z udziałem super kwasów i alkaloidów vinca. Superkwas jest to układ kwasowy, który w danych warunkach ma większą kwasowość niż 100% kwasu siarkowego. Jednym z najmocniejszych znanych współcześnie kwasów jest tzw. kwas fluoroantymonowy, który jest mieszaniną kwasu fluorowodorowego (HF) i pentafluorku antymonu (HF-SbF₅). W układzie tym kwas fluorowodorowy dysocjuje z wydzieleniem jonów H⁺

i F⁻. Pozwala to na modyfikacje struktury związków organicznych w pozycjach dotychczas niedostępnych. W 1991 r. reakcja winorelbiny z mieszaniną HF i HF-SbF₅, w obecności chloroformu (CHCl₃) (lub CCl₄), pozwoliła na wprowadzenie do cząsteczki winorelbiny dwóch atomów fluoru w pozycji C20' monoindolu katarantyny z jednoczesną redukcją 3',4' wiązania podwójnego [46,16]. Spowodowało to powstanie nowego, półsyntetycznego alkaloidu: winfluniny. Winflunina (VFL, vinflunine) wykazywała silniejsze działanie przeciwnowotworowe niż związek macierzysty (ryc. 8).



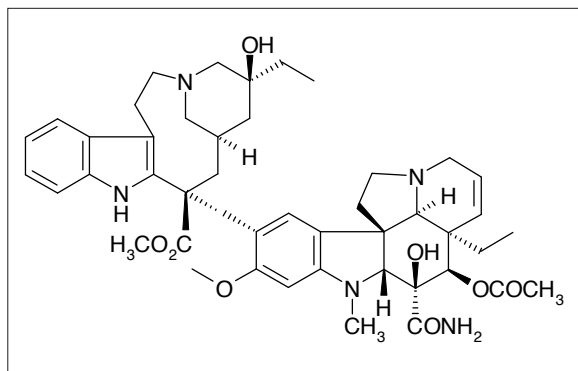
Ryc. 8. Wzór strukturalny winfluniny (wg [37])

Winflunina jest w III fazie badań klinicznych w leczeniu raka pęcherza moczowego i niedrobnokomórkowego raka płuca [28] oraz w II fazie badań w leczeniu raka piersi. Lek ten okazał się również skuteczny w chemioterapii hormoneopornego raka gruczołu krokowego (HRPC, hormone refractory prostate cancer) i w przerzutowym raku piersi osób z nadekspresją receptorów HER2 (human epidermal growth factor receptor 2) oraz w raku jajnika [37].

Winflunina jest mniej neurotoksyczna w porównaniu do innych inhibitorów mikrotubul. Za najczęstsze działania niepożądane VFL uznaje się zahamowanie czynności szpiku kostnego i zaparcia [2].

Windezyna

Windezyna (VDE, vindesine) była pierwszym syntetycznym analogiem winblastyny poddanym badaniom klinicznym (ryc. 9). Od naturalnego alkaloidu – VLB, windezyna



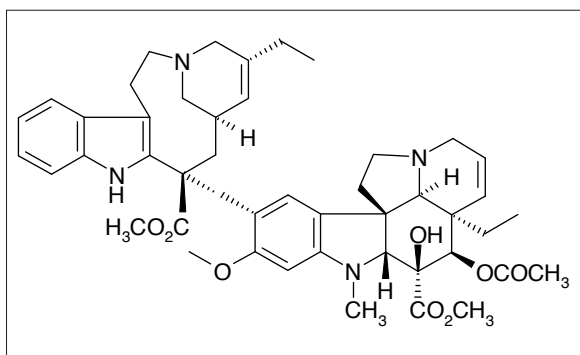
Ryc. 9. Wzór strukturalny windezyny (wg [37]).

różni się grupą amidową w miejscu estru metylowego oraz brakiem grupy acetylowej na pierścieniu windoliny.

Windezyna została włączona do terapii skojarzeniowej z winkrystyną i jest stosowana w leczeniu białaczek limfoblastycznych i szpikowych, chłoniaków, czerniaków złośliwych i niedrobnokomórkowego raka płuc [37,44].

Anhydrowinblastyna

Anhydrowinblastyna (AVLB, anhydrovinblastine) jest analogiem winblastyny, który różni się od związku macierzystego jedną cząsteczką wody (ryc. 10). Można ją uznać również za homolog winorelbiny z dodatkowym atomem węgla w miejscu połączenia indolu z piperydyną.

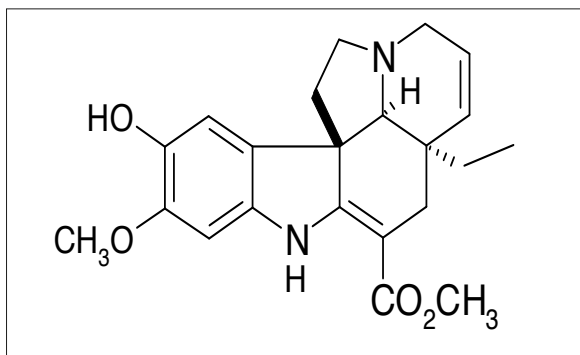


Ryc. 10. Wzór strukturalny anhydrowinblastyny (wg [37])

Anhydrowinblastyna jest w I fazie badań klinicznych w leczeniu zaawansowanych guzów litych: NSCLC, mięsaków tkanek miękkich i raka jelita grubego. Stabilizację choroby stwierdzono po dożylnym podawaniu leku u jednego chorego z mięsakiem dającym przerzut do płuc i u trzech pacjentów z przerzutami niedrobnokomórkowego raka płuc [37,53].

Jerantynina A

Lim i wsp. wyizolowali Jerantynine A-G z malajskiej rośliny *Tabernaemontana corymbosa* Roxb. ex Wall [39]. Jerantynina A (Jerantynine A) została wyizolowana z *Tabernaemontana corymbosa* i okazała się skuteczna w leczeniu nowotworów opornych na winkrystynę (ryc.11). Hamuje wzrost komórek nowotworowych i ich proliferację zależ-



Ryc.11. Wzór strukturalny jerantyniny A (wg [39])

nie od czasu i dawki leku. Prowadzi do indukowania apoptozy w liniach raka jelita grubego (HCT-116, HT-29), sutka i piersi (MCF-7, MDA-468) oraz niedrobnokomórkowego raka płuc (A549). Obserwowano cięcie PARP (poly (ADP-ribose) polymerase) i aktywację kaspazy 3. Hamowanie cyklu komórkowego w fazie G2/M nastąpiło po 24-godzinnej inkubacji we wszystkich badanych liniach komórkowych. Ponadto alkaloid hamuje polimeryzację tubuliny, zaburza organizację mikrotubul, wywołuje aneuploidie oraz redukuje stężenie cykliny B1. Oszacowano, że dla linii MDA-468, MCF-7 i HCT-116 stężenie IC₅₀ jest poniżej 1 μM. Dla octanowych pochodnych o większej stabilności względem naturalnych związków również wyznaczono parametr IC₅₀ poniżej 1 μM dla linii MDA-468, MCF-7, HCT-116 CRC i A549 [52].

Dolastatyny

Dolastatyny (dolastatins) zostały wyizolowane z morskiego mięczaka *Dollabella auricularia* przez zespół George Petita. W 1970 r. Petit i wsp. odkryli właściwości przeciwnowotworowe wyciągów z zająca morskiego i prawie 15 lat zajęło im zakończenie badań, których wynikiem było pozyskanie oczyszczonych związków. Naturalnie w organizmach dolastatyny występują w bardzo małych ilościach [67].

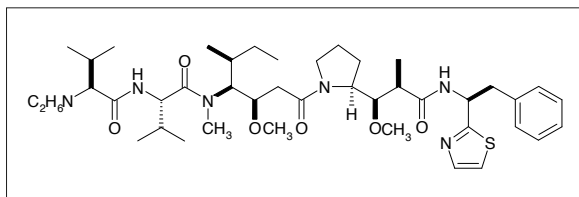
Dolastatyny to grupa silnie cytotoksycznych, cyklicznych pentapeptydów, które hamują polimeryzację tubuliny oraz mitozę komórek w nowotworach i powodują w komórkach proces apoptozy. Z muszli tego gatunku pochodzi około 15 antymitotycznych związków wykazujących działanie przeciwnowotworowe, grzybobójcze i bakterio-bójcze [37,69,76]. W badaniach *in vitro* i *in vivo* prowadzonych na linii niedrobnokomórkowego raka płuc wykazano silne działanie cytotoksyczne tych związków [76]. Wspólne z alkaloidami vinca mają miejsce wiązania z mikrotubulami w domenie vinca alkaloidowej, jednak dolastatyny łączą się w miejscu peptydowym tej domeny [4].

Dolastatyna 10

Najbardziej cytotoksycznym przedstawicielem naturalnie występujących dolastatyn jest dolastatyna 10 (Dol-10, dolastatin-10). Ze względu na trudność pozyskania z naturalnych źródeł i prostą budowę tego peptydu Pettit i wsp. podjęli próby jego chemicznej syntezy, zakończone sukcesem. Ułatwiło to badanie cytostatycznych i przeciwnowotworowych właściwości, jak również tworzenie jej pochodnych [80].

Dolastatyna 10 jest liniowym pentapeptydem, składa się z waliny (valine) i czterech resztach o unikalnej strukturze (dolavaline, dolaisoleucine, dolaproline, dolaphenine) (ryc. 12).

Dol-10 jest silnym antymitotycznym związkiem, dlatego też została poddana intensywnym badaniom klinicznym. Nie wykazała aktywności przeciwnowotworowej w leczeniu guzów litych. Wykazała niewielką aktywność u cho-

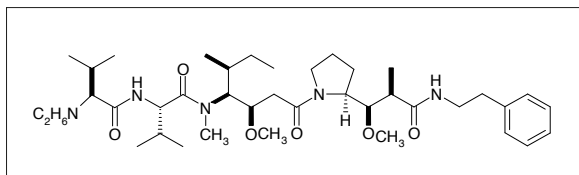


Ryc. 12. Wzór strukturalny dolastatyny 10 (wg [37])

rych na przerzutowego, hormonoopornego raka jajnika. Mało skuteczna okazała się również u pacjentów ze wznową raka jajnika opornych na leczenie pochodnymi platyny. Monoterapia dolastatyną 10 podczas II fazy badań klinicznych w National Cancer Institute wywołała u 40% pacjentów umiarkowaną neuropatię obwodową [67].

TZT-1027

TZT-1027 (auristatin PE; Soblidotin) jest półsyntetyczną pochodną dolastatyny 10 (ryc. 13). Wykazuje zbliżoną, bądź większą aktywność przeciwnowotworową niż alkaloidy vinca [37]. Powoduje inhibicję polimerizacji tubuliny i zatrzymanie cyklu komórkowego w fazach G1/S [23].



Ryc. 13. Wzór strukturalny TZT-1027 (wg [37])

Ocena przedkliniczna potwierdza, że TZT-1027 wykazuje nie tylko działanie cytotoksyczne, ale prowadzi również do apoptozy komórek nowotworowych w wyniku działania antyangiogenne [23]. Wykazuje szeroki zakres działania przeciwnowotworowego *in vitro*, nie powodując jednak zmniejszenia masy w mysich i ludzkich guzach nowotworowych [1].

Pierwszą fazę badań klinicznych tego związku przeprowadzono w celu określenia maksymalnej tolerowanej dawki (MTD, the maximum tolerated dose). Przeprowadzono ocenę profilu farmakokinetycznego pacjentów przez podawanie TZT-1027 jeden raz w tygodniu przez 3 tygodnie. Ta wyznaczona zalecana dawka do II fazy badań wyniosła 1,8 mg/m² związku [81].

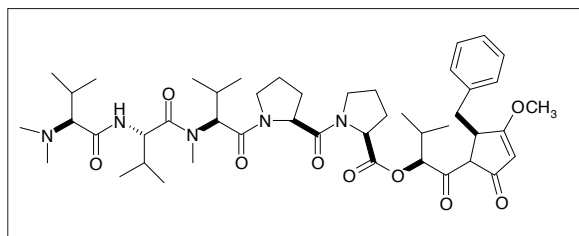
W I fazie kolejnych badań klinicznych stosowano leczenie skojarzeniowe TZT-1027 oraz karboplatyny u pacjentów z guzami litymi opornymi na standardowe leczenie. Terapia wywołała jednak neutropenię, niedokrwistość, zmęczenie, zaparcia oraz nudności [23,37].

Zbadano także skuteczność TZT-1027 w połączeniu z radioterapią, wyniki wskazują, że lek zwiększa aktywność przeciwnowotworową promieniowania jonizującego m.in. przez nasilenie indukcji apoptozy oraz działania antyan-

giogenne. Takie leczenie skojarzeniowe może stanowić nowy, obiecujący wariant strategii przeciwnowotworowej w badaniach klinicznych [1].

Dolastatyna 15

Dolastatyna 15 (dolastatin-15) jest liniowym heptapeptidem otrzymanym z *Auricularia Dolabella* (ryc.14). Mimo że wykazuje równie silne działanie jak dolastatyna 10 jej mechanizm działania jest inny. Dol-15 hamuje proces łączenia tubulin w dimery oraz hydrolizę GTP, nie blokując wymiany nukleotydowej [69].

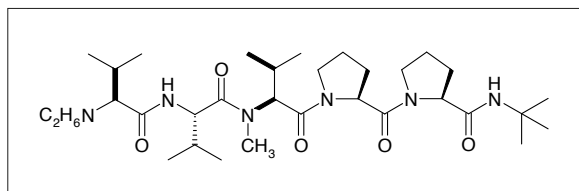


Ryc. 14. Wzór strukturalny dolastatyny 15 (wg [11])

Badania wykazały, że dolastatyna 15 powoduje zatrzymanie cyklu komórkowego w fazach G2/M w różnych ludzkich komórkach szpiczaka powodując ich apoptozę. Związek ten może więc być nowym skutecznym lekiem w terapii szpiczaka mnogiego [62].

Tasidotin

Tasidotin jest syntetycznym analogiem dolastatyny 15. Grupę estrową karboksylowego końca dol-15 zastąpiono grupą alkilową: tert-butylen (ryc. 15) [3].



Ryc. 15. Wzór strukturalny tasidotinu wg [37])

Tasidotin przeszedł I fazę badań klinicznych i jest w II fazie, rozpuszczalny w wodzie, stabilny metabolicznie pentapeptyd; może być stosowany doustnie.

Mechanizm działania związku różni się od innych inhibitorów polimerizacji tubuliny. Słabo hamuje polimerizację mikrotubul wykazując jednak dużą zdolność modulowania dynamiki tychże struktur [37]. Zmniejsza szybkość skracania mikrotubul, redukuje również czas wzrostu oraz ogranicza zmiany między fazami [54].

Badania przedkliniczne tasidotinu wykazały jego duże cytotoksyczne działanie. W leczeniu przeprowadzonym na myszach z przeszczepionymi ludzkimi komórkami

nowotworowymi uzyskano całkowitą odpowiedź zarówno w początkowych, jak i późnych stadiach raka piersi, stercza i czerniaka [54]. I faza badań dotyczyła oceny wielkości dawki związku. Zalecaną i maksymalną tolerowaną dawką dla II fazy badań klinicznych w schemacie podawania w pierwszym, trzecim i piątym dniu przez trzy tygodnie jest 34,4 mg/m².

Wykazano łagodniejszy niż w przypadku innych inhibitorów polimeryzacji tubuliny profil neurotoksyczności. Sposób działania tasidotinu otwiera nową drogę dalszych terapii skierowanych przeciwko nowotworom [11].

Halichondryny

Halichondryny są klasą złożonych z naturalnych związków przeciwnowotworowych pochodzenia morskiego. Zostały wyizolowane z gąbki morskiej z rodzaju *Halichondria* przez Uemura i Hirata w 1986 r., a później również z gatunku *Axinella* przez Pettita i wsp.. Mała dostępność naturalnych związków oraz długi czas syntezy stanowiły główne przeszkody w badaniach klinicznych halichondrynow [3].

Kilka związków z tej klasy wykazuje dużą cytotoksyczność, najważniejszym z nich jest halichondryn B (HB), po raz pierwszy całkowicie zsyntetyzowany w 1992 r. przez Yoshito Kishi i wsp. z Harvardu. Halichondryn B jest politerowym makrolitem, wykazuje właściwości przeciwnowotworowe u myszy w leczeniu białaczek i czerniaków [75]. Badania nad HB doprowadziły do opracowania uproszczonych związków o dużej aktywności biologicznej opartych na budowie halichondrynu B [4,37].

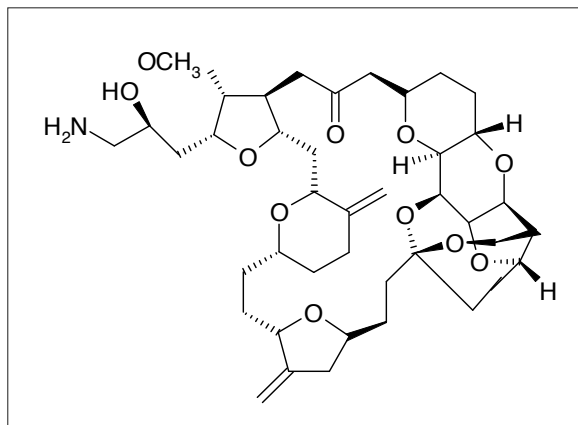
Mechanizm działania związków z rodziny halichondryny nie został jeszcze dokładnie poznany. Hamują polimeryzację mikrotubul i wykazują zdolność łączenia z domeną vinca alkaloidową α -, β -heterodimeru tubuliny w peptydowym miejscu wiązania [57].

Eribulin

Eribulin (E7389) jest to prosty analog halichondryny B. Hamuje dynamiczną niestabilność mikrotubul w komórkach interfazowych, co powoduje zatrzymanie cyklu komórkowego na przełomie faz G2 i M, następuje śmierć komórki w wyniku katastrofy mitotycznej (ryc.16) [30].

Związek wiąże się zarówno z dimerem tubuliny, jak i pojedynczą cząsteczką β -tubuliny powodując zahamowanie wzrostu, ale nie skracanie mikrotubul. Taki mechanizm działania zwiększa skuteczność w pokonywaniu chemiooporności.

Związek E7389 jest w II fazie badań klinicznych leczenia opernego raka piersi, wykazując obiecujące wyniki oraz 15% wskaźnik odpowiedzi u chorych na niedrobnoko-



Ryc. 16. Wzór strukturalny eribulinu (wg [37])

mórkowego raka płuc. Prowadzone są również badania w III fazie klinicznej w leczeniu raka stercza, pęcherza, jajnika, głowy i szyi oraz NSCLC. W trzeciej fazie badań porównywane jest leczenie E7389 z kapecytabiną w leczeniu raka piersi [57].

W porównaniu z innymi związkami oddziałującymi z mikrotubulami wykazują niewielką toksyczność.

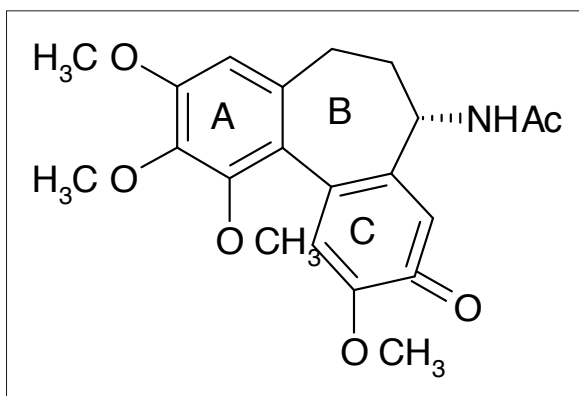
LEKI WIĄŻĄCE DOMENĘ KOLCHICYNOWĄ

Miejsce wiązania kolchicyny znajduje się w centrum dimeru tubuliny, naprzeciwko monomeru a i b. Jest to powolny, właściwie nieodwracalny proces. Zmiany w konformacji pozwalają na wnikięcie kompleksu kolchicyna-tubulina wewnątrz filamentu mikrotubulinowego i zahamowanie asocjacji mikrotubul. Obszar mikrotubuli, w którym następuje to połączenie nazywa się domeną kolchicynową [69,71]. Związki łączące się z domeną kolchicynową zebrano w tabeli 2.

Kolchicyna

Kolchicyna (Col, Colchicine) jest to związek otrzymywany z zimowita jesiennego (*Colchicum autumnale*). Po raz pierwszy została opisana w 1500 r. p.n.e. w papirusie Ebersa, jako lek stosowany w leczeniu obrzęków i reumatyzmu. Później był polecany w leczeniu dny moczniowej. Popularność wyciągu z korzenia zimowita w leczeniu różnych chorób wzrosła w XVIII w., mimo działań niepożądanych, takich jak biegunki i bóle brzucha [61].

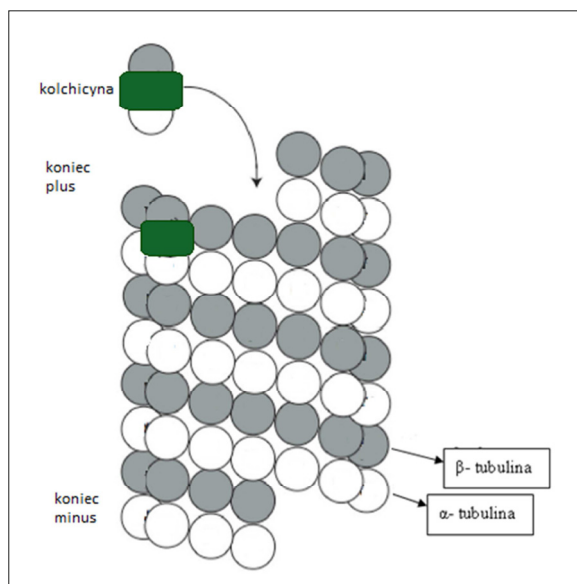
Kolchicyna jako aktywny alkaloid została wyodrębniona w 1820 r. przez francuskich chemików P.S. Pelletiera i J. Caventona (ryc. 17) [69]. W 1968 r. zidentyfikowano jako jej cel molekularny tubulinę, jest pochodną tropolonową. Składa się z trzech heksamerycznych pierścieni: A, B i C. Wiaże się z tubuliną w powierzchni a-b dimeryzacji za pomocą pierścienia B, wykorzystując obecność w podjednostce a domeny wiążącej GTP. Natomiast pierścieniami A i C wiąże się z podjednostką b tubuliny. Kolchicyna przyłącza się do niespolimeryzowanej tubuliny dwuetapowo. Początkowo kolchicyna



Ryc. 17. Wzór strukturalny kolchicyny (wg [24])

łączy się z tubuliną słabym wiązaniem o wysokiej energii aktywacji. Proces ten jest odwracalny [5]. Drugi etap prowadzi już do zmian w konformacji heterodimerów tubuliny. Kolchicyna przyłącza się do końców mikrotubul (ryc. 18) [13].

Następstwem działania tego związku jest depolimeryzacja mikrotubul w wyniku zahamowania bocznego kontaktu między protofilamentami, co prowadzi także do zahamowania cyklu komórkowego, egzocytozy i ruchliwości neutrofilów. Potwierdzono, że kolchicyna w niewielkich stężeniach może hamować powstawanie mikrotubul, a w wysokich odwrotny proces, tj. działa jako inhibitor depolimeryzacji. Ponadto lek ten powoduje wzrost w leukocytach stężenia cAMP (cyclic adenosine monophosphate), hamuje wytwarzanie IL-1 przez neutrofile i reguluje działanie TNF- α (tumor necrosis factor-alpha). Jest silnie toksyczny zarówno dla komórek prawidłowych jak i nowotworowych [13]. Duża toksyczność oraz mała aktywność w liniach komórkowych opornych na chemioterapię (MDR, multidrug resistance) spowodowała, że kolchicyna i jej analogi nie są wykorzystywane w terapii przeciwnowotworowej [71].

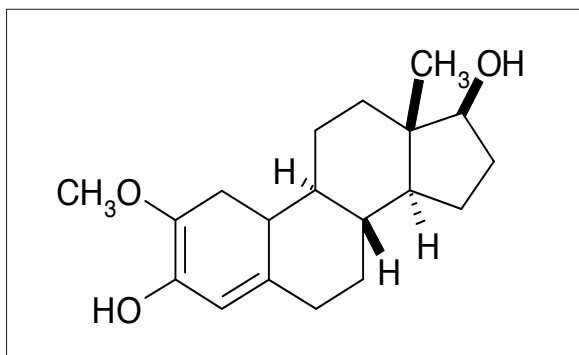
Ryc. 18. Włączanie do mikrotubuli kolchicyny związanej z α , β -tubuliną (wg [57], zmodyfikowano)

2-metoksyestradiol

2-metoksyestradiol (2-ME) jest endogennym metabolitem estrogenu. Działa niezależnie od ekspresji receptora estrogenowego i jego aktywności. Powstaje w wyniku 2-hydroksylacji β -estradiolu z udziałem cytochromu P450 i 2-O-metylacji przez katecho-O-metylotransferazę (ryc. 19) [33]. Silnie hamuje angiogenezę i wzrost komórek nowotworowych. Badania kliniczne wykazały następujące działania niepożądane 2-ME: zmęczenie, nudności, biegunkę, neuropatię, obrzęki i duszność. Wykazano, że 2-ME jest metabolizowane przez sprzęganie w pozycjach 3 i 17 i utlenianie w pozycji 17. Prowadzi to do utraty aktywności 10-100 razy. W celu ustabilizowania związku dokonano modyfikacji chemicznej w pozycji 3 i 17. Powstał syntetyczny analog - ENMD-1198. Hamuje on cykl komór-

Tabela. 2. Związki wiążące domenę kolchicynową (na podstawie [37,69])

Związek	Status kliniczny	Pochodzenie	Źródło
KOLCHICYNA			
Kolchicyna	Niestosowana klinicznie	rośliny	<i>Colchicum autumnale</i> – zimowit jesienny
KOMBRETASTATYNY			
Kombretastatyna A-4	–		
Fosforan kombretastatyny A-4 CA-4-P (Zybrestat)	Faza I-III	rośliny	<i>Combretum caffrum</i> – wierzba afrykańska
CA-1-P (Oxi4503)	Faza I-III		
AVE8062	Faza I-III		

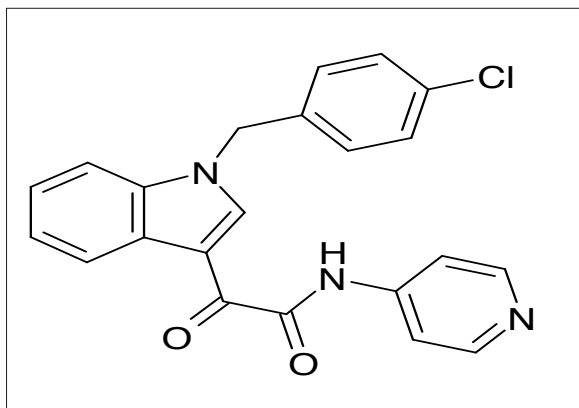


Ryc. 19. Wzór strukturalny 2-metoksyestradiolu (wg [40])

kowy w fazie G2/M i poziom czynnika transkrypcyjnego indukowany przez hipoksję (HIF-1 α , hypoxia-inducible factor 1 α). HIF-1 α jest fizjologicznym regulatorem procesów związanych z angiogenezą o potencjalnym znaczeniu terapeutycznym. Białko kodowane przez HIF-1 α aktywuje grupy genów decydujących o utrzymaniu homeostazy tlenu, aktywacji angiogenezy, erytropoezy czy regulujących procesy metabolizmu glukozy. Badania wykazały również, że ENMD-1198 hamował proliferację komórek śródbłonna, ich ruchliwość, migrację i morfogenezę [40]. Obniżał również aktywności dysmutazy nadadtlenkowej, co powodowało gromadzenie w komórkach znacznych ilości anionorodnika nadadtlenkowego. Skutkiem tej akumulacji było uszkodzenie błon mitochondrialnych, uwalnianie z nich cytochromu c i aktywacja apoptozy w komórkach nowotworowych. Zmniejsza również poziom czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego (VEGF, vascular endothelial growth factor). Obecnie 2-ME i jego analogi są używane w leczeniu chorych z niektórymi typami nowotworów [63,79].

Indibulin

Indibulin (D-24851, ZIO-301, 17) jest doustnym lekiem, skutecznym wobec nowotworów opornych na taksany (ryc. 20). Badania przedkliniczne wykazały, że indibulin nie jest neurotoksyczny, która jest w dużej mierze związana ze związkami wiążącymi tubulinę. Indibulin nie tylko hamuje wzrost linii komórek nowotworowych o różnych

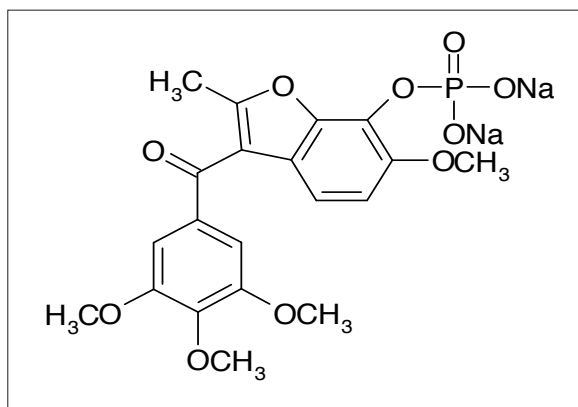


Ryc. 20. Wzór strukturalny indibulinu (wg [40])

fenotypach, ale i nie wywołuje nadekspresji glikoproteiny P, ani oporności wielolekowej. Ponadto zachowuje cytotoksyczność wobec komórek nowotworowych opornych na cisplatynę, inhibitory topoizomazy I (SN 38) i syntazy tymidylanowej (5-FU). W badaniach na szczurach nie wywoływał neurotoksyczności [40,48].

BNC-105P

BNC-105P, został opracowany, jako niskocząsteczkowy związek, przez Bionomics (Australia) (ryc. 21). BNC-105P jest ufosforylowanym prolekiem, który szybko jest przekształcany do postaci aktywnej, BNC-105, przez nieswoiste endogenne fosfatazy w osoczu i w komórkach śródbłonna. BNC-105 ma 80-krotnie większą siłę hamowania proliferacji w stosunku do spoczynkowych komórek śródbłonna. Badania kliniczne I fazy zostały zakończone i lek okazał się dobrze tolerowany. Badanie II fazy prowadzone na jasnokomórkowym raku nerek (clear cell renal carcinoma) dla BNC-105P w połączeniu z Everolimus są w trakcie [40,56]. Ponadto związek jest w II fazie badań klinicznych nad złośliwym międzybłoniakiem płucnej (MPM, malignancy pleural mesothelioma) [47].



Ryc. 21. Wzór strukturalny BNC-105P (wg [40])

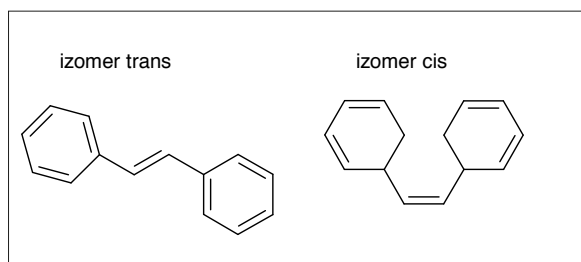
Kombretastatyny

George Pettit i wsp. w 1980 r. wyizolowali z południowoafrykańskiego drzewa *Combretum caffrum* kilka związków nazwanych kombretastatynami. Kombretastatyny pierwotnie uzyskiwano ze sproszkowanej kory tego niziołkowego drzewa [49].

Combretum caffrum jest liściastym drzewem osiagającym do 15 metrów wysokości, rośnie głównie w Republice Południowej Afryki. Drzewo jest podobne do wierzby, jesienią pojawiają się na nim czerwono-brązowe owoce, liście zanim opadną są jasnoczerwone. Dawniej wyciąg ze sproszkowanej kory korzeni tego drzewa używany był w lecznictwie afrykańskim, a przez Zulusów, jako truciźna [8].

Kombretastatyny są grupą obiecujących homologów cis stylbenów. Stylben (C₁₄H₁₂) jest organicznym związkiem

chemicznym z grupy nienasyconych węglowodorów aromatycznych wielopierścieniowych. Występuje w dwóch odmianach izomerycznych trans i cis (ryc.22) [20].



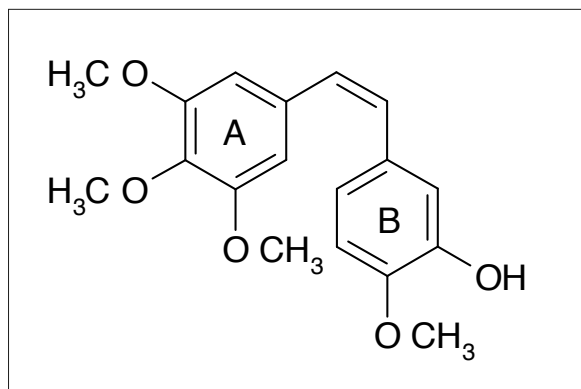
Ryc. 22. Wzór strukturalny izomerów trans i cis stylbenu (wg [37])

Są to proste struktury zawierające dwa pierścienie aromatyczne połączone mostkiem etanowym lub etenowym, który zapewnia potrzebną sztywność struktury. Mostek umożliwia położenie pierścieni aromatycznych w odpowiedniej odległości i nadaje cząsteczce kąty dwusienne [26].

Kombretastatyny są zaliczane do związków wiążących się do domeny kolchicynowej w mikrotubulach. Wykazują podobieństwo strukturalne do kolchicyny i mają większe powinowactwo do miejsca wiązania na tubulinie niż sama kolchicyna. Znane są z działania przeciwnowotworowego, są inhibitorami procesów wiązania kolchicyny i polimeryzacji tubuliny. Przez wiązanie z tubuliną prowadzą do zahamowania cyklu komórkowego w czasie mitozy w rezultacie wywołując śmierć w wyniku apoptozy. Hamują proces angiogenezy, co wykorzystane zostało w chemioterapii [12,69]. W połączeniu z innymi lekami, np. z paklitakselem niszczą również zewnętrzne komórki guza [57,66]. Duże stężenie kombretastatyn powoduje hydrolizę tubulinozależnego GTP, która całkowicie hamuje montaż podjednostek tubuliny [69].

Kombretastatyna A-4

Kombretastatyna A-4 (CA-4, combretastatin A-4) jest jednym z najsilniejszych inhibitorów polimeryzacji tubuliny (ryc.23). Silnie hamuje aktywność mikrotubul



Ryc. 23. Wzór strukturalny kombretastatyny A-4 (wg [37])

przez wiązanie się z domeną kolchicynową na β -tubulinie zakłócając wzrost i proliferację komórek [7]. Struktura krystaliczna związku nie jest płaska. Płaszczyzny pierścieni są nachylone wobec siebie. Energia konformacji cząsteczki jest mała, może być zaangażowana w wiązanie się CA-4 z tubuliną [51].

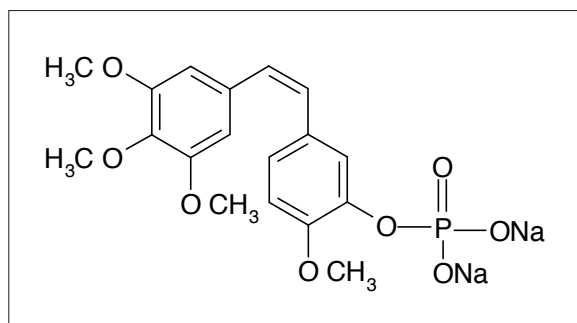
Badania wykazują, że kombretastatyna A-4 może wywoływać silnie i niszcząco wpływać na komórki śródbłonna naczyń krwionośnych w rejonie nowotworu. Skutki wywołane przez ten antymitotyczny związek są już w stężeniu poniżej 0,1 maksymalnej dawki tolerowanej (MTD, maximum tolerated dose), co wskazuje na szerokie okno terapeutyczne. Dodatkowe badania wskazują, że jego stosowanie ograniczone jest toksycznością ogólnoustrojową, dochodzi do zmniejszenia liczby płytek krwi. Komórki krwi powstają z megakariocytów, co jest głównym procesem uzależnionym od tubuliny w przedziale naczyniowym. Lek wymaga dalszego poznania molekularnych mechanizmów działania, schematów jego jednorazowego i wielokrotnego dawkowania zarówno w monoterapii jak i z innymi chemioterapeutykami [7,12].

Kombretastatyna A-4 może być stosowana w leczeniu powierzchniowych nowotworów pęcherza moczowego rozwijających się na błonie śluzowej wewnętrznej ściany pęcherza. Badania sugerują, że CA-4 prowadzi do apoptozy komórek raka pęcherza w wyniku indukcji apoptozy i katastrofy mitotycznej [65].

CA-4 jest wprawdzie jednym z najsilniej działających analogów pochodzenia naturalnego w tej grupie leków, ale jego wadą jest mała stabilność [22].

Fosforan kombretastatyny A-4

Fosforan kombretastatyny A-4 (CA-4P, combretastatin A-4 phosphate) został zsyntetyzowany z CA-4 w celu uzyskania większej rozpuszczalności (ryc.24). CA-4P indukuje śmierć ludzkich komórek przewlekłej białaczki limfatycznej w procesie katastrofy mitotycznej [45,37].



Ryc. 24. Wzór strukturalny fosforanu kombretastatyny A-4 (wg [37])

Faza I badań klinicznych wykazała, że CA-4P wybiórczo zmniejsza przepływ krwi w guzie w dobrze tolerowanych przez pacjentów dawkach. Obecnie związek ten jest w II fazie badań klinicznych w leczeniu raka tarczycy. Fosfo-

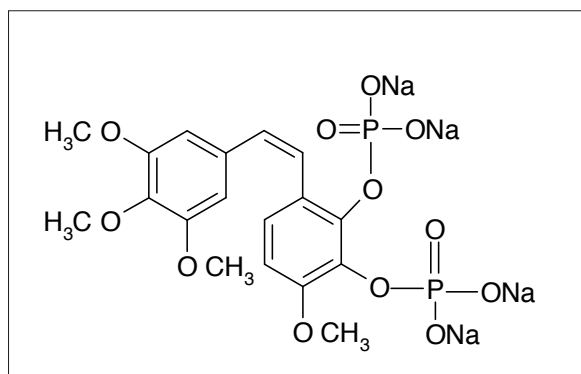
rany kombretastatyny A-4 w leczeniu pacjentów z zaawansowanym anaplastycznym rakiem tarczycy są również w II fazie. Ponadto związek ten jest w fazie III badań klinicznych w leczeniu raka szyjki macicy, jelita grubego, stercza, jajnika, tarczycy i NSCLC [7,49].

CA-4P jest skuteczny w ochronie i leczeniu neowaskularyzacji naczyńwkowej (CNV, choroidal neovascularization), która odgrywa główną rolę w rozwoju zwyrodnienia plamki związanego z wiekiem (AMD, age-related macular degeneration). Wstępne wyniki I/II fazy badań wskazują, że CA-4P jest dobrze tolerowany w dawkach do 36 mg/m². Łagodne wzrosty ciśnienia krwi i podwyższony puls są jedynymi działaniami niepożądanymi [10].

Aktywność naczyniową fosforanu kombretastatyny A-4 wykazano w wielu modelach nowotworów. W części z nich CA-4P powoduje niemal całkowitą redukcję przepływu krwi w ciągu 20 min i może pozostawiać w niewielkim stężeniu w organizmie do 24 godzin powodując rozległe uszkodzenie komórek w obrębie guza. Istotne jest, że redukcja przepływu krwi w prawidłowych tkankach po działaniu CA-4P jest łagodniejsza i mniej trwała oraz nie powoduje żadnych wykrywalnych martwic [58].

Fosforan kombretastatyny A-1

OXi4503 - izomer cis fosforanu kombretastatyny A-1 (CA-1P), bardziej zmniejsza przepływ krwi w guzie niż CA-4P (ryc.25). Prawdopodobnie analog ten charakteryzuje się zwiększoną cytotoksycznością. Przyczyną mogą być reaktywne formy tlenu generowane przez ten związek. Wykazano, że OXi4503 prowadzi do martwicy nowotworów (95%) po 24-godzinnej ekspozycji [55]. CA-1P jest obecnie w I fazie badań klinicznych [37].



Ryc. 25. Wzór strukturalny izomeru cis fosforanu kombretastatyny A-1 (wg [37])

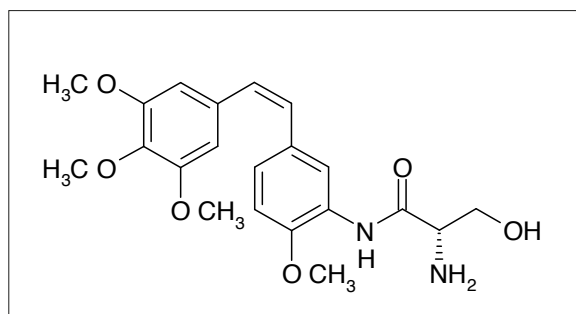
Działanie OXi4503 polega na niszczeniu mikrotubul oraz tworzeniu toksycznych rodników chinonowych [55]. Jest również jednym ze związków przyczyniających się do niszczenia systemu naczyniowego (VDA, vascular disrupting agents). Reprezentuje nową klasę leków, które przez wiązanie się bezpośrednio z mikrotubulami w komórkach śródbłónka naczyń krwionośnych celują w nowo powstającą sieć naczyń i indukują martwicę guza. Związki

te nie niszczą wszystkich komórek, pozostawiają cienką warstwę na obrzeżach atakowanego guza. Wykazano, że większą skuteczność w terapii guzów litych można uzyskać przez połączenie VDA z lekami antyangiogennymi. W wyniku stosowania takiej terapii skojarzonej można osiągnąć zwiększenie stopnia regresji nowotworów, w porównaniu do monoterapii [41].

Porównywano między innymi wpływ OXi4503 w monoterapii jak i w połączeniu z przeciwciałem monoklonalnym – bewacizumabem na leczenie ostrej białaczki szpikowej (AML, acute myeloid leukemia). Uzyskane wyniki potwierdzają, że sam CA-1P prowadzi do regresji nowotworu. Leczenie AML w połączeniu OXi4503 z bewacizumabem daje jednak lepsze wyniki. Regresję białaczki uzyskano zarówno w wyniku apoptozy jak i przez zmniejszenie aktywnej angiogenezy w obwodowych częściach nowotworu [41].

AVE8062

AVE8062 jest to syntetyczny związek, będący rozpuszczalną w wodzie pochodną kombretastatyny A-4 (ryc.26). Grupa hydroksylowa w pozycji 3 na łańcuchu B w CA4 została zastąpiona przez grupę aminową [6,50].



Ryc. 26. Wzór strukturalny AVE8062 (wg [37])

Związek we krwi ulega aktywacji w wyniku działania aminopeptydaz, a jego podstawowe działanie terapeutyczne polega na zmniejszeniu dopływu krwi do guza. AVE8062 oprócz bezpośredniego, hamującego wpływu na podziały komórki, pośrednio działa toksycznie na naczynia krwionośne. Powoduje reorganizację komórek śródbłónka i zmiany ich kształtu co uszkadza a naczynia, zwiększa ich przepuszczalność i niedostateczne ukrwienie guza [36,73].

AVE8062A jest w trakcie badań klinicznych w Europie i Stanach Zjednoczonych. Jednoczesne podawanie AVE8062 z docetakselem prowadzi do hamowania wzrostu raka jajnika [36]. III faza badań klinicznych została zainicjowana przez koncern farmaceutyczny Sanofi aventis dla AVE8062 u pacjentów z zaawansowanym mięsakiem tkanek miękkich. Inne badania wskazują, że AVE8062 ma taki sam mechanizm powodujący zatrzymanie przepływu krwi do nowotworów jak epinefryna. Prawdopodobnie oba te leki wpływają na tkankę mięśniową gładką naczyń [25].

OPORNOŚĆ NA INHIBITORY POLIMERYZACJI MIKROTUBUL

Duża śmiertelność chorych na nowotwory jest spowodowana zbyt późną lub nietrafną diagnostyką samej choroby oraz wciąż niedostatecznie efektywną terapią. Jedną z najczęstszych metod leczenia jest chemioterapia, mimo stosowania cytostatyków obserwuje się dalszy wzrost komórek nowotworowych. Wiąże się to głównie z wytworzeniem mechanizmów oporności wielolekowej (multi-drug resistance).

Leki wiążące mikrotubule prowadzą m.in. do oporności pierwotnej wynikającej z charakteru tkanki, z której wywodzi się nowotwór. Jej przyczyną są zmiany w ekspresji genu represyjnego dla MDR. Drugi typ to oporność nabyta, która powstaje w komórkach pierwotnie wrażliwych na chemioterapię. Pojawia się wówczas populacja zmutowanych komórek ze zwiększoną ekspresją glikoproteiny P (Pgp), wobec czego leki działają tylko na pozostałe komórki wrażliwe. Najczęstszą przyczyną oporności jest nadekspresja genu MDR1 kodującego Pgp, co obniża wewnątrzkomórkowe stężenia leku i jego cytotoksyczność. Nadekspresja Pgp często jest wywołana terapią z użyciem taksanów i alkaloidów vinca. Stosowane z lekami alkilującymi DNA nie wywołują lekooporności [43]. Część związków wiążących domenę kolchicynową nie prowadzi do występowania oporności wielolekowej. Ponadto, poza nadekspresją transporterów ABC (ATP-binding cassette transporter), przyczyną lekooporności są mutacje tubuliny, a zwłaszcza izoformy β tubuliny klasy III, co zdarza się po zastosowaniu paklitakselu czy winorelbiny. Mutacje tubuliny i zmiany w ekspresji poszczególnych izotypów mogą wywołać lekooporność, zarówno bezpośrednio przez obniżenie powinowactwa leków do tubuliny, jak i pośrednio przez zmiany w dynamice mikrotubul [34]. Natomiast leki wiążące domenę kolchicynową, np. kol-

chicina czy 2-metoksyestradiol nie wpływają na ekspresję klasy III β -tubulin [64,70].

PODSUMOWANIE

Mikrotubule pełnią istotne funkcje w komórkach. Są jednak podatne na uszkodzenia, a zatem mogą być doskonałym celem w terapii przeciwnowotworowej.

Związki wiążące tubulinę i hamujące polimeryzację mikrotubul wydają się jedną z bardziej obiecujących grup chemioterapeutyków używanych w walce z nowotworami. W ostatnich latach do badań przedklinicznych i klinicznych włączono kilkadziesiąt nowych, zarówno naturalnych, jak i syntetyzowanych chemicznie związków, które wpływają na strukturę i dynamiczność mikrotubul. Spośród związków wykazujących powinowactwo do domeny vinca, dwa naturalne alkaloidy vinca: winblastyna i winkrystyna są już stosowane w praktyce klinicznej. Dane z badań przedklinicznych wskazują na możliwość skutecznego wykorzystania innych związków z tej grupy, takich jak dolastatyny, czy halichondryny. Na szczególną uwagę zasługują także związki łączące się z domeną kolchicynową. Przedstawiciele kombretastatin mogą się okazać związkami skutecznymi w zwalczaniu wielu nowotworów, zarówno w monoterapiach, jak i w leczeniu skojarzeniowym. Ta grupa jest szczególnie obiecująca, ze względu na dużą toksyczność ogólnoustrojową kolchicyny, która wykluczyła ten związek z użycia do leczenia nowotworów.

Niezbędne są jednak dalsze badania w celu poznania mechanizmów ograniczających cytotoksyczne skutki działania inhibitorów polimeryzacji tubuliny oraz zwiększające skuteczność terapii przeciwnowotworowej, w tym także w kierunku możliwości ich zastosowania w komórkach opornych na działanie dotychczasowych chemioterapeutyków.

PIŚMIENNICTWO

- [1] Akashi Y., Okamoto I., Suzuki M., Tamura K., Iwasa T., Hisada S., Satoh T., Nakagawa K., Ono K., Fukuoka M.: The novel microtubule-interfering agent TZT-1027 enhances the anticancer effect of radiation in vitro and in vivo. *Br. J. Cancer*, 2007; 96: 1532-1539
- [2] Bachner M., De Santis M.: Vinflunine in the treatment of bladder cancer. *Ther. Clin. Risk Manag.*, 2008; 4: 1243-1253
- [3] Bai R., Edler M.C., Bonate P.L., Copeland T.D., Pettit G.R., Ludueña R.F., Hamel E.: Intracellular activation and deactivation of tasidotin, an analog of dolastatin 15: correlation with cytotoxicity. *Mol. Pharmacol.*, 2009; 75: 218-226
- [4] Bai R., Nguyen T.L., Burnett J.C., Atasoylu O., Munro M.H., Pettit G.R., Smith A.B.III, Gussio R., Hamel E.: Interactions of halichondrin B and eribulin with tubulin. *J. Chem. Inf. Model.*, 2011; 51: 1393-1404
- [5] Bhattacharyya B., Panda D., Gupta S., Banerjee M.: Anti-mitotic activity of colchicine and the structural basis for its interaction with tubulin. *Med. Res. Rev.*, 2008; 28: 155-183
- [6] Cai S.X.: Small molecule vascular disrupting agents: potential new drugs for cancer treatment. *Recent Pat. Anticancer Drug Discov.*, 2007; 2: 79-101
- [7] Carr M., Greene L.M., Knox A.J., Lloyd D.G., Zisterer D.M., Meegan M.J.: Lead identification of conformationally restricted β -lactam type kombretastatin analogues: synthesis, antiproliferative activity and tubulin targeting effects. *Eur. J. Med. Chem.*, 2010; 45: 5752-5766
- [8] Chaplin D.J., Jelinek C., Pettit G.R., Edvardsen K., Pinney K.G.: The Discovery and Development of the Combretastatins. CRC Press, LLC 2005
- [9] Checchi P.M., Nettles J.H., Zhou J., Snyder J.P., Joshi H.C.: Microtubule-interacting drugs for cancer treatment. *Trends Pharmacol. Sci.*, 2003; 24: 361-365
- [10] Ciulla T.A.: Opening new fronts in the battle against AMD. Nutrition and pharmacology are two key areas of study in the evolving effort to beat age-related macular degeneration. http://www.reviewofophthalmology.com/content/d/retinal_insider/i/1293/c/24902/
- [11] Cunningham C., Appleman L.J., Kirvan-Visovatti M., Ryan D.P., Regan E., Vukelja S., Bonate P.L., Ruvuna F., Fram R.J., Jekunen A., Weitman S., Hammond L.A., Eder J.P. Jr.: Phase I and pharmacokinetic study of the dolastatin-15 analogue tasidotin (ILX651) administered intravenously on days 1, 3, and 5 every 3 weeks in patients with advanced solid tumors. *Clin. Cancer Res.*, 2005; 11: 7825-7833

- [12] Dark G.G., Hill S.A., Prise V.E., Tozer G.M., Pettit G.R., Chaplin D.J.: Combretastatin A-4, an agent that displays potent and selective toxicity toward tumor vasculature. *Cancer Res.*, 1997; 57: 1829-1834
- [13] Dorleans A., Gigant B., Ravelli R.B., Mailliet P., Mikol V., Knosow M.: Variations in the colchicine-binding domain provide insight into the structural switch of tubulin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2009; 106: 13775-13779
- [14] Downing K.H., Nogales E.: Crystallographic structure of tubulin: implications for dynamics and drug binding. *Cell Struct. Funct.*, 1999; 24: 269-275
- [15] English D.P., Roque D.M., Santin A.D.: Class III β -tubulin overexpression in gynecologic tumors: implications for the choice of microtubule targeted agents? *Expert Rev. Anticancer Ther.*, 2013; 13: 63-74
- [16] Fahy J., Hellier P., Breillout F., Bailly C.: Vinflunine: discovery and synthesis of a novel microtubule inhibitor. *Semin. Oncol.*, 2008; 35: S3-S5
- [17] Faller B.A., Pandit T.N.: Safety and efficacy of vinorelbine in the treatment of non-small cell lung cancer. *Clin. Med. Insights Oncol.*, 2011; 5: 131-144
- [18] Farnsworth N.R.: Screening plants for new medicines. *Biodiversity*, 1988; 9: 83-97
- [19] Galano G., Caputo M., Tecce M.F., Capasso A.: Efficacy and tolerability of vinorelbine in the cancer therapy. *Curr. Drug Saf.*, 2011; 6: 185-193
- [20] Giraud A., Provot O., Hamzé A., Brion J.D., Alami M.: One-pot hydrosilylation-protodesilylation of functionalized diarylalkynes: a highly selective access to Z-stilbenes. Application to the synthesis of combretastatin A-4. *Tetrahedron Lett.*, 2008; 49: 1107-1110
- [21] González Pérez P., Serrano-Pozo A., Franco-Macías E., Montes-Latorre E., Gómez-Aranda F., Campos T.: Vincristine-induced acute neurotoxicity versus Guillain-Barré syndrome: a diagnostic dilemma. *Eur. J. Neurol.*, 2007; 14: 826-828
- [22] Greene L.M., Nathwani S.M., Bright S.A., Fayne D., Croke A., Gagliardi M., McElligott A.M., O'Connor L., Carr M., Keely N.O., O'Boyle N.M., Carroll P., Sarkadi B., Conneally E., Lloyd D.G., Lawler M., Megan M.J., Zisterer D.M.: The vascular targeting agent combretastatin-A4 and a novel *cis*-restricted β -lactam analogue, CA-432, induce apoptosis in human chronic myeloid leukemia cells and ex vivo patient samples including those displaying multidrug resistance. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2010; 335: 302-313
- [23] Greystoke A., Blagden S., Thomas A.L., Scott E., Attard G., Molife R., Vidal L., Pacey S., Sarkar D., Jenner A., De-Bono J.S., Steward W.: A phase I study of intravenous TZT-1027 administered on day 1 and day 8 of a three-weekly cycle in combination with carboplatin given on day 1 alone in patients with advanced solid tumours. *Ann. Oncol.*, 2006; 17: 1313-1319
- [24] Hayashi Y., Yamazaki-Nakamura Y., Yakushiji F.: Medicinal chemistry and chemical biology of diketopiperazine-type antimicrotubule and vascular-disrupting agents. *Chem. Pharm. Bull.*, 2013; 61: 889-901
- [25] Hori K., Saito S.: Induction of tumour blood flow stasis and necrosis: a new function for epinephrine similar to that of combretastatin A-4 derivative AVE8062 (AC7700). *Br. J. Cancer*, 2004; 90: 549-553
- [26] Hu Y., Lu X., Chen K., Yan R., Li Q.S., Zhu H.L.: Design, synthesis, biological evaluation and molecular modeling of 1,3,4-oxadiazoline analogs of combretastatin-A4 as novel antitubulin agents. *Bioorg. Med. Chem.*, 2012; 20: 903-909
- [27] Ishikawa H., Colby D.A., Seto S., Va P., Tam A., Kakei H., Rayl T.J., Hwang I., Boger D.L.: Total synthesis of vinblastine, vincristine, related natural products, and key structural analogues. *J. Am. Chem. Soc.*, 2009; 131: 4904-4916
- [28] Jacquesy J.C., Jouannetaud M.P.: La vinflunine, nouvel agent anticancéreux fluoré dérivé des alcaloïdes de Vinca. *Ann. Pharm. Fr.*, 2005; 63: 28-34
- [29] Jagetia G.C., Krishnamurthy H., Jyothi P.: Evaluation of cytotoxic effects of different doses of vinblastine on mouse spermatogenesis by flow cytometry. *Toxicology*, 1996; 112: 227-236
- [30] Jain S., Cigler T.: Eribulin mesylate in the treatment of metastatic breast cancer. *Biologics*, 2012; 6: 21-29
- [31] Johnson P.D., Sohn J.H., Rawal V.H.: Synthesis of C-15 vindoline analogues by palladium-catalyzed cross-coupling reactions. *J. Org. Chem.*, 2006; 71: 7899-7902
- [32] Jurczyszyn A., Wolska-Smołń T., Skotnicki A.B.: Znaczenie angiogenezy w prawidłowej i nowotworowej hematopoezie. *Adv. Clin. Exp. Med.*, 2003; 12: 489-496
- [33] Kambhampati S., Rajewski R.A., Tanol M., Haque I., Das A., Banerjee S., Jha S., Burns D., Borrego-Diaz E., Van Veldhuizen P.J., Banerjee S.K.: A second-generation 2-Methoxyestradiol prodrug is effective against Barrett's adenocarcinoma in a mouse xenograft model. *Mol. Cancer Ther.*, 2013; 12: 255-263
- [34] Kanakkanthara A., Teesdale-Spittle P.H., Miller J.H.: Cytoskeletal alterations that confer resistance to anti-tubulin chemotherapeutics. *Anticancer Agents Med. Chem.*, 2013; 13: 147-158
- [35] Kelly E.B., Tuszynski J.A., Klobukowski M.: QM and QM/MD simulations of the Vinca alkaloids docked to tubulin. *J. Mol. Graph. Model.*, 2011; 30: 54-66
- [36] Kim T.J., Ravoori M., Landen C.N., Kamat A.A., Han L.Y., Lu C., Lin Y.G., Merritt W.M., Jennings N., Spannuth W.A., Langley R., Gershenson D.M., Coleman R.L., Kundra V., Sood A.K.: Antitumor and antivascular effects of AVE8062 in ovarian carcinoma. *Cancer Res.*, 2007; 67: 9337-9345
- [37] Kingston D.G.: Tubulin-interactive natural products as anti-cancer agents. *J. Nat. Prod.*, 2009; 72: 507-515
- [38] Kuboyama T., Yokoshima S., Tokuyama H., Fukuyama T.: Stereocontrolled total synthesis of (+)-vincristine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2004; 101: 11966-11970
- [39] Lim K.H., Hiraku O., Komiyama K., Kam T.S.: Jerantinines A-G, cytotoxic *aspidosperma* alkaloids from *Tabernaemontana corymbosa*. *J. Nat. Prod.*, 2008; 71: 1591-1594
- [40] Lu Y., Chen J., Xiao M., Li W., Miller D.D.: An overview of tubulin inhibitors that interact with the colchicine binding site. *Pharm. Res.*, 2012; 29: 2943-2971
- [41] Madlambayan G.J., Meacham A.M., Hosaka K., Mir S., Jorgensen M., Scott E.W., Siemann D.W., Cogle C.R.: Leukemia regression by vascular disruption and antiangiogenic therapy. *Blood*, 2010; 116: 1539-1547
- [42] Mollinedo F., Gajate C.: Microtubules, microtubule-interfering agents and apoptosis. *Apoptosis*, 2003; 8: 413-450
- [43] Moudi M., Go R., Yien C.Y., Nazre M.: Vinca alkaloids. *Int. J. Prev. Med.*, 2013; 4: 1231-1235
- [44] Mutschler E., Geisslinger G., Kroemer H.K., Ruth P., Schaefer-Korting M.: Farmakologia i toksykologia. *Med. Pharm.*, 2009
- [45] Nabha S.M., Mohammad R.M., Dandashi M.H., Coupaye-Gerard B., Aboukameel A., Pettit G.R., Al-Katib A.M.: Combretastatin-A4 prodrug induces mitotic catastrophe in chronic lymphocytic leukemia cell line independent of caspase activation and poly(ADP-ribose) polymerase cleavage. *Clin. Cancer Res.*, 2002; 8: 2735-2741
- [46] Ngan V.K., Bellman K., Panda D., Hill B.T., Jordan M.A., Wilson L.: Novel actions of the antitumor drugs vinflunine and vinorelbine on microtubules. *Cancer Res.*, 2000; 60: 5045-5051
- [47] Nowak A.K., Brown C., Millward M.J., Creaney J., Byrne M.J., Hughes B., Kremmidiotis G., Bibby D.C., Leske A.F., Mitchell P.L., Pavlakis N., Boyer M., Stockler M.R.: A phase II clinical trial of the vascular disrupting agent BNC105P as second line chemotherapy for advanced Malignant Pleural Mesothelioma. *Lung Cancer*, 2013; 81: 422-427

- [48] Oostendorp R.L., Witteveen P.O., Schwartz B., Vainchtein L.D., Schot M., Nol A., Rosing H., Beijnen J.H., Voest E.E., Schellens J.H.: Dose-finding and pharmacokinetic study of orally administered indibulin (D-24851) to patients with advanced solid tumors. *Invest. New Drugs*, 2010; 28: 163-170
- [49] Pan L., Chai H., Kinghorn A.D.: The continuing search for antitumor agents from higher plants. *Phytochem. Lett.*, 2010; 3: 1-8
- [50] Pérez-Melero C., Maya A.B., del Rey B., Peláez R., Caballero E., Medarde M.: A new family of quinoline and quinoxaline analogues of combretastatins. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2004; 14: 3771-3774
- [51] Pettit G.R., Rhodes M.R., Herald D.L., Hamel E., Schmidt J.M., Pettit R.K.: Antineoplastic agents. 445. Synthesis and evaluation of structural modifications of (Z)- and (E)-Combretastatin A-4. *J. Med. Chem.*, 2005; 48: 4087-4099
- [52] Raja V.J., Lim K.H., Leong C.O., Kam T.S., Bradshaw T.D.: Novel antitumour indole alkaloid, Jerantinine A, evokes potent G2/M cell cycle arrest targeting microtubules. *Invest. New Drugs*. 2014; 32: 838-850
- [53] Ramnath N., Schwartz G.N., Smith P., Bong D., Kanter P., Berdzik J., Creaven P.J.: Phase I and pharmacokinetic study of anhydrovinblastine every 3 weeks in patients with refractory solid tumors. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 2003; 51: 227-230
- [54] Ray A., Okouneva T., Manna T., Miller H.P., Schmid S., Arthaud L., Luduena R., Jordan M.A., Wilson L.: Mechanism of action of the microtubule-targeted antimitotic depsipeptide tasidotin (formerly ILX651) and its major metabolite tasidotin C-carboxylate. *Cancer Res.*, 2007; 8: 3767-3776
- [55] Rice L., Pampo C., Lepler S., Rojiani A.M., Siemann D.W.: Support of a free radical mechanism for enhanced antitumor efficacy of the microtubule disruptor OXi4503. *Microvasc. Res.*, 2011; 81: 44-51
- [56] Rischin D., Bibby D.C., Chong G., Kremmidiotis G., Leske A.F., Matthews C.A., Wong S.S., Rosen M.A., Desai J.: Clinical, pharmacodynamic, and pharmacokinetic evaluation of BNC105P: a phase I trial of a novel vascular disrupting agent and inhibitor of cancer cell proliferation. *Clin. Cancer Res.* 2011; 17: 5152-5160
- [57] Risinger A.L., Giles F.J., Mooberry S.L.: Microtubule dynamics as a target in oncology. *Cancer Treat. Rev.*, 2009; 35: 255-261
- [58] Robinson R.: Zybrestat could help thyroid cancer patients to live longer. *Belle News, Science-tech*, 2011
- [59] Roepke J., Salim V., Wu M., Thamm A.M., Murata J., Ploss K., Boland W., De Luca V.: Vinca drug components accumulate exclusively in leaf exudates of Madagascar periwinkle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2010; 107: 15287-15292
- [60] Rogalska A., Szula E., Marczak A.: Novel agents stabilizing microtubule (MSA) from marine organisms – the future of chemotherapy. *Probl. Ter. Monitorowanej*, 2011; 22: 63-76
- [61] Roubille F., Kritikou E., Busseuil D., Barrere-Lemaire S., Tardif J.C.: Colchicine: an old wine in a new bottle? *Antiinflamm. Antiallergy Agents Med. Chem.*, 2013; 12: 14-23
- [62] Sato M., Sagawa M., Nakazato T., Ikeda Y., Kizaki M.: A natural peptide, dolastatin 15, induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis of human multiple myeloma cells. *Int. J. Oncol.*, 2007; 30: 1453-1459
- [63] Ścibior-Bentkowska D., Czacot H.: Komórki nowotworowe a stres oksydacyjny. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2009; 63: 58-72
- [64] Seve P., Dumontet C.: Is class III β -tubulin a predictive factor in patients receiving tubulin binding agents? *Lancet Oncol.*, 2008; 9: 168-175
- [65] Shen C.H., Shee J.J., Wu J.Y., Lin Y.W., Wu J.D., Liu Y.W.: Combretastatin A-4 inhibits cell growth and metastasis in bladder cancer cells and retards tumour growth in a murine orthotopic bladder tumour model. *Br. J. Pharmacol.*, 2010; 160: 2008-2027
- [66] Siemann D.W., Mercer E., Lepler S., Rojiani A.M.: Vascular targeting agents enhance chemotherapeutic agent activities in solid tumor therapy. *Int. J. Cancer*, 2002; 99: 1-6
- [67] Simmons T.L., Andrianasolo E., McPhail K., Flatt P., Gerwick W.H.: Marine natural products as anticancer drugs. *Mol. Cancer Ther.*, 2005; 4: 333-342
- [68] Smith N.F., Mani S., Schuetz E.G., Yasuda K., Sissung T.M., Bates S.E., Figg W.D., Sparreboom A.: Induction of CYP3A4 by vinblastine: role of the nuclear receptor NR1I2. *Ann. Pharmacother.*, 2010; 44: 1709-1717
- [69] Stanton R.A., Gernert K.M., Nettles J.H., Aneja R.: Drugs that target dynamic microtubules: a new molecular perspective. *Med. Res. Rev.*, 2011; 31: 443-481
- [70] Stengel C., Newman S.P., Leese M.P., Potter B.V., Reed M.J., Purohit A.: Class III β -tubulin expression and in vitro resistance to microtubule targeting agents. *Br. J. Cancer*, 2010; 102: 316-324
- [71] Szczepański M., Grzanka A., Izdebska M.: Mikrotubule – cel terapii przeciwnowotworowej. *J. Oncol.*, 2007; 57: 579-585
- [72] Tarlaci S.: Vincristine-induced fatal neuropathy in non-Hodgkin's lymphoma. *Neurotoxicology*, 2008; 29: 748-749
- [73] Thorpe P.E.: Vascular targeting agents as cancer therapeutics. *Clin. Cancer Res.*, 2004; 10: 415-427
- [74] Toso R.J., Jordan M.A., Farrell K.W., Matsumoto B., Wilson L.: Kinetic stabilization of microtubule dynamic instability in vitro by vinblastine. *Biochemistry*, 1993; 32: 1285-1293
- [75] Towle M.J., Salvato K.A., Budrow J., Wels B.F., Kuznetsov G., Aalfs K.K., Welsh S., Zheng W., Seletsky B.M., Palme M.H., Habgood G.J., Singer L.A., Dipietro L.V., Wang Y., Chen J.J. i wsp.: *In vitro* and *in vivo* anticancer activities of synthetic macrocyclic ketone analogues of halichondrin B. *Cancer Res.*, 2001; 61: 1013-1021
- [76] Vaishampayan U., Glode M., Du W., Kraft A., Hudes G., Wright J., Hussain M.: Phase II study of dolastatin-10 in patients with hormone-refractory metastatic prostate adenocarcinoma. *Clin. Cancer Res.*, 2000; 6: 4205-4208
- [77] Vici P., Colucci G., Giotta F., Sergi D., Filippelli G., Perri P., Botti C., Vizza E., Carpino A., Pizzuti L., Latorre A., Giannarelli D., Lopez M., Di Lauro L.: A multicenter prospective phase II randomized trial of epirubicin/vinorelbine versus pegylated liposomal doxorubicin/vinorelbine as first-line treatment in advanced breast cancer. A GOIM study. *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, 2011; 30: 39
- [78] Voss M.E., Ralph J.M., Xie D., Manning D.D., Chen X., Frank A.J., Leyhane A.J., Liu L., Stevens J.M., Budde C., Surman M.D., Friedrich T., Peace D., Scott I.L., Wolf M., Johnson R.: Synthesis and SAR of vinca alkaloid analogues. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2009; 19: 1245-1249
- [79] Wen X., Wu J., Wang F., Liu B., Huang C., Wei Y.: Deconvoluting the role of reactive oxygen species and autophagy in human diseases. *Free Radic. Biol. Med.*, 2013; 65: 402-410
- [80] Woyke T., Pettit G.R., Winkelmann G., Pettit R.K.: In vitro activities and postantifungal effects of the potent dolastatin 10 derivative auristatin PHE. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2001; 45: 3580-3584
- [81] Yamamoto N., Andoh M., Kawahara M., Fukuoka M., Niitani H.: Phase I study of TZT-1027, a novel synthetic dolastatin 10 derivative and inhibitor of tubulin polymerization, given weekly to advanced solid tumor patients for 3 weeks. *Cancer Sci.*, 2009; 100: 316-321

Autorki deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.