

Received: 17.04.2018
Accepted: 27.09.2018
Published: 13.12.2018

Ekteinascydyny – nowe leki przeciwnowotworowe z głębi mórz

Ecteinascidins – new antineoplastic drugs from the depths of the seas

Natalia Pawłowska¹, Anna Czajkowska², Anna Bielawska², Krzysztof Bielawski¹

¹Zakład Syntezy i Technologii Środków Leczniczych, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

²Samodzielna Pracownia Biotechnologii, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

Streszczenie

Trabektedyna, znana również jako ekteinascydyna 743 (Et-743), jest naturalnym alkaloidem tetrahydroizochinolinowym, który po raz pierwszy został wyizolowany z osłonicy morskiej *Ecteinascidia turbinata* żyjącej w Morzu Karaibskim. Trabektedyna jest jedną z pierwszych substancji pochodzenia morskiego, która została zarejestrowana jako lek w Unii Europejskiej. Stosowana jest u pacjentów z zaawansowanym mięsakiem tkanek miękkich w razie niepowodzenia konwencjonalnej terapii z użyciem antracyklin i ifosfamidu oraz w nawrotowym raku jajnika w połączeniu z liposomalną doksorubicyną. Mechanizm działania trabektedyny oparty jest na oddziaływaniu z mniejszą bruzdą podwójnej helisy DNA. Powstanie adduktu trabektedyna-DNA inicjuje kaskadę zdarzeń, które zakłócają prawidłowe funkcjonowanie niektórych czynników transkrypcyjnych, a także białek zaangażowanych w systemy naprawy DNA. Skutkiem tego jest zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G₂/M, co prowadzi do zaprogramowanej śmierci komórek – apoptozy. Ponadto liczne doniesienia wskazują, że trabektedyna działa nie tylko bezpośrednio na komórki nowotworowe, ale oddziałuje również na mikrośrodowisko guza, zmniejszając wytwarzanie głównych mediatorów zapalnych. Wieloaspektowy mechanizm działania może wyjaśniać pozytywne wyniki uzyskiwane po zastosowaniu trabektedyny w leczeniu pacjentów z nowotworami, które wykazują oporność na konwencjonalne chemioterapeutyki. Powszechne zastosowanie ekteinascydyn w terapii jak i badaniach klinicznych, jest jednak ograniczone wysoką ceną preparatów z tej grupy. Stąd też trwają intensywne prace nad poszukiwaniem syntetycznych analogów tych związków o równie dużej aktywności wobec komórek nowotworowych.

Słowa kluczowe:

chemioterapia nowotworów • leki alkilujące • ekteinascydyny • trabektedyna

Summary

Trabectedin, also known as ecteinascidin 743 (Et-743), is a tetrahydroisoquinoline alkaloid that was originally isolated from the Caribbean sea squirt *Ecteinascidia turbinata*. Trabectedin is one of the first anticancer drugs of marine origin that has been approved in the European Union. The compound is used to treat patients with advanced soft tissue sarcoma in case of failure of conventional anthracyclines and ifosfamide therapy and in the treatment of recurrent platinum-sensitive ovarian cancer in combination with pegylated liposomal doxorubicin. The mechanism of action of trabectedin is based on interaction with the minor groove of DNA double helix. It triggers a cascade of events that interfere with several transcription factors, DNA binding proteins and DNA repair pathways, resulting in G₂/M cell cycle arrest and ultimately apoptosis. Moreover, emerging evidence indicates that Et-743 has dual effects. In addition to induce direct growth inhibition, cell death and differentiation of malignant cells it also affects

Keywords:	the tumor microenvironment by reducing the production of key inflammatory mediators. A multifaceted mechanism of action may explain positive results when trabectedin is used in the treatment of cancer that exhibits resistance to conventional chemotherapeutics. The widespread use of ecteinascidins in therapy as well as in clinical trials is, however, limited by the high price of these compounds. Therefore, intensive work is being carried out on the search for synthetic analogues of ecteinascidins with equally high activity against tumor cells. cancer chemotherapy • alkylating drugs • ecteinascidins • trabectedin
GICID	01.3001.0012.7873
DOI:	10.5604/01.3001.0012.7873
Word count:	7110
Tables:	–
Figures:	4
References:	102

Adres autorki: mgr Natalia Pawłowska, Zakład Syntezy i Technologii Środków Leczniczych, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku, ul. Jana Kilińskiego 1, 15-089 Białystok, e-mail: npawłowska1@student.umb.edu.pl

EKTEINASCYDYNY – WYSTĘPOWANIE I WŁAŚCIWOŚCI LECZNICZE

Mimo znacznego postępu, jaki dokonał się w ostatnich latach w chemioterapii, radioterapii i immunoterapii, nadal nie ma w pełni skutecznych metod terapii przeciwnowotworowej. Utrudnieniem jest szybko pojawiająca się oporność na stosowane leki. Jest to związane z nasileniem wyrzutu leku na zewnątrz komórki z powodu aktywacji błonowej glikoproteiny P. Często obserwuje się także inaktywację leku w wyniku mutacji jego punktu uchwytu, wytworzenia alternatywnego szlaku metabolicznego lub nasilenia naprawy DNA. Ponadto, ogromnym problemem jest znaczna toksyczność chemioterapeutyków oraz pojawiające się działania niepożądane, obniżające jakość życia pacjentów. Prowadzone obecnie badania są ukierunkowane głównie na ulepszanie farmaceutycznych związków przeciwnowotworowych oraz ich modyfikację chemiczną w celu polepszenia profilu leczniczego. Największe nadzieje wiąże się z substancjami przeciwnowotworowymi, których działanie oparte jest o selektywne mechanizmy molekularne.

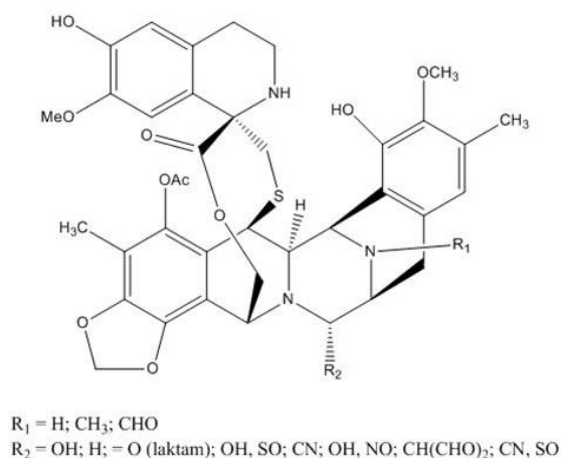
Przez wiele lat badania, związane z poszukiwaniem skutecznych chemioterapeutyków, koncentrowały się na testowaniu związków naturalnych – głównie roślin i mikroorganizmów. Było to związane z łatwym dostępem do tych substancji oraz obserwacjami medycyny tradycyjnej. Jednak od kilkunastu lat nastąpił wyraźny wzrost zainteresowania potencjałem terapeutycznym czynników zawartych w organizmach morskich [43, 44]. Świat podwodny jest cennym rezerwuarem unikalnych związków chemicznych – wciąż poznanych w niewielkim stopniu. W ostatnich latach wyłoniono spośród nich wiele nowych związków o udowodnionych silnych właściwościach przeciwnowotworowych [82, 84]. Wśród tych związków należy wymienić: trabectedynę (Yon-

delis[®], PharmaMar), cytarabinę (Cytosar-U[®], Bedford, Enzon), czy też mesylan eribuliny (Halaven[®], Eisai Inc.). Reprezentują pierwsze wprowadzone do terapii leki przeciwnowotworowe pozyskane z organizmów morskich [18, 44]. Niestety cena tych preparatów, związana z wysokimi kosztami izolacji z organizmów morskich, ogranicza ich powszechne zastosowanie.

Szczególnie ważną grupę substancji pochodzenia morskiego o dużej aktywności przeciwnowotworowej stanowią związki należące do ekteinascydyn (ryc. 1) [9]. Głównym przedstawicielem tej klasy chemioterapeutyków jest alkaloid tetrahydroizochinolinowy – trabektedyna (ryc. 1) [9, 43, 65, 82, 84]. Po raz pierwszy została wyizolowana w postaci ekstraktu w 1969 r. z osłonicy morskiej *Ecteinascidia turbinata* (ryc. 2) występującej w Morzu Karaibskim [65, 77].

Dopiero w 1996 r. w pełni wyizolowano i określono strukturę chemiczną trabektedyny. Otrzymywanie leku z surowca naturalnego jest niestety nieoptyczne – z jednej tony osłonicy otrzymuje się tylko 1 gram trabektedyny. Obecnie lek wytwarza się półsyntetycznie z produktu wyjściowego pochodzenia naturalnego, jakim jest cyjanosafracyna B, którą pozyskuje się metodami biotechnologicznymi z bakterii *Pseudomonas fluorescens* [9, 65].

Przeprowadzone w pierwszych latach XXI w. badania przedkliniczne z użyciem trabektedyny wykazały jej dużą aktywność cytotoksyczną *in vitro* w stężeniach pikomolowych wobec wielu komórek nowotworowych, w tym raka jajnika, piersi, stercza, nerki, a także czerniaka i niedrobnokomórkowego raka płuc [53, 96]. Skuteczność działania trabektedyny potwierdziły również badania z użyciem eksplantatów raka jajnika pobranych bezpośrednio od pacjentów, a także heteroprzeszczepów tego nowotworu [7, 45].



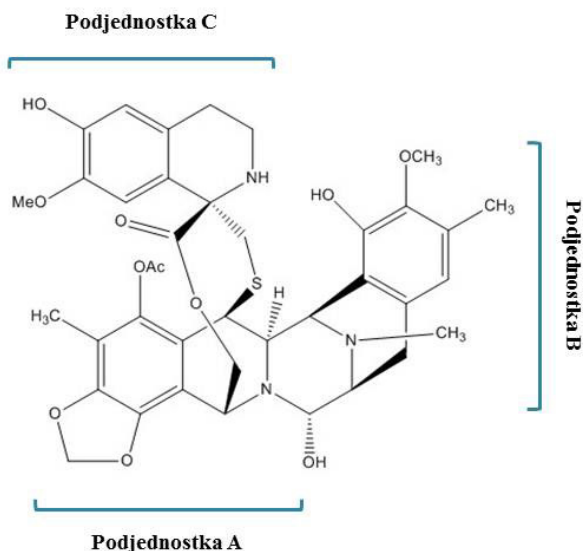
Ryc. 1. Ogólny wzór strukturalny związków należących do grupy ecteinascydyn oraz wzór strukturalny trabektedyny (R_1 – grupa metylowa CH_3 ; R_2 – grupa hydroksylowa OH)



Ryc. 2. *Ecteinascidia turbinata*

W Stanach Zjednoczonych w kwietniu 2005 r. FDA (Food and Drug Administration) przyznała trabektedynie status leku sierocego na raka jajnika. W Europie została zatwierdzona w 2007 r. pod nazwą Yondelis do leczenia pacjentów z zaawansowanym mięśniakiem tkanek miękkich (STS) w przypadku niepowodzenia konwencjonalnej terapii z zastosowaniem antracyklin i ifosfamidu [8, 9, 13, 14, 23, 44]. W 2009 r. została również zarejestrowana we wskazaniu do nawrotowego raka jajnika z liposomalną doksorubicyną [18, 44, 53, 60]. Oporność na trabektedynę jest związana z niewielką efektywnością systemu NER (nucleotide excision repair), co uczuła te nowotwory na działanie pochodnych platyny [15, 18, 72].

Wiele prowadzonych badań koncentruje się na ocenie działania trabektedyny z innymi chemioterapeutykami [16, 52, 83]. Testy przeprowadzone w warunkach *in vitro* i *in vivo* wskazują na addytywne lub synergistyczne



działanie trabektedyny w połączeniu z doksorubicyną [18]. Synergistyczne działanie stwierdzono również w czterech liniach komórkowych raka piersi (MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-436, HCC-1937) po zastosowaniu trabektedyny z olaparybem [5]. Olaparyb (AZD 2281) jest pierwszym zarejestrowanym w Europie i USA inhibitorem PARP we wskazaniu do leczenia pacjentek z rakiem jajnika [58]. Zadawalające wyniki uzyskano po zastosowaniu trabektedyny ze związkami platyny w liniach komórkowych ludzkiego raka jajnika (Igrov-1 i A2780), okrężnicy (HCT116), piersi (MCF-7) oraz w komórkach mięsaków (TE671, U-2OS i Saos-2) [18]. Dalsze badania *in vivo* z użyciem mysich modeli ksenoplantów ludzkiego raka jajnika oraz mięsaków, potwierdziły aktywność przeciwnowotworową trabektedyny z cisplatiną [16]. Podobnie, silne działanie przeciwnowotworowe w warunkach *in vivo* otrzymano stosując trabektedynę z oksaliplatiną lub paklitakselem [18, 90]. Uzyskane dobrze rokujące wyniki zachęcają do dalszych pogłębionych badań [16, 83, 90].

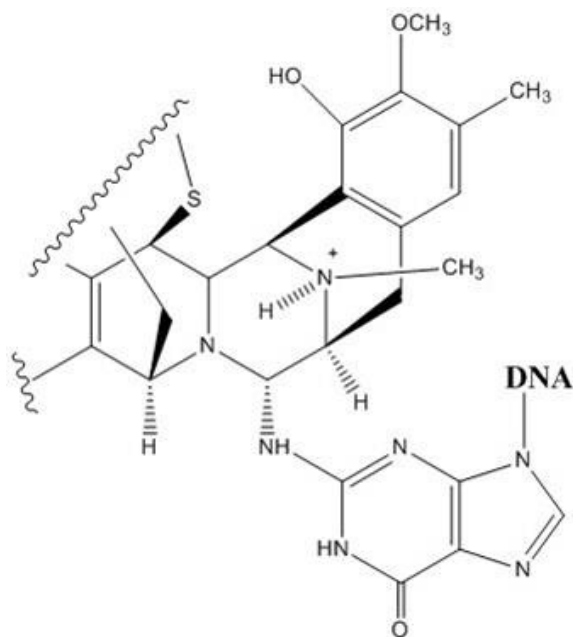
MECHANIZM WIĄZANIA TRABEKTEDYNY Z DNA

Trabektedyna wykazuje unikatowy mechanizm działania w porównaniu z innymi lekami cytostatycznymi [17, 18]. W przeciwieństwie do większości leków alkilujących, wiążących się z atomami N7 i O6 guaniny, oddziałuje w małej bruździe DNA i alkiluje guaninę w pozycji N2 [11, 61, 70, 73]. Mechanizm tworzenia kowalencyjnego adduktu wymaga reakcji trabektedyny z DNA z udziałem kationu iminowego powstałego w wyniku wewnątrzcząsteczkowej dehydratacji w obrębie ugrupowania karbinoloaminowego – obecnego w podjednosce A trabektedyny [70] (ryc. 3). Badania zależności struktura-aktywność (SAR, structure-activity relationship) wykazały, że ugrupowanie karbinoloaminowe jest ważne w farmakologicznej skuteczności leku. Pochodne trabek-

tedyny, pozbawione tej reaktywnej grupy – np. Et-745, charakteryzowały się 100-krotnie mniejszą aktywnością [11]. Natomiast badania NMR kompleksu trabektedyny z DNA ujawniły, że jedynie podjednostki A i B są odpowiedzialne za rozpoznanie sekwencji nukleotydowych w obrębie małej bruzdy DNA, podczas gdy podjednostka C znajduje się na zewnątrz bruzdy i ułożona jest prostopadle w stosunku do rdzenia A-B [17, 18]. Początkowo uważano, że rola pierścienia C jest podstawowa w aktywności przeciwnowotworowej trabektedyny przez hamowanie wiązania czynników transkrypcyjnych i naprawczych w miejscu uszkodzenia DNA. Jednak jak wykazały najnowsze badania, obecność pierścienia C nie jest konieczna do dużej aktywności. Badania doświadczalne potwierdziły, że syntetyczne pochodne trabektedyny o uproszczonej budowie nadal zachowują właściwości przeciwnowotworowe na poziomie wartości IC_{50} wynoszących kilka mikromoli [22, 86]. Badania prowadzone w naszym ośrodku badawczym nad nowymi pochodnymi oktahydropirazyno [2,1-a:5,4-a'] diizochinoliny wykazały, że mają dużą aktywność cytotoksyczną wobec ludzkich komórek raka sutka MCF-7 i MDA-MB-231 [36, 50].

Utworzony addukt trabektedyna-DNA (ryc. 3) jest dodatkowo stabilizowany przez oddziaływania van der Waalsa oraz jedno lub większą liczbę wiązań wodorowych [70].

Wiązania te powstają między podjednostkami A i B trabektedyny, a sąsiadującymi nukleotydami tej samej lub przeciwległej nici B-helisy DNA. Swoistość nukleotydowa trabektedyny jest związana z obecnością guaniny w centralnej pozycji trypletów 5'-puryna-GC i 5'-pirymidyna-GG. Faworyzowane są trójki TGG, CGG, AGC,



Ryc. 3. Struktura adduktu trabektedyna-DNA

GGC, podczas gdy sekwencja CGA jest całkowicie wykluczona [70]. Powstały addukt rozszerza małą bruzdę, co sprawia, że helisa DNA zagina się do dużej bruzdy. Uwalnia to kaskadę zdarzeń mających na celu naprawę uszkodzonego DNA [61]. Komórka uruchamia mechanizmy naprawcze, w tym system naprawczy NER (nucleotide excision repair), opierający się na wycinaniu uszkodzonych sekwencji nukleotydów [70].

WPŁYW TRABEKTEDYNY NA PROCESY NAPRAWY USZKODZEŃ DNA

Wśród mechanizmów naprawy DNA wyróżnia się: naprawę przez wycinanie zasad (BER, base excision repair), przez wycinanie nukleotydów (NER, nucleotide excision repair), naprawę niesparowanych zasad (MMR, mismatch repair), rekombinację homologiczną (HR, homologous recombination repair), a także łączenie niehomologicznych zakończeń (NHEJ, non homologous end joining) [46, 63]. Aktywacja określonego mechanizmu zależy od typu powstałego defektu. Szlaki BER, NER i MMR odrywają istotną rolę w naprawie takich uszkodzeń jak: jednoniciowe pęknięcia DNA (SSB, single strand breaks), błędy replikacji, insercje, delekcje oraz addukty [46]. W naprawie dwuniciowych pęknięć DNA (DSB, double strand breaks) bierze udział rekombinacja homologiczna oraz proces łączenia niehomologicznych zakończeń [87]. Rekombinacja homologiczna może zachodzić w fazach S i G_2 cyklu komórkowego, a łączenie niehomologicznych zakończeń – w każdej fazie cyklu komórkowego, także w komórkach będących w fazie G_0 [63, 87].

System naprawy DNA przez wycinanie nukleotydów umożliwia usuwanie wielu uszkodzeń podwójnej helisy DNA, które prowadzą do zniekształcenia jej drugorzędowej struktury lub blokują procesy replikacji i transkrypcji [87]. NER może przebiegać dwoma odmiennymi szlakami. Jeden z nich jest sprzężony z transkrypcją (TCR, transcription coupled repair) i bierze udział w usuwaniu uszkodzeń blokujących syntezę mRNA – prowadzoną przez polimerazę RNA II. Drugi natomiast jest niezależny od transkrypcji (GGR, global genomic repair) i eliminuje nieprawidłowości z nietranskrybowanych fragmentów genomu [40, 87].

Istnieją liczne doniesienia, że trabektedyna może swoiście oddziaływać na proces TC-NER (transcription-coupled nucleotide excision repair) [21, 41, 61, 91, 92], który w prawidłowych warunkach jest zaangażowany w naprawę uszkodzeń DNA powstałych w wyniku: promieniowania UV, działania cisplatyny i jej pochodnych. Pierwszy etap TC-NER to rozpoznanie uszkodzenia, a następnie wytworzenie naprawczego kompleksu otwartego, umiejscowionego w jego pobliżu. W powstawanie kompleksu inicjującego są zaangażowane białka należące do rodziny XP (*Xeroderma pigmentosum*) oraz inne czynniki systemu NER, takie jak TFIIH, czy RPA (replication protein A) [87]. Najbardziej prawdopodobna hipoteza sugeruje, że cząsteczka trabektedyny,

tworząca kowalencyjny addukt z DNA, wyłapuje czynniki wchodzące w skład kompleksu NER; powstaje duży, trójskładnikowy kompleks cytotoksyczny [11]. To powoduje zakłócenia w procesie ochrony nieuszkodzonej nici DNA przed działaniem endonukleaz. Dochodzi do nacięcia przez endonukleazę XPF/ERCC1 fragmentu DNA umiejscowionego na nici przeciwnej do miejsca uszkodzonego i prowadzi do powstania jednoniciowych pęknięć DNA (SSB) w transkrybowanych genach, a kończy się śmiercią komórki [11, 24, 41, 91, 92]. Potwierdzeniem przedstawionej hipotezy są badania, w których wykazano, że linie komórkowe z deficytem różnych białek systemu NER są mniej wrażliwe na działanie trabektedyny [10, 21, 92]. Brak ekspresji funkcjonalnych białek XPG w tych liniach komórkowych wywołuje oporność na trabektedynę [92, 94].

Inne badania sugerują istotną rolę rekombinacji homologicznej (HR) w mechanizmie przeciwnowotworowego działania trabektedyny [41, 61, 85, 89, 93]. W procesie HR do naprawy uszkodzeń DNA jest wykorzystywana informacja genetyczna siostrzanej chromatyny lub homologicznego chromosomu [69]. Główną rolę odgrywają tu białka kompleksu MRN (complex MRE11, RAD50 i NBS1) oraz białko CtIP (BRCA1 C-terminal interacting protein) [80]. Wymienione białka biorą udział w powstawaniu krótkich odcinków jednoniciowego DNA (ssDNA, single stranded DNA), inicjując naprawę uszkodzeń w wyniku rekombinacji homologicznej. Z udziałem czynników BRCA1 (breast cancer type 1 susceptibility protein), BRCA2 (breast cancer type 2 susceptibility protein) oraz RAD51 dochodzi do ligacji krótkich odcinków jednoniciowego DNA z nieuszkodzoną matrycą. W wyniku działania polimeraz, nukleaz, helikaz oraz innych protein następuje naprawa uszkodzeń [78, 80].

W kilku badaniach wykazano, iż w komórkach pozbawionych czynników zaangażowanych w proces HR skutek działania trabektedyny jest istotnie silniejszy w porównaniu do komórek ze sprawnie przebiegającą rekombinacją homologiczną [61, 85]. Takie różnice nie zostały zaobserwowane w komórkach z uszkodzonym systemem NHEJ [85]. Zaburzenia funkcjonowania procesu HR powodowały zahamowanie naprawy istniejących nieprawidłowości – dwuniciowych pęknięć DNA podczas fazy S cyklu komórkowego. To indukowało wprowadzenie komórek na drogę programowanej śmierci komórki [85, 93]. Szczególna wrażliwość komórek z upośledzonym systemem HR na działanie trabektedyny wydaje się również potwierdzona w badaniach klinicznych [12, 51, 57, 60, 81]. U pacjentów z mięsakiem tkanek miękkich, podanych leczeniu trabektedyną, zaobserwowano słabsze działanie terapeutyczne w przypadku ekspresji markerów nowotworowych BRCA1 i BRCA2 [61].

Istotne badania, mające na celu dokładniejsze poznanie mechanizmu przeciwnowotworowego działania dwóch alkaloidów tetrahydroizochinolinowych, przeprowadzili Feuerhahn i wsp. Wykazali, że trabektedyna i Zalypsis (syntetyczny analog trabektedyny) tworząc wiązania

kowalencyjne z jedną z nici DNA stymulują, w sposób zależny od stężenia, nukleazę XPF/ERCC1 do cięcia nici znajdującej się po przeciwnej stronie adduktu [24]. Ponadto stwierdzono, że pod wpływem działania tych związków dochodzi do upośledzenia procesu syntezy RNA. Było to spowodowane m.in. zahamowaniem wiązania czynników transkrypcyjnych, takich jak Sp1 do DNA, a także zatrzymaniem elongacji polimerazy RNA II w miejscu uszkodzenia. Uzyskane podczas eksperymentów wyniki potwierdzono za pomocą symulacji z użyciem modelowania molekularnego [24].

Ponadto badania dowiodły, iż w zależności od użytego stężenia wyróżnia się dwa główne mechanizmy działania trabektedyny wobec komórek nowotworowych, które warunkują jej silne właściwości antynowotworowe [29]. Pierwszy z nich jest zależny od transkrypcji, występuje w zakresie stężeń 1-10 nM i prowadzi do zahamowania cyklu komórkowego z akumulacją komórek w fazie G₂/M. Natomiast podczas stosowania leku w wyższych stężeniach (10-100 nM) jest uruchamiany, niezależny od transkrypcji, mechanizm wiodący do programowanej śmierci komórki. Omawiane właściwości cytostatyczne i proapoptotyczne trabektedyny wynikają zatem z aktywacji dwóch różnych ścieżek sygnałowych [29].

WŁAŚCIWOŚCI PROAPOPTOTYCZNE TRABEKTEDYNY

Trabektedyna wykazuje silne, zależne od zastosowanej dawki, właściwości cytostatyczne i proapoptotyczne w różnych liniach komórek nowotworowych [1, 6, 20, 29, 33]. U podstaw takiego działania leży aktywacja dwóch różnych ścieżek sygnałowych: szlaku zależnego od transkrypcji prowadzącego do zatrzymania cyklu komórkowego z akumulacją komórek w fazie G₂/M oraz drogi niezależnej od transkrypcji – indukującej apoptozę [1, 29].

Apoptoza, zwana również programowaną śmiercią komórki, to ewolucyjnie zachowany proces, który w warunkach fizjologicznych służy do eliminacji zbędnych lub uszkodzonych komórek, a tym samym odgrywa istotną rolę w utrzymaniu homeostazy w organizmie [28, 35, 54]. W czasie apoptozy dochodzi do obkurczenia i zaokrąglenia komórki, kondensacji chromatyny oraz fragmentacji jądra [34, 35, 71, 98]. Błona komórkowa zachowuje integralność aż do końcowego etapu procesu, kiedy następuje formowanie i rozpad komórki na ciała apoptotyczne [34, 79]. Zaburzenia apoptozy powodują różnorodne zmiany patologiczne związane z inicjacją, promocją i progresją kancerogenezy, a także wiążą się z niepowodzeniem stosowanego leczenia [28, 35]. Apoptoza, w przeciwieństwie do nekrozy, nie wywołuje stanu zapalnego. Proces ten jest preferowanym sposobem śmierci komórki w terapii przeciwnowotworowej. Regulacja szlaków apoptotycznych i selektywna indukcja apoptozy przez substancje lecznicze skupia obecnie uwagę wielu badaczy jako obiecujące podejście w terapii chorób nowotworowych [26, 27, 28, 35, 42, 66, 75, 82, 97, 98].

Zainicjowanie apoptotycznej śmierci komórki może przebiegać w dwojaki sposób – zależny od receptorów (szlak zewnątrzpochodny) oraz z udziałem mitochondriów (szlak wewnątrzpochodny) [27, 28, 34, 71, 75, 82, 98, 100].

Zewnątrzpochodny szlak apoptozy rozpoczyna się na powierzchni komórki, gdy swoisty ligand wiąże się z odpowiednim receptorem, który zawiera cytoplazmatyczną domenę śmierci – DD (death domain) [27, 42, 71, 75, 82, 98, 100]. Do takich receptorów zaliczane są m.in.: TNFR-1, TNFR-2, CD95, Fas/CD95, CD40, TRAIL-R1, TRAIL-R2. Należą do nadrodziny TNFR (tumour necrosis factor receptor). Po związaniu odpowiedniego liganda śmierci (TNF, TRAIL czy FasL) receptory gromadzą się w klastry w błonie komórkowej i promują rekrutację białek adaptorowych. Białka adaptorowe także zawierają efektorową domenę śmierci DED (death effector domain), dzięki której wchodzi w interakcje z prokaspazą-8 [27, 35, 42, 44, 62, 71, 75, 98, 100]. Receptor, białko adaptorowe i prokaspaza tworzą trójściładnikowy kompleks sygnałowy DISC (death inducing signaling complex) [27, 62, 71, 75, 98]. W jego obrębie zachodzi autokatalityczna aktywacja kaspazy-8, powodując uruchomienie kaskady kaspaz wykonawczych i następnie śmierci komórki [27, 42, 75, 79, 98].

Do aktywacji wewnętrznego szlaku apoptozy dochodzi pod wpływem wielu czynników, takich jak: wzrost stężenia jonów wapniowych (Ca^{2+}), reaktywnych form tlenu ROS (reactive oxygen species) oraz uszkodzeń DNA [26, 76, 98]. Wymienione zmiany powodują załamanie mitochondrialnego potencjału błonowego, a konsekwencją jest wzrost przepuszczalności błon mitochondrialnych [44, 56, 76, 98, 101]. Skutkiem jest uwolnienie cytochromu c z przestrzeni międzybłonowej mitochondriów do cytozolu [44, 76, 95]. W cytoplazmie białko to łączy się z czynnikiem Apaf-1 (apoptosis protease-activating factor 1) oraz prokaspazą-9. W ten sposób powstaje wielobiałkowy kompleks zwany apoptosomem, który aktywuje kaspazy efektorowe [26, 54, 56, 75, 76, 98]. Wraz z cytochromem c z mitochondrium uwalniane są również inne białka, np. Smac/DIABLO (second mitochondria-derived activator of caspase/direct inhibitor of apoptosis-binding protein with low pI) oraz Omi/HtrA2 [54, 75, 98]. Ich rolą jest hamowanie aktywności białek należących do rodziny inhibitorów apoptozy – IAPs (inhibitors of apoptosis protein family) [38, 71, 75, 95, 98]. Ponadto, wewnątrzpochodny szlak apoptozy jest regulowany przez grupę białek z rodziny Bcl-2, wśród których wyróżnia się czynniki proapoptotyczne (Bax, Bak) oraz czynniki antyapoptotyczne (Bcl-2, Bcl-X_L, Mc1-1, XIAP). Aktywność tych białek jest kontrolowana przez czynniki należące do podrodziny BH3, takie jak: Bim, Bid, Puma (p53 upregulated modulator of apoptosis), czy Noxa [26, 47, 56, 75, 101].

Trabektedyna jest opisywana jako czynnik o silnych właściwościach proapoptotycznych [4, 6, 20, 29, 55, 97]. Jedną z pierwszych prac, dotyczących mechanizmu apoptozy w komórkach poddanych działaniu trabektedyny, wyka-

zała, że związek ten jest zdolny do indukcji programowanej śmierci komórki, która ostatecznie prowadzi do między nukleosomalnej fragmentacji DNA [29]. Badania zostały przeprowadzone z użyciem komórek białaczek ludzkich HL-60 i HeLa. Uzyskany wynik był niezależny od transkrypcji i receptora Fas/CD95, ale angażował kinazy JNK (c-Jun N-terminal kinases), mitochondria oraz kaspazę-3 [29]. W komórkach poddanych działaniu trabektedyny po krótkim czasie obserwowano uwalnianie cytochromu c z mitochondriów. W przeprowadzonym eksperymencie zaobserwowano również zniesienie tego efektu w komórkach z nadekspresją białka Bcl-2. Zarówno aktywacja kinaz JNK, jak również wypływ cytochromu c z przestrzeni międzybłonowej mitochondrium to pierwszy etap apoptozy indukowanej trabektedyną. Opisane zmiany wykrywano już w ciągu pierwszych 6 godzin ekspozycji na testowany związek [29]. Potwierdzeniem wpływu trabektedyny na wewnątrzpochodny szlak apoptozy oraz braku aktywacji szlaku zewnątrzpochodnego było badanie z zastosowaniem blokera receptora Fas [29]. Taki układ doświadczalny nie prowadził do zahamowania aktywacji apoptozy indukowanej przez trabektedynę w komórkach linii Jurkat, co wykluczyło udział tego receptora w mechanizmie działania leku [29]. Jednak od kiedy wykazano, że aktywność trabektedyny jest związana z systemem naprawy DNA przez wycinanie nukleotydów (NER) powodującym powstawanie letalnych pęknięć nici DNA [91, 92], ponownie zaczęto uwzględniać udział zewnętrznego szlaku indukcji apoptozy w mechanizmie działania leku [55]. Obecnie wiadomo również, że czynniki prowadzące do uszkodzeń w obrębie DNA mogą indukować śmierć komórki przez ligandy Fas i TRAIL [20].

Badania przeprowadzone na liniach komórkowych raka sutka MCF-7 i MDA-MB-453 wykazały, że trabektedyna obniża przeżywalność komórek, indukuje zmiany morfologiczne związane z procesem apoptozy oraz degradację DNA, a także generuje wytwarzanie reaktywnych form tlenu – ROS [4]. W tym samym badaniu przeanalizowano zmiany w ekspresji białek związanych z procesem programowanej śmierci komórki. Dowiedziono, że trabektedyna wywołuje selektywną aktywację zewnętrznego oraz wewnętrznego szlaku apoptozy w liniach komórkowych ludzkiego raka sutka o różnych genotypach. W komórkach MCF-7, poddanych działaniu trabektedyny, wykazano wyższy poziom białek zaangażowanych w zewnętrzną szlak apoptozy (TRAIL-R1/DR4, TRAIL-R2/DR5, Fas/TNFRSF6, TNF RI/TNFRSF1A i FADD) w porównaniu do komórek kontrolnych. Natomiast w komórkach MDA-MB-453 odnotowano spadek ekspresji białek antyapoptotycznych Bcl-2 i Bcl-X_L i wzrost ekspresji czynników stymulujących apoptozę – Bax i Bad, a także cytochromu c, białka Smac/DIABLO i aktywnej postaci kaspazy-3 [4].

WPŁYW TRABEKTEDYNY NA AKTYWNOŚĆ CZYNNIKA TRANSKRYPCYJNEGO NF-κB

NF-κB (nuclear factor-kappa B) jest czynnikiem transkrypcyjnym, który odgrywa istotną rolę w wielu pro-

cesach komórkowych. Przykładami takich procesów są: rozwój embrionalny, neurogeneza, proliferacja komórkowa, apoptoza, a także odpowiedź immunologiczna na infekcje oraz stany zapalne [64, 68]. NF- κ B pobudza ekspresję docelowych genów w odpowiedzi na czynniki stymulujące, takie jak: antygeny wirusowe i bakteryjne (lipopolisacharydy – LPS; dsRNA), promieniowanie UV oraz niektóre cytokiny (np. IL-1 β , IL-2 i TNF- α) [59, 99]. W komórce cząsteczka NF- κ B występuje w postaci homodimeru lub heterodimeru, do którego jest przyłączone białko inhibitorowe – I κ B (inhibitory proteins of NF- κ B). Wskutek stymulacji szlaku związanego z NF- κ B, kaskada sygnalizacyjna prowadzi do aktywacji kinazy I κ B – IKK (I κ B kinase), która przeprowadza fosforylację I κ B. Rezultatem jest oddysocjowanie I κ B od dimeru NF- κ B przez degradację proteasomu i powstanie tzw. sygnału jądrowej lokalizacji dimeru [68, 99]. Następnie NF- κ B jest kierowany do jądra komórkowego, gdzie przyłącza się do odpowiednich miejsc wiążących i inicjuje transkrypcję określonych genów [59, 99]. Dotąd zidentyfikowano około 400 genów, których ekspresja może być zależna od czynnika NF- κ B. Są to m.in. geny: cytokin, chemokin, cząsteczek adhezyjnych, czynników wzrostu, onkogenów, a także białek pro- i antyapoptotycznych [59].

Dysregulacja szlaków przekazywania NF- κ B jest związana z chorobami o podłożu zapalnym oraz występuje w niektórych nowotworach [64, 99]. Konstytutywną aktywację NF- κ B zidentyfikowano w rakach: piersi, jelita grubego, stercza, nowotworach skóry i nowotworach układu limfatycznego [59]. Zatem blokowanie przekazywania sygnału z udziałem NF- κ B w komórkach nowotworowych jest ważną strategią poszukiwania i projektowania nowych leków przeciwnowotworowych. W 2010 r. na łamach czasopisma *Biochemical Pharmacology* opublikowano pracę, w której opisano badania mające na celu identyfikację drobnocząsteczkowych inhibitorów czynnika NF- κ B [59]. W zespole Millera i wsp. początkowo przeprowadzono badania przesiewowe 2 800 klinicznie zatwierdzonych leków oraz bioaktywnych związków wybranych z NIH Chemical Genomics Center Pharmaceutical Collection (NPC). Na tej podstawie wyselekcjonowano 19 cząsteczek, które hamowały sygnalizację NF- κ B przy stężeniu 20 nM. Następnie wybrane związki poddano bardziej szczegółowym analizom, które miały na celu poznanie mechanizmu działania tych cząsteczek. Wśród grupy związków o najwyższej aktywności znalazła się trabektedyna. Badania przeprowadzone z użyciem trabektedyny sugerują, że mechanizm jej działania polega na: hamowaniu aktywności białka NF- κ B, aktywacji kaspaz wykonawczych 3/7 oraz indukcji uwalniania LDH z komórki [59].

WPŁYW TRABEKTEDYNY NA MIKROŚRODOWISKO GUZA NOWOTWOROWEGO

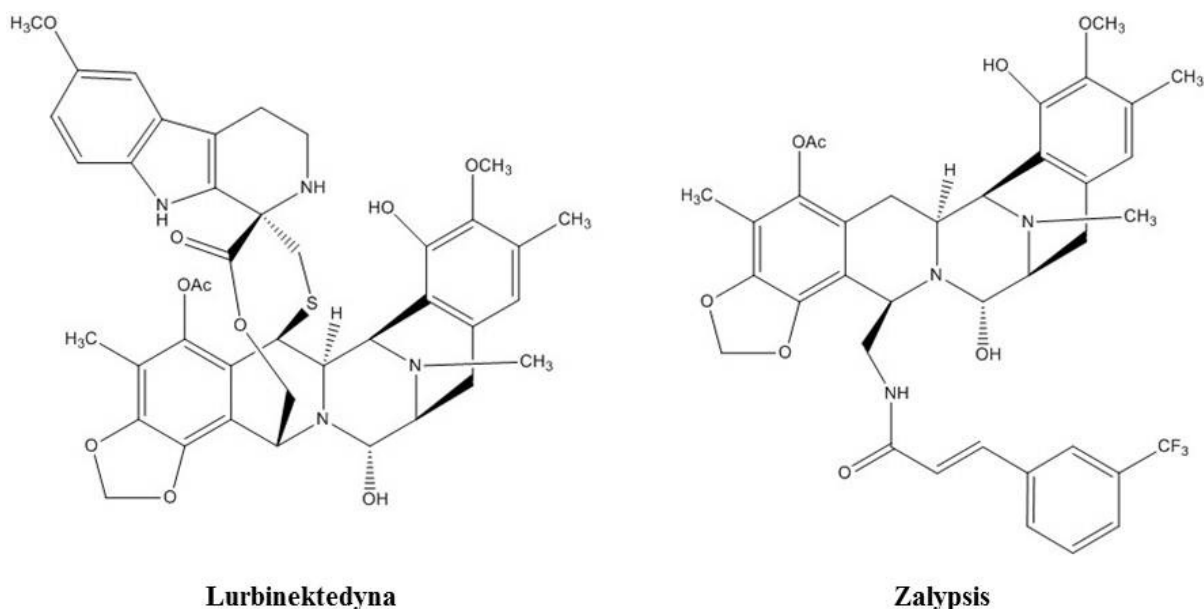
Progresja nowotworowa jest związana z powstawaniem swoistych wariantów komórek nowotworowych, które mogą rekrutować ze szpiku i z krwiobiegu niektóre komórki hematopoetyczne i mezenchymalne [88,

89]. Wśród komórek infiltrujących guzy nowotworowe są m.in.: monocyty, makrofagi, granulocyty, komórki tuczne, dendrytyczne, mieloblastyczne komórki supresorowe, a także fibroblasty. Rekrutowane komórki z macierzą pozakomórkową tworzą najbliższe otoczenie komórek nowotworowych i są określane mianem – mikrośrodowiska nowotworu [30, 88]. Pod wpływem swoistych czynników, wydzielanych przez komórki nowotworowe, niektóre z rekrutowanych komórek ulegają fenotypowemu „przeprogramowaniu”. W ten sposób powstają swoiste dla nowotworów makrofagi TAM (tumor-associated macrophages) [2, 31] oraz fibroblasty CAF (cancer-associated fibroblasts) [30, 39, 89].

Atrakcyjność trabektedyny jest związana z tym, iż ma szerszy zakres działania w porównaniu do innych stosowanych obecnie chemioterapeutyków. Intensywne badania tego związku wykazały, że oddziałuje nie tylko na komórki nowotworowe, ale w znaczący sposób wpływa także na mikrośrodowisko nowotworu [2, 3, 15, 30, 31, 61]. Badania przeprowadzone przez Allavena i wsp. wykazały, że wśród wszystkich leukocytów, ludzkie monocyty pochodzące z krwi i makrofagi były najbardziej wrażliwe na działanie trabektedyny [3]. To odkrycie zapoczątkowało serię eksperymentów mających na celu wyjaśnienie selektywności trabektedyny wobec jednojądrzastych fagocytów.

Trabektedyna przy niższych stężeniach, powodujących nieznaczny cytotoksycyzm, hamuje w warunkach *in vitro* wytwarzanie mediatorów prozapalnych CCL2 i interleukiny-6 (IL-6) przez monocyty, makrofagi oraz makrofagi związane z mikrośrodowiskiem guza izolowanego podczas biopsji raka jajnika [3]. Modulacja cytokin i chemokin występuje na poziomie transkrypcji, co wskazuje, że wpływ trabektedyny na regulację transkrypcji może mieć istotne znaczenie nie tylko w komórkach nowotworowych, ale także w niektórych komórkach prawidłowych, które wytwarzają czynniki niezbędne do wzrostu i progresji guza [32]. CCL2 pełni główną rolę w rekrutacji monocytów do miejsc zmienionych nowotworowo, podczas gdy IL-6 jest czynnikiem wzrostu w nowotworach [89]. Podobne wyniki uzyskano w tłuszczakomięsaku śluzowatym – nowotworze szczególnie wrażliwym na działanie trabektedyny [19, 32]. Zastosowana w stężeniach niewywołujących działania cytotoksycznego, trabektedyna selektywnie hamowała wytwarzanie CCL2, CXCL8, IL-6, VEGF (vascular endothelial growth factor) i białka pentraksyny-3 (PTX3) w hodowlach komórek pierwotnych oraz liniach komórkowych tłuszczakomięsaka śluzowatego [32]. Rezultaty tych badań potwierdzono również z wykorzystaniem mysiego modelu heteroprzeszczepu tego nowotworu. U zwierząt eksperymentalnych, którym podawano trabektedynę, odnotowano znaczną redukcję w ekspresji makrofagów infiltrujących CCL2/CXCL8/CD68+ [32].

Aktywność biologiczna trabektedyny, związana z wpływem na mikrośrodowisko nowotworu, została potwierdzona również w badaniach klinicznych u pacjentów



Ryc. 4. Struktury chemiczne analogów trabektedyny

chorych na tłuszczakomięsa śluzowatego. Terapia z użyciem trabektedyny w wielu przypadkach przyniosła pozytywną odpowiedź kliniczną już po kilku cyklach chemioterapii [37, 88].

SYNTEZYCZNE ANALOGI TRABEKTEDYNY

W licznych laboratoriach naukowych trwają intensywne prace nad syntetycznymi lub półsyntetycznymi analogami ekteinascydyń. Niektóre spośród nich, takie jak Lurbinektedyna czy Zalypsis (ryc. 4) są już na II etapie badań klinicznych.

Lurbinektedyna (PM01183), podobnie jak trabektedyna, zawiera pentacykliczny szkielet zbudowany z dwóch skondensowanych pierścieni tetrahydroizochinoliny (podjednostki A i B), który odpowiada za rozpoznanie i wiązanie do DNA. Odmiernym elementem struktury jest tetrahydro- β -karbolina, która zastępuje obecny w cząsteczce trabektedyny dodatkowy pierścień tetrahydroizochinoliny wchodzący w skład podjednostki C [49].

Zalypsis (PM00104) jest pochodną jorumycyny, uzyskaną w procesie syntezy organicznej. Jorumycyna to naturalnie występujący alkaloid tetrahydroizochinolinowy wyizolowany z płaszcza i śluzu ślimaka nagoskrzelnego *Jorunna funebris*, występującego powszechnie w wodach Pacyfiku [48, 77]. Badania z wykorzystaniem jorumycyny

wykazały, że związek ten jest bardzo aktywny *in vitro* wobec różnych typów komórek nowotworowych, w tym komórek opornych na stymulację czynnikami proapoptycznymi [25, 67]. Silne działanie jorumycyny, a także sukcesy kliniczne uzyskane podczas stosowania trabektedyny skłoniły do rozpoczęcia intensywnych prac nad chemiczną modyfikacją struktury jorumycyny w celu uzyskania jej syntetycznego analogu – Zalypsisu [67]. Zalypsis, podobnie jak trabektedyna, zbudowany jest z pentacyklicznego szkieletu. Nie ma jednak mostka laktonowego, a także podjednostki C w postaci pierścienia tetrahydroizochinolinowego – zamiast tego występuje ugrupowanie kwasu trifluorocynamonowego [77]. Zalypsis jest w II fazie badań klinicznych w raku szyjki macicy. Natomiast Lurbinektedyna wykazała dużą aktywność w II fazie badań klinicznych u pacjentek chorych na raka piersi z mutacją BRCA1 i BRCA2 oraz u chorych na drobnokomórkowego raka płuc. Ponadto, Lurbinektedyna i Zalypsis mają mniejsze działania niepożądane niż obecnie stosowane w chemioterapii związki alkilujące [48].

Powszechne zastosowanie ekteinascydyń w terapii, jak i badaniach klinicznych, jest jednak ograniczone wysoką ceną preparatów z tej grupy. Stąd też trwają intensywne prace nad poszukiwaniem innych syntetycznych analogów tych związków o równie dużej aktywności wobec komórek nowotworowych [36, 50, 74, 103]. Można mieć nadzieję, że badania zaowocują nową klasą leków przeciwnowotworowych dostępną dla ogółu pacjentów.

PIŚMIENICTWO

- [1] Acikgoz E., Guven U., Duzagac F., Uslu R., Kara M., Soner B.C., Oktem G.: Enhanced G2/M arrest, caspase related apoptosis and reduced E cadherin dependent intercellular adhesion by trabectedin in prostate cancer stem cells. *PLoS One*, 2015; 10: e.0141090
- [2] Allavena P., Germano G., Belgiovine C., D'Incalci M., Mantovani A.: Trabectedin: a drug from the sea that strikes tumor-associated macrophages. *Oncoimmunology*, 2013; 2: e24614
- [3] Allavena P., Signorelli M., Chieppa M., Erba E., Bianchi G., Marchesi F., Olimpio C.O., Bonardi C., Garbi A., Lissoni A. de Braud F., Jimeno J., D'Incalci M.: Anti-inflammatory properties of the novel antitumor agent yondelis (trabectedin): inhibition of macrophage differentiation and cytokine production. *Cancer Res.*, 2005; 65: 2964-2971
- [4] Atmaca H., Bozkurt E., Uzunoglu S., Uslu R., Karaca B.: A diverse induction of apoptosis by trabectedin in MCF-7 (HER2-/ER+) and MDA-MB-453 (HER2+/ER-) breast cancer cells. *Toxicol. Lett.*, 2013; 221: 128-136
- [5] Avila-Arroyo S., Nuñez G.S., Garcia-Fernández L.F., Galmarini C.M.: Synergistic effect of trabectedin and olaparib combination regimen in breast cancer cell lines. *J. Breast Cancer*, 2015; 18: 329-338
- [6] Beesoo R., Neergheen-Bhujun V., Bhagooli R., Bahorun T.: Apoptosis inducing lead compounds isolated from marine organisms of potential relevance in cancer treatment. *Mutat. Res.*, 2014; 768: 84-97
- [7] Brüning A., Mylonas I.: New emerging drugs targeting the genomic integrity and replication machinery in ovarian cancer. *Arch. Gynecol. Obstet.*, 2011; 283: 1087-1096
- [8] Christinat A., Leyvraz S.: Role of trabectedin in the treatment of soft tissue sarcoma. *Onco. Targets Ther.*, 2009; 2: 105-113
- [9] Cuevas C., Francesch A.: Development of Yondelis (trabectedin, ET-743). A semisynthetic process solves the supply problem. *Nat. Prod. Rep.*, 2009; 26: 322-337
- [10] Damia G., Silvestri S., Carrassa L., Filiberti L., Faircloth G.T., Liberi G., Foiani M., D'Incalci M.: Unique pattern of ET-743 activity in different cellular systems with defined deficiencies in DNA-repair pathways. *Int. J. Cancer*, 2001; 92: 583-588
- [11] David-Cordonnier M.H., Gajate C., Olmea O., Laine W., de la Iglesia-Vicente J., Perez C., Cuevas C., Otero G., Manzanares I., Bailly C., Mollinedo F.: DNA and non-DNA targets in the mechanism of action of the antitumor drug trabectedin. *Chem. Biol.*, 2005; 12: 1201-1210
- [12] Delaloge S., Wolp-Diniz R., Byrski T., Blum J.L., Gonçalves A., Campone M., Lardelli P., Kahatt C., Nieto A., Cullell-Young M., Lubinski J.: Activity of trabectedin in germline BRCA1/2-mutated metastatic breast cancer: results of an international first-in-class phase II study. *Ann. Oncol.*, 2014; 25: 1152-1158
- [13] Demetri G.D., Chawla S.P., Von Mehren M., Ritch P., Baker L.H., Blay J.Y., Hande K.R., Keohan M.L., Samuels B.L., Schuetz S., Lebedinsky C., Elsayed Y.A., Izquierdo M.A., Gómez J., Park Y.C., Le Cesne A.: Efficacy and safety of trabectedin in patients with advanced or metastatic liposarcoma or leiomyosarcoma after failure of prior anthracyclines and ifosfamide: results of a randomized Phase II study of two different schedules. *J. Clin. Oncol.*, 2009; 27: 4188-4196
- [14] Desar I.M., Constantinidou A., Kaal S.E., Jones R.L., Van der Graaf W.T.: Advanced soft-tissue sarcoma and treatment options: critical appraisal of trabectedin. *Cancer. Manag. Res.*, 2016; 8: 95-104
- [15] D'Incalci M., Badri N., Galmarini C.M., Allavena P.: Trabectedin, a drug acting on both cancer cells and the tumour microenvironment. *Br. J. Cancer*, 2014; 111: 646-650
- [16] D'Incalci M., Colombo T., Ubezio P., Nicoletti I., Giavazzi R., Erba E., Ferrarese L., Meco D., Riccardi R., Sessa C., Cavallini E., Jimeno J., Faircloth G.T.: The combination of yondelis and cisplatin is synergistic against human tumor xenografts. *Eur. J. Cancer*, 2003; 39: 1920-1926
- [17] D'Incalci M., Erba E., Damia G., Galliera E., Carrassa L., Marchini S., Mantovani R., Tognon G., Fruscio R., Jimeno J., Faircloth G.T.: Unique features of the mode of action of ET-743. *Oncologist*, 2002; 7: 210-216
- [18] D'Incalci M., Galmarini C.M.: A review of trabectedin (ET-743): a unique mechanism of action. *Mol. Cancer Ther.*, 2010; 9: 2157-2163
- [19] Dossi R., Frapolli R., Di Giandomenico S., Paracchini L., Bozzi F., Brich S., Castiglioni V., Borsotti P., Belotti D., Ubaldi S., Sanfilippo R., Erba E., Giavazzi R., Marchini S., Pilotti S., D'Incalci M., Tarabozzi G.: Antiangiogenic activity of trabectedin in myxoid liposarcoma: involvement of host TIMP-1 and TIMP-2 and tumor thrombospondin-1. *Int. J. Cancer*, 2015; 136: 721-729
- [20] Elmallah M.I., Mischeau O.: Marine drugs regulating apoptosis induced by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). *Mar. Drugs*, 2015; 13: 6884-6909
- [21] Erba E., Bergamaschi D., Bassano L., Damia G., Ronzoni S., Faircloth G.T., D'Incalci M.: Ecteinascidin-743 (ET-743), a natural marine compound, with a unique mechanism of action. *Eur. J. Cancer*, 2001; 37: 97-105
- [22] Erba E., Cavallaro E., Damia G., Mantovani R., Di Silvio A., Di Francesco A.M., Riccardi R., Cuevas C., Faircloth G.T., D'Incalci M.: The unique biological features of the marine product Yondelis (ET-743, trabectedin) are shared by its analog ET-637, which lacks the C ring. *Oncol. Res.*, 2004; 14: 579-587
- [23] Fayette J., Coquard I.R., Alberti L., Ranchère D., Boyle H., Blay J.Y.: ET-743: a novel agent with activity in soft tissue sarcomas. *Oncologist*, 2005; 10: 827-832
- [24] Feuerhahn S., Giraudon C., Martínez-Díez M., Bueren-Calabuig J.A., Galmarini C.M., Gago F., Egly J.M.: XPF-dependent DNA breaks and RNA polymerase II arrest induced by antitumor DNA interstrand crosslinking-mimetic alkaloids. *Chem. Biol.*, 2011; 18: 988-999
- [25] Fontana A., Cavaliere P., Wahidulla S., Naik C.G., Cimino G.: A new antitumor isoquinoline alkaloid from the marine nudibranch *Jorunna funebris*. *Tetrahedron*, 2000; 56: 7305-7308
- [26] Fulda S.: Modulation of mitochondrial apoptosis by PI3K inhibitors. *Mitochondrion*, 2013; 13: 195-198
- [27] Fulda S.: Targeting extrinsic apoptosis in cancer: challenges and opportunities. *Semin. Cell Dev. Biol.*, 2015; 39: 20-25
- [28] Fulda S.: Targeting apoptosis for anticancer therapy. *Semin. Cancer Biol.*, 2015; 31: 84-88
- [29] Gajate C., An F., Mollinedo F.: Differential cytostatic and apoptotic effects of ecteinascidin-743 in cancer cells. Transcription-dependent cell cycle arrest and transcription-independent JNK and mitochondrial mediated apoptosis. *J. Biol. Chem.*, 2002; 277: 41580-41589
- [30] Galmarini C.M., D'Incalci M., Allavena P.: Trabectedin and plitidepsin: drugs from the sea that strike the tumor microenvironment. *Mar. Drugs*, 2014; 12: 719-733
- [31] Germano G., Frapolli R., Belgiovine C., Anselmo A., Pesce S., Liguori M., Erba E., Ubaldi S., Zucchetti M., Pasqualini F., Nebuloni M., Van Rooijen N., Mortarini R., Beltrame L., Marchini S. i wsp.: Role of macrophage targeting in the antitumor activity of trabectedin. *Cancer Cell*, 2013; 23: 249-262
- [32] Germano G., Frapolli R., Simone M., Tavecchio M., Erba E., Pesce S., Pasqualini F., Grosso F., Sanfilippo R., Casali P.G., Gronchi A., Viridis E., Tarantino E., Pilotti S., Greco A. i wsp.: Antitumor and anti-inflammatory effects of trabectedin on human myxoid liposarcoma cells. *Cancer Res.*, 2010; 70: 2235-2244

- [33] Ghielmini M., Colli E., Erba E., Bergamaschi D., Pampallona S., Jimeno J., Faircloth G., Sessa C.: *In vitro* schedule-dependency of myelotoxicity and cytotoxicity of Ecteinascidin 743 (ET-743). *Ann. Oncol.*, 1998; 9: 989-993
- [34] Giżycka A., Kopiński P., Chorostowska-Wynimko J.: Zaprogramowana martwica i nekroptoza – mechanizmy molekularne. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2015; 69: 1353-1363
- [35] Gonzalez F., Ashkenazi A.: New insights into apoptosis signaling by Apo2L/TRAIL. *Oncogene*, 2010; 29: 4752-4765
- [36] Gornowicz A., Pawłowska N., Czajkowska A., Czarnomysy R., Bielawska A., Bielawski K., Michalak O., Staszewska-Krajewska O., Kałuża Z.: Biological evaluation of octahydropyrazin[2,1-a:5,4-a'] diisoquinoline derivatives as potent anticancer agents. *Tumor Biol.*, 2017; 39: 1010428317701641
- [37] Grosso F., Jones R.L., Demetri G.D., Judson I.R., Blay J.Y., Le Cesne A., Sanfilippo R., Casieri P., Collini P., Dileo P., Spreafico C., Stacchiotti S., Tamborini E., Tercero J.C., Jimeno J. i wsp.: Efficacy of trabectedin (ecteinascidin-743) in advanced pretreated myxoid liposarcomas: a retrospective study. *Lancet Oncol.*, 2007; 8: 595-602
- [38] Grzybowska-Izidorczyk O., Smolewski P.: Rola białek z rodziny inhibitora apoptozy (IAP) w chorobach rozrostowych układu krwiotwórczego. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2008; 62: 55-63
- [39] Hanahan D., Weinberg R.A.: Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 2011; 144: 646-674
- [40] Hanawalt P.C.: Subpathways of nucleotide excision repair and their regulation. *Oncogene*, 2002; 21: 8949-8956
- [41] Herrero A.B., Martín-Castellanos C., Marco E., Gago F., Moreno S.: Cross-talk between nucleotide excision and homologous recombination DNA repair pathways in the mechanism of action of antitumor trabectedin. *Cancer Res.*, 2006; 66: 8155-8162
- [42] Holoch P.A., Griffith T.S.: TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL): A new path to anti-cancer therapies. *Eur. J. Pharmacol.*, 2009; 625: 63-72
- [43] Imperatore C., Aiello A., D'Aniello F., Senese M., Menna M.: Alkaloids from marine invertebrates as important leads for anticancer drugs discovery and development. *Molecules*, 2014; 19: 20391-20423
- [44] Indumathy S., Dass C.R.: Finding chemo: the search for marine-based pharmaceutical drugs active against cancer. *J. Pharm. Pharmacol.*, 2013; 65: 1280-1301
- [45] Izbiccka E., Lawrence R., Raymond E., Eckhardt G., Faircloth G., Jimeno J., Clark G., Von Hoff D.D.: *In vitro* antitumor activity of the novel marine agent, Ecteinascidin-743 (ET-743, NSC-648766) against human tumors explanted from patients. *Ann. Oncol.*, 1998; 9: 981-987
- [46] Jackson S.P., Bartek J.: The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature*, 2009; 461: 1071-1078
- [47] Kelly P.N., Strasser A.: The role of Bcl-2 and its pro-survival relatives in tumorigenesis and cancer therapy. *Cell Death Differ.*, 2011; 18: 1414-1424
- [48] Leal J.F., García-Hernández V., Moneo V., Domingo A., Bueren-Calabuig J.A., Negri A., Gago F., Guillén-Navarro M.J., Avilés P., Cuevas C., García-Fernández L.F., Galmarini C.M.: Molecular pharmacology and antitumor activity of *Zalypsis* in several human cancer cell lines. *Biochem. Pharmacol.*, 2009; 78: 162-170
- [49] Leal J.F., Martínez-Díez M., García-Hernández V., Moneo V., Domingo A., Bueren-Calabuig J.A., Negri A., Gago F., Guillén-Navarro M.J., Avilés P., Cuevas C., García-Fernández L.F., Galmarini C.M.: PM01183, a new DNA minor groove covalent binder with potent *in vitro* and *in vivo* anti-tumour activity. *Br. J. Pharmacol.*, 2010; 161: 1099-1110
- [50] Lepiarczyk M., Kałuża Z., Bielawska A., Czarnomysy R., Gornowicz A., Bielawski K.: Cytotoxic activity of octahydropyrazin[2,1-a:5,4-a'] diisoquinoline derivatives in human breast cancer cells. *Arch. Pharm. Res.*, 2015; 38: 628-641
- [51] Lorusso D., Scambia G., Pignata S., Sorio R., Amadio G., Lepori S., Mosconi A., Pisano C., Mangili G., Maltese G., Sabbatini R., Artioli G., Gamucci T., Di Napoli M., Capoluongo E. i wsp.: Prospective phase II trial of trabectedin in BRCA-mutated and/or BRCAness phenotype recurrent ovarian cancer patients: the MITO 15 trial. *Ann. Oncol.*, 2016; 27: 487-493
- [52] Mabuchi S., Hisamatsu T., Kawase C., Hayashi M., Sawada K., Mimura K., Takahashi K., Takahashi T., Kurachi H., Kimura T.: The activity of trabectedin as a single agent or in combination with everolimus for clear cell carcinoma of the ovary. *Clin. Cancer Res.*, 2011; 17: 4462-4473
- [53] Marczak A., Denel M.: Trabectedin as a single agent and in combination with pegylated liposomal doxorubicin – activity against ovarian cancer cells. *Contemp. Oncol.*, 2014; 18: 149-152
- [54] Marek Ł.: Rola apoptosomu w aktywacji prokaspazy 9. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2013; 67: 54-64
- [55] Martínez-Serra J., Maffiotte E., Martín J., Bex T., Navarro-Palou M., Ros T., Plazas J.M., Vögler O., Gutiérrez A., Amat J.C., Ramos R., Saus C., Ginés J., Alemany R., Diaz M., Besalduch J.: Yondelis® (ET-743, Trabectedin) sensitizes cancer cell lines to CD95-mediated cell death: new molecular insight into the mechanism of action. *Eur. J. Pharmacol.*, 2011; 658: 57-64
- [56] Martinou J.C., Youle R.J.: Mitochondria in apoptosis: Bcl-2 family members and mitochondrial dynamics. *Dev. Cell*, 2011; 21: 92-101
- [57] Massuti B., Cobo M., Camps C., Dómine M., Provencio M., Alberola V., Viñolas N., Rosell R., Tarón M., Gutiérrez-Calderón V., Lardelli P., Alfaro V., Nieto A., Isla D.: Trabectedin in patients with advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC) with XPG and/or ERCC1 overexpression and BRCA1 underexpression and pretreated with platinum. *Lung Cancer*, 2012; 76: 354-361
- [58] Meehan R.S., Chen A.P.: New treatment options for ovarian cancer: PARP inhibitors. *Gynecol. Oncol. Res. Pract.*, 2016; 3: 3
- [59] Miller S.C., Huang R., Sakamuru S., Shukla S.J., Attene-Ramos M.S., Shinn P., Van Leer D., Leister W., Austin C.P., Xia M.: Identification of known drugs that act as inhibitors of NF-κB signaling and their mechanism of action. *Biochem. Pharmacol.*, 2010; 79: 1272-1280
- [60] Monk B.J., Ghatage P., Parekh T., Henitz E., Knoblauch R., Matos-Pita A.S., Nieto A., Park Y.C., Cheng P.S., Li W., Favis R., Ricci D., Poveda A.: Effect of BRCA1 and XPG mutations on treatment response to trabectedin and pegylated liposomal doxorubicin in patients with advanced ovarian cancer: exploratory analysis of the phase 3 OVA-301 study. *Ann. Oncol.*, 2015; 26: 914-920
- [61] Monk B.J., Lorusso D., Italiano A., Kaye S.B., Aracil M., Tanović A., D'Incalci M.: Trabectedin as a chemotherapy option for patients with BRCA deficiency. *Cancer Treat. Rev.*, 2016; 50: 175-182
- [62] Nikolettou V., Markaki M., Palikaras K., Tavernarakis N.: Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. *Biochim. Biophys. Acta*, 2013; 1833: 3448-3459
- [63] Pardo B., Gómez-González B., Aguilera A.: DNA repair in mammalian cells: DNA double-strand break repair: how to fix a broken relationship. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2009; 66: 1039-1056
- [64] Park M.H., Hong J.T.: Roles of NF-κB in cancer and inflammatory diseases and their therapeutic approaches. *Cells*, 2016; 5: E15
- [65] Patel R.M.: Trabectedin: a novel molecular therapeutic in cancer. *Int. J. Curr. Pharm. Res.*, 2011; 3: 65-70
- [66] Pavet V., Beyrath J., Pardin C., Morizot A., Lechner M.C., Briand J.P., Wendland M., Maison W., Fournel S., Micheau O., Guichard G., Gronemeyer H.: Multivalent DR5 peptides activate the TRAIL death pathway and exert tumoricidal activity. *Cancer Res.*, 2010; 70: 1101-1110
- [67] Petek B.J., Jones R.L.: PM00104 (Zalypsis®): A marine derived alkylating agent. *Molecules*, 2014; 19: 12328-12335

- [68] Piotrowska A., Iżykowska I., Podhorska-Okołów M., Zabel M., Dziągga P.: Budowa białek z rodziny NF- κ B i ich rola w procesie apoptozy. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2008; 62: 64-74
- [69] Podhorecka M.: γ H2AX jako marker dwuniciowych pęknięć DNA. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2009; 63: 92-98
- [70] Pommier Y., Kohlhagen G., Bailly C., Waring M., Mazumder A., Kohn K.W.: DNA sequence- and structure-selective alkylation of guanine N2 in the DNA minor groove by ecteinascidin 743, a potent antitumor compound from the Caribbean tunicate *Ecteinascidia turbinata*. *Biochemistry*, 1996; 35: 13303-13309
- [71] Portt L., Norman G., Clapp C., Greenwood M., Greenwood M.T.: Anti-apoptosis and cell survival: a review. *Biochim. Biophys. Acta*, 2011; 1813: 238-259
- [72] Poveda A., Ray-Coquard I., Romero I., Lopez-Guerrero J.A., Colombo N.: Emerging treatment strategies in recurrent platinum-sensitive ovarian cancer: focus on trabectedin. *Cancer Treat. Rev.*, 2014; 40: 366-375
- [73] Puyo S., Montaudon D., Pourquier P.: From old alkylating agents to new minor groove binders. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, 2014; 89: 43-61
- [74] Ramanivas T., Sushma B., Nayak V.L., Chandra Shekar K., Srivastava A.K.: Design, synthesis and biological evaluations of chiral pure 1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline analogs as anti-cancer agents. *Eur. J. Med. Chem.*, 2015; 92: 608-618
- [75] Rathore R., McCallum J.E., Varghese E., Florea A.M., Büsselberg D.: Overcoming chemotherapy drug resistance by targeting inhibitors of apoptosis proteins (IAPs). *Apoptosis*, 2017; 22: 898-919
- [76] Redza-Dutordoir M., Averill-Bates D.A.: Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. *Biochim. Biophys. Acta*, 2016; 1863: 2977-2992
- [77] Romano M., Frapolli R., Zangarini M., Bello E., Porcu L., Galmarini C.M., García-Fernández L.F., Cuevas C., Allavena P., Erba E., D'Incalci M.: Comparison of *in vitro* and *in vivo* biological effects of trabectedin, lurbinectedin (PM01183) and Zalypsis[®] (PM00104). *Int. J. Cancer*, 2013; 133: 2024-2033
- [78] San Filippo J., Sung P., Klein H.: Mechanism of eukaryotic homologous recombination. *Annu. Rev. Biochem.*, 2008; 77: 229-257
- [79] Sankari S.L., Masthan K.M., Babu N.A., Bhattacharjee T., Elumalai M.: Apoptosis in cancer-an update. *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, 2012; 13: 4873-4878
- [80] Sartori A.A., Lukas C., Coates J., Mistrik M., Fu S., Bartek J., Baer R., Lukas J., Jackson S.P.: Human CtIP promotes DNA end resection. *Nature*, 2007; 450: 509-514
- [81] Schöffski P., Taron M., Jimeno J., Grosso F., Sanfilippo R., Casali P.G., Le Cesne A., Jones R.L., Blay J.Y., Poveda A., Maki R.G., Nieto A., Tercero J.C., Rosell R.: Predictive impact of DNA repair functionality on clinical outcome of advanced sarcoma patients treated with trabectedin: a retrospective multicentric study. *Eur. J. Cancer*, 2011; 47: 1006-1012
- [82] Schumacher M., Kelkel M., Dicato M., Diederich M.: Gold from the sea: marine compounds as inhibitors of the hallmarks of cancer. *Biotechnol. Adv.*, 2011; 29: 531-547
- [83] Sessa C., Perotti A., Noverasco C., De Braud F., Gallerani E., Cresta S., Zucchetti M., Viganò L., Locatelli A., Jimeno J., Feilchenfeldt J.W., D'Incalci M., Capri G., Ielmini N., Gianni L.: Phase I clinical and pharmacokinetic study of trabectedin and doxorubicin in advanced soft tissue sarcoma and breast cancer. *Eur. J. Cancer*, 2009; 45: 1153-1161
- [84] 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
- [85] Soares D.G., Escargueil A.E., Poindessous V., Sarasin A., de Gramont A., Bonatto D., Henriques J.A., Larsen A.K.: Replication and homologous recombination repair regulate DNA double-strand break formation by the antitumor alkylator ecteinascidin 743. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2007; 104: 13062-13067
- [86] Soares D.G., Machado M.S., Rocca C.J., Poindessous V., Ouaret D., Sarasin A., Galmarini C.M., Henriques J.A., Escargueil A.E., Larsen A.K.: Trabectedin and its C subunit modified analogue PM01183 attenuate nucleotide excision repair and show activity toward platinum-resistant cells. *Mol. Cancer Ther.*, 2011; 10: 1481-1489
- [87] Sordet O., Nakamura A.J., Redon C.E., Pommier Y.: DNA double-strand breaks and ATM activation by transcription-blocking DNA lesions. *Cell Cycle*, 2010; 9: 274-278
- [88] Szala S.: Komórki mikrośrodowiska nowotworowego: cel terapii przeciwnowotworowej. *Nowotwory*, 2007; 57: 633
- [89] Szala S.: Angiogeneza i immunosupresja: jin i jang progresji nowotworów? *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2009; 63: 598-612
- [90] Takahashi N., Li W., Banerjee D., Guan Y., Wada-Takahashi Y., Brennan M.F., Chou T.C., Scotto K.W., Bertino J.R.: Sequence-dependent synergistic cytotoxicity of ecteinascidin-743 and paclitaxel in human breast cancer cell lines *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Res.*, 2002; 62: 6909-6915
- [91] Takebayashi Y., Goldwasser F., Urasaki Y., Kohlhagen G., Pommier Y.: Ecteinascidin 743 induces protein-linked DNA breaks in human colon carcinoma HCT116 cells and is cytotoxic independently of topoisomerase I expression. *Clin. Cancer Res.*, 2001; 7: 185-191
- [92] Takebayashi Y., Pourquier P., Zimonjic D.B., Nakayama K., Emmert S., Ueda T., Urasaki Y., Kanzaki A., Akiyama S.I., Popescu N., Kraemer K.H., Pommier Y.: Antiproliferative activity of ecteinascidin 743 is dependent upon transcription-coupled nucleotide excision repair. *Nat. Med.*, 2001; 7: 961-966
- [93] Tavecchio M., Simone M., Erba E., Chiolo I., Liberi G., Foiani M., D'Incalci M., Damia G.: Role of homologous recombination in trabectedin-induced DNA damage. *Eur. J. Cancer*, 2008; 44: 609-618
- [94] Uboldi S., Calura E., Beltrame L., Fuso Nerini I., Marchini S., Cavalieri D., Erba E., Chiorino G., Ostano P., D'Angelo D., D'Incalci M., Romualdi C.: A systems biology approach to characterize the regulatory networks leading to trabectedin resistance in an *in vitro* model of myxoid liposarcoma. *PLoS One*, 2012; 7: e35423
- [95] Vaux D.L.: Apoptogenic factors released from mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta*, 2011; 1813: 546-550
- [96] Vincenzi B., Napolitano A., Frezza A.M., Schiavon G., Santini D., Tonini G.: Wide-spectrum characterization of trabectedin: biology, clinical activity and future perspectives. *Pharmacogenomics*, 2010; 11: 865-878
- [97] von Schwarzenberg K., Vollmar A.M.: Targeting apoptosis pathways by natural compounds in cancer: marine compounds as lead structures and chemical tools for cancer therapy. *Cancer Lett.*, 2013; 332: 295-303
- [98] Wong R.S.: Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, 2011; 30: 87
- [99] Xia Y., Shen S., Verma I.M.: NF- κ B, an active player in human cancers. *Cancer Immunol. Res.*, 2014; 2: 823-830
- [100] Xu G., Shi Y.: Apoptosis signaling pathways and lymphocyte homeostasis. *Cell Res.*, 2007; 17: 759-771
- [101] Youle R.J., Strasser A.: The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2008; 9: 47-59
- [102] Zhu P., Ye W., Li J., Zhang Y., Huang W., Cheng M., Wang Y., Zhang Y., Liu H., Zuo J.: Design, synthesis, and biological evaluation of novel tetrahydroisoquinoline derivatives as potential antitumor candidate. *Chem. Biol. Drug Des.*, 2017; 89: 443-455

Autorzy deklaruja brak potencjalnych konfliktow interesow.