

Received: 2014.08.05
Accepted: 2015.08.25
Published: 2015.12.31

Glukuronidacja leków przeciwnowotworowych – detoksyfikacja, mechanizm oporności czy sposób na formę proleku?*

Glucuronidation of antitumour therapeutics – detoxification, mechanism of resistance or prodrug formation?

Anna Mróz, Zofia Mazerska

Katedra Technologii Leków i Biochemii, Wydział Chemiczny, Politechnika Gdańska

Streszczenie

Ksenobiotyki podlegają w organizmie biotransformacji I i II fazy, której celem jest ich detoksyfikacja i ułatwienie wydalania. UDP-glukuronylotransferazy (UGT) – enzymy należące do II fazy metabolizmu katalizują przyłączenie kwasu glukuronowego do lipofilowego substratu zawierającego nukleofilową grupę funkcyjną. Nadrodzina UGT składa się z izoenzymów o różnej swoistości substratowej oraz odmiennym profilu ekspresji w poszczególnych tkankach. Reakcja glukuronidacji przeważnie prowadzi do dezaktywacji substratu, jednak w niektórych przypadkach (morfina, tamoksyfen) glukuronid, ma niezmienną bądź wyższą aktywność biologiczną w stosunku do wyjściowego aglikonu.

Wśród pacjentów występuje zróżnicowany poziom ekspresji UGT. Zjawisko to jest skutkiem uwarunkowań genetycznych oraz wpływu czynników epigenetycznych. Ponadto, wiele ksenobiotyków ma zdolność modulacji ekspresji genów kodujących UGT zachodzącej za pośrednictwem receptorów jądrowych. Poza tym często obserwuje się niższe stężenie UGT w tkance nowotworowej niż w prawidłowej, co wiąże się z korzystną utratą zdolności do detoksyfikacji i selektywną aktywnością leku w tkance nowotworowej.

Jednak aktywność enzymów UGT jest uznana za jedną z przyczyn oporności na chemioterapię. Wydajny metabolizm detoksyfikacyjny leku z udziałem wątrobowych i jelitowych izoenzymów UGT przyczynia się do tzw. „efektu pierwszego przejścia”. Natomiast mechanizm oporności nabytej polega na indukcji ekspresji UGT przez lek lub jego metabolit. Co więcej, indukcja UGT może być skoordynowana z indukcją aktywności transporterów błonowych, głównie białek ABC, usuwających lek poza komórkę. Wymienione efekty oporności potęguje nadekspresja określonych izoenzymów UGT zaobserwowana w niektórych typach nowotworów.

W wielu zaawansowanych nowotworach stwierdzono większe niż w tkance prawidłowej stężenie β -glukuronidazy. Enzym ten mógłby być celem molekularnym ukierunkowanej terapii przeciwnowotworowej, gdyż katalizuje hydrolizę β -glukuronidów do ich aktywnych aglikonów.

Słowa kluczowe:

metabolizm • glukuronidacja • UDP-glukuronylotransferazy • polimorfizm • indukcja ekspresji genów • nowotwór • chemioterapia • oporność • prolek

* Praca powstała w wyniku realizacji projektu badawczego o nr 2013/09/B/NZ3/00003 finansowanego ze środków Narodowego Centrum Nauki.

Summary

The physiological role of phase I and II of xenobiotic biotransformations is their detoxification and better excretion outside the organism. UDP-glucuronosyltransferases (UGTs) being the enzymes of phase II metabolism catalyse the conjugation of glucuronic acid to the lipophilic substrate by its specific nucleophilic group. UGT isoenzymes of various substrate specificities and different expression profiles in selected tissues belong to the large UGT superfamily. Usually, glucuronidation is the detoxification process, but sometimes (morphine, tamoxifen) glucuronides express biological activity higher than or comparable to the native compound. The level of *UGT* gene expression is individual for patients, because of their genetic status as well as epigenetic conditions. Also, xenobiotics are able to modulate UGT level and gene expression by the interaction with nuclear receptors. Moreover, one can find a lower level of UGT in the tumour compared to normal tissue, which results in the protection against deactivation of the drug and in the promotion of its selective activity in tumor tissue.

On the other hand, UGT activity is considered as the possible cause of resistance to chemotherapy. Metabolism by hepatic and intestinal UGT isoenzymes is responsible for the “first-pass effect”, whereas acquired resistance consists in the induction of *UGT* gene expression by the chemotherapeutic or its metabolite. Moreover, *UGT* induction can be associated with the induction of membrane transporters, particularly proteins of the ABC family, responsible for drug excretion outside the cell. The above resistance effects can be fortified by the overexpression of selected UGT isoenzymes sometimes observed in specific types of tumours.

It is also considered that many advanced tumours are characterized by a higher level of β -glucuronidase. This enzyme has a chance to be the molecular target of directed antitumour therapy, as it catalyses β -glucuronide hydrolysis, leading to active aglycones.

Key words: metabolism • glucuronidation • UDP-glucuronosyltransferases • polymorphism • induction of gene expression • tumour • chemotherapy • resistance • prodrug

Full-text PDF: <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1191742>

Word count: 5998

Tables: –

Figures: 12

References: 97

Adres autorki: prof. dr hab. Zofia Mazerska, Katedra Technologii Leków i Biochemii, Wydział Chemiczny, Politechnika Gdańska, ul. Gabriela Narutowicza 11/12, 80-233 Gdańsk; e-mail: zofia.mazerska@pg.gda.pl

Wykaz skrótów: **ABC** – kasetka wiążąca ATP (ATP-binding cassette), **AhR** – receptor węglowodorów aromatycznych (aryl hydrocarbon receptor), **ARNT** – jądrowy transporter receptora AhR (AhR nuclear translocator), **AUC** – pole pod krzywą zależności stężenia leku w osoczu od czasu (area under the plasma concentration-time curve), **DEPT** – terapia poprzez wprowadzenie selektywnie do komórki nowotworowej enzymu metabolizującego prolek do jego postaci aktywnej (directed enzyme prodrug therapy), **ADEPT** – z wprowadzeniem przeciwciała przeciw antygenowi nowotworowemu (antibody-directed enzyme prodrug therapy), **GDEPT** – z wprowadzeniem genu pożądanego enzymu (gene-directed enzyme prodrug therapy), **DME** – enzymy metabolizujące leki (drug-metabolizing enzymes), **IC₅₀** – stężenie substancji hamujące dany parametr o 50% (half maximal inhibitory concentration), **MDR** – oporność wielolekowa (multidrug resistance), **MRP** – białko oporności wielolekowej (multidrug resistance-associated protein), **PXR** – receptor pregnanu X (pregnane X receptor), **RXR** – receptor retinoidowy X (retinoid X receptor), **SNP** – polimorfizm pojedynczych nukleotydów (single nucleotide polymorphism), **UDP** – urydynodifosforan (uridine diphosphate), **UDPGA** – kwas UDP-glukuronowy (UDP-glucuronic acid), **UGT** – UDP-glukuronilotransferaza (UDP-glucuronosyltransferase), **VNTR** – zmienna liczba tandemowych powtórzeń (variable number of tandem repeats).

WPROWADZENIE

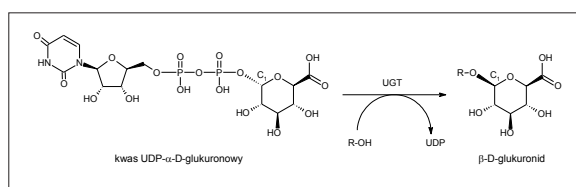
Zarówno substancje egzogenne, w tym ksenobiotyki, jak i związki pochodzenia endogennego mają często charakter lipofilowy, co utrudnia ich wydalanie i sprzyja akumulacji w tkankach. Dlatego konieczne są systemy enzymatyczne, które mogą przeprowadzać konwersję niepolarnych cząsteczek do pochodnych bardziej hydrofilowych, które mogą być usunięte z organizmu. Reakcje mające na celu detoksyfikację i eliminację związków z komórki podzielono na dwie fazy metabolizmu. Reakcje I fazy obejmują procesy utleniania, redukcji i hydrolizy, a ich zadaniem jest modyfikacja struktury substratu przez wprowadzenie bądź „odsłonięcie” grup funkcyjnych, najczęściej hydroksylowej, karboksylowej lub aminowej. Dzięki temu metabolizowane związki stają się bardziej podatne na dalsze przemiany z udziałem enzymów II fazy, które katalizują reakcje sprzężania substratu z glukuronianem, glutationem, siarczanem i aminokwasami. W kolejnym etapie produkty sprzężania są usuwane z komórek przez transportery błonowe (ryc. 1).

Reakcje katalizowane przez enzymy I i II fazy metabolizmu oraz transportery błonowe mają duże znaczenie z klinicznego punktu widzenia, gdyż wywierają ogromny wpływ na farmakokinetykę, farmakodynamikę, końcowy efekt terapeutyczny oraz toksyczność leków. Dlatego enzymy I i II fazy metabolizmu często określa się mianem enzymów metabolizujących leki – DME (drug-metabolizing enzymes) [56].

UGT JAKO ENZYMY II FAZY METABOLIZMU

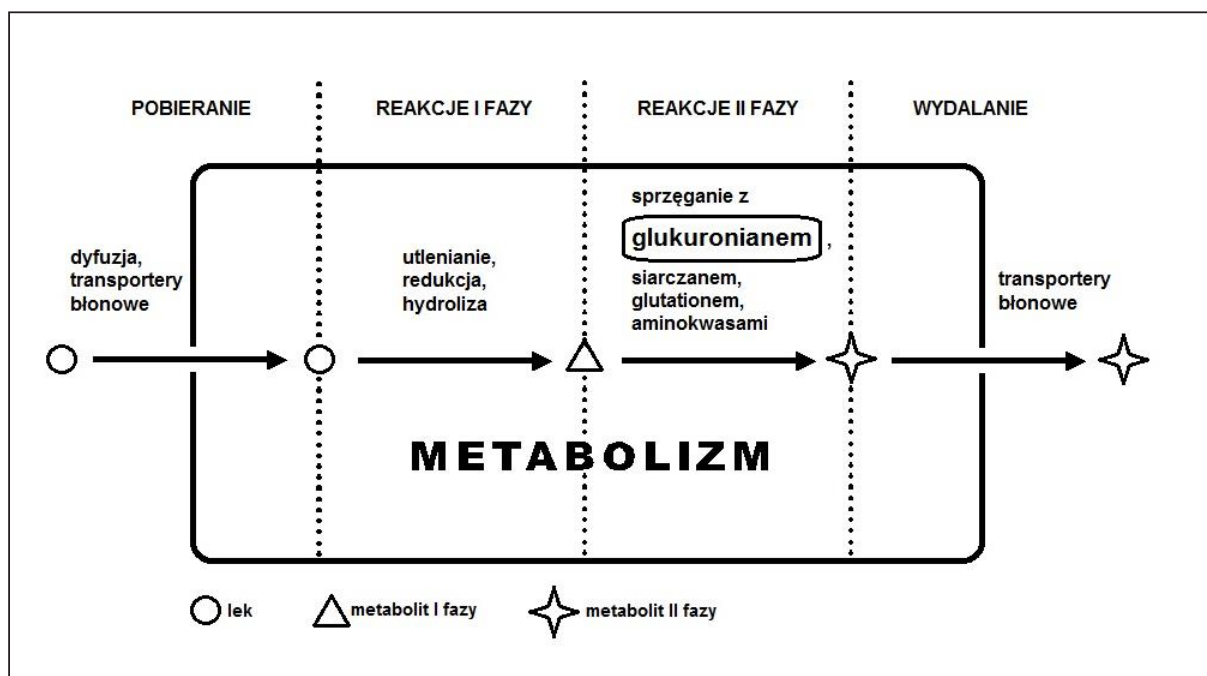
Jedną z głównych ścieżek metabolizmu II fazy jest glukuronidacja, czyli sprzężanie z glukuronianem. Katalizują ją

glukuronylotransferazy urydynodifosforanu – UGT (UDP-glukuronylotransferazy) biorące udział w reakcji przeniesienia kwasu glukuronowego z jego aktywnej postaci – kwasu urydono-5'-difosfo- α -D-glukuronowego – UDPGA (UDP-glucuronic acid) na odpowiednią grupę funkcyjną aglikonu. Reakcja przebiega zgodnie z mechanizmem substytucji nukleofilowej typu drugiego S_N2 (ryc. 2). Produktem reakcji jest β -D-glukuronid, który przeważnie ma obniżoną w porównaniu do substratu aktywność biologiczną i toksyczność. Obecność grup hydroksylowych reszty cukrowej oraz zdysocjowana w pH fizjologicznym grupa karboksylowa czyni glukuronid związkiem polarnym, który jest szybko usuwany z moczem i żółcią przez systemy transportujące aniony organiczne. Zatem enzymy UGT chronią organizm przed szkodliwymi substancjami powstającymi w ustroju jak i ksenobiotykami na zasadzie ich dezaktywacji i ułatwionego wydalania [27].



Ryc. 2. Reakcja glukuronidacji. Podczas ataku nukleofilowego aglikonu (R-OH) na anomeryczny atom węgla (C1) kwasu glukuronowego dochodzi do zmiany konfiguracji z α na β

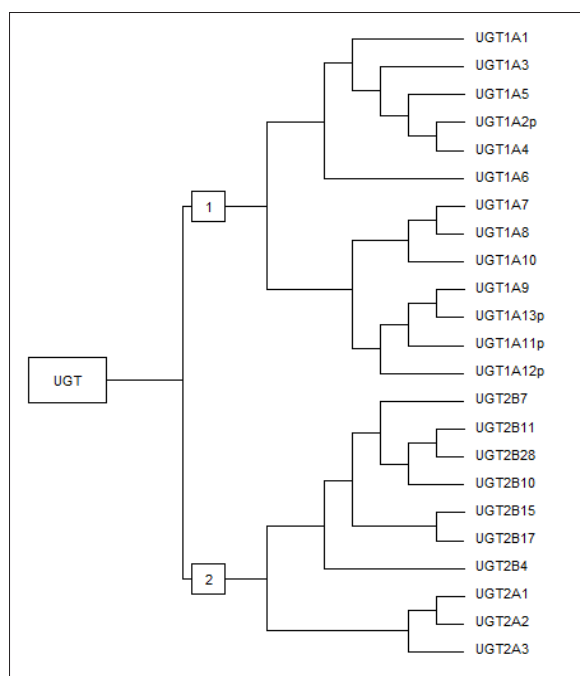
Substratami UGT są związki hydrofobowe, zazwyczaj o strukturze pierścieniowej, zawierające nukleofilowe atomy tlenu, azotu lub siarki. Glukuronidacji ulegają przede wszystkim ugrupowania hydroksylowe, karboksylowe,



Ryc. 1. Pobieranie leku może zachodzić w wyniku dyfuzji lub z udziałem transporterów błonowych. Kolejno lek podlega reakcjom I i II fazy metabolizmu, a następnie zostaje wydany w postaci metabolitu

aminowe (pierwszo-, drugo- i trzeciorzędowe), tiolowe, a także kwaśne atomy węgla. Do substratów endogennych UGT należą m.in. bilirubina, kwasy żółciowe, tłuszczowe, hormony steroidowe, hormony tarczycy i witaminy rozpuszczalne w tłuszczach [72]. Glukuronidacja tych związków jest mechanizmem kontrolującym ich właściwe stężenie w organizmie, co zapobiega negatywnym skutkom nadmiernej ekspozycji na substancje endogenne np. hiperbilirubinemii [25]. Substraty egzogenne UGT to substancje wprowadzane do organizmu z pożywieniem, zanieczyszczenia powietrza, kancerogeny oraz liczne grupy leków: przeciwbólowe, przeciwwirusowe, przeciwnowotworowe, przeciwzapalne, niesteroidowe leki przeciwzapalne, benzodiazepiny [72]. W związku z tym, UGT chronią organizm przed toksycznymi ksenobiotykami, a także uczestniczą w metabolizmie wielu leków, dzięki czemu są zaliczane do enzymów z grupy DME.

U człowieka, nadrodzina białek UGT stanowi grupę 19 funkcjonalnych izoenzymów, które ze względu na podobieństwo sekwencji nukleotydowej oraz sposób organizacji genów podzielono na rodziny (UGT1 i UGT2) i podrodziny (UGT1A, UGT2A i UGT2B) (ryc. 3) [35]. Zaobserwowano różne stężenie oraz rozmieszczenie izoenzymów UGT w poszczególnych narządach, co wskazuje, że regulacja ich ekspresji jest zależna od tkanki. Wysoką ekspresją UGT charakteryzują się tkanki narządów najbardziej narażonych na kontakt z ksenobiotykami i hormonami, tj. wątroby, nerek, płuc, przewodu pokarmowego, jajników, gruczołów mlekowych i gruczołu krokowego. Prawie wszystkie izoenzymy UGT są obecne w wątrobie, przy czym przedstawiciele podrodziny UGT2B występują tam w wyższych stężeniach



Ryc. 3. Drzewo filogenetyczne ludzkich izoenzymów UGT. Jak dotychczas poznano 19 funkcjonalnych ludzkich izoenzymów UGT. Literą „p” oznaczono pseudogeny zawierające mutacje (wg [35] zmodyfikowano)

niż izoenzymy z podrodziny UGT1A, a główną izoformą wątrobową jest UGT2B4. Profil ekspresji UGT w nabłonku jelita cienkiego i grubego jest zbliżony do wątrobowego, przy czym występują tu także pozawątrobowe izoenzymy: UGT1A7, 1A8 i 1A10 [15,58,62]. Tkanka żołądka charakteryzuje się obecnością przede wszystkim trzech izoenzymów: UGT2B15, 2B17 i 1A6, a tkanka nerek: UGT1A9, 2B7 i 1A6 [15,62]. Izoenzymy z podrodziny UGT2A ulegają ekspresji w nabłonku węchowym, gdzie najprawdopodobniej odgrywają rolę w terminacji sygnału zapachowego [15,50].

ZRÓŻNICOWANA EKSPRESJA UGT

Wśród pacjentów obserwuje się zróżnicowaną odpowiedź na lek, czyli różny efekt terapeutyczny oraz różne niepożądane objawy terapii. Zjawisko to zależy nie tylko od dawki i sposobu podania leku, wieku, płci i stanu zdrowia pacjenta, ale także wynika z genetycznie uwarunkowanych różnic międzysobniczych w poziomie DME, w tym UGT, w poszczególnych narządach. Różnice potęgują zdolność do indukcji/inhibicji ekspresji enzymów UGT przez różne ksenobiotyki, w tym leki stosowane w terapii. Z punktu widzenia terapii przeciwnowotworowej istotne są różnice ekspresji tych enzymów w tkance prawidłowej i nowotworowej.

Różnice międzysobnicze

Polimorfizm

Enzymy metabolizujące leki, w tym również izoenzymy z rodziny UGT, występują w różnych wariantach genetycznych charakteryzujących się odmiennym poziomem ekspresji i/lub aktywności. Zjawisko występowania różnych alleli danego izoenzymu u więcej niż 1% populacji nazywa się polimorfizmem. Najczęściej występującym rodzajem polimorfizmu są mutacje punktowe SNP (single nucleotide polymorphism), stanowiące ponad 90% wszystkich zmian genetycznych w ludzkim genomie. Innym przykładem może być zmienna liczba tandemowych powtórzeń VNTR (variable number of tandem repeats). Powtórzenia tandemowe to sekwencje o długości 0,1-10 kbp (kilo par zasad) składające się z powtórzeń krótkiej sekwencji do 4 nukleotydów [28].

Najlepiej zbadanym izoenzymem UGT, biorąc pod uwagę wpływ wariantów genetycznych na metabolizm substratów endo- i egzogennych, jest UGT1A1. Jest to jeden z głównych izoenzymów wątrobowych, odpowiedzialny za glukuronidację bilirubiny. Obniżona ekspresja UGT1A1 wynikająca z mutacji typu VNTR jest odpowiedzialna za wystąpienie syndromu Gilberta – łagodnej postaci hiperbilirubinemii. Polimorfizm ten wynika z różnej liczby powtórzeń dinukleotydowej sekwencji TA w kasecie TATA obecnej w promotorze genu *UGT1A1*. Najczęściej spotykany wariant zawiera 6 powtórzeń i jest oznaczany jako *UGT1A1*1*. Gdy liczba powtórzeń wynosi 7 mamy do czynienia z wariantem *UGT1A1*28*, który charakteryzuje się obniżoną transkrypcją *UGT1A1*, co obniża zdolność do glukuronidacji [44,57]. Częstotliwość występowania określonych mutacji *UGT1A1*

jest zróżnicowana w zależności od rasy. Allel *UGT1A1*28* występuje głównie u rasy kaukaskiej, natomiast u Azjatów syndrom Gilberta wiąże się z obecnością allelu *UGT1A1*6*. Wariant ten jest wynikiem SNP w pierwszym eksonie genu. Zmiana ta, w odróżnieniu od wariantu *UGT1A1*28* nie wpływa na aktywność transkrypcyjną promotora tylko obniża funkcjonalność białka [1,3]. Obecność allelu *UGT1A1*28* jak i *UGT1A1*6* to ważne czynniki pozwalające przewidzieć skuteczność glukuronidacji leku u danego pacjenta.

Najwięcej danych na temat roli polimorfizmu *UGT1A1* w metabolizmie leków przeciwnowotworowych dotyczy irinotekanu. *UGT1A1* jest głównym izoenzymem odpowiedzialnym za glukuronidację aktywnej postaci tego leku – SN-38 [23]. Gdy glukuronidacja jest niewydajna obserwuje się niepożądane działania terapii irinotekaniem, takie jak zagrażająca życiu biegunka i neutropenia [44]. Dlatego też prowadzi się badania, które na podstawie genotypu przewidują dawkę leku [75]. Pomocne w tym mogą być testy wykrywające wariant *UGT1A1*. Pozwoliłoby to na ograniczenie toksyczności irinotekanu u chorych o niewielkiej wydajności glukuronidacji przez podawanie im obniżonej dawki leku [44].

Innym lekiem przeciwnowotworowym podlegającym glukuronidacji katalizowanej głównie przez *UGT1A1* jest belinostat. Przeprowadzono doświadczenie polegające na inkubacji belinostatu w obecności ludzkich mikrosomów wątrobowych pozyskanych od osób o różnych profilach genetycznych izoformy *UGT1A1*. Okazało się, że najlepszą zdolnością glukuronidacji charakteryzowały się osoby homozygotyczne pod względem *UGT1A1*1*. Natomiast w przypadku mikrosomów pochodzących od osób heterozygotycznych lub homozygotycznych ze względu na allel *UGT1A1*28* stopień glukuronidacji był odpowiednio 1,3- oraz 2,2-krotnie niższy. Wynik ten obrazuje jak ważne jest uwzględnienie farmakogenetyki w celu optymalnego dostosowania terapii do pacjenta tak, aby zapobiec toksyczności wywołanej nadmierną ekspozycją na belinostat [91].

Czynniki epigenetyczne

Oprócz mutacji genów *UGT*, wpływ na różnice w ich ekspresji mają także czynniki epigenetyczne, takie jak metylacja DNA czy acetylacja histonów. Metylacja jest procesem przyłączania grupy metylowej do węgla C5 cytozyny w obrębie dinukleotydu CpG. Jeśli modyfikacja ta dotyczy wysp CpG w rejonie promotorowym genu, mamy do czynienia z hipermetylacją, która wycisza transkrypcję. Natomiast acetylacja histonów wpływa na strukturę chromatyny powodując jej rozluźnienie, co ułatwia dostęp dla czynników transkrypcyjnych. Zarówno metylacja jak i acetylacja są zaangażowane w regulację ekspresji izoenzymu *UGT1A1*. Spośród 50 przebadanych nowotworów jelita, ponad 82% wykazało bardzo małe lub niewykrywalne stężenie mRNA dla *UGT1A1*, natomiast w 18% przypadków stwierdzono nadekspresji *UGT1A1*. Potraktowanie komórek linii HCT116, niewykazującej ekspresji *UGT*, inhibitorem metylotransferazy DNA oraz inhibitorem deacetylazy histonów przy-

wróciło transkrypcję i aktywność *UGT1A1* w stosunku do SN-38. Oba związki działały synergicznie, co potwierdza udział metylacji DNA i pośrednio acetylacji histonów w regulacji ekspresji *UGT1A1* [32].

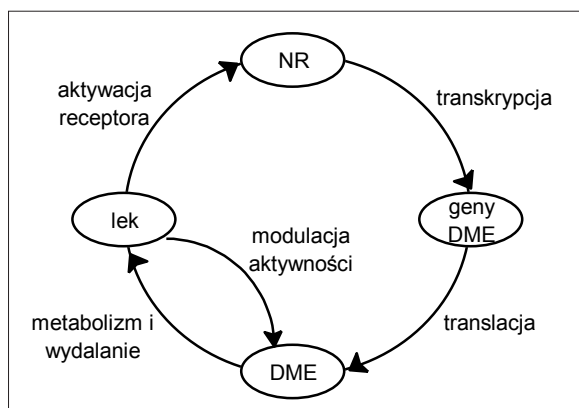
Wpływ wieku

Poziom ekspresji niektórych DME może zależeć od wieku pacjenta. Badania wykazały, że poziom izoformy *UGT2B7* oraz jej aktywność jest znacznie niższa u dzieci niż u dorosłych [97]. *UGT2B7* jest głównym izoenzymem katalizującym sprzężanie przeciwnowotworowego antybiotyku – epirubicyny [43]. Dlatego należy uwzględnić poziom ekspresji *UGT2B7* przy planowaniu schematów dawkowania epirubicyny dla pacjentów należących do różnych grup wiekowych. Dowiedzono m.in., że z wiekiem wzrasta zdolność do glukuronidacji epirubicyny. Jednak po uwzględnieniu zależności allometrycznych nie stwierdzono znaczących statystycznie różnic w poziomie *UGT2B7* między dziećmi a dorosłymi [97]. Wykazały to już wcześniejsze badania nad glukuronidacją morfiny, które dowiodły, że w 2-6 miesięcy po urodzeniu, względne stężenie *UGT2B7* osiąga wartość jak u dorosłych [24]. Na tej podstawie zasugerowano, że epirubicyna może być stosowana u dzieci powyżej 6 miesiąca życia bez narażania ich na większą toksyczność niż pacjentów dorosłych [97].

Modulacja ekspresji *UGT* przez związki egzogenne – ligandy receptorów

Jak wspomniano wcześniej, różnice w stężeniu enzymów *UGT* wynikają również z ekspozycji na związki egzogenne np. leki, które mogą być ligandami receptorów jądrowych. Za pośrednictwem tych receptorów leki mogą indukować ekspresję określonych genów. Receptory jądrowe pełnią funkcje czynników transkrypcyjnych rozpoznających odpowiednią sekwencję w promotorze genów docelowych. Ich przyłączenie do danej sekwencji uruchamia proces transkrypcji. W ten sposób jest regulowana ekspresja genów wielu enzymów metabolicznych, w tym również *UGT*. Do ligandów receptorów jądrowych, które mogą aktywować ekspresję *UGT*, należą m.in. flawonoidy, benzo[a]piren, rifampicyna, fenobarbital, a także niektóre leki przeciwnowotworowe. Transkrypcja *UGT*, w zależności od izoformy, może być uruchamiana przez różne receptory m.in. receptor pregnanu - PXR (pregnane X receptor) oraz receptor węglowodorów aromatycznych - AhR (aryl hydrocarbon receptor) [6]. Lek może oddziaływać na enzym w sposób bezpośredni – przez modulację jego aktywności (aktywację/inhibicję) lub w sposób pośredni – zależny od receptorów jądrowych. Lek będący agonistą receptora jądrowego aktywuje transkrypcję genów kodujących enzymy zaangażowane w jego metabolizm oraz detoksyfikację (ryc. 4). Jeżeli zjawisko to występuje w komórkach nowotworowych, to obniża ich wrażliwość na cytotoksyczne działanie leku, co jest poważnym ograniczeniem chemioterapii przeciwnowotworowej. Nadekspresja *UGT* może przekładać się na wzrost glukuronidacji nie tylko leków indukujących, ale także substancji przyjmowanych wraz z nimi, w tym innych terapeutyków. Należy to uwzględnić

podczas stosowania terapii wielolekowych.



Ryc. 4. Wzajemne zależności pomiędzy receptorem jądrowym (NR), jego ligandem – lekiem oraz enzymami metabolicznymi (DME)

Porównanie ekspresji PXR w 14 próbkach prawidłowej oraz nowotworowo zmienionej tkanki jelita grubego pozwoliło zaobserwować drobne różnice, jednak bez wyraźnej tendencji do nadekspresji w którejkolwiek z tkanek. Zauważono natomiast istotne różnice międzyosobnicze. W niektórych przypadkach poziom mRNA dla PXR w komórkach jelita był znacznie wyższy niż w komórkach wątroby, które ze względu na wysoką ekspresję PXR użyto w celu porównań [70]. Ponadto zaobserwowano liczne mutacje punktowe wpływające na ekspresję PXR oraz jego zdolność do wiązania ligandów [7]. Zróżnicowane stężenie oraz funkcjonalność PXR wśród pacjentów jest inną przyczyną różnic międzyosobniczych objawiających się różną zdolnością do metabolizowania leków. Przykładowo, różnice międzyosobnicze w możliwości glukuronidacji SN-38 mogą być wynikiem modulacji ekspresji UGT za pośrednictwem PXR. Wykazano, że wydajność glukuronidacji SN-38 koreluje z poziomem PXR, dlatego oznaczenie poziomu ekspresji oraz wariantu genetycznego tego receptora może pomóc w przewidywaniu odpowiedzi na terapię irinotekaniem u danego pacjenta [70].

Różnice pomiędzy tkanką prawidłową i nowotworową

Ogólnie tkanka nowotworowa charakteryzuje się takim samym bądź mniejszym stężeniem DME niż tkanka prawidłowa. Wykazały to badania ilości i aktywności enzymów I i II fazy w biopsjach tkanki nowotworowej i otaczającej prawidłowej tkanki u pacjentów chorych na nowotwór. Na przykład w przypadku niedrobnokomórkowego raka płuc stwierdzono znacznie mniejsze stężenie CYP1A1 w tkance nowotworowej. Natomiast badanie aktywności UGT i SULT nie wykazało różnic między tkanką prawidłową i nowotworową [88]. Podobne analizy przeprowadzono dla raka piersi. W przypadku UGT zaobserwowano 5-krotnie mniejszą aktywność tego enzymu w tkance nowotworowej. Stwierdzono natomiast 6-krotny wzrost aktywności β -glukuronidazy, enzymu katalizującego hydrolizę glukuronidów. Sugeruje się, że może to korzystnie wpływać na skuteczność chemio-

terapii, gdyż niewielka wydajność glukuronidacji w połączeniu z dużą wydajnością hydrolizy glukuronidów mogą sprzyjać zatrzymywaniu leku w tkance nowotworowej [2].

Badania poziomu ekspresji i aktywności UGT w tkance prawidłowej i nowotworowej mogą pomóc w zrozumieniu przyczyn kancerogenezy oraz zróżnicowanej odpowiedzi na chemioterapię. Często spotykana niższa ekspresja UGT w tkance nowotworowej może mieć wpływ na progresję nowotworu związaną z utratą zdolności do efektywnej glukuronidacji, czyli detoksyfikacji kancerogenów. Przypuszcza się, że poziom ekspresji UGT w tkance gruczołu piersiowego ma wpływ na rozwój raka piersi. Istotną rolę w progresji tego nowotworu odgrywają estrogeny i ich hydroksylowe pochodne [30]. Hormony te podlegają glukuronidacji katalizowanej głównie przez UGT1A10, a także w mniejszym stopniu UGT2B7. Zatem stężenie estrogenów jest regulowane w wyniku sprzężenia z glukuronianem, co jest mechanizmem ochronnym przed kancerogenezą [80,81]. Porównanie ekspresji UGT1A10 i UGT2B7 dla tkanki prawidłowej i zmienionej nowotworowo wykazało 4-krotną i 8-krotną redukcję poziomu mRNA w przypadku tkanki nowotworowej. Podobnie porównanie aktywności UGT względem estradiolu i 4-hydroksyestronu w próbkach białek pozyskanych z tkanki prawidłowej i nowotworowej wykazało 2- i 4-krotną redukcję aktywności enzymatycznej w tkance raka piersi [79]. Stwierdzono również związek między stopniem zaawansowania nowotworu, a ekspresją UGT2B7. Badania wykazały, że jest ona znacznie niższa w nowotworach przerzutujących, w porównaniu ze stadium przedinwazyjnym. Sugeruje się, że poziom ekspresji UGT2B7 może pełnić rolę markera umożliwiającego ocenę stopnia zaawansowania choroby oraz dobór właściwego schematu leczenia [33]. Również w przypadku raka jelita grubego poziom ekspresji i aktywność UGT są na ogół niższe w tkance nowotworowej w porównaniu do prawidłowej. Jedynie w 3 z 9 par biopsji wykazano większe stężenie białka UGT w tkance nowotworowej [17].

Jednak z terapeutycznego punktu widzenia niższa ekspresja UGT w tkance nowotworowej może być zjawiskiem korzystnym, gdyż podwyższa stężenie aktywnego chemioterapeutyku w komórkach nowotworowych zwiększając ich podatność na leki, których detoksyfikacja zachodzi w procesie glukuronidacji. Analizy porównawcze ekspresji i aktywności UGT w tkance prawidłowej i nowotworowej mogą być przydatne w wyborze odpowiedniej chemioterapii dla danego pacjenta. Przykładowo, irinotekan jest wskazany dla osób, u których ekspresja UGT jest wyższa w tkance prawidłowej niż w tkance nowotworowej. W związku z tym glukuronidacja chroni prawidłowe komórki nabłonka jelita przed toksycznym działaniem SN-38, natomiast komórki guza, wykazujące brak wystarczającej ochrony, są bardziej podatne na działanie leku.

OPORNOŚĆ NA LEKI PRZECIWNOWOTWOROWE

Przedstawiona charakterystyka enzymów UGT wskazuje na ich istotną rolę w odpowiedzi na terapię przeciwnowotworową. Poznawane coraz lepiej właściwości tych enzy-

mów pozwalają wyróżnić je jako jedną z przyczyn oporności pacjentów na chemioterapeutyki. Niżej opisano kilka możliwych mechanizmów oporności komórek nowotworowych na leki, związanych z aktywnością enzymów UGT, poziomem ich ekspresji oraz mechanizmem wydalania ich metabolitów poza komórkę.

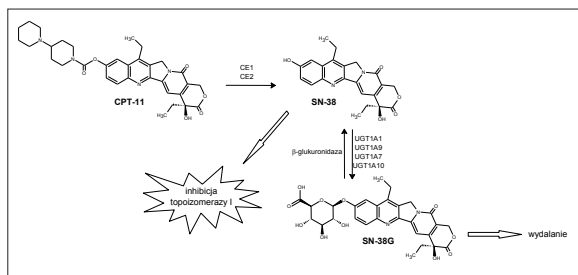
Wydajny metabolizm z udziałem UGT

Metabolizm z udziałem UGT zachodzi przede wszystkim w wątrobie, która charakteryzuje się wysokim poziomem ekspresji wielu izoenzymów z tej rodziny. Nie bez znaczenia dla metabolizmu leków jest też udział innych narządów, zwłaszcza jelit [84]. Obecne tam izoenzymy przyczyniają się do tzw. efektu pierwszego przejścia, zmniejszając biodostępność leku podanego doustnie. W związku z tym tylko część podanej dawki leku dociera wraz z krążeniem wrotnym do wątroby [76]. Oporność będąca skutkiem efektywnej glukuronidacji może wynikać również z obserwowanej w niektórych przypadkach, wysokiej ekspresji UGT w tkance nowotworowej [17]. Wydajna glukuronidacja chroni komórki nowotworowe przed cytotoksycznym działaniem leku i przyspiesza jego eliminację, uniemożliwiając osiągnięcie terapeutycznego stężenia leku w komórkach nowotworowych.

Irinotekan

Najlepiej zbadanym lekiem, którego główną ścieżkę detoksyfikacji stanowi glukuronidacja jest irinotekan [4]. Jest to lek pierwszego rzutu w terapii nowotworów jelita grubego [19]. Poza tym jest też stosowany m.in. u chorych w leczeniu raka płuc [49] i żołądka [10]. Irinotekan jest podawany w postaci proleku – CPT-11, który jest przekształcany w procesie hydrolizy wiązania estrowego do aktywnej postaci – SN-38 (ryc. 5). Metabolit ten jest inhibitorem topoisomerazy I. Przez stabilizację kompleksu DNA-topoisomeraza I, enzym uniemożliwia replikację co prowadzi do śmierci komórki [41]. Detoksyfikacja SN-38 przebiega przez sprzężanie aromatycznej grupy hydroksylowej z kwasem glukuronowym w pozycji 10. Izoenzymy katalizujące ten proces to poza wątrobowy UGT1A7 [12] oraz przede wszystkim UGT1A1 i UGT1A9 [39,45]. Zarówno UGT1A1 jak i UGT1A9 ulegają wydajnej ekspresji w przewodzie pokarmowym oraz w wątrobie [15] – głównym narzędzie, w którym zachodzi II faza metabolizmu SN-38 [31]. Następnie glukuronid SN-38 jest usuwany z komórek przez transportery błonowe z rodziny ABC (ATP-binding cassette) i wydalany z moczem i żółcią [55].

Badania przyczyn oporności na terapię nowotworów płuc wskazały m.in., że komórki raka płuc odporne na irinotekan PC-7/CPT wykazują ekspresję genów UGT1A1 oraz UGT1A10, izoenzymów aktywnych względem SN-38. Natomiast komórki wrażliwe na irinotekan PC-7 nie wykazują takiej ekspresji. Ponadto, tkanki nowotworu płuc przebadane pod kątem ekspresji genów obu izoenzymów wskazały na obecność transkryptów dla UGT1A1 i UGT1A10, jednak ich stężenie było bardzo zróżnicowane wśród pacjentów. Wyniki te wskazują na udział izoenzymów z podrodziny UGT1A w mechanizmie oporności na terapię raka płuc irinotekaniem [61]



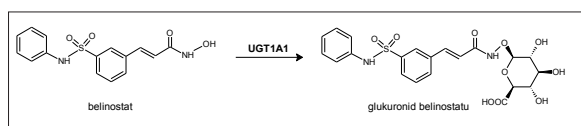
Ryc. 5. Główna ścieżka biotransformacji irinotekanu (CPT-11). CPT-11 jest hydrolizowany przez karboksylesterazy (CE1, CE2) do aktywnej postaci SN-38. Następnie SN-38 ulega glukuronidacji (wg [57] zmodyfikowano)

Problem nadekspresji UGT i związana z nią oporność na irinotekan dotyczy również nowotworów jelita. Zaproponowano strategię terapeutyczną pozwalającą na ominięcie tej przeszkody. Wykazano, że zastosowanie selektywnego inhibitora izoformy UGT ulegającej nadekspresji w komórkach nowotworowych może skutecznie zahamować detoksyfikację leku, a tym samym zwiększyć efektywność terapii. Badania takie przeprowadzono dla linii komórkowej raka jelita HT29 z nadekspresją UGT oraz dwóch inhibitorów topoisomerazy I: aktywnej postaci irinotekanu – SN-38 i NU/ICRF 505. Stwierdzono, że głównym izoenzymem odpowiedzialnym za glukuronidację tych leków w komórkach HT29 jest UGT1A9 z możliwością udziału UGT2B7 w glukuronidacji NU/ICRF 505. Ponadto zaobserwowano, że u niektórych pacjentów ilość białek UGT w tkance nowotworu jelita była większa niż w komórkach HT29. Przypuszcza się, że oporność raka jelita na irinotekan może być wynikiem nadekspresji UGT1A9. Stwarza to możliwość opracowania terapii ukierunkowanej polegającej na selektywnej inhibicji tego izoenzymu, co zmniejszyłoby oporność komórek nowotworowych na irinotekan, jednocześnie nie wpływając na jego metabolizm w wątrobie, w której za detoksyfikację SN-38 jest odpowiedzialna w przeważającej części izoforma UGT1A1. Wykazano już, że związki takie jak np. propofol, paraben metylowy czy ester oktylowy kwasu galusowego, wykazujące zdolność selektywnej inhibicji UGT1A9, obniżają wartość stężenia IC_{50} dla obu inhibitorów topoisomerazy [17].

Belinostat

Belinostat jest stosunkowo nowym lekiem, obecnie badanym pod kątem możliwości stosowania go w leczeniu chorych z nowotworami litymi i hematologicznymi [20,82]. Belinostat należy do inhibitorów deacetyazy histonowej, które zalicza się do cytostatyków nowej generacji o względnie małej toksyczności [90]. Z chemicznego punktu widzenia belinostat należy do klasy kwasów hydroksamowych, czyli pochodnych kwasów karboksylowych, w których grupa hydroksylowa zastąpiona została grupą hydroksyloaminową. Dzięki temu reaktywnemu ugrupowaniu belinostat przekształcany jest przez DME do 5 metabolitów, w tym głównie do glukuronidu. Sprzężanie z glukuronianem zachodzi na atomie tlenu grupy hydroksyloaminowej (ryc. 6). Obserwowana wśród pacjentów leczonych belinostatem

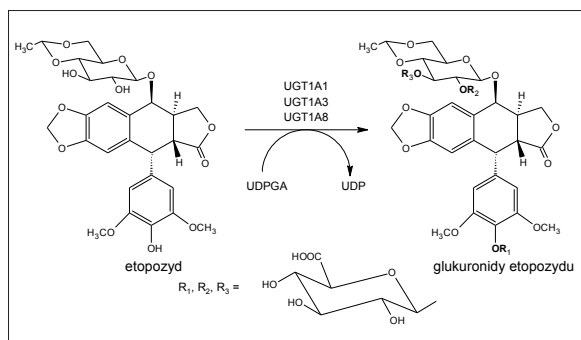
wysoka wartość współczynnika oczyszczenia wskazywała na wydajną reakcję glukuronidacji. Średnia ekspozycja na glukuronid belinostatu była ponad 4-krotnie wyższa niż na związek macierzysty. Za metabolizm belinostatu odpowiada prawie wyłącznie izoforma UGT1A1, choć zaobserwowano także nieznaczny udział UGT1A3, 1A8, 2B4 i 2B7 [91]. Isoforma UGT1A1 ulega ekspresji m.in. w przewodzie pokarmowym, gdzie odpowiada za obniżoną absorpcję leku podanego doustnie. Ponadto jest to jeden z głównych izoenzymów wątrobowych, dlatego w przypadku leku podanego drogą pokarmową jest możliwe obniżenie jego skuteczności przeciwnowotworowej [15].



Ryc. 6. Główna ścieżka detoksyfikacji belinostatu (wg [91] zmodyfikowano)

Etopozyd

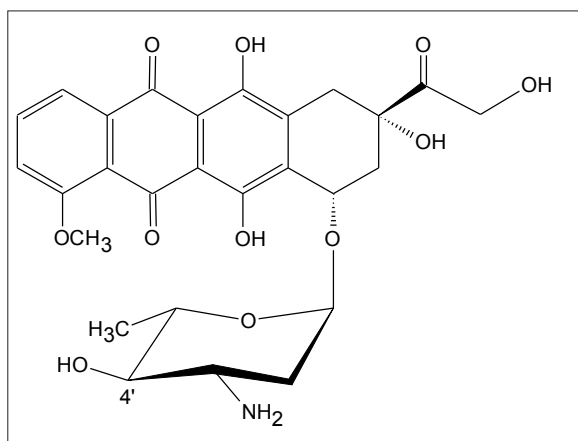
Etopozyd należy do inhibitorów topoiizomerazy II i jest stosowany w leczeniu chorych z ostrą białaczką, drobno-komórkowym rakiem płuc i nowotworami złośliwymi jądra [71,59]. Pod względem chemicznym jest glikozydem naturalnego związku – podofilotoksyny [77]. Etopozyd jest wydalany przez nerki głównie w postaci niezmienionej oraz jako glukuronid [37,38]. W strukturze ma trzy miejsca podatne na glukuronidację, tj. grupy hydroksylowe: dwie alkoholowe należące do reszty cukrowej oraz jedną fenolową (ryc. 7). Badania wykazały, że glukuronidacja etopozydu prowadzi do powstania trzech O-glukuronidów. Metabolizm ten jest katalizowany głównie przez izoenzymy UGT1A1, 1A8 i 1A3. Badania wykazały także, że najaktywniejszą izoformą jest UGT1A1, a głównym produktem metabolizmu jest glukuronid fenolowy. Zaobserwowano także, że efektywność sprzęgania leku z glukuronianem była bardzo zróżnicowana wśród ludzkich mikrosomów wątrobowych pozyskanych od różnych pacjentów [95]. Różnice międzysobnicze w oporności na etopozyd mogą więc wynikać z różnorodności wariantów genetycznych głównego izoenzymu odpowiedzialnego za metabolizm – UGT1A1 [89].



Ryc. 7. Reakcja glukuronidacji etopozydu. Jej produktami są trzy glukuronidy: dwa alkoholowe i jeden fenolowy (wg [95] zmodyfikowano)

Epirubicyna

Epirubicyna należy do antracyklin II generacji, jest epimerem doksorubicyny. Różnica dotyczy orientacji grupy hydroksylowej w pozycji 4'-aminosacharydu dzięki czemu epirubicyna wykazuje słabszą kardiotoxycywność niż doksorubicyna (ryc. 8). Ta niewielka różnica strukturalna ma ogromny wpływ na farmakokinetykę i metabolizm obu leków [93,94]. W przeciwieństwie do klasycznych antracyklin, epirubicyna oraz produkt jej redukcji – epirubicynol są wydajnie sprzęgane z glukuronianem w wątrobie przez UGT2B7, a następnie wydalane do żółci i krwi [43]. Jest to możliwe dzięki ekwatorialnemu położeniu grupy 4'-OH, co oznacza że znajduje się ona mniej więcej w płaszczyźnie pierścienia aminocukru, a to zmniejsza zawadę przestrzenną i umożliwia połączenie z kwasem glukuronowym. Głównym metabolitem leku obecnym w moczu jest glukuronid epirubicyny [93]. Dlatego przypuszcza się, że wydajna glukuronidacja z udziałem UGT2B7 może być jedną z przyczyn oporności na epirubicynę.



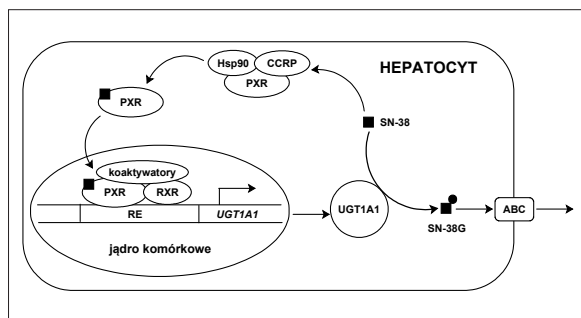
Ryc. 8. Struktura chemiczna epirubicyny. Sprzęganie z kwasem glukuronowym zachodzi z udziałem grupy hydroksylowej przy węglu 4'

Indukcja ekspresji UGT

Irinotekan

Oprócz oporności wynikającej z wydajnej glukuronidacji zachodzącej w jelitach i wątrobie zwanej efektem pierwszego przejścia, może wystąpić również zjawisko określane mianem oporności nabytej. Polega ono na indukcji DME w odpowiedzi na lek, co prowadzi do nadekspresji enzymów odpowiedzialnych za detoksyfikację i wydalanie leku. Klasycznym przykładem leku przeciwnowotworowego indukującego mechanizmy oporności nabytej jest irinotekan. Jego aktywna postać – SN-38 ma zdolność aktywacji receptora pregnanu PXR. Zaktywowany receptor przemieszcza się do jądra komórkowego, gdzie tworzy kompleks z receptorem kwasu 9-cis-retinowego RXR (retinoid X receptor). Powstały heterodimer wiąże się do sekwencji docelowych i uruchamia transkrypcję genów kodujących enzymy zaangażowane w detoksyfikację leku (ryc. 9). W ten sposób może przebiegać indukcja enzymów

I i II fazy metabolizmu oraz transporterów ABC, co prowadzi do oporności komórek nowotworowych na irinotekan, zwłaszcza jeśli mają zwiększoną ekspresję genu receptora PXR [5]. Badania przeprowadzone na linii komórkowej raka jelita LS174T transfekowanej wektorem zawierającym gen kodujący PXR wykazały, że inkubacja z SN-38 podwyższa stężenie mRNA dla UGT1A1 proporcjonalnie do poziomu ekspresji PXR. Słabszą nadekspresję zaobserwowano też w przypadku UGT1A9 i 1A10, natomiast nie stwierdzono wpływu ekspresji PXR na ilość mRNA dla UGT1A6 [70]. Inne analizy przeprowadzone z użyciem linii komórkowych raka wątroby HepG2 i jelita LS180 wykazały, że potraktowanie komórek SN-38 skutkuje w przypadku HepG2 wzrostem transkrypcji: *CYP3A4*, *CYP3A5*, *UGT1A1*, *MDR1*, *BCRP* i *MRP1*, a w przypadku linii LS180: *CYP3A4*, *CYP3A5*, *UGT1A1*, *UGT1A7* i *MRP2*. Działanie aktywną postacią irinotekanu na komórki HepG2, w których ograniczono ekspresję PXR spowodowało również wzrost poziomu transkryptów dla enzymów detoksyfikujących, lecz w mniejszym stopniu. Pozwala to przypuszczać, że PXR nie jest jedynym receptorem, poprzez który są uruchamiane mechanizmy oporności na irinotekan [5]. Przytoczone wyniki badań sugerują, że PXR wpływa na obniżanie stężenia SN-38 wewnątrz komórek nowotworowych przez indukcję UGT1A1, który jest głównym izoenzymem katalizującym powstawanie glukuronidu SN-38.



Ryc. 9. Indukcja UGT1A1 przez SN-38. Receptor jądrowy PXR występuje w cytoplazmie w kompleksie, w którego skład wchodzi też: białko szoku cieplnego – Hsp90 (heat shock protein 90) oraz białko CCRP (CAR cytoplasmic retention protein). Po związaniu liganda – SN-38, kompleks dysocjuje i receptor przemieszcza się do jądra komórkowego gdzie tworzy heterodimer z białkiem RXR. Heterodimer wiąże się do sekwencji RE (response element) i po związaniu koaktywatorów uruchamia transkrypcję genu *UGT1A1*. Produkt ekspresji – białko UGT1A1 jest głównym izoenzymem odpowiadającym za glukuronidację SN-38 w wątrobie. Glukuronid wydalany jest z komórki za pośrednictwem transporterów błonowych z rodziny ABC (wg [5,87] zmodyfikowano)

Metotreksat

Linie komórkowe raka piersi odporne na metotreksat wykazują nadekspresję kilku izoenzymów UGT: UGT1A1, 1A3, 1A4, 1A5 i 1A6 w stosunku do linii wrażliwych na metotreksat. W przypadku UGT1A6 zaobserwowano największą różnicę w poziomie mRNA między komórkami opornymi i wrażliwymi. Transfekcja komórek wrażliwych genem kodującym UGT1A6 zwiększyła ich przeżywalność po ekspozycji na metotreksat, co wskazuje na udział UGT1A6 w detoksyfikacji leku. Inkubacja komórek wrażliwych z małym stężeniem metotreksatu spowodowała wzrost transkrypcji genów *UGT1A6* oraz w mniejszym stopniu *UGT1A1* i *UGT1A4*. Wykazano, że nadekspresja *UGT1A6* jest wynikiem indukcji transkrypcji przez metotreksat, a nie amplifikacji genu. Jedną z proponowanych metod aktywacji transkrypcji jest indukcja za pośrednictwem AhR [21]. Jest to czynnik transkrypcyjny umiejscowiony w cytoplazmie. W wyniku aktywacji przez związanie liganda – metotreksatu, AhR przemieszcza się do jądra komórkowego i tworzy heterodimer z białkiem ARNT (AhR nuclear translocator). Powstały kompleks AhR/ARNT wiąże się do specyficznej sekwencji DNA, zwanej XRE (xenobiotic response element) [13]. Inną sugerowaną ścieżką indukcji UGT1A6 przez metotreksat jest związanie ARNT z HIF-1 (hypoxia-inducible factor 1), który wiąże się z sekwencją (inną od XRE) obecną w promotorze *UGT1A6* [52]. Ponadto, badania wykazały, że komórki wrażliwe, traktowane najpierw metotreksatem, a następnie tamoksyfenem lub irinotekanem stawały się bardziej odporne z powodu wzmożonej glukuronidacji tych leków. Metotreksat może więc obniżyć cytotoksyczność tamoksyfenu oraz irinotekanu i ten efekt może odpowiadać za częste niepowodzenia terapii łączonej raka piersi z użyciem tamoksyfenu i metotreksatu. Dlatego zjawisko indukcji oporności przez metotreksat powinno być uwzględniane podczas łączenia tego leku z innymi chemioterapeutykami podatnymi na glukuronidację [21].

Epirubicyna

Najnowsze badania donoszą, że ekspresja UGT może być regulowana także przez p53. Podejrzewa się, że geny enzymów metabolicznych mogą stanowić kolejny zestaw genów, których transkrypcja jest aktywowana za pośrednictwem p53 w odpowiedzi na obecność substancji genotoksycznych w komórkach. Wykazano, że epirubicyna indukuje ekspresję UGT2B7, czyli izoenzymu odpowiedzialnego za jej detoksyfikację. Potraktowanie komórek HepG2 epirubicyną wywołało wzrost poziomu mRNA, białka oraz aktywności katalitycznej UGT2B7. Badanie mechanizmu indukcji wykazało, że epirubicyna stymuluje przyłączenie p53 do sekwencji p53RE obecnej w promotorze genu UGT2B7. Sugeruje się, że indukcja ekspresji UGT2B7 w komórkach nowotworu wątroby jest częściowo odpowiedzialna za mechanizm oporności na epirubicynę [42].

Oporność zależna od glukuronidacji i związana z białkami ABC

Jak już wielokrotnie wspomniano, produkty metabolizmu UGT – glukuronidy, są usuwane z komórek. Wydaje się, że lipofilowe związki egzogenne, w tym leki, bardzo często nie są bezpośrednimi substratami transporterów błonowych, lecz są nimi m.in. polarne metabolity powstające z udziałem enzymów UGT. Wiele dowodów wskazuje, że indukcja DME w komórkach nowotworowych jest skoordynowana z indukcją transportera usuwającego metabolity leku z komórki. Mechanizm taki chroni komórki przed toksycznym działaniem leku na zasadzie dezaktywacji

i szybkiego pozbywania się jego produktów biotransformacji. Przykładowo, aktywna postać irinotekanu, związek SN-38 indukuje za pośrednictwem PXR ekspresję genów UGT1A1 oraz transportera z rodziny ABC - MRP1 w komórkach HepG2, a w przypadku komórek LS180 – UGT1A1, UGT1A7 i transportera ABC – MRP2 [5].

Transportery błonowe usuwające leki i ich metabolity, to głównie białka z rodziny ABC (ATP-binding cassette). Ulegają ekspresji w tkankach wielu narządów: wątroby, nerek, jelit, mózgu, gdzie są barierą dla wnikania leku. Odpowiadają za zjawisko oporności wielolekowej – MDR (multidrug resistance), która jest jedną z przyczyn niepowodzeń chemioterapii [78].

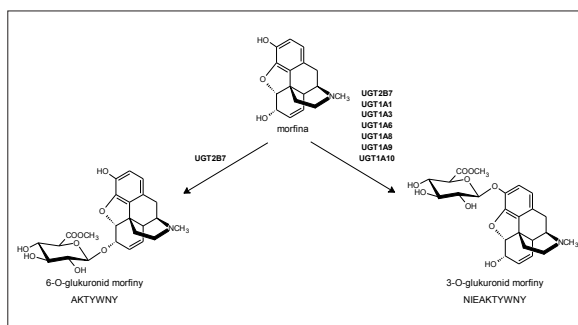
Inhibitory topoizomazy I - NU/ICRF 505 oraz SN-38 podlegają glukuronidacji w komórkach raka jelita HT29 charakteryzujących się wysoką ekspresją UGT [16,17]. Zaobserwowano, że w przypadku NU/ICRF 505, następuje szybkie wnikanie związku do komórek, po czym jego stężenie systematycznie spada kosztem glukuronidów wydalanych do pożywki. W odróżnieniu od HT29, komórki raka jelita HCT116, które nie wykazują ekspresji UGT, mają skłonność do akumulacji leku. Dowiedziono, że za transport glukuronidów NU/ICRF 505 na zewnątrz komórek odpowiadają białka z rodziny ABC, prawdopodobnie MRP1 i MRP3. Wyniki te wskazują na nieodzowną rolę białek ABC w mechanizmie oporności związanej z glukuronidacją. NU/ICRF505 jest silnie hydrofobowym związkiem, co czyni go całkowicie niepodatnym na transport z udziałem białek ABC. Jeśli związek macierzysty nie jest rozpoznawany przez transportery ABC, glukuronidacja jest głównym mechanizmem oporności, umożliwiającym transport leku w postaci glukuronidu na zewnątrz komórki, zapobiegając jego akumulacji. W odróżnieniu od NU/ICRF 505, SN-38 jest lepszym substratem dla białek ABC niż jego glukuronid. Dlatego w przypadku irinotekanu pierwszą linią obrony komórek nowotworowych jest aktywne wyrzucanie leku na zewnątrz, natomiast glukuronidacja odgrywa mniejszą rolę w mechanizmie oporności niż w przypadku NU/ICRF 505 [18].

AKTYWNE GLUKURONIDY

Czasami obserwuje się podwyższoną lub niezmienną aktywność biologiczną glukuronidu w stosunku do aglikonu. Do związków takich należą niesteroidowe leki przeciwpalne z grupy kwasów karboksylowych [74], retinoidy [63] oraz morfina [65]. Ta ostatnia sprzęgana jest przez izoenzym UGT2B7 w pozycjach 3-OH i 6-OH. W przeciwieństwie do 3-O-glukuronidu, 6-O-glukuronid morfiny wykazuje silne działanie analgetyczne, szacuje się, że jest 100-krotnie silniejszym agonistą receptorów opioidowych niż morfina (ryc. 10) [65].

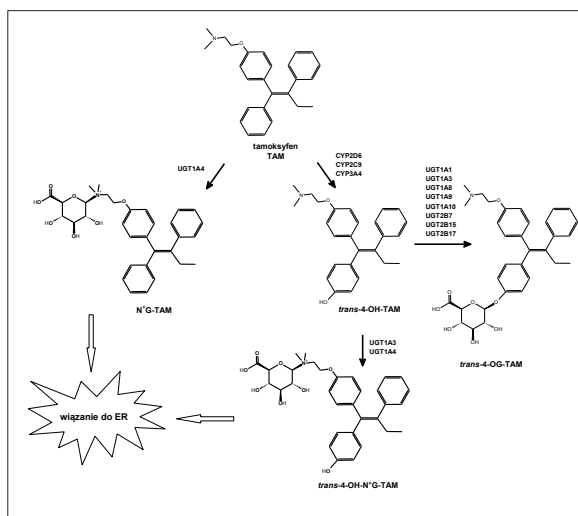
Tamoksyfen

Glukuronidy wykazujące silną aktywność biologiczną i wzmacniające działanie terapeutyczne spotyka się też wśród leków przeciwnowotworowych. Przykładem może być tamoksyfen – antagonistą receptorów estrogenowych



Ryc. 10. Metabolizm morfiny. Izoenzym UGT2B7 selektywnie katalizuje powstawanie aktywnego 6-O-glukuronidu. Drugi metabolit – 3-O-glukuronid jest nieaktywny i powstaje z udziałem UGT2B7 oraz izoenzymów z podrodziny UGT1A (wg [83] zmodyfikowano)

α/β stosowany w hormonoterapii oraz prewencji estrogenozależnego raka piersi [46,96]. Pierwszy etap biotransformacji tamoksyfenu zachodzi z udziałem izoenzymów cytochromu P450, co prowadzi do powstania hydroksylowych oraz demetylopochodnych leku [54]. Na szczególną uwagę zasługuje *trans*-4-hydroksytamoksyfen, który ma silniejsze powinowactwo do receptorów estrogenowych niż związek macierzysty [48]. Zarówno tamoksyfen jak i jego hydroksylowe metabolity ulegają glukuronidacji. W przypadku związku macierzystego jest to *N*-glukuronidacja, natomiast wśród hydroksylowych metabolitów powstają zarówno *N*-jak i *O*-glukuronidy [85]. O ile *O*-glukuronidacja powoduje dezaktywację związku, o tyle *N*-glukuronidacja prowadzi do powstania metabolitów o zachowanej lub podwyższonej aktywności w stosunku do tamoksyfenu (ryc. 11). Reakcję katalizują selektywnie UGT1A4 [60] oraz według innych autorów, również UGT1A3 [86]. Porównanie powinowactwa do



Ryc. 11. Wybrane szlaki metaboliczne tamoksyfenu. Oprócz tamoksyfenu (TAM) i jego aktywnego metabolitu *trans*-4-hydroksytamoksyfenu (*trans*-4-OH-TAM), zdolność do wiązania z receptorem estrogenowym (ER) posiadają także ich *N*-glukuronidy: tamoksyfenu (*N*⁺-G-TAM) i *trans*-4-hydroksytamoksyfenu (*trans*-4-OH-N⁺-G-TAM). Zdolności takiej nie wykazuje *O*-glukuronid *trans*-4-hydroksytamoksyfenu (*trans*-4-OG-TAM) (wg [60,86] zmodyfikowano)

receptorów estrogenowych O- i N-glukuronidu *trans*-4-hydroksytamoksyfenu, wykazało 15-krotnie wyższą aktywność N-glukuronidu. Różnicę tłumaczy się różnym wpływem zmian w strukturze na swoistość oddziaływań z miejscem wiążącym w receptorze. Obecność dużej objętościowo grupy kwasu glukuronowego przyłączonej do atomu tlenu w pozycji 4 uniemożliwia wiązanie z receptorem ze względów sterycznych. Natomiast przyłączenie kwasu glukuronowego do atomu azotu w łańcuchu bocznym nie powoduje przeszkód natury sterycznej i pozwala na utworzenie wiązań wodorowych między ligandem a receptorem [60].

C-1305

W pracach naszego zespołu wykazaliśmy ostatnio, że glukuronid przeciwnowotworowej pochodnej triazolokrydonu C-1305 może wykazywać większą aktywność cytotoksyczną względem linii komórkowych KB-3 z nadekspresją UGT1A10 niż związek macierzysty [66]. C-1305 charakteryzuje się aktywnością względem nowotworów doświadczalnych u myszy: białaczki oraz raka jelita grubego. Jednym z metabolitów C-1305 jest 8-hydroksyglukuronid, który obserwowano wobec ludzkich mikrosomów wątrobowych i jelitowych oraz izoenzymów rekombinowanych: przede wszystkim UGT1A10 oraz w znacznie mniejszym stopniu UGT1A1, 1A3, 1A7, 1A8 i 1A9 [29]. Wykazano, że w komórkach z nadekspresją UGT1A10 związek C-1305 był bardziej cytotoksyczny niż w tych samych komórkach niewykazujących ekspresji żadnego z izoenzymów UGT [66]. Pozwala to przypuszczać, że glukuronid C-1305 charakteryzuje się cytotoksycznością co najmniej porównywalną ze związkiem wyjściowym.

GLUKURONIDY JAKO PROLEKI

Precyzyjne ukierunkowanie leku tak, aby działał wybiórczo na komórki nowotworowe nie jest zadaniem łatwym ze względu na brak wyraźnych różnic między komórką prawidłową, szczególnie proliferującą a nowotworową. Jednak pewne cechy nowotworów np. nadekspresję niektórych enzymów można wykorzystać w terapii ukierunkowanej. Jedną z możliwości jest zaprojektowanie proleku, którego aktywacja przebiegałaby z udziałem enzymu wykazującego podwyższoną aktywność w tkance nowotworowej w porównaniu z prawidłową. Poprawiłoby to działanie terapeutyczne przy jednoczesnym ograniczeniu toksyczności. Interesującą propozycją jest wykorzystanie glukuronidów związków cytotoksycznych jako proleków. Celem molekularnym tej strategii terapeutycznej byłaby β -glukuronidaza, enzym prowadzący hydrolizę β -glukuronidów. W wielu nowotworach zaobserwowano bowiem podwyższone stężenie β -glukuronidazy w obrębie tkanki nowotworowej. Przypuszcza się, że przyczyną tego zjawiska nie jest nadekspresja enzymu w komórkach nowotworu, lecz nekroza tkanki nowotworowej, która powoduje uwolnienie enzymu z komórek [8,14,64]. W niektórych przypadkach zaawansowanych guzów nowotworowych stężenie zewnątrzkomórkowej β -glukuronidazy jest wystarczająco wysokie by zapewnić efektywną hydrolizę proleku lub endogennie generowanego glukuronidu do aktywnej postaci, która ze

względem na słabszą polarność niż glukuronid może wnikać do komórek nowotworowych [9]. W przypadku mniejszych guzów, niedotkniętych nekrozą, aktywacja glukuronidów nie zachodzi z powodu braku zewnątrzkomórkowej β -glukuronidazy. Dlatego rozważana jest też możliwość modyfikacji komórek nowotworowych tak, aby eksponowały na swojej powierzchni β -glukuronidazę [11]. Sposób realizacji takiej terapii polegałby na wprowadzeniu genu kodującego aktywujący enzym do komórek guza - GDEPT (gene-directed enzyme prodrug therapy). Produkt ekspresji genu – enzym, katalizowałby reakcję przekształcającą prolek do aktywnej postaci. Innym podejściem jest terapia ADEPT (antibody-directed enzyme prodrug therapy) polegająca na połączeniu enzymu aktywującego prolek z przeciwciałem swoiście rozpoznającym komórki nowotworowe [26, 51].

SN-38

W przypadku irinotekanu, modelem do badań proleku były ludzkie komórki nowotworu pęcherza moczowego transfekowane genem mysiej β -glukuronidazy. Białko enzymatyczne będące produktem ekspresji eksponowane było na powierzchni komórek. Stwierdzono, że aktywność cytotoksyczna glukuronidu SN-38 względem komórek zmodyfikowanych była 5-krotnie wyższa niż względem komórek nietransfekowanych. Obiecujące wyniki uzyskano również *in vivo* u myszy z ksenoprzeszczepami wymienionych wyżej nowotworów. Stężenie SN-38 w tkance nowotworowej było 70-130% wyższe, a glukuronidu 40-50% niższe w przypadku nowotworu z ekspresją zewnątrzkomórkowej β -glukuronidazy. W ten sposób udało się zwiększyć aktywność przeciwnowotworową irinotekanu nie wywołując dodatkowej toksyczności systemowej. Jak wspomniano, podwyższone stężenie β -glukuronidazy dotyczy tylko części nowotworów, dlatego dużo uwagi skupia się obecnie na strategiach mających na celu zwiększenie stężenia tego enzymu w tkance nowotworowej (ADEPT, GDEPT) tak, aby endogennie wytwarzany glukuronid SN-38 mógł być aktywowany również w nowotworach niewykazujących nekrozy [68].

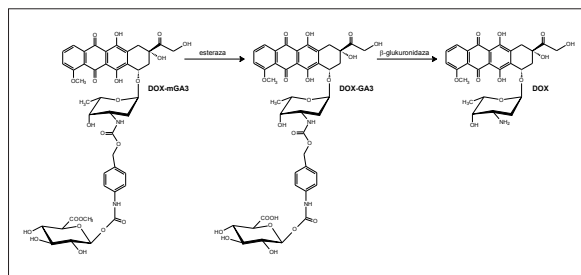
9-aminokamptotecyna

9-aminokamptotecyna należy do inhibitorów topoiomerazy I [92] i wykazuje dużą toksyczność względem nowotworowych linii komórkowych [53] oraz modeli ludzkich nowotworów u zwierząt [34]. Jednak wiązanie się 9-aminokamptotecyny z albuminą ludzkiej surowicy sprawia, że lek ten wykazuje słabą skuteczność przeciwnowotworową u pacjentów w badaniach klinicznych [73]. Natomiast glukuronid 9-aminokamptotecyny – 9ACG ma znacznie słabsze powinowactwo do albuminy, jest nietoksycznym, niezdolnym do przechodzenia przez błony komórkowe prolekiem, który ulega selektywnej aktywacji jedynie przez zewnątrzkomórkową β -glukuronidazę występującą w obrębie nowotworu [67,69]. Wykazano dużą aktywność 9ACG względem ludzkich ksenoprzeszczepów nowotworów u myszy BALB/c. Natomiast myszy NOD/SCID z deficytem makrofagów i neutrofilów wykazywały

słabszą odpowiedź na działanie cytotoksycznego leku. Przemawia to za udziałem komórek układu odpornościowego w procesie aktywacji 9ACG w mikrośrodowisku guza nowotworowego, najprawdopodobniej na zasadzie wydzielania β -glukuronidazy. Podanie myszom 9ACG w połączeniu z terapią antyangiogennym przeciwciałem monoklonalnym DC101 skutkowało synergicznym działaniem obu leków. Mechanizm ich współdziałania polega na normalizacji naczyń krwionośnych guza przez DC101, co wspomaga dostarczenie 9ACG do komórek nowotworowych, a także na zwiększonym zatrzymywaniu neutrofilów w obrębie nowotworu, co podwyższa poziom β -glukuronidazy, czego skutkiem jest wydajna hydroliza proleku do aktywnej postaci. Wyniki te przemawiają za tym, że 9ACG może być stosowana w monoterapii nowotworów objętych nekrozą i stanem zapalnym lub w połączeniu z lekiem antyangiogennym, który ułatwia dostarczenie i aktywację 9ACG w nowotworach o zbyt małym stężeniu zewnątrzkomórkowej β -glukuronidazy [47].

Doksorubicyna

Duża lipofilowość doksorubicyny sprawia, że związek ten szybko przenika do wnętrza komórki, przez co jego stężenie w zdrowych tkankach jest względnie duże. Dlatego największą przeszkodą w stosowaniu doksorubicyny są poważne działania niepożądane, takie jak kardiotoxyczność, mielosupresja, nudności i wymioty. Problem dużej toksyczności doksorubicyny można rozwiązać przez konstrukcję proleku w formie glukuronidu. Obiecującym kandydatem jest DOX-GA3, w którym kwas glukuronowy został przyłączony do grupy aminowej w pozycji 3 aminosacharydu za pośrednictwem aromatycznego łącznika (ryc. 12).



Ryc. 12. Struktury chemiczne doksorubicyny (DOX) i jej dwóch proleków: DOX-GA3 i DOX-mGA3. DOX-mGA3 na skutek działania esterazy przekształca się w DOX-GA3, który następnie jest hydrolizowany przez β -glukuronidazę do DOX (wg [40] zmodyfikowano)

Wykazano, że po podaniu DOX-GA3 myszom z ksenoprzeszczepem raka jajnika stężenie aktywnej postaci doksorubicyny było wyższe w tkance nowotworowej i niższe w tkankach zdrowych niż po podaniu doksorubicyny. Ponadto zdolność DOX-GA3 do zahamowania wzrostu guza nowotworowego zależała od jego wielkości. Lepsze efekty terapii zaobserwowano w przypadku większych nowotworów [40]. Jak już wcześniej wspomniano, tłumaczy się to podwyższonym stężeniem β -glukuronidazy, która jest uwalniana z objętych nekrozą guzów o średnicy prze-

ważnie większej niż 3 mm [8]. Jako rozwiązanie w terapii mniej zaawansowanych nowotworów proponuje się strategię ADEPT. Wykazano, że koniugat przeciwciała monoklonalnego z β -glukuronidazą wiąże się do komórek nowotworowych i efektywnie przeprowadza aktywację proleków antracyklinowych [36].

Mimo wielu korzystnych właściwości DOX-GA3, związek ten, ze względu na wysoką polarność, był szybko wydalany przez nerki [40]. Skłoniło to do dalszych prac nad poprawieniem parametrów farmakokinetycznych i farmakodynamicznych doksorubicyny. Zmodyfikowano strukturę DOX-GA3 poprzez estryfikację grupy karboksylowej kwasu glukuronowego otrzymując ester metylowy DOX-GA3 – DOX-mGA3. Aktywacja DOX-mGA3 przebiega w dwóch etapach. Najpierw związek jest hydrolizowany we krwi przez esterazę, co zapewnia powolne uwalnianie DOX-GA3, a następnie prolek jest przekształcany do doksorubicyny w reakcji katalizowanej przez β -glukuronidazę (ryc. 12). Dzięki estryfikacji prolek stał się bardziej lipofilowy, przez co jego wydalanie z moczem zachodziło wolniej. Pozwoliło to na uzyskanie większego pola pod krzywą AUC dla aktywnej postaci – doksorubicyny, po podaniu DOX-mGA3 niż po podaniu DOX-GA3. Zaobserwowano również 5-krotny wzrost stężenia doksorubicyny w tkance nowotworowej. Wyniki te wskazują, że DOX-mGA3 może efektywniej hamować wzrost nowotworu niż DOX-GA3 przy tej samej dawce proleku [22].

PODSUMOWANIE

Rola glukuronidacji w procesach detoksyfikacji lipofilowych związków endogennych, takich jak bilirubina, kwasy żółciowe, kwasy tłuszczowe czy hormony steroidowe i tyroidowe jest ogólnie znana. Uznano ją za mechanizm kontrolujący właściwe stężenie związków endogennych w organizmie, zapobiegający ich nadmiernej akumulacji, czego spektakularnym przykładem są objawy podwyższonego stężenia bilirubiny. Katalityczne przemiany z udziałem UGT zaadoptowane też zostały, jako mechanizm regulatorowy, do obniżania stężenia związków egzogennych w organizmie. Glukuronidacja tych związków wzmacnia ich właściwości hydrofilowe i poprawia zdolność do usuwania z organizmu. Najnowsze wyniki badań wskazują, że substratami białek z rodziny ABC, odpowiedzialnych za transport większości leków poza komórkę, są nie tyle ksenobiotyki, a powstające produkty ich glukuronidacji. Obserwacja ta poszerza możliwości wyjaśnienia przyczyn często nieskutecznej terapii różnymi lekami.

Następstwa katalitycznego działania UDP-glukuronilotransferaz są słabo poznane w aspekcie terapii przeciwnowotworowej. Glukuronidacja związków kancerogennych w odpowiednich tkankach może opóźnić proces transformacji komórki prawidłowej do nowotworowej. A także glukuronidacja leków przeciwnowotworowych obniża ich skuteczność. Jeśli doda się do tego różną ekspresję enzymów UGT w tkance zdrowej i nowotworowej, stwierdza się, że oba procesy mogą się okazać korzystne lub niekorzystne, w zależności od różnic w ekspresji tych enzymów w tkance zdrowej

i nowotworowej. Natomiast zmiana ekspresji enzymów UGT może być powiązana z ekspresją białek transportujących ABC i modulowana przez inne stosowane leki w terapii wielolekowej. W ten sposób „wąskie okno terapeutyczne” stosowanych i potencjalnych leków przeciwnowotworowych zawęża się jeszcze bardziej i wzmacnia przez UGT-zależną oporność na stosowane leki przeciwnowotworowe. Molekularne mechanizmy oporności z udziałem metabolizmu UGT i oddziaływań lek-UGT-lek opisano najlepiej dla irinotekanu, etopozynu i metotreksatu. Prace te rzuciły nowe światło na wyjaśnienie przyczyn obserwowanej u wielu pacjentów oporności na stosowaną terapię przeciwnowotworową, nie obserwowaną u innych.

Okazało się także, że deaktywacyjna rola enzymów UGT, przypisywana im jako rola podstawowa, może być też wykorzystana do optymalizacji efektów terapii przeciw-

nowotworowej. Ostatnie prace wskazują na możliwość zaprojektowania proleku, produktu katalizy UGT, którego aktywność „uwalniałaby się” w tkance nowotworowej z udziałem hydrolizującej glukuronidy, β -glukuronidazy. Wykazano bowiem, że podwyższone stężenie tego enzymu występuje w wielu tkankach nowotworowych. Jest to jakby „odwrotne” podejście do roli UGT w terapii, wymaga jeszcze rozwiązania wielu problemów, m.in. optymalizacji stężenia i aktywności β -glukuronidazy w przestrzeni komórek nowotworowych, w co próbuje się włączyć elementy terapii genowej. Podsumowując, można stwierdzić, że przedstawione wyżej wyniki badań dotyczących wzajemnych relacji nowotwór-lek-UGT poszerza możliwości projektowania i wdrażania nowych metod terapii przeciwnowotworowej, które będą mogły być przeznaczone indywidualnie dla wybranego pacjenta obciążonego daną chorobą nowotworową.

PIŚMIENICTWO

- [1] Akaba K., Kimura T., Sasaki A., Tanabe S., Ikegami T., Hashimoto M., Umeda H., Yoshida H., Umetsu K., Chiba H., Yuasa I., Hayasaka K.: Neonatal hyperbilirubinemia and mutation of the bilirubin uridine diphosphate-glucuronosyltransferase gene: a common missense mutation among Japanese, Koreans and Chinese. *Biochem. Mol. Biol. Int.*, 1998; 46: 21-26
- [2] Albin N., Massaad L., Toussaint C., Mathieu M.C., Morizet J., Parise O., Gouyette A., Chabot G.G.: Main drug-metabolizing enzyme systems in human breast tumors and peritumoral tissues. *Cancer Res.*, 1993; 53: 3541-3546
- [3] Araki K., Fujita K., Ando Y., Nagashima F., Yamamoto W., Endo H., Miya T., Kodama K., Narabayashi M., Sasaki Y.: Pharmacogenetic impact of polymorphisms in the coding region of the UGT1A1 gene on SN-38 glucuronidation in Japanese patients with cancer. *Cancer Sci.*, 2006; 97: 1255-1259
- [4] Atsumi R., Suzuki W., Hakusui H.: Identification of the metabolites of irinotecan, a new derivative of camptothecin, in rat bile and its biliary excretion. *Xenobiotica*, 1991; 21: 1159-1169
- [5] Basseville A., Preisser L., de Carné Trécesson S., Boisdron-Celle M., Gamelin E., Coqueret O., Morel A.: Irinotecan induces steroid and xenobiotic receptor (SXR) signaling to detoxification pathway in colon cancer cells. *Mol. Cancer*, 2011; 10: 80
- [6] Bock K.W.: Functions and transcriptional regulation of adult human hepatic UDP-glucuronosyl-transferases (UGTs): mechanisms responsible for interindividual variation of UGT levels. *Biochem. Pharmacol.*, 2010; 80: 771-777
- [7] Bosch T.M., Deenen M., Prunzel R., Smits P.H., Schellens J.H., Beijnen J.H., Meijerman I.: Screening for polymorphisms in the PXR gene in a Dutch population. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 2006; 62: 395-399
- [8] Bosslet K., Czech J., Hoffmann D.: A novel one-step tumor-selective prodrug activation system. *Tumor Target*, 1995, 1: 45-50
- [9] Bosslet K., Straub R., Blumrich M., Czech J., Gerken M., Sperker B., Kroemer H.K., Gesson J.P., Koch M., Monneret C.: Elucidation of the mechanism enabling tumor selective prodrug monotherapy. *Cancer Res.*, 1998; 58: 1195-1201
- [10] Bouché O., Raoul J.L., Bonnetain F., Giovannini M., Etienne P.L., Lledo G., Arsène D., Paitel J.F., Guérin-Meyer V., Mitry E., Buecher B., Kaminsky M.C., Seitz J.F., Rougier P., Bedenne L., Milan C.: Randomized multicenter phase II trial of a biweekly regimen of fluorouracil and leucovorin (LV5FU2), LV5FU2 plus cisplatin, or LV5FU2 plus irinotecan in patients with previously untreated metastatic gastric cancer: a Federation Francophone de Cancerologie Digestive Group Study-FFCD 9803. *J. Clin. Oncol.*, 2004; 22: 4319-4328
- [11] Brüsselbach S.: Extracellular β -glucuronidase for gene-directed enzyme-prodrug therapy. *Methods Mol. Med.*, 2004; 90: 303-330
- [12] Carlini L.E., Meropol N.J., Bever J., Andria M.L., Hill T., Gold P., Rogatko A., Wang H., Blanchard R.L.: UGT1A7 and UGT1A9 polymorphisms predict response and toxicity in colorectal patients treated with capecitabine/irinotecan. *Clin. Cancer Res.*, 2005; 11: 1226-1236
- [13] Carver L.A., LaPres J.J., Jain S., Dunham E.E., Bradfield C.A.: Characterization of the Ah receptor-associated protein, ARA9. *J. Biol. Chem.*, 1998; 273: 33580-33587
- [14] Connors T.A., Whisson M.E.: Cure of mice bearing advanced plasma cell tumours with aniline mustard: the relationship between glucuronidase activity and tumour sensitivity. *Nature*, 1966; 210: 866-867
- [15] Court M.H., Zhang X., Ding X., Yee K.K., Hesse L.M., Finel M.: Quantitative distribution of mRNAs encoding the 19 human UDP-glucuronosyltransferase enzymes in 26 adult and 3 fetal tissues. *Xenobiotica*, 2012; 42: 266-277
- [16] Cummings J., Boyd G., Ethell B.T., Macpherson J.S., Burchell B., Smyth J.F., Jodrell D.I.: Enhanced clearance of topoisomerase I inhibitors from human colon cancer cells by glucuronidation. *Biochem. Pharmacol.*, 2002; 63: 607-613
- [17] Cummings J., Ethell B. T., Jardine L., Boyd G., Macpherson J.S., Burchell B., Smyth J.F., Jodrell D.I.: Glucuronidation as a mechanism of intrinsic drug resistance in human colon cancer: reversal of resistance by food additives. *Cancer Res.*, 2003; 63: 8443-8450
- [18] Cummings J., Zelcer N., Allen J.D., Yao D., Boyd G., Maliepaard M., Friedberg T.H., Smyth J.F., Jodrell D.I.: Glucuronidation as a mechanism of intrinsic drug resistance in colon cancer cells: contribution of drug transport proteins. *Biochem. Pharmacol.*, 2004; 67: 31-39
- [19] Cunningham D., Maroun J., Vanhoefer U., Van Cutsem E.: Optimizing the use of irinotecan in colorectal cancer. *Oncologist*, 2001; 6, Suppl. 4: 17-23
- [20] Dai Y., Chen S., Wang L., Pei X.Y., Kramer L.B., Dent P., Grant S.: Bortezomib interacts synergistically with belinostat in human acute myeloid leukaemia and acute lymphoblastic leukaemia cells in association with perturbations in NF- κ B and Bim. *Br. J. Haematol.*, 2011; 153: 222-235

- [21] de Almagro M.C., Selga E., Thibaut R., Porte C., Noé V., Ciudad C.J.: UDP-glucuronosyltransferase 1A6 overexpression in breast cancer cells resistant to methotrexate. *Biochem. Pharmacol.*, 2011; 81: 60-70
- [22] de Graaf M., Nevalainen T.J., Scheeren H.W., Pinedo H.M., Haisma H.J., Boven E.: A methylester of the glucuronide prodrug DOX-GA3 for improvement of tumor-selective chemotherapy. *Biochem. Pharmacol.*, 2004; 68: 2273-2281
- [23] de Jong F.A., de Jonge M.J., Verweij J., Mathijssen R.H.: Role of pharmacogenetics in irinotecan therapy. *Cancer Lett.*, 2006; 234: 90-106
- [24] de Wildt S.N., Kearns G.L., Leeder J.S., van den Anker J.N.: Glucuronidation in humans. *Pharmacogenetic and developmental aspects. Clin. Pharmacokinet.*, 1999; 36: 439-452
- [25] Debinski H.S., Lee C.S., Dhillon A.P., Mackenzie P., Rhode J., Desmond P.V.: UDP-glucuronosyltransferase in Gilbert's syndrome. *Pathology*, 1996; 28: 238-241
- [26] Dubowchik G.M., Walker M.A.: Receptor-mediated and enzyme-dependent targeting of cytotoxic anticancer drugs. *Pharmacol. Ther.*, 1999; 83: 67-123
- [27] Dutton G.J.: *Glucuronidation of drugs and other compounds.* CRC Press: Boca Raton, FL, 1980
- [28] Efferth T., Volm M.: Pharmacogenetics for individualized cancer chemotherapy. *Pharmacol. Ther.*, 2005; 107: 155-176
- [29] Fedejko-Kap B., Bratton S.M., Finel M., Radomska-Pandya A., Mazerska Z.: Role of human UDP-glucuronosyltransferases in the biotransformation of the triazoloacridinone and imidazoacridinone antitumor agents C-1305 and C-1311: highly selective substrates for UGT1A10. *Drug Metab. Dispos.*, 2012; 40: 1736-1743
- [30] Feigelson H.S., Henderson B.E.: Estrogens and breast cancer. *Carcinogenesis*, 1996; 17: 2279-2284
- [31] Gagné J.F., Montminy V., Belanger P., Journault K., Gaucher G., Guillemette C.: Common human *UGT1A* polymorphisms and the altered metabolism of irinotecan active metabolite 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin (SN-38). *Mol. Pharmacol.*, 2002; 62: 608-617
- [32] Gagnon J.F., Bernard O., Villeneuve L., Têtu B., Guillemette C.: Irinotecan inactivation is modulated by epigenetic silencing of *UGT1A1* in colon cancer. *Clin. Cancer Res.*, 2006; 12: 1850-1858
- [33] Gestl S.A., Green M.D., Shearer D.A., Frauenhoffer E., Tephly T.R., Weisz J.: Expression of UGT2B7, a UDP-glucuronosyltransferase implicated in the metabolism of 4-hydroxyestrone and all-trans retinoic acid, in normal human breast parenchyma and in invasive and in situ breast cancers. *Am. J. Pathol.*, 2002; 160: 1467-1479
- [34] Giovanella B.C., Hinz H.R., Kozielski A.J., Stehlin J.S. Jr., Silber R., Potmesil M.: Complete growth inhibition of human cancer xenografts in nude mice by treatment with 20-(S)-camptothecin. *Cancer Res.*, 1991; 51: 3052-3055
- [35] Guillemette C., Lévesque E., Harvey M., Bellemare J., Menard V.: UGT genomic diversity: beyond gene duplication. *Drug Metab. Rev.*, 2010; 42: 22-42
- [36] Haisma H.J., Boven E., van Muijen M., de Jong J., van der Vijgh W.J., Pinedo H.M.: A monoclonal antibody- β -glucuronidase conjugate as activator of the prodrug epirubicin-glucuronide for specific treatment of cancer. *Br. J. Cancer*, 1992; 66: 474-478
- [37] Hande K., Anthony L., Hamilton R., Bennett R., Sweetman B., Branch R.: Identification of etoposide glucuronide as a major metabolite of etoposide in the rat and rabbit. *Cancer Res.*, 1988; 48: 1829-1834
- [38] Hande K.R., Wedlund P.J., Noone R.M., Wilkinson G.R., Greco F.A., Wolff S.N.: Pharmacokinetics of high-dose etoposide (VP-16-213) administered to cancer patients. *Cancer Res.*, 1984; 44: 379-382
- [39] Hanioka N., Ozawa S., Jinno H., Ando M., Saito Y., Sawada J.: Human liver UDP-glucuronosyltransferase isoforms involved in the glucuronidation of 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin. *Xenobiotica*, 2001; 31: 687-699
- [40] Houba P.H., Boven E., van der Meulen-Muileman I.H., Leenders R.G., Scheeren J.W., Pinedo H.M., Haisma H.J.: A novel doxorubicin-glucuronide prodrug DOX-GA3 for tumour-selective chemotherapy: distribution and efficacy in experimental human ovarian cancer. *Br. J. Cancer*, 2001; 84: 550-557
- [41] Hsiang Y.H., Liu L.F., Wall M.E., Wani M.C., Nicholas A.W., Manikumar G., Kirschenbaum S., Silber R., Potmesil M.: DNA topoisomerase I-mediated DNA cleavage and cytotoxicity of camptothecin analogues. *Cancer Res.*, 1989; 49: 4385-4389
- [42] Hu D.G., Rogers A., Mackenzie P.I.: Epirubicin upregulates UDP glucuronosyltransferase 2B7 expression in liver cancer cells via the p53 pathway. *Mol. Pharmacol.*, 2014; 85: 887-897
- [43] Innocenti F., Iyer L., Ramírez J., Green M.D., Ratain M.J.: Epirubicin glucuronidation is catalyzed by human UDP-glucuronosyltransferase 2B7. *Drug Metab. Dispos.*, 2001; 29: 686-692
- [44] Innocenti F., Vokes E.E., Ratain M.J.: Irinogenetics: what is the right star?. *J. Clin. Oncol.*, 2006; 24: 2221-2224
- [45] Iyer L., King C.D., Whittington P.F., Green M.D., Roy S.K., Tephly T.R., Coffman B.L., Ratain M.J.: Genetic predisposition to the metabolism of irinotecan (CPT-11). Role of uridine diphosphate glucuronosyltransferase isoform 1A1 in the glucuronidation of its active metabolite (SN-38) in human liver microsomes. *J. Clin. Invest.*, 1998; 101: 847-854
- [46] Jordan V.C.: Third annual William L. McGuire Memorial Lecture. „Studies on the estrogen receptor in breast cancer“ - 20 years as a target for the treatment and prevention of cancer. *Breast Cancer Res. Treat.*, 1995; 36: 267-285
- [47] Juan T.Y., Roffler S.R., Hou H.S., Huang S.M., Chen K.C., Leu Y.L., Prijovich Z.M., Yu C.P., Wu C.C., Sun G.H., Cha T.L.: Antiangiogenesis targeting tumor microenvironment synergizes glucuronide prodrug antitumor activity. *Clin. Cancer Res.*, 2009; 15: 4600-4611
- [48] Katzenellenbogen B.S., Norman M.J., Eckert R.L., Peltz S.W., Mangel W.F.: Bioactivities, estrogen receptor interactions, and plasminogen activator-inducing activities of tamoxifen and hydroxy-tamoxifen isomers in MCF-7 human breast cancer cells. *Cancer Res.*, 1984; 44: 112-119
- [49] Langer C.J.: The global role of irinotecan in the treatment of lung cancer: 2003 update. *Oncology*, 2003; 17: 30-40
- [50] Lazard D., Zupko K., Poria Y., Nef P., Lazarovits J., Horn S., Khen M., Lancet D.: Odorant signal termination by olfactory UDP glucuronosyl transferase. *Nature*, 1991; 349: 790-793
- [51] Leu Y.L., Roffler S.R., Chern J.W.: Design and synthesis of water-soluble glucuronide derivatives of camptothecin for cancer prodrug monotherapy and antibody-directed enzyme prodrug therapy (ADEPT). *J. Med. Chem.*, 1999; 42: 3623-3628
- [52] Li J., Shi M., Cao Y., Yuan W., Pang T., Li B., Sun Z., Chen L., Zhao R.C.: Knockdown of hypoxia-inducible factor-1 α in breast carcinoma MCF-7 cells results in reduced tumor growth and increased sensitivity to methotrexate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2006; 342: 1341-1351
- [53] Li M.L., Horn L., Firby P.S., Moore M.J.: Pharmacological determinants of 9-aminocamptothecin cytotoxicity. *Clin. Cancer Res.*, 2001; 7: 168-174
- [54] Lim Y.C., Desta Z., Flockhart D.A., Skaar T.C.: Endoxifen (4-hydroxy-N-desmethyl-tamoxifen) has anti-estrogenic effects in breast cancer cells with potency similar to 4-hydroxy-tamoxifen. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 2005; 55: 471-478
- [55] Mathijssen R.H., van Alphen R.J., Verweij J., Loos W.J., Nooter K., Stoter G., Sparreboom A.: Clinical pharmacokinetics and meta-

bolism of irinotecan (CPT-11). *Clin. Cancer Res.*, 2001; 8: 2182-2194

[56] Michael M., Doherty M.M.: Tumoral drug metabolism: overview and its implications for cancer therapy. *J. Clin. Oncol.*, 2005; 23: 205-229

[57] Nagar S., Blanchard R.L.: Pharmacogenetics of uridine diphosphoglucuronosyltransferase (UGT) 1A family members and its role in patient response to irinotecan. *Drug Metab. Rev.*, 2006; 38: 393-409

[58] Nakamura A., Nakajima M., Yamanaka H., Fujiwara R., Yokoi T.: Expression of UGT1A and UGT2B mRNA in human normal tissues and various cell lines. *Drug Metab. Dispos.*, 2008; 36: 1461-1464

[59] O'Dwyer P.J., Leyland-Jones B., Alonso M.T., Marsoni S., Wittes R.E.: Etoposide (VP-16-213): current status of an active anticancer drug. *N. Engl. J. Med.*, 1985; 312: 692-700

[60] Ogura K., Ishikawa Y., Kaku T., Nishiyama T., Ohnuma T., Muro K., Hiratsuka A.: Quaternary ammonium-linked glucuronidation of trans-4-hydroxytamoxifen, an active metabolite of tamoxifen, by human liver microsomes and UDP-glucuronosyltransferase 1A4. *Biochem. Pharmacol.*, 2006; 71: 1358-1369

[61] Oguri T., Takahashi T., Miyazaki M., Isobe T., Kohno N., Mackenzie P.I., Fujiwara Y.: UGT1A10 is responsible for SN-38 glucuronidation and its expression in human lung cancers. *Anticancer Res.*, 2004; 24: 2893-2896

[62] Ohno S., Nakajin S.: Determination of mRNA expression of human UDP-glucuronosyltransferases and application for localization in various human tissues by real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Drug Metab. Dispos.*, 2009; 37: 32-40

[63] Olson J.A., Moon R.C., Anders M.W., Fenselau C., Shane B.: Enhancement of biological activity by conjugation reactions. *J. Nutr.*, 1992; 122: 615-624

[64] Paigen K.: Mammalian β -glucuronidase: genetics, molecular biology, and cell biology. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, 1989; 37: 155-205

[65] Paul D., Standifer K.M., Inturrisi C.E., Pasternak G.W.: Pharmacological characterization of morphine-6 β -glucuronide, a very potent morphine metabolite. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1989; 251: 477-483

[66] Pawlowska M., Chu R., Fedejko-Kap B., Augustin E., Mazerska Z., Radomska-Pandya A., Chambers T.C.: Metabolic transformation of antitumor acridinone C-1305 but not C-1311 via selective cellular expression of UGT1A10 increases cytotoxic response: implications for clinical use. *Drug Metab. Dispos.*, 2013; 41: 414-421

[67] Prijovich Z.M., Chen B.M., Leu Y.L., Chern J.W., Roffler S.R.: Anti-tumour activity and toxicity of the new prodrug 9-aminocamptothecin glucuronide (9ACG) in mice. *Br. J. Cancer*, 2002; 86: 1634-1638

[68] Prijovich Z.M., Chen K.C., Roffler S.R.: Local enzymatic hydrolysis of an endogenously generated metabolite can enhance CPT-11 anticancer efficacy. *Mol. Cancer Ther.*, 2009; 8: 940-946

[69] Prijovich Z.M., Leu Y.L., Roffler S.R.: Effect of pH and human serum albumin on the cytotoxicity of a glucuronide prodrug of 9-aminocamptothecin. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 2007; 60: 7-17

[70] Raynal C., Pascucci J.M., Leguelinel G., Breuker C., Kantar J., Lallemand B., Poujol S., Bonnans C., Joubert D., Hollande F., Lumbroso S., Brouillet J.P., Evrard A.: Pregnane X Receptor (PXR) expression in colorectal cancer cells restricts irinotecan chemosensitivity through enhanced SN-38 glucuronidation. *Mol. Cancer*, 2010; 9: 46

[71] Ross W., Rowe T., Glisson B., Yalowich J., Liu L.: Role of topoisomerase II in mediating epipodophyllotoxin-induced DNA cleavage. *Cancer Res.*, 1984; 44: 5857-5860

[72] Rowland A., Miners J.O., Mackenzie P.I.: The UDP-glucuronosyltransferases: their role in drug metabolism and detoxification. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2013; 45: 1121-1132

[73] Rubin E., Wood V., Bharti A., Trites D., Lynch C., Hurwitz S., Bartel S., Levy S., Rosowsky A., Toppmeyer D., Kufe D.: A phase I and pharmacokinetic study of a new camptothecin derivative, 9-aminocamptothecin. *Clin. Cancer Res.*, 1995; 1: 269-276

[74] Sallustio B.C., Harkin L.A., Mann M.C., Krivickas S.J., Burcham P.C.: Genotoxicity of acyl glucuronide metabolites formed from clofibrate and gemfibrozil: a novel role for phase-II-mediated bioactivation in the hepatocarcinogenicity of the parent aglycones?. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 1997; 147: 459-464

[75] Satoh T., Ura T., Yamada Y., Yamazaki K., Tsujinaka T., Munakata M., Nishina T., Okamura S., Esaki T., Sasaki Y., Koizumi W., Kakeji Y., Ishizuka N., Hyodo I., Sakata Y.: Genotype-directed, dose-finding study of irinotecan in cancer patients with UGT1A1*28 and/or UGT1A1*6 polymorphisms. *Cancer Sci.*, 2011; 102: 1868-1873

[76] Sfakianos J., Coward L., Kirk M., Barnes S.: Intestinal uptake and biliary excretion of the isoflavone genistein in rats. *J. Nutr.*, 1997; 127: 1260-1268

[77] Stahelin H.F., von Wartburg A.: The chemical and biological route from podophyllotoxin glucoside to etoposide: ninth Cain memorial Award lecture. *Cancer Res.*, 1991; 51: 5-15

[78] Starlard-Davenport A., Lyn-Cook B., Beland F.A., Pogribny I.P.: The role of UDP-glucuronosyltransferases and drug transporters in breast cancer drug resistance. *Exp. Oncol.*, 2010; 32: 172-180

[79] Starlard-Davenport A., Lyn-Cook B., Radomska-Pandya A.: Identification of UDP-glucuronosyltransferase 1A10 in non-malignant and malignant human breast tissues. *Steroids*, 2008; 73: 611-620

[80] Starlard-Davenport A., Lyn-Cook B., Radomska-Pandya A.: Novel identification of UDP-glucuronosyltransferase 1A10 as an estrogen-regulated target gene. *Steroids*, 2008; 73: 139-147

[81] Starlard-Davenport A., Xiong Y., Bratton S., Gallus-Zawada A., Finel M., Radomska-Pandya A.: Phenylalanine⁹⁰ and phenylalanine⁹³ are crucial amino acids within the estrogen binding site of the human UDP-glucuronosyltransferase 1A10. *Steroids*, 2007; 72: 85-94

[82] Steele N.L., Plumb J.A., Vidal L., Tjornelund J., Knoblauch P., Rasmussen A., Ooi C.E., Buhl-Jensen P., Brown R., Evans T.R., DeBono J.S.: A phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic study of the histone deacetylase inhibitor belinostat in patients with advanced solid tumors. *Clin. Cancer Res.*, 2008; 14: 804-810

[83] Stone A.N., Mackenzie P.I., Galetin A., Houston J.B., Miners J.O.: Isoform selectivity and kinetics of morphine 3- and 6-glucuronidation by human UDP-glucuronosyltransferases: evidence for atypical glucuronidation kinetics by UGT2B7. *Drug Metab. Dispos.*, 2003; 31: 1086-1089

[84] Strassburg C.P., Nguyen N., Manns M.P., Tukey R.H.: UDP-glucuronosyltransferase activity in human liver and colon. *Gastroenterology*, 1999; 116: 149-160

[85] Sun D., Chen G., Dellinger R.W., Duncan K., Fang J.L., Lazarus P.: Characterization of tamoxifen and 4-hydroxytamoxifen glucuronidation by human UGT1A4 variants. *Breast Cancer Res.*, 2006; 8: R50

[86] Sun D., Sharma A.K., Dellinger R.W., Blevins-Primeau A.S., Ballet R.M., Chen G., Boyiri T., Amin S., Lazarus P.: Glucuronidation of active tamoxifen metabolites by the human UDP glucuronosyltransferases. *Drug Metab. Dispos.*, 2007; 35: 2006-2014

[87] Tolson A.H., Wang H.: Regulation of drug-metabolizing enzymes by xenobiotic receptors: PXR and CAR. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2010; 62: 1238-1249

[88] Toussaint C., Albin N., Massaad L., Grunenwald D., Parise O. Jr., Morizet J., Gouyette A., Chabot G.G.: Main drug- and carcinogen-metabolizing enzyme systems in human non-small cell lung cancer and peritumoral tissues. *Cancer Res.*, 1993; 53: 4608-4612

[89] Tukey R.H., Strassburg C.P.: Human UDP-glucuronosyltransferases: metabolism, expression and disease. *Annu. Rev. Pharmacol.*

Toxicol., 2000; 40: 581-616

[90] Vigushin D.M., Coombes R.C.: Histone deacetylase inhibitors in cancer treatment. *Anticancer Drugs*, 2002; 13: 1-13

[91] Wang L.Z., Ramirez J., Yeo W., Chan M.Y., Thuya W.L., Lau J.Y., Wan S.C., Wong A.L., Zee Y.K., Lim R., Lee S.C., Ho P.C., Lee H.S., Chan A., Ansher S., Ratain M. J., Goh B.C.: Glucuronidation by UGT1A1 is the dominant pathway of the metabolic disposition of belinostat in liver cancer patients. *PloS One*, 2013; 8: e54522

[92] Wani M.C., Nicholas A.W., Manikumar G., Wall M.E.: Plant antitumor agents. 25. Total synthesis and antileukemic activity of ring A substituted camptothecin analogues. Structure-activity correlations. *J. Med. Chem.*, 1987; 30: 1774-1779

[93] Weenen H., Lankelma J., Penders P.G., McVie J.G., ten Bokkel Huinink W.W., de Planque M.M., Pinedo H.M.: Pharmacokinetics of 4'-epi-doxorubicin in man. *Invest. New Drugs*, 1983; 1: 59-64

[94] Weenen H., van Maanen J.M., de Planque M.M., McVie J.G., Pinedo H.M.: Metabolism of 4'-modified analogs of doxorubicin. Uni-

que glucuronidation pathway for 4'-epidoxorubicin. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.*, 1984; 20: 919-926

[95] Wen Z., Tallman M.N., Ali S.Y., Smith P.C.: UDP-glucuronosyltransferase 1A1 is the principal enzyme responsible for etoposide glucuronidation in human liver and intestinal microsomes: structural characterization of phenolic and alcoholic glucuronides of etoposide and estimation of enzyme kinetics. *Drug Metab. Dispos.*, 2007; 35: 371-380

[96] White I.N.: Tamoxifen: is it safe? Comparison of activation and detoxication mechanisms in rodents and in humans. *Curr. Drug Metab.*, 2003; 4: 223-239

[97] Zaya M.J., Hines R.N., Stevens J.C.: Epirubicin glucuronidation and UGT2B7 developmental expression. *Drug Metab. Dispos.*, 2006; 34: 2097-2101

Autorki deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.