

Vitamin C působí cytotoxicky na nádorové a kmenové buňky hepatocelulárního karcinomu

*Vysokodávkovaný vitamin C se řadu let využívá na některých pracovištích (například v USA) jako komplementární terapie, doplňující standardní onkologickou léčbu. Jak ukázala řada studií, vitamin C podávaný v takových dávkách a takovou formou, aby bylo u pacientů dosaženo farmakologických hladin v řádu milimolů, může pomoci ochránit zdravé tkáně před nežádoucími účinky chemoterapie, zlepšit její snášenlivost, případně podpořit její účinnost. Laboratorní studie ukázaly, že v milimolárních koncentracích může vitamin C působit na některé typy nádorových buněk cytotoxicky, přičemž mechanismy tohoto účinku mohou být různé a jsou předmětem stále intenzivnějšího výzkumu. Příspěvkem k této problematice je studie, publikovaná letos v časopise *Npj Precision Oncology*.¹ Autoři se ve studii zabývali otázkou cytotoxického působení farmakologických hladin vitaminu C na buňky hepatocelulárního karcinomu (HCC) a kmenové buňky karcinomu jater (cancer stem cells, CSCs) a na účinnost podávání vitaminu C pacientům s HCC. O studii referujeme v následujícím textu.*

Úvod

Karcinom jater je šesté nejčastější onkologické onemocnění. Hepatocelulární karcinom, který tvoří 80 % těchto případů, se vyznačuje heterogenitou a značnou četností relapsů. Na těchto patologických rysech se mohou ve značné míře podílet maligní kmenové buňky, jejichž schopnost sebeobnovy a diferenciaci souvisí s progresí tumoru, metastazováním a rezistencí vůči chemoterapii. Eradikace CSCs se proto stává novým typem strategie terapie karcinomu jater.

Použití vitaminu C v onkologii má dnes za sebou už dlouhou tradici. V současné době jsou k dispozici výsledky řady studií využití vysoko-dávkovaného vitaminu C. Poprvé se použití vitaminu C v onkologické léčbě objevilo v pracích Paulinga a Camerona s onkologickými pacienty v pokročilém stadiu. Podávání vitaminu C (intravenózně a následně perorálně) vedlo k prodloužené době přežití ve srovnání se skupinou, které vitamin C nebyl podáván.

Později se ukázalo, že k dosažení potřebných účinků je zapotřebí farmakologických, milimolárních koncentrací askorbátu v séru. Na zdravé buňky působí askorbát ochranně (antioxidačně) a tím podporuje jejich normální funkci; zlepšuje tím i funkci imunitního systému, což má význam pro protinádorovou imunitu.

Laboratorní studie ukázaly, že kromě tohoto ochranného působení vůči zdravým buňkám působí vitamin C v milimolárních koncentracích na některé typy nádorových buněk cytotoxicky, přičemž mechanismy tohoto účinku mohou být různé, například prostřednictvím tvorby peroxidu vodíku v okolí maligních buněk, kterým navíc chybí



kataláza k odstranění peroxidu, přičemž normální buňky jsou katalázou chráněny.²⁻⁴ Farmakologické hladiny vitaminu C podle studií s xenograftovými modely ukázaly, že farmakologické hladiny vitaminu C působí cytotoxicky například na buňky karcinomu pankreatu, ovaria, prostaty, tlustého střeva, karcinomu mammy, mesotheliomu a neuroblastomu.⁵⁻⁷

Tyto výsledky vedly ke zvýšenému zájmu o protinádorové účinky vitaminu C. Otázka vlivu vitaminu C na nádorové kmenové buňky (CSCs, cancer stem cells) byla dosud nejasná. (Nádorová kmenová buňka je typ nádorové buňky s některými vlastnostmi buňky kmenové – je schopná proliferovat a měnit se na jakýkoliv typ nádorové buňky v daném nádoru.) Proto se autoři uvedené studie z letošního roku zaměřili také na tuto problematiku. Zabývali se i otázkou transportu vitaminu C do nádorových buněk a CSCs. Obecně je tento vitamin do buněk transportován transportními molekulami označovanými jako SVCT (sodium-dependent vitamin C transporters). Isoforma SVCT-1 je převážně v epitelech, SVCT-2 je v různých tkáních; převládá i v jaterních buňkách. Genetické variace SVCT-2 jsou spojeny s rizikem různých onkologických onemocnění, ale tyto souvislosti nejsou ještě dostatečně osvětleny.

Autoři vycházeli ve své studii z hypotézy, že míra exprese SVCT-2 v buňkách karcinomu jater a v nádorových kmenových buňkách koreluje s mírou citlivosti těchto buněk na cytotoxické působení vitaminu C. Zaměřili se na mechanismy cytotoxicity vitaminu C vůči těmto buňkám a souvislost s expresí SVCT-2. Ověřovali tyto mechanismy na xenograftovém modelu (patient-derived xenograft, PDX, tj. výzkum na myších, do kterých se přenesou nádorové buňky od onkologických pacientů) a hodnotili retrospektivně tuto problematiku u 613 pacientů s HCC, kteří prodělali kurativní resekci jater jako iniciační léčbu.

Výsledky

Expres SVCT-2 v buňkách HCC a nádorových kmenových buňkách

První část studie se zabývala expresí SVCT-2 v buňkách hepatocelulárního karcinomu a jaterních nádorových kmenových buňkách. Vysoká exprese SVCT-2 v nádorových buňkách korelovala u pacientů s HCC s mírou agresivity tumoru. U nádorových kmenových buněk korelovala exprese SVCT-2 s parametry specifickými pro SCCs („stemness“, např. na úrovni mRNA). Při umělém vyřazení (knockdown) SVCT-2 se snížila významně i rezistence nádorových buněk na chemoterapii (cisplatinu a sorafenib). Z toho vyplývá souvislost mezi expresí transportní molekuly SVCT-2 a její patologickou rolí u buněk hepatocelulárního karcinomu, ale i s rezistencí na chemoterapii.

Laboratorní studie ukázaly, že kromě ochranného působení vůči zdravým buňkám působí vitamin C v milimolárních koncentracích na některé typy nádorových buněk cytotoxicky, přičemž mechanismy tohoto účinku mohou být různé.

Tato zjištění in vitro byla ověřována in vivo na xenografovém modelu. Ukázalo se, že chybění SVCT-2 je spojeno se snížením růstu tumoru. Obdobně jako je ve studii in vitro exprese markerů charakteristických pro kmenové buňky (stemness markers) úměrná expresi SVCT-2. SVCT-2 je tedy preferenčně exprimovaný v jaterních nádorových kmenových buňkách (CSCs) a je potřebný pro jejich udržování. Deficit SVCT-2 vedl k expresi apoptotických markerů v těchto buňkách.

SVCT-2 ovlivňuje citlivost nádorových buněk vůči protinádorové cytotoxicitě vitaminu C

V další části studie autoři podrobili nádorové buňky HCC působení vitaminu C v rostoucích koncentracích (do 1,5 milimolu). Viabilita (životnost) nádorových buněk výrazně klesala po aplikaci vitaminu C v závislosti na dávce, jednotlivé linie se v citlivosti na tento podnět ale lišily. Obdobné výsledky byly opět in vivo potvrzeny na xenografových modelech.

Dále se autoři zabývali souvislostmi mezi expresí SVCT-2 v buňkách a citlivostí buněk na protinádorovou cytotoxicitu vitaminu C. Výsledky ukázaly, že tato souvislost je prokazatelná, že s mírou exprese SVCT-2 roste po podání vitaminu C intracelulární hladina askorbátu a také pokles viability těchto buněk.

Jakmile byl v buňkách uměle inhibován SVCT-2, jejich citlivost na vitamin C klesla, resp. došlo k jejich rezistenci na cytotoxicitu askorbátu. Ukázalo se tedy, že citlivost nádorových buněk na cytotoxicitu vitaminu C závisí na influxu vitaminu C do buněk, a tedy i na expresi SVCT-2.

Vitamin C preferenčně zabíjí jaterní kmenové nádorové buňky

Na základě zjištění, že jaterní nádorové kmenové buňky mají bohatě exprimovaný transportér SVCT-2, autoři zkoumali, zda jsou tyto buňky

citlivé na cytotoxicitu vitaminu C. Výsledky ukázaly, že tomu tak je, na rozdíl od cisplatinu, vůči které jsou rezistentní.⁸

Působení vitaminu C výrazně snížilo expresi genů specifických pro kmenové buňky (stemness), tvorbu tzv. nádorových sfér (tumor spheres) a jejich další růst. Vitamin C ve farmakologických koncentracích působí cytotoxicky na jaterní kmenové nádorové buňky.

Mechanismy cytotoxicity vitaminu C, závislé na SVCT-2

Intracelulární koncentrace reaktivních sloučenin kyslíku (ROS) u buněk výrazně exprimujících SVCT-2 po působení vitaminu C vzrostla; právě tento mechanismus zprostředkuje cytotoxicitu vitaminu C vůči nádorovým buňkám. Tento mechanismus byl potvrzen tím, že po podání antioxidantu N-acetyl-L-cysteinu (NAC), který snižoval koncentraci ROS, vzrostla opět viabilita buněk. Vitamin C u těchto buněk způsobil poškození DNA v závislosti na dávce. Vyřazení (knockout) SVCT-2 toto působení vitaminu C inhibovalo.

Poškození DNA nádorových buněk je tedy závislé na expresi SVCT-2 v buňkách. Přidání cisplatinu k vitaminu C a jejich společné působení na nádorové buňky ještě zvýšilo míru poškození DNA oproti samotnému vitaminu C a samotné cisplatině, což ukazuje na synergický účinek obou látek. Podobně synergicky působilo společné podání vitaminu C s dalším protinádorovým léčivem, inhibitorem PARP olaparibem.

Je známo, že silný intracelulární oxidační stres způsobuje depleci adenosin trifosfátu (ATP). Právě tento pokles hladiny ATP byl pozorován u nádorových buněk po působení vitaminu C a byl výraznější u buněk s vyšší expresí SVCT-2. Tato deplece byla reverzibilní po podání antioxidantu (NAC), nebo po vyřazení SVCT-2.



Další mechanismus cytotoxického působení vitaminu C na nádorové buňky představuje zástava buněčného cyklu ve fázi G2/M, výrazné snížení fází G0/G1 a zvýšená exprese cyklin-dependentního inhibitoru kinázy p21 s následnou apoptózou těchto buněk. Tyto pochody bylo opět možno inhibovat vyřazením transportéru SVCT-2. Vitamin C indukoval na kaspáze závislou apoptózu u nádorových buněk, v závislosti na míře exprese SVCT-2 a indukoval jejich autofágii.

Souhrnně řečeno: u nádorových buněk exprimujících SVCT-2 vstupuje vitamin C (pokud je k dispozici ve farmakologické koncentraci) do

buňky, vyvolává intracelulární produkci ROS a následně dochází k poškození DNA, depleci ATP, což vede k buněčné smrti zástavou buněčného cyklu s následnou apoptózou.

Vitamin C inhibuje růst tumoru a eradikuje nádorové kmenové buňky

Na xenograftových modelech byly in vivo ověřeny výše uvedené výsledky získané v podmínkách in vitro. Působení vitaminu C a jeho kombinace s cisplatinou byly v kmenových nádorových buňkách redukovány geny charakteristickými pro CSCs („stemness“), vitamin C tedy působí na CSCs inhibičně. Kombinace vitaminu C s cisplatinou inhibovala růst nádoru výrazněji než každé z léčiv samostatně. Vitamin C vedl k zpomalení růstu tumoru v závislosti na míře exprese SVCT-2 v buňkách.

Vitamin C ve farmakologické koncentraci snižuje riziko progresse HCC: klinická studie

Autoři kromě laboratorního výzkumu in vitro a in vivo ověřovali cytotoxické působení vitaminu C v klinické retrospektivní studii. Skupina 613 pacientů, kterým byla provedena iniciální kurativní resekce jater pro HCC, byla v rámci retrospektivní hodnocení rozdělena na ty, kterým byl podáván vitamin C (intravenózní aplikace v dávce 2 g, 4 či více dní po provedené hepatektomii), a na skupinu pacientů, kteří vitamin C po hepatektomii nedostávali.

Citlivost nádorových buněk na cytotoxicitu vitaminu C závisí na influxu vitaminu C do buněk, a tedy i na expresi SVCT-2.

Pracovní hypotéza předpokládala, že podávání vitaminu C sníží riziko relapsu HCC. Sledování ukázalo, že po dobu 5 let přežívalo bez projevu maligního onemocnění (tzv. disease-free survival, DFS) 24 % pacientů ve

skupině, kde byl podáván vitamin C, zatímco ve skupině bez vitaminu C jen 15 % (rozdíl byl statisticky významný, $p < 0,001$). Medián DFS byl ve skupině léčené vitaminem C 25,2 měsíce, zatímco ve skupině bez vitaminu C byl medián DFS 18 měsíců ($p < 0,001$). Multivariátní analýza ukázala, že intravenózní podávání vitaminu C (resp. působení farmakologických, milimolárních koncentrací tohoto vitaminu) představují nezávislý faktor pro zlepšení hodnot DFS ($p < 0,001$), tedy pro pravděpodobnost prodloužení období bez relapsu onemocnění.

Závěr

Výsledky této studie autoři shrnují konstatováním, že farmakologické hladiny vitaminu C působí cytotoxicky na buňky hepatocelulárního karcinomu (HCC), mají schopnost eradikace jaterních kmenových nádorových buněk, a navíc, jak ukázala retrospektivní klinická studie, snižují riziko progresse HCC. Studie dále ukázala, že jak nádorové buňky HCC, tak jaterní nádorové kmenové buňky exprimují ve vysoké míře transportní molekulu SVCT-2, která hraje významnou roli v citlivosti uvedených buněk na cytotoxické působení vitaminu C.

Významné zjištění je, že nádorové kmenové buňky, které hrají významnou roli v tumorigenezi, relapsu onemocnění a chemorezistenci, jsou citlivé na farmakologické hladiny vitaminu C, který výrazně snižuje jejich schopnost sebeobnovy a exprese pro tyto buňky charakteristických genů, a dokáže snížit zastoupení kmenových nádorových buněk v HCC.

Studie je též příspěvkem k objasnění některých mechanismů cytotoxicity farmakologických hladin vůči nádorovým buňkám: u nádorových buněk exprimujících SVCT-2 vstupuje vitamin C do buňky, vyvolává intracelulární produkci ROS, vzniklý intracelulární oxidativní stres poškozuje DNA, vyvolává depleci ATP, což vede k buněčné smrti zástavou buněčného cyklu a na kaspáze závislé apoptóze. Vitamin C ve farmakologické koncentraci tak představuje slibnou léčebnou strategii pro terapii hepatocelulárního karcinomu; výhodná je jeho kombinace s chemoterapií (např. cisplatinou), s níž působí synergicky.

Literatura

- Hongwei L, Changzheng W, Tian F, et al. Vitamin C preferentially kills cancer stem cells in hepatocellular carcinoma via SVCT-2. *Npj Precision Oncology* 2018; 2:1-13.
 - Chen Q, et al. Pharmacologic ascorbic acid concentrations selectively kill cancer cells: action as a pro-drug to deliver hydrogen peroxide to tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:13604-9.
 - Chen Q, et al. Ascorbate in pharmacologic concentrations selectively generates ascorbate radical and hydrogen peroxide in extracellular fluid in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:8749-54.
 - Chen Q, et al. Pharmacologic doses of ascorbate act as a prooxidant and decrease growth of aggressive tumor xenografts in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105: 11105-9.
 - Verrax J, Calderon PB. Pharmacologic concentrations of ascorbate are achieved by parenteral administration and exhibit antitumoral effects. *Free Radic Biol Med* 2009;47:32-40.
 - Deubzer B, et al. H(2)O(2)-mediated cytotoxicity of pharmacologic ascorbate concentrations to neuroblastoma cells: potential role of lactate and ferritin. *Cell Physiol Biochem* 2010;25:767-774.
 - Du J, et al. Mechanisms of ascorbate-induced cytotoxicity in pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* 2010;16:509-520.
 - Dean M, Fojo T, Bates S. Tumour stem cells and drug resistance. *Nat Rev Cancer* 2005;5:275-284.
- Další literatura u autora.

DOPORUČENÝ FRM PROTOKOL

LIPO-C-ASKOR
2x denně 10-15ml (2g)
dlouhodobě

DMG-FEX
2x denně 20 kapek
dlouhodobě

INFUZE VITAMIN C
7,5g-15g 1-2krát týdně
dlouhodobě

INFUZE GLUTATHION
1,2g-2,4g 1-2krát týdně
dlouhodobě

INFUZE CITICOLIN
1000 mg 1-2krát týdně
dlouhodobě



LABOLIFE 2LC2
obsah 1 kapsle vysypat
pod jazyk – období remise

MENTÁLNÍ FILTR
viz plakát strana 24-25



MUDr. Pavel Kostiuk, CSC.