

Mechanismy cytotoxického působení vysokodávkovaného vitamínu C na nádorové buňky

MUDr. Pavel Kostiuik, CSc.,
 medicínské odd.
 Edukafarm Praha,
PharmDr. Lucie Kotlářová,
 odd. farmakovigilance
 a klinické farmacie,
 Edukafarm Praha
 ve spolupráci s:
Prof. Dr. Leo Auerbach,
 Univerzitní klinika,
 Centrum pro zdraví prsu,
 Lékařská fakulta ve Vídni,
Prof. Dr. Karl R. Aigner,
 Klinika onkologické
 chirurgie, Burghausen,
**Prof. Dr. Dieter
 Müller,** Univerzitní
 neurochirurgická klinika
 v Hamburku,
Prof. Dr. Ulrich Borchard,
 Institut farmakologie,
 Univerzita Heinricha
 Heineho v Düsseldorfu

V posledních letech se v odborné literatuře objevují práce, které dokumentují cytotoxické působení milimolárních sérových koncentrací askorbátu (dosažitelných intravenózním podáním vysokých dávek vitamínu C) na buňky maligních nádorů. Nedávno byly publikovány dvě studie, které se zabývaly mechanismy cytotoxického účinku askorbátu. Studie, uveřejněná v roce 2010 dokumentovala cytotoxické působení askorbátu na buňky neuroblastomu a zaměřila se i na některé komponenty mechanismu tohoto účinku.¹ V další studii publikované v roce 2012² autoři zkoumali roli, kterou hraje v protinádorové účinnosti vitamínu C přítomnost proteinu p53 v nádorových buňkách.¹ V článcích jsou zároveň shrnuty některé dosud známé poznatky o mechanismu cytotoxického účinku vysokodávkovaného vitamínu C vůči maligním buňkám.

Protinádorové působení askorbátu

Je známo, že vitamin C je pro lidský organismus nepostradatelnou látkou z řady důvodů. Především hraje roli kofaktoru v celé řadě důležitých metabolických reakcí, další velmi významnou rolí vitamínu C (askorbátu) je antioxidační působení, kterým chrání tkáň, resp. buňky (nenádorové) před oxidačním stresem a vytváří podmínky pro jejich fyziologickou funkci. Méně známý, ale velmi důležitý je další typ účinku vitamínu C – cytotoxické působení askorbátu na nádorové buňky. Na rozdíl od antioxidačního působení na zdravé buňky působí askorbát na maligní buňky prooxidativně. Již v sedmdesátých letech 20. století Cameron a Pauling referovali o výsledcích studie, ve které zkoumali vliv podávání vitamínu C na délku přežití onkologických pacientů v terminálním stadiu.³ Pacienti, kterým byl podáván vitamin C (v dávce 10 g denně parenterálně a následně 10 g denně perorálně), přežívali déle a s lepší kvalitou života než pacienti, kteří vitamin nedostávali. Tyto výsledky však nebyly potvrzeny v následujících dvou dvojité zasklepných placebem kontrolovaných studiích, které byly provedeny na Mayo Clinic^{4,5} ovšem v těchto studiích byl vitamin C podáván pouze perorálně. Při srovnávacích analýzách uvedených studií se ukázalo, že rozdíly mezi výsledky Camerona/Paulinga a studii provedenými na Mayo Clinic byly způsobeny rozdílným způsobem podání vitamínu C. Sérové hladiny, dosažitelné intravenózním podáním, jsou totiž několikanásobně vyšší, než hladiny dosažitelné perorální aplikací.⁶

Autoři citované studie z roku 2012 uvádějí, že askorbát je důležitý antioxidant, považovaný v současné době za potenciální léčivo využitelné v onkologické terapii. Pro dosažení cytotoxicity, potřebné pro tento typ účinku, je zapotřebí farmakologických hladin askorbátu, dosažitelných intravenózní aplikací dostatečných dávek vitamínu

C.^{6,7} Askorbát ve farmakologické koncentraci selektivně poškozuje buňky některých zhoubných nádorů, ale nikoli normální buňky, což jsou vlastnosti výhodné pro onkologickou terapii.⁸ Účinnost askorbátu v onkologické klinické praxi je ovlivněna skutečností, že protinádorový účinek askorbátu je u různých buněčných linií rozdílný.^{7,9-11} Bylo poukázáno na to, že buněčná smrt způsobená askorbátem může mít různý mechanismus, např. apoptózu, nekrózu a zastavení buněčného cyklu.¹²⁻¹⁴ Tyto mechanismy se mohou u různých typů maligních buněk lišit.

Role peroxidu vodíku, laktátu a ferritinu

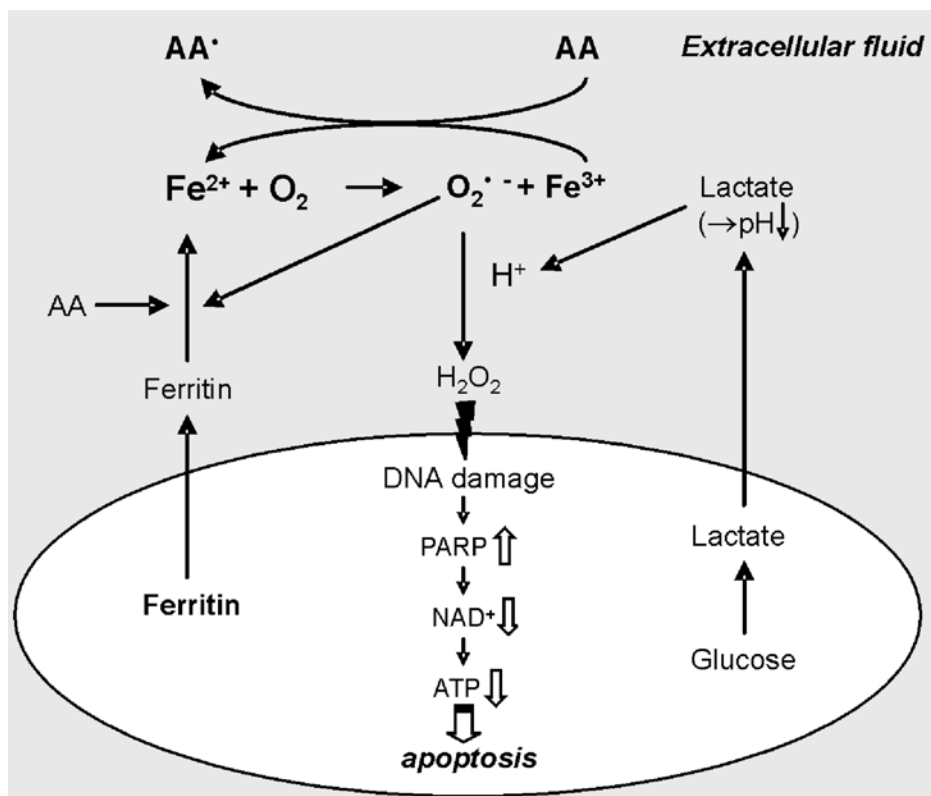
Podle současných názorů jsou toxické účinky farmakologických hladin askorbátu na maligní buňky způsobeny prooxidativním působením.¹ Tento účinek je zprostředkovaný jevem, specifickým pro některé maligní buňky - tvorbou peroxidu vodíku v jejich okolí, následným průnikem peroxidu do buněk a jejich poškozením vzniklým oxidativním stresem. Vytváření peroxidu vodíku je závislé na přítomnosti sloučenin přechodných kovů, například nestabilního dvojmocného železa, ale i na dalších faktorech, většinou produktech samotných maligních buněk.

Ve studii z roku 2010¹ byl zkoumán vliv dvou produktů tohoto typu - ferritinu (látky obsahující nestabilní dvojmocné železo, umožňující syntézu peroxidu vodíku) a laktátu - na cytotoxické působení askorbátu na buňky neuroblastomu (buněčné linie Kelly a SK-N-SH). Maligní buňky byly v tomto směru srovnávány se zdravými buňkami – fibroblasty. Je známo, že hladiny laktátu a ferritinu jsou v okolí buněk některých maligních tumorů, např. neuroblastomu, zvýšeny, laktát jako produkt aerobní glykolýzy, a ferritin jako tumorový marker vytvářený v maligních buňkách a uvolňovaný v signifikantním množství do jejich okolí. Aerobní

glykolýza je charakteristickým procesem, který probíhá v mnoha typech maligních buněk. Výsledky ukázaly, že askorbát ve farmakologické koncentraci a peroxid vodíku představují faktory cytotoxické pro maligní buňky, nikoli však pro zdravé buňky. Podle autorů kyselá reakce způsobená zvýšenou hladinou laktátu a přítomností železa ve formě ferritinu v okolí maligních buněk umožňuje tvorbu peroxidu vodíku a jím způsobenou selektivní cytotoxicitu askorbátu vůči maligním buňkám. Tyto buňky jsou navíc citlivé vůči peroxidu vodíku díky nefunkčnosti, resp. nepřítomnosti ochranného antioxidačního systému, např. enzymu katalázy, superoxidodismutázy a systému glutathion (GSH)/glutathionreduktáza. Snížená aktivita tohoto systému je charakteristická pro některé maligní buňky. Autoři uvádějí, že pro citlivost maligních buněk na askorbát jsou důležité různé faktory, mezi něž patří produkce a uvolňování ferritinu a dále vysoká aktivita nitro-buněčné aerobní glykolýzy, jejímž produktem je laktát. Celý proces je popsán v legendě k **obr. 1**.

Pro cytotoxický účinek askorbátu na nádorové buňky je rozhodující vznik peroxidu vodíku, který difuzí přestupuje do senzitivní maligní buňky, způsobuje v ní depleci ATP a následně buněčnou smrt. K depleci ATP může dojít trojím mechanismem.

1. Poškození DNA způsobené peroxidem vodíku aktivuje enzym PARP, jehož působením dochází ke katabolismu NAD-. Tím ubývá substrátu pro vznik NADH a následnou syntézu ATP.
2. Peroxid vodíku je katabolizován souběžně probíhající oxidací redukované formy glutathionu (GSH) na GSSG. K zpětné redukci na GSH se spotřebovává NADPH, který vzniká v pentózovém cyklu z glukózy. Glukóza spotřebovaná v tomto cyklu nemůže být zdrojem pro produkci NADPH, což vede opět ke snížení tvorby ATP, tedy k vyčerpání energetických zásob buňky.
3. Peroxid vodíku může poškozovat



Obr. 1. Schéma syntézy peroxidu vodíku v okolí nádorových buněk v přítomnosti askorbátu. Buňky neuroblastomu produkují a do svého okolí uvolňují ferritin. Působením superoxidu ($O_2^{\cdot-}$) může být z ferritinu uvolňováno dvojmocné železo. V přítomnosti kyslíku je dvojmocné železo oxidováno na trojmocné za vzniku superoxidu. Superoxid může být přeměněn na peroxid vodíku, který proniká do buňky a působí v ní oxidativní stres. Pokud nedojde k jeho detoxikaci, jako je tomu u některých maligních buněk, působí peroxid vodíku oxidativní poškození, například zlomy řetězců DNA a hyperaktivaci poly-(ADP-ribozo)-polymerázy (PARP), enzymu signalizujícího poškození DNA. Tato hyperaktivace vede k vyčerpání buněčných energetických zásob (ATP) a apoptóze. Vzniklé trojmocné železo může být působením askorbátu (AA) resp. askorbylového radikálu (AA^{\cdot}) přeměněno na dvojmocné a proces tak může pokračovat. Řada nádorových buněk okyseluje své okolí uvolňováním laktátu, vzniklého v buňkách aerobní glykolýzou, což brání vzniku inaktivní, nerozpustné formy železa – hydroxidu železitého $Fe(OH)_3$, a podporuje vznik reaktivního dvojmocného železa.

Předpokládá se, že tyto reakce, probíhající v extracelulárním prostoru v bezprostředním okolí nádorových buněk, jsou v kompartmentu krve inhibovány. Produkce askorbylového radikálu je v krvi inhibována redukcí erytrocytární membrány nebo plasmatickými proteiny s velkou molekulou, které nepřestupují do ECT. Pokud přesto dojde v krvi ke vzniku peroxidu vodíku, je odstraněn, resp. přeměněn na vodu a kyslík v reakci, katalyzované v plasmě katalázou a v erytrocytech GSH peroxidázou (GPx).

přímo mitochondrie, zvláště ATP-syntázu, což opět vede ke snížení syntézy ATP.

Snížená tolerance maligních buněk k oxidativnímu stresu souvisí také s vysokou intenzitou aerobní glykolýzy v těchto buňkách. Pokud jde o cytotoxicitu askorbátu, jsou důležité dva aspekty. Především vysoká produkce laktátu, která vede ke snížení pH v okolí těchto buněk. Kyselé prostředí vede k uvolňování reaktivního dvojmocného železa. Druhým významným aspektem je fakt, že v buňkách se zvýšenou intenzitou aerobní glykolýzy je snížená produkce vlastních reaktivních sloučenin kyslíku a proto tyto buňky mají i méně aktivní obranný antioxidantní systém. Proto jsou nadměrně citlivé vůči oxidativnímu stresu, který může vést až k apoptóze.

Role proteinu p53

Podle řady studií askorbát ve farmakologických koncentracích může v nádorových buňkách působit jako faktor, poškozující DNA a jako prooxidativní faktor.^{12,15,16} Autoři studie z roku 2012,¹ vycházeli z tohoto předpokladu a ověřovali předpoklad, že protein p53, transkripční faktor, reagující na poškození DNA a regulující oxidativní stres v buňce, se významně podílí na cytotoxicitě askorbátu. Protein p53 řídí transkripci genů podílejících se na blokování buněčného cyklu (dělení buněk), buněčného stárnutí a apoptózy.¹⁷ Bylo prokázáno, že jednou z funkcí p53 je stimulace procesů působících oxidativní stres.¹⁸ Hladina p53 je za fyziologických okolností regulována půso-

bením MDM2, molekuly, která snižuje množství p53 v buňce. Gen kódující protein p53 (TP53) v buňkách téměř poloviny všech lidských maligních nádorů je zmutovaný. Proto se různé maligní buňky vyznačují odlišnou expresí proteinu p53.

Právě z tohoto zjištění (rozdílná exprese proteinu p53 v různých typech maligních buněk) vycházeli autoři citované studie,² ve které byl porovnáván cytotoxický účinek askorbátu na nádorové buňky obsahující protein p53 (buněčné linie HCT116+/+, MCF7, HeLa, A549) a buňky s chybějícím p53 (HCT116-/-, SKOV3, H1299). Výsledky ukázaly, že buňky exprimující p53 zanikaly působením srovnatelné koncentrace askorbátu ve výrazně větší míře než buňky neobsahující tento protein, dále že přítomnost p53 v nádorových buňkách zvyšuje nitrobuňkový oxidativní stres (i bez podání antioxidantu). Askorbát dále zajišťuje ochranu p53 tím, že podporuje degradaci MDM2, tj. molekuly, která snižuje množství p53 v buňce. Tato zjištění in vitro byla potvrzena i v následné animální studii, v které se ukázalo, že tumory exprimující p53 jsou citlivější na cytotoxické působení askorbátu než tumory neexprimující p53. Byla porovnávána reakce na vysokodávkovaný askorbát u nádorů odvozených z isogenických buněk HCT 116 p53+/+ a p53-/. Objem tumorů z buněk exprimujících p53 se výrazně zmenšil, odpovídal po 9denním podávání vitamínu C průměrně 64,4% objemu tumoru v kontrolní skupině. U nádorů, jejichž buňky neexprimovaly p53, byl objem jen o něco menší než u kontrol (94 %).

Další studie

Byly publikovány i další studie na lidských či zvířecích nádorových buňkách, které ukázaly, že vitamin C potlačuje množení buněk některých maligních tumorů a usmrcuje je (např. buněk adenokarcinomu žaludku,¹⁹ karcinomu pankreatu, ovaria, prostaty, dělohy, plic²⁰). U buněk animálního karcinomu prostaty snížil vitamin C hmotu tumoru i počet a velikost metastáz.²¹ V preklinických modelech bylo prokázáno, že vitamin C zesiluje účinek některých standardně používaných cytostatik, např. doxorubicinu, cisplatinu a paclitaxelu u buněčných linií lidského karcinomu mammy,²² nebo gemcitabinu u karcinomu pankreatu.²³ V další studii²⁴ byl zkoumán vliv vysokých dávek vitamínu C na buňky různých lidských maligních tumorů (karcinomu tlustého střeva, ovaria, prostaty a prsu). Askorbát zvyšoval senzitivitu buněk vůči působení docetaxelu, epirubicinu, irinotecanu a 5-fluorouracilu.

V několika studiích bylo prokázáno, že vysokodávkovaná infuzní terapie vitamínem C podávaná jako součást adjuvantní a paliativní protinádorové terapie zvyšuje kvalitu života nemocných. Například ve studii, v které byl 39 onkologicky nemocným v terminálním stadiu podáván vitamin C ve vysoké dávce, se signifikantně zlepšily parametry kvality života, zmírnily se nežádoucí účinky léčby.²⁵ Obdobné výsledky přinesla jiná studie, do které byly zařazeny pacientky s karcinómem mammy. Přidání vysokodávkovaného vitamínu C ke standardní léčbě vedlo k významnému zmírnění projevů onemocnění a nežádoucích účinků léčby, například nauzey, nechutenství, únavy, deprese, hemoragické diatézy.²⁶

Závěr

Vitamin C je v současné době podle celé řady autorů považován za potenciální léčivo využitelné v onkologické terapii.² Pro dosažení cytotoxického účinku na některé druhy maligních buněk, je zapotřebí farmakologických hladin askorbátu, které lze zajistit intravenózní aplikací dostatečných dávek vitamínu C (nelze jich dosáhnout perorální aplikací).^{4,5} Askorbát ve farmakologické koncentraci selektivně poškozuje buňky zhoubných nádorů, ale nikoli normální buňky, což jsou vlastnosti mimořádně výhodné pro onkologickou terapii.⁶ Protinádorový účinek askorbátu je u různých buněčných linií rozdílný. Jak ukázaly citované studie, tyto rozdíly v účinku závisí na řadě vlastností těchto buněk, například schopnosti produkovat laktát, ferritin¹ a exprimovat protein p53.² Nicméně bez ohledu na tyto rozdíly a také na současnou míru pokročilosti „evidence based medicine“ na poli onkologické, potažmo farmakologické evidence všech možných účinků vitamínu C, je pro onkologickou praxi zajímavý poměr benefit/risk, respektive účinnost/bezpečnost. V případě vitamínu C se totiž jedná o účinnou látku fyziologickou, která je kofaktorem řady biochemických reakcí, má antioxidantní kapacitu a na imunitní systém působí imunomodulačně. Protože je rozpustná ve vodě, její podávání i ve vyšších dávkách (s výjim-



kou pacientů majících v anamnéze renální insuficienci) je vysoce bezpečné, nelze s ní organismus poškodit, a proto je její široké využití v onkologické praxi žádoucí, a to spolu se základní onkologickou léčbou i v době remise či rekonvalescence po této léčbě.

Literatura

1. Deubzer B, Mayer F, Kuci 7, et al. H₂O₂-mediated cytotoxicity of pharmacologic ascorbate concentrations to neuroblastoma cells: potential role of lactate and ferritin. *Cell Physiol Biochem* 2010;25:767-774.
2. Kim J, Lee SD, Chang B, et al. Enhanced antitumor activity of vitamin C via p53 in cancer cells. *Free Radical Biology and Medicine* 2012;53:1607-1615.
3. Cameron E, Pauling L. Supplemental ascorbate in the supportive treatment of cancer: reevaluation of prolongation of survival times in terminal human cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1978;75:4538-4542.
4. Creagan ET, Moertel CG, O'Fallon JR, et al. Failure of high-dose vitamin C (ascorbic acid) therapy to benefit patients with advanced cancer. A controlled trial. *N Engl J Med* 1979;301:687-690.
5. Moertel CG, Fleming TR, Creagan ET, et al. High dose vitamin C versus placebo in the treatment of patients with advanced cancer who have had no prior chemotherapy. A randomized double-blind comparison. *N Engl J Med* 1985;312:137-141.
6. Padayatty SJ, Sun H, Wang Y, et al. Vitamin C pharmacokinetics: implications for oral and intravenous use. *Ann Intern Med* 2004;140:533-7.
7. Verrax J, Calderon PB. Pharmacologic concentrations of ascorbate are achieved by parenteral administration and exhibit antitumor effects. *Free Radic BiolMed* 2009;47:32-40.
8. Chen Q, Espey MG, Sun AY, et al. Ascorbate in pharmacologic concentrations selectively generates ascorbate radical and hydrogen peroxide in extracellular fluid in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:8749-8754.
9. Chen Q, Espey MG, Sun AY, et al. Pharmacologic doses of ascorbate act as a pro-oxidant and decrease growth of aggressive tumor xenograft in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:11105-11109.
10. Prasad KN. Modulation of the effects of tumor therapeutic agents by vitamin C. *Life Sci* 1980;27:275-280.
11. DeLaurenzi V, Melino G, Savini I, et al. Cell death by oxidative stress and ascorbic acid regeneration in human neuroectodermal cell lines. *Eur J Cancer* 1995;31A:463-466.

12. Chen Q, Espey MG, Krishna MC 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;102:13604-13609.
13. Naidu KA, Fang Q, Cheng JQ, et al. p53enhances ascorbyl stearate-induced G2/M arrest of human ovarian cancer cells. *Anticancer Res* 2007;68:3927-3934.
14. Takemura Y, Satoh M, Satoh K, et al. High dose of ascorbic acid induces cell death in mesothelioma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;394:249-253.
15. Cheung FW, Che CT, Sakagami H, et al. Sodium 5,6-benzylidene-L-ascorbate induces oxidative stress, autophagy, and growth arrest in human colon cancer HT-29 cells. *J Cell Biochem* 2010;111:412-424.
16. Riviere J, Ravanat JL, Wagner JR. Ascorbate and H₂O₂ induced oxidative DNA damage in Jurkat cells. *Free Radic Biol Med* 2006;40:2071-2079.
17. Elledge RM, Lee WH. Life and death by p53. *Bioessays* 1995;17:923-930.
18. Velez JM, Miriyala S, Nithipongvanich R, et al. p53 regulates oxidative stress-mediated retrograde signaling: a novel mechanism for chemotherapy-induced cardiac injury. *PLoS One* 2011;6:e18005.
19. Zhang ZW, Abdullahi M, Farthing MJ. Effect of physiological concentrations of vitamin C on gastric cancer cells and *Helicobacter pylori*. *Gut* 2002;50:165-9.
20. Chen P, Stone J, Sullivan G, et al. Anticancer effect of pharmacologic ascorbate and its interaction with supplementary parenteral glutathione in preclinical cancer models. *Free Radic Biol Med* 2011;51:681-7.
21. Pollard HB, Levine MA, Eidelman O, et al. Pharmacological ascorbic acid suppresses syngeneic tumor growth and metastases in hormone-refractory prostate cancer. *In Vivo* 2010;24:249-55.
22. Kurbacher CM, Wagner U, Kolster B, et al. Ascorbic acid (vitamin C) improves the antineoplastic activity of doxorubicin, cisplatin, and paclitaxel in human breast carcinoma cells in vitro. *Cancer Lett* 1996;103:183-9.
23. Espey MG, Chen P, Chalmers B, et al. Pharmacologic ascorbate synergizes with gemcitabine in preclinical models of pancreatic cancer. *Free Radic Biol Med* 2011;50:1610-9.
24. Frömberg A, Gutsch D, Schulze D, et al. Ascorbate exerts anti-proliferative effects through cell cycle inhibition and sensitizes tumor cells towards cytostatic drugs. *Cancer Chemother Pharmacol* 2011;67:1157-1166.
25. Yeom CH, Jung GC, Song KJ. Changes of terminal cancer patients' health-related quality of life after high dose vitamin C administration. *J Korean Med Sci* 2007;22:7-11.
26. Vollbracht C, Schneider B, Leendert V, et al. Intravenous vitamin C administration of vitamin C improves quality of life in breast cancer patients during chemo-/radiotherapy and aftercare: results of a retrospective, multicentre, epidemiological cohort study in Germany. *In Vivo* 2011;25:983-90.