

VYSOKODÁVKOVANÝ PARENTERÁLNE PODÁVANÝ ASKORBÁT ZVYŠUJE CHEMOSENZITIVITU KARCINÓMU OVÁRIA A REDUKUJE TOXICITU CHEMOTERAPIE

MUDr. M. Holíková, InPharm Clinic, odd. klinickej onkológie, PharmDr. L. Kotlářová, Edukafarm, MUDr. P. Kostiuk, CSc., Edukafarm, MUDr. P. Garnolová, Inštitút onkológie a rehabilitácie Na Pleši

Výskum možnosti využitia vitamínu C v onkológii má dlhú históriu. Prvý raz sa táto téma objavila v 70. rokoch 20. storočia a stala sa predmetom odborných diskusií. Najnovším príspevkom o využití intravenózneho vysokodávkovaného vitamínu C (IVC) onkologickým pacientom je článok publikovaný vo februári 2014 americkými autormi v renomovanom časopise Science Translational Medicine¹.

Tento časopis sa zameriava na tzv. translačnú medicínu, t.j. odbor prepájajúci výsledky výskumu v oblasti molekulárnej biológie s klinickou praxou (impakt faktor časopisu predstavuje 10,75). Autori štúdií – väčšinou z Univerzity of Kansas a prof. Mark Levine z National Institutes of Health v Bethesde – sa zaoberali účinkami IVC pri karcinóme ovária a v článku referujú o troch štúdiách, dvoch laboratórnych a jednej klinickej.

FARMAKOLOGICKÉ PLAZMATICKÉ HLADINY

Skôr ako sa začneme článku detailne venovať, pripomeňme si niektoré skutočnosti. Relatívne nedávne objavy v oblasti farmakokinetiky a farmakodynamiky vitamínu C ukázali, že dôležitým faktorom pre jeho účinnosť je veľkosť podanej dávky a spôsob aplikácie a že vitamín C v plazmatickej koncentrácii v rade milimolov okrem antioxidantného, ochranného účinku na zdravú tkanivá pôsobí na niektoré línie nádorových buniek cytotoxicky (vdaka odlišnostiam nádorových buniek, napr. v oblasti bunkového metabolizmu).

Na základe týchto poznatkov sa ukázalo, že k protinádorovému účinku sú potrebné relatívne vysoké, tzv. farmakologické plazmatické hladiny askorbátu (radu milimolov), ktoré možno u človeka dosiahnuť len intravenóznym podaním dávok v rade gramov (perorálnou aplikáciou možno kvôli obmedzenému transportu askorbátu z čreva dosiahnuť plazmatické hladiny len v rade mikromolov)².

Dnes sa vo svete uskutočňuje laboratórny výskum zameraný na upresnenie mechanizmu cytotoxického pôsobenia farmakologických koncentrácií vitamín C na jednotlivé typy nádorových buniek. Zároveň sa uskutočnilo už niekoľko klinických štúdií fázy I zameraných na bezpečnosť intravenózneho vysokodávkovaného vitamínu C, príp. na jeho účinky u pacientov s onkologickým ochorením pri súčasne prebiehajúcej základnej protinádorovej liečbe (chemoterapia, rádioterapia).

VYSOKODÁVKOVANÝ ASKORBÁT A ONKOLOGICKÉ OCHORENIA

V úvode článku autori uvádzajú niektoré zistenia doterajšieho výskumu využitia IVC v onkológii. Upozorňujú, že štúdie ukázali bezpečnosť intravenózne podávaných dávok vitamínu C v rade aj desiatok gramov (napr. až 1,5 g/kg telesnej hmotnosti) u pacientov spĺňajúcich podmienky podávania IVC (normálna renálna funkcia a aktivita glukózo-6-fosfátdehydrogenázy)^{3,4}. Poukazujú na skutočnosť známú z predošlého výskumu, že jedným z mechanizmov cytotoxického pôsobenia IVC na nádorové bunky je produkcia peroxidu vodíka v okolí týchto buniek^{5,6,7}, prípadne reaktívnych zlúčenín kyslíka, ktoré pôsobia ako efektoory tohto účinku^{8,9}.

Cytotoxické pôsobenie farmakologických hladín askorbátu sa preukázalo u mnohých línií nádorových buniek^{5,8-10}. Boli publikované kauzistiky u onkologických pacientov^{11,12} a niekoľko štúdií fázy I, v ktorých sa preukázala jeho bezpečnosť, prípadne vplyv na zlepšenie znášanlivosti chemoterapie u pacientov s určitými typmi tumorov^{13,14}. Niektoré štúdie preukázali aj synergiu IVC s chemoterapeutikami¹⁷.

Na širšie použitie IVC v onkológii je podľa autorov potrebné, aby sa paralelne s klinickými štúdiami podrobnejšie vysvetľovali mechanizmy jeho účinku. Preto skúmali v laboratórnych podmienkach mechanizmus cytotoxického pôsobenia vitamínu C vo farmakologickej koncentrácii na bunky karcinómu

ovária, ďalej zisťovali, nakoľko askorbát ovplyvňuje pôsobenie chemoterapie na tieto bunky a nakoniec v randomizovanej klinickej štúdií skúmali bezpečnosť IVC v kombinácii s chemoterapiou u pacientok s karcinómom ovária.

MECHANIZMY CYTOTOXICKÉHO PÔSOBENIA ASKORBÁTU NA NÁDOROVÉ BUNKY

V prvej štúdií (in vitro) sa autori zaoberali mechanizmom protinádorového účinku milimolárnych hladín vitamínu C na bunky karcinómu ovária. Zistili, že askorbát v tejto koncentrácii svojou účasťou na tvorbe peroxidu vodíka v okolí nádorových buniek poškodzuje ich DNA. Tento efekt bol ešte výraznejší, ak sa askorbát kombinoval s alkylačným cytostatikom karboplatinou. Pridanie katalázy, t.j. scavengeru peroxidu vodíka, úplne zabránilo cytotoxicite askorbátu, čo je dôkazom, že táto cytotoxicita voči nádorovým bunkám je sprostredkovaná práve peroxidom vodíka.

Okrem toho askorbát v uvedenej koncentrácii spôsoboval v nádorových bunkách depléciu adenosintrifosfátu (ATP), ktorý je pre ne vitálne dôležitým, kým v normálnych ovariálnych bunkách askorbát túto depléciu nespôboval. Askorbát teda selektívne poškodzuje nádorové bunky metabolickým stresom. Okrem toho v nádorových bunkách aktivoval metabolickú cestu sprostredkovanú proteínkinázami ATM (ataxia-telangiectasia mutated) a AMPK (adenosine monophosphate-activated), a tým viedol k inhibícii proteínkinázy označovanej ako mTOR (mammalian target of rapamycin), čo je enzým dôležitý pre rast a proliferáciu buniek. Jej inhibícia má za následok zánik nádorových buniek.

SYNERGICKÉ PÔSOBENIE ASKORBÁTU A KARBOPLATINY V PREKLINICKOM MODELI

V druhej štúdií sa autori zaoberali in vitro v bunkách karcinómu ovária rozdielom medzi pôsobením samotného chemoterapeutika (karboplatiny) a jeho kombinácie s askorbátom vo farmakologickej koncentrácii. Ako sme už uviedli, autori zistili, že askorbát svojím pôsobením na DNA podporuje účinok karboplatiny, ktorá je liekom prvej línie pre terapiu pacientok s ovariálnym karcinómom. Na kvantitatívne upresnenie tohto efektu použili tri rôzne pomery dávok askorbátu a karboplatiny a zistili, že vyšší podiel askorbátu má za následok väčší počet zaniknutých nádorových buniek. Ide o synergický účinok, ktorý umožňuje pridaním askorbátu znížiť dávku karboplatiny na dosiahnutie rovnakého efektu, aký by sa dosiahol vyššou dávkou samotnej karboplatiny. Uvedená synergia sa ďalej testovala in vivo v animálnom modeli – na myšiach s inokulovaným ovariálnym karcinómom. Už samotný askorbát znižoval hmotnosť tumoru a navyše potencoval účinok karboplatiny a paklitaxelu, pričom najúčinnější bola kombinácia všetkých troch látok, ktorá spôsobila pokles hmotnosti tumoru o 94 %.

ZNÍŽENIE TOXICITY CHEMOTERAPIE

Tretia zo štúdií bola klinická prospektívna randomizovaná štúdia fázy I/IIa, do ktorej bolo zaradených 27 pacientok s najnovšie diagnostikovaným karcinómom ovária v štádiu III alebo IV. Pacientky boli randomizované na skupinu, v ktorej sa podávala len chemoterapia (paklitaxel a karboplatina), a na skupinu, v ktorej



sa podával okrem chemoterapie aj IVC. Obe skupiny sa porovnávali, pokiaľ ide o bezpečnosť, príp. toxicitu liečby. Štúdiu dokončilo 22 pacientok, 5 bolo z rôznych dôvodov z hodnotenia vyradených (napr. 2 pacientky zo skupiny bez IVC si žiadali počas štúdie podávanie askorbátu, ďalšie 2 pacientky nedodržiavali režimové pravidlá štúdie). Chemoterapia sa podávala v začiatkových 6 mesiacoch a IVC celkovo 12 mesiacov. Účastníčky štúdie boli sledované celkovo 5 rokov na hodnotenie prežitia. Nežiaduce účinky terapie sa hodnotili podľa kritérií CTCv3 (National Cancer Institute – NCI Common Terminology Criteria for Adverse Events verzia 3). Intravenóznym vitamín C sa podával v infúziách so stúpajúcimi dávkami, začatých dávkou 15 g. Najvyššie podávané dávky boli 75 alebo 100 g a riadili sa cieľovou vrcholovou plazmatickou koncentráciou askorbátu, ktorá bola stanovená na 350 až 400 mg/dl (20 až 23 mmol/l)^{4,13}. Infúzie sa podávali s rýchlosťou 0,5 g/min. Po dosiahnutí cieľovej plazmatickej hladiny askorbátu sa infúzie vitamínu C podávali 2-krát týždenne počas 6 mesiacov súbežne s chemoterapiou a po jej ukončení ešte ďalších 6 mesiacov.

Výsledky ukázali, že výskyt nežiaducich účinkov mierneho až stredného stupňa (toxická 1. a 2. stupňa) bol v skupine, kde sa aplikoval IVC, signifikantne nižší ako v skupine, v ktorej sa podávala len chemoterapia, čo možno interpretovať tak, že aplikácia IVC zlepšuje u pacientok znášanlivosť chemoterapie. Ak ide o jednotlivé kategórie toxicity, znižovalo prídanie IVC toxické pôsobenie chemoterapie na nervové

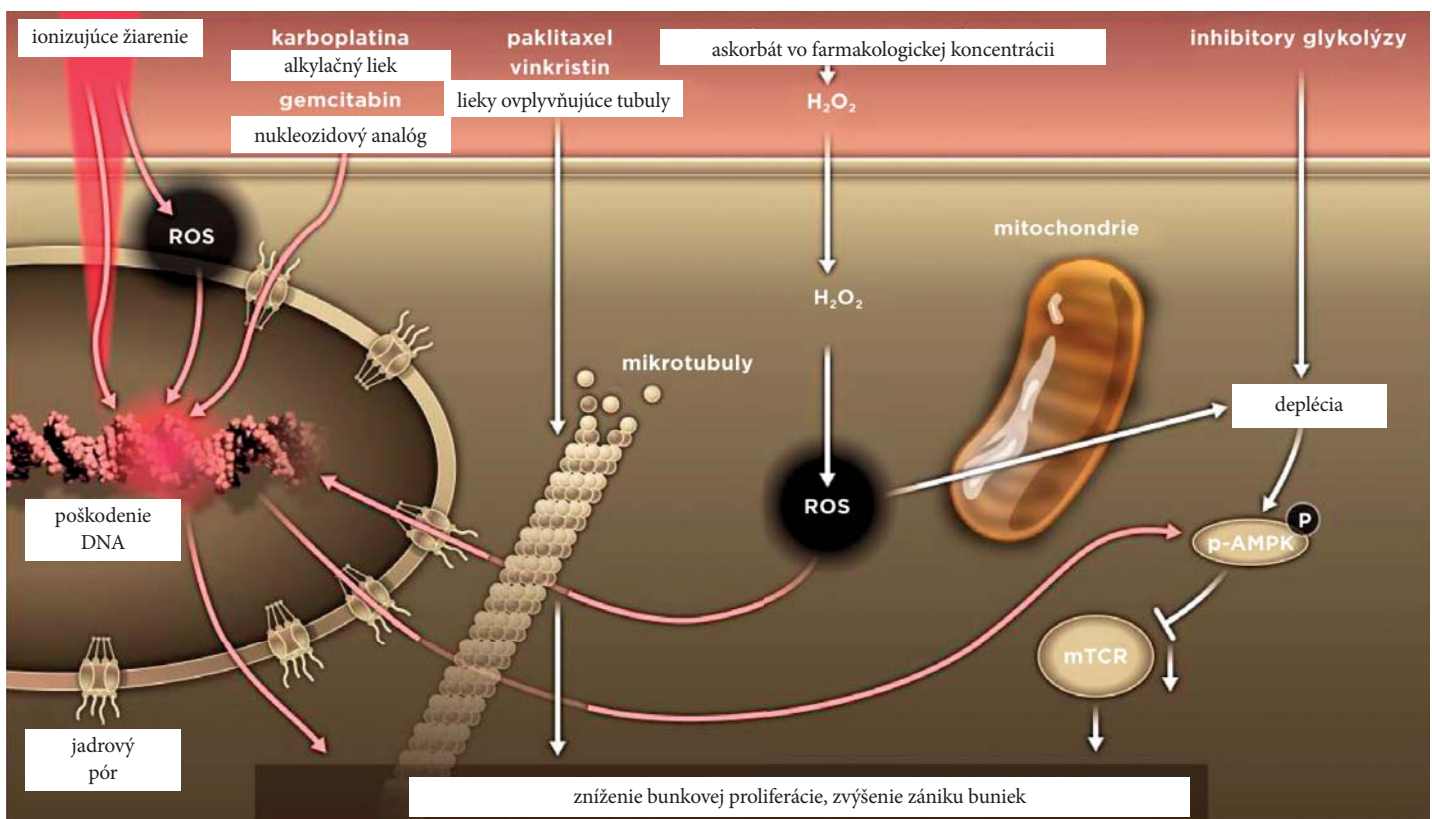
tkanivo, kostnú dreň, pečeň a žľazové cesty, pankreas, obličky, urogenitálny systém, znižovalo hepatobiliárnu, pankreatickú, renálnu/urogenitálnu, gastrointestinálnu, dermatologickú toxicitu a výskyt infekcií.

TREND NA PREDĹŽENIE CELKOVEJ DOBY PREŽITIA

Aj keď sa štúdia primárne zameriavala na hodnotenie bezpečnosti, príp. ovplyvnenia toxicity chemoterapie askorbátom, priniesla ešte jeden pozoruhodný výsledok, pokiaľ ide o vplyv prídania IVC, na efektivitu chemoterapie. V skupine pacientok, kde sa k chemoterapii pridal IVC, sa prejavil trend k predĺženiu celkovej doby prežitia (podiel pacientok, ktoré prežili viac ako 5 rokov, bol v tejto skupine vyšší ako v skupine bez askorbátu) a medián doby do progresie/relapsu bol v tejto skupine o 8,75 mesiacov dlhší. Pretože uvedené rozdiely nedosahovali hranicu štatistickej signifikancie, možno ho označiť ako trend k vyššej účinnosti chemoterapie, ak sa k nemu podáva intravenóznym vitamín C. Podľa autorov by na podporu tohto vplyvu IVC mohlo prispieť jeho častejšie podávanie¹³.

Štúdiu uskutočňovali v rokoch 2002 – 2007 na dvoch pracoviskách: Univerzity of Kansas Medical Cancer Center /Cancer Center a Research Medical Center/ Resource Center-Gynecologic (obidve v Kansas City, USA). Dohľad nad priebehom štúdie

Obrázok



Synergické pôsobenie askorbátu a chemoterapeutík na nádorovú bunku. Askorbát vo farmakologickej koncentrácii spôsobuje produkciu peroxidu vodíka (H_2O_2) v extracelulárnom priestore. Peroxid vodíka vstupuje difúziou do buniek, spôsobuje dvojreťazcové zlomy DNA, čím aktivuje senzorový proteín ATM a zároveň spôsobuje intracelulárnu depléciu ATP. Znížená koncentrácia ATP aktivuje proteínkinázu p-AMPK, čo vedie ku zníženiu aktivity proteínkinázy mTOR a k potlačeniu prežívania a proliferácie buniek. Mechanizmy pôsobenia chemoterapeutík: Alkylčné liečivo karboplatina obsahuje reaktívne platinové komplexy, ktoré sa napájajú v molekule DNA na nukleofilné skupiny (napr. oblasti bohaté na GC nukleotidy), spôsobuje tak medzivláknové priečne spoje (cross-links), čo má za následok inhibíciu bunkovej proliferácie a bunkovú smrť. Inhibitory mitózy ako paklitaxel a vinkristín sa napájajú na jadrový tubulín a stabilizujú ho, inhibujú organizáciu mikrotubulov a tvorbu mitotického vretienka; to vedie k zastaveniu bunkového cyklu v metafáze. Nukleozidový analóg gemcitabín zasahuje do DNA počas replikácie a inhibuje ribonukleotid reductázu, čo vedie k nedostatku báz pre syntézu DNA. Inhibitory glykolyzy spôsobujú depléciu ATP. Ionizujúce žiarenie predstavuje vysokoenergetickú rádiáciu, ktorá spôsobuje poškodenie DNA buď priamo ionizáciou, alebo častejšie nepriamo tvorbou reaktívnych zlúčenín kyslíka. Prevzaté z: McConnell MJ, Herst PM. Ascorbate combination therapy: New tool in the anticancer



zabezpečovalo centrum pre hodnotenie onkologických liekov amerického Úradu pre kontrolu potravín a liekov (FDA; Food and Drug Administration's Center for Drug Evaluation of Oncology Drug Products).

DISKUSIA

V laboratórnej časti štúdie sa autori zaoberali upresnením mechanizmu protinádorového účinku askorbátu vo farmakologických koncentráciách. Za základnú sa považuje produkcia peroxidu vodíka v extracelulárnom priestore⁵⁻⁷. V rôznych štúdiách sa postulovali rôzne mechanizmy tohto pôsobenia pri rôznych typoch nádorových buniek: napr. apoptóza, blokáda bunkového cyklu¹⁸, neapoptotické mechanizmy⁶⁻¹⁵, deplécia ATP¹⁶, autofágia^{8,16}. V uvedenej štúdií autori upresnili mechanizmus sprostredkovaný peroxidom vodíka – poškodenie DNA oxidatívnym stresom, ďalej preukázali depléciu ATP a spustenie procesu zahŕňajúceho aktiváciu ATM/AMPK a inhibíciu mTOR, t.j. zmeny, ktoré vedú k potlačeniu bunkovej proliferácie a zástaveniu bunkového cyklu, apoptóze, nekroze a autofágii. Tieto zistenia vytvárajú racionálny základ pre využitie kombinácie IVC s protinádorovými liekmi.

Vzhľadom na často neuspokojivé výsledky štandardnej chemoterapie u pacientok s karcinómom ovária existuje podľa autorov v liečbe týchto chorých priestor pre adjuvantné podávanie intravenózneho vysokodávkovaného vitamínu C. Uvádzajú, že toto poňatie podporujú výsledky ich doterajšieho výskumu, ktorý ukázal potenciál IVC ako látky selektívne cytotoxickej voči nádorovým bunkám^{2,13-14}. Ako ukázal laboratórny výskum in vitro a in vivo¹, askorbát pôsobí synergický s chemoterapeutikami ako karboplatina a paklitaxel a zvyšuje chemosenzitivitu nádoru. V klinickej štúdií, o ktorej referujeme, u pacientok s ovariálnym karcinómom znižoval toxicitu chemoterapie. Podiel pacientok, ktoré prežili 60 mesiacov, bol vyšší v skupine, ktorá mala k chemoterapii pridaný intravenózný vitamín C; v tejto skupine bol tiež dlhší medián doby do progresie/relapsu. Tieto rozdiely nedosahovali hranicu štatistickej signifikancie, preto ju autori označujú ako trend k vyššej účinnosti chemoterapie, ak sa k nej podáva IVC.

Autori zdôrazňujú, že výsledky tejto i ďalších štúdií (uskutočnilo sa už niekoľko štúdií fázy I preukazujúcich bezpečnosť vysokodávkovaného vitamínu C v kombinácii s chemoterapiou)^{1,13,14} vytvárajú základ pre rozsiahlejšie klinické skúmanie, ktoré bude vychádzať z výsledkov laboratórneho výskumu protinádorového pôsobenia vitamínu C vo farmakologických koncentráciách a zamerajú sa na účinnosť intravenózneho vysokodávkovaného vitamínu C pri rôznych nádorových ochoreniach a v kombinácii s rôznymi typmi chemoterapie.

LITERATÚRA

1. Ma Y, Chapman J, Levine M, Polireddy K, Drisko J, Chen Q. High-dose parenteral ascorbate enhanced chemosensitivity of ovarian cancer and reduced toxicity of chemotherapy. *Sci Transl Med* 2014;6:222ra18.
2. Padayatty SJ, Sun H, Wang Y, Riordan HD, Hewitt S. M., Katz A., Wesley R. A., Levine M. Vitamin C pharmacokinetics: implications for oral and intravenous use. *Ann Intern Med* 2004;140:533–537.
3. Padayatty SJ, Sun AY, Chen Q, Espey MG, Drisko J, Levine M. Vitamin C: intravenous use by complementary and alternative medicine practitioners and adverse effects. *PLOS One* 2010;5:e11414.
4. Hoffer LJ, Levine M, Assouline S, Melnychuk D, Padayatty SJ, Rosadiuk K, Rousseau C, Robitaille L, Miller WH Jr. Phase I clinical trial of i.v. ascorbic acid in advanced malignancy. *Ann Oncol* 2008;19:1969–1974.
5. Chen Q, Espey MG, Sun AY, Pooput C, Kirk KL, Krishna MC, Khosh DB, Drisko J, Levine M. Pharmacologic doses of ascorbate act as a prooxidant and decrease growth of aggressive tumor xenografts in mice. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2008;105:11105–11109.
6. Chen Q, Espey MG, Krishna MC, Mitchell JB, Corpe CP, Buettner GR, Shacter E, Levine M. Pharmacologic ascorbic acid concen-

trations selectively kill cancer cells: Action as a pro-drug to deliver hydrogen peroxide to tissues. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2005;102:13604–13609.

7. Chen Q, Espey MG, Sun AY, Lee JH, Krishna MC, Shacter E, Choyke PL, Pooput P, Kirk KL, Buettner GR, Levine M. Ascorbate in pharmacologic concentrations selectively generates ascorbate radical and hydrogen peroxide in extracellular fluid in vivo. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2007;104, 8749–8754.
8. Du J, Martin SM, Levine M, Wagner BA, Buettner GR, Wang SH, Taghiyev AF, Du C, Knudson CM, Cullen JJ. Mechanisms of ascorbate-induced cytotoxicity in pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* 2010;16:509–520.
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.
10. Pollard HB, Levine MA, Eidelman O, Pollard M. Pharmacological ascorbic acid suppresses syngeneic tumor growth and metastases in hormone-refractory prostate cancer. *In Vivo* 2010;24:249–255.
11. Padayatty SJ, Riordan HD, Hewitt SM, Katz A, Hoffer LJ, Levine M. Intravenously administered vitamin C as cancer therapy: three cases. *CMAJ* 2006;174:937–942.
12. Drisko JA, Chapman J, Hunter VJ. The use of antioxidants with first-line chemotherapy in two cases of ovarian cancer. *J Am Coll Nutr* 2003;22:118–123.
13. Monti DA, Mitchell E, Bazzan AJ, Littman S, Zabrecky G, Yeo CJ, Pillai MV, Newberg AB, Deshmukh S, Levine M. Phase I evaluation of intravenous ascorbic acid in combination with gemcitabine and erlotinib in patients with metastatic pancreatic cancer. *PLOS One* 2012;7:e29794.
14. Welsh JL, Wagner BA, van't Erve TJ, Zehr PS, Berg DJ, Halfdanarson TR, Yee NS, Bodeker KL, Du J, Roberts II LJ, Drisko J, Levine M, Buettner GR, Cullen JJ. Pharmacological ascorbate with gemcitabine for the control of metastatic and node-positive pancreatic cancer (PACMAN): results from a phase I clinical trial. *Cancer Chemother Pharmacol* 2013;71:765–775.
15. Verrax J, Delvaux M, Beghein N, Taper H, Gallez B, Buc Calderon P. Enhancement of quinone redox cycling by ascorbate induces a caspase-3 independent cell death in human leukaemia cells. An in vitro comparative study. *Free Radic Res* 2005;39, 649–657.
16. Chen P, Yu J, Chalmers B, Drisko J, Yang J, Li B, Chen Q. Pharmacological ascorbate induces cytotoxicity in prostate cancer cells through ATP depletion and induction of autophagy. *Anticancer Drugs* 2011;23:437–444.
17. Espey MG, Chen P, Chalmers B, Drisko J, Sun AY, Levine M, Chen Q. Pharmacologic ascorbate synergizes with gemcitabine in preclinical models of pancreatic cancer. *Free Radic Biol Med* 2011;50:1610–1619.
18. Lin SY, Lai WW, Chou CC, Kuo HM, Li TM, Chung JG, Yang JH. Sodium ascorbate inhibits growth via the induction of cell cycle arrest and apoptosis in human malignant melanoma A375.S2 cells. *Melanoma Res* 2006;16:509–519.

Ďalšia literatúra u autorov.