

Anastrozol jako inhibitor aromatazy – nowe podejścia w terapii raka piersi u kobiet w wieku pomenopauzalnym

Izabela Piotrowska, Magdalena Piotrowska

Katedra Technologii Leków i Biochemii, Wydział Chemiczny, Politechnika Gdańska

Wstęp. Anastrozol jest chemoterapeutykem stosowanym w leczeniu nowotworów piersi u kobiet po menopauzie. Warunkiem powodzenia tego typu leczenia jest obecność receptorów estrogenowych w komórkach nowotworowych. Anastrozol należy do silnych, niesteroidowych inhibitorów aromatazy, która jest odpowiedzialna za proces konwersji androgenów w estrogeny. Metabolizm tego leku oparty jest na biotransformacji zarówno w fazie I, jak i II. Początkowo ulega metabolizmowi w wątrobie z udziałem izoenzymów cytochromu P450, po czym następuje reakcja glukuronidacji katalizowana przez enzym UGT1A4.

Materiał i metoda. Aby zminimalizować występujące skutki uboczne, poszukuje się nowych podejść terapeutycznych zwiększających powodzenie terapii.

Wnioski. Obiecującą metodę stanowią biodegradowalne nanonarzędzia, dostarczające anastrozol do miejsca docelowego, ze zwiększeniem jego okresu półtrwania do 144 godzin. Podobny efekt można uzyskać, stosując transdermalny system podawania anastrozolu, który stanowi całkowicie bezinwazyjną metodę leczenia.

Biuletyn PTO NOWOTWORY 2019; 4, 1: 29–38

Słowa kluczowe: anastrozol, aromataza, cytochrom P450, nanotechnologia, system transdermalny

Wstęp

Nowotwór piersi zależny jest od wielu czynników. Jednym z ważnych elementów zagrożenia jest wiek pacjentki – ryzyko zachorowania rośnie wraz z wiekiem (do pewnej granicy wiekowej). Zdecydowana większość nowotworów piersi dotyczy kobiet w wieku pomenopauzalnym. Paradoksalnie nowotwory piersi u kobiet po menopauzie wykazują korzystne rokowania związane między innymi ze zwiększoną ekspresją receptorów steroidowych hormonów płciowych. Estrogeny, należące do grupy steroidowych hormonów płciowych, wspomagają wzrost i przeżycie komórek prawidłowych jak i nowotworowych. Jest to możliwe dzięki wiązaniu i aktywacji receptora estrogenowego (ER). Jego obecność w komórkach

nowotworowych, czyli określenie typu nowotworu jako ER+, stwierdza się w większości nowotworów piersi. Wskazuje to na dobrą prognozę przeżycia pacjentek z zastosowaniem leczenia farmakologicznego przy użyciu anti-estrogenów. Receptor estrogenowy aktywowany przez 17- β -estradiol działa na zasadzie czynnika transkrypcyjnego, który uruchamia ekspresję specyficznych genów. Odpowiadają one głównie za wzrost komórek, przedłużenie ich przeżycia oraz proliferację komórek nowotworowych. Z uwagi na to, że w większości przypadków zachorowalność na nowotwór piersi zależy od poziomu hormonów, można uznać, że hormonoterapia może być skuteczną metodą leczenia uzupełniającego. Istnieją trzy sposoby, dzięki którym procesy estrogenozależne, ważne w rozwoju

Jak cytować:

Piotrowska I, Piotrowska M. Anastrozole as aromatase inhibitor – new approaches to breast cancer treatment in postmenopausal women. NOWOTWORY J Oncol 2019; 69: 26–35.

Należy cytować wersję pierwotną.

i progresji większości nowotworów piersi, mogą być zahamowane. Pierwszym z nich jest zakłócenie wiązania estrogenu z ER oraz/lub elementami promotora genów, które on koduje. Przykładem takiego działania są selektywne modulatory ER, tj. tamoksyfen i raloksyfen. Drugą metodą jest zredukowanie lub wyeliminowanie ekspresji ER, które wykazuje fulwestrant – selektywny regulator obniżający ER. Jednak najbardziej efektywnym sposobem terapii jest zmniejszenie ilości estrogenu poprzez zahamowanie jego produkcji. Taki schemat działania wykazują inhibitory aromatazy (AI), do których zaliczany jest anastrozol (ryc.1). Czynnikiem warunkującym ich skuteczność jest wrażliwość komórek nowotworowych na hormony, czyli obecność w nich receptorów estrogenowych [1, 2].

Znaczenie anastrozolu w praktyce klinicznej

W oparciu o dostępne opublikowane dane, anastrozol można uznać za najbardziej selektywny inhibitor aromatazy trzeciej generacji w warunkach klinicznych. Nie wykazuje on osłabienia odpowiedzi na stymulację hormonu adrenokortykotropowego (ACTH) nawet przy 10-krotnym podawaniu normalnej klinicznej dawki anastrozolu przez okres 4 tygodni, co sugeruje, że leczenie anastrozolem nie wpływa na syntezę hormonów kory nadnercza [3].

Anastrozol był pierwszym inhibitorem aromatazy wykazującym znaczące korzyści przeżycia w porównaniu ze standardowym lekiem drugiej linii – octanem megestrolu. W dwóch badaniach klinicznych III fazy wykazano po 6 miesiącach, że anastrozol w dawce 1 mg na dobę jest tak samo skuteczny jak octan megestrolu, natomiast jego stosowanie nie wpłynęło na znaczny przyrost masy ciała, który obserwowano w przypadku podawania octanu megestrolu. Analiza ta wykazała także większą medianę przeżycia z korzyścią dla anastrozolu (22,5 miesiąca w grupie octanu megestrolu vs 26,9 miesiąca w grupie anastrozolu). Nie zaobserwowano dodatkowej korzyści po zwiększeniu dawki do 10 mg, popierając tym samym wybór 1 mg jako dawki klinicznej. Anastrozol został następnie zatwierdzony przez Amerykańską Agencję ds. Żywności i Leków do stosowania w drugiej linii leczenia kobiet po menopauzie z zaawansowanym rakiem piersi [4].

W 2000 r. powstały dwa programy kliniczne, które porównały skuteczność oraz tolerancję anastrozolu i tamoksifenu

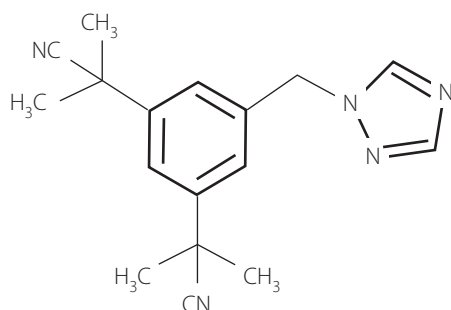
u kobiet z zaawansowanym rakiem piersi. Programy: „TARGET (Tamoxifen or Arimidex™ Randomized Group Efficiency and Tolerability) oraz „North American” obejmowały pacjentki z nowo zdiagnozowaną chorobą lub z progresją nowotworu w następstwie wcześniejszego leczenia. Zostały one przydzielone losowo do dawki anastrozolu 1 mg nadobę lub tamoksifenu 20 mg na dobę. Wyniki próby „North American” wykazały wyraźną wyższość anastrozolu nad tamoksifenem pod względem czasu progresji choroby (TTP = 11,1 miesiąca dla anastrozolu oraz 5,6 dla tamoksifenu). Wykazano także o 44% dłuższy okres przeżycia bez choroby pacjentek, które otrzymują anastrozol, w porównaniu z pacjentkami leczonymi tamoksifenem. Badanie TARGET także potwierdziło korzystne działanie anastrozolu w porównaniu z tamoksifenem. Po wynikach tych badań anastrozol został w wielu krajach zatwierdzony jako lek pierwszego rzutu w terapii zaawansowanego raka piersi u kobiet po menopauzie [3].

Lek ten spełnia również niezbędne kryteria, by uznać go za skuteczny w leczeniu uzupełniającym kobiet po menopauzie. Kryteria te to: lepsza skuteczność w stosunku do istniejących środków adjuwantowych, lepsza tolerancja oraz łatwe i wygodne dawkowanie [3].

Najnowsze badanie FACE (Final Anastrozole Clinical Evaluation) zostało zaprojektowane w celu oceny skuteczności oraz bezpieczeństwa adjuwantowego letrozolu (LET) w porównaniu z anastrozolem (ANA) u chorych po menopauzie z hormonalnie pozytywnym receptorem raka piersi. Ogólna liczba pacjentek wynosiła 4170, które przydzielono losowo do grupy otrzymującej letrozol (n = 2076) lub anastrozol (n = 2094). Przez 5 lat podawano im standardową dawkę kliniczną anastrozolu (1 mg na dobę) lub letrozolu (2,5 mg na dobę). Pierwszorzędnym punktem końcowym badania było przeżycie wolne od choroby po 5 latach (DFS). Kluczowymi drugorzędowymi punktami końcowymi były bezpieczeństwo oraz przeżycie całkowite (OS). Pięcioletni szacowany wskaźnik DFS wynosił 84,9% dla LET oraz 82,9% dla ANA, z kolei wskaźnik OS wynosił 89,9% (LET) oraz 89,2% (ANA). Głównymi przyczynami przerwania leczenia w ramieniu letrozolu w porównaniu z ramieniem anastrozolu były działania niepożądane (15,1% vs 14,3%) oraz progresja choroby (9,5% vs 10,4%). Profile bezpieczeństwa były podobne w obu ramionach leczenia. Najczęstszymi działaniami niepożądanymi w przypadku letrozolu w porównaniu z anastrozolem okazały się bóle stawów (48,2% vs 47,9%), uderzenia gorąca (32,5% vs 32,3%) oraz uczucie zmęczenia (16,8% vs 16,6%). Podejrzewane działania niepożądane prowadzące do przerwania leczenia zgłaszano odpowiednio u 14,0% pacjentek w grupie LET i 12,9% pacjentek w grupie ANA [5].

P450 jako enzymy metabolizujące estrogeny

Izoenzymy cytochromu P450 odgrywają ważną rolę w biosyntezie związków bioaktywnych, tj. steroli, hormonów steroidowych, eikozanoidów czy witamin. Ponadto biorą udział w detoksykacji ksenobiotyków, ale jedną z ważniejszych funkcji



Rycina 1. Struktura chemiczna anastrozolu

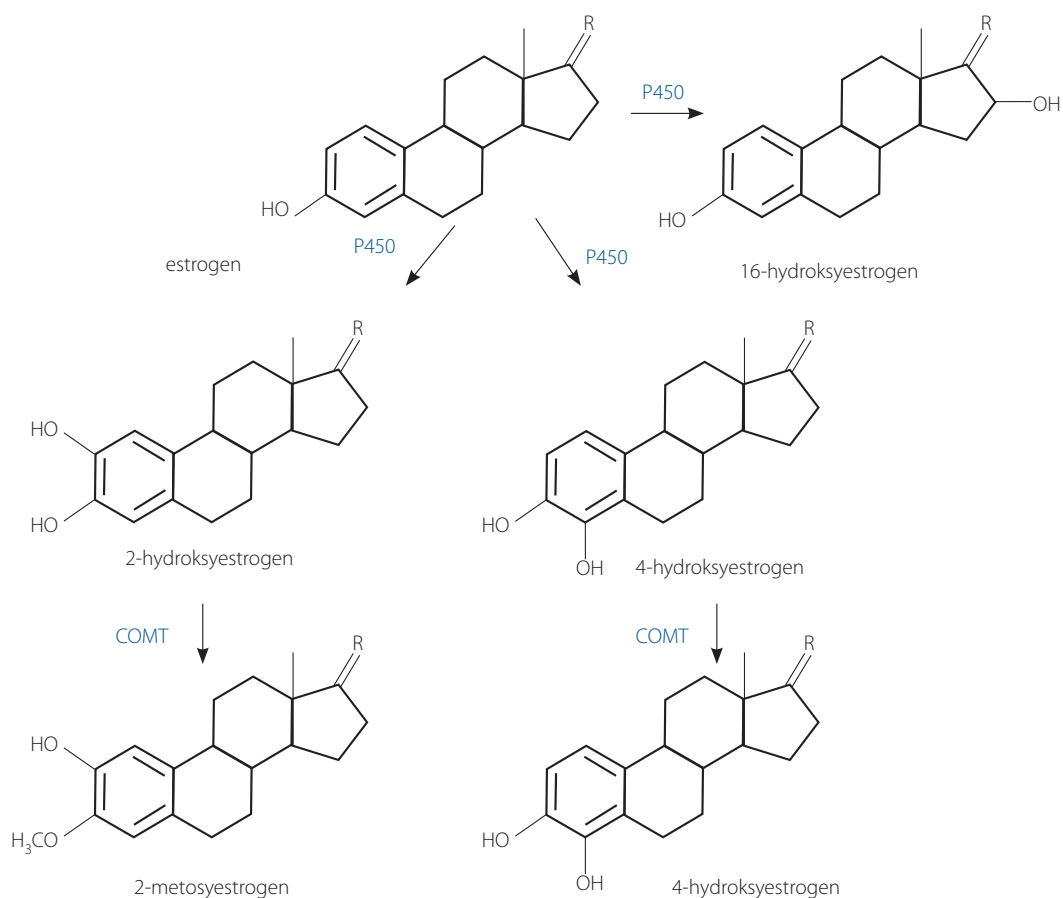
jakie pełnią, jest metabolizm leków [6, 7]. Izoenzymy biorą również udział w metabolizmie estrogenów. Dodanie grupy hydroksylowej w pozycji C-2 stanowi główny szlak metabolizmu estradiolu w wątrobie, w którym pośredniczą P450 1A2, 2C8, 2C9 i 3A4. Estrogeny ulegają biotransformacji w wyniku reakcji 2/4-hydroksylacji, katalizowanej głównie przez P450 3A4 w pozycji orto do grupy 3-fenolowej formy 2/4-hydroksyestrogenowej. Metabolity te przekształcane są następnie do 2/4-metoksyestrogenów z udziałem O-metylotransferazy katecholowej (COMT). Enzymy P450 katalizują także reakcję hydroksylacji w pozycji 16- α , w wyniku której powstaje 16 α -hydroksyestrogen (ryc. 2) [8, 9].

Aromataza (P450 19) jest kompleksem enzymatycznym, odpowiedzialnym za katalizowanie biosyntezy estrogenów z androgenów, związanym z retikulum endoplazmatycznym komórek. Kompleks ten kodowany jest przez pojedynczy gen CYP19 zlokalizowany w ludzkim chromosomie 15 w pozycji 21.2. Aromataza zwana jest także syntetazą estrogenową składającą się z dwóch funkcjonalnych białek. Pierwsze z nich to cytochrom P450, zwany monooksygenazą. Drugie to niespecyficzna mikrosomalna reduktaza flawoproteinowa, inaczej zwana reduktazą NADPH cytochromu P450, stosująca jako kofaktor dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy. Ponadto aromataza ulega silnej ekspresji w pęcherzykach Graffa oraz w łożysku. U kobiet po menopauzie większość estrogenów produkowana

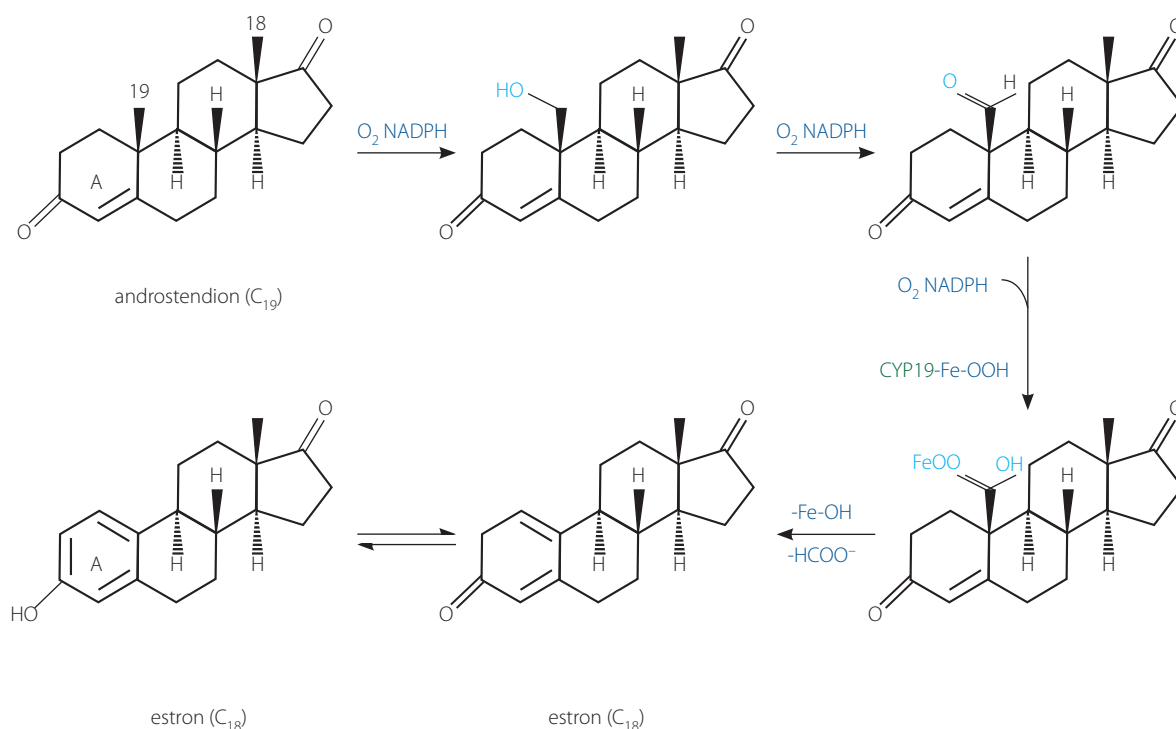
jest przez korę nadnerczy. Aromataza w niewielkich stężeniach pojawia się także w tkance piersi, tkance tłuszczowej, mózgu, wątrobie oraz w mięśniach [4, 10–12].

Androgeny, do których należą m.in. testosteron, dihydrotestosteron i androstendion, są przekształcane do estrogenów za pomocą aromatazy cytochromu P450 (ryc. 3). Estrogeny powstają w wyniku utraty przez androgeny bocznej grupy metylowej C-19 oraz utworzenie pierścienia aromatycznego. Estron (E1) jest syntetyzowany z androstendionu, a estradiol (E2) z testosteronu. Reakcja aromatyzacji, czyli tworzenie pierścienia aromatycznego, jest bezpośrednio katalizowana z udziałem P450 19.

Najważniejszym etapem tego procesu jest eliminacja grupy C-19, która umożliwia aromatyzację pierścienia A znajdującego się w cząsteczce. Proces ten przebiega w następstwie trzech reakcji utlenienia rozpoczynających się od hydroksylacji grupy metylowej w pozycji C-19. Ostatni etap to reakcja eliminacji reszty C-19, w postaci kwasu mrówkowego. Produkt powstały dzięki równowadze keto-enolowej dąży do aromatyzacji pierścienia A. Aby przeprowadzić cząsteczkę androstendionu do cząsteczki estronu, potrzebne są zatem trzy cząsteczki NADPH oraz tlen, z których w trakcie reakcji powstaje woda i ester fosforanowy dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (NADP⁺). Równoległe z aromatyzacją zachodzi reakcja hydroksylacji przy udziale NADPH+H⁺ [12, 13].



Rycina 2. Metabolizm estrogenów wobec enzymów cytochromu P450



Rycina 3. Reakcja katalizowana przez aromatazę. Utrata bocznej grupy C-19 z utworzeniem pierścienia aromatycznego

Anastrozol jako substancja aktywna

Anastrozol (2-[3-(2-cyano-2-propano)-5-(1,2,4-triazol-1-ylmetylo)fenylo]-2-metylopropanonitryl) zawiera w swojej strukturze pierścień aromatyczny z trzema podstawnikami, które składają się m.in. z grupowań metylowych, nitrylowych oraz pierścienia triazolu. Jest on zatem chiralną pochodną triazolu katalizowanego przez cytochrom P450 – co klasyfikuje go do silnych inhibitorów oraz induktorów metabolizmu leków. Ponadto związki lipofilowe zawierające w swojej strukturze azotowe podstawniki heterocykliczne hamują aktywność monooksygenazy w wątrobie, ze zmiennym powinowactwem wiązania do błon mikrosomalnych zależnym od pozycji podstawienia heterocyklicznego. Związki bardziej lipofilowe łatwiej przenikają przez błony, są zatem metabolizowane głównie w wątrobie przez enzymy mikrosomalne. Lipofilowość anastrozolu wyrażona jako współczynnik podziału $\log P_{o/w}$ wynosi 1,58 – co oznacza, że jest on związkiem umiarkowanie lipofilowym [14, 15].

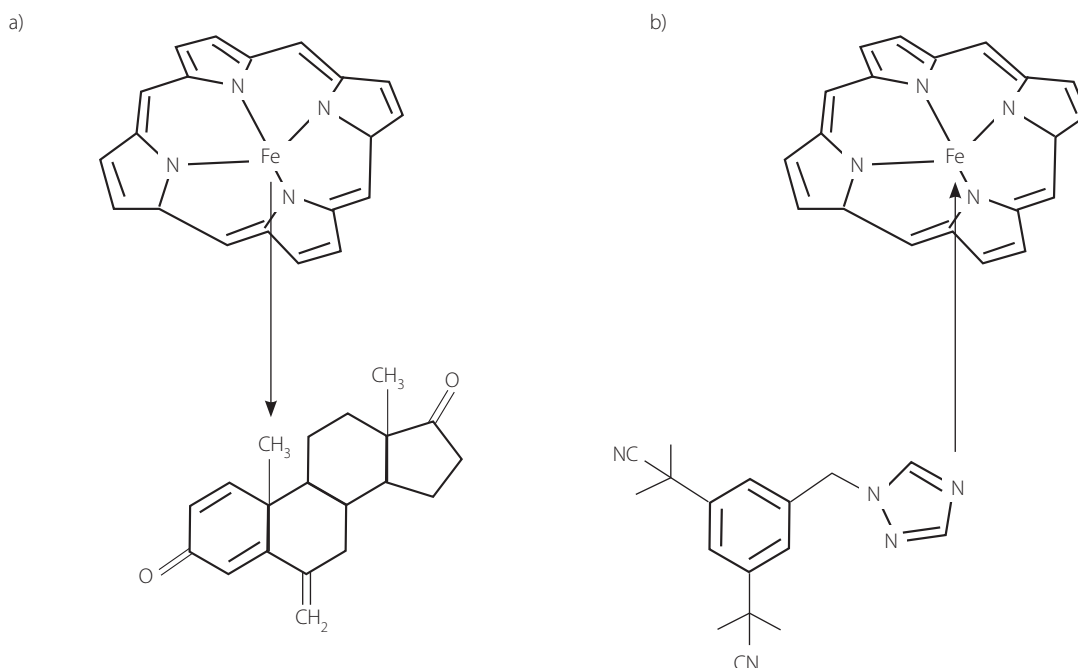
Wzrost oraz rozwój raka piersi zależy od poziomu estrogenów. Dlatego też inhibitory aromatazy, która odpowiada za ich biosyntezę, są często stosowane w leczeniu tego rodzaju nowotworu. Ograniczenie poziomu estrogenów to główny cel terapii hormonalnej w leczeniu raka piersi z pozytywnym działaniem hormono-receptorowym. Zmniejszenie ilości estrogenów można uzyskać na dwa sposoby: blokując receptor estrogenowy lub hamując biosyntezę estrogenów z udziałem aromatazy. Mechanizm działania anastrozolu ma prowadzić do zahamowania biosyntezy estrogenów. Badania kliniczne

potwierdzają skuteczność oddziaływania AI z receptorem estrogenowym w przypadku leczenia przerzutowego raka piersi wśród kobiet w wieku pomenopauzalnym. Ponadto szereg badań potwierdza, że u kobiet po menopauzie AI są bardziej skuteczne w porównaniu z tamoksyfenem powszechnie stosowanym w terapii adjuwantowej [16].

AI podzielone są na dwie grupy pod względem hamowania procesu aromatyzacji. Pierwsza grupa, do której zaliczany jest eksmestan, wiąże się nieodwracalnie z aromatazą i powoduje jej trwałą inaktywację. Druga grupa, do której należy anastrozol, wiąże się odwracalnie do P450 19, konkurując z endogennymi ligandami, do miejsca aktywnego enzymu. Dzieje się tak przez utworzenie odwracalnego wiązania grupy azotowej N-4 w pierścieniu triazolu z atomem żelaza znajdującym się w centrum aktywnym cytochromu P450 (ryc. 4). Anastrozol jest więc kompetycyjnym, niesteroidowym inhibitorem P450 19, selektywnie hamującym proces konwersji androgenów do estrogenów. W wyniku tego następuje obniżenie stężenia estronu, estradiolu oraz siarczanu estronu, krążących w surowicy. Inhibicja aromatazy przez anastrozol polega głównie na hamowaniu aktywności izoenzymów P450 1A2, 2C8, 2C9, 3A4, które biorą udział w metabolizmie estrogenów [8].

Metabolizm anastrozolu

Efekt działania danego leku wobec celów biologicznych zależy od jego specyficznej modyfikacji strukturalnej. Dana biotransformacja najczęściej przebiega w wątrobie i jej celem jest przekształcenie lipofilowych substancji w metabolity silnie



Rycina 4. Odziaływanie steroidowych i niesteroidowych inhibitorów z centrum aktywnym aromatazy – a) eksmestan, b) anastrozol

hydrofilowe, które ulegną wydalaniu. Substancja czynna po wchłonięciu do wnętrza komórki ulega metabolizmowi, który dzieli się na dwie główne fazy. W pierwszej fazie następuje wzrost hydrofilowości leków, co ułatwia oraz umożliwia ich wydalanie. W fazie tej zachodzą reakcje utlenienia, redukcji, eliminacji i hydrolizy. Dzięki wprowadzeniu grupy funkcjonalnej do cząsteczki leku, zdolny jest on do wchodzenia w reakcje i następnie do oddziaływania w reakcjach fazy II. Procesy utleniania stanowią najważniejszy szlak biotransformacji. Katalizowane są m.in. przez monoksygenazy, wbudowujące do ksenobiotyku jeden atom tlenu pochodzący z cząsteczki tlenu, przy czym drugi atom ulega redukcji z powstaniem cząsteczki wody. Najważniejsze dla tej fazy metabolizmu są enzymy z rodziny cytochromu P450, które są katalizatorami wielu przemian biochemicznych [12].

Anastrozol ulega metabolizmowi w wątrobie głównie w wyniku hydroksylacji – katalizowanej przez enzym P450 3A4 oraz w mniejszym stopniu przez P450 3A5 – z utworzeniem hydroksyanastrozolu. Drugą ważną transformacją leku jest *N*-dealkilacja, w wyniku której powstają metabolity: triazol oraz kwas 3,5-bis-(2-metylopropionoitryl)-benzoesowy (ryc. 5). Głównymi metabolitami anastrozolu, zidentyfikowanymi w moczu i osoczu po I fazie eliminacji, są triazol oraz hydroksyanastrozol. Triazol wykazuje przewagę jako główny metabolit krążący w surowicy chorych leczonych anastrozolem. Jest on farmakologicznie nieaktywny [17–19].

Podstawą metabolizmu II fazy są reakcje sprzęgania katalizowane przez specyficzne transferazy. W większości przy-

padków w wyniku tych reakcji do cząsteczki ksenobiotyku zostaje wprowadzona grupa, która zwiększa hydrofilowość, a to z kolei, rozpuszczalność w wodzie. Powstające koniugaty są następnie wydalane z moczem lub żółcią. Celem reakcji sprzęgania jest pozabawienie aktywności biologicznej albo detoksykacja, dlatego produkty tych reakcji są w większości przypadków nieaktywne biologicznie. W metabolizmie anastrozolu szczególną rolę odgrywa sprzęganie z aktywnym kwasem glukuronowym (UDP). Z uwagi na dodatkowe grupy hydroksylowe -OH w swojej strukturze, jest on uznawany za względnie silny kwas oraz związek silnie hydrofilowy. Jego przeniesienie na określony substrat następuje po związaniu na błonie komórkowej z enzymem UGT z rodziny glukuronylotransferaz (urydono-5'-difosfo-glukuroniltransferazy), które występują głównie w wątrobie, nerkach i jelitach. Stanowią one rodzinę enzymów, których funkcja detoksykacyjna polega na katalizowaniu reakcji sprzęgania kwasu glukuronowego z lipofilowym substratem, zawierającym w swojej strukturze nukleofilową grupę funkcjonalną. Tak samo jak w przypadku monoooksydaz zależnych od cytochromu P450 wyróżnia się wiele izoenzymów UGT. Różnią się one między sobą swoistością substratową oraz specyfiką ekspresji w określonych tkankach. Analogicznie do izoenzymów P450 wykazują różnice w aktywności, które wynikają z indukcji genów białek enzymatycznych. Enzymy UGT są zdolne do przeprowadzania glukuronidacji wielu różnorodnych strukturalnie leków i substratów endogennych, w związku z tym odgrywają ważną rolę w ich eliminacji [19, 20].

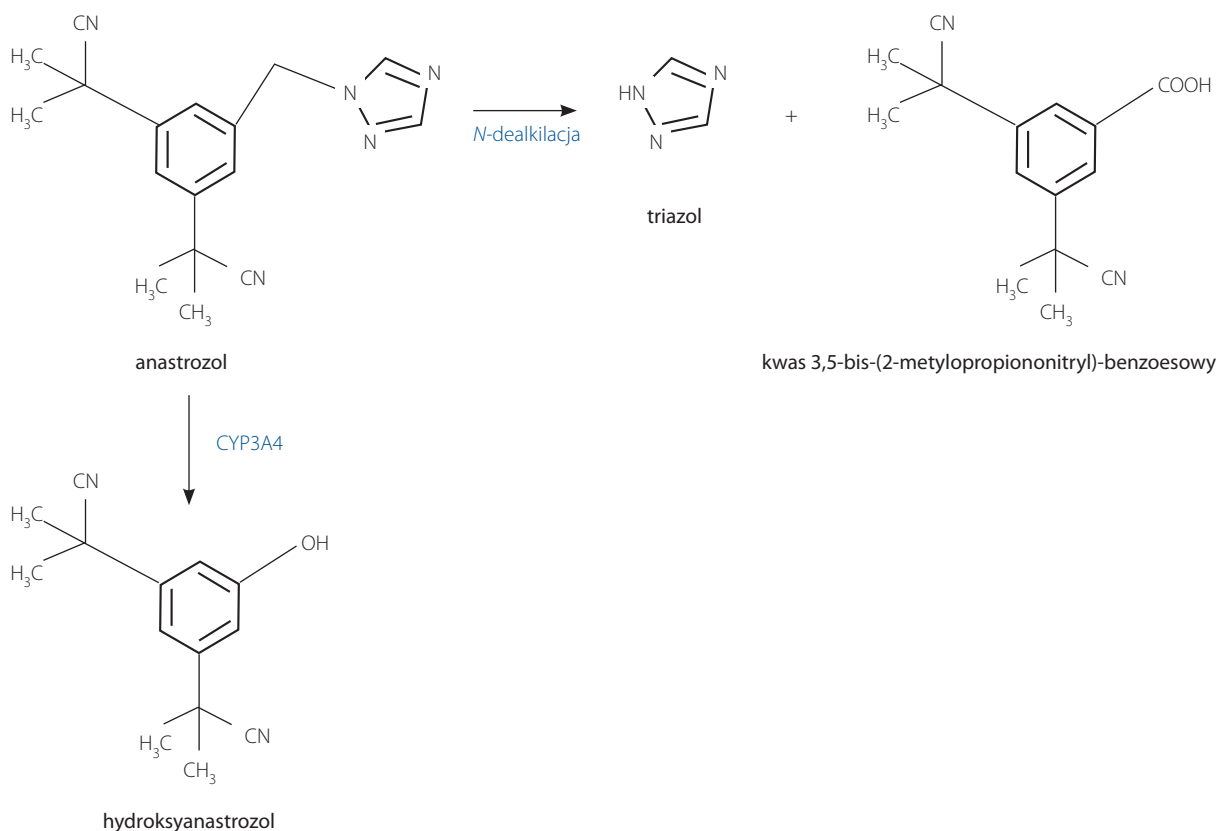
Badania dotyczące przemian anastrozolu dowodzą, że II faza metabolizmu jest głównie katalizowana przez izoenzym UGT1A4. Ponadto, wykazano, że izoenzym ten odgrywa ważną rolę w bezpośredniej glukuronidacji hydroksyanastrozolu powstałego w wyniku utleniania w I fazie. Zgodnie z uzyskanymi wynikami, hydroksyanastrozol został wykryty i określony ilościowo w osoczu, głównie w postaci sprzężonej, jako O-glukuronid hydroksyanastrozolu, a jedynie w niewielkim stopniu jako forma nieskoniugowana. Sugeruje to, że hydroksylowany metabolit jest skutecznie koniugowany przez enzymy UGT. Anastrozol może również ulegać bezpośredniej glukuronidacji do *N*-glukuronidu anastrozolu, która także jest katalizowana przez UGT1A4. Reakcja ta może zachodzić na jednym z atomów azotu w pierścieniu triazolu, stąd też mówimy o *N*-glukuronidacji. Jednak wątrobowy UGT1A4 nie jest jedynym enzymem uczestniczącym w tej reakcji. UGT2B7 oraz UGT1A3 również biorą w niej udział, jednakże w bardzo niewielkim stopniu [17, 21].

Podsumowując przemiany, którym ulega anastrozol, na rycinie 6 przedstawiono poszczególne szlaki metaboliczne z uwzględnieniem enzymów biorących w nich udział. Dzięki przeprowadzonym badaniom uważa się, że hydroksylacja stanowi główny szlak utleniania I fazy metabolizmu, a *N*-glukuronidacja główny szlak koniugacji leku w II fazie. Dane te mogą służyć jako podstawa do projektowania klinicznych interakcji

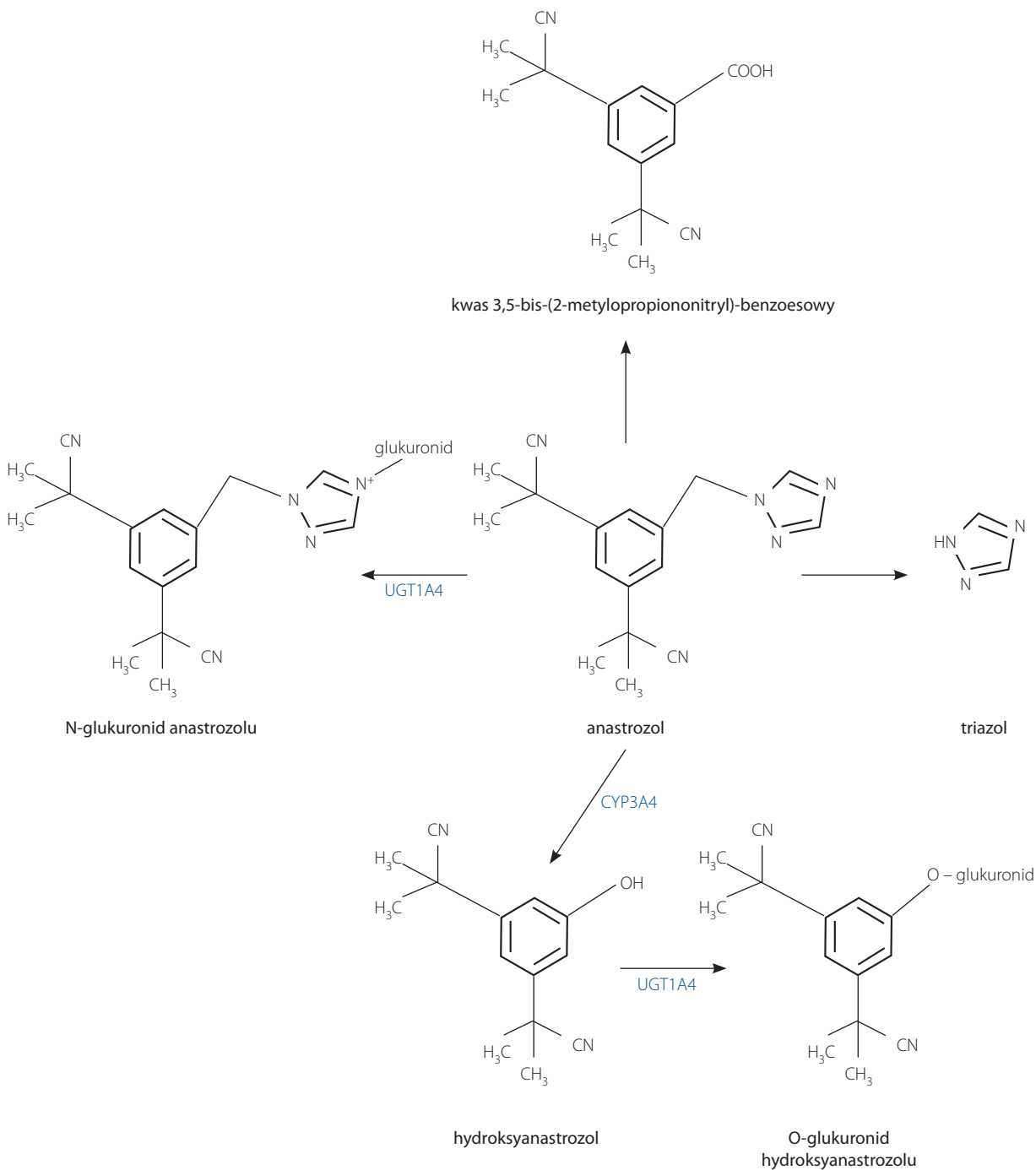
lekowych i badań farmakogenetycznych, które uwzględniają metabolizm z enzymami P450 3A4 i UGT1A4 oraz mają na celu przewidywanie klirensu anastrozolu, czyli objętości osocza całkowicie oczyszczonego z danej substancji w jednostce czasu.

Nowe podejścia terapeutyczne zwiększające efekt działania anastrozolu

W celu opracowania odpowiedniej terapii przeciwnowotworowej ważne jest zrozumienie klinicznej farmakologii rozpatrywanego leku. Anastrozol charakteryzuje się dobrą biodostępnością po podaniu doustnym i jest szeroko rozprzestrzeniany w krwioobieg. Hamuje stężenie estronu (E1) o 81–87%, estradiolu (E2) o 84–85% oraz siarczanu estronu (E1S) o 94% [22]. Podlega on intensywnemu metabolizmowi przez mikrosomy wątroby, z okresem półtrwania wynoszącym 40–50 godzin. W ciągu dwóch do trzech godzin po podaniu doustnym osiąga maksymalne stężenie w surowicy. Standardowa dawka anastrozolu wynosi 1 mg na dzień, podawana przez okres dwóch do pięciu lat. Taka ilość jest optymalna do zahamowania biosyntezy estrogenów. Badania farmakokinetyki anastrozolu wykazały, że nie wywiera on wpływu na dysfunkcję wątroby czy nerek. Około 10% dawki anastrozolu jest wydalane w postaci niezmienionej wraz z moczem, z kolei 60% podlega wydalaniu w postaci metabolitów obecnych w moczu [16, 23].



Rycina 5. Metabolizm I fazy anastrozolu



Rycina 6. Szlaki metaboliczne anastrozolu z uwzględnieniem głównych enzymów biorących udział w biotransformacji leku

Stosowanie anastrozolu niesie ze sobą jednak wiele niekorzystnych skutków ubocznych. Należą do nich m.in. zaburzenia układu nerwowego, układu mięśniowo-szkieletowego, zaburzenia pracy żołądka i jelit, tkanki łącznej, zaburzenia metabolizmu, odżywiania, objawy naczyniowe czy ogólne. Ich występowanie jest konsekwencją niskiej rozpuszczalności anastrozolu w wodzie, przez co zostaje on szybko usunięty z krwiobiegu, co powoduje krótki okres jego półtrwania w osoczu (średnio 41–48 godzin) oraz nieregularny pobór leku [3].

Nanotechnologia

Dziedziną nauki, która jest często stosowana w celu przezwycięzania efektów ubocznych aktywnych składników leków, jest nanotechnologia. Szczególną rolę odgrywają nanonarzędzia, które zapewniają ukierunkowane podejście do podawania leków specyficznych dla określonego miejsca, poprzez jego sprzężanie z cząsteczkami nośnika, takimi jak nanokapsułki, nanosfery, micelle [24]. Ponadto, pułapkowanie związków hydrofobowych wewnątrz specyficznych nanonarzędzi może

znacząco zwiększyć ich rozpuszczalność, efektywność dostarczenia i w konsekwencji także skuteczność. Nawiązując do anastrozolu, w 2006 r. Zidan i wsp. [25] opublikowali pierwszą pracę opisującą inkapsulację tego leku poprzez zastosowanie biodegradowalnych mikrocząstek opartych na kopolimerach kwasu mlekowego i glikolowego (PLGA-poly(lactic-co-glycolic acid)). Zastosowano w tym przypadku przedłużony system podawania anastrozolu. Jednym z możliwych rozwiązań technologicznych wykorzystywanych do zwiększenia trwałości leków w docelowym miejscu ich działania, jest zastosowanie systemów terapeutycznych opierających się na biodegradowalnych polimerach. Żywe matryce mają tę zaletę, że ulegają biodegradacji oraz stopniowo zanikają uwalniając lek bezpośrednio w miejscu działania. Ponadto podawanie leków w postaci mikrocząstek ułatwia iniekcję [27].

PLGA został szeroko przebadany jako polimerowy nośnik biodegradowalnych mikrosfer. Mikrocząstki PLGA okazały się skutecznym sposobem dostarczania leków należących do różnych klas, między innymi niesteroidowe leki przeciwnowotworowe – do których zaliczany jest anastrozol – a także niesteroidowe leki przeciwzapalne, peptydy oraz hormony steroidowe. Wybranie odpowiedniego składu polimeru ze znanym czasem degradacji pozwala na zastosowanie go do produkcji systemu dostarczania leku uwalniającego substancję czynną z określoną wcześniej szybkością. Do przygotowania takich mikrosfer stosuje się zarówno polimery naturalne jak i syntetyczne. Najbardziej popularnym sposobem wytwarzania mikrosfer z PLGA – ze względu na powtarzalność procesu oraz jednorodność wielkości cząstek – jest emulgowanie poprzez odparowanie rozpuszczalnika [28].

Sformułowane mikrosfery PLGA obciążone anastrozolem wykazały, że profile uwalniania leku charakteryzują się dwoma odrębnymi fazami. Początkowa faza uwalniania następuje pierwszego dnia, po czym następuje stopniowa, druga faza. Profile uwalniania anastrozolu z mikrocząstek tłumaczą następujące po sobie procesy dyfuzji. Dyfuzja wodnego, rozpuszczalnego roztworu do matrycy powoduje rozpuszczenie leku. Potem następuje jego dyfuzja przez pory do rozpuszczalnego medium [15]. Anastrozol w swojej strukturze nie zawiera grup podatnych na jonizację, zatem zmiana pH nie ma wpływu na jego rozpuszczalność [3]. Dodatkowo wykazano, że szybkość uwalniania leku wzrasta wraz ze wzrostem obciążenia anastrozolem [25].

Kolejnym sposobem dostarczania anastrozolu z wykorzystaniem narzędzi nanotechnologicznych jest zastosowanie nanocząstek PLA-PEG-PLA, które także są biodegradowalne oraz nietoksyczne. Syntetyzuje się je z PEG (poli(tlenek etylenu)), który jest odporny na rozpoznanie ze strony układu immunologicznego. Połączono go w tym przypadku z polilaktydem PLA (poli(kwas mlekowy)) [29]. Ten biokompatybilny system jest zdolny do inkapsulacji anastrozolu. W tym przypadku, zastosowano technikę podwójnej emulsji, która pozwala na skuteczne dostarczenie anastrozolu do komórek docelowych. System ten przyczynił się do przedłużonego uwalniania leku – sięgającego 144 godzin. To przedłużone uwalnianie jest wynikiem

powinowactwa do wiązania pomiędzy polimerem a lekiem, a także pojemnością polimeru do wprowadzenia leku [30].

Trójblokowy polimer stosowany do syntezy nanocząstek ma charakter amfifilowy, dzięki czemu jest odpowiedni do kapsułkowania związków nierozpuszczalnych w wodzie, do których zaliczany jest anastrozol. Optymalna wielkość nanocząstek mieści się w zakresie 10–200 nm, co umożliwia bezpośrednie celowanie w guzy. Mniejsze cząstki mogą zostać usunięte, z kolei większe nie dostaną się do przestrzeni guza naczyniowego i śródmiąższowego. Pomimo zwiększenia poziomu sygnalizacji proangiogennej w komórkach nowotworowych, które powoduje nadmierne unaczynienie guza, dostarczenie leku jest możliwe, ponieważ naczynia te wykazują zwiększoną przepuszczalność. Ponadto nowotwory charakteryzują się słabym drenażem limfatycznym, co pozwala na zatrzymywanie makrocząsteczek powyżej 40 kDa. W związku z tym nanocząstki mogą wykorzystywać cechy zwiększonej przepuszczalności oraz retencji ukierunkowanej na guzy lite [31].

Potwierdzeniem skuteczności takiego systemu były przeprowadzone badania cytotoksyczności, które wykazały zdolność nanocząstek obciążonych anastrozolem do wywołania podobnego efektu cytotoksycznego w porównaniu z wolnym lekiem. Efektywność nanocząstek potwierdziła także obserwacja ekspresji genów apoptotycznych c-MYC, MAPK3 i MCL-1 w komórkach raka piersi MCF-7. Gen MAPK3 należy do kinaz aktywowanych miogenem, które są fundamentalnym składnikiem sieci sygnalizacji komórkowej umożliwiającej funkcjonowanie komórek jako istotnej części organizmu. Białko c-MYC jest czynnikiem transkrypcyjnym, który odgrywa ważną rolę w progresji raka piersi. Jest on kluczowym regulatorem cyklu komórkowego, proliferacji komórek oraz ich transformacji. W przypadku dostępu do czynników przetrwania niedobór c-MYC indukuje apoptozę poprzez aktywację jej szlaku za pośrednictwem mitochondriów oraz receptorów. Z kolei gen MCL-1 jest proapoptotycznym członkiem rodziny białek BCL-2, które wykazują cechy inhibitorów apoptozy. Wyniki badania wykazały, że wszystkie trzy geny uległy nadmiernej ekspresji, co prowadzi do indukcji apoptozy komórek nowotworowych i tym samym bezpośrednio potwierdza skuteczność dostarczenia kapsułkowanego leku do komórek [30].

Wykorzystanie nowoczesnych technik nanotechnologicznych z zastosowaniem biodegradowalnych polimerów prowadzi do przedłużonego uwalniania niektórych składników aktywnych. W przypadku anastrozolu konieczne są dalsze badania potwierdzające efektywność nanocząstek obciążonych lekiem i możliwość ich stosowania w terapii klinicznej. Wszelkie dotychczas dostępne informacje obejmują jedynie badania *in vitro* prowadzone z udziałem nowotworowych linii komórkowych. Dostępne są też wyniki badań z udziałem zwierząt [32].

Transdermalne uwalnianie leku

Stosowany najczęściej doustny preparat z anastrozolu zapewnia dobre reakcje terapeutyczne. Maksymalne stężenie leku

w osoczu utrzymuje się przez około 2 godziny, a długotrwałe działanie ogólnoustrojowe ze średnim okresem półtrwania wynosi od 40 do 50 godzin. Jest to jednak często związane z ciężkimi ogólnoustrojowymi działaniami niepożądanymi. Pacjenci cierpiący na nudności i wymioty nie kwalifikują się do doustnego podawania leków. W związku z tym transdermalne systemy dostarczania leków (TTS – Transdermal Therapeutic Systems) stanowią obiecującą alternatywę i mogą pomóc uniknąć niepożądanych skutków ubocznych [33, 34]. Są one nieinwazyjną oraz całkowicie bezbolesną metodą, dzięki której do krwiobiegu przez skórę dostarczana jest ustalona, stała dawka leku. Do ich zalet należy równomierny profil stężenia leku w osoczu, utrzymujące się lokalne uwalnianie leku oraz, w razie konieczności, możliwość jego szybkiej eliminacji.

Doustna terapia inhibitorami aromatazy prowadzi do niekontrolowanego dostarczenia leku charakteryzującego się wczesnym, maksymalnym jego stężeniem oraz gorszą przyswajalnością, a w konsekwencji także zwiększoną liczbą efektów ubocznych. Natomiast niewielka masa cząsteczkowa, wysoki współczynnik podziału oraz niska temperatura topnienia anastrozolu to dogodne właściwości fizykochemiczne, które mogą zapewnić skuteczne przenikanie przez warstwę rogową naskórka.

Kinetyka anastrozolu w systemie transdermalnym została początkowo zbadana *in vitro* z wykorzystaniem komórek dyfuzyjnych Franza. Oceniano obciążenie lekiem, przenikanie oraz wzmocnienie w transporcie anastrozolu. Samoprzylepny klej anastrozolowy o przedłużonym działaniu zbadano następnie *in vivo* na psach rasy Beagle. Plastry zostały umieszczone na skórze piersiowo-brzuszej zwierząt. Zgodnie z oczekiwaniami zaobserwowano niższy początkowy transfer anastrozolu z plastrów doświadczalnych do krążenia ogólnoustrojowego w porównaniu z podawaniem doustnym leku u ludzi. W ciągu jednego dnia poziom anastrozolu wzrósł liniowo i osiągnął maksymalne stężenie w osoczu 4,7 oraz 5,8 ng/ml w punkcie czasowym $T_{max} = 24$ h. Wartości te odpowiadały 34% i 42% stężenia maksymalnego po jednym, doustnym podaniu 1 mg standardowej dawki anastrozolu u ludzi [35].

W przypadku anastrozolu możliwość kontrolowania jego uwalniania niesie ze sobą wiele zalet, np. przedłużone uwalnianie prowadzi do pożądanego przedłużonego czasu działania leku, przy czym poziom stężenia leku jest wystarczający do zapewnienia odpowiedniej aktywności terapeutycznej. Ponadto daje to możliwość uniknięcia niepożądanego maksymalnego stężenia leku w osoczu. Dodatkowo łatwy w użyciu system może potencjalnie poprawić przestrzeganie zaleceń przez pacjentów [35].

Podsumowanie

Rola cytochromu P450 w metabolizmie ksenobiotyków została szeroko poznana i stanowi cel molekularny dla chemoterapii raka piersi. Szczególnie istotna w tym kompleksie enzymatycznym okazuje się aromataza katalizująca biosyntezę androgenów w estrogeny. Wykazano, że inhibicja tej reakcji

znacząco obniża poziom estrogenów w krwiobiegu, a tym samym ogranicza wzrost guza zależnego od poziomu tych hormonów. Jednym ze skutecznych inhibitorów aromatazy jest anastrozol będący niesteroidową pochodną triazolu, który hamuje izoenzymy cytochromu P450 1A2, 2C8, 2C9, 3A4 biorące udział w metabolizmie estrogenów. Jako substancja egzogenna podlega on także metabolizmowi wobec enzymów I jak II fazy, co prowadzi do powstania jego metabolitów: kwasu-3,5-bis-(2-metylopropionitrylo)-benzoesowego, N-glukuronidu anastrozolu, triazolu oraz O-glukuronidu hydroksyanastrozolu. Standardową dawką stosowaną w leczeniu hormonalnym kobiet w wieku pomenopauzalnym jest doustne przyjmowanie 1 mg leku dziennie. Ilość ta wystarcza, aby osiągnąć pożądaną efekt terapeutyczny, który niestety powoduje także liczne skutki uboczne.

Aby ograniczyć występowanie skutków ubocznych anastrozolu i zwiększyć okres półtrwania w osoczu, opracowano nowe metody jego podawania. Jednym z rozwiązań jest zastosowanie nanonarzędzi, które zapewniają ukierunkowane dostarczenie leku zwiększające skuteczność terapii. W tym celu stosuje się polimery, czyli PLGA, będące nośnikami biodegradowalnych mikrocząstek obciążonych anastrozolem. System ten pozwala na kontrolowane uwalnianie leku i wpływa tym samym na skuteczność terapii. Możliwe jest także zastosowanie całkowicie bezinwazyjnej metody dostarczania leku, jaką jest podawanie go przez skórę. Taki transdermalny system pozwala na równomierny profil stężenia chemoterapeutyku w osoczu, opierający się na stałej, ustalonej dawce. Dodatkowo właściwości fizykochemiczne anastrozolu zapewniają jego skuteczne wchłanianie przez naskórek.

Prezentowane wyżej aspekty dotyczące anastrozolu stanowią podstawę do pełnego zrozumienia zarówno mechanizmów jego działania, jak i możliwości projektowania nowych podejść terapeutycznych, które zwiększają skuteczność terapii przeciwnowotworowych.

Podziękowania

Autorki dziękują prof. dr hab. inż. Zofii Mazerskiej za przekazaną wiedzę oraz wsparcie merytoryczne.

Konflikt interesów: nie zgłoszono

Izabela Piotrowska

Politechnika Gdańska

Wydział Chemiczny

Katedra Technologii Leków i Biochemii

ul. Narutowicza 11/12

80-233 Gdańsk

e-mail: izabela1.piotrowska@gmail.com

Otrzymano: 27 marca 2019 r.

Przyjęto do druku: 6 maja 2019 r.

Lista stosowanych skrótów

ER – receptor estrogenowy

AI – inhibitor aromatazy
 COMT – O-metylotransferaza katecholowa
 P450 19 – aromataza
 E1 – estron
 E2 – estradiol
 E1S – siarczan estronu
 NADP⁺ – ester fosforanowy dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego
 logP_{o/w} – współczynnik podziału
 UDP – kwas glukuronowy
 UGT – enzym urydyno-5'-difosfo-glukuronilotranferazy
 PLGA – kopolimer kwasu mlekowego i glikolowego
 PEG – poli(tlenek etylenu)
 PLA – poli(kwas mlekowy)
 TTS – transdermalny system dostarczania leków

Piśmiennictwo

- Creighton CJ, Massarweh S, Huang S i wsp. Development of resistance to targeted therapies transforms the clinically associated molecular profile subtype of breast tumor xenografts. *Cancer Res* 2008; 68: 7493–7501.
- Dębska S, Potemski P. Leczenie hormonalne chorych na raka piersi z nadekspresją receptora HER2. *Onkol Prak Klin* 2010; 6 (6): 301–310.
- Buzdar AU. Anastrozole (Arimidex™) – an aromatase inhibitor for the adjuvant setting? *Br J of Cancer* 2001; 85: 6–10.
- Buzdar AU, Jonat W, Howell A. Anastrozole versus megestrol acetate in the treatment of postmenopausal women with advanced breast carcinoma: results of a survival update based on a combined analysis of data from two mature phase III trials. Arimidex Study Group. *Cancer* 1998; 83: 1142–1152.
- O'Shaughnessy J, Yasrdley DA, Burris HS i wsp. Randomized phase 3 trial of adjuvant letrozole versus anastrozole in postmenopausal patients with hormone receptor positive, node positive early breast cancer. Final efficacy and safety results of the femara versus anastrozole clinical evaluation (Face) trial. *Thirty-Eighth Annual CTSC-AACR San Antonio Breast Cancer Symposium* 2015
- Bogacz A. Ocena wpływu wybranych roślin leczniczych na poziom transkrypcji genów CYP3A1 i CYP2D2 w badaniach *In vitro*. Projekt dyplomowy doktorski. UMP 2010.
- Hiroshi S, Yoshitsugu S. Diversity and substrate specificity in the structures of steroidogenic cytochrome P450 enzyme. *Biol. Pharm Bull* 2012; 35: 818–823.
- Lemke TL, Williams DA, Roche VF i wsp. *Essentials of Foye's Principles of Medical Chemistry*. USA 2006; 1303–1307.
- Thomas MP, Potter BVL. The structural biology of oestrogen metabolism. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 2013; 137: 27–49.
- Bańkowski E. *Biochemia. Podręcznik dla studentów uczelni medycznych*. Edra Urban & Partner 2016; 430–434.
- Kowalewska-Łuczak I, Kmiec M, Terman A. Aromataza cytochromu P450 – kluczowy enzym syntezy estrogenów. *Medycyna Wet* 2006; 62 (8): 870–872.
- Steinhilber D, Schubert-Zsilavec M, Roth HJ. *Chemia Medyczna*. Wydawnictwo Medyczne i Farmaceutyczne MedPharm Polska. 2012; 510–512.
- Berg JM, Tymoczko JL, Gatto GJ i wsp. *Biochemistry*. W.H. Freeman and Company 2015; 792–795.
- Grimm SW, Dyroff MC. Inhibition of human drug metabolizing cytochromes p450 by anastrozole, a potent and selective inhibitor of aromatase. *Drug Metab Dispos. The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics* 1997; 598–601.
- Product Monograph AstraZeneca Canada Inc. 2014.
- Bao T, Rudek MA. The clinical pharmacology of anastrozole. *European Oncology & Haematology* 2011; 7: 106–108.
- Kamdem LK, Liu Y, Stearns V i wsp. In vitro and in vivo oxidative metabolism and glucuronidation of anastrozole. *Br J Clin Pharmacol* 2010; 70: 854–869.
- Lazaurs P, Sun D. Potential role of UGT pharmacogenetics in cancer treatment and prevention: focus on tamoxifen and aromatase inhibitors. *Drug Metab Rev* 2010; 42: 182–194.
- Mutschler E, Geisslinger G, Kroemer HK i wsp. *Farmakologia i toksykologia*. Ed. 3. Wrocław: Wydawnictwo Medyczne i Farmaceutyczne MedPharm Polska; 2013.
- Mról A, Mazerska Z. Glukuronidacja leków przeciwnowotworowych – detoksyfikacja, mechanizm oporności czy sposób na formę proleku? *Postepy Hig Med Dosw* 2015; 69: 1462–1477.
- Edavana VK, Dhakal IB, Williams S i wsp. Potential role of UGT1A4 promoter SNPs in anastrozole pharmacogenomics. *Drug Metab Dispos* 2013; 41: 870–877.
- Geisler J, King N, Dowsett M i wsp. Influence of anastrozole (Arimidex), a selective, non-steroidal aromatase inhibitor, on in vivo aromatisation and plasma oestrogen levels in postmenopausal women with breast cancer. *Br J Cancer* 1996; 74: 1286–91.
- Yates RA, Dowsett M, Fisher GV i wsp. Arimidex (ZD1033): a selective, potent inhibitor of aromatase in postmenopausal female volunteers. *Br J Cancer* 1996; 73: 543–8.
- Ediriwickrema A, Saltzman WM. Nanotherapy for cancer: targeting and multifunctionality in the future of cancer therapies. *ACS Biomater Sci Eng* 2015; 1: 64–78.
- Zidan AS, Sammour OA, Hammad MA i wsp. Formulation of anastrozole microparticles as biodegradable anticancer drug carriers. *AAPS Pharm Sci Tech* 2006; 7: 61.
- Fernández-Carballido A, Herrero-Vanrell R, Molina-Martinez IT i wsp. Biodegradable ibuprofen-loaded PLGA microspheres for intraarticular administration: effect of labrafil addition on release in vitro. *Int J Pharm* 2004; 279: 33Y41.
- Freiberg S, Zhu XX. Polymer microspheres for controlled drug release. *Int J Pharm* 2004; 282: 1Y18.
- Arimidex® (Anastrozole) tablets prescribing information. 2002. Wilmington, DE: AstraZeneca. 2006.
- Whitehead KA, Langer R, Anderson DG. Knocking down barriers: advances in siRNA delivery. *Nat Rev Drug Discov*. 2009; 8: 129–138.
- Alyafee AY i wsp. Preparation of anastrozole loaded PEG-PLA nanoparticles: evaluation of apoptotic response of breast cancer cell lines. *International Journal of Nanomedicine* 2018; 13: 199–208.
- Danhier F, Feron O, Preat V. To exploit the tumor microenvironment: passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery. *J Control Release* 2010; 148: 135–146.
- Shavi GV, Reddy MS, Raghavendra R i wsp. PEGylated liposomes of anastrozole for long-term treatment of breast cancer: in vitro and in vivo evaluation. *J Liposome Res* 2016; 26: 28–46.
- Amir E, Seruga B, Niraula S i wsp. Toxicity of adjuvant endocrine therapy in postmenopausal breast cancer patients: a systematic review and meta-analysis. *J Natl Cancer Inst* 2011; 103 (17): 1299–1309.
- Niravath P. Aromatase inhibitor-induced arthralgia: a review. *Ann Oncol*, 2013; 24: 1443–1449.
- Regenthal R, Voskanian M, Baumann F i wsp. Pharmacokinetic evaluation of a transdermal anastrozole-in-adhesive formulation. *Drug Design, Development and Therapy* 2018; 12: 3653–3664.