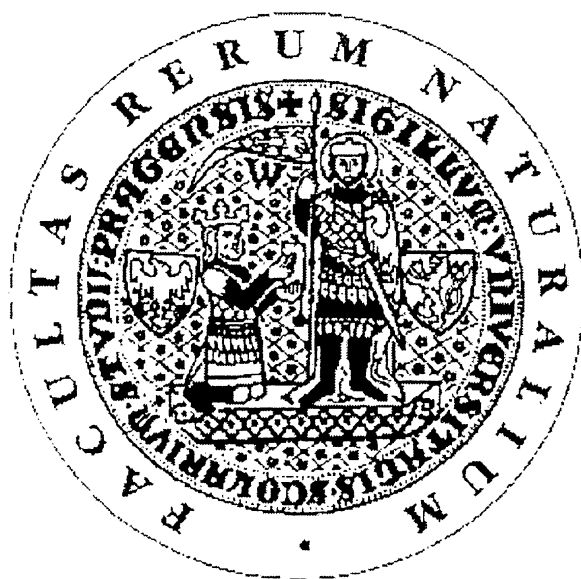


PROTINÁDOROVÁ LÉČIVA A JEJICH MECHANIZMUS PŮSOBENÍ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
KATEDRA BIOCHEMIE

2007



Aleš Vráblík

Školitel: Doc. RNDr. Marie Stiborová, DrSc.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci, která mi byla zadána dne 22.12.2006, na téma:
Protinádorová léčiva a jejich mechanismus působení, vypracoval samostatně.

V Praze, dne 27. 1. 2007

Aleš Vráblík



PODĚKOVÁNÍ

Děkuji mé školitelce Doc. RNDr. Marii Stiborové, DrSc. za zadání tématu a odborný dohled při vypracovávání samotné bakalářské práce.

„As crude a weapon as the cave man’s club, the chemical barrage has been hurled against the fabric of life“

Rachel Carson

(„Masivní chemické znečištění životního prostředí se stává stejně surovou zbraní jako kyj jeskynního muže“)

OBSAH

Cíl práce	6
Seznam použitých zkratk	7
Úvod	8
1. Výběr protinádorových léčiv (cytostatik)	8
1.1. Orientační výběr nových cytostatik	9
1.2. Prvotní výběr	9
1.3. Klinické zkoušení cytostatik	9
2. Aplikační postupy pro protinádorová léčiva	10
2.1. Systémová chemoterapie	10
2.2. Regionální chemoterapie	11
2.3. Lokální chemoterapie	11
3. Mechanismus působení cytostatik	12
3.1. Inhibice biosyntézy nukleových kyselin	13
3.1.1. Analoga kyseliny listové – antifolika	13
3.1.2. Purinová analoga	14
3.1.3. Pyrimidinová analoga	14
3.1.4. Inhibitory ribonukleotidreduktázy	14
3.1.5. Analoga aminokyselin	15
3.2. Poškození struktury a funkce nukleových kyselin	15
3.2.1. Alkylace a arylace	15
3.2.2. Interkalace	16
3.2.3. Inhibice topoizomeráz	16
3.2.4. Rozštěpení molekuly DNA	17
3.3. Alterace mikrotubulárního proteinu	17
3.4. Inhibice proteosyntézy	17
3.5. Kombinované účinky	18
3.6. Poškození buněčné membrány	18
4. Nežádoucí účinky protinádorových léčiv	18
4.1. Hematologická toxicita	19
4.2. Poškození kůže a kožních adnex	20
4.3. Gastrointestinální toxicita	20
4.4. Poškození jater a pankreatu	21

4.5. Poškození plic	21
4.6. Poškození srdce	22
4.7. Poškození ledvin a močového ústrojí	23
4.8. Nežádoucí účinky cytostatik na gonády	23
4.9. Neurotoxicita	24
4.10. Teratogenní účinky cytostatik	24
4.11. Mutagenní a kancerogenní účinky	24
5. Ellipticin	25
5.1. Struktura a historie ellipticinu	25
5.2. Protinádorové účinky ellipticinu	25
5.3. Mechanismus cytotoxicity a protinádorové aktivity ellipticinu	27
5.3.1. <i>Interkalace ellipticinu do dvoušroubovice DNA a inhibice topoizomerázy II ...</i>	27
5.3.2. <i>Kovalentní vazba ellipticinu na DNA</i>	27
5.3.3. <i>Aktivace ellipticinu cytochromy P450</i>	27
5.3.4. <i>Aktivace ellipticinu peroxidázami</i>	29
5.3.5. <i>Aktivace ellipticinu in vivo</i>	31
5.4. Deriváty ellipticinu	32
5.5. Ellipticin a jeho deriváty jako cíleně směřovaná léčiva	32
5.5.1. <i>Konjugát s heptagastrinem</i>	33
5.5.2. <i>Konjugát s enkefaliny</i>	33
5.5.3. <i>Konjugát s estradiolem</i>	33
5.5.4. <i>Konjugát se sacharidy</i>	33
5.5.5. <i>Konjugát s lidským sérovým albuminem</i>	33
5.5.6. <i>Konjugát s lipoproteiny</i>	34
5.6. Ellipticin a jeho deriváty v klinické praxi	34
Závěr	35
Použitá literatura	36

CÍL PRÁCE

Cílem předkládané bakalářské práce bylo zpracovat přehled o mechanismu působení protinádorových léčiv (cytostatik), se zvláštním zřetelem na protinádorové léčivo ellipticin. Ellipticin a mechanismus jeho působení jsou studovány v laboratoři, kde byla bakalářská práce vypracována, jako součást grantových projektů GAČR (203/06(0329) a MŠMT ČR (projekty MSM0021620808 a 1M4635608802).

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ADA	adenosindeamináza
ADP	adenosindifosfát
ALP	alkyllyzofosfolipid
AMP	adenosinmonofosfát
ARDS	syndrom akutní respirační nedostatečnosti
CYP	cytochrom P450
COX-1	ovčí cyklooxygenáza
COX-2	lidská cyklooxygenáza
CNS	centrální nervový systém
DFMO	difluoromethylornitin
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DTIC	dakarbazin
EPR	enhanced permeability and retention effect
FdUMP	5-fluorodeoxyuridinmonofosfát
FUTP	5-fluorouridinmonofosfát
GAČR	Grantová agentura České republiky
GMP	guanosinmonofosfát
HGPRT	hypoxantinguanosinfosforibozyltransferázy
HRP	křenová peroxidáza
IMP	inozinmonofosfát
i.p.	intraperitoneálně
i.v.	intravenózně
i.t.	intratratakálně
K_m	Michaelisova konstanta
LDL	low density lipoprotein
LPO	laktoperoxidáza
MPA	mykofenolová kyselina
MPO	myeloperoxidáza
MŠMTČR	Ministerstvo školství, mládeže a tělovýchovy České republiky
NADPH	nikotinamidadenindinukleotid – redukováná forma
NMR	nukleární magnetická rezonance
RNA	ribonukleová kyselina

ÚVOD

Snaha léčit zhoubné nádory pomocí chemických sloučenin je zmiňována již z doby před naším letopočtem. Hojně bylo používáno zejména některých kovů, jako např. mědi, antimonu nebo arzenu. Od 60. let předminulého století jsou patrné systematické snahy vedoucí k potlačení maligní proliferace chemoterapií.¹ Buňky maligních nádorů lze charakterizovat sníženou či neomezenou kontrolou růstu a na rozdíl od buněk benigních nádorů invazivitou do místních tkání a metastázováním do ostatních částí těla.^{2,3}

Důležitým krokem bylo objevení cytotoxických účinků yperitu a jeho derivátů. Počet derivátů dusíkatého yperitu přesáhl v krátké době počet několika tisíc, avšak malý počet byl vhodný pro léčebné účely. Kolem 40. let byly zavedeny antimetabolity do léčby leukémií. V terapii hemoblastóz se se svými příznivými účinky osvědčily kortikoidy.¹

Na přelomu 60. a 70. let minulého století se stala chemoterapie rovnocennou metodou vedle chirurgické léčby. Dostatečné teoretické znalosti problematiky a klinické zkušenosti ve znalosti biochemického profilu nádorových buněk předpokládá plné využití možností chemoterapie.¹⁻³ Důležitým konceptem nádorové chemoterapie je frakce buněk v růstu, což znamená procento buněk nádoru, které je konstantně v dělicím cyklu. Nádory mající tuto frakci vysokou, jsou zpravidla k chemoterapii citlivější, než buňky nacházející se v G_0 fázi.²

V současné době se pozornost upíná na cíleně směřovaná léčiva, která jsou schopna efektivně rozpoznat nádorové buňky pomocí nosičů, s kterými tvoří konjugáty.

1. VÝBĚR PROTINÁDOROVÝCH LÉČIV (CYTOSTATIK)

Od objevení látky s protinádorovým účinkem k jejímu zavedení do klinické praxe vede poměrně zdlouhavá a nákladná cesta. Nejprve je třeba vyhledat potenciálně účinná cytostatika, která následně podléhají systematickému testování. Cílem je vybrat přirozené či syntetické látky s nejvýhodnějšími vlastnostmi. Hledá se vhodná aplikační forma, stanovují se základní parametry toxicity, zkoumá se farmakokinetika.^{1,2}

Existují tři hlavní zdroje látek, které mají cytotoxické účinky a mohou sloužit jako protinádorová léčiva (označovaná též jako cytostatika). Prvním zdrojem je syntéza nových látek chemickou cestou, další je fermentace plísní a následná izolace protinádorových antibiotik a posledním zdrojem je extrakce látek přirozeného původu (z rostlin, mořských hub). Nejpočetnější skupinou jsou látky získané chemickou syntézou.¹

Pro výběr nových cytostatik byl vypracován etapovitý systém preklinického testování, ve kterém lze rozlišit čtyři etapy. Jsou jimi: orientační výběr, prvotní výběr, formulace a produkce nové látky a poslední etapou je toxikologická studie.¹

1.1. Orientační výběr nových cytostatik

Pro orientační výběr byla zavedena jednoduchá a jednotná orientační metoda, při níž se k předběžnému testování využívá myši leukémie P-388. Buňky leukémie se inokulují i.p. myším kmenem BDF-1 nebo CDF-1 v množství 10^6 . Zkoumaná látka se podává s různým časovým odstupem v logaritmičticky stoupajících dávkách. Posuzuje se pak doba přežití v procentech.¹

1.2. Prvotní výběr

Potenciální cytostatika jsou v tomto případě testována na testovacím panelu in vivo. Panel obsahuje zvířecí, i lidské transplantované nádory. Spolehlivost takového preklinického testování je závislá na vztahu: hostitel-nádor-cytostatikum. Dále mohou mít vliv vnější faktory (aplikační schéma, aplikační cesty, velikost nádorové masy v době zahájení léčby, místo implantace nádoru) nebo vnitřní faktory (věk zvířete, hmotnost, stav výživy, imunokompetence, buněčná populace nádoru, její nesourodost, cytokinetika, farmakokinetika zkoušeného cytostatika a jeho interakce). Daleko rychlejší je testování in vitro (2-3 dny), navíc vyžaduje daleko menší množství zkoumané látky a je méně nákladné. Sleduje se účinek cytostatika na kulturu buněk v tekutém médiu nebo na agaru.¹

Výsledky prvotního výběru se zhodnotí a k dalšímu preklinickému prověřování se vybere 30 - 35 nejúčinnějších látek. Dále je třeba stanovit akutní toxicitu (toxicitu po jednorázovém podání). Na výběr pokusných zvířat jsou stanovena velmi přísná kritéria, je stanoven i minimální počet zvířat v pokusu, neboť toxicita se může lišit v závislosti na kmeni pokusných zvířat a na aplikační cestě (p.o., i.v., i.p.). Například pro vodní živočichy, hypoteticky nejen pro ně, existuje ligandový model (BLM) akutní toxicity kovů spočívající v podstatě, že smrt nastává při dosažení kritické koncentrace kovů, která blokuje sodno draselné kanály a narušuje tak osmotický tlak krve.⁴ Nejprve se určuje chronická toxicita, posléze i lokální.¹

1.3. Klinické zkoušení cytostatik

Na experimentální výzkum navazuje klinické zkoušení cytostatik. Cílem je zhodnotit užitečnost cytostatika pro klinickou praxi, stanovit optimální dávkování a zjistit jeho nežádoucí či toxické účinky. Dále se nové cytostatikum porovnává s dosud známými

cytostatiky, určuje se jeho terapeutická hodnota a možnost jeho použití v kombinacích s jinými cytostatiky. Každému klinickému zkoušení nového léku předchází sestavení tzv. protokolu klinické studie.¹

Protokol by měl obsahovat následující části: úvod (cíl studie – co se bude sledovat a proč), způsob výběru nemocných pro studii (kritéria pro diagnostiku, posouzení rozsahu choroby), způsob léčby, způsob průběžné kontroly, způsob záznamního protokolu, kritéria pro hodnocení léčebného efektu, hodnocení nežádoucích účinků léčby, dále statistické metody, písemný souhlas nemocného a příslušné etické komise, graficky vyjádřené schéma protokolu, jména pracovníků a koordinátora studie a jako poslední literární citace (prameny zabývající se zkoumanou problematikou či výsledky studií z jiných pracovišť).

První etapa klinického zkoušení znamená první použití cytostatika u člověka, hlavním úkolem je určit maximální, bezpečně tolerovanou dávku a stanovit nežádoucí a toxické účinky.¹

Druhá etapa je určena k orientačnímu zjištění protinádorové účinnosti nového cytostatika s ohledem na různý druh nádorů. Nadále se sledují nežádoucí a toxické účinky. Hledá se nejvhodnější aplikační forma.

Nejnáročnější etapou klinického zkoušení je třetí. V této etapě se porovnává terapeutická hodnota s nežádoucími účinky s ohledem na cenu daného léku, nutnost hospitalizace či aplikační cestě. O kolik a zda vůbec je nová léčba lepší oproti konvenční.

Čtvrtou etapou je sledování léčiva po registraci, neboli prověření daného léku jeho použitím v onkologické a hematologické praxi. V této fázi je tedy nezbytná povinnost hlásit nežádoucí účinky cytostatik.¹

2. APLIKAČNÍ POSTUPY PRO PROTINÁDOROVÁ LÉČIVA

V protinádorové chemoterapii se nejčastěji volí systémová aplikační cesta. Méně často potom způsoby regionální a zřídka lokální aplikaci.

2.1. Systémová chemoterapie

Velmi jednoduché a pohodlné zůstává perorální podání. Takováto aplikace je ovšem vhodná pouze pro cytostatika, která nedráždí sliznici trávicího ústrojí, a která nejsou v trávicím ústrojí inhibována nebo rozkládána (trávicí enzymy, změny pH). Tento způsob podání je běžný u purinových antimetabolitů (merkaptopurinu, azathiopurinu, thioguaninu) a

pro některé alkylační látky (chlorambucil, busulfan, cyklofosamid nebo melfalan). Ze zbylých přípravků je perorální podání vhodné u prokarbazinu, etopozidu, estramustinu, fosfátu aj. Rektální aplikace se v protinádorové chemoterapii prakticky nepoužívá, protože resorpce z tlustého střeva je dosti omezená.¹

Parenterální aplikace je ideální pro potřebu rychlého průniku cytostatika do tkání způsobeného dosaženou vysokou koncentrací cytostatika v cirkulaci.

Na rozdíl od subkutánní aplikace, která je poměrně ojedinělá, je velmi častá intravenózní aplikace. Pro některá cytostatika (vinkristin, daunorubicin, dakarbazin - DTIC) je tato aplikace jediným možným způsobem. U látek, které lokálně nedráždí je možné i intramuskulární podání. Podání cytostatika zvláštní jehlou do dřevné dutiny kostí se označuje jako intraoseální. Je-li k dispozici správná technika, komplikace doprovázející tuto aplikační formu jsou minimální.¹

2.2. Regionální chemoterapie

Cílem regionální (oblastní) chemoterapie je zajistit vyšší koncentraci cytostatika v oblasti zhoubného nádoru, a tím docílit znatelnější léčebné odpovědi za relativně omezené toxicity.

U nádorových onemocnění, která postihují v určité fázi svého vývoje extravaskulární dutiny (především dutinu peritoneální, pleurální, popř. perikardiální) je výhodná intrakavitální chemoterapie, která znamená aplikaci cytostatik do tzv. třetích prostorů či kompartmentů. Intratékálně (i.t.) jsou podávána cytostatika (metotrexát, cytosinarabiosid a thiotepa) nejčastěji při infiltraci „mening“ akutní leukémií nebo maligním lymfomem. Jako doplňková léčba se stala užitečnou intraperitoneální chemoterapie cisplatinou. Zamezení tvorby výpotků se dosahuje použitím mustargenu či Coparvaxu intrapleurálně jako součást léčby mezoteliomu.

Aplikuje-li se účinný lék do tepny, jedná se o intraarteriální chemoterapii. Je možno rozeznávat čtyři aplikační cesty této varianty, kterými jsou: intraarteriální infúze, intraarteriální infúze s filtrací, intraarteriální perfúze a chemoembolizace.¹

2.3. Lokální chemoterapie

Zevní aplikace cytostatika ve formě masti přímo na nádor je nejjednodušším způsobem lokální aplikace (5-fluorouracil – Efudix, u kožních karcinomů). Méně častá je aplikace ve formě roztoku (dusíkatý yperit u mycosis fungoides). Aplikuje-li se roztok cytostatika do dutých orgánů, jedná se o intraluminární aplikaci (instilace cytostatik do močového měchýře). K posílení účinnosti lokální terapie může pomoci např. vazba cytostatika na metakrylátový

gel, který je aplikován do okolí nádoru nebo vazba cytostatika na magnetické mikročástice, které se zvýšeně koncentrují v magnetickém poli indukovaném v okolí nádoru.¹

3. MECHANIZMUS PŮSOBENÍ CYTOSTATIK

V tabulce 3.1. jsou uvedeny příklady některých léků užívaných v chemoterapii nádorů s uvedením jejich dosud známých mechanismů účinku.²

Tab. 3.1. Příklady léků užívaných v chemoterapii nádorů

Třída látek		Příklad	Místo účinku	Užití v léčbě
alkylační látky		Melfalan	alkylace DNA a ostatních molekul	myelom
antimetaboly	antagonisté purinů	Merkaptopurin	inhibice syntézy purinů podvojných nukleotidů	akutní myelocytová leukémie
	antagonisté pyrimidinů	Fluorouracil	podvojných nukleotidů inhibice thymidylátsyntetázy	kolorektální karcinom
	antagonisté folátu	Metotrexát	inhibice dihydrofolátreduktázy	choriokarcinomy
protinádorová antibiotika		Doxorubicin	interkalace do DNA stabilisace DNA -topoizomerázy II	Hodgkinova choroba
ostatní látky		Cisplatina	zlomy v řetězci DNA	karcinom plic
		Hydroxyurea	inhibice ribonukleotidreduktázy	chronická myelocytová leukémie
rostlinné látky		Vinblastin	vazba tubulinu inhibice tvorby mikrotubulů	Kaposiho sarkom
pohlavní hormony		Estrogeny	blokace androgenů u nádorů prostaty	rakovina prostaty
kortikosteroidy		Prednison	inhibice prolyferace lymfocytů	myelom

Léky uvedené v tabulce 3.1. jsou často užívány v kombinované chemoterapii spolu s ostatními.

Hlavní mechanismy cytotoxického účinku chemoterapeutik:¹

- 1) inhibice klíčových enzymů metabolismu – porucha biosyntézy nukleových kyselin s následnou inhibicí buněčného dělení

- 2) přímé poškození již hotové struktury nukleových kyselin
- 3) alternace mikrotubulárního proteinu – abnormální průběh mitózy, blokáda v metafázy
- 4) porucha syntézy proteinů
- 5) kombinované účinky

Z nádorových buněk jsou do krve uvolňovány některé enzymy či proteiny. Ty jsou využívány v diagnostice a pro monitorování terapie jako nádorové markery.²

3.1. Inhibice biosyntézy nukleových kyselin

Látky, strukturálně se podobající přirozeným metabolitům (analoga, antimetabolity), zasahují do normálních metabolických pochodů (inhibice či alterace DNA popř. RNA a proteinů)

- přímý inhibiční účinek na dílčí reakce intermediárního metabolismu nebo na enzymy
- antimetabolity nejprve samy metabolicky pozměněny – aktivovány (často přeměnou na nukleotid) – inkorporace do nukleových kyselin, znamená později syntézu falešné nukleové kyseliny
- inhibice metabolických reakcí mechanismem zpětné vazby

U zhoubných nádorových onemocnění jsou antimetabolity nejúčinnější tam, kde se čteně vyskytují proliferující buňky (tz. buňky nacházející se v buněčném cyklu).¹

3.1.1. Analoga kyseliny listové – antifolika

Antifolika působí kompetice s foláty o průnik do buňky, inhibice reakcí katalyzovaných folátovými koenzymy či inhibice folátových koenzymů. Blokádu dihydrofolát reduktázy způsobuje nejpoužívanější antifolikum – metotrexát. Znemožňuje tím redukcí kyseliny listové (dihydrolistové) na tetrahydrolistovou. Za normálních podmínek je kyselina tetrahydrolistová kofaktorem pro metabolismus jednouhlíkatých zbytků, potřebných pro biosyntézu purinů de novo. Antifolika mohou blokovat reakce, neboť mají k dihydrofolát reduktáze přibližně

10 000x větší afinitu než normální substrát. Tuto inhibici lze zrušit přidávkem kyseliny listové za současného podání redukovaných folátů (N-formyltetrahydrofolát). Antifolika pronikají do buňky aktivním transportním mechanismem. Následně jsou v buňce přeměněny na polyglutamát, navázáním 2-4 glutamátů γ -peptidickou vazbou. Jsou-li transportní mechanismy pro foláty a antifolika porušeny, dochází k rezistenci nádoru na metotrexát.¹

3.1.2. Purinová analoga

Purinové metabolity hrají v biosyntéze DNA a RNA významnou roli, jakýkoliv zásah tedy do normálního průběhu biosyntetických reakcí může syntézu nukleových kyselin značně ovlivnit. Jsou známa analoga guaninu a hypoxantinu, v jejichž molekule je dusík v poloze 6 nahrazen sírou (6-thioguanin, 6-merkaptopurin). Až po intracelulární aktivaci (přeměně na příslušný nukleotid) za pomoci enzymu hypoxantinguaninfosforibozyltransferázy (HGPRT) nabývají biologické účinnosti 6-thiopuriny. Syntézu purinů de novo a konverzi kyseliny ionozinové (IMP) na kyselinu adenyllovou (AMP) nebo guanylovou (GMP) inhibují purinová analoga mechanismem zpětné vazby ve formě nukleotidtrifosfátu.¹ Mykofenolová kyselina (MPA), jako inhibitor inosinmonofosfátdehydrogenázy, již v nanomolární koncentraci blokuje odezvu proliferujících T a B lymfocytů. Tento efekt se ruší po přidávku deoxyguanosinu či guanosinu, což se negativně projeví při DNA – syntéze.⁵ Mezi analoga adeninu (resp. adenosinu) patří adeninarabinosid (9- β -D-arabinofuranosyladenin). Je málo rozpustný ve vodě a podléhá deaktivaci-deaminaci adenosindeaminázou (ADA). 2-fluoromonofosfátový analog (fludabarin) již deaktivaci nepodléhá, naopak má značný cytotoxický účinek na lymfoidní tkáň.¹

3.1.3. Pyrimidinová analoga

Nejméně dvěma mechanismy působí fluorované pyrimidiny (nejrozšířenějším představitelem je 5-fluorouracil). Vlastní aktivní látka vzniká po intracelulární konverzi na nukleotid. Vzniká buď 5-fluorouridintrifosfát (FUTP) nebo 5-fluorodeoxyuridinmonofosfát (FdUMP). První z antimetabolitů se inkorporuje do DNA a poškozuje její funkci, zatímco druhý je inhibitorem thymidylátsyntetázy.¹

3.1.4. Inhibitory ribonukleotidreduktázy

Do této skupiny inhibitorů patří hydroxyurea, která blokuje účinek ribonukleotid reduktázy, znemožní se tak konverze ribonukleotidů na deoxyribonukleotidy a zablokuje se

syntéza DNA. Hydroxyurea dále znemožňuje opravu již poškozené DNA, omezuje vazbu vitamínu B₁₂ na transkobalamin II.¹

3.1.5. Analoga aminokyselin

Jedná se o látky, které jsou strukturně blízké přirozeným aminokyselinám a jejichž podání interferuje s normálním metabolismem aminokyselin. Největší praktické uplatnění mají analoga kyseliny L-asparagové, L-alanosin, které fungují jako inhibitory syntézy pyrimidinů de novo.¹

3.2. Poškození struktury a funkce nukleových kyselin

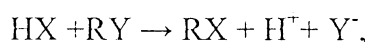
Největší význam z hlediska cytotoxického účinku má inhibice replikace a inhibice transkripce. Inhibice translace se uplatňuje méně často. K poškození nukleových kyselin může dojít různými způsoby:¹

- alkylací a arylací
- interkalací
- inhibicí topoizomeráz
- rozštěpením molekuly DNA

3.2.1. Alkylace a arylace

Tento způsob zásahu se uplatňuje nejen u alkylačních (arylačních) činidel (např. alkylaminy), ale i u některých syntetických přípravků (např. deriváty nitrozomocoviny, mitomycinu C, derivátů manitolu, platinových derivátů, aj.)

Z chemického hlediska lze alkylaci chápat jako konverzi:



kde R zastupuje alkylační (arylační) skupinu, X je substrát (zpravidla nukleová kyselina nebo molekula bílkoviny, která je alkylována na jednom z heteroatomů – dusíku, síře či kyslíku).

Alkylace a arylace vyvolává chemické změny, které způsobují změnu biologické funkce. Mohou být několikerého typu:¹

- prostá substituční reakce (substituce bází či esterifikace fosfátů)
- funkční substituční reakce (alkylační látka musí mít dvě funkční skupiny schopné reakce) – bifunkční nebo polyfunkční alkylační látky jsou cytotoxické, zatímco monofunkční látky mají mutagenní účinky.

- depurinace (uvolnění celé alkylované skupiny oslabením glykosidové vazby)
- rozštěpení řetězce DNA

3.2.2. *Interkalace*

Interkalace (vmezeření) je mechanismus, při kterém se cytostatika nekovalentně váží na molekulu DNA, konkrétně mezi dvoušroubovici. Inhibuje se tak replikace a transkripce. Výše popsaným mechanismem působí antracyklinová antibiotika aktinomycin D, deriváty antrachinonu, deriváty akridinu a ellipticiny. U některých látek se využívá i inhibice topoizomerázy II, tyto látky mohou tedy způsobit zlomy v řetězci DNA. Po podání antracyklinů vznikají kyslíkové radikály, a to nejméně dvěma způsoby. První z možností je redukce chinonového kruhu, při které vzniká semichinon, který poskytuje peroxid reakcí s kyslíkem. Druhá možnost nastává při vzniku komplexu s ADP a železitými ionty, a ten reaguje s kyslíkem za vzniku perferlylového komplexu. Tento komplex se následně rozpadá za vzniku peroxidu vodíku. Kyslíkové radikály jsou zodpovědné za peroxidaci lipidů a poškozují nejrůznější intracelulární struktury a buněčné membrány.¹

Jako příklad interkalátoru lze zmínit ellipticin, který se, vzhledem ke své struktuře dobře vmezeřuje do dvoušroubovice DNA. Vzhledem k tomu, že však působí i jinými mechanismy je o jeho působení detailně pojednáno v kapitole 5. Ellipticin. Ellipticin totiž zároveň inhibuje topoizomerázu II a pomocí jeho aktivace cytochromy P450 a peroxidázami vznikají kovalentní adukty s DNA (ellipticin tedy rovněž působí jako arylační činidlo).⁶⁻¹¹

3.2.3. *Inhibice topoizomeráz*

DNA-topoizomerázy jsou nukleární enzymy, které zabezpečují bezproblémový průběh replikace. Topoizomeráza I se uplatňuje v S-fázi buněčného dělení, kdy vzniká replikační vidlička. Naváže se na jeden řetěz DNA, který rozpojí, a tím uvolní nadměrnou torzi. Přerušovaný řetězec potom opět spojí.

Topoizomeráza II se váže na oba řetězce DNA, působí jejich přerušování a opětovné spojení.^{1,3} Tímto způsobem dochází k separaci chromozómů při mitóze. Při blokádě funkce obou topoizomeráz nedochází k opětovnému spojení řetězců a vytváří se tak zlomy v DNA, které mají pro buňku letální účinek.

Inhibici topoizomerázy I způsobuje cytostatikum kamptotecin a jeho deriváty (topotekan, irinotekan). Inhibici topoizomerázy II působí tenipozid, etopozid a většina interkalačních látek, jak již bylo zmiňováno např. u ellipticinu.^{1,6}

3.2.4. Rozštěpení molekuly DNA

K rozštěpení molekuly DNA dochází působením některých protinádorových antibiotik polypeptidové povahy (neokarcinostatin, bleomycin). Pro podobnost s účinkem záření se též označují jako radiomimetika. Jako výsledek několikasupňové reakce vznikají z komplexu bleomycinu se železem kyslíkové radikály, jakožto zprostředkovatelé rozštěpení DNA.¹

3.3. Alterace mikrotubulárního proteinu

Přípravky, jež poškozují strukturu a funkci mikrotubulů, bývají někdy označovány jako mitotické jedy, jelikož cytotoxický účinek nastává ve fázi mitózy. Správná migrace chromozómů k pólům buňky je způsobena poškozením dělicího vřeténka. Většina cytostatik, které se používají, omezují syntézu tubulinu. Polymerace a depolymerace tubulinu je za normálních okolností v rovnováze. Tento proces je závislý na koncentraci guanosintrifosfátu, na teplotě a na koncentraci kalciových iontů. Protinádorový účinek kolchicinu a alkaloidů z vinca rosea (vinkristin, vinblastin, vindesin, vinorelbin) lze tedy vysvětlit inhibicí polymerizace (inhibice tvorby tubulinu), která zablokuje průběh mitózy v metafázi.¹

Za inhibici depolymerizace jsou zodpovědné taxany (paklitaxel a docetaxel). Rovněž je narušen průběh mitózy, nastávají tedy obdobné funkční důsledky jako u inhibice polymerace. Taxany blokuji též tranzit buněk z G₂ fáze do fáze M. Buňky nacházející se v této fázi jsou nejcitlivější k ionizujícímu záření, taxany mají tudíž radiopotenciační účinek.¹

3.4. Inhibice proteosyntézy

L-asparagináza je zatím jedinou látkou, která se uplatnila v praxi v širším měřítku. Deplece aminokyselin, jakými jsou L-asparagin nebo L-glutamin v extracelulárním prostoru vyvolá nutriční deficit, naruší proteosyntézu a omezí proliferaci buňky.¹ L-asparagináza vyvolá depleci L-asparaginu tím, že jej přemění na kyselinu asparagovou a amoniak.^{1,3} I maligní buňky si však za určitých okolností dokáží zvýšit produkci vlastní L-asparaginsyntetázy, stávají se tudíž rezistentní vůči L-asparagináze.¹

Syntéza bílkovin může být však ovlivněna i nepřímo, inhibicí translačních pochodů. Poškozením ribozómů, která má za následek inhibici translačních pochodů, působí anguidin. Degradaci polyribozómů působí zase homoharingtonin. Většina inhibitorů proteosyntézy jsou vysoce toxické, a proto se doposud v klinické praxi příliš nepoužívají.¹

3.5. Kombinované účinky

Cytostatikum může účinkovat současně jako antimetabolit, i jako alkylační látka (např. purinový antimetabolit dakarbazin (DTIC), většina interkalačních látek působí inhibiči topoizomerázy II a podobně.¹

U některých cytostatik se doposud nepodařilo zcela objasnit mechanismus jejich cytotoxického působení. Rozhodujícím faktorem je koncentrace cytostatika v cílové tkáni.^{1,2}

3.6. Poškození buněčné membrány

Letální účinek může mít pro buňku změna fluidity, permeability, poškození receptorů nebo porušení integrity.^{1,3} Interakce cytostatik s buněčnou membránou byly prokázány u antracyklínů, které se váží na bílkovinu membrány spektrin a na membránový fosfolipid kardiolipin. Vazbu růstových faktorů na receptory membrány inhibují alkyl-lyzofosfolipidy (ALP, různé deriváty fosfocholinu jako jsou edelfosfin, miltefosfin a ilmofosfin), mění aktivitu proteinkináz a fosfolipáz. Membránu dále labilizují polyanionty (chondroitinsulfát, dextranulfát), které vedou k uvolnění enzymů a k destrukci buňky a polykationty (polyetylenimin, polylyzin a polyaminy). Koncentrace polyaminů vzrůstá v proliferačních tkáních. Jejich biosyntéza je podmíněna vysokou aktivitou ornitindekarboxylázy, která je klíčovým enzymem při syntéze putrescinu a ornitinu. Inhibice ornitindekarboxylázy (podáním DL- α -difluoromethylornitinu – DFMO) sníží koncentraci polyaminů v proliferační tkáni a omezí proliferaci.¹

4. NEŽÁDOUCÍ ÚČINKY PROTINÁDOROVÝCH LÉČIV

Z povahy cytostatik vyplývá, že nežádoucí účinky budou při protinádorové chemoterapii pravidlem, na rozdíl od kteréhokoliv léčiva, kde mohou nastat, avšak nemusí.^{1,2} Cytostatika neselektivně inhibují buněčnou proliferaci, tudíž nejčastěji se vyskytující nežádoucí účinky jsou vázány na cytotoxický účinek chemoterapie v normálních proliferačních buňkách, jakými jsou např. buňky kostní dřeně, epitel trávicího ústrojí, buňky vlasového folikulu, zárodečné pohlavní buňky, či embryonální tkáň. Nežádoucí účinky jiné, méně závažné, jsou individuální a souvisí s chemickou strukturou určitého cytostatika. Cytostatika mohou mít dále odlišné mechanismy účinku, distribuce v organismu, metabolismus nebo vylučování. Míra toxicity nezávisí však pouze na povaze cytostatika, ale také na dávce a na tom, jak

rychle je cytostatikum vylučováno z organismu (choroby ledvin, jater). Dále je třeba uvažovat značné individuální rozdíly mezi jednotlivými nemocnými.¹

Nežádoucí účinky lze dělit na pravidelné, časté a vzácné. Z jiného hlediska lze dělit cytostatika na subjektivní a objektivní, nebo na lokální a systémové. Často používané je také dělení cytostatika podle doby, která uplyne od aplikace cytostatika ke vzniku nežádoucí reakce.

4.1 Hematologická toxicita

Projevem hematologické toxicity je poškození krvetvorby. Mohou však nastat i poruchy hemostázy, u kterých někdy zůstává krvetvorba bez následků. Takové případy jsou ovšem vzácné.

Krvetvorbná tkáň vykazuje vysokou proliferační aktivitu, je tedy splněno základní pravidlo pro nejčastěji se vyskytující nežádoucí účinky. Hlavním znakem poškození krvetvorby je úbytek počtu krevních elementů v obvodové krvi. K přesnějšímu posouzení stupně poškození je třeba hodnotit stav krvetvorby na základě komplexního hematologického vyšetření, doplněného o morfologický nález v kostí dřeni.¹

Ve zdravém organismu jsou veškeré krevní elementy v rovnovážném stavu. Průběžné ztráty jsou nahrazovány plynulou obnovou spočívající v existenci nediferenciovaných kmenových buněk, schopných proliferace. Determinovaná buňka se diferencuje v myeloblast, promyelocyt a myelocyt, jakožto poslední buňku dané vývojové řady schopnou dělení. Tyto buňky tvoří mitotický „pool“. V kostní dřeni existují také maturační a skladovací „pool“, jež jsou tvořeny buňkami již neschopnými dělení. Část zralých granulocytů se dostává do obvodové krve, kde cirkulující granulocyty (pouhá polovina) tvoří cirkulační pool, granulocyty ulpívající na stěně drobných cév marginální granulocytový „pool“. Důsledek porušení krvetvorby cytostatikem, granulocytopenie, může být však způsoben i metastázujícím nádorem, který tlačí na kostní dřev.¹

Závažnost a charakter poškození krvetvorby závisí na druhu cytostatika, zejména na způsobu zásahu do buněčného cyklu, dále na dávce cytostatika, ale také na nesprávném načasování jednotlivých dávek při opakovaném podávání. Před zahájením cytostatické léčby je nutno uvažovat stav hemopoetické tkáně, zejména regenerační schopnost dřene. (věk, již prodělaná radioterapie či chemoterapie).

Terapie poruch krvetvorby (granulocytopenie, trombocytopenie, anémie) se řeší substitucí, a to zejména čerstvou krví, v případě anémie substitucí erytrocytární masy. U granulocytopenie a anémie je možné též použití farmakologických prostředků, kortikoidů

v případě granulocytopenie a androgenů u anémie. V některých případech anémie může být užitečné též podávání železa, nejlépe p.o. a vitamínu B₆.

S poruchou hemostázy se nejčastěji setkáváme jako s druhotným projevem snížení počtu krevních destiček, který je způsoben poškozením krvetvorby.

Terapii poruch hemostázy lze rozdělit na léčbu poruch primární hemostázy, která je porušena některými cytostatiky inhibujícími hemostatickou funkci destiček (většinou tzv. aspirinového typu) a na léčbu poruch plazmatické koagulace, které může způsobovat L-asparagináza, respektive porucha syntézy koagulačních faktorů při inhibici proteosyntézy v játrech L-asparaginázou. V prvním případě je nejdůležitější léčebnou metodou úprava trombocytopenie, u poruchy plazmatické koagulace zůstává jako nejúčinnější transfúze krve nebo mrazené plazmy.¹

4.2. Poškození kůže a kožních adnex

Toxický účinek chemoterapie se může projevit v kůži např. změnou pigmentace. Difúzní hyperpigmentaci může vyvolat podávání busulfanu, lineární hyperpigmentované pruhy na trupu jsou časté po bleomycinu, hyperpigmentace jazyka je projevem podávání doxorubicinu. Folikulitida se vyskytuje po léčbě prednizonem. Celulitida či nekróza kůže jsou časté při úniku cytostatika mimo žílu.¹

Z kožních adnex bývají nejčastěji poškozeny vlasové folikuly. Jelikož v 90% folikulů probíhá živá folikulace (tzv. anagenní fáze), antiproliferativní účinek chemoterapie postihne většinu vlasových folikulů. Zástava buněčného dělení omezí růst vlasu, vlas se v oslabené části láme na úrovni epidermis. Alopecie je většinou reverzibilní, vlasová pokrývka opět doroste po ukončení chemoterapie.¹

Terapie kožního poškození u hyperpigmentace neexistuje. U některých nemocných vymizí spontánně, jindy je však trvalá. U alopecie je terapie málo účinná, někdy dokonce nevhodná.

4.3. Gastrointestinální toxicita

Nežádoucí účinky tohoto typu lze rozdělit na inhibici proliferace buněk epitelu, funkční poruchy, nevolnost a zvracení.

První z účinků může postihnout jakýkoliv úsek zažívacího traktu, vede ke snížení obměny buněk. Klinickými projevy této poruchy bývají mukozitida (dutina ústní), malabsorpce (tenké střevo), v extrémních případech až exfoliace sliznic a hemoragické průjmy, což je fatální projev toxicity. Funkční poruchy se projevují zejména ve střevní pasáži (průjmy nebo zácpa).

Nevolnost a zvracení může vyvolat samotné nádorové onemocnění, mnohem častěji jsou to však důsledky protinádorové léčby.

Terapie gastrointestinální toxicity je většinou symptomatická. Při mukozitidě a slizniční nekróze v dutině ústní je zapotřebí dodržování pečlivé hygieny, výplachy horkým fyziologickým roztokem, vytírání borglycerinem. Při průjmech je nejdůležitější úhrada tekutin a elektrolytů.¹

4.4. Poškození jater a pankreatu

Poškození jater je poměrně málo časté, což lze přičíst jejich detoxikačním schopnostem. Důsledkem léčby cisplatinou nebo L-asparaginázou může být tuková degenerace. Intrahepatální cholestázu a fokální nekrózy způsobuje někdy merkaptopurin či azathiopirin. Dakarbazin a mitramycin může vyvolat masivní nekrózu jaterní tkáně. Po vysokých dávkách cytostatik, které se používají před transplantací kostní dřeně (kombinace busulfan nebo BCNU), nastává jako nejčastější komplikace venookluzivní choroba.¹

Poškození pankreatu (akutní pankreatitida) může nastat po L-asparagináze a azathiopirinu.¹ Toxicita azathiopirinu je způsobena inkorporací azathiopirin – derivátu 6-thioguanin nukleotidu (6-TGN) do DNA.¹²

4.5. Poškození plic

Plicní změny, vyskytující se po různých cytostatikách, jsou souhrnně označovány jako cytostatická plíce. Jelikož změny v plicním parenchymu mohou souviset s infekcí či se základním onemocněním, může být jejich diagnostika poměrně obtížná. Po chemoterapii se plicní změny vyskytují nejčastěji v souvislosti s léčbou bleomycinem nebo karmustinem (BCNU).¹ Po překročení přípustných kumulativních dávek (500 mg bleomycin, 1500 mg BCNU) hrozí vznik intersticiální plicní fibrózy. Bleomycin způsobuje peroxidaci lipidů, destrukci pneumocytů typu I doprovázenou fibrózní exsudací do alveolu. Následná infiltrace granulocyty a plicními makrofágy uvolňujícími elastázy, kolagenázy a myeloperoxidázy působí stimulaci fibroblastů, vznik kolagenních depozit a fibrózy. BCNU působí navíc jako inhibitor glutathionreduktázy v alveolárních makrofázích.¹

Plicní fibrózu může také vyvolat léčba busulfanem (po překročení dávky nad 3 g), cyklofosfamidem, mitomycinem C nebo ojediněle po léčbě chlorambucilem, merkaptopurinem či azathiopurinem.

Pneumonitidu alergického typu může způsobit prokarbazin. Zvýšené permeability kapilár, způsobující vysoké dávky cytosinarabinozidu, mohou vyvolat edém plic. Klinicky se projeví

jako syndrom akutní respirační nedostatečnosti (ARDS). Obdobnou souvislost mají pleurální výpotek nebo bronchospasmus a taxol.

Terapie pneumotoxicity je možná u edému plic, který při zvýšené permeabilitě kapilár příznivě reaguje na vysoké dávky methylprednizonu. Ireverzibilní je zpravidla plicní fibróza po bleomycinu a BCNU. Nepomáhají ani vysoké dávky kortikoidů, proto je nutné sledování kumulativní dávky, popř. volit jiná cytostatika.¹

4.6. Poškození srdce

Toto poškození se může příležitostně objevit po léčbě jakýmkoliv cytostatikem. Kardiotoxicita byla zaznamenána např. při léčbě vinkristinem, busulfanem, etopozidem, ifosfamidem nebo i cisplatinou. Častěji potom po taxolu, 5-fluorouracilu a mitomycinu. Mezi hlavní poruchy, způsobené nejčastěji cytostatiky fungující interkalačním mechanismem, patří poruchy rytmu, cytostatická kardiomyopatie a srdeční slabost. Účinek těchto látek (antracyklinová antibiotika, mitoxantron, amsakrin) se může projevit v různé formě:

- akutní účinek – během po několika hodin po aplikaci
- subakutní účinek – během dnů či týdnů – toxická myokarditida nebo perikarditida
- chronický účinek – za týdny či měsíce po léčbě – patří mezi nejzávažnější, projevující se kardiomyopatií, často s městnavou srdeční slabostí
- pozdní účinek – za pět i více let – srdeční selhání

Terapie kardiotoxicity spočívá v opatrném monitorování dávek kardiotoxických cytostatik. Používají se látky vychytávající volné radikály jako je např. α -tokoferol, N-acetylcystein a dexrazoxan (Cardioxan), jež má největší efektivitu. Tato látka je schopna vázat železo a blokuje tak reakce, které jsou katalyzované železem a vedou ke vzniku kyslíkových radikálů.¹

4.7. Poškození ledvin a močového ústrojí

Poškození ledvin může být vyvoláno dvěma způsoby. První ze způsobů je nepřímý, důsledek hypeurikémie vyvolaný cytostatickou léčbou, druhý je pak přímý způsobený přímým účinkem některých cytostatik na ledviny.

Nepřímé poškození ledvin vzniká dezintegrací nádorové tkáně energetickou chemoterapií. Následuje uvolnění velkého množství nukleových kyselin. Tyto kyseliny jsou následně metabolizovány na kyselinu močovou.

Přímé poškození ledvin může být způsobeno precipitací cytostatika v ledvinných kanálcích. Tak se zvyšuje nefrotoxicita metotrexátu. Přímé toxické účinky cytostatik byly příležitostně popsány u nejrůznějších cytostatik, avšak jen u několika jsou pravidlem. Je to streptozotocin, 5-azacytidin, cisplatina, mitramycin, mitomycin C, méně pak u cyklofosfamidu, ifosfamidu a vinkristinu. Cisplatina a mitramycin způsobuje nekrózu distálních tubulů. Hrubou poruchu funkce tubulů způsobuje streptozotocin či 5-azacytidin. Na distální tubulus mohou mít toxické účinky vysoké dávky cyklofosfamidu nebo ifosfamidu. Vysoká dávka těchto látek způsobuje po 4-6 hodinách poruchu exkrece vody a diluční hyponatrémii. Jako pozdní projev toxicity derivátů nitrozomočoviny bývá často popisována intersticiální nefritida.

Toxické projevy se mohou též objevit i v močovém měchýři, kde se vyvine po podání cyklofosfamidu a zejména ifosfamidu hemoragická cystitida. Vylučované metabolity, zejména pak akrolein, způsobují změnu na sliznici močového měchýře.

Jako prevenci přímého toxického poškození ledvin nefrotoxickými cytostatiky lze považovat hyperhydrataci. Dostatečným množstvím tekutin a udržováním alkalické reakce moči a podáváním alopurinolu se snažíme předejít vzniku sekundární urátové nefropatie. Podáváním Na-thiosulfátu nebo amifostinu lze dosáhnout omezení toxicity cisplatin.¹

4.8. Nežádoucí účinky cytostatik na gonády

U obou pohlaví se toxický účinek cytostatik projeví zničením zárodečných buněk. U mužů dochází k oligospermii, popřípadě k azoospermii, ale Leydigovy buňky, které produkují androgeny nemusejí být poškozeny vůbec. K poškození Leydigových buněk dojde po vysokých dávkách, které působí i trvalou sterilitu. Sekrece testosteronu klesá, což je doprovázeno i ztrátou libida.

U žen ustává sekrece estrogenů a gestragenů, dále dochází k fibrotizaci vaječnicků při náhradě zaniklých folikulů vazivem. Důsledkem je amenorea a sterilita. Ta může být dočasná či trvalá (předčasná menopauza s četnými průvodními příznaky). Uvedené následky

cytostatické léčby působí psychickou traumatizaci. Stupeň poškození gonád závisí na několika faktorech, jakými jsou například druh a dávka podávaného cytostatika či věk nemocného v době léčby.

Prevence poškození gonád se nejčastěji provádí odebráním a kryoprezervací spermatu před zahájením chemoterapie u mladých nemocných, kteří plánují rodinu. Možná je též kryoprezervace oocyty pro případné pozdější umělé oplodnění.¹

4.9. Neurotoxicita

Neurologické symptomy se projevují velmi pestrou závažností, od poruchy vědomí, komatózního stavu (léčba pentostatinem), přes akutní arachnoiditidy (po intratékálním podání cytostatik) až po vznik encefalopatie. Encefalopatie byla popsána po podání L-asparginázy, fludarabinu, hexamethylmelaminu či prokarbazinu. Cerebelární syndromy komplikují někdy léčbu pyrimidinovými analogy (5-fluorouracilem, tegafurem). Neuropatie, týkající se periferních nervů, je zapříčiněna nejčastěji axonální degenerací (po vinca alkaloidech, po taxanech) nebo demyelinizací (cisplatina). Méně často se neuropatie týká hlavových nebo autonomních nervů.¹

4.10. Teratogenní účinky cytostatik

Důsledkem inhibice intenzivně se dělící buňky embryonální tkáň může být buď zánik zárodku, nebo vývoj nejrůznějších malformací. Nejsilnější teratogenní účinky se našly u fázově specifických cytostatik (metotrexátů).¹ Metotrexát inhibuje enzym dihydrofolátreduktázu. Používá se při abnormálním krvácení, které nastává u jedné třetiny pacientek se symptomatickou rakovinou dělohy.¹³

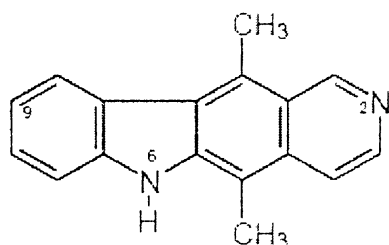
4.11. Mutagenní a kancerogenní účinky

Cytostatika mohou snadno způsobit chybu v kódování poškozením struktury nebo funkce nukleových kyselin, a tím i změnu v genomu buňky (mutaci).¹⁻³ Mutagenní účinky se mohou týkat jak buněk pohlavních, tak buněk somatických. Gametická mutace se projeví až u potomstva, na rozdíl od mutace somatické buňky, která může být příčinou nového, neoplastického fenotypu buňky.¹ S mutagenním účinkem tedy souvisí účinek kancerogenní. Kancerogenní proces může být spojen nejen s cytogenetickým mechanismem, ale i s epigenetickým mechanismem, jako je např. deprese části nebo celého integrovaného genomu nádorového viru nebo onkogenu. Imunosupresivním zásahem do mechanismů protinádorové imunity mohou cytostatika usnadnit vznik nádorového bujení.¹

5. ELLIPTICIN

5.1. Struktura a historie ellipticinu

Ellipticin (5,11-dimethyl-6H pyrido[4,3 - b]karbazol, Obr. 5.1.) je alkaloid vykazující společně se svými deriváty významnou protinádorovou aktivitu.¹⁴⁻¹⁷ Struktura jak přírodního tak i synteticky připraveného ellipticinu byla potvrzena chemickými metodami (rentgenostrukturní analýza krystalů).¹⁸



Obr 5. 1. Struktura ellipticinu
(převzato z citace³⁶)

Ellipticin a jeho deriváty jsou látky přírodního původu izolovatelné z rostlin čeledi Apocyanaceae, rostoucí v Austrálii, Madagaskaru, Havaji a na některých tichomořských ostrovech.¹⁹ Poprvé byl ellipticin izolován v roce 1959 (listy rostliny *Ochrosia elliptica* Labill), uměle syntetizovat se ho ale podařilo až v roce 1967. Ve stejném roce bylo též odhaleno jeho biologické působení.¹⁴

5.2. Protinádorové účinky ellipticinu

Působení ellipticinu jako protinádorového léčiva může probíhat pomocí několika mechanismů:²⁰

- Interkalace do dvoušroubovice DNA
- Inhibice topoizomerázy II
- Inhibice oxidační fosforylace v mitochondriích
- Inhibice telomerázy
- Inhibice fosforylace proteinu p53
- Inhibice DNA helikázy

Ellipticin a některé jeho deriváty (viz kapitola 5.6.) jsou ve formě acetátu užívány k léčení pokročilého karcinomu prsu s kostními metastázami, sarkomů ledvin, akutní myeloblastické leukémie a karcinomu štítné žlázy.^{1,21-24}

Ellipticin má vysokou účinnost vůči nádorovým onemocněním, navíc má relativně nízké toxické účinky s výjimkou nefrotoxicity, která je svým mechanismem vzniku podobná nefrotoxicitě cisplatin.¹¹

Cytotoxicita ellipticinu byla testována na celé řadě buněčných nádorových liniích. Nejúčinnější se jeví vůči buňkám nádorů prsu a buňkách leukemickým.¹¹ Cytotoxicita ellipticinu vůči buňkám HL-60 a CCRF-CEM lidské leukémie je závislá na dávce ellipticinu. Hodnota IC₅₀ pro ellipticin u buněk HL-60 je téměř o jeden řád nižší, než u buněk CCRF-CEM.²⁵ Silně cytotoxický je rovněž vůči buněčné linii lidského prsního adenokarcinomu, buňkám MCF-7.²⁶ V případě MCF-7 buněk ellipticin způsobuje zastavení buněčného cyklu a apoptózu v G₂/M fázi buněčného cyklu již po šesti hodinách po ošetření.⁷ Poslední studie prováděné v laboratoři, kde byla bakalářská práce vypracovávána, společně se spolupracujícími laboratořemi (2. LF UK, Univerzita ve Strasburgu) signalizují, že je ellipticin silně cytotoxický s hodnotami IC₅₀ řádově rovnými koncentraci 1 μM také vůči neuroblastomovým²⁷ a glioblastomovým buňkám (Stiborová, ústní sdělení).

Četné studie ukázaly na zapojení tumor supresorového proteinu p53 do cytotoxické aktivity ellipticinu.⁷ Ellipticin a 9-hydroxyellipticinu způsobují indukci apoptózy v G₁ fázi buněčného cyklu. Ellipticin a 9-hydroxyellipticin zapříčiňují selektivní inhibici fosforylace proteinu p53, prostřednictvím inhibice specifické kinázy v několika lidských nádorových buňkách (např. rakoviny plic či tlustého střeva).⁷ Samotná akumulace defosforylovaných proteinů p53 může mimo jiné navodit apoptózu.⁷

Ellipticin je v organizmech metabolizován. Oxidačními reakcemi v těle potkana je ellipticin metabolizován za tvorby 9-hydroxyellipticinu a 7-hydroxyellipticinu, což jsou majoritní produkty dosud nalezené a identifikované. Nicméně byly nalezeny rovněž oxidační (hydroxylační) metabolity, u nichž dosud není známa poloha hydroxylace.

Ze studií Lesca a spolupracovníků²⁸ a ze studií prováděných v naší laboratoři na katedře biochemie PřF UK vyplývá, že při hydroxylaci ellipticinu dochází ke zvýšení farmakologické účinnosti.²⁹ Ellipticin nebo jeho deriváty jsou převážně metabolizovány pomocí cytochromu P450 (CYP).⁷⁻¹⁰ Metabolity tvořené tímto enzymovým systémem jsou popsány v kapitole 5.3.3.

Ellipticin, včetně jeho 9-hydroxyderivátu, je silný mutagen vykazující mutagenní aktivitu vůči kmenům *Salmonella typhimurium*, *Neurospora crasa*, *Escherichia coli*, i vůči buňkám savčím.^{7,29,30}

Jak již bylo uvedeno výše, ellipticin je protinádorovým léčivem působícím několikerým mechanismem účinku. Donedávna bylo předpokládáno, že převládajícím mechanismem je pravděpodobně interkalace ellipticinu do dvoušroubovice DNA, vyplývající z jeho velikosti a tvaru molekuly, a dále pak inhibice topoizomerázy II.^{7,11,29} Specificita jeho účinku vůči

určitým typům nádorů však napovídá, že další, výše zmiňované mechanismy nelze z jeho působení vyloučit, naopak, mohou být ještě významnější.

5.3. Mechanismus cytotoxicity a protinádorové aktivity elliptycinu

5.3.1. *Interkalace elliptycinu do dvoušroubovice DNA a inhibice topoizomerázy II*

Tvar a velikost molekuly elliptycinu odpovídá komplementaritě párů bází při párování purin – pyrimidin, což zabezpečuje příznivé podmínky pro jeho interkalaci do dvoušroubovice DNA. Polycyklický aromatický charakter molekuly elliptycinu navíc způsobuje jeho ještě těsnější vmezeření do DNA, s vhodně uspořádanými hydrofobními částmi DNA.⁷

Jako primární buněčný cíl léčiva byla v řadě studií předpokládána topoizomeráza II. Mechanismus elliptycinu jako inhibitoru topoizomerázy II byl již důkladně prostudován. Pro rozbití dvoušroubovice DNA a později i smrt samotné buňky je pravděpodobně kritické uspořádání ternárního komplexu topoizomerázy II, DNA a léčiva.⁷

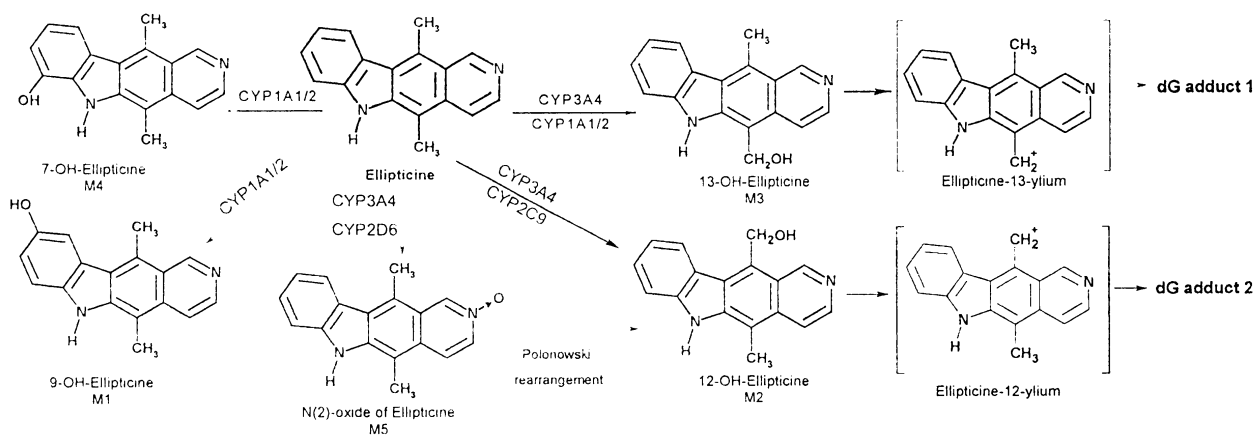
5.3.2. *Kovalentní vazba elliptycinu na DNA*

Transport vysoce hydrofobních molekul elliptycinu přes buněčnou membránu do buněk je nespecifický.¹ Díky svému hydrofobnímu charakteru probíhá transport snadno pasivní difuzí, narozdíl od distribuce v organismu, která je hydrofobním charakterem značně znesnadněna.¹¹ Nicméně ellipticin vykazuje specifičnost neoplastické aktivity pouze proti některým typům nádorových onemocnění. Tento rozpor může být vysvětlen metabolickými přeměnami elliptycinu v organismu.^{7,11} Skutečně, nedávno bylo studemí v naší laboratoři prokázáno, že se ellipticin po enzymové aktivaci kovalentně váže na DNA^{7,11,29} a jeho farmakologická efektivita a genotoxické účinky závisí právě na jeho metabolické aktivaci zprostředkované cytochromy P450 (CYP) a peroxidázami v cílových tkáních.^{7,31,32}

5.3.3. *Aktivace elliptycinu cytochromy P450*

Ukázalo se, že cytochromy P450 v lidských a potkaních játrech jsou důležité (nezbytné) pro tvorbu kovalentních aduktů elliptycinu s DNA in vitro. K jejich tvorbě dochází při oxidačních reakcích, katalyzovaných právě těmito enzymy. Struktury všech metabolitů elliptycinu produkovaných cytochromy P450 in vitro byly charakterizovány. Čtyři z metabolitů elliptycinu byly identifikovány jako C-hydroxylované deriváty (7-hydroxy, 9-hydroxy, 12-hydroxy a 13-hydroxyellipticin) a jeden jako N²-oxid elliptycinu (Obr. 5.2.).⁷⁻¹⁰

Všech pět metabolitů je tvořeno pomocí cytochromů P450 přítomných v jaterních mikrozómech i izolovaných enzymů rekonstituovaných s NADPH:cytochrom P450 reduktázou.⁸⁻¹⁰



Obr. 5.2. Oxidace ellipticinu cytochromy P450 vedoucí k tvorbě metabolitů a aduktů s DNA (převzato z citace^{10,33})

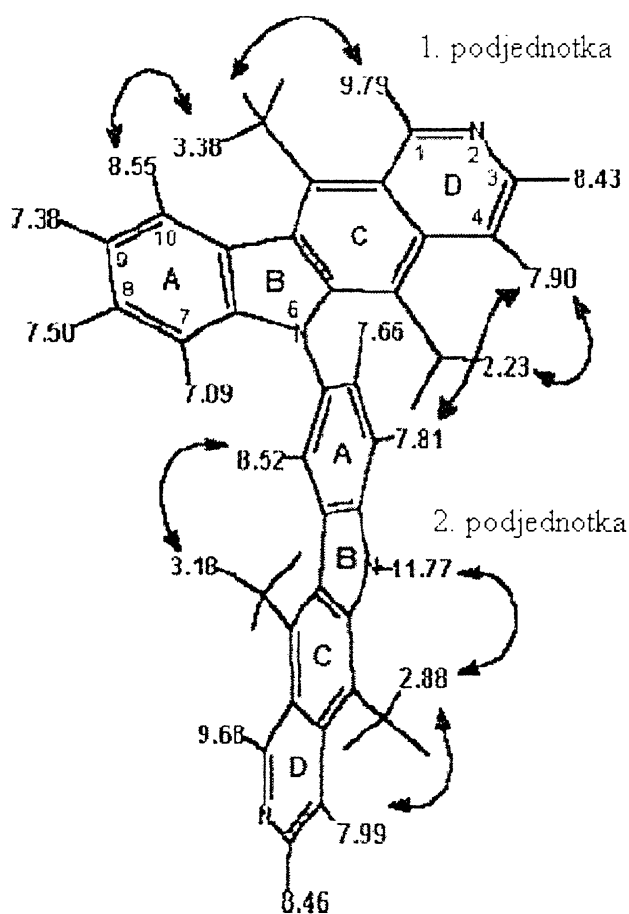
Tvorba 9-hydroxy a 7-hydroxyellipticinu je v lidských a potkaních jaterních systémech zprostředkována CYP1A1/2. To vyplývá jak z korelačních studií mezi aktivitami těchto cytochromů P450 a tvorbou obou metabolitů, tak i ze studií za pomoci inhibitorů CYP1A1/2.^{9,10} Ketokonazol, inhibitor CYP3A4, významně inhibuje tvorbu 13-hydroxyellipticinu a ellipticin N²-oxidu.^{9,10} Z tohoto vlivu a rovněž z korelačních analýz mezi aktivitou CYP3A4 a tvorbou 13-hydroxyellipticinu vyplývá, že je to CYP3A4, který ellipticin majoritně oxiduje na tento metabolit. Skutečně, majoritním enzymem oxidujícím ellipticin na 13-hydroxyellipticin je lidská rekombinantní CYP3A4, méně pak oxidují ellipticin na tento metabolit CYP1A2, 2D6 a 2C9.^{7,10} 12-hydroxyellipticin byl nalezen jako minoritní produkt oxidace ellipticinu lidskými a potkaními jaterními systémy^{9,10} a lidskými rekombinantními CYP enzymy. Nízké množství tohoto metabolitu bylo vytvořeno pouze v inkubaci obsahující CYP3A4 a 2C9.¹⁰

V případě potkaních cytochromů P450 bylo zjištěno, že 7-hydroxy a 9-hydroxyellipticin jsou vytvářeny především potkaními CYP1A1/2, zatímco 13-hydroxyellipticin a ellipticin N²-oxid CYP3A1, a to jak v jaterních potkaních mikrozómech, tak za použití izolovaných cytochromů P450 rekonstituovaných s NADPH:CYP reduktázou.⁷⁻⁹

Ze srovnání studií s enzymovými systémy cytochromů P450 a mikrozomálními systémy jater potkana a člověka vyplývá podobnost mezi oxidací (jak detoxikační, za tvorby 7-

hydroxy- a 9-hydroxyellipticinu, tak i aktivační za tvorby aduktů s DNA).^{6,8-10,34} Osud ellipticinu v lidském organismu lze tedy studovat na potkaním modelu *in vivo* s vyvozením poznatků zobecnitelných i pro člověka.

V průběhu oxidace ellipticinu na 13-hydroxy- a 12-hydroxyellipticinu dochází k tvorbě dvou aduktů s DNA (Obr. 5.2.)^{7-10,34} Tyto adukty, společně s několika dalšími minoritními adukty, byly detekovány pomocí metody ³²P-postlabeling, a to jak v experimentech *in vitro* za aktivace cytochromy P450 a peroxidázami^{6-8,10,29,34,35}, tak i *in vivo*.^{31,32} Vazba aktivovaného ellipticinu na DNA po aktivaci systému cytochromů P450 byla rovněž prokázána pomocí ellipticinu značeného ³H.^{7,29,34} Dva majoritní adukty jsou tvořeny na deoxyguanosinových zbytcích molekuly DNA (Obr. 5.2.).^{7,10,31,32,34} Oba adukty byly nalezeny též v nádorových buněčných liniích lidského prsního adenokarcinomu (buňky MCF-7)²⁶, v leukemických buňkách HL-60 a CCRF-CEM²⁵, rovněž jako v neuroblastomových buněčných liniích.²⁷ Zjištěno navíc bylo, že hladiny těchto aduktů v DNA korelují s cytotoxicitou ellipticinu vůči studovaným nádorovým liniím.²⁵⁻²⁷ Nejúčinnějšími lidskými cytochromy P450 tvořícími tyto adukty s DNA jsou CYP3A4, 1A1/2 a 1B1).¹⁰



Obr. 5.3. Dimer ellipticinu (převzato z citace⁶)

5.3.4. Aktivace ellipticinu peroxidázami

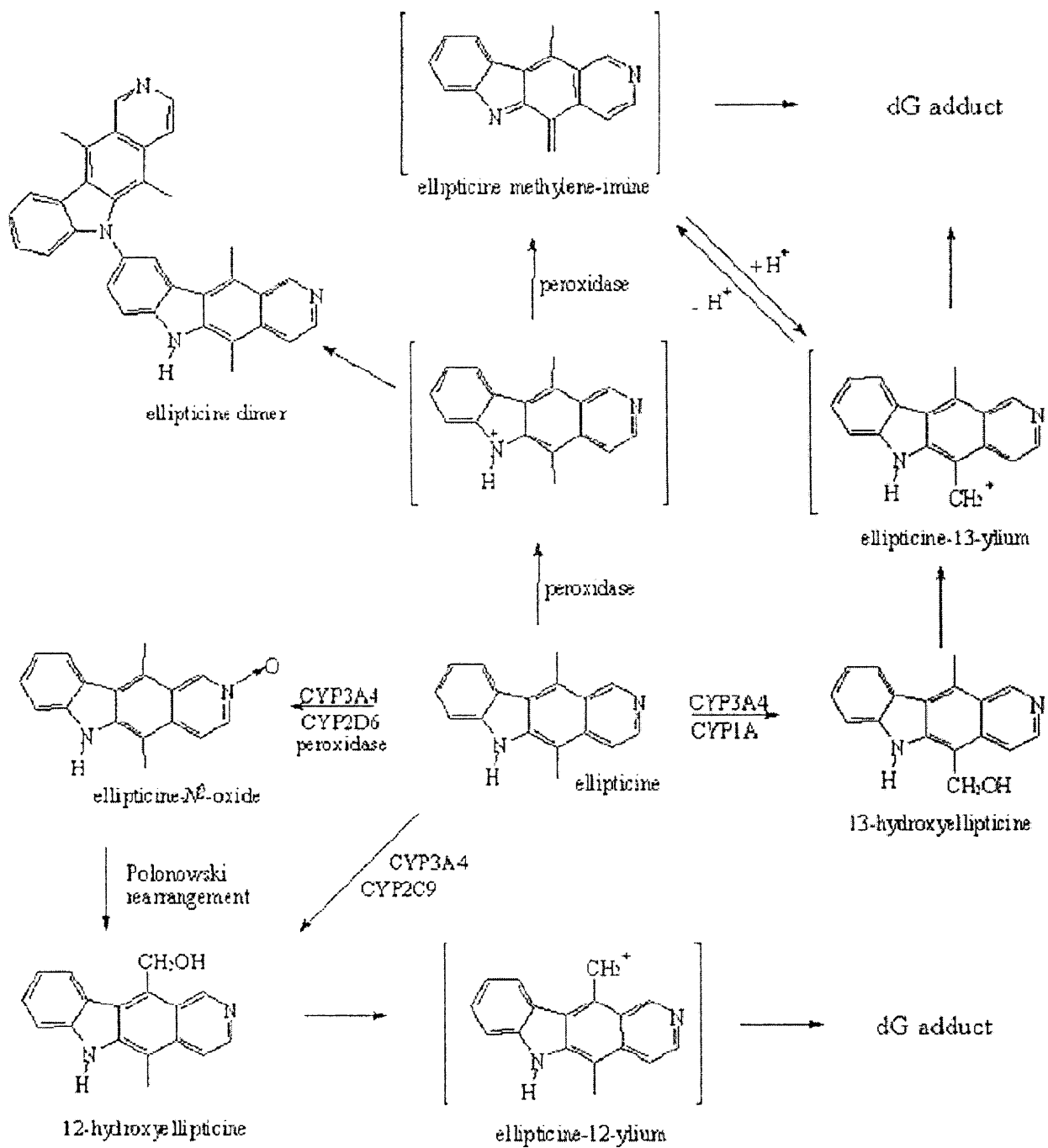
Vedle cytochromů P450 jsou v oxidační aktivaci ellipticinu účinné i peroxidázy.^{6,7,35} Z peroxidáz byly shledány, jak v oxidaci ellipticinu tak tvorby aduktů s DNA, efektivní hovězí laktoperoxidáza (LPO), lidská myeloperoxidáza (MPO), ovčí cyklooxygenáza (COX-1), lidská COX-2 a křenuvová peroxidáza (HRP).^{6,7,27,35} I v případě peroxidáz, bylo užito dvou nezávislých metod detekce kovalentní modifikace DNA, a to jak metodou ³²P-postlabeling, tak i za pomoci tritiového ellipticinu.

Během oxidace ellipticinu peroxidázami *in vitro*, byly detekovány dva metabolity ellipticinu.^{6,7,36} Jeden z nich, majoritní, byl pomocí ¹H NMR spektroskopie

identifikován jako dimer ellipticinu (znázorněn na Obr. 5.3.), ve kterém jsou dva ellipticinové

zbytky spojeny přes N⁶ atom dusíku pyrrolového kruhu jednoho a C9 atom uhlíku druhého ellipticinového zbytku. Peroxidázy metabolizují ellipticin v jednoelektronové oxidaci na volné radikály (metabolismus ellipticinu je schematicky znázorněn na Obr. 5.4.), které v závislosti na okolí, generují buď další metabolity (dimer ellipticinu) nebo DNA adukty.^{6,7} Jako druhý, minoritní, metabolit ellipticinu tvořený peroxidázami, byl nalezen N²-oxid ellipticinu.^{6,36} Zajímavé je zjištění, že při oxidaci ellipticinu peroxidázami dochází ke tvorbě stejných aduktů s DNA jako při oxidaci cytochromy P450.^{6,7}

Oxidace ellipticinu peroxidázami je závislá na čase, ale také na pH. Pro aktivaci ellipticinu peroxidázami se jako nejefektivnější ukázalo pH 6,4. Hodnota Michaelisovy konstanty (K_m) ellipticinu při oxidaci peroxidázami v přítomnosti peroxidu vodíku (ve dvousubstrátové reakci) a při pH 6,4 je totožná jak pro LPO, tak i pro MPO, ale hodnota K_m pro HPR je více než čtyřikrát vyšší než u ostatních peroxidáz.³⁵ Za přítomnosti DNA v inkubačních směsích ellipticinu s peroxidázami dochází k poklesu tvorby dimeru, který koreluje s tvorbou majoritního aduktu s DNA.^{6,7} Mechanismus, jakým dochází ke tvorbě stejného aduktu jako z 13-hydroxyellipticinu je uveden na obrázku 5.4. Vysvětlení tkví ve skutečnosti, že dochází ke generaci methyleniminu ellipticinu, který tvoří karbeniový ion, shodný s iontem tvořeným z 13-hydroxyellipticinu.⁶ Tvorba druhého aduktu v DNA je zprostředkována přes N²-oxid ellipticinu. Ten totiž přesmykuje na 12-hydroxyellipticin, který pak produkuje druhý ellipticinový adukt v DNA.^{6,7}



Obr. 5.4. Metabolismus ellipticinu – aktivace peroxidázami a lidskými CYP (převzato z citace⁶)

5.3.5. Aktivace ellipticinu *in vivo*

Oba majoritní adukty ellipticinu s DNA vznikající po aktivaci savčími cytochromy P450 a peroxidázami *in vitro* byly identifikovány i v *in vivo* studiích, v DNA několika orgánů laboratorních potkanů, kterým byl podán ellipticin (i. p.).^{31,32} Jak již bylo výše uvedeno, oba adukty byly identifikovány jako sloučeniny deoxyguanosinu odvozené od 13-

hydroxyellipticin a 12-hydroxyellipticin (ten navíc může vznikat z N²-oxid ellipticinu Polonowského přesmykem, Obr. 5.4.).⁶

5.4. Deriváty ellipticinu

Olivacin a 9-methoxyellipticin jsou deriváty vykazující také protinádorové účinky, které se vyskytují v přírodě.¹⁸ Molekulu ellipticinu lze rovněž synteticky modifikovat. Důvodem přípravy syntetických derivátů ellipticinu může být:

- zvýšení protinádorového (cytotoxického) účinku
- zvýšení rozpustnosti molekuly a účinnější absorpce nádorovými buňkami
- zvýšení selektivity a specifity léčiva vůči nádoru

Významným místem pro derivatizaci se stává uhlík v poloze 9, který je hydroxylován i v organizmech, na jeden z majoritních metabolitů ellipticinu (9-hydroxyellipticin), dále 9-methoxyellipticin a 9-chlorellipticin. Dalším důležitým místem pro derivatizaci je atom dusíku v poloze 2 (9-hydroxy-2-methylellipticinium), tento derivát se využívá jako medikament proti nádoru prsu s kostními metastázami, ale i proti leukémii. Proti nádorům mozku se zase využívá 9-chlor-2-methylellipticinium acetát.¹¹

Ellipticin prochází snadno buněčnou membránou pasivní difúzí (kap.5.3.2.). Pro zlepšení neschopné distribuce v organizmu se syntetizuje derivát v poloze 2 na atomu dusíku, který na molekule ellipticinu způsobuje vznik náboje, což vede ke zvýšení hydrofilních vlastností. Deriváty se používají ve formě solí, dochází sice ke zhoršení transportu přes buněčné membrány, ale k významnější distribuci takto derivatizovaného ellipticinu v organizmu.¹¹

5.5. Ellipticin a jeho deriváty jako cíleně směřovaná léčiva

Léčiva, která by byla cíleně směřovaná, je potřeba vyvíjet z důvodu omezení či snížení případných toxických účinků kancerostatik na nenádorové (zdravé) buňky. Jedna z možností přípravy cíleně směřovaných kancerostatik je jejich navázání na nosič, který obsahuje tzv. determinantu cíleného účinku, což je molekula schopná rozpoznat povrchové receptory nádorových buněk a celý konjugát k těmto receptorům zavést.³⁷ Při návrhu cíleně směřovaných kancerostatik se využívají receptory pro růstové faktory, cytokiny, steroidní či peptidové hormony nebo monoklonální protilátky, popřípadě lektiny.¹¹

5.5.1. Konjugát s heptagastrinem

Jedním z připravovaných cílených léčiv na bázi ellipticinu je konjugát ellipticinu s heptagastrinem. Tento konjugát využívá receptor pro gastrin/cholecystokinin přítomný v NHI/3T3 buňkách a využívá se při léčbě některých gastrointestinálních nádorů. Receptor s navázaným ellipticinem je recyklován do buněčného povrchu, kdežto konjugát putuje do lysozómů, kde dochází k pravděpodobné degradaci. Volný ellipticin působí v nádorové buňce jako cytotoxické agens.^{11,38}

5.5.2. Konjugát s enkefaliny

Dalším konjugátem je konjugát ellipticinu či 9-hydroxyellipticinu s enkefaliny. Enkefaliny (Leu-enkefalin Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu, a Met-enkefalin Tyr-Gly-Gly-Phe-Met) patří mezi peptidové hormony společně s β -endorfinem a působí na CNS podobným způsobem jako opiáty. Využívají tedy opiátové receptory mozkových buněk, jsou jejich fyziologickými agonisty (stejně působící). Tyto konjugáty nemohou však být používány jako cíleně směřované molekuly, neboť ztratily vlastnosti podstatné pro rozpoznání receptorem.^{11,39}

5.5.3. Konjugát s estradiolem

Konjugátů ellipticinu s estradiolem se využívá při léčbě karcinomu prsu. Nádorové buňky totiž obsahují receptory pro estrogeny a významně koncentrují estrogeny v buněčném jádře. Jelikož transport aktivního konjugátu, který vykazuje stejnou cytotoxickou aktivitu jako ellipticin, není zprostředkován receptory pro estrogen, je jeho využití jako cíleně směřovaného léčiva do jisté míry omezené.^{40,41}

5.5.4. Konjugát se sacharidy

Na atom dusíku v poloze 2 se váží cukerné složky všech konjugátů ellipticinu se sacharidy. Jedná se o kvarterní glykosidy. Cukerná složka přitom zvyšuje terapeutickou schopnost léčiva. Příkladem těchto glykosidů mohou být L-arabinopyranosid a D-xylofuranosid 9-hydroxyellipticinu. Oba uvedené glykosidy jsou velmi silnými kancerostatiky mající několikanásobně vyšší účinnost než samotný ellipticin.⁴²

5.5.5. Konjugát s lidským sérovým albuminem

Jako výhodný nosič kancerostatik se využívá lidský sérový albumin ($M_r = 66500$). V tomto případě jde o tzv. pasivní směřování, kde výhodou je samotná vysoká molekulová

hmotnost příslušného nosiče. Dochází až k několikanásobnému zvýšení koncentrace konjugovaného léčiva (HSA-ellipticin) v pevných nádorech, oproti volnému léčivu.²⁴ Důvodem je EPR efekt (enhanced permeability and retention effect), dále specifické pohlcování nádorovými buňkami, je biologicky stabilní, v organismu snadno dostupný, dochází ke snadné degradaci v prostředí nádorových buněk a pro organismus je zcela netoxický.⁴³

Ellipticin ve formě konjugátu s albuminem byl připraven teprve nedávno. Nádorovými buňkami je selektivně a efektivně přijímán, tam je posléze hydrolyzován na nosič a volné léčivo.⁴⁴ Tento konjugát se jeví jako nadějně cíleně směřované léčivo, což vyplývá z testování na buněčných liniích in vitro.⁴⁵

5.5.6. Konjugát s lipoproteiny

Rychle replikující se nádorové buňky nekontrolovaně proliferují a potřebují značné množství cholesterolu pro syntézu buněčné membrány. Cholesterol je třeba syntetizovat de novo (z dvouuhlíkatých jednotek) nebo může být dodán z degradovaných plazmatických lipoproteinů (LDL: low density lipoprotein). Daleko rychleji než zdravé buňky metabolizují LDL buňky nádorové, obsahují také receptory pro LDL. LDL tedy lze využít jako nosič protirakovinných léčiv.^{11,46}

Léčivo musí být značně hydrofobní, neboť komplex částice LDL a léčiva vzniká nekovalentními (hydrofobními) interakcemi – inkorporací léčiva do komplexu. Komplexy LDL s léčivem dosahují cílové nádorové buňky nezměněny, při transportu jsou dosti stabilní.¹¹

5.6. Ellipticin a jeho deriváty v klinické praxi

Vysoká účinnost a slabé vedlejší toxické účinky ellipticinu a jeho derivátů jsou významnými faktory pro jejich zařazení do klinické praxe.¹ Vedlejší účinky se nejčastěji projevují nevolností, suchostí v ústech (xerostomie) či zvracením. Dle klinických studií jsou závažnější toxické účinky poměrně vzácné, avšak v některých případech se při dlouhodobějším užívání vyskytuje hematologická toxicita (spíše imunoalergického původu), či nefrotoxicita (podobá se nefrotoxicitě cis-platiny v mírnější formě).^{1,16,47}

9-methoxyellipticin a 2-methyl-9-hydroxyellipticin se ve formě acetátů začal podávat od 70. let převážně ve Francii. V současné době se ellipticin a jeho deriváty: 9-hydroxyellipticin, N²-methyl-9-hydroxyellipticinium, N²-methyl-9-methoxyellipticinium a N²-methyl-9-hydroxyellipticinium využívají k léčbě pokročilého karcinomu prsu s kostními metastázemi, akutní myeloblastické leukémie, sarkomů ledvin a karcinomů štítné žlázy.^{1, 21-24}

Vedlejší účinky ellipticinu a jeho derivátů jsou testovány při pokusech na myších a králících, kde byly prokázány jejich teratogenní účinky a mutagenita ellipticinu a 9-hydroxyellipticinu vůči savčím buňkám a některým bakteriálním kmenům. (viz odst. 5.2.).¹¹

Potenciální účinky ellipticinu a jeho derivátů jsou i nadále zkoumány. Nejedná se však jen o různé typy nádorových onemocnění, zkoumány jsou též i některé virové choroby, zejména AIDS a schopnost ellipticinu inhibovat retrovirovou integrázu, reversní transkriptázu.²⁰

ZÁVĚR

Cílem bakalářské práce bylo uvést přehled o studiu a mechanismu působení protinádorových léčiv. Jak je z uvedeného přehledu patrné, je celá řada mechanismů pro jednotlivá léčiva dosud stále prozkoumána pouze okrajově nebo jejich mechanismus není znám vůbec. Pro optimální užití těchto chemoterapeutik, ale i pro vývoj protinádorových léčiv nových je třeba poznání v této oblasti rozšířit. Touto problematikou je proto třeba se zabývat i nadále a pokud možno i daleko intenzivněji.

POUŽITÁ LITERATURA

1. Klener P.: Protinádorová chemoterapie. Galén, Praha 1996.
2. Murray R.K., Granner D.K., Mayes P.A., Rodwell V.W.: Harperova Biochemie, H&H, Jihlava 2002.
3. Voet D., Voet J. G.: Biochemistry (Third edition), John Wiley & Sons, INC 2004.
4. Di Toro D.M., Allen H.E., Bergman H.L., Heyer J.S., Paquin P.R., Robert S.C.: Env. Toxicol. Chem., 20, 2383, 2001.
5. Eugui E.M., Almquist S.J., Muller C.D., Allison A.C.: Scand. J. Immun., 33, 161, 1991.
6. Stiborová M., Poljaková J., Ryšlavá H., Dračinský M., Eckschlager T., Frei E.: Int. J. Cancer, 120, 243, 2007.
7. Stiborová M., Rupertová M., Schmeister H.H., Frei E.: Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc CZ, 150, 13, 2006.
8. Kotrbová V., Aimová D., Březinová A., Janouchová K., Poljaková J., Hodek P., Frei E., Stiborová M.: Neuro Endocrinol. Lett., 27, 18, 2006.
9. Stiborová M., Bořek-Dohalská L., Aimová D., Kotrbová V., Kukačková K., Janouchová K., Rupertová M., Ryšlavá H., Hudeček J., Frei E.: Gen. Physiol. Biophys., 25, 245, 2006.
10. Stiborová M., Sejbál J., Bořek-Dohalská L., Aimová D., Poljaková J., Foresterová K., Rupertová M., Wiesner J., Hudeček J., Weisler M., Frei E.: Cancer.Res., 64, 8374, 2004.
11. Stiborová M., Frei E.: Chem. Listy, 95, 549, 2001.
12. Lennard L., Vanloon J.A., Weinshilboun R.M.: Clin. Pharmacol. Ther., 46, 149, 1989.

13. Zivanovic A., Arsenijevic S., Jankovic S., Juremovic M.: Methotrexat in the therapy of uterus leiomyomas, Novi Sad 1998.
14. Dalton L.K., Demerac S., Elmes B.C., Loder J.W., Swan J.M., Teitei T.: Aust. J. Chem., 20, 2715, 1967.
15. Le Pecq J.B., Dat Xuong N., Gosse C., Paoletti C.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 71, 5078, 1974.
16. Rouse J.G., Le Chevalier T., Caille F., Mondesir J.M., Sancho-Ganier H., May-Levin E., Spielman M., DeJager R., Amiel J.L.: Cancer Treat. Rep., 69, 707, 1985.
17. Mathé G., Triana K., Pontiggia P., Blanquet D., Hallard M., Morette C.: Biomed. Pharmacother., 52, 391, 1998.
18. Mukherje A.K., Basu S., Sarkar N., Ghosh A.C.: Curr. Med. Chem., 8, 1467, 2001.
19. Goodwin S., Smith A.F., Horning E.C.: Am. Chem. Soc., 81, 1903, 1959.
20. Háčková M.: Bakalářská práce: Přírodovědecká fakulta UK Praha, 2006.
21. Juret P., Heron J.F., Couette J.E., Delozier T., Letalaer J.Y.: Cancer Treat. Rep., 66, 1909, 1982.
22. Mathé G., Hayat M., De Vassal F., Schwarzenberg L., Schneider M., Schlumberger J.R., Jasmin C., Rosenfeld C.: Rev. Eur. Etud. Clin. Biol., 15, 541, 1970.
23. Caillé P., Monesir J., Droz J.P., Kebrt P., Goodman A., Ducret J.P., Theodore C., Spelman M., Rouesse J., Amiel J.L.: Cancer Treat. Rep., 69, 901, 1985.
24. Arguello F., Alexander M.A., Greene J.F.Jr., Stinson S., F., Jordan J.L., Smith E.M., Kalavar N.T., Alword W.G., Klabansky R.L., Sausville E.A.: J. Cancer Res.Clin.Oncol., 124, 19, 1998.

25. Poljaková J., Frei E., Gomez J.E., Aimová D., Eckschlanger T., Hraběta J., Stiborová M.: *Cancer Lett.*, 252, 270, 2007.
26. Bořek-Dohalská L., Frei E., Stiborová M.: *Collect. Czech. Chem. Commun.*, 69, 603, 2004.
27. Poljaková J.: *Doktorská disertační práce, Přírodovědecká fakulta UK, Praha 2005.*
28. Lesca P., Monsarrat B., Cros S., Paoletti C.: *J. Natl. Cancer Inst.*, 67, 871, 1981.
29. Stiborová M., Bieler C.A., Wiessler M., Frei E.: *Biochem. Pharmacol.*, 62, 1675, 2001.
30. De Marini D.M., Abu-Shakra A., Gupta R., Hender L.J., Levine J.E.: *Environ. Mol. Mutagen.*, 20, 12, 1992.
31. Stiborová M., Breuer A., Aimová D., Stiborová-Rupertová M., Wiessler M., Frei E.: *Int. J. Cancer*, 107, 885, 2003.
32. Stiborová M., Rupertová M., Aimová D., Ryšlavá H., Frei E.: *Toxicology*, 236, 50, 2007.
33. Mrázová B., Kotrbová V., Kořínková M., Svobodová L., Hudeček J., Hodek P., Kizek R., Frei E., Stiborová M.: *zasláno do časopisu Chem. Listy*
34. Stiborová M., Stiborová-Rupertová M., Bořek-Dohalská L., Wiessler M., Frei E.: *Chem. Res. Toxicol.*, 16, 38, 2003.
35. Poljaková J., Dračínský M., Frei E., Hudeček J., Stiborová M.: *Collect. Czech. Chem. Commun.*, 71, 1169, 2006.
36. Poljaková J., Forsterová K., Šulc M., Frei E., Stiborová M.: *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc CZ*, 149, 449-453 (2005).
37. Ulbrich K.: *Chem. Listy*, 89, 30, 1995.

38. Czerwinski G., Tarasova N.I., Michejda J.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95, 11520, 1998.
39. Rigaudy R., Garbay-Jaureguiberry Ch., Jacquemin-Sablon A., Le Pecq J.-B., Roques B.P.: Int. J. Pept. Protein Res., 30, 347, 1987.
40. Devraj R., Barret J.F., Fernandez J.A., Katzenellenbogen J.A., Cuzhman J.: J. Med. Chem., 38, 3367, 1996.
41. Debarre A., Oberlin R., Roques B.P., Borgna J.-L., Rocheford H., Le Pecq J.-B., Jacquemin-Sablon A.: J. Med. Chem., 28, 752, 1985.
42. Honda T., Kato M., Inoue M., Shimamoto T., Shima K., Nakanishi T., Yoshida T., Noguchi T.: J. Med. Chem., 31, 1295, 1988.
43. Kratz F., Beyer U., Collery P., Lechenault F., Cazabat A., Schumacher P., Falken U., Unger C.: Biol. Pharm. Bull., 21, 56, 1998.
44. Bieler C.A., Stiborová M., Breuer A., Sinn H., Schrenk H.-H., Frei E.: 7 Internat. Symposium on Molecular Aspects of Chemotherapy, Gdańsk 1999, Abstract p. 49.
45. Frei E., Bieler C.A., Stiborová M., Breuer A., Weissler M., Sinn H.: Proc. Am. Assoc. Cancer Res. , 41, 765, 2000.
46. Favre G.: C.R.Seances Soc.Biol.Fil., 186, 73, 1992.
47. Alberici G.F., Bidart J-M., Miongeon P., Paillet S., Mondesir J-M., Goodman A., Bohuon C.: Biochem. Pharmacol., 34, 1701, 1985.

